

NUÔI CÂY HOẠT HÓA, TĂNG SINH TẾ BÀO NK TRÊN BỆNH NHÂN UNG THƯ PHỔI KHÔNG TẾ BÀO NHỎ

Trần Mai Linh, Nguyễn Quý Linh,
Trần Văn Khánh, Trần Huy Thịnh và Tạ Thành Văn✉

Trường Đại học Y Hà Nội

Liệu pháp tế bào miễn dịch tự thân là liệu pháp điều trị kết hợp an toàn và hiệu quả cho nhiều loại ung thư, trong đó có ung thư phổi. Mục tiêu của nghiên cứu là áp dụng quy trình tách chiết, nuôi cấy hoạt hóa tăng sinh tế bào NK trên bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ. Lựa chọn vào nghiên cứu 5 người khỏe mạnh và 5 bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ, thu thập 10ml máu ngoại vi mỗi người, tiến hành tách chiết, nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh, định danh tế bào miễn dịch. Kết quả: nhóm khỏe mạnh, số tế bào ngày đầu $(11,74 \pm 1,50) \times 10^6$, tỷ lệ sống $93,6 \pm 1,52\%$. Số tế bào sau 21 ngày nuôi là $(11,1 \pm 2,4) \times 10^8$, tỷ lệ sống $78,05 \pm 3,5\%$, trong đó, NK: $62,19 \pm 1,51\%$, số lượng NK tăng sinh $674,93 \pm 309,13$ lần. Nhóm bệnh nhân, số tế bào ngày đầu $(9,88 \pm 1,10) \times 10^6$, tỷ lệ sống $94,6 \pm 0,89\%$. Số tế bào sau 21 ngày nuôi $(9,43 \pm 1,08) \times 10^8$, tỷ lệ sống $80,2 \pm 4,6\%$, trong đó, NK: $59,56 \pm 3,43\%$. Số lượng NK tăng sinh $644,43 \pm 298,12$ lần, không có sự khác biệt với nhóm khỏe mạnh ($p = 0,878$).

Từ khóa: liệu pháp miễn dịch tự thân, tế bào NK, ung thư phổi không tế bào nhỏ.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư phổi là bệnh có tỷ lệ mắc và tử vong hàng đầu trong các loại ung thư trên thế giới. Theo ghi nhận của Globocan năm 2018, số ca mới mắc ung thư phổi trên toàn thế giới là 2,1 triệu ca, chiếm 11,6% tổng số ca mắc do ung thư; số ca tử vong do ung thư phổi là 1,76 triệu ca, chiếm 18,4% tổng số ca tử vong do ung thư.¹ Tại Việt Nam, theo Globocan năm 2018, tỷ lệ mắc mới ung thư phổi xếp thứ hai đối với nam giới (chiếm 18,4%, sau ung thư gan) và xếp thứ ba đối với nữ giới (chiếm 9,4%, sau ung thư vú, ung thư đại trực tràng), có 164671 ca mắc mới ung thư phổi và 114871 người tử vong vì căn bệnh này.² Theo phân loại mô bệnh học, ung thư phổi chia làm 2 loại: ung thư phổi tế bào nhỏ và ung thư phổi không tế bào nhỏ

(UTPKTBN), trong đó UTPKTBN chiếm khoảng 85% các trường hợp ung thư phổi.³ Bên cạnh các phương pháp điều trị truyền thống như phẫu thuật, hóa xạ trị, việc phát triển phương pháp điều trị mới cũng như phối hợp các phương pháp với nhau để cải thiện chất lượng sống, thời gian sống thêm toàn thể với bệnh nhân ung thư phổi là điều hết sức có ý nghĩa. Hiện nay trên thế giới, liệu pháp tế bào miễn dịch tự thân được phát triển để điều trị nhiều loại ung thư đã cho những kết quả ban đầu hứa hẹn.^{4,5}

Tế bào diệt tự nhiên NK (natural killer cell), lần đầu tiên được mô tả vào những năm đầu thập kỷ 70, là tế bào dạng lympho hạt lớn, bên trong hạt chứa perforin và granzym, diệt tế bào đích khi tế bào đích giảm hoặc không biểu hiện phức hợp hòa hợp mô MHC-I.⁶ Điều này là lợi thế của tế bào NK so với tế bào T, do đó hấp dẫn các nghiên cứu trên thế giới về phát triển liệu pháp tế bào miễn dịch tự thân NK để điều trị nhiều loại ung thư, trong đó có ung thư

Tác giả liên hệ: Tạ Thành Văn

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: tathanhvan@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 23/10/2020

Ngày được chấp nhận: 24/12/2020

phối. Nhưng sự khó khăn trong việc phát triển phương pháp nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh tế bào NK đã làm chậm quá trình phát triển các thử nghiệm lâm sàng pha I truyền tế bào NK cho bệnh nhân ung thư.⁷

Hiện tại, Việt Nam vẫn đang trong giai đoạn tiếp cận với liệu pháp tế bào miễn dịch tự thân trong điều trị ung thư và chưa có nhiều công trình nghiên cứu được công bố trong lĩnh vực này. Do đó, nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu hoàn thiện quy trình tách chiết, nuôi cấy hoạt hóa tăng sinh tế bào NK trên bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng môi trường nuôi cấy tế bào cơ bản được bổ sung thêm IL-2, IL-12, IL-18 để hoạt hóa, tăng sinh tế bào NK, bởi vì sự phối hợp các cytokine này đã được biết đến là có khả năng hoạt hóa, tăng sinh tế bào NK cũng như đã được cấp phép sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng.⁸

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

- Nhóm bệnh: 5 bệnh nhân UTPKTBN trên 18 tuổi, chỉ số toàn trạng ECOG (thang điểm của Nhóm hợp tác ung thư Đông Âu - Eastern Cooperative Oncology Group) ≤ 3 , được khám tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. Các bệnh nhân có bệnh lý tự miễn, dùng thuốc ức chế miễn dịch, bệnh lý mạn tính kết hợp, bệnh lý ảnh hưởng đến các tế bào cơ quan tạo máu sẽ bị loại trừ khỏi nghiên cứu này.

- Nhóm chứng: 5 người tình nguyện khỏe mạnh, được khám tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

2. Phương pháp

Phương pháp thu thập mẫu: 10 ml máu ngoại vi được lấy vào ống chống đông heparin, bảo quản ở nhiệt độ phòng và được xử lý trong vòng 6 giờ.

Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu:

Kỹ thuật phân tách tế bào đơn nhân từ máu ngoại vi (PBMC: peripheral blood mononuclear cell): các tế bào miễn dịch được tách bằng phương pháp ly tâm thay đổi tỷ trọng sử dụng Ficoll 1.077.

Kỹ thuật nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh tế bào NK: sau khi phân lập, các tế bào được hoạt hóa trong môi trường AIM-V chứa 10% huyết thanh của bệnh nhân, có bổ sung thêm cytokine IL-2, IL-12, IL-18 theo nồng độ thích hợp trong 7 ngày đầu. Sau đó, các tế bào sẽ chuyển sang giai đoạn nuôi cấy tăng sinh số lượng lớn. Tổng thời gian nuôi cấy tế bào NK là 21 ngày.

Phương pháp xác định tỷ lệ tế bào sống, sử dụng Trypan blue: tế bào sau khi phân lập từ máu ngoại vi và sau nuôi cấy được nhuộm với Trypan blue để đếm số lượng và xác định tỷ lệ tế bào sống.

Kỹ thuật phân loại tế bào nuôi cấy bằng Flow cytometry: dựa trên các marker bề mặt tế bào thông qua các kháng thể đặc hiệu của chúng và đếm bằng máy đếm dòng chảy tế bào Novocyte Flow Cytometer (ACEA Biosciences, Inc). Các marker được sử dụng bao gồm: CD3-FITC, CD45-PerCp, CD19-APC, CD16+CD56-PE. Dựa trên các marker bề mặt có thể định danh được từng loại tế bào miễn dịch: lympho (CD45⁺): lympho B (CD45⁺CD19⁺), lympho T (CD45⁺CD3⁺CD16+CD56⁻), tế bào NK (CD45⁺CD3⁻CD16+CD56⁺), tế bào NK-T (CD45⁺CD3⁺CD16+CD56⁺).

3. Xử lý số liệu

Các số liệu được nhập và xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS 20.0. Thống kê phân tích sử dụng t-test độc lập so sánh giữa hai nhóm.

Biến số và chỉ số nghiên cứu

Số lượng tế bào và tỷ lệ tế bào sống sau tách chiết từ máu ngoại vi và sau 21 ngày nuôi cấy ở người khỏe mạnh và bệnh nhân UTPKTBN,

tỷ lệ tế bào lympho T, NK-T, NK trong quần thể tế bào sau tách chiết từ máu ngoại vi và sau 21 ngày nuôi cấy ở người khỏe mạnh và bệnh nhân UTPKTBN, số lượng tế bào NK sau tách chiết từ máu ngoại vi và sau 21 ngày nuôi cấy ở người khỏe mạnh và bệnh nhân UTPKTBN, sự tăng sinh số lượng tế bào NK sau 21 ngày nuôi cấy ở người khỏe mạnh và bệnh nhân UTPKTBN.

III. KẾT QUẢ

Áp dụng quy trình tách chiết và nuôi cấy hoạt hóa tăng sinh tế bào NK tách từ bệnh nhân UTPKTBN.

Trên nhóm người khỏe mạnh:

Các mẫu của người khỏe mạnh đều cho số lượng và tỷ lệ sống cần thiết để tiến hành nuôi cấy hoạt hoá và tăng sinh. Số lượng tế bào sau tách từ 10ml máu ngoại vi trung bình là $(11,74 \pm 1,50) \times 10^6$ tế bào. Tất cả các mẫu đều đạt tỷ lệ sống của tế bào trên 90%, trung bình là $93,6 \pm 1,52\%$ (bảng 1).

Bảng 1. Số lượng tế bào thu được sau khi tách chiết từ máu ngoại vi và sau 21 ngày nuôi cấy ở người khỏe mạnh và bệnh nhân UTPKTBN

Mã số	Ngày đầu nuôi cấy		Ngày 21 thu hoạch	
	Số lượng tế bào	Tỷ lệ tế bào sống (%)	Số lượng tế bào	Tỷ lệ tế bào sống (%)
KM-01	$12,5 \times 10^6$	92	$1,29 \times 10^9$	74
KM-02	$9,8 \times 10^6$	95	$0,94 \times 10^9$	76
KM-03	$11,4 \times 10^6$	95	$1,36 \times 10^9$	80
KM-04	$11,2 \times 10^6$	94	$1,18 \times 10^9$	83
KM-05	$13,8 \times 10^6$	92	$0,80 \times 10^9$	79
$\bar{X} \pm SD$	$(11,74 \pm 1,5) \times 10^6$	$93,6 \pm 1,52$	$(1,11 \pm 0,24) \times 10^9$	$78,4 \pm 3,5$
BN-01	$9,8 \times 10^6$	94	$9,92 \times 10^8$	86
BN-02	$10,4 \times 10^6$	95	$8,16 \times 10^8$	80
BN-03	$11,3 \times 10^6$	94	$9,28 \times 10^8$	83
BN-04	$9,56 \times 10^6$	94	$10,98 \times 10^8$	74
BN-05	$8,32 \times 10^6$	96	$8,8 \times 10^8$	78
$\bar{X} \pm SD$	$(9,88 \pm 1,10) \times 10^6$	$94,6 \pm 0,90$	$(9,43 \pm 1,08) \times 10^8$	$80,2 \pm 4,6$

Quần thể tế bào thu được sau tách chiết từ máu ngoại vi người khỏe mạnh, chiếm ưu thế là tế bào lympho T, tỷ lệ trung bình là $47,69 \pm 4,94\%$. Tỷ lệ tế bào NK và NK-T lần lượt là $8,28 \pm 2,97\%$ và $1,57 \pm 0,95\%$ (bảng 2).

Bảng 2. Tỷ lệ các loại tế bào miễn dịch trong quần thể tế bào thu được sau tách chiết từ máu ngoại vi và sau 21 ngày nuôi cấy ở người khỏe mạnh và bệnh nhân UTPKTBN

Mã số	Tỷ lệ từng loại tế bào miễn dịch ngày đầu nuôi cấy (%)						Tỷ lệ từng loại tế bào miễn dịch ngày 21 thu hoạch (%)				
	NK	NK-T	T	Tế bào khác			NK	NK-T	T	Tế bào khác	
				B	Mono	BCĐNTT					
KM-01	11,9	1,5	50,24	9,50	6,08	3,10	60,67	16,94	14,28	8,11	
KM-02	4,96	2,24	49,81	10,25	6,56	3,05	61,19	9,54	24,06	5,21	
KM-03	6,09	2,48	53,22	10,97	6,70	2,97	64,56	6,79	16,62	12,03	
KM-04	10,75	0,04	44,04	9,48	6,58	2,78	61,97	14,54	17,27	6,22	
KM-05	7,72	1,6	41,14	11,46	7,10	2,68	62,58	10,67	16,71	10,04	
$\bar{X} \pm SD$	8,28 $\pm 2,97$	1,57 $\pm 0,95$	47,69 $\pm 4,94$	10,33 $\pm 0,88$	6,60 $\pm 0,36$	2,92 $\pm 0,18$	62,19 $\pm 1,51$	11,70 $\pm 4,04$	17,79 $\pm 3,69$	8,32 $\pm 2,78$	
BN-01	5,41	2,31	56,50	11,00	6,59	3,02	60,53	17,60	13,58	8,29	
BN-02	6,90	3,38	57,59	8,91	6,71	2,93	55,93	17,18	14,42	12,47	
BN-03	13,28	3,60	46,82	7,15	6,84	3,32	64,81	7,04	21,86	6,29	
BN-04	6,10	2,76	53,74	9,25	7,21	2,89	59,25	7,87	26,82	6,06	
BN-05	11,77	1,28	47,74	7,25	7,10	3,68	57,29	10,01	20,69	12,01	
$\bar{X} \pm SD$	8,69 $\pm 3,58$	2,67 $\pm 0,93$	52,48 $\pm 4,96$	8,71 $\pm 1,59$	6,89 $\pm 0,26$	3,17 $\pm 0,33$	59,56 $\pm 3,43$	11,94 $\pm 5,09$	19,47 $\pm 5,51$	9,02 $\pm 3,07$	

Số lượng tế bào thu được sau 21 ngày nuôi cấy là $(1,11 \pm 0,24) \times 10^9$ tế bào với tỷ lệ tế bào sống trung bình đạt $78,05 \pm 3,5\%$ (bảng 1).

Trong quần thể tế bào thu được, tế bào NK: $62,19 \pm 1,51\%$, tiếp theo T là $17,88 \pm 3,68\%$, NK-T: $11,70 \pm 4,04\%$ (bảng 2). Số lượng tế bào NK tăng sinh trung bình sau 21 ngày nuôi cấy là $674,93 \pm 309,13$ lần (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả sự tăng sinh số lượng tế bào NK sau 21 ngày nuôi cấy ở người khỏe mạnh và bệnh nhân UTPKTBN

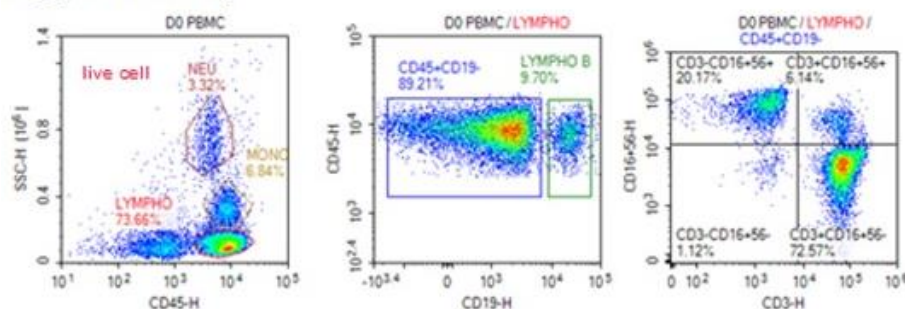
Mã số	Số lượng tế bào NK ngày 0	Số lượng tế bào NK ngày 21	Hệ số nhân lên
KM-01	$1,37 \times 10^6$	$5,79 \times 10^8$	423,20
KM-02	$0,46 \times 10^6$	$4,37 \times 10^8$	946,65
KM-03	$0,66 \times 10^6$	$7,02 \times 10^8$	1064,99
KM-04	$1,13 \times 10^6$	$6,07 \times 10^8$	536,27
KM-05	$0,98 \times 10^6$	$3,96 \times 10^8$	403,52
$\bar{X} \pm SD$	$(0,92 \pm 0,36) \times 10^6$	$(5,44 \pm 1,26) \times 10^8$	$674,93 \pm 309,13$
BN-01	$4,98 \times 10^5$	$5,16 \times 10^8$	1036,17
BN-02	$6,82 \times 10^5$	$3,65 \times 10^8$	535,57
BN-03	$14,1 \times 10^5$	$4,99 \times 10^8$	353,89
BN-04	$5,48 \times 10^5$	$4,81 \times 10^8$	878,23
BN-05	$9,4 \times 10^5$	$3,93 \times 10^8$	418,30
$\bar{X} \pm SD$	$(8,16 \pm 3,74) \times 10^5$	$(4,51 \pm 0,68) \times 10^8$	$644,43 \pm 298,12$

Trên bệnh nhân UTPKTBN:

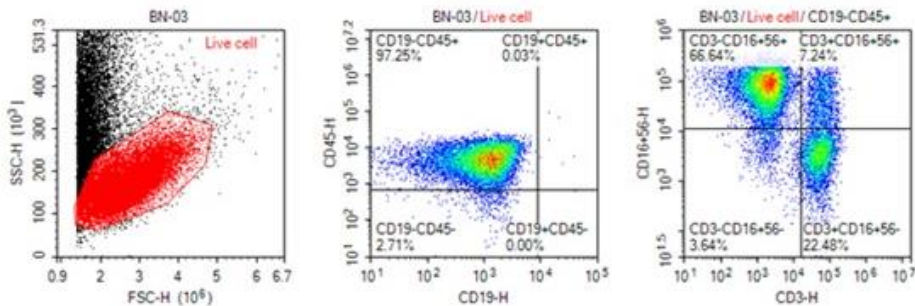
Số lượng tế bào tách được từ 10 ml máu ngoại vi ở bệnh nhân UTPKTBN trung bình là $(9,88 \pm 1,10) \times 10^6$ với tỷ lệ sống là $94,6 \pm 0,90\%$. Không có sự khác biệt về số lượng tế bào tách được từ máu ngoại vi và tỷ lệ tế bào sống giữa nhóm người khỏe mạnh và nhóm bệnh nhân (tương ứng với p lần lượt là 0,058 và 0,248) (bảng 1).

Quần thể tế bào thu được sau tách chiết từ máu ngoại vi bệnh nhân, chiếm ưu thế là tế bào lympho T, tỷ lệ trung bình là $53,48 \pm 4,96\%$. Tỷ lệ tế bào NK và NK-T lần lượt là $8,69 \pm 3,58\%$, và $2,67 \pm 0,93\%$ (bảng 2, hình 1).

Ngày đầu nuôi cấy



Ngày 21 thu hoạch



Hình 1. Kết quả minh họa phân tích tỷ lệ tế bào miễn dịch sau tách chiết từ máu ngoại vi và sau 21 ngày nuôi cấy ở mẫu BN-03

Số lượng tế bào thu được sau 21 ngày nuôi cấy và hoạt hóa là $(9,43 \pm 1,08) \times 10^8$ tế bào và tỷ lệ tế bào sống trung bình $80,2 \pm 4,6\%$, không có sự khác biệt số lượng tế bào và tỷ lệ tế bào sống với nhóm khỏe mạnh (lần lượt tương ứng $p = 0,196$, $p = 0,508$ (bảng 1).

Trong quần thể tế bào thu được, tế bào NK: $59,56 \pm 3,43\%$, tiếp theo là tỷ lệ T: $19,47 \pm 5,51\%$ tế bào NK-T: $11,94 \pm 5,09\%$ (bảng 2, hình 1). Số lượng tế bào NK tăng sinh trung bình $644,43 \pm 298,12$ lần, không có sự khác biệt so với nhóm người khỏe mạnh ($p = 0,878$) (bảng 3).

IV. BÀN LUẬN

Số lượng tế bào bạch cầu tách được từ 10 ml máu ngoại vi ở người tình nguyện khỏe mạnh trung bình là $(11,7 \pm 1,50) \times 10^6$ tế bào. Tất cả các mẫu đều đạt tỷ lệ sống của tế bào trên 90%, với tỷ lệ sống trung bình đạt $93,6 \pm 1,52\%$. Kết quả này tương tự như các kết quả trong các nghiên cứu khác với số lượng tế bào thu được sau khi tách chiết từ 10 mL máu ngoại vi người khỏe mạnh là $1,16-1,58 \times 10^6$ tế bào/ml và tỷ lệ tế bào sống trung bình khoảng $94,5 \pm 1,7\%$.⁹ Kết quả trên đã đạt yêu cầu chất lượng tế bào thu được sau tách chiết từ máu ngoại vi người bình thường: Số lượng $\geq 5 \times 10^6$ tế bào, tỷ lệ sống $\geq 90\%$, đảm bảo yêu cầu cho giai đoạn nuôi cấy hoạt hóa tiếp theo.

Quần thể tế bào thu được sau tách chiết từ máu ngoại vi người tình nguyện khỏe mạnh gồm các tế bào miễn dịch nhiều nhất là lympho

T, tỷ lệ trung bình là $47,69 \pm 4,94\%$, tiếp theo lympho B là $10,33 \pm 0,88\%$, tế bào NK là $8,28 \pm 2,97\%$, bạch cầu mono và đa nhân trung tính lần lượt là $6,60 \pm 0,36\%$ và $2,92 \pm 0,18\%$. Kết quả có tỷ lệ B, NK, mono tương đồng và tỷ lệ tế bào T thấp hơn so với nghiên cứu của Hendrika W Grievink (2016): tỷ lệ tế bào T là 65% – 70%, tế bào B (5% – 22%), NK (5% – 14%) và mono (4% – 12%).⁹ Ngoài ra, nghiên cứu cho kết quả số lượng tế bào NK sau khi tách từ 10ml máu ngoại vi trung bình là $(0,92 \pm 0,36) \times 10^6$ tế bào, tương tự với nghiên cứu của Granzin, trung bình $1,5 \times 10^6$ tế bào NK sau tách từ 20ml máu ngoại vi.¹⁰

Hiện tại có 2 phương pháp nuôi cấy NK từ tế bào đơn nhân tách từ máu ngoại vi (PBMC) được sử dụng (theo bảng 4) là:

Bảng 4. Các nghiên cứu nuôi cấy NK từ PBMC theo các phương pháp khác nhau

Nghiên cứu	Quần thể bắt đầu nuôi	Tế bào trung chuyển	Sự tăng sinh NK (Số lần/ số ngày)	Độ tinh khiết NK
Carlens ¹²	PBMC	Không	193 (21 - 277) lần/ 21 ngày	55% (7 - 92%)
Alici ²⁰	PBMC	Không (nhưng dùng anti- CD3 OKT3)	1625 (502 - 2658) lần/ 20 ngày	65%
Imai ¹⁴	PBMC	K562-mb15-41BBL	309-12409 lần/ 21 ngày	76% - 98%
Lapteva ¹⁵	PBMC	K562-mb15-41BBL	175 (39-255) lần/ 8 ngày	70 ± 11%
Koehl ¹¹	Bỏ CD3+/ chọn CD56+ từ PBMC	Không	5 lần/ 12 ngày	95%
Berg ¹⁷	Bỏ CD3+/ chọn CD56+ từ PBMC	EBV-LCL	300-930 lần/ 15 ngày	98%
Parkhurst ¹⁶	Bỏ CD3+ từ PBMC	PBMC chiếu xạ	278-1097 lần/ 21-26 ngày	91%-97%

Bằng các cytokine (riêng rẽ hoặc kết hợp) như IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, không có tế bào trung chuyển (feeder cell): sự tăng sinh tế bào NK không lớn và tế bào T, NK-T có tỷ lệ cao trong quần thể tế bào thu hoạch.^{11,12}

Bằng cách sử dụng tế bào trung chuyển, hay được sử dụng nhất là PBMC được chiếu xạ, EBV-LCL (Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines), K562 được biến đổi gen biểu hiện các phân tử kích thích tế bào NK như phối tử 4-1BBL và IL-15 liên kết màng (K562-mbIL15-41BLL) và các dòng tế bào khối u được chiếu xạ. Sự tăng sinh tế bào NK dùng cytokine và tế bào trung chuyển mạnh mẽ hơn so với dùng cytokine, không có tế bào trung chuyển. Theo nghiên cứu của Granzin, nuôi

cấy NK tinh khiết khi thêm EBV-LCL trong 2 tuần dẫn đến số lượng tế bào NK tăng gấp 850 ± 509 lần, trong khi không có EBV-LCL, chỉ với môi trường chứa IL-2, chỉ đạt được sự tăng sinh 14 ± 13 lần.¹³⁻¹⁷ Các phương pháp nuôi cấy tế bào NK khác nhau cho sự khác nhau giữa số lượng NK tăng sinh, sự "tinh khiết" của NK trong quần thể, kiểu hình, chức năng, mức độ biểu hiện các thụ thể kích thích, thụ thể ức chế, thụ thể chemokine, khả năng kích hoạt cytokine, độc tính tế bào với khối u

và sự tồn tại trong cơ thể sống của NK, về mặt lý thuyết điều này có thể có tác động đến hiệu quả điều trị sau khi tiêm truyền.⁷ Bởi vì tế bào T cũng sẽ tăng sinh trong các điều kiện nuôi cấy NK, loại bỏ tế bào CD3⁺, chọn lọc CD56⁺ từ PBMC ngay trước khi bắt đầu nuôi cấy đã được sử dụng để thu được quần thể tế bào NK số lượng lớn và tinh khiết cao.^{7,13} Các nghiên cứu trên thế giới theo đuổi các phương pháp tăng sinh tế bào NK có độ tinh khiết cao để có thể xác định hiệu quả và độc tính sản phẩm được truyền là do chính tế bào NK gây ra, và quan trọng hơn là mong muốn sản xuất tế bào NK số lượng lớn từ việc lấy NK từ các nguồn khác nhau (bệnh nhân (tự thân), hoặc các thành viên gia đình phù hợp MHC-I hoặc thậm chí người hiến tặng không liên quan đến bệnh nhân). Sản phẩm thu được yêu cầu độ tinh khiết NK cao.^{7,11,13,18} Ví dụ, truyền tế bào NK được cung cấp từ những người hiến tặng có MHC không phù hợp cần hạn chế “ô nhiễm” số tế bào T/kg < $1-5 \times 10^5$ để tránh hiện tượng ghép chống chủ (graft-versus-host disease – GVHD).¹⁹

Kết quả nghiên cứu trên nhóm người khỏe mạnh, sau 21 ngày nuôi cấy và hoạt hóa tăng sinh, số lượng tế bào thu được ($11,1 \pm 2,4$) $\times 10^8$ tế bào và tỷ lệ tế bào sống trung bình là $78,05 \pm 3,50\%$. Quần thể tế bào gồm tế bào NK chiếm tỷ lệ chủ yếu là $62,19 \pm 1,51\%$, NK-T: $11,70 \pm 4,04\%$, T: $17,8 \pm 3,68\%$. Giải thích cho kết quả này là phương pháp nuôi cấy NK chúng tôi thực hiện, chỉ dùng cytokine (IL-2, IL-12, IL-18), không có loại bỏ tế bào CD3⁺, chọn lọc CD56⁺ từ PBMC ngay trước khi bắt đầu nuôi cấy tế bào, nên độ tinh khiết của NK chỉ khoảng 62%, tỷ lệ tế bào T và NK-T trong quần thể còn cao. Tỷ lệ các loại tế bào miễn dịch trong các mẫu thu khá tương đồng với các nghiên cứu cũng chỉ tăng sinh NK bằng cytokine trên thế giới.^{12,20} Mặt khác, nghiên cứu này áp dụng cho

việc sử dụng liệu pháp tăng cường tế bào miễn dịch tự thân, tức là tách PBMC từ chính máu ngoại vi của bệnh nhân để nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh rồi truyền trở lại cho bệnh nhân đó, thì quần thể có cả NK-T và T cũng không gây ra GVHD. Không những thế, tế bào T và NK-T cũng được chứng minh có vai trò trong diệt tế bào u, sự hiệp đồng giữa NK và T kháng ung thư do sự biểu hiện bất thường MHC lớp I của tế bào u cho thấy sự có lợi của liệu pháp AIET kết hợp giữa tế bào T và NK. Các thử nghiệm lâm sàng về kết hợp giữa truyền tế bào T và NK tự thân đã cho kết quả tích cực được báo cáo ở Ấn Độ, Nhật Bản, Trung Quốc, Việt Nam.⁴

Nghiên cứu cho kết quả sau 21 ngày nuôi cấy PBMC lấy từ 10ml máu ngoại vi người khỏe mạnh, NK tăng sinh trung bình $674,93 \pm 309,13$ lần, với số lượng tế bào NK tuyệt đối là $(5,44 \pm 1,26) \times 10^8$, cho thấy khả năng tăng sinh tốt của tế bào NK trong môi trường nuôi cấy, đáp ứng số lượng NK để thử nghiệm lâm sàng.

Với những kết quả thu được trên mẫu người tình nguyện, quy trình tách chiết, nuôi cấy hoạt hóa tế bào NK từ máu ngoại vi được áp dụng trên bệnh nhân UTPKTBN. Số lượng tế bào bạch cầu tách được từ 10 ml máu ngoại vi ở bệnh nhân UTPKTBN trung bình là $(9,88 \pm 1,10) \times 10^6$, tỷ lệ sống $94,6 \pm 0,90\%$. Sau 21 ngày nuôi cấy, số lượng tế bào thu được là $(9,43 \pm 1,08) \times 10^8$, tỷ lệ sống $80,2 \pm 4,6\%$. Số lượng NK ngày thu là $(4,51 \pm 0,68) \times 10^8$ tế bào, số lượng tế bào NK tăng trung bình $644,43 \pm 298,12$ lần. Kết quả nuôi cấy tế bào NK giữa 2 nhóm bệnh và nhóm người khỏe mạnh không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, tương tự với nghiên cứu của Richard W.⁷

Hiện tại chưa có ngưỡng số lượng tế bào NK cần truyền để đạt được hiệu quả chống khối u^{4,7} Theo Richard W., trong thử nghiệm lâm sàng giai đoạn 1 điều tra tính an toàn và hiệu quả của việc truyền tế bào NK tự thân

tăng sinh ex vivo, họ dùng liều đầu là 1×10^8 tế bào NK/kg vào ngày 0 và liều thứ hai từ $1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ tế bào NK/kg vào ngày 5, thực hiện 78 lần truyền cho 26 bệnh nhân ở các loại ung thư khác nhau, thì 76/78 trường hợp dung nạp tốt (1 trường hợp bị viêm tuyến giáp và 1 trường hợp xuất hiện tình trạng thiếu oxy thoáng qua sau khi truyền $2,5 \times 10^8$ tế bào NK/kg vào ngày 5).⁷ Theo Granzin M, họ thu hoạch số lượng NK trung bình là $1,3 \times 10^9$ tế bào, dùng liều $1 \times 10^7 - 2 \times 10^7$ tế bào NK/kg trong thử nghiệm lâm sàng giai đoạn và nhận thấy không có tác dụng phụ, họ tiếp tục tăng liều thử nghiệm là $1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ tế bào NK/kg.¹⁰ Iliopoulou thực hiện thử nghiệm pha I trên 15 bệnh nhân UTPKTBN, mỗi bệnh nhân từ 2 - 4 lần truyền với liều $0,2 - 29 \times 10^6$ tế bào NK/kg, cho các kết quả đều an toàn.⁵

Nhóm nghiên cứu chúng tôi khi thử nghiệm lâm sàng pha I, lấy 30ml máu ngoại vi để tách lấy PBMC nuôi cấy. Số lượng tế bào NK sau tách từ 30 ml máu ngoại vi ước tính 2×10^6 tế bào NK. Giai đoạn ban đầu chỉ cần 10^6 tế bào NK là đủ để nuôi cấy hoạt hóa và tế bào cần được để yên, không rung lắc hay di chuyển chai nuôi cấy tế bào trong giai đoạn này, để giữ "sự tương tác" giữa các tế bào NK. Giai đoạn tăng sinh, thường sau ngày thứ 7, chuyển từ môi trường hoạt hóa sang môi trường tăng sinh, mật độ nuôi cấy cao hơn và tế bào nên được trộn nhẹ nhàng. Việc nuôi cấy tế bào NK thường được duy trì từ 14 đến 28 ngày và yêu cầu thêm môi trường để làm mới cytokine, đảm bảo rằng tế bào NK được duy trì ở mức nồng độ tối ưu hóa sự phát triển và khả năng tồn tại của chúng.¹⁰ Chúng tôi nuôi cấy trong 21 ngày, để đảm bảo số lượng tế bào thu hoạch truyền cho bệnh nhân 50 kg - 70 kg thì ước tính liều truyền sẽ gồm $2,7 \times 10^7$ tế bào NK/kg, $0,9 \times 10^7$ tế bào T/kg, $0,55 \times 10^7$ tế bào NK - T/kg.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã áp dụng quy trình tách chiết và nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh tế bào NK tách từ bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ. Tế bào thu được sau nuôi cấy đảm bảo đủ số lượng, chất lượng cho thử nghiệm lâm sàng pha I.

LỜI CẢM ƠN

Kết quả của nghiên cứu này thuộc đề tài cấp nhà nước "Nghiên cứu sử dụng tế bào miễn dịch tự thân gamma deltaT ($\gamma\delta$ T) và diệt tự nhiên (NK) trong điều trị ung thư phổi" (7/2018-12/2020) do Trường Đại học Y Hà Nội chủ trì, PGS.TS Trần Huy Thịnh làm chủ nhiệm đề tài. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492.
2. 704-viet-nam-fact-sheets.pdf. Accessed July 1, 2020. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/704-viet-nam-fact-sheets.pdf>.
3. Khoa MT. Kháng thể đơn dòng và phân tử nhỏ trong điều trị bệnh ung thư. *Nhà xuất bản Y học*. Published online 2016.
4. Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cellular & Molecular Immunology*. 2013;10(3):230-252. doi:10.1038/cmi.2013.10.
5. Iliopoulou EG, Kountourakis P, Karamouzis MV, et al. A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(12):1781-1789.

doi:10.1007/s00262-010-0904-3.

6. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Reviews*. 2006;20(3):123-137. doi:10.1016/j.blre.2005.10.001.

7. Childs RW, Berg M. Bringing natural killer cells to the clinic: ex vivo manipulation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013(1):234-246. doi:10.1182/asheducation-2013.1.234.

8. Poznanski SM, Lee AJ, Nham T, et al. Combined Stimulation with Interleukin-18 and Interleukin-12 Potently Induces Interleukin-8 Production by Natural Killer Cells. *JIN*. 2017;9(5):511-525. doi:10.1159/000477172.

9. Grievink HW, Luisman T, Klufft C, Moerland M, Malone KE. Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. *Biopreserv Biobank*. 2016;14(5):410-415. doi:10.1089/bio.2015.0104.

10. Granzin M, Soltenborn S, Müller S, et al. Fully automated expansion and activation of clinical-grade natural killer cells for adoptive immunotherapy. *Cytotherapy*. 2015;17(5):621-632. doi:10.1016/j.jcyt.2015.03.611.

11. Koehl U, Sörensen J, Esser R, et al. IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2004;33(3):261-266. doi:10.1016/j.bcmd.2004.08.013.

12. Carlens S, Gilljam M, Chambers BJ, et al. A new method for in vitro expansion of cytotoxic human CD3⁺CD56⁺ natural killer cells. *Human Immunology*. 2001;62(10):1092-1098. doi:10.1016/S0198-8859(01)00313-5.

13. Berg M, Childs R. Ex-vivo expansion of NK cells: What is the priority - high yield or high

purity? *Cytotherapy*. 2010;12(8):969-970. doi:10.3109/14653249.2010.536216.

14. Imai C, Iwamoto S, Campana D. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood*. 2005;106(1):376-383. doi:10.1182/blood-2004-12-4797.

15. Lapteva N, Duret Ag, Sun J, et al. Large-scale ex vivo expansion and characterization of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy*. 2012;14(9):1131-1143. doi:10.3109/14653249.2012.700767.

16. Parkhurst MR, Riley JP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive Transfer of Autologous Natural Killer Cells Leads to High Levels of Circulating Natural Killer Cells but Does Not Mediate Tumor Regression. *Clin Cancer Res*. 2011;17(19):6287-6297. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1347.

17. Berg M, Lundqvist A, Jr PM, et al. Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells. *Cytotherapy*. 2009;11(3):341-355. doi:10.1080/14653240902807034.

18. Siegler U, Meyer-Monard S, Jörgen S, et al. Good manufacturing practice-compliant cell sorting and large-scale expansion of single KIR-positive alloreactive human natural killer cells for multiple infusions to leukemia patients. *Cytotherapy*. 2010;12(6):750-763. doi:10.3109/14653241003786155.

19. Curti A, Ruggeri L, D'Addio A, et al. Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood*. 2011;118(12):3273-3279. doi:10.1182/blood-2011-01-329508.

20. Alici E, Sutlu T, Björkstrand B, et al. Autologous antitumor activity by NK cells expanded from myeloma patients using GMP-compliant components. *Blood*. 2008;111(6):3155-3162.doi:10.1182/blood-2007-09-110312.

Summary

ACTIVATION CULTURE AND PROLIFERATION OF NATURAL KILLER CELLS FROM NON-SMALL CELL LUNG CANCER PATIENTS

Autologous natural-killer -cell (NK cell)-based immunotherapy has been an efficacious and safe treatment method for various types of cancer, including lung cancer. The purpose of this study was to apply the process of extraction, activation, and proliferation of NK cells in non-small cell lung cancer in patients (NSCLC). The study was conducted on five healthy volunteers and five NSCLC patients. NK cells were isolated, activated, proliferated, and evaluated from 10 ml of blood sample of each participant. Among the five healthy volunteers, the number of NK cells isolated from 10 ml of peripheral blood was $(11.74 \pm 1.50) \times 10^6$ cells, and the cell survival rate was $93.6 \pm 1.52\%$. The number of cells after 21-day culture was $(11.1 \pm 2.4) \times 10^8$, the cell survival rate was $78.05 \pm 3.5\%$, and the survival rate of NK cells was $62.19 \pm 1.51\%$; the number of NK cells increased 674.93 ± 309.13 times. Among the five NSCLC patients, the number of NK cells isolated from 10 ml peripheral blood was $(9.88 \pm 1.10) \times 10^6$ cells, and the cell survival rate was $94.6 \pm 0.89\%$. The number of cells after 21-day culture was $(9.43 \pm 1.08) \times 10^8$, the cell survival rate was $78.05 \pm 3.5\%$, and the survival rate of NK cells was $59.56 \pm 3.43\%$; the number of NK cells increased 644.43 ± 298.12 times. There was no difference between the healthy group and the NSCLC group in the increase in the number of NK cells ($p = 0.878$).

Keywords: Autologous NK-cell-based immunotherapy, NK cells, non-small cell lung cancer in patients (NSCLC).