

nằm ngửa, việc khám răng miệng được thực hiện trong điều kiện tự nhiên theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), làm khô bề mặt răng trước khi khám.

Nhân sự thực hiện: Mỗi nhóm khám bao gồm các bác sĩ và điều dưỡng, đã được tập huấn và hiệu chuẩn theo quy trình thống nhất trước khi bắt đầu nghiên cứu.

Trình tự khám:

- Cho trẻ vệ sinh răng miệng trước khi khám.
- Làm sạch lại răng bằng gạc
- Khám và ghi nhận sâu răng theo chỉ số ICDAS-II

2.4 Kiểm soát sai lệch thông tin. Đội ngũ điều tra viên đã được tập huấn chuyên sâu và huấn luyện định chuẩn lâm sàng bởi các chuyên gia nha khoa công cộng với hệ số Kappa > 0,84.

2.5 Đạo đức nghiên cứu. Nghiên cứu đã được phê duyệt bởi Sở Khoa học Công nghệ tỉnh Bà Rịa – Vũng Tàu số 126/QĐ-SKHCN và được chấp thuận bởi Hội Đồng Đạo Đức Trong Nghiên cứu Y Sinh, Đại Học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh số 741/HĐĐĐ-ĐHYD. Phụ huynh được thông tin đầy đủ về nghiên cứu và ký đồng thuận trước khi trẻ tham gia.

2.6 Phân tích số liệu. Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm Stata 13.0. Các phân tích bao gồm thống kê mô tả (trung bình, độ lệch chuẩn,

tỷ lệ) và kiểm định Chi bình phương, kiểm định t độc lập được áp dụng trong nghiên cứu này.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1.1 Mẫu nghiên cứu

Bảng 3.1. Phân bố trẻ 3 tuổi tham gia nghiên cứu tại tỉnh Bà Rịa-Vũng Tàu (n=880)

Tham số	Vùng		Tổng cộng	p ^(a)
	Nông thôn	Thành thị		
Giới tính	N (%)			
Nam	212 (24,1%)	220 (25,0%)	432 (49,1%)	0,650
Nữ	213 (24,2%)	235 (26,7%)	448 (50,9%)	
Tổng cộng	425 (48,3%)	455 (51,7%)	880 (100,0%)	

(a) Kiểm định Chi bình phương

Bảng 3.1 cho thấy trong tổng số 880 trẻ 3 tuổi tham gia nghiên cứu được phân bố tương đối đồng đều giữa khu vực nông thôn là 425 trẻ (48,3%) và thành thị là 455 trẻ (51,7%), tỷ lệ trẻ nam chiếm 49,1% (432 trẻ) và nữ chiếm 50,9% (448 trẻ). Không có ý nghĩa thống kê giữa vùng và giới tính (p=0,650).

1.2 Tình trạng sâu răng sớm ECC và sâu răng sớm trầm trọng S-ECC của trẻ 3 tuổi tại tỉnh Bà Rịa – Vũng Tàu.

Bảng 3.2. Tình trạng sâu răng sớm (ECC) và sâu răng sớm trầm trọng (S-ECC) chưa tạo lỗ (s₁) và tạo lỗ (s₃) của 880 trẻ 3 tuổi tại tỉnh Bà Rịa-Vũng Tàu.

	Chung (n=880)	Giới tính		p ^(a)	Vùng		p ^(a)
		Nam (n=432)	Nữ (n=448)		Nông thôn (n=425)	Thành thị (n=455)	
		N (%)			N(%)		
ECC - s ₁	658 (74,8%)	329 (76,2%)	329 (73,4%)	0,353	358 (84,2%)	300 (65,9%)	<0,001
ECC - s ₃	507 (57,6%)	253 (58,6%)	254 (56,7%)	0,575	293 (68,9%)	214 (47,0%)	<0,001
S-ECC - s ₁	528 (60,0%)	259 (60,0%)	269 (60,0%)	0,978	299 (70,4%)	229 (50,3%)	<0,001
S-ECC - s ₃	393 (44,7%)	189 (43,8%)	204 (45,5%)	0,594	236 (55,5%)	157 (34,5%)	<0,001
(a) Kiểm định Chi bình phương							

(a) Kiểm định Chi bình phương

Bảng 3.2 cho thấy tỷ lệ ECC của 880 trẻ 3 tuổi tại tỉnh Bà Rịa – Vũng Tàu là 74,8% (s₁) và 57,6% (s₃), S-ECC lần lượt 60,0% (s₁) và 44,7% (s₃). Không có khác biệt giữa nam và nữ ở tất cả các chỉ số (p > 0,05). Ngược lại, sự khác biệt rõ rệt được ghi nhận giữa nông thôn và thành thị (p < 0,001): ECC (s₁) nông thôn 84,2% – thành thị 65,9%; ECC (s₃) 68,9% – 47,0%; S-ECC (s₁) 70,4% – 50,5%; S-ECC (s₃) 55,5% – 34,5%.

3.3 Tỷ lệ sâu răng sữa chưa điều trị trung bình ở trẻ 3 tuổi tại tỉnh Bà Rịa – Vũng Tàu

Bảng 3.3. Tỷ lệ sâu răng sữa chưa điều trị trung bình theo tổn thương tạo lỗ (s₁) và tạo lỗ (s₃) của 880 trẻ 3 tuổi theo giới tính tại tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu.

	Giới tính		Chung (n=880)	p ^(a)
	Nam (n=432)	Nữ (n=448)		
	TB% ± ĐLC			
Sâu răng chưa điều trị - s₁	75,97 ± 42,60	73,12 ± 44,29	74,52 ± 43,47	0,330
Sâu răng chưa điều trị - s₃	58,17 ± 49,18	56,36 ± 49,55	57,25 ± 49,35	0,588

(a) Kiểm định T độc lập

Bảng 3.3 cho thấy tỷ lệ sâu răng sữa chưa điều trị trung bình ở trẻ 3 tuổi tại Bà Rịa – Vũng Tàu ở ngưỡng tổn thương chưa tạo lỗ (s_1), tỷ lệ chưa điều trị là $74,52 \pm 43,47\%$ (nam là $75,97 \pm 42,60\%$; nữ là $73,12 \pm 44,29\%$) và sự khác biệt giữa hai giới không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,330$). Ở ngưỡng tổn thương tạo lỗ (s_3), tỷ lệ chưa điều trị là $57,25 \pm 49,35\%$ (nam là $58,17 \pm 49,18\%$; nữ là $56,36 \pm 49,55\%$) không có sự khác biệt giữa hai giới ($p = 0,588$).

Bảng 3.4. Tỷ lệ sâu răng sữa chưa điều trị trung bình theo tổn thương tạo lỗ (s_1) và tạo lỗ (s_3) của 880 trẻ 3 tuổi theo vùng tại tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu

Tham số	Vùng		Chung (n=880)	p ^(a)
	Nông thôn (n=425)	Thành thị(n=455)		
	TB% $\pm$ ĐLC			
Sâu răng chưa điều trị - s_1	84,13 $\pm$ 36,45	65,55 $\pm$ 47,43	74,52 $\pm$ 43,47	<0,001
Sâu răng chưa điều trị - s_3	68,69 $\pm$ 46,28	46,56 $\pm$ 49,78	57,25 $\pm$ 49,35	<0,001

(a) Kiểm định T độc lập

Bảng 3.4 cho thấy tỷ lệ sâu răng sữa chưa điều trị trung bình ở trẻ 3 tuổi tại Bà Rịa – Vũng Tàu có sự khác biệt rõ rệt giữa hai khu vực. Ở ngưỡng tổn thương chưa tạo lỗ (s_1), tỷ lệ chưa điều trị ở nông thôn là $84,13 \pm 36,45\%$ và thành thị là $65,55 \pm 47,43\%$, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$). Ở ngưỡng tổn thương tạo lỗ (s_3), tỷ lệ chưa điều trị ở nông thôn là $68,69 \pm 46,28\%$ và thành thị là $46,56 \pm 49,78\%$, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

IV. BÀN LUẬN

Mẫu gồm 880 trẻ 3 tuổi được chọn từ 16 trường mầm non tại tỉnh Bà Rịa – Vũng Tàu, phân bố tương đối cân đối giữa nông thôn (48,3%) và thành thị (51,7%). Cấu trúc giới gần như cân bằng (nam 49,1%, nữ 50,9%) và sự khác biệt phân bố giới theo nơi cư trú không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,650$). Cơ cấu này phản ánh khá sát dân số mục tiêu 3 tuổi của địa phương, bảo đảm tính đại diện cho các so sánh theo khu vực cư trú và giới, từ đó tạo nền tảng tin cậy cho diễn giải các ước lượng về ECC, S-ECC và tỷ lệ sâu răng sữa chưa điều trị.

Tỷ lệ ECC ở trẻ 3 tuổi ghi nhận cao: 74,8% ở ngưỡng s_1 (ICDAS 1–2, tổn thương chưa tạo lỗ) và 57,6% ở ngưỡng s_3 (ICDAS 3–6, tổn thương đã tạo lỗ). Tỷ lệ S-ECC cũng đáng lưu ý, đạt 60,0% (s_1) và 44,7% (s_3), phản ánh gánh nặng bệnh tiến triển nặng ngay ở lứa tuổi rất sớm. Các kết quả này tương hợp với bối cảnh trong nước: nghiên cứu tại Cần Thơ báo cáo ECC 92,7% và S-ECC 83% ở trẻ mầm non [1]; nghiên cứu tại Bình Chánh–Củ Chi ghi nhận S-ECC 71,2% (s_1) và 27,0% (s_3) [2]. So với một số quốc gia phát triển (ví dụ Hoa Kỳ, Vương quốc Anh) và một số vùng lãnh thổ châu Á có điều kiện dịch vụ tốt hơn (Hong Kong), mức hiện mắc tại Bà Rịa – Vũng Tàu vẫn cao hơn [5].

Sự chênh lệch theo nơi cư trú thể hiện rõ và có ý nghĩa thống kê: nông thôn có tỷ lệ ECC (s_1)

84,2% so với 65,9% ở thành thị; đối với S-ECC (s_3) là 55,5% so với 34,5% ($p < 0,001$). Các chênh lệch này phù hợp với điều tra quốc gia năm 2019, vốn cho thấy trẻ nông thôn có gánh nặng sâu răng cao hơn trẻ thành thị [4]. Chênh lệch giữa ECC (s_1) 74,8% và ECC (s_3) 57,6% cho thấy khoảng 17,2 điểm % tổn thương chưa tạo lỗ có nguy cơ bị bỏ sót nếu chỉ sử dụng các chỉ số cổ điển dựa trên lỗ sâu theo WHO. Quan sát này phù hợp với kết quả của Quách Hữu Thịnh và cs., nơi ECC (s_1) 80,6% vượt đáng kể 46,8% (s_3) [2]. Việc áp dụng ICDAS-II là điểm mạnh phương pháp của nghiên cứu. Từ góc độ lâm sàng – y tế công cộng, phân tầng s_1/s_3 giúp phát hiện “cửa sổ cơ hội” để đảo ngược/ổn định tổn thương bằng các biện pháp tối thiểu và chi phí thấp trước khi tiến triển thành lỗ sâu [6].

Về tình trạng chưa điều trị, đa số tổn thương chưa điều trị với 74,52% (s_1) và 57,25% (s_3). Các ước lượng này cho thấy khoảng trống chăm sóc đáng kể ngay ở nhóm tuổi 3, nhất là đối với tổn thương sớm, nơi can thiệp dự phòng có hiệu quả cao. Bảng chứng trong nước cũng có nhận định này: tại Hà Nội, chỉ 1,97% răng sâu được trám ở trẻ 4–6 tuổi [3]; tại Bình Chánh–Củ Chi, có tới 93% răng sâu chưa điều trị [2]. Sự khác biệt giữa nơi cư trú tiếp tục thể hiện rõ với tỷ lệ sâu răng chưa điều trị mức tạo lỗ s_3 ở nông thôn cao hơn hẳn so với thành thị tương ứng 68,7% so với 46,6% ($p < 0,001$). Đối với mức chưa tạo lỗ s_1 thì nông thôn là 84,1% so với 65,6% ở thành thị. Những sai khác này hàm ý hạn chế tiếp cận dịch vụ, rào cản chi phí, thiếu nguồn nhân lực và thách thức hợp tác điều trị ở lứa tuổi rất nhỏ.

Trong bối cảnh khu vực, tỷ lệ răng sâu chưa điều trị tại Việt Nam nói chung và Bà Rịa – Vũng Tàu nói riêng tiệm cận một số quốc gia Đông Nam Á có gánh nặng cao (ví dụ Singapore ~90%, Malaysia ~87%) theo tổng quan khu vực về ECC ở trẻ mẫu giáo [5]. Ngược lại, tại các hệ

thống y tế phát triển như Hoa Kỳ, ước khoảng ~10% trẻ 2–5 tuổi có sâu răng chưa điều trị tại thời điểm khảo sát—phản ánh mạng lưới dịch vụ, cơ chế chi trả và mô hình quản lý bệnh mạn tính đối với ECC vận hành hiệu quả hơn [8]. Bức tranh này cũng nhất quán với dịch tễ học toàn cầu của ECC, vốn biến thiên rộng theo vùng, mức phát triển và năng lực hệ thống y tế – xã hội [7]. Do khác biệt độ tuổi, định nghĩa và thước đo giữa các nghiên cứu, các so sánh nên chú trọng mẫu hình tương đối thay vì tuyệt đối từng con số [5], [7].

V. KẾT LUẬN

Tỷ lệ sâu răng sớm (ECC) ở trẻ 3 tuổi tại Bà Rịa – Vũng Tàu rất cao với ECC 74,8% (s_1) và 57,6% (s_3), S-ECC 60,0% (s_1) và 44,7% (s_3), cho thấy gần một nửa trẻ 3 tuổi đã có sâu răng tiến triển nặng. Tỷ lệ sâu răng chưa được điều trị với 74,52% (s_1) và 57,25% (s_3), đặc biệt ở nông thôn cao hơn đáng kể so với thành thị. Việc áp dụng ICDAS-II giúp phát hiện thêm khoảng 17% tổn thương sớm, nhấn mạnh vai trò quan trọng của phát hiện sớm và can thiệp kịp thời.

KIẾN NGHỊ

Cần tăng cường các chương trình khám răng định kỳ tại trường mầm non, chuẩn hóa sàng lọc theo ICDAS ở trường mầm non để phát hiện sớm sâu răng và phân tầng nguy cơ. Sử dụng các phương pháp dự phòng sâu răng cho trẻ như bôi vecni fluor, trám bít hố rãnh, giáo dục phụ huynh và mở rộng dịch vụ nha khoa nhi tuyến cơ sở, đặc biệt ở nông thôn. Nhằm giảm tỷ lệ ECC, tăng

tỷ lệ điều trị răng sâu từ đó cải thiện sức khỏe răng miệng ở trẻ mầm non.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Nhung NT, Kiên NT, Định TK, et al.** Tình hình sâu răng sớm ở trẻ 24–71 tháng tại các trường mầm non nội ô thành phố Cần Thơ, Việt Nam. Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh. 2019;23(1):129–136.
2. **Quách HT, Nguyễn TTV, Hoàng TH.** Tỷ lệ ECC và S-ECC ở trẻ mẫu giáo từ 3 tuổi tại những vùng chưa có chương trình fluor hóa nước máy: Nghiên cứu cắt ngang tại huyện Bình Chánh và huyện Củ Chi, TP.HCM. Tạp chí Y học Việt Nam. 2023;520(1B):88–94.
3. **Thu NH, Hạnh TTM, Hằng LM.** Thực trạng sâu răng sữa trên trẻ 4–6 tuổi tại một số trường mầm non ở Hà Nội. Tạp chí Y học Việt Nam. 2021;509(2):55–60.
4. **Trịnh Đình Hải, Nguyễn Thị Hồng Minh.** Điều tra sức khỏe răng miệng toàn quốc năm 2019. Nhà xuất bản Y học. 2019:24–26.
5. **Duangthip D, Gao SS, Lo ECM, Chu CH.** Early childhood caries among 5- to 6-year-old children in Southeast Asia. Int Dent J. 2017;67(2):98–106.
6. **Ekstrand KR, Gimenez T, Ferreira FR, Mendes FM, Braga MM.** The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): a systematic review. Caries Res. 2018;52(5):406–419.
7. **James SL, Abate D, Abate KH, et al.** Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet. 2018; 392 (10159):1789–1858.
8. **Edelstein BL, Basch CE, Zybert P, et al.** Chronic disease management of early childhood dental caries: practices of US pediatric dentists. Prev Chronic Dis. 2025;22:240151.

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH ĐỒNG NUÔI CẤY TẾ BÀO CAR-T VÀ AAPC TỐI ƯU HÓA CHẤT LƯỢNG TẾ BÀO CAR-T ĐIỀU TRỊ BỆNH BẠCH CẦU CẤP DÒNG LYMPHO

Cán Văn Mão¹, Nguyễn Cẩm Thạch², Lê Duy Cường²

TÓM TẮT

Mục tiêu nghiên cứu: Tối ưu hóa quá trình đồng nuôi cấy tế bào CAR-T và aAPC 1D2 nhằm thu nhận được tế bào CAR-T có số lượng và chất lượng tốt nhất điều trị bệnh bạch cầu cấp dòng lympho. **Đổi**

tượng và phương pháp: Chuyển nạp tế bào PBMC bằng máy 4D Amara Nucleofector cùng xung điện với chương trình EO-115. Phân tích tế bào CAR-T sau chuyển nạp bằng phương pháp flow cytometry trên hệ thống BD FACSlyric sau mỗi lần cấy chuyển. Đồng nuôi cấy CAR-T và aAPC 1D2 bằng môi trường CTS Optimizer T cell expansion. Bổ sung aAPC 1D2 vào môi trường nuôi cấy tế bào CAR-T sống theo tỉ lệ 1X hoặc 2X. **Kết quả:** Tế bào CAR-T tăng sinh tốt và tương đương nhau khi đồng nuôi cấy với aAPC 1D2 ở tỉ lệ 1:2 và 1:5; quần thể tế bào CAR-T đạt biểu hiện CAR ở mức 52,63% ở 14 ngày và 81,13% ở 21 ngày. **Kết luận:** Tỉ lệ nuôi cấy tế bào CAR-T với aAPC 1D2 tối ưu là 1:2, số lần cấy chuyển tối thiểu được xác

¹Học Viện Quân Y

²Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Chịu trách nhiệm chính: Lê Duy Cường

Email: leduycuong76@gmail.com

Ngày nhận bài: 23.6.2025

Ngày phản biện khoa học: 23.7.2025

Ngày duyệt bài: 29.8.2025

định là 3 lần (bổ sung tế bào aAPC 1D2 7 ngày/lần) để đạt được CAR-T biểu hiện kháng nguyên tốt.

Từ khóa: Tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo, nuôi cấy và cấy chuyển.

SUMMARY

STUDY ON THE PROCESS OF CAR-T WITH AAPC CELL CO-CULTURE TO OPTIMIZE QUALITY OF CAR-T CELLS FOR THE TREATMENT OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Objective: To optimize the co-culture process of CAR-T and aAPC 1D2 cells in order to obtain CAR-T cells with the highest yield and quality. **Subjects and Methods:** PBMCs were transposed using the 4D Amara Nucleofactor device with the EO-115 program. CAR-T cells were analyzed by flow cytometry on the BD FACSLyric system after each transposition. Subsequently, CAR-T cells were co-cultured with aAPCs in CTS Optimizer T-cell expansion medium. aAPC cells were added to the CAR-T culture medium at ratios equivalent to 1X or 2X live CAR-T cells. **Results:** When co-cultured with aAPC 1D2 at ratios of 1:2 and 1:5, CAR-T cells proliferated efficiently and comparably. The CAR-T cell population reached 52.63% CAR expression on day 14 and 81.13% on day 21. **Conclusion:** The optimal co-culture ratio was determined to be CAR-T: aAPC 1D2 at a 1:2 ratio in the volume. A minimum of three transpositions (with aAPC 1D2 added every 7 days) was required to obtain CAR-T cells with robust antigen expression.

Keywords: Artificial antigen-presenting cells, culture and transposition.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tế bào lympho T biến đổi gen nhằm biểu hiện ổn định các thụ thể miễn dịch đang được đánh giá có tiềm năng điều trị trong các thử nghiệm lâm sàng. Liệu pháp tế bào CAR-T nhằm đích CD19 đã cho thấy hiệu quả đáng kể trong điều trị các khối u ác tính tế bào lympho B. Tuy nhiên, một số vấn đề liên quan đến thiết kế, kích hoạt và tăng sinh tế bào này vẫn cần được nghiên cứu kỹ lưỡng nhằm tăng hiệu quả điều trị [1]. Trong đó, quá trình tăng sinh đóng vai trò tối quan trọng. Các nghiên cứu gần đây đã cho thấy tế bào ung thư bạch cầu K562 trình diện kháng nguyên nhân tạo (aAPC) có thể được sử dụng cho tăng sinh đặc hiệu tế bào CAR-T ex vivo hiệu quả [2]. Các tiếp cận này không những hiệu quả về mặt kỹ thuật mà còn mang lợi ích cao về mặt kinh tế. Cụ thể, sử dụng tế bào aAPC cho tăng sinh ex vivo CAR-T rẻ hơn rất nhiều so với sử dụng các sản phẩm thương mại bi từ gần phổi thể. Các nghiên cứu trước đây chỉ ra tế bào aAPC có thể được đồng nuôi cấy với CAR-T ở các tỉ lệ 1:1, 2:1, 5:1, hoặc 10:1 nhằm tối ưu hóa chất lượng tế bào CAR-T [1] [2]. Ngoài ra, thời gian tăng sinh tế bào aAPC 1D2 ở các thử nghiệm in vitro và in vivo thường là 7, 14, 21

hoặc 28 ngày [3], [3]. Tuy nhiên, để áp dụng cách tiếp cận này một cách hiệu quả nhất, quá trình đồng nuôi cấy tế bào CAR-T và aAPC cần được nghiên cứu và tối ưu hóa.

Nhằm hỗ trợ quá trình tăng sinh tế bào CAR-T ở quy mô lớn một cách hiệu quả, mục tiêu của nghiên cứu này là tối ưu hóa quy trình đồng nuôi cấy tế bào CAR-T và aAPC 1D2 nhằm thu nhận được số lượng và chất lượng tế bào CAR-T cao nhất. Cụ thể, nghiên cứu tối ưu hóa các yếu tố gồm: Tỉ lệ đồng nuôi cấy tế bào CAR-T và aAPC 1D2, số lần bổ sung tế bào aAPC 1D2 và thời gian nuôi cấy để tạo và chọn được một dòng tế bào K562 (aAPC 1D2) biểu hiện mạnh cả 4 phân tử CD19, CD64, CD86, và CD137L.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu. Tế bào K562 1D2 nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 (Biowest), Fetal Bovine Serum (Hyclone), CTS Optimizer T cell Expansion (Thermo Fisher). Sử dụng bộ kit SF Cell Line (Lonza), bộ kit Cell Line Nucleofector V (Lonza), và bộ kit Ingenio Electroporation (Mirus Bio) để chuyển nạp tạo tế bào aAPC 1D2. mRNA SB (mã hóa sleeping beauty transposase) được phiên mã in vitro tại phòng thí nghiệm Kỹ thuật Gen, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Chuyển nạp vào PBMC: Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) sau khi tách được nuôi cấy cùng với bi từ Dynabeads CD3/CD28 (số lượng tế bào bằng với số bi từ) trong 60 giờ, sau đó loại bỏ bi từ. Sinh khối tế bào (10^6 tế bào) được hòa tan bằng 100 μ L dung dịch chuyển nạp P3 Primary Cells (Lonza), 1 μ g plasmid SB100X và 3 μ g plasmid CD19RCD137/pSB rồi chuyển vào Cuvette chuyên dụng (Lonza) để chuyển nạp bằng máy 4D Amara Nucleofector, sử dụng chương trình EO-115 cùng với xung điện.

2.3.2. Phân tích tế bào CAR-T sau chuyển nạp: 5×10^5 tế bào sau chuyển nạp được thu và rửa sạch bằng PBS 1X rồi hòa tan trong FACS buffer (PBS 1% FBS) bổ sung thêm 1 μ g CD19 tái tổ hợp gắn FITC (rCD19-FITC, Abcam ab246020). Tế bào sau đó được ủ 30 phút trong tối tại 4 °C và được rửa sạch với FACS buffer. Tiếp theo hòa tan tế bào này trong 200 μ L FACS buffer và phân tích flow cytometry trên hệ thống BD Facyric sau mỗi lần cấy chuyển. Sử dụng CD64-APC-Cy7 (BD Biosciences) để phân biệt giữa CAR-T và tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo.

2.3.3. Đồng nuôi cấy tế bào CAR-T và

aAPC: Tế bào aAPC 1D2 được chuyển vào 10 mL RPMI 1640. Sau đó, tế bào được rửa sạch bằng PBS 1X và chuẩn nồng độ 10^7 tế bào/mL bằng môi trường CTS Optimizer T cell expansion. Bổ

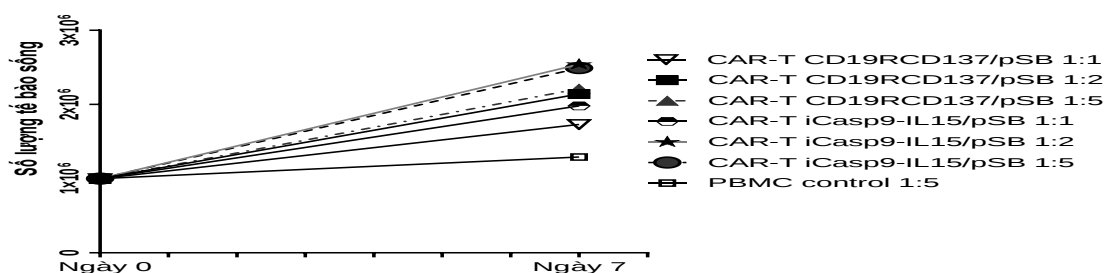
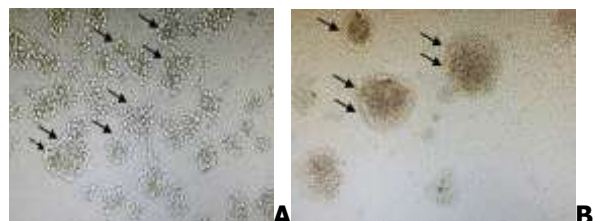
sung aAPC 1D2 vào môi trường nuôi cấy CAR-T theo tỉ lệ 1X hoặc 2X tế bào CAR-T sống.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Hình 1. Đồng nuôi cấy tế bào CAR-T và aAPC 1D2

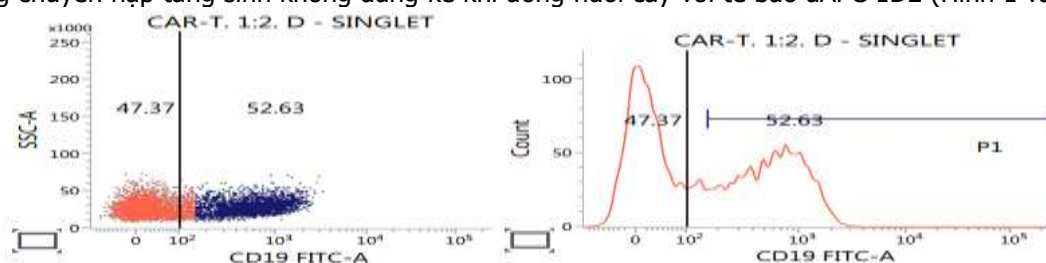
(A) Đồng nuôi cấy tế bào CAR-T và aAPC 1D2 ở ngày thứ 14, (B) Đồng nuôi cấy tế bào CAR-T và aAPC 1D2 ở ngày thứ 21.

Nhận xét: Tế bào CAR-T được kích hoạt bởi aAPC 1D2 hình thành cụm tế bào, ở ngày thứ 21 cụm tế bào CAR-T nhiều và lớn hơn ngày thứ 14.



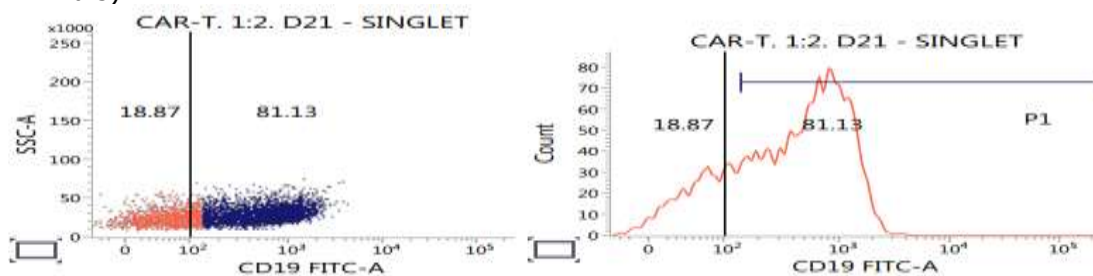
Hình 2. Số tế bào CAR-T sống sau 7 ngày đồng nuôi cấy với các lượng tế bào aAPC 1D2 khác nhau

Nhận xét: Chúng tôi cũng sử dụng 3 tỉ lệ là 1:1, 2:1, hoặc 5:1 cho tăng sinh tế bào CAR-T (tính theo số tế bào sống biểu hiện CAR 24h sau chuyển nạp). Ngoài ra, IL-2 (50U/mL) được bổ sung 2 ngày một lần trong quá trình nuôi cấy. Sau 7 ngày, tổng số tế bào sống được đếm bằng máy đếm tự động Countess™ II Automated Cell Counter và tế bào CAR-T được phân biệt với tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo còn dư bằng phân tích flow cytometry với rCD19-FITC. Kết quả cho thấy tế bào CAR-T tăng sinh tương đương nhau ở tỉ lệ 2:1 và 5:1 và tốt hơn so với tỉ lệ 1:1. Tế bào PBMC không chuyển nạp tăng sinh không đáng kể khi đồng nuôi cấy với tế bào aAPC 1D2 (Hình 1 và 2).



Hình 3. Đồng nuôi cấy tế bào CAR-T với aAPC 1D2 tỉ lệ 1:2 sau 14 ngày

Nhận xét: Kết quả từ Hình 2 cho thấy lượng tế bào aAPC 1D2 dùng cho quá trình tăng sinh được giữ ở mức 1 CAR-T : 2 aAPC 1D2. Kết quả phân tích biểu hiện CAR in vitro cho thấy quần thể tế bào T đạt biểu hiện CAR ở mức 52,63% sau 14 ngày (tế bào aAPC 1D2 được bổ sung 7 ngày/1 lần) (Hình 1 và 3).



Hình 4. Đồng nuôi cấy tế bào CAR-T với aAPC 1D2 ở tỉ lệ 1:2 sau 21 ngày