

## THIẾT LẬP QUY TRÌNH TINH SẠCH VÀ NUÔI CÂY TĂNG SINH KHỐI TẾ BÀO GIẾT TỰ NHIÊN (NK) PHÂN LẬP TỪ MÁU NGOẠI VI BỆNH NHÂN UNG THƯ TUYẾN TIỀN LIỆT

Nguyễn Trọng Phúc<sup>1</sup>, Phùng Thế Hải<sup>1</sup>, Nguyễn Hoàng Phương<sup>1</sup>  
Nguyễn Ngọc Tuấn<sup>1</sup>, Hoàng Trung Kiên<sup>1</sup>, Lê Việt<sup>2</sup>  
Đỗ Anh Tuấn<sup>2</sup>, Lê Văn Đông<sup>1</sup>, Đỗ Khắc Đại<sup>1\*</sup>

### Tóm tắt

**Mục tiêu:** Thiết lập quy trình tinh sạch tế bào giết tự nhiên (natural killer - NK) và quy trình nuôi cấy tăng sinh tạo khối tế bào NK của bệnh nhân (BN) ung thư tuyến tiền liệt (UTTTL) trong phòng thí nghiệm. **Phương pháp nghiên cứu:** Phân lập 3 mẫu máu ngoại vi từ BN được chẩn đoán UTTTL được thu thập để tách tế bào đơn nhân và sau đó sử dụng công nghệ hạt siêu nhỏ có từ tính Microbead (hãng Miltenyi/Đức) để tạo khối tế bào NK có độ tinh sạch cao (ngày D<sub>0</sub>) từ khối tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cells - PBMCs) này. Khối tế bào NK sau tinh sạch được chuyên nuôi cấy tăng sinh trong môi trường chuyên biệt KBM (Kohjin-Bio/Nhật Bản) và được thu hoạch ở ngày thứ 14 (D<sub>14</sub>). **Kết quả:** Tỷ lệ tinh sạch khối tế bào NK đạt 93,4% ở ngày D<sub>0</sub> và 94,9% ở ngày D<sub>14</sub>; với số lượng tế bào NK đạt 385,3 x 10<sup>6</sup> tế bào và tăng gấp 192,7 lần so với ngày D<sub>0</sub>. **Kết luận:** Chúng tôi đã thiết lập và triển khai thành công quy trình tinh sạch và nuôi cấy tạo khối tế bào NK trên BN UTTTL.

**Từ khóa:** Ung thư tuyến tiền liệt; Tế bào NK; Quy trình tinh sạch; Quy trình tăng sinh.

## A PROTOCOL FOR THE PURIFICATION AND EXPANSION OF PERIPHERAL BLOOD NATURAL KILLER CELLS DERIVED FROM PROSTATE CANCER PATIENTS

### Abstract

**Objectives:** To establish a protocol for the purification and expansion of Natural Killer cells (NK cells) derived from prostate cancer patients *in vitro*.

---

<sup>1</sup>Bộ môn Miễn dịch, Học viện Quân y

<sup>2</sup>Khoa Ngoại Tiết niệu, Bệnh viện K Trung ương

\*Tác giả liên hệ: Đỗ Khắc Đại (dokhacdai@vmmu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 03/8/2023

Ngày được chấp nhận đăng: 28/9/2023

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v48i8.446>

**Methods:** We collected peripheral blood samples from 3 patients diagnosed with prostate cancer for peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) separation and generated high-purity NK cells by using Microbeads (Miltenyi/Germany) from the PBMCs (day 0 - D<sub>0</sub>). The NK cells were cultured in a KBM-specific medium (Kohjin-Bio/Japan) for expansion and harvested on day 14 (D<sub>14</sub>). **Results:** The purification rate of NK cells was 93.4% on day D<sub>0</sub> and 94.9% on day D<sub>14</sub>. The average number of harvested NK cells at D<sub>14</sub> was  $385.3 \times 10^6$  cells (which increased by 192.7 times than that of day D<sub>0</sub>). **Conclusion:** We have successfully established and implemented successfully the process of purifying and culturing NK cells in prostate cancer patients.

**Keywords:** Prostate cancer; NK cells; purification process; proliferation process.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Tế bào giết tự nhiên là những tế bào bạch cầu lympho thuộc hệ miễn dịch tự nhiên, với chức năng sinh học là khả năng nhận diện và gây độc giết tế bào đích trực tiếp. Trong những năm gần đây, nhiều công nghệ nuôi cấy tăng sinh và truyền tế bào NK tự thân hoặc đồng loại trong một số loại bệnh ung thư đã được nghiên cứu, ứng dụng ở nhiều nước có nền y học tiên tiến nhằm điều trị hỗ trợ tăng cường miễn dịch (AIET) cho một số loại ung thư như ung thư phổi, ung thư đường tiêu hóa...[1, 2].

Đối với UTTTL, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra trong vi môi trường khối u, tế bào ung thư giải phóng ra nhiều yếu tố ức chế các hoạt động chế tiết, nhận diện và tiêu diệt của tế bào NK [3]; vì vậy, việc nuôi tăng sinh khối tế bào

phân lập từ người mắc ung thư có thể gặp khó khăn hơn.

Trong quá trình nuôi cấy tăng sinh NK, hoạt chất sinh học chính được sử dụng ở các bộ sinh phẩm là Interleukin 2 (IL-2) [4], hoạt chất này có tác dụng kích thích NK sinh trưởng nhưng đồng thời cũng hoạt hóa tăng sinh các tế bào miễn dịch khác, đặc biệt là tế bào T. Điều này dẫn tới độ tinh sạch của khối sản phẩm NK không cao và tạp nhiễm nhiều loại tế bào khác, làm cho số lượng và chất lượng của quá trình nuôi cấy NK không đạt yêu cầu; đôi khi có thể dẫn tới những tác dụng không mong muốn trong nghiên cứu và ứng dụng lâm sàng.

Vì vậy, cần có những phương pháp xử lý để có khối NK đạt độ tinh sạch cao ngay từ khi bắt đầu nuôi cấy, giúp đảm bảo cho quá trình tăng sinh đạt

hiệu quả tối ưu. Bên cạnh đó, công nghệ tinh sạch cần đảm bảo không có những nguy cơ độc tính có thể xảy ra khi truyền trên người để có thể thực hiện các thử nghiệm lâm sàng. Do đó, chúng tôi lựa chọn tinh sạch bằng công nghệ từ sử dụng các hạt sinh học siêu nhỏ (MicroBead) để loại bỏ các tế bào khác tế bào NK có trong khối tế bào bạch cầu đơn nhân (PBMCs) trong máu ngoại vi; khối tế bào NK sau thu hoạch được nuôi cấy tăng sinh tạo khối bằng bộ sinh phẩm thương mại KBM của Nhật Bản. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm hai mục tiêu: *Thiết lập quy trình tinh sạch khối tế bào NK ở máu ngoại vi; Thiết lập quy trình nuôi cấy tăng sinh tế bào NK ở BN UT TTL.*

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng nghiên cứu

\* *Đối tượng nghiên cứu:* Khối tế bào NK máu ngoại vi được phân lập từ 3 BN được chẩn đoán UT TTL tại Khoa Ngoại tiết niệu, Bệnh viện K Trung ương. BN hiện không mắc bệnh lý ung thư khác đi kèm và đồng ý tự nguyện tham gia nghiên cứu.

\* *Thời gian và địa điểm nghiên cứu:*

Thời gian nghiên cứu: Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 10/2022 - 3/2023.

\* *Địa điểm nghiên cứu:* Quy trình tinh sạch, nuôi cấy tăng sinh và các kỹ thuật xét nghiệm sử dụng trong nghiên cứu được thực hiện tại Labo xét nghiệm miễn dịch và Phòng thí nghiệm nuôi cấy tế bào, Bộ môn Miễn dịch, Học viện Quân y.

### 2. Phương pháp nghiên cứu

\* *Thiết kế nghiên cứu:* Nghiên cứu được thiết kế theo hình thức thực nghiệm labo.

\* *Các chỉ số - biến số nghiên cứu:* Tổng số PBMCs trước và sau tinh sạch, tỷ lệ % tế bào T, tỷ lệ % và số lượng NK trước và sau tinh sạch, tỷ lệ thu hồi NK D<sub>0</sub>, tỷ lệ NK tinh sạch ở ngày D<sub>14</sub>, tổng số tế bào thu hoạch ngày D<sub>14</sub> và số lần tăng sinh. Kết quả được so sánh với các thử nghiệm bằng phương pháp tương tự đã được tiến hành trên người khỏe mạnh để xác định mức độ thành công của thử nghiệm.

\* *Quy trình tinh sạch tế bào NK từ máu ngoại vi:*

Khối tế bào đơn nhân từ máu ngoại vi của BN UT TTL được thu hoạch bằng phương pháp tách gradient tỷ trọng sử dụng Ficoll; sau đó, khối PBMCs được chúng tôi sử dụng bộ kit tách tế bào NK của hãng Miltenyi Biotec (#130-092-657) để thu khối tế bào NK. Tế bào NK sau tinh sạch được

sử dụng để nuôi cấy tăng sinh ở bước tiếp theo và để đánh giá độ tinh sạch trên hệ thống máy đếm tế bào dòng chảy (Flow cytometry) của hãng Agilent Technologies (Novocyte 2060R).

Thực hiện quy trình: PBMCs sau tách ficoll được nhuộm thuốc nhuộm xanh trypan (trypan blue) để đánh giá tỷ lệ sống/chết và xác định số lượng bằng buồng đếm; tiếp theo, hoàn nguyên tế bào với 40 $\mu$ L Running buffer cho mỗi 10<sup>7</sup> tế bào trong ống 15mL. Bổ sung 10 $\mu$ L Cocktail Biotin-Antibody cho 10<sup>7</sup> tế bào. Trộn đều và ủ trong 5 phút ở nhiệt độ 2 - 8°C (khay lạnh). Bổ sung 30 $\mu$ L dung dịch đệm cho 10<sup>7</sup> tế bào. Bổ sung 20 $\mu$ L Cocktail MicroBead NK cho 10<sup>7</sup> tế bào, ủ 10 phút ở nhiệt độ 2 - 8°C; gắn cột từ vô trùng vào thiết bị tách; rửa cột từ bằng 3mL dung dịch đệm PBS; dùng pipet 1mL hút toàn bộ sản phẩm đã ủ nhỏ vào buồng tách trên cột, thu sản phẩm vào 1 ống vô trùng loại 15mL; rửa (tráng) cột bằng 3mL dung dịch đệm, sản phẩm là khối NK tinh sạch. Lấy cột ra khỏi vị trí gắn (cột sử dụng 1 lần); kết thúc tinh sạch, lấy mẫu kiểm tra tế bào, chia thể tích tương ứng với số lượng tế bào cần để nuôi cấy hoặc cho các thử nghiệm khác. Với phần tế bào chuyển nuôi cấy, bổ sung dung dịch đệm tới 10mL vào ống sản phẩm,

ly tâm rửa với tốc độ 1500 vòng/phút trong 5 phút (2 lần). Loại bỏ dung dịch rửa, bổ sung môi trường nuôi cấy tế bào theo quy trình nuôi cấy NK.

\* Quy trình nuôi cấy tăng sinh tế bào NK máu ngoại vi:

Chúng tôi sử dụng khối tế bào NK sau tinh sạch ở bước kể trên để nuôi cấy tăng sinh, sử dụng bộ kit KBM hãng Kohjin Bio (#16030210) trong 14 ngày.

Thực hiện quy trình: Gieo tế bào (ngày đầu nuôi cấy/D<sub>0</sub>); khối tế bào (tế bào) NK được bổ sung môi trường nuôi cấy NKCC1 + 10% huyết thanh tự thân, chỉnh mật độ nuôi cấy đạt 0,5 - 1,0 x 10<sup>6</sup> tế bào/mL, hút toàn bộ hỗn hợp nuôi cấy sang chai T25, chuyển tủ ấm 37°C (Memmert, ICO105MED) với 5% CO<sub>2</sub>, độ ẩm 96%; Kiểm tra tế bào: Sau 48 giờ, kiểm tra chai nuôi cấy, kiểm tra màu sắc môi trường bằng mắt thường, chụp hình, lấy mẫu đếm tế bào, bổ sung môi trường NKCC1 + 10% huyết thanh tự thân để đạt mật độ 0,5 - 1,0 x 10<sup>6</sup> tế bào/mL; thay môi trường; đến ngày thứ 4 (D<sub>4</sub>), hút môi trường nuôi cấy chuyển sang ống corning 15mL và ly tâm tốc độ 1.200 vòng/phút trong 5 phút, loại bỏ môi trường NKCC1, bổ sung môi trường NKCC2 với 5% huyết thanh tự thân để tế bào đạt mật độ 0,5 - 1,0 x 10<sup>6</sup> tế

bào/mL; kiểm tra chai nuôi cấy sau mỗi 2 - 3 ngày, lặp lại các bước bổ sung NKCC2; chuyển chai nuôi cấy diện tích lớn hơn (T75) hoặc túi nuôi khi thể tích môi trường lớn hơn; thu hoạch tế bào ( $D_{14}$ ): Kiểm tra tế bào, chụp hình, trộn đều chai (túi) nuôi cấy, lấy mẫu kiểm tra tế bào, lấy mẫu thực hiện các xét nghiệm định danh tế bào bằng kỹ thuật tế bào dòng chảy. Tính toán tổng thể tích sản phẩm, tổng lượng tế bào thu hoạch, số lần tăng sinh và độ tinh sạch khối tế bào NK (là quần thể có định danh: CD45+CD56+CD3- trên máy flow cytometry).

### 3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu là một phần nội dung đề tài “Nghiên cứu kiểu hình miễn dịch và hiệu quả tăng sinh tế bào NK ở bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt có hoạt tính NK thấp” đã được Hội đồng Đạo đức. Học viện Quân y chấp thuận ngày 04/10/2022; số: 02/2022/CNChT-HĐĐĐ.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

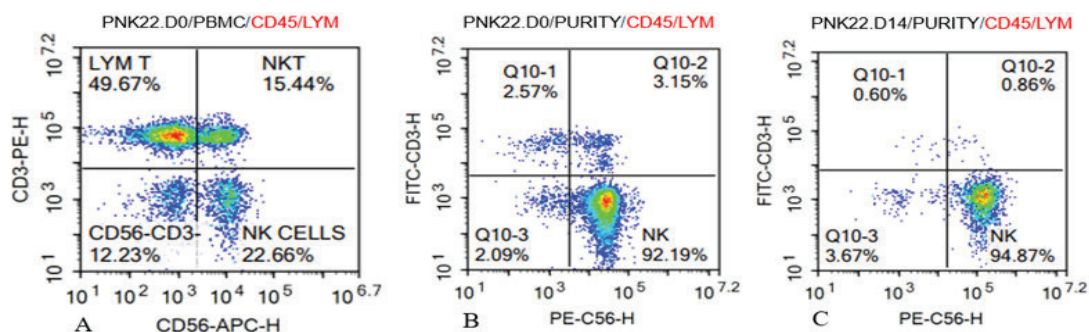
### 1. Quy trình tinh sạch tế bào NK từ máu ngoại vi BN UTTL

Để chuẩn bị mẫu cho hai quy trình tinh sạch và nuôi cấy, chúng tôi sử dụng phương pháp tách PBMCs từ

12mL máu ngoại vi bằng dung dịch Ficoll với tỷ lệ 1:1 cho phép thu được số lượng bạch cầu đơn nhân đủ dùng cho nghiên cứu. Về đặc điểm, cả 3 mẫu đều được thu thập từ BN ung thư giai đoạn 4 với độ tuổi trung bình là 57,7. Bảng 1 cho thấy lượng PBMCs trung bình đạt  $17,8 \pm 6,7 \times 10^6$  tế bào đơn nhân, trong đó quần thể lympho T chiếm  $54,1 \pm 5,0\%$ . Với tỷ lệ tế bào NK của 3 mẫu này trung bình  $22,9 \pm 1,6\%$  (dao động từ 21,5 - 24,6%), số lượng tế bào NK trước tinh sạch là  $4,2 \times 10^6$  tế bào (dao động từ 2,71 -  $6,2 \times 10^6$ ); đây là số lượng tế bào đầu vào đáp ứng tốt nhu cầu nuôi cấy ở quy mô nhỏ cho mục đích nghiên cứu và thử nghiệm lâm sàng.

Về mặt kỹ thuật, với số lượng PBMCs đầu vào, theo hướng dẫn của nhà sản xuất, chúng tôi sử dụng 1 cột từ loại LS (cho phép tách tối đa  $10^8$  tế bào được đánh dấu) cho mỗi BN. Lượng kháng thể gắn biotin và Microbead theo quy trình với mỗi 10 $\mu$ L biotin và 20 $\mu$ L Microbead cho  $10^7$  tế bào. Ví dụ: Trường hợp mẫu BN thứ 1 (BN1) có số lượng PBMCs là  $25,3 \times 10^6$  chúng tôi sử dụng tới 25 $\mu$ L biotin và 50 $\mu$ L Microbead. Theo đó, sau tinh sạch thực hiện kiểm định bằng kỹ thuật tế bào dòng chảy, chúng tôi thu được kết quả như sau:





**Hình 1.** Kết quả phân tích tỷ lệ % NK ở các thời điểm của mẫu BN thứ 3 (BN3-mã hóa PNK22) trên máy tế bào dòng chảy.

- A. Tỷ lệ NK trong PBMCs sau tách Ficoll;
- B. Tỷ lệ NK sau tinh sạch tại thời điểm trước khi nuôi tăng sinh ( $D_0$ );
- C. Tỷ lệ NK trong môi trường nuôi cấy ngày 14 ( $D_{14}$ ).

Cách thức phân tích trên máy đếm tế bào dòng chảy NK tại  $D_{14}$  (thước đo, “gating”...) được điều chỉnh do kiểu hình NK thay đổi sau quá trình nuôi cấy tăng sinh và hoạt hóa.

**Bảng 1.** Một số đặc điểm miễn dịch và kết quả tinh sạch, tăng sinh.

Đặc điểm	BN 1	BN 2	BN 3	$\bar{X} \pm SD$
Độ tuổi	60	50	63	$57,7 \pm 6,8$
PBMCs ( $10^6$ )	25,3	12,6	15,5	$17,8 \pm 6,7$
T (%)	53,1	59,5	49,7	$54,1 \pm 5,0$
NK (%)	24,6	21,5	22,7	$22,9 \pm 1,6$
Số lượng NK trước tinh sạch ( $10^6$ )	6,2	2,71	3,52	$4,2 \pm 1,8$
Số lượng PBMCs sau tinh sạch ( $10^6$ )	4,3	2,7	3,1	$3,4 \pm 0,8$
NK tinh sạch $D_0$ (%)	95,1	92,9	92,2	$93,4 \pm 1,5$
Số lượng NK sau tinh sạch ( $10^6$ )	4,09	2,51	2,86	$3,2 \pm 0,8$
Tỷ lệ thu hồi NK $D_0$ (%)	65,70	92,59	81,23	$79,8 \pm 13,5$
NK tinh sạch $D_{14}$ (%)	97,8	92,0	94,9	$94,9 \pm 2,9$
Tổng số tế bào ( $10^6$ )	480	216	460	$385,3 \pm 147,0$
Số lần tăng sinh (lần)	240	108	230	$192,7 \pm 73,5$

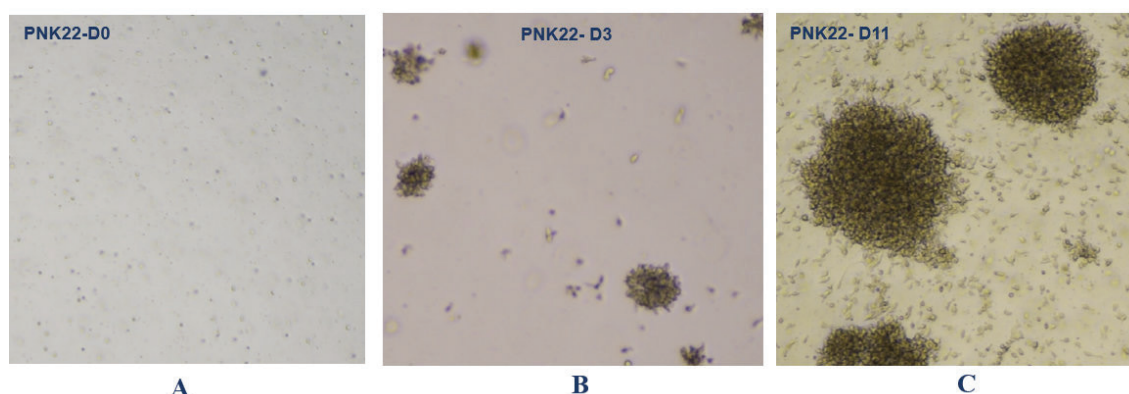
Kết quả tinh sạch cho thấy sử dụng cột từ cho phép thu được sản phẩm có tỷ lệ NK cao lên tới  $93,4 \pm 1,5\%$  (dao động từ 92,2 - 95,1%) với số lượng tế bào thu được trung bình đạt  $3,4 \pm 0,8 \times 10^6$  tế bào, đạt hiệu suất thu hồi trung bình 79,8% lượng tế bào NK trong khối PBMCs đầu vào. Quan trọng hơn, trong ứng dụng liệu pháp truyền tế bào miễn dịch, đặc biệt trong ghép đồng loài là độ tinh sạch của quần thể NK ở ngày thu hoạch ( $D_{14}$ ). Berg 2010 [5] đã có phân tích về tính an toàn và hiệu quả của sản phẩm tăng sinh và truyền trên người cần đạt độ tinh sạch là từ 90% tế bào NK trong khối tế bào trở lên. Kết quả của chúng tôi cho thấy nhiều triển vọng khi tỷ lệ tế bào NK ở ngày thu hoạch ( $D_{14}$ ) trung bình đạt 94,9% với dao động từ 92,0 - 97,8%.

Như vậy, kết quả cho thấy khi sử dụng phương pháp tinh sạch tế bào NK bằng cột từ cho phép thu được tỷ lệ tế bào NK đầu vào cao cho nuôi cấy (93,4%); từ đó, đạt được độ tinh sạch ở khối sản phẩm sau nuôi cấy cao (94,9%). Kết quả này tương tự như một số tác giả đã sử dụng phương pháp này trước đó [6], và cao hơn một số

phương pháp dùng kháng thể kháng CD3, CD52 đơn thuần [7, 8]. Bên cạnh đó, phương pháp còn cho thấy có nhiều ưu việt khác như: Sử dụng hạt từ tính (Bead) sinh học siêu nhỏ (Microbead) không ảnh hưởng tới đặc tính và đời sống của tế bào; thời gian thực hiện nhanh (30 - 45 phút), giúp tế bào nhanh chóng được xử lý để đưa vào môi trường nuôi cấy chuyên dụng.

## **2. Quy trình nuôi cấy tăng sinh tế bào NK ở BN UT TTL**

Kết quả nuôi cấy cho thấy số lần tăng sinh trung bình của 3 BN đạt  $192,7 \pm 73,5$  với số lượng tế bào trung bình là  $385,3 \pm 147,0 \times 10^6$  tế bào. Mặc dù số lần tăng sinh này chưa phải là cao nhưng điều này phần nào cũng đã được lý giải bởi nghiên cứu của Pasero và CS [3] đã chứng minh rằng TGF- $\beta$ 1 được tiết nhiều ở môi trường UT TTL và làm trung gian cho các tác động tăng cường ức chế miễn dịch lên tế bào NK. Như vậy, những tác động từ vi môi trường khối u trong một thời gian dài có thể là nguyên nhân ảnh hưởng đến sự tăng sinh của tế bào này trong phòng thí nghiệm.



**Hình 2.** Hình ảnh quá trình tăng sinh của mẫu BN3 (PNK22) ở một số thời điểm được chụp dưới kính hiển vi đảo ngược.

A. Ngày  $D_0$ , tế bào phân bố đều trên bề mặt chai nuôi cấy; B. Ngày  $D_3$ , tế bào tạo thành các cụm nhỏ, số lượng bắt đầu tăng sinh; C. Ngày  $D_{11}$ , giai đoạn tăng sinh mạnh, tế bào tạo những cụm lớn trong môi trường nuôi, môi trường có màu vàng chanh cũng là dấu hiệu cần bổ sung môi trường hoặc thu hoạch tế bào.

Tuy nhiên, quy trình nuôi cấy tăng sinh được chúng tôi áp dụng là sử dụng bộ sinh phẩm KBM (Kohjin-Bio, Nhật Bản) vẫn cho thấy tỷ lệ tăng sinh đáng kể của tế bào NK với trung bình lên tới gần 200 lần so với lượng NK đầu vào, kết quả này có thể so sánh với nhóm tác giả Fangming Wang [7] tế bào NK tăng trên 100 lần ở người khỏe mạnh và nhóm tác giả Kazuhiro Nagai [6] tế bào NK tăng trên 200 lần ở một số loại ung thư tạng đặc. Đến nay, trên thế giới đã có nhiều thử nghiệm truyền bổ

trợ tế bào NK trong nhiều mặt bệnh ung thư khác nhau, liều tế bào NK trên một lần truyền luôn có sự biến động (từ  $10^8$  tế bào/lần truyền [6] cho tới  $2 \times 10^9$  tế bào/ lần truyền [9]) với trung bình được nuôi cấy từ 20 - 40mL máu ngoại vi. Một thử nghiệm lâm sàng khác vào năm 2014 [10] trên 4 BN ung thư đường tiêu hóa di căn cũng cho thấy lượng tế bào truyền dao động từ  $5,0 - 9,0 \times 10^8$  với độ tinh sạch chỉ từ 39,7 - 78% NK. Như vậy, với thể tích máu ngoại vi 12mL chúng tôi nuôi cấy đạt số lượng tế bào trung bình  $3,85 \times 10^8$  tế bào với độ tinh sạch cao > 90%. Đây là lượng tế bào có thể đáp ứng được yêu cầu về liều cho những thử nghiệm lâm sàng để đánh giá tính an toàn của sản phẩm, với những nghiên cứu đánh giá tính hiệu quả và có quy mô lớn hơn; chúng tôi khuyến cáo sử dụng gấp đôi thể tích máu ban đầu là



24mL và 2 cột từ để thu được lượng tế bào nhiều hơn với độ tinh sạch cao hơn, từ đó có thể tối ưu hiệu quả của các nghiên cứu thử nghiệm.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi mô tả quy trình tinh sạch và nuôi cấy tăng sinh tế bào NK máu ngoại vi từ BN UT TTL được thực hiện trên cỡ mẫu rất nhỏ ( $n = 3$ ); vì vậy, kết quả độ tinh sạch và mức độ tăng sinh tế bào NK thông qua quy trình này cần được xác định rõ trong nghiên cứu tiếp theo với cỡ mẫu lớn hơn.

### **KẾT LUẬN**

Thiết lập thành công quy trình tinh sạch và nuôi tăng sinh khối tế bào NK phục vụ cho nghiên cứu và thử nghiệm về tế bào NK ở BN được chẩn đoán UT TTL.

Thông qua quy trình đã thiết lập và bước đầu thử nghiệm trên mẫu máu ngoại vi của 3 BN UT TTL cho thấy: Tỷ lệ tinh sạch sau nuôi cấy đạt 94,9%; tỷ lệ tăng sinh đạt  $3,85 \times 10^8$  tế bào với số lần tăng sinh gấp 192,7 lần sau 14 ngày.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. K. Nagai, Y. Harada, H. Harada, K. Yanagihara, Y. Yonemitsu, Y. Miyazaki. Highly activated ex vivo-expanded natural killer cells in patients with solid tumors in a phase I/IIa

clinical study. *Anticancer Res.* 2020 Oct; 40(10):5687-5700.

2. V. Dedeepiya, H. Terunuma, S. Manjunath, R. Senthilkumar, P. Thamarai Kannan, T. Srinivasan, C. Helen Reena, S. Preethy, S. Abraham. Autologous immune enhancement therapy for cancer using NK cells and CTLs without feeder layers; our six year experience in India. *J Stem Cells Regen Med.* 2011 Oct 30; 7(2):95.

3. C. Pasero, G. Gravis, M. Guerin, S. Granjeaud, J. Thomassin-Piana, P. Rocchi, M. Paciencia-Gros, F. Poizat, M. Bentobji, 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):2153-2165.

4. 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.

5. M. Berg, et al. Ex-vivo expansion of NK cells: What is the priority - high yield or high purity? *Cytotherapy.* 2010; 12:969-970.

6. K. Nagai, et al. Highly activated ex vivo-expanded natural killer cells in patients with solid tumors in a phase I/IIa clinical study. *ANTICANCER RESEARCH.* 2020; 40:5687-5700.

7. F. Wang,. et al. Allogeneic expanded human peripheral NK cells control prostate cancer growth in a preclinical mouse model of castration-resistant prostate cancer. *Hindawi Journal of Immunology Research*. 2022. Article ID 1786395.

8. R. Somayeh,. et al. Autologous natural killer cell-enrichment for immune cell therapy: Preclinical setting phase, shiraz experience. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2021. 20(2):233-243.

9. N. Sakamoto, T. Ishikawa, S. Kokura, *et al*. Phase I clinical trial of autologous NK cell therapy using novel expansion method in patients with advanced digestive cancer. *J Transl Med*. 2015; 13:277.

10. B. Subramani, CR. Pullai, K. Krishnan, SD. Sugadan, X. Deng, T Hiroshi, K. Ratnavelu. Efficacy of *ex vivo* activated and expanded natural killer cells and T lymphocytes for colorectal cancer patients. *Biomed Rep*. 2014 Jul; 2(4):505-508.