

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Lê Lan Phương

**NGHIÊN CỨU BIẾN ĐỔI CỦA MỘT SỐ GEN
TY THỂ Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ PHỔI
NGƯỜI VIỆT NAM**

Chuyên ngành: Nhân chủng học

Mã số: 9420101.02

DỰ THẢO TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2022

Công trình được hoàn thành tại :

Bộ môn Sinh lý học và Sinh học người, Khoa Sinh học
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Trịnh Hồng Thái
PGS.TS. Lê Trung Thọ

Phản biện:

.....

Phản biện:

.....

Phản biện:

.....

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng cấp Đại học Quốc gia
chấm luận án tiến sĩ họp tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên
vào hồi.....giờ.....ngày.....tháng.....năm.....

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Trung tâm Thư viện và Tri thức số, Đại học Quốc gia Hà Nội

MỞ ĐẦU

Ung thư phổi là một dạng ung thư phổ biến và là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu do ung thư trên thế giới (Duruiseaux and Esteller 2017)(Anon 2020). Ung thư phổi gồm 2 nhóm chính là ung thư phổi tế bào nhỏ (UTPTBN) chiếm khoảng 13% và ung thư phổi không tế bào nhỏ (UTPKTBN) chiếm 84%, trong đó UTPKTBN có tiên lượng tốt hơn và nhiều lựa chọn điều trị hơn (Kim, Lee, and Huang 2022). Sự gia tăng hiểu biết về hệ gen ở ung thư phổi đã dẫn đến những tiến bộ đáng kể trong việc điều trị bệnh. Tuy nhiên, vẫn có những thách thức trong chẩn đoán và điều trị ung thư phổi do việc khó chẩn đoán và phát hiện ung thư phổi ở giai đoạn sớm và xuất hiện kháng thuốc điều trị hướng đích ở những bệnh nhân đã tiến triển đến giai đoạn nặng, còn liệu pháp hóa trị thông thường lại có hiệu quả không cao (Duruiseaux and Esteller 2017). Năm 2021, Tổ chức Y tế Thế giới đã đưa ra một số thay đổi trong phân loại khối u phổi, đồng thời cũng nhấn mạnh về những tiến bộ trong bệnh lý phân tử, nghiên cứu di truyền, kết hợp xét nghiệm phân tử để giúp đưa ra liệu pháp điều trị phù hợp với từng cá thể đối với bệnh nhân ung thư phổi giai đoạn muộn (Nicholson et al. 2021). Do vậy, hướng nghiên cứu bệnh học phân tử để hiểu sâu hơn về hệ gen, xác định các biến đổi gen liên quan đến ung thư phổi để hướng tới hỗ trợ chẩn đoán, điều trị và đưa ra tiên lượng chính xác vẫn thu hút sự quan tâm của nhiều nhà nghiên cứu.

Biến đổi trên hệ gen ty thể từ lâu đã được xác định là liên quan đến quá trình hình thành khối u (Wang et al. 2015). Các

nguyên cứu gần đây đã xác định nhiều biến đổi của ADN ty thể liên quan đến ung thư phổi như: thay đổi số bản sao ADN ty thể, một số đa hình hoặc đột biến điểm trên một số gen ty thể, mất đoạn lớn. Tuy nhiên, các kết quả nghiên cứu trên thế giới vẫn chưa khẳng định nhất quán về mối liên quan giữa các dạng biến đổi gen ty thể và bệnh học ung thư phổi và các kết quả nghiên cứu cũng có sự khác biệt trên các quần thể người khác nhau.

Exosome là các bóng màng được tế bào tiết ra trong điều kiện sinh lý bình thường và cả trong trường hợp bệnh lý. Tế bào ung thư tiết ra exosome với số lượng nhiều hơn các tế bào bình thường và đây có thể là chỉ thị chẩn đoán ung thư (Cui et al. 2018). Exosome có trong các dịch cơ thể nên chúng đáp ứng yêu cầu của sinh thiết lỏng, exosome đang được nghiên cứu như một công cụ chẩn đoán và điều trị ung thư phổi (Srivastava et al. 2018). Đặc biệt, các protein trong exosome có tiềm năng trở thành chỉ thị sinh học cho chẩn đoán ung thư phổi không tế bào nhỏ (Sandfeld-paulsen et al. 2016). Ở nước ta hiện nay, những hiểu biết về exosome và các thành phần của chúng vẫn còn hạn chế, nhất ở bệnh nhân ung thư phổi. Vì vậy việc nghiên cứu exosome là vấn đề cấp thiết, có ý nghĩa về lý luận và thực tiễn.

Trên cơ sở đó, chúng tôi tiến hành đề tài **“Nghiên cứu biến đổi của một số gen ty thể ở bệnh nhân ung thư phổi người Việt Nam”** nhằm mục tiêu:

- Xác định được biến đổi của một số gen ty thể trong mô phổi, máu và exosome huyết tương của bệnh nhân UTPKTBN và mối liên quan giữa các biến đổi này với bệnh UTPKTBN.

- Đánh giá được thành phần của protein exosome huyết tương của bệnh nhân UTPKTBN người Việt Nam

Từ đó ứng dụng trong đánh giá nguy cơ, hỗ trợ chẩn đoán và tiên lượng bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ.

Đề tài được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Sinh học người thuộc Khoa Sinh học và Phòng Proteomics và Sinh học cấu trúc thuộc Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzyme và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

TÍNH MỚI CỦA LUẬN ÁN

Đề tài luận án là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam cung cấp dữ liệu về dạng mất đoạn lớn, tỷ lệ các dạng mất đoạn lớn, mức độ mất đoạn lớn, sự thay đổi số bản sao mtDNA và một số biến đổi gen ty thể ở cả mẫu mô phổi, mô máu và exosome huyết tương cũng như mối liên quan giữa các biến đổi trên với đặc điểm bệnh học của bệnh nhân UTPKTBN người Việt Nam.

Đây là nghiên cứu đầu tiên xác định được hệ protein exosome huyết tương ở bệnh nhân UTPKTBN người Việt Nam. Tìm thấy một số protein trong exosome huyết tương (EEF1A1, KPNB1, SCR, ACTC1) có tiềm năng trở thành chỉ thị sinh học trong đánh giá tiến triển của bệnh UTPKTBN.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ BỆNH PHỔI VÀ UNG THƯ PHỔI

1.1.1. Dịch tễ học ung thư phổi

Theo thống kê đến năm 2020 của tổ chức nghiên cứu ung thư thế giới - IARC (International Agency for Research on Cancer), ung thư phổi là một dạng ung thư phổ biến và là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu do ung thư trên thế giới (Duruissieux and Esteller 2017)(Anon 2020). Có tới 80 - 90% các trường hợp ung thư phổi xuất hiện ở người hút thuốc lá và khói thuốc chính là yếu tố nguy cơ chính của bệnh này (Duruissieux and Esteller 2017).

Các triệu chứng của bệnh thường xuất hiện khi bệnh đã tiến triển, có thể bao gồm: ho dai dẳng, ho ra máu, đau ngực, thay đổi giọng nói, khó thở, viêm phế quản phổi cấp và thường tái diễn. Ung thư phế quản phổi có thể không có dấu hiệu gì về lâm sàng trong một thời gian dài. Bệnh ung thư phổi là một loại ung thư có tiên lượng kém, tỷ lệ chẩn đoán sớm thấp.

1.1.2. Phân loại ung thư phổi theo mô bệnh học

Ung thư phổi còn được gọi là ung thư phế quản-phổi nguyên phát vì ung thư phổi thường phát triển từ tổ chức biểu mô phế quản, rất hiếm khi phát triển ở biểu mô phế nang. UTP gồm 2 nhóm chính là: UTPKTBN gồm: ung thư biểu mô vảy, ung thư biểu mô tuyến, ung thư biểu mô tế bào lớn. Nhóm ung thư này chiếm khoảng 84% các dạng ung thư phổi, còn nhóm UTPTBN chiếm khoảng 13% các dạng ung thư phổi (Anon 2020).

1.1.3. Phân loại giai đoạn ung thư phổi theo TNM

Phân loại giai đoạn bệnh dựa trên cơ sở về giải phẫu và mô bệnh học giúp tiên lượng bệnh và đưa ra chỉ định phẫu thuật. Bảng phân loại giai đoạn TNM theo Ủy ban phối hợp của Hoa Kỳ về bệnh ung thư và Hiệp hội Quốc tế kiểm soát bệnh ung thư năm 2017 và phân nhóm giai đoạn bệnh theo TNM sẽ giúp bác sĩ điều trị đưa ra phác đồ điều trị cho từng trường hợp cụ thể.

1.1.4. Các phương pháp chẩn đoán ung thư phổi

Các xét nghiệm được dùng trong xét nghiệm chẩn đoán ung thư phổi gồm xét nghiệm cận lâm sàng (chẩn đoán hình ảnh, xét nghiệm sinh hóa xác định dấu ấn ung thư...); chẩn đoán xác định bằng cách xét nghiệm tìm tế bào ung thư và chẩn đoán xác nhận bằng mô bệnh học.

1.1.5. Bệnh phổi không ung thư

Hiện nay, các bệnh về phổi là một trong những bệnh lý nguy hiểm hàng đầu. Theo tổ chức y tế thế giới WHO, các bệnh về phổi như bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính và nhiễm trùng đường hô hấp dưới (viêm phế quản, lao, viêm phổi...) là nguyên nhân tử vong đứng hàng thứ ba, thứ 4 trên toàn thế giới.

Các bệnh về phổi có thể chia thành bệnh ung thư phổi và bệnh phổi không ung thư gồm: (1) bệnh phổi tắc nghẽn; (2) bệnh phổi hạn chế và (3) bệnh truyền nhiễm.

1.2. TỔNG QUAN VỀ ADN TY THỂ NGƯỜI

1.2.1. Đặc điểm ADN ty thể người

Ty thể là bào quan có ở hầu hết các tế bào sinh vật nhân chuẩn. Chức năng chủ yếu của ty thể là tạo ra ATP - năng lượng

thiết yếu cho các hoạt động của tế bào. Do đó, số lượng của ty thể ở một tế bào cũng phụ thuộc vào nhu cầu sử dụng năng lượng của tế bào đó, có thể từ vài ty thể ở tế bào da cho đến vài nghìn ty thể ở tế bào cơ. Ty thể có hệ gen riêng với khoảng từ 10 đến hơn 1000 bản sao ADN ty thể (mtDNA) trong mỗi tế bào. ADN ty thể nhân bản độc lập với hệ gen nhân. Hệ gen của ty thể người được giải trình tự năm 1981 bởi Anderson. ADN ty thể người tồn tại ở dạng mạch vòng, sợi đôi, có kích thước 16.569 bp. mtDNA không liên kết với protein histone, điều này làm cho mtDNA giống ADN của vi khuẩn. ADN ty thể không có intron (ngoại trừ một số nucleotide không mã hóa ở giữa một vài gen) và có các gen nằm gối lên nhau (ví dụ gen mã hóa cho ATPase6 và ATPase8). Hệ gen ty thể sao chép độc lập với hệ gen nhân bằng một hệ thống riêng trong ty thể nhưng các enzyme cho quá trình tái bản lại do hệ gen nhân mã hóa.

1.2.2. Biến đổi ADN ty thể và bệnh ung thư

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, biến đổi hệ gen ty thể gây ra sự thay đổi chức năng ty thể và điều này có liên quan đến việc phát sinh một số bệnh như bệnh ty thể và bệnh ung thư. Tuy nhiên, cơ chế tác động của các biến đổi gen ty thể tới quá trình hình thành khối u vẫn chưa được làm sáng tỏ. Trong những năm gần đây, việc giải mã toàn bộ hệ gen ty thể người đã giúp xác định được một số biến đổi của ADN ty thể liên quan đến nhiều dạng ung thư khác nhau, bao gồm ung thư vú, ung thư đại trực tràng, ung thư buồng trứng, ung thư biểu mô dạ dày, ung thư gan, ung thư tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư phổi và một số dạng ung thư khác.

1.3. NGHIÊN CỨU BIẾN ĐỔI ADN TY THỂ Ở BỆNH UNG THƯ PHỔI

1.3.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Biến đổi trong hệ gen ty thể của người từ lâu đã bị nghi ngờ là đóng vai trò quan trọng trong sự hình thành và tiến triển của bệnh ung thư nói chung và ung thư phổi nói riêng. Mặc dù hầu hết các tế bào ung thư đều chứa biến đổi ADN ty thể, nhưng liệu các biến đổi này có liên quan đến sự hình thành, tiến triển và tiên lượng của bệnh ung thư phổi hay không thì vẫn chưa được làm sáng tỏ. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về biến đổi ADN ty thể ở bệnh nhân ung thư phổi, tuy nhiên, các kết quả nghiên cứu trên thế giới vẫn chưa khẳng định nhất quán về mối liên quan giữa các dạng biến đổi gen ty thể và bệnh ung thư phổi trên các quần thể người khác nhau.

1.3.2. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam

Tại Việt Nam, đã có nhiều công trình nghiên cứu về ung thư phổi nhưng tập trung chủ yếu vào khía cạnh dịch tễ học, chẩn đoán mô bệnh học và phương pháp điều trị. Các nghiên cứu về bệnh học phân tử còn hạn chế, một số nghiên cứu về biến đổi gen trên bệnh nhân ung thư phổi mới được thực hiện trên gen nhân. Tại Việt Nam, trong những năm gần đây, các nghiên cứu về biến đổi ADN ty thể đã thu hút được sự quan tâm của nhiều nhà khoa học. Tuy nhiên, các kết quả nghiên cứu biến đổi ADN ty thể ở bệnh nhân ung thư người Việt Nam còn hạn chế. Do đó, chúng tôi đề xuất thực hiện nghiên cứu biến đổi ADN ty thể ở bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ người Việt Nam.

1.4. NGHIÊN CỨU BIẾN ĐỔI ADN TY THỂ Ở BỆNH PHỔI KHÔNG UNG THƯ

Trên thế giới có các nghiên cứu về biến đổi mtDNA nói chung và đặc biệt là mức độ mất đoạn trên mtDNA (MĐMĐ mtDNA) và SBS mtDNA ở một số dạng bệnh như bệnh thoái hóa thần kinh, ung thư vú, ung thư phổi và lão hóa, nhưng nghiên cứu trên bệnh phổi không ung thư thì còn hạn chế (Dai et al. 2006)(Bonner et al. 2009).

1.5. TỔNG QUAN VỀ EXOSOME

Exosome là các túi màng được tế bào tiết ra trong điều kiện sinh lý bình thường và cả trong trường hợp bệnh lý. Chúng có vai trò quan trọng trong hoạt hóa miễn dịch và kết nối thông tin giữa các tế bào.

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về exosome ở bệnh ung thư, trong đó có bệnh ung thư phổi. Các nghiên cứu cho thấy exosome và các thành phần của chúng đã cung cấp cơ sở cho khả năng phát triển chỉ thị sinh học trong chẩn đoán sớm ung thư phổi.

1.6. NGHIÊN CỨU ADN TRONG EXOSOME

Ngoài DNA trong nhân và DNA trong ty thể, tế bào cũng giải phóng exosome chứa mtDNA. mtDNA được tìm thấy trong exosome giải phóng từ nguyên bào cơ, mô thần kinh và tế bào mast. Việc nghiên cứu mtDNA trong exosome đang là vấn đề mới. Hiện nay trên thế giới và ở Việt Nam đều chưa có nhiều công trình nghiên cứu về định lượng số bản sao và mất đoạn lớn trên DNA ty thể trong exosome ở bệnh nhân ung thư phổi nói chung và bệnh nhân UTPKTBN nói riêng. Trên cơ sở đó, chúng

tôi thực hiện đề tài nghiên cứu biến đổi của một số gen ty thể ở cả mẫu mô phổi, mẫu máu và exosome tách từ huyết tương của bệnh nhân UTPKTBN.

1.7. NGHIÊN CỨU PROTEOMICS EXOSOME HUYẾT TƯƠNG CỦA BỆNH NHÂN UNG THƯ PHỔI KHÔNG TẾ BÀO NHỎ

Các nghiên cứu gần đây cho thấy protein exosome đóng một vai trò quan trọng trong sự xuất hiện, phát triển và di căn của ung thư phổi không tế bào nhỏ và là chỉ thị sinh học quan trọng giúp chẩn đoán và tiên lượng bệnh. Nhiều nghiên cứu đã công bố các kết quả phân tích hệ protein exosome huyết tương ở nhiều bệnh ung thư phổi khác nhau trong đó có cả UTPKTBN. Gần đây các nghiên cứu đã báo cáo rằng exosome trong máu ngoại vi được có chứa 30 dấu ấn sinh học cụ thể. Do đó, protein exosome và các thành phần liên quan của chúng cung cấp một cơ sở lý thuyết đầy tiềm năng giúp khám phá các dấu ấn sinh học phân tử để chẩn đoán ung thư phổi không tế bào nhỏ giai đoạn đầu. Liên quan đến exosome, ở nước ta hiện nay, những hiểu biết về exosome và các thành phần của chúng vẫn còn hạn chế, nhất ở bệnh nhân ung thư phổi. Vì vậy việc nghiên cứu exosome là vấn đề cấp thiết, có ý nghĩa về lý luận và thực tiễn. Từ thực tiễn đó, chúng tôi đề xuất nghiên cứu biến đổi của một số gen ty thể kết hợp với nghiên cứu hệ protein exosome trong huyết tương của bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ người Việt Nam.

Chương 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN LIỆU

2.1.1. Đối tượng

Mẫu nghiên cứu là mẫu mô phổi và máu của bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ đã được xác nhận bằng chẩn đoán mô bệnh học, gồm: ung thư biểu mô vảy hoặc ung thư biểu mô tuyến hay ung thư tế bào lớn nguyên phát của phổi.

Mẫu chứng là vùng mô phổi bị cắt bỏ không có nguyên nhân của u phổi (trường hợp bệnh nhân mắc bệnh phổi không ung thư phải cắt bỏ mô phổi do xơ hóa, phổi biệt lập, thùy phổi mất chức năng...) và máu của người khỏe mạnh bình thường.

Mẫu phục vụ nghiên cứu được lấy tại Khoa Giải phẫu bệnh và Khoa Ung bướu của Bệnh viện Phổi Trung ương. Mẫu nghiên cứu gồm: 60 cặp mẫu mô phổi của BN UTPKTBN, 57 mẫu máu của BN UTPKTBN, 51 mẫu mô của BN mắc BPKUT và 31 mẫu máu của người khỏe mạnh làm đối chứng.

2.1.2. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu không vi phạm y đức vì đây là nghiên cứu khoa học hướng tới ứng dụng, đem lại lợi ích cho người tham gia nghiên cứu.

2.1.3. Hóa chất

Các hóa chất của các hãng Qiagen, iNtRON, Thermo Scientific.... đều đạt độ sạch cho nghiên cứu sinh học phân tử.

2.1.4. Thiết bị

Phần lớn các thiết bị đều thuộc Phòng thí nghiệm (PTN) Sinh học người và Phòng Proteomics và Sinh học cấu trúc, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên. Riêng máy Realtime PCR

7500 fast (Applied Biosystems, Mỹ) là do Trung tâm Khoa học Sự sống thuộc Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên và Công ty BCE Việt Nam hỗ trợ.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các bước thực hiện nghiên cứu được thể hiện trong sơ đồ nghiên cứu sau (Hình 2. 1).

2.2.1. Tách chiết ADN tổng số từ mẫu máu và mẫu mô

2.2.2. Tách ADN tổng số trong exosome tách từ huyết tương người

2.2.3. Xác nhận có mtDNA trong mẫu ADN tách từ exosome huyết tương

2.2.4. Xác định mất đoạn lớn trên ADN ty thể bằng kỹ thuật PCR

2.2.5. Điện di kiểm tra sản phẩm trên gel agarose

2.2.6. Tinh sạch sản phẩm PCR

2.2.7. Phân tích dữ liệu ADN

2.2.8. Phân tích PCR-RFLP

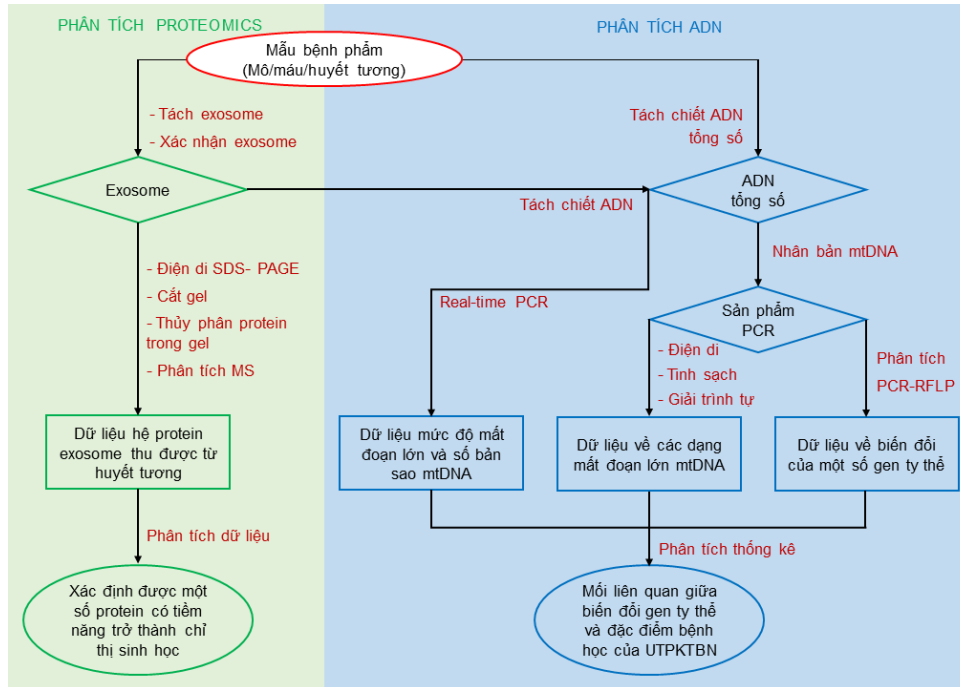
2.2.9. Định lượng ADN bằng real-time PCR

2.2.10. Xử lý số liệu và tính toán thống kê

2.2.11. Phân tách exosome từ huyết tương người

2.2.12. Xác nhận exosome từ huyết tương người

2.2.13. Chuẩn bị mẫu, đo và phân tích khối phổ



Hình 2. 1. Sơ đồ nghiên cứu

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ TÁCH CHIẾT ADN TỔNG SỐ

3.1.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số từ mẫu mô phổi và mẫu máu

Sử dụng kit tách chiết ADN từ mô: G-Spin™ Total DNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology), chúng tôi đã tách chiết được ADN từ 60 cặp mẫu mô phổi của bệnh nhân mắc ung thư phổi không tế bào nhỏ; 51 mẫu mô phổi của bệnh nhân mắc bệnh phổi không ung thư và 57 mẫu máu của BN UTPKTBN.

3.1.2. Kết quả tách chiết ADN tổng số và xác nhận sự có mặt của mtDNA trong ADN tách từ exosome

Mẫu huyết tương của từng bệnh nhân được siêu ly tâm để phân tách exosome khỏi các thành phần protein huyết tương. Cặn chứa exosome được xử lý với enzyme *dsDNase* để loại bỏ các DNA nằm bên ngoài exosome trước khi tiến hành tách ADN tổng số từ exosome. Sử dụng kit tách ADN tổng số QIAamp DNA Mini Kit của hãng QIAGEN-Đức đã tách chiết được ADN tổng số của exosome từ 29 mẫu huyết tương bệnh nhân và 31 mẫu huyết tương đối chứng. Các mẫu này đều được xác nhận sự có mặt của mtDNA hoàn chỉnh trong ADN tổng số tách được từ exosome huyết tương.

3.2. XÁC ĐỊNH BIẾN ĐỔI CỦA GEN TY THỂ

3.2.1. Xác định mất đoạn lớn ADN ty thể bằng kỹ thuật PCR

Để xác định mất đoạn lớn xảy ra trong hệ gen ty thể chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật PCR với 4 cặp mồi: ND3, mtDNA, 4977-1 và 4977-2. Quan sát kết quả điện di sản phẩm PCR với

4 cặp mồi trên gel agarose kèm thang chuẩn ADN chuẩn 100 bp nhận thấy kích thước băng PCR với mồi ND3, mtDNA, 4977-2 tương ứng với kích thước mong đợi lần lượt là 246 bp, 433 bp và 381 bp. Phân tích kết quả điện di sản phẩm PCR bắt gặp hiện tượng sản phẩm PCR sử dụng mồi 4977-1 và 4977-2 không lên băng chứng tỏ ADN ty thể ở các mẫu này không mang mất đoạn lớn. Bên cạnh đó, có trường hợp giếng điện di sản phẩm PCR sử dụng mồi 4977-1 và 4977-2 xuất hiện một băng duy nhất và cũng có trường hợp lên nhiều băng. Đồng thời có sự xuất hiện các băng có kích thước khác 381 bp. Giếng điện di sản phẩm PCR lên nhiều băng chính là mẫu có chứa đồng thời nhiều mất đoạn lớn khác nhau. Các mất đoạn này có thể gồm: mất đoạn 4977 bp (băng sản phẩm PCR là 381 bp), mất đoạn > 4977 bp (băng sản phẩm PCR < 381 bp) và mất đoạn < 4977 bp (băng sản phẩm PCR > 381 bp). Kết quả xác định mất đoạn lớn ADN ty thể bằng hình ảnh điện di sản phẩm PCR trên gel agarose được trình bày ở bảng sau:

Bảng 3. 1. Kết quả xác định mất đoạn lớn ADN ty thể ở mẫu mô

Đặc điểm		Mẫu mô phổi UTKTBN		Mô phổi BPKUT	
		Mô u (%)	Mô LCU (%)		
Tổng số mẫu		60	60	51	
Số mẫu không có mất đoạn lớn		7 (11,67)	6 (10,00)	0 (0,00)	
Số mẫu có mất đoạn lớn	1 mất đoạn lớn	4977 bp	31 (51,67)	28 (46,67)	11 (21,57)
		Khác 4977 bp	5 (8,33)	1 (1,66)	3 (5,88)
	Nhiều mất đoạn lớn	17 (28,33)	25 (41,67)	37 (72,55)	

3.2.2. Xác định mất đoạn lớn ADN ty thể bằng giải trình tự

Kết quả giải trình tự ADN được so sánh với trình ADN ty thể chuẩn trên cơ sở dữ liệu NCBI, đồng thời được tiến hành phân tích trên phần mềm sinh học Bioedit. Trong số 13 mẫu gửi giải trình tự để xác định dạng mất đoạn lớn mtDNA ở mô phổi của BN UTPKTBN, xác định được 2/13 mẫu là dạng mất đoạn 4977 bp phổ biến, 11/13 mẫu mang dạng mất đoạn khác 4977 bp, trong đó có 10 dạng mất đoạn lớn trên mtDNA khác 4977 bp là mất đoạn mới.

Thực hiện tương tự đối với mẫu mô phổi của bệnh nhân mắc bệnh phổi không ung thư, chúng tôi xác định được chính xác 9 dạng mất đoạn lớn khác 4977 bp ở mẫu mô phổi của bệnh nhân mắc bệnh phổi không ung thư. 9 dạng mất đoạn lớn khác 4977 bp này đều chưa từng được công bố trên cơ sở dữ liệu và bất kỳ công bố nào trên thế giới, gồm mất đoạn: 4776 bp, 4641 bp, 4745 bp, 4718 bp, 4820 bp, 4476 bp, 4672 bp, 4567 bp và 4859 bp.

3.2.3. Một số biến đổi khác của gen ty thể được phát hiện nhờ giải trình tự

Khi sử dụng kết quả giải trình tự ADN so sánh với trình ADN ty thể chuẩn (yếu tố nhận dạng là NC_012920.1) trên cơ sở dữ liệu NCBI, chúng tôi còn quan sát và phát hiện được một số biến đổi khác gồm: 15 biến đổi khác nhau trong các mẫu mô UTPKTBN, trong đó có 9 biến đổi hiện chưa được công bố.

Phân tích tương tự trên mẫu mô của BN mắc BPKUT thấy có 10 biến đổi mtDNA khác, trong đó 9/10 biến đổi là biến đổi đơn nucleotide, 1/10 biến đổi là đột biến mất đoạn 9 bp. Đặc biệt có 8 biến đổi chưa được công bố trên cơ sở dữ liệu.

3.2.4. Biến đổi A10398G trên mtDNA ở mẫu nghiên cứu

Đối với exosome huyết tương, ở mẫu nhóm giai đoạn I+II, biến đổi đồng tế bào chất 10398G chiếm tỷ lệ cao nhất 50%, trong khi đó kiểu đại 10398A chiếm 31,25% và biến đổi dị tế bào chất 10398A/G chiếm 18,75%. Ở mẫu giai đoạn III+IV, dạng A và G đều chiếm 46,15% còn 10398A/G chiếm 7,67%. Nhóm đối chứng có 38,71% mẫu có dạng A hay G, 22,58% có biến đổi dạng dị tế bào chất. Tỷ lệ dạng biến đổi 10398G của mtDNA trong mẫu exosome huyết tương là 62.1% đối với bệnh nhân UTPKTBN và 61,3% với nhóm đối chứng. Sự khác nhau trong phân bố biến đổi A10398G giữa các nhóm mẫu và giữa nhóm bệnh với nhóm đối chứng đều không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tỷ lệ 10398G tương ứng ở mô u và mô lân cận u là 53,85% và 61,54%. Phân tích trên mẫu exosome và mẫu mô của 13 bệnh nhân UTPKTBN, có 77% (10/13) mẫu giống nhau trong sự có mặt của biến đổi G. Như vậy, có sự tương quan trong biến đổi này giữa mẫu exosome huyết tương và mẫu mô phổi (hệ số tương quan Spearman giữa exosome và mô u là 0,59 với $p = 0,03$, giữa exosome và mô lân cận u là 0,69 với $p = 0,009$).

Kết quả phân tích biến đổi cho thấy tỷ lệ xuất hiện dạng biến đổi 10398G ở các nhóm giai đoạn I+II, giai đoạn III+IV, nhóm UTPKTBN (bao gồm giai đoạn I+II và giai đoạn III+IV) và nhóm đối chứng lần lượt là: 45,45% (10/22); 33,33% (3/9); 41,94% (13/31) và là 47,69% (31/65) và đều thấp hơn so với tỷ lệ xuất hiện của kiểu đại 10398A. Sự phân bố biến đổi A10398G của DNA ty thể ở các nhóm không có sự chênh lệch

nhiều và sự khác biệt này không mang ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.4. PHÂN TÍCH MỨC ĐỘ MẤT ĐOẠN LỚN VÀ SỐ BẢN SAO ADN TY THỂ

3.4.1. Mức độ mất đoạn và số bản sao mtDNA ở mẫu mô

Kết quả phân tích mối liên quan giữa mức độ mất đoạn mtDNA với đặc điểm bệnh học cho thấy: không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về mức độ mất đoạn ở cả mô u và mô lân cận u với các đặc điểm của bệnh nhân UTPKTBN gồm: độ tuổi, giới tính, hút thuốc lá, uống rượu, giai đoạn T/N/M hay giai đoạn bệnh ($p > 0,05$). Bên cạnh đó, kết quả phân tích cho thấy số bản sao tương đối của cả mô u và mô lân cận u ở nhóm bệnh nhân có hạch di căn cao hơn đáng kể so với nhóm bệnh nhân không có hạch di căn, tuy nhiên, chỉ có sự khác biệt ở mô lân cận u có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Phân tích mối liên quan giữa mức độ mất đoạn và số bản sao mtDNA với vị trí mô cho thấy số bản sao mtDNA ở mô u cao hơn so với mô lân cận u, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê về giá trị trung vị số bản sao mtDNA giữa mô u và mô lân cận u ($p = 0,014$). Mức độ mất đoạn lớn và số bản sao DNA ty thể ở nhóm bệnh nhân mắc bệnh phổi không ung thư thấp hơn so với nhóm bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ ở cả mô u lẫn mô lân cận u ($P < 0,05$).

3.4.2. Mức độ mất đoạn và số bản sao mtDNA ở mẫu máu

Đã xác định được MĐMĐ ở tất cả 57 mẫu bệnh nhân UTPKTBN trong đó có 35/57 (61,40%) bệnh nhân ở giai đoạn I – II và 22/57 (38,60%) bệnh nhân ở giai đoạn III – IV. Kết quả

phân tích cho thấy MĐMĐ ở các nhóm giai đoạn I – II, giai đoạn III – IV và nhóm bệnh có MĐMĐ cao hơn so với ở nhóm đối chứng và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($P < 0,01$). Trong đó, giai đoạn I – II có MĐMĐ cao hơn giai đoạn III – IV tuy nhiên sự khác biệt này không mang ý nghĩa thống kê. Không tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị trung vị của mức độ mất đoạn ở cả mô u và mô lân cận u với các đặc điểm của bệnh nhân UTPKTBN gồm: độ tuổi, giới tính, hút thuốc lá, uống rượu, giai đoạn T/N/M hay giai đoạn bệnh ($p > 0,05$). Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị trung vị của số bản sao mtDNA trong máu của bệnh nhân UTPKTBN giữa nhóm tuổi ≤ 50 và trên 50 ($p < 0,05$). Số bản sao mtDNA trong máu của BN trên 50 tuổi cao hơn hẳn so với nhóm bệnh nhân dưới 50 tuổi. Kết quả cho thấy số bản sao mtDNA ở mẫu máu của bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ cao hơn số bản sao mtDNA trong máu của người khỏe mạnh có ý nghĩa thống kê ($P < 0,01$). Mức độ mất đoạn lớn mtDNA ở mẫu máu của BN UTPKTBN cao hơn so với mất đoạn lớn mtDNA ở mẫu máu đối chứng, tuy nhiên không tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về mức độ mất đoạn lớn mtDNA giữa 2 nhóm bệnh nhân này ($P = 0,85$).

3.4.3. Mức độ mất đoạn và số bản sao mtDNA trong mẫu exosome huyết tương

Số bản sao tương đối mtDNA trong exosome huyết tương được thể hiện bằng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (TB \pm ĐLC) với giá trị tương ứng là $783,6 \pm 759,3$ (nhóm bệnh giai đoạn I-II), $2647,0 \pm 3584,0$ (nhóm bệnh giai đoạn III-IV) và

1207,0 ± 1550,0 (nhóm đối chứng). So sánh giữa các nhóm với nhau, sự khác biệt chỉ có ý nghĩa thống kê giữa nhóm bệnh giai đoạn I-II với giai đoạn III-IV ($p < 0,05$) và nhóm bệnh giai đoạn III-IV với nhóm đối chứng ($p < 0,05$). Kết quả phân tích mối liên quan cho thấy SBS mtDNA có liên quan đến giai đoạn bệnh, thói quen hút thuốc và giai đoạn N ($p < 0,05$). Các kết quả trên đã cho thấy số bản sao mtDNA trong exosome huyết tương có liên quan đến bệnh UTPKTBN.

3.5. MỐI LIÊN QUAN GIỮA MỘT SỐ BIẾN ĐỔI GEN TY THỂ VÀ BỆNH UNG THƯ PHỔI KHÔNG TẾ BÀO NHỎ

Phân tích mối liên quan giữa mức độ mất đoạn và SBS mtDNA giữa các loại mô của cùng một bệnh nhân, kết quả cho thấy, số bản sao ở mô máu cao hơn ở mô u và lân cận u có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Phân tích mối liên quan giữa mức độ mất đoạn và SBS mtDNA giữa các nhóm mẫu, kết quả cho thấy, số bản sao ở mô mô u và cao hơn mô lân cận u có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Như vậy, các kết quả nghiên cứu trên cho thấy MĐMĐ mtDNA có vai trò quan trọng đối tình trạng bệnh UTPKTBN và nó có thể là chỉ thị tiềm năng để chẩn đoán căn bệnh này.

3.6. ĐÁNH GIÁ THÀNH PHẦN PROTEIN EXOSOME HUYẾT TƯƠNG CỦA BỆNH NHÂN UNG THƯ PHỔI KHÔNG TẾ BÀO NHỎ

3.6.1. Phân tách và xác nhận exosome huyết tương

Exosome đã được tách ra khỏi các thành phần protein huyết tương bằng sắc ký lọc gel. Sau đó, exosome đã được phân tích một số tính chất như DLS, SEM, Western blot,... Các kết quả

này đã khẳng định sự có mặt của exosome trong các phân đoạn thu được sau khi phân tách chúng bằng sắc ký lọc gel.

3.6.2. Phân tích protein exosome huyết tương của bệnh UTPKTBN

Phân tích LC-MS/MS đã xác định được tổng cộng 243 protein trong exosome của mẫu UTPKTBN giai đoạn chưa di căn (giai đoạn I-II). Con số tương ứng của bệnh ở giai đoạn di căn là 294 protein (giai đoạn III-IV). Ở nhóm đối chứng, tổng cộng 214 protein đã được xác định.

Tiếp theo, các protein được so sánh với cơ sở dữ liệu về exosome để xác nhận độ tin cậy của các protein tìm được gồm cơ sở dữ liệu ExoCarta (Keerthikumar và cs, 2016) và Vesiclepedia (Pathan và cs, 2019), trong đó các protein thuộc Vesiclepedia được chọn từ protein thuộc dòng tế bào ung thư phổi. Kết quả so sánh đã cho thấy 160/214 protein được tìm thấy trong nhóm đối chứng và 252/322 protein trong nhóm bệnh trùng với các protein có trong ExoCarta, chứng tỏ rằng phần lớn các protein được tìm thấy trong nghiên cứu này thuộc protein của exosome. Tuy nhiên, sự trùng lặp của các protein trong nghiên cứu này với các protein exosome của dòng tế bào ung thư phổi trong Vesiclepedia chỉ là 52/322.

3.6.3. Phân tích biểu hiện protein exosome ở các giai đoạn bệnh khác nhau và mẫu đối chứng

So sánh với nhóm bệnh nhân UTPKTBN, 12 protein chỉ biểu hiện trong các mẫu của nhóm đối chứng. Mười chín protein chỉ xác định thấy trong nhóm bệnh giai đoạn I-II, trong khi 57 protein chỉ tìm thấy trong giai đoạn III-IV (Phụ lục dữ liệu).

Khi so sánh với tổng protein được tìm thấy trong nghiên cứu này, phân tích Gene Ontology (GO) các protein được tìm thấy trong 3 nhóm đã thể hiện rõ sự giàu có của protein trong vùng ngoại bào và exosome. Trong trường hợp protein được phân tách từ exosome của huyết tương bệnh UTPKTBN, phần lớn protein là thuộc exosome.

6.3.4. Mạng lưới tương tác protein-protein của 57 protein thuộc exosome từ bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn III-IV

Tổng cộng 57 protein đã được xác định thấy trong exosome của bệnh UTPKTBN giai đoạn di căn. Các protein này được sử dụng để xây dựng mạng lưới tương tác protein-protein bằng chương trình STRING và dự đoán khả năng di căn đến các cơ quan khác.

Trong mạng lưới tương tác protein, có một số điểm kết nối (hub) đáng chú ý, gồm: SRC (proto-oncogene tyrosine-protein kinase), FTL (Ferritin light chain), EEF1A1 (elongation factor 1- α 1), ARPC1B (Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B), KPNB1 (Importin subunit beta 1), HSP90B1 (molecular chaperone), PRDX1 (Peroxiredoxin-1), ACTR3 (Actin-related protein 3), ACTC1 (Actin, alpha cardiac muscle 1), ACTN4 (Alpha-actinin-4), và HSPA5 (glucose-regulated protein) (Hình 3). Tất cả các protein trên đã được khẳng định trong ExoCarta (Keerthikumar và cs, 2016), vì vậy, điều này cung cấp thêm bằng chứng chúng là thành phần của exosome.

Nghiên cứu của chúng tôi là nghiên cứu đầu tiên đã xác định thấy có mặt của một số protein trong exosome của huyết tương bệnh UTPKTBN thay vì trong dòng tế bào ung thư phổi. Các kết quả này cùng với các nghiên cứu trước đây về vai trò của

các protein đó trong sự tiến triển và di căn của ung thư đã đòi hỏi cần phải tiếp tục nghiên cứu về vai trò của chúng trong các con đường trao đổi và quá trình sinh học của chúng trong ung thư. Cơ chế làm thế nào các protein thực hiện chức năng trong ung thư cũng cần phải được làm sáng tỏ nhằm đánh giá khả năng sử dụng chúng như chỉ thị cho UTPKTBN. Vì vậy, trong các nghiên cứu tiếp theo, sự có mặt và nồng độ của một số protein như EEF1A1, KPNB1, SRC và ACTC1 cần phải được xác nhận sử dụng Western Blot hoặc ELISA.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả thu được, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Kết quả đánh giá tình trạng biến đổi của gen ty thể ở bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, tìm hiểu mối liên quan giữa các biến đổi này và bệnh:

- Xác định được tỷ lệ các dạng mất đoạn lớn ở nhóm mẫu nghiên cứu.

- Xác định được một số mất đoạn lớn trên mtDNA khác 4077 bp chưa từng được công bố trong các công trình khoa học trên thế giới, bao gồm: 10 mất đoạn lớn trên mtDNA ở bệnh nhân UTPKTBN (7 ở mô u và 3 ở mô LCU) và 9 mất đoạn lớn trên mtDNA ở nhóm bệnh nhân mắc BPKUT.

- Xác định được các dạng biến đổi mtDNA khác trên các mẫu giải trình tự, gồm: 9/15 biến đổi mtDNA ở mẫu mô phổi của BN UTPKTB và 8/10 biến đổi ở mẫu mô của BN mắc BPKUT hiện chưa được công bố trên các cơ sở dữ liệu cơ sở dữ liệu NCBI và MITOMAP.

- Mức độ mất đoạn mtDNA trong máu của BN UTPKTBN cao hơn so với nhóm đối chứng ($P < 0,0001$) và có thể phát triển thành chỉ thị sinh học tiềm năng trong chẩn đoán bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ.

- Số bản sao mtDNA trong máu của BN UTPKTBN có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ở hai nhóm BN dưới 50 tuổi và lớn hơn 50 tuổi ($P = 0,0003$).

- Số bản sao mtDNA trong exosome ở nhóm mẫu BN UTPKTBN giai đoạn III-IV cao hơn giai đoạn I-II và nhóm đối chứng ($P < 0,05$). Sự thay đổi số bản sao mtDNA trong exosome huyết tương có liên quan đến giai đoạn bệnh và giai đoạn N và thói quen hút thuốc của BN UTPKTBN ($P < 0,05$).

- Xác định được tỷ lệ dạng biến đổi 10398G của mtDNA trong exosome huyết tương là 62,1% đối với BN UTPKTBN và 61,3% đối với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, không tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về biến đổi này giữa nhóm bệnh và nhóm đối chứng.

2. Kết quả phân tách exosome từ huyết tương và xác định các protein của exosome có tiềm năng trở thành chỉ thị sinh học:

- Phân tách và xác nhận được sự có mặt của exosome trong huyết tương của người.

- Xác định được hệ protein trong exosome huyết tương, gồm: 243 protein trong exosome của mẫu UTPKTBN giai đoạn chưa di căn (giai đoạn I-II); 294 protein trong exosome của mẫu UTPKTBN ở giai đoạn di căn (giai đoạn III-IV); 214 protein trong exosome của mẫu đối chứng.

- Xác định được các protein đặc trưng cho từng nhóm mẫu, gồm: 12 protein chỉ biểu hiện trong các mẫu của nhóm đối chứng, 19 protein chỉ xác định thấy trong nhóm bệnh giai đoạn I-II, 57 protein chỉ tìm thấy trong các mẫu ở giai đoạn III-IV.

- Xác định thấy sự có mặt của một số protein trong exosome của huyết tương bệnh nhân UTPKTBN thay vì trong dòng tế bào ung thư phổi như: EEF1A1, KPNB1, SCR, ACTC1.

KIẾN NGHỊ

Từ quá trình nghiên cứu thực tế, chúng tôi đưa ra một số kiến nghị sau:

- Tiếp tục phân tích mức độ mất đoạn và số bản sao ADN ty thể ở mô phổi, máu và exosome của cùng bệnh nhân, đồng thời tăng cỡ mẫu nghiên cứu.

- Tiếp tục phân tích một số dạng biến đổi khác như đột biến điểm/biến đổi đơn nucleotide trên mtDNA.

- Tiếp tục nghiên cứu xác nhận một số protein trong exosome có tiềm năng trở thành chỉ thị sinh học cho UTPKTBN bằng kỹ thuật Western Blot hoặc ELISA.

- Tiếp tục nghiên cứu các biến đổi gen trong exosome huyết tương làm cơ sở cho việc sử dụng exosome huyết tương như mẫu sinh thiết lỏng không xâm lấn hỗ trợ chẩn đoán bệnh UTPKTBN.

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

1. Thao Phuong Bui, **Phuong Lan Le**, Linh Thi Tu Nguyen, Le Trung Tho and Thai Hong Trinh. Proteomic profiling of small extracellular vesicles isolated from the plasma of Vietnamese patients with non-small cell lung cancer reveals some potential biomarkers. *Asia Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2022 Jun 1;23(6):1893-1900.
2. **Lê Lan Phương**, Lê Thị Thanh Nhân, Hoàng Văn Sơn, Bùi Phương Thảo, Nguyễn Thị Tú Linh, Lê Trung Thọ và Trịnh Hồng Thái. Mức độ mất đoạn lớn và số bản sao DNA ty thể trong mô phổi của bệnh nhân mắc bệnh phổi không ung thư. *Tạp chí Sinh lý học Việt Nam* (chấp nhận đăng ngày 29/11/2022)
3. Nguyễn Thúy Quỳnh, Lê Thị Thanh Nhân, **Lê Lan Phương**, Bùi Phương Thảo, Nguyễn Thị Tú Linh, Lê Trung Thọ, Trịnh Hồng Thái. Biến đổi A10398G của gen ND3 ty thể trong exosome huyết tương của bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ. *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 36, No. 4 (2020) 50-59.
4. Lê Thị Thanh Nhân, Nguyễn Thúy Quỳnh, **Lê Lan Phương**, Bùi Phương Thảo, Nguyễn Thị Tú Linh, Lê Trung Thọ và Trịnh Hồng Thái. Xác định số bản sao DNA ty thể trong exosome huyết tương ở bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, Vol 38, No 1 (jan.2022), 34-41.
5. **Lê Lan Phương**, Lê Thị Thanh Nhân, Hoàng Văn Sơn, Nguyễn Thị Yến, Bùi Phương Thảo, Nguyễn Thị Tú Linh, Lê Trung Thọ, Trịnh Hồng Thái (2022), Mức độ mất đoạn lớn và số bản sao DNA ty thể trong mô phổi của bệnh nhân mắc bệnh phổi không ung thư, Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ 2 năm 2022 của Hội Di truyền Y học Việt Nam.
6. **Lê Lan Phương**, Phạm Thị Bích, Nguyễn Thị Tú Linh, Trịnh Hồng Thái. Quy trình xác định mất đoạn lớn trên ADN ty thể (Chấp nhận đơn hợp lệ cho đăng ký sáng chế theo Quyết định số 20586w/QĐ-SHTT, ngày 28/11/2022)
7. Trịnh Hồng Thái, Nguyễn Thị Tú Linh, Bùi Phương Thảo, **Lê Lan Phương**, Lê Thị Thanh Nhân. Bộ kit để phân tách exosome và các bóng ngoại bào từ huyết tương hoặc huyết thanh và quy trình phân tách exosome và các bóng ngoại bào sử dụng bộ kit này (Chấp nhận đơn hợp lệ cho đăng ký giải pháp hữu ích theo Quyết định số 13030w/QĐ-SHTT, ngày 16/08/2021).