

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



ĐÀO THỊ THÚY PHƯỢNG

**NGHIÊN CỨU NUÔI TẠO TẮM BIỂU MÔ
TỪ TẾ BÀO GỐC BIỂU MÔ
NIÊM MẠC MIỆNG**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2016

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

ĐÀO THỊ THÚY PHƯỢNG

**NGHIÊN CỨU NUÔI TẠO TẤM BIỂU MÔ
TỪ TẾ BÀO GỐC BIỂU MÔ
NIÊM MẠC MIỆNG**

Chuyên ngành : Mô - Phôi thai học

Mã số : 62720103

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Thầy hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. Nguyễn Thị Bình

HÀ NỘI - 2016

LỜI CẢM ƠN

Với sự nỗ lực của bản thân cùng với sự giúp đỡ của nhiều tập thể và cá nhân, tôi đã hoàn thành luận án này. **Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin được bày tỏ lòng cảm ơn chân thành đến:**

- PGS. TS. Nguyễn Thị Bình, nguyên Chủ nhiệm Bộ môn Mô-Phôi, Trường Đại học Y Hà Nội, người thầy tận tâm hướng dẫn, động viên và tạo mọi điều kiện cho tôi thực hiện nghiên cứu và hoàn thành luận án.
- GS. TS. Trịnh Bình, nguyên Chủ nhiệm Bộ môn Mô-Phôi, Trường Đại học Y Hà Nội, người thầy là tấm gương sáng cho tôi học tập.
- Các nhà khoa học đã đóng góp ý kiến quý báu và giúp đỡ tôi khi thực hiện và hoàn thiện luận án
- Ban giám hiệu, Khoa Sau đại học, Trường Đại học Y Hà Nội đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi.
- Toàn thể lãnh đạo và anh chị em bộ môn Mô-Phôi, Trường Đại học Y Hà Nội đã luôn động viên, giúp tôi nhiệt tình trong quá trình hoàn thiện bản luận án
- Bạn bè, đồng nghiệp và những người yêu thương trong gia đình đã động viên, khích lệ và giúp đỡ tôi vô điều kiện bất kể khi nào tôi cần.

Tôi xin được bày tỏ lời cảm ơn tới những bệnh nhân đã đồng ý tham gia trong nghiên cứu để tôi có được bản luận án này.

Hà Nội, ngày , tháng , năm

Tác giả luận án

Đào Thị Thúy Phượng

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là: Đào Thị Thúy Phượng, nghiên cứu sinh khóa 29, 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 cô Nguyễn Thị Bình.
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 và là một phần kết quả của đề tài cấp nhà nước “Nghiên cứu quy trình sử dụng tế bào gốc để điều trị một số bệnh của bề mặt nhãn cầu” do PGS. TS. Nguyễn Thị Bình làm chủ nhiệm.

Xác nhận của chủ nhiệm đề tài

TÁC GIẢ LUẬN ÁN

PGS. TS. Nguyễn Thị Bình

Đào Thị Thúy Phượng

DANH MỤC NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

3H-TdR	Tritiated thymidine	Tritiated thymidine
3T3	3-day transfer, inoculum 3x10 ⁵ cells	Lớp nguyên bào sợi chuột 3T3
5BrdU	5 bromo 2 deoxyuridine	5 bromo 2 deoxyuridine
ABCG2	ATP-binding cassette sub- family G member 2	Protein ABCG2
AMP	Anti microbial peptide	Peptid chống khuẩn
BMNC		Bề mặt nhẵn cầu
BN		Bệnh nhân
cAMP	Cyclic Adenosin monophosphate	AMP vòng
CD	Cluster of differentiation	Cụm các phân tử biệt hóa
cDNA	Complementary DNA	DNA bổ sung
CK	Cytokeratin	Xơ keratin
CS.		Cộng sự
Cx-43	Connexin 43	Protein connexin 43
DAB	Diaminobenzidine	Diaminobenzidine
DED	De-epithelialized dermis	Chân bì bỏ biểu mô
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium	Môi trường nuôi cấy Dulbecco cải tiến
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
DPBS	Dulbecco's phosphate buffed saline	Môi trường đệm phosphate của Dulbecco
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epithelial growth factor	Yếu tố phát triển biểu mô
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	ELISA
FBS	Fetal bovine serum	Huyết thanh bào thai bò

FCS	Fetal calf serum	Huyết thanh bào thai bò
FDA	US Food and Drug Administration	Cục thực phẩm và dược phẩm Mỹ
FGF	Fibroblast growth factor	Yếu tố phát triển nguyên bào sợi
GAG	Glycosaminoglycan	Glycosaminoglycan
hBD	Human β defensin	β defensin người
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen	Kháng nguyên bề mặt siêu vi B
HE	Hematoxinin-eosin staining	Nhuộm H.E.
HEGF	Human epithelial growth factor	Yếu tố phát triển biểu mô người
HGF	Hepatocyte growth factor	Yếu tố phát triển tế bào gan
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Virus gây suy giảm miễn dịch ở người
HLA	Human leukocyte antigen	Kháng nguyên bạch cầu người
IGF	Insulin-like growth factor	Yếu tố phát triển giống insulin
IL	Interleukin	Interleukin
IPAAm	N-isopropylacrylamid	N-isopropylacrylamid
IU	International unit	Đơn vị quốc tế
K		Xơ keratin
KGF	Keratinocyte growth factor	Yếu tố phát triển giác mạc bào
LSCD	Limbal stem cell deficiency	Suy giảm tế bào gốc vùng rìa
MCSP	Melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan	Chondroitin sulfate proteoglycan của tế bào hắc tố ung thư
MHC	Major histocompatibility complex	Phức hợp hòa hợp mô chính
MUC	Mucin	Chất nhày
NGF	Nerve growth factor	Yếu tố phát triển thần kinh

NMM		Niêm mạc miệng
PBS	Phosphate buffered saline	Đệm phosphate
PBST	Phosphate buffered saline with tween	Đệm Phosphate với tween
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng khuếch đại chuỗi
PDGF	Platelet derived growth factor	Yếu tố phát triển có nguồn gốc tiểu cầu
PPAR γ	Peroxisome proliferator activated receptor	Receptor hoạt hóa phân chia Peroxisome
RNA	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic
SEM	Scanning electron microscopy	Kính hiển vi điện tử quét
SHEM	Supplemental hormonal epithelial medium	Môi trường nuôi cấy biểu mô có bổ sung hormone
TAC	Transient amplifying cell	Tế bào tăng sinh chuyển tiếp
TBBM		Tế bào biểu mô
TEM	Transmission electron microscopy	Kính hiển vi điện tử truyền qua
TGF	Transforming growth factor	Yếu tố phát triển chuyển dạng
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Yếu tố phát triển tế bào nội mô mạch máu
VRGM		Vùng rìa giác mạc

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN	3
1.1. Cấu trúc của bề mặt nhãn cầu	3
1.1.1. Giác mạc.....	3
1.1.2. Kết mạc.....	5
1.1.3. Vùng rìa cứng-giác mạc	5
1.1.4. Các yếu tố liên quan đảm bảo sự toàn vẹn của BMNC	6
1.1.4.1. Mi mắt.....	6
1.1.4.2. Phim nước mắt	6
1.1.4.3. Các tuyến lệ	6
1.1.4.4. Sự toàn vẹn của hai cung phản xạ điều tiết nước mắt	7
1.1.4.5. Chức năng của tế bào biểu mô BMNC được hỗ trợ bởi nguyên bào sợi nhu mô và chất cơ bản.....	7
1.2. Cấu trúc biểu mô bề mặt khoang miệng	7
1.3. Hội chứng suy giảm tế bào gốc vùng rìa giác mạc	12
1.3.1. Nguyên nhân	12
1.3.2. Biểu hiện lâm sàng của hội chứng suy giảm vùng rìa	12
1.3.3. Phương pháp điều trị hội chứng suy giảm tế bào gốc vùng rìa giác mạc ..	13
1.4. Những nghiên cứu về nuôi tạo tấm biểu mô NMM	15
1.4.1. Các loại nền nuôi cấy tế bào	15
1.4.2. Chuẩn bị mẫu mô NMM và xử lý miếng mô cho nuôi cấy	19
1.4.3. Môi trường nuôi cấy.....	26
1.4.4. Định danh tế bào của tấm biểu mô NMM nuôi cấy.....	29
1.4.5. Ứng dụng lâm sàng của tấm biểu mô NMM.....	34
1.4.5.1. Ứng dụng trong nhãn khoa	34
1.4.5.2. Ứng dụng lâm sàng trong các lĩnh vực khác	36

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	37
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	37
2.1.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu:.....	37
2.1.2. Mô hình nghiên cứu	37
2.2. Quy trình nuôi cấy	38
2.2.1. Chuẩn bị trang thiết bị cần thiết cho nuôi cấy.....	38
2.2.2. Thực nghiệm trên thỏ	39
2.2.2.1. Chuẩn bị màng ối.....	39
2.2.2.2. Chuẩn bị lớp 3T3 làm nền nuôi cấy.....	41
2.2.2.3. Chuẩn bị mảnh mô NMM cho nuôi cấy	44
2.2.2.3. Môi trường nuôi cấy, quy trình nuôi cấy và theo dõi	48
2.2.2.4. Thu hoạch và định danh tế bào nuôi cấy	49
2.2.3. Thử nghiệm trên BN tự nguyện.	53
2.3. Chỉ tiêu nghiên cứu	54
2.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	54
2.5. Thiết kế nghiên cứu.....	54
2.6. Xử lý số liệu nghiên cứu	54
2.7. Đạo đức nghiên cứu	54
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	55
3.1. Kết quả nghiên cứu về nuôi tạo tấm biểu mô trên thỏ thực nghiệm. .	55
3.1.1. Lựa chọn vị trí sinh thiết và kích thước mảnh mô nuôi cấy	55
3.1.2. Lựa chọn môi trường nuôi cấy	58
3.1.3. Lựa chọn phương pháp nuôi cấy	59
3.1.4. Hình thái và tốc độ phát triển của tấm biểu mô được nuôi cấy bằng các phương pháp khác nhau	61
3.1.5. Hình thái và tốc độ phát triển của lớp nguyên bào sợi.....	73
3.1.6. Kết quả định danh tế bào tấm biểu mô nuôi cấy bằng hóa mô miễn dịch..	76
3.1.7. Kết quả ghép tấm biểu mô NMM nuôi cấy cho thỏ gây bỏng thực nghiệm	78
3.2. Kết quả nuôi cấy tấm biểu mô NMM từ tế bào gốc NMM trên người. 79	79
3.2.1. Lựa chọn vị trí sinh thiết và kích thước mảnh mô nuôi cấy	79

3.2.2. Lựa chọn môi trường nuôi cấy	82
3.2.3. Lựa chọn phương pháp nuôi cấy	82
3.2.4. Hình thái và tốc độ phát triển của tảo biểu mô	83
3.1.5. Kết quả định danh tế bào tảo biểu mô nuôi cấy bằng hóa mô miễn dịch	90
3.1.6. Kết quả ghép tảo biểu mô NMM nuôi cấy.....	92
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN	93
4.1. Về lựa chọn nền nuôi cấy.....	93
4.2. Về vị trí và kích thước của mảnh NMM dùng cho nuôi cấy	98
4.3. Về môi trường nuôi cấy	100
4.4. Về phương pháp nuôi cấy.....	105
4.4.1. Phương pháp nuôi cấy bằng mảnh mô	105
4.4.2. Phương pháp nuôi cấy bằng dịch treo	107
4.4.3. Phương pháp nuôi cấy bằng mảnh biểu mô.....	111
4.5. Về chất lượng tảo biểu mô nuôi cấy.....	112
4.6. Vấn đề tồn tại cần nghiên cứu tiếp để hoàn thiện quy trình nuôi cấy tảo biểu mô NMM	116
KẾT LUẬN	121
KHUYẾN NGHỊ.....	122
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	
1. Hình ảnh sinh thiết giác mạc thỏ sau ghép ở các thời điểm	
2. Hình ảnh mắt của BN sau phẫu thuật ghép tảo biểu mô NMM tự thân	
3. Quy trình nuôi cấy tảo biểu mô NMM	

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Giác mạc thỏ bình thường	4
Hình 1.2. Cấu trúc biểu mô NMM	8
Hình 1.3. Sơ đồ biệt hoá tế bào	9
Hình 2.1. Mô hình nghiên cứu	38
Hình 2.2. Mô hình nuôi cấy bằng mảnh mô.....	45
Hình 2.3. Mô hình nuôi cấy bằng dịch treo	46
Hình 3.1. Niêm mạc thỏ vùng giữa má	56
Hình 3.2. Niêm mạc thỏ vùng giữa má	56
Hình 3.3. Niêm mạc môi thỏ	57
Hình 3.4. Tấm biểu mô sau nuôi cấy ba ngày	61
Hình 3.5. Tấm biểu mô sau nuôi cấy 12 ngày	62
Hình 3.6. Tấm biểu mô sau nuôi cấy 12 ngày	63
Hình 3.7. Tấm biểu mô sau nuôi cấy 3 ngày	63
Hình 3.8. Tấm biểu mô sau nuôi cấy 7 ngày	64
Hình 3.9. Lát cắt đứng dọc của tấm biểu mô sau 21 ngày nuôi cấy	65
Hình 3.10. Tấm biểu mô sau nuôi cấy dịch treo 14 ngày	65
Hình 3.11. Ranh giới giữa hai tế bào tấm biểu mô nuôi cấy	66
Hình 3.12. Tấm biểu mô nuôi cấy 4 ngày	67
Hình 3.13. Tấm biểu mô sau nuôi cấy 7 ngày	68
Hình 3.14. Tấm biểu mô sau nuôi cấy 12 ngày	68
Hình 3.15. Lát cắt đứng dọc của tấm biểu mô sau 21 ngày nuôi cấy	69
Hình 3.16. Sau nuôi cấy bằng mảnh biểu mô 14 ngày	70
Hình 3.17. Bề mặt tấm biểu mô nuôi cấy sau 14 ngày	70
Hình 3.18. Ranh giới các tế bào biểu mô tấm biểu mô nuôi cấy sau 14 ngày ...	71
Hình 3.19. Tế bào lớp đáy tấm biểu mô nuôi cấy thỏ sau nuôi cấy 14 ngày.	72
Hình 3.20. Mặt đáy tế bào biểu mô sát với màng ối sau nuôi cấy 14 ngày ...	73
Hình 3.21. Lớp 3T3 chuẩn bị cho nuôi cấy	74

Hình 3.22. Sự phát triển của nguyên bào sợi đáy giếng nuôi cấy ngày 3	75
Hình 3.23. Sự phát triển của nguyên bào sợi đáy giếng nuôi cấy ngày 5	75
Hình 3.24. Sự phát triển của nguyên bào sợi đáy giếng nuôi cấy ngày 10.....	76
Hình 3.25. Tấm biểu mô nuôi cấy 18 ngày	77
Hình 3.26. Tấm biểu mô nuôi cấy 18 ngày	77
Hình 3.27. Tấm biểu mô nuôi cấy 18 ngày	78
Hình 3.28. Niêm mạc vùng giữa má BN Phạm Ngọc T.	80
Hình 3.29. Niêm mạc vùng giữa má BN Phạm Ngọc T.	80
Hình 3.30. Niêm mạc vùng giữa má BN Võ Nữ Ngọc Y.....	81
Hình 3.31. Niêm mạc vùng giữa má BN Võ Nữ Ngọc Y.....	81
Hình 3.32. Tấm biểu mô NMM của BN Nguyễn Hữu C. 14 tuổi.	83
Hình 3.33. Tấm biểu mô NMM của BN Phạm Ngọc T. 24 tuổi.	84
Hình 3.34. Bề mặt tấm biểu mô nuôi cấy BN Nguyễn Văn L.	85
Hình 3.36. Cấu trúc tế bào bề mặt tấm biểu mô nuôi cấy BN Nguyễn Văn L.	87
Hình 3.37. Ranh giới giữa các tế bào biểu mô nuôi cấy BN Nguyễn Văn L.	88
Hình 3.39. Tế bào lớp đáy của tấm biểu mô NMM nuôi cấy BN Lê Văn L.	90
Hình 3.40. Tấm biểu mô NMM nuôi cấy của BN Hoàng Tiến D.	91
Hình 3.41. Tấm biểu mô NMM nuôi cấy của BN Nguyễn Văn N.	91
Hình 4.1. Mảnh mô gọt sau ghép 12 tháng của BN Võ Vũ Ngọc Y.	98
Hình 4.2. Lớp biểu mô sau khi bóc tách	108
Hình 4.3. Lớp biểu mô sau khi nạo lấy lớp đáy	109
Hình 4.4. Tấm biểu mô NMM nuôi cấy ngày 16	113
Hình 4.5. Tấm biểu mô giác mạc nuôi cấy	114
Hình 4.6. Tấm biểu mô NMM nuôi cấy 18 ngày của BN Nguyễn Hữu L. 27 tuổi	118
Hình 4.7. Tấm biểu mô NMM nuôi cấy 21 ngày của BN Lê Văn N. 16 tuổi (dễ bóc)	119
Hình 4.8. Tấm biểu mô NMM nuôi cấy 21 ngày của BN Lê Văn N. 16 tuổi (khó bóc)	119

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Kết quả nghiên cứu lâm sàng của cấy ghép tấm biểu mô NMM .	35
Bảng 3.1.	Tỷ lệ mọc của tấm biểu mô NMM bằng các môi trường nuôi cấy khác nhau	58
Bảng 3.2.	Tỷ lệ nuôi tạo thành công tấm biểu mô NMM bằng các phương pháp nuôi cấy khác nhau.....	59
Bảng 3.3.	Tỷ lệ nuôi tạo thành công tấm biểu mô NMM sử dụng lớp tế bào nuôi 3T3	60
Bảng 3.4.	Tỷ lệ nuôi tạo thành công tấm biểu mô NMM sử dụng lớp tế bào nuôi khác nhau	60

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bề mặt nhãn cầu (BMNC) bị tổn thương do nhiều nguyên nhân khác nhau như: bỏng mắt do hoá chất hoặc nhiệt, hội chứng Stevens-Johnson, nhiễm khuẩn mắt nặng, nhiều phẫu thuật thực hiện trên cùng một mắt, đeo kính tiếp xúc... Một trong những di chứng thường gặp khi tổn thương BMNC là hội chứng suy giảm tế bào gốc vùng rìa giác mạc (Limbal stem cell deficiency-LSCD). Hậu quả của hội chứng này là làm mất độ trong của giác mạc do màng xơ mạch từ phía kết mạc xâm lấn qua vùng rìa lên bề mặt giác mạc. Hội chứng suy giảm tế bào gốc vùng rìa giác mạc cũng có thể gây ra hiện tượng loét biểu mô giác mạc khó hàn gắn, tróc biểu mô giác mạc tái phát, thậm chí có thể gây thủng giác mạc. Vì vậy, thị lực mắt bị bệnh bị suy giảm ở nhiều mức độ khác nhau [1],[2].

Để điều trị ngoại khoa hội chứng LSCD, các nhà nhãn khoa đã sử dụng nhiều phương pháp khác nhau như: ghép màng ối đơn thuần, ghép kết mạc rìa tự thân hoặc dị thân, ghép giác-củng mạc vùng rìa. Với phương pháp ghép kết mạc rìa, ghép giác-củng mạc rìa tự thân, mảnh mô dùng để ghép được lấy từ mắt lành phải khá lớn. Phương pháp ghép tẩm biểu mô giác mạc nuôi cấy được cho là có nhiều ưu điểm vượt trội so với các phương pháp sử dụng trước đây. Quá trình nuôi cấy đã giảm thiểu số lượng tế bào không có chức năng bình thường, việc sinh thiết vùng rìa có thể nhắc lại nếu cần thiết, giảm nguy cơ thải loại mảnh ghép vì trong tẩm biểu mô giác mạc nuôi cấy không có mặt của tế bào Langerhans-tế bào đóng vai trò trình diện kháng nguyên. Phương pháp này đã được thực hiện tương đối phổ biến trên thế giới [3],[4],[5],[6]. Tuy nhiên, phương pháp này lại không thực hiện được ở các trường hợp bệnh nhân (BN) tổn thương cả hai mắt.

Đối với các trường hợp BN bị tổn thương BMNC cả hai mắt, trước đây, các bác sỹ nhãn khoa đã sử dụng phẫu thuật ghép tế bào gốc dị thân từ mắt người thân trong gia đình hoặc từ vùng rìa giác mạc của người hiến. Tuy nhiên, những BN này phải dùng thuốc chống thải loại mảnh ghép và nguy cơ thải mảnh ghép khá cao [7],[8].

Trong cơ thể, biểu mô giác mạc và biểu mô lợp niêm mạc miệng (NMM) là loại biểu mô lát tầng không sừng hoá. Những tế bào lớp đáy của cả hai loại biểu mô này có khả năng phân chia để duy trì quá trình tái tạo sinh lý. Cả hai loại biểu mô này đều có nguồn gốc phôi thai là ngoại bì da. Năm 2003, Nakamura T. và cộng sự (CS.) đã nuôi cấy thành công tấm biểu mô NMM và ghép tự thân cho thỏ bị bỏng giác mạc [2],[9]. Cũng tác giả này là người đầu tiên mô tả thành công việc ghép tấm biểu mô NMM nuôi cấy trên người bị LSCD [10]. Sau đó rất nhiều tác giả thông báo thực hiện thành công kỹ thuật này [11],[12],[13],[14],[15],[16],[17],[18],[19],[20],[21],[22],[23],[24],[25].

Các nghiên cứu cho thấy hình dạng, kích thước và cấu trúc siêu vi của tế bào tấm biểu mô NMM nuôi cấy khá tương đồng với biểu mô giác mạc bình thường [26]. Như vậy, việc sử dụng tấm biểu mô NMM nuôi cấy để điều trị tổn thương giác mạc là một lựa chọn tốt cho các BN bị tổn thương cả hai mắt và không còn vùng rìa.

Với mong muốn áp dụng vào Việt Nam một phương pháp điều trị mới cho các BN bị hội chứng suy giảm tế bào gốc vùng rìa cả hai mắt, chúng tôi tiến hành đề tài: **“Nghiên cứu nuôi tạo tấm biểu mô từ tế bào gốc biểu mô niêm mạc miệng”** nhằm mục tiêu sau đây:

- 1. Xác định vị trí, kích thước mảnh mô niêm mạc miệng và môi trường nuôi cấy phù hợp cho nuôi tạo tấm biểu mô.*
- 2. Xác định phương pháp phù hợp để nuôi tạo tấm biểu mô niêm mạc miệng.*

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Cấu trúc của bề mặt nhãn cầu

BMNC là vùng được giới hạn bởi hai đường xám của mi trên và mi dưới, bao gồm biểu mô giác mạc, biểu mô kết mạc và ranh giới là biểu mô vùng rìa giác mạc (Hình 1.1).

1.1.1. Giác mạc

Giác mạc chiếm 1/6 vỏ ngoài của nhãn cầu, hình hơi bầu dục, dày 0,8–0,9mm ở vùng trung tâm và 1,1 mm ở chu biên. Giác mạc là cấu trúc vô mạch, gồm 5 lớp: Biểu mô giác mạc, màng Bowman, nhu mô giác mạc, màng Descemet và nội mô giác mạc.

(1) Biểu mô giác mạc: là biểu mô lát tầng không sừng hoá, gồm 4-6 hàng tế bào, chiếm khoảng 10% bề dày của giác mạc. Biểu mô được chia thành 3 lớp: lớp đáy, lớp tế bào hình cánh, lớp bề mặt. Các tế bào lớp đáy hình trụ, các tế bào liên kết với nhau bằng thể liên kết và liên kết với màng đáy bằng thể bán liên kết, các tế bào được sinh ra sẽ phát triển lên các lớp phía trên. Các tế bào lớp giữa (tế bào hình cánh) có nhân tròn hoặc dài, các tế bào liên kết với nhau bằng thể liên kết và các mạng liên kết. Các tế bào bề mặt có hình đa diện dẹt, liên kết với nhau bằng vòng dính, dải bịt và thể liên kết, bề mặt tế bào có những vi nhung mao ngắn và được phủ bởi một lớp glycocalyx. Lớp glycocalyx này liên kết với mucin của phim nước mắt, bảo vệ sự toàn vẹn của BMNC. Trong bào tương của các tế bào biểu mô giác mạc đã biệt hóa thể hiện dấu ấn của xơ trung gian K3 (keratin 3) và K12. Đặc biệt, K12 là dấu ấn tốt nhất và chỉ có ở những lớp trên đáy của biểu mô giác mạc.

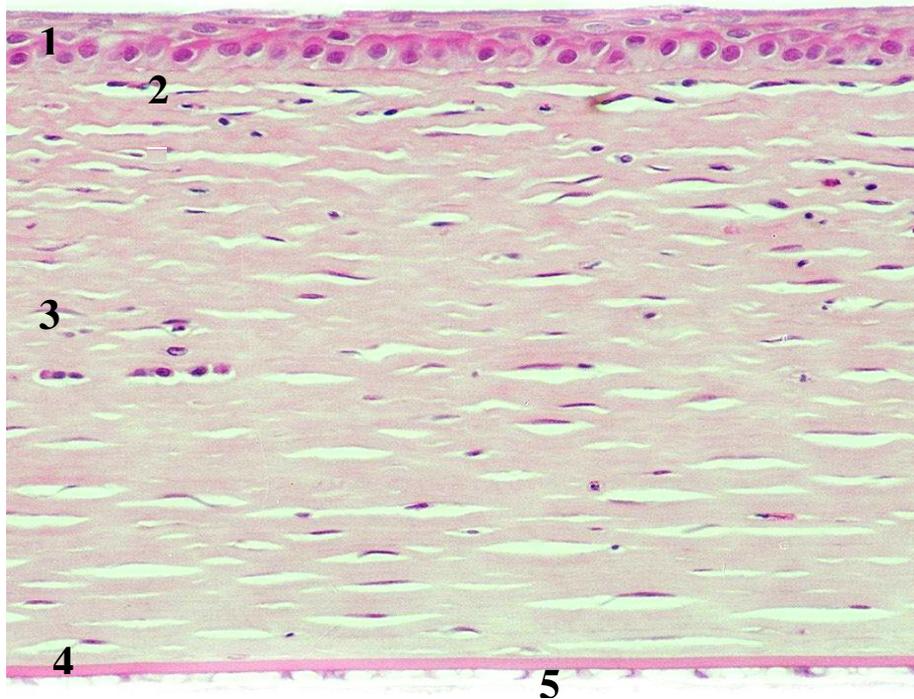
(2) Màng Bowman: Gồm màng đáy của biểu mô và màng Bowman chính thức. Màng Bowman là lớp ngoài của chân bì giác mạc (nhu mô giác mạc),

gồm các sợi collagen xếp theo các hướng khác nhau. Màng Bowman rất dai và là lớp bảo vệ quan trọng của nhãn cầu.

(3) Chân bì giác mạc: Chiếm 90% bề dày giác mạc, gồm các sợi collagen chủ yếu là type I, III, ít collagen type IV và V. Xen giữa các sợi và lá collagen là những tế bào sợi dệt gọi là giác mạc bào (keratocyte), khoảng gian sợi và gian bào chứa chất căn bản giàu glycosaminoglycan.

(4) Màng Descemet: Dày 5-10 μ m, được tạo ra từ chất tiết của nội mô giác mạc. Nó được coi như là màng đáy của biểu mô sau giác mạc.

(5) Nội mô giác mạc: Là biểu mô lát đơn gồm 1 hàng tế bào đa diện dệt xếp đều đặn phủ mặt sau giác mạc. Các tế bào nội mô giác mạc không có khả năng phân chia.



Hình 1.1. Giác mạc thỏ bình thường (H.E.x250)

1. Biểu mô trước giác mạc 2. Màng Bowman 3. Nhu mô 4. Màng Descemet

5. Nội mô giác mạc

1.1.2. Kết mạc

Kết mạc trải từ vùng rìa củng giác mạc đến đường xám của bờ mi, được chia thành 3 phần. *Kết mạc mi* lợp mặt trong của mi mắt, thuộc loại biểu mô trụ tầng. *Kết mạc nhãn cầu* lợp mặt trước nhãn cầu (trừ diện giác mạc), thuộc loại biểu mô lát tầng không sừng hoá. *Kết mạc cùng đồ* tiếp nối kết mạc nhãn cầu với kết mạc mi.

Biểu mô của kết mạc nhãn cầu gồm 6-8 hàng tế bào, các tế bào biểu mô kết mạc không đều đặn và có kích thước nhỏ hơn so với các tế bào biểu mô giác mạc. Xen kẽ với các tế bào nằm trên cùng của kết mạc có tế bào hình đài tiết nhày, chiếm khoảng 5-10% số lượng tế bào biểu mô bề mặt nhãn cầu, chúng tiết dịch nhày tạo thành phần của phim nước mắt. Các tế bào hình đài chỉ có trong kết mạc, không có ở giác mạc.

1.1.3. Vùng rìa củng-giác mạc

Vùng rìa là vùng tiếp nối giữa củng mạc với giác mạc, ở đây có sự chuyển tiếp từ biểu mô giác mạc thành biểu mô kết mạc nhãn cầu, vùng này không có màng Bowman và màng Descemet. Việc phân định ranh giới giữa vùng rìa và kết mạc là tương đối khó, vị trí tương ứng là nơi gặp nhau giữa móng mắt và mô nền giác mạc; hơn nữa, khác với kết mạc, biểu mô vùng rìa không có tế bào hình đài tiết nhày [27].

Quan sát trên lâm sàng, Davanger M. và Evensen A. (1971) đã mô tả biểu mô vùng rìa có các đường vạch sắc tố đậm vuông góc với giác mạc được gọi là hàng rào Vogt [28]. Về mặt cấu tạo, vùng rìa củng-giác mạc là một vùng hình nhẫn nằm giữa củng mạc và giác mạc. Vòng nhẫn này rộng hơn ở phía trên (1,5mm) và phía dưới (1mm), còn ở hai bên thì hẹp (khoảng 0,8mm) [1].

Biểu mô vùng rìa củng giác mạc gồm 7-10 hàng tế bào, các tế bào liên kết chặt chẽ với nhau giống như các tế bào của biểu mô giác mạc. Bên dưới

màng đáy, mô liên kết của vùng rìa tập trung nhiều dây thần kinh và giàu mạch máu, ngoài ra còn thấy sự có mặt của một số tế bào trung mô.

1.1.4. Các yếu tố liên quan đảm bảo sự toàn vẹn của BMNC [29].

Để có thể thực hiện được chức năng nhìn của mắt, ngoài hệ thống thần kinh toàn vẹn, sự toàn vẹn của BMNC là cần thiết giúp cho hình ảnh nhìn thấy có thể tới điểm hội tụ trên võng mạc. Có rất nhiều yếu tố tham gia để đảm bảo sự toàn vẹn của BMNC đó là:

1.1.4.1. Mi mắt

Mi mắt có tác dụng bảo vệ BMNC khỏi các sang chấn về mặt cơ học từ môi trường bên ngoài, cấu trúc mềm mại của bờ tự do mi mắt giúp dàn trải đều của phim nước mắt trên BMNC làm BMNC luôn nhẵn bóng và đủ độ ẩm cần thiết. Ở BN bong mắt, bờ tự do của mi bị tổn thương ở nhiều mức độ khác nhau ảnh hưởng đến sự bền vững của màng nước mắt và gây ảnh hưởng đến sự toàn vẹn của BMNC.

1.1.4.2. Phim nước mắt .

Sự toàn vẹn của bề mặt nhãn cầu cũng được đảm bảo bởi mối quan hệ mật thiết giữa biểu mô bề mặt nhãn cầu và phim nước mắt. Các rối loạn bề mặt nhãn cầu làm phim nước mắt kém bền vững và ngược lại. Hai đặc tính cơ bản của biểu mô bề mặt nhãn cầu là biểu mô không sừng hoá và tiết mucin (là thành phần quan trọng của màng phim nước mắt do tế bào hình đài tiết ra) đóng vai trò quan trọng để đảm bảo sự bền vững của màng phim nước mắt.

1.1.4.3. Các tuyến lệ

Thành phần không kém quan trọng của phim nước mắt là nước mắt cùng các chất điện phân và các loại protein do tuyến lệ chính và tuyến lệ phụ tiết ra. Trong các trường hợp bong mắt toàn bộ, hệ thống tuyến lệ phụ đều bị

tổn hại cùng với biểu mô bề mặt nhãn cầu, do đó phim nước mắt bị phá hủy hoàn toàn, gây tình trạng khô mắt nặng nề.

1.1.4.4. Sự toàn vẹn của hai cung phản xạ điều tiết nước mắt

Sự khởi phát hai cung phản xạ điều tiết nước mắt đều bắt nguồn từ những cảm giác của bề mặt nhãn cầu, gây ảnh hưởng tới quá trình điều tiết nước mắt và chớp mi mắt. Trên những mắt bị bỏng, toàn bộ bề mặt nhãn cầu bị tổn thương kèm theo các nhánh thần kinh cảm giác cho bề mặt nhãn cầu cũng bị tổn thương. Do vậy, tình trạng khô mắt ngày càng nặng nề hơn do giảm sút trầm trọng về số lượng cũng như chất lượng nước mắt và tần số chớp mắt.

1.1.4.5. Chức năng của tế bào biểu mô BMNC được hỗ trợ bởi nguyên bào sợi nhu mô và chất cơ bản.

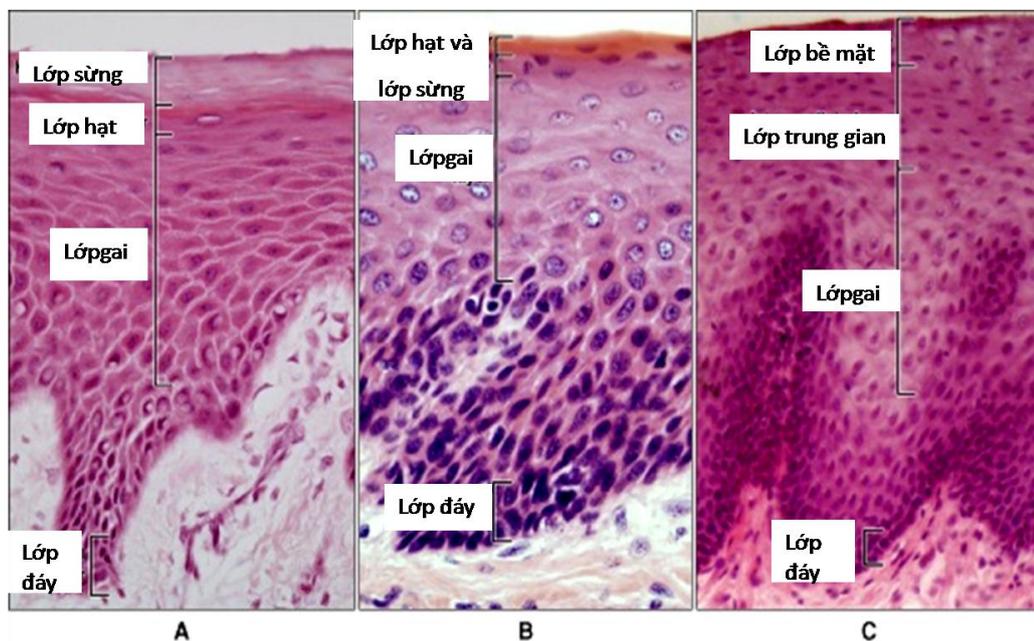
Sự trong suốt của giác mạc phụ thuộc vào sự sắp xếp của các sợi collagen và sự đồng nhất về kích thước sợi cũng như khoảng cách giữa các sợi. Trong quá trình hàn gắn biểu mô giác mạc, chất cơ bản ngoại bào có chứa các thành phần như fibronectin, enzyme protease, các yếu tố phát triển có vai trò quyết định trong sự kết dính và di thực trên bề mặt nhu mô giác mạc của các tế bào biểu mô.

1.2. Cấu trúc biểu mô bề mặt khoang miệng

NMM có cấu tạo gồm hai phần chính: biểu mô và lớp đệm. Ở nhiều vùng của miệng, NMM gắn chặt vào cấu trúc mô phía dưới bởi thành phần mô liên kết lỏng lẻo là tầng dưới niêm mạc, trừ ở vùng vòm miệng, lớp đệm của NMM dính chặt vào màng xương. Ba lớp này có cấu trúc tương tự như cấu trúc của biểu mô, chân bì và hạ bì của da [30].

Biểu mô NMM là loại biểu mô tầng, có thể sừng hoá hoặc không sừng hoá hoặc bán sừng hoá tùy thuộc vào từng vùng khác nhau [31]. Biểu mô gồm

các lớp: (1) lớp đáy (basal cell layer), lớp này chứa các tế bào gốc, các tế bào gốc sinh ra các tế bào lớp đáy và các tế bào biểu mô khác, (2) lớp gai (prickle cell layer), gồm các tế bào liên kết với nhau bởi thể liên kết đảm bảo tính bền vững cho biểu mô, (3) các lớp còn lại có cấu trúc khác nhau tùy loại biểu mô thuộc các vùng khác nhau của NMM. Đối với biểu mô sừng hoá sẽ có lớp hạt và lớp sừng (ở lớp này tế bào không thấy nhân). Ở biểu mô bán sừng, có lớp hạt và lớp sừng (lớp này tế bào vẫn còn nhân). Ở biểu mô không sừng hoá, có lớp trung gian và lớp bề mặt chứa các tế bào dẹt, nhân hình bầu dục nhỏ và bị bong ra ngoài. Biểu mô được thay thế nhờ các tế bào ở lớp sâu hơn (Hình 1.2) [32].



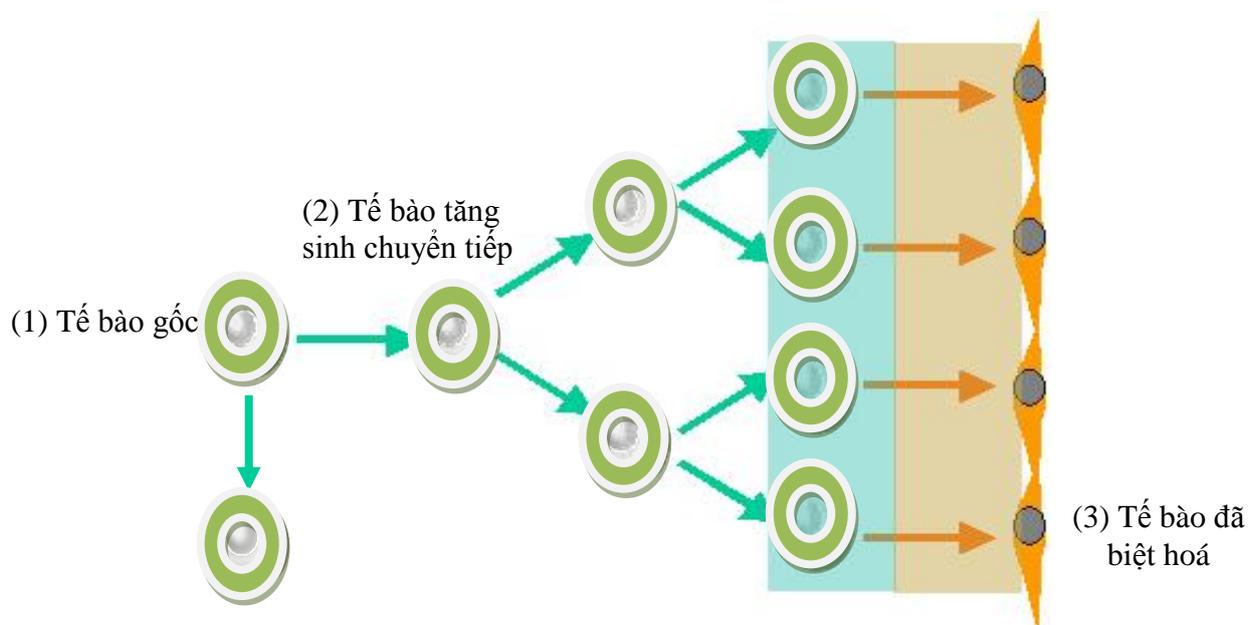
Hình 1.2. Cấu trúc biểu mô NMM [33]

A. Biểu mô sừng hóa B. Biểu mô bán sừng hóa C. Biểu mô không sừng hóa

Ở NMM, sự phân bố tế bào gốc chưa được nghiên cứu một cách đầy đủ, song về mặt cấu trúc mô học biểu mô NMM thuộc loại tầng và có kiểu tăng sinh giống như biểu bì da. Y văn đã chỉ ra rằng tế bào gốc biểu mô NMM có đủ các đặc tính tăng sinh trong suốt đời sống của nó nhưng lại

không thể phân biệt chúng với các tế bào đáy khác [34]. Do vấn đề đạo đức mà người ta không thể làm các nghiệm pháp để chứng minh sự tồn tại của tế bào gốc trên người mà chỉ có thể làm trong phòng thí nghiệm.

Ở những mô có sự đổi mới liên tục nói chung, sự tự đổi mới được diễn ra song song cùng với cơ chế mở rộng quần thể tế bào trưởng thành trước khi vào giai đoạn biệt hoá sau cùng [35]. Quá trình biệt hóa tế bào ở NMM diễn ra theo sơ đồ sau (Hình 1.3):



Hình 1.3. Sơ đồ biệt hoá tế bào

Các tế bào biểu mô nằm ở lớp đáy của biểu mô mỏng hoặc 2-3 lớp sát màng đáy đối với biểu mô dày (như ở má) là các tế bào có hình trụ hoặc hình đa diện và có khả năng phân chia để duy trì quần thể tế bào biểu mô ổn định. Các tế bào phân chia thường tạo thành từng cụm, nhìn thấy nhiều hơn ở chỗ sâu nhất của lõm biểu mô [36].

Nhiều chất có hoạt tính sinh học, mà phần lớn là các cytokin có thể kích thích hoặc ức chế tăng sinh biểu mô bao gồm: Yếu tố phát triển biểu bì (Epidermal growth factor-EGF), yếu tố phát triển chuyển dạng (Transforming

growth factor-TGF), yếu tố phát triển có nguồn gốc tiểu cầu (Platelet derived growth factor-PDGF), chất tương tác tế bào (Interleukin 1-IL1). Tốc độ tăng sinh là kết quả của việc tương tác giữa các yếu tố kích thích và ức chế, mà hoạt động thông qua hệ thống điều khiển phức tạp bao gồm việc gắn của các yếu tố peptid trên receptor bề mặt tế bào, phosphoryl hóa các yếu tố tại bào tương tế bào, hoạt động sao mã ở trong nhân dẫn tới sự sản xuất các protein liên quan tới sự điều khiển chu trình tế bào.

Hoạt động gián phân của tế bào cũng bị ảnh hưởng bởi một số các yếu tố như thời điểm trong ngày, stress và tình trạng viêm nhiễm. Sự biến đổi thành tế bào biệt hóa nhờ sự tác động của nồng độ Ca^{2+} ngoại bào, phorbol esters, vitamin A và vitamin D₃ [37].

Keratin là một loại xơ trung gian có trong các tế bào biểu mô. Chúng là những protein dạng sợi dài, hình thành nên một mạng lưới khắp tế bào. Những keratin tìm thấy trong biểu mô luôn có cấu trúc cặp, gồm một keratin type 1 (acide) và một keratin type 2 (base hoặc trung tính), cho tới nay đã biết khoảng 15 keratin của mỗi type [27]. Khi tế bào rời lớp đáy và bước vào quá trình biệt hóa, nó lớn hơn và dẹt dần, tích lũy xơ keratin trong bào tương. Ở biểu mô tầng của NMM nói chung, K5 và K14 thể hiện ở các tế bào lớp đáy. Ở biểu mô lát tầng không sừng hóa ở khoang miệng (trong đó có niêm mạc má), K4 và K13 thể hiện ở các tế bào lớp trên đáy.

Sự trưởng thành của các tế bào ở lớp trên đáy thể hiện ở những protein màng liên kết giữa các tế bào với nhau, các tế bào ở lớp đáy được gắn nhau bởi các liên kết có integrin. Quá trình biệt hóa liên quan tới sự di cư và mất đi integrin và sự dần tăng lên của các cadherin.

Ở biểu mô lát tầng không sừng hóa, sự tích lipid và xơ keratin, sự thay đổi về hình thái không điển hình như biểu mô sừng hóa, nhưng tế bào lớp trên

cùng của biểu mô vẫn còn nhân và các bào quan, các xơ trung gian không tập trung tạo thành các bó xơ lớn như thấy ở biểu mô lát tầng sừng hoá.

Đặc tính tự nhiên của tế bào gốc là có chu kỳ phân chia chậm, nên có thể phân biệt chúng với các tế bào khác bằng chất đánh dấu trong DNA (deoxyribonucleic acid) của tế bào như: 5- bromo-2 deoxyuridine (BrdU) hay 3H-thymidine (3H- TdR), Edu, Cdu - là các chất chuyên biệt cho pha S (pha phân chia -synthesis) của tế bào. Các chất này được hấp thụ vào DNA của tế bào đang phân chia bao gồm tế bào gốc và tế bào tăng sinh chuyên tiếp. Ở các tế bào tăng sinh chuyên tiếp, tín hiệu mất đi do sự phân chia nhanh và quá trình biệt hóa-chết tự nhiên của tế bào. Tế bào gốc do phân chia chậm vẫn giữ chất đánh dấu này sau khoảng thời gian 6-8 tuần.

Ở NMM, khi tế bào gốc phân chia, nó sẽ tạo ra một tế bào con mới giữ nguyên được đặc tính của tế bào gốc có khả năng phân chia vô hạn định, và một tế bào con khác bước vào quá trình biệt hoá, vì môi trường của tế bào (bao gồm mạch máu, các yếu tố phát triển và các tế bào hỗ trợ) sẽ quyết định số phận tế bào trở thành tế bào gốc hay không. Hatfield LD. và CS. (2005) chỉ ra một loại micro RNA không mã hoá (ribonucleic acid) thể hiện khác nhau ở tế bào gốc và có khả năng điều khiển sự phân chia tế bào này [38].

Các tương tác giữa tế bào biểu mô và mô liên kết cũng đóng vai trò quan trọng trong việc điều khiển sự phát triển mô. Các nghiên cứu thử nghiệm cũng chỉ ra rằng các kiểu biệt hoá đặc biệt theo vùng của vùng miệng được duy trì thông qua tương tác biểu mô và mô liên kết vùng đó [36],[39]. Việc sử dụng các thực nghiệm kinh điển, mẫu mô từ các vùng khác nhau của NMM tách ra làm hai phần biểu mô và mô liên kết, sau đó kết hợp khác loại và kết quả là mô liên kết có tác động lên sự phát triển biểu mô về kiểu biệt hoá thể hiện ở keratin và các marker carbohydrate bề mặt. Đặc điểm hình thái biểu

mô và thể hiện keratin bị ảnh hưởng bởi nguyên bào sợi phía dưới [40] và chất nền trung mô [41]. Nếu không có nguyên bào sợi ở trong chất nền, biểu mô sẽ dừng tăng sinh, trong khi quá trình biệt hoá tiếp tục thể hiện ở sự xuất hiện không bào thoái hoá khi nuôi cấy nếu không sử dụng nguyên bào sợi.

Có nhiều cytokin và yếu tố phát triển điều khiển sự tăng sinh và biệt hoá biểu mô [42]. Sự tăng sinh và biệt hoá của biểu mô thể hiện sự tương tác qua lại linh hoạt giữa biểu mô và nguyên bào sợi, phụ thuộc vào các yếu tố phát triển được sản xuất bởi nguyên bào sợi và có thể các thành phần mô liên kết khác qua cơ chế cận tiết.

1.3. Hội chứng suy giảm tế bào gốc vùng rìa giác mạc

1.3.1. Nguyên nhân

Hội chứng suy giảm tế bào gốc vùng rìa có thể *nguyên phát*, liên quan tới những bệnh lý làm thay đổi vi môi trường của tế bào gốc, ví dụ như: tật không móng mắt, viêm giác mạc liên quan tới suy nhiều tuyến nội tiết, chứng đờ da dày sừng bẩm sinh; hoặc có thể là hậu quả *thứ phát* của sự phá huỷ tế bào gốc do các yếu tố bên ngoài như: bỏng hoá chất, bỏng nhiệt, hội chứng Stevens Jonhson, đeo kính áp tròng, nhiễm khuẩn lan rộng [29],[43],[44].

1.3.2. Biểu hiện lâm sàng của hội chứng suy giảm vùng rìa

Suy giảm vùng rìa có thể xảy ra lan tràn toàn bộ hoặc chỉ ở một góc của vùng rìa. Trong trường hợp suy giảm một phần vùng rìa, sự xâm lấn của biểu mô kết mạc chỉ ảnh hưởng tới một phần bề mặt giác mạc và biểu hiện ở nhiều mức độ khác nhau, trong khi biểu mô giác mạc ở trung tâm vẫn còn bình thường. Triệu chứng chủ quan của người bệnh là nhìn mờ, cộm chói, chảy nước mắt, co quắp mi mắt và có thể có những đợt đau đỏ mắt tái phát.

Trong suy giảm tế bào gốc toàn bộ, mức độ tổn thương phụ thuộc vào nguyên nhân do thứ phát hay nguyên phát. Biểu hiện lâm sàng có thể chỉ là

giác mạc mờ đục, bề mặt gồ ghề không đều, có tân mạch nông hoặc sâu trong bề dày giác mạc hoặc kết mạc hóa giác mạc. Nặng hơn nữa có thể là ổ loét giác mạc khó hàn gắn, bờ ổ loét ranh giới rõ và gồ lên, xung quanh ổ loét có thể tồn tại tổ chức xơ tân mạch, BMNC gồ ghề với biểu hiện của một quá trình viêm mãn tính, nhuyễn giác mạc, giác mạc mỏng hoặc thủng giác mạc có thể xảy ra trong trường hợp nặng.

1.3.3. Phương pháp điều trị hội chứng suy giảm tế bào gốc vùng rìa giác mạc

Có nhiều phương pháp điều trị hội chứng LSCD. Việc nuôi tạo tấm biểu mô giác mạc từ tế bào gốc vùng rìa giác mạc để ghép điều trị cho các BN bị hội chứng LSCD là một phương pháp hiện đại và hiệu quả.

Phương pháp ghép tấm biểu mô giác mạc nuôi cấy được Pellegrini và CS. mô tả đầu tiên vào năm 1997. Tế bào biểu mô vùng rìa được lấy từ mắt bên lành nếu một mắt bị tổn thương, hoặc lấy ở vùng rìa còn bình thường trên mắt bị tổn thương tế bào gốc một phần hoặc từ người thân hoặc từ vùng rìa của người hiến nếu BN bị tổn thương cả hai mắt. Mảnh tổ chức mang tế bào gốc của biểu mô được nuôi cấy, nhân lên và tạo nên tấm tế bào biểu mô vùng rìa. Sau khi phẫu tích hết tổ chức xơ mạch trên bề mặt giác mạc và vùng rìa, tấm tế bào biểu mô nuôi cấy được cố định trên bề mặt giác mạc [45].

Về mặt lý thuyết, kỹ thuật này có ưu điểm vượt trội hơn các phương pháp khác đã được áp dụng từ trước: (1) Mảnh mô cần cho quá trình nuôi cấy kích thước sẽ nhỏ hơn, (2) Quá trình nuôi cấy đã giảm thiểu số lượng tế bào không có chức năng bình thường nằm trong mô của người cho, (3) Việc sinh thiết các tế bào gốc ở vùng rìa có thể nhắc lại nếu cần thiết. Ưu điểm nổi trội nhất của kỹ thuật này là giảm nguy cơ thải loại mảnh ghép vì sự vắng mặt của các tế bào Langerhans đóng vai trò trình diện kháng nguyên. Tuy nhiên,

phương pháp này còn nhiều vấn đề cần nghiên cứu và trong trường hợp LSCD toàn bộ cả hai bên mắt thì ghép vùng rìa đồng loại hoặc sử dụng nguồn tế bào biểu mô tự thân thay thế là giải pháp phải lựa chọn.

Có nhiều thông báo về ghép thành công tấm biểu mô NMM nuôi cấy. Sử dụng tấm biểu mô NMM nuôi cấy là một lựa chọn hợp lý và có nhiều ưu điểm hơn các phương pháp ghép dị thân. Khi ghép dị thân, BN phải sử dụng thuốc ức chế miễn dịch để chống thải loại mảnh ghép gây nhiều tác dụng phụ và tốn kém, hơn nữa nếu sử dụng lâu dài thì cũng không thể đảm bảo chắc chắn sự tồn tại của mảnh ghép.

Ở biểu mô NMM, tế bào ở giai đoạn biệt hoá thấp hơn so với tế bào dòng sừng ở da, nó có khả năng phân chia rất nhanh và kéo dài ở điều kiện nuôi cấy mà không hoá sừng. Hơn nữa, K3 thể hiện ở cả biểu mô giác mạc và biểu mô NMM chứ không có ở biểu mô da, chứng tỏ sự gần gũi hơn của biểu mô NMM và giác mạc.

Khi cấy ghép tấm biểu mô NMM nuôi cấy có thể có hiện tượng xâm lấn tân mạch ngoại vi vào giác mạc làm mất khả năng nhìn của người bệnh. Tuy nhiên, có thể khắc phục biến chứng này bằng việc sử dụng kháng FGF2 (Fibroblast growth factor 2-yếu tố phát triển nguyên bào sợi 2).

Tái thiết bề mặt nhãn cầu bằng phương pháp ghép tấm biểu mô nuôi cấy từ tế bào gốc phôi cũng đã được Ryusuke Homma và CS. (2004) tiến hành những thử nghiệm đầu tiên. Tế bào gốc phôi được nuôi trên nền collagen type IV trong vòng 8 ngày và sau đó được ghép vào giác mạc chuột tổn thương. Phân tích hình ảnh mô học sau ghép cho kết quả tốt [46]. Tuy nhiên để áp dụng phương pháp này trên người còn nhiều khó khăn do những hàng rào cản về mặt thực tế và đạo đức.

Như vậy, trong trường hợp không thể có tấm biểu mô giác mạc nuôi cấy, việc lựa chọn phương pháp ghép tấm biểu mô NMM nuôi cấy là lựa chọn khả quan giúp cải thiện tầm nhìn cho BN, bảo vệ phần còn lại của nhãn cầu và giảm các triệu chứng khó chịu gây ra cho người bệnh.

1.4. Những nghiên cứu về nuôi tạo tấm biểu mô NMM

1.4.1. Các loại nền nuôi cấy tế bào

Yếu tố quan trọng để nuôi tạo tấm biểu mô là lựa chọn giá đỡ chính xác về tính phù hợp sinh học, độ xốp, ổn định sinh học và đặc tính vật lí. Các giá sử dụng trong nuôi cấy NMM gồm các loại sau:

- *Các giá có nguồn gốc tự nhiên:*

Chân bì không có tế bào: Chân bì da của tử thi (AlloDerm™) đã được Izumi K. và CS. (1999), Izumi K. và CS. (2000) sử dụng [47],[48], Yoshizawa M. và CS. (2004) cũng sử dụng màng này nhưng phủ collagen typ IV [49].

Màng ối: Là giá đỡ tiện dụng và được sử dụng rộng rãi nhất trong nuôi tạo tấm biểu mô NMM. Màng ối có nhiều đặc điểm vượt trội hơn so với các màng sinh học khác về: tính chun giãn, tính trong suốt, mềm mại, nhẵn bóng, mỏng, khó rách.

Theo nghiên cứu của Fukuda K. và CS. (1999), màng đáy của màng ối hoàn toàn giống với màng đáy của kết mạc vì có chứa collagen typ IV, V, fibronectin, laminin-1, laminin-5, vì thế màng ối được sử dụng để thay thế kết mạc [50]. Các thành phần này đóng vai trò quan trọng trong sự biệt hoá và tăng sinh của các tế bào biểu mô.

Màng ối có chức năng của một biểu mô phủ, là biểu mô chế tiết và có khả năng trao đổi chất qua đường tế bào và gian tế bào.

Tế bào biểu mô màng ối có một số tính chất quan trọng: Không biểu lộ kháng nguyên HLA-A, B hoặc DR (human leukocyte antigens) trên bề mặt, là 3 loại kháng nguyên có vai trò quan trọng nhất trong vấn đề thải loại mảnh ghép, HLA-DR liên quan tới 6 tháng đầu, HLA-A liên quan tới 2 năm đầu và HLA-B ảnh hưởng tới sự tồn tại vĩnh viễn của mảnh ghép. Vì vậy sau khi ghép vào cơ thể, hiện tượng thải loại miễn dịch không xảy ra.

Qua nhiều nghiên cứu lâm sàng cho thấy màng ối tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình biểu mô hoá và ngăn chặn quá trình viêm và tăng sinh xơ trên bề mặt nhãn cầu, hỗ trợ sự di cư, kết dính của tế bào biểu mô, thúc đẩy sự biệt hoá tế bào, có khả năng thay thế màng cơ bản của kết mạc [51],[52].

Mặt khác, hiệu quả chống viêm và bảo vệ bề mặt nhãn cầu của màng ối được giải thích qua sự có mặt nhiều loại cytokin chống viêm như IL-1 α , IL-1 β . Màng ối còn có khả năng kháng khuẩn nên nguy cơ nhiễm trùng hậu phẫu ít hơn so với ghép các màng sinh học khác. Việc bóc tách màng ối ra khỏi màng đệm rất dễ dàng, cùng với tính chun giãn tốt của màng ối tạo điều kiện cho các thao tác dàn trải trong quá trình phẫu thuật được dễ dàng.

Màng ối là một nguyên liệu sẵn có, dễ lấy, dễ xử lý. Màng ối được bảo quản ở nhiệt độ - 80⁰ C có thể để được nhiều tháng [2],[53],[54].

Như vậy, màng ối là một màng sinh học có nhiều ưu điểm vượt trội, được sử dụng để che phủ bề mặt nhãn cầu và nền nuôi cấy đạt hiệu quả cao.

**Chuẩn bị màng ối làm nền nuôi cấy*

Thông qua hai đề tài: đề tài cấp bộ “*Nghiên cứu nuôi cấy tế bào rìa giác mạc và ứng dụng trong một số tổn thương giác mạc*” và đề tài nhánh “*Nghiên cứu quy trình tạo tấm biểu mô giác mạc người để điều trị tổn thương giác mạc do bỏng*” thuộc đề tài nhà nước “*Nghiên cứu phát triển và ứng dụng công nghệ tế bào gốc để điều trị một số bệnh về tim mạch, cơ quan tạo máu*”

và *thị giác người*”, chúng tôi đã đưa ra được quy trình xử lý màng ôi dùng làm nền nuôi tạo tế bào biểu mô hiệu quả, màng ôi được xử lý theo quy trình này là màng ôi đã loại bỏ biểu mô.

- *Giá gieo nguyên bào sợi*: một số sản phẩm thương mại thuộc nhóm này bao gồm Dermagraft (Mỹ) là vật liệu thay thế chân bì, cấu tạo bởi lưới polymer sinh học, được gieo nguyên bào sợi [55], sản phẩm khác như Apligraf (Mỹ), OrCel (Mỹ), Hyalograf (Ý)... các nguyên bào sợi trong các giá này sẽ sản xuất chất nền ngoại bào và các yếu tố phát triển trong vòng 2-3 tuần, tạo ra chất nền giống chân bì.

- *Giá đỡ nền Collagen*:

Lợi điểm của giá collagen đó là nó hỗ trợ cho sự phát triển của nguyên bào sợi và chính nguyên bào sợi này tạo cho tế bào biểu mô một môi trường phát triển phù hợp.

- *Các giá Gelatin*:

Cấu trúc không có tính kháng nguyên, có tính hấp dẫn nguyên bào sợi, hoạt hoá đại thực bào, kích thích biểu mô hoá và hình thành mô hạt. Một số thành phần như glucan có tính kháng khuẩn, kháng virus, chống đông và kích thích hoạt động hàn gắn vết thương hay hyaluronic được thêm vào giá để tăng cường đặc tính vật lý và sinh học.

- *Các giá fibrin*:

Chất hồ fibrin cung cấp sự ổn định kết dính, phù hợp với tình trạng phát triển rất mạnh của tế bào.

Một lớp gel fibrin được tạo ra và phủ đều lên đáy của lồng nuôi cấy để làm giá đỡ cho các tế bào. Đặc tính của màng fibrin này là sẽ bị tiêu dần bởi các protease do các tế bào nuôi cấy tự tiết ra. Để giữ được màng fibrin tồn tại

trong suốt quá trình nuôi cấy phải sử dụng aprotinin để ngăn chặn sự tiêu của các polymer fibrin [56].

Ưu điểm của tấm biểu mô nuôi cấy trên nền này là khi ghép không cần những đường khâu cố định do khả năng kết dính tốt với mô đệm bên dưới trong giai đoạn sớm sau mổ. Higa cũng đã khẳng định sự có mặt của phân tử kết dính integrin $\beta 1$ ở tấm biểu mô nuôi trên fibrin, nó giúp cho tấm biểu mô tồn tại trên bề mặt nhãn cầu mà không bị loại bỏ [57]. Hirayama và CS. năm 2012 cũng đã sử dụng giá đỡ này khi nuôi cấy và thấy thực sự hiệu quả [20].

•*Nền tổng hợp:*

Màng tổng hợp này có đặc tính vật lý rất tốt và không sợ bị lây những bệnh truyền nhiễm.

•*Giá lai:*

Vật liệu này là nền bán tổng hợp, có tính phù hợp sinh học và thoái hoá sinh học tốt trong thực tế cũng như trong phòng thí nghiệm.

•*Nền polymer nhạy cảm nhiệt*

Đây là phương pháp nuôi cấy không sử dụng giá đỡ để tạo được tấm biểu mô, được đề xuất đầu tiên bởi Nishida K. và CS. (2004) [58]. Đĩa nuôi cấy được phủ bởi một lớp polymer nhạy cảm với nhiệt độ. Để chuẩn bị đĩa nuôi cấy, một lớp N- isopropylacrylamid (IPAAm) hoà tan trong dung môi 2-propanol phủ lên bề mặt của đĩa, những đĩa này được chiếu xạ với liều 0,25 MGy để cho các đơn phân tử trùng hợp lại với nhau và tạo ra liên kết cộng hoá trị của IPAAm với bề mặt của đĩa nuôi cấy. Rửa lại các đĩa nuôi cấy bằng nước cất lạnh để loại bỏ các phân tử IPAAm không kết dính và khử trùng bằng khí oxid ethylene trước khi sử dụng [59].

1.4.2. Chuẩn bị mẫu mô NMM và xử lý miếng mô cho nuôi cấy

Trước khi lấy mẫu NMM, sát khuẩn kỹ khoang miệng. Thỏ được gây mê đường tĩnh mạch rìa tai bằng thiopental, còn đối với BN được gây tê tại chỗ. Kích thước mảnh mô trích thủ thay đổi tùy từng tác giả và phụ thuộc vào yêu cầu và phương pháp nuôi cấy để đảm bảo đủ lượng tế bào gốc chắc chắn cho sự thành công khi nuôi cấy và tối thiểu gây tổn thương cho NMM. Mảnh mô được xử lý qua nhiều công đoạn. Phương pháp xử lý mảnh mô cũng khác nhau trong các nghiên cứu.

Trên thỏ, kích thước mảnh mô NMM trích thủ thay đổi theo từng nghiên cứu. Nakamura T. và CS. (2003) lấy mảnh có kích thước 4-6mm² [2]. Shimazaki J. và CS. dùng mảnh mô đường kính 8mm khi nghiên cứu trên thỏ và cũng sử dụng kích thước này khi áp dụng trên người [60].

Trên người, theo tổng quan của Ultheim T. (2015): kích thước của các mảnh mô thay đổi từ 2-3mm² đến 5mm² [61]. Theo Shortt A. J. và CS. (2007), kích thước mẫu NMM sinh thiết thay đổi từ 2-3 tới 9mm² [62]. Nakamura T. và CS. (2004) sử dụng mảnh mô 2-3 mm² [10], tác giả Inatomi T. và CS. (2006) [63], Ang L. P. và CS. (2006) [12] cũng sử dụng kích thước này. Chen H. và CS. (2012) sử dụng kích thước 6x6mm hoặc lớn hơn [64], cũng tác giả Chen H. và CS. (2009) sử dụng mảnh mô có kích thước tương tự [16]. Kolli S. và CS. (2014) lấy mảnh mô có đường kính 3mm [25]. Nishida K. và CS. (2004) sử dụng kích thước là 3x3mm [11], Madhira S. L. và CS. (2008) [26], Krishnan S. và CS. (2010) [65], Burillon C. và CS. (2012) [21] sử dụng mảnh kích thước tương tự. Trong khi đó kích thước mảnh mô NMM chỉ là 2mm³ mà Hashemi H. và CS. (2009) khi nuôi cấy bằng phương pháp dịch tế bào trên các nam tình nguyện từ 18-20 tuổi [66]. Priya C. G. và CS. (2011) sử dụng các mảnh mô của 4 BN kích thước 2x4mm [67]. 4x4x2mm là kích thước

của tác giả Sen S. và CS. (2011) trên 20 BN [68]. Hori Y. và CS. (2008) khi nghiên cứu trên người tình nguyện khỏe mạnh sử dụng mảnh niêm mạc trích thủ có kích thước 5x5mm [69], cũng tác giả này năm 2007 mảnh NMM trích thủ có kích thước 3x3mm [70]. Đường kính 8mm của mảnh mô NMM mà tác giả Hirayama M. và CS. (2012) tiến hành nghiên cứu trên 32 mắt BN [20], Shimazaki J. và CS. (2009) [60], Oie Y. và CS. [71], Satake Y. và CS. (2011) [18], Satake Y. và CS. (2008) [72] cũng sử dụng kích thước này. Trong nghiên cứu của Ma D. H. và CS. (2009), kích thước mảnh NMM của BN là 6x6mm [14]. Hayshida Y. và CS. (2005) dùng mảnh NMM có bán kính 3mm [73]. Ilmarinen T. và CS. (2013) sinh thiết mảnh NMM có kích thước 5-10mm² [74]. Sotozono C. và CS. (2014) và Sotozono C. và CS. (2013), sử dụng mảnh niêm mạc có đường kính 6mm [75],[22].

Có hai phương pháp chính để nuôi tạo tấm biểu mô NMM nuôi cấy đó là mảnh mô và dịch treo tế bào. Mỗi phương pháp đều có những ưu và nhược điểm riêng. (1) Ở phương pháp mảnh mô, sau khi trích thủ, mô liên kết phía dưới được loại bỏ bằng phương pháp cơ học, mảnh mô được xử lý bằng dispase, sau đó rửa bằng môi trường PBS có kháng sinh, kháng nấm và không có ion Mg²⁺ và Ca²⁺. Tiếp theo, mảnh mô được xử lý qua EDTA (ethylenediaminetetraacetic) là một chất có khả năng gập các ion hoá trị 2, rồi mô được dính vào nền nuôi cấy, sau khi mảnh mô đã bám dính, cho môi trường vào và tiếp tục quá trình nuôi cấy cho tới khi thu hoạch. Môi trường nuôi cấy nên ngập mảnh mô khoảng 2-5mm. Khi tế bào nuôi cấy đạt một hàng và phủ kín đáy giếng, cho tế bào tiếp xúc với không khí để biểu mô tăng hóa. (2) Khi nuôi cấy bằng dịch treo tế bào, mảnh mô ngâm trong dispase để tách biểu mô ra khỏi màng đáy, sau đó sử dụng trypsin để li giải đám tế bào biểu mô tạo thành dạng dịch treo với những tế bào riêng rẽ, trypsin có thể

dùng cùng EDTA. Sau đó dịch tế bào được xác định mật độ trước khi đem nuôi cấy trong môi trường chuyên biệt cho NMM.

Theo tổng quan của Shortt A. J. và CS. (2007): trong số 17 nghiên cứu về nuôi tạo tấm biểu mô thay thế cho giác mạc có tới 11 nghiên cứu sử dụng phương pháp mảnh mô [62]. Theo tổng quan của Utheim (2015) trong 20 nghiên cứu về nuôi tạo tấm biểu mô NMM để điều trị có 18 nghiên cứu sử dụng phương pháp dịch treo, chỉ có 2 sử dụng phương pháp mảnh mô. Trong 28 nghiên cứu về nuôi tạo tấm biểu mô niêm mạc miệng áp dụng trên người mà chúng tôi tổng quan được có tới 23 nghiên cứu sử dụng phương pháp dịch treo.

Mỗi tác giả có một cách nuôi cấy riêng và một phương pháp xử lý phù hợp: mảnh mô sau khi thu thập được sẽ rửa sạch qua PBS có kháng sinh, kháng nấm, sau đó được xử lý tùy phương pháp nuôi cấy khác nhau. Thời gian ngâm mảnh mô trong dispase, nồng độ dispase, thời gian mảnh mô ngâm trong trypsin và/hoặc EDTA cũng hoàn toàn khác nhau giữa các tác giả. Sau xử lý, tế bào được nuôi trong môi trường hoàn toàn khác nhau về thành phần và nồng độ các chất bổ sung, việc sử dụng nền nuôi cấy, thời gian nuôi cấy, thu hoạch tấm biểu mô có dùng kỹ thuật tiếp xúc không khí hay không cũng tùy từng tác giả.

Trong 35 nghiên cứu tổng quan được có đề cập tới nền nuôi cấy, chủ yếu các tác giả sử dụng màng ối (chủ yếu đã loại bỏ biểu mô), chỉ có (a): 8 nghiên cứu sử dụng nền polymer nhạy cảm nhiệt: Nishida K. và CS. (2004) [58], Burillon C. và CS. (2012) [21], Hayashida Y. và CS. (2005) [73], Oie Y. và CS. (2010) [71], Hori Y và CS. (2007) [70], Hori Y. và CS. (2008) [69], Kocaba và CS. (2014) [24], Oie Y. và CS. (2010) [71]; (b): 3 nghiên cứu sử dụng nền fibrin: Satake Y. và CS. (2011) [18], Shimazaki J. và CS. (2009) [60], Hirayama và CS. (2012) [20]; (c): 3 nghiên cứu sử dụng nền chân bì da

AllodermTM: Izumi K. và CS. (1999), Izumi K. và CS. (2000) [47],[48], Yoshizawa M. và CS. (2004) cũng sử dụng màng này nhưng phủ collagen typ IV [49]; (d): 1 nghiên cứu không sử dụng nền nuôi cấy mà chỉ sử dụng lồng nuôi có phủ collage typ IV: Ilmarinen T. và CS. (2013) [74].

Mảnh mô trích thủ sau khi rửa qua PBS có kháng sinh, kháng nấm, không có ion hóa trị 2, không protein để thuận lợi cho các bước về sau làm rõ các tế bào biểu mô tạo dịch treo cho nuôi cấy.

Bước tiếp theo của quy trình xử lí mảnh mô để nuôi cấy là nhúng mảnh mô vào trong dispase, sau đó mô sẽ được tách rời các tế bào nhờ trypsin-EDTA. Dispase là một loại enzym tiêu protein, nó có khả năng phá hủy fibronectin và collagen typ IV là thành phần của chất nền ngoại bào và màng đáy, giúp cho biểu mô rời khỏi màng đáy. Thông thường các tác giả sử dụng dispase II với nồng độ 1,2UI (tương đương 3mg/ml) trong vòng 1 giờ ở 37⁰C: Inatomi T. và CS. (2006) [63], Hirayama M. (2012) [20], Ang L.P. (2006) [12], Hori Y. (2008) [69], Ma DH. (2009) [14], Shimazaki J. (2009) [60], Nakamura T. (2003) [2], Nakamura T. (2004) [10]. Cũng sử dụng dispase II với nồng độ 1,2UI/ml nhưng Hashemi H. và CS. (2009) ngâm mô ở 37⁰C trong vòng 2 giờ [66]. Satake Y. và CS. (2011) lại sử dụng dispase 0,8UI/ml và cũng ngâm mô 1 giờ ở 37⁰C [18], cũng cùng nồng độ 0,8UI/ml, tác giả này lại ngâm mô ở 4⁰C trong 5 giờ [72]. Cùng thời gian 4⁰C trong 5 giờ, Nakamura T. và CS. (2011) lại sử dụng nồng độ 1,2UI/ml [17]. Oie Y. và CS. (2010) ngâm mô ở 4⁰C trong 4 giờ nhưng sử dụng nồng độ 2,4UI/ml [71]. Priya và CS. sử dụng dispase II (2mg/ml) ngâm mô ở 37⁰C trong thời gian 45 phút [67]. Ilmarinen T. và CS. (2003) ngâm mảnh mô qua đêm ở 4⁰C ở nồng độ 1,55mg/ml [74].

Sau khi tách rời biểu mô khỏi màng đáy, dịch treo tế bào biểu mô sẽ được tạo ra nhờ hoạt tính của enzym trypsin và EDTA. EDTA có tác dụng gấp các ion hóa trị 2, làm lỏng lẻo liên kết giữa các tế bào và làm tăng hoạt tính của trypsin. Ang L. P. và CS. (2006), Nakamura T. và CS. (2011) sử dụng trypsin-EDTA 0,05% trong vòng 10 phút và không đề cập tới nhiệt độ sử dụng [12], [17]. Inatomi T. và CS. (2006) sử dụng nồng độ và thời gian như hai tác giả trên và ở 37⁰C [63]. Cùng nồng độ 0,05% Priya C. G. và CS. (2011) ngâm mô trong vòng 45 phút và không đề cập tới nhiệt độ [67]. Nồng độ 0,05% trypsin và 0,53mM EDTA, mảnh mô ngâm ở nhiệt độ phòng trong thời gian 10 phút được sử dụng trong nghiên cứu của Hirayama M. và CS. (2012) [20], Satake Y. và CS. (2008) [72], Satake Y. và CS. (2011) [18], Shimazaki J. và CS. (2009) [60]. Rất nhiều tác giả sử dụng nồng độ enzym là 0,25% như Ma D. H. và CS. (2009) ngâm mô ở 37⁰C cứ 3 phút nạo mảnh mô 1 lần và ít nhất 3 lần [14], Nakamura T. và CS. (2003) ngâm mô ở nhiệt độ phòng trong 30 phút [2], cũng tác giả này và CS. (2004) lại ngâm trong 10 phút ở nhiệt độ phòng [10], Hashemi H. và CS. (2009) sử dụng enzym ở nhiệt độ phòng trong 20 phút [66], Ilmarinen T. (2013) sử dụng nhiệt 37⁰C nhưng thời gian chỉ là 15 phút [74]. Một số tác giả khác không nêu nồng độ cụ thể của enzym như Nishida K. và CS. (2004) [11], Chen H. và CS. (2009) [16], Hori Y. và CS. (2008) cùng ngâm mô trong 15 phút [69], Hayashida Y. và CS. (2005) ngâm 20 phút [73].

Nếu sử dụng phương pháp mảnh mô, các tác giả chỉ cần lọc sạch miếng mô, sau đó dính trực tiếp lên nền nuôi cấy, chờ khô và bổ sung môi trường nuôi cấy.

Trong nuôi cấy, ngoài việc chuẩn bị nguồn tế bào biểu mô thì một loại tế bào nữa cũng gây nhiều tranh cãi đó là nguyên bào sợi chuột bất hoạt 3T3

(3-day transfer, inoculum 3×10^5 cells). Đây là lớp tế bào hỗ trợ cho sự tăng sinh và biệt hoá tế bào biểu mô.

Nguyên bào sợi dùng trong nuôi cấy có thể từ các nguồn khác nhau, lí tưởng nhất là nguyên bào sợi tự thân và ở ở đúng vùng mô liên kết tương ứng với biểu mô muốn nuôi cấy để đảm bảo việc tương tác biểu mô-mô liên kết cho tế bào biểu mô một sự phát triển hoàn hảo nhất, song điều này rất khó thực hiện. Nguyên bào sợi chuột bất hoạt là một giải pháp. Đây là tế bào có những nhánh bào tương, nhân hình elip, tế bào có một đến hai nhân, khi hoạt động tích cực, trong bào tương có rất nhiều hệ thống lưới nội bào có hạt. Nguyên bào sợi sản xuất collagen, glycoaminoglycan, sợi võng, sợi chun, glycoprotein tìm thấy trong chất nền ngoại tế bào. Tổn thương mô kích thích tế bào sợi và gây ra sự gián phân của tế bào này. Không giống như tế bào biểu mô phủ các cấu trúc của cơ thể, nguyên bào sợi không hình thành các lớp đơn và không bị phân cực khi bám vào màng đáy ở một mặt của tế bào, mặc dù nó có thể góp vai trò trong việc tạo ra màng đáy ở một số trường hợp.

Nguyên bào sợi trước khi sử dụng phải được chiếu xạ hoặc bất hoạt bằng mitomycin để tránh sự sinh sản thêm của tế bào này. Phương pháp chiếu xạ phát minh ra bởi Rheinwald năm 1980 [76], còn xử lý bằng mitomycin được Macpherson và Bryden năm 1971 áp dụng [77]. 3T3 làm tăng khả năng sống của nhiều tế bào biểu mô bao gồm các tế bào sừng hoá, tế bào biểu mô cổ tử cung và tế bào biểu mô tuyến vú. Có lẽ là do biểu mô có khả năng kết dính với nguyên bào sợi bất hoạt, các nguyên bào sợi bất hoạt giải phóng ra các yếu tố cận tiết làm tăng sự sống sót của biểu mô và ức chế hoạt động của TGF- β , chính TGF- β này lại là yếu tố kích thích hoạt động phân chia của nguyên bào sợi, vậy đây là phương pháp lợi thế nhất để kích thích phát triển biểu mô và ức chế sinh sản quá mức của nguyên bào sợi. Lớp tế bào này thực

sự có ý nghĩa đối với việc hỗ trợ sự phát triển của các tế bào biểu mô trong các trường hợp khó nuôi cấy.

Nguyên bào sợi có khả năng sản xuất ra các yếu tố tăng trưởng và khả năng loại bỏ các độc chất có trong môi trường nuôi cấy. Đã có rất nhiều các nghiên cứu khẳng định ưu điểm của nguyên bào sợi chuột trong quá trình nuôi cấy, song cũng không ít lo ngại bởi đây là sản phẩm có nguồn gốc động vật, bên cạnh đó cũng có nhiều nghiên cứu cho thấy thành công của nuôi tạo tấm biểu mô mà không cần tới sự có mặt của tế bào này. Cục dược phẩm và thực phẩm Mỹ FDA (US Food and Drug Administration) quy định tất cả các mô công nghệ sinh học trong quá trình sản xuất có sử dụng 3T3 được quy vào loại mảnh ghép dị loài [78], và nguy cơ có thể lây nhiễm các protein động vật [79].

Trong các nghiên cứu chúng tôi tổng quan được, hầu hết các tác giả vẫn sử dụng 3T3 làm tế bào đồng nuôi cấy. Chỉ có 5 tác giả trong tổng số 31 không sử dụng nền này: Izumi K. và CS. (2000) đã nuôi cấy tế bào gốc biểu mô NMM trong môi trường không huyết thanh và không 3T3 để giảm thiểu tiếp xúc với DNA dị loài và các virus có thể xuất hiện trong hai nguồn này [48]. Yoshizawa M. và CS. (2004) đã sử dụng phương pháp tương tự để sản xuất ra tấm kết mạc và NMM người [49]. Tác giả Oie Y. và CS. (2010) khi nuôi cấy tấm biểu mô NMM người tình nguyện đã thay thế nguyên bào sợi chuột 3T3 bằng nguyên bào sợi da người hậu gián phân thu được kết quả tốt (nhóm tương tự với nhóm sử dụng 3T3 về chất lượng của tấm biểu mô, tấm biểu mô tăng hoá đẹp) và tỉ lệ tế bào dương tính với p63 cao hơn có ý nghĩa thống kê [71]. Sen S. và CS. (2011) cũng không sử dụng 3T3 trong nuôi cấy tế bào biểu mô NMM và cũng đã thu được tấm biểu mô mang đặc điểm của biểu mô lát tầng không sừng hoá, các tế bào thể hiện sự chế tiết rất nhiều hạt mucin đặc biệt là mucin 1, 16 [68]. Ilmarinen T. và CS. (2013) đã nuôi cấy

tắm biểu mô NMM dù không sử dụng 3T3 nhưng kết quả thu được rất khả quan [80].

1.4.3. Môi trường nuôi cấy

Mọi môi trường nuôi cấy phải đáp ứng các đặc tính lý hoá như pH, áp suất thẩm thấu, nhiệt độ, nồng độ oxy, CO₂.... Áp suất thẩm thấu của máu bình thường là 290 mosmol/kg, vậy đây là mức hợp lý nhất cho các tế bào nuôi cấy trong ống nghiệm. Nhiệt độ phù hợp nhất cho nuôi cấy tế bào biểu mô NMM là 37⁰C.

Môi trường nuôi cấy tế bào biểu mô NMM thông thường là sự kết hợp của Ham's F12 và DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) với tỉ lệ 1:1 để phối hợp sự giàu thành phần của Ham's F12 và cao dinh dưỡng của DMEM. Ngoài ra cần có các yếu tố bổ sung khác: Insulin kích thích sự thu nạp glucose và axit amin, nó có thể kích thích phân chia tế bào, insulin ở nồng độ 1-10UI/ml sẽ thúc đẩy hiệu quả tạo cụm tế bào; IGF-II (Insulin-like growth factor) cũng kích thích tăng dung nạp glucose. Hormon tăng trưởng có trong huyết thanh, đặc biệt trong huyết thanh bào thai, nồng độ 50ng/ml hay được sử dụng, cùng với IGF_s (sometomedin) có thể có tác động tốt lên quá trình phân chia tế bào. Hydrocortisone với các nồng độ khác nhau có tác động lên sự liên kết giữa các tế bào, hydrocortisone có tác dụng tốt khi tăng sinh, song khi mật độ tế bào cao nó có thể gây biệt hoá tế bào, chất này cũng có trong huyết thanh, đặc biệt trong huyết thanh bào thai của bò. Barnes và Sato năm 1980 đã sử dụng 10pM triiodothyronin là yếu tố quan trọng cho tế bào thận chó và cũng được sử dụng trong nuôi cấy tế bào biểu mô phổi...[81], T3 có khả năng điều khiển sự biệt hóa của tế bào và biểu lộ protein, tăng tổng hợp protein cho tế bào. Cholera toxin và isoproterenol được biết là các chất làm tăng AMP vòng (cAMP-cyclic adenosin monophosphate) của tế bào,

AMP vòng làm tăng sự phát triển của các cụm tế bào biểu mô khi nuôi cấy biểu mô tầng ở người [82].

Thành phần chủ yếu nhất của huyết thanh là protein, chức năng quan trọng của nó là vận chuyển, tăng cường kết dính tế bào, ức chế hoạt động của trypsin, có lợi cho sự phát triển tế bào, tăng độ quán cho môi trường, giảm tác động vật lý cho tế bào khi thao tác và tăng cường năng lực cho hệ đệm trong nuôi cấy tế bào. Huyết thanh bê và bào thai của bò hay được sử dụng nhất, ngoài ra còn một số loại khác như huyết thanh của ngựa, người...

Huyết thanh động vật, mà chủ yếu là FBS (Fetal bovine serum) được nhiều tác giả sử dụng trong nuôi cấy tế bào: Nakamura T. và CS. (2003, 2004) dùng môi trường nuôi cấy có bổ sung thêm 10% FBS, penicillin/streptomycin 50UI/ml, insulin 5 μ g/ml, cholera toxin 0,1nmol/l, EGF người tái tổ hợp 10ng/ml, penicillin-streptomycin 50UI/ml [2],[10]. Năm 2006, Nakamura T. và CS. đã thay huyết thanh bào thai của bò bằng huyết thanh tự thân cho kết quả nuôi cấy tốt [83].

Tác giả Madhira S. L. và CS. (2008) nuôi tế bào biểu mô NMM trong môi trường có chứa DMEM và Ham's F12 với tỉ lệ 1:2 cùng với các yếu tố khác như EGF, insulin, penicillin, streptomycin, amphotericin, gentamicin, 10% huyết thanh bào thai bê trong vòng 3-4 tuần trong điều kiện 37⁰C, 5%CO₂ [26].

Satake Y. và CS. (2008) nuôi tế bào biểu mô NMM trong hỗn hợp 1:1 Ham's F12 và môi trường bổ sung của Eagle với 10% huyết thanh bào thai bò, 5 μ g/ml gentamicin, 0,25 μ g/ml amphotericin B [72].

Hashemi H. và CS. (2009) sử dụng DMEM và Ham's F12 với tỉ lệ 1:1, bổ sung thêm 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin/amphotericin B, insulin tái tổ hợp 5 μ g/ml, cholera toxin 0,1nmol/l, EGF 10ng/ml [66].

Krishnan S. và CS. (2010) sử dụng DMEM và Ham's F12 với tỉ lệ 1:1, bổ sung thêm 10% FBS, 50ng/ml streptomycin, 25ng/ml amphotericin B, insulin 5µg/ml, hydrocortisone 0,5mg/ml, transferrin selenium 5ng/ml, EGF 2ng/ml [65].

Sen S. và CS. (2011) sử dụng DMEM và Ham's F12 với tỉ lệ 1:1, bổ sung thêm 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin/amphotericin B, insulin 5µg/ml, EGF 10ng/ml [68].

Mặc dù FBS được rất nhiều tác giả sử dụng, nhưng đây là sản phẩm có nguồn gốc động vật. FBS có nhiều thành phần dễ thay đổi tùy theo lô sản phẩm. Hơn nữa, nó có thể bị nhiễm các nội độc tố, huyết sắc tố, các vi khuẩn, virus và các protein khác. Vì thế, lý tưởng nhất nếu vẫn sử dụng huyết thanh trong môi trường nuôi cấy là huyết thanh tự thân mặc dù đã có những lo ngại liệu huyết thanh tự thân của những trường hợp bệnh lý có thể chứa những chất liên quan đến cơ chế bệnh sinh có sử dụng được trong nuôi cấy hay không. Một số tác giả đã thành công trong việc thay thế huyết thanh bê bởi huyết thanh của chính BN khi nuôi cấy tấm biểu mô NMM đó là: Ang L. P. và CS. (2006) sử dụng huyết thanh tự thân của 10 BN bị suy giảm tế bào gốc toàn bộ để bổ sung vào môi trường nuôi cấy với nồng độ 5%, và bổ sung thêm vào môi trường nuôi cấy penicillin/streptomycin 50UI/ml, insulin 5µg/ml, cholera toxin 0,1nmol/l, EGF tái tổ hợp 10ng/ml [12]. Priya C. G. và CS. (2011) sử dụng huyết thanh tự thân của BN với nồng độ 10% và sử dụng thêm penicillin 100UI/ml, streptomycin 100mg/ml, insulin 10µg/ml, EGF tái tổ hợp người 10ng/ml, hydrocortisone 0,5mg/ml, T₃ 2 nmol/l, isoproterenol 1mmol/ml [67], Satake Y. và CS. (2011) sử dụng ở nồng độ 4% huyết thanh tự thân và penicillin/streptomycin 50UI/ml, insulin 5µg/ml, cholera toxin 0,1nmol/l, EGF tái tổ hợp 10ng/ml [18]. Hirayama M. và CS. (2012) sử dụng huyết thanh tự thân với nồng độ 4%, và bổ sung thêm vào môi trường nuôi

cấy 100 µg/ml streptomycin, 100 UI/ml penicillin, 10µg/ml insulin, 0,5µg/ml hydrocortisone, 2nmol/ml triiodothyronin, 1mmol/l isoproterenol cho kết quả tốt [20].

Việc sử dụng huyết thanh trong môi trường nuôi cấy còn nhiều bất lợi, vì vậy, một số tác giả đã sử dụng môi trường không huyết thanh. Theo các tác giả này có nhiều ưu điểm hơn: (1) Có thể lựa chọn môi trường phù hợp với mục tiêu nuôi cấy. Có thể lựa chọn yếu tố phát triển phù hợp với loại tế bào và giai đoạn nuôi cấy mong muốn. (2) Có thể điều khiển được quá trình tăng sinh và biệt hoá của tế bào bằng cách thay đổi các yếu tố phát triển cần thiết và các hoạt chất khác. Đặt nền móng cho việc sử dụng môi trường không huyết thanh là Hayashi và Sato (1976) [84]. Tác giả Izumi K. và CS. (2000) nuôi cấy tế bào NMM trong môi trường không huyết thanh và không 3T3 để giảm thiểu tiếp xúc với DNA dị loài và các virus có thể xuất hiện trong hai nguồn này [48]. Ulltveit-Moe HF E. J. và CS. (2011). Ilmarinen T. và CS. (2013) cũng đã sử dụng môi trường không huyết thanh để nuôi cấy tằm biểu mô NMM trong nghiên cứu của mình và tăng nồng độ EGF đã cho kết quả tốt [85],[80].

1.4.4. Định danh tế bào của tằm biểu mô NMM nuôi cấy

Có nhiều phương pháp định danh tế bào của tằm biểu mô NMM nuôi cấy:

- *Quan sát hình thái tằm biểu mô sống*: Là phương pháp để theo dõi quá trình nuôi cấy của tằm biểu mô. Kính hiển vi soi nổi và soi ngược được sử dụng với thiết kế đặc biệt để khoảng không thao tác với mẫu nuôi cấy không bị hạn chế. Đây là phương pháp kinh điển nhất được sử dụng trong nuôi cấy tế bào. Krishnan S. và CS. (2010), Đỗ Thùy Hương và CS. (2010), Nguyễn Phúc Hoàn và CS. (2011) đã sử dụng trong nghiên cứu nuôi cấy tế bào của mình [65],[86],[87].

- *Nhuộm trypan blue*: Đây là phương pháp nhằm xác định tỷ lệ sống và chết của tế bào. Tế bào sau nuôi cấy được thu hoạch sau đó rửa sạch bằng PBS, trộn trypan blue 0,5% vào cặn tế bào và ủ ấm ở nhiệt độ phòng, sau đó lên kính để quan sát. Tác giả Krishnan S. và CS. (2010) sử dụng kỹ thuật này [65].

- *Nhuộm giemsa*: Mục đích: quan sát bề mặt của tấm biểu mô nuôi cấy
 Đây là phương pháp đơn giản nhất và hiệu quả để đánh giá hình thái bề mặt tấm biểu mô nuôi cấy. Đỗ Thùy Hương và CS. [86], Nguyễn Phúc Hoàn và CS. [87] đã sử dụng trong nghiên cứu của mình.

- *Nhuộm Hematoxylin-Eosin (H.E.)*: Đây là kỹ thuật thường quy tiên hành tại các labo tế bào học. Phương pháp này nhằm đánh giá cấu trúc vi thể của tấm biểu mô theo chiều dọc. Hầu hết các nghiên cứu đánh giá hình thái tấm biểu mô nuôi cấy đều dựa trên kỹ thuật này như tác giả Krishnan S. và CS. (2010) [65], Madhira S. L. và CS. (2008) [26], Đỗ Thùy Hương và CS. (2010) [86], Nguyễn Phúc Hoàn và CS. (2011) [87], Sen S. và CS. (2011) [68]...

- *Kỹ thuật hiển vi điện tử*: Tấm biểu mô được kiểm tra bằng cả kính hiển vi điện tử quét (Scanning electron microscopy-SEM) và kính hiển vi điện tử xuyên (Transmission electron microscopy-TEM).

Mục đích: quan sát cấu trúc siêu vi của tấm biểu mô, tìm các cấu trúc liên kết giữa các tế bào biểu mô với nhau và giữa tế bào biểu mô với màng ối. Cũng có thể xác định sự có mặt của tế bào gốc trong tấm biểu mô NMM bằng cách quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền qua.

Kỹ thuật hiển vi điện tử là một trong những kỹ thuật không thể thiếu khi định danh tấm biểu mô NMM, giúp ta có hình ảnh siêu vi thể về cấu trúc bên trong tế bào cũng như các cấu trúc liên kết giữa các tế bào biểu mô và biểu mô-màng đáy. Khi nuôi cấy biểu mô NMM, quan sát ở kính hiển vi điện tử Hashemi H. và CS. thấy tế bào có nhiều xơ keratin, khoảng gian bào rộng,

bề mặt tế bào có nhiều vi nhung mao [66], Madhira S. L. và CS. (2008) thấy hình ảnh tế bào nuôi cấy đặc trưng cho các tế bào biểu mô tức là có thể liên kết [26], Sen S. và CS. (2011) dùng TEM để đánh giá chất lượng tấm biểu mô nuôi cấy [68].

- *Kỹ thuật khuếch đại chuỗi PCR* (polymerase chain reaction): Đây là phương pháp khuếch đại DNA, là cơ sở cho các kỹ thuật khác phát hiện các marker của tế bào gốc như p63, đặc biệt là dạng đồng phân ΔN của p63 (marker phân biệt tế bào gốc và tế bào tăng sinh chuyên tiếp), hoặc p75, K3, K12, ABCG2 (ATP-binding cassette, marker quần thể ranh giới của tế bào gốc), K15 (đặc biệt cho vùng rìa), K4, K13 (đặc biệt cho các biểu mô tầng không sừng hóa) hoặc các marker MUC (mucin, chất nhày) đảm bảo cho độ ẩm ướt và mạnh khỏe của biểu mô, AMP (antimicrobial peptids) đảm bảo tính kháng khuẩn cho biểu mô, hBD (human β defensins) có mặt ở các tế bào biểu mô khắp cơ thể, pax 6 là marker đặc biệt cho nhãn cầu... Mảnh mô nuôi cấy khi thu hoạch sẽ được xử lý qua trypsin và thu hoạch toàn bộ lượng RNA của mẫu, sau đó RNA được sao mã ngược nhờ đoạn mỗi, phản ứng PCR được tiến hành để nhân bản cDNA (complementary DNA), sản phẩm của PCR sẽ được điện di và xác định chính xác.

Thông qua kỹ thuật PCR, rất nhiều các marker của tế bào được phát hiện như:

- K3, K12, K4, K13, đó là các xơ trung gian trong tế bào được tìm thấy ở tất cả các loại biểu mô và là các dấu ấn cơ bản nhất của sự biệt hoá tế bào, thông tin về xơ keratin trong tế bào phản ánh cả kiểu loại và tình trạng biệt hoá của tế bào, vị trí phân lớp của biểu mô.

- Connexin 43 (Cx43) là thành phần của liên kết khe, là loại protein đầu tiên có liên quan tới sự phân bố của tế bào nguồn.

- p63 là loại protein được mã hoá bởi gen p63, p63 mã hoá cho hai isoform chính bởi các promotor khác nhau là TAp63 và Δ Np63, Δ Np63 tham gia vào các chức năng khác nhau trong quá trình phát triển biểu mô và sự điều khiển tế bào gốc và tăng sinh chuyển tiếp. Tìm hiểu mối liên quan giữa p63 và tế bào nguồn người ta chỉ ra rằng nồng độ p63 cao thì tăng tỷ lệ nhân/bào tương ở tế bào biểu mô. Điều đó có nghĩa là nếu có mặt của p63 thì tế bào chưa hay kém biệt hóa.

- Ngoài ra, còn một số marker khác cũng được phát hiện: intergrin, ABCG2, receptor thần kinh p75, AMP (antimicrobial peptid) đảm bảo tính kháng khuẩn cho biểu mô bao gồm các hBD (human β defensins), MUC (mucin) đảm bảo sự ổn định, tính ẩm ướt và mạnh khỏe cho biểu mô,...

- *Kỹ thuật hoá mô miễn dịch*: Mục đích: Đây là kỹ thuật hiện đại và được sử dụng phổ biến trong tất cả các nghiên cứu của các tác giả khi đánh giá đặc điểm của tằm biểu mô NMM nuôi cấy. Nhuộm hoá mô miễn dịch để xác định các marker: K3, K12, Cx-43, p63, p75, MCSP (melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan), β 1 intergrin, PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor), Ki67, Pax 6, occludin, ZO1 (Zonula Occludens 1), ABCG2, desmoplakin... Nghiên cứu của Madhira và CS. (2008) đã xác định sự có mặt của K3/K12, p63, p75, K13, K15, connexin 43 [26], Krishnan S. và CS. (2010) xác định CK12, Cx-43, p63 và MCSP [65]. Sen S. và CS. (2011) xác định K3/K12, Cx-43, p63, p75, connexin 43, β 1 intergrin (CD29), ABCG2 [68]. Priya C. G. và CS. (2011) xác định p63, MCSP, Ki67 [67]. Izumi K. và CS. (2007) nghiên cứu các marker β 1 intergrin, PPAR γ [88]. Shimazaki J. và CS. (2009) nghiên cứu marker K3, K4, K13, ZO1 và occludin [60]. Ulltveit-Moe HF E. J. và CS. (2011) đánh giá các marker ABCG2 và p63 [85]. Ang L. P. và CS. năm 2006 nghiên cứu các marker ZO1, Occludin, Desmoplakin, K4/K13, integrin α 6 [12].

- *Kỹ thuật lưu giữ BrdU*: Sự tăng sinh của tế bào được phân tích dựa vào định lượng tế bào gắn 5 Bromo-2-deoxyuridine trong khi tổng hợp DNA của tế bào nuôi cấy tăng sinh. Chỉ số đánh dấu BrdU được tiến hành phân tích bằng cách đếm số nhân ở vật kính 40X. Chỉ số đánh dấu được mô tả là số nhân dương tính/tổng số nhân x 100%. Tác giả Krishnan S. sử dụng test này để đánh giá khả năng tăng sinh của tế bào, test được thực hiện ở nhiều giai đoạn khác nhau từ ngày 1 đến ngày 21 sau khi nuôi cấy tằm biểu mô được 6 ngày [65]. Chen H. C. và CS. (2009) sau khi nuôi cấy tằm biểu mô NMM 2 tuần: tiếp tục nuôi một tuần trong môi trường có BrdU, sau đó nuôi tiếp 2 tuần không có BrdU rồi tiến hành đánh giá chất lượng tằm biểu mô [16].

- *Test tạo cụm*: Khi tách và phát triển ngoài cơ thể, một số đặc điểm của tế bào gốc được giữ lại và phản ánh ở kiểu của các cụm mà nó hình thành. Các cụm hình thành từ tế bào biểu mô được chia làm 3 loại sau [89]: (1) Clone toàn phần (holoclone): nó chứa hầu như toàn bộ là tế bào gốc, có viền ngoài nhẵn và bao gồm các tế bào nhỏ tập hợp rất chặt với nhau. Khi cấy chuyển, các clon này sẽ hầu như tạo ra các clone toàn phần. (2) Clone bán phần (paraclone), có thành phần chủ yếu là các tế bào tăng sinh chuyên tiếp muện và có viền ngoài không bình thường, có chứa các tế bào dẹt và lớn hơn, những tế bào này ít có tiềm năng phát triển hơn và chỉ có thể tạo ra clone bán phần khi chuyển. (3) Clone một phần (meroclone) có các thuộc tính trung bình và được coi như chứa chủ yếu các tế bào tăng sinh chuyên tiếp sớm.

Hiệu quả tạo cụm được đánh giá là số lượng cụm tế bào sinh ra từ từng phần tế bào biểu mô/tổng số tế bào gieo x100. Các cụm được đánh giá dựa vào hình dạng tế bào trong từng cụm. Nishida K. và CS. (2004) sau nuôi cấy khoảng 10-12 ngày, tác giả cố định và nhuộm rhodamin B và quan sát dưới kính hiển vi để đánh giá đặc điểm tạo cụm [11]. Nghiên cứu của Priya C. G. (2011) đánh giá khả năng tạo cụm của các tế bào biểu mô NMM thấy: mô

NMM bình thường là $0,22 \pm 0,02\%$, còn của tấm biểu mô NMM nuôi cấy là $0,199 \pm 0,04\%$. Cả hai loại tế bào biểu mô đều có khả năng hình thành clone toàn phần [67].

1.4.5. Ứng dụng lâm sàng của tấm biểu mô NMM

Tấm biểu mô NMM nuôi cấy có khả năng ứng dụng lâm sàng hoặc sử dụng trong các test thử nghiệm trong phòng thí nghiệm để đánh giá việc hàn gắn vết thương, độ độc tính và tính phù hợp sinh học.

1.4.5.1. Ứng dụng trong nhãn khoa

Đã có nhiều những thông báo về thành công trên thực nghiệm và lâm sàng về việc sử dụng tấm biểu mô NMM nuôi cấy để tái thiết bề mặt của nhãn cầu. Thời gian theo dõi sau ghép của tấm biểu mô cấy ghép khác nhau và kết quả khác nhau.

Năm 2003, Nakamura T. và CS. đã nuôi cấy thành công tấm biểu mô NMM và ghép tự thân cho thỏ bị bỏng giác mạc [2],[9]. Tác giả này là người đầu tiên công bố thành công việc ghép tấm biểu mô NMM nuôi cấy trên BN bị suy giảm tế bào gốc vùng rìa toàn bộ LSCD [10]. Tiếp theo đó nhiều tác giả cũng đã thông báo thành công của kỹ thuật này [11],[12],[13],[14],[15],[16],[17],[18],[19],[20],[21],[22],[23],[24],[25].

Kết quả nghiên cứu của một số tác giả được tóm tắt trong bảng sau:

Bảng 1.1. Kết quả nghiên cứu lâm sàng của cấy ghép tâm biểu mô NMM

Tên tác giả	Mẫu nghiên cứu	Thời gian theo dõi (tuần)	Kết luận
Nakamura T. (2004) [10].	6 mắt của 4 BN	13,8	-Bề mặt giác mạc phẳng trong, biểu mô hóa hoàn toàn sau 2 tuần cấy ghép -Tân mạch chỉ xuất hiện ở ngoại vi -Không có biến chứng sau mổ -Khả năng nhìn của tất cả các mắt cải thiện từ 2 dòng trở lên ở thời điểm 11 tháng -Tâm biểu mô ổn định và tồn tại tốt
Nishida K. (2004) [11].	8 mắt của 4 BN	14	-Biểu mô hóa hoàn toàn sau 1 tháng ghép -Không thấy xuất hiện biến chứng gì -Độ trong giác mạc cải thiện tốt
Ang L. P. (2006) [12].	10 mắt	19	-Bề mặt ổn định sau 3 tháng - Biểu mô hóa hoàn toàn sau 2-5 ngày -Thị lực cải thiện 9/10 mắt
Ma D. H. (2009) [14].	5 mắt	26-34	-Tâm biểu mô nuôi cấy kích thích quá trình biểu mô hóa, giảm viêm trong bóng cấp, tái thiết bề mặt nhãn cầu trong viêm mạn tính
Kocaba V. (2014) [24].	23 BN	18-48	-Thị lực cải thiện rõ ở 17 BN -Biểu mô được cải thiện ở 15 BN -Chất lượng cuộc sống tăng ở 12 BN
Satake Y (2011) [18].	36 BN	25,5 (nhiều nhất 54,9)	-Ủng hộ phương pháp nuôi cấy và ghép biểu mô giác mạc khi nghiên cứu các chỉ số về độ trong giác mạc, khả năng nhìn và các biến chứng sau mổ
Nakamura T. (2010) [90].	19 mắt của 17 BN	55 (nhiều nhất 90)	-Hầu như không xuất hiện kết mạc hóa và dính mi cầu -Tân mạch giảm dần và ổn định từ 6 tháng -Thị lực cải thiện rõ
Inatomi T. (2006) [63].	12 BN	34	-Bề mặt nhãn cầu ổn định -Tầm nhìn được cải thiện -10 mắt không có biến chứng

1.4.5.2. Ứng dụng lâm sàng trong các lĩnh vực khác

Tấm biểu mô NMM nuôi cấy được sử dụng trong lâm sàng khá phổ biến. Iida T. và CS. (2005) đã tách tế bào từ các mảnh NMM sau đó nuôi cấy trên chất nền của da tự thân đã loại bỏ biểu bì, kết quả đã thu được tấm tế bào tăng hoá và mang đặc điểm của tế bào biểu mô NMM. Sau nuôi cấy 3 tuần, tấm này được ghép cho BN bỏng nặng và kết quả cho thấy khoảng 30% miếng ghép tồn tại và sống sót, vậy kết quả này gợi ý cho việc sử dụng tấm biểu mô NMM để điều trị các trường hợp bỏng da rộng [91].

Ngoài việc sử dụng tấm biểu mô NMM nuôi cấy cho khoang miệng, các tấm biểu mô nuôi cấy còn được sử dụng cho điều trị các bệnh lý ngoài khoang miệng. Bhargava S. và CS. (2004) đã thành công trong việc dùng tấm biểu mô NMM nuôi cấy cho các phẫu thuật đường niệu [92]. Yoshizawa M. và CS. đã nghiên cứu ứng dụng tấm biểu mô NMM làm tấm ghép để tái thiết mi mắt [49]. Quint EH. và Park JM. (2014) và rất nhiều tác giả công bố thành công của kỹ thuật tạo hình âm đạo từ biểu mô NMM nuôi cấy, với phương pháp này vừa tận dụng được sự gần gũi giữa hai loại biểu mô, vừa tận dụng được đặc tính mềm mại của niêm mạc rất phù hợp cho âm đạo [93].

CHƯƠNG 2:

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu:

- Thỏ chủng *Orytolagus Cuniculus* khoẻ mạnh, trọng lượng $2\text{kg} \pm 0,2\text{kg}$ do trung tâm nghiên cứu dê và thỏ Sơn Tây cung cấp, thỏ được nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm 5 ngày trước khi làm thực nghiệm và trong suốt thời gian thực nghiệm.

- Mảnh mô NMM của thỏ.

- Mảnh mô NMM của người.

- Tế bào 3T3 do bộ môn Tế bào-Mô Phôi và Lý sinh, Đại học Khoa học tự nhiên cung cấp.

- Màng ối người đã xử lý theo quy trình của bộ môn Mô-Phôi, trường Đại học Y Hà Nội.

2.1.2. Mô hình nghiên cứu

Nghiên cứu tiến hành qua hai giai đoạn:

Giai đoạn 1: Tiến hành thực nghiệm trên thỏ (tổng số thỏ dùng trong nghiên cứu là 64).

-Nghiên cứu quy trình trích thủ và xử lý mảnh NMM

-Nghiên cứu lựa chọn môi trường phù hợp

-Nghiên cứu lựa chọn phương pháp nuôi cấy

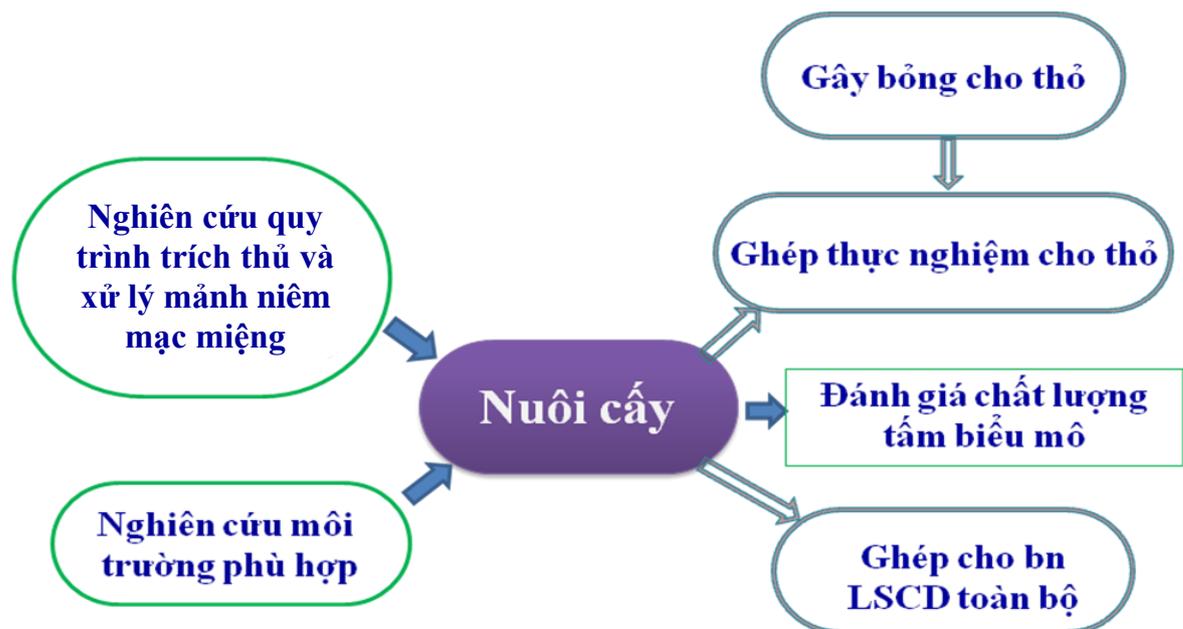
-Đánh giá chất lượng tám biểu mô

-Ghép thực nghiệm trên thỏ đã gây bỏng tổn thương toàn bộ vùng rìa.

Giai đoạn 2:

Dựa trên những kết quả trên thỏ, giai đoạn 2 sẽ tiến hành trên 17 BN LSCD cả hai mắt với quy trình tương tự.

Tuy vậy, trong bản luận án này, chúng tôi chỉ dừng ở mức đánh giá chất lượng tâm biểu mô nuôi tạo được.



Hình 2.1. Mô hình nghiên cứu

2.2. Quy trình nuôi cấy

2.2.1. Chuẩn bị trang thiết bị cần thiết cho nuôi cấy

- Phòng nuôi cấy vô trùng, có máy lọc khí
- Bồng thao tác vô trùng
- Tủ lạnh thường; tủ lạnh sâu -85°C
- Tủ ấm thường, tủ ấm CO_2

- KHV soi nổi có bàn làm ấm; KHV đa năng gắn camera số, kính hiển vi soi ngược có gắn máy ảnh số.
- Máy ly tâm lạnh
- Panh, kéo vô trùng, đèn cồn...
- Cốc có mỏ, chia độ vô trùng
- Đĩa nuôi cấy Nunc 4 giếng (Thermo Fisher Scientific); Đĩa nuôi cấy 6 giếng, đĩa nuôi cấy 6 giếng kèm lòng nuôi cấy Corning (Mỹ)
- Đĩa petri các loại đường kính 35mm, 60mm, 100mm Corning (Mỹ)
- Bơm tiêm các loại 5ml, 50ml Vinahankook (Việt Nam)
- Pipette các loại thể tích 1ml, 5ml, 10ml, 25ml Corning (Mỹ)
- Pipette pasteur vô trùng Volac (Anh)
- Các loại ống nghiệm 5ml, 14ml đáy nhọn Corning (Mỹ)
- Đầu tip các loại 1-20 μ l, 20-200 μ l Corning (Mỹ)
- Ống chịu lạnh 5ml Corning (Mỹ)
- Màng lọc 0,22 μ m BD (Mỹ)
- Găng tay, quần áo, mũ, khẩu trang vô trùng...

2.2.2. Thực nghiệm trên thỏ

2.2.2.1. Chuẩn bị màng ối

Bánh rau và màng bọc thai của các sản phụ mổ đẻ tại bệnh viện Phụ-Sản Hà Nội. Các sản phụ khoẻ mạnh và đã được sàng lọc các bệnh lây truyền: HIV (Human immunodeficiency virus-virus gây suy giảm miễn dịch mắc phải ở người), HbsAg (Hepatitis B surface antigen-kháng nguyên bề mặt siêu vi B), giang mai, không có nhiễm trùng toàn thân, chưa vỡ ối hoặc vỡ ối trước 6

giờ. Cả bánh rau và màng bọc thai được lấy bằng dụng cụ vô khuẩn tại phòng mổ.

- Định khu màng rau sẽ lấy để làm nền nuôi cấy bằng cách: lấy vùng cách 10 cm kể từ rìa bánh rau.
- Rửa màng rau bằng nước muối sinh lý 0,9% có pha kháng sinh và kháng nấm với nồng độ penicillin 100UI/ml (Wako, Nhật), streptomycin 100µg/ml (Wako, Nhật), amphotericin B 0,25µg/ml trong vòng 10 phút
- Nạo sạch máu ở màng rau bằng nạo tế bào
- Cắt màng rau ở vùng đạt tiêu chuẩn thành các mảnh có diện tích 3x3cm
- Rửa màng rau lần lượt hai lần bằng PBS 1X không có ion Mg^{2+} và Ca^{2+} (Gibco, Mỹ) có pha kháng sinh và kháng nấm với nồng độ penicillin 100UI/ml, streptomycin 100µg/ml, amphotericin B 0,25µg/ml

Màng rau tiếp tục được xử lý hoặc bảo quản lạnh sâu cả ba màng ở nhiệt độ $-80^{\circ}C$

- Bóc màng ối ra khỏi màng rau
- Ngâm màng ối bằng ammonia 10% (pha từ ammonia 25% của hãng Wako trong PBS 1X không kháng sinh, kháng nấm và không có ion Mg^{2+} và Ca^{2+})
- Nạo sạch cả hai mặt của màng ối bằng nạo tế bào
- Rửa lại hai lần bằng PBS 1X không kháng sinh, kháng nấm và không có ion Mg^{2+} và Ca^{2+}

- Các mảnh màng ối sẵn sàng được căng trên lồng nuôi cấy để sử dụng tươi hoặc tiến hành bảo quản trong DMSO 15% (Sigma) ở -80°C (sử dụng trong vòng 6 tháng)
 - Khi sử dụng, rã đông ở nhiệt độ phòng
- Rửa lại bằng PBS 1X không có kháng sinh, kháng nấm và không có ion Mg^{2+} và Ca^{2+}
- Đối với màng rau bảo quản cả 3 màng:
 - Ngâm trong ammonia 10%
 - Nạo bỏ lớp biểu mô và trung mô
 - Rửa lại bằng PBS 1X
- Trải màng ối lên bề mặt nhẵn vô khuẩn
- Xác định mặt màng ối đã loại bỏ biểu mô
- Căng phẳng màng ối lên lồng nuôi cấy đường kính 24mm, bằng nhựa polycarbonate của hãng Corning (Mỹ) sao cho mặt đã loại bỏ biểu mô màng ối hướng lên trên, không có bọt khí chen giữa đáy lồng và màng ối
- Để khô sau khoảng 2 giờ
- Sử dụng luôn hoặc đóng gói vô khuẩn (sử dụng trong vòng 1 tháng)
- Nuôi cấy tế bào gốc NMM

2.2.2.2. Chuẩn bị lớp 3T3 làm nền nuôi cấy

- a) Chuẩn bị lớp 3T3 (sử dụng mẫu 3T3 bảo quản lạnh, chưa qua xử lý mitomycin)
- Rã đông 1 ống 3T3
 - Lấy 8ml DMEM+10%FBS vào ống falcon 14 đáy nhọn
 - Hút toàn bộ dịch treo 3T3 vào và trộn đều

- Ly tâm 300g, 5 phút ở nhiệt độ phòng
- Hút bỏ dịch nổi
- Lấy cặn và làm tan cặn tế bào
- Thêm DMEM+10%FBS vào cặn sao cho số lượng tế bào thu được là 1×10^6 /12ml DMEM+10%FBS, trộn đều và cho vào bình flask 75cm²
- Láng đều đáy flask
- Gặt tế bào sau 3 ngày
- Lấy flask ra khỏi tủ ấm
- Bỏ hết dịch nổi
- Rửa flask bằng 10ml PBS (không ion hóa trị 2)
- Chuẩn bị dung dịch gồm 10ml DMEM+10%FBS+100μl mitomycin C (Sigma)
- Bơm dung dịch vào flask vừa thu hoạch
- Ủ trong tủ ấm trong vòng 2 giờ
- Hút bỏ DMEM
- Rửa lại flask 3 lần bằng DMEM, mỗi lần 10ml
- Thêm 2ml trypsin-EDTA 1X vào chai, để tủ ấm 3 phút
- Làm bong tế bào khỏi chai
- Thêm 8ml DMEM vào chai
- Hút toàn bộ vào ống falcon 14ml
- Ly tâm 300g, 5 phút
- Hút bỏ dịch nổi

- Làm tan cặn
- Thêm 10ml DMEM vào ống falcon và trộn đều
- Xác định lượng tế bào trong dung dịch bằng nhuộm trypan blue
- Cấy với số lượng $2,5 \times 10^5$ tế bào sống/2ml/1 giếng
- Ủ trong tủ ấm
- Sẵn sàng cho nuôi cấy tế bào biểu mô sau 1-3 ngày.

b) Chuẩn bị lớp 3T3 (sử dụng mẫu 3T3 đã qua xử lý mitomycin bảo quản lạnh)

- Rã đông 1 ống tế bào, thông thường có mật độ khoảng 3.3×10^6 /ml/tube
- Lấy 8ml DMEM 1X (Gibco) có 10% FBS (Gibco) vào ống falcon 14ml đáy nhọn
- Hút toàn bộ dịch chứa 3T3 vào ống falcon
- Ly tâm 400-500g trong vòng 5 phút ở nhiệt độ phòng
- Hút bỏ dịch nổi
- Trộn đều cặn, thêm vào 10ml DMEM +10%FBS vào ống trộn đều
- Lấy 10 μ l dịch treo trộn với 10 μ l trypan blue 0,4% (Sigma-Mỹ), trộn đều và đếm mật độ tế bào bằng buồng đếm Neubauer
- Pha thành dịch treo với mật độ tế bào $3,5 \times 10^5$ tế bào sống/2ml/1 giếng nuôi cấy
- Nuôi cấy trong tủ ấm trong vòng 1-3 ngày trước khi nuôi cấy cùng tế bào biểu mô
- Trong quá trình nuôi cấy thay lớp 3T3: 3 ngày một lần

2.2.2.3. Chuẩn bị mảnh mô NMM cho nuôi cấy

- Gây mê thỏ bằng đường tĩnh mạch rìa tai với thiopental liều 20mg/kg cân nặng.
- Sát trùng khoang miệng bằng betadine và nước muối sinh lí có penicillin, streptomycin và kháng nấm amphotericin B.
- Vị trí trích thủ: (1) mặt trong niêm mạc má phần trung tâm, (2) mặt trong niêm mạc má cách góc miệng 2mm và vuông góc, (3) mặt trong niêm mạc môi dưới phần trung tâm.
- Dùng dao tròn (Kai medical 30F, 60F, 80F) trích thủ các mảnh niêm mạc với kích thước: đường kính 3mm, 6mm, 8mm.

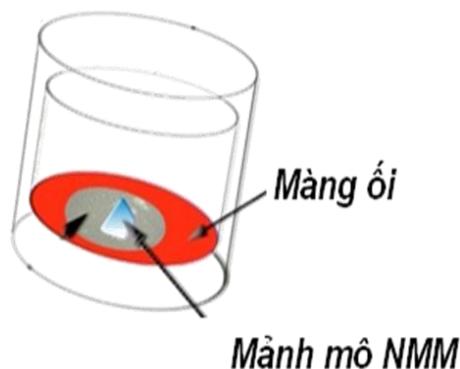
+ Kiểm tra cấu trúc vi thể của mảnh NMM

+ Mảnh NMM được rửa bằng PBS 1X có pha kháng sinh và kháng nấm với nồng độ penicillin 100UI/ml, streptomycin 100µg/ml, amphotericin B 0,25µg/ml

(1) Nuôi bằng phương pháp mảnh mô (hình 2.2):

- Cắt nhỏ mảnh NMM lớn thành các mảnh nhỏ có kích thước 1x1mm
- Ủ miếng mô trong dung dịch Dispase II 1,2UI/ml (Roche) ở 37⁰C trong 5 phút (pha từ dispase 2,4UI/ml trong DMEM/F12 có kháng sinh, kháng nấm và không có FBS)
- Rửa lại bằng PBS 1X
- Ngâm mảnh mô trong EDTA 0,05% (Gibco) trong vòng 3 phút ở nhiệt độ phòng
- Rửa sạch lại bằng môi trường nuôi cấy
- Nuôi cấy các mảnh mô đã được xử lý trên nền màng ối.

- + Mảnh mô NMM sau khi qua xử lý được đặt trực tiếp lên vào đáy của lồng nuôi cấy
- + Kiểm tra mặt biểu mô hướng lên phía trên
- + Chờ mảnh mô dính chặt vào màng ôi
- + Nhỏ 1,5ml môi trường vào giếng nuôi cấy và 1ml môi trường vào lồng nuôi cấy.
- + Hộp chứa các giếng nuôi cấy được đặt trong tủ ấm 37⁰C, 5% CO₂.
- + Thay môi trường đều đặn 2 ngày/lần. Thời gian nuôi cấy là 14-16 ngày.
- Đánh giá sự phát triển của tế bào gốc và chất lượng của tấm biểu mô nuôi cấy.

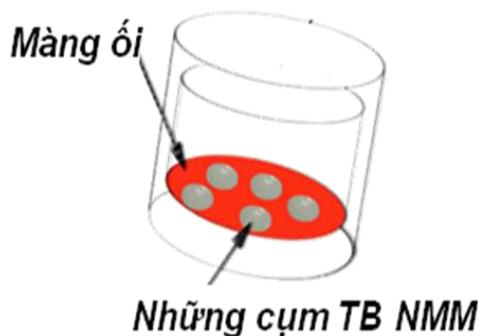


Hình 2.2. Mô hình nuôi cấy bằng mảnh mô

(2) Nuôi cấy bằng dịch treo (hình 2.3):

- Cắt nhỏ mảnh NMM lớn thành các mảnh nhỏ có kích thước 0,5x0,5mm
- Ủ mảnh NMM trong Dispase II 1,2 UI/ml trong tủ 37⁰C, 5% CO₂, thời gian 1 giờ
- Bóc rời mảnh biểu mô khỏi mô liên kết dưới kính hiển vi soi nổi
- Mảnh mô tiếp tục ngâm trong Trypsin-EDTA 0,05% (Gibco), thời gian 2 phút

- Rửa lại mảnh biểu mô và bằng DMEM+Ham's F12 có pha kháng sinh và kháng nấm với nồng độ penicillin 100UI/ml, streptomycin 100µg/ml, amphotericin B 0,25µg/ml và 10% FBS để dừng tác động của trypsin
- Nạo lấy các tế bào lớp đáy biểu mô
- Ly tâm lấy các tế bào biểu mô ở nhiệt độ 4⁰C
- Đếm tổng số tế bào thu được
- Tạo dịch treo có mật độ tế bào 1x10⁶ tế bào/ml
- Nuôi cấy trong lồng nuôi cấy:
 - + Cho 1 ml dịch treo tế bào vào lồng nuôi cấy.
 - + Thêm môi trường vào giếng đặt lồng nuôi cấy đã chuẩn bị 3T3 (nếu sử dụng phương pháp nuôi cấy dùng 3T3 chuột)
 - + Đặt giếng nuôi cấy trong tủ ấm 37⁰C, 5% CO₂. Thay môi trường đều đặn 2 ngày 1 lần. Thời gian nuôi cấy khoảng 14-16 ngày.
- Đánh giá sự phát triển của tế bào gốc và chất lượng của tấm biểu mô nuôi cấy.
- Nếu sử dụng lớp 3T3: 03 ngày thay 3T3 một lần.



Hình 2.3. Mô hình nuôi cấy bằng dịch treo

(3) Nuôi cấy bằng phương pháp mảnh biểu mô

- Cắt nhỏ mảnh NMM lớn thành các mảnh nhỏ có kích thước 0,5x0,5mm
- Ủ mảnh NMM trong dispase II 1,2 UI/ml trong tủ 37⁰C, 5% CO₂, thời gian 45-60 giờ
- Bóc rời mảnh biểu mô khỏi mô nền dưới kính hiển vi soi nổi
- Nhúng mảnh mô trong Trysin-EDTA 0,05% (Gibco), thời gian 30 giây
- Rửa lại mảnh biểu mô và mô liên kết bằng DMEM+Ham's F12 có kháng sinh, kháng nấm và 10% FBS để dừng tác động của trypsin
- Dán mảnh biểu mô lên trên nền màng ôi
- Kiểm tra và xác định biểu mô dán đúng hướng lên trên dưới kính hiển vi soi nổi
- Dán mô nền xuống đáy giếng nuôi cấy với tỉ lệ 3 mảnh biểu mô/2 mảnh mô nền
- Chờ mảnh mô dính chặt vào màng ôi và mảnh mô nền dính chặt vào đáy giếng nuôi cấy
- Nhỏ 1,5ml môi trường vào giếng nuôi cấy và 1ml môi trường vào lồng nuôi cấy.
- Hộp chứa các giếng nuôi cấy được đặt trong tủ ấm 37⁰C, 5% CO₂
- Thay môi trường đều đặn 2 ngày/lần. Thời gian nuôi cấy là 14-16 ngày
- Đánh giá sự phát triển của tế bào gốc và chất lượng của tấm biểu mô nuôi cấy.

Quy trình tạo tầng cho tấm biểu mô nuôi cấy:

- Khoảng ngày thứ 12 của quy trình nuôi cấy, khi thấy tế bào biểu mô mọc kín đáy lồng nuôi cấy, tiến hành tạo tầng cho tấm biểu mô.

2.2.2.3. Môi trường nuôi cấy, quy trình nuôi cấy và theo dõi

- Môi trường nuôi cấy SHEM 1: gồm DMEM/F12 tỉ lệ 1:1 (Gibco-Mỹ), có bổ sung: FBS 10% (Gibco-Mỹ), insulin 5 μ g/ml (Gibco-Mỹ), human rec EGF 10ng/ml (Invitrogen-Mỹ), penicillin 100UI/ml (Wako-Nhật), streptomycin 100 μ g/ml (Wako-Nhật), amphotericin B 0,25 μ g/ml (Gibco-Mỹ).
- Môi trường nuôi cấy SHEM 2: gồm DMEM/F12 tỉ lệ 1:1, có bổ sung: FBS 10%, insulin 5 μ g/ml, EGF 10ng/ml, triiodothyronin 1,3ng/ml (Sigma), isoproterenol 0,25 μ g/ml (Sigma), hydrocortisone 0,5 μ g/ml (Sigma), penicillin 100UI/ml, streptomycin 100 μ g/ml, amphotericin B 0,25 μ g/ml.

Nuôi cấy mảnh mô hoặc dịch treo của biểu mô NMM trong tủ 37⁰C, 5% CO₂. Thay môi trường hai ngày một lần. Theo dõi sự phát triển của các tế bào biểu mô giác mạc bằng kính hiển vi soi nổi. Khi các tế bào đã phủ kín đáy của lồng nuôi cấy, sử dụng kỹ thuật tạo tầng (air-lifting) để tăng số hàng cho tằm biểu mô nuôi cấy trong thời gian 2-4 ngày.

Quy trình tạo tầng cho tằm biểu mô nuôi cấy như sau:

- ✓ Khoảng ngày thứ 12 của nuôi cấy, khi thấy các tế bào biểu mô mọc kín giếng nuôi cấy, tiến hành tạo tầng cho tằm biểu mô
- ✓ Bơm môi trường vào giếng nuôi cấy và lồng nuôi cấy
- ✓ Hút hết môi trường trong lồng nuôi cấy bỏ đi, để cho các tế bào biểu mô tiếp xúc với không khí
- ✓ Đặt giếng nuôi cấy trong tủ ấm 37⁰C, 5%CO₂
- ✓ Thay môi trường trong giếng nuôi cấy hàng ngày.

Quy trình lấy tấm biểu mô nuôi cấy để định danh hoặc ghép lại cho thử nghiệm hoặc cho BN:

- ✓ Hút hết toàn bộ môi trường nuôi cấy có bổ sung 10% FBS
- ✓ Rửa hai lần tấm biểu mô nuôi cấy bằng môi trường nuôi cấy không bổ sung FBS
- ✓ Cắt tấm biểu mô nuôi cấy theo chu vi của lồng nuôi cấy
- ✓ Đặt tấm biểu mô đã cắt trong môi trường DMEM/Ham's F12 trong điều kiện 37⁰C để chuyển cho phẫu thuật viên cấy ghép.

2.2.2.4. Thu hoạch và định danh tế bào nuôi cấy

Sau khi nuôi cấy được tấm biểu mô kích thước 4 cm², tiến hành định danh tế bào của tấm biểu mô nuôi cấy bằng các kỹ thuật hiển vi quang học, hiển vi điện tử, hoá mô, hoá mô miễn dịch.

a. Nhuộm giemsa

Mục đích: quan sát bề mặt của tấm biểu mô nuôi cấy

- Tấm biểu mô vừa lấy ra khỏi giếng nuôi cấy được trải phẳng lên lam kính.
- Cố định bằng cồn tuyệt đối trong vòng 3 phút.
- Rửa lại bằng nước thường.
- Chuẩn bị giemsa 10% (Merck-Đức) pha trong nước cất ngay trước khi dùng.
- Nhuộm giemsa trong 10 phút.
- Rửa lam kính dưới vòi nước chảy.
- Để khô, dán lamella, sau đó kiểm tra trên kính.

b. Nhuộm Hematoxylin-Eosin

Mục đích: quan sát mặt cắt đứng của tấm biểu mô

- Tấm biểu mô vừa lấy ra khỏi giếng được cố định ngay bằng dung dịch formol 10% trong 1-2 giờ
- Rửa nước trong 1-2 giờ
- Khử nước bằng cồn 70°, 80°, 90°, 95°, 100°
- Làm trong miếng mô bằng cách ngâm lần lượt qua 3 lọ xylen
- Ngâm nén ở tủ 60⁰ C trong vòng 2 giờ
- Đúc miếng mô trong khuôn nén
- Cắt mẫu thành những lát mỏng 5-7 μ m
- Nhuộm màu theo phương pháp H.E. (Merck-Đức), quy trình như sau:
 - o Mẫu mô cắt lát mỏng 5-7 μ m được đưa lên lam kính
 - o Dàn đều mẫu mô bằng dung dịch Mayer, trên mặt phẳng ẩm
 - o Để tiêu bản khô trong tủ ẩm 45⁰C trong vòng 2 ngày
 - o Chạy 3 lọ xylene để tẩy nén (10 phút 1 lọ)
 - o Chạy 3 lọ cồn 90⁰ (10 phút 1 lọ)
 - o Rửa bằng nước cất
 - o Nhuộm Hemalun trong vòng 5 phút
 - o Rửa dưới vòi nước lã trong 30 phút
 - o Nhuộm Eosin trong vòng 5 phút
 - o Rửa nước 10 giây
 - o Nhúng qua 2 cốc cồn 100 trong vòng 10 giây
 - o Nhúng xylene nóng 56⁰C trong vòng 1 giờ
 - o Dán lamella phủ mẫu vật
- Quan sát bằng kính hiển vi quang học.

c. Kỹ thuật hiển vi điện tử

Tấm biểu mô được kiểm tra bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) và kính hiển vi điện tử xuyên (TEM).

Mục đích: quan sát cấu trúc siêu vi của tấm biểu mô, tìm các cấu trúc liên kết giữa các tế bào biểu mô với nhau và giữa tế bào biểu mô với màng ối.

- Tấm biểu mô vừa lấy ra khỏi giếng được cố định ngay bằng dung dịch glutaraldehyde 2,5% pha với đệm PBS trong 2 giờ.
- Rửa 3 lần trong 15 phút với PBS.
- Tiếp tục cố định trong 1 giờ 30 phút bằng dung dịch osmium tetroxide 1%.
- Rửa lại miếng mô thêm 3 lần nữa bằng PBS.
- Chuyển qua cồn để khử nước (50⁰, 70⁰, 80⁰, 90⁰, 95⁰, và 100⁰).

Với TEM, miếng mô sẽ được đúc trong khuôn nhựa epon, cắt lát siêu mỏng (300-400A⁰). Những lát cắt này sẽ được đặt trên lưới đồng, và được nhuộm bằng uranyl acetate và citrate chì. Mẫu được đọc trên kính Jeol 1010.

Với SEM, miếng mô sẽ được chuyển qua dung dịch hexamethyldisilazane trong vòng 10 phút, sau đó để khô trong không khí. Khi đã khô, miếng mô được mạ phủ vàng, sau đó kiểm tra trên kính. (S-4800 – Hitachi).

d. Kỹ thuật hóa mô (nhuộm P.A.S.-Periodic acid-Schiff)

- Mục đích: Định tính và bán định lượng hydratcacbon, glycoprotein và mucin
- Một phần tấm biểu mô được cố định bằng dung dịch Carnoy và cắt thành những lát mỏng.
- Khử nền
- Ngâm tiêu bản vào dung dịch acid periodic 1% trong vòng 15 phút
- Rửa dưới vòi nước chảy trong vòng 5 phút
- Rửa lại bằng nước cất trong vòng 5 phút
- Ngâm tiêu bản vào dung dịch Schiff trong vòng 30 phút để chỗ tối
- Cho vào 2 cốc SO₂ đậm kín, mỗi cốc 2 phút

- Rửa nước thường 2-5 phút
- Rửa nước cất
- Nhuộm nhân bằng Hematoxylin trong 3 phút
- Ngâm nước thường 15 phút
- Nhúng cồn 100 nhanh
- Ngâm xylene
- Gắn lamén
- Nhận định kết quả: sản phẩm dương tính trong phản ứng P.A.S. có màu tím đỏ.

e. Kỹ thuật hoá mô miễn dịch

Mục đích: để xác định một số loại keratin đặc hiệu có ở biểu mô NMM (trong đó K3 là loại keratin chỉ thấy ở các loại biểu mô tầng trong đó có NMM) và p63 là một loại protein nhân tế bào, đây là loại protein thấy xuất hiện nhiều ở các tế bào chưa biệt hóa.

- Tắm biểu mô vừa lấy ra khỏi giéng đượ có định ngay bằng dung dịch formol 10% trong 1-2 giờ
- Chạy nước để rửa sạch formol khoảng 1-2 giờ
- Khử nước bằng cồn 70°, 80°, 90°, 95°, 100°
- Làm trong miếng mô bằng cách ngâm lần lượt qua 3 lọ xylene
- Đúc miếng mô trong khuôn nén
- Cắt mẫu thành những lát mỏng 5-7µm
- Khử nén bằng xylene
- Khử xylene bằng cồn ethanol 100%, 95%, 75%
- Rửa mẫu 3 lần (5phút/lần) với PBST (phosphate buffered saline with tween) ở nhiệt độ phòng
- Bộc lộ kháng nguyên bằng nhiệt độ (96⁰C trong 30 phút)
- Rửa lại 2 lần (5phút/lần) với PBST ở nhiệt độ phòng

- Để hạn chế việc gắn không đặc hiệu, mẫu được ủ với dung dịch chặn BSA 5% (bovine serum albumin) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng
- Mẫu được ủ với kháng thể thứ nhất P63-L-CE nếu nhuộm p63, CK cocktail 1ml nếu nhuộm K3/K12 (Leica biosystems-Anh) ở nhiệt độ phòng trong vòng 2 giờ
- Rửa lại bằng PBS 3 lần (5 phút/lần)
- Chặn peroxidase
- Rửa lại 2 lần (5 phút/lần) với PBST ở nhiệt độ phòng
- Mẫu tiếp tục được ủ với kháng thể thứ hai trong vòng 60 phút ở nhiệt độ phòng
- Rửa 3 lần với PBS
- Phát hiện sự gắn đặc hiệu kháng nguyên-kháng thể bằng kit DAB (3, 3'-diaminobenzidine)
- Dán lamên
- Kiểm tra trên kính
- Nhận định kết quả: dương tính nếu
 - + Bào tương của tế bào bắt màu nâu khi nhuộm K3/K12
 - + Nhân tế bào bắt màu nâu nếu nhuộm p63.

2.2.3. Thử nghiệm trên BN tự nguyện.

Tiến hành sau khi có kết quả định hướng của thực nghiệm trên thỏ.

Trước mổ BN được điều trị các bệnh răng miệng nếu có, đánh răng đều đặn, không hút thuốc lá.

BN nằm trên bàn mổ, sát trùng NMM bằng polydone-iodine 10%. Gây tê tại chỗ bằng tiêm 1ml lidocain 2% dưới niêm mạc má

Sinh thiết một mảnh niêm mạc mặt trong má có đường kính 3 mm

Rửa mảnh mô bằng PBS pha kháng sinh, kháng nấm, sau đó ngâm mảnh sinh thiết trong môi trường DMEM, chuyển ngay tới phòng nuôi cấy tế bào xử lý

- Cắt nhỏ thành các mảnh 0,5x0,5mm, nuôi cấy bằng mảnh biểu mô
- Nuôi cấy trong môi trường SHEM2.

2.3. Chỉ tiêu nghiên cứu

- Tỷ lệ nuôi tạo thành công tấm biểu mô.
- Thời gian nuôi cấy.
- Cấu trúc vi thể của tấm biểu mô nuôi cấy.
- Cấu trúc siêu vi thể của tấm biểu mô nuôi cấy.
- Cấu trúc hoá học của tấm biểu mô nuôi cấy.

2.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu tiến hành tại bộ môn Mô-Phôi và khoa Kết-Giác mạc Bệnh viện Mắt Trung ương.

Từ tháng 10/1010 đến 10/2013.

2.5. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu tiền cứu.

2.6. Xử lý số liệu nghiên cứu

Xử lý số liệu theo phần mềm SPSS 16.0, sử dụng T test, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê nếu $p < 0,05$.

2.7. Đạo đức nghiên cứu

Đề tài là một phần của đề tài độc lập cấp nhà nước “*Nghiên cứu quy trình sử dụng tế bào gốc để điều trị một số bệnh cả bề mặt nhãn cầu*” thuộc bộ môn Mô-Phôi, Trường Đại học Y Hà Nội, đã được thông qua hội đồng đạo đức Y học, Trường Đại học Y Hà Nội (chứng nhận chấp thuận số 77/HĐĐĐ-YHN ngày 16/07/2010).

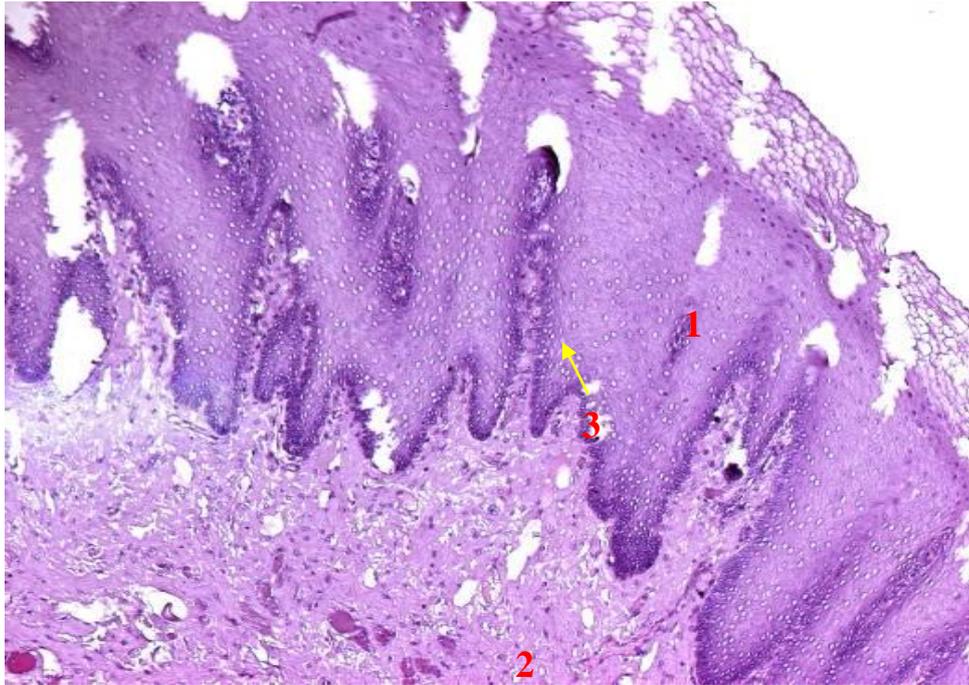
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nghiên cứu về nuôi tạo tằm biểu mô trên thỏ thực nghiệm.

3.1.1. Lựa chọn vị trí sinh thiết và kích thước mảnh mô nuôi cấy

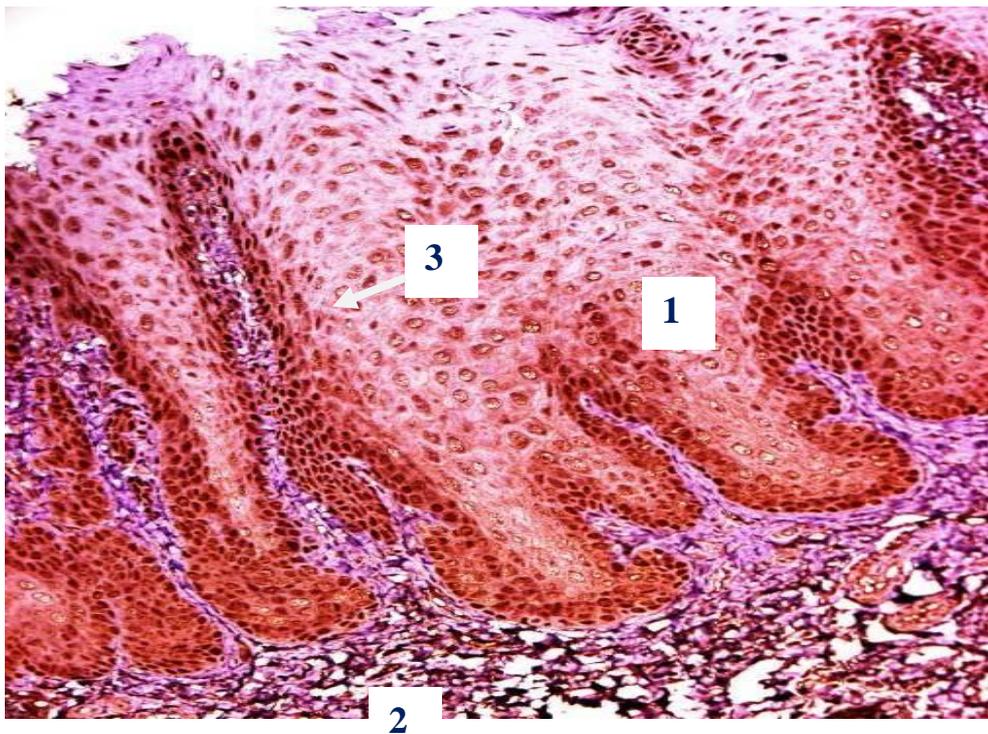
Sinh thiết NMM trên 5 thỏ chủng *Orytolagus Cuniculus* ở 3 vị trí khác nhau: (1) mặt trong niêm mạc má phần trung tâm, (2) mặt trong niêm mạc má cách góc miệng 2mm và vuông góc, (3) mặt trong niêm mạc môi dưới phần trung tâm, chúng tôi nhận thấy:

Ở vị trí mặt trong niêm mạc má phần trung tâm: Biểu mô là biểu mô lát tầng không sừng hóa. Biểu mô dày, gồm 18-20 hàng tế bào, chia làm 3 lớp (1) Lớp tế bào đáy gồm 2-3 hàng tế bào có kích thước nhỏ, nhân hình trứng, sẫm màu, bào tương rất ưa base (2) Các tế bào lớp gai gồm khoảng 10-12 hàng tế bào nằm trên lớp đáy, các tế bào có hình đa diện, nhân tròn, sáng màu (3) Các tế bào sát bề mặt có khoảng 3-4 lớp, tế bào dẹt nhân dẹt sẫm màu (hình 3.1). Trên các tiêu bản nhuộm p63, nhân các tế bào lớp đáy bắt màu rất đậm. Mô liên kết của lớp đệm tạo thành các nhú chân bì rất cao. Trong mô liên kết, tế bào thưa thớt (hình 3.2).



Hình 3.1. Niêm mạc thô vùng giữa má (H.E.x250)

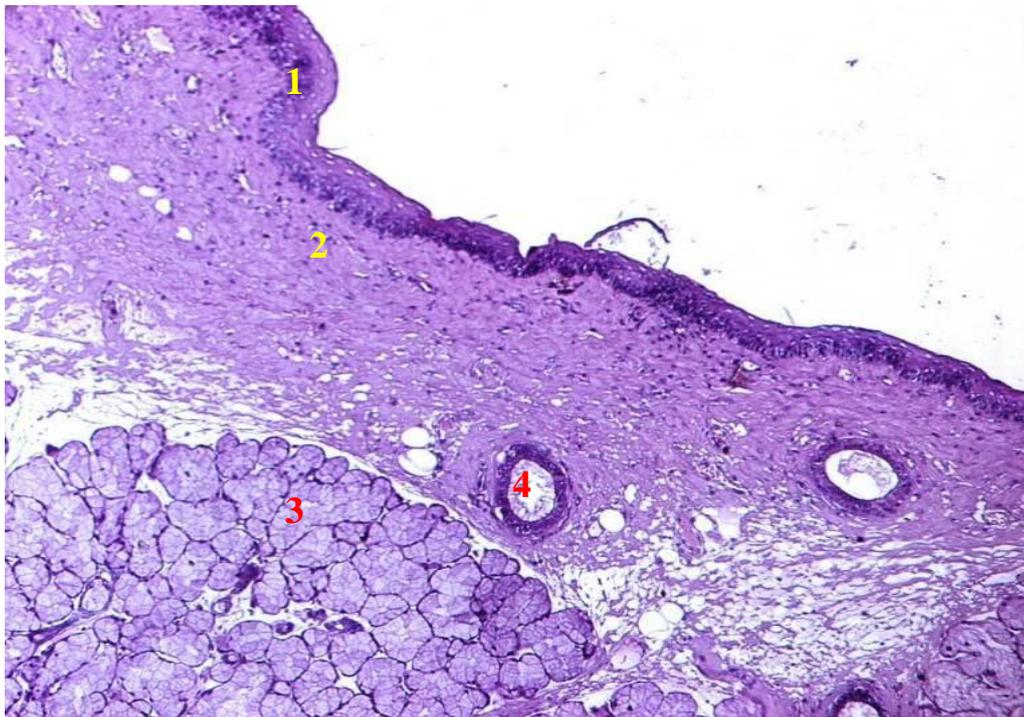
1. Biểu mô 2. Mô đệm 3. Nhân tế bào biểu mô



Hình 3.2. Niêm mạc thô vùng giữa má (p63x500)

1. Biểu mô 2. Mô đệm 3. Nhân tế bào biểu mô

Mặt trong niêm mạc má cách góc miệng 2mm và vuông góc, mặt trong niêm mạc môi dưới phần trung tâm: Biểu mô là loại lát tầng không sừng hóa. Biểu mô mỏng, gồm 4-5 hàng tế bào. Các tế bào lớp đáy có nhân hình trứng, sẫm màu, bào tương ưa base. Lớp giữa gồm 3-4 hàng tế bào đa diện, nhân tròn, sáng màu. Lớp trên cùng là một hàng tế bào dẹt, có nhân dẹt. Ranh giới giữa biểu mô và mô liên kết bên dưới tương đối bằng phẳng, không có các nhú chân bì. Các tế bào ở trong mô liên kết thưa thớt. Trong lớp đệm có những ống bài xuất và đám nang tuyến nước bọt (hình 3.3).



Hình 3.3. Niêm mạc môi thỏ (H.E.x250)

1. Biểu mô 2. Mô đệm 3. Tuyến nước bọt 4. Ống bài xuất của tuyến nước bọt

Khi trích thủ mẫu để làm nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy:

- Phương pháp nuôi bằng mảnh mô: cần mảnh mô có đường kính là 6mm để nuôi tạo được hai tấm biểu mô.

- Phương pháp dịch treo: kích thước mảnh mô phải có đường kính là 8mm mới đủ lượng tế bào tạo được 2 ml dịch treo có mật độ 1×10^6 tế bào/ml để nuôi tạo thành hai tấm biểu mô.
- Phương pháp nuôi bằng mảnh biểu mô: đường kính của mảnh mô trích thủ là **3mm**, sau đó mảnh mô được cắt thành các mảnh kích thước 0,5x0,5mm để nuôi thành hai tấm biểu mô.

3.1.2. Lựa chọn môi trường nuôi cấy

Giai đoạn đầu tiên hành thực nghiệm chúng tôi nuôi 18 mẫu mảnh mô NMM bằng môi trường SHEM1, kết quả thu được chỉ có 30% mẫu mọc, toàn bộ các mẫu mọc đều không kín đáy sau 28 ngày nuôi cấy. Sau đó, nghiên cứu chuyển sang sử dụng môi trường SHEM2, là môi trường SHEM 1 có bổ sung thêm insulin, hydrocortisone, triiodothyronine, isoproterenol và toàn bộ kết quả nghiên cứu tiến hành nuôi cấy trong môi trường SHEM2 với tỉ lệ nuôi tạo thành công tấm biểu mô là 87,5%. Tỉ lệ mọc của tấm biểu mô nuôi cấy sử dụng hai loại môi trường SHEM 1 và SHEM 2 khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$ được ghi trong bảng 3.1.

Bảng 3.1. Tỷ lệ mọc của tấm biểu mô NMM bằng các môi trường nuôi cấy khác nhau

	Số mẫu nuôi	Số mẫu mọc	Tỉ lệ (%)	p
SHEM 1	18	6	30	<i>p < 0,001</i>
SHEM 2	56	49	87,5	

3.1.3. Lựa chọn phương pháp nuôi cấy

Giai đoạn 1: Chúng tôi đã nuôi 17 giếng bằng mảnh mô, 20 giếng bằng dịch treo, 19 miếng bằng mảnh biểu mô. Tỷ lệ nuôi tạo thành công tám biểu mô được ghi trong bảng 3.2.

Bảng 3.2. Tỷ lệ nuôi tạo thành công tám biểu mô NMM bằng các phương pháp nuôi cấy khác nhau

	Số mẫu nuôi	Số mẫu mọc	Tỷ lệ nuôi tạo thành công (%)	p
Mảnh mô (1)	17	13	76,47	p (1, 2)>0,05
Dịch treo (2)	20	19	95	p (1, 3)>0,05
Mảnh biểu mô (3)	19	17	89,47	p (2, 3)>0,05

Kết quả cho thấy: nuôi cấy bằng dịch treo cho tỷ lệ tạo được tám biểu mô là 95%, phương pháp bằng mảnh mô có tỉ lệ nuôi tạo thành công thấp hơn chỉ khoảng 76,47%, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê, phương pháp nuôi bằng dịch treo có tỷ lệ nuôi tạo thành công cao hơn phương pháp mảnh biểu mô, song sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

- Giai đoạn 2: Chúng tôi đã nuôi 30 mẫu theo phương pháp mảnh biểu mô, tỉ lệ mọc và tạo tám biểu mô là 100%. Trong số này chúng tôi đã ghép tự thân 15 tám cho 15 mắt thờ bị mất toàn bộ biểu mô trước giác mạc một bên mắt.

Đánh giá tác dụng của lớp tế bào nuôi 3T3 trong các phương pháp nuôi tạo tám biểu mô NMM: tỷ lệ mọc của mẫu nuôi cấy sử dụng nguyên bào sợi

chuột 3T3 cao hơn khi không sử dụng lớp này (100% so với 81,48%). Kết quả được ghi trong bảng 3. 3.

Bảng 3. 3. Tỷ lệ nuôi tạo thành công tám biểu mô NMM sử dụng lớp tế bào nuôi 3T3

	Số mẫu nuôi	Số mẫu mọc	Tỷ lệ nuôi tạo thành công	p
3T3 (+) (1)	10	10	100	$p(1,2) < 0,05$
3T3 (-) (2)	27	22	81,48	

Đánh giá tác dụng của nguyên bào sợi tự thân, chúng tôi nuôi cấy 19 mẫu sử dụng nguyên bào sợi tự thân thay thế cho lớp nguyên bào sợi chuột 3T3. Kết quả được ghi trong bảng 3.4.

Bảng 3.4. Tỷ lệ nuôi tạo thành công tám biểu mô NMM sử dụng lớp tế bào nuôi khác nhau

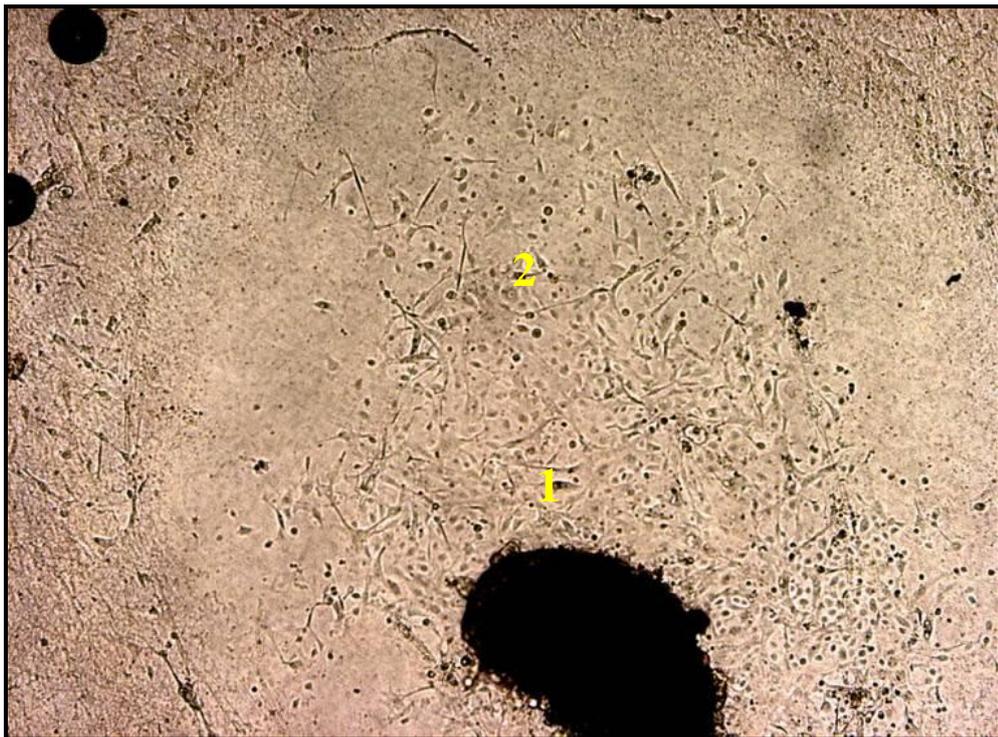
	Số mẫu nuôi	Số mẫu mọc	Tỷ lệ nuôi tạo thành công (%)	p
3T3 (+) chuột (1)	10	10	100	$p(1,2) > 0,05$
NBS tự thân (2)	19	17	89,47	

Tỷ lệ nuôi tạo thành công tấm biểu mô NMM sử dụng lớp tế bào nuôi chuột cao hơn khi sử dụng nguyên bào sợi tự thân, tuy nhiên sự khác nhau không có ý nghĩa thống kê.

- Giai đoạn 2: Chúng tôi đã nuôi 30 mẫu theo phương pháp mảnh biểu mô, có sự hỗ trợ của nguyên bào sợi tự thân, tỉ lệ mọc và tạo tấm biểu mô là 100%. Trong số này chúng tôi đã ghép tự thân 15 tấm cho 15 mắt thỏ bị mất toàn bộ biểu mô trước giác mạc một bên mắt.

3.1.4. Hình thái và tốc độ phát triển của tấm biểu mô được nuôi cấy bằng các phương pháp khác nhau

- Tấm biểu mô nuôi cấy bằng mảnh mô nguyên vẹn:
 - 3 ngày sau nuôi cấy: các tế bào đã phát triển lan ra xung quanh mảnh mô. Ranh giới nơi các tế bào đang lan rộng quan sát rõ. Các tế bào có hình tròn, hình đa diện và hình thoi dài (hình 3.4).

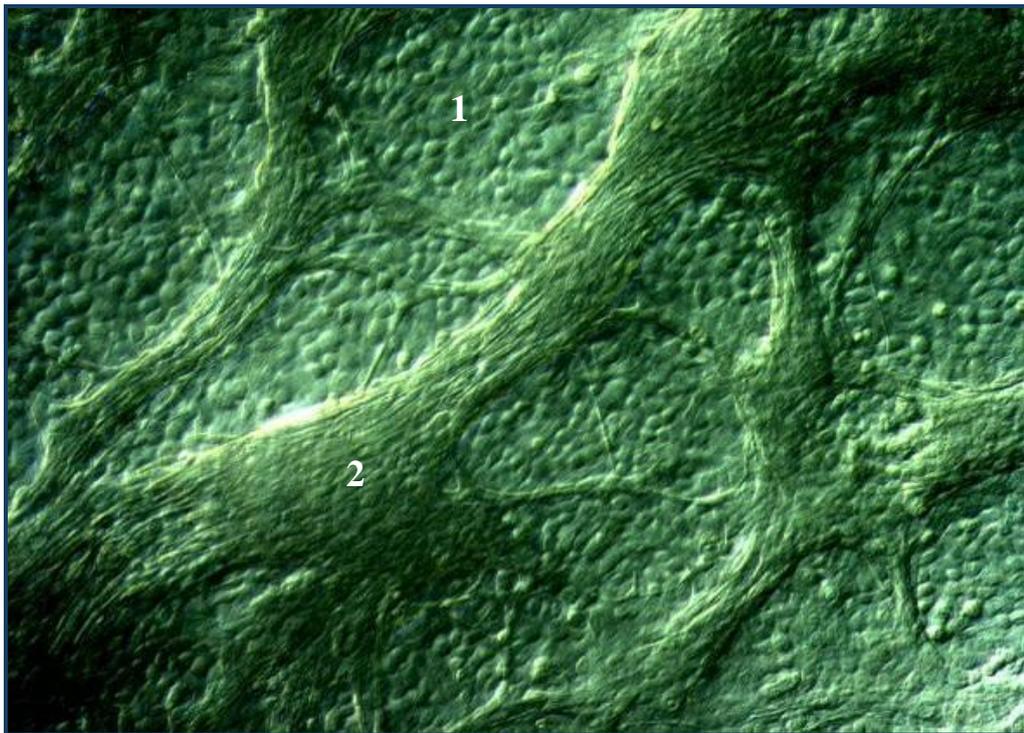


Hình 3.4. Tấm biểu mô sau nuôi cấy ba ngày (KHV soi n_ối x100)

1. Mảnh mô 2. Các tế bào đang lan rộng

- 10-12 ngày sau nuôi cấy: các tế bào tạo thành một lớp phủ kín đáy của lòng nuôi cấy. Bề mặt của tấm biểu mô không phẳng, có chỗ tạo thành các gờ khá cao. Ở các gờ này, các tế bào có hình thoi, nhân tế bào dẹt khi quan sát dưới kính hiển vi soi ngược (hình 3.5).

- 14-16 ngày sau nuôi cấy: quan sát trên lát cắt dọc nhuộm H.E. thấy tấm biểu mô không phẳng. Trong tấm biểu mô, ngoài tế bào biểu mô có nhiều nguyên bào sợi với hình thái điển hình (hình 3.6).



Hình 3.5. Tấm biểu mô sau nuôi cấy 12 ngày (KHV soi ngượcx250)

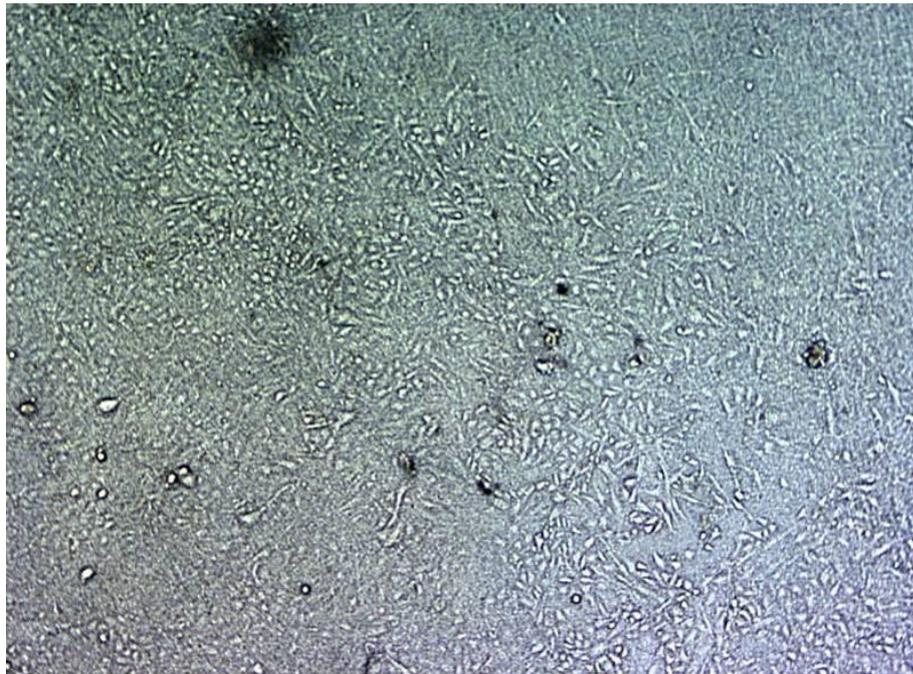
1. Tế bào biểu mô 2. Gờ nổi



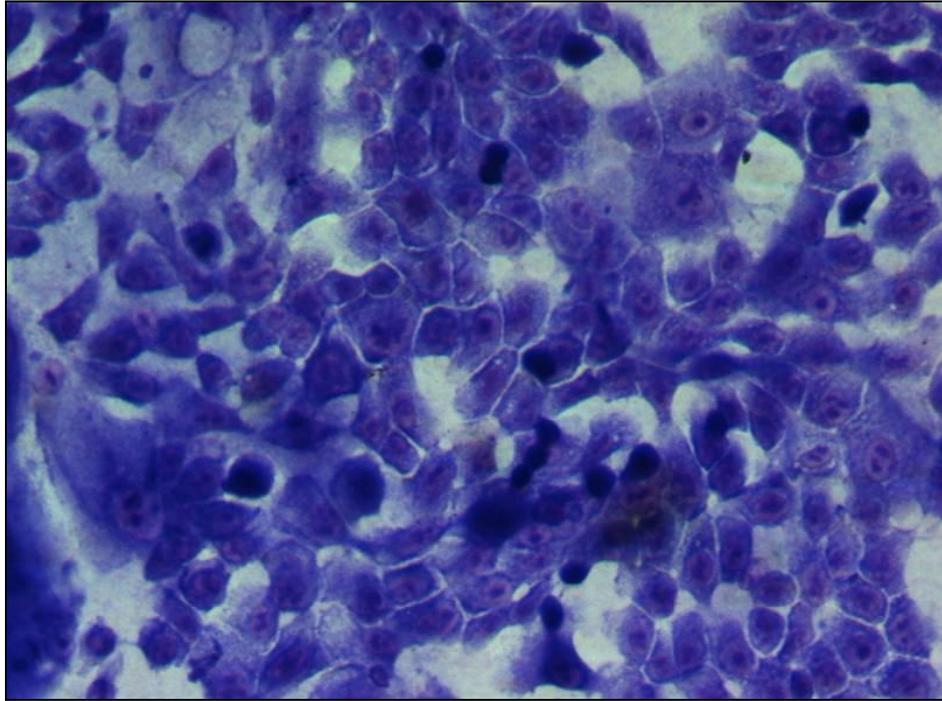
Hình 3.6. Tắm biểu mô sau nuôi cấy 12 ngày (H.E.x500)

1. Tế bào biểu mô 2. Gờ nổi

- Tắm biểu mô nuôi cấy bằng dịch treo tế bào
- 2 ngày sau nuôi cấy: có khá nhiều các tế bào tròn bám vào màng đáy, ở những ngày sau, các tế bào này xoè rộng với các nhánh bào tương khá dài (hình 3.7, 3.8).



Hình 3.7. Tắm biểu mô sau nuôi cấy 3 ngày (kính hiển vi soi nổi x125)



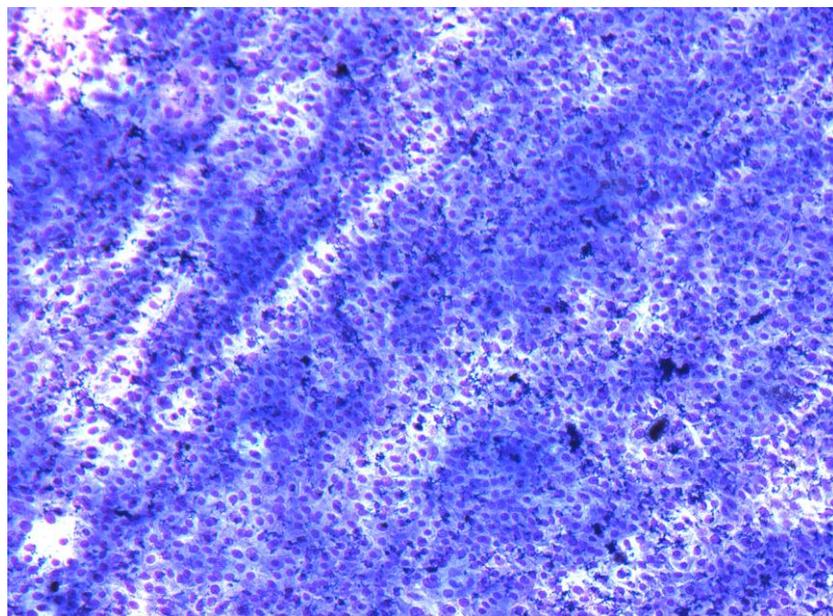
Hình 3.8. Tấm biểu mô sau nuôi cấy 7 ngày (giemsax1000)

- 12-14 ngày sau nuôi cấy: tế bào biểu mô phủ kín lòng nuôi cấy.
- Sau khi tạo tầng, quan sát trên lát cắt dọc nhuộm H.E thấy: tấm biểu mô phẳng, gồm 5-7 hàng tế bào, các lớp tế bào trên có xu hướng dẹt dần. Khoảng gian bào của tấm biểu mô rộng. Không thấy các tế bào hình thoi xen lẫn (hình 3.9).



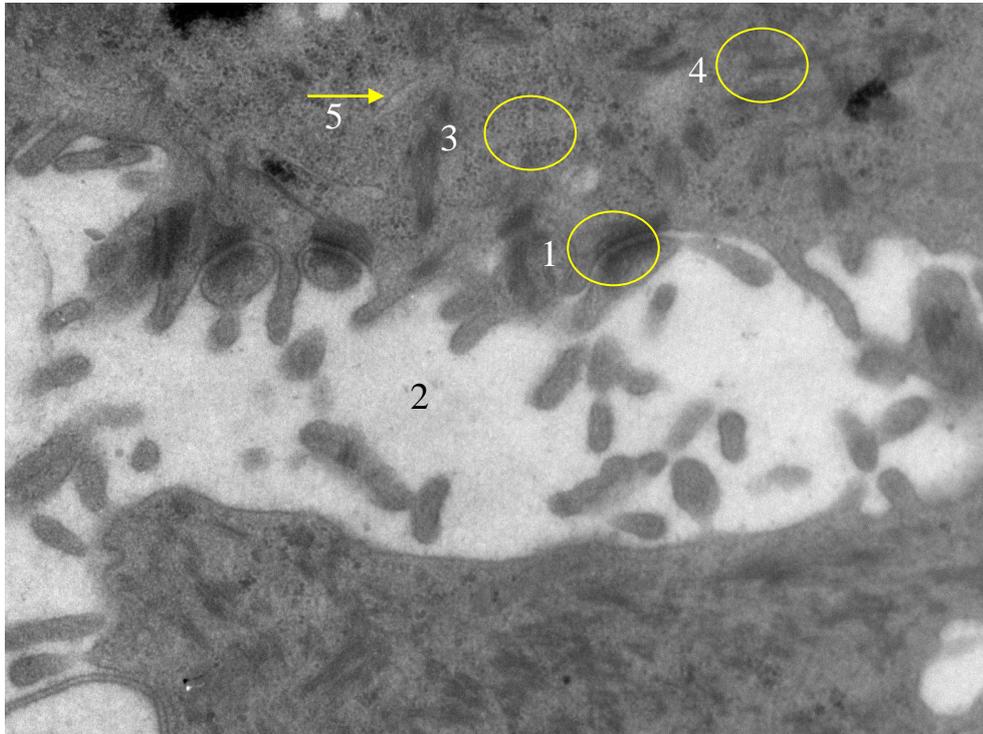
Hình 3.9. Lát cắt đứng dọc của tảo biểu mô sau 21 ngày nuôi cấy (nuôi bằng dịch tre) (H.E.x1000)

- Khi quan sát trên bề mặt tảo biểu mô nuôi cấy vào ngày thứ 14 bằng phương pháp nhuộm giemsa: tảo biểu mô nuôi bằng dịch tre được phủ kín, khoảng gian tế bào rộng và có kích thước không đều nhau. Không thấy các tế bào hình thoi xen lẫn ở tảo biểu mô (hình 3.10).



Hình 3.10. Tảo biểu mô sau nuôi cấy dịch tre 14 ngày (giemsa x250)

Khi quan sát bằng kính hiển vi điện tử, khoảng gian bào giữa các tế bào ở lớp giữa của tấm biểu mô khá rộng. Các tế bào ở đây liên kết với nhau bằng các mộng bào tương và thể liên kết. Trong bào tương các tế bào, các bào quan rất phát triển, có các hạt glycogen, các bó xơ tương lực, lưới nội bào có hạt (hình 3.11).



T18 DT(372).011

Print Mag: 10600x @ 51 mm

11:55:55 a 06/30/11

TEM Mode: Imaging

500 nm

HV=80.0kV

Direct Mag: 5000x

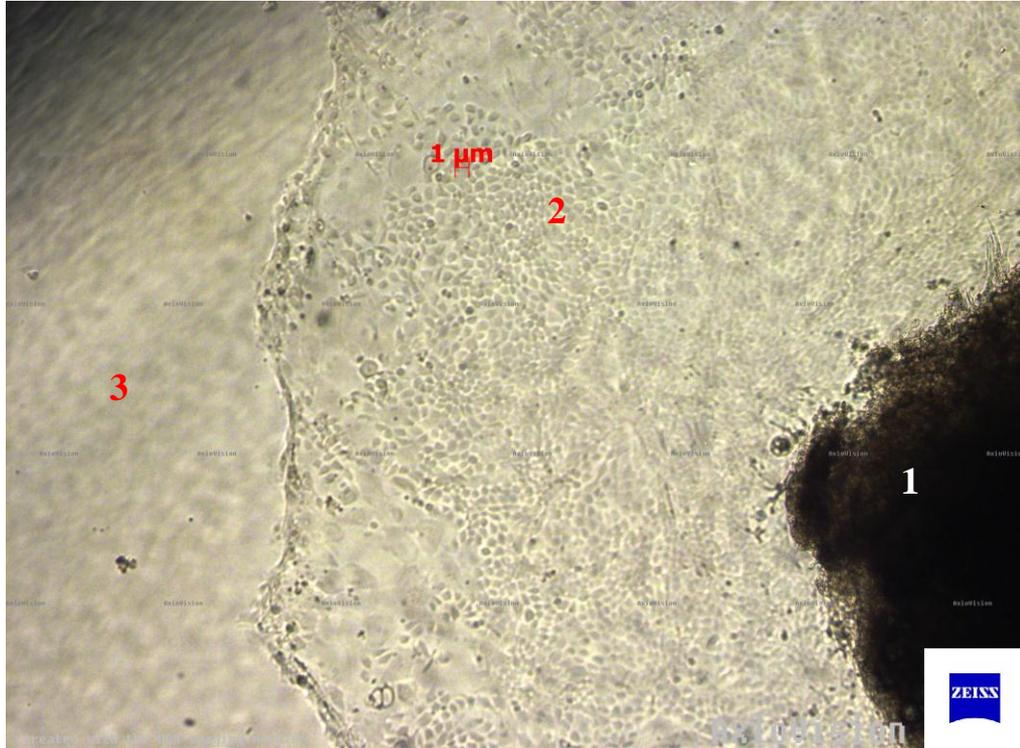
EMLab-NIHE

Hình 3.11. Ranh giới giữa hai tế bào tấm biểu mô nuôi cấy (TEM)

1. Thể liên kết
2. Khoảng gian bào
3. Đám hạt glycogen
4. Các bó xơ tương lực
5. Lưới nội bào

*Tấm biểu mô nuôi cấy bằng mảnh biểu mô

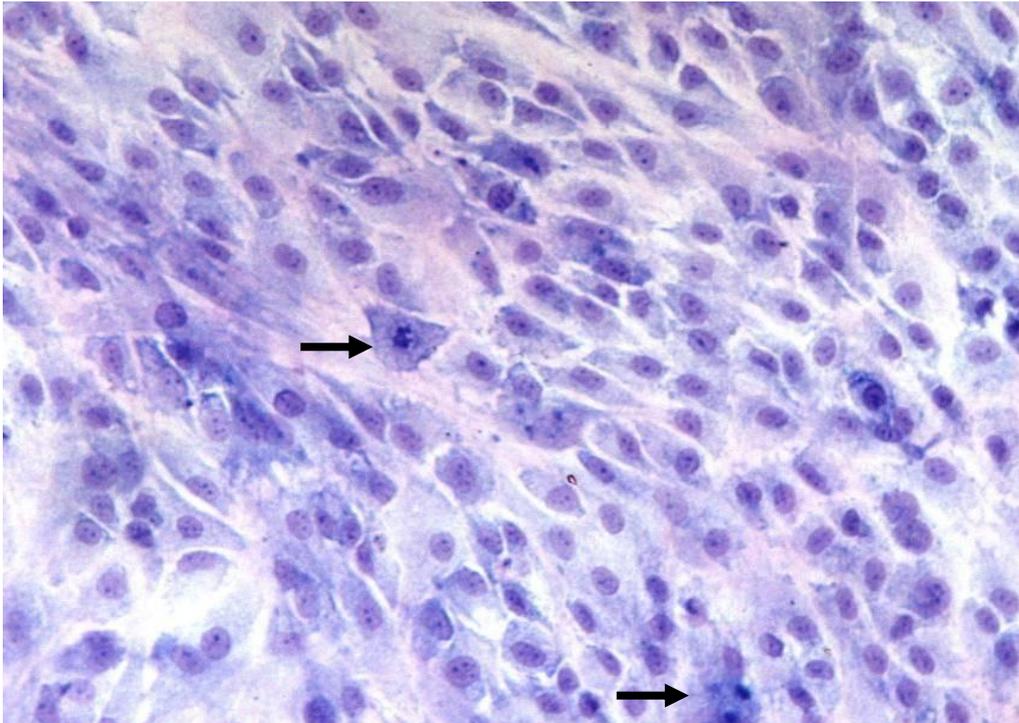
- 3-4 ngày sau nuôi cấy: Các tế bào bò lan khỏi tấm biểu mô. Các tế bào này có hình tròn, một số có hình đa diện với các nhánh bào tương dài (hình 3.12).



Hình 3.12. Tấm biểu mô nuôi cấy 4 ngày (kính hiển vi soi ngượcx125)

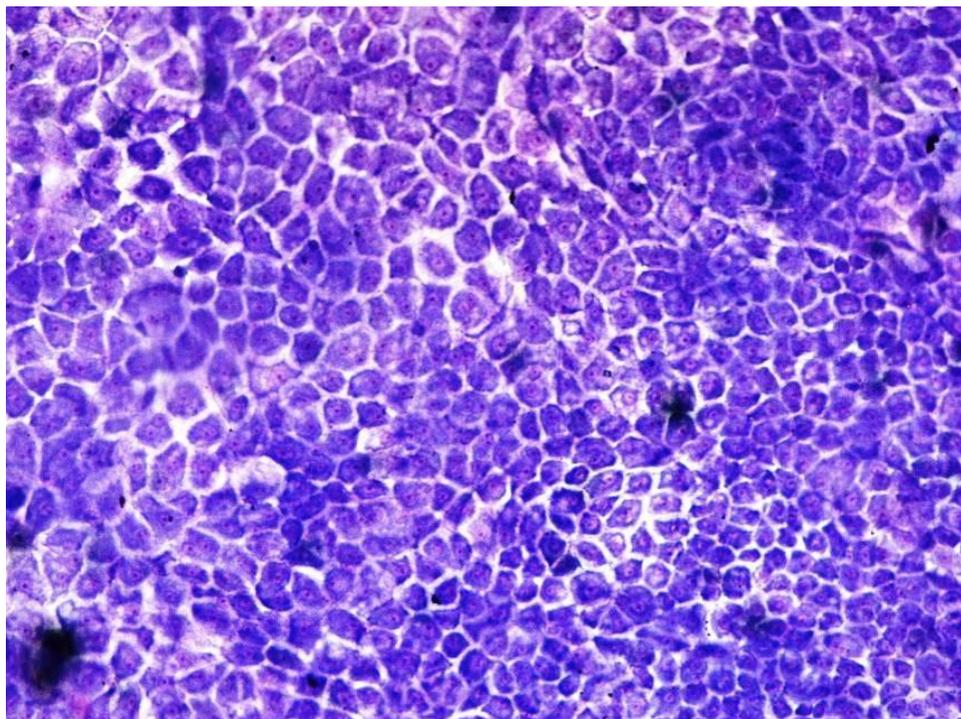
1. Mảnh biểu mô 2. Tế bào biểu mô bò lan 3. Nền màng ối

- Các ngày tiếp theo các tế bào lan rộng dần, lúc đầu các tế bào có hình đa diện lớn, khoảng gian bào rộng, khi các tế bào phát triển kín đáy lồng nuôi cấy vào khoảng ngày thứ 10-12, các tế bào nằm sát vào nhau, kích thước nhỏ đi, khoảng gian bào hẹp tuy nhiên vẫn quan sát thấy rõ ranh giới giữa các tế bào với nhau, nhiều hình ảnh tế bào đang phân chia (hình 3.13, 3.14).



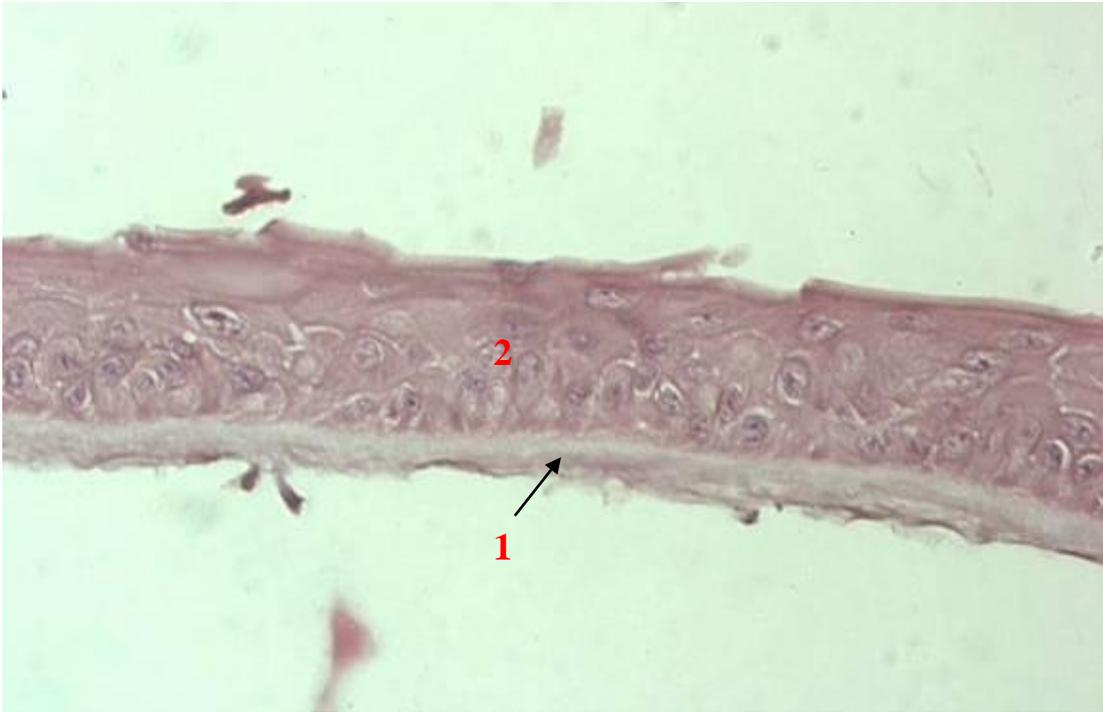
Hình 3.13. Tắm biểu mô sau nuôi cấy 7 ngày (giemsax500).

→ Tế bào đang phân chia



Hình 3.14. Tắm biểu mô sau nuôi cấy 12 ngày (giemsax500)

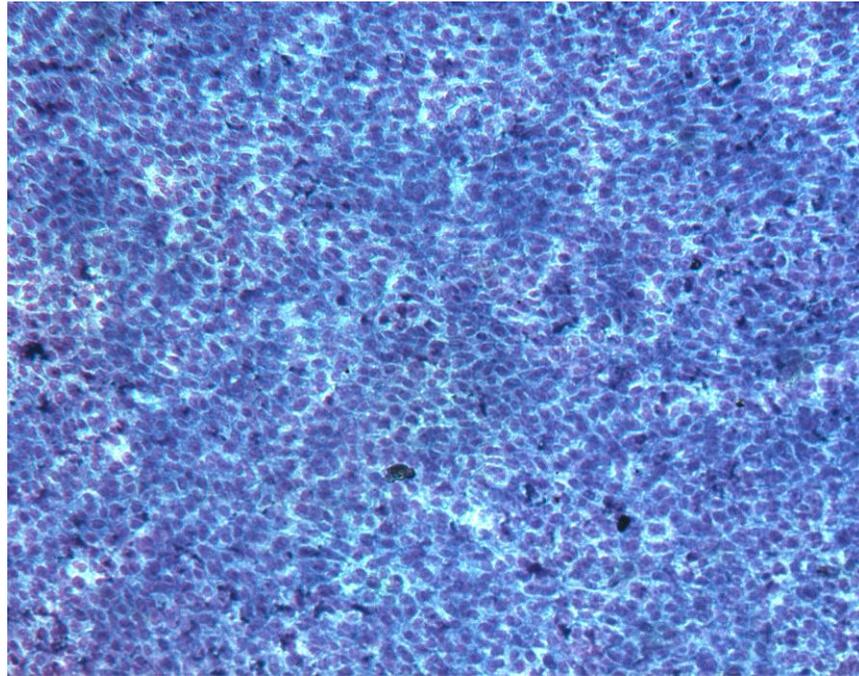
- Sau khi tạo tầng, quan sát trên lát cắt dọc nhuộm H.E thấy: tấm biểu mô phẳng, gồm 5-7 hàng tế bào, các lớp tế bào trên có xu hướng dẹt dần. Khoảng gian bào của tấm biểu mô nuôi bằng mảnh biểu mô hẹp hơn so với nuôi dịch treo. Không thấy các tế bào hình thoi xen lẫn (hình 3.15).



Hình 3.15. Lát cắt đứng dọc của tấm biểu mô sau 21 ngày nuôi cấy (Nuôi bằng mảnh biểu mô) (H.E.x1000)

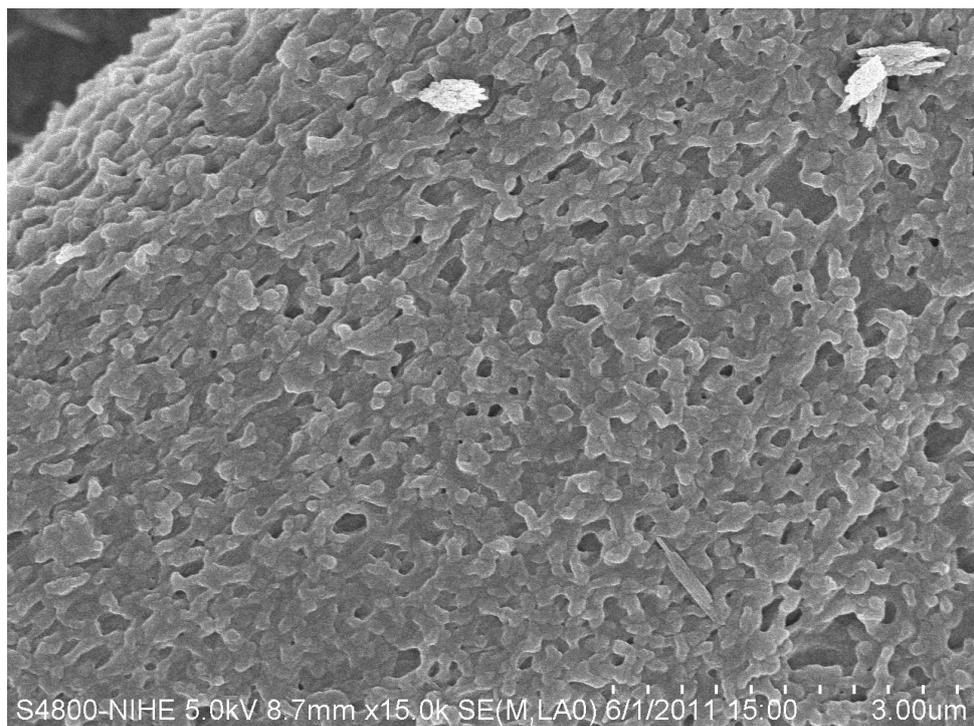
1. Màng ối 2. Tấm biểu mô

Khi quan sát trên bề mặt tấm biểu mô nuôi cấy vào ngày thứ 14 bằng phương pháp nhuộm giemsa: tấm biểu mô được phủ kín. Ở phương pháp mảnh biểu mô, khoảng gian bào hẹp và đều nhau trên toàn đáy lòng nuôi cấy, ngược lại với kết quả của phương pháp dịch treo có khoảng gian tế bào rộng hơn và có những khoảng gian tế bào với kích thước không đều nhau. Không thấy các tế bào hình thoi xen lẫn (hình 3.16).



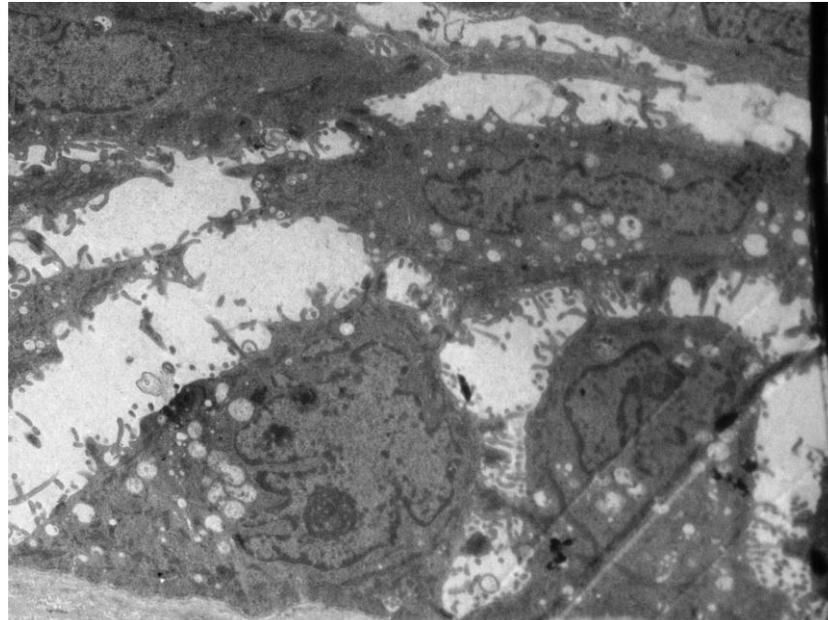
Hình 3.16. Sau nuôi cấy bằng mảnh biểu mô 14 ngày (giemsa x250)

Dưới kính hiển vi điện tử, bề mặt hàng tế bào trên cùng có nhiều vi nhung mao ngắn chia nhánh (hình 3.17).



Hình 3.17. Bề mặt tấm biểu mô nuôi cấy sau 14 ngày (SEM)

Dưới kính hiển vi điện tử truyền qua, khoảng gian bào giữa các tế bào lớp trên đáy khá rộng, các tế bào liên kết với nhau bởi các cầu bào tương (hình 3.18).

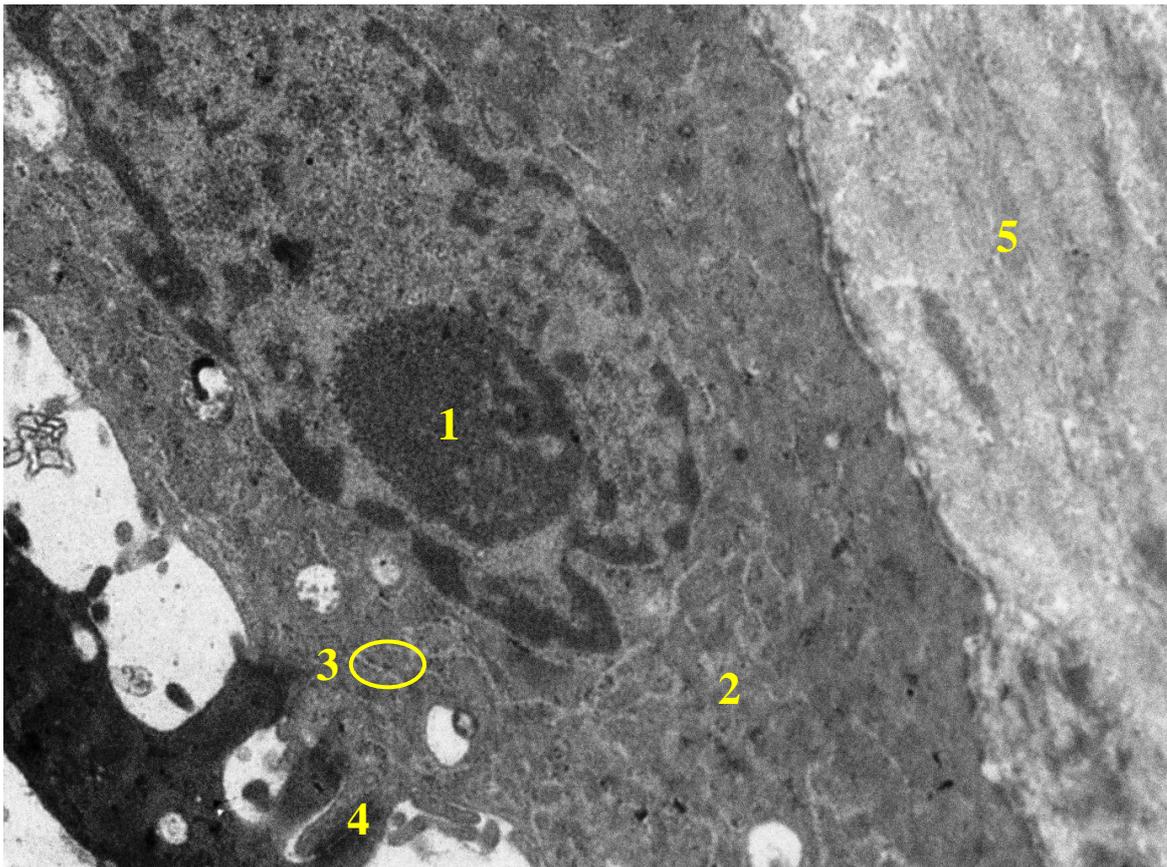


T18MM(371)-001
Print Mag: 2080x @ 51 mm
10:45:58 a 06/30/11
TEM Mode: Imaging

2 microns
HV=80.0kV
Direct Mag: 1000x
EMLab-NIHE

Hình 3.18. Ranh giới các tế bào biểu mô tám biểu mô nuôi cấy sau 14 ngày (TEM)

Các tế bào lớp đáy có nhân lớn, màng nhân có những lõm nông, hạt nhân rất lớn, chất nhiễm sắc phân tán, bào tương có lưới nội bào có hạt và ti thể phong phú, nhiều đám hạt glycogen. Các tế bào lớp đáy liên hệ chặt chẽ với các tế bào ở lớp trên đáy bởi các mống và thể liên kết còn với màng đáy bởi thể bán liên kết (hình 3.19).



T18MM (371)-008

Print Mag: 5970x @ 51 mm

1:02:22 a 07/01/11

TEM Mode: Imaging

2 microns

HV=80.0kV

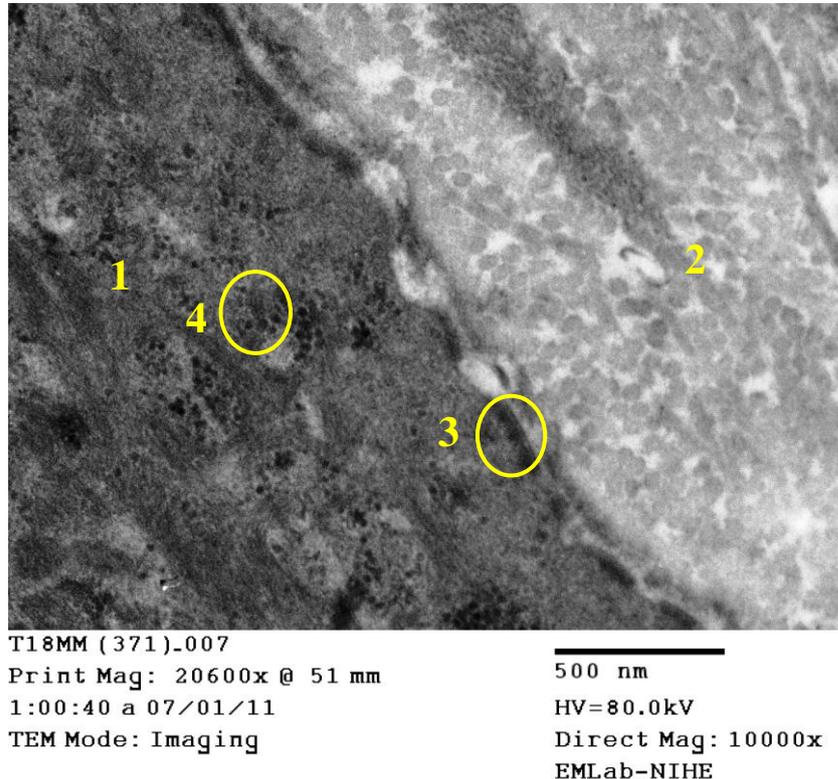
Direct Mag: 3000x

EMLab-NIHE

**Hình 3.19. Tế bào lớp đáy tằm biểu mô nuôi cấy thỏ sau nuôi cấy
14 ngày (TEM)**

1. Nhân tế bào 2. Ti thể 3. Lưới nội bào có hạt
4. Mạng liên kết 5. Màng ối

Bào tương các tế bào lớp đáy có nhiều đám hạt glycogen. Các tế bào lớp đáy liên hệ chặt chẽ với màng ối bởi thể bán liên kết (hình 3.20).



Hình 3.20. Mặt đáy tế bào biểu mô sát với màng ối sau nuôi cấy 14 ngày (TEM)

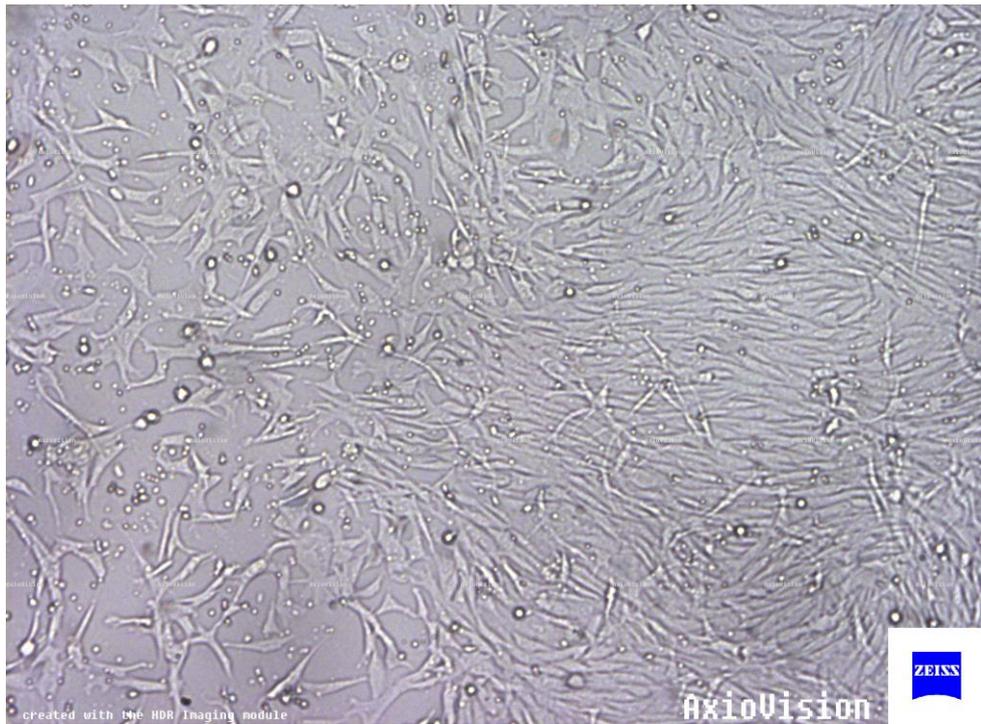
1. Tế bào biểu mô 2. Màng ối 3. Thể bán liên kết 4. Đám hạt glycogen

3.1.5. Hình thái và tốc độ phát triển của lớp nguyên bào sợi

3.1.5.1. Lớp 3T3

Lớp 3T3 sau khi chuẩn bị bằng mẫu 3T3 đã qua xử lí mitomycin các nguyên bào sợi bất hoạt này được nuôi trên đáy giếng nuôi cấy từ 1-3 ngày, sau 3 ngày nuôi cấy cho thấy hình ảnh nguyên bào sợi dài, phủ kín đáy giếng nuôi cấy (hình 3.21).

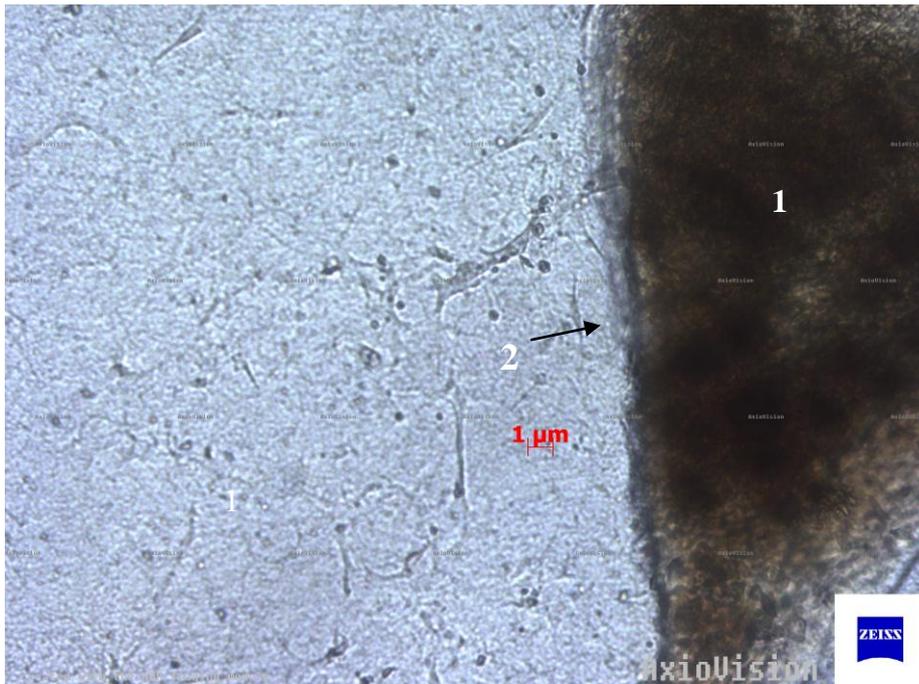
Các ngày sau đó, các tế bào thoái hóa dần, bong tróc khỏi nền giếng, vì vậy, sau 3 ngày sử dụng lớp 3T3 này phải thay mới.



Hình 3.21. Lớp 3T3 chuẩn bị cho nuôi cấy (hiển vi soi ngượcx250)

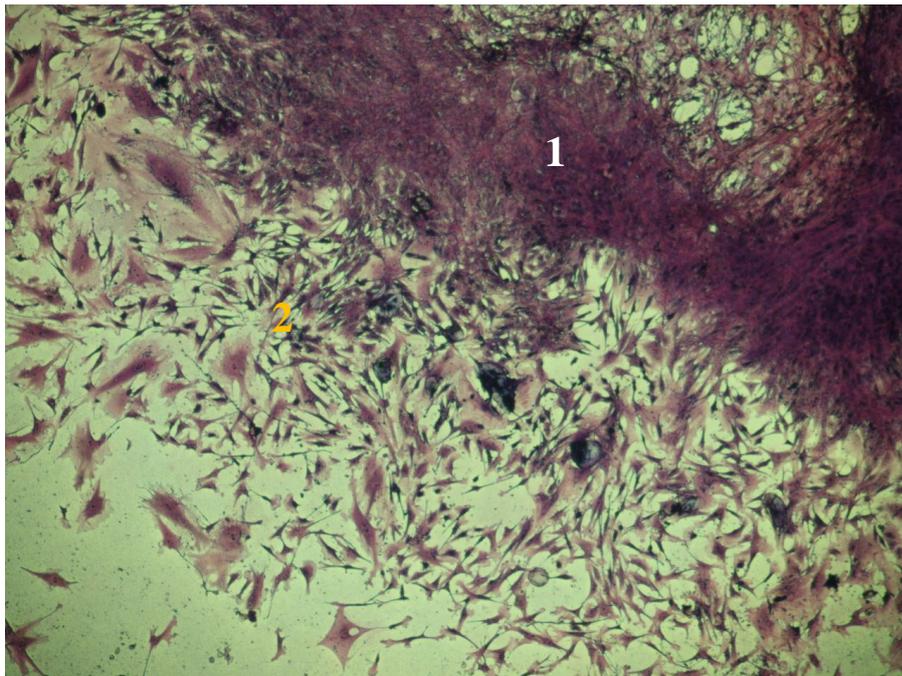
3.1.5.2. Lớp nguyên bào sợi tự thân

Các mảnh mô liên kết tách ra từ mảnh NMM được đồng nuôi cấy ở giếng nuôi cấy. Vào ngày thứ 3, 5 của quá trình nuôi cấy, các nguyên bào sợi có hình thoi dài, đa diện, nhiều nhánh bò lan ra xung quanh mảnh mô liên kết (hình 3.22, 3.23), chỉ ngày thứ 6, khoảng 1/2 diện tích của đáy giếng nuôi cấy đã được phủ bởi nguyên bào sợi và tới khoảng ngày thứ 10 thì toàn bộ đáy giếng được phủ kín (hình 3.24).



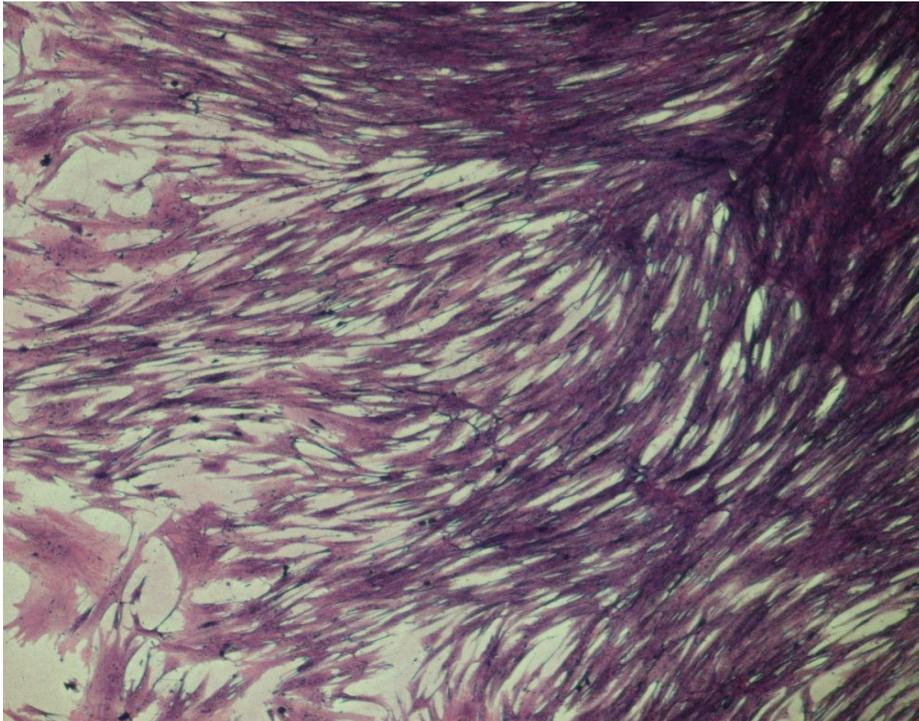
Hình 3.22. Sự phát triển của nguyên bào sợi đáy giếng nuôi cấy ngày 3 (hiển vi soi ngượcx250)

1. Mảnh mô đậm 2. Nguyên bào sợi



Hình 3.23. Sự phát triển của nguyên bào sợi đáy giếng nuôi cấy ngày 5 (giemsa x250)

1. Mảnh mô đậm 2. Nguyên bào sợi

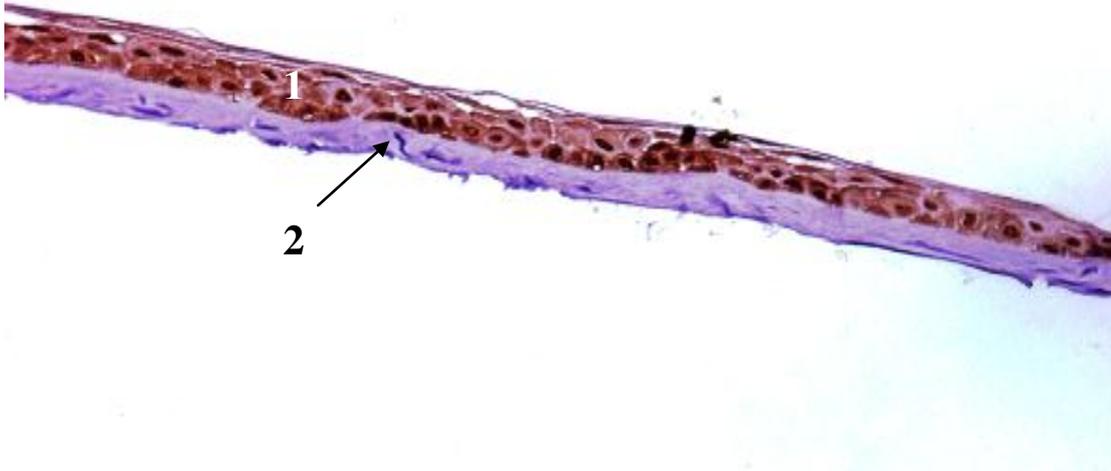


Hình 3.24. Sự phát triển của nguyên bào sợi đáy giếng nuôi cấy ngày 10 (hiển vi soi ngượcx250)

3.1.6. Kết quả định danh tế bào tấm biểu mô nuôi cấy bằng hóa mô miễn dịch

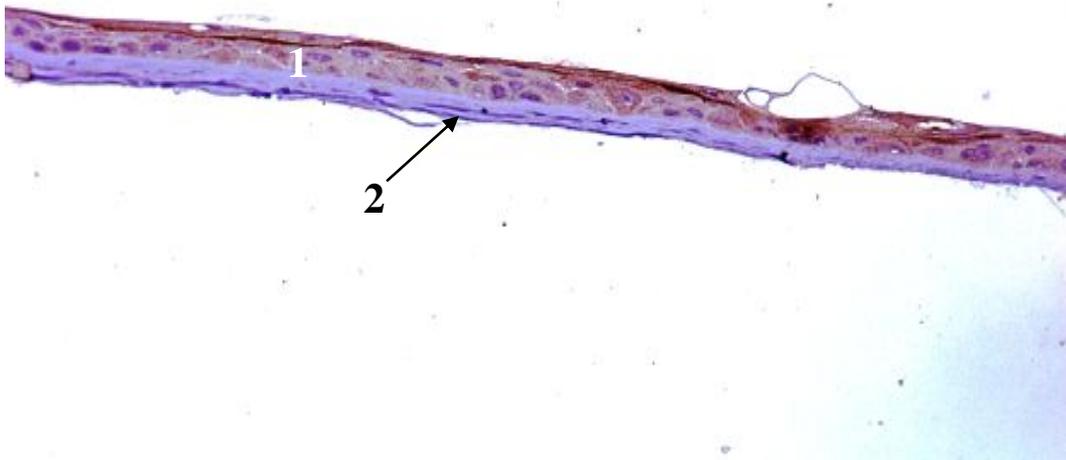
Trên các tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch phát hiện p63, nhân các tế bào của tấm biểu mô bắt màu nâu sẫm, đặc biệt là nhân các tế bào lớp đáy (hình 3.25).

Nhuộm phát hiện K3 và K12: K3 và K12 thể hiện yếu ở các tế bào lớp trên đáy (hình 3.26).



Hình 3.25. Tấm biểu mô nuôi cấy 18 ngày (p63x250)

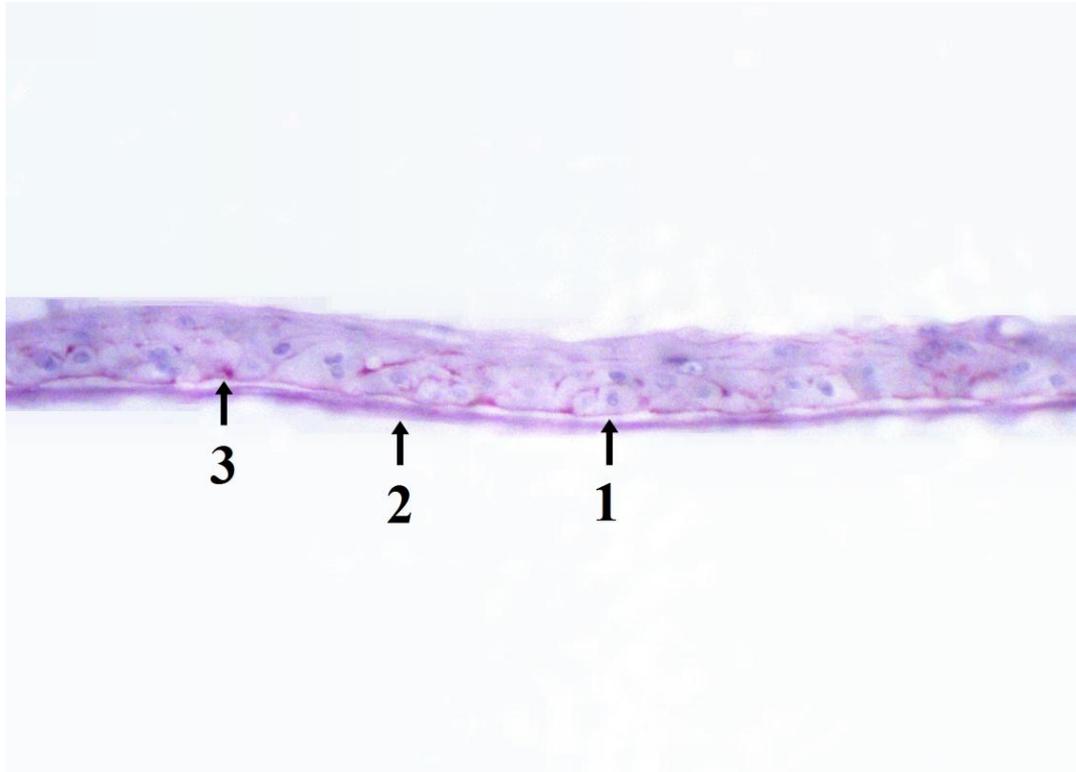
1. Biểu mô 2. Màng ối



Hình 3.26. Tấm biểu mô nuôi cấy 18 ngày (K3x250)

1. Biểu mô 2. Màng ối

Nhuộm P.A.S. để phát hiện glycogen và chất nhày: Trong bào tương các tế bào lớp dưới có ít glycogen. Không thấy các tế bào tiết nhày (hình 3.27).



Hình 3.27. Tấm biểu mô nuôi cấy 18 ngày (P.A.S.x500)

1. Biểu mô 2. Màng ối 3. Glycogen

3.1.7. Kết quả ghép tấm biểu mô NMM nuôi cấy cho thỏ gây bỏng thực nghiệm

Tổng số thỏ sống trong quá trình làm thực nghiệm là 21, trong đó 15 thỏ được ghép tấm biểu mô NMM nuôi cấy ở các thời điểm khác nhau.

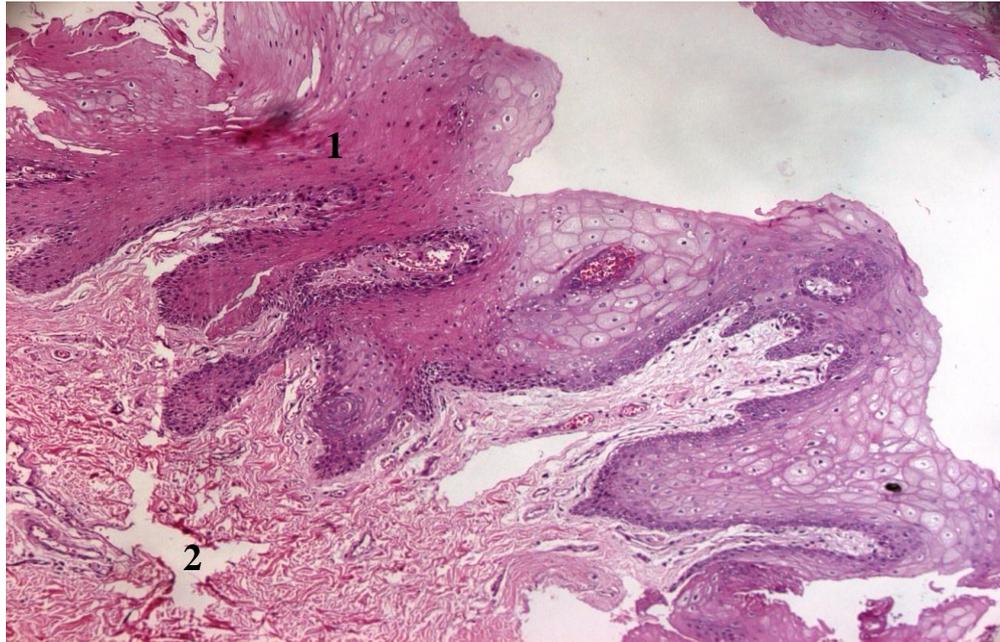
Các tiêu chí đánh giá bao gồm độ trong và áp của tấm biểu mô, sự toàn vẹn của bề mặt nhãn cầu và tân mạch giác mạc. Tiến hành giết thỏ theo từng lô ở từng thời điểm theo dõi và kiểm tra cấu trúc vi thể của giác mạc thỏ đã được ghép tấm biểu mô NMM nuôi cấy.

Tất cả các thỏ ở các lô đều có kết quả tốt: giác mạc trong, biểu mô liền tốt, nhãn bóng, không còn tân mạch. Chỉ có 1 thỏ có kết quả trung bình: tân mạch qua rìa vào chu biên ở thời điểm 60 ngày nhưng không vào đến trung tâm giác mạc.

3.2. Kết quả nuôi cấy tằm biểu mô NMM từ tế bào gốc NMM trên người

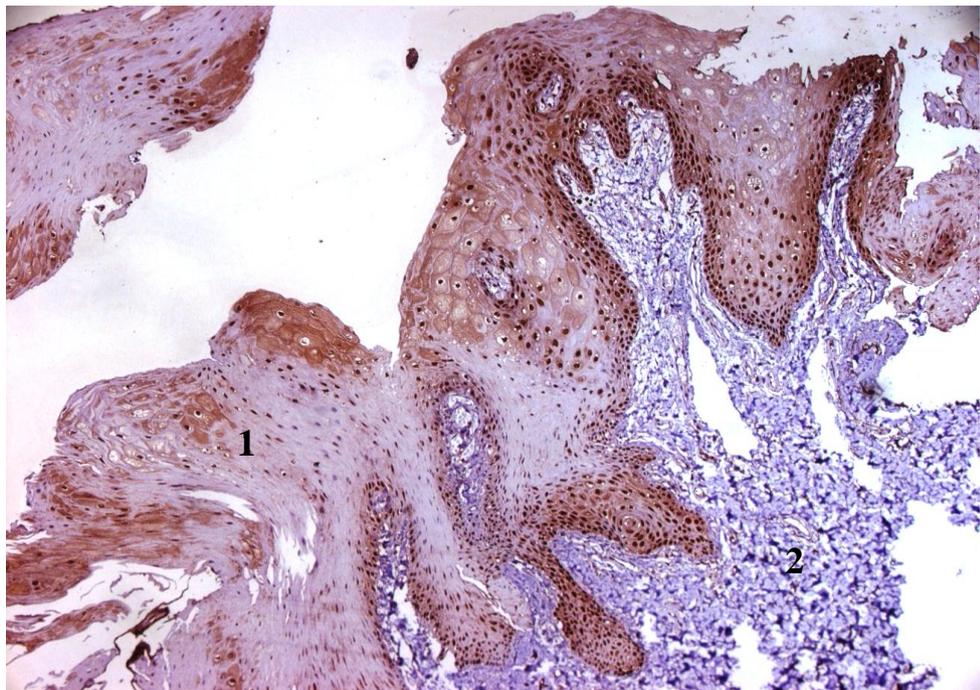
3.2.1. Lựa chọn vị trí sinh thiết và kích thước mảnh mô nuôi cấy

Dựa trên kết quả phân tích trên thỏ, chúng tôi lựa chọn vị trí sinh thiết trên người là mặt trong trung tâm niêm mạc má. Kết quả cho thấy biểu mô cũng gồm nhiều hàng tế bào (khoảng 10-15 hàng tế bào), nhưng không dày như niêm mạc vùng tương ứng của thỏ. Tuy vậy, lớp đáy dày và gồm khoảng 3-4 lớp gồm các tế bào có kích thước nhỏ, bào tương bắt màu base đậm, lớp Malpighi gồm nhiều hàng (7-10 hàng), gồm các tế bào hình đa diện, nhân hình cầu, kích thước tế bào lớp này lớn hơn của thỏ ở vị trí tương ứng, ranh giới giữa các tế bào khá rõ. Trên cùng là khoảng 2-3 hàng tế bào dẹt, chứa nhân dẹt (hình 3.28, 3.30). Trên tiêu bản nhuộm p63, nhân tế bào đặc biệt là ở lớp đáy bắt màu đậm. Các nhú chân bì cũng có kích thước lớn, chia nhánh rõ. Mô đệm lỏng lẻo, ít tế bào (hình 3.29, 3.31). Cấu trúc NMM vùng giữa má ở nam và nữ đều giống nhau.



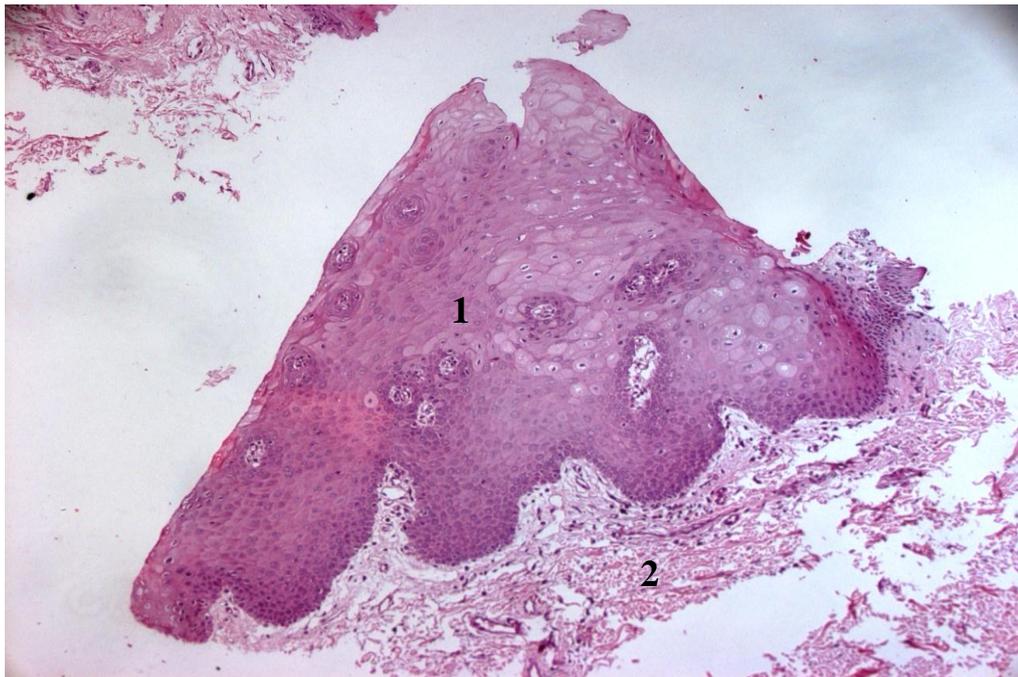
Hình 3.28. Niêm mạc vùng giữa má BN Phạm Ngọc T. (H.E.x500)

1. Biểu mô 2. Mô đệm



Hình 3.29. Niêm mạc vùng giữa má BN Phạm Ngọc T. (p63x500)

1. Biểu mô 2. Mô đệm



Hình 3.30. Niêm mạc vùng giữa má BN Võ Nữ Ngọc Y. (H.E.x500)

1. Biểu mô 2. Mô đệm



Hình 3.31. Niêm mạc vùng giữa má BN Võ Nữ Ngọc Y. (p63x500)

1. Biểu mô 2. Mô đệm 3. Nhân tế bào biểu mô

Dựa trên kết quả nghiên cứu thực nghiệm trên thỏ, sau khi cân nhắc về độ phức tạp của quy trình và kết quả thành công nuôi tạo của hai phương pháp dịch treo và mảnh biểu mô, cùng với kích thước trích thủ mảnh mô, phương pháp mảnh biểu mô đã được lựa chọn trong nghiên cứu ứng dụng trên người của chúng tôi. Kích thước mảnh mô được lựa chọn là đường kính 3mm, vị trí sinh thiết ở mặt trong vùng giữa má.

3.2.2. Lựa chọn môi trường nuôi cấy

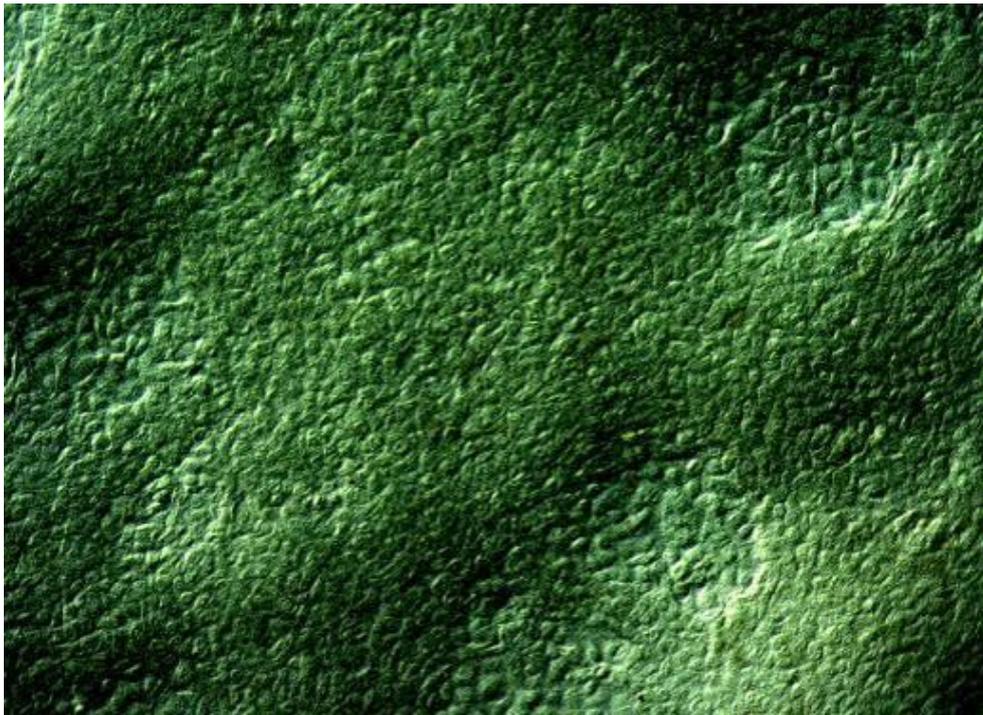
Dựa trên kết quả nghiên cứu thực nghiệm trên thỏ, chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy NMM của 17 BN (4 BN nuôi 2 lần) bằng môi trường SHEM2. Số tấm biểu mô nuôi tạo được là 54 trên tổng số 60 giếng nuôi cấy (tỷ lệ nuôi tạo thành công là 90%, 3 BN nuôi cấy không thành công). Số tấm biểu mô được ghép lại cho BN là 22.

3.2.3. Lựa chọn phương pháp nuôi cấy

Dựa trên kết quả nuôi cấy trên thỏ, chúng tôi lựa chọn phương pháp nuôi cấy là mảnh biểu mô, kết quả cho tỷ lệ nuôi tạo thành công tấm biểu mô là 54 tấm trên tổng số 60 giếng nuôi cấy (tỷ lệ là 90%).

3.2.4. Hình thái và tốc độ phát triển của tấm biểu mô

- Thời gian nuôi cấy các tế bào biểu mô là 16-28 ngày. Trên kính hiển vi soi ngược, tấm biểu mô nuôi cấy ở thời điểm thu hoạch phẳng, các tế bào biểu mô có hình đa diện nằm sát nhau (hình 3.32). Trên tiêu bản nhuộm HE, tấm biểu mô nuôi cấy có khoảng 4-5 hàng tế bào, hàng tế bào trên cùng dẹt và có nhân dẹt (hình 3.33).



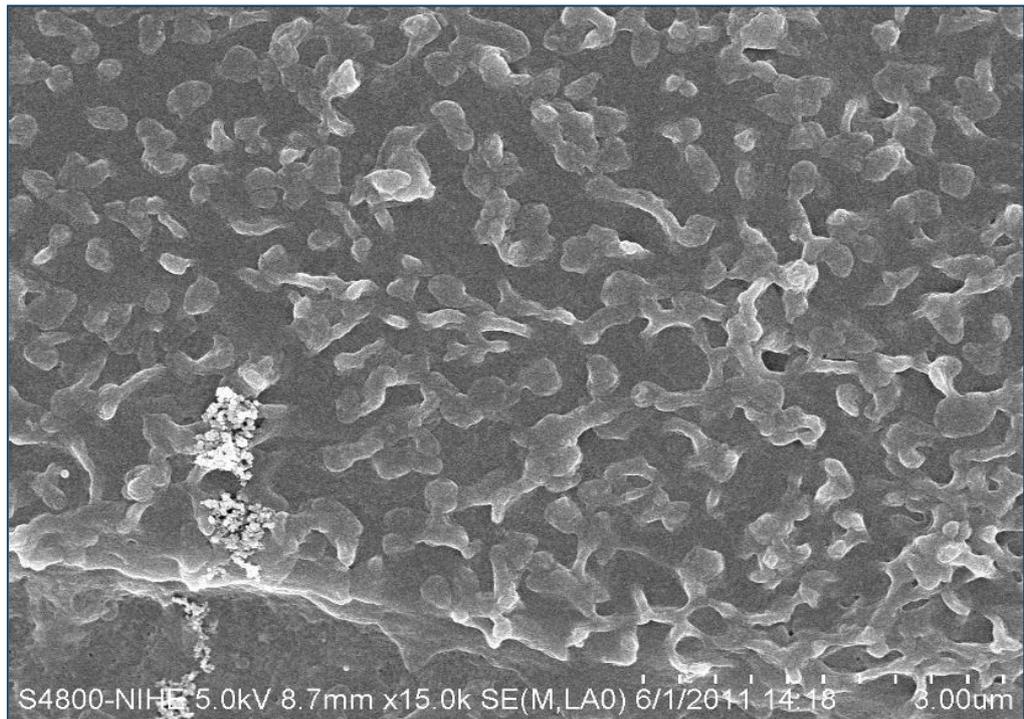
**Hình 3.32. Tấm biểu mô NMM của BN Nguyễn Hữu C. 14 tuổi.
(KHV soi ngược x 250)**



**Hình 3.33. Tấm biểu mô NMM của BN Phạm Ngọc T. 24 tuổi.
(H.E.x500)**

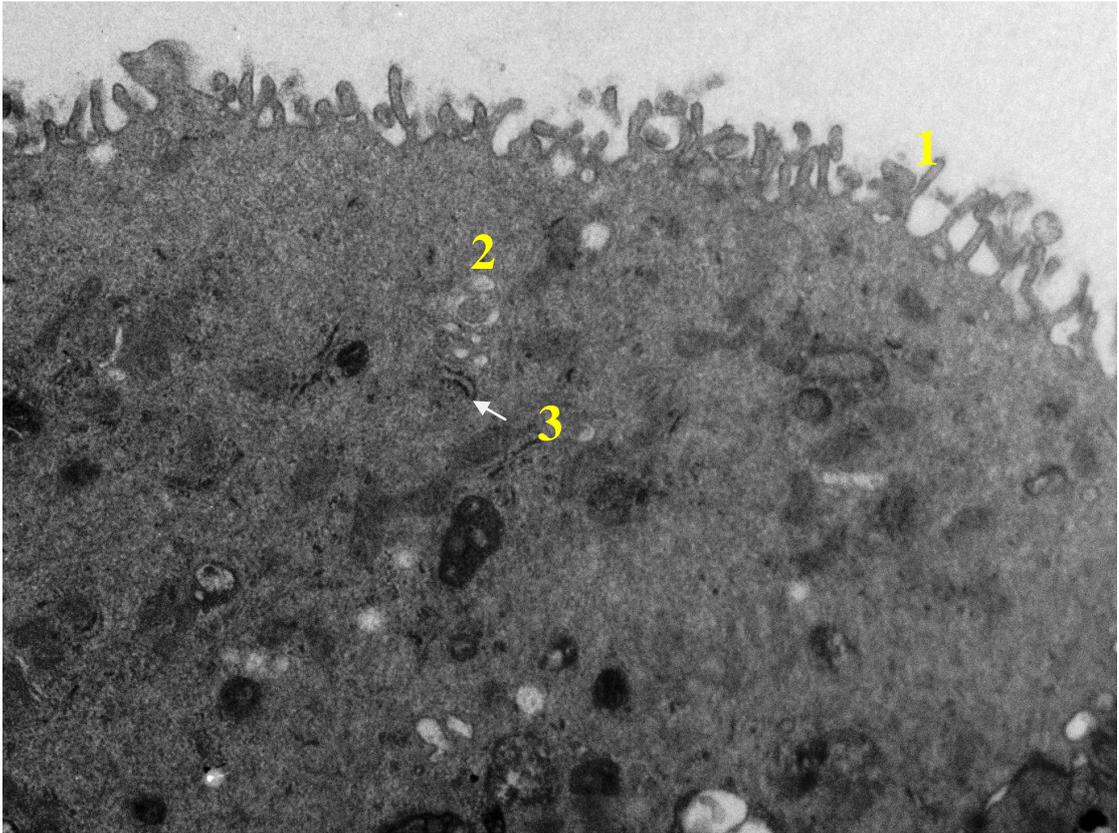
1. Biểu mô 2. Màng ối

Trên hình ảnh siêu vi, bề mặt tế bào hàng trên cùng của tấm biểu mô nuôi cấy có những vi nhung mao ngắn và chia nhánh, giống với hình ảnh của tế bào bề mặt ở giác mạc người bình thường. Song chúng tôi nhận thấy, kích thước của các vi nhung mao ở đây lớn hơn, và số lượng vi nhung mao ít hơn so với tấm biểu mô nuôi cấy ở thỏ (hình 3.34).



Hình 3.34. Bề mặt tế bào biểu mô nuôi cấy BN Nguyễn Văn L. (SEM)

Dưới kính hiển vi điện tử truyền qua, trên bề mặt tế bào lớp trên cùng thấy rõ các vi nhung mao ngắn, bào tương có nhiều ti thể dài, mào rõ, chất nền sẫm màu và lưới nội bào có hạt phát triển mạnh, lưới nội bào có lòng hẹp và ít ribosom bám ngoài, khoảng gian bào rất hẹp (hình 3.35, 3.36)



Phuong-374.001

Print Mag: 5330x @ 51 mm

1:45:59 a 07/01/11

TEM Mode: Imaging

2 microns

HV=80.0kV

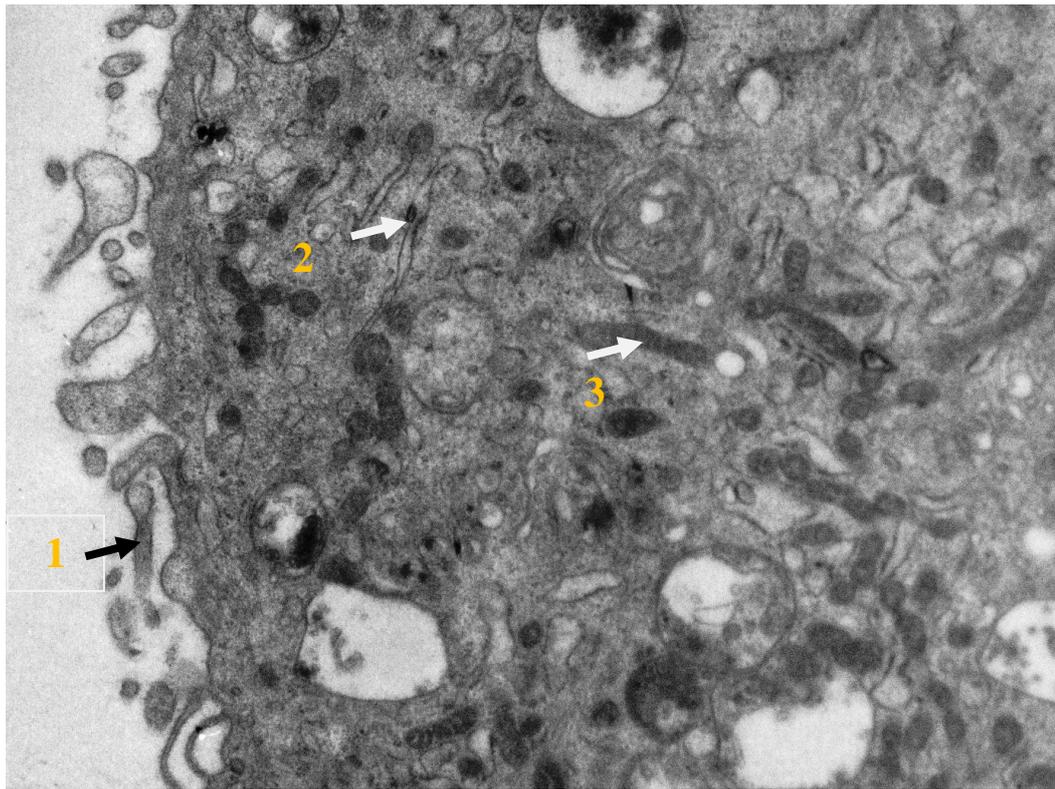
Direct Mag: 2500x

EMLab-NIHE

Hình 3.35. Tế bào lớp bề mặt tấm biểu mô nuôi cấy BN Trần Thị Thúy P.

(TEM)

1. Vi nhung mao 2. Ranh giới giữa hai tế bào 3. Lưới nội bào có hạt



Lap1-373-007

Print Mag: 5970x @ 51 mm

11:30:26 p 06/30/11

TEM Mode: Imaging

2 microns

HV=80.0kV

Direct Mag: 3000x

EMLab-NIHE

Hình 3.36. Cấu trúc tế bào bề mặt tấm biểu mô nuôi cấy BN Nguyễn

Văn L. (TEM)

1. Vi nhung mao 2. Lưới nội bào 3. Ti thể

Ở lớp trên của tấm biểu mô nuôi cấy, tế bào của tấm biểu mô liên kết với nhau bằng các cầu bào tương dài (dài hơn so với cầu bào tương khi nuôi cấy trên thỏ thực nghiệm) (hình 3.38) và các thể liên kết (hình 3.37), trong bào tương tế bào có nhiều lưới nội bào có hạt, ti thể, hạt glycogen (hình 3.38, 3.39), bộ Golgi nằm gần nhân với các túi dẹt và không bào, ranh giới giữa các tế bào rộng, tuy nhiên hẹp hơn so với khoảng gian bào của tấm biểu mô khi nuôi cấy trên thỏ (hình 3.39).



Lap1-373-001

Print Mag: 24100x @ 51 mm

12:16:29 p 06/30/11

TEM Mode: Imaging

500 nm

HV=80.0kV

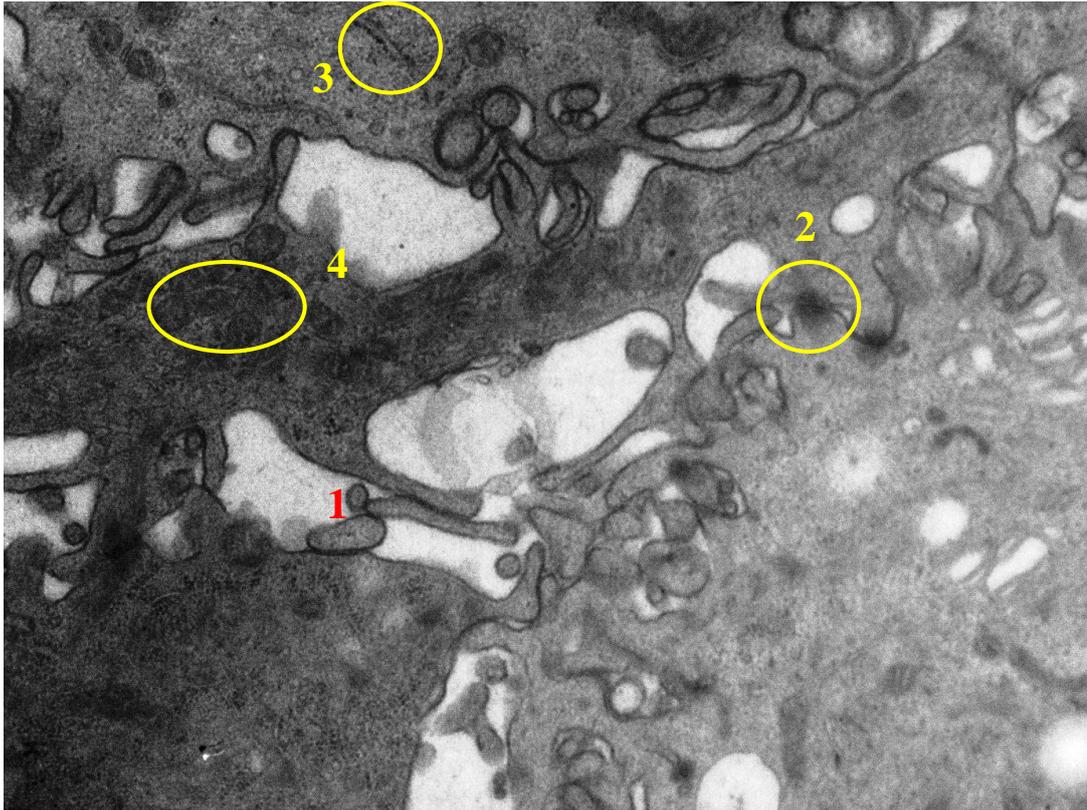
Direct Mag: 12000x

EMLab-NIHE

Hình 3.37. Ranh giới giữa các tế bào biểu mô nuôi cấy

BN Nguyễn Văn L. (TEM)

1. Thể liên kết 2. Khoảng gian bào



Phuong-374.006

Print Mag: 8210x @ 51 mm

1:54:30 a 07/01/11

TEM Mode: Imaging

500 nm

HV=80.0kV

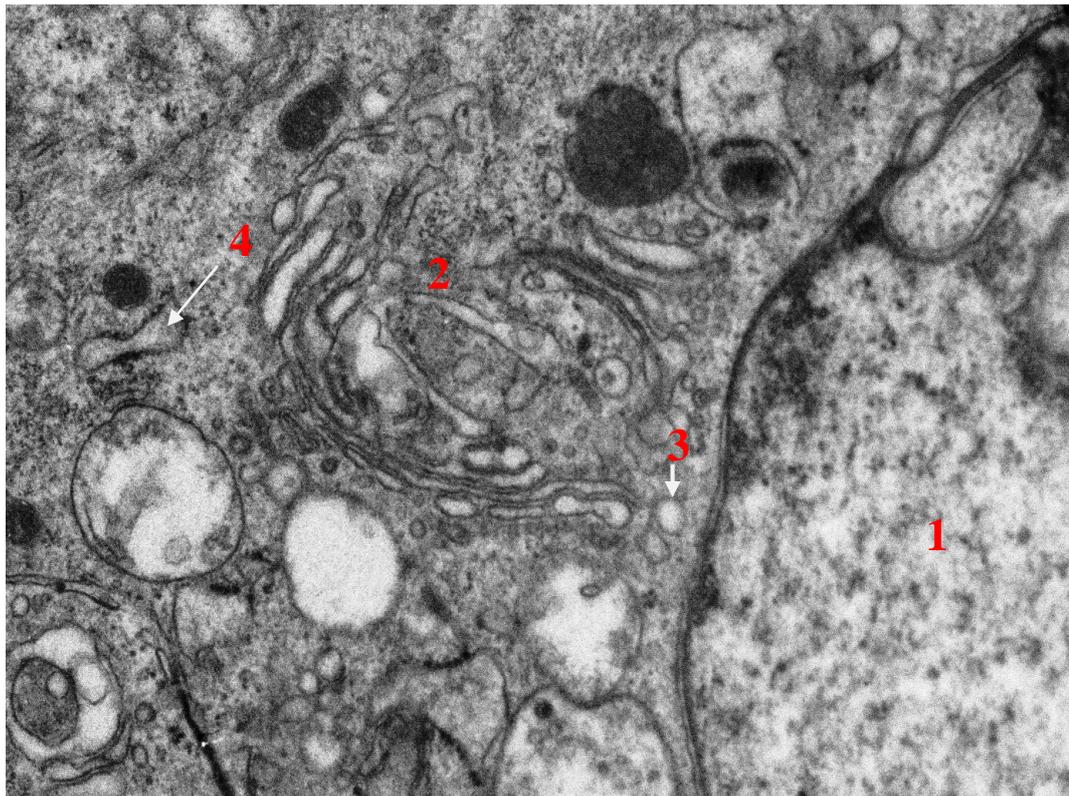
Direct Mag: 4000x

EMLab-NIHE

Hình 3.38. Ranh giới giữa hai tế bào tấm biểu mô nuôi cấy

BN Nguyễn Thị P. (TEM)

1. Cầu bào tương 2. Thể liên kết 3. Lưới nội bào có hạt 4. Ti thể



Lap1-373-004

Print Mag: 12600x @ 51 mm

12:19:21 p 06/30/11

TEM Mode: Imaging

500 nm

HV=80.0kV

Direct Mag: 6000x

EMLab-NIHE

**Hình 3.39. Tế bào lớp đáy của tấm biểu mô NMM nuôi cấy
BN Lê Văn L. (TEM)**

1. Nhân tế bào 2. Bộ Golgi 3. Không bào 4. Lưới nội bào

3.1.5. Kết quả định danh tế bào tấm biểu mô nuôi cấy bằng hóa mô miễn dịch

Trên các tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch phát hiện p63, nhận các tế bào của tấm biểu mô bắt màu nâu sẫm, đặc biệt là nhận các tế bào lớp đáy (hình 3.40).

Nhuộm phát hiện K3: K3 thể hiện yếu ở các tế bào lớp đáy và thể hiện rõ ở các tế bào lớp trên (hình 3.41).



**Hình 3.40. Tấm biểu mô NMM nuôi cấy của BN Hoàng Tiến D.
(p63x500)**

1. Biểu mô 2. Màng ối



**Hình 3.41. Tấm biểu mô NMM nuôi cấy của BN Nguyễn Văn N.
(K3x1000)**

1. Biểu mô 2. Màng ối

3.1.6. Kết quả ghép tâm biểu mô NMM nuôi cấy

Đánh giá kết quả phẫu thuật dựa trên 3 yếu tố: độ trong và áp của tâm biểu mô, tình trạng biểu mô bề mặt nhãn cầu, tăng sinh tân mạch nông, sâu hoặc tổ chức xơ trên giác mạc.

Phẫu thuật ghép thành công ở 12 ca. Trong đó 9 ca có thị lực cải thiện, chúng tôi nhận thấy ở các BN này có sự cải thiện rõ rệt về thị lực nhìn gần, trong khoảng 10–30 cm. Đặc biệt 3 BN loạn dưỡng giác mạc (ở 6 ca phẫu thuật) và 1 BN bỏng (BN số 5) đã có thể đọc, viết và soạn tin nhắn qua điện thoại, đọc được sách ở cỡ chữ bình thường, không phóng to, tuy nhiên phải dùng ở khoảng cách rất gần.

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. Về lựa chọn nền nuôi cấy

Nền nuôi cấy đóng vai trò quan trọng trong nghiên cứu nuôi cấy tế bào. Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng giá đỡ là màng ối đã nạo sạch biểu mô theo quy trình chuẩn của bộ môn Mô-Phôi, Trường Đại học Y Hà Nội.

Hiện nay, các tác giả trên thế giới chưa thống nhất được cách sử dụng màng ối làm nền nuôi cấy và kể cả cách xử lý loại bỏ biểu mô màng ối. Tuy nhiên, việc sử dụng màng ối đã loại bỏ biểu mô là xu hướng được sử dụng rộng rãi hơn do: (1) hiệu quả nuôi cấy cao, (2) đối với biểu mô, màng đáy không chỉ là giá đỡ đơn thuần về mặt cơ học, mà các protein ở màng đáy đóng vai trò quan trọng trong sự tăng sinh, biệt hóa, tạo hình và ngăn cản sự chết theo chương trình cho các tế bào biểu mô. Ở màng ối, các protein collagen type IV, V, fibronectin, laminin 1, laminin 5 đóng vai trò quyết định trong sự biệt hóa và tăng sinh của tế bào biểu mô [50].

Muốn tế bào biểu mô nuôi cấy có thể tiếp xúc trực tiếp với màng ối thì bước quan trọng là phải loại bỏ toàn bộ biểu mô màng ối [94],[95],[96].

Hiện nay trên thế giới có 3 cách chính để loại bỏ biểu mô màng ối khỏi mô nền, đó là: (1) sử dụng EDTA là một chất hóa học có khả năng gấp các ion hóa trị II, các ion này là thành phần không thể thiếu trong các môi liên kết giữa các tế bào, (2) sử dụng dispase là enzyme tiêu hủy các thành phần ngoại bào, đặc biệt là các thành phần màng đáy như collagen VI, fibronectin và laminin để giải phóng các tế bào biểu mô, (3) sử dụng ammonia 10%. Sau

đó, biện pháp cơ học tiếp tục được sử dụng để nạo bỏ tế bào biểu mô đã suy yếu.

Gần đây, Hopkinson đã đề xuất phương pháp loại bỏ biểu mô màng ối mới bằng việc ngâm màng ối trong thermolysin 125 μ g/ml, kết quả cho thấy bằng phương pháp này, phần màng ối đã loại bỏ biểu mô không bị ảnh hưởng tới cấu trúc phân tử, và cấu trúc hình thái của màng đáy như khi sử dụng EDTA và Dispase [97].

Khi so sánh chất lượng của tấm biểu mô vùng rìa nuôi cấy bằng phương pháp dịch treo trên nền màng ối nạo bỏ sạch biểu mô và nuôi cấy trên nền màng ối còn nguyên vẹn, Kozumi N. và CS. (2007) thấy: tấm biểu mô nuôi trên nền màng ối loại đã loại bỏ biểu mô có khả năng tạo tầng và biệt hóa tốt hơn, các tế bào gắn chặt với màng đáy, khoảng gian bào giữa các tế bào hẹp hơn, số lượng các mối liên kết giữa các tế bào biểu mô nhiều hơn. Ngược lại, khi nuôi cấy trên nền màng ối còn nguyên cả biểu mô, khả năng tạo tầng kém, nhiều vùng chỉ tạo được lớp đơn tế bào, ít mối liên kết giữa tế bào-tế bào, tế bào-màng đáy, khoảng gian các tế bào khá rộng [98].

Trong các nghiên cứu nuôi tạo tấm biểu mô giác mạc từ tế bào gốc vùng rìa giác mạc và biểu mô kết mạc của chúng tôi cũng cho thấy việc sử dụng màng ối đã nạo bỏ biểu mô thực sự có hiệu quả [99],[100].

Bên cạnh đó, nhiều nghiên cứu lại khẳng định sự ưu việt của màng ối để nguyên biểu mô khi nuôi cấy tế bào biểu mô, vì màng ối để nguyên biểu mô cung cấp vi môi trường thuận lợi cho sự phát triển của tế bào gốc [101], [102],[103]. Fukuda K. (1999) cho rằng biểu mô màng ối có chứa những yếu tố tăng trưởng, yếu tố phát triển biểu bì EGF, yếu tố phát triển giác mạc bào

KGF (Keratinocyte growth factor), yếu tố phát triển thần kinh NGF (Nerve growth factor). Chính những yếu tố này sẽ giúp tế bào biểu mô phát triển và phân chia. Màng ối có khả năng duy trì tính gốc của tế bào biểu mô [50].

Việc có nên sử dụng màng ối trong quá trình nuôi cấy tằm biểu mô hay không cũng được nhiều tác giả quan tâm. Nếu không sử dụng màng ối, bề mặt giác mạc sau ghép sẽ trong hơn so với nhóm có sử dụng màng ối làm nền nuôi cấy. Higa K. và CS. (2012) theo dõi bệnh nhân được ghép tằm biểu mô NMM nuôi cấy trên màng fibrin (nhóm 1) và màng ối (nhóm 2) thấy những bệnh nhân ở nhóm 1 cải thiện thị lực tốt hơn và giảm hiện tượng tân mạch tăng sinh [20]. Điều này được giải thích là do tằm biểu mô không giá đỡ khi ghép sẽ tiếp xúc trực tiếp với chất nền ở giác mạc, tế bào biểu mô cấy ghép liên hệ trực tiếp với giác mạc bào mà không bị ngăn cản bởi màng ối. Kết quả này cũng được Hayashida Y. và CS. (2005) minh chứng [73].

Tác giả Kocaba V. và CS. (2014) không sử dụng màng ối và cũng không sử dụng màng fibrin, mà tác giả này sử dụng màng polymer nhạy cảm nhiệt, theo tác giả này việc sử dụng màng polymer nhạy cảm nhiệt thực sự có hiệu quả khi đánh giá hiệu quả lâm sàng, lý giải đó là do khi thu hoạch tằm biểu mô nuôi cấy phục vụ cho cấy ghép không cần phải sử dụng enzyme để tách tằm biểu mô khỏi giếng nuôi cấy, việc không sử dụng enzyme trong khâu thu hoạch thực sự có lợi vì không làm hủy hoại các protein của màng đáy và các protein tương tác giữa các tế bào với nhau [24]. Có rất nhiều tác giả sử dụng giá đỡ này trong nghiên cứu nuôi cấy tằm biểu mô như Nishida K. và CS. (2004) [58], Hori Y. và CS. (2007) [70], Hori Y. và CS. 2008 [69], Oie Y. và CS. (2010) [71], Hayashida Y. và CS. (2005) [73].

Tế bào biểu mô NMM có khả năng tiết ra các yếu tố tăng sinh mạch nên gây ra sự xâm nhập của mô liên kết vào mảnh ghép, tuy nhiên giác mạc bào lại sản sinh ra yếu tố chống lại sự hình thành tân mạch như thrombospondin, vì vậy, nếu không có nền màng ối thì sự hình thành tân mạch sẽ giảm đi.

Lợi thế của tấm biểu mô không giá đỡ (giá fibrin hoặc màng nhạy cảm nhiệt) trong ghép là không cần khâu hay dùng hồ fibrin để dính tấm biểu mô lên mô nền giác mạc, song cơ chế cho vấn đề này vẫn cần được sáng tỏ. Nishida K. và CS. (2004) cho rằng cơ chế chính của hiện tượng này là chất nền nguyên vẹn và các phân tử kết dính [58]. Higa K. cũng đã khẳng định sự có mặt của phân tử kết dính intergrin $\beta 1$ ở tấm biểu mô nuôi trên fibrin đó là yếu tố có thể giúp cho tấm biểu mô tồn tại tốt trên bề mặt nhãn cầu [57].

Ngược lại, khi sử dụng màng ối làm nền nuôi cấy khi ghép cần phải khâu nên có thể gây ra hiện tượng phát triển của các tế bào biểu mô ở mặt dưới của màng ối, điều này phải khắc phục bằng sử dụng keo fibrin [104].

Nghiên cứu của Higa K. tiến hành trên mô hình thỏ bị nạo bỏ biểu mô giác mạc và vùng rìa, nhưng không gây thương tổn gì mô đệm, vì vậy, kết quả ghép tấm biểu mô nuôi cấy trên nền fibrin cho kết quả tốt [57]. Kocaba V. và CS. (2014) khi ghép tấm biểu mô NMM nuôi cấy trên nền màng polymer nhạy cảm nhiệt cho bệnh nhân nhận thấy: sau khi ghép 12 tháng, thị lực của 9 BN không cải thiện nhưng không thấy xuất hiện tân mạch trong mô nền giác mạc, tác giả cho rằng thị lực của bệnh nhân không cải thiện là do mô nền giác mạc vốn đã đục trước ghép [24].

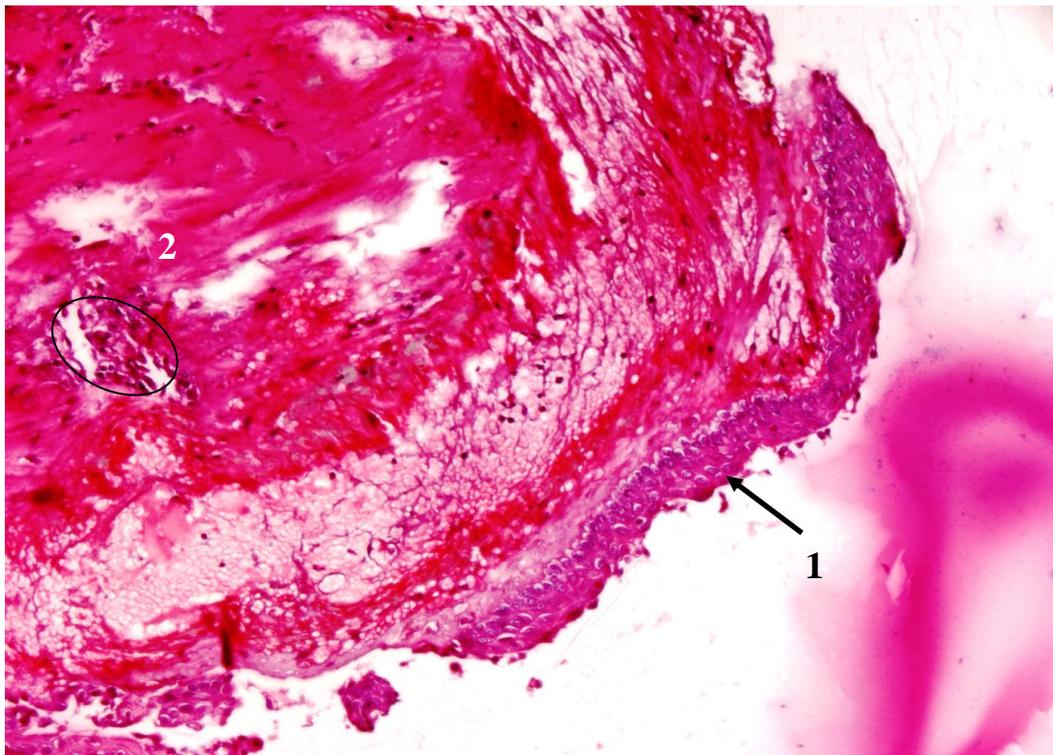
Trên thực tế, ở những bệnh nhân bị tổn thương bị tổn thương bề mặt nhãn cầu do bỏng thường mô nền giác mạc tổn thương nặng nề. Đối với các bệnh nhân này, việc ghép tấm biểu mô NMM nuôi cấy trên nền màng ối là rất có lợi vì tận dụng được rất nhiều đặc tính quý báu của màng ối đó là màng vô mạch, đặc tính vật lý tốt, có đặc tính ức chế tăng sinh mạch và chống viêm, có các yếu tố phát triển và các đặc tính chống hình thành tổ chức liên kết và giàu thành phần màng đáy [105],[106].

Kocaba V. và CS. (2014) mặc dù khẳng định ưu việt của màng polymer nhạy cảm nhiệt, song lại có những kết luận minh chứng cho việc sử dụng màng ối làm nền nuôi cấy là phù hợp, đó là tác giả không thấy sự tái tạo trở lại của màng Bowman do bị hủy trước khi ghép khi sử dụng màng polymer làm nền nuôi cấy, vì thế sự tồn tại của màng ối như một hàng rào ngăn lớp biểu mô và mô nền tỏ ra là lợi thế hơn về mặt sinh lý [24].

Sudha B. và CS. (2009) nhận thấy màng ối điều khiển sự sống và sự phân chia tế bào gốc biểu mô vùng rìa trong ống nghiệm [107]. Đặc tính gốc của tế bào gốc biểu mô vùng rìa được bảo tồn khi nuôi cấy trong ống nghiệm [108],[109]. Hơn thế, nhiều tế bào lưu giữ BrdU hơn và ít tế bào lưu giữ Ki67 hơn khi nuôi cấy ở tấm biểu mô nuôi trên màng ối so với tấm biểu mô nuôi không có màng ối [57].

Như vậy, các nghiên cứu đều cho thấy màng ối ảnh hưởng tới sự biệt hóa và duy trì tính gốc của tế bào. Trong nghiên cứu của chúng tôi, BN Võ Vũ Ngọc Y. (31 tuổi) sau ghép tấm biểu mô NMM nuôi cấy thay thế cho giác mạc ở thời điểm 12 tháng, do xơ mạch tăng sinh phải ghép lại lần 2, trong tổ chức cắt gọt của giác mạc thấy tồn tại tồn tại tấm biểu mô NMM được ghép trước đó. Tuy nhiên, chúng tôi thấy xuất hiện tổ chức xơ mạch ở giữa tấm

biểu mô và nhu mô giác mạc phía dưới (hình 4.1), điều này được giải thích có thể trong thời gian hậu phẫu, tấm biểu mô không áp chặt vào nền giác mạc nên dễ bị tổ chức xơ mạch xâm lấn từ phía ngoài vào trung tâm ở phía dưới của tấm biểu mô. Một trong những nguyên nhân của hiện tượng này là do chất lượng tấm biểu mô nuôi cấy (mức độ dai, tách dễ dàng khỏi đáy giếng nuôi cấy).



Hình 4.1. Mảnh mô gọt sau ghép 12 tháng của BN Võ Vũ Ngọc Y. (31 tuổi) (H.E.x250)

1. Biểu mô NMM 2. Tổ chức xơ mạch

4.2. Về vị trí và kích thước của mảnh NMM dùng cho nuôi cấy

Thành công của quy trình nuôi tạo tấm biểu mô phụ thuộc nhiều vào chất lượng của mẫu mô nuôi cấy ban đầu. Do đó, lựa chọn được vị trí trích thủ để thu được mảnh mô có nhiều tế bào gốc là một bước quan trọng. Việc

xác định nơi cư trú của tế bào gốc biểu mô NMM gặp nhiều khó khăn vì không có một đặc điểm hình thái, giải phẫu đặc thù nào có thể nhận diện được [110],[111].

Khi nghiên cứu cấu trúc vi thể NMM thỏ chúng tôi thấy: trong khi biểu mô ở niêm mạc vùng mặt trong niêm mạc má, cách góc miệng 2mm và vùng môi mỏng không thấy có nhú chân bì thì niêm mạc vùng trung tâm má thỏ có lớp biểu mô khá dày, đường ranh giới với mô liên kết bên dưới có các nhú cao. Khoảng 2-3 hàng tế bào sát đáy có kích thước nhỏ, nhân lớn, biểu hiện dương tính với marker p63, trong đó có những tế bào có biểu hiện dương tính mạnh. P63 là một protein có mặt trong nhân của các tế bào chưa biệt hóa. Đặc tính biểu hiện dương tính ở mức độ cao với p63 và tỷ lệ nhân/bào tương lớn là 2 yếu tố được xem là các dấu hiệu nhận diện tế bào gốc biểu mô NMM [67],[73]. Ở BN, chúng tôi cũng đã nhuộm hóa mô miễn dịch p63 mảnh NMM, kết quả tương tự của thỏ, đặc biệt ở người các nhú chân bì cao và chia nhánh. Như vậy, mảnh mô niêm mạc ở vùng giữa má có những đặc điểm thích hợp dùng để nuôi cấy vì khả năng thu được tế bào gốc ở vùng này cao hơn so với các vùng khác nếu xét trên cùng một diện tích miếng mô trích thủ. Kết quả của chúng tôi phù hợp với nhiều công bố trên thế giới [67],[110],[70],[63],[112],[14],[73].

Về kích thước mảnh mô trích thủ: Với mỗi đối tượng nghiên cứu, cần phải nuôi tạo hai tấm biểu mô, trong đó một tấm sử dụng cho ghép tự thân, một tấm còn lại để kiểm tra cấu trúc. Qua nghiên cứu, chúng tôi thấy khi nuôi cấy bằng dịch treo, mật độ tế bào nuôi cấy là 1×10^6 /ml, để có 2ml dịch treo cần mảnh niêm mạc có đường kính 8mm. Trong tổng quan của chúng tôi thấy nhiều tác giả khi sử dụng phương pháp nuôi cấy bằng dịch treo có kích thước

mảnh mô trích thủ nhỏ hơn, song các tác giả này chỉ nuôi 01 giếng nuôi cấy, Nishida K. và CS. (2004) trích thủ mảnh mô đường kính 3mm [11], Ma D. H. và CS. (2009) trích thủ mảnh mô với đường kính 6x6mm [14].

Trong phương pháp nuôi bằng mảnh mô, chúng tôi phải trích thủ mảnh NMM có đường kính 6mm để cắt nhỏ thành 6 mảnh có kích thước 1x1mm dùng để nuôi cấy. Đối với phương pháp mảnh biểu mô, các mẫu NMM được cắt thành các mảnh có kích thước 0,5x0,5mm, và mảnh NMM trích thủ chỉ cần có đường kính là 3mm. Việc lấy mảnh NMM nhỏ sẽ làm giảm đau đớn cho BN và vết thương sau trích thủ mau lành hơn. Kích thước 3mm của mảnh NMM cũng là kích thước nhỏ nhất mà một số tác giả đã thông báo [99],[113]. Ở phương pháp nuôi cấy dùng mảnh biểu mô, do mảnh biểu mô được tách khỏi mô liên kết trước khi nuôi cấy nên diện tiếp xúc của các tế bào gốc lớp đáy được tối đa bộc lộ, với cách nuôi cấy này còn loại được hoàn toàn nguyên bào sợi khỏi tấm biểu mô nuôi cấy giúp tấm phẳng đẹp, còn ở phương pháp mảnh mô thì ngược lại.

4.3. Về môi trường nuôi cấy

Ở giai đoạn đầu nghiên cứu chúng tôi sử dụng môi trường SHEM1, là môi trường được pha từ DMEM và Ham's F12 tỉ lệ 1:1 có bổ sung thêm FBS, EGF, kháng sinh, kháng nấm. Chúng tôi đã nuôi 18 mẫu, kết quả chỉ có 6 mẫu mọc, tất cả các mẫu đều không kín đáy lồng sau 28 ngày nuôi cấy, tốc độ mọc rất chậm. Sau đó chúng tôi chuyển sang sử dụng môi trường SHEM2 để nuôi cấy tế bào gốc biểu mô NMM. Đây là môi trường SHEM1 bổ sung thêm insulin, hydrocortisone, triiodothyronin, isoproterenol. Với môi trường SHEM2, kết quả nuôi tạo tấm biểu mô khá tốt: tỉ lệ mọc trung bình là 76,74% với phương pháp nuôi bằng mảnh mô, 95% ở phương pháp dịch treo và

89,47% ở phương pháp mảnh biểu mô. Sau khi đã xác định được môi trường nuôi cấy, phương pháp nuôi cấy, chúng tôi đã nuôi 30 mẫu biểu mô NMM thỏ, tỉ lệ nuôi tạo thành công tấm biểu mô là 100% và trên 17 BN với tỉ lệ nuôi tạo thành công tấm biểu mô là 90% với thời gian nuôi cấy trung bình là 16-28 ngày.

Môi trường nuôi cấy là một trong các yếu tố quyết định sự thành công của quá trình nuôi cấy, ngoài các thành phần cơ bản là DMEM và Ham's F12 tỉ lệ 1:1 còn có các chất bổ sung khác: huyết thanh, hormon, các yếu tố tăng trưởng, kháng sinh và kháng nấm. Mỗi tác giả có một công thức riêng cho môi trường nuôi cấy. Giai đoạn đầu, chúng tôi sử dụng môi trường SHEM1 để nuôi cấy tế bào gốc biểu mô NMM, tỉ lệ các mẫu mọc chỉ là 30%, các tấm biểu mô đều không đẹp. Môi trường SHEM1 là môi trường chúng tôi đã sử dụng để nuôi tạo thành công tấm biểu mô giác mạc từ tế bào gốc rìa giác mạc. Rõ ràng rằng, cùng là biểu mô nhưng yêu cầu thành phần môi trường khác nhau đối với mỗi loại tế bào gốc.

Ở môi trường SHEM2, chúng tôi sử dụng môi trường SHEM1 và bổ sung insulin, hydrocortisone, T3, isoproterenol, các tế bào gốc biểu mô NMM đã tăng sinh tạo thành tấm biểu mô với tỉ lệ từ 89,5%-95%. Mặc dù so với nhiều tác giả khác trên thế giới, môi trường SHEM2 của chúng tôi thiếu thành phần choleratoxin, tuy nhiên, với tỉ lệ nuôi tạo thành công tấm biểu mô, chúng tôi thấy môi trường SHEM2 sử dụng tốt để nuôi tạo tấm biểu mô từ tế bào gốc NMM. Sở dĩ chúng tôi có kết quả như vậy là do hai lí do sau (1) có sử dụng FBS trong môi trường nuôi cấy, (2) cả hai chất choleratoxin và isoproterenol được biết là các chất làm tăng cAMP của tế bào, AMP vòng lại làm tăng sự phát triển của các cụm tế bào biểu mô khi nuôi cấy biểu mô tăng

ở người, nghiên cứu của chúng tôi sử dụng môi trường thiếu cholera toxin nhưng lại có sử dụng isoproterenol.

Trong môi trường SHEM2, thành phần chủ yếu là DMEM và Ham's F12 với tỉ lệ 1:1. Sự kết hợp giữa Ham's F12 là môi trường giàu thành phần và DMEM giàu dinh dưỡng sẽ tạo điều kiện tốt để nuôi dưỡng các tế bào đang tăng sinh. Ngoài hai thành phần chính, môi trường SHEM2 được bổ sung một số thành phần khác:

(1) Trong điều kiện nuôi cấy tại Việt Nam, việc sử dụng kháng sinh và kháng nấm trong môi trường nuôi cấy tế bào, đặc biệt là biểu mô NMM là cần thiết, đặc biệt với các mẫu nuôi cấy trên thỏ, việc vệ sinh và sát khuẩn khoang miệng trước khi lấy mẫu rất khó tiến hành. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng nồng độ kháng sinh streptomycin 100µg/ml, penicillin 100UI/ml, kháng nấm amphotericin B với nồng độ 25µg /ml. Các tác giả khác nhau sử dụng kháng sinh ở những nồng độ hoàn toàn khác nhau. Mặc dù gentamicin là một kháng sinh có tính độc với tế bào cao, song Madhira S. L. và CS. (2008), Satake Y. và CS. (2008) có sử dụng gentamicin trong thành phần môi trường nuôi cấy [26],[72]. Amphotericin B là chất được hầu hết các tác giả sử dụng, tuy nhiên do tính độc nên một số nghiên cứu không sử dụng kháng nấm trong môi trường nuôi cấy như Hirayama M. năm 2012 không những không dùng amphotericin B và không sử dụng cả penicillin khi nuôi cấy [20].

(2) Huyết thanh: Hiện tại, huyết thanh dùng chủ yếu trong nuôi cấy tăng sinh tế bào biểu mô để tái tạo bề mặt nhãn cầu vẫn là huyết thanh bào thai của bò [114],[10],[11],[115]. Huyết thanh có chứa các yếu tố tăng trưởng kích thích tăng sinh tế bào, các hormon, các yếu tố kết dính và ức chế hoạt động của trypsin và kích thích kết dính tế bào, tăng độ quán và tăng cường

năng lực cho hệ đệm... tuy nhiên nó chứa rất nhiều những thành phần bất lợi, khó kiểm soát về mặt chất lượng cũng như vấn đề lây nhiễm, đặc biệt khi sử dụng huyết thanh có nguồn gốc động vật. Để giải quyết vấn đề này, cho tới nay, đã có rất nhiều nghiên cứu sử dụng huyết thanh tự thân cho kết quả nuôi cấy tốt. Các tác giả khác nhau sử dụng huyết thanh tự thân với nồng độ cũng hoàn toàn khác nhau. Một số tác giả đã thành công trong việc thay thế huyết thanh bê bởi huyết thanh của chính BN khi nuôi cấy tấm biểu mô NMM đó là: Nakamura T. và CS. (2006) [83], Ang L. P. và CS. (2006) [12]. Priya C. G. và CS. (2011). Satake Y. và CS. (2011) [18]. Hirayama M. và CS. (2012) cho kết quả nuôi cấy tốt [20].

Hội chứng LSCD rất thường gặp trong hội chứng Stevens-Johnson [29],[43],[44], có một vấn đề đáng lo ngại đó là: ở những BN bị Stevens-Johnson, nồng độ Fas ligand dạng hòa tan (sFasL) trong máu cao ở giai đoạn đầu bị bệnh, đây là chất có thể đóng vai trò hết sức quan trọng gây ra việc chết theo chương trình của các tế bào biểu mô và cơ chế bệnh học của hội chứng này [116]. Vì vậy, nếu sử dụng huyết thanh tự thân của các BN này sẽ gây hiện tượng chết theo chương trình của tế bào tại chính tấm biểu mô nuôi cấy. Tuy vậy, tác giả Ang L. P. và CS. (2006) đã so sánh chất lượng của tấm biểu mô NMM được nuôi cấy bằng môi trường huyết thanh tự thân với nồng độ 5% của 10 trường hợp (7 BN bị Stevens-Johnson và 3 BN bị LSCD do các nguyên nhân khác) và môi trường có huyết thanh bào thai bò, kết quả là tấm biểu mô nuôi bằng hai môi trường khác nhau nhưng có hình thái giống nhau và giống với biểu mô giác mạc bình thường, đều hình thành các protein liên quan tới màng đáy và thể bán liên kết bao gồm intergrins $\alpha 6$ và $\beta 4$, góp phần đảm bảo tính toàn vẹn cho mảnh ghép [12].

Nakamura T. và CS. (2006) nghiên cứu nuôi cấy tế bào trên 09 BN sử dụng huyết thanh tự thân [83], Priya C. G. và CS. (2011) sử dụng huyết thanh tự thân của BN với nồng độ 10% và sử dụng thêm penicillin 100UI/ml, streptomycin 100mg/ml, insulin 10 μ g/ml, EGF tái tổ hợp 10ng/ml, hydrocortisone 0,5mg/ml, T₃ 2 nmol/l, isoproterenol 1mmol/ml [67], Satake Y. và CS. (2011) sử dụng ở nồng độ 4% huyết thanh tự thân và penicillin/streptomycin 50UI/ml, insulin 5 μ g/ml, cholera toxin 0,1nmol/l, EGF tái tổ hợp 10ng/ml [18]. Hirayama M. và CS. (2012) sử dụng huyết thanh tự thân với nồng độ 4%, và bổ sung thêm vào môi trường nuôi cấy 100 μ g/ml streptomycin, insulin 10 μ g/ml, hydrocortisone 0,5mg/ml, triiodothyronin 2nmol/ml [20].

Bên cạnh việc sử dụng huyết thanh tự thân để mong muốn loại bỏ các thành phần có nguồn gốc động vật khỏi thành phần nuôi cấy, huyết thanh người có nhóm máu AB cũng được sử dụng. Nghiên cứu khi nuôi cấy tế bào biểu mô thay thế bề mặt nhãn cầu, tác giả Zakaria N. và CS. (2014) đã so sánh hai loại môi trường nuôi cấy CNT20 được bổ sung 1% huyết thanh người nhóm máu AB và SHEM có sử dụng huyết thanh bào thai của bò với nồng độ 5% cho kết luận môi trường sử dụng huyết thanh người thay thế cho huyết thanh động vật là khả thi [6].

Để giải quyết các bất lợi do huyết thanh trong môi trường nuôi cấy gây ra, môi trường không huyết thanh là một lựa chọn trong nhiều nghiên cứu, tuy nhiên để áp dụng rộng rãi loại môi trường này cần có nhiều nghiên cứu sâu hơn và hiện tại giá thành của môi trường khá cao [80],[84]. Rõ ràng rằng, việc sử dụng môi trường có huyết thanh cho kết quả tốt hơn khi không có nó trong

nuôi cấy. Trong điều kiện thực tại ở Việt Nam và trong nghiên cứu của chúng tôi có sử dụng huyết thanh bào thai của bò ở nồng độ 10%.

(3) Các thành phần khác: Các hormon insulin, triiodothyronin, EGF, hydrocortisone, isoproterenol, cholera toxin cũng được hầu hết các tác giả trên thế giới sử dụng khi nuôi cấy tế bào biểu mô NMM với các nồng độ khác nhau. Trong nghiên cứu của chúng tôi có sử dụng insulin với nồng độ 5 μ g/ml, hydrocortisone 0,5 μ g/ml, isoproterenol 0,25 μ g/ml, T3 1,3ng/ml, EGF 10ng/ml.

4.4. Về phương pháp nuôi cấy

4.4.1. Phương pháp nuôi cấy bằng mảnh mô

Sau khi trích thủ được mảnh NMM, chúng tôi cắt thành các mảnh nhỏ 1x1mm, ủ các mảnh này với dispase trong thời gian 5 phút. Dispase có tác dụng hủy một số thành phần protein như fibronectin, collagen IV... sẽ làm lỏng lẻo liên kết biểu mô và mô nền phía dưới. Tuy nhiên, khi sử dụng phương pháp này, trừ các tế bào ở chu vi mảnh mô được dán vào màng ôi sẽ dễ bò lan, các tế bào khác bị hạn chế bởi mô đệm để có thể tiếp xúc với nền nuôi cấy.

Ba ngày sau khi nuôi cấy, các tế bào từ mảnh mô đã tăng sinh bò lan ra xung quanh, có tế bào tròn xen lẫn với các tế bào hình sao, hình thoi. Sau 16-28 ngày nuôi cấy, tấm biểu mô nuôi cấy đã có từ 4-6 hàng tế bào. Bề mặt tấm biểu mô không bằng phẳng, có các gờ nổi lên. Khi cắt dọc tấm biểu mô, trong các gờ này là nguyên bào sợi. Theo chúng tôi, hiện tượng trên là do bên dưới lớp biểu mô của NMM là lớp mô liên kết lỏng lẻo, có độ đàn hồi và mềm dẻo hơn so với mô liên kết ở các vùng khác. Vì vậy, khi cắt gọt mẫu

bằng tay không thể loại bỏ hoàn toàn được lớp mô liên kết này. Trong điều kiện môi trường thuận lợi, những nguyên bào sợi trong mô liên kết còn sót lại đã tăng sinh, thậm chí ở một số mẫu nuôi cấy chúng còn chiếm ưu thế hơn so với tế bào biểu mô. Bề mặt tám biểu mô không bằng phẳng sẽ ảnh hưởng tới hiệu quả nếu ghép lại cho BN. Hơn nữa, sự có mặt của các nguyên bào sợi là điều kiện thuận lợi cho tổ chức xơ mạch bò vào giác mạc, theo Atiyeh và CS. (2007) nguyên bào sợi chế tiết ra nhiều chất trong đó có fibronectin có khả năng hóa hướng động các nguyên bào sợi ở vùng lân cận di chuyển tới gần nó [117].

Khi nuôi cấy tám biểu mô giác mạc từ tế bào gốc vùng rìa giác mạc trong các đề tài trước, chúng tôi cũng nuôi bằng phương pháp mảnh mô nhưng không thấy hiện tượng này xảy ra.

Thêm bằng chứng cho hiện tượng này, trong nghiên cứu của Kanayama S. và CS. (2007) trên tám biểu mô giác mạc và NMM nuôi cấy để xác định các yếu tố gây ra hiện tượng kết mạc hóa sau ghép tám biểu mô giác mạc, dịch nuôi cấy được thu hoạch ở các thời điểm khác nhau, protein FGF2 và VEGF (vascular endothelial growth factor-yếu tố phát triển nội mô mạch máu), TGF β 1 (transforming growth factor β 1-yếu tố phát triển chuyển dạng), và angiopoietin được phân tích bằng kỹ thuật ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), thêm nữa, mRNA của các sản phẩm FGF2 và VEGF được xác định bằng RT-PCR thấy rằng: tám biểu mô NMM nuôi cấy chế tiết nhiều FGF, mRNA của FGF cũng cao hơn một cách có ý nghĩa thống kê hơn tám biểu mô giác mạc nuôi cấy. Điều này đã khẳng định, chính FGF2 là nguyên nhân dẫn tới hiện tượng tân mạch và kết mạc hóa giác mạc xảy ra ở tám biểu mô NMM nuôi cấy mà đối với tám biểu mô nuôi cấy từ tế bào gốc

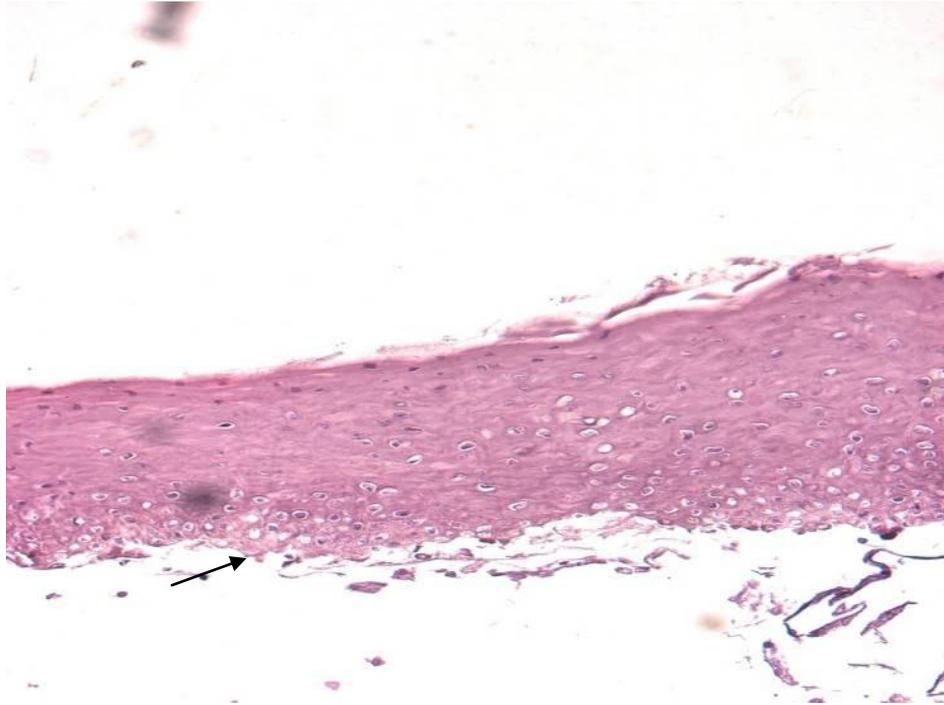
vùng rìa giác mạc không xảy ra. Tác giả này cũng đưa ra giả thuyết rằng FGF2 được tổng hợp, giải phóng và tích lũy ở chất nền ngoại bào, sau đó nó lại được giải phóng xuống chất nền giác mạc phía dưới sau khi ghép [118]. FGF có khả năng kích thích sự gia tăng của nhiều tế bào khác: như nguyên bào sợi, tế bào nội mô mạch máu, tăng cường lắng đọng các chất nền ngoại bào.

Từ tất cả các lý do trên, nên mặc dù phương pháp nuôi cấy bằng mảnh mô NMM đơn giản và cũng được nhiều tác giả trên thế giới sử dụng, nhưng sau khi nuôi 30 mẫu chúng tôi không sử dụng phương pháp này nữa.

Vậy, đối với NMM, phương pháp nuôi cấy được ưu tiên hơn đó là nuôi bằng dịch treo hoặc mảnh biểu mô (không chứa mô liên kết phía dưới) để tránh sự di cư của tế bào sợi vào tấm biểu mô nuôi cấy.

4.4.2. Phương pháp nuôi bằng dịch treo

Khi xử lý tạo dịch treo tế bào và mảnh biểu mô, chúng tôi dùng enzyme dispase, đây là một lựa chọn thường quy khi xử lý mảnh mô vùng rìa cũng như mảnh mô NMM để nuôi cấy [4],[119],[72]. Để có được dịch treo tế bào với mật độ 1×10^6 tế bào/ml, chúng tôi cắt mảnh NMM vừa trích thủ thành các mảnh nhỏ kích thước 0,5x0,5mm. Ủ các mảnh này với dispase 1,2UI ở nhiệt độ 37⁰C trong thời gian 45-60 phút. Dispase có tác dụng làm tan rã thành phần collagen của màng đáy, nhờ đó lớp tế bào biểu mô được tách rời ra khỏi mô đệm (hình 4.2).

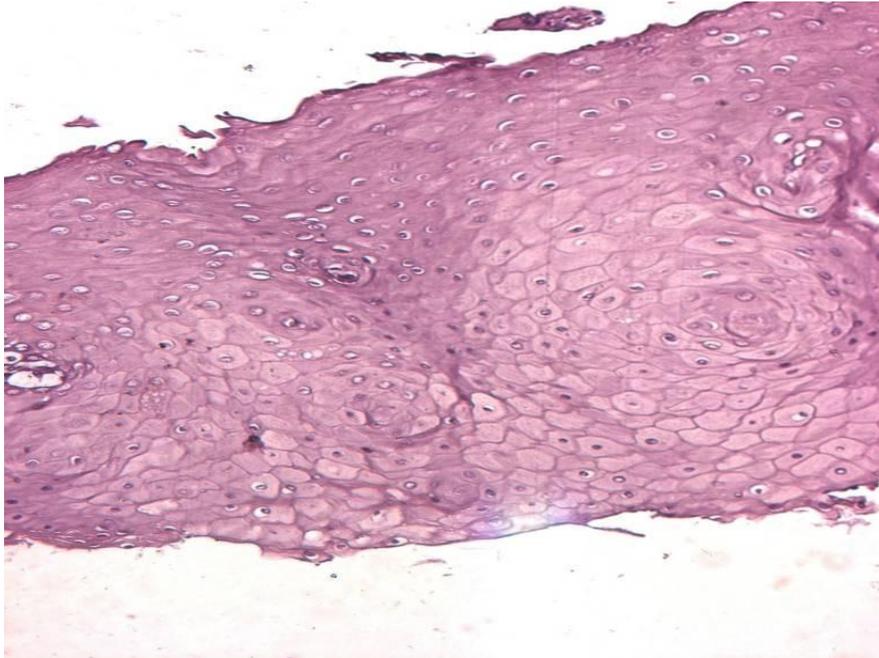


Hình 4.2. Lớp biểu mô sau khi bóc tách (H.E.x250)

→ *Tế bào lớp đáy*

Kiểm tra cấu trúc của mô nền sau bóc tách lớp biểu mô thấy: toàn bộ lớp biểu mô đã được lột bỏ, không còn tế bào biểu mô nào sót lại trên bề mặt mô nền. Cấu trúc mô nền còn lại là mô liên kết thưa. Đồng thời, trong lớp biểu mô được bóc ra cũng không thấy có mặt các tế bào của mô liên kết. Như vậy, hiệu quả của việc ủ mảnh mô với dispase là đã loại bỏ được hoàn toàn mô liên kết khỏi lớp biểu mô, và quan trọng hơn cả đó là tất cả các tế bào ở lớp đáy của biểu mô cũng được tách theo lớp biểu mô.

Ở bước tiếp theo, chúng tôi sử dụng hỗn hợp enzyme trypsin-EDTA để li giải lớp tế bào biểu mô thành những tế bào riêng rẽ sau đó nạo lấy những tế bào lớp đáy. Kiểm tra cấu trúc vi thể của phần còn lại của lớp biểu mô thấy rằng toàn bộ tế bào ở các lớp sát đáy đã được lấy vào trong dịch treo nuôi cấy (hình 4.3).



Hình 4.3. Lớp biểu mô sau khi nạo lấy lớp đáy (H.E.x500).

Như vậy, với kỹ thuật xử lý tạo dịch treo các tế bào đầu dòng có mặt ở các lớp sát đáy đều đã được tận dụng triệt để. Đối với phương pháp nuôi tạo tấm biểu mô NMM bằng dịch treo, tấm biểu mô nuôi cấy khi nhuộm K3 được thể hiện ở bào tương của các tế bào lớp trên đáy. Điều chứng tỏ nguồn gốc của các tế bào ở tấm này không phải nguyên bào sợi mà là tế bào dòng biểu mô. Kết luận này của chúng tôi cũng phù hợp với kết luận của một số tác giả khác trên thế giới như Ma D. H. và CS. (2009) [14], Nakamura T. và CS. (2003) [2], Hayashida Y. và CS. (2005) [73].

Mặc dù phương pháp dịch treo cho tỉ lệ mọc 95% là cao nhất trong 3 phương pháp nuôi cấy khác nhau trong nghiên cứu của chúng tôi, cao hơn 2 phương pháp mảnh mô và mảnh biểu mô (lần lượt là 76,47 và 89,47%), tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Hầu hết các tác giả khi nuôi cấy tấm biểu mô chúng tôi tổng quan được cũng sử dụng phương pháp dịch treo. Trong 28 nghiên cứu về nuôi tạo tấm biểu mô niêm mạc miệng áp dụng trên người mà chúng tôi tổng quan được có tới 23 nghiên cứu sử dụng

phương pháp dịch treo bao gồm các tác giả Sotozono C. và CS. (2014) [75], Sotozono C. và CS. (2013) [22], Hirayama M. và CS. (2012) [20], Chen H. và CS. (2012) [64], Burillon C. và CS. (2012) [21], Takeda K. và CS. (2011) [19], Priya C. và CS. (2011) [67], Satake Y. và CS. (2011) [18], Nakamura T. và CS. (2011) [17], Ma D. H. và CS. (2009) [14], Chen H. và CS. (2009) [16], Satake Y. và CS. (2008) [72], Nakamura T. và CS. (2007) [120], Inatomi T. và CS. (2006) [13], Inatomi T. và CS. (2006) [63], Ang L. P. và CS. (2006) [12], Nishida K. và CS. (2004) [11], Nakamura T. và CS. (2004) [10], Ilmarinen T. và CS. (2013) [74], Hashemi H. và CS. (2009) [66], Hayashida Y. và CS. (2005) [73], Kocaba V. và CS. (2014) [24], Shimazaki J. và CS. [60]. Còn lại chỉ có 4 nghiên cứu sử dụng phương pháp mảnh mô: Madhira S. L. và CS. (2008) [26], Sen S. và CS. (2011) [68], Gaddipati S. và CS. (2013) [121]. Krishnan K. và CS. (2010) [65] và 1 nghiên cứu sử dụng cả hai phương pháp: Kolli S. và CS. (2014) [25].

Tuy nhiên, trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi thấy đây là phương pháp khá phức tạp, đòi hỏi nhiều bước xử lý mảnh mô qua các loại enzyme khác nhau với thời gian khác nhau sẽ ảnh hưởng tới chất lượng tế bào nuôi cấy, phải sử dụng nhiều môi trường và trang thiết bị phức tạp. Chúng tôi cũng chưa tổng quan thấy tác giả nào trên thế giới sử dụng phương pháp mảnh biểu mô, đó là phương pháp phối hợp ưu điểm của phương pháp dịch treo (loại bỏ được nguyên bào sợi ra khỏi dịch nuôi cấy) và phương pháp mảnh mô (đơn giản và không phải sử dụng nguyên bào sợi chuột 3T3), vừa khắc phục được yếu điểm lớn nhất của hai phương pháp này đó là sử dụng nguyên bào sợi chuột ở phương pháp dịch treo và sự xâm nhập của nguyên bào sợi tự thân vào tấm biểu mô nuôi cấy ở phương pháp mảnh mô. Phương pháp nuôi bằng mảnh biểu mô của chúng tôi được nghiên cứu vừa tận dụng được ưu điểm lại

khắc phục được yếu điểm của của hai phương pháp nuôi cấy cơ bản trên thế giới đang áp dụng.

4.4.3. Phương pháp nuôi bằng mảnh biểu mô

So sánh hiệu quả của nuôi bằng kỹ thuật tạo dịch treo và kỹ thuật nuôi mảnh biểu mô thấy rằng: tỷ lệ mọc, tốc độ mọc và cấu trúc vi thể của hai tấm biểu mô hầu như là tương đồng với nhau. Sự khác biệt về tỉ lệ nuôi tạo thành công tấm biểu mô NMM là như nhau ở cả ba phương pháp mảnh mô, dịch treo và mảnh biểu mô bóc (lần lượt là 76,47%, 95% và 89,47%), phương pháp mảnh biểu mô có tỉ lệ nuôi tạo thành công thấp hơn dịch treo, nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Như vậy, đánh giá một cách toàn diện, kỹ thuật xử lý tạo mảnh biểu mô thể hiện có nhiều ưu điểm nổi bật hơn so với kỹ thuật xử lý tạo dịch treo bởi các lý do: giảm kích thước của mẫu mô cần cho nuôi cấy, rút ngắn thời gian xử lý mẫu và giảm thiểu thời gian tiếp xúc của tế bào nuôi cấy với enzyme trypsin-EDTA sẽ làm tăng khả năng sống sót của tế bào nuôi cấy, giảm thiểu trang thiết bị của phòng lab. như máy li tâm lạnh và nhiều dụng cụ vật tư tiêu hao khác và một lý do nữa chúng tôi cho rằng có liên quan tới hiệu quả tăng sinh của tế bào đó là sự duy trì được mối liên hệ giữa tế bào-tế bào.

Bên cạnh đó khi nuôi cấy mảnh biểu mô chúng tôi có sử dụng lớp tế bào nuôi là nguyên bào sợi được lấy từ chính mẫu mô đó, điều này đã tạo ra điều kiện nuôi cấy gần giống với môi trường sinh lý của tế bào nhất, các tế bào biểu mô có thể vẫn nhận được các tín hiệu từ các tế bào trong mô đệm ban đầu. Trong khi đó, với kỹ thuật nuôi dịch treo, hiện nay hầu hết các tác giả vẫn sử dụng lớp tế bào nuôi 3T3 lấy từ chuột mặc dù đã có những bằng chứng về sự tích hợp các protein của chuột vào các tế bào nuôi cấy. Nghiên cứu của Martin MJ. (2005) cho thấy khi tế bào gốc phôi người nuôi cấy cùng với môi trường có huyết thanh động vật và nguyên bào sợi chuột (cả hai

nguồn này đều có chứa acid sialic động vật có tên N-Glycolylneuraminic acid-Neu5Gc là chất mà tế bào loài người không thể tổng hợp được do bị đột biến gen tổng hợp trong quá trình tiến hóa) chất này được tích hợp vào trong tế bào người khi nuôi cấy trên nền 3T3. Ở người khỏe mạnh, thông thường trong máu sẽ có kháng thể kháng Neu5Gc, chính điều này làm tăng nguy cơ thất bại sau ghép tế bào nuôi cấy [79]. Cơ chế tích hợp vào tế bào người của Neu5Gc cũng đã được nghiên cứu kỹ [122]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy nuôi cấy sử dụng nguyên bào sợi tự thân cho tỉ lệ mọc cao hơn khi không sử dụng lớp này (89,47% so với 81,48%). Nuôi cấy có sử dụng 3T3 chuột cho tỉ lệ mọc cao hơn khi không sử dụng nguyên bào sợi với $p < 0,05$ (100% so với 81,48%). Vậy, sử dụng nguyên bào sợi tự thân có thể áp dụng được.

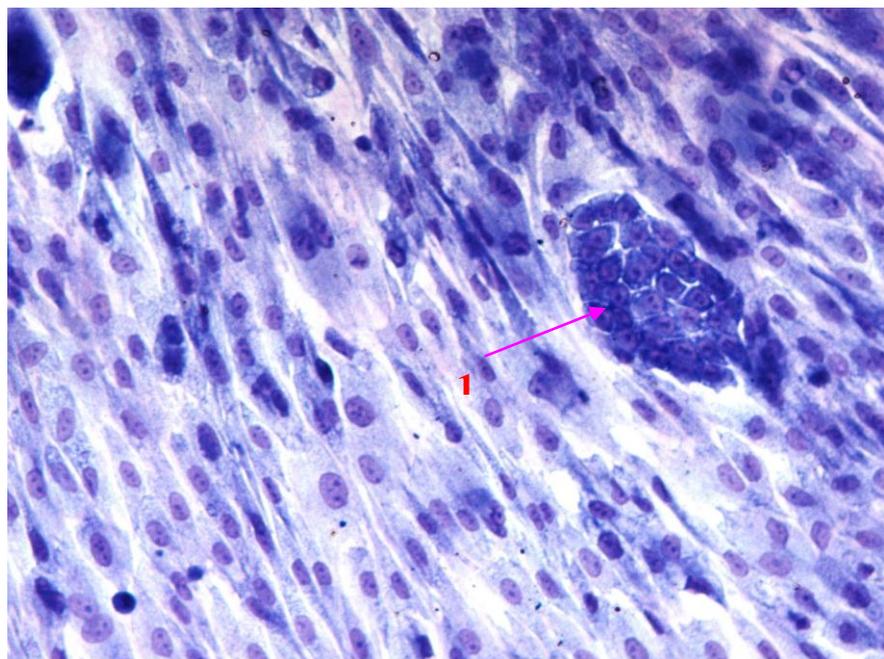
Theo tổng quan, chưa có nhóm nghiên cứu nào trên thế giới sử dụng kỹ thuật xử lý tạo mảnh biểu mô giống như chúng tôi. Theo chúng tôi, đây là một kỹ thuật hoàn toàn mới, thể hiện tất cả các lợi thế hơn các phương pháp nuôi cấy tấm biểu mô NMM hiện nay trên thế giới đang áp dụng: (1) kích thước mảnh mô trích thủ nhỏ, (2) quy trình nuôi cấy đơn giản, (3) sử dụng nguyên bào sợi tự thân làm nền nuôi cấy, (4) tấm biểu mô thu được về hình thái rất đẹp, mảnh ghép tốt.

4.5. Về chất lượng tấm biểu mô nuôi cấy.

Sau 16- 28 ngày nuôi cấy trong tủ 37°C , 5% CO_2 , chúng tôi thu được tấm biểu mô nuôi tạo từ tế bào gốc NMM. Tấm biểu mô là biểu mô lát tầng không sừng hóa gồm 4-5 hàng tế bào, hàng trên cùng dẹt và vẫn còn nhân. Trên tiêu bản nhuộm giemsa ở trước giai đoạn cho biểu mô tiếp xúc với không khí (giai đoạn các tế bào phủ kín đáy giếng nuôi cấy) thấy hình ảnh các tế bào có kích thước nhỏ, tỉ lệ nhân/bào tương lớn (hình 4.4). Về mặt hình thái, đây được cho là những tế bào còn non theo nghiên cứu của một số tác giả Izumi K. và CS. (2007), Priya C. G. và CS. (2011).

Theo Izumi K. (2007), đường kính trung bình của tế bào được quy vào 3 loại: lớn, nhỏ và trung bình, lần lượt là: $61 \pm 2,7 \mu\text{m}$, $46,3 \pm 1,7 \mu\text{m}$, $33,9 \pm 0,9 \mu\text{m}$, các nhóm tế bào này được xác định $\beta 1$ integrin, yếu tố phiên mã trong nhân và PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor gama) và đánh giá tình trạng phân chia của tế bào, kết quả cho thấy những tế bào có kích thước nhỏ có khả năng tạo những cụm tế bào kích thước lớn hơn và thời gian tăng sinh dài hơn so với tế bào thuộc nhóm trung bình và lớn [88].

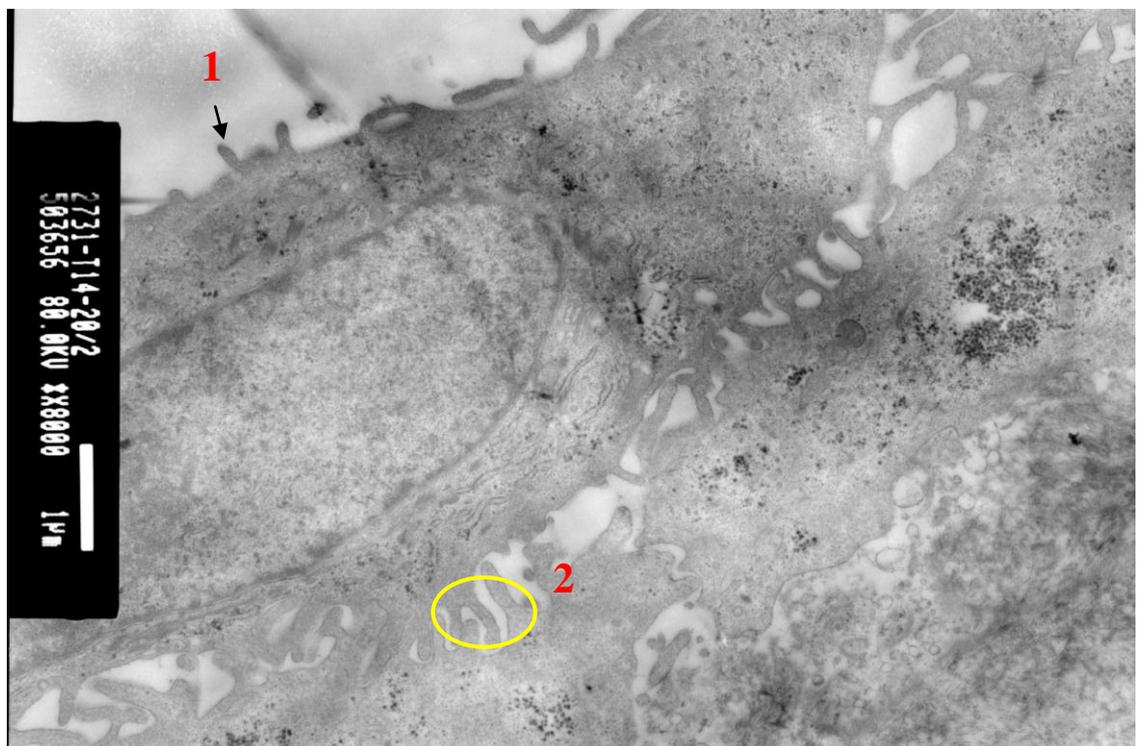
Priya C. G. và CS. (2011) sử dụng kính hiển vi đồng tiêu cự và laser quét đánh giá hình dạng tế bào và định lượng p63, đánh giá kèm với các phương pháp xác định tế bào gốc khác như test tạo cụm, xác định cx43, Melanoma-associated sulfate proteoglycan và đánh giá hiệu quả sau cấy ghép đã đưa ra kết luận: Tỷ lệ nhân/bào tương tế bào là chỉ số phản ánh tính gốc của tế bào [67].



Hình 4.4. Tấm biểu mô NMM nuôi cấy ngày 16 (Giemsa500)

1. Đám tế bào gốc

Ở mức độ siêu vi, trên bề mặt các tế bào có những vi nhung mao ngắn chia nhánh. Các tế bào liên kết chặt chẽ với nhau bằng các mộng bào tương dài và các thể liên kết. Các tế bào lớp đáy gắn chặt với màng ôi bằng các thể bán liên kết. Trong bào tương của các tế bào lớp dưới, các bào quan như lưới nội bào, ti thể, bộ Golgi phong phú. Kết quả nhuộm hoá mô miễn dịch tẩm biểu mô NMM nuôi cấy cho thấy: các tế bào của tẩm biểu mô có nhân bắt màu nâu sẫm, đặc biệt là các tế bào lớp đáy khi nhuộm phát hiện p63; các tế bào lớp trên thể hiện yếu khi nhuộm K3-K12, cấu trúc của tẩm biểu mô NMM của chúng tôi giống với cấu trúc của biểu mô trước giác mạc bình thường và tẩm biểu mô giác mạc nuôi cấy (hình 4.5) và cũng được nhiều tác giả trên thế giới mô tả [123], [26], [30], [124], [2], [90].



Hình 4.5. Tẩm biểu mô giác mạc nuôi cấy (TEM)

2. Vi nhung mao 2. Cầu bào tương

Các tấm biểu mô mà chúng tôi nuôi cấy được đã ghép lại trên thực nghiệm cho thỏ và cho BN bị hội chứng suy giảm tế bào gốc vùng rìa cả hai mắt với kết quả khá tốt. Vấn đề quan trọng là sự tồn tại của mảnh ghép về lâu dài thế nào? Trên thực nghiệm, chúng tôi đã theo dõi thỏ được ghép tấm biểu mô NMM nuôi cấy lâu nhất là 180 ngày, tấm biểu mô sống và áp sát vào mô nền giác mạc. Ở mảnh gọt bề mặt giác mạc của BN Võ Vũ Ngọc Y. (31 tuổi) sau ghép tấm biểu mô NMM nuôi cấy được 12 tháng, chúng tôi vẫn thấy một phần của tấm biểu mô tồn tại. Trên thế giới cũng có những bằng chứng về sự tồn tại lâu dài của tấm biểu mô sau ghép trên BN. Nghiên cứu của Kocaba V. và CS. (2014) cho thấy: khi nhuộm hóa mô miễn dịch của 4 tấm/tổng số 9 BN sau ghép 01 năm thấy CK6 thể hiện ở các lớp trên đáy của tấm biểu mô gọt (đây là marker biệt hóa của tế bào biểu mô NMM, marker này không thấy thể hiện ở giác mạc bình thường). Điều này chứng tỏ nguồn gốc của biểu mô sau ghép là từ các tế bào gốc của tấm biểu mô NMM cấy ghép, không phải từ giác mạc của chính BN. Khi nhuộm p63 các mảnh gọt này thấy tất cả các tế bào lớp đáy bắt nhuộm với p63, chứng tỏ khả năng tái sinh của mảnh ghép [24]. Tác giả Sangwan V. S. và CS. (2014) đã nhuộm P.A.S. tấm biểu mô gọt không thấy sự có mặt của tế bào tiết nhày, khi nhuộm hóa mô miễn dịch phát hiện K3/K12 thấy dương tính, nhưng khi nhuộm K12 (đặc hiệu cho giác mạc) thì không thấy thể hiện trong bào tương của tế bào, nhuộm K14 cũng không thấy sự thể hiện (đặc hiệu cho kết mạc), điều này cũng chứng tỏ nguồn gốc của tấm biểu mô ở đây không phải kết mạc và giác mạc mà là NMM [23].

Trong phương pháp nhuộm P.A.S. để phát hiện carbonhydrat, mucin và glycoprotein, chúng tôi sử dụng phương pháp Periodic Acid-Schiff, đây là phương pháp thông thường và sử dụng rộng rãi nhất trong các phương pháp để xác định mucin. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ thấy ở tấm biểu mô NMM nuôi cấy chủ yếu là sự tồn tại rải rác của các đám hạt glycogen

nằm tập trung dạt về một phía của tế bào, không thấy sự xuất hiện của cấu trúc của các hạt nhày điển hình (nhưng không thể loại trừ sự có mặt của các hạt này). Sự chế tiết mucin 1, 4, 16 được tìm thấy ở trong tấm biểu mô NMM nuôi cấy của Krisnan S. và CS. (2010) khi sử dụng kỹ thuật RT-PCR từ sản phẩm RNA của mẫu nuôi cấy, các loại mucin này đảm bảo cho sự ẩm ướt và khỏe mạnh của bề mặt nhãn cầu khi ghép tấm biểu mô NMM nuôi cấy [65].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, khi sử dụng phương pháp nhuộm P.A.S. không thấy các tế bào hình dài tiết nhày, kết luận này cũng phù hợp với nghiên cứu của tác giả Chen H.C. và CS. (2009) khi phát hiện MUC5AC bằng phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch, đây là loại mucin liên quan tới cấu trúc của tế bào hình dài tiết nhày, marker này âm tính ở các mẫu biểu mô NMM nuôi cấy [16]. Vậy tấm biểu mô nuôi cấy trong nghiên cứu của chúng tôi hoàn toàn phù hợp cho việc thay thế giác mạc.

4.6. Vấn đề tồn tại cần nghiên cứu tiếp để hoàn thiện quy trình nuôi cấy tấm biểu mô NMM

Để giảm thiểu tối đa sự tiếp xúc với các sản phẩm của động vật, trong quy trình thu hoạch tấm biểu mô chúng tôi đã rửa sạch môi trường có huyết thanh bằng DMEM:Ham's F12 với tỉ lệ 1:1. Sau đó tấm biểu mô được giữ trong môi trường không huyết thanh bào thai của bò và chuyển tới phòng phẫu thuật trong điều kiện vô khuẩn ở 37°C.

Sử dụng nguyên bào sợi tự thân trong nuôi cấy tấm biểu mô theo chúng tôi là một phương pháp có ưu điểm hơn so với sử dụng 3T3 chuột. Tuy nhiên, trong quá trình lấy tấm biểu mô ra khỏi lồng nuôi cấy đôi khi gặp khó khăn trong việc bóc tách tấm biểu mô khỏi đáy lồng.

Khi nghiên cứu trên người, tổng số lần tiến hành sinh thiết NMM là 26, do có 4 lần nuôi cấy tế bào biểu mô không mọc hoặc mọc rất thưa không

dùng để ghép được hoặc có chỉ định phẫu thuật thêm nên phải sinh thiết để nuôi cấy lần 2. Như vậy, có 22 lần nuôi cấy mọc thành tấm biểu mô hoàn chỉnh, phủ kín đáy giếng sau 16-28 ngày nuôi cấy trên nền màng ôi. Chúng tôi đã tiến hành được 22 phẫu thuật ghép tấm biểu mô cho BN. Ở 22 ca này chúng tôi đều có 1 tấm dùng để ghép cho BN và 1 tấm dùng để làm tiêu bản mô học. Trên tiêu bản nhuộm Giemsa thấy các tế bào biểu mô có hình đa diện, kích thước đều nhau, liên kết với nhau chặt chẽ và hình thái tế bào hoàn toàn bình thường. Trên tiêu bản cắt đứng dọc qua tấm biểu mô và nhuộm H.E. thấy rõ tấm biểu mô gồm 3 đến 4 hàng tế bào, liên kết với nhau chặt chẽ. Trong khi tách tấm biểu mô khỏi đáy lồng nuôi cấy, một số tấm dính đáy lồng nhiều nên làm mất lớp biểu mô từng đám nhỏ (2-4mm) và 4 tấm rách trong khi tách.

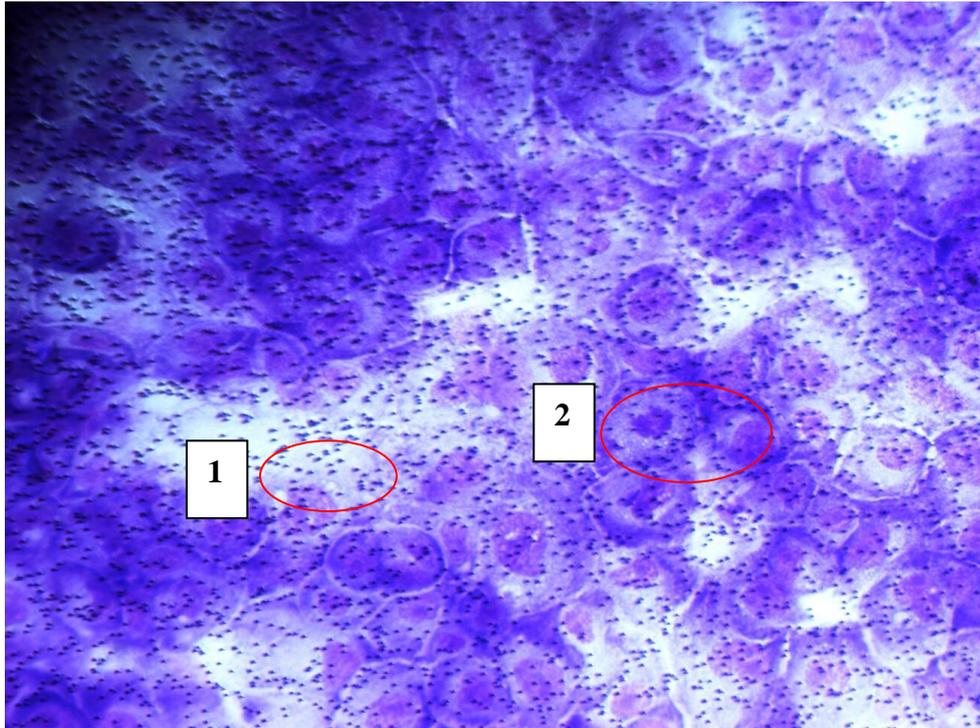
Ở BN Nguyễn Hữu L. (27 tuổi), trong hai giếng nuôi cấy thành công, sau bóc tách thử chỉ có 01 giếng thuận lợi cho cấy ghép trở lại cho BN, còn 01 tấm rất khó bóc khỏi đáy lồng nuôi cấy, tấm này được cố định và cắt nhuộm H.E. cho kết quả: nguyên bào sợi đã phát triển và bám ở dưới đáy lồng nuôi cấy (hình 4.6).



**Hình 4.6. Tấm biểu mô NMM nuôi cấy 18 ngày
của BN Nguyễn Hữu L. 27 tuổi (H.E.x500)**

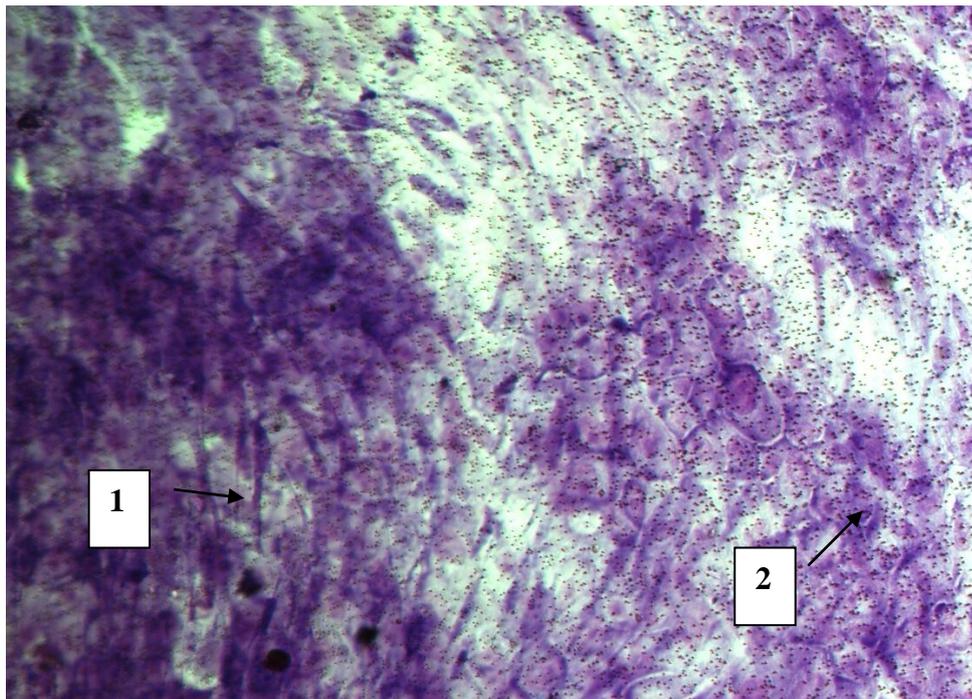
1. Lớp nguyên bào sợi 2.Màng ối 3.Tấm biểu mô nuôi cấy

BN Lê Văn N., 16 tuổi trong 02 giếng nuôi cấy thành công có 01 giếng quá trình bóc tách dễ và 01 tấm bóc tách khó, cả hai tấm biểu mô trên màng ối cùng đáy lồng nuôi cấy được nhuộm giemsa quan sát bề mặt kết quả như sau: ở tấm biểu mô bóc tách dễ dàng, nhìn từ mặt đáy lồng nuôi cấy thấy toàn bộ biểu mô NMM mọc phía trên màng ối, không thấy xuất hiện nguyên bào sợi bám phía dưới đáy lồng (hình 4.7). Ở giếng khó bóc tách, nhìn từ đáy giếng nuôi cấy thấy xuất hiện các nguyên bào sợi bám vào đáy lồng nuôi cấy (hình 4.8). Hiện tượng này chúng tôi chưa thấy tác giả nào mô tả. Đây là vấn đề tồn tại cần nghiên cứu tiếp để hoàn thiện quy trình nuôi cấy.



Hình 4.7. Tắm biểu mô NMM nuôi cấy 21 ngày của BN Lê Văn N. 16 tuổi (dễ bóc) (giemsax1000)

1. Các lỗ nhỏ của lồng nuôi cấy 2. Tế bào biểu mô



Hình 4.8. Tắm biểu mô NMM nuôi cấy 21 ngày của BN Lê Văn N. 16 tuổi (khó bóc) (giemsax250)

1. Nguyên bào sợi 2. Tế bào biểu mô

Theo nhận định của chúng tôi, có thể trong quá trình nuôi cấy mảnh mô nên dùng cho việc tạo ra lớp nguyên bào sợi có kích thước quá lớn đã tiếp xúc với đáy lồng nuôi cấy nên tạo điều kiện cho nguyên bào sợi phát triển, thông qua các lỗ màng có đường kính là $0,4\mu\text{m}$ đã tạo được mối liên hệ giữa tế bào sợi này và màng ôi làm cho quá trình bóc tách gặp khó khăn. Để hạn chế vấn đề này, theo chúng tôi, mảnh mô nên tạo lớp nguyên bào sợi cần phải giảm kích thước và khi nguyên bào sợi phủ kín khoảng $2/3$ diện tích đáy lồng nuôi cấy (khoảng ngày thứ 8 hoặc 9) sẽ nhấc bỏ mảnh mô ra khỏi đáy giếng nuôi cấy.

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu thực nghiệm trên thỏ và thử nghiệm trên BN, chúng tôi có kết luận như sau:

1. Đã xác định được vị trí, kích thước mảnh NMM và môi trường dùng để nuôi cấy:

- Vị trí sinh thiết mảnh NMM dùng nuôi cấy tấm biểu mô là vùng trung tâm má, mảnh NMM có đường kính 3mm đủ để nuôi tạo hai tấm biểu mô.
- Môi trường nuôi cấy tấm biểu mô NMM: Môi trường SHEM2: phối hợp DMEM/Ham's F12 tỉ lệ 1:1, bổ sung thêm các yếu tố khác: EGF, insulin, hydrocortisone, isoproterenol, FBS, T3, kháng sinh, kháng nấm.

2. Xác định được phương pháp mới nuôi tạo tấm biểu mô NMM: quy trình nuôi tạo tấm biểu mô bằng phương pháp mảnh biểu mô, sử dụng lớp tế bào nuôi là nguyên bào sợi tự thân (các bước tiến hành xem trong phần phụ lục).

KHUYẾN NGHỊ

- (1) Cần có những nghiên cứu tiếp theo để hoàn thiện quy trình thu hoạch tằm biểu mô NMM.
- (2) Cần có những nghiên cứu sâu hơn nữa về môi trường nuôi cấy để loại trừ hoàn toàn các sản phẩm của động vật khỏi môi trường nuôi cấy sử dụng trên người.
- (3) Cần có những theo dõi dài hơn và quy mô hơn để đánh giá chất lượng tằm biểu mô nuôi cấy sau cấy ghép.

**DANH MỤC NHỮNG CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ ĐƯỢC
CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Đào Thị Thúy Phượng, Nguyễn Thị Bình và cộng sự (2013). Nghiên cứu cấu trúc hình thái tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trên nền màng ối người. *Tạp chí Y-Dược học Quân sự số chuyên đề Mô - Phôi*, 4, 65-69.

2. Đỗ Thùy Hương, Đào Thị Thúy Phượng, Nguyễn Khang Sơn, Nguyễn Thị Bình và cộng sự (2012). Nghiên cứu phương pháp nuôi tạo tấm biểu mô niêm mạc miệng để điều trị tổn thương bề mặt nhãn cầu. *Tạp chí Y học Thực hành*, 818-819, 560-563.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dua H. S., Saini J. S., Azuara-Blanco A. et al (2000). Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J Ophthalmol*, 48(2), 83-92.
2. Nakamura T., Endo K., Cooper L. J. et al (2003). The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(1), 106-116.
3. Koizumi N., Inatomi T., Suzuki T. et al (2001). Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology*, 108(9), 1569-1574.
4. Nakamura T., Koizumi N., Tsuzuki M. et al (2003). Successful regrafting of cultivated corneal epithelium using amniotic membrane as a carrier in severe ocular surface disease. *Cornea*, 22(1), 70-71.
5. Sangwan V. S., Matalia H. P., Vemuganti G. K. et al (2006). Clinical outcome of autologous cultivated limbal epithelium transplantation. *Indian J Ophthalmol*, 54(1), 29-34.
6. Zakaria N., Possemiers T., Dhubhghaill S. N. et al (2014). Results of a phase I/II clinical trial: standardized, non-xenogenic, cultivated limbal stem cell transplantation. *J Transl Med*, 12, 58.
7. Holland E. J., Schwartz G. S. (2004). The Paton lecture: Ocular surface transplantation: 10 years' experience. *Cornea*, 23(5), 425-431.
8. Samson C. M., Nduaguba C., Baltatzis S. et al (2002). Limbal stem cell transplantation in chronic inflammatory eye disease. *Ophthalmology*, 109(5), 862-868.
9. Nakamura T., Kinoshita S. (2003). Ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial stem cells. *Cornea*, 22(7 Suppl), S75-80.

10. Nakamura T., Inatomi T., Sotozono C. et al (2004). Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol*, 88(10), 1280-1284.
11. Nishida K., Yamato M., Hayashida Y. et al (2004). Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med*, 351(12), 1187-1196.
12. Ang L. P., Nakamura T., Inatomi T. et al (2006). Autologous serum-derived cultivated oral epithelial transplants for severe ocular surface disease. *Arch Ophthalmol*, 124(11), 1543-1551.
13. Inatomi T., Nakamura T., Kojyo M. et al (2006). Ocular surface reconstruction with combination of cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation and penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol*, 142(5), 757-764.
14. Ma D. H., Kuo M. T., Tsai Y. J. et al (2009). Transplantation of cultivated oral mucosal epithelial cells for severe corneal burn. *Eye (Lond)*, 23(6), 1442-1450.
15. Uchino Y., Uchino M., Shimazaki J. (2009). Combination treatment of intravenous immunoglobulin and cultivated oral mucosal epithelial transplantation for ocular cicatricial pemphigoid. *BMJ Case Rep*, 2009.
16. Chen H. C., Chen H. L., Lai J. Y. et al (2009). Persistence of transplanted oral mucosal epithelial cells in human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50 (10), 4660-4668.
17. Nakamura T., Takeda K., Inatomi T. et al (2011). Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol*, 95(7), 942-946.
18. Satake Y., Higa K., Tsubota K. et al (2011). Long-term outcome of cultivated oral mucosal epithelial sheet transplantation in treatment of total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*, 118(8), 1524-1530.

19. Takeda K., Nakamura T., Inatomi T. et al (2011). Ocular surface reconstruction using the combination of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation and eyelid surgery for severe ocular surface disease. *Am J Ophthalmol*, 152(2), 195-201 e191.
20. Hirayama M., Satake Y., Higa K. et al (2012). Transplantation of cultivated oral mucosal epithelium prepared in fibrin-coated culture dishes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53(3), 1602-1609.
21. Burillon C., Huot L., Justin V. et al (2012). Cultured autologous oral mucosal epithelial cell sheet (CAOMECS) transplantation for the treatment of corneal limbal epithelial stem cell deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53(3), 1325-1331.
22. Sotozono C., Inatomi T., Nakamura T. et al (2013). Visual improvement after cultivated oral mucosal epithelial transplantation. *Ophthalmology*, 120(1), 193-200.
23. Sangwan V. S., Jain R., Basu S. et al (2014). Transforming ocular surface stem cell research into successful clinical practice. *Indian J Ophthalmol*, 62(1), 29-40.
24. Kocaba V., Thépot A., Yamato M. et al (2014). Long-Term Results of Cultured Autologous Oral Mucosa Epithelial CellSheet (CAOMECS) Graft for the Treatment of Blindness Due to Bilateral Limbal Stem Cell Deficiency. *J Stem Cell Res Ther*, 4(3), 181.
25. Kolli S., Ahmad S., Mudhar H. S. et al (2014). Successful application of ex vivo expanded human autologous oral mucosal epithelium for the treatment of total bilateral limbal stem cell deficiency. *Stem Cells*, 32, 2135-2146.
26. Madhira S. L., Vemuganti G., Bhaduri A. et al (2008). Culture and characterization of oral mucosal epithelial cells on human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Mol Vis*, 14, 189-196.

27. Trịnh Bình (2009). Nhận diện tế bào gốc biểu mô giác mạc. *Tạp chí nghiên cứu y học*, 64 (5), 111-118.
28. Davanger M., Evensen A. (1971). Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature*, 229(5286), 560-561.
29. Tseng S. C., Tsubota K. (1997). Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol*, 124(6), 825-835.
30. Moharamzadeh K., Brook I. M., Van Noort R. et al (2007). Tissue-engineered oral mucosa: a review of the scientific literature. *J Dent Res*, 86(2), 115-124.
31. Ian R. Freshney (2002). Human oral epithelium. *Culture of epithelial cells*, second edition, Wiley-Liss, Scotland, 196-214.
32. Mehrel T., Hohl D., Rothnagel J. A. et al (1990). Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell*, 61 (6), 1103-1112.
33. Smith (2012). Oral mucosa. Histology 1121 2012 [cited 2014 19 - 12]; Available from: <<https://www.studyblue.com/notes/n/oral-mucosa/deck/2612213>>.
34. Jabero M. F. (2010). *Investigation for the identification of transient amplifying/stem cell pool in oral mucosa*, Master of science, The Ohio State University.
35. Mackenzie I. C. (2005). Stem cells in oral mucosal epithelia. *Oral biosci med* 2(3), 95-103.
36. Dabelsteen E. (2005). Keeping faces-Saving/maintenance of oral mucosa and salivary glands. *Oral biosci med*, 2(2/3), 91-94.
37. Dotto G. P. (1999). Signal transduction pathways controlling the switch between keratinocyte growth and differentiation. *Crit Rev Oral Biol Med*, 10(4), 442-457.

38. Hatfield S. D., Shcherbata H. R., Fischer K. A. et al (2005). Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature*, 435(7044), 974-978.
39. Ian R. Freshney (2002). Cell interaction and epithelial differentiation. *Culture of epithelial cells*, second edition, Wiley-Liss, Scotland, 31-39.
40. Okazaki M., Yoshimura K., Suzuki Y. et al (2003). Effects of subepithelial fibroblasts on epithelial differentiation in human skin and oral mucosa: heterotypically recombined organotypic culture model. *Plast Reconstr Surg*, 112(3), 784-792.
41. Merne M., Syrjanen S. (2003). The mesenchymal substrate influences the epithelial phenotype in a three-dimensional cell culture. *Arch Dermatol Res*, 295(5), 190-198.
42. Florin L., Maas-Szabowski N., Werner S. et al (2005). Increased keratinocyte proliferation by JUN-dependent expression of PTN and SDF-1 in fibroblasts. *J Cell Sci*, 118(Pt 9), 1981-1989.
43. Thoft R. A. (1989). The role of the limbus in ocular surface maintenance and repair. *Acta Ophthalmol Suppl*, 192, 91-94.
44. Sangwan V. S., Tseng S. C. (2001). New perspectives in ocular surface disorders. An integrated approach for diagnosis and management. *Indian J Ophthalmol*, 49(3), 153-168.
45. Pellegrini G., Traverso C. E., Franzini A. T. et al (1997). Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*, 349(9057), 990-993.
46. Homma R., Yoshikawa H., Takeno M. et al (2004). Induction of epithelial progenitors in vitro from mouse embryonic stem cells and application for reconstruction of damaged cornea in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(12), 4320-4326.

47. Izumi K., Takacs G., Terashi H. et al (1999). Ex vivo development of a composite human oral mucosal equivalent. *J Oral Maxillofac Surg*, 57(5), 571-577; discussion 577-578.
48. Izumi K., Terashi H., Marcelo C. L. et al (2000). Development and characterization of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent produced in a serum-free culture system. *J Dent Res*, 79(3), 798-805.
49. Yoshizawa M., Feinberg S. E., Marcelo C. L. et al (2004). Ex vivo produced human conjunctiva and oral mucosa equivalents grown in a serum-free culture system. *J Oral Maxillofac Surg*, 62(8), 980-988.
50. Fukuda K., Chikama T., Nakamura M. et al (1999). Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea*, 18(1), 73-79.
51. Mejia L. F., Acosta C., Santamaria J. P. (2000). Use of nonpreserved human amniotic membrane for the reconstruction of the ocular surface. *Cornea*, 19(3), 288-291.
52. Prabhasawat P., Tesavibul N., Komolsuradej W. (2001). Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation. *Br J Ophthalmol*, 85(12), 1455-1463.
53. Dua H. S., Azuara-Blanco A. (1999). Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol*, 83(6), 748-752.
54. Lee S. H., Tseng S. C. (1997). Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol*, 123(3), 303-312.
55. Purdue G. F. (1997). Dermagraft-TC pivotal efficacy and safety study. *J Burn Care Rehabil*, 18(1 Pt 2), S13-14.

56. Itabashi Y., Miyoshi S., Kawaguchi H. et al (2005). A new method for manufacturing cardiac cell sheets using fibrin-coated dishes and its electrophysiological studies by optical mapping. *Artif Organs*, 29(2), 95-103.
57. Higa K., Shimmura S., Kato N. et al (2007). Proliferation and differentiation of transplantable rabbit epithelial sheets engineered with or without an amniotic membrane carrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(2), 597-604.
58. Nishida K., Yamato M., Hayashida Y. et al (2004). Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation*, 77(3), 379-385.
59. Shimizu T., Yamato M., Isoi Y. et al (2002). Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res*, 90(3), e40.
60. Shimazaki J., Higa K., Kato N. et al (2009). Barrier function of cultivated limbal and oral mucosal epithelial cell sheets. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(12), 5672-5680.
61. Utheim T. P. (2015). Concise review: transplantation of cultured oral mucosal epithelial cells for treating limbal stem cell deficiency-current status and future perspectives. *Stem Cells*, 33(6), 1685-1695.
62. Shortt A. J., Secker G. A., Notara M. D. et al (2007). Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. *Surv Ophthalmol*, 52(5), 483-502.
63. Inatomi T., Nakamura T., Koizumi N. et al (2006). Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *Am J Ophthalmol*, 141(2), 267-275.

64. Chen H. C., Yeh L. K., Tsai Y. J. et al (2012). Expression of angiogenesis-related factors in human corneas after cultivated oral mucosal epithelial transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53(9), 5615-5623.
65. Krishnan S., Iyer G. K., Krishnakumar S. (2010). Culture & characterisation of limbal epithelial cells & oral mucosal cells. *Indian J Med Res*, 131, 422-428.
66. Hashemi H., Salehnia M., Kamali M. et al (2009). The histological characteristics of cultured oral epithelium in different culture conditions. *Iran Biomed J*, 13(2), 109-115.
67. Priya C. G., Arpitha P., Vaishali S. et al (2011). Adult human buccal epithelial stem cells: identification, ex-vivo expansion, and transplantation for corneal surface reconstruction. *Eye (Lond)*, 25(12), 1641-1649.
68. Sen S., Sharma S., Gupta A. et al (2011). Molecular characterization of explant cultured human oral mucosal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(13), 9548-9554.
69. Hori Y., Nishida K., Yamato M. et al (2008). Differential expression of MUC16 in human oral mucosal epithelium and cultivated epithelial sheets. *Exp Eye Res*, 87(3), 191-196.
70. Hori Y., Sugiyama H., Soma T. et al (2007). Expression of membrane-associated mucins in cultivated human oral mucosal epithelial cells. *Cornea*, 26(9 Suppl 1), S65-69.
71. Oie Y., Hayashi R., Takagi R. et al (2010). A novel method of culturing human oral mucosal epithelial cell sheet using post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells and modified keratinocyte culture medium for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol*, 94(9), 1244-1250.

72. Satake Y., Dogru M., Yamane G. Y. et al (2008). Barrier function and cytologic features of the ocular surface epithelium after autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation. *Arch Ophthalmol*, 126(1), 23-28.
73. Hayashida Y., Nishida K., Yamato M. et al (2005). Ocular surface reconstruction using autologous rabbit oral mucosal epithelial sheets fabricated ex vivo on a temperature-responsive culture surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(5), 1632-1639.
74. Ilmarinen T., Laine J., Juuti-Uusitalo K. et al (2013). Towards a defined, serum- and feeder-free culture of stratified human oral mucosal epithelium for ocular surface reconstruction. *Acta Ophthalmol*, 91(8), 744-750.
75. Sotozono C., Inatomi T., Nakamura T. et al (2014). Cultivated oral mucosal epithelial transplantation for persistent epithelial defect in severe ocular surface diseases with acute inflammatory activity. *Acta Ophthalmol*, 92(6), e447-453.
76. Rheinwald J. G. (1980). Serial cultivation of normal human epidermal keratinocytes. *Methods Cell Biol*, 21A, 229-254.
77. Macpherson I., Bryden A. (1971). Mitomycin C treated cells as feeders. *Exp Cell Res*, 69(1), 240-241.
78. (Food and Drug Administration (FDA) centre for biologics evaluation and research (CBER) (2000). "In information for recommendations for physicians involved in the co-culture of human embryos with non-human animal cells. *US (FDA report)*.
79. Martin M. J., Muotri A., Gage F. et al (2005). Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med*, 11(2), 228-232.

80. Ilmarinen T., Laine J., Juuti-Uusitalo K. et al (2013). Towards a defined, serum- and feeder-free culture of stratified human oral mucosal epithelium for ocular surface reconstruction. *Acta Ophthalmol*, 91, 744-750.
81. Barnes D., Sato G. (1980). Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Analy Bioc*, 102, 255-270.
82. Green H. (1978). Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: a new view. *Cell*, 15(3), 801-811.
83. Nakamura T., Inatomi T., Sotozono C. et al (2006). Transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal epithelial equivalents for the treatment of severe ocular surface disease. *Ophthalmology*, 113(10), 1765-1772.
84. Hayashi I., Sato G. H. (1976). Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature*, 259(5539), 132-134.
85. Ulltveit-Moe HF E. J., Björkblom B., Møller S.G. et al (2011). Xenobiotic- and Serum-Free Culture Protocol for Autologous Cultivated Oral Mucosal Epithelial Cells on Therapeutic Contact Lenses. *Investigative Ophthalmology and Visual Science, Poster Abstract*.
86. Đỗ Thùy Hương (2010). *So sánh kết quả tạo tấm biểu mô giác mạc thỏ từ tế bào gốc biểu mô vùng rìa bằng mảnh mô và dịch treo*, Luận văn tốt nghiệp bác sĩ nội trú, Trường đại học Y Hà Nội.
87. Nguyễn Phúc Hoàn (2011). *Nghiên cứu tạo tấm biểu mô bằng nuôi cấy tế bào gốc biểu mô kết mạc thỏ*, Luận văn tốt nghiệp bác sĩ nội trú, Trường đại học Y Hà Nội.
88. Izumi K., Tobita T., Feinberg S. E. (2007). Isolation of human oral keratinocyte progenitor/stem cells. *J Dent Res*, 86(4), 341-346.
89. Barrandon Y., Green H. (1987). Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(8), 2302-2306.

90. Nakamura T., Takeda K., Inatomi T. et al (2010). Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol*, 95(7), 942-946.
91. Iida T., Takami Y., Yamaguchi R. et al (2005). Development of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent based on an acellular allogeneic dermal matrix: a preliminary report of clinical application to burn wounds. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 39(3), 138-146.
92. Bhargava S., Chapple C. R. (2004). Buccal mucosal urethroplasty: is it the new gold standard? *BJU Int*, 93(9), 1191-1193.
93. Quint E. H., Park J. M. (2014). Promising surgical innovations involving buccal mucosa for vaginal creation and reconstruction. *Obstet Gynecol*, 123(5), 921-922.
94. Kim M. K., Lee J. L., Oh J. Y. et al (2008). Efficient cultivation conditions for human limbal epithelial cells. *J Korean Med Sci*, 23(5), 864-869.
95. Lim L. S., Riau A., Poh R. et al (2009). Effect of dispase denudation on amniotic membrane. *Mol Vis*, 15, 1962-1970.
96. Nakamura T., Yoshitani M., Rigby H. et al (2004). Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(1), 93-99.
97. Hopkinson A., Shanmuganathan V. A., Gray T. et al (2008). Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*, 14(4), 371-381.
98. Koizumi N., Rigby H., Fullwood N. J. et al (2007). Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 245(1), 123-134.

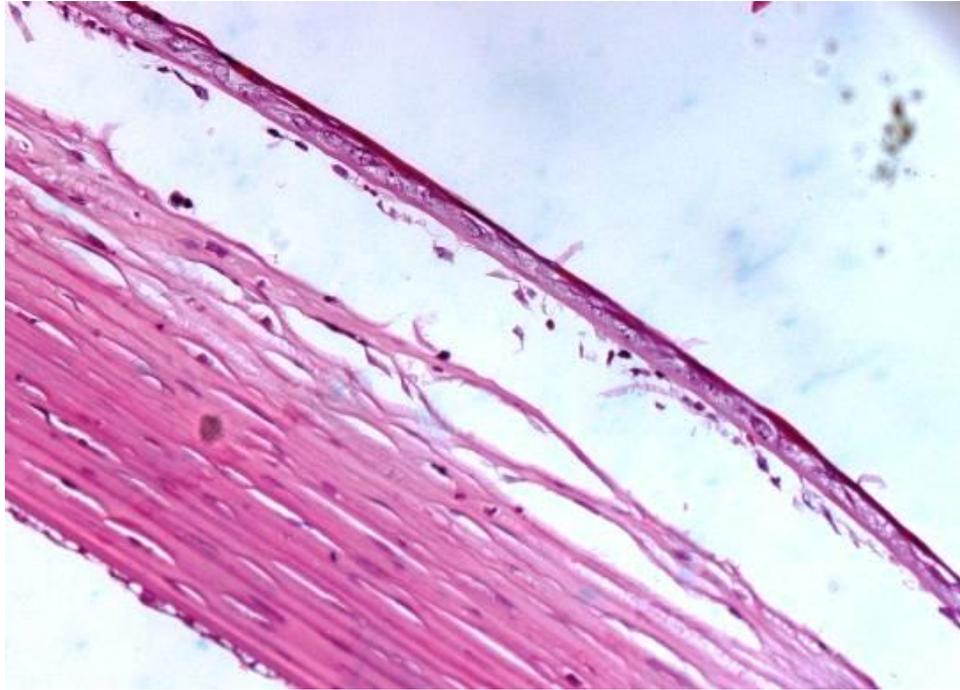
99. Đỗ Thùy Hương, Nguyễn Thị Bình (2009). Nghiên cứu phương pháp nuôi tạo tấm biểu mô giác mạc từ tế bào gốc vùng rìa giác mạc. *Nghiên cứu y học*, 65(6), 7-10.
100. Nguyễn Phúc Hoàn, Nguyễn Khang Sơn, Nguyễn Thị Bình et al. (2013). Nghiên cứu nuôi tạo tấm biểu mô kết mạc từ tế bào gốc kết mạc thỏ. *Tạp chí y dược học quân sự*, 38(4), 23-27.
101. Krishnan S., Sudha B., Krishnakumar S. (2010). Isoforms of p63 in corneal stem cells cultured on human amniotic membrane. *Biologicals*, 38(5), 570-576.
102. Pellegrini G., Golisano O., Paterna P. et al (1999). Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol*, 145(4), 769-782.
103. Kawasaki S., Tanioka H., Yamasaki K. et al (2006). Expression and tissue distribution of p63 isoforms in human ocular surface epithelia. *Exp Eye Res*, 82(2), 293-299.
104. Szurman P., Warga M., Grisanti S. et al (2006). Sutureless amniotic membrane fixation using fibrin glue for ocular surface reconstruction in a rabbit model. *Cornea*, 25(4), 460-466.
105. Hanada K., Shimazaki J., Shimmura S. et al (2001). Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera. *Am J Ophthalmol*, 131(3), 324-331.
106. Solomon A., Pires R. T., Tseng S. C. (2001). Amniotic membrane transplantation after extensive removal of primary and recurrent pterygia. *Ophthalmology*, 108(3), 449-460.
107. Sudha B., Jasty S., Krishnan S. et al (2009). Signal transduction pathway involved in the ex vivo expansion of limbal epithelial cells cultured on various substrates. *Indian J Med Res*, 129(4), 382-389.

108. Grueterich M., Espana E., Tseng S. C. (2002). Connexin 43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact and denuded amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(1), 63-71.
109. Meller D., Pires R. T., Tseng S. C. (2002). Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures. *Br J Ophthalmol*, 86(4), 463-471.
110. Squier C. A., Kremer M. J. (2001). Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 29, 7-15.
111. Dua H. S., Joseph A., Shanmuganathan V. A. et al (2003). Stem cell differentiation and the effects of deficiency. *Eye (Lond)*, 17(8), 877-885.
112. Inatomi T., Nakamura T., Koizumi N. et al (2005). Current concepts and challenges in ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial transplantation. *Cornea*, 24(8 Suppl), S32-S38.
113. Atallah M. R., Palioura S., Perez V. L. et al (2016). Limbal stem cell transplantation: current perspectives. *Clin Ophthalmol*, 10, 593-602.
114. Nakamura T., Inatomi T., Sotozono C. et al (2004). Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. *Acta Ophthalmol Scand*, 82(4), 468-471.
115. Sangwan V. S., Matalia H. P., Vemuganti G. K. et al (2005). Early results of penetrating keratoplasty after cultivated limbal epithelium transplantation. *Arch Ophthalmol*, 123(3), 334-340.
116. Abe R., Shimizu T., Shibaki A. et al (2003). Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome are induced by soluble Fas ligand. *Am J Pathol*, 162(5), 1515-1520.
117. Atiyeh B. S., Costagliola M. (2007). Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: three decades later. *Burns*, 33(4), 405-413.

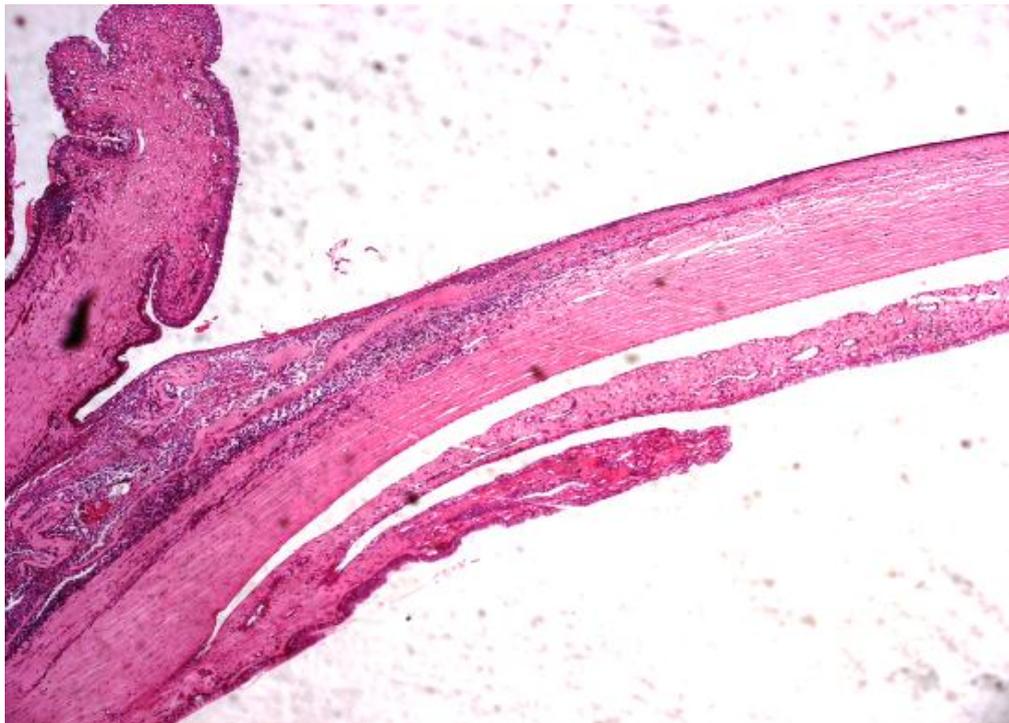
118. Kanayama S., Nishida K., Yamato M. et al (2007). Analysis of angiogenesis induced by cultured corneal and oral mucosal epithelial cell sheets in vitro. *Exp Eye Res*, 85(6), 772-781.
119. Yiu S. C., Thomas P. B., Nguyen P. (2007). Ocular surface reconstruction: recent advances and future outlook. *Curr Opin Ophthalmol*, 18 (6), 509-514.
120. Nakamura T., Inatomi T., Cooper L. J. et al (2007). Phenotypic investigation of human eyes with transplanted autologous cultivated oral mucosal epithelial sheets for severe ocular surface diseases. *Ophthalmology*, 114(6), 1080-1088.
121. Gaddipati S., Muralidhar R., Sangwan V. S. et al (2014). Oral epithelial cells transplanted on to corneal surface tend to adapt to the ocular phenotype. *Indian J Ophthalmol*, 62(5), 644-648.
122. Bardor M., Nguyen D. H., Diaz S. et al (2005). Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. *J Biol Chem*, 280(6), 4228-4237.
123. Ang L. P., Tanioka H., Kawasaki S. et al (2010). Cultivated human conjunctival epithelial transplantation for total limbal stem cell deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(2), 758-764.
124. Sekiyama E., Nakamura T., Kawasaki S. et al (2006). Different expression of angiogenesis-related factors between human cultivated corneal and oral epithelial sheets. *Exp Eye Res*, 83(4), 741-746.

PHỤ LỤC

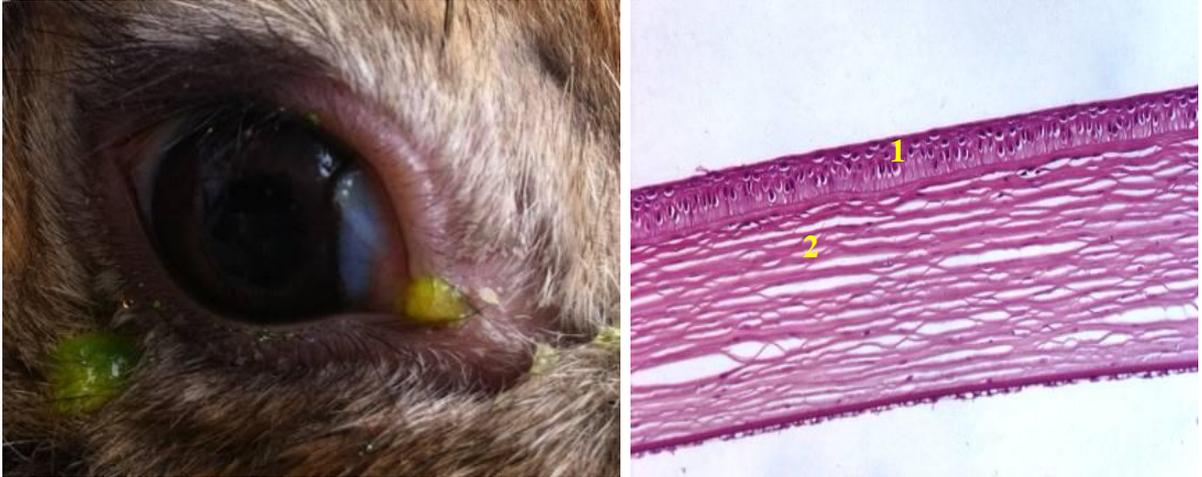
1. Hình ảnh sinh thiết giác mạc thô sau ghép ở các thời điểm



Giác mạc thô sau ghép tấm biểu mô NMM 7 ngày (x250)



Giác mạc thỏ sau ghép tẩm biểu mô NMM 15 ngày kết quả tốt (x100)



Giác mạc thỏ sau ghép tẩm biểu mô NMM 30 ngày kết quả tốt (x250)

1. Biểu mô 2. Nhu mô giác mạc



Giác mạc thỏ sau ghép tẩm biểu mô NMM 60 ngày kết quả tốt (x250)

2. Hình ảnh mắt của BN sau phẫu thuật ghép tằm biểu mô NMM tự thân



Mắt BN Phạm Ngọc T. Trước và sau mổ 2 năm (kết quả tốt)

3. Quy trình nuôi cấy tằm biểu mô NMM

- (i) lấy mảnh NMM mặt trong vùng giữa má có đường kính 3mm;
- (ii) cắt mảnh NMM này thành các mảnh nhỏ có kích thước 0,5mmx0,5mm;
- (iii) ủ mảnh NMM đã cắt nhỏ trong dung dịch dispase II 1,2 UI/ml ở nhiệt độ 37°C trong môi trường chứa 5% CO₂ từ 45 đến 60 phút;
- (iv) rửa bằng môi trường SHEM2 (Supplemental Hormonal Epithelial Medium – môi trường nuôi cấy biểu mô có bổ sung hormone) để làm dừng tác động của dispase II;
- (v) bóc tách biểu mô khỏi mô liên kết;
- (vi) ngâm biểu mô và mô liên kết trong dung dịch Trypsin – EDTA 0,05% trong PBS trong thời gian 30 giây;
- (vii) rửa biểu mô và mô liên kết hai lần bằng môi trường SHEM2;

- (viii) đặt mảnh biểu mô lên lồng nuôi cấy đã được căng màng ối, lồng nuôi cấy có mặt đáy được làm bằng màng phân cách có cỡ lỗ sao cho các tế bào trong mảnh mô liên kết không thể vượt qua;
- (ix) đặt mảnh mô liên kết vào giếng nuôi cấy thứ hai với tỷ lệ 3 mảnh biểu mô/2 mảnh mô liên kết;
- (x) đặt lồng nuôi cấy trong giếng nuôi cấy sao cho mặt đáy của nó nằm trong môi trường nuôi cấy;
- (xi) nhỏ 1ml môi trường SHEM2 vào lồng nuôi cấy và 1,5ml môi trường SHEM2 vào giếng nuôi cấy và thay môi trường 2 ngày một lần;
- (xii) tiến hành nuôi cấy cho đến khi nguyên bào sợi trong mô liên kết phủ 2/3 giếng thì loại bỏ mảnh mô liên kết;
- (xiii) tiếp tục nuôi cấy cho đến khi tế bào gốc trong mảnh biểu mô tăng sinh tạo thành một lớp biểu mô trên bề mặt màng ối thì loại bỏ mảnh biểu mô;
- (xiv) tiến hành tạo tầng cho lớp biểu mô cho đến khi biểu mô phát triển đến độ dày gồm từ 4 đến 5 hàng tế bào;
- (xiv) lấy tấm biểu mô đã được tạo tầng ra khỏi lồng nuôi cấy.