

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ QUỐC PHÒNG

HỌC VIỆN QUÂN Y

NGUYỄN THỊ HIỀN HẠNH

NGHIÊN CỨU TÍNH AN TOÀN VÀ TÁC DỤNG KHÁNG
MỘT SỐ DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ BẠCH CẦU CỦA
KHỐI TẾ BÀO CAR-T PHỐI HỢP VỚI
KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1 TRÊN THỰC NGHIỆM

Ngành: Khoa học y sinh

Mã số: 9720101

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI – 2024

CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI HỌC VIỆN QUÂN Y

Người hướng dẫn khoa học:

- PGS. TS. CÁN VĂN MÃO
- TS. BÙI KHẮC CƯỜNG

Phản biện 1: GS. TS. Nguyễn Văn Ba

Phản biện 2: TS. Nguyễn Văn Đô

Phản biện 3: PGS. TS. Phan Quốc Hoàn

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường

Vào hồi: giờ ngày tháng năm 2024

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia
- Thư viện Học viện Quân y

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh bạch cầu chiếm khoảng 2,4% tổng số ca mắc ung thư mới và 3,1% tỷ lệ tử vong liên quan đến ung thư trên thế giới. Hiện nay hóa trị liệu là phương pháp điều trị bệnh bạch cầu phổ biến nhất. Hiệu quả điều trị của liệu pháp này còn hạn chế, các bệnh nhân sau khi điều trị không thể lui bệnh hoàn toàn và tỷ lệ tái phát cao. Gần đây, chiến lược điều trị mới như điều trị nhắm đích trong đó có liệu pháp tế bào CAR-T được phát triển và ghi nhận kết quả khả quan. PD-1 là một protein được biểu hiện trên bề mặt của tế bào T. Khi PD-L1 gắn với thụ thể PD-1 gây ra hiện tượng bất hoạt động của tế bào T và hoạt động miễn dịch của tế bào T bị ức chế. Sự hiện diện của PD-1 trên bề mặt tế bào CAR-T được cho là góp phần làm giảm chức năng của liệu pháp CAR-T. Do vậy phong tỏa PD-1 trên tế bào CAR-T bằng chất ức chế hoặc kháng thể loại trừ PD-1 được cho là tăng cường hiệu quả tiêu diệt khối u của tế bào CAR-T. Kháng thể kháng PD-1 (PD-1 Ab) sẽ kích hoạt tế bào CAR-T giúp tăng cường hiệu quả, nâng cao chức năng của tế bào CAR-T từ đó sẽ cải thiện được tiên lượng, giảm sự xuất hiện tác dụng phụ và tăng hiệu quả điều trị. Phong tỏa PD-1 đang được coi là một hướng mới đầy hứa hẹn giúp cải thiện chức năng của tế bào CAR-T mang lại hiệu quả điều trị tốt. Tuy nhiên, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào đánh giá hiệu quả kết hợp tế bào CAR-T và kháng thể kháng PD-1 trên bệnh bạch cầu.

Vì vậy, đề tài được thực hiện với hai mục tiêu:

1. *Đánh giá tính an toàn của khối tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên thực nghiệm.*
2. *Đánh giá tác dụng kháng một số dòng tế bào ung thư bạch cầu của khối tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên thực nghiệm.*

Những đóng góp mới của luận án:

Đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam đánh giá về tính an toàn và tác dụng kháng một số dòng tế bào ung thư bạch cầu của khối tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên thực nghiệm.

Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 không ảnh hưởng lên sự sống sót, cân nặng, chức năng tạo máu, chức năng gan, chức năng thận và mô bệnh học gan, thận của chuột thí nghiệm sau 4 tuần theo dõi.

Tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 có khả năng ly giải các dòng tế bào ung thư có CD19+ (Daudi, Raji) cao hơn so với tế bào PBMC nhóm chứng. Liệu pháp CAR-T kết hợp kháng thể kháng PD-1 làm tăng 1,82 lần hiệu quả ly giải trên tế bào Raji ở tỷ lệ Raji/CAR-T = 1:10.

Cấu trúc luận án

- Tổng cộng 133 trang gồm: Phần đặt vấn đề; 4 chương (Chương 1: Tổng quan tài liệu; Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu; Chương 3: Kết quả nghiên cứu; Chương 4: Bàn luận); Phần kết luận và Kiến nghị. Luận án có: 18 bảng, 35 hình, 158 tài liệu tham khảo.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. ĐẠI CƯƠNG BỆNH BẠCH CẦU

1.1.1. Dịch tế học

1.1.1.1. Tình hình bệnh bạch cầu trên thế giới

Theo thống kê GLOBOCAN năm 2022, bệnh bạch cầu là ung thư được chẩn đoán phổ biến thứ 13 và là nguyên nhân thứ 10 gây tử vong do ung thư trên toàn thế giới, với 486.777 trường hợp mắc mới và 305.033 ca tử vong do bệnh bạch cầu.

1.1.1.2. Tình hình bệnh bạch cầu ở Việt Nam

Theo GLOBOCAN năm 2022, Việt Nam có 5789 ca mắc mới đứng thứ 8 và có 4330 ca tử vong đứng thứ 6 do bệnh bạch cầu.

1.1.2. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh của bệnh bạch cầu

1.1.2.1. Nguyên nhân

Cho đến nay chưa xác định được các nguyên nhân gây bệnh bạch cầu, tuy nhiên nhiều yếu tố nguy cơ làm tăng tỷ lệ mắc bệnh như: Tiền sử tiếp xúc với bức xạ ion hoá hoặc hóa chất, điều trị một số loại thuốc chống ung thư, nhiễm trùng với một số virus (HTLV-1 và HTLV-2, Epstein Barr), tiền sử rối loạn huyết học, các điều kiện di truyền (Thiếu máu Fanconi, Hội chứng Bloom thất điều, Hội chứng Down, sắc tố xeroderma, hội chứng Li-Fraumeni).

1.1.2.2. Cơ chế bệnh sinh

Bệnh bạch cầu là một bệnh máu ác tính liên quan đến việc sản sinh quá nhiều bạch cầu chưa trưởng thành hoặc bất thường. Bệnh xảy ra khi một số tế bào máu bị đột biến ADN và một số bất thường nhất định làm cho tế bào phát triển và phân chia nhanh hơn và tiếp tục sống trong khi các tế bào bình thường sẽ chết. Theo thời gian, các tế bào bất thường này có thể lấn át các tế bào máu bình thường trong tủy xương, dẫn đến giảm các tế bào bạch cầu, tế bào hồng cầu và tiểu cầu bình thường, gây ảnh hưởng đến chức năng các cơ quan và sức khỏe bệnh nhân.

1.1.4. Các phương pháp điều trị

Các phương pháp điều trị: hóa trị, xạ trị, ghép tế bào gốc tự thân hoặc đồng loài, liệu pháp miễn dịch, liệu pháp nhắm mục tiêu, liệu pháp CAR-T.

1.2. LIỆU PHÁP TẾ BÀO CAR-T

1.2.1 Tổng quan về liệu pháp tế bào CAR-T

1.2.1.1. Lịch sử hình thành và phát triển của liệu pháp TB CAR-T

Năm 1989 Eshhar Z. và cộng sự lần đầu tiên tạo ra gen thụ thể khảm của tế bào T (chimeric TCR gene). Đến năm 2017, FDA đã cho phép dùng liệu pháp tế bào CAR-T trong chữa trị bệnh ALL ở người lớn và trẻ em. Cho đến năm 2022, có 377 thử nghiệm lâm sàng ở Hoa

Kỳ và 636 thử nghiệm ở Trung Quốc trong khi Châu Âu chỉ có 58 thử nghiệm vẫn kém xa hai quốc gia dẫn đầu này. Các thử nghiệm lâm sàng nhắm vào CD19 chiếm hơn 40% số thử nghiệm tế bào CAR-T ở Hoa Kỳ. Hiện nay, Cục Quản lý thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ đã cấp phép điều trị cho sáu sản phẩm tế bào CAR-T, bốn trong số sáu sản phẩm là CAR-T CD19.

1.2.1.2. Các thể hệ tế bào CAR-T

Đã có năm thể hệ tế bào CAR-T được phát triển.

1.2.2. Độc tính của liệu pháp tế bào CAR-T với cơ thể

1.2.2.1. Hội chứng giải phóng cytokin và nhiễm độc thần kinh

Độc tính phổ biến nhất của liệu pháp tế bào CAR-T là hội chứng giải phóng cytokin (CRS - Cytokine release syndrome), là một phản ứng viêm toàn thân qua trung gian là sự hoạt động quá mức của các tế bào tác động và một lượng lớn cytokin.

Hội chứng nhiễm độc thần kinh liên quan đến tế bào tác động miễn dịch (ICANS - Immune Effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome) là độc tính cấp tính phổ biến thứ hai được quan sát thấy với liệu pháp tế bào CAR-T, với tỷ lệ mắc từ 2% đến 64% đối với ICANS mọi cấp độ và 0-50% đối với ICANS nặng.

1.2.3. Ứng dụng liệu pháp TB CAR-T trong điều trị bệnh bạch cầu

1.2.3.1. Quy trình sản xuất tế bào CAR-T trên lâm sàng

- Thu nhận tế bào đơn nhân từ máu ngoại vi.
- Hoạt hóa tế bào T.
- Chuyển nạp gen mã hoá cho CAR và tăng sinh tế bào.
- Truyền tế bào CAR-T trở lại bệnh nhân.

1.3. KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1

1.3.2. Kháng thể kháng PD-1

PD-L1 là một protein xuyên màng, có mặt tại màng tế bào ung thư, trong khi đó thụ cảm thể PD-1 có mặt trên bề mặt của các tế bào miễn dịch như: tế bào T, tế bào B, tế bào giết tự nhiên, đại thực bào.

Khi PD-L1 gắn với thụ thể PD-1 gây ra hiện tượng bất hoạt động của tế bào T và hoạt động miễn dịch của tế bào T bị ức chế. Vì thế khi dùng kháng thể ức chế PD-1 hoặc PD-L1 sẽ gây ra hiện tượng ức chế trực liên kết PD-1/PD-L1, từ đó hệ miễn dịch của tế bào T được kích hoạt và tấn công tế bào ung thư.

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. THỜI GIAN, ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

2.2. ĐỐI TƯỢNG VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.2.1. Tế bào CAR-T

Các khối tế bào CAR-T CD19R/pSB thế hệ thứ 2 đã được chuyển nạp và tăng sinh từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral Blood Mononuclear Cell - PBMC) của người khỏe mạnh, tự nguyện. Đây này là sản phẩm của đề tài nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ cấp quốc gia mã số KC10.39/16-20, Bộ môn Sinh lý bệnh - Học viện Quân Y. Khối tế bào CAR-T đạt các tiêu chuẩn cơ sở: có biểu hiện cấu trúc CAR CD19, có khả năng ly giải tế bào ung thư CD19+; không nhiễm vi khuẩn, nấm.

2.2.2. Kháng thể kháng PD-1

Kháng thể kháng PD-1 (ATC: L01XC18) hàm lượng 25mg/mL.

2.2.3. Các dòng tế bào ung thư bạch cầu

Tế bào Daudi (ATCC CCL-231) dòng tế bào ung thư hạch lympho CD19+ Burkitt (ATCC, Hoa Kỳ), tế bào Raji (ATCC CCL-86) là dòng tế bào ung thư bạch cầu lympho B CD19+ (ATCC, Hoa Kỳ), tế bào K562 (ATCC CCL-243) dòng tế bào ung thư bạch cầu mạn tính dòng tủy CD19- (ATCC, Hoa Kỳ).

2.2.4. Động vật

Chuột nhắt trắng, cân nặng $30g \pm 5g$, được cung cấp bởi Trung tâm nghiên cứu động vật thực nghiệm, Học viện Quân Y đủ tiêu chuẩn thí nghiệm, số lượng 60 con.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu thực nghiệm trên tế bào và động vật (chuột nhắt trắng). Nghiên cứu tiền cứu can thiệp có so sánh nhóm chứng.

2.3.2. Nội dung nghiên cứu

2.3.2.1. Đánh giá tính an toàn của khối tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên thực nghiệm

- Đánh giá chất lượng của tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1: tính tiệt trùng (cấy khuẩn), tỷ lệ biểu hiện CAR sau nuôi cấy tăng sinh, hàm lượng Endotoxin.

- Đánh giá tính an toàn của khối tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên động vật thực nghiệm: Chuột nhắt trắng, số lượng 60 con được chia làm 4 nhóm, mỗi nhóm 15 con

+ Nhóm 1 (chứng): Tiêm 0,1 ml PBS/chuột đường phúc mạc + Tiêm 0,1 ml PBS/chuột đường tĩnh mạch đuôi.

+ Nhóm 2 (CAR-T): Tiêm 10^6 tế bào CAR-T/0,1ml/chuột đường phúc mạc + Tiêm 0,1 ml PBS/chuột đường tĩnh mạch đuôi.

+ Nhóm 3 (PD-1 Ab): Tiêm 0,1 ml PBS/chuột đường phúc mạc + Tiêm PD-1 Ab (250 μ g)/0,1ml/chuột đường tĩnh mạch đuôi.

+ Nhóm 4 (CAR-T + PD-1 Ab): Tiêm 10^6 tế bào CAR-T/0,1ml/chuột đường phúc mạc và Tiêm PD-1 Ab (250 μ g)/0,1ml/chuột đường tĩnh mạch đuôi.

Theo dõi chuột trong 4 tuần đánh giá tình trạng toàn thân, trọng lượng, vị trí tiêm trên chuột. Kết thúc 4 tuần tiến hành lấy máu và mô gan thận chuột làm các xét nghiệm đánh giá:

+ Nồng độ cytokin IL-2, IL-6, TNF- α bằng xét nghiệm ELISA. (Mouse IL-2 ELISA kit MBS2701039, Mouse IL-6 ELISA kit MBS2508516, Mouse TNF- α ELISA kit MBS2500421 của hãng MyBiosource).

+ Chức năng gan (AST, ALT), thận (Ure, Creatinin), mô bệnh học gan thận, cơ quan tạo máu (chỉ số huyết học).

2.3.2.2. Đánh giá tác dụng kháng một số dòng tế bào ung thư bạch cầu của khối tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1

- Đánh giá tác dụng của khối tế bào CAR-T phối hợp với PD-1 Ab trên các dòng tế bào ung thư bạch cầu (Daudi, Raji, K562) :

+ Thiết kế nghiên cứu đánh giá ly giải trên 4 nhóm: PBMC, PD-1 Ab, CAR-T, CAR-T phối hợp PD-1 Ab. Với tỷ lệ bào ung thư Daudi/ Raji/ K562 (Target) được bổ sung các tế bào PBMC, CAR-T (Effector) theo tỷ lệ target:effector (T:E) 1:2, 1:5, 1:10. Kháng thể kháng PD-1 bổ sung vào giếng với nồng độ 20 μ g/mL.

+ Sau 6 giờ đồng nuôi cấy đánh giá tỷ lệ tế bào bị ly giải bằng kỹ thuật Flow Cytometry: sử dụng chất nhuộm tế bào huỳnh quang CFSE để đánh dấu tế bào ung thư bạch cầu. Sau đó sử dụng chất nhuộm nhân tế bào phát huỳnh quang là 7-Amino Actinomycin D (7-AAD) để kiểm tra tỷ lệ tế bào ung thư bị ly giải trên quần thể tế bào ung thư bạch cầu dương tính với CFSE.

- Đánh giá khả năng bài tiết cytokin trên *in vitro*: nồng độ cytokin được giải phóng ra môi trường nuôi cấy tế bào khi đồng nuôi cấy tế bào ung thư với 4 nhóm PBMC, PD-1 Ab, CAR-T và CAR-T kết hợp PD-1 Ab hai thời điểm 24 giờ và 48 giờ (n = 3) (Human IL-2 Uncoated ELISA Kit 2237558-007, Human IL-6 Uncoated ELISA Kit 298722-008, Human TNF- α Uncoated ELISA Kit 279143-009 của hãng Thermo Fisher Scientific).

2.4. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH KẾT QUẢ, XỬ LÝ SỐ LIỆU

Các số liệu nghiên cứu được phân tích bằng phần mềm IBM SPSS 22.0 và GraphPad Prism 8.0. So sánh trung vị của 2 nhóm độc lập bằng phép kiểm Mann-Whitney U test. So sánh trung bình của nhiều hơn 2 nhóm độc lập bằng phép kiểm ANOVA một chiều, phân tích poshoc của phép kiểm ANOVA bằng phép kiểm Turkey. $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

2.5. ĐẠO ĐỨC NGHIÊN CỨU

Động vật được nuôi trong điều kiện đảm bảo nhiệt độ, ánh sáng, thức ăn và nước uống đầy đủ. Các quy trình thí nghiệm trên động vật được thực hiện theo đúng tiêu chuẩn, quy định của Trung tâm nghiên cứu động vật thực nghiệm - Học viện Quân Y.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. CHẤT LƯỢNG KHỐI TẾ BÀO CAR-T VÀ TÍNH AN TOÀN CỦA KHỐI TẾ BÀO CAR-T PHỐI HỢP VỚI KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1 TRÊN THỰC NGHIỆM

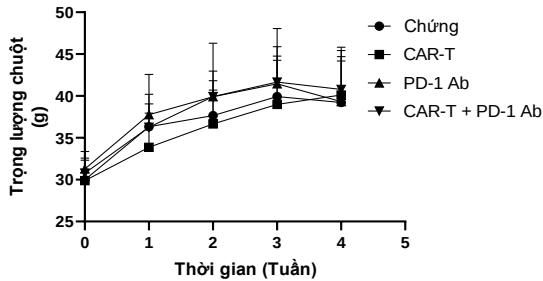
3.1.1. Chất lượng của khối tế bào CAR-T

- Tính tiệt trùng: xét nghiệm vi khuẩn nuôi cấy và định danh trên hệ thống tự động hiếu khí và kỵ khí của môi trường nuôi cấy chứng, PBMC, CAR-T, PD-1, CAR-T + PD-1 Ab đều có kết quả âm tính.
- Tỷ lệ biểu hiện của CAR trên bề mặt tế bào T được phân tích bằng phương pháp tế bào dòng chảy là 26,13% tế bào T có biểu hiện CAR trên bề mặt của chúng.
- Tế bào CAR-T có biểu hiện gen CAR khi đánh giá bằng kỹ thuật Realtime PCR.
- Hàm lượng Endotoxin mẫu dịch môi trường tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp PD-1 Ab đều < 0,1 EU/ml trong giới hạn cho phép.

3.1.2. Tính an toàn của khối tế bào CAR-T và CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên thực nghiệm

3.1.2.1. Tình trạng toàn thân của chuột trong quá trình thí nghiệm

- Tình trạng chung: trong quá trình theo dõi 4 tuần chuột ăn uống, vận động bình thường, nhanh nhẹn, lông mượt, mắt trong, hậu môn khô, không đi lỏng. Tỷ lệ chuột sống ở 4 nhóm là 100% cho đến ngày cuối cùng của thí nghiệm.



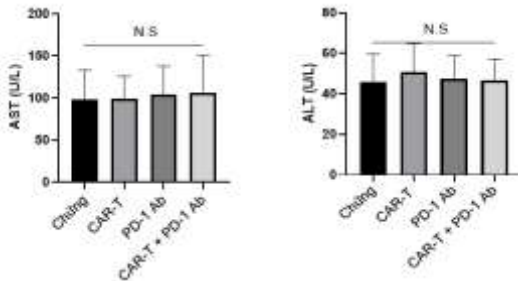
Hình 3. 1. Ảnh hưởng của tế bào CAR-T kết hợp với PD-1 Ab đến trọng lượng chuột

Tại các thời điểm ngày 0, ngày 7, ngày 14, ngày 21 và ngày 28 ở các nhóm CAR-T, PD-1 Ab và CAR-T kết hợp PD-1 Ab không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p > 0,05$).

3.1.2.2. Ảnh hưởng đến chức năng tạo máu của chuột

Các chỉ số dòng hồng cầu, bạch cầu và tiểu cầu ở cả 3 nhóm CAR-T, PD-1 Ab và CAR-T kết hợp PD-1 Ab không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p > 0,05$).

3.1.2.3. Ảnh hưởng đến các chỉ số AST, ALT và mô bệnh học gan

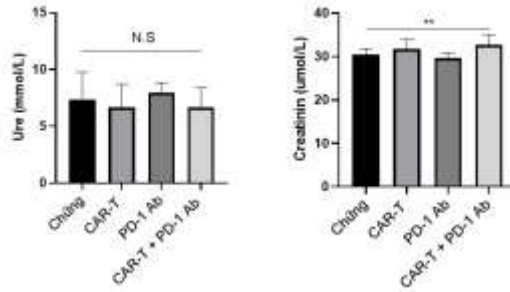


Hình 3. 2. Đặc điểm chỉ số AST, ALT giữa các nhóm

Chỉ số AST và ALT ở cả 3 nhóm CAR-T, PD-1 Ab và CAR-T kết hợp PD-1 đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với nhóm chứng ($p > 0,05$).

* Mô bệnh học: hình thái vi thể gan ở các nhóm không có sự khác biệt, nhu mô gan bình thường.

3.1.2.4. Ảnh hưởng đến chỉ số Creatinin, ure và mô bệnh học thận



Hình 3. 3. Kết quả chỉ số Ure, Creatinin giữa các nhóm
($p(1)(4) < 0,05$; $p(3)(4) < 0,001$)

Nồng độ Ure ở cả 3 nhóm CAR-T, PD-1 Ab và CAR-T kết hợp PD-1 Ab đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với nhóm chứng ($p > 0,05$). Có sự khác biệt về nồng độ Creatinin của nhóm CAR-T kết hợp PD-1 Ab so với nhóm chứng và nhóm PD-1 Ab ($p < 0,05$). Tuy nhiên chỉ số creatinin của các nhóm vẫn nằm trong mức giới hạn bình thường.

- Mô bệnh học: hình thái vi thể thận ở các nhóm không có sự khác biệt, nhu mô thận bình thường.

3.1.2.5. Ảnh hưởng đến nồng độ các cytokin

Bảng 3. 1. Nồng độ cytokin IL-6 của các nhóm nghiên cứu

Nhóm \ Chỉ số	n	IL-6 (pg/mL)	p [#]
		Trung vị (Tứ phân vị)	
Nhóm 1 (chứng)	15	129,01 (93,52 - 158,32)	$p(1)(2) > 0,05$ $p(1)(3) < 0,001$ $p(1)(4) < 0,005$ $p(2)(4) > 0,05$ $p(3)(4) > 0,05$
Nhóm 2 (CAR-T)	15	97,32 (86,03 - 141,41)	
Nhóm 3 (PD-1 Ab)	15	86,03 (82,34 - 93,52)	
Nhóm 4 (CAR-T+PD-1 Ab)	15	89,75 (86,03 - 97,32)	

Mann-Whitney U test

Nồng độ IL-6 ở nhóm CAR-T không có sự khác biệt so với nhóm chứng. Nồng độ IL-6 của nhóm PD-1 Ab và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p < 0,05$).

Bảng 3.8. Nồng độ cytokin IL-2 của các nhóm nghiên cứu

Nhóm \ Chỉ số	n	IL-2 (pg/mL)	p [#]
		Trung vị (Tứ phân vị)	
Nhóm 1 (chứng)	15	39,84 (35,70 - 52,96)	p (1)(2) > 0,05 p (1)(3) > 0,05 p (1)(4) < 0,01 p (2)(4) < 0,01 p (3)(4) < 0,01
Nhóm 2 (CAR-T)	15	38,79 (35,70 - 43,02)	
Nhóm 3 (PD-1 Ab)	15	44,10 (35,70 - 52,39)	
Nhóm 4 (CAR-T+PD-1 Ab)	15	33,67 (31,68 - 38,27)	

Mann-Whitney U test

Nồng độ IL-2 của nhóm CAR-T và PD-1 Ab không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p > 0,05$). Nhóm kết hợp CAR-T và PD-1 Ab có nồng độ IL-2 thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với các nhóm chứng, CAR-T và PD-1 Ab ($p < 0,01$).

Bảng 3.9. Nồng độ cytokin TNF- α của các nhóm nghiên cứu

Nhóm \ Chỉ số	n	TNF- α (pg/mL)	p
		Trung vị (Tứ phân vị)	
Nhóm 1 (chứng)	15	127,29 (110,26 - 185,68)	p (1)(2) > 0,05 p (1)(3) > 0,05 p (1)(4) < 0,001 p (2)(4) < 0,001 p (3)(4) < 0,001
Nhóm 2 (CAR-T)	15	183,58 (117,76 - 255,48)	
Nhóm 3 (PD-1 Ab)	15	83,22 (74,62 - 226,50)	
Nhóm 4 (CAR-T+PD-1 Ab)	15	383,76 (278,30-418,89)	

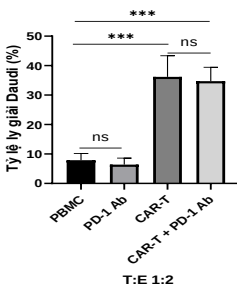
* Mann-Whitney U test

Nhóm CAR-T và PD-1 Ab có nồng độ TNF- α không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p > 0,05$). Tuy nhiên, nhóm kết hợp tế bào CAR-T và PD-1 Ab có nồng độ TNF- α cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng, nhóm CAR-T và nhóm PD-1 Ab ($p < 0,001$).

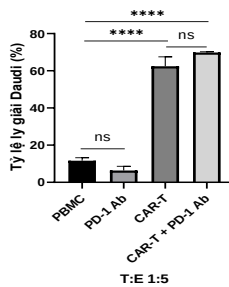
3.2. TÁC DỤNG KHÁNG TẾ BÀO DÒNG UNG THƯ BẠCH CẦU CỦA KHỐI TẾ BÀO CAR-T PHỐI HỢP VỚI PD-1 Ab

3.2.1. Kết quả đánh giá tác dụng ly giải tế bào *in vitro*

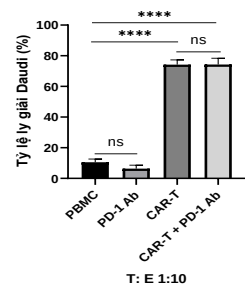
3.2.1.1. Tác dụng ly giải tế bào Daudi (CD19+)



Hình 3. 10. Ly giải TB Daudi ở 4 nhóm với T:E = 1:2



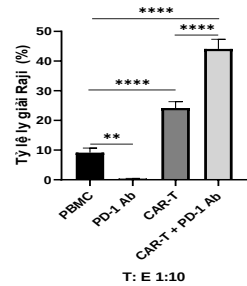
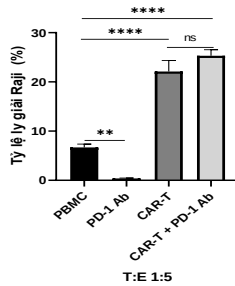
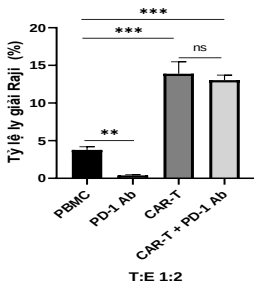
Hình 3. 11. Ly giải TB Daudi ở 4 nhóm với T:E = 1:5



Hình 3. 12. Ly giải TB Daudi ở 4 nhóm với T:E = 1:10

Tế bào CAR-T và CAR-T kết với PD-1 Ab thể hiện khả năng ly giải tốt đối với tế bào Daudi (CD19+). Tỷ lệ tế bào ly giải tăng khi tỷ lệ đồng nuôi cấy CAR-T/Daudi tăng, đạt từ 36,19% - 74,21%; kết hợp tế bào CAR-T với PD-1 Ab đạt tỷ lệ ly giải từ 34,73 - 74,28% . Không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ ly giải giữa nhóm CAR-T và nhóm kết hợp CAR-T với PD-1 Ab.

3.2.1.2. Tác dụng ly giải tế bào Raji (CD19+)



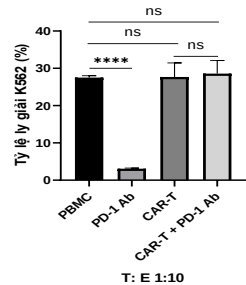
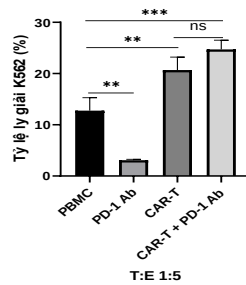
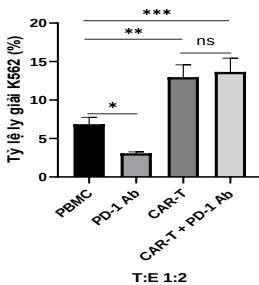
Hình 3. 13. Ly giải TB Raji ở 4 nhóm với T:E = 1:2

Hình 3. 14. Ly giải TB Raji ở 4 nhóm với T:E = 1:5

Hình 3. 15. Ly giải TB Raji ở 4 nhóm với T:E = 1:10

Tế bào CAR-T cũng ly giải tế bào Raji (CD19+) tốt hơn so với PBMC. Tỷ lệ tế bào Raji ly giải tăng khi tỷ lệ đồng nuôi cấy CAR-T/Raji tăng, tỷ lệ đạt từ 13,89% - 24,2%. Hiệu quả ly giải của CAR-T trên Raji thấp hơn nhiều so với Daudi (36,19% - 74,21%). Tuy nhiên, ở nhóm kết hợp CAR-T+PD-1 Ab, có xu hướng tăng hiệu quả ly giải khi tăng tỷ lệ CAR-T/Raji. Đặc biệt, với tỷ lệ Raji/CAR-T = 1:10, hiệu quả ly giải tăng từ 24,2% lên 44,1%, tương đương tăng hiệu quả 1,82 lần.

3.2.1.3. Tác dụng ly giải tế bào K562 (CD19-)



Hình 3. 16. Ly giải TB K562 ở 4 nhóm với T:E = 1:2

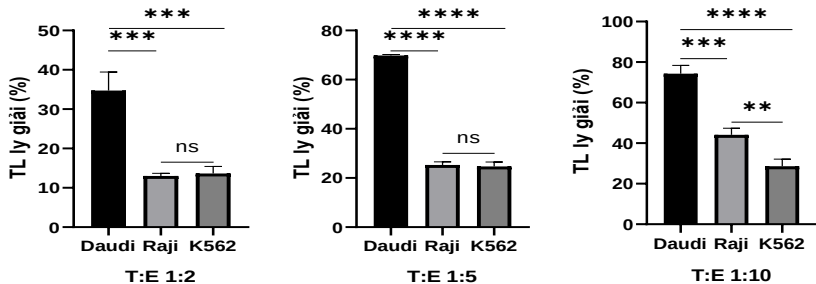
Hình 3. 17. Ly giải TB K562 ở 4 nhóm với T:E = 1:5

Hình 3. 18. Ly giải TB K562 ở 4 nhóm với T:E = 1:10

Đối với tỷ lệ K562/CAR-T 1:2 và 1:5, CAR-T và CAR-T + PD-1 có tác dụng ly giải tế bào tốt hơn PBMC nhưng đều ở mức

thấp. Với tỷ lệ K562/CAR-T = 1:10, kết quả cho thấy tỷ lệ tế bào K562 bị ly giải khi đồng nuôi cấy với PBMC 27,52%, CAR-T 27,67% và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab 28,59% là tương đồng nhau, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

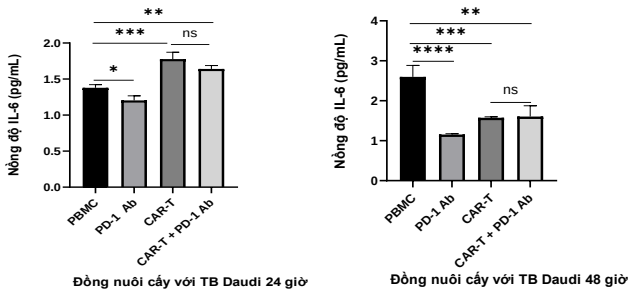
3.2.1.4. So sánh khả năng ly giải ba dòng tế bào ung thư bạch cầu của khối tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab



Hình 3.20. So sánh tỷ lệ ly giải 3 dòng tế bào ung thư bạch cầu của khối tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1

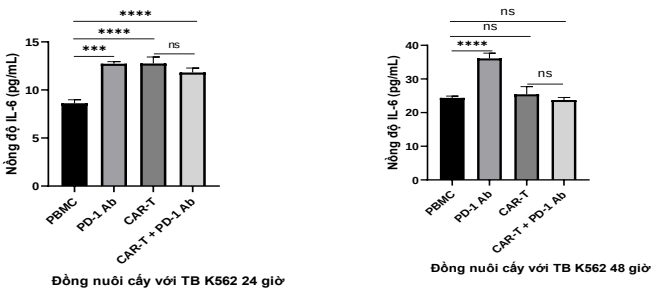
Hình 3.20 cho thấy ở cả 3 tỷ lệ thì tỷ lệ ly giải tế bào Daudi đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với tỷ lệ ly giải tế bào Raji và K562. Không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ ly giải tế bào Raji và K562 ở tỷ lệ T:E 1:2 và 1:5 ($p > 0,05$). Tỷ lệ T:E 1:10 thì tỷ lệ ly giải tế bào Raji của liệu pháp kết hợp cao hơn có ý nghĩa thống kê so với tỷ lệ ly giải tế bào K562 ($p < 0,01$).

3.2.2. Thay đổi nồng độ cytokin được giải phóng ở môi trường nuôi cấy tế bào



Hình 3. 21. So sánh khả năng bài tiết cytokin IL-6 khi đồng nuôi cấy với TB Daudi ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ

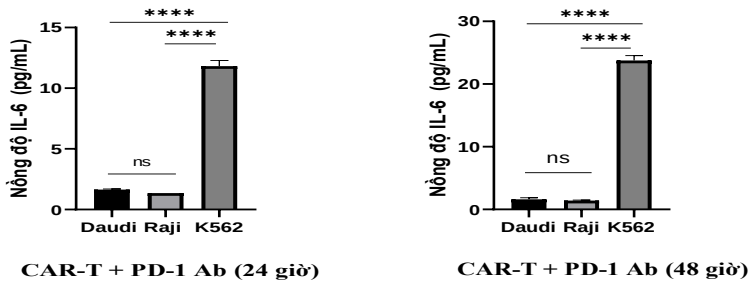
Kết quả cho thấy thời điểm 24 giờ nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy của tế bào Daudi đồng nuôi cấy với tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp PD-1 Ab đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) so với nhóm chứng PBMC. Đến 48 giờ nồng độ IL-6 ở hai nhóm này lại thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng PBMC ($p < 0,001$).



Hình 3.23. So sánh khả năng bài tiết cytokin IL-6 khi đồng nuôi cấy với TB K562 ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ

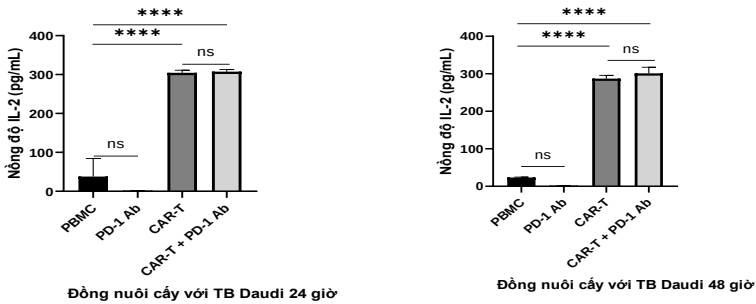
Hình 3.23 cho thấy tại thời điểm 24 giờ nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T, PD-1 Ab và CAR-T kết hợp PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với tế bào K562 đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$) so với nhóm PBMC. Và tại thời điểm 48 giờ nồng độ

IL-6 của hai nhóm này không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) so với chứng tế bào PBMC.



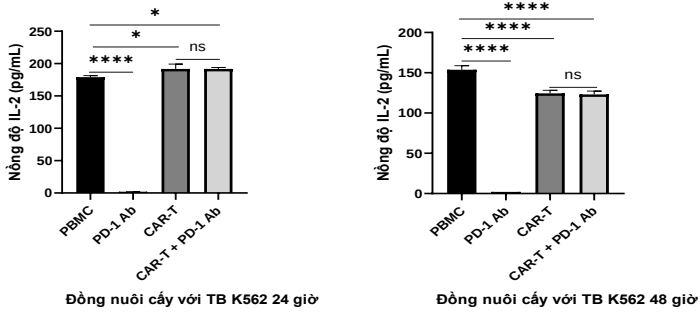
Hình 3. 25. So sánh khả năng bài tiết IL-6 của TB CAR-T kết hợp PD-1 Ab đồng nuôi cấy với TB ung thư bạch cầu sau 24 và 48 giờ

Kết quả hình 3.25 cho thấy ở cả hai thời điểm 24 giờ và 48 giờ nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy tế bào CAR-T kết hợp PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với các tế bào Raji và Daudi đều thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với khi đồng nuôi cấy cùng tế bào K562 ($p < 0,001$).



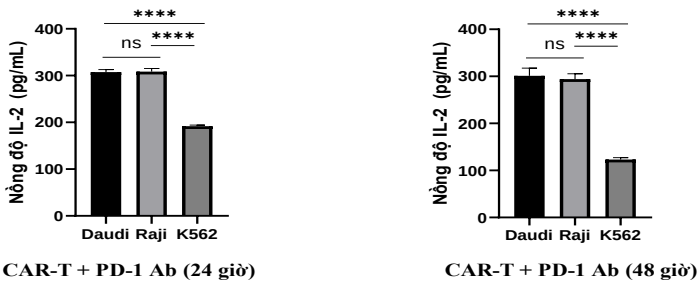
Hình 3.26. So sánh khả năng bài tiết cytokin IL-2 khi đồng nuôi cấy với TB Daudi ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ

Hình 3.26 cho thấy tại cả 2 thời điểm nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với tế bào Daudi đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$) so với nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy của nhóm tế bào PBMC.



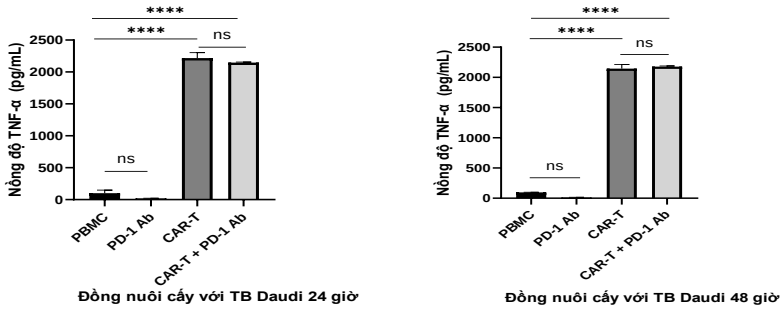
Hình 3.28. So sánh khả năng bài tiết cytokin IL-2 khi đồng nuôi cấy với TB K562 ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ

Thời điểm 24 giờ nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với tế bào K562 đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm tế bào PBMC ($p < 0,05$). Ngược lại tại thời điểm 48 giờ thì nồng độ IL-2 của hai nhóm này giảm thấp hơn rõ rệt so với nồng độ IL-2 trong dịch đồng nuôi cấy với tế bào PBMC ($p < 0,0001$).



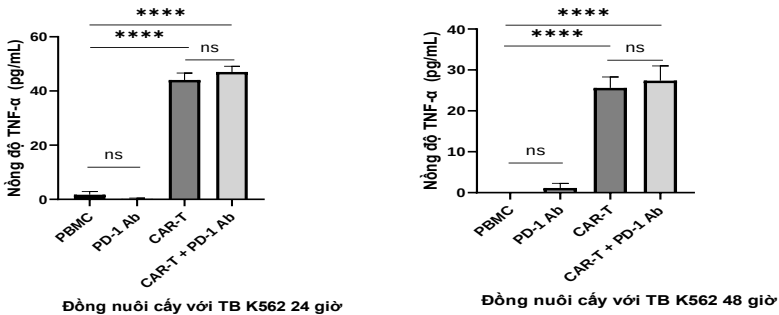
Hình 3.30. So sánh khả năng bài tiết IL-2 của TB CAR-T kết hợp PD-1 Ab đồng nuôi cấy với TB ung thư bạch cầu sau 24 và 48 giờ

Hình 3.30 cho thấy nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy tế bào CAR-T kết hợp PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với các tế bào Raji và Daudi ở cả thời điểm 24 và 48 giờ đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với khi đồng nuôi cấy với tế bào CD19- (K562) ($p < 0,0001$).



Hình 3.31. So sánh khả năng bài tiết cytokin TNF- α khi đồng nuôi cấy với TB Daudi ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ

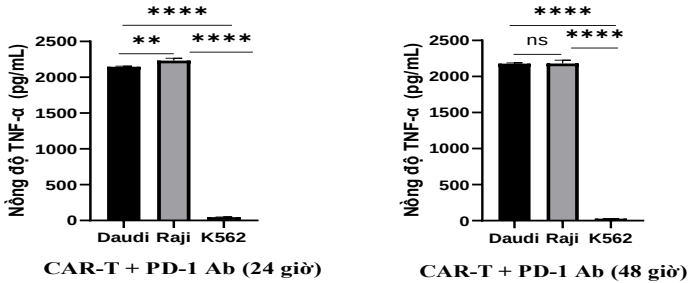
Sau cả hai thời điểm 24 và 48 giờ kết quả cho thấy nồng độ TNF- α trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với tế bào Daudi đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nồng độ TNF- α trong dịch nuôi cấy của nhóm chứng tế bào PBMC.



Hình 3. 33. So sánh khả năng bài tiết cytokin TNF- α khi đồng nuôi cấy với TB K562 ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ

Nồng độ TNF- α trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với tế bào K562 tại cả hai thời điểm đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nồng độ TNF- α trong dịch nuôi cấy của nhóm chứng PBMC.

* Cả hai thời điểm 24 và 48 giờ nồng độ các cytokin IL-2, IL-6, TNF- α của nhóm CAR-T và CAR-T kết hợp PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với cả ba dòng tế bào ung thư bạch cầu đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).



Hình 3. 35. So sánh khả năng bài tiết TNF- α của TB CAR-T kết hợp PD-1 Ab đồng nuôi cấy với TB ung thư bạch cầu sau 24 và 48 giờ

Nồng độ TNF- α ở nhóm tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với tế bào ung thư CD19+ (Raji và Daudi) ở cả thời điểm 24 và 48 giờ đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,0001$) so với khi đồng nuôi cấy với tế bào CD19- (K562).

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. CHẤT LƯỢNG KHỐI TẾ BÀO CAR-T VÀ TÍNH AN TOÀN CỦA KHỐI TẾ BÀO CAR-T PHỐI HỢP VỚI PD-1 AB

4.1.1. Chất lượng của tế bào CAR-T và CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi về môi trường tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp PD-1 Ab đều có nồng độ nội độc tố $< 0,1$ EU/ml, không nhiễm vi khuẩn kỵ khí, hiếu khí. Điều này cho thấy quy trình nuôi cấy và thí nghiệm trong phòng thí nghiệm của chúng tôi đảm bảo tiêu chuẩn và thực hiện đúng kỹ thuật.

Đánh giá tỷ lệ biểu hiện của tế bào CAR- T bằng kỹ thuật Flow cytometry thấy khoảng 26,13% tế bào T có biểu hiện CAR trên bề mặt của chúng và biểu hiện của các cặp môi trong thiết kế plasmid chuyển nạp vào tế bào T bằng kỹ thuật Raeltime PCR cho thấy mẫu tế bào CAR-T biểu hiện gen CAR ở tất cả các cặp môi.

4.1.2. Tính an toàn của khối tế bào CAR-T và CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên thực nghiệm

Sau tiêm, tiến hành theo dõi chuột hàng ngày trong 4 tuần thấy 100% số chuột ở các nhóm đều ăn uống, vận động bình thường, nhanh nhẹn, lông mượt, mắt trong, hậu môn khô, không biểu hiện đi lỏng. Tỷ lệ chuột sống ở 4 nhóm là 100% cho đến ngày cuối cùng của thí nghiệm. Trọng lượng chuột tại các thời điểm ngày 0, ngày 7, ngày 14, ngày 21 và ngày 28 ở các nhóm điều trị CAR-T, PD-1 Ab và CAR-T kết hợp PD-1 Ab tương tự như ở nhóm chứng.

Các kết quả nghiên cứu của chúng tôi khi tiến hành xét nghiệm đánh giá các chỉ số huyết học, chức năng gan thận, mô bệnh học gan thận, nồng độ các cytokin IL-2, IL-6 đều thấy các nhóm sử dụng CAR-T, PD-1 Ab và CAR-T kết hợp PD-1 Ab đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng. Sử dụng phối hợp CAR-T và PD-1 Ab gây tăng cao nồng độ TNF- α so với các nhóm chứng và điều trị đơn liệu pháp tế bào CAR-T, PD-1 Ab. Kết quả gợi ý về nguy cơ xảy ra hội chứng giải phóng cytokin quá mức khi ứng dụng liệu pháp kết hợp CAR-T và PD-1 Ab. Tuy nhiên, sau quá trình theo dõi chuột 4 tuần thì toàn bộ chuột vẫn ăn uống, hoạt động bình thường, khỏe mạnh đến thời điểm kết thúc thí nghiệm.

Do vậy, nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tế bào CAR-T với nồng độ 10^6 TB/chuột và tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 liều 250 μ g/chuột không gây tác dụng phụ trên động vật thực nghiệm sau 4 tuần theo dõi.

4.2. TÁC DỤNG KHÁNG TẾ BÀO DÒNG UNG THƯ BẠCH CẦU CỦA KHỐI TẾ BÀO CAR-T PHỐI HỢP VỚI PD-1 AB

4.2.1. Đánh giá tác dụng ly giải tế bào *in vitro*

Kết quả cho thấy tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp PD-1 Ab thể hiện khả năng ly giải tốt đối với tế bào Daudi CD19+, tỷ lệ ly giải của 2 nhóm này cao hơn so với nhóm tế bào PBMC. Tế bào CAR-T trong nghiên cứu của chúng tôi có khả năng nhắm đích kháng nguyên CD19, liên kết với tế bào thông qua thụ thể này và gây ly giải rõ các tế bào ung thư có biểu hiện CD19+ là tế bào Daudi. Khả năng ly giải của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab cũng tăng theo sự tăng của tỷ lệ CAR-T khi được đồng nuôi cấy với tế bào ung thư. Điều này cho thấy tế bào CAR-T được tạo ra trong nghiên cứu này có tác dụng ly giải tế bào ung thư và đặc biệt là có tính chọn lọc với tế bào ung thư CD19+ đúng như cơ chế tác dụng của nó. Kết quả này là phù hợp với thiết kế của thí nghiệm và cũng tương tự như các nghiên cứu khác khi tạo ra tế bào CAR-T để tiêu diệt tế bào ung thư CD19+.

Tương tự với tế bào Raji CD19+ kết quả cũng cho thấy tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp PD-1 Ab thể hiện khả năng ly giải tương đối tốt với tế bào Raji, tỷ lệ ly giải của 2 nhóm này cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm tế bào PBMC. Khả năng ly giải của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp PD-1 Ab cũng tăng theo sự tăng tỷ lệ CAR-T khi đồng nuôi cấy với tế bào ung thư. Mặc dù tỷ lệ ly giải thấp hơn so với tế bào Daudi, tuy nhiên nhóm kết hợp CAR-T với PD-1 Ab, có xu hướng tăng hiệu quả ly giải rõ rệt khi tăng tỷ lệ CAR-T/Raji. Với tỷ lệ Raji/CAR-T = 1:10, hiệu quả ly giải tăng từ 24,2% lên 44,11%, tương đương tăng hiệu quả 1,82 lần. Như vậy, kết hợp PD-1 Ab với CAR-T làm tăng hiệu quả ly giải tế bào Raji.

Để chứng minh hiệu quả tác dụng của tế bào CAR-T CD19 theo đúng cơ chế có tính chọn lọc với tế bào ung thư CD19+ chúng tôi tiến hành đánh giá tác dụng ly giải tế bào K562 CD19-. Đối với tỷ lệ K562/CAR-T 1:2 và 1:5, CAR-T và CAR-T kết hợp PD-1 Ab có tác dụng ly giải tế bào tốt hơn PBMC nhưng đều ở mức thấp. Với tỷ lệ K562/CAR-T = 1:10, kết quả cho thấy tỷ lệ tế bào K562 CD19- bị ly giải khi đồng nuôi cấy với PBMC 27,52%, CAR-T 27,67% và CAR-T kết hợp PD-1 Ab 28,59% là tương đồng nhau. Như vậy có thể thấy đối với tế bào K562 CD19- tế bào CAR-T CD19 trong nghiên cứu của chúng tôi chưa thể hiện rõ khả năng ly giải. Khả năng ly giải tương đương với tế bào PBMC ở tỷ lệ 1:10. Đối với tỷ lệ K562/CAR-T = 1:2 và 1:5, CAR-T và CAR-T kết hợp PD-1 Ab có tác dụng ly giải tế bào tốt hơn PBMC tuy nhiên đều ở mức thấp.

Những kết quả trên của chúng tôi cho thấy phù hợp với cơ chế tác dụng của tế bào CAR-T CD19. Bước đầu chúng tôi thấy liệu pháp CAR-T kết hợp PD-1 Ab làm tăng 1,82 lần hiệu quả ly giải trên tế bào Raji ở tỷ lệ T:E = 1:10.

4.2.2. Thay đổi nồng độ cytokin được giải phóng ở môi trường nuôi cấy tế bào

Nồng độ của IL-6 trong dịch đồng nuôi cấy PBMC với các tế bào ung thư bạch cầu CD19+ sau 24 và 48 giờ là tương đương nhau. Ngược lại, nồng độ IL-6 cao hơn đáng kể trong dịch đồng nuôi cấy tế bào PBMC và tế bào K562 có CD19-. Điều này gợi ý về khả năng tiết IL-6 cao hơn ở tế bào K562 có CD19- so với tế bào Raji và Daudi có CD19+. Kết quả của chúng tôi phù hợp trên tế bào K562 có CD19- rằng, đồng nuôi cấy có bổ sung PD-1 Ab làm tăng nồng độ IL-6. Ngược lại, giảm nồng độ IL-6 ở tế bào CD19+ (Daudi và Raji). Đây là phát hiện mới, gợi ý về sự liên quan chưa được báo cáo giữa biểu hiện CD19 và sự tương tác của giữa tín hiệu IL-6 và PD-1.

Kết quả nghiên cứu này chỉ ra nồng độ IL-2 cao hơn khi đồng nuôi cấy PBMC với tế bào K562 và Raji, so với tế bào Daudi. Bên cạnh đó, ở tế bào CD19+ là Daudi và Raji, khi đồng nuôi cấy với CAR-T và CAR-T kết hợp PD-1 Ab, nồng độ IL-2 tăng lên so với nhóm PBMC ở cả thời điểm 24 và 48h. Ngược lại, ở tế bào K562 có CD19-, sự khác biệt không rõ giữa nhóm CAR-T và CAR-T kết hợp PD-1 Ab so với nhóm chứng PBMC. Như vậy, nồng độ IL-2 tăng lên khi có sự tương tác giữa CAR-T mang thụ thể CD19 và kháng nguyên CD19 trên bề mặt tế bào ung thư bạch cầu đích (tế bào Daudi và Raji). Nguyên nhân có thể cho sự thay đổi không rõ nồng độ IL-2 ở tế bào K562, là thiếu sự tương tác đích của thụ thể khả năng và kháng nguyên đích trên tế bào K562. Điều này được thể hiện, khi đồng nuôi cấy tế bào CAR-T và tế bào CAR-T kết hợp PD-1 Ab, tế bào CD19+ có nồng độ IL-2 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với tế bào CD19-. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy nồng độ IL-2 tăng lên đáng kể khi đồng nuôi cấy tế bào ung thư bạch cầu CD19+ với CAR-T CD19, nghi do có sự tương tác đặc hiệu giữa thụ thể CD19 trên CAR-T và kháng nguyên CD19 trên tế bào đích. Tác dụng này thể hiện không đáng kể ở tế bào CD19-.

Nồng độ TNF- α trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với các tế bào ung thư bạch cầu Daudi và Raji có CD19+ đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với tế bào PBMC và đồng nuôi cấy với tế bào K562 CD19-. Kết quả này phù hợp với các báo cáo trước đây về sự tăng nồng độ TNF- α sau liệu pháp tế bào CAR-T và cơ chế tác dụng của liệu pháp tế bào CAR-T CD19 đặc hiệu trên tế bào CD19+. Kết quả này gợi ý cho thấy khi điều trị kết hợp trên tế bào CD19+ có sự tương tác kích thích làm tăng khả năng bài tiết TNF- α của tế bào CAR-T.

KẾT LUẬN

1. Tính an toàn của khối tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên thực nghiệm

* Chất lượng của tế bào CAR-T:

- Môi trường nuôi tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab đảm bảo tiêu chuẩn về nồng độ nội độc tố, không nhiễm khuẩn.

- Tỷ lệ biểu hiện của CAR trên bề mặt tế bào T được phân tích bằng phương pháp tế bào dòng chảy là 26,13% và kỹ thuật Realtime PCR cho thấy CAR biểu hiện trên các tế bào T được chuyển nạp.

* Tính an toàn của tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên động vật thực nghiệm

Tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab không ảnh hưởng lên sự sống sót, cân nặng, chức năng tạo máu, chức năng gan, chức năng thận và mô bệnh học gan, thận của động vật thí nghiệm sau 4 tuần theo dõi.

2. Tác dụng kháng tế bào dòng ung thư bạch cầu của khối tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên thực nghiệm

- Tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab có khả năng ly giải các dòng tế bào ung thư có CD19+ (Daudi, Raji) cao hơn so với tế bào PBMC nhóm chứng ($p < 0,05$).

- Liệu pháp CAR-T kết hợp PD-1 Ab làm tăng 1,82 lần hiệu quả ly giải trên tế bào Raji ở tỷ lệ T:E = 1:10 ($p < 0,001$).

- Không có sự khác biệt tỷ lệ ly giải tế bào ung thư Daudi CD19+ khi đồng nuôi cấy với tế bào CAR-T và kết hợp CAR-T với PD-1 Ab ($p > 0,05$).

- Nồng độ cytokin IL-2, TNF- α trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR- T kết hợp với PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với các tế bào ung thư có CD19+ đều cao hơn so với khi đồng nuôi cấy với tế bào CD19-. Không thấy có sự khác biệt về các nồng độ IL-6, IL-2 và TNF- α ở nhóm đồng nuôi cấy cùng tế bào CAR-T và kết hợp CAR-T với PD-1 Ab với $p > 0,05$.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI LUẬN ÁN**

1. **Nguyen Hien Hanh**, Bui Khac Cuong, Nguyen Thi Mai Ly, Pham Chi, Nham Thi Phuong Linh, Ngo Thu Hang, Ho Viet Hoanh, Ta Viet Hung, Przemyslaw Bozko, Nguyen Linh Toan, Can Van Mao (2023). The safety of CAR-T cells and PD-1 antibody combination on an experimental model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 649: 25-31.
2. **Nguyễn Thị Hiền Hạnh**, Cấn Văn Mão, Bùi Khắc Cường (2023). Đặc điểm một số chỉ số bạch cầu và nồng độ IL-6 sau điều trị bằng liệu pháp tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể đơn dòng ức chế PD-1 trên thực nghiệm. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 530(1): 111-115.
3. **Nguyễn Thị Hiền Hạnh**, Cấn Văn Mão, Ngô Thu Hằng, Đặng Thùy Linh, Bùi Khắc Cường (2024). Đánh giá khả năng ly giải các dòng tế bào ung thư CD19(+) của liệu pháp điều trị kết hợp tế bào CAR-T với kháng thể đơn dòng ức chế PD-1 trên thực nghiệm. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 535(1B): 265-269.
4. **Nguyễn Thị Hiền Hạnh**, Cấn Văn Mão, Bùi Khắc Cường (2024). Khảo sát nồng độ TNF- α và mối tương quan với các chỉ số bạch cầu trên chuột điều trị kết hợp ức chế PD-1 và tế bào CAR-T. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, 175(2): 164-171.