

PHÂN LẬP TẾ BÀO UNG THƯ TỪ KHỐI U VÀ DỊCH Ổ BỤNG CỦA BỆNH NHÂN UNG THƯ BIỂU MÔ BUỒNG TRỨNG

Nguyễn Thùy Linh^{1,✉}, Nguyễn Văn Đô¹, Trần Ngọc Dũng²
Nguyễn Lĩnh Toàn³, Ngô Thu Hằng³, Đặng Thành Chung²

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Quân y 103

³Học viện Quân y

Nghiên cứu thực nghiệm 50 mẫu bệnh phẩm từ mẫu u và dịch ổ bụng của bệnh nhân ung thư biểu mô buồng trứng tại Bệnh viện K - Tân Triều và Bệnh viện Quân y 103 từ tháng 12/2019 đến tháng 3/2021 để phân lập, tăng sinh tạo dòng tế bào ung thư từ người. Kết quả: 100% các mẫu phân lập đều bám đáy, trong đó 28% mẫu có tế bào u phát triển với mật độ tế bào đạt >80% diện tích đĩa nuôi cấy, Thời gian trung bình tách tế bào lần đầu là $11,46 \pm 8,07$ ngày, số lần tách trung bình là $2 \pm 1,5$. Có 8 mẫu phát triển tốt sau tăng sinh chiếm 16% và đều là ung thư biểu mô typ thanh dịch, độ cao. Các tế bào u bị chết khi phân lập do các nguyên nhân: mẫu bệnh phẩm ít tế bào u chiếm 44,7%, tế bào u tự thoái triển chiếm 26,3% và nhiễm khuẩn hoặc nhiễm nấm chiếm 21,1%. Khi làm tế bào dòng chảy (flow cytometry), tỷ lệ trung bình tế bào u sau phân lập bắt màu CD46 là 72,65%. Kết luận: nghiên cứu đã thành công trong việc phân lập, tăng sinh được tế bào ung thư biểu mô buồng trứng từ bệnh nhân và typ thanh dịch độ cao có sự tăng sinh tốt hơn các typ khác.

Từ khóa: Phân lập tế bào, ung thư biểu mô buồng trứng.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư buồng trứng là loại ung thư có độ ác tính cao ở nữ giới với tỷ mắc và tỷ lệ tử vong theo GLOBOCAN năm 2020 tương ứng là 3,4% (trong tổng số 9,2 triệu ca mới mắc) và 4,7% (trong tổng số 4,4 triệu ca tử vong do ung thư).¹ Ung thư buồng trứng chỉ chiếm 2,5% trong tổng số các ca ung thư ở phụ nữ nhưng chiếm 5% nguyên nhân tử vong do ung thư ở nữ giới với tỷ lệ sống thêm toàn bộ của bệnh nhân ung thư buồng trứng là 42,6%. Nguyên nhân lớn nhất được ghi nhận là do có 4/5 bệnh nhân ung thư buồng trứng khi được chẩn đoán đã ở giai đoạn tiến triển với sự xâm lấn lan tràn của khối u trong ổ bụng. Nếu bệnh nhân được

chẩn đoán ở giai đoạn sớm (khối u phát triển tại chỗ trong buồng trứng) thì 90% sống thêm sau 5 năm, ngược lại nếu ở giai đoạn tiến triển thì tỷ lệ sống thêm 5 năm chỉ 29%.² Bệnh nhân ung thư biểu mô buồng trứng ở giai đoạn tiến triển đáp ứng với liệu pháp dựa trên Taxane và Platinum còn hạn chế. Hơn nữa, do thiếu các công cụ chẩn đoán và tiên lượng hiệu quả làm cho ung thư buồng trứng trở nên khó quản lý và hầu hết bệnh nhân đều phát triển khối u kháng hóa trị và tái phát.³

Các nghiên cứu hình thái học và di truyền phân tử đã cho thấy rằng ung thư buồng trứng là một bệnh không đồng nhất bao gồm rất nhiều loại ung thư biểu mô khác nhau và mỗi loại có nguồn gốc phát sinh, tiến triển và tiên lượng khác nhau.^{3,4} Những bất thường liên quan đến kiểu hình ác tính và cơ chế phát triển của khối ung thư buồng trứng chưa được hiểu biết rõ ràng. Bên cạnh đó, các thử nghiệm trong ống

Tác giả liên hệ: Nguyễn Thùy Linh

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: bsnguyenthuylinhc6@gmail.com

Ngày nhận: 10/11/2021

Ngày được chấp nhận: 08/12/2021

nghiệm hiện nay đang gặp những khó khăn nhất định bởi hạn chế số lượng các dòng tế ung thư buồng trứng và sự không đồng nhất của quần thể tế bào có nguồn gốc từ khối u hoặc dịch ổ bụng. Do vậy việc phân lập, tăng sinh nhằm tạo ra dòng tế bào ung thư từ bệnh nhân sử dụng cho nghiên cứu di truyền, cơ chế bệnh sinh ung thư và đánh giá tác dụng điều trị của các liệu pháp là hết sức cần thiết.⁵ Nghiên cứu của chúng tôi tiến hành nhằm mục tiêu phân lập, tăng sinh tế bào u từ khối u và dịch ổ bụng của bệnh nhân ung thư biểu mô buồng trứng để cung cấp nguyên liệu cho các nghiên cứu về tế bào ung thư.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

46 mẫu bệnh phẩm từ khối u và 4 mẫu dịch di căn ổ bụng của bệnh nhân ung thư biểu mô buồng trứng tại Bệnh viện K - Tân Triều và Bệnh viện Quân y 103 trong thời gian tháng 12 năm 2019 đến tháng 3 năm 2021.

Tiêu chuẩn lựa chọn

- Bệnh nhân được chẩn đoán ung thư biểu mô buồng trứng và chưa điều trị bằng hóa trị và/hoặc xạ trị trước phẫu thuật. Có đầy đủ thông tin lâm sàng và cận lâm sàng chẩn đoán bệnh. Lượng mẫu đủ để phân lập và làm xét nghiệm giải phẫu bệnh.

- Bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ

- Bệnh nhân ung thư buồng trứng tái phát hoặc thứ phát, bệnh nhân được chẩn đoán ung thư biểu mô buồng trứng không phải loại biểu mô. Bệnh nhân được hóa, xạ trị tiền phẫu.

- Bệnh nhân không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2. Phương pháp

Nghiên cứu thực nghiệm, chọn mẫu có chủ đích.

Các bước tiến hành

- Tiến hành lấy mẫu bệnh phẩm, sau đó mẫu được tiến hành xử lý và phân lập trong phòng nuôi cấy tế bào đạt chuẩn của Khoa Sinh lý bệnh - Học viện Quân y. Các bệnh phẩm lấy từ bệnh nhân để phân lập phải bảo đảm yếu tố vô trùng tuyệt đối. Các mẫu khối u (kích thước tối thiểu 2 x 2 cm) được lấy ngay trong quá trình phẫu thuật, đựng trong ống Falcon 50ml vô trùng có nắp. Với dịch ổ bụng, bệnh nhân được đưa vào phòng tiểu thủ thuật và có trải băng, sát trùng kỹ trước khi chọc hút dịch. Dịch ổ bụng (lấy tối thiểu 20ml) được đựng trong các ống xét nghiệm vô trùng có chứa chống đông EDTA để đảm bảo dịch không bị đông khi có lẫn máu và các tế bào u không bị kết dính sau khi lấy ra. Mẫu bệnh phẩm sau khi lấy ra khỏi cơ thể được đưa ngay đến labo nuôi cấy tế bào để tiến hành xử lý mẫu và phân lập mẫu. Bệnh phẩm lấy từ khối u được rửa sạch bằng dung dịch đệm PBS 1X, sau đó cắt lấy khoảng 1 gam u, cắt thật nhỏ và nhẹ tay bằng dao mổ để các tế bào u dễ tách ra và phát triển trong môi trường nuôi cấy. Với các mẫu dịch ổ bụng, tiến hành ly tâm để thu cặn tế bào và rửa sạch bằng PBS 1X rồi đưa vào đĩa nuôi có môi trường nuôi cấy. Một phần mẫu u còn lại và cặn tế bào sau ly tâm được chuyển đúc cắt nhuộm với Hematoxylin – Eosin và hóa mô miễn dịch để xác định typ mô bệnh học của ung thư biểu mô buồng trứng theo phân loại của WHO (2014).⁶

- Theo dõi mẫu hàng ngày để thay môi trường nuôi cấy, ghi chép các mốc thời gian tế bào u bám đáy, tăng sinh, thoái triển, tỷ lệ tế bào u bám đáy và sự phát triển của tế bào trong các đĩa nuôi cấy, số ngày tách mẫu lần 1, lần 2, lần 3..., đánh giá các lý do mẫu phân lập phát triển tốt và bị thoái triển, ghi lại hình thái tế bào.

- Đánh giá tỉ lệ biểu lộ thụ thể CD46 có trên màng tế bào u sau phân lập bằng kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy với 33 mẫu tế bào sau phân

lập có số lượng tế bào lớn hơn $10^6/ml$.

3. Xử lý số liệu

Tất cả số liệu được xử lý theo phương pháp toán thống kê y học, nhập và xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS 20.0.

III. KẾT QUẢ

1. Kết quả về phân lập tế bào ung thư từ bệnh nhân ung thư buồng trứng

50 mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân ung thư buồng trứng chủ yếu là lấy từ mẫu mô tươi của khối u buồng trứng (chiếm 92%) và có 4 mẫu (chiếm 8%) được lấy từ dịch ổ bụng của bệnh

4. Đạo đức nghiên cứu

Đề tài đã được thông qua Hội đồng đạo đức Đại học Y Hà Nội: Giấy chứng nhận chấp thuận khía cạnh đạo đức số 125/GCN-HĐĐĐNCYSH-ĐHYHN ngày 15/07/20201.

nhân. Chẩn đoán giải phẫu bệnh phân typ mô bệnh học ung thư biểu mô buồng trứng cho thấy có 74% thuộc typ thanh dịch, 12% typ nhày, 8% typ tế bào sáng và tỷ lệ rất nhỏ là typ dạng nội mạc tử cung hoặc typ thần kinh nội tiết.

Bảng 1. Phân bố sự phát triển của các mẫu tế bào ung thư được phân lập

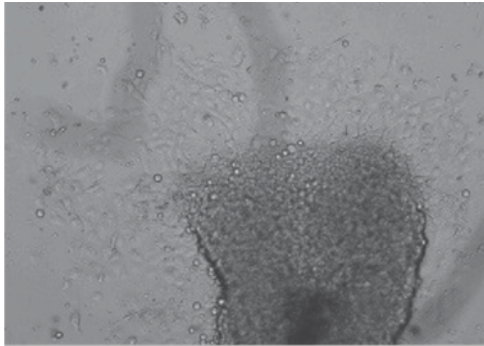
Đặc điểm	Số lượng	Tỷ lệ %
Tế bào u phát triển tốt	8	16
Tế bào u phát triển kém sau tách mẫu	4	8
Tế bào u chết	38	76
Tổng	50	100

Chỉ có 16% tế bào u phát triển tốt trong môi trường nuôi còn hầu hết các mẫu có tế bào u phát triển chậm hoặc chết trong quá trình phân lập.

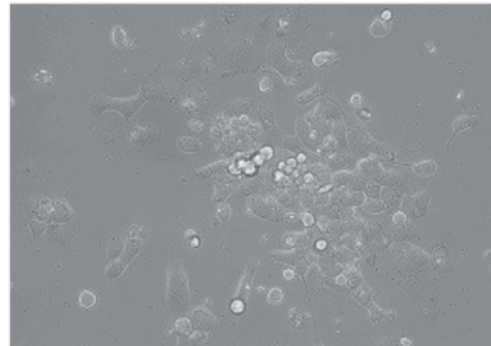
Bảng 2. Thống kê thời gian phân lập theo tỷ lệ tế bào phát triển của tế bào ung thư trên đĩa nuôi cấy

Tỷ lệ tế bào u phát triển	Số lượng	Tỷ lệ %	Thời gian trung bình (ngày)
Bám đáy	50	100	$2.84 \pm 1,75$
10% - 40%	40	80	$6,3 \pm 6,1$
50% - 70%	23	46	$7,48 \pm 3,69$
> 80%	14	28	$10,07 \pm 3,02$

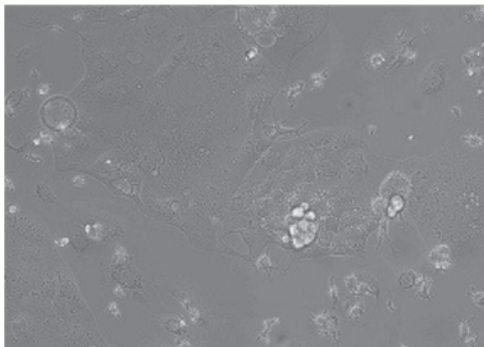
Tất cả các mẫu phân lập đều bám đáy, nhưng chỉ có 28% là tế bào u phát triển kín đáy với mật độ tế bào đạt trên 80% diện tích đĩa nuôi cấy.



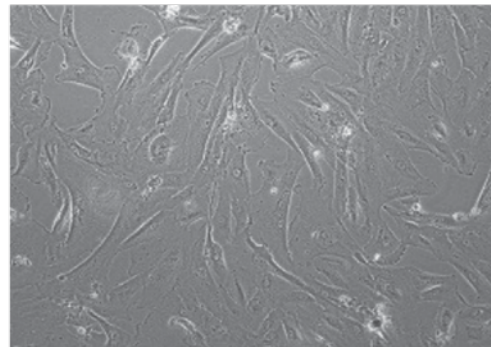
A. Tế bào u bám đáy (M29)



C. Tế bào u bám đáy 10% - 40% (M33)



F. Tế bào u bám đáy 50% - 70% (M31)



H. Tế bào u bám đáy > 80% (M16)

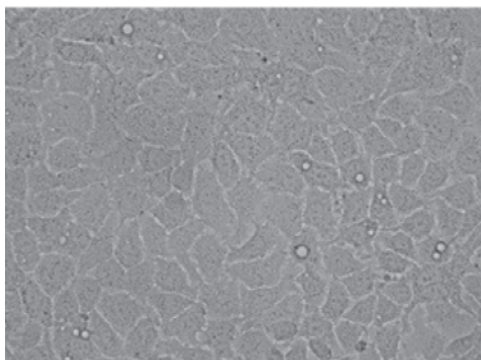
Hình 1. Tế bào u bám đáy và phát triển trong quá trình nuôi cấy**Bảng 3. Đặc điểm của tế bào ung thư trong môi trường nuôi cấy sau tách mẫu**

Đặc điểm	Số lượng	Tỷ lệ %
Số ngày trung bình tách mẫu lần 1	11,46 ± 8,07	
Số lần tách trung bình	2 ± 1,5	
Tế bào u tăng sinh sau tách mẫu lần 1	Tốt	10 / 20
	Chậm và tự thoái triển	4 / 8
Tế bào u tăng sinh sau nhiều lần tách mẫu	Tốt	8 / 16
	Chậm và tự thoái triển	6 / 12

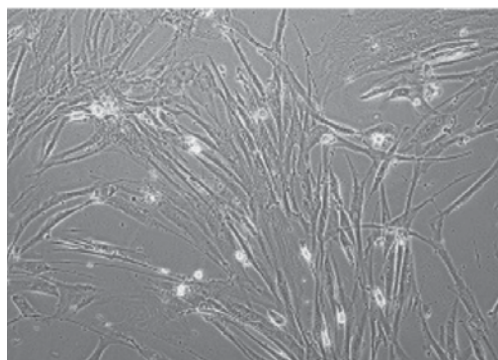
Khi tế bào u phát triển tốt, tiến hành tách sang các đĩa mới để tăng sinh tế bào u với thời gian trung bình tách mẫu lần đầu là 11,46 ± 8,07 ngày và số lần tách trung bình là 2 ± 1,5. Sau các lần tách mẫu thì chỉ có 8 mẫu phát triển

tốt, còn lại là mẫu bị thoái triển.

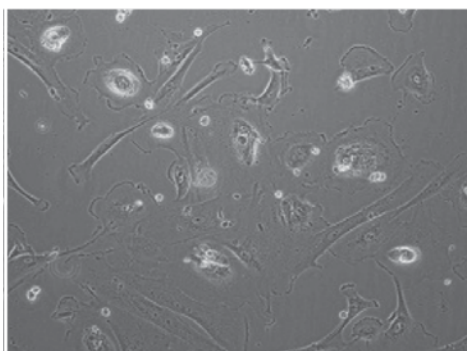
Các tế bào được phân lập có ba hình thái chính là dạng biểu mô chiếm 46%, dạng nguyên bào sợi chiếm 42% và loại hỗn hợp là gồm cả hai hình thái trên, chiếm 12%.



A. Tế bào u dạng biểu mô có hình đa diện và đồng dạng (M4)



B. Tế bào u dạng nguyên bào sợi có hình thoi dài (M23)

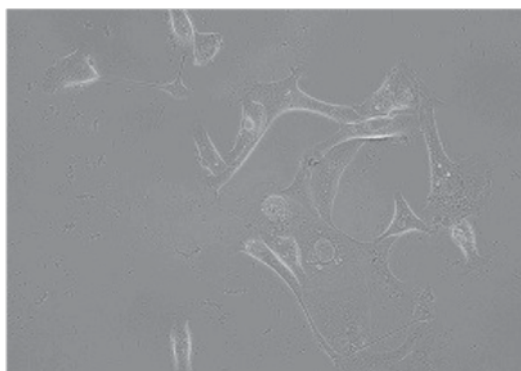


C. Tế bào u gồm hai loại hình dạng biểu mô và dạng nguyên bào sợi (M37)

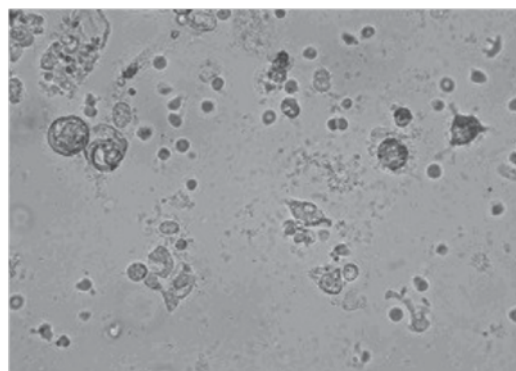
Hình 2. Các hình thái tế bào u phát triển trong môi trường nuôi cấy

Các tế bào u khi phân lập bị chết do mẫu bệnh phẩm ít tế bào chiếm 44,7%, do tế bào u tự thoái triển khi phân lập là 26,3%, do mẫu bệnh phẩm bị nhiễm vi khuẩn hoặc nấm ngay khi đưa

vào môi trường hoặc trong quá trình phân lập chiếm 21,1%. Nguyên nhân do rửa mẫu sớm khi tế bào u chưa bám đáy ít (khi tế bào u bám đáy < 10% diện tích đĩa nuôi) chiếm 7,9%.



A. Mẫu bị nhiễm khuẩn trong quá trình phân lập (M67)



B. Mẫu tế bào phân lập tự thoái triển (M19)

Hình 3. Các nguyên nhân gây chết tế bào u trong quá trình nuôi cấy, phân lập

2. Kết quả đếm tế bào ung thư biểu mô buồng trứng biểu lộ với dấu ấn CD46 bằng kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy

Bảng 4. Kết quả đếm tế bào ung thư buồng trứng được phân lập với dấu ấn CD46 bằng đếm tế bào dòng chảy

Nhóm	Đặc điểm	Số lượng	Tỷ lệ %
Nhóm không nhuộm CD46 (n = 33)	Tỷ lệ trung bình tế bào u bắt màu với dấu ấn CD46	0,68 ± 0,26	
	Tỷ lệ trung bình tế bào u bắt màu với dấu ấn CD46	72,65 ± 22,15	
Nhóm nhuộm CD46 (n = 33)	Tỷ lệ tế bào u bắt màu CD46 < 50%	6	18,18
	Tỷ lệ tế bào u bắt màu CD46 ≥ 50% và ≤ 70%	5	15,15
	Tỷ lệ tế bào u bắt màu CD46 >70%	22	66,67

So với nhóm chứng không nhuộm CD46 có đến trên 99% tế bào u sau phân lập không bắt màu CD46, nhóm nhuộm CD46 có tỷ lệ tế

bào u sau phân lập bắt màu CD46 trung bình là 72,65%. Trong đó tỷ lệ tế bào u bắt màu CD46 trên 70% chiếm đa số 66,67%.

IV. BÀN LUẬN

Các nguồn tế bào để nuôi cấy rất phong phú, từ tế bào gốc vạn năng, tế bào trưởng thành đến những tế bào ung thư. Tất cả đều có thể nuôi cấy và tăng sinh theo các mục đích khác nhau. Bệnh nhân ung thư buồng trứng có thể sử dụng các tế bào u nguyên phát ở buồng trứng hoặc từ các tế bào u di căn đến các cơ quan khác, trong đó di căn ổ bụng hay gặp đối với các bệnh nhân này. Khối u ở dạng đặc cho thấy việc tách rời các tế bào ra khỏi mô u thường gặp khó khăn hơn so với các tế bào u riêng lẻ trong dịch ổ bụng. Trong nghiên cứu của chúng tôi, 50 mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân ung thư buồng trứng chủ yếu là lấy từ mẫu mô của khối u buồng trứng chiếm 92% và có 4 mẫu được lấy từ dịch ổ bụng của bệnh nhân chiếm 8%. Trong nghiên cứu của Véronique Ouellet, năm 2008, với ba dòng tế bào mới của ung thư biểu mô buồng trứng thì có hai mẫu lấy từ khối u của bệnh nhân (TOV-1946 và TOV-2223G), và một

mẫu từ dịch ổ bụng của bệnh nhân (OV-1946). Còn các nghiên cứu của Ymada trong các năm 1991, 2013 và 2016, các dòng tế bào OMC-3, HCH-1, và NOMH-1 đều được lấy từ khối u của bệnh nhân ung thư buồng trứng.⁷⁻¹⁰

Các khối u và cận tế bào từ dịch ổ bụng của bệnh nhân được làm xét nghiệm giải phẫu bệnh để xác định typ mô bệnh học theo phân loại của Tổ chức y tế thế giới năm 2014. Kết quả phân typ mô bệnh học của 50 bệnh nhân ung thư biểu mô buồng trứng là 74% thuộc typ thanh dịch, 12% typ nhày, 8% typ tế bào sáng và tỷ lệ rất nhỏ là typ dạng nội mạc tử cung hoặc typ thần kinh nội tiết. Trong đó 8 mẫu tế bào duy trì sự phát triển ổn định sau nhiều lần nuôi cấy lại từ mẫu lưu trữ được phân lập từ khối u buồng trứng hoặc dịch ổ bụng của bệnh nhân Ung thư biểu mô buồng trứng thuộc typ thanh dịch độ cao. Để giải thích cho đặc điểm này chúng tôi thấy có một số lý do sau:

+ Trong ung thư biểu mô buồng trứng, typ thanh dịch là loại ung thư chiếm tỷ lệ cao nhất từ 75 đến 80%. Trong typ thanh dịch được chia dưới nhóm là ung thư biểu mô typ thanh dịch độ cao và ung thư biểu mô typ thanh dịch độ thấp, căn cứ vào cấu trúc mô u và kiểu hình miễn dịch của tế bào u. Trong khi ung thư biểu mô thanh dịch độ thấp biểu hiện đột biến BRAF và KRAF, còn ung thư biểu mô tuyến thanh dịch độ cao biểu hiện đột biến p53, BRCA1/2 là những đột biến liên quan đến sự tăng sinh không kiểm soát của tế bào u. Về tiên lượng, ung thư biểu mô thanh dịch độ cao là loại u có tiên lượng xấu khi tỷ lệ sống thêm 3 năm là 67,6%.¹¹

+ Về mô bệnh học của ung thư biểu mô thanh dịch độ cao cho thấy các tế bào u có mật độ cao hơn so với thành phần mô đệm, các tế bào u có chỉ số phân bào cao, cấu trúc u có phần đặc nhiều hơn phần nang. Các đặc điểm mô học này của ung thư biểu mô thanh dịch độ cao cho thấy có nhiều lợi thế hơn cho việc phân lập khi so sánh với các typ ung thư biểu mô buồng trứng khác như typ nang có dạng nang là chủ yếu với nhiều chất nhày ngoại bào nên mật độ tế bào u thường ít và chỉ số tăng sinh của u này cũng rất thấp; hoặc các typ dạng nội mạc tử cung và typ thần kinh nội tiết hay gặp dạng đặc với mật độ tăng sinh tế bào cao nhưng sự kết dính tế bào còn bền vững nên các tế bào u khó phân tách trong quá trình phân lập. Trên thế giới các typ mô bệnh học khác nhau của ung thư biểu mô buồng trứng đều được phân lập thành sản phẩm thương mại và đã công bố rộng rãi, bao gồm ung thư biểu mô typ thanh dịch, typ tế bào sáng, typ tuyến nang và typ dạng nội mạc tử cung.^{7-9,12}

Khi phân lập 50 mẫu tế bào được phân lập từ khối u hoặc từ dịch ổ bụng thì chỉ có tỷ lệ nhỏ (16%) tế bào u phát triển tốt trong môi trường nuôi cấy, có nghĩa là các mẫu tế bào này sau khi trải qua các lần phân tách đều duy trì được

sự tăng sinh tế bào và được lưu mẫu để sử dụng cho các thử nghiệm tiếp theo. Còn hầu hết các tế bào u phát triển chậm, tự thoái triển hoặc chết trong quá trình phân lập.

Tất cả các tế bào u được phân lập đều bám đáy trong thời gian trung bình là 2,8 ngày. Đây là pha chậm của quá trình nuôi cấy khi các tế bào tách ra từ mô đặc hay từ dịch ổ bụng thích nghi với mô trường nuôi cấy và bắt đầu bám xuống đáy đĩa nuôi cấy. Những mẫu tế bào từ dịch ổ bụng và những mẫu tế bào lấy từ mô đặc nhưng thành phần u ít mô liên kết mà gồm chủ yếu các cấu trúc của tế bào u thì dễ tách nhau hơn và bám đáy nhanh hơn những mẫu còn lại. Có 46% mẫu tế bào ở pha tăng trưởng khi các tế bào u bám đáy và tăng dần mật độ tế bào lên bằng phân chia tế bào. Có 28% là tế bào u đạt tới đỉnh của pha tăng trưởng khi tế bào u tăng sinh bám kín đáy đĩa nuôi với mật độ tế bào >80% diện tích đĩa nuôi với thời gian trung bình là 10 ngày. Khi phân lập mẫu tế bào đạt tới đỉnh của pha tăng trưởng thì nên được tách ra các đĩa mới để duy trì sự tăng trưởng của tế bào. Khi tế bào u phát triển bám đáy trên >80% diện tích đĩa nuôi cấy thì tiến hành tách sang các đĩa mới để tăng sinh tế bào u với thời gian trung bình tách tế bào lần đầu là 11,5 ngày và số lần tách trung bình là 2 lần. Sau các lần tách mẫu chỉ có 8 mẫu phát triển tốt chuyển sang pha duy trì, các mẫu còn lại bị thoái triển. Có một mẫu duy nhất đạt mức độ ổn định sau 5 lần tách mẫu trong thời gian 2 tháng. Sau nhiều lần tách mẫu vẫn bảo đảm tốc độ phát triển với tốc độ nhân đôi tế bào trung bình là 24h. Sau đó mẫu tế bào này được trữ đông trong dung dịch bảo quản và được lấy ra cấy lại nhiều lần để thực hiện các thí nghiệm khác của nghiên cứu. Mẫu tế bào này sau khi lấy ra nuôi cấy lại vẫn phát triển mạnh, một phần được dùng để làm các thí nghiệm, một phần lại được cất giữ đông. Một số lý do các

mẫu tế bào phát triển tốt là do các mẫu bệnh phẩm phân lập có mật độ tế bào u nhiều hơn các tế bào của mô đệm, mô u không bị hoại tử hoặc xuất huyết (nếu khối u có tế bào bị hoại tử hoặc mô đệm xuất huyết nhiều hồng cầu sẽ làm biến đổi môi trường nuôi cấy dẫn đến ức chế các tế bào u còn sống phát triển) hoặc dịch ổ bụng có nhiều tế bào u và ít hồng cầu và các tế bào viêm. Ngoài ra trong quá trình phân lập tế bào chúng tôi cũng nhận thấy nhiều khâu kỹ thuật ảnh hưởng đến kết quả phân lập, nhất là khâu xử lý mẫu và các thao tác kỹ thuật có đảm bảo đúng nguyên tắc vô trùng hay không. Một nghiên cứu của Surowiak (năm 1983) về dòng tế bào ung thư buồng trứng là OVCAR -3 là loại tế bào bám đáy, đã được nuôi cấy liên tục trong 10 tháng và trải qua 20 lần tách mẫu, dòng tế bào này vẫn phát triển ổn định. Với tốc độ nhân đôi tế bào là 48h.¹² Dòng tế bào OMC-3 lấy từ bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến thanh dịch phát triển tốt trong 65 tháng và trải qua hơn 50 lần cấy chuyển; dòng HCH-1 phát triển tốt trong 230 tháng và qua hơn 50 lần cấy chuyển; dòng NOMH-1 phát triển ổn định qua 232 tháng và hơn 50 lần cấy chuyển.⁷⁻⁹

Các hình thái tế bào u nuôi cấy quan sát được trên kính hiển vi ánh sáng ngược phản ánh được vùng lấy mẫu trên khối u. Nếu các tế bào u có hình thái dạng biểu mô thì vị trí lấy mẫu ở phần khối u chỉ gồm các tế bào biểu mô u, ngược lại nếu hình thái dạng nguyên bào sợi thì bệnh phẩm đưa vào nuôi cấy lấy ở vị trí có nhiều mô liên kết đệm đỡ khối u. Các tế bào được phân lập có ba hình thái chính là hình đa diện chiếm 46%, hình thoi dài chiếm 42% và loại hỗn hợp là gồm cả hai hình thái trên 12%. Chỉ có hình thái dạng biểu mô của tế bào mới duy trì được tốc độ tăng sinh của tế bào trong môi trường nuôi cấy. Còn mẫu tế bào dạng nguyên bào sợi và dạng hỗn hợp thì khó đạt tới đỉnh giai đoạn tăng trưởng và thường thoái triển sau

pha tăng trưởng. Quá trình nghiên cứu đã thấy rõ điều này khi các mẫu phát triển tốt đều có hình thái dạng biểu mô. Các dòng tế bào nuôi cấy thành công từ ung thư biểu mô buồng trứng của các nghiên cứu trên thế giới đều có hình thái dạng biểu mô như dòng TOV-1946, TOV-2223G, OV-1946, OMC-3, HCH-1, NOMH-1 và OVCAR-3.^{7-10,12}

Các tế bào u khi phân lập bị chết có rất nhiều lý do, trong đó lý do tế bào u chết do mẫu bệnh phẩm có ít tế bào u chiếm 43,6%, do tế bào u tự thoái triển khi phân lập là 25,6%, do mẫu nuôi cấy bị nhiễm ngay khi đưa vào môi trường nuôi cấy hoặc trong quá trình phân lập chiếm 23,1%. Ít nhất là nguyên nhân do kỹ thuật là rửa mẫu sớm khi tế bào u bám đáy ít chiếm 7,9%. Từ các nguyên nhân trên chúng tôi đã từng bước rút kinh nghiệm và điều chỉnh các bước và các thao tác kỹ thuật trong quá trình phân lập để hạn chế các yếu tố chủ quan ảnh hưởng đến kết quả phân lập.

CD46 (MCP- membrane cofactor protein) là một protein màng có vai trò ức chế sự hoạt hóa bề mặt của tế bào chủ, xuất hiện trên bề mặt của nhiều loại tế bào biểu mô, tế bào nội mô và tế bào máu, nhưng vắng mặt trong các tế bào hồng cầu. Sự biểu hiện của CD46 được chứng minh trong nhiều loại u khác nhau và trong các dòng tế bào có nguồn gốc từ những khối u đó. Biểu hiện của thụ thể CD46 trên các tế bào khối u rõ rệt hơn so với các mô lành xung quanh. Sự tăng biểu hiện của CD46 trên các tế bào khối u là gợi ý cho sự xuất hiện một cơ chế bảo vệ các tế bào u khỏi phản ứng miễn dịch của cơ thể. Ung thư buồng trứng là một trong các khối u có biểu hiện protein CD46 trên bề mặt tế bào u và sự biểu hiện thụ thể CD46 này có mối liên quan đến tiên lượng xấu khi chúng dự báo sự tái phát sớm của bệnh.¹³ Các nghiên cứu cũng chỉ ra biểu hiện CD46 trên bề mặt tế bào u không có mối liên quan với phân typ mô

bệnh học ung thư buồng trứng, độ biệt hóa của tế bào u và đáp ứng điều trị.¹³

Để xác định thụ thể CD46 có trên màng tế bào u có nhiều phương pháp khác nhau, trong đó kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy mang tính định lượng cho biết tỷ lệ tế bào u có biểu hiện thụ thể CD46 trong quần thể mẫu tế bào u và nhuộm hóa mô miễn dịch mang tính định tính khi cho biết sự có mặt của thụ thể CD46 trên màng tế bào u. Trong nghiên cứu của chúng tôi trên 33 mẫu tế bào u sau phân lập từ bệnh nhân ung thư buồng trứng được nhuộm với kháng thể đơn dòng CD46 và được phân tích bằng máy đếm tế bào dòng chảy để xác định tỷ lệ tế bào u biểu lộ thụ thể CD46 trên màng tế bào trong quần thể được phân tích. Kết quả thu được là nhóm chứng không nhuộm với CD46 có trên 99% tế bào u âm tính với thụ thể CD46, nhóm nhuộm CD46 có tỷ lệ tế bào u bắt màu CD46 trung bình là 72,65%; Trong đó tỷ lệ tế bào u bắt màu CD46 trên 70% chiếm đa số 66,67%. Một nghiên cứu của Surowiak P. năm 2006, tiến hành trên 73 mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân ung thư buồng trứng, được làm hóa mô miễn dịch với dấu ấn CD46, kết quả nghiên cứu cho thấy có 60% các khối u nguyên phát của buồng trứng có biểu hiện thụ thể CD46 trên màng tế bào u.¹³

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thành công trong việc phân lập, tăng sinh tế bào ung thư biểu mô buồng trứng từ bệnh nhân. Các dòng tế bào ung thư biểu mô buồng trứng phân lập từ bệnh nhân trải qua 4 pha của quá trình tăng trưởng gồm pha chậm, pha tăng trưởng, pha duy trì và pha thoái triển. Có 16% mẫu đạt được sự phát triển ổn định và tăng sinh, còn lại các mẫu bị thoái triển do nhiều nguyên nhân khác nhau. Dòng tế bào phân lập từ Ung thư biểu mô tụy thanh dịch độ cao và hình thái tế bào phân lập dạng biểu mô có sự tăng sinh

tốt hơn. Biểu hiện thụ thể CD46 trên màng tế bào u cho thấy các tế bào sau phân lập mang đặc điểm miễn dịch của tế bào ung thư.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. Feb 4 2021.
2. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(4):284-296.
3. Stewart C, Ralyea C, Lockwood S. Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Seminars in oncology nursing*. Apr 2019;35(2):151-156.
4. Armstrong DK. Relapsed ovarian cancer: challenges and management strategies for a chronic disease. *The oncologist*. 2002;7 Suppl 5:20-28.
5. Sueblinvong T, Ghebre R, Iizuka Y, et al. Establishment, characterization and downstream application of primary ovarian cancer cells derived from solid tumors. *PLoS One*. 2012;7(11):e50519.
6. Kurman RJ. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs, 4th Edition. Lyon, France: IARC. 2014.
7. Yamada T, Hattori K, Satomi H, Okazaki T, Mori H, Hirose Y. Establishment and characterization of a cell line (HCH-1) originating from a human clear cell carcinoma of the ovary. *Journal of ovarian research*. Jun 4 2016;9(1):32.
8. Yamada T, Kanda T, Mori H, Shimokawa K, Kagawa M, Shibayama Y. Establishment and characterization of a cell line (NOMH-1) originating from a human endometrioid adenocarcinoma of the ovary. *Journal of ovarian research*. Feb 4 2013;6(1):8.

9. Yamada T, Ueda M, Otsuki Y, Ueki M, Sugimoto O. Establishment and characterization of a cell line (OMC-3) originating from a human mucinous cystadenocarcinoma of the ovary. *Gynecologic oncology*. Feb 1991;40(2):118-128.

10. Ouellet V, Zietarska M, Portelance L, et al. Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines. *BMC Cancer*. May 28 2008;8:152.

11. Howitt BE, Lee KR, Muto MG, Nucci MR, Crum CP. Chapter 25 - The Pathology of Pelvic-Ovarian Epithelial (Epithelial-Stromal) Tumors.

In: Crum CP, Nucci MR, Howitt BE, Granter SR, Parast MM, Boyd TK, eds. *Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology (Third Edition)*. Philadelphia: Elsevier; 2018:865-948.

12. Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, et al. Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCA-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer research*. Nov 1983;43(11):5379-5389.

13. Surowiak P, Materna V, Maciejczyk A, et al. CD46 expression is indicative of shorter revival-free survival for ovarian cancer patients. *Anticancer research*. 2006;26(6C):4943-4948.

Summary

ESTABLISHMENT OF CELL LINES FROM TUMOR SAMPLES AND ABDOMINAL FLUIDS OF OVARIAN CARCINOMA PATIENTS

An experimental study on 50 samples from tumor and abdominal fluid of ovarian carcinoma patients was performed at K - Tan Trieu Hospital and 103 Military Hospital from December 2019 to March 2021. The purpose of this study is to establish and proliferate human cancer cell lines. Results: 100% of the samples adhered to the bottom, 28% of which had tumor cells growing with high cell density reaching over 80% of the culture plate area. The average time of first cell separation was 11.46 ± 8.07 days and the average number of separations was 2 ± 1.5 . After the growth cycle, 16% of all samples were well-developed and all of them were of high-grade serous type. Tumor cells death are triggered when patient samples containing scarce tumor cells (44.7%), self-regressing tumor cells (26.1%) and bacterial or fungal infection (21.1%). The average percentage of tumor cell lines with CD46 expression was 72.65%. Conclusion: The study successfully established and proliferated tumor cell lines from patients diagnosed with ovarian carcinoma, and compared with other types, the cell lines from high-grade serous ovarian carcinoma had the most potential proliferation.

Keywords: Establishment a cell line, ovarian carcinoma.