

LIỆU PHÁP CÂY GHÉP TẾ BÀO GỐC SINH TINH TRONG BẢO TỒN KHẢ NĂNG SINH SẢN Ở BỆNH NHI NAM UNG THƯ

CNSH. Nguyễn Duy Khang, ThS. Nguyễn Hữu Duy

IVF Vạn Hạnh

BẢO TỒN KHẢ NĂNG SINH SẢN Ở BỆNH NHI NAM UNG THƯ

Với sự tiến bộ của y học, hơn 80% bệnh nhi vượt qua căn bệnh ung thư (Miller, 2016). Tuy nhiên, các phác đồ điều trị ung thư ở trẻ thường gây độc cho hệ sinh dục và gây vô sinh cho khoảng 46% bệnh nhân trưởng thành sống sót sau ung thư (Wasilewski-Masker, 2014). Trong đoàn hệ trẻ thực hiện hóa trị với tác nhân alkyl hóa, 25% bệnh nhân bị vô tinh (azoospermia) và 28% bị thiếu tinh (oligospermia), ảnh hưởng tiêu cực đến việc có con (Daniel, 2014). Vì vậy, bảo tồn khả năng sinh sản đã trở thành một mối quan tâm lớn đối với các bệnh nhi nam ung thư (Abdelaal, 2021).

Đông lạnh tinh trùng là tiêu chuẩn vàng để bảo tồn khả năng sinh sản cho nam giới trưởng thành. Tuy nhiên, thiếu sự biệt hóa mô tinh hoàn và quá trình sinh tinh ở trẻ chưa dậy thì là vấn đề chính trong việc tiếp cận các phương pháp hỗ trợ sinh sản (Oktay, 2018; Walschaert, 2018). Do đó, bảo tồn khả năng sinh sản cho các bệnh nhân này nên dựa trên hai hướng tiếp cận: (i) cấy ghép mô tinh hoàn hoặc tế bào gốc sinh tinh (spermatogonial stem cells – SSCs) trở lại tinh hoàn sau khi điều trị ung thư và (ii) sinh tinh in vitro nhằm sử dụng trong công nghệ hỗ trợ sinh sản (Oliver, 2019). Tuy nhiên, trở ngại lớn khi cấy ghép mô tinh hoàn là nguy cơ tái nhiễm tế bào ung thư do vẫn chưa thể đánh giá chính xác sự nhiễm bằng các quy trình chẩn đoán thông thường (Aliakbari, 2021). Vì thế, SSCs là một

cách tiếp cận giúp bảo tồn khả năng sinh sản và khôi phục quá trình sinh tinh một cách an toàn (Pampanini, 2020).

TẾ BÀO GỐC SINH TINH

Tế bào gốc là những tế bào chưa chuyên môn hóa, có khả năng tự làm mới thông qua quá trình nguyên phân, giúp duy trì quần thể tế bào và có tiềm năng biệt hóa thành các dòng tế bào khác trong cơ thể. Ngay từ giai đoạn sớm của phôi đã xuất hiện một dòng tế bào gốc có nhiệm vụ hình thành giao tử, là tế bào gốc sinh dục (Phan Kim Ngọc, 2009). SSCs là tế bào gốc sinh dục lưỡng bội, được tìm thấy trên màng đáy của ống sinh tinh. Dòng tế bào này có khả năng tự làm mới và biệt hóa thành tinh trùng trưởng thành (de Rooji, 2017), phục hồi quá trình sản xuất tinh trùng khi các tế bào sinh tinh tổn thương hoặc cạn kiệt (Abdelaal, 2021). Tuy nhiên, các tế bào này rất nhạy cảm với độc tính của hóa trị hoặc xạ trị. Sự suy giảm số lượng SSCs có thể được nhìn thấy ngay cả ở liều chiếu xạ thấp từ 0,1 – 0,2 Gy (Howell và Shalet, 2005).

Liệu pháp lâm sàng được đề xuất cho các bệnh nhi nam ung thư là phân lập và nuôi cấy tăng sinh in vitro SSCs từ mẫu sinh thiết tinh hoàn đông lạnh. Tiếp theo, SSCs được cấy ghép vào tinh hoàn của bệnh nhân hồi phục sau ung thư, người bị vô sinh do các phương pháp điều trị. Sau cấy ghép, SSCs sẽ hình thành các dòng tế bào tại tinh hoàn, hồi phục quá trình sinh tinh và khả năng sinh sản tự nhiên (Brinster, 2007).

Vì vậy, cấy ghép tự thân SSCs vào tinh hoàn là kỹ thuật đầy triển vọng nhằm bảo tồn và hồi phục khả năng sinh sản sau khi điều trị ung thư cho các bệnh nhi (Abdelaal, 2021; Serrano, 2022).

PHÂN LẬP TẾ BÀO GỐC SINH TINH

Trở ngại trong việc sử dụng SSCs từ mẫu sinh thiết tinh hoàn là nguy cơ nhiễm tế bào ác tính. Các khối u ác tính ở trẻ di căn qua đường máu, có nguy cơ xâm nhiễm vào tinh hoàn (Wyns, 2010). Tái nhiễm ung thư là mối quan tâm lớn đối với cấy ghép tự thân. Do đó, phân lập SSCs là một bước quan trọng cho những quy trình tiếp theo.

Để thu nhận huyền phù đơn bào, mô tinh hoàn được thủy phân bằng các enzyme ly giải protein (collagenase I hay IV, trypsin, hyaluronidase và DNase I). Tỷ lệ sống trung bình của SSCs sau thủy phân khoảng 91,07% (Liu, 2011). Sau khi tách rời từ mảnh mô, SSCs là những tế bào có dạng hình tròn hoặc bầu dục, nhân lớn và ít tế bào chất, đường kính từ 18 – 20 μm , lớn hơn hầu hết các tế bào sinh dưỡng (Phan Kim Ngọc, 2009).

Tuy nhiên, thủy phân không phải là quy trình tối ưu để chọn lọc tế bào. Phương pháp này tạo ra một hỗn hợp không đồng nhất, bao gồm các quần thể SSCs, tế bào sinh dưỡng và tế bào ung thư (Ibtisham, 2020). Do đó, nhằm giảm số lượng tế bào nhiễm, hỗn hợp tế bào sau thủy phân cần được lựa chọn thông qua một hay phối hợp các phương pháp (Hình 1).

Phương pháp nuôi cấy bám dính

Mỗi loại tế bào khác nhau có ái lực khác nhau trong việc bám vào đĩa nuôi cấy. Theo đó, tế bào sinh dưỡng có khả năng bám vào đáy đĩa nhanh hơn. Trong khi SSCs vẫn còn ở dạng huyền phù, các tế bào này được hút và cấy trên đĩa nuôi cấy thứ cấp có phủ laminin. Tỷ lệ thu hồi SSCs của phương pháp này là 80% (Sadri Ardekani, 2009).

Phương pháp Percoll

Percoll là một chất phân tách tế bào có độ thẩm thấu thấp, các tế bào có tỷ trọng khác nhau sẽ được giữ lại theo từng lớp lọc có tỷ trọng khác



n nhau. Tỷ lệ tinh sạch SSCs trong mẫu sau lọc từ phương pháp này khoảng 86,7% (Liu, 2011).

Phương pháp hoạt hóa huỳnh quang (Fluorescence Activated Cell Sorting – FACS)

FACS phân loại tế bào dựa trên đặc điểm tán xạ ánh sáng và huỳnh quang đặc trưng của mỗi loại tế bào. Trong đó, phân tử huỳnh quang được gắn với kháng thể đặc hiệu cho protein bề mặt của SSCs như OCT4. Hiệu quả sử dụng FACS để lựa chọn SSCs khoảng 87% (Liu, 2011).

Phương pháp hoạt hóa từ tính (Magnetic Activated Cell Sorting – MACS)

MACS phân tách tế bào bằng hạt nano từ tính gắn kháng thể có ái lực với kháng nguyên bề mặt SSCs như GPR125 (G-protein coupled receptor 125), ITGA6 ($\alpha 6$ Integrin), CD90. Các tế bào biểu hiện kháng nguyên liên kết với hạt nano từ tính và được giữ lại trong cột từ trường. Quần thể SSCs sau lọc có độ tinh sạch cao, khoảng 90,2% (Jingtao Guo, 2019).

NUÔI CẤY TĂNG SINH IN VITRO TẾ BÀO GỐC SINH TINH

SSCs rất khan hiếm trong tinh hoàn. Một sinh thiết tinh hoàn từ bệnh nhi khoảng 31 mg, cung cấp hơn 390.000 tế bào. Tuy nhiên, tế bào sinh tinh chỉ chiếm gần 11.700 tế bào (Wu,

2009). Mirzapour (năm 2015) đã cấy huyền phù SSCs người vào chuột suy giảm miễn dịch bị vô sinh với nồng độ từ $10,3 \times 10^6$ lên $27,4 \times 10^6$ tế bào/ml, giúp tăng khả năng xâm nhập vào ống sinh tinh. Do đó, để cải thiện khả năng thành công của liệu pháp, SSCs cần được nuôi cấy tăng sinh in vitro nhằm gia tăng số lượng.

Nuôi cấy tăng sinh SSCs in vitro đã thành công trên mô hình động vật và người, cũng như ở trẻ em (Serrano, 2022). SSCs dựa vào tín hiệu từ vi môi trường trong tinh hoàn để cân bằng quá trình sinh tinh. Do đó, cần thiết lập môi trường và phương pháp nuôi cấy in vitro tối ưu cho quá trình tự làm mới và biệt hóa (Ibtrisham, 2020). Về môi trường, môi trường nuôi cấy tế bào gốc StemPro™ bổ sung nhân tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tế bào thần kinh đệm và nhân tố tăng trưởng nguyên bào sợi 2 (Guo, 2015; Sakashita, 2018) hoặc bổ sung tế bào đồng nuôi cấy (như tế bào Sertoli) (Liu, 2011) cho thấy sự tăng sinh đáng kể của SSCs. Về phương pháp, có thể chia thành ba hệ thống.

Nuôi cấy mảnh mô

Nuôi cấy mảnh mô tinh hoàn giúp duy trì cấu trúc, khả năng tồn tại và tạo điều kiện cho tương tác giữa SSCs với tế bào sinh dưỡng, cảm ứng quá trình sinh tinh. Nuôi cấy mảnh mô tinh hoàn chưa trưởng thành có thể duy trì sự tăng sinh SSCs lên đến 139 ngày (de Michele, 2017), sản sinh tinh trùng trưởng thành có khả năng thụ tinh, cho thế hệ con khỏe mạnh ở chuột (Sato, 2011).

Nuôi cấy hai chiều

Nuôi cấy SSCs trên hỗn hợp tế bào sinh dưỡng từ tinh hoàn hoặc trên một lớp phủ bằng tế bào nuôi (nguyên bào sợi), collagen, gelatin... SSCs người được nuôi trên đĩa cấy phủ laminin gia tăng số lượng 53 lần trong 19 ngày và 18.450 lần trong 64 ngày (Sadri-Ardekani, 2009).

Nuôi cấy ba chiều

Nuôi cấy ba chiều nhằm mô phỏng lại cấu trúc và vi môi trường mô tinh hoàn in vivo, thúc đẩy tương tác tế bào – tế bào, không chỉ kích thích quá trình tự làm mới, tăng sinh mà còn

hướng sự biệt hóa của SSCs (Lee, 2006). Baert (2017) đã cấy huyền phù SSCs người lên giá thể từ mô tinh hoàn khử tế bào, giúp duy trì sự tăng sinh và khởi động quá trình giảm phân sau 8 tuần nuôi cấy. Việc sản sinh tinh tử có khả năng thụ tinh (thông qua tiêm tinh tử vào bào tương noãn) đã được báo cáo bằng cách sử dụng hệ thống 3D-MatrigelVR (Sun, 2018).

ĐÔNG LẠNH TẾ BÀO GỐC SINH TINH

Hai chiến lược bảo tồn lâu dài SSCs là đông lạnh huyền phù đơn bào và đông lạnh mô tinh hoàn. Các quy trình đông lạnh chậm tế bào và mô tinh hoàn, sử dụng dimethyl sulfoxide (0,5M – 1,5M) và sucrose (0,1M – 0,15M) làm chất bảo vệ đông lạnh, đã được phát triển (Wu, 2012; Onofre, 2020). Trong đó, đông lạnh mảnh mô tinh hoàn mang lại cho bệnh nhân nhiều lựa chọn và chiến lược điều trị tiềm năng hơn trong tương lai do bảo tồn cả tế bào Sertoli và tế bào Leydigs (Wyns, 2010). So với đông lạnh huyền phù tế bào, SSCs từ mô tinh hoàn đông lạnh có tỷ lệ sống sau rã cao hơn (83,3% so với 72,6%; $P < 0,0001$), khả năng hình thành các cụm tế bào sau cấy ghép tốt hơn ($47,6 \pm 19,2$ so với $18,5 \pm 13,0$; $P = 0,0039$) và chuột được cấy ghép sản sinh nhiều con trên mỗi lứa hơn ($2,2 \pm 0,2$ so với $0,5 \pm 0,1$; $P = 0,0008$). Mẫu đông lạnh huyền phù đơn bào có kết quả hạn chế do quá trình thủy phân bằng enzyme làm tăng sự nhạy cảm của màng tế bào trước những thay đổi lý hóa của quá trình đông lạnh, dẫn đến apoptosis. Như vậy, đông lạnh mô tinh hoàn là phương pháp tối ưu để bảo tồn lâu dài SSCs (Onofre, 2020).

Bên cạnh đó, đông lạnh không ảnh hưởng đến sự ổn định, bất thường nhiễm sắc thể hoặc sai khác về sự methyl hóa DNA (Oblette, 2019). Cấy ghép SSCs được đông lạnh trong hơn 14 năm cũng phục hồi quá trình sản xuất tinh trùng ở chuột (Wu, 2012). Qua đó cho thấy, chức năng của SSCs không bị ảnh hưởng bởi quá trình đông lạnh.

TÍNH KHẢ THI VÀ AN TOÀN CỦA CÂY GHEP TẾ BÀO GỐC SINH TINH

Hiện tại, các chiến lược kể trên đều trong giai đoạn nghiên cứu tiền lâm sàng trên mô hình động vật. Tính đến năm 2019, có 1.033 mẫu mô tinh hoàn từ bệnh nhi ung thư đã được thu nhận, tăng 4 lần so với năm 2012. Sự gia tăng này cho thấy nỗ lực của các trung tâm hỗ trợ sinh sản và triển vọng của liệu pháp này cho các bệnh nhi nam ung thư (Goossens, 2020).

Cây ghép SSCs và hồi phục khả năng sinh sản đã thành công trên chuột bị vô sinh từ năm 1994 (Brinster, 1994). SSCs được cấy ghép vào ống sinh tinh có khả năng di chuyển vào các kẽ trong tinh hoàn, về các ổ tế bào gốc, nơi chúng được cảm ứng và khởi động quá trình sinh tinh (Sadri-Ardekani, 2011). Hermann (2012) đã quan sát thấy sự hiện diện trong mẫu xuất tinh của tinh trùng trưởng thành có khả năng thụ tinh (thông qua phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn). Cho thấy, quá trình sinh tinh và sự biệt hóa tinh trùng có chức năng được hồi phục khi cấy ghép SSCs. Ngoài ra, nếu bệnh ung thư hoặc việc điều trị có tác động tiêu cực đến vi môi trường trong ống sinh tinh. Trong những trường hợp này, cấy ghép SSCs cùng với các tế bào kẽ có thể cải thiện hiệu quả hồi phục khả năng sinh sản (Shetty, 2018).

SSCs mang thông tin di truyền cho thế hệ sau. Do đó, việc cấy ghép lâm sàng phải đảm bảo tính ổn định và an toàn của tế bào nuôi cấy (Serrano, 2022). Nghiên cứu của Nickkholgh (2014) cho thấy sự ổn định di truyền của SSCs sau quá trình nuôi cấy kéo dài mặc dù có những thay đổi về trạng thái methyl hóa. Bên cạnh đó, việc cấy ghép SSCs người được nuôi cấy không dẫn đến hình thành khối u trong tinh hoàn (Nickkholgh, 2014) hay giảm tuổi thọ ở chuột trải qua cấy ghép (Mulder, 2018). Thế hệ con được sinh ra từ thai tự nhiên ở chuột cấy ghép SSCs không bị bất thường bẩm sinh, bất thường trong quá trình phát triển hay mắc các vấn đề về tim mạch và tỷ lệ mắc bệnh lý, tuổi thọ tương

đương so với chuột đối chứng (Serrano, 2022). Mặt khác, nguy cơ nhiễm tế bào ung thư cần được quan tâm. Hiện tại, việc khôi phục khả năng sinh sản ở các bệnh nhân bị di căn hạn chế do thiếu các dấu hiệu cần thiết để xác định nguy cơ nhiễm tế bào ung thư và phương pháp phân lập chính xác quần thể SSCs (Pampanini, 2020).

KẾT LUẬN

Điều trị ung thư có thể dẫn đến suy tuyến sinh dục và vô sinh ở trẻ em nam. Bảo tồn khả năng sinh sản ở nhóm bệnh nhân này dựa trên việc sinh thiết mô tinh hoàn chưa trưởng thành. Trong khi cấy ghép mô tinh hoàn đối mặt với nguy cơ nhiễm tế bào ác tính, việc cấy ghép SSCs mang lại tiềm năng phục hồi khả năng sinh sản tự nhiên một cách lâu dài (Wyns, 2010). Do đó, SSCs là lựa chọn tốt để bảo tồn và hồi phục khả năng sinh sản.

Để bảo tồn lâu dài SSCs, đông lạnh mô tinh hoàn là lựa chọn được ưu tiên do khả năng sống sau rã cao hơn và hoạt động chức năng của tế bào hiệu quả hơn. Sau khi bệnh ung thư được điều trị, các mẫu SSCs đông lạnh được rã đông, phân lập, nuôi cấy tăng sinh và cấy ghép trở lại vào ống sinh tinh. Qua các nghiên cứu tiền lâm sàng, việc nuôi cấy và cấy ghép SSC không ảnh hưởng đến sức khỏe của người được cấy ghép và thế hệ con. Như vậy, cấy ghép SSCs là một liệu pháp đầy tiềm năng nhằm bảo tồn khả năng sinh sản và mang lại khả năng có thai tự nhiên cho các bệnh nhi ung thư.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wyns, C., Curaba, M., Vanabelle, B., và cộng sự (2010). Options for fertility preservation in prepubertal boys. *Human reproduction update*, 16(3), 312-328
2. Liu S., Tang Z., Xiong T. và cộng sự (2011), "Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells". 9 (1), pp. 1-9
3. Onofre J., Kadam P., Baert Y. và cộng sự (2020), "Testicular tissue cryopreservation is the preferred method to preserve spermatogonial stem cells prior to transplantation", *Reproductive BioMedicine Online*. 40 (2), pp. 261-269
4. Goossens E., Jahnukainen K., Mitchell R. và cộng sự (2020), "Fertility preservation in boys: recent developments and new insights". 2020 (3), pp. hoaa016
5. Ibtisham F., Honaramooz A. J. C. (2020), "Spermatogonial stem cells for in vitro spermatogenesis and in vivo restoration of fertility". 9 (3), pp. 745
6. Abdelaal N. E., Tanga B. M., Abdelgawad M. và cộng sự (2021), "Cellular Therapy via Spermatogonial Stem Cells for Treating Impaired Spermatogenesis, Non-Obstructive Azoospermia", *Cells*. 10 (7), pp. 1779.
7. Serrano J. B., Meißner A., van Pelt A. M. và cộng sự (2022), "Fathering a child after childhood cancer treatments". 12 (2), pp. 65-70