

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN PHÚC HOÀN

**PHÂN LẬP, TĂNG SINH VÀ BIỆT HÓA TẾ BÀO
GÓC NGOẠI BÌ THẦN KINH PHÔI – THAI
THÀNH TẾ BÀO DẠNG TIẾT DOPAMIN**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI – 2021

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN PHÚC HOÀN

**PHÂN LẬP, TĂNG SINH VÀ BIỆT HÓA TẾ BÀO
GÓC NGOẠI BÌ THẦN KINH PHÔI – THAI
THÀNH TẾ BÀO DẠNG TIẾT DOPAMIN**

Chuyên ngành : Mô phôi thai học

Ngành : Khoa học y sinh

Mã số : 9720101

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS. TS. NGUYỄN MẠNH HÀ

2. PGS. TS. NGUYỄN THỊ BÌNH

HÀ NỘI – 2021

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 đã tận tình hướng dẫn, động viên và tạo mọi điều kiện cho tôi thực hiện nghiên cứu và hoàn thành luận án này.

- PGS.TS. Nguyễn Mạnh Hà, Chủ nhiệm Bộ môn Mô – Phôi, Trường Đại học Y Hà Nội, người thầy đã cho tôi những kiến thức và kinh nghiệm quý báu trong suốt quá trình học tập cũng như hoàn thiện 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 để tôi noi theo.

- Các nhà khoa học đã đóng góp những ý kiến quý báu và giúp đỡ tôi khi thực hiện nghiên cứu và hoàn thiện luận án.

- Ban Giám Hiệu, Phòng Đào tạo Sau đại học, Trường Đại học Y Hà Nội đã tận tình hướng dẫn và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thực hiện và hoàn thiện luận án.

- Toàn thể lãnh đạo, các Thầy, các Cô và các anh chị em Bộ môn Mô – Phôi và đặc biệt là nhóm nghiên cứu Đề tài cấp Nhà nước ĐTDL/2013, Trường Đại học Y Hà Nội đã nhiệt tình giúp đỡ tôi trong công việc cũng như động viên tôi những lúc khó khăn.

- Bạn bè, đồng nghiệp và những người thân yêu trong gia đình đã luôn ở bên tôi, khích lệ tôi và là chỗ dựa vững chắc cho tôi bất kể lúc nào tôi cần.

Đặc biệt, tôi xin được bày tỏ lời cảm ơn tới các bệnh nhân đã đồng ý tham gia trong nghiên cứu để tôi có được bản luận án ngày hôm nay.

Tác giả luận án

Nguyễn Phúc Hoàn

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Nguyễn Phúc Hoàn, nghiên cứu sinh khóa 33, 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 Thầy Nguyễn Mạnh Hà và 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 ứng dụng quy trình phân lập, nuôi cấy tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi chuột và người để điều trị bệnh Parkinson thực nghiệm*” do PGS.TS. Nguyễn Mạnh Hà làm chủ nhiệm.

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

Hà Nội, ngày tháng năm 2021.

Tác giả luận án

Nguyễn Phúc Hoàn

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng anh	Tiếng việt
6-OHDA	6-hydroxydopamine	
BrdU	BromodeoxyUridine	
ChAT	Choline acetyltransferase	
DAT	Dopamin transporter	
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium	
EDTA	EthyleneDiamineTetraAcetic	
EGF	Epidermal growth factor	Yếu tố tăng trưởng biểu mô
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Receptor của EGF
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	Dòng chảy tế bào huỳnh quang kích hoạt
FBS	Fetal bovine serum	Huyết thanh bào thai bò
FGF	Fibroblast growth factor	Yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi
FGFR	Fibroblast growth factor receptor	Receptor của FGF
GABA	Gamma-aminobutyric acid	
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	
GFP	Green Fluoro Protein	Protein phát sáng xanh
H-E	Hematoxyline – Eosine	
HMMD		Hóa mô miễn dịch
iDA	Induced dopaminergic neuron	Noron tiết dopamin cảm ứng
iN	Induced neuronal	Noron cảm ứng
iPSC(s)	Induced pluripotent stem cell(s)	Tế bào gốc vạn năng cảm ứng
MACS	Magnetic-activated cell sorting	Dòng chảy tế bào từ tính

MAP-2	Microtubule-associated protein2	
mDA	Midbrain dopaminergic	Noron tiết dopamin ở não giữa
M-NECs	Mesencephalic Neuroepithelial Stem cells	Tế bào gốc ngoại bì thần kinh
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine	
NeuN	Neuronal Nuclei	
NF	Neurofilament	
OEC	Olfactory Ensheathing Cell	Tế bào khứu giác
PBS	Phosphate buffered saline	
PET	Position Emission Tomography	Chụp cắt lớp phát xạ
SGZ	Subgranular zone	
SVZ	Subventricular zone	
TH	Tyroxin hydroxylase	
UDPRS	Unified Parkinson's disease Rating Scale	Thang điểm xếp loại bệnh Parkinson
HEPES	HydroxyEthyl Piperazine EthaneSulfonic acid	Hệ đệm sử dụng trong môi trường nuôi cấy tế bào
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution	
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	
PSA-NCAM	Polysialylated-neural cell adhesion molecule	

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN	3
1.1. Đặc điểm tế bào gốc thần kinh.....	3
1.2. Quá trình hình thành và biệt hóa noron tiết dopamin in vivo	5
1.3. Tế bào gốc não giữa và noron tiết dopamin: ứng dụng trong điều trị.....	8
1.4. Phân lập, nuôi cấy và bảo quản lạnh tế bào gốc sần não giữa phôi	11
1.4.1. Phân lập.....	11
1.4.2. Nuôi cấy tế bào gốc thần kinh	17
1.5. Định danh tế bào gốc thần kinh và tế bào tiết dopamin.....	25
1.5.1. Định danh tế bào gốc thần kinh	25
1.5.2. Định danh tế bào tiết dopamin.....	30
1.6. Bảo quản lạnh tế bào gốc thần kinh và noron tiết dopamin.....	33
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	36
2.1. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	36
2.2. Đối tượng nghiên cứu.....	36
2.3. Phương pháp nghiên cứu	36
2.4. Các bước tiến hành	38
2.4.1. Các bước tiến hành trên phôi chuột	38
2.4.2. Các bước tiến hành trên phôi người.....	42
2.5. Chỉ tiêu nghiên cứu	43
2.6. Trang thiết bị, vật tư hóa chất dùng trong nghiên cứu.....	44
2.6.1. Trang thiết bị.....	44
2.6.2. Vật tư tiêu hao	44
2.6.3. Hóa chất, môi trường.....	45
2.7. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu.....	46
2.7.1. Kỹ thuật hiển vi	46

2.7.2. Kỹ thuật siêu vi	48
2.7.3. Kỹ thuật hóa mô miễn dịch.....	49
2.7.4. Kỹ thuật đếm tế bào TH	50
2.8. Xử lý số liệu nghiên cứu	52
2.9. Đạo đức nghiên cứu.....	52
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	53
3.1. Phân lập, tăng sinh và bảo quản lạnh tế bào gốc ngoại bì thần kinh não giữa phôi chuột.....	53
3.1.1. Phân lập, nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc ngoại bì thần kinh sàn não giữa phôi chuột theo nhóm tuổi	53
3.1.2. Nuôi cấy tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi chuột E12,5 – E13,5	66
3.1.3. Bảo quản lạnh tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi.....	71
3.2. Phân lập và nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi người	74
3.2.1. Phân lập tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi người.....	74
3.2.2. Nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc biểu mô ống thần kinh phôi người tạo neuron tiết dopamin	77
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN.....	83
4.1. Phân lập và nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc ngoại bì thần kinh não giữa phôi chuột	83
4.1.1. Xác định vị trí phẫu tích tế bào gốc ngoại bì thần kinh	83
4.1.2. Thử nghiệm nuôi cấy tế bào gốc ngoại bì thần kinh phân lập từ sàn não giữa trên phôi chuột từ 10,5 đến 14,5 ngày	89
4.1.3. Nuôi cấy tế bào gốc ngoại bì thần kinh não giữa phôi chuột công trắng giai đoạn E12,5 – E13,5	93
4.1.4. Bảo quản lạnh tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi.....	98
4.2. Phân lập và nuôi cấy tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi người.....	101
4.2.1. Thuận lợi và khó khăn trong quá trình thu thập phôi và phân lập tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi người.....	101

4.2.2. Cấu trúc của biểu mô ống thần kinh phôi người 6,5 - 7,5 tuần tuổi	102
4.2.3. Sự phát triển của các tế bào nuôi cấy và định danh các tế bào sau nuôi cấy.....	103
4.3. Hiệu quả nuôi cấy tạo noron tiết dopamin	106
KẾT LUẬN	113
KHUYẾN NGHỊ VÀ HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP.....	115
DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Những marker bề mặt tế bào thần kinh nhạy cảm với enzyme ...	14
Bảng 3.1. Phân bố phôi chuột theo độ tuổi.....	64
Bảng 3.2. Tỷ lệ trích thủ thành công mẫu mô não giữa qua các giai đoạn...	64
Bảng 3.3. Tỷ lệ mọc mầm theo tuổi phôi	66
Bảng 3.4. Tỷ lệ tế bào, cụm tế bào dương tính với marker TH sau nuôi cấy	71
Bảng 3.5. Tỷ lệ sống của các tế bào thần kinh sau rã đông	72
Bảng 3.6. Đánh giá tỷ lệ sống của tế bào theo thời gian.....	72
Bảng 3.7. Sự phân bố tuổi phôi, khả năng phẫu tích, phân lập của các phôi.....	75
Bảng 3.8. Tổng số tế bào sau phân lập và tỷ lệ tế bào sống.....	76
Bảng 3.9. Sự phân bố số tế bào dương tính với TH trong giếng nuôi cấy theo tuổi phôi.....	81

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1. Tổng số tế bào sau phân lập.....	65
Biểu đồ 3.2. Tỷ lệ mọc mầm nuôi cấy sau rã đông.....	73
Biểu đồ 3.3. Sự gia tăng số lượng tế bào dương tính với TH theo ngày nuôi cấy.....	82

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Các nguồn tế bào khác nhau trong điều trị bệnh Parkinson.....	3
Hình 1.2.	Sự tăng sinh tế bào ở ống thần kinh.....	6
Hình 1.3.	Các lớp của lá đáy não giữa và sự biểu hiện các gen liên quan đến sự phát triển của tế bào mDA.....	7
Hình 1.4.	Hình ảnh chụp PET với 6-L- fluorodopa ở vùng nhân bèo nhạt và bèo sẫm.....	10
Hình 2.1:	Sơ đồ nghiên cứu nuôi cấy tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi chuột cống trắng tạo noron tiết dopamin.....	37
Hình 2.2.	Phẫu tích não giữa theo Jan Pruzsak và cộng sự.....	39
Hình 3.1.	Cấu tạo vi thể não giữa phôi chuột cống trắng.....	54
Hình 3.2.	Sàn mô não giữa.....	55
Hình 3.3.	Sàn não giữa phôi chuột cống trắng E13.5.....	55
Hình 3.4.	Cấu trúc siêu vi của biểu mô thần kinh não giữa E11.5.....	56
Hình 3.5.	Tế bào lớp nội tủy đang phân chia.....	57
Hình 3.6.	Cấu trúc siêu vi của nguyên bào thần kinh E11.5.....	57
Hình 3.7.	Các tế bào đang trong quá trình biệt hóa của phôi E13.5.....	58
Hình 3.8.	Các nhánh bào tương của các noron não giữa phôi E12.5.....	59
Hình 3.9.	Các nhánh bào tương tập trung thành nhóm ở phôi E12.5.....	59
Hình 3.10.	Nón tăng trưởng ở phôi E12.5.....	60
Hình 3.11.	Các tế bào tiền thân tiết dopamine tại thành não giữa phôi chuột cống trắng E11.5.....	61
Hình 3.12.	Số lượng các tế bào tiền thân tiết dopamine tăng ở phôi E13.5.....	62
Hình 3.13.	Các tế bào tiết dopamine tập trung ở vùng sàn não giữa ở phôi chuột cống trắng E13.5.....	63
Hình 3.14.	Tế bào gốc não giữa nuôi cấy.....	67

Hình 3.15.	Hình thái vi thể của tế bào gốc não giữa sau nuôi cấy.....	68
Hình 3.16.	Tế bào gốc não giữa sau nuôi cấy 6 ngày.....	69
Hình 3.17.	Tế bào gốc não giữa.....	69
Hình 3.18.	Tế bào gốc phôi chuột cống trắng sau nuôi cấy 6 ngày	70
Hình 3.19.	Nhuộm HMMD với marker Vimentin và TH tế bào gốc não giữa phôi chuột cống trắng sau nuôi cấy	70
Hình 3.20.	Hình ảnh tế bào nuôi cấy sau rã đông	74
Hình 3.21.	Phôi người (A) 7 tuần (x50); (B) 8 tuần (x40)	75
Hình 3.22.	Cấu trúc thành ống thần kinh phôi người 7 tuần	76
Hình 3.23.	Tế bào gốc thần kinh người nuôi cấy	77
Hình 3.24.	Tế bào gốc thần kinh người nuôi cấy	78
Hình 3.25.	Tế bào mô thần kinh nuôi cấy 8 ngày	78
Hình 3.26.	Tế bào gốc thần kinh người 10 ngày sau nuôi cấy.....	79
Hình 3.27.	Tế bào gốc thần kinh người nuôi cấy nhuộm với Vimentin và TH ..	80

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, việc nghiên cứu và ứng dụng những hiểu biết ở cấp độ tế bào và dưới tế bào là những hướng đi mũi nhọn của y học. Một trong những lĩnh vực mũi nhọn ấy là nghiên cứu, tìm hiểu và sử dụng tế bào gốc trong điều trị như việc cấy ghép mô, tế bào vào cơ thể trưởng thành nhằm phục hồi một phần hay toàn bộ chức năng của mô, tế bào sau những thương tổn bệnh lý hay lão hóa, sau những sang chấn cơ học hay do những khuyết tật bẩm sinh.

Những năm gần đây, mặc dù không có số liệu thống kê toàn cầu, nhưng nhu cầu cấy ghép tế bào gốc có xu hướng ngày càng tăng, đặc biệt trong bệnh máu ác tính, các bệnh lý về xương khớp và các bệnh lý về tim mạch... Ngay cả trong các bệnh lý tại hệ thống thần kinh - một loại mô có những tế bào biệt hóa rất cao, tưởng như không thể tự thay mới khi có tổn thương – thì việc nghiên cứu cấy ghép tế bào gốc và liệu pháp gen nhằm thay thế các tế bào thần kinh thoái hóa đang là một hướng đi mang lại nhiều hi vọng mới cho người bệnh.

Ý tưởng cấy ghép tế bào gốc để điều trị bệnh Parkinson - là bệnh lý rối loạn thần kinh thoái hóa tiến triển do giảm chức năng các neuron tiết dopamin trong não đã được bắt đầu từ những năm 1980. Trên thế giới, rất nhiều nghiên cứu trên động vật và trên người đã chỉ ra rằng việc ghép tế bào gốc cải thiện đáng kể triệu chứng của bệnh Parkinson [1], [2]. Nhiều loại tế bào gốc khác nhau được thử nghiệm trên động vật: tế bào gốc tủy xương [3], tế bào gốc cảm ứng (iPS cells) [4], tế bào gốc ngoại bì thần kinh của bào thai (mesencephalic neuroepithelial stem cells = M-NECs). Trong số các loại trên, tế bào gốc ngoại bì thần kinh bào thai người đã được thử nghiệm lâm sàng trên người và đã mang lại kết quả tích cực do các tế bào ở đây có tỷ lệ biệt hóa thành các neuron tiết dopamin sau ghép cao, mô ghép hòa hợp tốt với mô chủ và chưa có bằng chứng nào về việc tiết dopamin bất thường từ các mảnh ghép trên mô chủ.

Ở Việt Nam hiện nay, tỷ lệ mắc bệnh Parkinson khoảng 1,6% ở những người trên 65 tuổi, và có xu hướng ngày càng tăng với tỷ lệ mắc mới khoảng 20/100 000 dân/năm. Thêm vào đó, điều trị nội khoa bằng cách sử dụng các thuốc là tiền chất chuyển hóa của dopamin như Levodopa cũng chỉ có tác dụng tốt trong khoảng 5-10 năm do hiện tượng kháng thuốc điều trị [5]. Vì vậy, việc nghiên cứu một phương pháp điều trị mới, có khả năng giải quyết được nguyên nhân gây bệnh là vô cùng cần thiết để hạn chế nguy cơ tàn phế do bệnh tật, nâng cao chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân. Với mong muốn tiếp cận một phương pháp mới trong điều trị bệnh Parkinson cũng như mong muốn nâng cao chất lượng cuộc sống cho người bệnh, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài: “*Phân lập, tăng sinh và biệt hóa tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi – thai thành tế bào dạng tiết dopamin*” với mục tiêu:

1. Phân lập, tăng sinh, biệt hóa và bảo quản lạnh tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi chuột cống trắng thành tế bào dạng tiết dopamin.

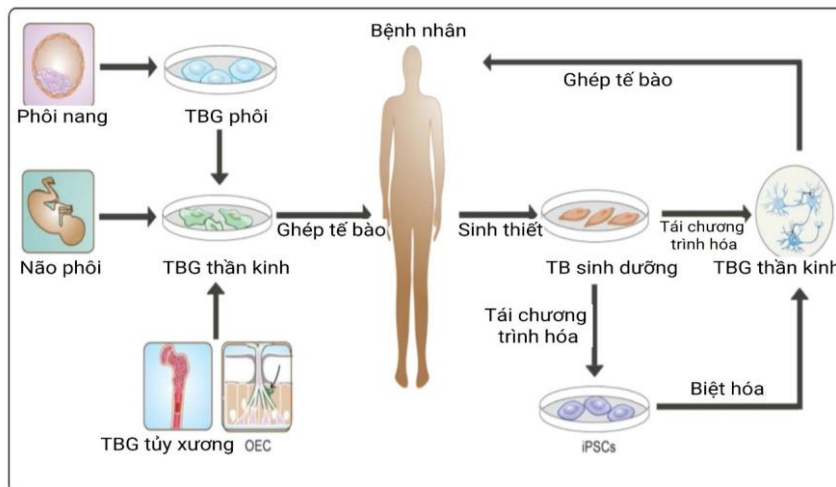
2. Bước đầu phân lập, tăng sinh và biệt hóa được tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi – thai người thành tế bào dạng tiết dopamin.

Commented [M1]: Neron

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Đặc điểm tế bào gốc thần kinh

Tế bào gốc thần kinh được Atzman và cộng sự mô tả lần đầu tiên năm 1962. Rất nhiều nguồn gốc tế bào khác nhau đã được sử dụng để tạo neuron tiết dopamin, đầu tiên có thể kể đến như: tế bào gốc trung mô phân lập từ tủy xương hay tế bào vùng hành khứu ở vỏ não. Tuy nhiên những dòng tế bào này khá hạn chế trong việc tạo thành các neuron tiết dopamin trên thực nghiệm. Vì vậy ngày nay, các nhà khoa học thường tập trung vào một số dòng tế bào khác có tiềm năng lớn hơn tạo neuron tiết dopamin như: tế bào gốc não giữa phôi, tế bào gốc phôi giai đoạn sớm (khối tế bào nội phôi của phôi nang), tế bào gốc vạn năng cảm ứng (iPSCs) (Hình 1.1).



Hình 1.1. Các nguồn tế bào khác nhau trong điều trị bệnh Parkinson [6]

Mọi loại tế bào gốc thần kinh đều có ích trong nghiên cứu y học, nhưng mỗi dòng tế bào lại có triển vọng phát triển cũng như giới hạn riêng. Nếu như tế bào gốc thần kinh ở phôi và thai đóng vai trò quan trọng trong hình thành

các cấu trúc thần kinh thì tế bào gốc thần kinh ở cơ thể trưởng thành lại có nhiệm vụ chính như một hệ thống tái tạo, sửa chữa mô, tạo ra các tế bào có chức năng thay thế cho các tế bào bị thiếu hụt sinh lý cũng như bệnh lý ở các mô biệt hóa.

Khi nghiên cứu về tế bào gốc, có ba khái niệm cần phải phân biệt rõ đó là thuật ngữ “tế bào gốc” (Stem cell), “tế bào đầu dòng” (progenitor cell) và “tế bào tiền thân” (precursor cell). Về cơ bản, trong mô thần kinh, tế bào gốc thần kinh phải đáp ứng được ba đặc tính: Khả năng tự đổi mới (self-renewal); Khả năng biệt hóa thành ba dòng tế bào thần kinh (nơron, tế bào ít nhánh và tế bào sao) và cuối cùng là khả năng tái tạo mô thần kinh. Khi một tế bào bị hạn chế khả năng tự đổi mới và đã cam kết số phận biệt hóa cụ thể, chúng trở thành các tế bào đầu dòng (progenitor cell), trong khi đó thuật ngữ “tiền thân” là chỉ những tế bào ở giai đoạn trung gian của quá trình phát triển.

- *Tế bào gốc thần kinh là những tế bào chưa biệt hóa*

Một trong những đặc tính căn bản của tế bào gốc là không có cấu trúc đặc hiệu mô. Đây là những cấu trúc mà đó tế bào có thể thực hiện các chức năng chuyên biệt. Tế bào gốc thần kinh là những tế bào chưa phát triển những cấu trúc giúp cho việc dẫn truyền xung động thần kinh như hệ thống ống siêu vi vận chuyển hóa chất trung gian hóa học, các synap...[7].

- *Tế bào gốc thần kinh có thể tự tái tạo*

Cũng giống như các tế bào gốc khác, tế bào gốc thần kinh có khả năng tăng sinh bằng cách gián phân và tự đổi mới (self-renewal) mà vẫn giữ được đặc tính không biệt hóa trong suốt quá trình tồn tại của mô, cơ thể. Quá trình tự làm mới có thể thông qua cả hai cách phân chia đối xứng và phân chia bất đối xứng. Nếu như phân chia đối xứng tạo ra hai tế bào gốc, điều này giúp làm tăng quần thể tế bào gốc thì phân chia bất đối xứng tạo ra 1 tế bào bắt đầu

quá trình biệt hóa đồng thời tạo ra một tế bào vẫn giữ nguyên tính gốc như ban đầu. Quá trình này rất quan trọng giúp duy trì quần thể tế bào gốc thần kinh tồn tại trong suốt đời sống cá thể.

- *Tế bào gốc thần kinh có khả năng biệt hóa*

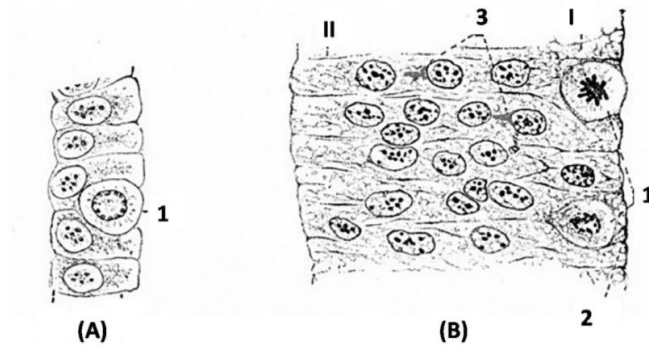
Quá trình tế bào gốc chuyên thành các tế bào có chức năng riêng biệt được gọi là quá trình biệt hóa. Quá trình này xảy ra khi tế bào gốc nhận được các tín hiệu từ bên trong và bên ngoài tế bào, đáp ứng với các tín hiệu này. Các tế bào gốc thần kinh có khả năng biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác nhau thông qua kích thích của môi trường nội và ngoại sinh [8]. Chúng phân chia tế bào bất đối xứng, một biệt hóa, một vẫn giữ tính gốc của nó. Tế bào gốc thần kinh chủ yếu biệt hóa thành các neuron, tế bào hình sao và tế bào ít nhánh.

1.2. Quá trình hình thành và biệt hóa neuron tiết dopamin *in vivo*

Trong quá trình phát triển phôi vị, khi máng thần kinh mới khép, thành ống thần kinh là biểu mô gồm một hàng tế bào gọi là biểu mô thần kinh. Không giống những vùng khác có sự tăng sinh và biến đổi phức tạp, não giữa phát triển đơn giản. Thành não chỉ dày lên do sự tăng sinh mạnh các tế bào biểu mô này. Ban đầu, thành ống có dạng biểu mô trụ giả tầng. Bào tương tế bào trải khắp chiều dày thành ống và nhân tế bào ở các mức độ cao thấp khác nhau. Những nhân tế bào đang phân chia nằm ở lớp sâu trong thành ống tạo thành lớp sinh sản. Những tế bào đã hoàn thành sự phân chia di cư ra vùng ngoại vi của thành ống nông hơn, xếp thành từng tầng, cao thấp không đều để tiếp tục phân chia. Một số tế bào vẫn ở lại lớp sinh sản duy trì tính gốc của nó (Hình 1.2)

Sau khi não giữa được hình thành, các tế bào ở sàn não giữa tăng sinh và phân lớp tạo thành 3 lớp: lớp nội tủy, lớp áo và lớp màn rìa. Một số tế bào ở lớp nội tủy vẫn còn giữ tính gốc của tế bào thần kinh trong khi hầu hết các tế bào sẽ di chuyển ra khỏi vùng sinh sản, ngừng phân chia tế bào và bắt đầu quá trình biệt hóa. Các tế bào đầu dòng của não giữa nhờ các tín hiệu (yếu tố

phiên mã và yếu tố chế tiết) sẽ tiếp tục được định hướng để biệt hóa thành các dòng tế bào khác nhau.



Hình 1.2. Sự tăng sinh tế bào ở ống thần kinh [9]

A: Biểu mô thần kinh; B: Tăng sinh tế bào của biểu mô thần kinh

I: Lớp nội tủy

II: Lớp áo

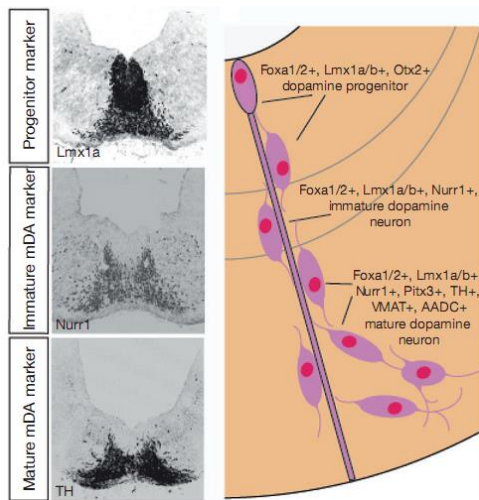
1- Nguyên bào thần kinh; 2- Nguyên bào xóp thần kinh;

3- Nhánh bào tương của tế bào xuyên tâm.

Các tế bào đầu dòng tiết dopamin ở não giữa cũng tập trung chủ yếu ở vùng sinh sản, những tế bào này biểu hiện *Lmx1a*, *Lmx1b*, *Foxa2*, *Msx1/2*, *Ngn2* và ở giai đoạn sớm là *Shh*. Ở giai đoạn này, các tế bào đầu dòng mDA sẽ phát triển theo hướng chuyên biệt, phân chia và bắt đầu những bước cuối cùng của quá trình biệt hóa xảy ra ở kì sau của tế bào.

Sau đó các tế bào đầu dòng tiết dopamin tiếp tục biệt hóa trở thành các tế bào tiết dopamin chưa trưởng thành (immature dopaminergic neurons). Các tế bào mDA bắt đầu xuất hiện trong khoảng E10.5 đến E13.5 ở chuột, trong khi ở người chúng bắt đầu xuất hiện vào tuần thứ 5 – 6 sau thụ thai, đạt cao nhất ở tuần 6 – 8 và dừng ở tuần 10 – 11 [10]. Các nguyên bào thần kinh của neuron dopamin bắt đầu rời khỏi vùng sinh sản dọc theo các nhánh của tế bào thần kinh xuyên tâm để xâm nhập vào vùng trung gian (lớp áo). Trong suốt quá

trình di cư từ lớp nội tủy ra bề mặt lõi của não giữa các nguyên bào thần kinh tiết dopamin tiếp tục biệt hóa để trở thành các tế bào mDA trưởng thành. Ngoài việc bắt đầu biểu hiện các gen mới trong suốt quá trình di cư và biệt hóa chúng tiếp tục duy trì biểu hiện các gen mà có vai trò quan trọng trong quá trình biệt hóa như *Foxa1/2*, *Lmx1a/b*, *En1/2*.



Hình 1.3. Các lớp của lá đáy não giữa và sự biểu hiện các gen liên quan đến sự phát triển của tế bào mDA.

Lá đáy não giữa gồm 3 lớp: *Lớp sinh sản* (nơi có các tế bào đầu dòng mDA), *lớp trung gian* (các tế bào mDA chưa trưởng thành di cư qua) và *lớp áo* (nơi các tế bào mDA trưởng thành biểu hiện các gen liên quan đến sinh tổng hợp dopamine) [11].

Nói tóm lại, quá trình hình thành và phát triển của tế bào tiết dopamin được bắt đầu từ khoảng ngày thứ 8 ở chuột và tuần thứ 5 sau thụ tinh ở người. Các tế bào xuất hiện ban đầu ở vùng sàn não giữa, sau đó trải qua hàng loạt các bước phát triển và biệt hóa để di cư đến những vị trí nhất định: liềm đen, vùng dưới đồi, hành khứu, võng mạc... Những kiến thức về lĩnh vực này đã tăng đáng kể trong những năm gần đây. Chính những hiểu biết này đã giúp

ích rất nhiều cho việc ứng dụng trong việc tìm kiếm những dòng tế bào tối ưu phục vụ điều trị bệnh Parkinson.

1.3. Tế bào gốc não giữa và noron tiết dopamin: ứng dụng trong điều trị

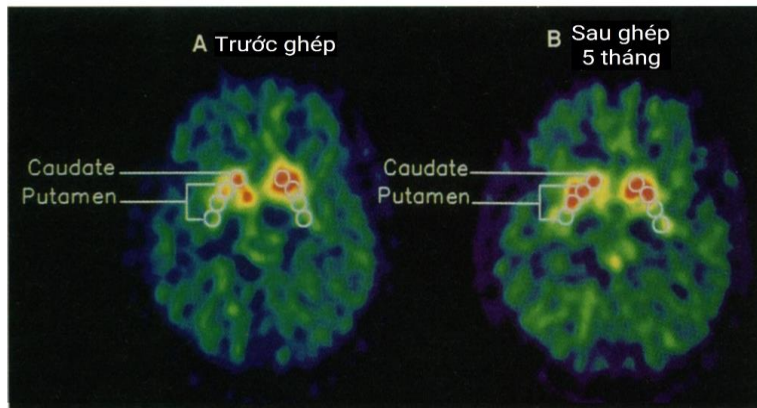
Những hiểu biết về quá trình phát triển và biệt hóa của noron tiết dopamin đã giúp các nhà khoa học định khu được vị trí của các tế bào gốc tiết dopamin. Do đó mô sần não giữa ngoại bì ống thần kinh phôi là một trong những loại mô đầu tiên được các tác giả sử dụng vì tại đây có các tế bào tiết dopamin cũng như các tế bào đầu dòng đã được định hướng để biệt hóa thành noron tiết dopamin.

Năm 1979, tác giả Perlow và cộng sự đã tiến hành ghép những mảnh mô sần não giữa phôi chuột vào thể vân chuột đã được gây Parkinson bằng 6-OHDA. Kết quả cho thấy sự cải thiện về triệu chứng lâm sàng của chuột sau ghép 1 tháng. Bằng chứng là có 5/29 chuột giảm 70% số vòng quay so với nhóm chứng [12]. Tuy có được thành công bước đầu như vậy xong kỹ thuật ghép mảnh mô chứa tế bào gốc vào não bộc lộ nhiều hạn chế như: tỷ lệ động vật sống sau ghép thấp; tỷ lệ cải thiện triệu chứng ở các lô nghiên cứu không đồng nhất hay chỉ ghép được ở một vài vị trí nhất định trong mô não. Những hạn chế này có thể liên quan tới việc kém nuôi dưỡng vì các tế bào trong mô ghép ít được tiếp xúc với mạch máu cũng như dịch não tủy hoặc do hạn chế phát triển các sợi trục của tế bào ra những vùng xung quanh [13]. Đến những năm 1980, thay vì sử dụng mảnh nhỏ mô sần não giữa để ghép vào thể vân, nhóm tác giả Bjorklund và cộng sự đã sử dụng dạng dịch treo tế bào gốc sần não giữa để tiêm vào thể vân. Khoảng 10 mảnh mô 2mm² được các tác giả ủ trong enzym trypsin 0,1%; 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó rửa lại trong dung dịch đệm và tiếp tục dùng pipet hút lên – xuống nhiều lần để tạo dịch treo tế bào. Mẫu dịch treo được sử dụng để tiêm trực tiếp để tiêm vào thể vân chuột Parkinson. Kết quả đạt được rất khả quan khi tỷ lệ khỏi bệnh của các

Commented [M2]: ??

chuột sau ghép ổn định giữa các lô. Hơn nữa khi quan sát cấu trúc thể vân sau ghép bằng kỹ thuật hóa mô, các tác giả nhận thấy sự tồn tại của các tế bào được ghép ở 11/ 15 mẫu. Những tế bào sống và tạo liên kết với mô chủ. Có thể quan sát được các noron di cư đến 0,5mm từ vị trí tiêm, thậm chí có mẫu lên tới 1mm từ vị trí tiêm [13].

Chính thành công của kỹ thuật tiêm tế bào gốc sàn não vào thể vân đã thúc đẩy các nhà khoa học tiến hành những thử nghiệm trên bệnh nhân tình nguyện. Tác giả Madrazo và cộng sự năm 1988 lần đầu tiên báo cáo 2 trường hợp ghép thành công hỗn hợp tế bào gốc thần kinh giàu noron tiết dopamin vào não bệnh nhân tình nguyện. Sau ghép, ghi nhận có cải thiện triệu chứng rối loạn vận động của bệnh nhân [14]. Tuy nhiên, những báo cáo một vài ca bệnh trong giai đoạn đầu này vẫn còn chưa rõ ràng do chưa có những bằng chứng về tác dụng của các tế bào sau ghép trên não bệnh nhân. Đến năm 1990, nhóm tác giả Lindvall và cộng sự tiếp tục báo cáo nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng trên bệnh nhân điều trị bằng tiêm tế bào gốc phôi người. Sau 2 tháng, các tác giả thấy có cải thiện về vận động và giấc ngủ so với trước điều trị. Các tác giả sử dụng kỹ thuật chụp Positron cắt lớp (Positron Emission Tomography –PET) với đồng vị phóng xạ 6-L-[¹⁸F] fluorodopa (FDOPA) để theo dõi hiệu quả điều trị. FDOPA có cấu tạo giống với L-DOPA, có thể đi qua hàng rào máu não tới các noron tiết dopamin cũng như các cúc tận cùng đầu trước sy – náp, từ đó phản ánh số lượng và chức năng của các noron này. Kết quả sau 5 tháng, quan sát có tăng tín hiệu huỳnh quang trên phim chụp, biểu hiện tăng sự có mặt của noron tiết dopamin trong não sau ghép so với trước ghép (Hình 1.4) [15].



Hình 1.4. Hình ảnh chụp PET với 6-L-[¹⁸F] fluorodopa ở vùng nhân bào nhợt và bào sẫm.

Màu đỏ là vùng có tín hiệu mạnh. Màu xanh là vùng không có tín hiệu [15].

Trong một thử nghiệm lâm sàng lớn trên 34 bệnh nhân Parkinson tình nguyện, tác giả Olanow (1992) đã chia các bệnh nhân mắc Parkinson làm 2 nhóm có điều trị và không điều trị tiêm tế bào gốc não giữa phôi người để đánh giá hiệu quả điều trị. Hơn nữa, trong nhóm có điều trị, tác giả lại tiếp tục chia làm 2 nhóm nhỏ là nhóm được tiêm tế bào từ 1 phôi và nhóm được tiêm tế bào lấy từ 4 phôi. Các tác giả sử dụng thang điểm UDPRS để đánh giá triệu chứng Parkinson trước và sau điều trị. Theo dõi sau 2 năm các tác giả nhận thấy không có sự khác biệt về chỉ số UDPRS giữa 2 nhóm có và không điều trị (dùng giả dược). Thêm vào đó, các tác giả cũng không nhận thấy có sự khác biệt giữa nhóm được tiêm 1 phôi cũng như nhóm được tiêm 4 phôi vào não so với nhóm chứng ($p=0,093$ và $0,346$). Tuy nhiên khi xem xét trong nhóm bệnh nhân có chỉ số UDPRS trước điều trị ≤ 49 (Parkinson nhẹ), các tác giả nhận thấy rằng có cải thiện chỉ số UDPRS ở nhóm có điều trị so với nhóm dùng giả dược ($p = 0,005$); hơn nữa, riêng ở nhóm được điều trị bằng tiêm 4

phôi có cải thiện triệu chứng có ý nghĩa so với nhóm dùng giả dược. Tiếp tục nghiên cứu đại thể và vi thể mô não của 5 bệnh nhân tử vong (nhồi máu cơ tim, viêm phổi, suy hô hấp, ung thư lưỡi) sau điều trị 5 năm (2 ở nhóm tiêm 1 phôi; 2 ở nhóm tiêm 2 phôi và 1 ở nhóm chứng) các tác giả nhận thấy có sự tăng biểu hiện marker TH ở nhóm tiêm 4 phôi so với nhóm tiêm 1 phôi và nhóm chứng [16]. Vì vậy, có thể thấy rằng hiệu quả điều trị Parkinson bằng tế bào tiết dopamin phân lập từ sần não giữa có liên quan đến số lượng tế bào được tiêm. Trong khi nguồn mô phôi thai đồng loại có hạn, vì vậy, để gia tăng số lượng tế bào cấy ghép, các nhà khoa học phải nuôi cấy tăng sinh các neuron tiết dopamin *in vitro*, tạo được hỗn hợp nhiều tế bào giàu dopamin phục vụ cho điều trị.

1.4. Phân lập, nuôi cấy tế bào gốc sần não giữa phôi

Commented [M3]: Phân lập, nuôi cấy

1.4.1. Phân lập

Phân lập tế bào gốc thần kinh theo các bước thông thường bao gồm trích thủ mô, phân ly tế bào và làm thuần khiết tế bào. Việc lấy mẫu mô như mô não là đặc biệt khó khăn do đó đòi hỏi người làm phải được đào tạo và có kỹ thuật thành thạo. Các nhóm tác giả khác nhau đã cho ra các quy trình phân lập độc lập tùy thuộc vào vị trí lấy mẫu, các giai đoạn phát triển khác nhau cũng như trên động vật hay người. Tuy nhiên, về cơ bản, phân lập tế bào gốc thần kinh dựa vào một số đặc tính của tế bào gốc thần kinh.

1.4.1.1. Trích thủ mô não

Nguồn gốc của mô ảnh hưởng đến loại tế bào phân lập được cũng như sự phát triển và khả năng biệt hóa. Một số khác biệt rõ rệt đã được báo cáo giữa các mẫu mô não từ các loài khác nhau (chuột nhắt, chuột cống và người) hay từ các giai đoạn biệt hóa trong sự phát triển của một loài nhất định [17], [18]. Thực tế các kết quả nghiên cứu cho thấy, những yếu tố chính quyết định kết quả phân lập phụ thuộc vào vị trí trích thủ tế bào gốc thần kinh mà không phụ

thuộc vào động vật thực nghiệm. Nếu sử dụng toàn bộ não [19] hoặc mảnh mô não lớn gồm nhiều khu vực [20], kết quả thu được sẽ gồm 1 quần thể không đồng nhất gồm nhiều loại tế bào do các tế bào gốc đến từ những vùng khác nhau. Một số báo cáo sự hiện diện của các tế bào gốc đa tiềm năng tại những vùng khác nhau của nhu mô não trưởng thành khác với các vùng kinh điển đã được biết (SVZ và SGZ) như ở thể vân [21]. Tuy nhiên, Lois và Alvarez-Buylla cho rằng những tế bào này có thể xuất phát từ những vùng thần kinh bên cạnh [22]. Do đó, cần phải có kiến thức đầy đủ về vị trí ổ tế bào gốc thần kinh, cùng kỹ thuật định vị để có mẫu não ở khu vực cần quan tâm đáng tin cậy trước khi phân lập. Sau đó, tiến hành cắt những lát mỏng bằng bộ vi thao tác dưới kính lúp [23].

Sau khi lấy được mẫu mô não cần đặc biệt chú ý đến khâu bảo quản mẫu. Quy trình phân lập sau lấy mô phải thực hiện trong vài giờ do số lượng tế bào gốc thần kinh sống sẽ giảm theo thời gian [24], [25].

1.4.1.2. Tách tế bào

Hiện nay, có hai phương pháp tách tế bào chủ yếu được các nhà nghiên cứu áp dụng là tách tế bào bằng enzym và tách tế bào bằng cơ học

a. Tách tế bào bằng enzym

Các tế bào gốc thần kinh bao quanh bởi các phân tử tạo thành lưới ngoại bào chủ yếu là Lecticans, acid hyaluronic, tenascin-C và Tenascin-R [26]. Các phân tử này tương tác với nhau và tương tác với các phân tử trên màng tế bào. Do vậy, muốn tách tế bào gốc thần kinh khỏi mô người ta sử dụng các protease làm suy yếu lưới ngoại bào này. Trước tiên, nên chia mô thành những mảnh nhỏ để tăng diện tích tiếp xúc với protease. Có hai enzym được sử dụng chủ yếu là: trypsin [21], [27], [28], [29] và papain [30], [31], [32], [33]. Trong đó, trypsin được sử dụng nhiều nhất, thường kết hợp với acid ethylenediaminetetra acetic (EDTA), đây là chất gắn với Ca^{2+} làm suy yếu

liên kết giữa các tế bào. Thời gian ủ rất thay đổi theo từng tác giả có thể từ 10 đến 90 phút. Ngoài ra, một số enzym khác cũng được dùng trong phương pháp phân ly này như hyaluronidase [34], [35], collagenase [36], dispase [33]. Các enzym này có thể được sử dụng đơn độc hay kết hợp với các enzym khác.

Nhưng dù sử dụng loại protease nào, các nhà nghiên cứu thường sử dụng kết hợp Desoxiribonulease I (DNase I) nhằm loại bỏ những chất nhày DNA có nguồn gốc từ sự ly giải tế bào. Chất này có thể ảnh hưởng đến khả năng sống của tế bào trong các thực nghiệm về sau.

Hơn nữa, để enzym có thể hoạt động cần phải sử dụng hệ đệm. Hệ đệm này có khả năng điều chỉnh pH đồng thời kích hoạt enzym. Kháng sinh/kháng nấm nên thêm vào dung dịch phân ly tế bào để ngăn nhiễm khuẩn, nhiễm nấm. Khi quá trình tách tế bào kết thúc, việc sử dụng các chất ức chế protease là cần thiết để ngăn chặn phản ứng của enzym. Đối với papain, chất trung hòa thường được sử dụng là huyết thanh bào thai bò (FBS). Còn đối với trypsin, ngoài FBS thì ovomucoid, protein đậu nành, đậu mỡ hay chất ức chế chiết xuất từ tụy cũng được nhiều tác giả sử dụng. Đặc biệt, với những mô não lấy từ phôi hay thai, do cấu trúc tương đối lỏng lẻo nên có xu hướng sử dụng nồng độ enzym thấp hơn cũng như thời gian ngắn hơn [37]. Tách tế bào ảnh hưởng trực tiếp đến tỷ lệ sống của tế bào gốc thần kinh và với mỗi loại mô não cụ thể, việc lựa chọn enzym cũng rất quan trọng. Năm 1998, Maric và cộng sự đã đánh giá hiệu quả của papain, trypsin, collagenase và tách tế bào bằng cơ học trên mô não từ phôi thai chuột. Kết quả cho thấy, đối với loại mô này, tách tế bào bằng papain cho tỷ lệ tế bào sống cao nhất và khả năng sinh sản tốt nhất [38].

Đồng thời, các nhà nghiên cứu thấy rằng khi thực hiện tách tế bào bằng enzym những marker bề mặt tế bào có thể bị thay đổi bởi các enzym này gây ra hiện tượng âm tính giả khi nhuộm bằng hóa mô miễn dịch hay phân loại tế bào huỳnh quang kích hoạt (FACS) sau khi phân lập (Bảng 1.1) [39], [40]. Ngoài

ra, một số nghiên cứu cũng chỉ ra rằng dùng trypsin có thể dẫn đến tăng dương tính với những marker bề mặt chỉ điểm khối u do thay đổi trạng thái glycosyl hóa của các marker này [39]. Riêng với marker CD133 được báo cáo là nhạy với trypsin ở tế bào người nhưng với tế bào của loài gặm nhấm thì không.

Bảng 1.1. Những marker bề mặt tế bào thần kinh nhạy cảm với enzyme (Corver & Panchision)

Enzym	Marker nhạy cảm	Marker ít nhạy cảm
Trypsin	hCD133, CD31, O4, CD81, c14, Ca125, BMa180	A2B5, CD15
Papain	PSA-NCAM, CD24, BMP IA, BMP IB	CD15, O4, CD81

b. Tách tế bào bằng cơ học

Thông thường tách tế bào bằng enzym chưa đủ để tách hoàn toàn tế bào gốc thần kinh trong mô. Các nhà nghiên cứu thường phối hợp cùng tách tế bào bằng cơ học. Tách tế bào bằng cơ học gây chết một lượng tế bào đáng kể. Nguyên nhân đầu tiên phải kể đến là do sử dụng pipet thủy tinh thành ống sắc, kích thước không đều. Vì vậy, phương pháp phổ biến nhất là tránh thực hiện kỹ thuật bằng pipét thủy tinh [21], [41], [42]. Hay sử dụng pipét với kích thước giảm dần để phân tách liên tiếp qua các bước giảm tế bào chết [31]. Hơn nữa, khi sử dụng pipét thủy tinh, các tế bào dính với thủy tinh và có thể mất trong quá trình thao tác. Vấn đề này có thể giải quyết bằng việc sử dụng pipét có tráng silicone, hay sử dụng các pipét nhựa thương mại sẵn có [43].

Một số nghiên cứu sau khi tách bằng enzym và cơ học còn có thêm một bước để loại bỏ các mảnh vụn từ dịch treo tế bào. Bước bổ sung này có thể loại bỏ miếng mô không phân ly cũng như loại bỏ những mảnh vụn hoại tử mà có thể gây chết tế bào về sau. Tuy nhiên việc làm này cũng làm giảm số lượng tế bào sống do bị giữ lại trong bộ lọc. Khuyến cáo khi sử dụng bộ lọc

đòi hỏi DNase I để loại bỏ chất nhầy có thể làm cản trở bộ lọc và nên pha loãng dịch treo tế bào với môi trường.

Loại và kích thước của bộ lọc không có sự thống nhất giữa các tác giả, có người sử dụng gạc vô trùng [43] hay các loại màng lọc tế bào. Kích thước lỗ lọc cũng khác nhau, có thể là 40 μm [31], 70 μm [44], 100 μm ...

c. Làm thuần nhất quần thể tế bào gốc

Quần thể tế bào thu được sau tách tế bào là không đồng nhất, với các mức độ biệt hóa khác nhau. Do đó, cần phải phân tách các nhóm tế bào riêng biệt. Thông thường việc phân loại nhóm dựa vào hình thái tế bào, đây là đặc điểm có liên quan chặt chẽ với tính gốc của chúng. Tuy nhiên, điều này chưa đủ để phân lập được một quần thể đồng nhất. Hiện nay, có nhiều phương pháp kỹ thuật mới ra đời giúp ta có thể thu một quần thể tế bào nhất định. Đây trở thành một bước quan trọng trong phân lập tế bào gốc thần kinh. Các phương pháp làm thuần nhất quần thể tế bào gốc thần kinh gồm:

- Phân loại tế bào dựa vào tính chất kết dính khác nhau của tế bào

Một trong những phương pháp đầu tiên làm thuần nhất quần thể đặc hiệu dựa trên sự bám dính khác nhau của các loại tế bào trên đĩa nuôi cấy do các phân tử kết dính đặc biệt. Bằng cách xử lý chất nền và lựa chọn thời gian nuôi cấy có thể giúp phân biệt các loại tế bào khác nhau. Trong ba nhóm tế bào gốc thần kinh thì tế bào hình sao thể hiện khả năng kết dính cao nhất, thậm chí trên cả đĩa nuôi cấy không được xử lý bám dính. Trong khi đó, tế bào ít nhánh lại dễ dàng bị tách ra khỏi đĩa nuôi cấy chỉ cần dưới tác động lắc với vận tốc chậm (200-300 vòng/phút) trong 12 – 20h. Phương pháp này đơn giản, kinh tế, lại hiệu quả, thường được áp dụng để lựa chọn loại tế bào gốc cụ thể như tế bào gốc ít nhánh [45], [46].

Cũng dựa vào đặc tính này, năm 1999, Lim và Alvarez-Buylla đã phân lập 4 nhóm tế bào gốc sử dụng trực tiếp dòng chảy môi trường hay PBS trên

đĩa nuôi cấy có xử lý poly-D-lysine. Những tế bào kết dính nhiều, được thuần nhất với PSA-NCAM và Tuj 1 - nhóm này được xác định là các nguyên bào thần kinh di cư [47].

- Phân loại dựa vào tỷ trọng tế bào khác nhau để ly tâm

Một số nghiên cứu làm thuần nhất tế bào gốc thần kinh dựa trên cơ sở các tế bào phân đoạn theo độ nổi của chúng. Ban đầu, tế bào được hòa trong một dung môi nhất định, sau đó ly tâm, tạo ra một gradient mật độ. Các tế bào trong các phân đoạn được thu gom riêng.

Gradient mật độ có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các dung môi khác nhau, trong đó Percoll được sử dụng rộng rãi nhất [48], [49]. Percoll gồm các hạt silica dạng keo phủ một lớp Polyvinylpyrrolidone (PVP) có thể được sử dụng để tạo dung dịch mật độ giữa 1,00 và 1,20g/ml. Sự kết hợp với Percoll tạo ra gradient mật độ có thể phân loại tốt hơn quần thể tế bào. Sử dụng gradient liên tục, Maric và cộng sự, năm 1998 đã phân lập được 20 dải khác nhau và phân định giới hạn các dải mật độ được hỗ trợ bằng sử dụng các hạt đánh dấu thương mại. Song phương pháp này có nhược điểm là chất PVP có thể gây độc tế bào nên các nhà nghiên cứu hạn chế sử dụng. Ngoài Percoll, gradient mật độ có thể được tạo ra bằng cách sử dụng dung dịch đường [50] hay Albumin huyết thanh bò [51].

- Phân loại dựa vào kết tủa miễn dịch đặc hiệu

Phương pháp kết tủa miễn dịch ban đầu được ứng dụng để loại tế bào cụ thể khỏi quần thể bằng kháng thể và qua trung gian bổ thể [52]. Hiện nay, người ta sử dụng kỹ thuật thanh lọc bằng miễn dịch một quần thể tế bào do sự bộc lộ kháng nguyên bề mặt khác nhau gắn kết với các kháng thể được gắn lên đĩa nuôi cấy. Tế bào bộc lộ kháng nguyên bề mặt này sẽ bị giữ lại trên đĩa, tách khỏi quần thể tế bào còn lại. Phương pháp này được áp dụng cho phân lập các tế bào hình sao đầu dòng sử dụng A2B5 hoặc O4 [53], [54], [55].

Phương pháp này cũng được dùng để tách các tế bào gốc thần kinh với marker PSA-NCAM [56], [57]. Cho đến hiện nay kỹ thuật này ít phổ biến hơn sau kỹ thuật FACS, nhưng một số tác giả báo cáo rằng dùng phương pháp này cho kết quả tế bào sống cao hơn [54].

- Phân loại dựa vào huỳnh quang kích hoạt (FACS)

FACS ra đời là bước cải tiến lớn trong việc tách và làm thuần nhất tế bào gốc thần kinh. Đây là một dạng đặc biệt trong phương pháp dòng chảy tế bào, FACS giúp phân loại các tế bào dựa trên sự kết hợp của một chất huỳnh quang cụ thể gắn với kháng thể của marker bề mặt tế bào. Ngoài ra, còn có thể sử dụng một số phân tử khác như lectin để nhận ra tình trạng glycosyl hóa một số epitop kháng nguyên.

1.4.2. Nuôi cấy tế bào gốc thần kinh

1.4.2.1. Điều kiện nuôi cấy

Các môi trường thường được sử dụng để nuôi cấy tế bào gốc thần kinh gồm 2 thành phần, môi trường cơ bản và các yếu tố bổ sung, yếu tố tăng trưởng. Môi trường cơ bản giống nhau thường sử dụng DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) tạo bởi hỗn hợp muối vô cơ, amino acid và vitamin trong các chất dinh dưỡng khác. DMEM thường kết hợp tỷ lệ (1:1) với Ham's F-12 (F-12) nhằm tăng mức độ các chất dinh dưỡng và cung cấp các muối vô cơ khác nhau. Có một số lựa chọn thay thế có tính chất tương tự như môi trường cơ bản như Neurobasal TM, hay Ex Vivo TM 15 [33].

Ngoài ra, môi trường cơ bản còn cần được bổ sung các chất như insulin, transferrin hay putrescine. Những yếu tố này chỉ được bổ sung khi nuôi cấy do chúng chỉ sử dụng được trong một thời gian rất ngắn khi bảo quản ở 4°C.

1.4.2.2. Huyết thanh và các yếu tố tăng trưởng

Một trong những yếu tố quan trọng nhất trong môi trường nuôi cấy là việc bổ sung yếu tố tăng trưởng riêng biệt hoặc huyết thanh.

Ban đầu, khi mới phân lập tế bào gốc thần kinh và duy trì tế bào sống, các nhà nghiên cứu sử dụng huyết thanh trong môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên, sau này, các nhà nghiên cứu thấy rằng việc sử dụng huyết thanh, thường là huyết thanh bào thai bò (Fetal bovine serum-FBS) có một số nhược điểm. Do huyết thanh là một hỗn dịch gồm nhiều thành phần không xác định, đồng thời chất lượng, nồng độ các chất trong đó thay đổi khác nhau giữa các lô, vì vậy có thể dẫn đến những kết quả không ổn định trong nuôi cấy. Hơn nữa, huyết thanh đắt tiền lại dễ bị nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, huyết thanh có sự kết hợp nhiều yếu tố tăng trưởng khác nhau vừa có yếu tố giúp duy trì tính gốc của tế bào lại có yếu tố giúp biệt hóa và duy trì sự sống của tế bào. Với tất cả lý do đó, người ta đã tìm cách thay thế huyết thanh bằng cách tổng hợp các yếu tố tăng trưởng tinh khiết. Có hai yếu tố tăng trưởng chính được sử dụng: Yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (Fibroblast growth factor-FGF) và yếu tố tăng trưởng biểu mô (Epidermal growth factor-EGF). Chúng có thể được dùng đơn độc hay kết hợp.

a. FGF

FGF được tìm thấy lần đầu tiên bởi tác giả Armelin năm 1973. Từ đó đến nay, có khoảng 22 loại FGF đã được tìm thấy tham gia vào con đường dẫn truyền tín hiệu tế bào. Chúng tác động thông qua thụ thể FGFR (FGF – receptors) trên bề mặt màng tế bào. Các thụ thể của FGF đều là những protein xuyên màng gồm 3 phần: phần bên ngoài màng tế bào có cấu tạo gồm 3 domain khác nhau (D1-D3), phần xuyên màng, phần bên trong màng tế bào có gắn với tyrosine kinase. Bình thường, phân tử heparan sulfate có vị trí gắn ở vùng D3, còn vị trí giữa D1 và D2 được gắn với một chuỗi ngắn các amino acid. Chuỗi amino acid này tương tác với heparan sulfate có tác dụng ngăn không cho FGFR hoạt động khi chưa được kích hoạt bởi FGF. Có 7 dưới nhóm khác nhau của các thụ thể FGFR. Nếu như FGF1 có khả năng kích hoạt

cả 7 receptor này thì FGF7 và FGF10 (keratynocyte Growth Factor) chỉ có khả năng kích hoạt 1 thụ thể duy nhất là FGFR2b [58]. Ở giai đoạn sớm của sự phát triển cá thể, FGF có vai trò trong quá trình tăng sinh, biệt hóa và di cư của các tế bào. Ở cơ thể trưởng thành, FGF đóng vai trò trong việc giữ cân bằng nội môi và tham gia vào quá trình sửa chữa của tế bào, cơ quan. Trong trường hợp bệnh lý ví dụ như ung thư, một vài dưới nhóm của FGF cũng có vai trò tham gia vào sinh lý bệnh khối u.

Trong quá trình phát triển, các tế bào gốc thần kinh thường biểu hiện với receptor FGF trong giai đoạn sớm, sau đó chúng có thêm biểu hiện với EGF (E16) [59], [60]. Rất nhiều yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi đã được nghiên cứu để bổ sung vào môi trường nuôi cấy và biệt hóa tế bào gốc thần kinh nói chung và tạo noron tiết dopamin nói riêng. Trong nuôi cấy tế bào gốc sần não giữa để tạo noron tiết dopamin ở phôi chuột giai đoạn E12, bFGF đã được Bouvier và cộng sự. (1995) chứng minh rằng giúp tăng sinh số lượng tế bào gốc mô thần kinh và làm chậm quá trình biệt hóa thành noron tiết dopamin - sự trì hoãn này có thể lên tới 8 ngày trên thực nghiệm. Hơn nữa, số lượng noron tiết dopamin thu được sau nuôi cấy cao gấp 20 lần so với nhóm chứng [61]. Trong các nghiên cứu biệt hóa noron tiết dopamin từ tế bào gốc phôi, nhiều tác giả đã sử dụng thêm FGF8 và Shh. Trong quá trình phát triển phôi, FGF8 xuất hiện rất sớm ở các tế bào gốc thần kinh đặc biệt là lớp nội tủy phía trong và lớp ngoại bì thần kinh phía ngoài xung quanh đường nguyên thủy (E6,5 ở chuột). Khi tằm thần kinh bắt đầu khép tạo ống thần kinh (E8,5 - E9), FGF8 được thấy ở não trước, vùng bụng não giữa và rãnh giữa sau. Sau đó, các tế bào có biểu hiện một yếu tố quan trọng là Shh. Sự tương tác của FGF8 và Shh góp phần vào quá trình biệt hóa tế bào gốc thần kinh thành những noron tiết dopamine [62]. Trên cơ sở này, khi nuôi cấy biệt hóa tế bào tiết dopamin từ tế bào gốc phôi, các tác giả sử dụng thêm FGF8 và Shh. Hai yếu

tổ này nên được bổ sung đồng thời. Gần đây, FGF20 cũng bắt đầu được nhiều tác giả nghiên cứu trong nuôi cấy tế bào gốc thần kinh tạo noron tiết dopamin. Về mặt cấu trúc, FGF20 có nhiều điểm tương đồng với FGF9 và FGF16. Bình thường, FGF20 được tìm thấy nhiều ở não, đặc biệt là vùng liềm đen, hơn nữa, receptor của FGF20 là FGFR1c cũng được thấy có tăng biểu hiện ở các tế bào dương tính với TH tại liềm đen trong khi giảm biểu hiện ở các tế bào tại những vùng khác của não. Vì vậy các tác giả đã đặt ra giả thiết rằng có thể FGF20 liên quan tới sự phát triển và biệt hóa của các noron tiết dopamin. Năm 2004, Grothe và cộng sự nhận thấy rằng có tăng số lượng của noron tiết dopamin biệt hóa từ tế bào gốc phôi khi sử dụng FGF20 trong nuôi cấy so với nhóm chứng do yếu tố này kích thích tăng quá trình biệt hóa thành noron tiết dopamin đồng thời giảm hiện tượng chết theo chương trình của các tế bào [63], [64].

b. EGF

EGF cũng tác động tới quá trình tăng sinh, biệt hóa và tồn tại của tế bào thông qua receptor EGFR trên bề mặt màng tế bào. Một loạt các nghiên cứu đã chỉ ra rằng các tế bào gốc thần kinh đáp ứng với FGF trong giai đoạn phát triển sớm, sau đó, chúng đáp ứng với cả EGF/FGF [59], [60]. Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng một lượng nhỏ FGF tự tiết hay cận tiết sản xuất bởi tế bào gốc thần kinh, cho phép tế bào gốc tồn tại không cần cung cấp FGF-2 cho tới khi tế bào đáp ứng với EGF [65]. Nồng độ EGF thông thường bổ sung trong môi trường nuôi cấy khoảng 20ng/ml, tuy nhiên, trong một nghiên cứu của tác giả Nelson và cộng sự (2008) nhận thấy rằng khi tăng nồng độ lên 100ng/ml ở nhóm nghiên cứu cho tỷ lệ biệt hóa thành noron cao hơn ở nhóm chứng [66]. Nhưng bổ sung tỷ lệ cao EGF có khả năng khởi phát các stress oxy hóa ở noron khi nuôi cấy, giảm khả năng sống của tế bào. Vì vậy đa phần các tác giả vẫn lựa chọn bổ sung EGF và FGF2 với tỷ lệ và nồng độ thấp (khoảng

20ng/ml) trong nuôi cấy tế bào gốc thần kinh do hầu hết các nghiên cứu đều cho thấy có tăng tỷ lệ tạo noron nói chung và tỷ lệ tạo noron tiết dopamin nói riêng và chúng được coi là thành phần quan trọng, không thể thiếu trong nuôi cấy tế bào gốc thần kinh [67].

c. Các yếu tố khác

Ngoài hai yếu tố chính là FGF và EGF, còn một số yếu tố phát triển khác cũng hỗ trợ nuôi cấy tế bào. Có thể chia làm hai nhóm chính là: Yếu tố phát triển thần kinh và các cytokines. Các yếu tố phát triển thần kinh có thể kể đến đó là: yếu tố phát triển chuyển dạng alpha (Transforming growth factor alpha-TGF- α), yếu tố phát triển chuyển dạng bê-ta (TGF- β), yếu tố kích thích sợi thần kinh (Ciliary neurotrophic factor- CNTF), Yếu tố kích thích tế bào thần kinh (Glial cell line Derived Neurotrophic Factor – GDNF), hay Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)... Các cytokines có thể kể đến: yếu tố ức chế bạch cầu (Leukemia inhibitory factor-LIF) hay các Interleukin (IL) ví dụ như IL-1 β ... Mặc dù vai trò của chúng trong giai đoạn phát triển sau của tế bào thần kinh còn chưa rõ ràng, tuy nhiên chúng đều được ghi nhận có vai trò trong quá trình biệt hóa tế bào gốc phôi thành tế bào thần kinh đặc biệt là chúng làm tăng hiệu quả biệt hóa thành noron tiết dopamine [29], [68].

1.4.2.3. pH và mức độ oxy hóa

Các quá trình trao đổi chất của tế bào trong môi trường nuôi cấy phát sinh các thành phần có tính acid. Những chất này làm giảm độ pH của môi trường nuôi cấy, điều này có ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt động của tế bào. Người ta thường dùng phenol đỏ để chỉ thị pH trong môi trường nuôi cấy. Nếu môi trường dần chuyển từ đỏ sang cam thì tế bào phát triển tốt, nếu chuyển sang vàng nhạt là môi trường bị nhiễm khuẩn. Do đó, để kiểm soát sự thay đổi pH trong môi trường, người ta sử dụng các hệ đệm. Có hai hệ đệm thường được sử dụng trong môi trường nuôi cấy: Hệ đệm bicarbonate natri và hệ đệm HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid).

Hệ đệm bicarbonate natri phụ thuộc vào nồng độ CO₂ trong tủ ẩm; trong khi đó hệ HEPES lại độc lập với CO₂. Mặc dù HEPES tốt hơn trong việc duy trì pH ổn định theo sinh lý, nhưng HEPES có một nhược điểm khi tiếp xúc với ánh sáng sinh ra hydro peroxide ảnh hưởng trực tiếp đến tế bào. Nếu dùng hệ đệm HEPES, môi trường nuôi cấy phải hạn chế tiếp xúc với ánh sáng [69]. Do nhược điểm này của HEPES, trong nuôi cấy tế bào gốc thần kinh, người ta vẫn sử dụng chủ yếu hệ đệm bicarbonate natri.

Trong nuôi cấy tế bào gốc thần kinh phân áp O₂ ở mức áp suất khí quyển (21%), mặc dù sinh lý yêu cầu mức phân áp O₂ thấp hơn nhiều (3%). Một số nghiên cứu cũng xác định rằng, tế bào gốc thần kinh phát triển trong điều kiện nồng độ O₂ thấp, cho tỷ lệ sống cao hơn cũng như biểu hiện các marker tính gốc cả invitro và in vivo sau khi cấy ghép tốt hơn.

1.4.2.4. Phương pháp nuôi cấy tế bào gốc thần kinh

Để duy trì và nhân rộng quần thể tế bào gốc thần kinh ban đầu, có hai phương pháp chính: Nuôi cấy dịch treo và nuôi cấy lớp đơn bám dính trên đĩa nuôi cấy.

a. Nuôi cấy tạo cụm dịch treo tế bào gốc thần kinh

Phương pháp rộng rãi nhất nhằm chứng minh sự có mặt tế bào gốc thần kinh chính là nuôi cấy tạo cụm dịch treo tế bào thần kinh [21]. Phương pháp này được mô tả lần đầu tiên năm 1992 bởi Reynold và Weiss. Tế bào gốc thần kinh được nuôi cấy trong môi trường thiếu các yếu tố kết dính nhưng chứa các yếu tố tăng trưởng đầy đủ. Điều này cho phép các tế bào gốc thần kinh tạo thành các cụm 3-D đặc trưng [21]. Một số nhà nghiên cứu cho rằng nuôi cấy dịch treo tế bào gốc thần kinh tương tự như một vi môi trường kích thích tế bào thần kinh, cho phép sự tồn tại của tế bào gốc trong ống nghiệm thông qua sự tương tác trực tiếp tế bào-tế bào [70]. Tuy nhiên, một cụm tế bào thần kinh riêng lẻ chỉ chứa một lượng nhỏ tế bào gốc thực sự. Trong khi các tế bào còn

lại đang trong các giai đoạn biệt hóa khác nhau bao gồm cả các tế bào bị hoại tử và chết theo chương trình. Và ngay cả những tế bào tiền thân cũng tạo cụm di động tương tự cụm tế bào gốc thần kinh [46].

Nuôi cấy bằng phương pháp dịch treo có một số nhược điểm. Thứ nhất, khi cụm di động lớn, sự khuếch tán các chất dinh dưỡng và các yếu tố tăng trưởng vào cụm khó khăn hơn [20]. Thứ hai, các cụm tế bào gốc thần kinh tập trung nhiều tế bào do đó không cho phép đánh giá từng tế bào, đồng thời gây trở ngại cho việc nghiên cứu quá trình biệt hóa. Thứ ba, gần đây một số tác giả chứng minh rằng cụm tế bào gốc di động không có nguồn gốc từ một tế bào đơn lẻ. Ngược lại, chúng có cấu trúc linh hoạt, tế bào có thể di chuyển từ cụm này sang cụm khác [71]. Có hai phương pháp để loại bỏ hiện tượng di chuyển này: hoặc là dùng việc pha loãng để có 1 tế bào trong mỗi giếng nuôi cấy hoặc là sử dụng môi trường nuôi cấy nửa rắn bằng cách thêm methylcellulose [45] hay collagen [72].

Việc tạo cụm tế bào gốc thần kinh có thể thúc đẩy bằng cách phổ biến là sử dụng chất chống kết dính bề mặt như poly-2-hydroxyethyl methacrylate [30] hay mercaptoethanol [45].

b. Nuôi cấy tế bào gốc thần kinh lớp đơn

Nuôi cấy tế bào gốc thần kinh lớp đơn khắc phục được các hạn chế của nuôi cấy tế bào gốc thần kinh dịch treo. Phương pháp này được sử dụng để nghiên cứu tính chất của các tế bào gốc ở cấp độ tế bào đơn lẻ, mặc dù chúng hạn chế các tế bào tương tác với nhau trong quá trình biệt hóa. Đồng thời, các tế bào tiếp xúc giống nhau với các yếu tố tăng trưởng và huyết thanh. Để gây dính tế bào, có thể sử dụng đĩa có phủ phân tử tích điện như poly-L-ornithine, poly-D-lysine hoặc laminin. Các chất bám dính: Poly- L-Lysin/ Laminin được xử lý trên bề mặt giếng nuôi cấy với mục đích tăng bám dính các tế bào đặc biệt là các tế bào gốc thần kinh. Hơn nữa, chúng còn có khả năng cải thiện

khả năng sống của tế bào do làm giảm quá trình chết theo chương trình – apoptosis [73].

Tuy nhiên, thông thường laminin được sản xuất từ bánh rau hoặc từ chuột chuyển gen. Vì vậy laminin thành phẩm thông thường không ổn định trong các lô sản xuất hoặc có chứa thêm một số thành phần khác như fibronectin. Nếu được sản xuất từ chuột chuyển gen thì có thể cải thiện được độ tinh khiết nhưng lại khiến cho các tác giả khá dè dặt khi dùng trên nuôi cấy tế bào gốc thần kinh của người. Theo nghiên cứu của tác giả Meyer và cộng sự (2012), nuôi cấy tạo cụm tế bào thu được hỗn hợp có tỷ lệ tế bào gốc thấp hơn so với nuôi cấy lớp đơn: chỉ 83% các cụm dương tính với Nestin trong khi tỷ lệ này ở lớp đơn gần tuyệt đối. Hơn nữa, khi đánh dấu bằng BrdU để tìm tế bào gốc, các tác giả cũng nhận thấy rằng chỉ 11% dương tính ở nhóm nuôi cụm trong khi ở nhóm nuôi lớp đơn là 14%. Tuy nhiên, sau thời gian nuôi cấy dài hơn, kết quả thu được rất bất ngờ khi chỉ 8% những tế bào lớp đơn biệt hóa thành neuron trưởng thành trong khi ở nhóm tạo cụm là 16% [74].

Như vậy có thể thấy rằng mặc dù có tỷ lệ chọn lọc tế bào gốc cao hơn trong nuôi cấy lớp đơn song khả năng tăng sinh và biệt hóa thành neuron trưởng thành lại không hiệu quả bằng nuôi cấy tạo cụm. Lý do được các tác giả đưa ra là trong các cụm neuron, không chỉ có tế bào gốc thần kinh mà còn có nhiều loại tế bào khác nhau, ở những giai đoạn phát triển khác nhau. Do đó, chúng liên kết chặt chẽ với nhau, giống như một “ổ tế bào gốc”, tiết ra những yếu tố nội tại để thúc đẩy sự biệt hóa của tế bào [75], [76].

1.4.2.5. *Cấy chuyển*

Bất kỳ loại nuôi cấy nào, lớp đơn hay dịch treo, cấy chuyển nên được thực hiện trước khi tế bào đạt tới mức độ tối đa (với phương pháp cấy lớp đơn) hoặc cụm tế bào bị hoại tử (với phương pháp nuôi cấy tạo cụm) để tránh hiện tượng tế bào lão hóa khi mật độ tế bào cao kéo dài.

Các phương pháp áp dụng cho bước phân tách khi cấy chuyển phụ thuộc vào loại tế bào. Cũng giống như khi phân lập các tế bào dính thường được tách bằng enzym. Trypsin sử dụng đơn độc hay kết hợp với EDTA là loại protease được sử dụng nhiều nhất [77]. Trong trường hợp cụm tế bào di động, tế bào được phân tách cơ học bằng việc sử dụng pipet hút liên tục. Tuy nhiên, đây là phương pháp có thể gây chết tế bào. Có thể khắc phục bằng cách dùng enzyme trước, nhưng điều này lại có thể làm thay đổi kết quả thử nghiệm nếu tiến hành FACS (Fluorescence-activated Cell Sorting) ngay sau phân tách.

Một phương pháp khác cũng được báo cáo với Svendsen và ter Borg cho cấy chuyển tế bào gốc thần kinh từ mô bào thai người. Cụm được cắt thành 4 mảnh thay vì phân tách thành từng tế bào riêng lẻ. Theo kết quả nghiên cứu, phương pháp này làm giảm tổn thương tế bào và duy trì sự tương tác tế bào, cho phép tế bào gốc thần kinh phân chia nhiều lần hơn trong thực nghiệm [37].

1.5. Định danh tế bào gốc thần kinh và tế bào tiết dopamin

1.5.1. Định danh tế bào gốc thần kinh

1.5.1.1. Về hình thái

a. Hình thái vi thể

Nhuộm tế bào bằng phương pháp nhuộm thông thường (H-E, Giemsa) hay phương pháp nhuộm Cajal là cách khá đơn giản để nhận biết tế bào gốc thần kinh. Tế bào gốc thần kinh có tỷ lệ nhân/bào tương lớn, ít bào quan, chưa có các cấu trúc nhằm đảm nhiệm chức năng dẫn truyền thần kinh như: sợi trục, sợi nhánh..

b. Hình thái siêu vi thể

Dưới kính hiển vi điện tử, các tế bào gốc thần kinh có hình đa diện hoặc hình tròn, nhân lớn, sáng màu, màng nhân thường có vị trí ấn lõm vào trong nhân. Tỷ lệ nhân/bào tương lớn. Các bào quan thường nghèo nàn, chỉ có một số ti thể nhỏ, lưới nội bào và xo trung gian [78].

1.5.1.2. Về các marker phân tử

Các marker phân tử để định danh tế bào gốc có thể là các gene hoặc các sản phẩm của chúng (protein), có tính đặc hiệu cho từng loại tế bào. Có thể chia các marker tế bào ra làm hai nhóm là các marker trên bề mặt màng tế bào và các marker bên trong tế bào.

Các marker trên bề mặt màng tế bào là những phân tử protein gắn trên bề mặt màng tế bào, những phân tử kết dính tế bào. Các marker bên trong tế bào được hiểu là các gene hoặc các phân tử protein do chúng sản xuất ra tồn tại trong bào tương tế bào. Các marker này được phát hiện chủ yếu dựa vào nguyên lý kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể đặc hiệu với các phân tử protein hoặc bằng các đoạn gen “mồi” đối với ADN hoặc ARN.

(1) Marker Nestin

Nestin nằm trong nhóm các xơ trung gian tham gia vào cấu trúc bộ khung tế bào. Nhóm các xơ trung gian được chia làm 5 nhóm lớn: trong đó các xơ keratin được xếp vào nhóm I và nhóm II; nhóm III gồm có vimentin, desmin, peripherin và GFAP (Glial fibrillary acidic protein); nhóm IV gồm Nestin và alpha-internexin; nhóm V gồm các xơ trung gian cấu tạo nên bộ khung của phần nhân tế bào.

Nestin được sử dụng trong rất nhiều nghiên cứu để xác định sự tồn tại của tế bào gốc thần kinh. Tác giả Dahlstrand và cộng sự khi nghiên cứu marker Nestin trên tế bào phôi chuột từ 7,75 ngày cho đến khi ra đời nhận thấy rằng marker Nestin biểu hiện dương tính mạnh ở vùng tằm thần kinh. Khi phôi chuột 10,5 ngày thì Nestin dương tính nhiều ở những tế bào dọc ống thần kinh. Sau khi chuột con được sinh ra, nhóm tác giả đã quan sát thấy sự sụt giảm biểu hiện marker Nestin trên những tế bào đã biệt hóa như: các neuron vận động ở sừng trước của tủy sống hay các neuron ở đại não [79]. Những neuron trưởng thành này sẽ được thay thế bằng những loại xơ trung

gian khác ví dụ như neurofilament ở neuron hay GFAP ở những tế bào sao. Nhóm tác giả Messam và cộng sự trong nghiên cứu về tế bào gốc phôi người được công bố năm 2002 cũng đưa ra nhận định rằng marker Nestin không chỉ dương tính mạnh ở những tế bào gốc hay tế bào đầu dòng thần kinh mà còn dương tính cả trên những tế bào tăng sinh chuyển tiếp từ những tế bào đầu dòng này [80].

(2) Marker Vimentin

Vimentin cũng là một loại xơ trung gian tham gia cấu tạo bộ khung tế bào, có vai trò trong việc vận chuyển một số phân tử protein giữa nhân và màng tế bào. Từ những năm 1980 vimentin được sử dụng như một marker đánh dấu tế bào gốc thần kinh. Tapscott và cộng sự (1981) đã quan sát thấy vimentin ở các tế bào vùng ống thần kinh phôi gà 33 – 38 giờ sau thụ tinh bằng phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch [81]. Đồng quan điểm này, Fedoroff và cộng sự (1983) cũng nghiên cứu biểu hiện vimentin ở vùng não phôi chuột 14 ngày, kết quả cho thấy các tế bào dương tính mạnh với marker vimentin và âm tính với marker GFAP [82]. Tuy nhiên ở chuột mới sinh thì các tế bào lại có biểu hiện dương tính với cả hai loại marker trên. Đặc điểm này chính là hạn chế lớn nhất của vimentin bởi ngoài các tế bào gốc thì vimentin còn có mặt ở cả những tế bào đã trưởng thành. Để làm rõ thêm nhận định này, nhóm tác giả Stagaard và cộng sự (1989) cũng đánh giá biểu hiện marker vimentin ở tế bào não phôi người từ 4 – 16 tuần nhận thấy rằng: ở giai đoạn phôi 4 – 6 tuần, vimentin dương tính ở hầu hết tế bào ngoại bì thần kinh. Khi phôi đến giai đoạn 7 – 8 tuần, các tế bào thần kinh đã có sự biệt hóa thì ngoài vimentin còn biểu hiện các marker khác như GFAP, neurofilament, S-100, desmin... [83] Ngoài ra, vimentin còn dương tính ở những tế bào có nguồn gốc từ trung mô như: tế bào cơ hay tế bào trung mô. Vì vậy ngày nay, vimentin được ứng dụng nhiều hơn trong chuyên ngành miễn dịch khối u để

phân biệt khối u có nguồn gốc từ biểu mô (carcinoma) hay từ trung mô (sarcoma). Tuy nhiên một điều khó có thể phủ nhận là xơ vimentin xuất hiện sớm hơn những loại xơ khác trong quá trình phát triển và biệt hóa tế bào thần kinh.

(3) Các marker khác

a. Musashi 1

Bên cạnh nestin và vimentin, Musashi1 – một loại protein gắn với RNA, tham gia vào quá trình phân chia bất đối xứng của tế bào gốc thần kinh cũng được các nhà nghiên cứu tìm hiểu từ những năm 1990. Musashi1 còn được biết đến với tên gọi Msi1, có biểu hiện dương tính ở cả tế bào gốc phôi và tế bào gốc thần kinh trên chuột trưởng thành. Tuy nhiên, Msi1 và nestin thường không đồng thời dương tính trên cùng một tế bào, vì vậy các tác giả đã đặt ra giả thuyết rằng có thể chúng là marker của 2 loại tế bào đầu dòng khác nhau.

b. SOX, PAX6

Yếu tố sao mã – SOX (SRY related HMG – box) lần đầu tiên được Sinclair và cộng sự mô tả năm 1990, cho đến nay, có rất nhiều gen được ghi nhận thêm đã tạo thành “SOX family”. “SOX family” có khoảng hơn 20 loại và được chia thành 8 nhóm từ A – H tùy thuộc vào trình tự amino acid ở vùng HMG tương ứng [84]. SOX1, SOX2 và SOX3 nằm trong nhóm B1 được cho là có liên quan nhiều tới sự phân chia và biệt hóa của tế bào gốc thần kinh [84], [85]. Bên cạnh SOX, PAX6 cũng là một yếu tố phiên mã tham gia điều hòa quá trình tăng sinh và biệt hóa của noron. Tăng biểu hiện PAX6 cũng đồng nghĩa với việc tăng sinh của quần thể tế bào gốc thần kinh.

c. β III- tubulin

β III - tubulin là một protein tham gia vào thành phần cấu tạo của ống siêu vi. Protein này được mã hóa bởi gen *TUBB3* trên nhánh dài nhiễm sắc thể số 16 (q1624.3). Chúng có mặt nhiều ở noron và các tế bào biểu mô tinh ở

tin hoàn. β III - tubulin được tìm thấy ở những noron chưa trưởng thành, đang trong quá trình biệt hóa. Đây cũng là marker được sử dụng để phân biệt noron và tế bào thần kinh đệm, bởi các nhà nghiên cứu không thấy có biểu hiện marker này ở các tế bào thần kinh đệm.

d. Doublecortin (DCX)

Doublecortin cũng là một loại protein tham gia vào quá trình hình thành ống siêu vi. Chúng có mặt trong bào tương noron và tham gia vào quá trình hình thành sợi trục ở những noron chưa trưởng thành. Biểu hiện marker này giảm dần ở những giai đoạn sau của quá trình phát triển noron vì vậy DCX cũng được sử dụng để đánh dấu các tế bào thần kinh chưa trưởng thành.

e. CD133, CD15

CD133 (AC133) là một protein xuyên màng, marker CD133 thường được sử dụng để đánh dấu tế bào gốc tủy xương và gần đây là tế bào gốc thần kinh. Uchida và cộng sự trong nghiên cứu công bố năm 2000 đã nhận thấy rằng CD133 dương tính khoảng 90% ở các tế bào vũng não phôi người từ 7 – 16 tuần. Hơn nữa, các tác giả đã sử dụng miễn dịch dòng chảy tế bào (FACS) để phân lập ra 2 dòng tế bào khác nhau là CD133 (-) và CD133 (+) để nuôi cấy. Rất lý thú là chỉ ở những giếng có CD133 (+) mới tạo thành những cụm tế bào thần kinh và sau đó biệt hóa tạo noron (marker β -tubulin III) cũng như tế bào thần kinh đệm (marker GFAP). Vì vậy CD133 cũng là một lựa chọn mới cho các nhà khoa học khi nghiên cứu về tế bào gốc thần kinh. Tuy nhiên một hạn chế của CD133 đó là marker này mới chỉ sử dụng được trên tế bào phôi người [38].

CD15 - còn có tên gọi khác là LewiX - là một protein trên bề mặt màng tế bào. CD15 có nhiều ở tế bào gốc phôi và các tế bào cấu thành nên cụm “neurosphere”, chịu trách nhiệm hình thành nên toàn bộ hệ thần kinh sau này.

Ngoài ra, có một số ít các noron ở vùng SVZ được phát hiện dương tính với CD15 trong quá trình nuôi cấy tuy nhiên mức độ biểu hiện yếu vì vậy nhìn chung đây không phải là một marker đặc hiệu cho tế bào gốc thần kinh. Thông thường các tác giả sử dụng kèm với các marker khác như nestin, SOX1 hay CD133... [86].

1.5.2. Định danh tế bào tiết dopamin

1.5.2.1. Về hình thái

a. Hình thái vi thể

Các noron tiết dopamin có hình thái giống với các noron đa cực khác với hình ảnh nhân ở giữa và nhiều nhánh bào tương tỏa ra xung quanh. Nhân của các noron tiết dopamin có đường kính khoảng 15 - 20 μ m [87].

a. Hình thái siêu vi thể

Dưới kính hiển vi điện tử, thân noron có hình ảnh nhiều xơ thần kinh, lưới nội bào có hạt, Golgi. Sợi nhánh nhiều chồi gai. Tận cùng sợi trục có hình ảnh synap và các túi synap [88].

1.5.2.2. Về các marker phân tử

a. Marker đánh dấu noron trưởng thành

(1). Neurofilament (NF)

Neurofilament là xơ trung gian tham gia cấu tạo nên bộ khung tế bào. Chúng có đường kính khoảng 10nm.

Dựa vào trọng lượng phân tử, các NF được chia làm ba nhóm chính:

NF – L: NF trọng lượng phân tử thấp

NF – M: NF trọng lượng phân tử trung bình

NF – H: NF trọng lượng phân tử cao

Trong đó NF – M và NF – H là hai marker thường được sử dụng để đánh dấu neuron trưởng thành.

(2). MAP-2 (Microtubule-associated protein 2)

MAP-2 là protein tham gia vào hình thành hệ thống ống siêu vi ở noron trong quá trình phát triển và biệt hóa. Chúng giúp ổn định cấu tạo của các ống siêu vi bằng cách tạo mối liên kết giữa các ống siêu vi với nhau cũng như với các xơ trung gian. Ở người, protein này được mã hóa bởi gen *MAP2*. MAP-2 cũng dương tính yếu ở các noron chưa trưởng thành.

(3). NeuN (Neuronal Nuclei)

NeuN ban đầu được mô tả lần đầu bởi nhóm tác giả Mullen và cs (1992) khi nghiên cứu một dòng kháng thể đơn dòng để nhận diện tế bào trong cấy ghép trên chuột thực nghiệm. Nhóm tác giả nhận thấy kháng thể này dương tính mạnh trên nhân tế bào thần kinh ở tất cả các mẫu. Lúc đó kháng thể này được đặt tên NeuN (Neuronal Nuclei). Sau đó, nhiều tác giả khác nghiên cứu và thấy rằng NeuN tương đồng với protein FOX 3 [89]. Từ đó đến nay, NeuN/FOX3 được sử dụng rộng rãi như một marker đánh dấu tế bào thần kinh trưởng thành. NeuN được ghi nhận dương tính ở hầu hết các tế bào thần kinh ngoại trừ: tế bào Purkinje, tế bào Golgi hay tế bào Mitral ở hành khứu.

(4). Synaptophysin và Synapsin I

Đây là 2 loại protein có ở trong các túi synap ở màng trước synap. Ở những noron trưởng thành, synapsin I và synaptophysin. Bằng các kỹ thuật miễn dịch đánh dấu kháng nguyên, những cụm kháng nguyên kháng thể này thể hiện là những điểm nhỏ ở vị trí sợi trục tiếp xúc với thân tế bào hoặc với các sợi nhánh khác. Quan sát các cấu trúc này dưới kính hiển vi điện tử, các tác giả nhận thấy đây là các túi synap ở phần trước synap. Trong nghiên cứu nuôi cấy tế bào thần kinh trên thực nghiệm, các tác giả nhận thấy synapsin I và synaptophysin tồn tại ở sợi trục và các nón tăng trưởng của noron, ngay cả ở những mẫu mới nuôi cấy, khi mà vẫn chưa có sự tiếp xúc của các tế bào với

nhau. Khi các tế bào đã có sự tiếp xúc, các tác giả vẫn quan sát thấy biểu hiện của các marker này, tuy nhiên mức độ biểu hiện các cụm kháng nguyên-kháng thể này cũng không tăng lên. Vì vậy, 2 marker này thường được sử dụng để đánh dấu neuron trưởng thành, hơn nữa, cũng có thể sử dụng để tách riêng các tế bào thần kinh trưởng thành bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang (FACS) từ giai đoạn sớm, trước khi có sự kết dính của các tế bào [90]. (5). GFAP (Glial fibrillary acidic protein), GABA (gamma-aminobutyric acid), ChAT (choline acetyltransferase)...

Ngoài ra, các nhà nghiên cứu còn sử dụng những marker khác: GFAP, O4, GABA để “chẩn đoán phân biệt” các loại tế bào thần kinh trưởng thành khác nhau: GFAP – marker đánh dấu tế bào thần kinh đệm, O4 để đánh dấu các tế bào ít nhánh, GABA (gamma - aminobutyric acid) để đánh dấu nhóm GABA neuron, ChAT để đánh dấu các neuron thuộc hệ cholinergic...

b. Marker đánh dấu neuron tiết dopamin

(1): TH (Tyrosine Hydroxylase)

Tyrosine hydroxylase là enzym tham gia vào quá trình chuyển đổi amino acid L-tyrosine thành L-3-4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). L-DOPA là tiền chất của dopamin – một chất trung gian dẫn truyền thần kinh. Sau đó, dopamin được tổng hợp ra tiếp tục tham gia vào quá trình tạo các catecholamine khác là epinephrine và norepinephrine. Ở người, Tyrosine hydroxylase được mã hóa bởi gen *TH*. Tyrosine hydroxylase có mặt trong các neuron của hệ thần kinh trung ương (liềm đen và một số vùng khác) cũng như các tế bào ở vùng tủy thượng thân.

Chính vì vậy, TH thường được sử dụng để đánh dấu các neuron tiết dopamin. Giảm hoạt tính của enzyme Tyrosine hydroxylase làm giảm tổng hợp dopamin cũng như epinephrine và norepinephrine. Trong bệnh Parkinson, biểu hiện của enzyme Tyrosine hydroxylase có giảm hơn so với nhóm không

bị Parkinson. Tuy nhiên đây không phải là nguyên nhân gây bệnh mà nguyên nhân gây bệnh đã được biết tới đó là sự thoái hóa của các neuron tiết dopamin ở liềm đen của não. Do đó, trên thực nghiệm, khi nhuộm TH để đánh dấu tế bào tiết dopamin ở liềm đen chuột bị Parkinson, có sự giảm cường độ bắt màu huỳnh quang ở bên gây bệnh so với bên lành [88].

(2): DAT (Dopamin Transporter)

DAT là một loại protein xuyên màng, có tác dụng vận chuyển phân tử dopamin qua màng tế bào. DAT có trên màng tế bào của một số neuron ở hệ thần kinh trung ương trong đó có neuron ở liềm đen. Cũng bằng phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch, nhiều tác giả cũng ghi nhận DAT có ở màng bào tương phần tận cùng của các sợi trục đến thể vân. Ở liềm đen, các tác giả thấy được DAT có ở cả phần thân, sợi trục và sợi nhánh của tế bào [88].

(3): En1, Nurr1, LMX1

En1 (homeobox protein engrailed-1), Nurr1 (nuclear receptor related1 protein), LMX1 (LIM homeobox transcription factor). Những marker này có vai trò trong quá trình hình thành và biệt hóa neuron tiết dopamin. Vì vậy, chúng có mặt ở những neuron tiết dopamin đang trong giai đoạn biệt hóa – neuron tiết dopamin chưa trưởng thành. Những marker này thường được sử dụng trong nuôi cấy tạo neuron tiết dopamin từ tế bào gốc phôi (tế bào gốc vạn năng) để định danh tế bào ở những giai đoạn phát triển khác nhau.

Commented [D4]: Nên viết ngắn gọn

1.6. Bảo quản lạnh tế bào gốc thần kinh và neuron tiết dopamin

Để trị liệu tế bào gốc được triển khai trên quy mô rộng thì bên cạnh việc nuôi cấy tăng sinh và biệt hóa các tế bào, việc lưu giữ, bảo quản lạnh tế bào gốc và các tế bào sau nuôi cấy cũng rất quan trọng để có thể sẵn sàng nguồn tế bào trong điều trị. Bảo quản lạnh tế bào là việc lưu giữ các tế bào ở nhiệt độ thấp mà vẫn bảo tồn được cấu trúc và khả năng sống của tế bào. Các kỹ thuật bảo quản lạnh không ngừng phát triển, đảm bảo được chất lượng của tế bào và nâng cao tỉ lệ sống của tế bào sau một thời gian dài lưu giữ [2].

Có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng tới quá trình bảo quản lạnh của tế bào nói chung cũng như tế bào thần kinh nói riêng như: chất bảo vệ lạnh, phương pháp hạ nhiệt độ và rã đông, mật độ tế bào... Tế bào thần kinh trong mẫu sau phân lập hay nuôi cấy thông thường có một vài đặc điểm khá đặc biệt như: có nhiều tế bào ở các giai đoạn biệt hóa khác nhau hay bên cạnh những tế bào đơn lẻ thì có sự tồn tại của nhiều “cụm” tế bào. Vì vậy, nghiên cứu về bảo quản lạnh tế bào thần kinh cũng được các tác giả chú ý tới những đặc điểm này.

Tế bào gốc thần kinh sau bảo quản lạnh đã được các tác giả chứng minh rằng không ảnh hưởng tới tính “gốc” của chúng. Chúng vẫn giữ được khả năng phân chia, tăng sinh và biệt hóa thành neuron sau bảo quản [91]. Rất nhiều nghiên cứu cũng đã được tiến hành với mục tiêu lựa chọn kỹ thuật bảo quản lạnh thích hợp nhất cho dòng tế bào này. Đầu tiên, về chất bảo vệ lạnh, có vẻ như chất bảo vệ lạnh thẩm qua màng tế bào DMSO được nhiều tác giả đồng thuận sử dụng. Nồng độ thông thường từ 7 - 10% cho tỷ lệ sống của các tế bào sau rã đông là cao nhất [91]. Tiếp theo, về phương pháp hạ nhiệt độ, hiện nay cũng song song tồn tại hai phương pháp là đông lạnh chậm ($1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$) và đông lạnh nhanh (vitrification) trong cọng rạ. Tuy nhiên, không có sự khác biệt giữa hai phương pháp trên về các marker phân tử cũng như khả năng biệt hóa của tế bào sau rã đông [92]. Tuy nhiên, với phương pháp hạ nhiệt độ siêu chậm $0,5^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ thì lại cho kết quả thu hồi neuron sau rã đông thấp hơn có ý nghĩa so với hai phương pháp trên, theo công bố của nhóm tác giả Drummond và cs (2020) [93]. Do vậy các tác giả khuyến cáo cần tìm được tốc độ hạ nhiệt lý tưởng cho từng loại tế bào cũng như từng môi trường bảo quản lạnh khác nhau để tối ưu quy trình bảo quản. Bởi cần có sự cân bằng giữa việc hạn chế hình thành tinh thể đá trong và ngoài tế bào khi tốc độ hạ nhiệt quá nhanh cũng như giảm tác động có hại của các chất bảo vệ lạnh khi chúng tiếp xúc với tế bào quá lâu trong quy trình hạ nhiệt độ chậm.

Trong một nghiên cứu rất thú vị về bảo quản lạnh tế bào gốc thần kinh não chuột gần đây của tác giả Rodriguez-Martinez, nhóm tác giả tập trung so sánh giữa bảo quản lạnh các tế bào gốc thần kinh đơn lẻ với các cụm tế bào hay bảo quản lạnh tế bào gốc thần kinh ở những giai đoạn biệt hóa khác nhau (ngay sau phân lập, sau nuôi cấy và sau các giai đoạn cấy chuyển). Kết quả cho thấy rằng mặc dù tỷ lệ sống của tế bào sau rã đông cao hơn ở nhóm tế bào đơn lẻ so với cụm tế bào (kích thước 50- 70 μ m). Tuy nhiên khả năng phân chia và biệt hóa của các cụm tế bào sau rã đông lại tốt hơn so với mẫu tế bào đơn lẻ trên cả *in vitro* và *in vivo* khi ghép mẫu tế bào vào não chuột thực nghiệm. Lý giải điều này, nhóm tác giả cho rằng trong hỗn hợp tế bào thần kinh đơn lẻ, các tế bào có cơ hội tiếp xúc tốt hơn với chất bảo vệ lạnh so với các cụm tế bào. Tuy nhiên việc tách rời các tế bào gốc thần kinh trong mẫu bảo quản lạnh sẽ cắt đứt sự liên hệ của các tế bào với những chất cận tiết cấu thành nên “ổ vi môi trường” - đóng vai trò quan trọng trong việc kiểm soát sự phân chia và biệt hóa của các tế bào gốc. Vì vậy, bảo quản lạnh “cụm” tế bào gốc thần kinh theo các tác giả giúp tăng khả năng phân chia và biệt hóa của tế bào hơn là nhóm tế bào đơn lẻ. Điều đặc biệt hơn nữa trong nghiên cứu này đó là nhóm tác giả không quan sát thấy dấu hiệu về khả năng sinh u của các tế bào gốc sau bảo quản khi ghép lại trên chuột khi theo dõi sau ghép một năm [94].

Những nghiên cứu trên sẽ là tiền đề để thực hiện thử nghiệm trên bảo quản lạnh tế bào gốc thần kinh của người. Thực tế, những nghiên cứu về bảo quản lạnh tế bào gốc thần kinh của người mới chỉ được công bố trong vài năm trở lại đây cũng cho những kết quả khá tốt về tỷ lệ sống, khả năng biệt hóa của tế bào sau bảo quản. Tuy nhiên, để tiến tới có thể sử dụng các mẫu tế bào rộng rãi trên lâm sàng, các tác giả vẫn kỳ vọng tìm ra kỹ thuật bảo quản trong đó loại trừ hoàn toàn các sản phẩm từ động vật như FBS cũng như hạn chế tối đa độc tính của chất bảo vệ lạnh được sử dụng [95], [96].

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành tại Labo nuôi cấy tế bào, Bộ môn Mô – Phôi, trường Đại học Y Hà Nội và Phòng kính hiển vi điện tử, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung Ương trong thời gian từ 10/2014 đến 10/2018.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trên:

- 776 phôi chuột cống trắng thuần chủng Wistar từ 10,5 đến 14,5 ngày tuổi (E10,5 – E14,5). Trong đó 186 phôi được sử dụng để nghiên cứu hình thái và cấu trúc não giữa theo các nhóm tuổi phôi khác nhau; 590 phôi được sử dụng để phân lập và nuôi cấy tế bào gốc ngoại bì thần kinh.

- 201 phôi người từ 6,0 – 8,0 tuần tuổi đã được sàng lọc các bệnh lây truyền như: HIV, viêm gan B, giang mai, được thu thập bằng phương pháp giảm thiểu thai ở những thai phụ đa thai trong kỹ thuật Hỗ trợ sinh sản (Bơm tinh trùng vào buồng tử cung hoặc Thụ tinh ống nghiệm) và được sự cho phép của thai phụ.

- Chất liệu nghiên cứu: tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi chuột và người.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành thực nghiệm trong Labo và chia làm hai giai đoạn. Giai đoạn 1 được thực hiện trên phôi chuột cống trắng. Giai đoạn 2 được tiến hành trên phôi người.

2.3.1. Mô hình nghiên cứu trên động vật

Phôi chuột được lấy ở các độ tuổi khác nhau: E10,5; E11,5; E12,5; E13,5; E14,5 để đánh giá mức độ biệt hóa của các tế bào gốc não giữa và khả năng biệt hóa thành noron tiết dopamin:

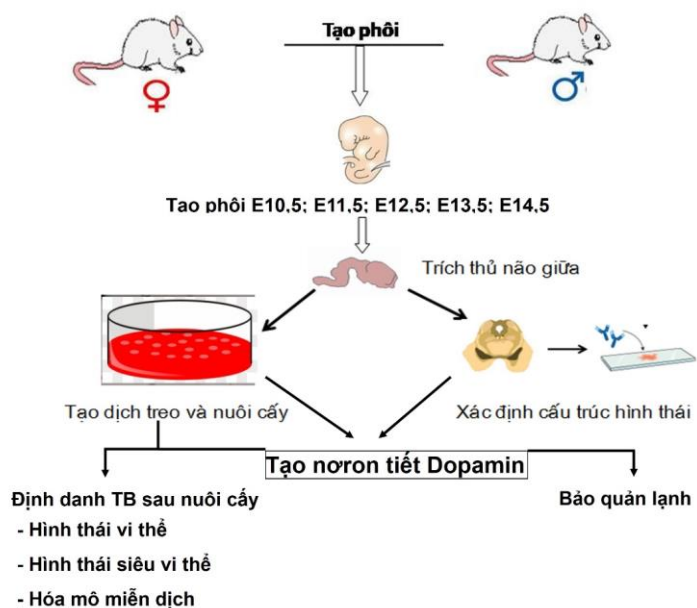
Commented [M5]: Sắp xếp chưa hợp lý, lủng củng, khó theo dõi

Commented [M6]: Cỡ mẫu / số lượng?

Commented [M7]: ???

Commented [D8]: Kiểm tra lại thời gian

Commented [M9]: Chất liệu NC: tế bào gốc ngoại bì TH phôi chuột và người; Thiết kế NC: thực nghiệm và NC labo



Hình 2.1: Sơ đồ nghiên cứu nuôi cấy tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi chuột cống trắng tạo neuron tiết dopamin

2.3.2. Mô hình nghiên cứu trên phôi người

- Phôi người 6 – 8 tuần tuổi được thu thập từ các bào thai được làm thủ thuật giảm thiểu thai ở những thai phụ đa thai khi điều trị Hỗ trợ sinh sản. Tuổi phôi được tính từ ngày đầu của kỳ kinh cuối cùng của thai phụ.

- Sau khi được thu thập từ bệnh viện, các phôi được để trong ống Falcon có chứa 10ml môi trường HBSS, bảo quản ở ngăn mát tủ lạnh (nhiệt độ 4°C) sau đó chuyển về Labo nuôi cấy tế bào trong vòng 8 giờ. Những phôi đủ tiêu chuẩn nghiên cứu sẽ được tiếp tục quá trình phân lập, nuôi cấy và định danh tương tự như trên.

2.4. Các bước tiến hành

2.4.1. Các bước tiến hành trên phôi chuột

2.4.1.1. Phân lập và nuôi cấy tế bào gốc thần kinh phôi

a. Tạo phôi chuột

(1) Chuột cống trắng trưởng thành thuần chủng đực và cái (2 - 3 tháng tuổi, cân nặng 150 - 250g) được nhốt chung với nhau qua đêm (từ 19 giờ ngày hôm trước tới 7 giờ hôm sau).

(2) Kiểm tra phôi đồ âm đạo chuột cái vào buổi sáng ngày hôm sau: nếu có tinh trùng, chuột đực coi là có thai 0,5 ngày; nếu không có tinh trùng, chuột đực coi là không có thai và lại tiếp tục được nhốt chung vào buổi chiều ngày hôm sau.

(3) Những chuột có thai sẽ được nuôi nhốt riêng và tiến hành lấy phôi nghiên cứu vào các thời điểm tuổi phôi từ 10,5 đến 14,5 ngày (E10,5 - E14,5).

b. Thu thập phôi

(1) Phẫu tích lấy sừng tử cung chuột đang mang thai trong điều kiện vô trùng. Nhúng toàn bộ sừng tử cung chuột vào đĩa petri 100mm có chứa dung dịch HBSS.

(2) Tách từng phôi ra khỏi buồng tử cung và bóc bỏ màng ối.

(3) Rửa lại bằng môi trường HBSS

c. Tách não giữa tiến hành dưới kính hiển vi soi nổi [97]

(1) Dùng lưỡi dao hoặc kéo vi phẫu để cắt rời phần đầu các phôi.

(2) Xác định hệ thần kinh trung ương và não giữa. Cẩn thận cắt rời não giữa ra.

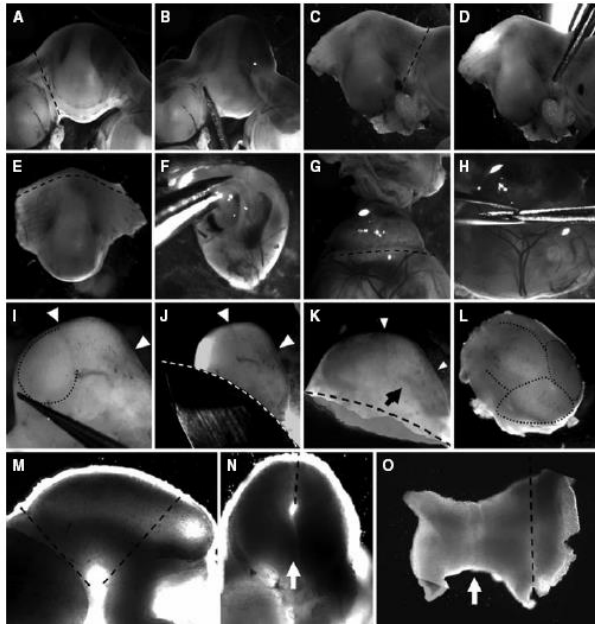
(3) Đặt não đã được cắt rời vào đĩa petri 60mm có chứa môi trường HBSS.

(4) Đặt não phôi theo mặt ngang, giữ mô não bằng panh, kẹp vào vùng não trước hoặc não sau. Dùng lưỡi dao cắt theo mặt phẳng đứng bỏ mô não trước và não sau.

(5) Dùng panh giữ nhẹ nhàng mảnh mô não giữa vừa thu được.

(6) Tách bỏ màng não dưới kính hiển vi soi nổi.

(7) Dùng kéo phẫu tích nhỏ hoặc phần mũi của dao để bóc tách ống thần kinh dọc theo đường giữa lưng thành dạng như hình cánh bướm.



Hình 2.2. Phẫu tích não giữa theo Jan Pruszek và cộng sự [97]

d. *Kỹ thuật tạo dịch treo M-NECs*

- (1) Phẫu tích lấy mô sần não giữa phôi chuột;
- (2) Rửa bằng DMEM có kháng sinh kháng nấm Penicillin - Streptomycin hàm lượng 100IU/ml;
- (3) Ngâm trong Dispase 1,2IU trong 3 phút (pha từ dung dịch Dispase 2,4IU trong DMEM/F12);
- (4) Tiếp tục ngâm trong Trypsin – EDTA 0,05% trong 3 phút;
- (5) Rửa lại bằng môi trường nuôi cấy M-NECs 3 lần;
- (6) Cho mảnh mô vào 1ml môi trường nuôi cấy M-NECs. Dùng pipet Pasteur hút lên xuống nhiều lần để tách rời các tế bào;

- (7) Lọc hỗn dịch tế bào bằng màng lọc 70 μ m;
- (8) Thu được 1ml dịch treo tế bào;
- (9) Xác định mật độ tế bào trong 1ml dung dịch.

e. Nuôi cấy tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi chuột

- (1) Hỗn dịch tế bào được cấy bề mặt nuôi cấy có mật độ $1,5 \times 10^5$ TB/cm²; Sử dụng môi trường nuôi cấy cơ bản M-NECs trong điều kiện 37°C và 5% CO₂;
- (2) Sử dụng đĩa nuôi cấy 6 giếng, 24 giếng, chai flask hoặc slide chambre;
- (3) Thay môi trường mỗi 2 ngày/lần đồng thời đánh giá sự phát triển của tế bào qua kính hiển vi soi ngược ở độ phóng đại x10; x20; x40;
- (4) Tiến hành cấy chuyển khi các tế bào mọc kín đáy giếng nuôi cấy.

f. Cấy chuyển

- (1) Lấy chai flask ra khỏi tủ ấm, hút bỏ dịch nổi;
- (2) Rửa chai flask bằng dung dịch PBS;
- (3) Hút bỏ PBS, thêm 2ml dung dịch Trypsin – EDTA 0,05% ủ trong tủ ấm 3 – 4 phút;
- (4) Làm bong tế bào khỏi chai;
- (5) Thêm 8ml môi trường M-NECs vào chai;
- (6) Hút toàn bộ hỗn hợp trong chai flask vào ống Falcon 14ml;
- (7) Ly tâm 1500 vòng/phút trong 5 phút;
- (8) Hút bỏ dịch nổi;
- (9) Rửa tiếp 2 lần bằng môi trường M-NECs; Ly tâm lấy cạn;
- (10) Thêm 10ml môi trường M-NECs vào ống Falcon và trộn đều;
- (11) Xác định mật độ tế bào;
- (12) Cấy với mật độ $1,5 \times 10^5$ TB/cm²;
- (13) Nuôi cấy tế bào trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂. Thay môi trường 2 ngày/lần.

g. Môi trường nuôi cấy tăng sinh và biệt hóa tế bào gốc ngoại bì thần kinh sử dụng trong nghiên cứu

- Môi trường nuôi M-NECs: DMEM/F12 (1:1) có bổ sung thêm các yếu tố: Fetal Bovine Serum (FBS) 10%; Epithelial Grow Factor (EGF) 20ng/ml và basic Fibroblast Grow Factor – 2 (bFGF-2) (20ng/ml), (invitrogen, Mỹ); Penicillin - Streptomycin (100IU/ml) (Thermo Scientific, Mỹ); Amphotericine B (0,25µg/ml); Progesterone (20nM), Putrescine (62nM), muối Selenit (30nM), (Sigma, Mỹ); Insulin – Transferine – Selenium (25ng/ml) (Gibco, Mỹ);

2.4.1.2. Bảo quản lạnh và rã đông tế bào gốc thần kinh phôi

a. Chia nhóm tế bào bảo quản lạnh

Các mẫu tế bào được chia làm 3 nhóm ở 3 giai đoạn khác nhau để đánh giá thời điểm thích hợp để bảo quản lạnh tế bào gốc ngoại bì thần kinh:

- Nhóm A: gồm các mẫu được bảo quản ngay sau khi phân lập tạo dịch treo tế bào từ mô sần não giữa;

- Nhóm B: gồm các mẫu được bảo quản sau khi nuôi cấy ở giai đoạn chưa cấy chuyển (P0);

- Nhóm C: gồm các mẫu được bảo quản ở giai đoạn cấy chuyển lần 1 (P1).

b. Môi trường bảo quản

Sử dụng chất bảo vệ lạnh DMSO được pha với tỷ lệ 10% trong nuôi cấy cơ bản (DMEM/F12).

Nhiệt độ bảo quản lạnh: Các mẫu tế bào được bảo quản trong nitơ lỏng, nhiệt độ -196°C.

c. Quy trình bảo quản lạnh và rã đông

• Tách các tế bào nuôi cấy

Việc tách các tế bào nuôi cấy khỏi chai flask được thực hiện với nhóm B và nhóm C, là những tế bào được nuôi cấy ở giai đoạn P0 và P1. Gồm các bước sau:

- (1) Lấy chai flask ra khỏi tủ ẩm, hút bỏ dịch nổi;
- (2) Rửa chai flask bằng dung dịch PBS;
- (3) Hút bỏ PBS, thêm 2ml dung dịch Trypsin – EDTA 0,05% ủ trong tủ ẩm 3 – 4 phút;
- (4) Làm bong tế bào khỏi chai;
- (5) Thêm 8ml môi trường M-NECs vào chai;
- (6) Hút toàn bộ hỗn hợp trong chai flask vào ống Falcon 14ml;
- (7) Hỗn hợp dịch treo tế bào được ly tâm 1500 vòng/phút trong 5 phút; lấy cạn và rửa lại 3 lần bằng môi trường cơ bản;
- (8) Bổ sung thêm môi trường cơ bản, đếm mật độ tế bào bằng buồng đếm hồng cầu và nhuộm trypan blue đánh giá tỷ lệ tế bào sống;

- Bảo quản lạnh tế bào

- (1) Bảo quản lạnh mẫu dịch treo tế bào trong môi trường nuôi cấy có bổ sung 10% DMSO với mật độ 1×10^6 TB/ml;
- (2) Lưu trữ dung dịch tế bào trong các tube bảo quản lạnh criovial 1,8ml;
- (3) Hạ nhiệt độ theo chương trình bằng máy Minicool 10 (Air liquide, Pháp);
- (4) Bảo quản lạnh tế bào trong nitơ lỏng, ở nhiệt độ -196°C .

c. Rã đông tế bào

- (1) Các tube tế bào được lấy ra khỏi nitơ lỏng và ngâm vào cốc nước ấm vô khuẩn 37°C trong 15 phút;
- (2) Rửa sạch chất bảo vệ lạnh bằng môi trường nuôi cấy 3 lần;
- (3) Phần cạn tế bào thu được sẽ được nhuộm trypan blue để đánh giá tỷ lệ sống.

2.4.2. Các bước tiến hành trên phôi người

a. Thu thập phôi

- (1) Các phôi sau giảm thiểu từ Labo Hỗ trợ sinh sản được cho vào ống Falcon 14ml chứa môi trường HBSS;

(2) Phôi được chuyển sang Labo Nuôi cấy tế bào, cho vào tủ ấm 37°C nếu tiến hành phân lập ngay hoặc bảo quản tủ mát 4°C trong 8h.

b. Phân lập tế bào gốc ngoại bì ống thần kinh phôi

- (1) Các phôi được lấy bằng kỹ thuật giảm thiểu thường ở dưới dạng các mảnh nhỏ. Với các phôi xác định được gan sẽ phẫu tích lấy đoạn ống thần kinh từ gan trở lên. Với các phôi không xác định được gan, phẫu tích lấy tất cả những đoạn ống thần kinh quan sát thấy;
- (2) Rửa lại 3 lần trong 2ml dung dịch HBSS;
- (3) Ủ Dispase II 1,2IU trong 3 phút;
- (4) Ủ trong Trypsin – EDTA 0,05% trong 3 phút;
- (5) Rửa 2 lần trong môi trường nuôi cấy M-NECs;
- (6) Dùng micropipette gắn đầu côn đánh tan mảnh mô trong 1ml môi trường nuôi cấy;
- (7) Lọc dịch treo tế bào bằng màng lọc kích thước 70µm;
- (8) Lấy 10µl dịch treo tế bào và 10µl trypan blue trộn đều. Load 10µl dung dịch vào buồng đếm Markler để đếm tỷ lệ sống và mật độ tế bào.

c. Nuôi cấy tế bào gốc ngoại bì ống thần kinh phôi

- (1) Tế bào sau phân lập được chuyển vào giếng nuôi cấy với mật độ khoảng $6 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ tế bào/cm² ở điều kiện 37°C và 5% CO₂;
- (2) Thay môi trường và theo dõi sự phát triển của tế bào 2 ngày/lần;
- (3) Sau 8 – 10 ngày sẽ tiến hành thu hoạch để định danh tế bào nuôi cấy.

2.5. Chỉ tiêu nghiên cứu

** Đối với mục tiêu 1:*

- Hình thái vi thể, siêu vi, hóa mô miễn dịch mẫu não giữa phôi chuột theo tuổi phôi.

- Hình thái vi thể, siêu vi, hóa mô miễn dịch tế bào phôi chuột sau nuôi cấy.

- Tỷ lệ noron tiết dopamin – TH (+) sau nuôi cấy.
- Tỷ lệ cụm tế bào có noron tiết dopamin – TH (+) sau nuôi cấy.
- Tỷ lệ sống tế bào sau bảo quản lạnh bằng nitơ lỏng.

**Đối với mục tiêu 2:*

- Hình thái vi thể, siêu vi, hóa mô miễn dịch mẫu não giữa phôi người.
- Hình thái vi thể, siêu vi, hóa mô miễn dịch tế bào phôi người sau nuôi cấy.
- Tỷ lệ noron tiết dopamin – TH (+) sau nuôi cấy.
- Tỷ lệ cụm tế bào có noron tiết dopamin – TH (+) sau nuôi cấy.

2.6. Trang thiết bị, vật tư hóa chất dùng trong nghiên cứu

2.6.1. Trang thiết bị

- Phòng nuôi cấy vô trùng, có máy lọc khí;
- Buồng thao tác vô trùng;
- Tủ lạnh thường;
- Bình trữ nitơ lỏng để bảo quản tế bào gốc;
- Tủ ẩm thường, tủ ẩm CO₂;
- Kính hiển vi soi nổi có bàn làm ẩm, kính hiển vi đa năng có gắn camera số, kính hiển vi soi ngược có gắn máy ảnh số;
- Máy ly tâm lạnh;
- Bàn định vị não chuột;
- Máy khoan xương sọ đường kính mũi khoan 0,5mm;
- Máy hạ nhiệt độ theo chương trình Minicool 10 (Air liquide, Pháp);
- Microsyringe Hamilton 10μl;
- Panh, kéo, dao, kẹp vi phẫu vô trùng.

2.6.2. Vật tư tiêu hao

- Đĩa petri các loại đường kính 35mm, 60mm, 100mm (Corning, Mỹ);
- Đĩa nuôi cấy Nunc 4 giếng (Thermo Scientific, Mỹ);
- Đĩa nuôi cấy 6 giếng, 24 giếng (Corning, Mỹ);

- Bùồng nuôi cấy Falcon Chambered Cell Culture Slide (Falcon, Mỹ);
- Pipette các loại thể tích 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 15ml, 25ml (Corning, Mỹ);
- Pipette Pasteur 150mm (Volac, Anh);
- Các loại ống nghiệm thể tích 5ml, 14ml, 15ml, 50ml (Corning, Mỹ);
- Ống chịu nhiệt (Crio vial 1,8ml, Thermo Scientific, Mỹ);
- Bơm tiêm các loại thể tích 1ml, 5ml, 10ml, 20ml (Vinahankook, Việt Nam);
- Màng lọc BD 0,22 μm (Mỹ);
- Màng lọc tế bào 70 μm , 100 μm (BD, Mỹ);
- Dụng cụ nạo tế bào Cell lifter 19mm (Corning, Mỹ);
- Găng tay, quần áo, mũ, khẩu trang vô trùng.

2.6.3. Hóa chất, môi trường

* Hóa chất, môi trường phục vụ phân lập, nuôi cấy tế bào gốc

- DMEM (invitrogen, Mỹ);
- DMEM/HAM'S F12 (1:1) (invitrogen, Mỹ);
- Hank's Balanced Salt Solution (invitrogen, Mỹ);
- Insulin – Transferin – Selenium (Gibco, Mỹ);
- EGF (invitrogen, Mỹ);
- bFGF – recombinant human protein (invitrogen, Mỹ);
- bFGF – recombinant mouse protein (invitrogen, Mỹ);
- Fetal Bovin Serum (invitrogen, Mỹ);
- PBS (invitrogen, Mỹ);
- Dispase II (Sigma, Mỹ);
- Trypsine – EDTA 0,5% (Sigma, Mỹ);
- Sodium selenite (Sigma, Mỹ);
- Progesterone (Sigma, Mỹ);
- Putrescine (Sigma, Mỹ)
- Penicillin Streptomycin 10.000 IU/ml (c);

Commented [M10]: Chia thành các nhóm: phân lập, nuôi cấy, định danh...

- Amphotericine B (Sigma, Mỹ);
- Trypan Blue 0,4% (Thermo Scientific, Mỹ);
- DMSO (Sigma, Mỹ);
- * **Hóa chất, môi trường phục vụ nhuộm Hóa mô miễn dịch**
- Huyết thanh dê (abcam, Mỹ);
- Triton X-100 (Sigma, Mỹ);
- Sytox green (Thermo Scientific, Mỹ);
- Paraformaldehyt – PFA (Sigma, Mỹ);
- Vimentin (abcam, ab92745, Mỹ);
- Tyrosine Hydroxylase (abcam, ab112, Mỹ);
- Alexa Flour 546 (abcam, Mỹ).

2.7. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

2.7.1. Kỹ thuật hiển vi

- a. Nhuộm Hematoxylin – Eosin (H-E):
- * Mục đích: nghiên cứu cấu trúc vi thể của não giữa phôi chuột, phôi người
- * Các bước tiến hành:
- Cố định Formol: 1- 4giờ;
- Rửa bằng nước thường: 30 phút;
- Hút nước bằng cồn 70°, 80°, 90°, 95°, 100°;
- Làm trong mô bằng toluene;
- Ngâm nén ở tủ 60°C trong 2 giờ;
- Đúc block paraffin;
- Cắt lát 3-4μm;
- Nhuộm tiêu bản bằng Hematoxylin- Eosin, quy trình như sau:
- (1) Mẫu mô cắt mỏng được đưa lên lam kính;
- (2) Dán đều mẫu mô bằng dung dịch Mayer trên mặt phẳng ẩm;
- (3) Để tiêu bản khô trong tủ ẩm 45°C 2 ngày;

- (4) Sử dụng 3 lọ toluene để tẩy nền;
 - (5) Sử dụng 3 lọ cồn 90° (10 phút/1 lọ) để loại bỏ toluene;
 - (6) Rửa bằng nước cất;
 - (7) Nhuộm Hematoxylin trong 5 phút;
 - (8) Rửa dưới vòi nước lã 30 phút;
 - (9) Nhuộm Eosin trong 5 phút;
 - (10) Nhúng lam tiêu bản qua 2 cốc cồn 100° trong 10 giây;
 - (11) Tiếp tục ngâm trong toluene nóng 56°C trong 1 giờ;
 - (12) Dán lamelle phủ mẫu vật lên lam kính;
- Đọc tiêu bản bằng kính hiển vi quang học với độ phóng đại x10, x20 và x40.

b. Nhuộm Giemsa:

* Mục đích: Quan sát bề mặt của mẫu tế bào nuôi cấy.

* Các bước tiến hành:

- (1) Lấy đĩa nuôi cấy ra khỏi tủ ấm và hút bỏ môi trường nuôi cấy;
- (2) Cố định bằng cồn 100°;
- (3) Rửa lại bằng nước thường;
- (4) Chuẩn bị Giemsa 10% (Merck – Đức) pha trong nước cất ngay trước

khi sử dụng;

- (5) Nhuộm Giemsa trong 10 phút;
- (6) Rửa đĩa nuôi cấy nhiều lần bằng nước cất;
- (7) Để khô sau đó kiểm tra trên kính

c. Nhuộm Cajal II:

* Mục đích: Để xác định sự có mặt của xơ thần kinh trong mô não giữa phôi chuột, trong mẫu tế bào nuôi cấy.

* Các bước tiến hành:

- (1) Cố định mô trong cồn Amoniac 1 ngày;
- (2) Rửa nước 30 phút;
- (3) Nhuộm bằng dung dịch AgNO_3 1,5%, 37°C trong 4 ngày;

- (4) Ngâm vào nước cất 1 phút;
- (5) Ngâm vào dung dịch Acid pyrogalic 1%, 37°C trong 1 ngày;
- (6) Rửa nước cất 5 phút;
- (7) Khử nước bằng cồn;
- (8) Khử cồn bằng toluene;
- (9) Đúc block;
- (10) Cắt tiêu bản;
- (11) Tẩy paraffin qua 3 cốc toluene
- (12) Qua toluene ấm 1 – 2 giờ;
- (13) Gắn lamelle

Đọc tiêu bản bằng kính hiển vi quang học với độ phóng đại x10 và x40.

2.7.2. Kỹ thuật siêu vi

Mẫu mô não giữa sau phân lập cũng như mẫu tế bào sau nuôi cấy được kiểm tra hình thái siêu vi 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 mảnh mô não giữa và các tế bào sau nuôi cấy.

* Các bước tiến hành với mẫu TEM

- (1) Cố định bằng glutaraldehyde 2,5% pha với đệm PBS qua đêm ở 4°C;
- (2) Rửa mẫu bằng dung dịch cacodylate 0,1M (15 phút/lần trong 3 lần);
- (3) Cố định acid osmic 1% trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng;
- (4) Rửa mẫu bằng dung dịch cacodylate 0,1M (15 phút/lần trong 3 lần);
- (5) Khử nước bằng cồn nồng độ tăng dần: 50, 70°, 80°, 90°, 95°, 100° (15 phút/ lần trong 3 lần);
- (6) Tẩy cồn bằng propylene oxyte (15 phút/ lần trong 2 lần);
- (7) Ngâm eponxy nguyên chất qua đêm;
- (8) Đúc bằng eponxy nguyên chất trong con nhộng gelatin;
- (9) Nhuộm bằng Uranyl acetate – 10 phút và citrate chì – 5 phút;

(10) Để mẫu khô tự nhiên;

(11) Quan sát bằng kính hiển vi điện tử xuyên (JEM1010 – JEOL)

* Các bước tiến hành với mẫu SEM

(1) Mẫu sẽ được chuyển qua dung dịch hexamethyldisilazane trong 10 phút, sau đó để khô tự nhiên và phủ vàng

(2) Mẫu được kiểm tra trên kính hiển vi điện tử quét (S-4800 – Hitachi).

2.7.3. Kỹ thuật hóa mô miễn dịch

a. Nhuộm kháng thể Vimentin:

* Mục đích: Quan sát sự hiện diện của xơ Vimentin trong tế bào não giữa phôi cũng như các tế bào sau nuôi cấy

Các bước tiến hành:

* Chuẩn bị mẫu:

o Với mô não giữa

- Cố định bằng PFA 4% trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng;
- Ngâm sucrose 20% qua đêm ở 4°C để mô chìm xuống đáy dung dịch;
- Đúc block OCT (Tissue Teck, Nhật Bản);
- Đông lạnh ở nhiệt độ -20°C đến -80°C;
- Cắt lát 5 - 10µm bằng máy cắt lạnh;
- Để mẫu khô 30 phút ở nhiệt độ phòng;

o Với tế bào nuôi cấy

- Cố định tế bào nuôi cấy bằng PFA 4% trong 30 phút ở nhiệt độ phòng

* Nhuộm tế bào

(1) Rửa PBS 0,1M 10 phút/lần trong 3 lần;

(2) Hoạt hóa kháng nguyên bằng dung dịch đệm natri citrate 0,1M, pH 6,0 ở 96°C trong 10 phút;

(3) Đưa lại nhiệt độ bình thường, chạy nước 10 phút;

(4) Rửa các tiêu bản bằng PBS 0,1M 30 phút/ lần trong 3 lần;

(5) Block kháng nguyên không đặc hiệu bằng dung dịch 5% NGS, 0,1% Triton X-100, PBS 1X trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng;

(6) Nhuộm kháng thể 1: Vimentin (pha loãng 1/300) qua đêm ở 4°C;

(7) Rửa PBS 0,1M 1h/lần trong 3 lần;

(8) Nhuộm kháng thể 2: huỳnh quang (Alexa Flour 546, pha loãng 1/200 trong 2h ở nhiệt độ phòng. Từ bước này tránh ánh sáng;

(9) Rửa PBS 0,1M 10 phút/ lần trong 3 lần

(10) Nhuộm nhân bằng Sytox green (pha loãng 1/10.000) trong 1 phút;

(11) Rửa bằng PBS 0,1M 10 phút/lần trong 3 lần;

(12) Dán lamelle;

(13) Quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang vật kính x10; x20 và x40.

b. Nhuộm kháng thể TH

* Mục đích: Quan sát sự hiện diện của enzym Tyrosine hydroxylase (TH) trong tế bào não giữa phôi cũng như các tế bào sau nuôi cấy.

* Các bước tiến hành:

Tương tự như nhuộm kháng thể Vimentin. Thay bước nhuộm kháng thể 1 bằng cách sử dụng kháng thể TH (pha loãng 1/750) qua đêm ở 4°C.

Các tiêu bản sau khi nhuộm cũng được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang.

2.7.4. Kỹ thuật đếm tế bào TH(+) (tương tự Carolina và cộng sự [98])

a. Đếm tế bào sau phân lập

* Sau khi lọc dịch phân lập qua màng lọc ϕ lỗ lọc 70 μm . Thu được 1 ml dịch treo tế bào

- Hút 10 μl dịch treo pha loãng tỷ lệ 1/20 với nước muối sinh lý

* Sử dụng buồng đếm Neubauer để đếm tổng số lượng tế bào:

- Đặt phiến kính phủ buồng đếm Neubauer khu vực trung tâm.

- Hút 10 μl dịch tế bào sau pha loãng nhỏ vào mép của phiến kính

- Tiến hành đếm tế bào ở 5 ô vuông lớn (80 ô vuông nhỏ). Đếm những tế bào chạm vạch giới hạn phía trên và bên trái, không đếm những tế bào chạm vạch giới hạn dưới và bên phải.

- Tính mật độ tế bào phân lập được theo công thức:

Số lượng tế bào/ml = SL tế bào đếm x 4000/80 x 20 = SL tế bào đếm x 10^3 /ml

* Tính tỷ lệ sống chết của tế bào sau phân lập:

- Lấy 10 μ l dung dịch treo tế bào sau pha loãng trộn lẫn với dung dịch Trypan Blue 0,4% theo tỷ lệ 1:1 để đánh giá tỷ lệ sống;

- Những tế bào sống không bắt màu xanh của Trypan Blue; Tế bào sống bắt màu Trypan Blue

- Đếm tế bào sống/tổng số 200 tế bào lặp lại 2 lần. Tính trung bình 2 lần đếm

- Tỷ lệ tế bào sống = Trung bình số tế bào sống 2 lần đếm/ 200 x100 (%)

b. Các mẫu nuôi cấy

* Các mẫu nuôi cấy tế bào được nhuộm hóa mô miễn dịch với kháng thể TH theo quy trình mục 2.5.3

* Đếm tế bào dưới kính hiển vi Huỳnh quang: Những tế bào TH (+) cho màu đỏ có biểu hiện ít nhất 2 nhánh bào tương

* Tính tỷ lệ cụm có tế bào TH (+)

- Quan sát dưới vật kính x 4

- Di chuyển vi trường theo hình zic zắc

- Quan sát trên toàn bộ đĩa nuôi , đếm số lượng cụm có tế bào TH (+)

Tỷ lệ cụm có tế bào TH (+) = Số lượng cụm có tế bào TH(+)/tổng số cụm

- Thực hiện 2 lần. Tính tỷ lệ trung bình 2 lần đếm coi là tỷ lệ cụm có tế bào TH (+) của mẫu nuôi cấy

* Tính tỷ lệ tế bào TH (+) bằng phương pháp đếm thủ công dưới kính hiển vi huỳnh quang

- Di chuyển ngẫu nhiên 10 vi trường dưới độ phóng đại x20

- Với mỗi vi trường đếm tế bào TH (+) và tổng số tế bào.
Tỷ lệ tế bào TH (+) = Số lượng tế bào TH (+) / Tổng số tế bào đếm
- Tính tỷ lệ tế bào TH trung bình của 10 vi trường coi là tỷ lệ tế bào TH (+) ở mỗi mẫu nuôi cấy.

2.8. Xử lý số liệu nghiên cứu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm SPSS 16.0,

Các test được sử dụng

- T-test để kiểm định khác biệt về tỷ lệ trung bình.
 - Test χ^2 để kiểm định sự khác biệt về trung bình giữa 2 nhóm.
 - Test one way ANOVA để kiểm định sự khác biệt về trung bình 3 nhóm có phương sai đồng nhất.
 - Test Welch để kiểm định sự khác biệt về trung bình 3 nhóm có phương sai không đồng nhất.
- Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

2.9. Đạo đức nghiên cứu

- Nghiên cứu này là một phần trong nội dung Đề tài Độc lập cấp Nhà nước đã được Hội đồng Đạo đức trường Đại học Y Hà Nội thông qua theo Công văn số 148/HĐĐĐĐHYHN ngày 06/8/2014 v/v chấp thuận của Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y Sinh học.
- Nghiên cứu có sự đồng ý của lãnh đạo cơ sở và sự chấp thuận tự nguyện của các sản phụ được làm thủ thuật giảm thiểu thai, có cam kết đồng ý.
- Các thông tin về bệnh nhân được lưu giữ bí mật, chỉ phục vụ cho nghiên cứu.
- Danh sách bệnh nhân sẽ không công bố tên tuổi đầy đủ để đảm bảo bí mật theo quy định của pháp luật.
- Nghiên cứu chỉ phục vụ cho sức khỏe bệnh nhân, ngoài ra không có mục đích nào khác.

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân lập, tăng sinh, biệt hóa và bảo quản lạnh tế bào gốc ngoại bì thần kinh não giữa phôi chuột

3.1.1. Phân lập, nuôi cấy tăng sinh và biệt hóa tế bào gốc ngoại bì thần kinh sàn não giữa phôi chuột theo nhóm tuổi

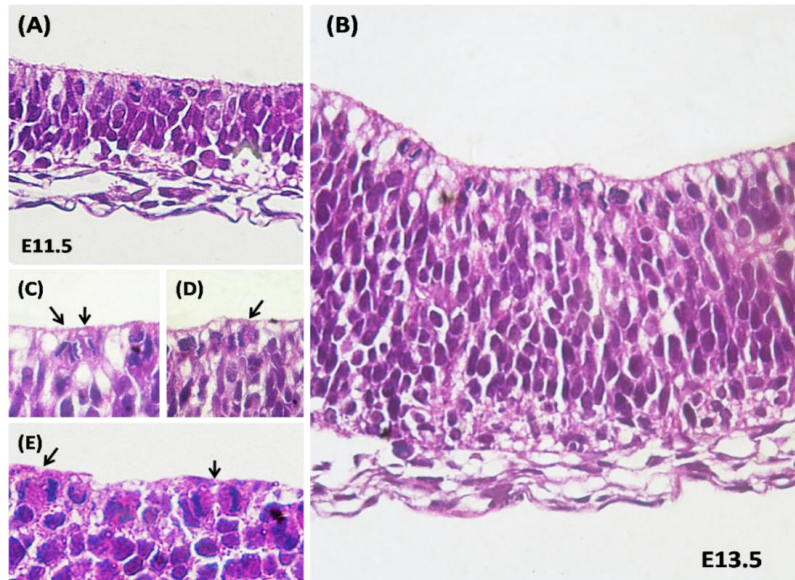
3.1.1.1. Xác định vị trí tế bào tiền thân tiết dopamin ở não giữa phôi chuột cống trắng

Để đánh giá hình thái, cấu trúc não giữa phôi chuột cũng như xác định vị trí tế bào tiền thân tiết dopamin ở não giữa phôi, chúng tôi đã sử dụng 186 phôi chuột cống trắng giai đoạn 10,5 đến 13,5 ngày tuổi.

a. Cấu trúc vi thể vùng não giữa phôi chuột cống trắng

Quan sát cấu trúc của não giữa phôi chuột cống trắng từ 10,5 – 13,5 ngày tuổi, nhận thấy não giữa có sự lớn lên về kích thước. Thành não giữa dày lên. Trung tâm não giữa là cống não (cống Sylvius). Thành của não giữa có cấu trúc dạng biểu mô tầng. Ở phôi 11,5 ngày, thành não giữa tương đối mỏng với vài hàng tế bào. Lớp nội tủy gồm một hàng tế bào ngay sát lòng cống não. Nhiều tế bào thuộc lớp nội tủy đang trong giai đoạn phân chia. Trong khi đó lớp áo gồm nhiều hàng tế bào, số lượng hàng tế bào của lớp này tăng lên theo độ tuổi của phôi. Ở giai đoạn muộn hơn (E13,5) có thể thấy những tế bào lớp trên đứng xa nhau hơn, các nhánh bào tương của tế bào dài, nhiều nhánh bào tương chạy vuông góc với thành não giữa (Hình 3.1):

Commented [M11]: Thiếu nội dung biệt hoá trong mục tiêu đề ra???

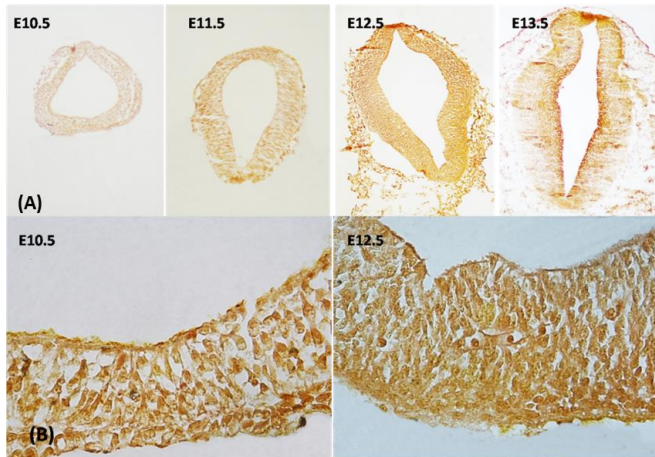


Hình 3.1. Cấu tạo vi thể não giữa phôi chuột cống trắng (H&E)

(A) cấu tạo não giữa phôi chuột cống trắng 11,5 ngày; (B) cấu tạo thành não giữa phôi chuột cống trắng 13,5 ngày (x200).

(C), (D), (E) Hình ảnh tế bào đang phân chia (→) ở lớp nội tủy (x250).

Trên các tiêu bản mô não giữa nhuộm Cajal II để phát hiện sự có mặt của các xơ thần kinh cũng quan sát thấy cấu trúc não giữa phôi chuột cống trắng giai đoạn E10,5 đến E13,5 cũng có dạng biểu mô tầng. Hơn nữa, mức độ ngấm thuốc nhuộm của mô não giữa cũng tăng dần theo tuổi phôi (Hình 3.2):

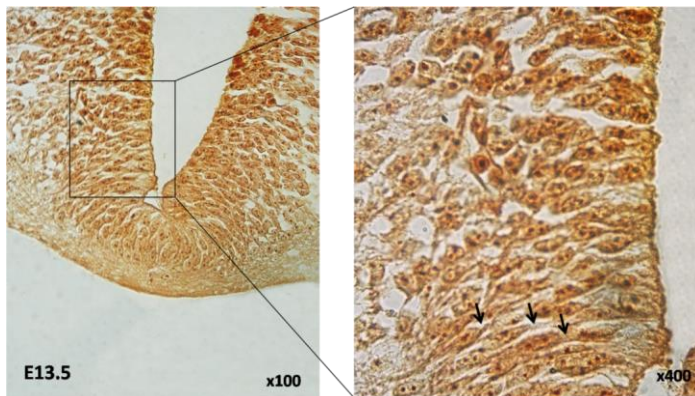


Hình 3.2. Sần mô não giữa (phương pháp nhuộm Cajal II)

(A) Não giữa chuột theo tuổi phôi 10,5 ngày, 11,5 ngày, 12,5 ngày, 13,5 ngày x40

(B) Sần não giữa phôi chuột cống trắng 10,5 ngày và 12,5 ngày có dạng biểu mô tầng (x200)

Đặc biệt tại vùng sần não giữa, số lượng các tế bào xuyên tâm tăng lên (Hình 3.3):

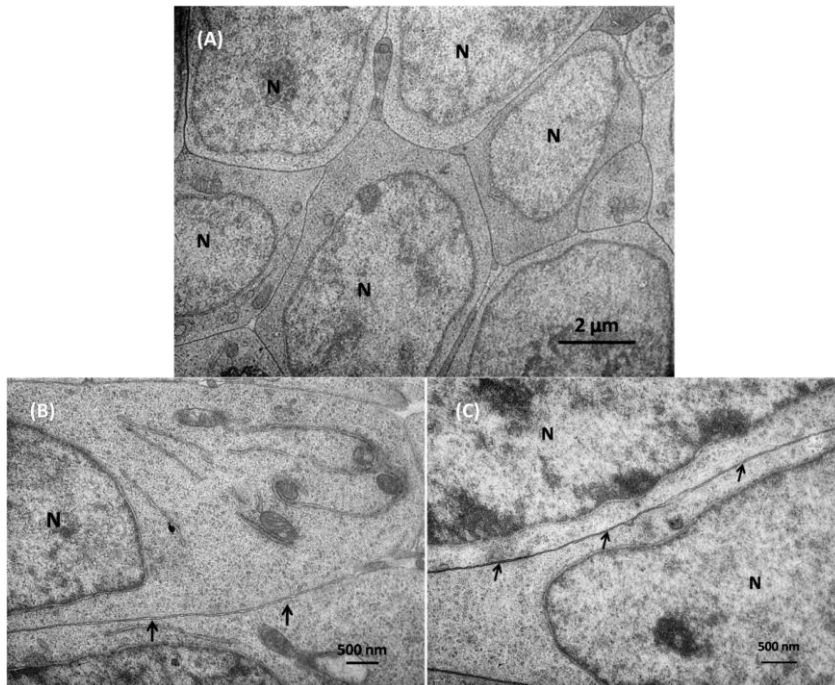


Hình 3.3. Sần não giữa phôi chuột cống trắng E13,5 (Cajal II)

Tế bào thần kinh xuyên tâm (→) xen giữa các tế bào khác

b. *Cấu trúc siêu vi vùng não giữa theo tuổi phôi*

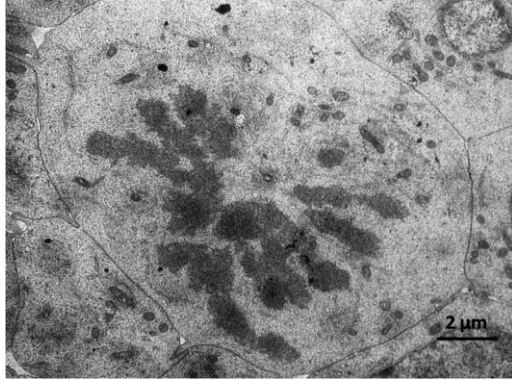
Quan sát cấu trúc não giữa dưới kính hiển vi điện tử thấy được ở giai đoạn E10,5 – E11,5 các tế bào đứng rất sát nhau. Chủ yếu gồm những tế bào đa diện, không có nhánh bào tương. Những tế bào này có tỷ lệ nhân/bào tương rất lớn. Trong bào tương tế bào có rất ít bào quan, có thể gặp một vài ti thể kích thước nhỏ (Hình 3.4):



Hình 3.4. Cấu trúc siêu vi của biểu mô thần kinh não giữa E11,5

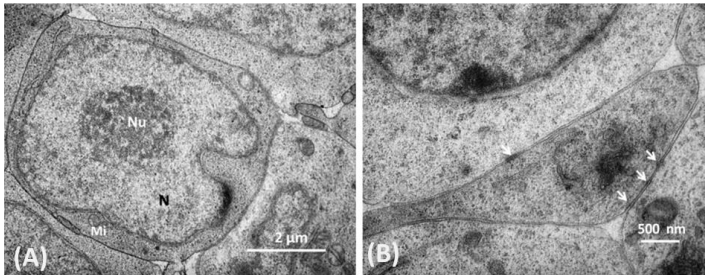
(A) Biểu mô thần kinh não giữa E11,5 (x2000). (B), (C) khoảng gian bào (→) rất hẹp, không thấy các cấu trúc gắn kết giữa các tế bào với nhau giống như ở biểu mô thông thường như vòng dính, dải bịt, thể liên kết (x4000).

Trong lớp nội tủy giai đoạn E10,5 – E11,5 có nhiều tế bào đang phân chia ở các pha khác nhau (Hình 3.5):



Hình 3.5. Tế bào lớp nội tủy đang phân chia (Phôi chuột cống trắng E10,5 (x1500))

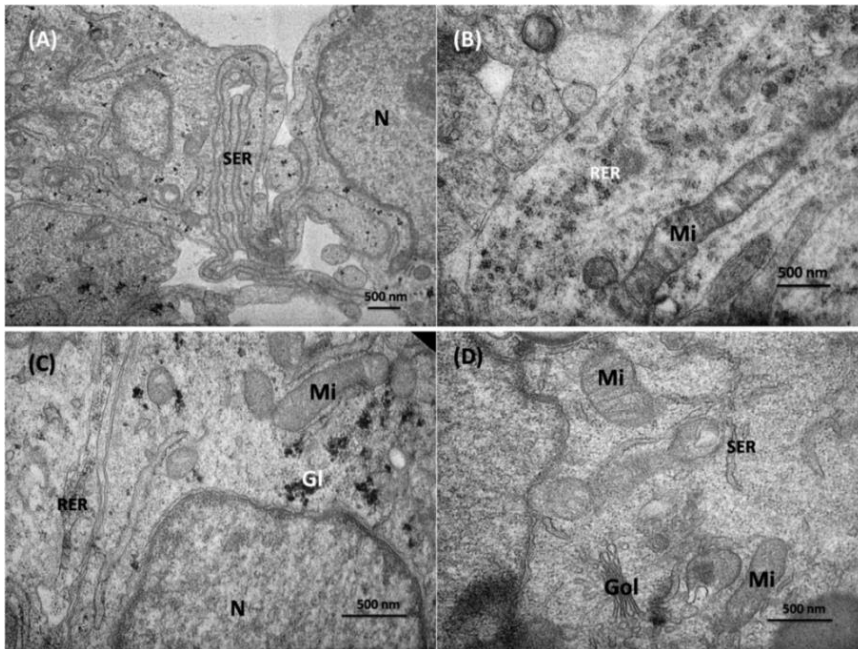
Ở phôi E11,5, xuất hiện các nguyên bào thần kinh với đặc điểm: nhân lớn với một hạt nhân, màng nhân có vết lõm sâu vào trong, bào tương tế bào có đậm độ điện tử ít với một vài ti thể nhỏ, lưới nội bào ngắn (Hình 3.6A). Cũng ở phôi E11,5, quan sát được hình ảnh neuron ở thành não giữa với các nhánh bào tương ngắn. Những nhánh bào tương này có đậm độ điện tử cao và liên kết chặt chẽ với các tế bào xung quanh bằng các thể liên kết (Hình 3.6B).



Hình 3.6. Cấu trúc siêu vi của nguyên bào thần kinh E11,5

A)-Nguyên bào thần kinh với nhân (N) lớn, nhạt màu, có 1 hạt nhân (Nu). Bào tương sáng màu với 1 vài ti thể nhỏ (x2500); (B)-Nhánh bào tương ngắn xuất phát từ thân tế bào thần kinh (E11.5), thể liên kết giữa các nhánh bào tương với tế bào xung quanh (mũi tên) (x6000)

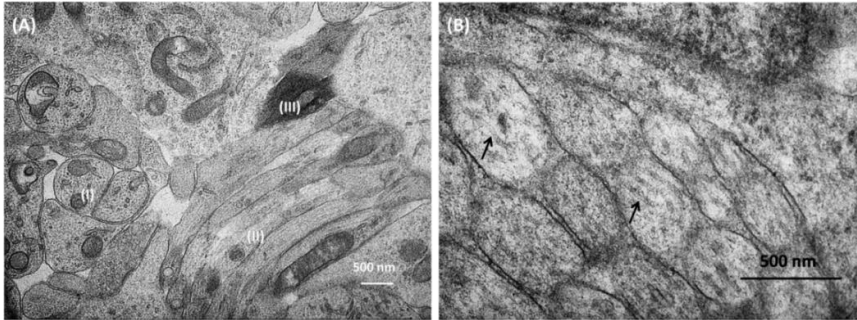
Ở giai đoạn E12,5 – E13,5, cấu trúc các tế bào não giữa thay đổi rõ ràng. Tỷ lệ nhân/bào tương giảm. Trong bào tương các bào quan phát triển: lưới nội bào không hạt kích thước lớn, lưới nội bào có hạt phát triển nhưng ngắn và chưa tạo thành các bề song song với nhau; ti thể và bộ Golgi có cấu trúc điển hình; những đám glycogen trong bào tương tăng lên về số lượng và kích thước (Hình 3.7):



Hình 3.7. Các tế bào đang trong quá trình biệt hóa của phôi E13,5

Các ti thể (Mi) đa dạng về hình dạng, kích thước. Lưới nội bào có hạt (RER), không hạt (SER) phát triển và nhiều đám glycogen (Gl). Bộ Golgi (Gol) có cấu trúc rất điển hình. (A) x4000; (B) x6000; (C), (D) x8000;

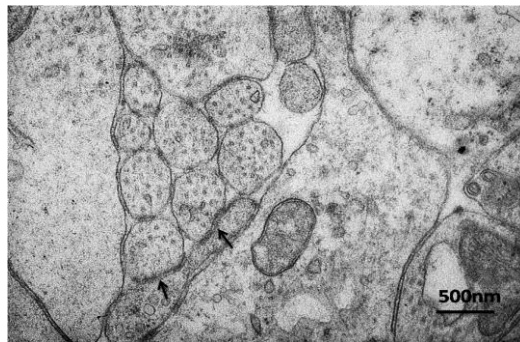
Đặc biệt ở giai đoạn này các nhánh bào tương của neuron dài và nhiều, đồng thời xuất hiện các nón tăng trưởng. Những nhánh bào tương có mật độ điện tử thấp đứng với nhau thành nhóm đồng thời quan sát rõ các xơ thần kinh và các ti thể bên trong (Hình 3.8, 3.9, 3.10)



Hình 3.8. Các nhánh bào tương của các **noron não giữa** phôi E12,5

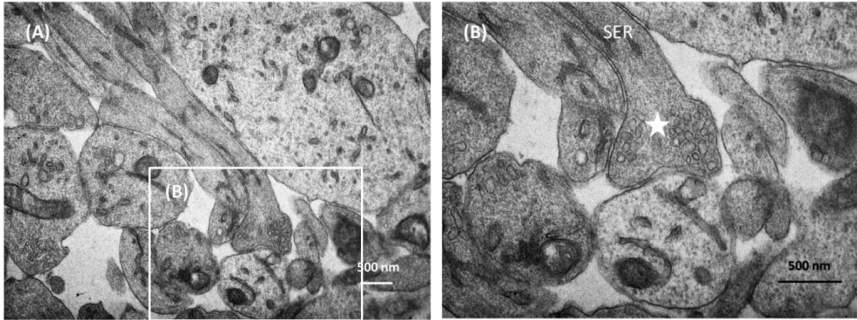
(A): (I) Các nhánh bào tương cắt ngang, (II) Các nhánh bào tương cắt dọc. Trong các nhánh bào tương này có thể quan sát thấy các ti thể dạng que. Bên cạnh đó có nhánh bào tương đậm độ điện tử rất cao (III); (B) Các xơ thần kinh trung gian (mũi tên) trong nhánh bào tương. (A) x4000; (B) x12000.

Commented [M12]: Các chú thích nhỏ, khó nhìn



Hình 3.9. Các nhánh bào tương tập trung thành nhóm ở phôi E12,5

Cấu trúc giống thể liên kết với nhánh bào tương của tế bào khác (mũi tên) (x6000).



Hình 3.10. Nón tăng trưởng ở phôi E12,5

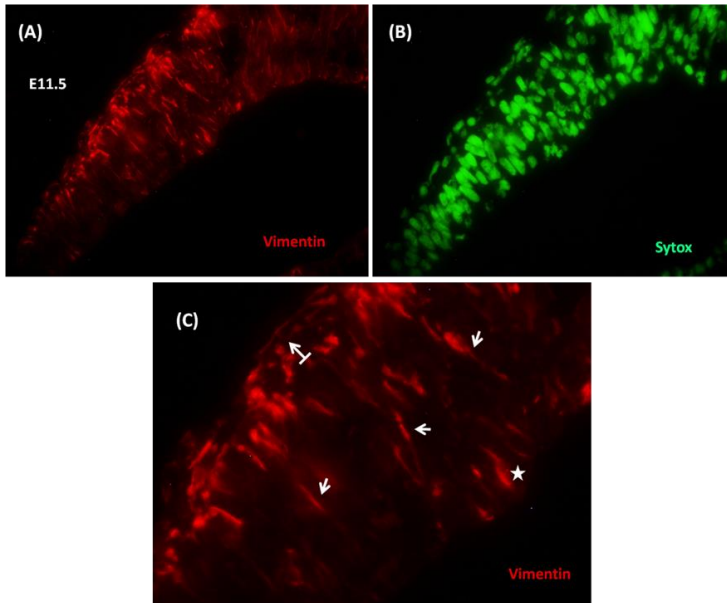
Nhánh bào tương kéo dài chứa xơ thần kinh với lưới nội bào nhẵn (SER), phần đầu phình to. (A) x4000; (B) x8000.

Tuy nhiên đến thời điểm E13,5 chúng tôi vẫn chưa quan sát thấy cấu trúc synap trong sàn não giữa.

c. Nhuộm hóa mô miễn dịch với marker Vimentin và TH

Để xác định sự hiện diện của tế bào tiền thân tiết dopamin ở não giữa phôi chuột cống trắng chúng tôi tiến hành nhuộm miễn dịch huỳnh quang với marker vimentin các mẫu não giữa phôi chuột giai đoạn E10,5 – E13,5.

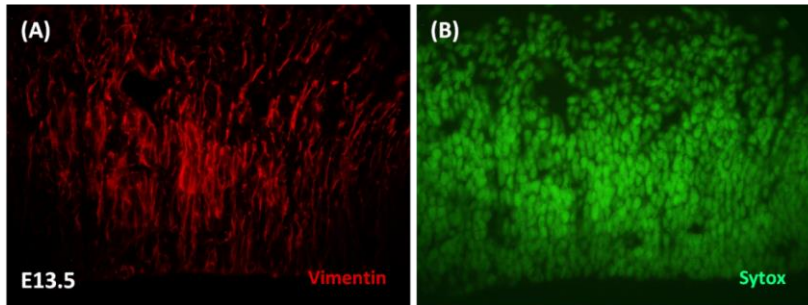
Tại thời điểm E10,5, vimentin biểu hiện rải rác trong mô não giữa phôi chuột cống trắng, hiếm thấy ở vùng sàn não giữa. Đến giai đoạn E11,5, vimentin xuất hiện trong những nhánh bào tương chạy dọc theo thành não giữa của các tế bào thần kinh xuyên tâm ở vùng sàn não giữa. Lớp màng rìa cũng dương tính với vimentin. Các tế bào này có hai cực, nhánh bào tương dương tính với vimentin chạy dọc suốt từ lớp nội tủy đến lớp màng rìa. Các tế bào lớp nội tủy cũng dương tính với vimentin (Hình 3.11):



Hình 3.11. Các tế bào tiền thân tiết dopamine tại thành não giữa phôi chuột cống trắng E11,5

(A) Phôi ngày 11,5 các nhánh bào tương chạy xuyên suốt thành não giữa dương tính với vimentin (màu đỏ) rải rác, nhân tế bào màu xanh (B); Hai hình ảnh A, B chụp 2 kênh màu của cùng cấu trúc. Các nhánh tế bào thần kinh xuyên tâm (→), lớp màn rìa (└→), các tế bào lớp nội tủy (hình sao) cũng dương tính với vimentin (C). (A),(B) x100; (C) x250.

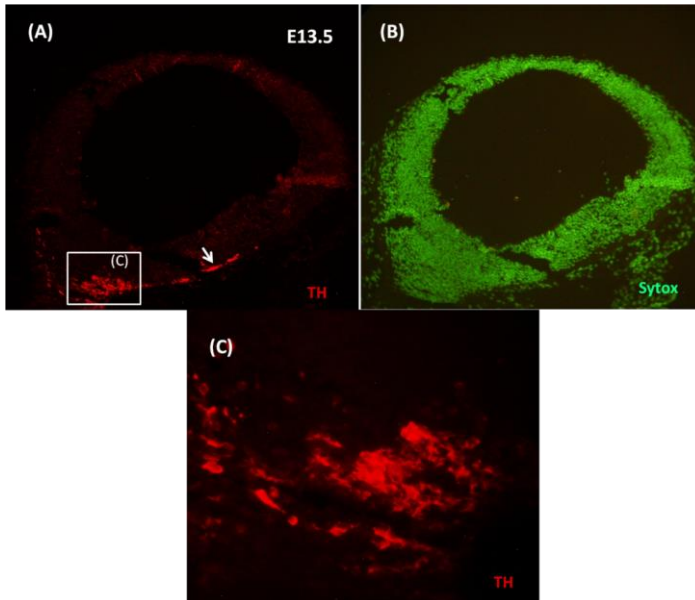
Đến giai đoạn E13,5, vimentin dương tính rất mạnh, những nhánh bào tương dương tính với vimentin xuất hiện dày đặc, đặc biệt vùng sàn não giữa (Hình 3.12):



Hình 3.12. Số lượng các tế bào tiền thân tiết dopamine tăng ở phôi E13,5
 (A) Các nhánh bào tương chứa xơ vimentin dày đặc chạy vuông góc với thành não giữa (màu đỏ). (B) Nhân tế bào bắt màu Sytox (màu xanh). Lớp nội tủy và màng rìa cũng dương tính với vimentin. (A), (B) là hai kênh trên màu cùng cấu trúc (x100).

Nhằm xác định thời điểm tế bào tiền thân biệt hóa thành noron tiết dopamin đồng thời xác định vị trí và sự di cư của các noron này tại não giữa phôi chuột cống trắng giai đoạn 10,5 - 13,5 ngày tuổi, chúng tôi tiến hành nhuộm hóa mô miễn dịch với marker TH. Đây là một enzym quan trọng trong quá trình tổng hợp dopamin và xuất hiện khi tế bào tiền thân biệt hóa thành các noron tiết dopamin. Sự xuất hiện của tế bào dương tính với TH tại não giữa chứng tỏ các tế bào tiền thân đã bắt đầu quá trình biệt hóa thành các noron tiết dopamin.

Trong giai đoạn phôi chuột cống trắng E10,5 - E12,5, chúng tôi không phát hiện được tế bào não giữa dương tính với marker TH. Tại thời điểm phôi giai đoạn E13,5 chúng tôi bắt đầu quan sát được sự xuất hiện của các tế bào dương tính với TH. Các tế bào này tập trung ở vùng sàn não giữa (Hình 3.13):



Hình 3.13. Các tế bào tiết dopamine tập trung ở vùng sần não giữa ở phôi chuột cống trắng E13,5

(A) Hình ảnh nhóm tế bào dương tính với TH tập trung ở vùng sần não giữa;
 (B): Nhân tế bào màu xanh; (A), (B) là hai màu trên cùng 1 cấu trúc (x60);
 (C) Các tế bào dương tính với TH có bào tương màu đỏ (x100)

3.1.1.2. Phân lập, nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc sần não giữa phôi chuột theo nhóm tuổi phôi

Giai đoạn này, chúng tôi tiến hành phân lập và nuôi cấy tổng cộng 148 phôi chuột ở các độ tuổi khác nhau từ E10,5 – E14,5 ngày tuổi. Sau quá trình phân lập và nuôi cấy thu được kết quả sau:

Commented [M13]: Thống nhất dấu thập phân

a. Phân bố phôi chuột theo tuổi phôi

Bảng 3.1. Phân bố phôi chuột theo độ tuổi

Tuổi phôi	E10,5	E11,5	E12,5	E13,5	E14,5	Tổng số (n)
Số mẫu	30	25	30	33	30	148
Tỷ lệ (%)	20,3	16,8	20,3	22,3	20,3	100

Bảng 3.1 cho thấy số lượng phôi chuột sử dụng lần lượt là 30 phôi E10,5; 25 phôi E11,5; 30 phôi E12,5; 33 phôi E13,5 và 30 phôi E14,5 chiếm tỷ lệ lần lượt là 20,3%; 16,8%; 20,3%; 22,3% và 20,3%.

b. Tỷ lệ trích thủ thành công não giữa theo tuổi phôi

148 phôi trên được tiến hành phẫu tích trích thủ vùng não giữa dưới kính hiển vi soi nổi. Trích thủ não giữa đúng vị trí, không bị dập nát, mất mẫu được đánh giá là trích thủ thành công. Kết quả thu được 121 mẫu thần kinh não giữa trên tổng số 148 phôi. Tỷ lệ trích thủ thành công là 81,7%. Hiệu quả phẫu tích mẫu não giữa theo nhóm tuổi phôi được thể hiện ở Bảng 3.2:

Bảng 3.2. Tỷ lệ trích thủ thành công mẫu mô não giữa qua các giai đoạn

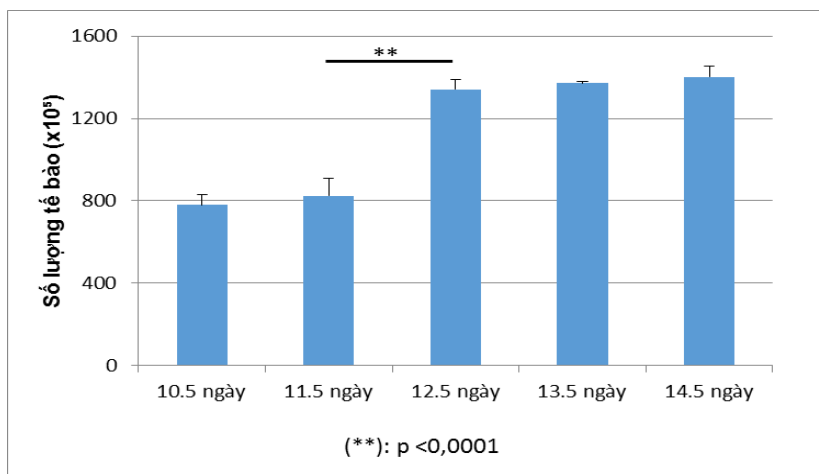
Tuổi phôi	E10,5	E11,5	E12,5	E13,5	E14,5	Tổng số (n)
Số phôi	30	25	30	33	30	148
Số phôi trích thủ thành công	19	18	27	30	27	121
Tỷ lệ (%)	63,3	72	90	90,9	90	81,7

Bảng 3.2 cho thấy tỷ lệ trích thủ thành công vùng não giữa theo các nhóm tuổi phôi E10,5; E11,5; E12,5; E13,5; E14,5 lần lượt là: 63,3%; 72%; 90%; 90,9% và 90%. Đối với phôi 10,5 ngày tuổi, tỷ lệ trích thủ thành công vùng não giữa là thấp nhất. Ở tuổi phôi cao hơn, tỷ lệ trích thủ thành công cũng cao hơn và cao nhất ở nhóm tuổi E12,5 – E14,5.

Commented [M14]: Bảng 1 cho thấy / nhận xét

c. Tổng số tế bào sống sau phân lập

Mẫu mô não giữa sau khi phân lập, được tiến hành ủ qua men Dispase và Trypsin –EDTA để tạo mẫu dịch treo tế bào. Để đánh giá hiệu quả phân lập tế bào gốc sần não giữa chúng tôi đếm tổng số tế bào trong mẫu dịch treo thu được. Số lượng tế bào trung bình theo tuổi phôi được thể hiện ở Biểu đồ 3.1 sau:



Biểu đồ 3.1. Tổng số tế bào sau phân lập

Tổng số tế bào sau phân lập thấp nhất ở tuổi phôi 10,5 ngày (khoảng $0,78 \pm 0,05 \times 10^5$ TB) và cao nhất ở tuổi phôi 14,5 ngày (khoảng $1,4 \pm 0,51 \times 10^5$ TB). Có sự khác biệt về số lượng tế bào giữa tuổi phôi 11,5 và 12,5 ngày (khoảng $0,82 \pm 0,085 \times 10^5$ TB so với $1,34 \pm 0,048 \times 10^5$ TB).

d. Tỷ lệ mọc mẫu nuôi cấy theo tuổi phôi

Sau khi phân lập tạo mẫu dịch treo, tế bào gốc ngoại bì thần kinh được nuôi cấy trong môi trường M-NECS để đánh giá hiệu quả tăng sinh của các mẫu. Kết quả tăng sinh tế bào được thể hiện ở Bảng 3.3:

Bảng 3.3. Tỷ lệ mọc mầm theo tuổi phôi

Tuổi phôi	E10,5	E11,5	E12,5	E13,5	E14,5
Số mẫu	19	18	27	30	27
Số mẫu mọc	2	16	27	30	27
Tỷ lệ	10,5%	88,9%	100%	100%	100%

Bảng 3.3 cho thấy tỷ lệ mọc rất thấp (10,5%) ở phôi chuột E10,5 trong khi phôi ở giai đoạn E11,5 có tỷ lệ mọc cao hơn (88,9%). Phôi E12,5 – E14,5 có tỷ lệ mọc mầm tốt nhất 100%.

3.1.2. Tăng sinh và biệt hóa tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi chuột E12,5 – E13,5

Sau giai đoạn lựa chọn tuổi phôi phù hợp để nuôi cấy noron tiết dopamin, nhận thấy tuổi phôi phù hợp nhất cho nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc sần não giữa là giai đoạn phôi 12,5 – 13,5 ngày tuổi. Chúng tôi đã tiến hành thực nghiệm trên 442 mẫu mô não giữa được trích thủ từ phôi chuột cống trắng giai đoạn E12,5 – 13,5. Trong đó, 370 mẫu được tiến hành nuôi cấy tăng sinh tạo noron tiết dopamin, còn lại 72 mẫu được phân lập thành dịch treo tế bào để bảo quản lạnh. Kết quả thu được 415 giếng tế bào sau nuôi cấy. Trong đó 138 mẫu được làm tiêu bản nhuộm HE, Giemsa và Cajal II; 159 mẫu được nhuộm Hóa mô miễn dịch với marker TH và Vimentin; 40 mẫu được làm tiêu bản Hiển vi điện tử quét (SEM) và Hiển vi điện tử xuyên (TEM).

3.1.2.1. Sự phát triển của các mẫu nuôi cấy theo thời gian

Về sự phát triển của các mẫu trong quá trình nuôi cấy

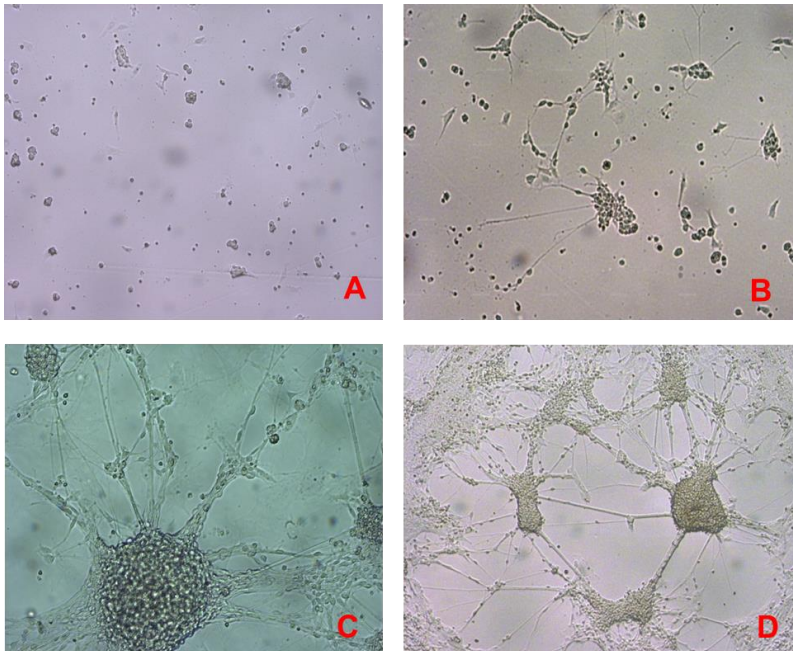
Hai ngày sau nuôi cấy: đa số các tế bào đã bám dính, bắt đầu quan sát thấy hình ảnh giống noron: tế bào hình sao, có vài nhánh bào tương ngắn tỏa ra từ thân, tận cùng có các đầu phình. Một số tế bào có những nhánh dài đến tiếp xúc với những tế bào gần kề (Hình 3.14A).

Commented [M15]: Thống nhất dấu thập phân

Commented [M16]:

- Tăng sinh??
- Biệt hoá???

Những ngày tiếp theo: các tế bào tăng sinh nhanh, có nhiều tế bào dạng biểu mô tạo thành đám, rải rác có những tế bào hình sao nằm phân tán, nhiều tế bào có những nhánh dài giống nơron đứng phân tán hoặc tạo thành cụm dạng nơron, các nhánh tế bào dài và nối với nhau chằng chịt (Hình 3.14B, C, D). Các tế bào trong các cụm dạng nơron có xu hướng phát triển lan ra vùng xung quanh đồng thời tỏa ra nhiều nhánh bào tương liên hệ với những cụm gần kề (Hình 3.14C, D):



Hình 3.14. Tế bào gốc não giữa nuôi cấy

A- Tế bào gốc não giữa sau nuôi cấy 2 ngày (KHV soi ngược x100)

B- Tế bào gốc não giữa sau nuôi cấy 4 ngày (KHV soi ngược x100)

C- Tế bào gốc não giữa sau nuôi cấy 6 ngày (KHV soi ngược x200)

D- Tế bào gốc não giữa sau nuôi cấy 8 ngày (KHV soi ngược x100)

Commented [D17]: Xem lại độ phóng đại

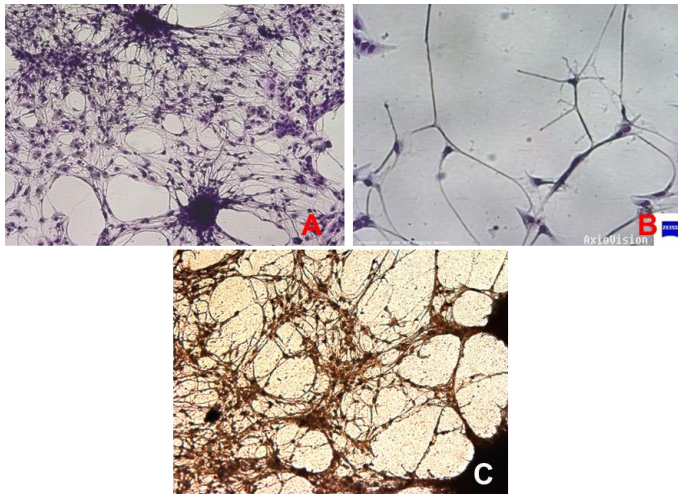
Về thời gian nuôi cấy:

Thời gian trung bình để các mẫu nuôi cấy mọc kín đáy lồng dao động khoảng $7,4 \pm 2,3$ ngày. Thời gian nuôi cấy và tốc độ phát triển của tế bào khá đồng đều trong các mẫu.

3.1.2.2. Kết quả định danh tế bào sau nuôi cấy

a. Hình thái vi thể

Ngoài việc quan sát hình thái và sự phát triển của tế bào bằng kính hiển vi soi ngược, chúng tôi sử dụng phương pháp nhuộm Giemsa và nhuộm Cajal II để đánh giá hình thái vi thể của tế bào nuôi cấy. Trên tiêu bản nhuộm Giemsa, quan sát được các tế bào hình sao, có nhiều nhánh bào tương mảnh, dài. Các tế bào có thể xếp thành lớp mỏng hoặc đứng thành cụm. Các nhánh bào tương nối với nhau thành mạng lưới (Hình 3.15A, B). Trên tiêu bản nhuộm Cajal II, các tế bào nuôi cấy đều bắt màu nâu đen (Hình 3.15C):



Hình 3.15. Hình thái vi thể của tế bào gốc não giữa sau nuôi cấy

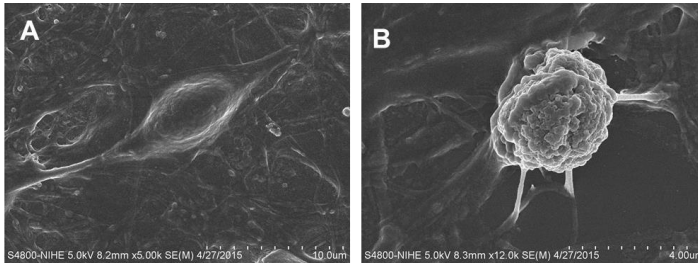
A- Tế bào gốc não giữa sau nuôi cấy 8 ngày (Giemsa x100)

B- Tế bào gốc não giữa sau nuôi cấy 4 ngày (Giemsa x200)

C- Tế bào gốc não giữa sau 7 ngày nuôi cấy (Cajal II x100)

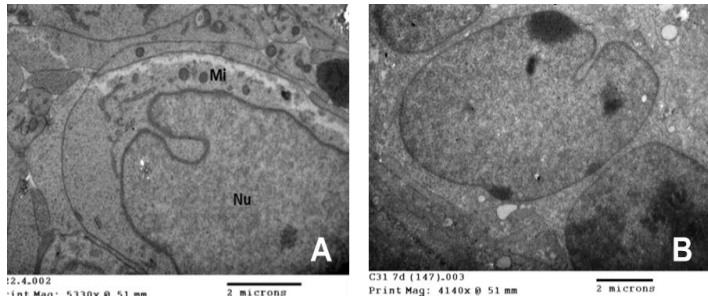
b. Hình thái siêu vi thể

Sử dụng kính hiển vi điện tử quét quan sát bề mặt tế bào nuôi cấy, nhận thấy hình ảnh các neuron với thân lớn, hình cầu hoặc hình thoi, các nhánh bào tương dài tiếp nối với các nhánh bào tương của tế bào kề bên (Hình 3.16):



Hình 3.16. Tế bào gốc não giữa sau nuôi cấy 6 ngày (SEM)

Khi quan sát bằng kính hiển vi điện tử truyền qua, trong số các tế bào nuôi cấy 7 ngày, xuất hiện những tế bào nhân lớn, mang đặc trưng của nguyên bào thần kinh như: chứa một hạt nhân duy nhất, màng nhân có vết lõm sâu vào trong chất nhân, bào tương tế bào nhạt màu có ít ti thể và lưới nội bào. Những hình ảnh này gợi ý đến những nguyên bào thần kinh ở biểu mô thần kinh sàn não giữa phôi (Hình 3.17):



Hình 3.17. Tế bào gốc não giữa (TEM)

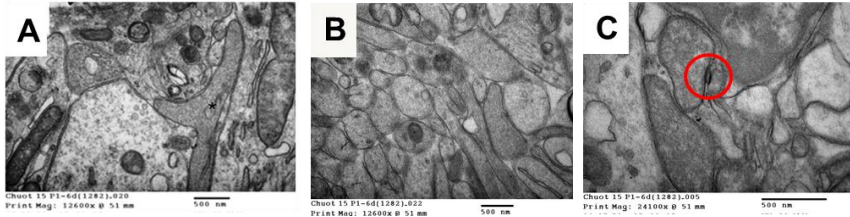
A- Nguyên bào thần kinh sàn não giữa phôi chuột 12,5 ngày (TEM x 5330)

B- Nguyên bào thần kinh sau nuôi cấy 7 ngày (TEM x 4140)

Trên các lát cắt qua lớp tế bào nuôi cấy, chúng tôi thấy có nhiều hình ảnh của các nhánh bào tương cắt ngang xung quanh tế bào (Hình 3.18A). Có những tận cùng của nhánh bào tương phình to thành các nón tăng trưởng

Commented [D18]: Nếu rõ những indentationn này là hình thái đặc trưng của nguyên bào thần kinh

(Hình 3.18B) và cũng có các **sy-náp** được hình thành giữa các nhánh bào tương (Hình 3.18C):

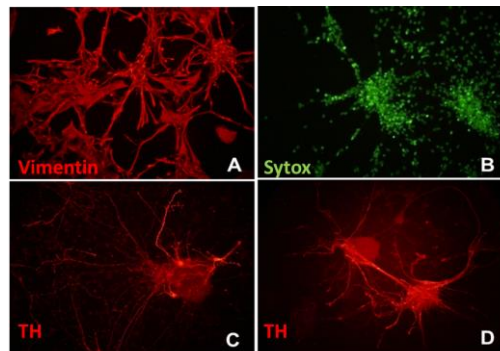


Hình 3.18. Tế bào gốc phôi chuột cống trắng sau nuôi cấy 6 ngày

(A) Nón tăng trưởng (TEM x 12600); (B) Các nhánh bào tương cắt ngang (TEM x 12600); (C) Synap (vòng tròn đỏ) (TEM x 24100).

c. Nhuộm hóa mô miễn dịch với marker **vimentin** và **TH**. Vòng tròn đỏ là hình ảnh **sy-náp thần kinh**

Khi nhuộm hóa mô miễn dịch với marker vimentin, chúng tôi quan sát được hình ảnh hầu hết các tế bào dương tính với marker vimentin ở các mẫu nuôi cấy (Hình 3.19A), nhân tế bào bắt màu xanh Sytox (Hình 3.19B). Các tế bào dương tính ít hơn với marker TH để đánh dấu neuron tiết dopamin. Các neuron tiết dopamin này có thể đứng riêng rẽ hoặc thành cụm (Hình 3.19C, D):



Hình 3.19. Nhuộm HMMD với marker Vimentin và TH tế bào gốc não giữa phôi chuột cống trắng sau nuôi cấy (KHV huỳnh quang x200)

(A, B) là 2 pha màu khác nhau cùng 1 vị trí; A: Tế bào dương tính với marker Vimentin (đỏ); B: Nhân tế bào dương tính với Sytox (xanh). (C, D) Tế bào dương tính với marker TH.

Commented [M19]: ???

Commented [M20]: Chú thích vòng tròn đỏ?

3.1.2.3. Tỷ lệ tế bào, cụm tế bào dương tính với marker TH sau nuôi cấy

Tiến hành đếm các neuron và cụm neuron dương tính với marker TH bằng kính hiển vi huỳnh quang nhận thấy tỷ lệ neuron và cụm neuron có sự hiện diện của enzym Tyrosine Hydroxylase như sau:

Bảng 3.4. Tỷ lệ tế bào, cụm tế bào dương tính với marker TH sau nuôi cấy

Tuổi phôi	Tỷ lệ TB có TH (+)	Tỷ lệ cụm TB có TH (+)
	X ± SD (%)	X ± SD (%)
E10,5 - E11,5	1,18 ± 0,48	13,27 ± 7,40
E12,5 - E13,5	5,38 ± 3,56	37,09 ± 6,53
p	0,01 < 0,05	0,001 < 0,05

- Ở phôi giai đoạn E10,5 – E11,5 chúng tôi nhận thấy tỷ lệ tế bào dương tính với marker TH rất thấp, chỉ 1,18% trong khi ở tuổi phôi giai đoạn E12,5 – E13,5, tỷ lệ tế bào dương tính với TH cao hơn, khoảng 5,38%.

- So sánh tỷ lệ các cụm tế bào có neuron dương tính với marker TH, chúng tôi cũng nhận thấy tỷ lệ này cao hơn có ý nghĩa ở nhóm tuổi phôi E12,5 – E13,5 so với tuổi phôi E10,5 – E11,5 (37,09% so với 13,27%).

3.1.3. Bảo quản lạnh tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi

a. Lựa chọn quần thể tế bào phù hợp nhất cho bảo quản lạnh

Tiến hành bảo quản lạnh 150 mẫu và chia làm 3 nhóm. Nhóm A gồm 72 mẫu được bảo quản ngay sau khi phân lập; nhóm B gồm 68 mẫu được bảo quản sau khi nuôi cấy ở giai đoạn chưa cấy chuyển và nhóm C gồm 10 mẫu được bảo quản ở giai đoạn cấy chuyển lần 1. Sau rã đông thu được một số kết quả sau:

Commented [M21]: Vấn đề là

- KQ nuôi cấy tăng sinh: thời gian, đặc điểm, môi trường...
- KQ nuôi cấy biệt hoá: thời gian, đặc điểm, qui trình, môi trường
- Định danh tính gốc sau tăng sinh
- Định danh TB đã biệt hoá; mức độ biệt hoá?

Bảng 3.5. Tỷ lệ sống của các tế bào thân kinh sau rã đông

Nhóm	Số mẫu (n= 150)	Tỷ lệ sống (%)	p
Sau phân lập (A)	72	66,6 ± 11,6	$p_{(A-B)} = 0,1 > 0,05$
Chưa cấy chuyển – P0 (B)	68	69,8 ± 11,4	$p_{(A-C)} = 0,000 < 0,001$
Sau cấy chuyển lần 1 – P1 (C)	10	19,9 ± 8,2	$p_{(B-C)} = 0,000 < 0,001$
Tỷ lệ sống trung bình (%)	64,9		

Commented [M22]: Không nên viết thế này

- Tỷ lệ sống sau bảo quản lạnh của nhóm A và nhóm B khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

- Tỷ lệ sống sau bảo quản lạnh của nhóm C thấp hơn có ý nghĩa thống kê với 2 nhóm còn lại với $p < 0,001$.

- Tỷ lệ sống trung bình của các mẫu là 64,9%.

b. Tỷ lệ sống của tế bào theo thời gian bảo quản

So sánh tỷ lệ sống của tế bào trong 140 mẫu bảo quản lạnh ở nhóm A và nhóm B theo thời gian thu được kết quả sau:

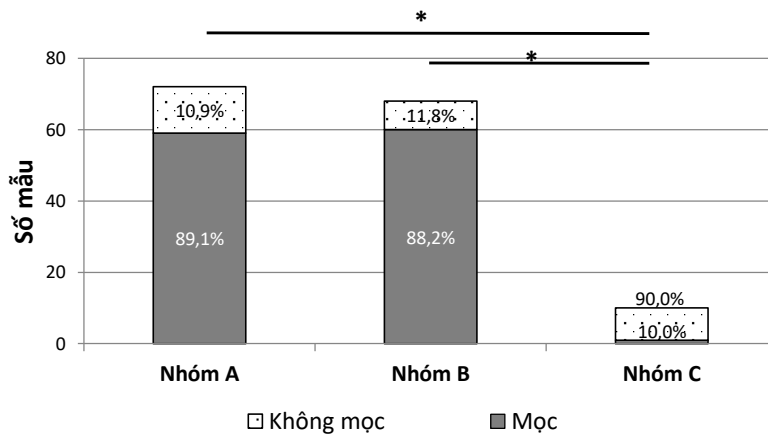
Bảng 3.6. Đánh giá tỷ lệ sống của tế bào theo thời gian

Nhóm	Số mẫu (n)	Tỷ lệ sống (%)	p
Sau bảo quản 2 tuần	35	65,54 ± 10,63	
Sau bảo quản 1 tháng	35	71,69 ± 11,20	P=0,162
Sau bảo quản 3 tháng	35	67,51 ± 11,84	>0,05
Sau bảo quản 6 tháng	35	67,91 ± 12,28	
Tổng	140	68,16 ± 11,60	

Tỷ lệ sống của tế bào sau bảo quản 2 tuần, 1 tháng, 3 tháng và 6 tháng lần lượt là 65,54%; 71,69%; 67,51%; 67,91%. Tuy có khác nhau nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

c. Nuôi cấy tăng sinh các tế bào sau bảo quản lạnh

Các mẫu tế bào sau rã đông được nuôi cấy tăng sinh, kết quả mọc mẫu thể hiện ở biểu đồ 3.2:



(*) : $p < 0,001$

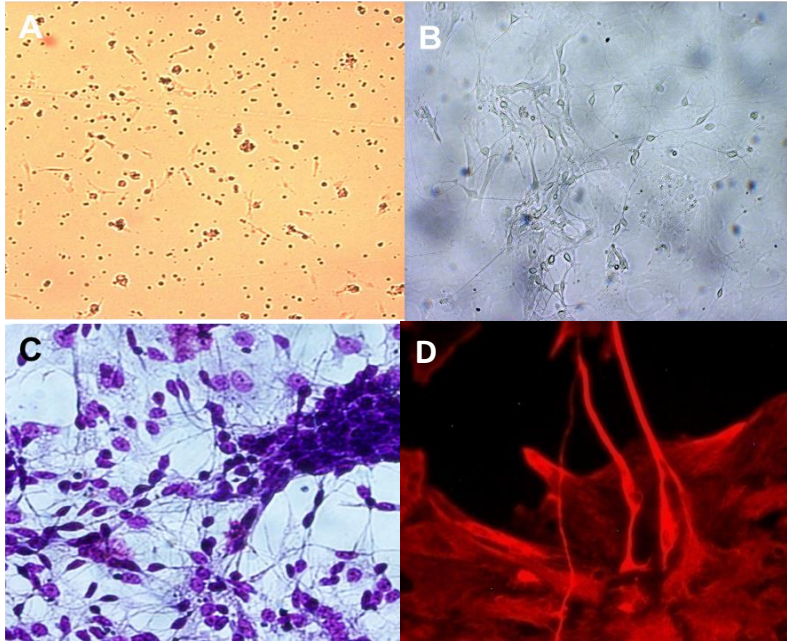
Biểu đồ 3.2. Tỷ lệ mọc mẫu nuôi cấy sau rã đông

Tỷ lệ mọc mẫu của nhóm A và nhóm B là tương đương nhau với $p > 0,05$.

Tỷ lệ mọc mẫu trong nhóm C thấp hơn có ý nghĩa thống kê với 2 nhóm còn lại với $p < 0,001$.

d. Định danh các tế bào nuôi cấy sau bảo quản lạnh

Theo dõi sự phát triển của các tế bào được nuôi cấy sau rã đông, quan sát được hình ảnh các tế bào bắt đầu bám đáy nuôi cấy vào ngày thứ 2. Các tế bào nhỏ, một số bắt đầu xuất hiện nhánh bào tương (Hình 3.20A). Trong những ngày tiếp theo, các tế bào tiếp tục tăng sinh, dần dần kín giếng nuôi cấy. Một số tế bào có xu hướng tạo cụm neuron (Hình 3.20B). Nhuộm Giemsa các mẫu để đánh giá hình thái tế bào, cũng quan sát được hình ảnh nhiều tế bào hình đa diện, có nhiều nhánh bào tương nối với nhau thành mạng lưới. Những tế bào này dương tính với marker vimentin khi nhuộm hóa mô miễn dịch (Hình 3.20C, D):



Hình 3.20. Hình ảnh tế bào nuôi cấy sau rã đông

(A) Ngày 2 sau nuôi cấy (KHV soi ngược x100);

(B) Ngày 7 sau nuôi cấy (KHV soi ngược x200);

(C) Ngày 7 sau nuôi cấy (Giemsa x400);

(D) Nhuộm marker Vimentin (màu đỏ) (KHV huỳnh quang x500).

3.2. Phân lập và nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi người

3.2.1. Phân lập tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi người

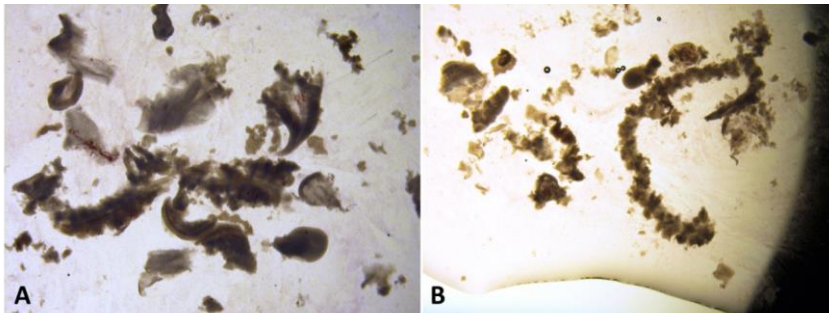
a. Sự phân bố tuổi phôi

Trong thời gian từ tháng 10/2014 đến 6/2017, chúng tôi thu được 201 phôi giảm thiểu từ các thai phụ làm thụ tinh ống nghiệm và thụ tinh nhân tạo bị đa thai (≥ 3 thai). Sự phân bố tuổi phôi và khả năng phẫu tích, phân lập của các phôi được tổng hợp trong bảng 3.7:

Bảng 3.7. Sự phân bố tuổi phôi, khả năng phẫu tích, phân lập của các phôi

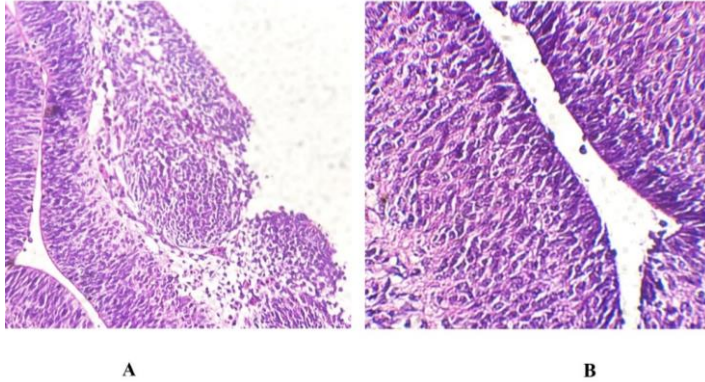
<i>Tuổi phôi</i>	<i>Số lượng</i>	<i>Phẫu tích</i>	<i>Phân lập</i>
6 tuần	6	0	0
6,5 tuần	36	28	18
7 tuần	95	79	65
7,5 tuần	28	28	19
8 tuần	36	36	0
Tổng	201	173	102

Trong số 201 phôi, chúng tôi đã phẫu tích được 173 phôi, số còn lại phôi quá nát nên không phẫu tích được. Đã phân lập được tế bào biểu mô ống thần kinh của 102 phôi. Các phôi sau khi hút ra thường có dạng mảnh nhỏ (Hình 3.21):

**Hình 3.21. Phôi người (A) 7 tuần (x50); (B) 8 tuần (x40)**

b. Cấu trúc của biểu mô ống thần kinh phôi người 6,5 – 7,5 tuần tuổi

Sau khi phẫu tích được các mảnh mô ống thần kinh, chúng tôi sử dụng một số mảnh để nghiên cứu cấu trúc vi thể của biểu mô thành ống thần kinh. Trên các tiêu bản nhuộm Hematoxylin – Eosin, thành ống thần kinh là biểu mô tầng, lớp nội tủy quan sát thấy nhiều tế bào trong quá trình phân chia, lớp áo gồm nhiều hàng tế bào, các tế bào cũng có xu hướng chạy vuông góc với thành não giữa (Hình 3.22):



Hình 3.22. Cấu trúc thành ống thần kinh phôi người 7 tuần

(A: H&E x200; B: H&E x400)

c. Tổng số tế bào sau phân lập và tỷ lệ sống

Kết quả phân lập tế bào gốc thần kinh từ phôi người được thể hiện ở Bảng 3.6:

Bảng 3.8. Tổng số tế bào sau phân lập và tỷ lệ tế bào sống

Tuổi phôi	Số lượng	Tổng số tế bào phân lập của 1 phôi	Tỷ lệ tế bào sống (%)	P
6 tuần	0	0	0	
6,5 tuần	18	0,96 ± 0,14 x 10⁵	86,1 ± 3,7	
7 tuần	65	1,02 ± 0,17 x 10⁵	84,7 ± 4,0	P=0,404
7,5 tuần	19	1,08 ± 0,20 x 10⁵	85,6 ± 5,0	> 0,05
Tổng cộng	102			

Trong số 102 phôi phân lập được mẫu tế bào biểu mô ống thần kinh, trung bình, 1 phôi 6,5 tuần tuổi có số lượng tế bào thu được khoảng $0,96 \times 10^5$ tế bào; phôi 7 tuần khoảng $1,02 \times 10^5$ tế bào; phôi 7,5 tuần tuổi khoảng $1,08 \times 10^5$ tế bào. Tỷ lệ sống của các tế bào sau phân lập dao động từ 84,7% - 86,1%. Không có sự khác biệt về số lượng tế bào thu được và tỷ lệ sống của tế bào ở các phôi phân lập được.

3.2.2. Nuôi cấy tăng sinh và biệt hóa tế bào gốc biểu mô ống thần kinh phôi người tạo noron tiết dopamin

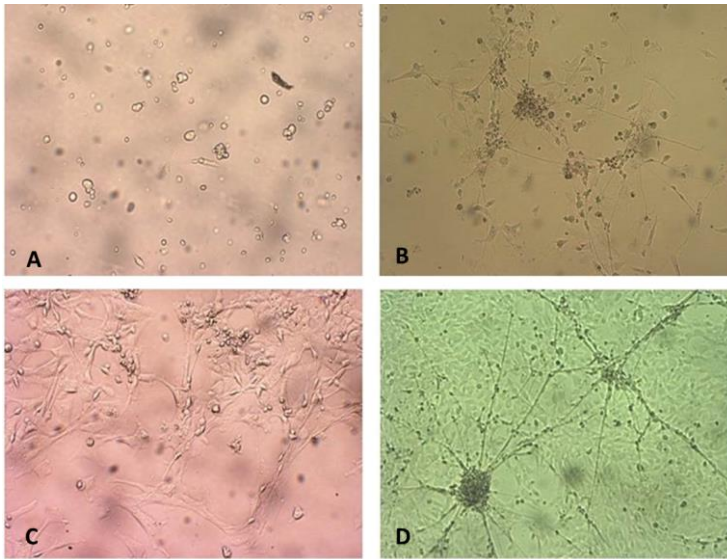
Commented [M23]: Tăng sinh? Biệt hoá?

Các mẫu tế bào biểu mô ống thần kinh sau khi được phân lập sẽ tiếp tục được tiến hành tạo mẫu dịch treo tế bào và nuôi trong các đĩa cấy. Trong quá trình nuôi cấy, chúng tôi thu được một số kết quả sau:

3.2.2.1. Hình thái và tốc độ phát triển của tế bào gốc nuôi cấy

Sau 2-3 ngày, quan sát dưới kính hiển vi soi nổi thấy các tế bào bắt đầu bám dính vào đáy bình nuôi cấy. Sau đó một số tế bào biệt hóa thành dạng noron: xuất hiện những nhánh dài tỏa ra xung quanh. Số lượng các tế bào dạng noron tăng dần theo thời gian, các nhánh của những tế bào này dài dần ra và đến tiếp xúc với nhau.

Sau khoảng 7 – 10 ngày, các tế bào tăng sinh và phủ kín đáy giếng nuôi cấy (Hình 3.23):



Hình 3.23. Tế bào gốc thần kinh người nuôi cấy (KHV soi ngược)

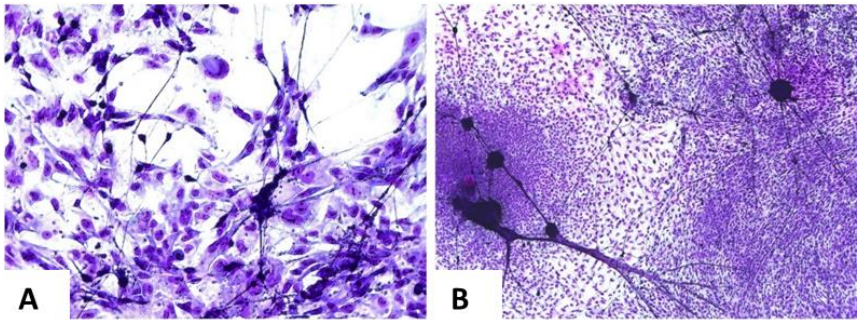
A: 2 ngày sau cấy (x100); B: 3 ngày sau cấy (x100)

C: 4 ngày sau cấy (x250), D: 9 ngày sau cấy (x100)

3.2.2.2. Định danh tế bào sau nuôi cấy

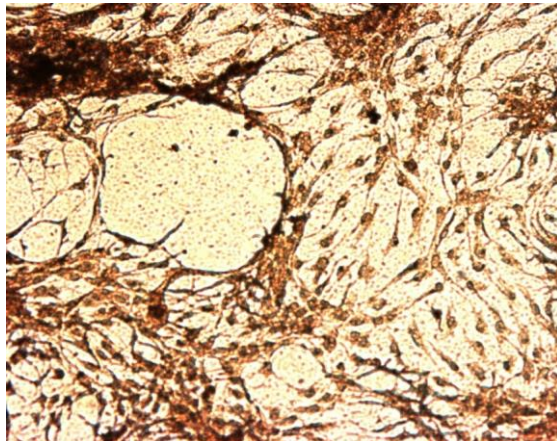
a. Vi thể

Trên tiêu bản nhuộm Giemsa, quan sát được các tế bào hình sao, có nhiều nhánh bào tương mảnh, dài. Các tế bào có thể xếp thành lớp mỏng hoặc đứng thành cụm. Các nhánh bào tương nối với nhau thành mạng lưới (Hình 3.24). Bằng phương pháp nhuộm Cajal II, toàn bộ các tế bào trong mẫu sau nuôi cấy đều bắt màu nâu (Hình 3.25):



Hình 3.24. Tế bào gốc thần kinh người nuôi cấy

A: 6 ngày sau cấy (Giemsa x250); B: 9 ngày sau cấy (Giemsa x50)

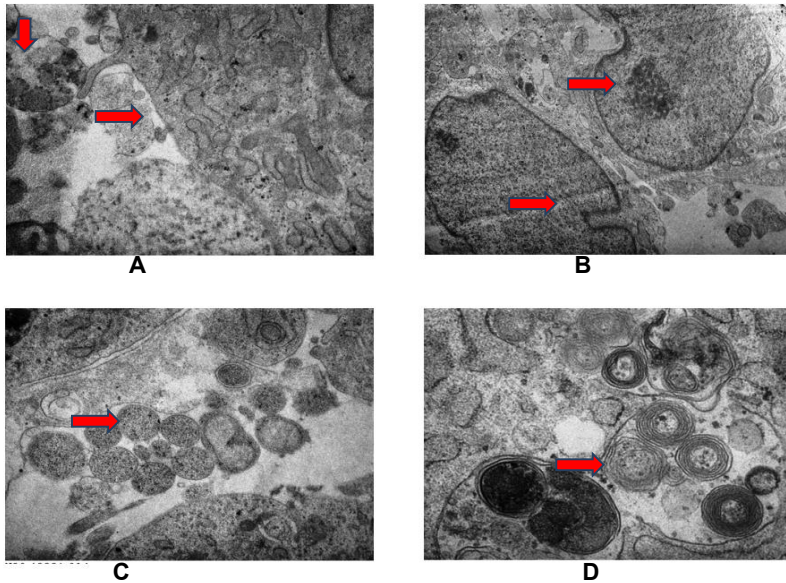


Hình 3.25. Tế bào mô thần kinh nuôi cấy 8 ngày (Cajal II x250)

Commented [M24]: Phóng đại bằng 3.23 A

b. Siêu vi thể

Ở mức độ siêu vi, quan sát thấy một số nguyên bào thần kinh với đặc điểm: tế bào có nhân lớn, màng nhân có vết lõm vào chất nhân điển hình, nhân có một hạt nhân lớn, tỷ lệ nhân/bào tương cao (Hình 3.26B). Một số tế bào khác đang ở trạng thái hoạt động mạnh với hình ảnh lưới nội bào giãn rộng, có nhánh bào tương ngắn (Hình 3.26A). Chúng tôi cũng bắt gặp hình ảnh cắt ngang qua các trụ trục của noron được bọc phía ngoài bởi tế bào ít nhánh, cấu trúc này tương lai sẽ tạo thành các sợi thần kinh có myelin (Hình 3.26C, D). Ở các mẫu tế bào phôi người sau nuôi cấy, chúng tôi chưa quan sát được hình ảnh synap giữa các noron.



Hình 3.26. Tế bào gốc thần kinh người 10 ngày sau nuôi cấy (TEM)

A: Lưới nội bào có hạt trong bào tương (Mũi tên đỏ)

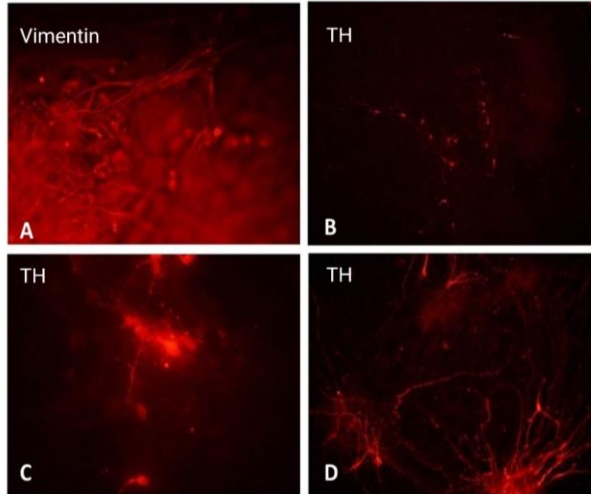
B: Vết lõm trên nhân (Mũi tên đỏ)

C,D: Các sợi thần kinh có myelin đang hình thành (Mũi tên đỏ)

c. Nhuộm hóa mô miễn dịch

Nhuộm kháng thể vimentin: chúng tôi quan sát thấy xơ vimentin ở hầu hết các tế bào nuôi cấy. Mức độ dương tính với marker vimentin ở các tế bào nuôi cấy không khác biệt giữa các tuần tuổi phôi (Hình 3.27A).

Nhuộm kháng thể TH: tất cả các mẫu nuôi cấy đều thấy xuất hiện các tế bào dương tính với marker TH. Các tế bào này được xác định là những tế bào tiết dopamin. Tiến hành đếm số lượng tế bào dương tính với TH trong giếng nuôi cấy ở các giai đoạn nuôi cấy khác nhau chúng tôi nhận thấy: ở cả ba độ tuổi phôi, số lượng neuron dương tính với TH tăng dần theo thời gian. Năm ngày sau nuôi cấy đã thấy xuất hiện các tế bào dương tính với TH. Tuy nhiên, số lượng tế bào dương tính với TH trong các giếng cấy ở thời điểm này còn ít, nằm thưa thớt, rải rác khắp giếng cấy và ở rìa những cụm tế bào “dạng neuron”. Số lượng tế bào dương tính với TH tăng dần sau 7 ngày và 10 ngày nuôi cấy (Hình 3.27 B, C, D):



Hình 3.27. Tế bào gốc thần kinh người nuôi cấy nhuộm với Vimentin và TH

A: 12 ngày sau cấy (Vimentinx200); B: 5 ngày sau cấy (THx200)

C: 8 ngày sau cấy (THx400), D: 12 ngày sau cấy (THx200)

3.2.2.3. Số lượng tế bào nuôi cấy dương tính với marker TH

Chúng tôi tiếp tục đánh giá số lượng neuron dương tính với TH trong các mẫu nuôi cấy theo tuổi phôi và theo thời gian nuôi cấy. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.9:

Bảng 3.9. Sự phân bố số tế bào dương tính với TH trong giếng nuôi cấy theo tuổi phôi

Tuổi phôi	Sau 5 ngày nuôi cấy		Sau 7 ngày nuôi cấy		Sau 10 ngày nuôi cấy	
	Số mẫu (n)	Số tế bào TH(+)	Số mẫu	Số tế bào TH(+)	Số mẫu	Số tế bào TH(+)
6,5 tuần	18	15,9 ± 4,8	18	40,7 ± 17,9	18	107,6 ± 10,04
7 tuần	65	18,4 ± 5,7	65	44,7 ± 15,9	65	114,7 ± 16,4
7,5 tuần	19	17,4 ± 5,6	19	38,2 ± 15,5	19	111,8 ± 14,4
Tổng cộng	102	P=0,243	102	P=0,266	102	P=0,096

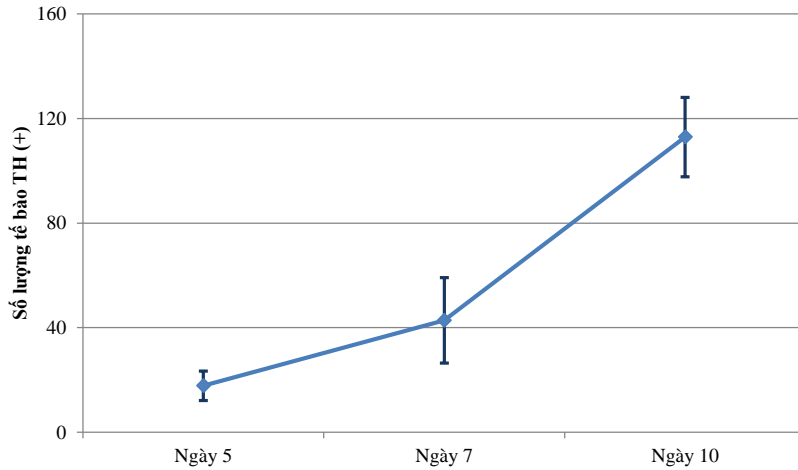
Theo thời gian nuôi cấy: số lượng tế bào dương tính với TH tăng từ 5 ngày, 7 ngày và lớn nhất là 10 ngày sau nuôi cấy.

Theo tuổi phôi: số lượng tế bào dương tính với TH không có sự khác biệt giữa các mẫu nuôi cấy ở các tuổi phôi khác nhau từ 6,5 – 7,5 tuần.

Sự gia tăng số lượng tế bào dương tính với marker TH trong quá trình nuôi cấy được thể hiện rõ hơn trên biểu đồ dưới đây:

Commented [M25]:

- Cần so sánh sự tăng sinh tại các thời điểm theo dõi (5, 7, 10 ngày...) có khác biệt không.
- Nhóm tuổi phôi nào tăng sinh tốt nhất



Biểu đồ 3.3. Sự gia tăng số lượng tế bào dương tính với TH theo ngày nuôi cấy

Các tế bào dương tính với marker TH có xu hướng tăng dần sau 5; 7 và 10 ngày nuôi cấy. Số lượng tế bào TH (+) ngày càng tăng lên từ trung bình khoảng $17,8 \pm 5,6$ tế bào ngày 5 lên $42,8 \pm 16,3$ tế bào dương tính TH ngày 7. Và vào khoảng ngày 10 sau nuôi cấy với trung bình $112,9 \pm 15,3$ tế bào TH(+).

Commented [M26]: Phân tích sự tăng sinh và sự biệt hoá. Đặc điểm, ý nghĩa...

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. Phân lập và nuôi cấy tăng sinh và biệt hóa tế bào gốc ngoại bì thần kinh não giữa phôi chuột

4.1.1. Xác định vị trí phôi tích tế bào gốc ngoại bì thần kinh

Các tế bào đầu dòng tiết dopamin bắt đầu quá trình biệt hóa và có mặt ở não giữa phôi chuột khoảng 10,5 ngày. Tuy nhiên, để xác định chính xác thời điểm nào lấy tế bào ngoại bì thần kinh để nuôi cấy neuron tiết dopamin là phù hợp nhất, chúng tôi tiến hành nghiên cứu cấu trúc não giữa và thử nghiệm nuôi cấy với các giai đoạn tuổi phôi khác nhau để đánh giá.

4.1.1.1. Về cấu trúc vi thể não giữa phôi chuột công trắng qua các giai đoạn E10,5 – E13,5

Bằng phương pháp nhuộm H-E thông thường, có thể đánh giá cấu trúc vi thể mô não giữa từ giai đoạn 10,5 đến 13,5 ngày. Trong giai đoạn này, sự thay đổi chủ yếu của não giữa là sự tăng lên về kích thước và chiều dày thành não. Đồng thời, quan sát thấy sự phát triển khác nhau theo trục bụng - lưng của não giữa: sàn não ít phát triển hơn trần não nên não giữa phát triển cong về phía sàn não. Cấu trúc mô não giữa ở giai đoạn này tương tự với cấu trúc của ống thần kinh nói chung gồm nhiều hàng tế bào dạng biểu mô tầng. Ở lớp nội tủy phía trong cùng có thể quan sát thấy nhiều hình ảnh tế bào đang phân chia chứng tỏ các tế bào ở lớp này có khả năng sinh sản mạnh (Hình 3.1). Điều này phù hợp với lý thuyết kinh điển – cho rằng lớp nội tủy chính là lớp sinh sản của ống thần kinh giai đoạn phôi. Tế bào lớp này tăng sinh, di cư và biệt hóa liên tục làm cho thành ống thần kinh ngày càng dày hơn.

Những nghiên cứu đầu tiên về sự biệt hóa của tế bào gốc ngoại bì thần kinh trong ống thần kinh được công bố bởi tác giả [Cajal](#). Cajal chỉ ra rằng dấu hiệu đầu tiên của sự biệt hóa các tế bào gốc thành các tế bào thần kinh là sự

Commented [M27]: Năm, TLTK???

xuất hiện các xơ thần kinh trong bào tương của tế bào. Những vùng xuất hiện xơ thần kinh đầu tiên được gọi là vùng fibril hóa và thường xuất hiện sớm ở lớp nội tủy. Phương pháp nhuộm Cajal cho phép nhuộm xơ thần kinh do đó gián tiếp đánh giá được quá trình biệt hóa của các tế bào thần kinh trong não giữa phôi chuột cống trắng. Tại thời điểm E10,5, chúng tôi quan sát thấy những tế bào có nhánh bào tương ngấm bạc bắt màu nâu đen xuyên suốt chiều dài của thành não giữa. Chúng tôi tại thời điểm này, đã có sự biệt hóa của các tế bào thần kinh xuyên tâm. Wilhelm và Pasko Rakic từ những năm 1970 đã chỉ ra rằng các sợi trục của neuron đang biệt hóa sử dụng các nhánh bào tương của tế bào thần kinh đệm xuyên tâm này cho sự định hướng và dẫn dắt trong quá trình phát triển của ống thần kinh [50].

Đặc biệt, sự thay đổi rõ ràng nhất quan sát thấy ở vùng sàn não giữa. Tại vùng sàn não giữa thời điểm phôi 10,5 ngày, đã xuất hiện những tế bào xuyên tâm nhưng còn ít. Đến thời điểm 12,5 - 13,5 ngày, vùng sàn não giữa dày đặc tế bào. Các tế bào xuyên tâm có nhánh bào tương chứa xơ thần kinh nâu đen đứng xen kẽ những tế bào ít bắt màu gợi ý có sự di cư mạnh của các tế bào đang được biệt hóa đến khu vực xác định. Đây là những hình ảnh gợi ý về nơi xuất phát của các tế bào đầu dòng tiết dopamin từ có thể định hướng tới việc sử dụng vị trí sàn não giữa phôi để phân lập các tế bào gốc ngoại bì thần kinh cho nuôi cấy neuron tiết dopamin (Hình 3.2; 3.3).

4.1.1.2. Về cấu trúc siêu vi của não giữa phôi chuột cống trắng giai đoạn E10,5 – E13,5

Quan sát bằng kính hiển vi điện tử, chúng tôi thấy ở thời điểm phôi 10,5 – 11,5 ngày, thành của não giữa là biểu mô tầng, các tế bào đứng rất sát nhau, khoảng gian bào hẹp. Tuy nhiên, giữa các tế bào không quan sát thấy những cấu trúc liên kết ở biểu mô thông thường như: cái mọng, vòng dính, dải bọt, thể liên kết... Nghiên cứu của Malatesta (2008) cũng chỉ ra rằng trong giai

Commented [M28]: Thì sao/: TB đã biệt hoá, không nên trích thủ, phân lập và nuôi cấy???

đoạn phát triển của hệ thần kinh phôi thai, các tế bào thần kinh đệm xuyên tâm có nguồn gốc từ sự biến đổi của biểu mô thần kinh hình thành từ tấm thần kinh. Sau đó, chúng dần giảm biểu hiện các protein có liên quan đến nguồn gốc biểu mô đồng thời tăng các biểu hiện của mô thần kinh như sự hiện diện của các đám glycogen, xơ trung gian vimentin và các GFAP...[71].

Có thể thấy thời điểm E10,5 ở phôi chuột cống trắng, ống thần kinh vẫn chưa đóng hoàn toàn, tính chất biểu mô của ống thần kinh vẫn còn thể hiện khá rõ. Tuy nhiên đây cũng là giai đoạn bắt đầu quá trình tăng sinh, biệt hóa mạnh mẽ của các tế bào thần kinh tại não giữa. Do vậy việc mất đi các cấu trúc liên kết giữa chúng giúp tạo điều kiện cho các tế bào di cư đến vị trí xác định.

Ngoài ra, ở giai đoạn này, chúng tôi cũng quan sát thấy nhiều tế bào có nhân lớn, tỷ lệ nhân/bào tương rất lớn. Bào tương của những tế bào này khá mỏng, có ít bào quan trong đó chủ yếu là các ti thể nhỏ. Những ti thể trong các tế bào này có cấu trúc đơn giản: hình cầu, mào ti thể kém phát triển (hình 3.17). Đây chính là những đặc điểm điển hình của các tế bào gốc – nguyên bào xóp. Đặc biệt, trong lớp nội tủy của những phôi ở độ tuổi 10,5 – 11,5 ngày còn bắt gặp hình ảnh những tế bào đang phân chia, chứng tỏ sự tăng sinh mạnh mẽ của các tế bào tại đây. Hơn nữa, trong giai đoạn này, chúng tôi còn quan sát thấy một số hình ảnh của nguyên bào thần kinh: nhân lớn trong có một hạt nhân. Một số tế bào xuất hiện các nhánh bào tương gắn với đậm độ điện tử cao. Điều này phù hợp với kết quả nhuộm Cajal khi mà tại thời điểm này, các xơ thần kinh xuất hiện ít, não giữa ít bắt màu thuốc nhuộm. Chúng tôi cho rằng đây là thời điểm các tế bào gốc có sự tăng sinh về số lượng đồng thời có sự biến đổi hình thái từ tế bào gốc ngoại bì thần kinh thành các tế bào đầu dòng là các nguyên bào thần kinh.

Sang giai đoạn 12,5 đến 13,5 ngày, trong sần não giữa các tế bào ít đứng sát nhau, chúng bị ngăn cách bởi những nhánh bào tương phát triển xung

Commented [M29]: Đường dẫn đến KQ??

quanh. Xuất hiện những tế bào có tỷ lệ nhân/bào tương nhỏ hơn, bào tương xung quanh phát triển, giàu bào quan. Ti thể nhiều, đa dạng về hình dạng, kích thước, mào ti thể rõ. Lưới nội bào không hạt tăng về số lượng, đồng thời giãn rộng hơn bình thường. Những cấu trúc liên quan đến tổng hợp protein cũng phát triển mạnh như: bộ Golgi hay hệ thống lưới nội bào có hạt với các polysom dày đặc và nhiều đám glycogen. Chúng tỏ đây là những tế bào đang biệt hóa để đáp ứng chức năng tổng hợp protein. Ở tuổi phôi lớn (13,5 ngày), sự hiện diện của các tế bào này nhiều hơn so với tuổi phôi nhỏ. Hơn nữa, ở thời điểm phôi chuột 12,5 ngày, chúng tôi cũng quan sát được nhiều cấu trúc dạng sợi chứa xơ thần kinh. Các sợi thần kinh đứng với nhau thành bó, số lượng sợi trong bó rất thay đổi. Trong các sợi này có thể thấy các ti thể, ribosom hay lưới nội bào nhẵn. Với những hình ảnh này, chúng tôi cho rằng đây chính là những nhánh bào tương của các tế bào tiền thân tiết dopamin trong quá trình biệt hóa. Vì thực tế, ở sần não giữa, những tế bào tiền thân tiết dopamin có hình thái giống với các tế bào thần kinh đệm xuyên tâm.

Tại thời điểm này còn quan sát được những cấu trúc của nón tăng trưởng xen kẽ với những nhóm nhánh bào tương trên. Tuy vậy, không bắt gặp cấu trúc synap – cấu trúc được hình thành trong giai đoạn cuối của quá trình biệt hóa noron. Từ những hình ảnh trên, chứng tỏ có sự di cư cũng như bắt đầu biệt hóa của các tế bào thần kinh trong sần não giữa ở giai đoạn này, hơn nữa, quá trình biệt hóa thành các noron tiết dopamin vẫn chưa hoàn toàn kết thúc.

4.1.1.3. Sự xuất hiện và biệt hóa của tế bào tiền thân tiết dopamin trong mô não giữa phôi chuột cống trắng từ 10,5 đến 13,5 ngày tuổi

Sử dụng kỹ thuật nhuộm miễn dịch huỳnh quang với marker vimentin để xác định những tế bào tiền thân tiết dopamin tại não giữa phôi chuột. Kết quả cho thấy trong giai đoạn từ 10,5 – 13,5 ngày tuổi, vimentin dương tính ngày càng tăng theo thời gian. Tại thời điểm E10,5, vimentin chỉ xuất hiện rải rác

trong mô sần não giữa phôi chuột cống trắng ở lớp áo giữa, chưa thấy ở vùng sần não. Đến giai đoạn E11,5 vùng sần não giữa bắt đầu dương tính với vimentin, các tế bào này có xu hướng chạy thẳng góc với sần não giữa. Sự xuất hiện các tế bào Vi (+) tăng dần, đến thời điểm E13,5 quan sát thấy các tế bào dương tính rất mạnh. Điều này chứng tỏ sự xuất hiện của các tế bào tiền thân tiết dopamin ở não giữa trong giai đoạn này tăng mạnh về số lượng.

Trong nghiên cứu của tác giả Houle và Fedoroff (1983) trên phôi chuột nhắt về sự biểu hiện của vimentin trong giai đoạn sớm ở ống thần kinh nhận thấy rằng vimentin chưa biểu hiện trong ống thần kinh phôi E8. Sang thời điểm E9, bắt đầu quan sát thấy sự hiện diện của vimentin tại vùng bụng ống thần kinh đoạn cổ. Từ E9 đến E10, có sự gia tăng đáng kể của xơ vimentin trong các tế bào ống thần kinh ở cả lớp màn rìa và lớp nội tủy. Sang thời điểm E11, sự phân bố của vimentin giống với giai đoạn E10 nhưng cường độ biểu hiện mạnh hơn. Có sự sai khác về tuổi phôi và biểu hiện vimentin giữa nghiên cứu của chúng tôi và nghiên cứu của nhóm tác giả trên do sự chênh lệch về giai đoạn phát triển giữa phôi chuột cống và phôi chuột nhắt. Nếu sử dụng bảng phân loại tuổi phôi theo giai đoạn của Carnegie để quy đổi thì kết quả của chúng tôi hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Houle và Fedoroff: phôi chuột nhắt thời điểm E9 tương đương với phôi chuột cống E10,5 và phôi chuột nhắt E11 tương đương với phôi chuột cống E12,5 [99].

Để đánh dấu thời điểm các tế bào tiền thân biệt hóa thành các noron tiết dopamin, chúng tôi sử dụng phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch với marker TH. Kết quả chúng tôi không quan sát được các tế bào dương tính với TH ở não giữa vào thời điểm tuổi phôi 12,5 ngày. Tuy nhiên, đến thời điểm tuổi phôi 13,5 ngày, chúng tôi xác định được một nhóm các tế bào dương tính với TH tập trung ở sần não giữa phía ngoài lớp áo. Như vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi quan sát được thời điểm đánh dấu sự biệt hóa đầu tiên thành

noron tiết dopamin là E13,5. Điều này gợi ý rằng đây chính là giai đoạn biệt hóa cuối cùng của tế bào tiền thân thành các noron tiết dopamin. Vị trí ban đầu được xác định vùng sàn não giữa, phía ngoài lớp áo. Trong một nghiên cứu khác của tác giả Sawamoto và cộng sự (2001) trên ống thần kinh não giữa chuột nhắt và chuột cống cũng thấy được các tế bào dương tính với TH ở vùng sàn não giữa ở phôi chuột nhắt giai đoạn E11,5 và phôi chuột cống giai đoạn E13,5 [73].

Năm 1990, Shults và cộng sự nghiên cứu mối liên hệ giữa tế bào tiết dopamin và các tế bào thần kinh xuyên tâm trong sự phát triển não giữa trên phôi chuột cống giai đoạn E12 đến E20. Các tác giả sử dụng marker TH đánh dấu tế bào tiết dopamin và vimentin để nhận biết các tế bào thần kinh xuyên tâm. Kết quả cho thấy tại thời điểm E12, các xơ vimentin của tế bào thần kinh xuyên tâm đã hiện diện. Sau đó các tế bào thần kinh xuyên tâm ngày càng nhiều và tồn tại trong suốt thời kỳ phôi đến trước khi sinh. Tại thời điểm E13, một số tế bào tại vùng sàn não giữa bắt đầu dương tính với TH. Đến thời điểm E15, E16 hay E18, các tế bào dương tính với TH đã có mặt trên suốt chiều dày của sàn não giữa. Các tác giả cũng nhận định rằng các tế bào thần kinh xuyên tâm cung cấp đường dẫn cho sự di cư của tế bào tiết dopamin trong lớp áo của não giữa phôi giai đoạn này. Hơn nữa, một số tế bào tiết dopamin có thể biểu hiện dương tính với marker TH trong quá trình di cư cũng như trước khi tới vị trí cam kết trên bán cầu não [100].

Như vậy, qua nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy sự phân bố các tế bào ở não giữa phôi chuột cống trắng như sau: các tế bào đầu dòng tiết dopamin nằm ở khu vực lớp nội tủy và phần sâu lớp áo. Những tế bào trong quá trình biệt hóa thành các tế bào tiền thân nằm dọc theo thành sàn não giữa và noron tiết dopamin trưởng thành sẽ nằm phía ngoài cùng của thành não giữa. Vị trí ban đầu của sự biệt hóa xảy ra ở vùng sàn não trong giai đoạn phôi khoảng

13,5 ngày. Do vậy, vị trí lựa chọn để phân lập tế bào tiền thân tiết dopamin cho nuôi cấy và ghép lại hợp lý nhất là vùng sàn não giữa. Hơn nữa, chúng tôi nhận thấy có sự tương ứng về đặc điểm vi thể, siêu vi và hóa mô miễn dịch theo từng thời điểm. Tại giai đoạn E10,5, ở phôi chuột cống trắng, ống thần kinh mới khép, não giữa vẫn giữ tính chất biểu mô tầng. Các tế bào gốc ngoại bì thần kinh tại não giữa vẫn giữ tính gốc với các đặc điểm: có khả năng phân chia, tự đổi mới. Về hình thái, các tế bào có tỷ lệ nhân/bào tương lớn, rất ít bào quan. Trong tế bào chưa xuất hiện các dấu hiệu của marker tế bào tiền thân hay biệt hóa (vimentin hay TH). Sau đó, dưới tác động của các yếu tố biệt hóa (SHH, FGF8, Wnt1, Wnt5a...), các tế bào gốc ngoại bì thần kinh chuyển thành các tế bào đầu dòng tiết dopamin chính là các nguyên bào thần kinh với đặc điểm tỷ lệ nhân/bào tương giảm, xuất hiện các bào quan. Những nguyên bào thần kinh lại tiếp tục phát triển thành những tế bào tiền thân tiết dopamin vào giai đoạn 11,5 – 12,5 ngày. Trên hình ảnh vi thể sẽ thấy xuất hiện những tế bào dạng xuyên tâm ở sàn não giữa. Những tế bào này có bào quan rất phát triển, thể hiện khả năng tổng hợp protein như lưới nội bào có hạt, polysom, bộ Golgi và các đám glycogen.... Đặc biệt, có sự dài ra của các nhánh bào tương biệt hóa thành các sợi thần kinh. Những tế bào tại sàn não giữa dương tính với vimentin từ thời điểm 11,5 ngày. Đến thời điểm 13,5 ngày, xuất hiện tế bào dương tính với TH chứng tỏ đây là những bước biệt hóa cuối cùng của tế bào tiền thân thành noron tiết dopamin.

4.1.2. Thử nghiệm nuôi cấy tế bào gốc ngoại bì thần kinh phân lập từ sàn não giữa trên phôi chuột từ 10,5 đến 14,5 ngày

Dựa vào việc tìm hiểu cấu trúc não giữa, nghiên cứu của chúng tôi nhận thấy rằng thời gian các tế bào gốc ngoại bì thần kinh bắt đầu tăng sinh tại sàn não giữa tương ứng với giai đoạn phôi khoảng 10,5 ngày. Vì vậy, để nuôi cấy tế bào gốc não giữa tạo noron tiết dopamin thì việc tiến hành lấy tế bào giai

đoạn sớm này có nên hay không? Hay nên lấy mô ở giai đoạn muộn hơn - trên 13,5 ngày để có được dòng tế bào đã biệt hóa, hạn chế tối đa nguy cơ tiềm ẩn có thể gây u não khi nuôi cấy các tế bào quá non? Để tìm hiểu vấn đề này, chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy thử nghiệm trên các tuổi phôi khác nhau từ E10,5 – E14,5. Với tổng số 148 phôi chuột được chia theo các giai đoạn E10,5; E11,5; E12,5; E13,5; E14,5 để đánh giá khả năng phân lập và nuôi cấy tạo neuron tiết dopamin chúng tôi nhận thấy rằng:

(1) Về vấn đề trích thủ lấy não giữa: ở giai đoạn sớm, E10,5, tỷ lệ phẫu tích thu được não giữa là thấp nhất, chỉ đạt 63,3% hay ở giai đoạn muộn hơn, E11,5 cũng chỉ đạt 72%. Trong khi ở các giai đoạn sau E12,5 – E14,5, tỷ lệ này lên tới trên 90% (Bảng 3.2). (2) Về tổng số tế bào thu được sau phân lập: ở tuổi phôi nhỏ, giai đoạn E10,5 và E11,5 số lượng tế bào thu được thấp hơn có ý nghĩa so với tuổi phôi giai đoạn lớn hơn. Số lượng tế bào dao động từ $0,78 - 0,82 \times 10^5$ TB (E10,5 – E11,5) so với khoảng $1,34 - 1,4 \times 10^5$ TB (E12,5 – E14,5) (Biểu đồ 3.1). (3) Về khả năng nuôi cấy, chúng tôi quan sát được chỉ khoảng 10,5% các mẫu tế bào ở giai đoạn E10,5 có khả năng tăng sinh trong môi trường nuôi cấy trong khi tỷ lệ này cao hơn nhiều ở các tuổi phôi lớn hơn: 88,9% ở giai đoạn E11,5; và 100% ở các giai đoạn sau, từ E12,5 – E14,5 (Bảng 3.3).

Ở tuổi phôi 10,5 ngày, kích thước ống thần kinh tương đối nhỏ và thành ống khá mỏng. Hơn nữa, lớp ngoại bì da và màng não bao bọc bên ngoài chưa tách biệt rõ ràng với lớp tế bào ngoại bì thần kinh tại thành ống. Mặt khác, trong quá trình phẫu tích còn gặp một số phôi có ống thần kinh chưa đóng hoàn toàn. Vì vậy, việc phẫu tích lấy sàn não giữa phôi ở giai đoạn này gặp nhiều khó khăn. Điều này khiến cho tỷ lệ phẫu tích thành công vùng sàn não giữa cũng như tổng số tế bào thu được sau khi phân lập tạo dịch treo tế bào ngoại bì thần kinh để nuôi cấy rất thấp ở tuổi phôi E10,5.

Ở tuổi phôi lớn hơn, giai đoạn E12,5, việc phẫu tích lấy não giữa tương đối thuận lợi vì ở giai đoạn này, não trước và não sau khá phát triển, tạo nên ranh giới khá rõ ràng với não giữa. Sau khi phẫu tích được não giữa, chúng tôi tiến hành loại bỏ phần ngoại bì da và màng não bọc bên ngoài. Việc làm này cũng tương đối thuận lợi ở giai đoạn này do các cấu trúc này bắt đầu phát triển và phân biệt khá rõ với lớp ngoại bì thần kinh bên trong. Bước tiếp theo, chúng tôi cắt bỏ phần trần não giữa – vị trí không chứa tế bào tiền thân tiết dopamin. Phần sàn não giữa còn lại được ủ enzym để tách rời các tế bào, tạo dung dịch tế bào nuôi cấy. Ở giai đoạn này, thành não giữa tương đối dày, do vậy số lượng tế bào chúng tôi thu được sau quá trình tách chiết cao hơn có ý nghĩa so với nhóm tuổi phôi ở giai đoạn sớm (E10,5 và E11,5). Cùng với đó là khả năng tăng sinh của các tế bào thu được khá tốt và ổn định khi tỷ lệ mọc mẫu nuôi cấy lên tới 100%.

Ở tuổi phôi giai đoạn E14,5, chúng tôi nhận thấy rằng, việc phẫu tích lấy não giữa cũng tương đối dễ dàng, đồng thời số lượng tế bào thu được, tỷ lệ mọc mẫu nuôi cấy tốt và ổn định giống với tuổi phôi E12,5 và E13,5. Tuy nhiên, ở giai đoạn này, phần màng não phía dưới ngoại bì khá phát triển và hình thành nhiều mạch máu trong mô liên kết. Do vậy, việc loại bỏ màng não và mô liên kết khá khó khăn dẫn tới tăng tỷ lệ các tế bào có nguồn gốc trung mô và giảm tỷ lệ neuron trong mẫu sau nuôi cấy.

Với những lý do trên, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn tuổi phôi từ 12,5 – 13,5 ngày tuổi để nuôi cấy tế bào gốc ngoại bì thần kinh với mục đích thu thập các neuron tiết dopamin phục vụ ghép thực nghiệm trên mô hình chuột được gây Parkinson.

Hơn nữa cũng dựa trên những hình ảnh về cấu trúc não giữa đã gợi ý sự hiện diện của các neuron dương tính với marker TH trên phôi chuột cống trắng tại thời điểm E13,5. Nhờ vậy, chúng tôi nhận thấy rằng thời điểm E13,5 chính

là thời điểm một số tế bào tiền thân tiết dopamin đã bước đầu hoàn thành quá trình biệt hóa trở thành noron tiết dopamin trưởng thành và bắt đầu quá trình di cư đến vị trí cam kết.

Theo tổng quan của tác giả Hegarty và cộng sự (2013), ở mức độ phân tử, tín hiệu sớm nhất có thể nhận biết được tế bào tiền thân của noron tiết dopamin đó là sonic hedgehog (Shh). Shh được tìm thấy ở phôi chuột 8,5 ngày tuổi. Ở giai đoạn này, Shh cùng với Wnt1 và FGF8 góp phần tăng cảm ứng của các tế bào gốc thần kinh ở tằm thần kinh để định hướng phát triển thành tế bào tiền thân tiết dopamin thông qua việc biểu hiện protein FoxA2 và Lmx1a/1b. Sau đó, ở giai đoạn muộn hơn, E9 – E10, hai chu trình lặp lại bao gồm Shh – FoxA2 và Wnt1 – Lmx1a liên tục diễn ra và tác động lẫn nhau để kích thích các tế bào tiếp tục quá trình định hướng phát triển thành noron tiết dopamin. Sản phẩm của các chu trình này là tạo ra protein Nurr1 và Pitx3. Vì vậy, protein Nurr1 và Pitx3 được phát hiện được ở giai đoạn sau hơn, khoảng 11 ngày. Và sau đó, chúng tham gia trực tiếp vào quá trình biệt hóa của các tế bào tiền thân tiết dopamin thành. Các tế bào tiết dopamin trưởng thành xuất hiện enzym tyrosine hydroxylase trong bào tương vì vậy có biểu hiện dương tính với marker TH khi nhuộm hóa mô miễn dịch [75]. Các tế bào tiền thân của noron tiết dopamin đạt số lượng lớn nhất vào thời điểm E12 ở chuột cống (khoảng 80% các tế bào đầu dòng tiết dopamin được sinh ra ở thời điểm E12). Chính vì vậy, biểu hiện marker TH là dấu hiệu đầu tiên đánh dấu noron tiết dopamin trưởng thành, nó xuất hiện ngay trước khi tế bào tiền thân bước vào giai đoạn cuối cùng của quá trình biệt hóa và chuyển sang giai đoạn tiếp theo là di cư, khoảng E13 – E14 [76].

Chính điều này cũng lý giải cho kết quả nuôi cấy thử nghiệm của chúng tôi, đó là các mẫu mọc tốt nhất ở giai đoạn E12,5 – E13,5 ngày. Trong khi đó, các giai đoạn sớm hơn hoặc muộn hơn đều cho kết quả kém hơn.

Commented [M30]: Biệt hoá thì còn tăng sinh không? Mức độ???

Commented [M31]: OK

4.1.3. Nuôi cấy tế bào gốc ngoại bì thần kinh não giữa phôi chuột cống trắng giai đoạn E12,5 – E13,5

Não giữa sau khi tách rời khỏi phôi được loại bỏ ngoại bì da và màng não bọc ngoài sần não giữa. Ngoại bì da tương đối dày nên việc loại bỏ khá dễ dàng. Tuy nhiên, màng não là phần khó bóc tách vì rất mỏng. Vì vậy chúng tôi cố gắng loại bỏ tối đa phần màng não nhìn thấy được dưới kính hiển vi soi nổi. Phần còn lại của sần não giữa sẽ tạo nên một dung dịch tế bào gốc ngoại bì thần kinh lẫn với các tế bào gốc trung mô. Các tế bào này một phần sẽ bị thoái hóa trong môi trường nuôi cấy M-NECs – là môi trường ưu tiên cho các tế bào thần kinh, vốn không thuận lợi cho các tế bào trung mô; một phần khác nếu có khả năng tiếp tục phân chia sẽ tạo vi môi trường cho neuron phát triển. Enzym chúng tôi sử dụng để ly giải liên kết giữa các tế bào là enzym dispase và trypsin - EDTA. Dispase có tác dụng tách biểu mô ống thần kinh khỏi màng đáy trong khi trypsin - EDTA giúp tách rời các tế bào của biểu mô thần kinh. Tuy vậy, việc sử dụng enzym cũng chưa thể giúp tách rời hoàn toàn các tế bào mà còn cần thêm sự hỗ trợ cơ học bằng pi-pét pasteur. [77].

a. Về thời gian nuôi cấy tế bào

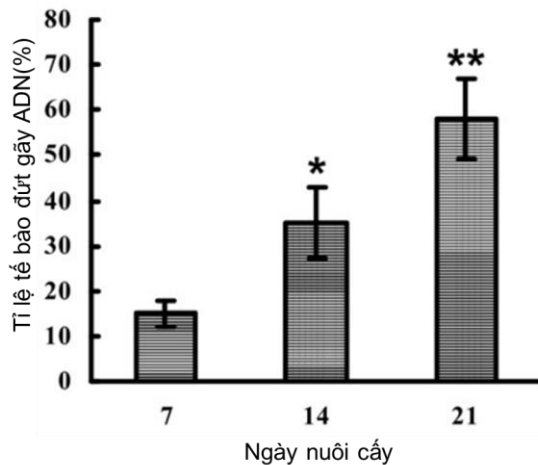
Thời gian nuôi cấy trung bình trong nghiên cứu là $7,4 \pm 2,3$ ngày, dao động từ 6 – 9 ngày, các tế bào đã mọc kín đáy lồng nuôi cấy. Quan sát sự phát triển của tế bào: hai ngày sau nuôi cấy đa số các tế bào đã bám dính, bắt đầu quan sát thấy các neuron như tế bào có hình sao, có vài nhánh bào tương ngắn tỏa ra từ thân tế bào; bốn ngày sau nuôi cấy các tế bào tăng sinh số lượng nhiều hơn, quan sát được nhiều tế bào cùng với nhánh bào tương của chúng lan ra xung quanh, đến tiếp xúc với các tế bào gần kề. Ở một số mẫu, đã quan sát được những cụm neuron (neurosphere) đứng rải rác trong đĩa cấy.

Thời gian nuôi cấy của chúng tôi cũng khá tương đồng với nhiều tác giả khác khi sử dụng tế bào gốc sần não giữa phôi chuột để nuôi cấy [61], [78].

Commented [D32]: Bổ xung thêm bàn luận về các supplements cho thêm vào môi trường nuôi cấy hỗ trợ phân chia và biệt hóa tế bào như thế nào?

Theo tác giả Shimoda và cộng sự (1992), các tế bào gốc sần não giữa phát triển tốt nhất trong khoảng 5 ngày đến 10 ngày sau nuôi cấy: biểu hiện bằng việc các tế bào sống, tăng sinh về số lượng tế bào đồng thời tăng sự hình thành phát triển các nhánh của tế bào thần kinh. Sau 14 ngày nuôi cấy, bắt đầu quan sát thấy hiện tượng co rút của các nhánh tế bào cũng như nhiều không bào trong bào tương tế bào. Đây chính là biểu hiện của sự thoái hóa của tế bào nuôi cấy [78].

Hơn nữa, tác giả Robert F. và cs (2012) khi nghiên cứu cấu trúc của các neuron nuôi cấy cũng nhận thấy vấn đề tương tự. Nhóm tác giả đã quan sát được nhiều hình ảnh bất thường của các bào quan dưới kính hiển vi điện tử xuyên như: ti thể hình nhẫn hay chia nhánh hoặc nhiều liposome được bao quanh bởi đa màng phospholipid kếp thay vì hai lớp màng như bình thường (multivesicular myeloid bodies) ở những mẫu tế bào nuôi cấy dài ngày. Tỷ lệ gặp các tế bào bất thường này tăng dần theo số ngày nuôi cấy. Nếu như ở giai đoạn nuôi 7 ngày nuôi cấy, chỉ bắt gặp 20%, ở giai đoạn 14 ngày là 70% thì tới 21 ngày nuôi cấy, tỷ lệ này lên tới 93%. Để có câu trả lời rõ ràng hơn cho hiện tượng này, nhóm tác giả cũng tiếp tục đánh giá tổn thương đứt gãy ADN trong nhân tế bào theo các mốc thời gian nuôi cấy là 7 ngày, 14 ngày và 21 ngày. Theo đó, tác giả nhận thấy rằng tỷ lệ các tế bào tổn thương ADN trên tổng số tế bào nuôi cấy tăng có ý nghĩa thống kê theo thời gian nuôi cấy. So sánh từng cặp được tiến hành giữa ngày 14 và ngày 21 với ngày 7 (* $p < 0,05$ và ** $p < 0,01$) (hình 3.28) [101].



Hình 4.1. Liên quan giữa số ngày nuôi cấy và tỷ lệ tế bào đứt gãy DNA [101]

Do đó, đa phần các tác giả đều đưa ra khuyến cáo về việc nên sử dụng các tế bào nuôi cấy trong giai đoạn từ 5 – 10 ngày.

b. Về phương pháp nuôi cấy tế bào

Ở nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phương pháp nuôi cấy tạo cụm. Các cụm neuron trong nghiên cứu bắt đầu quan sát được sau khoảng 3 – 4 ngày nuôi cấy. Sau đó, có sự tăng nhanh về số lượng và kích thước của các cụm tế bào trong những ngày tiếp theo. Nhóm tác giả Safak Er và cs (2020) áp dụng phương pháp nuôi cấy này, cũng quan sát được sự xuất hiện các cụm t bào đường kính khoảng 150 - 200 μ m trong giếng cấy sau vài ngày và xen giữa các cụm tế bào là các neuron với các nhánh bào tương tỏa ra xung quanh nối với các neuron kế bên [102].

Trong nuôi cấy tế bào gốc thần kinh, có hai phương pháp thường được sử dụng là nuôi cấy tạo cụm và nuôi cấy lớp đơn. Đối với nuôi cấy tạo cụm, các tế bào sau khi phân lập được sẽ đem nuôi trên các đĩa cấy không được xử lý chất bám dính. Trong khi nuôi cấy lớp đơn, các đĩa cấy được xử lý với chất

bám dính như poly – L – lysin và laminin trước giúp tăng hiệu quả bám dính của các tế bào gốc thần kinh. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng việc nuôi cấy lớp đơn, mặc dù có tỷ lệ chọn lọc tế bào gốc thần kinh cao hơn song khả năng tăng sinh và biệt hóa thành neuron trưởng thành lại không hiệu quả bằng nuôi cấy tạo cụm. Lý do được các tác giả đưa ra đó là trong các cụm neuron, không chỉ có các tế bào gốc thần kinh mà còn có nhiều tế bào khác nhau và ở những giai đoạn phát triển khác nhau. Chính vì vậy chúng tạo ra một môi trường trong đó các tế bào liên kết chặt chẽ với nhau, giống như một “ổ tế bào gốc”, tiết ra những yếu tố nội tại để thúc đẩy sự tồn tại, phân chia và biệt hóa của tế bào [74], [103], [84]. Tác giả Maria Weinert và cs (2015) đã tiến hành nghiên cứu cải tiến quy trình nuôi cấy lớp đơn để tối ưu hiệu quả thu hồi neuron sau nuôi cấy bằng cách tăng số lượng la-men nuôi cấy (coverslip) sử dụng cho một phôi. Đồng thời chỉ sử dụng mặt trên la-men để làm giá đỡ tế bào thay vì sử dụng cả 2 mặt sẽ giảm được hiện tượng mất tế bào khi chúng bám vào mặt dưới la-men. Bằng việc làm này, nhóm tác giả đã thu được tỷ lệ 0,5 – 1% lượng neuron TH(+) sau nuôi cấy [104]. Tỷ lệ này so với các thử nghiệm nuôi cấy tạo cụm đã được báo cáo thấp hơn rất nhiều có thể kể đến như nghiên cứu của nhóm tác giả Parish và cs (2007) là 6,4% – 9,5% neuron TH (+) trong tổng số tế bào sau nuôi cấy [105].

Với phương pháp nuôi cấy tạo cụm được áp dụng trong nghiên cứu, chúng tôi thu được rất nhiều cụm tế bào “dạng neuron” có các đặc điểm như: nhiều nhánh bào tương, các nhánh dài ngắn khác nhau, có xu hướng nối với nhau tạo thành mạng lưới. Mặt khác, đây cũng là một trong những đặc điểm nhận dạng tế bào gốc thần kinh bởi một trong những phương pháp quan trọng để xác định tính gốc của tế bào phân lập được đó là thử nghiệm tạo cụm. Chính thử nghiệm này cho phép đánh giá đặc điểm cơ bản của tế bào gốc thần kinh đó là khả năng tự đổi mới, khả năng biệt hóa cũng như khả năng phân chia.

Những mẫu tế bào sau quá trình nuôi cấy được tiến hành định danh bằng các phương pháp: nhuộm Giemsa hay nhuộm Cajal II để quan sát hình thái vi thể tế bào dưới kính hiển vi quang học; hoặc nhuộm đặc biệt để quan sát hình thái siêu vi bằng kính hiển vi điện tử hay nhuộm hóa mô miễn dịch với marker tyrosine hydroxylase để nhận diện các noron tiết dopamin trưởng thành.

c. Định danh các tế bào sau nuôi cấy

Bằng phương pháp nhuộm Cajal II, chúng tôi thấy được nhiều loại tế bào khác nhau trong đĩa cấy: đa phần là các tế bào dạng noron đa cực với những nhánh dài và các tế bào sao. Bên cạnh đó còn có các tế bào ít nhánh và một số ít tế bào dạng biểu mô. Các tế bào trong mẫu nuôi cấy bắt màu nâu đen rất điển hình của mô thần kinh do có sự tồn tại của các xơ thần kinh trong bào tương tế bào. Điều này được thấy rõ nét hơn khi quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi điện tử quét hay cấu trúc tế bào dưới kính hiển vi điện tử xuyên.

Dưới kính hiển vi điện tử quét, có thể quan sát thấy hình ảnh noron 2 cực với thân tế bào hình ovan, nằm chính giữa. Hoặc hình ảnh các noron đa cực với thân tế bào lớn và nhiều nhánh bào tương tỏa ra xung quanh. Thêm vào đó, khi quan sát những mẫu tế bào nuôi cấy này dưới kính hiển vi điện tử xuyên, chúng tôi thấy rất nhiều noron đang phát triển ở những giai đoạn khác nhau. Có những noron vẫn giữ được tính “gốc” với hình thái rất giống với nguyên bào thần kinh trên thành não giữa phôi chuột: tế bào hình cầu, nhân lớn, màng nhân có vết lõm vào trong chất nhân (Hình 3.17). Cũng tương tự như nghiên cứu của tác giả Gadisseux và cộng sự (1985), nguyên bào thần kinh ở não giữa phôi chuột quan sát dưới kính hiển vi điện tử ngoài những đặc điểm trên còn có thể quan sát được nhiều lưới nội bào nhẵn, ribosom tự do và các ti thể nhỏ hình tròn. Ở một số tế bào đang trong quá trình biệt hóa, có thể quan sát được một số nhánh ngắn mọc ra từ các cực của tế bào. Những nhánh này có thể có đường kính dao động từ 0,5 - 2 μ m [85].

Commented [M33]: Rất nhiều lỗi in ấn

Bên cạnh đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi còn quan sát thấy nhiều neuron có nhánh ngắn hoặc neuron có những nhánh dài, nhiều xơ thần kinh trong tế bào; đặc biệt là hình ảnh synap tạo thành giữa các neuron sau khoảng 7,5 ngày nuôi cấy. Điều này cho thấy đã bắt đầu xuất hiện những neuron trưởng thành và biệt hóa hoàn toàn ở giai đoạn này (Hình 3.18). Đặc điểm này cũng được nhóm tác giả Robert F. và cộng sự (2012) mô tả khi nuôi cấy tế bào gốc thần kinh phôi chuột. Các tác giả cũng bắt đầu quan sát được hình ảnh synap sau 7 ngày nuôi cấy với số lượng ít sau đó số lượng synap tăng lên nhiều đến rất nhiều ở giai đoạn 14 ngày và 21 ngày nuôi cấy [101].

4.1.4. Bảo quản lạnh tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi

Câu hỏi đầu tiên chúng tôi đặt ra là nên bảo quản lạnh tế bào gốc thần kinh ở giai đoạn nào? Để trả lời câu hỏi này, chúng tôi đã bảo quản lạnh 150 mẫu, trong đó 72 mẫu bảo quản ngay sau khi phân lập tạo dịch treo tế bào (nhóm A), 68 mẫu bảo quản sau nuôi cấy ở giai đoạn P0 – nuôi cấy sơ cấp (nhóm B) và 10 mẫu bảo quản sau cấy chuyển lần thứ nhất P1 – nuôi cấy thứ cấp (nhóm C). Đánh giá tỷ lệ tế bào sống sau rã đông ở nhóm A và nhóm B cho kết quả cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm C (69,8% và 66,6% so với 19,9% với $p < 0,001$). Như vậy, liệu rằng khả năng trữ lạnh của các tế bào thần kinh trưởng thành kém hơn so với các tế bào chưa trưởng thành khi mà các tế bào ở giai đoạn chưa nuôi cấy hoặc nuôi cấy sơ cấp có vẻ cho kết quả tốt hơn so với bảo quản ở giai đoạn nuôi cấy thứ cấp?

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng DMSO (dimethyl sulfoxide) – là một loại chất bảo vệ lạnh thấm qua màng tế bào. Sử dụng DMSO 10% trong môi trường bảo quản lạnh đã được rất nhiều nghiên cứu chứng minh có hiệu quả tốt đối với tế bào gốc thần kinh như: tỷ lệ tế bào sống cao sau rã đông, quy trình thao tác đơn giản và không ảnh hưởng tới tính “gốc” của các tế bào [106], [107]. Tỷ lệ sống của tế bào sau rã đông của chúng tôi là 64,9%. Tỷ lệ này khá tương đồng với các tác giả khác như Milosevic (2005) [106] và Hancock

Commented [M34]: Chốt lại, hướng đến KL:

- Thời điểm trích thủ phù hợp
- Cách thức trích thủ, xử lý phân lập
- Cách thức, qui trình nuôi cấy tăng sinh
- Hiệu quả nuôi cấy tăng sinh
- Thời điểm, qui trình, cách thức gây biệt hoá
- Định danh sản phẩm cuối, SP trung gian?

Commented [M35]: Cần nhắc bổ sung nội dung này trong mục tiêu

(2000) [107]. Trong 3 nhóm quần thể tế bào ở các giai đoạn khác nhau được bảo quản lạnh thì nhóm A và nhóm B có tỷ lệ sống cao hơn hẳn so với nhóm C (69,8% và 66,6% so với 19,9% với $p < 0,001$). Cũng tương tự nghiên cứu của tác giả Daniel Rodriguez và cộng sự (2017) đã công bố tỷ lệ sống sau rã đông ở nhóm neuron sau nuôi cấy từ tế bào gốc não phôi chuột từ 29 – 34% thấp hơn rất nhiều so với nhóm tế bào gốc sau phân lập, chưa nuôi cấy (60 – 70%) [94]. Nguyên nhân được đa phần các nhà khoa học đưa ra đó là các tế bào đã biệt hóa sẽ có sức chịu đựng kém hơn trong quá trình hạ nhiệt độ so với các tế bào chưa biệt hóa, vì vậy màng tế bào dễ bị tổn thương dẫn đến sự ly giải tế bào trong quá trình rã đông [94]. Vì vậy, việc bảo quản lạnh tế bào tốt hơn nên ở giai đoạn ngay sau phân lập hoặc sau nuôi cấy sơ cấp. Gần đây, vào năm 2020, nhóm tác giả Drummond và cs cũng nghiên cứu việc tối ưu hóa bảo quản lạnh neuron tiết dopamin bằng cách bổ sung một số enzyme phosphoryl hóa thuộc nhóm kinase như Rho-associate kinases (ROCKs). Những enzyme này tham gia vào cấu tạo bộ khung tế bào cũng như quá trình biệt hóa và chết theo chương trình của tế bào. Kết quả nghiên cứu cho thấy việc bổ sung ROCKs vào môi trường bảo quản lạnh và môi trường rã đông giúp hạn chế chết tế bào sau rã đông từ đó tăng khả năng thu hồi tế bào sống đặc biệt ở thời điểm 24 giờ sau rã đông so với nhóm không bổ sung. Điều này cũng mở ra thêm những hướng mới trong nghiên cứu bảo quản lạnh các neuron tiết dopamin để đáp ứng được nhu cầu về nguồn tế bào trong điều trị bệnh nhân Parkinson trong tương lai [93].

Tiếp tục đánh giá tỷ lệ sống của tế bào sau bảo quản lạnh ở các mốc thời gian khác nhau ngắn nhất là 2 tuần và dài nhất là 6 tháng, chúng tôi không quan sát được sự khác biệt giữa các nhóm khảo sát. Điều này cũng được nhiều nghiên cứu nhắc tới như trong nghiên cứu của tác giả Celeste Robert và cộng sự 2016. Nhóm tác giả cũng theo dõi tỷ lệ sống của neuron theo thời gian bảo quản và không nhận thấy sự khác biệt giữa các nhóm sau hai năm bảo quản

mẫu trong nitơ lỏng. Như vậy có thể sử dụng nitơ lỏng để bảo quản tế bào gốc thần kinh trong một khoảng thời gian dài. Đa phần các nhà khoa học đều đồng thuận với quan điểm này do ở nhiệt độ siêu lạnh (-196°C) hầu hết các enzym của tế bào đều ngừng hoạt động [108]. Tác giả Meneghel và cs (2019) đã tiến hành nghiên cứu một số hiện tượng sinh lý diễn ra trong quá trình bảo quản lạnh của các tế bào bằng cách đánh giá việc tiêu thụ năng lượng của các tế bào trong quá trình hạ nhiệt độ hay sự hình thành các tinh thể đá trong và ngoài tế bào ở giai đoạn đông lạnh và tan đông. Nhóm tác giả nhận thấy rằng trong môi trường bảo quản lạnh có 10% DMSO thì các tinh thể đá bên ngoài tế bào đã được hình thành toàn bộ ở nhiệt độ -47°C . Lúc này, hầu hết lượng nước trong tế bào đã thoát ra ngoài màng tế bào và trong tế bào chỉ còn lại các phân tử trọng lượng lớn như protein, đường hay các axit nucleic. Hiện tượng này giúp tế bào được nén thành một khối dạng gel rắn chắc và giúp màng tế bào trở được bảo vệ tốt hơn. Ở nhiệt độ thấp hơn, những phân tử nước trong tế bào tiếp tục đi ra phía ngoài tế bào. Nếu nước trong tế bào càng giảm thì tế bào càng được bảo vệ tốt hơn. Khi toàn bộ khối protein trong tế bào được đông đá lúc này tế bào ngừng hoàn toàn quá trình chuyển hóa. Hiện tượng này quan sát được ở thời điểm -123°C . Vì vậy, việc bảo quản lâu dài các tế bào tốt nhất ở dưới -123°C như trong nitơ lỏng -196°C hoặc hơi nitơ lỏng -135°C đến -150°C [109].

Các mẫu tế bào sau rã đông được tiến hành nuôi cấy tăng sinh, kết quả ở nhóm A và B có 88-89% mẫu bám dính và tăng sinh. Trong các mẫu nuôi cấy chúng tôi quan sát thấy có nhiều noron, các tế bào hình sao và tế bào ít nhánh. Điều này cũng cho thấy rằng việc bảo quản lạnh tế bào gốc thần kinh phôi không làm ảnh hưởng tới khả năng tăng sinh biệt hóa của chúng. Nghiên cứu này của chúng tôi cũng giống với nhóm tác giả Drummond và cs (2020). Các tác giả cũng thu được các noron tiết dopamin ở các mẫu tế bào nuôi cấy sau bảo quản lạnh khi nhuộm hóa mô miễn dịch đặc hiệu với các marker TH, NURR1 hay PITX3 [93].

4.2. Phân lập và nuôi cấy tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi người

4.2.1. Thuận lợi và khó khăn trong quá trình thu thập phôi và phân lập tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi người

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng các phôi được giảm thiểu từ những thai phụ đa thai sau khi thực hiện kỹ thuật hỗ trợ sinh sản (bơm tinh trùng vào buồng tử cung hoặc thụ tinh ống nghiệm). Các phôi được tiến hành phân lập và nuôi cấy tăng sinh tế bào thần kinh tiết dopamin. Các phôi sau khi hút ra thường dưới dạng mảnh nhỏ. Do đó, chúng thường không còn nguyên vẹn nữa nên rất khó để xác định nãu giữa, chỉ có thể lấy các đoạn khác nhau của ống thần kinh. Với các phôi 6 tuần tuổi, vì phôi quá nhỏ nên các thành phần của phôi đều bị nát vụn sau thủ thuật, do đó không thể phân biệt được ống thần kinh với các bộ phận khác. Với các phôi trên 8 tuần, lúc này, ống thần kinh đã đóng hoàn toàn, cột sống đã hình thành nên cũng rất khó để phẫu tích ống thần kinh. Vì vậy, còn lại các phôi từ 6,5 – 7,5 tuần là có khả năng phẫu tích được ống thần kinh do ống thần kinh lúc này đã đóng một phần hoặc hoàn toàn nhưng cột sống chưa hình thành. Nhìn chung, việc phẫu tích ống thần kinh phôi người phụ thuộc nhiều vào kinh nghiệm người làm, đặc biệt với các phôi bị nát nhiều.

Sự phân bố tuổi phôi trong nghiên cứu của chúng tôi không đồng đều. Tuổi phôi từ 6,5 đến 7,5 tuần chiếm phần lớn (79,1%) trong tổng số phôi nghiên cứu, trong đó phôi 7 tuần có số lượng nhiều nhất, chiếm 47,3% trong khi phôi 6 tuần chỉ chiếm 3%. Sở dĩ có hiện tượng này là do thời điểm để thực hiện việc giảm phôi - thai thường tiến hành trong giai đoạn 6 - 9 tuần và lý tưởng nhất là 7 tuần \pm 3 ngày – khi phôi không quá bé và không quá lớn.

Tuy nhiên, xét về thời điểm thu thập phôi thì đây lại là giai đoạn phù hợp nhất để thu thập tế bào tiết dopamin – do ở giai đoạn này, các tế bào tiết dopamin đang trong quá trình biệt hóa. Khi quá trình biệt hóa hoàn tất, tế bào

Commented [M36]: Tuổi nào thật hay tuổi ET, bản luận thêm

thường ít có cơ hội sống sót trong quá trình phân lập và nuôi cấy. Theo tác giả Freeman và cộng sự (1991) khi nghiên cứu quá trình sinh sản và di cư của các noron tiết dopamin trên phôi người từ 6,0 đến 13,2 tuần tuổi nhận thấy rằng các tế bào dương tính với marker TH bắt đầu quan sát được ở vùng bụng não giữa từ 5,5 đến 6,5 tuần tuổi. Khoảng 7,0 tuần tuổi, các tế bào có dấu hiệu di cư ra khỏi não giữa. Quá trình phát triển và hình thành mạng lưới noron của các noron tiết dopamin bắt đầu thấy được ở thời điểm 8,0 tuần. Tới 9,0 tuần, quan sát được các noron tiết dopamin tại thể vân, đồng thời, bắt đầu thấy các tế bào giảm biểu hiện dương tính với marker TH tại não giữa vào tuần thứ 10 và mất hoàn toàn vào thời điểm 11,2 tuần [86].

Việc sử dụng nguồn phôi giảm thiểu của các thai phụ làm thụ tinh nhân tạo hoặc thụ tinh ống nghiệm để phân lập tế bào gốc thần kinh phôi phục vụ nuôi cấy tạo noron tiết dopamin chưa được tài liệu nào trên thế giới đề cập tới. Theo chúng tôi, có thể do luật của một số quốc gia trên thế giới chỉ cho phép chuyển từ một đến hai phôi trong một lần chuyển phôi. Trong khi ở Việt Nam, các trung tâm Hỗ trợ sinh sản có thể chuyển từ hai đến bốn phôi nhằm tăng tỷ lệ có thai. Điều này cũng khiến làm tăng tỷ lệ đa thai cho bệnh nhân. Đối với những bệnh nhân đa thai, đặc biệt là trên 2 thai, đều được bác sỹ điều trị tư vấn về nguy cơ và cân nhắc khả năng giảm thiểu thai để tránh tai biến cho mẹ và con. Việc sử dụng các phôi giảm thiểu để phân lập tế bào gốc thần kinh phôi có nhiều ưu điểm có thể kể đến như: biết chính xác tuổi phôi, tuổi phôi giảm thiểu phù hợp với giai đoạn lấy tế bào gốc cho nuôi cấy; phôi được lấy trong môi trường vô khuẩn; mẫu mô tương đối tinh khiết và cuối cùng, đây là sản phẩm sinh học bỏ đi.

4.2.2. Cấu trúc của biểu mô ống thần kinh phôi người 6,5 - 7,5 tuần tuổi

Sau khi phẫu tích được các mảnh mô ống thần kinh, chúng tôi sử dụng một số mảnh để nghiên cứu cấu trúc vi thể của biểu mô thành ống thần kinh. Trên các tiêu bản nhuộm H-E, thành ống thần kinh là biểu mô tầng, lớp nội

Commented [M37]: OK

Commented [M38]: Rà soát

tùy quan sát thấy nhiều tế bào trong quá trình phân chia, lớp áo gồm nhiều hàng tế bào, các tế bào cũng có xu hướng chạy vuông góc với thành não giữa. Các tế bào biểu mô này sẽ có khả năng phát triển thành các loại tế bào khác nhau của mô thần kinh.

Các mảnh mô ống thần kinh sau khi phẫu tích được ủ với enzym Dispase 1,2IU rồi tiếp tục chuyển qua Trypsin – EDTA để tách rời các tế bào của mô thần kinh. Thời gian ủ mẫu với mỗi enzym là 3 phút. Tổng số tế bào trung bình phân lập được của một phôi dao động từ $0,96 \times 10^5$ đến $1,08 \times 10^5$ tế bào. Giữa các nhóm tuổi phôi 6,5 tuần, 7 tuần và 7,5 tuần thì nhóm tuổi phôi 7,5 tuần có số lượng tế bào phân lập được lớn nhất. Những mẫu dung dịch tế bào mà chúng tôi phân lập được đều được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường nuôi cấy tế bào gốc thần kinh M-NECs.

4.2.3. Sự phát triển của các tế bào nuôi cấy và định danh các tế bào sau nuôi cấy

Sau khoảng 2 - 3 ngày nuôi cấy, quan sát dưới kính hiển vi soi nổi thấy các tế bào bắt đầu bám dính và đáy giếng nuôi cấy. Thêm vào đó, một số tế bào biệt hóa thành nơron, xòe nhánh, có xu hướng tỏa ra xung quanh. Số lượng các nơron tăng dần theo thời gian, các nhánh của các nơron dài dần ra và tiếp xúc với nhau. Ở các mẫu phôi 7,5 tuần tuổi khi quan sát ở giai đoạn này thấy được số lượng các tế bào bám đáy cũng như các nơron có xu hướng nhiều hơn. Có thể do số lượng tế bào phân lập được ban đầu cao hơn so với các phôi 6,5 tuần tuổi. Môi trường nuôi cấy được thay lần đầu tiên sau ba ngày và sau đó sẽ được thay cách ngày. Sau khoảng 7 đến 10 ngày, các tế bào phát triển phủ kín đáy giếng nuôi cấy. So với kết quả nuôi cấy tế bào gốc ngoại bì thần kinh trên phôi chuột, chúng tôi nhận thấy rằng: tốc độ tăng sinh của tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi người chậm hơn so với phôi chuột mặc dù mật độ tế bào nuôi cấy ban đầu là tương đương nhau. Nhận định này của

chúng tôi cũng tương đồng với nhận định của nhóm tác giả Ribeiro và cs (2013). Để cải thiện khả năng nuôi cấy tế bào gốc thần kinh phôi người, nhóm tác giả đã bổ sung yếu tố Wnt5a trong môi trường nuôi cấy tế bào. Đây là yếu tố tham gia vào quá trình biệt hóa nơron tiết dopamin *in vivo*. Theo đó, các tế bào sần não giữa phôi người sau 2 tuần nuôi cấy trong môi trường “truyền thống” – có EGF và FGF2 sẽ tiếp tục được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung Wnt5a 4 ngày. Kết quả cho thấy số lượng nơron TH (+) ở nhóm được bổ sung Wnt5a tăng gấp 3,3 lần so với nhóm không bổ sung Wnt5a. Hơn nữa, việc sử dụng Wnt5a còn giúp các nơron biệt hóa tốt hơn về mặt hình thái như sợi trục và các sợi nhánh có sự trưởng thành tốt hơn với nhiều synap có phản ứng điện sinh học hay tăng khả năng biệt hóa của các tế bào tiền thân thành các nguyên bào thần kinh cũng như tăng số lượng nơron tiết dopamin trưởng thành [110].

Quan sát hình ảnh tế bào nuôi cấy ở mức độ siêu vi, chúng tôi thấy một số nguyên bào thần kinh với đặc điểm: tỷ lệ nhân/ bào tương lớn, màng nhân có vết lõm trên nhân điển hình; một số tế bào khác đang ở trạng thái hoạt động mạnh với hình ảnh lưới nội bào có hạt giãn rộng, có nhánh bào tương ngắn. Ngoài ra, chúng tôi còn bắt gặp hình ảnh cắt ngang qua các trụ trục của nơron được bọc phía ngoài bởi tế bào **ít nhánh (hình 3.26)**. Cấu trúc này tương lai sẽ tạo thành các sợi thần kinh có myelin. Tuy nhiên, chúng tôi chưa quan sát thấy hình ảnh synap giữa các nơron. Trên các mẫu nhuộm Cajal II, toàn bộ các tế bào đều bắt màu nâu. Điều này chứng tỏ các tế bào trong mẫu nuôi cấy là các tế bào thuộc mô thần kinh.

Để nhận định nguồn gốc cũng như giai đoạn biệt hóa của các tế bào nuôi cấy, chúng tôi tiến hành nhuộm hóa mô miễn dịch mẫu tế bào nuôi cấy với hai marker: Vimentin và TH.

Commented [M39]: Kết nối với phần KQ?

Trong nghiên cứu này, chúng tôi quan sát thấy xơ Vimentin ở hầu hết các tế bào nuôi cấy. Mức độ dương tính của Vimentin không thấy sự khác biệt giữa các tuần tuổi phôi. Khi nhuộm kháng thể TH, ở các mẫu nuôi cấy chúng tôi đều thấy xuất hiện các tế bào dương tính với marker TH - dấu hiệu của tế bào tiết dopamin. Như vậy, trong biểu mô ống thần kinh có các tế bào tiền thân tiết dopamin, sau khi nuôi cấy trong môi trường thích hợp, các tế bào tiền thân đã biệt hóa thành noron tiết dopamin như đã được “cam kết”. Đếm số lượng tế bào dương tính với marker TH trong giếng nuôi cấy ở các thời điểm nuôi cấy khác nhau, chúng tôi thấy được ở cả ba độ tuổi phôi, số lượng noron TH (+) tăng dần theo giai đoạn nuôi cấy. Năm ngày sau nuôi cấy đã thấy xuất hiện các tế bào TH (+). Tuy nhiên, số lượng tế bào TH (+) thời điểm này còn ít, nằm thưa thớt, rải khắp giếng nuôi cấy và ở rìa cụm tế bào “dạng noron”. Số lượng tế bào dương tính với TH tăng dần sau 7 - 10 ngày nuôi cấy. Điều này cũng cho thấy trong mẫu tế bào gốc thần kinh phôi người giảm thiểu thu thập được có một lượng không nhỏ các tế bào tiền thân tiết dopamin.

Tác giả Hebsgaard và cộng sự (2009) khi nghiên cứu về biểu hiện của các marker nhận biết tế bào gốc và tế bào đầu dòng của noron tiết dopamin trên phôi người giai đoạn từ 6 đến 7,5 tuần cũng chỉ ra rằng marker Vimentin dương tính nhiều tại sán não giữa phôi. Chính vùng này ở những giai đoạn phôi lớn hơn, là nơi khởi nguồn của noron tiết dopamin, biểu hiện bằng việc các tế bào sẽ dương tính nhiều với marker TH ở giai đoạn tuổi phôi lớn hơn. Nhận định này còn được khẳng định thêm bằng việc các tác giả đã sử dụng thêm marker Nestin và GFAP để nhuộm đồng thời với Vimentin. Kết quả không ngoài dự đoán khi Vimentin và Nestin cùng dương tính trên những tế bào sán não giữa ở giai đoạn sớm - gợi ý tới sự tồn tại của tế bào gốc thần kinh. Trong khi không thấy biểu hiện dương tính với GFAP - là marker đánh dấu noron trưởng thành ở giai đoạn này. Tiếp tục sử dụng marker Lmx1a để

nhận diện các tế bào đầu dòng tiết dopamin, nhóm tác giả nhận thấy rằng Lmx1a không chỉ giới hạn ở các tế bào ở sàn não giữa mà còn biểu hiện trên các tế bào não trước phôi. Điều này chứng tỏ các noron tiết dopamin vẫn tiếp tục biệt hóa trong quá trình di cư tới những vị trí đã được cam kết của mình trên vỏ não [87].

Nghiên cứu này của chúng tôi như để tiếp tục khẳng định nhận định này của nhóm tác giả khi nhận thấy rằng hoàn toàn có khả năng sử dụng các tế bào gốc thần kinh lấy từ ống thần kinh phôi người giảm thiểu để nuôi cấy tạo noron tiết dopamin trên thực nghiệm. Đây có thể coi là nguồn cung cấp tế bào lý tưởng sử dụng để tạo noron tiết dopamin điều trị bệnh Parkinson trong tương lai.

4.3. Hiệu quả nuôi cấy tạo noron tiết dopamin

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng marker TH để xác định sự tồn tại của các noron tiết dopamin trong mẫu tế bào sau nuôi cấy. Trên các mẫu nuôi cấy của cả chuột và người, chúng tôi đều quan sát được sự có mặt của các tế bào TH (+). Những tế bào này có xu hướng tăng dần theo thời gian nuôi cấy 5 ngày, 7 ngày và 10 ngày (Bảng 3.9 và Biểu đồ 3.3).

Theo nhiều tác giả ghi nhận thì sàn não giữa phôi là nơi tập trung một lượng lớn các tế bào tiền thân của noron tiết dopamin, có khả năng tăng sinh và biệt hóa thành noron tiết dopamin *in vitro*. Tuy nhiên, tỷ lệ tạo được noron tiết dopamin trong các mẫu nuôi cấy khác nhau rất nhiều giữa các nghiên cứu, dao động từ 3 – 18% [88], [111]. Sở dĩ có sự khác nhau như vậy là do không đồng nhất về môi trường nuôi cấy, tuổi phôi sử dụng để nuôi cấy hay phương pháp nuôi cấy...

Trong nghiên cứu của tác giả McKay và cộng sự (1998) nhận thấy rằng nếu bổ sung 10% FBS vào môi trường nuôi cấy, sẽ cho tỷ lệ thu hồi noron tiết dopamin cao hơn so với nhóm không bổ sung FBS (14,1 % so với 2,9 %);

Hơn nữa, tiếp tục nghiên cứu lợi ích của việc sử dụng bFGF trong môi trường nuôi cấy, nhóm tác giả cũng thu được tỷ lệ noron tiết dopamin cao hơn so với nhóm không bổ sung bFGF (18,4 % so với 5,6%). Tác giả Stull và cs. (2002) lại đưa ra ý tưởng nghiên cứu việc sử dụng các chất chống oxy hóa trong môi trường nhằm mục đích bảo vệ các noron nuôi cấy, chống lại các stress oxy hóa. Kết quả thu được không nằm ngoài mong đợi khi nhóm tác giả thấy rằng việc bổ sung các chất chống oxy hóa như: vitamin E, Selenite, melatonin, epigallocatechin galatte (trong trà xanh) đều có tác dụng bảo vệ các noron nuôi cấy như: kéo dài khả năng sống của noron trong môi trường nuôi cấy (ít nhất 2 ngày so với nhóm không sử dụng). Số lượng noron tiết dopamin ở nhóm không sử dụng chất chống oxy hóa chỉ bằng một phần ba so với nhóm có sử dụng chất chống oxy hóa trong môi trường nuôi cấy [90].

Nghiên cứu này của tác giả Stull và cs. không chỉ có ý nghĩa cải thiện tỷ lệ thu hồi noron tiết dopamin *in vitro* mà còn có ý nghĩa trong việc cải thiện tỷ lệ sống của các noron tiết dopamin sau khi cấy ghép [90].

Về tuổi phôi nuôi cấy, đối với phôi chuột cống, tuổi phôi thích hợp để nuôi cấy tế bào gốc não giữa là từ E10 - E14 do các tế bào sản não giữa trong giai đoạn này đã bắt đầu có biểu hiện với Lmx1a - là marker đánh dấu tế bào đầu dòng tiết dopamin cũng như là yếu tố chính tham gia vào quá trình phân chia và biệt hóa của noron tiết dopamin. Biểu hiện Lmx1a tăng dần đến giai đoạn E14. Ở tuổi phôi muộn hơn, bắt đầu từ E15, biểu hiện của marker Lmx1a giảm dần và thay vào đó là các marker khác đánh dấu sự trưởng thành của noron. Do đó, tỷ lệ thu hồi noron tiết dopamin nuôi cấy giảm ở tuổi phôi sau 15 tuần [91]. Trên phôi người, không có nhiều nghiên cứu về tuổi phôi như phôi trên chuột. Một trong số ít nghiên cứu tìm được là của tác giả Hebsgaard và cộng sự (2009) [87].

Nhóm tác giả nhận thấy rằng các tế bào đầu dòng tiết dopamin cũng bắt đầu biểu hiện marker Lmx1a từ khoảng 6 tuần tuổi và tiếp tục kéo dài tới sau 10 tuần. Tỷ lệ tế bào dương tính với marker Lmx1a không có sự khác biệt giữa tuổi phôi 6 đến 7,5 tuần tuổi. Theo bảng phân loại tuổi phôi của Carnegie, tương ứng với tuổi phôi chuột cống 10 - 14 ngày là phôi người giai đoạn 44 - 54 ngày (tương đương 6 - 8 tuần). Như vậy, quá trình biệt hóa noron tiết dopamin trên phôi người được khởi đầu khá tương đương với phôi chuột tuy nhiên có vẻ kéo dài hơn về thời gian.

Trong nghiên cứu này, môi trường nuôi cấy được sử dụng là môi trường cơ bản và đều được bổ sung bFGF, FBS hay EGF và chất chống oxy hóa. Việc bổ sung FGF trong môi trường nuôi cấy đã được nhóm tác giả Bouvier và cs (1995) chứng minh giúp tăng sinh số lượng tế bào gốc mô thần kinh và làm chậm quá trình biệt hóa của chúng, sự trì hoãn này có thể lên tới 8 ngày trên thực nghiệm [61]. Thêm vào đó, tác giả Nelson (2008) và tác giả Schwindt (2009) cũng đưa ra gợi ý rằng bổ sung EGF nồng độ thấp hoặc trung bình (20ng/ml) góp phần tăng tỷ lệ biệt hóa thành noron tiết dopamin trong nuôi cấy [66], [67]. Tỷ lệ tế bào dương tính với marker TH ở phôi chuột giai đoạn E12,5 - E13,5 trong nghiên cứu này khoảng $5,38 \pm 3,56 \%$, thấp hơn so với công bố của tác giả McKay và cs. năm 1998 ($18,4 \pm 5,1 \%$) với cùng điều kiện môi trường (bổ sung bFGF và FBS) và thời gian nuôi cấy. Sự khác nhau này có thể lý giải do trong nghiên cứu trên, tác giả sử dụng phương pháp nuôi cấy lớp đơn, trong khi chúng tôi sử dụng phương pháp nuôi cấy tạo cụm. Tỷ lệ noron dương tính với TH của chúng tôi chỉ đếm được trên các lớp đơn tế bào, còn phần nhiều lượng noron tiết dopamin có mặt trong các cụm tế bào chúng tôi không đếm được tỷ lệ riêng lẻ. Tuy nhiên, tỷ lệ cụm tế bào có noron TH (+) của chúng tôi lại khá nhiều, lên tới $37,09 \pm 6,53 \%$. Ở phôi chuột, tỷ lệ này có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở hai nhóm tuổi phôi: giai

Commented [D40]: Bàn luận sâu hơn về tác dụng của những chất này

đoạn sớm (E10,5 – E11,5) và giai đoạn muộn (E12,5 – E13,5). Trong khi đó, ở phôi người, số lượng noron TH (+) không có sự khác biệt giữa các tuổi phôi khác nhau (6,5 tuần; 7 tuần và 7,5 tuần) ở cùng thời điểm nuôi cấy.

Như vậy, có thể thấy rằng, một mặt dù thu được các noron tiết dopamin là nguồn tế bào lý tưởng cho điều trị bệnh Parkinson bằng liệu pháp tế bào gốc thì mặt khác, phương pháp này cũng biểu hiện những hạn chế nhất định. Một trong những hạn chế có thể thấy được đó là tỷ lệ thu hồi noron tiết dopamin – dương tính với TH không cao, có thể ảnh hưởng tới hiệu quả điều trị sau này. Chính vì vậy, rất nhiều các tác giả đã tập trung vào những biện pháp khác nhau để khắc phục nhược điểm này. Trong đó, có thể ghi nhận hai hướng tiếp cận chính: một là tiếp tục cải thiện kỹ thuật nuôi cấy tế bào gốc thần kinh phôi; hai là tìm ra những nguồn tế bào mới giúp tối ưu lượng noron tiết dopamin thu được.

Đối với vấn đề cải thiện kỹ thuật nuôi cấy, bên cạnh nhiều nghiên cứu đã được đề cập tới như việc bổ sung các yếu tố tăng trưởng (EGF, bFGF, insuline...); bổ sung các chất chống oxy hóa (vitamin E, Selenite, melatonin, epigallocatechin galatte...); hay bổ sung các chất làm chậm quá trình chết theo chương trình của các tế bào thần kinh (caspase...) thì gần đây, trong nghiên cứu của nhóm tác giả Hedlund và cộng sự (2016) [91], các tác giả đã tập trung vào việc sử dụng dopamin đối vận (Haloperidol) để thúc đẩy quá trình tăng sinh và biệt hóa của noron tiết dopamin. Trong nghiên cứu này, khi sử dụng Haloperidol cho chuột, nhóm tác giả đều nhận thấy có sự tăng biểu hiện của các tế bào đầu dòng tiết dopamin trên cả *in vivo* và *in vitro*. Cụ thể hơn, với nhóm chuột cái được sử dụng Haloperidol trước khi mang thai, sau đó, tiến hành đếm các tế bào dương tính với marker BrdU/GFP trên ống thần kinh phôi chuột giai đoạn E11,5 – E17,5 ngày, nhận thấy có sự tăng số lượng tế bào gốc thần kinh phôi so với nhóm không sử dụng. Đặc biệt, vị trí có sự

Commented [M41]: Việt hoá

thay đổi đáng kể này ở vùng bụng não giữa – nơi khởi nguồn của các noron tiết dopamin. Mức độ tăng của các tế bào được nhóm tác giả ước lượng lên tới khoảng 1,5 lần so với nhóm chứng. Không chỉ trên *in vivo*, nhóm tác giả còn quan sát được có sự tăng số lượng tế bào gốc thần kinh cũng như tế bào đầu dòng tiết dopamin trong quá trình nuôi cấy tế bào gốc phôi trên *in vitro*. Cũng tiến hành so sánh nhóm sử dụng Haloperidol với nhóm không sử dụng Haloperidol hay nhóm sử dụng dopamin agonist đều cho thấy có sự tăng biểu hiện tế bào gốc dương tính với marker BrdU và tỷ lệ noron TH (+) sau quá trình nuôi cấy. Giả thiết được các tác giả đề cập tới đó là có thể việc sử dụng dopamin antagonist góp phần tăng biểu hiện của tín hiệu dẫn truyền như Lmx1a. Lmx1a được cho là yếu tố điều hòa chính trong việc cam kết biệt hóa thành các noron tiết dopamin từ các tế bào gốc thần kinh não giữa. Nhiều thí nghiệm trên chuột đã quan sát được hiện tượng giảm số lượng noron tiết dopamin ở não chuột trưởng thành khi bất hoạt Lmx1a [112]. Tuy vậy, để khẳng định được điều này, cần thêm nhiều nghiên cứu sâu hơn trên thực nghiệm.

Giải pháp tiếp theo là sử dụng các nguồn tế bào khác thay thế cho tế bào gốc não giữa được rất nhiều tác giả hướng đến. Trong đó, nguồn tế bào gốc phôi và tế bào gốc cảm ứng được nhắc đến nhiều nhất do đây đều là những tế bào gốc đa tiềm năng, có khả năng tăng sinh mạnh mẽ cũng như biệt hóa thành hầu hết các tế bào của cơ thể, trong đó có noron tiết dopamin.

Đầu tiên có thể kể tới là tế bào gốc phôi được phân lập từ cực phôi của phôi nang. Năm 2008, tác giả Cho đã báo cáo biệt hóa thành công noron tiết dopamin từ tế bào gốc phôi người với tỷ lệ tế bào dương tính với marker TH sau nuôi cấy lên tới 86%. Những tế bào này có những đặc tính của noron trên hình ảnh vi thể cũng như khi sử dụng các marker phân tử: Oct4, Pax6, Nurr1, Pitx3 để định danh [113], [114]. Mặc dù cho tỷ lệ noron tiết dopamin cao hơn

rất nhiều so với các tế bào gốc thần kinh phôi được phân lập từ sần não giữa song cho tới hiện nay khả năng ứng dụng của dòng tế bào này mới chỉ dừng lại ở các thử nghiệm trên động vật. Hai trong số nhiều lý do phải kể tới đó là khả năng sinh u của dòng tế bào này khá cao và tỷ lệ sống của các tế bào sau ghép lại thấp. Có thể kể đến như báo cáo của tác giả Brederlau và cộng sự (2006) khi ghép hỗn hợp tế bào gốc phôi người sau nuôi cấy biệt hóa tạo neuron tiết dopamin ở các thời điểm 16, 20 và 23 ngày vào não chuột Parkinson nhằm đánh giá khả năng sống và phát triển của các mẫu trong mô chủ. Sau ghép, các chuột ở nhóm 16 ngày có tỷ lệ hình thành khối u cao hơn so với ở nhóm 20 và 23 ngày [95].

Thứ hai là tế bào gốc cảm ứng (iPSC) được tái chương trình từ tế bào sinh dưỡng của chính bệnh nhân Parkinson đã được báo cáo thành công [96]. Thông thường, đây là những nguyên bào sợi được sinh thiết từ da người bệnh sau đó được tái chương trình lại để trở thành tế bào gốc đa tiềm năng. Sử dụng môi trường biệt hóa giống với tế bào gốc phôi, các tác giả đã thu được nhiều neuron tiết dopamin trên thực nghiệm [115]. Việc sử dụng các iPSCs trong điều trị Parkinson được kỳ vọng mang lại nhiều lợi ích cho bệnh nhân. Đầu tiên, có thể kể đến đó là các tế bào sử dụng là tế bào của chính người bệnh. Do đó sẽ tránh được các rào cản miễn dịch so với việc sử dụng các tế bào đồng loại. Bệnh nhân không phải sử dụng hoặc sử dụng thuốc ức chế miễn dịch với liều rất thấp, vì vậy cũng tránh được các tác dụng phụ của thuốc ức chế miễn dịch. Thứ hai, sử dụng iPSCs cũng giúp bệnh nhân tránh được các rào cản về tâm lý và tín ngưỡng so với việc sử dụng các tế bào có nguồn gốc phôi hoặc thai. Tuy nhiên, mặc dù nhiều lợi ích là vậy, nhưng sử dụng các tế bào này có thật sự an toàn hay không và các tế bào được chuyển gen trên nền bệnh lý có sẵn có hạn chế gì vẫn là câu hỏi lớn cho các nhà khoa học.

Commented [M42]: Chốt ý đến KL như trên đây

Do đó, trong khi chờ thêm nhiều nghiên cứu để tìm nguồn tế bào ưu việt nhất sử dụng nuôi cấy tạo neuron tiết dopamin thì tế bào gốc não giữa phôi vẫn là lựa chọn hợp lý và an toàn cho tới thời điểm hiện tại. Để tiếp nối ý tưởng tối đa hóa lượng neuron tiết dopamin nuôi cấy phục vụ cấy ghép, nhóm nghiên cứu đã lựa chọn thử sức với giải pháp bảo quản lạnh tế bào – hy vọng sẽ mang lại nguồn cung cấp dồi dào và ổn định phục vụ điều trị.

KẾT LUẬN

Từ kết quả thu được của nghiên cứu phân lập, tăng sinh và biệt hóa tế bào gốc thần kinh phôi – thai thành tế bào dạng tiết dopamin, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Phân lập, tăng sinh, biệt hóa và bảo quản lạnh thành công tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi chuột

- Phân lập và nuôi cấy tăng sinh tốt nhất ở tuổi phôi E12,5 –E13,5. Tỷ lệ phân lập mẫu mô sần não giữa thành công 100% với số lượng tế bào sau phân lập khoảng $1,34 \pm 0,048 \times 10^5$ tế bào.

- Các tế bào sau nuôi cấy là tế bào của mô thần kinh, nhiều tế bào có các nhánh bào tương tỏa ra xung quanh liên hệ với các tế bào gần kề. Sử dụng marker TH để đánh dấu neuron tiết dopamin quan sát thấy nhiều tế bào dương tính với TH trong mẫu sau nuôi cấy. Tỷ lệ biệt hóa tạo neuron TH (+) dao động $5,38 \pm 3,56\%$ trong các mẫu tế bào sau nuôi cấy.

- Bảo quản lạnh các tế bào gốc thần kinh phôi trong môi trường DMEM 10% DMSO cho tỷ lệ sống trung bình là 64,9%. Các tế bào ở giai đoạn sau phân lập hoặc sau nuôi cấy sơ cấp cho tỷ lệ sống sau bảo quản lạnh cao hơn so với việc bảo quản lạnh ở giai đoạn nuôi cấy thứ cấp.

2. Phân lập, tăng sinh và biệt hóa được tế bào gốc thần kinh phôi người

- Có thể sử dụng ống thần kinh phôi của phôi người lấy được từ kỹ thuật giảm thiểu thai trong điều trị hỗ trợ sinh sản để nuôi cấy tạo neuron tiết dopamin.

- Số tế bào thu được sau phân lập từ một phôi ở tuần 6,5 là $0,96 \pm 0,14 \times 10^5$, phôi tuần thứ 7 là $1,02 \pm 0,17 \times 10^5$, phôi tuần thứ 7,5 là $1,08 \pm 0,2 \times 10^5$ với tỷ lệ sống tương ứng là $86,1 \pm 3,7\%$; $84,7 \pm 4\%$ và $85,6 \pm 5\%$. Không có sự khác biệt về số lượng tế bào và tỷ lệ tế bào sống phân lập được theo tuổi phôi từ 6,5 đến 7,5 tuần với $p = 0,404$.

- Các tế bào sau nuôi cấy là tế bào của mô thần kinh, có các nhánh bào tương tỏa ra xung quanh liên hệ với các tế bào gần kề.

Commented [M43]: Chưa rõ, cần viết lại

Commented [M44]: Bám sát mục tiêu

Commented [M45]: Phân lập ra sao, tăng sinh thế nào, kết quả biệt hoá?

Commented [M46]: Nên bổ sung MT này

- Số lượng neuron TH(+) sau 5 ngày và 10 ngày nuôi cấy tăng từ $15,9 \pm 4,8$ tế bào lên $107,6 \pm 10,04$ tế bào ở tuổi phôi 6,5 tuần; từ $18,4 \pm 5,7$ tế bào lên $114,7 \pm 16,4$ tế bào ở tuổi phôi 7 tuần và từ $17,4 \pm 5,6$ tế bào lên $111,8 \pm 14,4$ tế bào ở tuổi phôi 7,5 tuần.

KHUYẾN NGHỊ VÀ HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP

(1) Về khía cạnh nghiên cứu trên phôi người, chúng tôi nhận thấy còn một vài khó khăn trong khâu thu thập phôi cũng như phân lập các tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi do đặc điểm không toàn vẹn của các phôi sau giảm thiểu. Chính vì vậy, cần nhiều nghiên cứu hơn nữa trên phôi người để hoàn thiện quy trình nuôi cấy và tăng tỷ lệ tạo neuron tiết dopamin.

(2) Mục tiêu của nghiên cứu là nuôi cấy để tạo các neuron tiết dopamin phục vụ điều trị bệnh Parkinson. Chính vì vậy cần thêm những nghiên cứu sâu hơn về thử nghiệm điều trị trên động vật cũng như trên người để đánh giá khả năng tồn tại của tế bào sau nuôi cấy trên não vật chủ.

Commented [M47]: Và hướng NC tiếp theo

Commented [M48]: Khuyến nghị gì rút ra từ NC này?

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Nguyễn Thị Bình, **Nguyễn Phúc Hoàn**, Nguyễn Mạnh Hà, Đào Thị Thúy Phượng (2016). Phân lập và nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc ngoại bì thần kinh não giữa phôi chuột cống trắng và phôi người dùng điều trị bệnh Parkinson thực nghiệm. *Tạp chí Y học Việt Nam, số chuyên đề*, tháng 9/2016. tr. 197-203.
2. Nguyễn Thị Bình, **Nguyễn Phúc Hoàn**, Nguyễn Thanh Hoa, Nguyễn Mạnh Hà (2017). Định danh tế bào đầu dòng tiết Dopamin trên phôi chuột cống trắng Marker Vimentin và thyroxin hydroxylase. *Tạp chí Y dược học quân sự, số chuyên đề hình thái học*, 42, tr. 179-186.
3. **Nguyễn Phúc Hoàn**, Nguyễn Thị Bình, Nguyễn Mạnh Hà (2017). Nuôi cấy tăng sinh và bảo quản lạnh tế bào gốc ngoại bì thần kinh não giữa phôi chuột cống trắng. *Tạp chí Y dược học quân sự, số chuyên đề hình thái học*, 42, tr. 188-195.
4. Nguyễn Thanh Hoa, Nguyễn Thị Bình, **Nguyễn Phúc Hoàn**, Nguyễn Mạnh Hà (2017). Cấu trúc siêu vi của tế bào gốc trung mô não giữa chuột cống trắng nuôi cấy. *Tạp chí Y dược học quân sự, số chuyên đề hình thái học*, 42, tr. 213-218.
5. **Nguyễn Phúc Hoàn**, Nguyễn Hoàng, Nguyễn Thị Bình, Nguyễn Khang Sơn, Nguyễn Thanh Hoa, Đào Thị Thúy Phượng, Đỗ Thùy Hương, Nguyễn Mạnh Hà (2018). Phân lập, nuôi cấy tế bào gốc ngoại bì thần kinh phôi chuột cống trắng điều trị bệnh Parkinson thực nghiệm. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, 110(1), tr. 1-9.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Varanese, S., et al. (2011). Treatment of advanced Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*, **2010**: 480260.
2. Freed, W.J. (1988). Adrenal medulla grafts in animals. *Science*, **241**(4863): 275.
3. Dezawa, M., et al. (2004). Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest*, **113**(12): 1701-10.
4. Wernig, M., et al. (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**(15): 5856-61.
5. Nguyễn, V.C. (2011), *Thần kinh học*. Bệnh Parkinson. Hà Nội: Nhà xuất bản Y học.
6. Han, F., et al. (2015). Development of stem cell-based therapy for Parkinson's disease. *Transl Neurodegener*, **4**: 16.
7. Svendsen, C.N., A. Bhattacharyya, and Y.T. Tai (2001). Neurons from stem cells: preventing an identity crisis. *Nat Rev Neurosci*, **2**(11): 831-4.
8. Clarke, D.L., et al. (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. *Science*, **288**(5471): 1660-3.
9. Hardesty, I. (1904). On the development and nature of the Neuroglia. *American Journal of Anatomy*, **3**(3).
10. Nelander, J., J.B. Hebsgaard, and M. Parmar (2009). Organization of the human embryonic ventral mesencephalon. *Gene Expr Patterns*, **9**(8): 555-61.

11. Rubenstein, M., et al. (2009). Regenerative patterning in Swarm Robots: mutual benefits of research in robotics and stem cell biology. *Int J Dev Biol*, **53**(5-6): 869-81.
12. Perlow, M.J., et al. (1979). Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science*, **204**(4393): 643-7.
13. Bjorklund, A., R.H. Schmidt, and U. Stenevi (1980). Functional reinnervation of the neostriatum in the adult rat by use of intraparenchymal grafting of dissociated cell suspensions from the substantia nigra. *Cell Tissue Res*, **212**(1): 39-45.
14. Madrazo, I., et al. (1988). Transplantation of fetal substantia nigra and adrenal medulla to the caudate nucleus in two patients with Parkinson's disease. *N Engl J Med*, **318**(1): 51.
15. Lindvall, O., et al. (1990). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science*, **247**(4942): 574-7.
16. Olanow, C.W., et al. (2003). A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, **54**(3): 403-14.
17. Gritti, A., et al. (2009). Effects of developmental age, brain region, and time in culture on long-term proliferation and multipotency of neural stem cell populations. *J Comp Neurol*, **517**(3): 333-49.
18. Svendsen, C.N., et al. (1997). Restricted growth potential of rat neural precursors as compared to mouse. *Brain Res Dev Brain Res*, **99**(2): 253-8.
19. Von Visger, J.R., et al. (1994). Differentiation and maturation of astrocytes derived from neuroepithelial progenitor cells in culture. *Exp Neurol*, **128**(1): 34-40.

20. Kirschenbaum, B., et al. (1994). In vitro neuronal production and differentiation by precursor cells derived from the adult human forebrain. *Cereb Cortex*, **4**(6): 576-89.
21. Reynolds, B.A. and S. Weiss (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, **255**(5052): 1707-10.
22. Lois, C. and A. Alvarez-Buylla (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**(5): 2074-7.
23. Seaberg, R.M. and D. van der Kooy (2002). Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci*, **22**(5): 1784-93.
24. Xu, Y., et al. (2003). Isolation of neural stem cells from the forebrain of deceased early postnatal and adult rats with protracted post-mortem intervals. *J Neurosci Res*, **74**(4): 533-40.
25. Leonard, B.W., et al. (2009). Subventricular zone neural progenitors from rapid brain autopsies of elderly subjects with and without neurodegenerative disease. *J Comp Neurol*, **515**(3): 269-94.
26. Rutka, J.T., et al. (1988). The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. *J Neurosurg*, **69**(2): 155-70.
27. Reynolds, B.A., W. Tetzlaff, and S. Weiss (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*, **12**(11): 4565-74.
28. Kukekov, V.G., et al. (1999). Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol*, **156**(2): 333-44.

29. Kirschenbaum, B. and S.A. Goldman (1995). Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(1): 210-4.
30. Windrem, M.S., et al. (2004). Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain. *Nat Med*, **10**(1): 93-7.
31. Wang, S., et al. (2000). Promoter-based isolation and fluorescence-activated sorting of mitotic neuronal progenitor cells from the adult mammalian ependymal/subependymal zone. *Dev Neurosci*, **22**(1-2): 167-76.
32. Roy, N.S., et al. (2000). Promoter-targeted selection and isolation of neural progenitor cells from the adult human ventricular zone. *J Neurosci Res*, **59**(3): 321-31.
33. Babu, H., et al. (2007). Enriched monolayer precursor cell cultures from micro-dissected adult mouse dentate gyrus yield functional granule cell-like neurons. *PLoS One*, **2**(4): e388.
34. Weiss, S., et al. (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci*, **16**(23): 7599-609.
35. Gritti, A., et al. (1995). Basic fibroblast growth factor supports the proliferation of epidermal growth factor-generated neuronal precursor cells of the adult mouse CNS. *Neurosci Lett*, **185**(3): 151-4.
36. Uchida, N., et al. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(26): 14720-5.
37. Svendsen, C.N., et al. (1998). A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells. *J Neurosci Methods*, **85**(2): 141-52.

38. Maric, D., I. Maric, and J.L. Barker (1998). Buoyant density gradient fractionation and flow cytometric analysis of embryonic rat cortical neurons and progenitor cells. *Methods*, **16**(3): 247-59.
39. Corver, W.E., et al. (1995). Limited loss of nine tumor-associated surface antigenic determinants after tryptic cell dissociation. *Cytometry*, **19**(3): 267-72.
40. Panchision, D.M., et al. (2007). Optimized flow cytometric analysis of central nervous system tissue reveals novel functional relationships among cells expressing CD133, CD15, and CD24. *Stem Cells*, **25**(6): 1560-70.
41. Gage, F.H., et al. (1995). Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(25): 11879-83.
42. Ciccolini, F. and C.N. Svendsen (1998). Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striatal precursor cells: identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2. *J Neurosci*, **18**(19): 7869-80.
43. Kukekov, V.G., et al. (1997). A nestin-negative precursor cell from the adult mouse brain gives rise to neurons and glia. *Glia*, **21**(4): 399-407.
44. Rietze, R.L., et al. (2001). Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature*, **412**(6848): 736-9.
45. McCarthy, K.D. and J. de Vellis (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*, **85**(3): 890-902.
46. Chen, Y., et al. (2007). Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nat Protoc*, **2**(5): 1044-51.

47. Lim, D.A. and A. Alvarez-Buylla (1999). Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(13): 7526-31.
48. Palmer, T.D., et al. (1999). Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci*, **19**(19): 8487-97.
49. Chen, K., S.M. Hughes, and B. Connor (2007). Neural progenitor cells derived from the adult rat subventricular zone: characterization and transplantation. *Cell Transplant*, **16**(8): 799-810.
50. Johansson, C.B., et al. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*, **96**(1): 25-34.
51. Ericsson, R.J. (1977). Isolation and storage of progressively motile human sperm. *Andrologia*, **9**(1): 111-4.
52. Gard, A.L. and S.E. Pfeiffer (1993). Glial cell mitogens bFGF and PDGF differentially regulate development of O4+GalC- oligodendrocyte progenitors. *Dev Biol*, **159**(2): 618-30.
53. Wu, C., et al. (2009). Beta4 tubulin identifies a primitive cell source for oligodendrocytes in the mammalian brain. *J Neurosci*, **29**(24): 7649-57.
54. Mayer-Proschel, M. (2001). Isolation and generation of oligodendrocytes by immunopanning. *Curr Protoc Neurosci*, **Chapter 3**: Unit 3 13.
55. Barres, B.A., et al. (1992). Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*, **70**(1): 31-46.
56. Ben-Hur, T., et al. (1998). Growth and fate of PSA-NCAM+ precursors of the postnatal brain. *J Neurosci*, **18**(15): 5777-88.
57. Schmandt, T., et al. (2005). High-purity lineage selection of embryonic stem cell-derived neurons. *Stem Cells Dev*, **14**(1): 55-64.
58. Ornitz, D.M. and N. Itoh (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol*, **2**(3): REVIEWS3005.

59. Tropepe, V., et al. (1999). Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol*, **208**(1): 166-88.
60. Martens, D.J., V. Tropepe, and D. van Der Kooy (2000). Separate proliferation kinetics of fibroblast growth factor-responsive and epidermal growth factor-responsive neural stem cells within the embryonic forebrain germinal zone. *J Neurosci*, **20**(3): 1085-95.
61. Bouvier, M.M. and C. Mytilineou (1995). Basic fibroblast growth factor increases division and delays differentiation of dopamine precursors in vitro. *J Neurosci*, **15**(11): 7141-9.
62. Crossley, P.H. and G.R. Martin (1995). The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development*, **121**(2): 439-51.
63. Grothe, C., et al. (2004). Fibroblast growth factor-20 promotes the differentiation of Nurr1-overexpressing neural stem cells into tyrosine hydroxylase-positive neurons. *Neurobiol Dis*, **17**(2): 163-70.
64. Correia, A.S., et al. (2008). Growth factors and feeder cells promote differentiation of human embryonic stem cells into dopaminergic neurons: a novel role for fibroblast growth factor-20. *Front Neurosci*, **2**(1): 26-34.
65. Maric, D., et al. (2003). Prospective cell sorting of embryonic rat neural stem cells and neuronal and glial progenitors reveals selective effects of basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor on self-renewal and differentiation. *J Neurosci*, **23**(1): 240-51.
66. Nelson, A.D., M. Suzuki, and C.N. Svendsen (2008). A high concentration of epidermal growth factor increases the growth and survival of neurogenic radial glial cells within human neurosphere cultures. *Stem Cells*, **26**(2): 348-55.

67. Schwindt, T.T., et al. (2009). Effects of FGF-2 and EGF removal on the differentiation of mouse neural precursor cells. *An Acad Bras Cienc*, **81**(3): 443-52.
68. Rolletschek, A., et al. (2001). Differentiation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons is enhanced by survival-promoting factors. *Mech Dev*, **105**(1-2): 93-104.
69. Zigler, J.S., Jr., et al. (1985). Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed HEPES-containing culture medium. *In Vitro Cell Dev Biol*, **21**(5): 282-7.
70. Bez, A., et al. (2003). Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res*, **993**(1-2): 18-29.
71. Malatesta, P., I. Appolloni, and F. Calzolari (2008). Radial glia and neural stem cells. *Cell Tissue Res*, **331**(1): 165-78.
72. Butler, H.J., B.H.; (1987), *An Atlas for Staging Mammalian and Chick Embryos*. Florida: Boca Ratón.
73. Sawamoto, K., et al. (2001). Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene. *J Neurosci*, **21**(11): 3895-903.
74. Meyer, A.K., et al. (2012). Fetal mouse mesencephalic NPCs generate dopaminergic neurons from post-mitotic precursors and maintain long-term neural but not dopaminergic potential in vitro. *Brain Res*, **1474**: 8-18.
75. Hegarty, S.V., A.M. Sullivan, and G.W. O'Keefe (2013). Midbrain dopaminergic neurons: a review of the molecular circuitry that regulates their development. *Dev Biol*, **379**(2): 123-38.
76. Gates, M.A., et al. (2006). Re-examining the ontogeny of substantia nigra dopamine neurons. *Eur J Neurosci*, **23**(5): 1384-90.

77. Hitoshi, S., et al. (2002). Neural stem cell lineages are regionally specified, but not committed, within distinct compartments of the developing brain. *Development*, **129**(1): 233-44.
78. Shimoda, K., et al. (1992). A high percentage yield of tyrosine hydroxylase-positive cells from rat E14 mesencephalic cell culture. *Brain Res*, **586**(2): 319-31.
79. Dahlstrand, J., M. Lardelli, and U. Lendahl (1995). Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res*, **84**(1): 109-29.
80. Messam, C.A., et al. (2002). Analysis of the temporal expression of nestin in human fetal brain derived neuronal and glial progenitor cells. *Brain Res Dev Brain Res*, **134**(1-2): 87-92.
81. Tapscott, S.J., et al. (1981). Intermediate filament proteins in the developing chick spinal cord. *Dev Biol*, **86**(1): 40-54.
82. Fedoroff, S., et al. (1983). Astrocyte cell lineage. II. Mouse fibrous astrocytes and reactive astrocytes in cultures have vimentin- and GFP-containing intermediate filaments. *Brain Res*, **283**(2-3): 303-15.
83. Stagaard, M. and K. Mollgard (1989). The developing neuroepithelium in human embryonic and fetal brain studied with vimentin-immunocytochemistry. *Anat Embryol (Berl)*, **180**(1): 17-28.
84. Soma, F.A., et al. (2015). Meningeal cells influence midbrain development and the engraftment of dopamine progenitors in Parkinsonian mice. *Exp Neurol*, **267**: 30-41.
85. Gadisseux, J.F. and P. Evrard (1985). Glial-neuronal relationship in the developing central nervous system. A histochemical-electron microscope study of radial glial cell particulate glycogen in normal and reeler mice and the human fetus. *Dev Neurosci*, **7**(1): 12-32.

86. Freeman, T.B., et al. (1991). Development of dopaminergic neurons in the human substantia nigra. *Exp Neurol*, **113**(3): 344-53.
87. Hebsgaard, J.B., et al. (2009). Dopamine neuron precursors within the developing human mesencephalon show radial glial characteristics. *Glia*, **57**(15): 1648-58.
88. Studer, L., V. Tabar, and R.D. McKay (1998). Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci*, **1**(4): 290-5.
89. Mullen, R.J., C.R. Buck, and A.M. Smith (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, **116**(1): 201-11.
90. Stull, N.D., D.P. Polan, and L. Iacovitti (2002). Antioxidant compounds protect dopamine neurons from death due to oxidative stress in vitro. *Brain Res*, **931**(2): 181-5.
91. Hedlund, E., et al. (2016). Dopamine Receptor Antagonists Enhance Proliferation and Neurogenesis of Midbrain Lmx1a-expressing Progenitors. *Sci Rep*, **6**: 26448.
92. Kuleshova, L.L., et al. (2009). Effective cryopreservation of neural stem or progenitor cells without serum or proteins by vitrification. *Cell Transplant*, **18**(2): 135-44.
93. Drummond, N.J., et al. (2020). Cryopreservation of Human Midbrain Dopaminergic Neural Progenitor Cells Poised for Neuronal Differentiation. *Front Cell Dev Biol*, **8**: 578907.
94. Rodriguez-Martinez, D., M.M. Martinez-Losa, and M. Alvarez-Dolado (2017). Cryopreservation of GABAergic Neuronal Precursors for Cell-Based Therapy. *PLoS One*, **12**(1): e0170776.
95. Brederlau, A., et al. (2006). Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of in vitro differentiation on graft survival and teratoma formation. *Stem Cells*, **24**(6): 1433-40.

96. Hargus, G., et al. (2010). Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(36): 15921-6.
97. Pruszek, J., et al. (2009). Isolation and culture of ventral mesencephalic precursor cells and dopaminergic neurons from rodent brains. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, **Chapter 2**: Unit 2D 5.
98. Camacho-Fernandez, C., et al. (2018). Comparison of six different methods to calculate cell densities. *Plant Methods*, **14**: 30.
99. Houle, J. and S. Fedoroff (1983). Temporal relationship between the appearance of vimentin and neural tube development. *Brain Res*, **285**(2): 189-95.
100. Shults, C.W., et al. (1990). Dopaminergic cells align along radial glia in the developing mesencephalon of the rat. *Neuroscience*, **38**(2): 427-36.
101. Robert, F., J.F. Cloix, and T. Hevor (2012). Ultrastructural characterization of rat neurons in primary culture. *Neuroscience*, **200**: 248-60.
102. Er, S., et al. (2020). Studying Pre-formed Fibril Induced alpha-Synuclein Accumulation in Primary Embryonic Mouse Midbrain Dopamine Neurons. *J Vis Exp*, (162).
103. Sawamoto, K., et al. (2001). Visualization, direct isolation, and transplantation of midbrain dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(11): 6423-8.
104. Weinert, M., et al. (2015). Isolation, culture and long-term maintenance of primary mesencephalic dopaminergic neurons from embryonic rodent brains. *J Vis Exp*, (96).

105. Parish, C.L., et al. (2008). Wnt5a-treated midbrain neural stem cells improve dopamine cell replacement therapy in parkinsonian mice. *J Clin Invest*, **118**(1): 149-60.
106. Milosevic, J., A. Storch, and J. Schwarz (2005). Cryopreservation does not affect proliferation and multipotency of murine neural precursor cells. *Stem Cells*, **23**(5): 681-8.
107. Hancock, C.R., et al. (2000). Neuronal differentiation of cryopreserved neural progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **271**(2): 418-21.
108. Robert, M.C., et al. (2016). Cryopreservation by slow cooling of rat neuronal cells. *Cryobiology*, **72**(3): 191-7.
109. Meneghel, J., et al. (2019). Physical events occurring during the cryopreservation of immortalized human T cells. *PLoS One*, **14**(5): e0217304.
110. Ribeiro, D., et al. (2013). Efficient expansion and dopaminergic differentiation of human fetal ventral midbrain neural stem cells by midbrain morphogens. *Neurobiol Dis*, **49**: 118-27.
111. Bjorklund, L.M., et al. (2002). Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(4): 2344-9.
112. Yan, C.H., et al. (2011). Lmx1a and lmx1b function cooperatively to regulate proliferation, specification, and differentiation of midbrain dopaminergic progenitors. *J Neurosci*, **31**(35): 12413-25.
113. Cho, M.S., et al. (2008). Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**(9): 3392-7.

114. Arenas, E., M. Denham, and J.C. Villaescusa (2015). How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development*, **142**(11): 1918-36.
115. Soldner, F., et al. (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, **136**(5): 964-77.