

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM TUY XƯƠNG VÀ KẾT QUẢ THU GOM KHỐI TẾ BÀO GỐC TUY XƯƠNG Ở BỆNH NHÂN XƠ GAN MẮT BÙ DO VIÊM GAN VIRUS B

Đào Trường Giang², Trần Việt Tú², Bùi Tiến Sỹ¹
Mai Hồng Bằng¹, Lý Tuấn Khải¹, Nguyễn Tiến Thịnh¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá tủy xương và kết quả thu gom khối tế bào gốc (TBG) tủy xương ở bệnh nhân (BN) xơ gan, làm tiền đề cho ghép TBG tủy xương tự thân ở BN xơ gan. **Đối tượng và phương pháp:** 29 BN xơ gan mất bù do viêm gan virus B được làm tủy đồ, thu gom 300 ml dịch tủy xương từ xương chậu, tách lấy thành phần tế bào đơn nhân bằng phương pháp ly tâm phân lớp tỷ trọng tế bào, xét nghiệm thành phần tủy xương trước và sau cô đặc. **Kết quả:** Số lượng và thành phần tế bào tủy xương, số lượng tế bào CD34⁺ ở BN xơ gan bình thường. Tỷ lệ loại hồng cầu: $99,76 \pm 0,28\%$; tỷ lệ giữ tế bào đơn nhân: $30,06 \pm 9,81\%$, tỷ lệ giữ tế bào CD34⁺: $51,81 \pm 22,98\%$; khối TBG có tổng số lượng CD34⁺: $1,97 \pm 7,78 \times 10^6$ tế bào và số lượng TBG trung mô: $58,45 \pm 41,45 \times 10^6$ tế bào. **Kết luận:** Tủy xương của BN xơ gan cơ bản bình thường, kết quả thu gom khối TBG đạt hiệu quả tốt, loại bỏ được hầu hết tế bào trưởng thành trong khối TBG thành phẩm.

* Từ khóa: Tế bào gốc tủy xương; Xơ gan; Chất lượng khối tế bào gốc; Tủy xương.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Xơ gan là hậu quả của các cơ chế khác nhau làm tổn thương gan dẫn đến viêm hoại tử và hình thành sợi xơ. Xơ gan mất bù được xem là giai đoạn cuối của bệnh và dẫn đến tử vong nếu BN không được ghép gan và không có những biện pháp phòng ngừa biến chứng. Bên cạnh việc ghép gan, nghiên cứu ghép TBG hiện là hướng điều trị mới. Nguồn TBG có thể lấy từ tủy xương, tế bào CD34⁺ tách từ máu ngoại vi sau huy động bằng G-CSF hoặc từ mô mỡ. Dịch tủy xương chỉ chứa số lượng hạn chế các TBG, còn đa số là các tế bào đang trưởng

thành hoặc đã trưởng thành không có vai trò trong tái tạo tổ chức.

Nhiều nghiên cứu đã tiến hành thử nghiệm sử dụng TBG tủy xương để điều trị xơ gan. Tuy nhiên, phương pháp này chưa được ứng dụng rộng rãi ở nước ta. Bên cạnh đó, cần xây dựng quy trình thu gom, cô đặc dịch tủy xương ở BN xơ gan để đạt được khối TBG thích hợp, phù hợp với điều kiện kinh tế và trang thiết bị ở Việt Nam. Do đó, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm: *Đánh giá tủy xương, hiệu quả thu hồi khối TBG và hiệu quả loại bỏ những thành phần tế bào đã trưởng thành bằng phương pháp ly tâm theo gradient tỷ trọng.*

1. Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

2. Học viện Quân y

Người phản hồi: Đào Trường Giang (giangle127@gmail.com)

Ngày nhận bài: 12/3/2020

Ngày bài báo được đăng: 2/4/2020

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

29 BN có chỉ định ghép TBG tủy xương tự thân điều trị xơ gan tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

** Tiêu chuẩn lựa chọn:*

- Bệnh nhân xơ gan (có hội chứng suy chức năng gan, hội chứng tăng áp cửa); có biểu hiện xơ gan mất bù do viêm gan virus B với tiêu chí: cổ trướng, bệnh não gan, vàng da, xuất huyết tiêu hoá do vỡ tĩnh mạch thực quản.

- Điểm Child-Pugh ≤ 11 .

- Tuổi từ 35 - 75.

- Bệnh nhân được điều trị trong 3 tháng với phác đồ kháng virus và có đáp ứng với điều trị, nồng độ HBV-DNA dưới ngưỡng phát hiện.

- Không có ung thư gan.

- Dự kiến thời gian sống thêm > 24 tuần, đồng thuận tham gia nghiên cứu.

2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

** Các bước tiến hành:*

Bước 1: Thu gom, tách chiết, cô đặc dịch tủy xương.

- Chọc hút dịch tủy xương: Thực hiện tại phòng mổ vô trùng, BN được sử dụng thuốc an thần, gây tê tại chỗ từng lớp đến màng xương bằng lidocain 1%, chọc hút dịch tủy xương từ mào chậu sau trên 2 bên để thu 240 ml dịch tủy xương, chống đông bằng heparin (pha 5.000 đơn vị heparin trong 80 ml nước muối sinh lý) thu được 300 ml dịch tủy xương.

- Tách chiết cô đặc khối TBG từ dịch tủy xương trong điều kiện vô trùng bằng phương pháp ly tâm tỷ trọng, sử dụng dung dịch ficoll có tỷ trọng 1,077 g/l: hút dịch tủy xương vào các ống Falcon 50 ml có sẵn 15 ml dung dịch ficoll, ly tâm với tốc độ 3.000 vòng/phút ở nhiệt độ 22°C trong 30 phút bằng máy ly tâm có điều khiển nhiệt độ (hãng Herius, Đức). Hồng cầu, bạch cầu hạt và các tế bào có tỷ trọng lớn hơn tỷ trọng của dung dịch ficoll sẽ lắng xuống dưới lớp ficoll, còn các tế bào đơn nhân (lymphocyte, các TBG...) nhẹ hơn sẽ tạo thành một vòng nhẫn nằm ở lớp phía trên dung dịch ficoll. Dùng pipet Paster hút lớp tế bào này, rửa hai lần bằng nước muối sinh lý, huyền dịch cặn tế bào này trong 30 ml nước muối sinh lý để tạo thành khối TBG. Hỗn dịch tế bào này được sử dụng ngay bằng cách bơm qua catheter vào động mạch gan, đồng thời lấy mẫu để kiểm tra chất lượng (xác định các thành phần tế bào, tỷ lệ và số lượng TBG CD34⁺, cấy khuẩn...).

Bước 2: Đánh giá khối TBG tủy xương.

- Xét nghiệm tế bào máu và tủy xương: Sử dụng máy đếm tế bào tự động ADVIA 2012 (hãng Siemen, Đức) và phương pháp tế bào học kinh điển (nhuộm Giemsa và quan sát trên kính hiển vi quang học (hãng Olympus, Nhật Bản).

- Xác định TBG CD34⁺: Sử dụng phương pháp miễn dịch huỳnh quang tế bào dòng chảy với phần mềm Cellquest trên hệ thống máy FASC Canto II (hãng Becton Dickinson, Hoa Kỳ) với bộ sinh phẩm CD34 enumeration kit (anti-CD34-FITC, anti-CD45-FITC) theo phương pháp single platform.

* Các chỉ tiêu nghiên cứu:

- Số lượng tế bào có nhân của tủy xương.

- Tỷ lệ TBG CD34⁺ của máu ngoại vi và tủy xương.

- Nồng độ tế bào có nhân, tỷ lệ và số lượng TBG CD34⁺ của dịch tủy xương trước và sau quy trình chiết tách, cô đặc.

- Tỷ lệ loại bỏ hồng cầu, huyết sắc tố, bạch cầu hạt và tỷ lệ thu hồi TBG CD34⁺ sau quy trình chiết tách, cô đặc khối TBG từ dịch tủy xương.

- Nồng độ và tổng số lượng TBG CD34⁺ trong khối TBG sản phẩm.

* Xử lý số liệu: Bằng phần mềm SPSS 20.0.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

Bảng 1: Đặc điểm tủy xương.

Chỉ số		Đơn vị	$\bar{x} \pm SD$
Tủy xương:			
Bình thường		n, %	22 (75,9)
Giảm sản nhẹ		n, %	7 (24,1)
Tế bào có nhân		G/L	43,05 $\pm$ 26,39
Tế bào CD34 ⁺		G/L	0,32 $\pm$ 0,21
Nguyên tủy bào		G/L	0,31 $\pm$ 0,47
Tiền tủy bào		G/L	0,59 $\pm$ 0,59
Tủy bào	Trung tính	G/L	7,79 $\pm$ 2,50
	Ưa acid	G/L	0,38 $\pm$ 0,62
Hậu tủy bào	Trung tính	G/L	8,04 $\pm$ 2,53
	Ưa acid	G/L	0,93 $\pm$ 1,94
Đũa	Trung tính	G/L	8,39 $\pm$ 3,18
	Ưa acid	G/L	0,25 $\pm$ 0,46
Đa múi	Trung tính	G/L	20,86 $\pm$ 8,25
	Ưa acid	G/L	1,71 $\pm$ 1,94
Tế bào lympho		G/L	14,92 $\pm$ 6,15
Bạch cầu đơn nhân		G/L	2,14 $\pm$ 1,65
Tương bào		G/L	0,75 $\pm$ 0,75
Tiền nguyên hồng cầu		G/L	0,33 $\pm$ 0,48
Nguyên hồng cầu ưa bazơ		G/L	1,36 $\pm$ 0,73
Nguyên hồng cầu đa sắc		G/L	8,29 $\pm$ 3,75
Nguyên hồng cầu ưa acid		G/L	22,79 $\pm$ 9,29
Hồng cầu lưới		%	1,46 $\pm$ 0,55

22/29 BN (75,9%) có tủy xương bình thường, chỉ có 24,1% BN tủy xương giảm nhẹ số lượng tế bào. Trong đó, số lượng tế bào có nhân trong tủy xương: $43,05 \pm 26,39$ G/L, tế bào lympho trưởng thành: $14,92 \pm 6,15$ G/L, tỷ lệ các tế bào dòng bạch cầu hạt, dòng lympho, mono, dòng hồng cầu nằm trong giới hạn bình thường hằng số sinh học của người Việt Nam (2003). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả khác [1, 2].

Tỷ lệ tế bào CD34⁺ trong tủy xương là $0,61 \pm 0,32\%$. Nghiên cứu của Nguyễn Mạnh Khánh cho thấy, tỷ lệ tế bào CD34⁺ tủy xương ở BN khớp giả thân xương dài trung bình $0,6 \pm 0,2\%$ với số lượng tế bào

CD34⁺ là $0,4 \pm 0,2$ G/L. Lý Tuấn Khải và CS ghi nhận kết quả tương tự khi nghiên cứu 32 trường hợp khớp giả thân xương chày. Trong 3 nghiên cứu này, kỹ thuật đếm tế bào CD34⁺ là đồng nhất [3, 4]. Kết quả nghiên cứu trên 79 người Việt Nam trưởng thành cho thấy, số lượng tế bào CD34⁺ trung bình là $1,22 \pm 0,79$ G/L [5]. Tuy nhiên, phương pháp xác định tế bào CD34⁺ của 2 nghiên cứu hoàn toàn khác nhau: Dựa theo quy trình của ISHAGE và đếm trên hệ thống máy FACS-Canto II, nhóm tác giả nghiên cứu trên người Việt Nam trưởng thành sử dụng kỹ thuật huỳnh quang trực tiếp, đếm trên kính hiển vi huỳnh quang.

Bảng 2: Các chỉ số tế bào của dịch tủy xương thu được.

Chỉ số	Đơn vị	Giá trị thấp nhất	Giá trị cao nhất	$\bar{x} \pm SD$
Thể tích trước tách	ml	320	320	320
Số lượng tế bào có nhân	G/L	4,7	17,7	$10,5 \pm 3,58$
Bạch cầu đơn nhân	%	22,7	59,0	$41,63 \pm 8,89$
Bạch cầu hạt	%	41,0	77,3	$57,24 \pm 9,01$
Hồng cầu	T/L	1,8	4,3	$2,78 \pm 0,61$
Huyết sắc tố	g/L	59	135	$85,87 \pm 16,4$
Tiểu cầu	G/L	16	112	$34,81 \pm 19,08$
Nồng độ tế bào CD34 ⁺	tế bào/ μ l	4,6	390	$89,68 \pm 81,71$
Số lượng tế bào CD34 ⁺ $\times 10^6$	tế bào	1,5	124,8	$28,95 \pm 26,61$

So với số lượng tế bào có nhân trung bình trong tủy xương của 46 BN ($55,42 \pm 31,93$ G/L), số lượng tế bào có nhân trong dịch tủy xương trước tách giảm.

Bảng 3: Hiệu quả loại bỏ các tế bào bạch cầu hạt, hồng cầu, huyết sắc tố và tiểu cầu.

Chỉ số	Đơn vị	Giá trị thấp nhất	Giá trị cao nhất	$\bar{x} \pm SD$
Tỷ lệ loại bạch cầu hạt	%	66,2	99,25	$90,13 \pm 6,54$
Tỷ lệ loại hồng cầu	%	98,47	99,93	$99,76 \pm 0,28$
Tỷ lệ loại tiểu cầu	%	72,6	96,79	$86,74 \pm 5,62$

Mục tiêu chính của tách tế bào từ dịch tủy xương để tạo ra khối TBG đã loại bỏ những thành phần không cần thiết như bạch cầu hạt, hồng cầu, huyết sắc tố, tiểu cầu và giữ lại khối tế bào đơn nhân trong đó có chứa các TBG tạo máu, TBG trung mô. Kết quả của chúng tôi cho thấy, tỷ lệ loại tế bào bạch cầu hạt khi tách TBG từ dịch tủy xương bằng phương pháp ly tâm theo gradient tỷ trọng là $90,13 \pm 6,54\%$, trong đó tỷ lệ loại tế bào bạch cầu hạt cao nhất là $99,25\%$.

Khả năng loại bỏ tốt hồng cầu là một chỉ tiêu quan trọng, đặc biệt trong trường hợp khối TBG cần thời gian bảo quản lâu hơn 3 - 5 ngày trước khi sử dụng. Khi đó khối TBG cần bảo quản đông lạnh và sử dụng sau khi rã đông. Trước khi đông lạnh, nếu lượng huyết sắc tố và hồng cầu tồn dư trong khối TBG lớn, cần loại bỏ tiếp mới có thể làm đông lạnh để bảo quản được.

Kết quả này tương tự nghiên cứu của một số tác giả khác với số hồng cầu tồn dư trong khối TBG thu được còn khá lớn. Theo Mehta và CS (2002), khi tách tủy xương bằng 2 loại máy tách tế bào khác nhau (Cobe Spectra và Fenwal CS 3000 Plus), khối TBG thu được khi tách bằng máy Fenwal CS 3000 Plus có thể tích lớn hơn. Nếu lượng hồng cầu tồn dư lớn, phải tiếp tục ly tâm cô đặc lại và loại bỏ tiếp hồng cầu [6].

Khi so sánh hiệu quả của 2 phương pháp tách tế bào đơn nhân từ dịch hút tủy xương: Tách tự động bằng máy tách tế bào Fresenius AS 240 (FreseniusAG, Schweinfurt, Đức) và ly tâm theo gradient tỷ trọng sử dụng dung dịch ficoll-paque (tỷ trọng 1,077), Hernandez P. và CS nhận thấy tổng số lượng tế bào đơn nhân, số lượng tế bào CD34⁺ thu được sau tách bằng 2 phương pháp tách trên tương tự nhau [7].

Bảng 4: Tỷ lệ giữ lại tế bào đơn nhân, tế bào CD34⁺.

Chỉ số	Đơn vị	Giá trị thấp nhất	Giá trị cao nhất	$\bar{x} \pm SD$
Tỷ lệ giữ bạch cầu đơn nhân	%	13,7	52	$30,06 \pm 9,81$
Tỷ lệ giữ CD34 ⁺	%	12,19	99,2	$51,81 \pm 22,98$
Tăng CD34 ⁺ /μl	lần	1,30	11,53	$5,56 \pm 2,34$

Khi tách TBG từ dịch tủy xương bằng phương pháp ly tâm theo gradient tỷ trọng, tỷ lệ giữ bạch cầu đơn nhân là $30,06 \pm 9,81\%$. Tỷ lệ giữ tế bào CD34⁺ là $51,81 \pm 22,98\%$ và đậm độ tế bào CD34⁺/μl khối TBG tăng $5,56 \pm 2,34$ lần.

Bảng 5: Các chỉ số tế bào của khối TBG thu được.

Chỉ số	Đơn vị	Giá trị thấp nhất	Giá trị cao nhất	$\bar{x} \pm SD$
Thể tích khối TBG	ml	30	30	30
Số lượng tế bào nhân	G/L	3,6	62	$19,97 \pm 11,67$
Tỷ lệ bạch cầu đơn nhân	%	7,0	87,4	$68,24 \pm 16,05$
Tỷ lệ bạch cầu hạt	%	9,5	66,3	$29,21 \pm 11,35$
Hồng cầu	T/L	0,02	0,47	$0,07 \pm 0,07$

Huyết sắc tố	g/L	1	13	$4,64 \pm 3,19$
Tiểu cầu	G/L	12	152	$50,68 \pm 36,4$
Nồng độ tế bào CD34 ⁺	tế bào/ μ l	24,3	1.279,8	$399,03 \pm 259,02$
Số lượng tế bào CD34 ⁺ x 10 ⁶	tế bào	0,7	38,4	$11,97 \pm 7,78$

Số lượng tế bào có nhân trong khối TBG tách bằng phương pháp ly tâm theo gradient là $19,97 \pm 11,67$ G/L, tế bào đơn nhân chiếm đa số ($68,24 \pm 16,05\%$). Số lượng hồng cầu là $0,07 \pm 0,07$ T/L và lượng huyết sắc tố là $4,64 \pm 3,19$ g/L.

Ở khối TBG tách bằng phương pháp ly tâm theo gradient tỷ trọng, nồng độ tế bào CD34⁺/ μ l thấp nhất là 24,3 và cao nhất là 1.279,8 với nồng độ trung bình $399,03 \pm 259,02$ tế bào/ μ l. Tổng số lượng tế bào CD34⁺ thấp nhất trong khối TBG là $0,7 \times 10^6$ và cao nhất là $38,4 \times 10^6$ với số lượng tế bào CD34⁺ trung bình $11,97 \pm 7,78 \times 10^6$.

KẾT LUẬN

- Tuỷ xương BN xơ gan: Số lượng và thành phần tế bào tuỷ xương, số lượng tế bào CD34⁺ ở BN xơ gan bình thường.

- Quy trình chiết tách tạo khối TBG từ dịch hút tuỷ xương bằng phương pháp ly tâm theo gradient tỷ trọng đạt hiệu quả tốt:

+ Loại được hầu hết thành phần tế bào đã trưởng thành: Tỷ lệ loại tế bào bạch cầu hạt, hồng cầu và tiểu cầu lần lượt là $90,13 \pm 6,54\%$, $99,76 \pm 0,28\%$ và $86,74 \pm 5,62\%$.

+ Giữ lại được thành phần tế bào đơn nhân và tế bào CD34⁺: Tỷ lệ giữ lần lượt là $30,06 \pm 9,81\%$ và $51,81 \pm 22,98\%$.

+ Làm tăng nồng độ tế bào CD34⁺ trong khối TBG sản phẩm lên $5,56 \pm 2,34$ lần so với trước xử lý.

+ Khối TBG có nồng độ tế bào CD34⁺ là $399,03 \pm 259,02$ tế bào/ μ l, tổng số lượng CD34⁺ là $1,97 \pm 7,78 \times 10^6$ tế bào; tổng số lượng TBG trung mô là $58,45 \pm 41,45 \times 10^6$ tế bào.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Minh Hiếu, N.T.M.C., Nguyễn Khắc Hải. Nghiên cứu tủy đồ của 30 người Việt khỏe mạnh từ 27 - 48 tuổi. Tạp chí Y học Việt Nam. 2004, tr.302-304.

2. Nguyễn Thị Thu Hà, Lý Tuấn Khải, Nguyễn Thanh Bình và CS. Hiệu quả sử dụng tế bào gốc tủy xương tự thân trong điều trị khớp giả, hoại tử vô khuẩn chỏm xương đùi và kéo dài chi. Tạp chí Y học Việt Nam. tr.405-408.

3. Nguyễn Thị Thu Hà, Khánh Linh, Nguyễn Thanh Bình và CS. Đánh giá hiệu quả quy trình bảo quản tế bào gốc máu ngoại vi thực hiện tại Bệnh viện TWQĐ 108. Tạp chí Nghiên cứu Y học. 2009, 64(5), tr.20-27.

4. Lý Tuấn Khải, Nguyễn Thị Thu Hà, Trương Thị Minh Nguyệt và CS. Hình ảnh tế bào máu, tủy xương của bệnh nhân khớp giả thân xương chày trước khi lấy tế bào gốc để điều trị. Tạp chí Y học Việt Nam. 2008, tr.344-345.

5. Đỗ Trung Phấn và CS. Kỹ thuật xét nghiệm huyết học và truyền máu ứng dụng trong lâm sàng. Nhà xuất bản Y học. 2009.

6. Mehta J. et al. Cobe Spectra is superior to Fenwal CS 3000 Plus for collection of hematopoietic stem cells. Bone Marrow Transplantation. 2002, 29(7), pp.563-567.

7. Hernández P. et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation in patients with severe lower limb ischaemia: A comparison of using blood cell separator and ficoll density gradient centrifugation. Atherosclerosis. 2007, 194(2), pp.e52-e56.