

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG GÂY ĐỘC VÀ UNG THƯ CỦA TẾ BÀO CAR-T TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM

Cần Văn Mão¹, Ngô Thu Hằng^{1*}

Tóm tắt

Mục tiêu: Đánh giá khả năng gây độc và ung thư của khối tế bào CAR-T trên thực nghiệm để khẳng định chất lượng, độ an toàn của chế phẩm khối tế bào CAR-T.

Phương pháp nghiên cứu: Thu thập khối tế bào CAR-T từ phòng nuôi cấy tế bào với nồng độ 5×10^7 tế bào/mL. 36 chuột nhắt trắng được chia thành 3 nhóm (12 chuột/nhóm), chuột được chiếu xạ với liều 1.5Gy: Nhóm chứng được tiêm khối tế bào PBMC; nhóm CAR thế hệ 2 (CAR2) được tiêm khối tế bào CAR-T CD19RCD137/pMC; nhóm CAR thế hệ 4 (CAR4) được tiêm khối tế bào CAR-T CD19RCD137-iCasp9-IL15/pMC. Chuột được tiêm khối tế bào vào màng bụng sau đó được nuôi ở môi trường sạch và theo dõi các thông số. **Kết quả:** Ở thời điểm 1 tháng, 3 tháng và 6 tháng sau khi tiêm khối tế bào CAR-T, không có chuột bị chết, không bị giảm cân và các chỉ số huyết học thay đổi không đáng kể ($p > 0,05$). Màng bụng chuột trơn nhẵn, các cơ quan nội tạng mềm nhẵn, không thấy hình ảnh các khối bất thường hoặc các ổ viêm áp xe ở màng bụng, trong ổ bụng và ở các cơ quan nội tạng. **Kết luận:** Ở nồng độ nghiên cứu, tế bào CAR-T không gây ra độc tính, các thay đổi về chỉ số huyết học và không xuất hiện khối u đại thể trên động vật thực nghiệm trong thời gian thử nghiệm.

Từ khóa: Tế bào CAR-T; Thực nghiệm; Độc tính.

EVALUATION OF THE TOXICITY AND CARCINOGENICITY OF CAR-T CELLS IN EXPERIMENTAL ANIMALS

Abstract

Objectives: To evaluate the toxicity and carcinogenicity of CAR-T cells in experimental animals to confirm the quality and ensure the safety of CAR-T cell production. **Methods:** CAR-T cell blocks were collected from the cell culture room with a concentration of 5×10^7 cells/mL. 36 white mice were divided into 3 groups

¹Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y

*Tác giả liên hệ: Ngô Thu Hằng (drngohang1986@gmail.com)

Ngày nhận bài: 24/3/2025

Ngày được chấp nhận đăng: 22/5/2025

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v50i6.1272>

(12 mice/group), irradiated with a dose of 1.5Gy: The control group carrying PBMC cells; the CAR2 group carrying CD19RCD137/pMC CAR-T cells; the CAR4 group carrying CD19RCD137-iCasp9-IL15/pMC CAR-T cells. Mice were intraperitoneally injected with cell blocks and then fed in a clean environment and monitored for parameters. **Results:** At 1 month, 3 months, and 6 months after injection of CAR-T cells, no mortality, significant weight loss, and significant changes in hematological indices were observed in mice ($p > 0.05$). The peritoneum of the mice was smooth. The internal organs were soft and smooth. No abnormal masses or abscesses were observed in the peritoneum, abdomen, and internal organs. **Conclusion:** The study concentration of CAR-T cells did not cause any toxicity, changes in hematological indices, and tumors in experimental animals during the experimental period.

Keywords: CAR-T cells; Experimental; Toxicity.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Liệu pháp miễn dịch tế bào T thụ thể kháng nguyên chimeric (CAR) đã thu hút được sự chú ý đáng kể trong thập kỷ qua do có tiềm năng đặc biệt trong điều trị các loại khối u ác tính, đặc biệt là ung thư máu [1]. Mặc dù đã đạt được những thành công trong một số nghiên cứu, và hai sản phẩm tế bào CAR-T gần đây đã được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) và Cơ quan Dược phẩm châu Âu (EMA) (YESCARTA®, KYMRIAH®) phê duyệt, phương thức điều trị này vẫn có những thách thức đối với phát triển lâm sàng. Một nhược điểm tiềm ẩn của các sản phẩm CAR-T là khả năng tạo ra các phản ứng miễn dịch của vật chủ [1].

Các yếu tố nguy cơ cảm ứng tính sinh miễn dịch đã được chứng minh là có liên quan đến sự hiện diện của các cấu

trúc trình tự không phải người hoặc một phần người trong cấu trúc CAR, các thành phần khác của CAR-T, và sự hiện diện của các protein virus còn sót lại hoặc các protein khác không có nguồn gốc từ con người được sử dụng như một phần của bước chỉnh sửa gene của quá trình sản xuất CAR-T. Cả hình thức đáp ứng miễn dịch thể dịch và các phản ứng đáp ứng khác của cơ thể được mô tả, dẫn đến các mức độ tác động đến việc mở rộng và duy trì CAR-T khác nhau, do đó, an toàn tổng thể và đáp ứng có ý nghĩa lâm sàng trong điều trị [2].

Xuất phát từ thực tế trên, nghiên cứu đánh giá tác dụng phụ, đặc biệt là tác dụng gây ung thư của khối tế bào CAR-T là vấn đề rất quan trọng để đánh giá chất lượng sản phẩm có thể sử dụng trên lâm sàng. Chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng gây độc tính và ung thư trên

thực nghiệm của khối tế bào CAR-T nhằm: *Khắc định chất lượng, độ an toàn của chế phẩm khối tế bào CAR-T.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Chuột nhắt trắng chủng Swiss, khỏe mạnh, trọng lượng 18 - 22g do Ban Chăn nuôi, Học viện Quân y cung cấp. Chuột được nuôi trong phòng thí nghiệm của Bộ môn Sinh lý bệnh bằng thức ăn dành riêng cho chuột, uống nước tự do.

Khối tế bào PBMC, khối tế bào CAR thế hệ 2 (CAR-T CD19RCD137/pMC) và khối tế bào CAR thế hệ 4 (CAR-T CD19RCD137- iCasp9-IL15/pMC) thu nhận từ Labo Sinh học phân tử của Bộ môn Sinh lý bệnh.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Thu thập khối tế bào CAR-T từ phòng nuôi cấy tế bào:*

Tế bào PBMC và 2 loại CAR-T được thu từ các đĩa nuôi cấy bằng cách trộn đều môi trường nuôi cấy và tế bào trong đĩa nuôi cấy và chuyển sang ống fancel 15mL. Hỗn dịch được ly tâm 500 vòng trong 10 phút, hút bỏ dịch nổi và thu cặn tế bào, sau đó hòa lại vào môi trường nuôi cấy mới với mật độ 5×10^7 tế bào/mL.

* *Chiếu xạ chuột nhắt:*

36 chuột nhắt trắng từ 6 - 8 tuần tuổi, trọng lượng trung bình là 25g được

chia thành 3 nhóm (12 chuột/nhóm), được chiếu xạ với liều 1.5Gy: Nhóm chứng mang khối tế bào PBMC; nhóm CAR2 mang khối tế bào CAR-T CD19RCD137/pMC; nhóm CAR4 mang khối tế bào CAR-T CD19RCD137-iCasp9-IL15/pMC.

Chuột sau chiếu xạ được nuôi trong phòng sạch, cung cấp thức ăn và nước uống tiệt trùng.

* *Tiêm khối tế bào vào màng bụng chuột:*

Tế bào CAR, PBMC được hút bằng bơm tiêm vô khuẩn 1mL với thể tích 0,2 mL/chuột (tương đương 10^6 tế bào/chuột).

Chuột nhắt trắng được gây mê bằng Ketamin liều 0,1mL/10g và được cố định trên bàn mổ tư thế nằm ngửa. Dùng nĩa nhắc cơ bụng của chuột lên và đưa mũi kim bơm toàn bộ khối tế bào vào trong khoang màng bụng của chuột.

* *Theo dõi các thông số:*

Chuột sau tiêm chuột được đưa trở lại chuồng nuôi và theo dõi các biểu hiện trong 2 giờ đến sau khi hoàn toàn tỉnh trở lại.

- Theo dõi các thông số sau chiếu xạ: Cân nặng, xét nghiệm huyết học ở các thời điểm 1 tháng, 3 tháng và 6 tháng.

- Phẫu thuật 1/3 số chuột để quan sát màng bụng và các cơ quan nội tạng.

** Xử lý số liệu:*

Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và SPSS 22.0. Các biến số được thể hiện theo giá trị trung bình ($\bar{X}$), độ lệch chuẩn (SD), số lượng (n) và tỷ lệ phần trăm (%). Sử dụng kiểm định Kruskal-Wallis để đánh giá sự khác biệt nhiều nhóm phân bố không chuẩn. Giá trị $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê khi kiểm định.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được thông qua Hội đồng Đạo đức tại Bệnh viện Quân y 103 (Số 180/2021/CNChT-HĐĐĐ ngày 10/8/2021). Số liệu nghiên cứu được Ban chủ nhiệm đề tài Mã số: KC10.39/16-20 và Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y cho phép sử dụng và công bố. Nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Bảng 1. Theo dõi chuột chết của các nhóm tại các thời điểm nghiên cứu.

Thời điểm	Số lượng (n)	Nhóm chứng	Nhóm CAR2	Nhóm CAR4
Trước khi tiêm	12	0	0	0
Sau 1 tháng	8	0	0	0
Sau 3 tháng	4	0	0	0
Sau 6 tháng	0	0	0	0

Kết quả nghiên cứu cho thấy không có chuột bị chết ở thời điểm 1 tháng, 3 tháng và 6 tháng sau khi tiêm khối tế bào CAR-T.

Bảng 2. Theo dõi trọng lượng chuột của các nhóm ở các thời điểm nghiên cứu.

Thời điểm	Số lượng (n)	Nhóm chứng	Nhóm CAR2	Nhóm CAR4
Trước khi tiêm	12	21,91 ± 2,72	22,06 ± 2,97	23,86 ± 3,63
Sau 1 tháng	8	22,33 ± 2,94	22,48 ± 3,20	24,30 ± 3,72
Sau 3 tháng	4	23,59 ± 3,22	23,78 ± 3,15	26,20 ± 4,62
Sau 6 tháng	0	22,08 ± 0,55	22,85 ± 0,37	24,00 ± 0,59
p		> 0,05	> 0,05	> 0,05

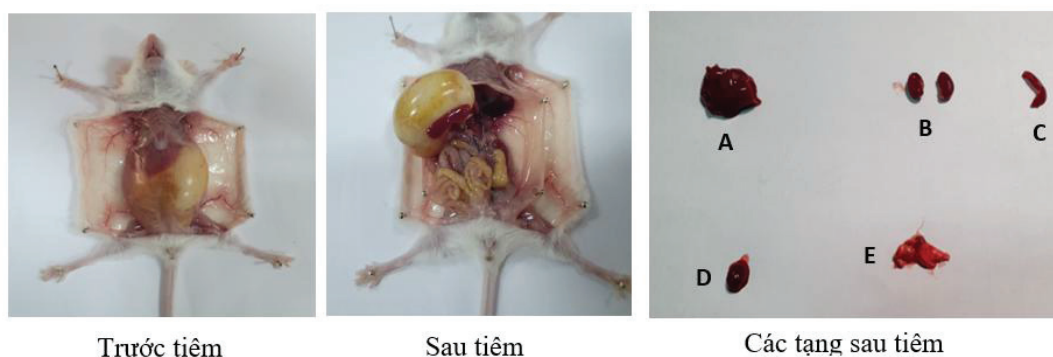
Kết quả cho thấy chuột sau khi tiêm tế bào CAR-T không bị giảm cân, sự khác biệt giữa các thời điểm nghiên cứu không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3. Theo dõi các chỉ số huyết học của các nhóm ở các thời điểm nghiên cứu.

Thời điểm	n	Hồng cầu (T/L)			Huyết sắc tố (g/dL)		
		NC	CAR2	CAR4	NC	CAR2	CAR4
Trước khi tiêm	12	6,02 ± 0,69	6,04 ± 0,74	6,03 ± 0,71	124,17 ± 8,65	124,83 ± 9,72	124,58 ± 9,84
Sau 1 tháng	8	6,09 ± 0,70	6,05 ± 0,72	6,04 ± 0,74	125,58 ± 9,07	124,50 ± 7,81	124,67 ± 8,56
Sau 3 tháng	4	5,98 ± 0,92	6,02 ± 0,95	6,06 ± 0,91	122,00 ± 9,20	123,00 ± 10,97	123,50 ± 9,10
Sau 6 tháng	0	5,56 ± 0,56	5,70 ± 1,06	5,70 ± 1,06	125,50 ± 3,11	124,25 ± 16,26	124,25 ± 16,26
p		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Trước khi tiêm	12	9,47 ± 1,61	9,42 ± 1,30	9,17 ± 1,35	762,50 ± 130,49	765,67 ± 135,97	764,42 ± 135,74
Sau 1 tháng	8	9,66 ± 1,42	9,43 ± 1,24	9,59 ± 1,13	755,00 ± 116,82	766,42 ± 136,33	766,25 ± 138,71
Sau 3 tháng	4	10,30 ± 1,05	9,12 ± 1,10	9,82 ± 1,10	781,38 ± 164,14	783,50 ± 156,14	740,25 ± 144,82
Sau 6 tháng	0	10,87 ± 1,22	8,80 ± 0,67	9,30 ± 1,06	683,25 ± 98,16	681,25 ± 93,99	683,50 ± 101,17
p		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

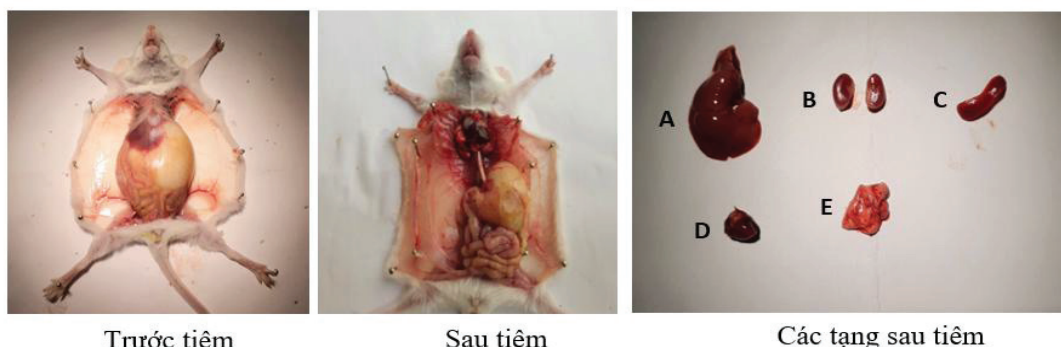
(NC: Nhóm chứng; CAR2: Nhóm CAR2; CAR4: Nhóm CAR4)

Kết quả cho thấy các chỉ số về số lượng hồng cầu, huyết sắc tố khác nhau không có ý nghĩa thống kê giữa các thời điểm trước và sau khi tiêm khối tế bào ($p > 0,05$). Số lượng bạch cầu và tiểu cầu ở các thời điểm sau tiêm khối tế bào có giảm so với thời điểm trước khi tiêm, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).



Hình 1. Hình ảnh màng bụng và các cơ quan nội tạng của chuột sau 1 tháng.
(A: Gan; B: Thận; C: Lách; D: Tim; E: Phổi)

Ở thời điểm 1 tháng sau tiêm tế bào CAR-T, màng bụng chuột trơn nhẵn, các cơ quan nội tạng mềm nhẵn, không thấy hình ảnh các khối bất thường hoặc các ổ viêm áp xe ở màng bụng, trong ổ bụng và ở các cơ quan nội tạng như gan, thận, lách, phổi, tim.



Hình 2. Hình ảnh màng bụng và các cơ quan nội tạng của chuột sau 3 tháng.
(A: Gan; B: Thận; C: Lách; D: Tim; E: Phổi)

Ở thời điểm 3 tháng sau khi tiêm tế bào CAR-T, màng bụng chuột trơn nhẵn, các cơ quan nội tạng mềm nhẵn, không thấy hình ảnh các khối bất thường hoặc các ổ viêm áp xe ở màng bụng, trong ổ bụng và ở các cơ quan nội tạng như gan, thận, lách, phổi, tim.

BÀN LUẬN

Mô hình chuột ghép khối u dị loài thường là mô hình dễ tiếp cận nhất và thường được sử dụng để thử nghiệm hoạt động chứng minh tác dụng của sản phẩm tế bào CAR-T mới. Chuột suy giảm miễn dịch đầu tiên được ghép với dòng tế bào ung thư của người hoặc ghép dị loài có nguồn gốc từ bệnh nhân (mô hình PDX), sau đó được điều trị bằng tế bào T của người được chuyển gene bằng CAR, cho phép quan sát trực tiếp các tác động của sản phẩm tế bào T của người có tác dụng điều trị trong cơ thể sống. Tất cả các sản phẩm tế bào CAR-T hiện có đều được thử nghiệm trong các mô hình ghép u dị loài và hầu hết đã được mô tả trong các ấn phẩm báo cáo về hoạt động chống khối u trong cơ thể sống, bao gồm CAR nhắm mục tiêu vào các kháng nguyên khối u

huyết học [3, 4] và các kháng nguyên khối u rắn như EGFRvIII [5], mesothelin [6]. Kết quả nghiên cứu cho thấy không có chuột chết ở thời điểm 1 tháng, 3 tháng và 6 tháng sau khi tiêm khối tế bào CAR-T. Như vậy, tiêm khối tế bào CAR-T không gây chết chuột, chuột vẫn sống và phát triển bình thường. Kết quả theo dõi trọng lượng của chuột cũng cho thấy chuột sau khi tiêm tế bào CAR-T không bị giảm cân, trọng lượng của chuột vẫn tăng đều theo thời gian. Liều tiêm trong nghiên cứu này đã được báo cáo trước đây chỉ ra là an toàn [7, 8]. Vì vậy, tiêm khối tế bào CAR-T không gây ảnh hưởng nặng nề lên chuột nên chuột vẫn ăn uống, tăng trọng đều đặn. Bên cạnh đó, các xét nghiệm về số lượng hồng cầu, huyết sắc tố, bạch cầu và tiểu cầu không có sự khác biệt có ý nghĩa khi so sánh giữa

các thời điểm trước và sau khi tiêm khối tế bào ($p > 0,05$). Điều này cho thấy tiêm khối tế bào CAR-T không làm ảnh hưởng đến chức năng của cơ quan tạo máu, không gây thiếu máu. Sự giảm nhẹ bạch cầu và tiểu cầu có thể do chuột được chiếu xạ nên gây ức chế tủy xương một phần. Điều này cho thấy tiêm khối tế bào CAR-T không làm ảnh hưởng đến chức năng của cơ quan tạo máu, không gây ảnh hưởng đến chức năng cầm máu và bảo vệ cơ thể.

Ở thời điểm sau tiêm tế bào CAR-T 1 tháng và 3 tháng, màng bụng chuột trơn nhẵn, các cơ quan nội tạng mềm nhẵn, không thấy hình ảnh các khối bất thường hoặc các ổ viêm áp xe ở màng bụng, trong ổ bụng và ở các cơ quan nội tạng như gan, thận, lách, phổi, tim. Kết quả này cũng tương đồng với các nghiên cứu trước đó, cho thấy nồng độ tế bào CAR-T ở 10^6 - 10^7 không gây ra độc tính và khối u ở mô hình chuột thiếu hụt miễn dịch [7, 8].

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy tế bào CAR-T không gây ra độc tính, các thay đổi về chỉ số huyết học và không xuất hiện khối u đại thể trên động vật thực nghiệm trong thời gian thử nghiệm 6 tháng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. 2018; 378(5):439-448.
2. Neelapu SSJHo. Managing the toxicities of CAR T-cell therapy. 2019; 37:48-52.
3. Kochenderfer JN, Feldman SA, Zhao Y, et al. Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. 2009; 32(7):689-702.
4. Friedman KM, Garrett TE, Evans JW, et al. Effective targeting of multiple B-cell maturation antigen-expressing hematological malignancies by anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor T cells. 2018; 29(5):585-601.
5. Johnson LA, Scholler J, Ohkuri T, et al. Rational development and characterization of humanized anti-EGFR variant III chimeric antigen receptor T cells for glioblastoma. 2015; 7(275):275ra22-ra22.
6. Carpenito C, Milone MC, Hassan R, et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. 2009; 106(9):3360-3365.
7. Sommermeyer D, Hudecek M, Kosasih PL, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8⁺ and CD4⁺ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. 2016; 30(2):492-500.
8. Haso W, Lee DW, Shah NN, et al. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. 2013; 121(7):1165-1174.