

ĐÁNH GIÁ TỶ LỆ SỐNG TRONG BẢO QUẢN VÀ KHẢ NĂNG BIỆT HÓA CỦA TẾ BÀO CD34⁺

Nguyễn Thị Giang An¹, Trần Quỳnh Ngân²

¹Khoa Sinh học – trường Đại học Vinh

²Khoa Ghép tủy- bệnh viện Ung bướu Nghệ An

Tác giả chịu trách nhiệm khoa học: **Nguyễn Thị Giang An**

Tác giả liên hệ chính: **Nguyễn Thị Giang An**

Email: nguyengianganganbio@vinhuni.edu.vn

Ngày tiếp nhận: 23/05/2023

Ngày phản biện: 01/06/2023

Ngày chấp nhận đăng: 15/06/2023

TÓM TẮT

Mục tiêu: Tế bào này được hình thành và cư ngụ ở tủy xương, chỉ một lượng nhỏ lưu hành trong máu ngoại vi. Khi bị tổn thương, stress, hoặc nhiễm hóa chất các tế bào này sẽ di chuyển ra ngoại vi. Sau khi dùng hóa trị liệu cao, các tế bào phân chia nhanh sẽ bị tấn công bởi hóa chất điều trị, trong đó có tế bào tạo máu, làm số lượng tế bào này suy giảm. Liệu pháp ghép tế bào gốc tạo máu tự thân CD34⁺ trước khi hóa trị liệu cao trong điều trị ung thư sẽ giúp phục hồi nhanh chóng các dòng tế bào máu. Nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng sống và biệt hóa của tế bào CD34⁺ thành các dòng tế bào máu sau ghép. Tế bào gốc tạo máu (CD34⁺) là tế bào gốc đa năng, có khả năng biệt hóa thành những dòng tế bào máu khác nhau. **Phương pháp:** Tế bào CD34⁺ được huy động từ tủy xương của bệnh nhân ung thư bằng thuốc G-CSF và lọc bằng máy đếm tế bào COBE spectra. Tế bào gốc sau quá trình bảo quản trong nitơ lỏng sẽ được đánh thức và xác định tỷ lệ sống sót trên máy đếm tế bào Facscalibur. **Kết quả:** Các tế bào CD34⁺ sẽ được huy động bằng G-CSF ở những bệnh nhân ung thư có độ tuổi $40.31 \pm 8,45$ với thời gian huy động trung bình là $6,91 \pm 1,43$ ngày. Sau khi huy động số lượng tế bào CD34⁺ ra ngoại vi gấp 16,78 lần. Tỷ lệ sống của tế bào CD34⁺ sau khi xử lý hóa chất là 89,72%, sau đánh thức từ trong nitơ lỏng là 79,82% và sau 30 phút đánh thức là 54,50%. Sau khi ghép tế bào CD34⁺ với liều $107,71 \pm 11,5$ tế bào/bệnh nhân, sự biệt hóa sớm nhất ở dòng tế bào bạch cầu trung tính vào ngày thứ 9 và tiểu cầu vào ngày thứ 10. Sự phục hồi các tế bào máu sẽ ổn định sau 3 tháng các dòng tế bào khác biệt hóa muộn hơn. Sau 3 tháng các tế bào máu đã ổn định.

Từ khóa: CD34⁺, ghép tế bào gốc tạo máu, tế bào gốc, biệt hóa tế bào, G-CSF.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tế bào gốc tạo máu CD34⁺ chiếm $1/10^4$ đến $1/10^6$ số lượng tế bào tủy xương, có khả năng biệt hóa thành các tế bào máu khác nhau. Trong điều kiện bình thường chỉ một lượng rất nhỏ lưu hành trong máu ngoại vi. Trong trạng thái bình thường, đa số các TBG tạo máu thường ở trạng thái nghỉ ngơi và chỉ có một bộ phận nhỏ tham gia vào chu kỳ tế bào để sinh ra và biệt hoá thành các tế bào tiền thân của các dòng tế bào máu. Tại tủy xương, các CD34⁺ sẽ tăng sinh và biệt hóa nhờ tiếp

nhận các tín hiệu phát ra từ môi trường tủy xương bao gồm tổ chức đệm ngoài tế bào, các tế bào nội mô và trung mô, và tạo cốt bào. Các CD34⁺ sẽ sinh các dòng tế bào lymphô CLP và dòng tủy CMP [13]. Tất cả những kết quả nghiên cứu về khả năng di chuyển vào tủy xương đã hình thành một nền tảng vững chắc cho kỹ thuật ghép tế bào gốc tạo máu.

Khi cần “huy động” các tế bào này rời tủy xương đi ra máu ngoại vi để phục vụ cho việc ghép tủy, có thể sử dụng các thuốc như G-CSF, GM-CSF..., phối hợp

các yếu tố kích thích sinh dòng bạch cầu hạt G-CSF có tác dụng tăng sản xuất dòng bạch cầu hạt trung tính và giải phóng các enzyme nhóm protease. Các protease lại có tác dụng phân hủy một loại protein đóng vai trò như một cái móc treo các tế bào gốc CD34⁺ vào tổ chức đệm của tủy xương và như vậy sẽ giải phóng các tế bào vào tuần hoàn[5]. Hiệu quả huy động các tế bào CD34⁺ sẽ tăng lên nếu G-CSF được chỉ định sau hóa trị liệu. Vốn dĩ tế bào CD34⁺ là những tế bào ở tủy xương, sự di chuyển một cách cưỡng ép ra ngoại vi, cũng như khi tách ra khỏi cơ thể trong môi trường nuôi dưỡng, cùng với sự thay đổi đột ngột điều kiện nhiệt độ luôn đã tạo nên những sốc lớn cho tế bào. Mặt khác, trong quá trình thu nhận các tế bào gốc, mỗi bệnh nhân cần huy động từ 5-10 lần mới đủ số lượng tế bào cho 1 ca cấy ghép, các tế bào này lại thường được lưu trữ trong nitơ lỏng. Khi cần sử dụng, các tế bào này được đánh thức, rã đông và ghép vào cho người bệnh. Sau khi trở lại cơ thể, các tế bào này sẽ nhận tín hiệu của cơ thể và biệt hóa thành những tế bào máu khác nhau. Nghiên cứu xác định tỷ lệ sống của tế bào CD34⁺ sau bảo quản, là cơ sở để tính lượng tế bào CD34⁺ cần cho mỗi ca ghép và nghiên cứu sự biệt hóa tế bào CD34⁺ nhằm đánh giá khả năng phục hồi của cơ thể sau mỗi ca ghép tủy.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là các bệnh nhân được ghép tế bào gốc tự thân tại bệnh viện Ung Bướu Nghệ An năm 2021. Những bệnh nhân này được tự nguyện tham gia nghiên cứu, có độ dưới 60 tuổi, tủy xương còn có khả năng sinh máu, không mắc các bệnh nội khoa như tim mạch, suy gan.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Huy động TBG CD34⁺ ra máu ngoại vi

Tế bào gốc CD34⁺ ở tủy xương sẽ được huy động ra máu ngoại vi bằng G-

CS, liều dùng G-CSF 10μg/kg cân nặng/ngày, tiêm dưới da cách 12 giờ/lần.

2.2.2 Quy trình thu thập TBG CD34⁺ máu ngoại vi

Theo dõi đếm số lượng tế bào CD34⁺ trong máu ngoại vi được bắt đầu từ ngày thứ 2. Khi số lượng tế bào CD34⁺ ≥ 12TB/μl tiến hành thu nhận TBG bằng hệ thống máy tách tế bào tự động COBE Spectra. Sản phẩm TBG CD34⁺ được để trong túi chuyên dụng có 160-220 ml huyết tương. Lượng TBG CD34⁺ cần cho một ca ghép tối thiểu là 2.10⁶TB/kg.

2.2.3 Đếm và xác định tỷ lệ tế bào CD34⁺ còn sống

Tế bào CD34⁺ được đếm trên máy đếm FACS Calibur tại khoa xét nghiệm, bệnh viện Ung bướu Nghệ An.

2.2.4 Bảo quản TBG CD34⁺ máu ngoại vi

Tế bào CD34⁺ được đưa vào 2 dung dịch bảo quản Stemsol và HES10% theo tỉ lệ 1:9. Sau đó được bơm vào trong các túi CryoStore Freezing cất vào ngăn tủ 4°C.

2.2.5 Bảo quản tế bào gốc trong Nitơ lỏng

Các túi tế bào gốc sẽ được hạ nhiệt độ bằng máy Krypton (Anh) từ 4°C trong 20 phút, tới -1°C trong 1 phút, đến -45°C trong 1 phút, hạ tiếp đến -50°C trong 1 phút và cuối cùng đưa dung dịch tế bào về mức -140°C. Sau đó đưa tế bào gốc vào nitơ lỏng ở -196°C.

2.2.6 Đánh thức tế bào sau bảo quản

Đưa túi chứa tế bào gốc từ nitơ lỏng được đánh thức qua bể ổn nhiệt 37°C để rã đông túi TBG từ từ. Mẫu sau khi đánh thức được lưu lại dưới dạng lỏng để đếm số lượng TBG bằng Stemcell-Kit thông qua hệ thống đếm tế bào qua dòng chảy (Flow Cytometry).

2.3 Xử lý số liệu: Số liệu thu được xử lý bằng phần mềm SPSS 2.0.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1 Kết quả huy động tế bào gốc từ máu ngoại vi của bệnh nhân

Số lượng tế bào CD34⁺ huy động

được trên các bệnh nhân với thời gian sử dụng thuốc G-CSF khác nhau được thể hiện bằng số liệu sau:

Bảng 1. Đặc điểm bệnh nhân trước khi huy động tế bào gốc CD34+

Các chỉ tiêu	Trung bình	r
Tuổi bệnh nhân	40.31 ± 8,45 [#]	r=-0,28, p>0,05
Cân nặng của bệnh nhân	54.006 ± 4.74	
Thời gian sử dụng thuốc G-CSF để huy động	6,91 ± 1,43*	
Liều thuốc G-CSF/ người	13,2 ± 2,23*	r = 0,67, p<0,05
Số lượng CD34+ máu ngoại vi trước huy động (10 ⁶ cells/μL)	50,9 ± 20,7 [#]	
Số lượng CD34+ máu ngoại vi sau huy động (10 ⁶ cells/μL)	854,14 ± 94,85 [#]	p<0,05

Nhận xét: Các bệnh nhân tham gia huy động tế bào gốc có độ tuổi trung bình là 40.31 ± 8,45. Thời gian trung bình để huy động tế bào CD34+ là 6-8 ngày với liều G-CSF sử dụng là 13,2 ± 2,23, liều dùng (mỗi liều là 5 μg/Kg) là 13,2 ± 2,23. Số lượng tế bào CD34+ trong máu ngoại vi

trước thu gom trung bình 50,9 ± 20,7 x 10⁶ tế bào/μl. Số lượng tế bào gốc tạo máu sau khi tiêm G-CSF ở máu ngoại vi là 854,14 ± 94,85 (10⁶cells/μL).

3.2. Tỷ lệ các tế bào sống sau quá trình thu gom, xử lý và rã đông

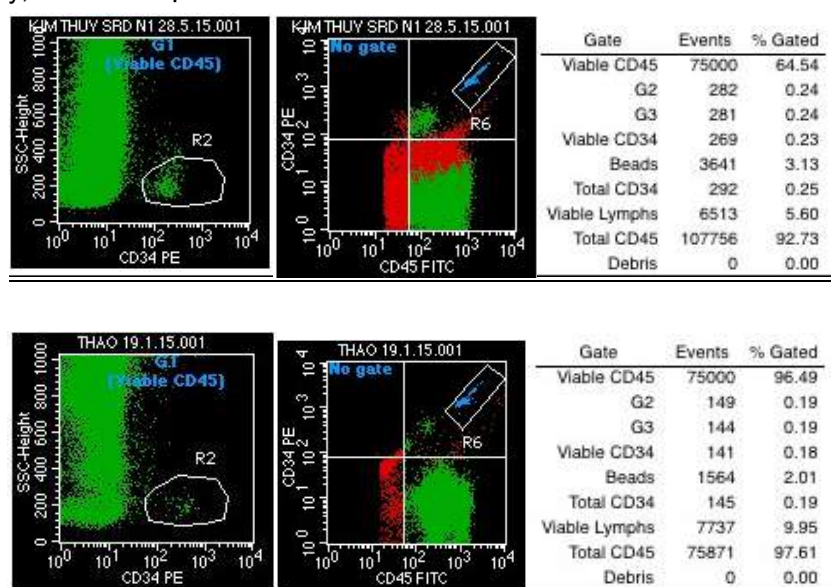
Bảng 2. Số lượng sống tế bào CD34+ sau quá trình xử lý và bảo quản

Tế bào CD 34 thu được			Tế bào CD34+	r và P
Lượng tế bào tối thiểu cho mỗi ca ghép			107,71±11,5	
Tổng thể tích máu (ml)			410,7 ± 80	
Số lượng tế bào huy động	Lần 1 (x10 ⁶)		154,62 ± 22,72	r=0,53; p<0,05
	Lần 2 (x10 ⁶)		123,9 ± 27,3	
	Lần 3 (x10 ⁶)		48,66 ± 1,03	
	Tổng số lượng tế bào thu được (x10 ⁶)		327,18± 17,02*	
Số lượng tế bào CD34 trong mỗi giai đoạn xử lý	Xử lý hóa chất (10 ⁶ TB)	Số lượng	291,73± 62,31	r=0,92; p<0,05
		Tỷ lệ sống	89,72 %	
	Đánh thức tế bào (10 ⁶ TB)	Số lượng	257,54 ± 41,56	r=0,56; p<0,05
		Tỷ lệ TB sống	79,82%	
	30 sau khi đánh thức	Số lượng	177,21± 13,23	r=0,53; p<0,05
		Tỷ lệ TB sống	54,50 %	

Nhận xét: Tổng tế số tế bào CD34+ sau 3 lần huy động đã thu được đạt từ 327,18± 17,02 x 10⁶ tế bào/μl với tổng thể tích máu thu được là 48,66 ± 1,03 ml máu ngoại vi. Sau quá trình thu gom tế bào từ

máu ngoại vi và xử lý hoá chất tỷ lệ tế bào CD34+ còn sống chiếm 89,72%, Sau khi rã đông số lượng tế bào đã giảm 9,35% (tỷ lệ tế bào sống 78,82 %); Sau khi đánh thức tế bào, số lượng tế bào CD34+ còn

sống chiếm 79,82%. Tuy nhiên, nếu không thức, tỷ lệ tế bào còn sống là 54,50%. ghép ngay, tế bào sẽ bị chết. Sau 30 đánh



Hình 1. Hình ảnh biểu thị số lượng tế bào CD34 trên máy Flow Cytometry

3.4. Khả năng biệt hóa của tế bào CD34+ thành các dòng tế bào máu khác nhau

Bảng 3. Thành phần của các tế bào máu trong các giai đoạn khác nhau của quá trình điều trị.

Các chỉ số huyết học	Trước điều trị	Sau khi tách tế bào CD34+ ra khỏi cơ thể			Sau khi truyền hóa chất			Sau khi ghép CD34+		
		Ngày 1	Ngày 4	Ngày 8	Ngày 1	3	Ngày 8	Ngày 1	Ngày 8	Ngày 22
RBC (T/L)	4,11 ± 0,51*	3,65 ± 0,31	3,81 ± 0,44	3,69 ± 0,43	3,68 ± 0,38*	3,62 ± 0,47	3,68 ± 0,50	3,41 ± 0,33	3,23 ± 0,25	3,66 ± 0,61
HGB (G/L)	120,57 ± 14,74*	107,57 ± 10,71	112,14 ± 14,68	109,0 ± 15,06	108,29 ± 13,67*	107,14 ± 13,48	108,57 ± 13,39	109,00 ± 11,06	118,59 ± 14,63	112,57 ± 11,29
PLT (G/L)	258,71 ± 32,82*	107,57 ± 28,31*	156,57 ± 54,22	266,4 ± 101,7	281,14 ± 122,30	267,86 ± 107,35	234,71 ± 98,87	213,5 ± 53,9	260,3 ± 23,2	215,5 ± 46,9
WBC (G/L)	6,38 ± 1,29	31,95 ± 9,64	7,21 ± 2,92	7,24 ± 4,21	7,99 ± 3,67	7,19 ± 3,03	5,98 ± 2,62	5,27 ± 3,09	5,65 ± 0,2	5,74 ± 2,59
NEUT (G/L)	4,07 ± 1,03	27,80 ± 9,43	4,89 ± 3,01	4,15 ± 2,09	5,91 ± 3,56	4,98 ± 2,96	4,42 ± 2,36	4,36 ± 2,96	5,61 ± 0,42	3,97 ± 0,1
LYM (G/L)	1,46 ± 0,55	1,65 ± 0,69	1,13 ± 0,26	1,30 ± 0,47	1,36 ± 0,42	1,48 ± 0,37	1,08 ± 0,50	1,45 ± 0,09	1,45 ± 0,22	1,50 ± 0,37
MONO (G/L)	0,51 ± 0,25	2,04 ± 0,51	0,73 ± 0,27	0,64 ± 0,32	0,59 ± 0,22	0,62 ± 0,22	0,35 ± 0,16	0,54 ± 0,21	0,60 ± 0,34	0,54 ± 0,02
EOSIN (G/L)	0,26 ± 0,24	0,41 ± 0,37	0,40 ± 0,31	0,10 ± 0,12	0,10 ± 0,13	0,08 ± 0,09	0,11 ± 0,10	0,31 ± 0,37	0,34 ± 0,30	0,38 ± 0,12
BAZO (G/L)	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,04	0,04 ± 0,00

(* chỉ giá trị $p < 0,05$)

Nhận xét: Kết quả ở bảng 3 cho thấy: Chỉ số hồng cầu (RBC) và huyết sắc tố (HGB) giảm sau khi tách tế bào CD34 ra khỏi cơ thể và chuyển hóa chất và phục hồi ở ngày 18 sau khi ghép. Sau khi sử dụng G-CSF để kích thích CD34⁺, hồng cầu, huyết sắc tố và tiểu cầu đều giảm. Nhưng các loại bạch cầu tăng lên. Trong đó, tăng rõ nhất là bạch cầu trung tính và bạch cầu mono. Sau 8 ngày, các tế bào này sẽ về trạng thái bình thường. Sau quá trình sử dụng hóa trị liều cao, tế bào hồng cầu, huyết sắc tố giảm, tiểu cầu giảm rõ ở ngày thứ 8, bạch cầu giảm nhẹ. Sau khi ghép tế bào CD34⁺, hai tế bào biệt hóa sớm nhất là bạch cầu trung tính (ngày thứ 9) và tiểu cầu (ngày thứ 10). Các tế bào máu các sẽ ổn định sau ngày 22, ngoại trừ hồng cầu và huyết sắc tố.

4. BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm bệnh nhân trong quá trình huy động tế bào gốc

Tế bào gốc (TBG) là các tế bào chưa có chức năng chuyên biệt, có thể biệt hóa thành nhiều tế bào khác nhau [3]. TBG có thể chia làm nhiều loại khác nhau, trong đó tế bào TBG tạo máu (CD34⁺) được xếp vào loại TBG đa năng, chúng có khả năng tự nhân lên và biệt hóa thành tất cả các dòng tế bào máu trưởng thành [2]. Tế bào gốc CD34⁺ đã được sử dụng nhiều trong điều trị các bệnh liên quan đến máu, điều trị bệnh nhược cơ [15], thẩm mỹ, phục hồi các tổn thương của cơ thể [4] và điều trị ung thư [8].

Bình thường các tế bào gốc cư ngụ ở tủy xương, nhưng khi có yếu tố kích thích, TBG sẽ được huy động từ tủy xương ra máu ngoại vi [14]. Nhờ đặc tính này người ta đã sử dụng các thuốc huy động với mục đích thu nhận được lượng TBG dùng cho ghép TBG tạo máu như G-CSF, GM-CSF, Cyclophosphamide [6]. Theo phác đồ này, với các bệnh nhân có tuổi đời trung bình $40,31 \pm 8,45$, được sử

dụng G-CSF đã với liều 5 $\mu\text{g/Kg}$, thời gian sử dụng thuốc là 7 đến 8 ngày. Số lượng tế bào CD34⁺ đã được huy động ra ngoại vi gấp 16,78 lần so với ban đầu. Trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Hà và cs (2012) đã sử dụng phác đồ phối hợp tiêm là Cyclophosphamide (Cy) kết hợp G-CSF để huy động. Với phác đồ này chỉ sau 3 ngày sử dụng có thể tiến hành thu được TBG [8]. Kết quả này cũng tương tự nghiên cứu của chúng tôi năm 2016 [12]. Số ngày huy động tế bào gốc trong nghiên cứu của Nguyễn Tuấn Tùng và CS (2022) với 4 loại thuốc, nhưng phải sử dụng đến 9 ngày để huy động [15].

4.2. Số lượng tế bào CD34⁺ cần huy động

Theo tính toán, số lượng tế bào gốc cần huy động phụ thuộc vào cân nặng của bệnh nhân. Theo lý thuyết, để số lượng tế bào CD34⁺ ở máu ngoại vi đạt $>10 \text{ TB}/\mu\text{l}$ và liều tối thiểu là 2×10^6 tế bào/kg cân nặng, thì chỉ cần 5 ngày tiêm G-CSF là đủ lượng tế bào cho ca ghép. Song để đủ lượng TBG cần cho việc gạn tách, thu gom và bảo quản chúng tôi đã phải kéo dài thời gian sử dụng thuốc để huy động được tối đa tế bào CD34⁺ ra máu ngoại vi hơn.

Theo công thức tính toán của Bạch Quốc Khánh (2014): Số lượng tế bào CD 34 thu gom được = $3,028 + 0,064 \times \text{số lượng tế bào CD34}^+$ máu ngoại vi trước gạn tách $\pm 0,820$ [11]. Tuy nhiên trên thực tế đa số bệnh nhân ghép tế bào gốc đều ở giai đoạn IIB đến IV, vì vậy tình trạng sức khỏe của bệnh nhân rất yếu, nên cần huy động nhiều lần mới đủ lượng tế bào gốc cho một ca ghép. Bên cạnh đó, các tế bào gốc sau khi huy động cần được xử lý và bảo quản trong nitơ lỏng. Trước khi ghép lại cho bệnh nhân cần phải được đánh thức. Trong quá trình này các tế bào sẽ chết rất nhiều. Kết quả phân tích ở bảng 2 cho thấy, sau khi xử lý hóa chất, tỷ lệ sống của tế bào CD34⁺ là 89,72%; sau khi đánh thức từ trong nitơ lỏng tỷ lệ tế bào sống là 79,82%. Nếu để các tế bào này trong vòng 30 phút thì tỷ lệ sống của tế bào còn

54,5%. Kết quả đạt được trong nghiên cứu này của chúng tôi đã cao hơn khuyến cáo của AABB, (tỷ lệ tế bào sống sau bảo quản đông lạnh tối thiểu phải đạt 70%) [5]. Tỷ lệ này cũng cao hơn nhiều so với nghiên cứu trước đây của chúng tôi vào năm 2016 [12], điều này có thể lý giải do quy trình ngày càng hoàn thiện.

4.3. Các chỉ số huyết học của bệnh nhân qua các giai đoạn điều trị

Sau khi tách tế bào CD34+ số lượng hồng cầu, huyết sắc tố và tiểu cầu giảm rất nhanh thể hiện ở bảng 3. Song sự phục hồi của tế bào tiểu cầu diễn ra rất nhanh, chỉ sau ngày thứ 4 tiểu cầu đã về giá trị bình thường. Trong khi đó hồng cầu ở ngày thứ 8 vẫn chưa phục hồi. Điều này hoàn toàn phù hợp với đặc điểm sinh lý của các tế bào này. Thời gian sinh sản của hồng cầu là 120 ngày, trong khi đó tiểu cầu chỉ mất 8-10 ngày đã có thể cho một thế hệ mới. Sau khi tách CD34+ ra khỏi cơ thể, số lượng bạch cầu tăng lên. Điều này có thể giải thích để huy động tế bào gốc từ tủy xương ra ngoại vi, G-CSF đã được sử dụng. Đây là một thuốc này ngoài tác dụng kích thích các tế bào gốc từ tủy xương ra máu ngoại vi, nó còn có tác dụng làm tăng bạch cầu trung tính, không ảnh hưởng nhiều đến các dòng bạch cầu khác [1].

Sau khi kết thúc quá trình huy động và thu gom tế bào gốc, thời gian điều trị hóa chất liều cao của các bệnh nhân đều được thực hiện trong 6 ngày; trước khi tiến hành ghép TBG bệnh nhân được nghỉ 1 ngày sau điều trị hóa chất. Trong giai đoạn này, các chỉ số huyết học và sinh hóa của máu chưa bị hóa chất liều cao tác động nhiều; sau thời gian dừng truyền hóa chất 2 đến 3 ngày thì các tế bào máu bắt đầu giảm sâu do tác động của hóa chất liều cao. Sau khi dừng truyền hóa chất liều cao, bệnh nhân được nghỉ 1 ngày rồi mới

tiến hành ghép TBG. Điều này cũng phù hợp với thời gian khuyến cáo truyền TBG sau khi kết thúc điều kiện hóa chất là 24 - 48 giờ [10]

Sau khi sử dụng hoá trị liều cao để tiêu diệt tế bào ung thư, mặt trái của nó là tổn thương các tế bào lành. Sau thời gian sử dụng hoá trị liều cao, các tế bào máu bắt đầu suy giảm, thể hiện rõ nhất là tế bào hồng cầu. Sau khi ghép tế bào CD34+ khả năng biệt hoá được phản ánh rõ nhất thông qua số lượng bạch cầu trung tính và tiểu cầu, bởi thời gian phục hồi của 2 tế bào này ngắn, kết quả này phù hợp với nhận định của S. Heomfeld, 2003 [9].

Trong nghiên cứu này, thời gian biệt hóa của dòng bạch cầu trung tính trung bình là 9,86 ngày. Bệnh nhân có số lượng bạch cầu phục hồi sớm nhất ở ngày thứ 8 và bệnh nhân phục hồi chậm nhất là ngày thứ 12. Theo y văn khuyến cáo, mảnh ghép chứa $>2 \times 10^6$ TB CD34+/Kg đủ đảm bảo mọc mảnh ghép trong vòng 10-15 ngày [16]

Nghiên cứu quá trình biệt hóa của các tế bào máu trong các công trình của Nguyễn Thu Hà, 2010; trung bình với bạch cầu trung tính là 11 ngày, tiểu cầu là 11,8 ngày [8]. Nghiên cứu của Bạch Quốc Khánh, 2013 trung bình với bạch cầu trung tính là 10,07 và tiểu cầu là 10,8 ngày và nghiên cứu của chúng tôi trung bình với bạch cầu trung tính là 9,86 và 11,4 với tiểu cầu [11].

5. KẾT LUẬN

Tế bào gốc tạo máu CD34+ đã được huy động từ tủy xương ra máu ngoại vi bằng G-CSF với thời gian huy động trung bình là $6,91 \pm 1,43$ ngày. Số lượng tế bào CD34+ ra ngoại vi gấp 16,78 lần so với ban đầu. Tỷ lệ sống của tế bào CD34+ sau khi xử lý hóa chất, là 89,72%, sau quá trình đánh thức từ trong nito lỏng là

79,82%. Sau sử dụng hoá trị liều cao số lượng tế bào máu giảm rất nhanh ($p < 0,05$). Sau khi ghép tế bào gốc và cho người bệnh, sự biệt hóa của tế bào bạch cầu trung tính là bắt đầu từ ngày thứ 9, tiểu cầu bắt đầu ngày thứ 10, các dòng tế bào khác biệt hóa muộn hơn. Ba tháng sau khi ghép tủy các tế bào máu sẽ ổn định.

Lời cảm ơn

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn tập thể cán bộ Khoa khám bệnh, khoa Bệnh máu ghép tủy và lãnh đạo Bệnh viện Ung bướu Nghệ An đã tạo điều kiện hỗ trợ chúng tôi trong quá trình nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Beveridge R.A., Miller J.A., Kales A.N., Binder R.A., Robert N.J., Harvey J.H., Windsor K., Gore I., Cantrell J., Thompson K.A., Taylor W.R., Barnes H.M., Schiff S.A., Shields J.A., Cambareri R.J., Butler T.P., Meister R.J., Feigert J.M., Norgard M.J., Moraes M.A., Helvie W.W., Patton G.A., Mundy L.J., Henry D. and Sheridan M.J. (1998), "A comparison of efficacy of sargramostim (yeast-derived RhuGM-CSF) and filgrastim (bacteria-derived RhuG-CSF) in the therapeutic setting of chemotherapy-induced myelosuppression", *Cancer Investigation*, 16(6)366–373.
- [2] Boulassel M., Doufar A., Maystad J., Nguyen D. and Belacel N. (2001), "Prediction of peripheral blood progenitor cell collection by measurement of CD34+ cells in the preapheresis blood", *Medscape Hematology-Oncology eJournal*, 48.
- [3] Burns L.J. (2015), "Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Handbook for Clinicians", *Transfusion*, 55(10)2534–2535.
- [4] Đào Trường Giang, Trần Việt Tú, Nguyễn Văn Thái, Nguyễn Việt Thịnh (2022), "Đánh giá kết quả bước đầu sử dụng tế bào gốc tủy xương tự thân trên 5 bệnh nhân xơ gan mất bù do rượu", *Tạp chí Y học Việt Nam*, 513(2).
- [5] Flomenberg N., Devine S.M., DiPersio J.F., Liesveld J.L., McCarty J.M., Rowley S.D., Vesole D.H., Badel K. and Calandra G. (2005), "The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone", *Blood*, 106(5)1867–1874.
- [6] Flomenberg N., Devine S.M., Dipersio J.F., Liesveld J.L., McCarty J.M., Rowley S.D., Vesole D.H., Badel K. and Calandra G. (2005), "The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone", *Blood*, 106(5)1867–1874.
- [7] Greer J.P. and Williams M. (2009), Non-Hodgkin Lymphoma in Adults. *Wintrob's clinical hematology*. 2145–2194.
- [8] Nguyễn Thị Thu Hà, Lý Tuấn Khải, Nguyễn Chính Trung (2010), Ghép tế bào gốc máu ngoại vi tự thân trong điều trị u hạch ác tính non- Hodgkin và đa u tủy xương ở bệnh viện Trung ương Quân đội 108". *Kỷ yếu Hội thảo nghiên cứu, ứng dụng tế bào gốc trong Y học*. 27–39.
- [9] Heimfeld S. (2003), "Bone marrow transplantation: how important is CD34 cell dose in HLA-identical stem cell transplantation?", *Leukemia*, 17(5)856–858.
- [10] Hiệp hội quốc tế chống ung thư UICC (1993), *Ung thư học lâm sàng*. Y học, Hà Nội.
- [11] Bạch Quốc Khánh (2014), "Nghiên cứu hiệu quả của ghép tế bào gốc tự thân điều trị bệnh đa u tủy xương và u lymphô ác tính không Hodgkin ". Luận án Y học, Đại học Y Hà Nội.
- [12] Nguyễn Thị Giang An, Nguyễn Quang Trung. (2016), "Xác định số lượng tế bào gốc tạo máu CD34+ cần huy động cho mỗi ca ghép tủy", *Tạp chí Y học thực hành*, Số 12.
- [13] Perseghin P., Terruzzi E., Dassi M., Baldini V., Parma M., Coluccia P.,

- Accorsi P., Confalonieri G., Tavecchia L., Verga L., Ravagnani F., Iacone A., Pogliani E.M. and Pioltelli P. (2009), "Management of poor peripheral blood stem cell mobilization: incidence, predictive factors, alternative strategies and outcome. A retrospective analysis on 2177 patients from three major Italian institutions", *Transfusion and Apheresis Science: Official Journal of the World Apheresis Association: Official Journal of the European Society for Haemapheresis*, 41(1)33–37.
- [14] Perseghin P., Terruzzi E., Dassi M., Baldini V., Parma M., Coluccia P., Accorsi P., Confalonieri G., Tavecchia L., Verga L., Ravagnani F., Iacone A., Pogliani E.M. and Pioltelli P. (2009), "Management of poor peripheral blood stem cell mobilization: Incidence, predictive factors, alternative strategies and outcome. A retrospective analysis on 2177 patients from three major Italian institutions", *Transfusion and Apheresis Science*, 41(1)33–37.
- [15] Nguyễn Tuấn Tùng, Nguyễn Văn Hưng, Tống Văn Giáp. (2022), "Kết quả huy động và thu gom tế bào gốc tạo máu cd34+ từ máu ngoại vi ở người bệnh u lympho không Hodgkin tế bào B tái phát/dai đẳng điều trị bằng phác đồ R-GDP".
- [16] Vasu S., Leitman S.F., Tisdale J.F., Hsieh M.M., Childs R.W., Barrett A.J., Fowler D.H., Bishop M.R., Kang E.M., Malech H.L., Dunbar C.E., Khuu H.M., Wesley R., Yau Y.Y. and Bolan C.D. (2008), "Donor demographic and laboratory predictors of allogeneic peripheral blood stem cell mobilization in an ethnically diverse population", *Blood*, 112(5)2092–2100.

SUMMARY**ASSESSMENT OF SURVIVAL IN STORAGE AND DIFFERENTIALITY
OF CD34+ CELLS****Nguyen Thị Giang An¹, Tran Quynh Ngan²**¹Department of Biology – Vinh University²Nghe An Oncology Hospital

Objective: The objective of this study is to assess the differentiation of blood cell lines following the transplantation of CD34+ hematopoietic stem cells. These stem cells, found in the bone marrow, have the ability to develop into various types of blood cells. Normally, they are primarily located in the bone marrow, with only a small number present in the peripheral blood. However, in response to injury, stress, or chemical infection, these cells migrate to the peripheral blood. When high doses of chemotherapy are administered, rapidly dividing cells, including hematopoietic cells, are affected, resulting in a reduction in their quantity. To expedite the restoration of blood cell lines, CD34+ autologous hematopoietic stem cell transplantation is performed prior to high-dose chemotherapy in cancer treatment. **Methods:** CD34+ cells were extracted from the bone marrow of cancer patients using G-CSF and filtered using a COBE spectra cell counter. The stem cells were preserved in liquid nitrogen, after which their viability was assessed using a Faccalibur cytometer. **Results:** G-CSF successfully mobilized CD34+ cells in cancer patients, with an average age of 40.31 ± 8.45 years and a mean mobilization time of 6.91 ± 1.43 days. The number of CD34+ cells in the peripheral blood increased by 16.78 times following mobilization. The survival rate of CD34+ cells after chemical treatment was 89.72%, after awakening from liquid nitrogen was 79.82%, and after 30 minutes of awakening, it was 54.50%. Following transplantation of an average of 107.71 ± 11.5 CD34+ cells per patient, the earliest differentiation was observed in neutrophils on day 9 and platelets on day 10. The hematopoietic cells achieved stability in terms of differentiated cell lines after 3 months.

Keywords: CD34+, hematopoietic stem cell transplantation, stem cells, cell differentiation, G-CSF.