



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
2-0001777

(51)⁷ **C12N 5/07, 5/00**

(13) **Y**

(21) 2-2016-00331

(22) 07.01.2014

(67) 1-2014-00055

(45) 27.08.2018 365

(43)

(73) **ĐẠI HỌC QUỐC GIA THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH (VN)**
Phường Linh Trung, quận Thủ Đức, thành phố Hồ Chí Minh

(72) **Phạm Văn Phúc (VN)**

(54) **QUY TRÌNH ĐÁNH GIÁ CHỨC NĂNG TẾ BÀO TUA TRONG ỐNG NGHIỆM**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình đánh giá chức năng tế bào tua trong ống nghiệm bao gồm các bước:

(i) bước 1 - tạo tế bào tua từ tế bào có nhân sử dụng cytokin;

(ii) bước 2 - tạo tế bào lympho T;

(iii) bước 3 - cho tế bào tua trưởng thành vào đĩa 96 giếng;

(iv) bước 4 - ủ;

(v) bước 5 - ly tâm loại bỏ dịch nổi;

(vi) bước 6 - bổ sung tế bào lympho T;

(vii) bước 7 - ủ đĩa đã bổ sung tế bào lympho T;

(viii) bước 8 - ly tâm đĩa đã bổ sung tế bào lympho T;

(ix) bước 9 - cho tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư vào đĩa sau ly tâm; và

(x) bước 10 - theo dõi và đọc kết quả.

Quy trình theo giải pháp hữu ích mang lại nhiều lợi ích cho xã hội như giúp giảm giá thành, tăng độ chính xác của việc đánh giá vai trò chức năng tế bào tua trước khi ứng dụng điều trị cho bệnh nhân; sự chính xác của việc đánh giá này sẽ nâng cao hiệu quả điều trị ung thư bằng liệu pháp này và giúp giảm chi phí điều trị cho bệnh nhân.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học y - dược, y học và chăm sóc sức khoẻ. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập tới quy trình đánh giá chức năng tế bào tua trong ống nghiệm để đánh giá chức năng, hiệu quả của liệu pháp miễn dịch sử dụng tế bào tua trong điều trị ung thư. Với quy trình này, việc đánh giá hiệu quả của liệu pháp trị liệu ung thư bằng tế bào tua đơn giản, dễ thực hiện, có hiệu quả và độ chính xác cao và được thực hiện bên ngoài cơ thể bệnh nhân.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Đã biết các phương pháp kỹ thuật khác để đánh giá chức năng tế bào tua trong ống nghiệm như phép phân tích hấp phụ miễn dịch liên kết với enzyme (enzyme linked immunosorbent assay – ELISA), đánh giá các protein dựa vào kháng thể gắn lên hạt bằng phép phân tích tế bào gắn lên hạt (cytometric bead array – CBA), kỹ thuật đánh giá chức năng thông qua việc định lượng protein tại các vị trí có liên kết enzyme bằng phép phân tích vị trí miễn dịch liên kết với enzyme (enzyme linked immunospot – ELISPOT), kỹ thuật đánh giá tế bào thông qua sự chèn thuốc nhuộm vào axit nucleic bằng phép phân tích kết hợp bromodeoxyuridin (BrDU) hoặc kỹ thuật đo sự tăng trưởng tế bào lympho LPA. Nguyên tắc chung của các phương pháp này là đánh giá sự đáp ứng tế bào thông qua kết quả đánh giá các chất tiết gọi là cytokin được sản xuất, trong đó, một số phương pháp đánh giá sự tăng sinh thông qua việc nhuộm với các chất phát huỳnh quang. Đây là những phương pháp tiến hành không đòi hỏi đầu tư trang thiết bị kèm theo hiện đại, đánh giá đơn giản, dễ dàng và ít bước tiến hành. Nhưng nhược điểm là độ chính xác không cao vì đây đều là các phương pháp đánh giá gián tiếp thông qua các chất có tác dụng tiêu diệt tế bào ung thư được tiết ra từ tế bào tua, không tức thời tác động theo thời gian và tính tự động thấp vì phụ thuộc hầu hết

vào người tiến hành và được thực hiện một cách gián đoạn, thông qua các lần lấy mẫu khác nhau.

Công ty ACEA (ACEA Biosciences Inc.) đã giới thiệu hệ thống phân tích tế bào theo thời gian thực xCelligence. Hệ thống này cho phép đọc tế bào liên tục và khép kín, không cần sử dụng thêm các tác nhân ngoài và không chịu sự tác động của các tác nhân bên ngoài trong quá trình thực hiện phép phân tích. Hệ thống này có thể hữu ích trong việc thực hiện đánh giá chức năng tế bào tua trong ống nghiệm. Tuy nhiên, hiện nay chưa có quy trình đánh giá chức năng tế bào tua trong ống nghiệm nào sử dụng hệ thống xCelligence này được công bố một cách chi tiết, để có thể thực hiện việc đánh giá một cách hiệu quả và chính xác.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để khắc phục các nhược điểm nêu ở trên, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình đánh giá chức năng tế bào tua trong ống nghiệm bằng cách định lượng trực tiếp thông qua sự chết và ức chế tăng sinh của tế bào tua bằng cách sử dụng hệ thống đọc tế bào liên tục xCelligence của công ty ACEA. Quy trình này cho phép đánh giá một cách chính xác tế bào ung thư có thể bị tiêu diệt theo thời gian bởi tế bào tua hay không. Vì những tế bào tua này cũng là tế bào sẽ tiêm truyền vào bệnh nhân ung thư và những tế bào ung thư sử dụng trong kỹ thuật cũng là từ bệnh nhân ung thư, nên nếu tế bào tua tiêu diệt được tế bào ung thư thì hiệu quả điều trị sẽ có thể dự đoán được. Hơn nữa, phương pháp này còn cho phép tự động hoá thao tác đánh giá và định lượng được hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư.

Để đánh giá khả năng tiêu diệt tế bào ung thư của tế bào tua trong ống nghiệm trước khi ứng dụng ghép điều trị trên bệnh nhân ung thư, đầu tiên, quy trình tiến hành việc cho tế bào tua tiếp xúc với kháng nguyên tế bào ung thư trong đĩa có gắn điện cực vàng ở mặt đáy của đĩa; sau 24 – 72 giờ, đĩa được ly tâm để giữ lại tế bào tua và loại bỏ kháng nguyên tế bào ung thư còn thừa; sau đó, tế bào lympho được cho vào trong đĩa cùng với tế bào tua đã tiếp xúc với kháng nguyên tế bào ung thư. Sau 36 giờ tiếp theo, tế bào ung thư được cho vào đĩa trên cùng với môi trường nuôi thích hợp. Cuối

cùng, đĩa được đặt vào hệ thống máy xCelligence của công ty ACEA để đọc khả năng tăng trưởng của tế bào ung thư. Dựa vào đường cong tăng trưởng của tế bào ung thư từ máy mà cho biết tế bào tua có ức chế hay tiêu diệt tế bào ung thư đang tăng trưởng hay không.

Quy trình đánh giá chức năng tế bào tua trong ống nghiệm theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

Bước 1: tạo tế bào tua từ tế bào có nhân sử dụng các cytokin;

Bước 2: tạo tế bào lympho T;

Bước 3: cho tế bào tua trưởng thành vào đĩa 96 giếng;

Bước 4: tạo kháng nguyên tế bào gốc ung thư; và ủ tế bào với kháng nguyên;

Bước 5: ly tâm loại bỏ dịch nổi;

Bước 6: bổ sung tế bào lympho T;

Bước 7: ủ đĩa đã bổ sung tế bào lympho T;

Bước 8: ly tâm đĩa đã bổ sung tế bào lympho T;

Bước 9: cho tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư vào đĩa sau ly tâm; và

Bước 10: theo dõi và đọc kết quả.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện tế bào trong quá trình biệt hóa thành tế bào tua. Trong đó, (A) Tế bào đơn nhân thu nhận từ máu cuống rốn; (B) Tế bào tua chưa trưởng thành được cảm ứng; và (C) Tế bào tua trưởng thành.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích dấu ấn (marker) tế bào đơn nhân và tế bào tua. Trong đó, (A-D) Tế bào đơn nhân (mẫu đối chứng); (E-H) Tế bào tua chưa trưởng thành được cảm ứng (induced dendritic cell - iDC); và (I-L) Tế bào tua trưởng thành (mature dendritic cell - mDC).

Hình 3 là hình ảnh thể hiện kết quả đánh giá phần trăm thu nhận tế bào T từ máu cuống rốn. Các tế bào T sau khi thu nhận dương tính với marker CD3, CD4 và CD8.

Hình 4 là biểu đồ thể hiện sự tăng sinh của tế bào ung thư trong các nhóm khác nhau. G0, G1, G2, G3 là các nhóm đối chứng. G0: giếng chỉ chứa môi trường nuôi; G1: Giếng chỉ chứa tế bào ung thư, G2: Giếng chỉ chứa tế bào tua. G3: Giếng chỉ chứa tế bào T. G4, G5 và G6 là các lô nghiên cứu với tỉ lệ bổ sung tế bào tua và tế bào T khác nhau, tương ứng là tế bào tua: tế bào T là 1:10, 1:20 và 1:40.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Tế bào tua là những tế bào trình diện kháng nguyên trong cơ thể, hiện diện xuyên suốt trong cơ thể. Trong in vitro, tế bào tua thường được biệt hóa từ tế bào đơn nhân thu nhận từ máu. Thu nhận tế bào tua được thực hiện qua 2 giai đoạn: (1) giai đoạn đầu, biệt hóa tế bào đơn nhân thành tế bào tua “tiền trưởng thành” bằng các yếu tố biệt hóa; (2) giai đoạn sau, cảm ứng tế bào tua “tiền trưởng thành” thành tế bào tua "trưởng thành" bằng các yếu tố bổ sung. Máu gồm nhiều loại tế bào khác nhau như tế bào hồng cầu, tế bào bạch cầu, tiểu cầu. Trong đó, tế bào bạch cầu bao gồm tế bào đơn nhân, tế bào lympho. Tế bào đơn nhân là các tế bào tiền thân có thể biệt hóa thành tế bào tua và tế bào T. Do đó, trong quy trình này, tế bào đơn nhân được chọn lọc để tạo tế bào tua và tế bào T.

Quy trình đánh giá chức năng tế bào tua trong ống nghiệm theo giải pháp hữu ích được thực hiện như mô tả chi tiết dưới đây.

Bước 1 - tạo tế bào tua từ tế bào có nhân sử dụng cytokin.

Bước tạo tế bào tua từ tế bào có nhân sử dụng cytokin này được thực hiện gồm 10 bước nhỏ như sau:

- Bước 1.1: Pha loãng 1 – 25 ml máu với 1 – 25 ml dung dịch đệm phosphat (phosphate buffer saline - PBS) hoặc nước muối sinh lý natri clorua (NaCl) 0,9% trong ống ly tâm. Máu được sử dụng trong bước này được chọn từ máu ngoại vi, máu tủy xương hay máu cuống rốn. Thể tích dung dịch pha loãng được lựa chọn tùy thuộc vào đặc tính nguồn máu thu nhận, nếu máu loãng thì tiến hành ở tỉ lệ cao, nếu máu đặc thì tiến hành ở tỉ lệ thấp để đảm bảo số lượng tế bào thu nhận. Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực huyết học sẽ biết cách phân loại nguồn máu thu nhận là loãng hay

đặc khi nhận nguồn máu. Thể tích ống ly tâm sẽ được lựa chọn tương ứng theo thể tích phản ứng là thể tích dung dịch thu được sau khi pha loãng nguồn máu.

- Bước 1.2: Nhẹ nhàng cho 1 – 25 ml dung dịch ficoll Hypaque 1.077 vào ống ly tâm. Dung dịch ficoll Hypaque 1.077 là dung dịch ficoll có tỷ trọng 1,077. Đây là loại dung dịch chuyên dụng để thu tế bào đơn nhân và lympho vì các loại tế bào này có tỷ trọng nhỏ hơn 1,077, nên khi ly tâm qua dung dịch ficoll sẽ thu được các loại tế bào này.

- Bước 1.3: Bổ sung vào ống ly tâm chứa dung dịch ficoll thu được ở bước 1.2 máu đã pha loãng thu được ở bước 1.1 với lượng gấp 1 – 3 lần lượng dung dịch ficoll trong ống ly tâm này.

- Bước 1.4: Ly tâm ống ly tâm ở bước 1.3 với tốc độ 800 – 3500 vòng/phút trong 10-60 phút. Sau khi ly tâm, dung dịch phản ứng trong ống ly tâm sẽ phân lớp.

- Bước 1.5: Thu nhận lớp tế bào màu trắng nằm giữa lớp ficoll và huyết tương, chuyển các tế bào thu được sang ống ly tâm mới.

- Bước 1.6: Bổ sung dung dịch PBS hoặc NaCl 0,9% vào ống ly tâm chứa tế bào thu được ở bước 1.5, ly tâm ống ly tâm này với tốc độ 800 – 3500 vòng/phút trong 5 – 30 phút để rửa tế bào thu nhận được, thu cạn là huyền phù tế bào. Tùy ý, lặp lại bước này thêm 1 lần. Cặn huyền phù tế bào thu được được chuyển vào bình nuôi tế bào.

- Bước 1.7: Bổ sung 2 – 15 ml môi trường RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) hoặc IMDM (Iscoe's modified Dulbecco's medium), là hai loại môi trường cơ bản để nuôi tế bào bạch cầu người, chuyên biệt để nuôi tế bào tua vào cặn tế bào thu được ở bước 1.6 và tạo huyền phù, thu được huyền phù tế bào. Nuôi tế bào trong huyền phù tế bào này ở điều kiện 37°C và CO₂ 5% trong khoảng 10 – 36 giờ.

- Bước 1.8: Thu nhận dịch nổi chứa các tế bào nổi cho vào ống ly tâm mới và bảo quản ống ly tâm này để sử dụng trong Bước 2 của quy trình, còn ống ly tâm chứa cặn tế bào còn lại là tế bào đơn nhân được dùng trong Bước 1.9 tiếp theo. Sau khi ly tâm trong dung dịch ficoll, các tế bào thu được gồm hai loại tế bào là tế bào đơn nhân

có khả năng bám dính và tế bào lympho không có khả năng bám dính. Do đó, sau khi nuôi tế bào theo Bước 1.7, lượng tế bào lympho sẽ nằm lơ lửng trong dịch nổi còn tế bào đơn nhân bám dính sẽ nằm trong lớp cặn tế bào.

- Bước 1.9: Nuôi tế bào đơn nhân trong ống ly tâm sau bước 1.8 trong 2 – 15 ml môi trường RPMI 1640 hoặc IMDM có bổ sung 5 – 30 ng/ml GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor – yếu tố kích thích quần lạc đại thực bào và tế bào hạt), 10-50 ng/ml IL-4 (interleukin – 4), nuôi tế bào ở điều kiện 37⁰C và CO₂ 5% trong 3 – 7 ngày, thu được tế bào tua tiền trưởng thành.

- Bước 1.10: Thay môi trường nuôi tế bào ở bước 1.9 bằng môi trường RPMI 1640 hoặc IMDM có bổ sung 5 – 30 ng/ml GM-CSF, 10 – 50 ng/ml IL-4 và 5 – 30 ng/ml TNF- α (tumor necrosis factor alpha - yếu tố hoại tử u alpha) trong 3 – 7 ngày, thu được tế bào tua trưởng thành. Lượng tế bào tua trưởng thành thu được sau bước này nằm trong khoảng từ 1.000 đến 100.000 tế bào.

Bước 2 - tạo tế bào lympho T.

Bước tạo tế bào lympho T này được thực hiện cụ thể như sau:

- Bước 2.1: Pha loãng tế bào lympho chứa trong dịch nổi được thu nhận được trong bước 1.8 trong dung dịch PBS hoặc NaCl 0,9% theo tỷ lệ 1:1 (thể tích:thể tích) và trộn đều.

- Bước 2.2: Cho 1 – 25 ml ficoll vào ống ly tâm.

- Bước 2.3: Bổ sung dung dịch tế bào đã pha loãng ở bước 2.1 vào ống ly tâm chứa dung dịch ficoll ở Bước 2.2 với lượng gấp 1 – 3 lần lượng ficoll chứa trong ống ly tâm này.

- Bước 2.4: Ly tâm ống ly tâm ở bước 2.3 với tốc độ 800 – 3500 vòng/phút trong 10 – 60 phút, thu nhận lớp tế bào màu trắng nằm giữa lớp ficoll và huyết tương, chuyển sang ống ly tâm mới.

Rửa tế bào thu được bằng cách bổ sung dung dịch PBS hoặc NaCl 0,9% vào ống ly tâm này và ly tâm với tốc độ 800 – 3500 vòng/phút trong 5 – 30 phút, thu cặn là

huyền phù tế bào. Tùy ý, lặp lại quá trình rửa tế bào này thêm 1 lần. Cặn huyền phù tế bào thu được được chuyển vào bình nuôi tế bào.

- Bước 2.5: Bổ sung 2 – 15ml môi trường RPMI 1640 hoặc IMDM vào cặn huyền phù tế bào thu được ở bước 2.4, tạo thành huyền phù tế bào và nuôi tế bào trong huyền phù tế bào này ở điều kiện 37⁰C và CO₂ 5% trong 3 – 7 ngày, thu dịch nổi chứa tế bào lympho T. Lượng tế bào lympho T thu được sau bước này nằm trong khoảng 1.000 đến 100.000 tế bào.

Bước 3 - cho tế bào tua trưởng thành vào đĩa 96 giếng.

Xác định thời điểm 0 giờ, cho 1.000 đến 100.000 tế bào tua trưởng thành thu được sau Bước 1 vào các giếng của đĩa 96 giếng có đáy gắn điện cực vàng thuộc hệ thống xCelligence cùng với 200 µl môi trường RPMI 1640 hoặc IMDM.

Bước 4 - ủ.

- Bước 4.1: Kháng nguyên tế bào hoặc tế bào gốc ung thư cần điều trị được tạo ra bằng cách sử dụng từ 10⁴ tế bào hoặc tế bào gốc ung thư tương ứng được huyền phù trong 1 – 100 mL dung dịch đệm sinh lý 0,9% natri clorua được đông lạnh – giải đông theo quy trình đông lạnh trong nitơ lỏng từ trên 1 phút, làm ấm ở 37⁰C trong 3 phút, lặp lại liên tục 5 lần.

- Bước 4.2: Ủ đĩa 96 giếng thu được sau Bước 3 trong 10 – 48 giờ, ở 37⁰C trong điều kiện 5% CO₂ cùng với kháng nguyên tế bào ung thư. Thời gian tiếp xúc của tế bào tua trưởng thành và kháng nguyên từ 10 đến 48 giờ, là khoảng thời gian đủ để tế bào tua trưởng thành thực bào kháng nguyên. Sau khi thực bào kháng nguyên, tế bào tua trưởng thành sẽ trình diện kháng nguyên lên bề mặt. Đây là bước quan trọng cho sự nhận diện kháng nguyên và tiêu diệt tế bào mục tiêu của tế bào T.

Bước 5 - ly tâm loại bỏ dịch nổi.

Ly tâm đĩa thu được ở Bước 4 với tốc độ 800 – 3500 vòng/phút trong 5 – 20 phút, loại bỏ dịch nổi, thu cặn tế bào. Sau đó, tái huyền phù cặn tế bào trong 200 µl môi trường RPMI 1640 hoặc IMDM. Bước này nhằm thay môi trường nhằm cung cấp môi trường mới cho sự phát triển của tế bào.

Bước 6 - bổ sung tế bào lympho T.

Cho 1.000 đến 100.000 tế bào lympho T thu được ở Bước 2 vào đĩa thu được ở Bước 5. Đây là bước trình diện kháng nguyên cho tế bào T, nhằm hoạt hoá tế bào T non trở thành tế bào T hoạt động là tế bào T đã trình diện kháng nguyên. Cơ chế của quá trình này là tế bào T khi tiếp xúc với tế bào tua đã được trình diện kháng nguyên thu được ở Bước 4, tế bào T sẽ được hoạt hoá và tiết các yếu tố như Granzym B, perforin để tiêu diệt tế bào có trình diện kháng nguyên mục tiêu. Ngoài ra, tế bào T còn tiết interleukin 2 để tự tăng sinh số lượng. Việc tăng sinh số lượng kết hợp với khả năng tiêu diệt những tế bào trình diện kháng nguyên mục tiêu giúp tăng cường hiệu quả hoạt động của tế bào T.

Bước 7 - ủ đĩa đã bổ sung tế bào lympho T.

Ủ đĩa thu được sau Bước 6 trong 10 – 48 giờ, ở 37°C trong điều kiện 5% CO₂. Thời gian tiếp xúc của tế bào tua với tế bào lympho T từ 10 đến 48 giờ, là khoảng thời gian đủ để đảm bảo cho tế bào T được hoạt hóa và tăng sinh, và sau đó biệt hoá thành tế bào T hoạt động.

Bước 8 - ly tâm đĩa đã bổ sung tế bào lympho T.

Ly tâm đĩa thu được ở Bước 7 ở tốc độ 800 – 3500 vòng/phút trong 5 – 20 phút, loại bỏ dịch nổi, thu cặn tế bào. Tái huyền phù cặn tế bào trong 200 µl môi trường RPMI 1640 hoặc IMDM.

Bước 9 - cho tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư vào đĩa sau ly tâm.

Cho 1.000 – 100.000 tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư vào đĩa thu được sau Bước 8, đặt đĩa này vào máy đọc đĩa xCelligence của công ty ACEA. Tế bào T hoạt động đã tiếp xúc với kháng nguyên trên tế bào mục tiêu và tế bào ung thư và/hoặc tế bào gốc ung thư thông qua tế bào tua được nêu tại Bước 7. Khi đó, tế bào T trở thành tế bào có chức năng tiêu diệt tế bào ung thư và/hoặc tế bào gốc ung thư ngay khi tiếp xúc.

Bước 10 - theo dõi và đọc kết quả.

Theo dõi từ 24 giờ đến 7 ngày và đọc kết quả tăng trưởng của tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư so với đối chứng. Mẫu đối chứng là các giếng chỉ có môi trường nuôi, hoặc chỉ có tế bào tua được ủ, hoặc chỉ có tế bào T hoặc có cả tế bào tua và tế bào T mà đều không bổ sung tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư. Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực công nghệ sinh học sẽ biết cách tạo các giếng chứa mẫu đối chứng trên đĩa 96 giếng được sử dụng trong quy trình này.

Dựa vào sự tăng trưởng của tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư trong giếng có tế bào tua và lympho T so với giếng chỉ có tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư, tính được phần trăm (%) tiêu diệt tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư của tế bào tua theo công thức của hệ thống máy xCelligence.

Hệ thống xCelligence là hệ thống cho phép xác định chỉ số tế bào dựa vào hình dạng, số lượng và sự bám dính của tế bào trên bề mặt đĩa nuôi một cách chính xác. Các tế bào được nuôi trong một loại đĩa đặc biệt (E – plate). Nhờ bề mặt đĩa nuôi được trải các sợi vi điện cực, khi các tế bào tăng sinh và bám lên các điện cực làm gia tăng trở kháng. Điện trở kháng được ghi nhận là chỉ số tế bào (Cell index – CI) phản ánh trạng thái sinh học của tế bào được theo dõi, bao gồm số lượng, hình thái, sự sống sót và mức độ bám dính. Cách đọc chính cho hệ thống xCELLigence là sử dụng chỉ số CI, trong đó:

- Khi không có mặt tế bào hoặc tế bào không bám vào điện cực, $CI = 0$;
- Dưới điều kiện sinh lý phù hợp, càng nhiều tế bào bám vào điện cực, giá trị CI càng lớn.
- Ngoài ra, sự thay đổi tình trạng tế bào như thay đổi hình dạng, sự bám dính hay sự sống của tế bào, sẽ dẫn đến thay đổi trong giá trị CI.

Như vậy, hệ thống xCelligence ghi nhận được từng giai đoạn tiềm tàng, tăng trưởng, ổn định và suy tàn của tế bào một cách chính xác trong thời gian xác định. Quy trình đánh giá chức năng tế bào tua được xác định gián tiếp thông qua sự tăng sinh của tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư. Nếu tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư tăng sinh mạnh, tức là chức năng tế bào tua không có tác dụng, thì giá trị CI

lớn. Ngược lại, nếu tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư tăng sinh yếu, tức là tế bào tua có tác động mạnh lên khả năng sống sót của tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư, thì giá trị CI nhỏ.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Thực hiện quy trình đánh giá chức năng tế bào tua trong ống nghiệm theo giải pháp hữu ích, trong đó, tế bào tua thu được từ máu cuống rốn người và được đánh giá chức năng trong việc tiêu diệt tế bào gốc ung thư vú người.

Bước 1 - tạo tế bào tua từ tế bào có nhân sử dụng cytokin.

- Bước 1.1: Pha loãng 20 ml máu cuống rốn người với 20 ml dung dịch đệm phosphat (phosphate buffer saline - PBS) trong ống ly tâm 50 ml.

- Bước 1.2: Nhẹ nhàng cho 10 ml dung dịch ficoll Hypaque 1.077 vào ống ly tâm 50 ml.

- Bước 1.3: Bổ sung 30 ml máu đã pha loãng thu được ở bước 1.1 vào ống ly tâm chứa dung dịch ficoll thu được ở bước 1.2.

- Bước 1.4: Ly tâm ống ly tâm ở bước 1.3 với tốc độ 3.000 vòng/phút trong 45 phút.

- Bước 1.5: Thu nhận lớp tế bào màu trắng nằm giữa lớp ficoll và huyết tương, chuyển các tế bào thu được sang ống ly tâm mới.

- Bước 1.6: Bổ sung dung dịch vào ống ly tâm chứa tế bào thu được ở bước 1.5, ly tâm ống ly tâm này với tốc độ 3000 vòng/phút trong 10 phút để rửa tế bào thu nhận được, thu cạn là huyền phù tế bào. Lặp lại bước này thêm 1 lần, thu cạn huyền phù tế bào và chuyển vào bình nuôi 75 cm².

- Bước 1.7: Bổ sung 10 ml môi trường RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) vào bình nuôi, nuôi tế bào trong huyền phù tế bào này ở điều kiện 37°C và CO₂ 5% trong 24 giờ.

- Bước 1.8: Thu nhận dịch nổi chứa các tế bào nổi cho vào ống ly tâm 15 ml mới và bảo quản ống ly tâm này để sử dụng trong Bước 2 của quy trình, còn ống ly tâm chứa cặn tế bào còn lại là tế bào đơn nhân được dùng trong Bước 1.9 tiếp theo.

- Bước 1.9: Nuôi tế bào đơn nhân trong ống ly tâm sau bước 1.8 trong 10 ml môi trường RPMI 1640 có bổ sung 15 ng/ml GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor – yếu tố kích thích quần lạc đại thực bào và tế bào hạt) và 15 ng/ml IL-4 (interleukin – 4), nuôi tế bào ở điều kiện 37⁰C và CO₂ 5% trong 4 ngày, thu được tế bào tua tiền trưởng thành.

- Bước 1.10: Thay môi trường nuôi tế bào ở bước 1.9 bằng 10 ml môi trường RPMI 1640 có bổ sung 15 ng/ml GM-CSF, 15 ng/ml IL-4 và 15 ng/ml TNF- α (tumor necrosis factor alpha - yếu tố hoại tử u alpha) trong 7 ngày, thu được tế bào tua trưởng thành

Kết quả của quá trình biệt hóa tế bào đơn nhân thu nhận được từ máu cuống rốn thành tế bào tua trưởng thành được thể hiện trên các Hình 1 và 2. Trong đó, có thể dễ dàng quan sát thấy quá trình biệt hóa thành tế bào tua của tế bào đơn nhân thu nhận từ máu cuống rốn, như được thể hiện trên Hình 1. Tế bào đơn nhân thu nhận từ máu cuống rốn (A) được biệt hóa thành tế bào tua chưa trưởng thành (B) và sau đó là tế bào tua trưởng thành (C). Trong môi trường nuôi cấy bổ sung các cytokin GM-CSF và IL-4, hầu hết các tế bào đơn nhân thay đổi hình thái sau khi nuôi cấy 7-14 ngày. Quan sát dưới kính hiển vi, các tế bào này đã mở rộng tế bào chất và đã hình thành đuôi gai. Khi chúng tiếp tục được nuôi trong môi trường bổ sung các yếu tố cảm ứng để trưởng thành như TNF- α , chúng biểu hiện rõ hình thái đặc trưng cho tế bào tua với sự không đồng nhất về nhân, xuất hiện nhiều ty thể và không bào.

Kết quả phân tích dấu ấn (marker) tế bào đơn nhân và tế bào tua được thể hiện trên Hình 2. Kết quả cho thấy, các tế bào đơn nhân (mẫu đối chứng) biểu hiện kiểu hình CD14⁺CD40⁻CD80⁻CD86⁻ trước khi được biệt hóa và cảm ứng (A-D). Sau khi cảm ứng, tế bào tua chưa trưởng thành được cảm ứng (induced dendritic cell - iDC) đặc trưng bởi kiểu hình CD86⁻CD40⁻CD14⁻CD80⁻ (E-H) và tế bào tua trưởng thành (mDC) biểu hiện kiểu hình CD40⁺CD80⁺CD86⁺CD14⁻ (I-L).

Đánh giá khả năng thực bào của tế bào tua. Khả năng thực bào là một chức năng quan trọng của tế bào tua, đặc biệt là iDC. Thực bào giúp cho iDC hấp thu

protein lạ và xử lý các protein này để trình diện cho các tế bào miễn dịch khác. Kết quả trình bày trong Hình 3 cho thấy, ở điều kiện 37°C, 92,28%±9,25% iDCs có thể hấp thu FITC–dextran, trong khi chỉ có 78,54%±8,15% mDC hấp thu FITC–dextran. Các tế bào này có thể không hấp thu FITC–dextran khi chúng được nuôi ở 4°C.

Bước 2 - tạo tế bào lympho T.

Bước tạo tế bào lympho T này được thực hiện cụ thể như sau:

- Bước 2.1. Pha loãng tế bào lympho chứa trong dịch nổi được thu nhận được trong bước 1.8 trong dung dịch PBS theo tỷ lệ 1:1 (thể tích:thể tích) và trộn đều.

- Bước 2.2: Cho 10 ml ficoll vào ống ly tâm 50 ml.

- Bước 2.3: Bổ sung dung dịch tế bào đã pha loãng ở bước 2.1 vào ống ly tâm chứa dung dịch ficoll ở Bước 2.

- Bước 2.4: Ly tâm ống ly tâm ở bước 2.3 với tốc độ 3000 vòng/phút trong 45 phút, thu nhận lớp tế bào màu trắng nằm giữa lớp ficoll và huyết tương, chuyển sang ống ly tâm mới.

Rửa tế bào thu được bằng cách bổ sung dung dịch PBS vào ống ly tâm này và ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút trong 10 phút để rửa tế bào thu nhận được, thu cạn là huyền phù tế bào. Lặp lại quá trình rửa tế bào này thêm 1 lần.

- Bước 2.5: Bổ sung 10 ml môi trường RPMI 1640 vào cạn huyền phù tế bào thu được ở bước 2.4, tạo thành huyền phù tế bào và nuôi tế bào trong huyền phù tế bào này ở điều kiện 37°C và CO₂ 5% trong 4 ngày, thu dịch nổi chứa tế bào lympho T.

Kết quả phân tích quần thể tế bào thu được bằng kỹ thuật phân tích tế bào ở dạng dòng chảy (flow cytometer) được thể hiện trên Hình 4. Kết quả cho thấy tế bào lympho T chiếm tỷ lệ 49,81% trong quần thể tế bào có nhân từ máu cuống rốn, trong đó, tỷ lệ tế bào T_{CD8} chiếm 19,79% và tế bào T_{CD4} chiếm 33,29%.

Bước 3 - cho tế bào tua trưởng thành vào đĩa 96 giếng.

Xác định thời điểm 0 giờ, cho 5000 tế bào tua trưởng thành thu được sau Bước 1 vào các giếng của đĩa 96 giếng có đáy gắn điện cực vàng thuộc hệ thống xCelligence cùng với 200 µl môi trường RPMI 1640.

Bước 4 - ủ.

- Bước 4.1: Kháng nguyên tế bào gốc ung thư vú được tạo ra bằng cách sử dụng 10^6 tế bào gốc ung thư vú người được huyền phù trong 1 mL dung dịch đệm sinh lý 0,9% natri clorua được đông lạnh – giải đông theo quy trình đông lạnh trong nitơ lỏng trong 3 phút, làm ấm ở 37°C trong 3 phút, lặp lại liên tục 5 lần.

- Bước 4.2: Ủ đĩa 96 giếng thu được sau Bước 3 trong 24 giờ, ở 37°C trong điều kiện 5% CO_2 cùng với kháng nguyên tế bào ung thư vú.

Bước 5 - ly tâm loại bỏ dịch nổi.

Ly tâm đĩa thu được ở Bước 4 với tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi, thu cặn tế bào. Sau đó, tái huyền phù cặn tế bào trong 200 μl môi trường RPMI 1640.

Bước 6 - bổ sung tế bào lympho T.

Cho 100.000 tế bào lympho T thu được ở Bước 2 vào đĩa thu được ở Bước 5.

Bước 7 - ủ đĩa đã bổ sung tế bào lympho T.

Ủ đĩa thu được sau Bước 6 trong 36 giờ, ở 37°C trong điều kiện 5% CO_2 .

Bước 8 - ly tâm đĩa đã bổ sung tế bào lympho T.

Ly tâm đĩa thu được ở Bước 7 ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi, thu cặn tế bào. Tái huyền phù cặn tế bào trong 200 μl môi trường RPMI 1640.

Bước 9 - cho tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư vào đĩa sau ly tâm.

Cho 5.000 tế bào gốc ung thư vú (breast cancer stem cell - BCSC) vào đĩa thu được sau Bước 8, đặt đĩa này vào máy đọc đĩa xCelligence của công ty ACEA.

Bước 10 - theo dõi và đọc kết quả.

Theo dõi từ 0 giờ đến 98 giờ và đọc kết quả tăng trưởng của tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư so với đối chứng. Mẫu đối chứng là các giếng (G0) chỉ có môi trường nuôi, (G1) chỉ có tế bào tua được ủ, (G2) chỉ có tế bào T và (G3) có cả tế bào tua và tế bào T mà đều không bổ sung tế bào gốc ung thư.

Trong khoảng thời gian từ mốc 0 giờ đến 24 giờ (trước thời điểm thay môi trường và bổ sung các tế bào T và tế bào tua vào), ở các nhóm có khả năng tăng sinh

của tế bào gốc ung thư vú (breast cancer stem cell – BCSC) là tương tự nhau ở các lô có bổ sung tế bào gốc ung thư, trong khi đó ở lô không có tế bào gốc ung thư, không có tín hiệu tăng sinh tế bào vì các tế bào tua và tế bào T không bám và tăng sinh. Tuy nhiên, sau giờ thứ 24 trở đi, là thời điểm bổ sung tế bào lympho T được cảm ứng bởi tế bào tua trưởng thành, tốc độ tăng sinh của tế bào gốc ung thư giảm mạnh (G4, G5 và G6). Trong khi đó, ở nhóm đối chứng (không bổ sung tế bào lympho T cảm ứng bởi tế bào tua trưởng thành, nhóm G1), tế bào gốc ung thư vẫn tiếp tục tăng trưởng mạnh. Dựa vào sự khác biệt này, có thể đánh giá vai trò và tác động của tế bào tua thông qua tế bào lympho T trong việc tiêu diệt tế bào gốc ung thư (Hình 5).

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích hoạt động dựa vào nguyên lý chung là tế bào tua có thể trình diện kháng nguyên cho tế bào lympho T; sau đó tế bào lympho T có thể tiêu diệt tế bào ung thư đang phát triển bằng nhiều con đường đặc biệt. Do đó, để đánh giá chức năng trong ống nghiệm của tế bào tua tiêu diệt tế bào ung thư, chúng ta tiến hành đánh giá khả năng sự chết/bị ức chế tăng sinh của tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư khi trộn chung với tế bào tua và tế bào lympho T. Việc đánh giá khả năng tăng trưởng của tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư dựa vào tính bám dính của nó trên đĩa có đáy gắn điện cực vàng và đo bằng máy xCelligence của công ty ACEA; trong khi đó các tế bào tua, tế bào lympho T không bám được lên điện cực nên không ảnh hưởng đến kết quả.

Quy trình theo giải pháp hữu ích mang lại nhiều lợi ích cho xã hội như giúp giảm giá thành, tăng độ chính xác của việc đánh giá vai trò chức năng tế bào tua trước khi ứng dụng điều trị cho bệnh nhân; sự chính xác của việc đánh giá này sẽ nâng cao hiệu quả điều trị ung thư bằng liệu pháp này và giúp giảm chi phí điều trị cho bệnh nhân. Quy trình này có thể xem như là kỹ thuật chẩn đoán hay xét nghiệm trước điều trị nên có giá trị kinh tế cao.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình đánh giá chức năng tế bào tua trong ống nghiệm bao gồm các bước:

(i) bước 1 - tạo tế bào tua từ tế bào có nhân sử dụng cytokin:

bước 1.1: pha loãng 1 – 25 ml máu với 1 – 25 ml dung dịch đệm phosphat (phosphate buffer saline - PBS) hoặc nước muối sinh lý natri clorua (NaCl) 0,9% trong ống ly tâm, trong đó máu được chọn từ nhóm bao gồm máu ngoại vi, máu tủy xương hoặc máu cuống rốn;

bước 1.2: nhẹ nhàng cho 1 – 25 ml dung dịch ficoll Hypaque 1.077 vào ống ly tâm;

bước 1.3: bổ sung vào ống ly tâm chứa dung dịch ficoll thu được ở bước 1.2 máu đã pha loãng thu được ở bước 1.1 với lượng gấp 1 – 3 lần lượng dung dịch ficoll trong ống ly tâm này;

bước 1.4: ly tâm ống ly tâm ở bước 1.3 với tốc độ 800 – 3500 vòng/phút trong 10-60 phút, thu được dung dịch phân lớp;

bước 1.5: thu nhận lớp tế bào màu trắng nằm giữa lớp ficoll và huyết tương, chuyển các tế bào thu được sang ống ly tâm mới;

bước 1.6: bổ sung dung dịch PBS hoặc NaCl 0,9% vào ống ly tâm chứa tế bào thu được ở bước 1.5, ly tâm ống ly tâm này với tốc độ 800 – 3500 vòng/phút trong 5 – 30 phút, thu cận là huyền phù tế bào; tùy ý, lặp lại bước này thêm 1 lần; chuyển cận huyền phù tế bào thu được vào bình nuôi tế bào;

bước 1.7: bổ sung 2 – 15 ml môi trường RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institue 1640) hoặc IMDM (Iscome's modified Dulbecco's medium) vào cận tế bào thu được ở bước 1.6 và tạo huyền phù, thu được huyền phù tế bào; nuôi tế bào trong huyền phù tế bào này ở điều kiện 37⁰C và CO₂ 5% trong khoảng 10 – 36 giờ;

bước 1.8: thu nhận dịch nổi chứa các tế bào nổi cho vào ống ly tâm mới và bảo quản ống ly tâm này để sử dụng trong bước 2 của quy trình, còn ống ly tâm chứa cận tế bào còn lại là tế bào đơn nhân được dùng trong bước 1.9;

bước 1.9: nuôi tế bào đơn nhân trong ống ly tâm thu được sau bước 1.8 trong 2 – 15 ml môi trường RPMI 1640 hoặc IMDM có bổ sung 5 – 30 ng/ml GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor – yếu tố kích thích quần lạc đại thực bào và tế bào hạt), 10-50 ng/ml IL-4 (interleukin – 4), nuôi tế bào ở điều kiện 37°C và CO₂ 5% trong 3 – 7 ngày, thu được tế bào tua tiên trưởng thành; và

bước 1.10: thay môi trường nuôi tế bào ở bước 1.9 bằng môi trường RPMI 1640 hoặc IMDM có bổ sung 5 – 30 ng/ml GM-CSF, 10 – 50 ng/ml IL-4 và 5 – 30 ng/ml TNF- α (tumor necrosis factor alpha - yếu tố hoại tử u alpha) trong 3 – 7 ngày, thu được tế bào tua trưởng thành;

(ii) bước 2 - tạo tế bào lympho T:

bước 2.1: pha loãng tế bào lympho chứa trong dịch nổi được thu nhận được trong bước 1.8 trong dung dịch PBS hoặc NaCl 0,9% theo tỷ lệ 1:1 (thể tích:thể tích) và trộn đều;

bước 2.2: cho 1 – 25 ml ficoll vào ống ly tâm;

bước 2.3: bổ sung dung dịch tế bào đã pha loãng ở bước 2.1 vào ống ly tâm chứa dung dịch ficoll ở bước 2.2 với lượng gấp 1 – 3 lần lượng ficoll chứa trong ống ly tâm này;

bước 2.4: ly tâm ống ly tâm ở bước 2.3 với tốc độ 800 – 3500 vòng/phút trong 10 – 60 phút, thu nhận lớp tế bào màu trắng nằm giữa lớp ficoll và huyết tương, chuyển sang ống ly tâm mới; bổ sung dung dịch PBS hoặc NaCl 0,9% vào ống ly tâm này và ly tâm với tốc độ 800 – 3500 vòng/phút trong 5 – 30 phút để rửa tế bào thu nhận được, thu cặn là huyền phù tế bào, tùy ý, lặp lại quá trình rửa tế bào này thêm 1 lần; chuyển cặn huyền phù tế bào thu được vào bình nuôi tế bào; và

bước 2.5: bổ sung 2 – 15ml môi trường RPMI 1640 hoặc IMDM vào cặn huyền phù tế bào thu được ở bước 2.4, tạo thành huyền phù tế bào và nuôi tế bào trong huyền phù tế bào này ở điều kiện 37°C và CO₂ 5% trong 3 – 7 ngày, thu dịch nổi chứa tế bào lympho T;

(iii) bước 3 - cho tế bào tua trưởng thành vào đĩa 96 giếng:

xác định thời điểm 0 giờ, cho 1.000 đến 100.000 tế bào tua trưởng thành thu được sau bước 1 vào các giếng của đĩa 96 giếng có đáy gắn điện cực vàng thuộc hệ thống xCelligence cùng với 200 μ l môi trường RPMI 1640 hoặc IMDM;

(iv) bước 4 - ủ:

bước 4.1: tạo huyền phù 10^4 tế bào hoặc tế bào gốc ung thư trong 1 – 100 mL dung dịch đệm sinh lý 0,9% natri clorua được đông lạnh – giải đông theo quy trình đông lạnh trong nitơ lỏng trên 1 phút, làm ấm ở 37°C trong 3 phút, lặp lại liên tục 5 lần để thu kháng nguyên tế bào hoặc tế bào gốc ung thư cần điều trị tương ứng; và

bước 4.2: ủ đĩa 96 giếng thu được sau bước 3 trong 10 – 48 giờ, ở 37°C trong điều kiện 5% CO_2 cùng với kháng nguyên tế bào ung thư; thời gian tiếp xúc của tế bào tua trưởng thành và kháng nguyên từ 10 đến 48 giờ;

(v) bước 5 - ly tâm loại bỏ dịch nổi:

ly tâm đĩa thu được ở bước 4 với tốc độ 800 – 3500 vòng/phút trong 5 – 20 phút, loại bỏ dịch nổi, thu cặn tế bào; tái huyền phù cặn tế bào trong 200 μ l môi trường RPMI 1640 hoặc IMDM;

(vi) bước 6 - bổ sung tế bào lympho T:

cho 1.000 đến 100.000 tế bào lympho T thu được ở bước 2 vào đĩa thu được ở bước 5, để hoạt hóa tế bào T non trở thành tế bào T hoạt động;

(vii) bước 7 - ủ đĩa đã bổ sung tế bào lympho T:

ủ đĩa thu được sau bước 6 trong 10 – 48 giờ, ở 37°C trong điều kiện 5% CO_2 . thời gian tiếp xúc của tế bào tua với tế bào lympho T từ 10 đến 48 giờ;

(viii) bước 8 - ly tâm đĩa đã bổ sung tế bào lympho T:

ly tâm đĩa thu được ở bước 7 ở tốc độ 800 – 3500 vòng/phút trong 5 – 20 phút, loại bỏ dịch nổi, thu cặn tế bào;

tái huyền phù cặn tế bào trong 200 μ l môi trường RPMI 1640 hoặc IMDM;

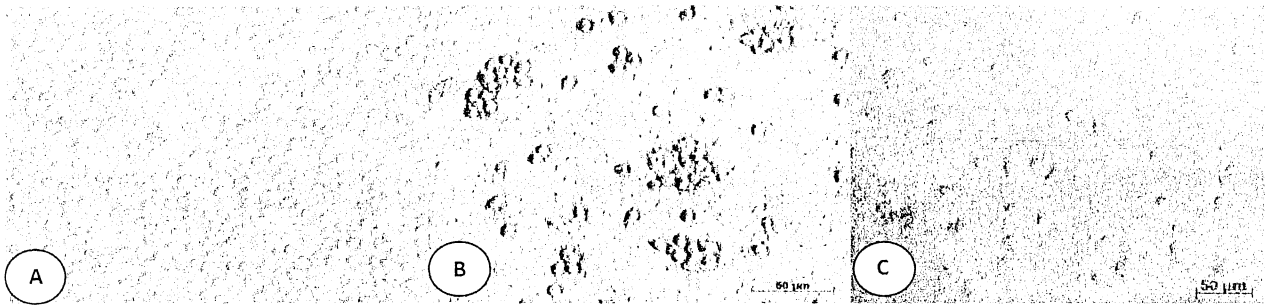
(ix) bước 9 - cho tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư vào đĩa sau ly tâm:

cho 1.000 – 100.000 tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư vào đĩa thu được sau bước 8, đặt đĩa này vào máy đọc đĩa xCelligence của công ty ACEA; và

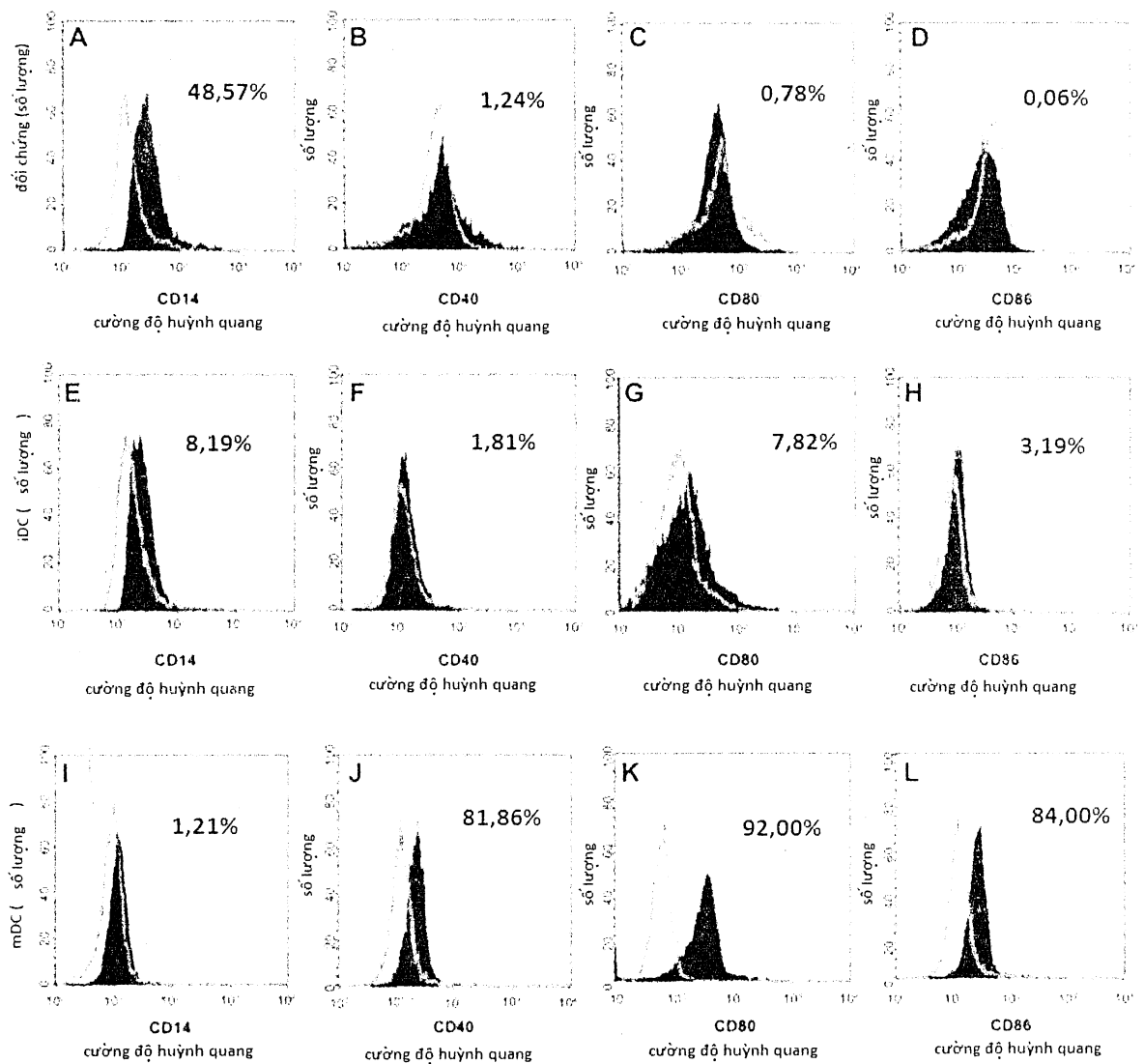
(x) bước 10 - theo dõi và đọc kết quả:

theo dõi từ 24 giờ đến 7 ngày và đọc kết quả tăng trưởng của tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư so với đối chứng; trong đó, mẫu đối chứng là các giếng chỉ có môi trường nuôi, hoặc chỉ có tế bào tua được ủ, hoặc chỉ có tế bào T hoặc có cả tế bào tua và tế bào T mà đều không bổ sung tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư;

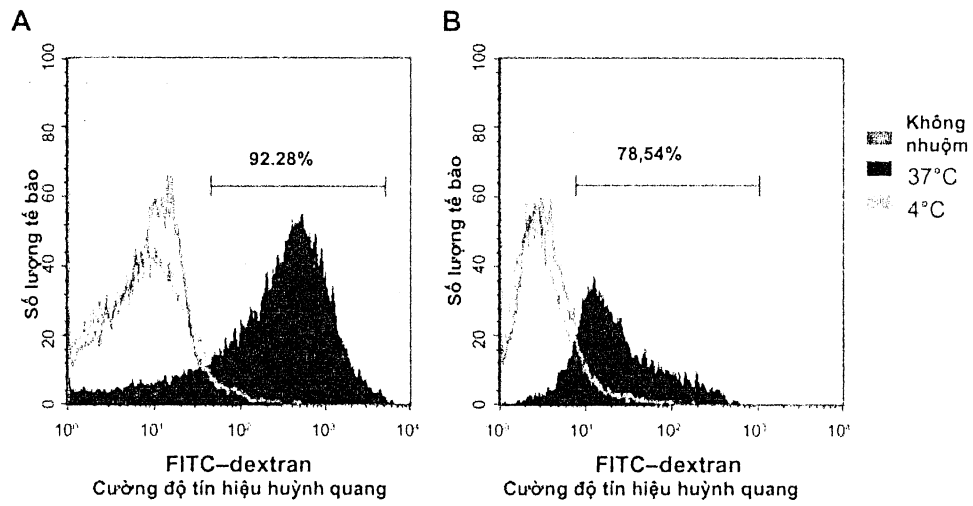
dựa vào sự tăng trưởng của tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư trong giếng có tế bào tua và lympho T so với giếng chỉ có tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư, tính được phần trăm (%) tiêu diệt tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư của tế bào tua theo công thức của hệ thống máy xCelligence.



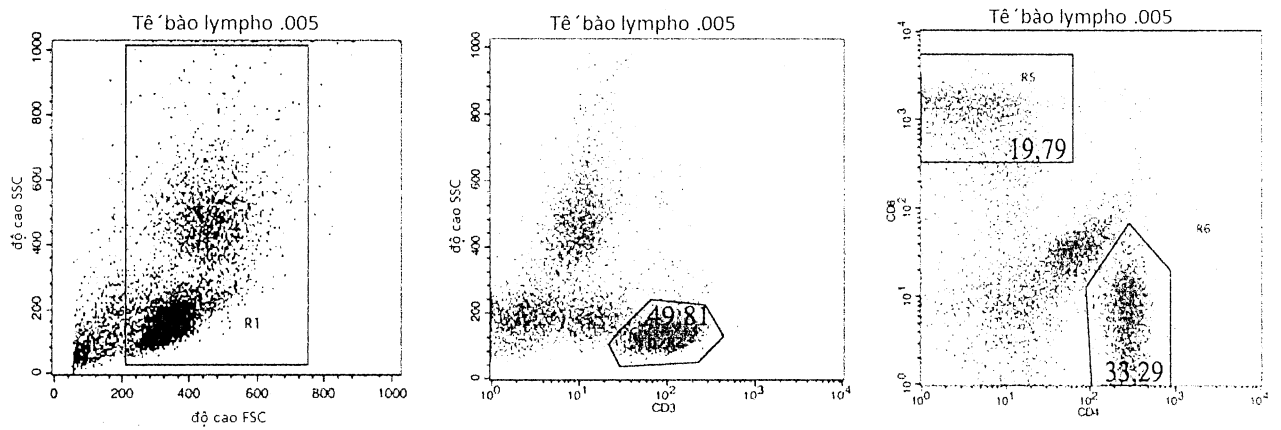
Hình 1



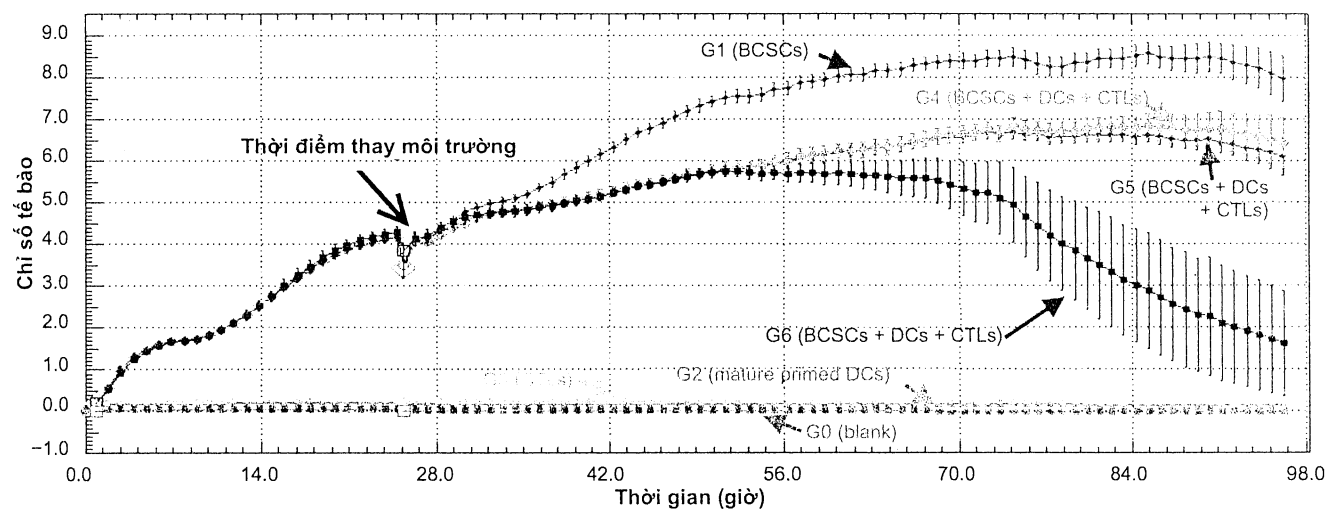
Hình 2



Hình 3



Hình 4



Hình 5