

**BỘ GIÁO DỤC VÀ
ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA
HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Chu Thị Thảo

**NGHIÊN CỨU NHÂN NUÔI VÀ HOẠT HÓA
TẾ BÀO DIỆT TỰ NHIÊN (NATURAL
KILLER CELL – NK) TỪ MÁU DÂY RÓN
TRONG HỖ TRỢ ĐIỀU TRỊ UNG THƯ**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Hà Nội – 2025

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

Người hướng dẫn khoa học:

Người hướng dẫn 1: PGS.TS. Hoàng Thị Mỹ Nhung

Người hướng dẫn 2: TS. Lý Thị Bích Thủy

Phản biện 1: ...

Phản biện 2: ...

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi ... giờ ..', ngày ... tháng ... năm 2025

Có thể tìm hiểu luận án tại:

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

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Ung thư là một thách thức y tế toàn cầu và đòi hỏi ngày càng nhiều sự quan tâm nghiên cứu nhằm tìm ra chiến lược tối ưu để giải quyết. Trong những năm gần đây, liệu pháp tế bào miễn dịch (Immune cell therapy) trong điều trị ung thư thu hút sự quan tâm của nhiều nhóm nghiên cứu. Liệu pháp này có thể sử dụng nhiều loại tế bào miễn dịch khác nhau như tế bào diệt tự nhiên (NK), tế bào T gây độc (CTL), tế bào CIK (cytokine-induced killer cells), Tế bào tua (DC), ...[1-3]. Trong số đó, tế bào NK là một trong những loại tế bào miễn dịch có khả năng nhận diện và tiêu diệt tế bào ung thư hiệu quả thông qua nhiều con đường.

Trong ghép tự thân, các tế bào NK tách từ chính bệnh nhân ung thư có thể bị vô hiệu hóa chức năng hoặc không nhận diện được tế bào đích khi đưa trở lại cơ thể. Trong khi ghép tế bào NK đồng loài với nhiều ưu điểm nổi bật như: ít gây hiệu ứng mảnh ghép chống chủ (GVHD), các tế bào NK từ nguồn khỏe mạnh có hoạt tính tốt, sự không phù hợp về HLA-KIR giữa người cho và người nhận giúp tăng hiệu quả điều trị,...

Trong các nguồn tế bào miễn dịch thì máu dây rốn là một nguồn cung cấp các tế bào miễn dịch trong liệu pháp ghép tế bào NK đồng loài điều trị ung thư với nhiều ưu điểm như dễ dàng thu thập, phân lập,... Và hiện ở Việt Nam, chưa có đơn vị nào tiến hành các triển khai các nghiên cứu trên đối tượng NK máu dây rốn, trong khi đây thực sự là liệu pháp tiềm năng trong hỗ trợ điều trị ung thư.

Dựa trên những vấn đề thực tiễn trên, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: ***Nghiên cứu nhân nuôi và hoạt hóa tế bào diệt tự nhiên (natural killer cell – NK) từ máu dây rốn trong hỗ trợ điều trị ung thư.***

2. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

*** Ý nghĩa khoa học**

- Nghiên cứu cung cấp các đặc điểm của quần thể tế bào máu dây rốn, bao gồm các đặc điểm về số lượng tế bào, tỉ lệ tế bào gốc tạo máu (HSC) và các loại tế bào miễn dịch trong máu dây rốn và các mối tương quan giữa chúng.
- Nghiên cứu cung cấp các đặc điểm và sự thay đổi của quần thể tế bào NK trong quá trình nuôi cấy tăng sinh và các đặc điểm của khối tế bào NK sau nuôi cấy, hoạt hóa.

*** Ý nghĩa thực tiễn**

- Nghiên cứu cung cấp giải pháp nuôi cấy tăng sinh tế bào NK từ máu dây rốn an toàn, ổn định, có hoạt tính và khả năng tiêu diệt tế bào ung thư cao, hướng tới việc ứng dụng trong điều trị ung thư trên lâm sàng.
- Nghiên cứu cung cấp các thông tin về tỉ lệ các loại tế bào gốc, tế bào miễn dịch trong máu dây rốn và phân tích một số yếu tố tương quan giữa chúng. Đây là tiền đề của nghiên cứu hồ sơ miễn dịch sơ sinh trong dự đoán và chẩn đoán bệnh. Đồng thời cũng là cơ sở cho việc triển khai các nghiên cứu về liệu pháp tế bào miễn dịch khác trong máu dây rốn trong tương lai.

3. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

Dựa trên những thực tiễn trên, nghiên cứu được triển khai nhằm:

- Phân tích các đặc điểm và tỉ lệ các quần thể tế bào miễn dịch, tế bào gốc tạo máu có trong máu dây rốn trẻ sơ sinh Việt Nam, nhằm làm rõ hơn về vai trò của máu dây rốn thực sự là nguồn tế bào gốc và tế bào miễn dịch tiềm năng cho trị liệu.
- Nghiên cứu xây dựng quy trình nhân nuôi và hoạt hóa tế bào NK từ máu dây rốn có hoạt tính cao, đáp ứng các tiêu chí về chất lượng để có thể áp dụng tại các cơ sở y tế trong trị liệu tế bào.

4. Những đóng góp mới của luận án

- Nghiên cứu này đã phân tích các đặc điểm các quần thể tế bào miễn dịch quan trọng trong máu dây rốn, đồng thời chỉ ra được sự khác biệt về tỉ lệ các quần thể tế bào miễn dịch ở trẻ sơ sinh Việt Nam so với các công bố trên quần thể người của một số quốc gia khác.
- Nghiên cứu là nghiên cứu đầu tiên đưa ra được quy trình nuôi cấy, hoạt hóa và tăng sinh tế bào NK từ máu dây rốn tại Việt Nam hiệu quả, có hoạt tính cao, có khả năng tiêu diệt tế bào ung thư. Chất lượng sản phẩm của khối tế bào sau nuôi cấy đáp ứng được một số tiêu chí quan trọng của cơ quan quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ - FDA trong việc xác định đặc tính của sản phẩm sinh học ngay từ giai đoạn thử nghiệm ban đầu như tiêu chí về định danh, tính vô khuẩn, tính tinh khiết, tính an toàn và tiềm năng

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tình hình ung thư hiện nay

1.1.1. Tình hình ung thư trên thế giới

Ung thư là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ hai trên toàn cầu, ước tính khoảng hơn 9,6 triệu ca tử vong trong tổng số hơn 18 triệu ca mắc phải vào năm 2022. Theo thống kê, trong năm 2022, trên thế giới có tổng gần 19 triệu ca mắc ung thư mới. Trong khi đó, số lượng ca ung thư tử vong hàng năm trên thế giới chiếm hơn 50% so với số lượng ca mắc mới. Dự báo, đến năm 2050, toàn thế giới sẽ có khoảng trên 35 triệu người mắc mới, và trên 18.5 triệu người tử vong mỗi năm do ung thư

1.1.2. Tình hình ung thư tại Việt Nam

Theo số liệu của Trung tâm nghiên cứu quốc tế về Ung thư trong năm 2022, có 5 loại bệnh ung thư có tỉ lệ mắc hàng năm cao nhất

tại Việt Nam gồm: ung thư vú (13.6%) ung thư gan (13.6%), ung thư phổi (13.5%), ung thư đại tràng (9.3%), ung thư dạ dày (9%) và các loại ung thư khác. Ở Việt Nam, tình trạng bệnh nhân tử vong do bệnh ung thư khoảng trên 60% cao hơn nhiều so với mặt bằng chung của thế giới, khoảng trên 50%.

1.2. Tổng quan về liệu pháp miễn dịch trong điều trị ung thư

Edward Jenner, người đã phát triển thành công vắc-xin đậu mùa đầu tiên vào năm 1796, được coi là người đã đặt nền tảng của miễn dịch học cho sự phát triển khoa học này. Cộng đồng y tế và khoa học đã bắt đầu nhìn nhận liệu pháp miễn dịch có thể là một niềm hy vọng mới cho bệnh nhân ung thư, đặc biệt là các bệnh nhân đã có di căn và không có đáp ứng tốt với các phương pháp điều trị truyền thống [4, 5].

1.3. Tình hình nghiên cứu liệu pháp tế bào miễn dịch hiện nay

1.3.1. Tình hình nghiên cứu liệu pháp tế bào miễn dịch trên thế giới

Trên thế giới, liệu pháp miễn dịch hiện đã trở thành mối quan tâm đặc biệt của các nhà trị liệu, không chỉ bởi hiệu quả của nó mà còn bởi tốc độ phát triển công nghệ trong lĩnh vực này. Đã có rất nhiều công bố trên thế giới báo quả hiệu quả và tính an toàn của các liệu pháp DC, liệu pháp CAR-T, CAR-NK, liệu pháp NK,...trên lâm sàng. Bệnh nhân sau khi được điều trị liệu pháp tế bào miễn dịch riêng lẻ hoặc được kết hợp với các phương pháp khác cho thấy kích thước khối u giảm, chất lượng sống cải thiện, kéo dài thời gian sống,...

1.3.2. Tình hình nghiên cứu, ứng dụng liệu pháp tế bào miễn dịch tại Việt Nam

Với lĩnh vực ứng dụng liệu pháp tế bào miễn dịch trong điều trị ung thư tại Việt Nam, các nghiên cứu, ứng dụng mặc dù được bắt đầu nghiên cứu từ 2011, tuy nhiên vẫn đang ở giai đoạn ban đầu với các công bố chủ yếu liên quan đến các phương pháp hoạt hóa, đánh giá hiệu quả

tiêu diệt tế bào ung thư của các loại tế bào miễn dịch như DC, CIK, gamma delta T,... trong phòng thí nghiệm, trên mô hình chuột và một số ít thử nghiệm lâm sàng đánh giá tính an toàn và hiệu quả như liệu pháp NK, CTL, $\gamma\delta$ T tự thân từ máu ngoại vi người trưởng thành.

1.4. Tổng quan về tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK)

1.4.1. Chức năng của tế bào NK

Tế bào diệt tự nhiên (NK) là một loại tế bào thuộc hệ miễn dịch bẩm sinh (ILC), đóng vai trò quan trọng trong các phản ứng miễn dịch bẩm sinh trong cơ thể. Được xác định lần đầu tiên vào năm 1973, thuật ngữ “*Natural Killer*” được đặt ra để chỉ rằng chúng sẵn sàng tiêu diệt các tế bào bị nhiễm bệnh mà không cần thêm các cơ chế môi hay nhận diện. Các chức năng chính của tế bào NK là điều hòa miễn dịch và gây độc tế bào.

1.4.2. Đặc điểm của tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK)

Trong máu dây rốn, NK chiếm khoảng 30% tổng số tế bào lympho, cao hơn hẳn so với tỉ lệ của NK trong máu ngoại vi là 10% [6, 80]. Các tế bào NK trong máu dây rốn cũng có kiểu hình CD3-/CD56+ và cũng được phân thành 2 quần thể con CD56^{dim} và CD56^{bright}, nhưng tỉ lệ CD16-CD56^{bright} cao hơn so với máu ngoại vi [6, 80]. Các tế bào NK máu dây rốn là những tế bào trẻ hơn và có khả năng tăng sinh mạnh hơn so với tế bào NK máu ngoại vi. Khi được kích thích bằng cytokin, khả năng gây độc của NK từ 2 nguồn tế bào này là tương đương nhau [83, 84].

1.4.3. Các thụ thể bề mặt của tế bào NK

1.4.3.1. Vai trò của các thụ thể

Trong quá trình tương tác của tế bào NK với các tế bào khác, kết quả của hoạt động được xác định bằng sự tích hợp các tín hiệu bắt nguồn từ ác thụ thể ức chế và kích hoạt trên tế bào NK và sự liên kết của chúng

với các phối tử trên tế bào đích [68]. Có rất nhiều thụ thể trên tế bào NK, trong đó có thể phân loại thành 2 nhóm chính dựa vào cấu trúc phân tử của chúng: (1) Các thụ thể giống lectin loại C bao gồm NKG2, CD94 và (2) Các thụ thể giống globulin miễn dịch bao gồm NCR, CD16, ILT-2 và KIR.

Thụ thể Immunoglobulin (KIRs) có chức năng điều chỉnh hoạt động tiêu diệt tế bào NK bằng cách liên kết với các phân tử MHC-I [89]. Trong đó các KIR hoạt hóa có đuôi tế bào chất ngắn và không phát tín hiệu trực tiếp. Các thụ thể KIR ức chế phát tín hiệu trực tiếp qua các đuôi tế bào chất dài chứa các thụ thể miễn dịch có bản chất tyrosine (ITIM) [90].

1.4.5. Các nguồn thu nhận và các phương pháp hoạt hóa tế bào NK

NK có thể được thu nhận từ máu ngoại vi (PBMNC), máu dây rốn (UCB), tủy xương (BM), tế bào gốc như tế bào gốc phôi (hESCs) hoặc tế bào gốc vạn năng cảm ứng (iPSCs) hay các dòng tế bào NK thương mại như NK-92 hay NK-92MI. Mỗi nguồn kể trên đều có những ưu, nhược điểm nhất định trong quá trình phân lập, hoạt hóa, tăng sinh tạo sản phẩm tế bào đáp ứng các tiêu chuẩn lâm sàng [104].

1.4.6. Ghép đồng loại tế bào diệt tự nhiên (NK) trong trị liệu ung thư

Cho đến nay đã có nhiều thử nghiệm lâm sàng pha I và II đang được tiến hành để đánh giá mức độ an toàn cũng như hiệu quả của việc sử dụng NK từ máu dây rốn kết hợp với hóa trị hoặc kháng thể đơn dòng để điều trị ung thư. Mặc dù vậy, vấn đề lớn nhất trong phương pháp này đó là sự giới hạn về lượng máu dây rốn thu thập dẫn đến sự giới hạn về số lượng tế bào NK có thể sử dụng để ghép cho người bệnh. Do đó phương pháp để hoạt hóa các tế bào NK tách từ máu dây rốn và làm tăng hiệu quả gây độc tế bào ung thư cần được nghiên cứu.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm, thời gian và đối tượng nghiên cứu

- Nghiên cứu được tiến hành từ 7/2017 đến 7/2021 tại bệnh viện đa khoa quốc tế Vinmec Times City, dựa trên nguồn tài trợ của tập đoàn Vingroup và chấp thuận của hội đồng y đức trong nghiên cứu y sinh học Công ty cổ phần bệnh viện đa khoa quốc tế Vinmec số 1507/2017/CN/HĐĐĐ VMEC, ngày 15/06/2017.

- 59 mẫu máu dây rốn và 9 mẫu máu ngoại vi được lựa chọn tham gia nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu thập mẫu

2.2.2. Phương pháp phân lập tế bào đơn nhân máu dây rốn sử dụng hệ thống AXP

2.2.3. Phương pháp phân lập tế bào đơn nhân máu dây rốn sử dụng ficoll

2.2.4. Phương pháp phân tích đặc điểm quần thể tế bào miễn dịch sử dụng flow cytometry

2.2.5. Phương pháp nhân nuôi tế bào NK

2.2.6. Phương pháp nhân nuôi và bảo quản dòng tế bào K562

2.2.7. Phương pháp nhân nuôi dòng tế bào KHYG

2.2.8. Phương pháp đánh giá hoạt tính tế bào NK

2.2.9. Phương pháp phân tích nhiễm sắc thể đồ (karyotyping)

2.2.10. Phương pháp xác định nồng độ endotoxin bằng máy Endosafe-PTS

2.2.11. Phương pháp xác định mycoplasma bằng kit Mycoalert

2.2.12. Phương pháp xác định tỉ lệ sống bằng chất nhuộm xanh trypan

2.2.13. Phương pháp đếm số lượng tế bào có nhân bằng thuốc nhuộm Turk's

2.2.14. Phương pháp trữ đông lạnh tế bào

2.2.15. Xác định hiệu suất thu hồi tế bào đơn nhân

2.2.16. Phân tích thống kê số liệu

Các dữ liệu về đặc điểm sản phụ, thai nhi và mẫu máu dây rốn được thực hiện bằng phương pháp thống kê mô tả. Sự khác biệt giá trị trung bình của các chỉ số được kiểm định bằng T-test / Man-Whitney test với sự khác biệt được coi là có ý nghĩa thống kê nếu giá trị $p < 0,05$. Sử dụng phân tích hồi quy tuyến tính Pearson để phân tích mối tương quan giữa các yếu tố sinh học. Hình, biểu đồ được vẽ bằng phần mềm GraphPad Prism.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Thu thập máu dây rốn

Nghiên cứu có 59 sản phụ đủ điều kiện và tình nguyện hiến mẫu máu dây rốn. Trong đó, 48 mẫu MDR được phân tách tế bào MNC, 12 mẫu được sử dụng để nghiên cứu nuôi cấy tăng sinh NK.

3.1.2. Đặc điểm của các đơn vị máu dây rốn thu thập

Thể tích mẫu máu dây rốn trung bình là $94,49 \pm 30,35$ ml không bao gồm chất chống đông.

Bảng 3. 7. Tổng số tế bào có nhân (TNC) máu dây rốn

Tổng số tế bào có nhân-TNC ($\times 10^8$ tế bào)	(N=48)
Mean (SD)	11,49 (3,97)
Median [Min; Max]	10,69 [5,10; 19,82]

Bảng 3.8. Tổng số tế bào đơn nhân (MNC) máu dây rốn

Tổng tế bào đơn nhân – MNC ($\times 10^8$ tế bào)	(N=48)
Mean (SD)	4,34 (1,66)
Median [Min; Max]	4,44 [1,64; 8,42]

3.1.3. Số lượng tế bào gốc tạo máu trong máu dây rốn (HSC)

Bảng 3.10. Tổng số HSC trong các đơn vị máu dây rốn thu thập

(N=48)	Tổng số tế gốc tạo máu HSC ($\times 10^6$)
Mean (SD)	3,64 (2,00)
Median [Min; Max]	3,5 [0,81; 9,79]

Bảng 3.11. Số lượng trung bình HSC theo giới tính

Giới tính	Nữ	Nam	p value
HSC ($\times 10^6$ tế bào)	2,97 (1,51)	4,12 (2,23)	0,03

Bảng 3.12. Số lượng trung bình HSC theo thể tích máu thu thập

Thể tích MDR	< 100 ml	> 100 ml	p value
HSC ($\times 10^6$ tế bào)	2,83 (1,65)	5,26 (1,74)	$1,12 \times 10^{-5}$

Nghiên cứu của chúng tôi không tìm thấy sự khác biệt về số lượng HSC giữa nhóm có tuần thai dưới 38 và trên 38 tuần, trong khi HSC ở trẻ nam thấp hơn trẻ nữ ($p=0,03<0,05$).

3.1.4. Kết quả phân tách tế bào đơn nhân máu dây rốn

Bảng 3.16. Kết quả phân tách MNC

	Ficoll	AXP
N (mẫu)	10	38
Thể tích mẫu (ml)		
Mean (SD)	60,27 (5,39)	103,49 (27,44)
Median [Min; Max]	58,3 [52; 68]	94,75 [68,3; 176]
MNC Pre ($\times 10^8$)		
Mean (SD)	3,21 (1,59)	3,6 (1,52)

Median [Min; Max]	2,39 [1,64; 7,21]	4,64 [1,65; 8,42]
MNC pos (x10⁸)		
Mean (SD)	2,33 (1,21)	3,44 (1,43)
Median [Min; Max]	1,78 [1,34; 5,34]	4,27 [1,55; 7,78]
Hiệu suất thu hồi MNC (%)		
Mean (SD)	75 (5)	96 (5)
Median [Min; Max]	75 [65; 82]	98 [79; 100]
P value	p<0,05	

3.2. Mẫu máu ngoại vi

3.2.1. Đặc điểm của bệnh nhân

09 bệnh nhân tham gia nghiên cứu, trong đó có 3 bệnh nhân ung thư dạ dày, 3 bệnh nhân ung thư gan và 3 bệnh nhân ung thư phổi. Độ tuổi trung bình là $66 \pm 8,8$ tuổi, trong đó bệnh nhân trẻ nhất là 53 tuổi, và bệnh nhân lớn tuổi nhất là 79 tuổi

3.2.2. Mẫu máu ngoại vi thu thập

Bảng 3.19. Mối tương quan giữa số lượng tế bào nuôi cấy ban đầu theo tuổi và loại ung thư (* $p < 0,05$)

Tế bào nuôi cấy D0	Tổng số lượng (x10 ⁶)	% NK	Tế bào NK (x10 ⁶)
	(Mean $\pm$ SD)	(Mean $\pm$ SD)	(Mean $\pm$ SD)
Trung bình	38,5 $\pm$ 20,2	16,7 $\pm$ 8,4	4,5 $\pm$ 3,4
Độ tuổi	$p=0,9888$	$p=0,0205^*$	$p=0,2251$
≤ 65	44,7 $\pm$ 18,3	7,1 $\pm$ 4,1	2,3 $\pm$ 0,5
> 65	37,0 $\pm$ 21,1	19,1 $\pm$ 7,5	5,1 $\pm$ 3,6
Loại ung thư	$p= 0,588$	$p=0,089$	$p=0,002^*$
Dạ dày	34,0 $\pm$ 16,0	9,3 $\pm$ 3,3	2,3 $\pm$ 0,6
Gan	39,7 $\pm$ 26,1	22,0 $\pm$ 5,0	5,4 $\pm$ 2,8

<i>Phối</i>	45,2±19,3	21,0±11,5	7,3±5,7
-------------	-----------	-----------	---------

3.3. Đặc điểm quần thể tế bào máu dây rốn

3.3.1. Tỷ lệ các loại tế bào miễn dịch (T-B-NK) trong máu dây rốn

Bảng 3. 20. Tỷ lệ tế bào B theo cân nặng và tuổi thai

(N=59)	CD3-/CD19+ (%)		
Mean (SD)	9,52 (3,28)		
Median [Min; Max]	9,2 [3,5; 18,6]		
<i>Cân nặng trẻ</i>	<i><=3kg</i>	<i>>3kg</i>	<i>P value</i>
N (%)	17 (28,8%)	42 (71,2%)	
Mean (SD)	8,83 (2,82)	9,80 (3,48)	>0,05
<i>Tuổi thai</i>	<i><=38 tuần</i>	<i>>38 tuần</i>	<i>P value</i>
N (%)	18 (30,5%)	41 (69,5%)	
Mean (SD)	8,34 (2,36)	10,04 (3,55)	<0,05

Bảng 3.21. Tỷ lệ CD3+/CD19+ theo cân nặng và tuổi thai

(N=59)	CD3+/CD19+ (%)		
Mean (SD)	8,59 (5,77)		
Median [Min; Max]	8,30 [0,1; 20,4]		
<i>Cân nặng trẻ</i>	<i><=3kg</i>	<i>>3kg</i>	<i>P value</i>
N (%)	17 (28,8%)	42 (71,2%)	
Mean (SD)	5,65 (4,24)	9,78 (5,99)	<0.05
<i>Tuổi thai</i>	<i><= 38 tuần</i>	<i>>38 tuần</i>	<i>P value</i>
N (%)	18 (30,5%)	41 (69,5%)	
Mean (SD)	8,13 (5,74)	8,80 (5,92)	>0.05

Bảng 3.22. Tỷ lệ TCD4 theo cân nặng, giới tính và tuổi thai

(N=59)	TCD4 (CD3+/CD4+) (%)
Mean (SD)	46,71 (8,99)
Median [Min; Max]	46,16 [24,36; 71,30]

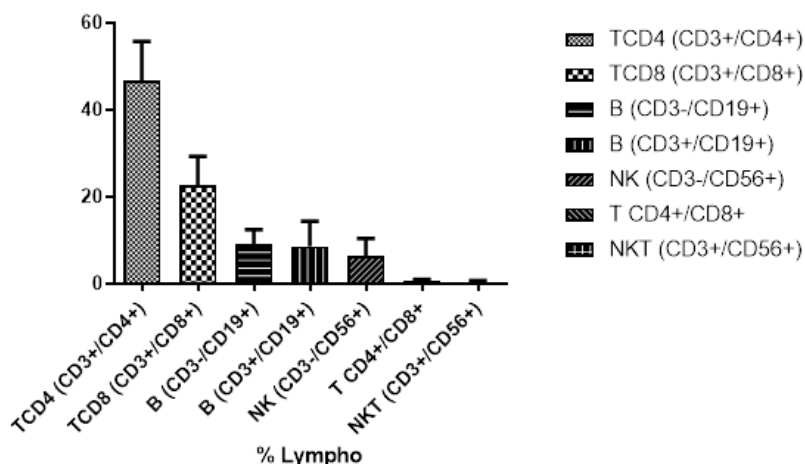
(N=59)	TCD4 (CD3+/CD4+) (%)		
<i>Cân nặng trẻ</i>	$\leq 3\text{kg}$	$> 3\text{kg}$	<i>P value</i>
N (%)	17 (28,8%)	42 (71,2%)	
Mean (SD)	48,83 (8,64)	45,85 (9,19)	$> 0,05$
<i>Giới tính</i>	<i>Nữ</i>	<i>Nam</i>	<i>P value</i>
Mean (SD)	48,01 (6,57)	45,64 (10,61)	$P > 0,05$
<i>Tuổi thai</i>	$\leq 38\text{ tuần}$	$> 38\text{ tuần}$	<i>P value</i>
N (%)	18 (30,5%)	41 (69,5%)	
Mean (SD)	46,82 (10,88)	46,66 (8,30)	$> 0,05$

Bảng 3.23. Tỷ lệ TCD8 theo cân nặng, tuổi thai, giới tính

(N=59)	TCD8 (CD3+/CD8+) (%)		
Mean (SD)	22,58 (6,73)		
Median [Min; Max]	22,43 [8,6; 48,96]		
<i>Cân nặng trẻ</i>	$\leq 3\text{kg}$	$> 3\text{kg}$	<i>P value</i>
N (%)	17 (28,8%)	42 (71,2%)	
Mean (SD)	20,83 (4,77)	23,29 (7,39)	$> 0,05$
<i>Tuổi thai</i>	$\leq 38\text{ tuần}$	$> 38\text{ tuần}$	<i>P value</i>
N (%)	18 (30,5%)	41 (69,5%)	
Mean (SD)	24,41 (8,34)	21,78 (5,93)	$> 0,05$
<i>Giới tính</i>	<i>Nữ</i>	<i>Nam</i>	<i>P value</i>
Mean (SD)	21,13 (5,92)	23,73 (7,29)	$> 0,05$

Bảng 3.26. Tỷ lệ trung bình các quần thể NK

N=59	NK CD3-/CD56+	NK CD56 ^{dim}	NK CD56 ^{bright}
	(%)	(%)	(%)
<i>Mean (SD)</i>	6,4 (4,9)	5,9 (4,8)	0,5 (0,4)
<i>Median [Min; Max]</i>	5,0 [2,1; 24,3]	4,5 [1,8; 23,4]	0,4 [0,01; 1,8]



Hình 3.9. Tỷ lệ quần thể các tế bào miễn dịch trong máu dây rốn

3.3.2. Mối quan hệ giữa các quần thể tế bào miễn dịch và tế bào gốc

Bảng 3.30. Mối tương quan giữa số lượng HSC và các yếu tố khác

Đặc điểm	Số lượng HSCs	
	Hệ số tương quan (r)	P
Tuổi thai (tuần)	- 0,08	0,59
Cân nặng (kg)	0,14	0,34
Thể tích mẫu (ml)	0,67	0,00
TNCs (10^8)	0,60	0,00
MNCs (10^8)	0,57	0,00
CD19+/CD3+ B cells	- 0,16	0,28
B cell (CD19-/CD3+)	- 0,30	0,03
TCD4 cells	0,35	0,01
TCD8 cells	- 0,11	0,44
NK cells	-0,23	0,11

Bảng 3.31. Tương quan của các yếu tố với tỉ lệ NK

Đặc điểm	Tỉ lệ NK (n=59)	
	Hệ số tương quan (r)	P
Tuổi thai (tuần)	0,10	0,46
Cân nặng (kg)	-0,03	0,83
Thể tích mẫu (ml)	- 0,23	0,12
TNCs (10^8)	- 0,01	0,99
MNCs (10^8)	- 0,11	0,46
CD19+/CD3+	- 0,26	0,05
Lympho B (CD19-	0,09	0,50
TCD4 (CD3+/CD4+)	- 0,42	0,01
T CD8 (CD3+/CD8+)	- 0,27	0,03

3.4. Nuôi cấy chọn lọc và tăng sinh NK máu ngoại vi

Bảng 3.32 Khối tế bào NK máu ngoại vi sau nuôi cấy

Tế bào sau nuôi cấy 21 ngày	Tỉ lệ sống (%)	% NK	Số tế bào NK (x106)	Tổng số tế bào (x106)	N
	(Mean±SD)	(Mean±SD)	(Mean±SD)	(Mean±SD)	
Trung bình	95,0±2,3	88,3±7,8	2.659,3±1.690,8	3.280,8±2.444,0	9
Độ tuổi	<i>p=0,2962</i>	<i>p=0,4275</i>	<i>p=0,0734</i>	<i>p=0,0759</i>	
≤ 65	93,7±0,9	85,0±10,7	4.212,0±2.533,2	5.507,8±3.865,2	4
> 65	95,3±2,5	89,1±7,3	2.271,1±1.284,5	2.724,0±1.787,4	
Loại ung thư	<i>p= 0,083</i>	<i>p=0,019</i>	<i>p=0,256</i>	<i>p=0,131</i>	5
Dạ dày	95,2±1,1	91,1±9,5	3.255,6±1.944,3	3.970,8±2.978,4	
Gan	96,5±0,8	88,2±2,2	1.858,9±	2.199,8±	3

			934,2	1.130,8	
Phổi	91,4±2,7	83,1±11,2	3.067,6± 2.267,2	4.062,6± 3.253,6	3

Bảng 3.33. Số lần thay đổi của quần thể tế bào

	Số lần tăng tổng tế bào	Số lần tăng NK	Số lần tăng tỉ lệ	N
	(Mean± SD)	(Mean± SD)	(Mean± SD)	
Trung bình	88,9±38,6	1.132,3±940,3	7,8±6,7	9
Độ tuổi	<i>p</i> =0,1962	<i>p</i> =0,0138*	<i>p</i> =0,0071*	
≤ 65	115,3±38,0	2.295,2±2.099,3	16,5±11,6	4
> 65	82,3±37,4	601,6±452,5	5,7±2,8	5
Loại ung thư	<i>p</i> = 0,598	<i>p</i> =0,000*	<i>p</i> =0,014*	
<i>Dạ dày</i>	110,4±34,8	1.644,9±1510,7	12,3±8,5	3
<i>Gan</i>	69,6±29,0	358,3±94,7	4,3±1,7	3
<i>Phổi</i>	84,5±52,7	807,3±695,0	5,8±5,2	3

3.5. Nuôi cấy chọn lọc và tăng sinh NK máu dây rốn

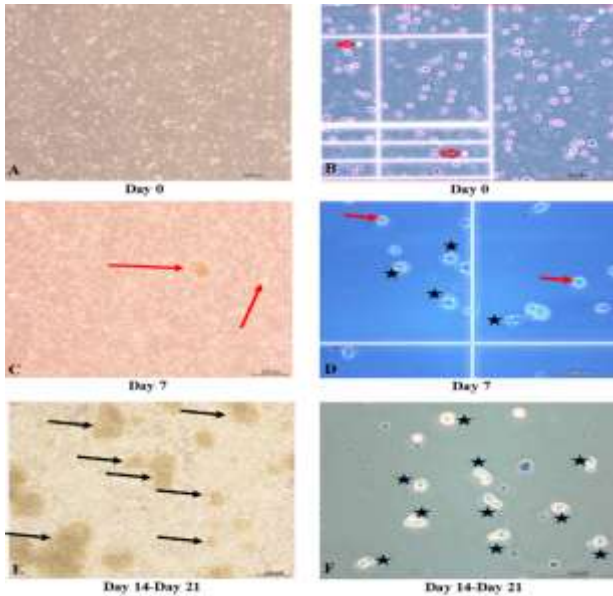
3.5.1. Lựa chọn môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy tăng sinh tế bào NK của hãng BINKIT do viện trị liệu sinh học Nhật Bản (BIJ) sáng chế, đồng thời các sản phẩm NK này cũng đã được đánh giá về độ an toàn cũng như hiệu quả điều trị trên lâm sàng, trên các đối tượng là người tình nguyện tại Nhật Bản và Việt Nam [64, 65, 136-138]. Kế thừa các kết quả nghiên cứu trên đối tượng tế bào NK máu ngoại vi, chúng tôi tiếp tục lựa chọn môi trường nuôi cấy này để tăng sinh tế bào NK máu dây rốn trong bước nghiên cứu tiếp theo.

3.5.2. Lựa chọn thời gian nuôi cấy

Số lượng tế bào bắt đầu giảm kể từ ngày nuôi cấy thứ 21 trở đi, do vậy, trong tất cả các khảo sát sau này, chúng tôi đặt ngưỡng nuôi cấy 21 ngày là tối đa.

3.5.3. Hình thái tế bào trong quá trình nuôi cấy

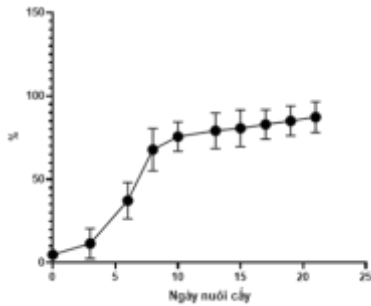


Hình 3.15. Sự thay đổi hình thái tế bào trong quá trình nuôi cấy

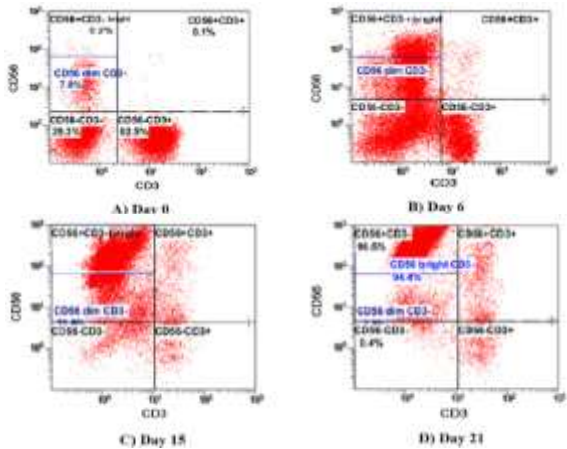
Từ ngày thứ 5 trở đi, số lượng tế bào hồng cầu trong mẫu nuôi cấy giảm. Từ ngày thứ 6,7 quan sát thấy hình thành một số cụm tế bào (Hình 3.13-C), hình thái tế bào trong quần thể thay đổi và không đồng nhất. Từ ngày thứ 14 trở đi, số lượng cụm tế bào cũng như kích thước cụm tế bào tăng lên rõ rệt. Từ ngày thứ 21 trở đi, tế bào có xu hướng nhỏ dần về kích thước, song song với sự suy giảm số lượng tế bào

3.5.4. Quần thể tế bào NK (CD3-/CD56+) nuôi cấy chọn lọc

3.5.4.1. Sự thay đổi kiểu hình miễn dịch của quần thể NK trong quá trình nuôi cấy



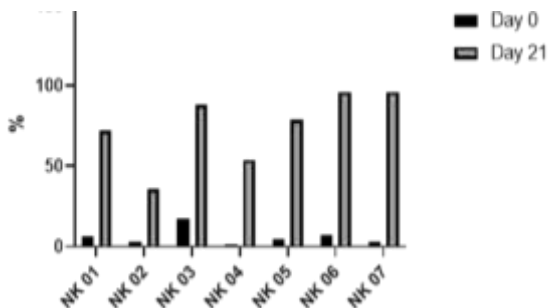
Hình 3.16. Tỉ lệ % NK (CD3-/CD56+) trong quá trình nuôi cấy



Hình 3.17. Kiểu miễn dịch quần thể tế bào NK máu dây rốn trong quá trình nuôi cấy

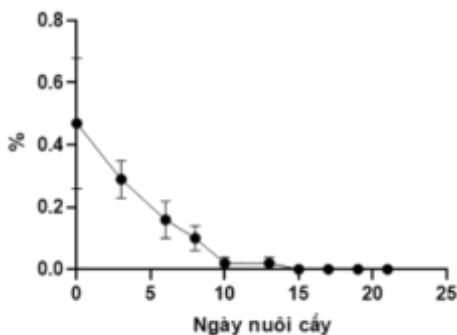
3.5.4.2. Hiệu quả nuôi cấy chọn lọc NK

Hình 3.18. Tỷ lệ quần thể NK trước và sau nuôi cấy



3.5.5. Kiểu hình miễn dịch của các quần thể tế bào khác trong quá trình nuôi cấy

3.5.5.1. Kiểu hình quần thể HSC



Hình 3.19. Tỷ lệ % HSC thay đổi trong quá trình nuôi cấy.

3.5.5.2. Tính chọn lọc của môi trường nuôi cấy NK

Bảng 3.37. Tỷ lệ các quần thể miễn dịch trước và sau nuôi cấy 21 ngày

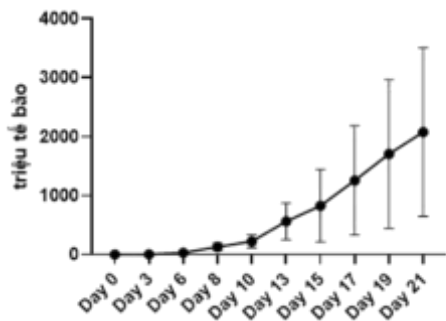
	Trước nuôi cấy	Sau nuôi cấy	N	Đánh giá
(CD3-/CD56+)	6,38 (4,87)	77,39 (19,11)	7	Tăng
(CD3+/CD56+)	0,09 (0,03)	6,21 (7,44)	7	Tăng
(CD3+/CD4+)	39,51 (11,3)	5,31 (5,03)	7	Giảm

(CD3+/CD8+)	20,84 (4,07)	3,47 (3,19)	7	Giảm
-------------	--------------	-------------	---	-------------

3.5.6. Sự thay đổi về số lượng tế bào nuôi cấy

Bảng 3.36. Tổng số tế bào và tế bào NK sau 21 ngày nuôi cấy

	Tế bào tổng số	NK (CD3-/CD56+)	N
Số lượng D0	45,02 ± 15,75	2,8 ± 1,9	7
Số lượng D21	2.115,4 ± 1.040,1	1.762,7 ± 1.141,1	7
Số lần tăng	46,06 ± 14,21	840,7 ± 550,4	7



Hình 3.23. Số lượng tế bào NK trong quá trình nuôi cấy (N=4)

3.5.7. Thời gian nhân đôi của tế bào

Bảng 3.38. Thời gian nhân đôi của tế bào trong các khoảng thời gian khác nhau

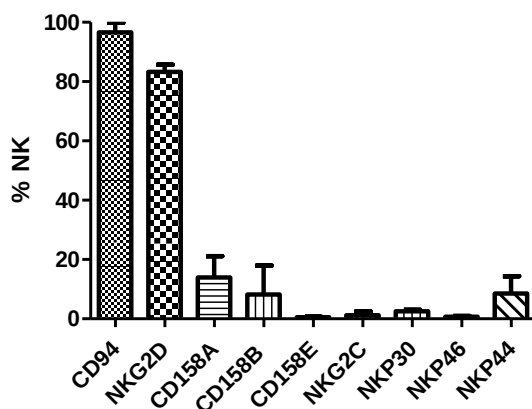
Thời gian khảo sát	Thời gian nhân đôi của NK				Trung bình	N
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 4		
Ngày 3- 10	1,62	1,11	1,14	0,88	1,19±0,31	4
Ngày 10- 15	4,49	2,22	2,67	3,87	3,31±1,05	4
Ngày 15- 21	3,53	5,61	3,56	3,60	4,08 ±1,03	4

Thời gian nhân đôi trung bình của tế bào NK trong toàn bộ 21 ngày nuôi cấy là 2,28 ngày (N=7), tương đương 54,82 giờ, cao hơn so với nghiên cứu tế bào NK có nguồn gốc từ máu ngoại vi người trưởng thành trong nghiên cứu của Yin Liu năm 2014 là 1,24 – 1,25 ngày [21], cao hơn kết quả 24-36 giờ của tế bào thương mại NK-92 [22], cũng như số liệu 30-40 giờ của dòng tế bào thương mại KHYG được nhà cung cấp dòng tế bào công bố. Tuy nhiên, số liệu trên lại thấp hơn rất nhiều so với ông bố của Lutz và cs năm 2011 trên đối tượng NK nguồn gốc máu ngoại vi người trưởng thành là 13,5 ngày [23].

3.6. Hoạt tính của NK máu dây rốn sau nuôi cấy

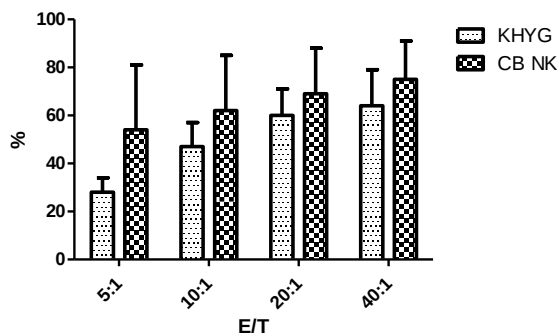
3.6.1. Sự biểu hiện các dấu ấn hoạt hóa trên tế bào NK

Các marker hoạt hóa như CD94, NKG2D biểu hiện mạnh với tỉ lệ trung bình lần lượt là $96,6 \pm 3,3$ % và $83,2 \pm 2,4$ %. Các marker CD158a, CD158b và NKp44 biểu hiện với tỉ lệ trung bình thấp, lần lượt là $14 \pm 7,1$ %; $8,2 \pm 9,7$ % và $8,5 \pm 5,9$ %. Trong khi CD158e, NKG2C, NKp30 và NKp46 biểu hiện ở mức rất thấp, dưới 3% (Hình 3.25).



Hình 3.25. Biểu hiện các marker hoạt hóa và ức chế trên tế bào NK sau nuôi cấy (n=3)

3.6.2. Hoạt tính tiêu diệt dòng tế bào ung thư K562 của NK sau nuôi cấy



Hình 3.26. Hoạt tính của NK nuôi cấy và KHYG với dòng tế bào K562. Với phương pháp nuôi cấy hiện tại của chúng tôi, không sử dụng dòng tế bào nuôi ngoại lai, tế bào NK sau hoạt hóa và tăng sinh có khả năng tiêu diệt tế bào tương đối cao, đạt 74,6% (SD=15,7%; N=5) ở tỉ lệ E/T=40/1, tương đồng với kết quả của một số nghiên cứu khác và hoạt tính NK sau nuôi cấy cao hơn so với dòng tế bào thương mại KHYG.

3.7. Đánh giá tỉ lệ sống NK sau rã đông

Bảng 3.42. Thông tin mẫu lưu trữ và rã đông đánh giá tỉ lệ sống

Tên mẫu	Tỉ lệ tế bào sống trước lưu trữ	Tỉ lệ tế bào sống sau lưu trữ
Mẫu 01	>90%	87,1%
Mẫu 02	>90%	46,3%
Mẫu 03	>90%	81,0%
Trung bình	>90%	71,5% ± 22%

3.8. Chất lượng khối tế bào NK sau tăng sinh, hoạt hóa

Bảng 3.43. Đánh giá các tiêu chí chất lượng sản phẩm NK theo tiêu chuẩn của FDA [169]

Tiêu chí chất lượng	Nội dung	Đánh giá
Định danh	- Sản phẩm được định danh thành phần các loại tế bào trong khối sản phẩm	- Sản phẩm được định danh thành phần các loại tế bào miễn dịch trong khối sản phẩm bằng phương pháp miễn dịch dòng chảy tế bào
Độ tinh khiết và độ vô khuẩn	- Âm tính với vi khuẩn, vi nấm - Âm tính với mycoplasma - Hàm lượng nội độc tố endotoxin 5 EU/kg cân nặng/giờ truyền - Tỷ lệ tế bào sống >70% - Thực hiện sàng lọc vi rút gây bệnh	- Âm tính với vi khuẩn - Âm tính với mycoplasma - Hàm lượng nội độc tố endotoxin <0,1 EU/ml - Sản phẩm sau nuôi cấy có tỷ lệ sống >90% - 100% người hiến được thực hiện sàng lọc với vi rút viêm gan B, viêm gan C, HIV, CMV và giang mai.
Độ an toàn	- Sản phẩm được đánh giá tính an toàn	Tế bào nuôi cấy được đánh giá tính ổn định của bộ nhiễm sắc thể. - Môi trường không chứa huyết thanh động vật - Thành phần môi trường nuôi cấy xác định, không có nguồn gốc động vật - Môi trường nuôi cấy được đánh giá tính an toàn và hiệu quả (pha 1&2) trên người
Tiềm năng	- Sản phẩm tế bào được đánh giá tiềm năng	- Tế bào sau nuôi cấy được đánh giá sự biểu hiện các marker hoạt hóa/ức chế như CD94, NKG2D, CD158a, CD158b, NKp44, CD158e, NKG2C, NKp30 và NKp46

		- Tế bào sau nuôi cấy được đánh giá hiệu quả tiêu diệt dòng tế bào ung thư thương mại K562
--	--	--

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Nghiên cứu đã phân tích đặc điểm và tỉ lệ các quần thể tế bào miễn dịch quan trọng trong 59 mẫu máu dây rốn của trẻ sơ sinh ở Việt Nam, với tế bào lympho B trưởng thành (CD3-/CD19+) chiếm $9,52\% \pm 3,28\%$ trong lympho, và tế bào này ở nhóm trẻ được sinh ra trước 39 tuần thai trung bình là $8,34\% \pm 2,36\%$ thấp hơn so với ở nhóm trẻ được sinh ra ở sau tuần thai 39 là $10,04\% \pm 3,55\%$ ($p=0,035<0,05$). Trong khi tế bào lympho TCD4 trung bình là $46,71\% \pm 8,99\%$, lympho TCD8 trung bình là $22,58\% \pm 6,73\%$ và tế bào lympho T CD4+/CD8+ trung bình là $0,63\% \pm 0,41\%$, thì quần thể tế bào NK (trong nghiên cứu này chiếm tỉ lệ trung bình là $6,44\% \pm 4,9\%$, và bao gồm 2 quần thể nhỏ là NK CD56^{dim} chiếm $5,93\% \pm 4,81\%$ và NK CD56^{bright} chiếm tỉ lệ nhỏ là $0,51\% \pm 0,39\%$).

2. Nghiên cứu đã đưa ra quy trình nuôi cấy, hoạt hóa và tăng sinh tế bào NK từ máu dây rốn hiệu quả, với quần thể tế bào có tỉ lệ NK ban đầu chiếm $6,38 \pm 4,87\%$ đã tăng lên $77,39 \pm 19,11\%$, tương ứng với số lượng tế bào NK là $1.762,7 \times 10^6 \pm 1.141,1 \times 10^6$ sau 21 ngày nuôi cấy, và tương đương với số lượng tế bào NK tăng lên $840,7 \pm 550,4$ lần so với ban đầu. Không chỉ vậy, khối tế bào NK sau nuôi cấy có khả năng tiêu diệt tế bào ung thư dòng K562 sau 3 giờ tương tác là $54,4\% \pm 26,9\%$ ở tỉ lệ E/T=5/1; $62,2 \pm 23,2\%$ ở tỉ lệ E/T= 10/1; $68,6 \pm 18,7\%$ ở tỉ lệ E/T=20/1 và $74,6 \pm 15,7\%$ ở tỉ lệ E/T=40/1. Ngoài ra, các dấu ấn hoạt hóa như CD94, NKG2D biểu hiện mạnh trên tế bào NK sau nuôi cấy với tỉ lệ trung bình lần lượt là $96,6 \pm 3,3\%$ và $83,2 \pm 2,4\%$; dấu ấn

CD158a, CD158b và NKp44 biểu hiện với tỉ lệ trung bình thấp, lần lượt là $14 \pm 7,1\%$; $8,2 \pm 9,7\%$ và $8,5 \pm 5,9\%$; trong khi thụ thể ức chế CD158e, thụ thể hoạt hóa NKG2C, NKp30 và NKp46 lại có biểu hiện ở mức rất thấp là dưới 3%. Khối tế bào NK sau nuôi cấy 21 ngày không mang tác nhân gây bệnh như vi khuẩn, mycoplasma; hàm lượng nội độc tố vi khuẩn endotoxin thấp $<0,1$ EU/ml và không phát hiện bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể. Các tiêu chí này bước đầu đáp ứng một số tiêu chuẩn chất lượng của FDA quy định sản phẩm tế bào soma nghiên cứu ứng dụng cho lâm sàng, là tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng trên người ở các giai đoạn sau này tại Việt Nam.

KIẾN NGHỊ

Với các kết quả đã đạt được trên, trong quá trình tiến hành nghiên cứu, nghiên cứu sinh cũng nhận thấy một số vấn đề còn tồn tại và là cơ sở để tiến hành các nghiên cứu trong tương lai như:

1. Nên tiến hành thêm giai đoạn tăng sinh và biệt hóa HSC ngay trước khi tăng sinh và huấn luyện tế bào NK có thể giúp làm tăng số lượng tế bào NK thu được sau nuôi cấy.
2. Việc nghiên cứu chọn lọc một phương pháp bảo quản có sử dụng dung dịch lưu trữ phù hợp, không chứa DMSO và chứa các thành phần an toàn cho cơ thể có thể giúp người bệnh sử dụng trực tiếp khối tế bào đông lạnh mà không cần phải tiến hành bước rửa là rất có ý nghĩa.
3. Cần thực hiện thêm các nghiên cứu đánh giá về tính an toàn, hiệu quả của liệu pháp trên mô hình động vật trước khi tiến hành trên người.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Chu Thi Thao, Do Thi Hoai Thu, Bui Viet Anh, Truong Linh Huyen, Nguyen Van Phong, Nguyen Thanh Liem and Hoang Thi My Nhung. Efficient Expansion of Human Umbilical Cord Blood- Derived NK Cells Ex Vivo without Requiring Feeder Layers. *Biomedical Journal of Scientific and Technical Research*. 2018, Volume 8 (5): 6739-6743.

2. Chu Thi Thao, Bui Viet Anh, Nguyen Van Phong, Nguyen Trung Kien, Nguyen Dac Tu, Doan Trung Hiep, Nguyen Thanh Liem, Hoang Thi My Nhung. Immune Cells Expansion from Peripheral Blood of Some Vietnamese Cancer Patients. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*. 2021, No 3. Page 1-11

3. Chu Thị Thao, Nguyen Thanh Liem, Bui Viet Anh, Tran Van Hiep, Ly Thi Bich Thuy, Hoang Thi My Nhung, Nguyen Trung Nam. Characterization of cord blood immune and stem cells from Vietnamese infants. 2024, *Vietnam Journal of Biotechnology*, 22(1), 35–44.