

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN THANH HUYỀN

**NGHIÊN CỨU VAI TRÒ CỦA GEN *A20* VÀ *CYLD*
TRONG ĐIỀU HÒA CHỨC NĂNG TẾ BÀO
Ở BỆNH NHÂN BẠCH CẦU DÒNG TỬY**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Hà Nội – Năm 2023

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN THANH HUYỀN

**NGHIÊN CỨU VAI TRÒ CỦA GEN *A20* VÀ *CYLD*
TRONG ĐIỀU HÒA CHỨC NĂNG TẾ BÀO
Ở BỆNH NHÂN BẠCH CẦU DÒNG TỬ**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số: 9.42.02.01

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1

Người hướng dẫn 2



Nguyễn Thị Trung

PGS.TS. Nguyễn Xuân Cảnh

PGS.TS. Nguyễn Thị Xuân

Hà Nội – Năm 2023

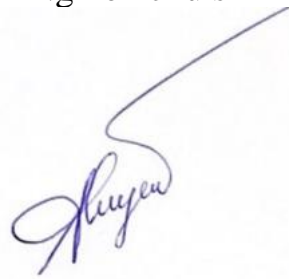
LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án với đề tài “Nghiên cứu vai trò của gen *A20* và *CYLD* trong điều hòa chức năng tế bào ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy” là công trình nghiên cứu được tôi thực hiện. Nghiên cứu này là một phần của đề tài khoa học “Nghiên cứu mối tương quan giữa đa hình gen, biểu hiện gen, hệ vi sinh, kiểu hình miễn dịch trên bệnh nhân ung thư máu” – Mã số: ĐTDL.CN-43/21.

Mọi số liệu và kết quả được trình bày trong luận án này là trung thực. Trong đó một phần kết quả đã được công bố trên tạp chí khoa học ở trong nước và quốc tế, các kết quả còn lại của luận án vẫn chưa được công bố.

Hà Nội, ngày 16 tháng 10 năm 2023

Nghiên cứu sinh



Nguyễn Thanh Huyền

LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên, tôi xin trân trọng cảm ơn đến PGS. TS. Nguyễn Xuân Cảnh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam và PGS. TS. Nguyễn Thị Xuân, Phòng Hệ gen học miễn dịch, Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã truyền thụ cho tôi nhiều kiến thức chuyên môn, cũng như tạo cơ hội để tôi có thể rèn luyện hơn nữa các kỹ năng thực nghiệm trong nghiên cứu khoa học.

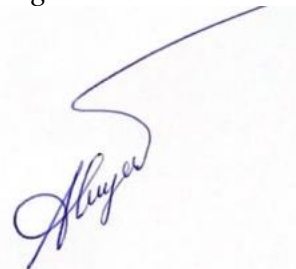
Tôi xin cảm ơn Ban giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Phòng đào tạo của Học viện đã tạo điều kiện để tôi có thể học tập và thực hiện tốt luận án.

Tôi xin cảm ơn GS. TS Nguyễn Huy Hoàng, Viện trưởng Viện Nghiên cứu hệ gen cùng toàn thể các thầy cô, các anh chị ở Viện đã hỗ trợ tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận án. Bên cạnh đó, tôi cũng cảm ơn ThS. Nguyễn Hoàng Giang, ThS. Trần Thị Phương Thảo, ThS. Bùi Thị Kiều Trang và TS. Đỗ Thị Trang thuộc Phòng Hệ gen học miễn dịch luôn giúp đỡ để tôi hoàn thành tốt mọi thí nghiệm của mình.

Tôi cũng gửi lời cảm ơn đến Ban lãnh đạo và các đồng nghiệp thuộc Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã tạo điều kiện để tôi hoàn thành việc học tập, nghiên cứu của mình.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình và người thân đã luôn tạo mọi điều kiện và chia sẻ những khó khăn với tôi để từ đó tôi có thể hoàn thành tốt luận án này.

Nghiên cứu sinh



Nguyễn Thanh Huyền

MỤC LỤC

DANH MỤC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT	i
DANH MỤC HÌNH	iii
DANH MỤC BẢNG	v
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU	3
1.1. Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính	3
1.1.1. Giới thiệu chung	3
1.1.2. Tần suất mắc bệnh	3
1.1.3. Nguyên nhân gây bệnh	4
1.1.4. Triệu chứng của bệnh AML	4
1.1.5. Phân loại bệnh AML	5
1.1.6. Các nghiên cứu về bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính	6
1.2. Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính	8
1.2.1. Giới thiệu chung	8
1.2.2. Tần suất mắc bệnh	9
1.2.3. Cơ chế bệnh sinh	10
1.2.4. Triệu chứng của bệnh CML	10
1.2.5. Các giai đoạn của bệnh	11
1.2.6. Các nghiên cứu trên bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính	11
1.3. Giới thiệu chung về enzyme deubiquitinase A20 và CYLD	14
1.3.1. Protein A20	15
1.3.2. Protein CYLD	19
1.3.3. Nghiên cứu di truyền phân tử trên gen A20, CYLD ở một số bệnh ung thư ...	22
1.4. Tín hiệu STAT	28
1.5. Biểu hiện của cytokine IL-6 và TNF- α ở bệnh bạch cầu dòng tủy	32
1.6. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi	34
1.6.1. Giới thiệu chung về tế bào đơn nhân máu ngoại vi	34

1.6.2. Đặc điểm của tế bào đơn nhân máu ngoại vi.....	34
1.6.3. Chức năng và ứng dụng của tế bào đơn nhân máu ngoại vi.....	35
1.6.4. Đặc điểm của M-CSF biệt hóa tế bào PBMC	37
1.6.5. Hoạt động sinh học của tế bào bạch cầu	38
1.7. Tế bào ung thư máu K562 và chất chống ung thư vincristine	41
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	44
2.1. Vật liệu nghiên cứu	44
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	44
2.1.2. Các hóa chất và thiết bị.....	45
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	47
2.2.1. Sơ đồ nghiên cứu	47
2.2.2. Phương pháp thu thập mẫu	48
2.2.3. Tách chiết DNA tổng số và khuếch đại gen A20, CYLD	48
2.2.4. Giải trình tự bằng phương pháp Sanger và xác định điểm đa hình/đột biến..	49
2.2.5. Tách chiết RNA tổng số	50
2.2.6. Tổng hợp cDNA và phản ứng qRT-PCR	50
2.2.7. Nuôi cấy, xử lý dòng tế bào K562 bởi Vincristine	52
2.2.8. Phân lập tế bào đơn nhân máu ngoại vi từ máu	52
2.2.9. Biệt hóa tế bào từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi sử dụng cytokine M-CSF ..	54
2.2.10. Phương pháp làm bất hoạt gen	54
2.2.11. Phương pháp ELISA Sandwich	55
2.2.12. Phương pháp western blot.....	57
2.2.13. Phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy (Flow cytometry)	57
2.2.14. Phương pháp xử lý số liệu.....	58
2.2.15. Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh	58
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	60
3.1. Đánh giá đa hình trên gen CYLD, A20.....	60
3.1.1. Đa hình gen CYLD ở bệnh nhân bạch cầu dòng.....	60

3.1.2. Đa hình gen A20 ở bệnh nhân bạch cầu dòng	65
3.2. Mức độ biểu hiện gen ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy	69
3.2.1. Biểu hiện gen <i>CYLD</i> , A20 ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy	69
3.2.2. Biểu hiện gen <i>STAT1</i> , <i>STAT3</i> ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy	70
3.3. Nồng độ cytokine IL-6, TNF- α được tiết ra ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy	71
3.4. Mối liên quan giữa đa hình nucleotide đơn, biểu hiện của gen và nồng độ cytokine ở bệnh bạch cầu dòng tủy	72
3.4.1. Mối liên hệ giữa sự phân bố kiểu gen của đa hình <i>CYLD</i> với biểu hiện gen <i>CYLD</i> ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy	72
3.4.2. Mối liên hệ giữa sự phân bố kiểu gen của đa hình <i>CYLD</i> với biểu hiện gen <i>STAT1</i> ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy	72
3.4.3. Mối liên hệ giữa sự phân bố kiểu gen của đa hình <i>CYLD</i> với nồng độ IL-6 và TNF- α ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy	73
3.4.4. Mối liên hệ giữa mức độ biểu hiện của A20, <i>CYLD</i> với gen tín hiệu <i>STAT1</i>	74
3.5. Xác định vai trò của A20, <i>CYLD</i> đối với quá trình tăng sinh và apoptosis của tế bào K562	75
3.5.1. Xác định vai trò của gen A20, <i>CYLD</i> đối với sự tăng sinh của tế bào K562	75
3.5.2. Xác định vai trò của A20, <i>CYLD</i> với quá trình apoptosis của tế bào K562	77
3.6. Xác định vai trò của gen <i>CYLD</i> đối với đại thực bào được biệt hóa bởi M-CSF thông qua tín hiệu <i>STAT1</i>	78
3.6.1. Vai trò của <i>CYLD</i> đối với đại thực bào được biệt hóa bởi M-CSF	78
3.6.2. Vai trò của <i>CYLD</i> đối với các chức năng của đại thực bào thông qua tín hiệu <i>STAT1</i>	80
3.6.3. Xác định vai trò của <i>CYLD</i> đối với quá trình thực bào của đại thực bào ở bệnh AML	83
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN	87
4.1. Đánh giá đa hình, biểu hiện gen A20, <i>CYLD</i> ở bệnh bạch cầu dòng tủy	87
4.2. Xác định vai trò của A20, <i>CYLD</i> đối với quá trình tăng sinh và apoptosis của tế bào K562	97

4.3. Xác định vai trò của gen <i>CYLD</i> đối với đại thực bào được biệt hóa bởi M-CSF qua tín hiệu STAT1	98
CHƯƠNG 5: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	102
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	103
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	104
PHỤ LỤC.....	- 1 -

DANH MỤC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Viết đầy đủ	Tiếng việt
ALL	Acute lymphocytic leukaemia	Bệnh bạch cầu dòng lympho cấp tính
AML	Acute myeloid leukaemia	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính
APC	Antigen-presenting cell	Tế bào trình diện kháng nguyên
CLL	Chronic lymphocytic leukemia	Bệnh bạch cầu lympho mạn tính
CML	Chronic myeloid leukemia	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính
DUB	Deubiquitinase enzyme	
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	Chất chống đông máu
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme
FBS	Fetal bovine serum	Huyết thanh bò
HWE	Hardy-Weinberg equation	Định luật cân bằng Hardy-Weinberg
LPS	Lipopolysaccharide	
MALT1	Mucosa-associated lymphoid tissue	Mô bạch huyết liên quan đến niêm mạc 1
M-AML	Macrophage differentiated from AML patient's PBMCs	Đại thực bào được biệt hóa từ tế bào PBMC của bệnh nhân AML
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor	Yếu tố kích thích tạo dòng đại thực bào
M-HP	Macrophage differentiated from healthy human's PBMCs	Đại thực bào được biệt hóa từ tế bào PBMC của người khỏe
NCI	National cancer institut	Viện quốc gia về ung thư

OTU	Ovarian tumor	Ung thư buồng trứng
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	Tế bào đơn nhân máu ngoại vi
RBC	Red blood cell	Hồng cầu
ROS	Reactive oxygen species	Các dạng oxy phản ứng
PRR	Pattern-recognition receptor	Thụ thể nhận dạng mẫu
SNP	Single nucleotide polymorphism	Đa hình nucleotide đơn
STAT	Signal transducer and activator of transcription	Bộ chuyển đổi tín hiệu và hoạt hóa phiên mã gen
TCR	T-cell receptor	Thụ thể tế bào T
TNFAIP3	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3	Protein kích thích yếu tố hoại tử khối u 3
TNFR	TNF receptor	Thụ thể TNF
TNF- α	Tumor necrosis factor- α	Yếu tố hoại tử khối u- α
TRAF6	TNFR-associated factor 6	Yếu tố liên kết với TNFR 6

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Nhiễm sắc thể Philadelphia.....	10
Hình 1.2. Cấu trúc A20	15
Hình 1.3. A20 điều hòa con đường tín hiệu NF- κ B.....	16
Hình 1.4. Cấu trúc CYLD	19
Hình 1.5. Các bước chính trong con đường tín hiệu JAK/STAT [87].....	30
Hình 1.6. Cấu trúc của vincristine [126].....	42
Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu.....	47
Hình 2.2. Sự phân lớp của các tế bào máu sau khi ly tâm	53
Hình 2.3. Hình ảnh minh họa pha loãng protein chuẩn của Kit ELISA với cytokine IL-6 và TNF- α	56
Hình 3.1. Điểm đa hình trên gen <i>CYLD</i> ở bệnh nhân AML	60
Hình 3.2. Dự đoán khả năng gây bệnh của SNP không đồng nghĩa p.Q731H trên gen <i>CYLD</i> bằng Polyphen-2.....	63
Hình 3.3. Điểm đa hình trên gen <i>CYLD</i> ở bệnh nhân CML	63
Hình 3.4. Điểm đa hình trên gen <i>A20</i> ở bệnh nhân AML.....	65
Hình 3.5. Điểm đa hình trên gen <i>A20</i> ở bệnh nhân CML.....	68
Hình 3.6. Biểu hiện của <i>A20</i> , <i>CYLD</i> trên bệnh nhân bạch cầu dòng tủy	70
Hình 3.7. Biểu hiện của gen <i>STAT1</i> , <i>STAT3</i> ở người bệnh (cột màu xám)	71
và người khỏe (cột màu đen).....	71
Hình 3.8. Nồng độ IL-6 và TNF- α ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy	71
Hình 3.9. Mối liên hệ giữa đa hình tại vị trí p.G731H trên gen <i>CYLD</i> và nồng độ IL-6 ở bệnh nhân AML	74
Hình 3.10. Mức độ biểu hiện <i>A20</i> , <i>CYLD</i> của tế bào K562 khi xử lý với vincristine .	76
Hình 3.11. Ảnh hưởng của <i>A20</i> , <i>CYLD</i> đến sự tăng sinh của tế bào K562.....	77
Hình 3.12. Ảnh hưởng của <i>A20</i> , <i>CYLD</i> đến khả năng sống sót của tế bào K562	78
Hình 3.13. Ảnh hưởng của <i>CYLD</i> đến tín hiệu <i>STAT1</i> trên đại thực bào (M-HP)	80
Hình 3.14. Biểu hiện CD40 ⁺ và CD86 ⁺ của đại thực bào M-HP	81

Hình 3.15. Nồng độ IL-6 do đại thực bào M-HP tiết ra.....	82
Hình 3.16. Ảnh hưởng của CYLD đến chức năng hoạt động của M-HP qua tín hiệu STAT1	82
Hình 3.17. Sự thực bào của đại thực bào M-AML khi được xử lý với fludarabine	84
Hình 3.18. Ảnh hưởng của CYLD đối với sự thực bào của M-AML.....	85

DANH MỤC BẢNG

<i>Bảng 1.1.</i> Phân loại bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính	6
<i>Bảng 2.1.</i> Trình tự môi sử dụng phản ứng PCR.....	49
<i>Bảng 2.2.</i> Các thành phần của phản ứng PCR	49
<i>Bảng 2.3.</i> Trình tự môi được sử dụng trong nghiên cứu.....	51
<i>Bảng 2.4.</i> Pha loãng protein chuẩn với các nồng độ khác nhau	56
<i>Bảng 3.1.</i> Đa hình nucleotide trên gen <i>CYLD</i> ở bệnh AML (SNP).....	61
<i>Bảng 3.2.</i> Mối tương quan giữa kiểu gen của các đa hình gen <i>CYLD</i> và bệnh AML	62
<i>Bảng 3.3.</i> Các đa hình nucleotide trên gen <i>CYLD</i> ở bệnh nhân CML (SNP).....	64
<i>Bảng 3.4.</i> Mối tương quan giữa kiểu gen của các đa hình gen <i>CYLD</i> và bệnh CML	64
<i>Bảng 3.5.</i> Các đa hình nucleotide trên gen <i>A20</i> ở bệnh AML (SNP)	66
<i>Bảng 3.6.</i> Mối tương quan giữa kiểu gen của các đa hình gen <i>A20</i> và bệnh AML ..	66
<i>Bảng 3.7.</i> Các đa hình nucleotide trên gen <i>A20</i> ở bệnh nhân CML (SNP).....	68
<i>Bảng 3.8.</i> Mối tương quan giữa kiểu gen của các đa hình gen <i>A20</i> và bệnh CML ..	68
<i>Bảng 3.9.</i> Sự liên quan giữa sự phân bố kiểu gen của đa hình tại vị trí p.Q731H trên gen <i>CYLD</i> và biểu hiện gen <i>CYLD</i> (<i>p</i> -value)	72
<i>Bảng 3.10.</i> Sự liên quan giữa đa hình trên gen <i>CYLD</i> và biểu hiện gen <i>STAT1</i>	73
<i>Bảng 3.11.</i> Sự liên quan giữa đa hình trên gen <i>CYLD</i> và nồng độ IL-6, TNF- α	73
<i>Bảng 3.12.</i> Sự liên quan giữa mức độ biểu hiện <i>A20</i> , <i>CYLD</i> và gen tín hiệu	75
<i>Bảng 4.1.</i> Thống kê kết quả đánh giá các chỉ số hóa sinh của bệnh nhân	- 2 -

MỞ ĐẦU

Bệnh bạch cầu dòng tủy là một trong các loại bệnh bạch cầu khá phổ biến và xảy ra ở mọi lứa tuổi nhưng thường gặp nhất là ở người trưởng thành. Bệnh bạch cầu dòng tủy có hai loại: Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (AML – Acute myeloid leukemia) và bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính (CML – Chronic myeloid leukemia). Hơn một nửa bệnh nhân bạch cầu dòng tủy được phát hiện trên 60 tuổi, với tuổi mắc bệnh trung bình của các bệnh nhân là 64. Hiện nay, việc điều trị cho các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy chủ yếu thường được thực hiện bằng biện pháp hóa trị và ghép tế bào đồng loài. Tuy nhiên tỷ lệ lui bệnh sau hóa trị liệu cũng như thời gian ổn định bệnh đều giảm, đồng thời các tác dụng phụ của việc điều trị này lại tăng đáng kể ở người bệnh lớn tuổi. Do đó, hiện nay nhiều nhà khoa học trong và ngoài nước đều quan tâm nghiên cứu về nguyên nhân gây bệnh bạch cầu dòng tủy.

Các gen deubiquitin *A20*, *CYLD* mã hóa cho các protein thuộc nhóm DUB (Deubiquitinase) đóng vai trò quan trọng trong điều hòa các quá trình tăng sinh và quá trình chết tế bào theo chương trình (apoptosis). Các protein DUB này có thể phân cắt các liên kết peptide hoặc isopeptide giữa protein đích và ubiquitin để làm đảo ngược quá trình sinh học bên trong tế bào. Các protein *A20*, *CYLD* tham gia điều hòa âm tính các phản ứng miễn dịch và giải phóng các cytokine viêm thông qua con đường tín hiệu STAT. Khi *A20*, *CYLD* biểu hiện bất thường có thể liên quan đến sự hình thành và phát triển của bệnh bạch cầu và bệnh ung thư hạch.

Dựa trên cấu trúc của gen *CYLD*, exon 16 có vai trò tương tác với polyubiquitin gắn với protein đích để từ đó khiến cho trung tâm hoạt động của *CYLD* thực hiện chức năng phân cắt liên kết polyubiquitin và protein. Như vậy, exon 16 đóng vai trò quan trọng trong hoạt động của gen *CYLD*. Bên cạnh đó, sự bất thường trên gen *A20* đã được tìm thấy ở bệnh CLL và ALL, đặc biệt là trên vị trí exon 7. Hơn thế nữa, gần đây, tỷ lệ người mắc bệnh bạch cầu dòng tủy ngày càng tăng, trong khi đó việc điều trị bệnh lý này còn gặp nhiều khó khăn. Do đó, nghiên cứu này tập trung nghiên cứu đa hình/đột biến trên exon 7 gen *A20* và trên exon 16 gen *CYLD* ở bệnh bạch cầu dòng tủy.

Vincristine là thuốc chống ung thư có bản chất alkaloid, được tách chiết từ cây Dừa cạn (*Catharantus roseus*). Vincristine thúc đẩy quá trình apoptosis của một số tế bào ung thư. Chính vì vậy, cùng với việc xác định được các đa hình gen

CYLD/A20 ở bệnh bạch cầu dòng tủy thì tiếp tục đánh giá vai trò của các gen này đối với quá trình tăng sinh và apoptosis của tế bào ung thư máu - K562 khi được xử lý bởi vincristine có thể là một bước tiến mới trong việc tìm ra biện pháp ức chế sự phát triển của các dòng tế bào bệnh bạch cầu dòng tủy. Bên cạnh đó, đại thực bào được biệt hóa từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC – Peripheral blood mononuclear cell) cũng có vai trò quan trọng trong các phản ứng chống viêm, sửa chữa mô, cân bằng nội môi và đặc biệt là có khả năng ức chế sự phát triển khối u và quá trình apoptosis của tế bào ung thư. Do vậy, việc tìm ra vai trò của gen *CYLD* hoặc *A20* đối với chức năng của đại thực bào cũng là nhiệm vụ quan trọng hướng tới xây dựng biện pháp hỗ trợ điều trị bệnh ung thư này hiệu quả nhất. Xuất phát từ những lý do trên, luận án “*Nghiên cứu vai trò của gen A20 và CYLD trong điều hòa chức năng tế bào ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy*” được thực hiện.

Mục tiêu của đề tài:

1. Xác định đa hình, biểu hiện gen *A20*, *CYLD*, biểu hiện viêm và một số gen tín hiệu liên quan ở bệnh bạch cầu dòng tủy.
2. Xác định vai trò của gen *A20*, *CYLD* điều hòa chức năng của tế bào ung thư máu và đại thực bào trên bệnh nhân bạch cầu dòng tủy.

Những đóng góp mới của luận án:

- Đã xác định được một số điểm đa hình trên gen *A20*, *CYLD*, đồng thời cũng xác định được mối liên quan giữa đa hình ở vị trí p.Q371H và nồng độ IL-6 ở bệnh bạch cầu dòng tủy cấp.
- Đã xác định được vai trò của gen *A20*, *CYLD* đối với quá trình tăng sinh và thúc đẩy quá trình apoptosis của tế bào K562; Đồng thời xác định được vai trò của *CYLD* trong việc hoạt hóa đại thực bào được biệt hóa từ PBMC của người bệnh AML khi được xử lý với fludarabine.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

1.1. Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính

1.1.1. Giới thiệu chung

Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (AML – Acute myeloid leukemia) là một bệnh bạch cầu phổ biến ở người trưởng thành. Bệnh AML được đặc trưng bởi sự tăng sinh của các tế bào blast (tế bào chưa trưởng thành), chủ yếu tồn tại trong tủy xương, dẫn đến quá trình tạo máu bình thường bị ức chế và hiện tượng suy tủy xương [1]. Gần đây, với sự phát triển của y học, việc điều trị bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính ở người trẻ tuổi đã có những bước tiến đáng kể nhưng việc điều trị cho người bệnh lớn tuổi vẫn còn gặp nhiều trở ngại. Cụ thể, hiệu quả điều trị cho các bệnh nhân trên 60 tuổi chỉ đạt khoảng 15% và trong khi đó 40% bệnh nhân dưới 60 tuổi được ghi nhận đã khỏi bệnh sau một thời gian điều trị. Mặc dù đã có những cải thiện trong việc điều trị bệnh, tuy nhiên việc tiên lượng tình trạng của bệnh vẫn gặp rất nhiều khó khăn, đặc biệt là ở người cao tuổi [2-4].

1.1.2. Tần suất mắc bệnh

Bệnh AML chiếm 70% số trường hợp mắc bệnh bạch cầu dòng tủy và gần 80% số trường hợp mắc bệnh bạch cầu cấp tính. Điều này cho thấy, AML là bệnh bạch cầu khá phổ biến [5]. Các số liệu báo cáo cho thấy những trường hợp mắc bệnh AML đang gia tăng theo từng năm. Theo số liệu thống kê của SEER, Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ vào năm 2021, có khoảng 20.450 bệnh nhân AML mới được chẩn đoán và ước chừng khoảng gần 11.400 người có thể tử vong vì bệnh này [6]. Trong số các bệnh bạch cầu thì AML được coi là bệnh gây tử vong cao nhất. AML chủ yếu xảy ra ở người trưởng thành và tỷ lệ mắc bệnh ngày càng tăng khi số tuổi càng cao. Trong số 100.000 người ở độ tuổi dưới 65 thì có 1,3 trường hợp mắc bệnh AML, con số này tăng lên 12,2 đối với người trên 65 tuổi [7].

Ở Việt Nam, tại bệnh viện Trung ương Huế và bệnh viện Sản Nhi Đà Nẵng giai đoạn 2014-2019, bệnh AML chiếm 20,1% trong số các bệnh ung thư được chẩn đoán bởi các bác sĩ chuyên khoa. Trong đó tỉ lệ nam và nữ mắc bệnh là 1,61/1 [8]. Hiện nay, thời gian sống không bệnh trong vòng 3 năm của các bệnh nhân AML vẫn rất thấp, với tỷ lệ khoảng 20,2% [9].

1.1.3. Nguyên nhân gây bệnh

Cho đến nay, nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh của bệnh AML vẫn chưa được hiểu biết kỹ càng. Một số báo cáo chỉ ra rằng, bệnh AML xảy ra chủ yếu là do hội chứng loạn sản tủy xương hay các rối loạn huyết học khác như xơ hóa tủy và thiếu máu bất sản. Các rối loạn bẩm sinh như hội chứng Down và hội chứng Bloom cũng làm tăng nguy cơ mắc bệnh AML. Ngoài ra, những người thường tiếp xúc với tia bức xạ, khói thuốc lá hay đã từng trải qua hóa trị liệu trước đó cũng gây ra các biến đổi di truyền liên quan đến bệnh AML. Như vậy, bệnh AML thường xảy ra do các đột biến gen liên quan đến quá trình tạo máu [10].

Theo Roushangar và cộng sự (2019), 97% các trường hợp được nghiên cứu đều mang gen đột biến. Mặc dù các đột biến này có tính không đồng nhất nhưng có thể phân loại chúng thành các nhóm nguy cơ thuận lợi, trung bình hoặc bất lợi dựa trên di truyền học tế bào. Bên cạnh đó, tiên lượng của các loại đột biến này cũng khác nhau. Khoảng 66% bệnh nhân dưới 60 tuổi và 33% bệnh nhân trên 60 tuổi mang đột biến chuyển đoạn t (8;21), t (15,17) hoặc inv (16) có tiên lượng tốt với tỷ lệ sống sót cao sau 3 năm. Những bệnh nhân mang đột biến t (9;11), hay bị rối loạn số lượng nhiễm sắc thể 5 hoặc 7 được xếp vào nhóm nguy cơ trung bình. Trong khi đó, các bệnh nhân mang đột biến t (6;9), inv (3) hoặc thay đổi ở vị trí nhiễm sắc thể 11q thường có tiên lượng xấu và nguy cơ tử vong cao. Ngoài di truyền học tế bào, các kết quả về phân tích di truyền phân tử cũng là cơ sở để xác định sự dung hợp gen, ví dụ *NPM1*, *CEBPA*, *RUNX1*, *FLT3* ở các bệnh nhân AML, từ đó phân loại các bệnh nhân AML theo các mức nguy cơ: thuận lợi, trung bình và bất lợi [11].

1.1.4. Triệu chứng của bệnh AML

Bệnh nhân AML thường có các triệu chứng liên quan đến việc suy giảm tế bào máu như nhiễm trùng, thiếu máu, dễ bị xuất huyết, đau đầu và đau xương. Tùy thuộc vào mức độ bị thiếu máu mà các bệnh nhân có thể bị suy nhược toàn thân, mệt mỏi, khó thở, tức ngực. Ngoài ra, các bệnh nhân AML còn có biểu hiện gan to và lách to [10].

1.1.5. Phân loại bệnh AML

Đối với hầu hết các loại bệnh ung thư, việc xác định giai đoạn (mức độ) của bệnh là rất quan trọng. Các giai đoạn này được xác định dựa trên kích thước của khối u và sự di cư của khối u. Nhưng thông tin này là cơ sở để dự đoán tình trạng của bệnh cũng như định hướng phương pháp điều trị. Tuy nhiên, bệnh AML thường không hình thành khối u. Các tế bào ung thư thường lan rộng khắp tủy xương và trong một số trường hợp, các tế bào này lan sang các cơ quan khác như gan và lách. Do đó, bệnh AML không được phân loại theo giai đoạn giống như hầu hết các bệnh ung thư khác mà thay vào đó bệnh này sẽ được phân loại thành các thể khác nhau. Phân loại bệnh AML được xác định thông qua tuổi của bệnh nhân và các kết quả xét nghiệm khác. Nhiều báo cáo đã cho thấy, phân loại bệnh AML có thể góp phần quan trọng trong việc đánh giá mức độ của bệnh, cũng như định hướng phương pháp điều trị tốt nhất [12].

Năm 1970, một nhóm chuyên gia về bệnh bạch cầu của Pháp, Mỹ và Anh (French-America-British – FAB) đã phân loại bệnh AML thành các thể từ M0 đến M7 dựa trên đặc điểm hình thái tế bào blast bằng cách quan sát dưới kính hiển vi (Bảng 1.1) [12].

Năm 2016, Theo công bố của Tổ chức Y tế thế giới phân loại bệnh AML dựa vào sự bất thường trên nhiễm sắc thể như sau [13].

- ✓ Bệnh AML với t (8;21) (q22; q22.1); Gen *RUNX1-RUNX1T1*
- ✓ Bệnh AML với inv (16) (p13.1q22) hoặc t (16;16) (p13.1; q22); Gen *CBFB-MYH11*
- ✓ Bệnh AML với t (15;17) (q22; q12); Gen *PML-RARA*
- ✓ Bệnh AML với t (9;11) (p21.3; q23.3); Gen *MLLT3-KMT2A*
- ✓ Bệnh AML với t (6;9) (p23; q24); Gen *DEK-NUP214*
- ✓ Bệnh AML với inv (3) (q21.3q26.2) hoặc t (3;3) (q21.3; q26.2); *GATA2, MECOM*
- ✓ Bệnh AML với t (1;22) (p13.3; q13.3); Gen *RBM15-MKLI*
- ✓ Bệnh AML có biến đổi gen *NPM1*
- ✓ Bệnh AML có biến đổi gen *CEBPA*

Bảng 1.1. Phân loại bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính

Thể bệnh	Đặc điểm hình thái, hóa học tế bào	Dấu ấn miễn dịch
M0	Tế bào non chưa biệt hóa $\geq 90\%$ các tế bào có nhân không thuộc dòng hồng cầu, không có thể Auer, $< 3\%$ MPO+	CD34+
M1	Tế bào non chưa trưởng thành dòng tủy $\geq 90\%$ các tế bào có nhân không thuộc dòng hồng cầu, hiếm gặp thể Auer, $> 3\%$ MPO+	HLA-DR, CD13, CD33, CD15, CD11 \pm
M2	Tế bào non đầu dòng tủy $< 90\%$ các tế bào có nhân không thuộc dòng hồng cầu, nhiều thể Auer	HLA-DR, CD13, CD33, CD15, CD11 \pm
M3	Bạch cầu cấp tiền tủy bào	CD33, CD13, CD15, CD11
M4	Bạch cầu cấp dòng tủy-mono	HLA-DR, CD34 \pm , CD33, CD15 \pm , CD14, CD64, CD11
M5a	Bạch cầu cấp dòng mono không biệt hóa dòng tủy	HLR-DR, CD34 \pm , CD33, CD15 \pm , CD14, CD64, CD11
M5b	Bạch cầu cấp dòng mono biệt hóa dòng tủy	
M6	$> 80\%$ là các tiền thân hồng cầu $\geq 30\%$ là các nguyên tiền hồng cầu tỷ lệ blast dòng tủy $< 20\%$	Glycophorin A
M7	$\geq 50\%$ blast thuộc dòng mẫu tiểu cầu	HLA-DR, CD61, CD42, CD34 \pm , CD33 \pm

1.1.6. Các nghiên cứu về bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính

Năm 1995, Schönbohn và cộng sự đã đánh giá nồng độ của một số cytokine như IL-1 (Interleukin1), IL-6, IL-8, IL1-RA, TNF- α (Tumor necrosis factor- α) và G-CSF (Granulocyte-colony stimulating factor) ở 20 bệnh AML sau khi đã được điều trị hóa trị liệu 23 lần. Các dữ liệu thu được cho thấy, nồng độ IL-6, IL-8 và G-CSF trong huyết tương tăng lên ở những bệnh nhân bị sốt giảm bạch cầu trung tính hoặc

bị nhiễm trùng nặng; Bên cạnh đó, nồng độ IL-6, IL-1, TNF- α và IL-1-RA trong huyết tương người bệnh được đo trước và sau một ngày khi bắt đầu các đợt sốt không dự đoán chính xác sự tiến triển của quá trình nhiễm trùng [14].

Không chỉ nghiên cứu về nồng độ cytokine do các tế bào AML tiết ra mà các nhà khoa học còn quan tâm tới mức độ biểu hiện gen *MALT1* (Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1), *A20*, *NF- κ B* (Nuclear factor kappa B) và *MALT-VI* trong tế bào lympho T CD3⁺ ở máu ngoại vi của bệnh nhân AML bằng phương pháp qRT-PCR để làm sáng tỏ các đặc điểm truyền tín hiệu của TCR (T-cell receptor) trong tế bào lympho T ở các bệnh nhân AML (Li Shi và cộng sự, 2013). Kết quả cho thấy, mức độ biểu hiện *MALT1* và *A20* thấp hơn đáng kể trong tế bào lympho T của bệnh nhân mắc bệnh AML so với nhóm đối chứng là những người khỏe mạnh; Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của *MALT1-VI* (biến thể 1) và *NF- κ B* tăng lên đáng kể ở bệnh nhân AML so với nhóm người khỏe. Như vậy, tín hiệu TCR-CD3 thấp có liên quan đến biểu hiện *MALT1* thấp, và do đó làm suy giảm miễn dịch tế bào lympho T; Trong khi đó sự biểu hiện của *MALT1-VI* tăng lại đóng vai trò trong việc khắc phục các hoạt động của tế bào lympho T bằng cách điều chỉnh làm giảm mức độ biểu hiện của gen *A20* ở bệnh nhân AML, từ đó gây ra phản ứng cụ thể với kháng nguyên của AML [15].

Bệnh AML là một bệnh ung thư ác tính, và đã được nhiều nhà khoa học quan tâm và nghiên cứu nhằm tìm ra cơ chế bệnh sinh, cũng như mối liên quan với các con đường truyền tín hiệu. Với những thông tin có được, năm 2013, Nguyen Le và Mitchell đã thành công trong việc nghiên cứu sự ức chế khả năng phát triển của tế bào ung thư máu thông qua quá trình tác động trực tiếp vào con đường truyền tín hiệu Phosphoinositide 3-kinase (PI3K/Akt). Kết quả này là bước tiến mới trong việc nghiên cứu và phát triển hướng điều trị bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính [16].

Năm 2019, Issa và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu xác định biểu hiện các gen trong tế bào gốc bạch cầu và ở bệnh nhân sau khi đã thực hiện quá trình điều trị bệnh AML. Kết quả cho thấy có sự thay đổi xảy ra trong quá trình phiên mã, điều này đã phần nào giải thích cho hiện tượng kháng trị liệu ở bệnh nhân AML. Sự phiên mã của tế bào gốc bạch cầu trước khi điều trị và ở bệnh nhân sau khi điều trị được đặc trưng bởi quá trình làm tăng điều hòa của các gen liên quan đến gen tiền

ung thư *Myc*, điểm kiểm soát chu trình của tế bào, con đường sửa chữa DNA và quá trình phosphoryl hóa. Đồng thời, nghiên cứu cũng xác định được khả năng làm giảm điều hòa của các gen liên quan đến miễn dịch trong tế bào gốc bạch cầu. Những phát hiện này có ý nghĩa rất lớn trong chiến lược điều trị bệnh AML trong tương lai để khắc phục tình trạng kháng thuốc ở bệnh nhân AML [17].

Bệnh AML xảy ra phần lớn do sự biến đổi di truyền trên nhiễm sắc thể và dựa vào đặc điểm này có thể phân loại bệnh nhân theo các nhóm nguy cơ: tốt, trung bình và xấu. Năm 2023, Lại Thị Thanh Thảo và cộng sự đã nghiên cứu trên 338 bệnh nhân AML được chẩn đoán tại Bệnh viện Chợ Rẫy và Bệnh viện Truyền máu Huyết học và kết quả khảo sát đã cho thấy, 14 trường hợp bị bất thường trên NST, chiếm tỉ lệ 4,14%. Các bất thường này rất đa dạng và khác nhau tùy theo từng trường hợp [18].

Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính có thể là một giai đoạn của bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính. Hiện nay, các nghiên cứu về bệnh AML được chuyển biến từ bệnh CML ở Việt nam còn rất hạn chế. Nguyễn Anh Trí và cộng sự đã tiến hành theo dõi và đánh giá tình trạng của 13 bệnh nhân CML (từ 1985-1992). Kết quả cho thấy có 8 bệnh nhân chuyển thành bệnh AML (61,54%) trong đó có 6 bệnh nhân thuộc thể M1 và 2 bệnh nhân thuộc thể M2 [19]. Nguyễn Hà Thanh thực hiện nghiên cứu tương tự trên 34 bệnh nhân và cũng xác nhận rằng phần lớn bệnh nhân chuyển sang bệnh AML (86,7%) [20].

1.2. Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính

1.2.1. Giới thiệu chung

Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính (CML – Chronic myeloid leukemia) là một loại ung thư bắt nguồn từ một số tế bào tạo máu có trong tủy xương. Bệnh CML được đặc trưng bởi sự gia tăng của các tế bào bạch cầu hạt đã được biệt hóa. Ban đầu, mặc dù số lượng tế bào bạch cầu hạt tăng lên trong máu ngoại vi nhưng chúng hoạt động tương đối bình thường. Tuy nhiên, khi bệnh tiến triển, các tế bào bạch cầu chưa trưởng thành hay còn gọi là nguyên tủy bào bắt đầu tích tụ trong máu và tủy xương. Sự phát triển quá mức của các nguyên tủy bào làm giảm sự phát triển của các tế bào máu khác, dẫn đến sự thiếu hụt các tế bào hồng cầu và tiểu cầu.

Những thay đổi này tạo ra sự dung hợp gen *BCR-ABL*, từ đó làm tăng khả năng sản xuất quá mức tyrosine kinase gây nên bệnh CML. Các tế bào bạch cầu phát triển, phân chia và tích tụ trong tủy xương rồi đi vào trong máu. Theo thời gian, các tế bào có thể di chuyển tới các bộ phận khác của cơ thể, bao gồm cả lách. CML là một bệnh bạch cầu phát triển khá chậm, nhưng nó có thể chuyển thành bệnh bạch cầu cấp tính rất nhanh và khó điều trị [21].

Từ năm 2001, CML được điều trị chủ yếu bằng chất ức chế tyrosine kinase đã giúp cải thiện đáng kể tỷ lệ kéo dài sự sống cho bệnh nhân. So với các phương pháp hóa trị khác thì việc sử dụng chất ức chế tyrosine kinase đã giúp cho các bệnh nhân có chất lượng cuộc sống tốt hơn nhiều. Như vậy, đây là một bước đột phá trong điều trị bệnh CML.

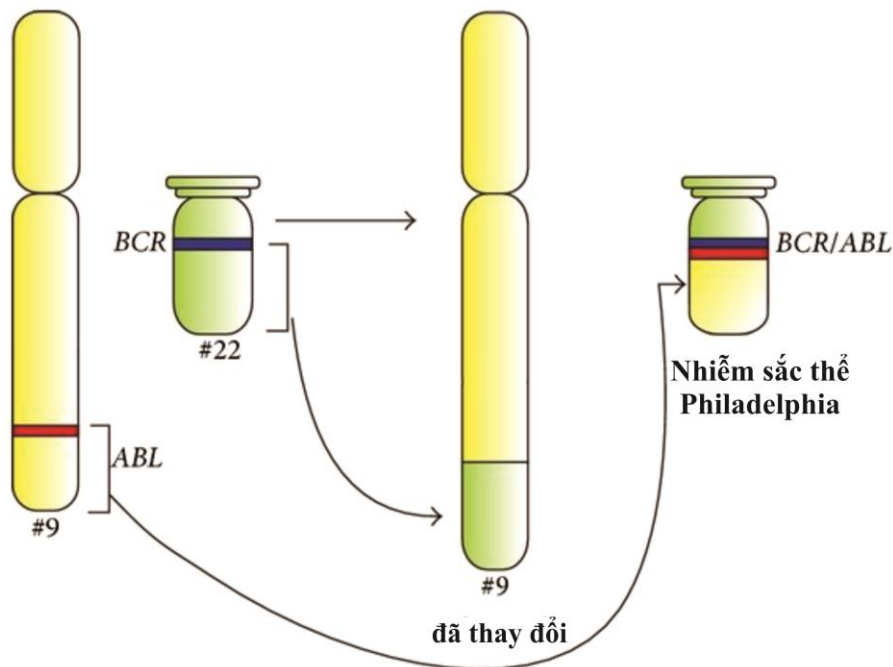
1.2.2. Tần suất mắc bệnh

Bệnh CML chiếm khoảng 15-20% trong tổng số các bệnh bạch cầu với tỉ lệ mắc bệnh tương đối cao. Mỗi năm, trong số 100.000 người sẽ có khoảng 1-2 trường hợp được chẩn đoán mắc bệnh CML và tỉ lệ nam giới mắc bệnh CML thường cao hơn nhiều so với nữ giới. Năm 2021, theo thống kê của Hiệp hội Ung thư Hoa Kỳ về bệnh CML thì ở Mỹ có khoảng 9.110 trường hợp được chẩn đoán mắc CML (5.150 bệnh nhân nam và 3.960 bệnh nhân nữ); Và có khoảng 1.220 người sẽ chết vì bệnh CML (680 bệnh nhân nam và 540 bệnh nhân nữ). Bệnh CML có thể xảy ra ở mọi lứa tuổi, nhưng phổ biến nhất ở người lớn tuổi khoảng 60-65 tuổi [22].

Tại Việt Nam, chưa có số liệu chung ở quy mô quốc gia được công bố rộng rãi. Tuy nhiên theo Nguyễn Hà Thanh, ở các tỉnh, thành phố phía Bắc, bệnh CML chiếm khoảng 5-6% bệnh về máu và cơ quan tạo máu [23]. Các bệnh nhân CML chủ yếu là trong độ tuổi 30-50, và nam giới được ghi nhận là mắc bệnh nhiều hơn nữ giới với tỉ lệ 2,2:1 [24]. Trong khi đó, theo báo cáo của Trần Văn Bé, số lượng bệnh nhân CML tại bệnh viện Huyết học Thành phố Hồ Chí Minh chiếm 5,73% tổng số bệnh về máu và chiếm 82,63% các bệnh rối loạn tăng sinh tủy [25]. Độ tuổi mắc bệnh của các bệnh nhân độ tuổi 30-60 là phổ biến nhất và tỉ lệ nam giới mắc bệnh cao hơn nữ giới (1,4:1) [26]

1.2.3. Cơ chế bệnh sinh

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, nhiễm sắc thể Philadelphia được phát hiện ở 90% bệnh nhân CML [21]. Vào năm 1959, báo cáo về bệnh nhân ung thư máu đầu tiên tại Philadelphia cho thấy Philadelphia là nhiễm sắc thể số 22 ở người bị đột biến chuyển đoạn từ nhiễm sắc thể số 9 chuyển sang. Cụ thể là, gen *BCR* trên nhiễm sắc thể 22 được nối liền với gen *ABL* tyrosine kinase trên nhiễm sắc thể 9 tạo nên tổ hợp *BCR-ABL* (Hình 1.1). Tổ hợp này khiến cho tế bào máu tạo ra quá nhiều tyrosine kinase (protein tín hiệu cho nhiều chức năng của tế bào), khi đó các tế bào bạch cầu phát triển ngoài sự kiểm soát.



Hình 1.1. Nhiễm sắc thể Philadelphia [27]

Chú thích: Gen *ABL* và *BCR* nằm trên nhánh dài của nhiễm sắc thể 9 và 22. Dung hợp gen *BCR/ABL* trên nhiễm sắc thể 22 tạo nên nhiễm sắc thể Philadelphia

1.2.4. Triệu chứng của bệnh CML

Lúc mới mắc bệnh, ước tính có khoảng một nửa số người bị bệnh CML không có bất kỳ dấu hiệu và triệu chứng nào mà chỉ được chẩn đoán khi xét nghiệm máu vì một lý do khác. Ở một số bệnh nhân, gan và/hoặc lách sẽ tăng nhanh về kích thước, từ đó gây ra cảm giác đầy bụng và chán ăn. Khi bệnh tiến triển, tình trạng đau đầu, đau xương, đau khớp, sốt, chảy máu, nhiễm trùng và nổi hạch của người bệnh trở nên nghiêm trọng hơn. Ngoài ra, bệnh CML cũng gây ra hiện tượng giảm

tiểu cầu hoặc rối loạn chức năng tiểu cầu dẫn đến các biến chứng về đông máu hoặc chảy máu [28].

1.2.5. Các giai đoạn của bệnh

Bệnh nhân CML thường trải qua ba giai đoạn: giai đoạn mạn tính, giai đoạn tiến triển và giai đoạn chuyển cấp tính. Trong giai đoạn mạn tính, số lượng tế bào bạch cầu trưởng thành tăng lên nhanh, còn các nguyên tử bào giảm, chiếm ít hơn 10% tổng số tế bào máu. Các dấu hiệu và triệu chứng của bệnh trong giai đoạn này thường nhẹ hoặc thậm chí là không có, sau đó tình trạng từ từ trở nên nghiêm trọng hơn. Giai đoạn mạn tính có thể kéo dài từ vài tháng đến vài năm. Trong giai đoạn tiến triển, số lượng nguyên tử bào cao hơn ở giai đoạn mạn tính, chiếm khoảng 10-19% tổng số tế bào máu. Các dấu hiệu và triệu chứng của bệnh bắt đầu gia tăng. Số lượng bạch cầu và tiểu cầu tăng nhanh không đáp ứng với điều trị. Ở một số trường hợp, số lượng tiểu cầu lại giảm nhanh khiến cho sức khỏe người bệnh bị suy yếu. Trong giai đoạn chuyển cấp tính, số lượng nguyên tử bào đạt khoảng hơn 20% tổng số tế bào máu trong cơ thể. Khi đó, các bệnh nhân có biểu hiện bệnh rõ rệt nhất như lách to ra, người bệnh cảm giác bị đau xương và giảm cân thấy rõ. Ngoài ra, hiện tượng nhiễm trùng nghiêm trọng và chảy máu không kiểm soát được cũng xảy ra có thể đe dọa tính mạng của người bệnh [29].

1.2.6. Các nghiên cứu trên bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính

Năm 2017, Caliskan và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu nhằm tìm ra vai trò của CYLD trong tín hiệu β -catenin qua trung gian Dishevelled (Dvl) ở các dòng tế bào CML như K562, MEG01 và KU821. Cả ba dòng tế bào này đều được lấy từ những bệnh nhân đang bị thiếu máu trầm trọng. Thông qua việc đánh giá sự biểu hiện mRNA của *CYLD* cho thấy ở cả ba dòng tế bào K562, MEG01 và KU821 đều biểu hiện *CYLD* và không thấy bất kỳ đột biến nào trong trình tự mã hóa *CYLD* ở trong cả ba dòng tế bào này. Qua đó, họ cho rằng gen *CYLD* có thể không đóng vai trò nào trong việc truyền tín hiệu Wnt không được kiểm soát ở bệnh CML. Tương tác protein Dvl-CYLD cũng đã được báo cáo ở một số nghiên cứu trước đây, *CYLD* có khả năng điều hòa hoạt động protein Dvl thông qua quá trình deubiquitin. Tuy nhiên, khi Caliskan và cộng sự thử làm bất hoạt gen *Dvl* trong các tế bào MEG01

thì biểu hiện mRNA của *CYLD* ở các tế bào bị làm bất hoạt gen *Dvl* giảm hơn hai lần so với các mẫu đối chứng; còn gen *Dvl* biểu hiện quá mức thì biểu hiện của *CYLD* cũng tăng lên. Như vậy, trong khi các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng, *CYLD* có khả năng điều hòa protein *Dvl* thì kết quả nghiên cứu của Caliskan và cộng sự lại cho thấy một cơ chế điều hòa phức tạp hơn rất nhiều [30].

Theo Jafarzadeh và cộng sự (2019) thì các đặc điểm phân tử và tế bào của tế bào gốc trung mô tủy xương và đại thực bào sẽ thay đổi đáng kể khi tiếp xúc với exosome có nguồn gốc từ K562. Nhiều nghiên cứu trước đó cũng đã chỉ ra rằng các exosome có nguồn gốc từ bệnh bạch cầu trong cơ chế bệnh sinh CML có thể làm thay đổi môi trường vi viêm cục bộ bằng cách điều chỉnh nồng độ cytokine (đặc biệt là IL-6 và TNF- α), nitric oxide (NO), và khả năng oxy hóa khử cả tế bào gốc trung mô tủy xương và đại thực bào. Những thay đổi này có thể dẫn đến ức chế miễn dịch và sự phát triển của khối u. Như vậy, những kết quả này có ý nghĩa rất lớn trong việc thiết kế các liệu pháp điều trị ung thư theo hướng thích hợp [31].

Năm 2020, sau một thời gian thực hiện nghiên cứu “Mối tương quan giữa Interleukin 6 và sự chuyển biến ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy mạn thuộc Đông Bắc Ấn Độ”, Sharma và cộng sự đã phát hiện thấy rằng IL-6 là một cytokine có vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch, tạo máu và đáp ứng giai đoạn cấp tính. Mức IL-6 huyết thanh tăng đáng kể ở bệnh nhân CML so với nhóm đối chứng có thể được sử dụng làm tiêu chí dự đoán mức độ nghiêm trọng của bệnh. Như vậy, qua nghiên cứu này có thể thấy rõ ràng mối liên hệ giữa mức độ IL-6 và sự biến chuyển bệnh của các bệnh nhân CML [32].

Hiện nay, ở Việt Nam đã có nhiều nghiên cứu được thực hiện về bệnh CML. Tuy nhiên các nhà khoa học chủ yếu quan tâm tới việc mô tả các triệu chứng bệnh, cơ chế bệnh sinh và các kết quả xét nghiệm nhằm chẩn đoán bệnh CML. Bệnh CML chiếm 5,73% trong số các bệnh về máu [33] và chiếm 71,4% trong số các bệnh thuộc hội tăng sinh tủy ác tính [34]. Gần đây, một số báo cáo chỉ ra rằng, khi được điều trị bởi imatinib, tỉ lệ lui bệnh của các bệnh nhân CML đều tăng lên. Cụ thể, nghiên cứu của Nguyễn Thị Thảo trên 109 bệnh nhân CML được điều trị bằng imatinib cho thấy, 100% bệnh nhân lui hoàn toàn bệnh huyết học, 64,2% bệnh nhân lui bệnh hoàn toàn về di truyền tế bào và 46,8% bệnh nhân lui hoàn toàn bệnh về

sinh học phân tử [35]. Tương tự như vậy, năm 2014, Cồ Nguyễn Phương Dung đánh giá khả năng đáp ứng thuốc imatinib mesylat của 118 bệnh nhân CML. Kết quả cho thấy, sau 5 năm điều trị 100% bệnh nhân đáp ứng hoàn toàn về huyết học, 85,7% bệnh nhân đáp ứng hoàn toàn về di truyền tế bào và 57,1% bệnh nhân đáp ứng hoàn toàn về sinh học phân tử [36].

Năm 2022, Chu Hoàng Hưng và cộng sự đã nghiên cứu đặc điểm của 31 bệnh nhân CML tại bệnh viện Trung ương Thái Nguyên. Kết quả ghi nhận rằng, số lượng hồng cầu, lượng huyết sắc tố và số lượng tiểu cầu của các bệnh nhân đều giảm so với ngưỡng giá trị bình thường. Tỷ lệ bệnh nhân có huyết sắc tố và tiểu cầu giảm dưới 100 g/l lần lượt là 54,8% và 37,8%. Trong khi đó, số lượng bạch cầu của các bệnh nhân này lại tăng cao [37].

Khi nghiên cứu về đột biến BCR-ABL T315I trên 99 bệnh nhân mắc bệnh CML cho thấy, Khair và cộng sự báo cáo rằng, có 43 bệnh nhân đều mang đột biến T315I kháng các loại thuốc chống ung thư với mức độ biểu hiện gen cao và đồng thời cũng xác định được mối tương quan giữa đột biến T315I với tình trạng lâm sàng của các bệnh nhân. Qua đó, Khair và cộng sự cũng kết luận rằng, đột biến T315I rất phổ biến ở các bệnh nhân CML, và việc phát hiện ra đột biến thuộc vùng ABL kinase có ý nghĩa rất lớn trong việc tối ưu hóa phương pháp trị liệu bệnh [38]. Gen p51/p63 là một thành viên thuộc họ gen p53. Yamaguchi và cộng sự phân tích đột biến và biểu hiện của gen này trên 80 bệnh nhân mắc bệnh CML để đánh giá vai trò của chúng trong quá trình biến đổi nguyên bào. Kết quả cho thấy, biểu hiện của gen p51/p63 được phát hiện ở 74 bệnh nhân và các đột biến gen p51/p63 hoạt động tương tự như đột biến gen p53 làm tăng sự phát triển của bệnh CML. Tuy nhiên, nghiên cứu này không xác định được mối tương quan giữa biểu hiện gen p51/63 với các giai đoạn lâm sàng của bệnh [39]. Trong một nghiên cứu tương tự, Zaen Pahore và cộng sự nghiên cứu trên 45 trường hợp mắc bệnh CML và xác định được 12 bệnh nhân mang đột biến JAK2V617V. Khi theo dõi tình trạng của các bệnh nhân này, họ đã phát hiện ra rằng, có 8 bệnh nhân dương tính với đột biến JAK2V617F đều biểu hiện tình trạng bệnh nặng hơn [40].

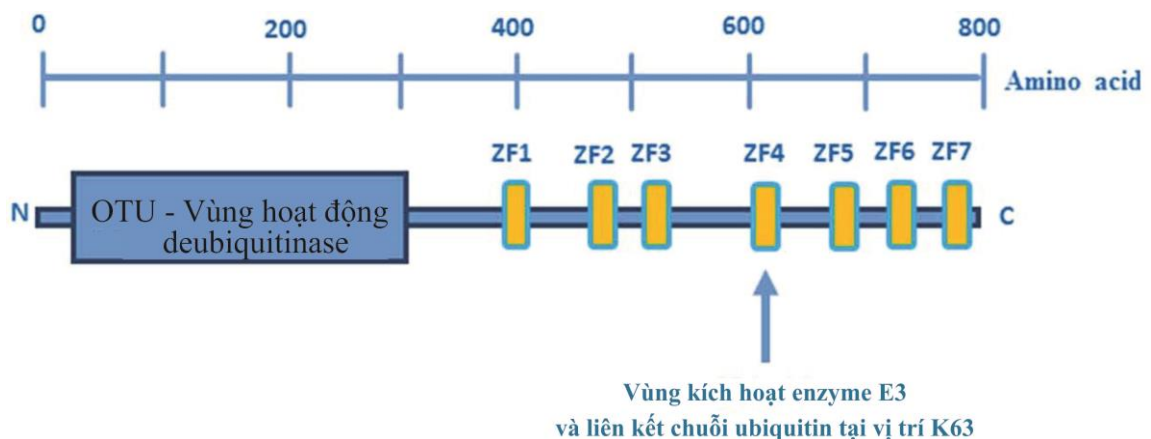
1.3. Giới thiệu chung về enzyme deubiquitinase A20 và CYLD

Ubiquitin là một loại protein gồm 76 amino acid được biểu hiện phổ biến trong tất cả các mô. Quá trình ubiquitin hóa là quá trình biến đổi sau dịch mã của một protein bằng cách gắn cộng hóa trị một hay nhiều đơn phân ubiquitin vào các protein này (thông qua liên kết isopeptide). Chức năng của ubiquitin là đánh dấu các protein nội bào cho quá trình phân hủy chúng bởi proteosome. Đây là một bước quan trọng trong các quá trình sinh học của tế bào như phát triển phôi, chu trình của tế bào, kiểm soát sự tăng sinh và ngăn ngừa thoái hóa thần kinh. Tuy nhiên, trong cơ thể cũng tồn tại các enzyme DUB thực hiện phân cắt liên kết peptide hoặc isopeptide giữa protein và ubiquitin để làm đảo ngược các quá trình sinh học bên trong tế bào [41]. Các enzyme DUB này có thể khiến cho các ubiquitin không hoạt động, thậm chí bị loại bỏ khỏi phức hợp protein-Ub mà không khiến cho các protein bị phân hủy hay có thể khiến đảo ngược tín hiệu ubiquitin [42].

Các DUB được coi như là các chất ức chế khối u và quá trình viêm bằng cách điều hòa âm tính sự tăng sinh/biệt hóa và tồn tại của tế bào thông qua việc phân cắt các Ub khỏi các protein tín hiệu như NF- κ B và STATs [43-45]. Thực tế, ảnh hưởng của các DUB như A20, OTUB1 và CYLD đối với tế bào bạch cầu dòng tủy chưa được nghiên cứu rộng rãi. Tuy nhiên, A20 được biết đến với khả năng ức chế sự tăng sinh và gây ra quá trình apoptosis của các dòng tế bào CML, CD34⁺CML [46]. Nhiều báo cáo cho thấy, biểu hiện A20 giảm ở bệnh ung thư hạch và bệnh CLL (Chronic lymphoblastic leukemia) [47], trong khi đó ở bệnh u nguyên bào thần kinh đệm, ung thư biểu mô tế bào gan và bệnh ALL (Acute lymphoblastic leukemia) thì biểu hiện A20 lại tăng lên rõ rệt [48, 49]. Tương tự như A20, CYLD được coi là một chất trung gian quan trọng của quá trình apoptosis ở các tế bào ALL và CLL [45, 50]. Bên cạnh đó, sự biểu hiện của OTUB1 lại liên quan đến khả năng kìm hãm sự di cư của các tế bào ung thư đại trực tràng [51]. Những con chuột thiếu OTUB1 thường xảy ra hiện tượng chết phôi muộn [43]. Tuy nhiên, tác động của OTUB1 đối với chức năng của tế bào bạch cầu vẫn chưa được xác định rõ ràng.

1.3.1. Protein A20

A20 còn được biết đến là protein kích thích yếu tố hoại tử khối u 3 (TNFAIP3- Tumor necrosis factor α -induced protein), được mã hóa bởi gen *TNFAIP3* (A20). A20 nằm trên nhiễm sắc thể số 6q23.3, trình tự cDNA dài 4.440 bp với khung đọc mở gồm 2.370 Nu mã hóa cho protein chứa 790 amino acid. Về mặt cấu trúc, A20 gồm vùng OTU (Ovarian tumor) và 7 vùng ZF (Zinc finger) làm trung gian cho hoạt động deubiquitin của A20, hoạt động gắn ubiquitin và liên kết ubiquitin của nó (Hình 1.2). Gen A20 được biểu hiện trong cơ thể thông qua các kích thích khác nhau như IL-1 β , TNF- α . Mặc dù, A20 được cảm ứng bởi các cytokine tiền viêm trong hầu hết các loại tế bào, nhưng sự điều hòa của A20 là khác nhau ở các tế bào khác nhau. Trong các cơ quan bạch huyết như tuyến ức, lách và mô lympho ở ruột, mức độ biểu hiện của A20 rất cao; Còn trong tế bào tuyến ức chưa trưởng thành và tế bào lympho T ngoại vi A20 chỉ được biểu hiện một phần [52].

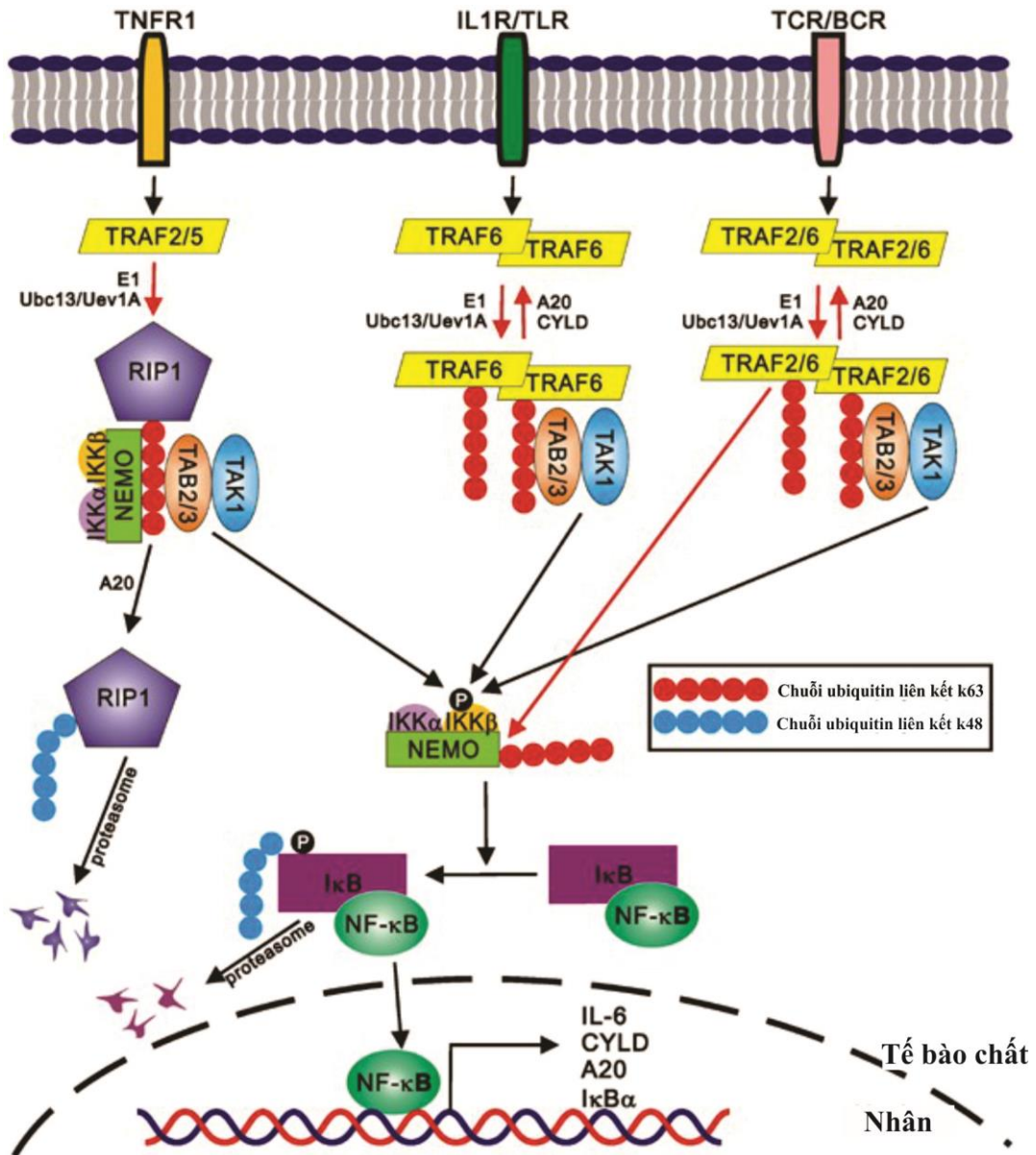


Hình 1.2. Cấu trúc A20 [53]

Chú thích: ZF (Zinc finger) là trung gian liên kết chuỗi ubiquitin và hoạt động deubiquitinase

Trong hệ thống miễn dịch bẩm sinh và thích ứng, TAK1 (Transforming growth factor β -activated kinase 1) và IKK (Inhibitor of κ B (I κ B) kinase) được kích hoạt qua trung gian ubiquitin. Ban đầu, TNFR1 (Tumor necrosis factor receptor 1) được kích thích dẫn đến sự hoạt hóa enzyme ubiquitin ligase TRAF2 (TNFR-Associated factor 2) và TRAF5 thực hiện chức năng gắn chuỗi polyubiquitin liên kết Lys63 vào RIP1 (kinases receptor-interacting protein 1) với sự có mặt của E1 và phức hợp Ubc13/Uev1A. Sau đó, RIP1 polyubiquitin tiếp tục gắn với protein TAK1

kinase thông qua sự tương tác giữa các chuỗi polyubiquitin K63 và TAB2 (TGF- β activated kinase 1 (MAP3K7) binding protein 2) hoặc TAB3, đồng thời chuỗi polyubiquitin cũng có vai trò gắn IKK bằng cách liên kết với NEMO (NF- κ B essential modulator), do đó cho phép TAK1 phosphoryl hóa và kích hoạt IKK. IKK khi đó đóng vai trò phosphoryl hóa I κ B và khiến nó trở thành đối tượng để proteasome phân hủy, từ đó cho phép NF- κ B xâm nhập vào nhân để kích hoạt các gen mục tiêu bao gồm các chất trung gian của phản ứng miễn dịch và viêm cũng như các chất ức chế con đường tín hiệu NF- κ B.



Hình 1.3. A20 điều hòa con đường tín hiệu NF- κ B [54]

Trong con đường tín hiệu NF- κ B, A20 là enzyme DUB có khả năng phân cắt chuỗi polyubiquitin liên kết Lys63 khỏi TRAF và RIP1 và gắn vào vị trí Lys 48, từ

đó ngăn chặn sự hoạt hóa IKK và trở thành mục tiêu để proteasome phân hủy. Đối với thụ thể IL1R/TLR và TCR/BCR, sau khi được kích thích chúng sẽ kích hoạt IKK thông qua TRAF2/TRAF6 và hoạt động như một ubiquitin E3 thúc đẩy quá trình phosphoryl hóa tại vị trí Lys63. TRAF2/TRAF6 sau đó thu nhận phức hợp TAK1 và IKK để làm trung gian cho việc kích hoạt các kinase này (Hình 1.3) [54]

Ban đầu, A20 được mô tả như là chất ức chế quá trình apoptosis của tế bào do TNF gây ra, nhưng các nghiên cứu sau này đã chứng minh rằng sự biểu hiện quá mức của A20 có thể ức chế sự hoạt hóa NF- κ B đáp ứng với các kích thích khác nhau. Sự biểu hiện quá mức của A20 trong một số dòng tế bào như tế bào ung thư biểu mô vú MCF7 ở người và tế bào WEHI164 ở chuột có khả năng kháng một phần đối với quá trình apoptosis do TNF gây ra. Tuy nhiên, sự biểu hiện quá mức gen A20 ở các tế bào Hela, A548 hoặc tế bào HepG2 ở người không có tác dụng lên quá trình apoptosis. Cho đến nay, vẫn chưa có những bằng chứng rõ ràng chứng minh được tại sao một số dòng tế bào được bảo vệ bởi A20 nhưng một số khác thì không. Mặc dù vậy, các nghiên cứu gần đây cũng chỉ ra rằng A20 có chức năng quan trọng trong việc ức chế khối u và sự bất hoạt gen A20 có liên quan chặt chẽ tới các u lympho [55]. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu khác cũng khẳng định A20 được biểu hiện khác nhau trong tế bào ung thư. Ở một số trường hợp A20 biểu hiện quá mức trong ung thư biểu mô vòm họng không biệt hóa, ung thư biểu mô tế bào vảy ở da và đầu, ung thư vú và ung thư biểu mô gan. Nghiên cứu của Fan Zhang và cộng sự chứng minh rằng biểu hiện quá mức A20 trong các mẫu B-ALL (chưa được công bố), điều này cho thấy rằng A20 có tham gia vào cơ chế bệnh sinh của các khối u ác tính nữa. Khi mức biểu hiện của A20 cao sẽ là tiên lượng xấu trong bệnh ung thư vú và thậm chí là nguyên nhân dẫn đến di căn ung thư. Do vậy, có thể coi A20 là một dấu ấn sinh học ung thư mới. A20 bị bất hoạt ở các u bạch huyết trong trường hợp gen này bị đột biến hoặc methyl hóa xảy ra ở vùng promoter. Khi đó, cả hai alen A20 đều bị ảnh hưởng và đó cũng được coi là dấu hiệu để nhận biết các gen ức chế khối u [52].

Sử dụng chuột thiếu A20 và công nghệ can thiệp RNA đã cho thấy vai trò quan trọng của A20 trong một loạt các con đường tín hiệu gây ra bởi mầm bệnh và các cytokine. Những chuột thiếu A20 thường chết ngay sau khi sinh do viêm đa cơ

quan cho thấy vai trò quan trọng của A20 trong cân bằng nội môi miễn dịch của vật chủ [56]. Các nghiên cứu về mối liên hệ trong toàn bộ hệ gen đã chỉ ra rằng locus *A20* dễ mắc nhiều bệnh tự miễn bao gồm bệnh viêm khớp dạng thấp, lupus ban đỏ hệ thống, bệnh vẩy nến, đái tháo đường loại 1, bệnh viêm ruột và bệnh mạch vành. Những thay đổi trong hoạt động hoặc biểu hiện của *A20* có thể ảnh hưởng đến cơ chế bệnh sinh của bệnh viêm khớp dạng thấp. Nhiều loại đa hình nucleotide đơn *A20* được phát hiện có liên quan đến tính nhạy cảm với bệnh tự miễn [57].

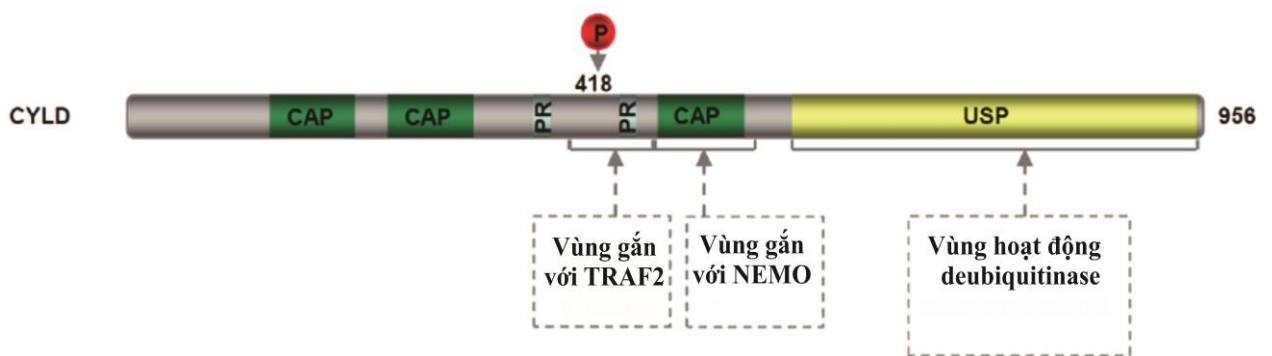
Những chuột đã loại bỏ gen *A20* thường chết sớm do viêm đa cơ quan cho thấy sự thiếu hụt *A20* có thể dẫn đến các kiểu hình riêng biệt và mức độ ảnh hưởng sẽ phụ thuộc vào loại tế bào đã loại bỏ *A20*. Ví dụ, sự thiếu hụt *A20* đặc hiệu ở biểu bì sẽ dẫn đến sự tăng sinh tế bào sừng, trong khi sự thiếu hụt *A20* trong tế bào tủy xương sẽ dẫn đến sự tiến triển của bệnh viêm khớp [58]. Những chuột bị thiếu hụt *A20* đặc hiệu trong tế bào tủy được gọi là chuột *A20^{MyelKO}* và tình trạng viêm ở những chuột này phụ thuộc vào gen cảm biến miễn dịch *Nlrp3*, tín hiệu của thụ thể IL-6 và IL-2 [59].

Ngoài NF- κ B thì JAK/STAT cũng là một con đường dẫn truyền tín hiệu rất quan trọng trong hệ thống miễn dịch. Trong đó, *A20* có vai trò ngăn chặn các phản ứng miễn dịch phụ thuộc vào STAT1 thông qua việc làm giảm sự biểu hiện của STAT1. STAT1 bao gồm cả STAT1 α và STAT1 β được chứng minh là nhân tố không thể thiếu đối với phản ứng miễn dịch qua trung gian IFN và thực tế tỷ lệ STAT1 α /STAT1 β xuất hiện trong tế bào chịu sự điều khiển của *A20*. Qua đó có thể thấy rằng *A20* cũng có thể ảnh hưởng tới tình trạng viêm qua trung gian IFN. Chức năng này cho phép *A20* có thể di chuyển giữa tế bào dòng tủy và tế bào mô ở khớp, từ đó *A20* được coi là chất điều biến mạnh đối với chức năng viêm qua trung gian STAT. Trong trường hợp gen *A20* bị loại bỏ, STAT1 sẽ được tăng cường sự biểu hiện dẫn đến quá trình kích thích khả năng làm tăng cường viêm phụ thuộc STAT1 [59]. Ở những bệnh nhân ALL thì nồng độ cytokine IL-6, TNF- α và IL-1 β trong huyết thanh tăng lên do gene *A20* đã bị bất hoạt. Khi đó, biểu hiện của STAT1, STAT3 và STAT5 cũng đều tăng lên trong tất cả tế bào ALL, còn STAT6 đóng vai trò ức chế sự tồn tại của tế bào ALL thì không được biểu hiện [60].

Như vậy, A20 hoạt động điều hòa âm tính NF- κ B để đáp ứng với nhiều kích thích và được coi là một chất ức chế khối u. Rối loạn chức năng A20 có thể liên quan đến bệnh ác tính tế bào lympho. Hơn thế nữa, các protein liên kết A20 và A20 có thể được sử dụng làm dấu ấn sinh học và là mục tiêu điều trị mới trong các khối u ác tính tế bào lympho.

1.3.2. Protein CYLD

Protein CYLD là enzyme deubiquitinase được mã hóa bởi gen cylindromatosis (*CYLD*). *CYLD* nằm trên nhiễm sắc thể 16q12.1 ở người, có kích thước 60 kb và mã hóa cho enzyme thioesterase chứa 956 amino acid với ba vùng bảo thủ protein-glycine (Cap-Gly) để tương tác với các protein mục tiêu như NEMO, TRAF2 trong con đường tín hiệu NF- κ B (Hình 1.4) và sau đó chúng hoạt động như là một enzyme khử ubiquitin. CYLD được tìm thấy chủ yếu trong tế bào chất và nhân của nhiều loại tế bào.



Hình 1.4. Cấu trúc CYLD [61]

Các nghiên cứu chức năng cho thấy vai trò của CYLD trong việc điều chỉnh quá trình viêm, miễn dịch, chu trình tế bào, sinh tinh, tạo xương, di cư và hình thành khối u. Cho đến nay, một số con đường tín hiệu được phát hiện có liên quan hoặc được điều chỉnh bởi CYLD như NF- κ B, Wnt/ β -catenin và JNK, và một số con đường khác. Sự thay đổi di truyền của CYLD có thể dẫn đến sự kích hoạt sai lệch hoặc ức chế các con đường tín hiệu này nhằm góp phần gây ra một số bệnh lý [62].

Ung thư là căn bệnh phổ biến do thiếu hoạt động của enzyme CYLD. Điều này cho thấy vai trò của CYLD trong việc kiểm tra tình trạng viêm đã được chứng minh ở rất nhiều loại ung thư. Viêm qua trung gian NF- κ B được biết đến là nguyên nhân tạo ra các dạng oxy phản ứng làm tổn thương mô, các cytokine viêm và đồng thời sản xuất ra các tế bào miễn dịch. Do đó, CYLD như một cơ quan điều chỉnh

chính đối với chứng viêm do NF- κ B gây ra và được coi như là yếu tố có thể ức chế NF- κ B để ngăn ngừa tổn thương mô dẫn đến hoại tử, ung thư và mất khả năng tăng sinh tế bào [63]. *CYLD* là nguyên nhân gây ra bệnh Paget của xương đặc trưng bởi đặc điểm xương giòn và dễ gãy do sự biệt hóa của tế bào hủy xương bị ảnh hưởng [63]. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng, *CYLD* bị bất hoạt có thể liên quan tới sự hình thành các khối u rắn ở đại tràng và gan, thận, cổ tử cung, tuyến tiền liệt, bệnh u vành khảm, u biểu mô tóc, và hội chứng Brooke-Spiegler. Sự biểu hiện quá mức của *CYLD* trong các dòng tế bào ung thư phổi làm tăng hoạt động của TRAIL bằng cách ức chế NF- κ B, do đó thúc đẩy quá trình apoptosis [64]. Như vậy, bằng cách liên kết nhiều con đường kích hoạt và phản ứng với trung tâm của quá trình viêm, *CYLD* không chỉ hoạt động như một gen gây ung thư mà còn là một chất điều chỉnh chính các con đường quan trọng dẫn đến các hiệu ứng tế bào đa dạng.

Protein Dvl được kích hoạt bởi sự kích thích con đường tín hiệu Wnt và có vai trò quan trọng trong việc điều hòa phức hợp phá hủy β -catenin. *CYLD* điều hòa âm tính con đường truyền tín hiệu Wnt/ β -catenin bằng cách khử protein Dvl. Tuy nhiên, khi *CYLD* bị mất chức năng hoặc đột biến sẽ tham gia vào việc hình thành các khối u rắn khác nhau. Sự điều hòa β -catenin được quan sát thấy trong quá trình phát triển của bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính. Tín hiệu Dvl bị ức chế có thể kích hoạt β -catenin trong CML; và *CYLD* khi đó có thể góp phần vào việc ức chế Dvl. Khi đánh giá sự biểu hiện mRNA trong ba dòng tế bào K562, MEG01 và KU812 của bệnh CML đều thấy sự biểu hiện mRNA của gen *CYLD*. Sự biểu hiện *CYLD* sẽ giảm xuống sau khi gen *Dvl* bị bất hoạt nhờ công nghệ siRNA. Trong khi thí nghiệm trước đó thì cho rằng *CYLD* có khả năng điều hòa protein Dvl và biểu hiện quá mức Dvl sẽ khiến biểu hiện *CYLD* giảm xuống [30].

Bệnh bạch cầu mạn tính tế bào B (B-CLL) được đặc trưng bởi sự tích tụ quá mức tế bào lympho B đã trưởng thành về mặt hình thái và miễn dịch. B-CLL là bệnh bạch cầu thường xảy ra ở người lớn, đặc biệt là ở các nước phương Tây. Các nghiên cứu gần đây đã phát hiện ra rằng *CYLD* hoạt động như một nhân tố quan trọng trong quá trình hoại tử tế bào. Vai trò của *CYLD* trong các con đường tín hiệu khác nhau cho thấy nó tham gia vào các quá trình sinh lý và bệnh lý của các sinh vật sống. Những chuột bị bất hoạt *CYLD* có biểu hiện bất thường trong quá trình

hoạt hóa tế bào lympho T và tế bào lympho B. Khi đó, mặc dù các khối u tự phát hầu như không phát triển nhưng lại tăng khả năng mắc bệnh ung thư. Hơn nữa, *CYLD* cũng được phát hiện với vai trò điều hòa quá trình tạo xương, cân bằng nội môi, sinh tinh, sự tiến triển của chu kỳ tế bào và di chuyển của tế bào [65].

Protein *CYLD* hoạt động như một chất ức chế khối u nên khi *CYLD* bị đột biến hoặc giảm mức độ biểu hiện sẽ thúc đẩy sự phát triển của các loại khối u. Mức độ biểu hiện của *CYLD* giảm đáng kể trong ung thư đại tràng, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư thận, u ác tính, ung thư cổ tử cung, đa u tủy xương, bệnh T-ALL và B-CLL. Sau đó, một số nghiên cứu khác đều cho rằng, những đột biến và giảm sự biểu hiện của *CYLD* đều liên quan đến bệnh đa u tủy xương [65].

CYLD thúc đẩy nhanh quá trình apoptosis ở các tế bào T-ALL [66] và khi sự điều hòa giảm biểu hiện của *CYLD* có thể đóng vai trò gây bệnh trong B-CLL, từ đó gây ra tín hiệu hoại tử đào thải trong các tế bào CLL. Tuy nhiên, cho đến năm 2014 thì dựa vào sự biểu hiện của *CYLD* để tiên lượng bệnh B-CLL vẫn chưa được xác định rõ ràng. Chính vì vậy, Wei Wu và cộng sự đã phân tích biểu hiện của *CYLD* ở 125 bệnh nhân B-CLL và mô tả mối tương quan giữa biểu hiện mRNA của *CYLD* và các đặc điểm lâm sàng nhất định của bệnh nhân B-CLL. Và qua đó họ đã bước đầu đánh giá ý nghĩa tiên lượng của biểu hiện *CYLD* ở bệnh nhân B-CLL [65].

Việc xác định các dấu hiệu tiên lượng mới trong CLL có tầm quan trọng vì các biểu hiện lâm sàng của bệnh không đồng nhất ở CLL, từ đó có thể cải thiện các liệu pháp trong điều trị bệnh CLL. Cụ thể là trong nghiên cứu này, Wei Wu và cộng sự đã xác định được *CYLD* điều hòa âm tính tín hiệu NF- κ B, mà NF- κ B được chứng minh là có tham gia vào quá trình sinh ung thư của các khối u ác tính và kích hoạt những bất thường trong bệnh CLL và do đó sự ức chế tín hiệu NF- κ B làm giảm khả năng sống sót của tế bào CLL. Bên cạnh đó, khi các tế bào CLL có thể phục hồi phản ứng hoại tử khi biểu hiện *CYLD* được phục hồi. Mức độ biểu hiện CD23 và CD21 trên bề mặt của các tế bào lympho B thiếu *CYLD* ở bệnh nhân CLL được xác định cao hơn so với tế bào lympho B bình thường. Phát hiện này cho thấy sự biểu hiện của *CYLD* có thể tham gia vào quá trình hình thành bệnh bạch cầu CLL. Việc loại bỏ gen *CYLD* dẫn đến sự mất cân bằng của quần thể tế bào lympho B ngoại vi với sự gia tăng đáng kể tế bào lympho B vùng biên ở chuột nghiên cứu.

Như vậy, nghiên cứu này đã chứng minh được sự điều hòa giảm sự biểu hiện *CYLD* trong CLL so với tế bào lympho B bình thường và sự biểu hiện *CYLD* thấp dự báo khả năng sống sót của bệnh nhân CLL kém. Kết quả này đã cho thấy *CYLD* có thể đóng vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh CLL [65].

Bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính là bệnh ung thư ác tính xảy ra phổ biến ở trẻ em. Mặc dù tiên lượng của bệnh ALL có thể khác nhau giữa các bệnh nhân, nhưng tỷ lệ sống sót của trẻ em mắc ALL đã được cải thiện trong nhiều thập kỷ qua. Bệnh ALL hiếm khi tìm thấy ở người trưởng thành nhưng khi đã mắc bệnh thì tiên lượng tình trạng bệnh khá nặng. Do sự phân bố của các tế bào bạch cầu trên cơ thể nên hiện nay hóa trị được coi là một lựa chọn tốt nhất để điều trị bệnh ALL. Tuy nhiên, do sự phát triển khá phức tạp của các tế bào trong bệnh bạch cầu mà liệu pháp hóa trị vẫn bị hạn chế sử dụng [67].

Việc nghiên cứu và khám phá ra cơ chế phân tử để điều chỉnh sự nhạy cảm của tế bào bệnh bạch cầu sẽ mang lại hiệu quả tích cực cho việc điều trị bệnh ALL. Đột biến mất *CYLD* liên quan đến sự hình thành của một số khối u ác tính như ung thư đại tràng, ung thư biểu mô tế bào gan, đa u tủy xương, và bệnh bạch cầu. Các nghiên cứu về gen *CYLD* đều cho rằng *CYLD* được biểu hiện nhiều trong quá trình nguyên phân và nó có tham gia vào các chu kỳ tế bào. Những phát hiện này là tiền đề để Yunfan Yang và cộng sự (2015) khám phá ra vai trò tiềm năng của *CYLD* trong việc điều chỉnh độ nhạy của tế bào bạch cầu với các loại thuốc nhắm mục tiêu vi ống. Thuốc nhắm mục tiêu vi ống được sử dụng rộng rãi trong quá trình hóa trị ung thư. Sự rối loạn của *CYLD* đã được chứng minh là một trong những yếu tố thúc đẩy sự tiến triển của bệnh bạch cầu lympho cấp tính và mạn tính. Chức năng của *CYLD* được thể hiện trong việc ngăn tế bào lympho khỏi sự hình thành khối u thông qua sự điều hòa quá trình apoptosis, và hoại tử của tế bào. Những phát hiện này cho thấy *CYLD* có thể coi là một dấu ấn sinh học, cũng như là nhân tố để thúc đẩy cho quá trình điều trị bệnh bạch cầu hiệu quả hơn [67].

1.3.3. Nghiên cứu di truyền phân tử trên gen A20, CYLD ở một số bệnh ung thư

Đa hình đơn nucleotide (SNP-single nucleotide polymorphism) là một trong những dạng biến thể di truyền phổ biến trong hệ gen người. SNP trong các gen quy định việc chỉnh sửa DNA, điều hòa chu kỳ tế bào, sự chuyển hóa và con đường

miễn dịch liên quan đến tính nhạy cảm về mặt di truyền đối với bệnh ung thư. Hiểu được cơ chế tác động của SNP đến sự nhạy cảm với ung thư là rất quan trọng nhằm hiểu rõ cơ chế bệnh sinh của các bệnh ung thư khác nhau. Như vậy, SNP có thể coi như là một dấu ấn sinh học được sử dụng trong chẩn đoán và điều trị ở nhiều loại ung thư.

SNP có thể nằm ở các vùng gen khác nhau như promoter, exon, intron cũng như vùng 5'- và 3' UTR (Untranslated region). Do đó, những thay đổi trong biểu hiện gen và ảnh hưởng của chúng đối với sự nhạy cảm với ung thư khác nhau tùy thuộc vào vị trí của SNP. SNP ở vùng promoter ảnh hưởng đến sự biểu hiện gen thông qua quá trình làm thay đổi hoạt động của promoter, liên kết yếu tố phiên mã, sự methyl hóa DNA và sửa đổi histone. Các SNP ngoại lai ảnh hưởng đến khả năng nhạy cảm với ung thư bằng cách ngăn chặn quá trình phiên mã và dịch mã gen. SNP trong các vùng intron tạo ra các biến thể mới nội của phiên mã và thúc đẩy hoặc phá vỡ sự liên kết và chức năng của các RNA dài không mã hóa (lncRNA - long non-coding RNA). SNP ở vùng 5'-UTR ảnh hưởng đến quá trình dịch mã, trong khi SNP ở vùng 3'-UTR điều chỉnh sự im lặng của các gen phụ thuộc vào microRNA (miRNA). SNP ở các vùng nằm xa gen thực tế làm giảm hoặc tăng cường sự phiên mã gen thông qua các hiệu ứng cis [68].

Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu về vai trò của các SNP ở các bệnh ung thư, nhưng cơ chế hoạt động của chúng vẫn còn rất phức tạp. Ví dụ, trong khi người ta biết rõ rằng SNP ở vùng promoter ảnh hưởng đến quá trình methyl hóa và thay đổi histone, thì mối liên quan giữa cơ chế di truyền và biểu sinh vẫn chưa được giải thích rõ ràng. Hơn nữa, trong khi các bằng chứng di truyền về mối tương quan giữa đa hình ngoại lai và tính nhạy cảm của ung thư đã được nghiên cứu, nhưng kết quả sinh hóa và sinh học tế bào của các SNP vẫn chưa được biết đến. Cơ chế liên quan đến đa hình gen và tính nhạy cảm với bệnh ung thư là rất phức tạp [68]. Như vậy, đa hình/đột biến gen khá đa dạng và có vai trò khác nhau đối với từng loại bệnh, đặc biệt là bệnh ung thư.

1.3.3.1. Đặc điểm di truyền phân tử của gen A20

Nghiên cứu toàn bộ hệ gen người (GWAS – genome-wide association studies) đã chỉ ra rằng, các đa hình nucleotide đơn (SNP) của gen *A20* có mối tương

quan với khả năng nhạy cảm của các bệnh lý gây viêm và bệnh tự miễn dịch ở người [69, 70].

Trong tế bào lympho B, A20 hạn chế sự kích hoạt của các con đường tín hiệu bởi những chất cảm ứng sinh lý liên quan đến sự xâm nhập của các mầm bệnh vào cơ thể. Ở chuột già, khi A20 bị bất hoạt trong tế bào lympho B có thể gây ra hội chứng viêm với các biểu hiện tự miễn dịch như viêm mạn tính kéo dài, nồng độ IL6 tăng cao, tế bào huyết tương tăng đáng kể và sự xuất hiện của các thể tự kháng đặc hiệu. Do vậy, khi tế bào lympho B phản ứng nhanh hơn với các kích thích từ môi trường do chức năng A20 bị giảm đi cho thấy mối tương quan giữa các đột biến gen di truyền hoặc đa hình trong A20 và các bệnh tự miễn dịch khác ở người [71].

Các nghiên cứu trên chuột về biểu hiện của A20 đã bị bất hoạt trong đại thực bào và bạch cầu hạt cho thấy rằng sự biểu hiện của A20 trong các tế bào này là cần thiết để duy trì cân bằng nội môi miễn dịch bẩm sinh [58]. Các tế bào tủy thiếu A20 sẽ dẫn đến tình trạng viêm đa khớp ăn mòn và sau đó có thể tăng khả năng hủy xương góp phần làm thay đổi quá trình tạo xương. Như vậy, biểu hiện A20 trong tế bào tủy ngăn chặn các tín hiệu gây ra viêm khớp và loãng xương. Những phát hiện này cung cấp những hiểu biết về sinh lý bệnh đối với sự thiếu hụt A20 dẫn đến bệnh viêm khớp ở chuột và ở người [69]. Do chức năng chống viêm mạnh của A20 nên các SNP của gen này đều liên quan đến bệnh và có thể làm giảm khả năng biểu hiện hoặc làm giảm chức năng của A20. Ví dụ, SNP liên quan đến bệnh lupus ban đỏ hệ thống nằm trong vùng mã hóa A20 khiến cho phenylalanine thay thế cysteine ở vị trí amino acid 127 và làm giảm chức năng của protein A20 [72], rồi từ đó gây ra các biến chứng thận và huyết học. Các SNP A20 liên quan đến bệnh khác nằm ngoài vùng mã hóa cho thấy rằng chúng cũng có thể gây ra tính nhạy cảm với bệnh bằng cách giảm sự biểu hiện A20 [73, 74]. Đột biến Biallelic trong trình tự mã hóa *TNFAIP3* đã được xác định ở khoảng 18% người bị bệnh u lympho tế bào [75, 76].

Watip Boonyasrisawat và cộng sự (2007) đã nghiên cứu sự tương quan giữa đa hình gen A20 và khả năng tăng xơ vữa động mạch ở bệnh nhân đái tháo đường. Kết quả cho thấy 5 SNP được tìm thấy ở 479 bệnh nhân đái tháo đường tuýp 2 [74]. Một số nghiên cứu về A20 ở bệnh viêm khớp dạng thấp đã chứng minh mối liên quan giữa một số SNP (rs2230926, rs6920220 và rs10499194) với nguy cơ mắc

bệnh [77]. Tuy nhiên, tần suất đột biến của *A20* trong các báo cáo khác nhau là không giống nhau. SNP rs2230926 nằm ở exon 3 của *A20* gây ra sự thay thế amino acid (ở vị trí 127) từ phenylalanine thành cysteine (Phe127Cys). Amino acid này (Cys127) làm giảm sự ức chế hoạt hóa NF- κ B do mức độ biểu hiện của *A20* giảm xuống [72]. SNP rs2230926 cũng được chứng minh là có mối tương quan với khả năng gia tăng nguy cơ mắc lupus ban đỏ hệ thống và viêm khớp dạng thấp ở người Nhật Bản [78] và bệnh viêm khớp dạng thấp ở cả người Châu Á và Châu Âu [77]. Trong nghiên cứu này, ba trường hợp có kiểu gen rs2230926 TG trong 50 mẫu bệnh nhân viêm khớp dạng thấp được tìm thấy; tuy nhiên, cũng tìm thấy hai trường hợp có kiểu gen rs2230926 TG trong số 30 cá thể khỏe mạnh. Do đó, kết quả sơ bộ này cho thấy tỷ lệ thấp về kiểu gen rs2230926 TG/GG ở bệnh nhân viêm khớp dạng thấp Trung Quốc. Mặc dù bệnh nhân có kiểu gen rs2230926 TG chứng tỏ khả năng chịu đựng cao nhưng không có mối liên quan đáng kể nào giữa bệnh nhân viêm khớp dạng thấp và người khỏe mạnh, điều này tương tự như phát hiện trong nghiên cứu trước đây của về bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính tế bào T (T-ALL) [79].

Nghiên cứu trên PBMCs từ bệnh nhân viêm khớp dạng thấp cho thấy mức độ biểu hiện của *A20* với kiểu gen rs2230926 TG và rs146534657 AG cao hơn so với bệnh nhân viêm khớp dạng thấp có kiểu gen rs2230926 TT và kiểu gen rs146534657 AA. Kết luận này tương tự với kết quả đã được báo cáo đối với T-ALL trong nghiên cứu trước đây [79]. Như vậy, kiểu gen rs2230926 TG có thể liên quan đến việc duy trì mức độ biểu hiện *A20*. Năm 2015, Lihua Zhu và cộng sự xác định được thêm SNP rs146534657 ở bệnh viêm khớp dạng thấp và đột biến (14284T>A) được tìm thấy trong dịch khớp của bệnh nhân viêm khớp dạng thấp [57].

Năm 2016, Chang và cộng sự đã tìm ra được 03 đột biến ở bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy miệng và tất cả các điểm đột biến này đều nằm trên exon 7 của gen *A20* [80]. Ngoài ra, một nghiên cứu khác cũng cho thấy, ở những người trưởng thành mắc bệnh T-ALL, hầu hết các đa hình nucleotide đơn của gen *A20* xuất hiện trên exon 7 [81].

1.3.3.2. Đặc điểm di truyền phân tử của gen *CYLD*

Gen *CYLD* là gen nằm trên nhiễm sắc thể 16q12.1 mã hóa cho protein cylindromatosis (*CYLD*) gồm có 856 amino acid và trọng lượng phân tử đạt khoảng 120 kDa. Protein *CYLD* được biết đến là một enzyme DUB có chức năng loại bỏ chuỗi polyubiquitin khỏi một số protein như TRAF2, TRAF6, BCL-3, Lck, TRPA1, TRAF7 và NEMO. Thông qua quá trình loại bỏ chuỗi polyubiquitin, *CYLD* tham gia việc điều hòa con đường tín hiệu NF- κ B và JNK (c-Jun N-terminal kinase) để phản ứng lại được với các tín hiệu kích thích, từ đó thúc đẩy sự phát triển, tăng sinh và quá trình apoptosis. Protein *CYLD* có ái lực mạnh với chuỗi Ub liên kết với lysine 63. Khi *CYLD* phân cắt chuỗi ubiquitin liên kết K63 sẽ ảnh hưởng đến tương tác protein-protein và do đó có vai trò quan trọng trong truyền tín hiệu tế bào [82]. Bằng cách điều chỉnh các tín hiệu kiểm soát sự phát triển của tế bào, enzyme *CYLD* hoạt động như một chất ức chế khối u, giúp ngăn chặn các tế bào phát triển và phân chia quá nhanh hoặc theo cách không kiểm soát được.

Năm 2002, Gutierrez và cộng sự đã giải trình tự, phân tích haplotype của một gia đình bốn thế hệ người Đức và đưa ra công bố rằng các khối u khác nhau từ những thành viên trong gia đình đều liên quan đến u cylindromas và u trichoepitheliomas. Sau khi phân tích đột biến dựa trên DNA của bạch cầu, cũng như DNA và RNA của khối u đều cho thấy đột biến lệch khung trong gen *CYLD* (2253delG). Như vậy, kết quả này là một minh chứng rõ ràng rằng một đột biến đơn lẻ trong gen *CYLD* có thể dẫn đến các khối u khác biệt về kiểu hình và mô học [83]. Các đột biến trong gen này có liên quan đến hội chứng Brooke-Spiegler. Hội chứng này có một số biến thể như u cylindromatosis có tính chất gia đình và u da trichoepithelioma có tính chất gia đình. Bệnh có bản chất lành tính tuy nhiên khoảng 5-10% tổng số bệnh nhân có tình trạng bệnh tiến triển nặng hơn và trở thành ác tính.

Cho đến năm 2009, đã xác định được 51 đột biến trên gen *CYLD*. Trong đó 41% (21) là đột biến dịch khung, 35% (18) là đột biến vô nghĩa, 14% (7) đột biến sai nghĩa và 10% (5) là đột biến ở vị trí cắt nối. Theo thống kê thì 86% (44/51) đột biến được dự đoán đều khiến cho protein bị cắt ngắn và vị trí xảy ra đột biến thường ở trên exon 16 và 17, tiếp theo là ở trên exon 18 và 10 của gen *CYLD* [82].

Năm 2009, Patrick và Jorge (2009) đã thực hiện các phân tích về đột biến *CYLD* của 87 gia đình. Kết quả cho thấy, 84% (73/87) trường hợp mắc BSS; Trong số đó 88% (30/34) trường hợp mắc u cylindromatosis, và 72% (18/25) trường hợp mắc u da trichoepithelioma do đột biến *CYLD*. Tuy nhiên, tỷ lệ phát sinh đột biến *CYLD* được báo cáo trước đây đối với u da trichoepithelioma và u cylindromatosis có tính gia đình lần lượt là 100% (3/3) và 44% (4/9). Mặc dù vậy, chẩn đoán phân biệt về mặt lâm sàng và mô học của nhiều nốt sần và nốt trên mặt di truyền rất phức tạp nên có thể chẩn đoán nhầm [82].

Ngày càng có nhiều bằng chứng chứng minh rằng hội chứng BSS có liên quan đến khối u tuyến nước bọt, đặc biệt là u tuyến tế bào đáy. Trong đó, những nghiên cứu về hội chứng BSS đều cho thấy *CYLD* tham gia vào cơ chế bệnh sinh của các khối u tuyến u nước bọt. Ngoài ra, đột biến *CYLD* còn liên quan đến các khối u rắn ở đại tràng, gan, thận, cổ tử cung, tuyến tiền liệt, và phổi. Các dòng tế bào ung thư đại tràng và tế bào gan cho thấy sự điều hòa giảm hoặc mất *CYLD*. Khi thực hiện quá trình chuyển nạp *CYLD* vào ung thư biểu mô tế bào gan thì sự biểu hiện *CYLD* làm giảm hoạt động của NF- κ B. Khi gene *CYLD* bị bất hoạt sẽ gây ra bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, bệnh đa u tủy xương và khi đó sự bất hoạt *CYLD* được cho là yếu tố dự báo về khả năng sống sót ở người mắc bệnh đa u tủy xương. Cơ chế mà *CYLD* tham gia quá trình hình thành khối u thường liên quan đến con đường tín hiệu NF- κ B [82].

Patrick và Jorge (2009) nghiên cứu 6 đột biến sai nghĩa trên gen *CYLD* đã được công bố để đánh giá xem có liên quan với một kiểu hình cụ thể nào không thì kết quả cho thấy rằng phần lớn đột biến sai nghĩa đều xảy ra ở những bệnh nhân mắc u trichoepitheliomas. Cụ thể là, đột biến p.D681G xảy ra trong một gia đình có 3 thành viên bị ảnh hưởng, trong đó 11/12 khối u được phân tích là trichoepitheliomas và một người nhiễm bị xoắn khuẩn. Một đột biến khác (p.E747G) được tìm thấy ở 2 gia đình, trong đó là một gia đình gốc Thổ Nhĩ Kỳ có 13 cá thể mắc u trichoepitheliomas [82]. Tuy nhiên, chức năng của *CYLD* không chỉ là căn nguyên của u cylindromatosis và trichoepithelioma mà còn được chứng minh là có vai trò ức chế khối u trong nhiều loại ung thư ở người như u ác tính ở đại tràng, phổi và đa u tủy xương [84].

Nghiên cứu và phân tích các nốt xuất hiện ở một bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào đáy 46 tuổi cho thấy đột biến thay thế (c.1684+1 G>A) trên gen *CYLD* có trong DNA được phân lập từ khối mô và máu ngoại vi của bệnh nhân này. Đột biến (c.1684+1 G>A) xảy ra ở điểm nối exon-intron và có ảnh hưởng đến việc nối đúng. Trong một nghiên cứu khác đối với 131 bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào vảy cho thấy, mức độ biểu hiện của gen *CYLD* không bị thay đổi. Tuy nhiên, hai nghiên cứu sau đó sử dụng động vật chuyển gen đã xác định được vai trò của đột biến gen *CYLD* trong sự phát triển của bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy. Như vậy, đột biến gen *CYLD* có liên quan đến sự phát triển của các loại ung thư da khác nhau. Qua đó, để tìm ra được liệu pháp để ngăn ngừa ung thư da khác nhau thì cần phải nghiên cứu con đường truyền tín hiệu trong các quần thể tế bào đích [84].

Năm 2021, Nagy và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu và khẳng định rằng phần lớn (99%) đột biến gen *CYLD* có liên quan đến bệnh ung thư da thường được tìm thấy trên exon 16, 17 và 20 ([85]). Bên cạnh đó, quan sát cấu trúc gen *CYLD* có thể thấy rằng, exon 16 có vai trò tương tác với polyubiquitin gắn với protein đích để từ đó khiến cho trung tâm hoạt động của *CYLD* thực hiện chức năng phân cắt liên kết polyubiquitin và protein. Như vậy, exon 16 đóng vai trò quan trọng trong hoạt động của gen *CYLD* ([86]).

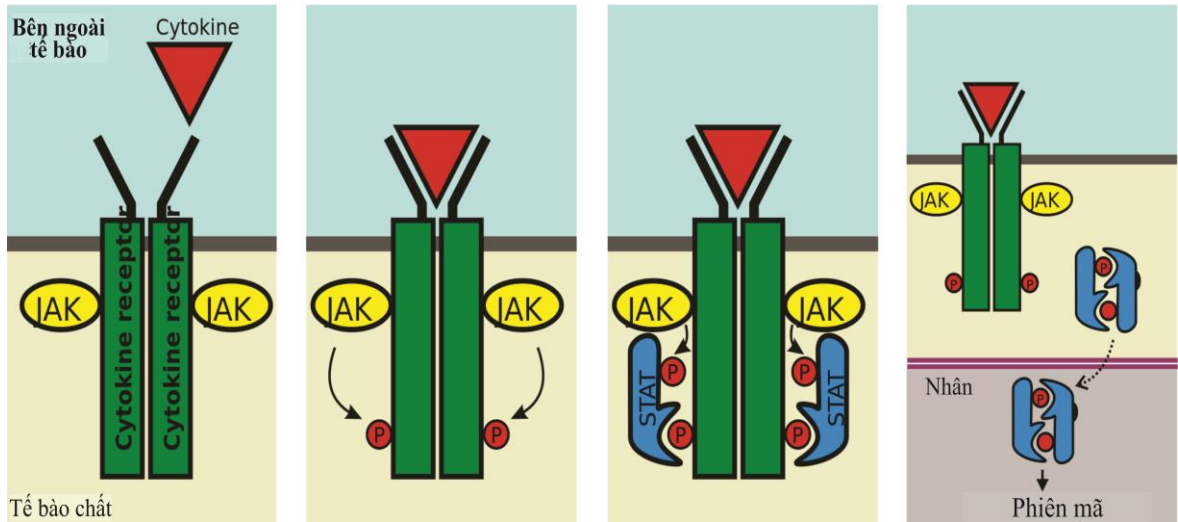
1.4. Tín hiệu STAT

Bệnh AML là một bệnh bạch cầu ác tính được đặc trưng bởi sự tăng sinh không kiểm soát được của các tế bào tạo máu thuộc dòng tủy. Phân tích các mẫu AML ở người và các mô động vật mắc bệnh bạch cầu đã chứng minh rằng những đặc điểm này có được là do sự thay đổi trong con đường dẫn truyền tín hiệu hoặc là làm gián đoạn các quá trình biệt hóa tế bào trong cơ chế bệnh sinh của AML. Nhiều nghiên cứu cho thấy, bệnh AML xảy ra một phần là do đột biến di truyền của thụ thể FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) trên các tế bào tiền thân dòng tủy và dòng lympho [87]. Khi thụ thể FLT3 đột biến sẽ kích hoạt các con đường tín hiệu JAK/STAT liên quan đến sự hình thành khối u và duy trì sự phát triển của tế bào ung thư [88].

Trong khi đó, bệnh CML lại đặc trưng bởi sự phát triển không kiểm soát của các tế bào dòng tủy ở cả tủy xương và máu ngoại vi. Bệnh CML xảy ra chủ yếu là do sự chuyển vị của các vùng gen BCR và ABL, dẫn đến sự dung hợp gen BCR-ABL, từ đó tạo nên nhiễm sắc thể Philadelphia [89]. Biểu hiện quá mức của protein dung hợp BCR-ABL dẫn đến sự hoạt hóa không bình thường của Janus kinase (JAK), đây là bộ chuyển đổi tín hiệu và là chất kích hoạt con đường truyền tín hiệu phiên mã (STAT). Điều này sẽ dẫn đến sự tăng sinh không kiểm soát và khả năng ức chế quá trình apoptosis của các tế bào CML [90].

STAT là họ các yếu tố phiên mã nội bào làm trung gian điều hòa sự biểu hiện của các gen liên quan đến sự tồn tại, tăng sinh, biệt hóa, phát triển của tế bào, sự chết theo chương trình (apoptosis), đáp ứng miễn dịch và một số chức năng sinh học thiết yếu khác. Các nhân tố này được kích hoạt chủ yếu khi JAK liên kết với thụ thể màng. Sự mất kiểm soát trong hoạt động của các nhân tố này ở các khối u nguyên phát sẽ làm tăng cường khả năng phát triển của khối u và đồng thời ức chế sự hoạt động của hệ thống miễn dịch.

Nghiên cứu knockout gen *STAT* cho thấy vai trò quan trọng của protein STAT trong hệ thống miễn dịch, cũng như trong việc duy trì khả năng dung nạp miễn dịch ngoại vi và giám sát khối u [91]. Con đường tín hiệu JAK/STAT bắt đầu khi một phối tử (interferon hoặc interleukin) liên kết với thụ thể trên bề mặt tế bào, rồi làm cho các thụ thể dimer hóa, từ đó khiến cho JAK có thể liên kết với thụ thể. Sau đó, các phân tử JAK sẽ phosphoryl hóa lẫn nhau tại vị trí tyrosine thuộc vùng hoạt hóa nhằm làm tăng khả năng hoạt động các kinase này. Các phân tử JAK sau khi được kích hoạt sẽ phosphoryl hóa tyrosine trên thụ thể để tạo ra các vị trí liên kết cho các protein có chứa miền SH2. Sau đó, các STAT liên kết với tyrosine được phosphoryl hóa trên bề mặt thụ thể tế bào thông qua miền SH2 của chúng, rồi phân ly ra khỏi thụ thể và liên kết với một phân tử STAT khác tạo thành một dimer (Hình 1.5). Dimer này sau đó tiếp tục đi vào nhân và liên kết với DNA để tạo ra sự phiên mã của gen mục tiêu [92].



Hình 1.5. Các bước chính trong con đường tín hiệu JAK/STAT [92]

Chú thích: Hệ thống tín hiệu JAK/STAT bao gồm: (1) Thụ thể (màu xanh lá cây), (2) Janus kinase (JAK) (màu vàng), (3) Bộ chuyển đổi tín hiệu và kích hoạt phiên mã (STAT) (màu xanh). Các vòng tròn màu đỏ là nhóm phosphate. Khi cytokine liên kết với thụ thể, JAK hoạt động gắn nhóm phosphate vào thụ thể. Điều này khiến cho các protein STAT được phosphoryl hóa và liên kết với nhau, tạo thành dimer. Các dimer này sau đó sẽ di chuyển vào nhân và liên kết với DNA, từ đó khiến cho quá trình phiên mã của gen xảy ra.

Họ STAT ở động vật có vú bao gồm STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B và STAT6 [93]. Hai gen *STAT5* có tỷ lệ tương đồng trên 90% nhưng được mã hóa bởi các gen riêng biệt. Mỗi thành viên của họ STAT đều có những chức năng riêng biệt trong việc truyền tín hiệu và đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa các phản ứng của tế bào đối với các cytokine khác nhau.

Nghiên cứu mối liên hệ giữa các protein STAT và ung thư biểu mô của người đã cho thấy khi STAT3 được kích hoạt sẽ thúc đẩy quá trình hình thành bệnh ung thư đầu cổ, các tế bào đa u tủy xương, một số khối u rắn, bệnh bạch cầu và u lympho. IL-6 tham gia vào quá trình kích hoạt STAT3 trong u tủy và các dòng tế bào ác tính tuyến tiền liệt; còn TGF- α (transforming growth factor- α) kích hoạt STAT3 trong một số dòng tế bào ung thư đầu và cổ [94].

Bên cạnh đó, kích hoạt STAT5 cũng là nguyên nhân phổ biến dẫn tới sự hình thành và phát triển của khối u. Thực tế, protein STAT5 không thể thiếu trong việc điều chỉnh phản ứng của tế bào tạo máu với các cytokine chuyên biệt. Một số nghiên cứu đã chứng minh được rằng STAT5 được kích hoạt có ý nghĩa quan trọng đối với sự tiến triển của bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính và bệnh tăng sinh tủy gây ra bởi TEL-JAK2. Dung hợp gen *BCR-ABL* được tạo ra bởi sự chuyển đoạn giữa

các nhiễm sắc thể khi bị kích hoạt sẽ kích thích STAT5 hoạt động ở bệnh CML và AML. Tuy nhiên, không phải tất cả các protein STAT đều thúc đẩy sự phát triển của ung thư [94].

Nghiên cứu trên chuột thiếu STAT1 cho thấy khối u phát triển mạnh hơn so với nhóm đối chứng. Khi STAT1 được kích hoạt bởi interferon loại I và loại II có thể ức chế quá trình apoptosis và ngăn chặn sự tăng sinh. Bên cạnh đó, chuột thiếu STAT1 nhạy cảm hơn với các bệnh do virus gây ra và không phản ứng lại được với tác động của virus, thậm chí là bị tử vong trong khi lượng virus này thường không ảnh hưởng đến cơ thể bình thường [94].

Như vậy, có thể thấy rằng STAT3 và STAT5 là hai protein quan trọng liên quan đến sự phát triển của bệnh ung thư, trong khi STAT1 đóng vai trò ngược lại đó là ngăn chặn sự phát triển của khối u. Kích hoạt STAT3/5 liên tục sẽ thúc đẩy quá trình viêm mạn tính, làm tăng tính nhạy cảm của các tế bào khỏe mạnh với các chất sinh ung thư. Ngoài ra, protein STAT còn được coi là chất trung gian quan trọng cho khả năng miễn dịch chống lại các tác nhân gây bệnh và trong sự phát triển của quá trình rối loạn viêm. Đầu tiên, khi gặp các tác nhân lạ, con đường tín hiệu INF/STAT1 sẽ gây viêm theo một số cách, như tăng sản xuất chemokine, kiểm soát sự biệt hóa và quá trình chết của các tế bào tạo máu và đồng thời bắt đầu hình thành các dạng oxy phản ứng và nitric oxide [95].

STAT2, STAT4 và STAT6 được kích hoạt dưới tác động của IL-12, IL-4/IL-13 và IFN- α [95]. Với sự kích hoạt bởi các thụ thể IFN loại I và loại III, STAT2 đóng vai trò trung tâm trong các phản ứng chống lại virus. Trong khi STAT2 làm trung gian truyền tín hiệu của IFN loại I thì STAT1 tham gia truyền tín hiệu bởi cả IFN loại I và II trong các phản ứng viêm sau khi cơ thể bị nhiễm virus và bảo vệ vật chủ khỏi sự tấn công của vi khuẩn và ký sinh trùng; Bên cạnh đó, STAT2 còn góp phần quan trọng trong hệ thống miễn dịch bẩm sinh. Mặc dù STAT2 chưa được nghiên cứu rộng rãi như một số STAT khác, nhưng không thể phủ nhận vai trò của chúng trong mối tương tác giữa vật chủ và mầm bệnh. STAT4 và STAT6 đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh hệ thống miễn dịch thích ứng. Hai protein này được kích hoạt để đáp ứng lại sự kích thích của IL-12 (STAT4) và IL-4 hoặc IL-13 (STAT6) [96]. Sau khi được kích hoạt bởi STAT6, tế bào Th tham gia tích cực vào

việc điều hòa tình trạng viêm trong quá trình bị dị ứng, còn khi được kích hoạt bởi STAT4 thì tế bào Th-1 lại tham gia vào các quá trình điều hòa rối loạn tự miễn dịch và viêm.

Ngoài ra, các biểu hiện bất thường của *STAT1* [97], *STAT3* và *STAT5* [98] cũng đã được phát hiện ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy.

1.5. Biểu hiện của cytokine IL-6 và TNF- α ở bệnh bạch cầu dòng tủy

Trong tủy xương, các tế bào gốc tạo máu thường được duy trì ở trạng thái cân bằng để đảm bảo quá trình tạo máu luôn ổn định và tăng cường các tế bào tạo máu khi bị nhiễm trùng, viêm cấp tính và mạn tính hay chảy máu [99]. Trong quá trình nhiễm trùng, một loạt các cytokine được tiết ra để kích hoạt hệ thống miễn dịch. Ở những bệnh nhân mắc bệnh tiền bạch cầu và bệnh bạch cầu, sự điều hòa chặt chẽ của các cytokine bị suy giảm và thay vào đó là sự tiết cytokine bất thường [100]. Các nghiên cứu về nồng độ cytokine tiền viêm và kháng viêm trong huyết thanh cho thấy, các cytokine được điều chỉnh tăng trong tất cả hoặc trong các nhóm bệnh nhân bạch cầu (AML và CML) so với nhóm người khỏe mạnh.

IL-6 là một trong những cytokine tiền viêm chính chịu trách nhiệm kích hoạt phản ứng miễn dịch. IL-6 thúc đẩy quá trình viêm thông qua việc kích hoạt sự tăng sinh tế bào lympho, biệt hóa tế bào lympho B, khả năng tích tụ tế bào bạch cầu và gây ra quá trình tổng hợp protein giai đoạn cấp tính ở gan. IL-6 được sản xuất bởi nhiều loại tế bào miễn dịch như bạch cầu đơn nhân, tế bào trung biểu mô, nguyên bào sợi, tế bào mỡ và tế bào lympho khi có sự kích thích sinh lý của TNF- α , IL-1 β , nội độc tố và stress oxy hóa [101]. IL-6 tác động lên các tế bào đích thông qua thụ thể IL-6R và khi đó IL-6R đóng vai trò kết nối con đường truyền tín hiệu quan trọng liên quan đến quá trình chuyển đổi giữa giai đoạn đầu và giai đoạn cuối của các phản ứng viêm [102].

Sự biểu hiện của IL-6 liên quan đến các bệnh viêm nhiễm và tự miễn cũng như rối loạn tạo máu và bệnh bạch cầu. Ở những bệnh nhân AML, nồng độ IL-6 trong huyết thanh và tủy xương tăng lên. Nhiều nghiên cứu cho thấy, nồng độ IL-6 liên quan đến tiên lượng xấu, sự tiến triển của bệnh cũng như khả năng kháng hóa

trị. Các bệnh nhân AML có nồng độ IL-6 kéo dài thường có tỉ lệ sống sót thấp hơn so với bệnh nhân giảm IL-6 [101].

TNF- α là một cytokine tiền viêm ban đầu có liên quan đến việc tiêu diệt các tế bào khối u và đóng vai trò then chốt trong việc điều chỉnh các chất trung gian gây viêm và chống viêm. Nhiều báo cáo cho thấy, TNF- α được coi là tác nhân điều chỉnh tổng thể của chuỗi cytokine để giúp bảo vệ vật chủ và nhanh chóng chống lại sự nhiễm trùng, tuy nhiên nếu vượt quá mức sẽ gây tử vong [101]. TNF- α được tiết ra chủ yếu bởi đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, tế bào lympho T, tế bào lympho B và một số tế bào khác để đáp ứng với các tổn thương tế bào do nhiễm trùng hoặc biến đổi ác tính [103]. Tuy nhiên, gần đây cytokine này được chứng minh là được sản xuất bởi nhiều loại tế bào khối u (tế bào CML) [104].

TNF- α có thể kích hoạt tế bào đích bằng cách tương tác với 1 trong 2 thụ thể TNFR1/TNFR2 và được điều hòa khác nhau tùy thuộc vào từng loại tế bào trong các mô khỏe mạnh và bệnh tật. Rối loạn điều hòa TNF- α dẫn đến sự hình thành các bệnh như viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm ruột, bệnh Alzheimer, và một số bệnh ung thư. Theo đó sự biểu hiện của TNF- α được điều chỉnh trong các phản ứng miễn dịch đối với bệnh nhiễm trùng hoặc trong các bệnh tự miễn. Hiện nay có nhiều loại thuốc tác động vào TNF- α và các thụ thể của nó như infliximab, certolizumab và etanercept nhằm điều trị các bệnh viêm nhiễm như viêm khớp dạng thấp [105].

Bệnh AML có liên quan chặt chẽ đến hoạt động của cytokine đối với quá trình tăng sinh, apoptosis và sự biệt hóa các tế bào bạch cầu [106]. Bệnh AML thường tiết ra nhiều loại cytokine với nồng độ cao hơn so với người khỏe mạnh. Việc sản xuất các cytokine như TNF- α , IL-6 được điều khiển trong quá trình tạo bạch cầu, kích thích sự phát triển của các nguyên tủy bào. Mức độ biểu hiện TNF- α cao được duy trì thông qua việc kích hoạt NF- κ B trong tế bào AML và từ đó dẫn đến sự tăng sinh liên tục [107]. Ngoài ra, nghiên cứu về bệnh CML cũng cho thấy, nồng độ IL-6 và TNF- α tăng cao khi so sánh với nhóm chứng [104, 105].

1.6. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi

1.6.1. Giới thiệu chung về tế bào đơn nhân máu ngoại vi

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC – Peripheral blood mononuclear cell) là những tế bào máu ngoại vi có một nhân tròn, đóng vai trò quan trọng trong hệ thống miễn dịch bẩm sinh và thích ứng, bảo vệ cơ thể khi bị nhiễm virus, vi khuẩn và ký sinh trùng, đồng thời PBMC còn có thể tiêu diệt các tế bào khối u và các tác nhân lạ khác. PBMC có nguồn gốc từ tế bào gốc tạo máu ở trong tủy xương. Các tế bào gốc tạo máu này tạo ra tất cả các tế bào máu của hệ thống miễn dịch thông qua quá trình tạo máu. Trong quá trình tạo máu, các tế bào dòng tủy (bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, bạch cầu hạt, megakaryocyte, tế bào đuôi gai, hồng cầu) và tế bào dòng lympho (tế bào lympho T, tế bào lympho B, tế bào NK – Natural killer) được tạo ra. Tuy nhiên, PBMC chỉ bao gồm tế bào lympho như tế bào lympho T, tế bào lympho B và tế bào NK, tế bào đuôi gai và bạch cầu đơn nhân.

1.6.2. Đặc điểm của tế bào đơn nhân máu ngoại vi

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi là hỗn hợp các tế bào miễn dịch, tuy nhiên ở mỗi cá thể thì tần suất xuất hiện của các tế bào khác nhau là khác nhau. Ở người, tế bào lympho chiếm phần lớn trong PBMC, tiếp theo là bạch cầu đơn nhân và tế bào đuôi gai chỉ chiếm một phần nhỏ. Tế bào lympho chiếm 70-90% trong tổng số tế bào PBMC và đóng vai trò thiết yếu trong các phản ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và dịch thể.

Tế bào lympho chủ yếu liên quan đến sự hoạt hóa của các tế bào lympho T và B. Trong quần thể tế bào lympho thì tế bào T CD3⁺ góp phần đáng kể vào sự hoạt động của hệ thống miễn dịch (45-70%). Hầu hết các tế bào lympho T tồn tại dưới dạng tế bào lympho T nghỉ ngơi hoặc tế bào lympho T non chưa được kích hoạt bởi kháng nguyên, còn một phần ít tế bào lympho T tồn tại ở dạng tế bào lympho T nhớ. Sau đó, khi được kích hoạt tế bào lympho T sẽ kích thích các phản ứng miễn dịch qua trung gian tế bào nhắm vào các kháng nguyên xuất hiện bên trong tế bào. Ngoài ra, sau khi được kích hoạt, tế bào lympho T CD3⁺ phát triển thành tế bào lympho T CD4⁺ hoặc CD8⁺. Tế bào lympho T CD4⁺ còn được gọi là tế bào lympho T trợ giúp (Th – T helper) vì chức năng chính của chúng là kích hoạt

các phản ứng miễn dịch. Tế bào Th sử dụng các thụ thể để liên kết với các tế bào trình diện kháng nguyên (APC – Antigen-presenting cell) và sau đó giải phóng các tín hiệu thông báo sự xâm nhập của các tế bào lạ, đồng thời đánh dấu chúng để có thể dễ dàng loại bỏ. Tế bào Th chiếm 25-60% tổng số tế bào lympho T CD3⁺ được kích hoạt. Trong khi đó, tế bào lympho T CD8⁺ hay còn gọi là tế bào lympho T gây độc (T killer hay T cytotoxic) chịu trách nhiệm sản xuất kháng thể có khả năng tiêu diệt các tác nhân lạ xâm nhập vào cơ thể. Khoảng 5-30% tế bào lympho T CD3⁺ được kích hoạt để trở thành tế bào lympho T killer. Tương tự như tế bào lympho T CD3⁺, tế bào CD19⁺ B tồn tại dưới dạng nguyên tủy bào hoặc tế bào nhớ. Tế bào này chỉ chiếm 5-15% tổng số tế bào lympho. Sau khi được kích hoạt, các tế bào lympho B biệt hóa thành các tế bào plasma có khả năng tiết ra kháng thể nhắm tới mục tiêu cụ thể hoặc các kháng nguyên tự do trong máu [108].

Tế bào NK chỉ chiếm 5-10% tổng số tế bào lympho trong cơ thể nhưng chúng lại có thể hoạt động mà không cần kháng nguyên và bảo vệ cơ thể chống lại sự hoạt động của khối u [108]; Bạch cầu đơn nhân chiếm 10-30% tổng số tế bào PBMC và được tìm thấy trong cả máu và mô ngoại vi. Khi được kích thích, bạch cầu đơn nhân sẽ trưởng thành và biệt hóa thành tế bào đuôi gai hoặc đại thực bào trung gian cho cả phản ứng miễn dịch bẩm sinh và thích ứng bằng cách hoạt động như các tế bào thực bào hoặc trình diện kháng nguyên [108]; Thành phần cuối cùng trong PBMC là tế bào đuôi gai. Tế bào này chỉ chiếm 1-2% nhưng có thể tham gia hoạt động trong cả hệ thống miễn dịch bẩm sinh và thích ứng. Tế bào đuôi gai có thể trình diện các mảnh kháng nguyên vào các tế bào của hệ thống miễn dịch thích ứng và kích hoạt sự hoạt động của tế bào lympho T và B [108].

1.6.3. Chức năng và ứng dụng của tế bào đơn nhân máu ngoại vi

Tế bào PBMC là loại tế bào chính trong hệ miễn dịch của cơ thể con người. Tế bào lympho T trong PBMC phần lớn tồn tại dưới dạng tế bào lympho T chưa trưởng thành hoặc T nhớ. Các tế bào lympho T non là những tế bào chưa từng tiếp xúc với kháng nguyên và thường được đặc trưng bởi sự vắng mặt của một số dấu ấn sinh học như CD25, CD44 hoặc CD69. Tuy nhiên, khi những tế bào lympho T chưa trưởng thành này được kích hoạt bởi kháng nguyên sẽ dẫn đến sự hoạt động của tế bào, sau đó sẽ tham gia vào quá trình biệt hóa và phát triển các chức năng đặc

trung. Các tế bào lympho T này sau đó sẽ được biệt hóa thành tế bào lympho T nhớ và khi gặp kháng nguyên một lần nữa chúng sẽ tạo ra phản ứng miễn dịch nhanh hơn và mạnh hơn.

Trong máu, tế bào lympho B cũng tồn tại dưới dạng nguyên tủy bào hoặc tế bào nhớ. Tuy nhiên, khi gặp kháng nguyên, tế bào lympho B sẽ được hoạt hóa và biệt hóa thành tế bào huyết tương thực hiện chức năng sản xuất kháng thể. Trong máu ngoại vi, tần số các tế bào lympho có tính đặc hiệu cho một kháng nguyên đơn lẻ là rất thấp. Do vậy, các chất hoạt hóa đa dòng như lectin phân bào cần được sử dụng để kích hoạt một tỷ lệ lớn các tế bào lympho có tính đặc hiệu với kháng nguyên của chúng [109]. Sự hoạt hóa đa dòng của tế bào lympho T có thể đạt được khi kháng thể gắn đặc hiệu với CD3 đơn lẻ hoặc là kết hợp với CD28; Còn lipopolysaccharide (LPS) gây ra sự tăng sinh tế bào lympho B và kích hoạt bạch cầu đơn nhân. Như vậy, thông qua việc xác định sự tăng sinh của tế bào lympho, sự bài tiết cytokine hoặc những thay đổi trong biểu hiện gen có thể đánh giá những ảnh hưởng của hoạt hóa đa dòng tới chức năng miễn dịch của PBMC [110].

Mỗi quần thể tế bào PBMC đóng vai trò không thể thiếu trong việc xây dựng và duy trì hiệu quả phản ứng miễn dịch. Vì lý do này mà các nhà khoa học thường sử dụng PBMC để đánh giá khả năng hoạt động của các tế bào miễn dịch khi tiếp xúc với các mầm bệnh, cũng như xác định sự tiến triển của bệnh trong cơ thể người và các yếu tố ảnh hưởng đến hệ thống miễn dịch.

Tế bào PBMC được sử dụng để nghiên cứu về các bệnh truyền nhiễm, phát triển vaccine, miễn dịch học, khối u ác tính huyết học và liệu pháp cấy ghép. Về cơ bản, các nghiên cứu PBMC trong điều kiện *in vitro* cung cấp những thông tin liên quan đến chức năng tế bào, nhận dạng dấu ấn sinh học và mô hình bệnh; Tuy nhiên, cũng có nhiều nghiên cứu được thực hiện trong điều kiện *in vivo* thông qua việc sử dụng chuột có mang gen bệnh lý của người. Việc sử dụng PBMC của người để thúc đẩy sự phục hồi của những con chuột bị suy giảm miễn dịch được coi là cơ sở để nghiên cứu hệ thống miễn dịch của người và phản ứng của các tế bào này đối với mầm bệnh, chất độc hoặc ung thư trong mô hình *in vivo* [111].

Hiện nay, các nghiên cứu sử dụng PBMC trong y học người ngày càng phát triển. Việc tạo ra các tế bào gốc đa năng cảm ứng từ một phần của PBMC ở người hiến tặng có ý nghĩa lớn trong các mô hình bệnh, sàng lọc độc tính của thuốc, phát hiện ra thuốc điều trị và liệu pháp thay thế tế bào [112]. Và gần đây nhất thì việc sử dụng công nghệ chỉnh sửa hệ gen như CRISPR/Cas9 có thể làm biến đổi các tế bào miễn dịch (tế bào lympho T trong PBMC) thành tế bào CAR-T để điều trị ung thư ở người mà không cần tìm người hiến tặng [113]. Như vậy, PBMC là một yếu tố quan trọng và là công cụ mạnh mẽ để nghiên cứu lâm sàng liên quan đến sức khỏe và các loại bệnh của con người. Thông qua quá trình xử lý và phân tích PBMC thành công và hiệu quả, các nhà nghiên cứu có thể kiểm tra các phản ứng miễn dịch, hiểu sâu hơn về hệ thống miễn dịch và áp dụng những phát hiện của họ vào việc điều trị bệnh cho con người.

1.6.4. Đặc điểm của M-CSF biệt hóa tế bào PBMC

Yếu tố kích thích thuộc địa đại thực bào (M-CSF – Macrophage colony-stimulating factor) là một cytokine được tạo ra bởi nhiều loại tế bào, có vai trò kích thích sự tồn tại, tăng sinh và biệt hóa của các tế bào gốc tạo máu thành đại thực bào và một số các tế bào liên quan khác. Khi đó, M-CSF ảnh hưởng đến đại thực bào và bạch cầu đơn nhân theo một số cách như kích thích hoạt động thực bào cũng như tăng độc tính cho các tế bào khối u. M-CSF hoạt động thông qua thụ thể yếu tố kích thích thuộc địa 1 (CSF1R) để điều chỉnh các quá trình liên quan đến miễn dịch học, chuyển hóa xương, khả năng sinh sản và mang thai.

Trong trường hợp bị kích thích nguyên bào xương sẽ tiết ra M-CSF gây tác động nội tiết lên tế bào hủy xương [114]. Cụ thể là M-CSF liên kết với các thụ thể có trên tế bào hủy xương để tạo ra sự biệt hóa và cuối cùng khiến cho nồng độ canxi trong huyết tương tăng cao do sự phân hủy xương. Bên cạnh đó, mức độ biểu hiện CSF-1 khá cao trong biểu mô nội mạc tử cung của thai phụ sẽ làm tăng cường sự biểu hiện của thụ thể CSF1R trong nguyên bào nuôi nhau thai. Điều này là cần thiết cho sự phát triển bình thường của phôi thai và sự phát triển của nhau thai. Chính vì vậy mà các nghiên cứu sau đó đã chứng minh được rằng CSF-1 và thụ thể CSF1R có liên quan đến tuyến vú trong quá trình phát triển bình thường và tăng trưởng khối u [115].

M-CSF cũng được xác định là tham gia vào sự phát triển của bệnh xơ vữa động mạch; hay đóng vai trò quan trọng trong bệnh lý thận như chấn thương thận cấp tính và suy thận mạn tính [116]. Sự hoạt hóa mạn tính của bạch cầu đơn nhân có thể dẫn đến nhiều bất thường về chuyển hóa, huyết học và miễn dịch ở bệnh nhân suy thận mạn tính. Trong trường hợp thận bị chấn thương cấp tính thì M-CSF có liên quan đến việc thúc đẩy quá trình sửa chữa sau chấn thương [117] nhưng trong một số trường hợp khác chúng cũng có thể tham gia thúc đẩy sự gia tăng kiểu hình đại thực bào tiền viêm [118].

M-CSF và IL-34 có chức năng trong việc duy trì nội mô của các quần thể đại thực bào cư trú ở mô thông qua việc thúc đẩy khả năng tồn tại và tăng sinh [119]. Mặc dù, M-CSF được tìm thấy trong huyết thanh của những người khỏe mạnh và có thể được tạo ra bởi các tế bào biểu mô, nguyên bào sợi, tế bào nội mô và chính đại thực bào, nhưng biểu hiện của chúng có thể tăng lên do tình trạng viêm ở đại thực bào cũng như tế bào lympho T và B [120].

Các nghiên cứu sử dụng các động vật thiếu hụt chức năng phối tử/thụ thể của MCSF vẫn còn hạn chế nhưng các nghiên cứu được thực hiện đến nay cũng đã cung cấp những thông tin chi tiết về việc M-CSF tham gia điều chỉnh mức độ của phản ứng viêm trong nhiều mô hình bệnh cụ thể ở mô như viêm cơ não tự miễn, xơ vữa động mạch, viêm khớp, viêm thận, viêm phổi và ung thư. Tuy nhiên, trong hầu hết các trường hợp, cơ chế hoạt động của M-CSF vẫn chưa thực sự được làm sáng tỏ, nhưng chắc chắn rằng M-CSF thúc đẩy sự tồn tại và tăng sinh của đại thực bào, đồng thời số lượng đại thực bào giảm được quan sát thấy khi có sự đối kháng với dịch nào tùy và từ đó dẫn đến làm giảm cường độ và thời gian bệnh [121].

Thực tế, đã có nhiều nghiên cứu thực hiện trên chuột để tìm ra được vai trò của M-CSF, tuy nhiên M-CSF của người có thể hoạt động trên tế bào chuột nhưng M-CSF của chuột lại không thể hoạt động trên các tế bào người [122].

1.6.5. Hoạt động sinh học của tế bào bạch cầu

1.6.5.1. Giới thiệu chung

Sự chết theo chương trình (apoptosis) là một quá trình mà các tế bào chết theo chu trình đã được định sẵn. Trong quá trình phát triển và lão hóa của các sinh vật đa bào, apoptosis thường xảy ra với mục đích loại bỏ các tế bào không cần thiết

hoặc các tế bào có hại để duy trì sự ổn định về số lượng các tế bào trong mô. Bên cạnh đó, apoptosis cũng được coi như là một cơ chế bảo vệ trong các phản ứng miễn dịch hoặc khi các tế bào bị tổn thương bởi bệnh tật, bị tấn công bởi các tác nhân có hại. Mặc dù có nhiều loại kích thích có thể gây ra quá trình chết theo chương trình apoptosis nhưng không phải tất cả các tế bào đều chết khi phản ứng với cùng một kích thích. Chiếu xạ hoặc các loại thuốc được sử dụng cho hóa trị liệu ung thư dẫn đến tổn thương DNA trong một số tế bào, có thể dẫn đến sự chết theo chương trình thông qua con đường phụ thuộc *p53*. Một số hormone như corticosteroid có thể dẫn đến quá trình apoptosis ở một số tế bào (tế bào tuyến giáp) trong khi đó các tế bào khác không bị ảnh hưởng hoặc thậm chí bị kích thích. Ngoài ra, sự bất thường trong quá trình apoptosis cũng có thể gây ra một số bệnh ung thư, hội chứng tăng sinh bạch huyết tự miễn, AIDS, thiếu máu cục bộ và các bệnh thoái hóa thần kinh như bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer, bệnh Huntington và bệnh xơ cứng teo cơ một bên [123].

Do đó, xác định mức độ biểu hiện của các chỉ thị sinh học đặc trưng như CFSE, Dextran và Annexin V được coi là cơ sở phân tích cơ chế hoạt động của tế bào bạch cầu.

1.6.5.2. Một số thuốc nhuộm huỳnh quang đặc trưng cho quá trình tăng sinh, thực bào và apoptosis

Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) là một loại thuốc nhuộm tế bào huỳnh quang. CFSE được sử dụng rộng rãi trong việc theo dõi sự phân chia tế bào lympho. Cụ thể là, CFSE thấm qua màng tế bào và đi vào bên trong tế bào đánh dấu các phân tử nội bào bằng thuốc nhuộm huỳnh quang, carboxyfluorescein. Khi một tế bào được đánh dấu CFSE phân chia thì mức độ carboxyfluorescein ở các tế bào con giảm đi một nửa. Như vậy, mỗi lần phân chia tế bào có thể được đánh giá bằng cách đo mức độ giảm huỳnh quang của tế bào tương ứng thông qua phương pháp đo tế bào dòng chảy. CFSE có khả năng đánh dấu tế bào với cường độ huỳnh quang cao, phương sai thấp, mà hầu như không gây độc cho tế bào, chính vì vậy mà CFSE được coi là thuốc nhuộm lý tưởng để xác định sự tăng sinh của tế bào [124].

Dextran là một polymer glucose có trọng lượng phân tử cao và có đặc tính liên kết với nước. Dextran không thể xâm nhập và tế bào sống, nhưng khi màng

sinh chất ở trạng thái dễ thấm thì dextran có thể xâm nhập vào và tập trung ở bên trong tế bào. Do đó, dextran khi kết hợp với isothiocyanate fluorescein (FITC-Dextran) có thể được sử dụng để xác định các tế bào chết và bị hoại tử bằng phương pháp đo dòng chảy tế bào. Như vậy, với khả năng có thể đánh dấu các tế bào bị tổn thương, FITC-Dextran được sử dụng trong các nghiên cứu về giai đoạn sớm và giai đoạn cuối cùng của quá trình apoptosis [125].

Các dạng oxy phản ứng (ROS-reactive oxygen species) bao gồm các gốc tự do như anion superoxide (O_2^-), singlet oxy (O_2), gốc hydroxyl (OH), các peroxide khác nhau (ROOR'), hydroperoxide (ROOH) và hydroperoxide (H_2O_2), được tạo ra liên tục trong quá trình hô hấp hiếu khí và đóng vai trò quan trọng trong hệ thống miễn dịch. Trong quá trình thực bào, đại thực bào và bạch cầu trung tính có khả năng tạo ra số lượng lớn RNI (reactive nitrogen intermediate – chất phản ứng nitơ trung gian) và ROS. Các gốc tự do rất quan trọng đối với các phản ứng miễn dịch chống vi khuẩn và tiêu diệt các khối u. Bình thường, bạch cầu trung tính chỉ tồn tại trong khoảng 24 giờ và ROS rất quan trọng đối với sự tồn tại của bạch cầu trung tính. Thông qua việc sản xuất ROS chống lại các mầm bệnh xâm nhập vào cơ thể, các bạch cầu trung tính sẽ được kích hoạt và trải qua quá trình chết tự nhiên. Ở mỗi tế bào đều duy trì hệ thống bảo vệ hoạt động chống oxy hóa mạnh mẽ nhằm ngăn chặn sự hình thành quá mức ROS. Do đó, khi ROS được tạo ra quá nhiều sẽ ảnh hưởng tới khả năng chống oxy hóa tự nhiên của tế bào và từ đó sẽ gây ra một số bệnh như ung thư, xơ vữa động mạch, các bệnh thoái hóa thần kinh và bệnh đái tháo đường. Như vậy, để đánh giá mức độ ảnh hưởng do quá trình oxy hóa gây ra thì cần phải xác định chính xác các dạng ROS trong tế bào thông qua các kỹ thuật có sử dụng các đầu dò huỳnh quang và phát quang hóa học có thể thâm thấu qua màng tế bào. Trong đó, 2'-7' Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) là một trong những kỹ thuật được sử dụng rộng rãi nhất để đo trực tiếp trạng thái oxy hóa khử của tế bào. Kỹ thuật này rất dễ sử dụng, có độ nhạy cao với những thay đổi trong trạng thái oxy hóa khử của tế bào, đặc biệt là không tốn kém và có thể được sử dụng để theo dõi những thay đổi trong ROS theo thời gian. Cụ thể là, DCFH-DA là một tiền chất không huỳnh quang có thể thâm qua tế bào và sau đó tích lũy bên trong tế bào. Khi quá trình oxy hóa diễn ra sẽ tạo ra sản phẩm có độ huỳnh quang

cao DCF. Trạng thái oxy hóa khử của mẫu có thể được xác định bằng cách phát hiện sự gia tăng huỳnh quang thông qua phương pháp đo dòng chảy tế bào [126].

Annexin V hay Annexin A5 là thành viên thuộc họ annexin gồm các protein nội bào liên kết với phosphatidylserine (PS). Bình thường, PS được tìm thấy bên trong của màng sinh chất ở các tế bào khỏe mạnh, nhưng trong giai đoạn đầu của quá trình apoptosis, PS sẽ di chuyển từ bên trong ra mặt bên ngoài của màng sinh chất. Annexin V khi gắn với huỳnh quang FITC được sử dụng để phát hiện sự xuất hiện của apoptosis thông qua phương pháp đo dòng chảy tế bào. Propidium iodide (PI) là thuốc nhuộm liên kết axit nucleic, không thấm nước và được sử dụng để nhuộm hạt nhân của tế bào apoptosis ở giai đoạn giữa hoặc giai đoạn muộn và các tế bào hoại tử. Khi đó, những tế bào sẽ phát huỳnh quang màu đỏ.

1.7. Tế bào ung thư máu K562 và chất chống ung thư vincristine

** Tế bào K562*

K562 là tế bào được phân lập từ tủy xương của một bệnh nhân bạch cầu dòng tủy mạn tính 53 tuổi. Các tế bào này mang nhiễm sắc thể Philadelphia, là đặc điểm đặc trưng ở các bệnh nhân CML. Chúng thường có hình tròn, không kết dính và có các đặc điểm tương tự như hồng cầu giai đoạn đầu, bạch cầu hạt và bạch cầu đơn nhân.

Tế bào K562 có nhiều chức năng nhưng lại không biệt hóa thành các tế bào khác, mặc dù chúng được biệt hóa từ giai đoạn sớm của bạch cầu đơn nhân, bạch cầu hạt và hồng cầu bằng các cách khác nhau. Thực tế, tế bào K562 được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu miễn dịch học. Các tế bào K562 biểu hiện một phần các phân tử MHC lớp I và lớp II trên bề mặt của chúng và một số phân tử có liên quan đến miễn dịch khác như (PD-L1, CD40, CD40-L [127]). Các tế bào này dễ dàng bị tiêu diệt bởi các tế bào diệt tự nhiên trong điều kiện *in vitro* [128]. Tế bào K562 có thể được sử dụng để tạo ra các tế bào trình diện kháng nguyên tạo [127]. Ngoài ra, người ta còn phát hiện ra rằng, K562 gây ra sự hình thành khối u ở chuột Nude [129] và chuột SCID [130].

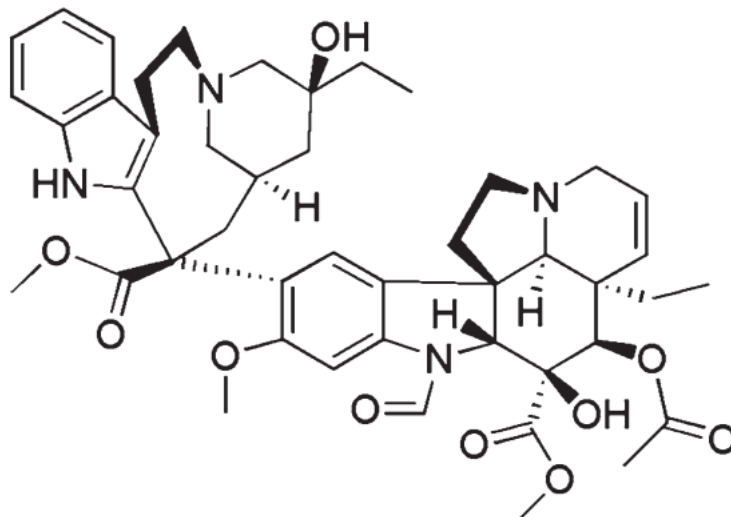
Hiện nay, thuốc Imatinib được sử dụng khá phổ biến nhằm ức chế gen BCR/ABL, từ đó khiến cho quá trình phát triển của tế bào ngừng lại và gây ra quá

trình chết theo chương trình [131]. Sirtuins và polyphyllin D cũng là phương pháp trị liệu hiệu quả nhằm ức chế sự phát triển của K562 [132, 133]. Bên cạnh đó, năm 2011, Paloma và cộng sự cũng khẳng định vincristine làm giảm đáng kể khả năng sống sót của tế bào K562 bằng cách ngăn chặn sự tiến triển của chu trình tế bào này [134].

* *Vincristine*

Vincristine là chất được chiết xuất từ cây đờn cựa (*Cantharanthus roseus*) có tác dụng ức chế hiệu quả đối với một số bệnh ung thư như bệnh bạch cầu dòng lympho, ung thư vú, ung thư gan, ung thư buồng trứng, ung thư đầu và cổ, ung thư tinh hoàn và bệnh bạch cầu dòng lympho [135].

Cơ chế hoạt động của Vincristine được xác định là tương tự với các chất chống ung thư đặc hiệu theo chu kỳ tế bào. Cụ thể là, chúng đều ức chế sự trùng hợp tubulin, ngăn cản sự hình thành vi ống và chu kỳ tế bào ở pha M, và sau đó ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư [136]. Tuy nhiên, tác dụng ức chế tế bào khối u có thể ảnh hưởng đến sự tăng sinh nhanh của các tế bào khác. Thực tế đã chứng minh, các tế bào biểu mô ruột non và tủy xương thường bị ức chế trong trường hợp điều trị bệnh, do đó đây là một trong những lý do gây ra tác dụng phụ đối với đường tiêu hóa và của quá trình cấy ghép tủy xương [135].



Hình 1.6. Cấu trúc của vincristine [135]

Trong quá trình điều trị, vincristine thường gây độc ở hệ thống thần kinh, rồi giải phóng các chất trung gian cho quá trình tiền viêm như IL-6, IL-1 β , và

TNF- α khi các tế bào được kích hoạt [137, 138]. Bằng cách kích hoạt con đường tín hiệu NF- κ B/STAT, vincristine được coi là tác nhân điều hòa một phần hoạt động chống ung thư [139].

Vincristine được sử dụng rất rộng rãi, đặc biệt là ở Trung Quốc trong việc hỗ trợ điều trị bệnh u lympho không Hodgkin. Vincristine có tác dụng hiệu quả trong việc điều trị bệnh ALL, đặc biệt là đối với trẻ em bị mắc bệnh ALL. Ngoài ra, Vincristine cũng được sử dụng trong điều trị ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, u nguyên bào thận, u nguyên bào thần kinh, ung thư vú, bệnh ALL và đa u tủy xương [135]. Gần đây, các nhà khoa học còn phát hiện ra khả năng ngăn chặn sự phát triển của tế bào khối u bằng cách ức chế sự tổng hợp RNA và protein của vincristine [135]. Ngoài ra, vincristine còn làm giảm bạch cầu trong máu ngoại vi và kéo dài được tuổi thọ đáng kể của mô hình cấy ghép bệnh bạch cầu dòng lympho trên chuột [135].

Kết quả này đã cung cấp những thông tin hữu ích để các nhà khoa học tiếp tục có những định hướng nghiên cứu sâu hơn về việc sử dụng vincristine trong điều trị bệnh bạch cầu hiệu quả. Như vậy, vai trò của vincristine trong việc điều trị ung thư đã phần nào được khẳng định.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là 92 bệnh nhân mắc bệnh AML và 50 bệnh nhân mắc bệnh CML (nhưng chưa được điều trị) được thu thập từ Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương. Nhóm đối chứng là 80 người tình nguyện khỏe mạnh được thu thập từ Phòng khám Đa khoa 103 Quốc Oai. Các bệnh nhân và tình nguyện viên được khám lâm sàng và làm các xét nghiệm cận lâm sàng để các bác sỹ chuyên khoa tại Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương và Phòng khám Đa khoa 103 Quốc Oai chẩn đoán xác định, lựa chọn chính xác đối tượng cần thiết cho nghiên cứu (danh sách bệnh nhân và người khỏe được liệt kê ở phụ lục 3). Tất cả đối tượng nghiên cứu đều ký văn bản đồng ý tham gia nghiên cứu.

Các tế bào ung thư máu K562 được mua từ một tổ chức ATCC (American type culture collection – Bộ sưu tập giống chuẩn của Mỹ)

Đại thực bào được biệt hóa từ tế bào PBMC của người khỏe và bệnh nhân mắc bệnh nhân AML

* Tiêu chuẩn lựa chọn

- Nhóm bệnh nhân:

- + Bệnh nhân được chẩn đoán xác định bệnh bạch cầu cấp tính và mạn tính;
- + Bệnh nhân chưa được can thiệp điều trị gì.

- Nhóm đối chứng: Tình nguyện viên khỏe mạnh, đang không sử dụng thuốc hoặc mắc các bệnh cấp tính hay mạn tính nào khác.

* Tiêu chuẩn loại trừ

- Nhóm bệnh nhân: Loại bỏ các đối tượng bệnh nhân không có đầy đủ các thông tin lâm sàng và các bệnh nhân đang bị nhiễm khuẩn huyết

- Nhóm đối chứng: Loại bỏ các tình nguyện viên không đồng ý tham gia nghiên cứu và đang gặp các vấn đề về sức khỏe.

* Công thức tính cỡ mẫu

Số lượng mẫu sử dụng trong nghiên cứu được tính theo công thức:

$$n = \frac{Z^2_{1-\alpha/2} P(1 - P)}{d^2}$$

n: Cỡ mẫu nghiên cứu; α : Mức ý nghĩa thống kê khi $\alpha = 0,05$ với độ tin cậy 95% thì khi đó hệ số tin cậy $Z_{1-\alpha/2} = 1,96$; P: Tỷ lệ ước đoán tần suất xuất hiện của đa hình/đột biến gen (2,2%); d: Khoảng sai lệch mong muốn giữa tỉ lệ thu được từ mẫu nghiên cứu và quần thể nghiên cứu ($d = 0,05$); Kết quả tính toán cỡ mẫu nhóm $n = 33,06$. Do vậy, cỡ mẫu cho mỗi nhóm nghiên cứu là ≥ 34 bệnh nhân [140, 141].

2.1.2. Các hóa chất và thiết bị

2.1.2.1. Hóa chất

Hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu đều đạt tiêu chuẩn quốc tế và được sản xuất từ các hãng có uy tín như: Thermo fisher Scientific, Sigma, Gibco, Biolegend...

* *Tách chiết DNA tổng số từ các mẫu máu và kỹ thuật PCR*: Sử dụng các hóa chất của bộ Kit thương mại QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN); Dream Taq DNA Polymerase và Dream Taq buffer (Thermo, Mỹ); dNTP; Nước cất nuclease-free; Các đoạn môi A20, *CYLD* (Phù Sa, Cần Thơ, Việt Nam).

* *Điện di*: Agarose (Affymetrix, Cleveland, Mỹ); Dung dịch TAE 1X; Dung dịch TBE 1X; Loading dye 6X (Thermo, Mỹ); Ethidium bromide (Thermo, Mỹ);

* *Kỹ thuật ELISA*: Sử dụng các hóa chất của bộ Kit ELISA MAXTM Standard Set Human IL-6 và ELISA MAXTM Standard Set Human TNF- α (BioLegend, Mỹ).

* *Kỹ thuật làm bất hoạt gen PCR*: *CYLD* siRNA & A20 siRNA (Thermo, Mỹ); LipofectaminTM 3000 Transfection Reagent (Thermo, Mỹ); OPTI-MEM (Gibco, Mỹ);

* *Tách chiết RNA tổng số, chuyển cDNA và kỹ thuật qRT-PCR*: TRIzolTM Plus RNA purification Kit (Invitrogen, Mỹ), Kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo, Mỹ); qPCR Master Mix (2X) (BioLabs); Các đoạn môi A20, *CYLD*, *STAT1* và *STAT3* (Phù Sa, Cần Thơ, Việt Nam); Nước cất hai lần khử ion.

* *Nuôi cấy tế bào*: Ficoll-Paque™ PREMIUM (Cytova, Thụy Điển); PBS (Gibco, Mỹ), RPMI-1640 medium (Gibco, Mỹ); FBS (Gibco, Mỹ); L-glutamine (Gibco, Mỹ); Streptomycin/Penicillin (Gibco, Mỹ); LPS (Sigma, Mỹ); Vincristine (Sigma, Mỹ); Human M-CSF (Peprotech, Mỹ)

* *Kỹ thuật Flow cytometry*: FACS buffer (PBS plus 0,1% FBS); Anti-CD11b, anti-CD86, anti-CD40, FITC anti-annexin V, PI, ROS (Thermo, Mỹ);

* *Các dung dịch*: EDTA 0,5M (BioBasic, Canada); RBC-lysis buffer (NH₄Cl/KHCO₃/EDTA); TAE 50X (Tris/Acetate/EDTA) (BioBasic, Canada); TBE (Tris/Borate/EDTA) (Biosic, Canada).

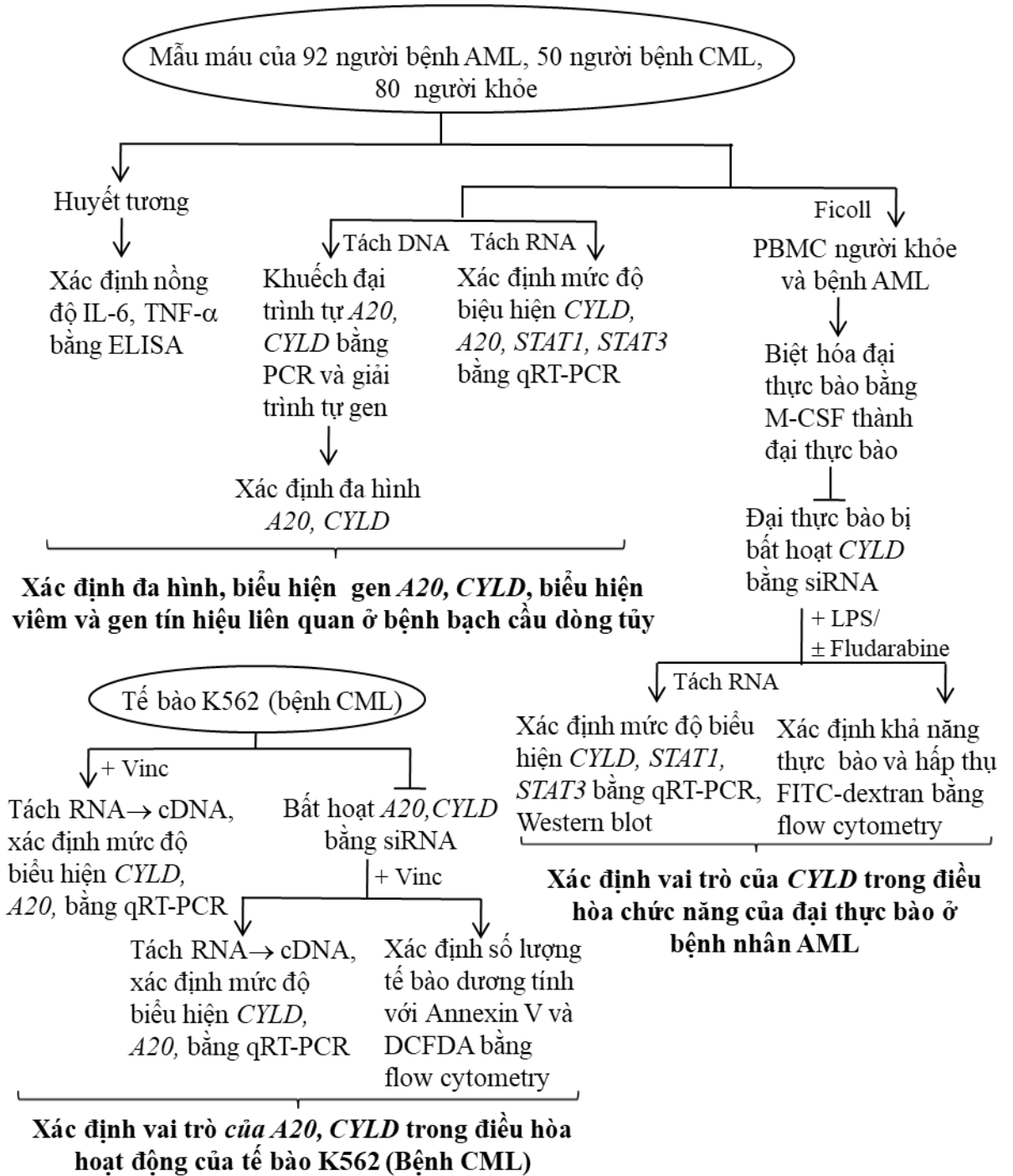
2.1.2.2. Địa điểm và thiết bị nghiên cứu

* *Địa điểm và thời gian nghiên cứu*: Nghiên cứu được thực hiện trong thời gian từ tháng 10 năm 2019 đến tháng 8 năm 2023 tại phòng Hệ gen học Miễn dịch, Viện nghiên cứu hệ gen – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

* *Thiết bị nghiên cứu*: Các dụng cụ và trang thiết bị được sử dụng cho nghiên cứu của luận án thuộc Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Học viện Quân Y: Bộ điện di (Bio-RAD, Mỹ); Máy soi gel & chụp ảnh Gel-Doc (UVP, Mỹ); Máy block nhiệt (Eppendorf, Đức); Bộ pipet (Eppendorf, Đức); Máy Vortex M52 (IKA, Đức); Máy khuấy từ gia nhiệt Model RCT (IKA, Đức); Máy PCR Mastercycler pro S (Đức); Máy NanoDrop Lite (Thermo, Mỹ); Máy qRT-PCR (Roche, Mỹ); Máy ly tâm lạnh (Eppendorf, Đức); Tủ âm CO₂ (Thermo, Mỹ); Máy đọc ELISA (Bio-Tex, Mỹ); Máy Flow cytometry (FACSaria Fusion, BD Biosciences, Mỹ) và các thiết bị chuyên dụng cần thiết khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

2.2.2. Phương pháp thu thập mẫu

Các bệnh nhân được chẩn đoán xác định mắc bệnh AML và CML bởi các bác sỹ chuyên khoa huyết học tại Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương và chưa được điều trị. Mỗi bệnh nhân và người tình nguyện được lấy 5 mL máu cho vào ống được chống đông bằng EDTA 0,5M (Ethylene diamine tetraacetic acid). Máu sau khi thu thập sẽ được lưu trữ ở nhiệt độ 2-4°C và vận chuyển tới phòng nghiên cứu. Các mẫu bệnh phẩm sau đó được mã hóa, xử lý mẫu và bảo quản theo quy trình.

2.2.3. Tách chiết DNA tổng số và khuếch đại gen A20, CYLD

2.2.3.1. Tách chiết DNA tổng số

Các mẫu máu của các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy và người khỏe mạnh được ly tâm ở 1.500 rpm trong 10 phút ở nhiệt độ phòng để tách huyết tương và huyết cầu. Huyết tương được sử dụng cho các thí nghiệm ELISA, còn huyết cầu được sử dụng để tách chiết DNA và RNA.

DNA tổng số từ các mẫu máu nghiên cứu được tách chiết bằng Kit QIAmp DNA Mini (QIAGEN). Quy trình tách chiết DNA được thực hiện theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất.

Sản phẩm DNA (3 μ L) sau đó được điện di trên gel agarose 1 % để kiểm tra DNA. Mẫu DNA được lưu giữ ở -20°C.

2.2.3.2. Khuếch đại gen A20, CYLD

* Thiết kế môi cho phản ứng khuếch đại gen

Phần mềm Primer 3 được sử dụng để thiết kế các cặp môi đặc hiệu nhằm khuếch đại vùng gen đích dựa trên trình tự của các gen A20, CYLD có nguồn gốc từ người với mã số lần lượt là NM_001378743.1 và NM_001270508.2 trong ngân hàng GenBank. Thông tin chi tiết về các môi được liệt kê trong Bảng 2.1.

Sản phẩm DNA tổng số thu được sau khi tách chiết được sử dụng làm nguyên liệu cho phản ứng PCR với cặp môi đặc hiệu để khuếch đại trình tự nucleotide vùng exon 7 trên gen A20 và vùng exon 16 trên gen CYLD (Bảng 2.2)

Bảng 2.1. Trình tự môi sử dụng phản ứng PCR

Môi	Trình tự môi	Kích thước sản phẩm
A20	F: 5'-TGAGCTAATGATGTAAAATCTTGTG-3'	731 bp
	R: 5'-AGGAGGCCTCTGCTGTAGTC-3'	
CYLD	F: 5- TAAGGTCTTGTGCCTGAGCA-3'	547 bp
	R: 5'- TTCTTTGGCAGCAGAAATCC-3'	

Bảng 2.2. Các thành phần của phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích (µl)
Nước cất	18,85
Đệm Dream Taq (10x)	2,5
dNTP (10 mM)	0,5
Môi xuôi (10 µM)	0,5
Môi ngược (10 µM)	0,5
Dream Taq DNA polymerase	0,15
DNA (50 ng/µL)	2 µl
TỔNG	25 µl

Quá trình khuếch đại gen được thực hiện theo chu trình nhiệt như sau: 96°C, 4 phút; 35 chu kì (94°C, 30 giây; 60°C, 30 giây; 72°C, 40 giây), 72°C, 8 phút, sau đó giữ ở 4°C.

2.2.4. Giải trình tự bằng phương pháp Sanger và xác định điểm đa hình/đột biến

Sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch bằng Kit GeneJET PCR Purification (Thermo, Mỹ) của hãng QIAGEN được giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Trình tự của các đoạn DNA được xác định trên máy giải trình tự tự động ABI PRISM®3500 Genetic Analyzers bằng cách sử dụng Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing.

Trình tự nucleotide của các mẫu nghiên cứu được so sánh với trình tự tham chiếu được công bố trên Ensembl thông qua phần mềm BioEdit nhằm xác định vị trí

các nucleotide có sự thay đổi. Các vị trí nucleotide này sau đó được nghiên cứu trong cơ sở dữ liệu NCBI SNP và Ensemble để xác định biến thể mới hay đã được công bố. Bên cạnh đó, các biến thể này cũng được kiểm tra trạng thái cân bằng quần thể Hardy-Weinberg (HWE) sử dụng phần mềm <http://www.ihh.kvl.dk/htm/kc/popgen/genetik/applets/kitest.htm> và <http://courses.atlas.illinois.edu/spring2016/STAT/STAT200/pchisq.html>.

2.2.5. Tách chiết RNA tổng số

Huyết cầu của các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy được thu nhận và bổ sung 10 mL RBC lysis buffer 1X (RBC-red blood cell). Mẫu sau đó được trộn đều và ủ trong 10-15 phút ở nhiệt độ phòng. Dung dịch sau khi ủ được ly tâm với tốc độ 1.500 rpm trong 10 phút ở nhiệt độ phòng, loại bỏ dịch nổi, thu cặn tế bào.

Hút 1mL TRIzol Reagent bổ sung vào ống Eppendorf có chứa mẫu tế bào cần tách RNA, trộn đều mẫu và bổ sung thêm 200 μ L chloroform lạnh. Hỗn hợp dung dịch tiếp tục được trộn đều và ly tâm 12.000 rpm trong 10 phút ở 4°C. Dung dịch ở lớp trên cùng sau khi ly tâm sẽ được thu vào 1 ống eppendorf mới và bổ sung thêm 600 μ L isopropanol lạnh. Hỗn hợp dung dịch được trộn đều và ly tâm mẫu 12.000 rpm trong 10 phút ở 4°C, loại bỏ dịch. Bổ sung 500 μ L ethanol 75% lạnh, trộn đều, ly tâm 12.000 rpm trong 10 phút ở 4°C, bỏ dịch. Cuối cùng, bổ sung 30-50 μ L nước cất để thu hồi RNA. Các mẫu RNA được bảo quản ở -80°C.

Sản phẩm RNA được xác định nồng độ và đánh giá độ tinh sạch bằng phương pháp đo quang phổ ở bước sóng 260 nm và 280 nm và điện di trên gel agarose 2%.

2.2.6. Tổng hợp cDNA và phản ứng qRT-PCR

** Tổng hợp cDNA*

cDNA được tổng hợp từ RNA tổng số theo các bước như trong hướng dẫn sử dụng của Kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo, Mỹ). Sản phẩm cDNA thu được sẽ được bảo quản ở -80°C.

Các mẫu cDNA được dùng để phân tích mức độ biểu hiện các gen *A20*, *CYLD*, *STAT1*, *STAT3* và *GAPDH*. Các primer được sử dụng trong nghiên cứu thể hiện ở bảng 2.3.

** Phản ứng qRT-PCR*

qRT-PCR là một kỹ thuật được sử dụng để khuếch đại và định lượng hoặc phát hiện DNA đích. Phản ứng qRT-PCR được đặc trưng bởi thời điểm (hoặc số chu kỳ) mà tại đó bắt đầu phát hiện mục tiêu khuếch đại. Giá trị này thường được gọi là chu kỳ ngưỡng (Ct). Khi số lượng DNA mục tiêu trong nghiên liệu ban đầu càng lớn thì tín hiệu huỳnh quang càng cao, từ đó dẫn đến giá trị Ct càng thấp (Morrison, 1998).

Trong nghiên cứu này, mức độ biểu hiện *A20*, *CYLD*, *STAT1*, *STAT3* và *GAPDH* được xác định dựa trên chu kỳ ngưỡng trung bình và độ lệch chuẩn giữa các nhóm nghiên cứu (\pm SD) theo phương pháp Livak định lượng tương đối, trong đó gen *GAPDH* được sử dụng làm gen tham chiếu chuẩn theo công thức: $2^{-\Delta\Delta Ct}$; Trong đó $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(C) - \Delta Ct(T)$; $\Delta Ct(C)$ là ΔCt của nhóm chứng; $\Delta Ct(T)$ của nhóm bệnh; $\Delta Ct = Ct$ của gen nghiên cứu – Ct của gen tham chiếu [142].

Bảng 2.3. Trình tự môi được sử dụng trong nghiên cứu

Môi	Trình tự môi
<i>A20</i>	F: 5'-TGAGCTAATGATGTAAAATCTTGTG-3'
	R: 5'-AGGAGGCCTCTGCTGTAGTC-3'
<i>CYLD</i>	F: 5'-TGCCTTCCAACCTCTCGTCTTG-3'
	R: 5'-AATCCGCTCTTCCCAGTAGG-3'
<i>STAT-1</i>	F: 5'-CCCTTCTGGCTTTGGATTGAA-3'
	R: 5'-CTTCCCGGGAGCTCTCACTGA-3'
<i>STAT-3</i>	F: 5'-GGAGGAGTTGCAGCAAAAAG-3'
	R: 5'-TGTGTTTGTGCCAGAAATGT-3'
<i>GAPDH</i>	F: 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAA-3'
	R: 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCAT-3'

Phản ứng qRT-PCR có tổng thể tích là 20 μL với các thành phần: 2 μL cDNA; 1 μL hai loại mồi (0,5 μM mỗi loại); 5 μL qPCR Master SybrGreen Mix (Roche Molecular Biochemicals); và 12 μL nước cất. Đoạn cDNA được khuếch đại ở 95°C trong 10 giây, 62°C trong 10 giây, và 72°C trong 16 giây, nhắc lại 40 chu kỳ.

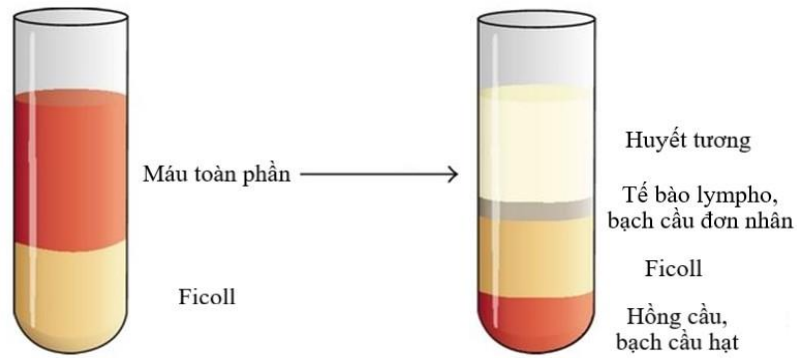
2.2.7. Nuôi cấy, xử lý dòng tế bào K562 bởi Vincristine

Vincristine là một alkaloid được chiết xuất từ cây Dừa cạn có khả năng ức chế các tế bào ung thư và đã được Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ phê duyệt là thuốc được sử dụng trong điều trị bệnh bạch cầu cấp tính dòng lympho, bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính, u lympho Hodgkin và Non-Hodgkin [143].

Tế bào K562 được nuôi cấy khởi động trong môi trường RPMI 1640 (Gibco, Mỹ) có bổ sung 10% FBS, 1% L-glutamin 2 mM và 1% penicillin-streptomycin (5.000 U/mL) ở 37°C, 5% CO₂ cho đến khi nồng độ tế bào K562 đạt giá trị thích hợp (10⁷ tế bào). Sau đó, tế bào K562 bị làm bất hoạt gen *A20*, *CYLD* trước khi được xử lý với Vinc (60-300 nM) trong 24 giờ. Các tế bào thu nhận được sử dụng để tách RNA, tổng hợp cDNA, rồi thực hiện phản ứng qRT-PCR để xác định mức biểu hiện mRNA của *A20* và *CYLD*, đồng thời một phần tế bào được sử dụng đánh giá khả năng tăng sinh và apoptosis của tế bào K562 bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy.

2.2.8. Phân lập tế bào đơn nhân máu ngoại vi từ máu

Máu toàn phần thu được từ phương pháp lấy máu tĩnh mạch bao gồm nhiều loại tế bào khác nhau như bạch cầu, hồng cầu và tiểu cầu. Trong đó, tế bào PBMC đóng vai trò quan trọng trong phản ứng miễn dịch của cơ thể. PBMC bao gồm các tế bào lympho (60-90%), đại thực bào/bạch cầu đơn nhân (10-30%) và tế bào tua gai (<2%) (Hình 2.2).



Hình 2.2. Sự phân lớp của các tế bào máu sau khi ly tâm [144]

Nhiều nghiên cứu cho thấy các tế bào này đều tham gia vào hầu hết các quá trình miễn dịch của cơ thể nên việc phân lập PBMC là bước quan trọng trong các thí nghiệm về miễn dịch. Sau khi được phân lập, PBMC có thể được sử dụng cho một loạt thí nghiệm nghiên cứu về bệnh tự miễn [145-147], bệnh ung thư [148-153], phát triển vaccine mới [154-156] và liệu pháp miễn dịch [150-153]. Một trong những kỹ thuật được sử dụng phổ biến nhất để phân lập PBMC là phương pháp ly tâm phân lớp theo tỷ trọng sử dụng Ficoll.

*** Các bước tiến hành thí nghiệm:**

Máu tĩnh mạch được lấy vào trong ống có chứa EDTA. Ly tâm mẫu máu ở nhiệt độ phòng với điều kiện 1.500 rpm trong 10 phút để phân tách huyết cầu và huyết tương làm hai lớp riêng biệt. Hút lớp huyết tương sang một ống falcon khác, còn lớp huyết cầu trong ống sẽ được bổ sung thêm PBS theo tỷ lệ 1:1. Trộn đều hỗn hợp dung dịch bằng pipet. Sau đó, bổ sung từ từ 25-30 mL hỗn hợp dung dịch máu và PBS vào 4 ống falcon 50 mới đã có chứa 15 mL dung dịch Ficoll-Paque. Ly tâm mẫu với điều kiện 400 g trong 30 phút ở 20°C, brake = 0. Sau khi ly tâm, cẩn thận lấy các mẫu ra khỏi máy ly tâm để tránh trộn lẫn giữa các lớp. Dùng pipet hút bỏ lớp plasma phía trên cùng nhằm mục đích thu nhận tế bào PBMC ngay phía dưới lớp plasma. Hút phần dung dịch có chứa tế bào PBMC vào ống falcon 50 mới, bổ sung dung dịch PBS vào ống chứa PBMC theo tỷ lệ 1:1, trộn đều hỗn hợp dung dịch bằng pipet. Ly tâm với điều kiện 300 g trong 10-15 phút ở 20°C, brake=9. Sau đó, cẩn thận loại bỏ phần dịch nổi phía trên để thu phần tế bào ở dưới đáy ống. Tiếp tục bổ sung 20 mL dung dịch PBS vào ống falcon có chứa tế bào PBMC, trộn đều

dung dịch. Ly tâm với điều kiện 200 g trong 10-15 phút ở 20°C, rồi cẩn thận loại bỏ phần dịch nổi phía trên để thu nhận được tế bào PBMC.

2.2.9. Biệt hóa tế bào từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi sử dụng cytokine M-CSF

Tế bào PBMC thu nhận được từ máu toàn phần sẽ được rửa trong 5 mL môi trường RPMI 1640 có bổ sung 10% FBS, 1% L-glutamin 2 mM và 1% penicillin-streptomycin (5.000 U/mL) đã được làm ấm đến 37°C. Ly tâm mẫu ở điều kiện 1.500 rpm trong 7 phút, nhẹ nhàng bỏ dịch. Tiếp tục bổ sung 10 mL môi trường nuôi cấy chuẩn đã được làm ấm đến 37°C vào tế bào PBMC, dùng pipet để phân tán đều các tế bào PBMC trong dung dịch. Sử dụng trypan blue để xác định mật độ tế bào có trong dung dịch bằng buồng đếm hồng cầu. Sau đó, chia tế bào PBMC vào các đĩa nuôi cấy, sao cho mỗi đĩa chứa khoảng 5×10^6 tế bào/mL. Ủ đĩa nuôi cấy khoảng 2 giờ trong tủ ấm (37°C) 5% CO₂ để các tế bào đơn nhân bám vào đĩa. Bổ sung M-CSF vào các đĩa nuôi cấy tương ứng sao cho nồng độ cuối cùng đạt 50 ng/mL (M-CSF), ủ tế bào 6 ngày trong tủ ấm (37°C), 5% CO₂. Trong khoảng thời gian này, vào ngày thứ 4 thực hiện thay môi trường trong đĩa nuôi cấy bằng môi trường RPMI 1640 chuẩn có bổ sung M-CSF. Sau 6 ngày nuôi cấy, ly tâm mẫu với điều kiện 1.500 rpm trong 7 phút ở nhiệt độ phòng, nhẹ nhàng loại bỏ dịch nổi và thu nhận tế bào đích (Thermofisher).

2.2.10. Phương pháp làm bất hoạt gen

Các tế bào sau khi biệt hóa được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 chứa 10% FBS, 1% L-Glutamine và không bổ sung kháng sinh trong khoảng một ngày trước khi chuyển nạp siRNA. Sử dụng Trypan blue để xác định mật độ tế bào dưới kính hiển vi. Sau đó chia tế bào vào các đĩa nuôi cấy sao cho mỗi đĩa chứa khoảng 5×10^6 tế bào/mL. Để chuyển nạp siRNA vào tế bào đích cần chuẩn bị phức hợp (siRNA: LipofectamineTM 3000) theo các bước sau: (1) Pha loãng siRNA trong 50 μ L opti-MEM không có chứa huyết thanh. Trộn đều dung dịch bằng pipet, rồi ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng; (2) Pha loãng LipofectaminTM3000 trong 50 μ L opti-MEM không có chứa huyết thanh. Trộn đều dung dịch bằng pipet, rồi ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng. Trộn đều siRNA và LipofectaminTM3000 đã được pha loãng và ủ trong 10-20 phút ở nhiệt độ phòng để siRNA và LipofectaminTM3000 có thể tạo phức.

Bổ sung phức hợp siRNA và LipofectaminTM3000 vào từng đĩa nuôi cấy. Lắc nhẹ để phức hợp siRNA và LipofectaminTM3000 có thể tiếp cận được với tế bào đích. Ủ các tế bào trong 24-48 giờ ở 37°C, 5% CO₂.

*** Thu tế bào để phân tích bằng phương pháp đếm tế bào dòng chảy và tách RNA**

Các bào sau khi được bất hoạt và nuôi ở điều kiện thích hợp được thu nhận vào ống falcon 15 mL. Ly tâm mẫu ở điều kiện 1.500 rpm trong 7 phút ở nhiệt độ phòng. Dịch nuôi cấy được sử dụng cho thí nghiệm ELISA, tế bào được sử dụng cho phương pháp đếm tế bào dòng chảy và tách chiết RNA tổng số để đánh giá mức độ biểu hiện của một số gen liên quan.

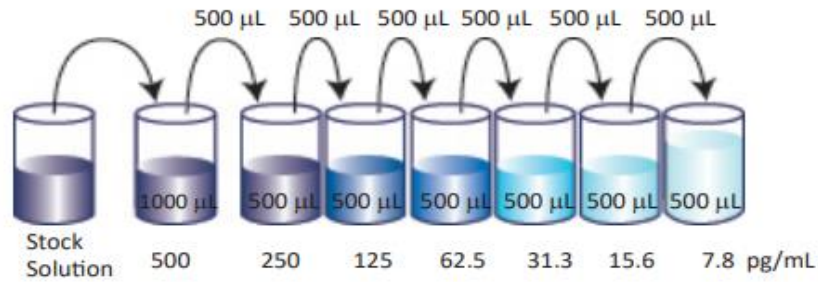
2.2.11. Phương pháp ELISA Sandwich

Kỹ thuật Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) là kỹ thuật được sử dụng để định lượng số lượng kháng nguyên hoặc kháng thể trong các dung dịch mẫu như huyết thanh, tinh dịch, nước tiểu, dịch huyền phù nuôi cấy. Hiện nay, ELISA được sử dụng khá rộng rãi trong chẩn đoán y học, bệnh lý học thực vật, và kiểm soát chất lượng của các ngành công nghiệp.

Kỹ thuật ELISA sandwich: là một dạng ELISA được sử dụng khá phổ biến trong thực tiễn do phản ứng mạnh và nhạy. Kỹ thuật này được gọi là ELISA sandwich vì kết quả thí nghiệm được đánh giá thông qua sự kết hợp của hai loại kháng thể (kháng thể bắt và kháng thể phát hiện). Kỹ thuật sử dụng trong đề tài này là kỹ thuật ELISA sandwich gián tiếp.

* Protein chuẩn với các nồng độ khác nhau được chuẩn bị như Bảng 2.4 và Hình 2.3

Chuẩn bị 8 ống eppendorf được đánh số thứ tự từ 1 đến 8. Ở ống eppendorf 1 được chuẩn bị 500 µL dung dịch protein chuẩn với nồng độ thích hợp (Bảng 2.4). Thêm 250 µL dung dịch đệm pha loãng mẫu vào các ống từ 2 đến 8. Hút 250 µL dung dịch protein chuẩn từ ống 1 sang ống 2, trộn đều. Tiếp tục, hút 250 µL dung dịch protein chuẩn từ ống 2 sang ống 3, trộn đều. Làm tương tự đến ống số 7. Ống số 8 là ống đối chứng âm.



Hình 2.3. Hình ảnh minh họa pha loãng protein chuẩn của Kit ELISA với cytokine IL-6 và TNF- α

Bảng 2.4. Pha loãng protein chuẩn với các nồng độ khác nhau

Ống nghiệm	Thể tích dung dịch protein chuẩn (μL)	Thể tích dung dịch pha loãng (μL)	Nồng độ cuối (pg/mL)	
			IL-6	TNF- α
1	500	0	500	500
2	250	250	250	250
3	250	250	125	125
4	250	250	62,5	62,5
5	250	250	31,3	31,3
6	250	250	15,6	15,6
7	250	250	7,8	7,8
8	0	250	0	0

*** Các bước tiến hành thí nghiệm:**

Nồng độ IL-6 và TNF- α được xác định bằng cách sử dụng bộ Kit ELISA (Biolegend). Các bước tiến hành được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Nhỏ 100 μL dung dịch kháng thể bắt vào các giếng của đĩa ELISA. Đậy nắp đĩa, bọc lại bằng giấy parafin và ủ ở 4°C qua đêm để kháng thể bắt bám vào bề mặt của các giếng. Sau đó, tháo nắp đĩa và rửa đĩa 4 lần bằng dung dịch đệm rửa (300 μL /giếng). Bổ sung 200 μL dung dịch đệm khóa vào mỗi giếng và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Rửa đĩa 4 lần bằng dung dịch đệm rửa (300 μL /giếng). Thêm

100 μL protein chuẩn vào dãy giếng ở cột đầu tiên của đĩa ELISA, các giếng còn lại bổ sung 100 μL dung dịch mẫu cần xác định nồng độ cytokine, và ủ đĩa ELISA ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Rửa đĩa 4 lần với đệm rửa (300 μL /giếng). Thêm 100 μL kháng thể phát hiện vào mỗi giếng và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Rửa đĩa 5 lần với đệm rửa (300 μL /giếng). Bổ sung 100 μL dung dịch Avidin-HRP vào mỗi giếng và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Rửa đĩa 7 lần với đệm rửa (300 μL /giếng). Bổ sung 100 μL dung dịch TMB vào từng giếng và ủ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút, dung dịch trong giếng khi đó có màu xanh. Tiếp tục thêm vào mỗi giếng 100 μL dung dịch H_2SO_4 2N để kết thúc phản ứng và khi đó màu xanh chuyển sang thành màu vàng. Cuối cùng, đo kết quả bằng máy đo độ hấp phụ quang ở bước sóng 450 nm.

Mỗi mẫu được thực hiện trong 2 giếng, lặp lại thí nghiệm 3 lần.

2.2.12. Phương pháp western blot

Đại thực bào (3×10^6 tế bào) được rửa hai lần trong đệm PBS và sau đó bổ sung dung dịch đệm chiết 100 μl RIPA-1 nhằm phá vỡ màng tế bào để thu protein tổng số. Sản phẩm protein sau khi thu được bảo quản ở điều kiện -80°C và sử dụng cho thí nghiệm western blot. Điện di protein thu được trên gel SDS-polyacrylamide 10% và chuyển lên màng polyvinylidene fluoride. Vị trí các protein được chuyển lên màng sẽ được cố định bằng cách sử dụng dung dịch đệm khóa. Sau đó, bổ sung kháng thể sơ cấp anti-p-STAT1 và anti-GAPDH (Santa Cruz) trong dung dịch đệm. Rửa màng 5 lần và tiếp tục bổ sung với kháng thể thứ cấp HRP anti-rabbit hoặc anti-mouse (Amersham) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa màng 5 lần và sau đó phát hiện kháng thể được gắn với protein trên màng bằng bộ kit ECL Plus kit (GE Healthcare).

2.2.13. Phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy (Flow cytometry)

Phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy là một kỹ thuật hiện đại hoạt động dựa trên nguyên tắc tán xạ ánh sáng và phát xạ huỳnh quang của các tế bào đã được đánh dấu huỳnh quang khi chúng đi qua chùm tia laser. Hiện nay, kỹ thuật này được sử dụng để phân tích các đặc tính vật lý và hóa học của hàng nghìn tế bào mỗi giây. Do vậy, có thể coi đây là phương pháp cho phép định lượng, phân tích kiểu hình và chức năng của tế bào ở dạng huyền phù nhanh chóng và chính xác.

Máy FACs Aria Fusion của hãng BD Biosciences và một số kháng thể đặc trưng được sử dụng cho thí nghiệm này.

** Xác định sự tăng sinh, thực bào và quá trình apoptosis của tế bào*

Các tế bào nghiên cứu thu nhận được được đánh giá sự tăng sinh và quá trình apoptosis bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. Các tế bào này được nhuộm với các kháng thể Annexin V, CFSE, ROS và FITC-dextran được sử dụng để phân tích sự tăng sinh, khả năng sản xuất ROS, quá trình thực bào và quá trình apoptosis. Kháng thể CD11b FITC CD40PE CD68APC; CD86PE CD68APC... để phân tích sự biểu hiện của các marker hoạt động bề mặt của các tế bào đích.

Các tế bào đích (10^6 tế bào/mL) sau khi nuôi ở các điều kiện nghiên cứu được rửa sạch 2 lần với PBS, riêng với các tế bào được nhuộm với kháng thể Annexin V thì được rửa sạch với dung dịch đệm AWB. Tiếp theo, các tế bào đích được nhuộm với 100 μ L kháng thể gắn huỳnh quang và ủ trong các khoảng thời gian thích hợp (CFSE – 10 phút, ở nhiệt độ phòng, trong bóng tối; FITC-dextran – 3 giờ, 37°C, 5%CO₂; CD11b CD68APC CD40PE, CD11b CD68APC CD86PE – 1 giờ, 4°C; Annexin V – 15 phút, ở nhiệt độ phòng, trong bóng tối). Cuối cùng, sau khi được rửa 2 lần với đệm PBS hoặc FACs, các tế bào đích được tái hòa tan trong dung dịch đệm FACs trước khi được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy.

2.2.14. Phương pháp xử lý số liệu

Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm SPSS và GraphPad Prism 8 nhằm đánh giá sự khác biệt giữa mức độ biểu hiện của gen, nồng độ cytokine ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy và nhóm đối chứng. Thuật toán Mann-Whitney U và kiểm định Spearman được sử dụng để so sánh kết quả giữa 2 nhóm nghiên cứu. Sự khác biệt giữa mẫu nghiên cứu và mẫu đối chứng được xử lý có ý nghĩa thống kê khi chỉ số $p < 0,05$.

2.2.15. Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh

Đề tài thực hiện trên các đối tượng nghiên cứu đều tuân thủ đúng theo y đức và đã được phê duyệt bởi Hội Đồng Y Đức của Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam theo Quyết định số 4-2021/NCHG-HĐĐĐ.

Tất cả các đối tượng tham gia nghiên cứu đều được cung cấp đầy đủ các thông tin, mục tiêu nghiên cứu và tự nguyện tham gia nghiên cứu theo đúng quy định về đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của các tổ chức trong và ngoài nước. Tất cả các thông tin liên quan đến đối tượng nghiên cứu đều được bảo mật. Các gia đình và bệnh nhân có thể rút khỏi nghiên cứu khi không muốn tiếp tục tham gia. Kết quả phân tích sẽ được thông báo cho gia đình bệnh nhân.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

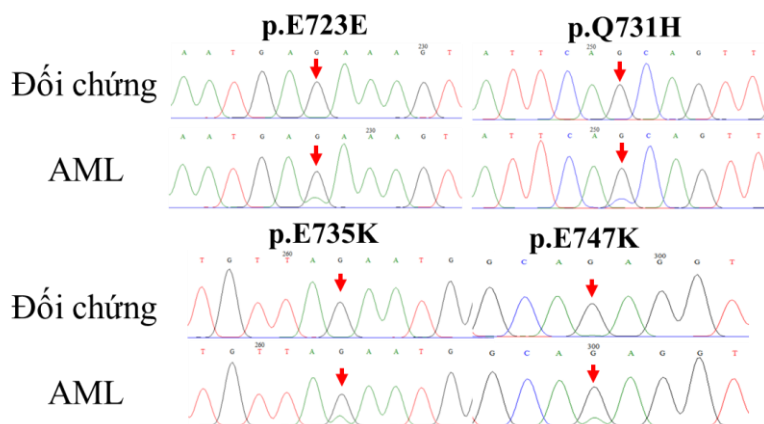
3.1. Đánh giá đa hình trên gen *CYLD*, *A20*

Trong nghiên cứu này, 92 bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh bạch cầu dòng tủy cấp (AML), 50 bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh bạch cầu dòng tủy mạn (CML) và 80 người khỏe đã được thu thập. Với mục đích xác định các điểm đa hình trên gen *A20*, *CYLD* để đánh giá cũng như tiên lượng về tình trạng bệnh, DNA tổng số được tách chiết từ các mẫu máu của bệnh nhân bạch cầu dòng tủy và người khỏe theo hướng dẫn của Kit QIAmp DNA Maxi thuộc hãng QIAGEN. Sau khi tách chiết, DNA tổng số được xác định nồng độ và đánh giá độ tinh sạch nhằm đảm bảo chất lượng cho các thí nghiệm khuếch đại trình tự nucleotide của gen *CYLD*, *A20* với cặp môi đặc hiệu bằng kỹ thuật PCR. Sản phẩm PCR của các mẫu cần nghiên cứu được tinh sạch trước khi đọc trình tự trực tiếp trên máy giải trình tự tự động ABI PRISM®3500 Genetic Analyzers.

3.1.1. Đa hình gen *CYLD* ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy

3.1.1.1. Đa hình gen *CYLD* ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy cấp tính

Sau khi so sánh trình tự đoạn gen *CYLD* của bệnh nhân AML và nhóm người khỏe với trình tự gen được công bố trên Ensemble (ENSG00000083799), 4 vị trí có các đa hình/đột biến trên gen này được xác định trên cả mẫu bệnh và đối chứng.



Hình 3.1. Điểm đa hình trên gen *CYLD* ở bệnh nhân AML

Kết quả cho thấy, 4 nucleotide trên exon 16 bị thay đổi, trong đó có 3 SNP (p.Q731H/c.2435 G>C; p.E735K/c.2445 G>A; p.E747K/c.2481 G>A) là SNP

không đồng nghĩa khiến cho amino acid cũ bị thay thế bởi amino acid mới (Hình 3.1) và SNP (p.E723E/c.2411 G>A) là SNP đồng nghĩa. Trong số các đa hình này, sự phân bố kiểu gen tại vị trí p.E723E, p.Q731H và p.E735K tuân theo định luật cân bằng HWE trên cả nhóm bệnh, nhóm chứng và trên toàn bộ quần thể nghiên cứu ($p > 0,05$); Trong khi đó ở vị trí p.E747K sự phân bố kiểu gen không tuân theo định luật cân bằng HWE trên toàn bộ quần thể nghiên cứu ($p < 0,05$) (Bảng 3.1).

Bảng 3.1. Đa hình nucleotide trên gen CYLD ở bệnh AML (SNP)

Vị trí đa hình	Thay đổi Nucleotide	MAF AML	HWE AML (p)	MAF Nhóm chứng	HWE Nhóm chứng (p)	HWE Quần thể (p)
c.G2411A/p.E723E	G>A	0,0109	0,9945	0,0375	0,9411	0,9524
c.G2435C/p.Q731H	G>C	0,0109	0,9945	0,0938	0,6518	0,7926
c.G2445A/p.E735K	G>A	0,0761	0,732	0,1375	0,3618	0,3088
c.G2481A/p.E747K	G>A	0,1413	0,2878	0,2125	0,05434	0,02153

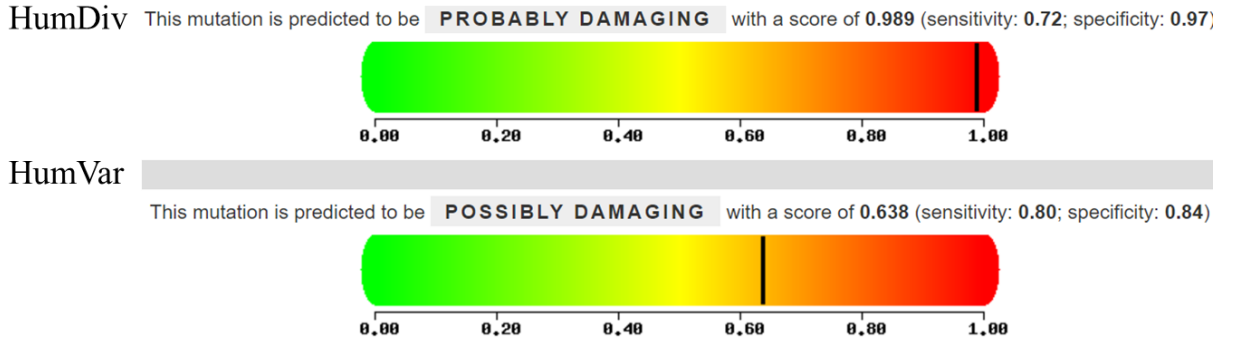
Chú thích: MAF: minor allele frequency, HWE: Hardy-Weinberg equilibrium;

Đánh giá mối liên quan giữa tỉ lệ kiểu gen và alen của các SNP ở bệnh nhân AML và người khỏe được trình bày ở bảng 3.2. Giá trị p quan sát được khi phân tích mối liên quan giữa tỉ lệ kiểu gen của SNP trên mô hình trội vì kiểu gen đồng hợp lặn không có trong quần thể nghiên cứu. Đối với điểm đa hình tại vị trí p.Q731H sự khác biệt đáng kể về kiểu gen GC giữa bệnh nhân AML và nhóm chứng khỏe mạnh được phát hiện khi so sánh với kiểu gen GG ($p = 0,0024$). Bên cạnh đó, tần số allele C cũng cho thấy khả năng liên quan đến giảm nguy cơ mắc bệnh AML cao ($p = 0,0032$). Ngược lại, điểm đa hình tại p.E723E và p.E735K không có sự khác biệt đáng kể về kiểu gen GA giữa bệnh nhân AML và nhóm chứng khỏe mạnh khi so sánh với kiểu gen GG ($p > 0,05$), đồng thời tần số allele A cũng không có sự liên quan đến khả năng mắc bệnh AML. Đa hình tại các vị trí p.E747K không được đánh giá sự liên kết di truyền vì sự phân bố kiểu gen của chúng không tuân theo HWE.

Bảng 3.2. Mối tương quan giữa kiểu gen của các đa hình gen *CYLD* và bệnh AML

Vị trí đa hình	Mô hình kiểu gen	Nhóm chứng (n=80)	Nhóm bệnh (n=92)	OR	95% CI	<i>p</i> -Value
c.G2411A /p.E723E	Mô hình trội					
	GG	74 (92,5%)	90 (97,83%)	1		0,1133
	GA	6 (7,5%)	2 (2,17%)	0,2681	0,0526-1,3675	
	Alen					
	G	154 (96,25%)	182 (98,91%)	1		0,124
	A	6 (3,75%)	2(2%)	0,2821	0,0561-1,4176	
c.G2435C /p.Q731H	Mô hình trội					
	GG	65 (81,25%)	90 (97,83%)	1		0,0024
	GC	15 (18,75%)	2 (2,17%)	0,0963	0,0213-0,4357	
	Alen					
	G	145 (90,63%)	182 (98,91%)	1		0,0032
	C	15 (9,37%)	2 (1,09%)	0,1062	0,0239-0,4720	
c.G2445A /p.E735K	Mô hình trội					
	GG	58 (72,5%)	78 (84,78%)	1		0,0509
	GA	22 (27,5%)	14 (15,22%)	0,4732	0,2232-1,0031	
	Alen					
	G	138 (86,25%)	170 (92,39%)	1		0,067
	A	22 (13,75%)	14 (7,61%)	0,5166	0,2548-1,0473	

Để xác định được liệu tác động của SNP không đồng nghĩa trên gen *CYLD* có làm thay đổi amino acid đến cấu trúc và chức năng của protein hay không thì nghiên cứu này đã sử dụng công cụ Polyphen-2. Dựa trên kết quả dự đoán có thể nhận thấy, SNP tại vị trí p.Q731H trên gen *CYLD* được dự đoán có thể là nguyên nhân gây bệnh (Hình 3.2).

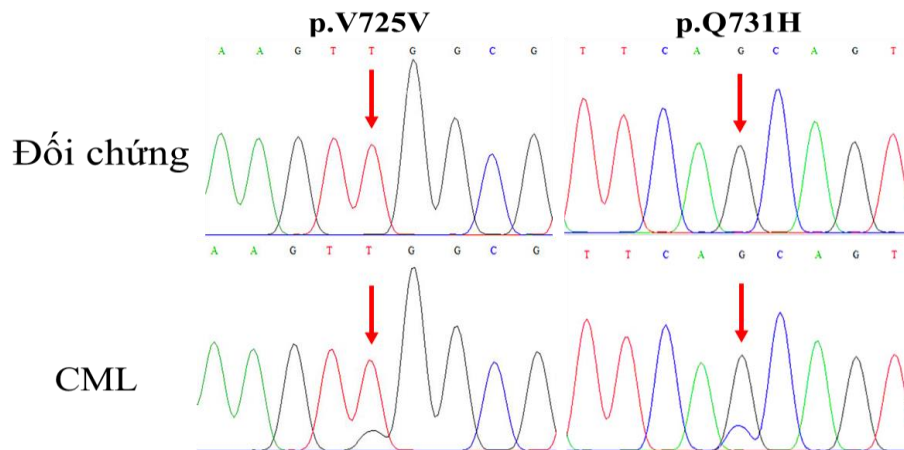


Hình 3.2. Dự đoán khả năng gây bệnh của SNP không đồng nghĩa p.Q731H trên gen *CYLD* bằng Polyphen-2

3.1.1.2. Đa hình trên gen *CYLD* ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy mạn tính

Sau khi so sánh trình tự đoạn gen *CYLD* của bệnh CML và nhóm người khỏe với trình tự gen được công bố trên Ensemble (ENSG00000083799), 2 vị trí có đa hình/đột biến trên gen này được xác định trên cả mẫu bệnh và đối chứng.

Kết quả cho thấy, 2 nucleotide trên exon 16 bị thay đổi, trong đó SNP p.Q731H (c.2435 G>C) là SNP không đồng nghĩa khiến cho amino acid cũ bị thay thế bởi amino acid mới và SNP p.V725V (c.2417 T>G) là SNP đồng nghĩa (Hình 3.3). Trong số các đa hình này, sự phân bố kiểu gen tại vị trí p.V725V, p.Q731H tuân theo định luật cân bằng HWE trên toàn bộ quần thể nghiên cứu ($p > 0,05$) (Bảng 3.3).



Hình 3.3. Điểm đa hình trên gen *CYLD* ở bệnh nhân CML

Bảng 3.3. Các đa hình nucleotide trên gen *CYLD* ở bệnh nhân CML (SNP)

Vị trí đa hình	Thay đổi Nucleotide	MAF CML	HWE CML (<i>p</i>)	MAF Nhóm chứng	HWE Nhóm chứng (<i>p</i>)	HWE Quần thể (<i>p</i>)
c.T2417G/p.V725V	T>G	0,02	0,9897	0	NaN	0,9961
c.G2435C/p.Q731H	G>C	0,02	0,9897	0,0938	0,6518	0,7275

Chú thích: MAF: minor allele frequency, HWE: Hardy-Weinberg equilibrium, NaN: Not a number;

Bảng 3.4. Mối tương quan giữa kiểu gen của các đa hình gen *CYLD* và bệnh CML

Vị trí đa hình	Mô hình Kiểu gen	Nhóm chứng (n=80)	Nhóm bệnh (n=50)	OR	95% CI	<i>p</i> -Value
c.T2417/p.V725V	Mô hình trội					
	TT	80 (100%)	48 (96%)	1		0,1749
	TG	0 (0%)	2 (4%)	8,299	0,3902-176,5104	
	Allele					
	T	160 (100%)	98 (98%)	1		0,1772
	G	0 (0%)	2 (2%)	8,1472	0,3871-171,4755	
c.G2435C/p.Q731H	Mô hình trội					
	GG	65 (81,25%)	48 (96%)	1		0,0275
	GC	15 (18,75%)	2 (4%)	0,1806	0,0394-0,8271	
	Allele					
	G	145 (90,63%)	98 (98%)	1		0,0336
	C	15 (9,37%)	2 (2%)	0,1973	0,0441-0,8820	

Phân tích thống kê được thực hiện trên mô hình các allele thay đổi (chiếm ưu thế). Đối với điểm đa hình tại p.V725V, sự đánh giá mối liên hệ của kiểu gen với bệnh CML chỉ được kiểm tra ở kiểu hình gen trội vì kiểu gen GG không có trong quần thể nghiên cứu. Cụ thể là tại vị trí này, kiểu gen TG giữa bệnh nhân CML và nhóm chứng khỏe mạnh được phát hiện là không có sự khác biệt đáng kể khi so sánh với kiểu gen TT ($p > 0,05$) và tần số allele G không liên quan đến khả năng tăng nguy cơ mắc bệnh CML. Trong khi đó, tại vị trí p.Q731H kiểu gen GC giữa bệnh nhân CML và nhóm chứng khỏe mạnh được phát hiện là có sự khác biệt đáng kể khi so sánh với kiểu gen GG ($p = 0,0275$). Bên cạnh đó, tần

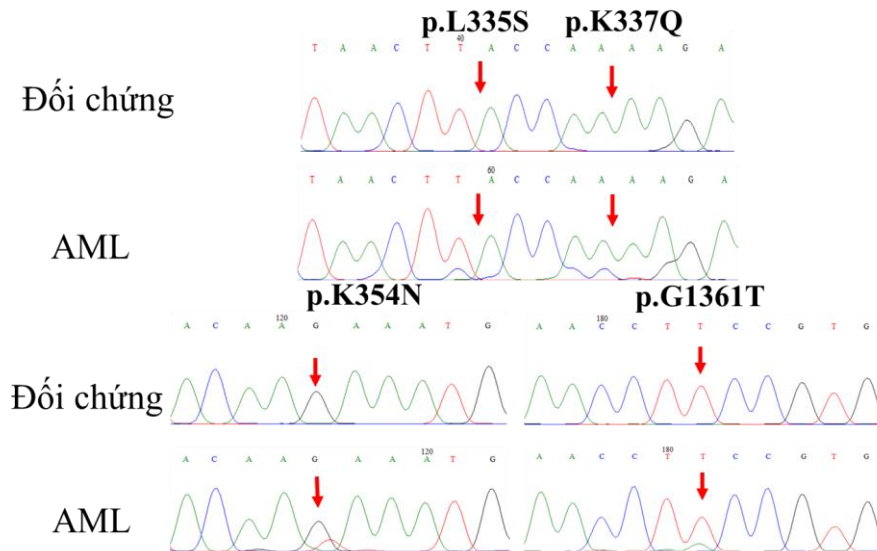
số allele C cũng cho thấy khả năng liên quan đến giảm nguy cơ mắc bệnh CML cao ($p = 0,0336$) (Bảng 3.4).

Để dự đoán tác động của SNP không đồng nghĩa đã xác định được trên gen *CYLD* làm thay đổi amino acid có làm ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của protein hay không thì nghiên cứu này đã sử dụng công cụ Polyphen-2. Kết quả cho thấy, SNP tại vị trí p.Q731H trên gen *CYLD* được dự đoán là có thể là nguyên nhân gây bệnh (Hình 3.2).

3.1.2. Đa hình gen *A20* ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy

3.1.2.1. Đa hình trên gen *A20* ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy cấp tính

Sau khi so sánh trình tự đoạn gen *A20* của bệnh nhân AML và nhóm người khỏe với trình tự gen được công bố trên Ensemble (ENSG00000118503), 4 vị trí có các đa hình/đột biến trên gen này được xác định trên cả mẫu bệnh và đối chứng.



Hình 3.4. Điểm đa hình trên gen *A20* ở bệnh nhân AML

Kết quả cho thấy, 4 nucleotide ở exon 7 (p.L335S/c.1303 T>C; p.K337Q/c.1308 A>C; p.K354N/c.1361 G>T; p.S376T/c.1425 T>A) bị thay đổi và đều là SNP không đồng nghĩa khiến cho amino acid cũ bị thay thế bởi amino acid mới (Hình 3.4). Bên cạnh đó, sự phân bố kiểu gen tại vị trí p.L335S,

p.K337Q, p.K354N và p.S376T cũng đều tuân theo định luật cân bằng HWE trên nhóm bệnh và trên toàn bộ quần thể nghiên cứu ($p > 0,05$) (Bảng 3.5).

Bảng 3.5. Các đa hình nucleotide trên gen A20 ở bệnh AML (SNP)

Vị trí đa hình	Thay đổi Nucleotide	MAF AML	HWE AML (p)	MAF Nhóm chứng	HWE Nhóm chứng (p)	HWE Quần thể (p)
c.T1303C/p.L335S	T>C	0,0381	0,9306	0	NaN	0,9636
c.A1308C/p.K337Q	A>C	0,0435	0,9306	0	NaN	0,9093
c.G1361T/p.K354N	G>T	0,0435	0,9306	0	NaN	0,9093
c.T1425A/p.S376T	T>A	0,0109	0,9945	0	NaN	0,9971

Chú thích: MAF: minor allele frequency, HWE: Hardy-Weinberg equilibrium, NaN: Not a number;

Đánh giá mối liên quan giữa tỉ lệ kiểu gen và allele của các SNP ở bệnh nhân AML và người khỏe được trình bày ở bảng 3.6. Giá trị p quan sát được khi phân tích mối liên quan giữa tỉ lệ kiểu gen của SNP trên mô hình trội vì kiểu gen đồng hợp lặn không có trong quần thể nghiên cứu. Đối với điểm đa hình tại vị trí p.L335S, p.K337Q, p.K354N và p.S376T, kiểu gen TC, AC, GT và TA không có sự khác biệt đáng kể khi so sánh với kiểu gen TT, AA, GG và TT tương ứng ($p < 0,05$), đồng thời tần số allele C (p.L335S), C (p.K337Q), T (p.K354N) và A (p.S376T) cũng không liên quan đến khả năng mắc bệnh AML.

Bảng 3.6. Mối tương quan giữa kiểu gen của các đa hình gen A20 và bệnh AML

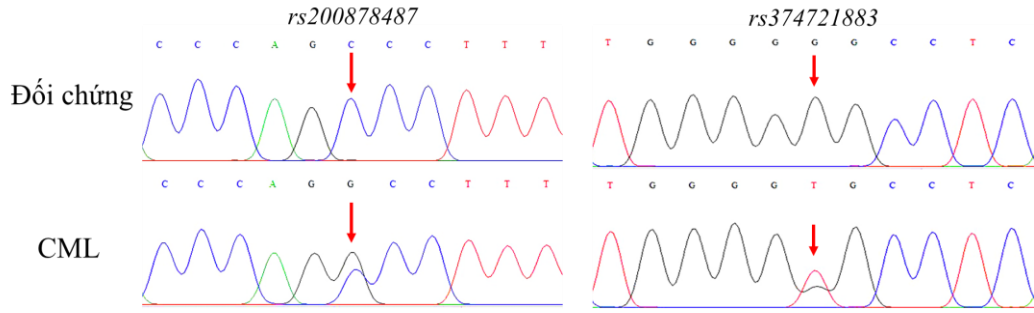
Vị trí đa hình	Mô hình kiểu gen	Nhóm chứng (n=80)	Nhóm bệnh (n=92)	OR	95% CI	p -Value
c.T1303C/p.L335S	Mô hình trội					
	TT	80 (100%)	85 (92,39%)	1		0,0714
	TC	0	7 (7,61%)	14,1228	0,7937-251,3110	
	Allele					
	T	160 (100%)	177 (96,2%)	1		0,075
	C	0	7 (3,8%)	13,5634	0,7685-239,3881	
c.A1308C/p.K337Q	Mô hình trội					
	AA	80 (100%)	84 (91,3%)	1		0,0571

	AC	0	8 (8,7%)	16,1953	0,9196-285,2103	
	Allele					
	A	160 (100%)	176 (95,65%)	1		0,0606
	C	0	8 (4,35%)	15,4589	0,8851-269,9956	
c.G1361T /p.K354N	Mô hình trội					
	GG	80 (100%)	84 (91,3%)	1		0,0571
	GT	0	8 (8,7%)	16,1953	0,9196-285,2103	
	Allele					
	G	160 (100%)	176 (95,65%)	1		0,0606
	T	0	8 (4,35%)	15,4589	0,8851-269,9956	
c.T1425A /p.S376T	Mô hình trội					
	TT	80 (100%)	90 (97,83%)	1		0,3377
	TA	0	2 (2,17%)	4,4475	0,2104-94,0265	
	Allele					
	T	160 (100%)	182 (98,91%)	1		0,3403
	A	0	2 (1,09%)	4.3973	0,2095 – 92,2774	

3.1.2.2. Đa hình trên gen A20 ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy mạn tính

Sau khi so sánh trình tự đoạn A20 bệnh CML và nhóm người khỏe với trình tự gen được công bố trên Ensemble (ENSG00000118503), 2 vị trí có các đa hình/đột biến trên gen này được xác định ở cả mẫu bệnh và đối chứng.

Kết quả cho thấy, 2 nucleotide trên exon 7 (*rs374721883/p.G456V*; *rs200878487/p.S466G*) bị thay đổi và đều là SNP không đồng nghĩa khiến cho amino acid cũ bị thay thế bởi amino acid mới (Hình 3.5). Bên cạnh đó, sự phân bố kiểu gen tại vị trí *rs374721883* và *rs200878487* đều tuân theo định luật cân bằng HWE trên nhóm bệnh và toàn bộ đối tượng nghiên cứu ($p > 0,05$) (Bảng 3.7).



Hình 3.5. Điem đa hình trên gen A20 ở bệnh nhân CML

Bảng 3.7. Các đa hình nucleotide trên gen A20 ở bệnh nhân CML (SNP)

SNP	Thay đổi Nucleotide	MAF CML	HWE CML (p)	MAF Nhóm chứng	HWE Nhóm chứng (p)	HWE Quần thể (p)
rs374721883	G>T	0,01	0,9975	0	NaN	0,9991
rs200878487	C>G	0,03	0,9764	0	NaN	0,9912

Chú thích: MAF: minor allele frequency, HWE: Hardy-Weinberg equilibrium, NaN: Not a number;

Bảng 3.8. Mối tương quan giữa kiểu gen của các đa hình gen A20 và bệnh CML

SNP	Mô hình Kiểu gen	Nhóm chứng (n=80)	Nhóm bệnh (n=50)	OR	95% CI	p-Value
rs374721883	Mô hình trội					
	GG	80 (100%)	49 (98%)	1		0,3347
	GT	0	1 (2%)	4,8788	0,1949-122,1296	
	Allele					
	G	160 (100%)	99 (99%)	1		0,3357
	T	0	1 (1%)	4.8392	0,1952-119,9615	
rs200878487	Mô hình trội					
	CC	80 (100%)	47 (94%)	1		0,1043
	CG	0	3 (6%)	11.8632	0,5996-234,6979	
	Allele					
	C	160 (100%)	97 (97%)	1		0,1072
	G	0	3 (3%)	11.5231	0,5889-225,4867	

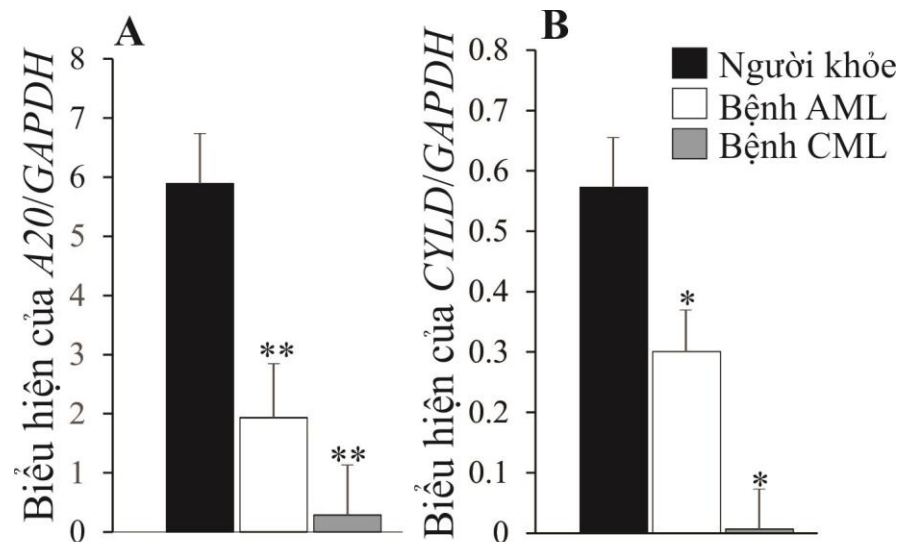
Phân tích thống kê được thực hiện trên mô hình các allele thay đổi (chiếm ưu thế). Đối với điểm đa hình tại rs374721883 và rs200878487, sự đánh giá mối liên quan giữa kiểu gen với bệnh CML chỉ được kiểm tra ở kiểu hình gen trội vì kiểu gen TT và GG tương ứng không có trong quần thể nghiên cứu. Cụ thể là tại hai vị trí này, kiểu gen GT (rs374721883), CG (rs200878487) giữa bệnh nhân CML và nhóm chứng khỏe mạnh được phát hiện là không có sự khác biệt đáng kể khi so sánh với kiểu gen GG (rs374721883), CC (rs200878487) ($p > 0,05$) và tần số allele cũng không liên quan đến khả năng mắc bệnh CML (Bảng 3.8).

3.2. Mức độ biểu hiện gen ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy

3.2.1. Biểu hiện gen *CYLD*, *A20* ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy

Enzyme deubiquitinase (DUB) là những protein đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa các quá trình bên trong tế bào thông qua việc phân tách ubiquitin khỏi protein cơ chất. Một số gen DUB như *OTUB1*, *OTUB2*, *Cezanne*, *A20*, *CYLD*... được quan tâm nghiên cứu nhằm tìm ra cơ chế gây bệnh, từ đó có thể xác định được các liệu pháp phòng và điều trị bệnh hiệu quả. Tuy nhiên, những nghiên cứu về các gen này, đặc biệt là gen *CYLD/A20* trên bệnh nhân bạch cầu dòng tủy vẫn còn hạn chế. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, mẫu cDNA của các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy và mẫu đối chứng của những người khỏe mạnh được sử dụng để phân tích mức độ biểu hiện của gen *CYLD/A20* nhằm đánh giá vai trò của các gen này đối với bệnh này.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, mức độ biểu hiện mRNA của gen *A20* giảm khoảng 3 lần ở các bệnh nhân bạch cầu tủy cấp và 39 lần ở các bệnh nhân bạch cầu tủy mạn so với người khỏe (Hình 3.6A). Tương tự như vậy, biểu hiện mRNA của gen *CYLD* ở người khỏe cao hơn ở các bệnh nhân bạch cầu tủy cấp và bệnh nhân bạch cầu tủy mạn lần lượt khoảng 2 lần và 89 lần (Hình 3.6B). Như vậy, ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy, biểu hiện của các gen *A20* và *CYLD* đều thấp hơn so với ở người khỏe và sự khác biệt này là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$ và $p < 0,05$).

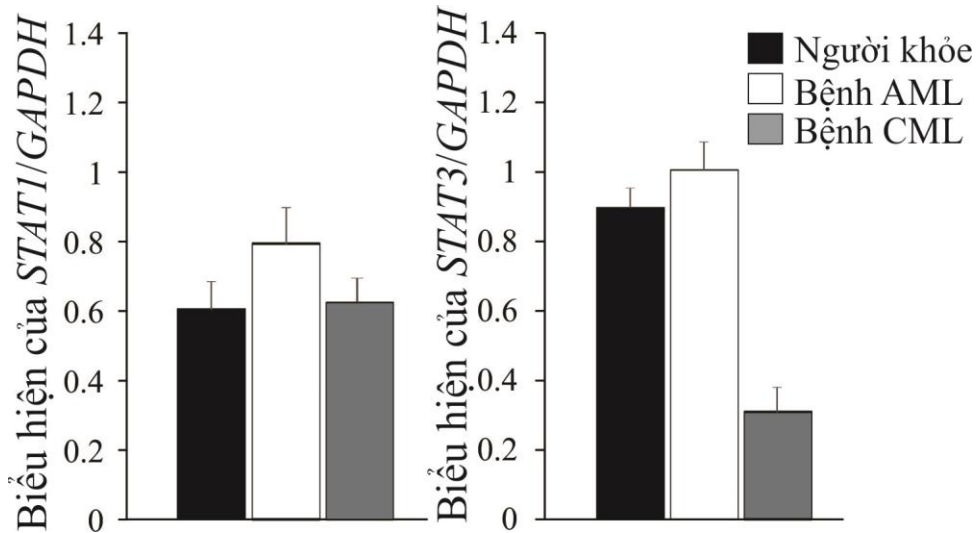


Hình 3.6. Biểu hiện của A20, CYLD trên bệnh nhân bạch cầu dòng tủy
* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm người khỏe và nhóm bệnh nhân

3.2.2. Biểu hiện gen STAT1, STAT3 ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy

STAT là họ các yếu tố phiên mã nội bào làm trung gian điều hòa sự biểu hiện của các gen liên quan đến sự tồn tại, tăng sinh, biệt hóa, phát triển của tế bào, sự chết theo chương trình apoptosis, đáp ứng miễn dịch và một số chức năng sinh học thiết yếu khác. Mỗi thành viên của họ STAT đều có những chức năng riêng biệt trong việc truyền tín hiệu và tham gia vào việc điều hòa các phản ứng của tế bào đối với các cytokine khác nhau. STAT1 được biết đến là gen tín hiệu mã hóa cho protein thực hiện chức năng ngăn chặn sự phát triển của khối u, trong khi đó STAT3 mã hóa cho protein liên quan đến sự phát triển của khối u. Do đó, trong nghiên cứu này, biểu hiện của STAT1, STAT3 được xác định nhằm tìm ra những thông tin hữu ích để tiên lượng tình trạng của bệnh.

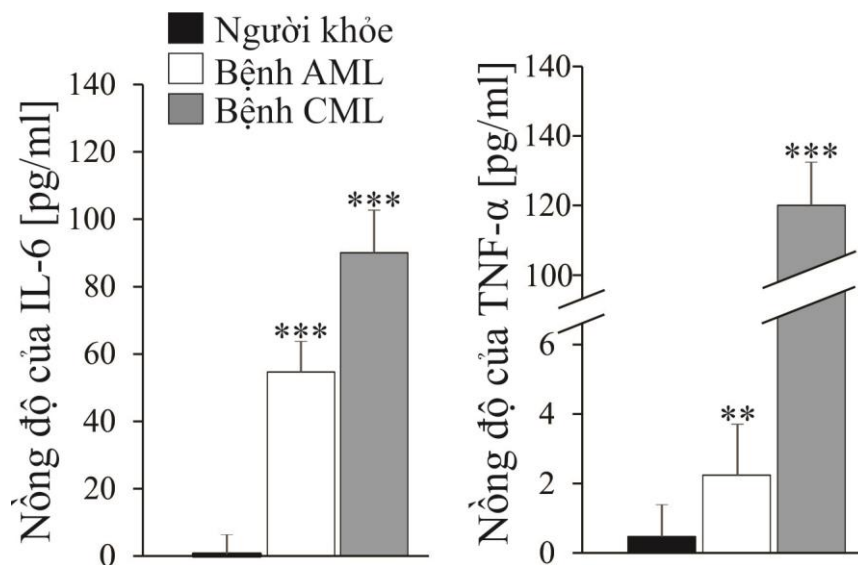
Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở hình 3.7 cho thấy rằng, mức độ biểu hiện của gen STAT1, STAT3 đều tăng ở bệnh nhân AML so với nhóm người khỏe. Tuy nhiên, sự thay đổi này là không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tương tự như vậy, mặc dù các dữ liệu cho thấy, biểu hiện của STAT1 tăng, còn biểu hiện của STAT3 giảm ở các bệnh nhân CML so với nhóm người khỏe, nhưng sự khác biệt này cũng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,04$).



Hình 3.7. Biểu hiện của gen *STAT1*, *STAT3* ở người bệnh (cột màu trắng và xám) và người khỏe (cột màu đen)

3.3. Nồng độ cytokine IL-6, TNF- α được tiết ra ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy

Trong nghiên cứu này nồng độ IL-6 và TNF- α được tiết ra ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy cũng được xác định nhằm đánh giá mức độ viêm.



Hình 3.8. Nồng độ IL-6 và TNF- α ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy

** ($p < 0,01$) và *** ($p < 0,001$): chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm người khỏe và nhóm bệnh nhân

Dựa vào số liệu được ghi nhận ở hình 3.8 cho thấy, nồng độ IL-6 tăng ở cả bệnh nhân AML và CML lần lượt khoảng 84 và 138 lần so với nhóm người

khỏe. Sự thay đổi này được ghi nhận là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Tương tự như vậy, nồng độ TNF- α được tiết ra ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy (AML và CML) tăng cao lần lượt khoảng 5 và 269 lần so với nhóm người khỏe. Sự thay đổi này cũng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.4. Mối liên quan giữa đa hình nucleotide đơn, biểu hiện của gen và nồng độ cytokine ở bệnh bạch cầu dòng tủy

3.4.1. Mối liên hệ giữa sự phân bố kiểu gen của đa hình *CYLD* với biểu hiện gen *CYLD* ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy

A20, *CYLD* được biết đến là hai trong số những gen DUB có vai trò quan trọng trong việc điều hòa âm tính các phản ứng miễn dịch trong cơ thể con người. Trong nghiên cứu đã xác định được một số điểm đa hình trên hai gen này, tuy nhiên chỉ có đa hình tại vị trí p.Q731H trên gen *CYLD* ở cả bệnh AML và CML được ghi nhận là có sự khác biệt đáng kể khi so sánh với kiểu gen GG và tần số allele C cũng cho thấy khả năng liên quan đến giảm nguy cơ mắc bệnh CML cao.

*Bảng 3.9. Sự liên quan giữa sự phân bố kiểu gen của đa hình tại vị trí p.Q731H trên gen *CYLD* và biểu hiện gen *CYLD* (p-value)*

Bệnh	Vị trí đa hình	Biểu hiện gen <i>CYLD</i>
Bệnh AML	p.Q731H	0,377
Bệnh CML	p.Q731H	0,121

Kết quả phân tích mối liên quan giữa sự phân bố kiểu gen của đa hình tại vị trí p.Q731H trên gen *CYLD* và biểu hiện gen *CYLD* (Bảng 3.9) dựa trên kiểm định Mann-Whitney U cho thấy, không có mối liên hệ giữa tần số kiểu gen của đa hình tại vị trí nghiên cứu trên gen *CYLD* với biểu hiện gen *CYLD* ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy.

3.4.2. Mối liên hệ giữa sự phân bố kiểu gen của đa hình *CYLD* với biểu hiện gen *STAT1* ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy

Trong nghiên cứu này, biểu hiện gen *STAT1* cũng được xác định là tăng ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy so với nhóm người khỏe. Mặc dù sự thay đổi

trong biểu hiện của gen *STAT1* ở cả bệnh AML và CML đều không có ý nghĩa thống kê, nhưng với vai trò của gen *STAT1*, cũng như kết quả ban đầu đạt được, chúng tôi tiếp tục đánh giá mối liên hệ với sự phân bố giữa kiểu gen tại vị trí p.Q731H nhằm tìm ra được cơ chế bệnh sinh của bệnh bạch cầu dòng tủy.

Kết quả phân tích dựa trên kiểm định Mann-Whitney U chỉ ra rằng, không có mối liên hệ nào giữa sự phân bố kiểu gen tại vị trí p.Q731H trên gen *CYLD* ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy và biểu hiện gen *STAT1* (Bảng 3.10).

Bảng 3.10. Sự liên quan giữa đa hình trên gen *CYLD* và biểu hiện gen *STAT1*

Đa hình gen	Bệnh		Biểu hiện gen <i>STAT1</i>
p.Q731H	Bệnh AML	<i>p</i> -value	0,684
	Bệnh CML	<i>p</i> -value	0,317

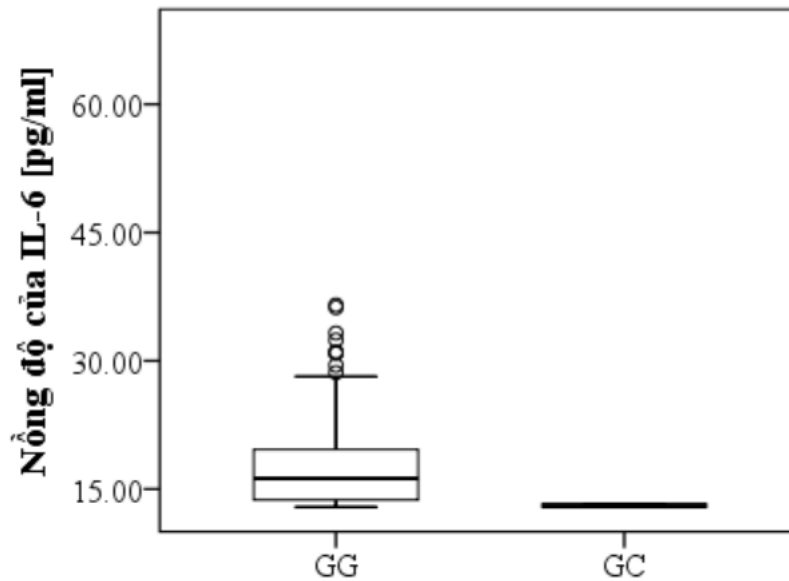
3.4.3. Mối liên hệ giữa sự phân bố kiểu gen của đa hình *CYLD* với nồng độ IL-6 và TNF- α ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy

Các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy thường giải phóng ra một lượng lớn các cytokine IL-6, TNF- α . Do đó, với mục đích nghiên cứu được đặt ra, chúng tôi tiếp tục đánh giá mối liên hệ giữa sự phân bố kiểu gen tại vị trí p.Q731H trên gen *CYLD* với nồng độ IL-6 và TNF- α do các bệnh nhân AML và CML tiết ra.

Bảng 3.11. Sự liên quan giữa đa hình trên gen *CYLD* và nồng độ IL-6, TNF- α

Đa hình gen	Bệnh		Nồng độ IL-6	Nồng độ TNF- α
p.Q731H	Bệnh AML	<i>p</i> -value	0,033	0,321
	Bệnh CML	<i>p</i> -value	0,298	0,115

Kết quả nghiên cứu dựa trên kiểm định Mann-Whitney U cho thấy, đa hình tại vị trí p.Q731H trên gen *CYLD* có mối liên quan chặt chẽ với nồng độ IL-6 ở các bệnh nhân AML ($p < 0,05$). Cụ thể, trong số các bệnh nhân AML thì bệnh nhân với kiểu gen GG sẽ có nồng độ IL-6 cao hơn hẳn so với bệnh nhân có kiểu gen GC (Bảng 3.11, Hình 3.9).



Hình 3.9. Mối liên hệ giữa đa hình tại vị trí p.G731H trên gen *CYLD* và nồng độ IL-6 ở bệnh nhân AML

3.4.4. Mối liên hệ giữa mức độ biểu hiện của *A20*, *CYLD* với gen tín hiệu *STAT1*

A20, *CYLD* là protein DUB đóng vai trò điều hòa các con đường tín hiệu khác nhau nhằm điều chỉnh các quá trình sinh lý bên trong cơ thể, từ phản ứng miễn dịch và phản ứng viêm đến sự tiến triển của chu trình tế bào, quá trình sinh tinh và tạo xương. Cụ thể là, *A20*, *CYLD* điều chỉnh làm giảm tín hiệu NF- κ B. Trong đó họ các yếu tố phiên mã (STAT) đóng vai trò trung gian cho sự biểu hiện của một số lượng lớn gen trong phản ứng viêm [157]. Nhiều nghiên cứu cho thấy, mức độ biểu hiện của gen *A20*, *CYLD* thường thấp ở một số bệnh nhân ung thư và khi các gen này bị làm bất hoạt thì sẽ thúc đẩy sự tăng sinh của các tế bào ung thư [158]. Chính vì vậy, việc nghiên cứu mối liên hệ giữa sự biểu hiện của gen *A20*, *CYLD* và các gen tín hiệu *STAT1* có thể là cơ sở để tìm ra được cơ chế bệnh sinh của các bệnh nhân ung thư bạch cầu dòng tủy.

Kết quả đánh giá dựa trên kiểm định Spearman cho thấy, không tìm thấy mối liên hệ nào giữa biểu hiện gen *A20*, *CYLD* và gen tín hiệu *STAT1* ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy (AML và CML) (Bảng 3.12).

Bảng 3.12. Sự liên quan giữa mức độ biểu hiện A20, CYLD và gen tín hiệu

Biểu hiện gen	Bệnh		Biểu hiện gen STAT1
A20	Bệnh AML	Chỉ số Spearman	-0,182
		<i>p</i> -value	0,247
	Bệnh CML	Chỉ số Spearman	0,143
		<i>p</i> -value	0,760
CYLD	Bệnh AML	Chỉ số Spearman	0,192
		<i>p</i> -value	0,182
	Bệnh CML	Chỉ số Spearman	0,607
		<i>p</i> -value	0,148

** ($p < 0,005$): Chỉ ra được mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa nhóm khỏe và nhóm đối chứng

Như vậy, trong nghiên cứu này, ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy, đã xác định được một số điểm đa hình trên gen A20, CYLD, sự biểu hiện của gen A20, CYLD giảm và sự thay đổi này đều có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$); Tương tự như vậy, biểu hiện của STAT1 đều tăng ở bệnh bạch cầu dòng tủy, nhưng chỉ có biểu hiện STAT1 ở các bệnh nhân AML mới có sự thay đổi đáng kể so với nhóm người khỏe ($p < 0,05$), trong khi đó biểu hiện STAT3 ở bệnh CML và AML hầu như không thay đổi so với nhóm người khỏe. Nồng độ IL-6/TNF- α cũng được xác định là đều tăng cao ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy khi so sánh với người khỏe mạnh; Tuy nhiên, khi phân tích mối liên hệ giữa các kết quả tìm được thì bước đầu chỉ xác định được giữa đa hình tại vị trí p.Q731H trên gen CYLD và nồng độ IL-6 ở các bệnh nhân AML có mối quan liên quan chặt chẽ với nhau, còn các kết quả khác vẫn chưa xác định rõ mối liên quan. Mặc dù vậy, với những kết quả đạt được, chúng tôi tiếp tục đánh giá vai trò của gen A20, CYLD trong nghiên cứu tiếp theo về bệnh bạch cầu dòng tủy.

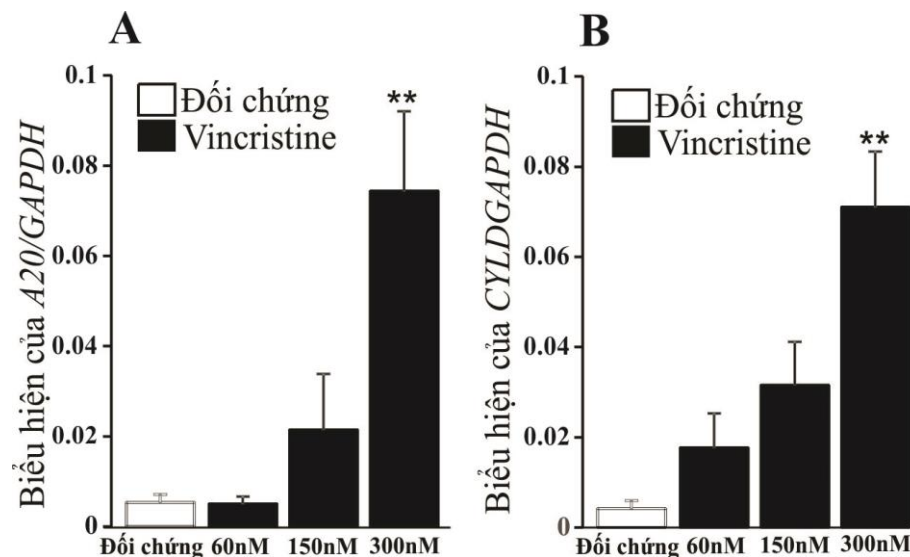
3.5. Xác định vai trò của A20, CYLD đối với quá trình tăng sinh và apoptosis của tế bào K562

3.5.1. Xác định vai trò của gen A20, CYLD đối với sự tăng sinh của tế bào K562

Vincristine được biết đến là chất có khả năng thúc đẩy quá trình apoptosis ở một số bệnh ung thư như bệnh bạch cầu lympho và bệnh ung thư hạch [159,

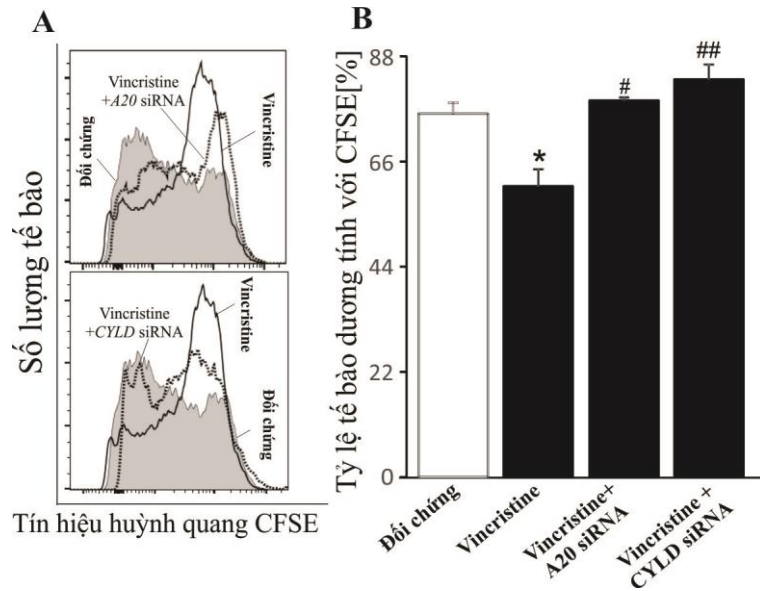
160]. Bên cạnh đó, mức độ biểu hiện gen *A20*, *CYLD* ở bệnh CML đã được xác định là giảm đáng kể so với nhóm đối chứng là những người khỏe mạnh. Do đó, việc xác định được rằng vincristine có làm thay đổi mức độ biểu hiện gen *A20*, *CYLD*, cũng như ảnh hưởng tới chức năng của tế bào K562 (dòng tế bào của bệnh CML) hay không là bước tiến quan trọng nhằm tìm hướng hỗ trợ điều trị bệnh ung thư bạch cầu dòng tủy, đặc biệt là bệnh CML.

Trong nghiên cứu này, khi tế bào K562 được xử lý bởi vincristine ở các nồng độ khác nhau (60-300 nM) thì mức độ biểu hiện mRNA của gen *A20*, *CYLD* đều cao hơn rõ rệt so với nhóm đối chứng, đặc biệt khi tế bào này được xử lý bởi vincristine ở nồng độ 300 nM (Hình 3.10). Như vậy, vấn đề được đặt ra là liệu mức độ biểu hiện *A20*, *CYLD* có làm ảnh hưởng đến chức năng của tế bào K562 hay không? Để có thể giải đáp được điều này, tế bào K562 được làm bất hoạt gen *A20*, *CYLD* trong 48 giờ, rồi tiếp tục được xử lý với vincristine 300 nM trong 24 giờ. Các tế bào sau đó được thu nhận và nhuộm với CFSE, nuôi cấy trong 5 ngày ở điều kiện 37°C, 5% CO₂ nhằm kiểm tra sự tăng sinh của tế bào K562 bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở hình 3.11.



Hình 3.10. Mức độ biểu hiện *A20*, *CYLD* của tế bào K562 khi xử lý với vincristine
 ** ($p < 0,01$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tế bào K562 được và không được xử lý bởi vincristine

Dựa vào biểu đồ huỳnh quang CFSE thu được từ các tế bào K562 có thể nhận thấy, sự tăng sinh của K562 giảm đáng kể khi được xử lý bởi vincristine 300nM. Tuy nhiên, trong trường hợp tế bào bị làm bất hoạt *A20*, *CYLD* thì tác dụng ức chế của vincristine đối với sự tăng sinh của tế bào không còn nữa. Như vậy, vincristine ức chế sự tăng sinh tế bào thông qua sự biểu hiện của gen *A20*, *CYLD*.



Hình 3.11. Ảnh hưởng của *A20*, *CYLD* đến sự tăng sinh của tế bào K562

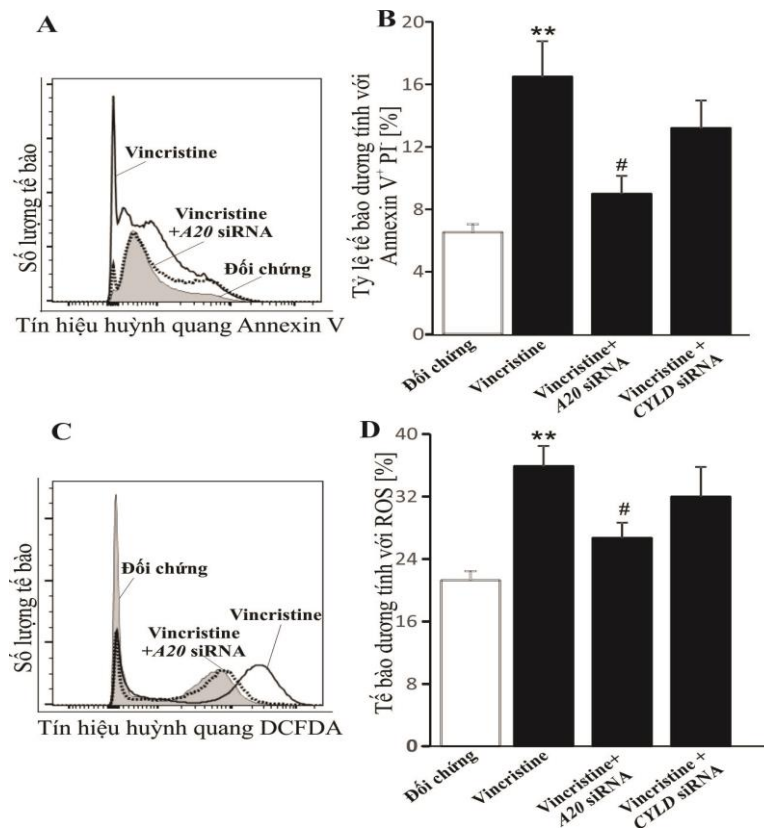
* ($p < 0.05$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tế bào K562 được và không được xử lý bởi vincristine; # ($p < 0.05$) và ## ($p < 0.01$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tế bào K562 được xử lý với vincristine trong trường hợp bất hoạt và không bất hoạt *A20*, *CYLD*

3.5.2. Xác định vai trò của *A20*, *CYLD* với quá trình apoptosis của tế bào K562

Nhằm mục đích kiểm tra khả năng tăng sinh của tế bào K562 khi được xử lý với vincristine giảm dần có liên quan đến quá trình apoptosis hay không, các tế bào K562 được nhuộm với một số kháng thể như Annexin V và DCFDA. Sau đó xác định số lượng tế bào K562 dương tính với các kháng thể này bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở hình 3.12.

Dựa vào biểu đồ huỳnh quang thu được từ các tế bào K562 cho thấy, việc xử lý bằng vincristine (300 nM) đã làm tăng cường đáng kể số lượng tế bào dương tính với Annexin V⁺/PI⁻ và sự tích tụ ROS. Tuy nhiên, khi tế bào K562 bị làm bất hoạt gen *A20*, *CYLD* thì số lượng tế bào này dương tính với kháng thể Annexin V⁺/PI⁻ và sự tích tụ ROS giảm so với tế bào không bị bất hoạt gen. Khi

tế bào K562 bị làm bất hoạt gen *A20* thì hiệu quả này thể hiện rõ ràng nhất và sự thay đổi được ghi nhận là có ý nghĩa thống kê, còn khi gen *CYLD* bị bất hoạt thì sự thay đổi là không đáng kể.



Hình 3.12. Ảnh hưởng của *A20*, *CYLD* đến khả năng sống sót của tế bào K562

** ($p < 0,01$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tế bào K562 được và không được xử lý bởi vincristine; # ($p < 0,05$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tế bào K562 được xử lý với vincristine trong trường hợp bất hoạt và không bất hoạt *A20*, *CYLD*

Như vậy, biểu hiện của gen *A20* có mối liên hệ với quá trình tăng sinh, apoptosis của tế bào K562, còn biểu hiện của gen *CYLD* cũng có thể có mối liên hệ với các quá trình này nhưng mối liên hệ này cần được tiếp tục nghiên cứu và đánh giá rõ hơn.

3.6. Xác định vai trò của gen *CYLD* đối với đại thực bào được biệt hóa bởi M-CSF thông qua tín hiệu STAT1

3.6.1. Vai trò của *CYLD* đối với đại thực bào được biệt hóa bởi M-CSF

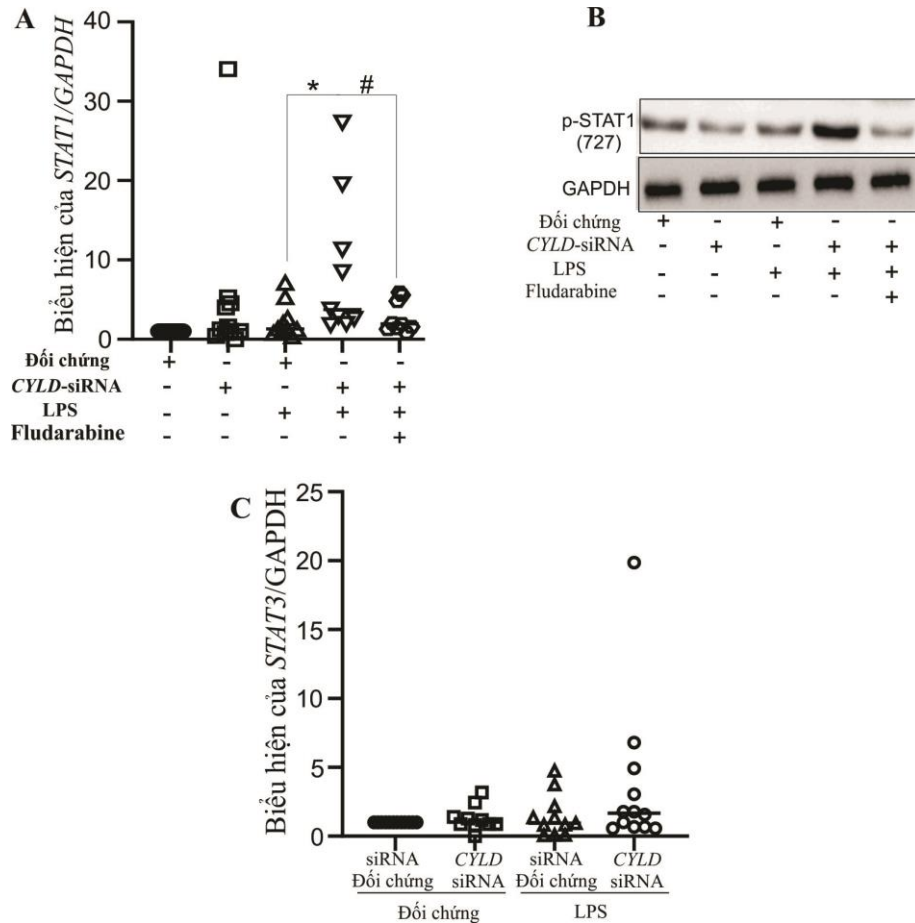
Do LPS là một chất dễ dàng được nhận biết bởi thụ thể TLR4 nhằm kích hoạt quá trình phiên mã của nhiều gen liên quan đến khả năng điều hòa sự trưởng thành/biệt hóa và kích hoạt đại thực bào [161] nên việc đánh giá xem liệu

CYLD có tham gia vào việc điều hòa các chức năng của đại thực bào ở người do LPS gây ra hay không.

Tế bào PBMC được phân lập từ máu toàn phần của các tình nguyện viên bằng phương pháp ly tâm phân lớp theo tỷ trọng sử dụng Ficoll. Mật độ tế bào PBMC được phân lập qua các lần thực hiện thí nghiệm khá ổn định (10^6 TB/mL) và điều này rất thích hợp cho việc nuôi cấy tế bào PBMC, cũng như cho quá trình biệt hóa các tế bào có trong PBMC sử dụng cytokine M-CSF (M-HP).

Các tế bào sau khi được biệt hóa từ tế bào PBMC sẽ được làm bất hoạt gen *CYLD* bằng phương pháp can thiệp siRNA nhằm ngăn chặn sự biểu hiện của gen *CYLD* với tính đặc hiệu và hiệu quả cao, từ đó đánh giá ảnh hưởng của gen *CYLD* đến sự biểu hiện của các gen tín hiệu khác. Các tế bào sau khi làm bất hoạt gen *CYLD* tiếp tục được kích hoạt bởi LPS. Sau đó, các tế bào này được thu nhận, tách chiết RNA và đánh giá hiệu quả làm bất hoạt gen *CYLD* cũng như xác định được mức độ biểu hiện của *STAT1*, *STAT3* bằng phản ứng qRT-PCR, từ đó có thể làm cơ sở để tìm ra được mối liên quan giữa sự biểu hiện của gen *CYLD* với các gen liên quan. Fludarabine là hợp chất thường được sử dụng để điều trị các khối u ác tính về huyết học nhằm điều chỉnh làm giảm tín hiệu hoặc sự kích hoạt phiên mã *STAT1* bằng cách ức chế quá trình phosphoryl hóa STAT1 ở cả tế bào thường và tế bào ung thư [162]. Do đó, khi tế bào được xử lý với fludarabine thì mức độ biểu hiện *STAT1* giảm đáng kể. Như vậy, việc xử lý tế bào bằng cách sử dụng *CYLD* siRNA và fludarabine có thể giải thích rõ hơn về mối liên hệ giữa *CYLD* và tín hiệu *STAT1*.

Kết quả ghi nhận ở hình 3.13A-B cũng cho thấy, việc các đại thực bào được xử lý bởi *CYLD* siRNA làm tăng đáng kể mức độ biểu hiện mRNA của *STAT1* và quá trình phosphoryl hóa STAT1 khi được kích hoạt bởi LPS, nhưng không làm ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của *STAT3* (Hình 3.13C). Tuy nhiên khi đại thực bào được xử lý với fludarabine thì hiệu quả làm tăng mức độ biểu hiện mRNA của *STAT1* giảm xuống. Do đó, biểu hiện của *CYLD* đã góp phần đáng kể trong việc ức chế kích hoạt tín hiệu *STAT1* trong đại thực bào.



Hình 3.13. Ảnh hưởng của CYLD đến tín hiệu STAT1 trên đại thực bào (M-HP)

* ($p < 0,05$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa M-HP bị bất hoạt và không bất hoạt CYLD; # ($p < 0,05$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa M-HP bị bất hoạt hoặc không bất hoạt CYLD so với các tế bào này khi được kích hoạt bởi LPS

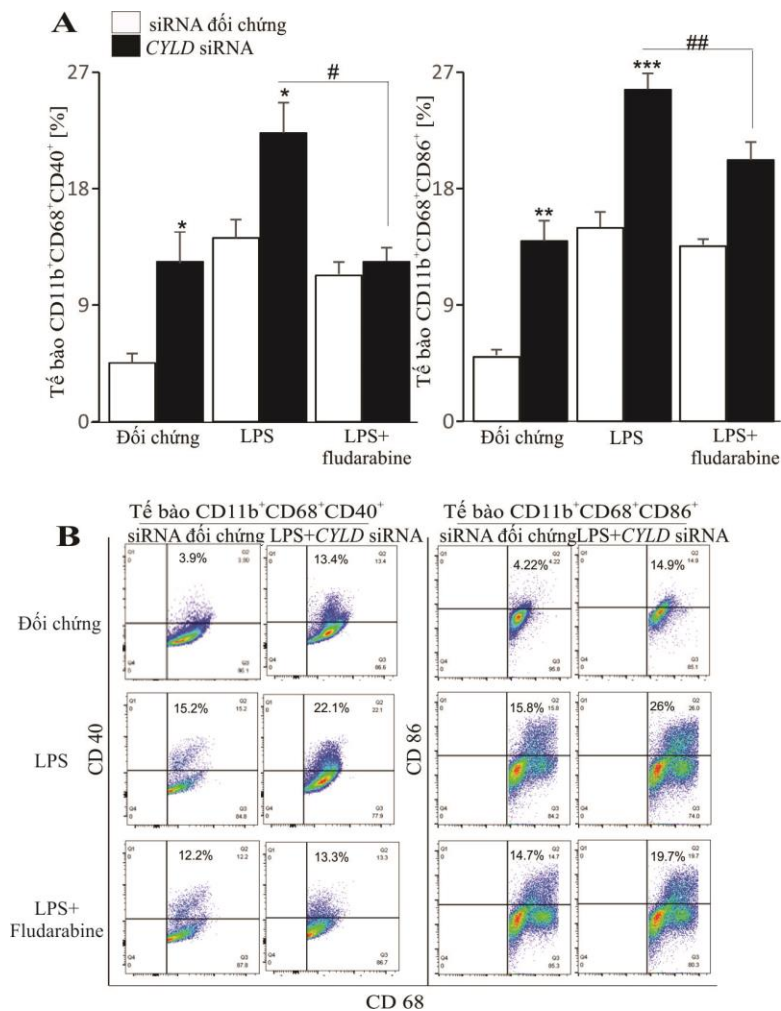
3.6.2. Vai trò của CYLD đối với các chức năng của đại thực bào thông qua tín hiệu STAT1

Để giải đáp cho câu hỏi liệu chức năng của đại thực bào có được điều chỉnh bởi CYLD thông qua tín hiệu STAT1 hay không, các tế bào này được chuyển nạp CYLD siRNA trong 48 giờ và tiếp tục được xử lý với fludarabine trong trường hợp được hoặc không được kích hoạt bởi LPS trong 24 giờ tiếp theo. Sau đó, các tế bào được thu nhận và nhuộm với các dấu ấn sinh học CD11b, CD68, CD40 và CD86.

Kết quả nghiên cứu thể hiện ở hình 3.14A-B cho thấy, bình thường tỷ lệ phần trăm đại thực bào biểu hiện 3,9% CD40⁺ và 4,22% CD86⁺, nhưng khi được kích hoạt bởi LPS thì tỷ lệ phần trăm tế bào biểu hiện các dấu ấn sinh học này

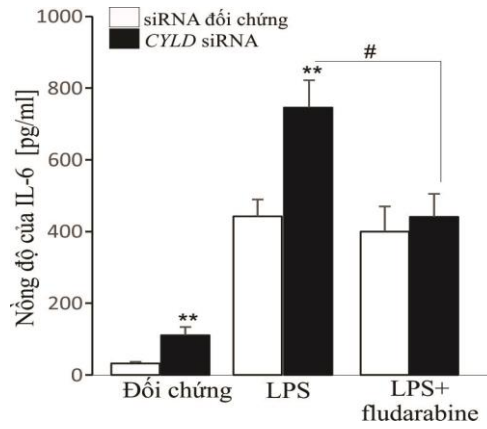
tăng cao. Đặc biệt hơn, khi không có sự biểu hiện của *CYLD* thì tỷ lệ này còn tăng cao hơn và đạt lần lượt khoảng 22,1% (CD40⁺), 26% (CD86⁺). Tuy nhiên, mức độ biểu hiện CD40⁺ và CD86⁺ của đại thực bào trưởng thành bị bất hoạt gen *CYLD* lại giảm đáng kể khi được xử lý với fludarabine.

Tương tự như vậy, khi được kích hoạt bởi LPS, các đại thực bào đều tăng khả năng giải phóng IL-6 và nồng độ cytokine này còn cao hơn khi đại thực bào bị làm bất hoạt gen *CYLD* so với các tế bào không được xử lý với *CYLD* siRNA. Trong khi đó nồng độ IL-6 không có sự khác biệt giữa đại thực bào bị bất hoạt gen và không bị bất hoạt *CYLD* khi fludarabine có mặt trong môi trường nuôi cấy tế bào (Hình 3.15).

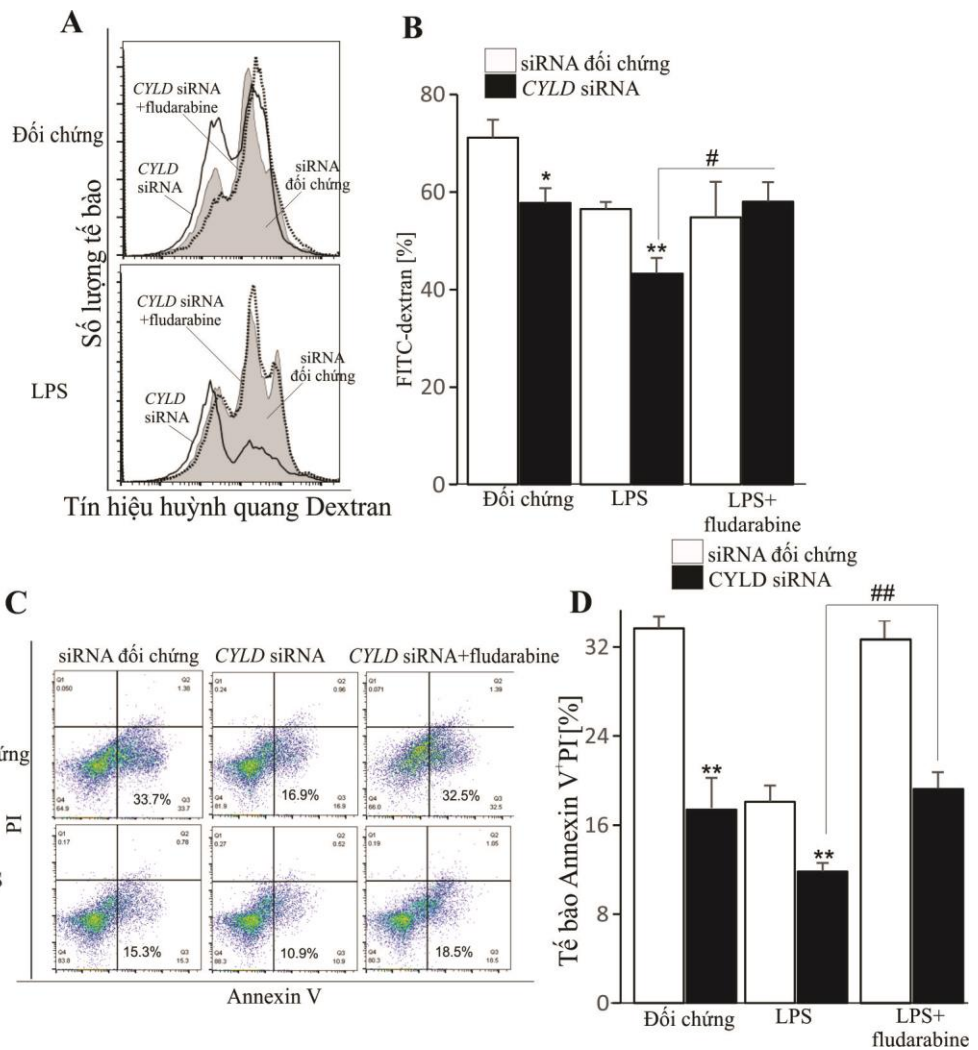


Hình 3.14. Biểu hiện CD40⁺ và CD86⁺ của đại thực bào M-HP

* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa M-HP bị bất hoạt và không bất hoạt *CYLD* biểu hiện CD40⁺ và CD86⁺; # ($p < 0,05$), ## ($p < 0,01$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa M-HP bị bất hoạt *CYLD* và kích hoạt bởi LPS trong trường hợp xử lý và không xử lý với fludarabine biểu hiện CD40⁺ và CD86⁺



Hình 3.15. Nồng độ IL-6 do đại thực bào M-HP tiết ra



Hình 3.16. Ảnh hưởng của CYLD đến chức năng hoạt động của M-HP qua tín hiệu STAT1

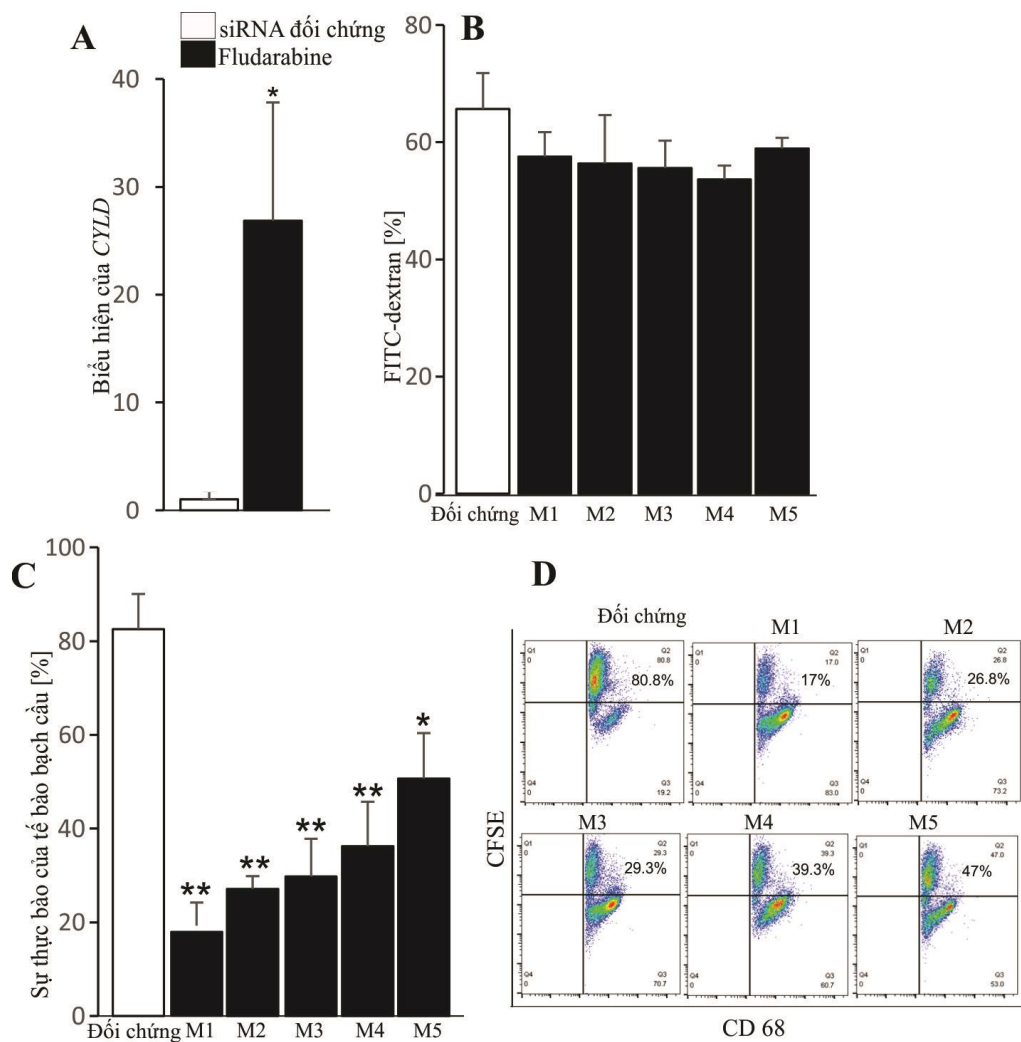
*($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ đại thực bào M-HP bị bất hoạt và không bất hoạt CYLD dương tính với FITC-dextran và Annexin V⁺/PI; #($p < 0,05$) và ##($p < 0,01$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa M-HP được kích hoạt bởi LPS và bất hoạt CYLD trong trường hợp xử lý hay không xử lý với fludarabine dương tính với FITC-dextran và Annexin V⁺/PI

Ngoài việc đánh giá sự trưởng thành và khả năng tiết cytokine IL-6 thì đại thực bào cũng được xác định khả năng thực bào các tế bào lạ và các tế bào ung thư thông qua việc đánh giá sự hấp thụ FITC-dextran và CFSE. Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng, sự trưởng thành của đại thực bào làm giảm hiệu quả thực bào của chúng [163]. Và trong nghiên cứu này, việc chuyển nạp *CYLD* siRNA vào đại thực bào làm giảm đáng kể sự hấp thụ FITC-dextran (Hình 3.16) và ngăn chặn một phần quá trình thực bào của tế bào AML (Hình 3.17) cũng khẳng định rõ hơn về khả năng thực bào của đại thực bào trưởng thành. Tuy nhiên, với sự hiện diện của fludarabine, vai trò của *CYLD* đối với sự hấp thụ FITC-dextran của các đại thực bào cũng loại bỏ (Hình 3.16).

Bên cạnh đó, sự thực bào của mầm bệnh còn dẫn đến quá trình apoptosis của đại thực bào [164]. Do đó, nghiên cứu này tiếp tục đánh giá biểu hiện *CYLD* bị thay đổi có ảnh hưởng đến sự sống sót của đại thực bào bình thường hay không. Bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy có thể xác định được tỷ lệ tế bào dương tính với Annexin V⁺/PI⁻ và qua đó có thể biết được khả năng sống sót của các tế bào này. Cụ thể, khi đại thực bào được chuyển nạp *CYLD* siRNA làm giảm đáng kể số lượng tế bào dương tính với Annexin V⁺/PI⁻, tuy nhiên hiệu quả này bị loại bỏ khi có sự hiện diện của fludarabine (Hình 3.16C-D). Như vậy, *CYLD* thúc đẩy sự hấp thụ FITC-dextran và quá trình apoptosis của đại thực bào khi có sự biểu hiện của tín hiệu *STAT1*.

3.6.3. Xác định vai trò của *CYLD* đối với quá trình thực bào của đại thực bào ở bệnh AML

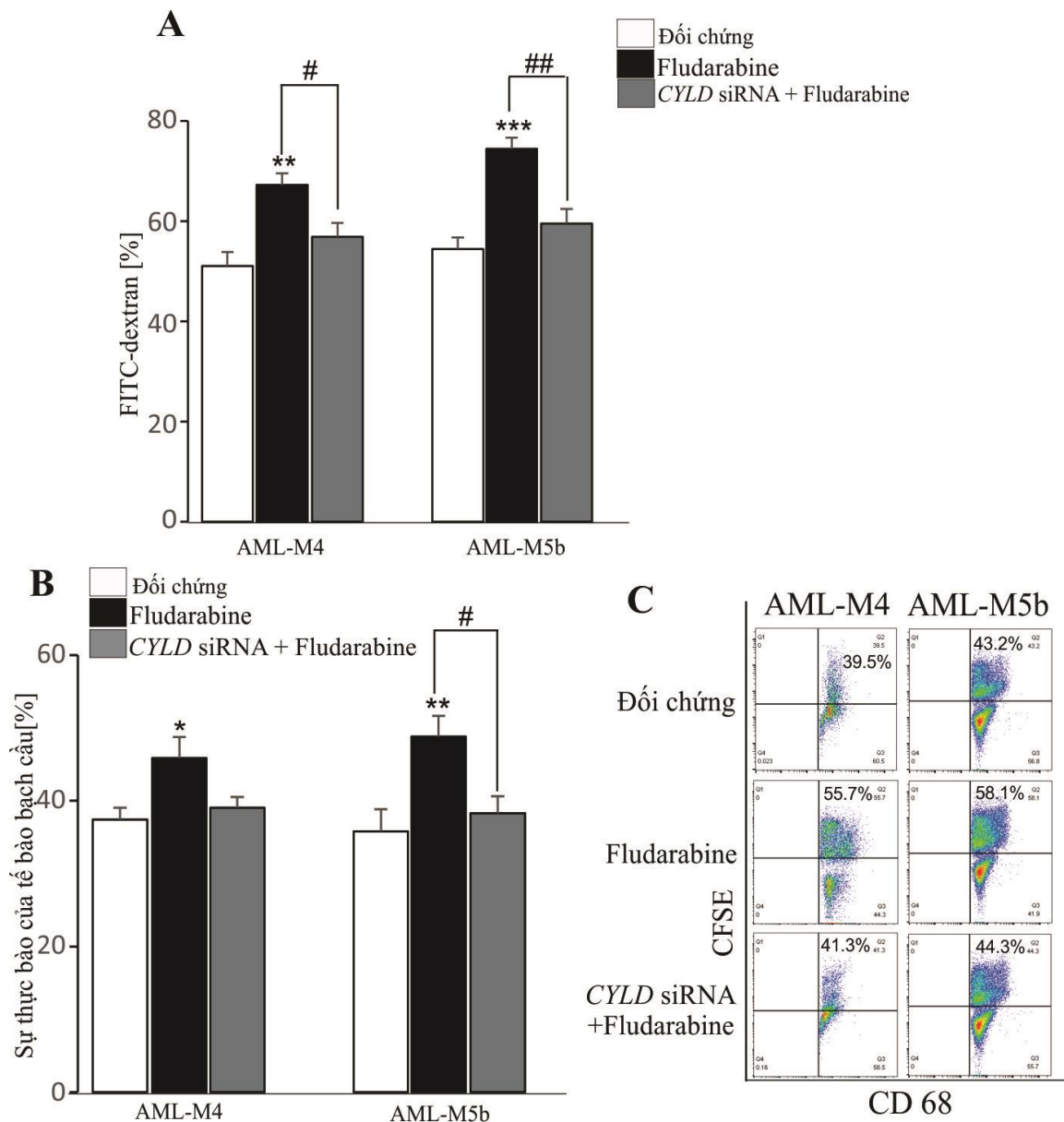
Với kết quả thu được ở thí nghiệm trước đó, có thể nhận thấy, biểu hiện gen *CYLD* giảm và biểu hiện *STAT1* cũng giảm ở bệnh AML so với nhóm người khỏe. Đồng thời cũng đã xác định được mối liên quan giữa biểu hiện *CYLD* và *STAT1* trên đại thực bào được biệt hóa từ tế bào PBMC của nhóm người khỏe. Do đó, việc đánh giá mối liên hệ giữa sự biểu hiện *CYLD* và *STAT1* cũng được kiểm tra trên các đại thực bào của bệnh nhân AML. Trong thí nghiệm này đã chứng minh được số lượng đại thực bào thu được từ bệnh nhân AML (M-AML) là tương đương với số lượng đại thực bào từ người khỏe (M-HP).



Hình 3.17. Sự thực bào của đại thực bào M-AML khi được xử lý với fludarabine

Khi đại thực bào M-AML được xử lý bởi fludarabine cho thấy, mức độ biểu hiện của *CYLD* tăng đáng kể (Hình 3.17A) và trong trường hợp gen *STAT1* bị bất hoạt số lượng đại thực bào được biệt hóa từ các thể của bệnh AML biểu hiện $CD11b^+CD68^+CD86^+$ và $CD11b^+CD68^+CD40^+$ là không thay đổi. Tương tự như vậy, nồng độ IL-6 và TNF- α do M-AML tiết ra bởi các thể là không thay đổi trong trường hợp tế bào được xử lý với fludarabine. Các thông tin này đã khẳng định giữa biểu hiện *CYLD* và các phản ứng viêm ở bệnh nhân AML không có mối liên quan. Hơn thế nữa, trong khi sự hấp thụ FITC-dextran của M-AML tương đương với sự hấp thụ của của M-HP (Hình 3.17B) thì quá trình thực bào do M-AML lại thấp hơn đáng kể so với M-HP (Hình 3.17C-D). Các dữ liệu này cho thấy hoạt động thực bào của M-AML đã bị ảnh hưởng do sự hình thành

của bệnh. Do vậy, với những thông tin về chức năng hoạt động của STAT1, cũng như mối liên hệ với CYLD thì khi làm bất hoạt *STAT1* có cải thiện hoạt động của M-AML trong trường hợp được xử lý bởi fludarabine hay không?



Hình 3.18. Ảnh hưởng của CYLD đối với sự thực bào của M-AML

*($p < 0,05$), **($p < 0,01$) và *** ($p < 0,001$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa đại thực bào M-AML trong việc hấp thụ FITC-dextran và sự thực bào tế bào bạch cầu khi được xử lý và không được xử lý bởi fludarabine. #($p < 0,05$) và ## ($p < 0,01$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa M-AML bị làm bất hoạt và không bất hoạt CYLD trong việc hấp thụ FITC-dextran và sự thực bào tế bào bạch cầu khi được xử lý bởi fludarabine

Kết quả ghi nhận được ở hình 3.18A đã cho thấy, sự hấp thụ FITC-dextran của M-AML (thể M4/M5b) đã tăng đáng kể so với M-HP khi được xử lý với fludarabine, tuy nhiên hiệu ứng này sẽ bị loại bỏ khi đại thực bào được chuyển nạp *CYLD* siRNA (Hình 3.18A). Ngoài ra, khi xử lý bằng fludarabine cũng đã kích thích việc M-AML loại bỏ các tế bào bạch cầu rất nhiều đối với thể M5b và chỉ một phần đối với thể M4 (hình 3.18B-C). Như vậy, *CYLD* đóng vai trò quan trọng đối với quá trình thực bào của M-AML (M4/M5b).

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (AML) là một bệnh lý ác tính khá phổ biến xảy ra ở tủy xương, trong đó các tiền chất tạo máu tăng sinh không kiểm soát được và giải phóng quá mức các tế bào máu chưa trưởng thành. Hầu hết các thể của bệnh AML được phân biệt với các bệnh rối loạn máu thông qua việc xác định số lượng tế bào chưa trưởng thành (>20%) có trong tủy xương [165]. Các bệnh nhân mắc bệnh AML thường bị nhiễm trùng, thiếu máu, và thậm chí còn xảy ra hiện tượng xuất huyết. Trong khi đó, bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính (CML) là một loại ung thư bắt nguồn từ một số tế bào tạo máu có trong tủy xương. Bệnh CML được đặc trưng bởi sự gia tăng của các tế bào dòng tủy chưa trưởng thành và bạch cầu hạt. Trong một số trường hợp, các tế bào dòng tủy chưa trưởng thành này sẽ xâm nhập vào máu và khiến cho hệ thống miễn dịch của con người hoạt động không được bình thường. Ngoài ra, ở các bệnh nhân CML còn xảy ra sự dung hợp gen *BCR-ABL* và hình thành nhiễm sắc thể Philadelphia. Hầu hết các bệnh nhân CML không có bất kỳ dấu hiệu và triệu chứng nào mà chỉ được chẩn đoán khi xét nghiệm máu vì một lý do khác [21].

4.1. Đánh giá đa hình, biểu hiện gen *A20*, *CYLD* ở bệnh bạch cầu dòng tủy

4.1.1. Đánh giá đa hình trên gen *A20*/ *CYLD*

Protein A20, CYLD được biết đến là hai enzyme DUB đóng vai trò quan trọng trong việc phân cắt chuỗi polyubiquitin ở các protein mục tiêu nhằm ức chế sự hoạt động của các con đường tín hiệu NF- κ B để đáp ứng lại được các tín hiệu kích thích, từ đó thúc đẩy sự phát triển, tăng sinh và quá trình apoptosis của tế bào. Do đó, nghiên cứu xác định các bất thường trên gen *A20* và *CYLD* ở các bệnh, đặc biệt là bệnh ung thư được thực hiện có thể tìm ra cơ chế bệnh sinh của bệnh, đồng thời qua đó xây dựng được biện pháp điều trị bệnh hiệu quả. Thực tế, một số nghiên cứu đã khẳng định vai trò của gen *A20* và *CYLD*. Cụ thể, ở người, nếu gen *A20* bị bất hoạt có thể gây ra bệnh ung thư hạch bằng cách kích thích sự tăng sinh của các tế bào bạch cầu [75]. Đột biến gen *A20* cũng liên quan đến nguy cơ mắc bệnh T-ALL [79] và bệnh CLL [166]; Những người mang SNP ở

exon 5,6,7 trên gen *A20* thường có nguy cơ cao mắc bệnh tự miễn và bệnh bạch cầu dòng lympho [79, 166, 167]. Trong khi đó biểu hiện gen *CYLD* giảm lại liên quan đến bệnh ung thư thể rắn và ALL [168]. Sự hiện diện của *CYLD* thúc đẩy quá trình apoptosis ở bệnh ALL và CLL [45]. Tuy nhiên, khi bị đột biến mất 9 Nu trên exon 7 và thay thế 1 Nu trên exon 10 của gen *CYLD* làm tăng nguy cơ mắc bệnh B-CLL [169]. Các nghiên cứu về chức năng miễn dịch đã chỉ ra rằng, *A20* và *CYLD* tham gia vào quá trình ức chế các phản ứng viêm và thúc đẩy sự tăng sinh của tế bào bạch cầu trong cơ thể, từ đó ngăn ngừa nguy cơ phát triển bệnh ung thư [170]. Ở chuột bị thiếu *A20*, tình trạng viêm và suy nhược xảy ra rất nghiêm trọng do sự tích tụ các tế bào lympho, bạch cầu hạt và đại thực bào hoạt hóa ở trong gan và lách [171]. Trong khi đó, những con chuột có biểu hiện *CYLD* giảm thường xảy ra những bất thường trong quá trình kích hoạt tế bào lympho T và tế bào lympho B [172].

Nghiên cứu toàn bộ hệ gen người đã chỉ ra rằng, các SNP của gen *A20* có mối tương quan với khả năng nhạy cảm của các bệnh lý gây viêm và bệnh tự miễn ở người [69, 70]. Do chức năng chống viêm mạnh của *A20* nên các SNP của gen này đều liên quan đến nguy cơ mắc bệnh và làm giảm khả năng biểu hiện hoặc làm giảm chức năng của *A20*. Đa hình đơn nucleotide (SNP) trên gen *A20* làm giảm khả năng liên kết của *A20* với các tiểu đơn vị NF- κ B, từ đó dẫn đến giảm biểu hiện chức năng *A20*, đồng thời dẫn đến cơ chế bệnh sinh của bệnh tự miễn và ung thư [173]. Ví dụ, SNP liên quan đến bệnh lupus ban đỏ hệ thống nằm trong vùng mã hóa *A20* khiến cho phenylalanine thay thế cysteine ở vị trí amino acid 127 và làm giảm chức năng của protein *A20* [72], rồi từ đó gây ra các biến chứng thận và huyết học. Các SNP của *A20* liên quan đến bệnh khác nằm ngoài vùng mã hóa cũng cho thấy rằng chúng làm tăng khả năng nhạy cảm với bệnh bằng cách làm giảm sự biểu hiện *A20* [73, 74].

Một số nghiên cứu về *A20* ở bệnh viêm khớp dạng thấp đã chứng minh mối liên quan giữa một số SNP (rs2230926, rs6920220 và rs10499194) với nguy cơ mắc một số bệnh [77]. Tuy nhiên, tần suất đột biến của *A20* trong các báo cáo khác nhau là không giống nhau. SNP rs2230926 nằm ở exon 3 của *A20* gây ra sự

thay thế amino acid (ở vị trí 127) từ phenylalanine thành cysteine (Phe127Cys). Alen này (Cys127) làm giảm khả năng ức chế sự hoạt hóa NF- κ B do mức độ biểu hiện của *A20* giảm xuống [72]. SNP rs2230926 cũng được chứng minh là có mối tương quan với khả năng gia tăng nguy cơ mắc bệnh lupus ban đỏ hệ thống và bệnh viêm khớp dạng thấp ở người Nhật Bản [78] và bệnh viêm khớp dạng thấp ở cả người Châu Á và Châu Âu [77]. Năm 2015, Lihua Zhu và cộng sự xác định được thêm SNP rs146534657 ở bệnh viêm khớp dạng thấp và đột biến (14284T>A) được tìm thấy trong dịch khớp của bệnh nhân viêm khớp dạng thấp [57]. Bên cạnh đó, các đột biến làm mất chức năng của gen *A20* cũng được ghi nhận là có liên quan đến một số bệnh ung thư như ung thư hạch, ung thư vú, ung thư dạ dày, sự hình thành các khối u ác tính và bệnh T-CLL [174].

Sau khi phân tích trình tự hệ gen của một bệnh nhân nữ 14 tuổi mắc bệnh ung thư hạch, Shaheen và cộng sự đã khẳng định rằng biến thể trên exon 7 của gen *A20* tại vị trí c.1777 C>T (p.Q593X) gây ra sự đơn bội của *A20* có thể là nguyên nhân gây ra bệnh [175]. Theo Chang và cộng sự, ba đột biến/đa hình c.1081 G>A (p.E361K), c.1398 C>G (p.S466R) (rs200878487) và c.1760 C>T (p.P587L) (rs 150056192) được tìm thấy ở các bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào vảy miệng đều nằm trên exon 7 [80]. Tương tự như vậy, khi nghiên cứu trên các bệnh nhân T-ALL, ba đa hình g.3033 C>T, g.3910 G>A và g.3904 A>G đều được tìm thấy trên exon 7 của gen *A20*. Trong đó, g.3033 C>T là SNP phổ biến nhất trong bệnh T-ALL, chiếm 60%. Những đột biến này đều làm thay đổi amino acid [81]. Dựa trên những thông tin này, exon 7 của gen *A20* được lựa chọn để nghiên cứu đánh giá đa hình trên gen *A20*, cũng như phân tích các mối liên quan đến gen này.

Gutierrez và cộng sự (2002) đã nghiên cứu các khối u khác nhau từ những thành viên trong gia đình bốn thế hệ người Đức và kết luận rằng, các khối u này đều liên quan đến u da cylindromas và trichoepitheliomas. Sau khi phân tích đột biến dựa trên DNA của tế bào bạch cầu, cũng như DNA và RNA của khối u đều cho thấy đột biến lệch khung trên gen *CYLD* (2253delG). Cho đến năm 2009, đã xác định được 51 đột biến trên gen *CYLD*. Trong đó 41% (21/51) là đột biến

dịch khung, 35% (18/51) là đột biến vô nghĩa, 14% (7/51) đột biến sai nghĩa và 10% (5/51) là đột biến ở vị trí cắt nối. Patrick và Jorge (2009) cũng thực hiện các phân tích về đột biến *CYLD* của 87 gia đình và kết quả cho thấy, 84% (73/87) trường hợp mắc ung thư biểu mô tế bào đáy; Trong số đó, 88% (30/34) trường hợp mắc u cylindromatosis, và 72% (18/25) trường hợp mắc u trichoepithelioma do đột biến gen *CYLD* gây ra. Tuy nhiên, tỷ lệ phát sinh đột biến *CYLD* được báo cáo trước đây đối với u da trichoepithelioma và u cylindromatosis có tính gia đình lần lượt là 100% (3/3) và 44% (4/9) [82]. Bên cạnh đó, trong nghiên cứu này, Patrick và Jorge cũng nghiên cứu 6 đột biến sai nghĩa trên gen *CYLD* đã được công bố để đánh giá xem có liên quan với một kiểu hình cụ thể nào không thì kết quả cho thấy rằng phần lớn đột biến sai nghĩa đều xảy ra ở những bệnh nhân mắc u trichoepitheliomas. Cụ thể, đột biến p.D681G xảy ra trong một gia đình có 3 thành viên bị ảnh hưởng, trong đó 11/12 khối u được phân tích là trichoepitheliomas. Bên cạnh đó, đột biến khác (p.E747G) lại được tìm thấy ở 2 gia đình, trong đó có một gia đình gốc Thổ Nhĩ Kỳ với 13 thành viên mắc u trichoepitheliomas [82].

Nghiên cứu và phân tích các nốt xuất hiện ở một bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào đáy 46 tuổi cho thấy đột biến thay thế (c.1684+1 G>A) trên gen *CYLD* có trong DNA được phân lập từ khối mô và máu ngoại vi của bệnh nhân này. Đột biến (c.1684+1 G>A) xảy ra ở điểm nối exon-intron và có ảnh hưởng đến việc nối đúng. Bên cạnh đó, đột biến *CYLD* còn liên quan đến sự hình thành của một số khối u ác tính như ung thư đại tràng, ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh đa u tủy xương, và bệnh bạch cầu. Các nghiên cứu về gen *CYLD* đều cho rằng, *CYLD* được biểu hiện nhiều trong quá trình nguyên phân và nó có tham gia vào các chu kỳ tế bào. Những phát hiện này là tiền đề để Yunfan Yang và cộng sự (2015) khám phá ra vai trò tiềm năng của *CYLD* trong việc điều chỉnh khả năng nhạy cảm của tế bào bạch cầu với các loại thuốc nhắm mục tiêu vi ống. Sự rối loạn của *CYLD* đã được chứng minh là một trong những yếu tố thúc đẩy sự tiến triển của bệnh CLL và ALL. *CYLD* ngăn chặn sự hình thành khối u thông qua điều hòa quá trình apoptosis, và hoại tử của tế bào [67].

Miguel Rito (2018) đã xác định được 20 SNP trên gen *CYLD* bao gồm 3 SNP đồng nghĩa, và 17 SNP không đồng nghĩa. Trong đó các SNP nằm trên exon 9-11 được xác định ở cả u tuyến và ung thư biểu mô tuyến, còn các SNP trên exon 12-20 chỉ được tìm thấy ở ung thư biểu mô. Mặc dù, các nhà khoa học vẫn không tìm thấy được mối tương quan giữa đa hình/đột biến *CYLD* và mức độ biểu hiện *CYLD*, cũng như các chỉ số lâm sàng, nhưng các kết quả đạt được cũng rất cần thiết cho việc chẩn đoán và điều trị trong tương lai [176]. Beatty và cộng sự nghiên cứu về bệnh ung thư tuyến mồ hôi đã báo cáo rằng, 99% đột biến mất chức năng của gen *CYLD* được tìm thấy trên exon 9 đến exon 20. Trong đó, hầu hết các đột biến xảy ra ở exon 16, 17 và 20 [177]. Trong nghiên cứu tương tự, Blake và cộng sự cũng khẳng định rằng vị trí đột biến phổ biến trên gen *CYLD* nằm ở exon 16 và 17 [82]. Hơn thế nữa, khi phân tích cấu trúc gen *CYLD*, có thể thấy rằng, exon 16 nằm tại vị trí tương tác với polyubiquitin để khiến cho trung tâm hoạt động của *CYLD* thực hiện chức năng polyubiquitin. Như vậy, exon này đóng vai trò quan trọng trong hoạt động của gen *CYLD* [86] và được lựa chọn để nghiên cứu trên bệnh bạch cầu dòng tủy.

Trong nghiên cứu này, một số điểm đa hình trên gen *A20*, *CYLD* đã được tìm ra ở bệnh bạch cầu dòng tủy. Cụ thể là 4 điểm đa hình trên gen *CYLD* ở bệnh AML (p.E723E/c.G2411A; p.Q731H/c.G2435C; p.E735H/c.G2445A và p.E747K/c.G2481A) và 2 điểm đa hình trên gen này ở bệnh CML (p.V725V/c.T2417G; p.Q731H/c.G2435C); 4 điểm đa hình trên gen *A20* ở bệnh AML (p.L335S/c.T1303C; p.K337Q/c.A1308C; p.K354N/c.G1361T; p.S376T/c.T1425A) và 2 điểm hình trên gen này ở bệnh CML (rs37471883/p.G456V; rs200878487/p.S466R). Trong đó, SNP rs200878487/p.S466R đã được Yuli (2016) xác định nằm trên exon 7 của gen *A20* và có liên quan đến nguy cơ mắc bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy miệng [80]; SNP rs374721883/p.G456V cũng đã được tìm thấy và ghi nhận là một đột biến trên gen *A20* ở bệnh nhân u lympho tế bào áo nang (Bảng sáng chế quốc tế, số WO 2016/071770); Các SNP p.E723E/c.G2411A; p.Q731H/c.G2435C và p.E735K/c.G2445A cũng đã được Đỗ Thị Trang và cộng sự (2022) khẳng định

là những đa hình/đột biến trên gen *CYLD* ở các bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn [178]; Còn các SNP còn lại (p.V725V/c.T2417G; p.L335S/c.T1303C; p.K337Q/c.A1308C; p.K354N/c.G1361T; p.S376T/c.T1425A) đều là những SNP mới. Trong số các đa hình này, chỉ có đa hình tại vị trí p.Q731H trên gen *CYLD* là có sự khác biệt đáng kể về kiểu gen GC giữa bệnh nhân bạch cầu dòng tủy và nhóm người khỏe mạnh khi so sánh với kiểu gen GG. Đồng thời tần số allele C cũng có liên quan đến khả năng giảm nguy cơ mắc bệnh bạch cầu dòng tủy. Bên cạnh đó, dựa trên kết quả phân tích bằng phần mềm PolyPhen-2 nhằm dự đoán khả năng ảnh hưởng của điểm đa hình/đột biến tới cấu trúc và chức năng protein đã cho thấy, tại điểm đa hình c.G2435C đã làm thay đổi amino acid Glutamine (Q) ở vị trí 731 thành Histidine (H) trong chuỗi protein, đồng thời, vị trí này có mức ảnh hưởng tương đối cao đến cấu trúc và chức năng protein với điểm số tin cậy HumDiv và HumVar đạt giá trị lần lượt là 0,989 và 0,638. Kết quả này bước đầu đã cung cấp những thông tin hữu ích nhằm thúc đẩy quá trình phát hiện bệnh và thậm chí góp phần tìm ra liệu pháp điều trị bệnh hiệu quả hơn trong tương lai.

4.1.2. Mức độ biểu hiện gen và biểu hiện viêm ở bệnh bạch cầu dòng tủy

Trong tế bào lympho B, A20 hạn chế sự kích hoạt của các con đường tín hiệu bởi những chất cảm ứng sinh lý liên quan đến sự xâm nhập của các mầm bệnh vào cơ thể. Ở chuột, khi A20 bị bất hoạt trong tế bào lympho B gây ra hội chứng viêm với các biểu hiện tự miễn dịch như viêm mạn tính kéo dài, nồng độ IL-6 tăng cao, tế bào huyết tương tăng đáng kể và sự xuất hiện của các thể tự kháng đặc hiệu. Do vậy, khi tế bào lympho B phản ứng nhanh hơn với các kích thích từ môi trường do chức năng A20 bị giảm đi đã cho thấy, mối tương quan giữa các đột biến gen di truyền hoặc đa hình trong A20 và các bệnh tự miễn dịch khác ở người [71].

Các nghiên cứu trên chuột về biểu hiện của A20 đã bị bất hoạt trong đại thực bào và bạch cầu hạt đã chứng tỏ rằng, sự biểu hiện của A20 trong các tế bào này là cần thiết để duy trì cân bằng nội môi miễn dịch bẩm sinh [58]. Các tế bào tủy thiếu A20 sẽ dẫn đến tình trạng viêm đa khớp ăn mòn và sau đó có thể tăng

khả năng hủy xương góp phần làm thay đổi quá trình tạo xương. Như vậy, biểu hiện *A20* trong tế bào tủy ngăn chặn các tín hiệu gây ra viêm khớp và loãng xương. Những phát hiện này cung cấp những hiểu biết về sinh lý bệnh đối với sự thiếu hụt *A20* dẫn đến bệnh viêm khớp ở chuột và ở người [69].

CYLD là enzyme DUB được tìm thấy đầu tiên trong các khối u hình trụ lành tính, nhưng gần đây *CYLD* được ghi nhận là có vai trò điều chỉnh con đường truyền tín hiệu, tham gia vào nhiều quá trình sinh lý và bệnh lý. Từ đó gây ra quá trình apoptosis và ức chế sự hình thành khối u. Khi có sự biến đổi bất thường ở gen này gây ra sự xuất hiện của bệnh và phát triển nhiều loại khối u như u da cylindromas và trichoepitheliomas, hội chứng Brooke Spiegler và các khối u khác. Ngoài ra, sự biểu hiện *CYLD* được điều chỉnh giảm trong các bệnh ung thư phổi, ung thư vú, ung thư đại tràng, ung thư biểu mô tế bào gan và các khối u rắn khác [179]. Hiện nay, các nghiên cứu về *CYLD* trong các khối u ác tính về huyết học vẫn còn rất hạn chế. *CYLD* là một enzyme deubiquitinase, điều chỉnh sự tăng sinh và kích hoạt của các tế bào bạch huyết. Ở các bệnh nhân T-ALL và CLL, biểu hiện của gen này bị ức chế đáng kể [65]. Trong khi đó, vai trò của *CYLD* vẫn còn chưa được xác định rõ ràng ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy. *CYLD* điều chỉnh nhiều con đường truyền tín hiệu và đóng vai trò quan trọng trong sự xuất hiện và phát triển của nhiều bệnh. Hiện tại, hầu hết các đột biến *CYLD* đã được báo cáo trong các khối u rắn, tuy nhiên vẫn còn rất ít nghiên cứu được thực hiện trên gen *CYLD* ở các khối u ác tính về huyết học. Sự vắng mặt của *CYLD* có thể là dấu hiệu tiên lượng về tình trạng của một số khối u ác tính về huyết học. Cho đến nay, cơ chế điều hòa của *CYLD* đối với chức năng hoạt động của tế bào vẫn chưa rõ ràng mà cần được tiếp tục nghiên cứu thêm. Làm sáng tỏ được cơ chế điều chỉnh con đường truyền tín hiệu của chúng có thể giúp xây dựng liệu pháp nhắm mục tiêu phân tử đối với các khối u ác tính về huyết học [180].

Ở bệnh nhân CML, *CYLD* được xác định là có tham gia vào việc ức chế tín hiệu Dvl. Çalışkan và cộng sự (2017) đã thực hiện nghiên cứu đánh giá sự biểu hiện mRNA trong ba dòng tế bào K562, MEG01 và KU812 của bệnh CML

đều cho thấy sự biểu hiện mRNA của gen *CYLD*. Trong đó, sự biểu hiện của *CYLD* giảm xuống khi gen *Dvl* bị bất hoạt nhờ công nghệ siRNA. Trong khi thí nghiệm trước đó chỉ ra rằng *CYLD* có khả năng điều hòa protein *Dvl* và biểu hiện *Dvl* sẽ khiến biểu hiện *CYLD* giảm xuống [30].

Như vậy, các nghiên cứu trên các bệnh nhân, đặc biệt là bệnh nhân ung thư, mức độ biểu hiện gen *A20*, *CYLD* thường giảm. Trong nghiên cứu này, biểu hiện gen *A20*, *CYLD* cũng giảm đáng kể ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy. Cụ thể, mức độ biểu hiện mRNA của gen *A20* giảm khoảng 3 lần (AML) và 39 lần (CML) với người khỏe. Trong khi đó, biểu hiện mRNA của gen *CYLD* ở người khỏe cao hơn ở các bệnh AML và CML lần lượt khoảng 2 lần và 89 lần.

Các gen thuộc họ *STAT* được nghiên cứu rộng rãi trong nhiều loại bệnh và sự biểu hiện của chúng thường tăng lên ở nhiều bệnh nhân ung thư. Gen *STAT1* có mức độ biểu hiện phụ thuộc vào quá trình phosphoryl hóa tyrosine và khi được biểu hiện thì chúng ức chế sự phát triển của khối u và thúc đẩy quá trình chết của tế bào. Ở chuột thiếu *STAT1* cho thấy, khối u phát triển mạnh hơn so với nhóm chứng là những con chuột khỏe mạnh, đồng thời khi đó chuột cũng sẽ nhạy cảm hơn với các bệnh do virus gây ra và không phản ứng lại được với các tác động của virus, thậm chí là tử vong trong khi lượng virus này không ảnh hưởng đến cơ thể bình thường. Trong khi đó *STAT3* và *STAT5* là hai protein quan trọng liên quan đến sự phát triển của bệnh ung thư. Kích hoạt *STAT3/5* liên tục sẽ thúc đẩy quá trình viêm mạn tính, làm tăng tính nhạy cảm của các tế bào khỏe mạnh với các chất sinh ung thư [95]. Bên cạnh đó, Giang và cộng sự (2021) đã nghiên cứu sự biểu hiện của các gen *STAT* ở bệnh nhân CML cũng cho thấy, gen *STAT1* có mức độ biểu hiện đều cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) [181]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, biểu hiện của gen *STAT1*, *STAT3* ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy lại hầu như không có sự thay đổi đáng kể so với nhóm người khỏe mạnh.

Viêm là quá trình thúc đẩy sự phát triển của khối u thông qua tác động trực tiếp hoặc gián tiếp của cytokine, chemokine, và các yếu tố tăng trưởng trên tế bào khối u. Trong các tế bào máu bình thường, sự kích hoạt các thụ thể bề mặt

tế bào bởi cytokine, chemokine và các yếu tố tăng trưởng có thể điều chỉnh hoạt động của các con đường dẫn truyền tín hiệu. Tuy nhiên, một số báo cáo đã khẳng định rằng, sự bất thường trong con đường tín hiệu có thể gây ra bệnh bạch cầu [182] và khi đó cytokine được coi nhân tố có tác động sâu sắc đến sự tiến triển của các khối u ác tính như bệnh bạch cầu dòng tủy. Trong khi các chất trung gian gây viêm như IL-1 β , TNF- α và IL-6 có xu hướng tăng ở bệnh nhân AML, còn các chất trung gian chống viêm như TGF- β và IL-10 dường như cản trở sự tiến triển của bệnh AML [183].

Trong nghiên cứu của Beatriz và cộng sự, nồng độ các cytokine tiền viêm hay kháng viêm đều được xác định ở các bệnh nhân AML thuộc cả 2 nhóm bệnh nhân trên 65 tuổi và dưới 65 tuổi. Cytokine IL-8 được tiết ra nhiều ở bệnh nhân AML dưới 65 tuổi trong khi nồng độ IL-4 và IL-5 trong huyết tương chỉ tăng cao ở nhóm bệnh nhân AML trên 65 tuổi. Nồng độ IL-6 thấp và IL-10 cao được coi là yếu tố tiên lượng thuận lợi cho khả năng sống sót ở bệnh nhân AML. Tuy nhiên, sự tương tác giữa các cytokine tiền viêm và kháng viêm ở AML cũng có thể kích thích đến sự tăng sinh, tồn tại và kháng thuốc của các tế bào bạch cầu [184]. Bên cạnh đó, Nievergall và cộng sự cũng cho biết, nồng độ TNF- α và IL-6 trong huyết thanh cao được coi là dấu ấn sinh học trong việc chẩn đoán tình trạng bệnh CML [185]. IL-2 và IL-6 trong huyết thanh của CML tăng đáng kể so với nhóm đối chứng [186]. Tương tự như vậy, trong nghiên cứu này, nồng độ IL-6 và TNF- α được xác định là tăng cao đáng kể ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy so với nhóm người khỏe. Cụ thể nồng độ IL-6 tăng ở cả bệnh nhân AML và CML lần lượt khoảng 84 và 138 lần so với nhóm người khỏe. Trong khi đó, nồng độ TNF- α được tiết ra ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy (AML và CML) tăng cao lần lượt khoảng 5 và 269 lần so với nhóm người khỏe. Sự thay đổi này nồng độ IL-6 và TNF- α đều có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Điều này chứng tỏ, ở các bệnh nhân này quá trình viêm xảy ra khá nghiêm trọng, từ đó có thể là nguyên nhân khiến cho hệ thống miễn dịch của bệnh nhân suy yếu.

Như vậy, các kết quả đạt được về đa hình gen *A20*, *CYLD*, mức độ biểu hiện của gen *A20*, *CYLD* đều giảm ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy so với

nhóm người khỏe mạnh, còn nồng độ cytokine IL-6 và TNF- α lại tăng cao ở các bệnh nhân này là những thông tin cần thiết cho việc tiếp tục phân tích mối liên hệ giữa chúng, từ đó có thể có cơ sở để xác định cơ chế bệnh sinh của bệnh bạch cầu dòng tủy.

4.1.3. Mối liên quan giữa đa hình nucleotide đơn, biểu hiện gen *A20*, *CYLD*, *STAT1*, *STAT3* và biểu hiện viêm ở bệnh bạch cầu dòng tủy

A20, *CYLD* là protein DUB đóng vai trò điều hòa các con đường tín hiệu khác nhau nhằm điều chỉnh quá trình sinh lý bên trong cơ thể, từ các phản ứng miễn dịch và phản ứng viêm đến sự tiến triển của chu trình tế bào, quá trình sinh tinh và tạo xương. Cụ thể, *A20*, *CYLD* điều chỉnh làm giảm tín hiệu NF- κ B. Trong đó họ các yếu tố phiên mã đóng vai trò trung gian cho sự biểu hiện của một số lượng lớn gen trong phản ứng viêm [157]. Nhiều nghiên cứu cho thấy, mức độ biểu hiện của gen *A20*, *CYLD* thường thấp ở một số bệnh nhân ung thư và khi các gen này bị làm bất hoạt có thể thúc đẩy sự tăng sinh của các tế bào ung thư [158].

Do đó, việc nghiên cứu mối liên hệ giữa đa hình gen *A20*, *CYLD*, biểu hiện của gen *A20*, *CYLD* và gen tín hiệu *STAT1*, cũng như nồng độ cytokine IL-6 và TNF- α tiết ra ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy là cơ sở để tìm ra được cơ chế bệnh sinh của các bệnh nhân ung thư bạch cầu dòng tủy. Kết quả phân tích cho thấy, chỉ tìm ra được mối liên hệ chặt chẽ giữa đa hình tại vị trí p.Q731H trên gen *CYLD* và nồng độ cytokine IL-6 do các bệnh nhân mắc bệnh AML tiết ra. Cụ thể, các bệnh nhân AML với kiểu gen GG sẽ có nồng độ IL-6 cao hơn hẳn so với bệnh nhân có kiểu gen GC. Mặc dù vậy, gen *A20*, *CYLD* vẫn là mục tiêu tiềm năng cho việc nghiên cứu và đánh giá mức độ tiến triển của bệnh, đồng thời kết quả đánh giá này có thể cung cấp những thông tin hữu ích cho các nghiên cứu về vai trò của *A20*, *CYLD* đối với bệnh bạch cầu dòng tủy; từ đó có thể tìm ra được những phương thức đánh giá tình trạng của bệnh, cũng những định hướng biện pháp điều trị bệnh hiệu quả.

4.2. Xác định vai trò của A20, CYLD đối với quá trình tăng sinh và apoptosis của tế bào K562

Vincristine là một chất được chiết xuất từ cây dừa cạn (*Cantharanthus roseus*) có tác dụng ức chế hiệu quả đối với một số bệnh ung thư như bệnh bạch cầu đơn nhân, ung thư vú, ung thư gan, ung thư buồng trứng, ung thư đầu và cổ, ung thư tinh hoàn và bệnh bạch cầu dòng lympho [135]. Cơ chế hoạt động của vincristine được xác định là tương tự với các chất chống ung thư đặc hiệu dựa theo chu kỳ của tế bào. Trong quá trình điều trị, vincristine thường gây độc ở hệ thống thần kinh, rồi giải phóng các chất trung gian cho quá trình tiền viêm như IL-6 và TNF- α khi các tế bào được kích hoạt [137, 138]. Bằng cách kích hoạt con đường tín hiệu NF- κ B/STAT, vincristine được coi là tác nhân điều hòa một phần hoạt động chống ung thư [139]. Một số nghiên cứu cũng đã chỉ ra rằng, vincristine làm giảm bạch cầu trong máu ngoại vi và gây suy tủy, đồng thời có thể kéo dài được tuổi thọ đáng kể của các mô hình cấy ghép bệnh bạch cầu dòng lympho trên chuột [135]. Theo Paloma và cộng sự (2011), vincristine làm giảm đáng kể khả năng sống sót của tế bào K562 bằng cách ngăn chặn sự tiến triển của chu trình tế bào [134].

Chính vì tầm quan trọng của vincristine đối với việc hỗ trợ điều trị một số bệnh ung thư, cũng như vai trò của A20, CYLD ở một số bệnh mà nghiên cứu đánh giá sự liên quan giữa A20, CYLD đối với sự tăng sinh và quá trình apoptosis của tế bào được thực hiện trên một dòng tế bào CML (K562) khi tế bào này được xử lý bởi vincristine nhằm khẳng định rõ vai trò của A20, CYLD đối với bệnh CML và từ đó có thể tìm ra biện pháp phòng và điều trị bệnh hiệu quả hơn. Trong nghiên cứu này, khi tế bào K562 được xử lý với vincristine thì mức độ biểu hiện mRNA của A20 và CYLD tăng lên đáng kể so với mức độ biểu hiện của hai gen này ở tế bào K562 không được xử lý với vincristine, đặc biệt trong trường hợp được xử lý với vincristine ở nồng độ 300 nM. Đây chính là cơ sở để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo nhằm đánh giá vai trò của A20 và CYLD đối với sự tăng sinh và quá trình apoptosis của tế bào K562. Kết quả nghiên cứu cho thấy, số lượng tế bào dương tính với CFSE được xác định là

giảm, trong khi số lượng tế bào dương tính với Annexin V/PI, cũng như sự tích tụ ROS tăng lên đáng kể khi tế bào được xử lý với vincristine (300 nM). Điều này chứng tỏ vai trò ức chế của vincristine đối với sự tăng sinh và sống sót của tế bào K562. Khi đó, vincristine liên kết với các vi ống để ngăn chặn sự phát triển của thoi phân bào, từ đó ức chế sự tăng sinh của tế bào [187]. Ngoài ra, nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng, vincristine không ảnh hưởng đến quá trình kích hoạt và sự trưởng thành của tế bào K562. Bên cạnh đó, khi cùng được xử lý bởi vincristine, mức độ biểu hiện mRNA của *A20*, *CYLD* tăng đáng kể trong các tế bào K562, còn trong tế bào PBMC sự biểu hiện mRNA của hai gen này chỉ tăng nhẹ. Trong trường hợp gen *A20* bị bất hoạt thì tác dụng ức chế sự tăng sinh và tồn tại của tế bào K562 không còn nữa, trong khi đó chỉ có sự tăng sinh của tế bào K562 bị ức chế khi có sự xuất hiện của gen *CYLD* khi tế bào này được xử lý bởi vincristine. Trước đó, một số nghiên cứu cũng khẳng định *A20* có thể thúc đẩy quá trình apoptosis của tế bào ở bệnh ung thư hạch [44], CLL [47] và bệnh bạch cầu dòng tủy. Hơn thế nữa, *A20* còn có tác dụng ngăn chặn sự tăng sinh và di căn của tế bào [46]. So với *A20*, *CYLD* không tác động nhiều đến quá trình apoptosis của tế bào K562. Cho đến nay, vẫn chưa có báo cáo nào về vai trò điều hòa của *CYLD* đối với các chức năng của tế bào bạch cầu dòng tủy, mặc dù *CYLD* đã được chứng minh là enzyme deubiquitinase điều hòa dương tính quá trình apoptosis của tế bào ở bệnh ALL và CLL [45, 50]. Rõ ràng rằng, vincristine đóng vai trò khác nhau trong việc điều chỉnh hoạt động của tế bào. Như vậy, nghiên cứu này đã cho thấy, vincristine ức chế sự tăng sinh và sống sót của tế bào K562 thông qua việc tăng cường sự biểu hiện *A20*. Những phát hiện này có thể góp phần xây dựng được liệu pháp trong việc điều trị bệnh ung thư khi sử dụng vincristine trên các tế bào CML nhạy cảm với *A20*.

4.3. Xác định vai trò của gen *CYLD* đối với đại thực bào được biệt hóa bởi M-CSF qua tín hiệu STAT1

Bên cạnh việc đánh giá vai trò của gen *A20*, *CYLD* đối với sự tăng sinh và quá trình apoptosis của dòng tế bào CML khi được xử lý bởi vincristine thì trong nghiên cứu này chúng tôi cũng tập trung đánh giá vai trò của gen *CYLD* đối với

các tế bào được biệt hóa từ PBMC để qua đó có thể đưa ra những đánh giá toàn diện hơn về gen *CYLD* cũng như chức năng của chúng trong việc xây dựng biện pháp điều trị bệnh bạch cầu dòng tủy.

Một số báo cáo đã khẳng định rằng, *CYLD* là một trong những enzyme deubiquitinase có vai trò điều hòa âm tính tình trạng viêm quá mức trong đại thực bào thông qua con đường tín hiệu NF- κ B [188] và STAT1 [189] ở chuột. Tương tự như vậy, nghiên cứu này cũng đã xác định được rằng *CYLD* ức chế sự trưởng thành và khả năng tiết cytokine cũng như gây ra hiện tượng thực bào và quá trình apoptosis của đại thực bào thông qua tín hiệu STAT1. Cụ thể, bình thường, mức độ biểu hiện của STAT1 của các đại thực bào là thấp, nhưng khi bị làm bất hoạt *CYLD* thì mức độ biểu hiện STAT1 tăng lên, đặc biệt trong trường hợp làm bất hoạt *CYLD*, kết hợp với xử lý bằng fludarabine. Điều này cho thấy, Biểu hiện của *CYLD* góp phần ức chế sự kích hoạt tín hiệu STAT1 trong đại thực bào. Ngoài ra, khi không có *CYLD*, sự biểu hiện của các phân tử CD40 và CD86, cũng như sự giải phóng IL6, TNF- α của đại thực bào được tăng cường đáng kể. Trong khi đó, khả năng hấp thu FITC-dextran và Annexin V/PI của các đại thực bào này ít hơn so với đại thực bào không bị bất hoạt gen *CYLD*. Do đó, có thể thấy rằng, *CYLD* đã thúc đẩy quá trình thực bào của đại thực bào, tuy nhiên với sự hiện diện của fludarabine, tác dụng này của *CYLD* đối với đại thực bào bị loại bỏ. Qua đó, khẳng định được rằng, tác dụng ức chế của *CYLD* đối với chức năng của đại thực bào phụ thuộc vào việc kích hoạt tín hiệu STAT1 lần đầu tiên được ghi nhận trong nghiên cứu này. Hơn nữa, trong các nghiên cứu trước đó, mức độ biểu hiện *CYLD* giảm cũng được ghi nhận ở một số bệnh ung thư máu [66, 178]. Nhiều nghiên cứu khác cũng khẳng định rằng khi *CYLD* bị bất hoạt sẽ kích hoạt tín hiệu Wnt, liên quan đến việc tiên lượng xấu ở bệnh đa u tủy xương [190] và bệnh u lympho [65, 191]. Ngoài ra, khi biểu hiện *CYLD* cao cho thấy khả năng sống sót tốt hơn ở các bệnh nhân bạch cầu dòng lympho mạn tính [65]. Gần đây, đột biến gen *CYLD* được xác định là có liên quan đến tính nhạy cảm với bệnh bạch cầu dòng lympho ở trẻ em. Cho đến nay, vẫn chưa có bằng chứng cho thấy sự thay đổi gen này có liên quan đến bệnh AML nhưng

biểu hiện của *CYLD* thấp cũng là dấu hiệu cho thấy nguy cơ tương đối cao ở các bệnh nhân AML.

Như đã đề cập ở trên, *CYLD* có vai trò điều hòa sự kích hoạt và trưởng thành của đại thực bào qua tín hiệu *STAT1*. Hơn nữa, mức độ biểu hiện của *CYLD* tăng đáng kể khi M-AML được xử lý bằng fludarabine-chất ức chế tín hiệu *STAT1*. Do đó, câu hỏi được đặt ra là liệu tín hiệu *STAT1* có liên quan đến vai trò ức chế đối với chức năng hoạt động của M-AML hay không. Các dữ liệu thu được cho thấy, không giống như M-HP, khi M-AML (M4/M5b) được xử lý bởi fludarabine, biểu hiện *CYLD* tăng cao kích hoạt sự hấp thu FITC-dextran và quá trình thực bào của M-AML. Phát hiện này khẳng định rằng *CYLD* đã thúc đẩy quá trình thực bào của M-AML thông qua con đường tín hiệu *STAT1*. Không giống như tác dụng của *STAT1* đối với việc điều chỉnh chức năng của đại thực bào ở bệnh AML, *STAT3* và *STAT5* được chứng minh là có vai trò kích thích sự tăng sinh và ức chế quá trình apoptosis trong các khối u ác tính về huyết học [192, 193]. Ngoài ra, để trả lời cho câu hỏi liệu *CYLD* và *STAT1* có tương tác vật lý trong M-AML và M-HP hay không thì thí nghiệm kích thích miễn dịch *CYLD* được thực hiện trên các đại thực bào khi được xử lý và không xử lý với LPS. Tương tự với các nghiên cứu được thực hiện trên đại thực bào của chuột [194], kết quả phân tích western blot đã chỉ ra rằng, *CYLD* không tương tác với *STAT1*. Do đó, kích hoạt *STAT1* có thể dẫn đến ức chế gián tiếp biểu hiện *CYLD*. Hơn thế nữa, một số nghiên cứu khác cũng khẳng định *CYLD* thực hiện vai trò tiền thực bào của các đại thực bào từ phân nhóm M4/M5b thông qua con đường *STAT1*. Như vậy kết quả này đã đưa ra những thông tin có ý nghĩa khoa học hữu ích về tác dụng thúc đẩy của *CYLD* đối với quá trình thực bào của đại thực bào trong bệnh AML khi được điều trị bằng fludarabine.

Với những kết quả đã đạt được, có thể thấy, vai trò *CYLD* rất quan trọng đối với M-HP và M-AML. Cụ thể, ở đại thực bào M-HP, *CYLD* ức chế sự kích hoạt *STAT1* trong đại thực bào, nhưng không làm ảnh hưởng đến *STAT3*. *CYLD* có vai trò kích thích sự hấp thu FITC-dextran, và quá trình thực bào của tế bào AML, từ đó làm tăng cường quá trình apoptosis các tế bào bạch cầu khi

có sự biểu hiện của *STAT1*. Tuy nhiên, đối với M-AML, CYLD kích thích khả năng hấp thụ FITC-dextran (thể M4/M5b) tăng đáng kể so với M-HP, đồng thời làm tăng cường việc loại bỏ các tế bào bạch cầu ở thể M5b và chỉ một phần đối với thể M4 khi được xử lý với fludarabine.

CHƯƠNG 5: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận:

1. *Mối liên quan giữa đa hình/đột biến trên gen A20, CYLD, biểu hiện gen tín hiệu liên quan, và nồng độ cytokine ở bệnh bạch cầu dòng tủy*

- Đã xác định được 5 điểm đa hình trên gen *CYLD*; 6 điểm đa hình trên gen *A20* ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy; Trong đó, đa hình tại vị trí p.Q731H trên gen *CYLD* có sự khác biệt đáng kể về kiểu gen GC so với kiểu gen GG khi so sánh với nhóm người khỏe.

- Đã xác định được mức độ biểu hiện mRNA của *A20, CYLD* đều giảm đáng kể ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy so với nhóm người khỏe; Trong khi đó, nồng độ IL-6, TNF- α được ghi nhận là tăng ở các bệnh nhân này.

- Đã xác định được mối liên quan chặt chẽ giữa đa hình gen *CYLD* tại vị trí p.Q371H và nồng độ cytokine IL-6 ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy cấp.

2. *Vai trò của gen A20, CYLD đối với chức năng tế bào*

- Đã xác định được vai trò của gen *A20, CYLD* trong việc ức chế quá trình tăng sinh và thúc đẩy apoptosis của tế bào K562 được xử lý bởi vincristine.

- Đã xác định được vai trò của *CYLD* trong việc hoạt hóa đại thực bào được biệt hóa từ PBMC của người khỏe (M-HP) khi có sự biểu hiện mRNA của *STAT1*, trong khi đó biểu hiện mRNA của *CYLD* lại tăng cường sự hoạt động của đại thực bào M-AML khi được xử lý với fludarabine.

Kiến nghị:

Cần tiếp tục nghiên cứu xác định các điểm đa hình/đột biến trên các exon khác của gen *A20, CYLD*, từ đó có thể đánh giá chính xác hơn về vai trò của gen *A20, CYLD* đối với bệnh bạch cầu dòng tủy. Đồng thời, tiếp tục đánh giá hiệu quả việc sử dụng các tế bào được biệt hóa bởi M-CSF và xử lý với vincristine trong việc xây dựng hướng điều trị bệnh bạch cầu dòng tủy kết hợp với liệu pháp gen đích *A20, CYLD* hoặc liệu pháp tế bào đích liên quan đến *A20, CYLD*.

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

1. **Nguyen Thanh Huyen**, Nguyen Thy Ngoc, Nguyen Hoang Giang, Do Thi Trang, Ha Hong Hanh, Vu Duc Binh, Nguyen Van Giang, Nguyen Xuan Canh, Nguyen Thi Xuan (2023). *CYLD stimulates macrophages phagocytosis of leukemic cells through STAT1 signaling in acute myeloid leukemia*. PLoS ONE 18(8):e0283586.
2. Nguyen Huy Hoang, **Nguyen Thanh Huyen**, Do Thi Trang, Nguyen Xuan Canh, Can Van Mao, Mentor Sopjani, Nguyen Ba Vuong, Nguyen Thi Xuan (2022). *Effects of Vinblastine and Vincristine on the function of chronic myeloid leukemic cells through expression of A20 and CYLD*. Cellular and Molecular Biology. 68(10): 47-53.
3. **Nguyen Thanh Huyen**, Nguyen Hoang Giang, Nguyen Thi Xuan (2022). *Expression of deubiquitinase genes and inflammatory response in myeloid leukemia*. Vietnam Journal of Biotechnology. 20(3): 401-408.
4. Nguyễn Hoàng Giang, **Nguyễn Thanh Huyền**, Nguyễn Thị Xuân. *Biểu hiện một số gen điều hòa miễn dịch ở bệnh bạch cầu tủy mạn*. Tạp chí Công nghệ sinh học 2021, 19(1): 51-60.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. J. L. Liesveld and M. A. Lichtman, *Acute Myelogenous Leukemia*, in *Williams Hematology, 10e*, Kaushansky K., et al., Editors. 2021, McGraw-Hill Education: New York, NY.
2. B. J. Bain and M. C. Béné, *Morphological and Immunophenotypic Clues to the WHO Categories of Acute Myeloid Leukaemia*. *Acta Haematologica*, 2019, 141(4), 232-244.
3. M. Nouraldein Mohammed Hamad, *Assessment of Serum Ferritin Levels in Sudanese Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia*. 2019, 8, 92-96.
4. B. C. Medeiros, S. M. Chan, N. G. Daver, et al., *Optimizing survival outcomes with post-remission therapy in acute myeloid leukemia*. *American Journal of Hematology*, 2019, 94(7), 803-811.
5. I. De Kouchkovsky and M. Abdul-Hay, '*Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update*'. *Blood Cancer Journal*, 2016, 6(7), e441.
6. *SEER Cancer Stat Facts: Acute Myeloid Leukemia (Percent of New Cases by Age Group)*. 2019, National Cancer Institute.
7. A. Shah, T. M. Andersson, B. Rachet, et al., *Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study*. *British Journal of Haematology*, 2013, 162(4), 509-16.
8. N. T. K. Hoa, T. V. A, and H. T. A. Tram, *Epidemiology of childhood cancer at central zone of Viet Nam*. *Journal of Clinical Medicine*, 2019, 56, 52-55.
9. T. Kiem Hao, C. Van Ha, N. Huu Son, et al., *Long-term outcome of childhood acute myeloid leukemia: A 10-year retrospective cohort study*. *Pediatric Reports*, 2020, 12(1), 8486.
10. A. Vakiti and P. Mewawalla, *Acute Myeloid Leukemia*. 2023, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
11. R. Roushangar and G. I. Mias, *Multi-study reanalysis of 2,213 acute myeloid leukemia patients reveals age- and sex-dependent gene expression signatures*. *Scientific Reports*, 2019, 9(1), 12413.
12. *Acute myeloid leukemia (AML) subtypes and prognostic fact*. *Acute myeloid leukemia early detection, diagnosis, and types*, 2018.
13. M. Hong and G. He, *2016 Revision to the WHO Classification of Acute Myeloid Leukemia*. *J Transl Int Med*, 2017, 5(2), 69-71.
14. H. Schönbohn, M. Schuler, K. Kolbe, et al., *Plasma levels of IL-1, TNF alpha, IL-6, IL-8, G-CSF, and IL1-RA during febrile neutropenia: results of a prospective study in patients undergoing chemotherapy for acute myelogenous leukemia*. *Annals of Hematology*, 1995, 71(4), 161-8.
15. L. Shi, S. Chen, Y. Lu, et al., *Changes in the MALT1-A20-NF- κ B expression pattern may be related to T cell dysfunction in AML*. *Cancer Cell International*, 2013, 13(1), 37.
16. X. T. Nguyen Le and B. S. Mitchell, *Akt activation enhances ribosomal RNA synthesis through casein kinase II and TIF-IA*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(51), 20681-6.

17. G. C. Issa, C. B. Benton, V. Mohanty, et al., *Identification of Gene Expression Signatures in Leukemia Stem Cells and Minimal Residual Disease Following Treatment of Adverse Risk Acute Myeloid Leukemia*. Blood, 2019, 134(Supplement_1), 2717-2717.
18. L. T. T. Thảo, T. T. Tòng, H. Q. Đạt, et al., *Đặc điểm bất thường nhiễm sắc thể phức tạo trên người bệnh bạch cầu cấp dòng tủy*. Tạp chí Y học Việt Nam, 2023, 524(1B).
19. N. A. Trí, *Đặc điểm lâm sàng và huyết học của quá trình chuyển thành loxêmi cấp sau một số bệnh cơ quan tạo máu ở người lớn tuổi*. 1993. p. 91.
20. N. H. Thanh, *Một số nhận xét bước đầu về thời gian sống thêm của các bệnh nhân leukemia kinh dòng hạt điều trị bằng Hydroxyurea*. Kỷ yếu công trình nghiên cứu khoa học Huyết học - Truyền máu 1999-2001. 2001: Nhà xuất bản Y học
21. G. Marzocchi, F. Castagnetti, S. Luatti, et al., *Variant Philadelphia translocations: molecular-cytogenetic characterization and prognostic influence on frontline imatinib therapy, a GIMEMA Working Party on CML analysis*. Blood, 2011, 117(25), 6793-800.
22. K. Ito and K. Ito, *Leukemia Stem Cells as a Potential Target to Achieve Therapy-Free Remission in Chronic Myeloid Leukemia*. Cancers (Basel), 2021, 13(22).
23. N. H. Thanh, *Tìm hiểu triệu chứng lúc mới vào viện lần đầu về đặc điểm lâm sàng và huyết học của bệnh nhân loxemi kinh dòng hạt*. Tạp chí y học thực hành, 1999, 7, 8-12.
24. N. H. Thanh, *Nghiên cứu điều trị Loxemi kinh dòng hạt giai đoạn mãn tính bằng Hydroxyurea đơn thuần và phối hợp với ly tách bạch cầu (tại Viện huyết học và Truyền máu)*, in . 2003, Trường Đại học y Hà Nội.
25. T. V. Bé, *Tình hình bệnh về máu tại Trung tâm Truyền máu Huyết học TP.HCM*, in *Lược yếu công trình nghiên cứu khoa học 1975-1994 của Trung tâm Truyền máu Huyết học HCM*. 1995.
26. N. Q. Thành, N. T. M. Hòa, and P. C. Dũng, *Đánh giá hiệu quả điều trị bệnh Bạch cầu mạn dòng tủy bằng Imatinib: tổng kết 10 năm*. Tạp chí y Học Thành phố Hồ Chí Minh, 2015, 19(4), 225-235.
27. E. Trela, S. Glowacki, and J. Błasiak, *Therapy of Chronic Myeloid Leukemia: Twilight of the Imatinib Era?* ISRN oncology, 2014, 2014, 596483.
28. E. Jabbour and H. Kantarjian, *Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring*. American Journal of Hematology, 2018, 93(3), 442-459.
29. F. Naeim, P. Nagesh Rao, S. X. Song, et al., *Chapter 11 - Chronic Myelogenous Leukemia— BCR-ABL1 Positive*, in *Atlas of Hematopathology (Second Edition)*, Naeim F., et al., Editors. 2018, Academic Press. p. 203-216.
30. C. Çalışkan, M. Pehlivan, Z. Yüce, et al., *Dishevelled proteins and CYLD reciprocally regulate each other in CML cell lines*. Molecular Biology Reports, 2017, 44(5), 391-397.
31. N. Jafarzadeh, Z. Safari, M. Pornour, et al., *Alteration of cellular and immune-related properties of bone marrow mesenchymal stem cells and*

- macrophages by K562 chronic myeloid leukemia cell derived exosomes.* Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(4), 3697-3710.
32. K. Sharma, U. Singh, M. Rai, et al., *Interleukin 6 and disease transformation in chronic myeloid leukemia: A Northeast Indian population study.* Journal of Cancer Research and Therapeutics, 2020, 16(1), 30-33.
 33. T. V. Bé, *Tình hình về bệnh máu tại trung tâm Truyền máu - Huyết học thành phố Hồ Chí Minh*, in *Báo cáo tại hội nghị Huyết học - Truyền máu thành phố Hồ Chí Minh.* 1992.
 34. T. T. M. Hương and Đ. T. Phần, *Tình hình bệnh máu tại Viện Huyết học - Truyền máu, Bệnh viện Bạch Mai.* Kỷ yếu công trình nghiên cứu khoa học Huyết học - Truyền máu. 2002: Nhà xuất bản Y học.
 35. N. T. Thảo, *Nghiên cứu mức độ lui bệnh và phát hiện bệnh tồn dư tối thiểu ở bệnh nhân lơ xê mi kinh dòng hạt được điều trị bằng imatinib.* 2013, Trường đại học Y Hà Nội.
 36. C. N. P. Dung, *Đánh giá đáp ứng điều trị thuốc imatinib mesylat trên bệnh nhân bạch cầu mạn dòng tủy sau 5 năm.* Y học thực hành, 2014, 423, 281-288.
 37. C. H. Hung, N. K. Giang, N. T. Hiền, et al., *Đặc điểm huyết học của bệnh nhân lơ xê mi kinh dòng hạt tại bệnh viện trung ương Thái Nguyên.* TNU Journal of Science and Technology, 2022, 227, 214-219.
 38. H. Elsir Khair, B. Ahmed Mohamed, B. Yousef Nour, et al., *Prevalence of BCR-ABL T315I Mutation in Different Chronic Myeloid Leukemia patients Categories.* Pak J Biol Sci, 2022, 25(2), 175-181.
 39. H. Yamaguchi, K. Inokuchi, Y. Sakuma, et al., *Mutation of the p51/p63 gene is associated with blastic crisis in chronic myelogenous leukemia.* Leukemia, 2001, 15(11), 1729-34.
 40. Z. A. Pahore, T. S. Shamsi, M. Taj, et al., *JAK2V617F mutation in chronic myeloid leukemia predicts early disease progression.* Journal of College of Physicians and Surgeons Pakistan, 2011, 21(8), 472-5.
 41. A. Y. Amerik and M. Hochstrasser, *Mechanism and function of deubiquitinating enzymes.* Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1695(1-3), 189-207.
 42. M. Neutzner and A. Neutzner, *Enzymes of ubiquitination and deubiquitination.* Essays in Biochemistry, 2012, 52, 37-50.
 43. 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.* Cellular & Molecular Immunology, 2021, 18(6), 1512-1527.
 44. X. Wang, Y. Xu, L. Liang, et al., *Abnormal expression of A20 and its regulated genes in peripheral blood from patients with lymphomas.* Cancer cell international, 2014, 14, 36-36.
 45. X. Xu, M. Kalac, M. Markson, et al., *Reversal of CYLD phosphorylation as a novel therapeutic approach for adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL).* Cell Death & Disease, 2020, 11(2), 94.
 46. Q. Jia, H. Sun, F. Xiao, et al., *miR-17-92 promotes leukemogenesis in chronic myeloid leukemia via targeting A20 and activation of NF- κ B*

- signaling*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 487(4), 868-874.
47. L. P. Frenzel, R. Claus, N. Plume, et al., *Sustained NF-kappaB activity in chronic lymphocytic leukemia is independent of genetic and epigenetic alterations in the TNFAIP3 (A20) locus*. International Journal of Cancer, 2011, 128(10), 2495-500.
 48. S. Chen, H. Xing, S. Li, et al., *Up-regulated A20 promotes proliferation, regulates cell cycle progression and induces chemotherapy resistance of acute lymphoblastic leukemia cells*. Leukemia Research, 2015, 39(9), 976-83.
 49. A. B. Hjelmeland, Q. Wu, S. Wickman, et al., *Targeting A20 decreases glioma stem cell survival and tumor growth*. PLoS biology, 2010, 8(2), e1000319-e1000319.
 50. P. Liu, B. Xu, W. Shen, et al., *Dysregulation of TNF α -induced necroptotic signaling in chronic lymphocytic leukemia: Suppression of CYLD gene by LEF1*. Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K, 2011, 26, 1293-300.
 51. Y. Zhou, J. Wu, X. Fu, et al., *OTUB1 promotes metastasis and serves as a marker of poor prognosis in colorectal cancer*. Molecular cancer, 2014, 13, 258-258.
 52. F. Zhang, L. Yang, and Y. Li, *The role of A20 in the pathogenesis of lymphocytic malignancy*. Cancer Cell International, 2012, 12(1), 44.
 53. K. Enesa and P. Evans, *The biology of A20-like molecules*. The Multiple Therapeutic Targets of A20, 2014, 33-48.
 54. A. Adhikari, M. Xu, and Z. J. Chen, *Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK*. Oncogene, 2007, 26(22), 3214-3226.
 55. S. G. Hymowitz and I. E. Wertz, *A20: from ubiquitin editing to tumour suppression*. Nature Reviews Cancer, 2010, 10(5), 332-41.
 56. B. Coornaert, I. Carpentier, and R. Beyaert, *A20: central gatekeeper in inflammation and immunity*. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(13), 8217-21.
 57. L. Zhu, L. Wang, X. Wang, et al., *Characteristics of A20 gene polymorphisms and clinical significance in patients with rheumatoid arthritis*. Journal of translational medicine, 2015, 13, 215-215.
 58. M. Matmati, P. Jacques, J. Maelfait, et al., *A20 (TNFAIP3) deficiency in myeloid cells triggers erosive polyarthritis resembling rheumatoid arthritis*. Nature genetics, 2011, 43(9), 908-912.
 59. K. De Wilde, A. Martens, S. Lambrecht, et al., *A20 inhibition of STAT1 expression in myeloid cells: a novel endogenous regulatory mechanism preventing development of enthesitis*. Annals of Rheumatic Diseases, 2017, 76(3), 585-592.
 60. N. X. Canh, N. V. Giang, V. X. Nghia, et al., *Regulation of cell activation by A20 through STAT signaling in acute lymphoblastic leukemia*. Journal of Receptors and Signal Transduction Research, 2021, 41(4), 331-338.
 61. G. Xiao and J. Fu, *NF- κ B and cancer: a paradigm of Yin-Yang*. American Journal of Cancer Research, 2011, 1(2), 192-221.

62. K. R. Verhoeft, H. L. Ngan, and V. W. Y. Lui, *The cylindromatosis (CYLD) gene and head and neck tumorigenesis*. *Cancers of the Head & Neck*, 2016, 1(1), 10.
63. B. J. Mathis, Y. Lai, C. Qu, et al., *CYLD-mediated signaling and diseases*. *Current drug targets*, 2015, 16(4), 284-294.
64. P. V. Hornbeck, J. M. Kornhauser, S. Tkachev, et al., *PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse*. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(Database issue), D261-70.
65. W. Wu, H. Zhu, Y. Fu, et al., *Clinical significance of down-regulated cylindromatosis gene in chronic lymphocytic leukemia*. *Leukemia & Lymphoma*, 2014, 55(3), 588-94.
66. 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), 268-81.
67. Y. Yang, J. Ran, L. Sun, et al., *CYLD Regulates Noscapine Activity in Acute Lymphoblastic Leukemia via a Microtubule-Dependent Mechanism*. *Theranostics*, 2015, 5(7), 656-66.
68. N. Deng, H. Zhou, H. Fan, et al., *Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility*. *Oncotarget*, 2017, 8(66), 110635-110649.
69. A. Ma and B. A. Malynn, *A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease*. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(11), 774-85.
70. R. R. Graham, G. Hom, W. Ortmann, et al., *Review of recent genome-wide association scans in lupus*. *J Intern Med*, 2009, 265(6), 680-8.
71. Y. Chu, J. C. Vahl, D. Kumar, et al., *B cells lacking the tumor suppressor TNFAIP3/A20 display impaired differentiation and hyperactivation and cause inflammation and autoimmunity in aged mice*. *Blood*, 2011, 117(7), 2227-36.
72. S. L. Musone, K. E. Taylor, T. T. Lu, et al., *Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus*. *Nat Genet*, 2008, 40(9), 1062-4.
73. L. M. Elsby, G. Orozco, J. Denton, et al., *Functional evaluation of TNFAIP3 (A20) in rheumatoid arthritis*. *Clin Exp Rheumatol*, 2010, 28(5), 708-14.
74. W. Boonyasrisawat, D. Eberle, S. Bacci, et al., *Tag polymorphisms at the A20 (TNFAIP3) locus are associated with lower gene expression and increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2007, 56(2), 499-505.
75. M. Kato, M. Sanada, I. Kato, et al., *Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas*. *Nature*, 2009, 459(7247), 712-6.
76. M. Compagno, W. K. Lim, A. Grunn, et al., *Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma*. *Nature*, 2009, 459(7247), 717-21.
77. Y. H. Lee, S. C. Bae, S. J. Choi, et al., *Associations between TNFAIP3 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis*. *Inflamm Res*, 2012, 61(6), 635-41.
78. K. Shimane, Y. Kochi, T. Horita, et al., *The association of a nonsynonymous single-nucleotide polymorphism in TNFAIP3 with systemic lupus*

- erythematosus and rheumatoid arthritis in the Japanese population. Arthritis Rheum*, 2010, 62(2), 574-9.
79. L. Zhu, F. Zhang, Q. Shen, et al., *Characteristics of A20 gene polymorphisms in T-cell acute lymphocytic leukemia. Hematology*, 2014, 19(8), 448-54.
 80. Y. C. Chang, Y. S. Chang, C. C. Chang, et al., *Development of a high-resolution melting method for the screening of TNFAIP3 gene mutations. Oncology Reports*, 2016, 35(5), 2936-42.
 81. C. Chen, L. Zhou, L. Zhu, et al., *TNFAIP3 mutation is an independent poor overall survival factor for patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer Medicine*, 2023, 12(4), 3952-3961.
 82. 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. Human mutation*, 2009, 30(7), 1025-1036.
 83. P. P. Gutiérrez, T. Eggermann, D. Höller, et al., *Phenotype Diversity in Familial Cylindromatosis: A Frameshift Mutation in the Tumor Suppressor Gene CYLD Underlies Different Tumors of Skin Appendages. Journal of Investigative Dermatology*, 2002, 119(2), 527-531.
 84. K. C. Masoumi, G. Shaw-Hallgren, and R. Massoumi, *Tumor Suppressor Function of CYLD in Nonmelanoma Skin Cancer. Journal of Skin Cancer*, 2011, 2011, 614097.
 85. N. Nagy, A. Dubois, M. Szell, et al., *Genetic testing in CYLD cutaneous syndrome: an update. 2021, 427-444.*
 86. 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), 451-64.
 87. A. Kresinsky, T. M. Schnöder, I. D. Jacobsen, et al., *Lack of CD45 in FLT3-ITD mice results in a myeloproliferative phenotype, cortical porosity, and ectopic bone formation. Oncogene*, 2019, 38(24), 4773-4787.
 88. M. L. Morales, A. Arenas, A. Ortiz-Ruiz, et al., *MEK inhibition enhances the response to tyrosine kinase inhibitors in acute myeloid leukemia. Scientific Reports*, 2019, 9(1), 18630.
 89. B. J. Druker, F. Guilhot, S. G. O'Brien, et al., *Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. New England Journal of Medicine*, 2006, 355(23), 2408-17.
 90. Q. He, J. Dong, H. Zhen, et al., *A small molecule significantly inhibits the bcr/abl fusion gene at the mRNA level in human chronic myelogenous leukemia. Leukemia Research*, 2011, 35(8), 1074-9.
 91. T. Wang, G. Niu, M. Kortylewski, et al., *Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. Nature Medicine*, 2004, 10(1), 48-54.
 92. S. S. Jatiani, S. J. Baker, L. R. Silverman, et al., *Jak/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: approaches for targeted therapies. Genes Cancer*, 2010, 1(10), 979-93.
 93. D. E. Levy and J. Darnell, *Stats: transcriptional control and biological impact. Nature reviews Molecular cell biology*, 2002, 3(9), 651-662.

94. M. H. Kaplan, *STAT signaling in inflammation*. JAK-STAT, 2013, 2(1), e24198-e24198.
95. C.-Y. Loh, A. Arya, A. F. Naema, et al., *Signal Transducer and Activator of Transcription (STATs) Proteins in Cancer and Inflammation: Functions and Therapeutic Implication*. Frontiers in oncology, 2019, 9, 48-48.
96. E. Pfitzner, S. Kliem, D. Baus, et al., *The Role of STATs in Inflammation and Inflammatory Diseases*. Current pharmaceutical design, 2004, 10, 2839-50.
97. I. I. Nitulescu, S. C. Meyer, Q. J. Wen, et al., *Mediator Kinase Phosphorylation of STAT1 S727 Promotes Growth of Neoplasms With JAK-STAT Activation*. EBioMedicine, 2017, 26, 112-125.
98. T. Ikezoe, S. Kojima, M. Furihata, et al., *Expression of p-JAK2 predicts clinical outcome and is a potential molecular target of acute myelogenous leukemia*. International Journal of Cancer, 2011, 129(10), 2512-21.
99. M. Luciano, P. W. Krenn, and J. Horejs-Hoeck, *The cytokine network in acute myeloid leukemia*. Frontiers in Immunology, 2022, 13, 1000996.
100. C. Mirantes, E. Passequé, and E. M. Pietras, *Pro-inflammatory cytokines: emerging players regulating HSC function in normal and diseased hematopoiesis*. Experimental Cell Research, 2014, 329(2), 248-54.
101. P. Stenvinkel, M. Ketteler, R. J. Johnson, et al., *IL-10, IL-6, and TNF- α : Central factors in the altered cytokine network of uremia—The good, the bad, and the ugly*. Kidney International, 2005, 67(4), 1216-1233.
102. S. A. Jones, S. Horiuchi, N. Topley, et al., *The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease*. The FASEB Journal, 2001, 15(1), 43-58.
103. M. S. Kim, J. W. Kang, J. S. Jeon, et al., *IL-32 θ gene expression in acute myeloid leukemia suppresses TNF- α production*. Oncotarget, 2015, 6(38), 40747-61.
104. M. Pehlivan, H. H. Sahin, S. Pehlivan, et al., *Prognostic importance of single-nucleotide polymorphisms in IL-6, IL-10, TGF- β 1, IFN- γ , and TNF- α genes in chronic phase chronic myeloid leukemia*. Genetic Testing and Molecular Biomarkers, 2014, 18(6), 403-9.
105. S. A. Zbaar, *Serum level of TNF-alpha in patients with chronic myeloid leukemia on Imatinib therapy*. Medicine Journal of Tikrit University, 2017, 22, 54-60.
106. A. Rynningen, L. Wergeland, N. Glenjen, et al., *In vitro crosstalk between fibroblasts and native human acute myelogenous leukemia (AML) blasts via local cytokine networks results in increased proliferation and decreased apoptosis of AML cells as well as increased levels of proangiogenic Interleukin 8*. Leukemia Research, 2005, 29(2), 185-96.
107. Y. Kagoya, A. Yoshimi, K. Kataoka, et al., *Positive feedback between NF- κ B and TNF- α promotes leukemia-initiating cell capacity*. The Journal of Clinical Investigation, 2014, 124(2), 528-42.
108. M. Tera, *Peripheral Blood Mononuclear Cells: A Brief Review*. Stemexpress.
109. M. T. Ashraf and R. H. Khan, *Mitogenic lectins*. Medical Science Monitor, 2003, 9(11), Ra265-9.

110. C. R. Kleiveland, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, Verhoeckx K., et al., Editors. 2015, Springer International Publishing: Cham. p. 161-167.
111. T. Pearson, D. L. Greiner, and L. D. Shultz, *Creation of "humanized" mice to study human immunity*. Current Protocols in Immunology, 2008, Chapter 15, Unit 15.21.
112. A. Kunisato, M. Wakatsuki, H. Shinba, et al., *Direct generation of induced pluripotent stem cells from human nonmobilized blood*. Stem Cells and Development, 2011, 20(1), 159-68.
113. 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), 1970-1983.
114. Y. Han, X. You, W. Xing, et al., *Paracrine and endocrine actions of bone-the functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts*. Bone research, 2018, 6, 16-16.
115. E. Sapi, *The role of CSF-1 in normal physiology of mammary gland and breast cancer: an update*. Exp Biol Med (Maywood), 2004, 229(1), 1-11.
116. *CSF-1 signalling is involved in repair following AKI*. Nature Reviews Nephrology, 2013, 9(1), 2-2.
117. M.-Z. Zhang, B. Yao, S. Yang, et al., *CSF-1 signaling mediates recovery from acute kidney injury*. The Journal of clinical investigation, 2012, 122(12), 4519-4532.
118. Q. Cao, Y. Wang, D. Zheng, et al., *Failed renoprotection by alternatively activated bone marrow macrophages is due to a proliferation-dependent phenotype switch in vivo*. Kidney Int, 2014, 85(4), 794-806.
119. E. D. Foucher, S. Blanchard, L. Preisser, et al., *IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. antagonistic effects of GM-CSF and IFN γ* . PloS one, 2013, 8(2), e56045.
120. J. A. Hamilton, *Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity*. Nature Reviews Immunology, 2008, 8(7), 533-544.
121. T. A. Hamilton, C. Zhao, P. G. Pavicic, et al., *Myeloid Colony-Stimulating Factors as Regulators of Macrophage Polarization*. 2014, 5.
122. E. Asakura, T. Hanamura, A. Umemura, et al., *Effects of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on lipopolysaccharide (LPS)-induced mediator production from monocytes in vitro*. Immunobiology, 1996, 195(3), 300-13.
123. S. Elmore, *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicologic pathology, 2007, 35(4), 495-516.
124. B. J. C. Quah and C. R. Parish, *The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation*. Journal of visualized experiments : JoVE, 2010(44), 2259.
125. M. Moumaris, B. Rajoelya, and N. Abuafa, *Fluorescein isothiocyanate-dextran can track apoptosis and necrosis induced by heat shock of peripheral blood mononuclear cells and HeLa cells*. Open Biological Sciences Journal, 2015, 1(1).
126. E. Eruslanov and S. Kusmartsev, *Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry*. Methods Molecular Biology, 2010, 594, 57-72.

127. M. O. Butler, J. S. Lee, S. Ansén, et al., *Long-lived antitumor CD8+ lymphocytes for adoptive therapy generated using an artificial antigen-presenting cell*. *Clinical Cancer Research*, 2007, 13(6), 1857-67.
128. L. Zamai, A. R. Mariani, G. Zauli, et al., *Kinetics of in vitro natural killer activity against K562 cells as detected by flow cytometry*. *Cytometry*, 1998, 32(4), 280-5.
129. B. B. Lozzio, E. A. Machado, S. V. Lair, et al., *Reproducible metastatic growth of K-562 human myelogenous leukemia cells in nude mice*. *Journal of the National Cancer Institute*, 1979, 63(2), 295-9.
130. M. Z. Ratajczak, J. A. Kant, S. M. Luger, et al., *In vivo treatment of human leukemia in a scid mouse model with c-myc antisense oligodeoxynucleotides*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(24), 11823-7.
131. J. Wang, Q. Li, C. Wang, et al., *Knock-down of CIAPIN1 sensitizes K562 chronic myeloid leukemia cells to Imatinib by regulation of cell cycle and apoptosis-associated members via NF- κ B and ERK5 signaling pathway*. *Biochemical Pharmacology*, 2016, 99, 132-145.
132. M. T. Duncan, T. A. DeLuca, H.-Y. Kuo, et al., *SIRT1 is a critical regulator of K562 cell growth, survival, and differentiation*. *Experimental Cell Research*, 2016, 344(1), 40-52.
133. C. Yang, H. Cai, and X. Meng, *Polyphyllin D induces apoptosis and differentiation in K562 human leukemia cells*. *International Immunopharmacology*, 2016, 36, 17-22.
134. P. Silva de Souza, F. Vasconcelos, F. Reis, et al., *P-glycoprotein and survivin simultaneously regulate vincristine-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells*. *International journal of oncology*, 2011, 39, 925-33.
135. Y.-W. Zhang, X.-Y. Kong, and G.-H. Du, *Vinblastine and Vincristine*. 2018. p. 551-557.
136. M. A. Jordan and L. Wilson, *Microtubules as a target for anticancer drugs*. *Nature Reviews Cancer*, 2004, 4(4), 253-65.
137. M. Gautam and M. Ramanathan, *Saponins of Tribulus terrestris attenuated neuropathic pain induced with vincristine through central and peripheral mechanism*. *Inflammopharmacology*, 2019, 27(4), 761-772.
138. E. Groninger, G. J. Meeuwse-De Boer, S. S. De Graaf, et al., *Vincristine induced apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cells: a mitochondrial controlled pathway regulated by reactive oxygen species?* *International Journal of Oncology*, 2002, 21(6), 1339-45.
139. A. Shakeri, M. Ghanbari, A. Tasbandi, et al., *Regulation of microRNA-21 expression by natural products in cancer*. *Phytotherapy Research*, 2021, 35(7), 3732-3746.
140. A. A. Ramírez-Guerrero, C. O. González-Villaseñor, E. Leal-Ugarte, et al., *Association between genetic variant rs2267716 of CRHR2 gene with colorectal cancer*. *Journal of Investigative Medicine*, 2022, 70(4), 947-952.
141. C. Chen, Z. Chen, L. Huang, et al., *TNFAIP3 mutation may be associated with favorable overall survival for patients with T-cell lymphoma*. *Cancer Cell International*, 2021, 21(1), 490.

142. K. J. Livak and T. D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001, 25(4), 402-8.
143. G. J. Schiller, L. E. Damon, S. E. Coutre, et al., *High-Dose Vincristine Sulfate Liposome Injection, for Advanced, Relapsed, or Refractory Philadelphia Chromosome-Negative Acute Lymphoblastic Leukemia in an Adolescent and Young Adult Subgroup of a Phase 2 Clinical Trial*. *Journal of Adolescent and Young Adult Oncology*, 2018, 7(5), 546-552.
144. W. Low and W. Abas, *Benchtop Technologies for Circulating Tumor Cells Separation Based on Biophysical Properties*. *BioMed Research International*, 2015, 2015, 1-22.
145. B. Mesko, S. Poliska, and L. Nagy, *Gene expression profiles in peripheral blood for the diagnosis of autoimmune diseases*. *Trends in Molecular Medicine*, 2011, 17(4), 223-33.
146. N. J. Olsen, J. H. Moore, and T. M. Aune, *Gene expression signatures for autoimmune disease in peripheral blood mononuclear cells*. *Arthritis Research & Therapy*, 2004, 6(3), 120-8.
147. G. Shi, Z. Zhang, and Q. Li, *New Biomarkers in Autoimmune Disease*. *Journal of Immunology Research*, 2017, 2017.
148. R. Harouaka, Z. Kang, S. Y. Zheng, et al., *Circulating tumor cells: advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications*. *Pharmacology & Therapeutics*, 2014, 141(2), 209-21.
149. H. Esmaeilsabzali, T. V. Beischlag, M. E. Cox, et al., *Detection and isolation of circulating tumor cells: principles and methods*. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(7), 1063-84.
150. G. V. Masucci, A. Cesano, R. Hawtin, et al., *Validation of biomarkers to predict response to immunotherapy in cancer: Volume I - pre-analytical and analytical validation*. *Journal for immunotherapy of cancer*, 2016, 4, 76-76.
151. S. Farkona, E. P. Diamandis, and I. M. Blasutig, *Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer?* *BMC Medicine*, 2016, 14, 73.
152. R. G. Vile, *Socializing Individualized T-Cell Cancer Immunotherapy*. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2016, 24(7), 1170-1173.
153. J. Yuan, P. S. Hegde, R. Clynes, et al., *Novel technologies and emerging biomarkers for personalized cancer immunotherapy*. *The Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2016, 4, 3.
154. H. E. Kohrt, P. C. Tumeh, D. Benson, et al., *Immunodynamics: a cancer immunotherapy trials network review of immune monitoring in immunoncology clinical trials*. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2016, 4(1), 15.
155. S. Kumar, R. Sunagar, G. Pham, et al., *Ex vivo antigen-pulsed PBMCs generate potent and long lasting immunity to infection when administered as a vaccine*. *Vaccine*, 2017, 35(7), 1080-1086.
156. A. Sambor, A. Garcia, M. Berrong, et al., *Establishment and maintenance of a PBMC repository for functional cellular studies in support of clinical vaccine trials*. *Journal of Immunological Methods*, 2014, 409, 107-16.

157. L.-m. Zhang, J.-J. Zhou, and C.-l. Luo, *CYLD suppression enhances the pro-inflammatory effects and hyperproliferation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by enhancing NF- κ B activation*. *Arthritis Research & Therapy*, 2018, 20(1), 219.
158. X. Lin, Q. Chen, C. Huang, et al., *CYLD Promotes TNF- α -Induced Cell Necrosis Mediated by RIP-1 in Human Lung Cancer Cells*. *Mediators Inflammation*, 2016, 2016, 1542786.
159. D. J. Bates, A. V. Danilov, C. H. Lowrey, et al., *Vinblastine rapidly induces NOXA and acutely sensitizes primary chronic lymphocytic leukemia cells to ABT-737*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2013, 12(8), 1504-14.
160. H. C. Toh, L. Sun, C. H. Koh, et al., *Vinorelbine induces apoptosis and caspase-3 (CPP32) expression in leukemia and lymphoma cells: a comparison with vincristine*. *Leukemia & Lymphoma*, 1998, 31(1-2), 195-208.
161. S. M. Lee, K. N. Son, D. Shah, et al., *Histatin-1 Attenuates LPS-Induced Inflammatory Signaling in RAW264.7 Macrophages*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(15).
162. Z. Feng, W. Zheng, Q. Tang, et al., *Fludarabine inhibits STAT1-mediated up-regulation of caspase-3 expression in dexamethasone-induced osteoblasts apoptosis and slows the progression of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head in rats*. *Apoptosis*, 2017, 22(8), 1001-1012.
163. M. Miksa, D. Amin, R. Wu, et al., *Maturation-induced down-regulation of MFG-E8 impairs apoptotic cell clearance and enhances endotoxin response*. *International Journal of Molecular Medicine*, 2008, 22(6), 743-8.
164. T. Frankenberg, S. Kirschnek, H. Häcker, et al., *Phagocytosis-induced apoptosis of macrophages is linked to uptake, killing and degradation of bacteria*. *European journal of immunology*, 2008, 38(1), 204-15.
165. K. Seiter, *Acute myeloid leukemia (AML)*, Besa E. C., Editor. 2022: Medscape.
166. C. Philipp, J. Edelmann, A. Bühler, et al., *Mutation analysis of the TNFAIP3 (A20) tumor suppressor gene in CLL*. *International Journal of Cancer*, 2011, 128(7), 1747-50.
167. P. Johansson, A. Bergmann, S. Rahmann, et al., *Recurrent alterations of TNFAIP3 (A20) in T-cell large granular lymphocytic leukemia*. *International Journal of Cancer*, 2016, 138(1), 121-4.
168. T. Johari and T. K. Maiti, *Catalytic domain mutation in CYLD inactivates its enzyme function by structural perturbation and induces cell migration and proliferation*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2018, 1862(9), 2081-2089.
169. M. Arora, D. Kaul, and N. Varma, *Functional nature of a novel mutant CYLD observed in pediatric lymphoblastic B-cell leukemia*. *Pediatric Blood & Cancer*, 2015, 62(6), 1066-9.
170. H. C. Hasselbalch, *Perspectives on chronic inflammation in essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis: is chronic inflammation a trigger and driver of clonal evolution and development of accelerated atherosclerosis and second cancer?* *Blood*, 2012, 119(14), 3219-25.

171. E. G. Lee, D. L. Boone, S. Chai, et al., *Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice*. *Science*, 2000, 289(5488), 2350-4.
172. W. Jin, W. R. Reiley, A. J. Lee, et al., *Deubiquitinating enzyme CYLD regulates the peripheral development and naive phenotype maintenance of B cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(21), 15884-93.
173. N. T. Xuan and N. H. Hoang, *The regulatory role of peripheral blood mononuclear cell function by A20*. *Vietnam Journal of Biotechnology*, 2020, 17(4), 603-609.
174. Y. Shi, X. Wang, J. Wang, et al., *The dual roles of A20 in cancer*. *Cancer Lett*, 2021, 511, 26-35.
175. Z. R. Shaheen, S. J. A. Williams, and B. A. Binstadt, *Case Report: A Novel TNFAIP3 Mutation Causing Haploinsufficiency of A20 With a Lupus-Like Phenotype*. *Front Immunol*, 2021, 12, 629457.
176. M. Rito, Y. Mitani, D. Bell, et al., *Frequent and differential mutations of the CYLD gene in basal cell salivary neoplasms: linkage to tumor development and progression*. *Modern Pathology*, 2018, 31(7), 1064-1072.
177. C. J. Beatty, A. Yousaf, A. Al-Bouri, et al., *Case report of syndromic multiple spiradenomas due to biallelic functional loss of CYLD*. *JAAD Case Reports*, 2022, 21, 106-108.
178. D. T. Trang, N. H. Giang, B. K. Trang, et al., *Prevalence of CYLD mutations in Vietnamese patients with polycythemia vera*. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2022, 31(4), 369-380.
179. M. Hayashi, H. Jono, S. Shinriki, et al., *Clinical significance of CYLD downregulation in breast cancer*. *Breast Cancer Research & Treatment*, 2014, 143(3), 447-57.
180. F. Z. a. N. Zhou, *CYLD in Hematological Malignancies*. Gavin Publishers, 2021.
181. N. Giang, N. Huyen, and N. Xuan, *Expression of genes involved in immune regulation in chronic myeloid leukemia*. *Vietnam Journal of Biotechnology*, 2021, 19, 51-60.
182. S. M. Kornblau, D. McCue, N. Singh, et al., *Recurrent expression signatures of cytokines and chemokines are present and are independently prognostic in acute myelogenous leukemia and myelodysplasia*. *Blood*, 2010, 116(20), 4251-4261.
183. S. Binder, M. Luciano, and J. Horejs-Hoeck, *The cytokine network in acute myeloid leukemia (AML): A focus on pro- and anti-inflammatory mediators*. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2018, 43, 8-15.
184. 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), 885-91.
185. E. Nievergall, J. Reynolds, C. H. Kok, et al., *TGF- α and IL-6 plasma levels selectively identify CML patients who fail to achieve an early molecular response or progress in the first year of therapy*. *Leukemia*, 2016, 30(6), 1263-1272.

186. G. Hoermann, G. Greiner, and P. Valent, *Cytokine Regulation of Microenvironmental Cells in Myeloproliferative Neoplasms*. Mediators of Inflammation, 2015, 2015, 869242.
187. M. Ghaehri, S. Miraghaee, A. Babaei, et al., *Effect of Stevia rebaudiana Bertoni extract on sexual dysfunction in Streptozotocin-induced diabetic male rats*. Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand), 2018, 64(2), 6-10.
188. J. Zhang, B. Stirling, S. T. Temmerman, et al., *Impaired regulation of NF-kappaB and increased susceptibility to colitis-associated tumorigenesis in CYLD-deficient mice*. Journal of Clinical Investigation, 2006, 116(11), 3042-9.
189. K. Wex, U. Schmid, S. Just, et al., *Receptor-Interacting Protein Kinase-2 Inhibition by CYLD Impairs Antibacterial Immune Responses in Macrophages*. 2016, 6.
190. H. van Andel, K. A. Kocemba, M. Spaargaren, et al., *Aberrant Wnt signaling in multiple myeloma: molecular mechanisms and targeting options*. Leukemia, 2019, 33(5), 1063-1075.
191. A. Schmidt, R. Schmitz, M. Giefing, et al., *Rare occurrence of biallelic CYLD gene mutations in classical Hodgkin lymphoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2010, 49(9), 803-9.
192. M. Baškiewicz-Masiuk and B. Machaliński, *The role of the STAT5 proteins in the proliferation and apoptosis of the CML and AML cells*. European Journal of Haematology, 2004, 72(6), 420-9.
193. L. Arora, A. P. Kumar, F. Arfuso, et al., *The Role of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) and Its Targeted Inhibition in Hematological Malignancies*. Cancers (Basel), 2018, 10(9).
194. K. Wex, U. Schmid, S. Just, et al., *Receptor-Interacting Protein Kinase-2 Inhibition by CYLD Impairs Antibacterial Immune Responses in Macrophages*. Frontiers in Immunology, 2015, 6, 650.
195. *Quyết định 1832/QĐ-BYT 2022 tài liệu Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị một số bệnh lý huyết học*. 2022, Bộ Y Tế.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh bạch cầu dòng tủy

*** Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp**

Bệnh AML được chẩn đoán dựa vào những đặc điểm sau [195]:

- Chẩn đoán xác định:

+ Dựa vào triệu chứng lâm sàng điển hình của bệnh

+ Xét nghiệm tủy đồ thấy tế bào blas $\geq 20\%$ tế bào có nhân trong tủy

- Chẩn đoán thể hiện bệnh và xếp loại bệnh bạch cầu dòng tủy cấp: Chẩn đoán thể bệnh bạch cầu tủy cấp dựa trên các bảng xếp loại của WHO và FAB

- Xếp loại bệnh bạch cầu dòng tủy cấp:

+ Xếp loại bạch cầu dòng tủy cấp theo FAB 1986 có bổ sung.

+ Kết hợp miễn dịch chia thành 8 thể, từ M0 đến M7

*** Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn:**

Bệnh CML được chẩn đoán dựa vào những đặc điểm sau [195]:

- Chẩn đoán xác định:

+ Dựa vào các triệu chứng lâm sàng như: Lách to, gan to; Thiếu máu mức độ nhẹ hoặc vừa; Tắc mạch; Khi bệnh chuyển sang giai đoạn cấp tính thì xuất hiện triệu chứng thiếu máu, xuất huyết và nhiễm trùng;

+ Xét nghiệm tế bào máu ngoại vi, tủy đồ, NST Ph và/hoặc gen *BCR-ABL1*

- Chẩn đoán phân biệt:

+ Phản ứng giả với bệnh bạch cầu gặp trong nhiễm trùng nặng: Phát hiện ô nhiễm trùng, không có NST Ph và gen kết hợp *BCR-ABL1*.

+ Các bệnh khác trong hội chứng tăng sinh tủy mạn ác tính, theo bảng xếp loại của WHO năm 2016.

Phu lục 2: Thống kê kết quả chỉ số hóa sinh của bệnh nhân bạch cầu dòng tủy

Bảng 4.1. Thống kê kết quả đánh giá các chỉ số hóa sinh của bệnh nhân

Chỉ số hóa sinh	AML (n=92)		CML (n=50)		Giá trị bình thường
	Bệnh nhân có kết quả xét nghiệm cao (%)	Giá trị trung bình	Bệnh nhân có kết quả xét nghiệm cao (%)	Giá trị trung bình	
Độ tuổi bệnh nhân		46,2 (1-84) (1-84 tuổi)		47,18 (16-80)	
Nam		54,3% (50 nam)		72% (36 nam)	
Urea (mmol/L)	33,72%	6,14 ± 0,35	2,13%	5,09 ± 1,27	2,5 -7,5
Glucose (mmol/L)	50,6%	6,46 ± 0,22	29,17%	6,29 ± 1,79	3,9-6,4
Creatinine (µmol/L)	16,09%	90,53 ± 28,15	10,2%	84,01 ± 21,1	53-120
Uric acid (µmol/L)	27,91%	411,18 ± 16,9	12,24%	318,92 ± 99,24	150-420
Bilirubin T.P (µmol/L)	26,44%	14,26 ± 1,58	10,42%	12,45 ± 2,97	< 17
Bilirubin T.T (µmol/L)	14,82%	4,24 ± 1,01	16,67%	3,04 ± 0,59	< 4,3
Bilirubin G.T (µmol/L)	28,74%	10,11 ± 0,62	12,5%	9,52 ± 1,61	< 12,7
Protein T.P (g/L)	20,29%	78,34 ± 4,35	15%	95,7 ± 19,32	65-82
Albumin (g/L)	0%	37,95 ± 0,53	0%	41,51 ± 9,92	35-50
Globulin (g/L)	34,29 %	36,06 ± 0,81	15,79%	33,36 ± 9,92	24-38
Ferritin (ng/L)	91,55 %	945,13 ± 67,8	55,32%	392,15 ± 28,04	30-300
AST (GOT) (U/L)	31,4 %	44,2 ± 4,63	24%	36,5 ± 8,48	< 37
ALT (GPT) (U/L)	31,4 %	37,46 ± 3,97	20%	40,14 ± 9,54	< 40
LDH (U/L)	67,95 %	1879,17 ± 413	48,98%	541,09 ± 129,95	230-460

AST-Aspartate transaminase; ALT-Alanine aminotransferase; LDH-Lactate dehydrogenase

Phu lục 3: Danh sách bệnh nhân và người khỏe


DANH SÁCH BỆNH NHÂN VÀ NGƯỜI CUNG CẤP MÁU MÁU
PHỤC VỤ NGHIÊN CỨU

Đề tài “Nghiên cứu mối tương quan giữa đa hình gen, biểu hiện gen, hệ vi sinh,
kiểu hình miễn dịch trên bệnh nhân ung thư máu”. Mã số ĐTĐT.CN.43/21

TT	NGÀY KHÁM	HỌ VÀ TÊN	NĂM SINH	MÃ SỐ	TÊN BỆNH
1	15/1/2018	PHẠM VĂN N.	1975	16037420	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
2	15/1/2018	NGUYỄN TUẤN L.	1980	15016822	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
3	15/1/2018	ĐỖ THỊ C.	1962	17001256	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
4	15/1/2018	TRẦN THỊ N.	1956	15030369	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
5	13/3/2018	TRẦN XUÂN T.	1976	17010914	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
6	13/3/2018	NGUYỄN THỊ U.	1981	10011111	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
7	14/3/2018	TRẦN THỊ H.	1993	11009806	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
8	19/3/2018	LÒ VĂN X.	1975	14019688	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
9	21/3/2018	PHAN THANH H.	1983	17023818	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
10	26/3/2018	NGUYỄN QUỐC T.	1976	9002337	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
11	27/3/2018	PHÙNG VĂN C.	1964	17022139	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
12	26/2/2018	TẠ THỊ N.	1938	17036974	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
13	03/4/2018	VŨ VĂN D.	1992	12009463	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
14	03/4/2018	TRỊNH THỊ N.	1971	11002263	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
15	03/4/2018	NGUYỄN TUẤN A.	1984	15030241	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
16	04/4/2018	QUÁCH VĂN L.	1962	14019540	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
17	04/4/2018	HOÀNG NGUYỄN TÙNG L.	1993	12000596	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
18	05/4/2018	PHAN VĂN T.	1956	17005191	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
19	09/4/2018	NGUYỄN THỊ XUÂN L.	2002	16013043	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
20	09/4/2018	BÙI VĂN S.	1972	17010597	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
21	09/4/2018	NGUYỄN PHÚ H.	1945	10008195	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
22	09/4/2018	NGUYỄN VĂN Đ.	1986	15027911	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
23	09/4/2018	PHẠM VĂN U.	1947	14000913	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
24	09/4/2018	TRẦN DUY T.	1956	11004844	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
25	09/4/2018	DƯƠNG VĂN H.	1956	12006997	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
26	09/4/2018	BÙI QUANG T.	1947	10002170	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn

27	09/4/2018	NGUYỄN DUY L.	1989	14050902	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
28	09/4/2018	HOÀNG NGỌC S.	1961	8005771	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
29	10/4/2018	HỒ HỮU C.	1971	7008523	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
30	10/4/2018	NGUYỄN HỒ ĐẠI H.	1988	12006979	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
31	10/4/2018	TRẦN VĂN T.	1962	15003185	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
32	10/4/2018	NGUYỄN VĂN O.	1976	7005880	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
33	10/4/2018	LÊ VĂN T.	1972	9000251	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
34	12/4/2018	TRẦN VĂN T.	1948	16004660	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
35	12/4/2018	HOÀNG BÁ P.	1981	17053099	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
36	12/4/2018	NGUYỄN THỊ H.	1988	13009021	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
37	12/4/2018	PHẠM THỊ H.	1958	16012651	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
38	16/4/2018	NGUYỄN VĂN T.	1962	15002056	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
39	16/4/2018	TRẦN QUANG P.	1966	15025752	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
40	16/4/2018	HOÀNG THỊ M.	1985	18000311	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
41	17/4/2018	HOÀNG VĂN H.	1963	18000476	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
42	17/4/2018	DƯƠNG VINH D.	1960	12000076	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
43	17/4/2018	TRẦN VĂN T.	1966	15001790	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
44	17/4/2018	DƯƠNG VĂN Q.	1986	16015535	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
45	18/4/2018	HOÀNG VĂN C.	1989	14009892	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
46	18/4/2018	NGUYỄN THỊ Đ.	1946	11004776	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
47	19/4/2018	VŨ VĂN T.	1974	18011637	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
48	19/4/2018	VY THỊ V.	1981	11044464	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
49	19/4/2018	DƯƠNG THỊ V.	1959	17053856	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn
50	23/4/2018	ĐÀM THỊ N.	1982	17010685	Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn

Xác nhận của Khoa/Phòng


BСКII. Lê Quang Tường

Hà Nội ngày 20 tháng 04 năm 2022

Xác nhận của Viện Huyết học-
Truyền máu Trung ương



PHÓ VIỆN TRƯỞNG
Vũ Đức Bình

DANH SÁCH BỆNH NHÂN VÀ NGƯỜI CUNG CẤP MÁU MÁU
PHỤC VỤ NGHIÊN CỨU

Đề tài “Nghiên cứu mối tương quan giữa đa hình gen, biểu hiện gen, hệ vi sinh,
kiểu hình miễn dịch trên bệnh nhân ung thư máu”. Mã số ĐTĐT.CN.43/21

TT	NGÀY KHÁM	HỌ VÀ TÊN	NĂM SINH	MÃ SỐ	TÊN BỆNH
1	28/12/2017	VŨ QUANG P.	1995	15005893	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
2	28/12/2017	NGUYỄN THỊ B.	1931	17052922	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
3	26/12/2017	ĐẶNG THỊ THU H.	1970	17010698	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
4	16/01/2018	NGUYỄN THỊ L.	1979	14007964	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
5	17/1/2018	VŨ VĂN Đ.	2000	15007589	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
6	19/1/2018	NGUYỄN VĂN S.	1979	7005813	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
7	22/1/2018	NGUYỄN THỊ TH.	1962	16095216	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
8	06/2/2018	TRỊNH VĂN T.	1948	17066993	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
9	13/3/2018	NGUYỄN VĂN N.	1983	14001418	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
10	19/3/2018	NGUYỄN THỊ T.	1960	13019331	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
11	22/3/2018	ĐÀO THỊ H.	1970	15005285	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
12	29/3/2018	NGUYỄN HỒNG V.	1960	06001600	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
13	04/4/2018	NGUYỄN TOÀN T.	1997	17010666	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
14	05/4/2018	NGÔ THỊ H.	1980	07005807	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
15	10/4/2018	LƯƠNG THỊ T.	1954	13019402	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
16	16/4/2018	TRẦN THỊ M.	1955	15002006	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
17	17/4/2018	NGUYỄN CĂN T.	1968	17020926	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
18	18/4/2018	NGUYỄN HUY S.	1989	17038455	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
19	26/4/2018	HOÀNG N.	1960	16024861	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
20	02/5/2018	NGUYỄN HỮU T.	1948	14005985	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
21	04/5/2018	NGUYỄN THỊ HỒNG V.	1938	16037665	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
22	08/5/2018	NGUYỄN THỊ HẢI Y.	1990	15038556	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
23	09/5/2018	PHẠM VĂN A.	1967	17032126	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
24	09/5/2018	PHẠM SỸ T.	1979	13079858	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
25	22/5/2018	PHAN DANH T.	2000	13008563	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp



VIỆN HUYẾT HỌC TRUYỀN MÁU TRUNG ƯƠNG

26	29/5/2018	NGUYỄN VĂN T.	1966	09003813	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
27	03/6/2018	ĐỖ THỊ H.	1955	17052821	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
28	01/08/2018	BÙI VĂN M.	1955	17056225	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
29	05/09/2018	NGUYỄN THỊ D.	1966	17085623	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
30	04/12/2018	LÊ VĂN H.	1974	17004926	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp

Hà Nội, ngày 20 tháng 04 năm 2022

Xác nhận của Khoa/Phòng



BSC.KII. Lê Quang Tường

Xác nhận của Viện Huyết học
Truyền máu Trung ương



PHÓ VIỆN TRƯỞNG
Vũ Đức Bình



DANH SÁCH BỆNH NHÂN VÀ NGƯỜI CUNG CẤP MÁU MÁU
PHỤC VỤ NGHIÊN CỨU

Đề tài “Nghiên cứu mối tương quan giữa đa hình gen, biểu hiện gen, hệ vi sinh,
kiểu hình miễn dịch trên bệnh nhân ung thư máu”. Mã số ĐĐT.CN.43/21

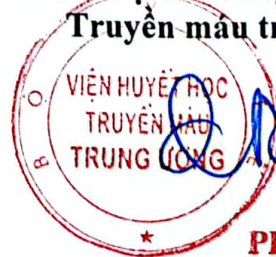
TT	NGÀY KHÁM	HỌ VÀ TÊN	NĂM SINH	MÃ SỐ	TÊN BỆNH
1	14/3/2022	VŨ THỊ N.	1963	2200011486	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
2	18/3/2022	NGUYỄN THỊ T.	1964	2200011537	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
3	18/3/2022	PHẠM THỊ T.	1957	2200011728	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
4	18/3/2022	ĐÌNH XUÂN T.	1959	2200011697	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
5	18/3/2022	ĐÀO NGỌC T.	1951	2200011839	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
6	18/3/2022	VŨ THỊ THANH B.	1954	2200011745	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
7	12/4/2022	NGUYỄN THỊ L.	1991	2200016270	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
8	20/4/2022	HOÀNG THỊ C.	1957	2200016433	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
9	20/4/2022	BÙI ĐÌNH P.	1961	2200018004	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
10	16/4/2022	LÊ HOÀNG Y.	2012	2200017984	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
11	20/4/2022	TRẦN VĂN H.	1972	2200018413	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
12	19/4/2022	ĐÀO THỊ (HỒNG) L.	1952	2200018009	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
13	25/4/2022	CAO THỊ T.	1964	2200020133	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
14	26/4/2022	VŨ TRỊNH HỮU P.	1972	2200020281	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
15	09/5/2022	TRẦN THỊ L.	1989	2200011297	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
16	23/5/2022	TRẦN THỊ K.	1949	2200026156	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
17	24/5/2022	NGUYỄN TRỌNG T.	1964	2200026559	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
18	03/6/2022	ĐỖ THỊ L.	1953	2200028557	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
19	03/6/2022	NGUYỄN THỊ H.	1955	2200028597	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
20	20/6/2022	CAO XUÂN N.	1980	2200031619	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp

Xác nhận của Khoa/Phòng

18/04
BSCKII. Lê Quang Tường

Hà Nội, ngày 15 tháng 3 năm 2023

Xác nhận của Viện Huyết học
Truyền máu trung ương



PHÓ VIỆN TRƯỞNG
Vũ Đức Bình

DANH SÁCH BỆNH NHÂN VÀ NGƯỜI CUNG CẤP MÁU MÁU
PHỤC VỤ NGHIÊN CỨU

Đề tài “Nghiên cứu mối tương quan giữa đa hình gen, biểu hiện gen, hệ vi sinh,
kiểu hình miễn dịch trên bệnh nhân ung thư máu”. Mã số ĐTĐT.CN.43/21

TT	HỌ VÀ TÊN	GIỚI TÍNH	NĂM SINH	MÃ SỐ	TÊN BỆNH
1	DƯƠNG THỊ H.	Nữ	1952	2300009712	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
2	HOÀNG VĂN H.	Nam	1980	2300009366	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
3	HOÀNG HỮU H.	Nam	2000	2300009461	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
4	NGUYỄN THỊ B.	Nữ	1953	2300008809	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
5	TRẦN THỊ L.	Nữ	1975	2300006317	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
6	VŨ THỊ MINH H.	Nữ	1977	2300010597	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
7	TRƯƠNG NGỌC T.	Nam	1957	2300008541	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
8	TRƯƠNG VĂN H.	Nam	1949	2300010367	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
9	TRẦN VĂN L.	Nam	1965	2300010064	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
10	VŨ THỊ P.	Nữ	1986	2300012127	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
11	HOÀNG VĂN N.	Nam	1996	2300011320	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
12	ĐÀO ĐÌNH T.	Nam	1959	2300012149	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
13	LƯU THỊ S.	Nữ	1953	2300011940	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
14	HOÀNG THANH D.	Nữ	1983	2300014344	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
15	ĐINH VĂN S.	Nam	1958	2300013915	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
16	THẠCH H.	Nam	1955	2300013986	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
17	NGUYỄN THANH B.	Nam	1964	2300014131	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
18	NGUYỄN THỊ H.	Nữ	1955	2300017823	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
19	ĐẶNG THỊ B.	Nữ	1970	2300017579	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
20	VŨ TRỌNG C.	Nam	1950	2300016940	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
21	PHẠM THỊ A.	Nữ	1959	2300018174	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
22	HOÀNG THỊ N.	Nữ	1970	2300018753	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
23	PHẠM VĂN H.	Nam	1982	2300018209	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
24	LƯU VĂN K.	Nam	2005	2300019770	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp



25	NGUYỄN THỊ H.	Nữ	1982	2300018868	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
26	HỒ ĐỨC N.	Nam	2003	2100029001	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
27	DU ĐÌNH T.	Nam	1959	2300021227	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
28	LÒ THỊ X.	Nữ	1985	2300021505	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
29	TRƯƠNG THỊ V.	Nữ	1974	2300021828	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
30	PHẠM THỊ B.	Nữ	1982	2300021445	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
31	PHAN THỊ L.	Nữ	1958	2300021237	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
32	NGUYỄN THỊ KHÁNH L.	Nữ	2007	2300021245	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
33	TÂN XÍN C.	Nam	1977	2300022027	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
34	LÊ VĂN N.	Nam	1954	2300021930	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
35	NGUYỄN VĂN S.	Nam	1953	2300021547	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
36	HOÀNG THỊ L.	Nữ	1955	2300015066	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
37	NGUYỄN THỊ L.	Nữ	1986	2300022521	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
38	BÙI THỊ T.	Nữ	1981	2300023395	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
39	HOÀNG NGHĨA T.	Nam	1947	2300024072	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
40	ĐẶNG THỊ V.	Nữ	1977	2300024042	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
41	LÊ THỊ X.	Nữ	1962	2300023191	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp
42	NGUYỄN ĐỨC T.	Nam	1987	2300023893	Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp

Xác nhận của Khoa/Phòng *Ue*

Ue

Ths.Bs. Nguyễn Quốc Nhật

Hà Nội, ngày 19 tháng 5 năm 2023

Xác nhận của Viện Huyết học
Truyền máu trung ương



PHÓ VIỆN TRƯỞNG
Vũ Đức Bình

DANH SÁCH NGƯỜI KHỎE CUNG CẤP MẪU MÁU
PHỤC VỤ NGHIÊN CỨU

Đề tài “Nghiên cứu mối tương quan giữa đa hình gen, biểu hiện gen, hệ vi sinh, kiểu hình miễn dịch trên bệnh nhân ung thư máu”. Mã số ĐTDĐ.CN.43/21

ST T	Họ và tên	Giới tính	Năm sinh	Kí hiệu
1	Nguyễn Thị H.	Nữ	1976	DK103-336
2	Trần Thị H.	Nữ	1948	DK103-337
3	Đàm Văn V.	Nam	1966	DK103-338
4	Nguyễn Đức K.	Nam	1945	DK103-339
5	Vũ Văn S.	Nam	1997	DK103-340
6	Lường Thị T.	Nữ	1970	DK103-341
7	Phan Thị T.	Nữ	1958	DK103-342
8	Trần Thị T.	Nữ	1980	DK103-343
9	Nguyễn Thị M.	Nữ	1973	DK103-344
10	Lê Thu P.	Nữ	1987	DK103-345
11	Bùi Thanh H.	Nam	1977	DK103-346
12	Trần Sông H.	Nữ	1954	DK103-347
13	Nguyễn Tuyết L.	Nữ	1958	DK103-348
14	Nguyễn Thị H.	Nữ	1992	DK103-349
15	Phạm Thị Thu H.	Nữ	1971	DK103-350
16	Nguyễn Thu H.	Nữ	1984	DK103-351
17	Trần Thị T.	Nữ	1978	DK103-352
18	Trần Quốc T.	Nam	1978	DK103-353
19	Trần Đức T.	Nam	1970	DK103-354
20	Nguyễn Thị N.	Nữ	1992	DK103-355
21	Nguyễn Thị Ngọc T.	Nữ	1997	DK103-356

22	Lý Thị Hồng C.	Nữ	1950	DK103-357
23	Ngô Thành Đ.	Nam	1955	DK103-358
24	Phạm Thị V.	Nữ	1957	DK103-359
25	Đỗ Thị H.	Nữ	1982	DK103-360
26	Nguyễn Thị H.	Nữ	1988	DK103-361
27	Nguyễn Văn H.	Nam	1985	DK103-362
28	Cao Xuân T.	Nam	1982	DK103-363
29	Nguyễn Văn A.	Nữ	1979	DK103-364
30	Đào Việt A.	Nam	1997	DK103-365
31	Đào Thị T.	Nữ	1967	DK103-366
32	Trần Thế L.	Nam	1972	DK103-367
33	Phạm Thị H.	Nữ	1980	DK103-368
34	Phùng Thị H.	Nữ	1989	DK103-369
35	Nguyễn Thị T.	Nữ	1969	DK103-370
36	Đào Thị A.	Nữ	1966	DK103-371
37	Nguyễn Văn H.	Nam	1974	DK103-372
38	Lê Hùng L.	Nam	1988	DK103-373
39	Nguyễn Thái B.	Nam	1996	DK103-374
40	Nguyễn Văn K.	Nam	1957	DK103-375
41	Vũ Thị Phương P.	Nữ	1978	DK103-376
42	Trần Thị H.	Nữ	1982	DK103-377
43	Đặng Văn Đ.	Nam	1990	DK103-378
44	Vũ Văn N.	Nam	1966	DK103-379
45	Nguyễn Thị C.	Nữ	1976	DK103-380
46	Phạm Văn Đ.	Nam	1968	DK103-381
47	Hoàng Thị Dương L.	Nữ	1986	DK103-382
48	Kiều Thị D.	Nữ	1991	DK103-383
49	Nguyễn Quốc B.	Nam	1972	DK103-384

28/11
CHI
PHỐ
ĐA
103 C
CƠM
HỒNG
H
200

50	Nguyễn Thanh Đ.	Nam	1986	DK103-385
51	Nguyễn Thị L.	Nữ	1961	DK103-386
52	Phạm Thị T.	Nữ	1987	DK103-387
53	Lưu Công L.	Nam	1973	DK103-388
54	Lê Duy H.	Nam	1958	DK103-389
55	Đàm Thị Thu H.	Nữ	1988	DK103-390
56	Bùi Đức M.	Nam	1981	DK103-391
57	Đặng Văn M.	Nam	1969	DK103-392
58	Đào Văn Đ.	Nam	1982	DK103-393
59	Đinh Thị H.	Nữ	1987	DK103-394
60	Đinh Văn T.	Nam	2000	DK103-395
61	Đỗ Anh K.	Nam	1989	DK103-396
62	Đỗ Thị C.	Nữ	1984	DK103-397
63	Dương Thị N.	Nam	1990	DK103-398
64	Dương Văn Đ.	Nam	1977	DK103-399
65	Dương Văn H.	Nam	1979	DK103-400
66	Dương Văn L.	Nam	1987	DK103-401
67	Hà Thị Q.	Nữ	1985	DK103-402
68	Hoàng Thị Y.	Nữ	1972	DK103-403
69	Hoàng Tuệ K.	Nam	1984	DK103-404
70	Hoàng Văn H.	Nam	1990	DK103-405
71	Kim Thị Phương T.	Nữ	1998	DK103-406
72	Kim Thị Thu P.	Nữ	1975	DK103-407
73	Kim Văn Q.	Nam	1984	DK103-408
74	Lâm Văn C.	Nam	1993	DK103-409
75	Lê Anh V.	Nam	1988	DK103-410
76	Lê Duy H.	Nữ	1987	DK103-411
77	Lê Thị Thu H.	Nữ	1989	DK103-412

007
NH
CHẤM
HÀ
OAI
TNNH
CÁY DỪ
TR
TP. V

78	Lê Thị Thùy D.	Nữ	1984	DK103-413
79	Lê Tiến T.	Nam	1983	DK103-414
80	Lê Văn C.	Nữ	1991	DK103-415

Hà Nội, ngày 01 tháng 12 năm 2022

Xác nhận của đơn vị



GIÁM ĐỐC
Phạm Xuân Hiền



Số: 4-2021/NCHG-HĐĐĐ
Vv: Chấp thuận ĐĐNCYSH

Hà Nội, ngày 14 tháng 01 năm 2021

CHỨNG NHẬN CHẤP THUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU Y SINH HỌC

Căn cứ Quyết định số 142/QĐ-NCHG ngày 02 tháng 12 năm 2015 của Viện trưởng Viện Nghiên cứu hệ gen về việc thành lập Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh học cấp cơ sở;

Căn cứ biên bản họp ngày 14 tháng 01 năm 2021 của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học Viện Nghiên cứu hệ gen (IGR IBR) và kiến nghị phê duyệt của chủ nhiệm đề tài về các vấn đề đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học,

HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU Y SINH HỌC VIỆN NGHIÊN CỨU HỆ GEN

Chấp thuận về các khía cạnh đạo đức đối với đề tài:

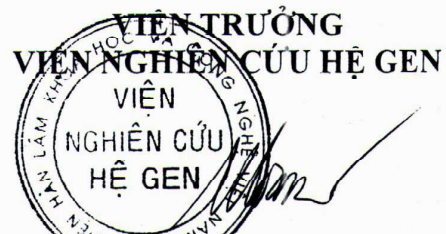
Tên đề tài: Nghiên cứu mối tương quan giữa đa hình gen, biểu hiện gen, hệ vi sinh, kiểu hình miễn dịch trên bệnh nhân ung thư máu

- Chủ nhiệm đề tài: TS. Nguyễn Thị Xuân
- Cơ quan chủ trì: Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
- Thời gian nghiên cứu: 01/2021 – 12/2023
- Ngày chấp thuận: Ngày 14 tháng 01 năm 2021

PHÓ CHỦ TỊCH



PGS. TS. Nguyễn Duy Bắc



PGS. TS. Nguyễn Huy Hoàng

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

GIẤY XÁC NHẬN PHỐI HỢP THỰC HIỆN¹
NHIỆM VỤ KH&CN CẤP QUỐC GIA

Kính gửi: Bộ Khoa Học và Công Nghệ

Căn cứ Quyết định số 562/QĐ-TTg ngày 25/4/2017 của Thủ tướng Chính phủ về việc phê duyệt Chương trình phát triển khoa học cơ bản trong lĩnh vực Hóa học, Khoa học sự sống, Khoa học trái đất và Khoa học biển giai đoạn 2017 - 2025;

Căn cứ Thông tư số 07/2014/TT-BKHCN ngày 26 tháng 5 năm 2014 của Bộ trưởng Bộ Khoa học và Công nghệ quy định trình tự, thủ tục xác định nhiệm vụ khoa học và công nghệ cấp quốc gia sử dụng ngân sách nhà nước và Thông tư số 03/2017/TT-BKHCN ngày 03 tháng 4 năm 2017 của Bộ trưởng Bộ Khoa học và Công nghệ sửa đổi, bổ sung một số điều của Thông tư số 07/2014/TT-BKHCN ngày 26 tháng 5 năm 2014;

Căn cứ Quyết định số 3585/QĐ-BKHCN ngày 15 tháng 12 năm 2017 của Bộ trưởng Bộ Khoa học và Công nghệ về việc phê duyệt định hướng nghiên cứu ưu tiên các khoa học cơ bản trong lĩnh vực Hóa học, Khoa học sự sống, Khoa học trái đất và Khoa học biển giai đoạn 2017 - 2025;

Căn cứ các Quyết định số 1435/QĐ-BKHCN ngày 28/05/2020 về việc phê duyệt Danh mục đề tài khoa học và công nghệ cấp quốc gia đặt hàng để tuyển chọn thực hiện;

Viện Nghiên cứu hệ gen và Viện Huyết học-Truyền máu Trung ương thống nhất đề xuất đề tài cấp Quốc gia với Bộ Khoa học và Công nghệ, cụ thể như sau:

1. Tên đề tài đăng ký tuyển chọn: Nghiên cứu mối tương quan giữa đa hình gen, biểu hiện gen, hệ vi sinh, kiểu hình miễn dịch trên bệnh nhân ung thư máu

Thuộc Chương trình KH&CN: Chương trình phát triển khoa học cơ bản trong lĩnh vực Hóa học, Khoa học sự sống, Khoa học trái đất và Khoa học biển giai đoạn 2017-2025

Mã số của Chương trình:

Thuộc lĩnh vực KH&CN: Y dược

2. Tổ chức và cá nhân đăng ký chủ trì đề tài

- Tên tổ chức đăng ký chủ trì đề tài: Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

¹ Giấy xác nhận được trình bày và in ra trên khổ giấy A4



- Họ và tên, học vị, chức vụ của cá nhân đăng ký làm chủ nhiệm đề tài: TS. Nguyễn Thị Xuân, Trưởng phòng Hệ gen học miễn dịch

3. Tổ chức đăng ký phối hợp thực hiện đề tài

- Tên tổ chức đăng ký phối hợp thực hiện đề tài: Viện Huyết học-Truyền máu Trung ương

- Địa chỉ: Phố Phạm Văn Bạch, phường Yên Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội.

- Điện thoại: 0967 89 16 16

4. Nội dung công việc tham gia trong đề tài (và kinh phí tương ứng) của tổ chức phối hợp nghiên cứu đã được thể hiện trong bản thuyết minh đề tài của hồ sơ đăng ký tuyển chọn.

Khi Hồ sơ trúng tuyển, chúng tôi cam đoan sẽ hoàn thành những thủ tục pháp lý do Quý Bộ hướng dẫn về nghĩa vụ và quyền lợi của mỗi bên để thực hiện tốt nhất đúng thời hạn mục tiêu, nội dung và sản phẩm của đề tài.

Trân trọng cảm ơn./.

Hà Nội, ngày 20 tháng 1 năm 2020.

**CÁ NHÂN
ĐĂNG KÝ CHỦ NHIỆM**
(Họ, tên và chữ ký)



Nguyễn Thị Xuân

**THỦ TRƯỞNG
TỔ CHỨC ĐĂNG KÝ CHỦ TRÌ**
(Họ, tên, chữ ký và đóng dấu)



Nguyễn Huy Hoàng

**THỦ TRƯỞNG
TỔ CHỨC ĐĂNG KÝ PHỐI HỢP THỰC HIỆN**
(Họ, tên, chữ ký và đóng dấu)



VIỆN TRƯỞNG
Bách Quốc Khánh