

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



ĐẶNG THỊ THU HẰNG

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG QUY TRÌNH
THU THẬP, XỬ LÝ, BẢO QUẢN TẾ BÀO GỐC
MÁU DÂY RÓN CỘNG ĐỒNG**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



ĐẶNG THỊ THU HẰNG

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG QUY TRÌNH
THU THẬP, XỬ LÝ, BẢO QUẢN TẾ BÀO GÓC
MÁU DÂY RÓN CỘNG ĐỒNG**

Chuyên ngành : Huyết học – Truyền máu

Mã số : 62720151

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. GS.TS. NGUYỄN ANH TRÍ

2. TS. BS. TRẦN NGỌC QUẾ

HÀ NỘI - 2020

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình học tập và hoàn thành luận án, tôi đã nhận được nhiều sự hướng dẫn chỉ bảo tận tình, tâm huyết, trách nhiệm và những sự động viên nhiệt tình từ các Thầy, Cô, các anh chị bác sĩ, cử nhân kỹ thuật, kỹ thuật viên, điều dưỡng viên, bạn bè và gia đình, đặc biệt những những sản phụ hiến tế bào gốc máu dây rốn đã cho tôi những số liệu quý giá. Với tình cảm và sự biết ơn sâu sắc, tôi xin kính gửi lời cảm ơn chân thành đến:

- Đảng ủy, Ban Giám hiệu, Phòng Quản lý Đào tạo Sau đại học, Bộ môn Huyết học - Truyền máu, Trường Đại học Y Hà Nội đã đào tạo, dạy dỗ và giúp đỡ để tôi hoàn thành chương trình học tập và luận án Tiến sĩ;

- Đảng ủy, Ban Lãnh đạo Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương, các khoa/phòng của Viện đã ủng hộ và tạo mọi điều kiện cho tôi trong quá trình công tác, học tập và thực hiện đề tài nghiên cứu.

- Đảng ủy, Ban Giám hiệu Trường Đại học Y Dược Thái Bình, Bộ môn Huyết học Truyền máu, Khoa Huyết học trường Đại học Y Dược Thái Bình, đã ủng hộ và tạo mọi điều kiện cho tôi trong quá trình công tác, học tập và thực hiện đề tài nghiên cứu.

- Đảng ủy, Ban Lãnh đạo Viện Phụ sản Hà Nội, đặc biệt khoa C3 đã thu thập mẫu máu dây rốn, tạo điều kiện cho tôi trong quá trình công tác, học tập và thực hiện đề tài nghiên cứu.

- Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, em xin chân thành cảm ơn GS.TS. Nguyễn Anh Trí – Nguyên Viện trưởng Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương. Thầy đã tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất ngay từ khi em bắt đầu nhận đề tài. Thầy luôn tâm huyết, tận tình chỉ bảo, truyền đạt cho em những kiến thức cũng như phương pháp làm việc và những sáng tạo trong nghiên cứu khoa học vô cùng quý giá. Thầy luôn động viên và tạo điều kiện tốt nhất cho em trong suốt quá trình thực hiện luận án.

- Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, em xin chân thành cảm ơn TS. Trần Ngọc Quế - Giám đốc Ngân hàng Tế bào gốc, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương, người Thầy đã hướng dẫn giúp đỡ và dìu dắt em từ khi bắt đầu thực hiện luận án. Thầy luôn tạo mọi điều kiện, luôn động viên, khích lệ,

chỉ bảo tỉ mỉ, tận tình, giảng dạy những kiến thức chuyên sâu trong lĩnh vực nghiên cứu và định hướng trong quá trình nghiên cứu để em tự tin hoàn thành luận án.

- Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, em xin chân thành cảm ơn GS.TS. Phạm Quang Vinh – Nguyên Chủ nhiệm Bộ môn Huyết học - Truyền máu, Trường Đại học Y Hà Nội, người Thầy đã dìu dắt em từ khi em thực hiện luận văn thạc sĩ. Thầy luôn động viên, giúp đỡ để em có được những kiến thức giá trị, định hướng nghiên cứu, tạo điều kiện và đóng góp những ý kiến rất quý báu cho em trong suốt thời gian học tập và thực hiện nghiên cứu này.

- Tôi xin chân thành cảm ơn các bác sĩ, các anh chị em cử nhân, điều dưỡng... làm việc tại Ngân hàng Tế bào gốc, Viện Huyết học Truyền máu – Trung ương, những người luôn sát cánh, động viên, giúp đỡ tôi nhiệt tình. Nơi đây như cơ quan làm việc thứ 2 trong cuộc đời tôi.

- Tôi gửi lòng biết ơn sâu sắc tới những sản phụ và thai nhi đã hiến tặng các mẫu máu quý giá để tôi thực hiện thành công đề tài.

Xin được cảm ơn chân thành nhất tới các anh, chị, em đồng nghiệp và bạn bè đã tạo mọi điều kiện giúp đỡ, luôn quan tâm, động viên, chia sẻ, thường xuyên khích lệ tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Nhân dịp này, Con xin được tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới Cha, Mẹ, xin được trân trọng cảm ơn các anh, các chị, các em và những người thân trong gia đình, trong họ tộc Nội, Ngoại đã luôn động viên, cổ vũ để con học tập, phấn đấu và trưởng thành trong cuộc sống và sự nghiệp. Cảm ơn Chồng và hai con thân yêu đã hy sinh rất nhiều cả tâm, sức, thời gian, tiền bạc và là nguồn sức mạnh thôi thúc để tôi phấn đấu vươn lên, chuyên tâm học tập và nghiên cứu.

Xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày 2 tháng 12 năm 2020

Học viên

Đặng Thị Thu Hằng

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Đặng Thị Thu Hằng nghiên cứu sinh khóa 35 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Huyết học và Truyền máu, xin cam đoan:

1. Đây là công trình nghiên cứu do tôi tham gia và trực tiếp thu thập số liệu, thực hiện dưới sự hướng dẫn của Thầy Nguyễn Anh Trí và Thầy Trần Ngọc Quế

2. Luận án này không trùng lặp với bất kỳ luận án nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.

3. Các số liệu và thông tin trong luận án là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được thông qua hội đồng đạo đức trường Đại học Y Hà Nội và có xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

Hà Nội, ngày 2 tháng 12 năm 2020

Tác giả luận án

Đặng Thị Thu Hằng

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Ý nghĩa	
AT	Adipose tissue	Mô mỡ
BM	Bone marrow	Tủy xương
BFU-E	Burst Forming Unit - Erythrocyte	Đơn vị tạo cụm hồng cầu lớn
CD	Cluster of differentiation antigens	Kháng nguyên biệt hóa
CFU-E	Colony Forming Unit - Erythrocyte	Đơn vị tạo cụm hồng cầu nhỏ
CFU-GEMM	Colony forming unit-granulocyte/erythrocyte/monocyte/megakaryocyte	Đơn vị tạo cụm hỗn hợp
CFU-GM	Colony Forming Unit - Granulocyte/Macrophage	Đơn vị tạo cụm dòng hạt-đại thực bào
CIBMTR	Center for International Blood and Marrow Transplant Research	Trung tâm nghiên cứu về máu và ghép tủy thế giới
CMV	Cytomegalovirus	Virus Cytomegalo
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4	Receptor loại 4 của C-X-C
FHCRC	The Fred Hutchinson Cancer Research Center	Trung tâm nghiên cứu ung thư Fred Hutchinson
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor	Yếu tố tăng trưởng bạch cầu hạt
GVHD	Graft versus host disease	Bệnh ghép chống chủ
HBV	Hepatitis B virus	virus viêm gan B
HGB	Hemoglobin	Huyết sắc tố
HCV	Hepatitis C virus	Virus viêm gan C
HES	Hydroxyethyl Starch	Dung dịch cao phân tử

HIV	Human immunodeficiency virus	Virus gây suy giảm miễn dịch ở người
HLA	Human leukocyte antigen	Kháng nguyên bạch cầu người
JMDP	The Japan Marrow Donor Program	Chương trình hiến tủy của Nhật Bản
KN		Kháng nguyên
KT		Kháng thể
MCV	Mean corpuscular volume	Thể tích trung bình hồng cầu
MDR	Umbilical cord blood	Máu dây rốn
MPB	Mobilized peripheral blood	Máu ngoại vi sau huy động
MSC	Mesenchymal stem cell	Tế bào gốc trung mô
NK	Natural killer	Tế bào diệt tự nhiên
NMDP	United States National Marrow Donor Program	Chương trình hiến tủy quốc gia Hoa Kỳ
TB		Tế bào
TBCN		Tế bào có nhân
TBG		Tế bào gốc
XN		Xét nghiệm

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	3
1.1. Đặc điểm của dây rốn, bánh rau và tế bào gốc máu dây rốn	3
1.1.1. Đặc điểm của dây rốn và bánh rau.....	3
1.1.2. Đặc điểm của tế bào gốc máu dây rốn	4
1.2. Tạo nguồn tế bào gốc từ máu dây rốn.....	11
1.2.1. Quy trình thu thập, xử lý và bảo quản máu dây rốn	11
1.2.2. Các loại hình ngân hàng máu dây rốn.....	14
1.2.3. Tìm kiếm tế bào gốc máu dây rốn cho ghép.....	17
1.3. Ứng dụng nguồn tế bào gốc từ máu dây rốn.....	23
1.3.1. Ứng dụng ghép máu dây rốn trong các bệnh lý huyết học	23
1.3.2. Ứng dụng của TBG máu dây rốn trong y học tái tạo.....	24
1.3.3. Một số hình thức ghép tế bào gốc máu dây rốn trong điều trị bệnh lý	25
1.4. Tình hình nghiên cứu tế bào gốc máu dây rốn trong và ngoài nước	28
1.4.1. Tình hình nghiên cứu tế bào gốc máu dây rốn trên thế giới	28
1.4.2. Tình hình nghiên cứu tế bào gốc máu dây rốn tại Việt Nam.....	32
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	37
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	37
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	38
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu.....	38
2.2.2. Quy trình nghiên cứu	38
2.2.3. Các xét nghiệm thực hiện.....	41
2.2.4. Các biến số nghiên cứu	44
2.3. Phương tiện, vật liệu và các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu	45
2.3.1. Các trang thiết bị	45
2.3.2. Vật liệu nghiên cứu	46

2.3.3. Hóa chất, sinh phẩm.....	46
2.4. Các kỹ thuật thực hiện trong nghiên cứu	47
2.4.1. Quy trình thu thập máu dây rốn	47
2.4.2. Quy trình xử lý máu dây rốn bằng đũa lắng có HES ly tâm 1 lần.....	48
2.4.3. Quy trình bảo quản khối tế bào gốc sau xử lý bằng nitơ lỏng	49
2.4.4. Quy trình đếm CD34 bằng máy Beckman Coulter FC500.....	50
2.4.5. Quy trình xét nghiệm HLA bằng kỹ thuật PCR-SSO.....	51
2.4.6. Quy trình nuôi cấy tạo cụm tế bào	52
2.4.7. Quy trình rã đông đơn vị tế bào gốc	53
2.5. Địa điểm nghiên cứu	54
2.6. Xử lý số liệu	54
2.7. Đạo đức nghiên cứu	55
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	57
3.1. Một số đặc điểm sản phụ và thai nhi của các đơn vị MDR được bảo quản...	57
3.2. Kết quả thu thập, xử lý, bảo quản máu dây rốn cộng đồng	59
3.2.1. Kết quả thu thập máu dây rốn	59
3.2.2. Kết quả xử lý và bảo quản.....	62
3.3. Một số yếu tố liên quan đến chất lượng và khả năng sử dụng đơn vị TBG MDR cộng đồng	66
3.3.1. Một số yếu tố liên quan đến chất lượng đơn vị TBG MDR cộng đồng.....	66
3.3.2. Khả năng sử dụng đơn vị TBG MDR cộng đồng	81
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN	89
4.1. Một số đặc điểm sản phụ và thai nhi của các đơn vị MDR được lựa chọn ...	89
4.2. Kết quả thu thập, xử lý, bảo quản máu dây rốn cộng đồng	93
4.2.1. Kết quả thu thập máu dây rốn	93
4.2.2. Kết quả xử lý và bảo quản.....	98
4.3. Một số yếu tố liên quan đến chất lượng và khả năng sử dụng đơn vị TBG MDR cộng đồng	109

4.3.1. Một số yếu tố liên quan đến chất lượng đơn vị TBG MDR cộng đồng....	109
4.3.2. Khả năng sử dụng đơn vị TBG MDR cộng đồng	115
KẾT LUẬN	122
KIẾN NGHỊ	125
DANH DÁCH CÁC BÀI BÁO VÀ CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN	
ĐẾN NỘI DUNG LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC 1	
PHỤ LỤC 2	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1. Một số đặc điểm sản phụ của TBG MDR được lưu trữ	57
Bảng 3.2. Phân bố dân tộc của sản phụ	57
Bảng 3.3. Hình thức sinh của sản phụ	57
Bảng 3.4. Một số đặc điểm thai nhi của TBG MDR lưu trữ	58
Bảng 3.5. Tỷ lệ theo giới tính trẻ sơ sinh	58
Bảng 3.6. Một số đặc điểm dây rốn, bánh rau	58
Bảng 3.7. Kết quả chung thu thập, xử lý MDR cộng đồng.....	59
Bảng 3.8. Nguyên nhân loại túi máu dây rốn sau thu thập	59
Bảng 3.9. Nguyên nhân loại đơn vị tế bào gốc sau xử lý	60
Bảng 3.10. Một số đặc điểm của mẫu máu dây rốn trước xử lý	60
Bảng 3.11. Tỷ lệ thể tích máu dây rốn trước xử lý	61
Bảng 3.12. Đặc điểm tế bào bạch cầu trong túi máu dây rốn trước xử lý	61
Bảng 3.13. Đặc điểm hồng cầu và tiểu cầu trong túi máu dây rốn trước xử lý	61
Bảng 3.14. Một số thông số đơn vị TBG lưu trữ	62
Bảng 3.15. Tỷ lệ trung bình các thành phần loại bỏ sau ly tâm	62
Bảng 3.16. Thành phần tế bào máu trong túi TBG lưu trữ	63
Bảng 3.17. Tỷ lệ nhóm máu đơn vị tế bào gốc lưu trữ	63
Bảng 3.18. Đặc điểm thành phần huyết sắc tố đơn vị TBG MDR lưu trữ	64
Bảng 3.19. Đặc điểm tế bào máu của đơn vị TBG MDR trước và sau rã đông.....	64
Bảng 3.20. Thành phần tế bào trong đơn vị TBG MDR trước và sau rã đông	65
Bảng 3.21. Kết quả cấy cụm sau bảo quản đông lạnh	65
Bảng 3.22. Liên quan giữa một số yếu tố của mẹ với thể tích mẫu máu dây rốn ..	66
Bảng 3.23. Liên quan giữa một số yếu tố thai nhi với thể tích MDR	67
Bảng 3.24. Liên quan giữa một số yếu tố mẹ với tổng số TBCN.....	68
Bảng 3.25. Liên quan giữa một số yếu tố của thai nhi với tổng số TBCN	69
Bảng 3.26. Liên quan giữa một số yếu tố mẹ với TB CD34	70
Bảng 3.27. Liên quan giữa một số yếu tố của trẻ với TB CD34	71

Bảng 3.28. Tỷ lệ các alen HLA ở mức độ phân giải thấp của từng locus	81
Bảng 3.29. Tỷ lệ các alen HLA-A của mẫu nghiên cứu	82
Bảng 3.30. Tỷ lệ các alen HLA-B của mẫu nghiên cứu	83
Bảng 3.31. Tỷ lệ các alen HLA-DR của mẫu nghiên cứu	84
Bảng 3.32. Đặc điểm của bệnh nhân tìm kiếm	87
Bảng 3.33. Tỷ lệ bệnh nhân tìm kiếm theo bệnh	87
Bảng 3.34. Tỷ lệ bệnh nhân tìm thấy đơn vị TBG MDR hòa hợp HLA	87
Bảng 3.35. Liều tế bào tìm kiếm được tương ứng với các mức hòa hợp	88
Bảng 3.36. Số đơn vị TBG MDR đã ghép.....	88
Bảng 4.1. So sánh thể tích máu dây rốn trong nghiên cứu với một số tác giả trong và ngoài nước	96
Bảng 4.2. So sánh tổng số tế bào có nhân với một số nghiên cứu trong và ngoài nước.....	97
Bảng 4.3. So sánh chỉ số hồng cầu trong nghiên cứu với nghiên cứu của Nelida I Noguera.....	98
Bảng 4.4. So sánh hiệu suất xử lý trong nghiên cứu với một số nghiên cứu khác	100

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1. Số lần sinh của sản phụ	58
Biểu đồ 3.2. Liên quan giữa thể tích máu dây rốn và tuổi sản phụ	66
Biểu đồ 3.3. Liên quan thể tích máu dây rốn và trọng lượng thai	67
Biểu đồ 3.4. Liên quan giữa số lượng TBCN và thể tích MDR trước xử lý ..	72
Biểu đồ 3.5. Liên quan giữa số lượng TB CD34 và thể tích MDR	72
Biểu đồ 3.6. Liên quan giữa hiệu suất xử lý và thể tích MDR thu được	73
Biểu đồ 3.7. Liên quan giữa hiệu suất xử lý và số lượng TBCN	73
Biểu đồ 3.8. Liên quan giữa hiệu suất xử lý và hematocrit	74
Biểu đồ 3.9. Liên quan giữa hiệu suất xử lý và thời gian lưu trước xử lý	74
Biểu đồ 3.10. Liên quan giữa hiệu suất xử lý và thời gian xử lý	75
Biểu đồ 3.11. Liên quan giữa TB CD34 sống và thời gian chờ xử lý	75
Biểu đồ 3.12. Liên quan giữa TB CD34 sống và thời gian xử lý	76
Biểu đồ 3.13. Liên quan giữa tỷ lệ TB CD34 sống và số lượng TBCN	76
Biểu đồ 3.14. Liên quan giữa TB CD34 và cụm sau rã đông	77
Biểu đồ 3.15. Liên quan giữa số lượng TBCN và cụm sau rã đông	77
Biểu đồ 3.16. Mọi liên quan giữa thời gian bảo quản và CFU-E	78
Biểu đồ 3.17. Mọi liên quan giữa thời gian bảo quản và BFU-E	78
Biểu đồ 3.18. Mọi liên quan giữa thời gian bảo quản và CFU-GM	79
Biểu đồ 3.19. Mọi liên quan giữa thời gian bảo quản và CFU-GEMM	79
Biểu đồ 3.20. Mọi liên quan giữa thời gian bảo quản và tổng số cụm	80
Biểu đồ 3.21. Mọi liên quan giữa thời gian bảo quản và tỷ lệ sống	80
Biểu đồ 3.22. Xác xuất tìm kiếm ít nhất 1 đơn vị TBG MDR hòa hợp HLA theo các cỡ mẫu lưu trữ.....	85
Biểu đồ 3.23. Khả năng tìm kiếm đơn vị TBG MDR theo liều TBCN tối thiểu 2 x 10 ⁷ /kg	86
Biểu đồ 3.24. Khả năng tìm kiếm TBG MDR theo liều CD34 tối thiểu 1 x 10 ⁵ /kg	86
Biểu đồ 4.1. Tần suất gặp các alen HLA-A, B, DR trong nghiên cứu và tác giả trong nước	116

DANH MỤC HÌNH, SƠ ĐỒ

Hình 1.1. Rau thai và dây rốn chụp ngay sau khi sinh.....	4
Hình 1.2. Tế bào gốc có trong máu dây rốn.....	4
Hình 1.3. Khả năng tự tái tạo và biệt hóa đa dòng của TBG MDR.....	5
Hình 1.4. Kháng nguyên bề mặt của tế bào gốc tạo máu dây rốn	9
Hình 1.5. Thu thập máu dây rốn trước sổ rau	12
Hình 1.6. Quá trình xử lý máu dây rốn bằng phương pháp thủ công	13
Hình 2.1. Các bước hạ nhiệt độ theo quy trình định sẵn.....	40
Hình 2.2. Bước để lắng sau khi thêm dung dịch HES	49
Hình 2.3. Một số loại cụm phổ biến tạo thành sau quá trình nuôi cấy trên môi trường methocult.....	53
Sơ đồ 2.1. Quy trình xử lý và xét nghiệm máu dây rốn.....	43
Sơ đồ 2.2. Sơ đồ nghiên cứu	56

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ghép tế bào gốc (TBG) tạo máu đồng loài là phương pháp ngày càng được sử dụng trong điều trị các bệnh máu. Phương pháp này nhiều khi đã trở thành cứu cánh cuối cùng và hiệu quả cho bệnh nhân mắc bệnh hiểm nghèo [1]. Trong ghép TBG tạo máu, thành công của cuộc ghép phần lớn phụ thuộc vào sự phù hợp HLA giữa người cho và người nhận. Nguồn người hiến trưởng thành là anh chị em cùng huyết thống là lựa chọn hàng đầu. Tuy nhiên, nguồn này chỉ đáp ứng được phần nhỏ nhu cầu. Phần lớn người bệnh không có nguồn người cho phù hợp [2].

Tại một số nước như Singapore, Australia... người ta đã huy động và sử dụng ngân hàng người cho TBG qua đó có thể lựa chọn được người cho không cùng huyết thống hòa hợp HLA. Tuy nhiên đến thời điểm này nhiều nước trên thế giới trong đó có Việt Nam chưa thực hiện được. Do đó nguồn TBG máu dây rốn (MDR) đã sử dụng thay thế cho nguồn người hiến trưởng thành. MDR có thể cung cấp TBG và có ưu điểm không cần hòa hợp toàn bộ hệ HLA cho cuộc ghép. Tuy nhiên hạn chế lớn nhất là số lượng TBG trong MDR không nhiều, chỉ có một tỷ lệ đơn vị TBG MDR có thể đủ số lượng cho ghép đồng loài người trưởng thành [3].

Ở Việt Nam đã có nhiều ngân hàng TBG MDR nhưng là ngân hàng tư nhân như Ngân hàng của Bệnh viện Truyền máu – Huyết học Thành phố Hồ Chí Minh, Bệnh viện Nhi trung ương, Bệnh viện Vinmec, MekoStem của Dược phẩm Trung ương 2 (MekoPhar)... Đó là các ngân hàng thu thập, xử lý, lưu trữ MDR theo yêu cầu người gửi và chỉ để dùng cho cá nhân họ, không có khả năng sử dụng cho cộng đồng. Từ năm 2014, Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương đã triển khai xây dựng ngân hàng TBG MDR cộng đồng. Tại đây diễn ra quá trình lựa chọn, xử lý và đưa vào bảo quản những đơn vị TBG MDR của những người tình nguyện hiến tặng. Những đơn vị TBG này

được lựa chọn từ nguồn người hiến, từ kết quả của các bước xử lý, bảo quản và được thực hiện các xét nghiệm đảm bảo chất lượng, xét nghiệm định danh trong đó có xét nghiệm HLA. Qua mỗi bước sẽ lựa chọn và chỉ giữ lại các đơn vị có thông số tốt nhằm tạo một ngân hàng lưu trữ các đơn vị TBG có chất lượng, có thông tin miễn dịch để có thể cung cấp bất kỳ người bệnh nào có nhu cầu ghép và bất kỳ thời điểm nào có yêu cầu.

Việc lựa chọn qua nhiều bước để tạo nên đơn vị TBG có chất lượng, việc xét nghiệm HLA để có thông tin miễn dịch đã tạo ra một ngân hàng có hàng ngàn đơn vị TBG đã giải quyết được khó khăn trong tìm người nguồn TBG hòa hợp HLA trong ghép TBG tạo máu đồng loài. Tuy nhiên chưa có nghiên cứu đánh giá tổng thể và toàn diện về chất lượng các đơn vị TBG MDR cộng đồng, chưa có nhiều thông tin về khả năng sử dụng nguồn TBG rất lớn này. Qua thực tế phân tích và sử dụng tại Viện chúng tôi thực hiện đề tài với mục tiêu:

- 1. Đánh giá quy trình thu thập, xử lý, bảo quản tế bào gốc máu dây rốn cộng đồng tại Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương.***
- 2. Nghiên cứu một số yếu tố liên quan đến chất lượng và khả năng sử dụng đơn vị tế bào gốc máu dây rốn cộng đồng.***

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Đặc điểm của dây rốn, bánh rau và tế bào gốc máu dây rốn

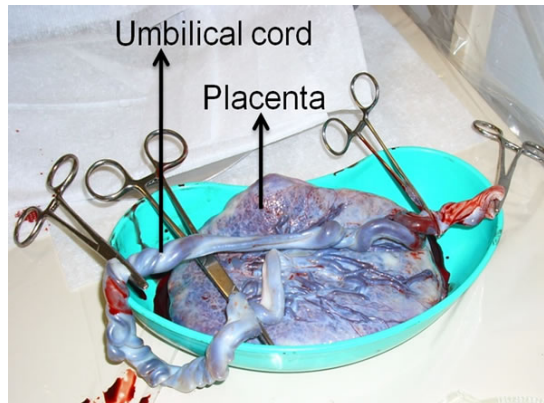
1.1.1. Đặc điểm của dây rốn và bánh rau

Dây rốn là dây kết nối thai nhi đang phát triển với rau thai. Dây rốn phát triển từ túi noãn hoàng vào tuần thứ 5 của sự phát triển thai nhi và là nơi cung cấp chất dinh dưỡng cho thai nhi thay cho túi noãn hoàng [4]. Khi kết thúc thời kỳ mang thai dây rốn trung bình dài từ 50 – 60 cm và đường kính khoảng 2 cm [5]. Dây rốn chứa ba mạch máu, một tĩnh mạch và hai động mạch, cuộn quanh tĩnh mạch theo cấu hình xoắn ốc [6].

Tĩnh mạch rau thai cung cấp cho thai nhi máu giàu oxy và dinh dưỡng. Các động mạch đưa máu đã khử oxy dinh dưỡng trở lại rau thai. Ba mạch máu được cách ly với một chất gelatin gọi là thạch Wharton, bảo vệ các mạch này và ngăn chặn lực nén cơ học giữa chúng [7]. Dây rốn được kết nối với thai nhi ở vùng bụng, sau khi sinh trở thành rốn. Khi ở trong bào thai, tĩnh mạch của dây rốn chia thành hai nhánh, một nhánh nối với tĩnh mạch gan, dẫn máu đến gan và nhánh thứ hai đến tĩnh mạch chủ ở tim thai nhi. Động mạch dây rốn phân nhánh từ động mạch chậu trong của thai nhi, là động mạch chính ở vùng chậu [8].

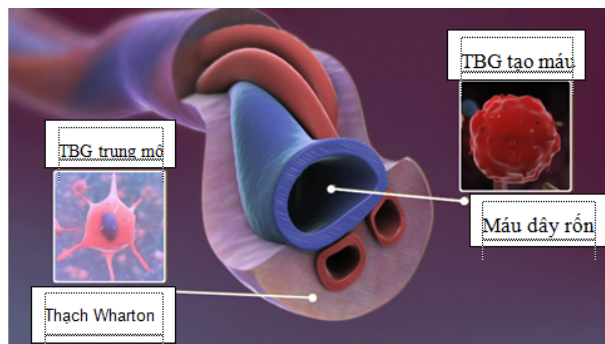
Rau thai là cơ quan kết nối thai nhi đang phát triển thông qua dây rốn với thành tử cung của mẹ thực hiện các chức năng dinh dưỡng, hô hấp và bài tiết. Rau thai bắt đầu phát triển trong quá trình phôi nang làm tổ vào nội mạc tử cung của mẹ và phát triển trong suốt thai kỳ. Về mặt giải phẫu, rau thai có màu hạt dẻ sẫm và hình tròn phẳng, đường kính trung bình khoảng 20 cm và dày 2,5 cm khi kết thúc thời kỳ mang thai (Hình 1). Rau thai được chia thành hai phần, phần của thai nhi và phần của mẹ. Phần của thai nhi bao gồm các lông nhung màng đệm, là những lông nhung hợp nhất từ màng đệm để tối đa

hóa vùng tiếp xúc với máu mẹ. Phần của mẹ chứa không gian xen kẽ, là không gian giữa các nhung mao của thai nhi và các mạch máu của mẹ. Các “bức tường” mỏng manh của nhung mao cho phép máu của thai nhi hấp thụ các chất dinh dưỡng và oxy từ máu của mẹ và loại bỏ các chất thải vào đó mà hai dòng máu không bị lẫn vào nhau [9],[10].



Hình 1.1. Rau thai và dây rốn chụp ngay sau khi sinh.

(Nguồn Hamad Ali (2012) *Stem Cell Discovery Vol. 2 No. 1*)



Hình 1.2. Tế bào gốc có trong máu dây rốn

1.1.2. Đặc điểm của tế bào gốc máu dây rốn

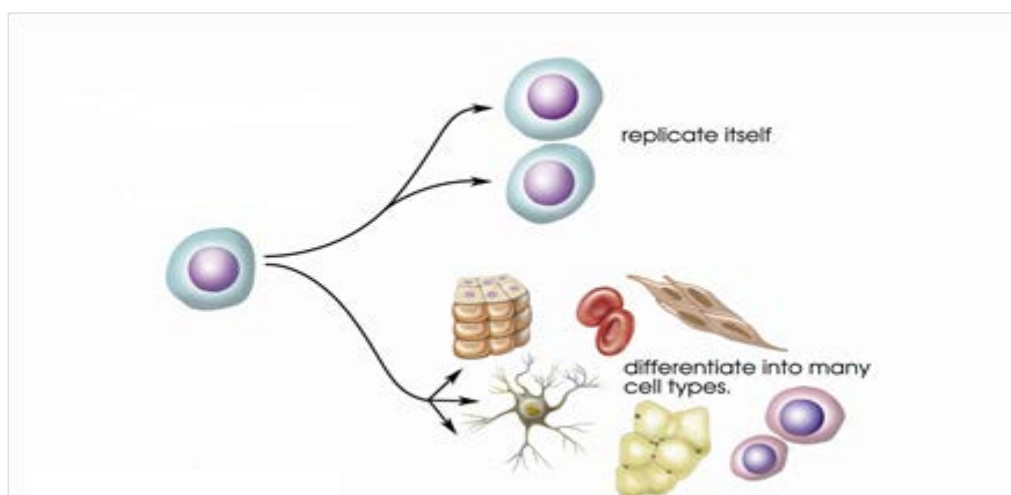
1.1.2.1. Đặc trưng cơ bản của tế bào gốc máu dây rốn

Đặc trưng cơ bản của TBG MDR cũng như các TBG tạo máu khác là khả năng tự tái tạo, khả năng biệt hóa thành các TB trưởng thành và khả năng phục hồi mô tạo máu. Ngoài ra TBG MDR còn có một số khả năng di chuyển, từ cơ quan tạo máu ra máu ngoại vi và từ máu ngoại vi vào cơ quan tạo máu,

chúng có tính mềm dẻo trong biệt hóa và tuân theo quy luật chết theo chương trình [11]. TBG MDR có các đặc điểm sau:

✚ Khả năng tự tái tạo (self renewal): TBG cung cấp liên tục các TB máu trong suốt cuộc đời của một cá thể. Mỗi ngày hàng tỷ TB máu mới được sản xuất ra trong cơ thể, và tất cả đều được bắt nguồn từ TBG tạo máu. Tế bào gốc tạo máu trưởng thành có tuổi thọ giới hạn nên khả năng TBG tạo máu tự đổi mới và tạo ra các tế bào máu mới cho đời sống của sinh vật là rất quan trọng để duy trì sự sống. Vấn đề then chốt là sự tự đổi mới theo đúng chương trình sinh lý của cơ thể.

✚ Khả năng biệt hóa đa dòng (differentiation): TBG tạo máu toàn năng (Totipotent hemopoietic stem cell) có khả năng biệt hóa thành tất cả các tế bào máu, tạo ra các TBG định hướng đầu dòng, các TBG đa năng và đơn năng để tạo thành từng loại tế bào chức năng như: hồng cầu, tiểu cầu, bạch cầu hạt, lympho T... Trong trường hợp cần thiết thì TBG định hướng dòng tủy có thể chuyển đổi thành định hướng dòng lympho và ngược lại.



Hình 1.3. Khả năng tự tái tạo và biệt hóa đa dòng của TBG MDR

✚ Khả năng tái định cư (homing): Là hiện tượng các TBG khi truyền vào cơ thể có thể di chuyển về tủy xương, ở đây chúng sẽ tăng sinh và biệt hóa ra các tế bào máu. Có rất nhiều các chemokine và các receptor khác nhau

tham gia vào quá trình này. Nghiên cứu của David và cộng sự năm 2002 đã chứng minh rằng GSCs và FSCs được gắn kết trong hốc tạo máu thông qua sự kết dính tế bào E-cadherin [12]. Các nghiên cứu đã nhanh chóng được thực hiện để tìm hiểu làm thế nào các phân tử bám dính có thể làm trung gian cho sự tương tác giữa các TBG cũng như đóng vai trò quan trọng trong điều chỉnh hoạt động của TBG. Dựa trên các kết quả từ các hệ thống nghiên cứu TBG khác nhau, người ta thấy mặc dù nhiều phân tử kết dính cùng tham gia quá trình này nhưng họ cadherin và integrin đã trở thành các trung gian phổ biến thích hợp cho hoạt động bám dính và neo giữ TBG. Do đó, tùy thuộc vào loại tế bào, TBG có thể sử dụng cadherins, integrins, hoặc sự kết hợp với các phân tử kết dính khác nhau để tương tác vật lý với hốc tạo máu. Sự tương tác nhờ cadherin có thể làm cho các TBG trở nên thích hợp, cho phép tiếp xúc liên tục với các tín hiệu ngăn và các tín hiệu phụ thuộc vào tế bào, do đó duy trì khả năng tự tái tạo dài hạn. Sự kết dính TBG cũng có thể giúp các TBG được ghép di chuyển vào các hốc thích hợp và thiết lập sự tương tác ổn định giữa TBG và các hốc tạo máu [12].

1.1.2.2. Đặc điểm sinh học của tế bào gốc máu dây rốn

Tế bào gốc máu dây rốn là những tế bào có kích thước nhỏ, nguyên sinh chất hẹp. Nó có khả năng phát triển, tự tái sinh và biệt hóa thành các dòng tế bào khác nhau trong cơ thể [13]. Trong MDR, khoảng 68% TBG tạo máu nằm ở pha G0 của chu kỳ phân bào. Đây là trạng thái “lặng” của tế bào, chúng hầu như không có sự trao đổi chất và cũng gần như không diễn ra quá trình tổng hợp protein. Do đó, các tế bào bắt màu rất yếu với các thuốc nhuộm huỳnh quang như Rhodamine 123, Hoechst 33342 hoặc Pyronin Y [12].

Hoạt động của TBG là khi nó bắt đầu từ pha G0 sang pha G1. Sự hoạt động này được đánh dấu bằng sự gia tăng quá trình phiên mã và tích lũy các ARN thông tin. Quá trình nuôi cấy sẽ tạo ra các TBG có hình thái tương tự

như TBG tạo máu: là những tế bào tròn, nhân to, nguyên sinh chất hẹp, hạt nhân to tròn.

1.1.2.3. Kháng nguyên bề mặt của tế bào gốc máu dây rốn

Cho đến nay, KN bề mặt CD34 được coi là dấu ấn duy nhất để xác định TBG tạo máu. Tuy nhiên, trong tủy xương và MDR bề mặt các tế bào ngoài KN CD34 còn có các yếu tố quyết định KN khác. Các quyết định KN đó được xác định qua các kỹ thuật như:

- Đếm tế bào dòng chảy để xác định sự hiện diện của dấu ấn CD34, CD38 trên bề mặt tế bào;
- Phân tích các dấu ấn của các dòng tế bào trưởng thành (HLA-DR);
- Phân tích thụ thể tyrosine kinase c-kit và sử dụng kháng thể có gắn sẵn màu fluorochromes để kết hợp đặc hiệu với kháng nguyên tương ứng cần nhận biết.

Như đã đề cập ở trên, một tính năng đặc trưng của tế bào tạo máu là sự hiện diện của kháng nguyên CD34 trên bề mặt (TB CD34). Bản chất của CD34 là một glycoprotein xuyên màng, có trọng lượng khoảng 104 - 120 kDa, thuộc họ phân tử bám dính được gọi là sialomucines. Cấu tạo gồm một lõi protein chứa 6 đến 9 vị trí gắn với N-glycosyl và hơn 9 vị trí liên kết với O-glycosyl. Trong tế bào chất, KN CD34 có hai vị trí cho sự phosphoryl hóa của protein kinase C và một vị trí cho sự phosphoryl hóa tyrosine. Do đó, chức năng của nó có liên quan đến sự dẫn truyền tín hiệu qua màng tế bào và nó có vai trò trong việc bám dính của TBG tạo máu với mô đệm tủy xương [13].

Xét nghiệm DNA cho thấy các tế bào biểu hiện các KN CD34+CD38- bị ức chế thường trong pha G0. Các tế bào có KN CD34+CD38+ thường đang trong pha S, pha G2/M, điều này phản ánh sự kích hoạt của chúng. Tế bào có CD34+CD38- non hơn CD34+CD38+ [14]. Bên cạnh đó, một KN khác được sử dụng để xác định mức độ trưởng thành là KN CD90, còn được gọi là Thy1.

Nó có trên bề mặt các tế bào non và vắng mặt trên các tế bào trưởng thành. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng số lượng TB CD34+CD90+ tương quan thuận với số lượng tế bào CD34+ CD38-.

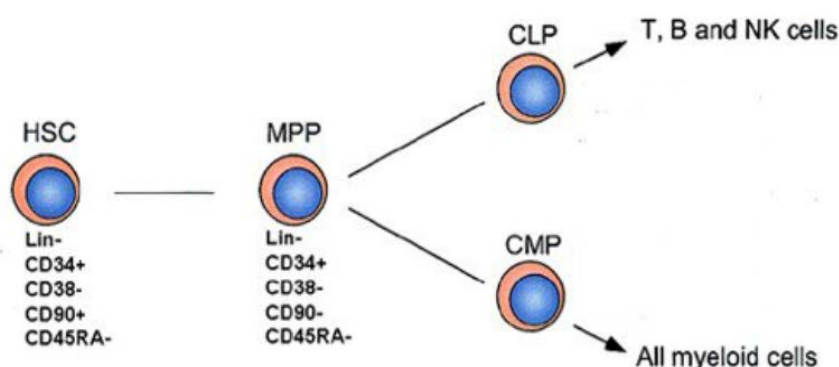
Các đồng KN CD117 và CD135 cũng được sử dụng để xác định sự trưởng thành của tế bào CD34+. Hơn 60% tế bào CD34+ có thêm CD177 (được coi như receptor c-kit) trên bề mặt. Các tế bào non, đầu dòng thường biểu hiện dấu ấn này ở mức độ thấp, các tế bào trưởng thành hơn thì dấu ấn này có biểu hiện ở mức độ cao hơn. 90% TB CD34+ có dấu ấn CD135 (các thuộc tính giống tyrosin kinase) và 25% có dấu ấn CD95 (chất điều hòa hoạt động của TBG thời kỳ sớm) [13]. Ngoài ra cũng có CD71, nó được coi là receptor vận chuyển cho tế bào. Bình thường TBG không có KN này, nếu xuất hiện CD71 điều đó chứng tỏ các TBG này sẽ biệt hóa thành cụm hồng cầu. Dấu ấn bề mặt đặc trưng cho dòng này là CD34+/CD45-/CD71+ [13].

Ở giai đoạn rất sớm của sự biệt hóa, tế bào cũng có dấu ấn CD45RO và CD45RB. Khi có CD45RA là đặc trưng của các tế bào tiền thân muộng và định hướng biệt hóa thành CFU-GM. Dấu ấn bề mặt đặc trưng cho dòng này là CD34+CD45RA+CD71- [13].

Ngoài dấu ấn CD34 còn tìm thấy dấu ấn AC133 trên mặt TB. Nó là một protein được glycosyl hóa với trọng lượng phân tử 120 kDa. Nó không hiển thị cùng với bất kỳ của các KN nào kể trên và cấu trúc cũng khác biệt với các dấu ấn khác trên bề mặt tế bào. Đóng vai trò là thụ thể của yếu tố tăng trưởng. AC133 biểu hiện chủ yếu ở các tế bào CD34+/Lin-, biểu hiện ở số rất ít tế bào CD34-Lin+ [15].

Đánh giá tiềm năng tăng sinh của các TBG tạo máu đã biệt hóa đến giai đoạn đầu dòng (CFU-GM, CFU-M, BFU-E) là cần thiết. Grskovic và cộng sự (2004) đã nuôi cấy cụm tế bào và cho kết quả là: các cụm tế bào đều phát triển từ TB CD34 có độ biểu hiện thấp với CD117 [15]. Ngoài ra, sự hiện

diện của dấu ấn CD135 tạo ra sự khác biệt hoạt động của các tế bào này. Smogorzewska và cộng sự nhận thấy rằng: sau 60 ngày nuôi cấy, tế bào CD34+CD38- vẫn có thể tạo cụm khi có mặt của các tế bào đệm trong tủy xương. Sau 40 ngày nuôi cấy các tế bào CD34+CD38+ không có khả năng biệt hóa thành cụm nữa [16].



Hình 1.4. Kháng nguyên bề mặt của tế bào gốc tạo máu dây rốn

(Nguồn <http://stemcellassay.com>. Ref: Anna Hordyjewska et al. 2015.

Cytotechnology: DOI 10.1007/s10616-014-9796-y Nguyen Van Tinh, PhD)

1.1.2.4. Sự khác biệt giữa tế bào gốc máu dây rốn với tế bào gốc tủy xương và tế bào gốc máu ngoại vi

TBG MDR khác với TBG tủy xương và máu ngoại vi về thành phần, số lượng và tính chất [17].

- Các TBG MDR có CD34+/CD38- (được tìm thấy trong pha G0) có đáp ứng tăng sinh với cytokine mạnh hơn và ít phụ thuộc vào tế bào đệm hơn trong tủy xương hoặc máu ngoại vi [13].

- Gao và cộng sự đã chỉ ra rằng trong MDR chứa những tế bào là tiền thân của tế bào đệm có khả năng tạo máu [18].

- MDR chứa các loại tế bào có tiềm năng tăng sinh tạo cụm cao gấp 8 lần trong tủy xương. Đánh giá khả năng mọc các cụm của TBG MDR người

ta thấy rằng 1 ml máu có khả năng tạo cụm CFU-E (8000 cụm) cao gấp 3 lần tủy xương và máu ngoại vi, tạo cụm CFU-GM (13000-24000 cụm) cao gấp 15 lần tủy xương và máu ngoại vi, khoảng 1000-10000 cụm hỗn hợp CFU-GEMM [19]. Thêm vào đó trong MDR chứa các tế bào tạo máu non nhiều hơn tủy xương. Tỷ lệ các tế bào có dấu ấn CD34 trên bề mặt trong MDR dao động 0,02 - 1,43%, thấp hơn trong dịch tủy xương (0,5-5%) nhưng cao hơn rất nhiều máu ngoại vi (< 0,01%) [20]. Số lượng tế bào chưa hoạt động có dấu ấn CD34+/HLA-DR- và CD34+/CD38- trong MDR cũng cao hơn so với tủy xương (lần lượt là 4% và 1 %) [21].

- Trên tế bào mang dấu ấn CD34 của MDR, có biểu hiện CD44 và các phân tử bám dính khác của nhóm integrins như CD49d hoặc CD49f cao hơn, nhưng biểu hiện CD11 và CD18 thấp hơn so với tế bào tủy xương hoặc máu ngoại vi [13].

- TBG MDR cũng được đặc trưng bởi vùng telomere dài hơn so với máu ngoại vi hoặc tủy xương. Do đó, các TBG MDR có khả năng tạo máu trong một thời gian dài hơn - chúng phân chia nhiều hơn và tạo ra một số lượng lớn các tế bào con.

- Máu rốn có chứa một quần thể tế bào T đặc trưng (kiểu hình CD3-/CD8-), là tiền thân của dòng tế bào T. Rất nhiều các nghiên cứu cho thấy tỷ lệ NK trong MDR thấp hơn và do đó hoạt động độc tế bào thấp hơn so với người trưởng thành. Do tính “ngây thơ” của các tế bào miễn dịch có trong MDR mà dẫn đến mức độ gây độc tế bào thấp. Đây là một giá trị đặc trưng của chu kỳ chu sinh và sơ sinh - chưa bị tác động bởi các yếu tố ngoại lai.

- Chang và cộng sự cho thấy: ngoài TBG tạo máu, MDR chứa các TBG trung mô (MSC) tương tự như tủy xương. Chúng có 2 hình thái chính là dạng sợi phẳng (93%) và dạng sợi hình con thoi. Cả 2 hình thái trên đều âm tính

với dấu ấn CD34, CD26, CD31, CD45 và HLA-DR. Dấu ấn bề mặt tế bào điển hình cho các tế bào trung mô: SH2, SH3 và SH4, các phân tử kết dính của các KN CD29, CD44 và HLA-A, B, C. MSC có hình dạng là con thoi và sợi phẳng. Sự khác biệt duy nhất giữa hai loại MSC này là mức độ biểu hiện KN CD90. MSC có dạng hình con thoi biểu hiện nhiều KN CD90, trong khi MSC dạng sợi phẳng cho thấy không có biểu hiện KN này [22].

Tế bào gốc máu dây rốn có ưu điểm khác với các TBG được tạo ra từ tủy xương: TBG MDR chưa bị hư hại do bệnh tật và đột biến. Chính vì vậy, đây là một nguồn TBG đang được ứng dụng ngày càng nhiều trên thế giới. Bên cạnh đó, so với các nguồn TBG khác thì đây là nguồn TBG có sẵn và đã có kết quả xét nghiệm HLA sẵn trong ngân hàng lưu trữ MDR cộng đồng nên thời gian chờ ghép sẽ được rút ngắn một cách đáng kể, có thể tận dụng được thời điểm vàng trong điều trị cho bệnh nhân.

Nhược điểm chính của nguồn TBG này là số lượng TBG khá thấp dẫn đến mọc mảnh ghép chậm và nguy cơ bội nhiễm cao. Hiện nay đã có rất nhiều thử nghiệm nghiên cứu khắc phục vấn đề này.

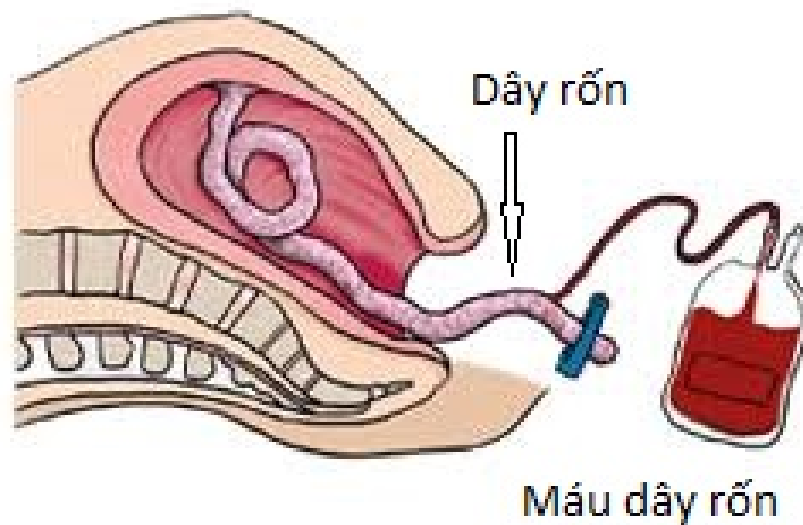
1.2. Tạo nguồn tế bào gốc từ máu dây rốn

1.2.1. Quy trình thu thập, xử lý và bảo quản máu dây rốn

1.2.1.1. Thu thập máu dây rốn

Máu dây rốn là một nguồn TBG đặc biệt, tận dụng một sản phẩm thải bỏ từ quá trình sinh sản để biến đổi thành nguồn thuốc quý giá phục vụ cho điều trị [23]. Vì vậy, việc thu thập, xử lý và bảo quản nguồn TBG này cũng đòi hỏi các quy trình khác biệt so với các nguồn TBG khác. Trên thế giới, rất nhiều nghiên cứu để cải tiến các quy trình nhằm nâng cao số lượng và chất lượng TBG MDR phục vụ cho lâm sàng. Công đoạn đầu tiên của quá trình này là việc thu thập máu từ dây rốn và bánh rau của sản phụ và trẻ sơ sinh.

Việc thu thập có thể tiến hành ở 2 thời điểm: trước và sau mổ rau . Các kết quả nghiên cứu đều nhận thấy rằng việc thu thập trước mổ rau, là thời điểm ngay sau khi đã kẹp và cắt dây rốn mà bánh rau còn nằm trong tử cung, sẽ giúp thu được số lượng TBG đạt số lượng tối ưu nhất [24]. Thể tích MDR thu thập ở các cơ sở thường lấy tiêu chuẩn tối thiểu 50 ml.



Hình 1.5. Thu thập máu dây rốn trước mổ rau

1.2.1.2. Xử lý máu dây rốn

Mẫu MDR sau khi thu thập sẽ được chuyển về các ngân hàng MDR để tiến hành xử lý. Đây là bước rất quan trọng nhằm (1) giảm thể tích, (2) loại bỏ các hồng cầu, (3) tinh lọc TBG. MDR hoàn thiện với thể tích trung bình khoảng 25 ml.

Những ngân hàng TBG MDR đầu tiên trên thế giới như Trung tâm máu New York đã áp dụng các quy trình xử lý giảm thể tích bằng phương pháp thủ công, sử dụng các loại chế phẩm giúp tăng độ lắng của hồng cầu như dung dịch HES (hydroxylethyl starch) hoặc Hetastarch (ethoxylated amylopectin) giúp loại bỏ huyết tương và bỏ bớt được hồng cầu, giảm bớt hematocrit cho sản phẩm [25]. Tuy nhiên, xử lý thủ công thường diễn ra theo nhiều bước,

quy trình hở và độ ổn định không cao do phụ thuộc vào tay nghề kỹ thuật viên. Năm 2001, hãng Biosafe đã đưa ra thế hệ máy đầu tiên là Sepax với khả năng xử lý hoàn toàn tự động, thiết kế riêng cho việc xử lý máu dây rốn và dần dần trở thành tiêu chuẩn quốc tế, được sử dụng ở đa số các ngân hàng máu dây rốn trên thế giới [26]. Xử lý trên hệ thống tự động có ưu điểm rất quan trọng là tính ổn định, quy trình khép kín nên đảm bảo an toàn và hạn chế nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, so với xử lý thủ công, xử lý tự động cũng có những nhược điểm nhất định như còn tồn dư nhiều hồng cầu đặc biệt hơn nữa là chi phí cao. Chính vì vậy, các ngân hàng máu dây rốn cộng đồng phải lựa chọn phương pháp xử lý cho thích hợp với nguồn lực kinh tế hiện có. Tại Nhật Bản, quy trình xử lý bằng kỹ thuật thủ công được tối ưu hóa để khắc phục những nhược điểm và trở thành phương pháp được lựa chọn để áp dụng trên quy mô lớn với giá cả hợp lý hơn so với kỹ thuật tự động. Viện Huyết học – Truyền máu Trung Ương đã cử cán bộ đi sang Nhật để học tập quy trình và đã tối ưu hóa cho phù hợp với điều kiện Việt Nam.



Hình 1.6. Quá trình xử lý máu dây rốn bằng phương pháp thủ công

1.2.1.3. Bảo quản tế bào gốc máu dây rốn

Máu dây rốn sau khi xử lý giảm thể tích loại bỏ các thành phần thừa sẽ được trộn với dung dịch bảo quản để có thể bảo vệ tế bào trong môi trường đông lạnh. Thành công của ngân hàng TBG phụ thuộc vào việc bảo quản TBG.

Nguy cơ lớn nhất với tế bào ở giai đoạn đông lạnh cũng như rã đông là sự thay đổi trạng thái lỏng - rắn, tạo các tinh thể trong quá trình đông lạnh làm tổn thương tế bào. Khi tốc độ làm lạnh nhanh, các tinh thể nước đá được tạo bên trong tế bào, bên trong các bào quan làm xé rách màng và cấu trúc tế bào làm tế bào chết nhanh chóng. Khi tốc độ làm lạnh chậm các tinh thể nước đá sẽ tạo ra ở bên ngoài tế bào làm tăng áp lực thẩm thấu do nước bị lôi vào tinh thể nước đá. Hiện nay, người ta đã sử dụng các chất bảo vệ tế bào ở nhiệt độ đông lạnh. Có 2 loại chất bảo vệ: loại thâm nhập vào tế bào (DMSO, glycerol) và loại không thâm nhập (HES).

Khối TBG sau khi được thu thập (và xử lý nếu cần thiết) sẽ được bảo quản trong môi trường có nhiệt độ 2-6°C trước khi sử dụng tươi hoặc bảo quản đông lạnh. Thời gian bảo quản không kéo dài quá 72 giờ.

Khối TBG tạo máu sau khi xử lý sẽ được trộn với chất bảo quản trước khi hạ lạnh và lưu trữ đông lạnh ở nhiệt độ -196°C. Dung dịch DMSO 10% là chất bảo quản thích hợp nhất với khối TBG tạo máu. Trước khi bảo quản đông lạnh khối TBG tạo máu, cần tiến hành hạ nhiệt độ theo một chương trình định sẵn để đưa khối TBG xuống đến nhiệt độ -60°C, sau đó khối TBG được chuyển lưu giữ trong bình nitơ ở pha hơi hoặc pha lỏng để duy trì nhiệt độ bảo ở -150°C đến -196°C. Với điều kiện này, khối TBG tạo máu có thể lưu giữ trong thời gian rất dài, có thể hàng chục năm, mà vẫn bảo đảm số lượng và chất lượng của khối TBG.

1.2.2. Các loại hình ngân hàng máu dây rốn

Các nghiên cứu của Knudtzon từ năm 1974 cho thấy MDR có chứa các TBG tạo máu và có thể lưu trữ lâu dài đã mở đường cho việc ứng dụng trong điều trị [27]. Năm 1988, tại Paris ca ghép TBG MDR đầu tiên thành công cho bệnh nhân fanconi. Các kết quả ghép TBG MDR trong những năm tiếp theo

là động lực cho hàng loạt ngân hàng TBG MDR ở Pháp, Mỹ, Đức, Nhật... ra đời và lan rộng ra toàn Thế giới với các loại hình khác nhau.

Ngân hàng TBG MDR bao gồm: (1) các ngân hàng lưu trữ MDR cộng đồng, nơi lưu trữ các đơn vị TBG MDR để sử dụng cho một người nhận không cùng huyết thống; (2) các ngân hàng lưu trữ MDR cá nhân, nơi lưu trữ MDR để sử dụng trong tương lai của người hiến hoặc người thân; (3) các ngân hàng kết hợp, cung cấp cả 2 loại dịch vụ trên [28].

1.2.2.1. Ngân hàng TBG máu dây rốn cộng đồng

Là ngân hàng được sử dụng cho bất kỳ ai trong cộng đồng, TBG MDR thuộc quyền sở hữu của ngân hàng, nguồn TBG này do người tình nguyện hiến cho ngân hàng. Ngân hàng TBG MDR cộng đồng thành lập đầu tiên năm 1991 tại New York Hoa Kỳ. Sau đó, mô hình ngân hàng này được nhân rộng ra trên toàn thế giới vì những lợi ích vượt trội của nó. Khác với ngân hàng lưu trữ MDR cá nhân, các ngân hàng này thường lấy MDR từ những sản phụ tình nguyện hiến tặng để sử dụng cho các trường hợp bệnh nhân có nhu cầu ghép vì vậy hiệu quả sử dụng cao hơn. Các mẫu MDR được thu thập theo các tiêu chuẩn định sẵn để đưa vào xử lý nhằm tạo ra các đơn vị TBG có chất lượng. Chính nhờ vào việc đưa ra các tiêu chuẩn định sẵn mà chất lượng của các đơn vị TBG (thể hiện ở thể tích thu thập, số lượng TBCN trung bình, số lượng TB CD34 trung bình) đều cao hơn và ổn định hơn so với MDR từ ngân hàng lưu trữ cá nhân. Đây chính là hình thức lưu trữ MDR phù hợp nhất, hiệu quả nhất cho các trường hợp bệnh nhân có nhu cầu điều trị ghép TBG nhưng không có người cho phù hợp trong gia đình. Ở Châu Âu mô hình này tương đối phổ biến, nó chiếm tỷ lệ lớn hơn nhiều so với ngân hàng lưu trữ MDR cá nhân. Một số nước như Đức, Ý chỉ cho thành lập ngân hàng này, hoàn toàn không khuyến khích thậm chí cấm thành lập ngân hàng lưu trữ MDR cá nhân. Vì đơn vị TBG trong ngân hàng MDR cộng đồng có thể được chọn để ghép cho

bất kỳ ai nên đòi hỏi ngoài sự an toàn chung cho các mẫu còn yêu cầu về số lượng TBG phải đủ lớn để sử dụng được cho các đối tượng. Ngoài ra xét nghiệm thành phần HLA là yêu cầu bắt buộc cũng như nhóm máu trong truyền máu để lựa chọn đơn vị thích hợp nhất cho bệnh nhân [29].

Trên thế giới, Nhật Bản là một trong các nước tiên phong trong ghép TBG từ MDR với ca ghép đầu tiên thực hiện vào năm 1995. Nhật Bản đã có 11 ngân hàng TBG MDR cộng đồng. Hiện nay đã tập trung hóa, sát nhập thành 8 ngân hàng MDR lưu trữ cho cộng đồng với tổng lượng lưu trữ thường xuyên khoảng 32.000 đơn vị [30].

1.2.2.2. Ngân hàng lưu trữ TBG MDR cá nhân

Đây là ngân hàng do người hiến hoặc chủ nhân sinh học mẫu TBG có nhu cầu ký gửi, nó không thuộc quyền sở hữu của ngân hàng. Theo yêu cầu của người trả phí sẽ tiến hành thu thập, xử lý, bảo quản và sử dụng. Ngân hàng lưu trữ TBG MDR cá nhân bảo quản các đơn vị TBG MDR cho mục đích phòng ngừa nghĩa là trong tương lai nếu người hiến hoặc người thân mắc một bệnh có thể điều trị bằng ghép TBG tự thân thì đơn vị TBG MDR được sử dụng khi có sự cho phép của người hiến và theo sự hướng dẫn của bác sĩ. Các đơn vị tại ngân hàng lưu trữ MDR cá nhân vẫn là tài sản của đứa trẻ, dưới sự giám hộ của cha mẹ và không có sẵn cho cộng đồng. Tuy nhiên, chúng có thể được cung cấp cho các thành viên khác trong gia đình, do đó, hầu hết các ngân hàng lưu trữ TBG MDR cá nhân đều là những ngân hàng dành cho cá nhân hoặc gia đình sử dụng [31].

Ngân hàng TBG này cũng đang phát triển mạnh mẽ, hiện nay là Cord Blood Registry tại Mỹ là ngân hàng lớn nhất thế giới với hơn 500.000 mẫu. Ngân hàng Via Cord tại Mỹ năm 2013 có 300.000 mẫu lưu trữ. Tuy nhiên, loại hình này có một số nhược điểm chính như: số lượng TBG không cao và không ổn định do thu thập theo yêu cầu bắt buộc, chỉ dùng cho bản thân

người lưu trữ hoặc người trong gia đình của họ, tỷ lệ ứng dụng thường khá thấp. Cơ hội sử dụng MDR cho cá nhân điều trị các rối loạn tạo máu trước 20 tuổi là thấp và ước tính thay đổi từ 1/2.700 đến 1/20.000 [32]. Nếu chủ nhân không có nhu cầu sử dụng thì việc thu thập, xử lý và bảo quản trở nên lãng phí rất lớn về công sức cũng như chi phí. Tuy nhiên ở một số quốc gia như Ý ngân hàng này bị cấm.

1.2.2.3. Ngân hàng kết hợp lưu trữ cộng đồng và cá nhân.

Loại hình này không nhiều nhưng có nhiều hình thức khác nhau. Một số ngân hàng chia TBG MDR thành hai phần riêng biệt, một phần được lưu trữ để sử dụng cho ghép tự thân hoặc cùng huyết thống, một phần sử dụng cho cộng đồng. Trong một số khác, các đơn vị ban đầu lưu trữ cho cá nhân sau đó chuyển mục đích sử dụng cho cộng đồng [33]. Hoặc có thể cha mẹ tặng MDR cho các ngân hàng cộng đồng nhưng vẫn giữ quyền sở hữu trong một khoảng thời gian xác định đủ để đáp ứng nhu cầu cuối cùng của trẻ [34].

1.2.3. Tìm kiếm tế bào gốc máu dây rốn cho ghép

Mục đích chính của việc xây dựng ngân hàng TBG MDR là để tìm kiếm đơn vị TBG MDR phù hợp cho bệnh nhân có nhu cầu ghép. Quy trình tìm kiếm đơn vị TBG MDR bắt đầu từ việc phân tích HLA của bệnh nhân. Bệnh nhân được gửi các thông tin gồm: chẩn đoán, kết quả HLA, cân nặng, nhóm máu đến ngân hàng để đánh giá sự hòa hợp. Do đó các vấn đề về HLA, liều TBG, nhóm máu, giới tính và bệnh lý bệnh nhân mắc phải là vấn đề đặc biệt quan trọng ảnh hưởng đến thành công của cuộc ghép TBG MDR.

1.2.3.1. Chọn mẫu phù hợp HLA (Human Leucocyte Antigen)

Kháng nguyên bạch cầu người (Human Leucocyte Antigen - HLA) hay phức hợp hòa hợp mô chủ yếu (Major Histocompatibility Complex - MHC) có vai trò rất quan trọng trong ghép mô, tạng nói chung và ghép TBG nói riêng. HLA được biết đến lần đầu tiên là do chúng liên quan đến hiện tượng

thải ghép. Protein này đóng vai trò quan trọng trong tổ chức miễn dịch của cơ thể cũng như những cơ chế “giao tiếp” giữa các tế bào. HLA được tạo ra do một nhóm gen mã hoá cho các protein trình diện KN trên bề mặt tế bào của đa số động vật có xương sống.

Hệ thống HLA bao gồm một loạt các gen phức tạp nằm trên nhiễm sắc thể số 6 và các sản phẩm phân tử của chúng có liên quan đến sự điều hòa miễn dịch và biệt hóa tế bào. Các HLA có thể tạo ra một phản ứng miễn dịch bằng cách nhận diện các peptide biến đổi nhận phân tử HLA lạ thông qua sự đa hình của chúng. Sự không hòa hợp HLA có liên quan đến sự thất bại của mảnh ghép, sự trì hoãn phục hồi miễn dịch, bệnh ghép chống chủ (GVHD) và tỷ lệ tử vong [35].

Có ba locus cổ điển ở lớp HLA I: HLA-A, -B và -Cw và năm locus ở lớp II: HLA-DR, -DQ, -DP, -DM và -DO. Hệ HLA có tính đa hình cao. Sự đa dạng của các gen lớp I và II có thể được phân tích bằng các phương pháp huyết thanh học hoặc phương pháp phân tử ở cấp độ DNA bằng các phương pháp khác nhau như môi đặc hiệu (SSP) và sử dụng đầu dò đặc hiệu (SSO). Kết hợp HLA lớp I và II rất quan trọng trong ghép đặc biệt là ghép thận và tủy xương. Ghép đồng loài gây ra cả đáp ứng miễn dịch dịch thể và tế bào ở người nhận điều này dẫn đến thải ghép và ghép chống chủ (GVHD).

Mục đích ghép TBG tạo máu đồng loài cho bệnh nhân bị bệnh lý huyết học ác tính là để phục hồi sự tạo máu bình thường và làm tăng hiệu ứng ghép chống khối u. Sự thành công của ghép TBG tạo máu đồng loài nói chung và ghép TBG MDR đồng loài nói riêng đều phụ thuộc vào mức độ phù hợp của các alen HLA lớp I và lớp II giữa người cho và người nhận. Đã có nhiều nghiên cứu về mức độ hòa hợp HLA cần thiết giữa người cho và người nhận như Trung tâm nghiên cứu ung thư Fred Hutchinson (FHCRC) và Chương trình hiến tủy Hoa Kỳ (NMDP) đã báo cáo tầm quan trọng của kết hợp HLA

lớp II trong giảm nguy cơ GVHD và tăng tỷ lệ sống sót sau ghép [36],[37]. Năm 2002, Chương trình Người hiến tủy của Nhật Bản (JMDF) đã chỉ ra HLA lớp I ảnh hưởng rất lớn đến GVHD cấp tính sau ghép, trong đó nếu alen HLA-A và -B hòa hợp thì kết quả sống sót sau ghép sẽ tốt hơn [38],[39]. Năm 2007, nghiên cứu của chương trình hiến tủy Hoa Kỳ cho thấy sự không phù hợp của HLA-A hoặc -DRB1 đối với sự sống sót chung ảnh hưởng nhiều hơn so với sự không phù hợp ở HLA-B hoặc -C [40]. Theo hướng dẫn của Hội Miễn dịch và ghép tủy của Anh năm 2013, yêu cầu về mức độ hòa hợp HLA khi ghép TBG MDR tối thiểu là 4/6 locus HLA-A, -B, -DR và mức độ hòa hợp càng cao thì tỷ lệ thành công càng lớn. Nguyên nhân là do TBG MDR hầu như chưa phơi nhiễm với các tác nhân miễn dịch do đó nó có khả năng dung nạp tốt hơn với tế bào bệnh nhân, mức độ hòa hợp HLA cũng lỏng lẻo hơn [41].

Một vấn đề khác liên quan đến yêu cầu hòa hợp HLA trong ghép TBG MDR là độ phân giải của HLA. Trong ghép TBG từ người trưởng thành, việc lựa chọn HLA phải xem xét ở mức độ phân giải cao. Do đó HLA của bệnh nhân và người hiến phải được xét nghiệm bằng kỹ thuật có khả năng phân tích cao như SSO, giải trình tự gen. Đối với ghép TBG MDR nếu phân tích bằng các kỹ thuật trên sẽ làm giá thành của đơn vị TBG MDR tăng lên cao. Mặt khác nhiều nghiên cứu cũng chỉ ra xét nghiệm bằng kỹ thuật cao cũng không cần thiết [42],[43]. Hòa hợp 4/6 (HLA-A, -B, -DRB1) được chấp nhận, cũng như hòa hợp 4/8 (HLA-A, -B, -C, and -DRB1) hoặc cao hơn nữa. Trong trường hợp ghép 2 đơn vị không nhất thiết 2 đơn vị phải hòa hợp với nhau [44]. Việc tìm được đơn vị TBG MDR hòa hợp HLA còn phụ thuộc và số lượng đơn vị TBG lưu trữ trong ngân hàng. Nếu số lượng đơn vị càng lớn thì hiệu quả tìm kiếm càng cao. Tuy nhiên theo khuyến cáo số lượng lưu trữ tối đa chỉ cần 4.000 – 5.000 đơn vị là đủ để xác suất tìm kiếm là 100% [28].

1.2.3.2. Chọn liều ghép phù hợp

Bên cạnh việc lựa chọn hòa hợp HLA thì chọn liều tế bào cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến sự thành công của ghép. Mỗi nguồn TBG khác nhau sẽ có liều tế bào khác nhau khuyến cáo cho ghép. Đối với TBG MDR, năm 2005, Vanderson Rocha và cộng sự đã đưa ra kết luận: Liều TBCN khi đưa vào bảo quản đông lạnh là một chỉ số phản ánh số lượng tế bào có khả năng biệt hóa. Số lượng TBCN đã được chuẩn hóa cách đo lường và có sẵn trong quá trình tìm kiếm do đó có khả năng liên thông giữa các phòng xét nghiệm và là thông tin dùng trong quá trình tìm kiếm [45]. Tác giả thấy rằng TBCN và mức độ hòa hợp HLA có liên quan đến xác suất ghép, liều TB CD34 và mức độ hòa hợp HLA liên quan đến xác suất GVHD cấp tính cấp độ III, IV. Tỷ lệ tái phát bệnh cao hơn ở các ca ghép phù hợp HLA cho thấy hiệu suất ghép chống lơ xê mi tăng trong các ca cấy ghép không hòa hợp HLA. Bên cạnh đó tác giả cũng thấy rằng số lượng TBCN càng cao thì yêu cầu hòa hợp HLA càng thấp và xác suất ghép càng cao. Theo đó, không có ngưỡng xác định nào cho liều tế bào và mức độ hòa hợp HLA, tuy nhiên dựa trên các nghiên cứu trước đó và hướng dẫn của Eurocord, tác giả đề xuất ghép TBG MDR không hòa hợp HLA tối thiểu 4/6 được chấp thuận và liều TBCN tối thiểu 2×10^7 /kg TBCN [45]. Năm 2013, Hội ghép tủy xương nhi khoa Vương quốc Anh đã đưa ra tiêu chuẩn để có thể sử dụng TBG MDR kết hợp giữa sự hòa hợp HLA và liều tế bào, cụ thể là những đơn vị TBG MDR có mức độ hòa hợp HLA càng thấp thì liều TBCN tính trên kg cân nặng càng cao: liều ghép $\geq 3 \times 10^7$ TBCN/kg nếu hòa hợp tối thiểu 6/6 locus HLA-A, -B, -DR, liều tế bào tối thiểu $\geq 4 \times 10^7$ TBCN/kg nếu hòa hợp tối thiểu 5/6 locus HLA-A, -B, -DR và liều $\geq 5 \times 10^7$ TBCN/kg nếu hòa hợp tối thiểu 4/6 locus HLA-A, -B, -DR [41]. Như vậy cân nặng của bệnh nhân cũng là yếu tố quan trọng vì dựa vào đó chúng ta tìm được đơn vị TBG đủ liều ghép. Trong những giai đoạn trước đây ghép

TBG MDR thường được thực hiện cho đối tượng là bệnh nhân trẻ em vì liều tế bào không đáp ứng được cho người lớn. Để khắc phục nhược điểm này người ta đã sử dụng 2 đơn vị TBG MDR để ghép cho người có cân nặng lớn. Tuy nhiên chi phí thường gấp đôi và thời gian chờ đợi lâu hơn [46]. Hiện nay quy trình thu thập, xử lý, bảo quản TBG MDR đã có nhiều cải tiến giúp cải thiện đáng kể số lượng TBG thu được, do đó có thể ứng dụng cho những bệnh nhân có cân nặng trung bình cao.

Đối với các đơn vị TBG MDR đơn, tổng liều TBCN tối thiểu phải là $2,5 \times 10^7/\text{kg}$ và số lượng TB CD34 tối thiểu là $1,5 \times 10^5/\text{kg}$. Đối với ghép hai đơn vị, tổng liều TBCN tối thiểu cho mỗi đơn vị là $1,5 \times 10^7/\text{kg}$ và TB CD34 tối thiểu là $1,0 \times 10^5/\text{kg}$. Tuy nhiên, liều tế bào thường được ưu tiên hơn mức độ hòa hợp HLA trong trường hợp người lớn và bệnh nhân nhi có cân nặng cao. Trẻ em, người lớn có cân nặng thấp hoặc bệnh nhân có HLA phổ biến sẽ có nhiều đơn vị đủ liều tế bào để lựa chọn, những trường hợp này thì hòa hợp HLA có thể được ưu tiên [44].

1.2.3.3. Vấn đề nhóm máu trong ghép

Nhóm máu được phát hiện bởi Karl Lansteiner vào năm 1900, đây là một trong những phát minh vĩ đại của y học, từ đây mở ra một kỷ nguyên mới trong truyền máu lâm sàng. Gen quy định nhóm máu ABO nằm trên NST số 9. Trong ghép, nhóm máu là một rào cản lớn đối với ghép tạng đặc. Tuy nhiên, ghép TBG vẫn có thể thực hiện dù không tương thích nhóm máu. Có 40-50% ca ghép TBG tạo máu được thực hiện không tương thích hệ nhóm máu ABO [47]. Sự không tương thích này có thể chia thành 3 nhóm: Không hòa hợp chính yếu (gặp 20-25% ca ghép) là không tương thích được đặc trưng bởi sự hiện diện sẵn có của KT trong máu người nhận chống lại hồng cầu trong đơn vị TBG truyền vào (ví dụ truyền TBG của người nhóm A, B, AB cho người nhóm O). Không hòa hợp thứ yếu (gặp 20-25% ca ghép): sự bất đồng xảy ra

khi người cho có KT chống lại KN trên bề mặt hồng cầu người nhận (ví dụ người có nhóm máu O truyền cho người có nhóm máu A, B, AB). Không tương thích hai chiều (gặp khoảng 5% ca ghép) khi kết hợp cả không hòa hợp chính yếu và thứ yếu như người có nhóm máu A ghép cho người có nhóm máu B. Trong trường hợp bất đồng chính yếu cần xử lý loại bỏ hồng cầu trong sản phẩm TBG [47].

		NGƯỜI CHO TBG TẠO MÁU			
NGƯỜI NHẬN TBG TẠO MÁU	Nhóm máu	0	A	B	AB
	0	Hòa hợp	Chính yếu	Chính yếu	Chính yếu
	A	Thứ yếu	Hòa hợp	Hai chiều	Chính yếu
	B	Thứ yếu	Hai chiều	Hòa hợp	Chính yếu
	AB	Thứ yếu	Thứ yếu	Thứ yếu	Hòa hợp

Sự bất đồng nhóm máu giữa người cho và người nhận

Theo Ignor B và cộng sự, những ngày đầu tiên sau ghép TBG đồng loài, nếu có bất đồng nhóm máu ABO thì có tỷ lệ thải ghép, ghép chống chủ gia tăng hoặc phản ứng tan máu nặng có thể xảy ra. Kết quả phân tích của tác giả cho thấy tỷ lệ tử vong không do tái phát tăng lên trong những tháng đầu tiên sau khi ghép ở các nhóm bệnh nhân không hòa hợp ABO chính yếu và thứ yếu. Mặc dù tỷ lệ GVHD và mức độ GVHD nghiêm trọng không khác biệt đáng kể giữa các nhóm, nhưng tỷ lệ tử vong liên quan đến GVHD trong các nhóm không hòa hợp ABO chính yếu gia tăng. Nghiên cứu cho thấy rằng sự không tương thích của ABO có tác động xấu đến kết quả mọc ghép [48].

Bên cạnh hệ thống nhóm máu ABO, các KN Rhesus (Rh), đặc biệt là KN D, là yếu tố quan trọng nhất đối với quá trình miễn dịch thường xảy ra sau khi những người có RhD âm tính tiếp xúc với các thành phần máu RhD dương tính [49]. Một số nghiên cứu đã cho thấy ở những người nhận TBG có 10% phản ứng miễn dịch chống D khi người RhD dương nhận TBG từ có RhD âm [50], [51].

1.3. Ứng dụng nguồn tế bào gốc từ máu dây rốn

1.3.1. Ứng dụng ghép máu dây rốn trong các bệnh lý huyết học

Ghép TBG tạo máu là đưa các TBG tạo máu vào cơ thể để các tế bào này có thể cư trú tại cơ quan sinh máu (chủ yếu là tủy xương) nhằm tái sinh lại hệ thống tạo máu đã bị phá hủy một phần hoặc hoàn toàn bởi hóa trị và/hoặc xạ trị. Ghép TBG tạo máu là một liệu pháp chữa trị tiềm năng cho các bệnh lý huyết học ác tính và các rối loạn nghiêm trọng khác của máu, hệ miễn dịch. Hiện nay ghép TBG tạo máu được ứng dụng cho nhiều bệnh lý huyết học cũng như các bệnh lý khác. Có khoảng 70 bệnh lý được điều trị bằng ghép TBG tạo máu bao gồm các nhóm bệnh bạch cầu cấp, nhóm bạch cầu kinh, rối loạn sinh tủy, bệnh lý u lympho ác tính, ung thư hạch, u nguyên bào thần kinh, thalassemia, ung thư hạch, thiếu hụt miễn dịch, các bệnh chuyển hóa... Việc sử dụng TBG MDR đã tăng lên nhanh chóng và đáng kể từ khi ca ghép TBG tạo máu đầu tiên vào năm 1957. Ca ghép TBG tạo máu thứ một triệu được thực hiện vào năm 2013. Năm 2014, hơn 40.000 ca ghép TBG tạo máu được thực hiện ở châu Âu cho hơn 36.000 bệnh nhân mắc các bệnh khác nhau, trong đó 58% là ghép tự thân còn lại nhận TBG tủy xương của những người cho cùng huyết thống hoặc không cùng huyết thống, từ máu ngoại vi sau khi huy động hoặc MDR [52].

Năm 2013 cũng đánh dấu kỷ niệm lần thứ 25 của ca ghép TBG MDR đầu tiên cho một đứa trẻ bị thiếu máu Fanconi. Người nhận vẫn còn sống và sức khỏe tốt. Trên toàn thế giới, ước tính có hơn 730.000 đơn vị TBG MDR

không cùng huyết thống được sử dụng tại hơn 160 ngân hàng máu, và hơn 35.000 đơn vị đã ghép [53]. Báo cáo năm 2014, tại Châu Âu MDR chiếm 2% ca ghép không cùng huyết thống, đặc biệt sử dụng nhiều ở Mỹ và Nhật Bản [52]. Từ dữ liệu có sẵn trên toàn thế giới, Trung tâm Nghiên cứu Máu và Tủy xương Quốc tế (CIBMTR) đã báo cáo rằng TBG MDR chiếm 8% ca ghép TBG tạo máu không cùng huyết thống. Khảo sát quốc tế năm 2015 đã ghi nhận rằng 32% trẻ em và 10% các trường hợp ghép TBG không cùng huyết thống sử dụng TBG MDR là nguồn chính để ghép [54].

1.3.2. Ứng dụng của TBG máu dây rốn trong y học tái tạo

Trước đây TBG MDR chủ yếu sử dụng để điều trị các bệnh lý có rối loạn chức năng tạo máu, nhưng các điều trị này đã được mở rộng một cách có hiệu quả đến các bệnh không liên quan đến rối loạn chức năng tạo máu. TBG MDR cũng được sử dụng như một hình thức tái tạo tế bào hoặc điều hòa miễn dịch [55]. Một số nghiên cứu thú vị là sử dụng ghép MDR tự thân hoặc đồng loài cho các bệnh thuộc các lĩnh vực khác như trong thần kinh học, nội tiết và tim mạch... những bệnh mà có ảnh hưởng rất lớn đến sức khỏe con người. So với nguồn TBG thu được từ tủy xương, nguồn TBG MDR có được coi là nguồn TBG phong phú nhất vì tỷ lệ sinh toàn thế giới là trên 140 triệu trẻ/năm (Thống kê y tế thế giới 2011). Ngoài ra, TBG MDR không liên quan đến các mối quan tâm về đạo đức, tôn giáo hoặc chính trị, khiến chúng trở nên hấp dẫn hơn khi sử dụng trong thực hành lâm sàng [56].

Tế bào gốc MDR cũng cho thấy một số lợi thế so với các nguồn TBG trưởng thành như tủy xương. Ngoài quy trình thu thập không xâm lấn, TBG MDR có telomere dài hơn so với các TBG trưởng thành khác do đó tiềm năng tăng sinh cao hơn [57]. Hơn nữa, khi ghép các mẫu MDR không hòa hợp hoàn toàn HLA cho thấy nguy cơ mắc bệnh GVHD thấp hơn so với ghép tủy xương. Điều này cũng được giải thích dựa trên thực tế là các tế bào được ghép

từ MDR ngày thơ hơn và có biểu hiện protein (HLA) thấp hơn so với TBG trưởng thành [58]. Ngoài ra, ghép MDR được chứng minh là có nguy cơ lây nhiễm thấp hơn so với ghép tủy xương [59].

Y học tái tạo là lĩnh vực phát triển rất nhanh và nhiều thử nghiệm lâm sàng đã được thực hiện. Có nhiều thử nghiệm đã thành công nhưng bên cạnh đó cũng có những thử nghiệm đang phải dừng lại vì các lý do khác nhau như: Năm 2014, Cotten CM và cộng sự đã đánh giá tính khả thi của việc thu thập, chuẩn bị và truyền các TBG MDR tươi tự thân cho trẻ sơ sinh bị bệnh thiếu oxy não cục bộ [55]. Min K và cộng sự (2013) đã ghép TBG MDR kết hợp với erythropoietin tái tổ hợp và ông đã chứng minh được liệu pháp của ông có hiệu quả tiềm năng cho việc điều trị trẻ bị bại não [60]. Truyền TBG MDR tự thân cho trẻ em bị đái tháo đường type 1 đã được chứng minh là an toàn [61].

Các TBG MDR của người cũng đang được nghiên cứu để điều trị bệnh viêm ruột, bệnh giác mạc, bệnh thận, viêm khớp do collagen gây ra. Một số thử nghiệm lâm sàng như ghép điều trị các bệnh thần kinh như bại não, thiếu oxy não cục bộ, chấn thương sọ não và chứng tự kỷ... Tuy nhiên hiện nay có những thách thức rất lớn với ghép TBG MDR trong y học tái tạo là: (1) Khó khăn để định lượng được mức độ thành công, ví dụ như ghép TBG MDR cho trẻ bại não thì theo dõi sự cải thiện chức năng rất khó; (2) Có những trở ngại vì tính nhân văn trong việc sử dụng sản phẩm

1.3.3. Một số hình thức ghép tế bào gốc máu dây rốn trong điều trị bệnh lý

Kết quả sống toàn bộ sau ghép TBG MDR và ghép TBG từ người cho cùng huyết thống là tương đương nhau. Tuy nhiên, ghép TBG MDR thường mọc mảnh ghép chậm, miễn dịch hồi phục chậm nên tăng nguy cơ nhiễm trùng cơ hội. Điều này có thể là do các TBCN cũng như tế bào CD34 trong MDR thấp đồng thời nó cũng phản ánh sự non nớt về thẩm quyền miễn dịch của MDR [62]. Trong bối cảnh này, vấn đề được đặt ra chiến lược tối ưu hóa cho ghép và phục hồi miễn dịch. Hình thức ghép TBG MDR kinh điển là

ghép 1 đơn vị đủ liều hòa hợp HLA tối thiểu. Tuy nhiên vì nhược điểm của TBG MDR là mọc ghép chậm mà người ta đã nghiên cứu ra các kiểu ghép kết hợp để khắc phục nhược điểm này. Hiện nay đang có các hình thức ghép sau:

* Ghép kết hợp 2 đơn vị TBG MDR không cùng huyết thống

Hình thức ghép kết hợp 2 đơn vị TBG MDR đã được sử dụng. Trường Đại học Minnesota đã đi đầu trong lĩnh vực này. Các báo cáo sau khi ghép kết hợp 2 đơn vị TBG MDR cho thấy: hiệu quả ghép đã được cải thiện đáng kể [62]. Ngoài ra, so với các nguồn khác nó làm giảm nguy cơ tái phát bệnh. Tăng mức độ ghép chống chủ từ mức độ nhẹ lên trung bình so với việc sử dụng 1 đơn vị TBG MDR. Nhiều nghiên cứu đã công bố kết quả sau khi ghép kết hợp 2 đơn vị TBG MDR trên bệnh nhân được điều trị bằng phác đồ điều kiện hóa giảm liều đã cho thấy tỷ lệ sống không bệnh sau ghép từ 30 – 50% [63]. Năm 2012, De Lima và cộng sự đã nghiên cứu ghép 2 đơn vị TBG MDR cho người trưởng thành mắc bệnh lý huyết học ác tính. Trong đó tác giả đã sử dụng 1 đơn vị chứa TBG được nhân lên trong môi trường có TBG trung mô đồng loài và đưa ra kết luận rằng: đơn vị TBG MDR được nuôi cấy nhân lên trong môi trường có TBG trung mô thì có hiệu quả ghép tốt hơn đơn vị TBG MDR không được nuôi cấy trong môi trường có TBG trung mô [64].

* Ghép Haploidentical –cord (haplo-cord)

Yếu tố ảnh hưởng lớn nhất đến sự thành công của cuộc ghép là sự hồi phục miễn dịch. Nếu bệnh nhân ghép có thời gian phục hồi miễn dịch càng chậm thì nguy cơ nhiễm khuẩn càng tăng, đặc biệt có thể mắc những virus hiếm gặp. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để đẩy nhanh thời gian mọc ghép thông qua kích thích sự di chuyển của TBG vào tủy xương, ghép nhiều lần, ghép nhiều đơn vị hoặc sử dụng thêm loại tế bào thứ ba. Ghép Haplo-cord, đi tiên phong bởi Fernandez từ Madrid. Đây là hình thức kết hợp một

đơn vị MDR với TB CD34 được lựa chọn từ người hiến cùng huyết thống, có HLA hòa hợp một phần [65]. Năm 2016, Koen van Besien và cộng sự nghiên cứu kết quả ghép halo-cord trên 200 bệnh nhân mắc bệnh huyết học ác tính. Kết quả cho thấy: Tỷ lệ bệnh nhân sống một năm là 64% đối với bệnh nhân có nguy cơ trung bình và thấp, không có tử vong sau 2 năm. Trong nhóm bệnh nguy cơ cao, tỷ lệ sống 1 năm là 44%. Khi so sánh với bệnh nhân được ghép kết hợp 2 đơn vị TBG MDR, ghép haplo-cord dẫn đến phục hồi tạo máu nhanh hơn, tỷ lệ GVHD và tỷ lệ tái phát bệnh thấp hơn, cải thiện được mức độ ghép chống chủ, khả năng tái phát và thời gian sống không bệnh [66].

Ghép Haplo-cord đại diện cho một phương pháp nghiên cứu đầy hứa hẹn để giải quyết một thách thức của ghép TBG đồng loài: vượt qua rào cản HLA. Kết quả của các nghiên cứu ban đầu là đáng khích lệ: đáp ứng thời gian ghép, tỷ lệ GVHD cấp tính và đặc biệt, GVHD mạn tính là cực thấp. Đối với bệnh nhân có bệnh huyết học ác tính trải qua ghép haplo – cord có tỷ lệ tái phát rất thấp [66].

* Sử dụng TBG MDR kết hợp với cytokin

Một nghiên cứu mới của đã sử dụng Prostaglandin E2 để cải thiện việc homing của tế bào dây rốn về tủy xương bằng cách điều chỉnh biểu hiện của CXCR4 và đã có sự cải thiện. Các chiến lược khác bao gồm sử dụng fucosylation tiêm trực tiếp vào đơn vị MDR hay sử dụng lympho T gây độc để giảm nhiễm virus cho người bệnh ghép TBG MDR. Nếu các kỹ thuật trên thành công thì sẽ làm giảm đáng kể chi phí ghép TBG MDR vì không phải dùng đến đơn vị TBG MDR thứ 2, không tốn tiền chi phí cho những điều trị sau ghép phòng ngừa biến chứng nhiễm trùng. Dù tái phát vẫn là nguyên nhân gây tử vong, nhưng những nghiên cứu gần đây của nhóm Seattle đã chỉ ra với những bệnh nhân tồn dư tối thiểu thấp nhất, nếu ghép TBG MDR thì có nguy cơ tái phát thấp hơn so với bệnh nhân ghép đồng loài khác [67].

1.4. Tình hình nghiên cứu tế bào gốc máu dây rốn trong và ngoài nước

1.4.1. Tình hình nghiên cứu tế bào gốc máu dây rốn trên thế giới

Vào tháng 9 năm 2018, kỷ niệm 30 năm ca ghép TBG tạo máu đầu tiên sử dụng MDR để ghép cho bệnh nhân bị thiếu máu Fanconi. Chứng minh thành công rằng MDR có khả năng phục hồi máu và hệ thống miễn dịch của bệnh nhân, cùng với xác nhận rằng MDR có thể được bảo quản để sử dụng sau này, dẫn đến việc thành lập ngân hàng MDR, và do đó ngân hàng TBG thành lập trong đầu những năm 1990 [68]. Ngân hàng tế bào gốc bao gồm các ngân hàng lưu trữ MDR cộng đồng, nơi lưu trữ các đơn vị TBG MDR để sử dụng cho một người nhận không cùng huyết thống; ngân hàng lưu trữ MDR cá nhân, lưu trữ MDR để sử dụng trong tương lai của người hiến hoặc người thân cấp một hoặc cấp hai; và các ngân hàng lai, cung cấp dịch vụ kết hợp [25]. Người ta ước tính rằng hơn 800.000 đơn vị TBG MDR được bảo quản lạnh trong các ngân hàng cộng đồng và hơn 5 triệu đơn vị khác được bảo quản trong các ngân hàng cá nhân [69]. Có nhiều nghiên cứu trên thế giới về cách thu thập, xử lý và lưu trữ MDR. Các quy trình này khác nhau ở các nước khác nhau thậm chí trong cùng một nước các ngân hàng khác nhau sẽ có quy trình khác nhau phù hợp với mục đích đề ra.

Trong nghiên cứu của Zingsem J và cộng sự năm 2003. Tác giả so sánh hai hình thức xử lý bằng máy tự động và bằng ly tâm tiêu chuẩn cho kết quả: Bảng hệ thống tự động hiệu suất thu thập trung bình là $78,6 \pm 24,9\%$ đối với các TBCN $77,4 \pm 27,8\%$ đối với MNC $55,5 \pm 14,6\%$ đối với hồng cầu và $83,6 \pm 32,5\%$ đối với TB CD34, trong khi khi sử dụng kỹ thuật ly tâm tiêu chuẩn $73,1 \pm 13,2\%$ đối với các TBCN, $78,1 \pm 14,9\%$ đối với các TB đơn nhân, $26,0 \pm 12,2\%$ đối với hồng cầu và $77,0 \pm 17,6\%$ đối với các TB CD34. Thời gian xử lý là khoảng 20 phút cho xử lý tự động và 60 đến 80 phút cho kỹ thuật ly tâm tiêu chuẩn [70].

Năm 2011, Tulika Chandra đã được phân tích 500 mẫu MDR trong đó có 282 trẻ sơ sinh (56,4%) là nam và 218 (43,6%) là nữ. Tuổi thai trung bình là 38 tuần (trong khoảng 31-41). Cân nặng khi sinh trung bình 2790 ± 426 gram (1800 - 3900gram). Trung bình của tuổi mẹ là 28 tuổi (trung bình $28,47 \pm 4,26$, tầm 19 - 44 tuổi). Thể tích thu thập và tổng nồng độ TB CD34 lần lượt là $79,47 \pm 13,04$ ml (70-120ml) và $0,41 \pm 0,42\%$ (0,02-1,98%) tương ứng với sinh thường. Thể tích thu thập và nồng độ TB CD34 là $137,22 \pm 17,80$ ml (100 - 160 ml) và $2,42 \pm 1,02\%$ (0,17-4,05%) tương ứng trong sinh mổ. Giá trị trung bình của thể tích MDR và nồng độ TB CD34 cao hơn đáng kể khi sinh mổ so với sinh thường ($p < 0,01$). Trẻ có cân nặng cao thì thể tích MDR và nồng độ TB CD34 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với trẻ có cân nặng thấp ($p < 0,01$). Giới tính trẻ em không ảnh hưởng đến thể tích MDR và nồng độ TB CD34 [71].

Một nghiên cứu cắt ngang từ 2012 đến 2014 với cỡ mẫu thuận tiện và kỹ thuật tuyển chọn liên tiếp. Dunia Jawdat và cộng sự tuyển chọn sản phụ bằng cách loại trừ các bà mẹ dưới 18 tuổi, các bà mẹ bị ung thư, di truyền, hoặc bệnh lây truyền, mẹ nhiễm sốt rét, đa thai. Nếu một trong hai người cha hoặc mẹ đã được ghép tạng, truyền máu hoặc có một hình xăm trong 12 tháng qua. Loại trừ trẻ có cân nặng $< 2500g$, sinh non < 34 tuần, có dấu hiệu nhiễm trùng hoặc dị tật bẩm sinh, điểm Apgar cho bé ít hơn 7-8 /10 trong 5 phút, dây rốn cho thấy bất kỳ bất thường và lượng máu thu thập được < 50 ml. Cân nặng khi sinh của trẻ sơ sinh được đo bằng các y tá được đào tạo sử dụng thang đo kỹ thuật số (SECA). Tất cả các bà mẹ đã được phỏng vấn, đồng ý và đăng ký bởi điều phối viên ngân hàng MDR. Một khi các bà mẹ đã đồng ý, tiền sử bệnh tật được xem xét để hoàn thành danh sách kiểm tra đánh giá khả năng chấp nhận của nhà tài trợ để quyết định có thu thập huy không. Sau khi thu thập thành công, máu đã chuyển đến phòng thí nghiệm để xử lý. Kết quả với

957 mẫu MDR thu được có nồng độ TB CD34 là $0,42 \pm 0,44\%$ (0,02-2,16%) cho nhóm 50 - 100 ml tổng thể tích máu thu gom. Giá trị trung bình của TB CD34 là $2,41 \pm 0,99\%$ (0,16 - 4,02%) cho nhóm thể tích MDR 101 -160 ml. Nồng độ TB CD34 cao hơn khi thể tích MDR cao hơn. Nồng độ TB CD34 tương quan thuận với thể tích MDR ($p < 0,01$) [72].

Một nghiên cứu dịch tễ học, cắt ngang, quan sát, đã phân tích 458 mẫu MDR tại 2 ngân hàng nằm ở thành phố São José, Santa Catarina từ tháng 9 năm 2009 đến tháng 3 năm 2013 thực hiện bởi Rodrigo Dias Nunes và cộng sự. Người hiến MDR được đánh giá tiền sử cá nhân, tiền sử gia đình, kết quả xét nghiệm và với các câu hỏi tiêu chuẩn được sử dụng giống như trong hiến máu. Tất cả đã ký chấp thuận trước khi thu thập. Thu thập được thực hiện sau sỏ rau trong một phòng riêng biệt. Thông thường, các mẫu MDR được giữ trong thời gian không quá 24-28 h ở $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ trước khi xử lý, sau đó được bảo quản lạnh trong nitơ lỏng, dưới tốc độ đóng băng có kiểm soát và được lưu trữ lâu dài theo tiêu chí quốc tế ở nhiệt độ thấp hơn -150°C . MDR được xử lý trong vòng tối đa 48 giờ sau khi được thu thập. Kết quả: độ tuổi sản phụ từ 18 đến 29 (62,8%), tuổi thai ≥ 40 tuần (55,2%), sinh thường (51,3%), sinh non (41,4%) và trẻ sơ sinh nam (54,4%) cân nặng 3000 - 3499 g (41,8%). Thể tích MDR dao động trong khoảng 71,6 đến 275,2 ml, tổng số TBCN nằm trong khoảng $4,77 \times 10^8$ - $31,0 \times 10^8$ tế bào và TB CD34 dao động từ 0,05 đến 1,23%. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về khối lượng so với tuổi thai > 38 tuần ($p = 0,001$), mổ lấy thai ($p < 0,001$) và cân nặng khi sinh > 3500 g ($p < 0,001$). Tổng số TBCN cao hơn ở nhóm mổ lấy thai ($p = 0,022$) và cân nặng khi sinh > 3500 g ($p < 0,001$). Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các biến và tỷ lệ phần trăm của các TB CD34 [73].

Với sự phát triển của ngân hàng MDR, các giải pháp phải được tìm thấy để giải quyết vấn đề không gian lưu trữ, bằng cách giảm thể tích đơn vị

MDR. V Lapierre và cộng sự đã so sánh tổng số TBCN và số lượng tế bào CD34+ trước và sau khi xử lý với ba phương pháp giảm thể tích khác nhau được sử dụng trong ngân hàng: phương pháp thủ công dựa trên quá trình lắng với HES (n = 447), một phương pháp bán tự động (TB) (n = 181) bằng Optipress II và phương pháp tự động Sepax (n = 213). Kết quả phục hồi TBCN cao hơn với Sepax ($80,3 \pm 7,7\%$) so với HES ($76,8 \pm 9,1\%$) và TB ($60,7 \pm 13,5\%$) ($p < 0,0001$). Khả năng phục hồi tế bào CD34+ cao hơn với Sepax ($86 \pm 11,6\%$) so với HES ($81,5 \pm 12,5\%$) và TB ($82,0 \pm 17,7\%$) ($p < 0,008$ và $< 0,0001$, tương ứng) và kết quả với HES và TB không khác biệt ($p = 0,7$). Như vậy, phương pháp giảm thể tích Sepax cho phép phục hồi tế bào TBCN và CD34+ cao hơn [74].

N. Sato đã thực hiện nghiên cứu năm 2015. Tác giả xử lý MDR bằng thiết bị lọc mới (CellEffic CB, bao gồm vải không dệt), mà không cần ly tâm. Các tế bào được thu hoạch bằng cách đi qua bộ lọc bằng cùng với HES 6% hoặc dung dịch muối sinh lý 0,9% (SALINE). CellEffic CB bao gồm một bộ lọc và hai túi như trong. Sợi polyester được sử dụng làm bộ lọc. Các mẫu CB được đưa vào bộ lọc dưới tác động của trọng lực. Các tế bào bị giữ trên bộ lọc được thu thập vào túi thu hoạch tế bào bằng cách rửa ngược dung dịch HES 6% (hydroxyethyl) hoặc SALINE (NaCl 0,9%). Tác giả so sánh các kỹ thuật xử lý bằng CellEffic CB với sử dụng HES 6%, saline (NaCl 0,9%) và hệ thống Sepax. Thu hồi tế bào CD45+ trung bình cho thu hoạch HES và SALINE lần lượt là $76,1 \pm 8,7\%$ và $73,4 \pm 5,9\%$. Không có sự khác biệt thống kê giữa thu hoạch HES và SALINE ($p > 0,05$). Theo kết quả phân tích Sepax, khả năng phục hồi tế bào CD45+ trung bình là $76,6 \pm 16,1\%$. Không có sự khác biệt thống kê giữa CellEffic CB (thu hoạch HES hoặc SALINE) và Sepax ($p > 0,05$) [75].

Indreshpal Kaur và cộng sự 2016 đã so sánh hai cách xử lý là hệ thống tự động Sepax và xử lý thủ công. Kết quả cho thấy phục hồi tổng số tế TBCN khi các thu hồi TB đơn nhân trên hệ thống Sepax (25%) so với phương pháp thủ công (22%) có sự khác biệt $p = 0,007$. Sự phục hồi của các tế bào CD34+, NK cao hơn ở Sepax (49,5%, 29,2%) so với phương pháp thủ công (24,2%; 13,5%) với $p < 0,0001$. Tuy nhiên, tác giả không tìm thấy sự khác biệt nào trong việc phục hồi bạch cầu mono ($p = 0,2$), tổng số tế bào lympho ($p = 0,66$), tế bào T CD3+ ($p = 0,44$) hoặc tế bào B CD19+ ($p = 0,14$) khi sử dụng hai phương pháp. Không có sự khác biệt tỷ lệ sống của TBCN ($p = 0,26$) hoặc tế bào CD34+ ($p = 0,25$) khi xử lý bằng hai phương pháp. Phương pháp thủ công giảm hematocrit, bạch cầu hạt và tiểu cầu với là ưu việt so với Sepax [76].

Năm 2000, NetCord – FACT là tổ chức đầu tiên đưa ra các tiêu chuẩn về máu dây rốn. Năm 2016, tái bản lần 6 với các tiêu chuẩn được đưa ra như sau [77]:

- Với tuổi thai dưới 34 tuần, các bác sĩ sản khoa phải đánh giá về mức độ an toàn của người hiến mới được phép thu thập;
- Mẫu MDR xử lý trong 24 giờ tính từ thời điểm thu thập;
- Xử lý thu hồi $\geq 60\%$ tế bào có nhân;
- Sau khi xử lý tổng số TBCN $\geq 5.0 \times 10^8$, số lượng tế bào CD34 sống sau khi xử lý $\geq 1.25 \times 10^6$;
- Phân tích thành phần huyết sắc tố (điện di) giúp loại trừ những đơn vị TBG mang bệnh huyết sắc tố di truyền.

1.4.2. Tình hình nghiên cứu tế bào gốc máu dây rốn tại Việt Nam

Tại Việt Nam, kỹ thuật ghép tủy (tế bào gốc tạo máu) đã được thực hiện lần đầu tiên vào năm 1995 ở Bệnh viện Truyền máu - Huyết học Thành phố Hồ Chí Minh, đến nay bệnh viện đã ghép được hơn 300 ca. TBG MDR lần đầu

tiên được ứng dụng năm 2011 [78]. Đến nay cả nước đã có 9 trung tâm ghép TBG tạo máu với số lượng ca ghép của cả nước gần 1.000 ca. Để phục vụ cho việc ứng dụng ghép, nhiều công trình nghiên cứu về việc tạo nguồn TBG tạo máu đã được triển khai. Trong số đó, đầu tiên là đề tài KH-CN cấp Bộ của tác giả Trần Văn Bé và cộng sự đã nghiên cứu kỹ thuật xử lý và trữ TBG MDR năm 2000 [79]. Sau đó một số nghiên cứu về TBG MDR được triển khai như chiết tách TBG MDR hay đánh giá chất lượng TBG MDR bằng đếm TB CD34 và nuôi cấy cụm tế bào, nghiên cứu xây dựng quy trình thu gom TBG tạo máu từ MDR... [80],[81],[82].

Năm 2008, luận án tiến sĩ của tác giả Huỳnh Nghĩa “Nghiên cứu ứng dụng quy trình xử lý tế bào gốc máu cuống rốn” [83]. Trong nghiên cứu, tác giả đã tư vấn, sàng lọc sản phụ và thiết kế phòng thu thập gần phòng sinh. Kết quả 1234 mẫu MDR được thu thập với thể tích trung bình $81,71 \pm 18,98$ ml, có 269 mẫu không đạt tiêu chuẩn chủ yếu do không đủ thể tích (trên 50%) và do bệnh lý hemoglobin (20%). 960 mẫu MDR được đưa vào xử lý bằng kỹ thuật quay ly tâm có HES. Kết quả giảm được 69,7% thể tích, 55,41% hồng cầu, TBCN tăng 3,21 lần. Thể tích đơn vị TBG thu được trung bình 23,4 ml với số lượng TBCN trung bình $75,01 \pm 37,04 \times 10^7$ và $2,26 \pm 1,85 \times 10^6$ TB CD34. Có 874 đơn vị TBG đạt tiêu chuẩn sau lưu trữ, thời gian lưu trữ và thành phần MDR không có sự thay đổi về số lượng và chất lượng.

Năm 2011, tác giả Nguyễn Quang Tùng đã “Nghiên cứu ứng dụng và hoàn thiện quy trình thu gom, xử lý, bảo quản tế bào gốc tạo máu dùng cho ghép đồng loài”. Luận án là sản phẩm đào tạo của đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ Y tế do GS.TSKH Đỗ Trung Phấn là chủ nhiệm [84],[85]. Trong nghiên cứu tác giả đã nghiên cứu thu gom, lưu trữ, bảo quản từ nhiều nguồn trong đó có MDR. Tác giả nghiên cứu trên 112 mẫu MDR thu được từ những

bà mẹ tình nguyện hiến MDR có thể tích trung bình $90,5 \pm 20,2$ ml. Chọn 40 mẫu có thể tích trên 90 ml để xử lý trong đó 20 mẫu xử lý bằng ly tâm đơn thuần, 20 mẫu xử lý bằng để lắng có HES 30 phút và ly tâm 90g trong 5 phút ở 10°C . Kết quả cho thấy sử dụng dung dịch HES thu hồi trên 90% TBCN và 85% TB CD34. Tổng số cụm tạo ra sau rã đông nuôi cấy 187 ± 39 cụm, trong đó 8,2% cụm đa dòng, 14,4% cụm dòng hạt – mono, 29,1% cụm dòng bạch cầu hạt, 43,8% cụm dòng hồng cầu.

Nhận thức được ưu điểm cũng như vai trò quan trọng của nguồn TBG này và dựa trên các thành tựu đã có về tạo nguồn TBG từ MDR, nhiều cơ sở trong cả nước đã xây dựng các ngân hàng MDR để lưu trữ dài hạn và làm nguồn cung cấp sẵn sàng cho các hoạt động ghép. Các ngân hàng TBG MDR được xây dựng đầu tiên tại Việt Nam thường lựa chọn đối tượng lưu trữ dành cho cá nhân như ngân hàng MDR Bệnh viện Truyền máu - Huyết học Thành phố Hồ Chí Minh, Mekostem của công ty Mekophar, Bệnh viện Nhi Trung ương, Bệnh viện Vinmec....

Ngân hàng MDR của bệnh viện Truyền máu – Huyết học TP HCM thành lập năm 2002. Đơn vị là thành viên chính thức của AsiaCord vào tháng 3 năm 2004. Tại đây có hàng ngàn đơn vị TBG MDR đã được lưu trữ và sẵn sàng phục vụ công tác điều trị bệnh.

Ngân hàng Tế bào Máu dây rốn, Bệnh viện Nhi Trung ương ra đời năm 2011. Đến nay, ngân hàng đã tiến hành thu thập và lưu trữ TBG từ MDR của hàng nghìn trẻ sơ sinh từ những gia đình có nhu cầu dùng hoặc dự phòng TBG MDR cho các bệnh lý về máu trong tương lai. Trong các mẫu TBG MDR được lưu trữ tại bệnh viện Nhi Trung ương, các bác sĩ đã ứng dụng điều trị thành công cho một số bé mắc bệnh tan máu bẩm sinh Thalassemia bằng TBG MDR của anh chị em ruột của trẻ.

Ra đời ngày 11/3/2014, ngân hàng MDR Vinmec hiện là ngân hàng MDR hiện đại nhất Việt Nam. Sau 4 năm đi vào hoạt động, ngân hàng MDR Vinmec đã lưu TBG MDR cho hơn 3.000 gia đình.

Bệnh viện Phụ sản Trung ương là bệnh viện đầu ngành về sản khoa của cả nước. Với nhu cầu lưu trữ và sử dụng TGB MDR ngày càng nhiều, tháng 4 năm 2018, bệnh viện đã cho đi vào hoạt động một Trung tâm TBG MDR với trang thiết bị và máy móc hiện đại được đầu tư lên đến hơn 20 tỷ đồng. Đây là nơi có lượng TBG MDR được lưu trữ vô cùng lớn với hơn 20.000 ca sinh được thực hiện ở đây mỗi năm. Trung tâm hiện là nơi có vai trò lưu trữ TBG MDR cho các mẹ có nguyện vọng lưu trữ tại các bệnh viện phụ sản, khoa sản và nhà hộ sinh trên địa bàn thủ đô Hà Nội...

Tuy nhiên, chỉ duy nhất tại Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương, với sự nhận thức tầm quan trọng của việc tạo nguồn TBG cho bệnh nhân từ nguồn người hiến tặng, đã thành lập Ngân hàng TBG MDR cộng đồng từ năm 2014. Đến năm 2017, ngân hàng đã lưu trữ được hơn 3000 đơn vị TBG MDR đã được xét nghiệm HLA sẵn sàng cung cấp cho các bệnh nhân có nhu cầu ghép [86]. Khác với các ngân hàng MDR dành cho hình thức lưu trữ dịch vụ cho cá nhân, ngân hàng MDR cho cộng đồng sẽ yêu cầu chất lượng TBG khác biệt đáng kể vì sự chọn lọc từ đầu vào, sàng lọc an toàn và điều chế với quy mô lớn. Chính vì vậy, bệnh nhân sẽ có được đơn vị TBG MDR có chất lượng tốt nhất, an toàn nhất và luôn sẵn sàng cho tìm kiếm để ghép. Các ngân hàng TBG MDR tại Việt Nam đều đã áp dụng các quy trình thu thập, xử lý và lưu trữ kết hợp tự động, bán tự động đạt chất lượng tốt. Tuy nhiên, các ngân hàng MDR tại Việt Nam mới chỉ áp dụng phương thức tiếp cận đối với lưu trữ TBG MDR cho cá nhân nên chất lượng chung khi áp dụng cho cộng đồng chưa cao. Việc cải tiến, tối ưu hóa các quy trình này là rất cần thiết giúp tăng số lượng TBG có trong mỗi đơn vị MDR thu thập, xử lý và lưu trữ đồng thời tăng khả năng điều trị thành công cho mỗi ca ghép. Cụ thể tại ngân hàng TBG

MDR cộng đồng của Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương, các đơn vị TBG MDR có thể đủ liều để ghép cho các bệnh nhân người lớn, với các kết quả xét nghiệm HLA độ phân giải cao, sàng lọc các yếu tố nguy cơ, định nhóm máu, chuẩn bị đầy đủ thông tin sẵn sàng cho nhu cầu tìm kiếm của bệnh nhân [87]. Cho đến nay vì nhu cầu lưu trữ MDR, tại Việt Nam đã có nhiều ngân hàng TBG được thành lập. Tuy nhiên, duy nhất ngân hàng TBG MDR cộng đồng đủ điều kiện phục vụ tìm kiếm của bệnh nhân có nhu cầu ghép TBG tạo máu.

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

* Đối tượng nghiên cứu gồm:

- 1668 mẫu máu dây rốn cộng đồng đủ tiêu chuẩn xử lý và bảo quản tại Ngân hàng Tế bào gốc trong số 2906 mẫu máu dây rốn được thu thập tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội từ tháng 1 năm 2016 đến tháng 12 năm 2018;

- 94 đơn vị tế bào gốc máu dây rốn cộng đồng được đánh giá chất lượng qua rã đông mẫu dây lưu đính kèm tại thời điểm bất kỳ trong thời gian nghiên cứu;

- 217 bệnh nhân có chỉ định tìm kiếm mẫu tế bào gốc phù hợp từ ngân hàng TBG MDR cộng đồng để ghép. Đây là các bệnh nhân mắc bệnh lý huyết học nằm điều trị tại Viện Huyết học cũng như ngoài Viện có chỉ định ghép TBG mà không tìm thấy người cho cùng huyết thống phù hợp.

* Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng nghiên cứu

- 2906 mẫu máu dây rốn được thu từ người hiến là

+ *Sản phụ*: Khỏe mạnh, tuổi từ 18 đến 35, MCV máu ngoại vi $> 80\text{fl}$. Không đa thai, không phát hiện dị tật trong quá trình mang thai (trên siêu âm) và khám thai định kỳ. Sản phụ hiến MDR phải trả lời đầy đủ thông tin vào: Phiếu điều tra sức khỏe người hiến MDR tình nguyện bằng cách điền vào phiếu sẵn và đăng ký tình nguyện hiến MDR.

+ *Thai nhi*: Khỏe mạnh, tuổi thai 36-42 tuần, trọng lượng trẻ ≥ 2600 gram, không có dị tật bẩm sinh.

+ *Quá trình chuyển dạ*: Trong quá trình chuyển dạ và đẻ không có biểu hiện sốt ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), không suy hô hấp, không suy thai... Nước ối không có màu và mùi bất thường.

- 1668 đơn vị TBG MDR được đưa vào bảo quản theo các tiêu chuẩn sau
- + Thể tích MDR ≥ 80 ml (không bao gồm chất chống đông);
- + Túi MDR nguyên vẹn, không có cục đông;
- + MCV MDR ≥ 95 fl (Theo đề tài nghiên cứu của ngân hàng Tế bào gốc: Tình hình phát hiện trẻ mắc thalassemia qua sàng lọc máu dây rốn thu thập và lưu giữ tại viện huyết học – truyền máu tw giai đoạn 2014-2015 [88]
- + TBCN $\geq 80 \times 10^7$
- + Thời gian từ khi thu thập đến xử lý < 24 giờ
- + Sau khi xử lý có kết quả điện di huyết sắc tố: không có bất thường;
- + Sau khi xử lý có kết quả xét nghiệm HIV, HCV, HBV, giang mai, CMV, vi khuẩn, vi nấm: âm tính

* Tiêu chuẩn loại trừ: tất cả những trường hợp không đồng ý tham gia nghiên cứu hoặc không đáp ứng được các tiêu chuẩn nghiên cứu đề ra.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

- Phương pháp nghiên cứu: mô tả cắt ngang, hồi cứu và tiền cứu;
- Thiết kế nghiên cứu theo mục tiêu nghiên cứu;
- Chọn mẫu thuận tiện. 94 mẫu rã đông đánh giá trong quá trình bảo quản, bao gồm: 12 đơn vị đã được rã đông ghép cho bệnh nhân và 82 đơn vị lựa chọn ngẫu nhiên 5% số mẫu trong quá trình bảo quản.
- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 1 năm 2016 đến tháng 12 năm 2018.

2.2.2. Quy trình nghiên cứu

Bước 1. Lựa chọn đối tượng hiến và thu thập máu dây rốn (do nhân viên y tế tại khoa Sản Bệnh viện Phụ sản Hà Nội thực hiện)

- + Tư vấn cho đối tượng là các sản phụ bắt đầu vào phòng chờ đẻ. Chỉ lập kế hoạch tiến hành thu thập khi sản phụ, thai nhi đáp ứng các tiêu chuẩn lựa chọn người hiến (theo phân đối tượng)

+ Sản phụ trả lời câu hỏi và ký vào đơn tình nguyện hiến MDR nếu đáp ứng tiêu chuẩn hiến

+ Nhân viên y tế dựa vào kinh nghiệm thu thập để chọn lựa những dây rốn dài, đường kính to và chỉ thu thập MDR trong quá trình sinh nếu sản phụ, thai nhi đủ điều kiện và quá trình chuyển dạ diễn ra hoàn toàn bình thường.

+ Bảo quản mẫu MDR trong hộp chuyên dụng, ở nhiệt độ phòng và bàn giao mẫu cho ngân hàng Tế bào gốc, Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương trong thời gian tối đa 24 giờ.

+ Bàn giao mẫu MDR: Tất cả các túi máu đều được Bệnh viện Phụ sản Hà Nội sơ tuyển trước khi bàn giao cho ngân hàng Tế bào gốc. Nếu không đáp ứng các tiêu chuẩn và thủ tục hành chính không đầy đủ thì hủy túi MDR. Bàn giao mẫu sau thu thập và các thông tin của sản phụ (họ và tên, ngày tháng năm sinh, nhóm máu, MCV máu ngoại vi, cân nặng, lần sinh), trẻ sơ sinh (giới tính, tuổi thai, cân nặng trẻ sơ sinh, cân nặng bánh rau, chiều dài dây rốn), túi MDR (cân nặng, tình trạng chống đông, thời gian bảo quản) và các yếu tố khác (thời gian chuyển dạ, hình thức sinh, các bất thường khác...).

Bước 2. Xử lý và bảo quản đông lạnh TBG MDR

Các mẫu MDR đủ tiêu chuẩn được đưa vào xử lý bằng phương pháp thủ công bổ sung HES 6% và để lắng.

** Kết quả cần đạt được sau xử lý máu dây rốn cộng đông*

- Giảm thể tích đơn vị MDR tối đa, thể tích TBG thu được khoảng 25 - 28 ml (bao gồm chất bảo quản);

- Hiệu suất thu hồi TBCN > 70%;

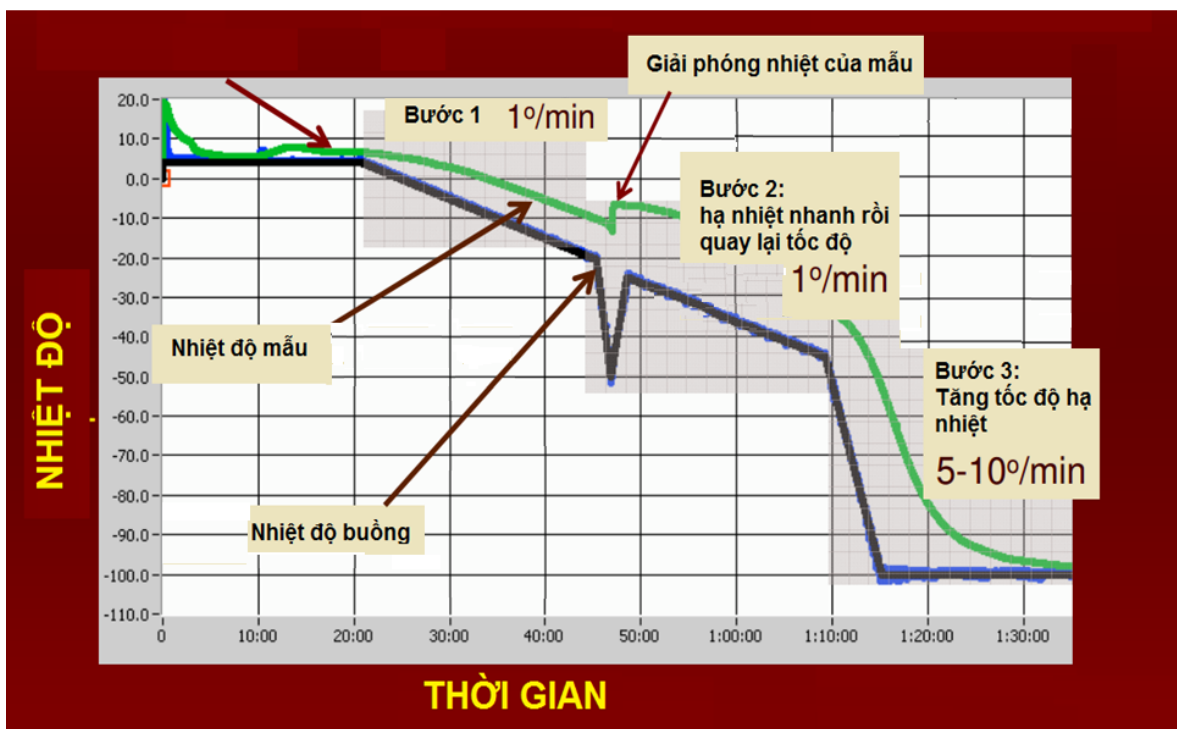
- Tỷ lệ tế bào CD34 sống \geq 70%;

- Xét nghiệm HIV, HBV, HCV, CMV, cấy khuẩn/nấm âm tính.

Mẫu MDR sau khi xử lý sẽ được thêm dung dịch bảo quản và chuyển mẫu đến hệ thống đông lạnh và lưu trữ.

Hạ lạnh theo chương trình: Khối TBG được tiến hành hạ nhiệt độ theo một chương trình định sẵn để đưa khối TBG xuống đến nhiệt độ -80°C , sau đó khối TBG được chuyển lưu ở pha hơi hoặc pha lỏng của bình nitơ lỏng để duy trì nhiệt độ bảo quản ở -150 đến -196°C .

Đưa vào bảo quản trong nitơ lỏng: Các đơn vị TBG MDR sau khi hạ lạnh được bảo quản trong bình/hệ thống có chứa nitơ lỏng và duy trì nhiệt độ âm sâu. Với điều kiện này, khối TBG tạo máu được lưu giữ trong thời gian rất dài, có thể hàng chục năm, mà vẫn bảo đảm số lượng và chất lượng của TBG.



Hình 2.1. Các bước hạ nhiệt độ theo quy trình định sẵn

Bước 3. Rã đông khối tế bào gốc đông lạnh

Mục đích: để đánh giá tình trạng khối TBG trong quá trình bảo quản bao gồm: số lượng TBCN, số lượng và tỷ lệ tế bào CD34 sống, nuôi cấy cụm.

* *Tiêu chuẩn đánh giá đơn vị TBG máu dây rốn sau bảo quản đông lạnh:*

- Đơn vị TBG MDR phải toàn vẹn;

- Thành phần trong mẫu MDR và số lượng TBCN;
- Tỷ lệ TB CD34/ TBCN, số lượng TB CD34;
- Tỷ lệ TB CD34 sống sau rã đông $\geq 70\%$;
- Khả năng mọc cụm khi nuôi cấy.

Bước 4. Thu thập và quản lý thông tin kết quả nghiên cứu

- Hồ sơ giấy (Phiếu trả lời tình trạng sức khỏe người hiến MDR, Phiếu đăng ký tình nguyện hiến MDR)
- Thông tin kết quả thu thập mẫu MDR, xét nghiệm trước, trong và sau quá trình xử lý;
- Thông tin về quá trình bảo quản TBG MDR và kết quả đánh giá chất lượng mẫu bảo quản;
- Thông tin về bệnh nhân tìm kiếm TBG MDR cộng đồng;
- Phần mềm quản lý các kết quả xét nghiệm của mẫu MDR và đơn vị TBG MDR.

2.2.3. Các xét nghiệm thực hiện

a, Xét nghiệm thực hiện trước quá trình xử lý:

- Xét nghiệm tổng phân tích thành phần tế bào trong mẫu MDR để đánh giá chất lượng (trong đó quan tâm đặc biệt đến chỉ số MCV của hồng cầu) và tính số lượng TBCN của mẫu MDR.

b, Xét nghiệm thực hiện sau xử lý bao gồm:

- Xét nghiệm sàng lọc các bệnh nhiễm trùng như virus HIV, HBV, HCV, CMV, nuôi cấy vi khuẩn/nấm... để đảm bảo an toàn khối TBG sử dụng;

- Xét nghiệm nhóm máu hệ ABO, Rh và các nhóm máu phụ để lựa chọn nguồn TBG phù hợp cũng như có chiến lược phù hợp trong quá trình ghép sau này;

- Xét nghiệm đếm TBG tạo máu (TBCN, TB CD34) nhằm đánh giá số lượng TBG tạo máu trong đơn vị TBG, cho phép tiên lượng khả năng mọc mảnh ghép... Xét nghiệm này đặc biệt quan trọng vì nó là tiêu chuẩn để quyết định sự thành công của ca ghép;

- Xét nghiệm tỷ lệ TB CD34 sống nhằm xác định liều lượng TBG cũng như đánh giá chất lượng của đơn vị TBG tại các thời điểm;

- Xét nghiệm điện di huyết sắc tố

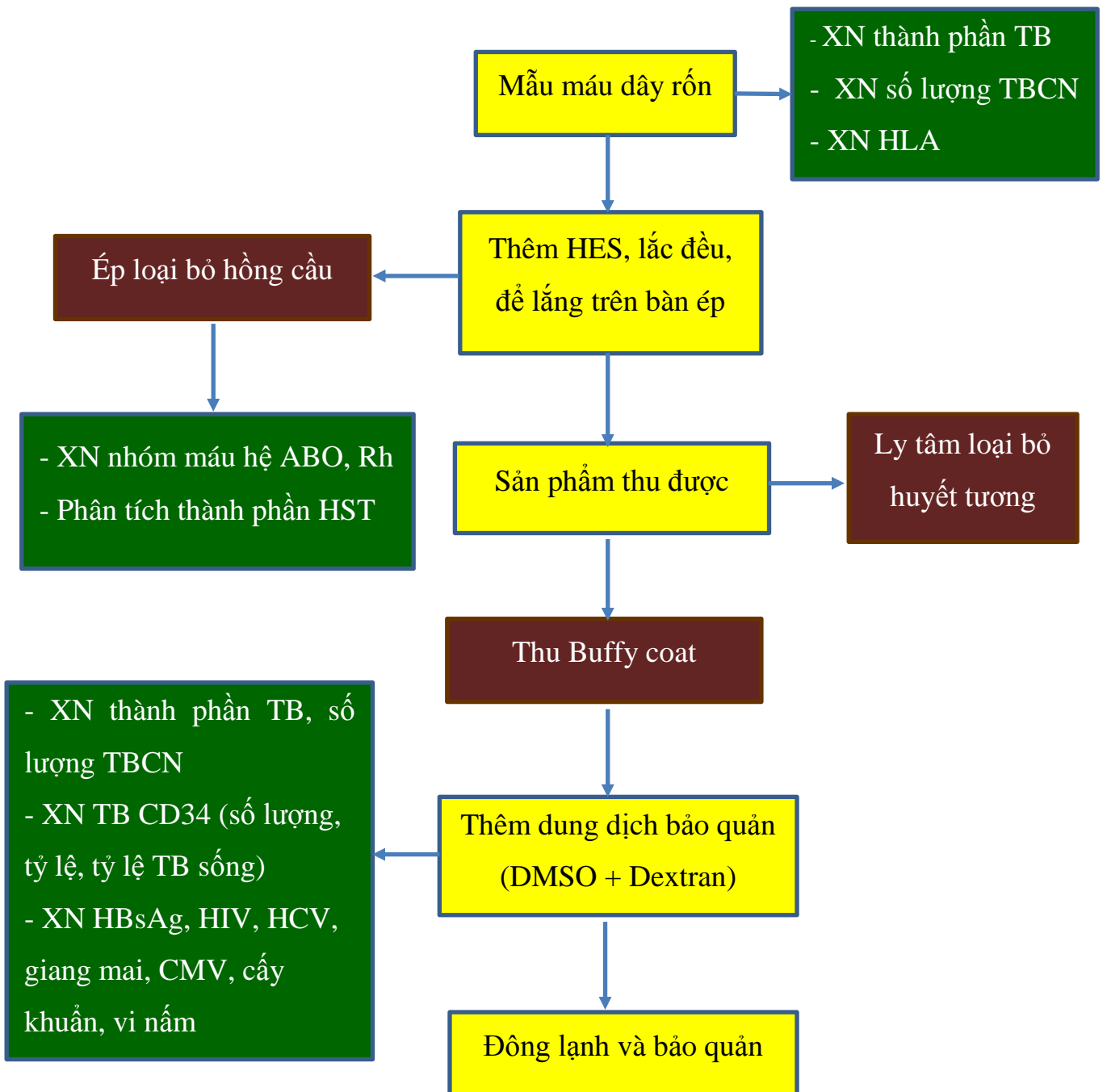
- Xét nghiệm HLA: nhằm tìm kiếm đơn vị TBG phù hợp với bệnh nhân. Người cho ở đây thường không cùng huyết thống nên cần xét nghiệm HLA ở độ phân giải cao bằng kỹ thuật PCR-SSO.

c, Xét nghiệm sau rã đông:

- Xét nghiệm đánh giá thành phần tế bào;

- Xét nghiệm TBCN, CD34 (số lượng và đánh giá tỷ lệ sống)

- Xét nghiệm nuôi cấy tạo cụm tế bào nhằm đánh giá khả năng tạo cụm của mẫu TBG.



Sơ đồ 2.1. Quy trình xử lý và xét nghiệm máu dây rốn

2.2.4. Các biến số nghiên cứu

* Đặc điểm chung

+ Sản phụ: tuổi, cân nặng, MCV máu ngoại vi, dân tộc, hình thức sinh, số lần sinh

+ Thai nhi: tuổi thai, trọng lượng, giới tính trẻ sơ sinh

+ Cân nặng bánh rau, chiều dài dây rốn

* Quá trình thu thập

+ Số đơn vị thu thập, xử lý, loại bỏ, bảo quản;

+ Nguyên nhân loại bỏ mẫu MDR trước xử lý;

+ Nguyên nhân loại bỏ đơn vị TBG sau xử lý;

+ Thể tích MDR, số lượng TBCN của mẫu MDR

+ Đặc điểm TB máu trong mẫu MDR

* Quá trình xử lý và bảo quản

- Chất lượng đơn vị TBG là kết quả của quy trình tuyển chọn, xử lý, bảo quản TBG MDR CỘNG ĐỒNG

+ Hiệu suất thu hồi TBCN, số lượng TBCN, TB CD34

+ Hiệu suất loại bỏ các thành phần như thể tích, hồng cầu, tiểu cầu, bạch cầu

+ Số lượng hồng cầu, hematocrit, số lượng bạch cầu, thành phần các loại bạch cầu, số lượng tiểu cầu trước và sau rã đông

+ Số lượng TBCN, TB CD34 trước và sau rã đông

+ Tỷ lệ các cụm mọc sau bảo quản

+ Tỷ lệ nhóm máu, thành phần huyết sắc tố, các alen HLA-A,B,DR

- Một số yếu tố liên quan

+ Liên quan thể tích MDR, số lượng TBCN, TB CD34 với một số yếu tố của sản phụ (tuổi, nhóm máu mẹ, số lần sinh, hình thức sinh), thai nhi (trọng lượng thai, giới tính, nhóm máu, tuổi thai)

+ Liên quan giữa số lượng TBCN, TB CD34 với thể tích MDR

- + Liên quan hiệu suất xử lý và thể tích MDR, số lượng TBCN, hematocrit, thời gian lưu trước xử lý, thời gian xử lý
- + Liên quan giữa TB CD34 sống và thời gian chờ xử lý, thời gian xử lý, số lượng TBCN
- + Liên quan giữa TBCN, TB CD34 và cụm sau rã đông
- + Liên quan thời gian bảo quản và tỷ lệ mọc các cụm, tỷ lệ sống của TB sau rã đông
- Khả năng lựa chọn đơn vị TBG
- + Đặc điểm bệnh nhân cần tìm kiếm TBG MDR
- + Tỷ lệ bệnh nhân tìm được đơn vị TBG MDR hòa hợp HLA
- + Số đơn vị TBG MDR đã ghép

2.3. Phương tiện, vật liệu và các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

2.3.1. Các trang thiết bị

2.3.1.1. Trang thiết bị cho quá trình thu thập mẫu máu dây rốn:

- Bộ dụng cụ sát khuẩn;
- Kẹp không máu;
- Kim vuốt;
- Cân.

2.3.1.2. Quá trình xử lý và bảo quản đông lạnh

- Tủ sinh học vô trùng cấp II (Thermo, Mỹ);
- Máy hạ nhiệt theo chương trình Thermogenesis;
- Hệ thống cấp nitrogen lỏng;
- Bàn ép huyết tương;
- Máy ly tâm;
- Pipet man.

2.3.1.3. Xét nghiệm

- Đếm tế bào trên hệ thống máy đếm tế bào tự động DXH500;
- Đếm tế bào CD34 bằng kỹ thuật tế bào dòng chảy trên hệ thống FC500;
- Đếm tỷ lệ tế bào sống bằng kỹ thuật tế bào dòng chảy trên hệ thống FC500;
- Xét nghiệm nhóm máu hệ ABO, Rh trên ống nghiệm;
- Xét nghiệm HLA-SSO trên hệ thống máy Luminex;
- Xét nghiệm sàng lọc anti HIV bằng kit Monolisa HIV Ag-Ab của Ultra;
- Xét nghiệm sàng lọc kháng nguyên HBsAg trên máy tự động COBAS 800;
- Xét nghiệm sàng lọc HCV bằng kit Monolisa HCV Ag-Ab của Ultra;
- Xét nghiệm sàng lọc virus CMV bằng kit PLATELIA CMV IgM;
- Xét nghiệm nuôi cấy vi khuẩn/nấm bằng máy cấy máu Bactec 9050;
- Xét nghiệm điện di huyết sắc tố.

2.3.2. Vật liệu nghiên cứu

- Túi dẻo 250ml (Demotek, Nhật Bản);
- Ống nghiệm;
- Đầu côn nhựa;
- Túi bảo quản chuyên dụng;
- Bơm, kim tiêm;
- Dung dịch Hydroxyetyl starch HES 6% (B-Braun, Đức);
- Dung dịch Dextran.

2.3.3. Hóa chất, sinh phẩm

- Hóa chất chạy máy đếm tế bào;
- Huyết thanh mẫu hệ nhóm máu ABO, Rh của Biorad;
- Hóa chất đếm TB CD34;
- Hóa chất điện di huyết sắc tố;

- Hóa chất xét nghiệm HLA;
- Môi trường nuôi cấy tế bào.

2.4. Các kỹ thuật thực hiện trong nghiên cứu

Quy trình thực hiện trong nghiên cứu dựa theo Hướng dẫn quy trình kỹ thuật khám bệnh, chữa bệnh chuyên ngành Huyết học – Truyền máu, Miễn dịch – Di truyền – Sinh học phân tử do Bộ Y tế xuất bản năm 2014.

2.4.1. Quy trình thu thập máu dây rốn

*** Nguyên lý kỹ thuật**

Thu thập máu từ bánh rau thông qua tĩnh mạch dây rốn vào túi dẻo có chất chống đông ngay sau khi cắt rốn cho trẻ.

*** Các bước tiến hành**

- Lựa chọn sản phụ và thai nhi đủ tiêu chuẩn hiến máu dây rốn;
- Chuẩn bị: Dụng cụ (túi dẻo lấy máu, kim vuốt, pank kẹp, dụng cụ sát trùng, bơm tiêm, cân bàn). Túi dẻo lấy máu (ghi rõ tên sản phụ trên túi dẻo, làm sẵn nút thắt);
- Đi găng, đội mũ, đeo khẩu trang, khử trùng tay, găng tay, chờ đến thời điểm đẻ thai xong và kẹp cắt dây rốn, bánh rau còn ở trong tử cung người mẹ;
- Chọn vị trí đâm kim sát chỗ kẹp dây rốn, sát trùng khu vực 10cm xung quanh vị trí lựa chọn bằng cồn iod;
- Lấy túi dẻo, bỏ nắp bọc kim, đâm kim từ từ, dứt khoát vào tĩnh mạch rốn;
- Giữ kim cố định tại vị trí chọc kim, lắc nhẹ túi cho máu vào đều;
- Đợi đến khi máu vào hết, tiến hành thắt nút, rút kim, đậy nắp kim;
- Vuốt dây để trộn chất chống đông;
- Cân túi máu, thu dọn dụng cụ, hoàn thiện hồ sơ.

Lưu ý: Nếu thu thập máu dây rốn sau sổ rau thì bánh rau được treo lên cây chuyên dụng, quá trình thu thập tiến hành như thu thập trước sổ rau.

2.4.2. Quy trình xử lý máu dây rốn bằng để lắng có HES ly tâm 1 lần

* Nguyên lý kỹ thuật

Các phân tử của dung dịch HES (Hydroxy Ethyl Starch) liên kết với hồng cầu làm tăng tỷ trọng, khi ly tâm phức hợp này nhanh lắng xuống trước, để lại lớp có nhiều tế bào có nhân.

* Các bước tiến hành

Chỉ những mẫu máu dây rốn đã thu thập đạt tiêu chuẩn ngân hàng đề ra (tiêu chuẩn về thể tích, sự xuất hiện cục máu đông, MCV máu dây rốn, số lượng TBCN trong đơn vị máu dây rốn...) mới được đưa vào xử lý

- Nhân viên rửa tay hai lần, mặc quần áo, đội mũ, đeo khẩu trang và đi găng;
- Chuẩn bị dụng cụ;
- Sát khuẩn bề mặt túi;
- Cắm kim và lấy mẫu xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu ngoại vi, virus, HLA;
- Bổ sung dung dịch HES 6% với tỷ lệ bằng 40% thể tích MDR, trộn đều trong vòng 15 phút;
- Kết nối bộ túi xử lý, đặt tại vị trí sẵn sàng ép, để lắng 50 phút;
- Loại bỏ hồng cầu bằng cách dùng bàn ép chuyển huyết tương và lớp buffy-coat sang túi khác, thu hồi túi huyết tương và lớp buffy-coat;
- Ly tâm sản phẩm thu được
- Loại huyết tương và giữ lại khoảng 22 ml lớp buffy-coat (đây là sản phẩm TBG MDR).
- Cân túi sản phẩm TBG;
- Lấy mẫu túi tế bào gốc và túi hồng cầu để xét nghiệm;
- Tính hiệu suất xử lý (thu hồi tế bào) theo công thức

$$HS_{thu\ h\ddot{o}i}(\%) = \frac{WBC_{Sau\ XL} \times V_{Sau\ XL}}{WBC_{tr\ddot{u}oc} \times V_{tr\ddot{u}oc}} \times 100$$

- Hoàn thành hồ sơ;



Hình 2.2. Bước để lắng sau khi thêm dung dịch HES

2.4.3. Quy trình bảo quản khối tế bào gốc sau xử lý bằng nitơ lỏng

* Nguyên lý kỹ thuật

Lưu giữ khối tế bào gốc có chất bảo quản DMSO trong môi trường nitơ lỏng (-150°C đến -196°C).

* Các bước tiến hành

Lưu giữ khối tế bào gốc có chất bảo quản DMSO trong môi trường nitơ lỏng (-150°C đến -196°C).

Bước 1. Trộn tế bào gốc với dung dịch bảo quản:

- Khối tế bào gốc: Sau khi đã xử lý và lấy mẫu xét nghiệm xong;
- Chuẩn bị dung dịch bảo quản gồm DMSO và Dextran 40 tỷ lệ 1:1 vào bơm tiêm 20ml và giữ ở 4°C (Thể tích DMSO = Thể tích Dextran = Thể tích TBG cuối / 4).

- Bơm dung dịch bảo quản đã chuẩn bị với tốc độ 24ml/h vào túi TBG được kẹp giữa 2 miếng gel lạnh đặt trên máy lắc liên tục;
- Sau khi bơm xong khoá đường DMSO và hàn cắt bỏ đường DMSO;
- Bỏ túi đông lạnh ra khỏi gel lạnh;
- Sau khi hàn các vị trí cần thiết, cho túi đông lạnh vào hộp bảo vệ đã dán sẵn barcode.

Bước 2. Hạ lạnh và lưu giữ khối tế bào gốc đã trộn với dung dịch bảo quản:

Tiếp nhận đơn vị TBG MDR từ phòng xử lý, kết nối các sensor của máy với túi TBG MDR và tiến hành hạ nhiệt độ.

Quá trình làm lạnh: để đạt được -196°C trong bảo quản cần tiến hành hạ nhiệt độ theo nhiều bước theo một lịch trình về thời gian đã được định sẵn.

Diễn biến của quá trình làm lạnh qua 3 giai đoạn như sau:

+ Giai đoạn 1: Duy trì nhiệt độ buồng ở 4°C trong vòng 20 phút, thời gian này mẫu cũng sẽ được đưa về nhiệt độ xấp xỉ nhiệt độ buồng.

+ Giai đoạn 2: bao gồm các bước sau:

Bước 1: Giảm nhiệt độ buồng $1^{\circ}/1$ phút, trong vòng 25 phút;

Bước 2: Hạ nhiệt độ nhanh trong vòng 3 phút, sau đó quay lại tốc độ $1^{\circ}/\text{phút}$ trong 22 phút;

Bước 3: Tăng tốc độ hạ nhiệt $5-10^{\circ}/\text{phút}$ trong vòng 5 phút. Sau đó duy trì nhiệt độ này trong 30 phút

+ Giai đoạn 3: Bảo quản trong ni tơ lỏng

2.4.4. Quy trình đếm CD34 bằng máy Beckman Coulter FC500

** Nguyên lý kỹ thuật*

Tế bào gốc tạo máu có kháng nguyên CD34 trên bề mặt. Nếu ủ kháng thể anti CD34 với mẫu bệnh phẩm có tế bào gốc tạo máu, kháng thể này sẽ gắn đặc hiệu lên bề mặt các tế bào gốc tạo máu mang CD34. Dùng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang phân tích trên máy phân tích tế bào dòng chảy (flow

cytometer) có thể đếm chính xác số lượng và tỷ lệ % tế bào gốc tạo máu CD34 trong mẫu bệnh phẩm

*** Các bước tiến hành**

- + Đếm SLBC trong mẫu. Pha loãng mẫu về nồng độ 10-15 G/l, ghi lại số lần pha loãng;
- + Lấy 100 µl mẫu thử đã pha loãng cho vào 3 ống 1,2,3;
- + Thêm 20 µl 7AAD vào mỗi ống;
- + Thêm 20 µl CD45-FITC/CD34-PE vào ống 1 và ống 2;
- + Thêm 20 µl Control (CD45-FITC/Isotype PE) vào ống số 3;
- + Vortex đều các ống và ủ nhiệt độ phòng trong 20 phút, tránh ánh sáng;
- + Thêm 2000 µl dung dịch ly giải hồng cầu, ủ nhiệt độ phòng 10 phút;
- + Thêm 100 µl huyền dịch hạt tham chiếu vào các ống 1, 2, 3;
- + Trộn lắc đều các ống;
- + Đếm CD34 bằng phần mềm có sẵn trên máy flow cytometry.

2.4.5. Quy trình xét nghiệm HLA bằng kỹ thuật PCR-SSO

*** Nguyên lý kỹ thuật**

Dựa trên nguyên lý lai giữa đầu dò DNA với sản phẩm DNA của mẫu xét nghiệm đánh dấu bằng huỳnh quang, trong đó các đầu dò DNA được thiết kế đặc hiệu cho từng alen HLA ở độ phân giải cao (High resolution). Tùy theo mật độ huỳnh quang tương ứng, hệ thống Luminex đọc và xác định được tên đầu dò đã gắn với chuỗi DNA của mẫu và kiểu gen HLA tương ứng

*** Các bước tiến hành**

- + Tách và ủ DNA của mẫu với đoạn mồi đặc hiệu tương ứng các gen HLA;
- + Khuếch đại các gen này bằng PCR;

+ Lai sản phẩm PCR với các đoạn đầu dò DNA đặc hiệu của các locus HLA ở độ phân giải cao đã biết và đồng thời mỗi loại hạt còn được mã hóa riêng bằng màu laser;

+ Chạy mẫu và phân tích mẫu trên hệ thống Luminex để xác định HLA của mẫu.

Nhờ công nghệ Xmap trên hệ thống Luminex, số lượng hạt nhựa có thể mã hóa lên đến tối đa 100 loại khác nhau, đồng thời số lượng đầu dò DNA gắn trên hạt rất nhiều nên kỹ thuật PCR-SSO giúp phân tích được nhiều gen HLA hơn và độ phân giải được nâng cao hơn. Thường kết quả định nhóm HLA của xét nghiệm này là độ phân giải trung bình với mức chi tiết 4 chữ số (ví dụ: A*02:03)

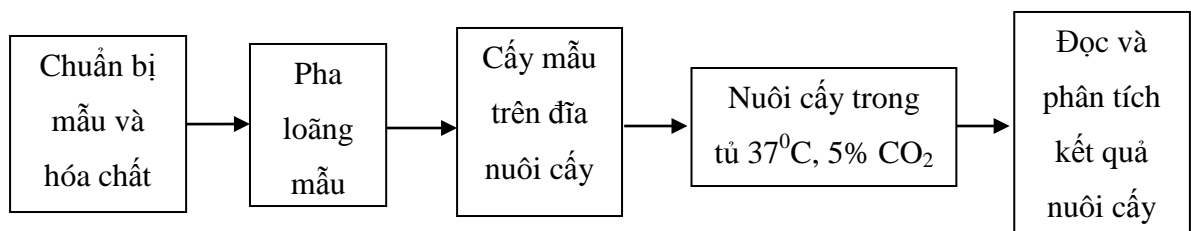
2.4.6. Quy trình nuôi cấy tạo cụm tế bào

* Nguyên lý kỹ thuật

Trong môi trường nuôi cấy có các chất kích thích phát triển thích hợp tế bào gốc sẽ phát triển thành các cụm biệt hóa của các dòng tế bào khác nhau. Dựa vào phương pháp này để đánh giá chất lượng khối tế bào gốc.

* Các bước tiến hành

- Quy trình nuôi cấy cụm tế bào với methycellulose medium. Quy trình thực hiện như sau



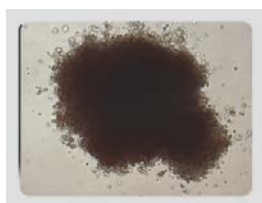
- + Pha mẫu về nồng độ 4×10^4 tế bào/ml;
- + Trộn đều mẫu trong môi trường;
- + Cấy 1 ml hỗn hợp đó lên 2 đĩa nuôi cấy ;
- + Đặt 2 đĩa trên và 1 đĩa chứa 1 ml nước cất vô trùng vào 1 đĩa to;

+ Đặt mẫu trong tủ ấm 37⁰C, 5% CO₂;

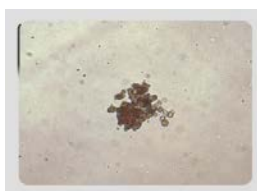
+ Đọc kết quả sau 14 ngày (số lượng, hình thái cụm).

Đánh giá cụm dưới kính hiển vi đảo ngược

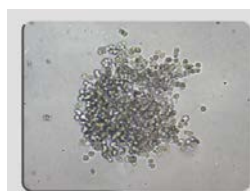
Màu sắc tế bào	Số lượng tế bào trong một cụm	Đánh giá kết quả
Duy nhất hồng cầu (màu đỏ)	≥ 8 tế bào	01 BFU-E
	< 8 tế bào	Không đếm
Duy nhất bạch cầu	≥ 40 tế bào	01 BFU-GM
	< 40 tế bào	Không đếm
Bạch cầu + Hồng cầu	≥ 20 tế bào bạch cầu	01 BFU-GEMM
	< 20 tế bào bạch cầu	Không đếm
Các loại khác		Không đếm



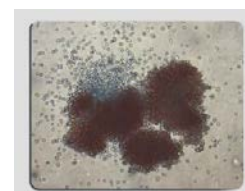
BFU-E



CFU-E



CFU-GM



CFU-GEMM

Hình 2.3. Một số loại cụm phổ biến tạo thành sau quá trình nuôi cấy trên môi trường methocult

2.4.7. Quy trình rã đông đơn vị tế bào gốc

* Nguyên lý kỹ thuật

Sử dụng bình cách thủy 37⁰C để đưa các sản phẩm tế bào bảo quản đông lạnh về điều kiện sử dụng trong khoảng thời gian nhất định.

* Các bước tiến hành

Sử dụng bình cách thủy 37⁰C để đưa các sản phẩm tế bào bảo quản đông lạnh về điều kiện sử dụng trong khoảng thời gian nhất định.

- + Người thực hiện: mặc đồ bảo hộ;
- + Kiểm tra mực nước và nhiệt độ trong bình cách thủy;
- + Lấy khối TBG đông lạnh ra khỏi nơi lưu trữ, kiểm tra sự toàn vẹn, đối chiếu thông tin;
- + Đặt khối TBG đông lạnh vào bình cách thủy cho tới khi tan đông (khoảng 5 phút);
- + Lấy mẫu để kiểm tra tỷ lệ tế bào sống;
- + Sử dụng sản phẩm rã đông để tiêm/truyền cho người bệnh;
- + Kết thúc quá trình rã đông, hoàn thiện hồ sơ.

2.5. Địa điểm nghiên cứu

- Quy trình thu thập MDR tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội
- Quá trình xử lý, xét nghiệm sàng lọc, xét nghiệm cấy vi khuẩn/nấm, điện di huyết sắc tố, xét nghiệm tổng phân tích tế bào, xét nghiệm TB CD34, đếm tỷ lệ tế bào sống, xét nghiệm HLA, nuôi cấy cụm được thực hiện theo các quy trình tại Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương.

2.6. Xử lý số liệu

Nhập liệu bằng phần mềm excel; phân tích số liệu bằng phần mềm SPSS

21.0. Sử dụng các test thống kê cụ thể:

- Các biến định lượng được biểu diễn dưới dạng số trung bình (\bar{X}) và độ lệch chuẩn (SD)
- Các biến định tính được biểu diễn bằng các tỷ lệ phần trăm
- Tìm hiểu mối tương quan giữa 2 yếu tố định lượng bằng cách tính hệ số tương quan r:

Tương quan thuận khi $1 > r > 0$, tương quan nghịch khi $-1 < r < 0$

Mức độ tương quan

Hệ số tương quan (r)	Ý nghĩa
$\pm 0,01$ đến $\pm 0,1$	Mối tương quan quá thấp, không đáng kể
$\pm 0,1$ đến $\pm 0,3$	Mối tương quan thấp
$\pm 0,3$ đến $\pm 0,6$	Mối tương quan trung bình
$\pm 0,6$ đến $0,8$	Mối tương quan chặt
$> \pm 0,8$	Mối tương quan rất chặt

2.7. Đạo đức nghiên cứu

- Nghiên cứu được thực hiện trên sự đồng ý của người hiến đủ tiêu chuẩn hiến máu dây rốn.

- Mọi hoạt động trong quá trình thực hiện không gây ảnh hưởng đến bất kỳ giai đoạn nào của cuộc chuyển dạ cũng như hoàn toàn không ảnh hưởng đến trẻ được sinh ra.

- Mọi thông tin thu thập đảm bảo bí mật cho sản phụ, chỉ thông báo cho sản phụ, chỉ phục vụ mục đích nghiên cứu.

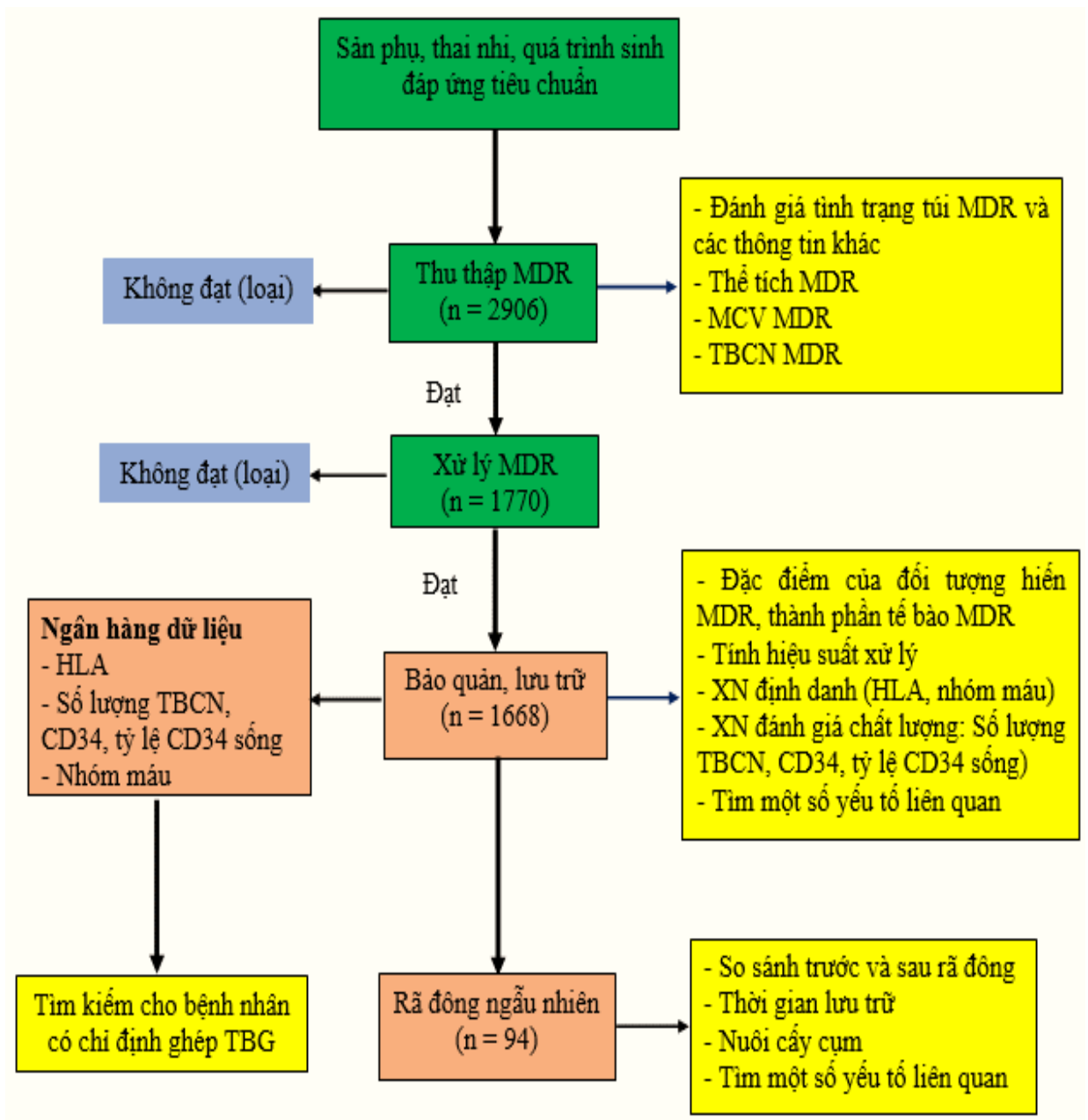
- Nghiên cứu được sự đồng ý và phê duyệt của lãnh đạo Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương, ngân hàng Tế bào gốc Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương.

- Kết quả nghiên cứu được phản hồi lại Viện, ngân hàng Tế bào gốc.

- Từ nghiên cứu, chúng tôi đã xây dựng được ngân hàng TBG MDR cộng đồng. Đưa ra được những những kết quả có ý nghĩa cho quá trình lựa chọn sản phụ, thai nhi hiến MDR, thu thập, xử lý, bảo quản, sử dụng TBG máu dây rốn cộng đồng. Từ đây nâng cao số lượng và chất lượng đơn vị TBG MDR cho điều trị. Với số lượng đơn vị TBG MDR cộng đồng càng lớn càng giúp cho bệnh nhân có cơ hội tìm được nguồn TBG phù hợp cao hơn, phục vụ được nhu cầu ghép nhằm đem lại sự sống cho bệnh nhân và niềm vui cho gia đình bệnh nhân.

- Đề tài đã được thông qua hội đồng đạo đức của Trường Đại học Y Hà Nội.

Sơ đồ 2.2. Sơ đồ nghiên cứu



CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Một số đặc điểm sản phụ và thai nhi của các đơn vị MDR được bảo quản

Bảng 3.1. Một số đặc điểm sản phụ của TBG MDR được lưu trữ (n=1668)

Sản phụ	$\bar{X} \pm SD$	Min	Max
Tuổi	$28 \pm 3,4$	18	35
Cân nặng (kg)	$63,7 \pm 5,9$	45	88
MCV (fl)	$91,2 \pm 3,6$	80,1	112

Nhận xét: Tuổi trung bình của sản phụ trong nghiên cứu là $28 \pm 3,4$ tuổi, cân nặng trung bình của sản phụ là $63,7 \pm 5,9$ kg. MCV máu ngoại vi của sản phụ trung bình $91,2 \pm 3,6$ fl.

Bảng 3.2. Phân bố dân tộc của sản phụ (n=1668)

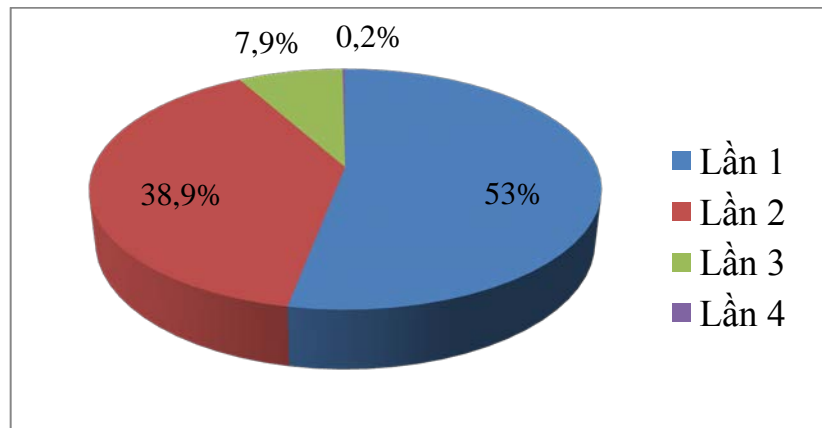
Dân tộc	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Kinh	1662	99,6
Mường	2	0,1
Sán đìu	1	0,1
Tày	3	0,2
Tổng	1668	100,0

Nhận xét: Chủ yếu là sản phụ dân tộc Kinh 99,6%. Bên cạnh đó cũng xuất hiện các sản phụ của dân tộc thiểu số như Mường, Sán Đìu, Tày nhưng với tỷ lệ rất thấp.

Bảng 3.3. Hình thức sinh của sản phụ (n=1668)

Hình thức sinh	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Sinh thường	1558	93,4
Sinh mổ	110	6,6
Tổng	1668	100,0

Nhận xét: Tỷ lệ sản phụ sinh thường chiếm 93,6%. Chỉ có 6,6% sản phụ sinh mổ.



Biểu đồ 3.1. Số lần sinh của sản phụ (n = 1668)

Nhận xét: Sản phụ chủ yếu là sinh con lần 1 và 2 chiếm đến 91,9% (lần 1: 53%, lần 2: 38,9%). Chỉ có 8,1% là sinh con lần 3 và 4 (lần 3: 7,9%, lần 4: 0,2%).

Bảng 3.4. Một số đặc điểm thai nhi của TBG MDR lưu trữ (n=1668)

Thai nhi	$\bar{X} \pm SD$	Min	Max
Tuổi thai (tuần)	39,3 ± 0,9	36	42
Trọng lượng trẻ sơ sinh (gram)	3257 ± 304	2600	4500

Nhận xét: Tuổi thai trung bình 39,3 ± 0,9 tuần, trọng lượng trẻ sơ sinh trung bình 3257 ± 304 gram.

Bảng 3.5. Tỷ lệ theo giới tính trẻ sơ sinh (n=1668)

Giới tính	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Nữ	771	46,2
Nam	897	53,8
Tổng	1668	100,0

Nhận xét: Tỷ lệ trẻ nam 53,8% nhiều hơn trẻ nữ 46,2%.

Bảng 3.6. Một số đặc điểm dây rốn, bánh rau (n=1668)

Máu dây rốn	$\bar{X} \pm SD$	Min	Max
Cân nặng bánh rau (gram)	505 ± 41,4	200	850
Chiều dài dây rốn (cm)	58,1 ± 5,8	45	85

Nhận xét: Cân nặng bánh rau trung bình 505 ± 41,4 gram, chiều dài dây rốn trung bình 58,1 ± 5,8 cm

3.2. Kết quả thu thập, xử lý, bảo quản máu dây rốn cộng đồng

3.2.1. Kết quả thu thập máu dây rốn

Bảng 3.7. Kết quả chung thu thập, xử lý MDR cộng đồng

	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Đơn vị MDR thu thập	2906	100
Đơn vị MDR xử lý	1770	60,9
Đơn vị TBG MDR lưu trữ	1668	57,4

Nhận xét: 2906 túi MDR được thu thập, có 1770 túi MDR đạt tiêu chuẩn đưa vào xử lý (60,9%). Sau xử lý, xét nghiệm thì có 1668 đơn vị TBG MDR đạt tiêu chuẩn được lưu trữ (57,4%).

Bảng 3.8. Nguyên nhân loại túi máu dây rốn sau thu thập (trước xử lý)

Nội dung		Số lượng	Tỷ lệ (%)
Hủy	Thể tích <80ml	736	64,8
	Có cục đông	60	5,3
	MCV MDR thấp (< 95fl)	26	2,3
	TBCN < 80x10 ⁷	258	22,7
	Khác (thiếu thông tin, quá giờ...)	56	4,9
	Tổng hủy	1136	39,1
Đạt tiêu chuẩn xử lý		1770	60,9
Tổng số		2906	100

Nhận xét: Túi MDR phải hủy là 1136 (39,1%). Trong đó, nguyên nhân hủy chủ yếu do không đạt tiêu chuẩn về thể tích chiếm 64,8% và không đạt tiêu chuẩn về số lượng TBCN chiếm 22,7%.

Bảng 3.9. Nguyên nhân loại đơn vị tế bào gốc sau xử lý

Nội dung		Số lượng	Tỷ lệ (%)	
Nguyên nhân loại	Cấy vi khuẩn/vi nấm (+)	31	30,4	
	HBsAg, HCV, HIV, GM, CMV (+)	12	11,8	
	Bệnh HST	HbE (37 - 2,2%)	12 (20,3%)	59 57,8
		HbBart (2 - 0,1%)	39 (66,1%)	
		HST khác	8 (13,6%)	
Tổng số loại		102	5,8	
Mẫu được lưu trữ		1668	94,2	
Tổng số mẫu xử lý		1770	100	

Nhận xét: Trong số 1770 túi MDR được đưa vào xử lý tạo ra các đơn vị TBG MDR thì có 102 đơn vị phải loại bỏ sau khi xử lý. Nguyên nhân loại chủ yếu do nghi ngờ bệnh lý huyết sắc tố chiếm 57,8%. Có kết quả dương tính khi sàng lọc một số virus như CMV, HBsAg, HCV, cấy vi khuẩn/nấm chiếm 42,2%. 1668 đơn vị TBG MDR đạt tiêu chuẩn đưa vào lưu trữ chiếm 94,2% đơn vị đã được xử lý.

Bảng 3.10. Một số đặc điểm của mẫu máu dây rốn trước xử lý (n=1668)

Máu dây rốn	$\bar{X} \pm SD$	Min	Max
Thể tích có chông đông (ml)	139 \pm 18,7	115	259,7
TBCN ($\times 10^7$)	151,8 \pm 40,4	80	447

Nhận xét: Thể tích MDR trung bình là 139 \pm 18,7 ml với số lượng TBCN là 151,8 \pm 40,4 $\times 10^7$ tế bào

Bảng 3.11. Tỷ lệ thể tích máu dây rốn trước xử lý (n=1668)

Thể tích (ml)*	Số lượng	Tỷ lệ (%)
≤ 120	194	11,6%
120 -150	1087	65,1%
> 150	387	23,2%
Tổng	1668	100

* Bao gồm chất chống đông

Nhận xét: Thể tích MDR thu được chủ yếu là trên 120 ml. Thể tích từ 120-150 ml chiếm tỷ lệ cao nhất 65,1%. Đặc biệt có 23,2% túi máu có thể tích trên 150 ml.

Bảng 3.12. Đặc điểm tế bào bạch cầu trong túi máu dây rốn trước xử lý (n=1668)

Chỉ số	$\bar{X} \pm SD$	Tỷ lệ (%)
SLBC (G/l)	13,5 ± 4,0	
BC trung tính (G/l)	8,6 ± 2,9	56,2 ± 7,8
BC lympho (G/l)	4,5 ± 1,7	30,2 ± 9,2
BC mono (G/l)	1,6 ± 0,6	10,8 ± 2,5

Nhận xét: Trong túi MDR thu được có SLBC trung bình 13,5 ± 4,0 G/l. Trong đó SLBC trung tính 8,6 ± 2,9 G/l, SLBC lympho 4,5 ± 1,7 G/l, SLBC mono 1,6 ± 0,6 G/l.

Bảng 3.13. Đặc điểm hồng cầu và tiểu cầu trong túi máu dây rốn trước xử lý (n=1668)

Chỉ số	$\bar{X} \pm SD$	Min	Max
SLHC (T/l)	4,4 ± 0,4	2,97	6,7
HGB (g/l)	154,3 ± 14,0	111,2	203,3
HCT (%)	48,2 ± 4,5	34,6	44,5
MCV (fl)	110,8 ± 4,6	95,9	133,5
MCH (pg)	35,5 ± 1,6	21,8	39,8
MCHC (g/l)	310,5 ± 24,5	280,8	365,4
SLTC (G/l)	303 ± 56,6	107,7	506,9

Nhận xét: Trong mỗi túi MDR trước khi xử lý có SLHC là $4,4 \pm 0,4$ T/l, nồng độ huyết sắc tố là $154,3 \pm 14,0$ g/l, thể tích khối hồng cầu $48,2 \pm 4,5$ l/l, MCV trung bình $110,8 \pm 4,6$ fl và nằm trong dải từ 95,9 - 133,5fl. SLTC trung bình $303 \pm 56,6$ G/l.

3.2.2. Kết quả xử lý và bảo quản

Bảng 3.14. Một số thông số đơn vị TBG lưu trữ (n=1668)

Chỉ số	$\bar{X} \pm SD$	Min	Max
Thể tích thu được sau xử lý (ml)	$26,7 \pm 0,5$	25,8	27,1
Hiệu suất thu hồi TBCN (%)	$84,9 \pm 5,6$	70,1	99,9
Số lượng TBCN ($\times 10^7/\text{đv}$)	$131,2 \pm 40$	43,8	329
Số lượng TB CD34/ μl	$213,3 \pm 143$	19,0	2085
Tỷ lệ tế TB CD34/CD45 (%)	$0,38 \pm 0,21$	0,05	2,79
Số lượng TB CD34 ($\times 10^5/\text{đv}$)	$48,1 \pm 35,5$	4,1	256
Tỷ lệ TB CD34 sống sau xử lý (%)	$94,5 \pm 3,4$	70,5	99,9

Nhận xét: Trong mỗi $26,7 \pm 0,5$ ml TBG có chứa trung bình $131,2 \pm 40 \times 10^7$ TBCN, $48,1 \pm 35,5 \times 10^5$ TB CD34. Sau xử lý hiệu suất thu hồi TBCN trung bình $84,9 \pm 5,6\%$ và có $94,5 \pm 3,4\%$ TB CD34 sống sau xử lý.

Bảng 3.15. Tỷ lệ trung bình các thành phần loại bỏ sau ly tâm (n=1668)

Thông số	Loại, mất (%)		
	(%)	Min	Max
Thể tích túi MDR (ml)	$83,8 \pm 1,9$	78,4	88,6
SLHC	$94,0 \pm 3,0$	76,5	98,2
SLBC	$15,3 \pm 5,6$	10,2	34,8
SLTC	$51,9 \pm 9,9$	26,9	96,7

Nhận xét: Quá trình xử lý của chúng tôi đã loại bỏ được $83,8 \pm 1,9\%$ thể tích MDR. Tỷ lệ hồng cầu bị loại là $94,0 \pm 3,0\%$. Tỷ lệ tiểu cầu bị loại là $51,9 \pm 9,9\%$. Tỷ lệ bạch cầu bị loại là $15,3 \pm 5,6\%$.

Bảng 3.16. Thành phần tế bào máu trong túi TBG lưu trữ (n=1668)

Chỉ số	$\bar{X} \pm SD$	Min	Max
SLBC (G/l)	59,0 ± 18,0	20,2	148,2
SLBC trung tính (G/l)	33,9 ± 13,9	2,0	109
SLBC lympho (G/l)	37,4 ± 8,7	30	70
SLBC mono (G/l)	5,9 ± 4,0	1,1	26,8
SLHC (T/l)	1,2 ± 0,6	0,43	10,5
HCT (%)	9,7 ± 4,8	0,42	10,6
TC (G/l)	662,1 ± 147,6	35	1291

Nhận xét: Trong mỗi đơn vị TBG lưu trữ có số lượng bạch cầu trung bình 59,0 ± 18,0 G/l. Trong đó, số lượng bạch cầu trung tính 33,9 G/l, số lượng bạch cầu mono 5,9 G/l, số lượng bạch cầu lympho 37,4 G/l. Số lượng hồng cầu và hematocrit tương đối thấp 1,2T/l hồng cầu và 9,7% hematocrit. Số lượng tiểu cầu tương đối cao 662,1 G/l.

Bảng 3.17. Tỷ lệ nhóm máu đơn vị tế bào gốc lưu trữ (n=1668)

Nhóm máu		Số lượng	Tỷ lệ (%)
ABO	A	365	21,9
	AB	80	4,8
	B	460	27,6
	O	763	45,7
	Tổng	1668	100
Rh	Dương	1668	100
	Âm	0	0
	Tổng	1668	100

Nhận xét: Tỷ lệ nhóm máu O là cao nhất 45,7%. Thấp nhất là nhóm máu AB 4,8%

**Bảng 3.18. Đặc điểm thành phần huyết sắc tố đơn vị TBG MDR lưu trữ
(n=1668)**

Chỉ số	Trung bình	min	max
Tỷ lệ huyết sắc tố A1	18,5 ± 5,3	3,2	87,9
Tỷ lệ huyết sắc tố A2	0,05 ± 0,2	0	0,6
Tỷ lệ huyết sắc tố F	81,5 ± 5,3	12,1	96,8

Nhận xét: Tỷ lệ huyết sắc tố A1 trung bình 18,5 ± 5,3%, tỷ lệ huyết sắc tố F trung bình 81,5 ± 5,3%

**Bảng 3.19. Đặc điểm tế bào máu của đơn vị TBG MDR trước và sau rã đông
(n = 94)**

Chỉ số	Trước bảo quản	Sau rã đông	p
SLHC (G/l)	1,0 ± 0,8	0,8 ± 0,3	< 0,05
Hematocrit (l/l)	10,0 ± 3,4	9,9 ± 2,2	> 0,05
SLBC (G/l)	57,1 ± 18,2	42,8 ± 13,6	< 0,001
SLBC trung tính (G/l)	38,8 ± 16,3	22,8 ± 13,1	< 0,05
SLBC đơn nhân (G/l)	16,1 ± 9,6	16,7 ± 13,0	> 0,05
SLTC (G/l)	610,4 ± 123,4	522,5 ± 335,1	< 0,05

Nhận xét: Số lượng hồng cầu (SLHC), Số lượng bạch cầu (SLBC), SLBC trung tính, số lượng tiểu cầu (SLTC) sau rã đông giảm so với trước ra đông có ý nghĩa thống kê, lượng Hematocrit giảm không có sự khác biệt so với trước đông lạnh. Đặc biệt số lượng tế bào đơn nhân trước và sau rã đông thay đổi không đáng kể.

**Bảng 3.20. Thành phần tế bào trong đơn vị TBG MDR trước và sau rã đông
(n = 94)**

Chỉ số	Trước bảo quản	Sau rã đông	p
Số lượng TBCN ($\times 10^7$)	136,7 \pm 47,5	126,3 \pm 46,0	< 0,001
Số lượng TB CD34 ($\times 10^5$)	56,2 \pm 46,8	49,9 \pm 36,8	< 0,001
Tỷ lệ TB CD34 (%)	0,43 \pm 0,25	0,48 \pm 0,35	< 0,05

Nhận xét: Số lượng TBCN, TB CD34 giảm, tỷ lệ TB CD34 sống giảm so với trước khi bảo quản, tỷ lệ TB CD34 sau khi rã đông tăng so với trước khi bảo quản có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.21. Kết quả cấy cộm sau bảo quản đông lạnh (n = 94)

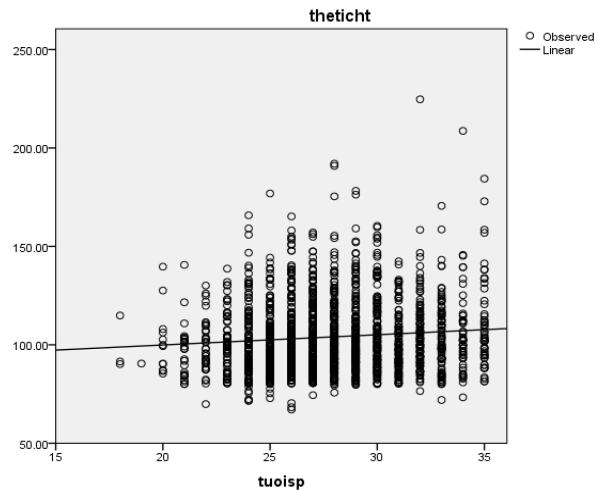
	Số cộm trung bình trong 1 đĩa cấy (cộm)	Số cộm trung bình trong 1 đơn vị TBG ($\times 10^4$)	Tỷ lệ (%)
BFU-E	23,8 \pm 12,5	99,5 \pm 75,3	48,1 \pm 9,5
CFU-E	0,55 \pm 0,62	2,36 \pm 2,92	1,2 \pm 1,4
CFU-GM	22,8 \pm 8,2	93,5 \pm 46,1	48,4 \pm 9,8
CFU-GEMM	1,14 \pm 0,97	4,86 \pm 4,84	2,4 \pm 1,9
Tổng số	48,2 \pm 18,3	200,3 \pm 115,2	100

Nhận xét: Tất cả các đơn vị TBG MDR nuôi cấy đều mọc và số cộm trung bình trong 1 đĩa nuôi cấy là 48,2 \pm 18,3 cộm tương ứng với trung bình 200,3 $\times 10^4$ cộm trong đơn vị TBG, Trong đó cộm BFU-E và CFU-GM chiếm tỷ lệ cao lần lượt là 48,1% và 48,4%, Cộm CFU-GEMM có với tỷ lệ 2,4%.

3.3. Một số yếu tố liên quan đến chất lượng và khả năng sử dụng đơn vị TBG MDR cộng đồng

3.3.1. Một số yếu tố liên quan đến chất lượng đơn vị TBG MDR cộng đồng

3.3.1.1. Một số yếu tố liên quan trong quá trình thu thập MDR cộng đồng



Thể tích MDR = tuổi sản phụ x 0,519 + 89,54 ($r = 0,095$, $p < 0,01$)

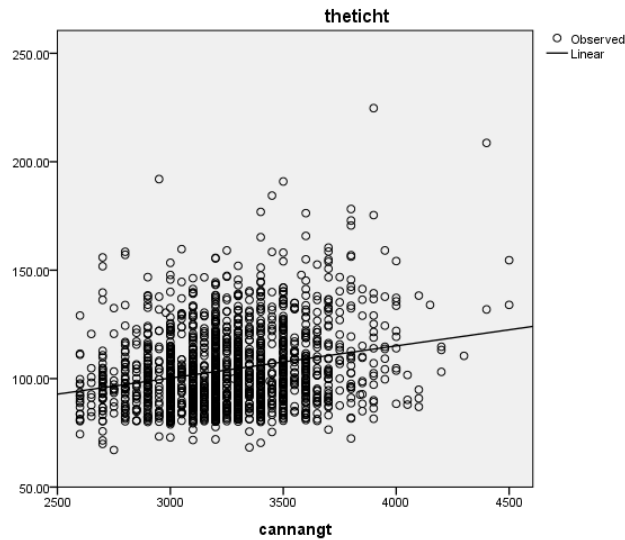
Biểu đồ 3.2. Liên quan giữa thể tích máu dây rốn và tuổi sản phụ (n = 1668)

Nhận xét: Thể tích MDR tỷ lệ thuận với tuổi sản phụ theo phương trình Thể tích MDR = tuổi sản phụ x 0,519 + 89,54 ($r = 0,095$, $p < 0,01$)

Bảng 3.22. Liên quan giữa một số yếu tố của mẹ với thể tích máu dây rốn (n=1668)

Thế tích trước xử lý (ml)		$\bar{X} \pm SD$	p
Chỉ số			
Nhóm máu mẹ	A	103,7±17,1	> 0,05
	B	104,8±18,3	
	AB	105,5±24,7	
	O	103,7±18,7	
Lần sinh	1	103±18,3	(1,2) < 0,05
	2	104±17,9	(2,3) < 0,05
	3	110±22,6	(3,4) < 0,05
	4	102±11,9	(1,4) < 0,05
Hình thức sinh	Sinh thường	104±18,5	> 0,05
	Sinh mổ	102±21	

Nhận xét: Tuổi mẹ càng cao, lần sinh càng nhiều thì thể tích MDR càng cao. Hình thức sinh và nhóm máu của sản phụ không có mối liên quan đến thể tích máu MDR thu được.



Biểu đồ 3.3. Liên quan thể tích máu dây rốn và trọng lượng thai (n = 1668)

Nhận xét: Thể tích túi MDR có liên quan thuận lờng lỏ với trọng lượng thai theo phương trình: Thể tích MDR = 0,015 * trọng lượng thai + 55,743 (r = 0,242 p < 0,01)

Bảng 3.23. Liên quan giữa một số yếu tố thai nhi với thể tích MDR (n=1668)

<i>Thể tích trước xử lý (ml)</i>		$\bar{X} \pm SD$	P
<i>Chỉ số</i>			
Giới tính thai	Gái	103±17,8	< 0,05
	Trai	105±19,4	
Nhóm máu thai	A	102,7±17,3 (1)	1,2)>0,05
	B	103,8±19,0 (2)	(2,3)>0,05
	AB	107,8±23,2 (3)	(3,4)>0,05
	O	104,5±18,5 (4)	(1,4) >0,05
Tuổi thai	36	107±22,7 (1)	>0,05
	37	107±18,2 (2)	
	38	105±20,6 (3)	
	39	104±18,8 (4)	
	40	103±18,1 (5)	
	41	103±16,1 (6)	
	42	109±32,0 (7)	

Nhận xét: Cân nặng thai nhi càng lớn, giới tính thai là trai thì thể tích mẫu MDR cao có ý nghĩa thống kê với p < 0,05. Nhóm máu của thai nhi và tuổi thai không có mối liên quan với thể tích mẫu MDR.

Bảng 3.24. Liên quan giữa một số yếu tố mẹ với tổng số TBCN (n = 1668)

<i>Tế bào có nhân (10^7)</i>		$\bar{X} \pm SD$	p
<i>Yếu tố</i>			
Tuổi mẹ	≤ 20	154 \pm 47,9 (1)	1,2) $>$ 0,05
	21-25	158 \pm 48,6 (2)	(2,3) $>$ 0,05
	26-30	157 \pm 48,4 (3)	(3,4) $>$ 0,05
	$>$ 30	154 \pm 46,3 (4)	(1,4) $>$ 0,05
Nhóm máu mẹ	A	151,1 \pm 42,9 (1)	1,2) $>$ 0,05
	B	160,3 \pm 48,2 (2)	(2,3) $>$ 0,05
	AB	157, 6 \pm 46,0 (3)	(3,4) $>$ 0,05
	O	157,0 \pm 48,3 ()	(1,4) $>$ 0,05
Lần sinh	1	162 \pm 50,5	$<$ 0,05
	≥ 2	151 \pm 44,1	
Hình thức sinh	Thường	158 \pm 48,1	$<$ 0,05
	Mổ	134 \pm 38,2	

Nhận xét: Hình thức sinh thường và sinh con lần 1 có số lượng TBCN cao hơn so với sinh mổ, sinh con từ lần 2. Tuổi mẹ, nhóm máu của sản phụ không có mối liên quan đến số lượng TBCN.

**Bảng 3.25. Liên quan giữa một số yếu tố của thai nhi với tổng số TBCN
(n=1668)**

<i>Tế bào có nhân (10^7)</i>		$\bar{X} \pm SD$	p
<i>Yếu tố</i>			
Nhóm cân nặng thai (g)	< 3000	146,9±42,2 (1)	(1,2) < 0,05
	3000 - 3499	155,2±46,6 (2)	(2,3) < 0,05
	3500 - 3999	164,6±52,8 (3)	(3,4) < 0,05
	≥ 4000	183,5±53,0 (4)	(1,4) < 0,05
Giới tính thai	Trai	152±44,4	< 0,05
	Gái	162±51,1	
Nhóm máu thai	A	152,4±48,4 (1)	(1,2) < 0,05
	B	171,5±67,8 (2)	(2,3) < 0,05
	AB	157,6±46,0 (3)	(3,4) < 0,05
	O	156,2±46,0 (4)	(1,4) < 0,05
Tuổi thai	36	147,9±57,5	> 0,05
	37	144,4±45,4	
	38	154,6±48,8	
	39	155,4±49,3	
	40	158,0±44,8	
	41	163,6±53,4	
	42	185,0±88,3	

Nhận xét: Thai nhi là gái, cân nặng càng lớn, thì số lượng TBCN trong mẫu MDR càng cao. Số lượng TBCN ở thai có nhóm máu B là cao hơn nhóm máu còn lại có ý nghĩa thống kê. Tuổi thai có mối liên quan không có ý nghĩa thống kê với số lượng TBCN tuy nhiên tuổi thai càng cao thì số lượng TBCN càng cao.

Bảng 3.26. Liên quan giữa một số yếu tố mẹ với TB CD34 (n = 1668)

<i>Tế bào CD34 (10⁵)</i>		$\bar{X} \pm SD$	p
<i>Yếu tố</i>			
Tuổi mẹ	≤ 20	48,0 ± 20,2	> 0,05
	21-25	55,6 ± 33,2	
	26-30	48,2 ± 32,5	
	>30	45,7 ± 31,1	
Nhóm máu mẹ	A	45,9 ± 33,5	> 0,05
	B	46,6 ± 29,3	
	AB	47,0 ± 31,2	
	O	52,3 ± 39,8	
Lần sinh	1	52,2 ± 42,7	> 0,05
	≥ 2	45,4 ± 31,3	
Hình thức sinh	Thường	50,3 ± 32,0	< 0,05
	Mổ	34,2 ± 18,2	

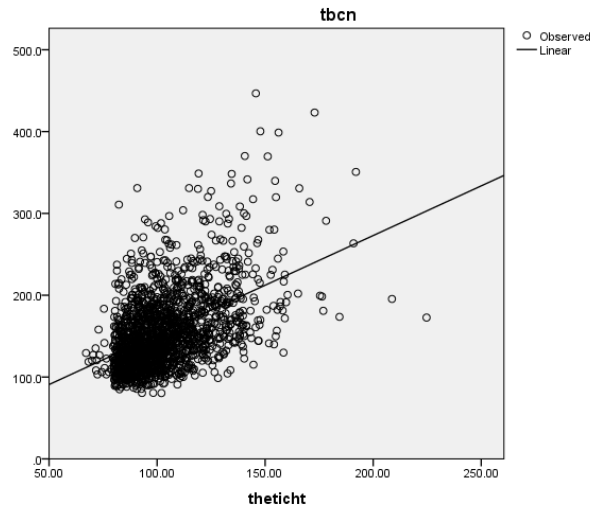
Nhận xét: Hình thức sinh thường thu được lượng TB CD34 nhiều hơn sinh mổ có ý nghĩa thống kê. TB CD34 thu được không khác nhau ở các nhóm tuổi mẹ, nhóm máu mẹ và các lần sinh

Bảng 3.27. Liên quan giữa một số yếu tố của trẻ với TB CD34 (n=1668)

<i>Số lượng tế bào CD34</i>		$\bar{X} \pm SD$	p
<i>Yếu tố</i>			
Nhóm cân nặng trẻ (g)	< 3000	47,3 ± 35,5	> 0,05
	3000 - 3499	47,8 ± 35,6	
	3500 - 3999	54,2 ± 32,6	
	≥ 4000	57,0 ± 28,6	
Giới tính trẻ	Trai	48,8 ± 33,8	< 0,05
	Gái	49,8 ± 36,1	
Nhóm máu trẻ	A	47,4 ± 41,2	> 0,05
	B	46,2 ± 27,8	
	AB	53,4 ± 40,2	
	O	51,6 ± 46,0	
Nhóm tuổi thai (tuần)	36-37	59,8 ± 39,4	> 0,05
	38-39	52,2 ± 36,7	
	40-42	44,9 ± 29,5	

Nhận xét: Lượng TB CD34 ở trẻ gái nhiều hơn trẻ trai có ý nghĩa thống kê. Cân nặng trẻ, nhóm máu trẻ, cân nặng thai không có mối liên quan với số lượng TB CD34.

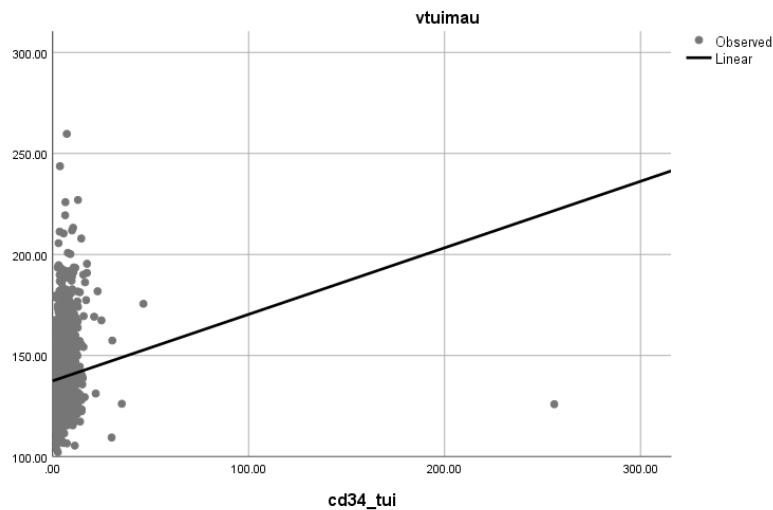
3.3.1.2. Một số yếu tố liên quan trong quá trình xử lý MDR cộng đồng



Tổng số TBCN ($\times 10^7$) = thể tích túi máu * 1,214 + 30,1 ($r=0,473$, $p<0,01$)

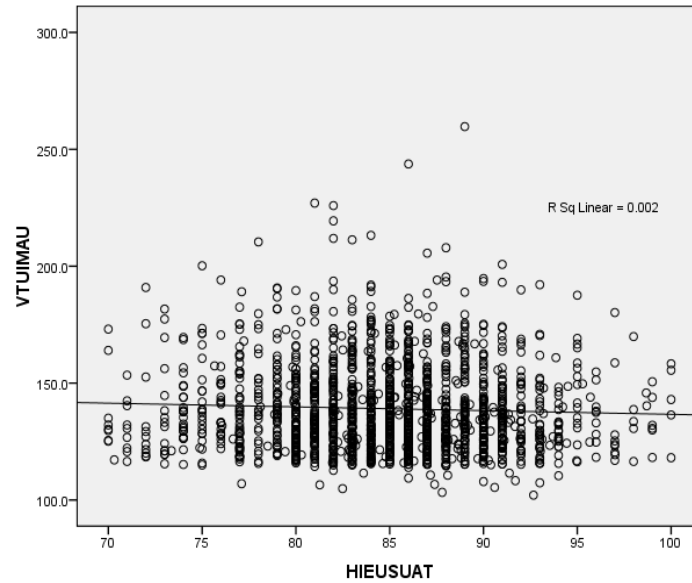
**Biểu đồ 3.4. Liên quan giữa số lượng TBCN và thể tích MDR trước xử lý
($n=1668$)**

Nhận xét: Số lượng TBCN có mối liên quan thuận mức độ trung bình với thể tích túi MDR với $r = 0,473$, $p<0,01$



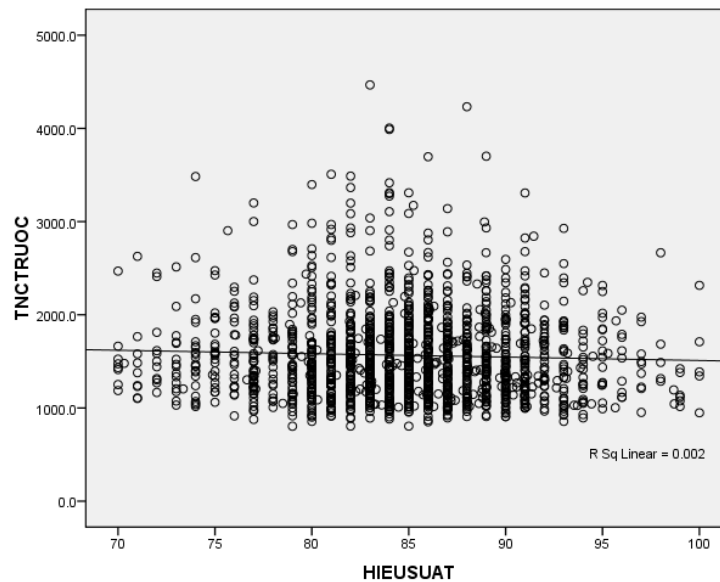
Biểu đồ 3.5. Liên quan giữa số lượng TB CD34 và thể tích MDR ($n = 1668$)

Nhận xét: Số lượng TB CD34 = thể tích MDR*0,329 +137,450
($r = 0,12$, $p<0,01$)

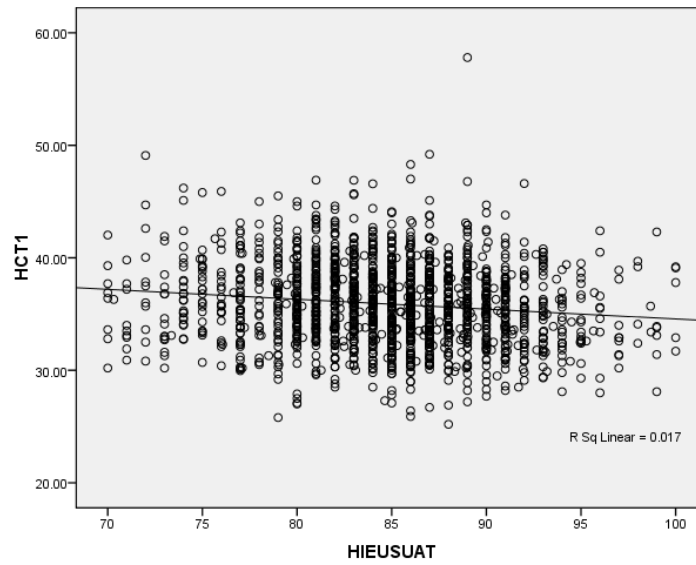


**Biểu đồ 3.6. Liên quan giữa hiệu suất xử lý và thể tích MDR thu được
($n = 1668$)**

Nhận xét: Thể tích MDR không ảnh hưởng đến hiệu suất xử lý
($r=0,046, p>0,05$)

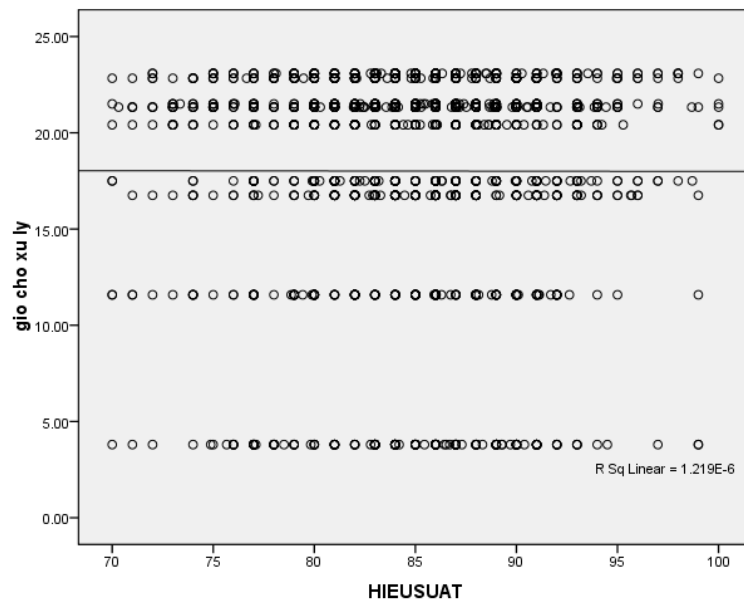


Biểu đồ 3.7. Liên quan giữa hiệu suất xử lý và số lượng TBCN ($n = 1668$)
Nhận xét: Số lượng TBCN không ảnh hưởng đến hiệu suất xử lý MDR
($r=0,041, p=0,092$)



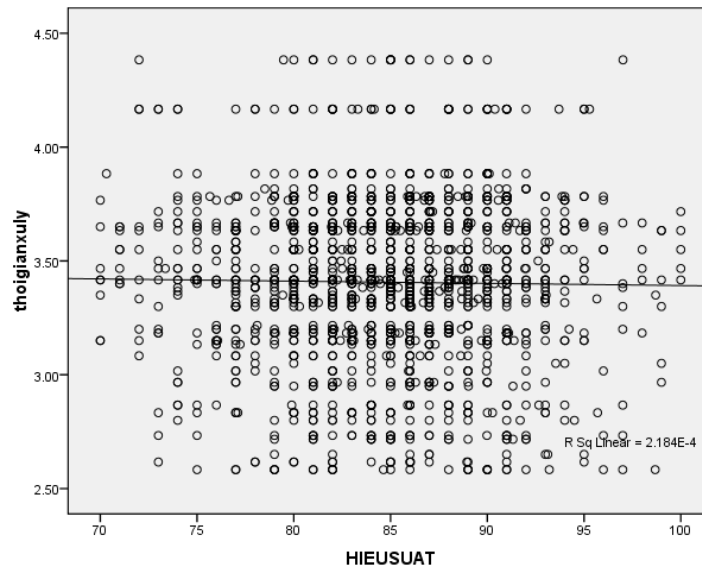
Biểu đồ 3.8. Liên quan giữa hiệu suất xử lý và hematocrit ($n = 1668$)

Nhận xét: Hiệu suất xử lý có mối liên quan lỏng lẻo với hematocrit ($r=0,13, p<0,05$)



Biểu đồ 3.9. Liên quan giữa hiệu suất xử lý và thời gian lưu trước xử lý ($n = 1668$)

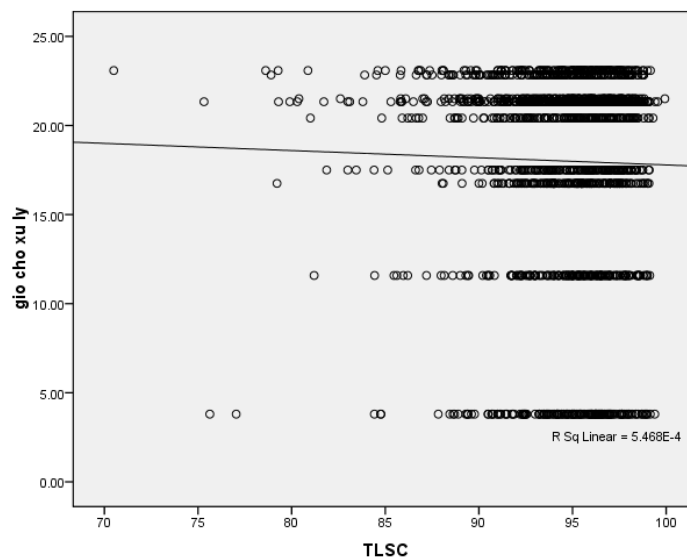
Nhận xét: Thời gian lưu trước xử lý không ảnh hưởng đến hiệu suất xử lý ($r=0,001, p > 0,05$)



Biểu đồ 3.10. Liên quan giữa hiệu suất xử lý và thời gian xử lý ($n = 1668$)

Nhận xét: Thời gian xử lý không ảnh hưởng đến hiệu suất xử lý

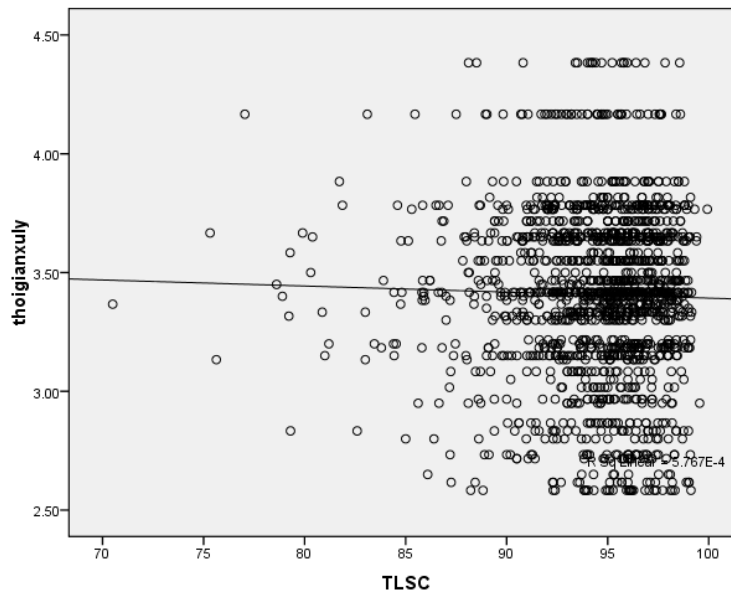
($r=0,015, p > 0,05$)



Biểu đồ 3.11. Liên quan giữa TB CD34 sống và thời gian chờ xử lý

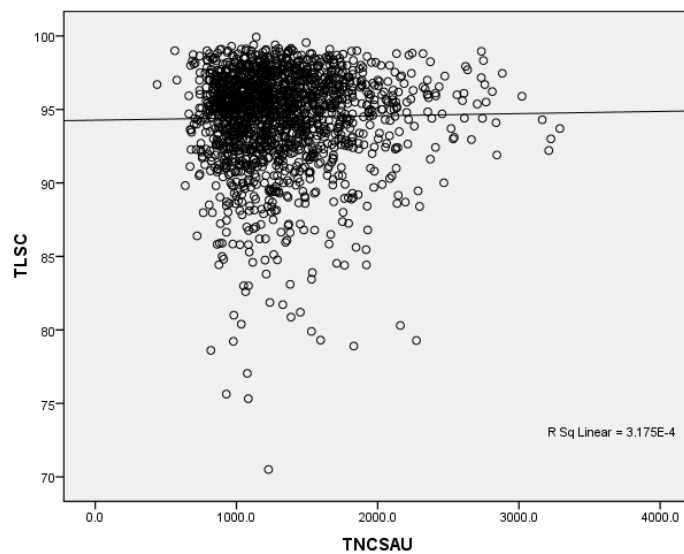
($n = 1668$)

Nhận xét: Thời gian lưu trước xử lý không ảnh hưởng tỷ lệ sống của TB CD34 ($r=0,02, p > 0,05$)



Biểu đồ 3.12. Liên quan giữa TB CD34 sống và thời gian xử lý (n = 1668)

Nhận xét: Thời gian xử lý không ảnh hưởng tỷ lệ sống của TB CD34 ($r=0,02, p > 0,05$)

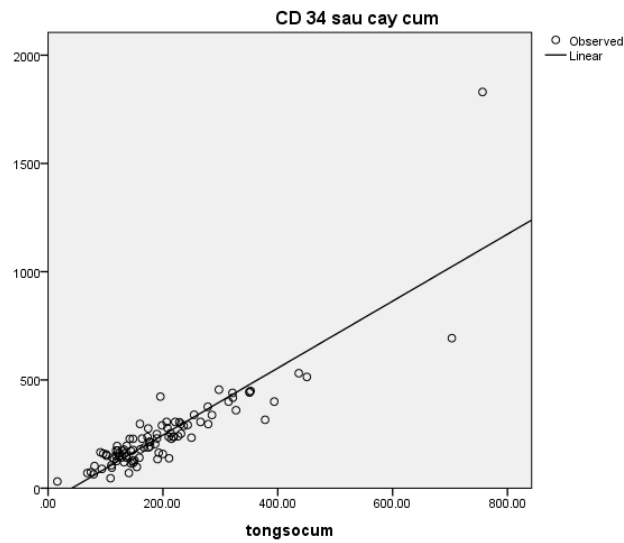


Biểu đồ 3.13. Liên quan giữa tỷ lệ TB CD34 sống và số lượng TBCN

(n = 1668)

Nhận xét: Số lượng TBCN không ảnh hưởng tỷ lệ sống của TB CD34 ($r = 0,018, p > 0,05$)

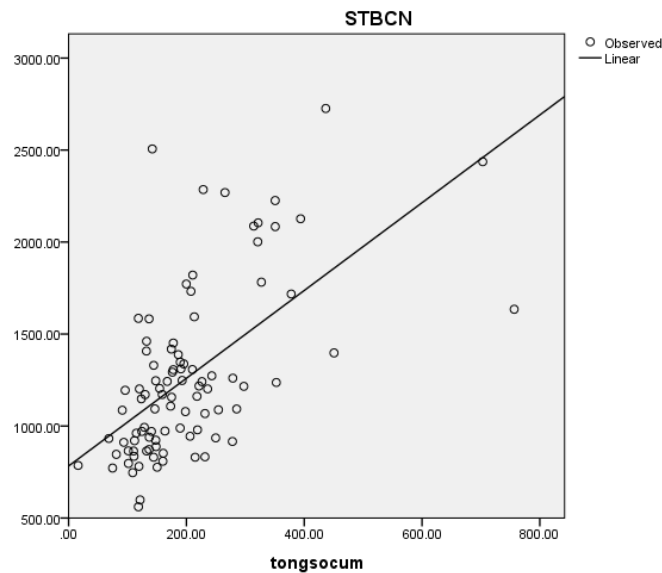
3.3.1.3. Một số yếu tố liên quan trong quá trình bảo quản TBG MDR cộng đồng



$$(r = 0,87 \ p < 0,001)$$

Biểu đồ 3.14. Liên quan giữa TB CD34 và cụm sau rã đông (n = 94)

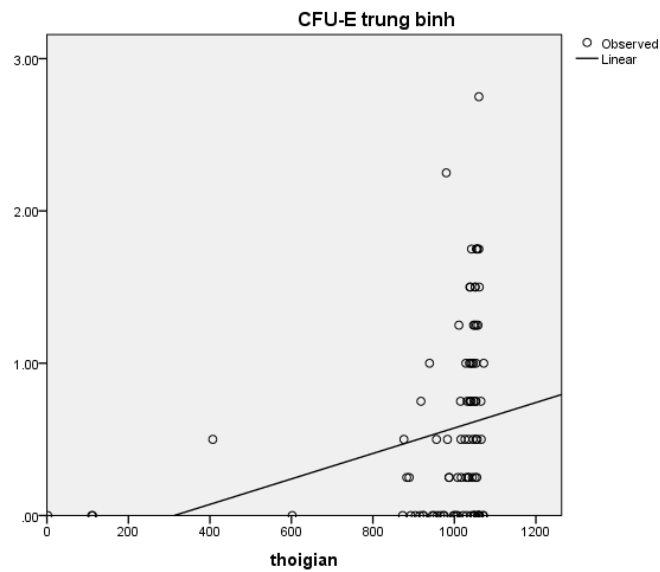
Nhận xét: Số cụm mọc có liên quan chặt với số lượng TB CD34 trong đơn vị TBG MDR sau rã đông



$$(r = 0,60 \ p < 0,001)$$

Biểu đồ 3.15. Liên quan giữa số lượng TBCN và cụm sau rã đông (n = 94)

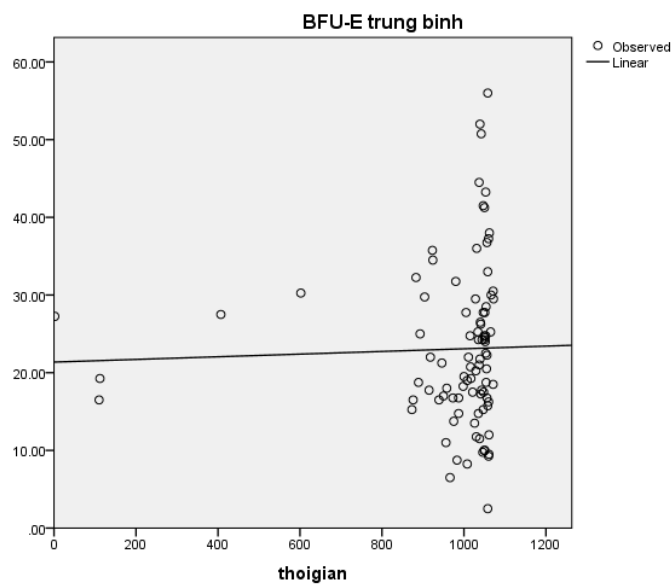
Nhận xét: Số cụm mọc có liên quan chặt với số lượng TBCN trong đơn vị TBG MDR sau rã đông



$$(r = 0,254 \text{ } p < 0,05)$$

Biểu đồ 3.16. Mối liên quan giữa thời gian bảo quản và CFU-E ($n = 94$)

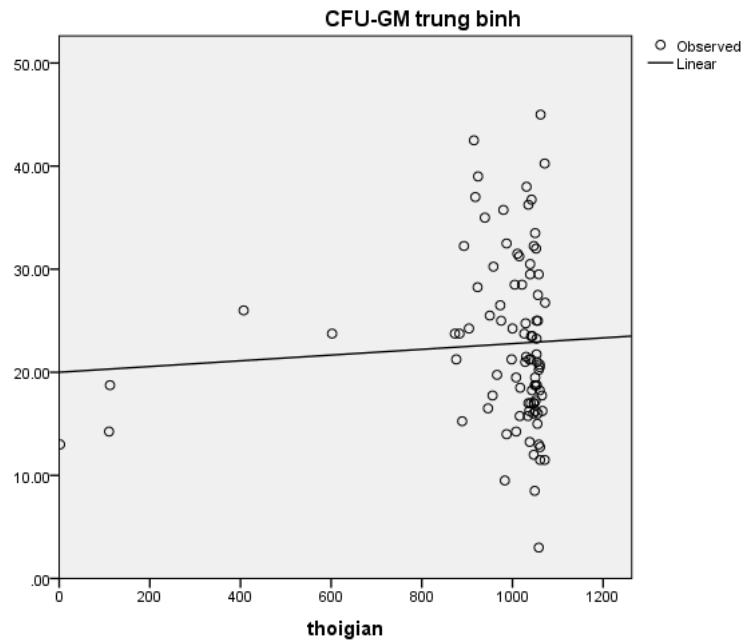
Nhận xét: Có mối liên quan giữa thời gian và CFU-E trung bình. Thời gian càng tăng thì CFU-E trung bình càng tăng.



$$(r = 0,031 \text{ } p > 0,05)$$

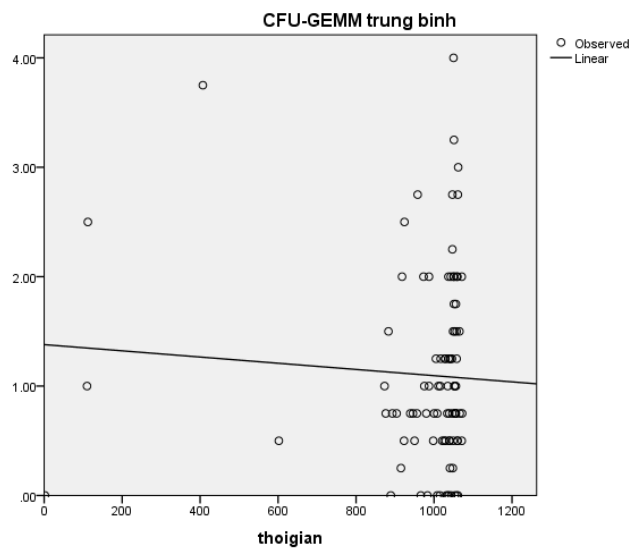
Biểu đồ 3.17. Mối liên quan giữa thời gian bảo quản và BFU-E ($n = 94$)

Nhận xét: Không có mối liên quan giữa thời gian bảo quản và BFU-E ($r = 0,064 \text{ } p > 0,05$)



Biểu đồ 3.18. Mối liên quan giữa thời gian bảo quản và CFU-GM ($n = 94$)

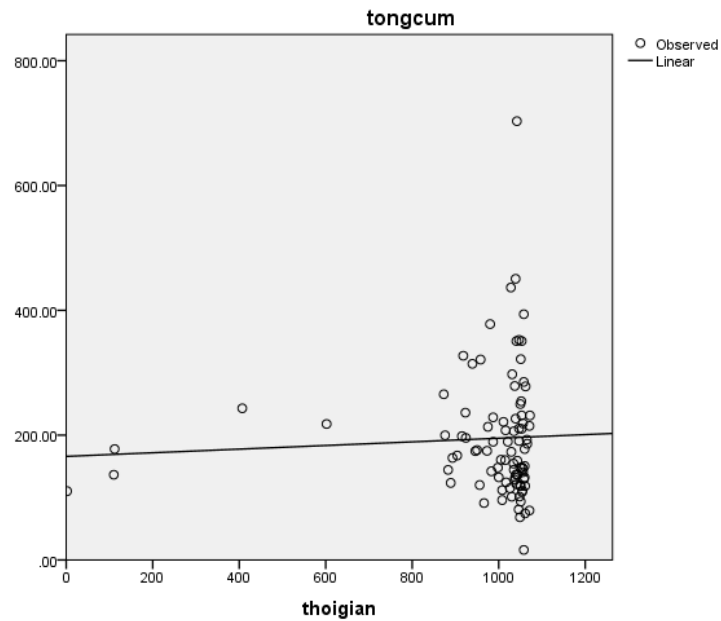
Nhận xét: Không có mối liên quan giữa thời gian bảo quản và CFU-GM



$$(r = 0,061 \quad p > 0,05)$$

Biểu đồ 3.19. Mối liên quan giữa thời gian bảo quản và CFU-GEMM ($n = 94$)

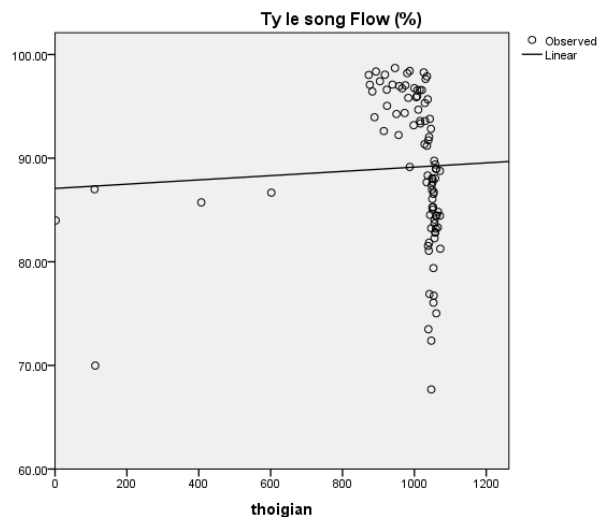
Nhận xét: Không có mối liên quan giữa thời gian và CFU-GEMM trung bình.



$$(r = 0,055 \ p > 0,05)$$

Biểu đồ 3.20. Mối liên quan giữa thời gian bảo quản và tổng số cụm ($n = 94$)

Nhận xét: Không có mối liên quan giữa thời gian và tổng số cụm.



$$(r = 0,054 \ p > 0,05)$$

Biểu đồ 3.21. Mối liên quan giữa thời gian bảo quản và tỷ lệ sống của tế bào sau rã đông ($n = 94$)

Nhận xét: Không có mối liên quan giữa thời gian bảo quản và tỷ lệ sống của TB sau rã đông.

3.3.2. Khả năng sử dụng đơn vị TBG MDR cộng đồng

3.3.2.1. Kết quả xét nghiệm HLA

Bảng 3.28. Tỷ lệ các alen HLA ở mức độ phân giải thấp của từng locus (n=1668)

STT	HLA-A		HLA-B				HLA-DRB1	
	alen	%	alen	%	alen	%	alen	%
1	11	48,8	15	37,0	18	1,5	12	31,7
2	02	36,2	46	19,2	56	2,3	15	11,4
3	24	27,6	07	8,4	48	1,1	09	10,3
4	33	8,0	58	7,7	37	0,8	04	7,9
5	29	12,1	38	4,4	52	0,6	10	7,2
6	01	2,8	40	11,2	13	0,5	07	6,4
7	26	2,0	51	9,7	08	0,2	03	5,4
8	31	1,4	13	4,2	73	0,2	14	4,9
9	30	1,0	35	3,7	50	0,2	08	4,9
10	03	1,2	44	2,9	41	0,1	13	4,5
11	34	0,6	57	2,8	49	0,1	11	2,8
12	74	0,7	54	2,6	81	0,1	16	2,2
13	68	0,4	27	3,3			01	0,4
14	32	0,1	55	1,7				
15	23	0,1	39	4,9				

Nhận xét: Locus HLA-B được phân tích cho ra kết quả với số lượng alen nhiều nhất là 27, locus HLA-A, HLA-DRB1 với 15 và 13 alen.

Bảng 3.29. Tỷ lệ các alen HLA-A của mẫu nghiên cứu (n=1668)

Alen	Tần suất (n)	Tỷ lệ (%)	Alen	Tần suất (n)	Tỷ lệ (%)
11:01	823	24,7	24:03	40	1,2
33:03	411	12,3	30:01	32	1,0
24:02	394	11,8	33:01	25	0,7
02:01	386	11,6	24:10	23	0,7
02:03	273	8,2	03:01	20	0,6
29:01	243	7,3	34:01	19	0,6
02:06	155	4,6	68:01	15	0,4
11:02	112	3,4	11:04	14	0,4
24:07	95	2,8	74:01	10	0,3
01:01	94	2,8	74:05	7	0,2
26:01	67	2,0	29:02	6	0,2
31:01	47	1,4			
13 alen hiếm gặp 01:03, 02:02, 02:05, 02:11, 03:02, 11:12, 23:01, 24:04, 24:05, 24:17, 24:43, 29:03, 32:01				25	0,5
Tổng số alen				36	100

Nhận xét: Trong số 36 alen của locus HLA-A, alen có tỷ lệ gặp nhiều nhất (>10%) là A*11:01 (24,7%); 33:03 (12,3%), 24:02 (11,8%); 02:01 (11,6%); 10 alen ít gặp hơn (chiếm tỷ lệ từ 1 đến 10%), và 13 alen hiếm gặp có tỷ lệ từ dưới 0,1%.

Bảng 3.30. Tỷ lệ các alen HLA-B của mẫu nghiên cứu (n=1668)

Alen	Tần suất (n)	Tỷ lệ (%)	Alen	Tần suất (n)	Tỷ lệ (%)
15:02	512	15,3	07:02	23	0,7
46:01	359	10,8	52:01	21	0,6
58:01	257	7,7	40:02	20	0,6
07:05	245	7,3	56:01	19	0,6
38:02	235	7,0	56:04	19	0,6
15:25	185	5,5	48:03	18	0,5
40:01	146	4,4	18:02	17	0,5
13:01	123	3,7	13:02	16	0,5
44:03	115	3,4	35:01	16	0,5
35:05	103	3,1	35:03	14	0,4
57:01	95	2,8	48:01	12	0,4
51:01	89	2,7	15:18	11	0,3
54:01	86	2,6	15:21	11	0,3
55:02	72	2,2	15:27	11	0,3
15:12	68	2,0	15:11	9	0,3
51:02	57	1,7	56:02	9	0,3
39:01	53	1,6	27:05	8	0,2
27:04	44	1,3	39:05	8	0,2
40:06	35	1,0	08:01	7	0,2
18:01	31	0,9	46:02	7	0,2
15:01	30	0,9	73:01	7	0,2
27:06	29	0,9	50:01	6	0,2
37:01	26	0,8	51:06	6	0,2
19 alen hiếm gặp 15:10, 15:13, 15:15, 15:17, 15:35, 15:46, 27:03, 27:07, 38:01, 39:03, 39:06, 41:01, 44:02, 46:06, 49:01, 51:04, 55:01, 56:03, 81:01			46	1,4	
Tổng số alen			69	100	

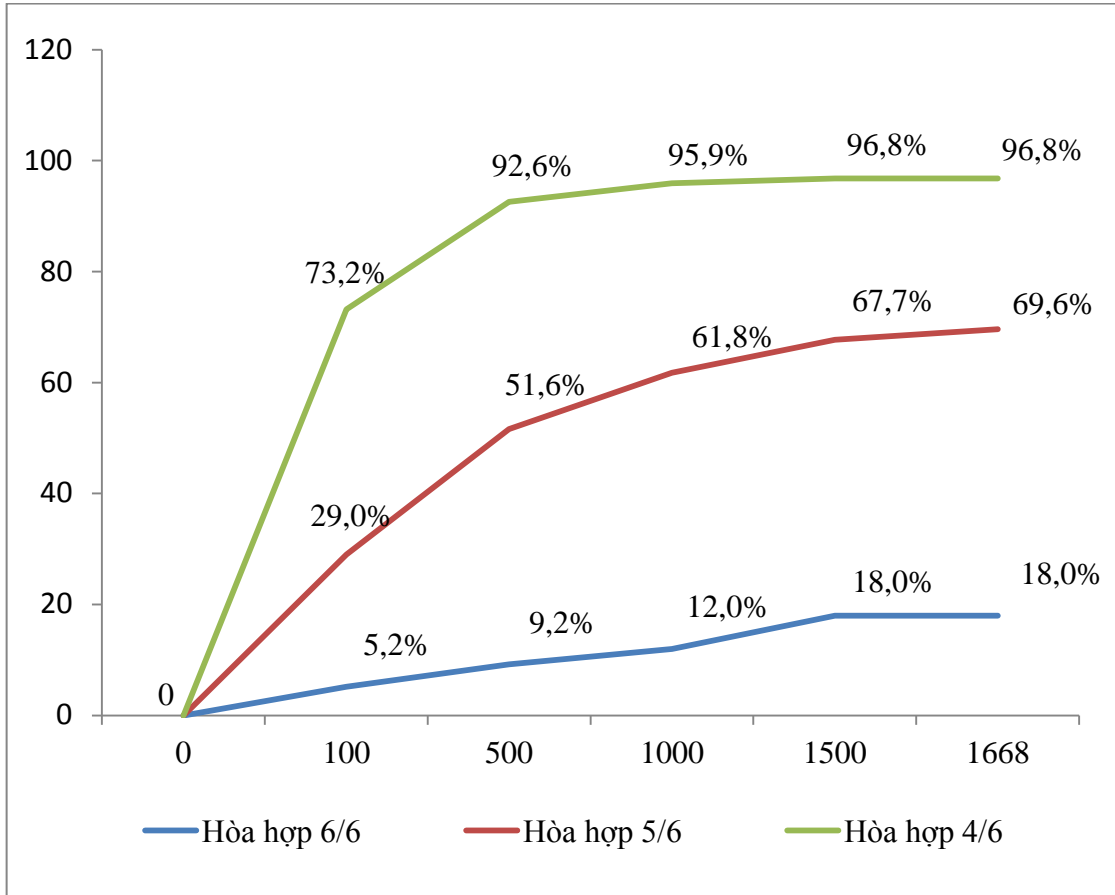
Nhận xét: Locus HLA-B có số lượng alen rất đa dạng với 69 loại, trong đó alen có tỷ lệ gặp nhiều nhất là B*15:02 (15,3%); 46:01 (10,8%); 17 alen ít gặp hơn (chiếm tỷ lệ từ 1 đến 10%); 19 alen rất hiếm gặp có tỷ lệ từ dưới 0,1%.

Bảng 3.31. Tỷ lệ các alen HLA-DR của mẫu nghiên cứu (n=1668)

Alen	Tần suất (n)	Tỷ lệ (%)	Alen	Tần suất (n)	Tỷ lệ (%)
12:02	1033	31,0	13:02	62	1,9
09:01	345	10,3	11:01	53	1,6
15:02	266	8,0	14:04	43	1,3
10:01	239	7,2	14:05	29	0,9
07:01	215	6,4	11:06	28	0,8
03:01	178	5,3	12:01	26	0,8
08:03	158	4,7	04:06	23	0,7
04:05	146	4,4	13:01	22	0,7
15:01	112	3,4	04:04	12	0,4
14:01	86	2,6	11:04	11	0,3
04:03	67	2,0	01:01	7	0,2
13:12	66	2,0	04:01	7	0,2
16:02	66	2,0	01:02	7	0,2
10 alen hiếm gặp 03:02, 04:07, 04:08, 08:02, 08:04, 14:10, 14:18, 15:03, 16:01, 16:12				29	0,8
Tổng số alen				36	100

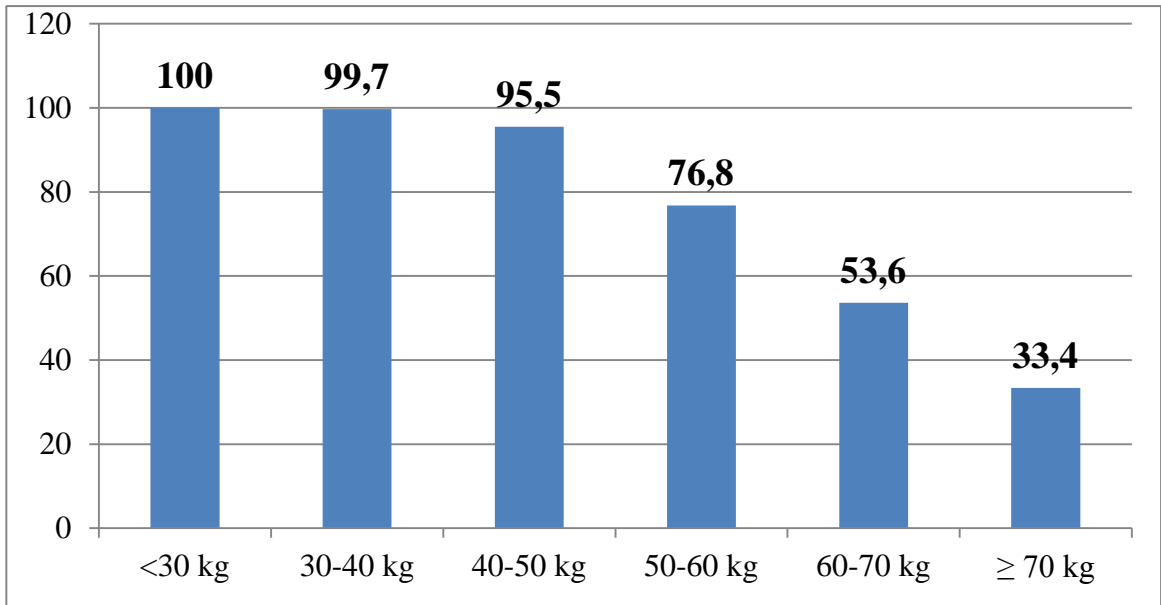
Nhận xét: locus HLA-DRB1 có 36 loại alen, trong đó gặp nhiều nhất là DRB1*12:02 (31,0%); 09:01 (10,3%); 14 alen ít gặp hơn (chiếm tỷ lệ từ 1 đến 10%); 10 alen hiếm gặp có tỷ lệ dưới 1%, 10 alen rất hiếm gặp có tỷ lệ từ dưới 0,1%.

3.3.2.2. Xác xuất tìm kiếm đơn vị tế bào gốc máu dây rốn



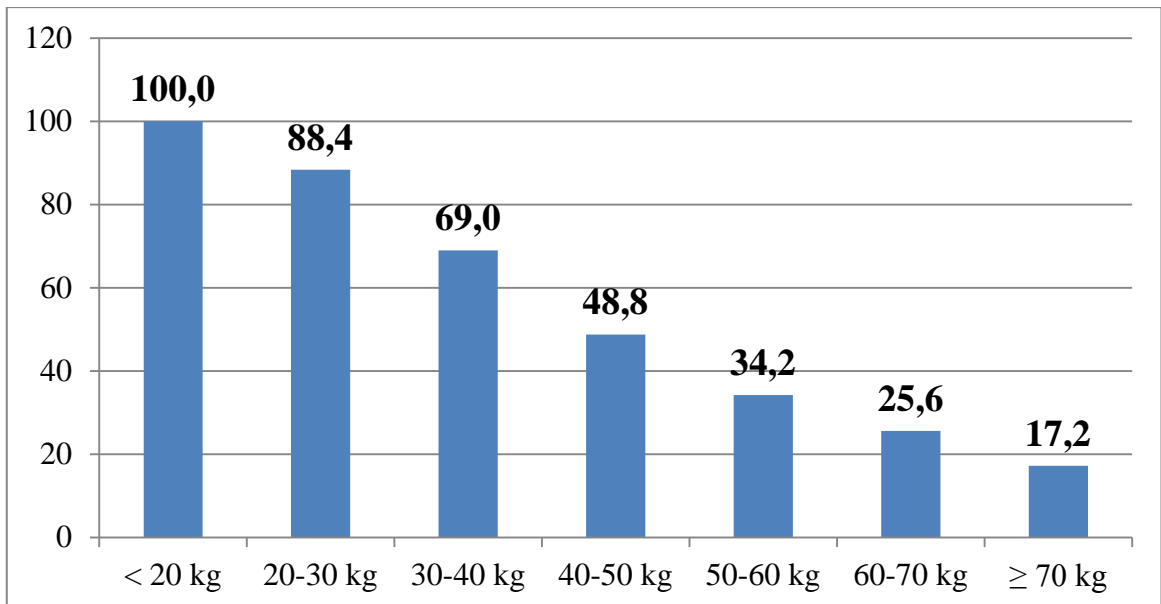
Biểu đồ 3.22. Xác xuất tìm kiếm ít nhất 1 đơn vị TBG MDR hòa hợp HLA theo các cỡ mẫu lưu trữ

Nhận xét: Với 1668 đơn vị TBG MDR của ngân hàng TBG, khả năng tìm kiếm được đơn vị TBG MDR hòa hợp HLA 4/6; 5/6 và 6/6 lần lượt là 96,8%; 69,6% và 18,0%. Với 1000 mẫu lưu trữ đã tìm được cho 95,9% bệnh nhân có nhu cầu tìm kiếm với mức hòa hợp HLA 4/6.



Biểu đồ 3.23. Khả năng tìm kiếm đơn vị TBG MDR theo liều TBCN tối thiểu $2 \times 10^7/\text{kg}$ ($n=1668$)

Nhận xét: Khả năng tìm kiếm TBG MDR theo liều TBCN tối thiểu ($2 \times 10^7/\text{kg}$) trung bình $65,6 \pm 20,0$ kg (21,9 kg - 164,5kg).



Biểu đồ 3.24. Khả năng tìm kiếm TBG MDR theo liều CD34 tối thiểu $1 \times 10^5/\text{kg}$ ($n=1668$)

Nhận xét: Khả năng tìm kiếm TBG MDR theo liều CD34 tối thiểu ($1 \times 10^5/\text{kg}$) trung bình $48,1 \pm 35,4$ kg (4,1kg - 256kg) trung vị 39,0 kg.

3.3.2.3. Kết quả chọn đơn vị tế bào gốc máu dây rốn cho bệnh nhân

Bảng 3.32. Đặc điểm của bệnh nhân tìm kiếm (n=217)

Đặc điểm	Nơi gửi		Tuổi	Cân nặng
	Tại viện	Ngoài viện		
		175 (80,6%)	42 (19,4%)	23,5 ± 1,7 (1-63)

Nhận xét: Tìm kiếm TBG MDR phục vụ tại viện chiếm 80,6% và ngoài viện 19,4%. Tuổi trung bình của bệnh nhân cần tìm kiếm HLA 23,5 ± 1,7, cân nặng trung bình 41,4 ± 1,8

Bảng 3.33. Tỷ lệ bệnh nhân tìm kiếm theo bệnh (n=217)

	n	Tỷ lệ
Lơ xê mi cấp	106	48,9
Lơ xê mi kinh	11	5,1
Thalassemia	58	26,7
Suy tủy xương	34	15,7
Rối loạn sinh tủy	10	4,6
Bệnh khác	9	4,1
Tổng	217	100

Nhận xét: 217 bệnh nhân có nhu cầu tìm kiếm TBG MDR. Trong đó chủ yếu là bệnh nhân lơ xê mi cấp (48,9%), thalassemia (26,7%), suy tủy xương (15,7%).

Bảng 3.34. Tỷ lệ bệnh nhân tìm thấy đơn vị TBG MDR hòa hợp HLA (n = 217)

Mức độ hòa hợp	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số đơn vị MDR tìm được
Hòa hợp hoàn toàn 6/6	39	18,0	1 - 17
Hòa hợp tối thiểu 5/6	151	69,6	1 - 96
Hòa hợp tối thiểu 4/6	210	96,8	1 - 184
Không có mẫu hòa hợp	7	3,2	

Nhận xét: Khi sử dụng kết quả xét nghiệm HLA độ phân giải cao của 1668 đơn vị TBG MDR lưu trữ để tìm kiếm TBG MDR cho 217 bệnh nhân có chỉ định ghép. Kết quả tìm kiếm cho thấy có 96,8% số trường hợp bệnh nhân đã tìm thấy đơn vị TBG MDR hòa hợp tối thiểu 4/6 locus chính (A, B, DR). Trong 210 bệnh nhân có 39 trường hợp tìm được đơn vị TBG MDR hòa hợp hoàn toàn 6/6. Tuy nhiên vẫn còn 7 bệnh nhân không tìm thấy mẫu TBG MDR hòa hợp.

Bảng 3.35. Liều tế bào tìm kiếm được tương ứng với các mức hòa hợp (n=217)

Hòa hợp	Tế bào	$\bar{X} \pm SD$ (min - max)
4/6	CD34 (10^5 tế bào/kg)	$3,6 \pm 2,3$ (0,42 – 24,15)
	TBCN (10^7 tế bào /kg)	$9,0 \pm 5,5$ (1,33 – 55,65)
5/6	CD34 (10^5 tế bào/kg)	$2,5 \pm 1,7$ (0,26 – 13,4)
	TBCN (10^7 tế bào /kg)	$6,7 \pm 4,0$ (1,44 – 41,74)
6/6	CD34 (10^5 tế bào/kg)	$2,4 \pm 1,4$ (0,41 – 14,62)
	TBCN (10^7 tế bào /kg)	$6,2 \pm 3,9$ (1,77 – 24,39)

Nhận xét: Với mức độ hòa hợp HLA lần lượt 4/6, 5/6, 6/6 liều TB CD34 trung bình tìm được cho bệnh nhân là 3,6; 2,5; 2,4 x 10^5 tế bào /kg, liều TBCN lần lượt là 9,0; 6,7; 6,2x 10^7 tế bào /kg.

Bảng 3.36. Số đơn vị TBG MDR đã ghép

Bệnh	n	Tỷ lệ
Lơ xê mi cấp	7	58,3
Suy tủy	1	8,3
Thalassemia	2	16,7
Rối loạn sinh tủy	2	16,7
Tổng	12	100

Nhận xét: 12 đơn vị TBG MDR đã ghép cho các bệnh nhân trong đó chủ yếu là bệnh nhân lơ xê mi cấp 58,3%. Ngoài ra là các bệnh nhân suy tủy, thalassemia, rối loạn sinh tủy.

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

4.1. Một số đặc điểm sản phụ và thai nhi của các đơn vị MDR được lựa chọn

Để có được đơn vị TBG MDR cộng đồng, mỗi ngân hàng TBG đều phải thực hiện các giai đoạn sau: (1) Tuyển chọn người hiến và được sự đồng ý của người hiến; (2) Thu thập MDR; bảo quản và vận chuyển về Ngân hàng; (3) Xử lý, xét nghiệm (sàng lọc, định danh, số lượng TB), bảo quản lạnh và lưu trữ; (4) Đảm bảo chất lượng theo tiêu chuẩn NetCord [7777]. Trước khi tiến hành thu thập phải diễn ra quá trình tuyển chọn đối tượng hiến MDR theo tiêu chuẩn đã được đặt ra. Đặc điểm của sản phụ là vấn đề đầu tiên tiếp cận để sàng lọc và quyết định có thu thập MDR hay không. Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng và thể tích MDR thu được. Một trong những vấn đề đó là tuổi sản phụ. Tuổi sản phụ càng cao thì khả năng có bất thường thai nhi càng lớn do đó TBG MDR cũng có thể tiềm tàng nhiều nguy cơ. Trong nghiên cứu chọn sản phụ có tuổi trung bình là $28 \pm 3,4$ tuổi, thấp nhất là 18 tuổi và cao nhất là 35 tuổi (Bảng 3.1). Chúng tôi chủ đích chọn độ tuổi như vậy vì đây là độ tuổi có quá trình sinh lý sinh sản tốt nhất, phù hợp với pháp luật và tiềm tàng ít các nguy cơ bất thường do tuổi tác gây ra. Nghiên cứu của chúng tôi cũng chọn chủ đích tương tự như nghiên cứu của Rodrigo Dias Nunes năm 2015 [73], Chanda và cộng sự năm 2011 [71] khi nghiên cứu 500 mẫu MDR cho thấy độ tuổi trung bình của sản phụ là $28,47 \pm 4,26$ tuổi. Nghiên cứu của chúng tôi khác với một số tác giả khác như Christine L. Keersmaekers (2013), tác giả Marina (2013) hay tác giả Dunia Jawdat (2015) đều thu thập MDR ở những sản phụ từ 18 tuổi trở lên [89],[90],[72]. Nghiên cứu của F.Mancinelli tác giả chọn sản phụ từ 18-45 tuổi [91]. Như vậy các nghiên cứu tại các nước khác nhau sẽ chọn giới hạn tuổi sản phụ khác nhau để thu thập MDR.

Chúng tôi cũng tiến hành khảo sát cân nặng của sản phụ hiện MDR thì thấy sản phụ có cân nặng trung bình 63,7 kg. Thấp nhất là 45 kg, nặng nhất là 88 kg.

Thalassemia là bệnh tan máu bẩm sinh di truyền. Hiện nay tỷ lệ người mang gen thalassemia trên thế giới cũng như tại Việt Nam rất cao. Theo thống kê mới nhất năm 2019 của Viện Huyết Học – Truyền máu Trung Ương Theo thống kê, ở nước ta ước tính có khoảng 12 triệu người mang gen bệnh (chiếm khoảng 12% dân số Việt Nam). Mỗi năm có hơn 8.000 trẻ sinh ra bị bệnh. Trong đó có hơn 2.000 trẻ mắc bệnh ở mức độ nặng cần được điều trị cả đời. Hơn 20.000 bệnh nhân đang cần được điều trị. Do đó, để một đơn vị TBG MDR không mang gen bệnh huyết sắc tố thì sản phụ phải là người không mang bệnh cũng như không mang gen. Theo Supatra Sirichotiyakul năm 2005 đã chỉ ra MCV là công cụ hữu ích để sàng lọc thalassemia khi mang thai vì tính đơn giản, chi phí thấp và độ nhạy cao. Với xét nghiệm $MCV \leq 80$ fl cho thấy độ nhạy tương ứng là 92,9% và 83,9% [92]. Theo nghiên cứu của Trần Ngọc Quế và cộng sự năm 2015, sản phụ có $MCV < 80$ fl thì thai có nguy cơ mang gen thalassemia tăng 44,7 lần [88]. Do đó trong nghiên cứu này chúng tôi sàng lọc bệnh huyết sắc tố thông qua chỉ số MCV của sản phụ và chỉ thu thập MDR ở những sản phụ có MCV trên 80fl. Kết quả nghiên cứu cho thấy MCV trung bình của sản phụ là $91,2 \pm 3,6$ fl (80,1 - 112 fl) (Bảng 3.1). Đây là một trong những tiêu chí lựa chọn sản phụ rất khác so với các nghiên cứu trước, nó góp phần giảm thiểu những đơn vị TBG MDR bị loại do bệnh lý huyết sắc tố. Từ đây góp phần nâng cao hiệu quả kinh tế cho ngân hàng.

Kết quả bảng 3.2 cho thấy sản phụ dân tộc Kinh chiếm chủ yếu 99,6%. Tỷ lệ gặp sản phụ dân tộc thiểu số rất ít 0,4% bao gồm dân tộc Mường, Sán Dìu và Tày. Điều này cũng dễ hiểu vì chúng tôi thu thập MDR tại Hà Nội, nơi đây chủ yếu người dân tộc Kinh sinh sống.

Máu dây rốn được thu thập ở sản phụ sinh thường và sản phụ sinh mổ. Tuy nhiên, chủ yếu là thu thập tại khoa sinh thường nên tỷ lệ sinh thường (chiếm tới 93,4% tổng số mẫu MDR thu được) cao hơn nhiều so với sinh mổ. Tỷ lệ sinh mổ chỉ có 6,6% (Bảng 3.3). Với sinh thường các tác giả thu MDR trước khi sổ rau. Với sinh mổ MDR được thu sau khi sổ rau. Đã có nhiều tác giả nghiên cứu về vấn đề sinh mổ và sinh thường nhưng các kết luận khác nhau. Sparrow RL và cộng sự năm 2002 nghiên cứu trên 218 mẫu MDR trong đó có 61 mẫu thu từ sản phụ sinh mổ và 157 mẫu thu từ sản phụ sinh thường đã chỉ ra thể tích MDR cao hơn đáng kể ở sản phụ sinh mổ ($n = 61$) so với sinh thường ($n = 157$; thể tích trung bình tương ứng 76 ml so với 63 ml; $p < 0,001$). Tuy nhiên tác giả lại thấy số lượng bạch cầu trong sinh thường cao hơn đáng kể so với mổ lấy thai ($17,1 \times 10$ và $13,6 \text{ G/l}$, $p < 0,001$) [93]. Tác giả F. Mancinelli và cộng sự nghiên cứu trên 304 mẫu MDR đã đưa ra các giả thuyết là khi sinh mổ, trọng lực là yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến thể tích. Trên thực tế, trẻ sơ sinh được đặt phía trên nhau thai trước khi kẹp rốn, theo trọng lực dòng máu chảy vào dây rau và vào bánh rau, bên cạnh đó bánh rau dập nát, máu đông hoặc thất thoát sẽ khiến cho số lượng máu thu thập giảm đáng kể nên làm giảm thể tích MDR thu thập. [91]. Solves P và cộng sự nghiên cứu 569 mẫu MDR từ sản phụ sinh thường và 70 mẫu MDR từ sản phụ mổ lấy thai. Tác giả đã rút ra kết luận sau: So sánh giữa tất cả các ca sinh thường và sinh mổ không cho thấy sự khác biệt về thể tích MDR thu được. Tác giả kết luận rằng hình thức thu thập không ảnh hưởng đến chất lượng của mẫu MDR. Tuy nhiên, thu thập trước khi sổ rau là cách tiếp cận tốt nhất để thu thập MDR và cho phép tối ưu hóa phương pháp thu thập MDR tại các ngân hàng [94].

Số lần sinh của sản phụ từ 1 đến 4 (Biểu đồ 3.1). Không có sản phụ sinh con thứ 5 trở lên. Trong đó chủ yếu là sản phụ sinh lần 1 và 2 chiếm 91,9%, chỉ có 8,1% sản phụ sinh con thứ 3, thứ 4. Điều này cũng phù hợp với chương trình truyền thông dân số tại Việt Nam.

Trong suốt thời kỳ mang thai dây rốn mang các chất dinh dưỡng từ mẹ sang con. Một trong những yếu tố ảnh hưởng đến thể tích MDR thu được là thời điểm kẹp dây rốn. Theo WHO [95] khuyến cáo kẹp dây rốn càng sớm thì thể tích thu được càng nhiều vì càng để lâu máu trong dây rốn vẫn tiếp tục đi vào trong đứa trẻ. Tuy nhiên với trẻ đẻ non tháng việc chắt rế từ 30-120 giây có lợi cho trẻ do đó không nên tiến hành kẹp sớm để thu lượng máu tối đa trong dây rốn. Với trẻ đã đủ tháng, điều này không có bất kỳ ảnh hưởng nào được ghi nhận do đó chúng tôi chỉ tiến hành thu thập ở những trẻ đủ tháng. Tuổi thai trong nghiên cứu từ 36-42 tuần (trung bình 39,3 tuần theo kết quả bảng 3.4). Theo hướng dẫn của NetCord 2016, với tuổi thai dưới 34 tuần, các bác sĩ sản khoa phải đánh giá về mức độ an toàn của người hiến mới được phép thu thập do đó nghiên cứu chúng tôi chọn tuổi thai từ trên 36 tuần [77]. Tiêu chuẩn trong nghiên cứu này cao hơn một số tác giả trên thế giới như Christine L. Keersmaekers, Dunia Jawdat, F. Mancinelli thu thập MDR từ những thai nhi trên 34 tuần [89],[72],[91]. Tương ứng với 36 tuần cân nặng của thai từ 2600 gram. Do đó chúng tôi lựa chọn những thai có trọng lượng từ 2600 gram trở lên để thu thập MDR. Trong nghiên cứu trọng lượng thai trung bình 3257 ± 304 gram dao động từ 2600 đến 4500 gram (Bảng 3.4). Nếu trọng lượng thai nhỏ hơn so với quy định sẽ bị loại ra khỏi quá trình thu thập, các nguyên nhân làm thai thiếu cân có thể do bệnh lý như thiếu máu, suy dinh dưỡng, mắc các bệnh mạn tính như suy tim, suy thận, tăng huyết áp hoặc các nguy cơ khác như tiền sản giật, tiểu đường thai kỳ...hoặc có thể thai bị dị tật bẩm sinh, cấu tạo của các phần phụ nuôi thai bất thường... Như vậy với tiêu chuẩn cân nặng đề ra, một phần nào cũng góp phần chọn được những sản phụ và thai nhi hoàn toàn khỏe mạnh hiến MDR, hạn chế những bất thường trong chuyển dạ. Từ đó quá trình thu thập cũng diễn ra thuận lợi và người hiến được hoàn toàn an toàn.

Kết quả bảng 3.5 cho thấy trẻ sơ sinh là trai chiếm tỷ lệ cao hơn nữ tương ứng là 53,1% và 46,9%. Sự chênh lệch về giới tính cũng tương tự nghiên cứu của Dunia Jawdat và cộng sự có tỷ lệ trẻ sơ sinh nam là 55,32% và nữ là 45,68% [72]. Các đặc điểm chung của dây rốn: cân nặng bánh rau trung bình $505 \pm 41,4$ gram. Chiều dài dây rốn trung bình $54,1 \pm 5,8$ cm (Bảng 3.6).

4.2. Kết quả thu thập, xử lý, bảo quản máu dây rốn cộng đồng

4.2.1. Kết quả thu thập máu dây rốn

Trong nghiên cứu, các bước thu thập MDR cụ thể như sau: Tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội diễn ra quá trình tuyển chọn và thu thập MDR. Khi nhận mẫu, nhân viên của ngân hàng sẽ kiểm tra sơ bộ túi máu và hồ sơ kèm theo, nếu đủ tiêu chuẩn túi MDR sẽ được vận chuyển về ngân hàng TBG. Tại đây, túi MDR được kiểm tra đánh giá các chỉ số: thể tích MDR, tình trạng túi máu, MCV, TBCN. Nếu mẫu MDR đạt yêu cầu sẽ được đưa vào xử lý. Kết quả nghiên cứu có 2906 túi MDR được bàn giao về ngân hàng, sau khi kiểm tra đánh giá có 1770 túi đạt tiêu chuẩn đưa vào xử lý chiếm 60,9%; 39,1% tương ứng với 1136 túi MDR không đáp ứng được tiêu chuẩn để ra phải tiêu hủy (Bảng 3.7). 39,1% mẫu MDR phải hủy cao hơn nghiên cứu của Huỳnh Nghĩa [83]. Sự khác nhau này được giải thích là do ngoài các tiêu chuẩn đề ra như trong nghiên cứu của tác giả, nghiên cứu này còn yêu cầu thể tích MDR cao hơn (≥ 80 ml) có thêm yêu cầu về số lượng TBCN, những mẫu MDR có TBCN $< 80 \times 10^7$ sẽ bị loại bỏ. Kết quả này của chúng tôi thấp hơn của Christine L. Keersmaekers [89]. Năm 2013, tác giả nghiên cứu 7839 đơn vị MDR được thu thập, 54,1% túi MDR không đáp ứng tiêu chuẩn đã phải hủy. Như vậy số lượng đơn vị MDR phải hủy trong nghiên cứu của tác giả cao hơn nghiên cứu của chúng tôi. Có sự khác biệt này là do tiêu chuẩn lựa chọn đầu vào của MDR. Trong nghiên cứu, chúng tôi đã kiểm soát chặt chẽ từ bước lựa chọn

người hiến, đây là bước đầu tiên, tiền đề để giảm thiểu những túi máu không đủ tiêu chuẩn. Trước khi thu thập chúng tôi đã tầm soát loại bỏ hết những sản phụ có nguy cơ không đáp ứng được tiêu chuẩn như sản phụ có MCV thấp dưới 80 fl, sản phụ dương tính với HBsAg, HIV, HCV... Bên cạnh đó, tỷ lệ MDR không đạt tiêu chuẩn trong nghiên cứu của tác giả cao hơn còn do tiêu chuẩn TBCN của tác giả $\geq 90 \times 10^7$ cao hơn nghiên cứu của chúng tôi. Ngân hàng của chúng tôi chấp nhận số lượng TBCN $\geq 80 \times 10^7$ được đưa vào xử lý. Cơ sở để đặt ra tiêu chuẩn này là do liều TBCN tối thiểu cho một trường hợp ghép từ MDR là 2×10^7 TBCN/kg cân nặng và Ngân hàng Tế bào gốc hướng tới những bệnh nhân người lớn với cân nặng trung bình 45 kg

Theo kết quả bảng 3.8 có nhiều nguyên nhân dẫn đến túi MDR không được xử lý, phải loại bỏ và tiêu hủy, trong đó nguyên do thể tích không đảm bảo từ 80 ml trở lên chiếm tỷ lệ cao nhất 64,8%, tiếp đến là số lượng TBCN không đáp ứng tiêu chuẩn chiếm 22,7% và MCV thấp (dưới 95fl) chiếm 2,3%. Trong MDR thành phần huyết sắc tố khác với trẻ em trên 1 tuổi và người lớn. Theo nghiên cứu của A. Al-Madhani và cộng sự nếu $MCV \leq 95$ fl and $MCH \leq 30$ pg thì xác định được bệnh α -globin đồng hợp tử với độ nhạy 100% [96]. Theo tác giả Nelida I Noguera và cộng sự [97] khi nghiên cứu về bệnh huyết sắc tố ở MDR của trẻ sơ sinh (1999) và cho thấy MCV là một thông số rất thú vị và tác giả đã đề xuất MCV như là một tiêu chí báo động để chẩn đoán alpha thalassemia; tuy nhiên, cần phải áp dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để đạt được chẩn đoán đáng tin cậy. Trong nghiên cứu, MCV ở trẻ sơ sinh đủ tháng có cân nặng theo tuổi thai là $105,1 \pm 5,3$ fl, do đó, tác giả đã xem xét các giá trị MCV nhỏ hơn 94,7 như một dấu hiệu tế bào cảnh báo. Theo hướng dẫn của NetCord, phân tích thành phần huyết sắc tố (điện di) giúp loại trừ những đơn vị TBG mang bệnh huyết sắc tố di truyền [77]. Tương tự như nghiên cứu của Trần Ngọc Quế (2015) khi khảo sát tình trạng

thalassemia trong MDR có kết quả MCV máu dây rốn $<95\text{fl}$ thì nguy cơ mang gen thalassemia tăng 347,5 lần [88]. Trong nghiên cứu, dù đã loại trừ thông qua chỉ số MCV chúng tôi tiếp tục phân tích thành phần huyết sắc tố cho các đơn vị TBG sau xử lý để sàng lọc bệnh huyết sắc tố di truyền. Kết quả có 59 đơn vị bị loại (chiếm 57,8%) vì xuất hiện các đột biến như HbE, HbBart...

Nguồn TBG MDR có rất nhiều ưu điểm so với các nguồn tế bào khác, một trong những ưu điểm đó là nguy cơ lây nhiễm thấp hơn. Tuy nhiên, không phải không có nguy cơ lây nhiễm [97],[98]. Do đó, giống như truyền máu chúng tôi đã tiến hành sàng lọc các bệnh lây truyền qua như HIV, HBV, HCV, CMV. Quá trình sàng lọc này được thực hiện ngay từ khi tuyển chọn người hiến. Trong nghiên cứu, chúng tôi không thu thập MDR của những sản phụ có kết quả test HIV, HBV, HCV dương tính. Để đảm bảo an toàn, khi xử lý, các đơn vị TBG MDR tiếp tục được sàng lọc tình trạng nhiễm virus bằng các kỹ thuật điện hóa phát quang miễn dịch và nuôi cấy xét nghiệm vi khuẩn/nấm. Kết quả nghiên cứu đã loại 102 đơn vị TBG sau khi xử lý. Trong đó nguyên nhân loại do cấy vi khuẩn/nấm (+) là 30,4%; nguyên nhân do xét nghiệm virus HBsAg, HCV, HIV, GM, CMV (+) là 11,8% (Bảng 3.9). Sau khi sàng lọc loại bỏ những đơn vị TBG không đáp ứng yêu cầu, chúng tôi có 1668 đơn vị TBG MDR đạt tiêu chuẩn đưa vào lưu trữ và được xét nghiệm HLA sẵn sàng cho ghép.

Thể tích MDR thu được là yếu tố đầu quan trọng để tạo ra đơn vị TBG đủ số lượng và chất lượng phục vụ cho sử dụng ghép trên lâm sàng. Trong nghiên cứu thể tích MDR thu được trung bình là $139 \pm 18,7$ ml trong đó bao gồm 35 ml chống đông; thể tích thu được nhỏ nhất là 115 ml, thể tích thu được cao nhất là 259,7 ml (Bảng 3.10). So sánh với các nghiên cứu trong và ngoài nước, kết quả của chúng tôi có sự khác biệt:

Bảng 4.1. So sánh thể tích máu dây rốn trong nghiên cứu với một số tác giả trong và ngoài nước

Tác giả	Thể tích túi máu dây rốn (ml)
Huỳnh Nghĩa (2008) [83]	81,71± 18,98
Tulika Chandra (2011) [71]	79,47 ± 13,04
Christine L. Keersmaekers (2013) [89]	95,2 ± 30,3
Trần Ngọc Quế (2014) [99]	86,3 ± 27,1
Kristin M, Page, MD (2014) [100]	93,0
Sara Y, Al-Deghaither (2015) [101]	78,51
Dunia Jawdat (2015) [72]	74,22 ± 0,84
Nghiên cứu của chúng tôi (2019)	139,7 ± 19,1

** Bao gồm chống đông*

Trong nghiên cứu của José C. Jaime-Pérez và cộng sự năm 2011 chỉ ra số lượng TBG MDR được phản ánh thông qua số lượng TBCN thu được trong mỗi đơn vị TBG. Thể tích MDR là yếu tố tiên lượng tốt nhất số lượng TBCN với $p < 0,001$ [102]. Điều này cũng được thể hiện trong kết quả nghiên cứu của Dunia Jawdat [72] trên 957 đơn vị TBG MDR. Do đó, thể tích MDR thu được là tiêu chí đầu vào quan trọng của quá trình thu thập. Thể tích thu thập ít và lượng tế bào trong đơn vị TBG MDR thấp là hạn chế nhất của TBG MDR hiện nay. Muốn nâng cao chất lượng và khả năng sử dụng TBG MDR thì thể tích MDR thu được phải lớn. Vì lý do đó, trong nghiên cứu chúng tôi đã không thu thập MDR của những dây rốn ngắn, nhỏ và loại bỏ không đưa những mẫu có thể tích dưới 80 ml vào xử lý. Điều này cũng dẫn đến kết quả 65,1% túi MDR có thể tích (bao gồm chất chống đông) từ 120 - 150 ml và 23,2% túi MDR có thể tích trên 150 ml (Bảng 3.11).

Số lượng TBCN được coi là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến thành công của cuộc ghép. Do đó muốn có những đơn vị TBG MDR đảm bảo ghép

cho bệnh nhân có cân nặng cao thì trước khi xử lý số lượng TBCN cũng phải cao. Thê tích MDR chỉ là tiền đề để thu được lượng TBCN cao đảm bảo đầu vào của ngân hàng. Chúng tôi tiến hành xét nghiệm số lượng TBCN và chỉ chấp nhận xử lý những đơn vị có số lượng TBCN từ 80×10^7 . Do đó số lượng TBCN trung bình trước khi xử lý trong nghiên cứu tương đối cao $151,8 \pm 40,4 \times 10^7$ tế bào. So với nghiên cứu trong và ngoài nước:

Bảng 4.2. So sánh tổng số tế bào có nhân với một số nghiên cứu trong và ngoài nước

Tác giả	Tổng số tế bào có nhân (10^7)
Huỳnh Nghĩa (2008) [83]	$84,36 \pm 35,79$
Nguyễn Quang Tùng (2011) [85]	$124,0 \pm 43,0$
Dunia jawdat (2015) [72]	$93,77 \pm 17,05$
Atakan Tanaçan (2018) [103]	$152,7 \pm 22,0$
Nghiên cứu của chúng tôi (2019)	$151,8 \pm 40,4$

Sở dĩ kết quả của Atakan Tanaçan (2018) cao hơn nghiên cứu của chúng tôi vì trong nghiên cứu tác giả chọn tiêu chuẩn TBCN $\geq 10 \times 10^8$ tế bào để xử lý. Nghiên cứu của chúng tôi chấp nhận TBCN ở ngưỡng thấp hơn là TBCN $\geq 8 \times 10^8$ tế bào. Trong các nghiên cứu còn lại tiêu chuẩn thường đặt ra thấp hơn nghiên cứu của chúng tôi nên số lượng TBCN thấp hơn. Như vậy với tiêu chuẩn TBCN đầu vào càng cao thì trong đơn vị TBG MDR càng cao.

Phân tích các chỉ số tế bào bạch cầu của túi MDR thu thập được cho kết quả số lượng TBCN trung bình $14,7 \pm 4,0$ G/l; BC trung tính $8,6 \pm 2,9$ G/l; BC lympho $4,5 \pm 1,7$ G/l; BC mono $1,6 \pm 0,6$ G/l (Bảng 3.12). Số lượng BC trong nghiên cứu tương đương với số lượng bạch cầu ở trẻ sơ sinh $15,4 \pm 9,5$ G/l

[104] nhưng cao hơn giá trị trung bình của người trưởng thành 4-10 G/l [105]. Điều này cho thấy TBCN trong MDR cao hơn người trưởng thành.

Kết quả các chỉ số hồng cầu trong nghiên cứu (Bảng 3.13) tương tự như kết quả của Nelida I Noguera và cộng sự năm 1999 khi nghiên cứu trên 476 mẫu MDR sơ sinh được thu thập tại Bệnh viện tỉnh Del Centenario, Rosario. Trong đó có 438/476 mẫu máu được thu từ trẻ sơ sinh đủ tháng [97].

Bảng 4.3. So sánh chỉ số hồng cầu trong nghiên cứu với nghiên cứu của Nelida I Noguera

Chỉ số	2019 (1668 mẫu)	Nelida I Noguera 1999(438 mẫu)
SLHC (T/l)	4,4 ± 0,4	4,66 ± 0,33
HGB	154,3 ± 14,0	155,0 ± 11,0
HCT (%)	48,2 ± 4,5	49,0 ± 4,3
MCV (fl)	110,8 ± 4,6	105,1 ± 5,30
MCH (pg)	35,5 ± 1,6	33,3 ± 1,2
MCHC (g/l)	430,5 ± 24,5	

4.2.2. Kết quả xử lý và bảo quản

MDR được thu thập vào túi vô trùng có thể tích 250 ml có sẵn 35 ml chống đông. Như vậy thể tích các túi MDR tương đối lớn bao gồm chủ yếu là hồng cầu, huyết tương và môi trường bảo quản, chỉ có một phần là tế bào đơn nhân (nơi chứa TBG) là cần thiết cho ngân hàng. Hơn nữa các thành phần này hầu hết không có lợi cho quá trình bảo quản cũng như sử dụng cho bệnh nhân. Do đó xử lý giảm thể tích, loại bỏ hồng cầu, thu hồi TBCN là bước không thể thiếu trước khi đưa vào bảo quản. Đã có nhiều nghiên cứu về lợi ích cũng như bất lợi của quy trình này và các tác giả đều thừa nhận lợi ích của nó. Giảm thể tích và loại bỏ hồng cầu của sản phẩm cho phép lưu trữ hiệu quả về mặt không gian, quan trọng là giảm nguy cơ không tương thích hệ nhóm máu ABO và

giảm độc tính DMSO cho người nhận. Mặc dù mất một số tế bào nhưng giảm thể tích có nhiều lợi ích trên thực tế lâm sàng [107], [108], [109].

Tại các trung tâm trên thế giới cũng như Việt Nam các túi MDR sau khi thu thập đều được xử lý trong một hệ thống khép kín. Nhiều phương pháp xử lý có thể được áp dụng bao gồm phương pháp tự động và phương pháp thủ công. Xử lý trên các máy tự động như bằng máy COBE 2991, COBE Spectra, Fenwal CS3000, PrepaCyte-CB, Sepax... hay sử dụng phin lọc “Procord” Terumo, phin lọc CelleEffic CB cùng với HES hoặc Dextran... Xử lý bằng phương pháp thủ công là các túi MDR được xử lý trong phòng vô khuẩn bởi các kỹ thuật viên đã được đào tạo. Hai phương pháp xử lý này đều có ưu và nhược điểm khác nhau, với xử lý bằng máy tự động chi phí cao, khó có thể phù hợp với người Việt Nam nên chúng tôi đã xử lý thủ công. Ngân hàng TBG MDR của Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương đã được chuyển giao công nghệ xử lý bằng phương pháp thủ công của Nhật Bản, các mẫu MDR cộng đồng được thực hiện xử lý bằng kỹ thuật để lắng với dung dịch HES, ly tâm 1 lần. Với mỗi túi MDR đạt tiêu chuẩn xử lý, thêm 40% HES 6% (so với thể tích ban đầu) lắc đều trong 15 phút và để lắng 50 phút. Theo tỷ trọng các tế bào sẽ phân lớp. Ép chuyển huyết tương và lớp buffy coat sang túi mới. Ly tâm túi chứa lớp buffy coat thu được khối TBG.

Thể tích thu được sau xử lý là thể tích nhỏ nhất nhưng đảm bảo lượng TBCN, TB CD34 thu hồi cao nhất, có khả năng đảm bảo cho tế bào sống tốt nhất, rã đông và truyền cho bệnh nhân phải nhanh nhất để lượng TBG thực hiện được chức năng vào cơ thể người nhận nhiều nhất, hạn chế những tác dụng phụ cho người nhận. Kết quả bảng 3.14, sau xử lý thu được những đơn vị TBG MDR có thể tích trung bình $26,7 \pm 0,5$ ml, trong đó thể tích lớn nhất là 27,1 ml. Nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đương với các nghiên cứu trong và ngoài nước như của được xử lý bằng phương pháp tự động như bằng

phương pháp phin lọc của L. Dal cortivo năm 2000 (20 ml) hay bằng hệ thống tự động theo nghiên cứu của Juergen Zingsem năm 2013 thì thể tích cuối là $26,3 \pm 11,6$ ml [70],[110].

Hiệu quả cốt lõi của quá trình xử lý là tỷ lệ TBG thu được trong đơn vị TBG MDR trước khi đưa vào bảo quản. Điều này được thể hiện thông qua chỉ số hiệu suất thu hồi TBCN. Hiệu suất này tính bằng giá trị TBCN sau xử lý so với trước xử lý. Nếu hiệu suất thu hồi càng lớn thì lượng TBCN thu được càng cao, giá trị sử dụng của đơn vị TBG MDR đó càng lớn. Kết quả của chúng tôi, hiệu suất thu hồi TBCN trung bình $84,9 \pm 5,6\%$. Kết quả này đáp ứng tiêu chuẩn của AABB hiệu suất xử lý tối thiểu cần đạt là 70% [111] và cao hơn các nghiên cứu khác.

Bảng 4.4. So sánh hiệu suất xử lý trong nghiên cứu với một số nghiên cứu khác

Tác giả	Phương pháp	Hiệu suất
Juergen Zingsem (2003) [70]	Hệ thống Sepax	$78,6 \pm 24,9$
	Ly tâm với HES	$73,1 \pm 13,2$
V. Lapierre (2007) [74]	Hệ thống Sepax	$80,3 \pm 7,7$
	HES, ly tâm 2 lần	$76,8 \pm 9,1$
	Bán tự động Optipress II	$60,7 \pm 13,5$
N. Sato (2015) [75]	Phin lọc Cellefflic CB sử dụng HES	$76,1 \pm 8,7$
	Phin lọc Cellefflic CB sử dụng SALINE	$73,4 \pm 5,9$
	Hệ thống Sepax	$76,6 \pm 16,1$
Nghiên cứu của chúng tôi (2019)	Lắng với HES, ly tâm 1 lần	$84,4 \pm 5,8$

Có sự khác biệt này là do phương pháp tự động được phát triển để xử lý MDR là hệ thống khép kín được kiểm soát bằng phần mềm máy tính và hạn chế sự can thiệp của con người. Phương pháp tự động về cơ bản có một túi xử lý trong đó MDR được truyền và một thiết bị tự động tách các thành phần khác nhau bằng quy trình ly tâm. Chủ yếu là hai phương pháp bao gồm Sepax và AXP được sử dụng để xử lý MDR tự động. Phương pháp sử dụng các cảm biến quang học để hướng các thành phần máu đến các túi máu riêng lẻ được chiết xuất từ đơn vị MDR. Phương pháp Sepax sử dụng HES để tách các thành phần, trong khi phương thức AXP không sử dụng HES để giảm thể tích MDR. Phương pháp tự động có lợi thế về khả năng tái sản xuất, tuy nhiên liên quan đến chi phí cao hạn chế ứng dụng của nó. Ngoài ra, lớp buffy coat và lớp RBC bị chồng chéo lên nhau, thể tích MDR không đồng đều làm cho hiệu suất thu hồi sẽ khác nhau. Trong nghiên cứu chúng tôi xử lý bằng phương pháp thủ công linh động và cụ thể trong việc thu hồi lớp buffy coat của từng mẫu MDR do đó hiệu suất thu hồi TBCN của chúng tôi cao hơn các nghiên cứu. Như vậy xử lý bằng phương pháp thủ công có sử dụng dung dịch HES để lắng giúp thu hồi được TBG với hiệu suất cao.

TBG MDR được chứa trong quần thể tế bào đơn nhân có KN CD34, thường chiếm ít hơn 1% tổng số bạch cầu trong MDR [112]. Kháng nguyên CD34 là marker được chấp nhận để xác định TBG trong tủy xương, máu ngoại vi và MDR [113]. Mặc dù không có hướng dẫn được chấp nhận phổ biến, hầu hết các ngân hàng đều sử dụng kết hợp trọng lượng sản phẩm (thể tích) và tổng số TBCN được tính là các yếu tố lựa chọn chính cho bảo quản lạnh [114],[115],[116]. Số lượng TB CD34 đã được chứng minh là có ảnh hưởng đến sống sót sau khi ghép TBG MDR đồng loài, dự đoán tốt hơn tiềm năng tạo máu của đơn vị TBG MDR so với hàm lượng TBCN [117]. Tuy nhiên, do thiếu tiêu chuẩn hóa các phương pháp đếm TB CD34, hiện tại

không thể so sánh số lượng TB CD34 giữa các ngân hàng MDR hoặc trung tâm cấy ghép. Do đó, José C. Jaime-Pérez và cộng sự đã nghiên cứu mối liên quan giữa TBCN và TB CD34 dựa trên phân tích đường cong ROC và đưa ra kết luận: Tất cả các đơn vị MDR có số lượng TBCN từ 8×10^8 trở lên đều có liều TB CD34 cần thiết cho bệnh nhân nặng từ trên 10 kg [102].

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy sau khi xử lý giảm thể tích, loại bỏ hồng cầu, tổng số TBCN trong đơn vị lưu trữ là $131,2 \pm 40 \times 10^7$ tế bào (Bảng 3.14). Kết quả này của chúng tôi so với các kết quả trong và ngoài nước có sự khác nhau. Sở dĩ có sự khác nhau này là do việc lựa chọn đầu vào của mỗi nghiên cứu khác nhau, phương pháp xử lý khác nhau, lượng TBCN thu hồi được khác nhau. Trước đây theo một số tác giả cho rằng TBCN tối thiểu là $1,5 \times 10^7$ tế bào/kg trọng lượng người nhận hoặc $1,7 \times 10^5$ CD34 tế bào/kg trọng lượng người nhận theo Grewal SS [118]. Năm 2010, Hiệp hội hiến tủy thể giới (World Marrow Donor Association) lấy liều tối thiểu là 2×10^7 /kg hoặc 2×10^5 CD34 tế bào/kg Welte K [119]. Tuy nhiên sau đó có nhiều tác giả còn đề xuất việc không cố định liều ghép mà thay đổi theo mức độ hòa hợp HLA như Wall DA [120]. Cuối cùng thống nhất đề xuất mức tối thiểu là TBCN 2×10^7 /kg, David Allan [121].

Theo như J.C.Jaime-Pérez thì số lượng TBCN có mối tương quan có ý nghĩa nhất với số lượng các TB CD34 ($r = 0,681$; $p < 0,01$). Số lượng TBCN càng cao thì TB CD34 thu được càng cao [102]. Đếm số lượng chính xác các TB CD34 là cần thiết cho việc tính liều TBG phù hợp cho quy trình ghép. Trong nghiên cứu, đếm TB CD34 bằng phương pháp tế bào dòng chảy, đây là phương pháp có độ chính xác cao được khuyến cáo bởi Hiệp hội kỹ thuật quốc tế về huyết học và ghép ISHAGE [112]. Kết quả trong mỗi đơn vị TBG MDR có chứa $48,1 \pm 35,5 \times 10^5$ TB CD34 chiếm tỷ lệ $0,38 \pm 0,21\%$ so với

TB CD45. Tỷ lệ TB CD34 sống sau xử lý là $94,5 \pm 3,4\%$ (Bảng 3.14). Nghiên cứu của chúng tôi đạt tiêu chuẩn đề ra của NetCord [77].

Theo bảng 3.15, thể tích đơn vị TBG MDR thu được đã giảm $83,3 \pm 1,9\%$ thể tích MDR ban đầu, loại được 94,0% hồng cầu, 51,9% tiểu cầu. Kết quả giảm thể tích của chúng tôi cao hơn của Huỳnh Nghĩa 2004, nghiên cứu của tác giả giảm được 69,7% thể tích, 55,4% hồng cầu [122]. Có sự khác nhau này là do quy trình xử lý MDR trong nghiên cứu này khác với nghiên cứu của tác giả. Điều này cho thấy quy trình xử lý trong nghiên cứu là khá tốt.

Các KN thuộc hệ nhóm máu trên bề mặt hồng cầu cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến quá trình ghép cho bệnh nhân. Các nghiên cứu chỉ ra mức 20 – 30ml tổng thể tích hồng cầu đưa vào cơ thể người nhận hay 0,2 – 0,3 ml/kg cân nặng cơ thể người nhận thì cơ thể người nhận có thể dung nạp được và không gây tai biến gì nguy hiểm. Lượng hồng cầu tối đa có thể chấp nhận được với người có chức năng thận bình thường là 0,5ml/kg cân nặng người nhận. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã xử lý và loại được 94,0% hồng cầu, như vậy đã giảm được lượng lớn hồng cầu sản phẩm TBG MDR thu được. Nghiên cứu của chúng tôi cao hơn nghiên cứu của Huỳnh Nghĩa năm 2004 và Trần Thị Mỹ Dung 2007 [122],[123]. Mục đích của xử lý là thu hồi được số lượng TBCN tối đa để tạo những đơn vị TBG MDR có số lượng TBCN lớn, đủ để ghép cho người lớn. Sau xử lý các TBCN cụ thể là SLBC chỉ mất có $15,3 \pm 5,6\%$, SLTC loại được $51,9 \pm 9,9\%$ so với ban đầu (Bảng 3.15).

Trong quá trình xử lý thu hồi TBG và loại bỏ các tế bào máu như hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu. Tuy nhiên không thể loại được toàn bộ các tế bào này vì chúng vẫn có khả năng nằm xen kẽ lẫn nhau dù tỷ trọng có khác nhau. Trong nghiên cứu của chúng tôi, sau xử lý, trong một đơn vị TBG có SLBC $59,0 \pm 18,0$ G/l trong đó có $33,9 \pm 13,9$ G/l BC trung tính; $37,4 \pm 8,7$ G/l BC

lympho; $5,9 \pm 4,0$ G/l BC mono. Trong đơn vị TBG MDR còn trung bình $1,2 \pm 0,6$ T/l hồng cầu và $662,1 \pm 147,6$ G/l tiểu cầu (Bảng 3.16). Tổng số tế bào đơn nhân khác với tổng số TBCN. Bằng cách loại trừ các tế bào như bạch cầu trung tính trong TBCN ta được TB đơn nhân. Một số nhóm bao gồm số lượng tế bào đơn nhân là một phần trong đặc tính của MDR mặc dù chỉ có một số ít các ngân hàng cung cấp thông tin này trong các tìm kiếm TBG MDR. Các tế bào đơn nhân có thể tương quan với số lượng TB CD34 [124], tuy nhiên các nghiên cứu liên quan đến kết quả sau ghép còn rất ít. Các ngân hàng quyết định mức tế bào đơn nhân như nào là phù hợp nhất phụ thuộc vào phương pháp xử lý giảm thể tích và loại bỏ tế bào của từng ngân hàng cụ thể.

Bên cạnh hệ thống KN bạch cầu người HLA thì hệ thống nhóm máu, cơ bản là hệ ABO cũng là rào cản đối với ghép đồng loài. Theo một số tác giả như Rowley SD hay Kimura F thì trên thực tế các ca ghép TBG không tương thích hệ ABO chiếm từ 25 – 50% tổng số ca ghép [125],[126]. Mặc dù không ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả ghép như HLA nhưng bất đồng nhóm máu có khả năng gây ra các biến chứng như tan máu, chậm mọc hồng cầu thậm chí bất sản đơn dòng hồng cầu. Do đó, định danh nhóm máu và chọn nhóm máu phù hợp là cần thiết cho cuộc ghép. Nếu bất đồng nhóm máu thì cũng có biện pháp hỗ trợ để kết quả ghép tốt nhất. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ nhóm máu O chiếm cao nhất 45,7%, nhóm máu A và B lần lượt là 21,9%, 27,6%. Thấp nhất là nhóm máu AB chiếm 4,8% (Bảng 3.17).

Những đơn vị TBG MDR được đưa vào lưu trữ phục vụ ghép có tỷ lệ huyết sắc tố A1 là $18,5 \pm 5,3\%$, tỷ lệ huyết sắc tố F trung bình $81,5 \pm 5,3\%$. Với tỷ lệ thành phần huyết sắc tố như trên là hoàn toàn bình thường vì đây là huyết sắc tố bào thai (Bảng 3.18). HbF có vai trò chính trong vận chuyển oxy. Thành phần này sẽ giảm sau khi trẻ ra đời và được thay thế bằng HbA1 và HbA2. Người trưởng thành, sự có mặt của HbF sẽ là chỉ điểm của bệnh lý

huyết sắc tố mà điển hình là β thalassemia. Với MDR loại huyết sắc tố này chiếm tỷ lệ chính do đó nó không có vai trò trong sàng lọc bệnh lý huyết sắc tố. Kết quả này tương tự kết quả của Phạm Quang Vinh (2010) [127].

Trong nghiên cứu có 2 thời điểm phải bảo quản là thời điểm bảo quản MDR trước xử lý và thời điểm sau khi xử lý tạo thành đơn vị TBG. Thời gian bảo quản trước xử lý là thời gian từ khi thu thập đến khi mẫu MDR được đưa vào phòng vô khuẩn để xử lý. Trong thời gian này bảo quản mẫu MDR thế nào cho hợp lý cũng là một vấn đề đặt ra. Có 2 yếu tố liên quan trực tiếp đến việc bảo toàn tế bào trước xử lý đó là thời gian và nhiệt độ bảo quản. Theo NetCord, mẫu MDR cần phải xử lý trong vòng 24 giờ để đảm bảo chất lượng tốt nhất [77]. Nghiên cứu trong và ngoài nước về nhiệt độ bảo quản trước xử lý thì cho thấy bảo quản ở nhiệt độ ổn định từ 20-24⁰C là tốt nhất cho tế bào và cho cả quá trình vận chuyển. Nghiên cứu của Trần Ngọc Quế và cộng sự cho thấy nếu các mẫu MDR lưu trữ ở nhiệt độ 20-24⁰C và xử lý trước 24 giờ thì hiệu suất thu hồi TBCN là $83,6 \pm 55\%$ cao hơn ở nhiệt độ 2-8⁰C ($82,9 \pm 4,8\%$). Trong nghiên cứu chúng tôi đã bảo quản đơn vị MDR trước xử lý ở 20-24⁰C và xử lý trong vòng 24 giờ tính từ thời điểm thu thập mẫu MDR.

Sau xử lý TBG MDR được bảo quản ở nhiệt độ đông lạnh. Bảo quản lạnh là việc sử dụng nhiệt độ cực thấp được duy trì để bảo toàn cấu trúc của các tế bào sống nguyên vẹn, cùng với việc tạo ra một môi trường ổn định, qua đó các tế bào có thể được bảo quản và lưu trữ để sử dụng trong tương lai. Phương pháp này được coi là dễ dàng và đáng tin cậy nhất [128].

Bảo quản lạnh làm cho tế bào chết do 2 quá trình: một là hình thành tinh thể chọc thủng màng tế bào, hai là tăng áp lực thẩm thấu bên ngoài màng tế bào do quá trình hình thành tinh thể. Hai điều này làm tế bào bị tổn thương. Để giải quyết vấn đề này người ta phải sử dụng chất bảo quản lạnh. Chất bảo quản lạnh chia theo khả năng xâm nhập vào tế bào có 2 loại là loại xâm nhập

vào tế bào như DMSO (dimethyl sulphoxid 1959) và glycerol (1949) là chất có trọng lượng phân tử nhỏ, có thể đi qua màng tế bào vào bào tương. Chất này cung cấp áp lực thẩm thấu bên trong tế bào không cho nước từ bên ngoài xâm nhập vào tế bào. Chất bảo vệ tế bào ở nồng độ cao có thể ngăn ngừa được sự hình thành tinh thể đá.

Loại không thâm nhập vào trong tế bào như HES, là chất có trọng lượng phân tử lớn, bảo vệ tế bào bằng cách tạo ra xung quanh tế bào thể kết tinh gọi là thủy tinh hóa, phòng chống mất nước bên ngoài tế bào. Bảo quản lạnh là giải pháp rất đặc biệt phải nhờ đến các chất được thêm vào sản phẩm ngay trước khi bảo quản (gọi là chất bảo vệ lạnh). Hiện DMSO đang là chất chuyên dụng cho bảo quản lạnh và được sử dụng rất phổ biến. Hoạt động bảo quản lạnh của DMSO là kết quả của các tương tác phân tử. Nước và DMSO tương tác mạnh mẽ và những tương tác này hoạt động xuyên suốt quá trình đóng băng [129]. Tuy nhiên DMSO lại độc cho người sử dụng. Các triệu chứng xuất hiện trên người sử dụng có thể từ các biểu hiện nhẹ như buồn nôn, nôn... đến đe dọa tính mạng như ngừng tim, co giật... [130],[131],[132]. Cách đơn giản nhất để giảm độc tính của DMSO là sử dụng với nồng độ thấp hơn. Trên thế giới có rất nhiều cách phối hợp các chất bảo quản lạnh như 2,0% DMSO và 10% ethylene glycol; 10% DMSO và 2,0% dextran-40; 2,5% DMSO và 30 mmol/l trehalose... Trong nghiên cứu, chúng tôi sử dụng DMSO trộn với dextran 40 với tỷ lệ thể tích 1:1 làm dung dịch bảo quản cho TBG. Tiến hành rã đông ngẫu nhiên 94 đơn vị TBG MDR đang lưu trữ tại ngân hàng. Quy trình rã đông được thực hiện trong bình cách thủy 37⁰C trong khoảng 3 - 5 phút. Sau rã đông, xét nghiệm thành phần tế bào và đếm TB CD34 trong đơn vị TBG. Kết quả SLHC thay đổi trước ($1,0 \pm 0,8T/l$) và sau rã đông ($0,8 \pm 0,3T/l$) có ý nghĩa thống kê, tuy nhiên lượng hematocrit không thay đổi (Bảng 3.19). Hồng cầu còn lại trong sản phẩm TBG là một bất lợi,

chúng có thể gây bất đồng nhóm máu trong quá trình ghép hoặc có thể trải qua giai đoạn ly giải trong quá trình rã đông giải phóng các chất có thể ảnh hưởng đến chức năng thận của người nhận. Do đó trong quá trình xử lý chúng tôi loại bỏ hồng cầu trước khi bảo quản đông lạnh. Tuy nhiên, khi loại bỏ hồng cầu có thể gây mất đi một lượng TBG do đó không loại bỏ hoàn toàn hồng cầu, khi ép lớp buffy coat lấy thêm một lượng hồng cầu nhất định để thu hồi được tối đa TBCN trong mẫu MDR. SLBC được cô đặc lại trong mỗi sản phẩm và trung bình là $57,1 \pm 18,2$ G/l trong đó SLBC trung tính $38,8 \pm 16,3$ G/l, SLTB đơn nhân $16,1 \pm 9,6$ G/l, SLTC $610,4 \pm 123,4$ G/l. Sau rã đông, trừ SLBC đơn nhân còn các BC khác đều giảm có ý nghĩa thống kê (Bảng 3.19). Kết quả này cho thấy quy trình bảo quản và quy trình rã đông được tối ưu hóa, đảm bảo cho việc bảo quản cả số lượng và chất lượng của tế bào. Sau rã đông SLBC giảm chủ yếu là do giảm SLBC trung tính.

Ngoài mức độ phù hợp với HLA, tổng số TBCN và số lượng TB CD34 là những yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến kết quả ghép. Trong mỗi đơn vị TBG chứa trung bình $136,7 \times 10^7$ TBCN và $56,2 \times 10^5$ TB CD34. Kết quả này cao hơn nghiên cứu của N M-Reboredo và cộng sự năm 2000 [24]. Sở dĩ có sự khác nhau này là do chúng tôi lựa chọn sản phụ, thai nhi, MDR đủ các tiêu chuẩn đề ra, chủ đích để thu được những mẫu MDR có số lượng TBCN cao mới xử lý. Sau khi rã đông, số lượng TBCN, số lượng TB CD34 giảm so với trước rã đông có ý nghĩa thống kê. Điều này khó tránh khỏi vì hoạt động rã đông làm tổn hại đến tế bào. Tuy nhiên tỷ lệ % TB CD34 sau rã đông ($0,48 \pm 0,35\%$) tăng so với trước rã đông ($0,43 \pm 0,25\%$) có ý nghĩa thống kê (Bảng 3.20). Điều này cho thấy số lượng TB CD34 giảm ít hơn các loại tế bào khác. Tuy tỷ lệ sống của TB CD34 giảm so với trước rã đông nhưng vẫn cao hơn ngưỡng cho phép của AABB [133].

Mặc dù liều các tế bào đã được xác định rõ ràng cho việc lựa chọn đơn vị TBG MDR. Tuy nhiên, chậm mọc ghép và thất bại ghép vẫn còn là mối quan tâm lớn nhất trong cuộc ghép. Nuôi cấy tạo cụm cho biết khả năng hoạt động của TBG sau bảo quản cả về chất lượng (khả năng sinh sản và biệt hóa) và số lượng. Đây là bằng chứng cho tiềm năng của TBG khi ở trong cơ thể người nhận. Nguyên lý của xét nghiệm này dựa trên khả năng tăng sinh và biệt hóa của tế bào đầu dòng tạo máu, hình thành các cụm (CFU) trên môi trường bán rắn với sự có mặt của các chất kích thích cytokine. Nghiên cứu đã nuôi cấy tạo cụm tế bào trong môi trường MethoCult H4434 theo quy trình Stemcell Technologies với nồng độ tế bào là 4×10^4 trong điều kiện 5% CO_2 và 37°C . Sau 14 ngày đánh giá kết quả. Kết quả cho thấy tất cả các đơn vị TBG MDR đều có kết quả mọc cụm và các cụm tương đối phong phú đặc biệt là cụm hỗn hợp, cụm này có khả năng biệt hóa thành các dòng khác nhau. Trong nghiên cứu này, số lượng cụm trung bình/1 đĩa nuôi cấy là 48,2 cụm/đĩa. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với khuyến cáo được nhắc đến trong nghiên cứu của Bert Wognum với 30 - 80 cụm/đĩa được xem là kết quả tối ưu đối với các điều kiện nuôi cấy tế bào [134]. Số cụm trung bình trong 1 đơn vị TBG là $200,3 \times 10^4$ (Bảng 3.21). Theo Kristin M. Page, liều CFU sau rã đông trung bình $> 1,3 \times 10^4/\text{kg}$ cân nặng có liên quan với mọc mảnh ghép tốt và liều $\text{CFU} \geq 3,3 \times 10^4/\text{kg}$ cân nặng bệnh nhân là hiệu quả nhất [135]. Như vậy tính theo liều cấy cụm có thể ghép cho người từ 60,7 – 154,1 kg. Số lượng các loại cụm trong đĩa nuôi cấy, chiếm ưu thế là cụm BFU-E và ít nhất là CFU-E. Kết quả của nghiên cứu này tương tự như các nghiên cứu của tác giả Nguyễn Bá Khanh năm 2015 [136] và Hye Ryun Lee năm 2014 [137]. Đây cũng là điểm đặc trưng cho nuôi cấy cụm từ TBG tạo máu từ nguồn MDR. Với ưu điểm về mức độ non trẻ của các TBG MDR đã mang đến tiềm năng tăng trưởng mạnh mẽ cho các tế bào vượt trội hơn so với các nguồn TBG trưởng

thành từ máu ngoại vi hay dịch tủy xương khi nuôi cấy trong cùng loại môi trường. Bên cạnh đó, sự có mặt của cụm hỗn hợp cụm CFU-GEMM ($4,86 \pm 4,84 \times 10^4$), CFU-GM ($93,5 \pm 46,1 \times 10^4$) đã khẳng định tiềm năng tăng sinh của nguồn TBG này.

4.3. Một số yếu tố liên quan đến chất lượng và khả năng sử dụng đơn vị TBG MDR cộng đồng

4.3.1. Một số yếu tố liên quan đến chất lượng đơn vị TBG MDR cộng đồng

4.3.1.1. Một số yếu tố liên quan trong quá trình thu thập MDR cộng đồng

Máu dây rốn đã được coi như là một nguồn TBG tạo máu thay thế cần thiết để điều trị một số bệnh (Rubinstein P) [138]. Mặc dù TBG MDR có lợi thế hơn so với tủy xương, như tỷ lệ mắc GVHD thấp hơn, có sẵn sử dụng ngay khi cần, nguy cơ mắc các bệnh truyền nhiễm thấp, khả năng phục hồi và sống sót miễn dịch lâu dài tốt hơn (Gluckman E) [139]. Nhược điểm chính của việc sử dụng TBG MDR trong ghép là số lượng TBCN và TB CD34 thấp do thể tích túi MDR thu được ít (Yamada T) [140]. Bởi vậy, việc xác định người hiến có đủ tiêu chuẩn để thu được thể tích MDR cao đóng một vai trò rất lớn đối với các ngân hàng lưu trữ cộng đồng, đặc biệt đối với các nước đang phát triển như Việt Nam. Tiến bộ trong việc tăng cường số lượng tế bào bằng cách sử dụng các quy trình khác nhau dường như là một sự đổi mới tốt trong lĩnh vực này và dự kiến sẽ mở rộng chỉ định của bệnh nhân ghép (Beksac M) [141].

Với tiêu chuẩn chặt chẽ được đề ra để lựa chọn sản phụ và thai nhi, chúng tôi đã làm cho giảm số mẫu MDR loại bỏ sau khi thu thập, từ đó giảm chi phí cho ngân hàng. Tuy nhiên để thu được mẫu MDR có đủ về chất lượng tức đảm bảo đủ số lượng TBCN để phục vụ cho ghép thì phải phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố, những yếu tố này có thể tác động riêng lẻ hoặc tác động phối hợp với nhau. Theo nghiên cứu của Tulika Chandra trên 500 mẫu MDR đã

đưa ra kết luận: khối lượng MDR thu thập rất quan trọng đối với việc tiên lượng số lượng lớn TBCN và TB CD34 [71]. Chúng tôi tìm các mối liên quan giữa các yếu tố của sản phụ và thai nhi đến thể tích MDR. Trong nghiên cứu với mục tiêu muốn đưa ra khuyến nghị để thu được mẫu MDR đảm bảo, hạn chế việc hủy mẫu MDR sau khi đã thu gom để giảm chi phí cho ngân hàng MDR cộng đồng, chúng tôi đã phân tích sự ảnh hưởng các yếu tố của sản phụ, thai nhi đến thể tích MDR cũng như số lượng TBCN, TB CD34 trong mỗi đơn vị TBG MDR.

Biểu đồ 3.2 cho thấy tuổi của sản phụ và thể tích MDR thu được không có mối liên quan với $r = 0,095$. Tuy nhiên dựa vào tuổi của sản phụ có thể ước lượng được thể tích MDR thu được thông qua phương trình: Thể tích MDR = tuổi sản phụ * 0,519 + 89,54 ($r = 0,095$, $p < 0,01$). Phương trình này chỉ phù hợp với sản phụ trong khoảng từ 18 đến 35 tuổi. Trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Mai [142], tác giả thấy nhóm sản phụ trên 35 tuổi có thể tích MDR thu được cao hơn so với nhóm dưới 35 tuổi có ý nghĩa thống kê. Điều này khác với nghiên cứu của chúng tôi, trong nghiên cứu không chọn sản phụ trên 35 tuổi vì tuổi sản phụ càng cao thì khả năng thai nhi cũng như các yếu tố cuộc đẻ có bất thường càng lớn, quá trình thu thập cũng sẽ không thuận lợi và hơn nữa TBG MDR cũng có thể có nhiều nguy cơ hơn.

Bảng 3.22 cho thấy thể tích MDR thu được không có sự khác biệt ở sản phụ sinh thường và sinh mổ cũng như không liên quan đến nhóm máu của sản phụ. Nghiên cứu của Sparrow RL và cộng sự năm 2002 ($n=218$), Nguyễn Thị Thanh Mai 2014 ($n=109$) đều cho thấy thể tích MDR ở sản phụ sinh mổ cao hơn sinh thường có ý nghĩa thống kê [93],[142]. Có lẽ do sự khác nhau về cỡ mẫu nghiên cứu dẫn đến sự khác biệt trên. Kết quả nghiên cứu tương tự như của tác giả Solves P năm 2003 ($n=596$). Tác giả kết luận sinh thường và sinh mổ thu được thể tích MDR là tương đương [94].

Thể tích MDR khác nhau ở các lần sinh có ý nghĩa thống kê, cao nhất ở sản phụ sinh con thứ 3 (Bảng 3.22).

Kết quả biểu đồ 3.3, trọng lượng thai nhi có mối liên quan thuận không chặt chẽ với thể tích MDR. Trọng lượng thai càng lớn thì thể tích MDR thu được càng nhiều. Nghiên cứu đã tìm ra được phương trình để ước tính thể tích mẫu MDR thông qua trọng lượng thai nhi: Thể tích MDR = $0,015 * \text{trọng lượng thai} + 55,743$ ($r = 0,242$ $p < 0,01$). Với phương trình này, trước khi sinh, dựa vào trọng lượng thai có thể tính toán được lượng MDR thu được. Trọng lượng thai nhi càng cao thì thể tích MDR thu được càng nhiều. Kết quả này của chúng tôi tương tự kết quả của nhiều tác giả Kristin M. Page , Nguyễn Thị Thanh Mai [100],[142].

Kết quả bảng 3.23 cho thấy giới tính trẻ là trai thu được thể tích MDR cao hơn trẻ gái có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Nghiên cứu của chúng tôi khác với Nguyễn Thị Thanh Mai [142], tác giả không thấy sự khác nhau giữa bé trai và bé gái. Kết quả nghiên cứu chưa tìm thấy mối liên quan giữa nhóm máu thai nhi và tuổi thai với thể tích MDR.

Nghiên cứu của Dunia Jawdat nghiên cứu trên 957 đơn vị TBG MDR đã chỉ thể tích MDR là yếu tố tiên lượng tốt nhất, điều kiện tiên quyết đảm bảo số lượng TBG MDR ($p < 0,001$). Tuy nhiên thể tích MDR là chỉ số gián tiếp tiên lượng và sàng lọc TBG MDR. Để thu đơn vị TBG có chất lượng có nhiều nghiên cứu tìm hiểu về yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến số lượng TBCN. Dunia Jawdat và cộng sự nghiên cứu và đưa ra kết luận ngoài thể tích MDR là yếu tố tiên đoán ($p = 0,0001$) thì trọng lượng sơ sinh ($p = 0,025$) và hình thức sinh ($p = 0,002$) có mối liên quan với số lượng TBCN [72].

Có mối liên quan giữa các lần sinh, hình thức sinh với số lượng TBCN. Sản phụ sinh con lần 1 thì số lượng TBCN cao hơn sinh con các lần sau có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Sản phụ sinh thường có số lượng TBCN cao hơn sinh mổ có ý nghĩa thống kê (Bảng 3.24). Nghiên cứu này của chúng tôi cũng

được thể hiện trong bài báo trong hội nghị Tế bào gốc năm 2017 (Đánh giá kết quả thu thập, xử lý, lưu trữ và sử dụng tế bào gốc máu dây rốn tại Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương từ 2012-2016. t229-238. Tạp chí Y học Việt Nam tập 453).

Cân nặng trẻ càng cao thì số lượng TBCN càng nhiều (Bảng 3.25). Kết quả này cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của rất nhiều tác giả như Nguyễn Thị Thanh Mai nghiên cứu năm 2015 [142], Wen SH và cộng sự nghiên cứu năm 2012 [143], tác giả Sara Y. Al-Deghaither và cộng sự nghiên cứu năm 2015 [144]. Nhóm máu của trẻ có mối liên quan đến số lượng TBCN. Trong nghiên cứu, số lượng TBCN cao nhất ở trẻ có nhóm máu B ($171,5 \pm 67,8$) và giảm dần ở những nhóm máu khác lần lượt là AB ($157,6 \pm 46,0$), O ($156,2 \pm 46,0$) và thấp nhất ở trẻ có nhóm máu A ($152,4 \pm 48,4$). Sự khác nhau này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Tuy nhiên, chưa tìm thấy sự khác biệt giữa các tuổi thai và số lượng TBCN (Bảng 3.25).

Kết quả bảng 3.26, bảng 3.27 cho thấy số lượng TB CD34 ở sản phụ sinh thường cao hơn sinh mổ, ở trẻ gái cao hơn trẻ trai có ý nghĩa thống kê. Hiện chưa tìm thấy mối liên quan giữa tuổi, nhóm máu, các lần sinh của sản phụ, cân nặng, nhóm máu trẻ, tuổi thai với số lượng TB CD34.

4.3.2.2. Một số yếu tố liên quan trong quá trình xử lý MDR cộng đồng

Thể tích MDR là yếu tố gián tiếp để thể hiện tổng số TBCN trong túi MDR. Theo Dunia Jawdat nghiên cứu trên 957 đơn vị TBG MDR đã chỉ thể tích MDR là yếu tố tiên lượng tốt nhất cho số lượng TBCN với $p < 0,001$ [72]. Do đó thể tích MDR càng cao thì tỷ lệ TBCN trong đơn vị MDR đó càng nhiều. Nghiên cứu của chúng tôi cho kết quả tương tự, số lượng TBCN có mối liên quan thuận ở mức độ trung bình với thể tích túi MDR. Kết quả biểu đồ 3.4 cho phương trình: Tổng số TBCN ($\times 10^7$) = thể tích túi máu * 1,214 + 30,1 ($r=0,473$, $p < 0,01$). Như vậy số thông qua thể tích MDR thu được có thể tính

được số lượng TBCN. Thông qua thể tích MDR cũng có thể tính được số lượng TB CD34 qua phương trình số lượng TB CD34 = thể tích MDR * 0,329 + 137,450 ($r = 0,12$, $p < 0,01$) (Biểu đồ 3.5).

Hiệu suất xử lý chính là hiệu suất thu hồi TBCN. Đây là một chỉ số quan trọng dùng để đánh giá hiệu quả của quy trình xử lý. Hiệu suất xử lý càng cao đồng nghĩa TBCN mất càng ít, điều này chứng tỏ quy trình xử lý càng tối ưu. Tuy nhiên, hiệu suất xử lý ngoài ảnh hưởng bởi kỹ thuật còn bị ảnh hưởng bởi yếu tố nào nữa không? Nghiên cứu tìm hiểu mối liên quan giữa thể tích MDR, số lượng TBCN trước xử lý, thời gian lưu trước xử lý, thời gian xử lý thì thấy các yếu tố này không ảnh hưởng đến hiệu suất xử lý (Biểu đồ 3.6, 3.7, 3.9, 3.10). Tuy nhiên nghiên cứu có thấy mối tương quan lỏng lẻo giữa hematocrit và hiệu suất xử lý có ý nghĩa thống kê (Biểu đồ 3.8). Trong xử lý để tách lớp hồng cầu - buffy coat - huyết tương thì phải để lắng sau khi trộn đều với dung dịch HES 6%. Dung dịch này giúp tế bào tăng lắng làm giảm thời gian phân lớp và cải thiện phân lớp tế bào. Kết quả trên có thể do lượng hematocrit ảnh hưởng đến sự phân lớp tế bào do đó hiệu suất xử lý bị ảnh hưởng.

Khả năng sống của tế bào là một chỉ số quan trọng cho chất lượng của các đơn vị TBG MDR, nó có thể ảnh hưởng đến kết quả của ca ghép trên lâm sàng. Do đó, điều đặc biệt quan trọng là xác định các yếu tố có thể ảnh hưởng đến chất lượng tế bào trong quá trình bảo quản tại ngân hàng. Nghiên cứu tìm hiểu mối liên quan của các yếu tố ngoại sinh (thời gian chờ xử lý: từ khi thu thập đến khi xử lý, thời gian xử lý) và các yếu tố nội sinh (tổng số TBCN) ảnh hưởng đến khả năng sống của tế bào. Thời gian lưu trước xử lý, thời gian xử lý, số lượng TBCN sau xử lý không ảnh hưởng tỷ lệ sống của TB CD34 (Biểu đồ 3.11, 3.12, 3.13). Dulugiac M và cộng sự cũng đã tìm hiểu mối liên quan nghịch giữa tỷ lệ tế bào sống với thời gian chờ xử lý ($r = -0.7228$; $p < 0,0001$)

[145], kết quả này khác với nghiên cứu của chúng tôi. Điều này được giải thích do thời gian chờ xử lý của tác giả trong vòng 48 giờ còn trong nghiên cứu của chúng tôi thời gian này thu gọn chỉ trong 24 giờ. Tiêu chí này thực hiện theo hướng dẫn của NetCord: mẫu TBG cần được xử lý trong 24 giờ để đảm bảo chất lượng tốt nhất [77]

4.3.2.3. Một số yếu tố liên quan trong quá trình bảo quản TBG MDR cộng đông

Từ năm 1990, HE Broxmeyer và cộng sự đã có những nghiên cứu và thấy rằng TBG MDR có chứa tế bào tiền thân sớm và số lượng cao hơn đáng kể so với máu ngoại vi trưởng thành. Số lượng cụm bạch cầu hạt - mono (CFU-GM), cụm hỗn hợp (CFU-GEMM) trong quá trình nuôi cấy MDR cao hơn rất nhiều so với máu ngoại vi thu được từ người trưởng thành. Tuy nhiên sau quá trình bảo quản, đơn vị TBG MDR còn khả năng tăng sinh, biệt hóa trong cơ thể người nhận hay không một phần được thể hiện qua xét nghiệm đánh giá nuôi cấy cụm tế bào. Đã có những nghiên cứu đánh giá khả năng mọc cụm tế bào sau bảo quản như Hye Ryun Lee [146]. Nghiên cứu này chúng tôi tìm hiểu một số yếu tố liên quan đến khả năng mọc cụm tế bào sau khi bảo quản. Kết quả cho thấy mối tương quan chặt chẽ có ý nghĩa thống kê giữa khả năng mọc cụm tế bào với số lượng TB CD34 và số lượng TBCN sau rã đông với r lần lượt là 0,87 và 0,60 (biểu đồ 3.14, 3.15). Như vậy cho thấy sau khi bảo quản đông lạnh, rã đông thì chất lượng mọc cụm tế bào không đổi. Chúng tôi nhận thấy nồng độ TBCN, TB CD34 trước bảo quản càng lớn thì khả năng mọc cụm càng nhiều.

Biểu đồ 3.16 cho thấy thời gian bảo quản ảnh hưởng đến số lượng cụm CFU-E. Nếu thời gian bảo quản càng tăng thì số lượng cụm này càng tăng. Hiện tại chưa tìm thấy mối liên quan giữa thời gian bảo quản với số lượng các

cụm mọc sau rã đông cũng như từng cụm CFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM (Biểu đồ 3.17, 3.18, 3.19, 3.20).

Tỷ lệ sống của tế bào sau rã đông không bị ảnh hưởng bởi thời gian bảo quản (Biểu đồ 3.21). Kết quả tương tự nghiên cứu của Hye Ryun Lee năm 2014 [146]. Như vậy quy trình bảo quản đạt hiệu quả tốt, giúp đơn vị TBG MDR có thể đảm bảo về chất lượng và bảo quản lâu dài.

4.3.2. Khả năng sử dụng đơn vị TBG MDR cộng đồng

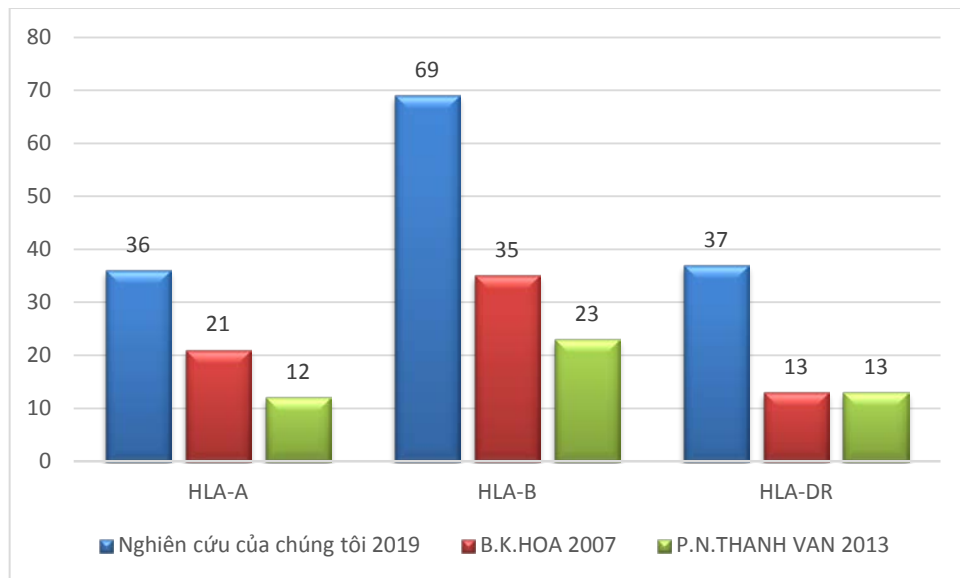
4.3.2.1. Kết quả xét nghiệm HLA

Với ngân hàng cá nhân, xét nghiệm HLA không được quan tâm nhiều vì TBG MDR thường sử dụng cho ghép tự thân. Nếu có xét nghiệm thì cũng chỉ là một hoạt động kiểm tra để khẳng định quá trình bảo quản không bị lẫn từ người này thành của người khác. Với ngân hàng TBG MDR cộng đồng thì ngược lại. Các đơn vị TBG MDR dùng để ghép đồng loài, cho bất kỳ bệnh nhân nào phù hợp do đó HLA là một xét nghiệm đặc biệt quan trọng và phải có sẵn để cho bệnh nhân có thể ghép bất kỳ thời điểm nào. Ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy sự phù hợp của HLA là một biến quan trọng cần xem xét khi lựa chọn đơn vị cho ghép TBG MDR. Trong ghép, các đơn vị MDR liều thấp, mức độ chênh lệch HLA càng trở nên quan trọng hơn Barker JN [147]. Chúng tôi tiến hành định danh HLA độ phân giải cao bằng kỹ thuật PCR SSO, sử dụng khuếch đại các gen bằng kỹ thuật PCR sau đó lai sản phẩm với các đầu dò DNA đặc hiệu của các locus HLA ở độ phân giải cao đã biết và đồng thời mỗi loại hạt còn được mã hóa riêng bằng màu laser thông qua hệ thống Luminex.

Do KN HLA là những KN đồng trội và đa hình nên có rất nhiều alen khác nhau đồng thời cùng biểu hiện kiểu hình của cả bố và mẹ tại mỗi locus. Như vậy mỗi locus sẽ có 2 kiểu hình được biểu hiện, Mỗi đơn vị TBG MDR sẽ biểu hiện ít 6 protein nên sẽ có 12 kiểu hình được biểu hiện. Trong nghiên

cứu này, chúng tôi xác định kiểu gen HLA của 1668 đơn vị MDR có tổng cộng 3336 trường hợp phân tích.

Trong nghiên cứu, tần suất xuất hiện alen HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 với độ phân giải thấp cho từng locus lần lượt là 36, 69, 36 (Bảng 3.28, 3.29, 3.30, 3.31). Nghiên cứu của chúng tôi cao hơn một số nghiên khác tại Việt Nam như tác giả Bạch Khánh Hòa [148] và Phan Nguyễn Thanh Vân [149]. Điều này cũng phù hợp vì đối tượng trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn rất nhiều so với các tác giả.



Biểu đồ 4.1. Tần suất gặp các alen HLA-A, B, DR trong nghiên cứu và tác giả trong nước

Kết quả cho thấy số alen của HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 lần lượt là 15, 27, 13. Alen HLA-A*11 chiếm tỷ lệ cao nhất 48,8%. Với độ phân giải cao, tỷ lệ các alen của HLA-A trên 5% là 11:01, 33:03, 24:02, 02:01, 02:03, 29:01 lần lượt là 24,7%, 12,3%; 11,8%; 11,6%; 8,2%; 7,3%. Alen HLA-B*15 chiếm tỷ lệ cao nhất 37,0%. Xét nghiệm với độ phân giải cao HLA-B*15:02 là alen chiếm tỷ lệ cao nhất, tiếp theo đến các alen 46:01, 58:01, 07:05, 38:02, 15:25, đây là những alen có tỷ lệ gặp trên 5%. Alen HLA-DR*12 chiếm tỷ lệ cao nhất 31,7%, trong đó HLA-DR*12:02 là alen chiếm tỷ lệ cao nhất 31,0%,

tiếp theo đến các alen 09:01, 15:02, 10:01, 07:01, 03:01 đây là những alen có tỷ lệ gặp trên 5%. Kết quả nghiên cứu chúng tôi khá tương đương với nghiên cứu của Bạch Khánh Hòa và cộng sự năm 2007. Tác giả nghiên cứu trên 170 người Kinh ở Việt Nam thì HLA-A*11:01, A*24:02 và A*33:03 (22,9%, 13,8% và 11,5%) là 3 alen chính của HLA, HLA-B*15:02 và B*46:01 (13,5% và 11,5%) là hai alen chính của HLA-B, HLA-DRB1*12:02 là một alen chiếm ưu thế duy nhất của gen HLA-DRB1, chiếm 35,3% các alen HLA-DRB1, HLA-DRB1*09:01 là các alen phổ biến tiếp theo (9,7%), và DRB1*07:01, DRB1*15:02 và DRB1*10:01 (cao hơn 5%).

Nhiều tác giả nhận thấy cộng đồng người khác nhau thì phân bố HLA có sự khác nhau. Nghiên cứu này MDR được thu thập tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội nên hầu hết là sản phụ dân tộc Kinh. Như vậy bức tranh HLA chưa được đầy đủ, chưa đại diện cho cộng đồng dân tộc Việt Nam, đặc biệt là người dân tộc thiểu số. Trong khi đó, ghép TBG MDR ngày càng được mở rộng cho nhiều bệnh lý khác nhau. Có các bệnh mang tính chất chủng tộc như bệnh thalassemia. Những bệnh nhân này sẽ rất khó để khăn để có thể tìm được một đơn vị TBG MDR nếu như ngân hàng không tiếp tục mở rộng thu từ những sản phụ tại các dân tộc khác nhau trong cộng đồng người Việt.

Tính chủng tộc được phản ánh rất rõ ở các quốc gia khác nhau. Ví dụ HLA-B*40:01 thường gặp ở Trung Quốc [150] (14,5%) nhưng trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ có 4,4%; HLA-A*31:01 của chúng tôi có tỷ lệ 1,4% trong khi đó nghiên cứu tại Hàn Quốc [151] thì đây là 1 trong 6 alen hay gặp HLA-A có tỷ lệ trên 5%. Do đó, sự liên kết các ngân hàng MDR cộng đồng có ý nghĩa vô cùng quan trọng vì có thể HLA ở cộng đồng này hiếm nhưng nó lại là phổ biến ở cộng đồng khác. Các ngân hàng sẽ hỗ trợ cho nhau trong việc tìm kiếm TBG MDR cho bệnh nhân đặc biệt bệnh nhân có HLA hiếm gặp.

4.3.2.2. Xác suất tìm kiếm đơn vị tế bào gốc máu dây rốn

Biểu đồ 3.22 là biểu đồ tổng quát, thể hiện xác suất tìm kiếm được đơn vị TBG MDR cho các bệnh nhân có chỉ định ghép. Kết quả của các quy trình lựa chọn, thu thập, xử lý, bảo quản với mục đích cuối cùng là tạo ra các đơn vị TBG MDR được định sẵn HLA và lưu trữ trong ngân hàng sẵn sàng phục vụ cho bệnh nhân có nhu cầu. Đây là một bước tiến lớn trong sự nghiệp xây dựng nguồn TBG phục vụ cho bệnh nhân ghép. Với 1668 mẫu, ta có thể thấy: khả năng bệnh nhân tìm được đơn vị MDR hòa hợp cho 217 bệnh nhân là rất cao, đặc biệt khi chỉ cần hòa hợp 4/6 thì tỷ lệ đã lên tới 96,8%. Từ trước đến nay, các bệnh nhân có nhu cầu điều trị bằng ghép TBG hoàn toàn phụ thuộc vào người cho là anh chị em cùng huyết thống. Đối với những trường hợp bệnh nhân không tìm được người thân hòa hợp HLA với bệnh nhân, việc điều trị sẽ tiếp tục là các biện pháp truyền thống và nguy cơ bệnh tiến triển xấu rất cao, đặc biệt với những bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu cấp, bạch cầu kinh dòng tủy. Hiện nay, các bệnh nhân này đã có cơ hội tìm được giải pháp hữu hiệu đó là nguồn TBG với người cho không cùng huyết thống lấy từ MDR cộng đồng. Với 1000 mẫu lưu trữ đã có khả năng tìm kiếm HLA hòa hợp 4/6 là 95,9%. Khi ngân hàng lưu trữ 1500 mẫu thì khả năng tìm kiếm này lên tới 96,8%. Tuy nhiên để tìm được những đơn vị hòa hợp tuyệt đối 6/6 còn khá thấp (18,0%). Trong nghiên cứu lượng bệnh nhân tìm kiếm còn khiêm tốn, số lượng đơn vị TBG cộng đồng hiện có cũng chưa nhiều so với các nghiên cứu trên thế giới nên đây mới chỉ là bước đầu tìm kiếm. Câu hỏi đặt ra là ngân hàng nên lưu trữ bao nhiêu là đủ tức vừa tránh lãng phí nhưng đồng thời cũng đáp ứng được nhu cầu tìm kiếm cho bệnh nhân. Trên thế giới có một số nghiên cứu như tại Anh [152] đã đưa ra khuyến cáo một ngân hàng chứa 50.000 đơn vị là tối ưu cho Anh đáp ứng nhu cầu 80% bệnh nhân ít nhất có 1 đơn vị TBG hòa hợp HLA 5/6. Con số này tại Hoa Kỳ là 150.000 và Nhật Bản là 10.000 đơn vị TBG MDR [153],[154]. Trong nghiên cứu tại Hàn Quốc, Jong Hyun Yoon và cộng sự đã đề xuất mức tối thiểu là 5.100 đơn vị

và tối đa 20.000 đơn vị cho một ngân hàng TBG MDR cộng đồng [155],[156]. Số lượng đề xuất tại mỗi nước khác nhau là khác nhau phụ thuộc vào sự đa dạng sắc tộc của HLA, mức độ yêu cầu hòa hợp HLA và độ phân giải HLA.

TBG MDR có rất nhiều ưu điểm so với các nguồn TBG khác. Tuy nhiên, hạn chế lớn nhất của TBG này là chỉ thu được một lần trong quá trình sinh, số lượng tế bào thường đủ để sử dụng cho trẻ nhỏ hoặc người có cân nặng thấp [157]. Để khắc phục nhược điểm này, các tác giả đã thực hiện ghép hai đơn vị TBG MDR hòa hợp một phân HLA để tăng liều cho bệnh nhân [158]. Năm 2016, Gérard Michel và cộng sự [159] nghiên cứu trên 151 bệnh nhân ghép: 74 bệnh nhân được chỉ định ngẫu nhiên một đơn vị và 77 bệnh nhân được chỉ định ghép 2 đơn vị và so sánh đối chứng trên hai nhóm bệnh nhân này. Tác giả đưa ra kết luận rằng chiến lược ghép hai đơn vị không hiệu quả trong việc cải thiện kết quả của cây ghép so với ghép một đơn vị duy nhất có liều tế bào thích hợp. Như vậy việc nâng cao số lượng tế bào trong đơn vị TBG MDR là việc vô cùng quan trọng. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy với liều TBCN tối thiểu 2×10^7 TB/kg thì ngân hàng có thể đáp ứng nguồn tế bào gốc ghép cho người có cân nặng trung bình $65,6 \pm 20,0$ kg. Như vậy quy trình trong nghiên cứu đã khắc phục được nhược điểm của nguồn TBG MDR. Trong đó, có đến 53,6% đơn vị đủ liều ghép cho bệnh nhân từ 60-70 kg và đặc biệt 33,4% đơn vị có khả năng ghép cho bệnh nhân trên 70 kg. Nếu tính theo liều tối thiểu CD 34 là 1×10^5 /kg, TBG MDR của chúng tôi có khả năng ghép cho bệnh nhân có cân nặng trung bình $47,7 \pm 39,1$ kg. Có 48,8% đơn vị đủ liều để ghép cho bệnh nhân có cân nặng 40-50 kg và 17,2% đơn vị đủ liều ghép cho người có cân nặng trên 70 kg (Biểu đồ 3.23, 3.24). Sở dĩ có kết quả này vì ngân hàng TBG MDR cộng đồng đã bám sát vào mục tiêu là phục vụ bất kỳ bệnh nhân nào trong cộng đồng nên số lượng TBG

trong đơn vị lưu trữ phải cao nhất có thể ghép được cho cả trẻ nhỏ và người lớn. Để làm được điều đó, quy trình thu thập đã được cải tiến để đầu vào có thể thu được những mẫu MDR có thể tích cao. Tuy nhiên, không phải sẽ xử lý tất cả những mẫu MDR thu được mà chỉ xử lý những mẫu có số lượng TBCN từ trên 80×10^7 như vậy đầu vào số lượng TBCN lớn hơn so với những ngân hàng MDR các nhân trong nước và cũng như một số ngân hàng trên thế giới (nghiên cứu này đã loại bỏ không xử lý 39,1% mẫu MDR thu thập được). Xử lý mẫu MDR là kỹ thuật để giảm thể tích, loại bỏ hồng cầu, tuy nhiên đồng thời có thể mất TBCN, do đó tối ưu hóa quá trình xử lý bằng để lắng có dung dịch HES và ly tâm 1 lần đã thu hồi được $84,9 \pm 5,6\%$ số lượng TBCN và tinh sạch được $94,0 \pm 3,0\%$ hồng cầu. Sau cùng bảo quản cũng có thể làm cho TBG chết và giảm số lượng TBG trong mỗi đơn vị. Do đó, quy trình bảo quản cũng được thực hiện một cách tối ưu nhất. Sau chu trình hạ nhiệt độ, chúng tôi lưu trữ TBG trong các tank nhỏ. Đây cũng là một trong những hoạt động giúp cho ổn định nhiệt độ lưu trữ. Sự cải tiến một cách đồng bộ cả 3 quy trình: quy trình thu thập, xử lý và bảo quản đã khắc phục được nhược điểm của TBG MDR là chỉ ghép được cho trẻ nhỏ cân nặng thấp. Kết quả là số đơn vị TBG MDR lưu trữ trong ngân hàng TBG MDR cộng đồng của Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương có khả năng tìm kiếm để ghép cho cả những người lớn có cân nặng cao.

4.3.2.3. Kết quả chọn đơn vị tế bào gốc máu dây rốn cho bệnh nhân

Kết quả sau cùng của ngân hàng TBG MDR cộng đồng là tạo ra các đơn vị TBG được định danh HLA sẵn sàng phục vụ cho tìm kiếm và ghép cho bệnh nhân có chỉ định mà không tìm được TBG cùng huyết thống. 217 bệnh nhân đã có nhu cầu tìm kiếm TBG MDR trong ngân hàng. Trong đó có 175 bệnh nhân được điều trị tại viện và 42 bệnh nhân từ các cơ sở y tế khác gửi đến (Bảng 3.32). Điều này khẳng định một lần nữa vị thế của ngân hàng tại Việt Nam.

Đến thời điểm này đây là ngân hàng duy nhất tại Việt Nam đáp ứng được khả năng tìm kiếm TBG phục vụ cho bệnh nhân. Bệnh nhân cần tìm đơn vị TBG MDR có tuổi trung bình trung bình $23,5 \pm 1,7$ và cân nặng $41,4 \pm 1,8$ kg. Các bệnh hay gặp chủ yếu lơ xê mi cấp (48,9%), thalassemia (26,7%), suy tủy xương (15,7%) (Bảng 3.33).

Khi sử dụng kết quả xét nghiệm HLA độ phân giải cao của 1668 đơn vị TBG MDR lưu trữ để tìm kiếm TBG MDR cho 217 bệnh nhân có chỉ định ghép. Kết quả có tới 96,8% số trường hợp bệnh nhân đã tìm thấy đơn vị TBG MDR hòa hợp tối thiểu 4/6 locus chính (A, B, DR). Trong đó, có những trường hợp bệnh nhân tìm kiếm được tới 184 đơn vị TBG MDR hòa hợp HLA mức độ 4/6. Điều này đem lại rất nhiều cơ hội lựa chọn cho người bệnh. Đặc biệt cũng có 1 tỷ lệ không nhỏ (18,0%) bệnh nhân tìm được TBG hòa hợp tuyệt đối 6/6. Có những trường hợp tìm được 17 đơn vị hòa hợp 6/6. Như vậy đây chính là nguồn “bảo hiểm sinh học” cho bệnh nhân không tìm thấy TBG cùng huyết thống (Bảng 3.34).

Bảng 3.35 cho thấy với hòa hợp HLA 4/6 số đơn vị TBG tìm được có liều trung bình khá cao với CD34 là $3,6 \pm 2,3 \times 10^5$ tế bào/kg, TBCN $9,0 \pm 5,5 \times 10^7$ tế bào /kg. Với mức độ hòa hợp HLA lần lượt 5/6, 6/6 liều tế bào CD34 trung bình tìm được cho bệnh nhân là 2,5 và $2,4 \times 10^5$ tế bào /kg, liều TBCN lần lượt là 6,7 và $6,2 \times 10^7$ tế bào /kg.

Trên thực tế đã có 12 đơn vị TBG MDR được ghép cho các bệnh nhân. Chủ yếu là lơ xê mi cấp 58,3%. Ngoài ra có bệnh nhân suy tủy, thalassemia, rối loạn sinh tủy (Bảng 3.36).

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu quy trình thu thập, xử lý và bảo quản 1668 đơn vị tế bào gốc máu dây rốn cộng đồng tại ngân hàng Tế bào gốc của Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Quy trình thu thập, xử lý, bảo quản tế bào gốc máu dây rốn cộng đồng đang được áp dụng có hiệu quả cao, tạo ra các đơn vị tế bào gốc máu dây rốn chất lượng:

- Quá trình thu thập máu dây rốn: Có 1668/2906 mẫu máu dây rốn sau khi thu thập đủ tiêu chuẩn xử lý và bảo quản chiếm 57,4%. Các mẫu máu này có:

- + Thể tích cao ($139 \pm 18,7$ ml)
- + Chứa nhiều tế bào có nhân ($151,8 \pm 40,4 \times 10^7$)

- Quy trình xử lý đạt hiệu quả tốt

- + Thu hồi được $84,9 \pm 5,6\%$ tế bào có nhân,
- + Loại được $83,8 \pm 1,9\%$ thể tích,
- + Loại được $94,0 \pm 3,0\%$ hồng cầu.

- Đơn vị tế bào gốc có chất lượng cao:

- + Tế bào có nhân: $131,2 \pm 40 \times 10^7$ tế bào trong 1 đơn vị,
- + Tế bào CD34: $48,1 \pm 35,5 \times 10^5$ tế bào trong 1 đơn vị,
- + Tỷ lệ tế bào CD34 sống sau xử lý $94,5 \pm 3,4\%$

+ Đánh giá khả năng sinh sản, biệt hóa: 100% đơn vị TBG mọc cụm khi nuôi cấy, số lượng cụm nhiều và đa dạng: cụm CFU-GM ($48,4 \pm 9,8\%$), CFU-E ($48,1 \pm 9,5\%$)

2. Nghiên cứu một số yếu tố liên quan đến chất lượng và khả năng sử dụng đơn vị tế bào gốc máu dây rốn cộng đồng

- Một số yếu tố liên quan đến chất lượng tế bào gốc máu dây rốn cộng đồng:

+ Số lượng tế bào có nhân và tế bào CD34 trong đơn vị tế bào gốc máu dây rốn có mối liên quan trung bình với thể tích máu dây rốn thu được với $r = 0,473$ và $0,12$ ($p < 0,05$).

+ Hiệu suất xử lý và tỷ lệ tế bào CD34 sống không bị ảnh hưởng bởi thể tích máu dây rốn, số lượng tế bào có nhân, thời gian lưu trước xử lý cũng như thời gian xử lý.

+ Sau bảo quản số cụm mọc có mối liên quan chặt với số lượng tế bào CD34 và số lượng tế bào có nhân sau rã đông với r lần lượt là $0,87$ và $0,6$ với $p < 0,05$.

+ Thời gian bảo quản chưa thấy ảnh hưởng đến số lượng tế bào, tổng số cụm mọc, từng loại cụm và tỷ lệ tế bào CD34 sống.

- Khả năng sử dụng đơn vị tế bào gốc máu dây rốn cộng đồng:

+ Xét nghiệm HLA với độ phân giải cao cho 1668 đơn vị tế bào gốc máu dây rốn bảo quản trong ngân hàng tế bào gốc của Viện đã giúp cho việc chọn lựa đơn vị tế bào gốc phục vụ người có nhu cầu ghép một cách chủ động và nhanh chóng.

+ Căn cứ theo tiêu chuẩn liều tối thiểu số lượng tế bào có nhân, các đơn vị tế bào gốc máu dây rốn lưu trữ đáp ứng ghép cho bệnh nhân có cân nặng lớn trung bình $65,6 \pm 20,0$ kg. Trong đó:

- 95,5% đơn vị có thể ghép được cho bệnh nhân trên 40 kg
- 76,8% đơn vị có thể ghép được cho bệnh nhân trên 50 kg
- 33,4% đơn vị đáp ứng cho bệnh nhân trên 70 kg.

+ Căn cứ theo tiêu chuẩn liều tối thiểu số lượng tế bào CD34, các đơn vị tế bào gốc máu dây rốn bảo quản đáp ứng ghép cho bệnh nhân có cân nặng lớn trung bình $48,1 \pm 35,4$ kg. Trong đó:

- 48,8% đơn vị có thể ghép được cho bệnh nhân trên 40 kg
- 34,2% đơn vị có thể ghép được cho bệnh nhân trên 50 kg
- 17,2% đơn vị đáp ứng cho bệnh nhân trên 70 kg.

+ Trên thực tế, lựa chọn cho 217 bệnh nhân có nhu cầu ghép thì tỷ lệ bệnh nhân tìm thấy đơn vị tế bào gốc máu dây rốn đủ số lượng tế bào có nhân, tế bào CD34 và phù hợp theo 3 locus chính (A, B, DR) của HLA ở các mức độ:

- 4/6 là 96,8%
- 5/6 là 69,6%
- 6/6 là 18%

KIẾN NGHỊ

Qua nghiên cứu đề tài chúng tôi có một số kiến nghị như sau:

- Quy trình thu thập, xử lý, bảo quản tế bào gốc máu dây rốn cộng đồng của Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương đang được thực hiện khá hoàn chỉnh và cho kết quả tốt. Quy trình này nên được triển khai, áp dụng cho nhiều trung tâm để tạo ra những đơn vị tế bào gốc máu dây rốn cộng đồng đủ về số lượng, chất lượng với mức chi phí thấp phù hợp với người Việt Nam..

- Trong nghiên cứu, đa số là người Kinh Việt Nam, chưa thu thập được các mẫu máu dây rốn ở các dân tộc khác do đó HLA chưa được phong phú. Cần tiếp tục triển khai nghiên cứu trên quần thể các dân tộc thiểu số để tạo ra một ngân hàng tế bào gốc máu dây rốn có HLA phong phú hơn nữa phục vụ cho cộng đồng dân tộc Việt Nam.

**DANH DÁCH CÁC BÀI BÁO VÀ CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN
ĐẾN NỘI DUNG LUẬN ÁN**

1. Đặng Thị Thu Hằng, Trần Ngọc Quế, Nguyễn Anh Trí (2017). Đánh giá kết quả thu thập, xử lý, lưu trữ và sử dụng TBG MDR tại Viện Huyết học truyền máu TW. *Tạp chí Y Học Việt Nam*, tập 453, tháng 4/2017, trang 229 – 238.
2. Đặng Thị Thu Hằng, Vũ Thu Huyền, Trần Ngọc Quế, Nguyễn Anh Trí (2019). Đánh giá chất lượng đơn vị TBG MDR cộng đồng sau rã đông tại Viện Huyết học – truyền máu trung ương (2014-2018). *Tạp chí Y Học Việt Nam*, tập 477, tháng 5/2019, trang 162 – 170.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ballen K (2017). Update on umbilical cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 6:1556-62.
2. Lazaryan A, Weisdorf DJ, DeFor T, Brunstein CG, MacMillan ML, Behanyan N et al (2016). Risk factors for acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation with umbilical cord blood and matched related donors. *Biol Blood Marrow Transplant*; 22, 134–140
3. Gluckman E (2009). History of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 44, 621-626.
4. Exalto, N (1995). Early human nutrition. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 61, 3-6.
5. Di Naro E, Ghezzi F, Raio L, Franchi M, D'Addario V (2001). Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 96, 150-157.
6. Chaurasia B.D and Agarwal B.M (1979). Helical structure of the human umbilical cord. *Acta Anatomica*, 103, 226-230.
7. Ferguson V.L and Dodson R.B (2009). Bioengineering aspects of the umbilical cord. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 144 (1), 108-113.
8. Currarino G, Stannard M.W and Kolni H (1991). Umbilical vein draining into the inferior vena cava via the internal iliac vein, bypassing the liver. *Pediatric Radiology*, 21, 265-266.
9. Desforges M and Sibley C.P (2010). Placental nutrient supply and fetal growth. *International Journal of Developmental Biology*, 54, 377-390.

10. Cross J.C, Nakano H, Natale D.R, Simmons D.G and Watson E.D (2006). Branching morphogenesis during development of placental villi. *Differentiation*, 74, 393-401.
11. Đỗ Trung Phần (2019). *Tế bào gốc và bệnh lý tế bào gốc tạo máu*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
12. Dravid G, Rao SGA (2002). Ex vivo expansion of stem cells from umbilical cord blood: expression of cell adhesion molecules. *Stem Cells* 20:183–189
13. Kopec'-Szlezak J, Podstawka U (2001). Cord blood hematopoietic CD34⁺ cells. *Acta Haematol Pol*, 32:61–69
14. Tian H, Huang S, Gong F, Tian L, Chen Z (2005). Karyotyping, immunophenotyping, and apoptosis analyses on human hematopoietic precursor cells derived from umbilical cord blood following long-term ex vivo expansion. *Cancer Genet Cytogenet*, 157:33–36
15. Grskovic B, Ruzicka K, Karimi A, Qujeq D, Muller MM (2004). Cell cycle analysis of the CD133⁺ and CD133⁻ cells isolated from umbilical cord blood. *Clin Chim Acta*, 343:173–178
16. Smogorzewska EM, Barsky LW, Crooks GM, Wienberg KI (1997). Purification of hematopoietic stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood. *Cent Eur J Immunol*, 22:232–239
17. Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H (2004). Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, 22(4):625-34
18. Gao L, Chen X, Zhang X, Liu Y, Kong P, Peng X, Liu L, Liu H, Zeng D (2006). Human umbilical cord blood-derived stromal cell, a new resource of feeder layer to expand human umbilical cord blood CD34⁺ cells in vitro. *Blood Cells Mol Dis*, 36:322–328

19. Wiess ML and Troyer DL (2006). Stem cell in the umbilical cord. *Stem cell review*, 2(2): 155-62
20. Stolarek M, Myśliwski A (2005). Stem cells of cord blood. *Post Biol Kom*, 32:375–390
21. Stojko R, Witek A (2005). Umbilical cord blood—a perfect source of stem cells? *Ginekol Pol*, 76:491–497
22. Chang Y-J, Tseng Ch-P, Hsu L-F, Hsieh T-B, Hwang S-M (2006). Characterization of two populations of mesenchymal progenitor cells in umbilical cord blood. *Cell Biol Int*, 30:495–499
23. Cassar. P and Blundell. R (2016). The Use of Umbilical Stem Cells. *Open Journal of Pathology*, 6, 41-56.
24. N M-Reboredo, A Diaz, A Castro, et al (2000). Collection, processing and cryopreservation of umbilical cord blood for unrelated transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 6, 1263-70.
25. Dessels C, Alessandrini M, Pepper M.S (2018). Factors Influencing the Umbilical Cord Blood Stem Cell Industry: An Evolving Treatment Landscape. *Stem Cells Transl*, 7:643–650.
26. Pilar Solves, Dolores Planelles, Vicente Mirabet, Amando Blanquer, and Francisco Carbonell-Uberos (2013). Qualitative and quantitative cell recovery in umbilical cord blood processed by two automated devices in routine cord blood banking: a comparative study. *Blood Transfus*. 11(3): 405–411
27. Knudtzon. S (1974). In Vitro Growth of Granulocytic Colonies from Circulating Cells in Human Cord Blood. *Blood*, 43, 357-361.
28. Kurtzberg J (2017). A History of Cord Blood Banking and Transplantation. *Stem Cells Transl*. 6:1309–1311.

29. Vanderson Roch (2005). Hematopoietic stem-cell transplantation using umbilical-cord blood cells. *Revista de Investigación Clínica*, Vol 57(2), 314-323
30. Yoshihisa Koderu, Shigeru Chiba, Shunichi Kato, et al (2012). Consequences of earthquake on unrelated transplants in Japan. The 38th Annual meeting of EBMT Joint Session.
31. Carlo Petrini (2014). Umbilical cord blood banking: from personal donation to international public registries to global bioeconomy. *Journal of Blood Medicine*: 5 87–97
32. Olayanju AO, Nkanga AE, Olayanju AJ, Oluwatayo BO, Adesina O, Enitan SS, Oladele AA (2017). Cord blood banking: the prospects and challenges of implementation in Nigeria. *Hematol Transfus Int J*, 5(4):273–278.
33. Aznar Lucea J (2012). Umbilical cord blood banks. Ethical aspects. Public versus private banks. *Cuad Bioet.* 23(78):269–285.
34. Webb S (2013). Banking on cord blood stem cells. *Nat Biotechnol.* 31(7): 585–588.
35. Meerim Park, Jong Jin Seo (2012). Role of HLA in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Bone Marrow Research Article*, 1-7.
36. E. W. Petersdorf, T. A. Gooley, C. Anasetti et al (1998). Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. *Blood*, vol. 92, no. 10, pp. 3515–3520.
37. E. W. Petersdorf, C. Kollman, C. K. Hurley et al (2001). Effect of HLA class II gen disparity on clinical outcome in unrelated donor hematopoietic cell transplantation for chronic myeloid leukemia: the US National Marrow Donor Program experience. *Blood*, vol. 98, no. 10, pp. 2922–2929.

38. Y. Morishima, T. Sasazuki, H. Inoko et al (2002). The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. *Blood*, vol. 99, no. 11, pp. 4200–4206.
39. T. Sasazuki, T. Juji, Y. Morishima et al (1998). Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. *New England Journal of Medicine*, vol. 339, no. 17, pp. 1177–1185.
40. S. J. Lee, J. Klein, M. Haagenson et al (2007). High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*, vol. 110, no. 13, pp. 4576–4583.
41. United Kingdom Paediatric Bone Marrow Transplant Group, British Society for Histocompatibility and Immunogenetics, The British Transplantation Society, et al (2013). *Guidelines for selection and HLA matching of related, adult unrelated donors and umbilical cord blood for haematopoietic progenitor cell transplantation*.
42. G Kögler, J Enczmann, V Rocha, E Gluckman & P Wernet (2005). High-resolution HLA typing by sequencing for HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ in 122 unrelated cord blood/patient pair transplants hardly improves long-term clinical outcome. *Bone Marrow Transplantation*, volume 36, pages 1033–1041.
43. Meghan Delaney Corey S, Cutler Richard L, Haspel (2012). High-resolution HLA matching in double-umbilical-cord-blood reduced-intensity transplantation in adults. *Transfusion*, Volume 49, Issue 5, p. 995-1002

44. Jason Dehn, Stephen Spellman, Carolyn K Hurley, et al (2019). Selection of unrelated donors and cord blood units for hematopoietic cell transplantation: guidelines from the NMDP/CIBMTR. *Blood*, 134 (12): 924-934.
45. Vanderson Rocha, Federico Gamier, Irina Ionescu, Eliane Gluckman (2005). Hematopoietic stem-cell transplantation using umbilical-cord blood cell. *Rev. invest. Clin*, vol.57, no.2, 156-62.
46. Ballen K. K, Gluckman E, & Broxmeyer H (2013). Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood*, 122(4), 491-498.
47. Nina Worel (2016). ABO-Mismatched Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Transfus Med Hemother*, 43:3-12.
48. Igor B. Resnick, Panagiotis D. Tsirigotis, Michael Y. Shapira, et al (2008). ABO Incompatibility is Associated with Increased Non-Relapse and GVHD Related Mortality in Patients with Malignancies Treated with a Reduced Intensity Regimen: A Single Center Experience of 221 Patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 14:409-417
49. Gonzalez-Porras JR, Graciani IE, Perez-Simon JA, et al (2008). Prospective evaluation of a transfusion policy of D+ red blood cells into D- patients. *Transfusion*, 48: 1318-1324.
50. Cid J, Lozano M, Fernandez-Aviles F, et al (2006). Anti-D alloimmunization after D-mismatched allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with hematologic diseases. *Transfusion*, 46: 169-173.
51. Worel N, Bohm A, Rabitsch W, et al (2012). Frequency and prognostic value of D alloantibodies after D-mismatched allogeneic hematopoietic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning. *Transfusion*, 52: 1348-1353.

52. Gratwohl A, Pasquini MC, Aljurf M, Atsuta Y, Baldomero H, Foeken L, et al (2015). One million haemopoietic stem-cell transplants: a retrospective observational study. *Lancet Haematol*, 91–100.
53. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P, et al (2014). Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant*, 51:786–92.
54. Pasquini MC ZX (2015). Current uses and outcomes of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR summary slides. Available from: <http://www.cibmtr.org>
55. Cotten CM, Murtha AP, Goldberg RN, et al (2014). Feasibility of autologous cord blood cells for infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr*, 164(5):973-979
56. Ballen, K.K, Barker, J.N, Stewart, S.K, Greene, M.F and Lane T.A (2008). Collection and preservation of cord blood for personal use. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 14, 356-363.
57. Pipes BL, Tsang T, Peng SX, Fiederlein R, Graham M and Harris, DT (2006). Telomere length changes after umbilical cord blood transplant. *Transfusion*, 46, 1038- 1043.
58. Ringden O, Okas M, Uhlin M, Uzunel M, Remberger M and Mattsson J (2008). Unrelated cord blood and mismatched unrelated volunteer donor transplants, two alternatives in patients who lack an HLA-identical donor. *Bone Marrow Transplant*, 42, 643-648.
59. Behzad-Behbahani A, Pouransari R, Tabei SZ, et al (2005). Risk of viral transmission via bone marrow progenitor cells versus umbilical cord blood hematopoietic stem cells in bone marrow transplantation. *Transplantation Proceedings*, 37, 3211-3212.

60. Min K, Song J, Kang JY, et al (2013). Umbilical cord blood therapy potentiated with erythropoietin for children with cerebral palsy: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Stem Cells*, 31(3):581-91.
61. Haller MJ, Wasserfall CH, Hulme MA, Cintron M, Brusko TM, McGrail KM, et al (2011). Autologous umbilical cord blood transfusion in young children with type 1 diabetes fails to preserve C-peptide. *Diabetes Care*, 34:2567–2569.
62. Brunstein CG, Gutman JA, Weisdorf DJ, Woolfrey AE, DeFor TE, Gooley TA, et al (2009). Reduced relapse and similar progression-free survival after Double Umbilical Cord Blood Transplantation (DMDRT): Comparison of outcomes between sibling, unrelated adult and unrelated DMDR Hematopoietic Stem Cell (HSC) Donors. *Blood*, 114:662.
63. Jonathan A Gutman, Stanley R Riddell, Suzanne McGoldrick, et al (2010). Double unit cord blood transplantation: Who wins—and why do we care? *Chimerism*. 1(1), p. 21-2.
64. De Lima M (2012). Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. *N Engl J Med*, 367(24):2305-15.
65. Fernandez MN, Regidor C, Cabrera R, et al (2013). Unrelated umbilical cord blood transplants in adults: Early recovery of neutrophils by supportive co-transplantation of a low number of highly purified peripheral blood CD34 cells from an HLA-haploidentical donor. *Exp Hematol*, 31:535–44.
66. Koen van Besien, Richard Childs (2016). Haploidentical cord transplantation the best of both worlds. *Seminars in Hematology*, vol 53(4), 257-266

67. Wolfram Goessling, Robyn S Allen, Xiao Guan, et al (2011). Prostaglandin E2 enhances engraftment of human cord blood stem cells and shows long-term safety in preclinical non-human primate transplant models. *Cell Stem Cell*, 8(4): 445–458.
68. Ballen K.K, Verter F, Kurtzberg J (2015). Umbilical cord blood donation: Public or private? *Bone Marrow Transpl.* 50:1271–1278
69. Kurtzberg J (2017). A History of Cord Blood Banking and Transplantation. *Stem Cells Transl.* 6:1309–1311.
70. Ju`rgen Zingsem, Erwin Strasser, Volker Weisbach, et al (2003). Cord blood processing with an automated and functionally closed system. *Transfusion*, 43:806-813
71. Tulika Chandra, Sheeba Afreen, Ashutosh Kumar, Uma Singh (2011). Correlation of umbilical cord blood volume with CD34+ cells concentration. *International Journal of Blood Transfusion and Immunohematology*, Vol.1, p12-16.
72. Dunia Jawdat, Reham Alqahtani, Sarah Alhdaythi, Suha Arab, Amal Aljuhani (2015). Factor predicting total nucleated cell count in cord blood units collected at king abdullah international medical research center cord blood bank. *International Journal of Advances in Science Engineering and Technology*, 71-74.
73. Rodrigo Dias Nunes, Flávia Maria Zandavalli (2015). Association between maternal and fetal factors and quality of cord blood as a source of stem cells. *Rev bras hematol hemoter*, 37(1): 38–42.
74. V Lapierre, N Pellegrini, I Bardey, C Malugani, P Saas, F Garnache, E Racadot, S Maddens and F Schillinger (2007). Cord blood volume reduction using an automated system (Sepax) vs, a semi-automated system (Optipress II) and a manual method (hydroxyethyl starch sedimentation) for routine cord blood banking: a comparative study. *Cytotherapy*, 9(2), 165-169

75. N. Sato, C. Fricke, C. McGuckin, N. Forraz, O. Degoul, G. Atzeni and H. Sakurai (2015). Cord blood processing by a novel filtration system. *Cell Prolif*, 48, 671–681
76. Indreshpal Kaur et al (2016). Comparison of two methodologies for the enrichment of mononuclear cells from thawed cord blood products: The automated Sepax system versus the manual Ficoll method. *Cytotherapy*;19(3):433-439
77. NetCord-FAC (2016). *International Cord Blood Standards Accreditation manual* (6th Edition-2013): 160
78. Huỳnh Văn Mẫn, Huỳnh Đức Vĩnh Phú, Nguyễn Hạnh Thu và cộng sự (2015). Tình hình ghép tế bào gốc tạo máu 20 năm qua tại Việt Nam. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, tập 19, số 4, p. 1-7.
79. Trần Văn Bé, Trương Đình Kiệt (2000). *Nghiên cứu kỹ thuật xử lý và trữ TBG máu cuống rốn*. Đề tài KHCN cấp Bộ
80. Trần Văn Bé (2006). Chiết tách tế bào gốc tạo máu từ máu cuống rốn. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 322(1-3).
81. Huỳnh Nghĩa, Trần Quốc Dũng, Lê Thị Thu Hiền (2004). Bước đầu đánh giá chất lượng sản phẩm tế bào gốc từ máu cuống rốn bằng các kỹ thuật đếm tế bào CD34 và nuôi cấy khúm tế bào. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 299(6): 36-40.
82. Trần Thị Mỹ Dung, Nguyễn Quang Tùng, Đỗ Trung Phần (2007). Nghiên cứu xây dựng quy trình thu gom tế bào gốc tạo máu từ máu dây rốn đạt hiệu quả cao. *Tạp chí nghiên cứu Y học*, 49(69-72)
83. Huỳnh Nghĩa (2008). *Nghiên cứu ứng dụng quy trình xử lý tế bào gốc máu cuống rốn*, Luận án tiến sĩ y học, Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

84. Đỗ Trung Phấn, Nguyễn Quang Tùng, Trần Thị Mỹ Dung và cộng sự (2008). *Nghiên cứu ứng dụng quy trình thu gom, làm sạch và bảo quản tế bào gốc sinh máu sử dụng cho ghép tủy đồng loài*. Đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ.
85. Nguyễn Quang Tùng (2011). *Nghiên cứu ứng dụng và hoàn thiện quy trình thu gom, xử lý, bảo quản tế bào gốc tạo máu dùng cho ghép đồng loài*. Luận án Tiến sỹ y học, Đại Học Y Hà Nội.
86. Nguyễn Thu Chang, Trần Ngọc Quế, Nguyễn Bá Khanh, Nguyễn Anh Trí (2017). Bước đầu đánh giá khả năng tìm kiếm tế bào gốc máu dây rốn của bệnh nhân có nhu cầu ghép tại Viện Huyết học – Truyền máu trung ương. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 453, 250-59.
87. Trần Ngọc Quế, Nguyễn Bá Khanh, Lê Xuân Thịnh (2015). Thành công bước đầu trong xây dựng Ngân hàng Tế bào gốc máu dây rốn cộng đồng tại Việt Nam. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 429, p.338-44
88. Trần Ngọc Quế và cộng sự (2015). Tình hình phát hiện trẻ mắc thalassemia qua sàng lọc máu dây rốn thu thập và lưu trữ tại viện Huyết học – Truyền máu trung ương giai đoạn 2014-2015. *Tạp chí Y học Việt Nam*, tập 434, 100-107.
89. Christine L, Keersmaekers, Brian A, Mason, Jan Keersmaekers, Matthew Ponzini, and Ryan A, Mlynarek (2013). Factors affecting umbilical cord blood stem cell suitability for transplantation in an in utero collection program. *Transfusion*, 2, 1-5.
90. Marina Izu, Zenith Rosa Silvino, Dulcinéa Luzia Oliveira Lima, et al (2013). Influence of obstetric and neonatal factors in cellularity and volume of the umbilical cord. *J Nurs UFPE on line*, Recife, 7(7):4621-6
91. F. Mancinelli, A. Tamburini, A. Spagnoli, C. Malerba, G. Suppo, R. Lasorella, P. de Fabritiis, and A. Calugi (2006). Optimizing Umbilical Cord Blood Collection: Impact of Obstetric Factors Versus Quality of Cord Blood Units. *Transplantation Proceedings*, 38, 1174–1176 (2006).

92. Supatra Sirichotiyaku, Jatuchai Maneerat, Torpong Sa-nguansermisri, Pisawat Dhananjayanonda, Theera Tongsong (2005). Sensitivity and specificity of mean corpuscular volume testing for screening for α -thalassemia-1 and β -thalassemia traits. *The Journal of obstetrics and gynaecology research, J Obstet Gynaecol Res*, 31(3), 198-201.
93. Sparrow RL, Cauchi JA, Ramadi LT, Waugh CM, Kirkland MA (2002). Influence of mode of birth and collection on WBC yields of umbilical cord blood units. *Transfusion*, 42(2):210-5.
94. Solves P, Moraga R, Saucedo E, et al (2003). Comparison between two strategies for umbilical cord blood collection. *Bone Marrow Transplant*, 31(4):269-73.
95. The WHO Reproductive Health Library: Optimal timing of cord clamping for the prevention of iron deficiency anaemia in infants The World Health Organization (last update 2 March 2012) [last visited June 13, 2012]; http://www.who.int/elena/titles/cord_clamping/en/
96. A. Al-Madhani, A. Pathare, S. Al Zadjali, M. Al Rawahi, I. Al-Nabhani and S. Alkindi (2019). The Use of HPLC as a Tool for Neonatal Cord Blood Screening of haemoglobinopathy: A Validation Study. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 11(1).
97. Nelida I Noguera, German Detarsio, Susana M. Perez, et al (1999). Hematologic study of newborn umbilical cord blood. *Medicina*, 59, 446-448.
98. Hough R, Danby R, Russell N, et al (2016). Recommendations for a standard UK approach to incorporating umbilical cord blood into clinical transplantation practice: an update on cord blood unit selection, donor selection algorithms and conditioning protocols. *Br J Haematol*, 172:360–70.

99. Trần Ngọc Quế và cs (2014). Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng máu dây rốn thu thập tại Viện Huyết học – Truyền máu TW. *Tạp chí Y học VN*, 429, 250-56.
100. Kristin M. Page, Adam Mendizabal, Brigid Betz-Stablein, et al, (2014). Optimizing Donor Selection for Public Cord Blood Banking: Influence of Maternal, Infant and Collection Characteristics on Cord Blood Unit Quality. *Transfusion*, 54(2): 340–352.
101. Sara Y, Al-Deghaither (2015). Impact of maternal and neonatal factors on parameters of hematopoietic potential in umbilical cord blood. *Saudi Med J*, 36 (6): 704-712.
102. J.C.Jaime-Pérez, R.Monreal-Robles, L.N.Rodríguez-Romo, and J.L. Herrera-Garza (2011). Evaluation of volume and total nucleated cell count as cord blood selection parameters. *The American Journal of Clinical Pathology*, 136, 5: 721-6.
103. Atakan tanaçan¹, Pınar yurdakul, Fatih aktoz¹, Gökçen örgül¹, Meral beksaç, Mehmet sinan beksaç (2018). Factors influencing the success of cord blood collection: a tertiary perinatal medicine center's experience. *Turk J Med Sci*, 48: 961-966.
104. Nguyễn Công Khanh (2004). Huyết học lâm sàng nhi khoa. Nhà xuất bản Y học.
105. Đỗ Trung Phần (2004). *Một số chỉ số huyết học người Việt Nam bình thường giai đoạn 1995-2000*. Bài giảng Huyết học- Truyền máu, NXB Y học, Hà Nội, trang 332-333.
106. Pablo Rubinstein, Ludy Dobrila, Richard E, et al (1995). Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Medical Sciences*, 92, 10119-10122

107. Solves P, Mirabet V, Blanquer A, Delgado-Rosas F, Planelles D, Andrade M, et al (2009). A new automatic device for routine cord blood banking: critical analysis of different volume reduction methodologies. *Cytotherapy*, 11:1101–7.
108. Solves P, Mirabet V, Roig R (2010). Volume reduction in routine cord blood banking. *Curr Stem Cell Res Ther*, 5:362–6.
109. Sergio Querol and Vanderson Rocha (2019). *Procurement and Management of Cord Blood*, chapter 18, p 131-136
110. L. Dal Cortivo, I Robert, C Mangin, et al (2000). Cord Blood Banking: Volume Reduction Using “Procord” Terumo Filter. *Journal of hematotherapy & stem cell research*, 9:885–890
111. Melissa Croskell (2009). *Basic Cellular Therapy Manufacturing Procedures. Cellular Therapy: Principles, Methods, and Regulations* Bethesda, MD: AABB, 2009. Chapter 26, p. 303-329.
112. Brocklebank AM, Sparrow RL (2001). Enumeration of CD34+ cells in cord blood: a variation on a single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy. *Cytometry*, 46:254-261
113. Holyoake TL, Alcorn MJ (1994). CD34+ positive haemopoietic cells: biology and clinical applications. *Blood Rev*, 8:113-124
114. Van Haute I, Lootens N, De Buck K, et al (2005). Selecting cord blood units for storage by CD34+ cell counts. *Transfusion*, 45:455-457.
115. Solves P, Carbonell-Uberos F, Mirabet V, et al (2007). CD34+ cell content for selecting umbilical cord blood units for cryopreservation. *Transfusion*, 47:552-553.
116. Novelo-Garza B, Limon-Flores A, Guerra-Marquez A, et al (2008). Establishing a cord blood banking and transplantation program in Mexico: a single institution experience. *Transfusion*, 48:228-236.

117. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, et al (2002). Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood*,100:1611-1618.
118. Grewal SS, Barker JN, Davies SM, Wagner JE (2003). Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? *Blood*, 101(11):4233-44.
119. Welte K, Foeken L, Gluckman E, Navarrete C (2010). Cord Blood Working Group of the World Marrow Donor Association, International exchange of cord blood units: the registry aspects. *Bone Marrow Transplantation*, 45(5):825–831
120. Wall DA, Chan KW (2008). Selection of cord blood unit(s) for transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 42(1):1-7.
121. David Allan, Tanya Petraszko, Heidi Elmoazzen, and Susan Smith (2013). A Review of Factors Influencing the Banking of Collected Umbilical Cord Blood Units. *Stem Cells Int*, 463-69.
122. Huỳnh Nghĩa (2004). Tình hình thu thập, sàng lọc và xử lý máu cuống rốn tại bệnh viện Truyền máu – Huyết học TP Hồ chí Minh. *Tạp chí Y học Việt Nam*, tập 299(6): 5-12
123. Trần Thị Mỹ Dung, Nguyễn Quang Tùng, Đỗ Trung Phần (2007). Kết quả nghiên cứu quy trình giảm khối lượng hồng cầu máu cuống rốn sử dụng cho bảo quản dài ngày tế bào gốc tạo máu. *Tạp chí nghiên cứu Y học*, số 51 (4): 1-4
124. Meyer-Monard S, Tichelli A, Troeger C, et al (2012). Initial cord blood unit volume affects mononuclear cell and CD34+ cell-processing efficiency in a non-linear fashion. *Cytotherapy*, 14(2):215–222.

125. Rowley SD, Donato ML, Bhattacharyya P (2011). Red blood cell-incompatible allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 46, 1167-1185.
126. Kimura F, Sato K, Kobayashi S, et al (2008). Impact of ABO-blood group incompatibility on the outcome of recipients of bone marrow transplants from unrelated donors in the Japan Marrow Donor Program. *Haematologica*, 93, 1686-1693
127. Phạm Quang Vinh (2006). *Cấu trúc chức năng tổng hợp huyết sắc tố, bệnh huyết sắc tố*. Bài giảng Huyết học - Truyền máu, Nhà xuất bản y học
128. Keiger, D (2011). How to: Harvest Stem Cells from Cord Blood, Johns Hopkins Magazine
129. Luzar A, Chandler D (1993). Structure and hydrogen bond dynamics of water-dimethyl sulfoxide mixtures by computer simulations. *J Chem Phys*, 98(10): 8160–73
130. Cordoba R, Arrieta R, Kerguelen A, Hernandez-Navarro F (2007). The occurrence of adverse events during the infusion of autologous peripheral blood stem cells is related to the number of granulocytes in the leukapheresis product. *Bone Marrow Transplant*, 40(11): 1063–7
131. Donmez A, Tombuloglu M, Gungor A, Soyer N, Saydam G, Cagirgan S (2007). Clinical side effects during peripheral blood progenitor cell infusion. *Transfus Apheresis Sci*, 36(1): 95–101,
132. Zenhäusern R, Tobler A, Leoncini L, Hess OM, Ferrari P (2000). Fatal cardiac arrhythmia after infusion of dimethyl sulfoxide-cryopreserved hematopoietic stem cells in a patient with severe primary cardiac amyloidosis and end-stage renal failure. *Ann Hematol*, 79(9): 523–6
133. Nicholas Greco and Lynn O'Donnell (2009). *Assessment of viability and apoptosis in cellular therapy products*. (Cellular therapy: principles, Methods, and regulation (Bethesda, MD: AABB, 2009), Chapter 47: 563-72

134. Bert Wognum, Ning Yuan, Becky Lai and and Cindy L. Miller (2013). Basic Cell Culture Protocols: Colony Forming Cell Assays for Human Hematopoietic Progenitor Cells. *Methods in Molecular Biology*. 946267-283.
135. Kristin M. Page, Lijun Zhang, Adam Mendizabal, Stephen Wease, Shelly Carter, Tracy Gentry, Andrew E. Balber, Joanne Kurtzberg (2011). Total Colony-Forming Units Are a Strong, Independent Predictor of Neutrophil and Platelet Engraftment after Unrelated Umbilical Cord Blood Transplantation: A Single-Center Analysis of 435 Cord Blood Transplants. *Biol Blood Marrow Transplant*, 17: 1362-74
136. Nguyễn Bá Khanh, Trần Ngọc Quế (2015), "Bước đầu nghiên cứu kết quả và một số yếu tố liên quan đến khả năng tạo cụm tế bào của mẫu máu dây rốn lưu trữ tại Viện Huyết học-Truyền máu TW", *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, 19(4), 257-261.
137. Hye Ryun Lee, Eun Young Song, Sue Shin, Eun Youn Roh, et al. (2014). Quality of cord blood cryopreserved for up to 5 years. *Korean Society of Hematology, Blood Research*. 49(1), 54-60.
138. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, Berkowitz RL, Cabbad M, Dobrila NL, Taylor PE et al (1998). Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med*, 339: 1565-1577.
139. Gluckman E (2009). Ten years of cord blood transplantation: from bench to bedside. *Br J Haematol*, 147: 192-199.
140. Yamada T, Okamoto Y, Kasamatsu H, Horie Y, Yamashita N, Matsumoto K (2000). Factors affecting the volume of umbilical cord blood collections. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 79: 830- 833.

141. Beksac M, Yurdakul P (2014). Modalities to improve cord blood engraftment. *J Stem Cell Res Ther*, 4: 3.
142. Nguyễn Thị Thanh Mai, Trần Thị Hồng Hà, Ngô Diễm Ngọc và cộng sự (2015). Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến các chỉ số chất lượng của một số đơn vị máu cuống rốn được thu thập, lưu trữ tại Bệnh viện Nhi trung ương. *Tạp chí Y học Việt Nam*, số 429, tr 264-273
143. Wen SH (2012). Associations among birth weight, placental weight, gestational period and product quality indicators of umbilical cord blood units. *Transfus Apher Sci*, 46(1):39-45.
144. Sara Y. Al-Deghaither (2015). Impact of maternal and neonatal factors on parameters of hematopoietic potential in umbilical cord blood. *Saudi Med J*, Vol. 36 (6): 704-712.
145. Dulugiac M, Horeanga I, Torcatoru A, Bardas A, Matei G, Zarnescu O (2014). Factors which can influence the quality related to cell viability of the umbilical cord blood units. *Transfus Apher Sci*, 51(3):90-8
146. Hye Ryun Lee, Eun Young Song, Sue Shin, Eun Youn Roh, et al. (2014). Quality of cord blood cryopreserved for up to 5 years. *Korean Society of Hematology, Blood Research*. 49(1), 54-60.
147. Barker JN, Scaradavou A, Stevens CE (2010). Combined effect of total nucleated cell dose and HLA-match on transplant outcome in 1061 cord blood recipients with hematological malignancies. *Blood*, 115(9):1843-9.
148. B, K, Hoa, N, T, L, Hang, K, Kashiwase, J, Ohashi, L, T, Lien, T, Horie, J, Shojima, M, Hijikata, S, Sakurada, M, Satake, K, Tokunaga, T, Sasazuki and N, Keicho (2007). HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 alleles and haplotypes in the Kinh population in Vietnam, *Journal compilation* ^a 2007 Blackwell Munksgaard, 71: 127-134

149. Phan Nguyễn Thanh Vân và cộng sự (2013). Ứng dụng kỹ thuật PCR - SSO xác định các loci HLA-A, HLA - B và HLA - DRB1 của máu cuống rốn tại Bệnh Viện Truyền Máu Huyết Học. *Tạp chí y học*, tập 423, p 376 – 380.
150. Hei AL, Li W, Deng ZH, He J, Jin WM, Du D, Zhou XY, Xiao Y, Zhang ZX, Cai JP (2009). Analysis of high-resolution HLA-A, -B, -Cw, -DRB1, and -DQB1 alleles and haplotypes in 718 Chinese marrow donors based on donor-recipient confirmatory typings. *Int J Immunogenet*, 36(5):275-82
151. Park H, Lee YJ, Song EY, Park MH (2016). HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype frequencies of 10 918 Koreans from bone marrow donor registry in Korea. *Int J Immunogenet*, 43(5):287-96
152. Sergio Querol (2009). Cord blood stem cells for hematopoietic stem cell transplantation in the UK: how big should the bank be? *Haematologica*, 94(4).
153. Howard DH, Meltzer D, Kollman C, Maiers M, Logan B, Gragert L et al (2008). Use of cost-effectiveness analysis to determine inventory size for a national cord blood bank. *Med Decis Making*; 28: 243–253
154. Takanashi M (2011). A suggested total size for the cord blood banks of Japan. *Bone Marrow Transplant*. 2011 Jul;46(7):1014-5
155. Jong Hyun Yoon (2013). The minimum number of cord blood units needed for Koreans is 51,000. *Transfusion*, 54: 504-508
156. Jong Hyun Yoon (2014). Estimation of size of cord blood inventory based on high-resolution typing of HLAs. *Bone Marrow Transplantation*. *Transfusion*, 54: 1-3
157. Moninger, Jeannette (2015). The Cord Blood Banking Controversy. *Parents.com, Retrieved, 03-09*.

158. Rocha V, Crotta A, Ruggeri A, Purtill D, Boudjedir K, Herr AL, et al (2010). Double cord blood transplantation: extending the use of unrelated umbilical cord blood cells for patients with hematological diseases. *Best Pract Res Clin Haematol*, 23(2):223–9
159. Gérard Michel, Claire Galambrun, Anne Sirvent, Cecile Pochon, Benedicte Bruno, Charlotte Jubert, et al (2016). Single- vs double-unit cord blood transplantation for children and young adults with acute leukemia or myelodysplastic syndrome. *Blood*, 127:3450-3457.

CÁC PHỤ LỤC

PHỤ LỤC 1: Đơn tình nguyện và Mẫu đăng ký hiến máu dây rốn

PHỤ LỤC 2: Xác nhận sử dụng số liệu nghiên cứu

PHỤ LỤC 1



BM.SC.14.02

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc.

ĐƠN TÌNH NGUYỆN HIẾN MÁU DÂY RÓN

Kính gửi: Ngân hàng Tế bào gốc, Viện Huyết học - Truyền máu TW

Tên tôi là (chữ in hoa):.....; Sinh ngàytháng.....năm
Số CMTND/hộ chiếu: ; Ngày cấp: ; Nơi cấp:.....
Hộ khẩu thường trú:
Địa chỉ liên lạc (nơi ở hiện tại):
Số điện thoại: (NR)..... (DD) Email:

Sau khi tìm hiểu và được tư vấn đầy đủ về việc lưu giữ máu dây rốn cộng đồng của Ngân hàng Tế bào gốc thuộc Viện Huyết học - Truyền máu TW, tôi nhận thức được rằng:

1. Ngân hàng Tế bào gốc là nơi lưu giữ, cung cấp nguồn tế bào gốc để phục vụ nhu cầu điều trị của bệnh nhân; Ngân hàng thực hiện việc thu thập, xét nghiệm và phân lập tế bào gốc từ máu dây rốn để lưu giữ và cung cấp cho mục đích chăm sóc sức khỏe cộng đồng. Ngân hàng có toàn quyền trong việc sử dụng mẫu tế bào gốc từ máu dây rốn của người hiến tặng theo đúng quy định của luật pháp.

2. Nếu mẫu máu dây rốn của trẻ đủ điều kiện và được lưu giữ tại Ngân hàng, trong trường hợp chính bản thân đứa trẻ cần phải sử dụng tế bào gốc để chữa bệnh thì gia đình của trẻ sẽ được Ngân hàng ưu tiên trong việc cung cấp một mẫu tế bào gốc máu dây rốn phù hợp nhất. Khi đó, gia đình chỉ phải hoàn trả cho Ngân hàng những chi phí thực tế đã sử dụng để thu thập, xử lý, lưu giữ mẫu tế bào gốc máu dây rốn đó.

Vì vậy, tôi làm đơn này tình nguyện hiến tặng máu dây rốn của con tôi cho Ngân hàng Tế bào gốc, Viện Huyết học - Truyền máu TW. Tôi sẵn sàng cung cấp đầy đủ, trung thực các thông tin theo yêu cầu và phối hợp với Ngân hàng trong việc thu thập, xét nghiệm để máu dây rốn của con tôi có thể được lưu giữ một cách tốt nhất.

Kính mong Quý Ngân hàng tạo điều kiện cho tôi được thực hiện việc hiến tặng máu dây rốn của con tôi.

Xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày... .. tháng... .. năm... ..

Người làm đơn

(Ký và ghi rõ họ tên)



**PHIẾU ĐIỀU TRA SỨC KHỎE
NGƯỜI HIẾN MÁU DÂY RÓN TÌNH NGUYỆN**

Họ và tên mẹ của trẻ:..... Ngày sinh:.....
Địa chỉ thường trú:
CMND/Hộ chiếu: Điện thoại:.....

DÀNH CHO NGƯỜI HIẾN MÁU DÂY RÓN	
Tiền sử bệnh của mẹ	Có/Không
1. Người mẹ đã từng mắc các bệnh truyền nhiễm như viêm gan B, viêm gan C, HIV, giang mai?	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
2. Người mẹ có mắc bệnh lý bẩm sinh, di truyền (như tan máu bẩm sinh,...)	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
3. Người mẹ đã từng mắc các bệnh về máu: ung thư máu, ung thư hạch, rối loạn đông cầm máu, bệnh lý tiểu cầu,...	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
4. Người mẹ đã từng mắc các bệnh lý mạn tính: bệnh tim mạch, bệnh gan, đái tháo đường, bệnh tự miễn...	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Tiền sử sinh hoạt của mẹ	
5. Đã từng xăm mình?	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
6. Có quan hệ mại dâm, tiêm chích ma túy?	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
7. Tiêm vắc xin trong thời kỳ mang thai: Bại liệt, Rubella, sởi, quai bị.	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
8. Mắc sốt rét, dịch cúm, sởi trong thời kỳ mang thai; Thuốc điều trị nếu có:.....	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
9. Phát hiện thai có bất thường: (nêu rõ nếu có).....	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
10. Thai đang mang là thụ tinh nhân tạo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
11. Có tiền sử sảy thai từ 2 lần trở lên	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
12. Chụp phim X-quang, cắt lớp trong quá trình mang thai	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
13. Từng sinh con mắc bệnh lý bẩm sinh, di truyền, huyết học	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Tiền sử người bố	
14. Mắc các bệnh bẩm sinh, di truyền	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
15. Mắc các bệnh truyền nhiễm: viêm gan B, viêm gan C, HIV, giang mai (gạch chân bệnh cụ thể)	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

Tôi đã đọc, hiểu và trả lời trung thực những câu hỏi trên. Tôi sẵn sàng phối hợp với cán bộ y tế để thực hiện việc thu thập máu dây rốn của con tôi.

Ngày...../...../20.....
Người hiến máu dây rốn
(Ký và ghi rõ họ tên)

DÀNH CHO CÁN BỘ Y TẾ (Thông tin lấy từ bệnh án)	
Tên xét nghiệm	Kết quả
MCV > 80fl (Thể tích hồng cầu trung bình)	
Nhóm máu ABO & Rh	
Viêm gan B	
HIV	
Giang mai	
Viêm gan C	

PHỤ LỤC 2