

detachments associated with atopic dermatitis. *Ophthalmology*. 1999;106(1):142-147.

5. **Lincoff H, Stopa M, Kreissig I.** Cutting the encircling band. Vol 262006.
6. **Ambati J, Arroyo JG.** Postoperative Complications of Scleral Buckling Surgery. *International Ophthalmology Clinics*. 2000;40(1):175-185.

THIẾT LẬP QUY TRÌNH ĐÁNH GIÁ NĂNG LỰC GÂY ĐỘC DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ CỦA TẾ BÀO GIẾT TỰ NHIÊN (NK) SAU NUÔI CẤY TĂNG SINH

Nguyễn Trọng Phúc¹, Phùng Thế Hải¹, Nguyễn Hoàng Phương¹,
Nguyễn Ngọc Tuấn¹, Hoàng Trung Kiên¹, Ngô Thu Hằng¹, Cấn Văn Mão¹,
Nguyễn Linh Toàn¹, Đỗ Anh Tuấn², Lê Văn Đông¹, Đỗ Khắc Đại¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu nhằm mục đích thiết lập quy trình đánh giá khả năng gây độc tế bào dòng ung thư của tế bào NK sau khi đã được hoạt hoá và tăng sinh in vitro dựa trên công cụ đánh giá là hệ thống đếm tế bào dòng chảy (flow cytometry). **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Hai khối tế bào NK: (1) tế bào NK máu ngoại vi phân lập từ người hiến (bệnh nhân được chẩn đoán xác định mắc ung thư tuyến tiền liệt tại bệnh viện K trung ương - cơ sở Tân Triều) tại thời điểm trước khi nuôi cấy tăng sinh (ngày đầu tiên - D0; NK-D0) và (2) tế bào NK tại thời điểm sau khi nuôi cấy tăng sinh bằng bộ kit nuôi cấy tăng sinh hoạt hoá tế bào NK (kit KBM) trong 14 ngày (Ngày thứ 14 - D14; NK-D14) được sản xuất; 2 nhóm tế bào NK này được tiến hành đồng nuôi cấy với tế bào dòng ung thư tuyến tiền liệt (PC3) theo tỉ lệ 5:1 (NK:PC3) trong vòng 6h để đánh giá năng lực hai khối tế bào NK này. Dựa vào tỉ lệ tế bào PC3 sống sót sau khi đồng nuôi cấy được đánh giá bằng kỹ thuật tế bào dòng chảy, xác định được tỉ lệ PC3 bị ly giải bởi tế bào NK. **Kết quả:** Dựa trên quy trình được thiết lập, chúng tôi nhận thấy tế bào NK sau nuôi cấy tăng sinh bộc lộ khả năng giết tế bào dòng ung thư mạnh mẽ hơn so với tế bào NK vừa phân lập từ máu ngoại vi. **Kết luận:** Chúng tôi thiết lập thành công quy trình đánh giá năng lực giết tế bào ung thư của tế bào NK sau khi nuôi cấy tăng sinh và hoạt hoá. Quy trình này là tiền đề phục vụ cho các nghiên cứu ứng dụng lâm sàng đánh giá năng lực tế bào miễn dịch sau nuôi cấy.

Từ khóa: Tế bào giết tự nhiên (NK), Tế bào dòng ung thư tuyến tiền liệt (PC3), nuôi cấy tăng sinh hoạt hoá, Đếm tế bào dòng chảy

SUMMARY

THE PROTOCOL FOR ANALYZING THE POTENCY OF POST-EXPANDED HUMAN NK CELLS IN KILLING CANCER CELL LINE IN VITRO

¹Học viện Quân Y

²Bệnh viện K Trung Ương

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Trọng Phúc

Email: nguyentrongphuc82@gmail.com

Ngày nhận bài: 12.6.2023

Ngày phản biện khoa học: 10.8.2023

Ngày duyệt bài: 21.8.2023

Objective: This study aims to establish a procedure to evaluate the cytotoxicity of NK cells after being activated and proliferated in vitro based on the evaluation tool of flow cytometry system. **Subjects and research methods:** We analyzed two sources of NK cells: (1) Peripheral blood NK cells isolated from a donor (the patient was diagnosed with prostate cancer at the central K hospital - Tan Trieu campus) at the time before proliferative culture (first day - D0; NK-D0) and (2) NK cells at the time of post-proliferative culture with the NK cell activation culture kit (KBM kit) in 14 days (Day 14 - D14; NK-D14); these two sources of NK cells were co-cultured with prostate cancer cells (PC3) in a ratio of 5:1 (NK:PC3) within 6 hours to evaluate the potency of two NK cells. The percentage of survived PC3 cells that were not lysed by NK cells was assessed by flow cytometry. **Results:** Based on the established procedure, we found that proliferative-cultured NK cells exhibited a stronger ability to kill cancer cell line (PC3) than fresh NK cells isolated from the patient. **Conclusion:** We have successfully established a procedure to evaluate the cancer cell killing ability of NK cells after proliferation and activation. This procedure is a premise for clinical application studies to evaluate the potency of immune cells after culture.

Keywords: Natural killer (NK) cells, Prostate cancer cell line (PC3), Culture for proliferation and activation, flow cytometry.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Phương pháp sử dụng tế bào miễn dịch trị liệu (immune cell therapy) như tế bào NK hiện nay đang được nghiên cứu, ứng dụng rộng rãi nhằm tăng cường miễn dịch cho cơ thể và hỗ trợ điều trị ung thư. Sau nuôi cấy tăng sinh tế bào trong phòng thí nghiệm, có nhiều mô hình khác nhau để đánh giá năng lực (potency) tế bào NK sau nuôi cấy trong việc gây độc dòng tế bào ung thư in vitro. Phương pháp hay được sử dụng trước đây là đồng nuôi cấy với tế bào ung thư dòng K562 và đánh giá khả năng tế bào NK giết K562 thông qua phương pháp đo chromium 51 (⁵¹Cr) được giải phóng vào môi trường sau khi tế bào K562 chết và ly giải [1]. Tuy nhiên phương pháp này tồn tại hạn chế như sử dụng yếu tố do

phóng xạ và thời gian theo dõi dài, phụ thuộc nhiều vào kỹ năng người thực hiện xét nghiệm... Vì vậy, chúng tôi nghiên cứu ứng dụng hệ thống đếm tế bào dòng chảy trong việc đánh giá năng lực giết tế bào đích của tế bào NK (được phân lập từ bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt (UTTTL) sau quá trình nuôi cấy sinh với hai mục tiêu:

1. Thiết lập mô hình đồng nuôi cấy tế bào NK với tế bào dòng ung thư tuyến tiền liệt PC3 trước và sau nuôi cấy tăng sinh.

2. Thiết lập quy trình đánh giá hiệu quả ly giải tế bào đích PC3 của tế bào NK bằng kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy (flow).

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Khối tế bào NK máu ngoại vi được phân lập từ 1 bệnh nhân được chẩn đoán UTTTL tại khoa ngoại tiết niệu, Bệnh viện K Trung Ương. Bệnh nhân hiện không mắc các bệnh lý ung thư khác đi kèm và đồng ý tự nguyện tham gia nghiên cứu.

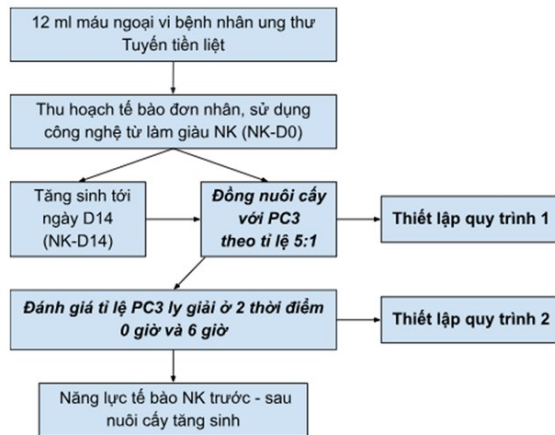
Khối tế bào giết tự nhiên (NK) được phân lập từ máu ngoại vi của người hiến bằng cách thu 12 mL máu tĩnh mạch vào ống vô trùng chứa chất chống đông heparin; sau đó, tế bào NK được tinh sạch từ mẫu máu kể trên bằng bộ kit tách công nghệ từ tính MicroBead (Miltenyi/ Đức) với tỷ lệ tinh sạch đạt trên 90% tế bào NK. Tế bào tại thời điểm vừa phân lập khỏi người hiến (NK-D0) được sử dụng để tiến hành đồng nuôi cấy giết tế bào đích, hoặc tiếp tục nuôi cấy tăng sinh hoạt hoá bằng bộ kit (KBM - Kohjin-Bio, Nhật Bản) để thu hoạch tế bào NK thời điểm ngày thứ 14 sau nuôi cấy (NK-D14). Đồng thời, chúng tôi cũng đánh giá khả năng giết tế bào đích của tế bào NK-D14.

Vật liệu nghiên cứu:

- Tủ nuôi cấy CO2 (Mettler/Đức)
- Kính hiển vi (Olympus/Nhật bản)
- Máy đếm tế bào dòng chảy NovoCyte (ACEA Biosciences/ Mỹ)
- Bồn đếm tế bào Neubauer
- Sinh phẩm, hóa chất:
 - Tế bào dòng ung thư PC3 (code: CRL-1435 ATCC), được hỗ trợ từ Bộ môn Sinh lý Bệnh, Học viện Quân y.
 - Dung dịch thu hoạch tế bào PC3 Accutase (BioLegend Inc., Mỹ)
 - Môi trường RPMI 1640, Huyết thanh bào thai bò FBS (Gibco-Thermo Fisher Scientific/ Mỹ)
 - Dung dịch PBS 1X free Ca, Mg (Gibco – Thermo Fisher Scientific/ Mỹ)

- Dung dịch nhuộm tế bào Trypan blue ((Gibco – Thermo Fisher Scientific/ Mỹ)
- Các kháng thể gắn huỳnh quang CD3-FITC, CD56-PE, CD44-APC (Biolegends/ Mỹ)
- Ống nuôi cấy vô trùng 12 × 75 mm polycarbonate (Fisher Scientific/ Mỹ)
- Ống eppendorf 1.5ml (Eppendorf/ Đức)

Sơ đồ nghiên cứu:

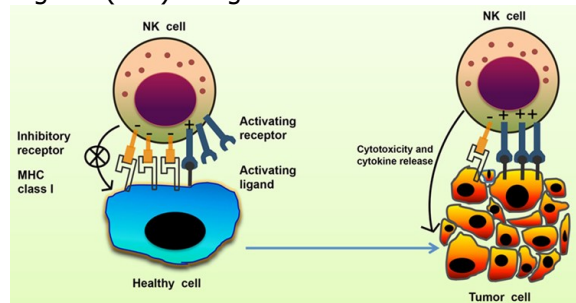


Hình 1. Sơ đồ nghiên cứu

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Mô hình đồng nuôi cấy (Thiết lập quy trình 1)

Nguyên lý: Tế bào NK có khả năng nhận diện và tiêu diệt tế bào đích (tế bào ung thư) là do tế bào ung thư bộc lộ các phối tử gây hoạt hoá tế bào NK, đồng thời tế bào ung thư cũng giảm biểu lộ phối tử gây ức chế tế bào NK (ví dụ như phân tử MHC lớp I). Vì thế, khi tế bào NK tiếp xúc với tế bào ung thư, cán cân tín hiệu gửi đến tế bào NK thiên về hướng hoạt hoá vì thế tế bào NK gây độc trực tiếp tế bào đích thông qua việc giải phóng perforin/granzyme (Hình 2, [2]). Dựa vào cơ sở lý thuyết trên, chúng tôi tiến hành đồng nuôi cấy tế bào NK (trước và sau nuôi cấy tăng sinh hoạt hoá in vitro) với tế bào đích dòng ung thư (PC3) trong 6h.



Hình 2. Cơ chế giết tế bào đích của NK dựa trên sự thay đổi bề mặt của MHC-I [2]

NK cell – tế bào NK; Inhibitory receptor – thụ thể ức chế; Activating receptor – Thụ thể hoạt hóa; MHC class I – MHC lớp I; Healthy cell – tế bào khỏe mạnh; Tumor cell – Tế bào ung thư; Cytotoxicity and cytokine release – Gây độc và giải phóng các hoạt chất sinh học.

Các bước tiến hành đồng nuôi cấy:

Bước 1: Chuẩn bị

- Tế bào NK ngày D0 (NK-D0): Khối tế bào NK được làm giàu bằng phương pháp sử dụng cột từ, đạt độ tinh sạch trên 90% là tế bào NK, sản phẩm được rửa 2 lần bằng dung dịch PBS 1X (1500 vòng/phút/5 phút) và hoàn nguyên trong môi trường RPMI + 10%FBS, số lượng tế bào cần chuẩn bị là $0,5 \times 10^6$ tế bào sống (sử dụng phương pháp nhuộm trypan blue và đếm tế bào bằng buồng đếm Neubauer), mật độ tế bào (tb) đạt 1000 tb/uL (microlit).

- Tế bào NK ngày D14 (NK-D14): Khối tế bào NK sau nuôi tăng sinh được rửa 2 lần bằng dung dịch PBS 1X, độ tinh sạch đạt trên 90%, được chuẩn bị về số lượng và mật độ tương tự như D0.

- Tế bào dòng ung thư tuyến tiền liệt (PC3): Tế bào PC3 được nuôi trong chai T25 (chai dành cho tế bào bám dính) với môi trường nuôi cấy (RPMI + 10%FBS). PC3 được thu hoạch khi mật độ tế bào đạt khoảng 70-90% sử dụng dung dịch Accutase (1,5mL, 37°C, 5phút). Sau đó, tế bào được rửa 2 lần bằng dung dịch RPMI và tiếp tục cấy chuyển tế bào tiếp theo (passage) trong môi trường RPMI + 10%FBS hoặc chuẩn tế bào về mật độ 1000 tb/uL với số lượng tuyệt đối là 200.000 tế bào sống cho thử nghiệm đồng nuôi cấy.

Bước 2. Tiến hành thử nghiệm

- Ghi nhãn các ống nuôi cấy lần lượt: ống 1 (chúng PC3), ống 2 (NK + PC3).

- Xác định tỉ lệ E:T (Effector cell/Tế bào giết: Target cell/Tế bào đích) là 5:1

✓ Ống 1, chúng PC3: Dùng pipet trộn đều nhẹ nhàng và hút 60 ul từ ống PC3 tương đương 60.000 tế bào PC3 (theo bước chuẩn bị), bổ sung 300 ul môi trường RPMI + 10%FBS để đạt thể tích 360 ul.

✓ Ống 2, NK+PC3: Theo tỉ lệ 5:1, dùng pipet trộn đều nhẹ nhàng và hút 300 ul từ ống NK, tương đương 300.000 tế bào và bổ sung 60 ul từ ống PC3 tương đương 60.000 tế bào PC3. Vậy, thể tích cuối cùng của ống 2 đạt 360 ul có chứa tổng số 360.000 tế bào với tỉ lệ 5 tế bào NK:1 tế bào PC3.

- Trộn đều nhẹ nhàng cả 2 ống và dùng pipet hút 180 ul (một nửa thể tích) từ mỗi ống (tránh tạo bọt) sang 2 ống eppendorf 1.5ml đã

dán nhãn tương ứng, 2 ống này được chuyển đi đánh giá kết quả ở thời điểm 0h bằng kỹ thuật tế bào dòng chảy.

- Đặt lắ và chuyển 2 ống nuôi cấy còn lại vào tủ ẩm 37°C với 5% CO₂ để đánh giá ở thời điểm 6h đồng nuôi cấy.

2.2.2. Đánh giá kết quả đồng nuôi cấy bằng kỹ thuật tế bào dòng chảy (Thiết lập quy trình 2)

Nguyên lý: Phương pháp đếm tế bào dòng chảy (flow cytometry) dựa việc sử dụng ánh sáng laser để phát quang các dấu ấn của tế bào được nhuộm các kháng thể gắn màu huỳnh quang riêng biệt khi các tế bào này di chuyển theo dòng chảy qua vị trí tia laser chiếu qua. Dữ liệu thu được từ sự phát quang của mỗi tế bào được ghi lại và phân tích bằng phần mềm đặc biệt. Phương pháp đếm tế bào bằng flow cytometry cho phép phân tích và đếm tế bào nhanh chóng và chính xác dựa trên các đặc điểm riêng của chúng.

Trong thử nghiệm này, chúng tôi sử dụng kháng thể kháng CD44-APC để phát hiện kháng nguyên CD44 trên tế bào PC3, anti CD3-FITC để phát hiện tế bào T, anti CD56-PE để phát hiện tế bào NK. (Kết quả có độ chính xác cao khi số dữ kiện (event) cho mỗi phân tích đạt tối thiểu 5000 event).

Các bước tiến hành:

Bước 1: Chuẩn bị

- Nguyên liệu: Khối tế bào NK-D0 (tinh sạch đạt 95,1% tế bào NK) và NK-D14 (độ tinh sạch 90,5% tế bào NK) được đồng nuôi cấy với PC3 theo tỉ lệ 5:1, đánh giá tại 2 thời điểm 0h và 6h theo thiết kế từ "Mô hình đồng nuôi cấy". Tại mỗi thời điểm, đánh giá các ống 1 (chúng PC3) và ống 2 (5NK+1PC3)

- Chuẩn bị: Ly tâm ống eppendorf chứa hỗn hợp tế bào NK + PC3 với tốc độ 1800 vòng/phút trong 3 phút ở 4°C. Nhẹ nhàng hút loại bỏ 120 ul dịch nổi, trộn đều và hút 25 ul sang ống 1.5 khác cho xét nghiệm PC3. Làm tương tự với ống chúng PC3.

Bước 2: Thực hiện

- Nhỏ các kháng thể 0,25 ul CD3-FITC, 0,25 ul CD56-PE, 0,25 ul CD44-APC vào mỗi ống chứa 25ul PC3 đã chuẩn bị (Tỷ lệ kháng thể trong hỗn hợp phản ứng là 1:100). Nhuộm lạnh (4°C) trong 30 phút, tránh sáng.

- Đọc 200 ul tại thời điểm 0h (số lượng PC3 thường đạt tối thiểu 5.000 tế bào ở thời điểm này để đảm bảo cho việc phân tích kết quả). Thực hiện tương tự với thời điểm 6h.

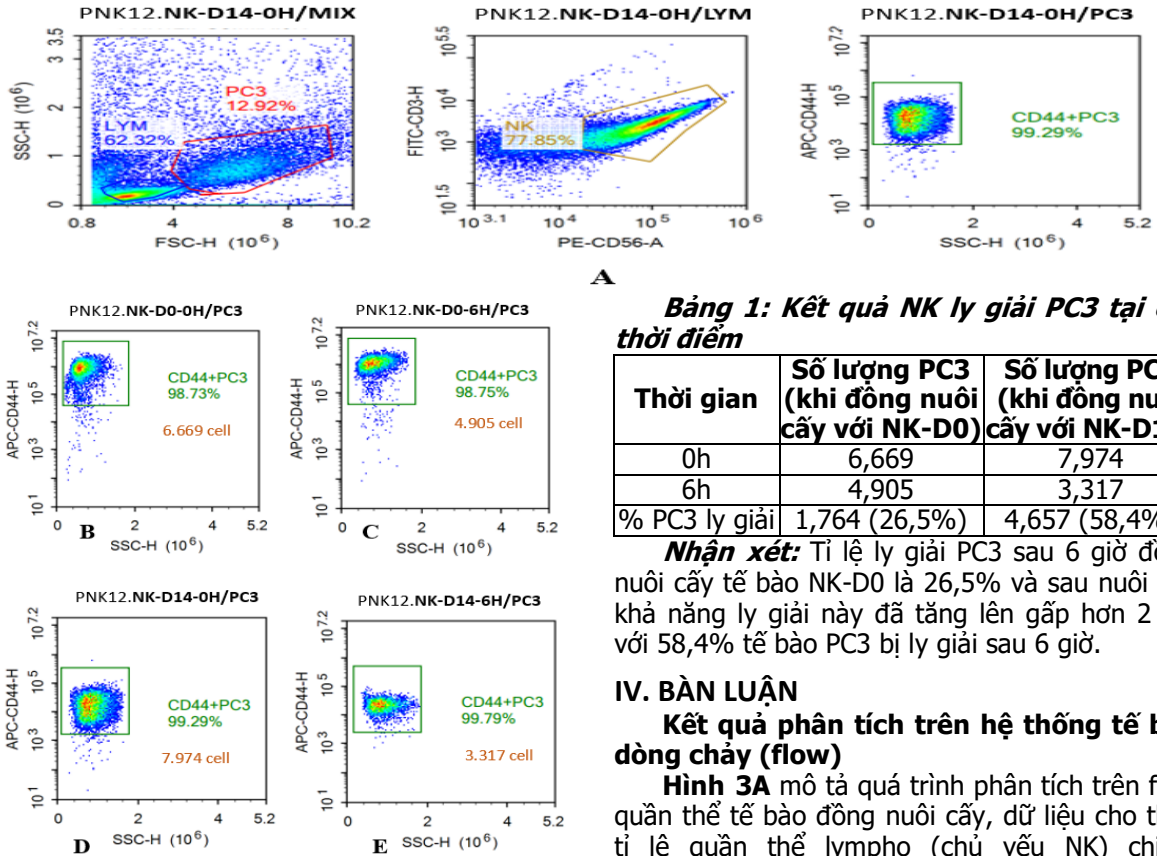
Bước 3: Phân tích kết quả

- Cách "gate": PC3 được định danh dựa trên vùng quần thể tế bào có SSC và FSC cao hơn cách biệt so với quần thể lympho (NK).
- Quần thể PC3 sống sau khi đồng nuôi cấy với NK được định nghĩa là quần thể âm tính với

- vùng CD3-FITC và CD56-PE, dương tính với CD44-APC (CD3-CD56-CD44+).
- Tỷ lệ phần trăm PC3 bị giết được tính theo công thức = [số PC3 bị ly giải (PC3 thời điểm 0h - PC3 thời điểm 6h)/PC3 thời điểm 0h x 100] - % PC3 ly giải tự nhiên (theo giếng chứng).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Hiệu quả giết PC3 bởi tế bào NK



Hình 3. Kết quả NK giết PC3 sau đồng nuôi cấy theo các thời điểm khác nhau

A) Lựa chọn phân tích (gating) quần thể tế bào NK (Lym) và quần thể tế bào PC3 (PC3) dựa trên tín hiệu SSC và FSC. Sau đó, lựa chọn quần thể NK có đặc điểm biểu lộ thụ thể CD56+ và lựa chọn quần thể tế bào PC3 có đặc điểm CD44+. B) Hình ảnh mô tả quần thể PC3 thời điểm 0h khi đồng nuôi cấy với tế bào NK ngày D0 (NK-D0). C) Hình ảnh mô tả quần thể PC3 thời điểm 6h khi đồng nuôi cấy với tế bào NK ngày D0 (NK-D0). D) Hình ảnh mô tả quần thể PC3 thời điểm 0h khi đồng nuôi cấy với tế bào NK ngày D14 (NK-D14). E) Hình ảnh mô tả quần thể PC3 thời điểm 6h khi đồng nuôi cấy với tế bào NK ngày D14 (NK-D14).

3.2. Hiệu quả giết PC3 trong quá trình đồng nuôi cấy

Bảng 1: Kết quả NK ly giải PC3 tại các thời điểm

Thời gian	Số lượng PC3 (khi đồng nuôi cấy với NK-D0)	Số lượng PC3 (khi đồng nuôi cấy với NK-D14)
0h	6,669	7,974
6h	4,905	3,317
% PC3 ly giải	1,764 (26,5%)	4,657 (58,4%)

Nhận xét: Tỷ lệ ly giải PC3 sau 6 giờ đồng nuôi cấy tế bào NK-D0 là 26,5% và sau nuôi cấy khả năng ly giải này đã tăng lên gấp hơn 2 lần với 58,4% tế bào PC3 bị ly giải sau 6 giờ.

IV. BÀN LUẬN

Kết quả phân tích trên hệ thống tế bào dòng chảy (flow)

Hình 3A mô tả quá trình phân tích trên flow quần thể tế bào đồng nuôi cấy, dữ liệu cho thấy tỷ lệ quần thể lympho (chủ yếu NK) chiếm 62,3%, quần thể PC3 chiếm 12,9%. Tỷ lệ đo đạc trên flow này chính xác với tỷ lệ đầu vào theo thiết kế là 5:1, đây là một chỉ điểm để kiểm định thao tác chuẩn bị và trộn 2 nhóm tế bào đồng nuôi cấy ban đầu. Ngoài ra, phân tích còn cho thấy >99% tế bào PC3 dương tính với marker CD44, theo các nghiên cứu đã công bố, tỷ lệ tế bào đồng ung thư PC3 dương tính với CD44 là 93,35±3,53% [3]. Như vậy, trong thử nghiệm này chúng tôi sử dụng kháng thể CD44-APC cho phép phát hiện hầu hết sự có mặt của tế bào PC3 trong mẫu thử.

Hình 3B và 3C cho thấy khả năng NK-D0 giết PC3 là không đáng kể, chỉ làm ly giải khoảng 26,5% (Bảng 1). Có thể lý giải dữ liệu này theo 2 góc độ: một là, có thể tế bào NK vừa tách khỏi máu ngoại vi cơ thể người bộc lộ khả năng giết

tế bào PC3 tương đối hạn chế tại thời điểm 6h; hai là, có thể NK này được tách từ bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt, vì thế hoạt tính tế bào NK có thể bị ảnh hưởng do tình trạng bệnh hay các yếu tố ức chế miễn dịch được tiết ra từ chính khối u [4]. Chúng tôi chưa thực hiện quy trình này trên tế bào NK khoẻ mạnh nên chưa thể đưa ra nhận xét rằng có hay không sự khác nhau về khả năng giết tế bào đích của tế bào NK ở bệnh nhân UTTL và người khoẻ mạnh ngay sau khi phân lập từ máu ngoại vi.

Tuy nhiên, tế bào NK-D14 có khả năng giết tế bào ung thư PC3 tương đối rõ với kết quả là 58,4% PC3 bị ly giải tại thời điểm 6h đồng nuôi cấy (Hình 3D, 3E); tỷ lệ ly giải PC3 bởi NK-D14 tăng lên đáng kể so với tỷ lệ ly giải PC3 bởi NK-D0 (Hình 3B, 3C). Mặt khác, chúng tôi nhận thấy gần như tế bào PC3 không bị ly giải hoặc chết tự nhiên sau 6h trong cùng điều kiện thí nghiệm. Như vậy, sau 6h đồng nuôi cấy, tỉ lệ tế bào PC3 bị giết thực chất được tính bằng công thức:

$$\%PC3 \text{ ly giải} = [(PC3 \text{ 0h} - PC3 \text{ 6h}) / PC3 \text{ 0h} \times 100] \text{ (Bảng 1)}.$$

Căn cứ thiết lập thời điểm đánh giá. Để có cơ sở lựa chọn mốc thời gian là 6h và tỉ lệ E:T là 5:1, theo các nghiên cứu đã công bố, chúng tôi thấy có nhiều thiết kế về thời gian và tỉ lệ được đưa ra như từ 10:1, 5:1,...tới 0,5:1 và đánh giá ở nhiều thời điểm tới 24h [5,6]. Trước khi lựa chọn và triển khai mô hình này, chúng tôi đã có một số thử nghiệm ở các tỉ lệ E:T khác nhau và đánh giá ở một số thời điểm tới 24h bằng kỹ thuật nhuộm MTT (phương pháp này dựa vào việc tế bào sống có khả năng chuyển muối tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) bởi enzym dehydrogenase ở ty thể thành sản phẩm formazan có màu xanh tím. Lượng formazan sinh ra tỷ lệ thuận với số lượng tế bào sống trong môi trường, sản phẩm được định lượng bằng đo mật độ quang ở bước sóng tối ưu 570nm) [7], tuy nhiên quan sát cho thấy ở thời điểm 24h tế bào PC3 bị giết không thấy có sự khác biệt so với thời điểm 6h; mặt khác, ở tỉ lệ 5:1 cho thấy khả năng giết PC3 của NK sau 6h là rõ nét và số lượng tế bào đầu vào cũng thuận tiện cho quá trình chuẩn bị theo thiết kế; kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu trước đó [5,6]. Bên cạnh đó, chúng tôi nhận thấy sử dụng phương pháp MTT cho thử nghiệm đồng nuôi cấy có một số hạn chế do lượng tế bào NK bám dính trên tế bào PC3 sau khi phản ứng có thể làm ảnh hưởng nhiều đến tín hiệu nền khi thực hiện bằng phương pháp đo quang làm độ sai

lệch kết quả cao. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn tỉ lệ E:T là 5:1 và thời điểm đánh giá là 0h và 6h sau nuôi cấy nhưng đánh giá hiệu quả giết PC3 bằng kỹ thuật dòng chảy tế bào để thuận tiện trong khâu thiết kế thí nghiệm và thời gian theo dõi tương đối ngắn, đồng thời phân tích trên hệ thống đếm tế bào dòng chảy (flow cytometry) cho độ chính xác cao.

Một số yếu tố ảnh hưởng tới thử nghiệm, cách khắc phục. Thử nghiệm này là một giai đoạn của một quá trình bao gồm nhiều kỹ thuật: Thu thập mẫu – Tách bạch cầu đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) – Tinh sạch NK – Đồng nuôi cấy NK-D0 – Nuôi cấy sơ cấp – Nuôi cấy thứ cấp – Đồng nuôi cấy NK-D14 nên việc thực hiện thí nghiệm cần được lên kế hoạch và chuẩn bị trước, khi thực hiện tuân thủ tuyệt đối quy trình, có bảng kiểm và có người giám sát để đảm bảo không có sai sót.

V. KẾT LUẬN

Chúng tôi thiết lập thành công quy trình đánh giá năng lực giết tế bào ung thư của tế bào NK sau khi nuôi tăng sinh và hoạt hoá dựa trên công cụ đếm tế bào dòng chảy để đánh giá tỷ lệ ly giải tế bào đích (PC3).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **C.W. Buller, S.O. Mathew.** (2022). NK Cell Isolation and Cytotoxicity by Radioactive Chromium Release Assay and DELFIA-EuTDA Cytotoxicity Assay. In: Shimasaki, N. (eds) Natural Killer (NK) Cells. Methods in Molecular Biology. vol 2463. Humana. New York. NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2160-8_16
2. **S. Paul, G. Lal.** The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. Front Immunol. 2017 Sep 13;8:1124. doi: 10.3389/fimmu.2017.01124. PMID: 28955340; PMCID: PMC5601256.
3. **C.Y. Su, G.C. Huang, Y.C. Chang, Y.J. Chen, H.W. Fana.** Analyzing the Expression of Biomarkers in Prostate Cancer Cell Lines. In Vivo. 2021 May-Jun;35(3):1545-1548. doi: 10.21873/in vivo.12408.
4. **C. Pasero, G. Gravis, M. Guerin, S. Granieaud, J. Thomassin-Piana, P. Rocchi, M. Paciencia-Gros, F. Poizat, M. Bentobii, F. Azario-Cheillan, J. Walz, N. Salem, S. Brunelle, A. Moretta, D. Olive.** Inherent and Tumor-Driven Immune Tolerance in the Prostate Microenvironment Impairs Natural Killer Cell Antitumor Activity. Cancer Res. 2016 Apr 15; 76(8):2153-65. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1965.
5. **F. Wang, X. Dong, J. Wang, F. Yang, D. Liu, J. Ma, S. Liu, D. Chang, N. Xing.** Allogeneic Expanded Human Peripheral NK Cells Control Prostate Cancer Growth in a Preclinical Mouse Model of Castration-Resistant Prostate Cancer. J

Immunol Res. 2022 Apr 11;2022:1786395. doi: 10.1155/2022/1786395.

6. **S.P. Hood, G.A. Foulds, H. Imrie, S. Reeder, S.E.B. McArdle, M. Khan, A.G. Pocklev.** Phenotype and Function of Activated Natural Killer Cells From Patients With Prostate Cancer: Patient-Dependent Responses to Priming and IL-2

Activation. Front Immunol. 2019 Jan 25;9:3169. doi: 10.3389/fimmu.2018.03169.

7. **T. Mosmann,** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods. 65: 55-63.

CÁC YẾU TỐ TIÊN ĐOÁN TỬ VONG TRONG VÒNG 1 NĂM SAU CẤY VAN ĐỘNG MẠCH CHỦ QUA ỐNG THÔNG TRÊN BỆNH NHÂN NGƯỜI CAO TUỔI VIỆT NAM HẸP VAN ĐỘNG MẠCH CHỦ NẶNG: KINH NGHIỆM TẠI MỘT TRUNG TÂM

Nguyễn Quốc Khoa^{1,2}, Nguyễn Văn Dương³, Lê Thị Thuý³, Nguyễn Văn Tân^{2,4}, Nguyễn Đức Công⁵, Võ Thành Nhân^{2,3}

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu này nhằm xác định các yếu tố tiên lượng tử vong trong vòng 1 năm trên bệnh nhân người cao tuổi tại Việt Nam bị hẹp van động chủ (ĐMC) nặng có triệu chứng được cấy van động mạch chủ qua ống thông (TAVI). **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Từ tháng 3 năm 2017 đến tháng 12 năm 2022 có 71 bệnh nhân (≥ 60 tuổi) bị hẹp van ĐMC nặng có triệu chứng được TAVI tại Bệnh viện Vinmec Central Park và có thời gian theo dõi ít nhất 1 năm. Các đặc điểm bệnh nhân được phân tích theo 2 nhóm (tử vong-TV và còn sống-CS) tại thời điểm 1 năm với các tiêu chí theo VARC-2. **Kết quả:** Có 4 bệnh nhân (5,6%) TV trong vòng 1 năm sau TAVI. Nhóm TV có tỷ lệ cao hơn về suy tim mạn, bệnh mạch máu não, điểm nguy cơ phẫu thuật (STS), van động chủ 2 mảnh, chênh áp trung bình và tối đa qua van ĐMC. Ngược lại, nhóm bệnh nhân CS có chức năng tâm thu thất trái và tỷ lệ thành công cấy van cao hơn. Phân tích hồi quy đơn biến cho thấy có 5 yếu tố làm tăng TV tại thời điểm 1 năm sau TAVI bao gồm suy tim mạn, bệnh mạch máu não, điểm nguy cơ phẫu thuật STS, chênh áp trung bình qua van ĐMC và thất bại khi cấy van. **Kết luận:** Nghiên cứu trên 71 bệnh nhân người cao tuổi Việt Nam được TAVI tại 1 trung tâm cho thấy các yếu tố tiên đoán TV trong vòng 1 năm sau thủ thuật bao gồm suy tim mạn, bệnh mạch máu não, điểm nguy cơ phẫu thuật (STS), chênh áp trung bình qua van ĐMC và thất bại cấy van.

Từ khóa: Tử vong một năm, thay van động mạch chủ qua ống thông, Việt Nam

SUMMARY

FACTORS PREDICTING 1-YEAR MORTALITY AFTER TRANSCATHETER AORTIC VALVE IMPLANTATION IN ELDERLY VIETNAMESE PATIENTS WITH SEVERE AORTIC VALVE STENOSIS: INSIGHTS FROM A SINGLE-CENTER EXPERIENCE

Objectives: This study aimed to identify the prognostic factors for one-year mortality in elderly Vietnamese patients with symptomatic severe aortic valve stenosis undergoing transcatheter aortic valve implantation (TAVI). **Patients and methods:** From March 2017 to December 2022, 71 patients (≥ 60 years old) with symptomatic severe aortic valve stenosis underwent TAVI at Vinmec Central Park Hospital, with a minimum follow-up duration of 1 year. The patient characteristics were analyzed and compared between two groups (survival and mortality) at the one-year mark using VARC-2 criteria. **Results:** Four patients (5.6%) died within one year after TAVI. The mortality group had a higher prevalence of chronic heart failure, cerebrovascular disease, STS surgical risk score, bicuspid aortic valve, and mean and peak transaortic pressure gradient in the mortality group. Conversely, the survival group had a higher left ventricular ejection fraction (LVEF) and device success rate. Univariate logistic regression analysis identified five factors associated with increased one-year mortality after TAVI, including chronic heart failure, cerebrovascular disease, STS surgical risk score, mean transaortic pressure gradient, and failure of device implantation. **Conclusion:** The study conducted on 71 elderly Vietnamese patients with severe symptomatic aortic valve stenosis who received TAVI at a single center identified predictive factors for mortality within 1-year, including chronic heart failure, cerebrovascular disease, STS surgical risk score, mean transaortic pressure gradient, and device implantation failure.

Keywords: 1-year mortality, TAVI, Vietnam.

¹Bệnh viện 30-4, Bộ Công an

²Đại học Y - Dược TP. Hồ Chí Minh

³Bệnh viện Đa khoa Quốc tế Vinmec Central Park, TP. Hồ Chí Minh

⁴Bệnh viện Thống Nhất, Tp. Hồ Chí Minh

⁵Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, TP. Hồ Chí Minh

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Đức Công

Email: cong1608@gmail.com

Ngày nhận bài: 9.6.2023

Ngày phản biện khoa học: 10.8.2023

Ngày duyệt bài: 21.8.2023