

**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**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Hà Nội – 2025

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 RÖN TRONG HỖ TRỢ ĐIỀU TRỊ UNG THƯ

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1

Người hướng dẫn 2

PGS.TS.
Hoàng Thị Mỹ Nhung

TS.
Lý Thị Bích Thủy

Hà Nội – 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: "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" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. 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. 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 24 tháng 12 năm 2025

Tác giả luận án



Chu Thị Thảo

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình thực hiện và nghiên cứu 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”, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ cũng như tạo điều kiện của tập thể Ban lãnh đạo và các nhà khoa học, cán bộ, chuyên viên y tế của Viện nghiên cứu Tế bào gốc và công nghệ gen Vinmec, cũng như Trung tâm Công nghệ cao Vinmec. Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành và sâu sắc về sự giúp đỡ đó.

Đặc biệt, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới GS. TS. Nguyễn Thanh Liêm, người đã hết sức tạo điều kiện cho tôi để có thể thực hiện và hoàn thành luận án này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới PGS.TS Hoàng Thị Mỹ Nhung và TS. Lý Thị Bích Thủy – những giảng viên trực tiếp hướng dẫn và chỉ bảo giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thiện luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ đã hỗ trợ tôi để luận án được hoàn thành.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn bạn bè, đồng nghiệp của tôi đang công tác tại Viện nghiên cứu Tế bào gốc và công nghệ gen Vinmec, cũng như Trung tâm Công nghệ cao Vinmec và gia đình đã động viên, khích lệ, tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện và hoàn thành luận án này.

Hà Nội, ngày 24 tháng 12 năm 2025

Tác giả luận án



Chu Thị Thảo

MỤC LỤC

MỤC LỤC.....	i
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC BẢNG.....	viii
DANH MỤC HÌNH	x
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	4
1.1. Tình hình ung thư hiện nay.....	4
1.1.1. Tình hình ung thư trên thế giới.....	4
1.1.2. Tình hình ung thư tại Việt Nam	6
1.2. Tổng quan về liệu pháp miễn dịch trong điều trị ung thư	7
1.2.1. Lịch sử của liệu pháp miễn dịch ung thư.....	7
1.2.2. Đặc điểm của miễn dịch ung thư	8
1.2.3. Phân loại liệu pháp miễn dịch trong điều trị ung thư	9
1.2.3.1. Phân loại theo chức năng miễn dịch	9
1.2.3.2. Phân loại theo cơ chế hoạt động	10
1.3. Tình hình nghiên cứu liệu pháp tế bào miễn dịch hiện nay	12
1.3.1. Tình hình nghiên cứu liệu pháp tế bào miễn dịch trên thế giới.....	12
1.3.1.1. Liệu pháp tế bào DC vaccine	12
1.3.1.2. Liệu pháp tế bào miễn dịch biến đổi gen	13
1.3.1.3. Liệu pháp tế bào NK	15
1.3.1.4. Liệu pháp tế bào TIL.....	18
1.3.2. Tình hình nghiên cứu, ứng dụng liệu pháp tế bào miễn dịch tại Việt Nam	19
1.3.2.1. Liệu pháp tế bào DC	19
1.3.2.2. Liệu pháp tế bào CIK.....	20
1.3.2.3. Liệu pháp tế bào CTL và tế bào NK.....	21
1.3.2.4. Liệu pháp tế bào gamma delta T.....	21
1.3.2.5. Liệu pháp CAR-T	22
1.4. Tổng quan về tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK).....	22
1.4.1. Chức năng của tế bào NK	22
1.4.2. Đặc điểm của tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK).....	23
1.4.2.1. Đặc điểm chung	23

1.4.2.2. Quần thể tế bào NK CD56 ^{bright} thường trú trong mô	25
1.4.2.3. Quần thể tế bào NK máu dây rốn.....	27
1.4.3. Các thụ thể bề mặt của tế bào NK	28
1.4.3.1. Vai trò của các thụ thể	28
1.4.3.2. Thụ thể giống immunoglobulin trên tế bào NK (KIR)	30
1.4.4. Mô hình huấn luyện và nhận diện tế bào ung thư của tế bào NK	31
1.4.4.1. Mô hình huấn luyện NK	31
1.4.4.2. Tương tác tế bào NK và tế bào ung thư.....	32
1.4.5. Các nguồn thu nhận và các phương pháp hoạt hóa tế bào NK.....	33
1.4.5.1. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi.....	34
1.4.5.2. Tế bào gốc NK phân lập từ tế bào gốc phôi hoặc tế bào iPSC	34
1.4.5.3. NK phân lập từ CD34+ tủy xương và máu dây rốn.....	35
1.4.5.4. Các dòng tế bào NK thương mại	36
1.4.6. Ghép đồng loại tế bào diệt tự nhiên (NK) trong trị liệu ung thư.....	36
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	39
2.1. Địa điểm, thời gian và đối tượng nghiên cứu.....	39
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	39
2.2.1. Thu thập mẫu	39
2.2.2. Phương pháp phân lập tế bào đơn nhân bằng hệ thống AXP	40
2.2.3. Phương pháp phân lập MNC bằng ly tâm sử dụng ficoll	40
2.2.4. Phân tích các dấu ấn bề mặt bằng phương pháp dòng chảy tế bào	41
2.2.5. Phương pháp nhân nuôi tế bào NK.....	42
2.2.6. Phương pháp nuôi cấy và bảo quản dòng tế bào K562	43
2.2.7. Phương pháp nhân nuôi tế bào KHYG-1.....	44
2.2.8. Phương pháp đánh giá hoạt tính tế bào NK.....	45
2.2.9. Phương pháp phân tích nhiễm sắc thể đồ (karyotyping)	48
2.2.10. Phương pháp xác định nội độc tố endotoxin	50
2.2.11. Phương pháp xét nghiệm mycoplasma	51
2.2.12. Phương pháp xác định tỉ lệ sống tế bào bằng trypan blue	52
2.2.13. Phương pháp đếm số lượng tế bào có nhân bằng thuốc nhuộm Turk's	53
2.2.14. Phương pháp lưu trữ đông lạnh tế bào.....	54
2.2.15. Xác định hiệu suất thu hồi tế bào đơn nhân.....	54
2.2.16. Phân tích thống kê số liệu.....	54

3.1. Thu thập máu dây rốn.....	56
3.1.1. Kết quả thu thập máu dây rốn.....	56
3.1.2. Đặc điểm của các đơn vị máu dây rốn thu thập.....	58
3.1.3. Số lượng tế bào gốc tạo máu trong máu dây rốn.....	62
3.1.4. Kết quả phân tách tế bào đơn nhân máu dây rốn.....	64
3.2. Mẫu máu ngoại vi.....	67
3.2.1. Đặc điểm của bệnh nhân.....	67
3.2.2. Mẫu máu ngoại vi thu thập.....	68
3.3. Đặc điểm quần thể tế bào máu dây rốn.....	69
3.3.1. Tỷ lệ các loại tế bào miễn dịch (T-B-NK) trong máu dây rốn.....	69
3.3.2. Mối tương quan giữa các quần thể tế bào miễn dịch và tế bào gốc tạo máu.....	80
3.4. Nuôi cấy chọn lọc và tăng sinh NK máu ngoại vi.....	83
3.5. Nuôi cấy chọn lọc và tăng sinh NK máu dây rốn.....	86
3.5.1. Lựa chọn môi trường nuôi cấy.....	86
3.5.2. Lựa chọn thời gian nuôi cấy.....	88
3.5.3. Hình thái tế bào trong quá trình nuôi cấy.....	88
3.5.4. Quần thể tế bào NK (CD3-/CD56+) nuôi cấy chọn lọc.....	90
3.5.4.1. Sự thay đổi kiểu hình miễn dịch của quần thể tế bào NK máu dây rốn trong quá trình nuôi cấy.....	90
3.5.4.2. Hiệu quả nuôi cấy chọn lọc NK.....	93
3.5.5. Kiểu hình miễn dịch của các quần thể tế bào khác trong quá trình nuôi cấy.....	94
3.5.5.1. Kiểu hình quần thể HSC.....	94
3.5.5.2. Tính chọn lọc của môi trường nuôi cấy tế bào NK.....	95
3.5.6. Sự thay đổi về số lượng tế bào nuôi cấy.....	96
3.5.7. Thời gian nhân đôi của tế bào.....	103
3.6. Hoạt tính của tế bào NK máu dây rốn sau nuôi cấy.....	105
3.6.1. Sự biểu hiện các dấu ấn hoạt hóa trên tế bào NK.....	105
3.6.2. Hoạt tính tiêu diệt dòng tế bào ung thư K562 của tế bào NK sau nuôi cấy.....	107
3.7. Đánh giá tỷ lệ sống tế bào NK sau rửa đông.....	110
3.8. Chất lượng khối tế bào NK sau tăng sinh, hoạt hóa.....	111

3.8.1. Một số tiêu chuẩn dành cho khối tế bào NK nuôi cấy sử dụng cho lâm sàng	111
3.8.2. Đánh giá nhiễm sắc thể đồ tế bào NK sau nuôi cấy	113
3.8.2. Hàm lượng nội độc tố (endotoxin)	114
3.8.3. Mycoplasma.....	115
3.8.4. Kiểm tra vi khuẩn	115
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	117
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	119
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	120
PHỤ LỤC	I

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

Ab	Antibody_Kháng thể
ACT	Adoptive cell therapy_Liệu pháp tế bào
ADCC	Antibody-dependent cytotoxic cell_ Gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể
Ag	Antigen_Kháng nguyên
AML	Acute myeloid leukemia_ Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính
APC	Antigen presenting cell_ Tế bào trình diện kháng nguyên
aAPC	Artificial antigen presenting cell_ Tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo
BM	Bone marrow_ Tủy xương
CAR	Chimeric antigen receptor_ Thể kháng nguyên khảm
CAR-T	Chimeric antigen receptor T cell_ Thể kháng nguyên khảm tế bào T
CB	Cord blood_ Máu dây rốn
CD	Cluster of differentiation_ Cụm phân tử biệt hóa
cGMP	Current good manufacturing practice_ Thực hành sản xuất tốt hiện hành
CMV	Cytomegalovirus
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte_ Tế bào T độc
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CSC	Cancer stem cells_ Tế bào gốc ung thư
DCs	Dendritic cells_ Tế bào tua gai
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EPC	Endothelial progenitor cell_ Tế bào gốc nội mô
FBS	Fetal Bovine Serum_ Huyết thanh thai bò
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor_ Yếu tố kích thích bạch cầu hạt
GvHD	Graft-versus-host disease_ Bệnh thải ghép
hESC	Human embryonic stem cells_ Tế bào gốc phôi người
HIV	Human immunodeficiency virus_ Vi rút gây suy giảm hệ miễn dịch người

HLA	Human leukocyte antigen_ Kháng nguyên bạch cầu người
HSC	Hematopoietic stem cell_ Tế bào gốc tạo máu
iPSC	Induced pluripotent stem cells_ Tế bào gốc vạn năng cảm ứng
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptor_ Thụ thể giống như globulin miễn dịch của tế bào tiêu diệt
mAb	Monoclonal antibody_ Kháng thể đơn dòng
Max	Giá trị lớn nhất
Mean	Giá trị trung bình
Median	Trung vị
MHC	Major histocompatibility complex_ Phức hợp tương thích mô chính
MHC I	Major histocompatibility complex class I_ Phức hợp tương thích mô chính lớp 1
Min	Giá trị nhỏ nhất
MNC	Mononuclear cells_ Tế bào đơn nhân
N (n)	Number_ Số mẫu
NK	Natural killer_ Tế bào tiêu diệt tự nhiên
NKT	Natural killer T cell_ Tế bào lympho mang đặc điểm của cả tế bào T và NK
NCR	Natural cytotoxicity receptors_ Thụ thể gây độc tế bào tự nhiên
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells_ Tế bào đơn nhân máu ngoại vi
PBS	Phosphate-Buffered Saline_ Dung dịch đệm phosphat
PD-1	Programmed death-1_ Protein gây chết tế bào theo chương trình 1
SD	Standard Deviation_ Độ lệch chuẩn
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1_ Yếu tố có nguồn gốc tế bào mô đệm 1
TAA	Tumor-associated antigen_ Kháng nguyên khối u
TCR	T cell receptors_ Thụ thể tế bào T
TGF- β	Transforming growth factor beta_ Yếu tố tăng trưởng chuyển đổi beta

TME	Tumor microenvironment_ Vi môi trường khối u
TIL	Tumor-infiltrating lymphocyte_ Lympho bào xâm nhập khối u
Th	T helper cell_ Tế bào T hỗ trợ
TNC	Total nucleated cell_ Tổng số tế bào có nhân
TNF- α	Tumor Necrosis Factor Alpha_ Yếu tố hoại tử khối u alpha
Treg	Regulatory T cells_ Tế bào T điều hòa
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor_ Yếu tố tăng trưởng nội mạch
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor_ Thụ thể yếu tố tăng trưởng nội mạch
WBC	White blood cell_ Tế bào bạch cầu
Cs	Cộng sự
MDR	Máu dây rốn

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các thử nghiệm lâm sàng với tế bào NK không cải biến gen có nguồn gốc máu dây rốn	17
Bảng 2. 1. Sơ đồ bố trí thí nghiệm đánh giá hoạt tính	47
Bảng 3. 1. Tuổi sản phụ	56
Bảng 3. 2. Tỷ lệ giới tính của trẻ.....	57
Bảng 3. 3. Nhóm máu của trẻ.....	57
Bảng 3. 4. Cân nặng của trẻ	58
Bảng 3. 5. Yếu tố tuổi thai	58
Bảng 3. 6. Thể tích máu dây rốn thu thập	59
Bảng 3. 7. Tổng số tế bào có nhân (TNC) máu dây rốn	60
Bảng 3. 8. Tổng số tế bào đơn nhân (MNC) máu dây rốn.....	60
Bảng 3. 9. Tổng số tế bào đơn nhân (MNC) máu dây rốn theo nhóm tuổi thai.....	61
Bảng 3. 10. Tổng số HSC trung bình trong các đơn vị máu dây rốn thu thập.....	62
Bảng 3. 11. Số lượng trung bình HSC theo giới tính.....	62
Bảng 3. 12. Số lượng trung bình HSC theo thể tích máu dây rốn thu thập	62
Bảng 3. 13. Số lượng trung bình HSC theo nhóm máu	63
Bảng 3. 14. Số lượng trung bình HSC theo cân nặng trẻ.....	63
Bảng 3. 15. Số lượng trung bình HSC theo tuổi thai	63
Bảng 3. 16. Kết quả phân tách MNC bằng hai phương pháp	66
Bảng 3.17. So sánh đặc điểm của hai phương pháp phân tách MNC	67
Bảng 3.18. Đặc điểm của bệnh nhân ung thư	68
Bảng 3.19. Mối tương quan giữa số lượng tế bào nuôi cấy ban đầu theo giới tính, tuổi và loại ung thư (*p<0,05)	69
Bảng 3. 20. Tỷ lệ tế bào B theo cân nặng và tuổi thai	71
Bảng 3. 21. Tỷ lệ CD3+/CD19+ theo cân nặng và tuổi thai.....	72
Bảng 3.22. Tỷ lệ tế bào TCD4 theo cân nặng, giới tính và tuổi thai	73
Bảng 3. 23. Tỷ lệ TCD8 theo cân nặng, tuổi thai, giới tính.....	74
Bảng 3. 24. Tỷ lệ CD3+/CD4+/CD8+ theo cân nặng, tuổi thai và giới tính	75
Bảng 3.25. Tỷ lệ TCD4/TCD8 theo giới tính, tuổi thai và tuổi sản phụ.....	76
Bảng 3. 26. Tỷ lệ trung bình các quần thể tế bào NK.....	77

Bảng 3. 27. Tỷ lệ các quần thể tế bào NK theo giới tính, tuổi thai, cân nặng trẻ	78
Bảng 3. 28. Tỷ lệ NKT theo giới tính, tuổi thai và cân nặng	79
Bảng 3.30. Mối tương quan giữa số lượng HSC và các yếu tố khác	82
Bảng 3.31. Tương quan của các yếu tố với tỷ lệ NK	83
Bảng 3.32 Khối tế bào NK máu ngoại vi sau nuôi cấy	84
Bảng 3.33. Số lần thay đổi của quần thể tế bào	85
Bảng 3. 34. Tỷ lệ % NK thay đổi trong quá trình nuôi cấy	91
Bảng 3.35. Tỷ lệ quần thể tế bào NK (CD3-/CD56+) trước và sau nuôi cấy	93
Bảng 3. 36. Tỷ lệ HSC thay đổi trong quá trình nuôi cấy	95
Bảng 3. 37. Tỷ lệ các quần thể miễn dịch trước và sau nuôi cấy 21 ngày	96
Bảng 3. 38. Tổng số lượng tế bào và tế bào NK sau 21 ngày nuôi cấy	96
Bảng 3. 39. Thời gian nhân đôi trung bình của tế bào NK trong các mẫu	103
Bảng 3. 40. Thời gian nhân đôi tế bào NK trong các giai đoạn khác nhau	104
Bảng 3. 41. Hoạt tính của tế bào NK và KHYG tiêu diệt tế bào ung thư K562	107
Bảng 3. 42. Thông tin mẫu lưu trữ và rã đông đánh giá tỷ lệ sống	110
Bảng 3.43. Đánh giá các tiêu chí chất lượng sản phẩm NK theo tiêu chuẩn của FDA	116
Bảng 3. 44. Thành phần và vai trò các chất trong môi trường nuôi cấy tế bào NK BINKIT	VI

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Số lượng ước tính ca ung thư trên thế giới năm 2022.....	4
Hình 1.2. Số ca tử vong do ung thư năm 2022 trên toàn thế giới.....	5
Hình 1.3. Ước tính số ca ung thư mắc mới và tử vong đến năm 2050	5
Hình 1.4. Tỷ lệ mắc các loại ung thư tại Việt Nam năm 2022	6
Hình 1.5. Tỷ lệ tử vong ở một số loại ung thư tại Việt Nam năm 2022	7
Hình 1.6. Liệu pháp miễn dịch điều trị ung thư.....	11
Hình 1.7. Phân bố của tế bào NK trong máu và mô [78].....	25
Hình 1.8. Đặc điểm của quần thể CD56 bright trong các mô khác nhau.....	26
Hình 1.9. Chức năng hoạt hóa hoặc ức chế NK của các thụ thể.....	29
Hình 1.10. Cấu trúc và phối tử của các thụ thể của tế bào NK.....	30
Hình 1.11. Cấu trúc phân tử KIR	31
Hình 1.12. Các nguồn phân lập, tăng sinh tế bào NK [108].	36
Hình 2. 1. Quy tắc đếm tế bào trên buồng đếm	53
Hình 3. 1. Thể tích máu dây rốn thu thập ở trẻ nam và nữ	59
Hình 3. 2. Số lượng MNC trong máu dây rốn ở trẻ nam và nữ	61
Hình 3. 3. Phân tách tế bào bằng ly tâm tỉ trọng sử dụng ficoll.....	64
Hình 3. 4. Phân tách tế bào bằng hệ thống AXP.....	65
Hình 3. 5. Số lượng MNC thu được ở hai phương pháp xử lý	66
Hình 3. 6. Hiệu suất thu hồi MNC ở hai phương pháp	66
Hình 3. 7. Chiến lược phân tích quần thể tế bào T-B-NK	70
Hình 3. 8. Quần thể tế bào NK CD56 ^{dim} và CD56 ^{bright}	77
Hình 3. 9. Tỷ lệ quần thể các tế bào miễn dịch trong máu dây rốn	80
Hình 3.10. Quần thể tế bào NK máu ngoại vi trước và sau nuôi cấy	84
Hình 3. 11. Tốc độ tăng sinh của NK máu ngoại vi trong quá trình nuôi cấy	84
Hình 3.12. So sánh số lượng NK nuôi cấy trong các điều kiện môi trường khác nhau	87
Hình 3.13. Tỷ lệ NK sau 7 ngày nuôi cấy trong các điều kiện môi trường khác nhau	87
Hình 3. 14. Khảo sát số lượng tế bào trong 23-25 ngày nuôi cấy.....	88
Hình 3. 15. Sự thay đổi hình thái tế bào trong quá trình nuôi cấy	89

Hình 3. 16. Tỷ lệ % NK (CD3-/CD56+) trong quá trình nuôi cấy	90
Hình 3. 17. Kiểu hình miễn dịch quần thể tế bào NK máu dây rốn trong quá trình nuôi cấy	92
Hình 3. 18. Tỷ lệ quần thể tế bào NK trước và sau nuôi cấy	94
Hình 3. 19. Tỷ lệ HSC thay đổi trong quá trình nuôi cấy	94
Hình 3. 20. Tỷ lệ các quần thể miễn dịch trước và sau nuôi cấy 21 ngày	96
Hình 3. 21. Số lượng tế bào NK và tổng số lượng tế bào trong quá trình nuôi cấy .	97
Hình 3. 22. Số lần tăng tổng số lượng tế bào trong 21 ngày nuôi cấy (n=7)	98
Hình 3. 23. Số lượng tế bào NK (CD3-/CD56+) trong quá trình nuôi cấy (n=4).....	98
Hình 3. 24. Số lần tăng NK sau nuôi cấy trên hai nguồn tế bào khác nhau.....	102
Hình 3.25. Biểu hiện các marker hoạt hóa và ức chế trên tế bào NK sau nuôi cấy (n=3)	106
Hình 3. 26. Hoạt tính của NK nuôi cấy và KHYG với dòng tế bào K562	108
Hình 3. 27. Khả năng tiêu diệt tế bào ung thư K562 sau 3 giờ.....	108
Hình 3. 28. Tỷ lệ tế bào sống của tế bào NK nuôi cấy rã đông sau lưu trữ.....	111
Hình 3. 29. 46, XY không phát hiện bất thường của tế bào NK sau nuôi cấy (Mẫu 01)	113
Hình 3. 30. 46, XX không phát hiện bất thường của tế bào NK sau nuôi cấy (Mẫu 02)	114
Hình 3. 31. 46, XX không phát hiện bất thường của tế bào NK sau nuôi cấy (Mẫu 03)	114

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của nghiên cứu

Ung thư là một thách thức y tế toàn cầu và đòi hỏi những phương pháp điều trị ung thư mới hiệu quả hơn so với các hình thức điều trị truyền thống từ trước đến nay như phẫu thuật, xạ trị hay hóa trị. Trong những năm gần đây, liệu pháp miễn dịch (immunotherapy) trong điều trị ung thư thu hút sự quan tâm của nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới bởi tiềm năng trị liệu lớn, linh hoạt và khả năng khắc phục các tồn tại, hạn chế của phương pháp điều trị truyền thống. Trong đó đáng chú ý là liệu pháp tế bào miễn dịch. Nguyên lý của liệu pháp này là tách các tế bào miễn dịch từ cơ thể người cho, sau đó nuôi cấy chọn lọc và tăng sinh cá thể bào miễn dịch để truyền lại chính cơ thể người bệnh (ghép miễn dịch tự thân – autologous immune cells therapy) hoặc người nhận phù hợp (ghép miễn dịch đồng loài - allogeneic immune cells therapy), hoặc các tế bào này được cải biến gen, làm tăng số lượng rồi truyền trở lại vào cơ thể của bệnh nhân (liệu pháp cải biến gen – immune cells gene therapy). Liệu pháp này có thể sử dụng nhiều loại tế bào miễn dịch khác nhau như tế bào giết tự nhiên NK (Natural killer cells), tế bào T gây độc CTL (Cytotoxic T cells), tế bào CIK (Cytokine-induced killer cells), tế bào tua DC (Dendritic Cells), tế bào T chứa kháng nguyên thể khảm CAR-T (Chimeric Antigen Receptor T), tế bào NK chứa kháng nguyên thể khảm CAR-NK (Chimeric Antigen Receptor NK) ...[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 trực tiếp và gián tiếp thông qua nhiều con đường khác nhau. Các nghiên cứu lâm sàng và thực nghiệm đã chỉ ra vai trò quan trọng của các tế bào NK trong sự phát triển của ung thư, đặc biệt khi hoạt tính của các tế bào NK trong máu ngoại vi bị suy giảm cũng đồng nghĩa với nguy cơ mắc ung thư tăng lên ở người trưởng thành [1, 4].

Một điểm đang lưu ý là, 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. Điều này là do nếu tế bào ung thư của người bệnh vẫn biểu hiện các phân tử Phức hợp tương thích mô chính lớp 1 (MHC-I_ Major histocompatibility complex class I) như các tế bào thường, các phân tử này sẽ kết hợp với các thụ thể ức chế của tế bào NK và làm giảm hoặc thậm chí ức chế sự hoạt hóa các tế bào diệt tự nhiên. Để khắc phục nhược điểm này, trong những năm gần đây liệu pháp ghép tế bào NK đồng loài được tập trung nghiên cứu và thử nghiệm lâm sàng với nhiều ưu điểm như ít gây bệnh thải ghép (GVHD_ Graft-versus-host disease), các tế bào NK từ người cho khỏe mạnh hoặc từ máu dây rốn không bị tác động giảm hoạt tính miễn dịch bởi sự có mặt của tế bào ung thư của người nhận, đặc biệt khi không có sự phù

hợp (mismatch) giữa phối tử giống như globulin miễn dịch của tế bào tiêu diệt KIR-L (Killer cell immunoglobulin-like ligand) và thụ thể KIR (Killer cell immunoglobulin-like receptor) ở người cho và người nhận sẽ tăng hiệu quả điều trị ung thư lên rõ rệt, đặc biệt ở các bệnh ung thư máu.

Một trong những vấn đề đặt ra của liệu pháp ghép tế bào NK đồng loài đó là tìm kiếm người cho phù hợp và một phương pháp nhân nuôi tế bào NK bên ngoài cơ thể (*ex vivo*) hiệu quả để cung cấp một lượng tế bào đủ lớn phục vụ cho điều trị. Do đó, tế bào máu dây rốn chính là một nguồn thay thế đầy tiềm năng để cung cấp các tế bào miễn dịch cho liệu pháp tế bào NK đồng loài. Ưu điểm chính của sử dụng nguồn cung cấp này đó là:

- Dễ dàng thu thập và bảo quản lạnh;
- Thời gian tìm kiếm người cho phù hợp nhanh chóng hơn so với nguồn máu từ người cho trưởng thành khi đã có sẵn cơ sở dữ liệu kháng nguyên bạch cầu người HLA (Human leukocyte antigen) trước khi lưu trữ và bảo quản;
- GVHD cũng rất thấp khi sử dụng các tế bào NK nhân nuôi từ máu dây rốn;
- Khả năng tồn tại của NK trong máu người nhận cao hơn;
- Trong máu dây rốn chứa quần thể tế bào NK đầu dòng mà bình thường không xuất hiện (hoặc có rất ít) trong máu ngoại vi;
- Sự biểu hiện mạnh thụ thể CXCR4, một thụ thể hướng đích đến tủy xương, sẽ giúp tế bào NK từ máu dây rốn có khả năng tập trung về tủy xương nhiều hơn so với tế bào NK từ máu ngoại vi. Đặc điểm này rất có ý nghĩa trong việc sử dụng tế bào NK máu dây rốn để điều trị các dạng ung thư máu dòng tủy [5, 6].

Để giải quyết những vấn đề thực tiễn trên, đề tài nghiên cứu được thực hiện: ***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.***

Nghiên cứu được thực hiện tại bệnh viện đa khoa quốc tế Vinmec Times City từ tháng 7/2017 đến 7/2021 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.

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 cuống rốn, bao gồm các đặc điểm về số lượng tế bào, tỉ lệ tế bào gốc tạo máu (HSC_ Hematopoietic stem cell) và các loại tế bào miễn dịch trong máu cuống rốn và các mối tương quan giữa chúng. Nghiên cứu cung cấp các đặc điểm và sự thay đổi của các thông số số lượng tế bào, tỉ lệ các quần thể tế bào miễn dịch và đặc biệt là tế bào NK trong quá trình nuôi cấy

tăng sinh.

Nghiên cứu cung cấp các đặc điểm của tế bào NK sau nuôi cấy, hoạt hóa, bao gồm sự biểu hiện dấu ấn hoạt hoá, ức chế và khả năng tiêu diệt tế bào ung thư.

*** 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 sự phong phú của các loại tế bào gốc, tế bào miễn dịch trong máu cuống 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 cuống rốn trong tương lai.

3. Mục tiêu của nghiên cứu

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 cuống rốn trẻ sơ sinh Việt Nam, nhằm làm rõ hơn về vai trò của máu cuống 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 là một trong số ít các nghiên cứu 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 đối với việc xác định đặc tính của sản phẩm sinh học ngay từ giai đoạn thử nghiệm ban đầu như tiêu chí về định danh (21 CFR 610.14), tính vô khuẩn (21 CFR 610.12), tính tinh khiết (21 CFR 610.13), tính an toàn và tiềm năng.

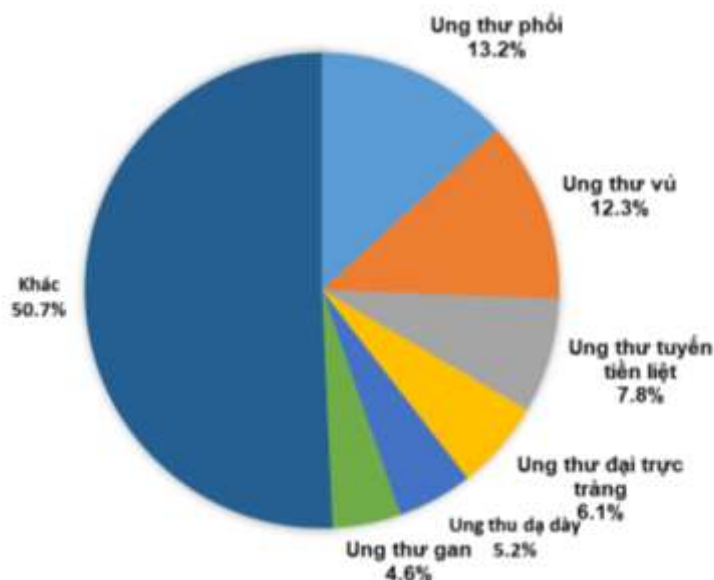
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

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. Ung thư phổi, tuyến tiền liệt, đại trực tràng, dạ dày và gan là những loại ung thư phổ biến nhất ở nam giới, trong khi ung thư vú, ung thư đại trực tràng, phổi, cổ tử cung và tuyến giáp là những bệnh phổ biến nhất ở phụ nữ. Gánh nặng ung thư tiếp tục gia tăng trên toàn cầu, gây căng thẳng về thể chất, tình cảm và tài chính đối với các cá nhân, gia đình, cộng đồng và hệ thống y tế. Nhiều hệ thống y tế ở các nước có thu nhập thấp và trung bình ít được chuẩn bị để quản lý gánh nặng này, và một số lượng lớn bệnh nhân ung thư trên toàn cầu không được tiếp cận với chẩn đoán và điều trị chất lượng kịp thời. Ở những quốc gia có hệ thống y tế mạnh, tỷ lệ sống sót ở nhiều loại ung thư đang được cải thiện nhờ khả năng phát hiện sớm, người bệnh có thể tiếp cận với chất lượng điều trị và chăm sóc phục hồi nâng cao.

Về số ca ung thư mắc mới, trong năm 2022, trên thế giới có tổng gần 19 triệu ca mắc ung thư mới, trong đó ung thư phổi chiếm tỉ lệ cao nhất 13,2% với gần 2,5 triệu ca, đứng thứ hai là ung thư vú với 12,3%, tương đương hơn 2,3 triệu ca và tiếp đó là ung thư tuyến tiền liệt (7,8%), ung thư đại trực tràng (6,1%), ung thư dạ dày (5,2%) và ung thư gan (4,6%) (Hình 1.1).

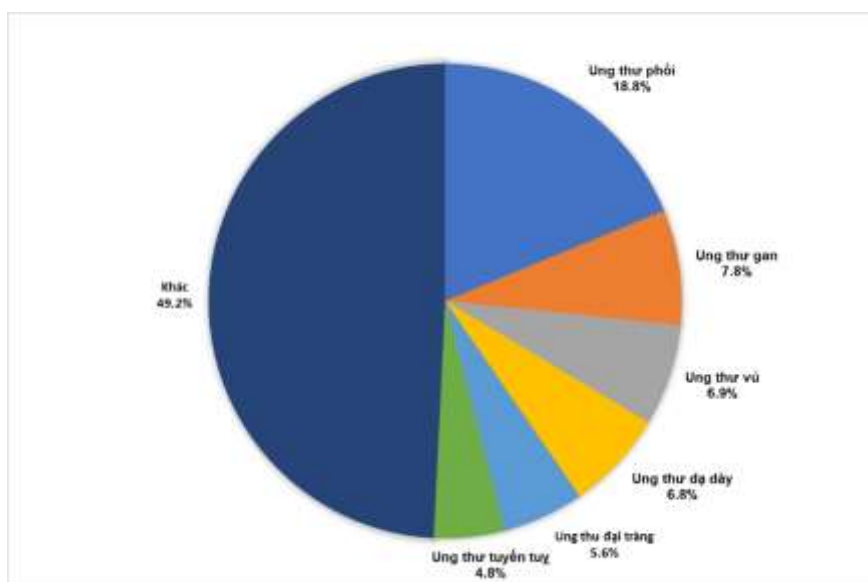


Hình 1.1. Số lượng ước tính ca ung thư trên thế giới năm 2022

(Nguồn: <https://www.iarc.who.int/>)

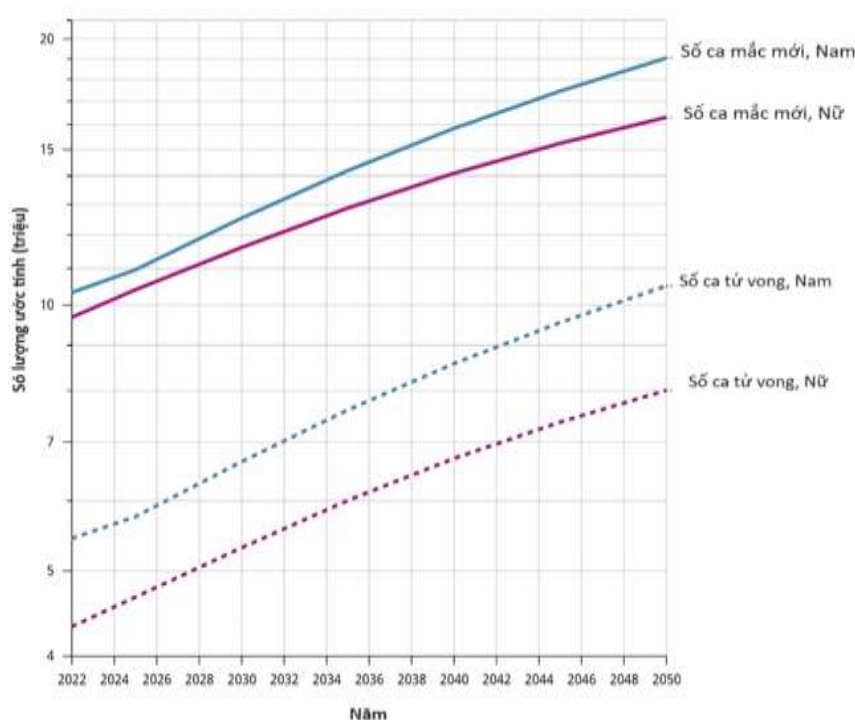
Trong khi đó, số lượng ca ung thư tử vong hàng năm trên thế giới chiếm hơn 50% so với số lượng ca mắc mới. Theo thống kê năm 2022, có hơn 9,6 triệu ca tử vong do ung thư trên toàn thế giới. Trong đó nguyên nhân hàng đầu là ung thư phổi

(18,8%), tiếp đến là ung thư gan (7,8%), ung thư vú (6,9%), ung thư dạ dày (6,8%), ung thư trực tràng (5,6%) và ung thư tuyến tụy (4,8%) (Hình 1.2).



Hình 1.2. Số ca tử vong do ung thư năm 2022 trên toàn thế giới
(Nguồn: <https://www.iarc.who.int/>)

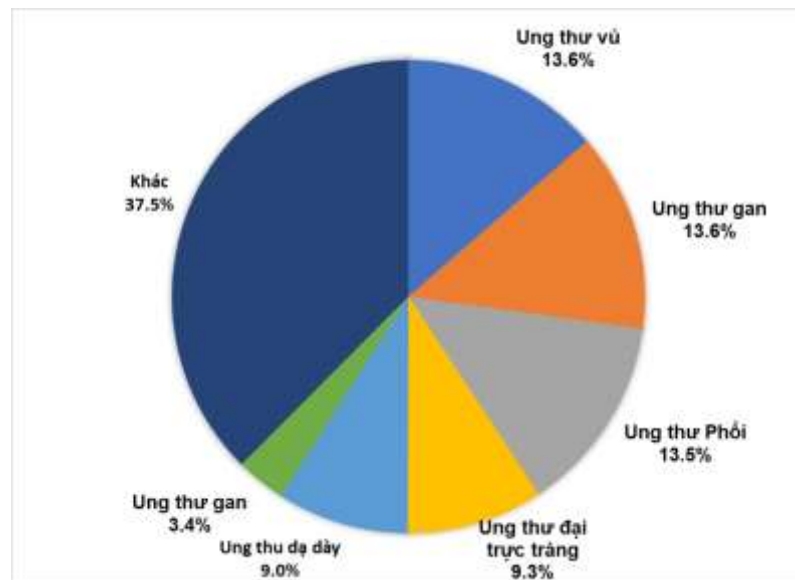
Cũng theo thống kê của Trung tâm nghiên cứu quốc tế về Ung thư (International Agency for Research on Cancer – IARC), số ca ung thư mắc mới, cũng như tử vong ngày càng tăng theo các năm. Dự báo, đến năm 2050, toàn thế giới sẽ có khoảng trên 35 triệu người mắc mới, và trên 18,5 triệu người tử vong mỗi năm do ung thư, trong đó số lượng các ca mắc mới và tử vong của nam giới cao hơn nữ giới (Hình 1.3).



Hình 1.3. Ước tính số ca ung thư mắc mới và tử vong đến năm 2050
(Nguồn: <https://www.iarc.who.int/>)

1.1.2. Tình hình ung thư tại Việt Nam

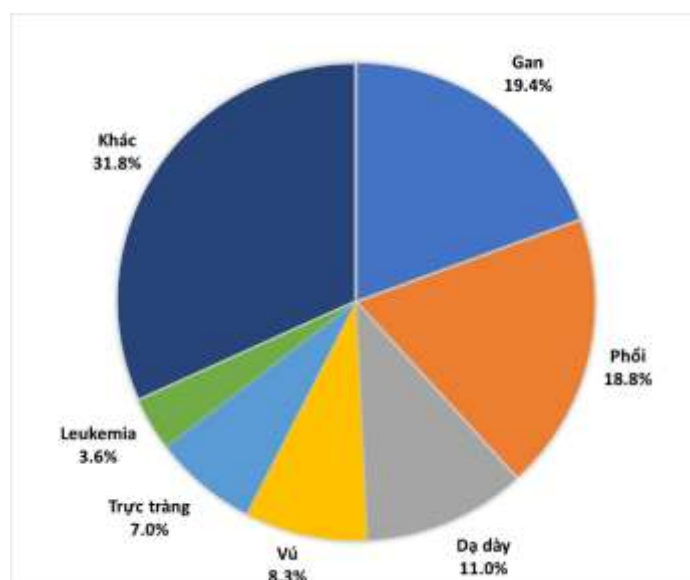
Theo thống kê của tổ chức Y Tế Thế giới WHO và số liệu của Trung tâm nghiên cứu quốc tế về Ung thư (International Agency for Research on Cancer – IARC), tỷ lệ ung thư tại Việt Nam đang không ngừng tăng lên. Cụ thể, vào năm 2000, Việt Nam có 68.000 ca mắc mới, đến năm 2010, số ca mắc đã lên đến 126.000 ca. Đặc biệt trong năm 2022 số ca mắc mới tăng lên hơn 180.000 ca trên tổng số 99.46 triệu dân và có khoảng hơn 120.000 ca tử vong. Đồng thời, cũng theo tổ chức này, 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. Trong đó, nam giới là những đối tượng có tỷ lệ mắc ung thư cao hơn nữ giới và thường gặp những loại ung thư như: ung thư gan, ung thư phổi do thói quen hút thuốc, uống nhiều rượu bia. Nữ giới cũng có tỷ lệ mắc ung thư phổi cao do hút thuốc lá bị động và một số bệnh ung thư phổ biến khác là ung thư vú, ung thư cổ tử cung... (Hình 1.4).



Hình 1.4. Tỷ lệ mắc các loại ung thư tại Việt Nam năm 2022

(Nguồn: <https://www.iarc.who.int/>)

Như vậy, ở Việt Nam, tình trạng bệnh nhân tử vong do bệnh ung thư rất cao, khoảng trên 60% và con số này cao hơn nhiều so với mặt bằng chung của thế giới, khoảng trên 50%. Đồng thời, cũng theo thống kê của Trung tâm nghiên cứu quốc tế về Ung thư trong năm 2022 ở Việt Nam, tỉ lệ người chết vì ung thư gan chiếm tỉ lệ cao nhất với 19,4%, tiếp theo là ung thư dạ dày (18,8%), sau đó lần lượt là ung thư vú (11%), ung thư trực tràng (8,3%), và ung thư máu leukemia (3,6%) (Hình 1.5).



Hình 1.5. Tỷ lệ tử vong ở một số loại ung thư tại Việt Nam năm 2022

(Nguồn: <https://www.iarc.who.int/>)

Ung thư đã trở thành vấn nạn của Quốc gia, và không chỉ được các nhà hoạch định chính sách, mà còn các nhà nghiên cứu, ứng dụng, điều trị bệnh và bệnh nhân đặc biệt quan tâm. Trước đây, bệnh ung thư ở nước ta được nghiên cứu chủ yếu dựa trên các đánh giá hình thái học về kích thước, tình trạng di căn hạch, loại mô học, độ mô học, ... Trong những năm gần đây, bên cạnh những tiên lượng kinh điển như trên, chúng ta đã có những bước tiến bộ vượt bậc trong đào tạo, nghiên cứu khoa học và điều trị. Nhiều kết quả đề tài nghiên cứu khoa học áp dụng các tiến bộ kỹ thuật mới hiện đại, nhằm nâng cao năng lực chẩn đoán, điều trị được triển khai áp dụng mang lại hiệu quả cao trong công tác khám chữa bệnh, điển hình như phương pháp hóa mô miễn dịch, kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ FISH, xét nghiệm dấu ấn bề mặt bằng flow cytometry, các xét nghiệm đột biến gen, giải trình tự gen...

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

1.2.1. Lịch sử của liệu pháp miễn dịch 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. Năm 1891, Tiến sĩ William Coley, được coi là “Cha đẻ của Liệu pháp Miễn dịch” đã phát hiện ra một số trường hợp bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh sarcoma phát triển thành viêm quầng do *Streptococcus pyogenes* gây ra, mà sau đó sarcoma có thể tự thuyên giảm trong thời gian dài hoặc tự biến mất. Sau đó ông bắt đầu tiêm vào khối u của bệnh nhân “độc tố hỗn hợp của Coley”, một hỗn hợp của *Streptococcus pyogenes* và *Serratia marcescens* sống bất hoạt. Ông đã đạt được các kết quả bao gồm sự tự thuyên giảm bệnh trong thời gian dài và biến mất hoàn toàn ở những bệnh nhân mắc các khối u ác tính khác nhau bao gồm sarcoma, ung thư hạch và ung thư

trình hoàn. Do những đáp ứng này chưa được hiểu rõ về cơ chế tác động và lo ngại về việc lây nhiễm vi khuẩn gây bệnh cho bệnh nhân, nên các phương thức điều trị khác như phẫu thuật, xạ trị và hóa trị vẫn trở thành phương pháp điều trị ung thư cơ bản cho đến nhiều thập kỷ sau đó [7-9].

Kể từ đó đến nay đã có hàng ngàn các nghiên cứu về mối liên quan giữa miễn dịch và ung thư được triển khai và đã có rất nhiều công nghệ mới được ứng dụng trong liệu pháp miễn dịch trên lâm sàng. Mặc dù vẫn chưa được coi là một phương pháp tiêu chuẩn, tuy nhiên 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 [10, 11].

1.2.2. Đặc điểm của miễn dịch ung thư

Có khoảng 20.000 sự kiện gây tổn hại DNA xảy ra với mỗi tế bào mỗi ngày, chúng thường xuyên được sửa chữa bằng các con đường sửa chữa DNA. Trong trường hợp các tế bào không cần thiết và /hoặc trở thành mối đe dọa, quá trình chết của tế bào theo chương trình hay còn gọi là *apoptosis* sẽ xảy ra để ngăn chặn sự tăng sinh của các tế bào này. Dấu hiệu nhận biết của tế bào ung thư là sự tăng sinh không kiểm soát được của các tế bào đột biến hoặc bất thường, lây lan trong cơ thể và xâm lấn các mô, cơ quan khỏe mạnh. Sự phát triển và tiến triển của ung thư xảy ra thông qua tám quá trình, bao gồm sinh sôi bền vững, trốn tránh các chất ức chế phát triển, chống lại quá trình chết tế bào, sự nhân bản bất tử, hình thành mạch, di căn, sự trao đổi chất được lập trình lại, và cuối cùng là tránh được sự phá hủy của hệ miễn dịch. Sự trốn tránh khỏi sự phá hủy miễn dịch đã được nghiên cứu trong nhiều thập kỷ [7].

Năm 1909, Paul Erlich đã phát triển một giả thuyết rằng các khối u có thể được kiểm soát bởi hệ thống miễn dịch. Năm 1957, Thomas và Burnet lần đầu tiên đề xuất lý thuyết giám sát miễn dịch ung thư, cho rằng các tế bào lympho hoạt động như những người bảo vệ chịu trách nhiệm xác định và loại bỏ các tế bào đã trải qua đột biến và khác với các tế bào khỏe mạnh. Các bằng chứng hỗ trợ và công nghệ để thực hiện nghiên cứu vào giai đoạn đó còn thiếu, và do đó, một lần nữa đã có sự chậm trễ trong việc kiểm tra mối liên hệ giữa các tế bào ung thư và hệ thống miễn dịch. Các nghiên cứu đánh giá tỷ lệ mắc bệnh ung thư ở những bệnh nhân bị ức chế miễn dịch liên quan đến bệnh, chẳng hạn như HIV và AIDS, hoặc những bệnh nhân sau ghép bằng liệu pháp ức chế miễn dịch miễn tính đã cung cấp bằng chứng hỗ trợ sự tồn tại và tầm quan trọng của việc giám sát miễn dịch. Từ giữa những năm 1970 đến những năm 1980, lại có một phong trào nghiên cứu về giám sát miễn dịch ung thư. Tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK) được phát hiện vào thời điểm đó đã tạo ra sự chú ý cho các

nhà khoa học, và lúc đó họ chưa có một định nghĩa chính xác và hiểu rõ về tế bào NK. Ngày nay, người ta biết rằng các tế bào ung thư có thể được hệ thống miễn dịch nhận biết vì sự khác biệt sinh hóa trong tế bào ung thư với tế bào tự bình thường. Trong giai đoạn ban đầu, các tế bào miễn dịch tiêu diệt các tế bào khối u và sau đó là thời kỳ khi các tế bào ung thư thông qua các cơ chế khác nhau có thể trốn tránh sự đào thải, tiêu diệt, nhận diện của hệ thống miễn dịch. Giám sát miễn dịch (*immunosurveillance*) là thuật ngữ dùng để mô tả quá trình các tế bào của hệ thống miễn dịch tìm kiếm và nhận diện các tác nhân gây bệnh lạ, chẳng hạn như vi khuẩn, vi rút, hoặc các tế bào tiền ung thư và ung thư trong cơ thể [7, 8].

Trong liệu pháp miễn dịch ung thư, mục tiêu không chỉ là trực tiếp tiêu diệt các tế bào ung thư mà còn là tác động đến các tế bào miễn dịch của cơ thể, làm tăng cường khả năng tấn công của các tế bào này trong trận đánh tiêu diệt tế bào ác tính [11-13]. Hệ miễn dịch đóng một vai trò quan trọng trong các cơ chế bảo vệ của cơ thể, không chỉ chống lại sự xâm nhiễm các vi sinh vật, hệ miễn dịch còn tham gia vào sự điều hòa và kiểm soát sự hình thành các khối u [14]. Các tế bào miễn dịch giống như những người lính rà soát, kiểm tra tất cả các mô để phát hiện và loại bỏ các tế bào ác tính khi chúng mới hình thành, trước cả khi chúng tạo thành các khối u nhỏ. Hệ miễn dịch bao gồm các tế bào miễn dịch đáp ứng và bẩm sinh đóng vai trò quan trọng trong việc thâm nhập vào vi môi trường khối u (TME - Tumor microenvironment) và điều tiết sự phát triển của khối u [15]. Các phản ứng miễn dịch hiệu quả có thể loại trừ được tận gốc tế bào ung thư ác tính hoặc làm thay đổi tình trạng và chức năng của chúng. Tuy nhiên, một khía cạnh khác, các tế bào ung thư có thể lẩn tránh hệ miễn dịch bằng nhiều con đường khác nhau, ví dụ như làm giảm quá trình trình diện kháng nguyên, gia tăng các cơ chế điều hòa ức chế hoặc làm giảm hoạt động miễn dịch [14, 15]. Khi hệ miễn dịch của cơ thể không hoạt động tốt, hóa trị và xạ trị không thể tiêu diệt tế bào ung thư một cách hiệu quả, liệu pháp miễn dịch được ứng dụng để đẩy mạnh cơ chế bảo vệ tự nhiên của cơ thể để chống lại các tế bào ung thư.

1.2.3. Phân loại liệu pháp miễn dịch trong điều trị ung thư

1.2.3.1. Phân loại theo chức năng miễn dịch

Liệu pháp miễn dịch được định nghĩa là việc sử dụng các vật liệu giúp tăng cường hoặc thiết lập lại khả năng phòng ngừa và chống lại bệnh tật của hệ thống miễn dịch. Mục tiêu của liệu pháp miễn dịch là cân bằng hệ thống miễn dịch để loại bỏ tế bào ung thư trong khi không tạo ra các phản ứng viêm tự miễn không được kiểm soát dẫn đến hạn chế trong điều trị của liệu pháp miễn dịch [11-13]. Hệ miễn dịch bẩm sinh bị giới hạn trong việc giải phóng các cytokine có chức năng kích thích các tế bào

miễn dịch khác bắt đầu phản ứng miễn dịch không đặc hiệu. Do đó hệ thống miễn dịch thích ứng đóng một vai trò đặc biệt quan trọng trong phản ứng miễn dịch đối với tế bào ung thư vì khả năng nhắm đích đặc hiệu vào các kháng nguyên lạ (non-self) [7, 8].

Dựa trên những đặc điểm cơ bản này, đã có nhiều phương pháp trị liệu miễn dịch khác nhau được phát triển, như vaccine, kháng thể đơn dòng và chất ức chế điểm kiểm soát (checkpoint inhibitor)...nhằm mang lại hiệu quả điều trị cao hơn, mỗi phương pháp lại có cơ chế và đích tác động khác nhau. Và để phân loại, thông thường, chúng được chia thành hai nhóm chính: liệu pháp miễn dịch chủ động và liệu pháp miễn dịch thụ động.

- Liệu pháp miễn dịch chủ động là sự kích thích hệ thống miễn dịch của người bệnh nhận biết và trực tiếp tấn công các tế bào lạ, đồng thời tạo trí nhớ miễn dịch và đáp ứng miễn dịch lâu dài, ví dụ như tiêm vắc xin ung thư (oncolytic vaccine) hoặc tiếp xúc với kháng nguyên khối u.
- Liệu pháp miễn dịch thụ động, là việc bổ sung các kháng thể hoặc các tế bào miễn dịch vào cơ thể người bệnh, tạo ra các đáp ứng miễn dịch cụ thể, nhanh chóng, tuy nhiên hiệu lực ngắn và không tạo trí nhớ miễn dịch, do đó cần phải sử dụng thường xuyên, ví dụ như các kháng thể đơn dòng, truyền huyết thanh,...

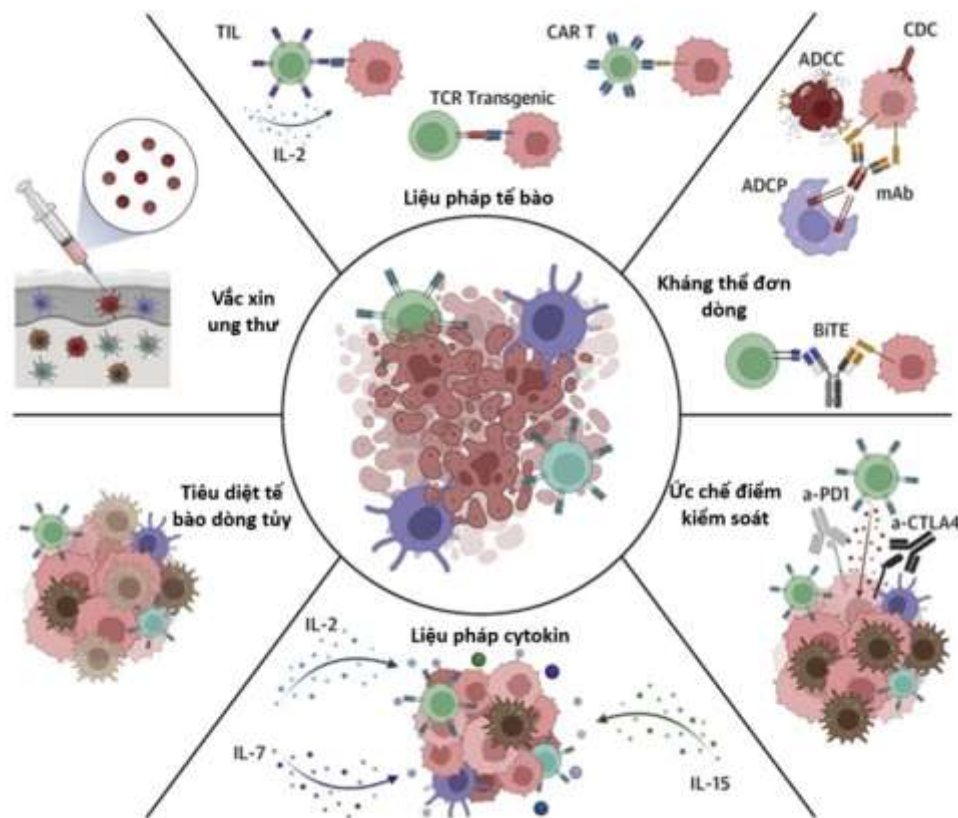
1.2.3.2. Phân loại theo cơ chế hoạt động

Theo cơ chế hoạt động cũng như ảnh hưởng của các tác nhân, có thể phân loại liệu pháp miễn dịch thành các phân nhóm sau:

- **Liệu pháp tế bào** (Adoptive cell therapy): liệu pháp này đề cập đến việc sử dụng chính các tế bào của hệ miễn dịch trong cơ thể để tiêu diệt ung thư, nhóm liệu pháp này bao gồm:
 - ❖ Liệu pháp tế bào Lympho xâm nhập khối u (Tumor-Infiltrating Lymphocyte-TIL)
 - ❖ Cải biến thụ thể tế bào T (Engineered T Cell Receptor -TCR)
 - ❖ Tế bào mang thụ thể kháng nguyên khảm: CAR- T, CAR-NK
 - ❖ Liệu pháp tế bào NK, tế bào T,...
- **Vắc xin ung thư** (Cancer vaccine): là một dạng liệu pháp đưa kháng nguyên vào cơ thể có thể huấn luyện hệ miễn dịch nhận diện và tiêu diệt đặc hiệu các tế bào ung thư. Các kháng nguyên này có thể là peptide/protein, DNA/RNA, tế bào ung thư bất hoạt, hoặc tế bào tua gai (DC).
- **Điều hòa miễn dịch** (Immunomodulator): Liệu pháp sử dụng các chất điều hòa miễn dịch là các phân tử nằm trên các con đường điều chỉnh hoạt động của hệ thống miễn dịch nhằm tăng cường, ức chế hoặc điều chỉnh cân bằng

phản ứng miễn dịch trong cơ thể. Các phân tử này bao gồm các chất ức chế điểm kiểm soát, cytokine, chất chủ vận và chất bổ trợ.

- **Liệu pháp virus tiêu diệt ung thư (Oncolytic virus therapy):** là một dạng liệu pháp miễn dịch sử dụng vi rút biến đổi gen để lây nhiễm và tiêu diệt tế bào ung thư. Vi rút là các phân tử chỉ lây nhiễm hoặc xâm nhập vào tế bào ung thư, sau đó sử dụng bộ máy di truyền của tế bào để tạo ra các bản sao của chính chúng và sau đó lây lan sang các tế bào ung thư khác. Quá trình này đồng thời tiêu diệt các tế bào ung thư, đồng thời giải phóng các kháng nguyên khối u, từ đó kích thích hệ miễn dịch nhận diện và tiêu diệt các tế bào ung thư khác. T-VEC (Imlygic) là vi rút gây ung thư đầu tiên được FDA phê duyệt năm 2015 và hiện nay, nhiều loại virus gây ung thư khác cũng đã được ra đời để điều trị một số loại ung thư như gan, phổi, u não, đại trực tràng...
- **Kháng thể đơn dòng (Mono-antibodies)** loại kháng thể được thiết kế đặc biệt trong phòng thí nghiệm để nhận diện và gắn chính xác vào một mục tiêu cụ thể (thường là kháng nguyên trên tế bào ung thư hoặc tác nhân gây bệnh) nhằm điều trị bệnh một cách chọn lọc. Phương pháp này bao gồm kháng thể đơn dòng, kháng thể mang thuốc, kháng thể đặc hiệu kép.



Hình 1.6. Liệu pháp miễn dịch điều trị ung thư [16]

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

Với những tiến bộ trong sự hiểu biết về tế bào ung thư và cơ chế phân tử cũng như chu trình hoạt động tế bào miễn dịch điều chỉnh các đáp ứng miễn dịch, liệu pháp miễn dịch đã được phát triển để điều trị các dạng ung thư huyết học cũng như các khối u rắn. Trong các phương pháp tiếp cận thụ động/thích ứng, các tế bào T và NK biến đổi gen hoặc không biến đổi gen được sử dụng, còn trong các liệu pháp miễn dịch chủ động lại sử dụng tế bào B, tế bào tua gai (Dendritic cell-DC) và đại thực bào (Macrophage) để tạo ra phản ứng miễn dịch chống lại các khối u [17]. Các chất ức chế điểm kiểm tra (checkpoint inhibitor) và kháng thể đơn dòng (mAbs) là những công cụ mạnh mẽ trong điều trị ung thư, đặc biệt là ở giai đoạn tiến triển và di căn cũng được sử dụng kết hợp. Nguyên lý của liệu pháp tế bào miễn dịch là kích thích, huấn luyện các tế bào của hệ thống miễn dịch để loại bỏ các tế bào ung thư. Mặc dù đã có rất nhiều tiến bộ gây chú ý, nhưng việc áp dụng liệu pháp miễn dịch trong điều trị ung thư vẫn là một thách thức do có sự tồn tại của các tế bào gốc ung thư (cancer stem cell – CSC). Các tế bào CSC này có khả năng thoát khỏi sự kiểm soát của hệ thống miễn dịch bằng các cơ chế khác nhau. Một trong các cơ chế đó là làm suy yếu và điều hòa quá trình trình diện kháng nguyên, điều hòa hoạt động của tế bào miễn dịch, giải phóng và biểu hiện của các yếu tố và thụ thể ức chế miễn dịch,...[18, 19].

1.3.1.1. Liệu pháp tế bào DC vaccine

Tế bào DC là tế bào trình diện kháng nguyên, chúng trình diện thông qua phân tử Phức hợp tương thích mô chính lớp 2 (MHC-II_ Major histocompatibility complex class II). Kết quả của quá trình này là các phản ứng miễn dịch bẩm sinh và thích ứng thông qua các tế bào TCD4 và TCD8. Việc các tế bào DC mang kháng nguyên khối u (TAA_ Tumor-associated antigen) sẽ dẫn đến việc kích hoạt tế bào T, hình thành khả năng miễn dịch chống lại kháng nguyên khối u và loại bỏ tế bào ung thư ở người bệnh [20, 21]. Trong các mô hình động vật mắc ung thư hắc tố D5 và ung thư tế bào vảy SCC7, Hu và cộng sự đã công bố kết quả nghiên cứu và chỉ ra rằng việc tiêm vắc-xin tế bào DC được cảm ứng với tế bào gốc ung thư biểu hiện ALDH^{cao} sau phẫu thuật cắt bỏ u, kết hợp với liệu pháp kháng thể đơn dòng PD-L1 đã cho thấy có hiệu quả trong việc giảm tái phát khối u, giảm di căn đến phổi và tăng khả năng sống sót của vật chủ [22]. Đáng chú ý, sự kết hợp giữa vắc-xin DC được cảm ứng tế bào gốc ung thư với PD1 và CTLA-4 trong các mô hình khối u ác tính ở chuột, Zheng và cộng sự đã chứng minh rằng liệu pháp phối hợp trên không chỉ thúc đẩy các phản ứng của tế bào T chống lại tế bào CSC và ức chế giải phóng yếu tố tăng trưởng chuyển đổi beta (TGF- β _ Transforming growth factor beta) mà còn tiêu diệt tế bào gốc ung thư

tốt hơn [23]. Trong một thí nghiệm gần đây hơn về bệnh ung thư vú, DC được cảm ứng với RNA tổng số của CSC có khả năng kích hoạt các tế bào T dẫn đến quá trình chết theo chu trình của các tế bào ung thư vú một cách hiệu quả. Tuy nhiên, nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, với các tế bào CSC biểu hiện nhiều kháng nguyên PD-L1 trên bề mặt có khả năng lẩn trốn khỏi sự tiêu diệt này. Nghiên cứu cho thấy tiềm năng sử dụng RNA của các tế bào gốc ung thư để cảm ứng DC, từ đó kích hoạt các phản ứng miễn dịch chống ung thư chống lại ung thư vú một cách hiệu quả hơn [24].

Năm 2022, Ian và cộng sự đã công bố kết quả nghiên cứu pha 1 thử nghiệm liệu pháp vaccine DC tự thân kết hợp với thuốc temozolomide trên 21 bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm sau hóa trị và xạ trị. Các bệnh nhân trải qua tối đa 12 chu kỳ điều trị với DC, mỗi chu kỳ kéo dài 28 ngày. DC vaccine tự thân được tiêm dưới da với liều $2 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$ tế bào mỗi chu kỳ. Kết quả cho thấy không gặp phải độc tính giới hạn liều vaccin. Thời gian sống sót không tiến triển trung bình là 9,7 tháng. Thời gian sống sót chung trung bình là 19 tháng. Tỷ lệ sống sót chung là 25% sau 2 năm và 10% sau 4 năm, một bệnh nhân vẫn không tiến triển bệnh sau 5 năm. Các phản ứng đặc hiệu của tế bào T CD8 đối với kháng nguyên gp100 liên quan đến khối u đã được quan sát thấy sau khi tiêm DC. Kết quả nghiên cứu cho thấy liệu pháp vắc xin DC là an toàn và có tính khả thi cao khi kết hợp với liệu pháp điều trị tiêu chuẩn cho những bệnh nhân mới được chẩn đoán [25].

Hiện trên thế giới các nghiên cứu lâm sàng về liệu pháp tế bào DC đang được tiến hành chủ yếu ở hai giai đoạn đầu (pha I và pha II), chủ yếu đánh giá tính an toàn, xác định liều vắc xin và tác động của vắc xin trong việc kích thích phản ứng miễn dịch tế bào và thể dịch. Do đó, cần có nhiều nghiên cứu lâm sàng chất lượng cao hơn trước khi đưa ra kết luận chung về hiệu quả lâm sàng của liệu pháp DC trong điều trị ung thư.

1.3.1.2. Liệu pháp tế bào miễn dịch biến đổi gen

Công nghệ biến đổi gene trên tế bào T để biến chúng thành tế bào CAR-T được phát triển đầu tiên vào năm 1987 tại Viện khoa học Weizmann ở Rehovot, Israel. Một trong những bước quan trọng nhất trong sự phát triển của nó là khi các nhóm nghiên cứu đã bắt đầu sử dụng các CAR được thiết kế để nhận diện kháng nguyên CD19 trên bề mặt của tế bào B, một đặc điểm phổ biến trong nhiều loại ung thư máu. Ngày nay, liệu pháp tế bào CAR chứng tỏ tiềm năng vượt trội trong số tất cả các chiến lược trị liệu miễn dịch chống ung thư. Công nghệ tạo CAR cũng có những tiến bộ vượt bậc, từ thế hệ CAR thứ nhất trước đây đến thế hệ thứ 4 hiện tại giúp phân tử CAR bền hơn, hoạt động hiệu quả hơn, tăng khả năng nhân rộng của tế bào; từ phân tử CAR nhắm đích CD19, đến nay, đích đến là rất nhiều phân tử khác như CD20,

CD5, CD7, CD22, CD133, CD70,... được ứng dụng trong điều trị nhiều loại ung thư; từ phân tử CAR nhận diện 1 kháng nguyên, đến nay, CAR có thể nhận diện 2 kháng nguyên giúp tăng cường hiệu suất và độ chính xác trong điều trị; các tế bào miễn dịch lựa chọn để cải biến có thể là tế bào T, tế bào NK, tế bào đại thực bào [26].

Gần đây các thử nghiệm về đích CD133+ và một số yếu tố khác được nghiên cứu cũng cho kết quả đầy triển vọng. Dữ liệu từ công bố mới đây về kết quả nghiên cứu tiền lâm sàng (pha 1 và II) liệu pháp CART-T nhắm mục tiêu CD133+ vào ung thư gan đã cho kết quả rất khả quan. Ở pha I, nghiên cứu đánh giá tính an toàn của liệu pháp. Trong pha II, nghiên cứu được thực hiện từ tháng 6 năm 2015 đến tháng 9 năm 2017 đánh giá thời gian sống không tiến triển bệnh (PFS) và thời gian sống sót (OS). Tổng có 21 bệnh nhân tham gia nghiên cứu, thời gian sống còn trung bình là 12 tháng (9,3-15,3 tháng, độ tin cậy 95%), thời gian sống không tiến triển bệnh trung bình là 6,8 tháng (4,3-8,4 tháng, độ tin cậy 95%). Trong đó, 1 bệnh nhân có đáp ứng một phần, 14 bệnh nhân có bệnh ổn định từ 2 đến 16,3 tháng và 6 bệnh nhân tiến triển sau khi truyền tế bào T. Tác dụng phụ cấp độ cao phổ biến nhất là tăng bilirubin máu. Kết quả tương quan với mức độ của yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu VEGF (Vascular endothelial growth factor), thụ thể VEGF hòa tan 2 (VEGFR2), yếu tố có nguồn gốc từ tế bào mô đệm SDF-1 (Stromal cell-derived factor 1) và số lượng tế bào gốc nội mô (EPC_Endothelial progenitor cell). Những thay đổi về số lượng EPC, VEGF, SDF-1, sVEGFR2 và IFN- γ (Interferon gamma) sau khi truyền tế bào có liên quan đến khả năng sống sót của bệnh nhân [27]. Không chỉ vậy, các nghiên cứu trước đó cũng chỉ ra rằng liệu pháp CAR-T CD133+ cũng rất triển vọng trong việc điều trị các loại ung thư dạng rắn khác như u nguyên bào thần kinh đệm, ung thư buồng trứng, ung thư dạ dày, ung thư vú, não, gan, đại trực tràng và ung thư tuyến tụy [28-31].

Khác với CAR-T, liệu pháp CAR-NK có những ưu điểm như chi phí thấp hơn, bệnh GVHD thấp hơn, tránh được các cơn bão cytokine, tế bào CAR-NK có tuổi thọ ngắn hơn tế bào T, dẫn đến giảm độc tính ngoài mục tiêu. Trong các nghiên cứu, nguồn để tạo CAR-NK có thể là máu dây rốn hoặc máu ngoại vi. Gần đây, liệu pháp tế bào CD33-CAR-NK-92 đã được sử dụng trong thử nghiệm lâm sàng đối với bệnh ung thư máu dòng tủy cấp – AML (Acute myeloid leukemia) tái phát/kháng trị (NCT02944162). Kết quả cho thấy liệu pháp an toàn và các tế bào CAR-NK có khả năng đáp ứng đặc hiệu với AML [32]. Một số nghiên cứu khác được triển khai trên nhóm bệnh nhân ung thư buồng trứng, đại trực tràng với dòng CAR – NK nhắm CD24, EpCAM cho kết quả cũng tương đối khả quan [33, 34]. Mặc dù những thử nghiệm lâm sàng với CAR-NK chưa có nhiều so với CAR-T, nhưng liệu pháp cũng

mang lại rất nhiều triển vọng trong điều trị ung thư, đặc biệt khi được kết hợp với các liệu pháp khác.

Gần đây, liệu pháp CAR cũng được ứng dụng trên tế bào đại thực bào (CAR-M), bởi chúng là nhân tố chính đóng vai trò miễn dịch bẩm sinh và là thành phần tham gia chính trong vi môi trường khối u (TME) bởi khả năng thâm nhập của chúng vào các tổn thương khối u. Các đại thực bào khối u có khả năng làm giảm khả năng ức chế hệ miễn dịch của vi môi trường khối u và tăng hiệu quả của liệu pháp miễn dịch. Dữ liệu từ nhiều nghiên cứu tiền lâm sàng đã xác nhận hiệu quả của liệu pháp miễn dịch dựa trên đại thực bào trong việc ức chế miễn dịch khối u, tuy nhiên, vẫn cần thực hiện nhiều nỗ lực để tối ưu hóa hiệu quả và độ an toàn của CAR-M trong điều trị lâm sàng [35, 36]. Klichinsky và cộng sự đã sử dụng các đại thực bào nguyên phát ở người và tạo ra CAR-M nhắm đích phân tử HER2. Các đại thực bào CAR (CAR-Ms) đã chứng minh khả năng thực bào đặc hiệu của kháng nguyên và làm sạch khối u trong phòng thí nghiệm. Trong cả mô hình chuột xenograft khối u rắn, và truyền CAR-M ở người đã cho thấy hiệu quả giảm kích thước, khối lượng của khối u và kéo dài thời gian sống của vật chủ. Trên mô hình thử nghiệm tiền lâm sàng, CAR-M cho thấy CAR-M biểu hiện các cytokine và chemokine gây viêm, chuyển đổi các đại thực bào M2 của người thành M1, giúp bộ máy trình diện kháng nguyên được điều hòa, thu hút và trình diện kháng nguyên cho các tế bào T và chống lại tác dụng của các cytokine ức chế miễn dịch. Chiến lược trị liệu miễn dịch CAR-M trong việc điều trị ung thư dạng rắn là một hướng đầy hứa hẹn cho nghiên cứu trong tương lai [37].

1.3.1.3. Liệu pháp tế bào NK

Khả năng gây độc của tế bào tự nhiên đối với khối u và các tế bào bị tổn thương đã được đề cập đến bởi các tác giả Herberman và Kiessling R. từ những năm 1975. Tác dụng gây độc tế bào của tế bào NK đồng loài đã được đánh giá trong các bệnh ung thư huyết học, trong khi cả tế bào NK đồng loài và tự thân đều có hiệu quả chống lại các khối u rắn. Các thí nghiệm trên mô hình ung thư vú, đại tràng, ung thư hắc tố và u nguyên bào thần kinh đệm cho thấy các tế bào NK được kích hoạt Interleukin 2 (IL-2) và/hoặc Interleukin 15 (IL-15) có thể xác định các tế bào gốc ung thư khối u rắn bằng cách liên quan đến cơ chế phụ thuộc vào thụ thể, cuối cùng dẫn đến loại bỏ tế bào gốc ung thư trong các khối u này [38-42].

Liệu pháp ghép tế bào NK tự thân điều trị ung thư được áp dụng và đem lại một số kết quả khả quan nhưng cũng tồn tại một số hạn chế. Các tế bào NK tách từ 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. Điều này là do các tế bào NK tự thân có thể bị ức chế

hoạt tính bởi chính sự biểu hiện của phân tử HLA tự thân trên các tế bào ung thư. Nếu tế bào ung thư của người bệnh vẫn biểu hiện các phân tử MHC lớp I như các tế bào thường, các phân tử này sẽ kết hợp với các thụ thể ức chế của tế bào NK và làm giảm hoặc thậm chí ức chế sự hoạt hóa các tế bào giết tự nhiên. Để khắc phục nhược điểm này, trong những năm gần đây liệu pháp ghép tế bào NK đồng loài được tập trung nghiên cứu và thử nghiệm lâm sàng. Trong việc ghép đồng loài, tiêu chí lựa chọn người hiến đặc biệt quan trọng vì nó ảnh hưởng đến toàn bộ kết quả của liệu pháp. Thông thường, ngoài yếu tố phù hợp HLA còn phải xác định phân tử KIR và phối tử của nó vì tính đa hình của chúng ảnh hưởng đến chức năng tế bào NK và kết quả lâm sàng [43].

Miller và cs. đã công bố kết quả đánh giá tính an toàn và hiệu quả điều trị khi sử dụng ghép tế bào NK đồng loài bán tương đồng (HLA-haploidentical) cho 19 bệnh nhân mắc AML tiên lượng kém (poor – diagnosis). Kết quả cho thấy 30 % bệnh nhân đã thuyên giảm hoàn toàn, đồng thời tế bào NK của người cho tồn tại trong máu ở những bệnh nhân này với một tỷ lệ cao hơn đáng kể so với các bệnh nhân còn lại [44]. Ruggeri và cộng sự tiến hành ghép tế bào NK bán tương đồng trên 51 bệnh nhân ung thư máu và ghép tế bào NK tương đồng trên 61 bệnh nhân ung thư máu cùng loại. Kết quả cho thấy tỷ lệ tái phát giảm hơn hẳn ở nhóm ghép bán tương đồng (3%) so với ghép tương đồng (47%) đồng thời tỷ lệ sống cũng tăng cao hơn ở nhóm bán tương đồng này [45]. Trong một nghiên cứu khác của Jeffrey E. và cộng sự trên 10 bệnh nhi mắc AML vừa kết thúc một đợt hóa trị, đang trong giai đoạn thuyên giảm bệnh, được điều trị bằng ghép NK đồng loài bán tương đồng không phù hợp KIR-HLA. Sau 14 ngày theo dõi không có biểu hiện của bệnh mảnh ghép chống chủ (GvGH – Graft versus host disease), không có tác dụng phụ nào được ghi nhận, tỷ lệ tế bào NK của người cho trong máu bệnh nhi cao đáng kể ở ngày thứ 14 sau ghép. Đồng thời trong 964 ngày theo dõi tất cả bệnh nhi đều duy trì tình trạng bệnh ở trạng thái thuyên giảm. Tất cả bệnh nhi đều có thời gian sống khỏi bệnh trên 2 năm [46]. Các kết quả thử nghiệm lâm sàng cho thấy phản ứng ghép của các tế bào NK đồng loài đối với bệnh nhân nhi bị ALL tốt hơn so với người trưởng thành bị ALL. Khả năng tái phát ALL ở bệnh nhân nhi cũng thấp hơn [47].

Với liệu pháp tế bào NK có nguồn gốc máu dây rốn và không trải qua cải biến di truyền, số lượng công bố cũng như thử nghiệm lâm sàng trên thế giới cũng chưa có nhiều, tuy nhiên với những kết quả nghiên cứu ban đầu, hứa hẹn liệu pháp này rất tiềm năng. Mới đây nhất, báo cáo của Yongxu và cộng sự về một trường hợp bệnh nhân nữ 52 tuổi được chẩn đoán mắc bệnh ung thư nội mạc tử cung giai đoạn IVB (T3N2M1). Bệnh nhân đã được điều trị hai đợt bằng liệu pháp miễn dịch tế bào NK

nguồn gốc máu dây rốn (CB-NK_Cord blood NK) từ tháng 3 đến tháng 9 năm 2022. Hai đơn vị máu dây rốn có tỷ lệ HLA 8/10 không khớp KIR đã được chọn nuôi cấy tăng sinh tế bào NK với hiệu suất cao ($>1,0 \times 10^{10}$ tế bào NK), độ tinh khiết ($>90\%$) và hoạt tính ($>80\%$). Kết quả cho thấy không có tác dụng phụ hoặc không quan sát thấy GVHD sau khi truyền tế bào CB-NK. Sau khi truyền, người bệnh được cải thiện chất lượng cuộc sống và giảm kích thước của các khối ở bụng và xương chậu cùng với sự biến mất của nhiều hạch bạch huyết di căn [48].

Bảng 1.1. Các thử nghiệm lâm sàng với tế bào NK không cải biến gen có nguồn gốc máu dây rốn [49]

Mã định danh thử nghiệm lâm sàng	Loại bệnh	Pha thử nghiệm	Số lượng bệnh nhân	Hình thức ghép	Ngày truyền NK	Thời gian triển khai	Nhà tài trợ
NCT03019640	B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma	Pha 2	40	Ghép tế bào gốc tạo máu (HSC) tự thân kết hợp hóa trị và tế bào NK	Ngày thứ 5 trước ghép		M.D. Anderson Cancer Center
NCT02280525	Leukemia, Lymphoma	Pha 1	8	Không kết hợp ghép HSC với tế bào NK	Là ngày truyền hoá chất (D0)	2017-2021	M.D. Anderson Cancer Center
NCT00354172	Leukemia, MDS	Pha 2	16	Ghép tế bào gốc tạo máu dây rốn kết hợp hóa trị và tế bào NK	Ngày thứ 5 trước ghép	2006-2008	Masonic Cancer Center, University of Minnesota
NCT02955550	MM	Pha 1	15	Ghép HSC tự thân kết hợp hóa trị và tế bào NK	Ngày +7 đến ngày +14 sau ghép HSC	2017-2019	Celularity Incorporated
NCT02781467	AML	Pha 1	10	Không kết hợp ghép HSC với tế bào NK	Là ngày truyền hoá chất (D0)	2016-2017	Celularity Incorporated
NCT04347616	AML	Pha 1, Pha 2a	24	Không kết hợp ghép HSC với tế bào NK	Là ngày truyền	2020-2023	Radboud University

					hoá chất (D0)		
NCT01619 761	ALL, AML, CLL. HL, YMDS, NHL, SLL	Pha 1	13	Ghép tế bào gốc tạo máu dây rốn kết hợp hóa trị và tế bào NK	2 ngày trước khi truyền HSC	2013- 2021	M.D. Anderson Cancer Center
NCT01729 091	MM	Pha 2	72	Ghép tế bào gốc tạo máu tự thân kết hợp hóa trị và tế bào NK	5 ngày trước ghép HSC	2013- 2024	M.D. Anderson Cancer Center
ChiCTR20 00030622	AML	Pha 1	20	Không kết hợp ghép HSC với tế bào NK	2 ngày sau hóa trị liệu củng cố	2015- 2020	PLA Air Force General Hospital, China
NCT01729 091	MM	Phase 1, 2	72	Ghép tế bào gốc tạo máu (HSC) tự thân kết hợp hóa trị và tế bào NK	5 ngày trước ghép HSC	2013- 2024	M.D. Anderson Cancer Center
EudraCT number 2010- 018988-41	AML	Phase 1	N/A	Không kết hợp ghép HSC với tế bào NK	Là ngày truyền hoá chất (D0)	2013- 2017	Radboud Medical Centre, Nijmegen, Netherlands

1.3.1.4. Liệu pháp tế bào TIL

Liệu pháp tế bào TIL (Tumor-infiltrating lymphocyte) hay còn gọi là liệu pháp tế bào T xâm nhập khối u trong những năm gần đây đã được sử dụng để điều trị một số loại ung thư như ung thư biểu mô tế bào vảy ở đầu và cổ, u hắc tố, ung thư phổi, ung thư tiết niệu sinh dục,... Nguyên lý thực hiện liệu pháp này, là sử dụng các tế bào lympho phân lập bên trong khối u, nuôi cấy tăng sinh *ex vivo* rồi truyền trở lại bệnh nhân ung thư [50].

Ưu điểm của liệu pháp này thể hiện ở tính đa dòng, TIL là quần thể chứa nhiều dòng tế bào lympho đặc hiệu cho nhiều loại kháng nguyên khác nhau trong khối u, do vậy nó giảm khả năng trốn thoát miễn dịch của các tế bào ung thư và làm tăng hiệu quả điều trị trong thời gian dài. Tuy nhiên, việc phân lập được TIL tương đối khó khăn cũng như chi phí thực hiện tương đối cao, đòi hỏi kỹ thuật phức tạp, nên liệu pháp

chưa thực sự được áp dụng rộng rãi. Tuy nhiên, một điều đáng chú ý là trong năm 2024, FDA đã tiên phong chấp thuận AMTAGVI (Lifileucel) là liệu pháp TIL đầu tiên để điều trị u hắc tố tiến triển, đánh dấu một bước đột phá lớn trong liệu pháp tế bào và di truyền và báo hiệu một kỷ nguyên hy vọng mới trong liệu pháp miễn dịch khối u [51].

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

Hiện nay việc điều trị các bệnh ung thư nói chung chủ yếu dựa vào liệu pháp phẫu thuật và hóa, xạ trị. Liệu pháp miễn dịch trong điều trị ung thư ở nước ta chủ yếu là sử dụng một số kháng thể thương mại đã được FDA công nhận để điều trị một số loại ung thư như: ung thư vú, ung thư dạ dày (Trastuzumab), u lympho ác tính không Hodgkin (Rituximab), ung thư đại trực tràng di căn (Avastin)... Bên cạnh đó, cũng có một số nghiên cứu sử dụng các cytokine để hỗ trợ điều trị ung thư như sản xuất IL2 tái tổ hợp của PGS. TS. Trương Nam Hải hay “Nghiên cứu ứng dụng gene mã hoá IL-12 trong điều trị ung thư tế bào gan” của PGS. Nguyễn Lĩnh Toàn; Nghiên cứu của Hồ Anh Sơn và Nguyễn Lĩnh Toàn cho thấy sự kết hợp của vắc xin vi rút sởi và quai bị tăng cường khả năng tiêu diệt tế bào ung thư dạng rắn [52] và bạch cầu dòng tủy cấp [53]. Không chỉ vậy, nhóm nghiên cứu cũng cho thấy sự kết hợp của vắc xin sởi và Nimotuzumab mang lại tiềm năng điều trị lớn đối với ung thư thanh quản [54].

Riêng lĩnh vực ứng dụng liệu pháp tế bào miễn dịch trong điều trị ung thư, 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 trong phòng thí nghiệm, trên mô hình chuột và một số ít thử nghiệm lâm sàng đánh giá tính an toàn và hiệu quả của liệu pháp. Các nhóm nghiên cứu mạnh bao gồm nhóm nghiên cứu của PGS.TS. Phạm Văn Phúc tại Đại học khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh; nhóm nghiên cứu của PGS.TS. Hoàng Thị Mỹ Nhung tại Đại học khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội; nhóm nghiên cứu của GS.TS.BS. Nguyễn Thanh Liêm tại Bệnh viện đa khoa quốc tế Vinmec và nhóm của PGS.TS.BS. Trần Huy Thịnh tại Đại học Y Hà Nội.

1.3.2.1. Liệu pháp tế bào DC

Từ những năm 2011, nhóm nghiên cứu của Phan Kim Ngọc và Phạm Văn Phúc tại Đại học khoa học tự nhiên thành phố Hồ Chí Minh, có những nghiên cứu đặt nền móng ban đầu về liệu pháp tế bào DC tiềm năng trong điều trị ung thư vú [55, 56]. Đến năm 2016, nhóm nghiên cứu của Phạm Văn Phúc và cộng sự đã công bố các kết quả nghiên cứu đánh giá hiệu quả điều trị của tế bào DC nguồn gốc tủy xương chuột

và máu dây rốn của người trên mô hình chuột suy giảm miễn dịch mang khối u ung thư vú. Các kết quả nghiên cứu chỉ ra tế bào DC được cảm ứng với tế bào gốc ung thư vú có khả năng làm giảm tốc độ tăng kích thước khối u và kéo dài thời gian sống của chuột hơn so với nhóm chứng. Ngược lại, DC được cảm ứng bởi tế bào MSC tuy xương chuột lại kích thích tăng nhanh khối u hơn so với nhóm chứng. Kết quả này gợi ý rằng liệu pháp DC dựa trên kháng nguyên có nguồn gốc tế bào ung thư vú là liệu pháp hứa hẹn trong điều trị ung thư [57-59].

Năm 2020, Bùi Việt Anh, Thân Thị Trang Uyên và các cộng sự đã công bố kết quả của 2 nghiên cứu liên quan đến biệt hóa, trưởng thành tế bào tua gai (DC) từ tế bào đơn nhân máu dây rốn với sự hiện diện của GM-CSF, IFN- α , và TNF- α (Tumor necrosis factor alpha). Các tế bào DC này được cảm ứng với protein tổng số của tế bào A549 và kích thích các tế bào lympho đồng loài tăng sinh, đặc biệt là tế bào V γ 9 δ T. Ngoài ra, các nhóm tế bào DC cảm ứng này cũng tiết ra exosome có khả năng kích thích tế bào lympho đồng loài tăng sinh. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cả DC được cảm ứng và exosome của chúng đều có thể gây ra sự tăng sinh tế bào T đồng loài. Và các tế bào lympho T đồng loài này có độc tính tiêu diệt tế bào ung thư cao hơn so với nhóm chứng. Kết quả nghiên cứu này bổ sung thêm bằng chứng về cho việc ứng dụng các tế bào tua gai được kích thích bằng interferon- α , có nguồn gốc từ máu dây rốn và các sản phẩm ngoại bào của chúng trong liệu pháp chống ung thư [60, 61].

1.3.2.2. Liệu pháp tế bào CIK

Những nghiên cứu về tiềm năng điều trị ung thư của tế bào tiêu diệt cảm ứng cytokine (cytokine-induced killer – CIK) cũng được nhóm nghiên cứu của Phạm Văn Phúc và Vũ Thanh Bình khởi xướng từ những năm 2015 trên nguồn tế bào máu dây rốn [62]. Khác với tế bào NK, các tế bào CIK này được đặc trưng bởi sự biểu hiện của cả cụm phân tử biệt hóa CD (Cluster of differentiation) như CD3 và CD56 (CD3+/CD56+). Nhóm nghiên cứu đã đưa ra được phương pháp nuôi cấy tăng sinh CIK với tỉ lệ tế bào thu được chiếm khoảng 26% trong tổng số tế bào sau nuôi cấy. Đồng thời, các tế bào CIK này biểu hiện mạnh mẽ Granzyme B (80,87%), yếu tố liên quan đến khả năng gây độc qua trung gian tế bào. Các tế bào CIK này cũng phiên mã biểu hiện quá mức các gen sản xuất IFN- γ , TNF- α và IL-2, đây là các yếu tố chính huy động tế bào miễn dịch chống lại các khối u [62, 63]. Khi đồng nuôi cấy DC và CIK, các tế bào CIK này trở nên tăng sinh mạnh hơn (133,7%), kích thích sự sản xuất FN- γ và biểu hiện Granzyme mạnh mẽ hơn và có tác dụng tiêu diệt tế bào ung thư rõ rệt nhất sau 72 giờ [64].

1.3.2.3. *Liệu pháp tế bào CTL và tế bào NK*

Nguyễn Thanh Liêm và Hoàng Thị Mỹ Nhung cùng cộng sự là nhóm nghiên cứu mở đầu cho chuỗi các nghiên cứu ứng dụng liệu pháp tăng cường miễn dịch tự thân trên lâm sàng tại Việt Nam. Năm 2018, nhóm đã công bố kết quả nuôi cấy tăng sinh tế bào NK và CTL trong máu ngoại vi của 7 bệnh nhân trong độ tuổi từ 30 đến 84 bị ung thư phổi di căn, sử dụng bộ sản phẩm nuôi cấy tăng sinh của hãng BINKIT (Viện trị liệu sinh học Nhật Bản). Sau 21 ngày nuôi cấy, số lượng CTL trung bình (CD3+CD8+) tăng gấp 742,3 lần, chiếm 72,2% và số lượng tế bào NK trung bình (CD3-CD56+) tăng gấp 637,5 lần, chiếm 84,3% quần thể tế bào sau nuôi cấy. Tỷ lệ tế bào NK hoạt động (CD3-CD56^{bright}) là 82,1%, tăng 408,9 lần [65]. Đến 2019, nhóm tác giả đã công bố kết quả nghiên cứu pha 1, được tiến hành từ tháng 3 năm 2016 đến tháng 12 năm 2017 đánh giá hiệu quả nuôi cấy tăng sinh tế bào CTL, NK và tính an toàn của liệu pháp tế bào miễn dịch tự thân trong điều trị ung thư phổi, gan và ruột kết, ba loại ung thư phổ biến ở Việt Nam. Kết quả cho thấy hầu hết các bệnh nhân đều cho thấy chất lượng cuộc sống được cải thiện, giảm các triệu chứng mệt mỏi và tăng thời gian sống thêm trung bình là 18,7 tháng khi kết thúc nghiên cứu. Nghiên cứu bước đầu này đáp ứng yêu cầu ứng dụng lâm sàng trong điều trị ung thư và chứng minh tính an toàn của liệu pháp này đối với bệnh nhân ung thư ở Việt Nam [66]. Nguyễn Hoàng Phương và cộng sự công bố kết quả nghiên cứu nhân mở, nhóm đơn được thực hiện từ tháng 1 năm 2016 đến tháng 12 năm 2021 tại Bệnh viện đa khoa quốc tế Vinmec, bao gồm 12 bệnh nhân được chẩn đoán mắc ung thư đại trực tràng giai đoạn III và IV, được truyền từ một đến bảy lần truyền tế bào NK và Tế bào lympho T gây độc tế bào (CTL). Sau 20–21 ngày nuôi cấy bằng bộ sản phẩm nuôi cấy tăng sinh của hãng BINKIT (Viện trị liệu sinh học Nhật Bản), tế bào NK tăng gấp 3.535 lần, chiếm 85% quần thể tế bào nuôi cấy và CTL chiếm 62,4% quần thể tế bào nuôi cấy, tăng gấp 1220 lần số lượng ban đầu. Kết quả cho thấy, chất lượng cuộc sống được cải thiện, mức độ nghiêm trọng của triệu chứng giảm. Cuối cùng, người ta quan sát thấy thời gian sống sót trung bình tăng $14,3 \pm 14,1$ tháng khi hoàn thành nghiên cứu. Liệu pháp tăng cường miễn dịch tự thân (AIET) đã chứng minh tính an toàn và cải thiện thời gian sống sót cũng như chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân ung thư đại trực tràng tại Việt Nam [67].

1.3.2.4. *Liệu pháp tế bào gamma delta T*

Nhóm nghiên cứu của PGS.TS. Trần Huy Thịnh tại đại học y Hà Nội công bố kết quả nghiên cứu năm 2019 về hiệu quả nuôi cấy hoạt hóa tế bào gamma delta T ($\gamma\delta$ T) trên bệnh nhân ung thư phổi với số lượng tế bào $\gamma\delta$ T tăng gấp trên 12.000 lần so với ban đầu. Khối tế bào sau hoạt hóa tỷ lệ sống trung bình đạt 90%, trong đó, tế

bào $\gamma\delta T$ chiếm 83.2% quần thể. Các tế bào này thể hiện các hoạt tính miễn dịch như khả năng gây độc cho tế bào ung thư và tăng tiết các cytokine như $IFN\gamma$ [68]. Năm 2023, nhóm công bố kết quả đánh giá hiệu quả kháng ung thư của tế bào gamma delta T ($\gamma\delta T$) trên chuột thiếu hụt miễn dịch mang khối ung thư phổi người. Kết quả cho thấy, chuột GDT3 mang khối ung thư phổi người H460 được điều trị bằng tế bào $\gamma\delta T$ với nồng độ cao, 10^7 tế bào/10g thể trọng, có thể tích khối u nhỏ hơn, thời gian sống dài hơn và tỉ lệ chuột chết ít hơn so với nhóm chứng [69]. Năm 2024, nhóm nghiên cứu này cũng đã công bố bước đầu hiệu quả điều trị của liệu pháp tế bào gamma delta T ($\gamma\delta T$) trên 5 bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ. Kết quả cho thấy liệu pháp sử dụng là an toàn chỉ xuất hiện một số biến chứng nhỏ như đau cơ, đau khớp, khó thở ban đầu, và 20% bệnh nhân (1 bệnh nhân) có bệnh đáp ứng một phần và 80% bệnh nhân (4 bệnh nhân) có bệnh ổn định khi kết thúc điều trị. Chất lượng cuộc sống của bệnh nhân được cải thiện sau khi điều trị ở hầu hết các biện pháp chức năng (hoạt động, nhận thức và xã hội), nhưng điểm số về thể chất và cảm xúc giảm nhẹ [70]. Đồng thời, nhóm nghiên cứu cũng công bố 1 trường hợp bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ đáp ứng với pháp đồ điều trị kết hợp giữa liệu pháp tế bào NK tự thân và kháng thể đơn dòng bevacizumab trong năm 2023 [71].

1.3.2.5. Liệu pháp CAR-T

Trong khoảng 1-2 năm trở lại đây, liệu pháp tế bào T mang kháng nguyên thể khảm CAR-T điều đã bắt đầu được các nhóm nghiên cứu triển khai, đây là liệu pháp tế bào miễn dịch tiên tiến nhất hiện nay và tốn kém chi phí. Năm 2023, nhóm nghiên cứu của Nguyễn Hiền Hạnh và Cán Văn Mão công bố kết quả thử nghiệm liệu pháp CAR-T kết hợp với kháng thể đơn dòng protein gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-1_Programmed death-1) trên mô hình chuột suy giảm miễn dịch và cho kết quả liệu pháp này an toàn trên chuột [72]. Ngoài ra, nhóm nghiên cứu của Nguyễn Thanh Liêm tại bệnh viện đa khoa quốc tế Vinmec cũng bắt đầu triển khai thử nghiệm lâm sàng ứng dụng liệu pháp CAR-T này trên các bệnh nhân ung thư máu lymphoma dòng tế bào B mang CD19. Việc triển khai liệu pháp này là minh chứng thể hiện năng lực nghiên cứu và ứng dụng của nền khoa học Việt Nam có thể nắm bắt kịp thời với được với những tiến bộ y học tiên tiến nhất của thế giới.

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. Tế bào NK sản xuất IFN- γ , đây là cytokin quan trọng trong việc kích hoạt đại thực bào để tiêu diệt các vi khuẩn bị thực bào cũng như các cytokine điều hòa miễn dịch khác. Hoạt động gây độc tế bào của tế bào NK có cơ chế giống như các tế bào lympho gây độc tế bào khác như tế bào TCD8. Tức là, sau khi được kích hoạt, tế bào NK giải phóng các hạt Perforin và Granzyme, bắt đầu quá trình apoptosis ở các tế bào đích [73].

Tế bào NK cũng đóng một vai trò quan trọng trong việc loại bỏ các bệnh nhiễm trùng do vi rút và các khối u ác tính. Nói chung, tế bào NK theo dõi sự thay đổi trong cân bằng nội môi của tế bào đích thông qua biểu hiện của các phối tử bề mặt tế bào. Điều này bao gồm sự biểu hiện của các phân tử ức chế cụ thể và mức độ biểu hiện của các phối tử phổ biến như MHC-I [74]. Có rất nhiều các phân tử ức chế như B7-H6 là phối tử cho thụ thể NKP30 hoặc MIC-A là phối tử cho thụ thể NKG2D và MHC-I được biết đến như một phối tử cho thụ thể KIR [73, 74].

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

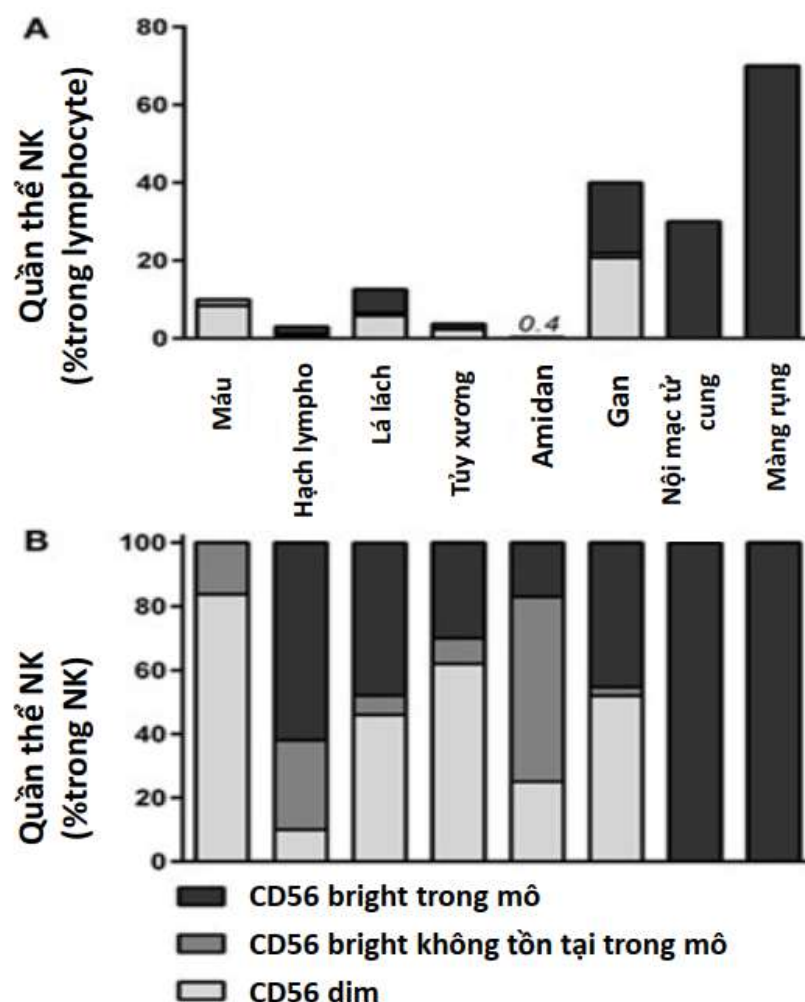
1.4.2.1. Đặc điểm chung

Tế bào giết tự nhiên (Natural killer - NK) có vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch bẩm sinh chống lại các tác nhân nội bào như vi rút hay các vi khuẩn khác. Tế bào NK lần đầu tiên được biết đến vào năm 1975 khi hai nhóm nghiên cứu của Herberman RB và Kiessling R cùng phát hiện một nhóm tế bào lympho có kích thước lớn hơn tế bào lympho T và B, chứa những thành phần khác biệt trong tế bào chất có khả năng gây độc với tế bào ung thư [75]. Tế bào NK chiếm khoảng từ 10 đến 15% số lượng tế bào lympho. Tế bào NK là một trong những tế bào quan trọng của hệ thống miễn dịch bẩm sinh chống lại các tác nhân nội bào như vi rút, một số vi khuẩn hoặc tế bào ung thư.

Năm 1982, Steven A Rosenberg từ Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ phát triển phương pháp nuôi cấy, hoạt hóa tế bào NK có khả năng tiêu diệt trực tiếp tế bào ung thư [76]. Tuy nhiên, do môi trường nuôi cấy hạn chế, thời gian nuôi cấy ngắn 5-7 ngày, tỷ lệ nhân nuôi tế bào thấp (khoảng 12 lần), thiếu những chất hoạt hóa hiệu quả cho nên hiệu quả lâm sàng chưa cao. Giống như các tế bào lympho khác, tế bào NK bắt nguồn từ các tế bào đầu dòng lympho ở tủy xương, sau đó chúng được biệt hóa và phân bố ở nhiều loại mô và cơ quan trong cơ thể như tủy xương, hạch lympho, lách, máu ngoại vi, phổi và gan [77]. Các tế bào NK là những tế bào lympho biểu hiện CD56 và không biểu hiện CD3 [77]. Mức độ biểu hiện CD56 của các tế bào NK cũng khác nhau. Khoảng 90% các tế bào Tế bào NK ở máu ngoại vi và lách có mức biểu hiện thấp với CD56 và mạnh với CD16 (CD56^{dim}CD16⁺) [77]. Các tế bào này

có hoạt tính độc tế bào mạnh khi tương tác với các tế bào đích (ví dụ như tế bào ung thư). Ngược lại, hầu hết các tế bào NK trong hạch lympho lại biểu hiện mạnh CD56 và không biểu hiện CD16 (CD56^{bright}CD16-), chúng chủ yếu đóng vai trò điều hòa miễn dịch thông qua việc tiết các cytokine như interferon – γ đáp ứng lại sự kích thích bằng IL-12, IL-15 và IL-18 [77]. Ngoài ra, chúng còn biểu hiện các yếu tố phiên mã Eomesodermin (EOMES) và protein perforin phân giải tế bào [78, 79].

Tế bào NK có hoạt tính gây độc cytotoxic tương tự như tế bào T độc CD8+, đồng thời chúng sản xuất cytokin thúc đẩy quá trình hoạt động của tế bào T hỗ trợ như Th1,2,17. Tế bào tiền thân của tế bào NK là các tế bào gốc tạo máu tủy xương CD34+ CD45RA+, sau đó di chuyển đến các vị trí khác nhau của cơ thể nơi có các tín hiệu IL-15 kích thích trưởng thành tế bào NK (CD3-CD56+) [80]. Hai quần thể tế bào NK chính là CD56^{bright} +CD16- và CD56^{dim} +CD16+. Trong máu ngoại vi, quần thể CD56^{bright} chỉ chiếm khoảng 10% tổng số tế bào NK, trong khi 90% còn lại là CD56^{dim}. Còn đối với các khu vực mô khác như hạch bạch huyết, amidan, dạ dày, ruột, gan, tử cung, tuyến thượng thận và mô mỡ nội tạng có sự hiện diện của tế bào NK chủ yếu là tế bào CD56^{bright}. Tương tự, đối với các cơ quan có độ tưới máu cao khác như phổi, thận, tủy xương, lách, quần thể tế bào NK CD56^{bright} cũng chiếm ưu thế [79]. CD16 có khả năng điều khiển quá trình gây độc phụ thuộc kháng thể trong khi quần thể tế bào CD56^{bright} được biết đến với khả năng sản sinh cytokin mạnh mẽ, còn quần thể CD56^{dim} có khả năng gây độc tế bào nổi trội hơn cả. Các nghiên cứu đã cho thấy, hai đặc tính của hai dòng tế bào CD56 này có thể được thay đổi trên mỗi loại tế bào để thực hiện chức năng miễn dịch. Cụ thể, sau khi nhận diện được tế bào đích, tế bào NK CD56^{dim} sẽ có khả năng gây độc cao, nhưng cũng có khả năng tiết cytokin. Ngược lại, tế bào NK CD56^{bright} đòi hỏi sự kích hoạt bởi các cytokin như IL2/IL12/IL15/IL18 để có hoạt tính gây độc và sản sinh cytokin [79].

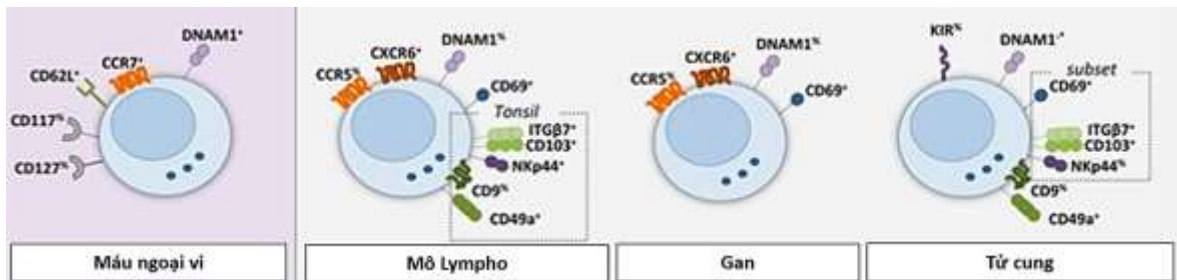


Hình 1.7. Phân bố của tế bào NK trong máu và mô [79]

1.4.2.2. Quần thể tế bào NK CD56^{bright} thường trú trong mô

Có rất nhiều đặc điểm và cơ chế để các tế bào này tồn tại được trong mô. Một trong các cơ chế đó được cho là sự hiện diện của CD69 trên các tế bào NK này và không biểu hiện trên tế bào NK máu ngoại vi [81]. Ban đầu CD69 được nhận diện là marker hoạt hóa sớm, tuy nhiên, ngày nay, CD69 được biết là có liên quan đến sự cư trú trong mô của tế bào miễn dịch bằng cách ức chế S1PR1 (sphingosine-1-phosphate receptor 1) biểu hiện trên bề mặt tế bào thường trú tại mô đó. Điều này dẫn đến giảm khả năng tế bào rời khỏi mô, giúp tế bào miễn dịch ổn định và duy trì trong mô để thực hiện các chức năng miễn dịch cần thiết [79, 82]. Một cơ chế tiềm năng khác là sự tham gia của các chemokin, trong đó CXCR6 và CCR5 đều được biểu hiện cao trên tế bào NK CD56^{bright} ở mô trong mô gan và mô lympho, nhưng lại biểu hiện thấp trên tế bào NK CD56^{bright} có trong máu ngoại vi, và thay vào đó là CCR7 biểu hiện cao trong quần thể CD56^{bright} có trong máu ngoại vi [79, 81]. Cơ chế thứ 3 thúc đẩy sự tồn tại của quần thể tế bào NK CD56^{bright} trong mô là sự biểu hiện hoặc vắng mặt của các phân tử kết dính như CD49a biểu hiện mạnh mẽ trên tế bào CD56^{bright} trong

tử cung, nhưng lại không biểu hiện trên tế bào NK lưu hành trong máu ngoại vi. Hơn nữa, khác với các quần thể tế bào NK $CD56^{bright}$ trong máu ngoại vi, các tế bào này trong mô thiếu sự biểu hiện của CCR7 và CD62L (L-selectin), đây là các phân tử có vai trò trong việc thúc đẩy các tế bào NK trong máu ngoại vi tới các mô lympho thông qua các tiểu tĩnh mạch giàu tế bào nội mô (HEV) [79, 83]. Trong khi sự biểu hiện của CD62L, CXCR3 và CCR7 sẽ hướng các tế bào NK $CD56^{bright}$ đến các cơ quan lympho thứ cấp, sự biểu hiện của Chemerin R, CXCR1, CXCR2 và CX3CR1 có vai trò hướng các tế bào NK $CD56^{dim}$ đến các cơ quan ngoại vi gây viêm để phản ứng với các phối tử chemokine tương ứng của chúng [84].



Hình 1.8. Đặc điểm của quần thể $CD56^{bright}$ trong các mô khác nhau

Các tế bào $CD56^{bright}$ trong máu ngoại vi biểu hiện các dấu ấn homing tại mô lympho là CD62L (L-selectin) và CCR7. Tế bào NK thường trú ở mô bạch huyết biểu hiện CD69 và CXCR6. Tế bào NK thường trú ở amidan ($NKp44^+ CD103^+$) biểu hiện thêm ITGB7, CD49a và một phần CD9. Trái ngược với các tế bào NK $CD56^{bright}$ máu ngoại vi, chỉ một phần nhỏ các tế bào NK mô lympho, amidan và tế bào NK ở gan biểu hiện DNAM1. Đa số tế bào NK cư trú ở gan ($CD69^+ CXCR6^+$) biểu hiện CCR5. CD49a + (nội mạc tử cung và decidua) biểu hiện CD69, ITGB7, CD103 và NKp44 [79].

NK trong hạch lympho

Hạch lympho chứa khoảng 40% số tế bào lympho trong toàn bộ cơ thể, trong đó chứa 2-5% là tế bào NK. Trên 75% tế bào NK trong hạch lympho là biểu hiện $CD56^{bright}$. Các tế bào này ít có khả năng sản xuất IFN- γ so với quần thể tế bào NK $CD56^{bright}$ trong máu ngoại vi và có khả năng kỵ giải tế bào K562 tương đương với NK $CD56^{dim}$ [79, 81].

Lách và tủy xương: Lách và tủy xương chứa tương ứng khoảng 14 và 10% tổng số tế bào lympho, trong đó, tế bào NK tại lách chiếm 5-20% và NK ở tủy xương chỉ chiếm khoảng 4% tổng số tế bào lympho. Tỷ lệ quần thể tế bào NK $CD56^{dim}$ và $CD56^{bright}$ chiếm tỷ lệ tương đương nhau tại lách [79, 81].

NK tại Amidan

Chỉ khoảng 0.4% tế bào lympho tại amidan là tế bào NK, trong đó tiểu quần thể $CD56^{bright}$ là chiếm ưu thế. Chỉ có khoảng 7% các tế bào NK tại đây mang cả 2 dấu ấn CD69 và CXCR6, trong khi hầu hết các tế bào NK tại đây đều biểu hiện các

dấu ấn NKp44, CD103, CD49a, Integrin β 7 và một phần CD9, điều này hoàn toàn khác biệt với các quần thể tế bào NK trong tủy xương, hạch lympho và lách. Các tế bào NK CD56^{bright} tại amidan có khả năng sản xuất IFN- γ cao và có khả năng ly giải tế bào khi được kích thích bằng IL-2 hoặc IL-12 tương tự như quần thể tế bào NK trong máu ngoại vi [79].

NK tại gan

Tại gan, NK chiếm khoảng 40% tổng số tế bào lympho có trong gan, trong đó khoảng 45% số tế bào NK là biểu hiện EOMES+CD56^{bright}. Tế bào NK CD56^{bright} cư trú ở gan được đặc trưng bởi sự biểu hiện đồng thời của CD69 và CXCR6. Chúng có biểu hiện CCR5 và NKp46 cao, và biểu hiện DNAM1 thấp. Ngoài ra, các tế bào này cũng có khả năng sản xuất IFN- γ và biểu hiện perforin and granzyme B ở mức độ thấp.

NK tại tử cung

Niêm mạc tử cung chứa các tế bào NK biểu hiện EOMES+CD56^{bright} và CD49a, trong khi không biểu hiện CCR5. Trái ngược với máu ngoại vi, tại đây hầu như không có bất kỳ tế bào NK CD56^{dim} nào trong cả điều kiện có mang thai và không mang thai. Bình thường, NK chiếm 30% tế bào lympho nội mạc tử cung, tuy nhiên trong giai đoạn mang thai, trên 70% các tế bào lympho của màng ối (lớp nội mạc tử cung biến đổi khi mang thai) là NK CD56^{bright}. Các tế bào này có khả năng sản xuất IFN- γ và có độc tính thấp, tuy nhiên chúng lại đặc trưng bởi sự biểu hiện các thụ thể kích thích NKG2C and NKG2E ở mức độ RNA [79].

Trên mô hình động vật thực nghiệm, tế bào NK trong lớp màng ối được cho là có chức năng kích thích sự xâm của nguyên bào nuôi dưỡng trophoblast và tái tạo động mạch tủy sống thai nhi thông qua việc sản xuất các chemokin khác nhau và yếu tố tạo mạch như angiopoietins và GM-CSF. Chuột thiếu tế bào NK trong lớp màng ối có biểu hiện bất thường trong thai kỳ, bao gồm cả việc tái tạo mạch bất thường của động mạch màng ối. Mặc dù quá trình hình thành nhau thai ở người là khác, tuy nhiên sự kết hợp đặc hiệu giữa allel HLA-C của thai nhi được trình diện bởi nguyên bào nuôi dưỡng và sự biểu hiện KIR của mẹ đã được chứng minh là có liên quan đến sự hình thành nhau thai thành công [79].

1.4.2.3. Quần thể tế bào NK máu dây rốn

Trong máu dây rốn, NK chiếm đến khoảng 30% tổng số tế bào lympho, cao hơn hẳn so với tỉ lệ của NK trong máu ngoại vi là 10% [6, 85]. 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}. Các tế bào NK CD56^{bright} là những tế bào ít biệt hóa hơn và CD56^{dim} là những tế bào NK trưởng thành hơn. Hơn nữa, tỉ lệ của chúng trong

máu dây rốn khác so với máu ngoại vi, cụ thể là, trong máu dây rốn, tỉ lệ CD16-CD56^{bright} cao hơn so với máu ngoại vi [6, 85]. Máu dây rốn là nguồn tế bào có đặc điểm là dễ dàng thu thập, xử lý và đông lạnh. Những nghiên cứu lâm sàng cũng chỉ ra rằng, quần thể tế bào NK là những tế bào miễn dịch hồi phục đầu tiên trên cơ thể người bệnh sau khi được ghép tế bào gốc tạo máu, điều này cho thấy nó đóng vai trò quan trọng trong việc tái cấu trúc hệ miễn dịch của cơ thể sau cấy ghép [86]. 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. Ngoài ra, so với tế bào NK máu ngoại vi, mức độ biểu hiện của CXCR4 (thụ thể liên quan đến việc làm tổ trong tủy xương) trên tế bào NK máu dây rốn cao hơn so với NK trong máu ngoại vi, điều này gợi ý rằng các tế bào NK từ máu dây rốn sẽ có khả năng làm tổ (homing) trong tủy xương tốt hơn.

Tuy nhiên, vì lượng máu dây rốn thu được là hữu hạn, do đó số lượng các tế bào NK máu dây rốn khi không được tăng sinh vẫn còn rất khiêm tốn và chúng chưa trưởng thành về chức năng. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng khả năng gây độc tiêu diệt tế bào ung thư K562 của NK máu dây rốn thấp hơn so với NK máu ngoại vi, mặc dù mức độ biểu hiện perforin, IFN-gamma, TNF-alpha nội bào của chúng là tương đương nhau [6, 87]. Một điểm đáng lưu ý nữa là sự biểu hiện các phân tử hoạt hóa mặc dù không có sự khác biệt nhiều giữa hai nguồn NK, nhưng NK có nguồn gốc máu dây rốn có biểu hiện thấp hơn các phân tử như CD16, KIRs, DNAM-1, NKG2C, IL-2R, granzyme B và biểu hiện thụ thể ức chế NKG2A cao hơn so với NK máu ngoại vi. Điều này phần nào giải thích cho khả năng tiêu diệt các tế bào khối u của chúng [87]. Tuy nhiên, đây là câu chuyện của NK máu dây rốn khi chưa được kích thích bởi cytokin. Khi được kích thích bằng cytokin, khả năng gây độc của NK từ 2 nguồn tế bào này là tương đương nhau [88, 89].

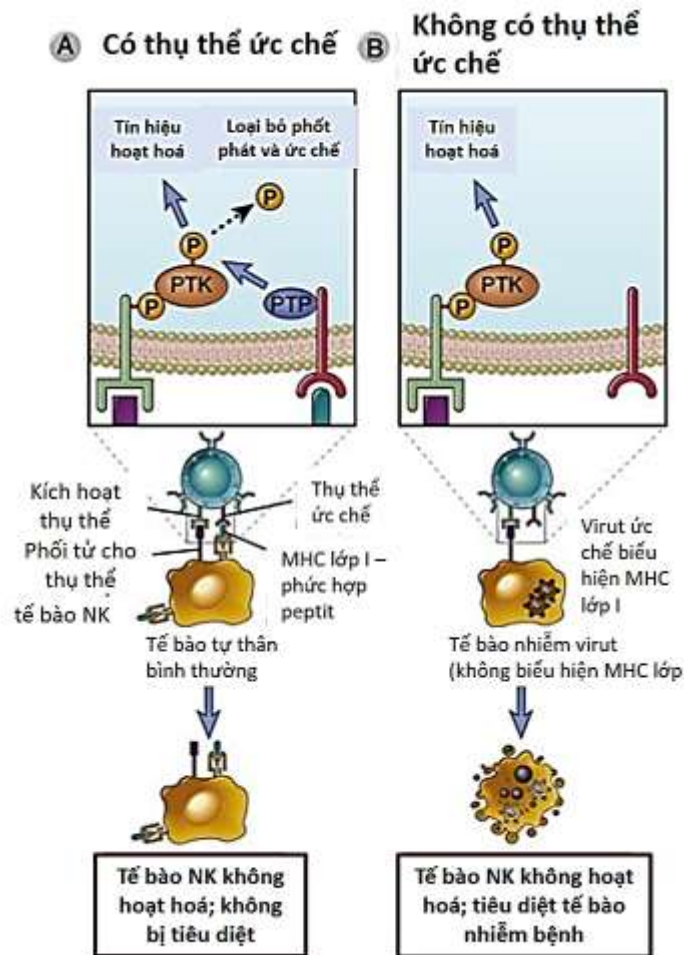
1.4.3. Các thụ thể bề mặt của tế bào NK

1.4.3.1. Vai trò của các thụ thể

Chức năng của tế bào NK được điều chỉnh bởi sự cân bằng giữa tín hiệu thụ thể kích hoạt và thụ thể ức chế. Các thụ thể hoạt hóa kích thích protein tyrosine kinase (PTK), chất này sẽ phosphoryl hóa các tín hiệu chất nền để kích thích NK hoạt động tiêu diệt tế bào và kết quả là quá trình apoptosis của các tế bào bị ức chế hoặc bị nhiễm bệnh. Trong khi đó, các thụ thể ức chế thúc đẩy protein tyrosine phosphatase (PTP) ức chế quá trình phosphoryl hóa do các thụ thể kích hoạt gây ra. Do đó, tế bào NK bị ức chế và các tế bào khỏe mạnh không bị phá hủy [73].

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 các 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

[90]. Sự biểu hiện của các thụ thể hoạt hóa và ức chế rất đa dạng ở bất kỳ cá thể nào và thậm chí ở các tế bào NK khác nhau trong cùng một cơ thể. Do đó, mức độ phản ứng của tế bào NK với các loại tế bào đích khác nhau cũng khác nhau [73]. Người ta ước tính rằng có khoảng 6.000-30.000 quần thể tế bào NK khác nhau trong mỗi cá thể. Ngoài ra, ước tính có hơn 100.000 kiểu hình của tế bào NK được tìm thấy trong quần thể người [91].



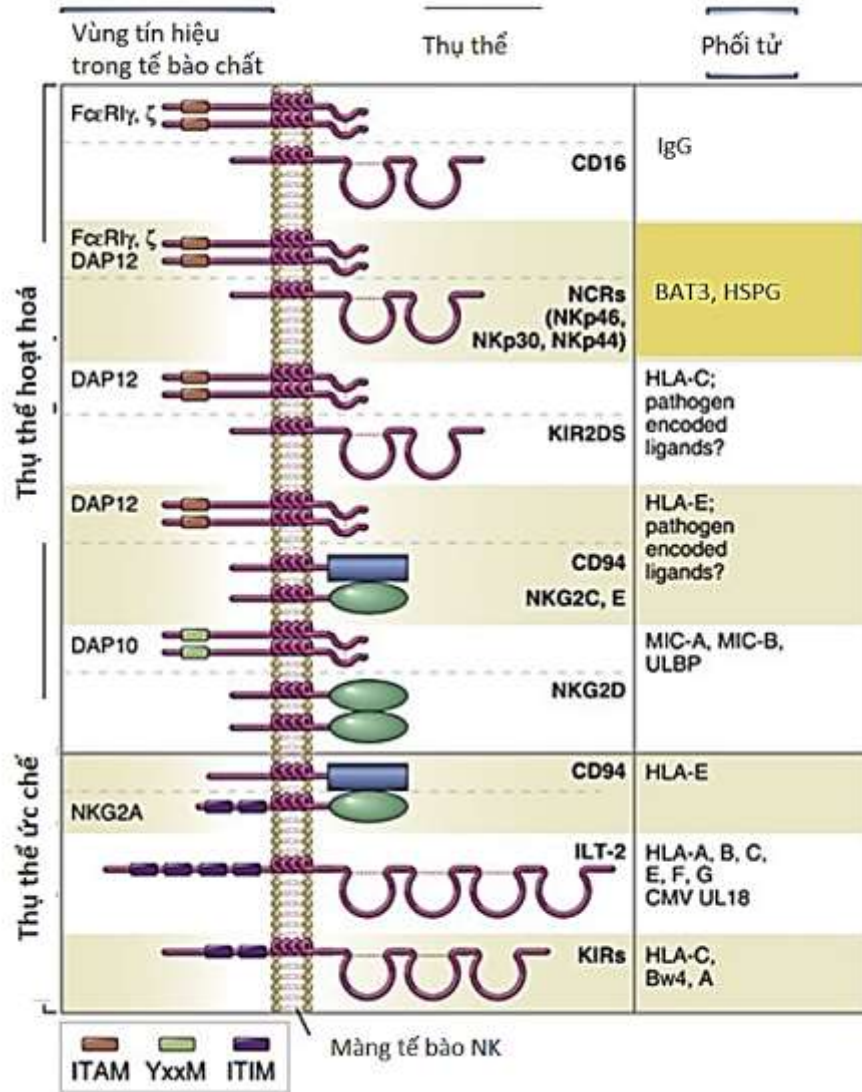
Hình 1.9. Chức năng hoạt hóa hoặc ức chế NK của các thụ thể

(A) Các thụ thể ức chế liên kết với các phân tử MHC lớp I và kích hoạt các men protein tyrosine (PTP), do đó ức chế quá trình phosphoryl hóa do các thụ thể hoạt hóa gây ra và tế bào NK không giết chết các tế bào khỏe mạnh biểu hiện MHC lớp I.

(B) Tế bào bị xâm nhiễm hoặc tế bào ung thư giảm biểu hiện MHC lớp I và gây ra biểu hiện của các phối tử hoạt hóa bổ sung. Kết quả là không có sự tương tác giữa các thụ thể ức chế và MHC-I, và thúc đẩy chức năng hoạt hóa các thụ thể để kích hoạt các phản ứng của tế bào NK bao gồm tiêu diệt tế bào đích và tiết cytokine.

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

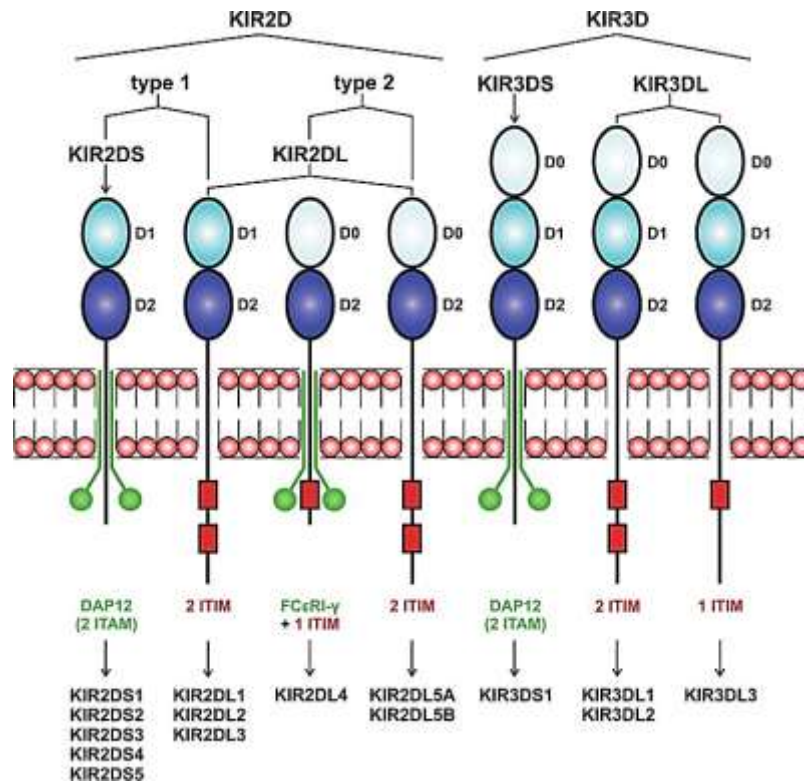
NKG2, CD94 và (2) Các thụ thể giống globulin miễn dịch bao gồm thụ thể gây độc tự nhiên (NCR_ Natural cytotoxicity receptors), CD16, ILT-2 và KIR (Hình 1.10)



Hình 1.10. Cấu trúc và phối tử của các thụ thể của tế bào NK

1.4.3.2. Thụ thể giống immunoglobulin trên tế bào NK (KIR)

Thụ thể giống immunoglobulin của tế bào NK (KIRs) thuộc về họ glycoprotein xuyên màng loại I được biểu hiện trên bề mặt tế bào NK và một số ít tế bào T [92, 93]. Chức năng quan trọng của KIRs là điều chỉnh hoạt động tiêu diệt tế bào NK bằng cách liên kết với các phân tử MHC-I. Các thụ thể KIR có thể nhận ra các tế bào bị xâm nhiễm hoặc tế bào ung thư bằng việc phân biệt các biến thể của MHC-I [94]. Cấu trúc chung của KIR bao gồm hai hoặc ba miền globulin miễn dịch loại C2, một vùng xuyên màng và một đuôi tế bào chất ngắn hoặc dài (Hình 1.11). Theo đó, hầu hết tất cả các phân tử KIR hai vùng (KIR2D) có cấu hình D1- D2, trong khi phân tử KIR ba vùng (KIR3D) có cấu hình D0-D1-D2. Đáng chú ý, hai vùng của KIR2DL4 và KIR2DL5 là D0 và D2 [95].



Hình 1.11. Cấu trúc phân tử KIR

Các KIR hoạt hóa có đuôi tế bào chất ngắn và không phát tín hiệu trực tiếp mà thay vào đó, các tín hiệu thông qua liên kết xuyên màng với bộ chuyển đổi tín hiệu DAP12 có chứa các thụ thể kích hoạt có bản chất tyrosine (ITAM). KIR hoạt hóa bao gồm KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5 và KIR3DS1. 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). Các thụ thể ức chế bao gồm KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL5, KIR3DL1, KIR3DL2 và KIR3DL3. Riêng KIR2DL4 có cả hai kiểu ức chế (ITIM) ở đuôi tế bào chất và cũng có thể bắt cặp với phân tử hoạt hóa tiếp hợp FcεRI-γ [95].

1.4.4. Mô hình huấn luyện và nhận diện tế bào ung thư của tế bào NK

1.4.4.1. Mô hình huấn luyện NK

Khoảng 50% tế bào NK biểu hiện KIR, dẫn đến sự tồn tại của cả quần thể tế bào NK “được huấn luyện” và KIR “không được huấn luyện” [91, 96]. Tế bào NK “được huấn luyện” KIR theo truyền thống là những tế bào biểu hiện thụ thể KIR ức chế với phối tử HLA. Do đó, các tế bào NK “không được huấn luyện” có khả năng chống lại cả tế bào đích không biểu hiện HLA và biểu hiện HLA. Trong khi đó, các tế bào NK “được huấn luyện” có phản ứng chống lại các tế bào đích không biểu hiện HLA nhưng lại không phản ứng với các tế bào đích biểu hiện HLA [96]. Do đó, tế

bào NK “được huấn luyện” được cho là những cảm biến hiệu quả về các mục tiêu không biểu hiện HLA [97].

1.4.4.2. Tương tác tế bào NK và tế bào ung thư

Các tế bào NK có thể nhận diện tế bào ung thư dựa vào sự phân tích biểu hiện của các yếu tố không phải bản thân (non-self), yếu tố thiếu hụt (missing – self) hay yếu tố bất thường (stress-induced self) [98]. Các đặc điểm này đều có ở tế bào ung thư. Vì vậy các tế bào NK được huấn luyện đóng vai trò quan trọng trong việc ức chế trực tiếp hoặc gián tiếp sự tăng trưởng của khối u và ngăn chặn sự di căn của tế bào ung thư. Sự có mặt của các tế bào NK ở khối u đã được chứng minh [99]. Tỷ lệ các tế bào NK này trong khối u tỷ lệ thuận với thời gian sống kéo dài thêm ở bệnh nhân mắc ung thư dạ dày, ung thư trực tràng, ung thư phổi...[100, 101] Tỷ lệ tế bào NK thấp ở những bệnh nhân ung thư gan có di căn là một bằng chứng cho thấy NK liên quan đến khả năng di căn của tế bào [101].

Các tế bào ung thư là các tế bào đã bị chuyển dạng từ các tế bào bình thường của cơ thể, vì thế các phân tử MHC lớp I của tế bào ung thư thường bị giảm biểu hiện hoặc không biểu hiện để trốn tránh sự nhận diện của các tế bào miễn dịch. Đồng thời, các biến đổi của DNA cũng như một số quá trình sinh lý của tế bào đã dẫn đến sự biểu hiện của các phối tử lạ trên bề mặt tế bào ung thư, đây chính là các phối tử sẽ tương tác với các thụ thể hoạt hóa của tế bào NK. Các tế bào ung thư bị giảm biểu hiện MHC lớp I hay mang những protein “lạ” trên bề mặt đều là những đích tấn công lý tưởng của các tế bào NK. Khả năng nhận diện tế bào ung thư của tế bào NK được chứng minh bởi nhiều nghiên cứu khi quan sát thấy rằng các tế bào ung thư bị thiếu hụt MHC lớp I đều bị loại bỏ bởi các tế bào NK. Thêm vào đó, các thụ thể ức chế của NK có khả năng phát hiện được những sự thiếu hụt này. Các tế bào NK còn có thể tiêu diệt tế bào ung thư thông qua cơ chế sử dụng các thụ thể hoạt hóa để phát hiện các phối tử chỉ biểu hiện ở các tế bào đã bị biến đổi như tế bào ung thư. Ví dụ như thụ thể NKGD2 của NK có thể phát hiện và liên kết với MICA và MICB là hai loại protein được tổng hợp và tiết bởi nhiều loại tế bào ung thư biểu mô, ung thư máu và ung thư sắc tố [99-105].

Các tế bào NK có thể tiêu diệt trực tiếp tế bào ung thư bằng nhiều cách: (i) Tiết ra các hạt nội bào chứa các chất perforin và granzyme để kích thích quá trình apoptosis ở các tế bào ung thư. Khi tế bào NK tương tác với tế bào ung thư, các hạt nội bào trên sẽ được tập trung về phía màng tế bào nơi tiếp xúc với tế bào ung thư và được giải phóng vào khoảng gian bào theo cách vận chuyển phụ thuộc canxi. Tiếp đó các granzyme sẽ được đưa vào tế bào ung thư nhờ các perforin tạo các lỗ trên màng sinh chất. Các granzym sau khi vào tế bào sẽ kích thích sự hoạt hóa caspase và gây

hiện tượng chết theo chương trình; (ii) Kích thích quá trình apoptosis bằng con đường thông qua thụ thể gây chết. Một số tế bào NK biểu hiện một số protein thuộc nhóm yếu tố hoại tử khối u như TNF- α , FasL hoặc TRAIL. Các yếu tố này khi tương tác với các thụ thể của chúng như FasR và TRAILR trên tế bào ung thư sẽ kích hoạt apoptosis; (iii) Tiết ra các yếu tố như IFN- γ có khả năng ảnh hưởng tiêu cực đến quá trình tăng sinh mạch máu khối u và thúc đẩy các đáp ứng miễn dịch đặc hiệu [98, 101, 102, 106, 107]. Đồng thời các cytokine khi tác động đến các tế bào ung thư luôn kèm theo các phản ứng sản sinh oxit nitric (NO), do đó kích thích các tế bào NK tiêu diệt tế bào ung thư theo con đường tín hiệu NO; (iv) tiêu diệt tế bào ung thư bằng con đường gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC - antibody-dependent cellular cytotoxicity) nhờ sự biểu hiện CD16 trên các tế bào NK [98].

Tác động gián tiếp của các tế bào giết tự nhiên được thể hiện thông qua sự tương tác của các tế bào này với các tế bào miễn dịch khác như tế bào tua (DC), đại thực bào, tế bào T và các tế bào nội mô để tiết các loại cytokine như chemokine và các yếu tố tăng trưởng [98, 106, 108]. Bằng cách sản xuất IFN- γ , các tế bào NK kích thích các tế bào TCD8 trở thành tế bào T gây độc (CTL), hỗ trợ biệt hóa tế bào TCD4 theo hướng đáp ứng Th1 để thúc đẩy sự biệt hóa tế bào T thành các tế bào T gây độc (CTL) [98]. Đồng thời các cytokine tiết bởi tế bào NK có thể kích thích tế bào lympho B sản xuất các kháng thể đơn dòng chống ung thư. Thêm vào đó, các tế bào ung thư bị giết bởi các tế bào NK sẽ cung cấp các kháng nguyên ung thư cho các tế bào tua (DC), thúc đẩy các tế bào này trưởng thành và trình diện kháng nguyên. Đến lượt mình, các tế bào tua có thể dễ dàng kích thích sự đáp ứng của các tế bào T gây độc thông qua sự trình diện các kháng nguyên đặc hiệu ung thư.

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

Tùy thuộc vào liệu pháp sử dụng tế bào miễn dịch tự thân hay đồng loài mà tế bào NK có thể thu nhận từ các nguồn khác nhau.

So với nguồn thu nhận tế bào T, các nguồn có thể thu thập tế bào NK tương đối đa dạng, bao gồm tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi (PBMCs_Peripheral mononucle cells), máu dây rốn (UCB_Umbilical cord blood), tủy xương (BM_Bone marrow), tế bào gốc như tế bào gốc phôi (hESCs_Human embryonic stem cells) hoặc tế bào gốc vạn năng cảm ứng (iPSCs_induced pluripotent stem cells) 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 [109].

1.4.5.1. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMCs_ Peripheral blood mononuclear cells) được đánh giá là nguồn an toàn, thuận tiện và các tế bào miễn dịch có tiềm năng tham gia vào các đáp ứng miễn dịch chống khối u. Từ mẫu máu ngoại vi, PBMCs được phân tách bằng phương pháp gạn tách apheresis hoặc ly tâm phân lớp theo tỷ trọng sử dụng Ficoll trong các phòng thí nghiệm đạt tiêu chuẩn cGMP (Current good manufacturing practice). PBMCs chứa từ 5-20% tế bào NK CD3-CD56+ nhưng khó có phương pháp phân tách toàn bộ quần thể này để đạt hiệu suất và độ tinh sạch cao, đáp ứng đủ liều theo tiêu chuẩn lâm sàng. Vì vậy, cần phát triển thêm các phương pháp tăng sinh NK từ PBMCs ngoài cơ thể để đáp ứng nhu cầu sử dụng.

Việc tăng sinh NK với PBMC tự thân như một lớp tế bào nuôi (feeder) đã được chứng minh là tạo ra các tế bào NK hoạt động, có chức năng cho điều trị. Việc sử dụng các thành phần đạt tiêu chuẩn GMP và lớp tế bào nuôi tự thân là các tế bào đơn nhân của máu ngoại vi, các quần thể tế bào NK thuần khiết đã được tăng sinh hiệu quả, gấp 2500 lần so với ban đầu vào ngày nuôi cấy thứ 17 [110]. Tương tự, một báo cáo khác cũng cho thấy hiệu quả khi tăng sinh NK với PBMC tự thân với sự hiện diện của OKT3 và IL-2 ở ngày nuôi cấy thứ 14 [111]. Các tế bào nuôi khác như Jurkat T-lymphoblast cũng đã được sử dụng để tăng sinh của tế bào NK kèm theo sự ức chế phát triển của tế bào T [112]. Một nghiên cứu khác cũng cho thấy quần thể tế bào NK tăng sinh gấp 277 lần sau 3 tuần (21 ngày) khi sử dụng lớp tế bào nuôi là tế bào K562 được biến đổi gen và biểu hiện phân tử IL-15 và 4-1BB (CD137L) trên màng [113]. Nghiên cứu của Denman và cộng sự năm 2012 cũng cho thấy hiệu quả tăng sinh NK khi sử dụng tế bào đệm là K562 đã được biến đổi để biểu hiện đồng phân tử IL-21 và CD137L liên kết màng [114]. Ngoài việc tăng sinh tổng số tế bào NK, các chiến lược để tăng sinh có chọn lọc các quần thể tế bào NK đã được phát triển. Các chiến lược này dựa trên quan sát rằng, mặc dù số lượng gen KIR di truyền là cố định, nhưng mỗi tế bào NK riêng lẻ lại biểu hiện một số biến thể KIR khác nhau trên bề mặt tế bào [115].

1.4.5.2. Tế bào gốc NK phân lập từ tế bào gốc phôi hoặc tế bào iPSC

Tế bào gốc đa tiềm năng như tế bào gốc phôi (hESC_ Human embryonic stem cells) hay tế bào gốc vạn năng cảm ứng (iPSC) có thể biệt hóa thành tế bào gốc tạo máu hHSC, vì vậy, đây cũng có thể là nguồn để tăng sinh tế bào NK. Để cải thiện khả năng tấn công khối u của tế bào NK, các nhà khoa học đã tiến hành so sánh giữa PBMC-NK và iPCS-NK được tăng sinh cùng tế bào trình diện kháng nguyên APC (Antigen presenting cell) với tế bào PBMC-NK được hoạt hóa qua đêm. Kết quả cho thấy PBMC-NK và iPCS-NK được tăng sinh cùng tế bào APC nhân tạo có khả năng

tạo đáp ứng miễn dịch khối u tốt trong mô hình *in vivo*. Tuy nhiên, hESC hay iPSC đòi hỏi các yêu cầu kỹ thuật phức tạp để duy trì tính gốc, biệt hóa thành hHSC và vẫn còn nhiều lo ngại về khả năng sinh ung thư (tumorigenicity) của chúng.

Trái ngược với các nghiên cứu và thử nghiệm lâm sàng tế bào NK từ PBMC và CD34 + máu dây rốn, việc tạo ra tế bào NK từ tế bào gốc phôi hESC hoặc iPSC là một lĩnh vực với cách tiếp cận phức tạp. Hiện nay, việc thiết kế thí nghiệm nhằm tập trung vào tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy để tạo ra các tế bào này. NK tạo ra từ hESC và quần thể tế bào gốc tạo máu là những tế bào có chức năng và có khả năng ly giải tế bào. Ngoài ra, những tế bào này có thể tiêu diệt tế bào ung thư bằng cách gây độc tế bào trực tiếp qua trung gian tế bào và ADCC. Kaufmann và cộng sự đã công bố việc tạo tế bào NK ở quy mô lâm sàng. Phương pháp này cho phép sản xuất các tế bào NK trưởng thành và có chức năng từ hESC và iPSC sau khi nuôi cấy ít nhất 2 tháng bằng cách sử dụng IL-21 biểu hiện trên các tế bào trình diện kháng nguyên. Số lượng tế bào NK được thu hoạch đủ để điều trị bệnh nhân [115].

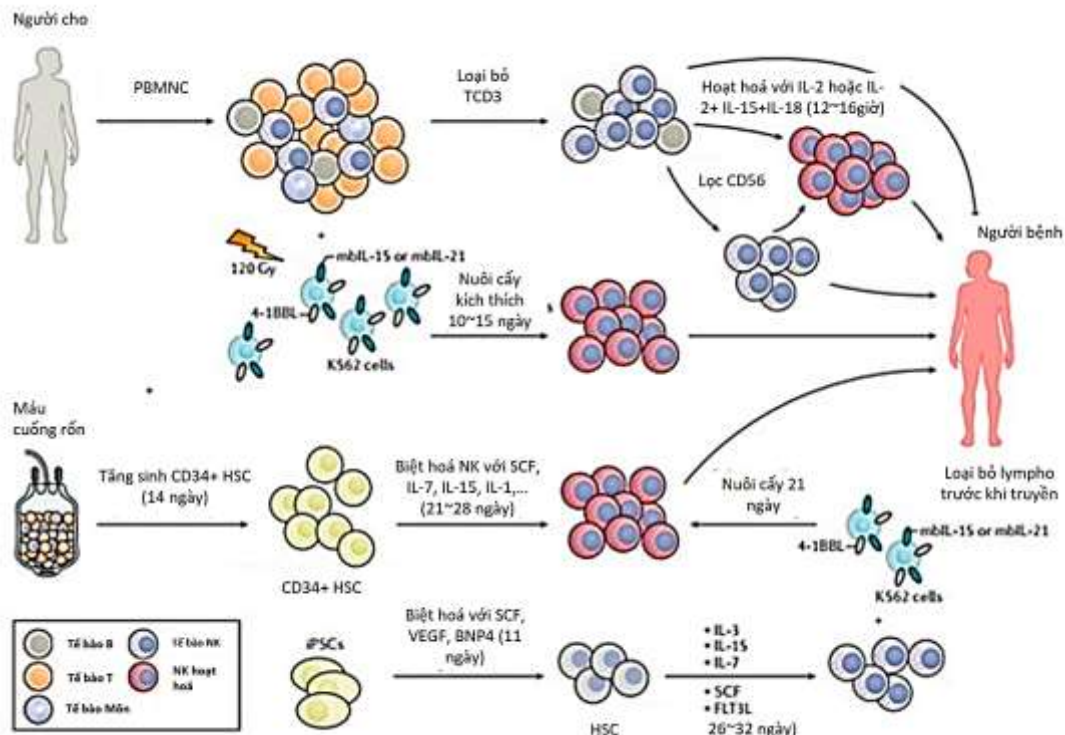
1.4.5.3. NK phân lập từ CD34+ tủy xương và máu dây rốn

Cũng như các loại tế bào miễn dịch khác, NK có nguồn gốc từ tế bào gốc tạo máu (Hematopoietic stem cells HSCs) có trong tủy xương. Vì vậy, các nguồn mẫu chứa HSCs cũng được xem là nguồn tiềm năng để thu nhận tế bào NK. Tủy xương và máu dây rốn là hai nguồn HSCs dồi dào và có nhiều tiềm năng ứng dụng trong lâm sàng. Một số nghiên cứu gần đây cho thấy, có thể tăng sinh tế bào NK không chỉ từ mẫu UCB tươi (fresh UCB) mà cả các mẫu UCB đã được lưu trữ đông lạnh với khả năng tăng sinh tốt mà vẫn duy trì được tính an toàn và chức năng miễn dịch.

Đặc biệt, máu dây rốn được coi là nguồn rác thải sinh học sau khi em bé được sinh ra nếu cha mẹ không có nhu cầu lưu trữ tế bào gốc cho chính đứa con của mình. Các nghiên cứu trước đây cho thấy rằng, NK chỉ chiếm một tỉ lệ tương đối nhỏ trong máu dây rốn, và tủy xương. Do đó đã có rất nhiều các quy trình khác nhau được phát triển để tăng sinh tế bào NK từ tế bào CD34+ tủy xương (BM_ Bone marrow) và sau đó từ máu dây rốn (CB) bằng cách đồng nuôi cấy với các loại tế bào nuôi và sự kết hợp của các cytokine thúc đẩy sự phát triển của tế bào NK. Nhiều hệ thống nuôi cấy sử dụng môi trường nuôi cấy không có huyết thanh động vật, không có tế bào nuôi và hỗn hợp heparin và cytokine để thay thế cho vi môi trường ngoại bào của BM trong túi nuôi cấy tế bào hoặc máy nuôi cấy tự động. Việc này giúp tăng số lượng NK lên mở rộng lên đến 10^{10} tế bào NK từ CD34+ ban đầu. Tế bào NK này có biểu hiện mức cao các thụ thể hoạt hóa và có khả năng ngăn chặn hiệu quả bệnh bạch cầu dòng tủy và các dòng tế bào hắc tố, cũng như các đợt bùng phát bệnh bạch cầu nguyên phát [116, 117].

1.4.5.4. Các dòng tế bào NK thương mại

So với các nguồn đã nêu trên, dòng tế bào NK thương mại như NK-92 có nguồn gốc từ tế bào CD3-CD56⁺ của bệnh nhân non-Hodgkin lymphoma. Dòng tế bào NK-92 có ưu điểm là nguồn không xâm lấn, dễ dàng tăng sinh, biểu hiện yếu hoặc thiếu hầu hết các thụ thể ức chế so với tế bào NK tự nhiên trong máu bệnh nhân. Vì vậy, sản phẩm tế bào NK trị liệu có nguồn gốc từ dòng NK-92 đã được sử dụng trong thử nghiệm điều trị ung thư phổi và melanoma và được FDA cho phép sử dụng trong thử nghiệm lâm sàng [109]. Tuy nhiên, vấn đề về tính sinh ung thư của các sản phẩm tế bào dạng này cũng là một thách thức cho các nhà nghiên cứu.



Hình 1.12. Một số nguồn phân lập, tăng sinh tế bào NK [109].

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

Hiệu quả và tính an toàn

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. Điều này là do nếu tế bào ung thư của người bệnh vẫn biểu hiện các phân tử MHC lớp I như các tế bào thường, các phân tử này sẽ kết hợp với các thụ thể ức chế của tế bào NK và làm giảm hoặc thậm chí ức chế sự hoạt hóa các tế bào diệt tự nhiên. Để khắc phục nhược điểm này, trong những năm gần đây liệu pháp ghép tế bào NK đồng loài được tập trung nghiên cứu và thử nghiệm lâm sàng.

Ưu điểm của liệu pháp này đó là:

- Ghép tế bào NK đồng loài ít gây GVHD do đó những tác dụng phụ gây ra bởi ghép NK đồng loài sẽ rất ít ;
- Các tế bào NK từ người cho khỏe mạnh không bị tác động giảm hoạt tính miễn dịch bởi sự có mặt của tế bào ung thư của người nhận, do đó có tiềm năng lớn trong việc ức chế khối u.
- Ngoài ra, khi không có sự phù hợp (mismatch) giữa phối tử (KIR ligand) và thụ thể KIR ở người cho và người nhận sẽ làm tăng hiệu quả điều trị ung thư lên rõ rệt, đặc biệt ở các bệnh ung thư máu như bệnh bạch cầu nguyên bào tủy cấp tính (AML - acute myeloid leukemia) .

Một trong những vấn đề đặt ra của liệu pháp ghép NK đồng loài đó là tìm kiếm người cho phù hợp và một phương pháp nhân nuôi tế bào NK *ex vivo* hiệu quả để cung cấp một lượng lớn tế bào phục vụ cho điều trị. Thực tế chỉ có khoảng 30% bệnh nhân có thể tìm được tế bào cho tương đồng từ những người cùng huyết thống (cha mẹ hoặc anh, chị em ruột), 70% còn lại phải tìm kiếm người cho tương đồng từ những người không có quan hệ gần gũi. Như vậy mặc dù liệu pháp ghép tế bào NK bán tương đồng đã làm tăng cơ hội tìm kiếm người cho phù hợp cho các bệnh nhân ung thư, nhưng việc tìm ra các nguồn cung cấp mới vẫn thật sự cần thiết.

Tế bào máu dây rốn chính là một nguồn thay thế đầy tiềm năng để cung cấp các tế bào miễn dịch trong liệu pháp ghép tế bào NK đồng loài điều trị ung thư. Ưu điểm chính của sử dụng nguồn cung cấp này đó là:

- (1) Dễ dàng thu thập và bảo quản lạnh;
- (2) Thời gian tìm kiếm người cho cũng như quy trình cấy ghép nhanh chóng hơn so với nguồn máu từ người cho trưởng thành, điều này đặc biệt quan trọng đối với những bệnh nhân ung thư máu ác tính mà khả năng tái phát lớn và nhanh chóng và quá trình ghép cần được tiến hành trong giai đoạn bệnh thuyên giảm;
- (3) Dễ dàng tìm thấy tỷ lệ KIR - HLA không phù hợp (mismatch) ở máu dây rốn với người nhận;
- (4) GVHD cũng rất thấp khi sử dụng các tế bào NK nhân nuôi từ máu dây rốn do tỷ lệ tế bào T trong máu dây rốn thấp hơn nhiều so với các nguồn máu khác;
- (5) Khả năng tồn tại của NK trong máu người nhận cao hơn;
- (6) Trong máu dây rốn chứa quần thể tế bào NK đầu dòng mà bình thường không xuất hiện (hoặc có rất ít) trong máu ngoại vi;
- (7) Một số nghiên cứu còn chỉ ra rằng khi bị kích thích bởi IL-12 và IL-18 các tế bào NK ở máu dây rốn có khả năng tiết IFN- γ lớn hơn và đồng thời tăng biểu hiện thụ thể hoạt hóa CD69 so với các tế bào NK từ máu ngoại vi;

- (8) Sự biểu hiện mạnh thụ thể CXCR4, một thụ thể hướng đích đến tủy xương, sẽ giúp tế bào NK từ máu dây rốn có khả năng tập trung về tủy xương nhiều hơn so với tế bào NK từ máu ngoại vi. Đặc điểm này rất có ý nghĩa trong việc sử dụng tế bào NK máu dây rốn để điều trị các dạng ung thư máu dòng tủy.

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 thực hiện 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/HĐĐD VMEC, ngày 15/06/2017.
- 59 mẫu máu dây rốn được thu thập từ em bé của các sản phụ khỏe mạnh, mang thai từ tuần 37 trở đi, không mắc các loại virus viêm gan B, C, HIV, CMV (Cytomegalovirus) và Giang mai. Các sản phụ ký cam kết tình nguyện hiến mẫu máu dây rốn. Mẫu máu dây rốn được thu thập tại Bệnh viện đa khoa quốc tế Vinmec từ tháng 7/2017 đến 5/2018.
- Phân tích hồi cứu đặc điểm quần thể tế bào NK trước và sau nuôi cấy của chín bệnh nhân (8 bệnh nhân nam, 1 bệnh nhân nữ) mắc ung thư dạ dày, gan và phổi thực hiện liệu pháp tế bào NK tự thân từ tháng 12 năm 2015 đến tháng 6 năm 2017 tại bệnh viện đa khoa quốc tế Vinmec.
- Nghiên cứu nuôi cấy tăng sinh tế bào NK máu dây rốn và phân tích các đặc điểm của tế bào NK trong quá trình nuôi cấy từ 7/2017 đến 7/2021.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu thập mẫu

Phương pháp này được tiến hành theo quy trình kỹ thuật Thu thập máu dây rốn được ban hành tại Bệnh viện đa khoa quốc tế Vinmec.

Chuẩn bị

- Vật tư: Túi thu thập máu cuống rốn hoặc ống lấy máu có chất chống đông ACD hoặc Heparin; bơm tiêm; gạc; găng tay vô khuẩn;
- Thuốc, hóa chất: Betadin hoặc cồn 70 độ

Tiến hành

- Sau khi đỡ em bé ra khỏi buồng tử cung, bác sỹ/nữ hộ sinh dùng 02 panh vô khuẩn kẹp phần dây rốn ở phía gần em bé; tiếp theo Bác sỹ cắt rời phần dây rốn giữa 2 panh để tách em bé khỏi mẹ và chuẩn bị thu thập máu dây rốn.
- Sát khuẩn dây rốn bằng cồn 70 độ hoặc dung dịch betadin. Chọc kim vào tĩnh mạch dây rốn và để cho máu dây rốn tự chảy vào túi thu thập hoặc dùng xy lanh hút máu từ tĩnh mạch dây rốn sau đó chuyển sang các ống lấy máu. Mẫu sau thu thập được bảo quản trong điều kiện 15-25°C và sẽ được tiến hành xử lý trong vòng 24 giờ.

2.2.2. *Phương pháp phân lập tế bào đơn nhân bằng hệ thống AXP*

Phương pháp này được tiến hành theo quy trình kỹ thuật Xử lý máu dây rốn được ban hành tại Bệnh viện đa khoa quốc tế Vinmec.

Vật tư tiêu hao:

- Bộ túi xử lý máu dây rốn kín AXP, Thermogenesis;

Thiết bị:

- Máy ly tâm túi máu lạnh Thermofisher, Mỹ
- Hệ thống xử lý máu dây rốn tự động, AXP-Thermogenesis, Mỹ

Hóa chất:

- Dung dịch bảo quản DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Protide, Pharmaceutical), bảo quản 15-30°C.
- Dung dịch DEXTRAND T40 (Protide, Pharmaceutical), bảo quản ở 2-8°C.

Tiến hành:

- Chuyển toàn bộ mẫu máu dây rốn từ túi thu thập sang bộ kit xử lý xchueen dụng. Tiến hành lắp bộ kit vào device theo hướng dẫn sử dụng.
- Ly tâm túi máu lần 1 để tạo các phân lớp với tốc độ 1400 g, 10 phút, 10 độC
- Ly tâm túi máu lần 2 để hệ thống tự động thu lớp buffycoat (bao gồm tế bào đơn nhân (MNC_Mononuclear cells), tiểu cầu và hồng cầu) chuyển sang túi chuyên dụng.
- Mẫu tế bào buffycoat sau xử lý được trộn đều và lấy mẫu để đếm số lượng tế bào bằng hệ thống đếm công thức máu.
- Mẫu tế bào được trộn với dung dịch bảo quản chứa DMSO và Dextrand (2-8°C) sao cho nồng độ cuối dùng là 10% DMSO và 1% Dextrand, tiếp đó được hạ lạnh và bảo quản lâu dài ở điều kiện nhiệt độ <-150°C

2.2.3. *Phương pháp phân lập MNC bằng ly tâm sử dụng ficoll*

Phương pháp này được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất hóa chất, được công bố tại trang <https://www.stemcell.com/>

Hóa chất:

- Dung dịch đệm phosphat PBS 1X (Phosphate-Buffered Saline), Gibco
- Dung dịch Ficoll (GE Healthcare hoặc Stemcell)
- Thuốc nhuộm nhân tế bào Turk's, Sigma , Aldrich

Vật tư tiêu hao

- Ống ly tâm; Pipet nhựa; Buồng đếm tế bào; đầu tip vô khuẩn, ...

Thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp II, Thermofisher, Mỹ
- Kính hiển vi soi ngược, Olympus, Nhật

- Tủ nuôi cấy tế bào, Thermofisher, Mỹ
- Máy ly tâm Eppendorf, Đức
- Tủ lạnh bảo quản hóa chất; máy ủ nhiệt khô, ...

Tiến hành

- Mẫu máu sau khi thu huyết tương được pha loãng với dung dịch PBS và chuyển nhẹ nhàng vào ống ly tâm 50mL đã chứa sẵn ficoll theo tỷ lệ thể tích (2:1).
- Ly tâm ống mẫu với tốc độ 840 g trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 20°C, thu lớp tế bào đơn nhân ở giữa và chuyển sang ống ly tâm 50mL.
- Bổ sung dung dịch PBS 1X, trộn đều và ly tâm với tốc độ 640 g trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 20°C. Loại bỏ dịch nổi sau ly tâm và bổ sung thêm dung dịch PBS 1X, trộn đều rồi lấy 0,5 mL để đếm tổng số lượng tế bào bằng máy đếm công thức máu.
- Tiếp tục ly tâm mẫu với tốc độ 270 g trong 8 phút ở nhiệt độ 20°C để thu tế bào đơn nhân chuẩn bị cho bước nuôi cấy và lưu trữ.
- Tế bào sau phân lập sẽ được lưu trữ trong dung dịch bảo quản chứa 10% DMSO và huyết tương tự thân, với nồng độ $20-30 \times 10^6$ tế bào/ml hoặc dung dịch bảo quản pha sẵn CryoStor® CS10 Cell Freezing, StemCell chứa 10% DMSO.

2.2.4. Phân tích các dấu ấn bề mặt bằng phương pháp dòng chảy tế bào

Phương pháp này được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất kháng thể được công bố tại trang mạng <https://www.mybeckman>.

Chuẩn bị

- Chuẩn bị các kháng thể:
 - o CD34, CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD56, CD45 hãng Beckman Coulter và BD gắn màu huỳnh quang phù hợp để phân tích tỉ lệ các quần thể tế bào miễn dịch và tế bào gốc tạo máu có trong máu cuống rốn
 - o CD94, NKG2D, CD158a, CD158b, NKp44, CD158e, NKG2C, NKp30 và NKp46 hãng Beckman Coulter gắn huỳnh quang phù hợp để phân tích tỉ lệ các dấu ấn hoạt hóa và ức chế trên tế bào NK.
- Dung dịch ly giải hồng cầu VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter)
- Thiết bị phân tích tế bào dòng chảy Navios, Beckman Coulter.

Loại mẫu

- 1ml mẫu máu cuống rốn toàn phần sau thu thập để phân tích đặc điểm các quần thể tế bào miễn dịch trong máu cuống rốn
- 1ml dịch tế bào NK nuôi cấy để phân tích các đặc điểm của tế bào NK trong, sau nuôi cấy

Tiến hành

- Bổ sung 10µl kháng thể (theo khuyến cáo của nhà sản xuất) vào 100 µl mẫu (khoảng 10^5 - 10^6 tế bào), trộn đều và ủ tại 4 độ C trong khoảng 20-30 phút.
- Sau đó bổ sung 1ml dung dịch ly giải hồng cầu đối với các mẫu nhiều hồng cầu (máu cuống rốn toàn phần) hoặc 1ml dung dịch đệm PBS 1x đối với mẫu tế bào nuôi cấy không có hồng cầu.
- Chuyển mẫu lên máy Navios, Beckman Coulter và phân tích bằng phần mềm Navios

2.2.5. Phương pháp nhân nuôi tế bào NK

Phương pháp này được tiến hành dựa trên hướng dẫn của nhà sản xuất hóa chất Biotherapy Institute of Japan, Nhật Bản và đã được mô tả ngắn gọn trong công bố trước đó của nhóm nghiên cứu Nguyễn Thanh Liêm và Hoàng Thị Mỹ Nhung (Nhung, 2018 #68).

Hóa chất

- Bộ Kit nuôi cấy tế bào NK đặc hiệu: BINKIT, Nhật Bản:
 - o NK Cell Initial Flask: Chai nuôi cấy sơ cấp đã được xử lý bề mặt đáy chai gắn các kháng thể đơn dòng.
 - o NK Cell Initial Medium: Môi trường nuôi cấy sơ cấp cho tế bào NK
 - o NK Cell Initial Cocktail: Cocktail cho nuôi cấy sơ cấp đã được bổ sung các yếu tố tăng trưởng chọn lọc chuyên biệt cho tế bào NK.
 - o NK Cell Subculture Medium: Môi trường nuôi cấy thứ cấp cho tế bào NK.
- Dung dịch PBS 1x, Ficoll (GE Healthcare)
- Thuốc nhuộm nhân tế bào Turk's

Vật tư tiêu hao:

- Chai nuôi cấy (hãng Corning_Falcon) T25, T75, T225
- Túi nuôi cấy (hãng Nipro, Nhật) sử dụng với mẫu có thể tích lớn mà chai nuôi cấy không thể đáp ứng
- Ống ly tâm, pipet nhựa, đầu tip vô khuẩn dùng 1 lần (hãng Corning_Falcon)
- Buồng đếm tế bào dùng 1 lần (C-Chip, Hàn Quốc)

Thiết bị:

- Tủ an toàn sinh học cấp II, Thermofisher, Mỹ
- Kính hiển vi soi ngược, Olympus, Nhật
- Tủ nuôi cấy tế bào, Thermofisher, Mỹ
- Máy ly tâm Eppendorf, Đức
- Tủ lạnh bảo quản hóa chất; máy ủ nhiệt khô, ...

Các bước thực hiện

Bước 1: Thu nhận huyết tương máu dây rốn:

- Ly tâm máu với tốc độ 1710 g trong 10 phút ở nhiệt độ 20°C để thu huyết tương.
- Huyết tương được bất hoạt ở 58°C trong thời gian 60 phút.
- Ly tâm tại 1710 g trong 5 phút ở nhiệt độ 20°C để loại bỏ protein tủa.

Bước 2: Phân lập tế bào đơn nhân theo mục 2.2.3

Bước 3: Nuôi cấy tăng sinh tế bào NK

Giai đoạn nuôi cấy sơ cấp tế bào NK

- Chuẩn bị chai nuôi cấy sơ cấp: Chai nuôi cấy sơ cấp dành cho tế bào NK được rửa 2 lần với dung dịch PBS 1X.
- Mật độ tế bào nuôi cấy: 1×10^6 tế bào/ml, huyết tương tự thân được bổ sung theo tỷ lệ thể tích là 5% so với môi trường nuôi cấy sơ cấp.
- Bổ sung Initial Cocktail cho tế bào NK theo tỉ lệ thể tích là 40 μ L/1mL môi trường sơ cấp.
- Tế bào đơn nhân được hòa đều trong môi trường nuôi cấy sơ cấp, sau đó chuyển toàn bộ dung dịch chứa tế bào NK vào chai nuôi cấy tế bào.
- Nuôi cấy tế bào bằng vào tủ nuôi cấy ở điều kiện 37°C với 5% CO₂ trong 72 giờ (3 ngày).

Giai đoạn nuôi cấy thứ cấp tế bào NK

- Thay môi trường nuôi cấy sơ cấp: Thu dịch huyền phù tế bào nuôi cấy và tiến hành ly tâm với tốc độ 270 g trong 8 phút, nhiệt độ phòng. Loại bỏ phần dịch nổi sau ly tâm.
- Môi trường nuôi cấy thứ cấp chứa 5% huyết tương tự thân được sử dụng để nuôi cấy tế bào trong giai đoạn thứ cấp với mật độ 1×10^6 tế bào/ml, nuôi cấy ở điều kiện 37°C với 5% CO₂ trong tủ nuôi cấy chuyên dụng.

Kiểm tra và bổ sung môi trường nuôi cấy thứ cấp 2-3 ngày/lần, không loại môi trường cũ, và việc này phụ thuộc vào tốc độ tăng sinh của tế bào, sao cho tế bào được nuôi cấy ở mật độ $0,6 \times 10^6 - 3,0 \times 10^6$ tế bào/ml. Thể tích huyết tương tự thân bổ sung từ ngày thứ 5 trở đi với nồng độ dưới 5-10% cho đến khi hết. Khi tế bào đạt số lượng khoảng trên 100×10^6 , có thể chuyển tế bào từ chai nuôi cấy sang túi nuôi cấy.

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

Loại mẫu

- Tế bào thương mại K562 là dòng tế bào ung thư bạch cầu dòng tuỷ mạn tính, hình thái dạng tròn và sống trôi nổi trong môi trường nuôi cấy. Dòng tế bào này

được cung cấp bởi ngân hàng tế bào nguồn sinh học nghiên cứu Nhật Bản (Japanese Collection of Research Bioresources Cell bank-JCRB)

Thiết bị:

- Tủ an toàn sinh học cấp 2; tủ nuôi cấy tế bào; kính hiển vi soi ngược; máy ly tâm lạnh; bể ổn nhiệt; tủ bảo quản hóa chất...

Vật tư tiêu hao:

- Chai nuôi cấy (hãng Corning_Falcon) T25, T75, T225
- Túi nuôi cấy (hãng Nipro, Nhật) sử dụng với mẫu có thể tích lớn mà chai nuôi cấy không thể đáp ứng
- Ống ly tâm, pipet nhựa, đầu tip vô khuẩn dùng 1 lần (hãng Corning_Falcon)
- Buồng đếm tế bào dùng 1 lần (C-Chip, Hàn Quốc)

Hóa chất:

- Môi trường nuôi cấy RPMI 1640 (Gibco)
- Huyết thanh bò (Fetal bovine serum – FBS, Gibco)
- Dung dịch PBS 1X (Gibco);
- Thuốc nhuộm Trypan Blue (Thermo Fisher Scientific);
- Dung dịch DMSO (Stemsol, Protide Pharmaceutical);
- Penicillin/Streptomycin (Gibco).

Các bước tiến hành

- Sau khi xác định số lượng và tỷ lệ sống/chết của tế bào bằng thuốc nhuộm Trypan blue, tiến hành nuôi tế bào trong môi trường nuôi cấy RPMI có bổ sung 10% FBS sao cho mật độ tế bào đạt $0,2 \times 10^6$ tế bào/ml. Kiểm tra tế bào dưới kính hiển vi và bổ sung môi trường nuôi cấy sau mỗi 2-3 ngày.
- Tế bào dòng thương mại K562 được nuôi cấy trong môi trường RPMI có bổ sung 10% FBS (Fetal bovine serum) và kháng sinh Penicillin/Streptomycin nồng độ 50 IU/ml trong điều kiện 37°C, 5% CO₂.
- Tế bào K562 được lưu trữ trong môi trường RPMI có bổ sung 20% FBS và 10% DMSO (Dimethyl sulfoxide) trong điều kiện bảo quản dưới -150 độ C.
- Tế bào K562 được rã đông trong môi trường nuôi cấy RPMI có bổ sung 20% FBS và Penicillin/Streptomycin nồng độ 50 IU/ml trong điều kiện 37°C với 5% CO₂ trong lần cấy chuyển đầu tiên.

2.2.7. Phương pháp nhân nuôi tế bào KHYG-1

Phương pháp này được tiến hành dựa trên hướng dẫn sử dụng của nhà cung cấp dòng tế bào KHYG-1, Ngân hàng JCRB tại website <https://cellbank.nibn.go.jp>.

Loại tế bào

- Tế bào KHYG là dòng tế bào ung thư NK (Natural Killer Cell) KHYG-1 được phân lập năm 1997 từ máu ngoại vi của một phụ nữ 45 tuổi mắc bệnh ung thư máu dòng NK. Tế bào có khả năng gây độc tính mạnh với tế bào ung thư dòng K562. Tế bào KHYG được cung cấp bởi ngân hàng tế bào nguồn sinh học nghiên cứu Nhật Bản (Japanese Collection of Research Bioresources Cell bank - JCRB)

Thiết bị:

- Tủ an toàn sinh học cấp 2; tủ nuôi cấy tế bào; kính hiển vi soi ngược; máy ly tâm lạnh; bể ổn nhiệt; tủ bảo quản hóa chất...

Vật tư tiêu hao:

- Chai nuôi cấy (hãng Corning_Falcon) T25, T75, T225
- Túi nuôi cấy (hãng Nipro, Nhật) sử dụng với mẫu có thể tích lớn mà chai nuôi cấy không thể đáp ứng
- Ống ly tâm, pipet nhựa, đầu tip vô khuẩn dùng 1 lần (hãng Corning_Falcon)
- Buồng đếm tế bào dùng 1 lần (C-Chip, Hàn Quốc)

Hóa chất:

- Môi trường nuôi cấy RPMI 1640 (Gibco)
- Huyết thanh bò (Fetal bovine serum – FBS, Gibco)
- Dung dịch PBS 1X (Gibco);
- Thuốc nhuộm Trypan Blue (Thermo Fisher Scientific);
- Dung dịch DMSO (Stemsol, Protide Pharmaceutical);
- Penicillin/Streptomycin (Gibco).

Các bước tiến hành

- Sau khi xác định số lượng và tỷ lệ sống/chết của tế bào bằng thuốc nhuộm Trypan blue, tiến hành nuôi tế bào trong điều kiện 37 độ C, 5% CO₂ với môi trường nuôi cấy RPMI có bổ sung 10% FBS, 200 IU/ml IL-2 và kháng sinh Penicillin/Streptomycin nồng độ 50 IU/ml; sao cho mật độ tế bào đạt $0,4 \times 10^6$ tế bào/ml được duy trì. Kiểm tra tế bào dưới kính hiển vi, đếm số lượng tế bào và bổ sung môi trường nuôi cấy mới sau mỗi 2-3 ngày.
- Tế bào KHYG được lưu trữ trong môi trường RPMI có bổ sung 20% FBS và 10% DMSO trong điều kiện bảo quản dưới -150 độ C.
- Tế bào KHYG được rã đông trong môi trường nuôi cấy RPMI có bổ sung 20% FBS và Penicillin/Streptomycin nồng độ 50 IU/ml trong điều kiện 37°C với 5% CO₂ ở lần cấy chuyển đầu tiên.

2.2.8. Phương pháp đánh giá hoạt tính tế bào NK

Phương pháp này được xây dựng dựa trên mô tả đầu tiên của nhóm tác giả Dewan và cộng sự [118].

Nguyên lý:

Sau khi các tế bào NK (Effector cell) được ủ với các tế bào đích là các tế bào ung thư K562 (Target cell) ở các nồng độ khác nhau, các tế bào miễn dịch sẽ thể hiện khả năng tiêu diệt tế bào ung thư của chúng bằng con đường gây độc không qua trung gian tế bào. Dựa trên sự suy giảm tín hiệu huỳnh quang của chất nhuộm Calcein-Acetyoxymethyl (Calcein-AM) trên tế bào ung thư K562 đã được nhuộm, để đánh giá khả năng tiêu diệt tế bào ung thư K562 của các tế bào miễn dịch sau một khoảng thời gian 3 giờ.

Trang thiết bị

- Hệ thống máy đánh giá hoạt tính Terascan (Nhật Bản)
- Máy ly tâm lạnh, tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ nuôi cấy tế bào, kính hiển vi soi ngược...

Vật tư tiêu hao

- Ống ly tâm, pipet vô khuẩn dùng 1 lần (Corning_Falcon)
- Đĩa nuôi cấy 96 giếng loại *half area* đáy phẳng (Corning)
- Buồng đếm tế bào dùng 1 lần C-Chip (Hàn Quốc)

Hóa chất

- Môi trường nuôi cấy RPMI 1640 (Gibco)
- PBS 1x (Gibco)
- FBS (Gibco)
- Thuốc nhuộm Calcein AM (Invitrogen)
- Thuốc nhuộm trypan blue (Gibco)
- DCN 90

Tiến hành

- Đếm số lượng và chuẩn bị tế bào gây độc (Effector cell-E) là tế bào NK sau nuôi cấy, hoạt hóa ở 4 nồng độ như sau:
 - o NK 1: 4×10^6 tế bào/ml (Tương ứng với tỷ lệ E/T = 40)
 - o NK 2: 2×10^6 tế bào/ml (Tương ứng với tỷ lệ E/T = 20)
 - o NK 3: 1×10^6 tế bào/ml (Tương ứng với tỷ lệ E/T = 10)
 - o NK 4: $0,5 \times 10^6$ tế bào/ml (Tương ứng với tỷ lệ E/T = 5)
- Nhuộm tế bào đích K562 (Target cell - T) với Calcein-AM.
- Chuẩn bị $2,5 \times 10^6$ tế bào K562 trong 2,5ml môi trường nuôi, bổ sung Calcein-AM với mật độ $10 \mu\text{g/ml}$ vào ống tế bào và ủ tại 37°C với 5% CO_2 trong 30 phút.
- Bổ sung PBS 1X tới 15ml vào ống ly tâm, trộn đều và ly tâm với tốc độ 270 g trong 8 phút ở nhiệt độ 20°C . Thực hiện 2 lần.

- Hòa tan khối tế bào thu được trong môi trường RPMI 10% FBS sao cho mật độ đạt $0,2 \times 10^6$ tế bào/ml.
- Chuẩn bị tế bào đối chứng: tế bào KHYG
Hòa tan khối tế bào thu được trong môi trường nuôi cấy với mật độ 4×10^6 tế bào/ml.
Chuẩn bị tế bào KHYG trong môi trường nuôi cấy theo 4 nồng độ khác nhau:
 - KHYG 1: 4×10^6 tế bào/ml (Tương ứng với tỷ lệ E/T = 40)
 - KHYG 2: 2×10^6 tế bào/ml (Tương ứng với tỷ lệ E/T = 20)
 - KHYG 3: 1×10^6 tế bào/ml (Tương ứng với tỷ lệ E/T = 10)
 - KHYG 4: $0,5 \times 10^6$ tế bào/ml (Tương ứng với tỷ lệ E/T = 5)
- Chuyển 50 μ l tế bào K562 (tương đương với 10.000 tế bào) vào các giếng và ủ với 100 μ l các ống tế bào NK, KHYG trên đĩa 96 giếng theo các tỉ lệ và bố trí như sau:

Bảng 2. 1. Sơ đồ bố trí thí nghiệm đánh giá hoạt tính

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		P	C	KHYG 100 μ l KHYG + 50 μ l K562				Sample 1 100 μ l NK + 50 μ l K562				
C		P	C									
D		P	C									
E				Sample 2 100 μ l NK + 50 μ l K562				Sample 3 100 μ l NK + 50 μ l K562				
F		N	N									
G		N	N									
H												

Trong đó:

PC = mẫu đối chứng dương: tế bào K562 + môi trường RPMI + DCN 90

C = mẫu đối chứng: chỉ có môi trường RPMI

NC = mẫu đối chứng âm: tế bào K562 + môi trường RPMI

KHYG = tế bào KHYG + tế bào K562

Sample= tế bào NK + tế bào K562

- Bổ sung 150µl môi trường RPMI vào các giếng C, 100µl vào các giếng NC và PC.
- Trộn đều tất cả các giếng chứa tế bào.

Đo mẫu thời điểm 0 giờ, 3 giờ: Đo cường độ tín hiệu huỳnh quang đĩa thí nghiệm bằng hệ thống đánh giá hoạt tính tế bào Terascan, ghi nhận thời điểm 3 giờ.

Phân tích kết quả

- Kết quả được máy phân tích bằng phần mềm chuyên dụng và thể hiện dạng biểu đồ là tỷ lệ phần trăm (%) hoạt tính tiêu diệt tế bào ung thư ở các nồng độ khác nhau, trong đó phần trăm hoạt tính được đánh giá dựa trên cường độ tín hiệu huỳnh quang đo được ở các giếng.

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

Phương pháp này được tiến hành theo quy trình kỹ thuật được ban hành tại bệnh viện đa khoa quốc tế Vinmec.

Nguyên lý

Sử dụng chất kích thích tế bào phân chia, sau đó dùng colcemid để tế bào dừng phân chia ở kỳ giữa (metaphases) hoặc kỳ giữa sớm (prometaphases). Các tế bào sau đó được phá vỡ màng bằng việc cho sốc nhược trương. Bộ nhiễm sắc thể của tế bào được cố định trên tiêu bản và nhuộm bang, sau đó được phân tích kiểu nhiễm sắc thể theo tiêu chuẩn ISCN (*International System for Human Cytogenomic Nomenclature 2016*).

Loại mẫu

- Tế bào NK đang trong pha tăng trưởng (từ ngày nuôi cấy thứ 18 trở đi) được nuôi ở mật độ 1×10^6 tế bào/ml

Chuẩn bị

- Trang thiết bị: Tủ an toàn sinh học cấp II (Thermo Fisher, Mỹ), Tủ ẩm nuôi cấy có CO₂ (Thermo Fisher, Mỹ), Tủ hút hóa chất (Thermo Fisher, Mỹ), Kính hiển vi quang học (Leica, Đức), Máy ly tâm (Eppendorf, Đức), Pipet aid (Eppendorf, Đức), Bàn sấy mẫu.

Vật tư

- Chai nuôi cấy (Corning_Falcon)
- Ống ly tâm, pipet, găng tay, giấy thấm

Hóa chất

- Môi trường RPMI 1640 (Gibco);
- Huyết thanh bào thai bê (FBS) (Gibco);
- Phytohemagglutinin (PHA) (Gibco);
- Dung dịch Karyomax Colcemide nồng độ 10µg/ml (Gibco);

- Dung dịch nhược trương KCl 0,56%; Methanol, Acid acetic (Sigma-Aldrich)
- Dung dịch sodium hypochlorite 10% hoặc bột giặt; Cồn 70° (Việt Nam).

Tiến hành

- **Chuẩn bị trước thu hoạch tế bào:**
 - o Làm ấm KCl 0.56% ở 37 độ C trong 1 giờ trước thu hoạch
 - o Pha dung dịch Carnoy theo tỷ lệ 3 Methanol/1 Acid acetic
 - o Phiến kính được ngâm với dung dịch sodium hypochlorite 10% qua đêm và ngâm nước cất trước khi sử dụng.
- **Thu hoạch tế bào:**
 - o Bổ sung PHA vào mỗi chai nuôi cấy tế bào sao cho thể tích PHA đạt 2,5%, trộn đều. Nuôi cấy tế bào trong 48 giờ.
 - o Bổ sung dung dịch colcemide vào mỗi chai nuôi cấy sao cho nồng độ đạt 10µl/ml, ủ ở tủ nuôi cấy trong 22 phút.
 - o Chuyển toàn bộ dung dịch ở chai nuôi cấy vào ống ly tâm, ly tâm 1800 vòng/phút trong 5 phút, loại dịch nổi. Tiếp theo bổ sung 9ml KCl 0,56% đã để ấm 37°C trước, trộn nhẹ, ủ trong 18 phút ở nhiệt độ phòng.
 - o Tiếp tục bổ sung 0.5-1 ml dung dịch Carnoy, trộn nhẹ ly tâm 1800 vòng/phút trong 5 phút, loại dịch nổi.
 - o Bổ sung 6ml Carnoy, ủ trong 15 phút trộn nhẹ ly tâm 1800 vòng/phút trong 5 phút, loại dịch nổi. Lặp lại bước này 2-3 lần.
 - o Giữ lại 1-2ml cặn tế bào sau khi rửa Carnoy
- **Lên tiêu bản**
 - o Trộn đều cặn tế bào, phun khoảng 100µl cặn tế bào lên mỗi tiêu bản, làm khô trên bàn sấy 60°C. 2-3 tiêu bản/1 chai nuôi cấy.
 - o Kiểm tra chất lượng tiêu bản bằng kính hiển vi soi ngược đánh giá số lượng và chất lượng cụm nhiễm sắc thể.
 - o Giữ tiêu bản trên bàn sấy 60°C hoặc tủ ấm 60°C qua đêm.
- **Nhuộm băng và lập công thức nhiễm sắc thể**
- Chuẩn bị hóa chất:
 - o Cốc 1: Pha 0,05g trypsin bột vào 50ml nước muối 0,9‰;
 - o Cốc 2: Pha 100ml FBS 2‰;
 - o Cốc 3: Nước muối 9‰;
 - o Cốc 4: Nước muối 9‰;
 - o Cốc 5: Pha Giêmsa 10% trong đệm pH 6,8;
 - o Cốc 6: Đệm pH 6,8.

- Nhúng tiêu bản trong cốc 1 từ 1 - 2 phút;
- Chuyển sang cốc 2/30 giây;
- Chuyển sang cốc 3/15 giây;
- Chuyển sang cốc 4/15 giây;
- Chuyển sang cốc 5 /10 phút;
- Chuyển sang cốc 6 /15 giây;
- Rửa dưới vòi nước chảy

Phân tích kết quả: Tiêu bản sau khi nhuộm bằng G được phân tích bất thường về số lượng, cấu trúc trên kính hiển vi ở độ phóng đại 1.000 lần và được phân tích bằng phần mềm chuyên dụng.

2.2.10. Phương pháp xác định nội độc tố endotoxin

- Endotoxin là một dạng của chất gây sốt, có bản chất lipopolysaccharide. Thành phần chính của thành tế bào vi khuẩn gram âm, có đặc tính rất bền với nhiệt, là một trong những nguồn gây nhiễm hệ thống nuôi cấy và xử lý tế bào. Endotoxin cũng được tìm thấy trong nước, huyết thanh và các sản phẩm bổ sung cho nuôi cấy, đặc biệt là những sản phẩm lên men hoặc được sản xuất bằng hệ thống vi khuẩn.
- Nồng độ endotoxin trong các mẫu xét nghiệm có thể được định lượng bằng phép thử nội độc tố vi khuẩn. Phương pháp sử dụng thuốc thử Limulus Amebocyte Lysate là dịch ly giải có trong máu một loài sam biển, *Limulus polyphemus* hoặc *Tachypleus tridentatus*. Nguyên lý của xét nghiệm dựa vào việc đo độ đục chất màu được giải phóng ra từ phản ứng giữa thuốc thử LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) với nội độc tố của vi khuẩn để xác định nồng độ nội độc tố - endotoxin có trong khối tế bào sử dụng để truyền cho người bệnh.
- Phương pháp này được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất thiết bị, được công bố tại trang mạng www.criver.com.

Thiết bị

- Máy Endosafe – PTS, Charles River, Mỹ;
- Máy vortex; Pipet...

Vật tư

- Đầu Tip; Găng vô khuẩn;
- Ống thủy tinh Charles River T-300 không chứa endotoxin

Hóa chất

- Thẻ PTS – 100 độ nhạy từ 0,005 EU – 0,5 EU (Charles River);
- Dung dịch LAL Reagent (Charles River).

Loại mẫu

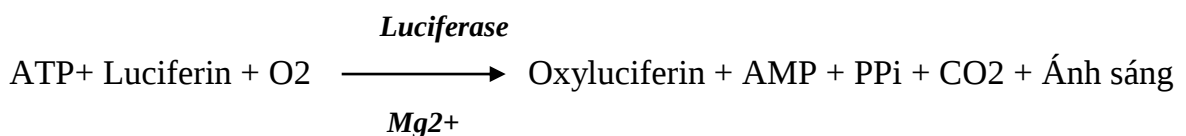
- Môi trường nuôi cấy tế bào NK tại ngày nuôi cấy thứ 18 trở đi.

Tiến hành:

- Bước 1: Khởi động thiết bị Endosafe – PTS, đợi cho máy gia nhiệt lên 37°C.
- Bước 2: Pha loãng mẫu
- Bước 3: Cài đặt thiết bị Endosafe – PTS
- Bước 4: Tra mẫu
 - Hút 25µl mẫu đã chuẩn bị vào đủ 4 giếng của thẻ PTS, nhấn Enter
 - Thời gian hút mẫu và phân tích kết quả của máy trong vòng khoảng 15 phút
- Bước 5: Phân tích và ghi nhận kết quả
- Kết thúc thời gian chạy mẫu, kết quả sẽ tự động được in từ máy in

2.2.11. Phương pháp xét nghiệm mycoplasma

- Mycoplasma là sinh vật nhân sơ (prokaryote) kích thước nhỏ và cấu trúc đơn giản. Chúng sống phụ thuộc vào vật chủ để lấy dinh dưỡng trong suốt quá trình sinh tổng hợp. Việc kiểm tra sự có mặt của Mycoplasma giúp hạn chế tổn thất lớn khi nuôi cấy tế bào dài ngày, đồng thời kiểm soát sản phẩm tế bào trước khi tiêm truyền vào cơ thể người.
- Phương pháp sử dụng kit MycoAlert® Mycoplasma plus cho phép xác định sự có mặt của 44 loài Mycoplasma phổ biến một cách nhanh và chính xác nhất. Nguyên lý của phương pháp này dựa trên Mycoplasma bị dung giải sẽ giải phóng ra môi trường enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa ADP thành ATP và sẽ nhanh chóng làm gia tăng nồng độ ATP trong cơ chất. Bằng việc đo độ phát quang sinh học của phản ứng dưới đây trước và sau khi bổ sung cơ chất, sẽ cho biết sự có mặt hay không của Mycoplasma:



- Phương pháp này được tiến hành dựa trên hướng dẫn của nhà sản xuất thiết bị và hóa chất, được công bố tại website <https://bioscience.lonza.com/>.

Trang thiết bị

- Pipet, máy vortex;
- Thiết bị đo độ phát quang Lucetta Luminometer, Lonza, Thụy Sĩ;

Vật tư

- Găng tay vô khuẩn, đầu tip,
- Ống đựng mẫu thủy tinh vô khuẩn (Charlie River)

Hóa chất

- Kit MycoAlert™ Plus Mycoplasma Detection – Lonza;

- Kit MycoAlert™ Assay Control Lonza;

Loại mẫu

- Môi trường nuôi cấy tế bào NK từ ngày nuôi cấy thứ 18 trở đi

Thực hiện kỹ thuật:

- Chuẩn bị mẫu và đo kết quả
 - o Kiểm tra mẫu, nếu mẫu có tế bào hoặc cặn tế bào, tiến hành ly tâm 300g x 5 phút để loại bỏ cặn tế bào
 - o Chuẩn bị 03 ống xét nghiệm đã được gắn nhãn:
 - o Ống chứng Dương: 80µl mẫu đối chứng dương - Kit MycoAlert™ Assay Control
 - o Ống chứng âm: 80µl đối chứng âm - MycoAlert™ PLUS Assay Buffer
 - o Ống mẫu: 80µl môi trường nuôi cấy tế bào NK
- Bổ sung 80µl dung dịch MycoAlert Reagent vào mỗi ống xét nghiệm, lắc đều các ống, ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng.
- Lần lượt đặt các ống xét nghiệm chứa mẫu vào máy đo, ghi nhận kết quả đo A của mỗi loại mẫu.
- Tiếp tục bổ sung 80µl cơ chất MycoAlert Substrate vào mỗi ống nghiệm, lắc đều các ống, ủ mẫu trong 10 phút, nhiệt độ phòng.
- Lần lượt đặt các ống nghiệm chứa mẫu vào máy đo, ghi nhận kết quả đo B của mỗi loại mẫu.
- Thiết bị hiển thị kết quả tỷ lệ $X = B/A$ cho từng mẫu, trong đó:
 - o $X < 1$ Âm tính
 - o $1 \leq X \leq 1.2$ Nghi ngờ
 - o $X > 1.2$ Dương tính

2.2.12. Phương pháp xác định tỉ lệ sống tế bào bằng trypan blue

Xanh trypan là: một loại thuốc nhuộm dùng để phân biệt giữa tế bào sống và tế bào chết. Đây là một thuốc nhuộm không được hấp thụ quan thành của các tế bào sống khỏe mạnh, mà chỉ được hấp thụ qua thành của các tế bào chết.

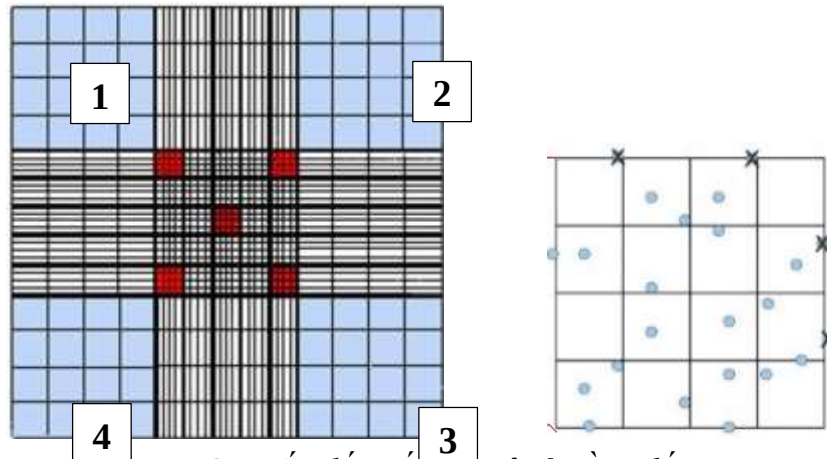
Phương pháp này được tiến hành dựa trên hướng dẫn của nhà sản xuất hóa chất được công bố tại trang mạng <https://www.thermofisher.com/>

Tiến hành

- Trộn đều tế bào bằng pipet, lấy 10-20µl hỗn hợp tế bào và ống Eppendorf
- Trộn đều tế bào với chất nhuộm xanh trypan theo tỉ lệ 1:1 và chuyển 10µl hỗn hợp sang buồng đếm hồng cầu chuyên dụng.
- Đếm số lượng tế bào, trong đó:

- Tế bào sống là tế bào không bắt màu thuốc nhuộm bên trong tế bào chất
- Tế bào chết là tế bào bắt màu thuốc nhuộm.

Cách đếm: đếm tế bào bên trong 4 ô vuông lớn và các tế bào nằm trên 02 cạnh bất kỳ của 4 ô vuông lớn đó thuộc buồng đếm (như hình 13)



Hình 2. 1. Quy tắc đếm tế bào trên buồng đếm

- Số lượng tế bào sống được tính theo công thức:

$$\text{Tổng số tế bào sống} = \frac{\text{Số lượng tế bào sống đếm được}}{2} \times 2 \times 10^4 \times \text{thể tích (ml)} \quad (\text{tế bào})$$

- Tỷ lệ tế bào sống được xác định bằng công thức

$$\text{Tỷ lệ \% tế bào sống} = \frac{\text{Số tế bào sống}}{\text{Tế bào sống} + \text{Tế bào chết}} \times 100\%$$

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

Thuốc nhuộm Turk's là: là một chất nhuộm huyết học (có màu tím pha lê hoặc xanh methylene trong dung dịch nước) được pha chế trong axit axetic 99%. Dung dịch này sẽ phá hủy các tế bào hồng cầu và tiểu cầu trong mẫu máu (axit axetic là tác nhân ly giải chính) và nhuộm màu nhân của các tế bào bạch cầu, giúp chúng dễ nhìn và đếm hơn.

Phương pháp này được tiến hành dựa trên hướng dẫn của nhà sản xuất hóa chất được công bố tại trang mạng <https://www.sigmaaldrich.com/>

Tiến hành:

- Trộn đều dung dịch tế bào bằng pipet, lấy 10-20μl hỗn hợp tế bào và ống eppendorf
- Trộn đều tế bào với chất nhuộm theo tỉ lệ 1:1 và chuyển 10μl hỗn hợp sang buồng đếm hồng cầu chuyên dụng.
- Đếm số lượng tế bào, trong đó: Tế bào có nhân tế bào bắt màu thuốc nhuộm.
- Cách đếm: đếm tế bào bên trong 4 ô vuông lớn và các tế bào nằm trên 02 cạnh bất kỳ của 4 ô vuông lớn đó thuộc buồng đếm (tương tự như đếm tế bào sử dụng chất nhuộm xanh trypan)
- Số lượng tế bào có nhân được tính theo công thức:

$$\text{Tổng số tế bào có nhân} = \frac{\text{Số lượng tế bào đếm được}}{2} \times 2 \times 10^4 \times \text{thể tích (ml)} (\text{tế bào})$$

2.2.14. Phương pháp lưu trữ đông lạnh tế bào

Phương pháp này được thực hiện dựa trên hướng dẫn của nhà sản xuất hóa chất được công bố tại trang web <https://www.stemcell.com/products/cryostor-cs10.html>

- **Bước 1:** Chuẩn bị môi trường lưu trữ bao gồm:
 - Với môi trường lưu trữ tế bào đơn nhân hoặc NK: Huyết tương bất hoạt nhiệt tự thân hoặc huyết thanh nhóm máu AB thương mại và chất bảo quản DMSO 10% hoặc dung dịch bảo quản CryoStor (hãng StemCell Technology) được bảo quản ở 4 độ C trước khi sử dụng.
 - Với môi trường lưu trữ các loại tế bào thương mại (K562, KHYG): Môi trường RPMI với 20% FBS và 10% DMSO

- **Bước 2:**

Chuyển tế bào vào các ống ly tâm chuyên dụng. Ly tâm với tốc độ 400g, 10 phút, loại bỏ dịch nổi bên trên. Dùng tay bóp nhẹ vào thành ống ly tâm để lớp tế bào bong khỏi đáy ống ly tâm và tách riêng rẽ. Nhẹ nhàng bổ sung dung dịch bảo quản sao cho nồng độ của các tế bào lưu trữ đạt:

- Với tế bào MNC: nồng độ 10-20 x10⁶ tế bào/ml
- Với tế bào K562: nồng độ 5 x10⁶ tế bào/ml
- Tế bào KHYG: nồng độ 5 x10⁶ tế bào/ml
- Tế bào NK: nồng độ 10-30 x10⁶ tế bào/ml

Bước 3: Hạ nhiệt tế bào theo chương trình 1°C /phút đến khi đạt -80°C, sau đó chuyển sang lưu trữ ở điều kiện âm sâu <-80°C.

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

Hiệu suất thu hồi tế bào MNC sẽ được tính dựa trên mật độ tế bào Lympho và Mono đếm được bằng máy đếm công thức máu và thể tích mẫu:

$$H_{MNC} = \frac{(\text{Mật độ tế bào Lympho+Mono sau xử lý}) \times \text{Thể tích mẫu sau xử lý}}{(\text{Mật độ tế bào Lympho+Mono thu thập}) \times \text{Thể tích mẫu thu thập}} \times 100\%$$

Hiệu suất thu hồi tế bào có nhân (TNC) sẽ được tính dựa trên mật độ tế bào bạch cầu (WBC_ White blood cell) trước (WBC pre) và sau xử lý (WBC pos) đếm được bằng máy đếm công thức máu:

$$H_{TNC} = \frac{\text{WBC pos} \times \text{Thể tích mẫu sau xử lý}}{\text{WBC pre} \times \text{Thể tích mẫu thu thập}} \times 100\%$$

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 VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thu thập máu dây rốn

Tổng nghiên cứu có 59 mẫu máu dây rốn (MDR) được thu thập từ các em bé khỏe mạnh, sinh ra bởi các sản phụ đủ điều kiện tình nguyện hiến mẫu. Các sản phụ có thai kỳ bình thường, âm tính với các tác nhân lây nhiễm như virus HIV, viêm gan B, viêm gan C, CMV (*cytomegalovirus*) và giang mai.

- 59 mẫu MDR, trong đó bao gồm 11 mẫu hiến 1 phần (1-3ml) và 48 mẫu hiến toàn bộ, tất cả được tiến hành khảo sát các quần thể tế bào miễn dịch có trong máu dây rốn trẻ sơ sinh, bao gồm tế bào lympho B, lympho T và tế bào giết tự nhiên (NK – Natural Killer cells) bằng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy – flow cytometry.
- 48 mẫu MDR được phân tách tế bào MNC, trong đó 38 mẫu được phân tách MNC bằng hệ thống AXP, hãng Thermogenesis và 10 mẫu được tách bằng phương pháp ly tâm phân lớp tỉ trọng sử dụng ficoll. Các mẫu này được khảo sát khảo sát số lượng tế bào bạch cầu đơn nhân sau thu thập bằng xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu trên máy Nihon Kohden 22 thông số.
- Tổng số có 12 mẫu MDR được tiến hành thực hiện nuôi cấy tăng sinh tế bào NK, trong đó 05 mẫu đầu tiên thực hiện tối ưu quy trình và kỹ thuật nuôi cấy, 07 mẫu được tiến hành nuôi cấy tăng sinh tế bào NK thành công với số lượng tế bào nuôi cấy đến ngày 21 đạt trên 1×10^9 tế bào.
- 5 mẫu NK sau nuôi cấy được đánh giá khả năng tiêu diệt tế bào ung thư K562

3.1.1. Kết quả thu thập máu dây rốn

Tổng số 48 mẫu máu dây rốn hiến tặng toàn phần và 11 mẫu máu dây rốn hiến tặng 1 phần được đưa vào nghiên cứu này.

Thông tin sản phụ

Độ tuổi trung bình của các sản phụ là $29,67 \pm 3,60$ (n=48), dao động trong khoảng từ độ tuổi 20 đến độ tuổi 38, chi tiết trong Bảng 3.1.

Bảng 3. 1. Tuổi sản phụ

Tuổi mẹ (tuổi)	(N=59)
Trung bình (Độ lệch chuẩn) <i>Mean (SD)</i>	29,54 (3,88)
Trung vị [Nhỏ nhất; Lớn nhất] <i>Median [Min; Max]</i>	28,92 [20,44; 38,22]

Yếu tố giới tính

Trong tổng số 59 mẫu, có 28 mẫu được thu thập từ bé gái, chiếm 47,6% và 31 từ bé trai, chiếm 52,5%, chi tiết trong Bảng 3.2

Bảng 3. 2. Tỷ lệ giới tính của trẻ

Giới tính	(N=59)
Nữ (N, %)	28 (47,6%)
Nam (N, %)	31 (52,5%)

Yếu tố nhóm máu

Các đơn vị MDR này được tiến hành định nhóm máu, trong đó nhóm máu O, Rh+ chiếm tỉ lệ cao nhất là 47,5% tương đương với 28 mẫu, tiếp theo là nhóm máu B, Rh+ và A, Rh+ với lần lượt là 17 mẫu (28,8%) và 11 mẫu (18,6%), Nhóm máu AB chiếm tỉ lệ thấp nhất là 5,1% với 3 mẫu, chi tiết trong Bảng 3.3.

Bảng 3. 3. Nhóm máu của trẻ

Nhóm máu	(n=59) (N,%)
A, Rh+	11 (18,6%)
AB, Rh+	3 (5,1%)
B, Rh+	17 (28,8%)
O, Rh+	28 (47,5%)

Yếu tố cân nặng

Cân nặng của trẻ trong khoảng [2,6 – 4,2] kg, trung bình là $3,28 \pm 0,33$ kg. Trong đó số trẻ có cân nặng ≤ 3 kg chiếm 28,8% với 17 trẻ, và nhóm có cân nặng từ 3kg trở lên chiếm 71,2% với 42 trẻ.

Trẻ nam có cân nặng trung bình $3,3 \pm 0,4$ kg (n=31) trong khi trẻ nữ có cân nặng trung bình $3,2 \pm 0,3$ kg (n=28), chi tiết trong Bảng 3.4.

Bảng 3. 4. Cân nặng của trẻ

Cân nặng (kg)	(N=59)
Mean (SD)	3,28 (0,33)
Median [Min; Max]	3,26 [2,66; 4,20]
$\leq 3\text{kg}$	17 (28,8 %)
$> 3\text{kg}$	42 (71,2%)
Nam	(N=31)
Mean (SD)	3,26 (0,36) kg
Nữ	(N=28)
Mean (SD)	3,2 (0,3) kg

Yếu tố tuổi thai

Các bé được sinh ra chủ yếu ở tuần thai thứ 39 và phân bố trong khoảng từ tuần thai 37 đến 40, Trong đó các bé sinh ra ở tuần thai 37 và 38 chiếm 30,5% với 18 bé và 41 bé được sinh ra ở tuần thai thứ 39 và 40, chiếm 69,5%, chi tiết trong Bảng 3.5.

Bảng 3. 5. Yếu tố tuổi thai

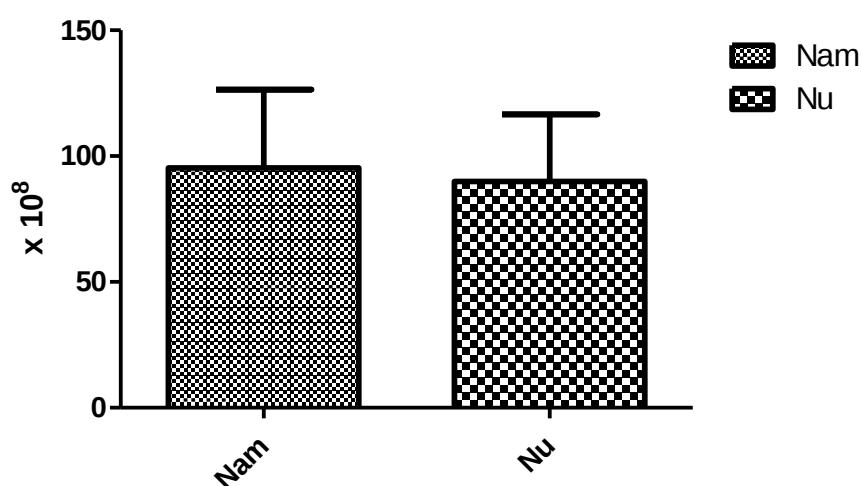
Tuổi thai	(N=59)
Mean (SD)	38,79 (0,88)
Median [Min; Max]	39,0 [37,0; 40,0]
≤ 38 tuần	N=18 (30,5%)
> 38 tuần	N=41 (69,5%)

3.1.2. Đặc điểm của các đơn vị máu dây rốn thu thập***Thể tích mẫu thu thập***

Trong tổng số 48 mẫu MDR được thu thập toàn bộ, thể tích mẫu máu dây rốn trung bình là $94,49 \pm 30,35$ ml không bao gồm chất chống đông, mẫu thấp nhất có thể tích là 52ml và mẫu có thể tích lớn nhất là 176 ml, Trong đó thể tích trung bình của các đơn vị MDR thu thập từ bé trai là $95,32 \pm 31,11$ ml (N=28) và bé nữ là $89,94 \pm 26,46$ ml (N=20), $p>0,05$, chi tiết Bảng 3.6 và Hình 3.1

Bảng 3. 6. Thể tích máu dây rốn thu thập

Thể tích (ml)	(N=48)
Mean (SD)	94,49 (30,35)
Median [Min; Max]	89,35 [52; 176]
Trẻ Nam	(N=28)
Mean (SD)	95,32 (31,11)
Median [Min; Max]	84,9 [52,0; 176,0]
Trẻ Nữ	(N=20)
Mean (SD)	89,94 (26,46)
Median [Min; Max]	86,9 [55,9; 140,0]



Hình 3. 1. Thể tích máu dây rốn thu thập ở trẻ nam và nữ

Số lượng tế bào có nhân

Tổng số tế bào bạch cầu có nhân (TNC_Total nucleated cell) của các đơn vị máu dây rốn thu được trung bình là $(11,48 \pm 3,93) \times 10^8$ tế bào (N=48), trong đó mẫu có TNC thấp nhất là $5,1 \times 10^8$ tế bào, và mẫu có số lượng TNC cao nhất là $55,7 \times 10^8$ tế bào, cao gấp gần 11 lần so với mẫu thấp nhất, chi tiết trong Bảng 3.7.

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

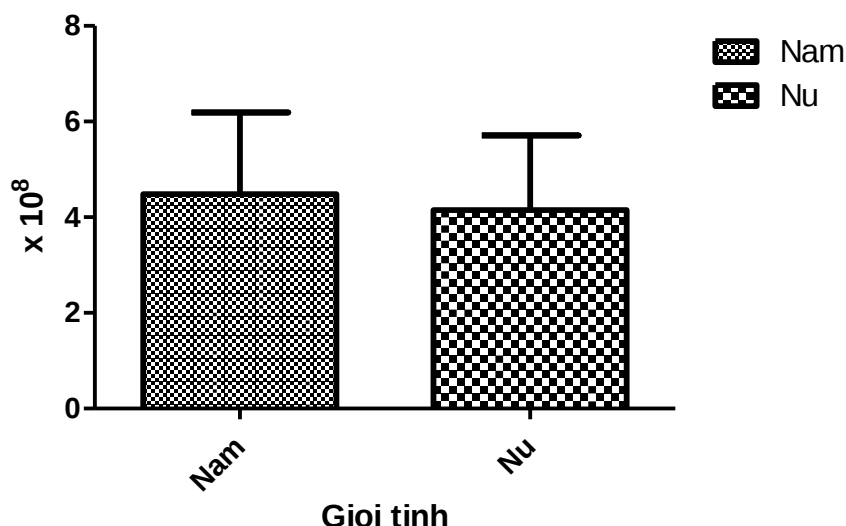
Tổng số tế bào có nhân-TNC (x 10^8 tế bào)	(N=48)
Mean (SD)	11,49 (3,97)
Median [Min; Max]	10,69 [5,10; 19,82]
Nam	N= 28
Mean (SD)	11,20 (3,85)
Median [Min; Max]	10,8 [5,10; 19,82]
Nữ	N= 20
Mean (SD)	11,89 (4,10)
Median [Min; Max]	10,68 [5,18; 19,82]

Tổng số tế bào đơn nhân

Tổng số tế bào đơn nhân (MNC) trong các mẫu máu dây rốn sau thu thập trung bình là $4,34 \pm 1,66 \times 10^8$ tế bào, dao động trong khoảng từ $1,64 \times 10^8$ tế bào đến $8,42 \times 10^8$ tế bào, Trong đó, MNC ở các đơn vị máu dây rốn của trẻ nam trung bình là $(4,48 \pm 1,71) \times 10^8$ tế bào (N=28) và ở trẻ nữ là $(4,15 \pm 1,56) \times 10^8$ tế bào ($p > 0,05$), chi tiết trong Bảng 3.8 và Hình 3.2.

Bảng 3. 8. Tổng số tế bào đơn nhân (MNC) máu dây rốn

Tổng tế bào đơn nhân – MNC (x 10^8 tế bào)	(N=48)
Mean (SD)	4,34 (1,66)
Median [Min; Max]	4,44 [1,64; 8,42]
Nam	N= 28
Mean (SD)	4,48 (1,71)
Median [Min; Max]	4,34 [1,65; 8,42]
Nữ	N= 20
Mean (SD)	4,15 (1,56)
Median [Min; Max]	4,44 [1,64; 7,21]



Hình 3. 2. Số lượng MNC trong máu dây rốn ở trẻ nam và nữ

Khi phân tích số lượng MNC trong các đơn vị máu dây rốn thu thập từ các trẻ có tuổi thai khác nhau, kết quả cho thấy: Có 14 trẻ sinh ra có tuổi thai ≤ 38 tuần với MNC trung bình là $3,83 \times 10^8$ tế bào, độ lệch chuẩn là $1,429 \times 10^8$ và 34 trẻ sinh ra có tuổi thai trên 38 tuần, MNC trung bình là $4,56 \times 10^8$ tế bào, độ lệch chuẩn là $1,736 \times 10^8$, trung bình MNC trong hai nhóm này không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), chi tiết trong Bảng 3.9.

Bảng 3. 9. Tổng số tế bào đơn nhân (MNC) máu dây rốn theo nhóm tuổi thai

	Tuổi thai theo tuần	N	Trung bình	SD	P value
MNC ($\times 10^8$ tế bào)	≤ 38 tuần	14	3,83	1,429	$p > 0.05$
	> 38 Tuần	34	4,56	1,736	

Như vậy, thể tích mẫu máu dây rốn thu thập trong nghiên cứu này là $94,49 \pm 30,35$ ml ($N=48$) tương đương với nghiên cứu của Tinh và cs năm 2019 là $87,46 \pm 25,96$ ml ($N=403$) [119] và của Page và cs năm 2013 là $97,5 \pm 28,6$ ml ($N=5267$) [120].

Số lượng TNC có trong các đơn vị máu dây rốn trung bình là $11,9 \times 10^8 \pm 3,97 \times 10^8$ tế bào/đơn vị ($N=48$) tương đương với công bố của Tinh và cs là $11,58 \times 10^8 \pm 4,4 \times 10^8$ tế bào/đơn vị ($N=403$), nhưng cao hơn so với công bố của Lee và cs trên quần thể người Hàn Quốc là $8,8 \times 10^8 \pm 3 \times 10^8$ tế bào/đơn vị. Trong khi nghiên cứu này không thấy sự khác nhau về trung bình thể tích máu dây rốn thu thập và TNC ở trẻ nam và nữ thì trong nghiên cứu của Lee và cộng sự, thể tích thu thập ở trẻ nam lớn hơn trẻ nữ, nhưng TNC ở trẻ nữ lại lớn hơn trẻ nam [121].

Số lượng tế bào đơn nhân (MNC) trong các đơn vị máu dây rốn của nghiên cứu này là $4,34 \times 10^8 \pm 1,66 \times 10^8$ tế bào/đơn vị tương đương với công bố của Tinh và cs là $4,45 \times 10^8 \pm 1,84 \times 10^8$ tế bào /đơn vị [119].

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

Tế bào gốc tạo máu (HSC) là một trong các thành phần tế bào quan trọng trong máu dây rốn, nó quyết định khả năng thành công cũng như thời gian mọc mảnh ghép. Các tế bào máu dây rốn có thể biệt hóa thành các tế bào gốc tạo máu mới, các tế bào gốc máu đầu dòng khác để sản sinh ra các loại tế bào máu, tế bào miễn dịch cho cơ thể. Các tế bào gốc tạo máu - HSC được chỉ thị bằng sự biểu hiện marker CD45 và CD34 trên bề mặt.

Kết quả khảo sát trên 48 mẫu máu dây rốn cho thấy số lượng tế bào HSC trung bình trong mỗi đơn vị là 3.64×10^6 tế bào, độ lệch chuẩn là 2×10^6 (Bảng 3.10).

Bảng 3. 10. Tổng số HSC trung bình trong các đơn vị máu dây rốn thu thập

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

Trong đó số lượng tế bào HSC trong máu dây rốn của trẻ nam là $4,12 \times 10^6 \pm 2,23 \times 10^6$ tế bào (n=28), cao hơn so với số lượng HSC trong máu dây rốn của trẻ nữ $2,97 \times 10^6 \pm 1,51 \times 10^6$ tế bào (n=20) (p=0,03) (Bảng 3.11).

Bảng 3. 11. Số lượng trung bình HSC theo giới tính

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

Số lượng tế bào HSC trong các đơn vị máu dây rốn có thể tích trên 100ml (không bao gồm chất chống đông) là $5,26 \pm 1,74$ cao hơn so với số lượng HSC trong các đơn vị máu dây rốn có thể tích dưới 100 ml là $2,83 \pm 1,65$ (p= $1,12 \times 10^{-5} < 0,05$) (Bảng 3.12).

Bảng 3. 12. Số lượng trung bình HSC theo thể tích máu dây rốn thu thập

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

Ngoài ra, khi so sánh số lượng tế bào HSC trong các đơn vị máu dây rốn thuộc nhóm máu O, Rh+ so với các nhóm máu khác cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$) (Bảng 3.13).

Bảng 3. 13. Số lượng trung bình HSC theo nhóm máu

Nhóm máu	O, Rh+ <i>Mean (SD)</i>	Nhóm máu khác <i>Mean (SD)</i>	p value
HSC ($\times 10^6$ tế bào)	3,61 (2,15)	3,67 (1,95)	0,46

Tương tự, không có sự khác biệt về số lượng tế bào gốc tạo máu HSC biểu hiện CD34 ở các đơn vị máu dây rốn thu được từ các em bé có cân nặng trên 3kg và dưới 3kg (Bảng 3.14)

Bảng 3. 14. Số lượng trung bình HSC theo cân nặng trẻ

Cân nặng trẻ	< 3kg <i>Mean (SD)</i>	> 3kg <i>Mean (SD)</i>	p value
HSC (CD34+) ($\times 10^6$ tế bào)	3,82 (3,26)	3,6 (1,74)	0,57

Không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở chỉ số trung bình số lượng HSC trong đơn vị máu dây rốn thu được từ trẻ sinh ra ở tuần thai ≤ 38 tuần là $3,83 \times 10^6$ ($SD=2,79 \times 10^6$) và ở tuần thai > 38 tuần là $3,47 \times 10^6$ ($SD=1,65 \times 10^6$) ($p>0,05$) (Bảng 3.15).

Bảng 3. 15. Số lượng trung bình HSC theo tuổi thai

Tuổi thai	≤ 38 tuần <i>Mean (SD)</i>	> 38 tuần <i>Mean (SD)</i>	p value
HSC (CD34+)	$3,83 \times 10^6$ ($SD=2,79 \times 10^6$)	$3,47 \times 10^6$ ($SD=1,65 \times 10^6$)	$p>0,05$

Số lượng tế bào gốc HSC biểu hiện CD34 trong các đơn vị máu dây rốn trong nghiên cứu này trung bình là $3,64 \times 10^6 \pm 2 \times 10^6$ tế bào/đơn vị, tương đương với nghiên cứu của Tình và cs là $3,66 \times 10^6 \pm 2,37 \times 10^6$ tế bào/đơn vị và của Page và cs là $3,66 \times 10^6 \pm 2,05 \times 10^6$, và cao hơn so với nghiên cứu của Lee là $1,19 \times 10^6 \pm 1,16 \times 10^6$ tế bào/đơn vị. Trong khi nghiên cứu của Page và cs chỉ ra rằng là số lượng CD34 thu được ở các đơn vị máu dây rốn của trẻ có tuần thai 34-37 thấp hơn so với ở tuần thai 38-40, còn tại nghiên cứu này, không tìm thấy sự khác biệt giữa nhóm có tuần thai dưới 38 và trên 38 tuần. Trong khi nghiên cứu của Lee cho rằng số lượng trung bình HSC (CD34+) là tương đương giữa nhóm trẻ nam và nữ và HSC ở trẻ có nhóm máu O cao hơn ở trẻ có nhóm máu khác. Điều này hoàn toàn trái ngược với kết quả trong

ngiên cứu này là HSC ở trẻ nam thấp hơn trẻ nữ ($p=0,03<0,05$) và trung bình HSC ở các nhóm máu khác nhau là tương đương nhau ($p=0,46$).

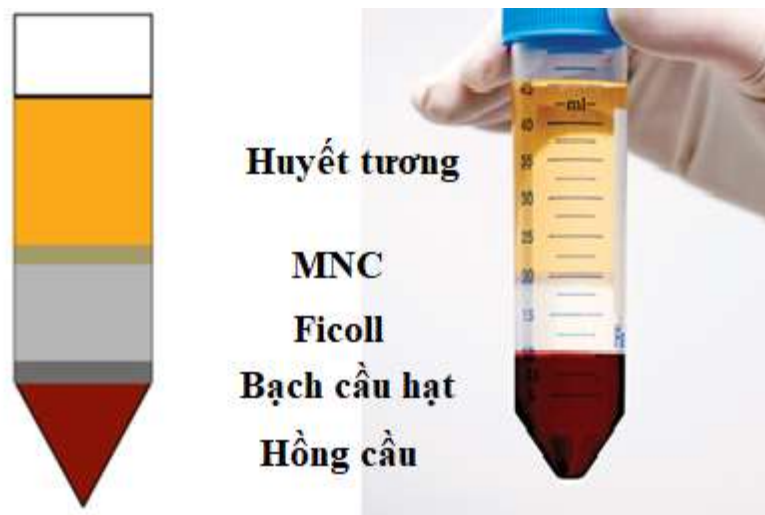
Có thể thấy có sự tương đồng giữa kết quả nghiên cứu về thể tích mẫu máu dây rốn, số lượng tế bào TNC, MNC và HSC của nghiên cứu này và nghiên cứu của Tình, có thể do đều thực hiện nghiên cứu trên cùng nhóm đối tượng quần thể người Việt Nam. Còn sự khác biệt với các nghiên cứu khác là do sự khác biệt về quần thể đối tượng nghiên cứu, cụ thể, nghiên cứu của Lee là trên quần thể người Hàn Quốc, nghiên cứu của Page là trên quần thể người Mỹ trong khi nghiên cứu này thực hiện trên quần thể trẻ sơ sinh tại Việt Nam, hơn nữa cỡ mẫu trong nghiên cứu này nhỏ hơn so với công bố của các tác giả trên.

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

Tổng số 10 mẫu máu dây rốn được phân tách tế bào đơn nhân bằng phương pháp ly tâm sử dụng ficoll và 38 mẫu máu dây rốn được tách tế bào đơn nhân bằng hệ thống AXP.

Sự giống nhau của 2 phương pháp này đều là sử dụng máy ly tâm để các tế bào được phân lớp theo tỉ trọng khác nhau. Tuy nhiên, điểm khác biệt chính của hai phương pháp này là:

- Khi sử dụng ficoll có tỉ trọng là 1,078 g/mL sẽ phân tách rõ các thành phần khác nhau của máu toàn phần, bao gồm: huyết tương nghèo tiểu cầu bên trên, tiếp đó là huyết tương giàu tiểu cầu nằm sát cạnh lớp buffycoat hay chính là lớp tế bào đơn nhân (MNC) nằm trên phân lớp ficoll, và cuối cùng là lớp bạch cầu đa nhân và hồng cầu ở phía dưới cùng (Hình 3.3). Do phân tách rõ rệt với các phân lớp khác, đặc biệt là hồng cầu nên sản phẩm MNC sau khi xử lý bằng phương pháp này hầu như không chứa hồng cầu, hoặc chỉ có 1 tỉ lệ rất ít.



Hình 3.3. Phân tách tế bào bằng ly tâm tỉ trọng sử dụng ficoll

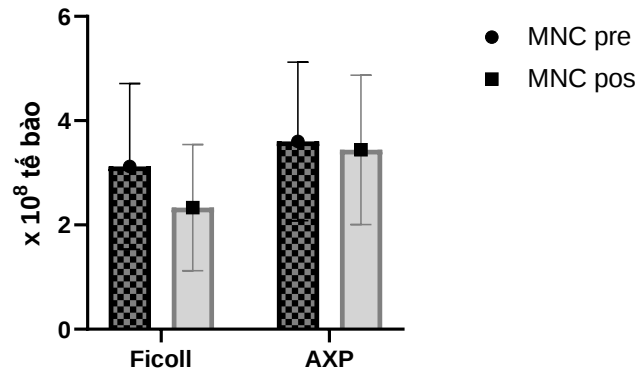
Khi xử lý bằng hệ thống AXP (Hình 3.4), sau khi ly tâm tốc độ cao, các thành phần của máu dây rốn sẽ tạo lên các phân lớp: huyết tương nghèo tiểu cầu bên trên, tiếp đó là huyết tương giàu tiểu cầu nằm sát cạnh lớp buffycoat chứa tế bào đơn nhân (MNC), và ngày sát đó là lớp bạch cầu đa nhân và hồng cầu ở phía dưới cùng. Thiết bị sẽ tự động hút phần buffycoat (chứa MNC) sang 1 túi máu riêng biệt dựa vào độ đặc của sản phẩm. Do các phân lớp của máu dây rốn toàn phần nằm sát nhau và không tách biệt rõ ràng, nên sản phẩm cuối cùng sau xử lý vẫn bao gồm cả tiểu cầu, MNC, bạch cầu hạt và hồng cầu.



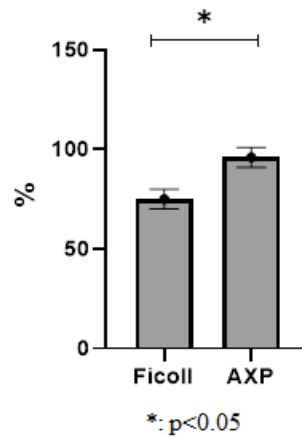
Hình 3. 4. Phân tách tế bào bằng hệ thống AXP

Kết quả phân tách MNC được thể hiện trong Bảng 3.16, Hình 3.5 và 3.6 dưới đây.

- Với 10 mẫu được xử lý bằng phương pháp ly tâm sử dụng ficoll, thể tích trung bình của các mẫu là $60,27 \text{ ml} \pm 5,39 \text{ ml}$ (không bao gồm chất chống đông), số lượng MNC ban đầu trước xử lý là $3,21 \times 10^8$ tế bào ($\text{SD}=1,59 \times 10^8$), và số lượng MNC trung bình sau xử lý là $2,33 \times 10^8$ tế bào ($\text{SD}=1,21 \times 10^8$), Như vậy hiệu suất thu hồi MNC trung bình là $75 \pm 5 \%$ (Hình 3.5)
- Với 38 mẫu máu dây rốn được xử lý bằng hệ thống AXP, thể tích máu dây rốn trung bình là $103,49 \pm 27,44 \text{ ml}$ (không bao gồm chất chống đông), Số lượng MNC ban đầu trước xử lý là $(3,6 \pm 1,52) \times 10^8$ tế bào, và số lượng MNC trung bình là $3,44 \times 10^8$ tế bào ($\text{SD}=1,43 \times 10^8$). Hiệu suất thu hồi MNC khi xử lý bằng hệ thống AXP trung bình là $96\% \pm 5\%$, cao hơn hiệu suất thu hồi MNC khi sử dụng ficoll ($p < 0,05$) (Hình 3.6).



Hình 3. 5. Số lượng MNC thu được ở hai phương pháp xử lý



Hình 3. 6. Hiệu suất thu hồi MNC ở hai phương pháp

Bảng 3. 16. Kết quả phân tách MNC bằng hai phương pháp

	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 (x10⁸)		
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	

Hiệu suất thu hồi MNC trong phương pháp sử dụng hệ thống AXP là $96 \pm 5\%$ tương đương với hiệu suất thu hồi trong nghiên cứu của Harris và cộng sự (cs) công bố năm 2007 khi sử dụng cùng hệ thống phân tách là AXP là $98,65 \pm 9,16\%$ [122] và cao hơn so với phương pháp sử dụng hệ thống tự động Sepax theo nghiên cứu của Carmen năm 2007 là 59% [123].

Với phương pháp tách MNC sử dụng ficoll, hiệu suất thu hồi MNC là $75 \pm 5\%$, thấp hơn so với phương pháp xử lý bằng hệ thống AXP ($P < 0,05$), và có vẻ tương đồng với kết quả nghiên cứu của Carmen khi hiệu suất thu hồi MNC là 73% [123].

Với 2 phương pháp phân tách tế bào đơn nhân này, mỗi phương pháp lại có những đặc điểm riêng và đáp ứng những nhu cầu khác nhau để nhà trị liệu hoặc các cơ sở y tế có thể lựa chọn cho các mục đích ứng dụng khác nhau (Bảng 3.17).

Bảng 3.17. So sánh đặc điểm của hai phương pháp phân tách MNC

Đặc điểm	AXP	Ficoll
Chi phí	Cao hơn (trung bình khoảng 5 triệu/mẫu)	Thấp hơn (trung bình khoảng 1-1,5 triệu/mẫu)
An toàn	Hệ thống kín, tự động hạn chế khả năng lây nhiễm trong quá trình xử lý	Hệ thống mở, bao gồm nhiều bước, nguy cơ lây nhiễm trong quá trình xử lý cao hơn
	Không phụ thuộc nhiều vào kỹ thuật người xử lý	Phụ thuộc nhiều vào kỹ thuật người xử lý
Hiệu suất	Tỉ lệ hồng cầu cao hơn sau xử lý	Tỉ lệ hồng cầu thấp sau xử lý
	Hiệu suất thu hồi MNC cao hơn	Hiệu suất thu hồi MNC thấp hơn
Thời gian xử lý	30-45 phút	45-60 phút

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, chi tiết tại Bảng 3.18.

Bảng 3.18. Đặc điểm của bệnh nhân ung thư

Bệnh nhân	Tuổi tại thời điểm điều trị	Giới	Loại ung thư
PT1	53	Nam	Ung thư dạ dày
PT2	55	Nam	Ung thư dạ dày
PT3	67	Nam	Ung thư dạ dày
PT4	69	Nam	Ung thư gan
PT5	79	Nam	Ung thư gan
PT6	68	Nữ	Ung thư gan
PT7	77	Nam	Ung thư phổi
PT8	61	Nam	Ung thư phổi
PT9	65	Nam	Ung thư phổi

3.2.2. Mẫu máu ngoại vi thu thập

Tất cả bệnh nhân được thu thập 25-50ml máu ngoại vi để chuẩn bị cho nuôi cấy. Sau khi thu thập, tất cả các mẫu được phân lập tế bào đơn nhân bằng phương pháp ly tâm có tỉ trọng có sử dụng ficoll, tế bào đơn nhân thu được sẽ được xác định tỉ lệ thành phần tế bào NK bằng phương pháp dòng chảy tế bào, đồng thời tiến hành nuôi cấy tăng sinh tế bào NK. Số lượng tế bào đơn nhân trung bình tại thời điểm bắt đầu nuôi cấy là $(38,5 \pm 20,2) \times 10^6$ tế bào. Trong đó tế bào NK chiếm $16,7 \pm 8,4\%$, tương đương với $(4,5 \pm 3,4) \times 10^6$ tế bào. Ngoài ra, tỷ lệ tế bào NK ở nhóm tuổi dưới 65 thấp hơn nhóm trên 65 tuổi (7,1 % so với 19,1%, $p=0,0205$). Hơn nữa, số lượng tế bào NK ở ngày bắt đầu nuôi cấy cao nhất ở bệnh nhân ung thư phổi ($7,3 \times 10^6$ tế bào) so với ung thư gan ($5,4 \times 10^6$ tế bào) và ung thư dạ dày ($2,3 \times 10^6$ tế bào), với $p=0,002$ (Bảng 3.19).

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

Tế bào nuôi cấy D0	Tổng số lượng ($\times 10^6$)	% NK	Số lượng tế bào NK
	(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	$p= 0,588$	$p=0,089$	$p=0,002^*$
<i>Dạ dày</i>	34,0 $\pm$ 16,0	9,3 $\pm$ 3,3	2,3 $\pm$ 0,6
<i>Gan</i>	39,7 $\pm$ 26,1	22,0 $\pm$ 5,0	5,4 $\pm$ 2,8
<i>Phổi</i>	45,2 $\pm$ 19,3	21,0 $\pm$ 11,5	7,3 $\pm$ 5,7

Có thể thấy, tỉ lệ tế bào NK trong máu ngoại vi của các bệnh nhân ung thư cao hơn so với tỉ lệ tế bào NK trong máu cuống rốn trong nghiên cứu này. Điều này trái ngược hoàn toàn với các kết luận trước đây khi cho rằng tế bào NK tồn tại trong máu cuống rốn nhiều hơn so với máu ngoại vi [6].

3.3. Đặc điểm quần thể tế bào máu dây rốn

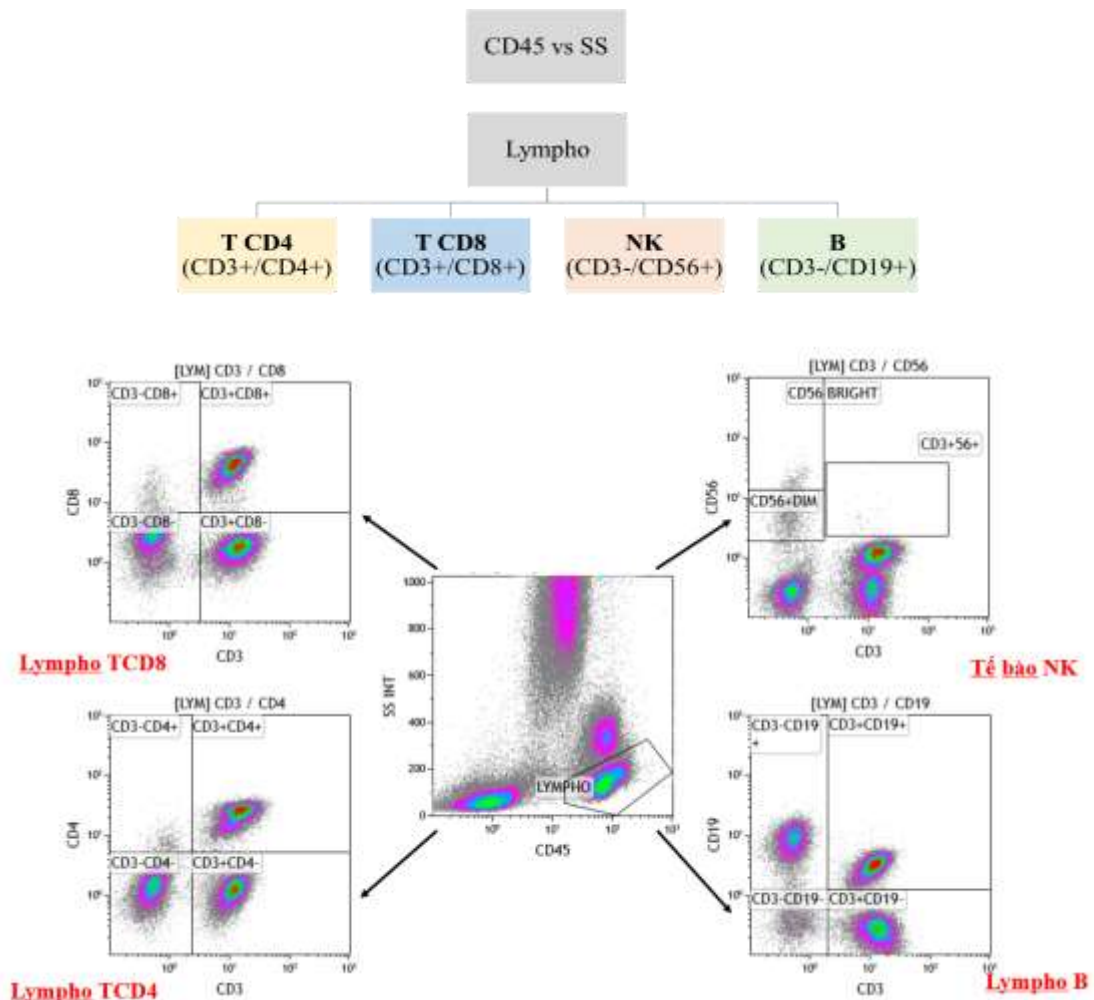
3.3.1. Tỉ lệ các loại tế bào miễn dịch (T-B-NK) trong máu dây rốn

Trong các loại tế bào miễn dịch được tìm thấy trong máu, ba quần thể tế bào miễn dịch chính là tế bào lympho T, tế bào lympho B, và tế bào NK. Mỗi một loại tế bào có chức năng cũng như được nhận dạng bởi những đặc điểm khác nhau, cụ thể:

- **Tế bào lympho T:** nằm trong quần thể lympho và được biểu hiện bởi dấu ấn CD3 (CD3+)
 - **Lympho T CD4** hay còn gọi là tế bào T hỗ trợ: nằm trong quần thể lympho và mang các dấu ấn CD3 và CD4 (CD3+CD4+)
 - **Lympho T CD8** hay còn gọi là các tế bào lympho T gây độc (T cytotoxic): Nằm trong quần thể lympho và mang các dấu ấn CD3 và CD8 (CD3+CD8+)

- **Tế bào lympho B:** nằm trong quần thể lympho và mang các dấu ấn CD19 nhưng không mang các dấu ấn CD3 (CD3-CD19+)
- **Tế bào NK:** Nằm trong quần thể lympho và đặc trưng bởi sự không biểu hiện CD3 và biểu hiện CD56 trên bề mặt (CD3-CD56+). Trong quần thể tế bào này có 2 nhóm quần thể nhỏ, trong đó 1 nhóm biểu hiện cường độ thấp CD56 được gọi là NK CD56^{dim} và 1 nhóm biểu hiện CD56 cường độ mạnh được gọi là tế bào NK CD56^{bright}. Các tế bào này cũng mang những chức năng khác nhau:
 - **Tế bào NK CD56^{dim}:** có khả năng tiêu diệt tế bào ung thư trực tiếp bằng cách tiết các chất gây độc tế bào như granzyme và perforin.
 - **Tế bào NK CD56^{bright}:** đặc trưng bởi khả năng sản xuất IFN-gamma và TNF-alpha, từ đó kích hoạt các tế bào miễn dịch khác để tham gia quá trình tiêu diệt tế bào ung thư.

Tổng số có 59 mẫu máu dây rốn được khảo sát các quần thể tế bào miễn dịch trong nghiên cứu này. Các quần thể tế bào được xác định bằng kỹ thuật dòng chảy tế bào (flow cytometry) dựa trên sự biểu hiện của các dấu ấn đặc trưng trên bề mặt tế bào, chi tiết thể hiện tại Hình 3.7.



Hình 3. 7. Chiến lược phân tích quần thể tế bào T-B-NK

Quần thể lympho B (CD3-/CD19+)

Kết quả khảo sát trên 59 mẫu máu dây rốn cho thấy, tỉ lệ Tế bào lympho B trưởng thành (CD3-/CD19+) chiếm $9,52\% \pm 3,28\%$ trong quần thể lympho. Tỉ lệ này không khác biệt giữa nhóm trẻ có cân nặng $\leq 3\text{kg}$ là $8,83\% \pm 2,82\%$ và ở nhóm trẻ có cân nặng $> 3\text{kg}$ là $9,80\% \pm 3,48\%$ ($p=0,31>0,05$). Trong khi đó, ở nhóm trẻ được sinh ra vào tuần thai thứ 37 và 38 tỉ lệ này trung bình là $8,34\% \pm 2,36\%$ thấp hơn so với ở nhóm trẻ được sinh ra ở tuần thai 39 và 40 là $10,04\% \pm 3,55\%$ ($p=0,035<0,05$), chi tiết trong Bảng 3.20.

Bảng 3. 20. Tỉ 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]		
Cân nặng trẻ	$\leq 3\text{kg}$	$> 3\text{kg}$	P value
N (%)	17 (28,8%)	42 (71,2%)	
Mean (SD)	8,83 (2,82)	9,80 (3,48)	$>0,05$
Tuổi thai	≤ 38 tuần	> 38 tuần	P value
N (%)	18 (30,5%)	41 (69,5%)	
Mean (SD)	8,34 (2,36)	10,04 (3,55)	$<0,05$

Tế bào lympho B (B cell) là một loại tế bào miễn dịch chuyên trách sản xuất kháng thể (antibody) để phản ứng với các tác nhân lạ như vi khuẩn, vi rút và các chất độc tố. Mặc dù hệ miễn dịch của trẻ sơ sinh, đặc biệt trẻ mới sinh chưa được hoàn thiện, nhưng nó lại có khả năng nhanh chóng đáp ứng lại với kích thích thể dịch hơn là tế bào lympho B của người trưởng thành [124].

Tỉ lệ trung bình của quần thể tế bào B trong lympho ở nghiên cứu này là $9,52\% \pm 3,28\%$, trong đó tỉ lệ này ở máu dây rốn trẻ sinh ở tuần thai thứ 37 và 38 thấp hơn so với nhóm trẻ sinh ở tuần thai 39 và 40. Tỉ lệ này cao hơn một chút so với công bố của Moroishi và cs năm 2023 trên đối tượng là trẻ em Mỹ là $6,76\% \pm 2,57\%$ (N=73) [125] nhưng thấp hơn so với công bố của Mendoza và cs năm 2020 trên quần thể trẻ Mexico là 13% (N=50) [126].

Quần thể CD3+/CD19+ trong lympho

Một điều đáng chú ý, nghiên cứu này phát hiện ra sự tồn tại quần thể tế bào lai giữa lympho B và lympho T, đồng biểu hiện cả CD3 và CD19 trong máu dây rốn

mà trước đây y văn ít đề cập đến. Kết quả khảo sát trong nghiên cứu này cho thấy: tỉ lệ quần thể CD3+/CD19+ chiếm trung bình $8,59\% \pm 5,77\%$ trong quần thể lympho, trong đó tỉ lệ trung bình ở trẻ có cân nặng $>3\text{kg}$ là $9,78\% \pm 5,99\%$ cao hơn so với trẻ có cân nặng $\leq 3\text{kg}$ với tỉ lệ này trung bình là $5,65\% \pm 4,24\%$ ($p < 0,05$). Đồng thời, khi khảo sát tỉ lệ quần thể này giữa các nhóm trẻ sinh ra ở những tuần thai khác nhau, mặc dù trong nhóm ≤ 38 tuần có tỉ lệ CD3+/CD19+ trung bình là $8,13\% \pm 5,74\%$ và ở nhóm >38 tuần là $8,8\% \pm 5,92\%$, nhưng tỉ lệ này giữa 2 nhóm không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), chi tiết Bảng 3.21.

Bảng 3. 21. Tỉ 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]		
Cân nặng trẻ	$\leq 3\text{kg}$	$>3\text{kg}$	P value
N (%)	17 (28,8%)	42 (71,2%)	
Mean (SD)	5,65 (4,24)	9,78 (5,99)	<0.05
Tuổi thai	≤ 38 tuần	>38 tuần	P value
N (%)	18 (30,5%)	41 (69,5%)	
Mean (SD)	8,13 (5,74)	8,80 (5,92)	>0.05

Quần thể tế bào lai giữa tế bào lympho B và lympho T, đồng biểu hiện cả CD3 và CD19 trong máu dây rốn là quần thể rất ít được nhắc đến trong y văn từ trước đến nay, ngoại trừ công bố năm 2014 của Angela Nagel và cộng sự [127], hay năm 2019 của Liora Schultz và cộng sự về việc phát hiện quần thể tế bào B CD3+CD19+ ở khối sản phẩm bạch cầu gạn tách từ bệnh nhân đã được ghép tế bào gốc tạo máu nửa hòa hợp [128] và một công bố khác của Qian Li và cs năm 2021 trên bệnh nhân nhiễm HIV và Mycobacterium [129]. Tất cả các công bố đều tập trung vào phát hiện quần thể CD3+/CD19+ trong máu ngoại vi người trưởng thành và chưa có công bố nào trên quần thể lympho máu dây rốn.

Quần thể tế bào TCD4 trong lympho

Tỉ lệ tế bào lympho TCD4 (CD3+/CD4+) trong máu dây rốn trung bình là $46,71\% \pm 8,99\%$. Trong đó tỉ lệ này ở nhóm trẻ có cân nặng $\leq 3\text{kg}$, là $48,83\% \pm 8,64\%$, không có khác biệt có ý nghĩa thống kê so với ở nhóm trẻ có cân nặng $>3\text{kg}$,

là $45,85\% \pm 9,19\%$ ($p>0,05$). Tỷ lệ tế bào TCD4 trung bình trong nhóm trẻ nữ là $48,01\% \pm 6,57\%$ và ở nhóm trẻ nam là $45,64\% \pm 10,61\%$ ($p>0,05$).

Đối với nhóm trẻ được sinh ra ở tuần thai ≤ 38 , tỷ lệ này là $46,82\%$ (SD=10,88, N=18) và ở nhóm sinh ra ở tuần thai >38 là $46,66\%$ (SD=8,30, N=41), không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ tế bào TCD4 ở hai nhóm ($p>0,05$) (Bảng 3.22).

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

(N=59)	T CD4 (CD3+/CD4+) (%)		
Mean (SD)	46,71 (8,99)		
Median [Min; Max]	46,16 [24,36; 71,30]		
Cân nặng trẻ	$\leq 3kg$	$>3kg$	P value
N (%)	17 (28,8%)	42 (71,2%)	
Mean (SD)	48,83 (8,64)	45,85 (9,19)	$>0,05$
Giới tính	Nữ	Nam	P value
Mean (SD)	48,01 (6,57)	45,64 (10,61)	$P>0,05$
Tuổi thai	≤ 38 tuần	>38 tuần	P value
N (%)	18 (30,5%)	41 (69,5%)	
Mean (SD)	46,82 (10,88)	46,66 (8,30)	$>0,05$

Quần thể tế bào T CD4 này còn được gọi là tế bào T trợ giúp hay T hỗ trợ (Th) có vai trò quan trọng trong việc giúp các tế bào B và tế bào T CD8 phát triển và hoạt động. T CD4 có khả năng nhận dạng các peptide từ các yếu tố lạ như vi khuẩn và vi rút, và phản ứng bằng cách sản xuất các cytokine và thực hiện các phản ứng khác để giúp kích hoạt các tế bào khác trong hệ thống miễn dịch. TCD4 cũng có vai trò quan trọng trong việc duy trì sự cân bằng của hệ thống miễn dịch, giúp ngăn ngừa các tổn thương tự miễn và đóng vai trò quan trọng trong việc phản ứng với ung thư.

Trong nghiên cứu này, quần thể T CD4 chiếm tỷ lệ lớn nhất trong lympho với $46,71\% \pm 8,99\%$. Tỷ lệ này không khác biệt so với công bố của Eisner và cs năm 2022 trên quần thể người Úc là $42,57\% \pm 9,07\%$ (N=742) (23), thấp hơn so với công bố của Mendoza là 65% [126], nhưng cao hơn so với công bố của Moroishi và cs năm 2023 là $13,86 \pm 5,05\%$ (n=73) [125].

Quần thể lympho TCD8 (CD3+/CD8+)

Tỷ lệ tế bào lympho TCD8 (CD3+/CD8+) trung bình là $22,58\% \pm 6,73\%$, Không tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh tỷ lệ này ở giới tính nam

và nữ, cũng như trong các nhóm trẻ $\leq 3\text{kg}$ với $>3\text{kg}$ hay trẻ sinh ở tuần thai ≤ 38 với nhóm >38 tuần ($p>0,05$). Cụ thể với nhóm trẻ có cân nặng $\leq 3\text{kg}$, tỉ lệ này là 20,83% ($\text{SD}=4,77\%$; $N=17$) và ở nhóm trẻ có cân nặng $>3\text{kg}$ là 23,29% ($\text{SD}=7,39\%$, $N=42$). Tỉ lệ này trong nhóm trẻ sinh ở tuần thai ≤ 38 tuần là 24,41% ($\text{SD}=8,34\%$, $N=18$), và nhóm trẻ sinh ở tuần thai >38 là 21,78% ($\text{SD}=5,92\%$, $N=41$). Với trẻ nữ, tỉ lệ này trong quần thể máu dây rốn là $21,13 \pm 5,92\%$ trong khi ở trẻ nam là $23,73 \pm 7,29\%$, chi tiết Bảng 3.23.

Bảng 3. 23. Tỉ 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]		
Cân nặng trẻ	$\leq 3\text{kg}$	$>3\text{kg}$	P value
N (%)	17 (28,8%)	42 (71,2%)	
Mean (SD)	20,83 (4,77)	23,29 (7,39)	$>0,05$
Tuổi thai	≤ 38 tuần	>38 tuần	P value
N (%)	18 (30,5%)	41 (69,5%)	
Mean (SD)	24,41 (8,34)	21,78 (5,93)	$>0,05$
Giới tính	Nữ	Nam	P value
Mean (SD)	21,13 (5,92)	23,73 (7,29)	$>0,05$

Quần thể tế bào này còn gọi là tế bào T gây độc (T cytotoxic) chúng sẽ phát hiện và nhận diện các kháng nguyên lạ thông qua việc gắn kết với các phân tử HLA (Human Leukocyte Antigen) trên bề mặt tế bào trình diện kháng nguyên và sử dụng các độc chất (như perforin và granzyme) để tiêu diệt tế bào bất thường. Ngoài ra, TCD8 còn có vai trò trong việc duy trì sự cân bằng của hệ miễn dịch bằng cách kiểm soát việc phát triển và hoạt động của các tế bào khác trong hệ miễn dịch, như tế bào TCD4, tế bào B và tế bào NK.

Trong nghiên cứu này, quần thể này chiếm tỉ lệ là $22,58\% \pm 6,73\%$ của lympho, Tỉ lệ này thấp hơn so với nghiên cứu của Mendoza là 32% [126] và cao hơn so với công bố của Moroishi và của Eisner lần lượt là $4,06\% \pm 2,36\%$ và $16,2\% \pm 1,33\%$ ($N=742$) [125, 130].

Quần thể CD3+/CD4+/CD8+

Tỉ lệ quần thể CD3+/CD4+/CD8+ trung bình là $0,63\% \pm 0,41\%$, trong đó tỉ lệ này ở nhóm trẻ có cân nặng $\leq 3\text{kg}$ là $0,64\% \pm 0,47\%$, ở nhóm trẻ cân nặng $> 3\text{kg}$ là $0,62\% \pm 0,40\%$ ($p > 0,05$). Ở nhóm trẻ sinh ở tuần thai 37 và 38, tỉ lệ quần thể này trung bình là $0,58\% \pm 0,41\%$, còn ở nhóm trẻ sinh ở tuần thai 39,40 là $0,65\% \pm 0,42\%$ ($p > 0,05$). Tỉ lệ quần thể này ở trẻ nam là $0,6\% \pm 0,41\%$ và trẻ nữ là $0,67\% \pm 0,43\%$, không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỉ lệ giữa hai nhóm này, chi tiết Bảng 3.24.

Bảng 3. 24. Tỉ lệ CD3+/CD4+/CD8+ theo cân nặng, tuổi thai và giới tính

(N=59)	CD3+/CD8+/CD4+ (%)		
Mean (SD)	0,63 (0,41)		
Median [Min; Max]	0,51 [0,11; 1,80]		
Cân nặng trẻ	$\leq 3\text{kg}$	$> 3\text{kg}$	P value
N (%)	17 (28,8%)	42 (71,2%)	
Mean (SD)	0,64 (0,47)	0,62 (0,40)	$> 0,05$
Tuổi thai	≤ 38 tuần	> 38 tuần	P value
N (%)	18 (30,5%)	41 (69,5%)	
Mean (SD)	0,58 (0,41)	0,65 (0,42)	$> 0,05$
Giới tính	Nữ	Nam	P value
Mean (SD)	0,67 (0,43)	0,60 (0,41)	$> 0,05$

Đây là quần thể tế bào mang đặc tính của cả tế bào T CD4 và T CD8, chúng vừa khả năng ức chế miễn dịch, vừa có khả năng tấn công tiêu diệt cá tác nhân lạ. Những nghiên cứu về quần thể tế bào này hiện không có nhiều, có thể một phần do chúng chỉ chiếm 1 tỉ lệ không đáng kể trong lympho và vai trò của nó còn chưa rõ ràng so với TCD4 và TCD8. Trong nghiên cứu này, quần thể này chỉ chiếm $0.63\% \pm 0.41\%$, nó tương đương với công bố của Beck và cs năm 1998 là $0,7\% \pm 0,4\%$ (N=5267) [131].

Tỉ lệ TCD4/TCD8

Ngoài ra, khi phân tích tỉ lệ giữa TCD4 và TCD8 trong quần thể lympho, tỉ lệ TCD4/TCD8 trung bình là $2,3 \pm 0,92$, tỉ lệ này không khác biệt giữa trẻ trai và gái ($p > 0,05$), giữa nhóm trẻ ≤ 38 tuần và > 38 tuần, cũng như nhóm trẻ sinh ra ở các bà mẹ ở các nhóm tuổi khác nhau ($p > 0,05$), chi tiết được thể hiện ở Bảng 3.25.

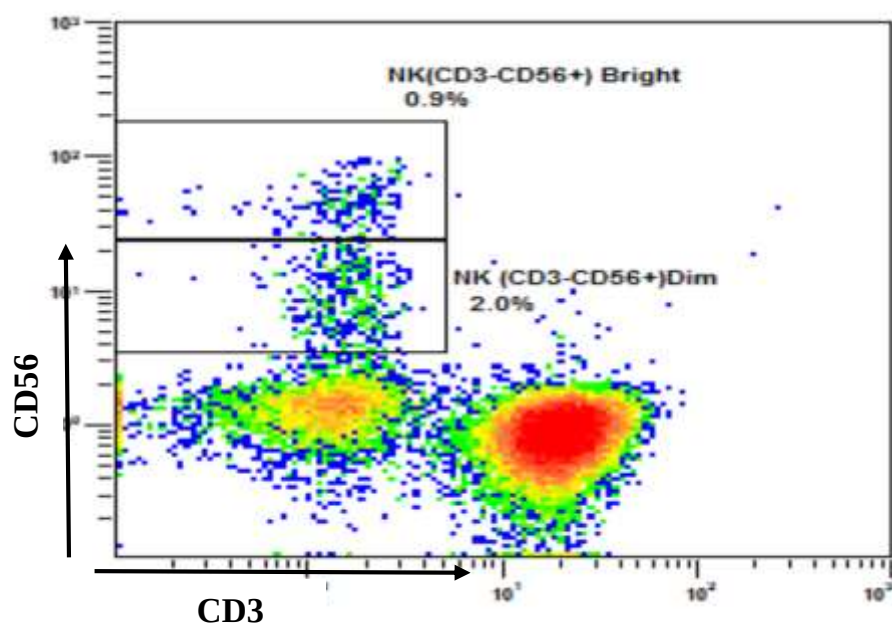
Bảng 3.25. Tỷ lệ TCD4/TCD8 theo giới tính, tuổi thai và tuổi sản phụ

N=59	Tỉ lệ CD4/CD8			
Mean (SD)	2,3 (0,92)			
Median [Min; Max]	1,99 [0,5; 5,24]			
Giới tính	Nữ		Nam	P value
Mean (SD) %	2,47 (0,82)		2,16 (0,99)	>0,05
Tuổi thai	≤ 38 tuần		> 38 tuần	P value
Mean (SD) %	2,09 (0,33)		2,34 (0,84)	>0,05
Tuổi mẹ	<30 tuổi	30-40 tuổi	>34 tuổi	P value
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	
Tỉ lệ TCD4/TCD8	2,31 (0,79)	2,17 (1,12)	2,5 (1,02)	0,689

Tỷ lệ TCD4/TCD8 từ lâu được coi là chỉ báo trong việc đánh giá tình trạng một số bệnh lý miễn dịch của cơ thể. Tỷ lệ này thấp hơn bình thường (< 1) có thể cho thấy rằng hệ thống miễn dịch đang phải đối mặt với một số vấn đề sức khỏe, bao gồm cả các bệnh nhiễm trùng, bệnh lý tự miễn, hoặc các bệnh ung thư, ở người khỏe mạnh, tỷ lệ này thường nằm trong khoảng từ 1-4. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ TCD4/TCD8 máu dây rốn là $2,3 \pm 0,92$, tương đương với quan sát trong nghiên cứu của D'Arena và cs là $1,7 \pm 0,5$ [132].

Quần thể tế bào NK (CD3-/CD56+)

Tế bào NK trong máu dây rốn trong nghiên cứu này cũng gồm 2 nhóm quần thể nhỏ, quần thể tế bào NK CD56^{dim} biểu hiện thấp CD56 và NK CD56^{bright} biểu hiện mạnh CD56 trên bề mặt (Hình 3.8). Trong khi NK CD56^{dim} có khả năng tiết các chất như Granzyme, Perofin mạnh hơn nên nó có khả năng tiêu diệt tế bào đích nhanh hơn so với NK CD56^{bright}. Ngược lại, NK CD56^{bright} tập trung vào việc tiết ra cytokine và chemokine như IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-13 và IL-15,... để kích thích và điều hòa các phản ứng miễn dịch trong cơ thể.



Hình 3. 8. Quần thể tế bào NK CD56^{dim} và CD56^{bright}

Trong máu dây rốn, quần thể tế bào NK CD56^{dim} chiếm tỉ lệ cao hơn NK CD56^{bright} có ở lympho với tỉ lệ trung bình $5,93\% \pm 4,81\%$, dao động trong khoảng $[1,8\% - 23,4\%]$, trong khi NK CD56^{bright} chiếm $0,51\% \pm 0,39\%$, dao động trong khoảng $[0,01\% - 1,8\%]$, chi tiết Bảng 3.26.

Bảng 3. 26. Tỉ lệ trung bình các quần thể tế bào NK

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

Bảng 3.27 thể hiện tỉ lệ các quần thể tế bào NK (CD3-/CD56+) và các quần thể phụ của nó trong các nhóm giới tính, tuổi thai và cân nặng của trẻ. Phân tích các giá trị trung bình của quần thể tế bào NK và các quần thể phụ của nó trong các cặp nhóm trên cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3. 27. Tỷ lệ các quần thể tế bào NK theo giới tính, tuổi thai, cân nặng trẻ

	CD3-/CD56⁺ (%)		CD3-/CD56^{dim} (%)		CD3-/CD56^{bright} (%)	
Giới tính	Nữ	Nam	Nữ	Nam	Nữ	Nam
Mean (SD)	6,24% (4,28%)	6,61% (5,46%)	5,73% (4,26%)	6,09% (5,34%)	0,51% (0,45%)	0,52% (0,35%)
P value	>0,05		>0,05		>0,05	
Tuổi thai	≤38 tuần	>38 tuần	≤38 tuần	>38 tuần	≤38 tuần	>38 tuần
Mean (SD)	5,49% (5,08%)	6,86% (4,88%)	4,87% (4,77%)	6,4% (4,88%)	0,62% (0,52%)	0,47% (0,32%)
P value	>0,05		>0,05		>0,05	
Cân nặng trẻ	≤3kg	>3kg	≤3kg	>3kg	≤3kg	>3kg
Mean (SD)	5,95% (5,22%)	6,65% (4,87%)	5,36% (4,96%)	6,16% (4,85%)	0,58% (0,52%)	0,49% (0,33%)
P value	>0,05		>0,05		>0,05	

Quần thể tế bào NK (CD3-/CD56⁺) trong nghiên cứu này chiếm tỷ lệ trung bình là 6,44% ± 4,9% quần thể lympho, và bao gồm 2 quần thể nhỏ là NK CD56^{dim} chiếm 5,93% ± 4,81% và NK CD56^{bright} chiếm tỷ lệ nhỏ hơn là 0,51% ± 0,39%. Tỷ lệ quần thể tế bào NK CD3-/CD56⁺ này tương đương với công bố của Moroishi và cs là 6,4% ± 3,2% [125], tuy nhiên lại thấp hơn so với các công bố khác như Mendoza và cs trên quần thể trẻ Mexico là 23% (N=73) [126], của D'Arena và cs năm 1998 là 23,8% ± 10,1% (N=40) [132], Rabian-Herzog và cs năm 1993 là 25% ± 11% [133] và nghiên cứu của Beck và cs trên quần thể người đa quốc gia là 20,4% ± 7,7% (N=5.267) [131].

Quần thể tế bào NKT (CD3+/CD56⁺)

Tế bào NKT (Natural killer T cells) được đặc trưng bởi cả CD3 và CD56, đây là một loại tế bào miễn dịch đặc biệt có khả năng kết hợp giữa tính chất của cả tế bào T và tế bào NK. Tế bào NKT có khả năng phát hiện và phản ứng với một loạt các tác nhân gây bệnh, bao gồm cả vi rút, vi khuẩn và tế bào ung thư.

Phân tích 59 mẫu máu dây rốn, NKT chỉ chiếm tỷ lệ khiêm tốn là 0,3% ± 0,53% thấp hơn nhiều so với quần thể tế bào NK. Trong đó, tỷ lệ quần thể này ở trẻ nữ là 0,17%

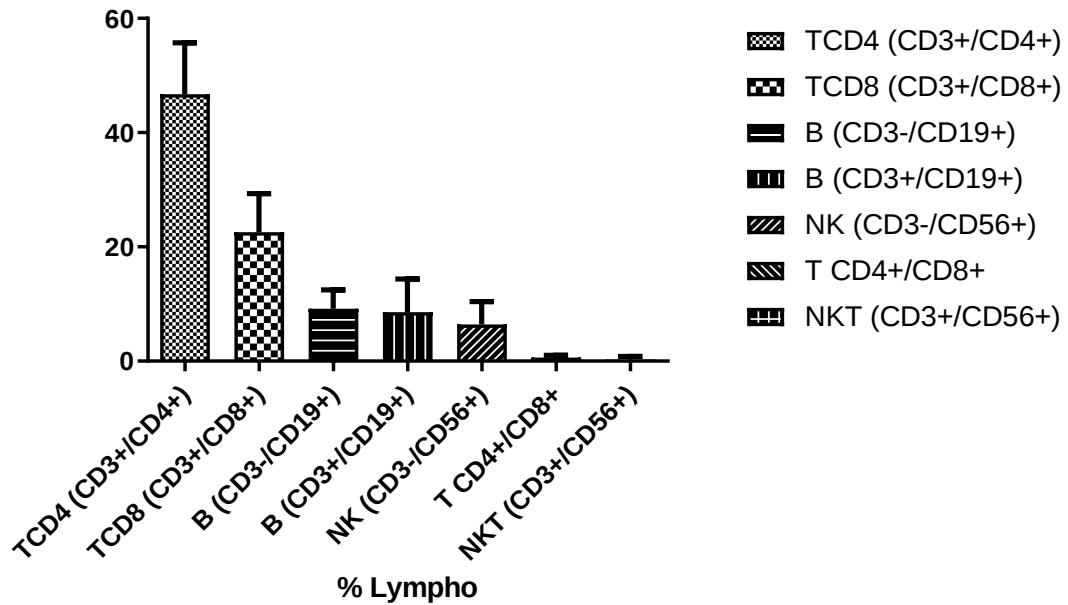
$\pm 0,1\%$, trẻ nam là $0,41\% \pm 0,7\%$; ở trẻ có cân nặng $\leq 3\text{kg}$ là $0,22\% \pm 0,15\%$, trẻ có cân nặng $>3\text{kg}$ là $0,33\% \pm 0,53\%$; và ở nhóm trẻ sinh ≤ 38 tuần là $0,23\% \pm 0,19\%$, nhóm trẻ sinh >38 tuần là $0,33\% \pm 0,64\%$, tuy nhiên sự khác biệt về tỉ lệ NKT ở các nhóm này không khác nhau có ý nghĩa thống kê, chi tiết Bảng 3.28.

Tế bào NKT có vai trò quan trọng trong việc điều tiết miễn dịch và giúp kích hoạt các tế bào T và tế bào NK trong hệ thống miễn dịch. Hơn nữa, tế bào NKT còn được biết đến là những tế bào chuyên trách trong việc điều tiết các phản ứng miễn dịch không đồng nhất, bao gồm cả phản ứng dị ứng và viêm. Trong nghiên cứu này, tỉ lệ quần thể tế bào này khá khiêm tốn, chỉ chiếm $0,3\% \pm 0,53\%$ của lympho (Bảng 3.28). Và số liệu này tương đồng với các công bố của Beck và cs năm 2009 là $0,15\% \pm 0,14\%$ ($n=5.267$) [131] và công bố của D'Arena và cs là $0,3\% \pm 0,3\%$ ($N=40$) [132].

Bảng 3. 28. Tỉ lệ NKT theo giới tính, tuổi thai và cân nặng

(N=59)	NKT (CD3+CD56+) (%)		
Mean (SD)	0,3 (0,53)		
Median [Min; Max]	0,2 [0,02; 4,10]		
<i>Giới tính</i>	<i>Nữ</i>	<i>Nam</i>	<i>P value</i>
Mean (SD)%	0,17 (0,10)	0,41 (0,70)	$>0,05$
<i>Tuổi thai</i>	<i>≤ 38 tuần</i>	<i>>38 tuần</i>	<i>P value</i>
Mean (SD)%	0,23 (0,19)	0,33 (0,64)	$>0,05$
<i>Cân nặng trẻ</i>	<i>$\leq 3\text{kg}$</i>	<i>$>3\text{kg}$</i>	<i>P value</i>
Mean (SD)%	0,22 (0,15)	0,33 (0,63)	$>0,05$

Như vậy, kết quả khảo sát 59 mẫu máu dây rốn cho thấy quần thể TCD4 (CD3+/CD4+) chiếm tỉ lệ cao nhất là $46,71\%$ ($SD=8,99\%$) trong lympho, tiếp theo là quần thể TCD8 (CD3+/CD8+) chiếm $22,58\%$ ($SD=6,73\%$). Quần thể tế bào B trưởng thành (CD3-/CD19+) chiếm $9,52\%$ ($SD=3,28$) và CD3+/CD19+ chiếm trung bình $8,59\%$ ($SD=5,77\%$) trong quần thể lympho. Quần thể tế bào NK (CD3-/CD56+) chiếm $6,44\%$ ($SD= 4,90$), lympho T mang cả 2 marker CD4 và CD8 (CD3+/CD4+/CD8+) chiếm $0,63\%$ ($SD= 0,41\%$) và quần thể tế bào NKT (CD3+/CD56+) chỉ chiếm $0,3\%$ ($SD=0,53\%$) (Hình 3.9).



Hình 3. 9. Tỷ lệ quần thể các tế bào miễn dịch trong máu dây rốn

Nhìn chung, máu dây rốn là nguồn tế bào miễn dịch phong phú và đa dạng. Một số nghiên cứu đã cho thấy rằng các yếu tố môi trường, di truyền, và đặc biệt là các yếu tố tiền sản như chế độ hút thuốc, stress của mẹ, hình thức sinh... có ảnh hưởng đến tỷ lệ thành phần các loại tế bào miễn dịch trong máu dây rốn [134] và góp phần gây ra sự sai khác trong các công bố. Điều này gợi ý rằng cần thực hiện các nghiên cứu sâu hơn các yếu tố tác động đến tỷ lệ các loại tế bào miễn dịch trong máu dây rốn của trẻ sơ sinh tại Việt Nam trong tương lai.

3.2.2. Mối tương quan giữa các quần thể tế bào miễn dịch và tế bào gốc tạo máu

Khi đánh giá tỷ lệ các loại tế bào miễn dịch có trong quần thể lympho ở các đơn vị máu dây rốn có tổng số lượng HSC khác nhau, kết quả thể hiện chi tiết trong Bảng 3.29. Trong đó:

- Tỷ lệ tế bào lympho B ở các đơn vị máu dây rốn có tổng số lượng HSC dưới $3,5 \times 10^6$ tế bào là 10,8% (SD=3,65%), trong khi ở các đơn vị máu dây rốn có số lượng HSC trong khoảng $3,5 \times 10^6 - 7 \times 10^6$ tế bào là 8,94% (SD= 2,95%) và các đơn vị có trên 7×10^6 tế bào HSC là 8,8 % (SD=4,18%) ($p=0,168 > 0,05$).
- Tỷ lệ tế bào lympho TCD4 ở các đơn vị máu dây rốn có tổng số lượng HSC dưới $3,5 \times 10^6$ tế bào là 45,01% (SD=6,91%), trong khi ở các đơn vị máu dây rốn có số lượng HSC trong khoảng $[3,5 \times 10^6 - 7 \times 10^6]$ tế bào là 49,12%

(SD=10,11%) và các đơn vị có trên 7×10^6 tế bào HSC là 48,99% (SD=14,15%) ($p>0,05$).

- Tỷ lệ tế bào lympho T CD8 ở các đơn vị máu dây rốn có tổng số lượng HSC dưới $3,5 \times 10^6$ tế bào là 23,28% (SD=5,17%), trong khi ở các đơn vị máu dây rốn có số lượng HSC trong khoảng $[3,5 \times 10^6 - 7 \times 10^6]$ tế bào là 22,22% (SD=8,65%) và các đơn vị có trên 7×10^6 tế bào HSC là 20,87% (SD=5,88%) ($p>0,05$).
- Tỷ lệ tế bào NK ở các đơn vị máu dây rốn có tổng số lượng HSC dưới $3,5 \times 10^6$ tế bào là 7,39% (SD=5,49%), trong khi ở các đơn vị máu dây rốn có số lượng HSC trong khoảng $[3,5 \times 10^6 - 7 \times 10^6]$ tế bào là 6,57% (SD=5,32%) và các đơn vị có trên 7×10^6 tế bào HSC là 4,7% (SD=3,06%) ($p>0,05$).

Bảng 3. 29. Tỷ lệ các loại tế bào miễn dịch theo các nhóm số lượng HSC khác nhau.

HSC (CD34+)	< $3,5 \times 10^6$ tế bào	$[3,5 \times 10^6 - 7 \times 10^6]$ tế bào	> 7×10^6 tế bào	<i>p</i> <i>value</i>
	(n=24)	(n=21)	(n=3)	
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	
Lympho B ($\times 10^6$ tế bào)	10,8 (3,65)	8,94 (2,95)	8,8 (4,18)	>0,05
Lympho T CD4 ($\times 10^6$ tế bào)	45,01 (6,91)	49,12 (10,11)	48,99 (14,15)	>0,05
Lympho T CD8 ($\times 10^6$ tế bào)	23,28 (5,17)	22,22 (8,65)	20,87 (5,88)	>0,05
Tế bào NK ($\times 10^6$ tế bào)	7,39 (5,49)	6,57 (5,32)	4,7 (3,06)	>0,05

Ngoài ra, khi phân tích mối liên hệ giữa các quần thể tế bào trong máu cuống rốn ở nghiên cứu này, nhận thấy rằng số lượng tế bào gốc tạo máu HSC có mối tương quan thuận tương đối chặt với thể tích máu dây rốn thu được, số lượng TNC và MNC, với hệ số tương quan (r) lần lượt là 0,67; 0,60 và 0,57 ($p<0,01$). Đồng thời số lượng HSC tương quan thuận mức trung bình với tỷ lệ tế bào TCD4 với $r=0,35$ ($p=0,01$). Ngược lại, số lượng HSC có mối tương quan nghịch ở mức trung bình với tỷ lệ tế bào lympho B, với $r= (-0,35)$ ($p=0,03$). Chi tiết được thể hiện ở Bảng 3.30.

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	- 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 (CD3+/CD4+)	0,35	0,01
TCD8 cells (CD3+/CD8+)	- 0,11	0,44
NK cells	-0,23	0,11

Kết quả về mối tương quan giữa T CD4 và HSC này cũng tương đồng với nghiên cứu của Putrawan năm 2022 với hệ số tương quan $r=0,64$ ($p<0,001$) tuy nhiên tác giả này mới chỉ tiến hành nghiên cứu trên đối tượng là chuột Wistar chứ chưa thực hiện quan sát trên người [135]. Về lý thuyết miễn dịch học, mối quan hệ giữa HSC và T CD4 từ lâu đã được nghiên cứu, trong đó sự tương tác giữa các tế bào TCD4 và HSC là một quá trình phức tạp bao gồm các cơ chế điều hòa tạo máu, miễn dịch và duy trì HSC. Trong ghép HSC đồng loài, các tế bào TCD4 này hay còn gọi là Th hoặc T điều hòa (Treg_Regulatory T cell) có vai trò ức chế các phản ứng miễn dịch thải ghép. Mối quan hệ của các tế bào này đặc biệt quan trọng và góp phần vào sự thành công của các ca ghép tế bào gốc tạo máu, cũng như cần thiết cho hoạt động bình thường của hệ thống miễn dịch [136, 137].

Ngoài ra, kết quả nghiên cứu còn cho thấy tỷ lệ tế bào T CD4 và TCD8 có tương quan nghịch ở mức độ trung bình với tỷ lệ tế bào NK với hệ số tương quan lần lượt là $r = -0,42$ ($p=0,01$), và $r = -0,27$ ($p=0,03$). Trong khi đó, các yếu tố như tuổi thai, cân nặng khi sinh, thể tích mẫu, số lượng TNC, MNC, tế bào B (CD3+/CD19+) và tế bào B (CD3-/CD19+) không có mối tương quan tuyến tính với tỷ lệ NK (Bảng 3. 31).

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

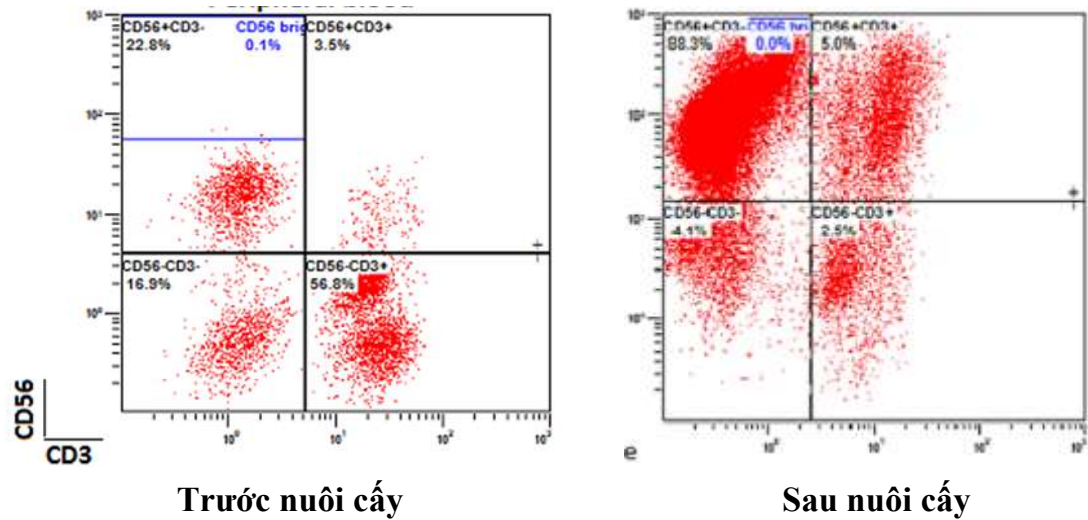
Đặc điểm	Tỉ lệ tế bào NK (n=59)	
	Hệ số tương quan (r)	P
Tuổi thai	0,10	0,46
Cân nặng (kg)	-0,03	0,83
Thể tích mẫu (ml)	- 0,23	0,12
TNCs (10^8)	- 0,01	0,99
MNCs (10^8)	- 0,11	0,46
CD19+/CD3+	- 0,26	0,05
Lympho B (CD19-/CD3+)	0,09	0,50
TCD4 (CD3+/CD4+)	- 0,42	0,01
T CD8 (CD3+/CD8+)	- 0,27	0,03

Trên thực tế, những công bố về đặc điểm các quần thể tế bào miễn dịch trong máu trẻ sơ sinh tại Việt Nam hiện chưa có nhiều, do vậy, những kết quả trong nghiên cứu này sẽ là tiền đề cho các nghiên cứu về hồ sơ miễn dịch từ thời kỳ sơ sinh và mô hình dự đoán bệnh lý trong tương lai.

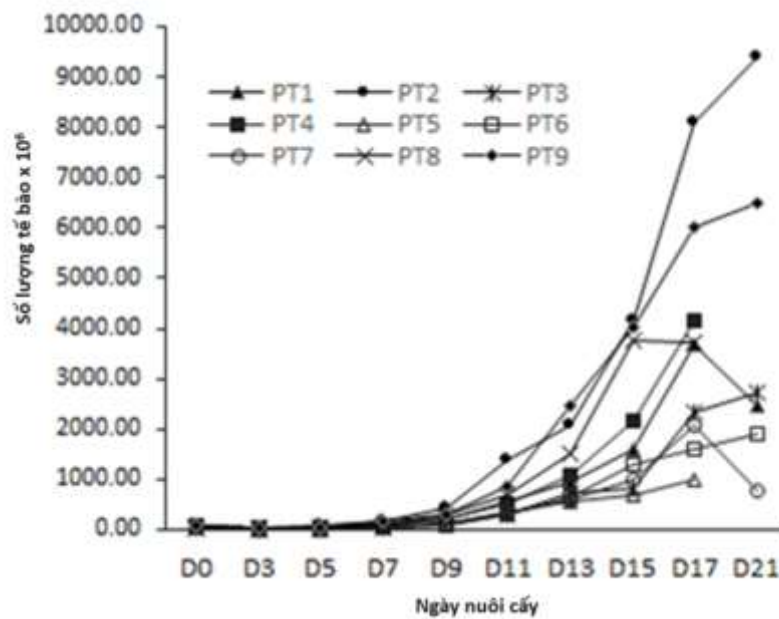
3.4. Nuôi cấy chọn lọc và tăng sinh NK máu ngoại vi

Quy trình kỹ thuật nuôi cấy tăng sinh tế bào NK máu ngoại vi được chuyển giao từ Nhật Bản với bộ kit môi trường nuôi cấy hoạt hóa và tăng sinh tế bào NK chuyên biệt, hãng BINKIT, được sử dụng trong nghiên cứu này.

Sau 3 ngày nuôi cấy hoạt hóa đầu tiên, số lượng tế bào giảm 41,7% so với ngày bắt đầu nuôi cấy (D0). Sau đó, tế bào được chuyển sang nuôi cấy bằng môi trường nuôi cấy tăng sinh, và bổ sung môi trường mới sau cứ mỗi 2-3 ngày. Các ngày sau đó tế bào phát triển đạt đến pha logarit từ ngày thứ 11 của quá trình nuôi cấy và có sự thay đổi rõ rệt về tỉ lệ dấu ấn [46] biểu hiện trên tế bào sau nuôi cấy, chi tiết thể hiện tại Hình 3. 10, Hình 3.11 và Bảng 3. 32, Bảng 3.33.



Hình 3.10. Quần thể tế bào NK máu ngoại vi trước và sau nuôi cấy



Hình 3.11. Tốc độ tăng sinh của NK máu ngoại vi trong quá trình nuôi cấy

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 ($\times 10^6$)	Tổng số tế bào ($\times 10^6$)	N
	(Mean $\pm$ SD)	(Mean $\pm$ SD)	(Mean $\pm$ SD)	(Mean $\pm$ SD)	
Trung bình	95,0 $\pm$ 2,3	88,3 $\pm$ 7,8	2659,3 $\pm$ 1690,8	3.280,8 $\pm$ 2.444	9
Độ tuổi	$p=0,2962$	$p=0,4275$	$p=0,0734$	$p=0,0759$	
≤ 65	93,7 $\pm$ 0,9	85,0 $\pm$ 10,7	4212,0 $\pm$ 2533,2	5.507,8 $\pm$ 3.865,2	4

Tế bào sau nuôi cấy 21 ngày	Tỉ lệ sống (%)	% NK	Số tế bào NK ($\times 10^6$)	Tổng số tế bào ($\times 10^6$)	
> 65	95,3 $\pm$ 2,5	89,1 $\pm$ 7,3	2.271,1 $\pm$ 1.284,5	2.724,0 $\pm$ 1.787,4	5
Loại ung thư	$p= 0,083$	$p=0,019$	$p=0,256$	$p=0,131$	
<i>Dạ dày</i>	95,2 $\pm$ 1,1	91,1 $\pm$ 9,5	3.255,6 $\pm$ 1944,3	3.970,8 $\pm$ 2.978,4	3
<i>Gan</i>	96,5 $\pm$ 0,8	88,2 $\pm$ 2,2	1.858,9 $\pm$ 934,2	2.199,8 $\pm$ 1.130,8	3
<i>Phổi</i>	91,4 $\pm$ 2,7	83,1 $\pm$ 11,2	3.067,6 $\pm$ 2267,2	4.062,6 $\pm$ 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 NK	N
	(Mean $\pm$ SD)	(Mean $\pm$ SD)	(Mean $\pm$ SD)	
Trung bình	88,9 $\pm$ 38,6	1.132,3 $\pm$ 940,3	7,8 $\pm$ 6,7	9
Độ tuổi	$p=0,1962$	$p=0,0138^*$	$p=0,0071^*$	
≤ 65	115,3 $\pm$ 38,0	2.295,2 $\pm$ 2.099,3	16,5 $\pm$ 11,6	4
> 65	82,3 $\pm$ 37,4	601,6 $\pm$ 452,5	5,7 $\pm$ 2,8	5
Loại ung thư	$p= 0,598$	$p=0,000^*$	$p=0,014^*$	
<i>Dạ dày</i>	110,4 $\pm$ 34,8	1.644,9 $\pm$ 1510,7	12,3 $\pm$ 8,5	3
<i>Gan</i>	69,6 $\pm$ 29,0	358,3 $\pm$ 94,7	4,3 $\pm$ 1,7	3
<i>Phổi</i>	84,5 $\pm$ 52,7	807,3 $\pm$ 695,0	5,8 $\pm$ 5,2	3

Ở ngày nuôi cấy thứ 20 – 21, số lượng và thành phần tế bào ở mỗi điều kiện nuôi cấy có sự thay đổi rõ rệt. Tổng số tế bào sau nuôi cấy đạt $3.280,8 \pm 2.444,0 \times 10^6$ với số lượng tế bào NK là $2.659,3,1 \pm 1.690,8 \times 10^6$ chiếm 88,3 $\pm$ 7,8% quần thể tế bào. Sự phát triển của tế bào NK cao ấn tượng, tăng gấp 1132,3 $\pm$ 940,3 lần so với số lượng tế bào NK khi nuôi cấy ban đầu. Trong khi đó, số lượng tế bào NK ở độ tuổi dưới 65 có khả năng tăng sinh tốt hơn với số lần tăng là 2295,2 $\pm$ 2099,3 lần, tăng gấp 3,7 lần so với độ tuổi trên 65 (601,6 $\pm$ 452,5 lần) ($p=0,0138$). Đặc biệt, sự phát triển của tế bào NK cao nhất ở ung thư dạ dày, tăng 1644,9 $\pm$ 1510,7 lần so với ban đầu, tiếp đến là ung thư phổi với số lần NK tăng trung bình là 807,3 $\pm$ 695,0 lần và ung thư gan tăng 358,3 $\pm$ 94,7 lần so với ban đầu ($p<0,05$).

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

3.5.1. Lựa chọn môi trường nuôi cấy

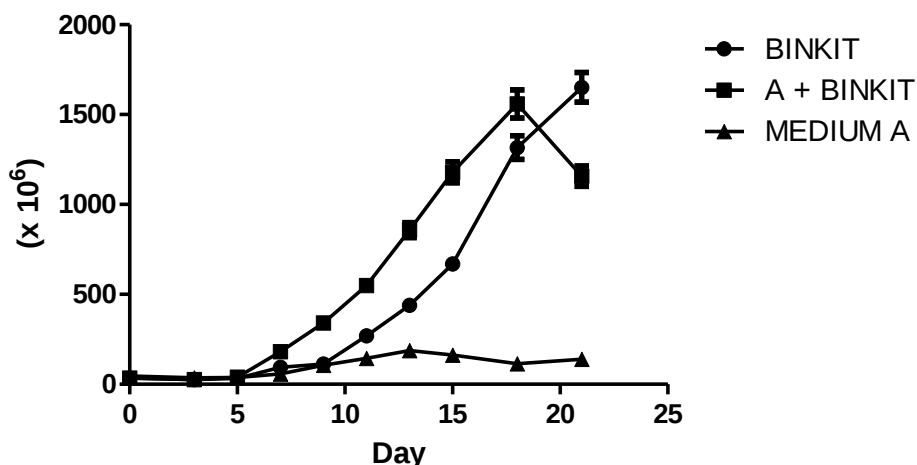
Mục tiêu của nghiên cứu là xây dựng được quy trình nuôi cấy tăng sinh tế bào NK hiệu quả, hướng đến sử dụng cho lâm sàng. Do vậy, các sản phẩm môi trường nuôi cấy thương mại đã được đánh giá an toàn trong lâm sàng là lựa chọn đặt lên hàng đầu.

Tại thời điểm triển khai nghiên cứu, trên thị trường Việt Nam chỉ có duy nhất 2 loại môi trường nuôi cấy tăng sinh NK là BINKIT và bộ kit hoạt hóa và tăng sinh tế bào NK của hãng Corning (mã 88-570), sau đây được gọi là “môi trường A”. Cả hai loại môi trường này được công bố có các thành phần tương tự nhau. Với môi trường A, các công bố về hiệu quả nuôi cấy tế bào NK không nổi bật, cũng như chất lượng của NK sau nuôi cấy mới chỉ được tiến hành thử nghiệm trên mô hình động vật, chưa được đánh giá trên lâm sàng. Trong khi đối với sản phẩm môi trường nuôi cấy tăng sinh tế bào NK của hãng BINKIT do viện trị liệu sinh học Nhật Bản (BIJ) sáng chế, các công bố đã cho thấy kết quả tăng sinh NK từ nguồn máu ngoại vi rất nổi bật, 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 [65, 66, 138-140]. Kế thừa các kết quả nghiên cứu trên đối tượng tế bào NK máu ngoại vi, nghiên cứu này tiếp tục lựa chọn môi trường nuôi cấy này để tăng sinh tế bào NK máu dây rốn trong bước nghiên cứu tiếp theo.

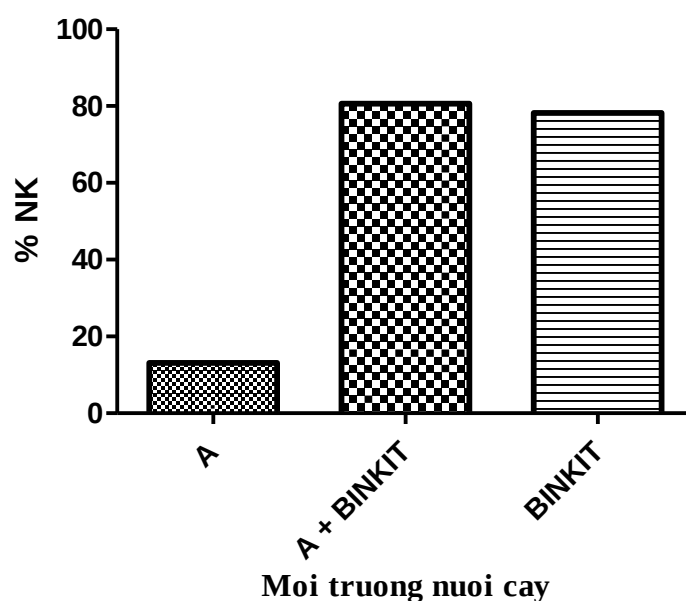
Tuy nhiên, để có thêm cơ sở, thử nghiệm nhỏ nhằm so sánh hiệu quả tăng sinh tế bào NK máu cuống rốn từ hai loại môi trường khác nhau được tiến hành. Mẫu máu dây rốn của cùng em bé được phân tách MNC bằng ly tâm tỉ trọng sử dụng ficoll và tiến hành nuôi cấy trong 3 điều kiện khác nhau với cùng số lượng tế bào ban đầu, cụ thể:

- *Môi trường A*: Hoạt hóa và tăng sinh NK bằng bộ kit môi trường A
- *A + BINKIT*: Hoạt hóa NK 3 ngày đầu bằng BINKIT, những ngày tiếp theo nuôi cấy bằng môi trường A
- *BINKIT*: Hoạt hóa và nuôi cấy tăng sinh bằng BINKIT

Kết quả được thể hiện trên Hình 3.12. và 3.13



Hình 3.12. So sánh số lượng NK nuôi cấy trong các điều kiện môi trường khác nhau



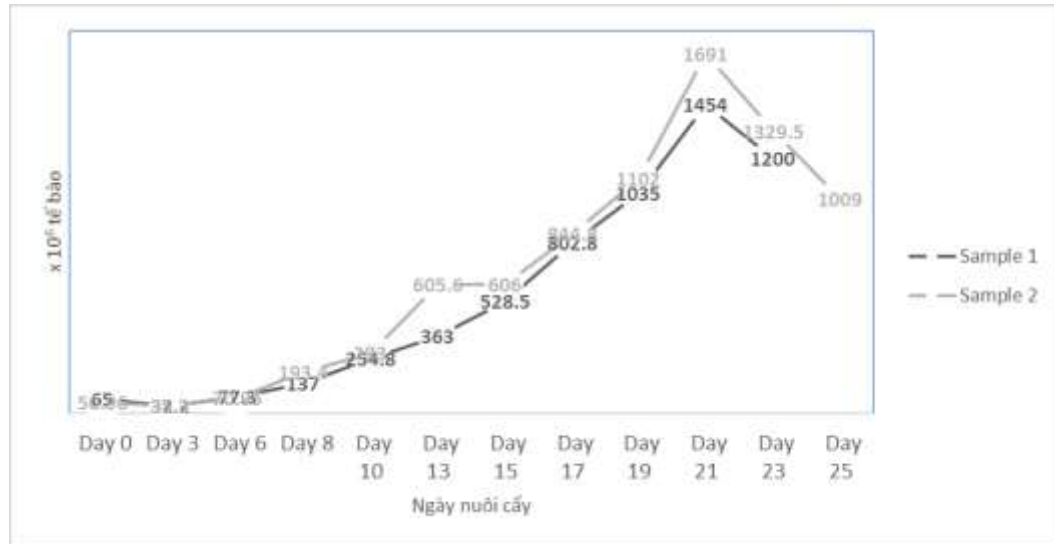
Hình 3.13. Tỷ lệ NK sau 7 ngày nuôi cấy trong các điều kiện môi trường khác nhau

Số lượng tổng tế bào nuôi cấy bằng BINKIT và kết hợp giữa BINKIT và môi trường A cho kết quả tương đương nhau, với tổng số tế bào tăng sau 21 ngày nuôi cấy là từ 31,6 đến 51,6 lần, trong khi môi trường nuôi cấy A có số lượng tổng tế bào chỉ tăng lên 3,1 lần. Không chỉ vậy, tại ngày nuôi cấy thứ 7, tỷ lệ quần thể tế bào NK ở môi trường A là 13,1%, trong khi môi trường BINKIT là 78,2%, và lô kết hợp là 80,2%.

Mặc dù thử nghiệm không được lặp lại nhiều lần, tuy nhiên, với kết quả thử nghiệm ban đầu như trên, và các bằng chứng khoa học về đánh giá tính an toàn, hiệu quả của môi trường BINKIT đã công bố (đây là tiêu chí quan trọng đặt lên hàng đầu của nghiên cứu), đã củng cố cho sự lựa chọn môi trường BINKIT là môi trường để nuôi cấy tăng sinh NK trong toàn bộ nghiên cứu này.

3.5.2. Lựa chọn thời gian nuôi cấy

Vì chi phí thực hiện cho mỗi lần nuôi cấy tương đối lớn, do vậy chỉ có 02 mẫu máu dây rốn được tiến hành khảo sát quá trình nuôi cấy tế bào NK trong 23-25 ngày. Kết quả cho thấy, số lượng tế bào bắt đầu giảm kể từ ngày nuôi cấy thứ 21 trở đi (Hình 3.14), điều này hoàn toàn phù hợp với khuyến cáo của nhà sản xuất kit cũng như những kết quả nghiên cứu trên đối tượng là tế bào máu ngoại vi. Do vậy, trong tất cả các khảo sát sau này trên đối tượng máu dây rốn của nghiên cứu này, ngưỡng nuôi cấy và theo dõi là 21 ngày là tối đa.



Hình 3. 14. Khảo sát số lượng tế bào trong 23-25 ngày nuôi cấy (n=2)

3.5.3. Hình thái tế bào trong quá trình nuôi cấy

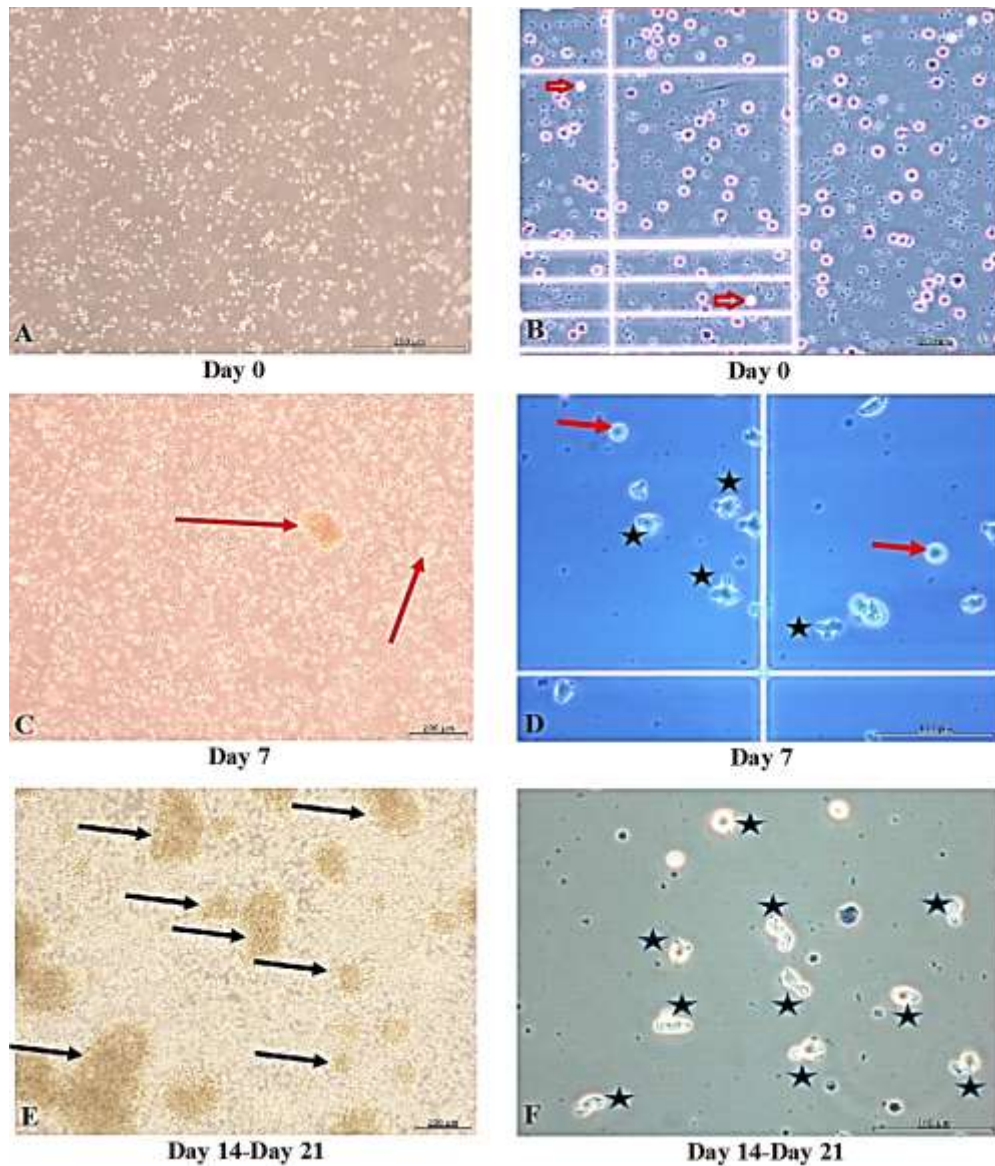
Quá trình nuôi cấy tế bào diễn ra trong vòng 21-25 ngày, trong điều kiện 37°C, 5% CO₂. Tại thời điểm ngày nuôi cấy đầu tiên, MNC máu dây rốn được phân tách sử dụng ficoll (đối với cả những mẫu trước đó được phân tách bằng hệ thống AXP). Khối MNC nuôi cấy thực tế vẫn còn các tế bào hồng cầu lẫn cùng với tế bào bạch cầu. Các tế bào bạch cầu tròn, sáng, nhân bắt màu thuốc nhuộm Turk's màu tím và dễ dàng quan sát trên kính hiển vi, một số tế bào hồng cầu chưa được ly giải có hình tròn, sáng và không bắt màu thuốc nhuộm (Hình 3.15-A, B)

Tế bào được nuôi cấy 3 ngày đầu tiên với mật độ từ 1-1,5 x 10⁶ tế bào/ml trong môi trường nuôi cấy chọn lọc ban đầu. Đến ngày thứ 3, môi trường nuôi cấy kích thích ban đầu được ly tâm loại bỏ, thay vào đó là môi trường nuôi cấy tế bào NK cơ bản và huyết thanh với nồng độ 5-10%.

Từ ngày thứ 5 trở đi, số lượng tế bào hồng cầu trong mẫu nuôi cấy giảm rõ rệt, lúc này có thể kiểm tra số lượng tế bào và xác định tỉ lệ tế bào sống bằng thuốc nhuộm xanh trypan.

Từ ngày thứ 6,7 hình thành một số cụm tế bào (Hình 3.15-C), hình thái tế bào trong quần thể thay đổi và không đồng nhất, phù hợp với các mô tả tế bào NK trong các công bố trước đây. Có 2 kiểu hình thái tế bào có nhân quan sát được trong chai nuôi cấy:

- Kiểu tế bào tròn, có một nhân ở chính giữa (mũi tên trong hình 3.15-D)
- Kiểu tế bào không đồng đều, thành tế bào lồi lõm tạo thành một số eo thắt. Nhân tế bào lớn (Ngôi sao trong hình 3.15-D)



Hình 3. 15. Sự thay đổi hình thái tế bào trong quá trình nuôi cấy

A, B) Tế bào tại ngày bắt đầu nuôi cấy, tế bào bạch cầu bắt màu thuốc nhuộm màu tím, hồng cầu tròn, sáng, kích thước nhỏ, không bắt màu thuốc nhuộm (mũi tên đỏ); C) Tế bào ngày nuôi cấy thứ 7, mũi tên- cụm tế bào; D) Tế bào ngày 7, mũi tên – tế bào tròn, hình sao – tế bào không đồng đều; E) Tế bào ngày 14, mũi tên – cụm tế bào lớn, hình sao – tế bào không đồng đều.

Từ ngày thứ 14 trở đi, số lượng cụm tế bào cũng như kích thước cụm tế bào tăng lên rõ rệt (Mũi tên, hình 3.15-E), tỉ lệ các tế bào có hình thái không đồng nhất tăng lên so với các ngày nuôi cấy trước đó (hình sao, hình 3.15-F) và tỉ lệ này khác nhau tùy vào từng mẫu.

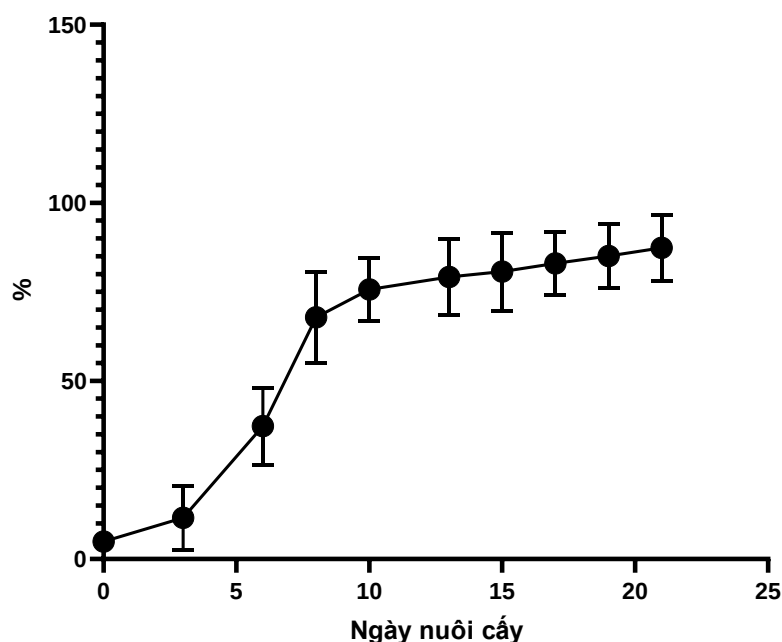
Từ ngày thứ 21 trở đi, tế bào có xu hướng nhỏ dần về kích thước, song song với sự suy giảm số lượng tế bào.

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 tế bào NK máu dây rốn trong quá trình nuôi cấy

Khảo sát kiểu hình miễn dịch quần thể tế bào NK ở 4 mẫu cho thấy sự thay đổi ngoạn mục về tỉ lệ tế bào NK trong quá trình nuôi cấy.

Quần thể tế bào ban đầu với tỉ lệ NK (CD3-/CD56+) trung bình là 4,88 % $\pm$ 1,51%, đến ngày nuôi cấy thứ 3, tỉ lệ NK CD3-/CD56+ tăng lên là 11,58% $\pm$ 8,97%, ngày thứ 6 là 37,35% $\pm$ 10,83%, ngày thứ 8 là 67,85% $\pm$ 12,7% và ngày thứ 10 là 75,68% $\pm$ 8,78%. Giai đoạn từ ngày thứ 3 đến ngày nuôi cấy thứ 10 này là giai đoạn gia tăng tỉ lệ NK lớn nhất trong suốt quá trình nuôi cấy (Hình 3.16).



Hình 3. 16. Tỉ lệ % NK (CD3-/CD56+) trong quá trình nuôi cấy (n=4)

Từ ngày nuôi cấy thứ 10 trở đi, tốc độ gia tăng tỉ lệ NK trong quần thể chậm lại, cụ thể, đến ngày thứ 13, tỉ lệ NK là 79,17% $\pm$ 10,74%, ngày thứ 15 đạt 80,67% $\pm$ 11,02%, ngày thứ 17 là 82,96% $\pm$ 8,8%, ngày thứ 19 là 85,06% $\pm$ 9% và ngày thứ 21 là 87,35% $\pm$ 9,22%, chi tiết Bảng 3.34.

Bảng 3. 34. Tỷ lệ % NK thay đổi trong quá trình nuôi cấy

Ngày nuôi cấy	Mean (%)	SD (%)	N
Day 0	4,88	1,51	4
Day 3	11,58	8,97	4
Day 6	37,35	10,83	4
Day 8	67,85	12,70	4
Day 10	75,68	8,78	4
Day 13	79,17	10,74	4
Day 15	80,67	11,02	4
Day 17	82,96	8,80	4
Day 19	85,06	9,00	4
Day 21	87,35	9,22	4

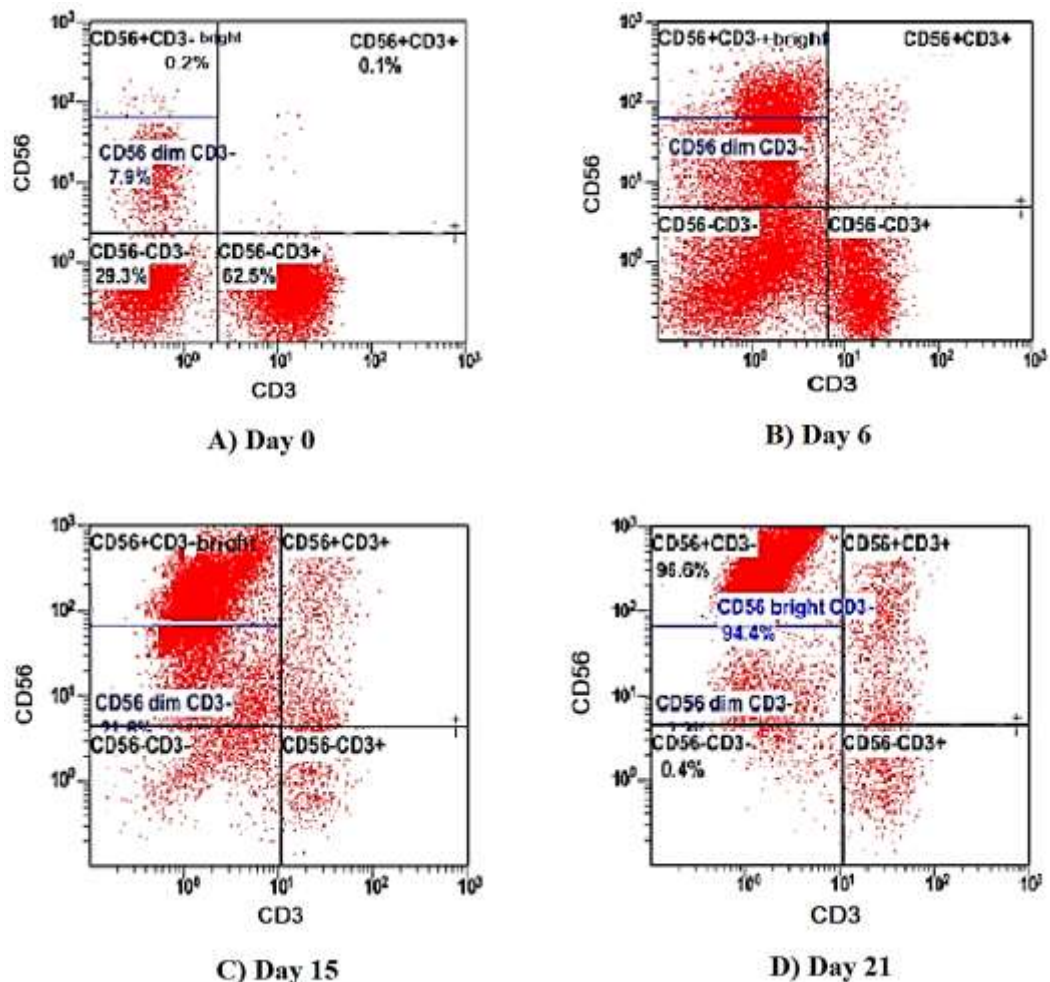
Một điều đáng chú ý là, từ quần thể tế bào NK ban đầu bao gồm 2 quần thể phụ là CD3-/CD56^{dim} biểu hiện thấp CD56 chiếm ưu thế so với quần thể thứ 2 là CD3-/CD56^{bright} biểu hiện mạnh CD56, sau 21 ngày nuôi cấy, tỷ lệ quần thể tế bào CD3-/CD56^{bright} đã chiếm gần như toàn bộ quần thể tế bào NK hoạt hóa. Chi tiết được thể hiện tại hình 3.17.

Sự chuyển đổi tỷ lệ hai quần thể tế bào NK CD56^{dim} và CD56^{bright} được bắt đầu thể hiện sau 5-6 ngày nuôi cấy đầu tiên và gia tăng mạnh trong các ngày sau đó, đặc biệt là giai đoạn từ ngày nuôi cấy thứ 14-15 và đạt cực đại vào ngày nuôi cấy thứ 21. Kết quả này phản ánh hiệu quả cũng như vai trò của các yếu tố hoạt hóa trong môi trường nuôi cấy, bao gồm các yếu tố như CD16, OKT432, IL2,... Quá trình chuyển đổi các quần thể tế bào trong quá trình nuôi cấy có thể giải thích như sau:

- Các tế bào NK, đặc biệt NK CD56^{dim} biểu hiện mạnh yếu tố hoạt hóa CD16, tương tác và được hoạt hóa bởi kháng thể kháng CD16 gắn trên bề mặt chai nuôi cấy. Quá trình này dẫn đến việc hoạt hóa NK để có thể sản xuất nhiều cytokine và chemokin như IFN- γ , TNF- α ,... Đồng thời tế bào NK sau khi được hoạt hóa bởi kháng thể kháng CD16 sẽ mất dần sự biểu hiện của CD16 trên bề mặt của chúng, song song với biểu hiện mạnh CD56 [141, 142].
- Tế bào HSC biệt hóa thành tế bào NK CD56^{bright}, sau đó các tế bào CD56^{bright} này có thể tạo ra các tế bào CD56^{dim} mang khả năng gây độc trực tiếp cao

hơn. Ngoài ra, các tế bào NK $CD56^{bright}$ này từ lâu đã được biết đến là có đặc trưng bởi đầu telomere dài hơn và biểu hiện $CD94$ mạnh hơn so với NK $CD56^{dim}$ [143, 144]. Điều này cho thấy rằng chúng có khả năng tồn tại và phân chia lâu dài hơn $CD56^{dim}$.

- Các yếu tố như OK432 và IL2 có trong môi trường nuôi cấy sơ cấp hoặc được kích thích tiết ra từ các tế bào đơn nhân làm gia tăng khả năng tăng sinh, biệt hóa của NK đầu dòng, tăng khả năng tiêu diệt và sản xuất cytokine của NK [145, 146].
- Ở giai đoạn nuôi cấy thứ cấp, dưới tác dụng của IL-2, và các yếu tố kích thích tăng trưởng có trong tiểu cầu được giải phóng, NK tiếp tục được kích thích tăng sinh và gia tăng hoạt tính của nó [145].



Hình 3. 17. Kiểu miễn dịch quần thể tế bào NK máu dây rốn trong quá trình nuôi
 A) Ngày nuôi cấy đầu tiên (Day 0), tỉ lệ NK $CD56^{dim}$ là 7,9%, trong khi $CD56^{bright}$ là 0,2%; B) Ngày nuôi cấy thứ 6 (Day 6); C) Ngày nuôi cấy thứ 15 (Day 15);
 D) Ngày nuôi cấy thứ 21 (Day 21) tỉ lệ NK $CD56^{dim}$ là 2,2%, trong khi $CD56^{bright}$ là 94,4%

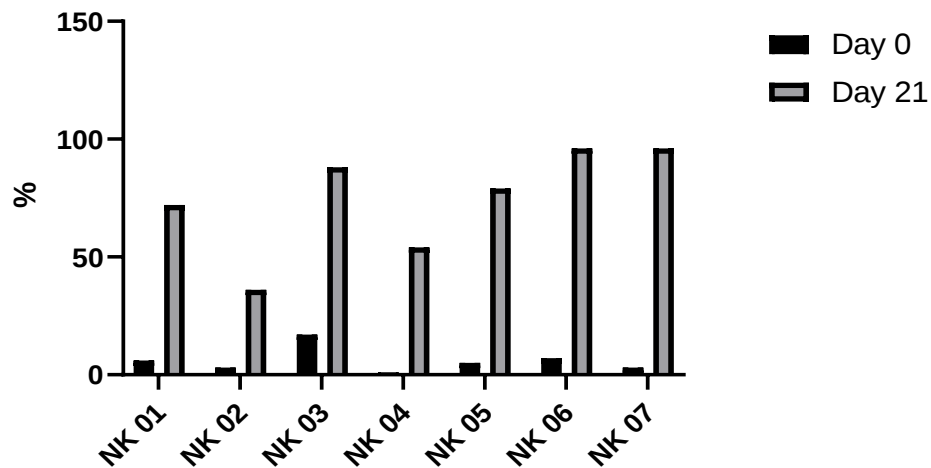
Như vậy, từ lý thuyết đến thực tiễn, sản phẩm tế bào NK sau hoạt hóa và tăng sinh trong nghiên cứu này có độ đồng nhất tương đối cao, trong đó các tế bào NK CD56^{bright} chiếm tỉ lệ chủ yếu. Các tế bào này, từ lâu đã được biết đến với sự biểu hiện thấp (hoặc không biểu hiện) CD16 và khả năng tiết cytokine, chemokine cao hơn quần thể tế bào NK CD56^{dim}.

3.5.4.2. Hiệu quả nuôi cấy chọn lọc NK

Kết quả nuôi cấy tăng sinh NK trên 7 mẫu máu dây rốn cho thấy quần thể tế bào NK (CD3-/CD56+) có biến động tăng từ 6,38% $\pm$ 4,87% ban đầu lên 77,39% $\pm$ 19,11% (tương đương với việc tăng tỉ lệ trung bình 11,6 lần), chi tiết được thể hiện ở Bảng 3.35 và Hình 3.18.

Bảng 3.35. Tỉ lệ quần thể tế bào NK (CD3-/CD56+) trước và sau nuôi cấy

Mẫu	Day 0 (%)	Day 21 (%)
NK 01	6,1	72
NK 02	3,1	36,7
NK 03	17,53	88,1
NK 04	1,7	72,8
NK 05	5,2	79,1
NK 06	7,2	96,84
NK 07	3,8	96,24
Min	1,7	36,7
Max	17,53	96,84
Mean	6,38	77,40
SD	4,87	19,11
N	7,00	7,00



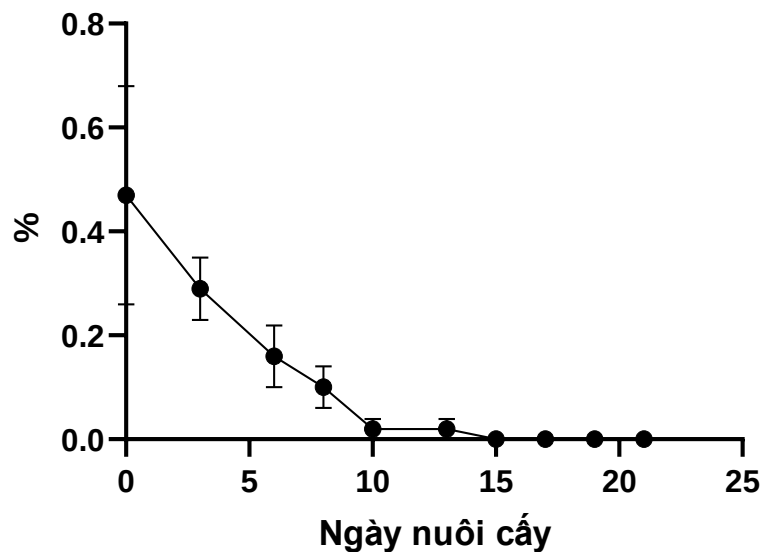
Hình 3. 18. Tỷ lệ quần thể tế bào NK trước và sau nuôi cấy

Mẫu NK 01 có tỷ lệ quần thể tế bào NK (CD3-/CD56+) tăng từ 6,1% lên 72,2%, mẫu NK 02 tăng từ 3,1% lên 36,1%, NK 03 tăng từ 17,52% lên 88,1%, mẫu NK 04 tăng từ 1,7% lên 72,8%, mẫu NK 05 tăng từ 5,2% lên 79,1%, mẫu NK 06 tăng từ 7,2% lên 96,84% và mẫu NK 07 tăng từ 3,8% lên 96,24% sau 21 ngày 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

Khảo sát quần thể HSC (CD34+) ở 03 mẫu tế bào nuôi cấy trong 21 ngày cho thấy tỷ lệ tế bào HSC giảm dần theo thời gian và đến khoảng ngày nuôi cấy thứ 10-15, HSC không còn tồn tại trong quần thể tế bào nuôi cấy (Hình 3.19).



Hình 3. 19. Tỷ lệ HSC thay đổi trong quá trình nuôi cấy (n=3)

Ở ngày nuôi cấy đầu tiên, tỷ lệ HSC trung bình là $0,47\% \pm 0,21\%$, ở ngày nuôi cấy thứ 3 (tức sau giai đoạn nuôi cấy sơ cấp), tỷ lệ này giảm mạnh xuống còn $0,29\% \pm$

0,06%. Tiếp đó, ở các ngày nuôi cấy thứ 6 là $0,16\% \pm 0,06\%$; ngày thứ 8 là $0,1 \pm 0,04\%$ và đến ngày 15 tỉ lệ HSC ở cả 3 mẫu đều là 0%, chi tiết Bảng 3.36.

Bảng 3. 36. Tỉ lệ HSC thay đổi trong quá trình nuôi cấy (n=3)

Ngày nuôi cấy	Mẫu 01	Mẫu 02	Mẫu 03
D0	0,2	0,7	0,5
D3	0,32	0,21	0,35
D6	0,07	0,2	0,21
D8	0,05	0,09	0,15
D10	0,02	0	0,05
D13	0,05	-	0
D15	0	-	-
D17	-	-	-
D19	-	-	-
D21	-	-	-

Rất nhiều nghiên cứu đã chỉ ra vai trò của HSC trong việc thúc đẩy biệt hóa thành dòng tế bào NK. Trong một số nghiên cứu, để gia tăng hiệu quả của quá trình nuôi cấy tăng sinh tế bào NK, bước kích thích tăng sinh HSC được tiến hành trước tiên với sự hiện diện của các chất kích thích tăng trưởng đã được đề cập ở trên trong thời gian từ 1-4 tuần, sau đó mới đến các bước hoạt hóa tăng sinh tế bào NK. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, do tỉ lệ HSC ban đầu trong khối tế bào thấp ($<1\%$)

3.5.5.2. Tính chọn lọc của môi trường nuôi cấy tế bào NK

Nghiên cứu tiến hành đánh giá sự thay đổi về tỉ lệ các loại tế bào miễn dịch như NK (CD3-/CD56+), NKT (CD3+/CD56+), T CD4 (CD3+/CD4+), T CD8 (CD3+/CD8+) trong khối tế bào trước và sau nuôi cấy 21 ngày trên 7 mẫu.

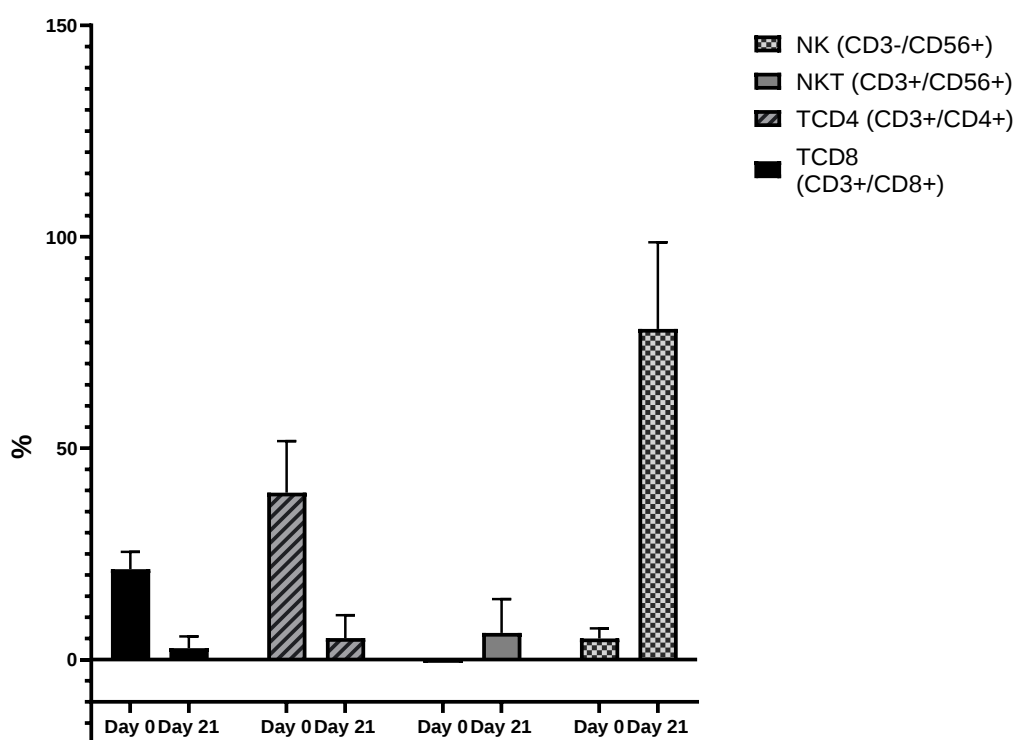
Kết quả cho thấy rõ sự thay đổi rất lớn về tỉ lệ các tế bào miễn dịch trong quần thể tế bào trước và sau nuôi cấy. Cụ thể, ngoài quần thể tế bào NK (CD3-/CD56+) có biến động tăng từ $6,38\% \pm 4,87\%$ ban đầu lên $77,39\% \pm 19,11\%$ (tương đương với việc tăng tỉ lệ 11,6 lần), Không chỉ vậy, quần thể tế bào NKT (CD3+/CD56+) cũng có biến đổi theo chiều hướng tăng, từ $0,09\% \pm 0,03\%$ lên $6,21\% \pm 7,44\%$.

Hai quần thể tế bào có xu hướng giảm tỉ lệ trong quá trình nuôi cấy là T CD4 (CD3+/CD4+) và TCD8 (CD3+/CD8+) với tỉ lệ ban đầu lần lượt là $39,51\% \pm 11,3\%$ và $20,84\% \pm 4,07\%$, sau khi nuôi cấy 21 ngày là $5,31\% \pm 5,03\%$ và $3,47\% \pm 3,19\%$,

tương đương với tỉ lệ giảm 7,44 và 6 lần (chi tiết thể hiện trong Bảng 3.37 và Hình 3.20).

Bảng 3. 37. Tỉ lệ các quần thể miễn dịch trước và sau nuôi cấy 21 ngày

Quần thể tế bào	Trước nuôi cấy Mean (SD)%	Sau nuôi cấy Mean (SD)%	N	Đánh giá
NK (CD3-/CD56+)	6,38 (4,87)	77,39 (19,11)	7	Tăng
NKT (CD3+/CD56+)	0,09 (0,03)	6,21 (7,44)	7	Tăng
T CD4 (CD3+/CD4+)	39,51 (11,3)	5,31 (5,03)	7	Giảm
T CD8 (CD3+/CD8+)	20,84 (4,07)	3,47 (3,19)	7	Giảm



Hình 3. 20. Tỉ lệ các quần thể miễn dịch trước và sau nuôi cấy 21 ngày

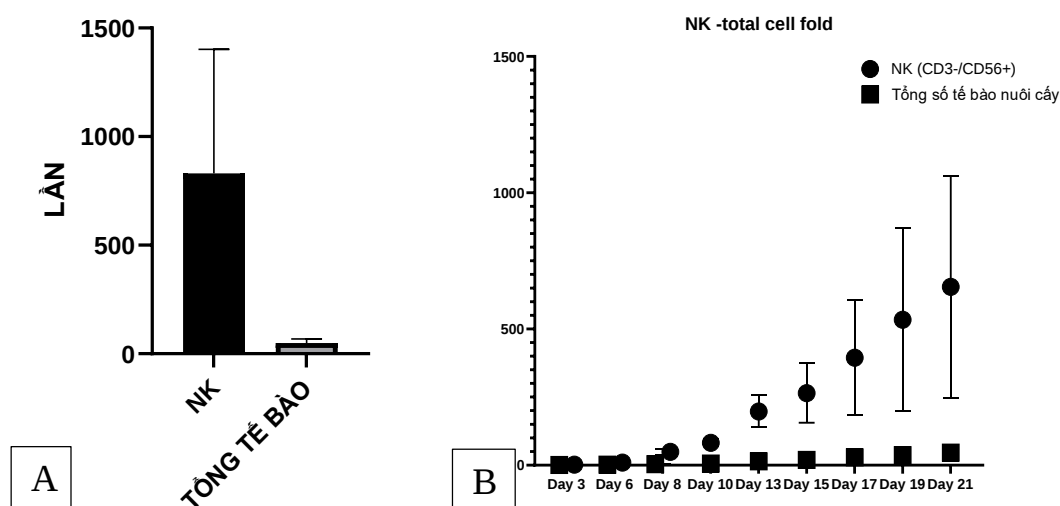
3.5.6. Sự thay đổi về số lượng tế bào nuôi cấy

Trong 7 mẫu tế bào nuôi cấy, tổng số lượng tế bào ban đầu là $45,02 \times 10^6 \pm 15,75 \times 10^6$, trong đó $2,8 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^6$ là tế bào NK (CD3-/CD56+), sau 21 ngày nuôi cấy, tổng số lượng tế bào là $2.115,4 \times 10^6 \pm 1.040,1 \times 10^6$, trong đó có $1.762,7 \times 10^6 \pm 1.141,1 \times 10^6$ là tế bào NK, tương đương với việc số lượng tổng tế bào tăng lên $46,06 \pm 14,21$ lần và số lượng tế bào NK tăng lên $840,7 \pm 550,4$ lần, chi tiết thể hiện trong Bảng 3.38.

Bảng 3. 38. Tổng số lượng tế bào và tế bào NK sau 21 ngày nuôi cấy

	Tế bào tổng số ($\times 10^6$) (Mean$\pm$SD)	NK (CD3-/CD56+) ($\times 10^6$) (Mean$\pm$SD)	N
Số lượng D0	45,02 $\pm$ 15,75	2,8 $\pm$ 1,9	7
Số lượng D21	2.115,4 $\pm$ 1.040,1	1.762,7 $\pm$ 1.141,1	7
Số lần tăng	46,06 $\pm$ 14,21	840,7 $\pm$ 550,4	7

Có thể thấy rằng, mặc dù số tế bào NK tăng thay đổi rất nhiều ở những mẫu khác nhau, nhưng đặc điểm chung của chúng là môi trường nuôi cấy có tính chọn lọc dòng tế bào NK cao. Khối tế bào NK sau nuôi cấy có độ đồng nhất (NK purity) cao, và tăng sinh rất nhiều lần so với khối tế bào ban đầu (Hình 3.21).



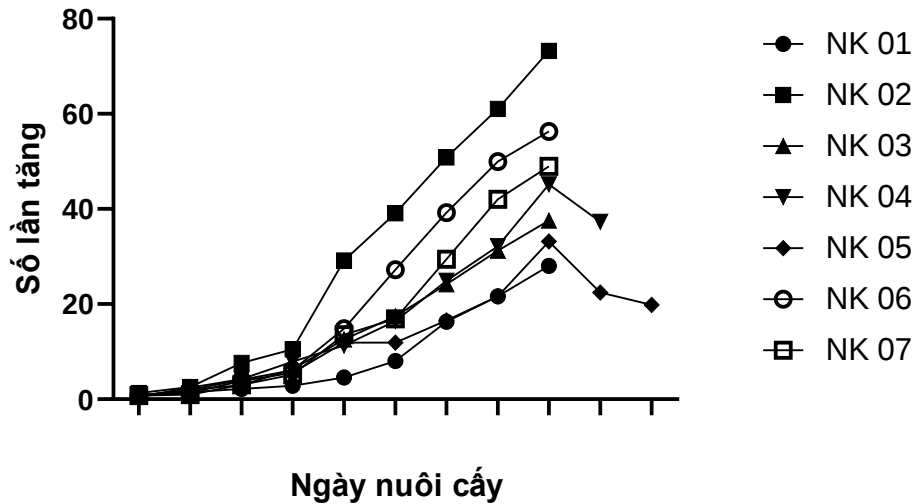
Hình 3. 21. Số lượng tế bào NK và tổng số lượng tế bào trong quá trình nuôi cấy

A) Số lần tăng số lượng tế bào sau 21 ngày nuôi cấy (N=7)

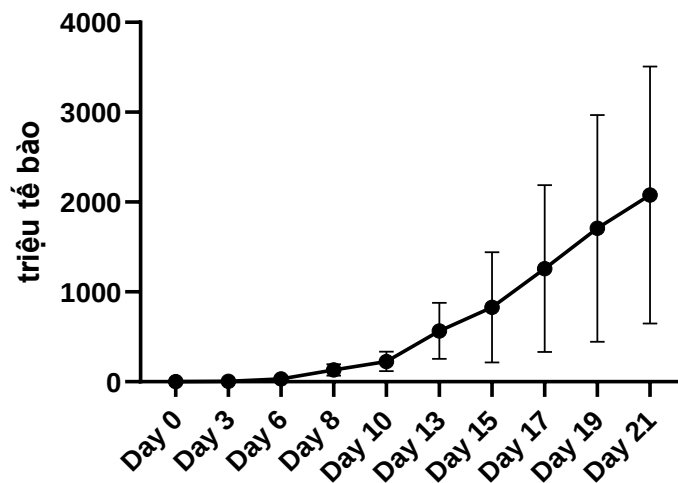
B) Số lần tăng số lượng tế bào trong 21 ngày nuôi cấy

Sau giai đoạn nuôi cấy sơ cấp 3 ngày đầu, hầu hết các mẫu có số lượng tế bào giảm so với tế bào nuôi cấy ban đầu, cụ thể 5/7 mẫu có số lượng tế bào Day 3 giảm so với Day 0; trong 7 mẫu khảo sát, 1 mẫu có số lượng tế bào không đổi và 1 mẫu có số lượng tế bào tăng lên. Nguyên nhân của việc giảm này là do tác dụng của các chất hoạt hóa, cụ thể kháng thể kháng CD3 liên kết với thụ thể CD3 trên bề mặt tế bào lympho ban đầu dẫn đến kích hoạt tế bào lympho T giải phóng các cytokine, nhưng sau đó gây ra quá trình chết theo chương trình (apoptosis) của các tế bào T [147]. Từ ngày nuôi cấy thứ 8 đến ngày nuôi cấy 21 là giai đoạn sinh trưởng mạnh nhất của tế bào. Sau ngày 21, tế bào có xu hướng lão hóa, giảm về số lượng. Hình 3.22 và hình

3.23 thể hiện chi tiết số lần tăng tổng số lượng tế bào và số lượng tế bào NK theo thời gian nuôi cấy.



Hình 3. 22. Số lần tăng tổng số lượng tế bào trong 21 ngày nuôi cấy (N=7)



Hình 3. 23. Số lượng tế bào NK (CD3-/CD56+) trong quá trình nuôi cấy (N=4)

Như vậy, tỉ lệ tế bào NK (CD3-/CD56+) và HSC (CD34+) trong quần thể tế bào đơn nhân máu dây rốn ban đầu trước nuôi cấy chỉ chiếm tỉ lệ lần lượt là $6,38\% \pm 4,87\%$ và dưới 1%. Tuy nhiên sau 21 ngày nuôi cấy, tỉ lệ quần thể tế bào NK này đã lên tới $77,4\% \pm 19,1\%$ với trung bình $1,762.7 \times 10^6 \pm 1,141.1 \times 10^6$ (trong khoảng từ $372 - 3681 \times 10^6$) tế bào và 840 ± 550 lần tăng số lượng tế bào NK (trong khoảng 141 – 1934 lần), trong khi số lượng của tế bào HSC (CD34+) giảm dần và không còn sau 10-15 ngày nuôi cấy. Điều này cho thấy, mặc dù HSC là loại tế bào biệt hóa rất nhanh, nhưng hỗn hợp các yếu tố kích thích sinh trưởng có trong môi trường nuôi cấy tế bào NK, bao gồm các chất kích thích tăng trưởng trong huyết thanh bất hoạt nhiệt

không chỉ kích thích tăng sinh tế bào NK mà còn duy trì tính gốc của HSC và kích thích biệt hóa thành tế bào NK.

Phân tích về tỉ lệ HSC thay đổi trong quá trình nuôi cấy, kết quả của nghiên cứu này tương đồng với công bố của Maria João Pinho và cộng sự năm 2011 khi nuôi cấy tăng sinh tế bào NK từ HSC (CD34+). Sau 7-28 ngày, HSC không còn trong môi trường nuôi cấy, thay vào đó là tỉ lệ tế bào NK tăng lên cao [148]. Nhưng kết quả nghiên cứu này khác biệt so với kết quả của Kao và cộng sự năm 2007 khi nuôi cấy tăng sinh HSC trong 1 tuần sau đó là nuôi cấy biệt hóa tế bào HSC thành tế bào NK trong vòng 6 tuần tiếp theo bằng môi trường chứa các chất kích thích tăng trưởng cho cả NK và HSC như TPO, SCF, FL, IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-12, IL-18, IL-15, GM-CSF, G-CSF...mặc dù tỉ lệ HSC giảm, nhưng sau 6 tuần nuôi cấy, tỉ lệ tế bào HSC vẫn đạt dưới 3%, tỉ lệ tế bào NK đạt 54.2% [149]. Nguyên nhân của sự khác biệt này có thể do nguồn tế bào ban đầu để nuôi cấy biệt hóa tế bào NK là tế bào HSC trong nghiên cứu của Kao đã qua quá trình chọn lọc đặc hiệu (sorting) và có độ tinh khiết là 99% thay vì hỗn hợp MNC chỉ chứa tế bào HSC dưới 1% như ở nghiên cứu này. Hơn nữa, môi trường nuôi cấy của Kao không chỉ bao gồm các chất kích thích tăng sinh hoạt hóa tế bào NK mà còn chứa các chất kích thích tăng sinh tế bào HSC được duy trì và bổ sung liên tục trong thời gian dài nuôi cấy. Còn trong nghiên cứu này, một số thành phần kích thích HSC (nếu có) chỉ tồn tại trong huyết thanh bất hoạt nhiệt được bổ sung vào môi trường với tỉ lệ 5-10%. Nồng độ các chất chưa được xác định và chỉ được duy trì nuôi cấy trong thời gian ngắn.

Khi so sánh với các kết quả của các nghiên cứu khác, quan sát thấy có sự khác nhau về hiệu quả tăng sinh NK bao gồm tăng sinh về số lượng cũng như tính đồng nhất của quần thể tế bào NK sau nuôi cấy.

Năm 2011, Jan Sphanholtz và nhóm nghiên cứu của ông cũng đã báo cáo kết quả của họ về sự khác biệt của tế bào NK với các tế bào CD34+ máu dây rốn. Các tế bào gốc tạo máu HSC máu dây rốn được nuôi cấy trong 2 tuần. Từ ngày thứ 14, các tế bào được nuôi cấy theo 2 phương pháp:

- Ở phương pháp thứ nhất, Jan Sphanholtz sử dụng túi nuôi cấy để tăng sinh tế bào HSC và kết hợp với môi trường chứa SCF, IL-7, IL-15 và IL-2 trong vòng 6 tuần. Kết quả là, tổng số tế bào trung bình tăng 1300 lần, sản phẩm tế bào NK có số lượng $900-1.900 \times 10^6$ và tỉ lệ CD3-/CD56+ là $71\% \pm 9\%$ (n=3) [150]. Ở phương pháp này tỷ lệ tế bào NK và số lượng tế bào NK không có sự khác biệt nhiều so với kết quả của nghiên cứu này. Mặc dù số lần tăng sinh tế bào NK trong nghiên cứu của Jan Sphanholtz cao hơn, nhưng vì quy trình nuôi cấy của họ kéo dài 6 tuần, trong khi quy trình của nghiên cứu này là 3 tuần (21

ngày), do vậy có thể nói số lần tăng sinh tế bào NK không thực sự nổi bật hơn so với nghiên cứu này.

- Trong phương pháp thứ hai, Jan Sphanholtz sử dụng hệ thống bioreactor để nuôi cấy tế bào và thu được kết quả tốt hơn so với phương pháp đầu tiên và cũng tốt hơn so với kết quả trong nghiên cứu này: Số lần tăng lên của tế bào là 2.100 lần, sản phẩm tế bào NK có độ tinh khiết cao với $92\% \pm 2\%$ và tổng số tế bào NK là $1.600 - 3.700 \times 10^6$ tế bào ($n=3$) [150].

Năm 2014, nhóm nghiên cứu của Hiroshi Terunuma cũng tiến hành thí nghiệm nuôi cấy tăng sinh tế bào NK từ máu ngoại vi cũng bằng bộ hóa chất BINKIT, kết quả cho thấy số lần tăng sinh tối đa của các tế bào NK là 161 lần và tỉ lệ CD3-/CD56+ sau nuôi cấy tối đa là 78% [151]. Kết quả tăng sinh số lượng tế bào NK này thấp hơn so với kết quả tăng sinh tế bào NK từ máu ngoại vi trên bệnh nhân ung thư ($1.132,3 \pm 940,3$ lần) và trên cả tế bào NK từ máu dây rốn ($840,7 \pm 550,4$ lần) ở nghiên cứu này. Vì máu dây rốn không chỉ là nguồn chứa tế bào NK chưa trưởng thành mà còn chứa cả tế bào gốc HSC có khả năng biệt hóa thành tế bào NK đầu dòng, cả hai loại tế bào này đều có khả năng phát triển thành tế bào NK hoạt hóa trưởng thành, do đó hiệu quả tăng sinh NK máu dây rốn vẫn còn có khả năng cao hơn rất nhiều khi tiến hành triển khai thêm giai đoạn tăng sinh HSC trước khi tăng sinh và biệt hóa tế bào NK.

Năm 2013, trong báo cáo của Nina Shah và các đồng nghiệp được công bố tỷ lệ tế bào NK (CD56+CD3-) có nguồn gốc từ máu dây rốn tươi tăng sinh là $> 95\%$ và số lượng tế bào NK trung bình gấp 1.848 lần so với ban đầu, trong khi NK từ máu dây rốn đông lạnh tăng sinh trung bình gấp 2.389 lần sau 14 ngày nuôi cấy. Kết quả trên cao hơn nhiều so với kết quả của nghiên cứu này. Nguyên nhân chính có thể là do sự khác biệt trong phương pháp tăng sinh tế bào NK máu dây rốn. Nina Shah đã sử dụng tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo (aAPC_ artificial antigen presenting cell) và các cytokine bao gồm IL-2, IL-15 và FLT-3. aAPC đã dẫn đến việc tạo ra các tế bào NK máu dây rốn nuôi cấy biểu hiện gia tăng của các thụ thể kích hoạt tế bào NK, và biểu hiện perforin và granzyme tăng lên.[152]. Kết quả trên thực sự ấn tượng bởi tuy thời gian nuôi cấy ngắn hơn nhưng số lượng tế bào NK và tỷ lệ tế bào NK đều cao hơn nhiều so với kết quả của nghiên cứu này. Điều này chứng tỏ rằng mặc dù có một số chất bổ sung tăng trưởng tương tự, nhưng các điều kiện nuôi cấy trong quy trình của Nina Shah hiệu quả hơn đối với việc tăng sinh NK. Tuy nhiên, trong phương pháp của Nina Shah có một giai đoạn tế bào NK phải tương tác với tế bào ngoại lai, do đó, rất khó kiểm soát ảnh hưởng của các tế bào này đến các tế bào NK cũng như trong

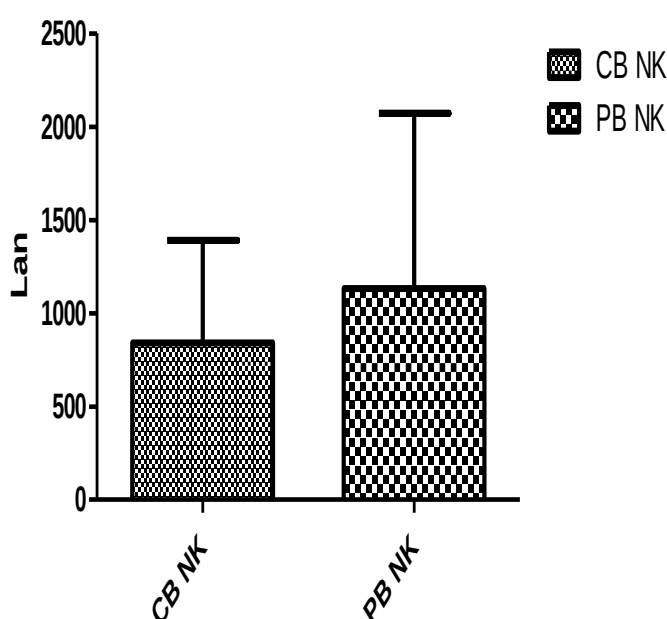
sản phẩm tế bào NK cuối cùng. Đây cũng là một nhược điểm khi so sánh với phương pháp trong nghiên cứu này.

Năm 2019, Mu và cộng sự đã công bố nghiên cứu của mình phương pháp nuôi cấy tăng sinh tế bào NK từ MNC máu dây rốn cũng sử dụng các chất kích thích tăng sinh và hoạt hóa tương tự là IL-2, kháng nguyên *Streptococcus* nhóm A và zoledronate. Trong nghiên cứu của Mu, từ quần thể MNC ban đầu với 5,02% tế bào NK (CD56⁺ CD3⁻), sản phẩm có tỉ lệ tế bào NK đạt $\geq 90\%$, sau 21 ngày nuôi cấy số lượng tế bào đạt trung bình $1,59 \times 10^{10}$ tế bào, cao gấp 101 lần tổng số lượng tế bào ban đầu và gấp 1.561 lần so với số lượng NK ban đầu (n=5) [153], và cao hơn so với kết quả nghiên cứu này. Một trong các nguyên nhân là nồng độ IL-2 sử dụng trong nghiên cứu của Mu là 2.000 IU/ml gấp đôi so với nồng độ tối đa sử dụng trong nghiên cứu này là 1.000 IU/ml. Ngoài ra, Mu còn cho thấy, việc bổ sung kháng nguyên vi khuẩn *Streptococcus* nhóm A ở nồng độ 0,01KE/mL như một tác nhân gây viêm nhiễm để kích thích tế bào NK hoạt hóa làm tỉ lệ tế bào NK thu được cao hơn hẳn các công bố trước đó khi sử dụng phương pháp nuôi cấy không sử dụng lớp tế bào nuôi hoặc phương pháp có sử dụng lớp tế bào nuôi. Tuy nhiên việc đánh giá hiệu quả của khối tế bào NK này trên lâm sàng chưa được làm rõ. Vì các kháng nguyên vi khuẩn này khi đưa vào cơ thể nó không chỉ kích thích tế bào NK mà nó có thể kích thích các phản ứng miễn dịch khác chưa được kiểm soát của cơ thể. Hơn nữa, các kháng nguyên vi khuẩn hiện diện trong khối tế bào, có thể ảnh hưởng đến chỉ số nồng độ nội độc tố vi khuẩn, và do vậy có thể dẫn đến việc khối tế bào không đạt tiêu chí này khi sử dụng trên lâm sàng. Đây là một điểm cần thực sự lưu ý.

Trên thực tế, các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng khi được kích thích bằng các cytokine như IL-2 hoặc IL-12, hoạt tính gây độc tế bào của tất cả các tập hợp con tế bào NK tăng lên đáng kể. Hơn nữa, sự kết hợp giữa IL-12 và IL-18 là cách tốt nhất để tạo ra sự sản xuất mạnh mẽ IFN- γ , cao gấp 20–30 lần trong tế bào NK CD56^{bright} so với trong tế bào CD56^{dim} [154]. Trong khi đó, ở nghiên cứu này, điều kiện nuôi cấy là sự kết hợp giữa IL-2, kháng thể kháng CD3, CD16 và OK-423, axit zoledronic và huyết tương tự thân giúp kích hoạt hóa và tăng sinh tế bào NK. Vào ngày đầu tiên, tỷ lệ tế bào NK CD56^{dim} chiếm ưu thế trong quần thể. Từ ngày thứ 5 đến ngày 21, tỷ lệ tế bào NK CD56^{dim} giảm và tỷ lệ CD56^{bright} tăng đáng kể lên $> 90\%$ trong quần thể tế bào NK. Điều này có nghĩa là quần thể tế bào NK đã thay đổi rất nhiều về tỉ lệ và số lượng so với quần thể tế bào ở giai đoạn ban đầu và cũng chứng minh rằng các chất bổ sung tăng trưởng trong điều kiện nuôi cấy có hiệu quả trong việc hoạt hóa và định hướng phát triển các tế bào NK CD56^{bright}.

Như đã thảo luận trước đây, CD56^{bright} có tỉ lệ cao hơn trong máu dây rốn so với máu ngoại vi trong khi CD56^{dim} có xu hướng ngược lại. Hoạt tính gây độc tế bào của các tế bào NK CD56^{dim} cao hơn đáng kể so với các tế bào CD56^{bright} và chúng chứa nhiều perforin, granzyme và hạt phân giải tế bào ung thư hơn. Mức độ biểu hiện cao của CD16 làm cho chúng trở thành chất trung gian hiệu quả của quá trình gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể, trong khi các tế bào NK CD56^{bright} chỉ thực hiện quá trình gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể một cách yếu ớt. Tuy nhiên, các tế bào NK CD56^{bright} là những tế bào sản xuất cytokine hiệu quả nhất. Các cytokine chính được giải phóng là interferon- γ (IFN- γ), yếu tố hoại tử khối u- α (TNF- α), yếu tố kích thích khuẩn lạc đại thực bào bạch cầu hạt (GM-CSF)... Hơn nữa, dẫn chứng y văn cho thấy tế bào NK CD56^{bright} là tiền thân của tế bào NK CD56^{dim}, chúng có thể chuyển dạng dưới sự xuất hiện của một số yếu tố như yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 1 (FGF-1), do vậy, giả thuyết đưa ra rằng sau khi NK CD56^{bright} vào cơ thể, các tế bào này có thể được kích hoạt để chuyển sang CD56^{dim} với khả năng tiêu diệt tế bào ung thư mạnh hơn và tiết cytokine, chemokine để kích hoạt các phản ứng miễn dịch chống ung thư khác trong cơ thể [155, 156].

Trong nghiên cứu này, khối tế bào NK sau tăng sinh, hoạt hóa có quần thể CD56^{bright} chiếm ưu thế, tuy nhiên nghiên cứu chưa thể đánh giá được khả năng tiết cytokine của tế bào NK để làm rõ hơn vai trò của các tế bào này. Đây sẽ là một trong những điểm cần triển khai nghiên cứu thêm trong tương lai.



Hình 3. 24. Số lần tăng NK sau nuôi cấy trên hai nguồn tế bào khác nhau

CB NK: NK máu dây rốn (n=7)

PB NK: NK máu ngoại vi (n=9)

Như vậy, xét về mặt số lượng cũng như hiệu quả tăng sinh tế bào NK, cùng với môi trường nuôi cấy và phương pháp nuôi cấy, trong nghiên cứu này, quá trình tăng sinh tế bào NK máu cuống rốn không có giai đoạn kích thích tăng sinh tế bào gốc tạo máu (HSC) cho hiệu quả tăng sinh thấp hơn so với nguồn máu ngoại vi, với số lần tăng sinh là 840 ± 550.4 lần ở máu cuống rốn so với $1.132,3 \pm 940,3$ lần ở máu ngoại vi (Hình 3.24). Nguyên nhân một phần có thể do chưa tối ưu được hiệu suất tăng sinh HSC, dẫn đến chưa tối ưu được hiệu suất biệt hóa và tăng sinh của NK trong máu dây rốn.

3.5.7. Thời gian nhân đôi của tế bào

Vì tốc độ sinh trưởng của tế bào ảnh hưởng đến tính ổn định cũng như sự đồng nhất của quần thể tế bào hay sản phẩm tế bào phục vụ trị liệu, do đó nghiên cứu tiến hành đánh giá thời gian nhân đôi của quần thể tế bào nuôi cấy nói chung và quần thể tế bào NK nói riêng.

Kết quả cho thấy thời gian nhân đôi trung bình của riêng tế bào NK trong suốt 21 ngày nuôi cấy là 2,28 ngày ($SD=0,31$ ngày; $N=7$), tương đương 54,82 giờ để hoàn tất 1 lần phân chia (Bảng 3.39). Điều này có nghĩa là, trong suốt quá trình nuôi cấy là 21 ngày, tế bào NK máu dây rốn đã phân chia được 9-11 lần.

Bảng 3. 39. Thời gian nhân đôi trung bình của tế bào NK trong các mẫu ($n=7$)

Mẫu	Thời gian nhân đôi (ngày)	Thời gian nhân đôi (giờ)
S7	2,05	49,15
S6	2,20	52,68
S5	2,34	56,14
S4	1,92	46,18
S3	2,39	57,29
S2	2,15	51,67
S1	2,94	70,61
<i>Min</i>	1,92	46,18
<i>Max</i>	2,94	70,61
Mean	2,28	54,82
SD	0,31	7,35

Tuy nhiên, khi phân tích vào từng giai đoạn sinh trưởng của tế bào, nhận thấy, trong mỗi giai đoạn khác nhau của quá trình nuôi cấy, thời gian nhân đôi của tế bào NK sẽ khác nhau. Vì trong giai đoạn 3 ngày nuôi cấy sơ cấp đầu tiên, hầu hết các mẫu có hiện tượng giảm số lượng tế bào so với ban đầu do ảnh hưởng của quá trình hoạt hóa, trong khi từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 21 hiện tượng này không còn xảy ra. Do vậy, căn cứ trên kết quả khảo sát tốc độ tăng sinh và biến đổi về tỉ lệ quần thể tế bào NK, thời gian nhân đôi của tế bào được phân tích trong 3 giai đoạn: Giai đoạn tăng trưởng mạnh nhất vào ngày thứ 3- ngày thứ 10; giai đoạn tìm điểm cân bằng từ ngày thứ 10 đến ngày 15 và giai đoạn bão hòa từ ngày 15 đến ngày 21. Tiến hành khảo sát trên 04 mẫu tế bào được theo dõi số lượng tế bào NK liên tục, kết quả được thể hiện ở Bảng 3.40.

Bảng 3. 40. Thời gian nhân đôi tế bào NK trong các giai đoạn khác nhau

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

Giai đoạn từ ngày thứ 3 đến ngày 10 là giai đoạn tế bào tăng sinh nhanh nhất với trung bình là $1,19 \pm 0,31$ ngày, tương đương $28,46 \pm 7,4$ giờ. Điều này đồng nghĩa là trong giai đoạn 7 ngày này, các tế bào đã thực hiện phân chia trung bình $6,2 \pm 1,3$ lần. Tương tự, trong giai đoạn từ ngày thứ 10 đến ngày 15, tế bào giảm tốc độ nhân lên, với trung bình $3,31 \pm 1,05$ ngày cho 1 lần phân chia, tương đương $79,48 \pm 25,2$ giờ, tương ứng với việc các tế bào đã thực hiện $1,6 \pm 0,5$ lần phân chia trong giai đoạn này. Cuối cùng, trong giai đoạn từ ngày 15 đến ngày 21 thời gian nhân đôi trung bình là $4,08 \pm 1,03$ ngày, tương đương với $97,81 \pm 24,6$ giờ, và trong quá trình này, các tế bào đã thực hiện phân chia $1,5 \pm 0,3$ lần.

Như vậy, trong nghiên cứu này, thời gian nhân đôi trung bình của tế bào NK trong toàn bộ 21 ngày nuôi cấy là $54,84 \pm 7,35$ giờ, tương đương với $2,29 \pm 0,31$ ngày, cao hơn đáng kể so với tế bào NK có nguồn gốc từ máu ngoại vi người trưởng thành trong nghiên cứu của Yin Liu và cộng sự năm 2014 là 1,24 – 1,25 ngày [157]. Tương tự, kết quả này cao hơn so với kết quả 24-36 giờ của tế bào thương mại NK-92 theo số liệu công bố của Tam và cộng sự năm 2003 [158], cũng như số liệu 30-40 giờ của

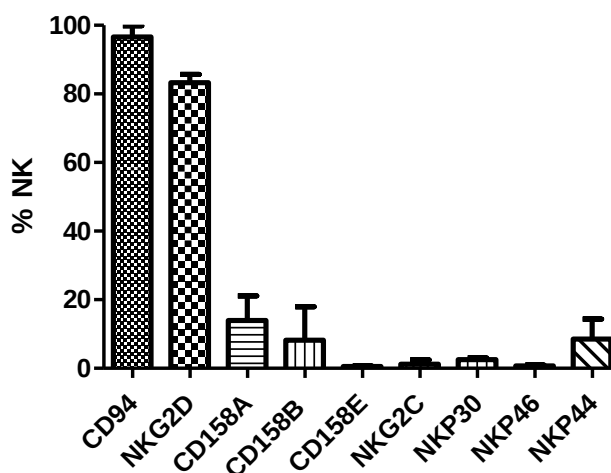
dòng tế bào thương mại KHYG được nhà cung cấp dòng tế bào công bố. Tuy nhiên, số liệu trên lại thấp hơn rất nhiều so với ông bố của Lutz và cs năm 2011 trên đối tượng tế bào NK nguồn gốc máu ngoại vi người trưởng thành là 13,5 ngày [159]. Vì thời gian nhân đôi của tế bào tỉ lệ nghịch với các biến đổi có thể xảy ra trong bộ mã di truyền do sai sót trong quá trình nhân đôi và phân chia. Do đó, để làm rõ hơn tính ổn định của bộ nhiễm sắc thể tế bào sau nuôi cấy, xét nghiệm nhiễm sắc thể đồ của tế bào NK sau 21 ngày nuôi cấy đã được thực hiện. Kết quả này sẽ được trình bày ở phần sau của nghiên cứu.

3.6. Hoạt tính của tế bào 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 và ức chế trên bề mặt của tế bào NK đóng vai trò quan trọng trong quá trình nhận diện và tiêu diệt tế bào bất thường, bao gồm cả tế bào ung thư và tế bào nhiễm vi rút. Sự cân bằng giữa các marker hoạt hóa và ức chế này rất quan trọng trong việc đảm bảo rằng tế bào NK chỉ tấn công các tế bào bất thường mà không tấn công các tế bào bình thường trong cơ thể. Ngoài ra, sự biểu hiện của các marker hoạt hóa và ức chế này không chỉ phụ thuộc vào các yếu tố bên ngoài môi trường bên ngoài như các chất kích thích, ức chế, tín hiệu của các tế bào miễn dịch lân cận khác mà còn phụ thuộc vào tín hiệu bên trong chính nội tại tại tế bào, bao gồm kiểu gen.

Trong nghiên cứu này, một số marker hoạt hóa và ức chế tiêu biểu như CD94/NKG2, NKG2C (CD159c), NKG2D (CD159d), KIR 2DL2/L3 (CD158b) ... trên một số mẫu tế bào NK sau nuôi cấy được khảo sát. Kết quả cho thấy, sự biểu hiện của các dấu ấn hoạt hóa và ức chế NK biểu hiện rất khác nhau, 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 ức chế CD158a, CD158b và marker hoạt hóa 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)

CD94 thường biểu hiện song song với một hoặc một vài phân tử thuộc nhóm NKG2 tạo thành một cặp dị phân tử biểu hiện trên bề mặt tế bào NK. Tùy thuộc vào phân tử NKG2 sẽ quyết định chúng là phân tử hoạt hóa hay ức chế [160]. Đồng thời, mức độ biểu hiện CD94 từ lâu được cho là có mối tương quan đối nghịch với sự chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào NK trong điều kiện nuôi cấy ngoài cơ thể. Điều này có nghĩa là tế bào NK sau nuôi cấy có khả năng tồn tại lâu hơn để thực hiện chức năng của mình [161].

Cùng mức độ biểu hiện mạnh với CD94, cặp NKG2D/ CD94 tạo thành cặp dị phân tử hoạt hóa của tế bào NK. NKG2D không chỉ biểu hiện trên tế bào NK mà còn biểu hiện trên tế bào NKT, tế bào T CD8 và γδT hoạt hóa. NKG2D có thể nhận diện rất nhiều họ phối tử, các phối tử của chúng thường biểu hiện thấp ở các tế bào khỏe mạnh thông thường, nhưng tăng biểu hiện ở các tế bào bị chuyển dạng (tế bào ung thư), tế bào nhiễm virus [162]. Các tín hiệu kích hoạt thông qua NKG2D và các phối tử NKG2DL của nó có thể lấn át các tín hiệu ức chế do các thụ thể ức chế khác tạo ra, kích thích tế bào NK giải phóng cytokine và sản xuất granzyme và perforin tiêu diệt tế bào ung thư [163-165].

Mặc dù NKP30, NKP46 và NKP44 là hai dấu ấn hoạt hóa của tế bào NK, tuy nhiên nó lại có sự biểu hiện thấp trên tế bào NK trưởng thành sau nuôi cấy trong nghiên cứu này. Đồng thời, các thụ thể ức chế CD158a, CD158b, CD158e biểu hiện ở mức trung bình thấp đến rất thấp.

Như vậy, bên cạnh sự biểu hiện ở mức độ thấp các thụ thể ức chế trên các tế bào NK sau nuôi cấy, cặp thụ thể hoạt hóa quan trọng là CD94 và NKG2D biểu hiện mạnh đóng vai trò quan trọng và quyết định hoạt tính của tế bào NK.

Sự thay đổi, khác biệt trong việc biểu hiện các dấu ấn hoạt hóa, ức chế tế bào NK sau nuôi cấy còn phụ thuộc vào kiểu gen của từng mẫu. Do các mẫu có kiểu gen quy định các protein hoạt hóa, ức chế khác nhau sẽ được biểu hiện khác nhau trong quá trình nuôi cấy và liên quan trực tiếp đến hoạt tính cũng như khả năng hoạt động của tế bào NK. Do vậy, việc khảo sát kiểu gen quy định các protein hoạt hóa, ức chế này và mức độ biểu hiện của nó cũng như kiểu hình các phối tử của nó ở người bệnh là thực sự cần thiết để có thể đánh giá được hiệu quả điều trị của liệu pháp. Đây có thể là ý tưởng nghiên cứu mới trong tương lai.

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

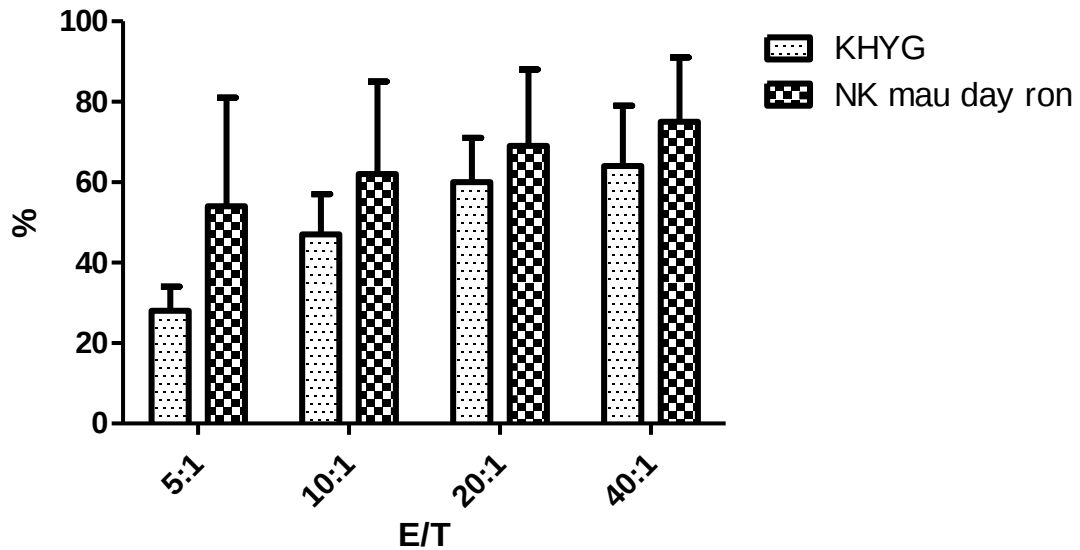
Kết quả đánh giá hoạt tính 05 mẫu tế bào NK sau nuôi cấy (ngày nuôi cấy thứ 18 đến 21) cho thấy khả năng tiêu diệt tế bào ung thư K562 của tế bào NK sau nuôi cấy tương đối cao, thậm chí cao hơn so với dòng tế bào NK thương mại KHYG. Chi tiết được thể hiện ở Bảng 3.41. và Hình 3.26

Bảng 3. 41. Hoạt tính của tế bào NK và KHYG tiêu diệt tế bào ung thư K562

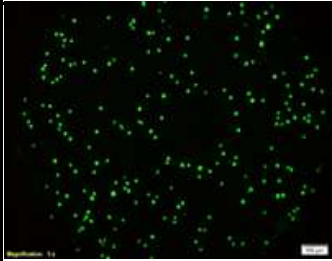
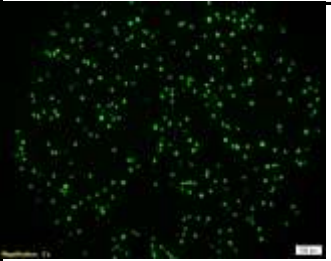
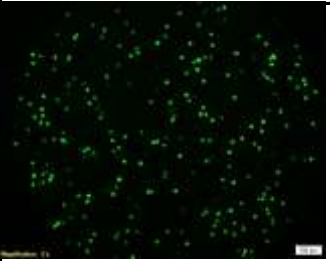
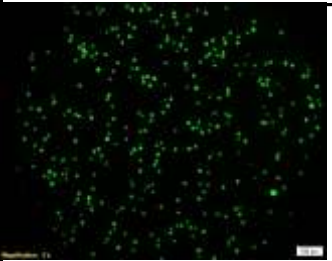
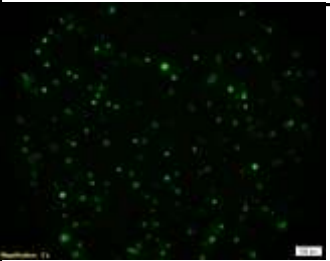
Loại tế bào	Tỉ lệ E/T	5:1 (%)	10:1 (%)	20:1 (%)	40:1 (%)
KHYG	Mean	27,7	47,4	60,0	64,1
	SD	6,2	10,0	10,8	15,1
	N	3	3	3	3
NK	Mean	54,4	62,2	68,6	74,6
	SD	26,9	23,2	18,7	15,7
	N	5	5	5	5

Cụ thể, ở tỉ lệ E/T=5/1, tức là cứ 05 tế bào NK sẽ được ủ với 1 tế bào K562, sau 3 giờ, lượng tế bào K562 bị tiêu diệt là đạt 54,4% (SD=26,9%; N=5), tương ứng với hoạt tính đạt 54,4%. Trong khi ủ K562 với tế bào KHYG ở cùng tỉ lệ, K562 bị tiêu diệt là 27,7% (SD=6,2; N=3), tương ứng với hoạt tính KHYG là 27,7%.

Tương tự, ở tỉ lệ E/T=10/1, hoạt tính của tế bào NK nuôi cấy đạt 62,2% (SD=23,2%, N=5) trong khi hoạt tính của KHYG là 47,7% (SD=10; N=3). Ở tỉ lệ E/T=20/1 và 40/1, hoạt tính của tế bào NK nuôi cấy lần lượt là 68,6 % (SD=18,7%; N=5) và 74,6% (SD=15,7%; N=5) trong khi của KHYG lần lượt là 60% (SD=10,8; N=3) và 64,1% (N=3).



Hình 3. 26. Khả năng tiêu diệt của NK nuôi cấy và KHYG với dòng tế bào K562

	K562 + RPMI	K562 + NK NUÔI CẤY	K562 + KHYG
0h	 A	 C	 E
3h	 B	 D	 F

Hình 3. 27. Khả năng tiêu diệt tế bào ung thư K562 sau 3 giờ

Khả năng tiêu diệt tế bào ung thư K562 của NK nuôi cấy và KHYG sau 3 giờ

A,B – Tế bào K562 và môi trường RPMI tại 0h và 3h

C,D – Tế bào K562 và tế bào NK nuôi cấy tại 0h và 3h

E,F - Tế bào K562 và tế bào KHYG tại 0h và 3h

Năm 2010, Yang và cs đã tiến hành thử nghiệm nuôi cấy tăng sinh tế bào CIK (CD3+/CD56+) và NK máu dây rốn, và họ chia thành 3 nhóm nghiên cứu, trong đó với nhóm A nuôi cấy bằng môi trường chứa SCF (40 ng/ml), IL-2 (80 ng/ml), IL-7

(40 ng/ml) và IL-15 (40 ng/ml); nhóm B, nuôi cấy bằng môi trường SCF (40 ng/ml), IL-2 (80 ng/ml), IL-7 (40 ng/ml), IL-15 (40 ng/ml) có bổ sung thêm FLT3 ligand (40 ng/ml); và nhóm C nuôi cấy bằng môi trường IL-2, IL-7 và IL-15. Đánh giá khả năng tiêu diệt tế bào K562 bằng phương pháp tương tự với nghiên cứu này, tuy nhiên thời gian ủ tế bào CIK/NK với tế bào ung thư lâu hơn, là 4 giờ. Kết quả cho thấy, ở tỉ lệ E/T=10:1 của tế bào NK thuộc nhóm A,B,C lần lượt là 55,33%±5,20%, 41,94%±4,18% và 45,68%±5,66%; ở tỉ lệ E/T=20:1, tỉ lệ tiêu K562 lần lượt là 64,55%±5,74%, 52,25%±5,10% và 54,57%±4,51% [166] và tương đương với kết quả trong nghiên cứu này.

Hoạt tính tiêu diệt tế bào ung thư của tế bào NK sau hoạt hóa và nuôi cấy trong nghiên cứu của Mu và cs thực hiện năm 2019 đã đề cập trước đó, với hiệu suất tăng sinh vượt trội so với nghiên cứu này được đưa ra so sánh. Trong nghiên cứu của Mu, các tế bào NK máu dây rốn nuôi được hoạt hóa bằng IL-2 nồng độ cao (2.000 IU/ml), có bổ sung zoledronate và kháng nguyên *Streptococcus* nhóm A cho thấy, ở tỉ lệ E/T = 1/1 tỉ lệ tế bào K562 bị tiêu diệt là 52,63%; ở E/T=10/1 có tỉ lệ tiêu diệt là 82,18% (N=5) [153]. Kết quả trên cao hơn so với kết quả quan sát được trong nghiên cứu này, cụ thể với tỉ lệ E/T=10/1, tỉ lệ K562 bị tiêu diệt là 62,2 % (n=5). Điều này cũng cho thấy rằng việc bổ sung kháng nguyên *Streptococcus* nhóm A có vẻ giúp gia tăng hoạt tính của tế bào NK, tuy nhiên việc sử dụng các sản phẩm tế bào NK này trên người cần được nghiên cứu thêm.

Năm 2022, Seung và cs đã tiến hành nuôi cấy tăng sinh tế bào NK dưới sự kích thích của tế bào nuôi K562-OX40L-mbIL-18/21 được chiếu xạ và môi trường nuôi cấy chứa IL-2 và IL-15 có bổ sung huyết thanh tự thân. Ở tỉ lệ E/T=2:1, sau 4 giờ, tỉ lệ K562 tiêu diệt là khoảng 80%, cao hơn so với kết quả trong nghiên cứu này là 54,4% ở tỉ lệ E/T=5/1 sau 3 giờ tương tác. Tuy nhiên, ở phương pháp của Seung, có sử dụng dòng tế bào ngoại lai là K562 đã được cải biến gen và được chiếu xạ làm yếu tố kích thích hoạt hóa và tăng sinh tế bào NK, việc này có thể là yếu tố không an toàn khi sử dụng cho trị liệu lâm sàng [167].

Tuy nhiên, kết quả trong nghiên cứu này cao hơn so với kết quả của Luevano và cộng sự năm 2012 khi tiến hành trên tế bào NK máu dây rốn chỉ được hoạt hóa bởi IL-2 ở nồng độ 1.000 IU/ml trong 7 ngày, kết quả cho thấy tỉ lệ tế bào K562 bị tiêu diệt là khoảng 20% ở E/T=1:1 và khoảng 45% ở E/T=10/1 [6].

Như vậy, có thể thấy, với phương pháp nuôi cấy trong nghiên cứu này, không sử dụng dòng tế bào nuôi ngoại lai, tế bào NK máu dây rốn sau hoạt hóa và tăng sinh có khả năng tiêu diệt tế bào ung thư dòng K562 tương đồng, thậm chí vượt trội so với

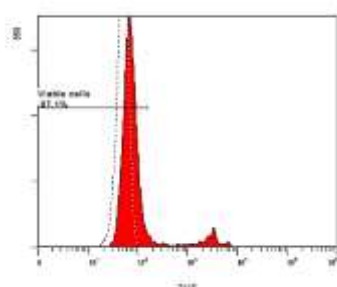
kết quả của một số nghiên cứu khác và khả năng tiêu diệt tế bào K562 của NK sau nuôi cấy cao hơn so với dòng tế bào thương mại KHYG-1.

3.7. Đánh giá tỉ lệ sống tế bào NK sau rã đông

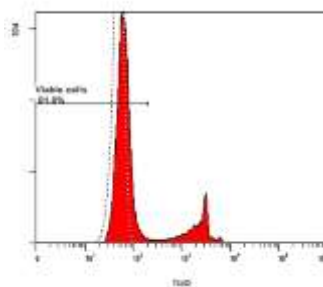
Do việc sử dụng liệu pháp tế bào miễn dịch thông thường có thể kéo dài nhiều chu kỳ. Trong khi ở một số trường hợp, người bệnh cần phải tiến hành trong thời gian ngắn hoặc việc ghép diễn ra tại nơi cách xa trung tâm sản xuất tế bào mà qua trình vận chuyển có thể kéo dài nhiều ngày. Do vậy, một phương pháp bảo quản lạnh tế bào NK sau hoạt hóa sao cho vẫn đáp ứng được các tiêu chí điều trị là thực sự cần thiết. Trong nghiên cứu này, phương pháp lưu trữ tế bào NK sau hoạt hóa bước đầu được triển khai thử nghiệm đánh giá. 03 mẫu tế bào NK sau nuôi cấy tối thiểu 14 ngày được lưu trữ với nồng độ 10 triệu tế bào/ml với dung dịch bảo quản Cryostor chứa 10% DMSO, sau đó ống lưu trữ được hạ lạnh 1°C/phút đến -80°C. Sau 30 ngày, tế bào được rã đông và kiểm tra tỉ lệ sống bằng phương pháp nhuộm 7AAD và phân tích trên hệ thống tế bào dòng chảy. Kết quả cho thấy tỉ lệ tế bào sống trung bình là $71,47\% \pm 17,97\%$ (N=3), trong đó mẫu có tỉ lệ tế bào sống cao nhất là 87,1% và mẫu có tỉ lệ sống thấp nhất là 46,3%. Đặc biệt, với mẫu có tỉ lệ sống thấp này, thời điểm tiến hành lưu trữ là tại ngày nuôi cấy thứ 14, sớm hơn so với 2 mẫu còn lại là ngày 16 và ngày 21. Chi tiết được thể hiện trong Bảng 3.42 và Hình 3.28.

Bảng 3. 42. Thông tin mẫu lưu trữ và rã đông đánh giá tỉ lệ sống

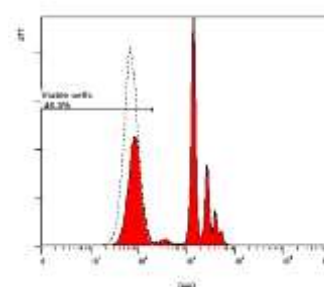
Tên mẫu	Tỉ lệ tế bào sống trước lưu trữ	Tỉ lệ tế bào sống sau lưu trữ
Mẫu 01	>90%	87,1%
Mẫu 02	>90%	46,3%
Mẫu 03	>90%	81,0%
Trung bình	>90%	71,5% $\pm$ 22%



Mẫu 01



Mẫu 02



Mẫu 03

Hình 3. 28. Tỷ lệ tế bào sống của tế bào NK nuôi cấy rồi đông sau lưu trữ

Trong số 03 mẫu khảo sát tỷ lệ tế bào sống sau lưu trữ với cùng điều kiện lưu trữ (nhiệt độ, mật độ tế bào, dung dịch bảo quản), có 1 mẫu có tỷ lệ sống thấp nhất là 46,3% (<50%) tế và 02 mẫu có tỷ lệ sống >70%. Nguyên nhân gây ra sự chênh lệch lớn về tỷ lệ sống của tế bào hiện chưa rõ. Đây có thể là một trong các vấn đề cần được làm rõ hơn trong các nghiên cứu sau này, cũng như việc xác định mật độ tế bào, thời điểm lưu trữ tế bào tối ưu hoặc thành phần dung dịch bảo quản tối ưu là hết sức cần thiết.

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

3.8.1. Một số tiêu chuẩn dành cho khối tế bào NK nuôi cấy sử dụng cho lâm sàng

Theo thống kê trên trang *Clinicaltrial.gov*, hầu hết các thử nghiệm lâm sàng với liệu pháp tế bào NK tập trung chủ yếu vào các giai đoạn đánh giá tính an toàn và tính khả thi của phương pháp, tương ứng với pha I/II. Đến nay, chưa có một sản phẩm liệu pháp tế bào NK nào được FDA cấp phép sử dụng trên lâm sàng. Tuy nhiên cũng đã có 1 số sản phẩm tế bào NK được FDA chấp thuận cho tiến hành thử nghiệm lâm sàng như NK010, sản phẩm NK nguồn gốc máu ngoại vi không biến đổi gen của NK CellTech được chấp thuận thử nghiệm trên ung thư buồng trứng; NK510, sản phẩm NK được biến đổi gen của Base Therapeutics được chấp thuận cho nghiên cứu điều trị u dạng rắn tiến triển; hay NKGen Biotech cũng có một số liệu pháp tế bào NK được chấp thuận tiến hành thử nghiệm lâm sàng như SNK01 cho bệnh Parkinson và SNK02-202 cho các khối u rắn; và IG NK001 của Gengleucel cho thử nghiệm điều trị bệnh bạch cầu tủy cấp tính (AML).

Hơn nữa, do đặc tính của liệu pháp bao gồm việc tiến hành nuôi cấy tăng sinh ngoài cơ thể trong thời gian dài, do vậy vấn đề an toàn khi sử dụng liệu pháp được đặt lên hàng đầu. Ngoài ra, khi xem xét lựa chọn một phương pháp phù hợp, các nhà trị liệu sẽ cần đánh giá trên nhiều yếu tố như:

- Khả năng tăng sinh ổn định với số lượng đáp ứng với nhu cầu của lâm sàng;
- Đặc điểm của tế bào NK bao gồm khả năng gây độc tính, dấu ấn hoạt hóa, ức chế, khả năng trao đổi chất, tăng sinh
- Tình trạng cải biến gen
- Tính an toàn: Quy trình đáp ứng tiêu chuẩn GMP, giảm tối đa khả năng gây các biến chứng bất lợi, sự đồng nhất, tính khiết của sản phẩm
- Tính đơn giản: Quy trình đơn giản, dễ dàng mở rộng mô hình; hệ thống nuôi cấy khép kín giảm thiểu rủi ro; nguồn mẫu đầu vào dễ thu thập
- Chi phí: hiệu quả và có khả năng duy trì

- Lưu trữ: có thể quản lạnh để hướng tới sản phẩm dùng sẵn, ngay lập tức (off-the-shelf)
- Nhanh chóng: sản phẩm được cung cấp nhanh chóng đến người bệnh
- Tính chấp nhận: Nguyên vật liệu đầu vào đảm bảo y đức; Sự chấp nhận các phương pháp kỹ thuật di truyền sử dụng; Hồ sơ các phản ứng lâm sàng [168].

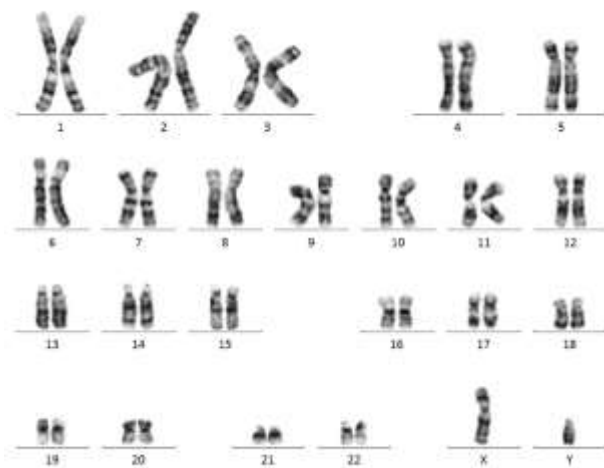
Không chỉ vậy, theo quy định của cơ quan quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ - FDA, các yêu cầu đối với việc xác định đặc tính của sản phẩm sinh học ngay từ giai đoạn thử nghiệm ban đầu, bao gồm các thử nghiệm thích hợp về Định danh - Identity, Độ tinh khiết - Purity, Độ an toàn - Safety và Tiềm năng - Potency. Trong đó, với tiêu chí Định danh – Identity (21 CFR 610.14), các sản phẩm phải được xác định được các thành phần bản chất trong nó. Theo tiêu chí này, các khối tế bào phải được xác định tỉ lệ các quần thể tế bào bằng các dấu ấn nhận dạng chuyên biệt, cụ thể là tỉ lệ tế bào NK và các tế bào miễn dịch khác có trong khối sản phẩm. Với tiêu chí đánh giá tính vô khuẩn (Sterility, 21 CFR 610.12), cần đánh giá sự có mặt của các vi sinh vật gây hại trong khối sản phẩm phẩm sử dụng, bao gồm các xét nghiệm kiểm tra vi khuẩn, vi nấm và mycoplasma. Ngoài ra, cần phải đánh giá khả năng mang các tác nhân gây bệnh khác như vi rút HIV, viêm gan B, viêm gan C, CMV, ... ở mức độ chính xác cao ngay từ giai đoạn sàng lọc người hiến. Ở tiêu chí đánh giá độ tinh khiết – Purity (21 CFR 610.13), sản phẩm phải được đánh giá nội độc tố (pyrogenicity/endotoxin). Trong đó, hàm lượng nội độc tố chấp nhận là dưới 5 EU/kg cân nặng/giờ truyền đối với thuốc tiêm, truyền tĩnh mạch hoặc dưới 0.2 EU/Kg/liều đối với sản phẩm qua đường tủy sống. Đồng thời, trong tiêu chí này cũng yêu cầu xác định các thành phần tạp chất, hay các mảnh vỡ tế bào, trong đó tỉ lệ tế bào sống tối thiểu là 70% đối với các sản phẩm truyền qua đường tĩnh mạch. Để đánh giá tính an toàn (Safety), các thành phần các chất trong khối sản phẩm cuối cùng đem sử dụng cũng cần được xác định. Đặc biệt, trong nghiên cứu này có thực hiện tiêu chí đánh giá sự ổn định bộ nhiễm sắc thể của tế bào sau nuôi cấy. Việc này ngoài đánh giá tính ổn định của phương pháp, còn giúp phát hiện phần nào sự tồn tại của các dòng tế bào bất thường trong khối tế bào cuối cùng. Với tiêu chí đánh giá tiềm năng (Potency), các sản phẩm phải được đánh giá bằng các phương pháp phù hợp, có thể được đo bằng các xét nghiệm in vitro hoặc in vivo hoặc cả hai để xác định hoạt tính của khối tế bào. Trong trường hợp này, tiêu chí đánh giá khối tế bào NK là thử nghiệm đánh giá khả năng tiêu diệt tế bào ung thư. Ngoài ra, FDA còn yêu cầu thực hiện một số các xét nghiệm như xác định số lượng tế bào, liều lượng tế bào trong sản phẩm cuối cùng, đánh giá tính ổn định của sản phẩm [169].

Bàn luận về khía cạnh số lượng tế bào cho lâm sàng, trên thực tế, các thử nghiệm đang trong giai đoạn tối ưu liệu truyền, tuy nhiên liệu tế bào sử dụng cho mỗi lần truyền sẽ khác nhau tương ứng với mỗi loại tế bào, cũng như mỗi loại bệnh, giai đoạn bệnh khác nhau. Một số thử nghiệm lâm sàng sử dụng phương pháp ghép đồng loài tế bào NK máu dây rốn trong điều trị ung thư dạng rắn đã sử dụng liệu truyền 5×10^7 tế bào/kg và 1×10^8 tế bào/kg và chủ yếu gặp các tác dụng phụ là độ 1 và 2 (mệt mỏi, chóng mặt, buồn nôn và nôn), các tác dụng phụ cấp độ 3 và 4 được quan sát thường xuyên nhất là giảm bạch cầu và hoặc giảm tiểu cầu. Không quan sát thấy hội chứng giải phóng cytokine hoặc nhiễm độc thần kinh [170].

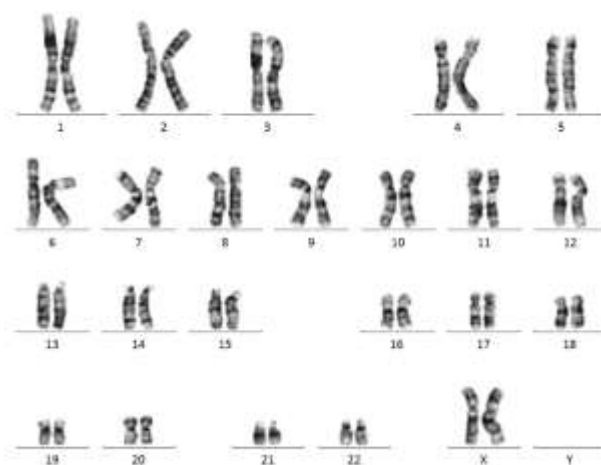
Với phương pháp hiện tại, từ số lượng tế bào đơn nhân ban đầu trung bình là $45,02 \times 10^6$ tế bào, sau 21 ngày nuôi cấy, khối tế bào NK thu được có tổng số tế bào trung bình là $2,1 \times 10^9$, trong đó số tế bào NK chiếm $1,76 \times 10^9$ tế bào. Điều này có nghĩa là, với 1 đơn vị máu cuống rốn thu thập có số lượng MNC trung bình trong nghiên cứu này là $4,34 \times 10^8$ tế bào, nếu tăng sinh toàn bộ với phương pháp hiện tại có thể cung cấp số lượng tế bào NK trung bình là $1,7 \times 10^{12}$ tế bào, tương đương với việc có thể cung cấp cho khoảng 7 lần truyền với liều 5×10^7 tế bào/kg ở bệnh nhân 50kg.

3.8.2. Đánh giá nhiễm sắc thể đồ tế bào NK sau nuôi cấy

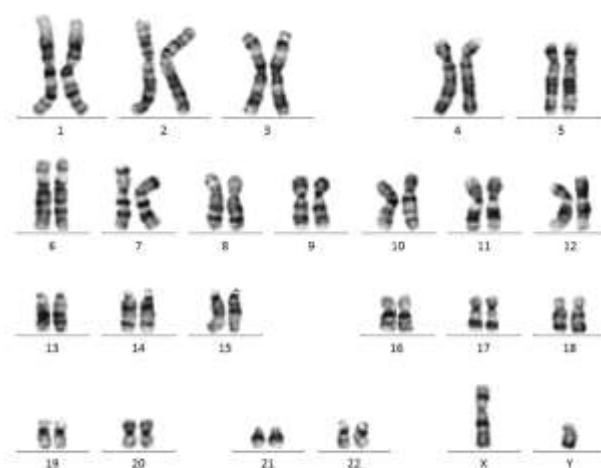
Để đánh giá tính ổn định bộ nhiễm sắc thể của tế bào NK sau nuôi cấy, bộ nhiễm sắc thể đồ của 03 mẫu tế bào NK nuôi cấy ngày thứ 21 được phân tích. Kết quả cho thấy không phát hiện thay đổi bất thường lớn trong bộ nhiễm sắc thể của tế bào NK sau nuôi cấy, chi tiết được thể hiện trong Hình 3.29; 3.30 và 3.31. Đây là một trong các tiêu chí quan trọng để đánh giá mức độ an toàn của khối tế bào sử dụng cho mục đích trị liệu, và nó thể hiện tính ổn định của tế bào NK máu dây rốn trong quá trình nuôi cấy, cũng như tính an toàn của phương pháp.



Hình 3. 29. 46, XY không phát hiện bất thường của tế bào NK sau nuôi cấy (Mẫu 01)



Hình 3. 30. 46, XX không phát hiện bất thường của tế bào NK sau nuôi cấy (Mẫu 02)



Hình 3. 31. 46, XX không phát hiện bất thường của tế bào NK sau nuôi cấy (Mẫu 03)

3.8.2. Hàm lượng nội độc tố (endotoxin)

Endotoxin là một loại độc tố tồn tại trong thành tế bào của vi khuẩn Gram âm, và có thể gây ra các phản ứng dị ứng nghiêm trọng nếu được truyền vào cơ thể. Do đó, các sản phẩm trị liệu tế bào phải được kiểm tra độ tinh khiết của chúng và đảm bảo không chứa bất kỳ hàm lượng nội độc tố endotoxin nào hoặc dưới ngưỡng cho phép, trước khi được sử dụng cho người.

Phương pháp LAL và bộ kit Endosafe®, PTS, hãng Charlie River từ lâu đã được biết đến với các đặc điểm như độ nhạy, độ chính xác cao, thời gian cho kết quả nhanh. Do đó nó được sử dụng để đánh giá hàm lượng endotoxin trong 03 mẫu NK sau nuôi cấy 21 ngày, kết quả như sau:

- Mẫu 01: nồng độ endotoxin <0,1 EU/ml

- Mẫu 02: nồng độ endotoxin <0,1 EU/ml
- Mẫu 03: nồng độ endotoxin <0,1 EU/ml

Cả 3 mẫu đều có hàm lượng endotoxin <0,1 EU/ml, đáp ứng được tiêu chí giới hạn <5 EU/kg cân nặng người bệnh của FDA đối với sản phẩm tế bào trị liệu truyền qua đường tĩnh mạch.

3.8.3. Mycoplasma

Mycoplasma là một loại vi khuẩn nhỏ không có thành tế bào, thường xuyên xuất hiện trong môi trường nuôi cấy tế bào, đặc biệt là trong các phòng thí nghiệm và cơ sở sản xuất tế bào. Nếu các sản phẩm tế bào sau khi nuôi cấy tăng sinh bị nhiễm mycoplasma, điều này có thể gây ra ảnh hưởng tiêu cực đến kết quả thí nghiệm và sử dụng sản phẩm trong nghiên cứu hoặc điều trị. Mycoplasma có thể gây ra nhiều vấn đề như:

- Gây giảm độ sống và tỷ lệ sinh sản của tế bào
- Gây biến đổi gene và thay đổi tính chất sinh lý của tế bào
- Gây sự thay đổi trong khả năng phản ứng của tế bào với các loại dược phẩm và thuốc điều trị
- Gây ra nhiễm trùng cho người sử dụng sản phẩm tế bào

Do đó, xét nghiệm mycoplasma đóng vai trò rất quan trọng để đảm bảo sản phẩm tế bào sau khi nuôi cấy tăng sinh không bị nhiễm mycoplasma, và đáp ứng được yêu cầu chất lượng trong các nghiên cứu hoặc ứng dụng điều trị.

Dịch nuôi cấy tế bào NK ở ngày thứ 21 của 03 mẫu được lấy để kiểm tra mycoplasma bằng phương pháp định tính, sử dụng bộ kit MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit, hãng Lonza. Kết quả như sau:

- Mẫu 01: Âm tính
- Mẫu 02: Âm tính
- Mẫu 03: Âm tính

Các mẫu NK không bị nhiễm mycoplasma, kết quả này đáp ứng được tiêu chí không mang nguồn bệnh Mycoplasma trong khối tế bào sau nuôi cấy.

3.8.4. Kiểm tra vi khuẩn

Xét nghiệm vi khuẩn là một phần quan trọng trong kiểm tra chất lượng và an toàn của sản phẩm trị liệu tế bào. Vi khuẩn có thể gây nhiễm trùng và gây hại cho sức khỏe con người, vì vậy, việc kiểm tra vi khuẩn là cần thiết để đảm bảo rằng sản phẩm trị liệu tế bào là an toàn và hiệu quả. Tiến hành kiểm tra vi khuẩn bằng phương pháp nuôi cấy đối với môi trường nuôi cấy và tế bào NK ở ngày thứ 21 của 03 mẫu, kết quả cho thấy cả 3 mẫu đều âm tính với vi khuẩn.

- Mẫu 01: Âm tính
- Mẫu 02: Âm tính

- Mẫu 03: Âm tính

Như vậy, với các phương pháp hiện tại trong nghiên cứu này, nguồn tế bào đầu vào là máu cuống rốn dễ thu thập, an toàn và không vi phạm y đức, dòng tế bào NK sau hoạt hóa tăng sinh có tỉ lệ tế bào NK tương đối ổn định, bước đầu có thể đáp ứng về số lượng cũng như liều dùng cho lâm sàng. Các tế bào NK có khả năng tiêu diệt tế bào ung thư hiệu quả, được sản xuất trong điều kiện phòng sạch và có sử dụng hệ thống túi kín nhằm hạn chế khả năng lây nhiễm từ bên ngoài. Ngoài ra, các tế bào này thuộc loại không cải biến gen, có bộ nhiễm sắc thể ổn định sau thời gian nuôi cấy dài ngày. Sản phẩm tế bào sau nuôi cấy đáp ứng các tiêu chí vô khuẩn, không mang vi khuẩn, mycoplasma, hàm lượng nội độc tố endotoxin thấp <0,1 EU/ml. Các tế bào này có thể bảo quản ở điều kiện âm sâu, tuy nhiên chức năng của tế bào sau lưu trữ cần đánh giá thêm cũng như cần nghiên cứu thêm về phương pháp bảo quản tối ưu cho tế bào. Bảng 3.43 trình bày các tiêu chuẩn chất lượng của khối tế bào NK sau nuôi cấy theo các tiêu chí đánh giá của FDA [169].

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

Tiêu chí chất lượng	Nội dung	Đánh giá
<i>Định danh</i>	- 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
<i>Độ tinh khiết và độ vô khuẩn</i>	- Âm tính với vi khuẩn, vi nấm - Âm tính với mycoplasma - Hàm lượng nội độc tố endotoxin 5 EU/kg cân nặng/giờ truyền - Tỉ 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 tỉ 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.
<i>Độ an toàn</i>	- 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 (CD3+/CD4+) trung bình là $46,71\% \pm 8,99\%$, lympho TCD8 (CD3+/CD8+) trung bình là $22,58\% \pm 6,73\%$ và tế bào lympho T CD3+/CD4+/CD8+ trung bình là $0,63\% \pm 0,41\%$, thì quần thể tế bào NK (CD3-/CD56+) 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 hơn 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

Hiện nay, việc sử dụng liệu pháp tế bào miễn dịch trong ung thư đã nhận được sự quan tâm của các nhà khoa học cũng như các bác sỹ lâm sàng trên toàn thế giới. Tại Việt Nam, một số bệnh viện đã được bộ y tế cấp phép cho việc sử dụng liệu pháp tế bào miễn dịch trong việc hỗ trợ điều trị ung thư, và có nhiều nghiên cứu, thử nghiệm lâm sàng sử dụng liệu pháp tế bào miễn dịch đã được tiến hành, tuy nhiên các nghiên cứu, ứng dụng chủ yếu tập trung vào các loại tế bào như NK, CTL, DC, CAR-T có nguồn gốc từ máu ngoại vi người trưởng thành. Nghiên cứu này là một trong các nghiên cứu tế bào NK đầu tiên tại Việt Nam triển khai trên đối tượng là máu dây rốn, hướng tới việc sử dụng trong ghép đồng loài hỗ trợ điều trị ung thư trên lâm sàng. 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 CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **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, 2021, Immune Cells Expansion from Peripheral Blood of Some Vietnamese Cancer Patients, *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 37(3), page 1-11.
2. **Chu Thi Thao**, Do Thi Hoai Thu, Bui Viet Anh, Truong Linh Huyen, Nguyen Van Phong, Nguyen Thanh Liem and Hoang Thi My Nhung, 2018, Efficient Expansion of Human Umbilical Cord Blood- Derived NK Cells Ex Vivo without Requiring Feeder Layers, *Biomedical Journal of Scientific and Technical Research*, 8.
3. **Chu Thị Thao**, Nguyen Thanh Liem, Bui Viet Anh, Tran Van Hiep, Ly Thi Bich Thuy, Hoang Thi My Nhung, Nguyen Trung Nam, 2024, (2024). Characterization of cord blood immune and stem cells from Vietnamese infants. *Vietnam Journal of Biotechnology*, 22(1), 35–44.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Imai, K., et al., *Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population*. Lancet, 2000. **356**(9244): p. 1795-9.
2. Li, R., et al., *Preservation of cell-based immunotherapies for clinical trials*. Cytotherapy, 2019. **21**(9): p. 943-957.
3. Levy, E.M., M.P. Roberti, and J. Mordoh, *Natural killer cells in human cancer: from biological functions to clinical applications*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 676198.
4. Hazeldine, J. and J.M. Lord, *The impact of ageing on natural killer cell function and potential consequences for health in older adults*. Ageing Res Rev, 2013. **12**(4): p. 1069-78.
5. Munoz, J., et al., *Concise review: umbilical cord blood transplantation: past, present, and future*. Stem Cells Transl Med, 2014. **3**(12): p. 1435-43.
6. Luevano, M., et al., *The unique profile of cord blood natural killer cells balances incomplete maturation and effective killing function upon activation*. Hum Immunol, 2012. **73**(3): p. 248-57.
7. Abbott, M. and Y. Ustoyev, *Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy*. Semin Oncol Nurs, 2019. **35**(5): p. 150923.
8. Dobosz, P. and T. Dzieciatkowski, *The Intriguing History of Cancer Immunotherapy*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2965.
9. Starnes, C.O., *Coley's toxins*. Nature, 1992. **360**(6399): p. 23.
10. Couzin-Frankel, J., *Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy*. Science, 2013. **342**(6165): p. 1432-3.
11. McNutt, M., *Cancer immunotherapy*. Science, 2013. **342**(6165): p. 1417.
12. Kirkwood, J.M., et al., *Immunotherapy of cancer in 2012*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(5): p. 309-35.
13. Mellman, I., G. Coukos, and G. Dranoff, *Cancer immunotherapy comes of age*. Nature, 2011. **480**(7378): p. 480-9.
14. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. **140**(6): p. 883-99.
15. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
16. Welty, N.E. and S.I. Gill, *Cancer Immunotherapy Beyond Checkpoint Blockade: JACC: CardioOncology State-of-the-Art Review*. JACC CardioOncol, 2022. **4**(5): p. 563-578.
17. Poorebrahim, M., et al., *Genetically modified immune cells targeting tumor antigens*. Pharmacol Ther, 2020. **214**: p. 107603.
18. Triaca, V., et al., *Cancer stem cells-driven tumor growth and immune escape: the Janus face of neurotrophins*. Aging (Albany NY), 2019. **11**(23): p. 11770-11792.
19. Tsuchiya, H. and G. Shiota, *Immune evasion by cancer stem cells*. Regen Ther, 2021. **17**: p. 20-33.

20. Xu, Q., et al., *Antigen-specific T-cell response from dendritic cell vaccination using cancer stem-like cell-associated antigens*. Stem Cells, 2009. **27**(8): p. 1734-40.
21. Zhou, L., et al., *Promise of cancer stem cell vaccine*. Hum Vaccin Immunother, 2015. **11**(12): p. 2796-9.
22. Hu, Y., et al., *Therapeutic Efficacy of Cancer Stem Cell Vaccines in the Adjuvant Setting*. Cancer Res, 2016. **76**(16): p. 4661-72.
23. Zheng, F., et al., *Cancer Stem Cell Vaccination With PD-L1 and CTLA-4 Blockades Enhances the Eradication of Melanoma Stem Cells in a Mouse Tumor Model*. J Immunother, 2018. **41**(8): p. 361-368.
24. Sumransub, N., et al., *Breast cancer stem cell RNA-pulsed dendritic cells enhance tumor cell killing by effector T cells*. Oncol Lett, 2020. **19**(3): p. 2422-2430.
25. Parney, I.F., et al., *Phase I trial of adjuvant mature autologous dendritic cell/allogeneic tumor lysate vaccines in combination with temozolomide in newly diagnosed glioblastoma*. Neurooncol Adv, 2022. **4**(1): p. vdac089.
26. Izadpanah, A., et al., *Update on immune-based therapy strategies targeting cancer stem cells*. Cancer Med, 2023. **12**(18): p. 18960-18980.
27. Dai, H., et al., *Efficacy and biomarker analysis of CD133-directed CAR T cells in advanced hepatocellular carcinoma: a single-arm, open-label, phase II trial*. Oncoimmunology, 2020. **9**(1): p. 1846926.
28. Zhu, X., et al., *Patient-derived glioblastoma stem cells are killed by CD133-specific CAR T cells but induce the T cell aging marker CD57*. Oncotarget, 2015. **6**(1): p. 171-84.
29. Hu, B., et al., *Nucleofection with Plasmid DNA for CRISPR/Cas9-Mediated Inactivation of Programmed Cell Death Protein 1 in CD133-Specific CAR T Cells*. Hum Gene Ther, 2019. **30**(4): p. 446-458.
30. Han, Y., et al., *Simultaneously target of normal and stem cells-like gastric cancer cells via cisplatin and anti-CD133 CAR-T combination therapy*. Cancer Immunol Immunother, 2021. **70**(10): p. 2795-2803.
31. Wang, Y., et al., *CD133-directed CAR T cells for advanced metastasis malignancies: A phase I trial*. Oncoimmunology, 2018. **7**(7): p. e1440169.
32. Tang, X., et al., *First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia*. Am J Cancer Res, 2018. **8**(6): p. 1083-1089.
33. Klapdor, R., et al., *Characterization of a Novel Third-Generation Anti-CD24-CAR against Ovarian Cancer*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(3).
34. Zhang, Q., et al., *Combination Therapy with EpCAM-CAR-NK-92 Cells and Regorafenib against Human Colorectal Cancer Models*. J Immunol Res, 2018. **2018**: p. 4263520.
35. Moyes, K.W., et al., *Genetically Engineered Macrophages: A Potential Platform for Cancer Immunotherapy*. Hum Gene Ther, 2017. **28**(2): p. 200-215.
36. Chen, Y., et al., *CAR-macrophage: A new immunotherapy candidate against solid tumors*. Biomed Pharmacother, 2021. **139**: p. 111605.
37. Klichinsky, M., et al., *Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy*. Nat Biotechnol, 2020. **38**(8): p. 947-953.

38. Yin, T., et al., *Human cancer cells with stem cell-like phenotype exhibit enhanced sensitivity to the cytotoxicity of IL-2 and IL-15 activated natural killer cells*. Cell Immunol, 2016. **300**: p. 41-5.
39. Oh, S., et al., *Natural Killer Cell Therapy: A New Treatment Paradigm for Solid Tumors*. Cancers (Basel), 2019. **11**(10).
40. Hu, W., et al., *Cancer Immunotherapy Based on Natural Killer Cells: Current Progress and New Opportunities*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1205.
41. Tallerico, R., et al., *Human NK cells selective targeting of colon cancer-initiating cells: a role for natural cytotoxicity receptors and MHC class I molecules*. J Immunol, 2013. **190**(5): p. 2381-90.
42. Lamb, M.G., et al., *Natural killer cell therapy for hematologic malignancies: successes, challenges, and the future*. Stem Cell Res Ther, 2021. **12**(1): p. 211.
43. Koehl, U., et al., *Advances in clinical NK cell studies: Donor selection, manufacturing and quality control*. Oncoimmunology, 2016. **5**(4): p. e1115178.
44. Geller, M.A. and J.S. Miller, *Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy*. Immunotherapy, 2011. **3**(12): p. 1445-59.
45. Ruggeri, L., et al., *Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value*. Blood, 2007. **110**(1): p. 433-40.
46. Avigan, D.E., et al., *Phase I/II study of vaccination with electrofused allogeneic dendritic cells/autologous tumor-derived cells in patients with stage IV renal cell carcinoma*. J Immunother, 2007. **30**(7): p. 749-61.
47. Lim, O., et al., *Present and Future of Allogeneic Natural Killer Cell Therapy*. Frontiers in Immunology, 2015. **6**.
48. Mu, Y., et al., *Case Report: Cord blood-derived natural killer cells as new potential immunotherapy drug for solid tumor: a case study for endometrial cancer*. Frontiers in Immunology, 2023. **14**.
49. Zhao, X., et al., *Cord-Blood Natural Killer Cell-Based Immunotherapy for Cancer*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 584099.
50. Zhao, Y., et al., *Tumor Infiltrating Lymphocyte (TIL) Therapy for Solid Tumor Treatment: Progressions and Challenges*. Cancers (Basel), 2022. **14**(17).
51. Hong, H., et al., *Clinical trial landscape for TIL therapy: emerging insights and future directions in oncology*. Journal of Translational Medicine, 2024. **22**(1): p. 1008.
52. Son, H.A., et al., *Combination of Vaccine-Strain Measles and Mumps Viruses Enhances Oncolytic Activity against Human Solid Malignancies*. Cancer Invest, 2018. **36**(2): p. 106-117.
53. Zhang, L.F., et al., *Combination of vaccine-strain measles and mumps virus synergistically kills a wide range of human hematological cancer cells: Special focus on acute myeloid leukemia*. Cancer Lett, 2014. **354**(2): p. 272-80.
54. Toan, N.L., et al., *Combination of Vaccine Strain Measles Virus and Nimotuzumab in the Treatment of Laryngeal Cancer*. Anticancer Res, 2019. **39**(7): p. 3727-3737.
55. Phuc, P.V., et al. *Effects of Breast Cancer Stem Cell Extract Primed Dendritic Cell Transplantation on Breast Cancer Tumor Murine Models*. 2011.

56. Phuc, P.V., et al., *Production of functional dendritic cells from menstrual blood--a new dendritic cell source for immune therapy*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2011. **47**(5-6): p. 368-75.
57. Pham, P.V., et al., *Targeting breast cancer stem cells by dendritic cell vaccination in humanized mice with breast tumor: preliminary results*. Onco Targets Ther, 2016. **9**: p. 4441-51.
58. Nguyen, S.T., et al., *Targeting specificity of dendritic cells on breast cancer stem cells: in vitro and in vivo evaluations*. Onco Targets Ther, 2015. **8**: p. 323-34.
59. Pham, V.Q., et al., *Breast cancer tumor growth is efficiently inhibited by dendritic cell transfusion in a murine model*. Biomedical Research and Therapy, 2014. **1**(3): p. 14.
60. Anh, B.V., et al., *V γ 9 γ δ T Cell Induction by Human Umbilical Cord Blood Monocytes-Derived, Interferon- α -Stimulated Dendritic Cells*. Cancer Control, 2020. **27**(1): p. 1073274820974025.
61. Than, U.T.T., et al., *Induction of Antitumor Immunity by Exosomes Isolated from Cryopreserved Cord Blood Monocyte-Derived Dendritic Cells*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(5).
62. Van Pham, P., et al., *Production of dendritic cells and cytokine-induced killer cells from banked umbilical cord blood samples*. Biomedical Research and Therapy, 2015. **2**(11): p. 28.
63. Vu, B.T., et al., *Culture and differentiation of cytokine-induced killer cells from umbilical cord blood-derived mononuclear cells*. Biomedical Research and Therapy, 2016. **3**(1): p. 2.
64. Vu, B.T., Tran, N. T.-A., Nguyen, T. T., Duong, Q. T.-N., Le, P. M., Le, H. T., & Pham, P., *The priming role of dendritic cells on the cancer cytotoxic effects of cytokine-induced killer cells*. Science and Technology Development Journal, 2019. **22**(2): p. 17.
65. Nhung, H.T.M., et al., *Ex vivo expansion of human peripheral blood natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes from lung cancer patients*. Oncol Lett, 2018. **15**(4): p. 5730-5738.
66. Liem, N.T., et al., *Phase I Clinical Trial Using Autologous Ex Vivo Expanded NK Cells and Cytotoxic T Lymphocytes for Cancer Treatment in Vietnam*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(13).
67. Nguyen, H.P., et al., *Evaluating the Safety and Quality of Life of Colorectal Cancer Patients Treated by Autologous Immune Enhancement Therapy (AIET) in Vinmec International Hospitals*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(19).
68. Quy Linh Nguyen, T.D.T., Van Toan Le, Van Khanh Tran, Thi My Nhung Hoang, Huy Thinh Tran, *Activation culture and proliferation of $\gamma\delta$ T cells from lung cancer patients*. Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences, 2019. **2**(62): p. 5.
69. Mậu, N.T.T., et al., *Hiệu quả kháng ung thư của tế bào gamma delta T trên mô hình chuột thiếu hụt miễn dịch mang khối ung thư phổi người*. Tạp chí Nghiên cứu Y học, 2023. **160**(12V2): p. 198-205.
70. Nguyen, T.T., et al., *Experience of Autologous Immunotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer Using Zoledronate-Activated Gammadelta T Cells*. Clin Lab, 2024. **70**(1).

71. Nguyen, T.M.T., et al., *A case of response to combination treatment with autologous immunotherapy and bevacizumab in advanced non-small cell lung cancer*. *Respir Med Case Rep*, 2023. **42**: p. 101804.
72. Nguyen, H.H., et al., *The safety of CAR-T cells and PD-1 antibody combination on an experimental model*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023. **649**: p. 25-31.
73. Abul, K.A., H.L. Andrew, and P. Shiv, *Cellular and Molecular Immunology*. Eighth ed. 2015, Philadelphia: Elsevier Saunders.
74. Gleimer, M. and P. Parham, *Stress management: MHC class I and class I-like molecules as reporters of cellular stress*. *Immunity*, 2003. **19**(4): p. 469-477.
75. Herberman, R.B., *Natural killer (NK) cells*. *Prog Clin Biol Res*, 1981. **58**: p. 33-43.
76. Rosenberg, S.A., et al., *Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report*. *N Engl J Med*, 1988. **319**(25): p. 1676-80.
77. Crinier, A., et al., *SnapShot: Natural Killer Cells*. *Cell*, 2020. **180**(6): p. 1280-1280 e1.
78. Artis, D. and H. Spits, *The biology of innate lymphoid cells*. *Nature*, 2015. **517**(7534): p. 293-301.
79. Melsen, J.E., et al., *Human Circulating and Tissue-Resident CD56bright Natural Killer Cell Populations*. *Frontiers in Immunology*, 2016. **7**(262).
80. Wu, S.-Y., et al., *Natural killer cells in cancer biology and therapy*. *Molecular Cancer*, 2020. **19**(1): p. 120.
81. Lugthart, G., et al., *Human Lymphoid Tissues Harbor a Distinct CD69+CXCR6+ NK Cell Population*. *J Immunol*, 2016. **197**(1): p. 78-84.
82. Gregoire, C., et al., *The trafficking of natural killer cells*. *Immunol Rev*, 2007. **220**: p. 169-82.
83. Campbell, J.J., et al., *Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire*. *J Immunol*, 2001. **166**(11): p. 6477-82.
84. Sivori, S., et al., *Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications*. *Cellular & Molecular Immunology*, 2019. **16**(5): p. 430-441.
85. Kotylo, P.K., et al., *Rapid analysis of lymphocyte subsets in cord blood*. *Am J Clin Pathol*, 1990. **93**(2): p. 263-6.
86. Nguyen, S., et al., *Involvement of mature donor T cells in the NK cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation*. *Leukemia*, 2008. **22**(2): p. 344-52.
87. Wang, Y., et al., *High expression of NKG2A/CD94 and low expression of granzyme B are associated with reduced cord blood NK cell activity*. *Cell Mol Immunol*, 2007. **4**(5): p. 377-82.
88. Verneris, M.R. and J.S. Miller, *The phenotypic and functional characteristics of umbilical cord blood and peripheral blood natural killer cells*. *British journal of haematology*, 2009. **147**(2): p. 185-191.
89. Verneris, M.R. and J.S. Miller, *The phenotypic and functional characteristics of umbilical cord blood and peripheral blood natural killer cells*. *Br J Haematol*, 2009. **147**(2): p. 185-91.

90. Cheent, K. and S.I. Khakoo, *Natural killer cells: integrating diversity with function*. Immunology, 2009. **126**(4): p. 449-457.
91. Horowitz, A., et al., *Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry*. Science translational medicine, 2013. **5**(208): p. 208ra145-208ra145.
92. Yawata, M., et al., *Variation within the human killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene family*. Critical Reviews™ in Immunology, 2002. **22**(5-6).
93. Bashirova, A.A., et al., *The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense*. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., 2006. **7**: p. 277-300.
94. Raulat, D.H., R.E. Vance, and C.W. McMahon, *Regulation of the natural killer cell receptor repertoire*. Annual review of immunology, 2001. **19**(1): p. 291-330.
95. Alves, H.V., et al., *Immunogenetics of MHC and KIR in the Leprosy*, in *Hansen's Disease-The Forgotten and Neglected Disease*. 2018, IntechOpen.
96. Boudreau, J.E. and K.C. Hsu, *Natural killer cell education and the response to infection and cancer therapy: stay tuned*. Trends in immunology, 2018. **39**(3): p. 222-239.
97. He, Y. and Z. Tian, *NK cell education via nonclassical MHC and non-MHC ligands*. Cellular & molecular immunology, 2017. **14**(4): p. 321-330.
98. Sun, J.C. and L.L. Lanier, *NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8(+) T cells*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(10): p. 645-57.
99. Terunuma, H., et al., *NK cell-based autologous immune enhancement therapy (AIET) for cancer*. J Stem Cells Regen Med, 2013. **9**(1): p. 9-13.
100. Srivastava, S., A. Lundqvist, and R.W. Childs, *Natural killer cell immunotherapy for cancer: a new hope*. Cytotherapy, 2008. **10**(8): p. 775-83.
101. Ljunggren, H.G. and K.J. Malmberg, *Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 329-39.
102. Terunuma, H., et al., *Potential role of NK cells in the induction of immune responses: implications for NK cell-based immunotherapy for cancers and viral infections*. Int Rev Immunol, 2008. **27**(3): p. 93-110.
103. Poggi, A., et al., *NKG2D and natural cytotoxicity receptors are involved in natural killer cell interaction with self-antigen presenting cells and stromal cells*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1109**: p. 47-57.
104. Boyiadzis, M., K.A. Foon, and R.B. Herberman, *NK cells in cancer immunotherapy: three decades of discovery*. Discov Med, 2006. **6**(36): p. 243-8.
105. Mocikat, R., et al., *Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses*. Immunity, 2003. **19**(4): p. 561-9.
106. Ferlazzo, G. and C. Munz, *NK cell compartments and their activation by dendritic cells*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1333-9.
107. Shresta, S., et al., *Natural killer and lymphokine-activated killer cells require granzyme B for the rapid induction of apoptosis in susceptible target cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5679-83.

108. Walzer, T., et al., *Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force"*. Blood, 2005. **106**(7): p. 2252-8.
109. Shimasaki, N., A. Jain, and D. Campana, *NK cells for cancer immunotherapy*. Nat Rev Drug Discov, 2020. **19**(3): p. 200-218.
110. Ahn, Y.O., et al., *Irradiated and activated autologous PBMCs induce expansion of highly cytotoxic human NK cells in vitro*. J Immunother, 2013. **36**(7): p. 373-81.
111. Lim, O., et al., *GMP-compliant, large-scale expanded allogeneic natural killer cells have potent cytolytic activity against cancer cells in vitro and in vivo*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53611.
112. Lim, S.A., et al., *Ex vivo expansion of highly cytotoxic human NK cells by cocultivation with irradiated tumor cells for adoptive immunotherapy*. Cancer Res, 2013. **73**(8): p. 2598-607.
113. Fujisaki, H., et al., *Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy*. Cancer Res, 2009. **69**(9): p. 4010-7.
114. Denman, C.J., et al., *Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30264.
115. Becker, P.S., et al., *Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2016. **65**(4): p. 477-84.
116. Spanholtz, J., et al., *High log-scale expansion of functional human natural killer cells from umbilical cord blood CD34-positive cells for adoptive cancer immunotherapy*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9221.
117. Chouaib, S., et al., *Improving the outcome of leukemia by natural killer cell-based immunotherapeutic strategies*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 95.
118. Dewan, M.Z., et al., *Natural killer activity of peripheral-blood mononuclear cells in breast cancer patients*. Biomed Pharmacother, 2009. **63**(9): p. 703-6.
119. Nguyen, P.H., et al., *Factors affecting human umbilical cord blood quality before cryopreservation: the importance of birth weight and gestational age*. Biopreservation and Biobanking, 2020. **18**(1): p. 18-24.
120. Page, K.M., et al., *Optimizing donor selection for public cord blood banking: influence of maternal, infant, and collection characteristics on cord blood unit quality*. Transfusion, 2014. **54**(2): p. 340-352.
121. Lee, H.R., et al., *Increased numbers of total nucleated and CD34+ cells in blood group O cord blood: an analysis of neonatal innate factors in the Korean population*. Transfusion, 2012. **52**(1): p. 76-81.
122. Harris, D.T., et al., *Stem Cell Recovery Following Implementation of an Automated Cord Blood Processing System in a High Volume Laboratory*. Blood, 2007. **110**(11): p. 4919.
123. Sepulveda, C.A., et al., *Evaluation of an Automated Ficoll Procedure To Enrich for Mononuclear Cells for Use in Clinical Trials*. 2007, American Society of Hematology.
124. Halista, S.M., et al., *Characterization of early activation events in cord blood B cells after stimulation with T cell-independent activators*. Pediatric research, 1998. **43**(4): p. 496-503.
125. Moroishi, Y., et al., *Umbilical cord blood immune cell profiles in relation to the infant gut microbiome*. Iscience, 2023. **26**(1): p. 105833.

126. Scheffer-Mendoza, S., et al., *Reference values of leukocyte and lymphocytes populations in umbilical cord and capillary blood in healthy Mexican newborns*. Allergologia et Immunopathologia, 2020. **48**(3): p. 295-305.
127. Nagel, A., et al., *CD3-positive B cells: a storage-dependent phenomenon*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e110138.
128. Schultz, L., et al., *Identification of dual positive CD19⁺/CD3⁺ T cells in a leukapheresis product undergoing CAR transduction: a case report*. Journal for Immunotherapy of Cancer, 2020. **8**(2).
129. Li, Q., et al., *Discovery of CD3⁺ CD19⁺ cells, a novel lymphocyte subset with a potential role in human immunodeficiency virus-Mycobacterium tuberculosis coinfection, using mass cytometry*. Clinical and Translational Medicine, 2021. **11**(12).
130. Eisner, A., et al., *Cord blood immune profile: Associations with higher prenatal plastic chemical levels*. Environmental Pollution, 2022. **315**: p. 120332.
131. Beck, R. and P. Lam-Po-Tang, *Comparison of cord blood and adult blood lymphocyte normal ranges: a possible explanation for decreased severity of graft versus host disease after cord blood transplantation*. Immunology and cell biology, 1994. **72**(5): p. 440-444.
132. D'Arena, G., et al., *Flow cytometric characterization of human umbilical cord blood lymphocytes: immunophenotypic features*. Haematologica, 1998. **83**(3): p. 197-203.
133. Rabian-Herzog, C., S. Lesage, and E. Gluckman, *Characterization of lymphocyte subpopulations in cord blood*. Bone marrow transplantation, 1992. **9**: p. 64-67.
134. Lurà, M.P., et al., *Response of cord blood cells to environmental, hereditary and perinatal factors: A prospective birth cohort study*. PLoS One, 2018. **13**(7): p. e0200236.
135. Si Ngurah Oka Putrawan , I.M.J., I Wayan Putu Sutirta Yasa , Anak Agung Ngurah Subawa , Ida Bagus Putra Manuaba *Excessive physical exercise caused a decrease in CD4⁺ and Hematopoietic Stem Cell (HSC) levels in Wistar rats*. Bali Medical Journal, 2022. **11**(3): p. 5.
136. Dolores, M., et al., *Human CD4⁺CD25⁺ Cells in Combination with CD34⁺ Cells and Thymoglobulin to Prevent Anti-hematopoietic Stem Cell T Cell Alloreactivity*. Biology of Blood and Marrow Transplantation, 2011. **17**(1): p. 61-68.
137. Mueller, A.M., et al., *Conventional CD4⁺CD25⁻ and Regulatory CD4⁺CD25⁺ T Cells Have Opposite Effects on Progenitor Cells and Hematopoietic Reconstitution Following Stem Cell Transplantation*. Blood, 2014. **124**(21): p. 654-654.
138. Terunuma, H., et al., *NK cell-based autologous immune enhancement therapy (AIET) for cancer*. Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine, 2013. **9**: p. 9 - 13.
139. Deng, X., et al., *Ex vivo-expanded natural killer cells kill cancer cells more effectively than ex vivo-expanded $\gamma\delta$ T cells or $\alpha\beta$ T cells*. Int Immunopharmacol, 2014. **22**(2): p. 486-91.

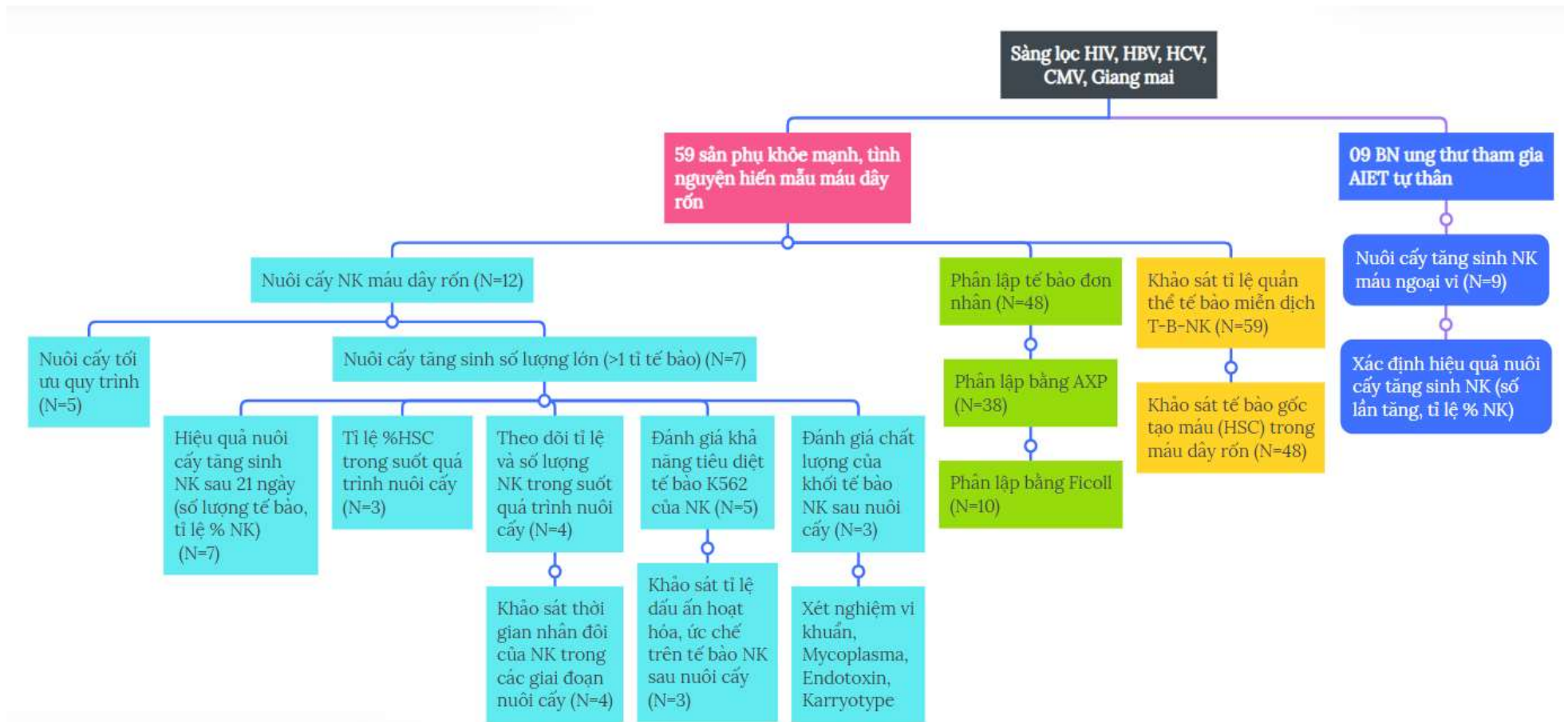
140. Terunuma, H., *Autologous Immune Enhancement Therapy for Cancer - Our experience since 2004*. J Stem Cells Regen Med, 2012. **8**(3): p. 205-6.
141. Coënon, L. and M. Villalba, *From Cd16a biology to antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity improvement*. Frontiers in Immunology, 2022. **13**.
142. Wirthmueller, U., et al., *Signal transduction by Fc gamma RIII (CD16) is mediated through the gamma chain*. The Journal of experimental medicine, 1992. **175**(5): p. 1381-1390.
143. Chan, A., et al., *CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts*. The Journal of Immunology, 2007. **179**(1): p. 89-94.
144. Romagnani, C., et al., *CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation*. The Journal of Immunology, 2007. **178**(8): p. 4947-4955.
145. Wang, K.S., J. Ritz, and D.A. Frank, *IL-2 induces STAT4 activation in primary NK cells and NK cell lines, but not in T cells*. The Journal of Immunology, 1999. **162**(1): p. 299-304.
146. Ryoma, Y., et al., *Biological effect of OK-432 (picibanil) and possible application to dendritic cell therapy*. Anticancer research, 2004. **24**(5C): p. 3295-3302.
147. Norman, D.J., *Mechanisms of action and overview of OKT3*. Therapeutic drug monitoring, 1995. **17**(6): p. 615-620.
148. Pinho, M.J., et al., *Ex vivo differentiation of natural killer cells from human umbilical cord blood CD34+ progenitor cells*. Cell Communication & Adhesion, 2011. **18**(3): p. 45-55.
149. Kao, I.T., et al., *Generation of natural killer cells from serum-free, expanded human umbilical cord blood CD34+ cells*. Stem Cells Dev, 2007. **16**(6): p. 1043-51.
150. Spanholtz, J., et al., *Clinical-grade generation of active NK cells from cord blood hematopoietic progenitor cells for immunotherapy using a closed-system culture process*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20740.
151. Subramani, B., et al., *Efficacy of ex vivo activated and expanded natural killer cells and T lymphocytes for colorectal cancer patients*. Biomed Rep, 2014. **2**(4): p. 505-508.
152. Shah, N., et al., *Antigen presenting cell-mediated expansion of human umbilical cord blood yields log-scale expansion of natural killer cells with anti-myeloma activity*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76781.
153. Mu, Y.X., et al., *A simple method for in vitro preparation of natural killer cells from cord blood*. BMC Biotechnol, 2019. **19**(1): p. 80.
154. Poli, A., et al., *CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset*. Immunology, 2009. **126**(4): p. 458-65.
155. Jacobs, R., et al., *CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(10): p. 3121-7.
156. Chan, A., et al., *CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 89-94.
157. Liu, Y., et al., *Growth and activation of natural killer cells ex vivo from children with neuroblastoma for adoptive cell therapy*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(8): p. 2132-43.

158. Tam, Y.K., et al., *Ex vivo expansion of the highly cytotoxic human natural killer-92 cell-line under current good manufacturing practice conditions for clinical adoptive cellular immunotherapy*. *Cytotherapy*, 2003. **5**(3): p. 259-72.
159. Lutz, C.T., et al., *Human NK cells proliferate and die in vivo more rapidly than T cells in healthy young and elderly adults*. *J Immunol*, 2011. **186**(8): p. 4590-8.
160. Gunturi, A., R.E. Berg, and J. Forman, *The role of CD94/NKG2 in innate and adaptive immunity*. *Immunol Res*, 2004. **30**(1): p. 29-34.
161. Ida, H., et al., *CD94 ligation induces apoptosis in a subset of IL-2-stimulated NK cells*. *J Immunol*, 1997. **159**(5): p. 2154-60.
162. Raulet, D.H., *Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(10): p. 781-90.
163. Watzl, C., *The NKG2D receptor and its ligands-recognition beyond the "missing self"?* *Microbes Infect*, 2003. **5**(1): p. 31-7.
164. López-Soto, A., et al., *Control of Metastasis by NK Cells*. *Cancer Cell*, 2017. **32**(2): p. 135-154.
165. Liu, H., et al., *Role of NKG2D and its ligands in cancer immunotherapy*. *Am J Cancer Res*, 2019. **9**(10): p. 2064-2078.
166. Li, Y., et al., *Optimized protocols for generation of cord blood-derived cytokine-induced killer/natural killer cells*. *Anticancer Res*, 2010. **30**(9): p. 3493-9.
167. Koh, S.K., et al., *Natural Killer Cell Expansion and Cytotoxicity Differ Depending on the Culture Medium Used*. *Ann Lab Med*, 2022. **42**(6): p. 638-649.
168. Kundu, S., M. Gurney, and M. O'Dwyer, *Generating natural killer cells for adoptive transfer: expanding horizons*. *Cytotherapy*, 2021. **23**(7): p. 559-566.
169. Vatsan, R.S., et al., *Regulation of immunotherapeutic products for cancer and FDA's role in product development and clinical evaluation*. *J Immunother Cancer*, 2013. **1**: p. 5.
170. Khazal, S., et al., *A phase 1 dose escalation trial of ex-vivo expanded allogeneic cord blood-derived natural killer cell immunotherapy for pediatric solid tumor malignancies*. *Journal of Clinical Oncology*, 2023. **41**(16_suppl): p. 2546-2546.
171. Menon, A.P., et al., *Modulating T Cell Responses by Targeting CD3*. *Cancers (Basel)*, 2023. **15**(4).
172. Capuano, C., et al., *Harnessing CD16-mediated NK cell functions to enhance therapeutic efficacy of tumor-targeting mAbs*. *Cancers*, 2021. **13**(10): p. 2500.
173. Romee, R., et al., *NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17)*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2013. **121**(18): p. 3599-3608.
174. Sharma, R. and A. Das, *IL-2 mediates NK cell proliferation but not hyperactivity*. *Immunologic Research*, 2018. **66**(1): p. 151-157.
175. Bonavida, B., J. Katz, and T. Hoshino, *Mechanism of NK activation by OK-432 (*Streptococcus pyogenes*). I. Spontaneous release of NKCF and augmentation of NKCF production following stimulation with NK target cells*. *Cell Immunol*, 1986. **102**(1): p. 126-35.

176. Ma, Z., et al., *Zoledronate increases enrichment, activation and expansion of natural killer cells from umbilical cord blood*. Human Cell, 2018. **31**(4): p. 310-312.
177. Mylabathula, P.L., et al., *IL-2 and Zoledronic Acid Therapy Restores the In Vivo Anti-Leukemic Activity of Human Lymphocytes Pre-Exposed to Simulated Microgravity*. FBL, 2022. **27**(7).
178. Ross, R. and A. Vogel, *The platelet-derived growth factor*. Cell, 1978. **14**(2): p. 203-210.

PHỤ LỤC

Phụ lục 01: Sơ đồ thí nghiệm



Phụ lục 02
Kết quả phân tích chỉ số Nội độc tố endotoxin

<pre> ***** ENDOSAFE Test Record ***** V712F 3/26/2015 DateTime: 28-12-20 @ 09:22:17 Device: 8672 OperatorID: THANH Cartridge: Endotoxin Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C Method: KX-122 Cartridge Lot#: 6621168 Cartridge Cal Code: 418456205854 Range: 0.5-0.005 Range Time: Sec: 184-962 Onset Times: >962 302 >962 314 Slope: -0.359 Intercept: +2.157 Dilution: 20 Sample Lot: 2012140176 Sample ID: NK Sample Rxn Time CV: 0.0% Pass Spike Value: 0.114 EU/mL Spike Rxn Time CV: 2.6% Pass Spike Recovery: 146% Pass Test Suitability: Pass Sample Value: <0.100 EU/mL : </pre>	<pre> ***** ENDOSAFE Test Record ***** V712F 3/26/2015 DateTime: 28-12-20 @ 09:53:50 Device: 8672 OperatorID: THANH Cartridge: Endotoxin Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C Method: KX-122 Cartridge Lot#: 6621168 Cartridge Cal Code: 418456205854 Range: 0.5-0.005 Range Time: Sec: 184-962 Onset Times: >962 316 >962 350 Slope: -0.359 Intercept: +2.157 Dilution: 20 Sample Lot: 2012140325 Sample ID: NK Sample Rxn Time CV: 0.0% Pass Spike Value: 0.091 EU/mL Spike Rxn Time CV: 7.2% Pass Spike Recovery: 117% Pass Test Suitability: Pass Sample Value: <0.100 EU/mL : </pre>	<pre> ***** ENDOSAFE Test Record ***** V712F 3/26/2015 DateTime: 08-01-21 @ 14:18:54 Device: 8672 OperatorID: THANH Cartridge: Endotoxin Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C Method: KX-122 Cartridge Lot#: 6622164 Cartridge Cal Code: 422867348985 Range: 0.5-0.005 Range Time: Sec: 228-1073 Onset Times: >1073 390 >1073 432 Slope: -0.336 Intercept: +2.257 Dilution: 20 Sample Lot: 2012260528 Sample ID: NK Sample Rxn Time CV: 0.0% Pass Spike Value: 0.082 EU/mL Spike Rxn Time CV: 7.2% Pass Spike Recovery: 92% Pass Test Suitability: Pass Sample Value: <0.100 EU/mL : </pre>
Mẫu NK 01	Mẫu NK 03	Mẫu NK 02

Phụ lục 03
Kết quả phân tích chỉ số Mycoplasma

PHIẾU THỰC HIỆN XÉT NGHIỆM PHÁT HIỆN MYCOPLASMA

1. HÓA CHẤT/ SINH PHẨM

MycoAlert Reagent: Lot: ...LT.27-284... Hạn sử dụng: ...27/08/2021
 MycoAlert Substrate: Lot: ...LT.27-287... Hạn sử dụng: ...23/08/2021
 MycoAlert Control: Lot: ...LT.27-235... Hạn sử dụng: ...11/11/2021

2. THIẾT BỊ

Tên thiết bị	Mã thiết bị	Ghi chú
Máy kiểm tra Mycoplasma- Lucetta	☒ TBG.MY.001 ☐ TBG.MY.002	
Máy lắc trộn	TBG.MT.001	
Micropipet	TBG.PP0.1X.....	

3. CÁC BƯỚC THỰC HIỆN

Các bước thực hiện	Positive control	Negative control	Họ tên NK01	Họ tên NK03	Họ tên
			PID NK01	PID NK03	PID
			SID	SID	SID
Loại mẫu			MTNK.MCR	MTNK.MCR	
Cho 100µl mẫu vào ống	☒	☒	☒	☒	☐
Cho 100µl MycoAlert Reagent vào ống. Đo sau 5 phút ở chế độ đọc 1s (kết quả A)	☒	☒	☒	☒	☐
Cho 100µl MycoAlert Substrate vào ống. Đo sau 10 phút ở chế độ đọc 1s (kết quả B)	☒	☒	☒	☒	☐
Đọc kết quả:					
X=B/A	602,24	0,168	0,456	0,544	
Kết luận	Pass	Pass	Âm tính	Âm tính	
GHI CHÚ <i>X<1.0: Âm tính</i> <i>1.0<X<1.2: Border line</i> <i>X>1.2: Dương tính</i>					

Ngày 28...tháng 12 năm 2020

Người thực hiện



Mai Thị Hương

PHIẾU THỰC HIỆN XÉT NGHIỆM PHÁT HIỆN MYCOPLASMA

1. HÓA CHẤT/ SINH PHẨM

 MycoAlert Reagent: Lot: LT27-284

 Hạn sử dụng: 27/08/2021

 MycoAlert Substrate: Lot: LT27-284

 Hạn sử dụng: 23/10/2021

 MycoAlert Control: Lot: LT27-235

 Hạn sử dụng: 11/11/2021

2. THIẾT BỊ

Tên thiết bị	Mã thiết bị	Ghi chú
Máy kiểm tra Mycoplasma- Lucetta	☒ TBG.MY.001 ☐ TBG.MY.002	
Máy lắc trộn	TBG.MT.001	
Micropipet	TBG.PP <u>018</u>	

3. CÁC BƯỚC THỰC HIỆN

Các bước thực hiện	Positive control	Negative control	Họ tên <u>NK02</u>	Họ tên	Họ tên
			PID <u>NK02</u>	PID	PID
			SID	SID	SID
Loại mẫu			<u>MTNK MCR</u>		
Cho 100µl mẫu vào ống	☒	☒	☒	☐	☐
Cho 100µl MycoAlert Reagent vào ống. Đo sau 5 phút ở chế độ đọc 1s (kết quả A)	☒	☒	☒	☐	☐
Cho 100µl MycoAlert Substrate vào ống. Đo sau 10 phút ở chế độ đọc 1s (kết quả B)	☒	☒	☒	☐	☐
Đọc kết quả:					
X=B/A	<u>629,765</u>	<u>0,172</u>	<u>0,234</u>		
Kết luận	<u>Pass</u>	<u>Pass</u>	<u>Âm tính</u>		
GHI CHÚ <i>X<1.0: Âm tính</i> <i>1.0<X<1.2: Border line</i> <i>X>1.2: Dương tính</i>					

 Ngày ..10..tháng ..09.. năm ..2021

Người thực hiện


 Nguyễn Thị Thanh

Phụ lục 04

Các thành phần môi trường nuôi cấy BINKIT

Quá trình nuôi cấy trong nghiên cứu được chia thành 2 giai đoạn, và môi trường sử dụng bao gồm gồm:

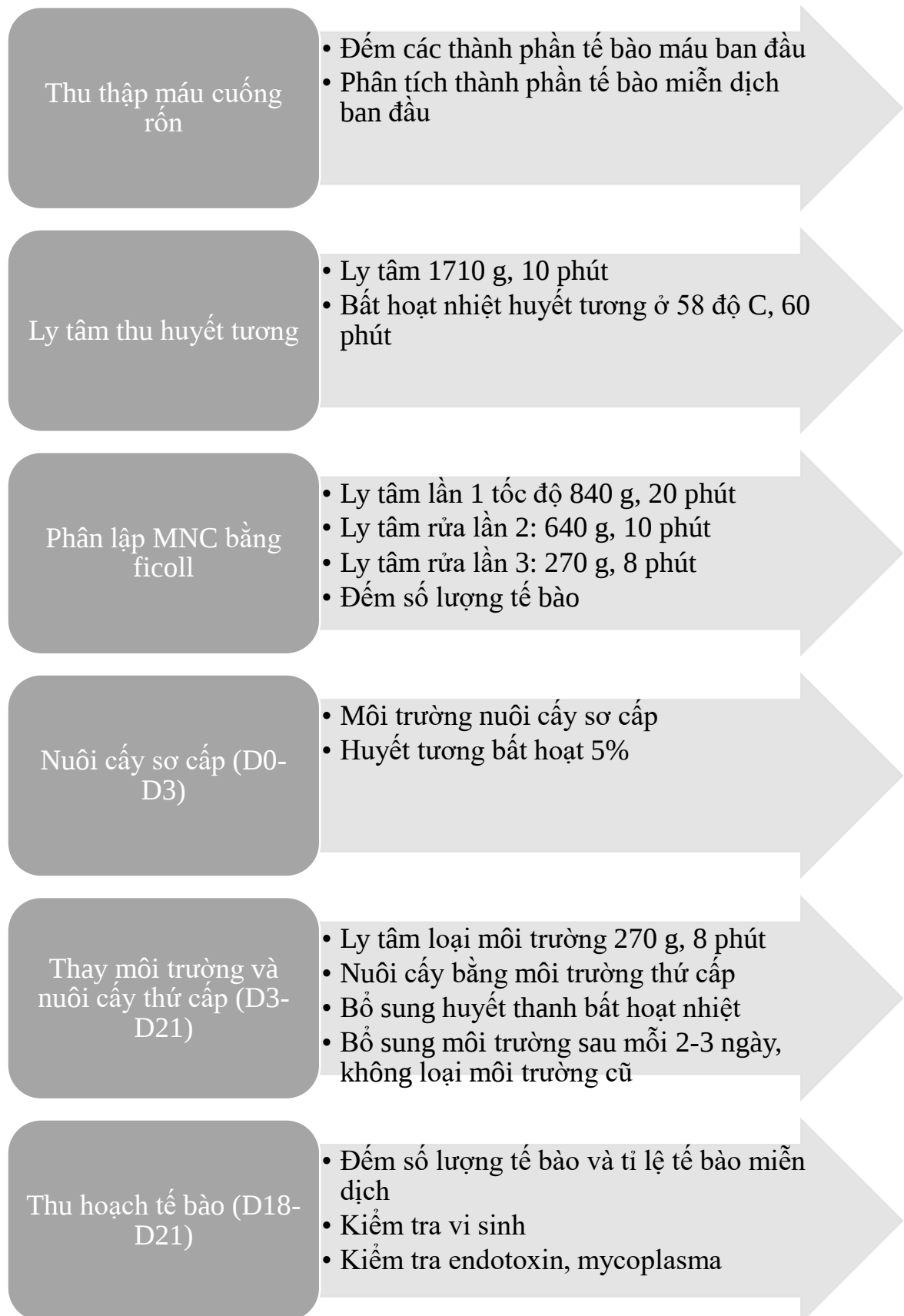
- Môi trường nuôi cấy hoạt hóa trong 3 ngày đầu chứa:
 - Đĩa nuôi cấy có phủ kháng thể đơn dòng liên kết CD3 (nồng độ 5ng/5ml), và liên kết CD16 (nồng độ 5µg/5ml)
 - Hỗn hợp OK-432 (nồng độ 0,01 KE/ml) và Axit zoledronic (nồng độ 5 µM/mL)
 - Hỗn hợp môi trường nuôi cấy cơ bản OpTmizer, Gibco chứa IL-2 nồng độ nồng độ 1.000 U/ml
 - Huyết thanh tủy thân bất hoạt nhiệt
- Môi trường nuôi cấy tăng sinh (sau 3 ngày)
 - Môi trường nuôi cấy cơ bản OpTmizer, Gibco chứa IL-2 nồng độ 700 U/ml kích thích tăng sinh NK
 - Huyết thanh tủy thân bất hoạt nhiệt

Trong giai đoạn nuôi cấy 3 ngày đầu tiên là giai đoạn nuôi cấy sơ cấp hay giai đoạn hoạt hóa. Thành phần như kháng thể đơn dòng kháng CD3 (anti-CD3 mAbs) và CD 16 (anti-CD16 mAbs), OK432, Zoledronic acid, IL-2 được tối ưu nồng độ và huyết thanh bất hoạt nhiệt tủy nhân có vai trò hoạt hóa và kích thích tế bào NK tăng sinh. Sau đó, các thành phần trên được ly tâm loại bỏ, tế bào bước sang giai đoạn nuôi cấy thứ cấp, hay nuôi cấy tăng sinh chọn lọc với thành phần chính là môi trường nuôi cấy cơ bản có bổ sung IL-2 với nồng độ là 700 U/ml giúp gia tăng số lượng và hoạt tính của NK.

Các thành phần trong môi trường nuôi cấy này từ lâu đã được nghiên cứu, trong đó, mỗi thành phần lại có vai trò riêng trong việc kích thích và tạo điều kiện nhân rộng NK. Bảng 3.44 tóm tắt vai trò của các thành phần trong hỗn hợp môi trường nuôi cấy này.

Bảng 3. 44. Thành phần và vai trò các chất trong môi trường nuôi cấy tế bào NK BINKIT

Thành phần	Chức năng
Kháng thể kháng CD3	Kháng thể kháng CD3 được cố định trên bề mặt chai nuôi cấy, liên kết với thụ thể CD3 trên bề mặt của các tế bào biểu hiện CD3+ như lympho T và NKT, ban đầu dẫn đến kích hoạt tế bào lympho T giải phóng các cytokine như yếu tố hoại tử khối u TNF và IFN- γ , nhưng sau đó gây ra apoptosis của các tế bào T [147, 171].
Kháng thể kháng CD16	Kháng thể kháng CD16 được cố định trên bề mặt chai nuôi cấy, đây là một trong những yếu tố hoạt hóa mạnh của NK, chúng liên kết với thụ thể CD16 trên bề mặt tế bào NK để kích thích quá trình hoạt hóa của NK [142, 147, 172, 173]. Việc cố định kháng thể kháng CD16 này sẽ làm tăng hiệu quả tiếp xúc với NK hơn so với CD16 hòa tan trong môi trường.
IL-2	IL-2 tác động thông qua tương tác với các thụ thể IL-2R trên bề mặt tế bào và kích hoạt con đường Janus kinase (JAK)/STAT trong tế bào, và kết quả là kích thích NK tăng sinh, đồng thời làm gia tăng hoạt tính của chúng [145, 174].
OK-432	OK432 đóng vai trò như một chất bổ trợ miễn dịch có khả năng kích hoạt bạch cầu đơn nhân sản xuất một số cytokine như IL-12, IL-18, IL-2,...tiếp đó các cytokin hoạt hóa các phản ứng miễn dịch tiếp theo, trong đó bao gồm việc làm gia tăng hoạt tính của tế bào NK [146, 175].
Zoledronic acid	Có vai trò trong việc tăng cường chức năng gây độc của tế bào NK [176, 177].
Huyết tương bất hoạt nhiệt	Quá trình bất hoạt huyết tương bằng nhiệt độ cao khiến tiểu cầu bị phá vỡ cấu trúc, giải phóng ra lượng lớn cytokine cần thiết cho sự phát triển của NK [178].

Phụ lục 05**Lưu đồ quy trình nuôi cấy tăng sinh tế bào NK**

Phụ lục 06

Giấy chứng nhận chấp thuận của hội đồng y đức trong nghiên cứu y sinh học



CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Hà Nội, ngày 15 tháng 6 năm 2017

GIẤY CHỨNG NHẬN**CHẤP THUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU Y SINH HỌC
CÔNG TY CP BỆNH VIỆN ĐA KHOA QUỐC TẾ VINMEC**

Căn cứ Quyết định số 24/2016/QĐ-VINMEC ngày 28/12/2016 của Chủ tịch Hội đồng quản trị Công ty Cổ phần Bệnh viện đa khoa quốc tế Vinmec về việc thành lập Hội đồng đạo đức trong Nghiên cứu y sinh học xét duyệt các vấn đề đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của các đề tài/dự án;

Căn cứ Quyết định số 23/2016/QĐ-VINMEC ngày 28/12/2016 của Chủ tịch Hội đồng quản trị Công ty Cổ phần Bệnh viện đa khoa Quốc tế Vinmec về việc ban hành Điều lệ Tổ chức và hoạt động của Hội đồng đạo đức Công ty Cổ phần Bệnh viện đa khoa quốc tế Vinmec;

Căn cứ Biên bản xét duyệt nghiên cứu ngày 15/6/2017 của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y, sinh học cấp công ty của Công ty Cổ phần Bệnh viện Đa khoa Quốc tế Vinmec

1. Tên nghiên cứu: Nghiên cứu nhân nuôi hoạt hóa tế bào diệt tự Nhiên (Natural killer cell – NK) từ máu dây rốn trong hỗ trợ điều trị ung thư
2. Nghiên cứu viên chính: ThS. Chu Thị Thảo, Viện Nghiên cứu Tế bào gốc và Công nghệ Gen Vinmec
3. Đối tượng nghiên cứu: Mẫu máu dây rốn được thu thập từ em bé của các sản phụ khỏe mạnh, mang thai từ tuần 37 trở đi, không mắc các loại virus viêm gan B, C, HIV, CMV và Giang mai. Các sản phụ ký cam kết tình nguyện hiến mẫu máu dây rốn. Mẫu máu dây rốn được thu thập tại Bệnh viện đa khoa quốc tế Vinmec Times City.
4. Cỡ mẫu: 50-70
5. Địa điểm: Bệnh viện Đa khoa quốc tế Vinmec Times City, Hà Nội
6. Thời gian triển khai nghiên cứu: tháng 07/2017 đến tháng 07/2021

Ngày chấp thuận: 15/6/2017

Những thay đổi trong khi sử dụng các tài liệu nêu trên sẽ phải được Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y, sinh học cấp công ty của Công ty Cổ phần Bệnh viện đa khoa quốc tế Vinmec xem xét

và chấp thuận trừ trường hợp phải thay đổi ngay để đảm bảo an toàn cao nhất cho đối tượng. Đồng thời phải báo cáo cho Hội đồng Đạo đức về những thay đổi này.

Nghiên cứu viên chính có trách nhiệm thực hiện đúng nguyên tắc về đạo đức đã được ghi trong đề cương nghiên cứu; các yêu cầu báo cáo về an toàn của Hội đồng Đạo đức và các quy định hiện hành về nghiên cứu lâm sàng đã được ban hành của Bộ Y tế; tuân thủ tuyên ngôn Helsinki và hướng dẫn thực hành lâm sàng tốt của Hội nghị Hợp nhất Quốc tế (ICH GCP).

Nơi nhận:

- Nghiên cứu viên chính;
- Nhà tài trợ;
- Lưu: VT, P. QLNCCKH;

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG ✓



GS.TS.BS. Đỗ Tất Cường