

KHẢO SÁT TẾ BÀO GỐC TẠO MÁU CD34(+) Ở MÁU CUỐNG RỐN

Hà Thị Anh*

TÓM TẮT

Tiến hành nghiên cứu mô tả, cắt ngang trên 134 sản phụ chuyển dạ tại Bệnh viện Hùng Vương, không phân biệt tuổi, sinh thường hoặc sinh mổ.

Kết quả cho thấy: thể tích túi máu không kể chống đông: $58,49 \pm 19,52$ ml; số lượng tế bào nhân: $8,6 \pm 0,45 \times 10^8$; số lượng tế bào CD34(+): $1,79 \pm 1,40 \times 10^6$; tỷ lệ bách phân tế bào CD34(+) so với (%) tế bào đơn nhân: $0,32 \pm 0,24$.

Số lượng tế bào gốc CD34(+) và tế bào nhân ở máu cuống rốn người Việt Nam có kết quả tương ứng với kết quả thực hiện ở nước ngoài. Chất lượng của máu cuống rốn ở người Việt Nam tốt, có thể là nguồn tế bào gốc quan trọng trong ghép tủy xương.

*Từ khóa: Tế bào gốc tạo máu; Ghép tủy xương; Máu cuống rốn.

RESEARCH ON HEMATOPOIETIC STEM CELL CD34(+) IN UMBILICAL CORD BLOOD

SUMMARY

A cross-sectional study was conducted with 134 women in stages of labor in Hung Vuong Hospital, delivery or caesarean section.

Result showed that: volume: 58.49 ± 19.52 ml; nucleus cell: $8.6 \pm 0.45 \times 10^8$; CD34(+) cell: $1.79 \pm 1.40 \times 10^6$; CD34(+)/nucleus cell: 0.32 ± 0.24 .

The number of cell CD34(+) is the same as the result of other country. Umbilical cord blood in this study has good quality. Umbilical cord blood can be used as an important stem cell source in bone marrow transplantation.

* Key words: Hematopoietic stem cell; Bone marrow transplantation; Umbilical cord blood.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Khi trường hợp ghép tủy xương đầu tiên được thực hiện từ những năm 1950, nó đã trở thành một phương pháp điều trị mới, thu hút sự nghiên cứu của nhiều nhà khoa học.

Trong vài thập niên gần đây, ghép tủy xương thực nghiệm đã phát triển thành một

phương pháp có chỉ định rõ ràng trên lâm sàng và được xem như một phương pháp điều trị tích cực các bệnh lý ác tính về máu cũng như một số bệnh di truyền, thiếu hụt miễn dịch [1, 8].

Có 2 phương pháp ghép tủy: dị ghép và tự ghép. Mỗi phương pháp đều có những đặc điểm riêng của nó. Tuy nhiên, vẫn

* Đại học Y - Dược TP.HCM

Phản biện khoa học: TS. Lê Văn Đông

đề mấu chốt là nguồn tế bào tủy. Trong phương pháp dị ghép, để tìm người cho tủy phù hợp

trong hệ thống HLA, trước tiên tìm các thành viên anh chị em trong cùng gia đình.

Nếu không tìm được người phù hợp, phải tìm người ngoài huyết thống. Đây là một vấn đề khó khăn về cả phương diện kỹ thuật lẫn xác suất người cho phù hợp.

Máu cuống rốn là nguồn tế bào gốc quan trọng, có thể dùng thay thế tủy xương [10]. Tuy nhiên, để có thể sử dụng được máu cuống rốn cần qua nhiều công đoạn tổ chức hợp lý.

Nghiên cứu này chỉ khảo sát tế bào CD34(+) nhằm tìm hiểu đánh giá chất lượng máu cuống rốn ở người Việt Nam.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

Sản phụ chuyển dạ tại Bệnh viện Hùng Vương, không phân biệt tuổi, sinh thường hoặc sinh mổ.

Thời gian tiến hành nghiên cứu từ tháng 9 - 1998 đến 9 - 1999.

2. Phương pháp nghiên cứu.

Quan sát mô tả cắt ngang.

** Phương pháp thu thập mẫu:*

- Dụng cụ: túi lấy máu chứa tối đa 250 ml, chống đông CPDA (35 ml); kẹp Kelly; dung dịch sát trùng (cồn iod).

- *Phương pháp lấy mẫu:* lấy trên tĩnh mạch cuống rốn của nhau thai. Thao tác vô trùng.

+ Lấy máu đo thể tích: thu thập máu cuống rốn sau khi xoắn nhau. Ngay sau sinh, kẹp cuống rốn lại bằng 2 kẹp ở vị trí cách rốn đứa trẻ từ 5 - 7 cm. Sát trùng kỹ vùng lấy máu với cồn iod. Dùng kim đâm vào tĩnh mạch cuống rốn, máu cuống rốn sẽ chảy vào túi đựng theo trọng lực. Túi đựng máu phải giữ thấp hơn bánh nhau khoảng 30 - 50 cm.

Khi tĩnh mạch xếp, máu không chảy nữa, đâm kim vào một vị trí khác cao hơn. Khi máu chảy vào túi máu, lắc đều túi máu để ngăn máu đông. Rút kim, đẩy đầu kim lại và thắt chặt nút. Lắc trộn đều máu với chất chống đông.

+ Lấy máu khảo sát tế bào gốc tạo máu CD34(+): lấy vô trùng 1 - 1,5 ml máu từ tĩnh mạch cuống rốn ngay sau sinh, bảo quản trong dung dịch chống đông (acid citric, citrat và dextrose) chuyển đến phòng xét nghiệm không quá 12 giờ.

** Phương pháp xét nghiệm:*

- Phương pháp tính thể tích:

+ Cân túi trước khi lấy (trọng lượng túi và trọng lượng chất chống đông) = 70 (g); cân túi máu sau khi lấy: M (g) (sau khi đã lấy đi các mẫu xét nghiệm).

+ Trọng lượng máu cuống rốn lấy được: $M - 70g = m$.

+ Tỷ trọng máu cuống rốn: $p = 1,051 - 1,078$.

+ Thể tích máu cuống rốn lấy được: $V = m/p$.

+ Thể tích máu cuống rốn lấy được bao gồm cả chống đông: $V + 35$ ml.

- Phương pháp khảo sát tế bào gốc tạo máu CD34(+) ở máu cuống rốn [7]:

Mỗi mẫu thử được khảo sát với 2 ống nghiệm:

+ Ống chứng (nucleic acid dye + γ_1 phycoerythrin PE + CD45 peridinin chlorophyll protein per CP).

+ Ống thử nghiệm (nucleic acid dye + CD34-PE + CD45-per CP).

Các kháng thể chống CD34(+) và chống CD45 có gắn huỳnh quang sẽ nối kết đặc

hiệu lên kháng nguyên bề mặt tế bào. Phản ứng này đồng thời làm phóng thích một số lượng nhất định các hạt huỳnh quang có sẵn trong ống nghiệm.

Ống chứng giúp đánh giá hình ảnh dương tính giả, nhất là do các thụ thể Fc và giúp đặt ngưỡng khảo sát cho mẫu đo. Thêm dung dịch ly giải để phá vỡ hồng cầu. Đọc mẫu thử qua máy để đánh giá sự phát tán các loại huỳnh quang. Sau cùng, nhờ một phần mềm chuyên biệt giúp phân tích mẫu thử và tính số lượng tuyệt đối các tế bào CD34(+).

* *Phương tiện và thuốc thử*: thuốc thử: bộ kit của hãng Becton Dickinson; máy: FACS Calibur của hãng Becton Dickinson (Hoa Kỳ).

* *Phân tích mẫu*: xác định các cổng lọc tế bào (gates):

+ $G_1 = R_1 + R_3 + R_4 + R_5$ (tế bào gốc tạo máu).

+ $G_2 = R_2$ (hạt huỳnh quang).

+ $G_3 = G_1$ hoặc G_2 (tế bào gốc tạo máu + hạt huỳnh quang).

+ $G_4 = R_6 + R_7$ (tế bào CD45).

= $G_5 = R_7$ (tế bào đơn nhân).

Trong đó: R_1 là quần thể lympho \pm mono; R_2 : hạt huỳnh quang; R_3 : FL₁ (nucleic acid dye) giúp nhận diện các tế bào đơn nhân. Hầu hết âm tính với CD34 (FL₂-PE).

Vùng phát tán huỳnh quang PE mạnh hơn nằm phía trên tế bào đơn nhân là R_3 chứa tế bào CD34(+) nếu có và cả các mảnh dương tính giả.

R_4 : tế bào CD34(+) phát huỳnh quang yếu với CD45 (FL₃-per CP) và kém tạo hạt sẽ hiện diện ở vùng phía sau của quần thể lympho; R_5 : tế bào CD34(+) nằm ở vùng phía trước quần thể lympho, phát tán huỳnh quang PE mạnh hơn; R_6 : tế bào CD45; R_7 : tế bào đơn nhân.

Các vùng từ $R_1 - R_7$ được cài đặt trên mẫu chứng G_1 , tách biệt tế bào trên mẫu đo thỏa mãn các tiêu chuẩn $R_1 + R_3 + R_4 + R_5$ của 5 đầu dò FSC, SSC, FL₁, FL₃ chính là tế bào CD34(+).

Phần mềm thống kê cho phép đọc thành phần hiện diện trong từng cổng tương quan với các hạt huỳnh quang được phóng thích ra. Sau đó, tính toán tỷ lệ pha bản mẫu để có số lượng tuyệt đối quần thể tế bào CD45 và tế bào đơn nhân.

Công thức tính trị số tuyệt đối của tế bào gốc CD34(+):

| | | | | |
|---|---|--|---|-----------------|
| Số tế bào CD34(+) (CD34 ⁽⁺⁾ Events) | x | Số hạt huỳnh quang chuẩn (Beads per test) | x | Tỷ lệ pha loãng |
| Số hạt huỳnh quang | | Thể tích thử nghiệm | | |

1. Thể tích máu cuống rốn.

- Thể tích của túi máu (có chống đông): $V_2 = 93,49 \pm 20,73$ (73 - 96 ml).

- Thể tích thật sự (đã trừ chống đông và các mẫu xét nghiệm): $V_1 = 58,49 \pm 19,52$.

- Thể tích túi máu cuống rốn (ml) không kể chống đông: lớn nhất 61,84 ml; nhỏ nhất 38,05 ml, trung bình 58,49 ml. 2 kết quả về thể tích máu cuống rốn khác biệt có ý nghĩa thống kê. Thể tích máu cuống rốn của nghiên cứu này thu thập được thấp hơn so với các tác giả nước ngoài ($p < 0,01$), có lẽ do những nguyên nhân sau: thể tạng phụ nữ Việt Nam nhỏ bé hơn so với phụ nữ châu Âu, châu Mỹ; số mẫu nghiên cứu còn ít; chưa lấy được triệt để sau khi xoắn nhau vì chưa đủ điều kiện vô trùng.

Tuy nhiên, thể tích nhiều hay ít chưa phải là yếu tố quyết định, mà quan trọng hơn cả là số lượng TBG tạo máu thu được trong túi máu cuống rốn. Lợi ích lâm sàng của túi máu cuống rốn nên được đánh giá dựa trên số lượng tế bào thu được hơn là chỉ đơn thuần dựa trên thể tích túi máu.

Thể tích túi máu > 40 ml (không kể chống đông) có thể sử dụng như là một tiêu chuẩn phân loại ban đầu nhằm giảm thiểu các chi phí thử nghiệm và bảo quản túi máu.

Với kết quả thể tích trung bình túi máu lấy được là rất khả quan. Chúng tôi hy vọng những nghiên cứu sau với số mẫu nhiều hơn có thể xác định được thể tích máu cuống rốn trung bình của phụ nữ Việt Nam và có những cải tiến trong kỹ thuật lấy máu cuống rốn, giúp thu thập lượng máu nhiều hơn.

2. Số lượng tế bào nhân trong túi máu.

Tính trị số trung bình 134 mẫu, kết quả: số lượng tế bào nhân trong 1 ml máu cuống rốn = $23,56 \times 10^6$ /ml; nhỏ nhất $2,6 \times 10^6$ /ml; lớn nhất $339,6 \times 10^6$ /ml; số lượng trung bình tế bào nhân trong túi máu = $(8,6 \pm 0,45) \times 10^8$ ml.

Số lượng tế bào nhân theo nghiên cứu này không khác biệt với nghiên cứu Mannheim, 1996) ($p > 0,001$). Điều này cho phép chúng tôi nghĩ rằng tại Việt Nam máu cuống rốn có thể là nguồn ghép tủy thích hợp. Theo tiêu chuẩn ghép máu cuống rốn châu Âu từ tháng 10 - 1988 đến 12 - 1996 tại 45 trung tâm đã ghép cho 143 BN: số lượng tế bào nhân trung bình: $3,7 \times 10^7$ /kg. So với số lượng tế bào nhân trong túi máu cuống rốn của nghiên cứu này là: $8,6 \times 10^8$ ml, đủ tiêu chuẩn để ghép cho khoảng 58% trẻ em và người lớn 40 kg.

3. Số lượng tế bào CD34(+) trong túi máu.

Tính trị số trung bình 134 mẫu, số lượng tế bào CD34(+)/ml = $27,08 \times 10^3$ /ml; nhỏ nhất $8,04 \times 10^3$ /ml; lớn nhất $396,3 \times 10^3$ /ml; số lượng trung bình tế bào CD34(+) trong túi máu = $(1,79 \pm 1,4) \times 10^6$ ml.

Số lượng tế bào gốc CD34(+) trong túi máu cuống rốn của các kết quả nghiên cứu ở nước ngoài là $(2,0 \pm 1,3) \times 10^6$ (Mannheim, Germany, 1996). Kết quả của chúng tôi không khác biệt so với Mannheim.

4. Tỷ lệ phần trăm tế bào CD34(+) so với tế bào đơn nhân.

Tỷ lệ phần trăm tế bào CD34(+)/tế bào nhân = $0,32\% \pm 0,24$; nhỏ nhất 0,04%; lớn nhất 0,63%.

Theo Mannheim (Germany, 1996) tỷ lệ này là $0,22\% \pm 0,14$. So sánh giữa nghiên cứu của chúng tôi và Mannheim: không có sự khác biệt về số lượng tế bào CD34(+) và tỷ lệ bạch phân tế bào CD34(+)/tế bào nhân. Như vậy, máu cuống rốn người Việt Nam có thể là nguồn tế bào dùng để ghép tủy.

KẾT LUẬN

Đã thu thập được 134 mẫu máu cuống rốn của sản phụ. Qua khảo sát thể tích máu cuống rốn và đánh giá chất lượng của máu cuống rốn thông qua TBG tạo máu CD34(+) ở máu cuống rốn, chúng tôi thu được kết quả sau:

- Thể tích trung bình máu cuống rốn thấp hơn so với các tác giả nước ngoài, nhưng cũng đạt tiêu chuẩn sản phẩm để ghép (> 40 ml máu).
- Khảo sát số lượng các loại TBG CD34(+) và tế bào nhân ở máu cuống rốn người Việt Nam cho kết quả tương đồng với kết quả thực hiện ở nước ngoài. Điều này cho phép đánh giá chất lượng tế bào máu cuống rốn ở người Việt Nam có thể thay thế cho tủy xương toàn phần để ghép cho BN.
- Tỷ lệ tế bào nhân của túi máu cuống rốn cũng đáp ứng được tiêu chuẩn ban đầu về tế bào học, phục vụ cho việc điều trị ghép tủy xương ở bệnh nhi. Kết quả này rất khả quan (98% các túi máu cuống rốn).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Trần Văn Bé*. Ghép máu cuống rốn để điều trị bệnh lý ác tính và bệnh di truyền bẩm sinh. Y học Việt Nam. 1997, tập 217, 6, tr.29-33.
2. *Trần Văn Bé, Trần Văn Bình, Nguyễn Tấn Bình*. Tụ ghép tế bào gốc CD34(+) máu ngoại vi để điều trị bệnh về máu tại Trung tâm Truyền máu Huyết học TP.Hồ Chí Minh. Y học Việt Nam. 1997, tập 217, 6, tr.23-28.
3. *Bừu Mật*. Đặc tính sinh học và miễn dịch máu cuống rốn trong ghép. Y học Việt Nam. 1997, tập 217, 6, tr.34-36.
4. *Lê Hữu Tài*. Khảo sát tế bào CD34(+) ở máu cuống rốn. Y học Việt Nam. 1997, tập 217, 6, tr.36-39.
5. *Nguyễn Thị Thùy, Thái Mai Duyên Thi*. Khảo sát thể tích máu cuống rốn. Y học Việt Nam. 1998, 2, tr.1-6.
6. *Bro H.E., Hangoc G., Cooper RS*. Clinical and biological aspects of human umbilical cord blood as a source of transplantable hematopoietic stem and progenitor cell. Bone Marrow Transplantation. 1992, 9 (Suppl. 1), pp.7-10.
7. *Gluckman E, Rocha V, Chastang C*. Cord blood banking and transplant in Europe. Vox sanguinis. 1998, 74, pp.95-100.
8. *Mannheim*. Mannheim cord blood project. Germany.1996.

9. *Roberts G.T.* Current application of flow cytometry. *Lab Media.* 1991, p.9014.
10. *Wagner JE.* Umbilical cord blood transplantation. *Transfusion.* 1995. August, 35 (8), pp.619-621.