

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**

Chuyên ngành : Mô - Phôi thai học

Mã số : 62720103

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2016

CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI:

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

THẦY HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

PGS.TS. NGUYỄN THỊ BÌNH

Phản biện 1: PGS.TS. Quán Hoàng Lâm

Phản biện 2: PGS.TS. Nguyễn Hồng Giang

Phản biện 3: PGS.TS. Trần Văn Khánh

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án cấp Trường họp tại Trường Đại học Y Hà Nội.

Vào hồi giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện quốc gia
- Thư viện thông tin Y học Trung ương
- Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tổn thương bề mặt nhãn cầu (BMNC) do nhiều nguyên nhân khác nhau thường để lại di chứng là hội chứng suy giảm tế bào gốc vùng rìa giác mạc (limbal stem cell deficiency-LSCD) và hậu quả là suy giảm thị lực. Trên thế giới, phương pháp hiện đại nhất để điều trị hội chứng LSCD toàn bộ cả hai bên mắt là ghép tẩm biểu mô nuôi cấy từ tế bào gốc biểu mô niêm mạc miệng tự thân. Niêm mạc miệng sở dĩ được lựa chọn do có cùng nguồn gốc phôi thai và cấu trúc mô học với biểu mô trước giác mạc. Đã có nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới công bố về sự thành công của phương pháp này. Tuy nhiên, cho đến nay ở Việt Nam chưa có một nghiên cứu nào về vấn đề này. Vì vậy, chúng tôi tiến hành “**Nghiên cứu nuôi tạo tẩm biểu mô từ tế bào gốc biểu mô niêm mạc miệng**” với các mục tiêu sau:

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

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Đã tìm ra được phương pháp nuôi tạo tẩm biểu mô niêm mạc miệng hoàn toàn mới đó là sử dụng mảnh biểu mô và lớp tế bào đồng nuôi cấy là nguyên bào sợi tự thân. Trên thực nghiệm, ở giai đoạn đầu quá trình nghiên cứu, phương pháp này cho tỷ lệ nuôi tạo thành công cao hơn phương pháp mảnh mô và thấp hơn phương pháp dịch treo nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Ở giai đoạn 2, chúng tôi đã nuôi 30 mẫu trên thỏ với tỷ lệ nuôi tạo thành công là 100%. Phương pháp mới này đơn giản, hiệu quả, khắc phục được nhược điểm và tận dụng được ưu điểm của cả hai phương pháp nuôi cấy hiện đang sử dụng trên thế giới. Nguyên bào sợi tự thân được sử dụng thay thế cho 3T3 là loại tế bào có nguồn gốc từ chuột. Áp dụng phương pháp này để nuôi tạo tẩm biểu mô từ tế bào gốc biểu mô niêm mạc miệng trên người, tỷ lệ thành công là 90%.

2. Sử dụng nhiều phương pháp khác nhau để định danh các tế bào của tấm biểu mô nuôi cấy. Kết quả: các tế bào của tấm biểu mô nuôi cấy có cấu trúc hình thái và hóa học giống với biểu mô trước giác mạc.
3. Ghép các tấm biểu mô bằng phương pháp này cho 15 mắt thỏ bị suy giảm tế bào gốc vùng rìa giác mạc toàn bộ, 60 ngày sau ghép giác mạc thỏ trong và tấm biểu mô dính sát vào lớp chân bì. 17 bệnh nhân được ghép tấm biểu mô có 9 bệnh nhân cải thiện thị lực, số còn lại không còn hiện tượng tăng sinh xơ mạch vào giác mạc.

CẤU TRÚC CỦA LUẬN ÁN

Luận án gồm 122 trang, 4 chương, 5 bảng, 55 hình, 124 tài liệu tham khảo với 5 tài liệu tiếng Việt, 119 tài liệu nước ngoài. Phần đặt vấn đề: 02 trang; chương 1: tổng quan tài liệu 34 trang; chương 2: đối tượng và phương pháp nghiên cứu 18 trang; chương 3: kết quả nghiên cứu 38 trang; chương 4: bàn luận 28 trang; kết luận: 1 trang; khuyến nghị: 01 trang; danh mục bài báo liên quan; tài liệu tham khảo; phụ lục.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

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 và là nơi có các tế bào gốc của giác mạc.

1.1.1. Giác mạc

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.

1.1.2. Kết mạc

Kết mạc là một bộ phận phụ thuộc nhãn cầu, trải từ vùng rìa cùng giác mạc đến đường xám của bờ mi, được chia thành 3 phần: *kết mạc mi, kết mạc nhãn cầu, kết mạc cùng đồ*.

1.1.3. Vùng rìa cùng-giác mạc

Vùng rìa là vùng tiếp nối giữa cùng mạc với giác mạc, ở đây có sự chuyển tiếp từ biểu mô giác mạc thành biểu mô kết mạc nhãn cầu.

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

Mắt cần có hệ thống thần kinh toàn vẹn và sự toàn vẹn của BMNC giúp cho hình ảnh nhìn thấy có thể tới điểm hội tụ trên võng mạc. Mi mắt, phim nước mắt, các tuyến lệ, sự toàn vẹn của hai cung phản xạ điều tiết nước mắt, chức năng của tế bào biểu mô BMNC được hỗ trợ bởi nguyên bào sợi, nhu mô và chất cơ bản là các yếu tố đảm bảo toàn vẹn của bề mặt nhãn cầu.

1.2. Cấu trúc biểu mô bề mặt khoang miệng

Niêm mạc miệng có cấu tạo gồm hai phần chính: biểu mô và lớp đệm. Biểu mô niêm mạc miệng là loại biểu mô tầng.

Biểu mô niêm mạc má thuộc loại lát tầng không sừng hóa. Tế bào biểu mô ở lớp đáy gồm 2-3 lớp sát màng đáy có hình trụ hoặc hình đa diện, 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.

Khi tế bào rời lớp đáy và bước vào quá trình biệt hóa, tế bào lớn hơn dẹt dần và tích lũy xơ keratin và lipid trong bào tương ngày một nhiều.

Ở niêm mạc miệng, khi tế bào gốc phân chia, nó sẽ tạo ra một tế bào con giữ nguyên đặc tính của tế bào gốc là khả năng phân chia vô hạn định và cho ra một tế bào con khác bước vào quá trình biệt hoá. Có rất nhiều yếu tố quyết định số phận tế bào sẽ trở thành gốc hay tế bào tăng sinh chuyển tiếp.

Các tương tác giữa tế bào biểu mô và mô liên kết đóng vai trò quan trọng trong việc điều khiển sự phát triển mô.

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

Hội chứng suy giảm tế bào gốc vùng rìa có thể *nguyên phát*, hoặc có thể là hậu quả *thứ phát*. Suy giảm vùng rìa có thể xảy ra toàn bộ hoặc chỉ ở một góc của vùng rìa. 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.

1.4. Những nghiên cứu về nuôi tạo tấm biểu mô niêm mạc miệng

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 đỡ sử dụng trong nuôi cấy tế bào gốc biểu mô niêm mạc miệng gồm nhiều loại khác nhau, nhưng màng ối đã được nhiều tác giả sử dụng.

Việc chuẩn bị mẫu mô niêm mạc miệng và xử lý miếng mô cho nuôi cấy cũng có vai trò rất quan trọng. Sau khi sát khuẩn kỹ khoang miệng, bệnh nhân được gây tê tại chỗ, dùng dao tròn trích thủ mảnh niêm mạc miệng. Kích thước mảnh mô trích thủ thay đổi tùy từng tác giả và phụ thuộc vào yêu cầu và phương pháp nuôi cấy. Mảnh mô được xử lý qua nhiều công đoạn và phương pháp xử lý mảnh mô khác nhau. Có hai phương pháp chính nuôi cấy đó là nuôi bằng mảnh mô hoặc dịch treo tế bào.

Trong nuôi cấy, việc sử dụng nguyên bào sợi chuột bất hoạt 3T3 làm lớp tế bào nuôi cũng gây nhiều lo ngại bởi đây là sản phẩm có nguồn gốc động vật. Đã 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.

Môi trường nuôi cấy tế bào biểu mô niêm mạc miệng thông thường là sự kết hợp của Ham's F12 và DMEM với tỉ lệ 1:1. Ngoài ra cần có các yếu tố bổ sung khác: Insulin, hydrocortisone, T3, isoproterenol, cholera toxin, các hormon tăng trưởng... Các thành phần bổ sung thông thường có mặt đầy đủ trong huyết thanh. Huyết thanh bào thai bò (FBS) được rất nhiều tác giả sử dụng, nhưng đây là sản phẩm có nguồn gốc động vật. Vì thế, có tác giả dùng huyết thanh tự thân hoặc của người có nhóm máu AB để thay thế FBS. Một số tác giả đã sử dụng môi trường không huyết thanh.

Có nhiều cách khác nhau để định danh tế bào của tấm biểu mô:

(1) *Quan sát hình thái tấm biểu mô sống* bằng kính hiển vi soi nổi.
 (2) *Nhuộm trypan blue*: để xác định tỷ lệ tế bào sống và chết của tế bào.
 (3) *Nhuộm giemsa*: để quan sát bề mặt của tấm biểu mô nuôi cấy.
 (4) *Nhuộm Hematoxylin-Eosin (H.E)* nhằm đánh giá cấu trúc vi thể của tấm biểu mô theo chiều dọc.
 (5) *Kỹ thuật hiển vi điện tử*: để nghiên cứu cấu trúc của tế bào và tấm biểu mô.
 (6) *Kỹ thuật khuếch đại chuỗi PCR* (polymerase chain reaction): dùng phát hiện các marker của tế bào biểu mô niêm mạc miệng.
 (7) *Kỹ thuật hoá mô miễn dịch*: Đây là kỹ thuật hiện đại và được sử dụng phổ biến khi đánh giá đặc điểm của tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy. Nhuộm hoá mô miễn dịch để xác định các marker: K3, K12, connexin-43 (Cx-43), p63, p75, MCSP, $\beta 1$ intergrin, PPAR γ , Ki67, Pax 6, occludin, ZO1, ABCG2, desmoplakin...
 (8) *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.

Tấm biểu mô niêm mạc miệng được ứng dụng: (1) Trong nhãn khoa, (2) Điều trị các trường hợp bỏng da rộng, cho các phẫu thuật đường niệu, tạo hình âm đạo, thực quản hoặc tái thiết mi mắt.

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:

-Mảnh mô niêm mạc miệng của thỏ chủng *Orytolagus Cuniculus* khoẻ mạnh.

-Mảnh mô niêm mạc miệng người.

-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.

- Nghiên cứu quy trình trích thủ và xử lý tấm biểu mô niêm mạc miệng, lựa chọn môi trường nuôi cấy, phương pháp nuôi cấy phù hợp
- Đánh giá chất lượng tấm biểu mô
- Ghép thực nghiệm trên thỏ đã gây bông tổn thương toàn bộ vùng rìa.

Giai đoạn 2:

Dựa trên những kết quả trên thỏ, giai đoạn 2 sẽ tiến hành trên bệnh nhân suy giảm tế bào gốc vùng rìa toàn bộ với quy trình tương tự.

2.2. Quy trình nuôi cấy

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

2.2.2. Thực nghiệm trên thỏ

2.2.2.1. *Chuẩn bị màng ối:* Sử dụng màng ối được xử lí theo quy trình của bộ môn Mô-Phôi, trường Đại học Y Hà Nội, tức là màng ối đã loại bỏ biểu mô bằng ammonia 10%.

2.2.2.2. *Chuẩn bị lớp 3T3 làm nền nuôi cấy:* Chuẩn bị lớp 3T3 (sử dụng mẫu 3T3 đã qua xử lý mitomycin)

2.2.2.3. *Chuẩn bị mảnh mô niêm mạc miệng cho nuôi cấy*

- Gây mê thỏ bằng đường tĩnh mạch rìa tai, sát trùng khoang miệng
- 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 trích thủ các mảnh niêm mạc với kích thước: đường kính 3mm, 6mm, 8mm.
- + Kiểm tra cấu trúc vi thể của mảnh niêm mạc miệng
- + Mảnh niêm mạc miệng được rửa bằng PBS có bổ sung kháng sinh, kháng nấm.

(1) Nuôi bằng phương pháp mảnh mô:

- Cắt mảnh niêm mạc miệng thành các mảnh nhỏ 1x1mm
- Ủ miếng mô trong dung dịch dispase II, rửa lại bằng PBS, ngâm EDTA, sau đó miếng mô được rửa lại sạch bằng môi trường nuôi cấy.

- Nuôi cấy các mảnh mô đã được xử lý trên nền màng ỏi.

(2) Nuôi cấy bằng dịch treo:

- Cắt mảnh niêm mạc miệng thành các mảnh nhỏ 0,5x0,5mm.

- Ủ mảnh niêm mạc miệng trong dispase II, bóc mảnh biểu mô ra khỏi mô nền, ngâm mảnh biểu mô trong Trypsin-EDTA, sau đó rửa lại mảnh biểu mô và bằng DMEM+Ham's F12 có kháng sinh, kháng nấm và 10% FBS.

- Nạo lấy các tế bào lớp đáy biểu mô và li tâm lấy các tế bào biểu mô.

- Tạo dịch treo có mật độ tế bào 1×10^6 tế bào/ml.

- Nuôi cấy trong lồng nuôi cấy ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Thay môi trường đều đặn 2 ngày 1 lần.

- Nếu sử dụng lớp 3T3: 03 ngày thay 3T3 một lần.

(3) Nuôi cấy bằng phương pháp mảnh biểu mô:

Đây là phương pháp hoàn toàn mới, chưa có tác giả nào trên thế giới sử dụng.

- Ủ mảnh niêm mạc miệng đã cắt nhỏ 0,5x0,5mm trong dispase II, bóc rời mảnh biểu mô khỏi mô nền, ngâm mô sau bóc vào trypsin-EDTA 0,05%, sau đó rửa lại bằng DMEM+Ham's F12 có kháng sinh, kháng nấm và 10% FBS.

- Dán mảnh biểu mô lên trên nền màng ỏi để mặt biểu mô hướng lên trên.

- Dán mô nền xuống đáy giếng nuôi cấy với tỉ lệ 3 mảnh biểu mô/2 mảnh mô nền.

- Nuôi cấy trong điều kiện 37°C, 5% CO₂, thay môi trường 2 ngày/lần.

Ở các phương pháp nuôi cấy khác nhau, theo dõi liên tục sự phát triển của tấm biểu mô. Khi tế bào biểu mô mọc kín đáy lồng nuôi cấy, tiến hành tạo tầng cho tấm biểu mô, đánh giá chất lượng của tấm biểu mô nuôi cấy sau thu hoạch.

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), insulin 5µg/ml (Gibco),

EGF 10ng/ml (Gibco), penicillin 100UI/ml (Wako), streptomycin 100µg/ml (Wako), amphotericin B 0,25µg/ml (Gibco).

- Môi trường nuôi cấy SHEM 2: gồm DMEM/F12 tỉ lệ 1:1 (có bổ sung: FBS 10%, insulin 5µg/ml, EGF 10ng/ml, triiodothyronin 1,3ng/ml, isoproterenol 0,25µg/ml, hydrocortisone 0,5µg/ml, penicillin 100UI/ml, streptomycin 100µg/ml, amphotericin B 0,25µg/ml).

2.2.2.4. Thu hoạch và định danh tế bào nuôi cấy

Sau khi nuôi cấy được tám biểu mô kích thước 4 cm², mẫu nuôi cấy được ghép lại cho thử nghiệm, phần còn lại tiến hành định danh tế bào của tám biểu mô nuôi cấy bằng các kỹ thuật hiển vi quang học, hiển vi điện tử, hoá mô, hoá mô miễn dịch.

2.2.3. Thử nghiệm trên bệnh nhân tự nguyện.

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

2.3. Chỉ tiêu nghiên cứu

- Tỷ lệ nuôi tạo thành công tám biểu mô.
- Thời gian nuôi cấy.
- Cấu trúc vi thể, siêu vi thể và hóa học của tám biểu mô nuôi cấy.

2.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu tiền cứu được 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

Xử lí số liệu theo phần mềm SPSS 16.0.

2.6. 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” đã được thông qua hội đồng đạo đức Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nghiên cứu về nuôi tạo tấm biểu mô trên thử nghiệm.

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

Sinh thiết niêm mạc miệng trên 5 thử chủng *Orytolagus Cuniculus* ở 3 vị trí khác nhau, chúng tôi nhận thấy:

Ở mặt trong niêm mạc má phần trung tâm: Biểu mô là loại lát tầng không sừng hóa. Biểu mô dày, gồm 18-20 hàng tế bào, chia làm 3 lớp, lớp tế bào đáy gồm 2-3 hàng tế bào có kích thước nhỏ, nhân hình trứng, sẫm màu, bào tương rất ưa base. 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.

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, mỏng, gồm 4-5 hàng tế bào. Các tế bào lớp đáy có nhân hình trứng, sẫm màu, bào tương ưa base. Ranh giới giữa biểu mô và mô liên kết bên dưới tương đối bằng phẳng, không có các nhú chân bì.

Chúng tôi lựa chọn vị trí lấy mảnh mô dùng cho nuôi cấy là mặt trong, phần trung tâm niêm mạc má.

Khi trích thủ mẫu để làm nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy, để nuôi tạo được 2 tấm biểu mô, mảnh mô trích thủ cần phải có kích thước: (1) đường kính 6mm ở phương pháp nuôi bằng mảnh mô. (2) đường kính 8mm mới đủ lượng tế bào tạo được 2 ml dịch treo có mật độ 1×10^6 tế bào/ml ở phương pháp dịch treo. (3) đường kính 3mm ở phương pháp nuôi bằng mảnh 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 niêm mạc miệng bằng môi trường SHEM1, chỉ có 30% mẫu mọc và các mẫu mọc đều không kín đáy sau 28 ngày nuôi cấy. Sau đó, nghiên cứu chuyển sang sử dụng môi trường SHEM2, và

toàn bộ kết quả nghiên cứu tiến hành nuôi cấy trong môi trường SHEM2 với tỉ lệ nuôi tạo thành công tằm biểu mô là 76,47-95%.

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 giếng bằng mảnh biểu mô. Tỷ lệ nuôi tạo thành công tằm biểu mô được ghi trong bảng 3.2.

Bảng 3.2. Tỷ lệ nuôi tạo thành công tằm biểu mô niêm mạc miệng 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 (2, 3)>0,05
Mảnh biểu mô (3)	19	17	89,47	p (1, 3)>0,05

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

Đánh giá lớp tế bào nuôi 3T3 trong các phương pháp nuôi tạo tằm biểu mô niêm mạc miệng (bảng 3.3):

Bảng 3.3. Tỷ lệ nuôi tạo thành công tằm biểu mô niêm mạc miệng 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	p1,2<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 (bảng 3.4):

Bảng 3.4. Tỷ lệ nuôi tạo thành công tấm biểu mô niêm mạc miệng 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	<i>p1,2>0,05</i>
NBS tự thân (2)	19	17	89,47	

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 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 ven:

- 3 ngày sau nuôi cấy: các tế bào đã phát triển lan ra xung quanh mảnh mô. Ranh giới các tế bào rõ ràng, tế bào có hình tròn, hình đa diện và hình thoi dài.

-10-12 ngày sau nuôi cấy: các tế bào tạo thành một lớp phủ kín đáy của lồng 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.

- 14-16 ngày sau nuôi cấy: Tấm biểu mô không phẳng, ngoài tế bào biểu mô còn có nhiều nguyên bào sợi với hình thái điển hình (hình 3.5).

- Tấm biểu mô nuôi cấy bằng dịch treo tế bào

- 2 ngày sau nuôi cấy: có khá nhiều các tế bào tròn bám vào đáy, sau đó, các tế bào này xoè rộng với các nhánh bào tương khá dài

- 12-14 ngày sau nuôi cấy: tế bào biểu mô phủ kín lòng nuôi cấy.

- Sau khi tạo tầng, 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).

Trên 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 trương lực, lưới nội bào có hạt.

• Tấm biểu mô nuôi cấy bằng mảnh biểu mô

- 3-4 ngày sau nuôi cấy: Các tế bào có hình tròn, một số có hình đa diện với các nhánh bào tương dài bò lan. 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 lòng nuôi cấy vào khoảng ngày thứ 10-12, các tế bào nằm sát 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.

- Sau khi tạo tầng: 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).

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.

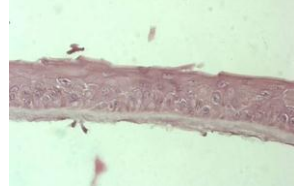
Dưới kính hiển vi điện tử, bề mặt hàng tế bào trên cùng có nhiều vi nhung mao ngắn chia nhánh, khoảng gian bào giữa các tế bào lớp trên đáy khá rộng, các tế bào liên kết với nhau bởi các cầu bào tương. Các tế bào lớp đáy có nhân lớn, màng nhân có những lõm nông, hạt nhân rất lớn, chất nhiễm sắc phân 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 mộng và thể liên kết còn với màng đáy bởi thể bán liên kết, 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 3.5. Tắm biểu mô sau nuôi cấy 12 ngày (Nuôi bằng mảnh mô)



Hình 3.9. Lát cắt đứng dọc của tắm biểu mô sau 21 ngày nuôi cấy (Nuôi bằng dịch treo)



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

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 lý mitomycin, được nuôi trên đáy giếng nuôi cấy. Nguyên bào sợi dài, phủ kín đáy giếng sau 3 ngày nuôi cấy. Các ngày sau đó, các tế bào thoái hóa dần, vì vậy, sau 3 ngày sử dụng lớp 3T3 này phải thay mới.

3.1.5.2. Lớp nguyên bào sợi tự thân

Các mảnh mô liên kết tách ra từ mảnh niêm mạc miệng 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, 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.

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.

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

Nhuộm P.A.S.: Trong bào tương các tế bào lớp dưới có ít glycogen. Không thấy các tế bào tiết nhầy.

3.1.7. Kết quả ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng 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 niêm mạc miệng nuôi cấy ở các thời điểm khác nhau.

Tất cả các thỏ ở các lô đều có kết quả tốt: giác mạc trong, biểu mô liền tốt, nhẵn 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 tấm biểu mô niêm mạc miệng từ tế bào gốc niêm mạc miệng trên người

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 gồm khoảng 10-15 hàng tế bào, 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), 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. Trên

tiêu bản nhuộm p63, nhân tế bào đặc biệt là ở lớp đáy bất màu đậm. Các nhú chân bì cũng có kích thước lớn, chia nhánh rõ. Mô đệm lỏng lẻo, ít tế bào. Cấu trúc niêm mạc miệng vùng giữa má ở nam và nữ đều giống nhau.

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. Tỷ lệ nuôi thành công là 90%.

Dựa trên kết quả nghiên cứu thực nghiệm trên thỏ, chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy niêm mạc miệng của 17 bệnh nhân (4 bệnh nhân nuôi 2 lần) bằng môi trường SHEM2, với phương pháp nuôi cấy là mảnh biểu mô. Số tấm biểu mô nuôi được là 54 (tỷ lệ nuôi thành công là 90%, 3 bệnh nhân nuôi cấy không thành công). Số tấm biểu mô được ghép lại cho bệnh nhân là 22. Với thời gian nuôi cấy các tế bào biểu mô là 16-28 ngày. Tấm biểu mô nuôi cấy có khoảng 4-5 hàng tế bào, hàng tế bào trên cùng dẹt và có nhân dẹt.

Bề mặt tế bào tấm biểu mô nuôi cấy trên người có những vi nhung mao, giống với hình ảnh của tế bào bề mặt ở giác mạc người bình thường. Song kích thước của các vi nhung mao lớn hơn, và số lượng ít hơn so với tấm biểu mô nuôi cấy ở thỏ, 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) và các thể liên kết trong bào tương tế bào có nhiều lưới nội bào có hạt, ti thể, hạt glycogen 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. Bào tương tế bào biểu mô nuôi cấy 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.

Trên các tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch phát hiện p63, nhân các tế bào của tằm biểu mô bất màu nâu sẫm, đặc biệt là nhân các tế bào lớp đáy.

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

Tằm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy được ghép lại cho bệnh nhân và được đánh giá kết quả phẫu thuật dựa trên 3 yếu tố: độ trong và áp của tằm biểu mô, tình trạng biểu mô bề mặt nhẵn 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 bệnh nhân này có sự cải thiện rõ rệt về thị lực nhìn gần, trong khoảng 10–30 cm.

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. Về lựa chọn nền nuôi cấy

Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng màng ổi đã nạo sạch biểu mô bằng ammonia 10% 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 sử dụng nền nuôi cấy nào và nếu dùng màng ổi thì sử dụng như thế nào? Nếu dùng màng ổi, loại bỏ biểu mô trước khi nuôi cấy được sử dụng rộng rãi hơn (Kim và cs. 2008, Lim và cs. 2009, Nakamura và cs. 2004). Bên cạnh đó, có những nghiên cứu lại khẳng định sự ưu việt của màng ổi để nguyên biểu mô (Fukuda và cs. 1999).

Tuy nhiên, nếu không sử dụng màng ổi (sử dụng màng polymer nhạy cảm nhiệt hoặc hồ fibrin), bề mặt giác mạc sau ghép sẽ trong hơn khi quan sát trên thô (Higa K. và cs. 2007, Higa K. và cs. 2012, Hayashida và cs. (2005), Kokaba V. và cs. (2014), Nishida K. và cs. (2004), Hori Y. và cs. (2007), Hori Y. và cs. 2008, Oie Y. và cs. (2010), Hayashida Y. và cs. (2005)).

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 tẩm biểu mô nuôi cấy trên nền fibrin cho kết quả tốt. Tuy nhiên, trong trường hợp tổn thương mô đệm, hay gặp do bỏng nặng, thì sử dụng nền màng ối là sự lựa chọn phù hợp hơn. Chính tác giả Kocaba V. và cs. (2014) sử dụng màng polymer nhạy cảm nhiệt, song không thấy sự tái tạo trở lại của màng Bowman do bị hủy trước khi ghép, vậy sử dụng màng ối hợp với sinh lý hơn. Sudha B. và cs. (2009) cũng khẳng định ưu điểm của màng ối.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, bệnh nhân Võ Vũ Ngọc Y. (31 tuổi) sau ghép tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy 12 tháng, tẩm biểu mô còn nguyên vẹn, điều này chứng tỏ trong tẩm biểu mô nuôi cấy vẫn có tế bào gốc.

4.2. Về vị trí và kích thước của mảnh niêm mạc miệng dùng cho nuôi cấy

Khi nghiên cứu cấu trúc vi thể niêm mạc miệng thỏ chúng tôi thấy: niêm mạc vùng 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. Ở bệnh nhân, niêm mạc vùng mặt trong má cũng có kết quả tương tự. Kết quả của chúng tôi phù hợp với nhiều công bố trên thế giới Priya C. G. và cs. 2011, Squier C. A. và cs. 2001, Hori Y. và cs. 2007, Inatomi T. và cs 2006, Dua và cs 2003, Ma D. H. và cs. 2009, Hayashida Y. và cs. 2005.

Để có được hai tẩm biểu mô có kích thước 4cm^2 , khi nuôi cấy bằng dịch treo, mảnh niêm mạc cần có đường kính 8mm. Một số tác giả trích thủ mảnh mô nhỏ hơn, song chỉ nuôi 01 tẩm: Nishida K. và cs. (2004) sử dụng đường kính 3mm, Ma D. H. và cs. (2009) là $6 \times 6\text{mm}$. Khi nuôi bằng mảnh mô, chúng tôi trích thủ mảnh có đường kính 6mm. Phương pháp nuôi bằng mảnh biểu mô, đường kính của mảnh niêm mạc miệng là 3mm. Ở phương pháp nuôi cấy bằng mảnh

biểu mô, diện tiếp xúc của các tế bào gốc lớp đáy được bộc lộ tối đa, loại bỏ được hoàn toàn nguyên bào sợi nên tấm biểu mô nuôi cấy phẳng đẹp.

4.3. Về môi trường nuôi cấy

Mỗi tác giả có một công thức riêng cho môi trường nuôi cấy. Giai đoạn đầu, chúng tôi sử dụng môi trường SHEM1, tỉ lệ các mẫu mọc chỉ là 30%, các tấm biểu mô có tế bào thừa thớt.

Khi dùng SHEM2 là môi trường SHEM1 có bổ sung insulin, hydrocortisone, T3, isoproterenol, các tế bào gốc biểu mô niêm mạc miệng 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 cholera toxin. Tuy nhiên, với tỉ lệ nuôi tạo thành công tấm biểu mô, môi trường SHEM2 sử dụng tốt để nuôi tạo tấm biểu mô từ tế bào gốc niêm mạc miệng.

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 niêm mạc miệng là cần thiết, đặc biệt với các mẫu nuôi cấy trên thỏ. Các tác giả khác nhau sử dụng các loại kháng sinh khác nhau, ở những nồng độ hoàn toàn khác nhau. Madhira S. L. và cs. (2008), Satake Y. và cs. (2008) có sử dụng gentamicin trong thành phần môi trường nuôi cấy. 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. Trong môi trường nuôi cấy, huyết thanh bào thai của bò vẫn được sử dụng trong nhiều nghiên cứu (Nakamura và cs. 2003, Nakamura và cs. 2004, Picot 2005). Tuy nhiên, việc sử dụng huyết thanh bào thai của bò có những bất lợi, đặc biệt là vấn đề protein dị loài. Để giải quyết vấn đề này, cho tới nay, có nhiều nghiên cứu sử dụng huyết thanh tự thân ở nhiều nồng độ khác nhau cho kết quả nuôi cấy tốt (Nakamura T. và cs. (2006), Ang L. P. và cs. (2006). Priya C. G. và cs. (2011). Satake Y. và cs. (2011). Hirayama M. và cs. (2012)). 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 (Zakaria N. và cs. (2014)).

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 (Ilmarinen T. và cs. 2012, Hayashi I. và cs. 1976). 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%.

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 niêm mạc miệng với các nồng độ khác nhau.

4.4. Về phương pháp nuôi cấy

4.4.1. Phương pháp nuôi cấy bằng mảnh mô:

Khi sử dụng phương pháp này, trừ các tế bào ở chu vi mảnh mô được dán vào màng ồi sẽ dễ bò lan, các tế bào khác bị hạn chế bởi mô đệm để có thể tiếp xúc với nền nuôi cấy.

Tấm biểu mô nuôi cấy của chúng tôi không bằng phẳng, có các gờ nổi lên, đó là nguyên bào sợi. Theo chúng tôi, niêm mạc miệng có lớp mô liên kết lỏng lẻo, 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. 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. Điều này sẽ ảnh hưởng tới hiệu quả khi ghép lại cho bệnh nhân. Sự có mặt của các nguyên bào sợi là điều kiện thuận lợi cho tổ chức xơ mạch bò vào giác mạc. Khi nuôi cấy tấm 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. Kanayama S. và cs. (2007) khi nghiên cứu tằm biểu mô giác mạc và niêm mạc miệng nuôi cấy để xác định các yếu tố gây ra hiện tượng kết mạc hóa sau ghép, kết quả là FGF là nguyên nhân dẫn tới hiện tượng tân mạch và kết mạc hóa giác mạc xảy ra ở tằm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy mà đối với tằm biểu mô nuôi cấy từ tế bào gốc vùng rìa giác mạc không gặp hiện tượng này.

Mặc dù phương pháp nuôi cấy bằng mảnh mô đơn giản và cũng được nhiều tác giả trên thế giới sử dụng, nhưng trong nghiên cứu của chúng tôi, chất lượng của tằm biểu mô nuôi cấy không đạt yêu cầu đề ra nên chúng tôi không sử dụng phương pháp này nữa.

4.4.2. Phương pháp nuôi bằng dịch treo:

Khi xử lý tạo dịch treo tế bào và mảnh biểu mô, chúng tôi dùng dispase. Đây là enzym có tác dụng cắt các mối liên kết giữa tế bào và màng đáy nhờ đó lớp tế bào biểu mô được tách rời ra khỏi mô đệm. 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, cũng không thấy có mặt các tế bào của mô liên kết ở mảnh biểu mô. Sau đó sử dụng enzyme trypsin-EDTA để li giải lớp tế bào biểu mô thành những tế bào riêng rẽ để 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.

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 tằm biểu mô niêm mạc miệng bằng dịch treo, nguồn gốc của các tế bào ở tằm này là tế bào dòng biểu mô được khẳng định khi nhuộm K3 dương tính ở bào tương của các tế bào lớp trên đáy. Kết luận này của chúng tôi cũng phù hợp với kết luận của Ma D. H. và cs. (2009), Nakamura T. và cs. (2003), Hayashida Y. và cs. (2005).

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. Tỷ lệ nuôi tạo thành công tấm biểu mô từ ba phương pháp mảnh mô, dịch treo và mảnh biểu mô bóc 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, không cần 3T3 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.

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 với $p < 0,05$ (100% so với 81,48%).

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. Đây là một kỹ thuật hoàn toàn mới, thể hiện tất cả các lợi thế hơn các phương pháp nuôi cấy tấm biểu mô niêm mạc miệng 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 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 thấy hình ảnh các tế bào có kích thước nhỏ, tỉ lệ nhân/bào tương lớn. Về mặt hình thái, đây được cho là những tế bào gốc (Izumi K. và cs. (2007), Priya C. G. và cs. (2011)).

Tế bào của tẩm biểu mô thu hoạch thể hiện các cấu trúc của biểu mô điển hình. 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 cho thấy: các tế bào đặc biệt là các tế bào lớp đáy dương tính mạnh với p63; các tế bào lớp trên dương tính mạnh với K3-K12, cấu trúc của tẩm biểu mô niêm mạc miệng của chúng tôi giống với cấu trúc của biểu mô trước giác mạc bình thường và tẩm biểu mô giác mạc nuôi cấy và cũng được nhiều tác giả trên thế giới mô tả (Nakamura và cs. 2003, Madhira và cs. 2008, Moharamzadeh và cs. 2007, Nakamura và cs. 2010, Ang và cs. 2010, Sekiyama và cs. 2006).

Các tẩm biểu mô mà chúng tôi nuôi cấy được đã ghép lại trên thực nghiệm cho thỏ và cho bệnh nhân 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 tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy lâu nhất là 180 ngày, tẩm biểu mô sống và áp sát vào mô nền giác mạc. Ở mảnh gọt bề mặt giác mạc của bệnh nhân Võ Vũ Ngọc Y. (31 tuổi) sau ghép tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy được 12 tháng, chúng tôi vẫn thấy một phần của tẩm biểu mô tồn tại. Trên thế giới cũng có những bằng chứng về sự tồn tại lâu dài của tẩm biểu mô sau ghép trên bệnh nhân (Kocaba V. và cs. (2014), Sangwan V. S. và cs. (2014)).

4.6. Vấn đề tồn tại cần nghiên cứu tiếp để hoàn thiện quy trình nuôi cấy tẩm biểu mô niêm mạc miệng

Để giảm thiểu tối đa sự tiếp xúc với các sản phẩm của động vật, trong quy trình thu hoạch tẩm biểu mô chúng tôi đã rửa tẩm biểu mô

nuôi cấy bằng DMEM:Ham's F12 (không FBS), sau đó chuyển phẫu thuật trong điều kiện vô khuẩn ở 37⁰C.

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.

Khi nghiên cứu trên người, tổng số lần tiến hành sinh thiết niêm mạc miệng 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 ối. Chúng tôi đã tiến hành được 22 phẫu thuật ghép tấm biểu mô cho bệnh nhân. Ở 22 ca này chúng tôi đều có 1 tấm dùng để ghép cho bệnh nhân và 1 tấm dùng để làm tiêu bản mô học. Cấu trúc vi thể của các tấm được khẳng định hoàn toàn bình thường. 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 các tấm khó bóc sau khi nuôi cấy chúng tôi thấy nguyên bào sợi đã phát triển và bám ở dưới đáy lồng nuôi cấy. 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.

Theo nhận định của chúng tôi, có thể trong quá trình nuôi cấy mảnh mô nền dùng cho việc tạo ra lớp nguyên bào sợi có kích thước quá lớn tạo điều kiện cho nguyên bào sợi phát triển, thông qua các lỗ màng đã tạo được mối liên hệ giữa tế bào sợi và màng ối làm cho quá trình bóc tách gặp khó khăn. Để hạn chế vấn đề này, theo chúng tôi, mảnh mô nền 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 nhắc bỏ mảnh mô ra khỏi đáy giếng nuôi cấy.

KẾT LUẬN

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

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

- Vị trí sinh thiết mảnh niêm mạc miệng dùng nuôi cấy tằm biểu mô là vùng trung tâm má, mảnh niêm mạc miệng có đường kính 3mm đủ để nuôi tạo hai tằm biểu mô.

- Môi trường nuôi cấy tằm biểu mô niêm mạc miệng: Môi trường SHEM2: phối hợp DMEM/Ham's F12 tỉ lệ 1:1, bổ sung thêm các yếu tố khác: EGF, insulin, hydrocortisone, isoproterenol, T3, FBS, kháng sinh, kháng nấm.

2. Xác định được phương pháp mới nuôi tạo tằm biểu mô niêm mạc miệng: quy trình nuôi tạo tằm biểu mô bằng phương pháp mảnh biểu mô, sử dụng lớp tế bào nuôi là nguyên bào sợi tự thân.

KHUYẾN NGHỊ

(1) Cần có những nghiên cứu tiếp theo để hoàn thiện quy trình thu hoạch tằm biểu mô niêm mạc miệng.

(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 tằm 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 tằm biểu mô niêm mạc miệng để điều trị tổn thương bề mặt nhãn cầu. *Tạp chí Y học Thực hành*, 818-819, 560-563.

MINISTRY OF EDUCATION MINISTRY OF HEALTH
AND TRAINING

HANOI MEDICAL UNIVERSITY

DAO THI THUY PHUONG

**RESEARCH TO CREATE THE CULTURED
ORAL EPITHELIAL CELLS SHEET FROM
ORAL EPITHELIAL STEM CELLS**

Speciality: Histology and Embryology

Code: 62720103

ABREVIATION OF DOCTORAL THESIS

HANOI - 2016

The thesis is completed at:
Hanoi Medical University

Advisor:

Ass. Prof. Nguyen Thi Binh

Criticizer 1: Ass. Prof. Quan Hoang Lam

Criticizer 2: Ass. Prof. Nguyen Hong Giang

Criticizer 3: Ass. Prof. Tran Van Khanh

This thesis will be presented at the Hanoi Medical University's doctoral degree granting committee as a fulfillment of the Doctor of Science degree in Medicine.

This session will be held at Hanoi Medical University.

Time: Date:

The thesis is placed at:

- National library
- National Medicine library

- Hanoi Medical University library

BACKGROUND

The injuries of the eyes's surface are the consequences of many different causes. That leads to the limbal stem cell deficiency syndrome (LSCD) resulting in visual loss. Worldwide, one of the most modern methods to treat LSCD is using cultivated autologous oral epithelial cells sheet from oral mucosa epithelial stem cells. Oral mucosa is selected because it has the same embryonic origin and similar histological structure to corneal epithelium. There have been many studies around the world announced the success of this approach. However, so far in Vietnam, there have not yet had any research on this issue. Therefore, we conducted a "Research to create the cultured oral epithelial cells sheet from oral epithelial stem cells" with the following objectives:

1. Specify the location, the size of the oral mucosa tissue and culture medium suitable for the culture of epithelial sheets.
2. Determine the appropriate method to create the oral mucosa epithelial sheet.

NEW CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

1. Find out the completely new method to create the cultured oral mucosal epithelial sheet: using epithelial fragment only and co-cultured with autologous fibroblasts. In phase 1 of experimental period, the proportion of successful creation of cultured epithelial sheet of epithelial fragment method were higher than explant, and lower than suspension method but the difference were not significant. In phase 2: We have adopted 30 samples by the epithelial fragment method, the success growth rate is 100%. This new method is simple, effective and has many advantages over and take full of pros of current methods in the world. Autologous fibroblasts were co-cultured instead of mouse 3T3 (animal derived product). On human, the success growth rate was 90% when using this new finding method.

2. Using many different methods to characterize the cells of cultured epithelial sheets, the results showed that the morphological

and chemical characteristics of the cultured cells are similar to corneal epithelial cells.

3. Fifteen cultured oral epithelial sheets created by our new method were transplanted for 15 eyes of 15 rabbits with total LSCD in one eye, clear corneal surfaces were observed and the grafts were firmly attached to the underlying connective tissue after 60 days of transplantation. After grafting, among 17 total limbal stem cell deficiency patients, the visual acuity was improved in 9 patients, no fibrovascular tissue invasion was found on the corneal surface in the rest.

STRUCTURE OF THE THESIS

The thesis consists of 122 pages, 4 chapters, 5 tables, 55 figures, 124 references: Vietnamese: 5, foreign language: 119.

Background: 02 pages; Chapter 1: Overview: 34 pages; Chapter 2: Objects and Methods: 18 pages; Chapter 3: Results: 38 pages; Chapter 4: Discussion: 28 pages; Conclusions: 1 page; Recommendations: 01 page; lists of related articles; references; appendix.

CHAPTER 1: OVERVIEW

1.1. The structure of the eye's surface

The surface of the eye is the area that is bounded by two gray lines on upper and lower eyelids, including corneal and conjunctival and epithelium and at the boundary is the limbal epithelium where the stem cells of the cornea are located.

1.1.1. The cornea

Corneal epithelium is non-keratinized stratified squamous structure and is comprised of 4-6 cell lines, accounting for about 10 % of the corneal thickness. Epithelium is divided into three layers: the basal, prickle and the superficial layer.

1.1.2. The conjunctiva

It spreads from the periphery of the cornea to gray lines of the eyelids, and is divided into 3 parts: palpebral, fornical and bulbal conjunctiva.

1.1.3. The limbus

Limbus is located between the cornea and the conjunctiva, where has the transition from the corneal to the conjunctivalepithelium.

1.1.4. The relevant factors to ensure the integrity of the eyes

Eyes need nervous system and surface integrity to see. Eyelids, tear film, the lacrimal glands, the integrity of the two regulatory reflex arcs of tears and function of eye surface epithelial cells supported by fibroblasts, connective tissue are required to ensure the integrity of the ocular surface.

1.2. The Structure of the oral mucosal surface

Oral mucosa consists of two main parts: the epithelium and the connective tissue. The mucosal epithelium of the mouth is stratified squamous, may keratinized, nonkeratinized or parakeratinized depending on different regions and has the same proliferative pattern of skin.

Epithelial cells in the basal layer of the thin epithelium or 2-3 layers close to the basement membrane in thick epithelium possess cylindrical or cubal shapes. They are capable of division to maintain epithelial cell population. The dividing cells usually exist in clusters, see more in the deepest recess of the epithelium. When leaving the basal layer, they enter the progress of differentiation, become larger, flatter, accumulate the keratin fibers and lipid in the cytoplasm.

In the buccal mucosa, when the stem cell divides, it create a new daughter cell retain the ability to divide indefinitely of stem cells, and produces a different daughter cells enter differentiation process. Lots of factors being found in many studies decide the fate of cells will become stem or transit amplifying cell.

The interaction between epithelial cells and connective tissue plays an important role in the growth of the epithelium.

1.3. Limbal stem cell deficiency syndrome

Limbal stem cell deficiency syndrome may be primary or secondary consequences and may be total or partial. Clinical manifestations may be corneal opacity, roughness surface, shallow or

deep neovascularization in the thickness of the cornea or conjunctivalization of the cornea. It may be difficult in corneal ulcer healing. Thin cornea or corneal perforation can occur in severe cases.

There are many ways to treat the LSCD. The most effective and modern method is using the cultured corneal epithelium sheet. In the case of total stem cell deficiency, there has no limbal stem cells, so using allograft or autologous epithelial cells are compulsory solutions. So grafting autologous cultured mucosa epithelium sheet is the top choice to prevent using immunosuppressive drug.

1.4. Studies on culturing the oral mucosa epithelium sheet.

Selection the suitable culture substrate on biological and physical properties, porosity, stability is one of the most important factors to make epithelial sheet. There are a lot of kinds of substrates using in culturing the oral epithelial sheet, amniotic membrane is selected by most of the authors.

The preparation and handling of the oral mucosal tissue plays a significant role in culture. After oral antiseptic, the patient is under local anesthesia, special kind of knife manually use to extract the oral mucosa. The size of the extracted tissue manually change depending on the author and methods of culturing. Biosy tissue is processed through several stages and methods of handling vary depending on the authors. There are two main culture methods: explants culture and cell-suspension.

Besides, the use of inactivated mouse fibroblast 3T3 cell is controversial, fibroblast must be inactivated by irradiation or mitomycin before use to avoid further reproduction of cells. 3T3 has many pros in co- cultures but has many cons because it is the product of animal. There are also many success studies without using 3T3.

Oral mucosa culture media is a combination of Ham 's F12 and DMEM with ratio 1:1 and additional factors: insulin, hydrocortisone, T3, growth hormone... The additional components normally present in serum. Fetal bovine serum (FBS) is chosen by most of the authors,

but this is the product of animal. Therefore, instead of FBS, some authors have used autologous serum. Some other authors have used serum-free medium in culture. According to these authors it has more advantages: (1) the environment can be selected in accordance with the target of culture. (2) Can control the proliferation and differentiation process of cells.

After creating the oral epithelial sheet, the identification of the epithelial cells will be carried out by using these methods: (1) Observe the development process of epithelial cells by stereo microscope. (2) Trypan blue staining: to assess cell viability. (3) Giemsa staining, to observe the surface of cultured epithelial sheets. (4) Hematoxylin-eosin staining (HE.) to evaluate the vertical structure of the epithelial sheet. (5) Electron microscope, to study the ultra structure of epithelial cells and cell sheet. (6) Polymerase chain reaction: to detect the markers of epithelial cells. (7) Immunohistochemical technique: This is a modern technique and is commonly used to assess the characteristics of cultured oral mucosal epithelial sheets. K3 , K12 , connexin - 43 (Cx - 43), p63, p75, MCSP, β 1 intergrin, PPAR γ , Ki67, Pax 6, occludin, ZO1, ABCG2, desmoplakin ... are determined by this technique: (8) Cluster forming test: when being isolated and develop outside the body, some of the characteristics of stem cells are retained and reflected in the type of the cluster it formed.

Oral epithelial cell sheet is applied in many fields: (1) application in ophthalmology: There have been many announcements of success in clinical trials and the use of oral mucosal cultured epithelial sheets for reconstruction of the ocular surface. The follow up time after transplantation and results are different depending on the authors. (2) The application in other areas: Technology creates the oral mucosal epithelial sheets are rarely applied in other clinical applications. However, it is possible to use the cultured oral mucosal epithelial sheets for treatment of extensive skin burns and urinary tract surgery or eyelid reconstruction.

Chapter 2: SUBJECTS AND METHODS

2.1. Subjects of the research

2.1.1. *Subjects and materials research:*

- Oral mucosal biopsy sample of healthy rabbit (strain *Orytolagus Cuniculus*).

- Human oral mucosal biopsy sample

- 3T3 cells supplied by The cell-histology-embryology and Biophysiology dept of the University of Natural Sciences.

- Amniotic membrane was processed under the procedures of the department of Histology and Embryology, Hanoi Medical University.

2.1.2. *Research model*

Research conducted in two phases:

Phase 1: Conducting experiments on rabbits.

- Research the way to extract and process the oral mucosal sample, the choice of culture medium, suitable culture method.

- Evaluate the quality of the cultured epithelial sheet

- Experiments on rabbits with total LSCD by alkaline burn injury.

Phase 2:

Based on the results in rabbits, phase 2 will be conducted in patients with total LSCD.

2.2. The process of culturing

2.2.1. *Prepare the equipment required for culturing*

2.2.2. *Experiment on rabbit*

2.2.2.1. Preparation of membranes: Using amniotic membrane, epithelial cells were removed after rinsing in 10% of ammonia.

2.2.2.2. Preparation of 3T3: using mitomycin inactivated 3T3 samples

2.2.2.3. *Preparing for the oral mucosa tissue cultured*

- Oral mucosal biopsy specimens were taken from rabbits with anesthesia induced by ear intravenous injection, mouth antiseptic was carry out before the operation.

- The position of biopsy: (1) the central part of the inside buccal, (2) the cheek: 2mm from the oral commissure and at perpendicular angle, (3) mucosal surface in the lower center lip.

- Use a round knife with the mucosal extract size: diameter 3mm, 6mm, 8mm.

- + Check the structure of the biosy sample of the oral mucosa

- + Fine oral mucosa was washed with PBS supplemented with antibiotics, antifungals.

(1) Explant culture method:

- Cut the piece of oral mucosa into small pieces: 1x1mm

- Incubate tissue pieces in dispase II solution, rinse with PBS, soak in EDTA, then rinse with culture medium

- The piece of tissue were placed on the amniotic membranes and cultured in SHEM medium

(2) Suspension culture:

- Cut the piece of oral mucosa into small pieces: 1x1mm

- Incubate tissue pieces in dispase II solution, peel off the epithelium from tissue, soak the epithelium in Trypsin - EDTA, then rinse the epithelium in DMEM + Ham's F12 with antibiotics, antifungal and 10 % FBS

- Scraping the epithelial layer and centrifugation to havest epithelial cells.

- To create the suspension of cell at density 1×10^6 cells/ml

- Culture in the incubation at 37°C, 5% CO₂. Change the medium every 2 days.

- If using 3T3 cells: change 3T3 every 03 days.

(3) Epithelial fragment method: This is a completely new approach, no authors in the worth declare this method.

- Incubate tissue pieces in dispase II solution, peeloff the epithelium from the connective tissue, then peeled tissue isoaked in Trypsin – EDTA 0,05%, then rinse the epithelium in DMEM + Ham's F12 with antibiotics, antifungal and 10% FBS.

- Place the epithelial fragment on amniotic membrane with the epithelial side upward.

- Stick on the bottom of the culture dish 3 epithelial fragments /2 connective pieces.

- Culture in incubator of 37⁰C, 5% CO₂, change the medium every 2 days.

In each culture methods, continuously observe the development of epithelial sheets. When epithelial cell expanded the surface (confluence) of the insert, exposed the cells to the air (air-lifting) to stratify the epithelial sheet.

Assess the quality of cultured epithelial sheets when harvested.

2.2.2.3. Culture media, culture and observing process

- SHEM1 comprises DMEM/F12 1:1 (Gibco, Invitrogen – USA with 10 % FBS (Gibco) , insulin 5µg /ml, EGF, 100UI penicillin/ml, streptomycin 100µg /ml (Biowest), amphotericin B 200 g/ml (Gibco).

- SHEM2 comprises DMEM/F12 1:1 (with 10% FBS, insulin 5µg /ml, EGF, triiodothyronine, isoproterenon, hydrocortisone, 100UI penicillin/ml, streptomycin 100µg/ml, amphotericin B 200 g/ml).

2.2.2.4. Harvesting and identifying cultured cells

When cultured epithelial sheet reaches the size of 4 cm², one cultured sheet was used for experiment on rabbit, the rest was used for microscopes, electron microscopy, histochemical, immunohistochemical evaluation.

2.2.3. *Tested on a voluntary patient.*

Conducted after the results in rabbits.

2.3. Research targets

The proportion of successfully created epithelial sheet

The time of culture

The microscopic structure, ultrastructure, histochemistry of cultured epithelial sheets.

2.4. Location and time of the study

A prospective study was conducted at the department of histology and embryology of Hanoi medical university and The department of Cornea of The National institute of Ophthalmology, from October/1010 to october/2013.

2.5. Study design

Statistical analysis was performed using the SPSS 16.0 statistical software. The rate was compared with T test, $P < 0.05$ was considered statistically significant.

2.6. Ethics of research

The thesis is part of the National independent study, "Research on the use of stem cells for the treatment of ocular surface diseases", code DTDL.2010T/15 have adopted ethical council of Medicine, Hanoi medical University.

Chapter 3: FINDINGS

3.1. Results of studies to create the epithelial sheet on rabbits.

3.1.1. Selecting the location and the size of biopsy samples

Biopsy of oral mucosa conducted in 5 rabbits (strain Orytolagus Cuniculus) in 3 different positions, we found that:

On the mucosa in the central part of the inside buccal: Epithelium is stratified nonkeratinized and very thick, composed of 18-20 cell lines, divided into three layers, the basal cell layer consists of 2-3 rows of small size cells with the egg-shaped, deep nuclear, very basophilic cytoplasm. Using P63 staining, the cells on the bottom layer are strongly expressed. The connective tissue under the epithelial layer creates very high papillary.

Inside mucosal surface of the cheek, in a perpendicular angle and 2mm from the oral commissure, inside mucosal surface in the central part of the bottom lip: Epithelium is thin, stratified and non-keratinized, consisting of 4-5 cell lines. The cells on the basal layer possess the egg-shaped, deep nuclear, very basophilic cytoplasm. The boundary between epithelial and connective tissue beneath is relatively flat, without the papillary.

We selected the place to take the sample for culture is the central part of the inside buccal.

When extract samples for research, we found that, to form 2 epithelial sheets, the size of biosy sample should be: (1) diameter 6mm in tissue culture method by explant. (2) 8mm is enough for 2 ml suspension at density of 1×10^6 cells /ml in suspension method. (3) 3mm in the method adopted by the epithelium fragment.

3.1.2. Selection of culture medium

In the beginning, we conducted experimental animal models: 18 pieces were cultured by SHEM1 medium, only 30% of the sample developed and were not confluent after 28 days of culture. Then, SHEM2 was applied, and all research results conducted in SHEM2 with the rate of success is 76.47 to 95%.

3.1.3. Selection culture method

Phase 1: We cultured 17 wells with tissue fragments method, 20 wells with suspension, 19 wells with epithelial fragments. The proportion of successful creation of epithelial sheet was listed in Table 3.2.

Table 3.2. The proportion of successful creation the oral mucosa epithelial sheets with different culture methods

	Culture sample	Successful sheet	Success culture rate (%)	p
Explant(1)	17	13	76,47	p(1, 2)>0,05
Suspension(2)	20	19	95	p(2, 3)>0,05
Epithelial fragment(3)	19	17	89,47	p(1, 3)>0,05

Phase 2: We have adopted 30 samples by the epithelial fragment method, the rate of growth and success culture rate is 100%. Among these, 15 cultured epithelial sheets were grafted for 15 eyes of 15 rabbits losing the entire corneal epithelium in one eye by alkaline burn.

- To evaluate the role of 3T3 layer (table 3.3):

Table 3.3. Percentage of successful cultured oral epithelial rate using 3T3 cells

	Culture sample	Successful sheet	Success culture rate (%)	p
3T3 (+) (1)	10	10	100	<i>p_{1,2}<0,05</i>
3T3 (-) (2)	27	22	81,48	

To evaluate the effect of autologous fibroblasts, we cultured 19 samples using autologous fibroblasts substitute for mouse 3T3 (table 3.4).

Table 3.4. Percentage of successful cultured oral epithelial sheet using different source of feeder cells

	Culture sample	Successful sheet	Success culture rate (%)	p
Mouse 3T3(+)(1)	10	10	100	<i>p_{1,2}>0,05</i>
Autologous fibroblasts(2)	19	17	89,47	

Phase 2: We have adopted 30 samples by epithelial fragment method, with the support of autologous fibroblasts, the rate of growth and successful creation of the epithelial sheet is 100%. Among these, 15 cultured epithelial sheets were grafted for 15 eyes of 15 rabbits losing the entire corneal epithelium by alkaline burn.

3.1.4. Morphology and growth rate of cultured epithelial sheets by different methods

- cultured epithelial sheets by explant method:

- 3 days of culture: the cells have spread to surrounding tissue fragments. Boundaries of cells are clearly seen, cells are round, multifaceted and lozenge.

-10-12 days of culture: the cells form a layer covering totally the bottom of the insert culture. The surface of the cultured epithelial

sheet is not flat, high edges were observed on the surface. In this edge, there are a lot of long cells with flat nucleus when using inverted microscope.

- 14-16 days of culture: epithelial sheets are not flat, many fibroblasts co-exist in the epithelial sheet (figure 3.5).

- cultured epithelial sheets by cell suspension

- 2 days of culture: there are plenty of round cells stick to the bottom, then, they spread with long cytoplasmic branches

- 12-14 days of culture: epithelial cells are confluent.

- After air-lifting, using H.E. staining and Giemsa staining method: the surface of the cultured epithelial sheet was flat, consisting of 5-7 rows of cells, the the shape of the higher cell is flatter. The intercellular space is wide, the lozenge cells were not existed in the cultured sheet (figure 3.9).

On electron microscopy, intercellular space between the cells in the supra-basal layer of the epithelial sheet is quite wide. The cells here are closely attached to neighbouring cells by numerous desmosomal and intercellular junctions. In the cytoplasm of cells, there are a lot of organelles, glycogen particles, the bundle of fiber, rough endoplasmic reticulum.

- Cultured epithelial sheets by epithelial fragments

- 3-4 days of culture: The cells with round shape, polyhedral shape with long cytoplasmic branches spread. Cell spreading gradually, beginning with polyhedral shape cells, wide intercellular space. When the cells are confluent all the surface of the bottom of insert culture dish in 10-12 days, the cells close together, the size of the cells are smaller with narrower intercellular space but still clearly observed boundaries, dividing cells appeared crowdedly.

- After air-lifting: We harvested the flat surface cultured epithelial sheet, consisting of 5-7 rows of cells, the higher cell position the flatter shape they become. The intercellular space is narrower than the space in the culture sheet by suspension method. Spindle cell could not observed by this method (figure 3.15).

When observed the surface of cultured epithelial sheets on day 14 by Giemsa staining method: The epithelial cells are confluent. In epithelial fragments method, narrow intercellular space was seen, in contrast to the results of the suspension method with a wider intercellular space. Spindle cell could not be observed by this method.

Under the electron microscope: the apical side of the cells in the superficial row were covered with many short-branched villi, intercellular space on the prickly layers is quite wide, the cells connected by cytoplasmic bridges. The nucleus of the cells on the basal layer are enlarged and has dispersed chromatin, there are lots of rough endoplasmic reticulum and mitochondria and clusters of glycogen particles in the cytoplasm. The cells on the basal layer adhered well to the surrounding cells by desmosomes and to the amniotic membrane by hemi-desmosomes.

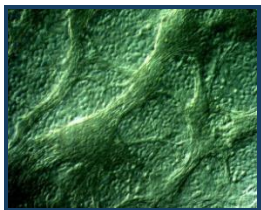


Figure 3.5. 12 days cultured epithelial sheets (explant method)

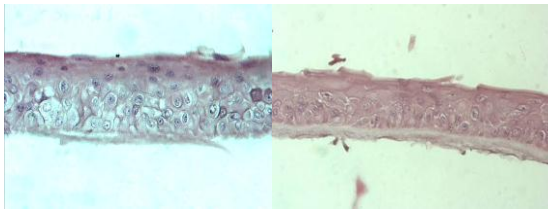


Figure 3.9. 21 days cultured epithelial sheets (suspension method)

Figure 3.15. 21 days cultured epithelial sheets (epithelial fragment method)

3.1.5. Morphology and growth of fibroblasts

3.1.5.1. 3T3

3T3 layer was created by mitomycin-treated 3T3, fed on the bottom of the culture well. After 3 days of culture, the fibroblasts cover all the surface of the bottom of the well. On the following days, the cells gradually degenerate, so, after 3 days of using 3T3 should be replaced.

3.1.5.2. Autologous fibroblasts

The piece of connective tissue extracted from buccal mucosa fragments were co-cultured with the epithelial cells. On the day 3-5 of culture, the long spindle - multifaceted shaped fibroblast with

many branches spread around the connective tissue, on the 6th day of culture, about half of the area of the bottom are covered by fibroblasts and to about day 10 of culture, the entire bottom are covered.

3.1.6. The results of identifying cultured epithelial cell sheet by immunohistochemistry

On slides are stained to detect p63 by immunohistochemical, the nucleus of the cells of the epithelial sheet are dark brown, especially on the basal layer.

To detect K3 and K12: K3 and K12 shown weakness in the cells on the supra basal layers.

To detect glycogen and mucus by PAS staining: In the cytoplasm of the cells haveless glycogen. Do not see the mucous secreting cells.

3.1.7. The results of grafting oral cultured mucosa epithelial sheet on experimental burn model on rabbits

21 rabbits still exist during the experiment, of which 15 received oral cultured epithelial sheets at different times. All rabbits in the plot have good results: clear cornea, epithelialisation completely in all rabbits, smooth surface, no neovascular or just around the limbal region. Only one rabbit had moderate result: neovascularization in peripheral but not in the center of the cornea at 60 days after surgery.

3.2. Results of cultured oral mucosa epithelial sheets on human

Based on the results in rabbits, we selected the location for the biopsy is the center of the buccal. Histological results showed that epithelium consists of about 10-15 cell lines, but not as thick as epithelium in rabbits. However, the basal layer consists of 3-4 cell lines and consists of small cells with dark basophilic cytoplasm, Malpighi layer includes 7-10 rows (the cell size is larger than in rabbit, the boundary between the cells is quite clear). And 2-3 layer of flat squamous superficial cells. The cells especially in the basal layer strongly expressed p63. The papillary dermis is also large, well branched. The stromal has few cells. The structure of oral mucosa in men and women are the same.

After considering the complexity of the process and results and the oral mucosal biopsy specimen size of the two methods: suspension and epithelial fragments, epithelial fragments method was chosen for the application on patient. Oral mucosal biopsy specimen is 3mm in diameter, biopsy in the inside middle of the buccal position. The proportion of successfulcultivation was 90%.

Based on the results of experimental studies in rabbits, we conducted culture oral mucosa of 17 patients (4 patients had to carry 2 times) by SHEM2 medium, the culture method is epithelial fragment. The total number of cultured sheets is 54 (the success rate is 90%, failed culture in 3 patients). The number of grafted cultured sheet for patients is 22. The culture period of epithelial cells is 16-28 days. The cultured epithelial sheets comprise of 4-5 cell lines with flat squamous superficial cells.

The apical side of the epithelial cells in the superficial layer are covered with the microvilli, like the structure of the surface of cells in normal human cornea. But the size of the villi is larger, and the amount is less than in cultured epithelial sheets in rabbits, epithelial cells of the cultured sheets interconnected by long cytoplasmic bridges (longer than the cytoplasmic bridges in experimental rabbits) and desmosomes. Rough endoplasmic reticulum, mitochondria, glycogen particles, Golgi apparatus located close to the nucleus, the intercellular space is wide, but narrower than the intercellular space of the cultured epithelial sheets in rabbits. In cytoplasm of cultured epithelial cells have many long mitochondria with distinguished crests and dark substrate, rough endoplasmic reticulum with narrow inside diameter and ribosomes attached. The intercellular space is very narrow.

To detect p63 by immunohistochemical staining, p63 shown strongly in the cells of the epithelial sheets with dark brown nucleus, especially in human cultured cells on the basal layer.

K3 shown weakness in the cells' cytoplasm of basal layer, and strong in prickle and superficial layers.

Cultivated oral mucosa epithelium was used for transplant patients. The evaluation criteria include the transparency degree of cornea, the integrity of the ocular surface and corneal neovascularization. Successful transplantation was noted in 12 cases which have visual improvement were noted in 9 cases, especially at short distance, about 10-30 cm.

CHAPTER 4: DISCUSSIONS

4.1. Regarding the choice of culture substrate

Amniotic membrane without epithelium (the epithelial cells are removed by ammonia 10%) according to standard procedure of the department of Histology and Embryology, Hanoi Medical University were used in this study. Currently, the authors of the world have no consensus of opinion on the kind of substrate will be used in culture and the how to use them? If the amniotic membranes are used, epithelial removal before culture more widely used (Kim et al., 2008, Lim et al., 2009, Nakamura et al. 2004). In addition, other studies have confirmed the superiority of the intact amniotic membrane (Fukuda et al. 1999).

However, if not using the AM (using temperature -sensitive polymer membrane or fibrin membrane), the corneal surface after transplantation is more transparency on experimental rabbit model (Higa K. et al, 2007, Higa K. et al. 2012, Hayashida et al. (2005), Kokaba V. et al. (2014), K. Nishida et al. (2004), Y. Hori et al. (2007), Y. Hori et al, 2008, Oie Y. et al. (2010), Hayashida Y. et al. (2005)).

K. Higa conducted study on rabbit without the corneal epithelium and the limbal, but not stromal injury, thus, result of transplantation of the cultured epithelium on fibrin is excellent. However, in the case of injury of the stromal (severe burn), the use of amniotic membrane is an appropriate choice. Kokaba V. et al. (2014) used temperature -sensitive polymer substrate, but they didn't find the regeneration of the basement membrane which is destroyed by Bowman before transplantation, so the use of the AM is more physiological. Sudha B. et al. (2009) also confirmed the advantages of the AM.

In our study, Vo Ngoc Vu Y. (31 ys old) after 12 months of the transplantation of the cultured oral epithelial sheet for the cornea, revealing the integrity of the epithelial sheet which is the equal evidence for the existence of stem cells in the cultured epithelial sheets.

4.2. The location and the size of the biopsy of the oral mucosa for culture

When studying the structure of rabbit oral mucosa can we found: while the epithelium of the cheek, in a perpendicular angle and 2mm from the oral commissure, inside mucosal surface in the central part of the bottom lip are very thin and without the beneath high papillae. The epithelium on the mucosa in the central part of the inside cheek is thick, the cells in the 2-3 bottom lines possesses small size with large nucleus/cytoplasm ratio, positive expression of p63 marker, the connective tissue under the epithelial layer forming very high papillary. In patients, we get the similar conclusion. Our results are consistent with the results of published worldwide Priya et al. 2011, Meller et al. 2002, Hori et al. 2007 Inatomi et al. 2006, Dua et al. 2003, Ma et al. 2009, Kawasaki et al. 2006.

We selected the location to take the sample for culture is the central part of the inside buccal.

When extract samples for research, we found that, to form 2 epithelial sheets, the size of biosy tissue should be: (1) 6mm diameter in tissue culture method by explant. (2) 8mm is enough for 2 ml suspension at density of 1×10^6 cells /ml in suspension method. (3) 3mm piece in the method adopted by the epithelium fragment.

To get two 4cm square cultured oral epithelial sheets in suspension method, the biosy samples 8mm diameter are required. Some authors extracted smaller fragments, but they only created 01 sheet, K. Nishida et al. (2004) used a biosy with 3 mm of diameter, Ma DH et al. (2009) extracted 6x6mm tissue. 3mm in diameter is the size of biosy we need for epithelial fragment method (as Koizumi et al. 2007 Inatomi et al. 2005). In the epithelial fragment method,

exposed area of stem cells in the basal layer is maximum, completely eliminate fibroblasts leads to good quality and flat surface cultured sheets.

4.3. About culture medium

Each author has a specific formula for the culture medium. In the early period of research, we use SHEM1, the percentage of success culture rate only 30%, epithelial sheets are not good with sparse cell density.

When SHEM2 were used (SHEM1 added with insulin, hydrocortisone, T3, isoproterenol), the epithelial stem cell proliferation was excellent, the success culture rate are 89.5% - 95%. Although when compared to many other authors in the world, cholera toxin is not included in our culture medium. However, the rate of success of creating epithelial sheet in our results suggest that SHEM2 is good enough to culture epithelial sheets from oral mucosa stem cells.

The use of antibiotics and antifungals in cell culture media, especially the oral mucosa in rabbits in Vietnam is essential. The authors used different types of antibiotics, at different concentrations. Madhira S. L. et al. (2008), Y. Satake et al. (2008) have used gentamicin as culture medium components. Most authors used Amphotericin B, but due to its toxicity, some studies eliminated (Hirayama M. 2012 didn't use both amphotericin B and penicillin).

Currently, fetal bovine serum (FBS) is the priority choice of nearly all authors in the world (Nakamura et al. 2003, Nakamura et al. 2004, Picot 2005). However, FBS has many cons, especially heterologous protein. To solve this problem, there have been many studies using autologous serum at different concentrations and the results are good (T. Nakamura et al. (2006), Ang LP et al. (2006). Priya CG et al. (2011). Y. Satake et al. (2011). Hirayama M. et al. (2012)). Besides the use of autologous serum to remove unwanted components from animal derived product, AB blood type human serum is also used (Zakaria N. et al. (2014)).

Serum free culture medium are the choice in many studies, however, to widespread the application of this type of medium requires a lot of more researches and reduction of costs (Ilmarinen et al. 2012, Hayashi and et al. 1976). Clearly, the use of serum in culture brings better results than serum free medium. In the real condition in Vietnam and in our research, fetal bovine serum was added at a concentration of 10%.

The insulin hormone, triiodothyronine, EGF, hydrocortisone, isoproterenol, cholera toxin are used by most authors in the world at different concentrations.

4.4. Methods of culture

4.4.1. Explant culture

When using this method, in the perimeter of the tissue, the cells are capable of contact with AM and have opportunity to develop around, the other cells is limited by the under connective tissue to be exposed to the culture substrate.

Our epithelial sheets by this method is not flat, have high edges which are formed by the fibroblasts. In our opinion, the oral mucosa has more loose, elastic and flexible connective tissue than in other regions. So, we can't eliminate completely the connective tissue by hand. The fibroblasts in the connective tissue can proliferate with high speed and become more dominant than the epithelial cells. This will affect the effectiveness of transplantation for patients. The presence of fibroblasts is a favorable condition for the invasion of conjunctival tissue in to the cornea surface. When creating the cultured corneal epithelial sheet from stem cells from the limbal region in our previous researchs, we also applied the explants culture method, but didn't see the same phenomenon. S. Kanayama et al. (2007) study in culture of corneal epithelial sheet from limbal stem cells and cultured oral epithelial sheet to specify the factors that cause conjunctivalization after transplantation, they concluded that: FGF is the cause of the phenomenon of neovascularization and conjunctivalization that occur in the cultured oral epithelial sheet after transplantation.

Although, explants culture method are used by many authors in the world and seems to be very simple, but our result show no support to this way.

4.4.2. Suspension method

Dispase was the enzyme to process the biosy sample in this study, it helps to cut the junctions between the cells and the basement membrane. Check the structure of the stromal tissue: the entire epithelial layer was eliminated, we also found no presence of connective tissue cells in epithelial fragments. Then trypsin - EDTA was used for separate the epithelial cells into individual cells. The cells in some bottom cell layers are taken by scrapping the fragment. The microscopic structure of the rest of the fragment showed that all cells in the bottom layers were eliminated for suspension culture.

Thus, all stem cells in the layer close to the basement membrane are fully utilized. The origin of the cells in cultivated cell sheet created by this method was confirmed by immunohistochemistry (K3 are strongly expressed in the cytoplasm of the cells on the bottom layer). This conclusion is also consistent with our conclusion of Ma DH. et al. (2009), T. Nakamura et al. (2003), Hayashida Y. et al. (2005).

4.4.3. Epithelial fragment culture method

Comparing the effectiveness of the culture technique suspension and epithelial fragment, we found that: the culture success rates, the growth rates and the microstructure of sheets are nearly similar. The success culture rates of three different methods are 76.47%, 95% and 89.47%. The culture success rate in epithelial fragment method is lower than the rate of suspension method, but this difference was not statistically significant. Overall, epithelial fragment method has much more prominent advantages compared with suspension because of these reasons: to reduce the size of the biosy sample size, shorten the tissue processing time and tissue enzyme exposure time of cultured cells with trypsin - EDTA that increases the survival of cultured cells,

reducing the lab equipment. And maintainance the link between cell – cell is not excluded that leads to the success of the technique.

Besides, when autologous fibroblasts obtained from tissue samples, this has created a favourable physiological condition for the development of the cells, epithelial cells can still receive signals from stromal cells.

Currently, in the suspension culture technique, most authors still use mouse 3T3 (animal derived product). The results of our study show that using cultured autologous fibroblasts gets higher success culture rate than without this layer (89.47% versus 81.48%). Using mouse 3T3 gets higher success culture rate than without 3T3 with $p < 0.05$ (100% versus 81.48%).

According to the review, no team in the world using epithelial fragment culture method. This is a completely new technique, showing all the advantages over the other methods are being applied now: (1) small biosy (2) simple culture process (3) using autologous fibroblasts (3T3 was eliminated) (4) the morphology of the cultured epithelial sheet is good.

4.5. The quality of the cultured epithelial sheet

After 16-28 days of culture in 37⁰C, 5% CO₂, we obtained stratified, non-keratinized epithelial cells sheet, the sheet consists of 4-5 rows, the cells on the superficial layer are flat and have nuleus. Images of cells with small size, high nucleus/cytoplasm are found by Giemsa staining at confluent period (before air-lifting). In terms of morphology, these are stem cells (K. Izumi et al. (2007), Priya C. G. et al. (2011)).

The cells of the cultured sheet represents the typical structure of epithelium. In the cytoplasm of the cells on lower layers, organelles such as endoplasmic reticulum, mitochondria, Golgi apparatus are rich. The results of immunohistochemical staining showed that the cells (especially the basal cells) are strongly positive for p63; Using

K3 - K12 staining, cells in the suprabasal layers are weakly expressed. The structure of the cultured epithelial sheets of us are the same with the structure of the normal corneal epithelium and cultured corneal epithelial sheet and like other authors in the world described (Nakamura et al. 2003, Madhira et al., 2008, Moharamzadeh et al., 2007, Nakamura et al., 2010, Ang et al., 2010, Sekiyama et al. 2006).

The cultured epithelial sheet were grafted on experimental rabbits and patients with LSCD in both eyes gets pretty good results. The important thing is how long does the graft exist? In experiments, we have monitored grafted rabbits with the longest time is 180 days, the epithelial sheets were attached well to the corneal stromal tissue. The cultured oral epithelial graft from the cornea surface of the patient Vo Ngoc Vu Y. (31) was extracted after 12 months of transplantation, we still observe part of the oral epithelial sheet. There are many publications in the world about the long-term survival of epithelial sheets after transplantation in patients (Kocaba V. et al. (2014), Sangwan VS. et al. (2014)).

4.6. The remaining issues to be studied to improve the cultured oral epithelial sheet

To minimize using the animal product, in the harvesting process, the cultured epithelial sheets are immersed in DMEM: Ham's F12 (without FBS), then send to operating room in aseptic conditions at 37⁰C.

The use of autologous fibroblasts in culture has more advantages over the use of mouse 3T3. However, the process of harvesting cultured sheets is sometimes difficult.

In human, the total number of biopsies is 26, because of 4 times of failure in culture, so they should not be used for transplantation or the patient need more operation. Thus, there are 22 times of success in culture. The cells of the epithelial sheets are confluent at the day of 16-28 of culture. We have conducted transplantation for 22 patients. In 22 cases, we have one sheet for transplantation and the other for examining histological characteristics. Microstructure of the sheets was confirmed to be completely normal. While epithelial sheets

separated from the bottom of the insert culture, we meet a lot of difficulties, that leads to the lost of small groups of epithelium (2-4mm) and 4 sheets are torn during separation.

At the hard separation sheets, the fibroblasts developed and attached well at the bottom of of the insert. We have not seen any author describes the same phenomenon. These are problems to be studied to improve the process of culture.

According to us, the connective tissue used for creating the feeder layer was too big, it created a favourable condition for the development of the fibroblast, and contact with the epithelial cells through pores of membranes and makes the dissection difficult. To mitigate this problem, the size of the connective tissue to form autologous fibroblast layer must be reduced, and it must be picked out when the fibroblasts covered about 2/3 of the insert bottom (about 8 or 9 days).

CONCLUSIONS

Through experimental study in rabbits and tested on patients, we conclude:

1. We are successful in specifying the exact location, the size of the oral mucosa and the culture medium for culture:

-Central part of the inside buccal is the biosy position, the 3mm diameter is the size of the biosy sample for culture the two sheets of the epithelium.

- Culture medium for oral epithelial sheet: SDEM2: DMEM/Ham's F12 with ratio1:1, other elements are added: EGF, insulin, hydrocortisone, isoproterenol, FBS, T3, antibiotic, antifungus.

2. We are successful in specifying the completely new culturing method to create the oral mucosa epithelial sheets: epithelial fragment method, co-culture with autologous fibroblasts. The steps are as follows:

(i) Obtain the 3mm diameter biosy samplein the central part of inside buccal;

- (ii) Cut into small pieces of 0.5 mm x 0.5 mm in size;
- (iii) The chopped pieces were incubated in dispase II solution 1.2 UI/ml at 37°C, 5% CO₂ from 35 to 45 minutes;
- (iv) Washed in SHEM2 to inactivate the action of dispase II;
- (v) The epithelial fragments are detached from the connective tissue;
- (vi) Immerse the epithelial fragments and connective tissue in the solution of trypsin - EDTA 0.05% (in PBS) for 30sec;
- (vii) Wash the epithelial and connective tissue twice with SHEM2;
- (viii) Place the epithelial fragments on the surface of the stretched amniotic membranes.
- (ix) Place the stromal tissue on the surface of the culture dish with a ratio of 3 pieces of epithelial / 2 pieces of connective tissue;
- (x) Put the insert culture in to the well;
- (xi) 1ml of SHEM2 is added in to insert culture, 1,5ml SHEM2 are poured into the culture wells and change the medium every 2 days;
- (xii) Remove the connective tissue when fibroblasts covered 2/3 of the well surface;
- (xiii) Remove the epithelial fragments when epithelial cells get confluence;
- (xiv) Air-lifting will be carried out to created 4 to 5 cell line of thickness;
- (xv) Harvest the epithelial sheet.

RECOMMENDATIONS

- (1) There should be further research to improve the process of harvesting the oral mucosa epithelial sheet.
- (2) There should be further research on the culture medium to completely eliminate animal products from the culture medium in human.
- (3) It should have a longer follow-up to assess the quality of cultured epithelial sheets after transplantation.

**THE LIST OF PUBLISHED ARTICLES RELATED
TO THE THESIS**

1. Dao Thi Thuy Phuong, Nguyen Thi Binh et al (2013). Characterization of the cultured oral mucosal epithelial cell sheet on amniotic membrane. *Journal of military Phamaco-medicine*, 4, April, 65-69.

2. Do Thuy Huong, Dao Thi Thuy Phuong, Nguyen Khang Son, Nguyen Thi Binh et al (2012). Culture and application of oral epithelial cell sheet for ocular surface disease. *Journal of medical practice*, 818-819, 560-563.