

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ ĐIỀU TRỊ CỦA TẾ BÀO CAR-T TRÊN CHUỘT MANG TẾ BÀO U LYMPHO DÒNG B THỂ LAN TỎA

Ngô Thu Hằng[✉], Hoàng Văn Tổng, Hồ Viết Hoàn

Bùi Khắc Cường, Cấn Văn Mão

Học viện Quân Y

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá hiệu quả điều trị của tế bào CAR-T trên chuột mang tế bào u lympho dòng B thể lan tỏa. Chuột thiếu hụt miễn dịch NODscid được tiêm đường phúc mạc liều duy nhất 10^6 tế bào u lympho dòng B Daudi Luci+/chuột. Sau 3 ngày chia nhóm điều trị bằng tế bào CAR-T và nhóm chứng sử dụng PBMC. Sau tiêm, theo dõi tình trạng toàn thân, thời gian sống, tỉ lệ sống chết và hoạt độ Luciferase trong máu chuột. Hoạt độ Luciferase trong máu chuột ở các nhóm điều trị thấp hơn so với nhóm chứng ($p < 0,01$), tỷ lệ sống của nhóm chuột điều trị là 90%, nhóm chứng là 40%, thời gian sống trung bình ở các nhóm điều trị cao hơn nhóm chứng ($p < 0,05$). Kết quả nghiên cứu cho thấy tế bào CAR-T có tác dụng kháng ung thư trên mô hình chuột mang tế bào u lympho dòng B thể lan tỏa.

Từ khóa: CAR-T, Daudi, Luciferase, NODscid.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lơ xê mi cấp dòng lympho (ALL) là một trong những bệnh ung thư phổ biến nhất ở trẻ em trên thế giới, chiếm khoảng 75% tất cả các loại ung thư máu.^{1,2} ALL xuất hiện khi quá trình tạo tế bào máu trong tủy xương bị biến đổi, tạo ra các tế bào bạch cầu bất thường, ác tính. Theo thống kê trên thế giới, tỷ lệ mắc ALL hàng năm khoảng 1 đến 4 ca/100.000 dân tùy vào vùng địa lý trong đó tỷ lệ mắc mới của ALL gặp nhiều nhất ở lứa tuổi từ 2 - 5 tuổi.³ Hóa trị là phương pháp điều trị chính cho ALL, tuy nhiên liệu pháp này thường gây ra nhiều tác dụng phụ cho người bệnh. Tác dụng phụ của hóa trị phụ thuộc vào từng cá nhân và liều sử dụng. Chúng có thể bao gồm các tác dụng phụ như rụng tóc, mệt mỏi, chán ăn, buồn nôn và nôn, tiêu chảy, và các vấn đề về thận và gan, yếu cơ, đau dây thần kinh, các vấn đề về xương

khớp... Mặt khác tỉ lệ thuyên giảm bệnh còn thấp dưới 20%.⁴ Các hướng điều trị mới hiệu quả hơn rất cần được áp dụng để để nâng cao hiệu quả cho nhóm các bệnh nhân mắc ALL.

Hiện nay, các nhà khoa học đang nghiên cứu các hướng điều trị mới, điển hình là liệu pháp miễn dịch trong đó liệu pháp sử dụng tế bào T mang thụ thể nhân tạo CAR (Chimeric antigen receptors) là một hướng tiếp cận mới. Năm 2017, cơ quan thực phẩm và dược phẩm hoa kỳ (FDA) đã cấp phép cho 2 dạng điều trị sử dụng CAR-T là Kymriah của hãng Novartis cho điều trị bệnh bạch cầu lympho cấp ở trẻ em và Yescarta của hãng Kite Pharma cho các bệnh lymphoma không phải Hodgkin ở người lớn. Vào tháng 5 năm 2018, FDA tiếp tục cấp phép cho liệu pháp tế bào CAR-T Kymrial của hãng Novartis cho điều trị lymphoma không phải Hodgkin trên người lớn (nguồn www.fda.gov). Ngày 24 tháng 7 năm 2020 FDA đã phê duyệt brexucabtagene autoleucel (Tecartus, Kite Pharma), đây là liệu pháp tế bào CAR-T đầu tiên được phê duyệt để điều trị bệnh nhân trưởng thành bị U lympho tế bào lớp vỏ (mantle

Tác giả liên hệ: Ngô Thu Hằng

Học viện Quân Y

Email: drngohang1986@gmail.com

Ngày nhận: 29/05/2023

Ngày được chấp nhận: 01/07/2023

cell lymphoma: MCL) tái phát hoặc kháng trị. Liệu pháp tế bào CAR-T đã mở ra kỷ nguyên mới trong điều trị ung thư bằng tế bào miễn dịch.

Tuy nhiên, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào ứng dụng liệu pháp tế bào CAR-T trong điều trị bệnh lý ung thư. Nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã tối ưu hóa quá trình sản xuất tế bào CAR-T, đánh giá tính an toàn của CAR-T trên mô hình thực nghiệm và xây dựng thành công mô hình chuột xenograft mang tế bào u lympho dòng B thể lan tỏa để phục vụ cho thử nghiệm đánh giá hiệu quả điều trị của liệu pháp tế bào CAR-T trong điều trị bạch cầu nguyên bào lympho cấp trên động vật thực nghiệm.^{5,6} Trong chuyên đề này, chúng tôi tiến hành đánh giá hiệu quả điều trị của tế bào CAR-T trên chuột mang tế bào ung thư CD19+ thể lan tỏa.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

- Tế bào Daudi (CCL-213) dòng U lympho dòng B CD19 + (ATCC, Hoa Kỳ).

- Chuột thiếu hụt miễn dịch NOD scid: chuột nhất đực thiếu hụt miễn dịch, không có tế bào lympho B, lympho T và không có tế bào giết tự nhiên (NK cell). Do thiếu tế bào lympho T nên chúng không có đáp ứng miễn dịch thải ghép. Vì vậy, loài chuột này có thể dung nạp được nhiều loại tế bào từ các loài khác nhau. Chuột thiếu hụt miễn dịch được nhập khẩu từ Công ty Charles-River (Hoa Kỳ).

- Tế bào CAR-T CD19RCD137/pSB (CAR-T2) là sản phẩm của đề tài Nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ cấp quốc gia Mã số KC 10.39/16-20.

- Tế bào CAR-T CD19RCD137- iCasp9-IL15/pSB (CAR-T4) là sản phẩm của đề tài Nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ cấp quốc gia Mã số KC 10.39/16-20.

2. Phương pháp

Nghiên cứu được thiết kế là nghiên cứu thực nghiệm, mô tả cắt ngang có đối chứng.

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào Daudi

Tế bào Daudi (1 mL) bảo quản ở -80°C trong FBS (10% DMSO) được làm ấm nhanh ở 37°C trong khoảng 1 phút. Sau đó, 20 mL môi trường RPMI 1640 (10% FBS) được bổ sung từ từ vào ống tế bào trước khi ly tâm ở 200 vòng trong 10 phút. Sau khi loại bỏ toàn bộ dịch nổi, cặn tế bào được hòa tan bằng môi trường nuôi cấy RPMI 1640 (10% FBS, 37°C) nhằm đưa mật độ tế bào về 10^5 tế bào/mL. Tế bào được nuôi trong chai T25 ở 37°C, 5% CO₂, độ ẩm > 90%, không lắc đến khi mật độ đạt 10^6 tế bào/mL thì tiến hành cấy chuyển về 5×10^5 tế bào/mL. Thay môi trường nuôi cấy 2 ngày/lần. Khi số lượng tế bào đủ lớn, thu hoạch tế bào và đếm số lượng tế bào thu được, điều chỉnh mật độ tế bào đạt các mật độ 10^7 tế bào/mL.

Chăm sóc chuột thiếu hụt miễn dịch "NOD scid"

50 chuột *NOD scid* được nuôi trong phòng vô trùng, duy trì nhiệt độ phòng ở $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$, độ ẩm $55 \pm 5\%$, ánh sáng tự động điều khiển bật lúc 7 giờ, tắt lúc 19 giờ. Tiệt trùng thức ăn và nước uống trước khi sử dụng. Mỗi lồng chuột được để trên hệ thống giá có thông khí độc lập và lọc qua màng lọc vi khuẩn bảo đảm khả năng cách ly tốt với mầm bệnh.

Quy trình tiêm TB Daudi trên chuột thiếu hụt miễn dịch để tạo mô hình u tế bào lympho dòng B

TB Daudi sau khi thu hoạch đạt các mật độ 10^7 tế bào/mL tiêm vào phúc mạc chuột, số lượng huyền dịch tế bào sử dụng để ghép là 0,1 ml/chuột, tương đương 10^6 tế bào (số lượng 60 con). Sau khi ghép, tiếp tục nuôi chuột trong phòng vô trùng và theo dõi chặt chẽ diễn biến tại vị trí ghép cũng như toàn thân.

Đánh giá hiệu quả điều trị của tế bào CAR-T trên chuột mang tế bào u lympho dòng B CD19+ thể lan tỏa

- Sau 3 ngày tiêm tế bào Daudi vào phúc mạc chuột (n = 50) được chia ngẫu nhiên thành 5 nhóm (mỗi nhóm n = 10 chuột) gồm:

+ Nhóm T-C: nhóm chứng được tiêm tế bào T không biến nạp PBMC liều 10^6 tế bào/0,1 mL/ chuột, đường phúc mạc, 1 lần/tuần trong 3 tuần.

+ Nhóm CAR-T2-1: nhóm điều trị 1 bằng tế bào CAR-T CD19RCD137/pSB liều 10^6 tế bào/0,1 mL/ chuột, đường phúc mạc, 1 lần/tuần trong 3 tuần.

+ Nhóm CAR-T2-2: nhóm điều trị 2 bằng tế bào CAR-T CD19RCD137/pSB liều 5×10^6 tế bào/0,1 mL/ chuột, đường phúc mạc, 1 lần/tuần trong 3 tuần.

+ Nhóm CAR-T4-1: nhóm điều trị 3 bằng tế bào CAR-T CD19RCD137- iCasp9-IL15/pSB liều 10^6 tế bào/0,1 mL/ chuột, đường phúc mạc, 1 lần/tuần trong 3 tuần.

+ Nhóm CAR-T4-2: nhóm điều trị 4 bằng tế bào CAR-T CD19RCD137- iCasp9-IL15/pSB liều 5×10^6 tế bào/0,1 mL/ chuột, đường phúc mạc, 1 lần/tuần trong 3 tuần.

- Chuột được đánh giá toàn trạng bằng cách theo dõi cân nặng theo thời gian (sau bắt đầu tiêm, sau tiêm 7, 14, 21, 28 ngày).

- Theo dõi tỉ lệ sống, chết của chuột ở các nhóm nghiên cứu: Theo dõi chuột nod/scid mang khối u bạch cầu ở các nhóm nghiên cứu cho tới khi kết thúc thí nghiệm (thời điểm tất

cả chuột ở các nhóm nghiên cứu bị chết hết) theo các tiêu chí sau: Thời gian sống của từng con chuột và thời gian sống trung bình của cả nhóm chuột ở các nhóm nghiên cứu, so sánh tương quan, số chuột chết ở từng nhóm, so sánh tương quan.

Quy trình đánh giá hoạt độ luciferase trong máu chuột

- Thời điểm đánh giá: ngày 28 sau khi tiêm tế bào Daudi vào chuột.

- Tế bào được xử lý và nhuộm theo hướng dẫn thực hiện quy trình của bộ kit FITC Mouse Anti-Human CD19, sau đó chạy flow cytometry trong 1 giờ đánh giá biểu hiện của CD19.

Xử lý thống kê

So sánh trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test, so sánh trung bình của 3 nhóm bằng phân tích phương sai ANOVA. Số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS 20.0 và GraphPad Prism 8. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

III. KẾT QUẢ

1. Tình trạng toàn thân chuột

Tình trạng toàn thân chuột trước khi điều trị

Sau 3 ngày tiêm tế bào Daudi liều 10^6 tế bào/ chuột vào phúc mạc chuột, chuột vẫn ăn uống, hoạt động bình thường, nhanh nhẹn, lông mượt, mắt trong, hậu môn khô, không thấy biểu hiện đi lỏng. Số chuột sống đạt tỷ lệ 100% (bảng 1).

Bảng 1. Kết quả theo dõi sức khỏe chuột trước thời điểm điều trị

Số TT	Tiêu chí theo dõi	Mức độ đánh giá	
		Bình thường	Kém
1	Vận động	50/50 con	0
2	Đáp ứng với kích thích	50/50 con	0
3	Phân chuột	50/50 con	0
4	Da chuột	50/50 con	0

Tình trạng toàn thân chuột trong quá trình điều trị

Trong quá trình điều trị, ở nhóm chứng chuột có hiện tượng xù lông, ăn kém, giảm vận động so với các nhóm chuột còn lại.

Trong 30 ngày theo dõi chuột ở các nhóm, ở nhóm chứng có 6 chuột chết; nhóm CAR-T2-1 có 2 chuột bị chết, nhóm CAR-T2-2 và CAR-T4-1

có 1 chuột chết và nhóm CAR-T4-2 không có chuột nào chết.

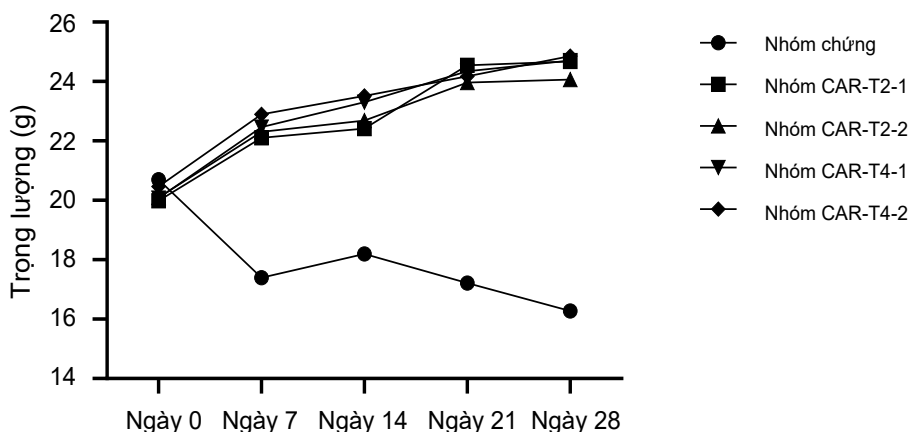
Sau 30 ngày thí nghiệm, tỷ lệ chuột sống ở nhóm điều trị bằng tế bào CAR-T là: 36/40 đạt 90%; ở nhóm chứng điều trị bằng tế bào T không biến nạp là 4/10 đạt 40%.

Diễn biến trọng lượng cơ thể ở chuột nghiên cứu**Bảng 2. So sánh trọng lượng trung bình chuột trước điều trị (g)**

Nhóm	Thông số	n	$\bar{x} \pm SD$	p
Nhóm chứng T-C (1)		10	20,690 \pm 0,425	$p_{2-1} > 0,05$;
Nhóm CAR-T2-1 (2)		10	19,982 \pm 0,682	$p_{3-1} > 0,05$;
Nhóm CAR-T2-2 (3)		10	20,090 \pm 1,316	$p_{4-1} > 0,05$
Nhóm CAR-T4-1 (4)		10	20,070 \pm 0,782	$p_{5-1} > 0,05$
Nhóm CAR-T4-2 (5)		10	20,470 \pm 1,193	

Trước điều trị, trọng lượng trung bình cả 5 nhóm chuột thí nghiệm tương đương nhau, sự

khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$ (bảng 2).

**Biểu đồ 1. Trọng lượng cơ thể chuột nghiên cứu (g)**

Sau tiêm 3 ngày tế bào Daudi vào vị trí phúc mạc chuột, chuột được chia nhóm điều trị. Trọng lượng cơ thể của các chuột ở 4 nhóm được điều trị bằng tế bào CAR-T đều có xu hướng tăng so với trước khi thí nghiệm. Trong khi đó, trọng lượng chuột ở nhóm chứng giảm

dần theo thời gian cùng với sự xuất hiện của hiện tượng xù lông, kém ăn, giảm vận động, giảm đáp ứng với các kích thích. Ở tất cả các thời điểm nghiên cứu cho tới ngày 28, trọng lượng trung bình của các chuột ở nhóm chứng điều trị bằng tế bào T không biến nạp thấp hơn

trọng lượng trung bình của các chuột ở cả 4 nhóm điều trị bằng tế bào CAR-T, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01 - 0,001$. Trọng

lượng trung bình của chuột ở các nhóm được điều trị bằng tế bào CAR-T không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) (biểu đồ 1).

2. Kết quả thời gian sống, tỉ lệ sống, tỉ lệ sống tích lũy của chuột NODscid sau thời gian điều trị bằng tế bào CAR-T

Bảng 3. Thời gian sống sót trung bình của các nhóm chuột điều trị

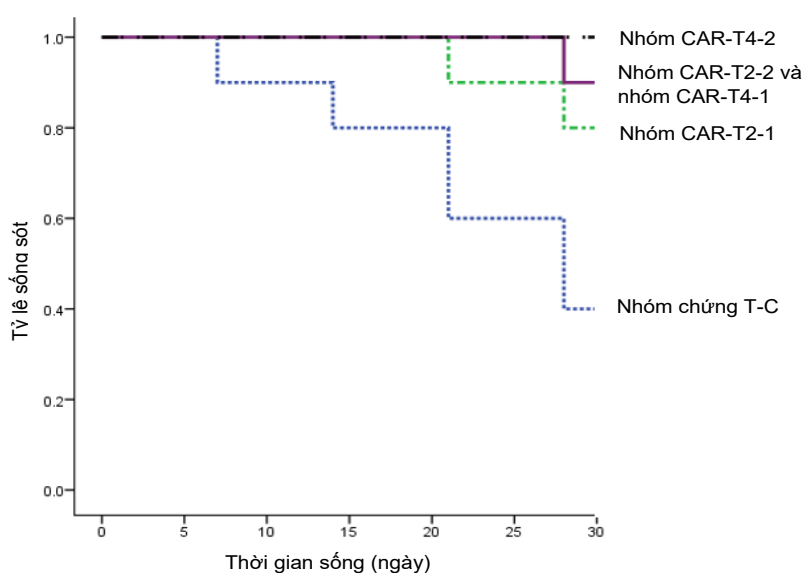
Nhóm chuột	Số lượng (con)	Thời gian sống sót trung bình	Số chuột sống	Tỷ lệ sống (%)	p
Nhóm chứng T-C (1)	10	23,90 ± 8,05	4 con	40	$p_{1-2} = 0,006$
Nhóm CAR-T2-1 (2)	10	28,90 ± 2,85	8 con	80	$p_{1-3} = 0,001$
Nhóm CAR-T2-2 (3)	10	29,80 ± 0,63	9 con	90	$p_{1-4} = 0,001$
Nhóm CAR-T4-1 (4)	10	29,80 ± 0,63	9 con	90	$p_{1-5} = 0,001$
Nhóm CAR-T4-2 (5)	10	30,00	10 con	100	

Tại tất cả các thời điểm nghiên cứu, số lượng và tỉ lệ chuột chết của nhóm chứng cao hơn so với bốn nhóm điều trị bằng tế bào CAR-T. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại thời điểm ngày 21 trở đi với $p < 0,01$ (Bảng 3, Biểu đồ 2).

Đặc biệt trong 28 ngày điều trị, tại các thời điểm nghiên cứu nhóm điều trị bằng tế bào CAR-T4 có số chuột chết ít hơn so với nhóm điều trị CAR-T2. Tuy nhiên, sự khác biệt không

có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Kết thúc thí nghiệm (vào ngày 30 sau điều trị), số chuột còn sống ở nhóm chứng là 4/10 (40%), nhóm CAR-T2-1 là 8/10 (80%), nhóm CAR-T2-2 là 9/10 (90%), nhóm CAR-T4-1 là 9/10 (90%) và nhóm CAR-T4-2 là 10/10 (100%). Sự khác biệt chỉ có ý nghĩa thống kê giữa nhóm chứng và nhóm điều trị từ ngày 21 trở đi ($p < 0,05$) (biểu đồ 2).



Biểu đồ 2. Kết quả tỉ lệ chuột sống ở các nhóm nghiên cứu

3. Kết quả đánh giá hoạt độ luciferase trong máu chuột ở các nhóm

Bảng 4. Kết quả hoạt độ luciferase trong máu chuột ở các nhóm

Nhóm	Hoạt độ luciferase (%)
Nhóm chứng T-C (1)	2392,84 ± 600,27
Nhóm CAR2 T2-1 (2)	523,64 ± 105,20
Nhóm CAR2 T2-2 (3)	26,58 ± 6,81
Nhóm CAR – T4-1 (4)	193, 59 ± 54,96
Nhóm CAR – T4-2 (5)	12,27 ± 3,35
p	$p_{1,2} < 0,05, p_{1,3}, p_{1,4}, p_{1,5} < 0,01$ $p_{2,4}, p_{3,5} < 0,05; P_{2,3}, P_{4,5} < 0,01$

Kết quả ở các bảng 4 cho thấy: chuột ở nhóm chứng được tiêm phúc mạc Daudi mà không được điều trị gì thì có hoạt độ Luciferase rất cao (2392,84 ± 600,27) điều này cho thấy tế bào Daudi khi được đưa vào màng bụng chuột đã phát triển và di cư vào trong máu nhiều tạo nên chuột mang khối tế bào ung thư CD19+ thể lan tỏa. Chuột ở các nhóm được gây bệnh nhưng sau đó được điều trị bằng tế bào CAR-T ở cả hai thế hệ 2 và thế hệ 4 đều có hoạt độ Luciferase thấp hơn rõ rệt so với nhóm chứng. Trong đó chuột ở nhóm điều trị bằng tế bào CAR-T (cả hai thế hệ T2 và T4) liều thấp tế bào (1×10^6 tế bào/ 0,1 mL/chuột) thì có hoạt độ Luciferase cao hơn ($p < 0,01$) so với nhóm điều trị liều cao (5×10^6 tế bào/ 0,1 mL/chuột). Ngoài ra khi so sánh hiệu quả điều trị giữa hai nhóm tế bào CAR-T CD19RCD137/pSB và CAR-T CD19RCD137- iCasp9-IL15/pSB (với cùng liều sử dụng) thì cũng thấy chuột ở nhóm sử dụng tế bào CAR-T CD19RCD137- iCasp9-IL15/pSB có hiệu quả hơn ($p < 0,05$).

IV. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này chúng tôi tạo ra mô hình u lympho dòng trên chuột nhắt thiếu hụt miễn dịch Nod/scid bằng cách tiêm liều 10^6 tế bào Daudi/chuột đường phúc mạc. Tiêm tế bào

ung thư vào phúc mạc chuột là phương pháp làm khá phổ biến, đã được các tác giả thực hiện trước đây với ưu điểm là kỹ thuật tiến hành đơn giản, không cần gây mê động vật, tế bào có thể dễ dàng vào máu và di chuyển tới các cơ quan khác. Chúng tôi tiến hành thử nghiệm tiêm với liều lượng 10^6 tế bào/chuột. Số lượng tế bào này tương đương với số lượng tế bào của một số nghiên cứu trong và ngoài nước trước đây.⁷⁻⁹

An toàn là điều hết sức quan trọng, đặc biệt khi có tỷ lệ lớn các bệnh nhân ung thư tuổi cao và có thể trạng rất yếu. Trong nghiên cứu này, chúng tôi theo dõi tính an toàn của liệu pháp tế bào CAR-T trên chuột thiếu hụt miễn dịch mang tế bào u lympho dòng B người thể lan tỏa. Sau 3 tuần điều trị (1 lần/tuần), vị trí tiêm không chảy máu, không nhiễm khuẩn, không loét, chuột hoạt động bình thường, vận động nhanh nhẹn, không đi lỏng. Trọng lượng của chuột tăng dần, trong khi nhóm chứng có sự giảm trọng lượng, xù lông, giảm vận động trong quá trình theo dõi 30 ngày (biểu đồ 2). Kết quả này có lẽ là do tế bào u lympho đã sinh sôi, phát triển trong cơ thể chuột ở nhóm chứng và gây nên tình trạng tương tự như bệnh lý bạch cầu cầu cấp trên người. Trong khi đó ở các nhóm điều trị bằng tế bào CAR-T các tế bào ung thư này đã được kiểm soát nên chuột có toàn trạng

tốt và cân nặng của chuột vẫn tăng. Kết quả này cũng được ghi nhận ở một số nghiên cứu trước đây trong nghiên cứu đánh giá kết quả điều trị của tế bào CAR-T.⁹ Kết quả trên cho thấy tế bào CAR-T không gây độc toàn thân ở chuột NODscid mang tế bào u lympho dòng B. Trong quá trình nghiên cứu, các chuột ở các nhóm được chăm sóc điều kiện thí nghiệm như nhau, các chuột không có dấu hiệu bệnh lý khác gây tử vong, Như vậy, tỉ lệ chuột chết và số ngày sống của chuột ở các nhóm phụ thuộc vào sự phát triển, tiến triển và hậu quả của u lympho dòng B và kết quả của liệu pháp điều trị gây nên.

Tác dụng kháng ung thư của tế bào CAR-T được đánh giá thông qua thời gian sống trung bình, tỷ lệ chuột chết và tỷ lệ sống sót của các nhóm điều trị so với nhóm chứng. Trong 30 ngày điều trị, tại tất cả các thời điểm nghiên cứu, số lượng và tỉ lệ chuột chết của nhóm chứng cao hơn so với bốn nhóm điều trị bằng tế bào CAR-T. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại thời điểm ngày 21 trở đi với $p < 0,01$ (biểu đồ 2). Mặt khác, ở nhóm điều trị bằng tế bào CAR-T CD19RCD137- iCasp9-IL15/pSB (CAR-T4) có số chuột chết ít hơn so với nhóm điều trị CAR-T CD19RCD137/pSB (CAR-T2). Tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với một số nghiên cứu khác đều chứng minh được tế bào CAR-T có tác dụng kéo dài thời gian sống ở các chuột NODscid ghép dị loài tế bào u lympho dòng B.⁷⁻⁹

Trong nghiên cứu này, để đánh giá sự phát triển của tế bào u lympho dòng B người trong cơ thể chuột, chúng tôi đã sử dụng tế bào Daudi được gắn luciferase để có thể phát hiện được mật độ của tế bào trong máu nhờ vào đo hoạt độ luciferase trong máu ngoại vi của chuột. Phương pháp này hiện nay đã được sử dụng rất phổ biến không những trong nghiên cứu

ung thư mà trong cả các bệnh lý khác như tim mạch, thần kinh, viêm gan.¹⁰⁻¹² Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng đã cho thấy kết quả đo hoạt độ luciferase trong máu chuột ở các nhóm là phù hợp với tình trạng thể trạng nói chung và biến đổi thể trọng của chuột. Trong đó, chuột ở nhóm điều trị bằng PBMC không biến nạp thì hoạt độ luciferase rất cao trong khi chuột ở các nhóm điều trị bằng tế bào CAR-T chỉ số này thấp hơn so với nhóm chứng.

Ngoài ra, kết quả cũng cho thấy chuột điều trị bằng tế bào CAR-T CD19RCD137- iCasp9-IL15/pSB có hoạt độ luciferase trong máu ngoại vi thấp hơn so với ở chuột điều trị bằng CAR-T CD19RCD137/pSB. Ở đây có thể giải thích là do tế bào CAR-T CD19RCD137- iCasp9-IL15/pSB có thêm cấu trúc có thể sinh ra IL15 trong cơ thể chuột nên thúc đẩy quá trình sinh sản và tồn tại của tế bào CAR-T tốt hơn như vậy khả năng diệt tế bào Daudi của tế bào CAR-T ở chuột thuộc nhóm này cũng hiệu quả hơn nên kết quả hoạt độ luciferase thấp hơn. Trong nhiều nghiên cứu của các tác giả trước đây cũng cho thấy tế bào CAR-T ở thể hệ 4 với các đồng cấu trúc nhằm biểu hiện các cytokine để hoạt hóa tế bào CAR-T như IL2, IL15 sẽ giúp tế bào CAR-T có khả năng phát triển mạnh hơn và khả năng diệt tế bào ung thư tốt hơn.^{13,14}

V. KẾT LUẬN

Tế bào CAR-T có tác dụng làm giảm sự tăng sinh của tế bào Daudi luc+ trong máu chuột, kéo dài thời gian sống, tăng tỷ lệ sống sót của chuột mang tế bào u lympho dòng B của người thể lan tỏa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* Sep-Oct 2010;60(5):277-300.
2. Judith F, Steuber C, Poplack D. *Acute lymphoblastic leukemia. Principle and Practice*

of *Pediatric Oncology*. 2005.

3. Stanulla M, Schrappe M. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. Jan 2009;46(1):52-63.

4. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood cancer journal*. Jun 30 2017;7(6):e577. doi:10.1038/bcj.2017.53

5. Bui KC, Ho VH, Nguyen HH, et al. X-ray-irradiated K562 feeder cells for expansion of functional CAR-T cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 2023;33:101399. doi:10.1016/j.bbrep.2022.101399

6. Nguyen HH, Bui KC, Nguyen TML, et al. The safety of CAR-T cells and PD-1 antibody combination on an experimental model. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 15 2023;649:25-31. doi:10.1016/j.bbrc.2023.01.096

7. Vallera DA, Chen H, Sicheneder AR, et al. Genetic alteration of a bispecific ligand-directed toxin targeting human CD19 and CD22 receptors resulting in improved efficacy against systemic B cell malignancy. *Leukemia research*. Sep 2009;33(9):1233-42. doi:10.1016/j.leukres.2009.02.006

8. Verma MK, Clemens J, Burzenski L, et al. A novel hemolytic complement-sufficient NSG mouse model supports studies of complement-mediated antitumor activity in vivo. *Journal of immunological methods*. Jul 2017;446:47-53. doi:10.1016/j.jim.2017.03.021

9. Vuist WM, v Buitenen F, de Rie MA, et al. Potentiation by interleukin 2 of Burkitt's

lymphoma therapy with anti-pan B (anti-CD19) monoclonal antibodies in a mouse xenotransplantation model. *Cancer Res*. Jul 15 1989;49(14):3783-8.

10. Dobrenkov K, Olszewska M, Likar Y, et al. Monitoring the efficacy of adoptively transferred prostate cancer-targeted human T lymphocytes with PET and bioluminescence imaging. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. Jul 2008;49(7):1162-70. doi:10.2967/jnumed.107.047324

11. Keller AF, Gravel M, Kriz J. Live imaging of amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: disease onset is characterized by marked induction of GFAP in Schwann cells. *Glia*. Aug 1 2009;57(10):1130-42. doi:10.1002/glia.20836

12. Brentjens RJ, Santos E, Nikhamin Y, et al. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clin Cancer Res*. Sep 15 2007;13(18 Pt 1):5426-35. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-07-0674

13. Haso W, Lee DW, Shah NN, et al. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. Feb 14 2013;121(7):1165-74. doi:10.1182/blood-2012-06-438002

14. Kowolik CM, Topp MS, Gonzalez S, et al. CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Res*. Nov 15 2006;66(22):10995-1004. doi:10.1158/0008-5472.Can-06-0160

Summary

ANTITUMOR EFFECT OF CAR-T CELLS ON HUMAN LEUKEMIA LYMPHO B XENOGRAFT NODSCID MICE

The study aims to evaluate the antitumor effects of CAR-T in Human Leukemia lympho

B xenograft NODscid Mice. Mice were injected with a single dose of 10^6 Daudi Luci+ cells into the peritoneal cavity. After 3 days, 50 mice were divided into treatment groups using CAR-T cells and the control group using PBMC. The anticancer effects of CAR-T were evaluated by assessing the survival time and rate as well as Luciferase activity in the blood. Luciferase activity in the blood of mice in the treatment groups was lower than that in the control group ($p < 0.01$). The survival rate of the treated mice group was 90% while the control group was 40%. The survival time in CAR-T groups was higher than that in the control group ($p < 0.05$). We suggest that CAR-T cells have antitumor effect on Human Leukemia xenograft NODscid Mice.

Keywords: CAR-T, Daudi, Luciferase, NODscid.