

KẾT LUẬN

- Đã tách chiết, phân lập, định danh và nuôi cấy tăng sinh thành công tế bào gốc trung mô từ tủy xương thỏ, từ đó đưa ra một qui trình tóm tắt các bước quan trọng như: phương pháp vô cảm, vị trí, kỹ thuật chọc hút, phương pháp tách chiết tế bào sau chọc hút để nuôi cấy tăng sinh (có định danh để khẳng định tế bào gốc trung mô).

- Đã biệt hóa thành công tế bào gốc trung mô tủy xương thành tạo cốt bào trong môi trường biệt hóa cảm ứng tạo xương. Sau biệt hóa, định danh bằng kỹ thuật đặc hiệu như: hóa mô miễn dịch với marker osteocalcin, nhuộm với Alizarin red, quan sát tinh thể khoáng dưới kính hiển vi điện tử quét và có biểu hiện tăng khả năng tạo xương trên ghép thực nghiệm. Các kết quả định danh có cơ sở khẳng định tế bào sau biệt hóa là dạng tạo cốt bào. Sau biệt hóa tế bào được bảo quản với phương pháp đông chậm, hạ nhiệt độ theo chương trình trong môi trường có 10% DMSO và 15% FBS, với mật độ tế bào 10^6 - 10^7 tế bào/ml. Rã đông nhanh, đánh giá tỷ lệ sống (đạt trên 80%), nuôi cấy tăng sinh các tế bào vẫn phát triển tốt, hình dạng tế bào không thay đổi.

KHUYẾN NGHỊ

Đây là đề tài nằm trong phạm vi của một đề tài cấp Bộ mà ý tưởng xuất phát từ thực tiễn của cơ sở nghiên cứu và đào tạo nhằm giải quyết một vấn đề khoa học. Vì vậy kết quả của đề tài cần được ứng dụng trở lại nhằm đảm bảo tính thực tiễn. Cụ thể cần phối hợp với cơ sở điều trị:

- Chuẩn hóa qui trình phân lập, nuôi cấy tăng sinh, biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào tạo xương trên người.
- Ứng dụng ghép tế bào gốc trung mô tự thân đã biệt hóa thành tế bào tạo xương cho bệnh nhân cấy ghép mô xương hoặc các bệnh lý về xương.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tổn thương xương, khớp là tổn thương thường gặp do nhiều nguyên nhân gây nên, diễn biến phức tạp, điều trị không đơn giản. Các phẫu thuật ghép xương tự thân, ghép xương đồng loại, ghép các vật liệu thay thế xương, thậm chí đang có nhiều công trình nghiên cứu ghép xương dị loài đều nhằm điều trị các bệnh thiếu hụt xương. Các phương pháp trên tuy đã mang lại nhiều tiến bộ trong y học, song mỗi phương pháp đều có những nhược điểm khó khắc phục.

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

Muốn có nguồn tế bào theo mong muốn được biệt hóa từ tế bào gốc, phải tách chiết, phân lập, nuôi cấy làm tăng số lượng tế bào, biệt hóa để có các dòng tế bào trực tiếp gần với mục đích điều trị. Đây là hướng nghiên cứu hiện đang được nhiều tác giả tiến hành trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Bảo quản tế bào với mục đích lưu giữ nguyên vẹn các đặc tính sinh học theo thời gian nhằm để chủ động sử dụng trong các mục đích khác nhau như nghiên cứu, điều trị.

Hiện nay tại cơ sở nghiên cứu, mỗi ngày chúng tôi cung cấp mô xương cho hàng chục bệnh nhân để ghép tự thân và đồng loại. Nhằm mục đích kết hợp công nghệ tế bào gốc với công nghệ ghép mô xương mà mục tiêu trước mắt là xây dựng được các quy trình phân lập, nuôi cấy, biệt hóa và bảo quản tế bào gốc trung mô nên chúng tôi tiến hành đề tài: "**Nghiên cứu thực nghiệm áp dụng quy trình nuôi cấy và bảo quản tạo cốt bào biệt hóa từ tế bào gốc trung mô tủy xương**".

Mục tiêu của đề tài:

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

Những đóng góp của luận án: Luận án là một đóng góp mới trong lĩnh vực nghiên cứu thực nghiệm về tế bào gốc tại Việt Nam. Đặc biệt là đã biệt hóa thành công tế bào gốc trung mô tủy xương thành tạo cốt bào với những kỹ thuật định danh hiện đại. Đây là kết quả đầu tiên ở Việt Nam. Kết quả này có ý nghĩa thực tiễn rất lớn trong điều trị các bệnh lý về xương, khớp bằng liệu pháp tế bào gốc.

Thông qua việc làm luận án, tác giả và nhóm nghiên cứu tế bào gốc của Bộ môn Mô Phôi Đại học Y Hà Nội đã nắm bắt và tiến hành thành thạo các bước trong một qui trình, bắt đầu từ kỹ thuật tách chiết, phân lập, nuôi cấy tăng sinh, biệt hóa, định danh đến bảo quản lạnh tế bào sau biệt hóa, tiến tới xây dựng một ngân hàng tế bào được biệt hóa theo yêu cầu điều trị và nghiên cứu.

Bố cục của luận án

Luận án gồm 127 trang trong đó: Đặt vấn đề 02 trang, tổng quan tài liệu 37 trang, đối tượng và phương pháp nghiên cứu 18 trang, kết quả nghiên cứu 30 trang, bản luận 37 trang, kết luận 02 trang, kiến nghị 01 trang, 11 bảng, 5 biểu đồ, 50 hình, tài liệu tham khảo: 7 tiếng Việt: 128 ngoại ngữ.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tế bào gốc trung mô

1.1.1. Đặc điểm chung của tế bào gốc trung mô

Friedenstein AJ (1976) đã mô tả tế bào nền tủy xương là tế bào bám bề mặt đĩa nuôi và có khả năng tạo cụm (colony forming unit-fibroblast: CFU-F).

MSC có khả năng biệt hóa thành nhiều dòng tế bào trong đó có tế bào xương

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

Đầu tiên MSC được phát hiện từ quần thể các tế bào tủy xương. Ở

không đủ nhanh.

Kết quả cho thấy, bảo quản ở môi trường MT3 có khả năng thẩm thấu nước tốt, nên tế bào có tỷ lệ sống cao (87,07%). Tế bào bảo quản ở môi trường MT1, không có huyết thanh có tỷ lệ tế bào sống thấp hơn (61,28%) nhưng có ý nghĩa ứng dụng trên lâm sàng.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với tác giả Verdanova M (2014) bảo quản tạo cốt bào trong các môi trường khác nhau, theo phương pháp hạ nhiệt độ theo chương trình với tốc độ 1^oC/phút đến -80^oC, rồi cho vào nitơ lỏng. Trong đó môi trường bảo quản tạo cốt bào chuẩn là DMSO 10% và 25% FBS có tỷ lệ tế bào sống 87%. Còn tác giả bảo quản MSC trong môi trường bảo quản 10% DMSO tỷ lệ tế bào sống xấp xỉ là 80%.

4.2.2. Đặc điểm hình thái tế bào sau bảo quản

Hình dạng tế bào

Quan sát trên 90 mẫu tế bào bảo quản với 3 loại môi trường không và có tỷ lệ huyết thanh khác nhau và so với trước khi bảo quản, không thấy sự khác biệt về hình dạng tế bào.

Khả năng phát triển sau bảo quản

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

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

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

Sau nuôi cấy trong môi trường tạo xương khoảng 7-14 ngày có sự thay đổi hình thái tế bào và thấy có tinh thể khoáng. Nhuộm alizarinred tế bào và chất nền bắt màu đỏ cam chứng tỏ có sự lắng đọng canxi trong chất nền (Hình 3.8). Dưới kính hiển vi điện tử quét thấy có sự hình thành tinh thể khoáng màu trắng (Hình 3.9). Nhuộm hóa mô miễn dịch tế bào biểu hiện dương tính marker osteocalcin (Hình 3.10) là marker của tạo cốt bào.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với một số tác giả như Quiroz FG (2008)

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

Chúng tôi so sánh kết quả tạo xương giữa hai nhóm thấy rằng ở nhóm thực nghiệm có kết quả tái tạo và liền xương nhanh hơn so với nhóm chứng ở thời điểm 3 tuần qua hình ảnh vi thể. Ở thời điểm 6 tuần xương liền hoàn toàn tại vùng ở khuyết. Tuy nhiên dưới hình ảnh HVĐT quét kết quả liền xương ở nhóm thực nghiệm vẫn tốt hơn so với nhóm chứng.

4.2. Bảo quản tế bào sau nuôi cấy biệt hóa

4.2.1. Tỷ lệ tế bào sống sau bảo quản

Tế bào được bảo quản bằng quy trình đông lạnh chậm trải qua 3 giai đoạn hạ nhiệt. Đầu tiên tế bào được đặt ở 4°C trong 30 phút để nước bên trong tế bào có thể thay thế bởi chất bảo quản, sau đó tế bào được trữ ở -20°C, -80°C qua đêm trước khi cho vào nitơ lỏng.

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

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

đó, MSC chỉ chiếm 0.001% đến 0.01% tổng số tế bào có nhân, bằng 1/10 tế bào gốc tạo máu. Ngày nay, người ta có thể phân lập các tế bào này từ nhiều mô của cơ thể trưởng thành như: máu tuần hoàn, máu dây rốn, trung mô dây rốn, tủy xương, mô mỡ, gan, lách, dịch ối...nhưng tủy xương vẫn được coi là nguồn cung cấp chủ yếu MSC.

1.1.2. Marker tế bào gốc trung mô

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

Marker MSC dương tính	Marker MSC âm tính
Marker dương tính >95%: CD 105, CD73, CD90	Marker âm tính ≤2%: CD45, CD34, CD14 hoặc CD11b, Cd79α hoặc CD19, HLA-DR

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

1.1.3. Phân lập và định danh tế bào gốc trung mô

❖ Phân lập tế bào

Khối tế bào gốc tủy xương dễ dàng phân lập bằng phương pháp ly tâm tỷ trọng. Môi trường ly tâm thường dùng là Percoll, Ficoll. Những tế bào sẽ lắng ở một lớp trong gradien tỷ trọng có tỷ trọng tương ứng với tỷ trọng của nó. Khối tế bào gốc thu được sẽ nằm trên lớp Ficoll và dưới lớp huyết thanh.

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

1.2. Tiêu chuẩn khẳng định hMSC (ISCT)

- ❖ Hình thái: giống nguyên bào sợi khi bám vào bề mặt chai nuôi cấy
- ❖ Marker bề mặt: dương tính: $\geq 95\%$ CD105, CD90, CD73
âm tính: $\leq 2\%$ CD34, CD45, CD14 hoặc CD11b, CD79 α hoặc CD19, HLA-DR
- ❖ Khả năng biệt hóa: tế bào xương, sụn, mỡ.

1.3. Khả năng biệt hóa tế bào gốc trung mô:

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

1.4. Bảo quản lạnh tế bào

1.4.1. Cơ chế bảo quản lạnh:

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

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

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

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

1.4.2. Vai trò chất bảo quản lạnh:

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

20%FBS, 100u/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, đánh giá sự tăng sinh tế bào bởi kỹ thuật MTT. Kết quả cho thấy thời gian nhân đôi quần thể là 17,8 giờ.

4.1.2.5. Định danh bằng marker

MSC ở P4 được định danh marker bề mặt bằng kỹ thuật flow cytometry và hóa mô miễn dịch. Kết quả cho thấy tế bào dương tính với CD44, CD90 và biểu hiện âm tính CD14, CD34.

Quần thể tế bào được sử dụng xác định marker là ở P2 hoặc P3 cho thấy CD90 biểu hiện 96,9% ở MSC từ tủy xương thỏ, và biểu hiện 100% ở MSC từ tủy xương ở người. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi CD90 biểu hiện dương tính 95,37%

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy CD44 biểu hiện dương tính 97,42%. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Lee TC. (2014) trên thỏ: 97,32%.

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

Theo nghiên cứu của Lee TC (2014) trên 25 marker biểu hiện trên tế bào gốc trung mô, tỷ lệ dương tính của CD14 là 0,17%, CD34 là 0,36. Trong khi đó CD44 là 97,32%, CD90 là 95,37%. So sánh sự biểu hiện marker MSC giữa người và thỏ trên 25 marker có 9 marker biểu hiện sự khác biệt, không có ở trên thỏ.

4.1.2.6. Biệt hóa tế bào gốc trung mô thành nguyên bào mỡ

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

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

4.1.2.3. Khả năng tạo cụm

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

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

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

4.1.2.4. Đánh giá sự tăng sinh tế bào

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

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

Theo tác giả Liu C (2014) nghiên cứu nuôi cấy phân lập MSC từ đĩa gian đốt sống, nuôi cấy tế bào trong môi trường có DMEM,

gian đông lạnh.

1.4.3. Bảo quản tế bào gốc

- Noriko K (2005) MSC bảo quản trong: DMSO và FBS sau bảo quản (0,3 -37 tháng) tỷ lệ sống xấp xỉ 90%. Phân tích marker bề mặt của MSC cả 2 nhóm bảo quản và không bảo quản không có sự khác biệt.
- Zeisberger SM (2011) bảo quản AT-MS-C với mật độ 10⁶ tế bào/ml, hạ nhiệt độ với tốc độ 1°C/phút đến -80°C, sau 2h các mẫu cho vào bình Nitơ. Các tế bào bảo quản trong môi trường có DMSO khác nhau thì sẽ có sự hình thành tinh thể đá khác nhau trong và ngoài tế bào.
- Liu G (2008) nghiên cứu sự hình thành mô xương từ MSC bảo quản. Bảo quản MSC trong môi trường 10% DMSO và 20% FBS với mật độ 10⁶/ml, bảo quản 1 giờ ở 4°C, ở -20°C sau đó cho vào -196°C. Sau rã đông và nuôi cấy biệt hóa tạo xương so sánh cùng nhóm chứng, thấy sau 2 tuần cả 2 nhóm biệt hóa có phản ứng ALP dương tính và có lắng đọng canxi trong chất nền.

Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu, chất liệu nghiên cứu

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

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

- 30 mẫu dịch chứa tế bào gốc trung mô sau khi phân lập từ dịch tủy xương sử dụng để nuôi cấy, tăng sinh. Sau khi tăng sinh, chia nhỏ lấy 120 mẫu tiến hành biệt hóa theo hướng tạo cốt bào, lấy 15 mẫu định danh sau biệt hóa, 15 mẫu ghép thực nghiệm, 90 mẫu đưa vào bảo quản lạnh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

2.2.1. Nghiên cứu tiến hành theo các nội dung sau:

- Phân lập tế bào gốc trung mô từ tủy xương, nuôi cấy, định danh và biệt hóa thành tạo cốt bào.
- Bảo quản tạo cốt bào, đánh giá khả năng phục hồi tế bào sau bảo quản.

2.2.2. Kỹ thuật nghiên cứu:

2.2.2.1. Tách chiết, phân lập, nuôi cấy định danh MSC từ tủy xương và biệt hóa thành tạo cốt bào.

Chọc hút tủy xương: Lựa chọn vị trí chọc hút tủy xương và số lượng dịch tủy xương.

Phân lập, tách chiết tế bào: Tế bào đơn nhân tách bởi phương pháp gradient tỷ trọng.

Nuôi cấy tế bào:

Nuôi cấy sơ cấp: Huyền phù khối tế bào đơn nhân thu được sau ly tâm vào chai flask, đặt trong tủ nuôi cấy tế bào. Thay môi trường 2 -3 ngày một lần, khi tế bào mọc 70-80% đĩa nuôi thì cấy chuyển

Nuôi cấy thứ cấp: Tách tế bào bằng trypsin/EDTA, sau đó ly tâm thu lấy tế bào. Cho tế bào vào chai flask để tủ nuôi cấy tế bào.

Định danh để xác định tế bào nuôi cấy là tế bào gốc trung mô:

Hóa mô miễn dịch:

Kỹ thuật dòng chảy:

Tiêu chuẩn xác định tế bào nuôi cấy là MSC

Biệt hóa tế bào MSC thành tế bào mỡ: Đánh giá sau biệt hóa bởi phương pháp nhuộm Oil red O

Biệt hóa tế bào MSC thành tạo cốt bào: Các tế bào MSC được biệt hóa trong môi trường có dexamethasone, ascorbic, β - glycerolphosphatase. Kỹ thuật này theo tác giả Lee TC (2014) đã được chúng tôi áp dụng thành công. Đánh giá sự biệt hóa thành tạo cốt bào

- Nhuộm Alizarin red: đánh giá sự tổng hợp canxi trong chất nền
- Nhuộm hóa mô miễn dịch: xác định các marker sau biệt hóa có dương tính osteocalci ?
- HVĐT quét: Có tinh thể khoáng hình thành ở khoảng gian bào

$1,92 \times 10^4 / 10^6$ tế bào đơn nhân.

Sự phát triển tế bào đơn nhân ở giai đoạn sơ cấp thấy các tế bào dạng hình cầu giảm dần, số lượng tế bào giống nguyên bào sợi tăng dần.

Ngày 7-12 tế bào có hình dạng giống nguyên bào sợi khá dày chiếm 70-80% diện tích bề mặt chai nuôi.

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

Trong nghiên cứu này, mẫu tế bào đơn nhân được phân lập từ tủy xương thò nuôi cấy, các mẫu tế bào đều mọc và phát triển tốt đạt tỷ lệ 100%. Trong nghiên cứu của chúng tôi, sau cấy chuyển lần thứ 10 (P10) đặc điểm hình thái và khả năng tăng sinh của tế bào vẫn không thay đổi.

4.1.2.2. Nuôi cấy thứ cấp tế bào gốc trung mô

Do tế bào phân chia theo cấp số nhân nên càng về sau, bề mặt bình nuôi cấy càng được phủ nhanh. Nuôi cấy sơ cấp thành công khi tế bào mọc khoảng 70-80% diện tích đáy nuôi cấy.

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

Sau khi tế bào mọc 70-80% đĩa nuôi cấy thì tiến hành cấy chuyển, thường dùng enzym để tách các tế bào.

Trypsin chúng rất phổ biến trong việc tách tế bào. Xử lý tế bào bằng trypsin dẫn đến sự cuộn tròn tế bào. Khi các tế bào co lại, các liên kết trở lên lỏng lẻo và dễ dàng tế bào được tách ra bởi tác động cơ học. Trypsin cắt các cầu nối hầu như hoàn toàn.

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. Chọc hút, phân lập, nuôi cấy, biệt hóa, định danh tế bào gốc trung mô tủy xương

4.1.1. Số lượng và chất lượng tủy xương sau chọc hút

Chúng tôi đã chọc hút thành công trên 30 mẫu, các mẫu dịch không bị đông, lượng dịch tủy xương cũng như lượng tế bào đơn nhân thu được khá cao. Nghiên cứu của Jau- Wen Huang (2006) cho thấy lượng tủy xương chọc hút trên mỗi thỏ khoảng 10ml là phù hợp và đủ lượng tế bào trung mô cho nuôi cấy. Việc hút quá nhiều dịch tủy xương sẽ làm lẫn nhiều tế bào máu ngoại vi và ảnh hưởng đến việc hồi phục sức khỏe của thỏ sau chọc hút.

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

4.1.2. Nuôi cấy, tăng sinh, tạo cụm của tế bào gốc trung mô tủy xương

4.1.2.1. Nuôi cấy sơ cấp tế bào gốc trung mô

Cơ sở lựa chọn MSC là có các phân tử bám dính trên bề mặt tế bào, do vậy trong điều kiện nuôi cấy ngoài cơ thể, các tế bào này có khả năng bám đơn lớp vào bề mặt nhựa nuôi cấy. Trong khi đó, HSC trong tủy xương không có khả năng bám dính này, sẽ bị loại bỏ dần khi thay mới môi trường. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định được lượng MSC thu được từ tủy xương. Sau khi tiến hành chọc hút, ly tâm và nuôi cấy có số lượng tế bào trung bình là $6,6 \times 10^6/1\text{ml}$, sau nuôi cấy 10 ngày thì thu được lượng tế bào mọc trung bình là $1,2 \times 10^5$. Sau nuôi cấy 10 ngày đã nhiều lần thay môi trường số lượng tế bào máu còn ít, đa số là tế bào dạng nguyên bào sợi giống tế bào trung mô (Hình 3.3). Như vậy, xác định lượng tế bào bám đáy chai ở giai đoạn sơ cấp là $1,8 \times 10^4$ tế bào/ 10^6 tế bào đơn nhân. Kết quả này cũng phù hợp với tác giả Xie XH (2012) tế bào bám dính thu được ở giai đoạn sơ cấp là

hay trên bề mặt tế bào ?

Ghép MSC biệt hóa theo hướng tạo cốt bào trên thực nghiệm: Kỹ thuật cấy ghép nhằm bổ sung cho kết quả về khả năng tạo xương trên thực nghiệm của dòng tế bào được biệt hóa từ MSC theo hướng tạo cốt bào. Quy trình: chuẩn bị 15 thỏ cùng độ tuổi, tiến hành chọc hút, phân lập, nuôi cấy, biệt hóa MSC thành tạo cốt bào như quy trình đã nghiên cứu. Tạo ổ khuyết xương. Khoan mỗi bên một lỗ ở đầu dưới xương đùi đường kính 0.5 x 0.5 cm. Bơm tế bào gốc, bơm lần lượt vào mỗi lỗ 1 giọt môi trường chứa 10^6 tế bào/ml. Bên phải chỉ bơm môi trường không chứa tế bào. Sau ghép theo dõi toàn thân và tại vị trí ghép ở thười điểm 3 tuần, 6 tuần.

2.2.2.2. Bảo quản tạo cốt bào sau biệt hóa

Phương pháp đông lạnh tế bào

Sau khi biệt hóa MSC thành tế bào gốc mô xương, thời gian biệt hóa 10 ngày, bảo quản tế bào với mật độ tế bào $10^6 - 10^7$ tế bào/ml. Chất bảo quản 10% DMSO với 0% FBS, 15% FBS, 30% FBS. Bảo quản tế bào ở 4°C trong thời gian 30 phút, -20°C , -80°C để qua đêm rồi cho trong N_2 lỏng (-196°C)

Phương pháp rã đông:

Rã đông nhanh ở 37°C , pha loãng dịch bảo quản với môi trường nuôi, ly tâm thu lấy tế bào, huyền phù với môi trường nuôi. Xác định tỷ lệ sống/ chết tế bào bằng nhuộm trypan blue và nuôi lại trong chai flask.

Nuôi cấy tế bào sau bảo quản

Sau khi rã đông tế bào được dung dịch huyền phù cho vào môi trường nuôi cấy đánh giá hình thái tế bào và khả năng phát triển của tế bào.

2.3. Xử lý số liệu

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

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả số lượng và chất lượng dịch tủy xương

Chúng tôi thu được tủy xương từ mào chậu của thỏ. Dịch tủy xương sau chọc hút được chống đông bằng Heparin và chiết tách lấy khối tế bào đơn nhân, sau đó nuôi cấy tế bào.

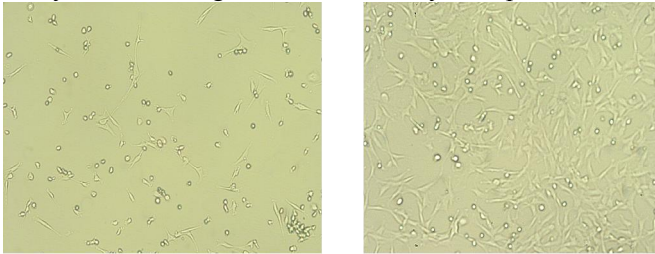
Số lượng dịch tủy xương trung bình trên 30 mẫu là 12 ± 4.3 (ml), sau ly tâm tế bào đơn nhân là 6.7 ± 1.12 (ml) và hiệu quả thu được MSC (P0) là 12.04 ± 2.94

3.2. Kết quả nuôi cấy, tăng sinh của tế bào gốc trung mô tủy xương

3.2.1. Kết quả nuôi cấy sơ cấp

Ba mươi mẫu tế bào đơn nhân chọc hút từ 30 thỏ sử dụng nuôi cấy tăng sinh theo 2 bước, nuôi cấy sơ cấp và thứ cấp

Sự thay đổi hình dạng tế bào khi nuôi cấy sơ cấp



Quần thể tế bào đơn nhân sau nuôi cấy 5 ngày (x200) Quần thể tế bào đơn nhân sau nuôi cấy 10 ngày (x200)

Hình 3.1. Hình ảnh quần thể tế bào đơn nhân trong giai đoạn nuôi cấy sơ cấp

3.2.2. Kết quả nuôi cấy thứ cấp

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

3.2.2. Môi liên quan về tỷ lệ tế bào sống với các môi trường bảo quản khác nhau

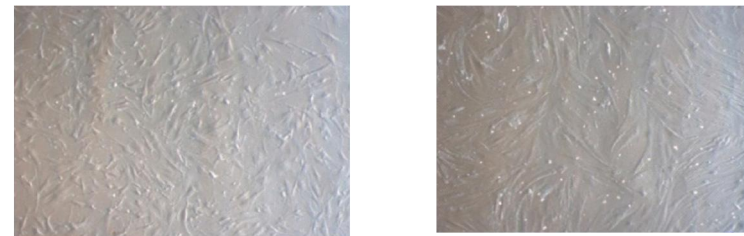
Tỷ lệ tế bào sống sau khi bảo quản ở môi trường MT1, MT2 có mối tương quan tuyến tính thuận, ở mức độ trung bình với hệ số tương quan của tỷ lệ tế bào sống sau bảo quản ở 2 môi trường là $r = 0,437$.

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

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

3.2.2. Nuôi cấy tế bào sau bảo quản

Quan sát trên 90 mẫu tế bào bảo quản với 3 loại môi trường không và có tỷ lệ huyết thanh khác nhau và so với trước khi bảo quản, không thấy sự khác biệt về hình dạng tế bào.



Trước bảo quản

Sau bảo quản

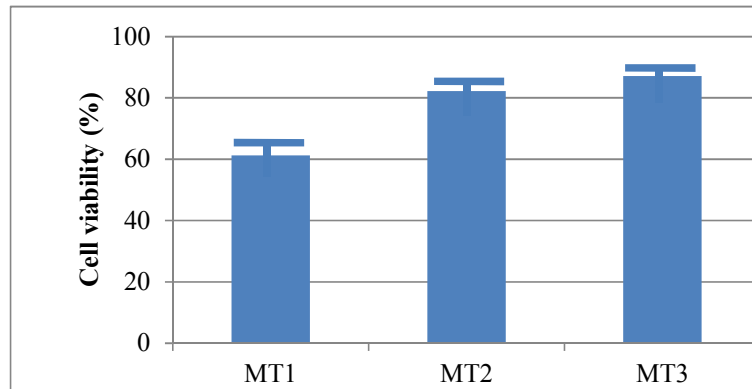
Hình 3.13. Không có sự khác biệt về hình dạng tế bào trước và sau bảo quản lạnh (x150).

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

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

3.2.1. Tỷ lệ tế bào sống sau bảo quản và mối liên quan với các môi trường MT1, MT2, MT3

Chúng tôi tiến hành bảo quản 90 mẫu tế bào sau biệt hóa định hướng dạng tạo cốt bào, chọn thỏ cùng độ tuổi, cùng trọng lượng, cùng điều kiện nuôi. Môi trường bảo quản có thay đổi % FBS ở các môi trường MT1, MT2 và MT3. Về thao tác tiến hành cùng một quy trình với các thao tác như nhau cho các đợt thí nghiệm. Sử dụng các thiết bị, dụng cụ hóa chất đồng bộ trong quá trình thí nghiệm. Mật độ tế bào, điều kiện nuôi là đồng nhất.



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

Từ biểu đồ trên ta thấy tỷ lệ tế bào sống sau bảo quản ở môi trường 1 có tỷ lệ thấp nhất: $61,28 \pm 3,89$, môi trường 2: $82,19 \pm 5,45$, môi trường 3 có tỷ lệ tế bào sống cao nhất là $87,07 \pm 4,18$. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



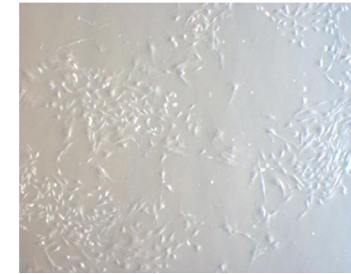
Quản thể tế bào (P3) sau nuôi cấy 5 ngày (x 200).

Quản thể tế bào (P3) sau nuôi cấy 7- 8 ngày (x 200).

Hình 3.2. Hình ảnh quản thể tế bào cấy chuyển lần 3

3.2.3. Khả năng tạo cụm

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

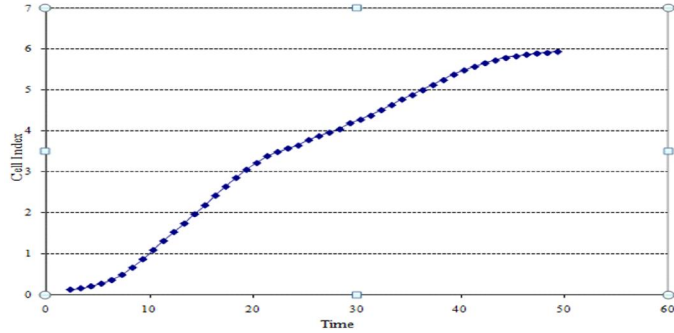


Hình 3.3. Hình ảnh cụm tế bào sau nuôi cấy 7 ngày. (x 200).

Nuôi cấy tạo cụm với mật độ 200 tế bào/cm² thu được 107 ± 25 cụm tế bào. Các tế bào tạo thành cụm rõ rệt (Hình 3.3.)

3.2.4. Xây dựng đường cong tăng trưởng theo hệ thống X-celligence

Để theo dõi tốc độ phát triển của tế bào nuôi cấy, chúng tôi xây dựng đường cong tăng trưởng bằng hệ thống X-celligence với mẫu tế bào thu hoạch ở giai đoạn P4. Tiến hành trên 5 mẫu, mỗi mẫu lặp lại 6 lần, cấy trên đĩa 96 giếng điện cực bằng vàng chuyên dụng.



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

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

3.2.5. Kết quả định danh tế bào gốc trung mô

Kỹ thuật dòng chảy (flow cytometry)

Bảng 3.1 Kết quả tỷ lệ % dương tính một số marker của tế bào gốc trung mô tủy xương thỏ.

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

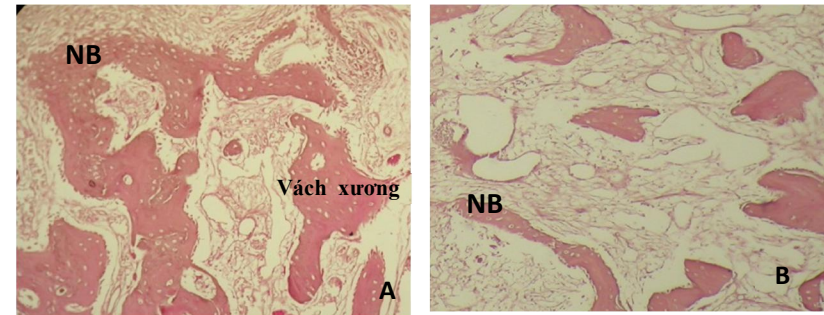
Kết quả cho thấy biểu hiện dương tính trên 95% với marker CD90, CD44; biểu hiện âm tính dưới 2% với marker CD14, CD34

3.1.5.2. Kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch

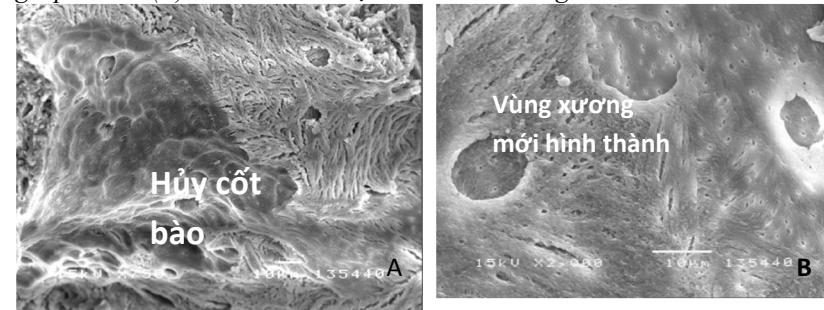
Kết quả 5 mẫu tế bào ở giai đoạn P3, nhuộm hóa mô miễn dịch với các marker CD44, CD90, CD14 và CD34 cho thấy các tế bào biểu hiện dương tính rõ với CD44, CD90 và âm tính với CD14, CD34 (Hình 3.4; Hình 3.5).

3.1.8. Kết quả ghép MSC biệt hóa theo hướng tạo cốt bào trên thực nghiệm

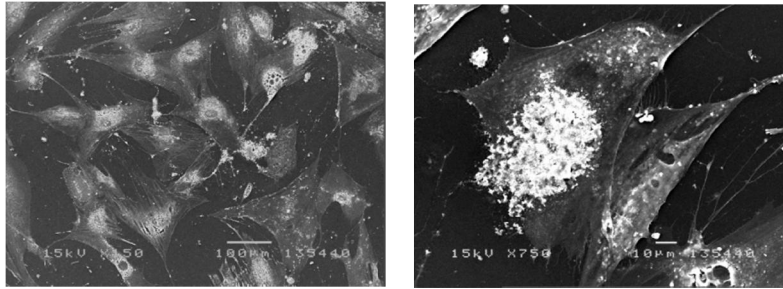
Sau ghép tế bào vào ổ khuyết xương thỏ, đánh giá sự phát triển của xương ở các thời điểm 3 tuần, cho thấy trên các hình ảnh vi thể có dấu hiệu của sự tạo xương mới nhiều hơn so với nhóm đối chứng. Sau ghép 6 tuần sự hình thành xương 2 nhóm tương đối hoàn toàn. Tuy nhiên, hình ảnh dưới HVĐT quét vùng xương có bom tế bào xuất hiện các tế bào tạo xương mới khá rõ, trong đó có cả hủy cốt bào.



Hình 3.11. Hình ảnh vi thể tại vùng xương ghép tế bào (A) và không ghép tế bào (B) sau 3 tuần nhuộm HE. NB: xương mới hình thành.



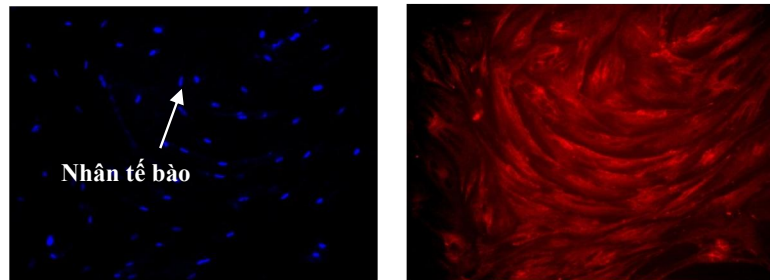
Hình 3.12. Hình ảnh siêu vi thể tại vùng xương ghép tế bào (A) và không ghép tế bào (B) sau 6 tuần (Hiển vi điện tử quét SEM).



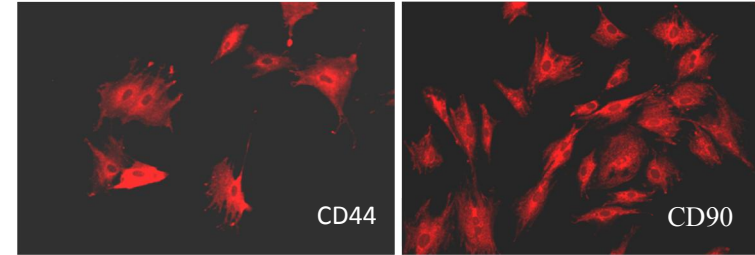
Hình 3.9. Tế bào gốc trung mô sau biệt hóa 30 ngày dưới HVĐT quét.

Các tế bào đang biệt hoá có dạng hình đa giác với các nhánh bào tương ngắn. Các tinh thể khoáng tập trung thành đám trên bề mặt hoặc lân cận tế bào đang biệt hoá.

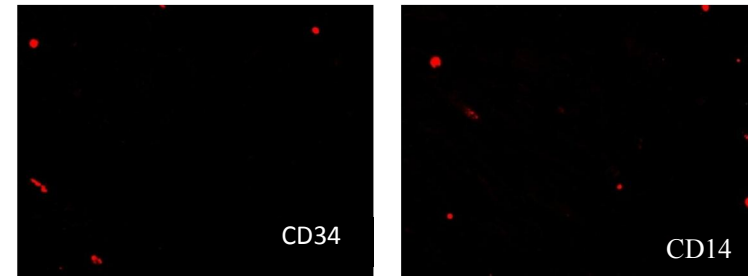
Các tế bào sau biệt hóa nhuộm hóa mô miễn dịch với marker osteocalcin, kết quả nhuộm ở giai đoạn này dương tính với osteocalcin. Osteocalcin là protein được tổng hợp nhiều trong tế bào tạo xương và được xem là marker của tế bào tạo xương.



Hình 3.10. Hình ảnh các tế bào sau biệt hóa 15 ngày trong môi trường cảm ứng tạo xương (nhuộm HMMD biểu hiện dương tính với marker osteocalcin (x200).



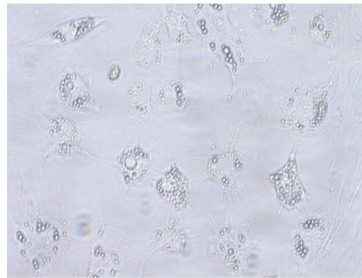
Hình 3.4. Nhuộm HMMD của tế bào gốc trung mô dương tính với CD44, CD90. tế bào bắt màu đỏ biểu hiện dương tính ở giai đoạn P3(x500).



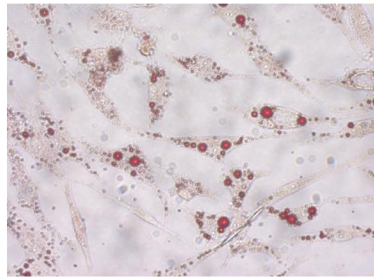
Hình 3.5. Nhuộm HMMD của tế bào gốc trung mô âm tính với CD34, CD14. Tế bào không bắt màu, ở giai đoạn P3

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

Chúng tôi nghiên cứu biệt hóa MSC thành tế bào mỡ, số mẫu (n=5). Sau thời gian biệt hóa khoảng 3-5 ngày, các tế bào bắt đầu chuyển dần thành dạng đa diện với sự xuất hiện các giọt mỡ nhỏ trong bào tương ở ngoại vi tế bào (Hình 3.6). Nhuộm Oil-red O. Các giọt mỡ bắt màu đỏ.



Biệt hóa MSC thành tế bào tạo mỡ sau 5-7 ngày (x500).

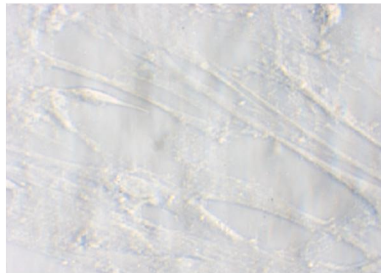


Nhuộm Oil-red O. Các giọt mỡ bắt màu đỏ (x 500).

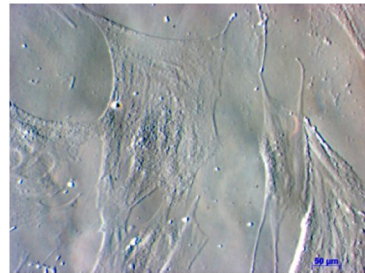
Hình 3.6. Hình ảnh tế bào gốc trung mô biệt hóa thành tế bào mỡ

3.1.7. Kết quả biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tạo cốt bào

Sau khi nuôi cấy với môi trường cảm ứng biệt hóa 4 ngày, tế bào có sự thay đổi hình dạng nhẹ. Hầu hết tế bào vẫn còn dạng thon dài. Sau 7,14 ngày tế bào co ngắn lại, có dạng hình sao nhánh bào tương ngắn và dạng hạt đậu. Dạng thuôn dài trải rộng là hình dáng của MSC và hình hạt đậu là hình dáng của tế bào xương.



MSC (nhóm chứng) (x500).



MSC biệt hóa thành tạo cốt bào sau 21 (x750).

Hình 3.7. Hình ảnh tế bào gốc trung mô biệt hóa thành tạo cốt bào

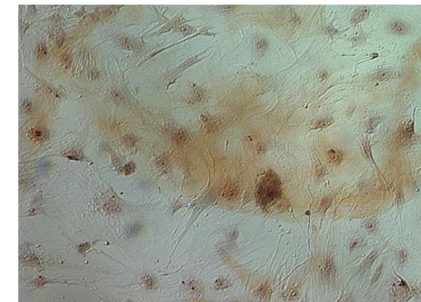
Bảng 3.2. Kết quả biệt hóa và định danh tạo cốt bào được biệt hóa từ MSC tủy xương

Thông số NC MSC	Số mẫu tế bào biệt hóa	Nhuộm Alizarin red		Hiện vi điện tử		Hóa mô miễn dịch	
		Số mẫu	Tỷ lệ thành công	Số mẫu	Tỷ lệ thành công	Số mẫu	Tỷ lệ thành công
MSC	15	5	5/5	5	5/5	5	5/5

Nhận xét:

Số mẫu tế bào trung mô biệt hóa thành tạo cốt bào là 15 mẫu, trong đó để định danh tế bào sau biệt hóa bằng kỹ thuật: Alizarin red, hiện vi điện tử quét, nhuộm hóa mô miễn dịch, mỗi phương pháp nghiên cứu ngẫu nhiên trên 5 mẫu. Tỷ lệ thành công sau làm các kỹ thuật là 5/5 (100%).

Các tế bào khi nhuộm với Alizarin red, sau khi nhuộm tế bào và chất nền bắt màu đỏ cam.



Hình 3.8. MSC sau biệt hóa 21 ngày nhuộm Alizarin red.(x500).

Dưới kính hiển vi điện tử quét thấy tế bào biệt hóa sau 30 ngày xuất hiện các các tinh thể khoáng.