

**XÂY DỰNG CƠ SỞ DỮ LIỆU VÀ PHẦN MỀM TRA CỨU HLA
CỦA TẾ BÀO GỐC DÂY RÓN ĐƯỢC HIẾN TẶNG CHO
NGÂN HÀNG TẾ BÀO GỐC MEKOSTEM**

Nguyễn Đặng Dũng*; Nguyễn Ngọc Tuấn*; Lê Văn Đông*

TÓM TẮT

Với Ngân hàng Tế bào gốc (TBG), yêu cầu thiết yếu là cần có dữ liệu về kháng nguyên hòa hợp tổ chức (HLA) của mẫu TBG được lưu giữ, đồng thời có công cụ tìm kiếm và độ HLA giữa mẫu TBG với bệnh nhân (BN) cần sử dụng TBG cho điều trị. Đề tài này tiến hành nhằm xây dựng cơ sở dữ liệu về HLA của mẫu TBG dây rốn được hiến tặng cho Ngân hàng Tế bào gốc MekoStem, đồng thời phát triển phần mềm tìm kiếm và độ HLA. Kết quả: nhóm nghiên cứu đã ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên phản ứng PCR trong định tít HLA, xây dựng được cơ sở dữ liệu HLA của 100 mẫu TBG dây rốn, đồng thời phát triển phần mềm tìm kiếm và độ HLA, cho phép lựa chọn mẫu TBG dây rốn phù hợp tốt nhất về HLA với BN cần điều trị bằng TBG. Cơ sở dữ liệu và phần mềm này có thể liên thông với cơ sở dữ liệu HLA khác và phù hợp cho sử dụng ở ngân hàng mô, tế bào cũng như dùng cho hoạt động điều phối về hiến ghép mô, tạng và tế bào.

* Từ khoá: HLA; Tế bào gốc dây rốn; Xây dựng cơ sở dữ liệu HLA.

**RESEARCH ON ESTABLISHING HLA DATABASE
AND DEVELOPING AN HLA-BASED MATCHING SOFTWARE
FOR UMBILICAL CORD-DERIVED STEM CELLS AT
MEKOSTEM CELL BANK**

SUMMARY

One of the essential requirements that a Stem cell Bank must fulfill is to have HLA database of the stored stem cell samples. Besides, the bank must have an effective tool for selecting an appropriate cell sample to be used in treatment, based on finding and matching HLA specificities between the cell samples and the patients. In this study, we have successfully applied PCR-based molecular HLA typing technique to establish the HLA database of 100 umbilical cord-derived stem cell samples donated and stored in MekoStem cell Bank. In addition, we have also developed software that allows us to find a stored stem cell sample with HLA specificities which best match with those of the patient who need the stem cell for therapeutic purpose. The database and software are ready for integration with other HLA database and suitable for usage at other cell and tissue banks and also for the coordination of the cell, tissue and organ donation and transplantation programs.

* *Key words: HLA; Umbilical cord-derived stem cell; Establishing HLA database.*

* Học viện Quân y

**Chịu trách nhiệm nội dung khoa học: GS. TS. Hoàng Văn Lương
PGS. TS. Nguyễn Thái Sơn**

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tế bào gốc (TBG) là tế bào chưa có chức năng chuyên biệt, có khả năng tăng sinh mạnh mẽ, có tiềm năng phát triển thành nhiều loại tế bào khác nhau và có khả năng tự thay mới. TBG là nguyên liệu cơ bản để sử dụng trong y học tái sinh nhằm chữa một số bệnh của cơ quan tạo máu, một số bệnh di truyền bẩm sinh liên quan đến chuyển hoá và suy giảm miễn dịch, ung thư máu và có thể dùng để chữa được nhiều bệnh nan y như tiểu đường, liệt do chấn thương tuỷ sống, suy tim do tổn thương cơ tim, một số bệnh ung thư và bệnh lý gen... [3].

Dây rốn và nhau thai nổi thai nhi với hệ thống tuần hoàn của người mẹ. Dây rốn chứa nhiều loại TBG, bao gồm các TBG tạo máu, TBG biểu mô, TBG trung mô, TBG nội mô chứa trong máu dây rốn, trong lớp gel Wharton (Wharton's jelly) hay trong lớp màng bao dây rốn. Các TBG này có thể dùng để chữa bệnh hay làm nguyên liệu để nghiên cứu biệt hoá tạo ra các chế phẩm tế bào phục vụ cho chữa bệnh hoặc phát triển thuốc. TBG dây rốn có thể được dùng để điều trị cho chính đứa trẻ có dây rốn đó, anh chị em ruột, người thân trong gia đình hoặc BN là người ngoài có đặc điểm hòa hợp mô phù hợp với mẫu TBG dây rốn được lưu giữ. Từ những lợi ích này, nhiều quốc gia trên thế giới đã lập các ngân hàng để thu thập và bảo quản đông lạnh TBG dây rốn [3, 5].

Trên phương diện miễn dịch, khi cấy ghép TBG vào cơ thể người nhận có đặc điểm di truyền khác với TBG, sẽ xảy ra quá

trình nhận diện và tấn công miễn dịch loại bỏ tế bào ghép bởi cơ thể người nhận ghép (đáp ứng thải ghép), hoặc TBG được cấy ghép sẽ tạo ra tế bào miễn dịch mới tấn công cơ thể người nhận (bệnh mô ghép chống túc chủ). Mức độ khốc liệt của quá trình tấn công miễn dịch này tỷ lệ thuận với mức độ khác biệt về di truyền giữa chủ nhân sinh học của TBG và người được cấy ghép TBG [4]. Vì thế, với ngân hàng TBG công, ngoài việc bảo quản TBG, ngân hàng còn phải có dữ liệu về HLA của các mẫu TBG lưu giữ cùng với công cụ quản lý và độ HLA của BN chờ ghép TBG với mẫu TBG dự tuyển trong ngân hàng [3].

Từ những cơ sở lý luận và thực tiễn trên, nghiên cứu này được triển khai nhằm mục tiêu: *Xây dựng cơ sở dữ liệu HLA của các mẫu TBG dây rốn được sản phụ hiến tặng cho Ngân hàng Tế bào gốc MekoStem và phần mềm tra cứu HLA phục vụ cho việc lựa chọn tế bào để cấy ghép.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

100 mẫu máu dây rốn hút từ dây rốn do các sản phụ sinh con tình nguyện hiến dây rốn trong Chương trình Xây dựng Ngân hàng mẫu TBG công tại Ngân hàng TBG Mekostem. Đây là các mẫu máu dây rốn tương ứng với mẫu TBG dây rốn đã được xử lý thành công và lưu giữ trong ngân hàng, đủ tiêu chuẩn để sẵn sàng lấy ra sử dụng khi có nhu cầu và BN phù hợp.

Tiêu chuẩn tuyển chọn: sản phụ > 18 tuổi, có tiền sử khỏe mạnh, xét nghiệm âm tính với virút viêm gan B, C, virút HIV, HTLV, CMV, vi khuẩn giang mai và tự nguyện hiến dây rốn; trẻ sinh ra với tuổi thai > 37 tuần, sinh một, không có tai biến trong quá trình sinh đẻ.

Các hóa chất, sinh phẩm, thuốc thử, máy móc cho định týp HLA bằng phương pháp sinh học phân tử.

2. Phương pháp nghiên cứu.

* Xét nghiệm HLA:

Xác định HLA lớp I và lớp II của các mẫu tế bào bằng kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên phản ứng PCR-SSP với bộ kit SSP-ABDR (One Lambda Inc., Mỹ) theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Phân tích kết quả bằng phần mềm ADN/LMT405 do hãng One Lambda phát triển và cung cấp kèm theo bộ kit xét nghiệm. Toàn bộ quy trình xét nghiệm được chuẩn hóa trong một nghiên cứu trước đây của chúng tôi [1] và thực hiện tại Labo Miễn dịch, Trung tâm Nghiên cứu Y Sinh Dược học Quân sự, Học viện Quân y.

* *Thiết kế phần mềm quản lý các mẫu TBG trong ngân hàng:*

Bằng phương pháp tham khảo phần mềm quản lý tập dữ liệu và tham khảo mô hình các công cụ đo kết quả xét nghiệm HLA theo hướng dẫn năm 2008 của Chương trình Hiến tủy xương Quốc gia Hoa Kỳ (National Marrow Donor Program HLA Matching Guidelines) [5]. Tiến hành thiết kế phần mềm quản lý có công cụ tìm kiếm và đo mẫu tế bào có trong ngân hàng theo thông số HLA của BN cần tế bào điều trị.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả xét nghiệm HLA.

Kết quả xét nghiệm phân tích 100 mẫu, xác định được 200 allen HLA-A và 200 allen HLA-B của cả 100 mẫu. Với HLA-DB1, tổng số allen xác định được là 196; có 2 mẫu không xác định được HLA-DRB1. Tổng số loại allen đã xác định được bao gồm 14 allen HLA-A, 21 allen HLA-B và 12 allen HLA-DB1. Trong đó, các allen có tần suất xuất hiện > 10% gồm: HLA-A*11, A*24, A*33; HLA-B*15, B*46; HLA-DRB1*12, DRB1*09, DRB1*15.

Bạch Khánh Hoà và CS (2008) [6] nghiên cứu trên quần thể 170 người Kinh Việt Nam, dùng bằng phương pháp sinh học phân tử, phát hiện được số allen nhiều hơn (21 HLA-A, 37 HLA-B và 25 HLA-DRB1). Tuy số allen trong nghiên cứu của chúng tôi ít hơn (một phần có thể do cỡ mẫu nhỏ hơn), nhưng có sự tương tự về allen có tần suất xuất hiện > 10% trong cả hai quần thể được nghiên cứu (gồm HLA-A*11, A*24, A*33, B*15, B*46, DRB1*12).

Một nhóm nghiên cứu khác của Trần Minh Hiếu và CS (2006) khảo sát 1.278 mẫu máu dây rốn thu thập ở khu vực Thành phố Hồ Chí Minh cho thấy, tỷ lệ các allen có tần suất xuất hiện cao là HLA-A*11, A*24, A*33; HLA-B*15, B*46, B*40; HLA-DRB1*12, DRB1*09. Như vậy, mặc dù cỡ mẫu của chúng tôi còn nhỏ, nhưng kết quả thu được có sự tương đồng so với kết quả của Trần Minh Hiếu và CS thực hiện bằng phương pháp sinh học phân tử [2].

Bảng 1: Tần suất các allen HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 trong 100 mẫu nghiên cứu.

HLA-A*	n	TẦN SUẤT (200 allen)	HLA-B*	n	TẦN SUẤT (200 allen)	HLA-DRB1*	n	TẦN SUẤT (196 allen)
01	22	11,00%	7	14	7,00%	3	10	5,10%
02	27	13,50%	12	4	2,00%	4	17	8,70%
03	6	3,00%	13	13	6,50%	7	17	8,70%
11	49	24,50%	15	38	19,00%	8	10	5,10%
24	41	20,50%	18	2	1,00%	9	25	12,80%
26	6	3,00%	27	11	5,50%	10	14	7,10%
29	13	6,50%	35	10	5,00%	11	4	2,00%
30	2	1,00%	37	4	2,00%	12	59	30,10%
31	2	1,00%	38	5	2,50%	13	6	3,10%
33	28	14,00%	39	3	1,50%	14	12	6,10%
34	1	0,50%	40	16	8,00%	15	21	10,70%
68	1	0,50%	44	8	4,00%	16	1	0,50%
74	1	0,50%	46	25	12,50%			
92	1	0,50%	48	2	1,00%			
			51	7	3,50%			
			52	2	1,00%			
			54	4	2,00%			
			55	9	4,50%			
			57	7	3,50%			
			58	12	6,00%			
			95	4	2,00%			

2. Phần mềm tra cứu và độ HLA.

Chức năng của Ngân hàng TBG công là có các mẫu TBG được xét nghiệm HLA, sẵn sàng cung cấp để điều trị cho BN chờ ghép có chỉ số HLA phù hợp. Phần mềm quản lý Ngân hàng TBG MekoStem được thiết kế công cụ tìm kết quả HLA của một mẫu TBG nhất định lưu giữ trong ngân hàng và độ các chỉ số HLA của BN với chỉ số HLA của các mẫu tế bào hiện có trong ngân hàng để tìm ra những mẫu TBG có mức độ phù hợp khác nhau với BN cần TBG để cấy ghép.

Để tìm thông số HLA của một mẫu tế bào đã lưu giữ và có mã số trong ngân hàng, tại cửa sổ giao diện “Mẫu tế bào HLA”, nhập mã số của mẫu cần tìm vào ô nhập mã số; kết quả tìm kiếm sẽ hiển thị thông tin về 6 allen HLA-A, HLA-B và HLA-DR của mẫu tế bào đó. Hình 1 minh họa cách tra cứu và kết quả HLA của mẫu tế bào có mã số 361.



Hình 1: Cửa sổ tìm kiếm HLA của mẫu TBG có mã số 361 trong ngân hàng.

Để tìm và đo thông số HLA của một BN cần TBG để cấy ghép với HLA của mẫu tế bào lưu giữ trong ngân hàng, tại cửa sổ giao diện “Tìm mẫu tế bào phù hợp HLA”, nhập thông số HLA của BN vào cửa sổ nhập dữ liệu HLA của BN ở phía trên để tìm kiếm. Kết quả tìm kiếm sẽ hiển thị thông tin về HLA của mẫu TBG lưu giữ trong ngân hàng có các chỉ số HLA phù hợp với BN. Hình 2 và 3 minh họa kết quả tìm và đo HLA của BN có các chỉ số HLA là: HLA-A: 24, 02; HLA-B: 55, 48; HLA-DRB1: 04, 12. Hình 2 là kết quả khi nhập cả 6 allen của BN vào cửa sổ tra cứu. Kết quả mẫu TBG số 229 của ngân hàng phù hợp cả 6/6 allen với HLA của BN cần TBG.



Hình 2: Cửa sổ đo dữ liệu HLA (cả 6 allen) của BN với mẫu TBG có trong ngân hàng.

Phần mềm cho phép tìm kiếm chọn lọc theo số allen từ 1 - 6. Số lượng allen càng nhiều, tính chọn lọc càng cao. Nếu quan tâm nhiều đến HLA-DRB1, có thể nhập thông tin về 2 allen của HLA-DRB1 trước, phần mềm sẽ cho ra kết quả của những mẫu có cùng chỉ số HLA-DRB1. Hình 3 là kết quả tìm kiếm cho thấy có 5 mẫu TBG trong ngân hàng có cùng chỉ số HLA-DRB1 với HLA của BN. Tính năng này cho phép trong trường hợp không phù hợp được tuyệt đối cả 6/6 allen, có thể cân nhắc lựa chọn những mẫu tương đối phù hợp hơn để có thể cấy ghép cho BN nếu cần.



Hình 3: Kết quả tìm kiếm mẫu TBG phù hợp về 2 allen HLA-DRB1.

Nhiệm vụ của ngân hàng TBG là phân lập, bảo quản lâu dài và cung cấp mẫu TBG cho yêu cầu điều trị và nghiên cứu khoa học. Bên cạnh những yêu cầu về quản lý chất lượng TBG, yêu cầu về quản lý thông tin cũng đóng một vai trò quan trọng trong hoạt động của ngân hàng. Theo yêu cầu của Chương trình Người hiến tủy xương Quốc gia (NMDP, Mỹ), một ngân hàng TBG máu dây rốn tối thiểu phải có > 100 mẫu TBG, trong đó, mỗi mẫu tế bào phải có ít nhất những thông tin sau [5]:

- Mỗi mẫu TBG cần có một mã số riêng biệt, thông tin rõ ràng và đầy đủ, cho phép tìm kiếm và truy nguyên nguồn gốc của mẫu TBG.

- Kết quả xét nghiệm HLA-A, HLA-B và HLA-DRB1, trong đó, HLA-A và HLA-B có thể xét nghiệm bằng phương pháp huyết thanh học hoặc bằng phương pháp sinh học phân tử, còn HLA-DRB1 được xét nghiệm bằng phương pháp sinh học phân tử.

- Quy trình tìm kiếm và cung cấp mẫu TBG, trong đó có các công cụ tìm kiếm mẫu tế bào dựa trên những tiêu chí khác nhau, đặc biệt là công cụ đo kết quả HLA và đánh giá mức độ phù hợp về HLA giữa người nhận cần TBG để cấy ghép và mẫu TBG có trong ngân hàng.

Căn cứ vào yêu cầu trên cho thấy, kết quả nghiên cứu của đề tài này đóng góp quan trọng giúp Ngân hàng TBG MekoStem đáp ứng được những yêu cầu thiết yếu của một ngân hàng TBG mà Chương trình Người hiến tủy xương Quốc gia (Hoa Kỳ) đã khuyến cáo. Mặt khác, cơ sở dữ liệu và phần mềm tra cứu và đo HLA này có thể liên thông với cơ sở dữ liệu HLA khác, phù hợp cho sử dụng ở các ngân hàng mô, tế bào khác. Bên cạnh đó, cách tìm và đo HLA này cũng dựa trên cùng nguyên tắc áp dụng cho hoạt động điều phối về hiến ghép mô, tạng và tế bào.

KẾT LUẬN

Bảng kỹ thuật sinh học phân tử, đã tiến hành xét nghiệm xác định HLA, xây dựng được cơ sở dữ liệu HLA lớp I và lớp II của 100 mẫu TBG dây rốn lưu giữ tại Ngân hàng TBG MekoStem, đã phát triển được phần mềm tìm kiếm và đo HLA của một BN bất kỳ với HLA của các mẫu TBG dây rốn hiến tặng đang lưu giữ và có trong cơ sở dữ liệu của Ngân hàng TBG MekoStem.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Đặng Dũng, Nguyễn Ngọc Tuấn. Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong xác định HLA. *Tạp chí Y- Dược học Quân sự*, 2011, tập 36, số 6, tr.45-51.
2. Trần Minh Hiếu, Bửu Mật, Trần Văn Bé. Khảo sát HLA-A, HLA-B, HLA-DR từ máu cuống rốn bằng kỹ thuật sinh học phân tử. *Y học Việt Nam*. 2006, số 5, tr.4-7.
3. Phan Kim Ngọc, Phạm Văn Phúc, Trương Định. Công nghệ TBG. NXB Giáo dục. 2009.
4. Vũ Dương Quý, Phạm Mạnh Hùng. Miễn dịch ghép trong "Miễn dịch học". NXB Y học. 2006, tr.277-290.
5. Bray R. A, Hurley C.K, et al. National Marrow Donor Program HLA Matching Guidelines for unrelated adult donor hematopoietic cell transplants. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2008, No 14, pp.45-53.
6. Hoa BK, Hang NT, Kashiwase K, Ohashi J, Lien LT, Horie T, Shojima J, Hijikata M, Sakurada S, Satake M, et al. HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 alleles and haplotypes in the Kinh population in Vietnam. *Tissue Antigens*. 2008, Vol 71, No 2, pp.127-134.

Ngày nhận bài: 16/5/2012

Ngày giao phản biện: 25/7/2012

Ngày giao bản thảo in: 31/8/2012

