

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tế bào gốc (TBG) là những tế bào chưa biệt hóa, không có chức năng chuyên biệt nhưng có tiềm năng biệt hóa cao. Tùy theo nguồn gốc mà chúng có khả năng biệt hóa thành bất kỳ dòng tế bào mong muốn nào phụ thuộc vào điều kiện của môi trường nuôi cấy. Do có những đặc tính quan trọng này mà tế bào gốc trở thành một lĩnh vực đầy hứa hẹn trong việc cung cấp nguồn tế bào cho điều trị các bệnh khiếm khuyết về mô, tế bào. Kể cả khiếm khuyết về chức năng cũng như hình thái.

TBG có nhiều loại và có thể tìm thấy ở nhiều cơ quan, tổ chức khác nhau của người trưởng thành, kể cả trong phôi, bào thai. Tùy theo mục đích sử dụng điều trị, TBG được thu gom chiết tách từ những nguồn đã được lựa chọn một cách thích hợp. Trong nhiều phương pháp điều trị bằng TBG thì một trong những nguồn cung cấp TBG thường được lựa chọn là tủy xương. Tủy xương là một tổ chức có chứa nhiều loại TBG với khả năng tăng sinh, biệt hóa khác nhau và có thể thu gom tương đối dễ dàng và an toàn [1].

Tổn thương xương, khớp là tổn thương thường gặp do nhiều nguyên nhân gây nên, diễn biến phức tạp, điều trị không đơn giản. Từ hàng nghìn năm trước con người đã biết tìm nhiều cách phục hồi các thiếu hụt về xương nhằm duy trì các chức năng vận động của cơ thể. Các phẫu thuật ghép xương tự thân, ghép xương đồng loại, ghép các vật liệu thay thế xương, thậm chí đang có nhiều công trình nghiên cứu ghép xương dị loài đều nhằm điều trị các bệnh thiếu hụt xương. Các phương pháp trên tuy đã mang lại nhiều tiến bộ trong y học, song mỗi phương pháp đều có những nhược điểm khó khắc phục.

Một số nghiên cứu tại Mỹ cho thấy có đến 5% các bệnh lý về xương không thể chữa liền bằng các phương pháp điều trị thông thường và họ đã hướng đến liệu pháp tế bào gốc [2].

Nuôi cấy làm tăng số lượng tế bào, biệt hóa để có các dòng tế bào trực tiếp gắn với mục đích điều trị. Bảo quản tế bào với mục tiêu tế bào phải được cất giữ nguyên vẹn theo thời gian nhằm lưu trữ, chủ động sử dụng sau này. Đây là hướng nghiên cứu có ý nghĩa thực tiễn hiện đang được nhiều tác giả tiến hành trên thế giới cũng như ở Việt Nam.

Hiện nay tại cơ sở nghiên cứu, hàng ngày chúng tôi cung cấp mô xương cho hàng chục bệnh nhân để ghép. Nhằm mục đích kết hợp áp dụng công nghệ tế bào gốc với công nghệ ghép mô xương mà mục tiêu trước mắt là xây dựng được các quy trình phân lập, nuôi cấy, biệt hóa, bước đầu đánh giá khả năng tạo xương trên thực nghiệm và bảo quản dòng tế bào này, chúng tôi tiến hành đề tài: "**Nghiên cứu thực nghiệm áp dụng quy trình nuôi cấy và bảo quản tạo cốt bào biệt hóa từ tế bào gốc trung mô tủy xương**". Đề tài gồm **2 mục tiêu:**

- 1. Tách chiết phân lập, nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc trung mô tủy xương thỏ.*
- 2. Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tạo cốt bào và bảo quản sau biệt hóa.*

Chương 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU

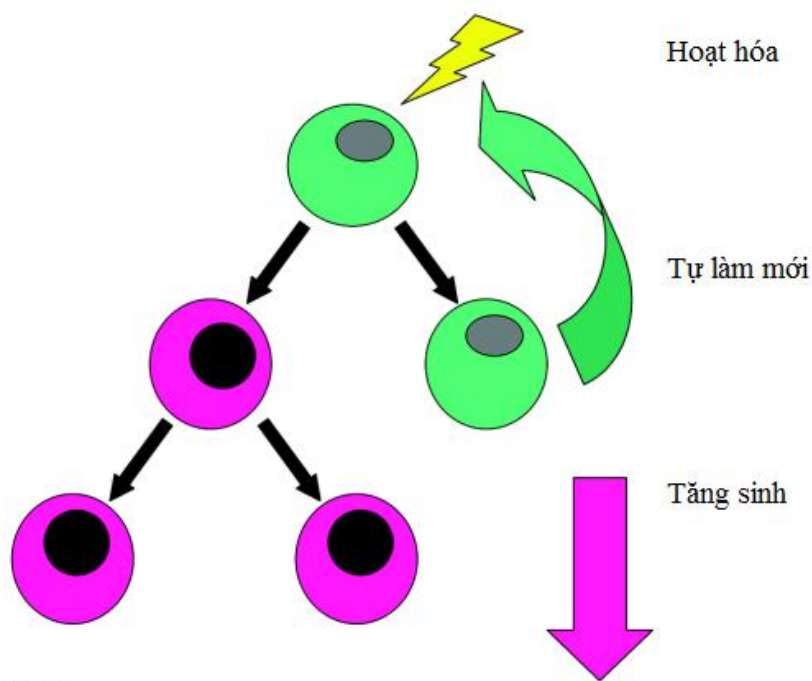
1.1.Đại cương về tế bào gốc

1.1.1. Khái niệm về tế bào gốc

Tế bào gốc là những tế bào chưa biệt hóa, chúng có khả năng biệt hóa thành các kiểu tế bào chức năng. Chúng có vai trò như hệ thống sửa chữa mô, tạo ra những tế bào khác hoạt động bình thường trên cơ thể sinh vật.

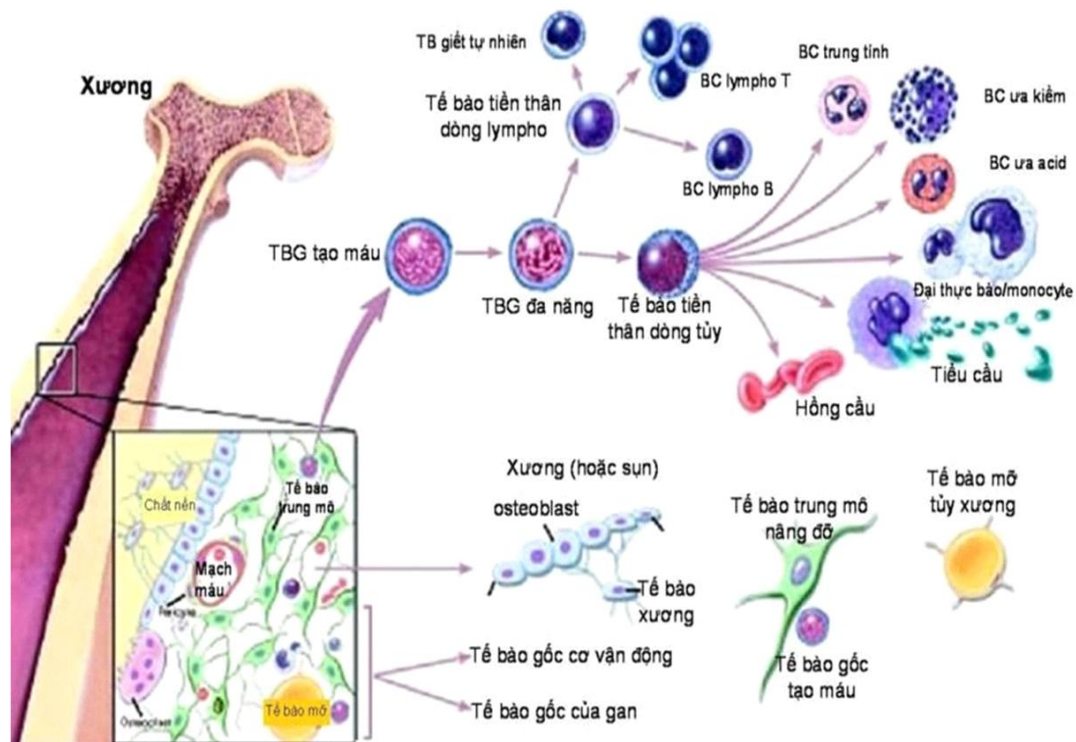
Một tế bào gốc có ít nhất hai đặc tính dưới đây:

Tính tự làm mới: tế bào đó có khả năng tiến hành một số lượng lớn chu kỳ phân bào, mà vẫn duy trì trạng thái không biệt hóa. Tế bào gốc trong bất cứ mô nào cũng có một quần thể có khả năng tự làm mới [3],[4],[5].



Hình 1.1. Khả năng tự làm mới của tế bào gốc [5]

Tính biệt hóa: Là quá trình trong đó một tế bào chưa biệt hóa trở thành tế bào chuyên hóa về chức năng. Trong suốt quá trình biệt hóa, do sự điều hòa biểu hiện gen, một số gen nhất định được biệt hóa trong khi những gen khác bị bất hoạt dẫn đến các tế bào được biệt hóa phát triển những cấu trúc đặc hiệu và thực hiện những chức năng nhất định [5],[6],[7].

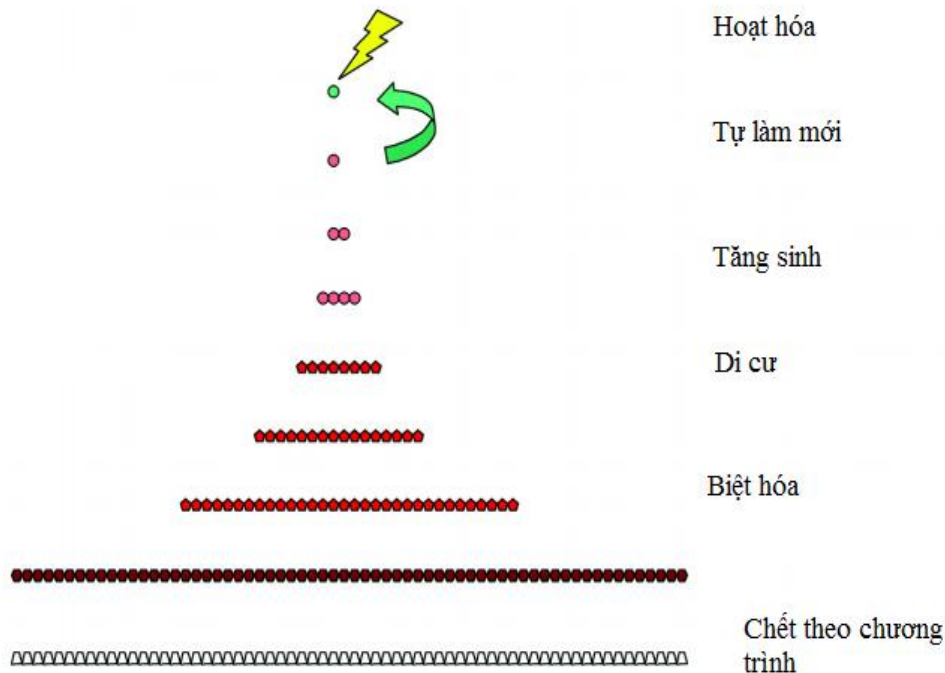


Hình 1.2. Khả năng biệt hóa tế bào gốc tạo máu và tế bào gốc trung mô trong tủy xương.

(Nguồn © 2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk stemcells.nih.gov)

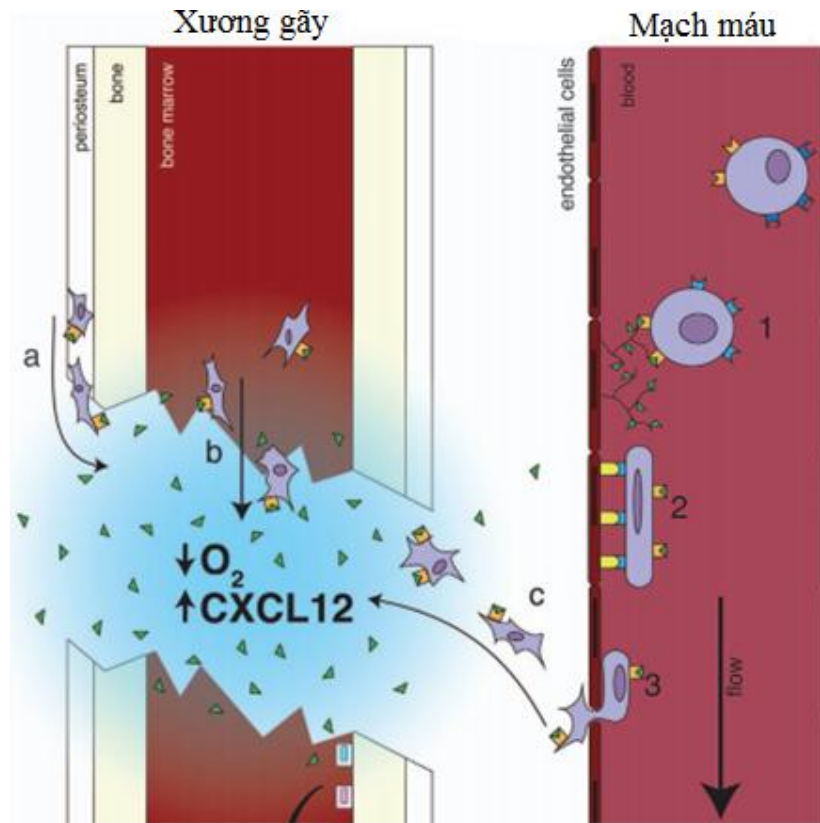
1.1.2. Hoạt động của tế bào gốc

Hiểu biết chu kỳ sống và những yếu tố có thể ảnh hưởng đến hoạt động của tế bào gốc và tế bào tiền thân rất quan trọng. Chu kỳ sống của tế bào gốc hoặc tiền thân là một quá trình được điều hòa bởi 5 hoạt động cơ bản: hoạt hóa, phân chia, di cư, biệt hóa và hoạt động chức năng [5] (Hình 1.3)



Hình 1.3. Quá trình hoạt động tế bào gốc [5]

Quá trình hoạt hóa tế bào gốc và tế bào tiền thân từ tủy xương và các nguồn mô khác chịu ảnh hưởng bởi yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc tiểu cầu (platelet-derived growth factor -PDGF), và yếu tố tăng trưởng biểu bì (epidermal growth factor -EGF) để cảm ứng và duy trì phát triển quần thể tế bào tiền thân từ các tế bào tủy xương. Khi quá trình hoạt hóa xảy ra có những bằng chứng cho thấy EGF, PDGF, yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (fibroblast growth factor-2; FGF-2), yếu tố phát triển nội mô mạch (vascular endothelial growth factor receptor-2; VEGF) tăng và giảm nồng độ oxy máu [8],[9]. Trong trường hợp bệnh lý, mô tổn thương hay đáp ứng với các kích thích sinh lý thì sự huy động tế bào gốc tới nơi tổn thương tăng lên. Chẳng hạn khi gãy xương nồng độ oxy tại đó giảm, làm tăng chemokines CXCL2 dẫn đến tăng sự di cư tế bào gốc mô xương ở màng xương và tủy xương đến vùng tổn thương [10] (Hình 1.4).



Hình 1.4. Sự di cư của tế bào gốc tại vùng gãy xương [10].

Sự di chuyển của tế bào gốc tại vết thương rất quan trọng đối với quá trình hoạt hóa tại mô. Quá trình di chuyển thường diễn ra thuận lợi bởi nhiều cytokine và phụ thuộc vào khả năng chất nền hoặc chất đệm mà tế bào có thể gắn vào và di chuyển. Chất đệm có thể là khối fibrin, chất đệm ngoại bào, hoặc vật liệu hydroxyapatite (HA) hoặc ceramic. Nói chung, sự huy động tế bào đòi hỏi một chuỗi các sự kiện phối hợp với nhau, đó là tín hiệu hóa ứng động, tín hiệu giúp tế bào di cư.

Sự biệt hóa tế bào chịu ảnh hưởng bởi những yếu tố sinh học quan trọng là áp lực oxy, độ pH của dịch kẽ, dinh dưỡng và các tác nhân kích thích cơ học cũng như bởi thành phần hóa học của chất nền xung quanh.

Chết theo chương trình (apoptosis) là một quá trình quan trọng trong phát triển, tái tạo và đổi mới mô. Tế bào gốc nhạy cảm với những tín hiệu có thể cảm ứng quá trình chết theo chương trình suốt chu kỳ sống của chúng [5].

1.1.3. Phân loại tế bào gốc (theo cách thức tạo ra tế bào gốc)

- Tế bào gốc phôi (*embryonic stem cell*)

Tế bào gốc phôi được thu nhận trực tiếp từ phôi (embryo) của người và động vật có vú, chúng có tiềm năng biệt hóa lớn nhất. Nhóm này gồm các tế bào được thu nhận từ mầm phôi giai đoạn phôi nang.

- Tế bào gốc trưởng thành (*Adult stem cell*)

Tế bào gốc trưởng thành được thu nhận từ cơ thể trưởng thành. Ngày càng phát hiện có nhiều tế bào gốc trưởng thành, trong đó tế bào gốc tủy xương được biết rõ hơn cả. Tủy xương là nơi có nhiều tế bào gốc tạo máu, đó là nguồn quan trọng trong cơ chế điều hòa số lượng tế bào máu. Ngoài tế bào gốc tạo máu, tủy xương còn được biết như là một trong các mô có chứa nguồn tế bào trung mô. Nguồn tế bào này có tính linh hoạt cao, chúng có thể biệt hóa hay chuyển biệt hóa thành nhiều kiểu tế bào chức năng khác nhau.

Một nguồn thu nhận tế bào gốc nữa là từ thai, mô cuống rốn, máu cuống rốn, nhau thai, dịch ối, biểu mô dây rốn. Nguồn tế bào gốc thu từ phần bỏ sau khi sinh như máu cuống rốn, nước ối hay rau thai chủ yếu là tế bào gốc tạo máu và tế bào gốc trung mô. Những tế bào gốc này không đủ đặc điểm tế bào gốc phôi nên có thể xếp chúng vào nhóm tế bào gốc ở cơ thể trưởng thành.

- Tế bào gốc nhân tạo (*tế bào gốc vạn năng cảm ứng*)

Đây là tế bào gốc do chính con người tạo ra nhờ kỹ thuật thao tác gen, thuật ngữ chính xác để chỉ tế bào này là “tế bào gốc vạn năng cảm ứng” (induced Pluripotent stem cell- iPS). Về nguyên tắc bất kỳ tế bào sinh dưỡng

nào đều có thể trở thành iPS, nhờ chúng được cảm ứng bằng phương pháp chuyển gen in vitro. Khi được kích hoạt, các tế bào sinh dưỡng sẽ khởi động cơ chế tái thiết lập chương trình bộ gene hay sự khử biệt hóa [2].

1.2. Tế bào gốc của tủy xương

Tế bào gốc của tủy xương (TBGTX) đã được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi [1],[11]. Tủy xương là nơi cư trú của một hỗn hợp các TBG có khả năng tái tạo và biệt hóa khác nhau: TBG tạo máu (hemopoietic stem cell- HSC) [1],[11],[12], tế bào gốc trung mô (mesenchymal stem cell - MSC) [13],[14], tế bào tiền thân nội mạc (Endothelial stem/progenitor cells- EPC) [15], ngoài ra còn có một số loại TBG khác hiếm gặp hơn và sự tồn tại của chúng vẫn còn đang gây tranh cãi như quần thể tế bào phụ (Side population-SP)... Trong số đó, TBG tạo máu và tế bào gốc trung mô đã được nghiên cứu ứng dụng rộng rãi.

Các TBG của tủy xương trước hết đều mang đặc tính chung của TBG đồng thời có những đặc tính riêng, chuyên biệt cho từng loại TBG. Khả năng biệt hóa và tính linh hoạt của chúng là cơ sở cho liệu pháp điều trị bằng TBG của tủy xương, chúng có thể được sử dụng để tái tạo nhiều cơ quan, tổ chức khác nhau: cơ, xương, sụn, cơ tim...[1],[14],[15].

1.2.1. Tế bào gốc trung mô (MSC)

Trong tủy xương MSC cũng như những tế bào của tổ chức đệm không trực tiếp nhưng gián tiếp tham gia vào tạo máu bằng cách tạo ra vi môi thích hợp cho tạo máu. MSC tăng sinh và giữ được kiểu hình không biệt hóa qua nhiều lần cấy chuyển. MSC có khả năng tăng sinh cao, với 35 lần nhân đôi in vitro [16]. Dưới tác dụng của chất gây phân bào như PDGF (platelet –derived growth factor), EGF (epidermal growth factor), bFGF (basic fibroblast growth

factor) và IGF-1 (insulin –like growth factor-1) [17], MSC tăng sinh mà vẫn giữ được trạng thái không biệt hóa (xem ở mục 1.2).

1.2.1.1. Đặc điểm chung của tế bào gốc trung mô

Friedenstein AJ (1976) đã mô tả tế bào gốc trung mô là tế bào bám bề mặt đĩa nuôi và có khả năng tạo cụm (colony forming unit-fibroblast: CFU-F) và chúng có khả năng tự làm mới của tế bào gốc và khả năng tái tạo mô xương. MSC được coi là tế bào gốc trung mô hay những nguyên bào trung mô bởi vì những tế bào này có khả năng biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác trong cơ thể [18],[19]. Theo Simmon PJ (1987) còn gọi chúng là tế bào nền tủy xương bởi vì chúng dường như được phát sinh từ những cấu trúc chống đỡ trong tủy xương cũng như chúng hoạt động như những lớp cung cấp chất dinh dưỡng cho sự tăng trưởng những tế bào gốc của mô tạo máu [20].

MSC là quần thể tế bào gốc (có khả năng tự làm mới và khả năng biệt hóa thành nhiều dòng tế bào) nhưng liệu rằng đặc tính gốc này có hay không khi ở dạng tế bào đơn. Bonet D (2007) và cộng sự đã chứng minh tế bào đơn từ quần thể MSC tủy xương chuột biểu hiện kháng nguyên đặc biệt của phôi, từng tế bào có khả năng biệt hóa trong điều kiện *invivo*, do vậy chúng thực sự mang đặc điểm tế bào gốc [21].

Trong thời gian gần đây người ta đề xuất thuật ngữ tế bào nền trung mô đa tiềm năng để mô tả các tế bào có khả năng bám vào bề mặt plastic khi nuôi cấy *in vitro* và có hình dáng giống nguyên bào sợi. Các nghiên cứu cho thấy các tế bào đa tiềm năng không chỉ biệt hóa thành dòng trung mô mà còn biệt hóa thành các dòng nội bì và ngoại bì thần kinh bao gồm tế bào thần kinh, tế bào gan, tế bào tụy [22],[23]. Các tế bào gốc đa tiềm năng được hiểu với nhiều tên gọi như tế bào tiền thân trưởng thành đa tiềm năng (multipotent adult progenitor cells- MAPCs), tế bào gốc đa tiềm năng từ tủy xương (Bone

marrow- derived multipotent stem cell- BMSCs), tế bào có thể cảm ứng đa tiềm năng từ tủy xương (marrow-isolated adult multilineage inducible cells- MIAMIs) hoặc là tế bào gốc giống tế bào gốc phôi rất nhỏ (very small embryonic-like stem cell- VSELs) [24].

MSC có hình thoi hoặc hình sao, ở mức độ vi thể rất khó phân biệt với nguyên bào sợi. Đặc điểm siêu cấu trúc của chúng là nhân tế bào chứa khối nhiễm sắc thể, bào tương nghèo nà, chứa ít ti thể và lưới nội bào [25].

Đầu tiên MSC được phát hiện từ quần thể các tế bào tủy xương. Ở đó, MSC chỉ chiếm 0.001% đến 0.01% tổng số tế bào có nhân [26]. Ngày nay, người ta có thể phân lập các tế bào này từ nhiều mô của cơ thể trưởng thành như: máu tuần hoàn, máu dây rốn, trung mô dây rốn, tủy xương, mô mỡ, gan, lách, dịch ối...nhưng tủy xương vẫn được coi là nguồn cung cấp chủ yếu MSC.

1.2.1.2. Marker tế bào gốc trung mô

Sự xác định các protein bề mặt đặc hiệu tế bào nhằm mục tiêu mô tả nhận biết một loại tế bào nào đó. Có rất nhiều nghiên cứu về marker bề mặt của tế bào gốc trung mô: CD105 hay (SH2), CD73(SH3, SH4), CD90 (Thy-1), Stro-1. Thụ thể mạng lưới gian bào $\alpha 1$ integrin (CD49a), $\alpha 2$ integrin (CD49b), $\alpha 3$ integrin (CD49c), $\alpha 5$ integrin (CD49e), $\alpha 6$ integrin (CD49f), αV integrin (CD51), $\beta 1$ integrin (CD29), $\beta 3$ integrin (CD61), $\beta 4$ integrin (CD104), ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), VCAM-1(CD106), LFA-3 (CD58), CD72, ALCAM (CD166), HLA-1 [26],[27],[28].

MSC ở tủy xương gồm 2 marker SH2 (CD105) và SH3 (CD73). Những nghiên cứu sau đó cho thấy kháng thể CD105 gắn vào endoglin, nằm trên bề mặt tế bào và là thành phần của phức hợp receptor TGF- β , thấy trên các mô trung mô và trên các tế bào nội mô, đại thực bào, là protein nặng 92kDa. Thêm

vào đó là các kháng thể CD73 là ecto-5'-nucleotidase là một enzym nằm trên bề mặt tế bào. CD29 (intergrin $\beta 1$) được biết vai trò tương tác với các tế bào đệm tủy, sự di cư của MSC và khả năng miễn dịch [28],[29],[30],[31].

CD90 (Thy 1) là một marker của MSC, chúng biểu hiện trong tế bào gốc trung mô tủy xương, mô mỡ [32].

CD44 là receptor hyaluronan có vai trò sự di cư của tế bào trung mô ở chất nền ngoại bào. CD44 là một trong những marker biểu hiện trên bề mặt MSC và biểu hiện trong hầu hết quần thể MSC [33].

Kháng thể STRO-1 rất tốt cho việc xác định, chọn lọc dương tính MSC trong tủy xương. STRO-1 được sử dụng để tách cụm tế bào CFU-F từ tủy xương và các tế bào chọn lọc STRO-1 cũng biểu hiện phát triển thành xương, sụn, mỡ và các tế bào hỗ trợ quá trình tạo máu. Không như kháng thể khác, STRO-1 có thể sử dụng không chỉ để nhuộm và xác định các đặc tính của MSC mà còn cho quá trình tách tế bào bằng các hạt từ tính gắn kháng thể [34].

MSC có rất nhiều các marker nhưng không có marker nào là đặc hiệu cho quần thể MSC. Theo tác giả Dominici và CS năm (2006) đưa ra tiêu chuẩn tối thiểu về tế bào gốc trung mô - theo ủy ban tế bào gốc và trung mô của hiệp hội trị liệu tế bào (Committee of International Society for Cellular Therapy-ISCT). Gồm 3 tiêu chuẩn: khả năng bám dính của MSC trên bề mặt nhựa nuôi cấy, biểu hiện kháng nguyên đặc hiệu (Bảng 1.1) và khả năng biệt hóa in vitro thành osteoblasts, adipocyte và chondroblast [35].

Bảng 1.1. Các marker của tế bào gốc trung mô người

Marker dương tính (>90%)	Marker âm tính ($\leq 2\%$)
CD 105, CD73, CD90	CD45, CD34, CD14 hoặc CD11b, Cd79 α hoặc CD19, HLA-DR

Tuy nhiên, marker của MSC ở trên người và thỏ không hoàn toàn giống nhau. Một số marker hay được nghiên cứu trên thỏ như bảng dưới đây.

Bảng 1.2. Các marker của tế bào gốc trung mô thỏ

Marker Tác giả	CD29	CD44	CD90	CD105	CD14	CD34	CD45
Gu S(2009)	+					-	
Lee TH (2013)	-	+	-		-		-
Tan SL (2013)	+	+	+			-	-
Lee TC (2014)	-	+	-	-	-	-	-
Jin L (2014)	+	+				-	-

1.2.2. Tế bào gốc tạo máu

Tất cả các tế bào tạo máu đều có nguồn gốc từ HSC đa tiềm năng. HSC có khả năng tự làm mới và biệt hóa thành tất cả các dòng tạo máu. Dạng HSC-sớm phát triển thành tế bào gốc giới hạn về tiềm năng và khả năng tự làm mới. Qua sự biệt hóa tiếp theo, các tế bào này trở thành tế bào tiền thân, chúng có khả năng tăng sinh và trưởng thành thành một dòng tế bào chức năng [13],[36],[37]. HSC ở người trưởng thành được sản sinh và cư trú chủ yếu tại tủy xương. Chúng có thể được huy động và có mặt trong máu ngoại vi, nhưng trong các mô khác (gan, lách) thì rất hiếm. Trong tủy xương khoảng 10.000-15.000 tế bào có nhân mới có một HSC thực thụ, còn ở máu ngoại vi khoảng 100.000 bạch cầu mới có một HSC. Quần thể HSC này đặc trưng bởi dấu ấn kháng nguyên bề mặt CD 34 và một số kháng nguyên khác chỉ có ở tế bào máu, như CD38, CD59, HLA-DR và CD133 [36].

1.2.3. Tế bào tiền thân nội mô

Tế bào tiền thân nội mô (Endothelial Progenitor cell-EPC) còn gọi là tế bào gốc nội mô (Endothelial stem cell). Các tế bào này cùng với HSC và

MSC có mặt trong tập hợp tế bào đơn nhân tủy xương. Ngoài ra, còn phân lập được EPC từ máu ngoại vi, máu dây rốn, có một số marker bề mặt như CD34, VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor-2), Flk-1 và CD309.

1.3. Nuôi cấy, biệt hóa tế bào gốc trung mô

1.3.1. Phân lập tế bào gốc trung mô

Khối tế bào gốc tủy xương dễ dàng phân lập bằng phương pháp ly tâm theo tỷ trọng tế bào sử dụng Ficoll hoặc Percoll. Những tế bào sẽ lắng ở một lớp trong gradien tỷ trọng có tỷ trọng tương ứng với tỷ trọng của nó. Khối tế bào gốc thu được sẽ nằm trên lớp Ficoll và dưới lớp huyết tương [38],[39].

Phân lập mới chỉ tạo ra một khối tế bào gốc trong đó có tế bào gốc trung mô tủy xương. Trong khối này chứa một lượng không nhỏ các tế bào thuộc các dòng tế bào tạo máu. Nuôi cấy có mục tiêu chính là tiếp tục loại bỏ tế bào máu và lưu giữ các MSC. Trong môi trường nuôi cấy có mật độ huyết thanh thấp không phù hợp cho các tế bào máu và do vậy có tác dụng loại bỏ các tế bào này, chỉ còn lại tế bào bám đĩa plastic và có hình dạng giống nguyên bào sợi gọi là MSC [39],[40].

Gần đây, nhiều nhà khoa học đã xác minh và nghiên cứu về loại tế bào này. Những kết quả thu được xác minh chắc chắn rằng những tế bào gốc trung mô được phân lập nhờ tính bám dính của chúng trên nền đĩa nuôi là những tế bào giàu tiềm năng. Tương tự tế bào gốc tạo máu, tế bào gốc trung mô có khả năng gián phân và tự làm mới. Những tế bào nền tủy xương thỏ đã được chứng minh có khả năng nhân đôi 20-30 lần trong nuôi cấy vẫn tiếp tục tạo xương ở in vivo sau khi cấy ghép [41].

1.3.2. Nuôi cấy tế bào gốc trung mô

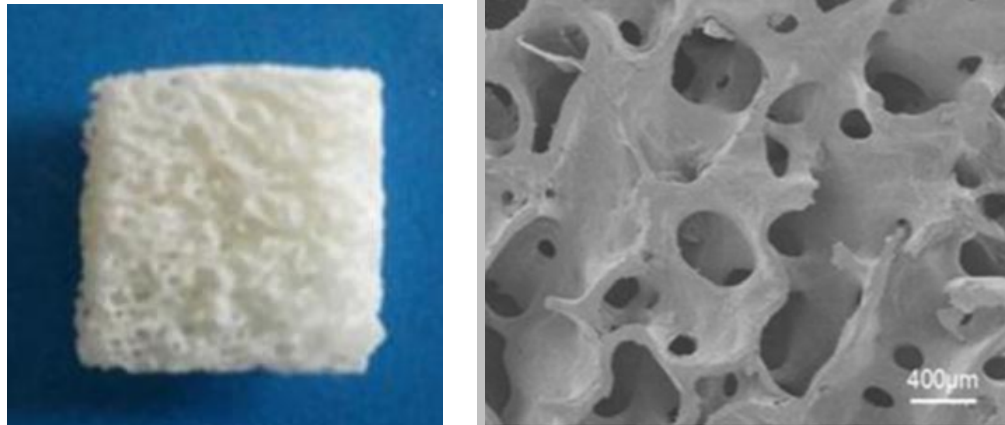
1.3.2.1. Điều kiện nuôi cấy

Khả năng tăng sinh và phát triển của tế bào gốc trung mô phụ thuộc hoàn toàn vào điều kiện nuôi cấy ngoài cơ thể. Có 4 yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của tế bào:

- Giá thể nuôi cấy
- Thành phần hoá lí và sinh lí của môi trường nuôi cấy
- Thành phần pha khí
- Nhiệt độ tối ưu khi nuôi cấy

❖ *Giá thể nuôi cấy*

Giá thể nuôi cấy tế bào là một trong những điều kiện quan trọng để tế bào phát triển. Giá thể hay vật mang tế bào còn mang đến sự phù hợp cho các mục đích sử dụng khác nhau. Theo Phan Kim Ngọc, vì tế bào động vật không có vách như tế bào thực vật và vi sinh vật nên chúng cần một giá thể để có thể trải rộng ra trong suốt quá trình tăng sinh. Các giá thể thông thường bao gồm đĩa, bình nuôi bằng nhựa được sử dụng phổ biến, chúng có hai ưu điểm: (1) giá thể có bề mặt phù hợp cho tế bào gắn bám và thấm được CO₂ và O₂; (2) bề mặt bằng nhựa mỏng, thích hợp cho việc quan sát tế bào dưới kính hiển vi quang học hay điện tử. Tuy nhiên nuôi cấy hai chiều có những mặt hạn chế như khó tạo ra mô giống cơ thể. Ngày nay các nhiều công trình khoa học về tế bào gốc đang tập trung nghiên cứu giá thể. Ngoài tìm kiếm chất liệu, hình dạng, đặc biệt là tạo ra các hình khối, không gian ba chiều để nuôi cấy, tăng sinh tế bào gốc tiến tới tạo ra được các bộ phận của cơ thể cũng là mục tiêu trong tương lai.



Hình 1.5. Sử dụng giá thể là xương xốp, tế bào có thể phát triển, tăng sinh để tạo ra sinh khối mang tế bào[42]

❖ **Môi trường nuôi cấy**

Thành phần của môi trường chủ yếu gồm muối vô cơ, các amino acid, carbohydrate, vitamin, axit béo, lipid, huyết thanh.

Môi trường dùng để nuôi cấy tế bào MSC thông thường là MEM hoặc DMEM có bổ sung huyết thanh bào thai bò (FBS) để tăng sinh và duy trì tiềm năng biệt hóa cho tế bào.

Đa số các tế bào được nuôi cấy với môi trường tổng hợp có bổ sung 5-10% huyết thanh. Trên thực tế sử dụng ngay cả môi trường cơ bản vẫn thường phải bổ sung huyết thanh, hay những dịch chiết sinh học phức tạp (dịch chiết mô, huyết tương...), các nhân tố tăng trưởng, các hormone [43][44].

Bảng 1.3. Môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô của một số tác giả

Tác giả	Môi trường cơ bản	Nồng độ FBS và yếu tố bổ sung khác	Kháng sinh
Nadri S (2007)	DMEM	15% FBS, 2mM L-glutamine	100u/ml penicillin, 100u streptomycin
ShahdadfarA (2005)	DMEMF12	20% FBS	1% kháng sinh-kháng nấm
Tan SL (2013)	DMEM-LG	10% FBS, 200mM glutamax	1% kháng sinh
Meuleman N (2006)	α -MEM	15% FBS, 2mM L-glutamine	0,5% kháng sinh-kháng nấm

pH: Môi trường nuôi cấy quá acid hay base sẽ làm giảm sự phát triển tế bào. Do vậy kiểm soát pH là cần thiết để tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH 7,0- 7,4 bởi hầu hết tế bào sống trong môi trường có ngưỡng pH 6,5- 7,8.

❖ **Các pha khí:**

Ba loại khí cần quan tâm: CO₂, O₂, N₂. Tỷ lệ của chúng được phối trộn thích hợp theo các chương trình thiết kế sẵn của tủ nuôi, nhờ đó các phân áp khí được tạo ra thích ứng với đặc điểm sinh lý của tế bào và mô sống.

Tất cả các tế bào đều cần có O₂ cho sự chuyển hóa. O₂ có vai trò quan trọng trong sinh trưởng, tăng sinh và biệt hóa tế bào.

Tác động của CO₂ lên nuôi cấy tế bào khó xác định một cách chính xác, bởi nó liên quan đến hàm lượng CO₂ hòa tan, pH, nồng độ HCO₃⁻. Áp suất CO₂ trong không khí có thể điều hòa trực tiếp nồng độ CO₂ hòa tan, với sự tham gia của yếu tố nhiệt độ, chính sự biến đổi thuận nghịch CO₂ thành HCO₃⁻ có thể sẽ làm thay đổi pH của môi trường nuôi, do vậy nồng độ CO₂ trong tủ nuôi có tính quyết định đến pH của môi trường nuôi cấy.

❖ **Nhiệt độ:**

Hầu hết các tế bào được nuôi cấy ở 37⁰C, nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của đa số các dòng tế bào thu nhận từ người và động vật. Để duy trì nuôi cấy, thường phải sử dụng tủ ấm.

1.3.2.2. *Kỹ thuật nuôi cấy*

- Nuôi cấy sơ cấp

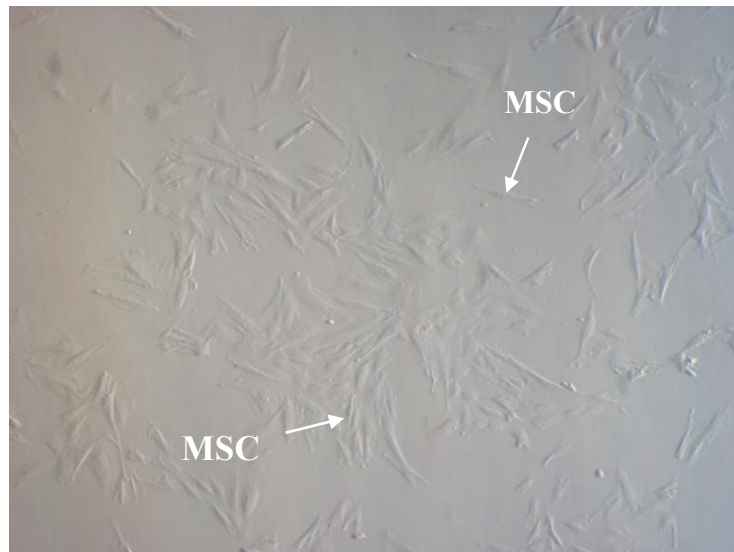
Trong nuôi cấy sơ cấp, các tế bào ban đầu thường là một hỗn hợp các dòng khác nhau, hoặc chứa một kiểu tế bào trội nhất, trong đó có những tế bào quan tâm và những tế bào khác (tế bào nhiễm), mục đích nuôi cấy là loại bỏ tế bào nhiễm.

Sau khi ly tâm dịch tủy xương thu được tế bào, huyền phù tế bào sau khi thu nhận được vào dụng cụ nuôi. Tùy từng loại tế bào, môi trường và các điều kiện nuôi cấy có thể khác nhau. Thông thường điều kiện 37⁰C, 5% CO₂ được duy trì ổn định trong các tủ nuôi.

Tùy theo thể tích của bình nuôi, người ta sẽ dùng một lượng môi trường thích hợp tương ứng với mật độ tế bào, các tế bào nuôi cấy sơ cấp thường có mật độ cao. Từ 1-2 ngày, hầu hết tế bào bám vào bề mặt bình nuôi và có dạng đặc trưng. Những tế bào nổi trong môi trường là các tế bào chết, các mảnh vỡ tế bào có trong dịch huyền phù, khi đó đổ bỏ dịch nổi để thay môi trường mới.

- Nuôi cấy thứ cấp

Nuôi cấy thứ cấp là cấy chuyển để cung cấp chất dinh dưỡng và không gian cho các dòng tế bào phát triển liên tục. Tần số (độ thường xuyên cấy chuyển) và tỷ lệ pha loãng, hay nồng độ tế bào phụ thuộc vào đặc tính của mỗi dòng. Nếu dòng được cấy chuyển quá thường xuyên hay nồng độ tế bào quá thấp, chúng có thể bị mất.



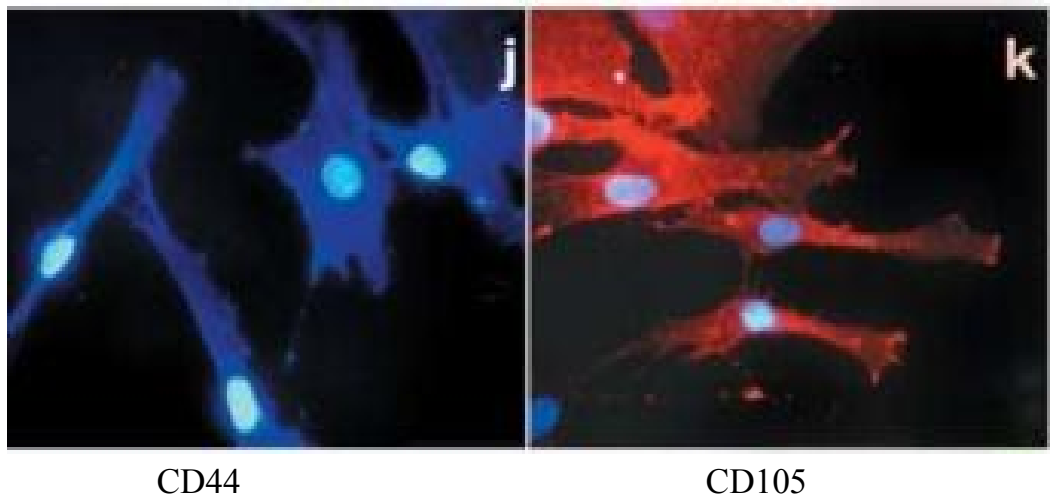
Hình 1.5. Tế bào gốc trung mô tủy xương (mũi tên) cấy chuyển lần 3 (P3) sau nuôi cấy 3 ngày trong chai flask với môi trường DMEM F12, FBS10%[45].

1.3.3. Kỹ thuật đặc hiệu định danh tế bào gốc trung mô

Định danh tế bào nhằm xác định chính xác dòng tế bào nghiên cứu. Mỗi tế bào trong cơ thể có những protein đặc biệt gọi là những kháng nguyên. Kháng nguyên có khả năng liên kết hay gắn một cách đặc hiệu với kháng thể nhờ vậy mà ta có thể phân biệt được đặc điểm tế bào. Phức hợp kháng nguyên- kháng thể có thể được phát hiện bằng huỳnh quang hoặc phản ứng với enzym. Có hai cách phổ biến xác định tế bào gốc bằng marker: kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch và kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy (Flow cytometry).

- Kỹ thuật hóa mô miễn dịch

Là phương pháp nhuộm đặc biệt, sử dụng các kháng thể để xác định các kháng nguyên trong tổ chức (*Hình 1.6*). Do các kháng nguyên được phân bố một cách đặc hiệu trên bề mặt tế bào khác nhau hoặc trên các lát cắt mô học của tổ chức và phát hiện bằng kính hiển vi quang học thường nên kỹ thuật này rất có giá trị trong định danh tế bào hay chuẩn đoán bệnh học.



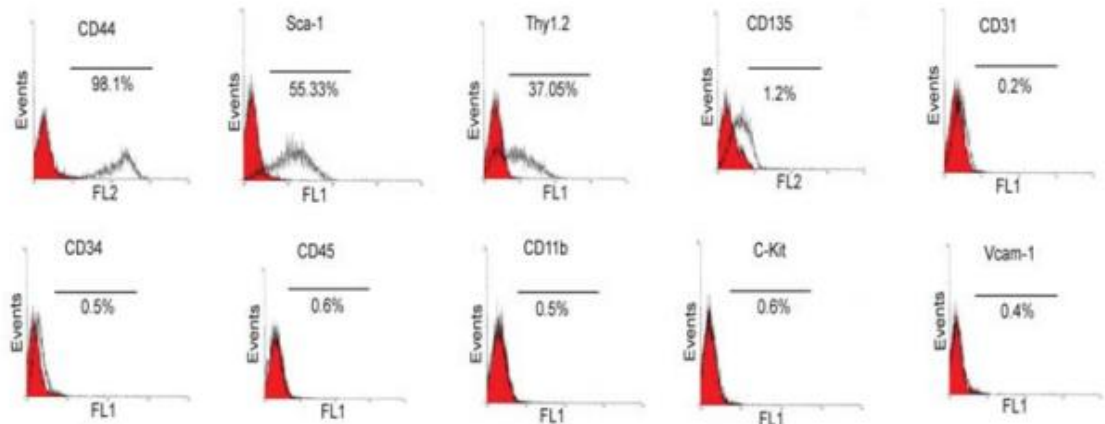
Hình 1.6. Hình ảnh nhuộm hóa mô miễn dịch của MSC có biểu hiện dương tính với CD44, CD105 [46]

- Kỹ thuật đo dòng chảy tế bào (Flow cytometry)

Đo dòng chảy tế bào là công nghệ định lượng và phân tích đặc điểm của đơn vật thể thông thường là tế bào khi chúng chảy thành dòng xuyên qua

một chùm ánh sáng. Các tính chất định lượng bao gồm kích thước, tính chất hạt hoặc mức độ phức tạp bên trong và mức độ phát huỳnh quang của tế bào.

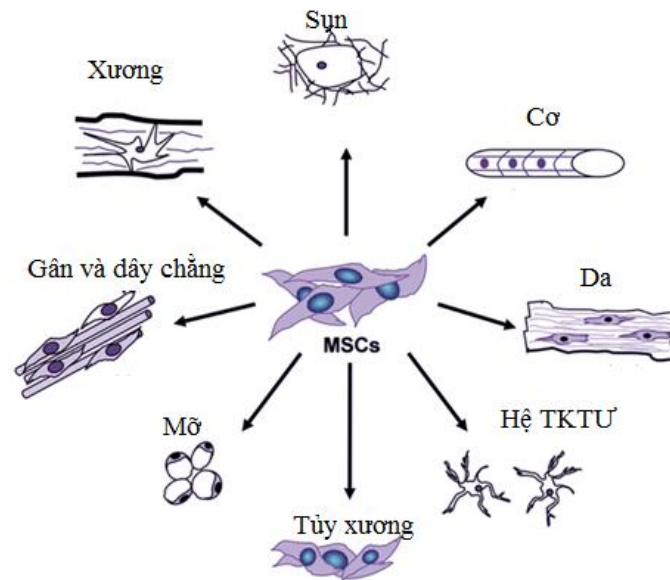
Dựa trên các thông số thu được có thể phân biệt, nhận dạng và phân loại tự động được dòng tế bào được quan tâm trong một quần thể tế bào.



Hình 1.7. Xác định marker của MSC bằng phương pháp flow cytometry [47]

1.4. Khả năng biệt hóa của tế bào gốc trung mô

Dưới điều kiện thích hợp, MSC có thể biệt hóa thành nhiều dòng tế bào chuyên biệt như: tế bào xương, sụn, cơ, mỡ....



Hình 1.8. Khả năng biệt hóa in-vitro của MSC

1.4.1. Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào mỡ

Quá trình biệt hóa thành tế bào mỡ gồm nhiều giai đoạn khác nhau

- Giai đoạn đầu, tế bào gốc trung mô tăng sinh. Một số tế bào gốc trung mô sẽ biệt hóa thành nguyên bào mỡ
- Nguyên bào mỡ tiếp tục tăng sinh, sau đó trải qua nhiều giai đoạn biệt hóa tiếp theo và bắt đầu tích lũy lipid. Đầu tiên tế bào tiền tạo mỡ tích lũy những giọt lipid nhỏ; cuối cùng những giọt lipid nhỏ hợp nhất với nhau để thành giọt lipid lớn.

Các nhân tố cảm ứng sự biệt hóa mỡ

- Indomethacin: Indomethacin là một nhân tố sao mã quan trọng giai đoạn sớm của quá trình biệt hóa tạo mỡ. Nhờ vào PPAR proteosome tăng quá trình phân hủy β -catenin, từ đó ức chế tín hiệu Wnt trong tế bào để cảm ứng quá trình tạo mỡ, ức chế quá trình tạo xương [48].
- Dexamethasone: được sử dụng như chất cảm ứng biệt hóa tạo mỡ. Dex kích thích phosphory hóa lipase thông qua con đường tạo cAMP làm cho lượng lipid bên trong tế bào giảm mạnh. Sự suy giảm lipid này kích thích tế bào thu nhận các tryglycerid từ dịch ngoại bào. Sự tăng vận chuyển này là tín hiệu cảm ứng cho quá trình biệt hóa mỡ [48].
- Insulin: là tác nhân chính gây biệt hóa MSC thành tế bào tạo mỡ.

1.4.2. Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào sụn

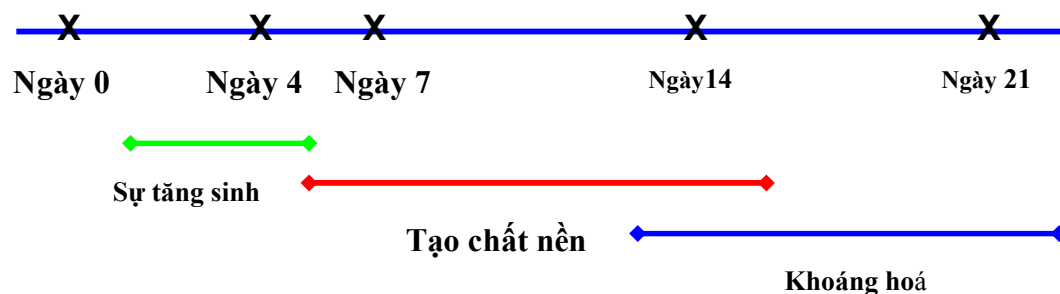
Để thúc đẩy biệt hóa tạo sụn, MSC được nuôi cấy với sự có mặt của transforming growth factor- β [49],[50]. Các khối tế bào này sẽ phát triển thành nhiều lớp có hình thái giàu chất đậm, và các phân tích mô học cho thấy khả năng bắt màu mạnh với thuốc nhuộm toluidine blue, chứng tỏ chất đậm ngoại bào rất giàu chất glycosaminoglycan. Các tế bào này cũng sản xuất collagen typ II, một chất đặc trưng của sụn khớp.

1.4.3. Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tạo cốt bào in vitro, sự tạo xương trong cơ thể và các yếu tố phiên mã.

Khả năng biệt hóa của MSC thành tạo cốt bào là một đặc tính của tế bào gốc trung mô. Khả năng này đã gợi ra những tiềm năng to lớn trong ứng dụng để điều trị các bệnh về xương khớp. Đây cũng là một mục tiêu đặt ra trong luận án này. Biệt hóa thành công tế bào gốc trung mô thành tạo cốt bào sẽ là một điểm mới của nghiên cứu.

1.4.3.1. Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tạo cốt bào in vitro

Các MSC có thể cảm ứng và biệt hóa thành tạo cốt bào. Các yếu tố được dùng trong biệt hóa tạo tế bào xương in vitro là: dexamethasone, axit ascorbic, β -glycerolphosphatase. Dưới các điều kiện nuôi cấy này các tế bào phát triển tuần tự theo các giai đoạn sau: (Hình 1.9)



Hình 1.9. Các giai đoạn biệt hóa của MSC thành xương [51]

- Giai đoạn tăng sinh: được đánh dấu bởi sự gia tăng số lượng tế bào.
- Giai đoạn tạo chất nền: Biểu hiện bởi sự tổng hợp collagen typ I, alkalinephosphatase.
- Giai đoạn khoáng hóa: Giai đoạn này xuất hiện sự lắng đọng canxi trong chất nền.

Trong điều kiện in vitro, MSC được cảm ứng biệt hóa thành tạo cốt bào khi bổ sung các yếu tố vào môi trường nuôi cấy:

- Dexamethasone: có tác dụng kích thích tạo xương phụ thuộc vào liều tác dụng. Trong tế bào xương chúng có tác dụng thay đổi mức độ biểu hiện của các protein như collagen, alkaline phosphatase...
- Ascorbic: Là vitamin cần thiết để biến đổi tiền collagen thành collagen và quá trình tiết ra chúng sau đó.
- Glycerolphosphatase: Là một hợp chất phosphatase hữu cơ và là cơ chất cho enzym alkalinephosphatase. Chúng thúc đẩy sự hình thành chất nền khoáng hóa in vitro.

Ngoài ra còn có các yếu tố tăng trưởng điều chỉnh sự biệt hóa như: FGF, EGF, PDGF, TGF. Dấu hiệu xác định sự biệt hóa đối với tạo cốt bào là sự lắng đọng calcium phosphate, sự biểu hiện của protein osteocalcin và alkalinephosphatase.

1.4.3.2. Sự tạo xương và các yếu tố phiên mã

- Sự tạo xương

Có hai quá trình của sự tạo xương/sự cốt hóa ở phôi thai là: (1) Sự tạo xương nội màng: mô xương được hình thành trực tiếp từ mô liên kết nguyên thủy, tức trung mô; (2) Sự tạo xương nội sụn: mô xương thay thế mô sụn trong có sẵn là khuôn mẫu hay mầm của miếng xương tương lai.

- Sự tạo xương nội màng (Sự cốt hóa trực tiếp)

Các xương màng như các xương dẹt của xương vòm sọ, hình thành từ sự tạo xương nội màng. Sự tạo xương nội màng xảy ra theo trình tự sau:

- Trung mô phôi thai chuyển đổi thành mô liên kết giàu mạch máu. Các tế bào trung mô giống nguyên bào sợi được vùi vào một chất nền ngoại bào dạng thạch có chứa các sợi collagen và tập hợp các sợi collagen.
- Các tế bào trung mô chuyển đổi thành các tạo cốt bào có hình trụ điển hình và bắt đầu chế tiết ra chất nền xương. Rất nhiều trung tâm cốt hóa xuất hiện rồi sát nhập lại với nhau, tạo ra một mạng lưới các bè xương

phân nhánh được gọi là xương nguyên phát. Do sợi collagen bên trong các bè xương mới tạo sắp xếp lộn xộn, nên còn gọi là xương lưới hay xương tiền lá (woven bone).

- Tạo cốt bào tạo ra chất căn bản xương và gián tiếp lắng đọng calcium phosphate vào chất nền xương rồi vùi trong chất căn bản để tạo tế bào xương.

Các hiện tượng phát triển sau cùng bao gồm:

- Sự chuyển đổi mô xương tiền lá thành mô xương lá, các sợi collagen mới tổng hợp được sắp xếp tạo bó có định hướng. Các lá xương xếp thành nhiều vòng đồng tâm bao quanh một mạch máu trung tâm ở trong ống Havers tạo nên hệ havers. Các xương màng được duy trì dưới dạng có mô xương xốp ở giữa, gọi là xương xốp ở xương dẹt, bao quanh là lớp xương đặc ngoài và lớp xương đặc trong.
- Sự tạo xương từ mô hình sụn trong (sự cốt hóa gián tiếp)

Sự tạo xương từ mô hình sụn trong là quá trình thay thế khuôn mẫu sụn bằng mô xương. Các xương của các chi, cột sống và xương chậu có nguồn gốc từ khuôn mẫu sụn trong. Sự hóa xương trong sụn đòi hỏi sự biệt hóa của tế bào trung mô theo quá trình của tế bào sụn để tạo thành tấm sụn. Điều đó được theo sau bởi sự hình thành liên tiếp và sự thoái biến những cấu trúc sụn, cũng như sự lắng đọng tăng dần của chất nền xương nhờ tiền tạo cốt bào bên trong mảnh sụn.

Cả hai quá trình tạo xương trực tiếp và gián tiếp không chỉ xảy ra tạo xương sinh lý mà còn trong suốt quá trình phát triển sau sinh và trong sự hồi phục gãy xương [52],[53].

- *Các yếu tố phiên mã điều hòa sự hình thành xương*

Xương được hình thành có sự điều hòa của các phân tử để biệt hóa tế bào trung mô thành tạo cốt bào. Sự tạo cốt bào qua nhiều bước với sự điều hòa qua các cơ chế phân tử bởi các yếu tố phiên mã và các tín hiệu protein.

Runx2

Là gen đặc hiệu tạo cốt bào điều chỉnh sự biệt hóa ra tạo cốt bào, mã hóa cho một yếu tố phiên mã có vai trò cảm ứng sự biệt hóa ra tạo cốt bào và kiểm soát sự biểu hiện osteocalcin. Runx2 là chất chỉ thị xuất hiện sớm nhất và đặc hiệu nhất cho biết sự tạo xương và sự biệt hóa của nó được cảm ứng bởi BMP 7 dẫn đến sự biểu hiện của osteocalcin, osteopontin. Osteocalcin là một protein chế tiết đặc hiệu chỉ biểu hiện ở các tạo cốt bào đã biệt hóa đến giai đoạn cuối dưới sự kiểm soát của Runx2.

Chuột bị thiếu Runx2 cũng phát triển đủ kỳ (sinh đủ tháng) nhưng bộ xương chỉ là mô sụn. Ở những con chuột này không có dấu hiệu cho thấy có sự biệt hóa ra tạo cốt bào hay sự tạo xương. Ngoài ra, chuột không có Runx2 cũng không có cả hủy cốt bào.

Giống với đặc điểm hệ xương ở chuột bị thiếu Runx2 là một bệnh ở người, gọi là loạn sản đòn sọ (cleido cranial dysplasia). Bệnh loạn sản đòn-sọ có đặc điểm thiếu sản xương đòn, chậm cốt hóa các đường khớp ở các xương vòm sọ đi đôi với đột biến gen Runx2 [52],[53],[54].

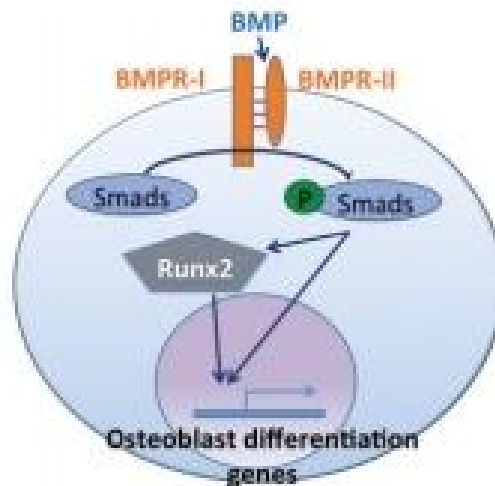
Osx

Protein Osx ở chuột là polypeptit gồm 428 axit amin, với trọng lượng phân tử 46 kDa. Osx đặc biệt cần thiết cho tất cả quá trình tạo cốt bào. Osx biểu hiện ở ngày thứ 13.5 (E 13.5) có vai trò biệt hóa tạo sụn và tập trung trung mô để hình thành xương tương lai. Sau ngày 15.5 (E15.5) biểu hiện mạnh trong các tế bào hình thành nên bề xương. Osx cần thiết cho quá trình hình thành xương và khoáng hóa ở in vivo. Gen Osx khi bị đột biến ở dạng dị hợp chuột vẫn sống bình thường. Osx bị đột biến ở dạng đồng hợp tử chuột sẽ chết ngay sau sinh vì khó thở, tím tái. Mặc dù, Osx- null ở thời kỳ phôi sụn vẫn phát triển nhưng xương thiếu hoàn toàn, do không thể biệt hóa thành tạo cốt bào, sự khoáng hóa không xảy ra.

Ngoài ra, Osx ức chế quá trình tăng sinh tạo cốt bào trong suốt quá trình phát triển xương [55].

✚ *Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)*

Các BMP là protein thuộc gia đình TGF- β , gồm có phức hợp receptor bất đối xứng bao gồm receptor loại I và loại II. BMP bám vào mặt ngoài của receptor dẫn đến sự phosphoryl hóa các R-Smad. R-Smad dưới dạng phosphoryl hóa tạo phức hợp với co-Smad, đi vào nhân tế bào và điều khiển hoạt động của gen. Phức hợp BMP-Smad có gene đích là Runx2. In vitro, được điều trị BMP-2 thấy tăng biểu hiện gen Runx2, sự tương tác Runx2-Smad biểu hiện sớm của giai đoạn biệt hóa [56] (Hình 1.10)



Hình 1.10: Tác động của BMP lên các gen biệt hóa tạo cốt bào [55]

✚ *Wnt*

Hai cơ chế phân tử liên quan đến sự tạo xương bởi tín hiệu Wnt, gồm tín hiệu kinh điển và tín hiệu không kinh điển. Tín hiệu Wnt kinh điển là qua β -catenin, tín hiệu không kinh điển không qua β -catenin.

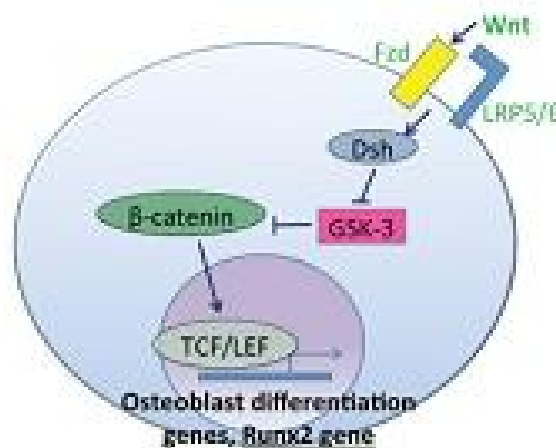
β -catenin là một protein trong tế bào chất có chức năng trong sự dính tế bào-tế bào, nó cũng có thể hoạt động như phân tử truyền tín hiệu giữa các tế bào của con đường truyền tín hiệu *Wnt*. Khi *Wnt* gắn vào receptor của nó, Frizzled và coreceptor LRP5 hay LRP6 hoạt hóa. Nhân tố tác động xuôi

Dishevelled (Dsh) sau đó được hoạt hóa thông qua cơ chế chưa hiểu rõ. Dsh được hoạt hóa sẽ bất hoạt glycogen synthase kinase (GSK3). Vì yếu tố này sẽ cảm ứng sự phân hủy của β -catenin khi thiếu ligand Wnt, sự bất hoạt của nó gây kết quả là sự ổn định tích lũy protein β -catenin trong nhân. β -catenin gắn vào và hoạt hóa nhân tố phiên mã LEF/TCF.

Tín hiệu *Wnt* thông qua con đường không chính thống, điều này gồm dòng calcium, phospholipase (PLC), phosphokinase (PKC). Vai trò tín hiệu con đường này vẫn chưa rõ chức năng.

Nhiều nghiên cứu chứng minh vai trò của *Wnt* theo con đường kinh điển trong sự điều hòa tạo xương. Ở người khi bị đột biến dẫn đến hoạt động quá mức của LRP5 dẫn đến kết quả kiểu hình khối xương cao, khi sinh thiết thấy tăng thể tích khối xương, giảm lượng mỡ trong tủy. Ngược lại, khi bị đột biến làm bất hoạt LRP5 gây chứng loãng xương.

Tương tự tín hiệu BMP (Bone morphogenetic protein), tín hiệu *Wnt* trong quá trình biệt hóa xương là liên kết với Runx2. Hơn nữa, kích hoạt tín hiệu *Wnt*/ β -catenin ở MSC sẽ ức chế quá trình phiên mã tạo mỡ yếu tố (peroxisome proliferator-activated receptor- γ ; PPAR- γ) và cảm ứng biểu hiện gen dòng tế bào xương [56] (Hình 1.11).



Hình 1.11: Tác động của tín hiệu *Wnt* lên quá trình biệt hóa tạo cốt bào [58]

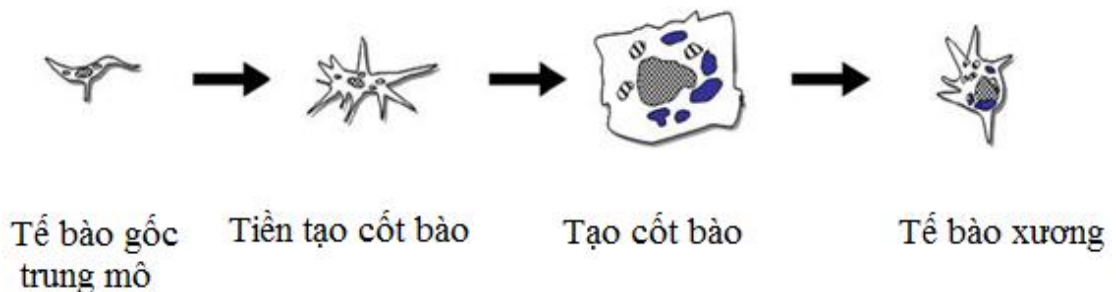
✚ *Leptin*: (peptidase được tổng hợp bởi tế bào mỡ) có ái lực gắn vào thụ thể của nó ở vùng dưới đồi để điều hòa sự tạo xương theo một cơ chế trung ương (central mechanism). Tuy chi tiết của cơ chế điều hòa leptin- vùng dưới đồi chưa được biết rõ, nhưng chuột thiếu leptin hay thụ thể leptin thì có lượng mô xương nhiều hơn rõ rệt so với chuột wide-type. Thực tế, bệnh nhân loạn dưỡng lipid toàn thân bị xơ hóa xương (osteosclerosis) (tăng độ cứng xương tăng) và tăng sự tạo xương [52],[53].

1.5. Tạo cốt bào

1.5.1. Đặc điểm của tạo cốt bào

Tạo cốt bào là một trong 4 loại tế bào của mô xương. Các tế bào thường tạo thành một lớp phủ lên các vị trí có sự tạo xương. Tạo cốt bào là tế bào khởi động và kiểm soát sự khoáng hóa chất tiền xương. Các sản phẩm đặc hiệu của tạo cốt bào là collagen type I, osteocalcin, osteopontin và sialoprotein của xương. Tạo cốt bào phản ứng mạnh với phosphatase kiềm. Tạo cốt bào sản xuất ra các yếu tố tăng trưởng, đặc biệt họ protein tạo hình xương – BMP (Bone morphogenetic protein) [52].

Tạo cốt bào được biệt hóa từ tế bào gốc trung mô qua giai đoạn thành tiền tạo cốt bào (Hình 1.12).



Hình 1.12. Các giai đoạn biệt hóa dòng tế bào xương từ tế bào gốc trung mô

1.5.2. Kỹ thuật xác định sự hiện diện của tạo cốt bào

- Các kỹ thuật nhằm phát hiện ra ion Ca có trong các mẫu mô hay tế bào:
Nhuộm Alizarin red – đây là sự kết hợp ion Ca và Alizarin red tạo ra phức hợp Alizarin- S- Ca có màu đỏ cam.
- Nhuộm hóa mô miễn dịch osteocalcin, một marker của tạo cốt bào.
- Đánh giá sự lắng đọng tinh thể khoáng trong tiêu bản siêu cấu trúc.

Như vậy mục đích của các phương pháp là phát hiện ra các ion canxi trong mẫu nghiên cứu và marker bề mặt tế bào sau biệt hóa.

1.6. Bảo quản lạnh tế bào

Là quá trình đưa tế bào từ điều kiện sinh lý, xuống điều kiện nhiệt độ rất thấp, ở dung dịch môi trường đông lạnh hay chất bảo quản lạnh. Tại điều kiện này mọi hoạt động sống, các quá trình chuyển hóa và phát triển của tế bào dừng lại, nhưng chúng không chết, nhờ đó giữ tế bào ở trạng thái tiềm sinh trong một thời gian dài.

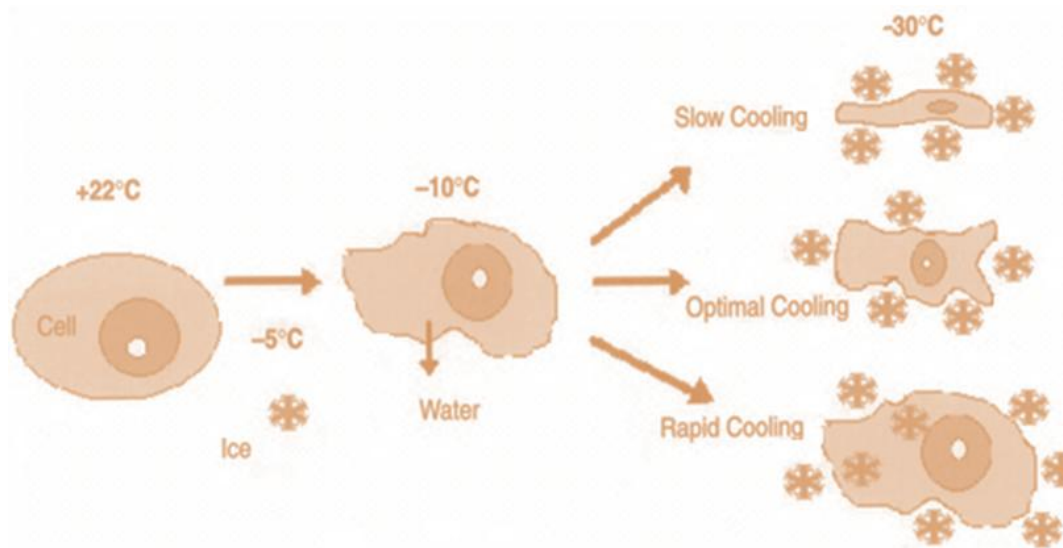
1.6.1. Cơ chế bảo quản lạnh

Trong kỹ thuật đông chậm tế bào, nước trong môi trường lạnh -5°C đến -10°C sẽ hình thành tinh thể đá bắt đầu ở môi trường ngoài tế bào, trong khi đó nước trong tế bào chưa bị đông. Khi nước chuyển sang dạng tinh thể tinh khiết, lượng nước ở thể lỏng giảm đi. Do đó, nồng độ chất tan và chất bảo vệ lạnh ngày càng tăng dẫn đến tăng áp lực thẩm thấu bên ngoài tế bào, kéo nước từ trong tế bào sẽ đi ra ngoài. Mức độ mất nước trong tế bào phụ thuộc vào tốc độ làm lạnh.

Nếu mức độ làm lạnh đủ chậm sẽ cho phép dung dịch nội bào cân bằng với môi trường ngoại bào. Mặt khác, nếu tốc độ làm lạnh nhanh hơn so với nước thẩm ra ngoài dễ gây hình thành tinh thể đá trong tế bào, tuy nhiên hình thái tế bào chưa bị biến dạng.

Do đó quá trình đông lạnh tốt nhất khi tế bào chỉ khử nước một phần và vì thế chúng ở trạng thái cân bằng. Nếu tốc độ làm lạnh không nhanh, đá kết tinh sẽ hình thành ở ngoại bào sẽ gây hiện tượng co tế bào [57],[58],[59].

Như vậy, bảo quản lạnh tế bào là sự cân bằng giữa sự mất nước tế bào và tốc độ làm lạnh.(Hình 1.15).



Hình 1.13. Cơ chế vật lý trong bảo quản lạnh tế bào

1.6.2. Vai trò chất bảo quản lạnh

Chất bảo quản đông lạnh có vai trò nhằm chống lại những tác động bất lợi của nhiệt độ thấp hay nhiệt độ đông lạnh. Một chất bảo quản đông lạnh có thể làm cho nước đông lại giống như thủy tinh mà không hình thành tinh thể đá. Những chất bảo quản này cũng ngăn chặn sự tạo thành muối, cũng như tạo thành tinh thể trong tế bào trong suốt thời gian đông lạnh.

Năm 1949, Polge công bố công trình nghiên cứu là bước ngoặt của họ, trong đó chỉ ra rằng nếu thêm vào dung dịch bảo quản từ 10-20% glycerol, tinh trùng có khả năng sống lâu hơn khi bảo quản đông lạnh ở -80°C . Khi sử dụng glycogen, độ cô đặc của toàn bộ chất tan sẽ tăng lên, đồng thời giảm thiểu số lượng tinh thể đá [60].

Năm 1959, DMSO được chứng minh là có khả năng được sử dụng như một chất bảo quản. DMSO thấm xuyên qua màng tế bào dễ dàng hơn glycerol, nhưng DMSO có thể có độc tính mạnh hơn ở nhiệt độ cao. Bất cứ chất bảo quản đông lạnh nào đều phải có một trong những tính chất sau [59]:

- Hợp chất có thể hòa tan trong nước ở nồng độ cao và vẫn giữ được nồng độ đó trong quá trình hạ nhiệt độ và nhiệt độ cực thấp.
- Chất bảo quản phải thấm sâu vào trong tế bào
- Chất bảo quản phải có độc tính thấp để có thể sử dụng ở nồng độ cao, hiệu quả hơn trong việc bảo quản.

Có 2 nhóm chất bảo vệ lạnh:

- Chất bảo vệ lạnh thấm qua màng tế bào: có kích thước phân tử nhỏ, có khả năng đi qua màng tế bào, có khả năng hoạt động cả trong và ngoài tế bào: DMSO, 1,2 propanediol (PrOH), glycerol, ethylen glycerol, propylene glycol
- Chất bảo vệ không thấm qua màng tế bào: khử nước trong tế bào, bảo vệ màng tế bào, bao gồm các loại: đường sucrose, mannose, trehalose) protein polymer (polyvinyl pyrrolidone - PVP), polyethylene oxide - PEO).

1.6.3. Những tác động của việc thay đổi nhiệt độ

Trên thực tế, kỹ thuật bảo quản đông lạnh áp dụng cho nhiều loại tế bào là một quá trình phức tạp. Đầu tiên là tốc độ đông lạnh và tốc độ rã đông, hai yếu tố này được xem như yếu tố quyết định quan trọng đến sự sống của tế bào. Sự thay đổi tốc độ của nhiệt độ bảo quản quan trọng vì nó điều khiển sự vận chuyển nước qua màng tế bào và vì thế có thể có sự đông lạnh bên trong tế bào. Sự đông lạnh bên trong tế bào dễ gây chết. Tốc độ làm lạnh điều khiển nước chuyển sang dạng đá vì vậy nó cũng điều khiển tốc độ nồng độ của dung dịch tế bào. Bằng cách kiểm soát sự chuyển động, thẩm thấu của các chất lưu xung quanh tế bào, sự thay đổi tốc độ nhiệt cũng ảnh hưởng đến tốc độ nước

vận chuyển ra ngoài tế bào trong lúc làm lạnh và đi vào tế bào lúc rã đông. Với điều kiện nước được vận chuyển nhanh chóng ra khỏi tế bào để duy trì sự cân bằng nhiệt học 2 bên màng tế bào, nhiệt độ trong tế bào chất không bị hạ xuống dưới điểm đông đặc. Tất cả tinh thể đá sẽ chỉ hình thành bên ngoài tế bào.

Việc kết hợp cả hai yếu tố: tác động của dung dịch và sự đông lạnh bên trong tế bào cho ta căn nguyên thấy được sự tồn tại tốt nhất của từng tế bào ở một tốc độ làm lạnh nhất định. Mỗi tế bào có một tốc độ làm lạnh tối ưu, mặc dù sự sống sót của tế bào là rất thấp nếu không có chất bảo quản [57],[59].

1.6.4. Quá trình rã đông tế bào

Sự ảnh hưởng của quá trình rã đông lên tế bào còn phụ thuộc vào nhiệt độ ban đầu, nhiệt độ của cơ chế làm lạnh có tạo ra sự đóng băng nội bào hay sự khử nước tế bào hay không. Trong điều kiện có sự hình thành đá nội bào sự rã đông nhanh là tối ưu, bởi cơ chế rã đông nhanh có thể sẽ ngăn cản được sự lớn dần kích thước của tinh thể đá nhỏ trong tế bào, để chúng không thể trở thành các tinh thể đá có hại với kích thước lớn hơn. Trong trường hợp tế bào được đông lạnh từ từ, nhằm tránh tạo tinh thể đá trong tế bào, thì sự đáp ứng của tế bào trước điều kiện môi trường khi làm ấm lên cũng sẽ làm thiệt hại đáng kể tới sức sống của tế bào. Tuy nhiên, điều này còn phụ thuộc vào điều kiện đông lạnh và tùy từng loại tế bào.

Một tổn thương khác có thể xảy ra khi rã đông là do áp suất thẩm thấu. Khi đá tan ra sẽ dẫn đến giảm nồng độ các chất hòa tan ngoại bào. Cho nên nhiệt độ đông lạnh phải thích hợp để sự tan ra của nước đá đủ chậm, giúp tế bào phản ứng kịp thời, nhưng đồng thời cũng phải đủ nhanh để các tinh thể đá tái kết tinh thành tinh thể đá lớn hơn, gây chết tế bào [57].

1.6.5. Các phương pháp bảo quản lạnh

1.6.5.1. Đông lạnh chậm theo chương trình:

Các tube chứa tế bào đông lạnh trong môi trường thích hợp được đặt trong buồng làm lạnh, nhiệt độ sẽ được giảm theo chương trình cài đặt trước.

Hệ thống làm lạnh sẽ sử dụng hơi lạnh từ nitơ lỏng. Thông thường máy làm lạnh này sẽ đưa về nhiệt độ -80°C , sau đó mẫu sẽ được đặt vào bình nitơ lỏng.

Sau khi đông lạnh, mẫu tế bào chứa trong tube được rã đông nhanh bằng cách cho vào nước ấm -37°C .

Thirumala S (2010) nghiên cứu bảo quản tế bào gốc trung mô từ mô mỡ, với phương pháp bảo quản lạnh hạ nhiệt độ theo chương trình, 4°C đến -15°C tốc độ $0,4^{\circ}\text{C}/\text{phút}$, từ -15°C đến -50°C tốc độ $1,2^{\circ}\text{C}/\text{phút}$, từ -50°C đến -80°C tốc độ $0,4^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ [61].

Nếu không có máy hạ nhiệt độ theo chương trình có thể dùng cách đặt các ống mẫu tế bào (trong môi trường bảo quản lạnh) vào trong tủ lạnh 4°C , sau đó đặt tiếp vào tủ -20°C rồi -80°C ; cuối cùng đặt mẫu vào bình chứa nitơ lỏng.

1.6.5.2. Đông lạnh cực nhanh (thủy tinh hóa)

Phương pháp này tiến hành bằng cách đặt mẫu chứa tế bào trong môi trường đông lạnh vào trong bình chứa nitơ lỏng.

Đây là kỹ thuật mới, tận dụng hiện tượng đông đặc của nước khi giảm nhiệt độ thật nhanh. Người ta đặt tế bào vào trong môi trường có áp suất thẩm thấu cao (4000mOSm). Với điều kiện áp suất thẩm thấu này, sự khử nước sẽ xảy ra rất nhanh, sau đó tế bào được đặt thẳng vào trong bình chứa nitơ lỏng. Khi đó nước không chuyển thành nước đá thông qua sự kết tinh mà chuyển thành dạng kính hay thủy tinh.

Trong suốt quá trình hạ nhiệt độ toàn bộ khối vật chất bên trong và bên ngoài tế bào chuyển thành dạng khối đặc, trong suốt giống như thủy tinh, đặc biệt không có sự hình thành tinh thể đá bên trong mẫu tế bào, cũng như môi trường bên ngoài trong quá trình làm lạnh.

Sau khi được cân bằng với môi trường có nồng độ chất bảo quản đông lạnh rất cao, mẫu tế bào được cho vào dụng cụ cryotube và nhúng trực tiếp vào nitơ lỏng không qua quá trình hạ nhiệt độ theo từng bước như trong đông

lạnh chậm. Tốc độ làm lạnh của phương pháp này rất lớn, khoảng 2000-2500⁰C/phút.

Trong hạ nhiệt độ chậm, quá trình mất nước cần được diễn ra từ từ để hạn chế sự hình thành tinh thể đá. Do đó thời gian cần thiết để hoàn tất một quy trình kéo dài so với hạ nhiệt độ cực nhanh [62].

1.6.6. Ứng dụng bảo quản tế bào gốc

Ngày nay, tế bào gốc được dùng để điều trị một số bệnh. Chẳng hạn tế bào gốc tạo máu (HSC) được điều trị một số bệnh kinh điển như bạch cầu cấp, leukemia và hiện nay còn rối loạn máu, bệnh tự miễn. Tủy xương là hỗn hợp chứa nhiều thành phần HSC và MSC. MSC được điều trị một số bệnh về xương, sụn. Bảo quản tế bào gốc có ứng dụng trong lâm sàng trong liệu pháp điều trị tế bào gốc. Ngân hàng bảo quản tế bào gốc phải đảm bảo chất lượng và kiểm tra an toàn trước khi sử dụng. Gần đây các nghiên cứu cải tiến quá trình đông tập trung vào hai bước chính (1) môi trường đông; (2) quy trình đông và bảo quản. Một số tác giả sử dụng nồng độ 10% DMSO được dùng phổ biến trong bảo quản tế bào gốc [63].

Noriko K(2005) thông báo kết quả nghiên cứu tỷ lệ % tế bào sống và so sánh tiềm năng tạo xương của nhóm tế bào trước và sau bảo quản. MSC được bảo quản trong môi trường có DMSO và FBS sau bảo quản (0,3 -37 tháng) tỷ lệ sống xấp xỉ 90%. Phân tích marker bề mặt của MSC cả 2 nhóm bảo quản và không bảo quản không có sự khác biệt và đánh giá tiềm năng tạo xương của 2 nhóm tế bào về sự biểu hiện ALP và sự khoáng hóa tương tự nhau. Kết luận nhóm tế bào sau bảo quản có đặc điểm tương tự như nhóm không bảo quản có giá trị trong trị liệu hay tái tạo xương [64].

Theo tác giả Thirumala S (2010) bảo quản tế bào gốc trung mô từ mô mỡ với môi trường bảo quản Methylcellulose (MC) và DMSO ở các nồng độ khác nhau với phương pháp hạ nhiệt độ theo chương trình sau bảo quản ít

nhất là 2 tuần, rồi đông nhanh kiểm tra tỷ lệ sống của tế bào như sau: DMEM cùng 0% DMSO tỷ lệ sống $11.4 \pm 7.4\%$, DMEM cùng 2%, 4%, 6% DMSO tỷ lệ tế bào sống khoảng 60%- 65%, DMEM cùng 8%, 10% DMSO tỷ lệ tế bào sống trên 70%. DMEM cùng 1% MC tỷ lệ tế bào sống $37.3\% \pm 4.1\%$, DMEM cùng 1% MS và 10% DMSO tỷ lệ tế bào sống $66.0 \pm 2.1\%$ [61].

Liu G (2008) nghiên cứu công nghệ sự hình thành mô xương từ MSC bảo quản. MSC được lấy từ tủy xương phân lập, nuôi cấy và bảo quản trong môi trường 10% DMSO và 20% FBS với mật độ tế bào bảo quản $10^6/\text{ml}$ cho vào cryotube, bảo quản 1 giờ ở 4°C , 2 giờ ở -20°C và cho đông nhanh ở -196°C . Sau đó cho rã đông và nuôi cấy biệt hóa tạo xương so sánh cùng nhóm chứng (không bảo quản), thấy sau 2 tuần cả 2 nhóm biệt hóa có phản ứng ALP dương tính và có sự lắng đọng canxi trong chất nền bằng phương pháp nhuộm von Kossa [65].

Naaldijk Y (2012) nghiên cứu bảo quản MSC ở chuột với các cách hạ nhiệt độ và dung dịch bảo quản khác nhau. Bảo quản MSC theo các protocol khác nhau. Các cách hạ nhiệt độ khác nhau được bảo quản trong môi trường DMSO có nồng độ DMSO là 0,1,2...10%; HES nồng độ thay đổi 10,9...0%, sao cho nồng độ DMSO + HES là 10%. Tế bào được bảo quản theo các protocol ở trên, sau bảo quản tế bào được rã đông, nuôi cấy thấy tế bào được bảo quản trong môi trường DMSO dưới 5% tỷ lệ tế bào sống giảm. Tế bào được bảo quản trong dung dịch 8% DMSO/2% HES có tỷ lệ tế bào sống cao hơn tế bào được bảo quản trong dung dịch dưới 5% DMSO. Dung dịch bảo quản chỉ có 10% HES tỷ lệ tế bào sống thấp dưới 10%. Tóm lại, môi trường bảo quản chỉ có HES không có hiệu quả khi bảo quản MSC [66].

Zeisberger SM (2011) nghiên cứu bảo quản AT-MSc bảo quản trong môi trường (FBS-10: 90%FBS + 10% DMSO; CM-10: 10% DMSO; CM- 5: 5% DMSO; CM-2: 2% DMSO; CM-0: 0% DMSO với mật độ 10^6 tế bào/ml,

bảo quản hạ nhiệt độ với tốc độ $1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ đến -80°C , sau 2h các mẫu được cho vào bình nitơ (-196°C). Trong quá trình bảo quản các tế bào được đánh giá sự hình thành tinh thể đá bởi hệ thống phần mềm và kính hiển vi chuyên dụng trong quá trình bảo quản, thấy các tế bào bảo quản trong môi trường CM-0, CM-2 có sự hình thành tinh thể đá ở nội bào và gian bào, trong suốt quá trình bảo quản CM-5 quan sát thấy hình thành ít tinh thể đá ở gian bào, tế bào bảo quản ở môi trường CM-10, FBS -10 không thấy sự hình thành tinh thể đá ở trong và ngoài tế bào [67].

Yong KW (2015) nghiên cứu bảo quản tế bào gốc mô mỡ ở P2 với mật độ tế bào 1×10^6 tế bào trong môi trường bảo quản gồm: DMEMF12 và chất bảo quản 0,25M trehalose; 5% DMSO; 10% DMSO; 5%DMSO+ 20% FBS; 10%DMSO + 20% FBS. Bảo quản bằng phương pháp đông chậm để -80°C qua đêm sau đó cho vào bình nitơ. Sau bảo quản 3 tháng rã đông nhanh đánh giá hình thái và chức năng của tế bào. Sau bảo quản tế bào có hình thái giống nguyên bào sợi và có marker bề mặt tế bào giống như nhóm tế bào không bảo quản. Biểu hiện dương tính với marker: CD90, HLA ABC, CD44, CD105 và CD73. Biểu hiện âm tính: CD14, CD19, CD34, CD45, và HLA DR [68].

Chất bảo quản rất cần để duy trì tế bào sống và chức năng tế bào được bảo quản -196°C , chất bảo quản DMSO ngăn cản sự hình thành tinh thể đá, 2 chất FBS và trehalose làm ổn định màng tế bào và cân bằng áp lực thẩm thấu. Tế bào chỉ bảo quản trehalose có tỷ lệ sống thấp dưới 15% có thể là trehalose là chất bảo quản không thấm qua màng tế bào, không thể ngăn được sự hình thành tinh thể đá. Tỷ lệ tế bào sống cao khi bảo quản trong môi trường có DMSO, điều đó thấy rằng DMSO duy trì tế bào sống trong suốt quá trình bảo quản và rã đông. Chất bảo quản chỉ chứa trehalose không thể sử dụng thay thế DMSO trong bảo quản ASC. Chất bảo quản tế bào chỉ có 5% DMSO ít độc và tránh được huyết thanh có thể gây ra phản ứng miễn dịch dị loài có thể ứng

dụng bảo quản phục vụ cho lâm sàng. Nghiên cứu xác định sự tăng sinh tế bào sau bảo quản so với nhóm không bảo quản, nuôi cấy đến ngày 14 là tương tự nhau. Kết quả thấy rằng ASC sau bảo quản vẫn duy trì khả năng biệt hóa thành mỡ, xương, sụn tiêu chuẩn tối thiểu của MSC.

Về đánh giá ảnh hưởng của chất bảo quản lên tính gốc của tế bào ASC: tính gốc là đặc điểm của MSC có vai trò quan trọng trong khả năng tự làm mới và biệt hóa của tế bào. Yoo (2011) nghiên cứu thấy rằng khi bất hoạt gen SOX-2 có ý nghĩa ức chế sự tăng sinh và tiềm năng biệt hóa của tế bào, hoặc gen OCT-4 bị bất hoạt làm giảm tỷ lệ tăng sinh và biệt hóa của tế bào. Để xác định marker tính gốc của tế bào sau bảo quản trong nghiên cứu này xác định mức độ biểu hiện gen OCT-4, REX-1, SOX-2 và NANOG và so với nhóm không bảo quản thấy rằng tế bào vẫn duy trì được tính gốc. Tuy nhiên, sự gia tăng biểu hiện tính gốc của hASC trong quá trình bảo quản cũng cần phải nghiên cứu [69]. Fan (2013) nghiên cứu thấy rằng biểu hiện quá mức gen SOX-2 ở MSC tủy xương kết quả là biểu hiện gia tăng sự tăng sinh và biệt hóa của tế bào, Gen OCT-4 biểu hiện quá mức thấy tỷ lệ tăng sinh cao. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này mặc dù tăng sự biểu hiện marker tính gốc nhưng chúng vẫn tăng sinh và biệt hóa bình thường [70]. Choi (2014) nghiên cứu thấy rằng sự tăng sinh và biệt hóa của MSC không bị ảnh hưởng trực tiếp của marker tính gốc của tế bào. Thực tế thấy rằng sự tăng sinh và biệt hóa tế bào bị ảnh hưởng bởi các yếu tố khác như nồng độ oxy, môi trường nuôi cấy, giá thể nuôi cấy là 2D hay 3D [71]. Tóm lại bảo quản trong thời gian ngắn ASC vẫn duy trì tính gốc của tế bào, khả năng tăng sinh, biệt hóa tế bào và duy trì đặc điểm kiểu hình của tế bào nên bảo quản DMSO ở nồng độ 5%.

1.7. Ứng dụng tế bào gốc điều trị các bệnh về xương và các nghiên cứu thực nghiệm ghép tế bào gốc

Gãy xương là một tình trạng mất tính liên tục của xương, nó có thể biểu hiện dưới nhiều hình thức từ một vết rạn cho đến một sự gãy hoàn toàn của xương. Nguyên nhân gây gãy xương rất đa dạng nhưng xét về mặt vật lý gãy xương thường là do tác dụng của một lực vào xương. Lực này có thể bắt đầu từ bên ngoài của cơ thể là trực tiếp hoặc gián tiếp.

Sự gãy xương không có khả năng tự phục hồi là một thách thức, một vấn đề trong phẫu thuật chỉnh hình. Trong suốt quá trình lành xương bình thường, những tế bào gốc chưa phân hóa, với sự trợ giúp của các loại protein hình thái xương (BMP- Bone Morphogenic protein) và những yếu tố điều hòa tế bào, tăng sinh biệt hóa thành những tế bào sụn, tế bào xương và hình thành xương, theo đó sự tổn thương sẽ được sửa chữa. Tuy nhiên, một số tổn thương không có khả năng liền và trở thành sự gãy xương không có khả năng tự phục hồi, nó dẫn đến tình trạng bệnh tật và sự hạn chế về chức năng của bệnh nhân [72],[73],[74],[75].

Những nghiên cứu đã công bố cho đến nay về tế bào gốc đối với sự phục hồi gãy xương không tự hàn gắn đã mô tả trong những mô hình gãy xương và có thể phân tích trên động vật nhỏ, động vật lớn [73],[76].

Kadiyala (1997) nghiên cứu những tế bào gốc trưởng thành kết hợp với những giá thể có cấu trúc khác nhau gây ra sự hồi phục xương ở mô hình động vật nhỏ với những ổ khuyết có kích thước tới hạn. MSC tự thân rút từ tủy xương được nuôi cấy tăng sinh sẽ được chuyển lên trụ gốm (ceramic) sau đó ghép vào ổ gãy xương 8mm trong xương đùi chuột với sự hình thành xương hoàn toàn. Qua 8 tuần MSC trên giá thể có sự hình thành xương đáng kể hơn so với giá thể với dịch tủy xương hay giá thể không có tế bào.

Cũng nhóm nghiên cứu này sau đó đã sử dụng tế bào gốc trung mô tủy xương người để hàn gắn ổ khuyết xương vòm sọ có kích thước tới hạn ở

chuột khi được cấy với giá thể Polylactic-co-glycolic acid (PLGA) được bao phủ apatite không có sự thêm nhân tố tăng trưởng ngoại sinh [77].

Cowan (2004) nghiên cứu tổn thương xương vòm sọ với ổ khuyết 8mm trên chuột được điều trị với tế bào gốc mỡ người đã nuôi cấy trong môi trường tạo xương trên PLGA và trong một nghiên cứu với những tế bào gốc mỡ tự thân của chuột được nuôi cấy trong môi trường tạo xương trên phức hợp calcium phosphate- nanocomposite tự tiêu. Cả 2 nghiên cứu cho thấy rằng những cấu trúc đã hấp thu tế bào gốc mỡ người đã biệt hóa có sự tái tạo xương nhiều hơn những cấu trúc với những tế bào mỡ chưa biệt hóa [78]

Hashemibeni B (2014) Nghiên cứu đánh giá sự liền xương trên chó cùng với tạo cốt bào được biệt hóa từ ADSCs trên giá thể alginate gel. Ghép tạo cốt bào được biệt hóa 2 tuần trên giá thể alginate. Sau ghép 4 tuần đám xương mới tạo ra vẫn mỏng và có độ bền kém xương chủ. Sự hình thành xương mạnh ở thời điểm 8 tuần so với nhóm chứng không có tế bào [79].

Ở những đứa trẻ mắc bệnh xương dễ gãy (OI-osteogenesis imperfecta). Nguyên nhân do đột biến gen gây ra thiếu collagen typ I. Collagen là protein cấu trúc chính và cung cấp một giá thể cho xương hình thành. Những đứa trẻ OI bị biến dạng xương chi và cột sống, do chậm sinh trưởng về thể chất dẫn đến người có vóc dáng thấp bé.

Horwitz điều trị những bệnh nhân OI bằng cách cấy ghép tủy xương. Sự thay thế tủy xương của những bệnh nhân OI bằng tủy xương của người khỏe mạnh. Sau 6 tháng sau cấy ghép những đứa trẻ tăng trưởng trung bình 7.5 cm và xương của chúng trở nên đặc hơn so với nhóm chứng trẻ không được điều trị chỉ tăng trưởng 1.25 cm. Tốc độ sinh trưởng sau đó chậm lại và cuối cùng đạt tới tình trạng ít hoặc không tăng trưởng sau thời kỳ sinh trưởng nhanh [80].

Hernigou (2005) nghiên cứu ghép tủy xương tự thân đã qua xử lý thu được lớp tế bào đơn nhân, điều trị cho 60 bệnh nhân khớp giả thân xương chày. Tỷ lệ liền xương đạt 88,3% với thời gian trung bình 12 tuần. Trong trường hợp

không liên do độ tập trung tế bào và tổng số lượng tế bào được ghép vào đều thấp hơn so với những trường hợp liền xương. Mức độ can xương và liền xương cũng liên quan đến số lượng tế bào gốc tủy xương được ghép [81].

Tại Việt Nam, trong lĩnh vực chấn thương chỉnh hình các nghiên cứu ghép khối tạo cốt bào tự thân ở nước ta chưa có công trình nào công bố. Một số nghiên cứu ghép khối TBG tủy xương nhưng mới ở giai đoạn đầu thử nghiệm hầu như chưa được ứng dụng rộng rãi với một số ít báo cáo.

Cao Thi (2007) ghép tủy xương tự thân vào ổ gãy mới xương chày cho 29 bệnh nhân gãy hở thân 2 xương cẳng chân. Tủy xương được hút ra từ mào chậu và bơm trực tiếp ngay vào ổ gãy. Thời gian trung bình liền xương là 21.2 tuần [82].

Năm 2009 nhóm nghiên cứu khoa chấn thương chỉnh hình bệnh viện Việt Đức, khoa huyết học bệnh viện Trung ương quân đội 108 bước đầu điều trị khớp giả thân xương dài bằng TBG tủy xương tự thân được hút từ mào chậu, tách bằng phương pháp ly tâm tỷ trọng để còn lại khối đơn nhân trong đó có TBG tủy xương được ghép vào khớp giả. Thời gian trung bình liền xương 22,8 tuần [83].

Khoa huyết học bệnh viện Trung ương quân đội 108 ghép tế bào gốc tủy xương điều trị hoại tử vô khuẩn chỏm xương đùi và kéo dài chi. Thời gian liền xương ở bệnh nhân kéo dài chi cùng ghép tế bào gốc 32 ngày, nhóm không ghép tế bào là 39 ngày. Khối tế bào đơn nhân tiêm vào vị trí hoại tử chỏm xương đùi theo dõi 22,8 tháng theo thang điểm Harris 73,3% đạt kết quả tốt [84].

Tóm lại, nghiên cứu ghép khối tạo cốt bào để điều trị bệnh về xương, hàn gãy xương gãy nói chung vẫn là vấn đề mới mẻ trong nước, chưa được nghiên cứu ứng dụng rộng rãi, cần đánh giá hiệu quả cũng như mối liên kết chất lượng tủy xương, số lượng tạo cốt bào với tỷ lệ thời gian liền xương, mức độ can xương..

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu, chất liệu nghiên cứu

- Thỏ ta mạnh khỏe, trọng lượng 2.0 - 2.5 kg, nuôi nhốt trong điều kiện thí nghiệm trước 1 tuần. Sử dụng 17 thỏ để thử nghiệm và xây dựng quy trình chọc hút tủy xương. Sau khi qui trình chọc hút hoàn chỉnh, sử dụng 30 thỏ để chọc hút chính thức lấy dịch tủy.

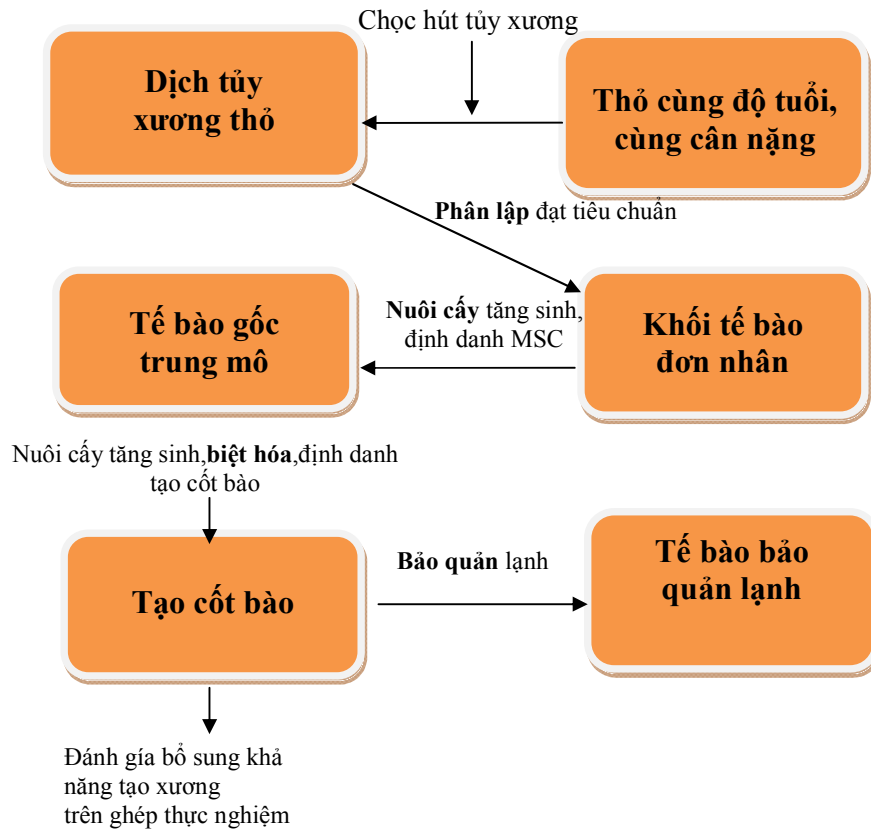
- 30 mẫu dịch tủy xương thỏ sau chọc hút sử dụng để tách chiết tế bào gốc trung mô.

- 30 mẫu dịch chứa tế bào gốc trung mô sau khi phân lập từ dịch tủy xương sử dụng để nuôi cấy, tăng sinh. Sau khi tăng sinh, chia nhỏ lấy 105 mẫu tiến hành biệt hóa theo hướng tạo cốt bào, lấy 15 mẫu định danh sau biệt hóa, 90 mẫu đưa vào bảo quản lạnh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu thực nghiệm trên động vật và trong phòng thí nghiệm (in vivo và in vitro).

2.2.1. Mô hình nghiên cứu



Hình 2.1. Mô hình nghiên cứu

2.2.2. Dụng cụ, thiết bị và hóa chất nghiên cứu

2.2.2.1. Dụng cụ nghiên cứu

- Bộ dụng cụ gây mê thỏ
- Kim chọc tủy troca kích thước 2'' – 13 gauge
- Ống Fancol 5,10, 15ml
- Chai nuôi cấy flask 25 cm²
- Đĩa 4 giếng, đĩa 6 giếng
- Type bảo quản: cyotube

2.2.2.2. Thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh
- Tủ nuôi cấy tế bào
- Kính hiển vi soi ngược
- Kính hiển vi huỳnh quang
- Máy hấp vô trùng
- Thiết bị đo dòng chảy tế bào FACS Calibure

2.2.2.3. Môi trường, hóa chất, thuốc nhuộm, kháng thể

Hóa chất:

- Dung dịch đệm PBS (*sigma*)
- Dung dịch tách tế bào: Trypsin- EDTA 0,25% (*sigma*)
- Dung dịch phân lập tế bào: Ficoll-paque (*do chúng tôi tự pha*)

Thuốc nhuộm:

- Thuốc nhuộm Alizarin red:
- Alizarin red (*sigma*): 2g

Nước cất

Trộn đều và chỉnh pH về 4,1 – 4,3 bằng 0,5% ammonium hydroxide

- Thuốc nhuộm Oil red O

Oil red (*sigma*): 0,1g

Isopropanol (*sigma*): 20ml

Khuấy đều trong 10 phút ở 37⁰C, lọc bằng giấy lọc

Môi trường nuôi cấy, biệt hóa:

- *Môi trường nuôi cấy MSC*

DMEMF12(sigma), 10% FBS (Gibco), 1% kháng sinh-kháng nấm (sigma).

- *Môi trường biệt hóa xương*

DMEM low glucose (sigma), 10% FBS (Gibco), 1% kháng sinh- kháng nấm (sigma), 50µg/ml Ascorbic (sigma), 0,1µM dexamethasone (sigma), 100mM β-glycerolphosphate (sigma).

- *Môi trường biệt hóa mỡ*

DMEM low glucose (sigma), 10% FBS (Gibco), 1% kháng sinh-kháng nấm, 0,5µM dexamethasone, 0,2mM indomethacin, 0,5µM 3 isobutyl-1 methylxanthin –IBMX (sigma).

Kháng thể: sử dụng một số kháng thể định danh tế bào gốc trung mô (trên thỏ), tạo cốt bào biệt hóa ...

Các kháng thể đơn dòng: Kháng thể kháng CD34 gắn P.E (Abcam), kháng thể kháng CD14, CD44 gắn P.E (Antigenix), kháng thể kháng CD90 gắn FITC (Thermo Fisher Scientific). Goat IgG P.E.

2.2.3. Các bước tiến hành nghiên cứu

Nghiên cứu tiến hành theo các bước sau:

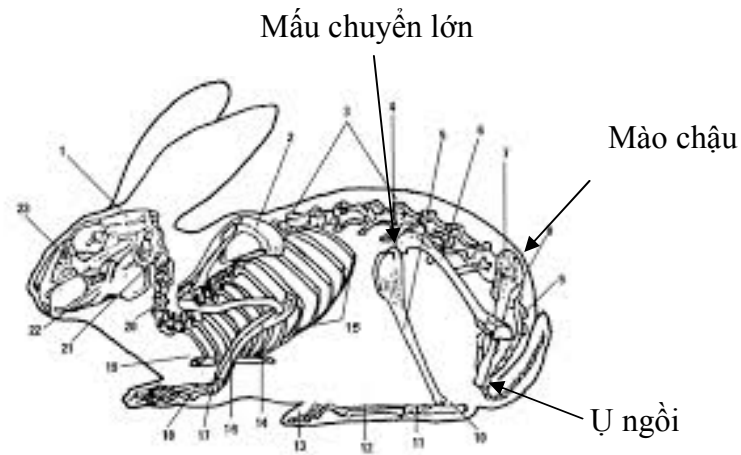
- Chọc hút lấy dịch tủy xương, ly tâm tách lấy tế bào đơn nhân
- Nuôi cấy tăng sinh, định danh kháng định tế bào gốc trung mô
- Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tạo cốt bào
- Định danh tạo cốt bào
- Thử nghiệm bổ sung đánh giá khả năng tạo xương trên động vật
- Bảo quản lạnh sau biệt hóa

2.2.3.1. Chọc hút tủy xương, tách chiết, phân lập tế bào gốc trung mô

- Lựa chọn phương pháp giảm đau, vị trí chọc hút

Nghiên cứu lựa chọn 1 trong 3 phương pháp giảm đau phù hợp nhất: gây mê bằng thuốc thiopental, gây tê tại chỗ đơn thuần hoặc gây mê phối hợp gây tê tại chỗ. Mỗi phương pháp vô cảm thử nghiệm trên 5 thỏ (n=5).

Vị trí chọc hút tủy xương thử nghiệm tại 3 vị trí: ụ ngồi, máu chuyển lớn xương đùi, mào chậu. Mỗi vị trí thử nghiệm 5 thỏ (n=5).



Hình 2.2. Vị trí giải phẫu chọc tủy xương trên thỏ

- Chọc hút tủy xương

Quá trình chọc hút dịch tủy xương phải đảm bảo vô trùng, dịch hút đủ số lượng để nghiên cứu. Cách thức tiến hành như sau:

Thỏ cố định ở tư thế ngồi, làm nhô hẳn xương mào chậu lên phía trên, phần cao nhất là vị trí chọc hút. Vô trùng vùng da nơi chọc hút, có thể rạch da, bóc lộ và bóc nhẹ màng xương. Dùng kim chọc tủy troca loại 2''-13 gauge kèm nòng được chọc hơi chếch ra trước 30 độ. Kim chọc tủy được đẩy bằng tay qua da và lớp xương cứng của khung chậu, sao cho đầu kim nằm ở lớp xương xốp có chứa tủy xương nằm giữa 2 lớp xương cứng. Dịch tủy xương được hút xilanh 10ml, xi lanh mỗi lần hút được rửa bằng dung dịch đệm bao

gồm 100ml PBS và 650 đơn vị heparin để chống đông. Số lượng dịch tủy xương mỗi lần hút 0,5-1ml. Tổng lượng dịch tủy xương khoảng 10ml/thỏ.



A. Chọc kim vào vị trí



B. Hút tủy

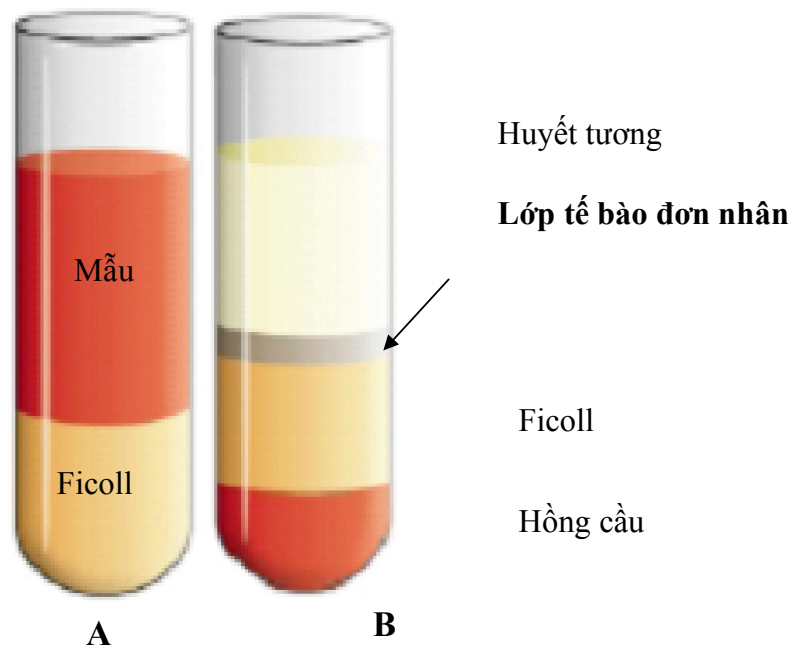
Hình 2.3. Chọc hút tủy từ xương mào chậu thỏ

- Phân lập tế bào gốc trung mô từ dịch tủy xương

Tế bào đơn nhân được tách bởi phương pháp gradient tỷ trọng: Ly tâm dịch tủy xương sau khi pha loãng, sử dụng chất chống đông được đặt trên lớp Ficoll tỷ trọng $1,077\text{g/cm}^3$. Trong quá trình ly tâm, hồng cầu và bạch cầu sẽ lắng xuống đáy ống. Các tế bào có tỷ trọng thấp hơn sẽ lắng ở lớp giữa Ficoll và lớp huyết tương (Hình 2.3). Đây là phân đoạn chứa tế bào gốc. Kỹ thuật này được áp dụng theo tác giả Shahdadfar A (2005). Quy trình thực hiện như sau:

Dịch tủy xương được pha loãng bằng PBS theo tỷ lệ 1: 4 bằng cách hút 10ml dịch tủy xương đã pha loãng vào từng ống facol 15 ml đáy nhọn đã chuẩn bị sẵn 4 ml dung dịch Ficoll. Chú ý phải đặt nhẹ nhàng tránh làm xáo trộn bề mặt tiếp xúc giữa dịch tủy xương và dung dịch Ficoll. Ly tâm 30 phút tốc độ 3000 vòng/phút, sau đó hút lớp tế bào đơn nhân (khoảng 3-4 ml) vào ống Facon 15ml mới. Lớp này nằm giữa lớp dung dịch Ficoll (màu trắng) ở

dưới và huyết tương (màu hồng) ở trên. Rửa khối tế bào đơn nhân thu được trong 5ml PBS. Ly tâm 1500v/phút trong 10 phút. Loại bỏ dịch nổi thu lấy cặn tế bào. Tạo huyền phù khối tế bào thu được trong 5ml môi trường. Đếm số lượng tế bào, xác định mật độ. Cuối cùng, cho dịch huyền phù tế bào vào chai nuôi cấy loại diện tích 25cm².



Hình 2.4. Hình ảnh dịch tủy xương trước (A) và sau ly tâm (B)

Chú ý: Lớp tế bào đơn nhân thu nhận thành công phải thấy được bằng mắt thường, ranh giới rõ, có màu trắng đục. (Hình 2.4)

2.2.3.2. Nuôi cấy tế bào gốc trung mô.

- Nghiên cứu lựa chọn giá thể nuôi cấy:

Chúng tôi sử dụng giá thể nuôi cấy chính là chai nuôi flask 25 cm² và bước đầu thử nghiệm nuôi cấy trên giá thể 3D là mảnh mô xương xốp người. Việc lựa chọn xương xốp với mong muốn tạo ra một giá thể 3D là những mẫu xương chứa tế bào gốc có thể sử dụng cấy ghép trực tiếp vào mô xương, khớp

để điều trị. Các mảnh xương trong nghiên cứu này có kích thước rất nhỏ, lấy ra từ các đoạn xương được hiến cho Labo Công nghệ mô ghép để nghiên cứu.

Giá thể truyền thống: chai nuôi flask 25cm² của hãng BD

Giá thể xương xộp: xương xộp cắt thành 10 mẫu nhỏ kích thước 3x3x3mm (n =10). Xử lý làm sạch tủy, mỡ, protein, khử khoáng bằng cách ngâm trong dung dịch hydroxy peroxyt 30% x 4 giờ, ngâm trong HCL 0.5N trong 30 phút. Rửa lại nhiều lần trong nước cất vô trùng, rửa siêu âm lần cuối. Qui trình nhằm loại bỏ hoàn toàn các yếu tố gây độc, gây miễn dịch cho tế bào nuôi cấy. Đông khô trong điều kiện áp suất 0.04 mbar, nhiệt độ -56 độ C.

- Tiến hành nuôi cấy

Nuôi cấy được tiến hành theo 2 giai đoạn, sơ cấp và thứ cấp

Nuôi cấy sơ cấp:

Huyền phù khối tế bào đơn nhân thu được sau ly tâm cho vào chai flask. Tiếp tục cho vào chai 5ml môi trường nuôi cấy MSC, đặt trong tủ nuôi với 37⁰C, 5% CO₂. Sau 48 giờ khi thấy tế bào đã bám đáy cần thay môi trường mới, loại bỏ môi trường cũ. Thay môi trường mới cần tiến hành 2-3 ngày/lần, mỗi lần 5 ml. Khi tế bào mọc 70 -80% đĩa nuôi cấy thì cấy chuyển.

Nuôi cấy thứ cấp (cấy chuyển):

o Nuôi cấy trong chai flask:

Hút bỏ môi trường cũ, rửa 2 lần bằng PBS. Cho vào mỗi chai 2 ml trypsin/EDTA để trong 3-5 phút. Quan sát dưới kính hiển vi, khi tế bào co tròn thì bất hoạt trypsin bằng môi trường DMEM và 10% huyết thanh. Thu dịch huyền phù vào ống falcon 15ml, ly tâm với tốc độ 1500v/phút trong 10 phút. Thu lấy tế bào, pha loãng các tế bào vào môi trường mới, tỉ lệ 1/3. Cho tế bào vào chai flask đặt ở tủ nuôi 37⁰C, 5% CO₂.

Nuôi cấy thứ cấp sau 5-7 ngày tế bào mọc đạt 70 -80% diện tích đáy chai nuôi, có hình dạng tế bào giống như nuôi cấy sơ cấp. Trong nghiên

cứu này phương pháp chọn lọc MSC được tiến hành theo phương pháp của Shahdadfar A (2005).

- Nghiên cứu thử nghiệm nuôi cấy trên giá thể xương xốp:

Giá thể xương xốp sau khi xử lý được ủ trước 24h trong môi trường nuôi cấy, sau đó bơm chậm tế bào lên giá thể. Mật độ dung dịch chứa tế bào : 10^5 tế bào/ml. Đưa giá thể chứa tế bào vào môi trường nuôi cấy, có đầy đủ các điều kiện về khí, nhiệt độ. Cách thay môi trường, thời gian thay, theo dõi sự phát triển của tế bào tiến hành như nuôi trong chai flask. Việc quan sát tế bào trong giá thể khó hơn nên cần quan sát kỹ, chú ý những tế bào phát triển bên cạnh giá thể

- *Đánh giá khả năng phát triển của tế bào nuôi cấy bằng phương pháp xây dựng đường cong tăng trưởng:*

Đường cong tăng trưởng được thiết lập để phân tích các đặc điểm phát triển của kiểu tế bào hay dòng tế bào. Phương pháp xây dựng đường cong tăng trưởng bằng hệ thống x-celligence được tiến hành như sau: tách các tế bào bằng trypsin, tái huyền phù các tế bào trong môi trường, nuôi cấy tế bào ở các nồng độ nhất định trong đĩa nuôi chuyên dụng có điện cực bằng vàng. Hệ thống x-celligence sẽ cho phép xác định số lượng tế bào trên bề mặt đĩa nuôi. Do bề mặt đĩa nuôi được trải các vi điện cực nên khi các tế bào tăng sinh và bám lên các điện cực làm gia tăng điện trở. Bộ phận xử lý của hệ thống cho ra số liệu và biểu đồ minh họa đường cong tăng trưởng. Quy trình cụ thể tiến hành như sau:

- Pha loãng lượng tế bào thu được sao cho nồng độ đạt được khoảng 5000 tế bào/ml. Hút huyền phù tế bào cho vào đĩa nuôi có điện cực bằng vàng chuyên biệt của hệ thống x-celligence.
- Nuôi tế bào trong hệ thống x-celligence ở điều kiện 37⁰C, 5% CO₂.
- Kết quả đường cong tăng trưởng được xây dựng dựa vào số liệu thu

được. Quá trình này tiến hành trên 5 mẫu, mỗi mẫu lặp lại 6 lần.

- Nhận biết tế bào gốc trung mô - Phương pháp tạo cụm

Các tế bào gốc trong quá trình nuôi cấy sẽ tăng sinh từ một tế bào gốc ban đầu, phân chia nhiều lần và tạo ra một cụm (colony) là một quần thể tế bào giống nhau. Kỹ thuật này dựa theo tác giả Ahmadbeigi N (2010). Quy trình như sau:

- Nuôi cấy tế bào với mật độ 200 tế bào/cm²
- Thay môi trường 2 ngày /lần.
- Sau 7 ngày rửa tế bào trong PBS.
- Đếm số cụm tạo thành và số lượng tế bào trong 1 cụm.
- Thực hiện trên 10 mẫu (n=10).

- Các kỹ thuật đặc hiệu để xác định tế bào nuôi cấy là tế bào gốc trung mô

Kỹ thuật hóa mô miễn dịch

- Cố định tế bào nuôi cấy bởi PFA 4% khoảng 15 phút.
- Rửa tế bào với PBS 3 lần, mỗi lần 5 phút.
- Bất hoạt kháng nguyên không đặc hiệu bởi huyết thanh trong 30 phút
- Rửa tế bào.
- Ủ với kháng thể sơ cấp: CD14, CD34, CD44, CD90 để qua đêm ở 4⁰C.
- Rửa tế bào.
- Ủ với kháng thể thứ cấp trong tối khoảng 45 phút.
- Rửa tế bào.
- Nhuộm nhân tế bào DAPI.

Đánh giá kết quả bằng quan sát hình ảnh tế bào dương tính, âm tính với dấu ấn nào bằng kính hiển vi huỳnh quang.

Kỹ thuật đo dòng chảy tế bào (flow cytometry)

Trong nghiên cứu này chúng tôi đánh giá marker của MSC sau nuôi cấy được tiến hành dựa theo kỹ thuật đo dòng chảy tế bào và các tế bào ở lần cấy chuyên P4 được chọn để phân tích marker đặc trưng cho MSC. Quy trình tiến hành như sau:

- Tách các tế bào nuôi cấy khỏi bề mặt chai nuôi bằng enzym trypsin/EDTA 0,25%.
- Chuyển tế bào vào ống ly tâm 15ml, ly tâm trong 5 phút để thu lấy tế bào.
- Rửa tế bào bằng PBS pH 7.4, ly tâm trong 5 phút để thu nhận phần tế bào.
- Huyền phù tế bào ở mật độ 1×10^6 tế bào/ml trong dung dịch PBS
- Bổ sung kháng thể sơ cấp (có gắn chất phát huỳnh quang) ở độ pha loãng thích hợp, trộn đều ở nhiệt độ phòng trong 30 phút.
- Rửa mẫu tế bào.
- Ủ mẫu tế bào với kháng thể thứ cấp trong 15 phút.
- Phân tích kết quả bằng máy flow cytometry và sử dụng phần mềm Cell Quest pro.

Đánh giá bổ sung khả năng đa biệt hóa của tế bào gốc trung mô: biệt hóa thành tế bào mỡ

Trong nghiên cứu này chúng tôi thử nghiệm khả năng biệt hóa của tế bào gốc trung mô thành tế bào mỡ. Quy trình thực hiện như sau:

- Chuẩn bị môi trường biệt hóa tế bào mỡ gồm: DMEM, 0,2mM indomethacin, 50 μ axit ascorbic, 0,5 μ M dexamethasone.
- Khi tế bào đạt 70-80% diện tích đĩa nuôi, cho vào môi trường cảm ứng biệt hóa, thay môi trường 2 ngày/lần. Theo dõi khả năng biệt hóa sau 2-3 tuần,
- Đánh giá sự tích tụ các giọt mỡ trong bào tương tế bào khi quan sát dưới kính hiển vi soi nổi, hoặc nhuộm Oil red O, thấy có sự hiện diện các giọt mỡ trong bào tương tế bào. Giọt mỡ thường xuất hiện vào ngày 5-7 sau biệt hóa. Quy trình dựa theo tác giả Shahdadfar A (2005).

Qui trình nhuộm Oil Red:

- Loại bỏ môi trường nuôi cấy
- Cố định mẫu
- Nhuộm tế bào với Oil red, ủ 10-20 phút.
- Loại bỏ thuốc nhuộm bởi nước cất hoặc PBS
- Quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược. Những tế bào mỡ tích trữ những giọt mỡ sẽ có màu đỏ của thuốc nhuộm.

Oil red là thuốc nhuộm màu đỏ, hòa tan trong lipid. Khi nhuộm mẫu tế bào đã cố định, bất kỳ nơi nào có chứa giọt mỡ, Oil red sẽ hòa tan trong đó làm chúng có màu đỏ.

Các dấu hiệu khẳng định MSC:[35]

- Sau từ 3-5 ngày nuôi cấy, thu được quần thể tương đối thuần nhất. Thông thường để khẳng định là MSC dựa vào các tiêu chí sau:
Hình thái, đặc điểm: các tế bào có hình dạng giống nguyên bào sợi, tạo thành các cụm, bám vào bề mặt chai nuôi cấy.
- Về marker bề mặt: biểu hiện dương tính: CD44, CD9, biểu hiện âm tính: CD34, CD14
- Về khả năng đa biệt hóa: MSC có khả năng biệt hóa thành tế bào xương, tế bào mỡ.

2.2.3.3. Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tạo cốt bào.

Về lý thuyết, các MSC được biệt hóa trong môi trường có dexamethasone, ascorbic, β – glycerolphosphatase sẽ biệt hóa thành tạo cốt bào. Sau biệt hóa (biệt hóa thành công) định danh phát hiện yếu tố tạo xương trong tế bào bằng các kỹ thuật đặc hiệu như nhuộm hóa mô miễn dịch với marker osteocalcin, nhuộm alizarin red, quan sát tinh thể khoáng dưới kính hiển vi điện tử quét.

Quy trình biệt hóa tiến hành như sau:

- Chuẩn bị môi trường biệt hóa: là môi trường biệt hóa xương bổ xung 10mM β -glycerolphosphat (sigma), 50 μ g ascorbate (sigma), 10^{-7} M dexamethasone (sigma).

- Nuôi cấy tế bào khi đạt mật độ khoảng 10.000/ cm² trong lớp đơn.

- Đưa tế bào vào môi trường biệt hóa. Thay môi trường 2-3 ngày/ lần. Thời gian biệt hóa từ 14-21 ngày.

Sau biệt hóa 21 ngày, định danh tế bào.

Các kỹ thuật định danh tế bào sau biệt hóa:

Trong 15 mẫu đã biệt hóa, lấy ngẫu nhiên 5 mẫu định danh bằng nhuộm Alizarin red, 5 mẫu nhuộm hóa mô miễn dịch với marker osteocalcin, 5 mẫu làm kỹ thuật siêu cấu trúc. Quy trình định danh như sau:

+ Định danh bằng kỹ thuật nhuộm Alizarin red

Alizarin là loại thuốc nhuộm có nguồn gốc thực vật. Alizarin red là dẫn xuất của alizarin được sử dụng để phát hiện ra ion Ca có trong các mẫu mô hay tế bào. Sự kết hợp ion Ca và Alizarin red tạo ra phức hợp Alizarin- S- Ca có màu đỏ cam. Như vậy mục đích của phương pháp nhuộm là phát hiện ra ion canxi trong mẫu nghiên cứu. Các bước tiến hành:

- Khử nước mẫu tế bào
- Rửa lại mẫu bằng PBS
- Ủ với dung dịch thuốc nhuộm trong 5 phút
- Kiểm tra sự xuất hiện màu đỏ cam dưới kính hiển vi đảo ngược
- Rửa mẫu bằng PBS để loại bỏ thuốc nhuộm

Đánh giá kết quả bằng cách quan sát thấy tế bào và vùng ngoại bào sẽ có màu đỏ cam là dấu hiệu dương tính.

+ Định danh bằng kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch với marker osteocalcin

Quy trình thực hiện như nhuộm hóa mô miễn dịch với marker là osteocalcin.

+ Định danh bằng kỹ thuật hiển vi điện tử quét (SEM)

Mục đích của kỹ thuật này là đánh giá sự tạo xương in vitro bằng quan sát sự hình thành tinh thể khoáng trong mẫu nghiên cứu:

- Rửa mẫu bằng dung dịch đệm cacodylate, rửa 3 lần, 2 phút/lần
- Cố định mẫu 2,5% glutaraldehyde trong đệm cacodylate
- Rửa mẫu bằng dung dịch đệm cacodylate, rửa 3 lần, 2 phút/lần
- Cố định lần 2 bằng axit osmic 1% pha trong đệm cacodylate
- Rửa mẫu bằng dung dịch đệm cacodylate, rửa 3 lần, 2 phút/lần
- Làm khô mẫu: Khử nước trong mẫu có nồng độ bằng cồn tăng dần 50⁰, 70⁰, 85⁰, 96⁰, 100⁰. Khử cồn ethylic bằng T-Butyl: 30 phút/lần x3 lần. Sau đó để ngăn đá tủ lạnh để cồn chuyển dạng tinh thể. Bốc bay cồn T-Butyl trong máy JFD 100 trong 2-5 giờ

- Mạ phủ mẫu bằng vàng bởi máy JFC-1200
- Quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét.

➤ Ghép tế bào gốc mô xương trên thực nghiệm

Kỹ thuật cấy ghép tự thân tế bào sau nuôi cấy biệt hóa 7 ngày định hướng dòng tạo cốt bào để ghép trên thực nghiệm nhằm bổ sung cho kết quả về khả năng tạo xương trên thực nghiệm của dòng tế bào được biệt hóa từ tế bào gốc trung mô theo hướng tạo cốt bào. Quy trình cấy ghép và đánh giá được tiến hành như sau:

Chuẩn bị 15 thỏ cùng độ tuổi. Tiến hành quy trình chọc hút, phân lập nuôi cấy, biệt hóa tế bào gốc trung mô tủy xương như quy trình đã nghiên cứu. Mẫu nghiên cứu của mỗi thỏ được đánh số phù hợp với thỏ đó để sau này ghép trở lại, tránh nhầm lẫn. Các bước tiến hành như sau:

- Tạo ổ khuyết xương: Lựa chọn vùng đầu dưới xương đùi 2 bên, khoan mỗi bên một lỗ có đường kính 0,5cm, sâu khoảng 0,5 cm. Tất cả các lỗ có kích thước bằng nhau.

- Bơm tế bào gốc: Bơm lần lượt vào mỗi lỗ một giọt dung dịch môi trường chứa tế bào gốc trung mô đã biệt hóa theo hướng tạo cốt bào, mật độ 10^6 /ml vào lỗ khoan bên trái. Lỗ khoan bên phải chỉ bơm môi trường không chứa tế bào. Sau ghép theo dõi toàn thân và tại vị trí ghép ở thời điểm 3 tuần, 6 tuần.



Hình 2.5. Bơm tế bào gốc vào lỗ khuyết đầu dưới xương đùi thỏ

- Đánh giá khả năng tạo xương in vivo của tế bào đã biệt hóa sau ghép tại thời điểm 3 và 6 tuần trên tiêu bản nhuộm H.E, nhuộm Masson's, tiêu bản hiển vi điện tử quét. Chỉ tiêu đánh giá: khối lượng xương tạo ra, mật độ tạo cốt bào. So sánh vùng xương không ghép tế bào. Trên siêu vi thể: quan sát và nhận xét sự xuất hiện các tạo cốt bào, hủy cốt bào và cốt bào vùng xương có ghép tế bào, so sánh tiêu bản xương không ghép tế bào

2.2.3.4. Bảo quản lạnh tế bào sau biệt hóa

- Phương pháp bảo quản lạnh tế bào

Sử dụng 90 mẫu lấy ra từ việc chia nhỏ số mẫu tế bào sau biệt hóa, chia thành 3 nhóm bảo quản trong 3 môi trường khác nhau về nồng độ FBS. Môi trường bảo quản là DMEM/F12 có bổ sung DMSO và tỷ lệ FBS ở ba nồng độ khác nhau: MT1 (10% DMSO); MT2 (10% DMSO và 15% FBS); MT3 (10% DMSO + 30% FBS). Thời gian bảo quản tế bào là 2 tuần.

Cách tiến hành:

- Hút bỏ môi trường cũ, rửa 2 lần bằng PBS
- Cho mỗi chai 1ml trypsin/EDTA trong 3-5 phút
- Quan sát dưới kính hiển vi, khi tế bào co tròn thì bắt hoạt trypsin bằng môi trường DMEM với 10% FBS, huyền phù nhẹ dung dịch tế bào.
- Thu dịch huyền phù tế bào vào ống falcon, ly tâm với tốc độ 1500 vòng/phút trong 10 phút.
- Thu tế bào, huyền phù 200 μ l môi trường, xác định mật độ tế bào.
- Cho vào cryotube với mật độ 10^6 - 10^7 tế bào/ml.
- Bảo quản tế bào ở 4⁰C trong thời gian 30 phút, -20⁰C trong thời gian 1 giờ, -80⁰C để qua đêm rồi cho trong nitơ lỏng (-196⁰C).

Hết thời gian bảo quản, rã đông để đánh giá khả năng sống của tế bào sau bảo quản và khả năng phát triển của tế bào:

- Lấy cryotube ra khỏi nitơ lỏng, đặt ngay vào bồn ổn nhiệt 37⁰C trong 2 phút.
- Pha loãng dịch bảo quản với môi trường nuôi, ly tâm với vận tốc 1500v/phút trong 10 phút.
- Thu lấy tế bào, huyền phù với môi trường nuôi.

- *Đánh giá tế bào sau bảo quản bằng nhuộm trypan blue 0,4%*

Tỷ lệ tế bào sống sau bảo quản được xác định bằng kỹ thuật nhuộm trypan blue 0,4%. Tiến hành như sau: Trộn dung dịch tế bào sau ly tâm với dung dịch xanh trypan blue với tỷ lệ 1:1 về thể tích, để ở nhiệt độ phòng. Chuẩn bị buồng đếm Neubauer, nhỏ dung dịch trên vào buồng đếm. Đếm tế bào trên kính hiển vi ở 4 ô vuông lớn của buồng đếm, đếm số tế bào sống và số tế bào chết. Các tế bào chết bắt màu xanh do màng tế bào bị tổn thương nên ngấm thuốc nhuộm xanh trypan blue, các tế bào sống có màng tế bào còn nguyên vẹn nên sáng màu do không ngấm thuốc nhuộm.

Tỷ lệ tế bào sống tính bằng công thức: $A = \frac{\text{Số lượng tế bào sống}}{\text{Số lượng tế bào sống} + \text{số lượng tế bào chết}} \times 100$.

- *Nuôi cấy tế bào sau bảo quản:*

Tiếp tục nuôi cấy để đánh giá khả năng phát triển của tế bào sau bảo quản.

2.3. Chỉ tiêu nghiên cứu

- Xác định được phương pháp giảm đau hiệu quả nhất, vị trí chọc hút, kỹ thuật chọc hút cho dịch tủy xương đủ số lượng, đảm bảo chất lượng để tách chiết tế bào.
- Xác định kỹ thuật xử lý mẫu dịch tủy xương cho kết quả tốt nhất.
- Lấy đủ 30 mẫu dịch tủy xương sau chọc hút đủ tiêu chuẩn: vô trùng, không đông, khối lượng 1.5 – 2.0ml/mẫu.
- Lấy đủ 30 mẫu dịch tế bào đơn nhân sau phân lập, tách chiết có mật độ 10^6 tế bào đơn nhân/ml.
- Nuôi cấy tăng sinh thành công 30 mẫu tế bào gốc trung mô.
- Định danh 10 mẫu bằng hai kỹ thuật: kỹ thuật đo dòng chảy tế bào (flow cytometry), $n=5$ và kỹ thuật hóa mô miễn dịch ($n=5$).

- Biệt hóa thành công 15 mẫu tế bào gốc trung mô thành tạo cốt bào.
- Định danh 15 mẫu khảng định tạo cốt bào bằng ba phương pháp, mỗi phương pháp 5 mẫu (n=5): 5 mẫu bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch có kết quả dương tính với marker tế bào tạo xương, 5 mẫu bằng kỹ thuật quan sát trên tiêu bản siêu cấu trúc có lắng đọng tinh thể khoáng, 5 mẫu bằng kỹ thuật nhuộm Alirazin red có lắng đọng can xi.
- Ghép trên thực nghiệm cho 15 thỏ tế bào được biệt hóa định hướng tạo cốt bào để nhận xét khả năng tạo xương trên in vivo.
- Bảo quản 90 mẫu tạo cốt bào. Tỷ lệ tế bào sống sau bảo quản đạt trên 80%. Nuôi cấy tế bào sau bảo quản tiếp tục phát triển trên 100% số mẫu.

2.4. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Bộ môn Mô-Phôi, Trường Đại học Y Hà Nội, khoa huyết học, bệnh viện Trung ương quân đội 108.

2.5. Xử lý số liệu

Số liệu thu nhận được xử lý bằng phần mềm xử lý thống kê SPSS. Phương pháp xử lý số liệu T-test, anova, kiểm định tương quan Pearson.

2.6. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu thực nghiệm nên vấn đề đạo đức không đề cập đến. Tuy nhiên, chúng tôi hạn chế tối đa sử dụng động vật và trước khi làm các thủ thuật phải tiến hành gây mê, gây tê để giảm đau.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả phân lập, nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc trung mô từ tủy xương thỏ.

3.1.1. Kết quả chọc hút, phân lập tế bào gốc trung mô từ tủy xương thỏ

3.1.1.1. Kết quả lựa chọn phương pháp giảm đau

Bảng 3.1. Kết quả lựa chọn phương pháp giảm đau

Phương pháp giảm đau	Khả năng cố định	Khả năng thao tác chọc hút	Hút tủy thành công
Gây tê tại chỗ	Kém	Khó	0/5
Gây mê	Tốt	Dễ làm, nhiều nguy cơ thỏ tử vong	3/5
Gây tê phối hợp gây mê	Tốt	Dễ làm, mau tỉnh	5/5

Nhận xét: Kết quả từ bảng trên cho thấy phương pháp gây tê tại chỗ thỏ hay cử động, khó chọc hút. Phương pháp gây mê dễ làm nhưng thỏ lâu tỉnh hoặc dễ ngừng thở. Phương pháp gây mê phối hợp gây tê tại chỗ cho thao tác chọc hút dễ dàng, động vật mau tỉnh, tỷ lệ chọc hút tủy xương thành công là cao nhất.

3.1.1.2. Kết quả lựa chọn vị trí chọc dịch tủy xương

Bảng 3.2. Kết quả lựa chọn vị trí chọc dịch tủy xương

Vị trí	Khả năng thao tác	Mức độ tổn thương	Thành công
Mẫu chuyển lớn	Khó quan sát	Nặng	0/5
Ụ ngòì	Khó quan sát	Nặng	0/5
Mào chậu	Dễ quan sát	Nhẹ	5/5

Nhận xét: Kết quả cho thấy tại vị trí mẫu chuyển lớn, ụ ngòì khó quan sát, thao tác khó, khó cố định, tổn thương nặng. Vị trí mào chậu dễ quan sát, vùng đó có bản xương rộng nhất, dễ thao tác, mức độ tổn thương nhẹ và có tỷ lệ hút được tủy xương cao nhất.

3.1.1.3. Kết quả số lượng và chất lượng dịch tủy xương sau chọc hút

Bảng 3.3. Kết quả số lượng, chất lượng dịch tủy xương sau chọc hút, ly tâm, tách chiết

Thông số nghiên cứu	Lượng dịch tủy xương (ml)	Tổng tế bào đơn nhân sau ly tâm($\times 10^6$)/1ml tủy xương thô
Số mẫu (n=30)	12 \pm 4.3	6.7\pm1.12

Nhận xét: Kết quả từ bảng trên cho thấy số lượng tủy xương chọc hút trung bình là 12 \pm 4.3 ml, số tế bào đơn nhân thu được là 6,7 $\times 10^6$ tế bào/ml.

Các mẫu dịch tủy xương này sử dụng để nuôi cấy tăng sinh.

3.1.2. Kết quả nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc trung mô tủy xương

3.1.2.1. Kết quả nuôi cấy sơ cấp

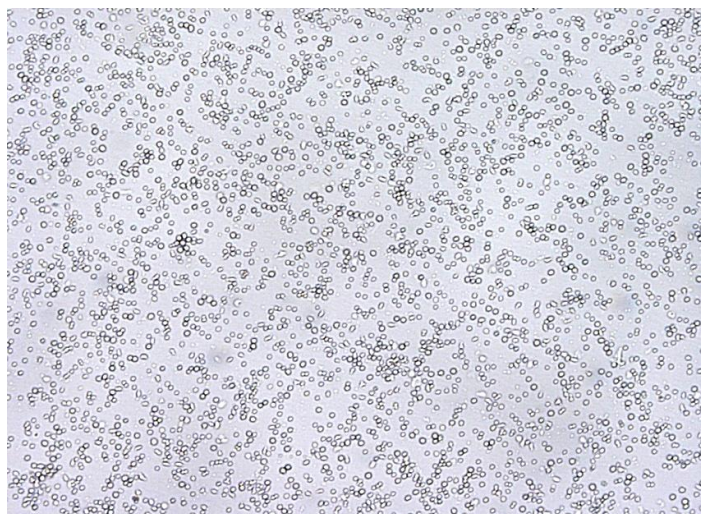
30 mẫu tế bào đơn nhân chọc hút từ 30 thỏ sử dụng nuôi cấy, tăng sinh theo 2 bước, nuôi cấy sơ cấp (lần đầu) và thứ cấp (cấy chuyển). Kết quả nuôi cấy sơ cấp sau 15 ngày được trình bày ở bảng sau:

Bảng 3.4. Kết quả MSC thu được ở giai đoạn nuôi cấy sơ cấp (P0).

Thông số nghiên cứu	Tổng số tế bào đơn nhân sau ly tâm ($\times 10^6$)/1ml tủy xương thỏ	Tổng tế bào bám dính đĩa nuôi cấy ($\times 10^4$)/ tổng tế bào đơn nhân
Số mẫu (n=30)	6.7\pm1.12	12.04 \pm 2.94

Nhận xét: Qua bảng 3.4 nhận thấy số lượng tế bào gốc trung mô ở giai đoạn sơ cấp (P0) là 12.04×10^4 tế bào/tổng tế bào đơn nhân.

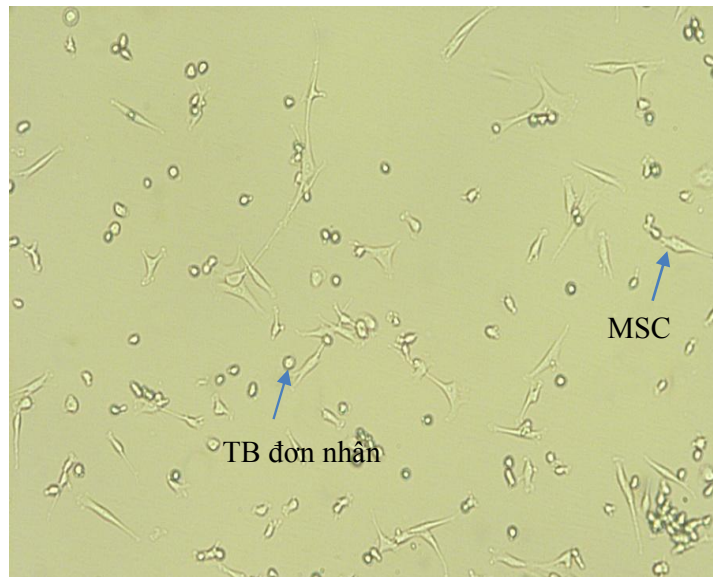
Tế bào sau khi phân lập từ tủy xương có dạng hình cầu, đa dạng về kích thước khi quan sát dưới kính hiển vi soi ngược. Ngay sau khi nuôi cấy quan sát dưới kính hiển vi có thể nhận biết và phân biệt một số dạng tế bào thông qua hình dạng. Trong mẫu còn sót lại một ít hồng cầu có hình đĩa lõm 2 mặt còn tế bào đơn nhân có kích thước nhỏ hơn, hình tròn đều (*Hình 3.1*).



Hình 3.1. Tế bào đơn nhân phân lập từ tủy xương thỏ sau ly tâm, chưa nuôi cấy. (KHV soi ngược x 100)

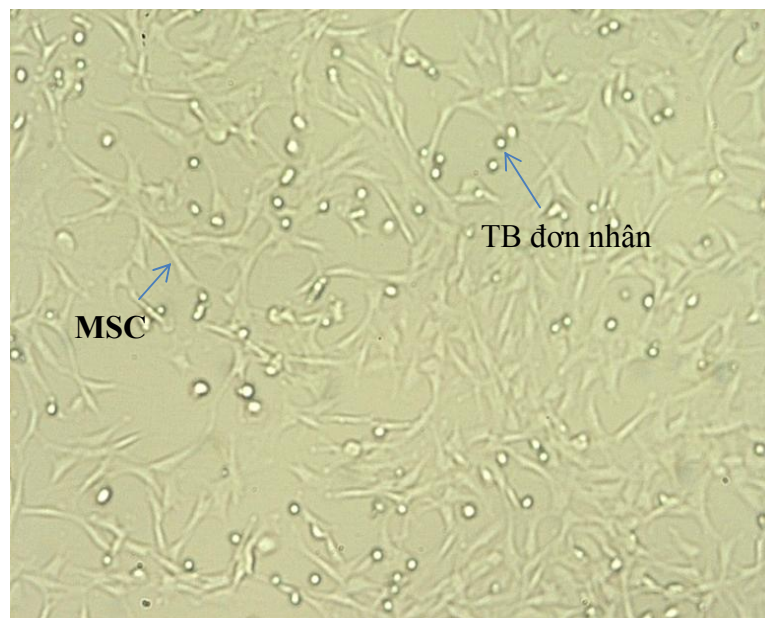
Sau 24 giờ nuôi, một số tế bào bám vào đáy chai nuôi cấy và trải ra giống nguyên bào sợi. Bên cạnh đó còn nhiều tế bào nổi lơ lửng trong dịch nuôi. Những tế bào bám dính được cho là tế bào gốc trung mô.

Sau 5-10 ngày nuôi cấy, hầu hết tế bào có dạng tế bào gốc trung mô và bám vào đáy chai, tuy nhiên ở giai đoạn này còn các tế bào nổi lơ lửng (Hình 3.2), (Hình 3.3).



Hình 3.2. Quần thể tế bào sau nuôi cấy 5 ngày. KHV soi ngược (x200).

Nhận xét: Sau nuôi cấy 5 ngày ở giai đoạn sơ cấp có một số tế bào đơn nhân bên cạnh tế bào có hình dạng của tế bào gốc trung mô. Tế bào có mật độ thưa (20% diện tích bề mặt chai nuôi cấy). Các tế bào phát triển đa hướng trên bề mặt đĩa nuôi cấy.



Hình 3.3. Quần thể tế bào đơn nhân sau nuôi cấy 10 ngày. KHV soi ngược (x200).

Nhận xét: Các tế bào có mật độ tương đối cao (80% diện tích bề mặt chai nuôi cấy)

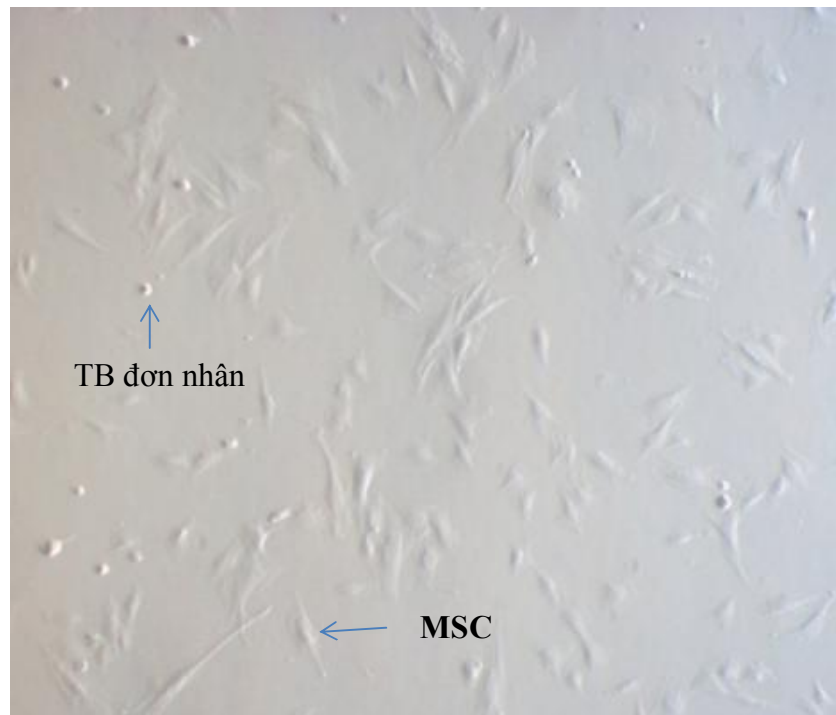
Lúc này, các tế bào dạng nguyên bào sợi trở nên nổi trội hơn so với tế bào khác. Khi mật độ tế bào càng cao, tế bào tăng sinh chậm. Đôi khi tại một số vị trí xuất hiện các tế bào co tròn, nổi lên, dấu hiệu của sự chết tế bào do thiếu dinh dưỡng. Đây là giai đoạn cần phải cấy chuyển để cung cấp không gian và dinh dưỡng.

3.1.2.2. Kết quả nuôi cấy thứ cấp (cấy chuyển)

- Nuôi cấy trong chai nuôi flask

Sau 7-10 ngày nuôi cấy sơ cấp, quần thể bắt đầu hợp dòng và chiếm 70-80% diện tích bề mặt bình nuôi. Thời điểm này thích hợp cho cấy chuyển.

Sau cấy chuyển từ 3 đến 5 ngày, tế bào phát triển nhiều lên có hình dạng giống nguyên bào sợi và hình thành các cụm tế bào. Sau 7 -8 ngày, các tế bào hợp dòng phủ kín bề mặt nuôi cấy. (Hình 3.4; Hình 3.5; Hình 3.6).



Hình 3.4. Quần thể tế bào cấy chuyển lần 3 (P3) sau nuôi cấy 3 ngày. KHV soi ngược (x 200).

Nhận xét: Đến giai đoạn cấy chuyển lần 3 tế bào có dạng hình tròn giảm gần hết chỉ còn lại các tế bào giống nguyên bào sợi. Tế bào có mật độ thưa thớt (20% diện tích bề mặt chai nuôi cấy)



Hình 3.5. Quần thể tế bào cấy chuyển lần 3 (P3) sau nuôi cấy 5 ngày. KHV soi ngược (x 200).

Nhận xét: Sau nuôi cấy 5 ngày ở lần cấy chuyển 3 thấy các cụm tế bào lan dần bề mặt chai nuôi. (Mật độ tế bào hơn 50% diện tích bề mặt chai nuôi)



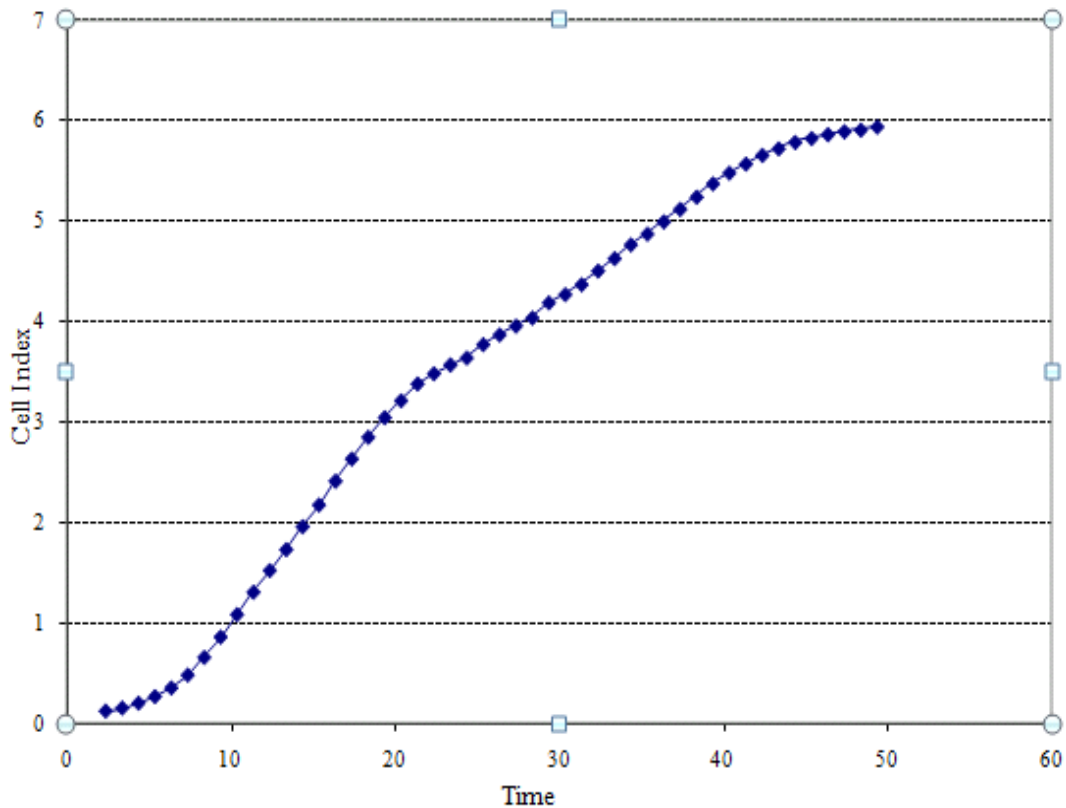
Hình 3.6. Quần thể tế bào cấy chuyển lần 3 (P3) sau nuôi cấy 10 ngày. KHV soi ngược (x 200).

Nhận xét: Sau 10 ngày nuôi cấy tế bào phủ gần kín bề mặt chai nuôi cấy

Quần thể tế bào có dạng nguyên bào sợi tương đối thuần nhất

3.1.2.3. Theo dõi tăng sinh của tế bào nuôi cấy

Để theo dõi tốc độ phát triển của tế bào nuôi cấy, chúng tôi xây dựng đường cong tăng trưởng bằng hệ thống X-celligence với mẫu tế bào thu hoạch ở giai đoạn P4, cấy trên đĩa 96 giếng điện cực bằng vàng chuyên dụng. Sự phát triển của tế bào được biểu thị trên Biểu đồ 3.1.



Biểu đồ 3.1. Tốc độ tăng trưởng tế bào đo dưới hệ thống X-celligence

Biểu đồ 3.1 cho thấy từ 0 đến 2 giờ là thời điểm tế bào mới nạp lên đĩa nên tế bào vẫn lơ lửng chưa bám đĩa. Từ 2 giờ đến 49 giờ, thấy đường cong của biểu đồ có độ dốc lớn. Sau 50 giờ, đường biểu diễn có xu hướng đi ngang.

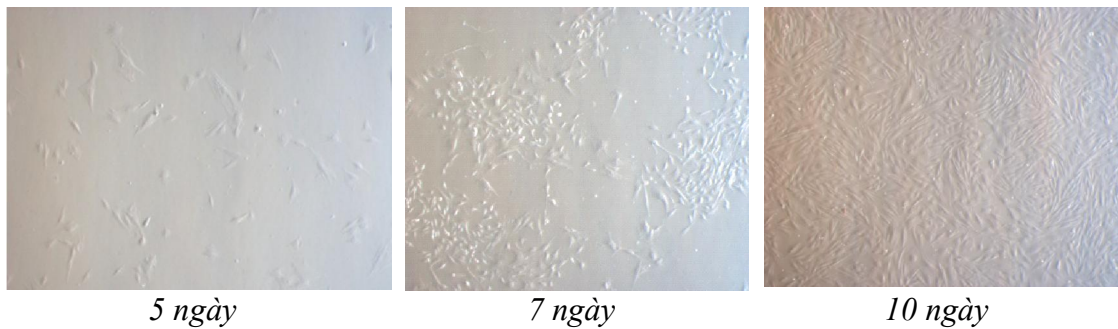
3.1.2.4. Khả năng tạo cụm, bám đáy của tế bào nuôi cấy

Đặc tính của MSC là khả năng tạo cụm dạng nguyên bào sợi (CFU-F) khi cấy chuyên ở mật độ thưa. Sau 7 ngày nuôi cấy, chúng tôi đã quan sát thấy rõ các cụm tế bào.



Hình 3.7. Hình ảnh cụm tế bào sau nuôi cấy 7 ngày (x 200).

Quan sát trên kính hiển vi thấy được các cụm tế bào khá rõ. Sau 7 ngày nuôi cấy mỗi cụm có trên 50 tế bào.



Hình 3.8. Khả năng tăng sinh, bám đáy và tạo cụm của tế bào nuôi cấy tăng dần theo thời gian

Bảng 3.5. Kết quả theo dõi sự biến đổi hình dạng, đặc tính tế bào gốc trung mô sau nuôi cấy

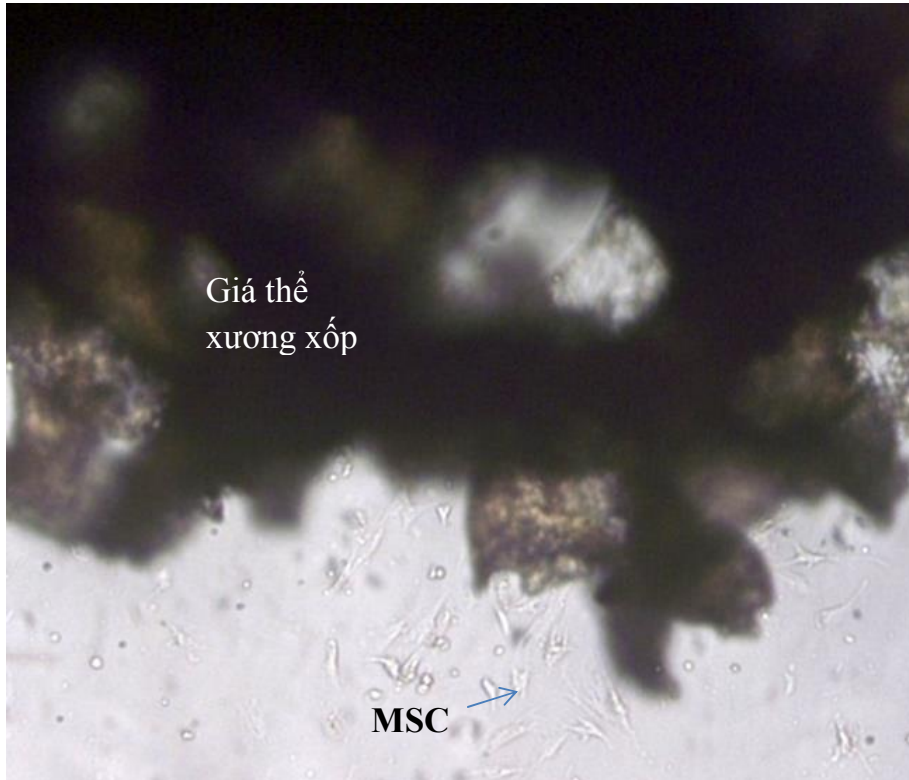
Mẫu nuôi cấy	Số mẫu có tế bào giống nguyên bào sợi	Số mẫu có tế bào bám đáy	Số mẫu có tế bào tạo cụm	Tổng số cụm tế bào
n=10 (mật độ 200 tế bào/cm ²)	10/10	10/10	10/10	107± 25

Nhận xét: Chọn ngẫu nhiên 10 mẫu tế bào sau nuôi cấy với mật độ 200 tế bào/cm² quan sát khả năng biến đổi về hình dạng, đặc tính của chúng. Kết quả cho thấy: 100% số mẫu có tế bào bám bề mặt chai, 100% có hình dạng giống nguyên bào sợi, 100% số mẫu tạo cụm. Số cụm tế bào trung bình là 107 ± 25.

Kết quả cho thấy các tế bào nuôi cấy mang đặc điểm của tế bào gốc trung mô. Tuy nhiên, để đảm bảo chắc chắn, chúng tôi sử dụng kỹ thuật định danh với các marker đặc hiệu.

- Nuôi cấy tế bào trên giá thể xương xốp đông khô

Sau khi giá thể được bơm tế bào gốc và để trong môi trường nuôi cấy với đầy đủ các điều kiện như nuôi trong chai nuôi flask, theo dõi sự phát triển của tế bào và sự biến đổi của môi trường nuôi cấy. Ngày thứ 5, môi trường đổi màu và có nhiều tế bào lan xung quanh giá thể, thấy hình ảnh tế bào bình thường giống nguyên bào sợi, giống dạng tế bào bám trên đĩa nuôi thường. (Hình 3.9). Tuy nhiên vì đây không phải là giá thể được lựa chọn chính nên chúng tôi không theo dõi sự phát triển của tế bào trên giá thể.



Hình 3.9. Tế bào gốc trung mô nuôi trên giá thể xương xốp

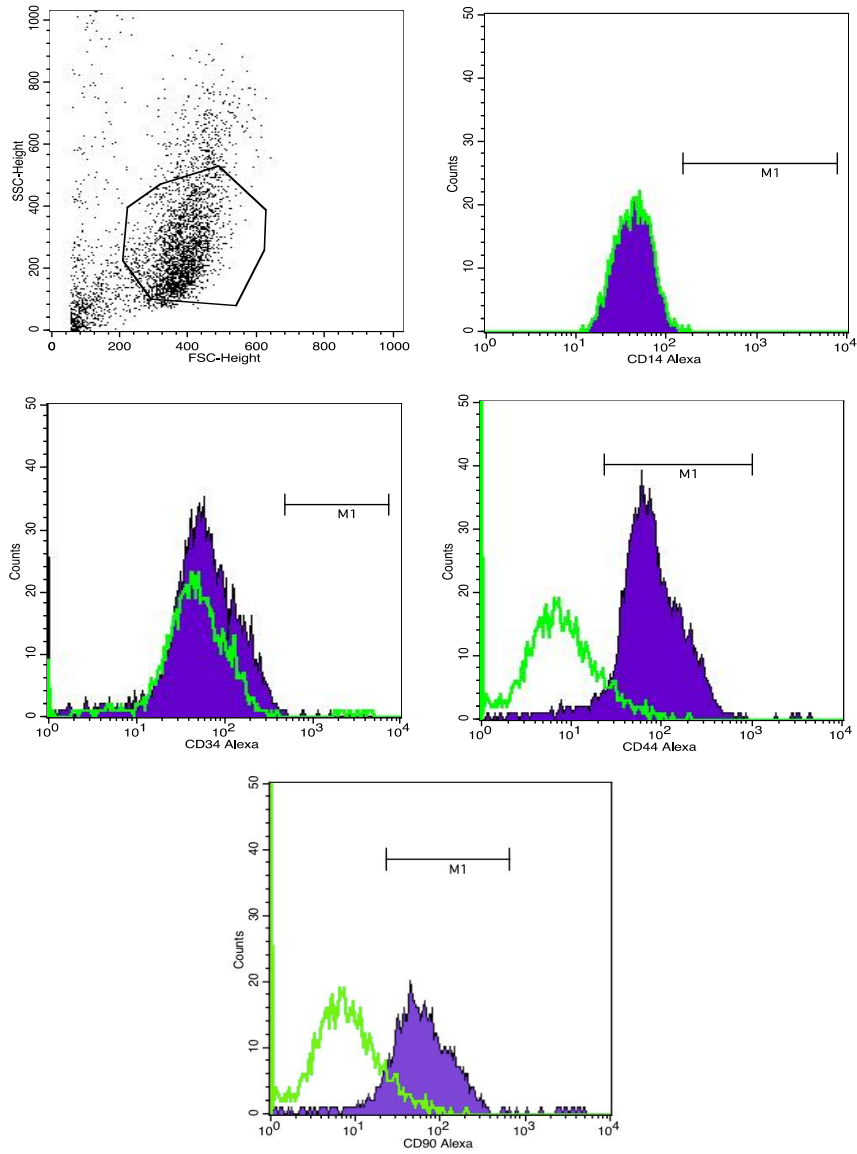
Nhận xét: MSC phát triển bình thường xung quang giá thể xương xốp. Tuy nhiên hơi khó quan sát thấy tế bào trên các vách xương.

3.1.2.5. Kết quả định danh tế bào gốc trung mô

Ngoài các đặc tính như hình dạng, khả năng bám xuống đáy chai nuôi, phát triển tập trung thành các cụm tế bào, để đảm bảo chắc chắn là tế bào gốc trung mô, chúng tôi tiến hành một số kỹ thuật đặc hiệu nhằm phát hiện các marker của chúng và khả năng đa biệt hóa của tế bào gốc trung mô.

- *Định danh bằng kỹ thuật đo dòng chảy tế bào (flow cytometry):*

MSC được nuôi cấy đến giai đoạn P4 thu được quần thể tế bào tương đối thuần nhất, tiến hành xác định marker bề mặt tế bào bằng flow cytometry.



Hình 3.10. Kết quả xác định marker của MSC bằng kỹ thuật đo dòng chảy tế bào

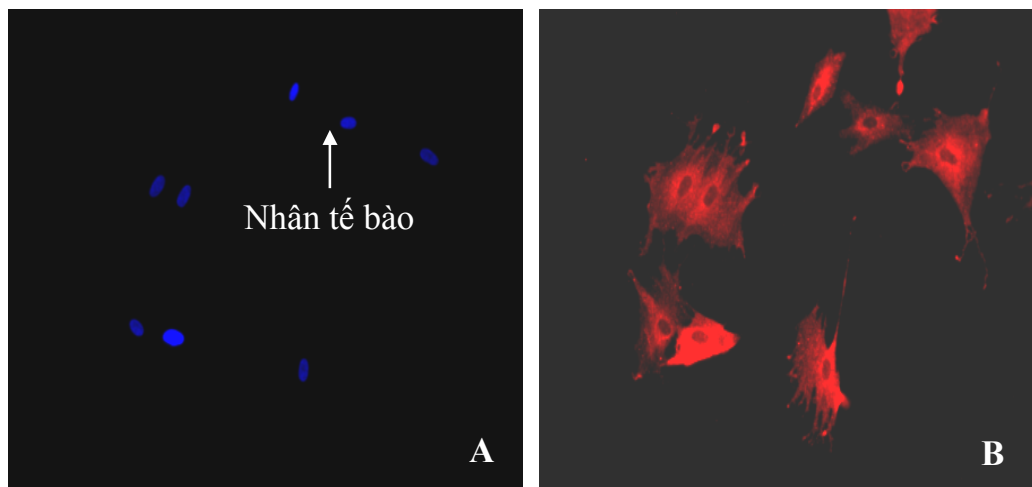
Bảng 3.6. Kết quả xác định tỷ lệ % dương tính một số marker của tế bào gốc trung mô tủy xương thỏ bằng kỹ thuật đo dòng chảy tế bào (flow cytometry)

Marker	CD14(n=5)	CD34 (n=5)	CD44 (n=5)	CD90 (n=5)
% Dương tính	0,17±1,5	0,36±1,14	97,42±1,42	95,37±0,8

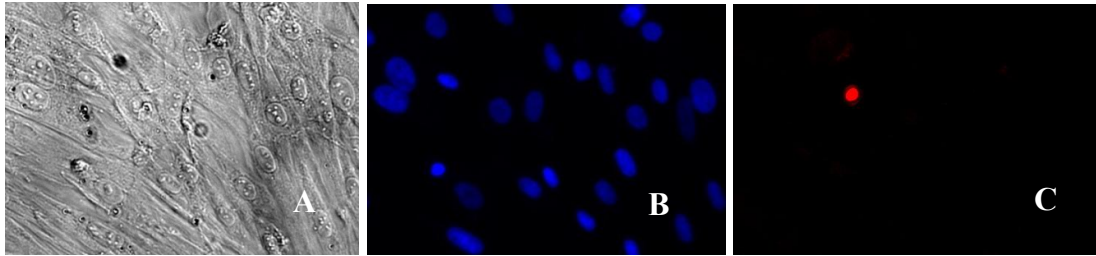
Kết quả cho thấy tỷ lệ dương tính trên 95% với marker CD90,CD44; biểu hiện âm tính dưới 2% với marker CD14, CD34.

- *Định danh bằng kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch:*

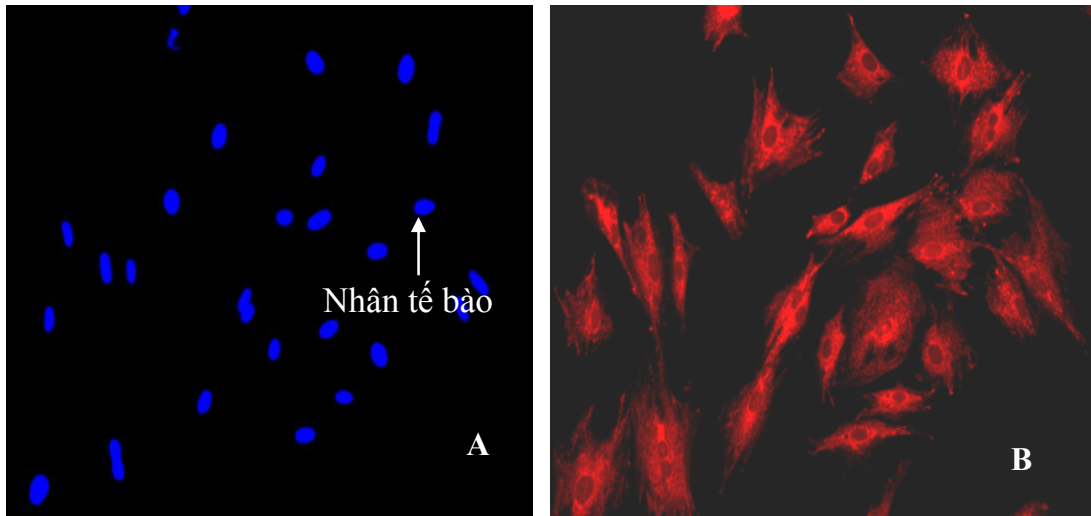
Kết quả 5 mẫu tế bào nuôi cấy ở giai đoạn P3, nhuộm hóa mô miễn dịch với các marker CD44, CD90, CD14 và CD34 cho thấy các tế bào biểu hiện dương tính rõ với CD44, CD90 và âm tính với CD14, CD34 (Hình 3.10; 3.11; 3.12; 3.13).



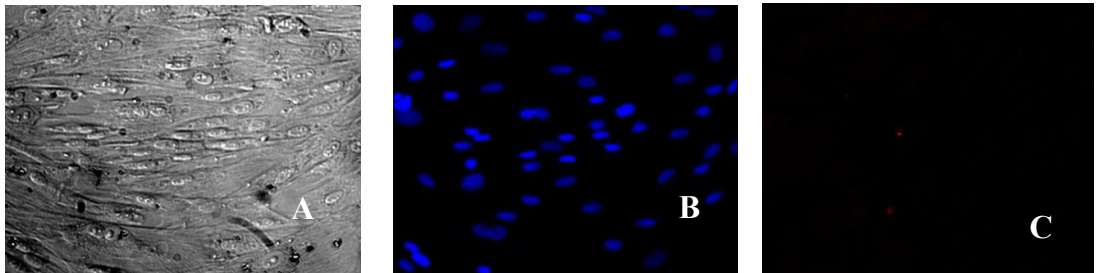
Hình 3.11. Tế bào gốc trung mô dương tính với CD44. Hình A: Nhân tế bào bắt màu xanh và hình B: Tế bào bắt màu đỏ. (Tế bào cấy chuyển giai đoạn P3 - Nhuộm HMMD x 500)



Hình 3.12. Tế bào gốc trung mô âm tính với CD14. Hình A: MSC. Hình B: Nhân tế bào bắt màu xanh và hình C: Tế bào không bắt màu. (Tế bào cấy chuyển giai đoạn P3 - Nhuộm HMMD x 500)



Hình 3.13. Tế bào gốc trung mô dương tính với CD90. Hình A: Nhân tế bào bắt màu xanh và hình B: Tế bào bắt màu đỏ. (Tế bào cấy chuyển giai đoạn P3 - Nhuộm HMMD x 500)

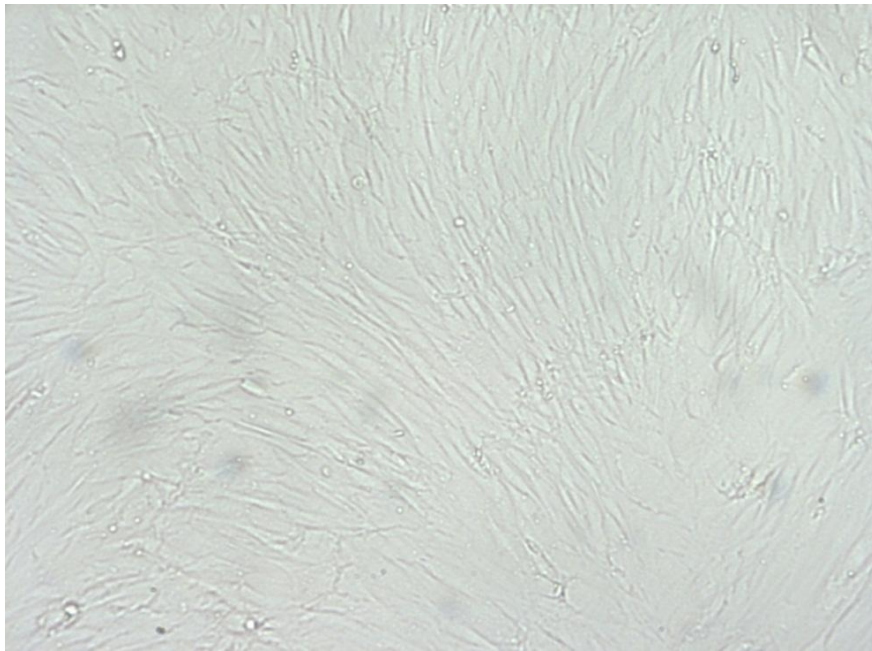


Hình 3.14. Tế bào gốc trung mô âm tính với CD34. Hình A: Nhân tế bào bắt màu xanh và B: Tế bào không bắt màu. (Tế bào cấy chuyển giai đoạn P3 - Nhuộm HMMD x 500)

- Kết quả biệt hóa tế bào gốc trung mô thành nguyên bào mỡ

Nuôi cấy trong môi trường biệt hóa tế bào mỡ 5 mẫu (n=5) tế bào gốc trung mô cùng 5 mẫu nuôi trong môi trường không biệt hóa (n=5). Kết quả cho thấy các mẫu tế bào nuôi trong môi trường cảm ứng tạo mỡ sau thời gian 3 đến 5 ngày bắt đầu chuyển dần thành dạng đa diện với sự xuất hiện các giọt mỡ nhỏ trong bào tương ở ngoại vi tế bào (*Hình 3.16*), ngược lại các mẫu nuôi trong môi trường không cảm ứng tạo mỡ hoàn toàn không có hiện tượng trên. (*Hình 3.15*).

Theo thời gian, các giọt mỡ nhỏ có xu hướng lớn dần và hợp nhất lại cùng với sự biến đổi hình thái tế bào thành dạng hình bầu dục hoặc hình cầu. Tất cả các mẫu tế bào trong nghiên cứu của chúng tôi đều có khả năng biệt hoá thành nguyên bào mỡ trong môi trường biệt hoá sau khoảng 3-5 ngày.



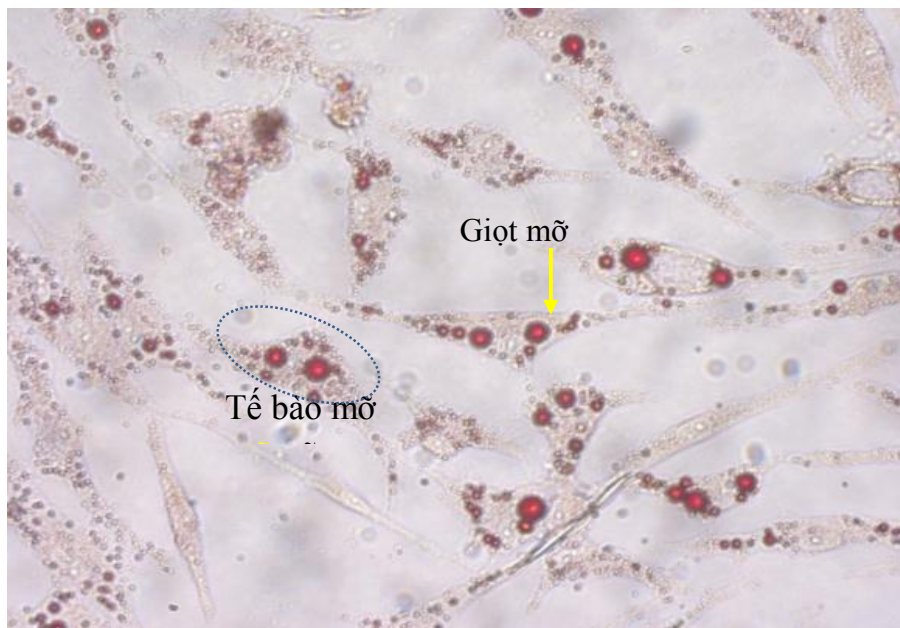
Hình 3.15. Tế bào gốc trung mô nuôi cấy nhưng không biệt hóa. (x200).

Hình dạng MSC đặc trưng, không có sự khác biệt



Hình 3.16 Tế bào gốc trung mô nuôi cấy trong môi trường biệt hóa tạo mỡ sau 5-7 ngày. (x200).

Nhận xét: Nuôi cấy MSC trong môi trường biệt hóa tạo mỡ sau 5-7 ngày tế bào chuyển dạng thành tế bào đa diện dẹt trong bào tương xuất hiện các giọt mỡ



Hình 3.17. Tế bào gốc trung mô nuôi cấy trong môi trường biệt hóa tạo mỡ sau 5-7 ngày nhuộm Oil-red O. Các giọt mỡ bắt màu đỏ(x 500).

3.2. Kết quả biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tạo cốt bào và kết quả bảo quản sau biệt hóa

3.2.1. Kết quả biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tạo cốt bào in vitro

Bảng 3.7. Kết quả định danh sau biệt hóa tế bào gốc trung mô tủy xương thành tạo cốt bào

Số mẫu	Kỹ thuật	Số mẫu tế bào định danh	Nhuộm Alizarin red		Hóa mô miễn dịch		Hiện vi điện tử	
			Số mẫu	Số mẫu dương tính	Số mẫu	Số mẫu dương tính	Số mẫu	Số mẫu dương tính
MSC		15/15	5	5/5	5	5/5	5	5/5

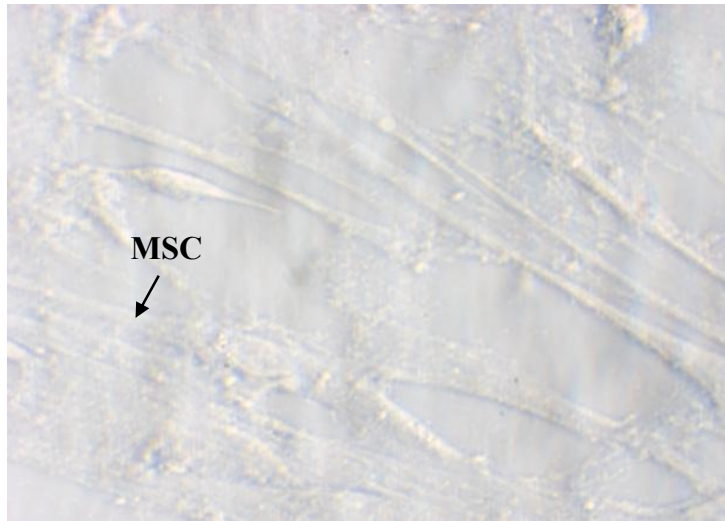
Nhận xét: Số mẫu để định danh tế bào là 15 mẫu, trong đó 5 mẫu bằng kỹ thuật nhuộm Alizarin red, 5 mẫu bằng kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch và 5 mẫu bằng kỹ thuật hiển vi điện tử quét. Các mẫu lấy ngẫu nhiên.

Đánh giá sự biệt hóa dựa trên:

- Hình thái vi thể tế bào
- Sự khoáng hóa trong chất nền
- Biểu hiện marker bề mặt tế bào

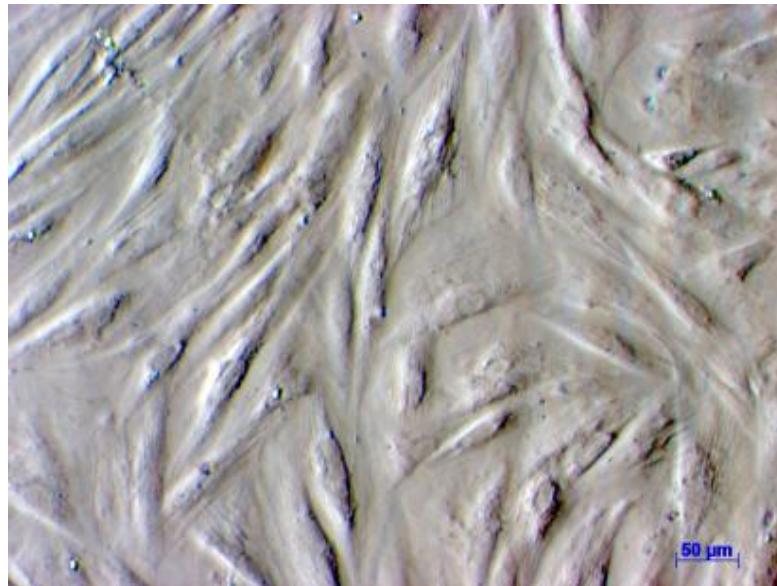
Kết quả biểu hiện bảng trên cho thấy tỷ lệ dương tính 100% ở cả ba kỹ thuật.

Các tế bào trong môi trường nuôi cấy thông thường không định hướng biệt hóa có dạng hình sợi kích thước to nhỏ không đồng đều. Ranh giới tế bào với bề mặt nhựa nuôi cấy rõ nét. (Hình 3.18)

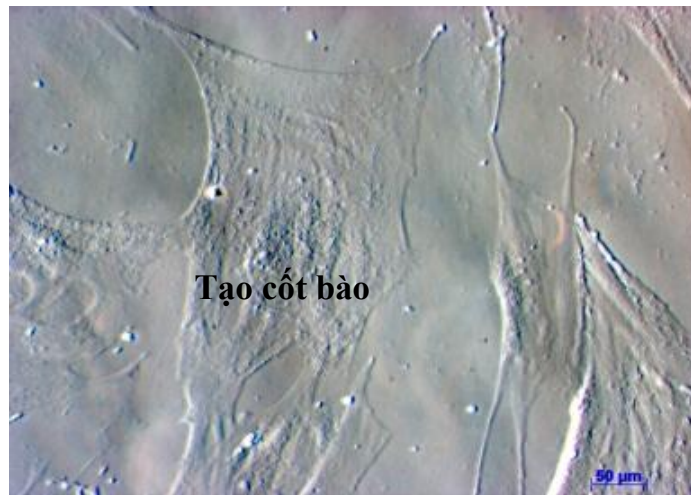


Hình 3.18. Tế bào gốc trung mô nuôi cấy không biệt hóa

Những tế bào nuôi cấy với môi trường cảm ứng biệt hóa 4 ngày, tế bào bắt đầu có sự thay đổi hình dạng, tuy nhiên hầu hết vẫn còn dạng thon dài. Sau 7,14 ngày tế bào co ngắn lại, có dạng hình sao nhánh bào tương ngắn và dạng hạt đậu là hình dáng đặc trưng của tế bào xương cũng giống như tế bào gốc đã biệt hóa thành tế bào chức năng (Hình 3.19; Hình 3.20).

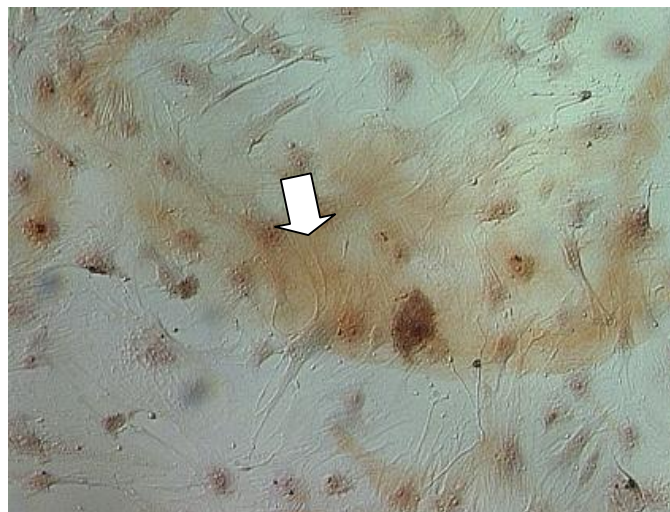


Hình 3.19. Tế bào gốc trung mô sau 12 ngày biệt hóa theo hướng tạo cốt bào - (x500)



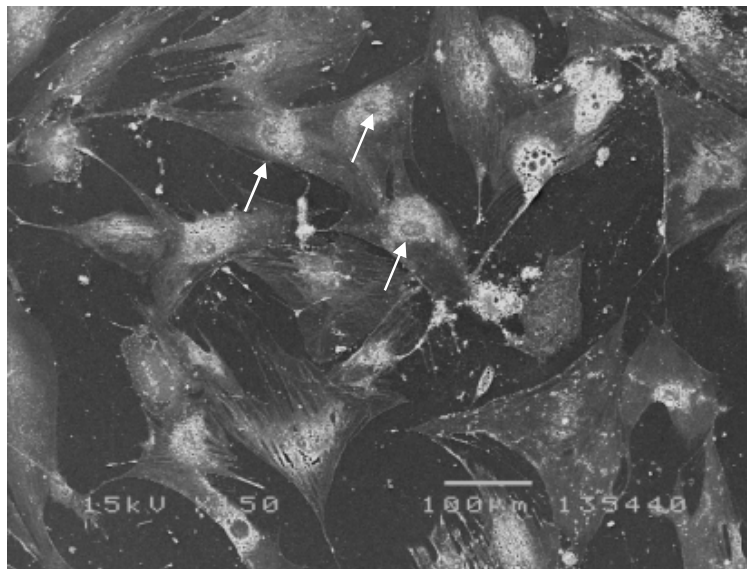
Hình 3.20. Tế bào gốc trung mô sau biệt hóa theo hướng tạo cốt bào 21 ngày (x750).

Các tế bào khi nhuộm với Alizarin red, sau khi nhuộm tế bào và chất nền bắt màu đỏ cam (Hình 3.21). Màu đỏ cam là phức hợp của thuốc nhuộm với ion canxi hiện diện trong tế bào hay chất nền ngoại bào. Điều này chứng tỏ các MSC đã chuyển sang dạng tế bào tạo xương với sự lắng tụ canxi trong tế bào và chất nền. Dưới kính hiển vi điện tử quét thấy tế bào biệt hóa sau 30 ngày xuất hiện các các tinh thể khoáng.

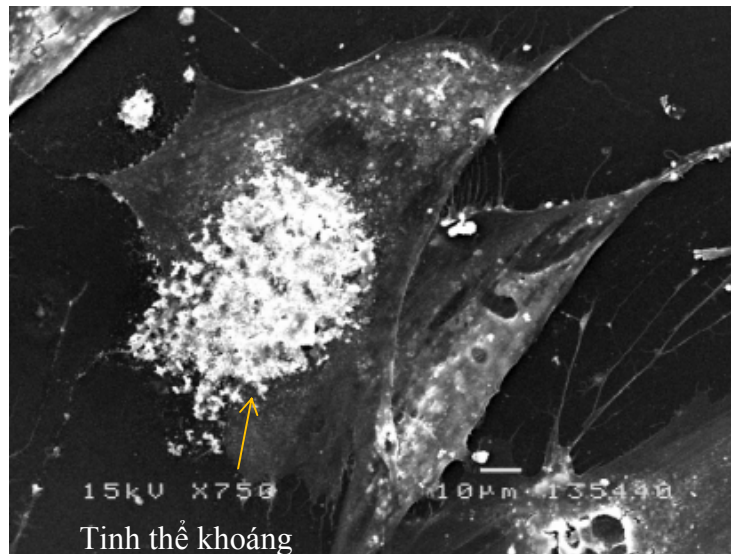


Hình 3.21. Tế bào gốc trung mô sau biệt hóa 21 ngày nhuộm Alizarin red. (x 500). Tế bào và mô nền gian bào có vùng bắt màu đỏ cam (mũi tên), có biểu hiện dương tính với Alizarin red.

Dưới kính hiển vi điện tử quét cho thấy các tế bào đang biệt hoá có dạng hình đa giác với các nhánh bào tương ngắn. Càng về sau, các tế bào được cảm ứng biệt hóa càng trở nên thô nhám do hiện tượng canxi tích tụ nhiều ở bề mặt tế bào. Ở giai đoạn 30 ngày sau biệt hóa các tế bào có hình dạng đặc trưng của tế bào xương nuôi cấy in vitro và chất nền ngoại bào cũng khoáng hóa rõ nét. Các tinh thể khoáng tập trung thành đám trên bề mặt hoặc lân cận tế bào đang biệt hoá (Hình 3.22), (Hình 3.23).

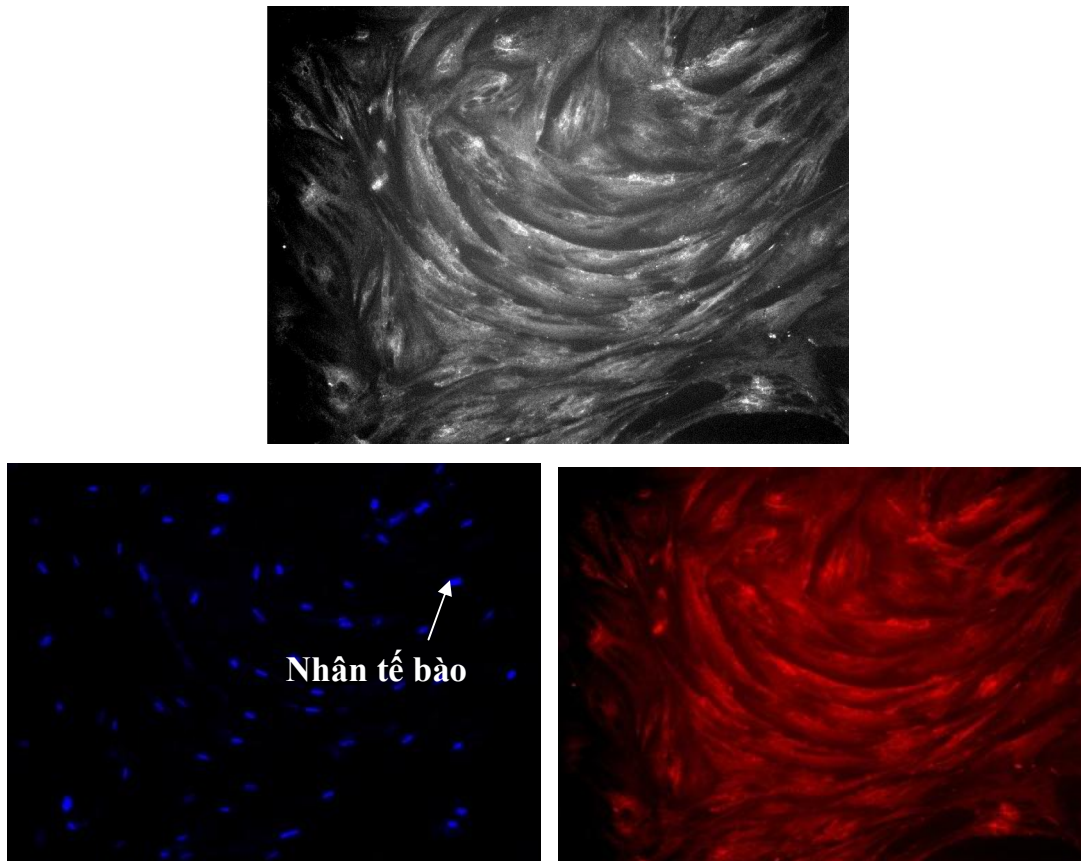


Hình 3.22. Tế bào gốc trung mô sau biệt hóa 30 ngày dưới HVĐT quét (mũi tên).



Hình 3.23. Tế bào gốc trung mô sau biệt hóa 30 ngày dưới HVĐT quét. Tinh thể khoáng hình thành rõ nét

Osteocalcin là protein được tổng hợp nhiều trong tế bào tạo xương và được xem là marker của tế bào tạo xương. Để xác định marker tế bào sau biệt hóa bằng phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch với kháng thể kháng osteocalcin. Kết quả cho thấy các tế bào sau biệt hóa dương tính với kháng thể kháng osteocalcin biểu hiện tế bào bắt màu đỏ (Hình 3.24).

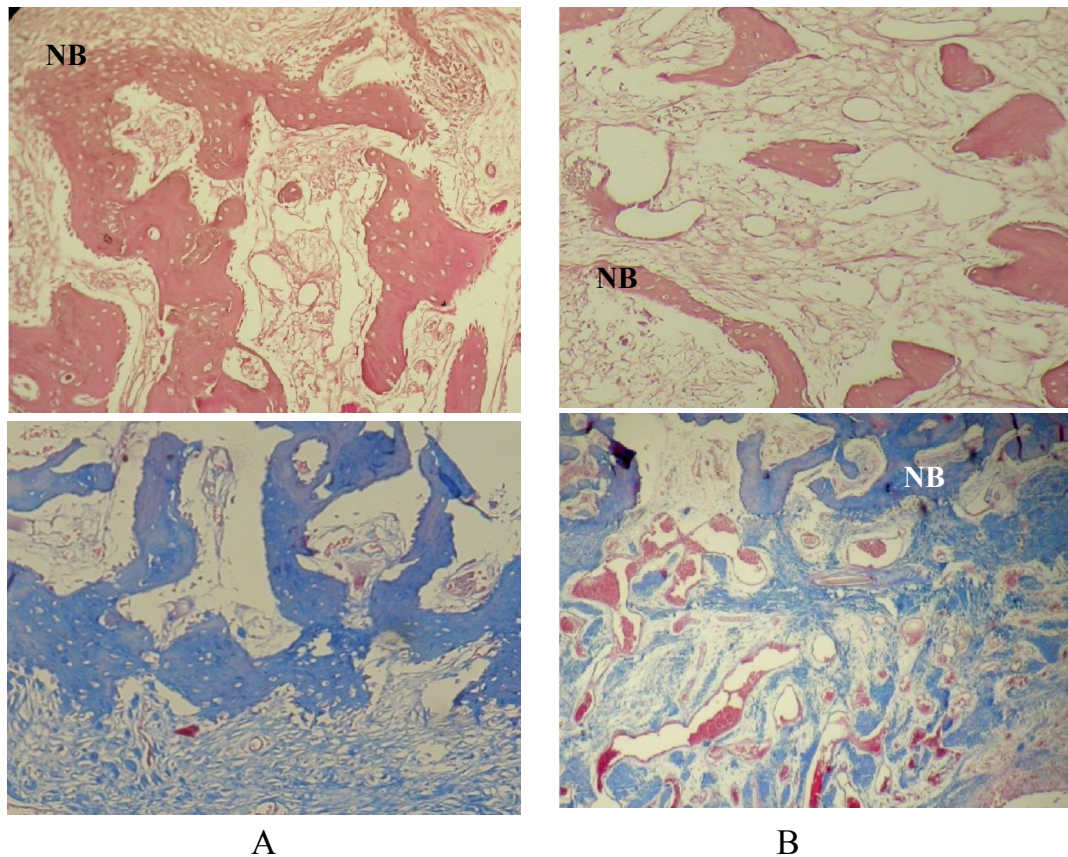


Hình 3.24. Hình ảnh các tế bào sau biệt hóa 15 ngày trong môi trường cảm ứng tạo xương (nhuộm HMMD biểu hiện dương tính với marker osteocalcin (x200)).

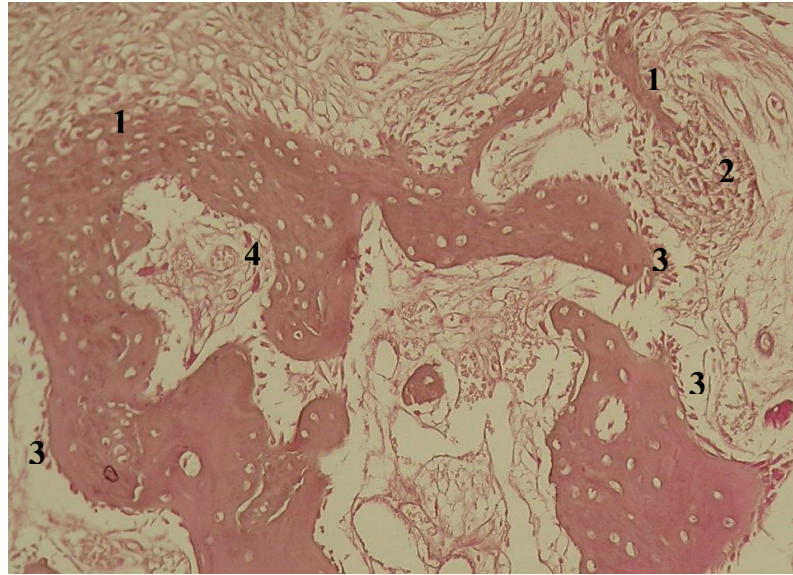
Tóm lại, 15 mẫu tế bào gốc trung mô được biệt hóa theo hướng tạo cốt bào, sau biệt hóa định danh bằng 3 phương pháp đặc hiệu với phương pháp lấy mẫu ngẫu nhiên cho thấy 100% các mẫu đã được biệt hóa thành công.

3.2.2. Kết quả ghép tế bào gốc trung mô biệt hóa theo hướng tạo cốt bào trên thực nghiệm

Nhằm xác định khả năng tạo xương của tạo cốt bào được biệt hóa từ tế bào gốc trung mô tủy xương theo quy trình thực nghiệm, ngoài việc định danh dựa theo các tiêu chuẩn, chúng tôi đánh giá thêm khả năng tạo xương của chúng trên thực nghiệm có đối chứng. Sau ghép tế bào vào ổ khuyết xương thỏ, đánh giá sự phát triển của xương ở các thời điểm 3 tuần và 6 tuần trên các tiêu bản vi thể nhuộm bằng 2 phương pháp Hematoxylin Eosin và Masson's. Kết quả cho thấy trên các tiêu bản của nhóm nghiên cứu (bơm môi trường có tế bào) có dấu hiệu của sự tạo xương mới mạnh mẽ hơn như diện tích vùng xương mới nhiều hơn, có nhiều tạo cốt bào hơn nhóm đối chứng (bơm môi trường không có tế bào). (Hình 3.25 và 3.26).



Hình 3.25: Hình ảnh vi thể tại vùng xương ghép tế bào (A) và không ghép tế bào (B) sau 3 tuần (ảnh trên: H.E và Masson's ảnh dưới). NB: xương mới hình thành.



Hình 3.26: Hình ảnh vi thể vùng xương có bơm tế bào sau 3 tuần. 1: Xương mới; 2: Vùng đang lắng đọng can xi; 3: Các tạo cốt bào; 4: mạch máu. (H.E)

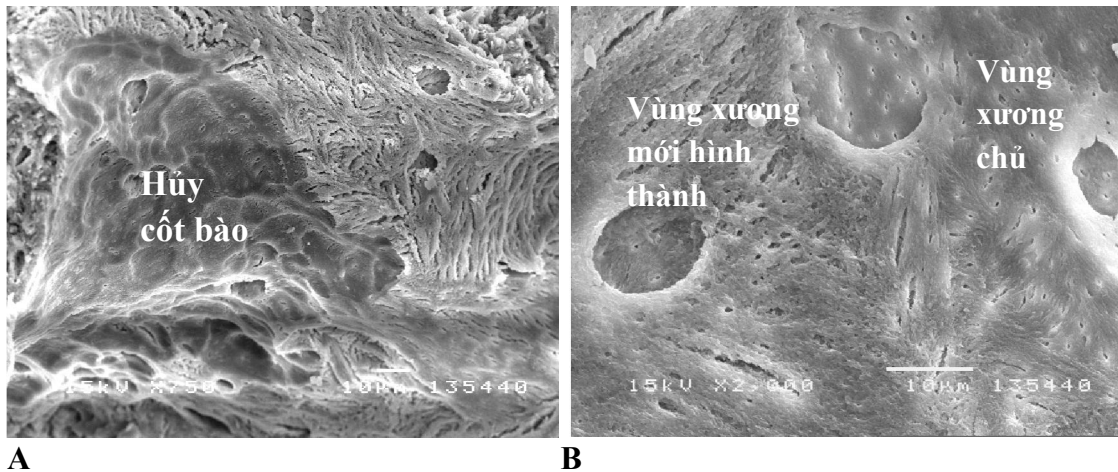
Quan sát trên các tiêu bản nhuộm H.E và Masson's lấy ngẫu nhiên giữa nhóm mẫu có và không ghép tế bào, chúng tôi nhận thấy:

Diện tích xương mới (NB) trên tiêu bản vùng xương cắt qua lỗ khoan có bơm tế bào của thỏ nuôi 3 tuần lớn hơn so với vùng xương không bơm tế bào. (Hình3.25)

Vùng mô liên kết nơi chưa hình thành xương ở nhóm có bơm tế bào gốc có biểu hiện mạnh mẽ của sự tạo xương như tăng sinh mạch máu, lắng đọng can xi, xuất hiện các tế bào sụn, đảo sụn. Hiện tượng này xảy ra chậm chạp ở nhóm không ghép tế bào. (Hình 3.25)

Xuất hiện nhiều tạo cốt bào trên các vách xương ở nhóm có bơm tế bào, ít thấy hơn ở nhóm không bơm tế bào (Hình 3.26)

Trên hình ảnh siêu cấu trúc (Hiện vi điện tử quét), vùng xương có bơm tế bào xuất hiện các tế bào tham gia tạo xương mới khá rõ, trong đó có cả hủy cốt bào. (Hình 3.27)



Hình 3.27: Hình ảnh siêu vi thể tại vùng xương ghép tế bào (A) và không ghép tế bào (B) sau 6 tuần (Hiển vi điện tử quét SEM).

3.3. Kết quả bảo quản tạo cốt bào sau biệt hóa

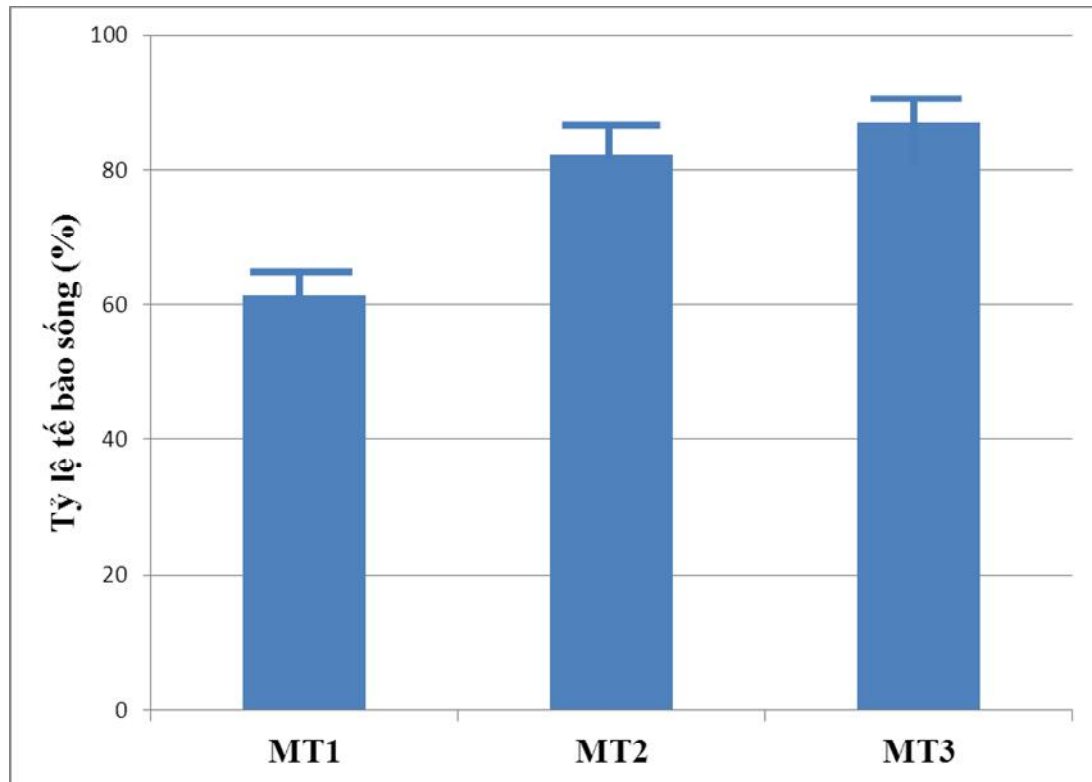
3.3.1. Tỷ lệ tế bào sống sau bảo ở các môi trường có nồng độ huyết thanh khác nhau (MT1, MT2, MT3).

Chúng tôi tiến hành bảo quản 90 mẫu tế bào được phân lập từ tủy xương thỏ sau khi nuôi cấy biệt hóa định hướng dạng tạo cốt bào, môi trường bảo quản khác nhau MT1, MT2, MT3 có thay đổi tỷ lệ FBS: 0%, 15% và 30% Quy trình tiến hành như nhau cho các đợt thí nghiệm. Sử dụng các thiết bị, dụng cụ hóa chất đồng bộ trong quá trình thí nghiệm. Mật độ tế bào, điều kiện nuôi là đồng nhất. Kết quả tỷ lệ tế bào sống sau bảo quản theo bảng, biểu đồ dưới đây:

Bảng 3.8. Tỷ lệ tế bào sống trung bình sau rửa đông ở các môi trường MT1,MT2,MT3

Thông số nghiên cứu Môi trường bảo quản	Giá trị nhỏ nhất (min)	Giá trị lớn nhất (max)	Giá trị trung bình (Mean \pm SD)	p
MT1 (n=30)	50,9	68,1	61,28 \pm 3,89	P1,2<0.001
MT2 (n=30)	72,4	92,96	82,19 \pm 5,45	P2,3 < 0.001
MT3 (n=30)	76	93,05	87,07 \pm 4,18	P1,3 < 0.001

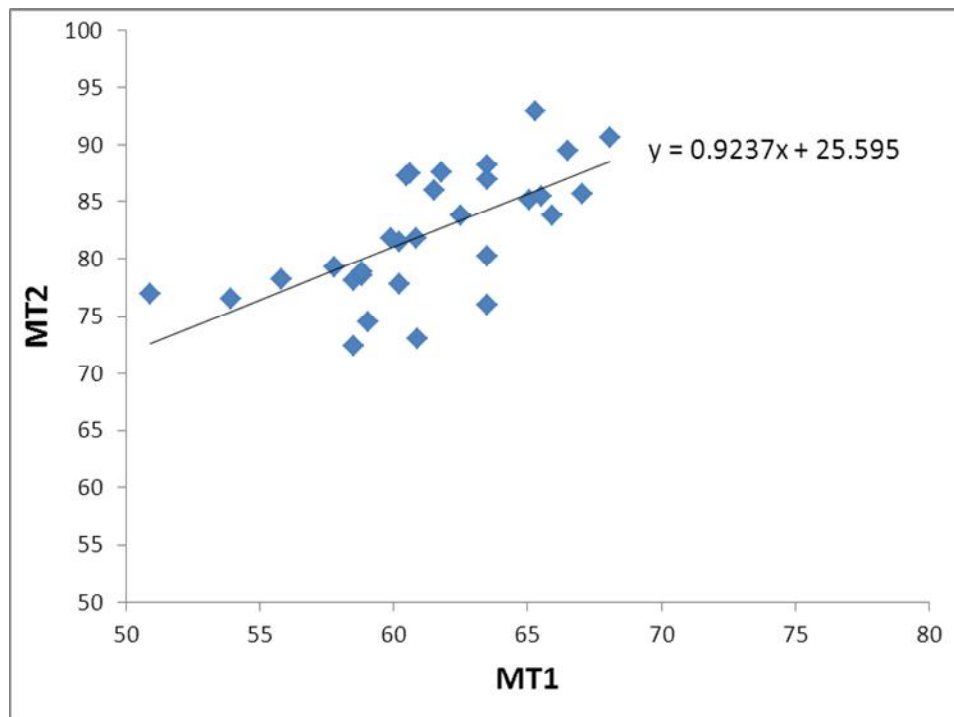
(1,2: MT1 so với MT2; 2,3: MT2 so với MT3; 1,3: MT1 so với MT3)



Biểu đồ 3.2. Biểu đồ biểu thị tỷ lệ tế bào sống sau bảo quản ở các môi trường khác nhau

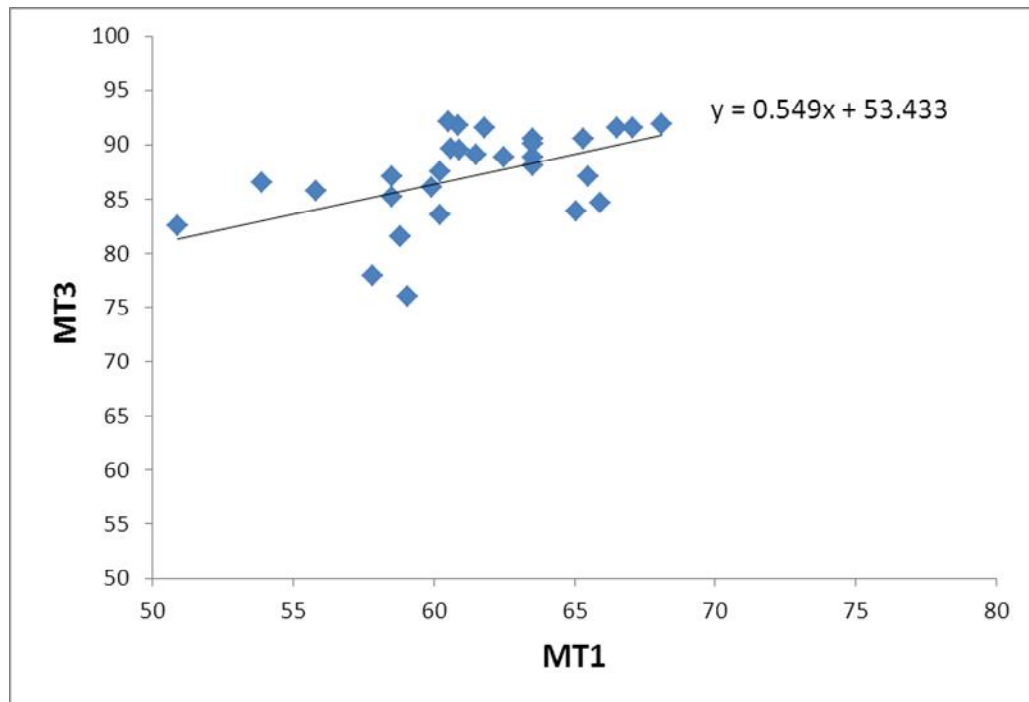
Nhận xét: Từ bảng và biểu đồ ta thấy tỷ lệ tế bào sống trung bình sau bảo quản ở môi trường 1 có tỷ lệ thấp nhất: $61,28 \pm 3,89$, môi trường 2: $82,19 \pm 5,45$, môi trường 3 có tỷ lệ tế bào sống cao nhất là $87,07 \pm 4,18$. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

Mối liên quan về tỷ lệ tế bào sống với các môi trường bảo quản khác nhau thể hiện ở các biểu đồ dưới đây:



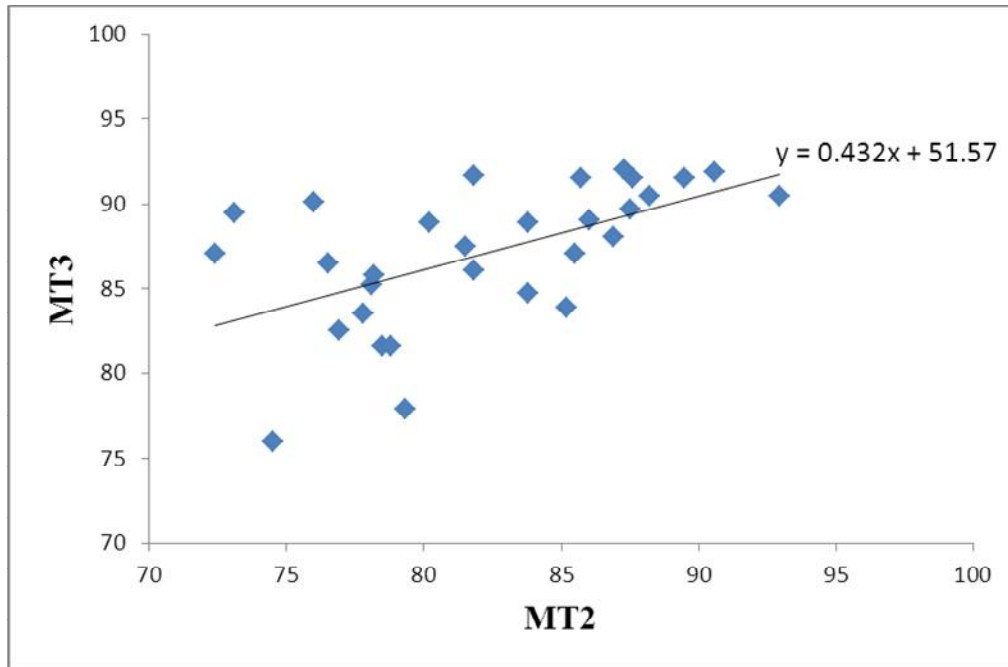
Biểu đồ 3.3. Mối liên quan giữa tỷ lệ tế bào sống với tỷ lệ huyết thanh có trong môi trường MT1 và MT2

Nhận xét: Tỷ lệ tế bào sống sau khi bảo quản ở môi trường MT1, MT2 có mối tương quan tuyến tính thuận, ở mức độ trung bình với hệ số tương quan của tỷ lệ tế bào sống sau bảo quản ở 2 môi trường là $r=0,437$.



Biểu đồ 3.4. Mối liên quan giữa tỷ lệ tế bào sống với tỷ lệ huyết thanh có trong môi trường MT1 và MT3

Nhận xét: Tỷ lệ tế bào sống sau khi bảo quản ở môi trường MT1, MT3 có mối tương quan tuyến tính thuận, ở mức độ thấp với hệ số tương quan của tỷ lệ tế bào sống sau bảo quản ở 2 môi trường là $r=0,262$.



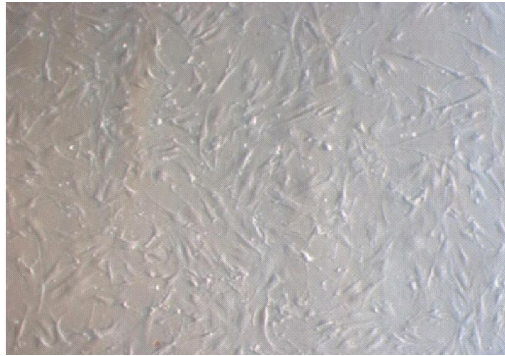
Biểu đồ 3.5. Mối liên quan giữa tỷ lệ tế bào sống với tỷ lệ huyết thanh có trong môi trường MT2 và MT3

Nhận xét: Tỷ lệ tế bào sống sau khi bảo quản ở môi trường MT2, MT3 có mối tương quan tuyến tính thuận, ở mức độ trung bình với hệ số tương quan của tỷ lệ tế bào sống sau bảo quản ở 2 môi trường là $r=0,316$. Điều này chứng tỏ rằng FBS có tác dụng làm tăng tỷ lệ tế bào sống sau bảo quản nhưng ở mức độ trung bình.

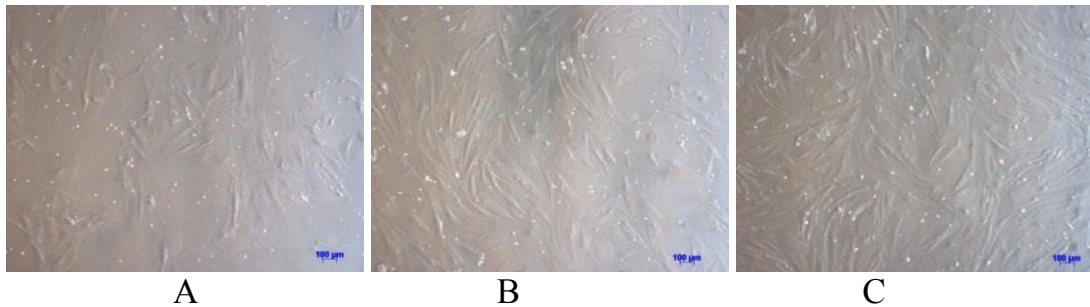
3.3.2. Kết quả phát triển tiếp theo sau bảo quản

90 mẫu tế bào bảo quản được nuôi cấy tiếp, theo dõi 10 ngày sau kết quả cho thấy các tế bào vẫn tiếp tục phát triển bình thường.

Về hình dạng tế bào sau bảo quản: Không quan sát thấy sự bất thường về hình dạng tế bào sau bảo quản ở cả 3 nhóm (Hình 3.28), (Hình 3.29)



Hình 3.28. Hình dạng tế bào trước bảo quản (x150)



Hình 3.29. Hình dạng tế bào sau bảo quản ở các môi trường MT1 (A), MT2 (B), MT3(C) (x 150).

Sau rã đông và tiến hành nuôi cấy tiếp thấy tế bào vẫn phát triển như trước bảo quản.

Từ kết quả trên, chúng tôi rút ra nhận xét về các điều kiện tiến hành bảo quản lạnh tế bào như sau:

- Mật độ tế bào đưa vào bảo quản: 10^6 - 10^7 TB/ml
- Môi trường bảo quản là môi trường cơ bản có bổ sung DMSO 10% và FBS tối thiểu là 15%.
- Nhiệt độ bảo quản - 135 độ C hoặc thấp hơn.
- Các đặc điểm về hình thái, khả năng phát triển tiếp theo không thay đổi sau bảo quản.

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. Tách chiết, phân lập, nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc trung mô tủy xương.

4.1.1. Về kết quả chọc hút tủy xương, tách chiết, phân lập tế bào gốc

Chọc hút tủy xương để phân lập tế bào là giai đoạn đầu tiên nhưng có thể nói là quan trọng nhất. Nếu chọc hút không thành công sẽ không có hoặc không đạt chuẩn cho các mẫu tế bào nghiên cứu tiếp theo.

- Lựa chọn phương pháp giảm đau

Trong kỹ thuật chọc hút tủy xương, giảm đau là một khâu quan trọng. Giảm đau không tốt động vật cử động trong khi đang chọc hút có thể gây tắc kim, tổn thương xương vùng chọc. Giảm đau quá liều có thể gây chết động vật. Vì vậy, chúng tôi nghiên cứu lựa chọn 1 trong 3 phương pháp giảm đau phù hợp sau khi tham khảo thủ thuật này trên người, gây mê tĩnh mạch, gây tê tại chỗ, gây mê phối hợp gây tê. Chúng tôi nhận thấy:

- Gây tê tại chỗ bằng novocain không đủ giảm đau để chọc hút tủy xương.

- Gây mê thỏ bằng thiopental với liều 20mg/kg cân nặng qua đường tĩnh mạch rìa tai đơn thuần đảm bảo được việc giảm đau cho thủ thuật chọc hút tủy xương. Tuy nhiên thực tế cho thấy, lượng thuốc mê cho thỏ thường khó kiểm soát liều phù hợp; nếu gây mê sâu thỏ dễ bị chết hoặc lâu tỉnh; nếu gây mê chưa đủ sâu, thỏ bị căng cơ, giãy đạp và gây thất bại cho việc chọc hút tủy.

- Gây mê thỏ bằng thiopental, với liều 17mg/kg cân nặng qua đường tĩnh mạch rìa tai kết hợp gây tê tiêm tại chỗ bằng novocain là phương pháp giảm đau phù hợp nhất. Phương pháp này giúp giảm liều gây mê, giảm thời gian gây mê và giảm đau tốt.

- Lựa chọn vị trí chọc dịch tủy xương

Vị trí chọc hút rất quan trọng, vì nếu chọc không đúng sẽ không hút được tủy, lượng dịch tủy ít.

Năm thỏ được chúng tôi chọn để thử nghiệm chọc hút tủy xương tại vị trí ụ ngồi 2 bên, nhưng đều không thành công. Việc phẫu tích ụ ngồi sau đó cho thấy, ụ ngồi của thỏ có vị trí thấp, tư thế chọc rất khó; mặt khác, ụ ngồi có kích thước nhỏ, khi chọc dễ làm vỡ xương.

Vị trí chọc tại mấu chuyên xương đùi được thực hiện trên 5 thỏ cũng không thành công, do khó cố định vị trí chọc, lượng tủy ít, tổn thương nặng, lâu hồi phục.

Vị trí chọc tại mào chậu phù hợp nhất cho việc chọc hút tủy xương thỏ: mào chậu quan sát rõ khi thỏ ngồi; vị trí ở nông, dễ xác định, dễ cố định, ít gây tổn thương khi chọc và phục hồi nhanh sau chọc. 30 thỏ trong nghiên cứu này đều được chọc hút tủy xương thành công tại vị trí mào chậu.

- Kỹ thuật chọc hút tủy xương

Sau khi lựa chọn điểm chọc hút, có thể rạch da khoảng 1cm. Để kim không bị trượt, theo kinh nghiệm chúng tôi dùng mũi dao bóc tách nhẹ màng xương bộc lộ xương xốp. Việc làm này tạo điều kiện cho kim khi chọc vào xương nhẹ nhàng, đúng hướng.

Dùng kim chọc tủy troca loại 2''-13 gauge kèm nòng chọc hơi chéch ra trước và nghiêng khoảng 30⁰ cho phù hợp đặc điểm giải phẫu của xương. Khi kim qua bản xương đặc, vừa chọc vừa xoay nhẹ tới độ sâu 8mm tới phần xốp của xương chậu, xoay nhẹ kim ngược với chiều xoay thông thường rồi rút kim ra khoảng 1mm, rút nòng của kim. Lưu ý: không được lắc kim vì sẽ làm rộng miệng lỗ chọc ở thành xương.

- Hút dịch tủy xương qua bơm tiêm (loại 3ml) đã tráng sẵn dung dịch chống đông. Số lượng dịch tủy xương mỗi lần hút từ 0,5-1ml sau đó thay bơm tiêm để làm giảm độ pha loãng với máu ngoại vi và chống hiện tượng đông máu.

Một số lưu ý: vỡ xương, nguyên nhân do: vị trí chọc bị lệch, chọc không chuẩn hướng, chọc sâu quá hoặc động tác chọc thô bạo.

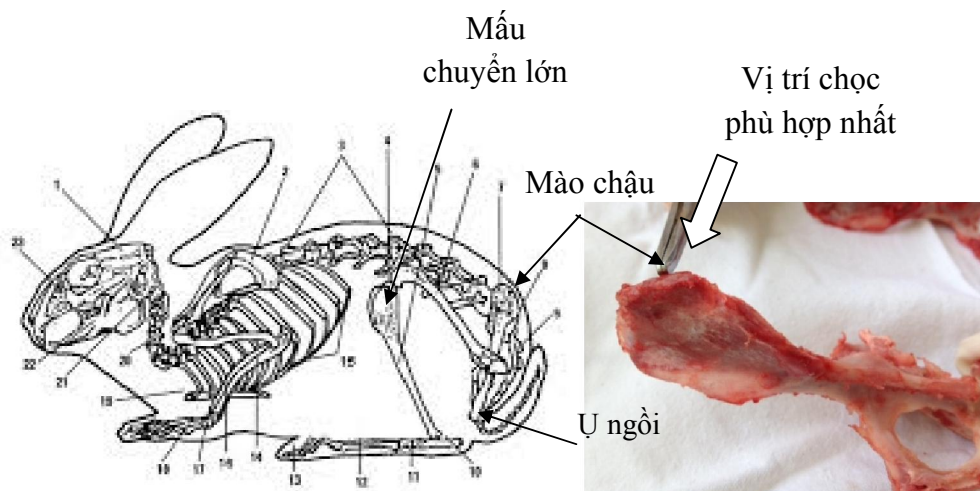
Không hút được tủy xương hoặc hút được rất ít tủy có thể do chọc chưa tới, bị màng xương, vụn xương hoặc cục máu đông bịt kín đầu kim. Không tạo được áp lực âm khi hút hoặc nhiều bọt do bơm tiêm gắn chưa chặt hoặc miệng lỗ chọc ở thành xương quá rộng.

- Dịch tủy xương lấy ra được cho vào ngay các ống Falcon loại 15ml đã có sẵn Heparine để chống đông .

- Qui trình được lặp lại với bên mào chậu đối diện; thể tích dịch tủy xương chọc hút phù hợp khoảng 5ml/bên; tổng lượng dịch tủy xương khoảng 10ml/thỏ.

Lượng dịch tủy khoảng 10ml/thỏ phù hợp cho việc tách chiết và nuôi cấy tế bào và đảm bảo cho thọ sống và hồi phục tốt. Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với nhận định của một số tác giả như Huang JW, Xie XH [85],[86].

Sau chọc tủy lần 1 khoảng 1 tháng, thỏ có thể được chọc tủy lần 2 với số lượng dịch tủy thường chỉ đạt 60-80% so với lần 1. Theo kinh nghiệm của chúng tôi không nên chọc tủy lần 3 do lượng tủy chọc được thường rất ít bởi mô liên kết đã xâm nhập và thay thế tủy xương sau những lần chọc.



Hình 4.1. Vị trí giải phẫu chọc tủy xương trên thỏ

Vấn đề xử lý dịch tủy xương sau khi hút được rất quan trọng. Yêu cầu

thao tác phải nhanh, dứt khoát, nếu chậm tủy sẽ bị đông, nếu bơm không đúng sẽ tạo bọt ảnh hưởng đến chất lượng tủy.

- Số lượng và chất lượng tủy xương sau chọc hút

Chúng tôi đã thực hiện thành công trên 30 mẫu: các mẫu dịch tủy xương không bị đông, lượng dịch tủy cũng như lượng tế bào đơn nhân thu được khá cao. Nghiên cứu của Jau- Wen Huang (2006) cho thấy lượng tủy xương chọc hút trên mỗi thỏ khoảng 10ml là phù hợp và đủ lượng tế bào trung mô cho nuôi cấy [85]. Việc hút quá nhiều dịch tủy xương sẽ làm lẫn nhiều tế bào máu ngoại vi và ảnh hưởng đến việc hồi phục sức khỏe của thỏ sau chọc hút. Theo chúng tôi, một thỏ chỉ nên chọc hút tối đa hai lần, cách nhau 4 tuần để đảm bảo chất lượng và số lượng tủy. Mặt khác, độ tuổi cũng có ảnh hưởng đến số lượng và chất lượng tủy xương. Nên cần lựa chọn thỏ nghiên cứu trong độ tuổi phù hợp.

Việc tách khối tế bào đơn nhân từ dịch tủy xương được chúng tôi thực hiện bằng phương pháp ly tâm theo gradient tỷ trọng tế bào, sử dụng dung dịch Ficoll có tỷ trọng 1,077 g/cm³[38]. Mỗi loại tế bào có tỷ trọng khác nhau sẽ nằm ở những lớp khác nhau của ống ly tâm. Sau ly tâm khối tế bào đơn nhân sẽ tạo ra một lớp nằm ngay trên lớp Ficoll và phân tách khỏi các loại tế bào khác.

Ly tâm theo gradient tỷ trọng phải được thực hiện trong một môi trường không làm suy yếu cũng như không làm hỏng tế bào sau khi được phân lập vì nó liên quan đến khả năng sống và những chức năng sinh học của chúng. Các quá trình phân lập và tinh sạch được xem là càng vô hại thì càng tốt nếu chúng không chứa bất cứ trở ngại nào trong suốt quá trình thực hiện. Các thông số về lực ly tâm, thời gian ly tâm, và loại rotor dùng để ly tâm có thể thay đổi khác nhau phụ thuộc vào yêu cầu phân tích mẫu. Một số môi trường ly tâm theo gradient tỷ trọng thường được sử dụng là Percoll, Ficoll...

Phân lập MSC dựa vào kích thước tế bào thường áp dụng trên chuột. Dựa vào những nghiên cứu trên chuột người ta sử dụng phim lọc có kích thước lỗ lọc $70\mu\text{m}$ để lọc tế bào. Theo Nadri S (2007) phân lập MSC từ tủy xương chuột bằng phương pháp này. Những tế bào qua được lỗ lọc thì cho vào nuôi cấy còn những tế bào không qua lỗ lọc thì loại bỏ. Phương pháp này thực hiện thu được tế bào có độ tinh sạch cao, dễ thực hiện [47].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi sau khi ly tâm lượng tế bào đơn nhân thu được của mỗi mẫu tủy xương là $6,7\pm 3,8 \times 10^6$ tế bào (Bảng 3.3). Kết quả này cho thấy mục tiêu của quá trình chọc hút và phân tách tủy xương đã đạt được và cũng phù hợp với kết quả của Xie XH (2012) khi nghiên cứu mô hình gần tương tự đã thu được 10ml dịch tủy xương trên 1 thỏ với $6,2\pm 0,85 \times 10^6$ tế bào đơn nhân sau phân tách [86].

4.1.2. Về nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc trung mô tủy xương

4.1.2.1 Giá thể nuôi cấy

Chai flask là giá thể nuôi cấy truyền thống, sử dụng giá thể này thao tác nuôi cấy thuận tiện, dễ thu hoạch tế bào, đảm bảo vô trùng. Tuy nhiên nuôi cấy trên chai flask không thể tạo nên một vật mang tế bào 3D, không thể tạo ra một cơ quan, bộ phận. Mục đích chính của chúng tôi là nghiên cứu, ứng dụng và chuẩn hóa qui trình nên trong đề tài này chúng tôi sử dụng chai nuôi flask là giá thể chính. Bên cạnh đó, để thử nghiệm khả năng phát triển của tế bào gốc trung mô và khả năng áp dụng thực tiễn cấy ghép vào mô xương, chúng tôi sử dụng 10 mẫu giá thể là xương xốp đông khô sau khi khử hết tủy, mỡ.

Một trong những tiêu chuẩn cơ bản để nhận dạng MSC là có các phân tử bám dính trên bề mặt tế bào, do vậy trong điều kiện nuôi cấy ngoài cơ thể, các tế bào này có khả năng bám đơn lớp vào bề mặt nhựa nuôi cấy. Trong khi đó, HSC trong tủy xương không có khả năng bám dính này, sẽ bị loại bỏ dần khi thay mới môi trường. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định được

lượng MSC thu được từ tủy xương. Sau khi tiến hành chọc hút và nuôi cấy tế bào, ly tâm lấy tế bào có số lượng tế bào trung bình là $6,6 \times 10^6/1\text{ml}$, sau nuôi cấy 10 ngày thì thu được lượng tế bào mọc trung bình là $1,2 \times 10^5$. Sau nuôi cấy 10 ngày với nhiều lần thay môi trường, số lượng tế bào máu còn ít, đa số là tế bào dạng nguyên bào sợi giống tế bào trung mô (*Hình 3.3*). Như vậy, xác định lượng tế bào bám đáy chai ở giai đoạn sơ cấp là $1,8 \times 10^4$ tế bào/ 10^6 tế bào đơn nhân (bảng 3.4). Kết quả này cũng phù hợp với tác giả Xie XH (2012) tế bào bám dính thu được ở giai đoạn sơ cấp là $1,92 \times 10^4/10^6$ tế bào đơn nhân [86].

Hình 3.1; 3.2; 3.3 mô tả sự phát triển tế bào đơn nhân ở giai đoạn sơ cấp thấy các tế bào dạng hình cầu giảm dần, số lượng tế bào giống nguyên bào sợi tăng dần.

Từ ngày thứ 7 đến ngày 12 tế bào có hình dạng giống nguyên bào sợi khá dày, trải rộng chiếm 70-80% diện tích bề mặt chai nuôi. Sự tăng sinh của tế bào chỉ xếp thành một lớp kín khí đáy bình nuôi không có hiện tượng chùng chéo lên nhau của các tế bào (khác tế bào K). Ở một số chai nuôi khác đến ngày 12- 15 mật độ tế bào mới đạt bao phủ 70-80% diện tích, chúng tôi nhận thấy có một số mẫu chỉ khoảng 6 ngày, phụ thuộc vào khả năng tăng sinh của mỗi mẫu. Ở những thỏ có số lượng tế bào gốc thu được sau ly tâm nhiều thời gian tăng sinh tế bào nhanh hơn, khoảng thời gian phủ kín chai nuôi nhanh hơn. Ngược lại, những mẫu được thu nhận tủy xương từ thỏ có số lượng tế bào gốc ít thì khoảng thời gian phủ kín bề mặt đĩa nuôi dài hơn. Mặt khác sự phát triển của tế bào phụ thuộc vào tuổi của thỏ, khoảng 6-8 tuần tế bào phát triển nhanh hơn so với thỏ ở 8 tuần [87]. Sự khác nhau về khoảng thời gian để tế bào phủ kín bề mặt đĩa nuôi phụ thuộc vào số lượng và tuổi của thỏ dùng cho việc thu nhận tế bào gốc từ tủy xương. Ở những thỏ còn non thì mật độ tế bào gốc trong tủy xương nhiều và tính gốc cao hơn nên chúng

tăng sinh mạnh hơn. Mặt khác, ngay cả những mẫu có thỏ cùng độ tuổi thì thời gian nuôi để tế bào phủ kín bề mặt đĩa nuôi cũng khác nhau, điều này do đặc điểm sinh lý và số lượng tế bào gốc trong tủy xương của mỗi con biến động khác nhau [87],[88].

Nuôi cấy trên giá thể xương xốp. Chúng tôi bước đầu nghiên cứu nuôi cấy trên giá thể xương xốp nhằm phát triển các mô thay thế. Trên cơ sở ứng dụng các nguyên tắc sinh học, kỹ thuật để phát triển các vật thay thế có khả năng sống, nhằm khôi phục và duy trì chức năng của mô xương.

Độ dày của lớp tế bào được tạo ra trong giá thể phụ thuộc vào độ khuếch tán của tế bào qua các lỗ xốp trong giá thể. Các tế bào có thể dễ dàng di chuyển vào những phần ngoài cùng của giá thể và không thể phân bố đồng nhất trong khắp giá thể vì tính di động ngẫu nhiên và sự khuếch tán dưỡng chất hạn chế.

Lớp tế bào trên cùng tiêu thụ phần lớn oxy và dưỡng chất làm hạn chế sự khuếch tán của các thành phần này do đó làm giảm số tế bào di cư sâu vào bên trong giá thể. Do đó việc quan sát thấy tế bào bên trong giá thể là rất khó

Xương xốp có cấu trúc lỗ xốp cho phép sự di chuyển tế bào, hỗ trợ sự hình thành mạch máu và việc cung cấp chất dinh dưỡng từ môi trường bên ngoài vào bên trong giá thể diễn ra thuận lợi. Do đó, mô xương xốp có khả năng cảm ứng tạo xương và thúc đẩy quá trình hình thành xương mới tại vị trí mô ghép.

Tuy nhiên để việc nuôi tế bào trên giá thể 3 D là khá khó khăn, trang thiết bị nuôi cấy phải chuyên biệt: như nuôi cấy trong chai khuấy. Nuôi cấy của chúng tôi trên đĩa petri nên bước đầu thấy có sự dung nạp tế bào lên giá thể và giá thể không gây độc cho tế bào.

Như vậy, qua lựa chọn trên thực tế nghiên cứu, chúng tôi thấy chai nuôi flask là nền nuôi cấy phù hợp nhất với tế bào gốc trung mô trong phạm vi đề

tài này. Hình ảnh các tế bào phát triển xung quanh giá thể xương xốp (Hình 3.9) cho thấy giá thể có tính phù hợp sinh học, không độc cho tế bào.

4.1.2.2. Môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô

Chất dinh dưỡng giữ vai trò tối cần thiết trong nuôi cấy tế bào, chúng là nhân tố quyết định sự thất bại hay thành công sự phát triển của tế bào in vitro. Các chất dinh dưỡng thiết yếu giúp tế bào phân chia như aminoacid, acid béo, đường, các vitamin và các phân tử cần thiết duy trì môi trường hóa học cho các tế bào. Một số thành phần có thể giữ nhiều vai trò hơn chẳng hạn như sodium bicarbonate được sử dụng để duy trì pH thích hợp và tạo áp suất thẩm thấu.

Hầu hết lipid trong môi trường là hỗn hợp acid béo hay cholesterol. Năng lượng trong môi trường thường là glucocid [89],[90],[91].

Gharibi B (2012) nghiên cứu nuôi cấy MSC bổ sung các cytokine acid ascorbic, FGF, EGF, PDGF, IL-6, transferrin hoặc Wnt 3a so với môi trường chứng: MEM, 10% FBS, 1% kháng sinh trong thời gian nuôi cấy dài. Đánh giá sự ảnh hưởng của cytokine lên sự tăng sinh tế bào, tính gốc của tế bào.

Nghiên cứu nuôi cấy MSC từ P4 đến P10 bổ sung các yếu tố FGF, acid ascorbic, PDGF, EGF và Wnt3a có thời gian nhân đôi quần thể lần lượt là 2.5, 2.7, 2.8, 3.05 và 4.2 ngày so với nhóm nuôi cấy bổ sung IL-6, Wnt3a, nhóm chứng tương ứng là: 7.6, 7.8, 8.1 ngày. Sự tăng sinh tế bào ở giai đoạn P4 với các yếu tố bổ sung khác nhau thì phát triển tương tự nhau, càng về sau sự phát triển tế bào càng có sự khác biệt. IL-6, transferrin không ảnh hưởng đến thời gian nhân đôi của tế bào hay tổng số tế bào của nhân đôi quần thể. Bổ sung các yếu tố acid ascorbic, FGF-2, PDGF vào môi trường nuôi cấy thì kết quả số lượng tế bào tăng gấp 1000 lần so với nhóm chứng. Nghiên cứu sự kết hợp các yếu tố acid ascorbic, FGF-2, PDGF vào môi trường nuôi cấy hoặc FGF-2 kết hợp acid ascorbic, PDGF hoặc cả 3 yếu tố kết hợp lại số lượng tế bào tăng từ 1 đến 2 lần so với mỗi một yếu tố đơn.

Thời gian nuôi cấy tế bào hay bổ sung các yếu tố tăng trưởng khác làm thay đổi tỷ lệ tăng sinh, tiềm năng tự đổi mới “self-renewal” và khả năng biệt hóa của MSC. Theo các nghiên cứu trước các gen duy trì tính gốc của tế bào “stemness” như gene Nanog, Oct-4, Klf2... Các yếu tố bổ sung này làm giảm các biểu hiện gen tính gốc nuôi cấy ở những giai đoạn sau [92],[93].

Điều kiện lý hóa trong nuôi cấy tế bào như: nhiệt độ, pH, áp suất thẩm thấu, các pha khí phải ổn định. Đặc biệt oxy có vai trò quan trọng trong sinh trưởng, tăng sinh, biệt hóa tế bào. Trong môi trường nuôi cấy các phân tử oxy trong không khí luôn có xu hướng khuếch tán vào trong môi trường nuôi cấy. Nồng độ oxy phổ biến dùng trong tủ nuôi tế bào thường 16 – 20%.

Tuy nhiên, một số nghiên cứu gần đây cho rằng nồng độ oxy có ảnh hưởng đến đặc điểm tế bào gốc. Nghiên cứu của Lennon.PP (2001) thấy rằng nuôi cấy MSC ở giai đoạn sơ cấp tiềm năng hình thành cụm cao và tăng cường đặc điểm biệt hóa tạo cốt bào khi nuôi cấy ở điều kiện 5% O₂ [94]

Malladi p (2006) nuôi cấy MSC từ mô mỡ chuột thấy tỷ lệ tăng sinh cao nhưng giảm khả năng biệt hóa tạo xương, sụn ở điều kiện 2% O₂ [95]

Về màu sắc môi trường nuôi cấy: môi trường tươi có màu đỏ hồng, ở những ngày đầu của quá trình nuôi cấy sơ cấp, khoảng 1-4 ngày mới thay môi trường, càng về sau thời gian thay môi trường càng ngắn dần. Tế bào tăng sinh nhanh màu của môi trường nuôi cấy thay đổi từ hồng đỏ chuyển thành màu hồng nhạt rất nhanh thậm chí còn chuyển thành màu vàng nhẹ và nếu để lâu thì tế bào chết nhanh. Do tế bào tăng sinh mạnh thì thu nhận nhiều chất dinh dưỡng và đào thải các chất chuyển hóa làm thay đổi thành phần môi trường, biến đổi màu môi trường. Các chất này càng nhiều, nồng độ của chúng càng gia tăng trong môi trường nuôi dẫn đến cơ chế kìm hãm, ức chế khả năng tổng hợp, có thể gây tổn thương tế bào, thậm chí gây chết hàng loạt. Sự bài tiết của tế bào làm môi trường bị acid hóa và chất chỉ thị trong môi

trường (đỏ phenol) đổi màu. Do vậy, trong nuôi cấy cần chú ý đến thời gian thay môi trường để đảm bảo sự tăng trưởng của tế bào [4].

Phân lập dựa vào hình thái của tế bào, đặc điểm MSC ở thỏ quan sát dưới kính hiển vi thấy hình thái và cấu trúc tương tự MSC ở người. MSC có nhân lớn hình trứng, chất nhiễm sắc mịn, hạt nhân rõ. Các bào quan rất phong phú, có dạng giống nguyên bào sợi và giống tế bào sợi [96]. Theo tác giả Tan SL (2013) đường kính trung bình của tế bào ở trên thỏ có chiều dài $202,66 \pm 8,40 \mu\text{m}$, chiều rộng $13,09 \pm 0,91 \mu\text{m}$. Ở trên người chiều dài tế bào $152,04 \pm 43,35 \mu\text{m}$, chiều rộng $9,82 \pm 0,66 \mu\text{m}$ [97].

Dưới kính hiển vi điện tử thấy tế bào có nhân lớn, không đều, lệch tâm, nhân tế bào chứa nhiễm sắc thể. Bào tương có bộ Golgi, lưới nội bào và ti thể có hình dạng khác nhau. Bề mặt tế bào xuất hiện nhiều vi nhung mao.

Về hình thái tế bào có nhiều vi nhung mao ở quanh tế bào, có thể giải thích điều này là khả năng di cư ở mô [98],[99],[100]. Theo tác giả Colter và CS (2001); Prockop và CS (2001) cho rằng tế bào MSC thường có 2 nhân và có số lượng lớn không bào [101],[102].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng môi trường DMEM/F12 10%FBS, 1% kháng sinh kháng nấm với 30 mẫu tế bào đơn nhân được phân lập từ tủy xương thỏ nuôi cấy. Kết quả nuôi cấy qua nhiều đợt, các mẫu tế bào đều mọc và phát triển tốt đạt tỷ lệ 100% kể cả sau cấy chuyển lần thứ 10 (P10) đặc điểm hình thái và khả năng tăng sinh của tế bào vẫn không thay đổi.

Như vậy môi trường chúng tôi sử dụng có chất lượng tương đối ổn định. Môi trường của chúng tôi chứa các yếu tố tương tự Tan SL và cs (2013). Nuôi cấy với khối tế bào đơn nhân có chứa tế bào gốc thu được sau ly tâm từ dịch tủy xương của thỏ, được nuôi trong môi trường: DMEM/F12 + 10% FBS + 200mM GlutaMax-I +1% kháng sinh, sau khoảng 8-12 ngày loại bỏ tế bào không bám dính cũng thu được quần thể tế bào tương đối đồng nhất có hình thái giống nguyên bào sợi mà tác giả cho là MSC [97].

Karaoz E và cs (2009) nuôi cấy khối tế bào gốc đơn nhân ở tủy xương của chuột, sau 12-15 ngày thu được lớp tế bào đơn, hình thái giống nguyên bào sợi chiếm 80% diện tích đáy chai nuôi cấy và ở các lần cấy chuyển sau hình thái tế bào vẫn không thay đổi cho đến lần cấy chuyển thứ 25 [103].

Theo Lee TC và cs (2014), sau nuôi cấy 1 tuần chỉ xuất hiện vài tế bào giống nguyên bào sợi. Sau 2 tuần nuôi cấy, số lượng tế bào giống nguyên bào sợi trải gần kín bề mặt đĩa nuôi [104]. Như vậy, kết quả nghiên cứu và nhận định của chúng tôi cũng phù hợp với tác giả khác.

4.1.2.3. Cấy chuyển và khả năng phát triển của tế bào

Do tế bào phân chia theo cấp số nhân nên càng về sau, bề mặt bình nuôi cấy càng được phủ nhanh. Mặt khác, kiểm soát ngoại bào cũng tác động đến sự tăng sinh tế bào. Chu trình tế bào được điều khiển bởi các tín hiệu từ môi trường. Khi mật độ tế bào thấp, tế bào có không gian tiếp xúc với môi trường rộng làm chúng có khả năng trải rộng, sẽ đi vào chu trình phân bào. Nồng độ tế bào cao sẽ ức chế sự phát triển của tế bào thông thường (không phải tế bào K). Thời điểm này thích hợp cho cấy chuyển nhằm cung cấp chất dinh dưỡng và không gian cho tế bào phát triển. Nuôi cấy sơ cấp thành công khi tế bào mọc khoảng 70-80% diện tích đáy nuôi cấy.

Thông qua cấy chuyển, lượng tế bào ban đầu được pha loãng tỷ lệ 1: 3. Tốc độ phát triển của tế bào tương đối như nhau giữa các lần cấy chuyển và cao hơn trong nuôi cấy sơ cấp. So với nuôi cấy sơ cấp, thời gian tế bào bám đáy và tốc độ phát triển cũng nhanh hơn 5-7 ngày là cấy chuyển được [44].

Sau khi tế bào mọc 70-80% đĩa nuôi cấy thì tiến hành cấy chuyển, thường dùng enzym để tách các tế bào. Cầu nối gian bào có bản chất là protein, do vậy các protease sử dụng để tách tế bào là những enzym thủy phân protein như: trypsin, collagenase, dispase hay những tổ hợp khác. Việc sử dụng enzym, có thể riêng lẻ hay kết hợp tùy thuộc vào mục đích.

Trypsin chúng rất phổ biến trong việc tách tế bào. Xử lý tế bào bằng trypsin dẫn đến sự cuộn tròn tế bào. Khi các tế bào co lại, các liên kết trở lên lỏng lẻo và dễ dàng tế bào được tách ra bởi tác động cơ học. Hoạt tính của trypsin sẽ bị bất hoạt bởi huyết thanh. Trypsin không tác động đặc hiệu cho loại protein, vì vậy có thể phân cắt các protein ở màng và gây vỡ tế bào khi dùng nồng độ cao, hoặc cho tác động trong thời gian dài. Nồng độ trypsin thường dùng để tách tế bào là 0.25%, đôi khi là 1%. Trypsin cắt các cầu nối hầu như hoàn toàn [4].

Sau khi thu được dung dịch tế bào huyền phù trong môi trường nuôi, tiếp tục nuôi cấy ở giai đoạn tiếp theo.

4.1.2.4. Kỹ thuật đánh giá sự tăng sinh tế bào

Chúng tôi nuôi cấy MSC với mật độ 5000 tế bào/ giếng trên đĩa chuyên dụng 96 giếng có điện cực bằng vàng. Nuôi cấy MSC trong môi trường có DMEMF12, 10%FBS, 1% kháng sinh và kháng nấm. Hình 3.1 cho thấy, từ 0 đến 2 giờ là thời điểm tế bào mới nạp lên đĩa nên tế bào vẫn lơ lửng chưa bám đĩa. Từ 2 giờ đến 49 giờ, thấy đường cong của biểu đồ có độ dốc lớn. Chứng tỏ thời gian này diện tích tiếp xúc giữa tế bào với bề mặt đĩa nuôi tăng nhanh. Đây là khoảng thời gian tế bào tăng sinh mạnh nhất. Sự tăng sinh số lượng tế bào sẽ tỉ lệ thuận với diện tích tiếp xúc tế bào với bề mặt đĩa nuôi. Sau 50 giờ, đường biểu diễn có xu hướng đi ngang. Điều này có thể giải thích do tế bào đã tăng sinh tối đa, bề mặt đĩa nuôi không còn diện tích trống để tế bào bám hoặc tế bào chồng lên nhau. Mặt khác, có thể do môi trường dinh dưỡng giảm, sức sống tế bào giảm dần. Tế bào chết tăng lên bong khỏi bề mặt đĩa nuôi. Quần thể tế bào đi vào pha suy tàn.

Đường cong tăng trưởng được thiết lập để phân tích các đặc điểm phát triển của kiểu tế bào hay dòng tế bào.

Sự gia tăng số lượng tế bào cũng thường được sử dụng như một phương pháp đánh giá ảnh hưởng của hormon, chất dinh dưỡng và những yếu tố khác lên một kiểu tế bào chuyên biệt. Sự tăng trưởng, hay sự tăng số lượng tế bào là đánh giá tốt nhất cho sự đáp ứng sinh học, bởi nó được xác định và ảnh hưởng bởi nhiều nhân tố khác nhau, bao gồm các chất gây nguyên phân, sự thay đổi trong mức độ dinh dưỡng, sự vận chuyển và các nguyên nhân khác.

Theo tác giả Liu C (2014) nghiên cứu nuôi cấy phân lập MSC từ đĩa gian đốt sống, nuôi cấy tế bào trong môi trường có DMEM, 20%FBS, 100u/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, đánh giá sự tăng sinh tế bào bởi kỹ thuật MTT. Kết quả cho thấy thời gian nhân đôi quần thể là 17,8 giờ [105].

Thời gian tăng sinh tế bào phụ thuộc vào mật độ tế bào nuôi cấy, môi trường nuôi cấy, nguồn tế bào. Theo tác giả Kern (2006) nghiên cứu nuôi cấy tăng sinh MSC từ 3 nguồn: tủy xương, máu cuống rốn và từ mô mỡ, nuôi cấy trong môi trường DMEM-1 và 10% thành phần bổ xung phát triển MSC. Thời gian nhân đôi quần thể của MSC-BM có tỷ lệ thấp từ P4- P6, theo sau là MSC-AT tăng sau ở P3, MSC- USB tỷ lệ tăng sinh cao nhất ở tất cả các P đến P9 [106].

Yang XF (2011) nghiên cứu nuôi cấy tăng sinh hADSCs với mật độ tế bào 5×10^3 tế bào/ giếng của đĩa 24 giếng, trong môi trường DMEM-L, 10% FBS, 100U/ml penicilin, 100mg/l streptomycin. Thời gian nhân đôi tế bào là 24.8 giờ. Tỷ lệ tăng sinh của tế bào không khác nhau giữa các P nghiên cứu nuôi cấy đến P12 [107].

Tan SL (2013) nghiên cứu nuôi cấy MSC tủy xương, mật độ tế bào $1,8 \times 10^4$ / giếng của đĩa 96 giếng trong môi trường DMEM-L, 10% FBS, 1% kháng sinh và 200mM glutamax. Thời gian nhân đôi quần thể rMSC là $6,4 \pm 1,3$ giờ; đối với hMSC là $7,6 \pm 1,7$ giờ [97].

Bruder SP (1997) nghiên cứu sự tăng sinh của hMSC gồm 2 nhóm tế bào: nhóm nuôi cấy hàng ngày thay môi trường (N1) và nhóm nuôi cấy 3 ngày thay môi trường/1 lần (N2). Mỗi P thì hMSC tăng sinh có giai đoạn đầu tế bào thích ứng với môi trường nuôi cấy là 24-36 giờ, giai đoạn tăng trưởng là 4-6 ngày. Giai đoạn tăng trưởng phụ thuộc vào giai đoạn nuôi cấy và sự phân chia tế bào. Ở cả 2 nhóm sự tăng sinh tế bào đến ngày 9 ngày 10 tỷ lệ tăng sinh chậm lại. Tuy nhiên, nhóm N1 tỷ lệ tế bào tăng sinh nhanh hơn so với nhóm nuôi cấy N2 ở giai đoạn đầu. Nuôi cấy đến P10 số lượng tế bào tăng sinh ở nhóm N1 và N2 tỷ lệ tăng sinh sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Sau P10 sự tăng sinh tế bào giảm, một số mẫu dừng tăng sinh ở P12, một số mẫu còn lại vẫn tăng sinh chậm P12-P15 [18].

Fekete N (2012) nghiên cứu nuôi cấy MSC theo tiêu chuẩn GMP tế bào nuôi cấy phải đảm bảo vô trùng, an toàn và hiệu quả đến sản phẩm cuối cùng [108].

Bernardo ME (2007) công bố nghiên cứu hMSC từ tủy xương và máu cuống rốn được nuôi cấy bổ sung PL hoặc FCS có thể nuôi cấy đến P25 hoặc dài hơn không mất đi đặc điểm kiểu hình và chức năng sinh học của MSC. MSC sau phân lập và nuôi cấy 44 tuần không thấy có cụm nhiễm sắc thể nào bất thường tìm thấy karyotype [109].

4.1.2.6. Dấu hiệu nhận biết tế bào gốc trung mô - khả năng tạo cụm

Dựa vào kích thước, hình dạng của cụm (độ lớn, độ dày đặc bên trong, hình dạng viền) và độ lớn của các tế bào trong cụm, người ta có thể biết được tiềm năng của tế bào gốc hình thành nên cụm đó. Ngoài ra còn biết số lượng tế bào gốc trung mô trong khối tế bào gốc thu được.

Kỹ thuật tạo cụm nguyên bào sợi CFU (Colony forming units-Fibroblast - CFU). Khi nuôi cấy các tế bào tủy xương tỷ trọng thấp, mỗi cụm nguyên bào sợi là một tập hợp riêng biệt của các tế bào giống nguyên bào sợi

(fibroblast –like cell) bám dính vào bề mặt nuôi cấy phát sinh từ một tế bào tiền thân trung mô duy nhất. Xét nghiệm này được thực hiện khá nhanh chóng và chính xác có thể lặp lại nhiều lần khi cần thiết, được coi là xét nghiệm “tiêu chuẩn” trong đánh giá tế bào gốc trung mô [81].

Sự hình thành cụm tế bào khi nuôi cấy là một chỉ tiêu đánh giá khả năng tự làm mới của một loại tế bào cần khảo sát.

Nghiên cứu của chúng tôi nuôi cấy tạo cụm với mật độ MSC tủy xương là 200 tế bào/cm², số cụm thu được là 107 ± 25 cụm. Theo tác giả Liu C (2014) nghiên cứu phân lập và nuôi cấy nguồn MSC từ đĩa gian đốt sống ở thỏ, nuôi cấy tạo cụm trong môi trường 20% FBS, sau 3-4 ngày bắt đầu hình thành tạo cụm, các cụm có kích thước khác nhau 1-3mm. Hình thái tế bào giống nguyên bào sợi, cụm tế bào hình thành phụ thuộc vào mật độ tế bào. Nghiên cứu thấy mật độ tế bào 200 tế bào/cm² có hiệu quả tạo cụm cao nhất. Sau 10-12 ngày nuôi cấy cụm tế bào lan rộng có thể cấy chuyển [87].

Nadri S (2007) nghiên cứu nuôi cấy tạo cụm trên MSC tủy xương ở chuột, với mật độ tế bào 100 tế bào/cm² nuôi trong 7 ngày số cụm tạo ra là $70 \pm 3,4$ và $20 \pm 4,2$ lần lượt ở môi trường nuôi có thay môi trường và không thay môi trường [47].

Xét nghiệm nuôi cấy tạo cụm dạng nguyên bào sợi có thể xác định chính xác số lượng tế bào gốc trung mô thu được. Kỹ thuật này được tác giả Hernigou PH dùng để đếm số lượng tế bào gốc trước khi tiêm vào ổ khớp giả, hoại tử chỏm xương đùi [81].

4.1.2.7. Các kỹ thuật định danh đặc hiệu tế bào gốc trung mô

Ngoài các đặc điểm như hình dạng, khả năng bám đáy, tạo cụm chúng tôi tiến hành thêm các kỹ thuật định danh đặc hiệu nhằm khẳng định chắc chắn đối tượng nghiên cứu là tế bào gốc trung mô.

MSC ở P4 được định danh marker bề mặt bằng kỹ thuật flow cytometry

và hóa mô miễn dịch. Kết quả cho thấy tế bào dương tính với CD44, CD90 và biểu hiện âm tính CD14, CD34.

CD90 được cho là những marker đặc hiệu của tế bào gốc trung mô. Tan SL và cộng sự (2013) đã so sánh tế bào gốc trung mô tủy xương ở người và thỏ. Quần thể tế bào được sử dụng xác định marker là ở P2 hoặc P3 cho thấy CD90 biểu hiện 96,9% ở MSC từ tủy xương thỏ, và biểu hiện 100% ở MSC từ tủy xương ở người [97]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi CD90 biểu hiện dương tính 95,37%.

CD44 là receptor hyaluronan có vai trò trong sự di cư của tế bào, là những marker biểu hiện trên bề mặt trong hầu hết quần thể tế bào gốc trung mô[5]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy CD44 biểu hiện dương tính 97,42%. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Lee TC (2014) trên thỏ: 97,32% [104].

Các marker CD14, CD34 được biết là marker tế bào gốc tạo máu. CD14 là kháng nguyên bề mặt cho tế bào monocyte. Tế bào dương tính CD34 có thể là tế bào gốc tạo máu.

Một vài kết quả nghiên cứu gần đây công bố xác định marker tế bào gốc trung mô bằng cả 2 phương pháp Flow cytometry và RT-PCR, trong đó so sánh hai marker CD44, CD105 trên người và thỏ. CD44 của tế bào gốc trung mô ở người và thỏ biểu hiện mức độ tương tự nhau ở mức RNA. Tuy nhiên hMSC so sánh với rMSC sự biểu hiện CD105 cao hơn ở mức RNA. Nghiên cứu trên flow, hMSC biểu hiện dương tính CD44, CD105 trong khi ở thỏ chỉ biểu hiện dương tính với CD44 và âm tính với CD105. Marker của MSC giữa người và thỏ có một vài sự khác biệt [97].

Theo nghiên cứu của Lee TC (2014) trên 25 marker biểu hiện trên tế bào gốc trung mô, tỷ lệ dương tính của CD14 là 0,17%, CD34 là 0,36%. Trong khi đó CD44 là 97,32%, CD90 là 95,37%. So sánh sự biểu hiện marker

MSC giữa người và thỏ trên 25 marker có 9 marker biểu hiện sự khác biệt, không có ở trên thỏ [104].

Marker bề mặt của MSC không có marker của tế bào gốc máu như CD3 (receptor của T cell), CD34 (marker của tế bào tiền thân tạo máu), CD45 (marker của tế bào bạch cầu) và biểu hiện mạnh CD73 (ecto-5'-nucleotidase), CD90 (Thy-1) và CD105 (endoglin). Đặc điểm marker của MSC thường theo tiêu chuẩn ISCT [35] đây là tiêu chuẩn cơ bản để so sánh các MSC thu được ở các lab khác nhau. Ngoài ra, sự biểu hiện marker còn phụ thuộc vào điều kiện nuôi cấy.

Nghiên cứu profile marker của MSC thấy một số marker biểu hiện sau phân lập khác với MSC sau cấy chuyển. CD73, CD105 biểu hiện dương tính của MSC sau phân lập. CD44, CD271, CD146, CD106 kết quả thay đổi trong quá trình nuôi cấy. Mức độ biểu hiện CD106, CD146 giảm trong quá trình nuôi cấy. CD44 biểu hiện âm tính sau phân lập MSC ở cả chuột và ở người, sau nuôi cấy CD44 biểu hiện dương tính mạnh. Điều này có thể giải thích bởi MSC sau ly tâm vẫn còn lẫn nhiều loại tế bào khác, lượng tế bào MSC thấp nên sau nuôi cấy MSC tăng lên dẫn đến biểu hiện marker MSC dương tính $\geq 95\%$.

4.1.2.8. Các dấu hiệu bổ sung khả năng đa biệt hóa - Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành nguyên bào mỡ

Một trong các đặc tính của tế bào gốc trung mô là có khả năng đa biệt hóa. Vì vậy, chúng tôi nghiên cứu bổ sung góp phần định danh tế bào nuôi cấy là tế bào gốc trung mô.

Một số hormone, cytokine, vitamin, các ion Ca^{2+} các hợp chất tác động lên tế bào có thể làm biệt hóa tế bào. Hầu hết các chất được xem là chất biệt hóa sẽ tác động lên tế bào theo kiểu tác động của hormone hay tín hiệu nội bào. Sự tác động này làm cho tế bào thay đổi sự biểu hiện của gen, mở hay đóng sự hoạt động của các gen liên quan.

Những thay đổi này dẫn đến thay đổi dần dần trong tế bào theo một chiều hướng nhất định phù hợp với kích thích, kết quả tạo thành một kiểu tế bào chuyên biệt nào đó. Khi đó chất hay những chất gây lên sự biệt hóa chuyên biệt này được gọi là chất biệt hóa định hướng cho một loại tế bào từ tế bào gốc.

MSC được biệt hóa trong môi trường chuyên biệt theo hướng tạo tế bào mỡ và việc phát hiện hạt mỡ trong bào tương tế bào nuôi cấy bằng phương pháp nhuộm Oil-red O như là một tiêu chuẩn xác định một tập hợp tế bào thu được sau phân lập, nuôi cấy là MSC.

Sau nuôi cấy 10-15 ngày trong môi trường biệt hóa được đánh giá sự hình thành tế bào mỡ. Dưới kính hiển vi quang học đối pha, các hạt mỡ trong bào tương tăng sáng khi nhấp nháy ốc vi cấp của kính hiển vi. Thêm vào đó, kỹ thuật nhuộm tế bào chuyên biệt giúp phát hiện các hạt mỡ dưới kính hiển vi quang học khi các hạt mỡ này bắt màu đỏ của thuốc nhuộm Oil- Red O. Trong khi ở điều kiện nuôi cấy thông thường các tế bào âm tính với thuốc nhuộm. Điều này chứng tỏ các tế bào mỡ đã được hình thành từ các tế bào nuôi cấy trong môi trường biệt hóa chuyên biệt.

Ngoài ra, các tế bào sau biệt hóa còn thay đổi hình dạng tế bào từ tế bào dạng sợi chuyển dần hình đa diện với sự xuất hiện các giọt mỡ nhỏ trong bào tương tế bào. Theo thời gian hạt mỡ có xu hướng lớn dần và hợp nhất lại cùng với sự thay đổi hình thái trở thành hình bầu dục hay hình cầu.

Quy trình biệt hóa mỡ của chúng tôi theo tác giả Shahdadfar A (2005) có tác nhân biệt hóa 10 μ g/ml insulin, 0,5 μ M dexamethasone, 0,2mM indomethacin, 0,5 μ M isobutylmethyl-xathine biệt hóa trong 1-2 tuần. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như một số tác giả.

Theo tác giả Meuleman N (2005) biệt hóa hMSC thành tế bào mỡ trong môi trường α - MEM bổ sung 60 μ M indomethacin, 1 μ M dexamethasone và

5 μ g/mL insulin, thay môi trường 3-4 ngày/lần, biệt hóa trong 2 tuần, quan sát thấy nhiều hạt mỡ trong bào tương tế bào [110].

Wappler J (2013) biệt hóa hMSC thành tế bào mỡ trong môi trường DMEM, 10% FBS, 0,01 mg/ml insulin, 0,2 μ M indomethacin, 0,5mM isobutylmethyl-xanthine, thời gian biệt hóa là 3 tuần thấy hình thành nhiều giọt mỡ trong tế bào [111].

Yang XF (2011), biệt hóa MSC từ mô mỡ trong môi trường DMEM bổ sung 10% FBS, 1 μ mol/L dexamethasone, 50 μ mol/L indomethacin, 0,5mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine và 10 μ M insulin, thời gian biệt hóa là 2 tuần [112].

Liu Y (2010) nghiên cứu biệt hóa hMSC thành tế bào tạo mỡ trong môi trường nuôi cấy MSC là DMEM F12 có bổ sung 10% huyết thanh thỏ, 10⁻⁸M dexamethasone 5 μ g/ml insulin, thời gian biệt hóa là 2 tuần [113].

Với việc bổ sung dexamethasone, 1 methyl-3 isobutylmethyl-xanthine, indomethacin, insulin, MSC nuôi cấy lớp đơn sẽ biệt hóa tạo mỡ [83]. Insulin là yếu tố kích hoạt sự tăng sinh và biệt hóa tế bào mỡ. Insulin ở nồng độ cao có vai trò như yếu tố tăng trưởng (insulin-like growth factor-1: IGF-1). Nghiên cứu thấy rằng insulin ở nồng độ cao không cần thiết cho quá trình biệt hóa mỡ, giai đoạn sau biệt hóa thường giảm liều insulin. Dexamethasone có nồng độ thường cao hơn cho sự biệt hóa tạo xương. Sự biệt hóa tạo mỡ xảy ra phụ thuộc ở nồng độ tế bào, có sự tiếp xúc tế bào-tế bào. Isobutylmethyl-xanthine là chất ức chế phosphodiesterase, khóa sự đổi ion cAMP thành 5'AMP. Điều này gây nên sự điều hòa dương tính của protein kinase A, mà kết quả là làm giảm sự tăng sinh tế bào.

Sự hoạt hóa của các protein gắn với CAAT/ protein gắn (C/EBP) trùng với sự biểu hiện của receptor hoạt hóa sự khuếch đại peroxisome (peroxisome proliferators-activated receptor: PPAR) xảy ra trong sự hiện diện

của indomethacin, được biết là phối tử cho PPAR. Nhân tố phiên mã này cần sớm cho quá trình tạo mỡ, bởi nó ức chế tín hiệu Wnt. Do vậy, có thể điều hòa quá trình tạo xương và tạo mỡ là sự biểu hiện PPAR trong MSC. Tín hiệu Wnt dương tính ức chế sự biệt hóa thành xương, cần thiết cho quá trình biệt hóa thành mỡ. Do đó cần có sự cân bằng tồn tại giữa sự điều hòa biệt hóa thành xương và mỡ. Hơn nữa mất chức năng của PPAR hay C/EBP sẽ ảnh hưởng có hại cho quá trình tạo mỡ và giảm quá trình tăng sinh mỡ, cũng như giảm sự tích tụ các không bào chứa mỡ [114][115].

Như vậy, các tế bào đơn nhân được phân lập từ tủy xương thỏ nuôi cấy trong môi trường đặc hiệu đã phát triển, tăng sinh. Trong quá trình phát triển đã thể hiện rõ một số đặc tính như biến đổi hình dạng giống các nguyên bào sợi, bám vào đáy chai, tạo thành các cụm. Đây là các đặc điểm của tế bào gốc trung mô. Dùng các kỹ thuật định danh đặc hiệu như hóa mô miễn dịch, đo dòng chảy tế bào đã cho kết quả trên 95% dương tính với CD 90 và gần 100% với CD44, đây là hai marker đặc hiệu của tế bào gốc trung mô. Ngoài ra, một trong các khả năng của tế bào gốc trung mô là đã biệt hóa cũng đã được thể hiện trong nghiên cứu này, đó là khả năng đa biệt hóa thành tế bào tế bào mỡ, tế bào tạo xương.

4.2. Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tạo cốt bào và bảo quản tế bào sau biệt hóa

4.2.1. Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tạo cốt bào in vitro

4.2.1.1. Môi trường biệt hóa

Môi trường nuôi cấy của chúng tôi gồm: DMEM low glucose (sigma), 10% FBS (Gibico), 1% kháng sinh- kháng nấm (sigma), 50µg/ml Ascorbic (sigma), 0,1µM dexamethasone (sigma), 100mM β-glycerolphosphate (sigma). Quy trình được tiến hành theo tác giả Shahdadfar A (2005).

Sau nuôi cấy khoảng 7-14 ngày có sự thay đổi hình thái tế bào và thấy

có tinh thể khoáng. Biệt hóa sau 30 ngày có hình ảnh khoáng hóa rất rõ dưới kính HVĐT (*Hình 323*). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với một số tác giả.

Theo tác giả Noriko K (2005) biệt hóa MSCs thành dạng tạo cốt bào trong môi trường có 10 mM β -glycerophosphate disodium salt, 0.07 mM L-ascorbic acid 2 phosphate magnesium salt n- hydrate và 0.1 M Dexamethasone. Nhóm chứng môi trường nuôi cấy chỉ có 10mM β -glycerophosphate disodium salt. Thời gian biệt hóa là 2 tuần. So với nhóm chứng, nhóm nuôi cấy có mặt dexamethasone thì có sự khoáng hóa (lắng đọng canxi ở chất nền). Còn nhóm nuôi cấy không có dexamethasone thì không thấy sự tạo khoáng [64].

Rogério P (2011) môi trường biệt hóa có 10^{-8} M dexamethasone, 50 μ g/ml ascorbic acid và 10mM β – glycerophosphate. Thời gian biệt hóa là 3 tuần [116].

Jaiswal N (1997) môi trường biệt hóa: 100nM Dex, 10mM glycerolphosphate, 0,05mM asocbic axit trong môi trường DMEM. Nghiên cứu quan sát ở ngày 4, hình thái tế bào thay đổi từ hình con suốt đến hình đa diện, khoảng 30-40% tế bào có phản ứng dương tính Alkaline phosphate (ALP). Sau 8 ngày gần như tất cả các tế bào nuôi cấy có hình lập phương hay hình đa diện và hơn 80% tế bào có phản ứng dương tính ALP. Ở ngày thứ 12 bắt đầu xuất hiện khoáng hóa. Ở ngày 16 sự khoáng hóa xuất hiện rõ, hầu hết tế bào có phản ứng dương tính ALP hình thái tế bào đa diện không còn hình thái của MSC [117].

Nghiên cứu sâu hơn nữa ảnh hưởng của Dex trên MSC trong quá trình biệt hóa tạo xương, nồng độ Dex (1-1000nM trong khoảng 16 ngày). Nghiên cứu quan sát ở ngày 8, MSC nuôi cấy trong môi trường tạo xương, nồng độ Dex 1-1000nM Dex thì ALP tăng 3-8 lần so với chứng. Ở nồng độ 1nM Dex có ý nghĩa kích thích tạo ALP, tuy nhiên hình thái tế bào vẫn giống nguyên

bào sợi, không có sự khoáng hóa. Nuôi cấy ở nồng độ 10nM Dex hoạt tính ALP ở mỗi tế bào tăng. Có hình thái giống tạo cốt bào, lắng đọng khoáng hóa rõ ở 100nM Dex. Nghiên cứu ở nồng độ 1000nM Dex sự khoáng hóa mạnh hơn ở 100nM Dex, nhưng ở ngày thứ 16 có hiện tượng bong [118].

Bruder SP (1997) nuôi cấy biệt hóa MSC thành tạo cốt bào trong môi trường 100nM dex, 10mM β -GP và 0,05 axit ascorbic. Sau biệt hóa thấy thay đổi hình thái tế bào và biểu hiện gia tăng ALP và sự khoáng hóa trong chất nền. Sự gia tăng ALP từ ngày 4 đến ngày 12, ở ngày 4 tế bào biểu hiện dương tính ALP 30-40%, ngày 12 biểu hiện (+) ALP là 90%, đến ngày 16 có sự giảm dần. Sự giảm ALP ở giai đoạn cuối của quá trình biệt hóa bởi bắt đầu gia tăng sự khoáng hóa của tế bào xương, lắng đọng canxi hình thành khoáng hóa trong chất nền hMSC nuôi cấy trong môi trường biệt hóa sự gia tăng ALP ở ngày 8 từ P1-P10 và biểu hiện mức độ ALP từ P10 giảm [18].

Nhìn chung, phương pháp kinh điển để biệt hóa MSC thành tạo cốt bào là nuôi cấy MSC trong môi trường có dexamethason, acid ascorbic và β -glycerophosphate. Quá trình đáp ứng hình thành tạo cốt bào của MSC tăng lên khi bổ sung các loại BMP vào môi trường nuôi cấy.

Ngoài ra nhiều nghiên cứu đã chứng minh vai trò của vitamin D với sự biệt hóa tạo cốt bào cùng với vô số các gene của tạo cốt bào điều hòa bởi vitamin D (1,25D). Các báo cáo nghiên cứu về tác động của vitamin D là ức chế sự tăng sinh và tăng cường biệt hóa tạo cốt bào [119].

1,25-dihydroxyvitamin D có vai trò quan trọng trong điều hòa gen tạo cốt bào, điều hòa biểu hiện của protein chất nền xương chẳng hạn Runx2, chìa khóa điều hòa của quá trình biệt hóa xương. Tập gen ở gà được xác định ở pha tiền khoáng và khoáng hóa là thời điểm phiên mã mạnh hơn 0.6% gen được điều hòa bởi 1,25D3. VitaminD (1,25D3) có ý nghĩa tạo ra sản phẩm tinh thể khoáng nhỏ ở giai đoạn tiền khoáng hóa. Những ảnh hưởng này làm

thay đổi chất nền protein ngoại bào. Sự khoáng hóa và đặc điểm sinh học của các tinh thể khoáng và tín hiệu từ vai trò của 1,25D3 trong chuyển hóa xương và nhấn mạnh sự quan trọng của các tinh thể khoáng trong xương duy trì sự chắc khỏe của xương bởi trạng thái khoáng hóa tối ưu [120].

Tóm lại vitamin D có vai trò quan trọng điều hòa hoạt động của tạo cốt bào cũng như ảnh hưởng phụ thuộc vào từng giai đoạn của tạo cốt bào.

Gãy xương không có khả năng tự hồi phục là một thách thức, một vấn đề quan trọng trong phẫu thuật chấn thương chỉnh hình. Trong suốt quá trình lành xương sự biệt hóa MSC, cytokin, các yếu tố điều hòa, tăng sinh biệt hóa thành tế bào xương, hình thành xương. Tuy nhiên một số tổn thương không có khả năng liền và trở thành gãy xương khó liền, hạn chế về chức năng của bệnh nhân.

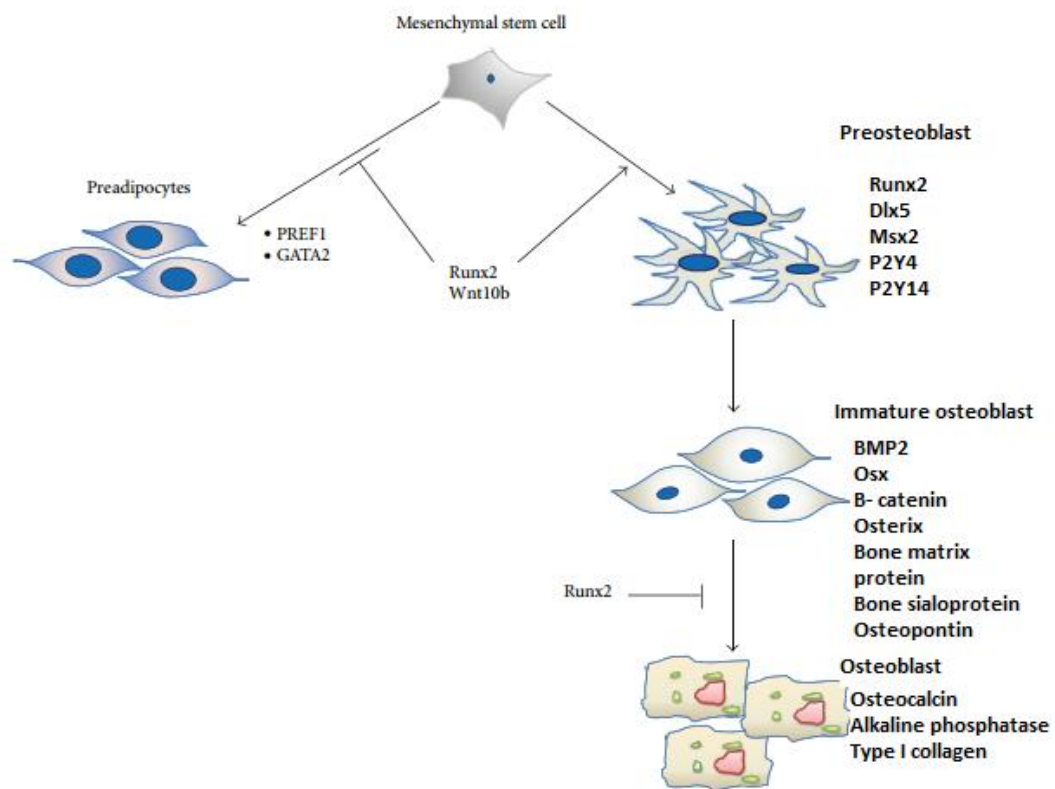
Nhiều nghiên cứu đã công bố về vai trò của tế bào gốc đối với sự hồi phục gãy xương không tự hàn gắn. Vì vậy việc nghiên cứu biệt hóa MSC thành tế bào gốc mô xương rất được quan tâm. Khả năng biệt hóa MSC thành dạng tạo cốt bào gợi mở ứng dụng liệu pháp tế bào gốc trong tái tạo mô xương. Hướng nghiên cứu có ý nghĩa quan trọng về mặt cung cấp các bằng chứng khoa học, vai trò định hướng dòng trong điều trị tái tạo xương.

4.2.1.2. Các yếu tố tham gia biệt hóa

Sự hợp dòng và biệt hóa MSC tạo dòng xương được điều hòa bởi nhiều yếu tố. MSC biệt hóa tạo tiền tạo cốt bào. Tiền tạo cốt bào có hình elip, nhân nằm dọc theo tế bào và giai đoạn đầu của biệt hóa tế bào vẫn có tiềm năng tăng sinh. Chúng biểu hiện Runx2, DLx5, MSx2 và một vài marker của tạo cốt bào như ALP, collagen type I và osteopontin (OPN), nhưng sự biểu hiện các marker yếu hơn ở tạo cốt bào trưởng thành. ALP là một trong những protein biểu hiện sớm và điều hòa sự khoáng hóa.

β -catenin, Runx2, và Osx biệt hóa thành tiền tạo cốt bào đến tạo cốt bào trưởng thành. Những tế bào này phẳng có hình con suốt. Chúng biểu hiện protein chất nền xương, BSP, và OPN.

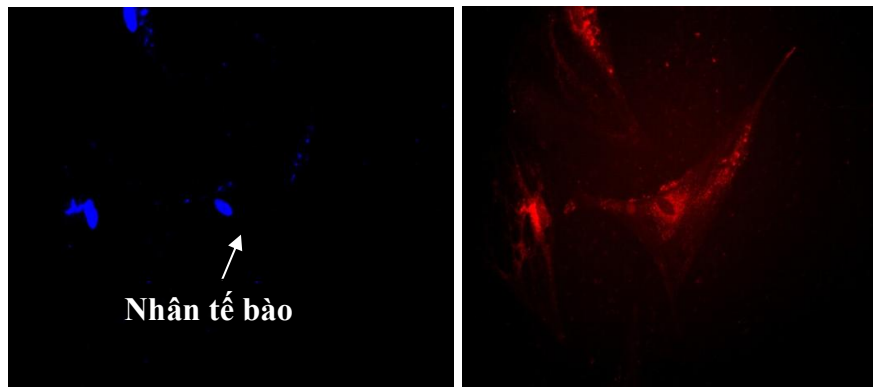
Giai đoạn sau, Runx2 bị ức chế khi tạo cốt bào trưởng thành. Osx có ở giai đoạn cuối của tạo cốt bào trưởng thành và cảm ứng sự biểu hiện osteocalcin. Khi tế bào hoàn tất quá trình biệt hóa có dạng hình khối và sản phẩm khoáng hóa vào chất nền vô cơ. Trong bào tương có bộ Golgi và lưới nội bào có hạt rất phát triển ở tạo cốt bào, kết quả là tăng các sản phẩm protein. Sự biểu hiện của OPN là giảm ở tạo cốt bào trưởng thành, trong khi sự biểu hiện các protein như P2X5, alkaline phosphatase, collagen typ I và osteocalcin ngày càng tăng [48].



Hình 4.2. Sự thay đổi hình thái và các yếu tố liên quan giai đoạn biệt hóa MSC thành tạo cốt bào [48]

4.2.1.3. Định danh tế bào gốc trung mô sau biệt hóa thành tạo cốt bào

Sau biệt hóa 3 tuần thấy hình thái tế bào thay đổi từ dạng hình sao giống nguyên bào sợi thành tế bào hình hạt đậu (Hình 3.19), (Hình 3.20). Nhuộm hóa mô alizarinred tế bào và chất nền bắt màu đỏ cam chứng tỏ có sự lắng đọng canxi trong chất nền (Hình 3.22). Dưới kính hiển vi điện tử quét thấy có sự hình thành tinh thể khoáng màu trắng (Hình 3.23). Nhuộm hóa mô miễn dịch tế bào biểu hiện dương tính marker osteocalcin là marker của tạo cốt bào (Hình 3.24), (Hình 4.3).



Hình 4.3. Nhuộm hóa mô miễn dịch với marker osteocalcin của tạo cốt bào sau biệt hóa 18 ngày (x500).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp tác giả Nadri S (2007). Nuôi cấy MSC sau khi được tách chiết từ tủy xương biệt hóa thành tế bào tạo xương, sau 3 tuần biệt hóa thấy hình thành nốt khoáng hóa bắt màu đỏ khi nhuộm Alazarin red và phân tích marker biểu hiện xương bởi kỹ thuật RT-PCR biểu hiện dương tính osteocalcin, osteopontin [38].

Tsai MT (2012) sau nuôi cấy biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tạo cốt bào cũng được định danh bởi các marker Runx2, ALP, Osteocalcin. Runx2 biểu hiện gia tăng ở ngày thứ 3 sau biệt hóa, ALP là marker biểu hiện sớm của tạo cốt bào. Osteocalcin là marker xương đặc biệt xuất hiện muộn tăng cao sau biệt hóa 28 ngày [122].

Quiroz FG (2008) nghiên cứu biệt hóa hMSC thành tạo cốt bào trong môi trường chuyên biệt tạo xương, đánh giá sự tạo xương bởi sự khoáng hóa trong chất nền và marker biểu hiện ở tạo cốt bào ở các thời điểm 14 và 20 ngày và so sánh với nhóm chứng. Sau 2 ngày biệt hóa hình thái tế bào đã thay đổi, sau 5 ngày biệt hóa tế bào có hình đa diện, nhóm tế bào ở nhóm chứng không có sự thay đổi kiểu hình, hình thái vẫn giống nguyên bào sợi.

Sau 14 ngày biệt hóa sự khoáng hóa trong chất nền chưa rõ mặc dù hình thái tế bào đã thay đổi, sau 20 ngày thấy có sự lắng đọng canxi hình thành trong chất nền khá điển hình. Tế bào MSC không nuôi cấy trong môi trường biệt hóa (nhóm chứng) hình thái tế bào không có sự thay đổi, không có sự khoáng hóa. Mức độ biểu hiện gen collagen typ I(col1), osteonectin (ON), bone sialoprotein (BSP) so với nhóm chứng thấy rằng mức độ biểu hiện gen col1 và ON không có sự khác biệt ở thời điểm 14 và 20 ngày. Biểu hiện BSP có sự khác biệt ở thời điểm 14 và 20 ngày sau biệt hóa. Tiềm năng biệt hóa xương của MSC được xác định bởi sự khoáng hóa trong chất nền, là điều kiện duy trì trong quá trình biệt hóa xương. Quan sát sự khoáng hóa sau 20 ngày biệt hóa từ MSC có kiểu hình tương tự tế bào tiền thân tạo xương.

Biểu hiện gen col1, ON, BSP tương quan đến quá trình biệt hóa xương ở giai đoạn sớm và giai đoạn trung gian của quá trình biệt hóa. Col1 tăng tối đa gấp 5.4 lần trong quá trình biệt hóa và tổng hợp chất nền, protein này chiếm 90% chất nền vô cơ. Tương tự, ON và BSP tham gia điều hòa quá trình khoáng hóa chất nền. BSP là nhân tố chính hình thành tinh thể hydroxyapatite. Điều này có vai trò quan trọng trong quá trình biệt hóa, chỉ khi BSP biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa giữa trước và sau quá trình khoáng hóa trong chất nền dẫn đến kiểu hình thay đổi giống kiểu hình tạo cốt bào [123].

Về hình ảnh tế bào có sự lắng đọng khoáng chất dưới kính hiển vi điện tử quét là kết quả nghiên cứu mới của chúng tôi, tổng quan chưa thấy tác giả nào nghiên cứu. Ở độ phóng đại hàng nghìn lần có thể thấy sự hình thành tinh thể khoáng vào trong chất nền (Hình 3.23). Sự lắng đọng các tinh thể khoáng trong mô nền quanh tế bào đang biệt hoá có xu hướng tăng dần về số lượng. Các tinh thể khoáng này có dạng hình kim, hoặc hình bông tuyết, tập hợp thành đám, lớn dần theo thời gian (hình 3.23). Nghiên cứu của chúng tôi đã kéo dài thời gian biệt hóa 30 ngày, tế bào biệt hóa rất rõ, hình thái điển hình của tạo cốt bào dưới kính hiển vi điện tử quét.

Hình ảnh tế bào sau biệt hóa này giống với hình ảnh mô xương đang tái tạo *in vivo*, chụp dưới kính hiển vi điện tử quét (pha khoáng) mà tác giả Bùi Thanh Thủy (2015) đã mô tả [120]. Nghiên cứu song song các mẫu tế bào trung mô được nuôi cấy trong môi trường thông thường, không có yếu tố gây biệt hoá, không thấy hình ảnh lắng đọng tinh thể khoáng.

Chúng tôi cho rằng đây là minh chứng rõ nét nhất cho thấy các tế bào trung mô trong môi trường nuôi cấy đặc biệt có chất biệt hóa đã biệt hoá thành tạo cốt bào. Chính các tạo cốt bào này đã sinh ra mô nền tiền cốt. Mô nền tiền cốt này với đặc tính đặc biệt, đã tạo sự lắng đọng muối khoáng (mà chủ yếu là canxi và phospho), để tạo ra chất căn bản xương sau đó.

4.2.2. Nghiên cứu thực nghiệm nhằm đánh giá khả năng tạo xương của tạo cốt bào biệt hóa từ tế bào gốc trung mô tủy xương.

Kết quả cho thấy tại thời điểm 3 tuần vùng tổn thương không ghép tế bào có tốc độ sinh xương mới chậm hơn, diện tích xương mới được tạo ra ít hơn, mặc dù xu hướng tạo xương của cả hai đều khá rõ: mô liên kết mạch tăng sinh rất nhiều tạo cốt bào, xương mới đang hình thành. Sau ghép 6 tuần thấy liền xương hoàn toàn ở cả hai nhóm. (Hình 3.25; 3.26; 3.27)

Các tế bào tiền thân của mô xương có nguồn gốc trung mô và có thuộc tính của tế bào gốc: có khả năng tăng sinh và biệt hóa. Các tế bào tiền thân này tạo ra các tạo cốt bào theo một cơ chế được điều hòa bởi các yếu tố tăng trưởng và yếu tố phiên mã hiện diện ở lớp trong của màng ngoài xương và màng trong xương. Các tế bào tiền thân tồn tại suốt đời sau sinh, chúng được tái hoạt ở người trưởng thành khi cần sửa chữa do gãy xương hoặc các loại tổn thương khác. Với các ổ khuyết nhỏ theo thời gian tại ổ khuyết cũng liền. Tuy nhiên với ổ khuyết lớn, gãy xương khó liền thì cần bổ sung thêm khối tế bào gốc. Sự liền xương sẽ được điều hòa nhờ các yếu tố hóa ứng động, vai trò cytokine. Ở thời gian ngắn 3 tuần sự tạo xương mới còn ít, thấy mạch máu tăng sinh nhiều (*Hình 3.25*). Tuy nhiên nhóm 3 tuần có ghép tạo cốt bào đám xương mới tạo ra vẫn nhiều hơn so với nhóm không ghép tế bào.

Ở nhóm 6 tuần hình ảnh mô xương mới nhiều tế bào xương, vùi trong chất căn bản xương, tạo cốt bào biến thành tế bào xương, mô dạng xương biến thành mô xương.

Kết quả nghiên cứu sau ghép tế bào vào vị trí ổ khuyết 6 tuần, đánh giá về mặt đại thể thấy đã liền xương. Dưới kính hiển vi điện tử thấy có vùng xương đang hình thành xen giữa vùng xương đã hình thành. (*Hình 3.27*)

Vùng xương đang hình thành, chất nền đang trong quá trình khoáng hóa. Sự khoáng hóa diễn ra không đồng thời, biểu hiện bằng hình ảnh các tinh thể khoáng lắng đọng tạo thành các hạt khoáng kích thước to, nhỏ không đều và sắp xếp không có trật tự, không có hướng tùy theo tiến trình hình thành xương mới.

Khi cấu trúc nền cơ bản được hình thành thì sự khoáng hóa này dần nhiều lên và kéo dài hơn làm tăng số lượng và kích thước các tinh thể khoáng. Vùng bên ghép có tế bào thấy tốc độ liền xương nhanh hơn, có vùng phá hủy xương có hình ảnh hốc lõm, các đường viền xung quanh hốc lõm do các

nhánh bào tương của hủy cốt bào bám vào xương đồng thời tiết ra các enzym phá hủy xương hoặc phân hủy xương cũ, chuẩn bị quá trình tạo xương mới

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với tác giả Dehghan MM (2014) nghiên cứu ghép MSC tủy xương trên đoạn khuyết xương của xương chày chó, với mật độ tế bào (1.0×10^7) và 3ml PRP. Sau ghép đánh giá sự liền xương vi thể thấy ổ khuyết xương được ghép cùng tế bào sự hình thành xương mới là 46,32%, nhóm chứng không có tế bào tỷ lệ liền xương là 39,06% [124].

Thời gian biệt hóa tạo cốt bào chúng tôi biệt hóa ở giai đoạn đầu định hướng biệt hóa dòng tạo xương cho kết quả rất khả quan đã rút ngắn được thời gian biệt hóa so với một số tác giả khác phải biệt hóa 20 ngày đến 30 ngày [16].

Kim SJ (2007) nghiên cứu đánh giá khả năng liền xương sau ghép tự thân tạo cốt bào. Thực nghiệm được tiến hành phân lập tế bào gốc từ tủy xương rồi nuôi cấy biệt hóa thành tạo cốt bào. Tạo ổ khuyết xương trên xương chày thỏ khoảng 15mm. Sau đó ghép khối tạo cốt bào trộn fibrin với mật độ 5×10^6 /ml vào ổ khuyết. Đánh giá sự liền xương bằng chụp X-Quang và làm tiêu bản vi thể nhuộm H.E và nhuộm Masson's ở thời điểm 3,6 và 9 tuần sau ghép. Sau 3 tuần chưa thấy liền xương hoàn toàn tại ổ khuyết, sau 6 tuần liền xương hoàn toàn, sau 9 tuần xương mới hình thành tương tự mô xương chủ [125].

Như vậy, sau khi định danh khẳng định chắc chắn tế bào gốc trung mô, chúng được tiếp xúc với môi trường biệt hóa thành tế bào tạo xương. Kết quả định danh bằng các phương pháp đặc hiệu như hóa mô miễn dịch, hiển vi điện tử cho thấy quá trình biệt hóa đã thành công. Các tế bào sau khi biệt hóa thành tạo cốt bào được thử nghiệm trên động vật có đối chứng cho thấy khả năng tạo xương mới giai đoạn đầu nhanh hơn so với vùng tổn thương không sử dụng tế bào thực nghiệm

4.2.3. Bảo quản tế bào sau nuôi cấy biệt hóa

4.2.3.1. Tỷ lệ tế bào sống sau bảo quản và mối liên quan với nồng độ huyết thanh ở các môi trường MT1, MT2, MT3.

Tế bào được bảo quản bằng quy trình đông lạnh chậm trải qua 3 giai đoạn hạ nhiệt. Đầu tiên tế bào được đặt ở 4⁰C trong 30 phút để nước bên trong tế bào có thể thay thế bởi chất bảo quản, sau đó tế bào được trữ ở -20⁰C, -80⁰C qua đêm trước khi cho vào nitơ lỏng.

Khi bảo quản bằng phương pháp đông lạnh chậm, nhiệt độ được hạ từ từ qua từng giai đoạn, nước bên trong tế bào sẽ được thay thế bởi chất bảo quản và tế bào có thời gian thích nghi với môi trường mới.

Kết quả thống kê cho thấy có sự khác biệt giữa mật độ tế bào sống sau bảo quản ở 3 môi trường khác nhau. Các tế bào chết có thể do các tinh thể đá nội bào hình thành trong quá trình hạ nhiệt khi nồng độ không đủ cao hoặc hình thành trong quá trình làm ấm khi tốc độ rã đông không đủ nhanh.

Kết quả cho thấy, bảo quản ở môi trường MT3 có khả năng thẩm thấu nước tốt, nên tế bào có tỷ lệ sống cao (87,07%). Tế bào bảo quản ở môi trường MT1, chưa thích hợp nên tỷ lệ tế bào sống thấp (61,28%).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với tác giả Verdanova M (2014) bảo quản tạo cốt bào trong các môi trường khác nhau, theo phương pháp hạ nhiệt độ theo chương trình với tốc độ 1⁰C/phút đến -80⁰C, rồi cho vào nitơ lỏng. Trong đó môi trường bảo quản tạo cốt bào chuẩn là DMSO 10% và 25% FBS có tỷ lệ tế bào sống 87%. Còn tác giả bảo quản MSC trong môi trường bảo quản 10% DMSO tỷ lệ tế bào sống xấp xỉ là 80%.

Ở điều kiện nhiệt độ cực thấp, các tế bào được bảo vệ bằng các yếu tố cơ học như sử dụng các chất bảo vệ lạnh, hạ nhiệt độ nhanh, rã đông nhanh để tránh hình thành tinh thể đá, tránh mất nước của tế bào thì không nhất thiết phải sử dụng huyết thanh nếu chỉ bảo quản trong thời gian ngắn và không yêu

cầu tỷ lệ sống cao. Tỷ lệ tế bào sống sau bảo quản 2 tuần giữa môi trường có tỷ lệ huyết thanh 15%(MT2) và 30% (MT3) chênh lệch không đáng kể mặc dù lượng huyết thanh gấp đôi.

Nhìn chung trong các lab nuôi cấy hay bổ sung thêm huyết thanh (FBS), huyết thanh chứa rất nhiều chất khoáng, lipid, hormon, protein. Thành phần chủ yếu nhất của huyết thanh là protein chức năng quan trọng vận chuyển, tăng độ quán cho môi trường, giảm tác động vật lý cho tế bào khi thao tác và tăng khả năng đệm của môi trường. FBS được coi là chất bảo vệ tế bào rất tốt, ổn định màng và cân bằng áp xuất thẩm thấu như một chất bảo quản CPA. Một số lab hay dùng công thức bảo quản là 10%DMSO và 90% FBS. FBS rất có giá trị cho bảo quản tế bào gốc và hBMSC. Tuy nhiên DMSO và FBS cũng còn một số bất cập.

DMSO có thể ổn định protein tế bào trong quá trình đông, ổn định protein màng tế bào, nhưng có thể gây độc. Theo nhiều nghiên cứu cho thấy độc tính của DMSO phụ thuộc vào nồng độ. Bên cạnh đó DMSO cũng tăng độc tính ở nhiệt độ cao hơn. Cho nên sau rã đông tế bào cần phải loại bỏ nhanh DMSO ra khỏi dung dịch tế bào.

Nồng độ DMSO 10% là nồng độ tối ưu cho bảo quản tế bào gốc. Cho nên quy trình của chúng tôi áp dụng bảo quản tế bào DMSO ở nồng độ 10%.

Bên cạnh ưu điểm của FBS thì vẫn còn những hạn chế như khó xác định mang mầm bệnh virut, truyền những bệnh về virut khi sử dụng protein dị loài. Nên sử dụng huyết thanh tự thân giải quyết vấn đề kinh tế và an toàn hơn. Tuy nhiên quá trình sản xuất huyết thanh tự thân cần nhiều thời gian và khó để có sản phẩm với số lượng lớn. Cho nên xu hướng nghiên cứu bảo quản tế bào là giảm nồng độ FBS hay không dùng FBS [126][127]

Mối liên quan giữa tỷ lệ tế bào sống với nồng độ huyết thanh được thể hiện ở các biểu đồ 3.3; 3.4; 3.5, thể hiện mối liên quan giữa các môi trường

bảo quản MT1 và MT2, MT1 và MT3, MT2 và MT3. Mỗi liên quan giữa tỷ lệ tế bào sống và nồng độ huyết thanh là mối tương quan thuận, tuy nhiên mức độ tương quan chỉ ở mức yếu và trung bình. Điều này chứng tỏ nồng độ huyết thanh có ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của tế bào.

Tìm ra một tỷ lệ thành phần huyết thanh tối ưu giúp cho tế bào sống và phát triển là một bài toán khó. Theo Brian Douglass: “Việc lựa chọn sản phẩm huyết thanh phụ thuộc vào yêu cầu tăng trưởng của từng loại tế bào, ví dụ những dòng tế bào nhạy cảm thường cần loại huyết thanh có chất lượng cao nhất”. Huyết thanh thai bò (Fetal bovine serum- FBS) hoặc huyết thanh thai bê (Fetal calf serum – FCS) là những loại sử dụng phổ biến nhất. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng FBS trong môi trường bảo quản tạo cốt bào với nồng độ thay đổi từ 0 đến 30%, trong đó nồng độ FBS 15% tỷ lệ tế bào sống là trên 80%. Điều đặc biệt là bảo quản tế bào trong môi trường không có huyết thanh tỷ lệ tế bào sống trên 60%. Đây là bước nghiên cứu mới trong việc phát triển bảo quản tế bào ứng dụng trên lâm sàng [128].

Theo Liu Y (2010) bảo quản MSC tùy xương ở các môi trường có nồng độ DMSO khác nhau. Bảo quản trong môi trường C1(10%DMSO), C2 (10% DMSO+ 10% FBS), C3 (10% DMSO+ 90%FBS) và công thức dung dịch bảo quản khác để các nhóm thử nghiệm. Quy trình bảo quản là: mật độ tế bào 1×10^6 /ml và để 10 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó cho tốc độ làm lạnh ($1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$) để vào hộp isopropanol trong tủ lạnh -80°C để qua đêm, sau đó bảo quản trong nitơ. Sau bảo quản 1 tuần tỷ lệ sống $82.7 \pm 3.7\%$ C1(10% DMSO); $83.8\% \pm 2.9\%$ C2(10% DMSO+ 10FBS); $90.2\% \pm 1.45$ C3(10% DMSO+ 90% FBS). Sau đã đồng tỷ lệ sống hBMSCs bảo quản môi trường (10%DMSO+90%FBS) là cao nhất so với dung dịch đông khác, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0.05$), tuy nhiên tỷ lệ tế bào sống giữa nhóm C1 (10%DMSO) và C2 (10% DMSO và 10% FBS) sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

So sánh môi trường bảo quản: fs2 (5% DMSO +5% PEG), fs3 (5%DMSO + 2%PEG +3% trehalose), fs2A (5%DMSO+ 5% PEG +2% BSA), fs3A (5% DMSO +2% PEG +3% trehalose + 2% BSA). So sánh 2 môi trường fs3 và fs3A thấy vai trò của albumin làm tăng tỷ lệ tế bào sống sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, thêm vào trehalose trong dung dịch đông không làm tăng tỷ lệ tế bào sống. Kết hợp 1,2- propanediol và PEG bảo vệ tốt hơn là 1,2- propanediol.

Nghiên cứu bảo quản hBMSC bằng phương pháp đông chậm, rã đông nhanh với dung dịch đông có môi trường giảm DMSO (7.5% DMSO, 2.5% PEG, 2% albumin thấy có tỷ lệ tế bào sống, khả năng tăng sinh, biệt hóa sau bảo quản. Mặc dù DMSO bảo vệ tế bào giảm nguy cơ hình thành tinh thể đá nội bào nhưng là chất gây độc cho tế bào nên cần phải giảm nồng độ DMSO. Nhóm nghiên cứu cho rằng bảo quản hBMSC có DMSO trên 5% nếu bảo quản một loại chất bảo quản thấm qua màng tế bào và cho rằng DMSO không thể thay thế hoàn toàn loại chất bảo quản không thấm qua màng tế bào. Điều này giải thích tỷ lệ tế bào sống thấp khi bảo quản 2,5% DMSO với 7,5% PEG kể cả có albumin không cải thiện tỷ lệ tế bào sống sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Có thể kết luận rằng lượng CPA thấm qua màng tế bào là cần thiết bảo vệ tế bào tránh tổn thương.

Nếu thay thế PEG bằng trehalose không cải thiện tỷ lệ sống tế bào hBMSC sau rã đông ở môi trường fs2, fs3, fs2A và fs3A trong khi nồng độ DMSO là tương tự nhau.

Chất bảo quản thấm qua màng 1,2- propanediol có thể sử dụng thay thế DMSO và PEG có thể dùng ở nồng độ thấp.

Chất bảo quản hỗn hợp tốt hơn có một chất bảo quản thấm qua màng. Chất bảo quản không thấm qua màng tế bào, các hợp chất cao phân tử như polyvinyl-pyrrolidone (PVP) và hydroxyethylstarch (HES) được dùng để bảo quản tế bào cho kết quả tốt [129].

4.2.4.2. Phục hồi nuôi cấy tế bào sau bảo quản

- Khả năng phát triển sau bảo quản

Sau rã đông và tiến hành nuôi cấy tiếp thấy tế bào vẫn phát triển như trước bảo quản.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với tác giả Verdanova M (2014) bảo quản tạo cốt bào trong các môi trường khác nhau, theo phương pháp hạ nhiệt độ theo chương trình với tốc độ $1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ đến -80°C , rồi cho vào nitơ lỏng. Hình thái tế bào trước và sau bảo quản cũng không thay đổi.

Bảo quản lạnh -196°C mẫu tế bào dạng tạo cốt bào được biệt hóa từ tế bào gốc trung mô tủy xương thỏ bằng phương pháp hạ nhiệt độ và rã đông nhanh trong thời gian 2 tuần trong môi trường gồm 10% DMSO, 30% FBS tỷ lệ tế bào sống đạt gần 90%. Tuy nhiên trong môi trường không có huyết thanh (với DMSO 10%) tỷ lệ sống của tế bào vẫn đạt trên 60%. Tế bào sau bảo quản theo qui trình trên không thấy biến đổi hình thái, cấy chuyển vẫn phát triển bình thường.

Xu X (2014) nghiên cứu bảo quản hMSC trên các giá thể khác nhau glass, G (Gelatin), M (matrigel) bảo quản tế bào trong môi trường 10% DMSO và 10% FBS, hạ nhiệt độ theo chương trình 1°C đến -80°C , sau đó bảo quản trong nitơ lỏng. Trước bảo quản tế bào có hình dạng nguyên bào sợi, sau bảo quản tế bào sống khoảng 40% đa phần tế bào có dạng giống như trước bảo quản ở trên G, M và gần như không có tế bào nào trên glass. Tỷ lệ tế bào sống khác nhau do ở trên giá thể khác nhau có thể tổn thương tế bào tăng do sự hình thành tinh thể đá do nguyên nhân tương tác tế bào- tế bào, tế bào và giá thể xung quanh. Sự thay đổi đặc điểm giá thể sau bảo quản có thể là kết quả thay đổi sự tác động giữa tế bào và giá thể có ảnh hưởng đến tế bào [130].

Miyamoto Y (2012) bảo quản tế bào gốc mô mỡ ở các môi trường bảo quản khác nhau như môi trường Cellbanker 2, môi trường DMEM-F12 +10%

DMSO +0.1mol/L maltose và 1% sericin, và môi trường cơ bản +10% DMSO, bảo quản với mật độ 5×10^6 /tế bào/ 2ml, hạ nhiệt độ tốc độ 1°C /phút đến -80°C để bảo quản 1-4 tuần. Tỷ lệ tế bào sống sau bảo quản đều trên 95%, không có sự khác biệt về số lượng tế bào sống từ P2-P7.

Đánh giá tỷ lệ tăng sinh của tế bào sau bảo quản ASC được kiểm tra ở 0, 4, 7 và 11 ngày. Ở ngày 11, tỷ lệ tăng sinh sau rã đông ASC ở môi trường Cellbanker 2, DMEM-F12, 10% DMSO, 0,1mol/l maltose và 1% sericin có tỷ lệ tăng sinh tế bào cao hơn nhóm tế bào ASC bảo quản trong môi trường cơ bản +10% DMSO.

Khả năng biệt hóa của tế bào sau bảo quản thành tế bào xương, tế bào mỡ không có sự khác biệt khi biệt hóa ở các thời điểm P5, P9 [131].

Liu G (2008) nghiên cứu bảo quản hBMSC bằng phương pháp đông chậm, rã đông nhanh tế bào được bảo quản ở các môi trường khác nhau. Sự chuyển hóa của tế bào được xác định bằng test alamarBlue ở các thời điểm 0,2,4,6 và 24 giờ sau rã đông. Ngay sau rã đông tỷ lệ chuyển hóa của tế bào bằng khoảng 50% tế bào không bảo quản. Sau 2 giờ hoạt động chuyển hóa của tế bào tăng nhưng giảm nhẹ khi quan sát ở 4 giờ sau rã đông và hoạt động chuyển hóa tăng cao nhất ở 6 giờ sau rã đông; 24 giờ hoạt động chuyển hóa sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nhóm sau rã đông 6h.

Sự tăng sinh của tế bào sau bảo quản được xác định bởi số lượng tế bào ở ngày 2, 4, 6, 8, 12. hBMSC không bảo quản có tỷ lệ tăng sinh cao hơn tế bào nuôi cấy sau bảo quản. Tế bào không bảo quản có chu kỳ tăng trưởng đến ngày 9 rồi giảm dần, tuy nhiên tỷ lệ tăng sinh sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Bảo quản tế bào hBMSC thấy có hình thái tế bào, pH nội bào, sự phân bố ty thể như nhóm tế bào không bảo quản [132].

Gonda K (2008) nghiên cứu khả năng tăng sinh và tiềm năng biệt hóa của tế bào gốc trung mô từ mô mỡ được phân lập từ 18 bệnh nhân ở thời điểm

trước và sau bảo quản 6 tháng. Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ được lấy từ ổ bụng, được bảo quản với mật độ tế bào 10^6 tế bào/ml trong dung dịch bảo quản cell Banker 1, hạ nhiệt độ theo chương trình 4°C trong 5 phút, sau đó hạ tốc độ $1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ đến -50°C tiếp tục hạ nhiệt độ $-5^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ đến -80°C rồi cho vào nitơ lỏng. Bảo quản tế bào ở giai đoạn P1 và P2, bảo quản sau 6 tháng, tiếp tục nuôi cấy tế bào thấy thời gian nhân đôi tế bào của nhóm không bảo quản 43 giờ, nhóm tế bào bảo quản là 35 giờ, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Sau bảo quản thời gian dài 6 tháng không ảnh hưởng đến khả năng biệt hóa xương, sụn, mỡ của tế bào gốc mô mỡ. Phân tích marker bề mặt tế bào gốc mô mỡ có marker bề mặt trước và sau bảo quản tương tự nhau IgG1, CD29, CD44, CD49d, CD71, CD90, CD105, CD117, CD144, Flk-1, Tie-2, chỉ riêng CD34 giảm khi các giai đoạn P tăng.

Trong nghiên cứu này chứng minh rằng tế bào gốc trung mô từ mô mỡ có khả năng tăng sinh, tiềm năng biệt hóa, biểu hiện marker sau 6 tháng bảo quản không ảnh hưởng đến đặc điểm sinh học của tế bào gốc trung mô từ mô mỡ [133].

Ginis I (2012) nghiên cứu bảo quản hMSC với môi trường cryostor (CS) với 2%, 5%, 10% DMSO (CS-2, CS-5, CS-10) tốc độ hạ nhiệt $1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ đến -60°C , cho vào bình nitơ. Sau 1 tháng tỷ lệ tế bào sống ở môi trường CS-2 là: 91,7%, ở môi trường CS-5, CS-10 là trên 95%. Sau 5 tháng bảo quản tỷ lệ sống lần lượt 72% và 80%. Sau đó biệt hóa tế bào sau bảo quản thành tạo cốt bào. So sánh mức độ biểu hiện alkaline phosphatase của nhóm tế bào bảo quản 1 tháng, 5 tháng không có sự thay đổi so với nhóm chứng không bảo quản.

Mức độ lắng đọng Ca^{2+} được đo lường ở ngày 21 sau biệt hóa xương không có sự khác biệt giữa nhóm bảo quản 1 tháng, 5 tháng và nhóm chứng. Phân tích một số marker CD166, CD9, CD90, CD14, CD105 nhóm bảo quản 5 tháng và nhóm chứng không có sự khác biệt [134].

Shimizu T (2013) bảo quản tủy tạo cốt bào được biệt hóa từ MSC tủy xương, bảo quản trong môi trường cell Banker 1[®], bảo quản -80°C. Sau bảo quản 4 tuần, 12 tuần tỷ lệ sống lần lượt 63,3 ±8,6%; 61,1± 6,5%. Đánh giá sự duy trì tiềm năng tạo xương như: lượng ALP ở 4 tuần, 12 tuần tăng hơn so với nhóm chứng (không bảo quản) và nhóm 4 tuần, 12 tuần không có sự khác biệt nhưng lượng osteocalcin giảm cùng với thời gian bảo quản tăng ở nhóm 12 tuần [135].

- Hình dạng tế bào

Quan sát trên 90 mẫu tế bào bảo quản với 3 loại môi trường không và có tỷ lệ huyết thanh khác nhau và so với trước khi bảo quản, không thấy sự khác biệt về hình dạng tế bào. Tuy nhiên có thể làm thêm một số xét nghiệm để đánh giá biến đổi gen nhằm đảm bảo tế bào sau bảo quản vẫn giữ được tính gốc, không có sự biến đổi hệ gen.

Tóm lại, bảo quản bằng phương pháp đông chậm, rã đông nhanh nếu bảo quản tế bào trong môi trường có huyết thanh 15% tỷ lệ tế bào sống cao trên 80%. Nhưng bảo quản trong môi trường có thể không cần huyết thanh tỷ lệ tế bào sống trên 60% là hướng nghiên cứu mới để ứng dụng trên lâm sàng.

KẾT LUẬN

Đề tài đã nghiên cứu trên thực nghiệm tách chiết thành công tế bào gốc trung mô từ tủy xương thỏ, nuôi cấy tăng sinh trên giá thể chính là chai nuôi Flask, nuôi cấy thử nghiệm trên giá thể là xương xốp, biệt hóa chúng thành tế bào dạng tạo cốt bào, định danh bằng các kỹ thuật đặc hiệu và bước đầu đánh giá khả năng tạo xương trên thực nghiệm. Bảo quản lạnh tế bào sau biệt hóa. Các kết quả của đề tài đã đáp ứng hai mục tiêu. Cụ thể:

1. Tách chiết tế bào từ tủy xương, nuôi cấy tăng sinh, định danh khẳng định tế bào gốc trung mô:

- Chọc hút lấy dịch tủy xương từ mào chậu. Dịch tủy xương chọc hút đảm bảo vô trùng, không đông. Phân lập tế bào gốc từ tủy xương bằng phương pháp ly tâm gradient tỷ trọng, khối tế bào đơn nhân trung bình là 6×10^6 tế bào/ml.
- Nuôi cấy thành công tế bào trong chai nuôi flask, bước đầu thử nghiệm trên xương xốp đông khô, môi trường nuôi cấy gồm DMEMF12 có 10%FBS, 1% kháng sinh, đa phần cấy chuyển 5 lần. Theo dõi tăng sinh bằng phần mềm X- celligence. Định danh xác định tiêu chuẩn tế bào gốc trung mô với các marker đặc hiệu dương tính CD44,CD90 và âm tính CD14,CD34.

2. Biệt hóa tế bào gốc trung mô nuôi cấy thành tạo cốt bào và bảo quản tế bào sau biệt hóa.

- Trong môi trường biệt hóa cảm ứng tạo xương, các tế bào đã biệt hóa thành dạng tạo cốt bào căn cứ vào kết quả định danh bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch dương tính với marker osteocalcin, có dấu hiệu lắng đọng canxi trong chất nền sau khi nhuộm với Alizarid red, có hình ảnh tinh thể khoáng dưới kính hiển vi điện tử quét và có biểu hiện tăng khả năng tạo xương trên ghép thực nghiệm.

- Sau biệt hóa, tế bào được bảo quản với phương pháp đông chậm, hạ nhiệt độ theo chương trình. Môi trường bảo quản gồm có 10% DMSO và 15% FBS. Mật độ tế bào đưa vào bảo quản 10^6 - 10^7 tế bào/ml. Tỷ lệ sống sau bảo quản lạnh đạt trên 80%. Nếu bảo quản tế bào trong môi trường không huyết thanh tỷ lệ tế bào sống đạt trên 60%. Tiếp tục nuôi cấy tăng sinh các tế bào vẫn phát triển tốt, hình dạng tế bào không thay đổi.

KHUYẾN NGHỊ

- Chuẩn hóa qui trình phân lập, nuôi cấy tăng sinh, biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào tạo xương trên người.
- Tiếp tục nghiên cứu nuôi cấy tăng sinh và biệt hóa trên giá thể 3D là xương xốp nhằm tạo ra các vật mang tế bào gốc để ứng dụng ghép tế bào gốc trung mô tự thân đã biệt hóa thành tế bào tạo xương cho bệnh nhân cấy ghép mô xương hoặc các bệnh lý về xương.

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

1. Lê Thị Hồng Nhung, Nguyễn Khang Sơn, Ngô Duy Thìn (2014) Kỹ thuật chọc hút tủy xương thỏ phục vụ nuôi cấy tế bào gốc trung mô. *Y học Việt Nam*, tập 424, 183 – 187.
2. Lê Thị Hồng Nhung, Nguyễn Khang Sơn, Ngô Duy Thìn (2015). Nuôi cấy tăng sinh và định danh tế bào gốc trung mô tủy xương thỏ. *Y học Việt Nam*, tập 437, 102 - 108.
3. Lê Thị Hồng Nhung, Nguyễn Khang Sơn, Ngô Duy Thìn (2016). Bảo quản tế bào dạng tạo cốt bào biệt hóa từ tế bào gốc trung mô tủy xương trong môi trường không có huyết thanh. *Y học thực hành*, 1002, 77-82.
4. Lê Thị Hồng Nhung, Nguyễn Khang Sơn, Ngô Duy Thìn (2017). Biệt hóa tế bào gốc trung mô tủy xương thỏ thành dạng tạo cốt bào trong môi trường dexamethasone và ascorbic. *Y học dược quân sự*, số 42, 173-178.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Thu Hà (2004). Tế bào gốc và ứng dụng trong y sinh học. Nghiên cứu y học, Phụ bản, tập 32, số 6; 13-25.
2. Nather A (2010) Book Allograft procurement, processing and transplantation.
3. Martí M, Mulero L, Pardo C, Morera C, Carrió M, Laricchia-Robbio L, Esteban CR, Izpisua Belmonte JC (2013). Characterization of pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 8(2):223-53.
4. Freshney R I (2005). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Fifth Edition
5. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG (2004). Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am.* ;86-A(7),1541-58.
6. Bielby R.C, Boccaccini A.R, Polak J.M, Buttery L.D.K (2004). In Vitro differentiation and in Vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells. *Tissue Engineering*, 10(9), 1518-1525.
7. Zipor D (2005). The Stem State: Plasticity Is Essential, Whereas Self-Renewal and Hierarchy Are Optional. *Stem Cells* ;23; pp : 719–726
8. Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KS, Chase L, Lakshminpathy U, Choong C, Yang Z, Vemuri MC, Rao MS, Tanavde V (2008). PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood.* 15;112(2), 295-307.

9. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al (2007), Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells*; 25: 2739-2749.
10. Yellowley C CXCL12/CXCR4 (2013) signaling and other recruitment and homing pathways in fracture repair. *BoneKEy Reports*2, 300
11. Dreger P, Gluckman E, Schmitz N (2000), Source of Haemopoietic stem cells, Haemopoietic stem cell transplantation, 69- 90.
12. Gunsilius E, Gastl G, Petzer AL (2001), Hematopoietic stem cells. *Biomed Pharmacother*, 55: 186 -194.
13. Đỗ Trung Phần. Bài giảng huyết học truyền máu. Nhà xuất bản y học 2014
14. Wilson A, Trumpp A (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 6(2), 93-106.
15. Travlos G.S (2006). Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. *Toxicol Pathol* 34 (5), 548-565
16. Bruder S.P., Jaiswal N., Haynesworth S.E., (1997), Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation, *J. Cell. Biochem*. 64, 278–294.
17. Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL (2001), Can stem cells cross lineage boundaries?, *Nat Med*; 7, 393 – 5.
18. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 4(5):267-74.
19. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 14;9:12. doi: 10.1186/1478-811X-9-12

20. Simmons PJ, Torok-Storb B (1991). Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*.78(1), 55-62.
21. Bonnet D, Anjos-Afonso F (2007). Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1+ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood*. 109(3), 1298-306.
22. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM (2002). Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*.109(10), 1291-302.
23. Birnbaum T, Roider J, Schankin CJ, et al, (2007), Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines, *J Neurooncol* 83, 241-247.
24. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 164(2):247-56.
25. Trịnh Bình (2007) Mô liên kết, Bài giảng mô học. Nhà xuất bản y học.
26. Pittenger M.F, Martin B.J, (2004). Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ.Res*,95,9-20.
27. Liu M and Han Z C (2008). Mesenchymal stem cells: biology and clinical potential in type 1 diabetes therapy. *J. Cell. Mol. Med* 12(4), 1155–1168
28. Silva W.A, Covas D, Panepucci R.A, Proto-Siqueira R, Siufi J, Zanette D, Santos A, Zago M.A (2003). The Profile of Gene Expression of Human Marrow Mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 21, 661-669

29. Otto W R, and Wright A N(2011). Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. *Fibrogenesis & Tissue repair*, 4: 20,1-14
30. Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J (1999). The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun*. 265(1), 134-9.
31. Ode A, Kopf J, Kurtz A, Schmidt-Bleek K, Schrade P, Kolar P, Buttgereit F, Lehmann K, Hutmacher DW, Duda GN, Kasper G (2011). CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells. *Eur Cell Mater*. 22, 26-42.
32. Mafi P, Hindocha S, Mafi R, Griffin M, and Khan W.S(2011). Adult Mesenchymal Stem Cells and Cell Surface Characterization - A Systematic Review of the Literature. *Open Orthop J*, 5, 253–260.
33. Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, Barsky LW, Weinberg K, Barr ML, Demetriou A, Wu GD (2006). The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cell*, 24(4), 928-35.
34. Simmons PJ and Torok-Storb B (2015). Identification of Stromal Cell Precursors in Human Bone Marrow by a Novel Monoclonal Antibody, STRO-1. *Blood*, 78, 55-62.
35. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8(4), 315-7.

36. Bianco P, Riminucci M (2001), Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications, *Stem cells*, 19: 180 -192.
37. Dawn B, Bolli R (2005), Adult bone marrow-derived cells: regenerative potential, plasticity, and tissue commitment, *Basis Res Cardiol*, 100: 494 -503.
38. Soleimani M, & Nadri S (2009). A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nature protocols* 4(1), 102-106
39. Ahmad A and Shakoori A.R (2012). Isolation and differentiation of murine mesenchymal stem cells into osteoblasts in the presence and absence of dexamethasone. *Pakistan J.Zool*, 44(5), 1417-1422.
40. Colter DC, Class R, and Prockop DJ (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *PNAS* 97(7). 3213–321
41. Izadpanah R, Kaushal D, Kriedt C, Tsien F, Patel B, Dufour J, and Bunnell B (2008). Long-term In vitro Expansion Alters the Biology of Adult Mesenchymal Stem Cells. *Cancer Res* 68(11), 4229–38
42. Mauney RJ, Jaquie C, Volloch V, Heberer M, Martin I, Kaplan DL (2005). In vitro and in vivo evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering. *Biomaterials* 26; 3173-3185
43. Fan X, Liu T, Liu Y, Ma X, Cui Z (2009). Optimization of primary culture condition for mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood with factorial design. *Biotechnol Prog.* 25(2), 499-507
44. Colter DC, Class R, and Prockop DJ (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *PNAS* 97(7). 3213–321

45. Lifang Jin, Shaohui Ji, Mei Shen, Jianlong Zhang , Jiwei Han and Jian Ni (2014). Expansion, characterization, and differentiation of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells in serum-free medium. *Animal Cells and Systems* 18 (4), 228–236
46. Schieker M, Pautke C, Haasters F, Schieker J, Docheva D, Böcker W, Guelkan H, Neth P, Jochum M and Mutschler W (2007). Human mesenchymal stem cells at the single-cell level: simultaneous seven-colour immunofluorescence. *J Anat*, 210; 592–599
47. Nadri S, Soleimani M, Hosseini RH, Massumi M, Atashi A, Izadpanah R (2007). An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol.* 51(8), 723-9.
48. Zhang Y, Khan D, Delling J, Tobiasch E(2012). Mechanisms Underlying the Osteo- and Adipo-Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *The Scientific World Journal*.:793823. doi:10.1100/2012/793823.
49. Pelttari K., Steck E., Richter W., (2008), The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis, *Int. J Care Injured* 39, 58-65.
50. Huang J.I., Kazmi N., Durbhakula M.M., (2005). Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *J Orthop Res* 23: 1383–1389.
51. Birgit K, Gerald F, Anita J et al (2007) Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*, 8:70 doi:10.1186/1471-2164-8-70.
52. Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE (2007). Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port.* 32(2),103-10.

53. Nguyễn Trí Dũng (2014). Bài giảng Mô học phân tử. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật
54. Komori T (2006). Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem.* 99(5), 1233-9
55. Zhang C (2010). Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor *Osx*. *J Orthop Surg Res.* 15, 2-8.
56. Lin GL, Hankenson KD (2011). Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* 112(12), 3491-501.
57. Gao D, Critser JK (2000). Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR*;41(4),187-96.
58. Qi WD, Ding DL, Salvi RJ (2008). Cytotoxic effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on cochlear organotypic cultures. *Hearing Res* 236, 52–60.
59. Wang X, Hua TC, Sun DW, et al (2007). Cryopreservation of tissue-engineered dermal replacement in Me2SO: Toxicity study and effects of concentration and cooling rates on cell viability. *Cryobiology* 55, 60–65.
60. Pegg DE, Diaper MP, Skaer HL, Hunt CJ (1984). The effect of cooling rate and warming rate on the packing effect in human erythrocytes frozen and thawed in the presence of 2 M glycerol. *Cryobiology.* 21(5), 491-502.
61. Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV (2010). Evaluation of methylcellulose and dimethyl sulfoxide as the cryoprotectants in a serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells. *Stem Cells Dev.*19(4), 513-22.

62. Song Y. S. et al (2010). Vitrification and levitation of a liquid droplet on liquid nitrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4596–4600
63. Thirumala S, Goebel WS, Woods EJ (2009). Clinical grade adult stem cell banking. *Organogenesis*. 5(3), 143-154.
64. Noriko K, Motohiro H, Hiroko M, Youichi K et al (2005) Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells. *Tissue engineering*, 11, 663-673.
65. Liu G, Shu C, Cui L, Liu W, Cao Y (2008). Tissue-engineered bone formation with cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cryobiology*, 56, 209–215.
66. Naaldijk Y, Staude M, Fedorova V and Stolzing A (2012). Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide. *BMC Biotechnology* 12:49 DOI: 10.1186/1472-6750-12-49.
67. Zeisberger SM, Schulz JC, Mairhofer M, Ponsaerts P, Wouters G, Doerr D, Katsen-Globa A, Ehrbar M, Hescheler J, Hoerstrup SP, Zisch AH, Kolbus A, Zimmermann H (2011). Biological and physicochemical characterization of a serum- and xeno-free chemically defined cryopreservation procedure for adult human progenitor cells. *Cell Transplant*. 20(8),1241-57.
68. Yong KW, Pingguan-Murphy B, Xu F, Abas WA, Choi JR, Omar SZ, Azmi MA, Chua KH, Wan Safwani WK (2015). Phenotypic and functional characterization of long-term cryopreserved human adipose-derived stem cells. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep09596.
69. Yoon, D. S., Kim, Y. H., Jung, H. S., Paik, S. & Lee, JW (2011). Importance of Sox2 in maintenance of cell proliferation and multipotency of mesenchymal stem cells in low-density culture. *Cell Prolif*. 44, 428–440.

70. Fan, Y. X. et al(2013). Oct4 and Sox2 overexpression improves the proliferation and differentiation of bone mesenchymal stem cells in Xiaomeishan porcine. *Genet. Mol. Res.* 12, 6067–6079.
71. Choi, J. R. et al(2014). Hypoxia Promotes Growth and Viability of Human AdiposeDerived Stem Cells with Increased Growth Factors Secretion. *J Asian Sci. Res.* 4, 328–338 (2014).
72. Körbling M, Estrov Z, Champlin R (2003). Adult stem cells and tissue repair. *Bone Marrow Transplant.* 32, 23-4.
73. Susan S. Tseng, MD; Mark A. Lee, MD; A. Hari Reddi, PhD (2008). Nonunions and the Potential of Stem Cells in Fracture-Healing. *J Bone Joint Surg Am*, 90, 92 -98.
74. Kon E, Filardo G, Roffi A, et al (2012). Bone regeneration with mesenchymal stem cells. *Clin Cases Mineral Bone Metab* 9, 24–27
75. Chen YS, Chen IA, Tsai PH, Chen CP, Shaw SW and Hsuan Y, HsuanY (2016). Mesenchymal Stem Cell: Considerations for Manufacturing and Clinical Trials on Cell Therapy Product. *Int J Stem Cell Res Ther*, 3:029, 1-12
76. Marcacci M, Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Martin I, Boyde A, Ruspantini I, Chistolini P, Rocca M, Giardino R, Cancedda R, Quarto R (2000). Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res*, 49, 328-37.
77. Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder SP (1997). Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells regenerate a critical-sized segmental bone defect. *Tissue Eng*, 3, 173-85.
78. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, Quarto N, Contag CH, Wu B, Longaker MT(2004). Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol*, 22, 560-7.

79. Hashemibeni B, Razavi S, Esfandiari E, Karbasi S, Mardani MO (2014). Human cartilage tissue engineering from adipose-derived stem cells with BMP-6 in alginate scaffold. *J Iran Anat Sci.* ;8:117–29
80. Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, McCarville ME, Orchard PJ, Pyeritz RE, Brenner MK (2001). Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood.* 97(5):1227-31.
81. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H (2005). Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am,* 87(7), 1430-7
82. Trần Công Toại, Cao Thi (2009) , Cây tủy xương để đánh giá số lượng tế bào gốc trung mô thông qua các đơn vị tạo cụm nguyên bào sợi (CFU-FS). *Y học TP.Hồ Chí Minh, tập 13*, phụ bản số 1,488 -490
83. Nguyễn Mạnh Khánh, Nguyễn Thị Thu Hà, Nguyễn Tiến Bình và CS (2007). Ghép tế bào gốc tủy xương tự thân điều trị khớp giả thân xương chày. *Nghiên cứu y học* 51 (4), 4-8.
84. Nguyễn Thanh Bình, Nguyễn Thị Thu Hà, Lý Tuấn Khải (2015). Đánh giá kết quả sau ghép tế bào gốc tủy xương tự thân điều trị hoại tử vô khuẩn chỏm xương đùi và kéo dài chi. *Y học Việt Nam,* tập 429, 225-231.
85. Huang JW , Chen WJ, Liao SK, Yang CY, Lin SS, Wu CC. (2006) Osteoblastic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells loaded in A carrier system of Pluronic F127 and Interpore. *Chang Gung Med J,* 29(4),363-72.
86. Xie XH, Wang XL, et al (2012). Promotion of bone repair by implantation of cryopreserved bone marrow-derived mononuclear cell in rabbit model of steroid-associated osteonecrosis. *Arthritis Rheum;* 64(5), 1562-71.

87. Liu C, Guo Q and Yang H (2014). Identification of Rabbit Annulus Fibrosus-Derived Stem Cells. *PLoS ONE*.9(9):e108239.
88. Yassen M, Fei Q, Hutton WC, Zhang J, Dong J, et al (2013). Changes of number of cells expressing proliferation and progenitor cell markers with age in rabbit intervertebral discs. *Acta Biochim Biophys Sin* 45, 368 -376.
89. Rodrigues M, Griffith LG, and Wells A (2010). Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells. *Stem Cell Res Ther*, 1(4): 32. doi: 10.1186/scrt32
90. Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, Takagishi K, Kato Y (2001). Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun*; 288, 413–419.
91. Tamama K, Kawasaki H, Wells A. Epidermal growth factor (EGF) treatment on multipotential stromal cells (2010). Possible enhancement of therapeutic potential of MSC. *J Biomed Biotechnol*. ID795385
92. Gharibi B, Hughes FJ (2012). Effects of medium supplements on proliferation, differentiation potential, and in vitro expansion of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 1(11): 771-82.
93. Ahmadbeigi N, Shafiee A, Seyedjafari E, Gheisari Y, Vassei M, Amanpour S, Amini S, Bagherizadeh I, Soleimani M. (2011) *Early spontaneous immortalization and loss of plasticity of rabbit bone marrow mesenchymal stem cell*. *Cell Prolif*.;44(1), 67-74.
94. Lennon D.P, Edmison J.M, Caplan A.I. (2001), Cultivation of rat marrow derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis, *J. Cell. Physiol*. 187, 345–355.

95. Malladi P, Xu Y, Chiou M, Giaccia A.J, Longaker M.T (2006), Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells.*Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290, 1139–1145.
96. Raimondo S, Penna C, and Geuna S (2005). Morphological characterization of GFP stably transfected adult mesenchymal bone marrow stem cells. *J Anat*, 208, 3-12
97. Tan SL, Ahmad TS, Selvaratnam L, Kamarul T (2013), Isolation, characterization and the multi-lineage differentiation potential of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cell, *J Anat*: 222, 437-450
98. Wu GD, Nolte JA, Jin YS, Barr ML, Yu H, Starnes VA, et al. (2003) Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation* 75, 679– 685.
99. Lee MS, Lill M, Makkar RR (2004) Stem cell transplantation in myocardial infarction. *Rev Cardiovasc Med* 5, 82–98.
100. Hoogduijn MJ, Beukel JC, Wiersma LC, Ijzer J (2013). Morphology and size of stem cells from mouse and whale: observational study. *BMJ*; 347 doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.f6833>
101. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001) Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7841–7845.
102. Prockop DJ, Sekiya I, Colter DC (2001) Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy* 3, 393–396.
103. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. (2009), Characterization of mesenchymal stem cell from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers, *Histochem Cell Biol.* DOI. 10.1007/s00418-009-0629-6.

104. Lee TC, Lee TH, Huang YH, Chang NK, Lin YJ, Chien PW, Yang WH, Lin MH (2014), Comparison of surface marker between Human and rabbit mesenchymal stem cell, *Plos one*; 9;11; e 111390.
105. Liu C, Guo Q, Li J, Wang S, Wang S, Li B, Yang H (2014) Identification of rabbit annulus fibrosus-derived stem cells. *Plos One*, 9(9),1-8.
106. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K (2006). Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or adipose Tissue. *Stem cell*, 24, 1294 -1301.
107. Yang XF, He X, He J, Zhang LH, Su XJ, Dong ZY, Xu YJ, Li Y, Li YL (2011). High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. doi: 10.1186/1423-0127-18-59.
108. Fekete N, Rojewski MT, Fürst D, Kreja L, Ignatius A, Dausend J, Schrezenmeier H (2012). GMP-Compliant Isolation and Large-Scale Expansion of Bone Marrow-Derived MSC. *Plos one* 7(8) doi: 10.1371/journal.pone.0043255.
109. Bernardo ME, Cometa AM, Pagliara D, Vinti L, Rossi F, Cristantielli R, Palumbo G, Locatelli F (2011). Ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells. *Best Pract Res Clin Haematol*. 24(1), 73-81.
110. Meuleman N, Tondreau T, Delforge A, Dejeneffe M, Massy M, Libertalis M, Bron D, Lagneaux L (2006). Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. *Eur J Haematol*. ;76(4), 309-16.
111. Wappler J, Rath B, Läufer T, Heidenreich A and Montzka K (2013). Eliminating the need of serum testing using low serum culture conditions for human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell expansion. *BioMedical Engineering OnLine* 12:15 DOI: 10.1186/1475-925X-12.

112. Yang XF, He X, He J, Zhang LH, Su XJ, Dong ZY, Xu YJ, Li Y, Li YL (2011). High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci.* .doi: 10.1186/1423-0127-18-59.
113. Liu Y, Xu X, Ma X, Martin-Rendon E, Watt S, Cui Z (2010). Cryopreservation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with reduced dimethylsulfoxide and well-defined freezing solutions.*Biotechnol Prog.* 26(6), 1635-43.
114. Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL (2005). Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res.*306(2), 330-5.
115. Janderova L, McNeil M, Murrell AN, Mynatt RL, Smith SR (2003). Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis.*Obes Res.* 11(1), 65-74.
116. Rogerio PP, Haruko O, Takanori I et al (2011).*Development of osteogenic cell sheets for bone tissue engineering applications.* Tissue engineering 2011, 17: 1507-1515.
117. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.* 64(2):295-312.
118. Alm JJ, Heino TJ, Hentunen TA, Väänänen HK, Aro HT (2012). Transient 100 nM dexamethasone treatment reduces inter- and intraindividual variations in osteoblastic differentiation of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells.*Tissue Eng Part C Methods.* 8(9), 658.

119. Yang D, Atkins GJ, Turner AG, Anderson PH, Morris HA (2013). Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D on mineralisation and differentiation in two different types of osteoblast-like cultures. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 136,166-70.
120. Woeckel VJ, Alves RD, Swagemakers SM, Eijken M, Chiba H, van der Eerden BC, van Leeuwen JP. (2010). 1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$ acts in the early phase of osteoblast differentiation to enhance mineralization via accelerated production of mature matrix vesicles. *J Cell Physiol.* 225(2), 593-600
121. Bùi Thanh Thủy, Nguyễn Khang Sơn siêu cấu trúc bề mặt pha khoáng vùng ghép tự thân mảnh xương sọ thỏ bảo quản lạnh sâu dưới kính hiển vi điện tử quét. *Tạp chí Y học Việt Nam*, tập 424, 170-176.
122. Tsai MT, Lin DJ, Huang S, Lin HT, Chang WH. (2012). Osteogenic differentiation is synergistically influenced by osteoinductive treatment and direct cell-cell contact between murine osteoblasts and mesenchymal stem cells. *Int Orthop.* 36(1),199-205.
123. Quiroz FG, Olga M. Estefan P, Perez DG, Castro N.H, Carlos A. Velasquez S , Hansford D.J , Florez P.A , Rojas L.L (2008). Isolation of human bone marrow mesenchymal stem cells and evaluation of their osteogenic potential. *Revista Ingenierisa Biomesdica* , 48-55
124. Dehghan MM, Baghaban Eslaminejad M, Motallebizadeh N, et al. Transplantation of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with Platelet-Rich Plasma Accelerate Distraction Osteogenesis in A Canine Model. *Cell Journal (Yakhteh)* ;17(2); pp: 243-252.
125. Kim SJ, Jang JD, Lee SK (2007). Treatment of long tubular bone defect of rabbit using autologous cultured osteoblasts mixed with fibrin. *Cytotechnology.* 54; pp: 115-20

126. Brindley DA, Davie NL, Culme-Seymour EJ, Mason C, Smith DW, Rowley JA. 2012. Peak serum: Implications of serum supply for cell therapy manufacturing. *Regen Med* 7:7–13.
127. Carmen J, Burger SR, McCaman M, Rowley JA. 2012. Developing assays to address identity, potency, purity and safety: Cell characterization in cell therapy process development. *Regen Med* 7:85–100.
128. Heathman T, Glyn V, Picken A, Rafiq Q, Coopman K, Nienow A, Kara B, Hewitt C (2015). Expansion, Harvest and Cryopreservation of Human Mesenchymal Stem Cells in a Serum-free Microcarrier Process. *Biotechnol. Bioeng.*;112: 1696–1707
129. Liu Y, Xu X, Ma X, Martin-Rendon E, Watt S, Cui Z (2010). Cryopreservation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with reduced dimethylsulfoxide and well-defined freezing solutions. *Biotechnol Prog.* 26(6),1635-43.
130. Xu X, Liu Y, Cui ZF (2014). Effects of cryopreservation on human mesenchymal stem cells attached to different substrates. *J Tissue Eng Regen Med.* 8(8), 664-72.
131. Miyamoto Y, Oishi K, Yukawa H, Noguchi H, Sasaki M, Iwata H, Hayashi S (2012). Cryopreservation of human adipose tissue-derived stem/progenitor cells using the silk protein sericin. *Cell Transplant.*21(2-3), 617-22.
132. Liu G, Zhou H, Li Y, Li G, Cui L, Liu W, Cao Y (2008). Evaluation of the viability and osteogenic differentiation of cryopreserved human adipose-derived stem cells. *Cryobiology* 57(1), 18-24.
133. Gonda K, Shigeura T, Sato T, Matsumoto D, Suga H, Inoue K, Aoi N, Kato H, Sato K, Murase S, Koshima I, Yoshimura K (2008). Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plast Reconstr Surg*121(2), 401-105.

134. Ginis I, Grinblat B, Shirvan MH (2012). Evaluation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after cryopreservation and hypothermic storage in clinically safe medium. *Tissue Eng Part C Methods* 18(6), 453-63.
135. Shimizu T, Akahane M, Ueha T, Kido A, Omokawa S, Kobata Y, Murata K, Kawate K, Tanaka Y (2013). Osteogenesis of cryopreserved osteogenic matrix cell sheets. *Cryobiology*. 66(3), 326-32.

SỐ MẪU TẾ BÀO BẢO QUẢN Ở CÁC MÔI TRƯỜNG KHÁC NHAU

STT	Môi trường 1	Môi trường 2	Môi trường 3
1	66.5	89.5	91.5
2	59.05	74.5	76
3	60.86	81.8	91.7
4	60.6	87.5	89.7
5	65.3	92.96	90.5
6	57.8	79.3	77.9
7	60.2	81.5	87.5
8	58.5	72.4	87.05
9	61.8	87.6	91.5
10	58.5	78.1	85.2
11	68.1	90.6	91.9
12	60.2	77.8	83.5
13	65.05	85.2	83.9
14	65.9	83.8	84.7
15	60.5	87.3	92.05
16	58.8	78.5	81.6
17	53.9	76.5	86.5
18	63.5	80.2	88.9
19	58.8	78.8	81.6
20	61.5	86.03	89.08
21	63.5	88.2	90.5
22	59.9	81.8	86.06
23	50.9	76.9	82.5
24	62.5	83.8	88.9
25	67.06	85.7	91.5
26	55.8	78.2	85.8
27	65.5	85.5	87.08
28	63.5	86.9	88.09
29	60.9	73.1	89.5
30	63.5	76	90.1

CÁC THÔNG SỐ VỀ SỐ LƯỢNG, CHẤT LƯỢNG TỦY XƯƠNG

STT	Thể tích	Số lượng tế bào đơn nhân	Số lượng tế bào mọc
1	11	6	10.5
2	10	5.9	10.2
3	15	7.8	13.1
4	8	5.9	12.5
5	16	9	11.8
6	8	6.1	9.5
7	12	6.2	14
8	13	6.8	14.5
9	9	5.5	8.7
10	12	6.9	14.8
11	13	8.5	11
12	13	7.6	11.5
13	10	6.8	9
14	8	7.9	13
15	6	5.5	11.2
16	7	5.5	8.9
17	11	7.8	9.5
18	8	5	9
19	10	6.6	13.2
20	8	5.3	11
21	11	7.1	9.5
22	12	6.9	15
23	7	6	14.2
24	6	5.8	11.5
25	11	9	12.9
26	10	5.9	13.1
27	16	8.1	24
28	10	6.9	11.9
29	6	5.2	10.2
30	9	6.9	12.1

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



LÊ THỊ HỒNG NHUNG

**NGHIÊN CỨU THỰC NGHIỆM ÁP DỤNG
QUY TRÌNH NUÔI CẤY VÀ BẢO QUẢN TẠO CỐT BÀO
BIỆT HÓA TỪ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỬY XƯƠNG**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2019

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

LÊ THỊ HỒNG NHUNG

**NGHIÊN CỨU THỰC NGHIỆM ÁP DỤNG
QUY TRÌNH NUÔI CẤY VÀ BẢO QUẢN TẠO CỐT BÀO
BIỆT HÓA TỪ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỬY XƯƠNG**

Chuyên ngành : Mô - Phôi thai học

Mã số : 62720103

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Thầy hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Ngô Duy Thìn
2. PGS.TS. Lý Tuấn Khải

HÀ NỘI - 2019

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Lê Thị Hồng Nhung, nghiên cứu sinh khóa 31, Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Mô phôi thai học, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Ngô Duy Thìn và PGS.TS. Lý Tuấn Khải
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp nhận của cơ sở nơi nghiên cứu.

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

Hà Nội, ngày 20 tháng 01 năm 2019

Người viết cam đoan

Lê Thị Hồng Nhung

CHỮ VIẾT TẮT

AT	Mô mỡ	Adipose tissue
ALP		Alkaline phosphatase
BM	Tủy xương	Bone marrow
BMP	Protein tạo hình xương	Bone morphogenetic protein
CD	Cụm các phân tử biệt hóa	Cluster of differentiation
CFU-F	Đơn vị tạo cụm nguyên bào sợi	Colony forming unit fibroblastic
DMEM	Môi trường nuôi cấy	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMSO		Dimethyl sulfoxide
EGF	Yếu tố tăng trưởng biểu mô	Epidermal growth factor
EPC	Endothelial/ progenitor stem cell	Tế bào tiền thân nội mô
ESC	Tế bào gốc phôi	Embryonic stem cell
FGF	Yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi	Fibroblast growth factor
HSC	Tế bào gốc tạo máu	Hematopoietic stem cells
IGF	Yếu tố phát triển dạng insulin	Insulin-like growth factor
iPS	Tế bào gốc cảm ứng	Induced pluripotent stem cell
ISCT	Hiệp hội tế bào gốc	International Society of Cellular Therapy
MEM	Môi trường nuôi cấy	Minimum essential medium
MSC	Tế bào gốc trung mô	Mesenchymal stem cell
OC		Osteocalcin
OPN		Osteopontin
Osx		Osterix
PDGF	Yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc tiểu cầu	Platelet – derived growth factor
PPAR		Peroxisome proliferator activated receptor
Runx2	Yếu tố phiên mã Runx2	Runt-related transcription factor 2
TGF-beta	Yếu tố tăng trưởng chuyển dạng β	Transforming growth factor beta
TBG	Tế bào gốc	
VEGF	Yếu tố phát triển nội mạc mạch	Vascular endothelial growth factor

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Đại cương về tế bào gốc	3
1.1.1. Khái niệm về tế bào gốc	3
1.1.2. Hoạt động của tế bào gốc.....	4
1.1.3. Phân loại tế bào gốc.....	7
1.2. Tế bào gốc của tủy xương.....	8
1.2.1. Tế bào gốc trung mô	8
1.2.2. Tế bào gốc tạo máu.....	12
1.2.3. Tế bào tiền thân nội mô	12
1.3. Nuôi cấy, biệt hóa tế bào gốc trung mô.....	13
1.3.1. Phân lập tế bào gốc trung mô.....	13
1.3.2. Nuôi cấy tế bào gốc trung mô	14
1.3.3. Kỹ thuật đặc hiệu định danh tế bào gốc trung mô	18
1.4. Khả năng biệt hóa của tế bào gốc trung mô	19
1.4.1. Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào mỡ	20
1.4.2. Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào sụn.....	20
1.4.3. Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tạo cốt bào in vitro, sự tạo xương trong cơ thể và các yếu tố phiên mã.....	21
1.5. Tạo cốt bào.....	27
1.5.1. Đặc điểm của tạo cốt bào	27
1.5.2. Kỹ thuật xác định sự hiện diện của tạo cốt bào	28
1.6. Bảo quản lạnh tế bào	28
1.6.1. Cơ chế bảo quản lạnh.....	28
1.6.2. Vai trò chất bảo quản lạnh	29
1.6.3. Những tác động của việc thay đổi nhiệt độ	30

1.6.4. Quá trình rã đông tế bào	31
1.6.5. Các phương pháp bảo quản lạnh	31
1.6.6. Ứng dụng bảo quản tế bào gốc.....	33
1.7. Ứng dụng tế bào gốc điều trị các bệnh về xương và các nghiên cứu thực nghiệm ghép tế bào gốc	37
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	40
2.1. Đối tượng nghiên cứu, chất liệu nghiên cứu	40
2.2. Phương pháp nghiên cứu	40
2.2.1. Mô hình nghiên cứu.....	41
2.2.2. Dụng cụ, thiết bị và hóa chất nghiên cứu	41
2.2.3. Các bước tiến hành nghiên cứu.....	43
2.3. Chỉ tiêu nghiên cứu	56
2.4. Địa điểm nghiên cứu.....	57
2.5. Xử lý số liệu	57
2.6. Đạo đức trong nghiên cứu.....	57
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	58
3.1. Kết quả phân lập, nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc trung mô từ tủy xương thỏ. .	58
3.1.1. Kết quả chọc hút, phân lập tế bào gốc trung mô từ tủy xương thỏ....	58
3.1.2. Kết quả nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc trung mô tủy xương.....	60
3.2. Kết quả biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tạo cốt bào và kết quả bảo quản sau biệt hóa.....	75
3.2.1. Kết quả biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tạo cốt bào in vitro..	75
3.2.2. Kết quả ghép tế bào gốc trung mô biệt hóa theo hướng tạo cốt bào trên thực nghiệm.....	80
3.3. Kết quả bảo quản tạo cốt bào sau biệt hóa	82
3.3.1. Tỷ lệ tế bào sống sau bảo ở các môi trường có nồng độ huyết thanh khác nhau	82
3.3.2. Kết quả phát triển tiếp theo sau bảo quản.....	86

Chương 4: BÀN LUẬN.....	88
4.1. Tách chiết, phân lập, nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc trung mô tủy xương. .	88
4.1.1. Về kết quả chọc hút tủy xương, tách chiết, phân lập tế bào gốc ..	88
4.1.2. Về nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc trung mô tủy xương	92
4.2. Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tạo cốt bào và bảo quản tế bào sau biệt hóa.....	107
4.2.1. Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tạo cốt bào in vitro	107
4.2.2. Nghiên cứu thực nghiệm nhằm đánh giá khả năng tạo xương của tạo cốt bào biệt hóa từ tế bào gốc trung mô tủy xương.....	114
4.2.3. Bảo quản tế bào sau nuôi cấy biệt hóa	117
KẾT LUẬN.....	125
KHUYẾN NGHỊ.....	127
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Các marker của tế bào gốc trung mô người.....	11
Bảng 1.2.	Các marker của tế bào gốc trung mô thỏ.....	12
Bảng 1.3.	Môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô của một số tác giả....	15
Bảng 3.1.	Kết quả lựa chọn phương pháp giảm đau.....	58
Bảng 3.2.	Kết quả lựa chọn vị trí chọc dịch tủy xương	59
Bảng 3.3.	Kết quả số lượng, chất lượng dịch tủy xương sau chọc hút, ly tâm, tách chiết	59
Bảng 3.4.	Kết quả MSC thu được ở giai đoạn nuôi cấy sơ cấp.....	60
Bảng 3.5.	Kết quả theo dõi sự biến đổi hình dạng, đặc tính tế bào gốc trung mô sau nuôi cấy.....	68
Bảng 3.6.	Kết quả xác định tỷ lệ % dương tính một số marker của tế bào gốc trung mô tủy xương thỏ bằng kỹ thuật đo dòng chảy tế bào	71
Bảng 3.7.	Kết quả định danh sau biệt hóa tế bào gốc trung mô tủy xương thành tạo cốt bào.....	75
Bảng 3.8.	Tỷ lệ tế bào sống trung bình sau rã đông ở các môi trường MT1,MT2,MT3	83

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1.	Tốc độ tăng trưởng tế bào đo dưới hệ thống X-celligence.....	66
Biểu đồ 3.2.	Biểu đồ biểu thị tỷ lệ tế bào sống sau bảo quản ở các môi trường khác nhau	83
Biểu đồ 3.3.	Mối liên quan giữa tỷ lệ tế bào sống với tỷ lệ huyết thanh có trong môi trường MT1 và MT2.....	84
Biểu đồ 3.4.	Mối liên quan giữa tỷ lệ tế bào sống với tỷ lệ huyết thanh có trong môi trường MT1 và MT3.....	85
Biểu đồ 3.5.	Mối liên quan giữa tỷ lệ tế bào sống với tỷ lệ huyết thanh có trong môi trường MT2 và MT3.....	86

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Khả năng tự làm mới của tế bào gốc.....	3
Hình 1.2.	Khả năng biệt hóa tế bào gốc tạo máu và tế bào gốc trung mô trong tủy xương.....	4
Hình 1.3.	Quá trình hoạt động tế bào gốc.....	5
Hình 1.4.	Sự di cư của tế bào gốc tại vùng gãy xương.....	6
Hình 1.5.	Sử dụng giá thể là xương xốp, tế bào có thể phát triển, tăng sinh để tạo ra sinh khối mang tế bào.....	15
Hình 1.5.	Tế bào gốc trung mô tủy xương (mũi tên) cấy chuyển lần 3 (P3) sau nuôi cấy 3 ngày trong chai flask với môi trường DMEM F12, FBS10%.....	17
Hình 1.6.	Hình ảnh nhuộm hóa mô miễn dịch của MSC có biểu hiện dương tính với CD44, CD105.....	18
Hình 1.7.	Xác định marker của MSC bằng phương pháp flow cytometry ..	19
Hình 1.8.	Khả năng biệt hóa in-vitro của MSC.....	19
Hình 1.9.	Các giai đoạn biệt hóa của MSC thành xương.....	21
Hình 1.10:	Tác động của BMP lên các gen biệt hóa tạo cốt bào.....	25
Hình 1.11:	Tác động của tín hiệu Wnt lên quá trình biệt hóa tạo cốt bào.....	26
Hình 1.12.	Các giai đoạn biệt hóa dòng tế bào xương từ tế bào gốc trung mô ..	27
Hình 1.13.	Cơ chế vật lý trong bảo quản lạnh tế bào.....	29
Hình 2.1.	Mô hình nghiên cứu.....	41
Hình 2.2.	Vị trí giải phẫu chọc tủy xương trên thỏ.....	44
Hình 2.3.	Chọc hút tủy từ xương mào chậu thỏ.....	45
Hình 2.4.	Hình ảnh dịch tủy xương trước (A) và sau ly tâm (B).....	46
Hình 2.5.	Bơm tế bào gốc vào lỗ khuyết đầu dưới xương đùi thỏ.....	54

Hình 3.1.	Tế bào đơn nhân phân lập từ tủy xương thỏ sau ly tâm, chưa nuôi cấy.	61
Hình 3.2.	Quần thể tế bào sau nuôi cấy 5 ngày.....	62
Hình 3.3.	Quần thể tế bào đơn nhân sau nuôi cấy 10 ngày.....	62
Hình 3.4.	Quần thể tế bào cấy chuyển lần 3 (P3) sau nuôi cấy 3 ngày.....	63
Hình 3.5.	Quần thể tế bào cấy chuyển lần 3 (P3) sau nuôi cấy 5 ngày.....	64
Hình 3.6.	Quần thể tế bào cấy chuyển lần 3 (P3) sau nuôi cấy 10 ngày. KHV soi ngược	65
Hình 3.7.	Hình ảnh cụm tế bào sau nuôi cấy 7 ngày	67
Hình 3.8.	Khả năng tăng sinh, bám đáy và tạo cụm của tế bào nuôi cấy tăng dần theo thời gian	67
Hình 3.10.	Kết quả xác định marker của MSC bằng kỹ thuật đo dòng chảy tế bào	70
Hình 3.11.	Tế bào gốc trung mô dương tính với CD44.....	71
Hình 3.12.	Tế bào gốc trung mô âm tính với CD14.....	72
Hình 3.13.	Tế bào gốc trung mô dương tính với CD90.....	72
Hình 3.14.	Tế bào gốc trung mô âm tính với CD34.....	72
Hình 3.15.	Tế bào gốc trung mô nuôi cấy nhưng không biệt hóa.....	73
Hình 3.16	Tế bào gốc trung mô nuôi cấy trong môi trường biệt hóa tạo mỡ sau 5-7 ngày.	74
Hình 3.17.	Tế bào gốc trung mô nuôi cấy trong môi trường biệt hóa tạo mỡ sau 5-7 ngày nhuộm Oil –red O.	74
Hình 3.18.	Tế bào gốc trung mô nuôi cấy không biệt hóa.....	76
Hình 3.19.	Tế bào gốc trung mô sau 12 ngày biệt hóa theo hướng tạo cốt bào..	76
Hình 3.20.	Tế bào gốc trung mô sau biệt hóa theo hướng tạo cốt bào 21 ngày..	77
Hình 3.21.	Tế bào gốc trung mô sau biệt hóa 21 ngày nhuộm Alizarin red ..	77
Hình 3.22.	Tế bào gốc trung mô sau biệt hóa 30 ngày dưới HVĐT quét	78

Hình 3.23.	Tế bào gốc trung mô sau biệt hóa 30 ngày dưới HVĐT quét. Tinh thể khoáng hình thành rõ nét.....	78
Hình 3.24.	Hình ảnh các tế bào sau biệt hóa 15 ngày trong môi trường cảm ứng tạo xương.....	79
Hình 3.25:	Hình ảnh vi thể tại vùng xương ghép tế bào (A) và không ghép tế bào (B) sau 3 tuần.....	80
Hình 3.26:	Hình ảnh vi thể vùng xương có bơm tế bào sau 3 tuần.....	81
Hình 3.27:	Hình ảnh siêu vi thể tại vùng xương ghép tế bào (A) và không ghép tế bào (B) sau 3 tuần	82
Hình 3.28.	Hình dạng tế bào trước bảo quản	87
Hình 3.29.	Hình dạng tế bào sau bảo quản ở các môi trường MT1 (A), MT2 (B), MT3	87
Hình 4.1.	Vị trí giải phẫu chọc tủy xương trên thỏ	90
Hình 4.2.	Sự thay đổi hình thái và các yếu tố liên quan giai đoạn biệt hóa MSC thành tạo cốt bào	111
Hình 4.3.	Nhuộm hóa mô miễn dịch với marker osteocalcin của tạo cốt bào sau biệt hóa 18 ngày.....	112