

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN HOÀNG GIANG

**NGHIÊN CỨU VAI TRÒ ĐIỀU HÒA CỦA MỘT SỐ GEN
DEUBIQUITINASE ĐẾN CHỨC NĂNG TẾ BÀO TUA VÀ
TẾ BÀO NON TRÊN BỆNH NHÂN BẠCH CẦU CẤP TÍNH**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Hà Nội - 2026

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN HOÀNG GIANG

**NGHIÊN CỨU VAI TRÒ ĐIỀU HÒA CỦA MỘT SỐ GEN
DEUBIQUITINASE ĐẾN CHỨC NĂNG TẾ BÀO TUA VÀ
TẾ BÀO NON TRÊN BỆNH NHÂN BẠCH CẦU CẤP TÍNH**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9420201

**Xác nhận của
Học viện Khoa học
và Công nghệ**

Người hướng dẫn 1
(Ký, ghi rõ họ tên)

Người hướng dẫn 2
(Ký, ghi rõ họ tên)

Two handwritten signatures in blue ink are shown. The first signature is on the left, and the second is on the right.

PGS.TS. Nguyễn Thị Xuân PGS.TS. Vũ Xuân Nghĩa

Hà Nội - 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: "**Nghiên cứu vai trò điều hòa của một số gen deubiquitinase đến chức năng tế bào tua và tế bào non trên bệnh nhân bạch cầu cấp tính**" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của PGS.TS. Nguyễn Thị Xuân và PGS.TS. Vũ Xuân Nghĩa. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc.

Luận án sử dụng một phần số liệu từ đề tài cấp nhà nước "Nghiên cứu mối liên quan giữa đa hình gen, biểu hiện gen, hệ vi sinh, kiểu hình miễn dịch trên bệnh nhân ung thư máu", mã số ĐTĐL.CN.43/21.

Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả.

Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày 15 tháng 09 năm 2026

Tác giả luận án

Giang

Nguyễn Hoàng Giang

LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên, tôi xin trân trọng cảm ơn đến PGS. TS. Nguyễn Thị Xuân, Phòng thí nghiệm trọng điểm về công nghệ gen, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và PGS. TS. Vũ Xuân Nghĩa, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 đã hướng dẫn, 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.

Nhân dịp này, nghiên cứu sinh cũng xin chân thành cảm ơn Ban Giám đốc, tập thể cán bộ giảng viên Khoa Sinh học, 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.

Nghiên cứu sinh cũng xin trân trọng cảm ơn Ban Lãnh đạo Viện Nghiên cứu hệ gen cũ, nay là Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, cán bộ phòng quản lý tổng hợp, 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.

Nghiên cứu sinh cũng chân thành cảm ơn nhóm nghiên cứu đề tài “Nghiên cứu mối liên quan giữa đa hình gen, biểu hiện gen, hệ vi sinh, kiểu hình miễn dịch trên bệnh nhân ung thư máu”, mã số ĐTĐL.CN.43/21 đã tạo điều kiện và hỗ trợ nhiệt tình cho tôi trong suốt quá trình thực hiện và hoàn thành luận văn này.

Nghiên cứu sinh cũng xin gửi lời cảm ơn đến những người tình nguyện khỏe mạnh, người bệnh đã đồng ý tham gia nghiên cứu, cùng đội ngũ y bác sĩ tại Viện Huyết học Truyền máu Trung Ương, Bệnh viện Quân Y 103 đã nhiệt tình hỗ trợ tôi trong suốt quá trình thu thập mẫu tại đây.

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

Hà Nội, ngày 15 tháng 09 năm 2026

Nghiên cứu sinh



Nguyễn Hoàng Giang

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ KÝ VIẾT TẮT.....	vii
DANH MỤC BẢNG.....	xi
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ.....	xii
MỞ ĐẦU.....	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	5
1.1. Bệnh bạch cầu cấp tính.....	5
1.1.1. Bệnh bạch cầu cấp dòng lympho	6
1.1.2. Bệnh bạch cầu cấp dòng tủy.....	7
1.2. Gen mã hóa enzyme deubiquitinase.....	9
1.2.1. Gene CYLD.....	9
1.2.2. Gene A20.....	11
1.3. các cytokine điều hòa đáp ứng miễn dịch.....	13
1.3.1. Tumor Necrosis Factor-alpha.....	13
1.3.2. Transforming Growth Factor-beta.....	14
1.3.3. Interleukin-6.....	15
1.4. Tế bào tua.....	16
1.4.1. Giới thiệu chung.....	16
1.4.2. Vai trò của tế bào tua.....	16
1.4.3. Chức năng của tế bào tua trong miễn dịch.....	17
1.5. Một số con đường tín hiệu liên quan đến bệnh bạch cầu cấp.....	19
1.5.1. Con đường tín hiệu PI3K/Akt/mTOR.....	19
1.5.2. Con đường tín hiệu protein kinase hoạt hóa phân bào (MAPK)	20
1.5.3. Con đường tín hiệu yếu tố nhân kappa B.....	22
1.5.4. Con đường tín hiệu Wnt.....	23
1.5.5. Con đường tín hiệu JAKT/STAT.....	24
1.6. Một số hóa chất điều hòa tế bào.....	26
1.6.1. Doxorubicin.....	27
1.6.2. Malloapelta C.....	28
1.6.3. SB203580.....	29
1.6.4. Everolimus.....	30
1.6.5. Wnt-C59.....	31

1.6.6. Nifuroxazide.....	31
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	33
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	33
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	33
2.1.2. Hóa chất.....	35
2.1.3. Địa điểm và thiết bị nghiên cứu.....	36
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	36
2.2.1. Phương pháp nghiên cứu.....	36
2.2.2. Phương pháp thu mẫu.....	37
2.2.3. Thu thập thông tin lâm sàng, cận lâm sàng.....	37
2.2.4. Phân loại tiên lượng theo hướng dẫn của Hội Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ và Liên đoàn Ung thư Châu Âu.....	37
2.2.5. Phân lập tế bào đơn nhân máu ngoại vi.....	39
2.2.6. Phân lập và nuôi cấy tế bào tua từ tế bào PBMC.....	40
2.2.7. Tách chiết RNA và tổng hợp cDNA.....	42
2.2.8. Phản ứng qRT-PCR.....	43
2.2.9. Biến nạp plasmid.....	45
2.2.10. Phương pháp flow cytometry.....	45
2.2.11. Phương pháp ELISA.....	49
2.2.12. Phương pháp di cư tế bào.....	52
2.2.13. Phương pháp phân tích số liệu.....	53
2.2.14. Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh.....	53
2.2.15. Sơ đồ nghiên cứu.....	55
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	56
3.1. Phân tích đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính.....	56
3.1.1 Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở bệnh nhân BCTC.....	56
3.1.2 Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở bệnh nhân BCLC.....	57
3.2. Đánh giá biểu hiện viêm ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính.....	58
3.2.1. Kết quả phân tích nồng độ cytokine ở bệnh nhân BCTC.....	59
3.2.2. Kết quả phân tích nồng độ cytokine ở bệnh nhân BCLC.....	61
3.2.3. Kết quả đánh giá kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCTC.....	62
3.2.4. Kết quả đánh giá kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCLC.....	63

3.3. Biểu hiện gen A20, CYLD ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính.....	64
3.3.1. Biểu hiện gen A20, CYLD ở các nhóm tiên lượng trên bệnh nhân BCTC.....	65
3.3.2. Biểu hiện gen A20, CYLD ở các nhóm tiên lượng trên bệnh nhân BCLC.....	65
3.4. Mối liên quan giữa biểu hiện gen A20 và CYLD với đặc điểm miễn dịch và lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính.....	66
3.4.1. Mối liên quan giữa biểu hiện gen A20 và CYLD với kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCTC.....	66
3.4.2. Mối liên quan giữa biểu hiện gen A20 và CYLD với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCTC.....	68
3.4.3. Mối liên quan giữa biểu hiện gen A20 và CYLD với kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCLC.....	69
3.4.4. Mối liên quan giữa biểu hiện gen A20 và CYLD với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCLC.....	70
3.5. Đánh giá vai trò của gen A20 điều hòa hoạt động tế bào non ở bệnh bạch cầu cấp.....	70
3.5.1. Vai trò của gen A20 điều hòa sự tăng sinh tế bào miễn dịch ở bệnh bạch cầu cấp.....	71
3.5.2. Vai trò của gen A20 điều hòa tín hiệu STAT và sự di cư của tế bào non.....	73
3.5.3. Vai trò của tín hiệu STAT trong điều hòa sự di chuyển của tế bào bạch cầu non.....	74
3.6. Vai trò của gen viêm điều hòa hoạt động của tế bào tua ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính dưới tác động của Doxorubicin và Malloapelta C.....	76
3.6.1. Ảnh hưởng của Doxorubicin và Malloapelta C đến sự trưởng thành, apoptosis và thực bào của tế bào tua trên bệnh nhân BCLC.....	78
3.6.2. Vai trò của con đường tín hiệu Wnt trong tác động của	81

<i>Doxorubicin đối với sự trưởng thành và apoptosis của tế bào tua.....</i>	
3.6.3. <i>Vai trò của các con đường tín hiệu mTOR và MAPKp38 trong tác động của Malloapelta C lên quá trình trưởng thành và thực bào của tế bào tua.....</i>	82
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN.....	85
4.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính	85
4.1.1. <i>Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở bệnh nhân BCTC.....</i>	85
4.1.2. <i>Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở bệnh nhân BCLC.....</i>	87
4.2. Đánh giá kiểu hình miễn dịch và nồng độ cytokine ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính.....	88
4.2.1. <i>Nồng độ cytokine ở BCTC.....</i>	88
4.2.2. <i>Nồng độ cytokine ở BCLC.....</i>	89
4.2.3. <i>Các dấu ấn miễn dịch ở bệnh nhân BCTC.....</i>	90
4.2.3. <i>Các dấu ấn miễn dịch ở bệnh nhân BCLC.....</i>	92
4.3. Mối liên quan giữa biểu hiện gen A20 và CYLD ở các nhóm tiên lượng trên bệnh nhân bạch cầu cấp tính.....	93
4.4. Mối liên quan giữa biểu hiện gen A20 với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và miễn dịch ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính.....	96
4.4.1. <i>Mối liên quan giữa biểu hiện gen A20 với kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCTC.....</i>	96
4.4.2. <i>Mối liên quan giữa biểu hiện gen A20 với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân BCTC.....</i>	97
4.4.3. <i>Mối liên quan giữa biểu hiện gen A20 và kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCLC.....</i>	97
4.4.4. <i>Mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, và biểu hiện gen A20 và CYLD ở bệnh nhân BCLC.....</i>	98
4.5. Ảnh hưởng của A20 đến hoạt động tế bào non ở bệnh bạch cầu cấp tính.....	99
4.5.1. <i>Vai trò của gen A20 điều hòa sự tăng sinh tế bào miễn dịch ở bệnh bạch cầu cấp tính.....</i>	99
4.5.2. <i>Vai trò của gen A20 điều hòa tín hiệu STAT và sự di cư của tế bào non ở bệnh nhân bạch cầu cấp.....</i>	100

4.5.3. Vai trò của gen <i>A20</i> điều hòa sự di chuyển của tế bào bạch cầu non thông qua tín hiệu <i>STAT</i>	101
4.6. Vai trò của gen tín hiệu điều hòa hoạt động tế bào tua ở bệnh nhân bạch cầu lympho cấp tính khi tiếp xúc với Doxorubicin và Malloapelta C.....	102
4.6.1. Ảnh hưởng của Doxorubicin và Malloapelta C đến con đường tín hiệu <i>mTOR</i> , <i>MAPKp38</i> và <i>Wnt</i>	102
4.6.2. Ảnh hưởng của Doxorubicin và Malloapelta C đến hoạt động của tế bào tua trên bệnh nhân <i>BCLC</i>	105
4.6.3. Phân tích vai trò của con đường tín hiệu <i>Wnt</i> đối với sự trưởng thành và apoptosis của tế bào tua.....	107
4.6.4. Phân tích vai trò của các con đường tín hiệu <i>mTOR</i> và <i>MAPKp38</i> lên quá trình trưởng thành và thực bào của tế bào tua.....	109
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	112
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	114
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	115

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ KÝ VIẾT TẮT

Viết tắt	Viết đầy đủ	Tiếng Việt
AKT	Ak strain transforming	Ak strain transforming
APC	Antigen presenting cell	Tế bào trình diện kháng nguyên
ATP	Adenosine Triphosphate	Adenosine Triphosphate
BCR-ABL1	Breakpoint Cluster Region – Abelson 1	Gen dung hợp BCR-ABL1
BCTC	Bệnh bạch cầu cấp dòng tủy	Bệnh bạch cầu cấp dòng tủy
BCLC	Bệnh bạch cầu cấp dòng lympho	Bệnh bạch cầu cấp dòng lympho
CBFB-MYH11	Core-Binding Factor Beta – Myosin Heavy Chain 11	Gen dung hợp CBFB-MYH11
CD	Cluster of Differentiation	Cụm biệt hóa
CEBPA	CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha	Protein gắn vùng tăng cường CCAAT alpha
c-KIT	KIT Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase	Thụ thể tyrosine kinase KIT
CYLD	CYLD Lysine 63 Deubiquitinase	Enzyme khử ubiquitin CYLD
DC	Dendritic cells	Tế bào tua
Dox	Doxorubicin	Doxorubicin
DUB	Deubiquitinase	Deubiquitinase
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	Acid ethylenediaminetetraacetic
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Phương pháp miễn dịch hấp phụ liên kết enzyme
ELN	European Leukemia Net	Liên đoàn Ung thư Châu Âu
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase	Kinase điều hòa tín hiệu ngoại bào
ETV6-RUNX1	ETS Variant Transcription Factor 6 – Runt-related transcription factor 1	Gen dung hợp ETV6-RUNX1

FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting	Dung dịch đệm tế bào hoạt hóa bằng huỳnh quang
FBS	Fetal Bovine Serum	Huyết thanh bào thai bò
FITC	Fluorescein Isothiocyanate	Fluorescein Isothiocyanate
FLT3-ITD	FMS-like Tyrosine Kinase 3 – Internal Tandem Duplication	Đột biến lặp đoạn nội tại của gen FLT3
FLT3L	FMS-like Tyrosine Kinase 3 Ligand	FMS-like Tyrosine Kinase 3 Ligand
FZD	Frizzled Receptor	Thụ thể Frizzled
HSP27	Heat Shock Protein 27	Protein sốc nhiệt 27
IC50	Half Maximal Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế bán tối đa
IDO	Indoleamine 2,3-Dioxygenase	Enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase
igG	Immunoglobulin G	Globulin miễn dịch G
IKK	I κ B Kinase	Kinase phosphoryl hóa I κ B
IL	Interleukin	Interleukin
I κ B α	Inhibitor of NF- κ B Alpha	Chất ức chế NF- κ B alpha
JAK	Janus Kinase	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase	Kinase đầu tận N của c-Jun
KMT2A	Lysine Methyltransferase 2A	Gen methyltransferase lysine 2A
LDH	Lactate Dehydrogenase	Lactate Dehydrogenase
Mal C	Malloapelta C	Malloapelta C
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	Protein kinase hoạt hóa bởi mitogen
MHC II	Major Histocompatibility Complex Class II	Phức hợp hòa hợp mô chủ yếu lớp II
MK2	MAPKAP kinase-2	Protein kinase 2 hoạt hóa bởi MAPK
MLL	Mixed Lineage Leukemia	Gen bạch cầu hỗn hợp dòng
mTOR	mammalian Target of Rapamycin	mục tiêu rapamycin ở động vật có vú
NCCN	National Comprehensive	Hội Ung thư Quốc Gia Hoa

	Cancer Network Guidelines	Kỳ
NEMO	NF- κ B Essential Modulator	Protein điều hòa thiết yếu NF- κ B
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa B	Yếu tố nhân kappa B
NPM1	Nucleophosmin 1	Nucleophosmin 1
OTU	Ovarian Tumor	Gen khối u buồng trứng
PAMP	Pathogen associated molecular pattern	phân tử liên quan đến mầm bệnh
PBS	Phosphate Buffered Saline	Dung dịch đệm phosphate sinh lý
PE	Phycoerythrin	Phycoerythrin
PI	Propidium Iodide	Propidium Iodide
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase	Phosphoinositide 3-Kinase
PKC	protein kinase C	protein kinase C
PRR	Pattern recognition receptor	Thụ thể nhận dạng khuôn mẫu
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog	Protein tương đồng phosphatase và tensin
RIPK1	Receptor-Interacting Protein Kinase 1	Protein kinase tương tác thụ thể 1
SHP	Src Homology 2 Domain-containing Phosphatase	Phosphatase chứa miền Src homology 2
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription	Chất truyền tín hiệu và hoạt hóa phiên mã
TGF β	Transforming Growth Factor Beta	Yếu tố tăng trưởng β
TLR	Toll-Like Receptor	Thụ thể giống Toll
TOP2	Topoisomerase II	Topoisomerase II
TP53	Tumor Protein p53	Protein ức chế khối u p53
TYK2	Tyrosine Kinase 2	Tyrosine Kinase 2
USP	Ubiquitin-Specific Protease	Protease đặc hiệu ubiquitin
Wnt	Wingless/Integrated	Đường truyền tín hiệu Wnt

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1:	Bảng phân nhóm tiên lượng theo ELN và NCCN đối với bệnh nhân bạch cầu cấp dòng tủy.....	38
Bảng 2.2:	Bảng phân nhóm tiên lượng theo NCCN đối với bệnh nhân bạch cầu cấp dòng lympho.....	39
Bảng 2.3:	Thành phần phản ứng qRT-PCR.....	43
Bảng 2.4:	Các trình tự môi đặc hiệu được sử dụng.....	44
Bảng 2.5:	Pha loãng protein chuẩn với các nồng độ khác nhau.....	51
Bảng 3.1:	Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhân BCTC.....	56
Bảng 3.2:	Các chỉ số lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhân BCTC...	58
Bảng 3.3:	Nồng độ cytokine ở bệnh nhân BCTC.....	60
Bảng 3.4:	Nồng độ cytokine của bệnh nhân BCLC theo nhóm tiên lượng.....	62
Bảng 3.5:	Mối liên quan giữa biểu hiện gen và nhóm tiên lượng ở BCTC.....	65
Bảng 3.6:	Biểu hiện các gen DUB ở các nhóm bệnh nhân BCLC.....	66
Bảng 3.7:	Mối tương quan giữa biểu hiện gen A20 với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng.....	68
Bảng 3.8:	Mối liên quan giữa biểu hiện gen A20, CYLD đến đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân BCLC.....	70

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1:	Điều hòa miễn dịch ở gen CYLD.....	10
Hình 1.2:	Vai trò của A20 đến con đường tín hiệu NF- κ B	12
Hình 1.3:	Con đường tín hiệu MAPK p38	21
Hình 2.1:	Sơ đồ các bước thực hiện nghiên cứu.....	55
Hình 3.1:	Nồng độ cytokine ở bệnh nhân BCTC.....	59
Hình 3.2:	Nồng độ cytokine của bệnh nhân BCLC.....	61
Hình 3.3:	Biểu hiện miễn dịch ở bệnh nhân BCTC và nhóm đối chứng khỏe mạnh.....	62
Hình 3.4:	Nồng độ cytokine và kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCLC.....	64
Hình 3.5:	Mối liên quan giữa biểu hiện gen A20 với kiểu hình miễn dịch.....	67
Hình 3.6:	Biểu đồ biểu thị tỷ lệ tế bào CD56+CD44+ ở bệnh nhân BCLC có biểu hiện A20 thấp và A20 cao.....	69
Hình 3.7:	Ảnh hưởng của A20 đến kiểu hình miễn dịch ở tế bào non.	72
Hình 3.8:	Ảnh hưởng của A20 đến biểu hiện tín hiệu STAT và sự di cư của tế bào bạch cầu non.....	73
Hình 3.9:	Vai trò của tín hiệu STAT trong điều hòa sự hoạt hóa.....	75
Hình 3.10:	Tác dụng của Dox và Mal C lên sự biểu hiện của các phân tử tín hiệu mTOR, MAPKp38 và Wnt ở người khỏe và bệnh nhân BCLC.....	77
Hình 3.11:	Ảnh hưởng của Dox và Mal C đến chức năng tế bào DC từ người khỏe mạnh và bệnh nhân BCLC.....	78
Hình 3.12:	Ảnh hưởng của Dox và Mal C lên quá trình thực bào và trưởng thành của tế bào DC ở người khỏe mạnh và bệnh nhân bạch cầu cấp tính.....	80
Hình 3.13:	Ảnh hưởng của con đường Wnt đến sự trưởng thành và apoptosis của tế bào DC ở người khỏe mạnh và bệnh nhân bạch cầu cấp tính.....	81
Hình 3.14:	Ảnh hưởng của các con đường mTOR và MAPKp38 đến sự trưởng thành và thực bào của tế bào DC ở người khỏe mạnh và bệnh nhân bạch cầu cấp tính.....	83

MỞ ĐẦU

Bệnh bạch cầu cấp là một dạng bệnh ung thư máu với các tế bào bạch cầu non chưa trưởng thành chiếm thành phần chủ yếu ở trong máu. Sự tích lũy nhanh chóng của các tế bào ác tính này làm suy giảm quá trình sinh máu bình thường, dẫn đến thiếu máu, giảm tiểu cầu, suy giảm miễn dịch và tăng nguy cơ nhiễm trùng, xuất huyết. Bệnh bạch cầu cấp bao gồm hai loại là bệnh bạch cầu cấp dòng lympho và bệnh bạch cầu cấp dòng tủy. Đây đều là những bệnh ung thư tiến triển nhanh, cần được chẩn đoán và điều trị kịp thời. Mặc dù các phương pháp điều trị hiện nay như hóa trị liệu, ghép tế bào gốc tạo máu và liệu pháp miễn dịch đã giúp cải thiện tiên lượng bệnh, tuy nhiên tình trạng tái phát, kháng thuốc và suy giảm miễn dịch vẫn là những thách thức lớn trong điều trị bệnh bạch cầu cấp.

Trong những năm gần đây, vai trò của hệ miễn dịch và vi môi trường tủy xương trong cơ chế bệnh sinh của bạch cầu cấp ngày càng được quan tâm. Trong đó, tế bào tua là các tế bào trình diện kháng nguyên chuyên biệt, tham gia điều hòa đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thích ứng. Tế bào tua có khả năng bắt giữ, xử lý và trình diện kháng nguyên cho tế bào lympho T, từ đó khởi phát đáp ứng miễn dịch chống lại các tác nhân gây bệnh và tế bào ung thư. Tuy nhiên, trong môi trường ung thư, đặc biệt là ở bệnh bạch cầu cấp, các tế bào ác tính có thể tác động lên chức năng của tế bào tua thông qua việc tiết các cytokine ức chế miễn dịch, làm suy giảm khả năng nhận diện và tiêu diệt tế bào ung thư của hệ miễn dịch. Điều này góp phần tạo nên môi trường thuận lợi cho sự tồn tại và phát triển của tế bào bạch cầu ác tính.

Các con đường truyền tín hiệu nội bào đóng vai trò trung tâm trong việc điều hòa hoạt động viêm của tế bào miễn dịch cũng như sự sống còn, tăng sinh và chết theo chương trình của tế bào ung thư. Nhiều con đường tín hiệu như NF- κ B, JAK/STAT, MAPK, PI3K/AKT/mTOR và Wnt/ β -catenin đã được chứng minh có liên quan mật thiết đến quá trình phát triển, kháng thuốc và thoát miễn dịch của tế bào bạch cầu cấp. Sự hoạt hóa bất thường của các con đường tín hiệu này có thể thúc đẩy quá trình tăng sinh tế bào ung thư, đồng thời ức chế hoạt động của các tế bào miễn dịch chống ung thư. Do đó, việc nghiên cứu các yếu tố điều hòa tín hiệu tế bào đang trở thành hướng tiếp

cận quan trọng trong việc tìm kiếm các liệu pháp điều trị nhắm trúng đích và cải thiện hiệu quả điều trị bệnh.

Trong số các yếu tố điều hòa viêm, nhóm gen mã hóa enzyme deubiquitinase (*DUB*) được xem là các chất điều hòa quan trọng và sống còn của tế bào miễn dịch. Các gen *DUB* tham gia loại bỏ ubiquitin khỏi protein đích, từ đó kiểm soát sự ổn định và hoạt tính của nhiều phân tử tín hiệu trong tế bào. Một số gen *DUB* như *A20* (*TNFAIP3*), *CYLD* đã được chứng minh có vai trò điều hòa âm tính các con đường tín hiệu NF- κ B, JAK/STAT và phản ứng viêm. Sự rối loạn biểu hiện hoặc chức năng của các gen này có thể dẫn đến hoạt hóa kéo dài các tín hiệu viêm và thúc đẩy quá trình sinh ung thư. Tuy nhiên, các nghiên cứu hiện tại mới chủ yếu dừng lại ở việc đánh giá biểu hiện gen hoặc chức năng riêng lẻ trên dòng tế bào ung thư, chưa làm rõ được mối liên quan giữa sự thay đổi biểu hiện của các gen *DUB* với chức năng miễn dịch của tế bào tua và các tế bào non trong vi môi trường bệnh bạch cầu cấp.

Xuất phát từ những vấn đề trên, luận án: “**Nghiên cứu vai trò điều hòa của một số gen deubiquitinase đến chức năng tế bào tua và tế bào non trên bệnh nhân bạch cầu cấp tính**” được thực hiện nhằm góp phần làm sáng tỏ vai trò của các gen mã hóa enzyme deubiquitinase trong điều hòa chức năng tế bào tua và tế bào non ở bệnh nhân bạch cầu cấp, từ đó cung cấp thêm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu sâu hơn về bệnh bạch cầu cấp.

- **Mục tiêu nghiên cứu**

- Xác định được các đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, biểu hiện gen liên quan đến viêm và kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân bạch cầu cấp;
- Xác định được vai trò điều hòa của một số gen mã hóa enzyme deubiquitinase (*A20*, *CYLD*) và tín hiệu nội bào liên quan như NF- κ B, JAK/STAT, MAPKp38 và Wnt đến hoạt động của tế bào tua và tế bào non trên bệnh nhân bạch cầu cấp.

- **Nội dung nghiên cứu**

- Xác định đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, biểu hiện gen liên quan đến viêm (gen mã hóa enzyme deubiquitinase và gen tín hiệu) cũng như kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân bạch cầu cấp;
- Đánh giá mối liên quan giữa các đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng biểu hiện gen liên quan đến viêm và kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân bạch

cầu cấp;

- Xác định vai trò điều hòa của gen mã hóa enzyme deubiquitinase đến chức năng tế bào non trên bệnh nhân bạch cầu cấp;
- Xác định vai trò điều hòa của gen tín hiệu đến hoạt động của tế bào tua ở bệnh nhân bạch cầu cấp khi tiếp xúc với hoạt chất Malloapelta C và Doxorubicin.

• **Cơ sở khoa học và thực tiễn của đề tài**

Nghiên cứu này được thực hiện tại Viện Nghiên cứu hệ gen, nay là Viện Sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, là đơn vị có nhiều kinh nghiệm trong nghiên cứu sinh học phân tử, miễn dịch học và công nghệ tế bào, đồng thời được trang bị hệ thống thiết bị hiện đại phục vụ cho các nghiên cứu về sinh học tế bào, biểu hiện gen, miễn dịch học và phân tích tín hiệu nội bào. Đây là những điều kiện thuận lợi cho các nghiên cứu theo hướng này.

Mặc dù vai trò của các gen deubiquitinase (*DUB*) như *A20*, *CYLD* đã được ghi nhận trong điều hòa phản ứng viêm và tín hiệu miễn dịch ở một số bệnh ung thư, tuy nhiên các nghiên cứu hiện nay chủ yếu tập trung trên dòng tế bào hoặc mô hình thực nghiệm, trong khi dữ liệu về vai trò điều hòa của các gen này đối với chức năng của tế bào tua và tế bào non trên bệnh nhân bạch cầu cấp vẫn còn hạn chế, đặc biệt tại Việt Nam. Đồng thời, tác động giữa các gen *DUB* với các con đường tín hiệu như *STAT*, *mTOR*, *MAPKp38* và *Wnt* liên quan đến hoạt động điều hòa miễn dịch ở bệnh bạch cầu cấp vẫn chưa được làm sáng tỏ đầy đủ.

Bên cạnh đó, với kiến thức, kinh nghiệm của người hướng dẫn cùng với sự phối hợp của các cơ sở y tế trong việc thu thập mẫu bệnh phẩm và dữ liệu lâm sàng. Điều này góp phần đảm bảo tính khả thi, độ tin cậy và giá trị khoa học của nghiên cứu. Về mặt thực tiễn, kết quả của đề tài có thể cung cấp thêm cơ sở khoa học cho việc làm sáng tỏ vai trò của các gen mã hóa enzyme deubiquitinase trong điều hòa chức năng miễn dịch ở bệnh bạch cầu cấp, đồng thời mở ra tiềm năng ứng dụng điều trị nhắm trúng đích trong tương lai.

• **Những đóng góp mới của luận án**

- Đã xác định được vai trò của gen *A20* ảnh hưởng đến chức năng của tế bào non trên bệnh nhân bạch cầu cấp thông qua hoạt động của tín hiệu *STAT*.

- Đã xác định được vai trò một số tín hiệu bao gồm mTOR, MAPKp38 và Wnt đến hoạt động của tế bào tua ở bệnh nhân bạch cầu cấp khi tiếp xúc với hoạt chất Malloapelta C và Doxorubicin.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Bệnh bạch cầu cấp tính

Bệnh bạch cầu là một dạng bệnh ác tính liên quan đến tình trạng có quá nhiều tế bào bạch cầu chưa trưởng thành hoặc tế bào bất thường được tạo ra, làm ảnh hưởng đến việc sản sinh các tế bào máu bình thường và gây nên tình trạng thiếu máu. Bệnh bạch cầu cấp tính đặc trưng bởi sự gia tăng các tế bào non (nguyên bào – tế bào blast), với tỷ lệ chiếm trên 20% tổng số tế bào [1] [2]. Các tế bào blast này có khả năng phân chia rất nhanh dẫn đến sự tích lũy các tế bào ác tính và làm giảm số lượng tế bào máu bình thường. Bệnh bạch cầu cấp tính có thể phát sinh sau khi có sự tiếp xúc trực tiếp với các chất độc hay phải trải qua quá trình hóa trị liệu. Nhiều yếu tố di truyền đã được xác định làm tăng nguy cơ mắc bệnh như hội chứng Klinefelter, hội chứng Down, bệnh thất điều, hội chứng Bloom và các bệnh lý như thiếu máu Falconi, loạn sản sừng bẩm sinh, hội chứng Shwachman-Diamond....[1]. Bạch cầu cấp (BCC) gồm được chia thành hai nhóm chính là bệnh bạch cầu cấp dòng lympho (BCLC) và bệnh bạch cầu cấp dòng tủy (BCTC).

Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của bệnh BCC được đặc trưng bởi sự lấn át của tế bào blast so với các dòng tế bào máu bình thường trong tủy xương và sự thâm nhiễm của chúng tại các cơ quan ngoại vi [2].

Về phương diện lâm sàng, bệnh nhân bạch cầu cấp thường biểu hiện bằng sự khởi phát nhanh và tiến triển của các hội chứng, phản ánh tình trạng suy tủy và thâm nhiễm ác tính. Hội chứng thiếu máu thường xuất hiện sớm và đi kèm với đó là hội chứng xuất huyết, chủ yếu hệ quả của tình trạng giảm tiểu cầu, biểu hiện đa dạng từ xuất huyết tự nhiên dưới da, niêm mạc đến các thể nặng như xuất huyết nội tạng. Đặc biệt, biến chứng đông máu rải rác trong lòng mạch là một biểu hiện lâm sàng nghiêm trọng, thường được ghi nhận với tần suất cao ở thể bạch cầu cấp tiền tủy bào. Bên cạnh đó, sự suy giảm số lượng và chất lượng bạch cầu trưởng thành dẫn đến hội chứng nhiễm trùng, đặc trưng bởi sốt cao, viêm loét vùng miệng họng, viêm phổi hoặc nhiễm trùng da dai dẳng. Sự tăng sinh và lan tỏa của các tế bào ác tính còn hình thành hội chứng thâm nhiễm, gây nên các triệu chứng như gan lách to, hạch ngoại vi sưng đau, phì đại lợi hoặc thâm nhiễm hệ thần kinh trung ương. Ngoài ra, bệnh nhân thường suy sụp thể trạng nhanh chóng với các triệu

chúng toàn thân như mệt mỏi, sụt cân và có thể gặp biến chứng tắc mạch trong trường hợp số lượng bạch cầu tăng quá cao [2].

Về phương diện cận lâm sàng, sự biến đổi của huyết đồ và tủy đồ là những tiêu chuẩn quan trọng nhất để xác định bệnh lý. Xét nghiệm tế bào máu ngoại vi điển hình bởi tình trạng thiếu máu bình sắc, hồng cầu kích thước bình thường kèm theo chỉ số hồng cầu lưới giảm. Số lượng bạch cầu có thể tăng nhưng dấu hiệu đặc trưng là sự hiện diện của các tế bào blast ác tính, trong khi số lượng tiểu cầu thường giảm thấp. Để đạt được chẩn đoán xác định, xét nghiệm tủy đồ đóng vai trò tiên quyết khi ghi nhận tỷ lệ tế bào blast chiếm từ 20% trở lên trong tổng số tế bào có nhân, gây ra hiện tượng lấn át hoàn toàn các dòng tế bào máu bình thường. Sinh thiết tủy xương được chỉ định trong trường hợp chọc hút tủy không chẩn đoán xác định được do tủy nghèo tế bào thấy ổ tế bào blast [2].

Bên cạnh các đánh giá về hình thái, việc phân tích hóa sinh và di truyền sẽ giúp ích rất nhiều cho việc phân loại tiên lượng bệnh. Các xét nghiệm hóa sinh như LDH, acid uric, điện giải đồ và chức năng gan thận giúp tầm soát sớm hội chứng tiêu khối u. Xét nghiệm miễn dịch phát hiện dấu ấn của tế bào non - ác tính bằng cách nhuộm tế bào sử dụng dịch hút tủy xương như Peroxidase, sudan đen, PAS [3]. Hoặc phân tích biểu hiện kháng nguyên tế bào blast bằng kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy (flow cytometry). Cuối cùng, xét nghiệm nhiễm sắc thể và gen có thể gặp một số bất thường bằng phân tích công thức NST tủy xương hoặc phân tích các đột biến gen. Ở BCLC, các khảo sát tập trung vào đột biến gen *c-KIT*, *FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA* hoặc các tổ hợp gen *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*. Ngược lại, BCLL trọng tâm chẩn đoán và tiên lượng dựa trên việc phát hiện nhiễm sắc thể Philadelphia t(9;22), gen lai *BCR-ABL1* cùng các tái cấu trúc liên quan đến *KMT2A* hoặc *ETV6-RUNX1* [2].

1.1.1. Bệnh bạch cầu cấp dòng lympho

Bệnh bạch cầu cấp dòng lympho (BCLL) là bệnh ác tính của dòng tế bào lympho B và tế bào lympho T đặc trưng bởi sự tăng sinh không kiểm soát của các tế bào lympho bất thường, hoặc chưa trưởng thành ở trong tủy xương và các cơ quan bạch huyết khác. Đây là loại ung thư thường gặp nhất ở trẻ em (chiếm 80% các ca mắc bệnh) đặc biệt là những người trong độ tuổi từ hai đến năm tuổi, bệnh tiến triển nhanh chóng và thường gây tử vong trong vài

tuần hoặc vài tháng nếu không được điều trị [4, 5]. Chẩn đoán bệnh được xác định dựa trên hình thái tế bào, hóa mô miễn dịch, kiểu hình miễn dịch và dấu ấn phân tử đặc hiệu của tế bào lymphoblast. Trong đó, Terminal deoxynucleotidyl transferase được coi là một dấu hiệu sinh học nổi bật cho bệnh BCLC, khi thường có hơn 40% các tế bào ác tính dương tính với Terminal deoxynucleotidyl transferase [6]. Ngoài ra, các chỉ số sinh hóa như lactate dehydrogenase (LDH) và β 2-microglobulin tăng cao thường liên quan đến khối lượng tế bào u lớn và tiên lượng xấu của bệnh. Biểu hiện của bệnh nhân mắc bệnh thường có triệu chứng bao gồm đau đầu, đau bụng, mệt mỏi, xanh xao, hay xuất hiện các vết bầm tím [6].

Bệnh BCLC là một bệnh lý ác tính của hệ tạo máu có nhiều bất thường di truyền, trong đó các bất thường nhiễm sắc thể và tái sắp xếp gen đóng vai trò then chốt trong cơ chế sinh bệnh, đáp ứng điều trị và tiên lượng. Dựa trên các đặc điểm di truyền và đặc biệt là công thức nhiễm sắc thể (Karyotype), bệnh nhân BCLC được phân loại thành các nhóm nguy cơ trung bình và xấu theo hệ thống phân loại Hướng dẫn của Hội Ung thư Quốc Gia Hoa Kỳ (NCCN Guidelines - National Comprehensive Cancer Network Guidelines) [7]. Bệnh nhân mắc BCLC sẽ được phân loại vào nhóm tiên lượng xấu khi mang các bất thường di truyền có tính ác tính cao như nhiễm sắc thể Philadelphia $t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1$, tái sắp xếp gen *KMT2A* (chuyển vị MLL) [8], $t(4;11)$, giảm bội, hoặc mang kiểu nhiễm sắc thể phức tạp có từ năm hoặc nhiều hơn bất thường về nhiễm sắc thể trở lên, chúng đều liên quan đến nguy cơ tái phát cao và tỷ lệ sống sót thấp hơn đáng kể [7, 9]. Bệnh nhân BCLC được phân vào tiên lượng trung bình khi không phát hiện bất kỳ nhiễm sắc thể nào của nhóm tiên lượng xấu hoặc có bộ nhiễm sắc thể bình thường. Bên cạnh đó, sự xuất hiện của các bất thường di truyền và nhiễm sắc thể như thể đơn nhiễm hoặc chuyển đoạn $t(12;21)$ (*ETV6-RUNX1*) thường liên quan đến đáp ứng điều trị tốt và sẽ được phân vào nhóm tiên lượng trung bình [7].

1.1.2. Bệnh bạch cầu cấp dòng tủy

Bệnh bạch cầu cấp dòng tủy (BCTC) là một bệnh ác tính của hệ tạo máu, đặc trưng bởi sự tăng sinh bất thường của các tế bào chưa trưởng thành ở trong máu và tủy xương. Sự tăng sinh mất kiểm soát của tế bào tế bào blast làm ức chế quá trình sinh máu bình thường, dẫn đến thiếu máu, giảm tiểu cầu, giảm bạch cầu chức năng và tăng nguy cơ nhiễm trùng, xuất huyết. Các tế bào

bất thường ở bệnh BCTC thường không hình thành khối u mà chúng lan rộng khắp tủy xương và lan sang các cơ quan khác như gan và lách. Các tế bào chưa trưởng thành này mất khả năng biệt hóa và không thể thực hiện được chức năng bình thường của chúng. BCTC là bệnh mà tiên lượng xấu chủ yếu ở nhóm bệnh nhân lớn tuổi, với tỷ lệ sống sót của bệnh nhân cao tuổi sau 5 năm mắc bệnh vẫn còn thấp, chỉ đạt 20% [10]. Về sinh học phân tử, BCTC là bệnh có liên quan chặt chẽ đến biến đổi di truyền và rối loạn tín hiệu nội bào. Một số đột biến như đột biến trên gen nucleophosmin (*NPM1*) hoặc *CEBPA* sẽ thường có tiên lượng thuận lợi hơn so với các bệnh nhân khác. Trong khi đó người bệnh mang đột biến *FLT3* thường có tiên lượng xấu hơn (ngay cả khi bệnh nhân có cả đột biến *NPM1* có lợi). Ngoài ra, các yếu tố nguy cơ của BCTC còn bao gồm các hội chứng như hội chứng rối loạn sinh tủy, các hội chứng bẩm sinh như hội chứng Down, hội chứng Bloom [11] [12].

Bệnh bạch cầu cấp tính dòng tủy có liên quan đến các bất thường về gen và nhiễm sắc thể (Karyotype), với kiểu nhiễm sắc thể được phân loại thành các nhóm tiên lượng thuận lợi, trung bình và xấu theo phân loại Hướng dẫn của Hội Ung thư Quốc Gia Hoa Kỳ (NCCN) và Liên đoàn Ung thư Châu Âu (ELN) [13]. Phân tích kiểu nhiễm sắc thể là một công cụ chẩn đoán tiêu chuẩn cung cấp thông tin tiên lượng quan trọng liên quan đến đáp ứng với liệu pháp điều trị ban đầu, thời gian thuyên giảm và tỷ lệ sống sót chung. Nhóm tiên lượng tốt bao gồm các bệnh nhân mang các bất thường nhiễm sắc thể cụ thể như chuyển đoạn $t(8;21)$, $t(15;17)$ và $inv(16)$, cũng như các bệnh nhân BCTC đột biến *NPM1* mà không có *FLT3-ITD*. Nhóm nguy cơ trung bình chiếm thường khoảng 50% bệnh nhân BCTC. Nhóm này bao gồm các trường hợp có bộ nhiễm sắc thể bình thường cũng như những trường hợp mang các bất thường cụ thể như chuyển đoạn $t(9;11)$ hoặc đột biến *FLT3-ITD* hoặc các bất thường số lượng nhiễm sắc thể đơn độc không đặc hiệu, bao gồm +8, +21... [14]. Không giống như hai nhóm trên, bệnh nhân BCTC có hồ sơ nguy cơ cao với tiên lượng xấu được đặc trưng bởi sự hiện diện của thể đơn nhiễm hoặc phức tạp có bất thường từ năm bất thường trở lên, chuyển đoạn $inv(3)$, $t(3;3)$, $t(6;9)$, $t(9;22)$ và $t(8;16)$, đột biến *TP53* cũng như mất nhiễm sắc thể $del5$ hoặc $del7$ [15]. Việc tích hợp phân loại nguy cơ theo ELN và NCCN không chỉ giúp dự đoán tiên lượng chính xác hơn mà còn đóng vai trò quan

trọng trong việc cá thể hóa chiến lược điều trị hoặc các liệu pháp điều trị đích ở bệnh nhân BCTC nguy cơ cao.

1.2. Gen mã hóa enzyme deubiquitinase

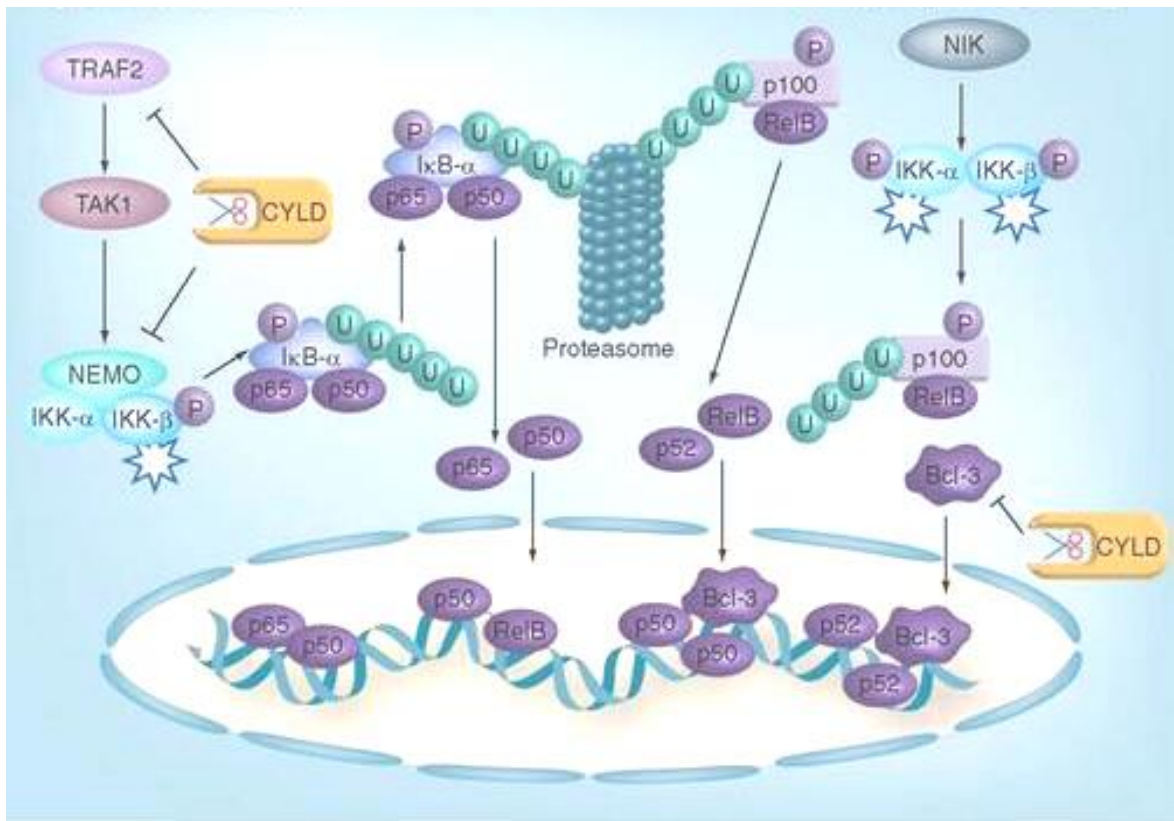
Nhóm gen mã hóa enzyme deubiquitinase (*DUB*) là những gen tham gia điều hòa âm tính các phản ứng viêm trong quá trình đáp ứng miễn dịch với nhiều loại bệnh khác nhau trong đó có ung thư máu. Các gen này tham gia điều hòa hoạt động của nhiều con đường tín hiệu nội bào như NF- κ B, JAK/STAT và SHP thông qua quá trình loại bỏ chuỗi ubiquitin khỏi các protein đích, từ đó kiểm soát hoạt tính của các phân tử tín hiệu liên quan [16]. Chính vì vậy, sự rối loạn biểu hiện hoặc chức năng của các gen *DUB* có liên quan mật thiết đến quá trình hình thành và tiến triển của các bệnh lý ác tính. Thông qua việc điều hòa các tín hiệu nội bào, các gen *DUB* có thể ảnh hưởng đến hoạt động của nhiều loại tế bào miễn dịch, làm thay đổi quá trình tiết cytokine và chemokine, góp phần duy trì tình trạng viêm kéo dài cũng như điều hòa biểu hiện của các marker hoạt hóa trên tế bào miễn dịch. Những thay đổi này có thể dẫn đến mất cân bằng đáp ứng miễn dịch và tạo điều kiện thuận lợi cho sự tồn tại của tế bào ung thư. Các gen *DUB* đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa nhiều quá trình sinh học như chu trình tế bào, sửa chữa DNA, tái cấu trúc nhiễm sắc thể, và một số con đường tín hiệu [16].

1.2.1. Gene *CYLD*

CYLD (cylindromatosis gene) là một trong những thành viên nhận được nhiều sự quan tâm thuộc nhóm USP (Ubiquitin-Specific Protease). Trong đó, miền USP của *CYLD* có chứa bộ ba xúc tác Cys-601, His-871 và Asp-889 tương tự như các *DUB* khác thuộc họ USP [17]. Bộ ba xúc tác này đóng vai trò quan trọng trong hoạt tính thủy phân liên kết isopeptide giữa ubiquitin và cơ chất protein, giúp *CYLD* thực hiện chức năng deubiquitinase của mình. Các *DUB* nói chung có thể dễ dàng nhận ra các liên kết chuỗi polyubiquitin cụ thể vì cấu trúc liên kết Lys-63 (K63) và linear ubiquitin khác biệt khá rõ với liên kết Lys-48 (K48) [17]. Và cũng tương tự như các *DUB* khác, *CYLD* có thể nhận biết các cơ chất cụ thể để liên kết và thực hiện hoạt tính deubiquitin của mình.

Cơ chế ức chế khối u và điều hòa miễn dịch của *CYLD* được thực hiện thông qua việc loại bỏ chuỗi ubiquitin khỏi các phân tử trung gian như TRAF2, TRAF6, TAK1, Dvl và BCL-3, từ đó tác động lên các con đường tín

hiệu NF- κ B, Wnt, JNK và p38 MAPK [18].



Hình 1.1: Điều hòa miễn dịch ở gen *CYLD* [18, 19].

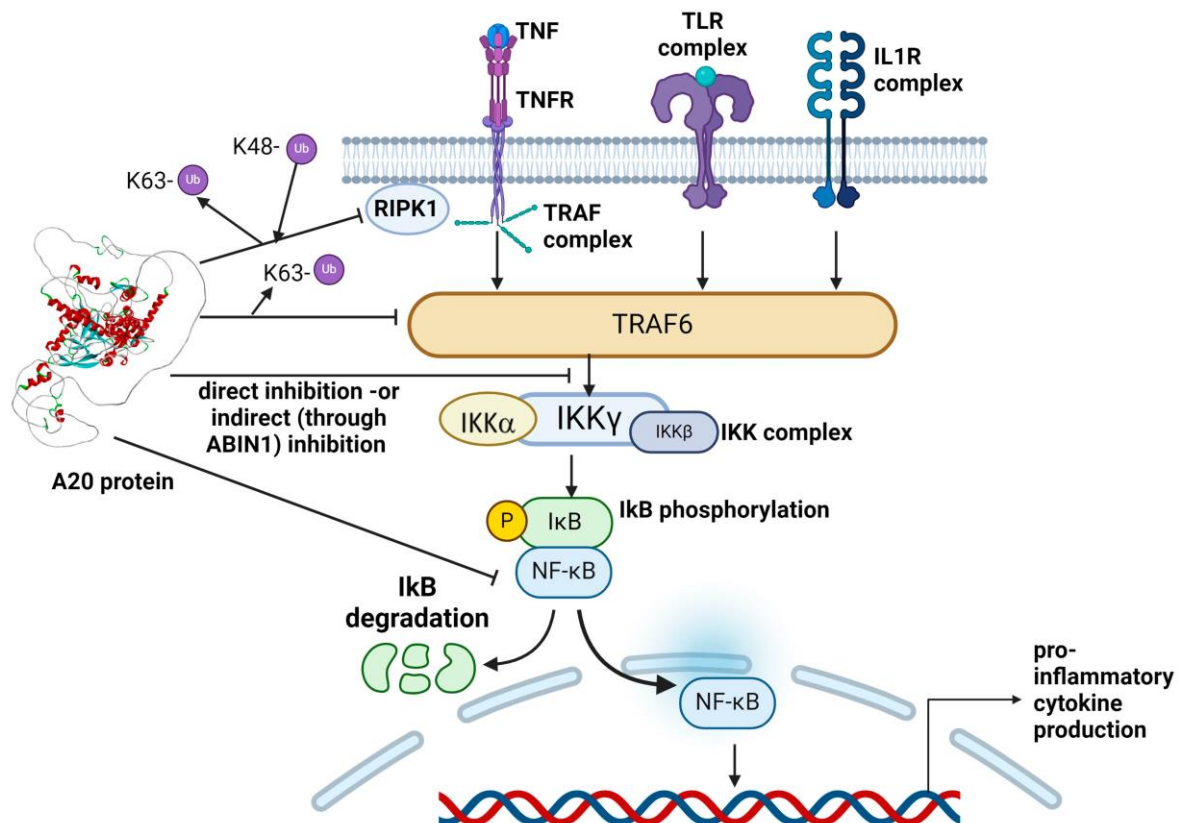
Trong điều kiện bình thường như được mô tả ở Hình 1.1, NF- κ B được định khu trong bào tương bởi các protein I κ B. Khi các thụ thể bề mặt (TNFR, IL-1R, TLR, BCR/TCR) được kích hoạt, phức hợp IKK (gồm IKK α , IKK β và NEMO) sẽ tiến hành phosphoryl hóa I κ B, dẫn đến sự ubiquitination và thoái hóa I κ B, cho phép NF- κ B chuyển vị vào nhân. *CYLD* can thiệp vào quá trình này bằng cách khử chuỗi polyubiquitin K63 và N-terminal methionine (M1) trên NF- κ B essential modulator (NEMO), từ đó kìm hãm hoạt tính của phức hợp IKK. Việc bất hoạt *CYLD* dẫn đến sự kích hoạt quá mức NF- κ B, thúc đẩy biểu hiện các gen sống sót và ức chế quá trình chết theo chương trình. Ngoài con đường NF- κ B cổ điển (canonical), *CYLD* còn điều hòa con đường NF- κ B không cổ điển (non-canonical) thông qua việc khử ubiquitin của BCL-3 và các protein tín hiệu liên quan, từ đó ảnh hưởng đến quá trình xử lý p100 thành p52 và hoạt động của phức hợp RelB/p52 trong nhân tế bào. Ngoài ra, các thực nghiệm với siRNA đã xác nhận *CYLD* là chất trung gian thiết yếu trong hoại tử tế bào – một cơ chế chết tế bào độc lập với caspase nhưng phụ thuộc vào các kinase RIPK1 và RIPK3 [20].

Bên cạnh con đường truyền tín hiệu NF- κ B, *CYLD* cũng điều hòa tín hiệu p38 MAPK để hạn chế tình trạng viêm và khả năng sống sót của tế bào. *CYLD* điều hòa tín hiệu p38 MAPK phụ thuộc vào TAK1. Con đường tín hiệu này trong cơ thể có vai trò liên quan đến khả năng miễn dịch của cơ thể. Trên mô hình chuột knock-out, việc mất chức năng *CYLD* đã tạo ra cơ chế bảo vệ cơ thể khỏi nhiễm trùng và tử vong do vi khuẩn nhờ sự hiệu chỉnh đáp ứng p38 MAPK. Ngoài ra, *CYLD* có thể điều hòa các phản ứng kháng virus bẩm sinh bằng DUB của RIG-I và TAK-binding kinase 1, qua đó kiểm soát quá trình tiết các cytokine tiền viêm và interferon. Trong quá trình sinh ung thư gan, *CYLD* hoạt động như một rào cản chống lại sự tăng sinh tế bào không kiểm soát qua trung gian JNK1 [21]. Việc mất chức năng *CYLD* (do đột biến hoặc bất hoạt) dẫn đến sự kích hoạt liên tục của các con đường này, thúc đẩy sự sống sót của tế bào và khả năng kháng lại các tín hiệu gây chết tế bào

1.2.2. Gene A20

A20 (hay TNFAIP3) là một protease OTU (Ovarian Tumor) được biết đến khá nhiều thuộc nhóm OTU này. Trong cấu trúc ngoài việc A20 có miền OTU ở đầu N thì nó còn có chứa miền ligase ubiquitin ở đầu C bao gồm bảy Zinc finger Cys2-Cys2. Nhờ cấu trúc đặc biệt này, A20 loại bỏ chuỗi ubiquitin liên kết Lys63 khỏi RIP1 và thêm polyubiquitin Lys48 vào RIP1, từ đó giúp phá hủy các protein bị lỗi, hư hỏng, hoặc không cần thiết, giúp duy trì cân bằng nội môi [22]. Điều này cũng giải thích cho lý do tại sao A20 lại có tác dụng ức chế NF- κ B, do NF- κ B hoạt động cần có polyubiquitination Lys63 của RIP1 [22]. Bên cạnh đó, A20 cũng có chứa E3 ubiquitin ligase được tìm thấy ở vị trí zinc finger thứ 4 trong đầu C của nó. Điều này đã cho thấy A20 với hai chức năng chỉnh sửa ubiquitin đối lập nhau là chức năng E3 ligase để tạo ra chuỗi polyubiquitin ở đầu C và miền protease để phân cắt chuỗi polyubiquitin ở đầu N của nó.

Bên cạnh *CYLD*, A20 là một nhân tố điều hòa âm tính quan trọng đối với con đường tín hiệu NF- κ B nhằm đáp ứng với các kích thích tiền viêm đa dạng như TNF, IL-1, LPS, cũng như các ligand của thụ thể NOD và thụ thể kháng nguyên tế bào T/B như được mô tả ở Hình 1.2.



Hình 1.2: Vai trò của A20 đến con đường tín hiệu NF-κB [23].

A20 liên kết với K63 và N-terminal methionine (M1) tương ứng thông qua vị trí zinc finger thứ 4 và thứ 7 giúp ức chế hoạt hóa IKK và truyền tín hiệu NF-κB. Khác với *CYLD* đơn thuần là một DUB, A20 có khả năng vừa loại bỏ K63 (hoạt tính DUB) vừa gắn thêm chuỗi K48 (hoạt tính E3 ligase) vào các cơ chất như TRAF6 hoặc RIPK1 để thúc đẩy sự thoái hóa của chúng tại proteasome. Thông qua việc điều hòa ubiquitination của RIPK1 và TRAF6, A20 làm giảm hoạt hóa phức hợp IKK, từ đó hạn chế quá trình phosphoryl hóa và thoái hóa IκB, ngăn cản sự chuyển vị của NF-κB vào nhân và làm giảm biểu hiện các cytokine tiền viêm.

Mặc dù A20 ban đầu được mô tả như là một protein ức chế quá trình chết theo chương trình do TNF gây ra, nhưng tác dụng chống apoptotic của nó dường như bị hạn chế và phụ thuộc nhiều hơn vào loại tế bào hơn là chức năng ức chế NF-κB. Ở tế bào lympho B và tế bào tua, A20 thậm chí còn được chỉ ra là có tác dụng tạo nên apoptotic, điều này có thể là do tác dụng ức chế NF-κB của nó, dẫn đến làm giảm biểu hiện của các protein chống apoptotic. A20 được chỉ ra là có tác dụng điều hòa sự tiết chemokine do TNF-α gây ra bằng cách ngăn chặn tín hiệu ERK [24]. Một số nghiên cứu cũng chỉ ra rằng

sự biểu hiện quá mức của A20 sẽ làm ức chế hoạt hóa con đường tín hiệu JNK/ERK/MAPK, có tác dụng điều hòa ức chế tiết các chemokine [24].

Trong các mô như gan, đại trực tràng và biểu mô phổi, A20 chủ yếu hoạt động như một protein ức chế khối u [25]. Bằng cách ngăn chặn tình trạng viêm mãn tính thông qua ức chế NF- κ B, A20 ngăn ngừa sự thiết lập của môi trường vi mô thúc đẩy ung thư. Trong ung thư biểu mô tế bào gan, sự suy giảm của A20 dẫn đến viêm gan mãn tính, xơ hóa và cuối cùng là hình thành khối u [26]. Nghiên cứu cho thấy mức độ biểu hiện A20 trong các mẫu lâm sàng ung thư biểu mô tế bào gan thấp hơn đáng kể so với mô bình thường, và sự biểu hiện thấp này liên quan đến kích thước khối u lớn hơn và tiên lượng bệnh nhân kém hơn.

Ngược lại, trong một số loại ung thư khác, A20 lại đóng vai trò duy trì sự sống sót và thúc đẩy di căn của tế bào u. Trong ung thư vú, đặc biệt là các thể xâm lấn, gen A20 thường được biểu hiện cao. Nó ổn định protein Snail1 bằng cách ngăn chặn quá trình phosphoryl hóa qua trung gian GSK3, từ đó thúc đẩy chuyển đổi biểu mô-mô liên kết và khả năng di căn của tế bào ung thư. Hơn nữa, A20 còn giúp tế bào ung thư vú kháng lại apoptosis do TNF- α gây ra bằng cách tăng cường con đường chống apoptosis qua trung gian HSP70 [27]. A20 đóng vai trò trong việc giúp tế bào melanoma trốn thoát khỏi sự giám sát miễn dịch bằng cách điều hòa biểu hiện PD-L1 và làm giảm hoạt tính của tế bào T CD8+. Sự biểu hiện cao của A20 trong melanoma tương quan với phản ứng kém đối với các liệu pháp kháng PD-1 [25].

1.3. Các cytokine điều hòa đáp ứng miễn dịch

1.3.1. Tumor necrosis factor-alpha

Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) là một cytokine tiền viêm đa chức năng, đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa hệ thống miễn dịch bẩm sinh, phản ứng viêm và sự sống sót của tế bào. Ban đầu, vai trò của TNF- α gắn liền với khả năng gây hoại tử các mô khối u *in vivo*, tuy nhiên các nghiên cứu hiện đại đã chứng minh đây là một phân tử lưỡng cực, tham gia vào một mạng lưới điều hòa sinh học phức tạp [28]

TNF- α thực hiện chức năng sinh học thông qua việc liên kết với hai loại thụ thể màng đặc hiệu là TNFR1 (biểu hiện ở hầu hết các loại tế bào) và TNFR2 (chủ yếu khu trú trên tế bào miễn dịch và tế bào nội mô) [28]. Khi TNF- α gắn với TNFR1, phức hợp thụ thể sẽ tuyển mộ các protein adaptor như

TRADD, RIP1 và TRAF2, từ đó hoạt hóa phức hợp kinase IKK thông qua các quá trình phosphoryl hóa và ubiquitin hóa. Phức hợp IKK phosphoryl hóa I κ B α , dẫn đến sự thoái hóa của protein này qua proteasome và giải phóng NF- κ B. Sau đó, NF- κ B chuyển vị vào nhân và hoạt hóa quá trình phiên mã của nhiều gen liên quan đến sự sống còn, tăng sinh tế bào cũng như sản xuất cytokine và chemokine tiền viêm [28, 29]. Ngược lại, trong một vài điều kiện nhất định khi con đường NF- κ B bị ức chế (ví dụ: có sự can thiệp của các enzyme deubiquitinase như A20 hoặc CYLD), TNFR1 có thể chuyển dịch tín hiệu sang phức hợp hoạt hóa Caspase-8/Caspase-3, kích hoạt trực tiếp con đường chết theo chương trình (apoptosis) hoặc con đường hoại tử có lập trình (necroptosis) phụ thuộc vào RIPK1/RIPK3 [29].

Trong bối cảnh bệnh lý ác tính, đặc biệt là các ung thư hệ tạo máu, TNF- α thể hiện tính chất hai mặt rõ rệt phụ thuộc nghiêm trọng vào nồng độ và thời gian tiếp xúc. Ở nồng độ sinh lý cao tại chỗ, TNF- α có khả năng kích hoạt phản ứng miễn dịch chống u mạnh mẽ thông qua việc tăng cường độc tính của tế bào NK và tế bào T CD8+ [30]. Tuy nhiên, tình trạng tăng tiết TNF- α mạn tính ở nồng độ thấp trong vi môi trường tủy xương lại tạo ra một "niche" viêm u, thúc đẩy sự mất ổn định di truyền của tế bào blast, kích thích tăng sinh tự chủ và hỗ trợ khối u trốn tránh đáp ứng miễn dịch [30] [28].

1.3.2. Transforming growth factor-beta

Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) là một cytokine đa chức năng đóng vai trò nhạc trưởng trong việc điều hòa cân bằng nội mô, quá trình tạo máu, biệt hóa tế bào miễn dịch và sinh bệnh học ung thư. Hoạt chất này được giải phóng khỏi phức hợp lưu trữ ngoại bào dưới tác động của các protease hoặc stress oxy hóa (ROS)[31].

TGF- β thực hiện chức năng thông qua cơ chế kích hoạt các thụ thể serine/threonine kinase xuyên màng (T β RI và T β RII). Sau khi ligand gắn với thụ thể, tín hiệu được lưỡng phân thành hai nhánh gồm con đường phụ thuộc Smad (canonical) và con đường không phụ thuộc Smad (non-canonical). Ở con đường phụ thuộc Smad, T β RI phosphoryl hóa các Smad điều hòa (Smad2 và Smad3), sau đó các protein này liên kết với Smad4 và di chuyển vào nhân để phối hợp với các yếu tố phiên mã điều hòa biểu hiện gen đích, góp phần kiểm soát chu trình tế bào, biệt hóa và apoptosis [32]. Ngược lại, con đường non-canonical hoạt hóa nhiều con đường tín hiệu khác như MAPK (ERK,

JNK, p38), PI3K/Akt/mTOR và Rho-like GTPase, từ đó ảnh hưởng đến tăng sinh, di cư, tái cấu trúc bộ xương tế bào và đáp ứng miễn dịch của tế bào [33].

Trong sinh bệnh học ung thư, TGF- β có thể đóng vai trò khác nhau phụ thuộc vào giai đoạn tiến triển của bệnh. Ở giai đoạn đầu, TGF- β vận hành như một chất ức chế u mạnh mẽ thông qua việc kích hoạt apoptosis và kìm hãm chu trình tế bào ở pha G1. Tuy nhiên, ở giai đoạn muộn hoặc trong môi trường ác tính, tế bào u thường phát triển các cơ chế kháng lại nhánh ức chế sinh trưởng của Smad, đồng thời tận dụng các con đường non-canonical nhằm thúc đẩy sự xâm lấn và kháng thuốc [31, 34]. Đặc biệt, ở bệnh nhân bạch cầu, TGF- β đóng vai trò là nhân tố ức chế miễn dịch hàng đầu, thông qua việc bất hoạt tế bào NK, tế bào T gây độc, và thúc đẩy sự tích lũy của tế bào Treg, tạo lá chắn bảo vệ tế bào blast khỏi hệ thống giám sát miễn dịch của cơ thể [34].

1.3.3. Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) là một protein có trọng lượng phân tử dao động từ 21 kDa đến 28 kDa [35]. IL-6 giúp cân bằng nội môi và đáp ứng miễn dịch. Tuy nhiên, khi nồng độ IL-6 tăng cao quá mức thì nó thường liên quan đến các bệnh viêm mãn tính, bệnh tự miễn và sự tiến triển của nhiều loại ung thư, bao gồm cả các bệnh lý huyết học ác tính.

IL-6 thực hiện chức năng sinh học thông qua việc kích hoạt các con đường tín hiệu nội bào quan trọng như JAK/STAT3, MAPK và PI3K/AKT, nó được xem là tác nhân chính dẫn đến các phản ứng viêm hệ thống. Khi nồng độ IL-6 tăng cao quá mức, nó thường liên quan mật thiết đến các bệnh viêm mãn tính, bệnh tự miễn và sự tiến triển của nhiều loại ung thư, bao gồm cả các bệnh lý huyết học ác tính [35].

IL-6 có thể đóng vai trò như là một yếu tố tăng trưởng mạnh mẽ cho các tế bào dòng B và T, giúp thúc đẩy sự phân chia và kéo dài tuổi thọ của chúng. Nó được sử dụng rộng rãi như một yếu tố tăng trưởng để hỗ trợ sự phát triển của các dòng tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng. Nhờ đặc tính này, IL-6 thường được thêm vào môi trường nuôi cấy tế bào để mô phỏng môi trường vi mô khối u ức chế miễn dịch, giúp đánh giá hiệu quả của các thuốc kháng ung thư hoặc thuốc điều hòa miễn dịch. Nó cũng được dùng để kích hoạt các phản ứng phục vụ nghiên cứu về cơ chế viêm và chuyển hóa ở tế bào [36].

1.4. Tế bào tua

1.4.1. Giới thiệu chung

Tế bào tua (DC- Dendritic cells) là một loại tế bào trình diện kháng nguyên (APC- Antigen presenting cell) đóng vai trò quan trọng trong hệ thống miễn dịch. Tế bào tua chủ yếu được tìm thấy ở niêm mạc phổi, tế bào biểu mô của da, niêm mạc của mũi và đường tiêu hóa. Trong đó, ở các biểu mô của hệ hô hấp, mật độ tế bào tua được xác định là cao hơn nhiều so với các nơi khác và mật độ này đạt khoảng 500-1000 tế bào/mm² [37]. Ngoài ra, mật độ các tế bào này cũng khác nhau giữa các biểu mô khác nhau. Cụ thể, ở các biểu mô có nguy cơ tiếp xúc với kháng nguyên cao hơn thì mật độ tế bào tua cao, và ngược lại. Ví dụ, trong hệ hô hấp thì tế bào tua có mật độ cao nhất ở các mô gần với đường thở và khi xa đường thở hoặc phế nang, mật độ các tế bào này giảm dần [37].

Ngoài ra, tế bào DC còn được tìm thấy ở một số biểu mô khác trong cơ thể. Ban đầu các tế bào DC chưa trưởng thành được tìm thấy trong máu, sau đó các tế bào này được kích hoạt và di chuyển đến các mô bạch huyết, rồi tương tác với các tế bào lympho T và B, từ đó giúp tạo các phản ứng miễn dịch thích ứng. Chức năng chính của DC là làm cầu nối giữa hệ thống miễn dịch bẩm sinh và hệ thống miễn dịch thích ứng bằng cách thúc đẩy hoạt động của tế bào lympho T, giúp tăng cường khả năng phản ứng của hệ miễn dịch và bảo vệ cơ thể khỏi các tác nhân lạ. DC là các tế bào miễn dịch bẩm sinh vì chúng nhận biết và phản ứng với các tín hiệu liên quan đến mầm bệnh, từ đó hình thành nên phản ứng viêm cấp tính [37].

1.4.2. Vai trò của tế bào tua

Ở niêm mạc, DC được tìm thấy ở trạng thái ổn định và có hình dạng đặc trưng. Tại đây, DC đóng góp vai trò trong việc tiêu diệt các tác nhân gây bệnh (kháng nguyên) hoặc trình diện chúng cho tế bào T. Ngoài ra, DC cũng có thể tiêu diệt các kháng nguyên thông qua các trung gian thụ thể. Trên bề mặt của DC, có các thụ thể đặc biệt như thụ thể lectin loại C, thụ thể mannose và thậm chí cả thụ thể apoptotic. Những thụ thể này có khả năng nhận biết và kết nối với các kháng nguyên mục tiêu của chúng. Các loại tế bào DC khác nhau có chức năng hoạt động khác nhau và chúng sẽ đóng góp vai trò giúp xác định xem phản ứng miễn dịch sẽ được bắt đầu với tế bào nào: tế bào T gây độc tế bào, tế bào T điều hòa, tế bào B nhớ hay tế bào T trợ giúp [38].

Các kháng nguyên được trình diện cho tế bào T trên phân tử MHC I và MHC II sẽ kích hoạt và giúp tế bào lympho T biệt hóa trở thành tế bào T gây độc tế bào hoặc tế bào T trợ giúp tương ứng. DC giúp tăng cường phản ứng miễn dịch bằng cách trình diện các marker trên bề mặt của chúng, các marker này liên kết với các phân tử kích thích tế bào lympho T, chẳng hạn như IL-12 sẽ kích thích và tối ưu hóa sự tăng sinh tế bào lympho T. Các kháng nguyên có nguồn nội sinh như protein của virus thường được trình diện trên các phân tử MHC I để làm tăng sinh tế bào T gây độc tế bào. Trình diện kháng nguyên nội sinh được thực hiện bởi các phân tử MHC I trên tất cả các tế bào có nhân và liên quan đến sự phân hủy protein tế bào và chuyển các peptide thu được vào MHC I mới được tổng hợp trong mạng lưới nội chất, trong khi các kháng nguyên ngoại bào được trình diện trên các phân tử MHC II. Các kháng nguyên ngoại sinh, chẳng hạn như các kháng nguyên có nguồn gốc từ vi khuẩn, chúng bị tiêu diệt bởi các DC chưa trưởng thành bằng phương pháp nội thực bào, thực bào hoặc cả hai thông qua các phân tử khác nhau như thụ thể Fc của IgG hoặc lectin như CD205, từ đó dẫn đến quá trình tiếp xúc của các kháng nguyên này với các ngăn nội tiết với độ axit tăng dần: từ tính axit nhẹ, tính axit vừa phải đến tính axit rất cao, đây chính là con đường endolysosome. Ở ngăn cuối của con đường endolysosome trong ngăn nội tiết tính axit cao có chứa rất nhiều MHC II và tại chính ngăn này các kháng nguyên bị phân hủy thành polypeptide [39].

DC cũng đóng góp vào chức năng của tế bào B và giúp duy trì trí nhớ miễn dịch của chúng. DC tiết cytokine và các yếu tố khác thúc đẩy sự hoạt hóa và biệt hóa của tế bào B. Phản ứng miễn dịch xảy ra khi có một kháng nguyên xâm nhập, các DC có trong các hạch bạch huyết được kích hoạt và trình diện kháng nguyên đến tế bào B, từ đó tế bào B hoạt động hình thành nhiều phức hợp kháng thể-kháng nguyên, điều này giúp cho tế bào B có thể tự tiếp nhận và trình diện kháng nguyên cho các tế bào T.

1.4.3. Chức năng của tế bào tua trong miễn dịch

DC có ba chức năng chính, đầu tiên là trình diện kháng nguyên và kích hoạt tế bào lympho T. Từ đó tạo ra các phản ứng miễn dịch thích ứng, với sự giải phóng của các cytokine quan trọng như IL-12 để thúc đẩy tế bào lympho T biệt hóa thành tế bào T trợ giúp hoặc tế bào T gây độc tế bào. DC có khả năng kích thích mạnh mẽ tế bào T CD4 + tự nhiên, trình diện kháng

nguyên với các tế bào T CD8 và tiết các cytokine gây viêm IL-1, IL-6, TNF- α , IL-12 và IL-23 [40]. Bên cạnh trình diện kháng nguyên, DC còn có khả năng tạo ra dung nạp miễn dịch. Có 2 loại dung nạp miễn dịch là dung nạp miễn dịch trung tâm và dung nạp miễn dịch ngoại vi. Dung nạp trung tâm xảy ra ở tuyến ức, nơi DC tiếp xúc và dung nạp với các kháng nguyên của cơ thể và các tế bào lympho T phản ứng với các kháng nguyên đó bị phá hủy, điều này cũng xảy ra trong tương tác với tế bào lympho B. Dung nạp ngoại vi xảy ra khi các phân tử đồng kích thích cuối cùng không thể trình diện kháng nguyên cho hệ thống miễn dịch, dẫn đến sự thất bại trong việc hoạt hóa tế bào lympho T và làm cho tế bào lympho T có khả năng dung nạp. Chức năng cuối cùng của DC là khả năng duy trì bộ nhớ miễn dịch song song với tế bào B. Trong trung tâm mầm, DC được tìm thấy có các nang chứa phức hợp kháng nguyên và kháng thể, giúp cho DC có thể kéo dài bộ nhớ miễn dịch trong một thời gian dài có thể lên đến vài tháng hoặc nhiều năm. Điều này cho phép DC kích thích lên tế bào B để duy trì bộ nhớ miễn dịch. Như vậy, DC có vai trò quan trọng trong việc trình diện kháng nguyên, kích hoạt tế bào lympho T, dung nạp miễn dịch và duy trì bộ nhớ miễn dịch song song với tế bào B [40].

DC còn có vai trò quan trọng trong miễn dịch bẩm sinh, DC có các thụ thể nhận dạng khuôn mẫu (PRR- Pattern recognition receptor) và mô hình phân tử liên quan đến mầm bệnh (PAMP- Pathogen associated molecular pattern). Điều này giúp chúng nhận biết vi khuẩn, virus và các tác nhân gây bệnh khác. Những mô hình thụ thể này giúp hoạt hóa TLR, lectin loại C và giải phóng các cytokine gây viêm để kích hoạt hệ thống miễn dịch bẩm sinh [41]. Ngoài ra, DC có liên quan đến sự tăng sinh tế bào lympho B và gây ức chế phản ứng miễn dịch bằng cách cảm ứng với tế bào lympho T. Điều này xảy ra khi thiếu các phân tử đồng kích thích hoặc thiếu IL-12, tế bào lympho T tiết ra IL-10 và biến đổi yếu tố tăng trưởng β (TGF β - Transforming Growth Factor Beta) [40].

Các nhà nghiên cứu cũng đã quan sát thấy rằng các tế bào khối u có thể ức chế sự trưởng thành của các tế bào DC và gây ra sự biến đổi kiểu hình của chúng để kích hoạt phản ứng với tế bào Th17 và Treg (các tế bào Th17 chủ yếu tiết ra IL-17, IL-22 và IL-23 giúp thu hút bạch cầu trung tính và thúc đẩy quá trình viêm tại vị trí nhiễm trùng. Còn các tế bào Treg tiết ra các cytokine chống viêm IL-10 và TGF- β , giúp ngăn chặn hoạt động của nhiều loại tế bào

miễn dịch, do đó ức chế các phản ứng miễn dịch) giúp tạo ra môi trường thuận lợi cho sự tăng sinh của các tế bào u [42]. Sự hình thành các gốc tự do cũng góp phần làm tăng tỉ lệ đột biến trong khối u. DC chưa trưởng thành có thể hoạt hóa các tế bào Treg tạo ra kháng nguyên đặc hiệu của tế bào lympho, điều này có thể giúp cho khối u phát triển [43]. Trong nghiên cứu về DC được phân lập từ những bệnh nhân trong giai đoạn di căn hoặc đã bước sang giai đoạn phát triển của bệnh ung thư, các nhà nghiên cứu đã chứng minh rằng các DC biểu hiện các phân tử ức chế PD-L1, arginase và IDO, đồng thời tiết TGF- β , IL-10 và prostaglandin E2, dẫn đến ức chế tế bào lympho T. Bên cạnh đó, việc sử dụng các chất kích thích miễn dịch có thể ức chế tác dụng xấu này do DC gây ra [44]. Ở một số bệnh nhân, ở trên mô bạch huyết ngoài khối u người ta thường tìm thấy được ngoài các DC trưởng thành là sự xuất hiện của các tế bào T nhớ và tế bào T chưa trưởng thành.

Các khối u có thể ức chế một phần khả năng miễn dịch của cơ thể thông qua việc tác động lên DC. Sự biệt hóa và kích hoạt DC có thể bị ức chế bởi các cytokine được tế bào ung thư tiết ra như IL-6 và IL-10. Các DC có nguồn gốc từ khối u có thể tạo ra các tế bào T điều hòa (Treg) và ức chế sự tăng sinh của hai loại tế bào có khả năng tiêu diệt tế bào ung thư là tế bào T gây độc [45]. Các tế bào khối u cũng có thể trốn tránh miễn dịch bằng cách giải phóng các cytokine như TGF- β và IL-10 có khả năng ngăn chặn phản ứng miễn dịch, và thậm chí gây tổn thương hoặc giết chết tế bào lympho.

1.5. Một số con đường tín hiệu liên quan đến bệnh bạch cầu cấp

1.5.1. Con đường tín hiệu *PI3K/Akt/mTOR*

Con đường tín hiệu PI3K/Akt/mTOR kiểm soát một loạt các quá trình sinh lý của tế bào bao gồm tăng sinh, sống sót, biệt hóa, trao đổi chất, tự thực bào, tạo mạch, xuất bào và vận động. Tuy nhiên, tín hiệu PI3K/Akt/mTOR đóng vai trò tiên lượng xấu và ảnh hưởng tiêu cực đến các phương pháp điều trị ở nhiều loại khối u rắn và máu [46].

Khi được kích thích bởi các yếu tố tăng trưởng hoặc cytokine, PI3K loại I xúc tác tạo phospholipid màng là PIP3, từ đó hoạt hóa serine/threonine kinase Akt. Sau khi được kích hoạt Akt phosphoryl hóa nhiều mục tiêu khác nhau, trong đó mục tiêu liên quan chính đến khả năng gây ung thư và kháng thuốc là mTOR. Đây là một loại serine/threonine protein kinase tham gia vào hai phức hợp protein là phức hợp mTOR 1 (mTORC1) và phức hợp mTOR 2

(mTORC2). mTORC1 giúp hỗ trợ các tế bào khối u bằng cách kích thích tổng hợp protein cần thiết cho sự phát triển, sự sống của tế bào, hình thành mạch, hấp thu chất dinh dưỡng và chuyển hóa. Hơn nữa, nó còn ngăn chặn hiện tượng tự thực bào diễn ra. mTORC2 kiểm soát sự sống sót của tế bào, quá trình trao đổi chất và khung tế bào bằng cách phosphoryl hóa một số kinase AGC, bao gồm Akt, kinase 1 được điều hòa bởi huyết tương/glucocorticoid (SGK1) và protein kinase C (PKC) α [47].

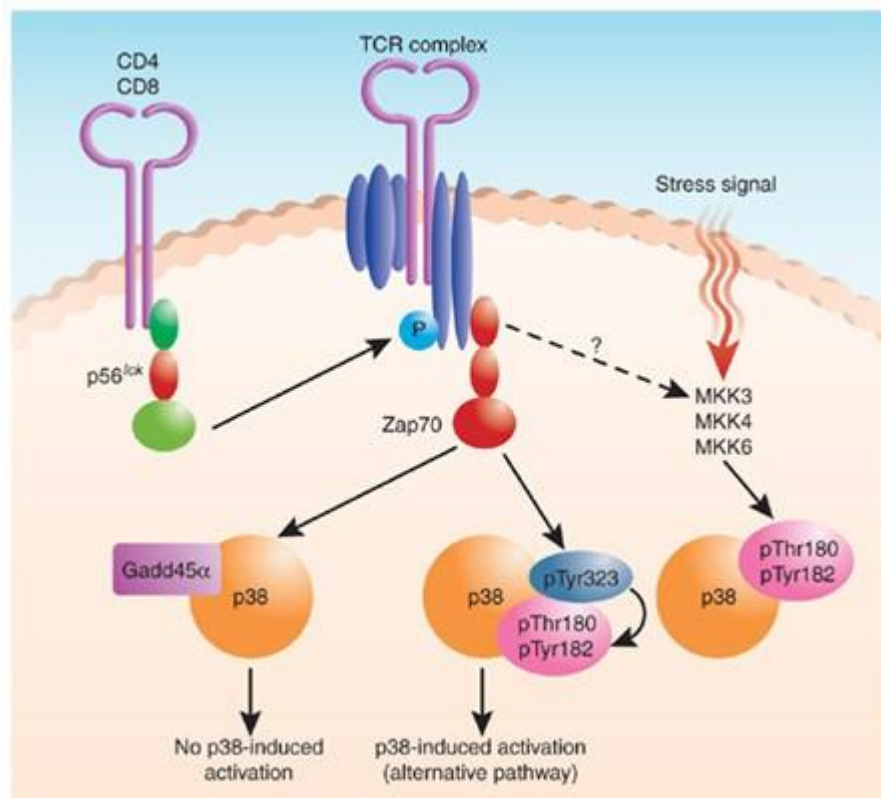
Con đường tín hiệu PI3K/Akt/mTOR thường được điều chỉnh tăng phổ biến ở bệnh nhân BCLC với khoảng 70-85% bệnh nhi được phát hiện và nó báo hiệu tiên lượng xấu hơn ở bệnh. Có nhiều lý do dẫn đến sự tăng hoạt động của PI3K/Akt/mTOR bao gồm sự bất hoạt protein PTEN thông qua Notch1/HES1 điều chỉnh giảm PTEN mRNA bằng miR-19 đột biến ở PI3K/Akt/PTEN. Tuy nhiên lý do phổ biến nhất là do protein PTEN bị bất hoạt do phosphoryl hóa bởi casein kinase 2 (CK2) hoặc quá trình oxy hóa bởi các loại oxy phản ứng [48] [46].

Rối loạn ở con đường tín hiệu PI3K/Akt/mTOR xuất hiện ở khoảng 60% bệnh nhân BCTC, và sự kích hoạt con đường tín hiệu này được chỉ ra là có liên quan đến việc giảm tỷ lệ sống sót ở bệnh nhân. Đột biến các protein liên kết màng chẳng hạn như RTK hoặc GTPase là nguyên nhân chính gây ra rối loạn điều hòa tín hiệu PI3K-Akt-mTOR và nó diễn ra ở khoảng 55% bệnh nhân BCTC [48]. Đột biến gen *FLT3* là một trong những đột biến thường gặp nhất ở BCTC gồm hai loại là FLT3-ITD và FLT3-TKD. Sự hoạt hóa của con đường tín hiệu PI3K/Akt/mTOR giúp cho sự sống sót của các tế bào BCTC. Hơn nữa, sự phosphoryl hóa ở Thr308 bởi PDK1 và tại Ser473 bởi mTORC2 làm kích hoạt Akt, điều này được phát hiện ở phần lớn bệnh nhân BCTC. Sự phosphoryl hóa Akt ở hai vị trí này có liên quan đến việc giảm tỷ lệ sống sót ở bệnh nhân BCTC.

1.5.2. Con đường tín hiệu protein kinase hoạt hóa phân bào (MAPK)

Con đường tín hiệu protein kinase hoạt hóa phân bào (MAPK) đóng vai trò việc điều chỉnh biểu hiện gen, sự phát triển của tế bào và sự sống sót của tế bào. Tín hiệu MAPK bất thường có thể dẫn đến làm tăng và tăng không kiểm soát quá trình tăng sinh tế bào và gây cản trở quá trình chết theo chương trình của tế bào [49]. MAPK cũng được biết đến với vai trò thúc đẩy sự sống sót và tăng sinh của các tế bào ung thư ở cả các khối u rắn và tế bào bạch cầu

trong máu. Các rối loạn ở MAPK có thể dẫn đến sự biến đổi bất thường tế bào bạch cầu dòng tủy. Phosphoryl hóa MAPK được coi là một yếu tố tiên lượng về đáp ứng kém trong điều trị và thời gian sống sót gần ở bệnh nhân BCTC. Các con đường tín hiệu thuộc MAPK bao gồm: con đường tín hiệu ERK1 và 2 (ERK1/2 – extracellular signal regulated kinase 1 and 2 pathway), con đường tín hiệu JNK (JNK – c Jun N terminal kinase pathway), con đường tín hiệu p38 và con đường tín hiệu ERK5 được nêu trong Hình 1.3. Mỗi một con đường được bắt đầu với các tín hiệu ngoại bào cụ thể dẫn đến việc kích hoạt con đường tín hiệu MAPK [50, 51].



Hình 1.3: Con đường tín hiệu MAPK p38 [52]

Con đường tín hiệu MAPK p38 đóng vai trò quan trọng trong việc chuyển đổi các kích thích ngoại bào thành một loạt các phản ứng tế bào. Chuỗi tín hiệu MAPK p38 cũng bao gồm một hệ thống ba tầng MAPKKK-MAPKK-MAPK. Có bốn dạng đồng phân thuộc MAPK p38 (α , β , γ và δ). Con đường tín hiệu p38 MAPK được bắt đầu với các kích thích ngoại bào làm hoạt hóa MAPKKK, các MAPKKK này bao gồm ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), DLK1 (dual-leucine-zipper-bearing kinase 1), TAK1 (transforming growth factor β -activated kinase 1), TAO (thousand-and-one amino acid) 1 và 2, TPL2 (tumor progression loci 2), MLK3 (mixed-lineage

kinase 3), MEKK (MAPK/ERK kinase kinase) 3 và MEKK4, và ZAK1 (leucine zipper and sterile- α motif kinase 1). MAPKKK kích hoạt MAPKK, MKK3 và MKK6 là các MAPKK chính để kích hoạt p38 và chúng có khả năng phosphoryl hóa hầu hết các dạng đồng phân của p38. MKK4 có khả năng phosphoryl hóa p38 α và p38 δ ở một số loại tế bào cụ thể. Ngoài ra, p38 α cũng có thể được hoạt hóa một cách động lập với MAPKK. TAB1 (TAK protein binding 1) cũng có thể tương tác trực tiếp với p38 α để thúc đẩy quá trình phosphoryl hóa trên Thr 180 và Tyr 182, do đó kích hoạt hoàn toàn p38 α . Một cách kích hoạt động lập với MAPKK khác được thực hiện qua trung gian là ZAP70. ZAP70 có thể phosphoryl hóa trực tiếp p38 α /p38 β trên Tyr 323, dẫn đến quá trình phosphoryl hóa Tyr 180 và hoạt hóa p38 [53].

1.5.3. Con đường tín hiệu yếu tố nhân kappa B

Yếu tố nhân kappa B (NF- κ B) là yếu tố phiên mã thiết yếu kiểm soát quá trình biểu hiện gen mã hóa liên quan đến một loạt các quá trình khác nhau của phản ứng miễn dịch và phản ứng viêm của cơ thể. NF- κ B gây ra sự biểu hiện của nhiều tiền gen viêm khác nhau, bao gồm cả những gen mã hóa các cytokine và chemokine, đồng thời cũng tham gia vào quá trình điều hòa các thể gây viêm. Ngoài ra, NF- κ B đóng một vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh sự sống, sự hoạt hóa và biệt hóa của các tế bào miễn dịch bẩm sinh và tế bào T gây viêm. Do đó, việc bất hoạt NF- κ B góp phần vào quá trình gây bệnh của các bệnh viêm nhiễm khác nhau. Sự biểu hiện quá mức của NF- κ B có liên quan tới một số loại ung thư như ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư tụy và ung thư tuyến tiền liệt [54].

Các thành viên NF- κ B bao gồm năm thành viên liên quan đến cấu trúc, bao gồm NF- κ B1 (còn được gọi là p50), NF- κ B2 (cũng được gọi là p52), RelA (cũng được gọi là p65), RelB và c-Rel, chúng làm trung gian cho quá trình phiên mã của các gen mục tiêu bằng cách liên kết với các DNA cụ thể, dưới dạng các dime khác nhau. NF- κ B thường bị cô lập trong tế bào chất bởi các protein ức chế là I κ B, mà đặc trưng nhất là I κ B α . Ngoài ra còn có các protein như NF- κ B1 và NF- κ B2, p105 và p100, đóng vai trò là protein giống I κ B [55].

Con đường kích hoạt NF- κ B bao gồm hai con đường truyền tín hiệu chính là con đường thông thường và không thông thường (hoặc con đường thay thế), cả hai đều góp phần quan trọng việc điều hòa các phản ứng miễn

dịch và viêm mặc dù chúng có sự khác biệt về cơ chế truyền tín hiệu [56]. Con đường truyền tín hiệu NF- κ B thông thường tham gia đáp ứng với nhiều loại kích thích khác nhau bao gồm phối tử của nhiều thụ thể cytokine khác nhau, bao gồm thụ thể nhận dạng mẫu (PRR), các thành viên họ thụ thể TNF (TNFR), cũng như thụ thể tế bào T và thụ thể tế bào B. Cơ chế để kích hoạt con đường NF- κ B thông thường là sự suy giảm cảm ứng của I κ B α thông qua quá trình phosphoryl hóa đặc hiệu bởi phức hợp I κ B kinase (IKK). IKK bao gồm hai tiểu đơn vị xúc tác là IKK α và IKK β và một tiểu đơn vị điều hòa tên là NEMO hoặc IKK γ . IKK có thể được kích hoạt bởi các yếu tố kích thích khác nhau bao gồm cytokine, yếu tố tăng trưởng, ty thể, thành phần vi sinh vật và tác nhân gây căng thẳng. Sau khi kích hoạt, IKK phosphoryl hóa I κ B α hai serine ở đầu N và gây suy giảm I κ B α phụ thuộc ubiquitin trong proteasome, dẫn đến sự chuyển vị hạt nhân của các NF- κ B là p50/RelA và p50/c-Rel [55].

Ngược lại với con đường NF- κ B thông thường là con đường NF- κ B thay thế, nó phản ứng chọn lọc với một số các kích thích cụ thể bao gồm các phối tử thuộc TNFR như LT β R, BAFFR, CD40 và RANK [57, 58]. Ngoài ra con đường này còn liên quan đến sự suy giảm của NF- κ B mà không phụ thuộc vào I κ B α , mà nó lại phụ thuộc vào quá trình xử lý protein precursor NF- κ B2 là p100 [56, 57]. Quá trình xử lý p100 liên quan đến sự suy giảm I κ B ở đầu C của nó, dẫn đến việc tạo ra NF- κ B2 p52 trưởng thành và sự chuyển vị hạt nhân của phức hợp NF- κ B p52/RelB [56, 57, 59]. Về mặt chức năng, NF- κ B thông thường liên quan đến hầu hết tất cả các khía cạnh của phản ứng miễn dịch, trong khi con đường NF- κ B thay thế đóng vai trò như một con đường tín hiệu bổ sung với con đường NF- κ B thông thường trong việc điều chỉnh các chức năng cụ thể của hệ thống miễn dịch thích ứng [57, 58].

1.5.4. Con đường tín hiệu Wnt

Con đường tín hiệu Wnt là một hệ thống truyền tín hiệu giữa các tế bào được bảo tồn cao trong tiến hóa, đóng vai trò trung tâm trong quá trình phát triển phôi, duy trì cân bằng mô, điều hòa tăng sinh, biệt hóa, di chuyển tế bào và duy trì quần thể tế bào gốc. Con đường này lần đầu tiên được phát hiện ở *Drosophila* và sau đó được chứng minh có vai trò thiết yếu ở động vật có xương sống cũng như con người [60, 61]. Sự đa dạng về ligand Wnt, thụ thể, protein trung gian và cơ chế điều hòa khiến Wnt trở thành một mạng lưới tín

hiệu phức tạp, bao gồm con đường Wnt kinh điển phụ thuộc β -catenin và các con đường Wnt không kinh điển.

Trong con đường Wnt/ β -catenin (kinh điển), các protein Wnt ngoại bào gắn vào thụ thể Frizzled (FZD) và đồng thụ thể LRP5/6 trên bề mặt tế bào, dẫn đến hoạt hóa protein Dishevelled (DVL) và ức chế phức hợp phân hủy β -catenin (gồm Axin, APC, GSK3 β và CK1). Khi không có tín hiệu Wnt, β -catenin bị phosphoryl hóa và phân hủy qua hệ ubiquitin–proteasome. Ngược lại, khi con đường Wnt được hoạt hóa, β -catenin được ổn định, tích lũy trong bào tương và di chuyển vào nhân, nơi nó tương tác với các yếu tố phiên mã TCF/LEF để điều hòa biểu hiện các gen đích liên quan đến tăng sinh, sống sót và định hướng số phận tế bào [62].

Bên cạnh đó, các con đường Wnt không kinh điển, bao gồm con đường Wnt/PCP (planar cell polarity) và Wnt/Ca²⁺, hoạt động độc lập với β -catenin. Các nhánh này chủ yếu tham gia điều hòa cực tính tế bào, tái cấu trúc bộ xương tế bào, di chuyển tế bào và tín hiệu canxi nội bào thông qua các phân tử trung gian như Rho GTPase, JNK và CaMKII [63].

Sự rối loạn điều hòa tín hiệu Wnt có liên quan mật thiết đến nhiều bệnh lý ở người, đặc biệt là ung thư, trong đó hoạt hóa bất thường Wnt/ β -catenin góp phần vào sinh ung, tiến triển khối u, duy trì tế bào gốc ung thư, xâm lấn, di căn và kháng điều trị. Ngoài ra, ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy tín hiệu Wnt còn tham gia điều hòa vi môi trường miễn dịch của khối u, ảnh hưởng đến chức năng tế bào T, đại thực bào và các cơ chế ức chế miễn dịch [64]. Do đó, các thành phần của con đường Wnt đang được xem là những đích điều trị tiềm năng trong ung thư và các bệnh lý viêm – miễn dịch.

1.5.5. Con đường tín hiệu JAK/STAT

Con đường tín hiệu JAK/STAT (Janus Kinase - Signal Transducer and Activator of Transcription) đóng vai trò quan trọng trong truyền tin nội bào, cho phép tế bào phản ứng nhanh chóng với các kích thích ngoại bào. Nó đóng vai trò đa đích, điều phối một mạng lưới rộng lớn các phản ứng sinh học bao gồm quá trình tạo máu, biệt hóa tế bào miễn dịch, kiểm soát chu kỳ tế bào và duy trì cân bằng nội môi.

Về mặt cấu trúc phân tử, hệ thống này gồm ba thành phần: các thụ thể cytokine xuyên màng, bốn kinase dòng Janus (JAK1, JAK2, JAK3, TYK2) và bảy yếu tố phiên mã STAT (1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6) [65]. Các protein JAK liên

kết với thụ thể tại các vùng giàu proline, sở hữu miền kinase JH1 chịu trách nhiệm xúc tác và miền pseudokinase JH2 đóng vai trò điều hòa. Thành phần STAT bao gồm miền SH2 quan trọng, cho phép chúng nhận diện các điểm phosphotyrosine và hình thành các cấu trúc dime hóa chức năng.

Cơ chế kích hoạt con đường tín hiệu (canonical pathway) bắt đầu khi các cytokine hoặc yếu tố tăng trưởng liên kết với thụ thể, thúc đẩy sự dime hóa hoặc thay đổi cấu hình thụ thể. Sự xích lại gần nhau của các đuôi thụ thể cho phép các JAK thực hiện quá trình phosphoryl hóa chéo (trans-phosphorylation) lẫn nhau, sau đó phosphoryl hóa các gốc tyrosine trên thụ thể để tuyển dụng STAT thông qua miền SH2. Khi được JAK kích hoạt tại các vị trí tyrosine then chốt (ví dụ Y705 ở STAT3 hoặc Y701 ở STAT1) [66], các STAT rời thụ thể, hình thành dime và vận chuyển vào nhân thông qua các protein importin để liên kết với các trình tự DNA đặc hiệu, từ đó khởi động chương trình phiên mã gen đích [67].

Bên cạnh con đường truyền tin truyền thống, các nghiên cứu hiện đại đã xác định những chức năng phi chính thống (non-canonical) của hệ thống này. Protein STAT ở trạng thái không phosphoryl hóa (U-STAT) có khả năng khu trú tại nhân để ổn định cấu trúc dị nhiễm sắc (heterochromatin) thông qua tương tác với protein HP1, từ đó điều hòa gián tiếp sự biểu hiện gen và ổn định bộ gen. Đặc biệt, một phần STAT3 còn khu trú tại ti thể, nơi nó được phosphoryl hóa tại vị trí serine S727 để điều hòa chuỗi truyền tín hiệu và duy trì trạng thái oxy hóa khử của tế bào, hỗ trợ sự sống sót của các dòng tế bào ung thư [68].

Để duy trì cân bằng sinh lý, con đường JAK/STAT được kiểm soát bởi các cơ chế điều hòa âm tính đa tầng. Họ protein SOCS hoạt động theo cơ chế điều hòa âm tính, trực tiếp ức chế hoạt tính kinase của JAK hoặc đánh dấu thụ thể cho sự phân hủy proteasome. Protein PIAS ngăn cản sự liên kết của STAT với DNA, trong khi các enzyme phosphatase thực hiện quá trình khử phosphoryl hóa để tắt tín hiệu tại cả bào tương và nhân.

Sự mất điều hòa của trục tín hiệu này là căn nguyên của nhiều bệnh lý phức tạp. Đột biến soma JAK2 V617F dẫn đến tình trạng hoạt hóa kinase liên tục không phụ thuộc phối tử, gây ra các bệnh lý tăng sinh tủy (MPNs) như đa hồng cầu nguyên phát và xơ tủy xương. Ở khía cạnh suy giảm miễn dịch, đột biến mất chức năng ở JAK3 gây ra hội chứng suy giảm miễn dịch kết hợp

nghiêm trọng (SCID) do khiếm khuyết trong phát triển tế bào T và NK. Ngược lại, đột biến ở STAT3 gây ra hội chứng Hyper-IgE (Job syndrome), làm gián đoạn sự biệt hóa tế bào Th17 và khiến bệnh nhân dễ nhiễm trùng nấm, vi khuẩn [69].

Việc ứng dụng phân tích tế bào cũng đang giúp lập bản đồ các tương tác JAK/STAT trong môi trường vi mô khối u, đặt nền móng cho các chiến lược y học cá thể hóa trong tương lai.

1.6. Một số hóa chất điều hòa hoạt động tế bào

Sự rối loạn trao đổi chất hay sự bất thường trong quá trình chuyển hóa được coi là một trong những cơ chế liên quan đến quá trình sinh ung thư. Chính vì vậy mà trong nhiều năm, việc tìm kiếm các tác nhân điều trị chống ung thư mới đã tập trung vào hai trong số nhiều đặc điểm của ung thư là sự tăng sinh không kiểm soát của chúng và khả năng trốn tránh sự chết theo chương trình. Thiên nhiên giúp cung cấp một nguồn đáng kể các hợp chất có hoạt tính sinh học với tiềm năng dược lý đa dạng giúp điều chỉnh cũng như kiểm soát sự phát triển của tế bào ung thư. Trong số các chất điều hòa ung thư có đến hơn 80% được phân lập từ thực vật, nấm và vi sinh vật [70]. Các phân tử tự nhiên hay phân tử sinh tổng hợp đều có thể giúp chống lại từng dấu hiệu ung thư. Các hợp chất điều hòa ung thư có thể là các thành phần thực phẩm được sử dụng hàng ngày hoặc là các vị thuốc đã được sử dụng từ rất lâu trong y học cổ truyền [71]. Vì thế, chúng mang đặc điểm thuận lợi về khả năng hấp thụ, cũng như chuyển hóa trong cơ thể.

Con đường tín hiệu tế bào là mạng lưới phức tạp của các phân tử truyền tải thông tin từ môi trường ngoại bào vào bên trong tế bào nhằm điều phối các quá trình sinh học như tăng sinh, biệt hóa, chuyển hóa và chết theo chương trình. Các chất điều hòa con đường tín hiệu tế bào, bao gồm protein, peptide, lipid và các phân tử nhỏ, đóng vai trò then chốt trong việc điều chỉnh hoạt động của các con đường tín hiệu này thông qua việc kích hoạt, ức chế hoặc điều biến chức năng của các thành phần trung gian. Những chất này có thể hoạt động tại nhiều mức độ: từ thụ thể màng (như EGFR, TLR) cho đến các kinase (như MAPK, PI3K/AKT), yếu tố phiên mã (NF- κ B, STAT) và cả các phân tử điều hòa âm tính như A20, Cezanne, hoặc CYLD. Bất thường trong sự điều hòa các con đường tín hiệu có thể dẫn đến sự mất kiểm soát tăng trưởng tế bào, kháng apoptosis và trốn tránh miễn dịch – những đặc điểm nổi

bật của ung thư. Do đó, việc nghiên cứu các chất điều hòa con đường tín hiệu tế bào không chỉ giúp hiểu rõ cơ chế bệnh sinh mà còn mở ra cơ hội phát triển các chiến lược điều trị nhắm trúng đích trong ung thư và các bệnh lý khác.

1.6.1. Doxorubicin

Doxorubicin (Dox) có cấu trúc phân tử ((7S,9S)-7-((2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxy-6,9,11-trihydroxy-9-(2-hydroxyacetyl)-4-methoxy-8,10-dihydro-7H-tetracene-5,12-dione), đây là một anthracycline deoxy hexoside được chiết xuất từ vi khuẩn *Streptomyces peucetius* var. *caesius* vào những năm 1970 và thường được sử dụng trong điều trị một số bệnh ung thư bao gồm ung thư vú, phổi, dạ dày, buồng trứng, tuyến giáp, u lympho không Hodgkin và Hodgkin, đa u tủy xương, sarcoma cũng như ung thư ở trẻ em [72]. Dox là một loại thuốc có nguồn gốc từ nhóm kháng sinh anthracycline, một chất xen kẽ có cấu trúc phẳng chứa naphthacenoquinone liên kết với daunosamine (một loại đường amin) thông qua liên kết glycosid. Sự hiện diện của chuỗi aliphatic đóng một vai trò quan trọng trong việc liên kết với chuỗi xoắn DNA.

Dox được sử dụng rộng rãi và mang lại hiệu quả cao trong việc điều trị các khối u ác tính về huyết học, khối u rắn và u lympho, chúng là một phần của nhóm hóa trị anthracycline [72]. Cơ chế tác động của Dox liên quan đến việc tạo chất oxy hóa và ức chế TOP2 trong tế bào ung thư, tuy nhiên nó cũng gây độc cho một số cơ quan [73]. Dox tạo ra các gốc oxy hóa mạnh (ROS-Reactive Oxygen Species) ở cả trong tế bào và ty thể. Khi sử dụng Dox với liều lượng cao trong một thời gian dài làm cho phản ứng ROS cũng tăng cao dẫn đến phân hủy lipid trên màng tế bào, giảm ATP, kích thích kênh protein xuyên màng mitochondrial permeability transition pore (mPTP) mở và gây ra giải phóng quá mức canxi vào trong bào tương. Những tác động này của ROS đều dẫn đến quá trình apoptosis của tế bào, chính vì thế việc bổ sung các chất chống oxy hóa sẽ làm giảm tác động quá mức của ROS khi sử dụng Dox. Cơ chế chính của Dox trong vai trò một tác nhân chống ung thư là khả năng liên kết với topoisomerase trong nhân tế bào ung thư [74]. Khi Dox liên kết với TOP2 β tạo thành phức hợp Dox -DNA-TOP2 β gây ra hiện tượng đứt gãy DNA sợi đôi và apoptosis ở tế bào. Ở bệnh nhân ung thư thì dường như Dox lại dễ dàng liên kết với TOP2 β hơn nên việc duy trì liều lượng sử dụng thuốc ở bệnh nhân là điều cần thiết để tránh tình trạng tích lũy thuốc gây độc cho tế

bào. Gen *TP53* là gen có vai trò quan trọng trong đáp ứng tổn thương của DNA và liên quan chặt chẽ với quá trình apoptosis, nó cũng được chỉ ra là có liên quan đến con đường tín hiệu gây nên hiện tượng chết ở tế bào gây ra bởi Dox. Một số nghiên cứu cũng chỉ ra *TP53* tăng cường hoạt động khi điều trị với các thuốc dòng anthracycline như Dox.

Dox là một trong những loại thuốc chống ung thư mạnh nhất khi được sử dụng hiện nay dù đơn lẻ hay được kết hợp với các loại thuốc khác với IC_{50} của nó chỉ khoảng từ 1 đến 5 micromolar. Nó được sử dụng hiệu quả trong việc điều trị các khối u rắn như u vú, ống mật, tuyến tiền liệt, tử cung, buồng trứng, thực quản, dạ dày và gan. Dox cũng được dùng để điều trị các bệnh ác tính về huyết học như sarcoma ác tính, sarcoma mô mềm, sarcoma Kaposi's cũng như bệnh bạch cầu dòng tủy [75].

Trong những năm đầu khi Dox được sử dụng lâm sàng, một số nghiên cứu lâm sàng giai đoạn II và III đã được thực hiện để đánh giá lợi ích của nó so với tác dụng phụ. Các tác dụng phụ thường gặp nhất liên quan đến việc sử dụng Dox bao gồm buồn nôn và nôn cấp tính, viêm miệng, rối loạn tiêu hóa, rụng tóc, hói đầu, rối loạn thần kinh (ảo giác, chóng mặt), gây độc đối với tim và suy tủy xương [76]. Tác dụng ức chế tủy xương của Dox có thể làm tăng tỷ lệ bệnh nhân bị nhiễm khuẩn, làm chậm lành vết thương và gây chảy máu ở nước. Tác dụng phụ chủ yếu của việc giới hạn liều khi sử dụng Dox là ức chế tủy với tình trạng giảm bạch cầu (chủ yếu là giảm bạch cầu hạt), giảm tiểu cầu và gây nên tình trạng thiếu máu, triệu chứng này thường đạt mức thấp nhất trong tuần điều trị thứ hai nhưng mức độ nghiêm trọng sẽ phụ thuộc vào liều lượng thuốc và khả năng tái tạo của tủy xương. Các nghiên cứu cũng báo cáo rằng việc sử dụng Dox có thể dẫn đến sự xuất hiện của chứng xơ cứng tĩnh mạch, đặc biệt là khi tiêm vào tĩnh mạch nhỏ hoặc tiêm nhiều lần vào một tĩnh mạch.

1.6.2. *Malloapelta C*

Malloapelta C (Mal C) là một diterpenoid tự nhiên được phân lập từ lá của cây *Malloapelta apelta* (tên tiếng Việt: cây Bùm bụp), thuộc họ Thầu dầu (Euphorbiaceae) – một họ thực vật vốn nổi tiếng với nhiều hoạt chất sinh học đa dạng. Hợp chất này có công thức phân tử $C_{18}H_{24}O_6$ và khối lượng phân tử là 336 Da.

Chi *Malloapelta* nói chung đã được báo cáo sở hữu nhiều hoạt tính sinh học quý giá như chống viêm, chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng nấm, điều hòa miễn dịch và kháng virus [77]. Trong số đó, *Malloapelta* C nổi bật với tiềm năng chống ung thư, đặc biệt thông qua các nghiên cứu độc tính tế bào. Các khảo sát sàng lọc bước đầu cho thấy *Malloapelta* C có khả năng ức chế trên 50% sự phát triển của các dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt (PC-3) và ung thư vú (MCF-7) tại nồng độ 30 μ M [78-80]. Những nghiên cứu tiếp theo đã xác định giá trị IC_{50} của *Malloapelta* C rất thấp (dưới 5 μ M) đối với nhiều dòng tế bào ung thư khác, cho thấy tính chất độc tế bào mạnh mẽ của hợp chất này. Các cơ chế tác động cụ thể tiềm năng của *Malloapelta* C chưa được làm rõ hoàn toàn, các nghiên cứu tiền lâm sàng và dữ liệu từ các chất liên quan trong chi *Mallotus* gợi ý một số cơ chế tiềm năng, bao gồm ức chế kênh ion ANO1, ức chế yếu tố phiên mã NF- κ B và hoạt hóa các con đường dẫn đến apoptosis [78-80].

1.6.3. SB203580

SB203580 được biết đến như một chất ức chế chọn lọc con đường truyền tín hiệu của protein kinase hoạt hóa bởi mitogen p38 (p38 MAPK)[81]. Ban đầu được phát triển bởi SmithKline Beecham (nay là GlaxoSmithKline) với mục tiêu ức chế tổng hợp cytokine gây viêm, SB203580 sau đó được xác định là một chất ức chế mạnh mẽ và chọn lọc đối với p38 MAPK, đặc biệt là các isoform α (SAPK2a/p38) và β (SAPK2b/p38 β 2). SB 203580 là một chất ức chế mạnh và chọn lọc của p38 MAPK, với giá trị IC_{50} dao động trong khoảng 50~100 nanomolar [81, 82].

Cơ chế tác động của SB203580 là thông qua việc gắn vào vùng liên kết ATP của p38 MAPK, từ đó ức chế quá trình phosphoryl hóa và truyền tín hiệu xuôi dòng thông qua MAPKAP kinase-2 (MK2) và protein sốc nhiệt 27 (HSP27) – hai tác nhân quan trọng trong điều hòa phản ứng viêm và stress tế bào. Tuy nhiên, SB203580 không ức chế quá trình phosphoryl hóa p38 MAPK bởi các kinase ở đầu của con đường tín hiệu như MKK3, MKK6 hoặc SEK3, phản ánh cơ chế chọn lọc nhắm vào hoạt tính kinase đã được kích hoạt thay vì ngăn chặn sự kích hoạt ban đầu. Do cơ chế ức chế cạnh tranh với ATP, hiệu quả ức chế của SB203580 có thể bị ảnh hưởng bởi nồng độ ATP nội bào, một yếu tố cần được cân nhắc trong các mô hình sinh học và nghiên cứu tiền lâm sàng [83]. Với công thức phân tử $C_{21}H_{16}FN_3OS$ và khối lượng

phân tử khoảng 377,4 g/mol, với cấu trúc lõi pyridinyl imidazole của nó đóng vai trò then chốt trong khả năng liên kết enzyme, trong khi các nhóm thế như fluorophenyl và methylsulfinylphenyl tăng cường tính đặc hiệu và ái lực liên kết. SB203580 là một công cụ dược lý học quan trọng trong nghiên cứu về viêm và stress tế bào. SB 203580 đã được thử nghiệm trên nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau, nhằm nghiên cứu vai trò của p38 MAPK trong sự phát triển, xâm lấn và di căn của khối u. Nó có thể điều chỉnh việc tiết các cytokine tiền viêm và các yếu tố phân giải protein liên quan đến sự tiến triển của ung thư [83].

1.6.4. Everolimus

Everolimus là một dẫn xuất rapamycin, có tác dụng ức chế miễn dịch và chống ung thư. Nó thuộc nhóm thuốc chống ung thư và cũng được phân loại là một liệu pháp nhắm đích, một chất ức chế kinase và một chất ức chế sự hình thành mạch máu. Bên cạnh đó, everolimus còn được biết đến với tên hóa học là 42-O-(2-hydroxyethyl) rapamycin và mã nghiên cứu RAD001 [84]. Everolimus là một chất ức chế mạnh và chọn lọc đối với mục tiêu rapamycin ở động vật có vú (mTOR - mammalian Target of Rapamycin) – một serine/threonine kinase giữ vai trò trung tâm trong quá trình điều hòa tăng trưởng, sinh sản và sống còn của tế bào [85]. Cơ chế tác động chính của Everolimus là thông qua việc liên kết với protein nội bào FKBP-12 (FK506-binding protein-12), từ đó hình thành một phức hợp thuốc–protein có khả năng ức chế trực tiếp phức hợp mTORC1 (mTOR Complex 1). Sự ức chế này ngăn cản quá trình phosphoryl hóa của các chất như S6 ribosomal protein kinase (S6K1) và eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1), dẫn đến sự ức chế tổng hợp protein và gián đoạn chu kỳ tế bào, đặc biệt là quá trình chuyển pha từ G1 sang S. Kết quả là sự tăng sinh tế bào bị chặn lại, đồng thời kích hoạt quá trình apoptosis [86]. Everolimus đã được chứng minh là có khả năng ức chế sự tăng sinh của nhiều dòng tế bào ung thư ở người trong các nghiên cứu in vitro, với giá trị IC₅₀ dao động từ dưới nanomolar đến micromolar tùy thuộc vào loại tế bào.

Ngoài tác dụng ức chế tăng sinh, Everolimus còn ức chế sự hình thành mạch máu thông qua việc giảm biểu hiện của yếu tố cảm ứng bởi tình trạng thiếu oxy, từ đó làm giảm nồng độ yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu [85]. Điều này góp phần hạn chế nguồn cung cấp dinh dưỡng và oxy đến các khối

u, đặc biệt hiệu quả trong điều trị các loại ung thư có xu hướng phụ thuộc mạnh vào quá trình hình thành mạch máu, như ung thư buồng trứng hoặc u thần kinh nội tiết. So với hợp chất gốc là apamycin, Everolimus có ưu điểm vượt trội về dược lý học bao gồm khả năng hòa tan trong nước tốt hơn, sinh khả dụng đường uống cao hơn và chọn lọc mạnh hơn đối với mTORC1, trong khi đó nó ít có tác động hơn đến mTORC2. Những đặc tính này làm cho Everolimus trở thành một tác nhân điều trị trúng đích hiệu quả, được ứng dụng rộng rãi trong lâm sàng đối với nhiều loại ung thư và rối loạn tăng sinh khác [85].

1.6.5. Wnt-C59

Wnt-C59 hay là C59 được biết đến là một chất ức chế tín hiệu Wnt mạnh mẽ. Cơ chế hoạt động chính của nó là ức chế enzyme Porcupine, một thành viên của họ membrane-bound O-acyltransferase [87], chịu trách nhiệm cho quá trình lipid hóa protein và tiết các protein Wnt. Bằng cách đó, Wnt-C59 điều hòa hiệu quả con đường tín hiệu Wnt, bao gồm cả các phân nhóm canonical và non-canonical. Wnt-C59 nổi bật nhờ hiệu lực rất cao ($IC_{50} = 74$ pM) và khả năng thấm qua màng tế bào, cùng với sinh khả dụng đường uống tốt. Hiệu lực cao này cho phép các nhà nghiên cứu sử dụng nồng độ thấp, giảm thiểu khả năng xảy ra các tác dụng không mong muốn ngoài mục tiêu, điều này đặc biệt quan trọng trong các nghiên cứu sinh học phức tạp.

Các nghiên cứu tiền lâm sàng đã chứng minh tiềm năng ứng dụng đa dạng của Wnt-C59 trong nhiều lĩnh vực bệnh lý, bao gồm ức chế sự phát triển của khối u trong các mô hình ung thư, thúc đẩy biệt hóa tế bào gốc trong y học tái tạo, cải thiện chức năng tim mạch và giảm xơ hóa, cũng như thể hiện tác dụng chống viêm. Wnt-C59 đã được nghiên cứu rộng rãi như một ứng cử viên thuốc chống ung thư, do vai trò của con đường Wnt trong sự phát triển khối u [88]. Các nghiên cứu tiền lâm sàng đã chỉ ra rằng Wnt-C59 có khả năng ngăn chặn sự tiến triển của các khối u vú trong các mô hình chuột chuyển gen *MMTV-WNT1*, đồng thời điều hòa giảm các gen đích của con đường Wnt/ β -catenin như β -catenin, CyclinD1 và c-Myc [88].

1.6.6. Nifuroxazide

Nifuroxazide là một dẫn xuất nitrofuran có lịch sử lâu đời được sử dụng như một loại thuốc kháng khuẩn đường ruột phổ rộng [89]. Tuy nhiên, những khám phá gần đây về khả năng ức chế con đường tín hiệu STAT3 đã

đưa Nifuroxazide trở thành một ứng viên sáng giá trong việc thử nghiệm thuốc để hỗ trợ điều trị ung thư và điều hòa miễn dịch [90].

Các nghiên cứu đột phá đã xác định hoạt chất này là một chất ức chế mạnh mẽ con đường tín hiệu STAT3, mở ra tiềm năng lớn trong điều trị ung thư và điều hòa miễn dịch. Nifuroxazide hoạt động bằng cách liên kết trực tiếp vào các túi bề mặt của protein STAT3 (đặc biệt tại các vị trí axit amin Lys591, Glu612 và Ser613), từ đó ngăn chặn sự phosphoryl hóa tyrosine tại vị trí Tyr705 thông qua việc ức chế các kinase thượng nguồn như JAK2 và Tyk2 [91]. Bên cạnh đặc tính kháng khuẩn, Nifuroxazide còn thể hiện khả năng chống ung thư đa mục tiêu, bao gồm ức chế dấu ấn tế bào gốc ung thư ALDH1, giảm biểu hiện của các protease di căn như MMP-2, MMP-9 và ngăn chặn sự tăng sinh mạch thông qua hạ thấp nồng độ VEGF [92].

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên nhóm bệnh nhân bao gồm 63 bệnh nhân bạch cầu cấp dòng tủy, 57 bệnh nhân bạch cầu cấp dòng lympho và 50 người khỏe làm nhóm đối chứng (Danh sách đối tượng tham gia nghiên cứu được trình bày trong Phụ lục I)

Mẫu máu ngoại vi của nhóm bệnh nhân và mẫu máu nhóm người khỏe đối chứng được thu thập từ bệnh Viện Huyết học và Truyền máu Trung Ương và Bệnh viện Quân y 103. Bệnh nhân bạch cầu cấp dòng tủy và bạch cầu cấp dòng lympho được xác định bởi các chuyên gia là các bác sĩ đến từ bệnh Viện Huyết học và Truyền máu Trung Ương để đảm bảo điều kiện nghiên cứu. Nhóm người khỏe đối chứng là những người khỏe mạnh tình nguyện tại Bệnh viện Quân y 103. Mỗi bệnh nhân sẽ được thu thập đầy đủ thông tin lâm sàng, cận lâm sàng để phục vụ cho quá trình nghiên cứu. Đồng thời, các tình nguyện viên tham gia nghiên cứu đều cho phép lấy mẫu theo đề cương của Hội Đồng Đạo 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 đối tượng nghiên cứu đều ký văn bản đồng ý tham gia nghiên cứu.

Tế bào tua được biệt hóa từ tế bào PBMC của người khỏe và bệnh nhân bạch cầu cấp.

**Tiêu chuẩn lựa chọn:*

- Nhóm bệnh nhân:
 - Bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh bạch cầu cấp dòng tủy, bệnh bạch cầu cấp dòng lympho cấp dựa vào lâm sàng và cận lâm sàng (tổng phân tích máu, sinh hóa máu, tủy đồ, sinh thiết tủy xương, chẩn đoán hình ảnh..., các kỹ thuật hóa học tế bào, miễn dịch, di truyền) và theo tiêu chuẩn của Bộ Y tế (2022).
 - Bệnh nhân được chẩn đoán lần đầu, chưa điều trị đặc hiệu bằng hóa trị, xạ trị hoặc liệu pháp nhắm đích tại thời điểm lấy mẫu nghiên cứu (ngoại trừ điều trị hỗ trợ).
 - Bệnh nhân có đầy đủ hồ sơ thông tin lâm sàng, cận lâm sàng.

- Bệnh nhân hoặc người giám hộ hợp pháp đồng ý tự nguyện tham gia nghiên cứu và ký văn bản chấp thuận tham gia nghiên cứu theo quy định đạo đức y sinh.
- Nhóm đối chứng:
 - Người khỏe mạnh được lựa chọn ngẫu nhiên, có sự tương đồng về tuổi, giới so với nhóm bệnh nhân, và đang không sử dụng các loại thuốc điều trị nào khác.
 - Không có biểu hiện lâm sàng gợi ý bệnh lý huyết học tại thời điểm thu nhận mẫu như sốt kéo dài không rõ nguyên nhân, thiếu máu, xuất huyết bất thường hoặc nổi hạch.
 - Không có tiền sử hoặc hiện tại không mắc bệnh lý ảnh hưởng đến hệ miễn dịch hoặc viêm mạn tính (như bệnh tự miễn, HIV, viêm gan B/C, lao).

** Tiêu chuẩn loại trừ:*

- Nhóm bệnh nhân:
 - Bệnh nhân không có đầy đủ thông tin lâm sàng, cận lâm sàng.
 - Đã hoặc đang được điều trị tại thời điểm thu thập mẫu nghiên cứu.
 - Bệnh nhân mắc bệnh lý ác tính, bệnh lý cấp tính, bệnh lý tự miễn, nhiễm trùng nặng hoặc nhiễm vi rút mạn tính (như HIV, viêm gan B, viêm gan C) hoặc tiền sử ung thư trong vòng năm năm gần đây.
 - Có bệnh lý nội khoa nặng (như suy gan, suy thận giai đoạn cuối, suy tim nặng, rối loạn đông máu nghiêm trọng) làm ảnh hưởng đến khả năng tham gia nghiên cứu hoặc độ tin cậy của các kết quả xét nghiệm.
 - Bệnh nhân không đồng ý tham gia nghiên cứu hoặc rút lui khỏi nghiên cứu trong quá trình thực hiện.
- Nhóm đối chứng:
 - Không đồng ý tham gia nghiên cứu và đang mắc các bệnh cấp tính, mạn tính.
 - Có rối loạn huyết học hoặc miễn dịch được phát hiện qua thăm khám hoặc xét nghiệm sàng lọc.

- Đang sử dụng thuốc ảnh hưởng đến hệ miễn dịch hoặc tạo máu trong vòng 3 tháng trước khi lấy mẫu.

2.1.2. Hóa chất

Hóa chất và thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu đều đạt tiêu chuẩn quốc tế và được sản xuất tại Châu Âu, Mỹ như: Sigma, Qiagen, Thermo scientific, Biolegend...

**Hóa chất dùng cho sinh học phân tử:*

Hóa chất dùng cho tách chiết RNA tổng số được thực hiện bằng TRIzol™ Plus RNA Purification Kit (Invitrogen, Hoa Kỳ). Phản ứng tổng hợp cDNA sử dụng RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Hoa Kỳ). Phản ứng qRT-PCR sử dụng qPCR Master Mix nồng độ 2X (New England BioLabs, Anh). Các cặp mồi đặc hiệu cho gen *A20*, *CYLD*, *STAT1*, *STAT3*, *MTOR*, *MAPKp38*, *AKT1*, *ERK*, *WNT1* và *WNT3* được tổng hợp bởi Công ty Phù Sa Biochem (Việt Nam). Nước khử nuclease (DEPC) để đảm bảo môi trường không chứa RNase (Thermo, Hoa Kỳ).

** Môi trường và hóa chất nuôi cấy tế bào:*

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi được phân lập bằng dung dịch Ficoll-Paque™ PREMIUM (hãng Cytiva, Thụy Điển). Tế bào được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 (hãng Gibco, Hoa Kỳ) được bổ sung FBS, L-glutamine, Penicillin/Streptomycin, cùng với dung dịch axit amin không thiết yếu nồng độ 1X (MEM Non-Essential Amino Acids Solution) đều được mua của hãng Gibco, Hoa Kỳ. Dung dịch đệm phosphate saline 1X (PBS, được mua của hãng Gibco, Hoa Kỳ) được sử dụng để rửa và pha loãng tế bào trong suốt quá trình thí nghiệm. Các chất xử lý trong nuôi cấy tế bào như Malloapelta C được tài trợ bởi PGS. TS. Nguyễn Xuân Nhiệm – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Doxorubicin (được mua của hãng Ebewe Pharma, Áo), Everolimus, SB203580, Wnt-C59, IL-6 và Nifuroxazide đều được mua của hãng Sigma, Mỹ.

** Kháng thể và hóa chất được dùng cho kỹ thuật Flow cytometry:*

Dung dịch đệm FACS được chuẩn bị từ dung dịch PBS 1X và FBS. Các kháng thể đơn dòng gắn huỳnh quang được sử dụng bao gồm: kháng thể CD117 APC, kháng thể CD4 FITC, kháng thể CD13 PE, kháng thể CD56 PE, kháng thể CD40 APC, kháng thể CD44 FITC, kháng thể CD3 PE, kháng thể CD25 gắn APC và kháng thể FoxP3 PE đều được mua của hãng Thermo

Fisher Scientific (Hoa Kỳ). Đánh giá tế bào chết sử dụng kháng thể Annexin V gắn FITC kết hợp với thuốc nhuộm Propidium Iodide (PI) đều được mua của hãng Thermo Fisher Scientific (Hoa Kỳ).

** Bộ kit ELISA:*

Bộ Kit Human IL-6 ELISA, TNF- α Human ELISA, Human TGF- β ELISA, Human TGF- β ELISA, Human IL-35 ELISA (được mua của hãng Invitrogen, Mỹ).

** Các dung dịch khác:*

Dung dịch EDTA 0,5M (hãng BioBasic, Canada); Dung dịch ly giải hồng cầu RBC-lysis buffer ($\text{NH}_4\text{Cl}/\text{KHCO}_3/\text{EDTA}$) (Sigma, Đức).

2.1.3. Địa điểm và thiết bị nghiên cứu

** Địa điểm nghiên cứu:* Nghiên cứu được thực hiện trong thời gian từ tháng 5 năm 2021 đến tháng 5 năm 2025 tại Phòng Hệ gen học Miễn dịch, Viện nghiên cứu hệ gen (cũ), nay là Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen, Viện Sinh học – 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 pipet đơn kênh và đa kênh (Eppendorf, Đức);
- Máy lắc Vortex (IKA, Đức);
- Máy khuấy từ gia nhiệt (IKA, Đức);
- Máy đo quang phổ NanoDrop Lite (Thermo, Mỹ);
- Hệ thống máy Realtime PCR (Roche, Mỹ);
- Máy ly tâm tốc độ cao (Biorad, Đức);
- Tủ ấm 37°C + CO₂ (Thermo, Mỹ);
- Máy đọc đĩa ELISA tự động (Bio-Tex, Mỹ);
- Hệ thống máy phân tích Flow cytometry (FACS Aria Fusion, Hãng BD Biosciences, Mỹ)
- Đầu côn pipet vô trùng các loại, ống ly tâm Eppendorf 1.5 mL, ống ly tâm Eppendorf 2.0 mL, ống falcon 15 mL, ống falcon 50 mL, đĩa nuôi cấy tế bào.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu

- Nghiên cứu mô tả cắt ngang kết hợp thực nghiệm *in vitro*.
- Phương pháp chọn mẫu: lấy mẫu thuận tiện.

2.2.2. Phương pháp thu mẫu

Tiến hành thu 5 mL mẫu máu từ bệnh nhân tham gia nghiên cứu, thủ thuật lấy máu được thực hiện bởi các y bác sĩ chuyên trách, sau đó mẫu máu được cho vào ống lưu mẫu chứa chất chống đông K2 EDTA - 0,5 M. Mẫu thu được sẽ bảo quản ở 4°C, sau đó được vận chuyển đến phòng thí nghiệm để xử lý các bước tiếp theo và bảo quản mẫu.

2.2.3. Thu thập thông tin lâm sàng, cận lâm sàng

Thông tin lâm sàng, cận lâm sàng của người tham gia nghiên cứu được lấy từ các kết quả xét nghiệm đã được thực hiện tại bệnh Viện Huyết học và Truyền máu Trung Ương và Bệnh viện Quân y 103, thông được điền vào mẫu bệnh án nghiên cứu và lưu trữ (mẫu bệnh án nghiên cứu được mô tả tại Phụ lục II).

2.2.4. Phân loại tiên lượng theo hướng dẫn của Hội Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ và Liên đoàn Ung thư Châu Âu.

Công thức nhiễm sắc thể (Karyotype) của bệnh nhân được xác định trên tiêu bản bằng phương pháp nhuộm Giemsa và nhuộm băng G nhằm phát hiện bất thường nhiễm sắc thể, như được mô tả chi tiết tại nghiên cứu của Sato và cộng sự [93]. Xét nghiệm này được thực hiện theo quy trình tiêu chuẩn của Khoa Di truyền học phân tử, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương. Sau khi đánh giá, bệnh nhân được phân vào nhóm nguy cơ theo Liên đoàn Ung thư Châu Âu (ELN - European Leukemia Net) hoặc Hướng dẫn của Hội Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (NCCN Guidelines - National Comprehensive Cancer Network Guidelines) tương ứng được mô tả tại Bảng 2.1 và Bảng 2.2.

Bảng 2.1: Bảng phân nhóm tiên lượng theo ELN và NCCN đối với bệnh nhân bạch cầu cấp dòng tủy

Nhóm tiên lượng	Bất thường về công thức nhiễm sắc thể/di truyền
Tiên lượng tốt	$\text{inv}(16)(\text{p13.1q22})/\text{RUNX1}$ $\text{t}(16;16)(\text{p13.1;q22})$ hoặc $\text{t}(8;21)(\text{q22;q22.1})/\text{CBFB}$ Đột biến NPM1 không đi kèm FLT3-ITD bZIP CEBPA đột biến
Tiên lượng trung bình	$\text{t}(9;11)(\text{p21.3;q23.3})$ đột biến FLT3-ITD karyotype bình thường hoặc các bất thường không thuộc phân loại tiên lượng tốt và tiên lượng xấu
Tiên lượng xấu	$\text{t}(6;9)(\text{p23;q34.1})/\text{DEK}::\text{NUP214}$ $\text{t}(v;11\text{q23.3})/\text{KMT2A}$ $\text{t}(9;22)(\text{q34.1;q11.2})/\text{BCR-ABL1}$ $\text{t}(8;16)(\text{p11.3;p13.3})/\text{KAT6A}::\text{CREBBP}$ $\text{inv}(3)(\text{q21.3q26.2})$ hoặc $\text{t}(3;3)(\text{q21.3;q26.2})/\text{GATA2, MECOM(EVI1)}$ -5, del(5q), -7, -17 hoặc bất thường 17p, Karyotype phức tạp: Được định nghĩa là có ≥ 3 bất thường nhiễm sắc thể trở lên (không tính các nhóm đã định nghĩa riêng biệt), đây là một chỉ dấu độc lập cho tiên lượng xấu.

Bảng 2.2: Bảng phân nhóm tiên lượng theo NCCN đối với bệnh nhân bạch cầu cấp dòng lympho

Nhóm tiên lượng	Bất thường về công thức nhiễm sắc thể/di truyền
Tiên lượng trung bình	Siêu tam bội (51–65 nhiễm sắc thể). Các trường hợp có tam nhiễm (trisomy) các nhiễm sắc thể 4, 10, và 17 t(12;21)(p13;q22)/ETV6::RUNX1 t(1;19)(q23;p13.3)/TCF3::PBX1 t(9;22)(q34;q11.2)/BCR-ABL1 hoặc karyotype bình thường
Tiên lượng xấu	Giảm bội (<44 nhiễm sắc thể) t(4;11) Đột biến TP53 Tái sắp xếp gen IgH Tái sắp xếp gen HLF Tái sắp xếp gen ZNF384 Tái sắp xếp gen MEF2D Tái sắp xếp gen MYC BCR-ABL1 p190/p210/MLL-AF4 Karyotype phức tạp: Được định nghĩa là có ≥ 5 bất thường nhiễm sắc thể trở lên (không tính các nhóm đã định nghĩa riêng biệt), đây là một chỉ dấu độc lập cho tiên lượng xấu.

2.2.5. Phân lập tế bào đơn nhân máu ngoại vi

Mẫu máu của bệnh nhân tham gia nghiên cứu thu được thông qua phương pháp lấy máu tĩnh mạch bao gồm có nhiều loại tế bào khác nhau như tế bào bạch cầu, hồng cầu và tiểu cầu. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC-peripheral blood mononuclear cell) là những tế bào chỉ có một nhân tròn và nó đóng vai trò quan trọng trong hệ thống miễn dịch của cơ thể. PBMC bao gồm tế bào lympho T, tế bào lympho B, đại thực bào/bạch cầu đơn nhân và một lượng ít tế bào tua. PBMC được chọn làm mục tiêu tham gia vào nhiều nghiên cứu về cơ chế cũng như chức năng của hệ thống miễn dịch trong các bệnh tự miễn, ung thư và liệu pháp miễn dịch [38].

**Các bước tiến hành thí nghiệm*

Quá trình phân lập tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được thực hiện bằng phương pháp ly tâm tỷ trọng sử dụng dung dịch Ficoll-Paque. Đầu tiên, 5 mL mẫu máu toàn phần có chứa EDTA được bảo quản tại 4°C, được đưa về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành. Mẫu được ly tâm sơ bộ tại 1500 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng để tách huyết tương; phần dịch nổi màu vàng phía trên được thu hồi vào ống Eppendorf 2 mL vô trùng, bảo quản tại -20°C cho các phân tích cytokine sau này.

Phần máu còn lại được pha loãng với dung dịch đệm PBS 1X (pH 7,2) theo tỷ lệ 1:2 để làm giảm độ nhớt của máu, tạo điều kiện tối ưu cho quá trình tách lớp. Tiếp theo, 10 mL hỗn hợp máu đã pha loãng được thả nhẹ nhàng lên bề mặt 5 mL dung dịch Ficoll trong ống falcon 15 mL. Mẫu sau đó được ly tâm ở 1200 vòng/phút trong 30 phút tại 20°C, lưu ý thiết lập chế độ giảm tốc không phanh (brake-off).

Kết thúc quá trình ly tâm, lớp tế bào PBMC màu trắng đục nằm giữa lớp huyết tương pha loãng và ficoll được thu nhận cẩn thận bằng pipet sang một ống falcon 15 mL mới. Tế bào thu được được rửa hai lần bằng 500 mL dung dịch PBS 1X nhằm loại bỏ hoàn toàn các tạp chất và hóa chất dư thừa; mỗi lần rửa tiến hành ly tâm ở tốc độ 1200 vòng/phút trong 10 phút. Cuối cùng, dịch nổi được loại bỏ hoàn toàn, tủa tế bào PBMC ở đáy ống được huyền phù trong môi trường phù hợp hoặc dung dịch bảo quản tùy theo mục đích thực nghiệm kế tiếp. Sau khi phân lập, số lượng và tỷ lệ tế bào sống được xác định bằng phương pháp nhuộm trypan blue trên buồng đếm tế bào để đảm bảo chất lượng mẫu cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.6. Phân lập và nuôi cấy tế bào tua từ tế bào PBMC

Tế bào tua từ bệnh nhân được biệt hóa từ tế bào bạch cầu đơn nhân bằng cách sử dụng FMS-like Tyrosine Kinase 3 Ligand (FLT3L) (Miltenyi Biotec, Đức). Quần thể tế bào sau biệt hóa được phân tích dựa trên biểu hiện đồng thời của CD11c và CD123. Trong đó, quần thể CD11c⁺CD123⁺ được xác định là quần thể DC và được sử dụng cho các phân tích tiếp theo. Việc đánh giá đồng thời CD11c và CD123 nhằm xác định sự hình thành quần thể tế bào có kiểu hình phù hợp với DC sau quá trình biệt hóa. Bên cạnh việc xác định kiểu hình DC, biểu hiện của các phân tử đồng kích thích CD40 và CD86 trên quần thể CD11c⁺CD123⁺ được phân tích nhằm đánh giá mức độ trưởng

thành/hoạt hóa của DC. Sự biệt hóa được xem xét dựa trên sự hình thành và gia tăng rõ rệt của quần thể $CD11c^+CD123^+$ sau quá trình biệt hóa so với quần thể tế bào trước biệt hóa/đối chứng tương ứng. Kết quả được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ phần trăm (%) tế bào $CD11c^+CD123^+$ và được minh họa bằng biểu đồ dot plot/histogram của kết quả flow cytometry. Sự biểu hiện CD40 và CD86 trên quần thể $CD11c^+CD123^+$ được sử dụng như bằng chứng bổ sung về trạng thái trưởng thành/hoạt hóa của DC.

**Các bước tiến hành thí nghiệm*

Tế bào PBMC sau khi phân lập bằng phương pháp ly tâm tỷ trọng ở phía trên được chuyển sang ống falcon 15 mL vô trùng mới để thực hiện các bước nuôi cấy tiếp theo. Đầu tiên, tế bào được rửa bằng 10 mL môi trường nuôi cấy RPMI 1640, ly tâm ở tốc độ 1200 vòng/phút trong 8 phút tại nhiệt độ phòng. Sau khi loại bỏ dịch nổi, cặn tế bào được huyền phù trong 10 mL môi trường nuôi cấy RPMI 1640 hoàn chỉnh (được bổ sung 10% FBS, 1% L-glutamin, 1% penicillin-streptomycin và 1% axit amin không thiết yếu).

Số lượng và tỉ lệ sống của tế bào PBMC được xác định bằng phương pháp nhuộm trypan blue 0,4% trên buồng đếm hồng cầu trước khi xử lý. Tế bào sau đó được chia đều vào các đĩa nuôi cấy với mật độ định mức khoảng 4×10^6 tế bào/mL. Để kích thích quá trình biệt hóa thành tế bào tua, FLT3L (100 ng/mL) được bổ sung trực tiếp vào môi trường nuôi cấy. Hệ thống nuôi cấy được duy trì ổn định trong tủ ấm tại điều kiện 37°C và 5% CO_2 .

Trong suốt quá trình nuôi cấy kéo dài 7 ngày, môi trường nuôi cấy được thay mới định kỳ mỗi 3 ngày bằng môi trường nuôi cấy RPMI 1640 hoàn chỉnh mới để đảm bảo cung cấp đầy đủ dinh dưỡng cho tế bào. Vào ngày thứ 7, các tế bào tua biệt hóa được thu nhận bằng cách cạo nhẹ bề mặt đĩa và chuyển vào ống falcon 15 mL, tiếp theo là bước ly tâm tại 1200 vòng/phút trong 8 phút để thu tế bào.

Cuối cùng, các tế bào tua thu nhận từ bệnh nhân được chia đều để xử lý theo 6 điều kiện khác nhau: (1) Đối chứng, (2) Malloapelta C 20 μM [78-80], (3) Doxorubicin 5 μM [94], (4) Malloapelta C + Everolimus 10 μM [95], (5) Malloapelta C + SB203580 10 μM [96] và (6) Doxorubicin 5 μM + Wnt C59 10 μM [97]. Sau khi bổ sung với các chất, tế bào tiếp tục được nuôi và thu sau 24 giờ nuôi cấy.

Trong nghiên cứu này, Doxorubicin và Malloapelta C được xác định là hai nhân tố chính nghiên cứu vai trò của một số gen tín hiệu điều hòa hoạt động của tế bào tua ở bệnh nhân bạch cầu cấp dòng lympho. Dox một thuốc hóa trị đã được sử dụng rộng rãi và Mal C là một chất tự nhiên có tiềm năng điều hòa miễn dịch lên chức năng của tế bào tua ở bệnh bạch cầu cấp. Trong thiết kế nghiên cứu, các tế bào DC được xử lý trực tiếp với Dox hoặc Mal C và đánh giá các chỉ tiêu về biểu hiện gen tín hiệu, trưởng thành, thực bào và apoptosis.

Ngược lại, Everolimus, SB203580 và Wnt-C59 được sử dụng như các công cụ dược lý để kiểm chứng vai trò của từng con đường tín hiệu. Cụ thể, Everolimus được sử dụng để ức chế con đường mTOR, trong khi SB203580 được sử dụng để ức chế MAPK p38. Hai chất này được phối hợp riêng với Malloapelta C nhằm xác định liệu tác động của Malloapelta C lên quá trình trưởng thành và thực bào của DC có phụ thuộc vào mTOR và MAPK p38 hay không. Thiết kế này cho phép so sánh trực tiếp nhóm Malloapelta C với nhóm Malloapelta C kết hợp chất ức chế, thay vì xem bản thân Everolimus hoặc SB203580 là các tác nhân điều trị cần khảo sát. Tương tự, Wnt-C59 được sử dụng với mục đích xác nhận vai trò của con đường Wnt trong tác động của Doxorubicin.

2.2.7. Tách chiết RNA và tổng hợp cDNA

Sau khoảng 08 ngày nuôi cấy, tiến hành thu tế bào đã nuôi cấy vào ống falcon 15 mL và tiến hành tách chiết RNA. Quá trình ly giải tế bào được thực hiện bằng cách bổ sung 1 mL trizol reagent. Mẫu được vortex mạnh hoặc hút nhả liên tục bằng pipet nhằm đảm bảo phá vỡ cấu trúc tế bào và giải phóng vật chất di truyền. Tiếp theo, 200 μ L chloroform được bổ sung và trộn đều để phân tách các pha. Hỗn hợp sau đó được ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong 10 phút tại 4°C để tách lớp; pha nước chứa RNA ở phía trên được thu nhận cẩn thận sang một ống Eppendorf mới.

RNA tổng số được kết tủa bằng cách bổ sung 600 μ L isopropanol, trộn đều và ủ tại -20°C trong 30 phút. Sau khi ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong 10 phút tại 4°C, dịch nổi được loại bỏ để thu nhận tủa RNA ở đáy ống. Tủa RNA tiếp tục được rửa hai lần bằng 1 mL ethanol 75% để loại bỏ muối dư và tạp chất hữu cơ. Sau lần rửa cuối cùng, toàn bộ ethanol được loại bỏ và tủa được để khô tự nhiên trong không khí từ 5-10 phút trước khi hòa tan trong 30 μ L

nước không chứa nuclease (nuclease-free water). Sản phẩm RNA tổng số sau khi chiết tách được bảo quản ổn định tại -80°C cho các phân tích kế tiếp.

Sản phẩm RNA tổng số được sử dụng làm khuôn để tổng hợp cDNA thông qua phản ứng phiên mã ngược theo đúng hướng dẫn khi sử dụng kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Hoa Kỳ). Một lượng RNA tương đương 500 ng được pha loãng với nước không chứa nuclease trong ống PCR 0,2 mL để đạt tổng thể tích 12,5 μL . Phản ứng tổng hợp được thiết lập bằng cách bổ sung lần lượt các thành phần bao gồm: 4 μL đệm phản ứng 10X, 2 μL hỗn hợp dNTP (10 mM mỗi loại), 0,5 μL chất ức chế RNase, và cuối cùng là 1 μL enzyme phiên mã ngược. Hỗn hợp được trộn đều bằng pipet và ly tâm nhanh (spin down) để đảm bảo toàn bộ thành phần tập trung ở đáy ống. Phản ứng tổng hợp cDNA được thực hiện trên máy chu trình nhiệt tại 42°C trong 60 phút. Sau đó, enzyme phiên mã ngược được bất hoạt bằng cách tăng nhiệt độ lên 72°C trong 10 phút để kết thúc phản ứng. Sản phẩm cDNA thu được được lưu trữ tại -80°C để tiến hành phân tích biểu hiện gen sau này.

2.2.8. Phản ứng qRT-PCR

Các mẫu cDNA được sử dụng để xác định biểu hiện của các gen được thực hiện với các thành phần được mô tả trong Bảng 2.3.

Bảng 2.3: Thành phần phản ứng qRT-PCR

Thành phần phản ứng	Thể tích phản ứng (μL)
qLuna Master mix	10
Môi xuôi	0,5
Môi ngược	0,5
Nước DEPC	7
cDNA	2
Tổng thể tích	20 μL

Chu trình nhiệt của phản ứng được thực hiện theo các điều kiện lần lượt là: làm nóng mẫu đến 95°C trong 10 giây, làm nguội đến 60°C trong 10 giây và tăng dần nhiệt độ từ 60°C đến 95°C với tốc độ $0,1^{\circ}\text{C}/\text{giây}$, với việc thu tín hiệu huỳnh quang liên tục. Quy trình này cho phép xác định nhiệt độ nóng chảy (T_m) của các sản phẩm PCR cụ thể và phát hiện các cặp môi (trình tự các cặp môi được thể hiện trong Bảng 2.4)

Bảng 2.4: Các trình tự mỗi đặc hiệu được sử dụng

Mỗi	Trình tự mỗi
<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'-TGTGTTTGTGCCCAGAATGT-3'
<i>STAT-5</i>	F-5'-CAGACCAAGTTTGCAGCCAC-3'
	R-5'-CACAGCACTTTGTCAGGCAC-3'
<i>STAT-6</i>	F-5'-GCCCCACTCACTCCAGAGGACCT-3'
	R-5'-GGTGTTGGGGAAAGTCGACAT-3'
<i>GAPDH</i>	F-5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAA-3'
	R-5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCAT-3'
<i>WNT1</i>	F-5'-ATCTTCGCTATCACCTCCGC-3'
	R-5'-GGCCGAAGTCAATGTTGTGCG-3'
<i>WNT3</i>	F-5'-TGA CT CGCATCATAAGGGGC-3'
	R-5'-GCCTCGTTGTTGTGCTTGTT-3'
<i>ERK</i>	F-5'-CCCAAATGCTGACTCCAAAGC-3'
	R-5'-GCTCGTCACTCGGGTCGTAAT-3'
<i>AKT1</i>	F-5'-CAGGATGTGGACCAACGTGA-3'
	R-5'-AAGGTGCGTTCGATGACAGT-3'
<i>MTOR</i>	F-5'-TTCCGACCTTCTGCCTTCAC-3'
	R-5'-CCACAGAAAGTAGCCCCAGG-3'
<i>MAPKp38</i>	F-5'-ATGCCGAAGATGAACTTTGC-3'
	R-5'-TCTTATCTGAGTCCAATACAAGCATC-3'

Để đảm bảo độ tin cậy, mỗi mẫu đều được thực hiện hai lần lặp lại độc lập, và giá trị ΔC_t trung bình được sử dụng trong phân tích. Đối với những

mẫu không lên tín hiệu hoặc tín hiệu khuếch đại không xuất hiện, giá trị Ct được lấy là 45, tương ứng với số chu kỳ tối đa của phản ứng (điều này tương tự với một số nghiên cứu đã công bố [98] nhằm đảm bảo số liệu trong xử lý dữ liệu).

2.2.9. Biến nạp plasmid

Để đánh giá tác động của việc biểu hiện quá mức gen A20 trên tế bào non bạch cầu, dòng tế bào THP-1 (ATCC -TIB-202, American Type Culture Collection, Mỹ) được sử dụng và tiến hành biến nạp với plasmid pGEM-T easy-A20 hoặc plasmid đối chứng pGEM-T easy (Promega) bằng lipofectamine™ 2000, theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất.

Cụ thể, 1 µg plasmid pGEM-T easy-A20 hoặc pGEM-T easy được pha loãng trong 1 mL môi trường nuôi cấy RPMI 1640 không chứa kháng sinh và không chứa FBS, sau đó trộn đều với 5 µL lipofectamine™ 2000 đã được pha loãng thích hợp. Trộn đều dung dịch plasmid đã pha loãng với dung dịch lipofectamine, ủ hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong khoảng 20 phút để hình thành phức hợp liposome-DNA bền vững.

Bổ sung từ từ hỗn hợp phức hợp trên vào đĩa nuôi cấy tế bào (chứa 2 mL môi trường nuôi cấy RPMI 1640, mật độ tế bào đạt 5×10^5 tế bào/mL) sao cho nồng độ plasmid cuối cùng đạt 1 µg/mL. Sau biến nạp, tế bào được xử lý với IL-6 (50 ng/mL; Sigma) trong điều kiện có hoặc không có Nifuroxazide (10 µM; Sigma-Aldrich).

Sau 24 giờ biến nạp, tế bào được thu nhận và mức độ biểu hiện của gen A20 được đánh giá bằng phương pháp qRT-PCR nhằm xác nhận hiệu quả của quá trình biến nạp và biểu hiện quá mức gen A20.

2.2.10. Phương pháp flow cytometry

2.2.10.1 Phương pháp flow cytometry đánh giá hoạt động của các tế bào miễn dịch

Trạng thái trưởng thành của tế bào T và tế bào NK là yếu tố quan trọng trong hệ thống miễn dịch, ảnh hưởng đến khả năng phản ứng của cơ thể đối với các tác nhân gây bệnh. Các cụm biệt hóa tế bào như CD56, CD44, CD3+CD4+CD25+FoxP3+ (Treg) và CD13+CD117+ được sử dụng để đánh giá trạng thái trưởng thành của những tế bào này [99-101]. Hoạt động của các quần thể tế bào miễn dịch được đánh giá dựa trên tỷ lệ phần trăm (%) tế bào

duy tính với các marker đặc hiệu trong tổng số tế bào được phân tích. Sự gia tăng hoặc giảm có ý nghĩa thống kê của các cụm biệt hóa tế bào này giữa nhóm xử lý và nhóm đối chứng được sử dụng làm tiêu chí đánh giá sự thay đổi hoạt động của quần thể tế bào miễn dịch.

**Các bước tiến hành thí nghiệm:*

Đầu tiên, tế bào PBMC từ bệnh nhân bạch cầu cấp được phân lập bằng kỹ thuật ly tâm gradient tỷ trọng với ficoll-paque theo quy trình chuẩn. Sau khi phân lập, số lượng tế bào và tỷ lệ sống sót được đánh giá chính xác thông qua phương pháp nhuộm với trypan blue.

Tiếp theo, tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS (dung dịch đệm PBS có bổ sung 5% FBS). Tiếp theo, tế bào được điều chỉnh về mật độ 10^5 tế bào/mL và tiến hành ủ với các kháng thể kháng CD117 APC, CD4 FITC, CD13 PE, CD56 PE, CD40 APC, CD44 FITC, CD3 PE, CD25 APC và FoxP3 PE (bằng cách bổ sung 10 μ L kháng thể vào 100 μ L dung dịch đệm chứa 10^6 tế bào). Quá trình nhuộm kháng thể được thực hiện trong điều kiện thiếu sáng ở 4°C trong vòng 1 giờ.

Sau thời gian ủ, mẫu tế bào tiếp tục được rửa hai lần bằng 500 μ L dung dịch đệm FACS. Cuối cùng, tủa tế bào được hòa huyền phù trong 200 μ L dung dịch đệm FACS và đưa vào hệ thống máy đo tế bào dòng chảy để phân tích. Dữ liệu thu được sẽ cung cấp thông tin chi tiết về tỷ lệ và đặc tính các quần thể tế bào mục tiêu trong mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân.

2.2.10.2 Phương pháp flow cytometry đánh giá hoạt động thực bào

Thuốc nhuộm huỳnh quang CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) được dùng để kiểm tra đánh giá hoạt động thực bào của tế bào tua. CFSE là loại thuốc nhuộm huỳnh quang thấm qua màng. Khi thuốc nhuộm khuếch tán vào tế bào, nhóm succinimidyl của nó liên kết cộng hóa trị với lysine nội bào và nhóm amin chính tự do khác, tạo ra huỳnh quang màu xanh lá cây. Liên kết ổn định này đảm bảo duy trì thuốc nhuộm trong tế bào sau khi nhuộm và không bị rò rỉ vào các tế bào xung quanh. Ưu điểm này của CFSE đã giúp cho nó được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu sử dụng kính hiển vi huỳnh quang hoặc phương pháp flow cytometry để nghiên cứu sự phân chia, tăng sinh và di chuyển tế bào. Việc sử dụng CFSE để nhuộm với tế bào ung thư trước khi nó được ủ với tế bào tua giúp cho việc theo dõi quá trình

hoạt động thực bào diễn ra dễ dàng hơn, do CFSE có đặc tính không tương tác với kháng nguyên bề mặt [102].

Hoạt động thực bào của tế bào tua được xác định dựa trên tỷ lệ tế bào tua dương tính với CFSE sau thời gian nuôi cấy với tế bào đích đã được nhuộm CFSE. Quần thể tế bào tua được xác định dựa trên kiểu hình CD11c⁺CD123⁺. Các tế bào CD11c⁺CD123⁺CFSE⁺ được xem là quần thể tế bào tua đã thu nhận tế bào đích và được sử dụng để đánh giá hoạt động thực bào. Chỉ số chính được sử dụng để đánh giá là tỷ lệ phần trăm CD11c⁺CD123⁺CFSE⁺ trong quần thể DC. Giá trị này càng cao phản ánh tỷ lệ tế bào tua có khả năng thực bào càng lớn.

**Các bước tiến hành thí nghiệm:*

Chuẩn bị quần thể tế bào tua trưởng thành: Các tế bào DC sau 8 ngày nuôi cấy biệt hóa từ PBMC với FLT3L và được xử lý theo các điều kiện (Đôi chúng, Malloapelta C 20 μ M; và Doxorubicin 5 μ M) được thu vào ống falcon 15 mL vô trùng. Tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm PBS 1X, ly tâm ở tốc độ 1500 vòng/phút trong 7 phút tại nhiệt độ phòng. Sau khi làm sạch, mật độ tế bào DC được điều chỉnh về mức 10^6 tế bào/mL.

Chuẩn bị tế bào đích: Tế bào non được phân lập từ bệnh nhân bạch cầu cấp được sử dụng làm tế bào đích. Sau khi rửa sạch hai lần bằng PBS 1X (ly tâm 1500 vòng/phút, 5 phút). Sau khi làm sạch, mật độ tế bào được điều chỉnh về mức 10^6 tế bào/mL. Tiếp theo tế bào được nhuộm với thuốc nhuộm CFSE với nồng độ 2,5 μ M. Quá trình nhuộm được thực hiện trong tủ ấm tại 37°C, 5% CO₂ trong 20 phút. Để loại bỏ lượng thuốc nhuộm CFSE dư thừa, tế bào được rửa hai lần bằng 500 μ L dung dịch PBS 1X trước khi đưa vào thí nghiệm tiếp theo.

Tế bào đích đã nhuộm CFSE được trộn với tế bào tua theo tỷ lệ 1:1 trong môi trường RPMI 1640. Hỗn hợp được ủ trong 3 giờ ở 37°C, 5% CO₂. Sau thời gian ủ, mẫu được rửa hai lần bằng 500 μ L PBS 1X và ly tâm ở 1500 vòng/phút trong 7 phút.

Tiếp theo, phức hợp tế bào được ủ với CD123 PE và CD11c APC trong 1 giờ tại 4°C, bằng cách bổ sung 10 μ L CD123 PE và 10 μ L CD11c APC vào 100 μ L dung dịch đệm chứa 10^6 tế bào. Sau đó, mẫu được rửa sạch hai lần bằng 500 μ L dung dịch PBS 1x ở 1200 vòng/phút trong vòng 7 phút ở nhiệt độ phòng và cuối cùng được hòa huyền phù trong 200 μ L dung dịch

đệm FACS. Dữ liệu tương tác và biểu hiện các marker bề mặt được thu thập và phân tích thông qua hệ thống đo tế bào dòng chảy (Flow Cytometry).

2.2.10.3. Phương pháp flow cytometry đánh giá tỷ lệ tế bào chết apoptosis

Để đánh giá quá trình apoptosis của tế bào, tế bào sẽ được nhuộm với dung dịch annexin V và propidium iodide (PI) [103]. Nguyên lý của phương pháp là do annexin V liên kết với phosphatidylserine ở trên màng tế bào, còn PI thì đi vào trong tế bào và liên kết với DNA khi màng tế bào bị phá vỡ. Tế bào bình thường có bản chất kỵ nước nên phosphatidylserine nằm ở mặt trong của màng tế bào (đối diện với tế bào chất), khi tế bào tiến vào quá trình apoptosis thì mặt trong của màng tế bào lật mở để trở thành mặt ngoài của màng tế bào bởi hoạt động của enzyme translocase, do đó phosphatidylserine quay ra bên ngoài và tiếp xúc trực tiếp với môi trường bên ngoài. Annexin V có ái lực cao đối với màng tế bào chứa phosphatidylserine mang điện tích âm, do đó chúng nhanh chóng liên kết với nhau dưới xúc tác của Ca^{2+} . Các tế bào có liên kết này có thể dễ dàng nhận biết được bởi vì hợp chất Annexin V có gắn chất phát huỳnh quang FITC.

PI là một loại thuốc nhuộm huỳnh quang được sử dụng để đánh giá sự sống còn của tế bào. Nó liên kết với DNA sợi kép bằng cách xen kẽ giữa các cặp bazơ. Khi tế bào ở trạng thái bình thường, màng tế bào vẫn còn nguyên vẹn nên PI không thể xâm nhập vào trong tế bào do khả năng xâm nhập của PI phụ thuộc vào tính thấm của màng. Còn khi mà một tế bào chết đi thì màng tế bào của nó sẽ bị tổn thương và PI có thể đi vào trong tế bào, nơi nó có thể liên kết với DNA và phát huỳnh quang. Điều này giúp nó được sử dụng để phân biệt các tế bào bình thường và tế bào đã chết.

Trạng thái sống/chết và apoptosis của tế bào được xác định dựa trên sự kết hợp tín hiệu Annexin V-FITC và PI bằng flow cytometry. Bốn quần thể được phân biệt gồm: Annexin V⁻/PI⁻ là tế bào sống; Annexin V⁺/PI⁻ là tế bào apoptosis sớm; Annexin V⁺/PI⁺ là tế bào apoptosis; và Annexin V⁻/PI⁺ là tế bào hoại tử. Sự thay đổi các tỷ lệ các quần thể tế bào giữa nhóm xử lý và nhóm đối chứng được sử dụng để đánh giá tác động của điều kiện nghiên cứu lên khả năng sống và quá trình apoptosis/hoại tử của tế bào.

**Các bước tiến hành thí nghiệm:*

Tế bào tua sau 8 ngày nuôi cấy biệt hóa được thu nhận vào ống falcon 15 mL vô trùng. Tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm PBS 1X, quá

trình ly tâm được thực hiện ở tốc độ 1500 vòng/phút trong 7 phút tại nhiệt độ phòng. Sau khi làm sạch, mật độ tế bào được điều chỉnh để thu nhận đạt 10^6 tế bào trong 100 μ L dung dịch đệm PBS 1x và chuyển sang ống chuyên dụng cho máy đo dòng chảy (ống FACS).

Tế bào được huyền phù trong dung dịch đệm annexin V binding buffer. Tiếp theo, mẫu được nhuộm bằng cách bổ sung 5 μ L annexin V FITC và 1 μ L PI (100 μ g/ mL) trong 100 μ L dung dịch đệm chứa tế bào. Quá trình ủ được thực hiện trong 30 phút tại nhiệt độ phòng, trong bóng tối. Sau thời gian nhuộm, mẫu tế bào được rửa hai lần bằng 500 μ L dung dịch PBS ở 1500 vòng/phút trong vòng 7 phút. Cuối cùng, tủa tế bào được hòa huyền phù trong 300 μ L dung dịch đệm FACS và tiến hành đo mẫu.

2.2.10.4. Phương pháp flow cytometry đánh giá sự trưởng thành của tế bào

Sự trưởng thành của tế bào tua là một yếu tố quan trọng trong hệ thống miễn dịch, ảnh hưởng đến khả năng phản ứng của cơ thể đối với các tác nhân gây bệnh. Các marker tế bào như CD40, CD86, CD123, CD11c được sử dụng để đánh giá trạng thái trưởng thành và chức năng của tế bào này.

**Các bước tiến hành thí nghiệm:*

Tiến hành thu tế bào DC đã nuôi cấy sau 8 ngày sang ống falcon 15mL vô trùng mới. Tế bào được rửa sạch hai lần bằng dung dịch đệm PBS 1X. Quá trình ly tâm được thực hiện ở tốc độ 1500 vòng/phút trong thời gian 7 phút tại nhiệt độ phòng. Tế bào sau đó được ủ với kháng thể kháng CD40 PE, CD86 PE, CD123 PE và CD11c APC (bằng cách bổ sung 10 μ L kháng thể vào 100 μ L dung dịch đệm chứa 10^6 tế bào). Quá trình ủ được diễn ra trong 1 giờ tại 4°C, điều kiện thiếu sáng để đảm bảo hiệu suất gắn kết đặc hiệu của kháng thể. Sau thời gian ủ, mẫu tế bào được rửa hai lần bằng 500 μ L dung dịch đệm FACS với tốc độ 1500 vòng/phút trong 7 phút. Tế bào cuối cùng được bổ sung với 200 μ L dung dịch đệm FACS để duy trì tính ổn định của mẫu trong quá trình đo. Dữ liệu được thu thập và phân tích trên hệ thống máy đo tế bào dòng chảy.

2.2.11. Phương pháp ELISA

Quy trình ELISA được sử dụng để định lượng nồng độ TNF- α , TGF- β , IL-6 và IL-35 trong mẫu dịch nuôi cấy tế bào được thực hiện theo đúng hướng dẫn quy trình thực hiện của nhà sản xuất Invitrogen, Mỹ. Mỗi mẫu được thực hiện trong 2 giếng, lặp lại thí nghiệm 3 lần.

**Tiêu chuẩn loại trừ và kiểm soát các yếu tố ảnh hưởng đến viêm cytokine*

Để hạn chế ảnh hưởng của các yếu tố gây nhiễu đến kết quả định lượng cytokine, nghiên cứu áp dụng các tiêu chuẩn loại trừ đối với những đối tượng có tình trạng viêm hoặc nhiễm trùng không phản ánh trực tiếp đặc điểm bệnh bạch cầu cấp tính. Các trường hợp có biểu hiện nhiễm trùng cấp tại thời điểm lấy mẫu, nhiễm trùng hoặc bệnh lý viêm mạn tính đang hoạt động, bệnh tự miễn hoặc các tình trạng viêm toàn thân khác được loại trừ khỏi phân tích cytokine. Các trường hợp đang sử dụng thuốc có khả năng ảnh hưởng đáng kể đến đáp ứng miễn dịch hoặc nồng độ cytokine được ghi nhận và xem xét trong quá trình phân tích.

Mẫu máu được lấy tại thời điểm thống nhất theo thiết kế nghiên cứu và ưu tiên trước khi bệnh nhân được điều trị hoặc sử dụng các thuốc có khả năng ảnh hưởng đến đáp ứng viêm. Các mẫu được xử lý, phân tách huyết thanh và bảo quản theo cùng một quy trình nhằm hạn chế biến thiên tiền phân tích. Việc định lượng các cytokine liên quan được thực hiện bằng cùng phương pháp xét nghiệm, cùng hệ thống thuốc thử và điều kiện kỹ thuật thống nhất giữa các mẫu.

Tại thời điểm lấy mẫu, các thông tin về tình trạng nhiễm trùng, biểu hiện viêm, điều trị, công thức máu và các chỉ số xét nghiệm liên quan được ghi nhận. Những trường hợp có yếu tố gây nhiễu rõ ràng được loại trừ hoặc được xem xét riêng khi phân tích. Các yếu tố có khả năng ảnh hưởng đến nồng độ cytokine được kiểm soát nhằm đảm bảo rằng sự thay đổi cytokine quan sát được chủ yếu phản ánh đặc điểm bệnh lý và đáp ứng miễn dịch của bệnh nhân bạch cầu cấp tính.

**Chuẩn bị hóa chất và dung dịch:*

Dung dịch đệm rửa: Pha loãng 50 mL đệm rửa 20x với nước cất để đạt thể tích 1000 mL, trộn nhẹ tránh tạo bọt và bảo quản tại 2°C – 25°C.

Dung dịch đệm phản ứng (1x): Pha loãng toàn bộ (5 mL) dung dịch đệm phản ứng 20x với nước cất để đạt được dung tích 100 mL. Trộn nhẹ nhàng để tránh tạo bọt. Bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.

Dung dịch Biotin-Conjugate và Streptavidin-HRP: Pha loãng dung dịch đậm đặc theo tỷ lệ 1:100 với dung dịch đệm phản ứng (1X) trong ống nhựa sạch bằng cách cho 0,12 mL dung dịch 100X, sau đó bổ sung 11,88 mL dung dịch đệm phản ứng (1X). Lắc đều cho tan hoàn toàn.

**Pha dung dịch đường chuẩn*

Dung dịch đường chuẩn được pha với nước DEPC theo hướng dẫn của nhà sản xuất, để ổn định từ 10–30 phút. Chuỗi nồng độ đường chuẩn được thiết lập bằng phương pháp pha loãng bậc 2 tuần tự. Hút 225 μL dung dịch chuẩn gốc vào ống S1 chứa sẵn 225 μL dung dịch pha loãng, sau đó chuyển tiếp 225 μL từ ống trước sang ống kế tiếp để tạo ra 7 điểm nồng độ (S1–S7) và một ống đối chứng âm [104].

Bảng 2.5: Pha loãng protein chuẩn với các nồng độ khác nhau

Ống thí nghiệm	Thể tích dung dịch pha loãng (μL)	Nồng độ cuối (pg/mL)			
		TNF- α	IL-6	TGF- β	IL-35
S1	0	500	500	2000	1000
S2	250	250	250	1000	500
S3	250	125	125	500	250
S4	250	62,5	62,5	250	125
S5	250	31,3	31,3	125	63
S6	250	15,6	15,6	63	31.2
S7	250	7,8	7,8	31	15.63
Blank	250	0	0	0	0

**Các bước tiến hành thí nghiệm:*

Quy trình định lượng các cytokine được thực hiện bằng phương pháp ELISA Sandwich theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đầu tiên, các đĩa 96 giếng đã được gắn sẵn kháng thể bắt đặc hiệu cho các cytokine được đưa về nhiệt độ phòng.

Tiến hành thêm 100 μL mẫu và 100 μL các nồng độ chất chuẩn (đã được chuẩn bị ở trên) vào các giếng tương ứng. Một giếng đối chứng trắng chỉ chứa dung dịch pha loãng mẫu để hiệu chỉnh nền. Đĩa được đậy kín bằng tấm phủ chuyên dụng và ủ trong vòng 2 giờ tại nhiệt độ phòng (18°C đến 25°C), tạo điều kiện cho các kháng nguyên mục tiêu gắn kết đặc hiệu với

kháng thể bắt trên bề mặt giếng. Sau thời gian ủ, dịch lỏng trong các giếng được loại bỏ, và đĩa được rửa 3 lần bằng 300 μ L dung dịch rửa 1x.

Tiếp theo, thêm 50 μ L dung dịch biotin-conjugate (kháng thể phát hiện có gắn Biotin) đặc hiệu được bổ sung vào mỗi giếng. Đĩa tiếp tục được ủ trong 2 giờ tại nhiệt độ phòng, hình thành cấu trúc "sandwich" giữa kháng thể bắt - kháng nguyên - kháng thể phát hiện. Sau đó, đĩa được rửa 3 lần để loại bỏ dư lượng biotin-conjugate tự do, và 100 μ L dung dịch streptavidin-HRP được thêm vào mỗi giếng và ủ trong 1 giờ.

Sau đó đĩa được rửa kỹ 5 lần bằng dung dịch rửa 1X để đảm bảo loại bỏ hoàn toàn enzyme không liên kết. Thêm 100 μ L dung dịch cơ chất TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) vào mỗi giếng và tiếp tục ủ đĩa trong tối khoảng 20 phút; dung dịch sẽ chuyển sang màu xanh lục. Phản ứng được dừng lại bằng cách thêm 50 μ L dung dịch dừng H_2SO_4 , khi đó dung dịch trong giếng sẽ chuyển từ màu xanh sang màu vàng đặc trưng.

Cuối cùng, mật độ quang (Optical Density - OD) của các giếng được đo bằng máy đọc đĩa ELISA ở bước sóng 450 nm. Sử dụng đường chuẩn để suy ra nồng độ các cytokine trong các mẫu nghiên cứu dựa trên giá trị OD đo được.

2.2.12. Phương pháp di cư tế bào

Tế bào non được tách bằng phương pháp ly tâm gradient mật độ sử dụng Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences) với dung dịch đệm Hank's (Gibco). Quá trình ly tâm được thực hiện ở tốc độ 1200 vòng/phút trong 30 phút ở nhiệt độ phòng.

Sau khi tách, tế bào mới thu nhận được rửa bằng dung dịch PBS và đếm số lượng tế bào bằng buồng đếm Neubauer. Tế bào sau cùng được hòa huyền phù trong môi trường RPMI 1640 (Gibco) bổ sung 10% huyết thanh bò thai (FBS- Gibco), L-glutamine (Gibco), dung dịch kháng sinh – kháng nấm (Antibiotic-Antimycotic Solution, Sigma) và các axit amin không thiết yếu (MEM NEAA, Gibco). Tế bào được điều chỉnh mật độ ở mức 2×10^6 tế bào/mL và nuôi cấy trong điều kiện tiêu chuẩn. Sau đó được chuyển sang bước tiếp theo.

Các tế bào blast (tế bào non) được rửa hai lần bằng dung dịch PBS và huyền phù lại trong môi trường RPMI 1640. Khả năng di chuyển của tế bào

được đánh giá lặp lại ba lần bằng hệ thống buồng di chuyển đa giếng có kích thước lỗ màng lọc 3 μm (Costar).

Dung dịch huyền phù chứa tế bào với mật độ đạt 2×10^6 tế bào/mL được cho vào buồng trên, cho phép tế bào di chuyển qua màng lọc xuống buồng dưới. Buồng dưới được bổ sung CXCL12 (200 ng/mL; PeproTech) nhằm kích thích hóa hướng động, hoặc chỉ chứa môi trường nuôi cấy làm đối chứng di chuyển tự phát.

Toàn bộ hệ thống được ủ trong điều kiện 37°C , 5% CO_2 trong 20 giờ. Sau thời gian ủ, các tế bào di chuyển xuống buồng dưới được thu nhận và đếm dưới kính hiển vi quang học bằng phương pháp nhuộm Trypan blue để loại trừ tế bào chết.

Số lượng tế bào di chuyển tự phát được trừ khỏi tổng số tế bào di chuyển trong điều kiện có CXCL12. Khả năng di chuyển của tế bào được biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm số tế bào di chuyển so với tổng số tế bào ban đầu.

2.2.13. Phương pháp phân tích số liệu

Số liệu được phân tích được thực hiện bởi phần mềm SPSS 25.0 và GraphPad Prism 8. Đối với các biến định lượng, dữ liệu được kiểm tra phân phối chuẩn bằng test Shapiro-Wilk hoặc Kolmogorov-Smirnov. Các biến định lượng xác định tuân theo phân phối chuẩn được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn ($\text{Mean} \pm \text{SD}$), hoặc trung vị (Median) và khoảng tứ phân vị (Q1-Q3) khi không phân phối chuẩn.

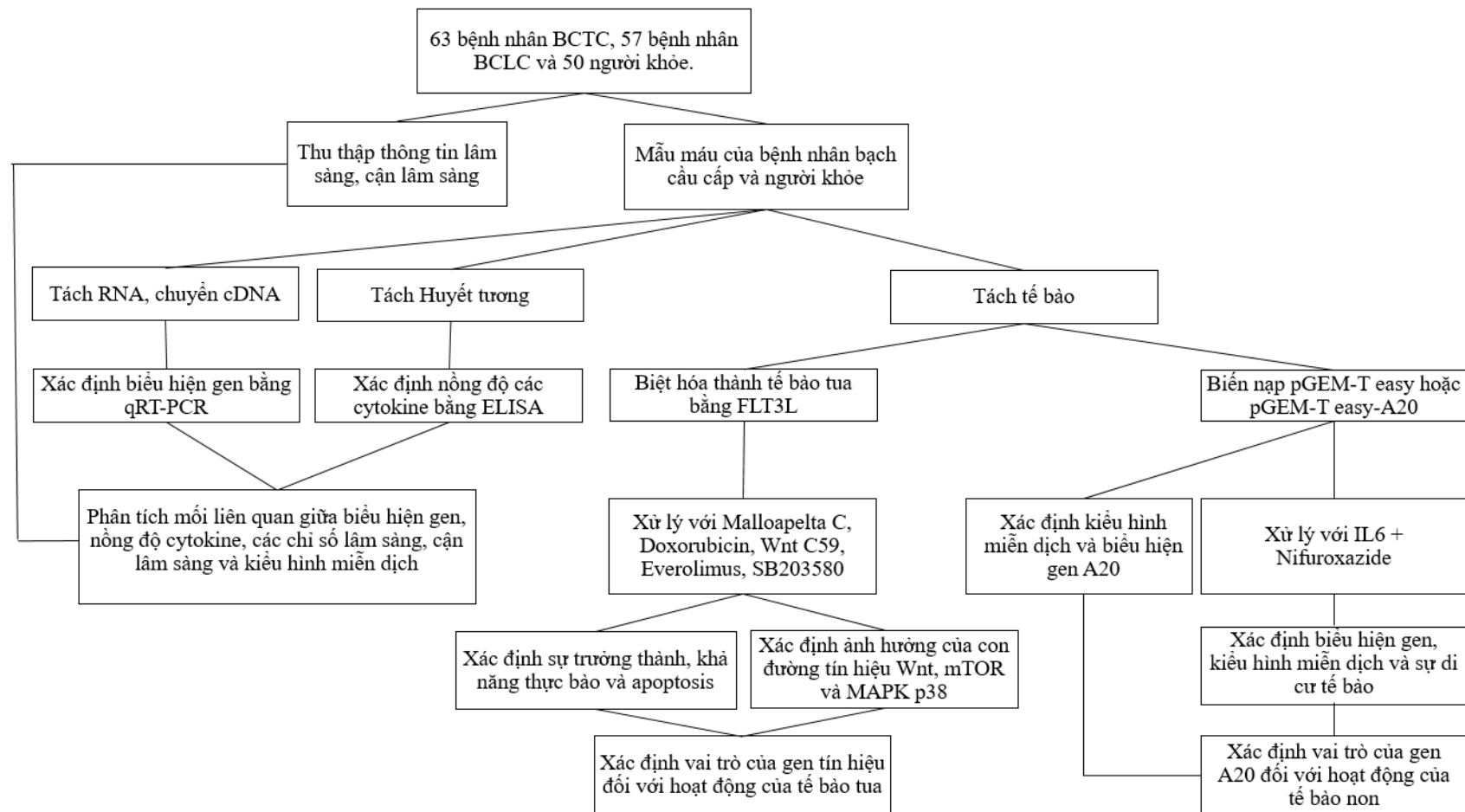
Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được xác định bởi thuật toán t-test hoặc ANOVA đối với dữ liệu phân phối chuẩn. Khi so sánh giữa hai nhóm độc lập sử dụng Mann-Whitney U test hoặc so sánh với ba nhóm trở lên sẽ sử dụng Kruskal-Wallis test. Giá trị $p < 0,05$ chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

2.2.14. 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 Đạo 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. Nghiên cứu được thực hiện không can thiệp

hoặc gây ảnh hưởng đến bệnh nhân. Các gia đình và bệnh nhân có thể rút khỏi nghiên cứu khi không muốn tiếp tục tham gia.

2.2.15. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.1: Sơ đồ các bước thực hiện nghiên cứu

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân tích đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính

3.1.1 Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở bệnh nhân BCTC

Bảng 3.1: Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhân BCTC

Chỉ số	Ngưỡng bình thường	Kết quả ở bệnh nhân BCTC Median (Q1-Q3)	Nhóm bệnh nhân BCTC			p-value
			Tiền lượng tốt (n=14) Median (Q1-Q3)	Tiền lượng trung bình (n=34) Median (Q1-Q3)	Tiền lượng xấu (n=15) Median (Q1-Q3)	
Tuổi		48,1 ± 21,9	31,2 ± 20,8	50,5 ± 21,3	58,5 ± 15,6	0,004**
Giới tính, nam (n,%)		36 (57,14%)	7 (50%)	18 (52,94%)	7 (46,67%)	0,756
Creatinine (μmol/L)	62-120	83 (62,75 – 97,5)	61,00 (54,00 - 83,00)	88,50 (69,50 - 99,00)	81,00 (72,00 - 92,00)	0,048*
Bilirubin tổng số (μmol/L)	≤17	9,5 (7,33 – 12,45)	7,90 (6,00 - 9,60)	11,100 (7,875 - 14,250)	9,60 (7,00 - 11,70)	0,041*
Bilirubin gián tiếp (μmol/L)	≤12,7	7,85 (5,95 – 9,6)	6,10 (4,95 - 8,15)	8,75 (6,40 - 11,250)	7,20 (5,50 - 8,80)	0,021*
Số lượng hồng cầu có nhân (G/L)	0	0,01 (0 – 0,1)	0 (0 - 0,01)	0,04 (0 - 0,20750)	0,020 (0 - 0,040)	0,006**
Số lượng bạch cầu (G/L)	3,5-10,5	19,03 (5,26 – 53,18)	10,13 (4,52 - 24,12)	33,75 (6,58 - 81,38)	6,01 (4,66 - 19,03)	0,015*
Số lượng tế bào lympho (G/L)	1,2-3	2,95 (1,44 - 5,24)	1,82 (1,15 - 5,305)	3,7 (2,07- 6,305)	1,74 (1,16 - 2,58)	0,016*

* ($p < 0,05$) và ** ($p < 0,01$) biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa ba nhóm bệnh nhân BCTC (ANOVA).

Kết quả ghi nhận sự phân bố đa dạng giữa các nhóm, phản ánh đúng tính chất không đồng nhất về mặt sinh học của bệnh lý BCTC. Cụ thể có 14/63 (22,22%) được xếp vào nhóm tiên lượng tốt, 34/63 (53,96%) được phân loại vào nhóm tiên lượng trung bình và 15/63 (23,82%) vào nhóm tiên lượng xấu với các đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng được thể hiện trong Bảng 3.1.

Kết quả được trình bày trong Bảng 3.1 cho thấy độ tuổi trung bình tăng dần từ nhóm tiên lượng tốt đến nhóm tiên lượng trung bình và cao nhất ở nhóm tiên lượng xấu ($p = 0,004$). Bên cạnh đó, tỷ lệ nam – nữ không khác biệt giữa các nhóm ($p = 0,756$).

Các chỉ số sinh hóa với nồng độ creatinine ở nhóm tiên lượng tốt ($61,00 \mu\text{mol/L}$) thấp hơn đáng kể so với nhóm tiên lượng trung bình và xấu (lần lượt là $88,5 \mu\text{mol/L}$ và $81 \mu\text{mol/L}$, $p = 0,048$). Tương tự, nồng độ bilirubin tổng số và bilirubin gián tiếp cũng thấp hơn đáng kể ở nhóm tiên lượng tốt so với hai nhóm còn lại ($p = 0,041$ và $p = 0,021$).

Ngoài ra, số lượng hồng cầu có nhân tăng cao đáng kể ở nhóm tiên lượng trung bình và xấu ($p = 0,006$). Số lượng bạch cầu cũng tăng cao nhất ở nhóm tiên lượng trung bình, thấp nhất ở nhóm xấu và sự khác biệt giữa các nhóm có ý nghĩa ($p = 0,015$). Ngược lại, số lượng tế bào lympho giảm rõ rệt ở nhóm tiên lượng xấu và trung bình so với nhóm tiên lượng tốt ($p = 0,016$).

Các kết quả này cho thấy nhóm bệnh nhân BCTC tiên lượng tốt có một số chỉ số cận lâm sàng tốt hơn so với nhóm có tiên lượng trung bình và xấu. Ngược lại, các nhóm tiên lượng trung bình và xấu thể hiện nhiều rối loạn sinh hóa và miễn dịch hơn, tương ứng với mức độ tiến triển bệnh nặng hơn.

Bên cạnh đó, về biểu hiện lâm sàng, đa số bệnh nhân BCTC nhập viện với các hội chứng suy tủy đặc trưng do sự lấn át của các tế bào non ác tính. Nổi bật nhất là hội chứng thiếu máu biểu hiện qua da xanh, niêm mạc nhợt và mệt mỏi kéo dài; hội chứng xuất huyết đa hình thái dưới da, niêm mạc do giảm tiểu cầu nặng; và hội chứng nhiễm trùng với sốt cao dai dẳng do suy giảm bạch cầu hạt trung tính. Bên cạnh đó, hội chứng thâm nhiễm ngoài tủy cũng được ghi nhận ở một số bệnh nhân qua tình trạng phì đại nướu răng, gan lách to mức độ nhẹ đến vừa hoặc tổn thương thâm nhiễm da.

3.1.2 Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở bệnh nhân BCLC

Trong số 57 bệnh nhân BCLC tham gia nghiên cứu, tất cả đều được thu thập đầy đủ thông tin về đặc điểm lâm sàng và dựa vào phân tầng nguy cơ

theo hướng dẫn của NCCN [7] như Bảng 3.2, có 36/57 (63,16%) được phân loại vào nhóm tiên lượng trung bình, và 21/57 (36,84%) được phân loại vào nhóm tiên lượng xấu.

Kết quả phân tích cho thấy có sự khác biệt rõ rệt về đặc điểm lâm sàng – cận lâm sàng giữa nhóm BCLC tiên lượng trung bình và nhóm tiên lượng xấu. Độ tuổi trung bình của nhóm tiên lượng xấu lớn hơn đáng kể so với nhóm tiên lượng trung bình ($p = 0,044$).

Bảng 3.2: Các chỉ số lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhân BCLC.

Chỉ số	Ngưỡng bình thường	Kết quả của bệnh nhân BCLC Median (Q1-Q3)	Nhóm bệnh nhân BCLC		p-value
			Tiên lượng trung bình (n=36) Median (Q1-Q3)	Tiên lượng xấu (n=21) Median (Q1-Q3)	
Tuổi		32,8 ± 20,3	28,8 ± 20,6	40,0 ± 18,0	0,044*
Glucose (mmol/l)	3,9-6,4	5,75 (5,0 - 7,2)	6,4 (5,3-7,7)	5,3 (5-6,3)	0,044*
LDH (U/L)	230-460	1535 (648 – 3873)	1078 (477-2718)	2230 (1538,25-4824)	0,013**
Số lượng tế bào bạch cầu (G/L)	3,5-10,5	21,89 (5,53 – 104,02)	10,01 (2,45-48,66)	65,58 (22,27-127,4)	0,003**
Số lượng bạch cầu trung tính (G/L)	1 -7,5	3,33 (1,12 – 6,35)	1,84 (0,54-5,82)	4,39 (2,55-10,24)	0,004**
Số lượng tế bào lympho (G/L)	1,2-3	3,56 (1,54 - 8,62)	2,44 (1,31-7,14)	6,74 (3,24-14,5)	0,001***

* ($p < 0,05$; ** ($p < 0,01$) và *** ($p < 0,001$) biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa hai nhóm bệnh nhân BCLC (ANOVA).

Nồng độ glucose trong máu ở nhóm tiên lượng xấu thấp hơn so với nhóm tiên lượng trung bình ($p = 0,044$). Tiếp theo, LDH tăng cao rõ rệt ở nhóm tiên lượng xấu (2230 U/L) so với nhóm tiên lượng trung bình (1078 U/L; $p = 0,013$). Số lượng tế bào bạch cầu ở nhóm tiên lượng xấu tăng mạnh (65,58 G/L) so với nhóm tiên lượng trung bình (10,01 G/L; $p = 0,003$). Tương

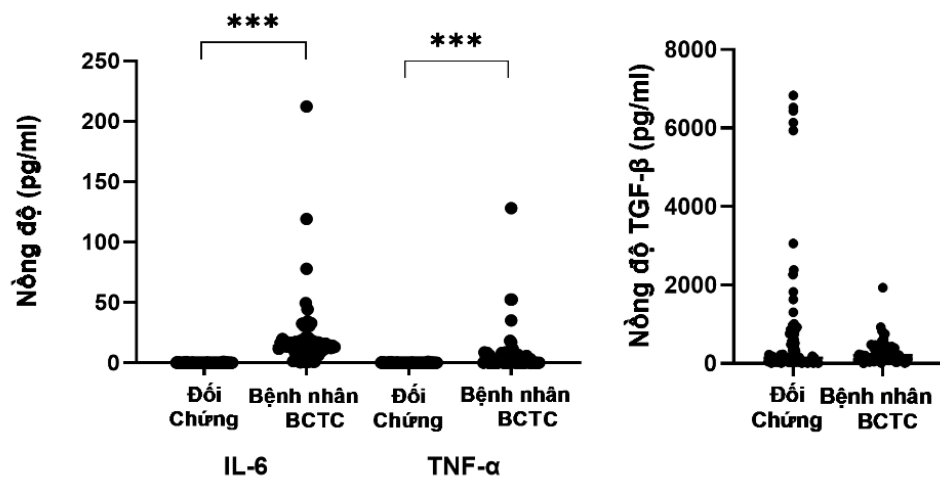
tự, số lượng bạch cầu trung tính và tế bào lympho cũng đều tăng đáng kể ở nhóm tiên lượng xấu (p -value lần lượt là 0,004 và 0,001).

Biểu hiện lâm sàng của nhóm bệnh nhân BCLC phản ánh tình trạng ức chế sinh máu tủy xương kết hợp với mức độ thâm nhiễm mô lympho rõ rệt. Đa số người bệnh biểu hiện hội chứng thiếu máu tiến triển nhanh, sốt nhiễm trùng tái diễn và các mảng xuất huyết dạng chấm/nốt dưới da. Đặc biệt, hội chứng thâm nhiễm cơ quan lympho xuất hiện với tần suất cao, đặc trưng bởi tình trạng nổi hạch ngoại vi lan tỏa (hạch cổ, nách, bẹn), gan to, lách to rõ rệt, kèm theo triệu chứng đau nhức xương khớp dữ dội do sự tăng sinh và chèn ép của dòng tế bào non trong khoang tủy.

3.2. Đánh giá biểu hiện viêm ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính

Kết quả phân tích đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng cho thấy bệnh nhân bạch cầu cấp tính có sự khác biệt rõ rệt giữa các nhóm tiên lượng bệnh, phản ánh mức độ tiến triển và tình trạng nặng của bệnh khác nhau. Tuy nhiên, các đặc điểm này chưa phản ánh đầy đủ tình trạng rối loạn miễn dịch và vi môi trường viêm trong bệnh bạch cầu cấp tính. Do đó, nghiên cứu tiếp tục tiến hành đánh giá nồng độ cytokine và đặc điểm kiểu hình miễn dịch nhằm làm rõ vai trò của phản ứng viêm và sự thay đổi quần thể tế bào miễn dịch trong cơ chế bệnh sinh của bệnh.

3.2.1. Kết quả phân tích nồng độ cytokine ở bệnh nhân BCTC



Hình 3.1: Nồng độ cytokine ở bệnh nhân BCTC

*** ($p < 0,001$) cho thấy sự khác biệt đáng kể của nồng độ cytokine IL-6, TNF- α , và TGF- β so với người khỏe đối chứng (ANOVA).

Kết quả ở Hình 3.1 cho thấy nồng độ IL-6 và TNF- α ở bệnh nhân BCTC tăng cao so với nhóm đối chứng khỏe mạnh ($p < 0,001$). Bên cạnh đó, nồng độ TGF- β có xu hướng giảm nhưng không đạt mức khác biệt có ý nghĩa thống kê.

BCTC là bệnh lý có mức độ đa dạng di truyền cao, với các phân nhóm tiên lượng (tốt – trung bình – xấu) khác nhau dựa trên bất thường nhiễm sắc thể và đột biến gen. Các phân nhóm này không chỉ khác nhau về đặc điểm sinh học mà còn khác biệt đáng kể về vi môi trường miễn dịch và đặc điểm cytokine. Do đó, việc phân tích cytokine theo phân nhóm nguy cơ giúp làm rõ liệu sự thay đổi cytokine có liên quan đến mức độ ác tính sinh học, tiên lượng và cơ chế tiến triển bệnh hay không. Chính vì vậy, nghiên cứu tiến hành đánh giá lại nồng độ cytokine sau khi chia bệnh nhân BCTC vào ba nhóm tiên lượng theo tiêu chuẩn ELN và tiến hành xác định nồng độ các cytokine ở người khỏe. Sau đó, kết quả trung bình của người khỏe sẽ được sử dụng để làm ngưỡng bình thường đối chiếu với nồng độ cytokine đo được ở bệnh nhân BCTC như Bảng 3.3.

Bảng 3.3: Nồng độ cytokine ở bệnh nhân BCTC

Chỉ số	Ngưỡng bình thường	Nhóm bệnh nhân BCTC			<i>p</i> -value
		Tiên lượng tốt (n=14) Median (Q1-Q3)	Tiên lượng trung bình (n=34) Median (Q1-Q3)	Tiên lượng xấu (n=15) Median (Q1-Q3)	
Nồng độ IL-6 (pg/mL)	< 7	11,9 (5,03-16,35)	13,94 (11,41-18,72)	17,38 (8,9-30,7)	0,095
Nồng độ TGF- β (pg/mL)	2000-4000	93,25 (38-201,17)	254,82 (144,09-454,05)	233,25 (103,93-428,45)	0,038*
Nồng độ TNF- α (pg/mL)	< 8	0 (0-8,56)	0 (0-2,17)	5 (0 -17,01)	0,163

* ($p < 0,05$) và ** ($p < 0,01$) cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa ba nhóm BCTC (Kruskal Wallis test).

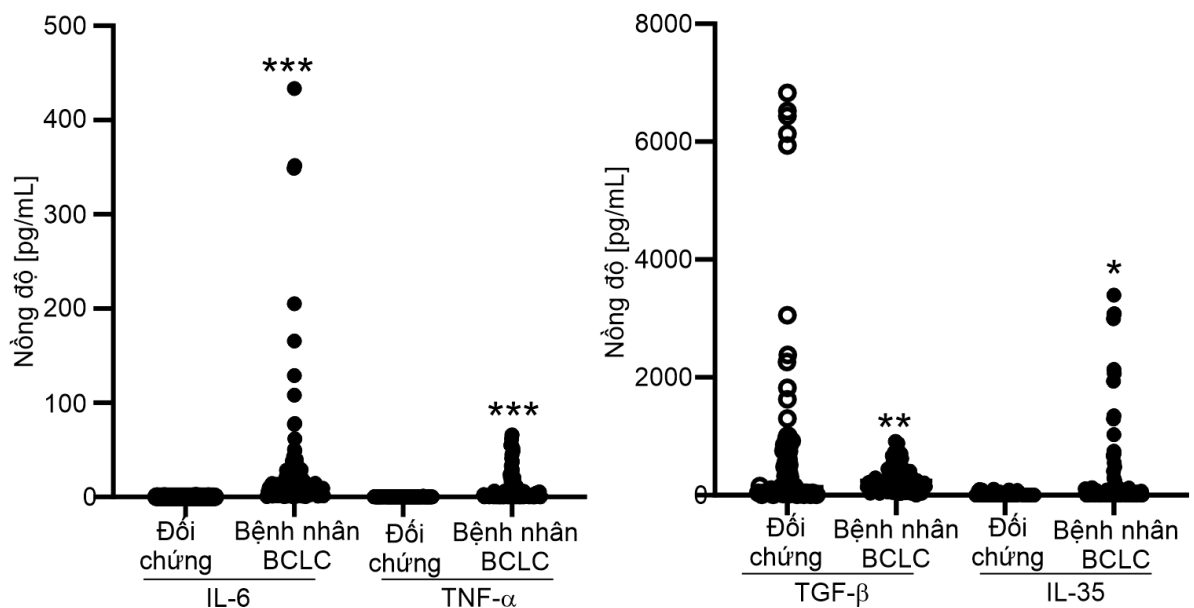
Kết quả ở Bảng 3.3 cho thấy nồng độ các cytokine viêm có sự thay đổi đáng kể giữa ba nhóm tiên lượng của bệnh nhân BCTC. Đối với IL-6, mặc dù giá trị trung bình ở nhóm tiên lượng trung bình và tiên lượng xấu tăng rõ so

với nhóm tiên lượng tốt, sự khác biệt chung giữa chúng lại không đạt ý nghĩa thống kê ($p = 0,095$).

Trong khi đó, TGF- β là một cytokine điều hòa miễn dịch đối kháng lại tăng theo mức độ nguy cơ của bệnh ($p = 0,038$). Nhóm tiên lượng tốt có mức TGF- β thấp nhất (93,25 pg/mL), tăng gấp đôi ở nhóm tiên lượng xấu (233,25 pg/mL) và có nồng độ cao nhất ở nhóm tiên lượng trung bình (254,82 pg/mL). Bên cạnh đó, các nhóm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về nồng độ TNF- α ($p = 0,163$), tuy nhiên, kết quả cho thấy giá trị trung vị của nồng độ TNF- α ở nhóm tiên lượng xấu cao hơn hẳn khi so sánh với nhóm tiên lượng tốt và trung bình.

Như vậy, kết quả của nghiên cứu cho thấy nồng độ TGF- β là chỉ số có khả năng phân biệt tốt giữa các nhóm tiên lượng BCLC. Đặc biệt khi TGF- β tăng tương ứng với mức độ nguy cơ và mức độ tiến triển của bệnh. Những phát hiện này góp phần củng cố vai trò của cytokine và dấu ấn sinh học trong phân tầng tiên lượng và chỉ số lâm sàng ở bệnh nhân BCLC.

3.2.2. Kết quả phân tích nồng độ cytokine ở bệnh nhân BCLC



Hình 3.2: Nồng độ cytokine của bệnh nhân BCLC

* ($p < 0,05$) và *** ($p < 0,001$) cho thấy sự khác biệt đáng kể của nồng độ cytokine IL-6, TNF- α , TGF- β và IL-35 so với nhóm đối chứng (ANOVA).

Chúng tôi tiến hành xác định nồng độ các cytokine ở người khỏe và bệnh nhân BCLC. Trong đó, kết quả trung bình của người khỏe sẽ được sử dụng để làm ngưỡng bình thường đối chiếu với nồng độ cytokine đo được ở

bệnh nhân BCLC.

Ở bệnh nhân BCLC, nồng độ các cytokine trong huyết tương cho thấy nồng độ TGF- β được phát hiện giảm đáng kể ở nhóm bệnh nhân BCLC. Trái ngược với điều này, nồng độ của IL-6 có mức độ tăng cao rõ rệt ở nhóm bệnh so với nhóm đối chứng. Tương tự, TNF- α và IL-35 cũng được ghi nhận với nồng độ cao hơn đáng kể ở nhóm bệnh nhân BCLC (Hình 3.2).

Bảng 3.4: Nồng độ các cytokine của bệnh nhân BCLC theo nhóm tiên lượng

Chỉ số	Ngưỡng bình thường	Nhóm bệnh nhân BCLC		<i>p-value</i>
		Tiên lượng trung bình (n=36) Median (Q1-Q3)	Tiên lượng xấu (n=21) Median (Q1-Q3)	
Nồng độ IL6 (pg/mL)	< 7	7,66 (4,02-14,9)	8,34 (2,78-19,26)	0,974
Nồng độ TGF- β (pg/mL)	2000-4000	192,71 (85-67-369,85)	328,38 (235,43-523,79)	0,02*
Nồng độ TNF- α (pg/mL)	< 8	0,93 (0,70-2,7)	0,86 (0,76-0,93)	0,636
Nồng độ IL35 (pg/mL)	<26	1,66 (0-35,24)	0,63 (0-16,23)	0,535

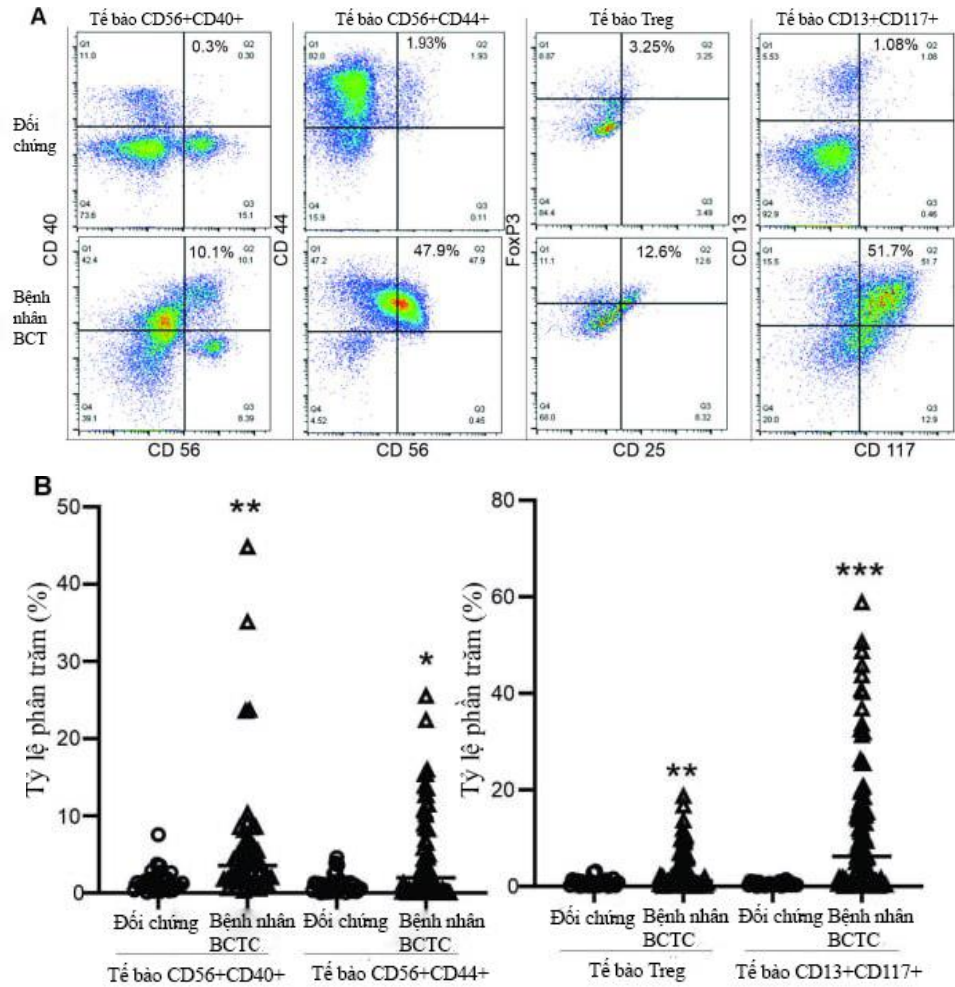
* ($p < 0,05$) cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa hai nhóm BCLC (Mann Whitney U Test).

Phân tích nồng độ cytokine trong huyết tương trong Bảng 3.4 cho thấy nồng độ IL-6 và TNF- α không ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm tiên lượng ($p > 0,05$), mặc dù nồng độ IL-6 ở cả nhóm tiên lượng xấu và tiên lượng trung bình của bệnh nhân BCLC đều tăng cao hơn so với ngưỡng đối chứng. Ngược lại, phân tích so sánh giữa hai nhóm cho thấy, nồng độ TGF- β ở nhóm tiên lượng xấu cao hơn đáng kể so với nhóm tiên lượng trung bình ($p < 0,05$). Riêng IL-35 không ghi nhận khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm (Bảng 3.4).

3.2.3. Kết quả đánh giá kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCTC

Kết quả phân tích flow cytometry (Hình 3.3.A-B) cho thấy sự thay đổi đáng kể trong tỷ lệ các quần thể tế bào miễn dịch ở bệnh nhân BCTC so với nhóm đối chứng khỏe mạnh. Tỷ lệ tế bào NK hoạt hóa mang kiểu hình CD56⁺CD40⁺ tăng rõ rệt ở nhóm bệnh nhân (khoảng 10%, $p < 0,01$) so với

đối chứng. Tương tự, $CD56^+CD44^+$ là tế bào NK hoạt hóa, tỷ lệ của chúng tăng mạnh ở bệnh nhân BCTC (47,9%) so với nhóm chứng (1,93%, $p < 0,05$).



Hình 3.3: Biểu hiện miễn dịch ở bệnh nhân BCTC và nhóm đối chứng khỏe mạnh.

A. Biểu đồ chấm đại diện cho các tế bào $CD56^+CD40^+$, $CD56^+CD44^+$, $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (Treg) và $CD13^+CD117^+$ ở bệnh nhân BCTC và nhóm đối chứng khỏe mạnh. B. Đồ thị biểu thị tỷ lệ phần trăm các tế bào $CD56^+CD40^+$, $CD56^+CD44^+$, Treg và $CD13^+CD117^+$ ở bệnh nhân BCTC và nhóm đối chứng khỏe mạnh. ** ($p < 0,01$) và *** ($p < 0,001$) chỉ ra sự khác biệt thống kê so với nhóm đối chứng (Mann–Whitney U test).

Bên cạnh đó, ở bệnh nhân BCTC cũng ghi nhận sự gia tăng đáng kể tỷ lệ tế bào T điều hòa (Treg) $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, với tỷ lệ trung bình khoảng 12,6% so với 3,25% ở nhóm đối chứng ($p < 0,01$).

Đặc biệt, tỷ lệ tiền thân dòng tủy mang đặc điểm là tế bào $CD13^+CD117^+$ tăng vượt trội ở bệnh nhân (51,7%) so với nhóm đối chứng (1,08%, $p < 0,001$). Trái ngược với những thay đổi này, hoạt động chung của tế bào T

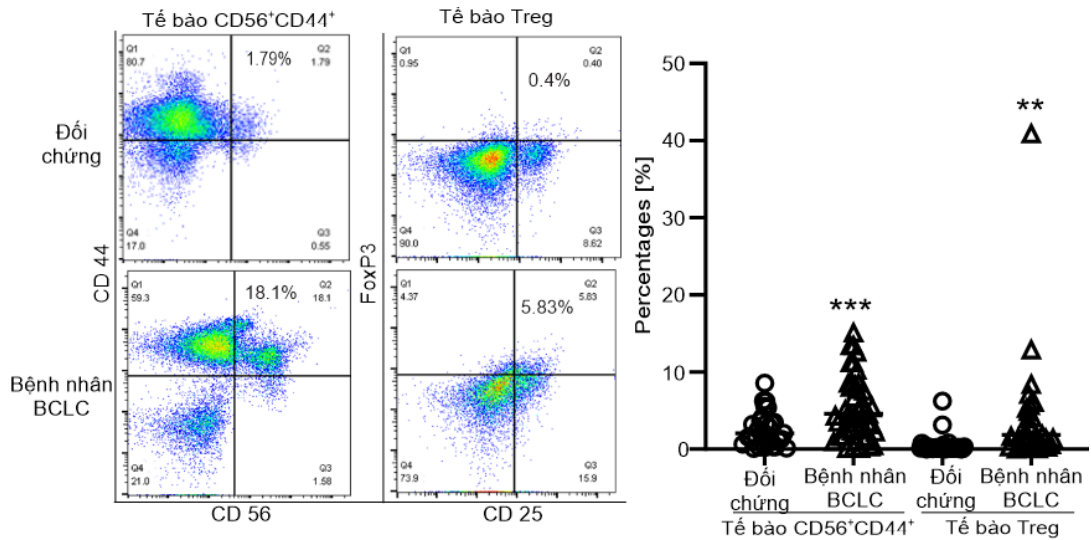
được đánh giá qua tỷ lệ tế bào CD4+CD25+ và CD4+CD44+ và không có sự khác biệt đáng kể giữa hai nhóm.

Tổng hợp các kết quả này cho thấy bệnh nhân BCLC có hai đặc điểm miễn dịch nổi bật là sự rối loạn tăng hoạt các tế bào miễn dịch bẩm sinh, và sự gia tăng mạnh các tế bào Treg gây ức chế miễn dịch. Đồng thời, sự tăng biểu hiện của quần thể CD13+CD117+ khẳng định tình trạng tăng sinh ác tính của tế bào non trong tủy xương.

3.2.4. Kết quả đánh giá kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCLC

Trạng thái hoạt hóa của các tế bào miễn dịch bao gồm tế bào T, tế bào NK và quần thể tế bào T điều hòa (Treg), đã được tiến hành đánh giá trên cả người khỏe và bệnh nhân BCLC được thể hiện ở Hình 3.4.

Kết quả phân tích tế bào theo dòng chảy cho thấy quần thể tế bào NK với kiểu hình CD56+CD44+ có tỷ lệ cao hơn đáng kể ở bệnh nhân BCLC so với nhóm đối chứng khỏe mạnh (Hình 3.4). Tương tự, quần thể tế bào Treg được xác định bởi sự đồng biểu hiện của CD3, CD4, CD25 và FoxP3 (CD3+CD4+CD25+FoxP3+), cũng cho thấy tỷ lệ tăng cao ở nhóm bệnh nhân BCLC (Hình 3.4).



Hình 3.4: Nồng độ cytokine và kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCLC.

A. Biểu đồ chấm đại diện cho các tế bào CD56+CD44+ và CD3+CD4+CD25+FoxP3+ (Treg) ở bệnh nhân BCLC và nhóm đối chứng khỏe mạnh. B. Đồ thị biểu thị tỷ lệ phần trăm các tế bào CD56+CD44+ và CD3+CD4+CD25+FoxP3+ (Treg) ở bệnh nhân BCLC và nhóm đối chứng khỏe

manh. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) và *** ($p < 0,001$) chỉ ra sự khác biệt thống kê so với nhóm đối chứng (Mann–Whitney U test).

Trái ngược với những thay đổi này, tỷ lệ tế bào T hoạt hóa, được đánh giá thông qua các marker CD4+CD25+ và CD4+CD44+, không có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm bệnh nhân BCLC và nhóm đối chứng. Những kết quả này chỉ ra rằng, bệnh nhân BCLC có tỷ lệ tăng đồng thời của cả các quần thể tế bào có khả năng chống lại khối u (tế bào NK hoạt hóa) và các quần thể tế bào ức chế miễn dịch (tế bào Treg).

3.3. Biểu hiện gen A20 và CYLD ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính

Kết quả phân tích cytokine và kiểu hình miễn dịch cho thấy bệnh nhân bạch cầu cấp tính xuất hiện tình trạng rối loạn miễn dịch rõ rệt, đặc trưng bởi sự thay đổi nồng độ các cytokine viêm và sự mất cân bằng của nhiều quần thể tế bào miễn dịch. Những biến đổi này gợi ý sự tham gia của các cơ chế điều hòa phân tử liên quan đến phản ứng viêm và tín hiệu nội bào. Vì vậy, nghiên cứu tiếp tục khảo sát mức độ biểu hiện của các gen liên quan đến điều hòa phản ứng viêm nhằm làm rõ cơ chế phân tử liên quan đến tiến triển bệnh và đáp ứng miễn dịch ở bệnh nhân bạch cầu cấp.

3.3.1 Biểu hiện gen A20 và CYLD ở các nhóm tiên lượng trên bệnh nhân BCTC

Bảng 3.5: Mối liên quan giữa biểu hiện gen và nhóm tiên lượng ở BCTC

Biểu hiện gen	Đối chứng (n=50) Median (Q1-Q3)	Nhóm bệnh nhân BCTC			p-value
		Tiên lượng tốt (n=14) Median (Q1-Q3)	Tiên lượng trung bình (n=34) Median (Q1-Q3)	Tiên lượng xấu (n=15) Median (Q1-Q3)	
Biểu hiện gen A20/GAPDH	15,12 (0,15 - 81,53)	0,6 (0,18- 1,77)	2,76 (0,79- 11,34)	1,02 (0,17- 1,76)	0,013*
Biểu hiện gen CYLD/GAPDH	9,57 (0,05 - 45,36)	0,24 (0- 0,74)	0,43 (0,23- 1,47)	0,26 (0,02- 1,01)	0,095

* ($p < 0,05$) và ** ($p < 0,01$) chỉ ra sự khác biệt thống kê giữa các nhóm BCTC (ANOVA).

Ở gen A20, sự khác biệt giữa ba nhóm tiên lượng đạt ý nghĩa thống kê với $p = 0,013$. Giá trị trung vị ghi nhận cao nhất ở nhóm tiên lượng trung bình (2,76), đứng thứ hai ở nhóm tiên lượng xấu (1,02) và đạt mức thấp nhất ở

nhóm tiên lượng tốt (0,6). Đối với gen *CYLD*, mức biểu hiện mRNA đạt giá trị trung vị cao nhất ở nhóm tiên lượng trung bình (0,43), tiếp đến là nhóm tiên lượng xấu (0,26) và thấp nhất ở nhóm tiên lượng tốt (0,24), với giá trị $p = 0,095$.

3.3.2. Biểu hiện gen *A20*, *CYLD* ở các nhóm tiên lượng trên bệnh nhân BCLC

Tiếp theo, nghiên cứu mức độ biểu hiện gen liên quan đến phản ứng viêm bao gồm các gen *A20* và *CYLD* ở các nhóm tiên lượng trên bệnh nhân BCLC.

Bảng 3.6: Biểu hiện các gen *DUB* ở các nhóm bệnh nhân BCLC

Chỉ số	Đối chứng (n=50) Median (Q1-Q3)	Nhóm bệnh nhân BCLC		<i>p-value</i>
		Tiên lượng trung bình (n=36) Median (Q1-Q3)	Tiên lượng xấu (n=21) Median (Q1-Q3)	
Biểu hiện gen <i>CYLD/GAPDH</i>	15,32 (0,05 - 78,33)	0,56 (0,04- 2,21)	0,44 (0,02- 2,38)	0,873
Biểu hiện gen <i>A20/GAPDH</i>	9,57 (0,58- 53,76)	3,12 (0,69 - 11,96)	2,03 (0,43- 9,99)	0,653

Kết quả phân tích mức độ biểu hiện mRNA của các gen mã hóa enzyme deubiquitinase bao gồm *CYLD* và *A20* được thể hiện tại Bảng 3.6. Nhìn chung, cả hai gen khảo sát đều ghi nhận mức độ biểu hiện ở nhóm bệnh nhân BCLC thấp hơn rõ rệt so với nhóm đối chứng khỏe. Cụ thể, biểu hiện gen *CYLD* ở cả hai nhóm bệnh nhân thấp hơn nhiều lần so với nhóm đối chứng (15,32). Tương tự, mức biểu hiện của gen *A20* ở các nhóm bệnh nhân cũng ghi nhận ở mức thấp hơn so với đối chứng, với các giá trị trung vị lần lượt là 3,12 và 2,03 so với 9,57.

Khi phân tích sâu theo phân tầng tiên lượng trong nhóm bệnh nhân BCLC, kết quả cho thấy mức độ biểu hiện các gen này ở nhóm tiên lượng xấu có xu hướng thấp hơn hoặc tương đương với nhóm tiên lượng trung bình. Cụ thể, mức biểu hiện gen *CYLD* ở nhóm tiên lượng xấu (0,44) thấp hơn so với nhóm tiên lượng trung bình (0,56). Đối với gen *A20*, mức biểu hiện ở nhóm

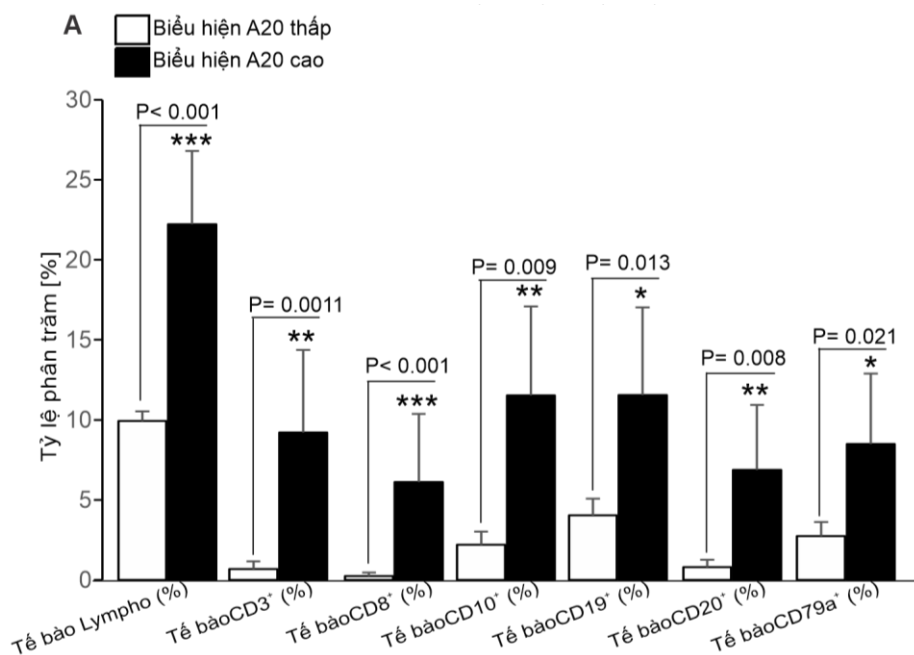
tiên lượng xấu (2,03) cũng ghi nhận ở mức thấp hơn so với nhóm trung bình (3,12).

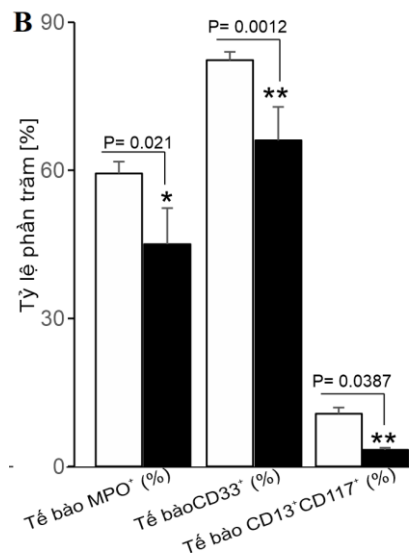
3.4. Mối liên quan giữa biểu hiện gen *A20* và *CYLD* với đặc điểm miễn dịch và lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính

3.4.1. Mối liên quan giữa biểu hiện gen *A20* và *CYLD* với kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCTC

Để làm rõ vai trò của các gen *DUB* trong sinh bệnh học của BCTC, chúng tôi phân chia bệnh nhân thành hai nhóm dựa trên mức độ biểu hiện của từng gen (nhóm biểu hiện thấp và nhóm biểu hiện cao) so với mức biểu hiện trung bình của người khỏe, sau đó phân tích mối liên quan giữa mức độ biểu hiện gen *A20*, *CYLD* với đặc điểm kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCTC.

Kết quả đã chỉ ra rằng biểu hiện gen *CYLD* không ảnh hưởng đến đặc điểm kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCTC. Trong khi đó, nhóm biểu hiện *A20* thấp có kiểu hình đặc trưng của một hệ miễn dịch bị suy giảm nghiêm trọng với mức độ ác tính cao. Cụ thể, tỷ lệ các tế bào thuộc dòng lympho bao gồm tế bào lympho tổng số, CD3+, CD8+, CD10+, CD19+, CD20+ và CD79a+ đều giảm đáng kể ở nhóm *A20* thấp so với nhóm *A20* cao (Hình 3.5A). Ngược lại, các marker thuộc dòng tủy như MPO+, CD33+ và CD13+CD117+ lại tăng cao đáng kể ở nhóm có biểu hiện *A20* thấp này.





Hình 3.5: Mối liên quan giữa biểu hiện gen *A20* với kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCTC.

A-B. Các đồ thị biểu thị tỷ lệ phần trăm tế bào CD3+, CD8+, CD10+, CD19+, CD20+, CD79a+, MPO+, CD33+ và CD13+CD117+ ở bệnh nhân BCTC có mức độ biểu hiện *A20* thấp và cao. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) và *** ($p < 0,001$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với nhóm biểu hiện *A20* thấp (Mann–Whitney U test).

3.4.2. Mối liên quan giữa biểu hiện gen *A20* và *CYLD* với đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở bệnh nhân BCTC

Bảng 3.7: Mối tương quan giữa biểu hiện gen *A20* với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng.

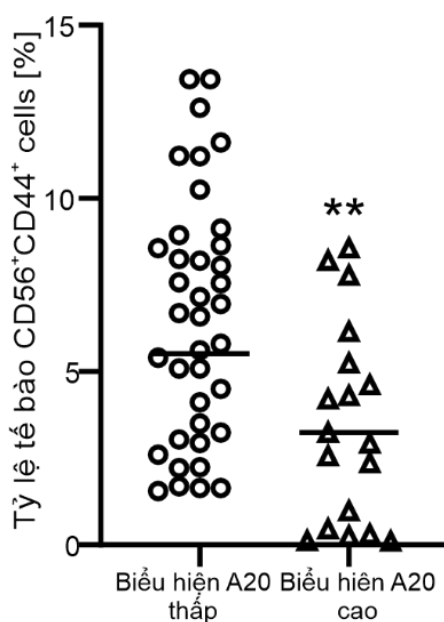
Chỉ số		Albumin (g/L)	Số lượng tiểu cầu
Biểu hiện gen <i>A20</i>	Nhóm biểu hiện thấp (n=47) Median (Q1-Q3)	38,81 (26,6 - 51,1)	51 (31 -115.5)
	Nhóm biểu hiện cao (n=16) Median (Q1-Q3)	48,7 (32,9–64,6)	28 (12.5 -61.5)
	<i>p</i> -value	0,029*	0,039*

* ($p < 0,05$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với nhóm biểu hiện *A20* thấp và nhóm biểu hiện *A20* cao (ANOVA).

Mức độ biểu hiện gen của *A20* và *CYLD* ở bệnh nhân BCTC được chia thành hai nhóm (biểu hiện cao so và biểu hiện thấp) dựa trên giá trị biểu hiện của từng gen so với giá trị trung bình của nhóm người khỏe. Các nhóm này được tiến hành tính tương quan với các chỉ số lâm sàng và cận lâm sàng.

Kết quả cho thấy rằng, mức độ biểu hiện của gen *CYLD* không ảnh hưởng đến các chỉ số lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân BCTC. Trong khi đó, mức độ biểu hiện gen *A20* cho thấy có mối liên quan với albumin và số lượng tiểu cầu ($p < 0,05$). Với kết quả cụ thể được thể hiện trong Bảng 3.7, nhóm biểu hiện *A20* cao được phát hiện trong 16 mẫu (25,4%) và nhóm biểu hiện *A20* thấp được phát hiện trong 47 mẫu (75,6%). Cụ thể, nồng độ albumin ở nhóm biểu hiện *A20* thấp đạt 38,81 g/L so với 48,7 g/L ở nhóm biểu hiện cao ($p = 0,029$). Bên cạnh đó, số lượng tiểu cầu ở nhóm biểu hiện *A20* thấp cũng cao hơn đáng kể, với giá trị trung vị là 51 G/L.

3.4.3. Mối liên quan giữa biểu hiện gen *A20* và *CYLD* với kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCLC



Hình 3.6: Biểu đồ biểu thị tỷ lệ tế bào CD56⁺CD44⁺ ở bệnh nhân BCLC có biểu hiện A20 thấp và A20 cao.

** ($p < 0,01$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với nhóm bệnh nhân có mức độ biểu hiện A20 thấp (Mann–Whitney U test).

Tương tự bệnh nhân BCTC, mức độ biểu hiện của gen *CYLD* cũng không ảnh hưởng đến đặc điểm kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCLC khi

tiến hành phân tích. Tuy nhiên mức độ biểu hiện của gen *A20* chỉ ảnh hưởng đến mức độ hoạt hóa của tế bào NK như được chỉ ra trong Hình 3.6,

Mức độ biểu hiện của *A20* ở bệnh nhân BCLC được chia thành hai nhóm dựa trên giá trị biểu hiện trung bình của chúng so với nhóm người khỏe (cao so với thấp). Nhóm biểu hiện *A20* cao được phát hiện trong 18 mẫu và nhóm biểu hiện *A20* thấp được phát hiện trong 39 mẫu. Kết quả cho thấy những bệnh nhân có mức biểu hiện *A20* thấp cho thấy số lượng tế bào $CD56^+CD44^+$ tăng đáng kể so với những bệnh nhân có mức biểu hiện *A20* cao (Hình 3.6).

3.4.4. Mối liên quan giữa biểu hiện gen *A20* và *CYLD* với đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở bệnh nhân BCLC

Bảng 3.8: Mối liên quan giữa biểu hiện gen *A20*, *CYLD* đến đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân BCLC

Chỉ số		Số lượng tế bào lympho (G/L)	Urê (mmol/L)
Ngưỡng đối chứng		1-3	2,5 -7,5
Biểu hiện <i>A20</i> / <i>GAPDH</i>	Nhóm biểu hiện thấp (n=39) Median (Q1-Q3)	3,33 (1,71 – 8,02)	5,3 (3,95 – 6,7)
	Nhóm biểu hiện cao (n=18) Median (Q1-Q3)	7 (2,03 – 10,29)	7,25 (6,15 – 11,93)
	<i>p</i> -value	0,39	0,012*
Biểu hiện <i>CYLD</i> / <i>GAPDH</i>	Nhóm biểu hiện thấp (n=48) Median (Q1-Q3)	3,93 (2,24 – 9,05)	5,4 (4,2 – 6,8)
	Nhóm biểu hiện cao (n=9) Median (Q1-Q3)	1,3 (0,63- 4,61)	8,7 (3,15 –17,2)
	<i>p</i> -value	0,032*	0,36

* ($p < 0,05$) và ** ($p < 0,01$) thể hiện sự khác biệt so với nhóm biểu hiện gen thấp (Mann–Whitney U test).

Phân tích mối liên quan giữa biểu hiện gen *A20* và các thông số lâm sàng cho thấy nhóm bệnh nhân có biểu hiện *A20* cao có nồng độ urê cao hơn so với nhóm biểu hiện thấp ($p = 0,012$). Đối với gen *CYLD*, nhóm bệnh nhân có biểu hiện *CYLD* cao có xu hướng giảm số lượng tế bào lympho so với nhóm biểu hiện thấp, với sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê ($p = 0,032$). Bên cạnh đó, nhóm này lại có nồng độ ure cao hơn khi so với nhóm thấp ($p > 0,05$).

3.5. Đánh giá vai trò của gen A20 điều hòa hoạt động tế bào non ở bệnh bạch cầu cấp tính

Kết quả phân tích sự tương quan giữa mức độ biểu hiện gen và kiểu hình miễn dịch ở cả hai quần thể bệnh nhân BCTC và BCLC chỉ ra rằng, nhóm bệnh nhân BCTC có biểu hiện A20 thấp có sự suy giảm của tế bào dòng lympho và sự gia tăng mạnh mẽ của tế bào non dòng tủy ác tính thể hiện qua sự gia tăng biểu hiện MPO+, CD33+ và đặc biệt là tế bào CD13+CD117+ có liên quan chặt chẽ đến gánh nặng tế bào non ở bệnh nhân và tiên lượng xấu.

Hiện tượng tương tự cũng được quan sát thấy trong nhóm BCLC, khi sự sụt giảm biểu hiện A20 gây nên sự thay đổi hoạt hóa tế bào NK CD56+CD44+ và làm giảm số lượng tế bào lympho. Những dữ liệu này cho thấy mức độ biểu hiện A20 thấp có thể liên quan đến tình trạng mất cân bằng miễn dịch và thúc đẩy sự tăng sinh không kiểm soát của tế bào non.

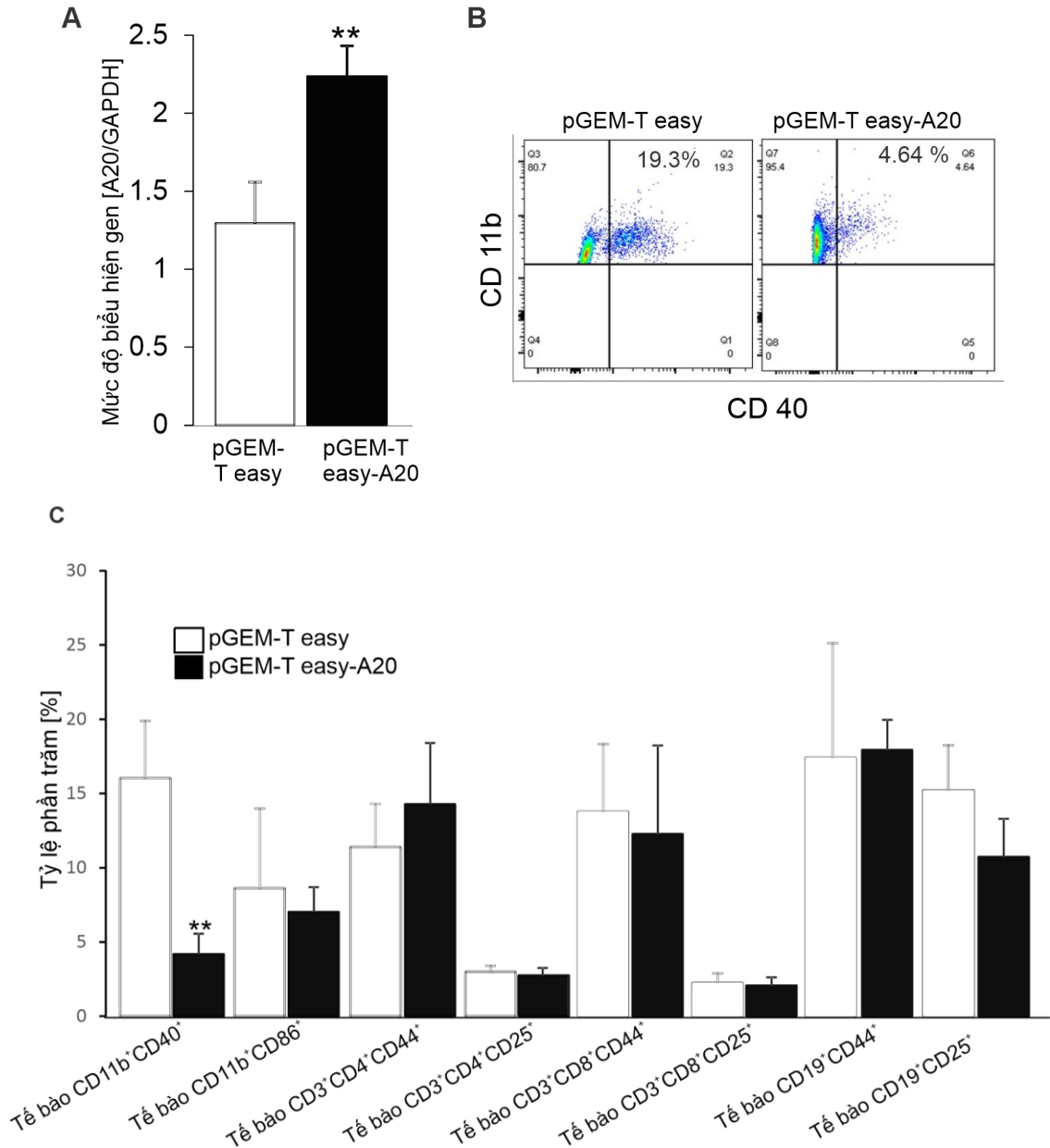
Tuy nhiên, các phân tích trên mới chỉ phản ánh mối liên hệ về mặt lâm sàng và kiểu hình miễn dịch trên bệnh nhân, mà chưa làm rõ vai trò chức năng trực tiếp của A20 trên hoạt động của tế bào bạch cầu non. Do đó, nghiên cứu *in vitro* tiếp tục được thực hiện nhằm đánh giá vai trò điều hòa của A20 đối với trạng thái hoạt hóa, sự chết apoptosis, khả năng di chuyển của tế bào non ở bệnh bạch cầu cấp và tín hiệu STAT liên quan.

3.5.1. Vai trò của gen A20 điều hòa sự tăng sinh tế bào miễn dịch ở bệnh bạch cầu cấp tính

Để nghiên cứu tác động của A20 lên trạng thái hoạt hóa của tế bào bạch cầu non, các tế bào được biến nạp với pGEM-T easy hoặc pGEM-T easy-A20 và sau đó kiểm tra sự hoạt hóa của các tế bào dòng tủy (CD11b+), tế bào T CD4 (CD3+ CD4+), tế bào T CD8 (CD3+ CD8+) và tế bào B (CD19+).

Trong nghiên cứu này, quá trình phân tích tất cả các mẫu được giới hạn trong quần thể tế bào có biểu hiện CD45+. Biểu hiện gen A20 được kiểm tra bằng RT-qPCR, và kết quả cho thấy pGEM-T easy-A20 đã làm tăng hiệu quả biểu hiện của A20 trong các tế bào bạch cầu non (Hình 3.7A). Đáng chú ý, phân tích bằng phương pháp flow cytometry cho thấy việc tăng biểu hiện A20 làm giảm đáng kể số lượng tế bào biểu hiện CD11b+CD40+ (Hình 3.7B-C) và không ảnh hưởng đến tỷ lệ của các tế bào biểu hiện CD11b+CD86+, CD3+CD4+CD44+, CD3+CD4+CD25+, CD3+CD8+CD44+, CD3+CD8+CD25+, CD19+CD44+ và CD19+CD25+. Kết quả nghiên cứu

chỉ ra rằng, A20 ức chế hoạt động của các tế bào biểu hiện CD11b+CD40+ vào hệ tuần hoàn bệnh nhân bạch cầu cấp tính (Hình 3.7C).

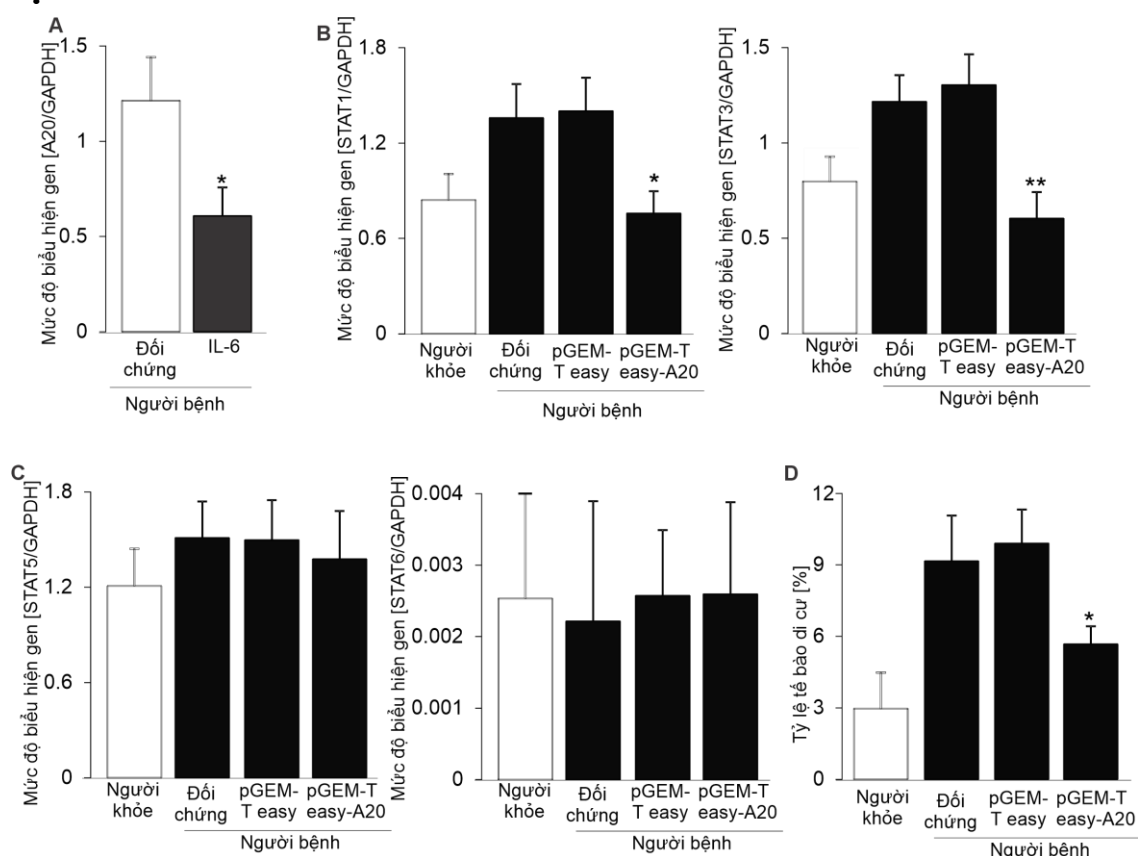


Hình 3.7: Ảnh hưởng của A20 đến kiểu hình miễn dịch ở tế bào non

A. Giá trị trung bình cộng $\pm$ SEM của mức độ biểu hiện gen A20 được thể hiện trong tế bào non của bệnh nhân bạch cầu cấp tính, được chuyển gen với pGEM-T easy (cột màu trắng) hoặc pGEM-T easy-A20 (cột màu đen). GAPDH được sử dụng làm gen tham chiếu. ** ($p < 0,01$) cho thấy sự khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng (ANOVA). B. Biểu đồ chấm của các tế bào non có biểu hiện CD11b+CD40+, được chuyển gen với pGEM-T easy (bên trái) hoặc pGEM-T easy-A20 (bên phải). Tất cả các mẫu đều được chọn lọc

với các tế bào có biểu hiện CD45+. C. Giá trị trung bình cộng $\pm$ SEM tỷ lệ phần trăm tế bào biểu hiện CD11b+CD40+, CD11b+CD86+, CD3+CD4+CD44+, CD3+CD4+CD25+, CD3+CD8+CD44+, CD3+CD8+CD25+, CD19+CD44+ và CD19+CD25+, được biến nạp với pGEM-T easy (cột màu trắng) hoặc pGEM-T easy-A20 (cột màu đen). Tất cả các mẫu đều được chọn lọc dựa trên tế bào có biểu hiện CD45+. $^{**}(p<0,01)$ cho thấy sự khác biệt đáng kể so với tế bào bạch cầu non đối chứng (ANOVA).

3.5.2. Vai trò của gen A20 điều hòa tín hiệu STAT và sự di cư của tế bào bạch cầu non



Hình 3.8: Ảnh hưởng của A20 đến biểu hiện tín hiệu STAT và sự di cư của tế bào bạch cầu non

Giá trị trung bình cộng $\pm$ SEM của mức độ biểu hiện gen A20 trong tế bào non, khi không được xử lý (cột màu trắng) hoặc được xử lý bằng IL-6 (50ng/ml, cột màu đen). GAPDH được sử dụng làm gen tham chiếu. $^{**}(p<0,01)$ cho thấy sự khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng (ANOVA). B-C. Giá trị trung bình cộng $\pm$ SEM của mức độ biểu hiện gen STAT-1, STAT-3, STAT-5 và STAT-6 ở tế bào non, khi không được xử lý (cột màu trắng)

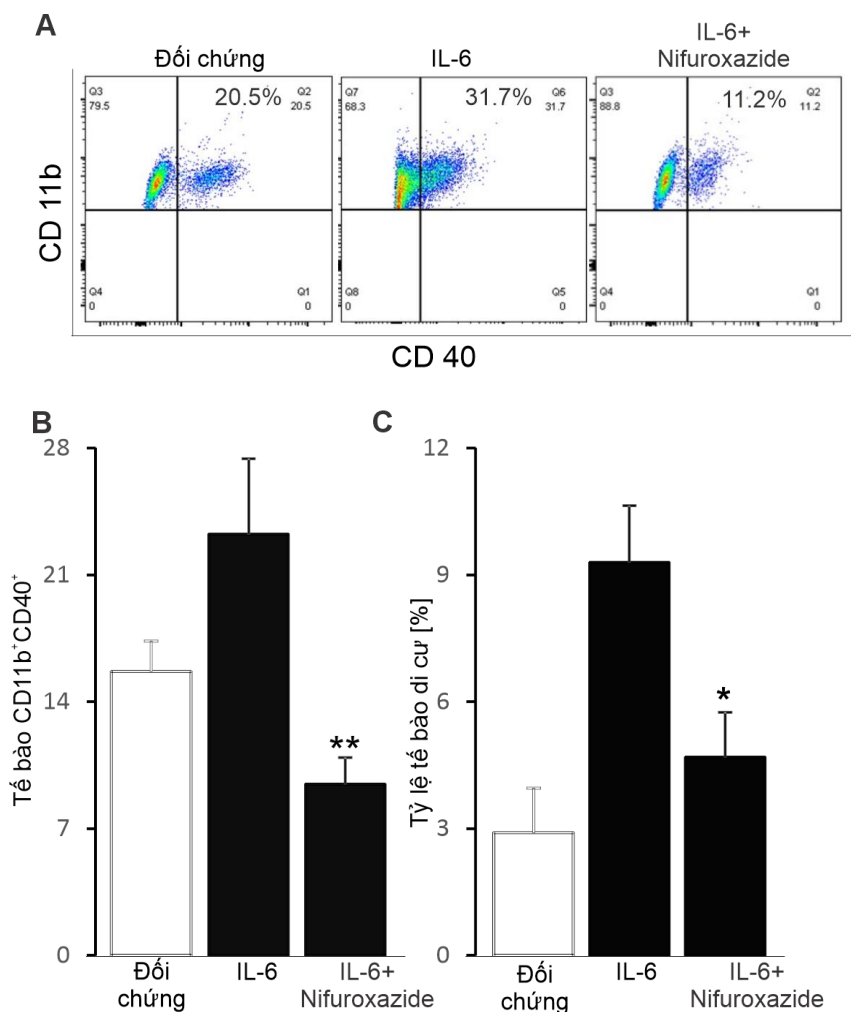
hoặc được xử lý bằng IL-6 (50ng/ml, cột màu đen) khi có hoặc không có pGEM-T easy hoặc pGEM-T easy-A20. GAPDH được sử dụng làm gen tham chiếu. $*(p<0,05)$ và $** (p<0,01)$ cho thấy sự khác biệt đáng kể so với các tế bào non được xử lý bằng pGEM-T easy (ANOVA). D. Giá trị trung bình cộng $\pm$ SEM của tỷ lệ phần trăm tế bào di chuyển, khi không được xử lý (cột màu trắng) hoặc được xử lý bằng IL-6 (50ng/ml, cột màu đen) khi có hoặc không có pGEM-T easy hoặc pGEM-T easy-A20. $*(p<0,05)$ cho thấy sự khác biệt đáng kể so với tế bào được xử lý bằng pGEM-T easy (ANOVA).

Trên cơ sở các kết quả trước đó cho thấy biểu hiện gen A20 có mối liên quan chặt chẽ với sự thay đổi số lượng tế bào non, tế bào dòng tủy và tế bào dòng lympho ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính, chúng tôi tiếp tục tiến hành nghiên cứu vai trò điều hòa chức năng của A20 đến tín hiệu nội bào. Trong đó, IL-6 được lựa chọn làm tác nhân kích thích vì đây là cytokine tiền viêm quan trọng, thường tăng cao ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính và có vai trò trung tâm trong hoạt hóa con đường JAK/STAT, đặc biệt là STAT1 và STAT3. Mà A20 có khả năng điều hòa âm tính tín hiệu STAT và đáp ứng viêm. Do đó, nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của gen A20 lên sự hoạt hóa con đường STAT và khả năng di chuyển của tế bào bạch cầu non trong điều kiện kích thích bằng IL-6.

Trong nghiên cứu này, xử lý các tế bào bạch cầu non bằng IL-6 dẫn đến sự điều hòa giảm biểu hiện gen A20 (Hình 3.8A), cho thấy IL-6 có thể điều hòa âm tính biểu hiện A20 trong bối cảnh hoạt hóa tín hiệu viêm. Chúng tôi tiếp tục khảo sát vai trò điều hòa của A20 đối với tín hiệu STAT trong đáp ứng với IL-6 ở tế bào non. Kết quả cho thấy IL-6 đã kích thích hoạt hóa biểu hiện STAT1 và STAT3, trong khi không gây ảnh hưởng đáng kể lên STAT5 và STAT6 khi so sánh với nhóm người khỏe đối chứng (Hình 3.8B-C). Ảnh hưởng kích hoạt biểu hiện gen STAT1 và STAT3 của IL-6 bị ức chế khi có mặt vector pGEM-T easy-A20 khi so sánh với nhóm đối chứng và nhóm có vector pGEM-T easy, cho thấy A20 đóng vai trò ức chế tín hiệu STAT khi tiếp xúc với IL-6 ở tế bào bạch cầu non (Hình 3.8B). Tiếp theo, kết quả thí nghiệm di cư tế bào cho thấy rằng khi tiếp xúc với CXCL12, IL-6 làm tăng sự di chuyển của tế bào non và mức độ biểu hiện của gen A20 không ảnh hưởng đến chức năng này (Hình 3.8D).

3.5.3. Vai trò của tín hiệu STAT trong điều hòa sự di chuyển của tế bào bạch cầu non

Tiếp theo, để tìm hiểu sự tham gia tín hiệu STAT trong việc điều hòa trạng thái hoạt hóa của các tế bào dòng tủy và sự di chuyển của tế bào non dưới ảnh hưởng của IL-6, các tế bào đã được xử lý bằng chất ức chế STAT là Nifuroxazide.



Hình 3.9: Vai trò của tín hiệu STAT trong điều hòa sự hoạt hóa của tế bào bạch cầu non

A. Biểu đồ chấm thể hiện các tế bào biểu hiện CD11b⁺CD40⁺ có trong tế bào non, khi được xử lý bằng IL-6 (50ng/ml) có hoặc không có Nifuroxazide (10mM). Tất cả các mẫu đều được chọn lọc dựa trên tế bào có biểu hiện CD45⁺. B. Giá trị trung bình cộng $\pm$ sai số chuẩn của các tế bào biểu hiện CD11b⁺CD40⁺, khi không được xử lý (cột màu trắng) hoặc được xử lý bằng IL-6 (50ng/ml, cột màu đen) có hoặc không có Nifuroxazide (10mM). ($p < 0,01$) cho thấy sự khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng (ANOVA). C. Giá trị trung bình cộng $\pm$ SEM của phần trăm tế bào di chuyển, khi không

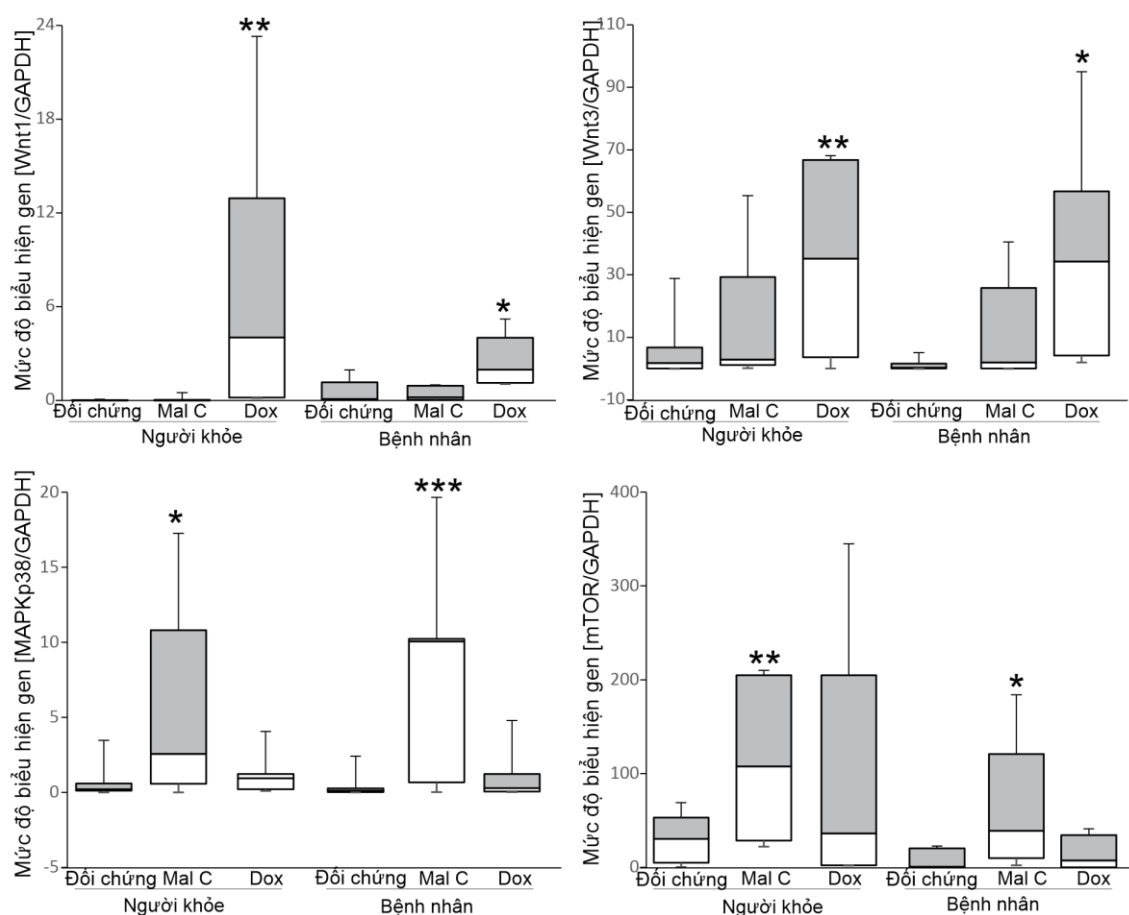
được xử lý (cột màu trắng) hoặc được xử lý bằng IL-6 (50ng/ml, cột màu đen) có hoặc không có Nifuroxazide (10mM). * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) cho thấy sự khác biệt đáng kể so với các nhóm đối chứng (ANOVA).

Như thể hiện trong Hình 3.9A-B, kết quả cho thấy IL-6 làm gia tăng rõ rệt tỷ lệ tế bào CD11b⁺CD40⁺, đồng thời thúc đẩy khả năng di chuyển của tế bào dòng tủy và tế bào non. Tuy nhiên, hiệu ứng này bị suy giảm đáng kể khi có mặt Nifuroxazide, khi ở điều kiện IL-6 kết hợp với Nifuroxazide thì tỷ lệ tế bào CD11b⁺CD40⁺ và khả năng di chuyển của tế bào đã giảm đi rõ rệt.

3.6. Vai trò của gen viêm điều hòa hoạt động của tế bào tua ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính dưới tác động của Doxorubicin và Malloapelta C

Chức năng điều hòa đáp ứng miễn dịch của tế bào tua (DC) bị suy giảm ở bệnh nhân bạch cầu cấp [105]. Do đó, vai trò của gen *A20* tiếp tục được khảo sát nhằm đánh giá ảnh hưởng của gen này lên chức năng của tế bào DC ở bệnh nhân BCTC và BCLC khi xử lý với Doxorubicin (Dox) và Malloapelta C (Mal C). Kết quả nghiên cứu cho thấy việc xử lý tế bào DC bằng Doxorubicin và Malloapelta C không làm thay đổi mức độ biểu hiện gen *A20* ở cả hai nhóm bệnh nhân BCTC và BCLC. Chính vì thế, biểu hiện của một số gen tín hiệu liên quan đến viêm như: *ERK2*, *mTOR*, *MAPKp38*, *Wnt1*, *Wnt3* và *AKT1* được xác định.

Các tế bào DC của người khỏe mạnh và bệnh nhân bạch cầu cấp tính được biệt hóa từ tế bào PBMC sau khi xử lý với FLT3L. Vào ngày thứ 8 của quá trình nuôi cấy, các tế bào DC được bổ sung Mal C (20 μ M) hoặc Dox (5 μ M). Mức độ biểu hiện của *ERK2*, *mTOR*, *MAPKp38*, *Wnt1*, *Wnt3* và *AKT1* được xác định bằng RT-qPCR sau khi xử lý tế bào DC bằng Mal C hoặc Dox ở nhóm bệnh và nhóm người khỏe. Kết quả chỉ ra rằng, ở bệnh nhân BCTC, biểu hiện của các marker trên không thay đổi khi tế bào DC được xử lý với Mal C hoặc Dox. Kết quả Hình 3.10 chỉ ra sự thay đổi mức độ biểu hiện của gen tín hiệu khi tế bào DC trên bệnh nhân BCLC được xử lý với Mal C hoặc Dox.



Hình 3. 10: Tác dụng của Dox và Mal C lên sự biểu hiện của các phân tử tín hiệu mTOR, MAPKp38 và Wnt ở người khỏe và bệnh nhân BCLC.

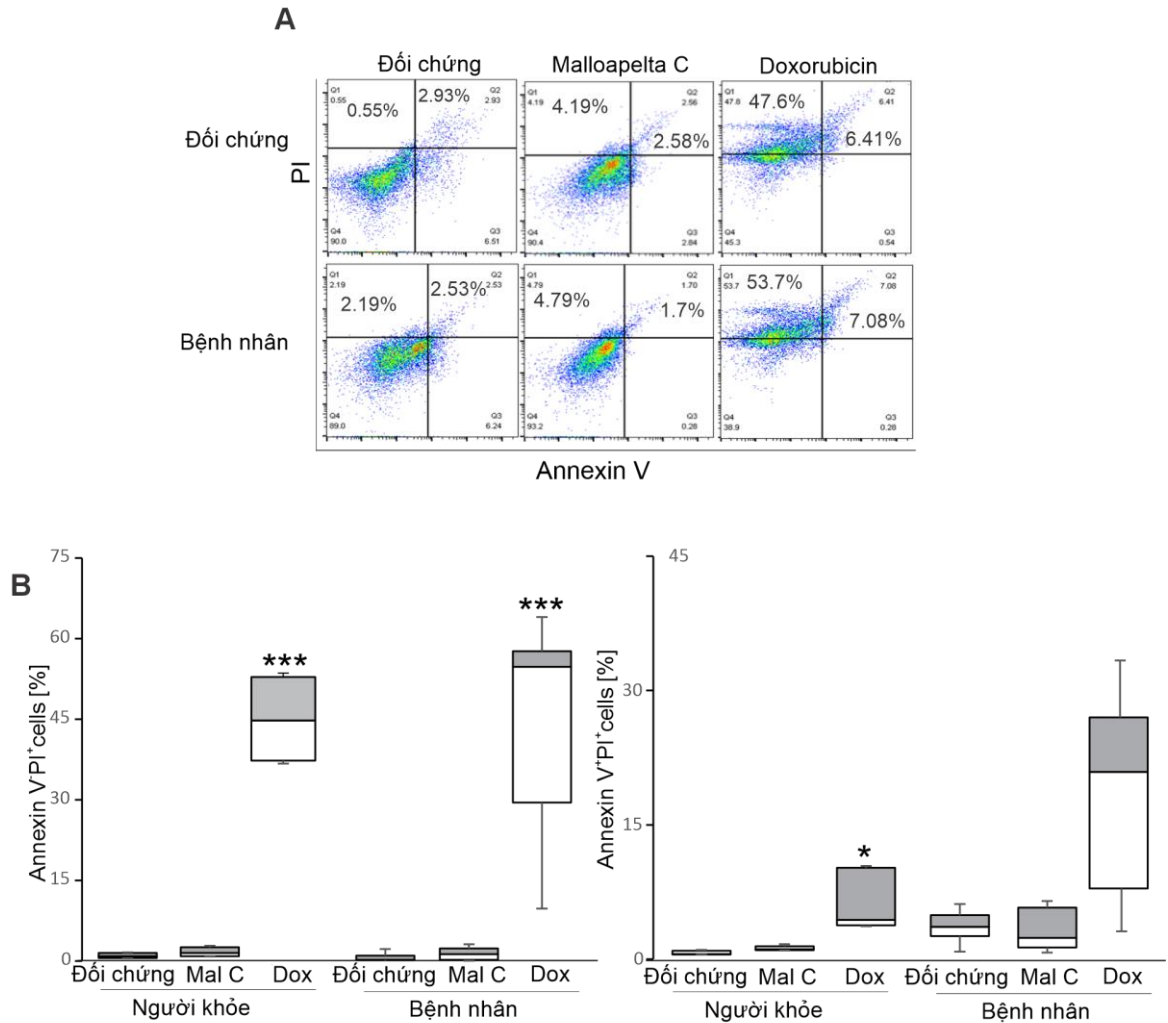
Giá trị trung bình cộng $\pm$ SEM của mức độ biểu hiện gen *Wnt1*, *Wnt3*, *MAPKp38* và *mTOR* được thể hiện trong tế bào tua của bệnh nhân BCLC và người khỏe. *GAPDH* được sử dụng làm gen tham chiếu. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) và *** ($p < 0,001$) cho thấy sự khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng DC (ANOVA).

Chúng tôi quan sát thấy rằng mức độ biểu hiện mRNA của *mTOR* và *MAPKp38* tăng lên đáng kể khi có mặt Mal C, trong khi mức độ mRNA của *Wnt1* và *Wnt3* tăng lên khi tiếp xúc với Dox (Hình 3.10). Biểu hiện *Wnt1* tăng mạnh ở tế bào DC từ người khỏe mạnh khi xử lý Dox ($p < 0,01$), trong khi Mal C không gây sự thay đổi đáng kể. Trái lại, ở nhóm bệnh, Dox chỉ làm tăng nhẹ biểu hiện *Wnt1* ($p < 0,05$). Ở cả người khỏe mạnh và bệnh nhân, biểu hiện gen *Wnt3* đều tăng khi được xử lý với Mal C và Dox.

Biểu hiện *MAPK p38* tăng rõ rệt khi xử lý Mal C ở tế bào khỏe mạnh ($p < 0,05$) và ở nhóm bệnh nhân BCLC ($p < 0,001$). Trong khi đó, Dox chỉ gây tăng nhẹ mức độ biểu hiện *MAPK p38* ở cả hai nhóm. Ở người khỏe, cả Mal C ($p < 0,01$) và Dox ($p < 0,01$) đều làm tăng biểu hiện *mTOR*. Tuy nhiên, ở bệnh

nhân, chỉ Mal C làm tăng biểu hiện *mTOR* ($p<0,05$), trong khi Dox hầu như không gây thay đổi mức độ biểu hiện của gen *mTOR*. Ngoài ra, các con đường tín hiệu khác như *ERK2* và *AKT1* không bị ảnh hưởng khi tế bào tiếp xúc với Mal C hoặc Dox.

3.6.1. Ảnh hưởng của Doxorubicin và Malloapelta C đến sự trưởng thành, apoptosis và thực bào của tế bào tua trên bệnh nhân BCLC



Hình 3.11: Ảnh hưởng của Dox và Mal C đến chức năng tế bào DC từ người khỏe mạnh và bệnh nhân BCLC.

A-B. Biểu đồ thể hiện tế bào Annexin V-PI+ và Annexin V+PI+ từ những người khỏe và bệnh nhân BCLC, không được xử lý hoặc được xử lý bằng Mal (20 μ M) hoặc Doxorubicin (5 μ M). * ($p<0,05$) và *** ($p<0,001$) cho thấy sự khác biệt đáng kể so với tế bào DC đối chứng (ANOVA).

Do không ghi nhận sự thay đổi đáng kể về biểu hiện gen tín hiệu ở tế bào DC từ bệnh nhân BCLC sau xử lý với Mal C hoặc Dox, các phân tích

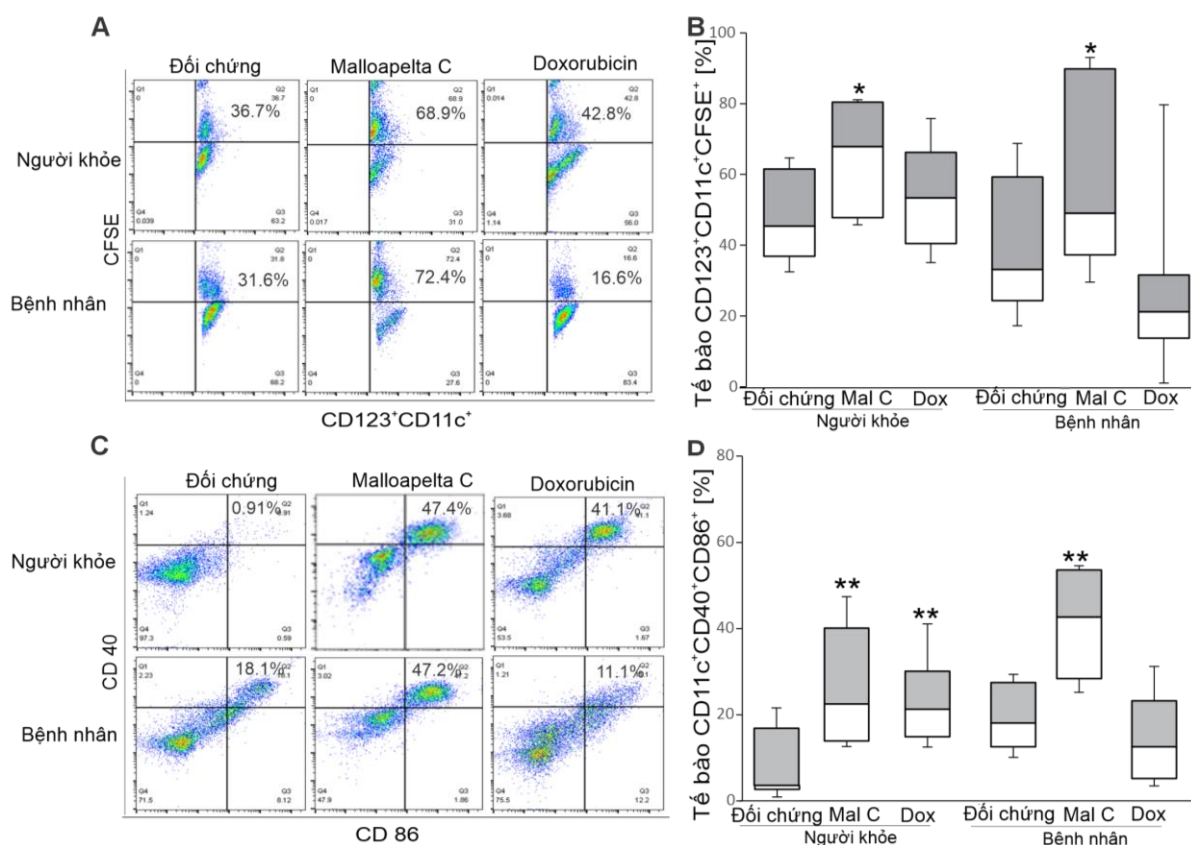
chức năng tiếp theo tập trung chủ yếu trên nhóm bệnh nhân BCLC nhằm làm rõ cơ chế điều hòa của các hợp chất này đối với chức năng của tế bào DC

Tiếp theo, Mal C và Dox được phân tích ảnh hưởng đến sự sống sót của tế bào DC. Như thể hiện trong Hình 3.11 B-C, tỷ lệ phần trăm tế bào chết theo chương trình apoptosis/tế bào hoại tử (Annexin V⁺PI⁻ hoặc Annexin V⁺PI⁺ hoặc Annexin V-PI⁺) đã được xác định ở trên người khỏe mạnh và bệnh nhân BCLC.

Kết quả Hình 3.11B-C cho thấy Mal C làm tăng nhẹ tỷ lệ tế bào hoại tử Annexin V-PI⁺ ở cả người khỏe mạnh và bệnh nhân (khoảng 2–7%), trong khi Dox gây chết do hoại tử mạnh hơn đáng kể (biểu hiện của Annexin V-PI⁺ tăng đến khoảng 47% ở nhóm đối chứng khỏe mạnh và khoảng 53% ở nhóm bệnh nhân), với mức tăng không đáng kể so với nhóm chứng. Trong khi đó, Dox làm tăng mạnh tỷ lệ tế bào PI⁺ (hoại tử). Biểu đồ Annexin V⁺PI⁺ cho thấy Dox gây chết apoptosis đáng kể và vượt trội so với Mal C. Mal C chỉ làm tăng apoptosis ở mức độ rất ít ở bệnh nhân BCLC.

Kết quả xử lý tế bào cho thấy việc điều trị tế bào DC bằng Dox đã làm tăng đáng kể số lượng tế bào Annexin V⁺PI⁺ (chết theo chương trình) và Annexin V-PI⁺ (hoại tử) ở cả hai nhóm.

Tiếp theo, khả năng thực bào các tế bào bạch cầu bởi các tế bào CD11c+CD123-DC, CD11c+CD123+DC và CD11c-CD123+ từ người khỏe mạnh và bệnh nhân đã được xác định. Kết quả ở Hình 3.12A-C cho thấy ảnh hưởng khác biệt của Mal C và Dox lên sự trưởng thành và hoạt hóa của tế bào DC biệt hóa từ PBMC của người khỏe mạnh và bệnh nhân BCLC. Mal C làm tăng đáng kể khả năng thực bào tế bào CD123⁺CD11c⁺ DC ở cả hai nhóm, đặc biệt rõ ở nhóm bệnh nhân, nơi mức tăng gần gấp đôi so với đối chứng (từ 31.6% ở nhóm đối chứng lên 72.4% khi được xử lý với Mal C). Ngược lại, Dox làm giảm mạnh quần thể CD123⁺CD11c⁺ ở bệnh nhân, khi làm giảm tỷ lệ tế bào CD123⁺CD11c⁺ DC từ 31.6% xuống còn 16.6% sau khi bổ sung Dox. Ngoài ra, khả năng thực bào của các tế bào CD11c+CD123- và CD11c-CD123+ không thay đổi khi có mặt Mal C và Dox ở cả hai nhóm.



Hình 3.12: Ảnh hưởng của Dox và Mal C lên quá trình thực bào và trưởng thành của tế bào DC ở người khỏe mạnh và bệnh nhân BCLC.

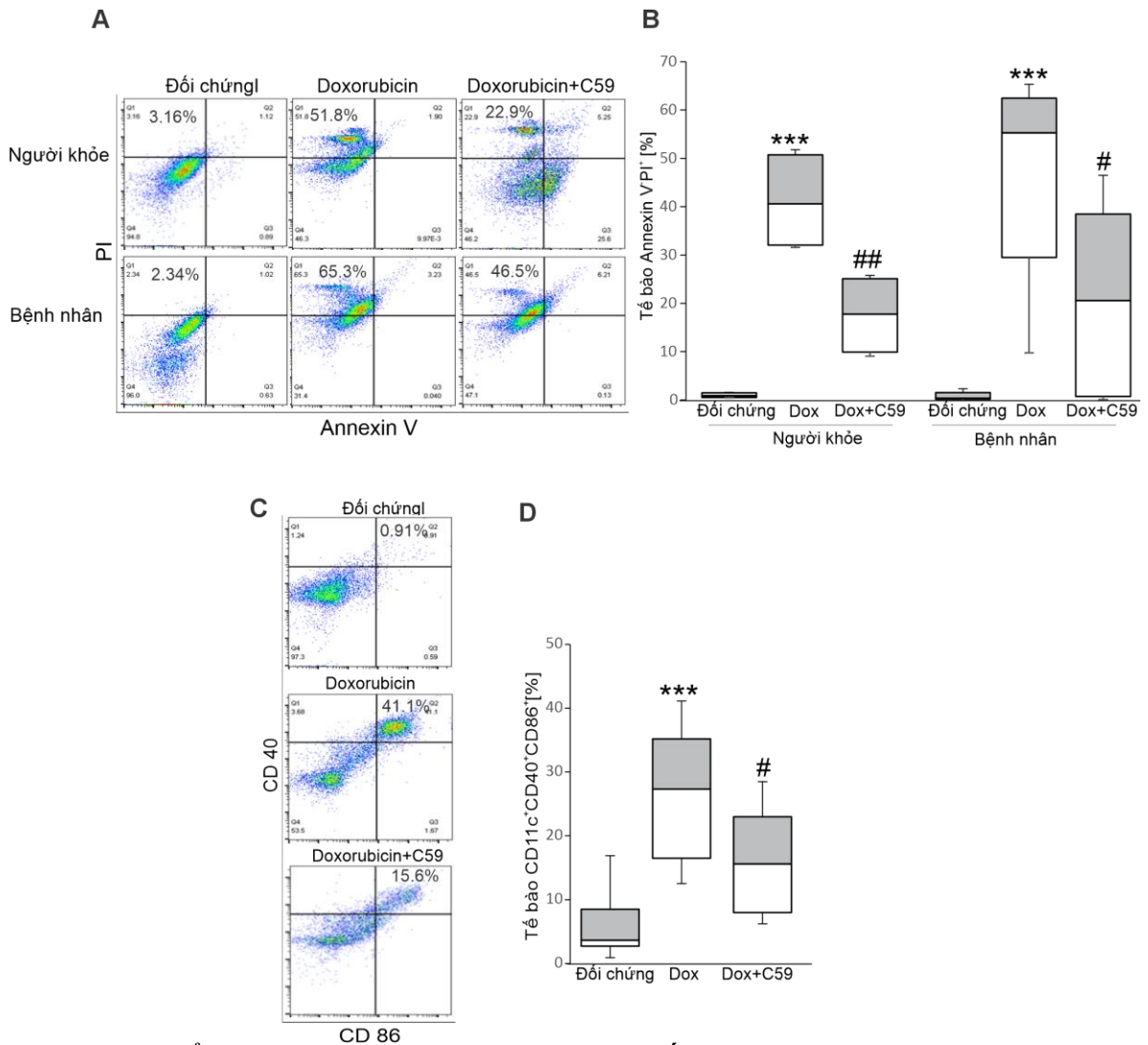
A và C. Biểu đồ chấm thể hiện tế bào CD11c⁺CD123⁺CFSE⁺ (A) và tế bào DC CD40⁺CD86⁺ (C), không được xử lý hoặc được xử lý bằng Mal (20 μ M) hoặc Doxorubicin (5 μ M). B và D. Biểu đồ thể hiện tỷ lệ phần trăm tế bào CD11c⁺CD123⁺CFSE⁺ (B) và tế bào DC CD40⁺CD86⁺ (D), không được xử lý hoặc được xử lý bằng Mal (20 μ M) hoặc Doxorubicin (5 μ M). * ($p < 0,05$) và ** ($p < 0,01$) cho thấy sự khác biệt đáng kể so với tế bào DC đối chứng (ANOVA).

Để xác định các dấu ấn trưởng thành của DC, các tế bào CD11c⁺ đã được phân tích về sự biểu hiện của các phân tử kích thích đồng thời cụm biệt hóa CD40 và CD86. Kết quả Hình 3.12C-D cho thấy tỷ lệ tế bào DC CD40⁺CD86⁺ ở nhóm bệnh nhân tăng lên đáng kể khi có mặt Mal C từ 18.1% lên 47.2%, nhưng lại giảm còn 11.1% khi bổ sung Dox. Trong khi đó, sự biểu hiện của tế bào DC CD40⁺CD86⁺ ở những người khỏe mạnh được tăng cường khi có mặt Mal C và Dox (lần lượt từ 0,91% lên 47.4% và 41.1%), kết quả này cho thấy quá trình trưởng thành của tế bào DC ở bệnh

nhân BCLC bị suy giảm khi tiếp xúc với Dox. Ngoài ra, nồng độ IL-6 và TNF- α cũng được kiểm tra, tuy nhiên, Mal C và Dox không gây ra sự giải phóng các cytokine này (dữ liệu không được hiển thị).

Kết quả này cho thấy Mal C đóng góp vai trò tích cực trong việc thúc đẩy quá trình trưởng thành ở DC, cũng như khả năng thực bào tăng lên đáng kể ở tế bào DC.

3.6.2. Vai trò của con đường tín hiệu Wnt trong tác động của Doxorubicin đối với sự trưởng thành và apoptosis của tế bào tua



Hình 3.13: Ảnh hưởng của con đường Wnt đến sự trưởng thành và apoptosis của tế bào DC ở người khỏe mạnh và bệnh nhân BCLC

A và C. Biểu đồ chấm thể hiện tế bào Annexin V-PI+ (A) và tế bào DC CD40+CD86+ (C), không được bổ sung hoặc được bổ sung bằng Dox (5 μ M) trong trường hợp không có hoặc có Wnt C59 (10 μ M). B và D. Biểu đồ thể hiện tỷ lệ phần trăm tế bào Annexin V-PI+ (B) và tế bào DC CD40+CD86+ (D), không được bổ sung hoặc được bổ sung bằng Dox (5 μ M) trong trường

hợp không có hoặc có Wnt C59 (10 μ M). ***($p<0,001$) cho thấy sự khác biệt đáng kể so với tế bào DC đối chứng. #($p<0,05$) và ## ($p<0,01$) cho thấy sự khác biệt đáng kể so với tế bào DC được bổ sung bằng Dox (ANOVA).

Vì Dox làm tăng sự trưởng thành và apoptosis của tế bào DC ở người khỏe mạnh, tuy nhiên sự trưởng thành của tế bào DC không được ghi nhận ở bệnh nhân BCLC sau khi xử lý với Dox. Bên cạnh đó, biểu hiện của tín hiệu Wnt tăng lên khi tiếp xúc với Dox, do vậy, chúng tôi đã tiếp tục tiến hành nghiên cứu khảo sát vai trò của con đường tín hiệu Wnt trong tác động điều hòa của Dox đối với chức năng tế bào DC, thông qua việc sử dụng chất ức chế tín hiệu Wnt C59.

Như thể hiện trong Hình 3.13A-B, khi xử lý bằng Dox, tỷ lệ tế bào Annexin V-PI+ tăng lên so với mẫu đối chứng (ở người khỏe, từ 3.16% tăng lên 51.8%; trong khi đó, ở bệnh nhân thì tăng từ 2.34% lên 65.3% khi được xử lý với Dox) Trong khi đó, khi bổ sung Dox+Wnt C59 thì tỷ lệ Annexin V-PI+ đã giảm đi còn 22.9% ở nhóm người khỏe mạnh và 46.5% ở nhóm bệnh. Tế bào Annexin V+PI+ đã bị loại bỏ khi có mặt chất ức chế Wnt C59 ở cả hai nhóm người khỏe và bệnh nhân BCLC.

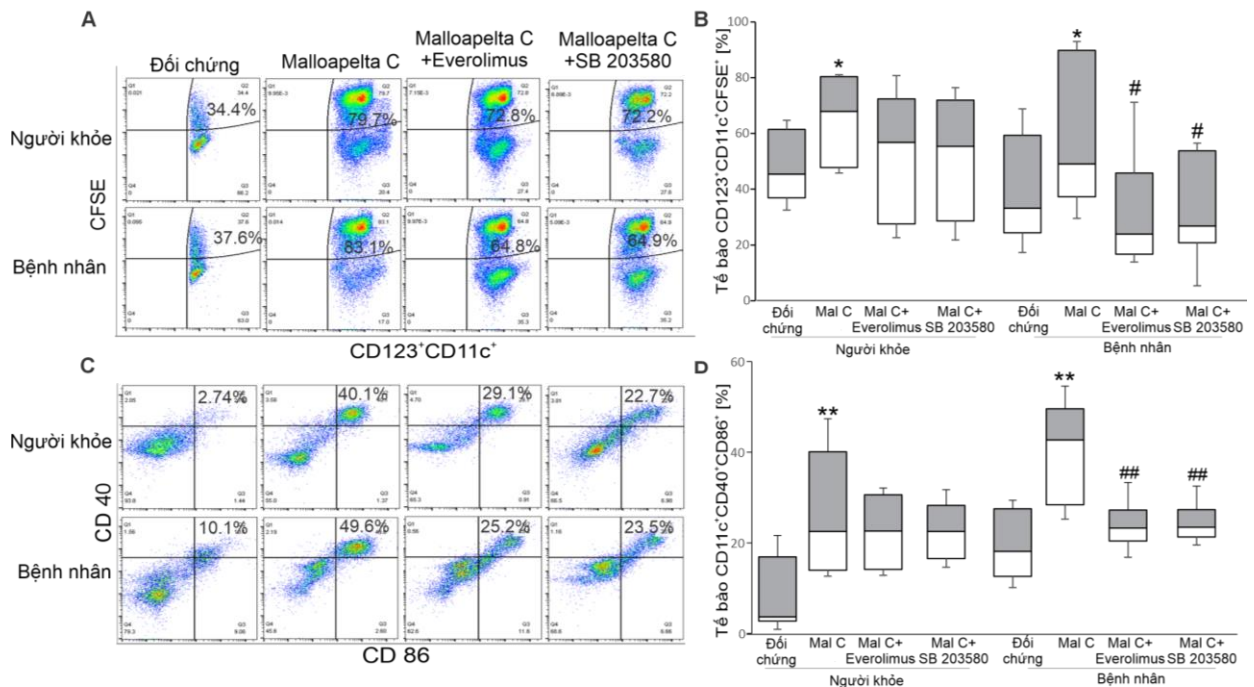
Tiếp theo, khi kiểm tra sự trưởng thành của tế bào DC khi xử lý với Dox có phải cũng bị ức chế bởi Wnt C59 hay không (Hình 3.13C-D), kết quả cho thấy tỷ lệ tế bào CD40+CD86+ tăng lên khi được xử lý với Dox so với nhóm đối chứng (từ 0,91% lên 41,1% khi xử lý với Dox, $p<0,001$) và khi được bổ sung Dox + Wnt C59 thì tỷ lệ tế bào CD40+CD86+ đã suy giảm xuống còn 15,6% như Hình 3.13C ($p<0,05$).

Kết quả này cho thấy rằng Dox gây ra apoptosis tế bào DC ở người khỏe và ở bệnh nhân BCLC thông qua con đường Wnt. Tuy nhiên, sự trưởng thành của tế bào DC ở bệnh nhân BCLC bị suy giảm khi tiếp xúc với Dox.

3.6.3. Vai trò của các con đường tín hiệu mTOR và MAPKp38 trong tác động của Malloapelta C lên quá trình trưởng thành và thực bào của tế bào tua

Để kiểm tra xem các phân tử tín hiệu mTOR và MAPKp38 có liên quan đến tác động điều hòa của Mal C lên chức năng của tế bào DC hay không, chúng tôi đã sử dụng Everolimus và SB 203580 để ức chế các con đường tín hiệu mTOR và MAPKp38 tương ứng.

Khả năng thực bào tế bào bạch cầu của tế bào DC CD11c+CD123+ từ bệnh nhân BCLC được kích thích bởi Mal C bị suy giảm khi môi trường nuôi cấy được bổ sung chất ức chế mTOR và MAPKp38 là Everolimus và SB203580 (Hình 3.14A-B) từ mẫu đối chứng là 37,6% tăng lên 83,1% khi bổ sung với Mal C, và giảm còn 64,8% khi bổ sung với Mal C + Everolimus và 64,9% khi bổ sung với Mal C +SB203580, trong khi khả năng thực bào của tế bào DC CD11c+CD123+ từ người khỏe mạnh không thay đổi khi có mặt Everolimus và SB203580; từ mẫu đối chứng là 34.4% tăng lên 79.7% khi bổ sung với Mal C, và giảm còn 72.8% khi bổ sung với Mal C + Everolimus và 72.2% khi bổ sung với Mal C +SB203580.



Hình 3.14: Ảnh hưởng của các con đường mTOR và MAPKp38 đến sự trưởng thành và thực bào của tế bào DC ở người khỏe mạnh và bệnh nhân BCLC.

A và C. Biểu đồ chấm thể hiện tế bào CD11c+CD123+ CFSE+ (A) và tế bào DC CD40+CD86+ (C), không được bổ sung hoặc được bổ sung bằng Mal C (20μM) khi không có hoặc có Everolimus (10μM) và SB 203580 (10μM). B và D. Biểu đồ thể hiện tỷ lệ phần trăm tế bào CD11c+CD123+ CFSE+ (B) và tế bào DC CD40+CD86+ (D), không được bổ sung hoặc được bổ sung bằng Mal C (20μM) khi không có hoặc có Everolimus (10μM) và SB 203580 (10μM). * ($p < 0,05$) và ** ($p < 0,01$) cho thấy sự khác biệt đáng kể so với tế

bào DC đối chứng. #($p < 0,05$) và ## ($p < 0,01$) cho thấy sự khác biệt đáng kể so với tế bào DC được bổ sung bằng Mal C (ANOVA).

Cuối cùng, vai trò của các con đường tín hiệu mTOR và MAPKp38 trong quá trình trưởng thành của tế bào DC được kích thích bởi Mal C đã được khảo sát thông qua việc sử dụng các chất ức chế tương ứng là Everolimus và SB203580. Ở nhóm bệnh nhân BCLC, tỷ lệ tế bào DC trưởng thành tăng từ 10,1% ở mẫu đối chứng lên 49,6% sau khi xử lý với Mal C, nhưng giảm còn 25,2% và 23,5% khi bổ sung lần lượt Everolimus và SB203580. Tương tự, ở nhóm người khỏe mạnh, tỷ lệ tế bào DC CD40+CD86+ tăng từ 2,74% lên 40,1% khi xử lý với Mal C và giảm xuống còn 29,1% và 22,7% khi kết hợp Mal C với Everolimus hoặc SB203580.

Kết quả cho thấy rằng, khi có mặt Mal C, các con đường mTOR và MAPKp38 ức chế sự trưởng thành và thực bào của các tế bào DC có trong bệnh nhân BCLC.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính

4.1.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở bệnh nhân BCTC

Mặc dù bệnh BCTC có thể xuất hiện ở mọi lứa tuổi, nhưng đây lại là một bệnh lý chủ yếu của người cao tuổi. Sự liên hệ chặt chẽ giữa BCTC và tuổi tác khiến độ tuổi của bệnh nhân trở thành một yếu tố quan trọng cần được xem xét trong quá trình đánh giá ban đầu [106].

Kết quả nghiên cứu cho thấy một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng có sự khác biệt giữa các nhóm tiên lượng BCTC, trong đó tuổi và một số chỉ số huyết học, sinh hóa có xu hướng thay đổi giữa các nhóm. Tuy nhiên, không phải tất cả các chỉ số đều khác biệt có ý nghĩa thống kê. Đầu tiên, độ tuổi trung bình của nhóm tiên lượng xấu và trung bình cao hơn đáng kể so với nhóm tiên lượng tốt. Đây là một đặc điểm đã được chỉ ra ở trong nhiều nghiên cứu: tuổi cao là yếu tố tiên lượng độc lập liên quan đến tỷ lệ đáp ứng điều trị thấp và thời gian sống còn ngắn hơn ở bệnh nhân BCTC do chức năng tủy xương suy giảm, gánh nặng đột biến cao hơn và khả năng dung nạp hóa trị liệu trong điều trị của bệnh nhân cũng kém hơn [107, 108]. Một nghiên cứu gần đây cho thấy bệnh nhân dưới 60 tuổi có tỷ lệ chữa khỏi cao hơn những người từ 60 tuổi trở lên. Một nghiên cứu tương tự về bệnh bạch cầu dòng tủy đã mô tả rằng tỷ lệ mắc các kiểu nhân phức tạp cũng được ghi nhận tăng theo tuổi [109]. Đặc biệt là với bệnh nhân trên 60 tuổi, thường có tiên lượng bệnh xấu hơn. Bên cạnh đó tỷ lệ sống sót sau 5 năm giảm rõ rệt theo độ tuổi, với sự khác biệt đáng kể giữa nhóm bệnh nhân dưới 40 tuổi và nhóm từ 80 tuổi trở lên [110]. Mặc dù những tiến bộ trong điều trị gần đây đã mang lại sự cải thiện nhất định về tỷ lệ sống ở nhóm bệnh nhân từ 65–74 tuổi, tuy nhiên ở nhóm người từ 75 tuổi trở lên lại ít hoặc không có tiến bộ rõ ràng [110].

Sự khác biệt về phân bố giới tính trong nghiên cứu này không có ý nghĩa thống kê với tỷ lệ bệnh nhân giữa nam và nữ là gần như tương đồng. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đây cho thấy BCTC xảy ra thường xuyên hơn ở nam giới so với nữ giới, và tỷ lệ sống sót tương đối sau 5 năm ở với phụ nữ mắc BCTC thường tốt hơn nam giới (với số liệu báo cáo là 60,4% ở nữ giới so với 48.8% ở nam giới) [111].

Đặc điểm phản ánh chức năng của gan, thận như nồng độ creatinine, bilirubin toàn phần và bilirubin gián tiếp của nhóm tiên lượng tốt đều thấp hơn so với hai nhóm còn lại. Tuy nhiên chúng vẫn nằm trong khoảng giá trị bình thường. Điều này chưa cho thấy mức độ tổn thương gan thận ở bệnh nhân BCTC. Các nghiên cứu trước đây cũng ghi nhận rằng tăng bilirubin máu ở bệnh nhân BCTC liên quan đến mức độ xâm lấn tủy cao, rối loạn chuyển hóa và tăng nguy cơ biến chứng, bao gồm rối loạn đông máu và hội chứng ly giải khối u [112]. Tăng creatinine không chỉ là dấu hiệu của tổn thương thận mà còn là yếu tố tiên lượng xấu ảnh hưởng trực tiếp đến tỷ lệ tử vong sớm trong điều trị BCTC do bệnh nhân bị giới hạn liều thuốc hóa trị khi sử dụng [112]. Bên cạnh đó, nồng độ creatinine trong huyết tương tăng cao cũng là một chỉ số quan trọng giúp đánh giá mức độ nghiêm trọng của bệnh. Ngoài ra, nồng độ bilirubin gián tiếp cao cũng đã được chỉ ra là có liên quan đến huyết khối ở bệnh bạch cầu tủy cấp dòng tủy [113].

Đồng thời, sự gia tăng số lượng hồng cầu có nhân ở nhóm tiên lượng trung bình và nhóm tiên lượng xấu cho thấy tình trạng xâm lấn của tế bào ác tính trong tủy xương, đây cũng là dấu hiệu thường gặp ở BCTC giai đoạn tiến triển. Hồng cầu có nhân là tiền thân của hồng cầu chưa trưởng thành, nằm trong tủy xương và không có trong hệ tuần hoàn của người trưởng thành khỏe mạnh [114].

Số lượng tế bào bạch cầu cao là một đặc điểm huyết học điển hình trong chẩn đoán BCTC. Số lượng bạch cầu cao tại thời điểm chẩn đoán thường liên quan đến tiên lượng xấu hơn trong BCTC. Số lượng bạch cầu cao trong bệnh bạch cầu cấp tính dẫn đến đột quy, xuất huyết nội, suy đa tạng hoặc mất thị lực. Bên cạnh đó, tuổi cao và số lượng bạch cầu cao là các yếu tố nguy cơ dẫn đến thất bại điều trị ở bệnh nhân ung thư máu [115].

Số lượng bạch cầu tăng mạnh ở nhóm nguy cơ trung bình, phù hợp với đặc điểm của các bệnh nhân có tiên lượng kém thường có số lượng bạch cầu tăng cao hơn rõ rệt. Bên cạnh đó, số lượng bạch cầu tăng mạnh ở nhóm nguy cơ trung bình tăng cao hơn cả nhóm tiên lượng xấu, sự khác biệt này cho thấy số lượng bạch cầu không hoàn toàn tăng tuyến tính theo mức độ nguy cơ di truyền. Ở bệnh nhân BCTC, số lượng bạch cầu tại thời điểm chẩn đoán chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố, bao gồm mức độ tăng sinh của tế bào blast, khả năng huy động tế bào từ tủy xương ra máu ngoại vi và tình trạng suy giảm tạo

máu. Do đó, chỉ số bạch cầu cần được diễn giải kết hợp với các đặc điểm di truyền và các thông số huyết học khác thay vì sử dụng đơn độc để phản ánh mức độ nguy cơ. Số lượng tế bào lympho thấp nhất ở nhóm tiên lượng xấu, và điều này tương đồng với mô tả trong các báo cáo chỉ ra việc suy giảm số lượng tế bào lympho là một yếu tố tiên lượng xấu ở bệnh nhân BCTC [116]. Ngoài ra, các đặc điểm lâm sàng khác, bao gồm urê, glucose, axit uric, bilirubin trực tiếp, protein tổng số, albumin, globulin, ferritin, AST, ALT, GGT, LDH, công thức máu, hematocrit, tỷ lệ hồng cầu lưới, số lượng tiểu cầu, tế bào non cũng như bạch cầu (ngoại trừ tế bào lympho) đều không có sự khác biệt đáng kể giữa ba nhóm.

Nhóm trung bình và nhóm xấu thể hiện mức độ rối loạn lớn hơn về chuyển hóa, chức năng cơ quan và hệ miễn dịch, góp phần giải thích tiên lượng kém hơn ở các nhóm bệnh nhân này. Do đó, việc kết hợp đặc điểm lâm sàng – sinh hóa với phân tầng nguy cơ dựa trên phân loại nhiễm sắc thể và phân tử sẽ giúp nâng cao độ chính xác trong đánh giá tiên lượng cho bệnh nhân BCTC.

4.1.2. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở bệnh nhân BCLC

Kết quả nghiên cứu cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa nhóm BCLC tiên lượng trung bình và nhóm tiên lượng xấu ở nhiều chỉ số sinh học quan trọng. Độ tuổi trung bình của nhóm tiên lượng xấu cao hơn có ý nghĩa so với nhóm tiên lượng trung bình, điều này phù hợp với một nghiên cứu đã công bố rằng tuổi cao là yếu tố tiên lượng bất lợi mạnh nhất ở BCLC do nó liên quan đến tình trạng nặng của bệnh lớn hơn, tỷ lệ đột biến liên quan đến kháng thuốc cao hơn và khả năng dung nạp điều trị thấp hơn [117].

LDH tăng được xem là dấu ấn sinh học quan trọng liên quan đến khối lượng tế bào ung thư cao, khả năng xâm lấn tủy mạnh và tiên lượng kém, phù hợp với quan sát trong nghiên cứu này. Sự tăng cao của nồng độ LDH là dấu hiệu của tăng sinh và phá hủy tế bào, tuy không phải là một dấu ấn đặc hiệu cho BCLC nhưng nó rất thường gặp và có giá trị hỗ trợ trong đánh giá mức độ tiến triển của bệnh. Sự gia tăng LDH đáng kể ở nhóm tiên lượng xấu phản ánh quá trình tăng sinh của tế bào non và tổn thương của cơ thể [118].

Số lượng bạch cầu ở nhóm tiên lượng xấu tăng hơn sáu lần so với nhóm tiên lượng trung bình, đồng nhất với các báo cáo quốc tế cho thấy việc số lượng bạch cầu tăng cao là yếu tố tiên lượng xấu liên quan chặt chẽ với nguy

cơ tái phát cao hơn và thời gian sống còn không bệnh cũng như sống còn toàn bộ ngắn hơn ở bệnh nhân [119].

Tổng hòa các chỉ số, kết quả của chúng tôi nhất quán với dữ liệu quốc tế, khẳng định rằng LDH tăng cao, số lượng bạch cầu tăng mạnh, và tuổi cao đều là dấu ấn quan trọng liên quan đến tiên lượng xấu ở bệnh nhân BCLC.

4.2. Đánh giá kiểu hình miễn dịch và nồng độ cytokine ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính

Trong nghiên cứu này, IL-6, TNF- α , TGF- β và IL-35 được lựa chọn nhằm đánh giá tình trạng viêm và điều hòa miễn dịch ở bệnh nhân BCTC và BCLC. Việc phân tích theo nhóm tiên lượng được thực hiện nhằm xác định liệu sự thay đổi của các cytokine có liên quan đến đặc điểm sinh học và nguy cơ bệnh hay không [120].

Mặc dù TGF- β được biết đến với vai trò kép trong ung thư, vừa là chất ức chế vừa là chất thúc đẩy tùy thuộc vào bối cảnh, nhưng những kết quả nghiên cứu trên cho thấy vai trò tiềm tàng của nó như một chất ức chế khối u trong quá trình hình thành bạch cầu giai đoạn đầu. Tuy nhiên, sự gia tăng nồng độ TGF- β có thể là hiện tượng thứ phát phản ánh tình trạng bệnh, thay vì đóng vai trò nguyên nhân trực tiếp trong cơ chế bệnh sinh. Các nghiên cứu đánh giá trên mẫu tủy xương có thể giúp làm rõ hơn vai trò của TGF- β trong bối cảnh BCLC [121]. Nồng độ TNF- α cũng có tương quan thuận với số lượng tế bào non và bạch cầu [122] cũng như tiên lượng xấu trong bệnh BCLC [123] [124].

4.2.1. Nồng độ cytokine ở BCTC

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy các cytokine tiền viêm như IL-6 và TNF- α đều tăng rõ rệt ở bệnh nhân BCTC so với nhóm chứng, nhưng không khác biệt có ý nghĩa giữa các nhóm tiên lượng; ngược lại, TGF- β tăng có ý nghĩa ở nhóm tiên lượng trung bình và nhóm tiên lượng xấu so với tiên lượng tốt. Những quan sát này phù hợp với những nghiên cứu khác về vai trò của viêm và điều hòa miễn dịch trong bệnh bạch cầu khi IL-6 và TNF- α là các cytokine phản ánh tình trạng viêm và có thể tham gia thúc đẩy các tín hiệu tăng trưởng hoặc kháng apoptosis ở tế bào ác tính, do đó chúng thường tăng ở các bệnh lý ác tính huyết học nhưng không phải lúc nào cũng mang tính phân tầng nguy cơ đặc hiệu (như trong nghiên cứu này của chúng tôi). Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đây cho thấy IL-6 và TNF- α đóng góp vai

trò là những trung tâm điều hòa giữa viêm và ung thư, tuy nhiên chúng lại không đủ tính đặc hiệu cho phân tầng tiên lượng nguy cơ bệnh nếu đứng một mình [125].

Mặc dù nồng độ TGF- β ghi nhận được ở các nhóm bệnh nhân vẫn nằm trong giới hạn tham chiếu của quần thể khỏe mạnh, nhưng sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các phân nhóm tiên lượng cho thấy cytokine này đóng vai trò như một bộ điều chỉnh trong vi môi trường ác tính. Trong bối cảnh BCTC, sự tăng nồng độ TGF- β từ nhóm tiên lượng tốt sang các nhóm tiên lượng kém hơn, dù vẫn trong ngưỡng sinh lý đã phản ánh mức độ gia tăng dần của áp lực ức chế miễn dịch. Kết quả này ủng hộ quan điểm rằng xu hướng biến thiên của cytokine mang giá trị chỉ báo quan trọng hơn so với việc vượt ngưỡng giá trị tuyệt đối, phù hợp với báo cáo trước đây về vai trò của TGF- β trong việc hỗ trợ sự tồn tại và tiến triển của tế bào leukemia [126].

Kết quả phân tích nồng độ cytokine của chúng tôi ủng hộ quan điểm rằng trong số các cytokine khảo sát như IL-6 và TNF- α phản ánh gánh nặng viêm toàn thân nhưng không phân tầng rõ rệt tiên lượng, trong khi TGF- β tăng ở nhóm tiên lượng trung bình và nhóm tiên lượng xấu gợi ý vai trò quan trọng của cơ chế ức chế miễn dịch ở BCTC.

4.2.2. Nồng độ cytokine ở BCLC

Tương tự như nồng độ cytokine IL-6 và TNF- α tăng cao ở bệnh nhân BCTC, bệnh nhân BCLC còn có nồng độ IL-35 tăng cao so với người khỏe mạnh. IL-35 là một cytokine thuộc họ IL-12, chủ yếu được tiết bởi tế bào T điều hòa (Treg), có vai trò quan trọng trong điều hòa đáp ứng miễn dịch và duy trì trạng thái ức chế miễn dịch của khối u [127]. Ngoài ra, tương đồng với một số nghiên cứu cũng cho thấy nồng độ IL-35 tăng cao có liên quan đến gánh nặng tế bào non, mức độ tiến triển bệnh và tiên lượng xấu ở bệnh nhân bạch cầu [128]. Ngược lại, nồng độ TGF- β trên bệnh nhân BCLC giảm rõ rệt so với người khỏe mạnh. Kết quả cho thấy IL-6 và TNF- α đóng vai trò là các chỉ dấu về biểu hiện viêm của bệnh nhân BCLC, trong khi TGF- β thể hiện ưu thế vượt trội như một thông số hỗ trợ phân tầng tiên lượng.

IL-6 được xem là cytokine chính trong đáp ứng viêm mạn tính, hoạt hóa con đường JAK/STAT3 và thúc đẩy sự sống còn cũng như khả năng kháng apoptosis của tế bào non ở bệnh bạch cầu [129]. Trong BCLC, nồng độ IL-6 tăng cao hơn so với người khỏe mạnh ($p < 0,001$), tuy nhiên khi phân tầng

tiền lượng theo nhóm tiền lượng thì sự khác biệt giữa các nhóm lại không đạt ý nghĩa thống kê, điều này cho thấy IL-6 phản ánh tình trạng viêm chung hơn là mức độ ác tính của bệnh, do đó không đủ để phân tầng nguy cơ trong quần thể nghiên cứu hiện tại. Tương tự, TNF- α là một chất trung gian viêm hệ thống có vai trò hoạt hóa NF- κ B, cũng gia tăng ở bệnh nhân BCLC so với nhóm chứng nhưng không khác biệt giữa các nhóm tiền lượng, điều này có thể xảy ra do phản ứng viêm vốn phổ biến trong bệnh huyết học ác tính chỉ mang tính chất khu trú, không tạo ra sự gia tăng nồng độ lớn như trong nhiễm trùng cấp tính [130].

Ngược lại, TGF- β cho thấy giá trị phân tầng tốt khi nó tăng có ý nghĩa và tăng cao khác biệt hoàn toàn giữa nhóm tiền lượng trung bình và tiền lượng xấu. Kết quả này phù hợp với vai trò của TGF- β là một cytokine điều hòa miễn dịch quan trọng, đóng vai trò ức chế hoạt động gây độc của tế bào T/NK, cảm ứng T điều hòa (Treg) và hình thành “niche bảo vệ” cho tế bào ác tính trong tủy xương [31]. Việc nồng độ TGF- β ghi nhận được vẫn nằm trong ngưỡng bình thường có thể xuất phát từ đặc tính hoạt động cận tiết (paracrine) mạnh mẽ của cytokine này. TGF- β được tiết ra chủ yếu tại vi môi trường tủy xương; nồng độ đo được ở máu ngoại vi thực chất là phần dư thừa sau khi đã bị pha loãng [131]. Do đó, sự biến thiên tương đối giữa các nhóm tiền lượng, thay vì giá trị tuyệt đối vượt ngưỡng đối chứng, chính là bằng chứng xác thực cho sự gia tăng áp lực ức chế miễn dịch ở các nhóm nguy cơ cao [132].

Nhìn chung, kết quả này cho thấy các cytokine IL-6, TNF- α phản ánh gánh nặng viêm toàn thân, trong khi cytokine điều hòa miễn dịch như TGF- β lại mang giá trị phân tầng nguy cơ, còn IL-35 cần được xác nhận thêm khi kết hợp với phân tích các mô hình đa biến cùng chỉ số lâm sàng–huyết học.

4.2.3. Các dấu ấn miễn dịch ở bệnh nhân BCTC

Các cụm biệt hóa hay CD là những phân tử quan trọng trên bề mặt tế bào, giúp phân biệt và phân loại các loại tế bào khác nhau, bao gồm tế bào máu bình thường và tế bào ác tính [133]. Các dấu ấn này đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển và tiến triển của các bệnh ác tính huyết học ở BCTC hay BCLC, và có thể được sử dụng để sàng lọc, chẩn đoán, tiên lượng, dự đoán đáp ứng điều trị và theo dõi sự tiến triển của bệnh [133].

Trong nghiên cứu này, sự gia tăng quần thể tế bào NK CD56+CD40+ và CD56+CD44+ cho thấy sự thay đổi kiểu hình của quần thể tế bào NK ở bệnh nhân BCTC. CD56 có biểu hiện bất thường (với tỷ lệ từ 10 đến 40% tùy nghiên cứu [134] [135]) được coi là yếu tố tiên lượng xấu ở bệnh nhân BCTC. Kết quả này của chúng tôi phù hợp với các báo cáo về việc bệnh nhân BCTC có CD56+ thường có thời gian sống sót chung ngắn hơn đáng kể; cụ thể là bốn tháng so với 14.5 tháng ở nhóm CD56- [73, 135]. Bên cạnh CD56, một cụm biệt hóa khác có vai trò quan trọng trong miễn dịch là CD40, nó đóng một vai trò quan trọng trong hệ thống miễn dịch bằng cách kích hoạt các tế bào trình diện kháng nguyên như tế bào B, tế bào tua và đại thực bào, dẫn đến tăng cường phản ứng tế bào T và sự phát triển của miễn dịch dịch thể. CD44 cũng đóng một vai trò quan trọng trong các quá trình tế bào khác nhau, bao gồm kết dính tế bào, di chuyển, tăng sinh, biệt hóa và sự sống sót của các tế bào gốc cũng như tiền thân tạo máu [101]. Biểu hiện CD44 có mối liên quan với thời gian sống sót ngắn hơn ở bệnh nhân BCTC. Đồng thời sự biểu hiện quá mức của CD44+ có liên quan đến tăng khả năng tái phát trong BCTC [136]. Mặc dù biểu hiện các marker hoạt hóa tăng cao, các tế bào NK ở bệnh nhân BCTC thường bị rối loạn tín hiệu nội bào, dẫn đến tình trạng suy kiệt và mất khả năng gây độc tế bào [118].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, sự gia tăng đáng kể tỷ lệ tế bào Treg trong nhóm bệnh nhân BCTC cũng phù hợp với các nghiên cứu quốc tế. Một số nghiên cứu đã chỉ ra sự tăng cao của tế bào Treg ở cả máu ngoại vi và tủy xương của bệnh nhân BCTC so với người khỏe mạnh [137, 138]. Bệnh nhân BCTC có số lượng tế bào Treg tăng cao, và mức tăng này liên quan chặt chẽ đến tiên lượng xấu và giảm đáp ứng điều trị [139]. Một nghiên cứu của Zhou và cộng sự (2019) cũng cho thấy Treg tăng cả trong máu ngoại vi và tủy xương ở bệnh nhân BCTC mới chẩn đoán, qua đó làm suy yếu chức năng tế bào T (CD4+/CD8+) giúp tạo điều kiện cho tế bào non trốn tránh miễn dịch [140].

Cụm tế bào dương tính với CD13 và CD117 là đặc trưng của các tế bào dòng tủy chưa trưởng thành, và sự gia tăng mạnh mẽ của chúng phản ánh gánh nặng tế bào non tăng cao, phù hợp với đặc điểm bệnh học của BCTC [141, 142]. Trong đó, CD117 (c-Kit) là dấu ấn bề mặt của tế bào gốc và tiền thân dòng tủy, và là đặc trưng nổi bật của tế bào non chưa trưởng thành. Theo

báo cáo của Arber và cộng sự (2016), hầu hết bệnh nhân BCTC đều có tỷ lệ tế bào CD117⁺ cao và đây là chỉ dấu quan trọng để xác định blast trong chẩn đoán flow cytometry [143]. Thêm vào đó, CD117 liên quan đến các đột biến gen *KIT*, vốn làm tăng tín hiệu tăng sinh và được xem là yếu tố tiên lượng xấu trong một số phân nhóm BCTC [142]. Sự tăng cao của tỷ lệ CD13⁺CD117⁺ cao trong kết quả của chúng tôi phản ánh gánh nặng blast lớn, phù hợp với tình trạng bệnh và các nghiên cứu trên thế giới.

Tóm lại, dữ liệu của chúng tôi cho thấy bệnh nhân BCTC trải qua sự mất cân bằng miễn dịch đa chiều. Đó là sự kết hợp giữa của sự tăng sinh ác tính của dòng tế bào tiền thân (CD117⁺); kết hợp cùng sự suy giảm chức năng tế bào NK dù có biểu hiện hoạt hóa (CD56/CD40/CD44); và cuối cùng là sự bảo vệ thông qua các tế bào điều hòa miễn dịch (Treg). Những phát hiện này củng cố quan điểm rằng điều trị BCTC hiện nay không nên chỉ tập trung vào việc tiêu diệt tế bào blast mà còn cần hướng tới việc tái lập sự cân bằng miễn dịch và phá vỡ vi môi trường bảo vệ do các quần thể tế bào này thiết lập.

4.2.4. Các dấu ấn miễn dịch ở bệnh nhân BCLC

Các dấu ấn phổ biến nhất như CD10, CD19, CD20, CD45 và CD34 được sử dụng để xác định các giai đoạn trưởng thành trong BCLC [4, 5]. Trong đó, sự biểu hiện quá mức của CD20 ở bệnh nhân BCLC có liên quan đến tiên lượng xấu và tăng khả năng kháng thuốc [144]. Tiếp theo, số lượng và hoạt động của tế bào Treg và NK được đánh giá ở người khỏe mạnh và bệnh nhân BCLC.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi ghi nhận tỷ lệ tế bào CD56⁺CD44⁺ tăng cao ở bệnh nhân BCLC, phù hợp với kết quả của một nghiên cứu đã mô tả rằng các tế bào NK ở BCLC thường rơi vào trạng thái hoạt hóa bất thường hoặc biệt hóa không hoàn chỉnh, dẫn đến giảm chức năng gây độc tế bào [145].

Đặc biệt, việc phát hiện CD56⁺ trên cả dòng lympho B và T ác tính là một dấu hiệu lâm sàng nghiêm trọng. Đáng chú ý, biểu hiện CD56⁺ và CD200⁺ tại thời điểm chẩn đoán có thể được xem là các marker độc lập để nhận diện nhóm bệnh nhân nguy cơ cao, có liên quan đáng kể đến thời gian sống thêm toàn bộ và thời gian sống thêm không bệnh ngắn hơn, đồng thời gia tăng khả năng kháng hóa trị [146].

Tỷ lệ tế bào Treg (CD3+CD4+CD25+FOXP3+) cũng tăng đáng kể, tương đồng với nghiên cứu của Idris và cộng sự, trong đó số lượng Treg gia tăng có liên quan chặt chẽ với ức chế miễn dịch, giảm đáp ứng điều trị và thời gian sống còn ngắn hơn ở bệnh nhân BCLC [147]. Nhờ khả năng ức chế hoạt động của tế bào T, NK và tế bào trình diện kháng nguyên, Treg đóng vai trò trung tâm trong việc giúp các tế bào bạch cầu ác tính né tránh sự giám sát miễn dịch, từ đó tạo điều kiện cho khối u phát triển và lan rộng [148] [149].

4.3. Mối liên quan giữa biểu hiện gen A20 và CYLD ở các nhóm tiên lượng trên bệnh nhân bạch cầu cấp tính

Thông qua khả năng kiểm soát tín hiệu viêm và đáp ứng miễn dịch, A20 và CYLD được xem là các yếu tố ức chế khối u quan trọng trong nhiều bệnh lý ác tính huyết học. 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 [150]. Đột biến gen A20 cũng liên quan đến nguy cơ mắc bệnh BCTC [151] và bệnh BCLC [152]. Trong khi đó biểu hiện gen CYLD giảm lại liên quan đến bệnh ung thư thể rắn và BCLC [153], đồng thời sự hiện diện của CYLD thúc đẩy quá trình apoptosis ở bệnh BCTC và BCLC [154].

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 [155]. 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 [156]. 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 [157]. Những dữ liệu này cho thấy A20 và CYLD có vai trò thiết yếu trong việc duy trì cân bằng nội môi miễn dịch và kiểm soát phản ứng viêm.

Trong hệ miễn dịch và bệnh lý ác tính huyết học, A20, CYLD đóng vai trò ức chế quan trọng của tín hiệu NF- κ B, một con đường tín hiệu quan trọng giúp điều hòa đáp ứng viêm, tăng sinh và khả năng kháng apoptosis của tế bào ung thư. Khi chức năng hoặc biểu hiện của các DUB này bị suy giảm, hoạt hóa NF- κ B sẽ tăng lên, từ đó góp phần thúc đẩy quá trình sinh ung thư và tạo môi trường viêm hỗ trợ khối u. Điều này hoàn toàn phù hợp với kết quả

ngiên cứu của chúng tôi khi biểu hiện các gen *CYLD*, *A20* ở người bệnh đều thấp hơn so với nhóm người khỏe đối chứng.

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. Điều này cho thấy sự suy giảm chức năng *A20* có thể làm tăng tính nhạy cảm của tế bào lympho B với các tín hiệu kích thích, từ đó thúc đẩy rối loạn miễn dịch và bệnh lý tự miễn [158]. Bên cạnh đó, 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 [159]. Thiếu hụt *A20* trong các tế bào dòng tủy có thể dẫn đến viêm đa khớp ăn mòn và tăng hủy xương, góp phần làm rối loạn quá trình tạo xương [160].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy mức độ biểu hiện của các gen *A20* và *CYLD* ở nhóm bệnh nhân BCTC thấp hơn đáng kể so với nhóm đối chứng khỏe mạnh. Trong đó, biểu hiện gen *A20* ở bệnh nhân tiên lượng trung bình so xu hướng cao hơn bệnh nhân tiên lượng tốt và bệnh nhân tiên lượng xấu. Điều này có thể phản ánh tính dị hợp sinh học của nhóm tiên lượng trung bình, vốn là nhóm bao gồm nhiều kiểu bất thường di truyền khác nhau với mức độ hoạt hóa tín hiệu NF- κ B không đồng nhất [142]. Biểu hiện của gen *A20* thường cao hơn ở người trẻ so với người cao tuổi. Sự khác biệt này có thể do sự phân bố độ tuổi giữa các nhóm tiên lượng, khi tuổi cao thường là một yếu tố tiên lượng độc lập bất lợi ở BCTC [161]. Quá trình lão hóa hệ tạo máu thường đi kèm với tình trạng rối loạn điều hòa miễn dịch và suy giảm chức năng của các cơ chế kiểm soát tín hiệu viêm nội bào, trong đó có các enzyme deubiquitinase như *A20* và *CYLD* [162]. Do đó, mức biểu hiện *A20* thấp hơn ở nhóm bệnh nhân cao tuổi, không chỉ phản ánh đặc tính sinh học liên quan đến tuổi tác, mà còn giải thích tại sao nhóm tiên lượng xấu với phần lớn bệnh nhân lớn tuổi lại ghi nhận mức mRNA của gen *A20* thấp hơn rõ rệt so với nhóm tiên lượng trung bình. Ngược lại, nhóm tiên lượng trung bình theo phân loại ELN và NCCN thường bao gồm nhiều trường hợp có kiểu nhân bình thường hoặc các bất thường di truyền không thuộc nhóm

nguy cơ cao, với độ tuổi trung bình thấp hơn và khả năng duy trì đáp ứng tín hiệu nội bào còn tương đối tốt [142]. Việc ghi nhận mức biểu hiện *A20* cao hơn ở nhóm này có thể phản ánh cơ chế điều hòa phản hồi nhằm hạn chế sự hoạt hóa quá mức của NF- κ B ở các tế bào blast bạch cầu.

Ở bệnh nhân BCLC, mức biểu hiện của chúng không khác biệt ở các phân nhóm tiên lượng lâm sàng. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đây khi cho thấy sự bất hoạt hay giảm chức năng của *A20* có thể thúc đẩy tăng sinh tế bào blast trong BCTC và BCLC, nhưng không phải lúc nào cũng có liên quan chặt chẽ với phân nhóm nguy cơ [163]. Ở một số dòng tế bào và mô hình động vật, sự tăng biểu hiện *A20* làm giảm hoạt động NF- κ B, gây ức chế tăng trưởng và tăng apoptosis, chứng tỏ tính chất ức chế khối u của *A20* trong bối cảnh này [164].

Tương tự, *CYLD* là một deubiquitinase có vai trò ức chế NF- κ B, được báo cáo là liên quan đến sự tăng sinh bất thường và khả năng kháng apoptosis trong tế bào ác tính huyết học [18]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, biểu hiện *CYLD* ở bệnh nhân BCLC không có sự khác biệt rõ ràng giữa các nhóm tiên lượng. Điều này cho thấy vai trò của *CYLD* trong BCLC có thể liên quan nhiều hơn đến cơ chế sinh bệnh học chung thay vì phản ánh trực tiếp mức độ nguy cơ lâm sàng. Nhiều nghiên cứu lâm sàng và mô hình học đã chỉ ra rằng giảm biểu hiện hoặc mất chức năng *CYLD* liên quan đến tiên lượng xấu ở một số bệnh lý huyết học (ví dụ bệnh đa u tủy xương) và dẫn đến tăng hoạt động tín hiệu thúc đẩy tăng sinh và kháng apoptosis [18].

Sự biểu hiện *CYLD* còn được ghi nhận 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 [165]. Là một deubiquitinase có vai trò điều hòa âm tính tín hiệu NF- κ B, *CYLD* tham gia kiểm soát quá trình tăng sinh, apoptosis và hoạt hóa của tế bào miễn dịch. Trong các bệnh lý ác tính huyết học, đặc biệt ở các dòng tế bào BCLC nguồn gốc lympho T và lympho B, biểu hiện *CYLD* được báo cáo giảm đáng kể [166]. Tuy nhiên, vai trò của *CYLD* trong bệnh bạch cầu cấp, đặc biệt là BCTC, hiện vẫn chưa được làm sáng tỏ đầy đủ. Phần lớn các nghiên cứu về đột biến hoặc mất chức năng *CYLD* hiện nay chủ yếu tập trung trên các khối u rắn, trong khi số lượng nghiên cứu trên các bệnh lý ác tính huyết học còn tương đối hạn chế. Một số dữ liệu cho thấy sự giảm biểu hiện hoặc mất chức năng *CYLD* có thể liên quan đến tăng hoạt hóa các con đường

tín hiệu thúc đẩy tăng sinh và kháng apoptosis của tế bào ác tính, từ đó góp phần vào tiến triển bệnh và tiên lượng bất lợi [166]. Do CYLD tham gia điều hòa nhiều con đường truyền tín hiệu quan trọng liên quan đến miễn dịch và sống còn tế bào, việc làm sáng tỏ cơ chế hoạt động của CYLD trong bệnh bạch cầu cấp có thể giúp mở ra các hướng tiếp cận mới trong điều trị nhắm trúng đích đối với các khối u ác tính huyết học.

4.4. Mỗi liên quan giữa biểu hiện gen A20 với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và miễn dịch ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính

4.4.1. Mỗi liên quan giữa biểu hiện gen A20 với kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCTC

A20 được biết đến như một chất điều hòa âm tính chức năng của các tế bào miễn dịch trong BCTC [167]. Đáng chú ý, những bệnh nhân BCTC có biểu hiện A20 thấp có số lượng tế bào dòng lympho thấp hơn, bao gồm tế bào lympho, tế bào CD3+, CD8+, CD10+, CD19+, CD20+ và CD79a+ cũng như số lượng tế bào dòng tủy cao hơn như tế bào MPO+, CD33+ và CD13+CD117+. Hầu hết các tế bào non trong BCTC đều biểu hiện cao MPO, CD33, CD13 và CD117, tuy nhiên, chúng không có hoặc biểu hiện ở mức thấp trong các tế bào gốc tạo máu bình thường [168].

Sự giảm biểu hiện A20 ở bệnh nhân BCTC có thể góp phần hình thành một vi môi trường tủy xương thuận lợi cho sự phát triển của tế bào ác tính nhưng bất lợi đối với đáp ứng miễn dịch chống khối u. A20 được biết đến là một gen điều hòa âm tính quan trọng của tín hiệu NF- κ B, có vai trò kiểm soát sự tăng sinh của tế bào dòng tủy và duy trì cân bằng miễn dịch [169]. Khi biểu hiện A20 suy giảm, quá trình tăng sinh và tích lũy các tế bào dòng tủy ác tính trở nên mạnh hơn, thể hiện qua sự gia tăng các quần thể tế bào MPO+, CD33+ và CD13+CD117+, vốn là các dấu ấn liên quan đến mức độ blast cao và tình trạng bệnh tiến triển nặng [170]. Đáng chú ý, sự gia tăng đồng thời tỷ lệ tế bào blast và tế bào Treg ở nhóm bệnh nhân có biểu hiện A20 thấp cho thấy khả năng hình thành một vi môi trường ức chế miễn dịch, góp phần bảo vệ tế bào ác tính, bất hoạt chức năng tế bào NK và thúc đẩy hiện tượng trốn tránh miễn dịch của khối u [171].

Kết quả này phù hợp với nhận định rằng A20 có vai trò điều hòa ngược quá trình xâm nhập và tăng sinh của tế bào non dòng tủy, đồng thời hỗ trợ duy trì quần thể tế bào lympho ở bệnh nhân BCTC. Tuy nhiên, vai trò sinh

học của A20 có thể khác nhau tùy theo từng dòng bệnh bạch cầu. Trong khi A20 chủ yếu thể hiện vai trò ức chế khối u ở BCTC, một số nghiên cứu ở BCLC lại cho thấy A20 có thể thúc đẩy tăng sinh và ức chế apoptosis ở BCLC [172], phản ánh tính phức tạp và phụ thuộc bối cảnh của cơ chế điều hòa miễn dịch bởi A20 trong các bệnh lý ác tính huyết học.

4.4.2. Mối liên quan giữa biểu hiện gen A20 với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân BCTC

Nhóm bệnh nhân có biểu hiện A20 cao ghi nhận nồng độ albumin cao hơn so với nhóm biểu hiện thấp, phù hợp với kết quả phân tích mối liên quan giữa A20 và kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCTC. Trong vi môi trường mà biểu hiện A20 bị suy giảm, hoạt hóa NF- κ B kéo dài có thể làm tăng sản xuất các cytokine tiền viêm như IL-6 và TNF- α , từ đó ảnh hưởng đến chức năng gan và làm giảm tổng hợp albumin [173]. Điều này cho thấy nhóm bệnh nhân có biểu hiện A20 thấp thường đi kèm với tình trạng viêm kéo dài, rối loạn điều hòa miễn dịch và tăng sinh tế bào ác tính mạnh hơn.

Bên cạnh đó, mối liên quan giữa biểu hiện A20 và số lượng tiểu cầu có thể phản ánh mức độ xâm lấn tủy xương và rối loạn chức năng tạo máu ở bệnh nhân bạch cầu cấp. Khi biểu hiện A20 suy giảm, sự gia tăng tích lũy tế bào blast trong tủy xương có thể làm ức chế quá trình biệt hóa mẫu tiểu cầu và giảm khả năng sinh tiểu cầu bình thường. Đồng thời, hoạt hóa kéo dài của các tín hiệu viêm nội bào cũng góp phần làm rối loạn vi môi trường tạo máu và ảnh hưởng đến chức năng của tế bào gốc tạo máu, đồng thời ức chế quá trình biệt hóa mẫu tiểu cầu [174]. Vì A20 tham gia điều hòa nhiều con đường tín hiệu liên quan đến đáp ứng viêm và apoptosis, sự thay đổi biểu hiện của gen này có thể ảnh hưởng gián tiếp đến khả năng duy trì chức năng tạo máu bình thường trong tủy xương.

Nhìn chung, các dữ liệu này cho thấy A20 không chỉ đóng vai trò điều hòa tín hiệu nội bào ở tế bào bạch cầu ác tính mà còn liên quan chặt chẽ đến tình trạng viêm hệ thống, cân bằng miễn dịch và chức năng tạo máu ở bệnh nhân bạch cầu cấp. Điều này gợi ý rằng A20 có thể là một dấu ấn sinh học tiềm năng phản ánh mức độ rối loạn miễn dịch và mức độ tiến triển của bệnh.

4.4.3. Mối liên quan giữa biểu hiện gen A20 và kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCLC

Mối liên quan giữa biểu hiện A20 và quần thể CD56⁺CD44⁺ cho thấy A20 có thể liên quan đến sự thay đổi kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân BCLC. Đánh giá đồng thời mức độ biểu hiện của A20 và số lượng tế bào CD56⁺CD44⁺ có thể hỗ trợ trong việc xác định bệnh nhân có nguy cơ tái phát cao hoặc không đáp ứng tốt với điều trị.

Một cơ chế sinh học tiềm năng giải thích mối liên hệ này có thể liên quan đến vai trò điều hòa âm tính của A20 đối với con đường tín hiệu NF-κB. Việc giảm biểu hiện A20 có thể dẫn đến sự hoạt hóa quá mức của NF-κB, từ đó làm tăng biểu hiện của các cụm biệt hóa như CD56 và CD44 ở BCLC. Bên cạnh đó, tình trạng thiếu hụt A20 có thể làm suy giảm chức năng của các tế bào miễn dịch, chẳng hạn như tế bào NK và tế bào tua, là những thành phần có vai trò trong việc nhận diện và loại bỏ các tế bào ác tính biểu hiện CD56⁺CD44⁺.

Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu quốc tế cho thấy A20 là một gen ức chế u quan trọng trong các bệnh lý ác tính dòng lympho B. Kato và cộng sự cho thấy A20 không chỉ điều hòa NF-κB mà còn ảnh hưởng đến biểu hiện các phân tử bề mặt và khả năng đáp ứng tín hiệu tăng trưởng của tế bào miễn dịch [164].

Tổng hợp lại, kết quả của nghiên cứu này nhất quán với bằng chứng quốc tế rằng biểu hiện A20 cao gắn liền với đặc điểm miễn dịch và kiểu hình tế bào u ít tiên tiến hơn, trong khi mất hoặc giảm biểu hiện A20 có thể góp phần làm tăng các quần thể tế bào mang dấu ấn liên quan đến tiên lượng xấu như CD56⁺CD44⁺. Điều này không chỉ làm rõ hơn vai trò sinh học của A20 trong BCLC mà còn gợi ý tiềm năng sử dụng A20 như một chỉ dấu sinh học liên quan đến phân tầng nguy cơ và tiên tiến bệnh.

4.4.4. Mối liên quan giữa đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, và biểu hiện gen A20 và CYLD ở bệnh nhân BCLC

Kết quả phân tích mối liên quan giữa mức biểu hiện các gen *DUB* (A20, *CYLD*) với các đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân BCLC cho thấy các gen này có liên quan đến nhiều biến đổi sinh học quan trọng.

A20, *CYLD* là những điều hòa then chốt của các quá trình tế bào như biệt hóa tế bào, trưởng thành, tiết cytokine, di chuyển, phagocytosis và apoptosis [7]. Sự đồng điều hòa này có thể phản ánh cơ chế bù trừ khi một

DUB bị suy giảm, hoặc chúng có thể được điều hòa bởi các yếu tố phiên mã chung đáp ứng với tín hiệu viêm hoặc stress tế bào trong BCLC.

Các nghiên cứu đã chứng minh rằng *A20* tăng cao trong BCLC và nhiều dòng tế bào bạch cầu, và bất hoạt gen *A20* dẫn đến giảm tăng sinh tế bào gắn liền với sự ngừng chu kỳ tế bào. Phát hiện của chúng tôi về mối liên quan giữa biểu hiện cao *A20* và tăng ure máu ($p=0,012$) gợi ý một liên hệ mối liên hệ giữa *A20* và tình trạng stress chuyển hóa hoặc tổn thương cơ quan trong BCLC. Điều này phù hợp với các báo cáo cho thấy *A20* không chỉ tham gia điều hòa miễn dịch mà còn liên quan đến bảo vệ mô trong bối cảnh viêm mạn tính và độc tính điều trị, đặc biệt tại gan và thận [175].

Đối với *CYLD*, kết quả ghi nhận số lượng tế bào lympho giảm đáng kể ở nhóm biểu hiện cao, điều này có thể phản ánh vai trò ức chế tăng sinh và thúc đẩy chết tế bào của *CYLD* thông qua việc điều hòa tín hiệu NF- κ B và JNK. *CYLD* được biết đến như một gen ức chế u, và mất hoặc giảm chức năng *CYLD* đã được mô tả trong nhiều bệnh lý ác tính dòng lympho [176]. Việc biểu hiện *CYLD* cao liên quan đến lymphopenia gợi ý hoạt tính điều hòa âm tính, góp phần hạn chế tăng sinh tế bào lympho ác tính trong BCLC.

4.5. Ảnh hưởng của *A20* đến hoạt động tế bào bạch cầu non ở bệnh bạch cầu cấp tính

4.5.1. Vai trò của gen *A20* điều hòa sự tăng sinh tế bào miễn dịch ở bệnh bạch cầu cấp tính

Sự suy giảm quần thể CD11b⁺CD40⁺ quan sát được trong nghiên cứu này cho thấy *A20* có khả năng ức chế trạng thái hoạt hóa của tế bào dòng tủy ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính. CD40 là một phân tử đồng kích thích quan trọng, thuộc họ thụ thể TNF, được biểu hiện trên đại thực bào, tế bào tua và các tế bào dòng tủy khác. Sự tương tác giữa CD40 với CD40L thường dẫn đến việc kích hoạt mạnh mẽ các con đường tín hiệu nội bào như NF- κ B và MAPK từ đó thúc đẩy đáp ứng viêm và miễn dịch thích ứng [177]. Việc *A20* làm giảm biểu hiện của CD40 gợi mở vai trò ức chế trạng thái hoạt hóa tiền viêm của tế bào dòng tủy ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính. Mặc dù CD11b được coi là dấu ấn của các tế bào ức chế có nguồn gốc từ dòng tủy và góp phần ức chế đáp ứng miễn dịch chống lại khối u. Trong bối cảnh này, việc *A20* làm giảm tỷ lệ tế bào CD11b⁺CD40⁺ có thể phản ánh vai trò điều hòa của

gen này đối với sự cân bằng giữa tình trạng viêm và ức chế miễn dịch trong bệnh bạch cầu cấp tính.

Nhiều nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng sự thiếu hụt hoặc giảm biểu hiện A20 trong tế bào dòng tủy dẫn đến tình trạng hoạt hóa quá mức, tăng tiết cytokine viêm và góp phần vào bệnh sinh của các rối loạn viêm mạn tính cũng như bệnh lý ác tính huyết học [178]. Do đó, kết quả của nghiên cứu này góp phần củng cố thông tin khi cho thấy việc tăng biểu hiện A20 có thể ức chế sự hoạt hóa CD40 trên tế bào dòng tủy, mà không gây ức chế lên các quần thể lympho T và B. Tính chọn lọc này mang ý nghĩa lâm sàng to lớn, gợi mở tiềm năng của A20 như một mục tiêu điều trị miễn dịch mới. Thay vì gây ra tình trạng ức chế miễn dịch toàn thân, việc tác động vào trục A20/CD40 cho phép điều hòa chọn lọc trạng thái của tế bào dòng tủy, từ đó hạn chế viêm, ngăn chặn sự tiến triển của tế bào non ác tính và tái lập sự cân bằng miễn dịch ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính.

4.5.2. Vai trò của gen A20 điều hòa tín hiệu STAT và sự di cư của tế bào bạch cầu non

Trong nghiên cứu này, sự di chuyển của tế bào bạch cầu non tăng lên khi tiếp xúc với IL-6 và tác dụng này không bị thay đổi bởi sự tăng biểu hiện của A20. Kết quả này cho thấy sự gia tăng khả năng di chuyển của tế bào bạch cầu non trong điều kiện giảm A20 có thể góp phần vào cơ chế tiến triển bệnh và liên quan đến tiên lượng xấu ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính. Điều này được khẳng định rõ ràng hơn khi A20 được coi là chất ức chế con đường STAT [179] và sự di chuyển của các tế bào miễn dịch [180].

Cuối cùng, các cơ chế liên quan đến việc điều hòa sự hoạt hóa của tế bào bạch cầu non bởi A20 khi tiếp xúc với IL-6 đã được kiểm tra. IL-6 là một cytokine tiền viêm quan trọng có khả năng hoạt hóa trục tín hiệu JAK/STAT3, từ đó thúc đẩy tăng sinh, sống còn và khả năng kháng apoptosis của tế bào blast [162,163]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lần đầu tiên cho thấy rằng IL-6 làm giảm biểu hiện A20 và tăng cường hoạt hóa STAT1 và STAT3, nhưng không phải STAT5 và STAT6 khi không có A20 trong tế bào bạch cầu non. Kết quả này có phần khác biệt với một nghiên cứu cho thấy vai trò ức chế của A20 đối với STAT1, nhưng không ảnh hưởng đến STAT3 trong tế bào tủy xương chuột khi bị kích thích bởi IL-6 [181]. Ngoài ra, IL-6 được chứng minh là tạo điều kiện thuận lợi cho sự di chuyển của dòng tế bào tủy

thông qua *STAT3*, trong khi sự di chuyển do cytokine này gây ra trong tế bào ung thư vú không nhạy cảm với *STAT3* [182].

Tuy nhiên, mặc dù *A20* ức chế hiệu quả tín hiệu *STAT*, nó không đủ để đảo ngược sự di chuyển của tế bào do IL-6 gây ra trong điều kiện kích thích bằng CXCL12. Điều này gợi ý rằng sự di chuyển của tế bào bạch cầu non không phụ thuộc hoàn toàn vào *STAT* mà còn được điều hòa bởi các con đường tín hiệu khác, bao gồm CXCL12/CXCR4 [183] và các đường truyền tín hiệu liên quan như PI3K/Akt và MAPK. Do đó, *A20* có thể đóng vai trò chủ đạo trong điều hòa khả năng hoạt hóa và tín hiệu viêm nội bào, trong khi đó lại chỉ tham gia một phần vào kiểm soát khả năng di chuyển của tế bào bạch cầu trong vi môi trường giàu chemokine.

Kết quả nghiên cứu cho thấy IL-6 không chỉ thúc đẩy hoạt hóa *STAT1* và *STAT3* mà còn ức chế biểu hiện *A20*, dẫn đến suy giảm cơ chế điều hòa âm tính nội sinh của tế bào bạch cầu non. Việc tăng cường biểu hiện *A20* có thể đảo ngược hoạt hóa *STAT* cảm ứng bởi IL-6, nhưng không đủ để kiểm soát hoàn toàn sự di chuyển của tế bào. Những phát hiện này làm sáng tỏ vai trò của *A20* trong điều hòa tín hiệu cytokine của tế bào bạch cầu non, đồng thời gợi ý rằng các chiến lược điều trị nhắm vào con đường IL-6/*STAT* có thể cần được kết hợp với các liệu pháp ức chế chemokine để đạt hiệu quả tối ưu.

4.5.3. Vai trò của gen A20 điều hòa sự di chuyển của tế bào bạch cầu non thông qua tín hiệu STAT

Kết quả của chúng tôi phù hợp với các báo cáo trước đó cho thấy IL-6 thúc đẩy biểu hiện CD40 và các phân tử đồng kích thích khác trên tế bào trình diện kháng nguyên thông qua con đường JAK/*STAT3*, từ đó tăng cường đáp ứng viêm và đáp ứng miễn dịch bất lợi trong ung thư máu [184]. Việc ức chế *STAT* làm suy giảm mạnh quần thể CD11b⁺CD40⁺ gợi ý rằng *STAT* không chỉ đóng vai trò truyền tín hiệu tăng sinh và sống sót, mà còn là góp phần điều hòa trong vi môi trường bệnh bạch cầu cấp tính.

Song song với đó, kết quả thí nghiệm di chuyển tế bào cho thấy IL-6 làm tăng đáng kể khả năng di chuyển của tế bào. Khi kết hợp IL-6 với Nifuroxazide, khả năng di chuyển của tế bào giảm xuống. Phát hiện này cho thấy tín hiệu *STAT* tham gia một phần vào quá trình điều hòa sự di chuyển của tế bào, có thể thông qua việc kiểm soát biểu hiện các phân tử liên quan đến hoạt động và bám dính tế bào [185].

Tuy nhiên, sự ức chế sự di chuyển bởi Nifuroxazide không hoàn toàn làm mất đi tác động của IL-6, cho thấy quá trình di chuyển của tế bào dòng tủy và tế bào bạch cầu non không phụ thuộc hoàn toàn vào STAT, mà có thể chịu sự chi phối đồng thời của các con đường tín hiệu khác như PI3K/Akt hoặc MAPK, vốn đã được chứng minh là hoạt hóa mạnh mẽ bởi CXCL12/CXCR4 trong bạch cầu cấp tính [186].

Các dữ liệu này cho thấy tín hiệu IL-6/STAT đóng vai trò trung tâm trong việc điều hòa trạng thái hoạt hóa của tế bào dòng tủy hoặc tế bào bạch cầu non và tham gia một phần vào kiểm soát sự di chuyển của tế bào non. Việc ức chế STAT bằng Nifuroxazide làm suy giảm đáng kể cả hai quá trình này, qua đó cho thấy STAT là yếu tố quan trọng kết nối tín hiệu cytokine tiền viêm với hoạt động của tế bào bạch cầu.

Tổng hợp lại, kết quả nghiên cứu cho thấy A20 đóng vai trò then chốt trong việc điều hòa tương tác miễn dịch giữa tế bào dòng tủy, và tế bào bạch cầu non. Thông qua việc ức chế hoạt hóa CD40 trên tế bào dòng tủy và kiểm soát con đường IL-6/STAT, A20 góp phần ức chế môi trường viêm thuận lợi cho sự tồn tại và phát triển của tế bào bạch cầu non. Những phát hiện này không chỉ làm sáng tỏ cơ chế bệnh sinh miễn dịch của bạch cầu cấp tính mà còn gợi mở tiềm năng khai thác A20 như một gen đích điều hòa miễn dịch.

4.6. Vai trò của gen tín hiệu điều hòa hoạt động tế bào tua ở bệnh nhân bạch cầu cấp dòng lympho tính khi tiếp xúc với Doxorubicin và Malloapelta C

4.6.1. Ảnh hưởng của Doxorubicin và Malloapelta C đến con đường tín hiệu mTOR, MAPKp38 và Wnt

Kết quả nghiên cứu cho thấy Mal C và Dox hoạt hóa các con đường tín hiệu khác nhau ở tế bào tua, nó phản ánh hai cơ chế tác động khác biệt: Mal C chủ yếu kích hoạt biểu hiện mRNA của mTOR và MAPK p38, dẫn đến điều hòa miễn dịch và thúc đẩy chức năng DC, trong khi Dox làm tăng biểu hiện các thành viên họ Wnt (*Wnt1*, *Wnt3*), gắn liền với đáp ứng stress và độc tính tế bào.

Con đường mTOR thường liên quan đến việc thúc đẩy tăng trưởng tế bào, tổng hợp protein, trình diện kháng nguyên và tiết cytokine ở DC [187]. Sự gia tăng biểu hiện mRNA của mTOR do Mal C gây ra có khả năng dẫn đến tăng lượng protein mTOR và hoạt tính của nó. Điều này có thể thúc đẩy sự

trưởng thành của DC thông qua nhiều cơ chế. Cụ thể, hoạt hóa mTOR đã được chứng minh làm tăng cường biểu hiện các phân tử đồng kích thích như CD40 và CD86, cải thiện khả năng kích thích tế bào T, và điều hòa nồng độ cytokines. Nghiên cứu của Weichhart và cộng sự đã chỉ ra rằng mTOR kiểm soát cân bằng giữa cytokines tiền viêm và kháng viêm trong DC, trong đó ức chế mTOR bằng rapamycin làm giảm biểu hiện CD86 và có thể làm tăng IL-12 và giảm IL-10 [188]. Do đó, kích hoạt mTOR bởi Mal C trong nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các tác động sinh học quan sát được - tăng CD40⁺CD86⁺ và cải thiện chức năng kích thích miễn dịch - cho thấy Mal C điều hòa DC có khả năng kích hoạt miễn dịch chống khối u.

Trong khi đó, MAPK p38 được biết đến như một con đường tín hiệu nhạy cảm với stress, góp phần vào điều hòa nồng độ cytokine và biểu hiện các dấu ấn trưởng thành của DC [189]. Nó thường đóng vai trò trong việc điều hòa các đáp ứng của tế bào với tổn thương, có thể dẫn đến ngừng chu kỳ tế bào hoặc apoptosis tùy thuộc vào cường độ và thời gian kích hoạt, cũng như bối cảnh tế bào [53]. Việc Mal C làm tăng biểu hiện mRNA của *MAPKp38* có thể dẫn đến tăng hoạt tính của *MAPKp38*, từ đó nó có thể góp phần vào việc hoạt hóa và trưởng thành của DC.

Do đó, việc Mal C làm tăng biểu hiện gen *mTOR* và *MAPK p38* phù hợp với các công bố chức năng trong nghiên cứu (tăng các dấu ấn trưởng thành CD40/CD86 và khả năng thực bào mà không gây độc tế bào mạnh), cho thấy Mal C hoạt động chủ yếu như một chất điều hòa miễn dịch hơn là một chất gây độc tế bào không chọn lọc.

Ngược lại, Dox là một chất gây tổn thương DNA/oxy hóa mạnh (cơ chế đã mô tả rõ qua tác dụng chặn topoisomerase II và gây gãy chuỗi DNA), và trong nhiều mô hình tế bào, Dox thúc đẩy các chương trình tái tạo, bao gồm kích hoạt tín hiệu Wnt/ β -catenin, vốn liên quan đến cơ chế sinh tồn, kháng stress và kháng trị. Ngược lại, việc giảm điều hòa các con đường Wnt/ β -catenin và PI3K/AKT/mTOR gây ra apoptosis của tế bào BCLC [190].

Tuy nhiên, điều đáng ngạc nhiên là Dox lại làm tăng đáng kể biểu hiện mRNA của *Wnt3*. Các phối tử Wnt, đặc biệt là *Wnt3a* (một thành viên điển hình của gia đình Wnt3), thường hoạt động thông qua con đường Wnt/ β -catenin, một con đường được biết đến với vai trò thúc đẩy sự sống sót của tế

bào, tăng trưởng, duy trì tế bào gốc ung thư và quan trọng là góp phần vào sự kháng hóa trị [191].

Sự tăng *Wnt1/Wnt3* sau khi xử lý Dox ở tế bào DC có thể phản ánh phản ứng nội bào nhằm duy trì khả năng sống sót hoặc thay đổi hướng biệt hóa dưới áp lực tổn thương DNA. Hơn nữa, sự khác biệt về mức độ tăng biểu hiện *Wnt1* giữa tế bào DC từ người khỏe và từ bệnh nhân BCLC (tăng mạnh ở người khỏe nhưng nhẹ ở BCLC) cho thấy rằng trạng thái của tế bào có thể làm thay đổi tín hiệu tiền viêm hoặc các cơ chế điều hòa khác biệt mà làm giảm hoặc đổi hướng đáp ứng Wnt.

Tác dụng của Dox đối với apoptosis đã được ghi nhận rõ ràng. Tương tự, chúng tôi chỉ ra rằng Dox gây ra apoptosis DC ở cả hai nhóm thông qua con đường Wnt. Điều quan trọng là, tác dụng của Dox đối với sự trưởng thành của DC thông qua con đường Wnt đã được quan sát thấy ở người khỏe, nhưng không thấy ở bệnh nhân BCLC. DC được báo cáo là có chức năng bị ức chế ở bệnh nhân bạch cầu trưởng thành [192] và việc loại bỏ DC dẫn đến phản ứng miễn dịch chống bệnh bạch cầu bị kém đi [193]. Trong phát hiện này, sự chết tế bào của DC do Dox gây ra nhạy cảm với con đường Wnt, tuy nhiên, sự trưởng thành của DC khi điều trị bằng Dox ở bệnh nhân BCLC đã bị suy giảm.

Mặt khác, Mal C và Dox lại gây bất hoạt *ERK2* và *AKT1*. Cả hai kinase này đều là những yếu tố then chốt trong các con đường thúc đẩy sự sống sót, tăng trưởng và phát triển của tế bào. Sự ức chế đồng thời *ERK* và *AKT* thường được coi là một chiến lược hiệu quả để gây độc tế bào ung thư. Tuy nhiên, Dox một tác nhân hóa trị liệu gây độc tế bào mạnh, đã gây ra sự ức chế hoạt tính của các con đường sinh tồn quan trọng là *ERK* và *AKT*, điều này phù hợp với cơ chế gây chết tế bào của nó.

Tổng hợp lại, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy Mal C và Dox tác động lên DC thông qua các mạng lưới tín hiệu khác nhau. Mal C ưu tiên điều hòa các con đường mTOR/MAPK p38 nhằm thúc đẩy chức năng và trưởng thành DC trong điều kiện được kiểm soát, trong khi Dox kích hoạt các chương trình đáp ứng stress và tái lập trình liên quan đến Wnt, đi kèm với độc tính tế bào và suy giảm chức năng DC ở bệnh nhân BCLC. Những phát hiện này nhấn mạnh vai trò trung tâm của các gen điều hòa tín hiệu nội bào trong việc quyết định sự sống sót và chức năng của DC, đồng thời gợi mở tiềm

năng khai thác Mal C như một chất điều hòa miễn dịch hơn là một tác nhân gây độc tế bào không chọn lọc.

4.6.2. Ảnh hưởng của Doxorubicin và Malloapelta C đến hoạt động của tế bào tua trên bệnh nhân BCLC

Nghiên cứu của chúng tôi về ảnh hưởng của Mal C và Dox lên các con đường tín hiệu trong tế bào DC biệt hóa từ PBMC bằng FLT3L đã cho thấy những thay đổi phức tạp và khác biệt của các con đường tín hiệu giữa tế bào DC từ người khỏe mạnh và bệnh nhân BCLC. Việc sử dụng FLT3L để biệt hóa DC được chứng minh là hiệu quả ở phần lớn bệnh nhân leukemia, đồng thời các DC thu được vẫn duy trì khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T [194].

Kết quả thu được cho thấy Mal C tăng cường các dấu ấn trưởng thành/hoạt hóa và khả năng thực bào của tế bào tua ($CD11c^+CD40^+$, $CD123^+CD11c^+$) mà không gây độc tế bào cấp tính lớn (tỷ lệ Annexin V⁻PI⁺ thấp và không gây tăng tỷ lệ Annexin V⁺PI⁺), trong khi Dox chủ yếu biểu hiện qua độc tính mạnh với sự gia tăng rõ rệt cả hoại tử (Annexin V⁻PI⁺) và apoptosis (Annexin V⁺PI⁺) ở tế bào. Điều này phù hợp với các cơ chế gây độc tế bào đã biết của Dox, bao gồm phá hủy DNA, ức chế topoisomerase II và tạo ra các gốc oxy hóa tự do ROS dẫn đến tổn thương DNA và chết tế bào [195].

Quan trọng hơn, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy Mal C không chỉ đơn thuần làm tăng số lượng DC sống sót mà còn kích hoạt có chọn lọc các con đường tín hiệu nội bào liên quan đến trưởng thành và chức năng miễn dịch của DC, cho thấy Mal C hoạt động chủ yếu như một chất điều hòa miễn dịch hơn là một chất gây độc tế bào trực tiếp. Điều này gợi ý sự tham gia của các gen điều hòa tín hiệu (có thể bao gồm *A20*, *CYLD* và các *DUB* khác) trong việc định hướng đáp ứng chức năng của DC, thay vì kích hoạt các con đường gây stress hoặc chết tế bào. Những kết quả này cho thấy Mal C có tiềm năng được tiếp tục nghiên cứu như một chất điều hòa chức năng DC. Tuy nhiên, khả năng ứng dụng trong điều trị cần được đánh giá thêm trên các mô hình tiền lâm sàng và lâm sàng.

CD40 và CD86 là các phân tử đồng kích thích quan trọng. CD86 liên kết với CD28 trên tế bào T, cung cấp tín hiệu thứ hai quan trọng cho việc kích hoạt tế bào T. Sự tương tác giữa CD40 trên DC và CD40L trên tế bào T tiếp

tục kích hoạt DC, dẫn đến tăng cường tiết IL-12 và duy trì đáp ứng của tế bào T [196]. Về mặt sinh học, việc thúc đẩy biểu hiện CD40, CD86 là yếu tố quan trọng giúp gia tăng khả năng trình diện kháng nguyên và hoạt hóa tế bào T hiệu ứng, một cơ chế nền tảng trong các chiến lược liệu pháp miễn dịch dựa trên DC [197].

Kết quả của chúng tôi cho thấy Mal C làm tăng đáng kể tỷ lệ tế bào CD40⁺CD86⁺ ở cả người khỏe và đặc biệt ở bệnh nhân BCLC (từ 18,1% lên 47,2%, tăng 160%), phản ánh khả năng mạnh mẽ của Mal C trong việc thúc đẩy trưởng thành DC. Điều đáng chú ý là Dox thể hiện hiệu ứng nghịch lý: khi kích thích trưởng thành DC ở người khỏe (từ 0,91% lên 41,1%) nhưng lại ức chế trưởng thành DC ở bệnh nhân BCLC (giảm từ 18,1% xuống 11,1%). Sự khác biệt này phản ánh rằng DC trong môi trường BCLC nhạy cảm hơn đáng kể với độc tính của Dox, phù hợp với các bằng chứng từ các nghiên cứu trước đây cho thấy DC trong leukemia dễ bị cảm ứng apoptosis và rối loạn biệt hóa khi tiếp xúc với anthracycline [198].

Ngoài ra, phân tích Annexin V/PI cho phép phân biệt rõ hai dạng chết tế bào có ý nghĩa lâm sàng: Annexin V-PI⁺ tương ứng với hoại tử cấp tính (necrosis) còn Annexin V⁺PI⁺ phản ánh apoptosis hoặc chết không hồi phục. Dữ liệu của chúng tôi cho thấy Dox thúc đẩy cả hai dạng này với Annexin V-PI⁺ tăng 47-53% và Annexin V⁺PI⁺ tăng đáng kể, trong khi Malloapelta C chỉ gây tăng rất hạn chế (2-7%), điều này chứng tỏ tính an toàn hơn của Mal C về mặt tế bào [198].

Những khác biệt này có ý nghĩa lâm sàng trong việc cân bằng giữa hiệu quả tiêu diệt tế bào ác tính và bảo tồn/khai thác khả năng đáp ứng miễn dịch chống u: các thuốc gây chết tế bào mạnh có thể giải phóng DAMPs làm kích hoạt miễn dịch nhưng đồng thời cũng có thể phá hủy tế bào miễn dịch tại chỗ; ngược lại, các chất làm trưởng thành DC mà ít gây độc có thể tối ưu hóa bước trình diện kháng nguyên và kích hoạt đáp ứng của tế bào T hiệu quả hơn khi được phối hợp với các liệu pháp khác [199].

Mặt khác, Mal C thể hiện khả năng tăng cường mạnh mẽ hoạt tính thực bào của quần thể DC CD123⁺CD11c⁺ ở người khỏe và bệnh nhân BCLC, nhưng mức gia tăng đặc biệt đáng kể ở bệnh nhân BCLC khi tỷ lệ thực bào tăng gần gấp đôi (từ 31,6% lên 72,4%, tăng 130%). Kết quả này có ý nghĩa đặc biệt quan trọng vì thực bào là bước đầu tiên và thiết yếu trong chuỗi đáp

ứng dẫn đến hoạt hóa miễn dịch kháng khối u: DC phải tiêu diệt tế bào khối u (apoptotic hoặc necrotic), xử lý kháng nguyên, sau đó di chuyển đến hạch lympho và trình diện kháng nguyên cho tế bào T naïve để kích hoạt đáp ứng miễn dịch thích ứng đặc hiệu. Điều này cho thấy Mal C hoạt động như một chất điều hòa miễn dịch thúc đẩy quá trình trưởng thành và hoạt hóa chức năng DC, đặc biệt trong môi trường miễn dịch bị suy giảm của BCLC.

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng DC ở bệnh nhân bạch cầu thường bị rối loạn biệt hóa và có khả năng trình diện kháng nguyên kém hơn, dẫn đến giảm hiệu quả đáp ứng miễn dịch chống ung thư [200]. Việc Mal C có thể cải thiện chức năng này cho thấy chất này có tiềm năng phục hồi những thiếu hụt miễn dịch đặc trưng ở BCLC.

Ngược lại, Dox gây tác động trái ngược trên cùng quần thể DC. Dox làm giảm mạnh số lượng tế bào CD123⁺CD11c⁺ DC có khả năng thực bào trong BCLC (từ 31,6% xuống 16,6%), phản ánh rõ độc tính tế bào của thuốc và ảnh hưởng tiêu cực của nó đến quá trình biệt hóa DC. Điều này phù hợp với các bằng chứng trước đây cho thấy anthracycline như Dox gây chết tế bào mạnh mẽ [201] đặc biệt trong các mô hình bệnh ác tính huyết học nơi DC vốn đã suy giảm chức năng. Sự suy giảm khả năng thực bào cảm ứng bởi Dox ở bệnh nhân BCLC gợi ý rằng việc sử dụng hóa trị liệu anthracycline đơn thuần có thể làm tổn hại khả năng của hệ miễn dịch trong việc thanh thải tế bào bạch cầu và thiết lập miễn dịch kháng bạch cầu lâu dài.

Tổng hợp lại, các dữ liệu của chúng tôi cho thấy Mal C hoạt động như một chất điều hòa miễn dịch chọn lọc, thúc đẩy sự trưởng thành và chức năng của DC thông qua các con đường tín hiệu nội bào được kiểm soát chặt chẽ, trong khi Dox chủ yếu kích hoạt các con đường gây stress và chết tế bào. Những phát hiện này củng cố quan điểm rằng các chất điều hòa tín hiệu, thay vì chỉ có tác dụng gây độc tế bào mạnh, nó cũng có thể đóng vai trò quan trọng trong các chiến lược điều trị kết hợp, nhằm vừa tiêu diệt tế bào ác tính vừa bảo tồn và khai thác tối đa chức năng của hệ miễn dịch.

4.6.3. Phân tích vai trò của con đường tín hiệu Wnt đối với sự trưởng thành và apoptosis của tế bào tua

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy Dox tác động lên tế bào tua thông qua các cơ chế khác biệt giữa người khỏe và bệnh nhân BCLC, đồng thời làm nổi bật vai trò trung tâm của con đường tín hiệu Wnt trong việc điều hòa

apoptosis và sự trưởng thành của DC. Cụ thể, ở cả hai nhóm đối tượng, Dox làm gia tăng mạnh tỷ lệ tế bào Annexin V-PI⁺ (51,8% ở người khỏe, 65,3% ở bệnh nhân), phản ánh tình trạng tổn thương màng tế bào và hoại tử sớm do tổn thương DNA nghiêm trọng. Tuy nhiên, khi con đường Wnt bị ức chế bằng WntC59 (chất ức chế porcupine ngăn chặn tiết protein Wnt), tỷ lệ Annexin V-PI⁺ giảm đáng kể xuống 22,9% ở người khỏe và 46,5% ở bệnh nhân (giảm 30-56%, $p < 0,001$), đồng thời quần thể tế bào Annexin V-PI⁺ (apoptosis muộn) gần như bị loại bỏ hoàn toàn. Kết quả này cho thấy rằng hoạt hóa gen *Wnt1* và gen *Wnt3* đóng vai trò quan trọng trong việc trung gian hóa tác động gây chết tế bào của Dox trên DC.

Những kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng tín hiệu Wnt/ β -catenin có thể điều hòa hoạt động tế bào DC, bao gồm cả sự sống sót và apoptosis. Manicassamy và cộng sự đã chứng minh rằng hoạt hóa quá mức Wnt/ β -catenin trong DC có thể dẫn đến rối loạn chức năng và thay đổi đáp ứng miễn dịch [202], trong khi các nghiên cứu khác cho thấy sự kích hoạt Wnt bất thường có thể làm tăng nhạy cảm của tế bào miễn dịch với stress gây độc tế bào [203]. Trong bối cảnh này, việc Dox kích hoạt tín hiệu Wnt dẫn đến tăng apoptosis DC là một cơ chế hợp lý về mặt sinh học.

Đáng chú ý, kết quả của chúng tôi cũng cho thấy gen Wnt đóng vai trò quan trọng trong điều hòa sự trưởng thành của DC được kích thích bởi Dox ở người khỏe (tăng mạnh CD40⁺CD86⁺) nhưng hiện tượng này không được duy trì ở bệnh nhân BCLC, nơi quá trình trưởng thành DC bị suy giảm khi tiếp xúc với Dox. Việc bổ sung chất ức chế Wnt C59 làm giảm rõ rệt tỷ lệ DC CD40⁺CD86⁺, cho thấy sự trưởng thành DC do Dox cảm ứng cũng phụ thuộc vào con đường Wnt. Điều này phù hợp với các báo cáo quốc tế cho thấy Wnt/ β -catenin tham gia trực tiếp vào quá trình biệt hóa và trưởng thành của DC, đặc biệt thông qua điều hòa biểu hiện các phân tử đồng kích thích như CD40 và CD86 [204]

Kết quả của chúng tôi cho thấy ức chế gen Wnt bằng C59 không chỉ làm giảm apoptosis mà còn làm suy yếu quá trình trưởng thành DC ở người khỏe, qua đó khẳng định rằng gen *Wnt1* và *Wnt3* là mắt xích trung gian quan trọng và không thể thiếu trong cả hai tác động của Dox: gây chết tế bào và kích thích trưởng thành DC. Điều này tạo ra một nghịch lý thú vị: cùng một gen Wnt có thể vừa trung gian cho apoptosis vừa trung gian cho trưởng thành

DC, tùy thuộc vào mức độ kích hoạt, thời gian, và đặc biệt là ngữ cảnh tế bào (người khỏe mạnh với bệnh nhân BCLC).

Tổng hợp lại, các dữ liệu này cho thấy rằng Dox điều hòa chức năng DC thông qua con đường Wnt, đồng thời cũng xác nhận vai trò trung tâm của con đường tín hiệu Wnt trong việc điều hòa chức năng của DC, tuy nhiên các tác động này phụ thuộc mạnh mẽ vào tình trạng miễn dịch của vật chủ. Ở người khỏe, tín hiệu này góp phần thúc đẩy cả trưởng thành và apoptosis DC, trong khi ở bệnh nhân BCLC, sự mất cân bằng tín hiệu Wnt có thể dẫn đến ưu thế của độc tính tế bào và suy giảm chức năng DC, góp phần vào tình trạng ức chế miễn dịch đặc trưng của bệnh. Những phát hiện này nhấn mạnh vai trò cũng như tầm quan trọng của các con đường tín hiệu như Wnt trong đáp ứng miễn dịch cũng như điều trị ở bệnh nhân BCLC.

Những phát hiện này có ý nghĩa quan trọng, việc kết hợp Dox với chất ức chế Wnt như C59 có thể giảm đáng kể độc tính tế bào (giảm 30-56% apoptosis/necrosis) trong khi vẫn duy trì khả năng giết tế bào bạch cầu non của Dox. Hơn nữa, việc điều hòa gen Wnt về mức tối ưu thay vì ức chế hoàn toàn có thể cho phép DC trưởng thành hiệu quả mà không bị apoptosis quá mức, tạo điều kiện cho đáp ứng miễn dịch kháng bạch cầu. Những phát hiện này nhấn mạnh vai trò trung tâm và tầm quan trọng của con đường tín hiệu Wnt như các điểm kiểm soát chính trong đáp ứng miễn dịch ở bệnh nhân BCLC.

4.6.4. Phân tích vai trò của các con đường tín hiệu mTOR và MAPKp38 lên quá trình trưởng thành và thực bào của tế bào tua

Trong nghiên cứu này, chúng tôi chứng minh rằng tác động tăng cường chức năng của Mal C lên tế bào DC ở bệnh nhân BCLC phụ thuộc vào sự hoạt hóa các con đường tín hiệu mTOR và MAPK p38. Việc sử dụng các chất ức chế đặc hiệu Everolimus (mTOR) và SB203580 (MAPK p38) đã làm suy giảm đáng kể cả khả năng thực bào lẫn sự trưởng thành của quần thể DC CD11c⁺CD123⁺, đặc biệt rõ rệt ở bệnh nhân BCLC, trong khi ảnh hưởng này không đáng kể ở người khỏe. Điều này cho thấy mTOR và MAPK p38 là các con đường tín hiệu quan trọng trung gian cho điều hòa miễn dịch của Mal C.

Về chức năng thực bào, Mal C làm tăng mạnh khả năng bắt giữ tế bào bạch cầu của DC CD11c⁺CD123⁺ ở bệnh nhân BCLC, phản ánh sự phục hồi chức năng của các DC vốn bị suy giảm trong môi trường leukemia. Tuy

nhiên, khi ức chế mTOR hoặc MAPK p38, hiệu ứng này bị giảm đáng kể, cho thấy hoạt động của cả hai con đường là cần thiết để duy trì trạng thái DC có khả năng thực bào cao. mTOR từ lâu đã được xác định là một bộ điều hòa trung tâm kiểm soát chuyển hóa, sự sống còn và biệt hóa của tế bào trình diện kháng nguyên.

Các nghiên cứu trên mô hình DC cho thấy hoạt hóa mTOR cần thiết cho quá trình tăng biểu hiện các phân tử đồng kích thích như CD40 và CD86, cũng như cho khả năng trình diện kháng nguyên và kích hoạt tế bào T hiệu quả [205]. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây cho thấy mTOR tham gia vào quá trình điều hòa cho hoạt động thực bào của DC [188].

Song song đó, con đường MAPK p38 được biết đến là yếu tố then chốt trong điều hòa đáp ứng viêm, quá trình trưởng thành DC và khả năng thực bào. Hoạt hóa MAPK p38 đã được chứng minh là cần thiết cho sự cảm ứng CD40/CD86 cũng như cho việc tái cấu trúc bộ xương tế bào phục vụ quá trình bắt giữ và xử lý kháng nguyên [206]. Việc ức chế MAPK p38 trong nghiên cứu của chúng tôi làm giảm đáng kể tác động tăng cường của Mal C lên DC ở bệnh nhân BCLC cho thấy Mal C nhiều khả năng khai thác các con đường tín hiệu viêm – chuyển hóa này để phục hồi chức năng DC bị suy giảm trong leukemia.

Đáng chú ý, tác dụng ứng ức chế của Everolimus và SB203580 lên chức năng thực bào và trưởng thành rõ rệt hơn ở bệnh nhân BCLC so với người khỏe, cho thấy DC trong môi trường bệnh lý phụ thuộc mạnh hơn vào các con đường tín hiệu nội bào này để duy trì chức năng. Điều này có thể phản ánh tình trạng bù trừ trong hoạt động của DC trong ung thư máu, nơi các con đường mTOR và MAPK p38 bị hoạt hóa quá mức để duy trì khả năng miễn dịch của bệnh nhân. Do đó, việc ức chế mTOR hoặc MAPK p38 trong bối cảnh này dễ dẫn đến suy giảm chức năng DC rõ rệt hơn so với điều kiện sinh lý bình thường.

Tương tự, phân tích các dấu ấn trưởng thành DC cho thấy Mal C thúc đẩy mạnh sự biểu hiện CD40 và CD86 ở bệnh nhân BCLC, phản ánh quá trình trưởng thành và tăng khả năng kích hoạt tế bào T. Tuy nhiên, điều này bị hạn chế đáng kể khi mTOR hoặc MAPK p38 bị ức chế, cho thấy hai con đường tín hiệu này đóng vai trò then chốt trong việc trung gian hóa quá trình trưởng thành DC do Mal C cảm ứng. Những phát hiện này phù hợp với

các báo cáo quốc tế cho thấy mTOR là yếu tố điều hòa trung tâm của sự trưởng thành DC, làm tăng biểu hiện các phân tử đồng kích thích (như CD40, CD86) trên DC, qua đó cải thiện khả năng kích hoạt tế bào T và đáp ứng miễn dịch chống u [207].

Việc các chất ức chế mTOR và MAPK p38 không làm mất hoàn toàn tác động của Mal C, mà chỉ làm suy giảm một phần, cho thấy Mal C nhiều khả năng tác động lên DC thông qua nhiều con đường tín hiệu khác, trong đó mTOR và MAPK p38 đóng vai trò quan trọng nhưng không phải là duy nhất. Điều này gợi ý rằng Mal C là một chất điều hòa miễn dịch đa đích, có khả năng kích hoạt mạng lưới tín hiệu nội bào phức tạp nhằm phục hồi chức năng DC ở BCLC.

Các kết quả này cho thấy Mal C thúc đẩy sự trưởng thành và hoạt tính thực bào của DC ở bệnh nhân BCLC thông qua các con đường mTOR và MAPK p38, và sự phụ thuộc tín hiệu này rõ rệt hơn trong môi trường bệnh lý so với sinh lý bình thường. Phát hiện này không chỉ làm sáng tỏ cơ chế tác động của Mal C mà còn gợi ý rằng điều hòa các con đường tín hiệu nội bào của DC, đặc biệt là mTOR và MAPKp38, có thể là chiến lược tiềm năng và đầy hứa hẹn nhằm phục hồi miễn dịch chống u ở bệnh nhân BCLC.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Từ những kết quả nghiên cứu của luận án có thể rút ra những kết luận sau:

1. Đã xác định được đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, biểu hiện các gen liên quan đến viêm và kiểu hình miễn dịch ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính.

a) Đã xác định được đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính. Về lâm sàng, đa số bệnh nhân BCTC và BCLC đều biểu hiện rõ các hội chứng suy tủy điển hình (thiếu máu, xuất huyết, nhiễm trùng), trong đó BCTC nổi bật với thâm nhiễm ngoài tủy (phì đại nước, tổn thương da), còn BCLC ưu thế với hội chứng thâm nhiễm hệ lympho (hạch to, gan lách to và đau nhức xương). Ở BCTC, số lượng tế bào bạch cầu, tế bào lympho tăng cao ở nhóm tiên lượng trung bình. Bên cạnh đó, nồng độ IL-6, TNF- α , tỷ lệ tế bào NK, Treg và CD13⁺CD117⁺ đều tăng cao, trong khi TGF- β giảm so với người khỏe mạnh. Ở BCLC, nhóm tiên lượng xấu ghi nhận LDH, số lượng bạch cầu và lympho cao hơn nhóm tiên lượng trung bình. Đồng thời, nồng độ IL-6, TNF- α , IL-35, cùng tỷ lệ tế bào NK và Treg tăng cao, trong khi nồng độ TGF- β giảm so với nhóm đối chứng khỏe mạnh.

b) Đã xác định được biểu hiện của các gen mã hóa enzyme deubiquitinase, đặc biệt là A20, liên quan chặt chẽ đến sự điều hòa vi môi trường viêm và kiểu hình miễn dịch, trong khi CYLD cũng giảm biểu hiện ở bệnh nhân bạch cầu cấp nhưng chưa ghi nhận mối liên hệ xác định với các chỉ số huyết học hay nồng độ cytokine. Điều này cho thấy A20 và CYLD có vai trò điều hòa khác nhau ở bệnh nhân bạch cầu cấp.

c) Bệnh nhân BCTC có biểu hiện A20 thấp có số lượng tế bào dòng lympho thấp bao gồm tế bào lympho tổng số, tế bào CD3⁺, CD8⁺, CD10⁺, CD19⁺, CD20⁺ và CD79a⁺ và số lượng các tế bào dòng tủy như: tế bào MPO⁺, CD33⁺ và CD13⁺CD117⁺ tăng đột biến cao so với bệnh nhân có biểu hiện A20 cao.

2. Đã xác định được vai trò điều hòa của A20, CYLD và một số tín hiệu nội bào liên quan đến chức năng của tế bào non và tế bào tua ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính.

- a) Xác định được vai trò của *A20* điều hòa hoạt hóa của tế bào dòng tủy và tế bào non bạch cầu cấp tính thông qua ức chế tín hiệu STAT1/STAT3 phụ thuộc IL-6, làm giảm quần thể CD11b⁺CD40⁺ và hạn chế sự di chuyển của tế bào non, góp phần kiểm soát quá trình hoạt hóa miễn dịch.
- b) Đã xác định được vai trò của các con đường tín hiệu mTOR và MAPK/p38 trong điều hòa chức năng của tế bào tua ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính; sự hoạt hóa các con đường này dưới tác động của Malloapelta C làm tăng quá trình trưởng thành và thực bào của tế bào tua mà không ảnh hưởng đến khả năng sống sót của tế bào.

Hạn chế của nghiên cứu và định hướng nghiên cứu trong tương lai

Nghiên cứu hiện tại vẫn còn một số hạn chế. Trước hết, cỡ mẫu nghiên cứu chưa đủ lớn để đại diện đầy đủ cho các phân nhóm tiên lượng ở bệnh nhân bạch cầu cấp tính, do đó có thể ảnh hưởng đến độ tin cậy và khả năng khái quát hóa của kết quả nghiên cứu. Đây cũng có thể là nguyên nhân khiến một số phân tích mối liên quan giữa biểu hiện gen, đặc điểm miễn dịch và các nhóm tiên lượng chưa đạt được ý nghĩa thống kê rõ rệt.

Bên cạnh đó, nghiên cứu mới chủ yếu tập trung đánh giá vai trò của một số gen *DUB* trên tế bào non và tế bào tua, trong khi chức năng của nhiều quần thể tế bào miễn dịch khác trong vi môi trường miễn dịch của bệnh bạch cầu cấp tính vẫn chưa được làm sáng tỏ đầy đủ. Vì vậy, trong các nghiên cứu tiếp theo, cần mở rộng cỡ mẫu, đồng thời tiếp tục khảo sát sâu hơn vai trò điều hòa của các gen *DUB* khác đối với chức năng của các tế bào miễn dịch như đại thực bào, tế bào NK, tế bào lympho T và B nhằm làm rõ hơn cơ chế điều hòa miễn dịch trong bệnh bạch cầu cấp tính cũng như tiềm năng ứng dụng trong chẩn đoán và điều trị.

KIẾN NGHỊ

1. Tăng cường cỡ mẫu trong các nghiên cứu tiếp theo để đảm bảo đại diện đầy đủ cho các phân nhóm bệnh (theo tuổi, giới, giai đoạn bệnh...), từ đó nâng cao độ chính xác và độ tin cậy của nghiên cứu cũng như khả năng khái quát hóa kết quả nghiên cứu;

2. Nghiên cứu tiếp theo về ảnh hưởng của gen mã hóa enzyme deubiquitinase đến chức năng của các loại tế bào miễn dịch khác trên bệnh nhân bạch cầu cấp tính.

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

1. Le Thuy Ha, **Nguyen Hoang Giang**, Nguyen Linh Toan, Nguyen Van Giang, Can Van Mao, Nguyen Quoc Nhat, Tran Dang Quan, Nguyen Huy Hoang, Ngo Thu Hang, Nguyen Thi Xuan., 2025. Cross-Sectional Study: Associations of A20 and Cezanne with Leukocyte Accumulation in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Medicina (Kaunas)*, 61(7):1166. doi: 10.3390/medicina61071166. PMID: 40731796; PMCID: PMC12299410.
2. **Hoang Giang Nguyen**, Xuan Nghia Vu, Thi Trang Do and Thi Xuan Nguyen., 2026. Expression of immunophenotype, inflammatory response and chromosomal abnormality in Acute Lymphoid Leukemia. *Vietnam Journal of Biotechnology*, 24(1), 13–27. doi: <https://doi.org/10.15625/vjbt-24015>
3. **Hoang Giang Nguyen**, Xuan Nghia Vu, Hong Hanh Ha and Thi Xuan Nguyen., 2026. Expression of several inflammation-related genes, immunophenotype and chromosome abnormalities in Acute Myeloid Leukemia. *Vietnam Journal of Biotechnology*, 24(2), 147-160. doi: <https://doi.org/10.15625/vjbt-23474>

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anna P., James W.V., 2011, Acute myeloid leukemia with expanded erythropoiesis, *Haematologica*, 96(9), 1241-1243.
2. Bộ Y tế, 2022, *Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị một số bệnh lý huyết học (Ban hành kèm theo Quyết định số 1832/QĐ-BYT ngày 01 tháng 7 năm 2022 của Bộ trưởng Bộ Y tế)*, Bộ Y tế, Hà Nội.
3. Lee S.J., Yang L., Huang M., et al., 2011, Activated natural killer cells predict poor clinical prognosis in high-risk leukemia, *Blood*, 118(15), 3461-3472.
4. Al-Zayan N.R., Ashour M.J., Abuwarda H.N., et al., 2024, ARID5B, IKZF1, GATA3, CEBPE, and CDKN2A germline polymorphisms and predisposition to childhood acute lymphoblastic leukemia, *Pediatric Hematology and Oncology*, 41(2), 103-113.
5. Rudant J., Orsi L., Bonaventure A., et al., 2015, ARID5B, IKZF1 and non-genetic factors in the etiology of childhood acute lymphoblastic leukemia: the ESCALE study, *PLoS One*, 10(3), e0121348.
6. Smeenk L., Fischer M., Jurado S., et al., 2017, Molecular role of the PAX5-ETV6 oncoprotein in promoting B-cell acute lymphoblastic leukemia, *Oncogene*, 36(6), 718-735
7. Shah B., Mattison R.J., Abboud R., et al., 2024, Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 22(8), 563-576.
8. Kotecha R.S., Pieters R., Stutterheim J., 2024, KMT2A-rearranged acute lymphoblastic leukaemia, *EJC Paediatric Oncology*, 4, 100204..
9. Moorman A.V., 2012, The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia, *Blood Reviews*, 26(3), 123-135.
10. De Kouchkovsky I., Abdul-Hay M., 2016, Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update, *Blood Cancer Journal*, 6(7), e441.

11. Thanh Huyen N., Hoang Giang N., Thi Xuan N., 2022, Expression of deubiquitinase genes and inflammatory response in myeloid leukemia, *Vietnam Journal of Biotechnology*, 20(3), 401-408.
12. Huyen N.T., Ngoc N.T., Giang N.H., et al., 2023, CYLD stimulates macrophage phagocytosis of leukemic cells through STAT1 signalling in acute myeloid leukemia, *PLoS One*, 18(8), e0283586.
13. Lachowiez C.A., Long N., 2023, Comparison and validation of the 2022 European LeukemiaNet guidelines in acute myeloid leukemia, *Blood Advances*, 7(9), 1899-1909.
14. Döhner H., Wei A.H., Appelbaum F.R., et al., 2022, Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN, *Blood*, 140(12), 1345-1377.
15. Pollyea D.A., Altman J.K., Assi R., et al., 2023, Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2023, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 21(5), 503-513.
16. Lai K.P., Chen J., Tse W.K.F., 2020, Role of Deubiquitinases in Human Cancers: Potential Targeted Therapy, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2354.
17. Komander D., Lord C.J., Scheel H., et al., 2008, The structure of the CYLD USP domain explains its specificity for Lys63-linked polyubiquitin and reveals a B box module, *Molecular Cell*, 29(4), 451-464.
18. Massoumi R., 2011, CYLD: a deubiquitination enzyme with multiple roles in cancer, *Future Oncology*, 7(2), 285-297.
19. Marín-Rubio, J. L., Raote, I., Inns, J., et al., 2023, CYLD in health and disease, *Disease models & mechanisms*, 16(6):dmm050093
20. Hitomi J., Christofferson D.E., Ng A., et al., 2008, Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway, *Cell*, 135(7), 1311-1323.
21. Lv X.Y., Duan T., Li J., 2020, The multiple roles of deubiquitinases in liver cancer, *American Journal of Cancer Research*, 10(6), 1647-1657.

22. Schmitz R., Hansmann M.L., Bohle V., et al., 2009, TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma, *Journal of Experimental Medicine*, 206(5), 981-989.
23. Bagyinszky E., An S.S.A., 2024, Genetic Mutations Associated With TNFAIP3 (A20) Haploinsufficiency and Their Impact on Inflammatory Diseases, *International Journal of Molecular Sciences*, 25(15), 8275.
24. Zhou X., An D., Liu X., et al., 2018, TNFalpha induces tolerant production of CXC chemokines in colorectal cancer HCT116 cells via A20 inhibition of ERK signaling, *International Immunopharmacology*, 54, 296-302.
25. Lee J., Cheong H., 2025, The Role of A20 in Cancer: Friend or Foe?, *Cells*, 14(7), 544.
26. Shi Y., Wang X., Wang J., et al., 2021, The dual roles of A20 in cancer, *Cancer Letters*, 511, 26-35.
27. Tang X., Li Y., Liu Y., 2025, Dissecting the dual role of OTU family proteins in tumor progression and immune escape, *Frontiers in Immunology*, 16, 1024-1035.
28. Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P., 2003, Tumor necrosis factor signaling, *Cell Death & Differentiation*, 10(1), 45-65.
29. Manohar S.M., 2024, At the Crossroads of TNF alpha Signaling and Cancer, *Current Molecular Pharmacology*, 17, e060923220758.
30. Wang X., Lin Y., 2008, Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes?, *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(11), 1275-1288.
31. Batlle E., Massagué J., 2019, Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer, *Immunity*, 50(4), 924-440.
32. Massagué J., 2012, TGF β signalling in context, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(10), 616-630.
33. Tzavlaki K., Moustakas A., 2020, TGF- β Signaling, *Biomolecules*, 10(3), 487.
34. Akhurst R.J., Hata A., 2012, Targeting the TGF β signalling pathway in disease, *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(10), 790-811.
35. Huang B., Lang X., Li X., 2022, The role of IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway in cancers, *Frontiers in Oncology*, 12, 1023177.

36. Kitamura H., Ohno Y., Toyoshima Y., et al., 2017, Interleukin-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy, *Cancer Science*, 108(10), 1947-1952.
37. Schlitzer A., Sivakamasundari V., Chen J., 2015, Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow, *Nature Immunology*, 16(7), 718-728.
38. Esmaeilsabzali H., Beischlag T.V., Cox M.E., et al., 2013, Detection and isolation of circulating tumor cells: principles and methods, *Biotechnology Advances*, 31(7), 1063-1084.
39. Rock K.L., Reits E., Neefjes J., 2016, Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules, *Trends in Immunology*, 37(11), 724-737.
40. José Luis M.-C., Juan Francisco C.-C., Oscar G.-C., et al., 2021, *Role of Dendritic Cells in Pathogen Infections: A Current Perspective*, in *Cell Interaction*, IntechOpen, Rijeka.
41. Tan Y.F., Leong C.F., Cheong S.K., 2010, Observation of dendritic cell morphology under light, phase-contrast or confocal laser scanning microscopy, *Malaysian Journal of Pathology*, 32(2), 97-102.
42. Palucka K., Ueno H., Fay J., et al., 2011, Dendritic cells and immunity against cancer, *Journal of Internal Medicine*, 269(1), 64-73.
43. Fridman W.H., Pages F., Sautes-Fridman C., et al., 2012, The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome, *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 298-306.
44. Scarlett U.K., Rutkowski M.R., Rauwerdink A.M., et al., 2012, Ovarian cancer progression is controlled by phenotypic changes in dendritic cells, *Journal of Experimental Medicine*, 209(3), 495-506.
45. Liu K., *Dendritic Cells*. Encyclopedia of Cell Biology. 2016:741-9. doi: 10.1016/B978-0-12-394447-4.30111-0. Epub 2015 Aug 20.
46. Martelli A.M., Lonetti A., Buontempo F., et al., 2014, Targeting signaling pathways in T-cell acute lymphoblastic leukemia initiating cells, *Advances in Biological Regulation*, 56, 6-21.

47. Zoncu R., Efeyan A., Sabatini D.M., 2011, mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), 21-35.
48. Ley T.J., Miller C., Ding L., et al., 2013, Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia, *New England Journal of Medicine*, 368(22), 2059-2074.
49. Santarpia L., Lippman S.M., El-Naggar A.K., 2012, Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(1), 103-119.
50. Qi M., Elion E.A., 2005, MAP kinase pathways, *Journal of Cell Science*, 118(16), 3569-3572.
51. Keshet Y., Seger R., 2010, The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions, *Methods in Molecular Biology*, 661, 3-38.
52. Sinkala M., Nkhoma P., Mulder N., et al., 2021, Integrated molecular characterisation of the MAPK pathways in human cancers reveals pharmacologically vulnerable mutations and gene dependencies, *Communications Biology*, 4(1), 9.
53. Salvador J.M., Mittelstadt P.R., Guszczynski T., et al., 2005, Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases, *Nature Immunology*, 6(4), 390-395.
54. Wang W., Abbruzzese J.L., Evans D.B., et al., 1999, Overexpression of urokinase-type plasminogen activator in pancreatic adenocarcinoma is regulated by constitutively activated RelA, *Oncogene*, 18(32), 4554-4563.
55. Beinke S., Ley S.C., 2004, Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology, *Biochemical Journal*, 382(2), 393-409.
56. Sun S.C., 2011, Non-canonical NF-kappaB signaling pathway, *Cell Research*, 21(1), 71-85.
57. Sun S.C., 2012, The noncanonical NF-kappaB pathway, *Immunological Reviews*, 246(1), 125-140.
58. Sun S.C., Liu Z.G., 2011, A special issue on NF-kappaB signaling and function, *Cell Research*, 21(1), 1-2.

59. Zhang H., Sun S.C., 2015, NF-kappaB in inflammation and renal diseases, *Cell & Bioscience*, 5, 63.
60. Xue C., Chu Q., Shi Q., et al., 2025, Wnt signaling pathways in biology and disease: mechanisms and therapeutic advances, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 10(1), 106.
61. Sharma M., Pruitt K., 2020, Wnt Pathway: An Integral Hub for Developmental and Oncogenic Signaling Networks, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8014.
62. Goldsberry W.N., Londoño A., Randall T.D., et al., 2019, A Review of the Role of Wnt in Cancer Immunomodulation, *Cancers (Basel)*, 11(6), 789.
63. Wang H., Zhang L., Hu C., et al., 2024, Wnt signaling and tumors (Review), *Molecular and Clinical Oncology*, 21(1), 45.
64. Tai D., Wells K., Arcaroli J., et al., 2015, Targeting the WNT Signaling Pathway in Cancer Therapeutics, *The Oncologist*, 20(10), 1189-1198.
65. Lv Y., Qi J., 2024, The JAK-STAT pathway: from structural biology to cytokine engineering, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 221.
66. Sharma A., 2013, Structural insights into the JAK-STAT signaling pathway, *Journal of Molecular Biology*, 425(2), 311-325.
67. Liongue C., Ward A.C., 2013, Evolution of the JAK-STAT pathway, *Jakstat*, 2(1), e22756.
68. Berkley K., Zalejski J., 2025, Targeting STAT3 for Cancer Therapy: Focusing on Y705, S727, or Dual Inhibition?, *Cancers*, 17(5), 1102.
69. Staerk J., Constantinescu S.N., 2012, The JAK-STAT pathway and hematopoietic stem cells from the JAK2 V617F perspective, *Jakstat*, 1(3), 184-190.
70. Cerella C., Radogna F., Dicato M., et al., 2013, Natural compounds as regulators of the cancer cell metabolism, *International Journal of Cell Biology*, 2013, 639401.
71. Orlikova B., Diederich M., 2012, Power from the garden: plant compounds as inhibitors of the hallmarks of cancer, *Current Medicinal Chemistry*, 19(14), 2061-2087.

72. Zanden S.Y., Qiao X., Neefjes J., 2021, New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin, *The FEBS Journal*, 288(21), 6095-6111.
73. Sun Y., Wan J., Song Q., et al., 2021, Prognostic Significance of CD56 Antigen Expression in Patients with De Novo Non-M3 Acute Myeloid Leukemia, *Biomed Research International*, 2021, 1929357.
74. Yarmohammadi F., Rezaee R., Karimi G., 2021, Natural compounds against doxorubicin-induced cardiotoxicity: A review on the involvement of Nrf2/ARE signaling pathway, *Phytotherapy Research*, 35(3), 1163-1175.
75. Kaklamani V.G., Gradishar W.J., 2003, Epirubicin versus doxorubicin: which is the anthracycline of choice for the treatment of breast cancer?, *Clinical Breast Cancer*, 4(1), S26-S33.
76. Maluf F.C., Spriggs D., 2002, Anthracyclines in the treatment of gynecologic malignancies, *Gynecologic Oncology*, 85(1), 18-31.
77. Anh N.H., Park S., Trang D.T., et al., 2022, Genus Mallotus (Euphorbiaceae): A review on traditional medicinal use, phytochemistry and biological activities, *Vietnam Journal of Science and Technology*, 60(2), 141-174.
78. Seo Y., Anh N.H., Heo Y., et al., 2020, Novel ANO1 Inhibitor from Mallotus apelta Extract Exerts Anticancer Activity through Downregulation of ANO1, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6542.
79. Gao H.M., Wang T., Hu H.T., et al., 2020, Three new triterpenoids from Mallotus macrostachyus, *Fitoterapia*, 142, 104498.
80. Kiem P.V., Nhiem N.X., Anh N.H., et al., 2020, Enantiomeric chromene derivatives with anticancer effects from Mallotus apelta, *Bioorganic Chemistry*, 104, 104268.
81. He T., Liu S., Chen S., et al., 2018, The p38 MAPK Inhibitor SB203580 Abrogates Tumor Necrosis Factor-Induced Proliferative Expansion of Mouse CD4(+)Foxp3(+) Regulatory T Cells, *Frontiers in Immunology*, 9, 1556.
82. Zhou W.D., Yang H.M., Wang Q., et al., 2010, SB203580, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, suppresses the development

- of endometriosis by down-regulating proinflammatory cytokines and proteolytic factors in a mouse model, *Human Reproduction*, 25(12), 3110-3116.
83. Martin J.L., Avkiran M., Quinlan R.A., et al., 2001, Antiischemic effects of SB203580 are mediated through the inhibition of p38alpha mitogen-activated protein kinase: Evidence from ectopic expression of an inhibition-resistant kinase, *Circulation Research*, 89(9), 750-752.
 84. Coppin C., 2010, Everolimus: the first approved product for patients with advanced renal cell cancer after sunitinib and/or sorafenib, *Biologics*, 4, 91-101.
 85. Lane H.A., Wood J.M., McSheehy P.M., et al., 2009, mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) has antiangiogenic/vascular properties distinct from a VEGFR tyrosine kinase inhibitor, *Clinical Cancer Research*, 15(5), 1612-1622.
 86. Guo H., Zhong Y., Jackson A.L., et al., 2016, Everolimus exhibits anti-tumorigenic activity in obesity-induced ovarian cancer, *Oncotarget*, 7(15), 20338-20356.
 87. Shah K., Panchal S., Patel B., 2021, Porcupine inhibitors: Novel and emerging anti-cancer therapeutics targeting the Wnt signaling pathway, *Pharmacological Research*, 167, 105532.
 88. Jang J., Song J., Sim I., et al., 2021, Wnt-C59 inhibits proinflammatory cytokine expression by reducing the interaction between β -catenin and NF- κ B in LPS-stimulated epithelial and macrophage cells, *Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 25(4), 307-319.
 89. Bailly C., 2019, Toward a repositioning of the antibacterial drug nifuroxazide for cancer treatment, *Drug Discovery Today*, 24(9), 1930-1936.
 90. Bęben D., Karłowicz-Bodalska K., Birska M., et al., 2025, Novel Applications of Nifuroxazide in Oncology—Potential and Perspectives in Cancer Therapies, *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 82, 585-594.
 91. Jia H., Cui J., Jia X., et al., 2017, Therapeutic effects of STAT3 inhibition by nifuroxazide on murine acute graft-vs.-host disease: Old drug, new use, *Molecular Medicine Reports*, 16(6), 9480-9486.

92. Liu L., Ma C., Ji J., et al., 2025, Role of antidiarrheal agents nifuroxazide in antitumor multi-target anticancer, multi-mechanism anticancer drug (Review), *Oncology Letters*, 29(6), 260.
93. Sato H., Asano S., Mori K., et al., 2015, Plasmacytoid Dendritic Cells Producing Interferon- α (IFN- α) and Inducing Mx1 Play an Important Role for CD4(+) Cells and CD8(+) Cells in Necrotizing Lymphadenitis, *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*, 55(3), 127-135.
94. Liu J., Zhao Z., Qiu N., et al., 2021, Co-delivery of IOX1 and doxorubicin for antibody-independent cancer chemo-immunotherapy, *Nature Communications*, 12(1), 2425.
95. Chiong E., Lee I.L., Dadbin A., et al., 2011, Effects of mTOR inhibitor everolimus (RAD001) on bladder cancer cells, *Clinical Cancer Research*, 17(9), 2863-2873.
96. Zhang J.X., Zhuang W.J., Poon K.H., et al., 2003, Induction of HL-60 cell differentiation by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 is mediated through the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway, *Anti-Cancer Drugs*, 14(1), 31-38.
97. Cheng Y., Phoon Y.P., Jin X., et al., 2015, Wnt-C59 arrests stemness and suppresses growth of nasopharyngeal carcinoma in mice by inhibiting the Wnt pathway in the tumor microenvironment, *Oncotarget*, 6(16), 14428-14439.
98. Rodems T.S., Juang D.S., Stahlfeld C.N., et al., 2022, SEEMLIS: a flexible semi-automated method for enrichment of methylated DNA from low-input samples, *Epigenetics*, 14(1), 37.
99. Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y., 2003, Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, *Nature Immunology*, 4(4), 330-336.
100. Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A., 2001, The biology of human natural killer-cell subsets, *Trends in Immunology*, 22(11), 633-640.
101. Wu S., Tan Y., Li F., et al., 2024, CD44: a cancer stem cell marker and therapeutic target in leukemia treatment, *Frontiers in Immunology*, 15, 1354992.

102. Quah B.J., Parish C.R., 2010, The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation, *Journal of Visualized Experiments*, (44), e2259.
103. Sabiiti W., Mtafya B., De Lima D.A., et al., 2020, A Tuberculosis Molecular Bacterial Load Assay (TB-MBLA), *Journal of Visualized Experiments*, (158), e60421.
104. Blank U., Karlsson S., 2015, TGF- β signaling in the control of hematopoietic stem cells, *Blood*, 125(23), 3542-3550.
105. Valencia J., L M.F.-S., Fraile-Ramos A., et al., 2019, Acute Lymphoblastic Leukaemia Cells Impair Dendritic Cell and Macrophage Differentiation: Role of BMP4, *Cells*, 8(7), 712.
106. Thein M.S., Ershler W.B., Jemal A., et al., 2013, Outcome of older patients with acute myeloid leukemia: an analysis of SEER data over 3 decades, *Cancer*, 119(15), 2720-2727.
107. Appelbaum F.R., Gundacker H., Head D.R., et al., 2006, Age and acute myeloid leukemia, *Blood*, 107(9), 3481-3485.
108. Döhner H., Estey E., Grimwade D., et al., 2017, Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel, *Blood*, 129(4), 424-447.
109. Mrózek K., 2008, Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype, *Seminars in Oncology*, 35(4), 365-377.
110. Shimony S., Stahl M., Stone R.M., 2023, Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management, *American Journal of Hematology*, 98(3), 502-526.
111. Ansarian M.A., Fatahichegeni M., Ren J., Wang X., 2025, Sex and Gender in Myeloid and Lymphoblastic Leukemias and Multiple Myeloma: From Molecular Mechanisms to Clinical Outcomes, *Blood Reviews*, 32(4), 210-225.
112. Shallis R.M., Ma X., Zeidan A.M., 2019, Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges, *Blood Reviews*, 36, 70-87.
113. Song X., Chi C., Gao W., et al., 2024, Biochemical risk factors and outcomes of acute promyelocytic leukemia patients with thrombotic

- events: a matched pair analysis, *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 57(5), 828-841.
114. Girard S., Lours C., 2023, Acute myeloid leukemia as an adverse event in a patient treated with a poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, *American Journal of Hematology*, 98(10), 1665-1666.
 115. Ustun C., Morgan E.A., 2021, Core-binding factor acute myeloid leukemia with inv(16): Older age and high white blood cell count are risk factors for treatment failure, *Leukemia Research*, 43(1), e19-e25.
 116. Sadek N., Abd-eltawab S., Assem N., et al., 2020, Prognostic Value of Absolute Lymphocyte count, Lymphocyte percentage, Serum albumin, Aberrant Expression of CD7, CD19 and the Tumor Suppressors (PTEN and p53) in Patients with Acute Myeloid Leukemia, *Asian Pacific Journal of Cancer Biology*, 5, 131-140.
 117. Pui C.H., Robison L.L., Look A.T., 2008, Acute lymphoblastic leukaemia, *The Lancet*, 371(9617), 1030-1043.
 118. Bassan R., Hoelzer D., 2011, Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia, *Journal of Clinical Oncology*, 29(5), 532-543.
 119. Möricke A., Zimmermann M., Reiter A., et al., 2010, Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000, *Leukemia*, 24(2), 265-284.
 120. Kureshi C.T., Dougan S.K., 2025, Cytokines in cancer, *Cancer Cell*, 43(1), 15-35.
 121. Su J., Morgani S.M., David C.J., et al., 2020, TGF- β orchestrates fibrogenic and developmental EMTs via the RAS effector RREB1, *Nature Communications*, 577(7791), 566-571.
 122. Wen J., Xu F., Zhou Q., et al., 2023, Effects of peripheral blood leukocyte count and tumor necrosis factor-alpha on early death in acute promyelocytic leukemia, *BMC Cancer*, 23(1), 27.
 123. Ahmed M.B., Shehata H.H., Moussa M., et al., 2012, Prognostic significance of survivin and tumor necrosis factor-alpha in adult acute lymphoblastic leukemia, *Clinical Biochemistry*, 45(1-2), 112-116.

124. Urwanisch L., Luciano M., Horejs-Hoeck J., 2021, The NLRP3 Inflammasome and Its Role in the Pathogenicity of Leukemia, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1104.
125. Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M., 2010, Immunity, inflammation, and cancer, *Cell*, 140(6), 883-899.
126. Flavell R.A., Sanjabi S., Wrzesinski S.H., et al., 2010, The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta, *Nature Reviews Immunology*, 10(8), 554-567.
127. Wang R.X., Yu C.R., Dambuza I.M., et al., 2014, Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease, *Nature Medicine*, 20(6), 633-641.
128. Solati H., Zareinejad M., Ghavami A., et al., 2020, IL-35 and IL-18 Serum Levels in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia: The Relationship With Prognostic Factors, *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 42(4), 281-286.
129. Taniguchi K., Karin M., 2014, IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer, *Seminars in Immunology*, 26(1), 54-74.
130. Landskron G., De la Fuente M., Thuwajit P., et al., 2014, Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment, *Journal of Immunology Research*, 2014, 149185.
131. Lyu Z.-S., Shen M.-Z., Zhang Y.-Y., et al., 2025, TGF- β 1-triggered maladaptive bone marrow endothelium impedes hematopoietic recovery, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 10(1), 332.
132. Bakhtiyari M., Liaghat M., Aziziyan F., et al., 2023, The role of bone marrow microenvironment (BMM) cells in acute myeloid leukemia (AML) progression: immune checkpoints, metabolic checkpoints, and signaling pathways, *Cell Communication and Signaling*, 21(1), 252.
133. Tang J., Luo L., Bosco B., et al., 2024, Identification of cell surface markers for acute myeloid leukemia prognosis based on multi-model analysis, *The Journal of Biomedical Research*, 38(4), 397-412..
134. Saultz J., Rai M., Burns F., et al., 2023, Prognostic Significance of NCAM1 (CD56) Expression in AML Patients Treated with HMA+Venetoclax, *Blood*, 142, 5762-5762.

135. Alegretti A.P., Bittar C.M., Bittencourt R., et al., 2011, The expression of CD56 antigen is associated with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia, *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 33(3), 202-206.
136. Casucci M., Nicolis di Robilant B., Falcone L., et al., 2013, CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma, *Blood*, 122(20), 3461-3472.
137. Mohy El-Din A.M.M., AlShaarawy B.A., Kandeel E.Z., et al., 2025, Immunopathological Dysregulation in Acute Myeloid Leukemia: The Impact of T-bet, RORgammat, and FOXP3 on Disease Dynamics, *Cells*, 14(7), 890.
138. Wan Y., Zhang C., Xu Y., et al., 2020, Hyperfunction of CD4 CD25 regulatory T cells in de novo acute myeloid leukemia, *BMC Cancer*, 20(1), 472.
139. Ustun C., Miller J.S., Munn D.H., et al., 2011, Regulatory T cells in acute myelogenous leukemia: is it time for immunomodulation?, *Blood*, 118(19), 5084-5095.
140. Liu M., Yang M., Qi Y., et al., 2025, Immunosuppressive cells in acute myeloid leukemia: mechanisms and therapeutic target, *Frontiers in Immunology*, 16, 1627161.
141. Jaffe E., Swerdlow S.H.C.E., Campo E., et al., 2008, *WHO Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Vol. 2.*, IARC Press, Lyon.
142. Döhner H., Wei A.H., 2022, Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN, *Blood*, 140(12), 1345-1377.
143. W. L., 2022, *The 5th Edition of the World Health Organization Classification of Hematolymphoid Tumors. Leukemia.*, Exon Publications, Brisbane (AU).
144. Maury S., Huguet F., Leguay T., et al., 2010, Adverse prognostic significance of CD20 expression in adults with Philadelphia chromosome-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, *Haematologica*, 95(2), 324-328.

145. Duault C., Kumar A., 2021, Activated natural killer cells predict poor clinical prognosis in high-risk B- and T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Blood*, 138(16), 1465-1480.
146. Fischer L., Gökbuget N., Schwartz S., et al., 2009, CD56 expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia is associated with non-thymic phenotype and resistance to induction therapy but no inferior survival after risk-adapted therapy, *Haematologica*, 94(2), 224-229.
147. Idris S.Z., Hassan N., Lee L.J., et al., 2015, Increased regulatory T cells in acute lymphoblastic leukemia patients, *Hematology*, 20(9), 523-529.
148. Ge J., Yin X., Chen L., 2024, Regulatory T cells: masterminds of immune equilibrium and future therapeutic innovations, *Frontiers in Immunology*, 15, 1457189.
149. Niedźwiecki M., Budziło O., Adamkiewicz-Drożyńska E., et al., 2019, CD4(+)CD25(high)CD127(low/-)FoxP3(+) Regulatory T-Cell Population in Acute Leukemias: A Review of the Literature, *Disease Markers*, 2019, 2816498.
150. Kato M., Sanada M., Kato I., et al., 2009, Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas, *Nature*, 459(7247), 712-716.
151. Zhu L., Zhang F., 2014, Characteristics of A20 gene polymorphisms in T-cell acute lymphocytic leukemia, *Hematology*, 19(8), 448-454.
152. Philipp C., Edelmann J., Bühler A., et al., 2011, Mutation analysis of the TNFAIP3 (A20) tumor suppressor gene in CLL, *International Journal of Cancer*, 128(7), 1747-1752.
153. Johari T., Maiti T.K., 2018, 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*, 1862(9), 2081-2089.
154. Xu X., Kalac M., Markson M., et al., 2020, Reversal of CYLD phosphorylation as a novel therapeutic approach for adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL), *Cell Death & Disease*, 11(2), 94.
155. Hasselbalch H.C., 2012, 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*, 119(14), 3219-3225.
156. Lee E.G., Boone D.L., Chai S., et al., 2000, Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice, *Science*, 289(5488), 2350-2354.
 157. Jin W., Reiley W.R., Lee A.J., et al., 2007, Deubiquitinating enzyme CYLD regulates the peripheral development and naive phenotype maintenance of B cells, *Journal of Biological Chemistry*, 282(21), 15884-15893.
 158. Chu Y., Vahl J.C., Kumar D., et al., 2011, B cells lacking the tumor suppressor TNFAIP3/A20 display impaired differentiation and hyperactivation and cause inflammation and autoimmunity in aged mice, *Blood*, 117(7), 2227-2236.
 159. Matmati M., Jacques P., Maelfait J., et al., 2011, A20 (TNFAIP3) deficiency in myeloid cells triggers erosive polyarthritis resembling rheumatoid arthritis, *Nature Genetics*, 43(9), 908-912.
 160. Ma A., Malynn B.A., 2012, A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease, *Nature Reviews Immunology*, 12(11), 774-785.
 161. Juliusson G., Antunovic P., Derolf A., et al., 2009, Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry, *Blood*, 113(18), 4179-4187
 162. Kovtonyuk L.V., Fritsch K., Feng X., et al., 2016, Inflamm-Aging of Hematopoiesis, Hematopoietic Stem Cells, and the Bone Marrow Microenvironment, *Frontiers in Immunology*, 7, 502.
 163. Compagno M., Lim W.K., Grunn A., et al., 2009, Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma, *Nature*, 459(7247), 717-721.
 164. Kato M., Sanada M., Kato I., et al., 2009, Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas, *Nature*, 459, 712-716.
 165. Hayashi M., Jono H., Shinriki S., et al., 2014, Clinical significance of CYLD downregulation in breast cancer, *Breast Cancer Research and Treatment*, 143(3), 447-457.

166. Wu W., Zhu H., Fu Y., et al., 2014, Clinical significance of down-regulated cylindromatosis gene in chronic lymphocytic leukemia, *Leukemia & Lymphoma*, 55(3), 588-594.
167. Zhang X., Su Y., Song H., et al., 2014, Attenuated A20 expression of acute myeloid leukemia-derived dendritic cells increased the anti-leukemia immune response of autologous cytolytic T cells, *Leukemia Research*, 38(6), 673-681.
168. Hao F., Sholy C., Wang C., et al., 2021, The Role of T Cell Immunotherapy in Acute Myeloid Leukemia, *Cells*, 10(12), 3412.
169. Nakagawa M.M., Rathinam C.V., 2019, A20 deficiency in hematopoietic stem cells causes lymphopenia and myeloproliferation due to elevated Interferon-gamma signals, *Scientific Reports*, 9(1), 12658.
170. Weeda V., Mestrum S.G.C., Leers M.P.G., 2022, Flow Cytometric Identification of Hematopoietic and Leukemic Blast Cells for Tailored Clinical Follow-Up of Acute Myeloid Leukemia, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10412.
171. Wang X., Zheng J., Liu J., et al., 2005, Increased population of CD4(+)CD25(high) regulatory T cells with their higher apoptotic and proliferating status in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients, *European Journal of Haematology*, 75(6), 468-476.
172. Chen S., Xing H., Li S., et al., 2015, Up-regulated A20 promotes proliferation, regulates cell cycle progression and induces chemotherapy resistance of acute lymphoblastic leukemia cells, *Leukemia Research*, 39(9), 976-983.
173. Don B.R., Kaysen G., 2004, Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition, *Seminars in Dialysis*, 17(6), 432-437.
174. Pluthero F.G., Kahr W.H.A., 2018, The Birth and Death of Platelets in Health and Disease, *Platelets*, 33(3), 225-234.
175. Catrysse L., Vereecke L., Beyaert R., et al., 2014, A20 in inflammation and autoimmunity, *Trends in Immunology*, 35(1), 22-31.
176. Sun S.C., 2010, CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF-kappaB activation and diverse biological processes, *Cell Death & Differentiation*, 17(1), 25-34.

177. Elgueta R., Benson M.J., de Vries V.C., et al., 2009, Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system, *Immunological Reviews*, 229(1), 152-172.
178. Lork M., Verhelst K., Beyaert R., 2017, CYLD, A20 and OTULIN deubiquitinases in NF- κ B signaling and cell death: so similar, yet so different, *Cell Death & Differentiation*, 24(7), 1172-1183.
179. Wang X., Deckert M., Xuan N.T., et al., 2013, Astrocytic A20 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting NF- κ B- and STAT1-dependent chemokine production in astrocytes, *Acta Neuropathologica*, 126(5), 711-724.
180. Chen H., Hu L., Luo Z., et al., 2015, A20 suppresses hepatocellular carcinoma proliferation and metastasis through inhibition of Twist1 expression, *Molecular Cancer*, 14, 186.
181. De Wilde K., Martens A., Lambrecht S., et al., 2017, A20 inhibition of STAT1 expression in myeloid cells: a novel endogenous regulatory mechanism preventing development of enthesitis, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(3), 585-592.
182. Badache A., Hynes N.E., 2001, Interleukin 6 inhibits proliferation and, in cooperation with an epidermal growth factor receptor autocrine loop, increases migration of T47D breast cancer cells, *Cancer Research*, 61(1), 383-391.
183. Kremer K.N., Peterson K.L., Schneider P.A., et al., 2013, CXCR4 chemokine receptor signaling induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells via regulation of the Bcl-2 family members Bcl-XL, Noxa, and Bak, *Journal of Biological Chemistry*, 288(32), 22899-22914.
184. Johnson D.E., O'Keefe R.A., Grandis J.R., 2018, Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(4), 234-248.
185. Kortylewski M., Yu H., 2008, Role of Stat3 in suppressing anti-tumor immunity, *Current Opinion in Immunology*, 20(2), 228-233.
186. Zeng Z., Shi Y.X., Samudio I.J., et al., 2009, Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to

- kinase inhibitors and chemotherapy in AML, *Blood*, 113(24), 6215-6224.
187. Sukhbaatar N., Hengstschläger M., Weichhart T., 2016, mTOR-Mediated Regulation of Dendritic Cell Differentiation and Function, *Trends in Immunology*, 37(11), 778-789.
 188. Weichhart T., Hengstschläger M., Linke M., 2015, Regulation of innate immune cell function by mTOR, *Nature Reviews Immunology*, 15(10), 599-614.
 189. Cuadrado A., Nebreda A.R., 2010, Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling, *Biochemical Journal*, 429(3), 403-417.
 190. Evangelisti C., Chiarini F., Cappellini A., et al., 2020, Targeting Wnt/ β -catenin and PI3K/Akt/mTOR pathways in T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Journal of Cellular Physiology*, 235(6), 5413-5428.
 191. Goessling W., North T.E., Loewer S., et al., 2009, Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration, *Cell*, 136(6), 1136-1147.
 192. Zhou Z., Lin W., Li X., et al., 2019, Aberrant Phenotype and Function of Dendritic Cells in Adult B Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia, *Immunological Investigations*, 48(8), 781-793.
 193. Maecker B., Mougiakakos D., Zimmermann M., et al., 2006, Dendritic cell deficiencies in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients, *Leukemia*, 20(4), 645-649.
 194. Woiciechowsky A., Regn S., Kolb H.J., et al., 2001, Leukemic dendritic cells generated in the presence of FLT3 ligand have the capacity to stimulate an autologous leukemia-specific cytotoxic T cell response from patients with acute myeloid leukemia, *Leukemia*, 15(2), 246-255.
 195. Kciuk M., Gielecińska A., 2023, Doxorubicin-An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity, *Cells*, 12(4), 612.
 196. Ma D.Y., Clark E.A., 2009, The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells, *Seminars in Immunology*, 21(5), 265-272.
 197. Palucka K., Banchereau J., 2013, Dendritic-Cell-Based Therapeutic Cancer Vaccines, *Immunity*, 39, 38-48.

198. Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutellingsperger C., 1995, A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V, *Journal of Immunological Methods*, 184(1), 39-51.
199. Galluzzi L., Buqué A., Kepp O., Zitvogel L., et al., 2017, Immunogenic cell death in cancer and infectious disease, *Nature Reviews Immunology*, 17(2), 97-111.
200. Valencia J., L M.F.-S., Fraile-Ramos A., 2019, Acute Lymphoblastic Leukaemia Cells Impair Dendritic Cell and Macrophage Differentiation: Role of BMP4, *Cells*, 8(7), 712.
201. Zitvogel L., Apetoh L., Ghiringhelli F., et al., 2008, Immunological aspects of cancer chemotherapy, *Nature Reviews Immunology*, 8(1), 59-73.
202. Manicassamy S., Reizis B., Ravindran R., et al., 2010, Activation of beta-catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine, *Science*, 329(5993), 849-853.
203. Swafford D., Manicassamy S., 2015, Wnt signaling in dendritic cells: its role in regulation of immunity and tolerance, *Discovery Medicine*, 19(105), 303-310.
204. Suryawanshi A., Manoharan I., Hong Y., et al., 2015, Canonical wnt signaling in dendritic cells regulates Th1/Th17 responses and suppresses autoimmune neuroinflammation, *The Journal of Immunology*, 194(7), 3295-3304.
205. Thomson A.W., Turnquist H.R., Raimondi G., 2009, Immunoregulatory functions of mTOR inhibition, *Nature Reviews Immunology*, 9(5), 324-337.
206. Arrighi J.F., Rebsamen M., Rousset F., et al., 2001, A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF- α , and contact sensitizers, *The Journal of Immunology*, 166(6), 3837-3845.
207. Amiel E., Everts B., Freitas T.C., et al., 2012, Inhibition of mechanistic target of rapamycin promotes dendritic cell activation and enhances

therapeutic autologous vaccination in mice, *The Journal of Immunology*, 189(5), 2151-2158.

PHỤ LỤC I
DANH SÁCH BỆNH NHÂN VÀ NGƯỜI KHỎE
THAM GIA NGHIÊN CỨU

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:

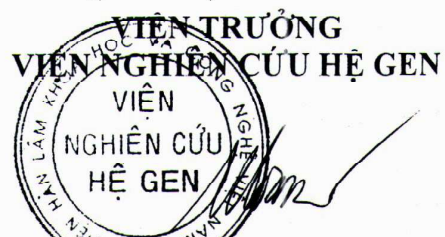
Tên đề tài: Nghiên cứu mối tương quan giữa đa hình gen, biểu hiện gen, hệ vi sinh, kiểu hình miễn dịch trên bệnh nhân ung thư máu

- 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 và đúng thời hạn mục tiêu, nội dung và sản phẩm của đề tài.

Trân trọng cảm ơn./.

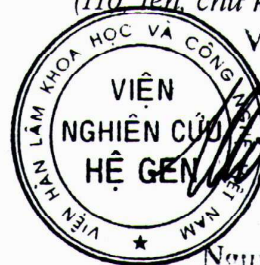
Hà Nội, ngày 20 tháng 11 năm 2020.

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



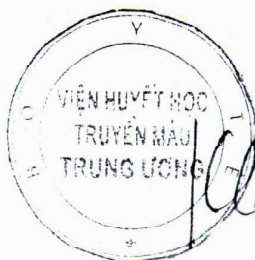
Nguyễn Thị Xuân

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



Nguyễn Huy Hoàng

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



2

VIỆN TRƯỞNG
Bách Quốc Khánh

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	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

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	ĐÌNH 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*

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 BỆNH NHÂN THAM GIA NGHIÊN CỨU

Thuộc 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 TĐT.CN.43/21.

Chủ nhiệm đề tài: Nguyễn Thị Xuân

Thời gian thu thập mẫu: Tháng 3/2022 đến tháng 09/2024

Địa điểm thu thập mẫu: Khoa bệnh máu tổng hợp H7- Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương.

	HỌ VÀ TÊN	GIỚI	NĂM SINH	SỐ LƯU TRỮ	CHẨN ĐOÁN	MÃ NC
1	Đặng Văn Tr.	Nam	1961	2200011010	ALL	LPH01
2	Ma Thị G.	Nữ	1993	2200011133	ALL	LPH02
3	Nguyễn Văn T.	Nam	1963	2200011462	CLL	LPH04
4	Trần Văn X.	Nam	1984	2200011530	ALL	LPH05
5	Bùi Văn H.	Nam	1970	2200011973	ALL	LPH06
6	Nguyễn Thị T.	Nữ	1972	2200011726	CLL	LPH07
7	Lại Ngọc Th.	Nam	1954	2200012389	CLL	LPH08
8	Nguyễn Thị Ph.	Nữ	1952	2200012814	CLL	LPH09
9	Nguyễn Văn H.	Nam	1957	2200012098	ALL	LPH10
10	Phạm Văn Tr.	Nam	1992	2200012645	ALL	LPH11
11	Võ Thị Q.	Nữ	1972	2100048580	ALL	LPH12
12	Nguyễn Duy D.	Nam	1960	2200016160	ALL	LPH13
13	Nguyễn Thị B.	Nữ	1973	2200016155	ALL	LPH14
14	Nguyễn Văn Ngh.	Nam	2001	2200015684	ALL	LPH15
15	Nguyễn Quang Th.	Nam	2005	2200015782	ALL	LPH16

16	Hoàng Ngọc Th.	Nam	2001	2200017197	ALL	LPH17
17	Nguyễn Văn H.	Nam	1944	16015377	CLL	LPH18
18	Nguyễn Văn C.	Nam	1971	2200016355	CLL	LPH19
19	Nguyễn Đình Ng.	Nam	1960	2200017904	ALL	LPH20
20	Nguyễn Văn Y.	Nam	1965	2200017963	ALL	LPH21
21	Nguyễn Văn Kh.	Nam	1962	2200017270	ALL	LPH22
22	Nguyễn Thanh D.	Nữ	1983	2200018735	ALL	LPH23
23	Nguyễn Văn Th.	Nam	1974	2200016134	CLL	LPH24
24	Nguyễn Thị V.	Nữ	1958	2200017463	CLL	LPH25
25	Ngô Thị B.	Nữ	1955	2200019877	ALL	LPH26
26	Trần Văn T.	Nam	1948	2200019683	CLL	LPH27
27	Nguyễn Thị S.	Nữ	1965	2200019740	ALL	LPH28
28	Đoàn Thị L.	Nữ	1968	2200019495	CLL	LPH29
29	Hoàng Văn Đ.	Nam	1990	2200020365	ALL	LPH30
30	Lưu Đình Đ.	Nam	1947	2200019832	ALL	LPH31
31	Hoàng Phong L.	Nam	2000	2200020412	ALL	LPH32
32	Nguyễn Trí Th.	Nam	1976	2200021334	ALL	LPH33
33	Hoàng Thị Q.	Nữ	1989	2200022798	ALL	LPH34
34	Nguyễn Văn T.	Nam	2004	2200026050	ALL	LPH35
35	Trần Thị Kh.	Nữ	1949	2200026156	ALL	LPH36
36	Vũ Thị H.	Nữ	1978	1920046062	CLL	LPH37
37	Trần Thị Thanh H.	Nữ	1994	2200026546	ALL	LPH38
38	Vũ Đình Ch.	Nam	1956	2200026742	CLL	LPH39
39	Hoàng Ngọc Th.	Nam	1988	19023939	ALL	LPH40
40	Phạm Trung L.	Nam	1948	2200031792	CLL	LPH41
41	Đào Thị Th.	Nữ	1982	2200032670	ALL	LPH42
42	Đặng Thị S.	Nữ	1949	2200032521	CLL	LPH43
43	Trịnh Thị Bích H.	Nữ	1989	2200031771	ALL	LPH44
44	Giảng Nguyễn Thuận H.	Nam	1969	2200035504	ALL	LPH45
45	Nguyễn Văn H.	Nam	2003	2200037681	ALL	LPH46

KINH

TRU

46	Bùi Đình V.	Nam	1950	2200038143	ALL	LPH47
47	Hoàng Thúy L.	Nữ	1989	2200038225	ALL	LPH48
48	Phan Văn Tr.	Nam	1976	2200023839	ALL	LPH49
49	Đỗ Đình Gi.	Nam	2001	2200038741	ALL	LPH50
50	Hà Duyên D.	Nam	1969	2200038277	CLL	LPH51
51	Phạm Đức Tr.	Nam	1989	2200039612	ALL	LPH52
52	Mê Văn S.	Nam	1959	2100021751	ALL	LPH53
53	Trần Thị Th.	Nữ	1960	6001456	ALL	LPH54
54	Đặng Thị L.	Nữ	1972	2200043640	ALL	LPH55
55	Nguyễn Đăng Đ.	Nam	2000	2200043487	ALL	LPH56
56	Bùi Thị H.	Nữ	1987	2200043754	ALL	LPH57
57	Vũ Thị Ng.	Nữ	1946	2200044164	ALL	LPH58
58	Nguyễn Xuân T.	Nam	1981	2200045223	ALL	LPH59
59	Bùi Tiến Đ.	Nam	2002	2200046162	ALL	LPH60
60	Trần Thu H.	Nữ	2006	2200045598	ALL	LPH61
61	Lê Đoài S.	Nam	1963	2200047149	CLL	LPH62
62	Nguyễn Văn B.	Nam	1963	2200046808	CLL	LPH63
63	Nguyễn Thị H.	Nữ	1972	2200046886	ALL	LPH64
64	Nguyễn Đình T.	Nam	1991	2200047917	ALL	LPH65
65	Nguyễn Thị B.	Nữ	1973	2200047916	CLL	LPH66
66	Bùi Văn G.	Nam	1997	2200046761	ALL	LPH67
67	Phạm Thị V.	Nữ	1958	2100033207	CLL	LPH68
68	Trần Văn V.	Nam	1946	2200042264	CLL	LPH69
69	Nguyễn Thị L.	Nữ	1958	2200046499	CLL	LPH70
70	Lý Thị Tr.	Nữ	1964	2200053554	CLL	LPH71
71	Hoàng Thị Hồng L.	Nữ	1947	2100037415	CLL	LPH72
72	Nguyễn Thị H.	Nữ	1946	2200010593	CLL	LPH73
73	Đinh Huy Đ.	Nam	1938	2200049040	CLL	LPH74
74	Đỗ Quang Th.	Nam	1953	2200048908	CLL	LPH75
75	Nguyễn Văn Tr.	Nam	1947	2200043830	CLL	LPH78

YÊN
ĐẠI
HỌC
QUẢNG
TRUNG

76	Trần Ngọc D.	Nam	1961	2200057347	CLL	LPH79
77	Vũ Đức Ch.	Nam	2006	2200052409	ALL	LPH81
78	Nguyễn Đình Q.	Nam	1985	2200051713	ALL	LPH82
79	Phạm Minh Ch.	Nam	1947	2200057722	CLL	LPH83
80	Hoàng Văn Ph.	Nam	1986	2200051896	CLL	LPH84
81	Đỗ Thị N.	Nữ	1963	2200054050	ALL	LPH85
82	Phạm Đức Th.	Nam	1950	2100042785	ALL	LPH86
83	Châu A V.	Nam	2004	2200055297	ALL	LPH87
84	Hoàng Văn V.	Nam	1959	2200053540	CLL	LPH89
85	Nguyễn Huy Đ.	Nam	1998	2200054653	ALL	LPH90
86	Đỗ Thị T.	Nữ	1972	2100043108	CLL	LPH91
87	Ngô Trung K.	Nam	1983	2200056160	ALL	LPH94
88	Sầm Thị S.	Nữ	1993	2200056537	ALL	LPH95
89	Lê Văn H.	Nam	1960	2100059364	CLL	LPH96
90	Phạm Thị L.	Nữ	1962	2200005465	CLL	LPH97
91	Nguyễn Đình H.	Nam	1971	2200023726	CLL	LPH98
92	Nguyễn Văn Th.	Nam	1990	2200059141	ALL	LPH99
93	Lê Viết V.	Nam	1954	2200052424	CLL	LPH100
94	Lê Ngọc Th.	Nam	1951	2200060330	CLL	LPH101
95	Nguyễn Năng H.	Nam	1961	2200057988	CLL	LPH102
96	Bùi Thị H.	Nữ	1957	2200065144	CLL	LPH103
97	Nguyễn Thị K.	Nữ	1955	2300004001	CLL	LPH104
98	Hoàng Văn V.	Nam	1947	2300013975	CLL	LPH105
99	Nguyễn Văn M.	Nam	1957	2300025438	CLL	LPH106
100	Nguyễn Thị T.	Nữ	1952	2300031107	CLL	LPH107
101	Lưu Thiếu Ch.	Nam	1946	2300029338	CLL	LPH108
102	Phạm Thế H.	Nam	1962	18017250	CLL	LPH109
103	Lục Thị B.	Nữ	1955	2300038150	CLL	LPH110
104	Dương Đình M.	Nam	1950	2020107527	CLL	LPH111
105	Nguyễn Đức C.	Nam	1960	2300044465	CLL	LPH112

106	Vũ Văn T.	Nam	1966	2300038148	CLL	LPH113
107	Phạm Thị Kh.	Nữ	1950	2300042828	CLL	LPH114

Bệnh bạch cầu cấp dòng Lympho (ALL)

Bệnh bạch cầu mạn dòng Lympho (CLL)

Xác nhận của đơn vị thu thập số liệu

Người lấy mẫu



Ths.Bs. Nguyễn Quốc Nhật



Lê Thuý Hà

Xác nhận của phòng Kế hoạch tổng hợp

Xác nhận của Viện Huyết học – Truyền máu
Trung ương



Nguyễn Hữu Chiến



PHÓ VIỆN TRƯỞNG
Vũ Đức Bình:



**DANH SÁCH NHÓM CHÚNG LÀ NGƯỜI HIẾN MÁU TÌNH NGUYỆN
PHỤC VỤ NGHIÊN CỨU**

Thuộc 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 TĐT.CN.43/21.

Thời gian thu thập mẫu: Tháng 2/2021 đến 12/2022

Địa điểm: Bộ môn Trung tâm Huyết học – Truyền máu, Bệnh viện Quân y 103,
Học viện Quân y.

ST T	HỌ VÀ TÊN	GIỚI TÍNH	NĂM SINH	MÃ BARCODE
1	Hà Xuân T.	Nam	1995	92100989
2	Hồ Thị Bích N.	Nữ	1986	92100984
3	Lê Khắc Ng.	Nam	1992	92100988
4	Lê Ngọc L.	Nam	1969	92100943
5	Lê Việt A.	Nam	1996	92100948
6	Ngô Anh Th.	Nam	1971	92101108
7	Ngô Thị L.	Nữ	1981	92100993
8	Nguyễn Đức A.	Nam	1994	92101121
9	Nguyễn Ngọc K.	Nam	1983	92100975
10	Nguyễn Thị Ngọc H.	Nữ	1981	92100991
11	Nguyễn Thị Ng.	Nữ	1984	92100983
12	Nguyễn Thị Phương Th.	Nữ	1993	92100977
13	Nguyễn Thị Q.	Nữ	1986	92100986

14	Nguyễn Văn H.	Nam	2000	92101131
15	Nguyễn Tiến D.	Nam	1988	92101088
16	Nguyễn Tiến D.	Nam	1976	92100942
17	Nguyễn Thu H.	Nữ	1984	92100958
18	Nguyễn Tuấn A.	Nam	2001	92100978
19	Nguyễn Tuấn V.	Nam	1992	92101123
20	Nguyễn Văn Ch.	Nam	1981	92100990
21	Phạm Anh V.	Nam	1990	92101107
22	Phạm Cao D.	Nam	1982	92100974
23	Phạm Huy Q.	Nam	1979	92100979
24	Phạm Thị Thanh H.	Nữ	1986	92100951
25	Phạm Thị Thu Th.	Nữ	1983	92100952
26	Phạm Văn H.	Nam	1988	92100981
27	Phan Văn H.	Nam	2001	92100950
28	Phùng Quang L.	Nam	1981	92100976
29	Quách Văn A.	Nam	1988	92101073
30	Trần Thị Thu Th.	Nữ	1986	92100982
31	Nguyễn Văn L.	Nam	1986	92100967
32	Vũ Thị Anh Đ.	Nữ	1980	92100992
33	Vũ Thị Thu H.	Nữ	1985	92100987
34	Đặng Thu H.	Nữ	1980	92100962
35	Đinh Xuân D.	Nam	1979	92100972
36	Đỗ Văn A.	Nữ	1989	92100956
37	Hà Thị Thanh M.	Nữ	1979	92100959
38	Hoàng Đình Tr.	Nam	1998	92101109
39	Hoàng Minh Tr.	Nam	1994	92101130
40	Lâm Mạnh T.	Nam	1989	92101132
41	Lê Văn N.	Nam	1992	92101129

42	Nguyễn Hồng D.	Nam	1991	92100954
43	Nguyễn Kiều O.	Nữ	1995	92100968
44	Nguyễn Kỳ N.	Nam	1988	92100970
45	Nguyễn Lương H.	Nam	1996	92100955
46	Nguyễn Nhật D.	Nam	1983	92101115
47	Nguyễn Thị H.	Nữ	1987	92101002
48	Nguyễn Thị L.	Nữ	1986	92100963
49	Trịnh Tuấn L.	Nam	1989	92101127
50	Nguyễn Thị Mỹ Nh.	Nữ	1982	92101004
51	Nguyễn Thị T.	Nữ	1988	92105388
52	Nguyễn Thị X.	Nữ	1992	92105426
53	Lê Thị Quỳnh A.	Nữ	1995	92105459
54	Nguyễn Thùy L.	Nữ	1991	92105729
55	Nguyễn Trung K.	Nam	1978	92105639
56	Nguyễn Văn C.	Nam	1993	92105622
57	Nguyễn Văn M.	Nam	1977	92105722
58	Nguyễn Văn Q.	Nam	1986	92105650
59	Nguyễn Văn T.	Nam	1986	92105676
60	Nguyễn Văn Th.	Nam	1978	92105648
61	Nguyễn Xuân H.	Nam	1976	92105740
62	Phạm Bạch Tr.	Nữ	1980	92105401
63	Phạm Thị H.	Nữ	1986	92105596
64	Phạm Thị H.	Nữ	1987	92105460
65	Phạm Thị H.	Nữ	1984	92105673
66	Lê Văn T.	Nam	2001	92105571
67	Tạ Ngọc L.	Nam	1976	92105724
68	Lê Thị Hồng L.	Nữ	1976	92105385
69	Lê Sỹ B.	Nam	1980	92105657

70	Tạ Thị D.	Nữ	1976	92105398
71	Tạ Thị Hải Y.	Nữ	1985	92105458
72	Ngô Quang H.	Nam	1976	92105396
73	Tạ Thị L.	Nữ	1976	92105569
74	Tạ Thị Thu H.	Nữ	1973	92105736
75	Tạ Xuân L.	Nam	1979	92105660
76	Trần Hùng D.	Nam	1980	92105635
77	Trần Thị H.	Nữ	1990	92105730
78	Trần Thị L.	Nữ	1987	92105663
79	Trần Thị Lan A.	Nữ	2002	92105572
80	Trần Thị Phương Th.	Nữ	1979	92105684
81	Trần Thị Thùy L.	Nữ	1993	92105653
82	Trần Thu L.	Nữ	1987	92105678
83	Nguyễn Thị Th.	Nữ	1995	92105621
84	Trần Trọng B.	Nam	1984	92105627
85	Trần Văn Th.	Nam	1981	92105642
86	Trần Xuân H.	Nam	1981	92105633
87	Trịnh Lan A.	Nữ	1988	92105651
88	Nguyễn Thị Thúy Ng.	Nữ	1985	92105421
89	Võ Thị Ph.	Nữ	1995	92105354
90	Lê Văn B.	Nữ	1975	92105647
91	Vũ Thị Kh.	Nữ	1986	92105677
92	Vũ Thị N.	Nữ	1989	92105395
93	Vũ Thị Ng.	Nữ	1988	92105664
94	Vũ Thị Thanh Th.	Nữ	1973	92105382
95	Đại Thị Th.	Nữ	1973	92105744
96	Đỗ Thị H.	Nữ	1984	92105611
97	Đỗ Thị H.	Nữ	1993	92105737

98	Hoàng Thị H.	Nữ	1970	92105742
99	Lê Mạnh H.	Nam	1992	92105741
100	Lưu Thị Th.	Nữ	1979	92105428

GDTT Huyết học - Truyền máu

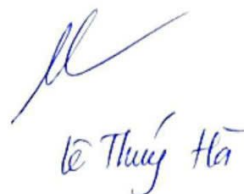


Đại tá, TS. *Tạ Việt Hưng*

Trưởng phòng KHTH



Người lấy mẫu



Thủ trưởng Bệnh Viện



**Đại tá
PGS.TS Tạ Bá Thắng**



PHỤ LỤC II
MẪU BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU
Mã bệnh phẩm:

I. THÔNG TIN BỆNH NHÂN

1. Họ và tên bệnh nhân: Năm sinh:
2. Giới:
3. Địa chỉ :
5. Ngày vào viện :
6. Mã bệnh nhân:

II. TIỀN SỬ

1. Bản thân:
2. Gia đình:

III. THÔNG TIN LÂM SÀNG

1. Lí do vào viện:

2. Các cơ quan:

- Gan to:
- Lách to:
- Hạch:
- Xuất huyết:
- Thần kinh:
- Hô hấp:
- Tim mạch:
- Tiêu hóa:
- Cơ xương khớp:
- Cơ quan khác:

IV. THÔNG TIN CẬN LÂM SÀNG

1. Công thức máu

- | | |
|---------------------|---------------------------------|
| - Hồng cầu:.....T/L | Số lượng Bạch cầu: :.....G/L |
| - HST:g/L | BC trung tính: :.....% |
| - HCT:.....L/L | BC lympho: :.....% |
| - Tiểu cầu:.....G/L | Số lượng BC trung tính:.....G/L |
| | Số lượng BC lympho:.....G/L |

2. Sinh hóa máu

- | | |
|-------------------|---------------------|
| - Ure:.....mmol/L | - Albumin:g/L |
|-------------------|---------------------|

- | | |
|---|--------------------------------------|
| - Glucose :.....mmol/L | - Acid uric:..... $\mu\text{mol//L}$ |
| - Creatinin:..... $\mu\text{mol/L}$ | - AST:U/L |
| - Bilirubin TP: $\mu\text{mol/L}$ | - ALT:U/L |
| - Bilirubin TT: $\mu\text{mol/L}$ | - GGT:U/L |
| - Bilirubin GT: $\mu\text{mol/L}$ | - LDH:U/L |

3. Tủy đồ:

4. Công thức nhiễm sắc thể (karyotype):

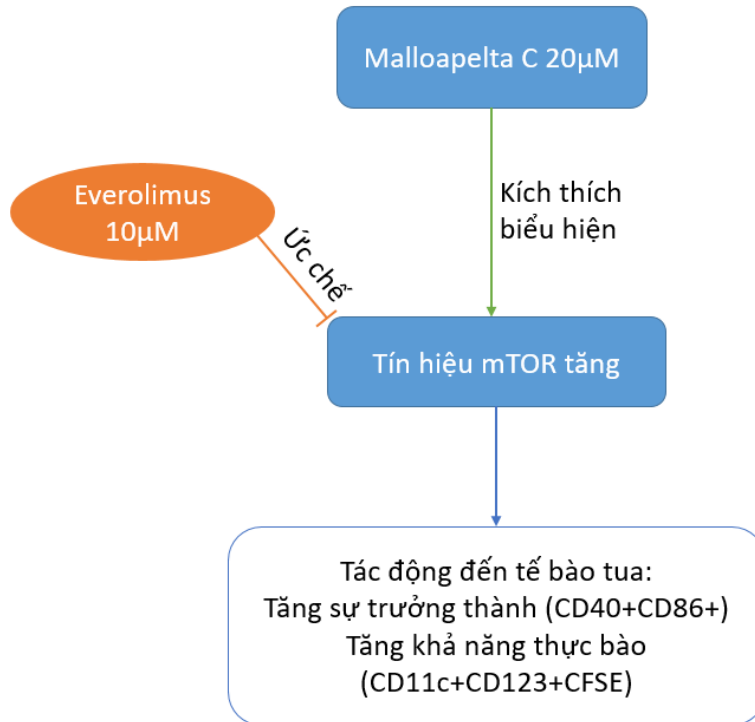
5. Xét nghiệm phát hiện gene bệnh máu ác tính (bằng kỹ thuật RT-PCR):

V. CHẨN ĐOÁN:

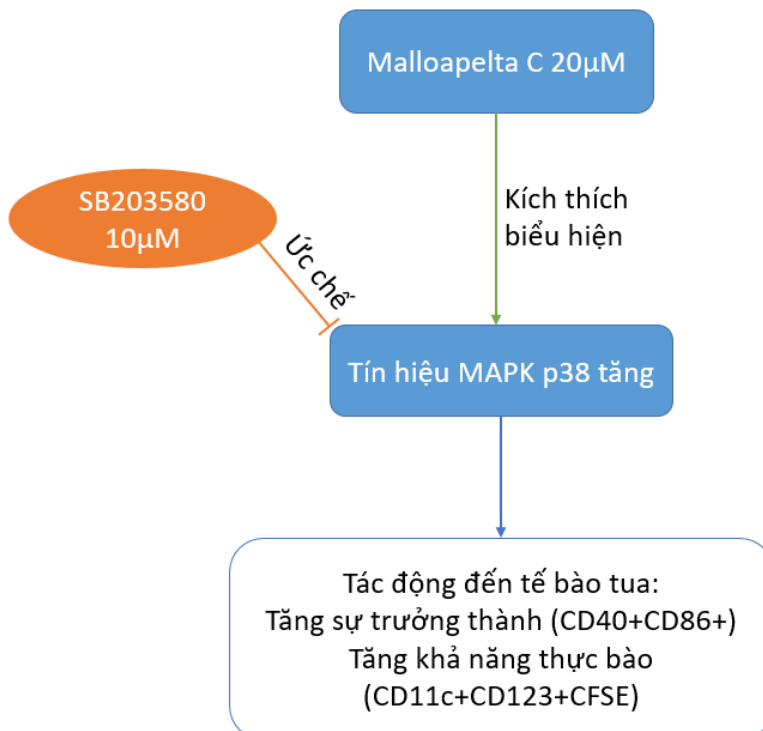
Phụ lục III

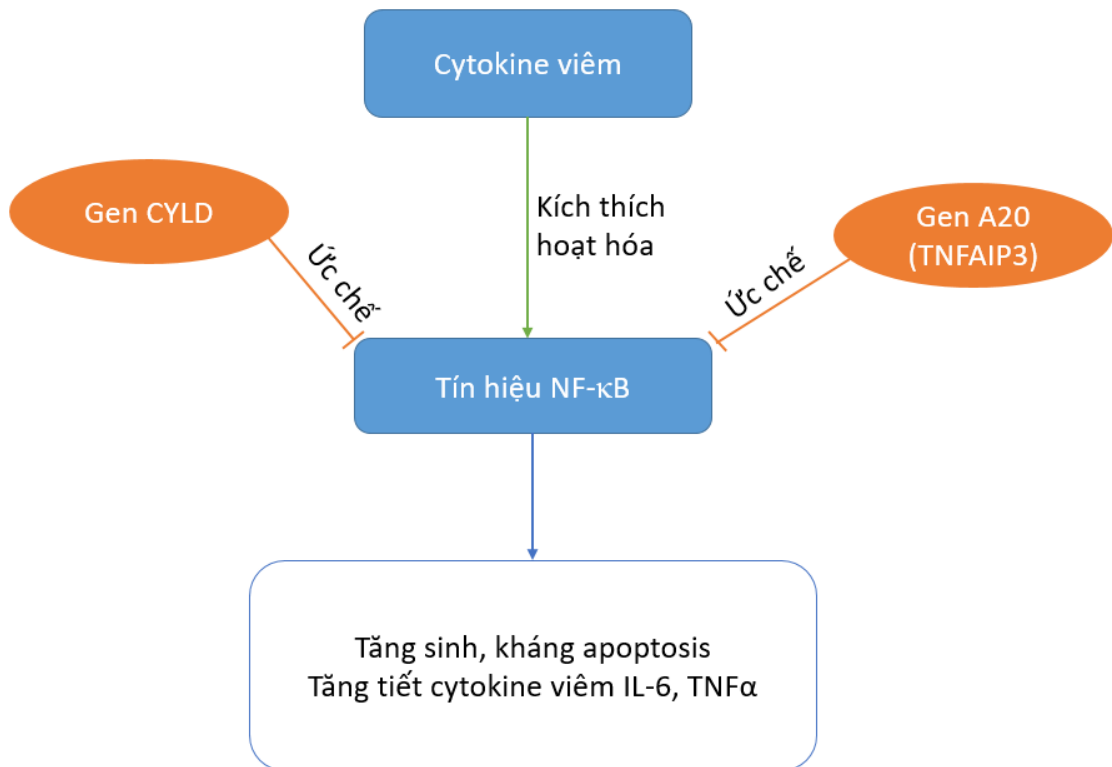
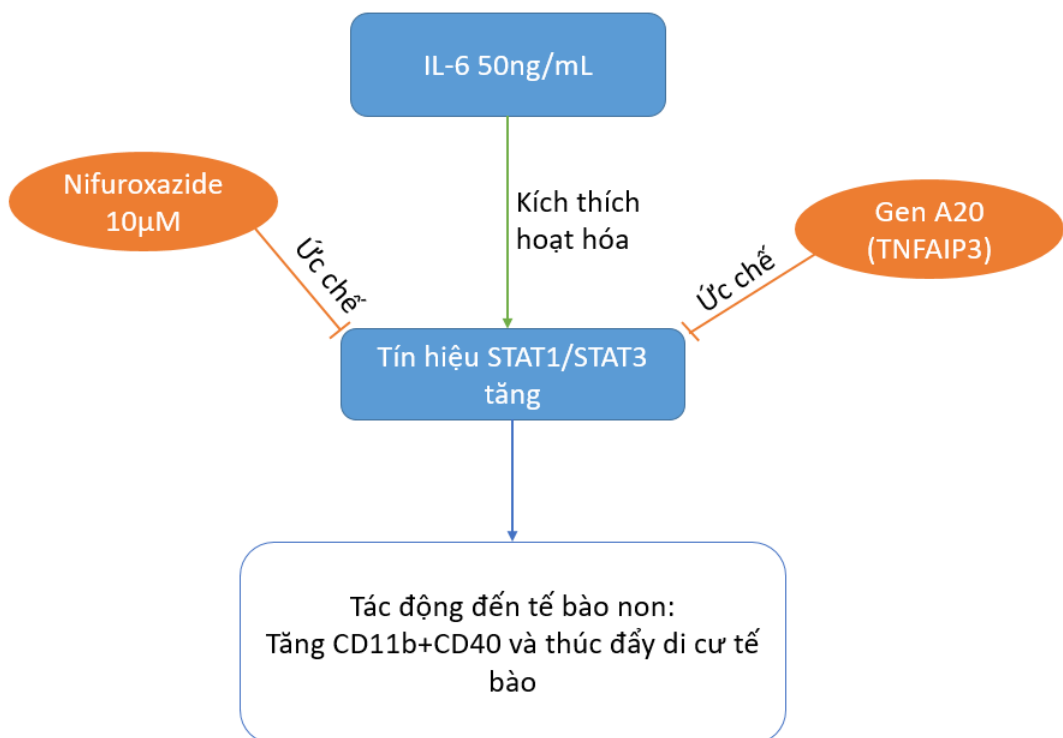
Sơ đồ một số con đường tín hiệu liên quan đến bệnh bạch cầu cấp tính và một số chất liên quan

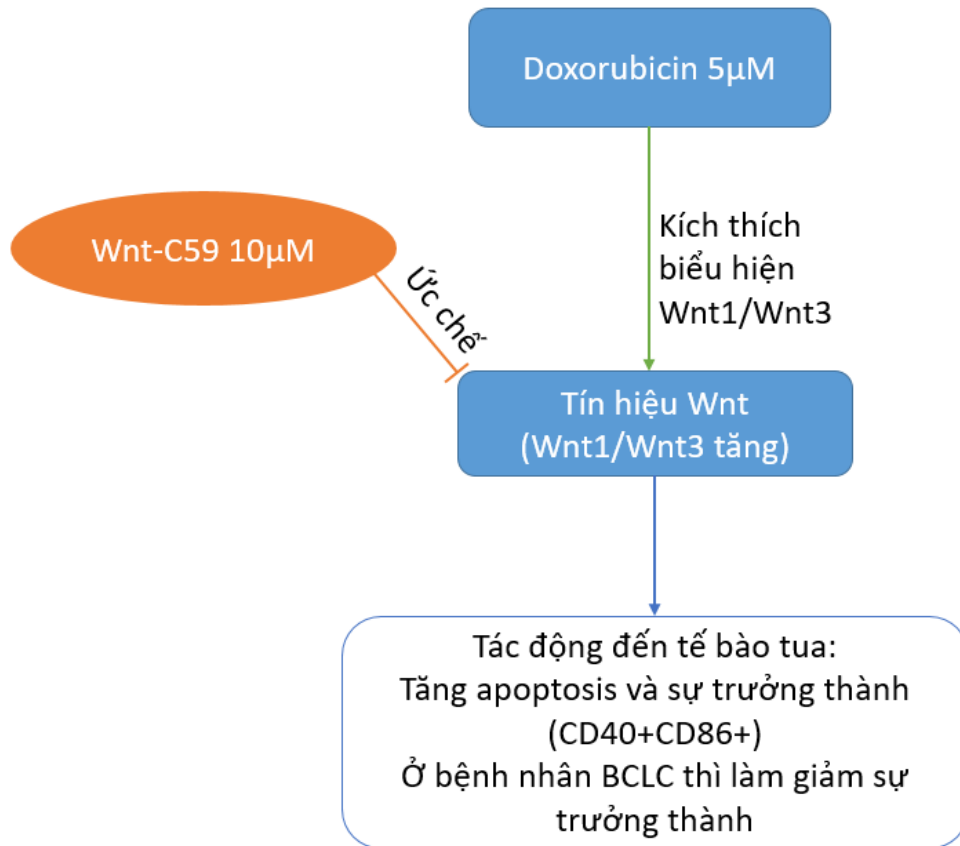
Con đường tín hiệu PI3K/AKT/mTOR



Con đường tín hiệu MAPK p38



Con đường tín hiệu NF- κ B**Con đường tín hiệu JAK/STAT**

Con đường tín hiệu Wnt

PHỤ LỤC IV:
PHÂN NHÓM TIỀN LƯỢNG CỦA
NHÓM ĐỐI TƯỢNG THAM GIA NGHIÊN CỨU DỰA TRÊN KẾT QUẢ PHÂN TÍCH NHIỄM SẮC THỂ VÀ GEN.

A. BỆNH NHÂN BẠCH CẦU CẤP DÒNG TỬY

STT	Công thức karyotype	Phát hiện gen bệnh máu ác tính (ETO/AML, LXM cấp M1, M2, M5)	Phát hiện gen bệnh máu ác tính (CBFB/MYH11, LXM cấp M4, M4eo)	Phát hiện gen bệnh máu ác tính (FLT3-ITD, Bệnh AML)	Phát hiện gen bệnh máu ác tính (FLT3-TKD, Bệnh AML)	Phát hiện gen bệnh máu ác tính (NPM1-mutA, Bệnh AML)	Phân loại theo ELN và NCCN
BCTC1	46,XX,i(17q)[20]	Âm tính		Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiền lượng xấu
BCTC2	46,XY,t(8;21) [20]	Dương tính	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Tiền lượng tốt
BCTC3	46,XX,+21 [16]/ 46,XX [4]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiền lượng trung bình
BCTC4	Đa tổn thương [10]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiền lượng xấu
BCTC5	45, XY,-20, del(7q) [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiền lượng xấu
BCTC6	46,XY[13/ 45,X,-Y,t(8;21) [8]	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiền lượng tốt
BCTC7	46,XX,t(7;11)[20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiền lượng xấu
BCTC8	46,XY [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiền lượng trung bình
BCTC9	46,XY,t(2;8;21) [20/ 46,	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiền lượng

BCTC22	46,XX [7]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
BCTC23	46,XX [20]	Âm tính	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
BCTC24	46,XX,t(15;17) [10]/ 46,XX [10]	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng tốt
BCTC25	46,XX,t(8;21) [20]	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng tốt
BCTC26	47,XY, +22,t(2;6),t(1;8) [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng xấu
BCTC27	46,XX [20]	Âm tính	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Dương tính	Tiên lượng trung bình
BCTC28	47,XY, +19 [20]	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng tốt
BCTC29	46,XX,9qh- [8]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
BCTC30	46,XY [10]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
BCTC31	Đa tổn thương nhiều dòng tế bào bất thường	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng xấu
BCTC32	46,XY [14]/. Đa tổn thương [6]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng xấu
BCTC33	46,XX, t(8;21) [20]	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng tốt
BCTC34	45, X,-Y, t(8;21) [7]/ 46,XY [19]	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng tốt

BCTC48	Đa tổn thương (44NST, -Y, del(5q), del(11q), 12p+)	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng xấu
BCTC49	46,XX,t(15;17) [20]			Dương tính	Âm tính		Tiên lượng tốt
BCTC50	46,XY [20]/ 46, XY, del(17q) [4]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Tiên lượng xấu
BCTC51	46,XY [12]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
BCTC52	46,XX [15]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
BCTC53	46,XX [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
BCTC54	46,XY,t(15;17) [20]			Âm tính	Âm tính		Tiên lượng tốt
BCTC55	46,XY [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
BCTC56	46,del(Xq),-Y,add(2p),i(17q) [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng xấu
BCTC57	46,XY [14]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
BCTC58	45,X,-Y [19]/ 46, XY [1]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
BCTC59	46,XY [20]	Âm tính	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
BCTC60	46,XY [20]	Âm tính	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình

BCTC61	46,XX [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
BCTC62	45,XY, del(5q), del(7q),-15,add(16q),-20,+mar [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng xấu
BCTC63	46,X,-Y,t(8;21) [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng tốt

B. BỆNH NHÂN BẠCH CẦU CẤP DÒNG LYMPHO

STT	Công thức nhiễm sắc thể (karyotype) tủy xương	Phát hiện gen bệnh máu ác tính (BCR-ABL p210, bệnh CML/ALL)	Phát hiện gen bệnh máu ác tính (BCR-ABL p190, bệnh CML/ALL)	Phát hiện gen bệnh máu ác tính (MLL-AF4, bệnh ALL)	Phát hiện gen bệnh máu ác tính (TEL-AML1, bệnh ALL)	Phát hiện gen bệnh máu ác tính (E2A-PBX1, bệnh ALL)	Phân loại theo NCCN
LPH1	46,XY,1p+ [15]/ 46,XY, 1p+,7p+,9q-,13q [5]	Âm tính	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Tiền lượng xấu
LPH2	46,XY [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiền lượng trung bình
LPH5	46,XY[8]/46,XY, Ph 1 [9]	Âm tính	Dương tính	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Tiền lượng xấu
LPH6	47,XX,+mar[7]/46,XX[4]	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiền lượng trung bình
LPH10	46,XY [8]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiền lượng trung bình
LPH11	46,XY [16]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiền lượng trung bình
LPH12	46,XY[18]/ 46,XY, Ph 1 [2]	Âm tính	Dương tính	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Tiền lượng xấu
LPH13	46,XX [20]	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiền lượng trung bình
LPH14	46,XY[20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiền lượng

							trung bình
LPH15	46,XX[15]	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH16	46,XX,22ps+ [14]/ 46,XX[6]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH17	46,XX[8]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH20	46,XY[20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH21	46,XY [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH22	46,XY[20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH23	46,XY[15]/48,XY+X,+6,-16,+22,del(17q),t(1;19)[5]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Dương tính	Tiên lượng xấu
LPH26	46,XY[5]	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH28	46,XX,2q+[5]/46,XX,9p-[20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH30	46,XY [6]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH31	46,XY [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH32	46,XY [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH33	46,XY[15]/ 46,XY, +X, +6, -16, +22,del(17q),t(1;19)[5]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Dương tính	Tiên lượng xấu
LPH34	46,XX,2q+[5]/ 46,XX, 9p-[20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng

							trung bình
LPH35	46,XX [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH36	46, XY, del(9p)	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH38	46,XY, [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH40	46,XY,1p+,del(9p),del(15q)[20]	Âm tính	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng xấu
LPH42	Đa tổn thương (i(17q),1p+,-4,+mar,Ph 1) [20]	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng xấu
LPH44	46, XY [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH45	46, XY [15]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH46	46,XY,del(6q),del(7p),del(9p), t(9;22)...[20]	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng xấu
LPH47	48,XY,+X,+8,del(9p),t(9;22),+der(22)t(9;22)[20]	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng xấu
LPH48	46,XY [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH49	46,XY[5] / 47,XY,+X,del(7p),del(9p),t(9;22),+der(22)[15]	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng xấu
LPH50	46,XY [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH52	46,XX [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH53	46,XX,t(9;22) [20]	Âm tính	Âm tính	Dương	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng

				tính			xấu
LPH54	46,XY [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH55	48,XX,+X,+8,del(9p),t(9;22),+der(22)t(9;22)[20]	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng xấu
LPH56	46,XX,del(3p),del(11q),add(21q),+mar [15]/ 46,XX [5]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng xấu
LPH57	46,XX [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH58	46,XX,2q+,t(9;22) [15]/ 46,XX,t(9;22),del(11q),add(22q) [3]/ 46,XX [2]	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng xấu
LPH59	47,XX, +10 [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH60	46,XX,del(6q),del(7p),del(9p),+mar, Ph1 [20]	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng xấu
LPH61	46,XY [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Dương tính	Tiên lượng trung bình
LPH64	46,XX,del(6q),t(7;10),t(9;22),del(9?),del (12p)[10]/ 46,XX[10]	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng xấu
LPH65	46,XX [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH67	46,XY [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH81	47,XX,-6,-13,add(14q),+?21 [8]/ 46,XX,add(14q),+?21x2 [4]/46,XX [8]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng xấu
LPH82	46,XY [20]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng trung bình
LPH85	45,XX,-6,del (7p),-13,-16,+?i(17q) [2]	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Tiên lượng

