

# Y HỌC TÁI TẠO VÀ TRỊ LIỆU TẾ BÀO

## THU NHẬN VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC ĐỘNG CỦA GEL HUYẾT TƯƠNG GIÀU TIỂU CẦU LÊN TẾ BÀO NỘI MẠC TỬ CUNG NGƯỜI *IN VITRO*

Lê Thị Vĩ Tuyết<sup>1,2,3\*</sup>, Phan Thị Hiếu Nghĩa<sup>1,2,3</sup>, Hoàng Thị Diễm Tuyết<sup>4</sup>, Trần Lê Bảo Hà<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Bộ môn Sinh lý học và Công nghệ sinh học Động vật, Khoa sinh học – Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Phòng Thí nghiệm Kỹ nghệ mô và Vật liệu Y sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>3</sup>Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>4</sup>Bệnh viện Hùng Vương, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

### TÓM TẮT

Tế bào nội mạc tử cung người (hEnSCs) giữ vai trò quan trọng trong quá trình tái tạo liên quan đến chu kỳ kinh nguyệt tự nhiên hoặc các bệnh lý rối loạn chức năng tử cung. Mục tiêu của nghiên cứu là thu nhận thành công gel huyết tương giàu tiểu cầu (PRP gel) với khả năng phóng thích các yếu tố tăng trưởng (GFs) và đánh giá vai trò của nó lên sự sinh trưởng của hEnSCs. Theo đó, PRP gel được thu nhận và đánh giá nồng độ các GFs (PDGF-AB và VEGF-A) từ dịch chiết sau 1, 3 và 7 ngày ủ ở 37°C. Chế phẩm này tiếp tục được đánh giá ảnh hưởng lên sự tăng sinh và di cư của hEnSCs thông qua các thử nghiệm MTT, di cư vào vết rạch và di cư vào khối PRP gel. Kết quả cho thấy rằng, PRP gel có khả năng phóng thích PDGF-AB và VEGF-A. Tuy vậy, tốc độ phóng thích các yếu tố tăng trưởng này khác nhau. Nồng độ PDGF-AB bắt đầu được ghi nhận từ dịch chiết sau 1 ngày ủ ấm ( $2150,33 \pm 11,07$  pg/mL) và có xu hướng giảm dần sau đó. Trong khi ở VEGF-A, tín hiệu phóng thích bắt đầu vào 7 ngày ( $67,00 \pm 6,71$  pg/mL). Ngoài ra, dịch chiết từ PRP gel thúc đẩy tăng sinh và di cư vào vết rạch của hEnSCs. Tuy vậy, không quan sát thấy tế bào di cư vào sâu trong khối PRP gel sau 3 ngày đồng nuôi cấy. Từ các kết quả trên có thể nhận định rằng, PRP có khả năng phóng thích các GFs liên quan đến quá trình tái tạo mô đồng thời thúc đẩy quá trình tăng sinh và di cư của các tế bào nội mạc tử cung ở người. Chế phẩm PRP có tiềm năng ứng dụng điều trị các bệnh lý liên quan tái tạo nội mạc tử cung. Tuy nhiên, dạng tồn tại của chế phẩm cần được nghiên cứu thêm nhằm tối ưu hiệu quả điều trị.

*Từ khóa:* Gel, huyết tương giàu tiểu cầu, tái tạo, tế bào nội mạc tử cung, yếu tố tăng trưởng.

### MỞ ĐẦU

Nội mạc tử cung, lớp lót bên trong tử cung, là cấu trúc mô đặc biệt trải qua những thay đổi liên tục trong suốt chu kỳ kinh nguyệt để đáp ứng với sự điều hòa của nội tiết tố. Những thay đổi này rất cần thiết để phối hợp làm tổ thành công và dẫn đến sự mang thai sau đó. Quá trình tái cấu trúc nội mạc tử cung đặc trưng bởi hoạt động của các tế bào mô đệm nội mạc tử cung (hEnSCs) bao gồm sự tăng sinh, di cư và biệt hóa (Gellersen, Brosens, 2014). Sự bất thường của các hoạt động này có liên quan đến các rối loạn sinh sản khác nhau, chẳng hạn như lạc nội mạc tử cung, sảy thai và vô sinh. Mặc dù quá trình tái tạo nội mạc tử cung bao gồm các hoạt động của hEnSCs phụ thuộc vào hormone sinh dục nhưng các yếu tố tăng trưởng lại giữ vai trò quan trọng trong việc điều hòa quá trình này (Guzeloglu-Kayisli et.al., 2009). Do đó, các liệu pháp bổ sung yếu tố tăng trưởng dần được quan tâm trong nghiên cứu liệu pháp điều trị các bệnh lý nội mạc tử cung.

Huyết tương giàu tiểu cầu (PRP) đã được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực lâm sàng khác nhau, bao gồm chỉnh hình, nhãn khoa và da liễu. Trong quá trình sửa chữa mô, tiểu cầu được kích hoạt nhằm mục đích kháng viêm, thúc đẩy di cư tế bào, tái cấu trúc chất nền ngoại bào, tăng sinh, biệt hóa tế bào và thúc đẩy sự hình thành mạch máu. Do đó, PRP được sử dụng tại vị trí tổn thương mô để sửa chữa, tái tạo mô trong các bệnh lý khác nhau. Trong sản phụ khoa, PRP gần đây đã được nghiên cứu để điều trị suy giảm chức năng nội mạc tử cung và buồng trứng ở phụ nữ vô sinh. Nhiều nghiên cứu đã báo cáo tác dụng điều trị của việc bơm PRP chưa hoạt hóa (nA-PRP) vào buồng tử cung, giúp tăng độ dày nội mạc tử cung và cơ hội làm tổ của phôi (Allahveisi et.al., 2020). Tuy vậy, cũng còn một số tranh cãi bởi một số công bố không ghi nhận được hiệu quả tác động (Javaheri et.al., 2020). Ở Việt Nam, một số thử nghiệm lâm sàng cũng được công bố trên các tạp chí khoa học trong nước nhằm đánh giá vai trò PRP trong hỗ trợ tái tạo nội mạc tử cung. Tuy vậy, cùng trên đối tượng bệnh nhân mỏng nội mạc tử cung và có tiền sử thất bại làm tổ phôi, trong khi nhóm nghiên cứu của Nguyễn Thanh Tùng và cộng sự (2020) khẳng định được hiệu quả PRP thông qua khả năng cải thiện độ dày nội mạc và khả năng mang thai thì Nguyễn Huyền Minh Thụy và cộng sự (2020) lại có ghi nhận ngược lại (Nguyễn Huyền Minh Thụy et.al., 2020, Nguyen

Thanh et.al., 2022, Nguyễn Thanh Tùng et.al., 2020). Bên cạnh đó, các chế phẩm từ PRP cũng chưa được nghiên cứu và ứng dụng nhiều trong lĩnh vực này.

Trong nghiên cứu này, chế phẩm PRP dạng gel được nghiên cứu và đánh giá tiềm năng *in vitro* thông qua tác động lên dòng tế bào nội mạc tử cung. Nghiên cứu cung cấp cơ sở khoa học cho việc ứng dụng chế phẩm này trong điều trị bệnh lý liên quan đến tái tạo nội mạc tử cung.

## VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Tế bào nội mạc tử cung được cung cấp bởi ATCC (hEnSC, ATCC No. CRL-4003), được nuôi cấy trong môi trường (M+): DMEM/F12 (Sigma, USA) có bổ sung 1,5 g/L sodium bicarbonate (Sigma, USA), 10% huyết thanh bào thai bò (FBS) được xử lý charcoal/dextran (HyClone, USA), 1% ITS+ Premix (BD, USA) và 500 ng/mL puromycin (Sigma, USA).

Máu ngoại vi được thu từ người tình nguyện khỏe mạnh, trong độ tuổi sinh sản và có kết quả xét nghiệm máu âm tính với HIV, HBV, HCV và BW. Việc thu nhận máu ngoại vi người được tiến hành và thông qua bởi Hội đồng Y đức (số: 2395/GCN-BVHV, cấp ngày 15/09/2019) của Bệnh viện Hùng Vương.

### Thu nhận PRP gel và dịch chiết từ PRP gel

Để chuẩn bị PRP gel, 8,5 mL máu ngoại vi người được thu nhận vào ống lấy máu chứa 1,5 mL ACD (Acid Citrate Dextrose) (BD Vacutainer, USA). Ống máu được ly tâm (Hettich, Đức) với tốc độ 3.500 vòng/phút, trong 3 phút và phân đoạn huyết tương được thu nhận vào một ống ly tâm mới (Nunc, USA). Ống này được ly tâm với tốc độ 3.000 vòng/phút, trong 22 phút để thu nhận 1/3 dịch huyết tương với cặn tiểu cầu ở lớp đáy. Huyền phù hỗn hợp này được gọi là huyết tương giàu tiểu cầu chưa hoạt hóa (nA-PRP). Để hoạt hóa tiểu cầu, dung dịch 230 mM CaCl<sub>2</sub> (Sigma, USA) được bổ sung vào nA-PRP theo tỷ lệ tương ứng 1:9. PRP gel được hình thành khi hỗn hợp này được ủ ở 37°C.

Dịch chiết từ PRP gel được thu nhận cho các đánh giá nồng độ yếu tố tăng trưởng và tác động lên tế bào nội mạc tử cung. Quy trình thu nhận dịch chiết tuân thủ hướng dẫn theo ISO 10993-12. Theo đó, gel PRP được ngâm trong môi trường cơ bản M- (môi trường M+ không chứa huyết thanh) với tỷ lệ 0,1 g/mL (w:v) ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (Panasonic, Nhật Bản).

### Đánh giá nồng độ PDGF-AB và VEGF-A bằng ELISA

Dịch chiết PRP được thu nhận tại các thời điểm sau 1 ngày, 3 ngày và 7 ngày ủ PRP gel sẽ được nạp vào đĩa ELISA của các yếu tố tăng trưởng PDGF-AB (RAB0396, Sigma, USA) và VEGF-A (RAB0507, Sigma, USA). Đĩa được ủ qua đêm ở 4°C (Panasonic, Nhật Bản). Kháng thể được bổ sung vào các giếng ngay sau đó, ủ và lắc nhẹ 60 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp theo, dung dịch HRP-Streptavidin được thay vào các giếng, ủ và lắc nhẹ 45 phút ở nhiệt độ phòng. Thuốc thử TMB được bổ sung vào các giếng trong 30 phút ở nhiệt độ phòng và dung dịch STOP được sử dụng để dừng phản ứng. Cuối cùng, kết quả được ghi nhận ở bước sóng 450 nm bởi máy đọc đĩa 96 giếng (Biochrom ASYS, United Kingdom).

### Nuôi cấy tế bào nội mạc tử cung

Tế bào nội mạc tử cung được nuôi cấy trong môi trường M+, môi trường được thay sau mỗi 2-3 ngày. Sau khi tế bào che phủ được trên 80% bề mặt đĩa nuôi, các tế bào được tách khỏi bề mặt đĩa nuôi bằng 0,25% Trypsin/EDTA (Sigma, USA) và ly tâm 3.000 vòng/phút trong 5 phút. Cặn tế bào được thu nhận và tiến hành cấy chuyển hoặc bảo quản đông lạnh (10% DMSO) (Sigma, USA).

### Đánh giá khả năng tăng sinh tế bào nội mạc tử cung (hEnSCs) bằng thử nghiệm MTT

Dịch chiết PRP sau 1 ngày ủ PRP gel sẽ được sử dụng để đánh giá khả năng tác động lên sự tăng sinh của các tế bào hEnSCs. Thử nghiệm MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) (Sigma, USA) được thực hiện. Theo đó, 100 µL hEnSCs được cấy vào đĩa 96 giếng (Nunc, USA) với 10<sup>4</sup> tế bào/giếng và được ủ ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> qua đêm. Sau đó, môi trường M- được bổ sung với dịch chiết PRP (10%) được thay vào giếng nhằm khảo sát tác động của PRP lên sự tăng sinh tế bào. Môi trường M+ và M- được sử dụng tương ứng là đối chứng dương và đối chứng âm. Các thời điểm đánh giá bao gồm sau 1, 3, 5 và 7 ngày nuôi cấy. Tại đó, 100 µL của 0,5 mg/mL MTT được bổ sung vào đĩa và ủ ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong 4 giờ. Cuối cùng, MTT được loại bỏ và 100 µL DMSO:Ethanol (1:1) (Sigma, USA) được bổ sung. Kết quả được ghi nhận ở bước sóng 570 nm.

### Đánh giá khả năng di cư của tế bào nội mạc tử cung vào vết rạch

Để đánh giá khả năng di cư vào vết rạch của các tế bào hEnSCs, các tế bào này được cấy vào đĩa 6 giếng (Nunc, USA) với mật độ 10<sup>5</sup> tế bào/giếng và nuôi cấy đến khi độ bao phủ của tế bào trên bề mặt đĩa nuôi đạt trên 80%. Sau đó, vết rạch được tạo trên lớp đơn tế bào. Dịch chiết 10% PRP được bổ sung vào đĩa nuôi để đánh giá tác động lên sự di cư của hEnSCs. Môi trường M+ và M- được sử dụng là đối chứng dương và đối chứng âm. Sau 24 giờ thực hiện liệu pháp, hình ảnh tế bào (Olympus, Nhật Bản) và diện tích che phủ vào vết rạch của tế bào được ghi nhận (phần mềm ImageJ).

### Đánh giá khả năng di cư của tế bào nội mạc từ cung vào khối PRP gel

100  $\mu$ L dịch huyền phù tế bào hEnSCs với số lượng  $5 \times 10^4$  tế bào được bổ sung lên trên bề mặt PRP gel đã được đặt vào đĩa 96 giếng (Nunc, USA) trước đó. Đĩa nuôi được ủ ở  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Việc đánh giá khả năng di cư của tế bào vào PRP gel được thực hiện bằng cách cố định gel với 4% paraformaldehyde (Sigma, USA), cắt lát và nhuộm mô học (hematoxylin & eosin). Hình ảnh di cư của tế bào vào PRP gel được ghi nhận tại các mốc thời gian sau 1, 2 và 3 ngày nuôi cấy.

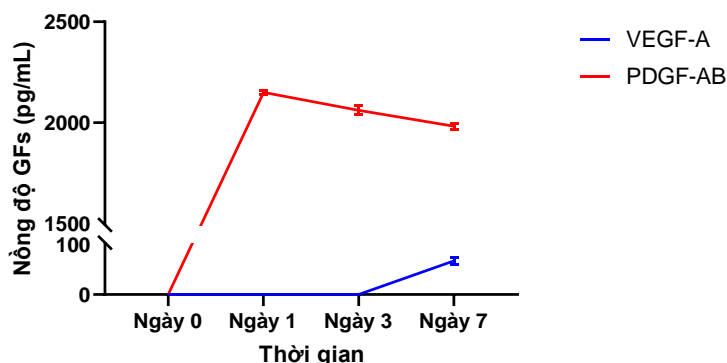
### Xử lý thống kê

Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm GraphPad Prism 9. Kết quả được biểu thị bằng giá trị trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (Mean  $\pm$  SD). Giá trị  $p < 0,05$  được coi là khác biệt có ý nghĩa thống kê.

## KẾT QUẢ

### Kết quả đánh giá nồng độ PDGF-AB và VEGF-A bằng ELISA

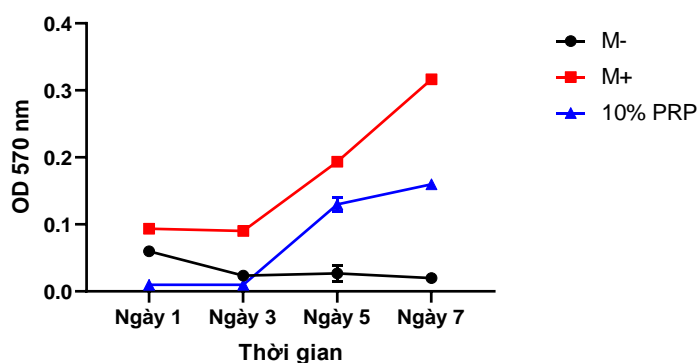
Khả năng phóng thích các GFs bao gồm PDGF-AB và VEGF-A từ PRP gel được thực hiện thông qua việc định lượng nồng độ của chúng ở dịch chiết gel tại các mốc thời gian cố định bao gồm sau 1, 3 và 7 ngày ủ. Kết quả cho thấy rằng, PRP gel có khả năng phóng thích cả hai yếu tố tăng trưởng (Hình 1). Tuy nhiên, tốc độ phóng thích của chúng khác nhau. Cụ thể, ở PDGF-AB, khả năng phóng thích cao nhất sau 1 ngày, đạt  $2150,33 \pm 11,07$  pg/mL và có xu hướng giảm dần theo thời gian xuống còn  $1982,50 \pm 15,91$  pg/mL sau 7 ngày ( $p < 0,05$ ). Khác với PDGF-AB, thời điểm ghi nhận được tín hiệu phóng thích VEGF-A muộn hơn, vào cuối quá trình khảo sát và nồng độ GF này là  $67,00 \pm 6,71$  pg/mL.



Hình 1. Đồ thị thể hiện nồng độ PDGF-AB và VEGF-A theo thời gian

### Kết quả đánh giá khả năng tăng sinh tế bào nội mạc từ cung (hEnSCs) bằng thử nghiệm MTT

Kết quả thử nghiệm MTT chỉ ra rằng, PRP có khả năng kích thích tăng sinh tế bào hEnSCs (Hình 2). Tuy vậy, hiệu quả kích thích tăng sinh chậm, được ghi nhận tại thời điểm sau 5 ngày nuôi cấy và tiếp tục gia tăng kích thích đến ngày 7 ( $p < 0,05$ ). Mặt khác, khi so sánh hiệu quả tác động của môi trường bổ sung 10% PRP so với bổ sung 10% FBS (M+), có thể thấy FBS (10%) có hiệu quả kích thích sinh trưởng tế bào cao hơn ( $p < 0,05$ ).

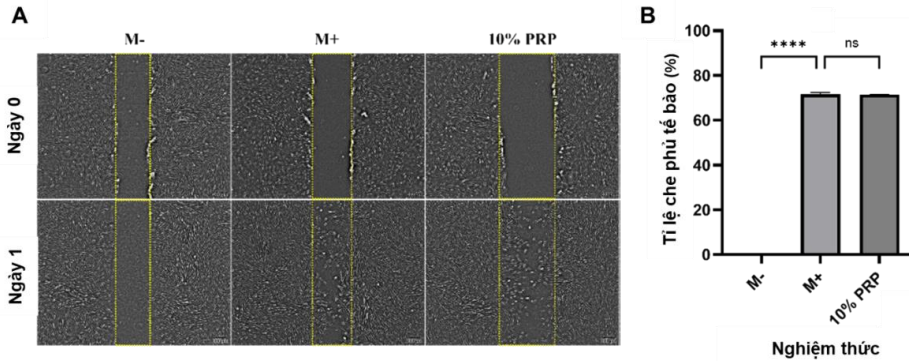


Hình 2. Đồ thị thể hiện khả năng tăng sinh của tế bào trong các môi trường theo thời gian

M-: ĐỐI CHỨNG ÂM, M+: ĐỐI CHỨNG DƯƠNG.

**Kết quả đánh giá khả năng di cư của tế bào nội mạc tử cung vào vết rạch**

Thử nghiệm mô phỏng vết thương được thực hiện bằng cách tạo một vết rạch trên lớp đơn tế bào được nuôi cấy *in vitro* nhằm mục đích xác định khả năng di cư của hEnSCs. Kết quả cho thấy, có sự di cư của tế bào vào vùng tổn thương ở nghiệm thức 10% PRP sau 1 ngày nuôi cấy, hiện tượng này được quan sát tương tự ở nhóm đối chứng dương (10% FBS). Không quan sát được sự di cư tế bào ở nhóm đối chứng âm (**Hình 3A**). Kết quả thống kê cũng chỉ ra rằng, tỷ lệ bao phủ của tế bào tại vị trí mô phỏng tổn thương không khác biệt giữa nghiệm thức 10% PRP ( $71,47 \pm 0,08\%$ ) và đối chứng dương ( $71,57 \pm 0,82\%$ ) ( $p > 0,05$ ) (**Hình 3B**).

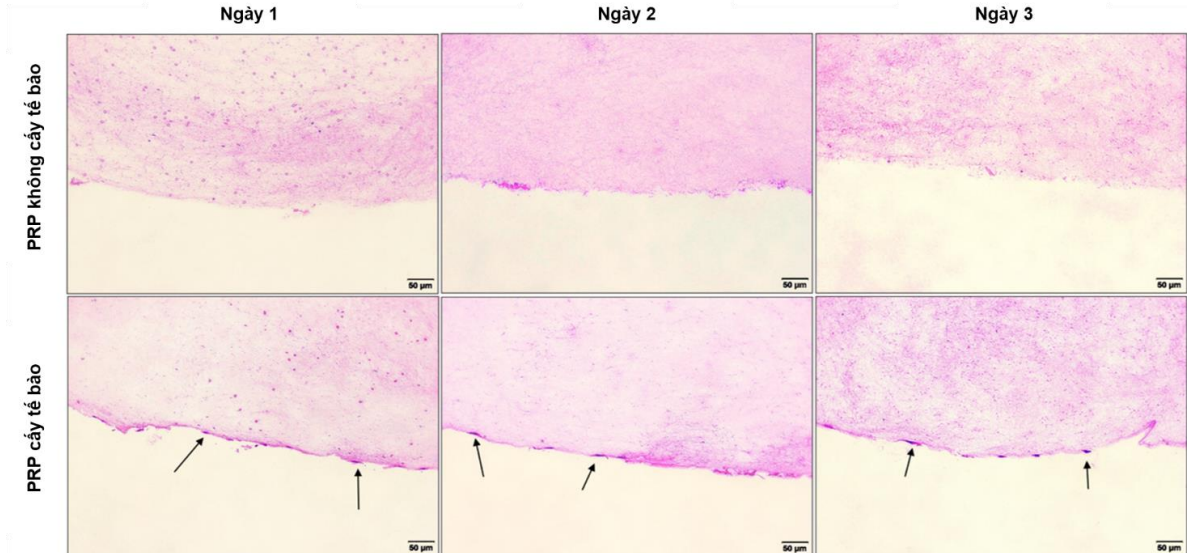


**Hình 3. Kết quả di cư của tế bào hEnSCs vào vết rạch ở các nghiệm thức**

A. Hình ảnh tế bào; B. Đồ thị thể hiện tỷ lệ che phủ tế bào vào vết rạch M-: Đối chứng âm, M+: Đối chứng dương, ns: Không khác biệt.

**Kết quả đánh giá khả năng di cư của tế bào nội mạc tử cung vào khối PRP gel**

Kết quả đánh giá khả năng di cư của hEnSCs vào khối PRP gel cho thấy rằng, chỉ có thể quan sát được tế bào bám dính trên bề mặt của PRP gel theo thời gian. Tế bào được ghi nhận là không có khả năng di cư vào sâu trong khối gel sau 3 ngày quan sát (**Hình 4**).



**Hình 4. Kết quả đánh giá khả năng di cư của tế bào vào PRP gel theo thời gian**

Mũi tên đen: Tế bào hEnSCs.

**THẢO LUẬN**

Huyết tương giàu tiểu cầu (PRP) được biết đến là vật liệu tái tạo mô. Một vài nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng, PRP thường được sử dụng ở trạng thái chưa hoạt hóa (nA-PRP) trong điều trị các bệnh lý liên quan đến tái tạo nội mạc tử cung. Nghiên cứu này đề xuất đánh giá vai trò của PRP gel, một trong những chế phẩm ở trạng thái đã hoạt hóa, lên tế bào nội mạc tử cung từ đó làm cơ sở cho các nghiên cứu sâu hơn ở mô hình động vật hoặc trên lâm sàng.

PDGF-AB và VEGF-A là hai yếu tố giữ vai trò quan trọng thúc đẩy sự tăng sinh, hình thành mạch máu mới trong quá trình tái tạo nội mạc tử cung theo chu kỳ (Guo et.al., 2021). Kết quả của nghiên cứu này cho thấy PRP gel có khả năng phóng thích cả hai yếu tố tăng trưởng là PDGF-AB và VEGF-A. Trong đó, thời gian ghi nhận bắt đầu có sự phóng thích VEGF-A muộn hơn so với PDGF-AB. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, VEGF-A có ái lực gắn kết cao với fibrin và fibrinogen, cũng như thời gian bán hủy dài hơn so với PDGF-AB. Những đặc điểm này có thể góp phần làm chậm thời gian phóng thích VEGF-A trong thời gian khảo sát và cũng là đặc điểm giúp VEGF-A phóng thích kéo dài hơn (Wang et.al., 2022). Bên cạnh đó, PRP gel khẳng định được hiệu quả thúc đẩy tăng sinh và di cư vào vết rạch khi tác động lên dòng tế bào nội mạc tử cung. Điều này một lần nữa khẳng định rằng, các yếu tố tăng trưởng từ PRP gel được phóng thích ra môi trường bên ngoài và có tác động lên tế bào nội mạc tử cung, dòng tế bào đã được chứng minh là biểu hiện thụ thể đặc hiệu của các yếu tố tăng trưởng này (Zhang et.al., 2020). Tuy nhiên, thử nghiệm đánh giá khả năng di cư qua PRP gel của tế bào hEnSCs khẳng định tế bào này không thể di cư vào sâu trong khối gel sau 3 ngày. Khẳng định này tương tự với một công bố của Sadeghi-Ataabadi và cộng sự năm 2017 khi khảo sát sự di cư của các tế bào gốc trung mô dây rốn với nồng độ  $\text{CaCl}_2$  trong gel hóa PRP là 2,5% (gần như tương đồng với nghiên cứu này) (Sadeghi-Ataabadi et.al., 2017). Việc tế bào không thể di chuyển vào sâu bên trong PRP gel được lý giải bởi đặc tính cơ học của sợi fibrin được tạo ra bằng các hoạt hóa nA-PRP trong  $\text{CaCl}_2$  (Carr Jr, Carr, 1995).

Có thể thấy rằng, PRP gel không phù hợp khi sử dụng như giá thể giúp làm dày trong quá trình di cư tái tạo nội mạc tử cung. Ngoài ra, hoạt tính của PRP gel trong kích thích tăng sinh tế bào nội mạc tử cung còn hạn chế so với huyết thanh bào thai bò (FBS). Do đó, việc nghiên cứu thêm chế phẩm từ PRP để gia tăng hoạt tính và đạt trạng thái dễ dàng ứng dụng hiệu quả là điều cần thiết trong tương lai.

## KẾT LUẬN

PRP gel có khả năng phóng thích các yếu tố tăng trưởng bao gồm PDGF-AB và VEGF-A, thúc đẩy sự tăng sinh và di cư vào vết rạch của tế bào hEnSCs mặc dù hiệu quả kích thích tăng sinh chưa tương đồng với FBS. Mặt khác, ở thử nghiệm đánh giá vai trò làm giá thể, PRP gel được khẳng định là không hỗ trợ sự di cư vào bên trong của các tế bào hEnSCs sau 3 ngày khảo sát. Kết quả nghiên cứu này khẳng định được tiềm năng ứng dụng của PRP trong tái tạo nội mạc tử cung thông qua các tác động lên dòng tế bào nội mạc. Tuy nhiên, cần xem xét dạng hoạt động của chế phẩm PRP cho hiệu quả và tính khả thi cao hơn để ứng dụng.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu được tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh trong khuôn khổ Đề tài mã số 615/QĐ-SKHCN.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Allahveisi A, Seyedshohadaei F, et al. (2020). The effect of platelet-rich plasma on the achievement of pregnancy during frozen embryo transfer in women with a history of failed implantation, *Heliyon*, 6: e03577.
- Carr Jr M, and Carr S (1995). Fibrin structure and concentration alter clot elastic modulus but do not alter platelet mediated force development, *Blood coagulation fibrinolysis*, 6: 79.
- Gellersen B, and Brosens JJ (2014). Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure, *Endocrine reviews*, 35: 851-905.
- Guo X, Yi H, et al. (2021). Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human embryo implantation: clinical implications, *Biomolecules*, 11: 253.
- Guzelglu-Kayisli O, Kayisli UA, and Taylor HS, editors. The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions. Seminars in reproductive medicine; 2009: © Thieme Medical Publishers.
- Javaheri A, Kianfar K, et al. (2020). Platelet-rich plasma in the management of Asherman's syndrome: An RCT, *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 18: 113.
- Nguyễn Huyền Minh Thụy, Phạm Văn Tài, et al. (2020). Đánh giá hiệu quả của huyết tương giàu tiểu cầu tự thân (PRP) trong cải thiện khả năng làm tổ của phôi, *Hội Nội tiết sinh sản và Vô sinh Thành phố Hồ Chí Minh*.
- Nguyen Thanh T, Hoang Van A, et al. (2022). Effect of autologous platelet-rich plasma treatment on patients with thin endometrium, *Rev cuba med mil*: e1802-e.
- Nguyễn Thanh Tùng, Đoàn Thị Hằng, et al. (2020). Kết quả bước đầu của huyết tương giàu tiểu cầu (PRP) tự thân điều trị trên các bệnh nhân thất bại làm tổ nhiều lần và nội mạc tử cung mỏng, *Hội Nội tiết sinh sản và Vô sinh Thành phố Hồ Chí Minh*.
- Sadeghi-Ataabadi M, Mostafavi-Pour Z, et al. (2017). Fabrication and characterization of platelet-rich plasma scaffolds for tissue engineering applications, *Materials Science Engineering: C*, 71: 372-80.
- Wang X, Fok MR, et al. (2022). In Vitro and Ex Vivo Kinetic Release Profile of Growth Factors and Cytokines from Leucocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) Preparations, *Cells*, 11: 2089.
- Zhang J, Zhang J, et al. (2020). The effects of platelet-rich and platelet-poor plasma on biological characteristics of BM-MSCs In vitro, *Analytical Cellular Pathology*, 2020: 8546231.

## COLLECT AND EVALUATE THE EFFECT OF PLATELET-RICH PLASMA GEL ON HUMAN ENDOMETRIAL STROMAL CELLS *IN VITRO*

Tuyet Thi Vi Le<sup>1,2,3\*</sup>, Nghia Thi Hieu Phan<sup>1,2,3</sup>, Tuyet Thi Diem Hoang<sup>4</sup>, Ha Le Bao Tran<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>*Department of Physiology and Animal Biotechnology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, VNU-HCM, Vietnam*

<sup>2</sup>*Laboratory of Tissue Engineering and Biomedical Materials, University of Science, VNU-HCM, Vietnam*

<sup>3</sup>*Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam*

<sup>4</sup>*Hung Vuong Hospital, Ho Chi Minh City, Vietnam*

### SUMMARY

Human endometrial stromal cells (hEnSCs) play an essential role in the regeneration process related to the natural menstrual cycle or uterine dysfunction. This work aimed to collect platelet-rich plasma gel (PRP gel) that could release growth factors (GFs), and to confirm its impact on the growth of hEnSCs. Accordingly, PRP gel was collected and evaluated for the concentration of GFs (PDGF-AB and VEGF-A) in the extract after 1, 3, and 7 days of incubation at 37°C. The proliferation and migration of hEnSCs was examined in the presence of PRP gel extracts, via MTT, in vitro scratch, and migration into the PRP scaffold assays. The results showed that PRP gel could release PDGF-AB and VEGF-A. However, the release rates of these growth factors varied. PDGF-AB was detected from the extract after 1 day of incubation ( $2150.33 \pm 11.07$  pg/mL) before decreasing over time. In contrast, VEGF-A was released at day 7 ( $67.00 \pm 6.71$  pg/mL). Additionally, the PRP gel extract promoted the proliferation and migration of hEnSCs into the artificially induced scratch on monolayer cultures. However, cell migration into the PRP gel was not observed after 3 days of co-culture. It can be concluded that PRP can release GFs promoting tissue regeneration and the proliferation and migration of human endometrial stromal cells. PRP preparations have the potential for application in treating diseases related to endometrial regeneration. However, further work is needed to enhance treatment effectiveness.

*Keywords:* Endometrial stromal cells, gel, growth factors, platelet-rich plasma, regeneration.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0936738303; Email: lvtuyet@hcmus.edu.vn

# VAI TRÒ CỦA VI THAO TÁC TRONG THU NHẬN TINH TRÙNG KHI THỰC HIỆN THU TINH TRONG ỐNG NGHIỆM VỚI CÁC TRƯỜNG HỢP THIỂU TINH NẶNG

Nguyễn Văn Trung<sup>1,\*</sup>, Lê Minh Tâm<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế

<sup>2</sup>Bộ môn Phụ Sản, Trường Đại học Y - Dược Huế, Đại học Huế

## TÓM TẮT

Thiểu tinh nặng ở nam giới gây ảnh hưởng lớn đến kết quả điều trị thụ tinh trong ống nghiệm do khó khăn trong quá trình thu nhận tinh trùng. Nghiên cứu hồi cứu được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả của việc chủ động thu nhận tinh trùng bằng kỹ thuật vi thao tác ở các trường hợp thiểu tinh nặng trong điều trị vô sinh hiếm muộn, thông qua kết quả nuôi cấy phôi nang và chuyển phôi. Tổng cộng 136 chu kỳ điều trị được chẩn đoán thiểu tinh nặng được tiến hành từ tháng 1/2019 đến tháng 6/2023 tại Trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế. Các kết quả thụ tinh, nuôi cấy phôi nang và chuyển phôi được thu thập để đánh giá vai trò của vi thao tác thu nhận tinh trùng trong điều trị vô sinh hiếm muộn ở các đối tượng thiểu tinh nặng. Kết quả 102 các trường hợp thu nhận đủ tinh trùng từ mẫu tươi, 34 trường hợp phải sử dụng thêm mẫu rã hoặc phẫu thuật trích ly tinh trùng và 0 trường hợp sử dụng mẫu hiến tặng. Sử dụng các tinh trùng thu nhận từ vi thao tác cho đối tượng này mang lại tỷ lệ thụ tinh (69,1%); tỷ lệ phôi nang hình thành (59,6%); tỷ lệ phôi nang tốt (32,5%); tỷ lệ beta hCG dương (40,1%); tỷ lệ chu kỳ có trẻ sinh sống (33,3%); tỷ lệ thai ngừng tiến triển (6,25%). Các tỷ lệ này đáp ứng chỉ số đánh giá hiệu quả KPI cho quá trình điều trị hiếm muộn.

*Từ khóa:* Nuôi cấy phôi nang, thiểu tinh nặng, thụ tinh trong ống nghiệm, trẻ sinh sống, vi thao tác.

## MỞ ĐẦU

Thiểu tinh nặng được định nghĩa là những trường hợp nam giới được ghi nhận mật độ tinh trùng trong dịch xuất tinh dưới 5 triệu/mL, định nghĩa này bao gồm cả những trường hợp tinh trùng dưới 1 triệu/mL hoặc tinh trùng ở dạng cryptozoospermia (tinh trùng chỉ được tìm thấy trong dịch sau ly tâm). Nam giới được chẩn đoán là thiểu tinh nặng đối diện với nguy cơ rất lớn không có hoặc không đủ tinh trùng để thực hiện kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn tại ngày thụ hồi noãn (Liu et al., 2023). Bên cạnh đó, chất lượng của tinh trùng không tốt có thể gây các ảnh hưởng tiêu cực lên quá trình nuôi cấy phôi và điều trị thụ tinh trong ống nghiệm (Ciotti et al., 2021).

Thu nhận đủ tinh trùng để thực hiện kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI - Intracytoplasmic Sperm Injection) luôn là thách thức cho các trường hợp thiểu tinh nặng. Đối với các trường hợp có số lượng và chất lượng tinh trùng tốt, các kỹ thuật như ly tâm theo thang nồng độ hoặc bơi lên thường được thực hiện để thu nhận các tinh trùng di động tốt. Tinh trùng được phân lập theo các phương pháp trên gần như không lẫn các tinh trùng bất động và các thành phần khác. Trong khi đó, số lượng tinh trùng quá ít được ghi nhận đòi hỏi cách thức lọc rửa phải thay đổi để thu nhận tối đa số lượng tinh trùng có trong mẫu. Các mẫu tinh dịch chỉ được lọc với một lớp lọc, rửa đơn thuần hoặc chỉ ly tâm thuần túy để lắng tinh trùng. Mẫu sau khi lọc vẫn chứa rất nhiều các thành phần không mong muốn và ảnh hưởng đến việc thu nhận tinh trùng cho ICSI. Việc tách và thu nhận các tinh trùng từ mẫu sau khi tiến hành xử lý vẫn sẽ gặp rất nhiều khó khăn, dẫn đến không có đủ tinh trùng để thực hiện thủ thuật hoặc tinh trùng bị ảnh hưởng nghiêm trọng.

Vi thao tác là thiết bị phổ biến được gắn trên kính hiển vi đảo ngược để thực hiện kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn. Thiết bị này cho phép chuyển đổi các cử động có phạm vi di chuyển lớn thành các chuyển động vi mô ở cấp độ micromet. Đối với các trường hợp thiểu tinh nặng, vi thao tác đóng vai trò giúp thu nhận tinh trùng một cách chủ động, gom đủ số lượng để thực hiện kỹ thuật ICSI (Nagy et al., 2018). Trên thực tế tiến hành, các tinh trùng khi được ghi nhận khả năng di động hoặc được xác định có khả năng sống cần phải tách ra khỏi các thành phần của dịch sau xử lý. Trong các trường hợp tinh trùng có khả năng di động và số lượng nhiều, điều này có thể dễ dàng đạt được bằng chính năng lực của tinh trùng. Ngược lại, khi các mẫu tinh trùng quá yếu và ít, sự tách biệt tinh trùng và các thành phần không mong muốn gần như không thể. Khi này các tinh trùng được chủ động bắt giữ và đưa sang giọt môi trường mới bằng hệ thống vi thao tác là cần thiết. Hệ thống vi thao tác sử dụng kim ICSI để hút và di chuyển tinh trùng từ giọt chứa dịch sau xử lý sang giọt môi trường mới. Quá trình này được thực hiện đến khi số lượng tinh trùng thu nhận được vượt quá số lượng noãn thu được vào ngày chọc hút noãn. Giai đoạn tiếp theo là chọn lựa lại những tinh trùng đã được thu nhận bằng kỹ thuật vi thao tác để tiến hành thủ thuật bất động tinh trùng và tiêm tinh trùng vào bào tương noãn.



Nghiên cứu được tiến hành nhằm hai mục tiêu. Mục tiêu thứ nhất, đánh giá khả năng thu nhận tinh trùng bằng hệ thống vi thao tác đối với các trường hợp thiếu tinh nặng. Mục tiêu thứ hai là đánh giá hiệu quả của kỹ thuật vi thao tác lên khả năng thụ tinh, tạo phôi nang trong điều trị vô sinh hiếm muộn.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nghiên cứu của chúng tôi được tiến hành trên 123 bệnh nhân thuộc nhóm thiếu tinh nặng, tham gia điều trị với 136 chu kỳ thu hồi noãn được nuôi cấy đến giai đoạn phôi nang (Bảng 1). Các tinh trùng được thu hồi bằng hệ thống vi thao tác trước khi tiến hành kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn tại trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh, bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế từ 1/2019 đến 6/2023. Tiêu chuẩn loại trừ gồm những trường hợp có lạc nội mạc tử cung, dính vùng chậu hoặc bệnh viêm vùng chậu.

**Bảng 1. Đặc điểm bệnh nhân trong chu kỳ kích thích buồng trứng**

<b>Đặc điểm vô sinh</b>	
Vô sinh nguyên phát	71,3% (97/136)
Thời gian vô sinh (năm)	5,07 ± 2,84 (0,00 – 15,00)
<b>Người chồng</b>	
Tuổi chồng (năm)	36,29 ± 6,32 (27,00 – 69,00)
Chỉ số khối cơ thể - BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23,65 ± 3,55 (16,61 – 41,42)
Chẩn đoán cryptozoospermia	65,4% (89/136)
<b>Người vợ</b>	
Tuổi vợ (năm)	32,93 ± 5,06 (27,00 – 49,00)
Chỉ số khối cơ thể - BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20,57 ± 2,16 (13,79 – 28,04)
AMH (ng/mL)	3,42 ± 2,49 (0,01 – 16,48)
AFC	11,85 ± 4,82 (3 – 24)

*Các biến định lượng được mô tả giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (nhỏ nhất – lớn nhất); các biến định tính được mô tả với tỷ lệ %.*

Bệnh nhân được kích thích buồng trứng bằng phác đồ GnRH antagonist để thu noãn trưởng thành. Người vợ được tiêm liều FSH tái tổ hợp (Gonal F, Merck, Đức) với liều lượng từ 150 – 250 IU vào ngày 2 của chu kỳ kinh dựa vào số nang noãn đếm được đầu chu kỳ. Siêu âm đầu dò âm đạo được thực hiện để theo dõi sự phát triển của nang noãn. Khi siêu âm có các nang trội đạt kích thước tối thiểu 18 mm, noãn được kích thích trưởng thành với GnRH agonist 0,2 mg tiêm dưới da (Diphereline 0,1 mg, Ipsen Pharma Biotech, Pháp). Sau 36 giờ, chọc hút noãn được thực hiện để thu hồi noãn. Dưới sự hướng dẫn của siêu âm đầu dò âm đạo, kim chọc hút nòng đơn (Kitazato, Nhật Bản) được sử dụng để thu dịch nang noãn vào các ống Falcon đáy tròn 14 mL.

Noãn được thu nhận trong dung dịch G-MOPS PLUS (Vitrolife, Västra Frölunda, Thụy Điển) và được ủ 2 giờ trong giọt môi trường G-IVF plus (Vitrolife, Thụy Điển) ở 37°C, 6% CO<sub>2</sub> (tủ cấy Galaxy 170S, Eppendorf, Anh). Tế bào hạt quanh noãn được tách ra bởi enzyme HYASE 80 IU (Vitrolife, Västra Frölunda, Thụy Điển) và cơ học với pipet thủy tinh có đường kính giảm dần từ 1,5 mm đến 200 µm và 140 µm. Những noãn có hiện diện thể cực thứ nhất được xem là noãn trưởng thành và sẽ được sử dụng cho bước ICSI.

Song song với quá trình xử lý noãn, tinh trùng được chuẩn bị bằng phương pháp rửa đơn thuần. Tinh trùng sau ly giải ở 37°C được pha với Flushing (Fertipro, Beernem – Bỉ) theo tỷ lệ thấp nhất là 1:1. Phần dịch nổi sau ly tâm (300 g trong 10 phút) được loại bỏ cho đến khi trong ống còn lại 0,5 mL dung dịch và cặn lắng. Cặn lắng sau khi thu nhận bằng phương pháp rửa đơn thuần được cho vào các giọt môi trường lớn để tiến hành khảo sát và ghi nhận sự hiện diện của tinh trùng. Kỹ thuật vi thao tác được sử dụng để thu nhận các tinh trùng có khả năng sống và chuyển sang giọt nhỏ dưới 1 µL.

Thực hiện kỹ thuật ICSI với các tinh trùng được thu nhận trong giọt nhỏ với các noãn trưởng thành. Sau khi tiến hành ICSI, noãn được nuôi cấy đơn trong các giọt môi trường G-TL (20 µL, Vitrolife, Västra Frölunda, Thụy Điển), được phủ 3 mL OVOIL (Vitrolife, Västra Frölunda, Thụy Điển), và được nuôi cấy trong 5 ngày với điều kiện 6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> trong tủ cấy FreyGen (IVFtech, Đan Mạch).

Phần mềm SPSS 20 for Windows (SPSS, Chicago, Mỹ) được sử dụng để xử lý dữ liệu. Kiểm tra phân phối chuẩn các biến định lượng bởi Kolmogorov-Smirnov test. Biến định lượng có phân phối chuẩn sẽ được so sánh trung bình và độ lệch chuẩn bởi t-test, biến không theo phân phối chuẩn được so sánh trung vị và khoảng tứ phân vị bằng phương pháp Mann-Whitney U. Các biến phân loại và biến tỷ lệ được so sánh với chi-square test. Khác biệt có ý nghĩa thống kê khi giá trị  $p < 0,05$ .

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phương pháp thu nhận tinh trùng bằng vi thao tác có thể giúp chủ động thu nhận tinh trùng từ các mẫu tinh dịch của các bệnh nhân được chẩn đoán thiếu tinh nặng. Những tinh trùng được cho là có khả năng di động hoặc được đánh giá là vẫn còn chức năng sống được thu nhận và chuyển ngay lập tức sang một giọt môi trường rất nhỏ đã được làm phẳng. Giọt môi trường này đóng vai trò như một giọt trung gian lưu giữ tinh trùng trước khi thực hiện kỹ thuật ICSI. Giọt môi trường này phải thỏa mãn điều kiện là thể tích phải rất nhỏ (dưới 1  $\mu$ L), phẳng và không bị khô để đảm bảo chức năng sống của tinh trùng và dễ dàng thu nhận lại khi thực hiện kỹ thuật ICSI. Việc thu nhận tinh trùng bằng kỹ thuật vi thao tác trong trường hợp thiếu tinh nặng đảm bảo ba mục đích. Thứ nhất, tinh trùng được tách khỏi dịch sau ly tâm một cách sớm nhất, hạn chế tác động của các gốc oxy hóa hoạt động (ROS - reactive oxygen species) lên tinh trùng. Thứ hai, những tinh trùng tốt nhất có thể được chọn lọc khi thực hiện ICSI. Thứ ba, việc thu nhận tinh trùng trước bằng kỹ thuật vi thao tác giúp giảm thời gian ICSI, qua đó giảm thiểu tác động tiêu cực lên noãn.

Trong quá trình điều trị thụ tinh trong ống nghiệm, số noãn trưởng thành thu nhận trung bình  $10,79 \pm 6,87$  và phân bố với khoảng khá rộng từ 1 đến 44 noãn, đòi hỏi phải có quy trình thu nhận tinh trùng với các yêu cầu khác nhau (Bảng 2). Nhờ việc áp dụng các kỹ thuật thu nhận tinh trùng này, chúng tôi đã đảm bảo được khả năng thu nhận tinh trùng cho kỹ thuật ICSI cho nhóm bệnh nhân này. Cụ thể với 136 chu kỳ ICSI trong đó 89 chu kỳ được ghi nhận tinh trùng thuộc nhóm tinh trùng ần (cryptozoospermia), chúng tôi đã không phải sử dụng đến nguồn tinh trùng hiến tặng. Việc thực hiện vi thao tác trong thu nhận tinh trùng đã giúp chúng tôi thu được tinh trùng từ các mẫu tươi với tỷ lệ cao, 75% (102/136, Bảng 2), nhờ đó giảm được sự lo lắng và giảm áp lực về kinh tế cho bệnh nhân thiếu tinh nặng. Tỷ lệ có tinh trùng từ mẫu tươi cho các đối tượng này cao hơn so với nghiên cứu trước đây (55,71%; Koscinski et al., 2007).

**Bảng 2. Đặc điểm chu kỳ kích thích buồng trứng và nuôi cấy phôi**

Đặc điểm chu kỳ kích thích buồng trứng	
Liều đầu FSH	235,85 $\pm$ 37,97 (100 – 300)
Tổng liều FSH	2751,96 $\pm$ 2055,06 (300 – 3300)
Số ngày kích thích	8,78 $\pm$ 1,02 (5,00 – 13,00)
Số noãn thu hồi	14,03 $\pm$ 8,62 (1,00 – 48,00)
Số noãn trưởng thành	10,79 $\pm$ 6,87 (1,00 – 44,00)
Tỷ lệ noãn trưởng thành	76,9% (1468/1908)
Mẫu tươi	75,0% (102/136)
Sử dụng thêm mẫu trữ lạnh	16,2% (22/136)
Sử dụng thêm mẫu trữ lạnh và phẫu thuật trích ly tinh trùng	8,8% (12/136)
Tinh trùng hiến tặng	0% (0/136)

*Các biến định lượng được mô tả giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (nhỏ nhất – lớn nhất); các biến định tính được mô tả với tỷ lệ %.*

Việc thu nhận đủ tinh trùng và chọn được các tinh trùng tốt nhất của mẫu với kỹ thuật vi thao tác đã giúp chúng tôi có kết quả thụ tinh và nuôi cấy phôi tốt cho các bệnh nhân thiếu tinh nặng. Cụ thể, tỷ lệ thụ tinh đạt 69,1%; tỷ lệ phôi nang hình thành đạt 59,6% và tỷ lệ phôi nang tốt đạt 32,5% (Bảng 3). Kết quả tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ phôi nang tạo thành của chúng tôi cao hơn kết quả của nhóm nghiên cứu Cai và cộng sự (2020), lần lượt là 54% và 27%. Kết quả của chúng tôi khá tương đồng với kết quả của Bartolacci và cộng sự (2018), lần lượt là 66,7% và 50%. Các tỷ lệ này nằm trong ngưỡng chấp nhận được của chỉ số đánh giá hiệu quả KPI (Key Performance Indicator) trong nuôi cấy phôi theo đồng thuận của Vienna 2017 và của Ý 2023 (ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine, 2017; Vaiarelli et al., 2023).

**Bảng 3. Kết quả thụ tinh và nuôi cấy phôi**

Đặc điểm thụ tinh và nuôi cấy phôi		Ngưỡng
Số noãn thụ tinh bình thường	7,46 $\pm$ 5,67 (1,00 – 37,00)	
Tỷ lệ noãn thụ tinh	69,1% (1015/1468)	60 - 80%
Số phôi phân cắt	7,43 $\pm$ 5,66 (1,00 – 36,00)	
Tỷ lệ phôi phân cắt	98,0% (995/1015)	
Số phôi nang D5	4,42 $\pm$ 4,17 (0,00 – 28,00)	
Số phôi nang D5 loại tốt	2,44 $\pm$ 2,89 (0,00 – 16,00)	
Tỷ lệ phôi nang hình thành	59,6% (601/1015)	40 - 60%
Tỷ lệ phôi nang tốt	32,5% (330/1015)	30 - 40%

*Các biến định lượng được mô tả giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (nhỏ nhất – lớn nhất); các biến định tính được mô tả với tỷ lệ %.*

Mặc dù chất lượng tinh trùng kém ở nhóm bệnh nhân thiếu tinh nặng nhưng kết quả sau chuyển phôi đã cho kết quả tốt. Cụ thể tỷ lệ beta hCG dương sau chuyển phôi đạt 40,1% sau mỗi chu kỳ chuyển phôi, kết quả thai lâm sàng đạt 35,9% và tỷ lệ chu kỳ có trẻ sinh sống sau điều trị là 33,3% (Bảng 4). Các tỷ lệ này vượt ngưỡng kỳ vọng trong điều trị cho các bệnh nhân tiền lượng kém theo đồng thuận của Y (2023) và cao hơn kết quả của các nghiên cứu trước đây. Trong khi đó, chỉ 6,25% các chu kỳ có ghi nhận sảy thai, thấp hơn so với tỷ lệ 15% trong nghiên cứu trước đó (Vaiarelli et al., 2023).

**Bảng 4. Kết quả chuyển phôi và diễn tiến thai kỳ**

Kết quả chuyển phôi và diễn tiến của thai kỳ	
Số lần chuyển phôi	1,41 ± 0,89 (1 – 5)
Tỷ lệ beta hCG dương	40,1% (77/192)
Tỷ lệ thai lâm sàng	35,9% (69/192)
Tỷ lệ thai ngừng tiến triển	6,25% (12/192)
Tỷ lệ thai cộng dồn	59,2% (77/130)
Tỷ lệ chu kỳ có trẻ sinh sống	33,3% (64/192)

*Các biến định lượng được mô tả giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (nhỏ nhất – lớn nhất); các biến định tính được mô tả với tỷ lệ %.*

**Bảng 5. So sánh chất lượng mẫu tinh trùng trong nhóm thiếu tinh nặng**

Đặc điểm	Nhóm cryptozoospermia	Nhóm 1 - 5 triệu/mL	Giá trị p
Tỷ lệ thụ tinh	67,4% (648/962)	72,5% (367/506)	0,042
Tỷ lệ phôi nang hình thành	58,6% (380/648)	60,2% (221/367)	0,624
Tỷ lệ phôi nang tốt	31,5% (204/648)	34,3% (126/367)	0,352
Tỷ lệ beta hCG dương	45,8% (54/118)	31,1% (23/74)	0,043
Tỷ lệ chu kỳ có trẻ sinh sống	39,0% (46/118)	24,3% (18/74)	0,036

*Các biến định tính được so sánh với kiểm định Chi bình phương.*

**Bảng 6. Ảnh hưởng của tuổi vợ đến các chu kỳ điều trị**

Người vợ	< 35 tuổi	≥ 35 tuổi	Giá trị p
Cryptozoospermia	63,4% (59/93)	69,8% (30/43)	0,471
Số noãn trưởng thành	11 (9)	8 (8)	0,024
Tỷ lệ thụ tinh	70,6% (750/1062)	65,3% (265/406)	0,047
Tỷ lệ phôi nang hình thành	61,5% (461/750)	52,8% (140/265)	0,014
Tỷ lệ phôi nang tốt	35,1% (263/750)	25,5% (67/265)	0,003
Tỷ lệ beta hCG dương	46,4% (58/125)	28,4% (19/67)	0,015
Tỷ lệ chu kỳ có trẻ sinh sống	39,2% (49/125)	22,4% (15/67)	0,019

*Các biến định tính được so sánh với kiểm định Chi bình phương. Các biến định lượng so sánh trung vị và khoảng tứ phân vị bằng phương pháp Mann-Whitney U.*

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy rằng số lượng tinh trùng ít hơn trong nhóm cryptozoospermia so với nhóm tinh trùng ≥ 1 triệu tinh trùng/mL chỉ ghi nhận tỷ lệ thụ tinh giảm có ý nghĩa thống kê (67,4% so với 72,5%;  $p = 0,042$ ). Tuy nhiên tỷ lệ beta hCG dương và tỷ lệ trẻ sinh sống ghi nhận cao hơn (có ý nghĩa thống kê) ở nhóm cryptozoospermia so với nhóm còn lại (45,8% so với 31,1%;  $p = 0,043$  và 39,0% so với 24,3%;  $p = 0,036$ , tương ứng) (Bảng 5). Tỷ lệ có thai và có trẻ sinh sống của chúng tôi cao hơn báo cáo của Hibi và cộng sự (2023) tương ứng với 31,5% và 20,5% (Hibi et al., 2023). Như vậy dường như số lượng tinh trùng ít ảnh hưởng đến kết quả điều trị thụ tinh trong ống nghiệm. Bên cạnh đó, người vợ đóng vai trò quan trọng trong điều trị thụ tinh trong ống nghiệm. Trong nghiên cứu này chúng tôi ghi nhận khi người vợ <35 tuổi, các chỉ số về điều trị thụ tinh trong ống nghiệm đều cho kết quả tốt hơn so với nhóm người vợ ≥35 tuổi và các khác biệt này có ý nghĩa thống kê (Bảng 6). Kết quả này phù hợp với các nhận định về vai trò sửa sai của noãn đối với các bất thường DNA được phát hiện trên tinh trùng bị suy giảm khi tuổi người vợ tăng (Borges et al., 2019).

**KẾT LUẬN**

Kỹ thuật vi thao tác được sử dụng để thu nhận tinh trùng ở các bệnh nhân thiếu tinh nặng có thể giúp giải quyết phần nào các khó khăn trong việc thu nhận tinh trùng. Bên cạnh đó kỹ thuật vi thao tác giúp đảm bảo chất lượng của tinh trùng, giúp cải thiện hiệu quả điều trị vô sinh hiếm muộn với phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Bartolacci, A., Pagliardini, L., Makieva, S., Salonia, A., Papaleo, E., & Viganò, P. (2018). Abnormal sperm concentration and motility as well as advanced paternal age compromise early embryonic development but not pregnancy outcomes: a retrospective study of 1266 ICSI cycles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35: 1897–1903.
- Borges E, Zanetti BF, Setti AS, Braga DP de AF, Provenza RR, Iaconelli A. (2019). Sperm DNA fragmentation is correlated with poor embryo development, lower implantation rate, and higher miscarriage rate in reproductive cycles of non-male factor infertility. *Fertil Steril*, 112(3):483-490
- Cai, H., Gordts, S., Sun, J., Meng, B., & Shi, J. (2020). Reproductive outcomes with donor sperm in couples with severe male-factor infertility after intracytoplasmic sperm injection failures. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37: 1883–1893.
- Ciotti, P. M., Calza, N., Zuffa, S., Notarangelo, L., Nardi, E., Damiano, G., Cipriani, L., & Porcu, E. (2021). Two subsequent seminal productions: A good strategy to treat very severe oligoasthenoteratozoospermic infertile couples. *Andrology*, 9(4): 1185–1191.
- ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine (2017). The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators. *Reproductive BioMedicine Online*, 35(5):494-510.
- Hibi, H., Tokoro, M., Sonohara, M., Ihara, K., Fukunaga, N., & Asada, Y. (2023). Cryptozoospermia: Should we use ejaculated sperm or surgically retrieved sperm for assisted reproductive technology? *Reproductive Medicine and Biology*, 22(1): 2–7.
- Koscinski, I., Wittemer, C., Marcelli, F., Defosse, A., Rigot, J. M., Flandre, J. De, & Lille, C. (2007). Optimal management of extreme oligozoospermia by an appropriate cryopreservation programme. *Human Reproduction*, 22(10): 2679–2684.
- Liu, H., Luo, Z., Chen, J., Zheng, H., & Zeng, Q. (2023). Treatment progress of cryptozoospermia with Western Medicine and traditional Chinese medicine: A literature review. *Health Science Reports*, 6(1).
- Nagy, Z. P., Varghese, A. C., & Agarwal, A. (2018). A Textbook of Current and Emerging Methods and Devices Second. In *Encyclopedia of Endocrine Diseases*.
- Vaiarelli, A., Zacà, C., Spadoni, V., Cimadomo, D., Conforti, A., Alviggi, C., Palermo, R., Bulletti, C., De Santis, L., Pisaturo, V., Vigiliano, V., Scaravelli, G., Ubaldi, F. M., & Borini, A. (2023). Clinical and laboratory key performance indicators in IVF: A consensus between the Italian Society of Fertility and Sterility and Reproductive Medicine (SIFES-MR) and the Italian Society of Embryology, Reproduction and Research (SIERR). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 40(6): 1479–1494.

## MICROMANIPULATION RETRIEVAL OF SPERM IN *IN-VITRO* FERTILIZATION IN CASES OF SEVERE OLIGOASTHENOTERATOZOOSPERMIA

Nguyen Van Trung<sup>1\*</sup>, Le Minh Tam<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Center for Reproductive Endocrinology and Infertility

<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University, Hue, Vietnam

**SUMMARY**

Sperm collection during in vitro fertilization treatment is challenging in cases of severe oligoasthenoteratozoospermia (OAT). Micromanipulation techniques can be used to aid sperm collection during treatment. In this retrospective study, the effects of micromanipulation techniques on severe OAT in vitro fertilization treatment were evaluated, based on blastocyst culture and embryo transfer results. The study involved 136 treatment cycles, conducted between January 2019 and June 2023 at the Center for Reproductive Endocrinology and Infertility, Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital. The fertilization outcomes, blastocyst culture and embryo transfer were evaluated following the application of micromanipulation sperm retrieval. Of 136 treatment cycles, 102 cycles used sperm from fresh samples, 34 cycles used additional frozen samples or retrieval sperm from surgery. Donated sperm was not used during ICSI. We found most parameters: the fertilization rate (69.1%), the blastocyst rate (59.6%), the good quality blastocyst rate (32.5%), the positive beta hCG rate (40.1%), the cycles with live birth rate (33.3%) and the miscarriage rate (6.25%) exceeded the KPI for the consensus IVF treatment.

**Keywords:** Blastocyst culture, in vitro fertilization, live birth, micromanipulation, severe oligoasthenoteratozoospermia.

\* Author for correspondence: Tel: 0935551344; Email: nvtrung@bv.huemed-univ.edu.vn

# ẢNH HƯỞNG CỦA LOẠI TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ VÀ LẦN CẤY CHUYỂN ĐẾN HÀM LƯỢNG PROTEIN EXOSOME ĐƯỢC TIẾT RA

Thân Thị Trang Uyên<sup>1,2\*</sup>, Hoàng Hương Diễm<sup>1#</sup>, Nguyễn Thị Tuyết Anh<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Công nghệ cao Vinmec, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu Miễn dịch Vinmec-VinUni, Hà Nội, Việt Nam

#Tác giả có đóng góp như nhau trong nghiên cứu.

## TÓM TẮT

Thế tiết ngoại bào exosome, đặc biệt là exosome từ tế bào gốc trung mô, đang nổi lên như là một đối tượng tiềm năng cho ứng dụng chẩn đoán và trị liệu. Tuy nhiên, hướng nghiên cứu ứng dụng này đang gặp phải rào cản là dòng tế bào ổn định tiết exosome, quy mô sản xuất và mức độ ổn định của các thành phần sinh học trong exosome. Nghiên cứu này của chúng tôi nhằm tìm mối liên hệ của loại tế bào gốc trung mô sơ cấp và số lần cấy chuyển (passage – P) lên hàm lượng protein exosome được tế bào tiết ra trong quá trình nuôi tế bào 2D. Kết quả cho thấy rằng, tế bào gốc trung mô trong nuôi cấy có hình dạng thuôn dài và giống nguyên bào sợi và exosome thu được có hình thái giống cái bát (cup-shaped). Không có sự khác biệt về hàm lượng protein exosome từ các mẫu exosome được tiết ra từ hai loại tế bào gốc trung mô dây rốn và mô mỡ và từ các P khác nhau (P5, P6 và P7) của dòng tế bào gốc trung mô dây rốn. Kết quả từ phép phân tích tương quan cho thấy các P khác nhau (P5, P6 và P7) của tế bào gốc trung mô dây rốn không làm ảnh hưởng đến hàm lượng protein exosome được tiết ra ( $r^2 = 0,015$ ). Đồng thời, hai loại tế bào gốc trung mô dây rốn và mô mỡ nuôi cấy sơ cấp cũng không liên quan đến hàm lượng protein exosome tiết ra ( $r^2 = 0,019$ ). Các dữ liệu từ nghiên cứu này cho thấy rằng trong điều kiện nuôi cấy 2D bình thường, hàm lượng protein exosome tiết ra không bị tác động bởi tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ mô dây rốn và mô mỡ và tế bào ở các giai đoạn cấy chuyển cao.

*Từ khóa:* Protein tổng số, tế bào gốc trung mô, thế tiết exosome.

## MỞ ĐẦU

Thế tiết ngoại bào (extracellular vesicles/EV) là các túi nhỏ có lớp màng lipid kép giống như màng tế bào và được tiết ra từ nhiều loại tế bào khác nhau (Hoang *et al.*, 2020). Chúng được tìm thấy trong môi trường nuôi cấy tế bào và nhiều loại dịch cơ thể như huyết tương, nước tiểu, nước bọt, dịch ối và sữa mẹ (Lasser *et al.*, 2011). Thế tiết hay EV được phân làm 3 loại: thể tế bào chết theo chương trình - apoptotic body (1 - 5  $\mu$ m), vi thể/vi bóng bào - microvesicle (100 - 1000 nm) và thể exosome (50 - 200 nm) (Than *et al.*, 2017). Trước đây, thế tiết ngoại bào được coi là rác thải từ tế bào; tuy nhiên, các nghiên cứu đã chứng minh rằng thế tiết có vai trò quan trọng trong các quá trình sinh lý học của cơ thể do chúng có thể tác động đến chính nhóm tế bào tiết ra chúng (autocrine) hoặc tác động đến các tế bào khác ở môi trường xung quanh (paracrine).

Tế bào gốc trung mô hiện đang là loại tế bào gốc được sử dụng rộng rãi nhất trong thử nghiệm lâm sàng nhằm mục đích điều trị nhiều bệnh lý khác nhau. Tuy nhiên, ngày càng nhiều nghiên cứu cho thấy hiệu quả trị liệu của tế bào gốc trung mô chủ yếu thông qua các chất tiết hơn là cơ chế biệt hoá trực tiếp của chúng (Lai *et al.*, 2010; Phinney & Prockop, 2007; Turturici *et al.*, 2014). Các nghiên cứu gần đây cho thấy chức năng sinh học và khả năng ứng dụng cao của các thế tiết ngoại bào được tiết ra từ tế bào gốc trung mô là do thành phần chất mang chứa bên trong nó. Đặc biệt trong quá trình liền vết thương, EV có khả năng thúc đẩy khả năng di chuyển và tăng sinh tế bào, thúc đẩy tế bào tăng sản xuất collagen và sự hình thành các mạch máu mới, tái biểu mô hóa và giảm độ rộng sẹo (Than *et al.*, 2017). Đối với thoái hoá sụn khớp, EV có vai trò giảm viêm, điều hoà miễn dịch môi trường sụn khớp, giảm đau và tái tạo cấu trúc nền (extracellular matrix) (Nguyen *et al.*, 2021). Các loại thế tiết ngoại bào khác nhau hoặc cùng loại thế tiết nhưng được tạo ra từ các điều kiện nuôi khác nhau (có hay không có các chất kích thích) sẽ mang các hoạt chất khác nhau. Do vậy, khả năng tác động của EV và các hoạt chất trong từng loại EV tới các quá trình sinh học tế bào là khác nhau và cần được đánh giá để lựa chọn loại thế tiết ngoại bào phù hợp.

Y văn hiện nay đã cung cấp cơ sở khoa học cho hướng sử dụng thế tiết từ tế bào gốc trung mô như một loại thuốc mới trong các liệu pháp y học tương lai. Tuy nhiên, rào cản của việc phát triển và sử dụng thế tiết ngoại bào đó là nguồn tế bào ổn định tiết thế tiết, quy trình và điều kiện nuôi cấy tế bào để tiết thế tiết có thành phần ổn định và mức độ đáp ứng quy mô đủ để có thể sản xuất thế tiết phục vụ nhu cầu điều trị. Trong nghiên cứu này, chúng tôi kiểm tra mức độ tương quan giữa các lần cấy chuyển tế bào gốc trung mô dây rốn sơ cấp và loại tế bào gốc trung mô từ dây rốn và mô mỡ đến số lượng thế tiết được tiết ra thông qua hàm lượng protein tổng số của exosome.

## NGUYÊN VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên vật liệu

Tế bào gốc trung mô dây rốn và mô mỡ được đã được thu thập và lưu trữ tại Ngân hàng mô Vinmec.

### Phương pháp nuôi cấy tế bào gốc trung mô

Tế bào được rã đông trong bể ổn nhiệt 37°C và chuyển sang ống ly tâm chứa sẵn 5 mL môi trường nuôi cấy. Dung dịch tế bào được ly tâm với lực 400 x g trong vòng 4 phút ở 20°C để làm lắng tế bào. Cặn tế bào được hoà tan trong 3 mL môi trường nuôi cấy StemMACS™ MSC Expansion Media Kit (Miltenyi Biotec, Đức). Tế bào được nhuộm và đếm bằng cách lấy 10 µL dịch huyền phù tế bào trộn đều với 10 µL Trypan Blue (Gibco, Mỹ), sau đó nhỏ 10 µL dịch tế bào vào buồng đếm Neubauer cải tiến (InCyto, Hàn Quốc) và đếm tế bào bằng máy hemocytometer. Chai nuôi cấy tế bào sẽ được xử lý bề mặt bằng cơ chất CTS™ CELLstart™ (Gibco, Mỹ) đã pha loãng với PBS (Invitrogen, Mỹ) theo tỷ lệ 1:300 trong 1 giờ ở 37°C trước khi cấy tế bào. Tế bào được cấy vào chai nuôi cấy với mật độ 5000 tế bào/cm<sup>2</sup> và nuôi trong môi trường nuôi cấy StemMACS™ MSC Expansion Media Kit (Miltenyi Biotec, Đức) trong điều kiện 37°C và 5% CO<sub>2</sub>.

Khi tế bào đạt mật độ 90% bề mặt chai nuôi cấy, dịch nuôi tế bào được hút bỏ và tế bào được rửa bằng dung dịch PBS (Invitrogen, Mỹ). Sau khi loại bỏ dịch rửa PBS, bổ sung 2 mL dung dịch Enzyme CTS™ TrypLE™ (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) vào chai nuôi cấy T75 và ủ trong tủ nuôi cấy ở 37°C trong 3 phút. Tiếp theo, tế bào được hỗ trợ tách rời khỏi bề mặt chai bằng cách vỗ nhẹ cạnh bên của chai nuôi cấy, và enzyme sẽ được trung hoà bằng cách bổ sung môi trường nuôi cấy với thể tích bằng với thể tích enzyme đã sử dụng trước đó. Tế bào sẽ được thu lại bằng ly tâm với lực 400 x g trong vòng 4 phút ở 20°C, sau đó được đánh tan trong môi trường nuôi cấy và chuyển vào chai nuôi tế bào.

### Phương pháp ly tâm thu thể tiết exosome

Môi trường điều hoà nuôi cấy tế bào đầu tiên được ly tâm ở 300 x g trong 5 phút để loại bỏ các mảnh vỡ tế bào. Sau đó môi trường tiếp tục được ly tâm ở lực 2.000 x g trong 30 phút và 15.000 x g trong 30 phút để loại bỏ các quần thể thể tiết kích thước lớn. Tiếp theo, môi trường điều hoà tiếp tục được ly tâm ở 100.000 x g trong 90 phút để phân lập thể tiết exosome (Crescitelli *et al.*, 2013). Cuối cùng, exosome sẽ được hoà tan lại trong PBS (Invitrogen, Mỹ) để rửa và thu lại bằng thực hiện ly tâm ở 100.000 x g trong 90 phút. Cặn exosome thu được sẽ được đánh tan trong PBS (Invitrogen, Mỹ) để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

### Phương pháp xác định đặc điểm hình thái của thể tiết ngoại bào bằng kính hiển vi điện tử truyền qua

Nhằm phân tích đặc điểm hình thái của thể tiết, phương pháp nhuộm âm tính và soi dưới kính hiển vi điện tử truyền qua đã được sử dụng trong nghiên cứu này. Mẫu exosome được rã đông và cố định với 4% paraformaldehyde (Sigma Aldrich, Mỹ) với tỷ lệ về thể tích 1 EV : 1 paraformaldehyde. Tiếp đó, nhỏ 5 µL dung dịch thể tiết từ tế bào gốc trung mô dây rốn đã cố định lên một màng Formvar-carbon coated grids (Ted Pella Inc., Mỹ) và để lắng 20 phút ở nhiệt độ thường. Nhuộm exosome với uranyl-oxalate trong 5 phút ở nhiệt độ phòng và soi thể tiết exosome dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (JEOL 1100 TEM) tại Phòng Siêu cấu trúc - Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

### Phương pháp đo protein tổng số bằng BCA

Mẫu thể tiết exosome bảo quản ở nhiệt độ -80°C được rã đông đến nhiệt độ phòng và đo hàm lượng protein tổng số sử dụng bộ kit Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Chất chuẩn và hoá chất được chuẩn bị theo hướng dẫn đi kèm của bộ kit. Mẫu exosome cần đo (đã rã đông) và chất chuẩn (ở các dải nồng độ khác nhau) được hút và nhỏ vào từng giếng của đĩa đã thiết kế (25 µL/giếng). Tiếp theo, bổ sung vào mỗi giếng 200 µL dung dịch Working Reagent và lắc đều trong vòng 30 giây. Đĩa thí nghiệm được đậy nắp và ủ ở 37°C trong vòng 30 phút. Sau khi kết thúc ủ, đĩa thí nghiệm sẽ được để ở nhiệt độ phòng (khoảng 10 phút) và đo độ hấp thụ tại bước sóng 562 nm bằng máy đo quang phổ Glomax (Promega, Mỹ). Giá trị hấp thụ đo được và nồng độ chất chuẩn sẽ được sử dụng để dựng được đường chuẩn (có dạng  $y = ax + b$ ) thể hiện mối tương quan giữa nồng độ chất chuẩn và độ hấp thụ, từ đó tính ra nồng độ protein tương ứng.

### So sánh tương quan và thống kê

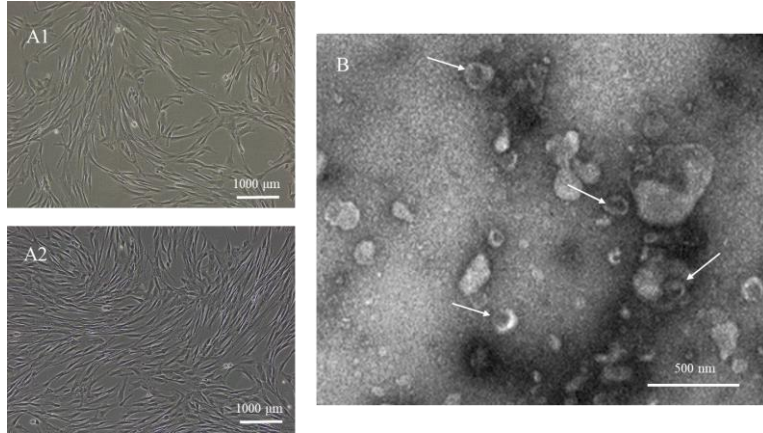
Phần mềm Excel được sử dụng để phân tích dữ liệu và trình bày biểu đồ. Biểu đồ phân tán (scatterplot) để biểu diễn sự phân tán của mẫu và phân tích hiệp phương sai và hệ số tương quan để đánh giá mối tương quan của lần cấy chuyên với hàm lượng protein thu được. Dữ liệu trung bình được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (SD).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Nuôi cấy tế bào gốc trung mô và phân lập exosome

Trong quá trình nuôi cấy, cả tế bào gốc trung mô dây rốn và mô mỡ sơ cấp đều có biểu hiện kiểu hình thuôn dài và giống nguyên bào sợi (Hình 1 A1-A2). Đây là kiểu hình điển hình của tế bào gốc trung mô trong nuôi cấy.

Đồng thời, khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM), exosome thu được có kiểu hình giống cái bát (cup-shaped) và kích thước trong khoảng từ 50 nm đến 200 nm (Hình 1B). Đây cũng là hình thái điển hình của exosome được nhuộm âm tính và quan sát dưới kính hiển vi. Kết quả này tương đồng với các kết quả của chúng tôi trước đây cũng như các kết quả công bố quốc tế của các nhóm nghiên cứu khác (Hoang *et al.*, 2020). Khi quan sát hình ảnh dưới kính hiển vi TEM, chúng tôi nhận thấy bên cạnh những hạt có đặc điểm hình thái và kích thước của exosome, có những hạt có kích thước lớn (khoảng 500 nm) và hạt tròn không có hình cái bát. Những hạt kích thước lớn hoặc nhỏ, bề mặt hạt không trơn nhẵn có thể là các vi thể (microvesicle) lẫn vào quần thể exosome trong quá trình phân lập do hai quần thể thể tiết này có sự giao thoa về mặt kích thước, và vì phương pháp siêu ly tâm không có khả năng tinh sạch các quần thể thể tiết có sự giao thoa về kích thước (Patel *et al.*, 2019; Vlassov *et al.*, 2012). Để phân tách được exosome và vi thể, cần thiết phải sử dụng phương pháp ly tâm dựa vào tỷ trọng (gradient centrifugation) để tách các hạt quần thể có trọng lượng khác nhau (Patel *et al.*, 2019).



**Hình 1. Đặc điểm hình thái của tế bào gốc trung mô trong nuôi cấy và exosome**

A1) Hình thái của tế bào gốc trung mô dây rốn; A2) Hình thái tế bào gốc trung mô mô mỡ;  
B) Hình thái đại diện của exosome phân lập từ tế bào gốc trung mô dây rốn (mũi tên màu trắng).

### Biểu hiện của protein exosome tiết ra trong quá trình nuôi cấy

Sau khi exosome thu được từ phương pháp ly tâm, cần exosome được đo hàm lượng protein tổng số và tính tương ứng với hàm lượng protein exosome được tiết ra từ 1 triệu tế bào. Kết quả trong Bảng 1 cho thấy, cứ 1 triệu tế bào gốc trung mô dây rốn trong nuôi cấy từ P5 đến P7 có thể tiết ra từ 18,040 µg đến 20,928 µg protein. Mặc dù có sự khác biệt về hàm lượng protein exosome được tiết ra giữa các tế bào gốc trung mô dây rốn ở P5, P6 và P7, nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Bên cạnh đó, cứ 1 triệu tế bào gốc trung mô mô mỡ (P3) có thể tiết ra 25,254 µg protein exosome. Khi so sánh với hàm lượng protein exosome do tế bào gốc trung mô mô mỡ (P3) và dây rốn (ở P5, P6 và P7) tiết ra, chúng tôi cũng nhận thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Trong nghiên cứu này, tế bào gốc trung mô mô mỡ phát triển chậm hơn ở các giai đoạn cấy chuyển cao từ P5 trở đi; do vậy, chúng tôi không thu được đủ exosome ở các P5, P6 và P7 để so sánh với exosome từ tế bào gốc trung mô dây rốn ở P tương ứng. Vấn đề này sẽ cần phải khắc phục và giải quyết ở các nghiên cứu tiếp theo.

Hàm lượng exosome thu được phản ánh hiệu suất thu hồi exosome, tỷ lệ exosome với protein và mức độ tinh sạch của exosome (Patel *et al.*, 2019). Hàm lượng protein exosome khó có thể so sánh trực tiếp giữa các nghiên cứu, tuy nhiên trong báo cáo của Webber & Clayton cho biết, cứ khoảng  $10^9 - 10^{10}$  hạt exosome có thể thu được 1 µg protein tổng số (Webber & Clayton, 2013). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tính hàm lượng protein tổng số của exosome nhằm mục đích đánh giá khả năng tiết của tế bào gốc trung mô. Tuy nhiên, chúng tôi không đếm được hạt exosome để tính được tỷ lệ exosome và protein trong mẫu nghiên cứu thu được. Bên cạnh đó, do số lượng mẫu thu được trong giai đoạn nghiên cứu là khác nhau, nên cỡ mẫu của tế bào gốc trung mô mô mỡ thu được ít hơn so với dây rốn. Do vậy, trong các nghiên cứu tiếp theo, nhóm nghiên cứu cần phải tăng cỡ mẫu sinh học để đảm bảo mức độ đồng đều về cỡ mẫu cho các nhóm nhằm nâng cao giá trị kết quả đo được.

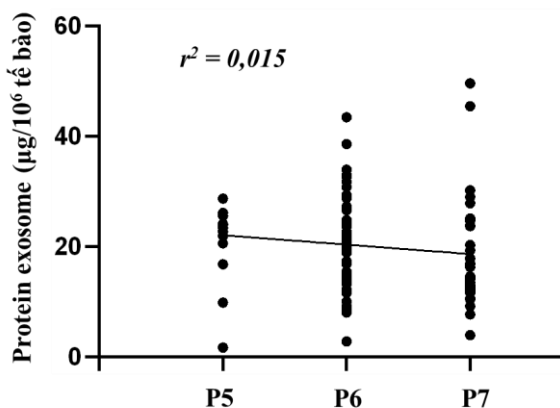
**Bảng 1. Biểu hiện protein exosome tổng số do tế bào gốc trung mô tiết ra.**

	Protein/1 triệu tế bào (µg)	SD	n
TBGTMDR_P5	20,429	7,660	12
TBGTMDR_P6	20,928	7,814	67
TBGTMDR_P7	18,040	9,909	33
TBGTMMM_P3	25,254	14,992	7

TBGTMDR: tế bào gốc trung mô dây rốn; TBGTMMM: Tế bào gốc trung mô mô mỡ; SD: Độ lệch chuẩn; n: Cỡ mẫu.

**Sự tương quan giữa lần cấy chuyển và hàm lượng protein exosome tổng số do tế bào gốc trung mô dây rốn tiết ra**

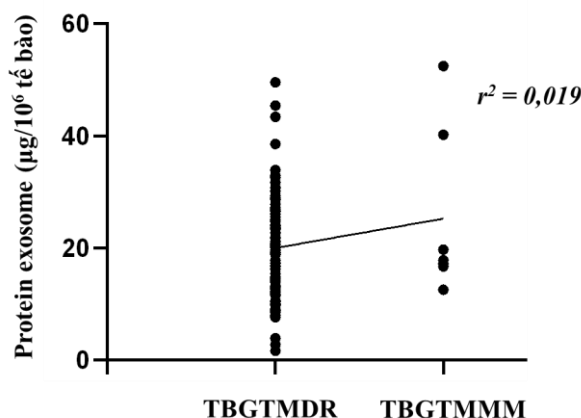
Để kiểm tra sự tương quan giữa các lần cấy chuyển với lượng exosome được tiết ra thông qua đo protein tổng số của exosome, chúng tôi tiến hành đo protein tổng số của exosome thu được từ tế bào gốc trung mô dây rốn ở P5, P6 và P7. Kết quả cho thấy, không có sự tương quan giữa các lần cấy chuyển P5, P6 và P7 của tế bào gốc trung mô dây rốn với lượng protein exosome được tiết ra (hệ số tương quan  $r^2 = 0,015$ ;  $p = 0,198$ ). Điều này cho thấy, có thể tế bào gốc trung mô dây rốn sơ cấp ở các lần cấy chuyển lớn có thể đã ổn định hơn và có khả năng tiết exosome đều hơn. Thông thường, tế bào nuôi cấy sơ cấp sẽ không tiết exosome ổn định bằng các dòng tế bào do tế bào sơ cấp đang trong giai đoạn thích nghi với điều kiện tăng sinh bên ngoài cơ thể (Le Gall *et al.*, 2020). Tuy nhiên, dữ liệu của chúng tôi cho thấy rằng, tế bào gốc trung mô dây rốn ở giai đoạn từ P5 trở đi đã ổn định trong việc tiết protein exosome.



Hình 2. Biểu đồ phân tán biểu diễn mối tương quan giữa lần cấy chuyển tế bào gốc trung mô dây rốn (P5, P6 và P7) với hàm lượng protein exosome được tiết ra trong quá trình nuôi cấy

**Sự tương quan giữa loại tế bào và hàm lượng protein exosome tổng số do tế bào tiết ra**

Tương tự, chúng tôi kiểm tra liệu loại tế bào gốc trung mô sơ cấp dây rốn và tế bào gốc trung mô sơ cấp mô mỡ có ảnh hưởng đến hàm lượng protein exosome tiết ra hay không. Kết quả cho thấy, không có mối tương quan nào về hai loại tế bào này với hàm lượng protein exosome được tiết ra (hệ số tương quan  $r^2 = 0,019$ ,  $p = 0,135$ ). Hiện chưa thấy có báo cáo nào về khả năng tiết protein exosome của các dòng tế bào gốc trung mô, tuy nhiên đã có báo cáo về khả năng tiết protein exosome của các dòng tế bào ung thư tụy (DU145, LNCAP, PC3), ung thư bàng quang (HT1376) và ung thư vú (MCF7) (Webber & Clayton, 2013). Tuy nhiên, nghiên cứu này cũng không chỉ ra hàm lượng protein tương ứng với số lượng tế bào tiết nên rất khó khăn cho việc so sánh giữa các nghiên cứu khác nhau.



Hình 3. Biểu đồ phân tán biểu diễn mối tương quan giữa loại tế bào với hàm lượng protein exosome được tiết ra trong quá trình nuôi cấy

TBGTMDR: Tế bào gốc trung mô dây rốn; TBGTMMM: Tế bào gốc trung mô mô mỡ.



**KẾT LUẬN**

Tế bào gốc trung mô dây rốn tiết ra một lượng protein exosome ổn định ở P5, P6 và P7. Không có sự khác biệt về hàm lượng protein exosome tiết ra từ tế bào gốc trung mô dây rốn và mô mỡ sơ cấp. Đồng thời, không có mối tương quan giữa các lần cấy chuyển (P5, P6 và P7) của tế bào gốc trung mô dây rốn và hai loại tế bào gốc trung mô (từ dây rốn và mô mỡ) với hàm lượng protein exosome tiết ra trong quá trình nuôi cấy thông thường.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Crescitelli, R., Lässer, C., Szabó, T. G., Kittel, A., Eldh, M., Dianzani, I., . . . Lötvall, J. (2013). Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal Of Extracellular Vesicles*, 2, 1-10.
- Hoang, D. H., Nguyen, T. D., Nguyen, H. P., Nguyen, X. H., Do, P. T. X., Dang, V. D., . . . Than, U. T. T. (2020). Differential wound healing capacity of mesenchymal stem cell-derived exosomes originated from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord under serum- and xeno-free condition. *Front Mol Biosci*, 7, 119. doi:10.3389/fmolb.2020.00119
- Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., Sze, N. S., Choo, A., Chen, T. S., . . . Lim, S. K. (2010). Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res*, 4(3), 214-222. doi:10.1016/j.scr.2009.12.003
- Lässer, C., Valadi, H., Alikhani, V. S., Ekstrom, K., Eldh, M., Paredes, P. T., . . . Lotvall, J. (2011). Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *Journal Of Translational Medicine*, 9(1), 9-9. doi:10.1186/1479-5876-9-9
- Le Gall, L., Ouandaogo, Z. G., Anakor, E., Connolly, O., Butler Browne, G., Laine, J., . . . Duguez, S. (2020). Optimized method for extraction of exosomes from human primary muscle cells. *Skeletal Muscle*, 10(1), 20. doi:10.1186/s13395-020-00238-1
- Nguyen, T. H., Duong, C. M., XH, N., & UTT, T. (2021). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for osteoarthritis treatment: extracellular matrix protection, chondrocyte and osteocyte physiology, pain and inflammation management. *Cells*, 10(11). doi:10.3390/cells10112887
- Patel, G. K., Khan, M. A., Zubair, H., Srivastava, S. K., Khushman, M. d., Singh, S., & Singh, A. P. (2019). Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Scientific Reports*, 9(1), 5335. doi:10.1038/s41598-019-41800-2
- Phinney, D. G., & Prockop, D. J. (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*, 25(11), 2896-2902. doi:10.1634/stemcells.2007-0637
- Than, U. T. T., Guanzon, D., Leavesley, D., & Parker, T. (2017). Association of extracellular membrane vesicles with cutaneous wound healing. *Int J Mol Sci*, 18(5). doi:10.3390/ijms18050956
- Turturici, G., Tinnirello, R., Sconzo, G., & Geraci, F. (2014). Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am J Physiol Cell Physiol*, 306(7), C621-633. doi:10.1152/ajpcell.00228.2013
- Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R., & Conrad, R. (2012). Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 1820(7), 940-948. doi:10.1016/j.bbagen.2012.03.017
- Webber, J., & Clayton, A. (2013). How pure are your vesicles? *J Extracell Vesicles*, 2. doi:10.3402/jev.v2i0.19861

## EFFECTS OF MESENCHYMAL STEM CELL TYPES AND PASSAGES ON THE EXOSOMAL PROTEIN AMOUNT SECRETED

Than Thi Trang Uyen<sup>1,2\*</sup>, Hoang Huong Diem<sup>1#</sup>, Nguyen Thi Tuyet Anh<sup>1#</sup>

<sup>1</sup> Vinmec Hi-Tech Center, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup> Vinmec-VinUni Institute of Immunology, Hanoi, Vietnam

# Authors contributed equally in this study.

### ABSTRACT

Exosomes are emerging as a potential candidate for diagnostic and therapeutic applications. Therefore, exosomes originating from mesenchymal stem cells have attracted interest from scientists who want to develop them into drugs for disease treatments, particularly in regenerative medicine. However, the limitations of this applied research direction are the consistent cell lines that secrete exosomes, the isolation and production scale, and the stability of components carried by exosomes. Our study aims to investigate the relationship between primary mesenchymal stem cell types, the passage and the exosomal protein quantity secreted by the cells during 2D cell culture. The results showed that mesenchymal stem cells expressed an elongated and fibroblast-like morphology, and exosomes expressed cup-shaped morphology. There was no difference in exosomal protein amounts from samples originating from two cell types of umbilical cord mesenchymal stem cells and adipose tissue and among different passages (P5, P6, and P7) of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. Data from correlation analysis showed that umbilical cord-derived mesenchymal stem cells at P5, P6, and P7 did not affect the amount of exosomal protein secreted ( $r^2 = 0.015$ ). Additionally, primary umbilical cord- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells did not relate to the amount of exosomal protein secretion ( $r^2 = 0.019$ ). This study shows that under normal 2D culture conditions, the amount of exosomal proteins secreted is not affected by types of primary mesenchymal stem cells derived from the umbilical cord and adipose tissue and cells at the different passages.

*Keywords:* Exosomes, mesenchymal stem cells, total protein.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0865662355; Email: v.uyenttt@vinmec.com

# ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG LÊN KHẢ NĂNG TĂNG SINH VÀ CHỨC NĂNG TẾ BÀO GIẾT TỰ NHIÊN *IN VITRO*

Thân Thị Trang Uyên<sup>1,2\*</sup>, Lê Thị Huyền<sup>1</sup>, Phạm Thị Phương<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Công nghệ cao Vinmec, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Viện nghiên cứu Miễn dịch Vinmec-VinUni, Hà Nội, Việt Nam

## TÓM TẮT

Tế bào giết tự nhiên (natural killer cell - NK) là loại tế bào miễn dịch, có khả năng phát hiện và tiêu diệt tế bào ung thư và các tế bào bị nhiễm vi rút. Trong cơ thể, số lượng tế bào NK trong máu ngoại vi có hạn và thường không đủ đáp ứng nhu cầu điều trị. Bằng cách nuôi cấy và tăng sinh tế bào bên ngoài cơ thể, chúng ta có thể tạo ra một số lượng lớn tế bào NK và kiểm soát được chất lượng của chúng trước khi sử dụng. Do vậy, việc nghiên cứu và phát triển liệu pháp tế bào NK sẽ cung cấp cơ hội mới cho y học hiện đại nhằm điều trị và hỗ trợ điều trị các bệnh lý liên quan hệ miễn dịch và ung thư. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thử nghiệm khả năng tăng sinh của tế bào NK trong các điều kiện môi trường nuôi khác nhau và hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư của chúng. Kết quả cho thấy rằng, tế bào đơn nhân máu ngoại vi có khả năng tăng sinh tương đương nhau trong môi trường B ( $86,3 \pm 15,7 \times 10^6$  tế bào) và M ( $148,6 \pm 89,6 \times 10^6$  tế bào) sau 12 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên, tỷ lệ tế bào NK thu được từ môi trường B cao hơn so với từ môi trường M, tương ứng với từng loại môi trường là  $82,91 \pm 17,34\%$  và  $53,9 \pm 15,7\%$ . Đồng thời, khả năng tiêu diệt tế bào ung thư bạch cầu dòng tủy K562 của tế bào NK thu được từ môi trường B cũng cao hơn so với NK thu được từ môi trường M ở tất cả các dải nồng độ, và hiệu quả này cũng cao hơn nhóm đối chứng. Điều này cho thấy tế bào NK sau nuôi cấy tăng sinh *in vitro*, đặc biệt là trong môi trường B, có hiệu quả cao trong tiêu diệt dòng tế bào ung thư bạch cầu dòng tủy K562. Do vậy, đây là môi trường có tiềm năng trong nghiên cứu phát triển liệu pháp tế bào NK điều trị bệnh hiệu quả.

**Từ khóa:** Hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư, *in vitro*, K562, tăng sinh tế bào, tế bào NK.

## MỞ ĐẦU

Liệu pháp tế bào đang là một trong những xu hướng nghiên cứu mới của y học nhằm điều trị và hỗ trợ điều trị các bệnh lý nan y. Trong số các liệu pháp tế bào đang được nghiên cứu và ứng dụng, liệu pháp tế bào giết tự nhiên (natural killer cells – NK) đang được nghiên cứu ứng dụng trong điều trị các bệnh lý liên quan đến hệ miễn dịch, bệnh thận, đái tháo đường và một số bệnh truyền nhiễm khác (El-Kadiry et al., 2021).

Tế bào NK là các tế bào bạch huyết bẩm sinh gây độc tế bào, tạo ra các cytokine và chemokine gây viêm (Vivier et al., 2008). Bằng cách tiêu hủy các tế bào bị biến đổi hoặc bị nhiễm bệnh, chúng hạn chế sự phát triển của khối u và tế bào nhiễm vi rút. Trong khi tế bào T nhận ra các peptide được trình diện bởi các phân tử phức hợp hòa hợp mô chính yếu (major histocompatibility complex – MHC), tế bào NK mang các thụ thể nhận biết các protein tự thân trên tế bào ung thư (Vivier et al., 2008). Đồng thời, hoạt động chức năng của chúng bị ức chế bởi các phân tử MHC hiển thị trên các tế bào đó.

Tiềm năng to lớn của tế bào NK trong liệu pháp miễn dịch điều trị ung thư được minh họa bằng khả năng chúng nhận biết rộng rãi được các tế bào bị stress, bất kể có sự biểu hiện của kháng nguyên mới và tăng cường hoạt động chống lại các khối u đã mất biểu hiện MHC lớp I do mắc phải cơ chế kháng thuốc (Page et al., 2024; Vivier et al., 2024). Kết quả là, nhiều nỗ lực đang được tiến hành nhằm huy động các tế bào NK nội sinh bằng phương pháp trị liệu hoặc cung cấp các quần thể tế bào NK được nhân rộng ngoài cơ thể sống như một liệu pháp tế bào, trong một số trường hợp có thể trang bị thêm cho các tế bào NK các thụ thể kháng nguyên (Page et al., 2024). Do vậy, gần đây NK đang nổi lên như là liệu pháp tế bào miễn dịch mới quan trọng cho điều trị và hỗ trợ điều trị ung thư (Chu et al., 2022).

Mặc dù liệu pháp tế bào NK có tiềm năng trong điều trị các bệnh lý liên quan đến hệ miễn dịch và ung thư, nhưng chúng cũng tồn tại một số hạn chế và thách thức cần phải khắc phục như hiệu quả không đồng đều, tái phát bệnh, điều kiện sản xuất đòi hỏi công nghệ tiên tiến (Vivier et al., 2024). Việc huy động được lượng lớn tế bào NK từ máu ngoại vi nhằm đáp ứng liều cho mỗi lần điều trị đang là một thách thức. Một giải pháp cho vấn đề này là tăng sinh tế bào NK bên ngoài cơ thể để đảm bảo đủ số lượng và chất lượng tế bào cần thiết cho liệu pháp (Peighambarzadeh et al., 2020). Hầu hết các quy trình tăng sinh đều sử dụng cytokine hoặc cùng nuôi cấy với lớp tế bào nuôi đã bất hoạt khả năng tăng trưởng. Tuy nhiên, việc sử dụng lớp tế bào nuôi khá phức tạp, đòi hỏi sự kiểm soát nghiêm ngặt. Do vậy, phương pháp bổ sung cytokine như IL-12/18/15 hay IL-21/15 vào cuối giai

đoạn nuôi cấy tế bào được sử dụng phổ biến (Sivonen et al., 2023). Trong nghiên cứu này, chúng tôi thử nghiệm ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy có bổ sung cytokine lên khả năng tăng sinh của tế bào NK và hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư *in vitro*.

## NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên vật liệu

Máu ngoại vi được thu nhận từ 03 người tình nguyện khỏe mạnh tại Vinmec. Máu ngoại vi (20 mL) được lấy vào ống chống đông chứa sodium heparin (Jiangxi Exquisite Technology Co., Ltd, Trung Quốc), bảo quản ở nhiệt độ phòng và được xử lý trong vòng 6 giờ.

### Phương pháp phân lập tế bào đơn nhân từ máu ngoại vi

Mẫu máu sau khi thu thập được ly tâm tại  $1710 \times g$  trong 10 phút tại  $20^\circ\text{C}$  để thu thập huyết tương. Sau đó, huyết tương tự thân được bất hoạt tại nhiệt độ  $58^\circ\text{C}$  trong 1 giờ. Phần máu còn lại được pha loãng với PBS 1X và ly tâm với lymphoprep (Stemcell Technologies, Đức) theo tỷ lệ 2:1. Dựa vào phương pháp ly tâm theo tỷ trọng, lớp tế bào đơn nhân máu ngoại vi được phân tách sau quá trình ly tâm  $760 \times g$  trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Tế bào đơn nhân được rửa lại 2 lần với PBS 1X lần lượt tại  $420 \times g$  trong 5 phút và  $200 \times g$  trong 10 phút (Chen et al., 2020).

### Phương pháp nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh tế bào ứng viên

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi thu được bằng phương pháp ly tâm theo tỷ trọng nuôi cấy ban đầu với mật độ  $D = 1 \times 10^6$  tế bào/mL trong hai loại môi trường B và M với tổng thời gian nuôi cấy là 12 ngày.

Môi trường B: Tế bào đơn nhân được nuôi cấy trong môi trường kích thích B (Initial B) với dung dịch bổ sung chứa IL-2 (Chiron Corp, Hoa Kỳ), OK432 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Nhật Bản) và 5% huyết tương tự thân trong chai nuôi cấy đã được phủ kháng thể đơn dòng kháng CD3 và kháng CD16. Sau 3 ngày nuôi cấy, tế bào được loại bỏ các thành phần kích thích bằng phương pháp ly tâm tại  $270 \times g$  trong 8 phút. Sau đó, tế bào được chuyển vào chai nuôi cấy không phủ kháng thể và nuôi trong môi trường tăng sinh B có bổ sung IL-2 và 10% huyết tương tự thân. Môi trường được bổ sung thêm mỗi 2 ngày/lần tùy thuộc vào số lượng tế bào tăng sinh để duy trì mật độ tế bào  $0,8 \times 10^6$  tế bào/mL.

Môi trường M: Tế bào đơn nhân được nuôi cấy trong môi trường cơ bản M có bổ sung dung dịch chứa IL-2, IL-15 (Miltenyi Biotec, Đức) và 5% huyết tương tự thân trong chai nuôi cấy không phủ kháng thể. Sau 5 ngày nuôi cấy, bổ sung gấp đôi môi trường mới vào chai nuôi cấy chứa tế bào chứa 10% huyết tương tự thân. Đến ngày thứ 7, môi trường mới được bổ sung thêm mỗi 2 ngày/lần tùy thuộc vào số lượng tế bào tăng sinh để duy trì mật độ  $0,5 \times 10^6$  tế bào/mL.

### Phương pháp đếm số lượng tế bào

Tế bào được đếm bằng phương pháp nhuộm với Trypan Blue. Lấy 10  $\mu\text{L}$  huyền phù tế bào trộn đều với 10  $\mu\text{L}$  dung dịch Trypan Blue (Gibco, Hoa Kỳ), sau đó nhỏ 10  $\mu\text{L}$  hỗn hợp vào buồng đếm tế bào Neubauer cải tiến (INCYTO C-Chip Hemocytometers, InCyto Co., Ltd, Hàn Quốc). Soi đếm tế bào tại 4 ô của buồng đếm dưới kính hiển vi soi ngược. Số lượng tế bào được tính theo công thức sau:

$$\text{Số tế bào/mL} = (\text{tổng số tế bào của 4 ô}/4) \times 2 \times 10^4$$

### Phân tích tế bào bằng phương pháp dòng chảy (flow cytometry)

Tế bào sau khi phân lập và tế bào ứng viên sau nuôi cấy được nhuộm với các kháng thể đơn dòng: Anti-CD3-Pacific Blue, Anti-CD4- APC-Alexa Flour 750, Anti-CD8- FITC, Anti-CD56-PE, Anti-IgG1- Pacific Blue, Anti-IgG-APC-Alexa Flour 750, Anti IgG1-FITC, Anti IgG1-PE (Miltenyi Biotec, Đức). Sau đó, tế bào được phân tích bằng hệ thống Navios và phân tích bằng phần mềm Navios software (Beckman Coulter, Hoa Kỳ). Quy trình thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất kit.

### Đánh giá hoạt tính tế bào NK

Hoạt tính tế bào NK được xác định bằng khả năng tiêu diệt tế bào ung thư dòng tủy K562 (ATCC, Hoa Kỳ) (là tế bào đích - ký hiệu là T), đã được gắn thuốc nhuộm huỳnh quang Calcein-AM (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Nhật Bản). Tế bào đơn nhân, tế bào NK sau nuôi cấy và tế bào đối chứng ung thư bạch cầu giết tự nhiên KHYG (AcceGen Biotech, Hoa Kỳ) (ký hiệu là E), được ủ với tế bào ung thư dòng tủy K562 ở các mật độ E/T khác nhau, lần lượt là: 1; 2,5; 5; 10; 20 và 40 trong 2 giờ (EP2539442A1, accessed August 2024). Sau khi ủ, cường độ huỳnh quang của tế bào được đo dưới hệ kính hiển vi Terascan VPC2. Cường độ tín hiệu huỳnh quang bị giảm tương đương với tỷ lệ tế bào K562 bị tiêu diệt và tỷ lệ thuận với hoạt tính NK có trong mẫu.

### Phân tích thống kê

Sử dụng phần mềm Excel để trình bày biểu đồ và phân tích dữ liệu. Dữ liệu trung bình được trình bày dưới dạng Trung bình  $\pm$  SD. Giá trị  $p < 0,05$  được cho là so sánh khác biệt có ý nghĩa thống kê.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

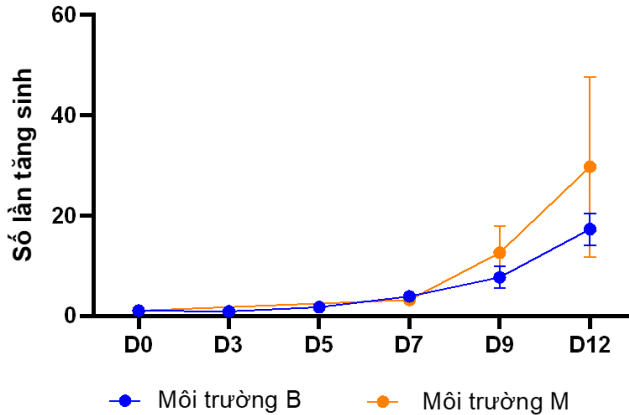
**Nuôi cấy tăng sinh tế bào ứng viên**

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi được nuôi cấy trong hai loại môi trường B và M để đánh giá khả năng tăng sinh. Kết quả trình bày trong Bảng 1 cho thấy số lượng tế bào vào ngày thứ 3 nuôi cấy có bị giảm đi so với số tế bào cấy ban đầu; tuy nhiên tế bào bắt đầu tăng sinh mạnh từ ngày thứ 5 sau khi cấy. Đến ngày cuối cùng của thí nghiệm (D12), số lượng tế bào ứng viên nuôi trong môi trường B tăng lên 17,26 lần và trong môi trường M là 29,6 lần so với số lượng tế bào ở ngày cấy ban đầu (D0). Khi so sánh số lượng tế bào giữa hai nhóm môi trường B và M thì thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Một điểm thiếu sót trong thí nghiệm là không theo dõi được số lượng tế bào nuôi trong môi trường M tại ngày D3 và D5; do đó, không so sánh được sự khác biệt về số lượng tế bào ứng viên ở hai thời điểm này. Bên cạnh đó, chúng tôi phân tích thời gian nhân đôi tế bào ứng viên trong các loại môi trường thì thấy rằng cũng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai loại môi trường nuôi cấy B và M (Hình 1).

**Bảng 1. Số lượng tế bào ứng viên qua các ngày nuôi cấy**

*ĐVT: triệu tế bào*

	Mẫu 1		Mẫu 2		Mẫu 3		Trung bình ± SD		Giá trị p
	B	M	B	M	B	M	B	M	
D0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0 ± 0	5,0 ± 0	
D3	4,7	-	4,2	-	4,4	-	4,4 ± 0,3	-	
D5	10,9	-	6,9	-	7,6	-	8,4 ± 2,1	-	
D7	22,8	18,7	17,3	17,5	17,6	11,8	19,2 ± 3,1	16,0 ± 3,7	0,104
D9	50,9	93,6	30,2	44,7	34,2	50,4	38,4 ± 11,0	62,9 ± 26,7	0,057
D12	104,4	250,8	75,9	83,2	78,7	112,0	86,3 ± 15,7	148,6 ± 89,6	0,140



**Hình 1. Tốc độ tăng sinh của tế bào ứng viên trong quá trình nuôi cấy đến 12 ngày**  
D: ngày của quá trình nuôi cấy.

Các kết quả trên cho thấy rằng cả hai môi trường nuôi cấy đều có khả năng kích thích tăng sinh tế bào ứng viên, tuy nhiên sự khác biệt giữa hai loại môi trường chưa rõ ràng.

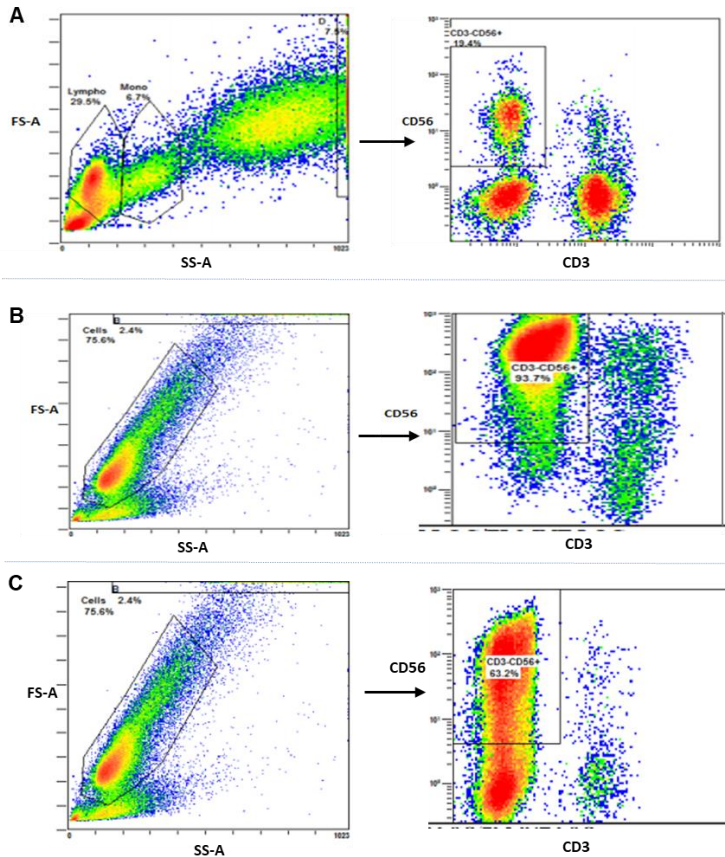
**Biểu hiện dấu ấn bề mặt tế bào NK**

Tế bào đơn nhân trước nuôi cấy và tế bào ứng viên sau nuôi cấy được phân tích biểu hiện dấu ấn bề mặt tế bào NK để đánh giá sự ảnh hưởng của loại môi trường lên biểu hiện dấu ấn bề mặt tế bào. Kết quả trình bày ở Bảng 2 và Hình 2 cho thấy, tỷ lệ tế bào NK (biểu hiện CD56+) trong quần thể tăng lên sau 12 ngày nuôi cấy. Khi so sánh hai loại môi trường nuôi, tỷ lệ % tế bào NK nuôi trong môi trường B cao hơn so với tế bào nuôi trong môi trường M ( $p < 0,001$ ). Kết quả này cho thấy môi trường B phù hợp hơn cho việc tăng sinh tế bào NK máu ngoại vi. Nghiên cứu trước đây của Sivonen và cộng sự cho thấy cytokine có thể ảnh hưởng đến biểu hiện kiểu hình và hiệu quả của tế bào NK trong nuôi cấy *in vitro* (Sivonen et al., 2023). Thậm chí, khi IL-2 và IL-15 được bổ sung vào môi trường nuôi cấy, số lượng tế bào NK tăng gấp 100 lần sau 16 ngày (Peighambarzadeh et al., 2020). Do vậy, hiệu quả biệt hóa thành tế bào NK ở môi trường B có thể là do thành phần cytokine bổ sung vào trong quá trình nuôi cấy.

**Bảng 2. Biểu hiện dấu ấn bề mặt tế bào NK trước và sau nuôi cấy**

	Máu ngoại vi	Sau nuôi cấy 12 ngày		Giá trị p
	Tế bào đơn nhân	NK-B	NK-M	
Tỷ lệ NK CD56+ (%)	13,83 ± 5,56	82,91 ± 17,34	53,9 ± 15,7	< 0,001
CD3+CD8+ (%)	23,6 ± 3,47	3,32 ± 2,65	20,71 ± 21,71	0,13
CD3+CD4+ (%)	30,88 ± 8,12	2,51 ± 1,88	1,09 ± 0,79	0,086

NK-B: NK nuôi trong môi trường B, NK-M: NK nuôi trong môi trường M. CD56+: tế bào dương tính với CD56, là tế bào NK; CD3+CD8+: tế bào dương tính với CD3 và CD8, gồm tế bào T độc và T ức chế; CD3+CD4+: tế bào dương tính với CD3 và CD4, là tế bào T hỗ trợ.



**Hình 2. Tỷ lệ tế bào NK được xác định theo phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy (Flow cytometry)**

(A) mẫu máu ngoại vi, (B) mẫu tế bào ứng viên sau 12 ngày nuôi cấy môi trường B, (C) mẫu tế bào ứng viên sau 12 ngày nuôi cấy môi trường M. Từ quần thể tế bào Lympho được xác định dựa theo FS-A (tán xạ thẳng) và SS-A (tán xạ bên), quần thể tế bào NK được xác định là quần thể dương tính với CD56 và âm tính với CD3.

**Đánh giá hoạt tính tiêu diệt tế bào ung thư của tế bào NK nuôi cấy**

Để kiểm tra khả năng tiêu diệt tế bào ung thư của tế bào NK nuôi cấy trong hai loại môi trường B và M, chúng tôi kiểm nghiệm trên tế bào đích là dòng tế bào ung thư bạch cầu dòng tủy K562. Kết quả cho thấy hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư K562 của tế bào NK nuôi trong cả hai loại môi trường B và M tăng lên sau 12 ngày nuôi cấy so với tế bào đơn nhân ở thời điểm ban đầu (Bảng 3). Bên cạnh đó, tế bào NK nuôi trong môi trường B có khả năng tiêu diệt tế bào ung thư K562 tốt hơn tế bào NK nuôi trong môi trường M ở tất cả các nồng độ, và tốt hơn dòng tế bào NK đối chứng là dòng tế bào ung thư bạch cầu giết tự nhiên KHYG ở tất cả các nồng độ E/T từ 1 đến 20, trừ nồng độ E/T = 40. Đồng thời, E/T càng cao thì khả năng tiêu diệt tế bào ung thư càng tốt.

Trong một báo cáo trước đây, tế bào đơn nhân máu ngoại vi nuôi dưới sự kích thích của cytokine (IL-2, IL-7 và IL-15) có khả năng tăng sinh số lượng tế bào NK gấp từ 15 đến 48 lần so với ban đầu, và tế bào tăng sinh ngoài cơ thể này có hiệu quả tiêu diệt tế bào K562 cao đáng kể với tỷ lệ E/T = 20 (EP2539442A1, accessed August 2024). Điều này cho thấy kết quả nghiên cứu này khá tương đồng với nghiên cứu trước đây về cả khả năng tăng sinh và khả năng tiêu diệt dòng tế bào ung thư đích của tế bào NK nuôi cấy tăng sinh ngoài cơ thể.

**Bảng 3. Tỷ lệ tế bào ung thư K562 bị tiêu diệt bởi tế bào NK trước và sau khi nuôi cấy tại các tỷ lệ khác nhau**

(ĐVT: % tế bào ung thư bạch cầu dòng tủy K562 bị tiêu diệt)

	E/T = 1	E/T = 2,5	E/T = 5	E/T = 10	E/T = 20	E/T = 40
Tế bào đơn nhân	1,3 ± 0,58	2,67 ± 2,08	12 ± 5,57	29,33 ± 19,01	51 ± 24,98	67,67 ± 23,18
NK_B	39,67 ± 22,81	68,33 ± 12,1	81 ± 2,65	87 ± 2,65	89,33 ± 2,52	89,67 ± 0,58
NK_M	3,33 ± 1,53	10,33 ± 8,74	21,33 ± 13,58	37 ± 14,93	53,33 ± 12,74	67,33 ± 4,51
KHYG (Đối chứng)	11 ± 5,57	39,33 ± 3,79	61,33 ± 3,51	74,67 ± 3,05	85 ± 3	90,67 ± 2,08

NK\_B: tế bào NK nuôi trong môi trường B; NK\_M: tế bào NK nuôi trong môi trường M.

## KẾT LUẬN

Có thể tăng sinh số lượng lớn tế bào NK (tăng từ 17,26 lần đến 29,6 lần trong 12 ngày nuôi cấy) từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi trong cả hai môi trường B và M. Tỷ lệ phần trăm tế bào NK thu được từ môi trường B cao hơn môi trường M, và khả năng tế bào NK thu được từ môi trường B tiêu diệt tế bào ung thư K562 cũng cao hơn so với tế bào NK thu được từ môi trường M. Do vậy, môi trường B có bổ sung cytokine IL-2 phù hợp hơn để tăng sinh số lượng lớn tế bào NK ngoài cơ thể, hướng tới các ứng dụng lâm sàng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chen, H., Schürch, C. M., Noble, K., Kim, K., Krutzik, P. O., O'Donnell, E., . . . McIlwain, D. R. (2020). Functional comparison of PBMCs isolated by Cell Preparation Tubes (CPT) vs. Lymphoprep Tubes. *BMC Immunol*, 21(1), 15. doi:10.1186/s12865-020-00345-0
- Chu, J., Gao, F., Yan, M., Zhao, S., Yan, Z., Shi, B., & Liu, Y. (2022). Natural killer cells: a promising immunotherapy for cancer. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 240. doi:10.1186/s12967-022-03437-0
- El-Kadiy, A. E., Rafei, M., & Shammaa, R. (2021). Cell therapy: types, regulation, and clinical benefits. *Front Med (Lausanne)*, 8, 756029. doi:10.3389/fmed.2021.756029
- EP2539442A1. (accessed August 2024). Method for the generation of a cik cell and nk cell population. <https://patents.google.com/patent/EP2539442A1/en?q=EP2539442A1>.
- Page, A., Chuvin, N., Valladeau-Guilemond, J., & Depil, S. (2024). Development of NK cell-based cancer immunotherapies through receptor engineering. *Cellular & Molecular Immunology*, 21(4), 315-331. doi:10.1038/s41423-024-01145-x
- Peighambarzadeh, F., Najafalizadeh, A., Esmaeil, N., Rezaei, A., Ashrafi, F., & Ganjalikhani Hakemi, M. (2020). Optimization of In Vitro Expansion and Activation of Human Natural Killer Cells against Breast Cancer Cell Line. *Avicenna J Med Biotechnol*, 12(1), 17-23.
- Sivonen, M., Sirviö, K. A., Wojciechowski, S., Kailaanmäki, A., Kaipainen, S., Bailey, A., . . . Kekarainen, T. (2023). Cytokines impact natural killer cell phenotype and functionality against glioblastoma in vitro. *Frontiers in Immunology*, 14. doi:10.3389/fimmu.2023.1227064
- Vivier, E., Rebuffet, L., Narni-Mancinelli, E., Cornen, S., Igarashi, R. Y., & Fantin, V. R. (2024). Natural killer cell therapies. *Nature*, 626(8000), 727-736. doi:10.1038/s41586-023-06945-1
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, 9(5), 503-510. doi:10.1038/ni1582

## EFFECTS OF CULTURE MEDIA ON THE PROLIFERATION AND FUNCTION OF NATURAL KILLER CELLS *IN VITRO*

Than Thi Trang Uyen<sup>1,2\*</sup>, Le Thi Huyen<sup>1</sup>, Pham Thi Phuong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Vinmec HiTech Center, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>Vinmec-VinUni Institute of Immunology, Hanoi, Vietnam

### SUMMARY

Natural killer cells (NK) are a type of immune cells that have the capacity to detect and destroy cancer cells and virus-infected cells. The number of NK cells in the body's peripheral blood is limited and often not enough for the treatment. Using the technology of cell proliferation *in vitro*, we can produce a large number of NK cells and control their quality before use. Therefore, investigation and development of NK cell therapy will provide a new approach to treat and support the treatment of diseases related to the immune system and cancers. In this study, we studied the proliferation of NK cells in two different culture media and their effectiveness in killing cancer cells. The results showed that peripheral blood mononuclear cells expressed a similar proliferative ability in media B ( $86.3 \pm 15.7 \times 10^6$  cells) and media M ( $148.6 \pm 89.6 \times 10^6$  cells) after 12 days of culture. However, the percentage of NK cells obtained was higher in media B ( $82.91 \pm 17.34\%$  compared to  $53.9 \pm 15.7\%$ ). Additionally, the ability of NK cells obtained from media B to kill the human immortalized myelogenous leukemia cell line K562 was also higher than that of NK cells obtained from media M at all concentration ratios, and the cancer cell targeting efficiency was also higher than those of the control group. Data from this study indicated that NK cells, especially when expanded in media B, were effective at killing the human immortalized myelogenous leukemia cell line K562. Therefore, this is a potentially useful medium for the study and development of NK cell therapies to treat human diseases.

*Keywords:* Cell proliferation, *in vitro*, killing cancer cells, K562, NK cells.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0865662355; Email: v.uyenttt@vinmec.com



# NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO VẬT LIỆU SƠ CẤP CỨU TRÊN NỀN CHITOSAN

Lê Việt Hoàng<sup>1,3\*</sup>, Nguyễn Minh Nhật<sup>2,3</sup>, Trần Lê Bảo Hà<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Phòng Thí nghiệm Kỹ nghệ mô và Vật liệu Y sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>3</sup>Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

## TÓM TẮT

Nhiều nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng chitosan có khả năng thúc đẩy tốc độ phản ứng đông máu và có hoạt tính kháng khuẩn. Hai đặc tính này đồng thời cũng là hai yêu cầu hàng đầu đối với một vật liệu sơ cấp cứu. Trong nghiên cứu này, hai loại vật liệu sơ cấp cứu dạng lỏng CS-MC và CS-MP đã được chế tạo trên nền chitosan. Hai loại vật liệu CS-MC và CS-MP đều đạt độ vô khuẩn theo GMP-WHO và kháng được ba loài vi khuẩn có tỷ lệ thường gặp cao nhất trên vết thương, bao gồm tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus*, trực khuẩn mủ xanh *Pseudomonas aeruginosa* và trực khuẩn lỵ *Escherichia coli*. Bên cạnh đó, các kết quả thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* cũng đã chứng minh rằng hai loại vật liệu này đều có khả năng kích hoạt tốc độ phản ứng đông máu nhanh hơn so với điều kiện bình thường. Do đó, CS-MC và CS-MP hoàn toàn là hai loại vật liệu có nguồn gốc sinh học phù hợp ứng dụng trong sơ cấp cứu, mang đồng thời các đặc tính cầm máu, sát khuẩn và sẵn sàng sử dụng.

*Từ khóa:* Chitosan, đông máu *in vitro*, đông máu *in vivo*, kháng khuẩn, sơ cấp cứu.

## MỞ ĐẦU

Ngay tại thời điểm xuất hiện vết thương hở ngoài da, cầm máu và sát khuẩn là hai công đoạn cần phải thực hiện ngay lập tức nhằm hạn chế các biến chứng của vết thương và sự xâm nhập của các loài vi khuẩn vào bên trong cơ thể thông qua cầu nối này. Bông gòn và gạc tiệt trùng là hai loại vật liệu cầm máu bằng phương pháp ép chặt trên bề mặt vết thương thường được sử dụng phổ biến. Tuy nhiên, hai loại vật liệu truyền thống này không thể tương thích với tất cả hình dạng vết thương, thường rất dễ bị nhiễm khuẩn và dễ gây đau đớn cho bệnh nhân khi thay băng. Do đó, các nghiên cứu chế tạo vật liệu sơ cấp cứu thế hệ mới, mang đồng thời các đặc tính cầm máu, sát khuẩn và sẵn sàng sử dụng là thực sự cần thiết.

Chitosan (CS) là một đại phân tử sinh học có nguồn gốc từ chitin. Trong nhiều thập kỷ gần đây, CS là đối tượng được chú trọng trong nhiều nghiên cứu thuộc lĩnh vực vật liệu sinh học, y học và dược học. CS có khả năng kích thích sự kết dính hồng cầu, hấp phụ fibrinogen và kích hoạt tiểu cầu, qua đó thúc đẩy tốc độ phản ứng đông máu (He et al., 2013; Wang et al., 2021). Hơn nữa, với vai trò là một đại phân tử sinh học tích điện dương, CS dễ dàng tương tác với các nhóm tích điện âm trên bề mặt tế bào vi khuẩn, gây ra sự biến đổi và phá vỡ cấu trúc tế bào, dẫn đến sự ly giải của tế bào (Ahmed et al., 2014; Moratti & Cabral, 2017). Cation  $Mg^{2+}$  có khả năng kích hoạt phản ứng đông máu độc lập, hoàn toàn không phụ thuộc vào bất kỳ yếu tố đông máu nào (Hense & Strube, 2023). Anion  $(ClO_4)^{-}$  là tác nhân oxy hóa mạnh, có khả năng tăng cường kết dính hồng cầu và hoạt hóa tiểu cầu (Lopes-Pires et al., 2021). Do đó, CS khi kết hợp cùng cation  $Mg^{2+}$  và anion  $(ClO_4)^{-}$  có thể được phát triển thành một loại vật liệu có nguồn gốc sinh học mang đồng thời các đặc tính cầm máu, sát khuẩn và sẵn sàng sử dụng.

Trong nghiên cứu này, hai loại vật liệu sơ cấp cứu trên nền chitosan được chế tạo và thử nghiệm các đặc tính vô khuẩn, tính kháng đối với một số loài vi khuẩn thường gặp trên vết thương, và khả năng kích hoạt nhanh tốc độ phản ứng đông máu.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

CS dạng rắn (có trọng lượng phân tử không quá 200 kDa) được cung cấp bởi Công ty TNHH Sản xuất giống Cá tra Vĩnh Hoàn. Các loài vi khuẩn tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*S. aureus*), trực khuẩn mủ xanh *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*P. aeruginosa*) và trực khuẩn lỵ *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*) được cung cấp bởi American Type Culture Collection (ATCC). Máu toàn phần được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Kỹ nghệ mô và Vật liệu Y sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (mua từ Trung tâm Truyền máu Huyết học). Chuột nhắt trắng *Mus musculus* được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Kỹ nghệ mô và Vật liệu Y sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

## Phương pháp

### Phương pháp chế tạo vật liệu sơ cấp cứu trên nền CS

Hỗn hợp rắn chứa CS và các tá dược khác, bao gồm calcium chloride, magnesium chloride hoặc magnesium perchlorate được đóng gói trong ống nhựa, sau đó được chiếu xạ khử trùng bằng tia gamma với liều 25 kGy. Dung môi hoà tan được đóng gói trong chai thủy tinh chịu nhiệt, sau đó được hấp khử trùng ở 121°C, dưới áp suất 15 psi trong thời gian 30 phút. Hỗn hợp rắn chứa CS và các tá dược được hoà tan hoàn toàn trong dung môi ở điều kiện vô khuẩn theo GMP-WHO nhằm thu nhận hai loại vật liệu sơ cấp cứu dạng lỏng CS-MC (chứa CS, CaCl<sub>2</sub> và MgCl<sub>2</sub>) và CS-MP (chứa CS, CaCl<sub>2</sub> và Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>).

### Phương pháp thử nghiệm đánh giá độ vô khuẩn

Hai loại vật liệu sơ cấp cứu CS-MC và CS-MP được thử nghiệm vô khuẩn trên môi trường thạch Luria Bertani (LB). Trong buồng thao tác vô trùng, 1 mL vật liệu CS-MC hoặc CS-MP được trải đều trên các đĩa thạch LB đường kính 90 mm. Đối chứng (-) trong thử nghiệm là đĩa thạch LB không trải vật liệu, và đậy nắp kín. Đối chứng dương (+) trong thử nghiệm cũng là đĩa thạch LB không trải vật liệu, nhưng không đậy nắp và được đặt tại phòng đệm có độ sạch cấp D theo GMP-WHO trong 4 giờ đầu thử nghiệm. Sau 20 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (Colony Forming Units, CFU) được xác định bằng phương pháp đếm thủ công.

### Phương pháp thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn của hai loại vật liệu sơ cấp cứu CS-MC và CS-MP được thử nghiệm bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường thạch LB. Các loài vi khuẩn được khảo sát trong thử nghiệm bao gồm *S. aureus*, *P. aeruginosa* và *E. coli*. Mật độ vi khuẩn được nuôi cấy khoảng  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL, được xác định bằng phương pháp so sánh độ đục của dịch vi khuẩn với độ đục tiêu chuẩn 0,5 Mc Farland. Độ đục tiêu chuẩn 0,5 Mc Farland được chuẩn bị bằng phương pháp trộn dung dịch barium chloride 1% với dung dịch sulfuric acid 1% theo tỷ lệ thể tích lần lượt là 1:199, có mức độ hấp thụ ánh sáng khoảng từ 0,08 đến 0,1 và độ truyền suốt khoảng từ 74,0 đến 74,5% đối với chùm tia sáng có bước sóng  $\lambda = 600$  nm.

Trong buồng thao tác vô trùng, ở khu vực cách ngọn lửa đèn cồn không quá 10 cm, 0,1 mL dịch vi khuẩn có chứa  $1,5 \times 10^7$  CFU được trải đều trên các đĩa thạch LB đường kính 9 mm. Sau khi dịch vi khuẩn trên các đĩa thạch đã khô ráo, các đĩa này được đục một lỗ hình tròn có đường kính không quá 1/10 đường kính đĩa tại vị trí trung tâm. 0,5 mL vật liệu CS-MC hoặc CS-MP được nạp vào các lỗ này. Sau 24 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, hoạt tính kháng các loài vi khuẩn *S. aureus*, *P. aeruginosa* và *E. coli* được xác định bằng phương pháp đo đường kính vòng kháng khuẩn với độ chính xác 0,5 mm.

### Phương pháp thử nghiệm khả năng đông máu in vitro

Khả năng đông máu *in vitro* của hai loại vật liệu sơ cấp cứu CS-MC và CS-MP được thử nghiệm trên các mẫu máu toàn phần với phương pháp chống đông máu bằng EDTA. Trong buồng thao tác vô trùng, 1 mL vật liệu CS-MC hoặc CS-MP và 0,1 mL máu toàn phần được trải đều trên các đĩa nhựa đường kính 90 mm. Đối chứng (-) trong thử nghiệm là đĩa nhựa không trải vật liệu, chỉ trải 0,1 mL máu toàn phần. Thời gian đông máu *in vitro* của hai loại vật liệu được ghi nhận bằng đồng hồ bấm giây.

### Phương pháp thử nghiệm khả năng đông máu in vivo

Khả năng đông máu *in vivo* của hai loại vật liệu sơ cấp cứu CS-MC và CS-MP được thử nghiệm đối với các vết thương hở ngoài da trên mô hình chi trước hoặc chi sau của chuột nhắt trắng *Mus musculus*. Trong buồng thao tác giải phẫu động vật, ở khu vực cách ngọn lửa đèn cồn không quá 10 cm, 1 mL vật liệu CS-MC hoặc CS-MP được trải đều trên các vết thương hở. Đối chứng (-) trong thử nghiệm là vết thương hở không trải vật liệu. Thời gian đông máu *in vivo* của hai loại vật liệu được ghi nhận bằng đồng hồ bấm giây.

### Phương pháp thu thập và phân tích số liệu

Tất cả các thử nghiệm trong nghiên cứu này đều có số lần lặp lại  $n = 3$  hoặc  $n = 9$ . Số liệu thử nghiệm được phân tích khác biệt trung bình one-way ANOVA với mức ý nghĩa  $\alpha = 0,05$  bằng phần mềm Microsoft Excel for Mac version 16.86 và GraphPad Prism for MacOS version 10.2.3.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Độ vô khuẩn

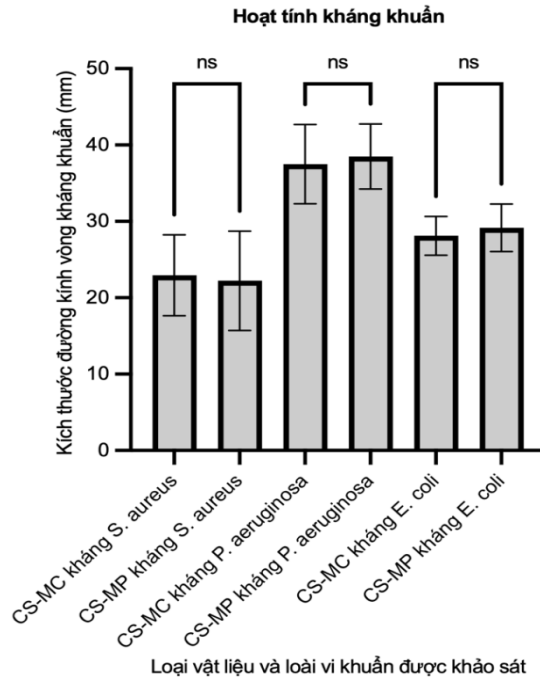
Sau 20 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, trên môi trường thạch LB, các đĩa được trải 1 mL vật liệu CS-MC hoặc CS-MP, cũng như đối chứng (-) đều không phát hiện khuẩn lạc (**Bảng 1**). Đối với đĩa đối chứng (+), 25 – 82 khuẩn lạc đã được phát hiện, phù hợp với quy định về ngưỡng CFU cho phép tại nơi đặt đĩa (phòng đệm có độ sạch cấp D theo GMP-WHO) (**Bảng 1**). Kết quả phân tích khác biệt trung bình one-way ANOVA đã chứng minh rằng, so với đối chứng (+), số lượng CFU trên môi trường thạch LB của các đĩa được trải vật liệu CS-MC hoặc CS-MP và đĩa đối chứng (-) khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ). Hai loại vật liệu sơ cấp cứu trên nền chitosan CS-MC và CS-MP đã được chế tạo có đặc tính vô khuẩn với số lượng CFU trên đĩa có đường kính 90 mm ít hơn 1 (**Bảng 1**).

**Bảng 1. Độ vô khuẩn của hai loại chế phẩm CS-MC và CS-MP**

	CS-MC	CS-MP	(-)	(+)
Số lượng CFU (đơn vị)	Không phát hiện	Không phát hiện	Không phát hiện	25 – 82

**Hoạt tính kháng khuẩn**

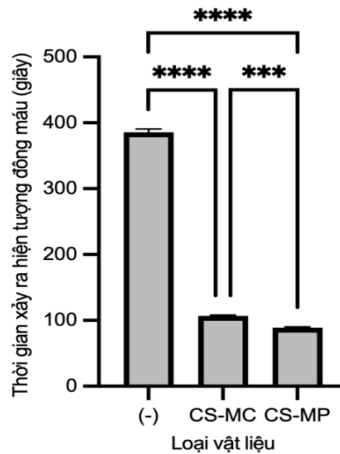
Ngay tại thời điểm xuất hiện vết thương hở ngoài da, bệnh nhân hoàn toàn có nguy cơ nhiễm khuẩn do một số loài vi khuẩn ngay lập tức có thể xâm nhập vào bên trong cơ thể thông qua cầu nối này. Trong nhiều nghiên cứu lâm sàng, hàng trăm loài vi khuẩn thường xuất hiện trên các vết thương đã được xác định bằng các phương pháp phân lập, nuôi cấy, định danh hình thái và định danh sinh học phân tử. Đơn nhiễm, hay còn được hiểu là sự xuất hiện của một loài vi khuẩn duy nhất trên vết thương, là tình trạng thường gặp nhất, chiếm đến hơn 75% số lượng ca bệnh (Puca et al., 2021). Gần 25% số lượng ca bệnh còn lại thuộc về đa nhiễm, hay còn được hiểu là sự xuất hiện của ít nhất hai loài vi khuẩn trên vết thương (Puca et al., 2021). *S. aureus*, *P. aeruginosa* và *E. coli* là ba loài vi khuẩn có tỷ lệ thường gặp cao nhất trên vết thương, lần lượt là 29,1%, 23,3%, và 12,0% (Puca et al., 2021). Do đó, hoạt tính kháng khuẩn của hai loại vật liệu sơ cấp cứu CS-MC và CS-MP đã được khảo sát đối với ba loài vi khuẩn này. Sau 24 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, trên môi trường thạch LB, từ 0,1 mL dịch vi khuẩn có chứa  $1,5 \times 10^7$  CFU ban đầu, khuẩn lạc đã dàn trải đều trên toàn bộ bề mặt thạch, ngoại trừ vị trí lỗ thạch và vòng xung quanh lỗ thạch. Kích thước đường kính vòng kháng *S. aureus* được tạo ra từ hai loại vật liệu CS-MC và CS-MP lần lượt là  $23 \pm 5$  và  $22 \pm 7$  mm (Hình 1). Tương tự, kích thước đường kính vòng kháng *P. aeruginosa* lần lượt là  $38 \pm 5$  và  $39 \pm 4$  mm và *E. coli* lần lượt là  $28 \pm 3$  và  $29 \pm 3$  mm (Hình 1). Kết quả phân tích khác biệt trung bình one-way ANOVA đã chứng minh rằng đối với cùng một loài vi khuẩn *S. aureus* hoặc *P. aeruginosa* hoặc *E. coli*, kích thước đường kính vòng kháng khuẩn do hai loại vật liệu CS-MC và CS-MP tạo ra khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $n = 9, p > 0,05$ ). Do đó, khả năng kháng khuẩn của hai loại vật liệu này đối với các loài vi khuẩn đã khảo sát là như nhau. Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn hoàn toàn tương đồng với các giả thuyết cơ chế đã công bố trong nhiều nghiên cứu trước đây. Với vai trò là một đại phân tử sinh học tích điện dương, CS dễ dàng tương tác với các nhóm tích điện âm trên bề mặt tế bào vi khuẩn, gây ra sự biến đổi và phá vỡ cấu trúc tế bào, dẫn đến sự ly giải của tế bào (Ahmed et al., 2014; Moratti & Cabral, 2017).



**Hình 1. Hoạt tính kháng *S. aureus*, *P. aeruginosa* và *E. coli* của hai loại chế phẩm CS-MC và CS-MP**

**Khả năng đông máu *in vitro***

Khả năng đông máu của hai loại vật liệu sơ cấp cứu CS-MC và CS-MP được khảo sát đối với 0,1 mL máu toàn phần. Tính từ thời điểm máu toàn phần và vật liệu CS-MC hoặc CS-MP được hoà trộn đồng đều, hiện tượng đông máu xuất hiện chỉ trong thời gian dưới 110 giây (Hình 2). Đối với đối chứng (-) trong thử nghiệm, thời gian đủ để hiện tượng đông máu xuất hiện mất ít nhất 380 giây (Hình 2). Kết quả phân tích khác biệt trung bình one-way ANOVA đã chứng minh rằng, khi so sánh với đối chứng (-), thời gian hiện tượng đông máu xuất hiện dưới tác dụng của từng loại vật liệu khác biệt có ý nghĩa thống kê theo từng cặp ( $n = 3, p < 0,05$ ). Do đó, hai loại vật liệu CS-MC và CS-MP đều có khả năng kích hoạt phản ứng đông máu nhanh hơn so với điều kiện bình thường.

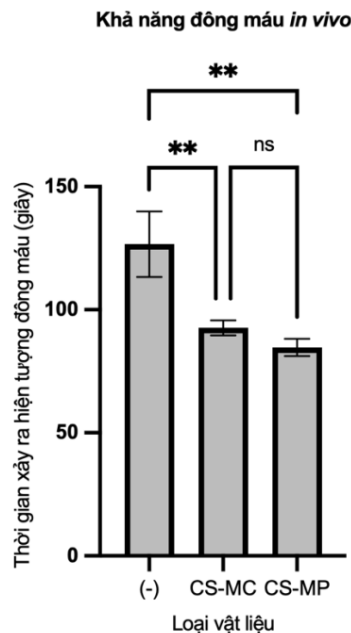


Hình 2. Khả năng xúc tác đông máu *in vitro* của hai loại chế phẩm CS-MC và CS-MP

Trong một nghiên cứu khác, CS dạng rắn CS-HU đã được thử nghiệm khả năng đông máu *in vitro* đối với các mẫu máu từ thỏ (Hu et al., 2018). Với tỷ lệ vật liệu CS-HU:máu được khảo sát là 0,05 g:1 mL, thời gian đủ để hiện tượng đông máu xuất hiện dưới 1025 giây (Hu et al., 2018). Đối với đối chứng (-) trong thử nghiệm, tại thời điểm 1800 giây, hiện tượng đông máu vẫn chưa xuất hiện (Hu et al., 2018).

### Khả năng đông máu *in vivo*

Khả năng đông máu của hai loại vật liệu sơ cấp cứu CS-MC và CS-MP được khảo sát trên mô hình chi trước hoặc chi sau của chuột nhắt trắng *Mus musculus*. Tính từ thời điểm 1 mL vật liệu CS-MC hoặc CS-MP được trải đều trên các vết thương hở, hiện tượng đông máu xuất hiện chỉ trong thời gian dưới 100 giây (Hình 3). Đối với đối chứng (-) trong thử nghiệm, thời gian đủ để hiện tượng đông máu xuất hiện mất ít nhất 118 giây (Hình 3). Kết quả phân tích khác biệt trung bình one-way ANOVA đã chứng minh rằng, thời gian hiện tượng đông máu xuất hiện dưới tác dụng CS-MC hoặc CS-MP khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $n = 3, p > 0,05$ ). So sánh với đối chứng (-), thời gian hiện tượng đông máu xuất hiện dưới tác dụng của từng loại vật liệu khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $n = 3, p < 0,05$ ). Do đó, thời gian kích hoạt phản ứng đông máu trên mô hình *in vivo* dưới tác dụng của hai loại vật liệu CS-MC và CS-MP là như nhau.



Hình 3. Khả năng đông máu *in vitro* của hai loại chế phẩm CS-MC và CS-MP

Kết quả thử nghiệm khả năng đông máu *in vitro* và *in vivo* hoàn toàn tương đồng với các giả thuyết cơ chế đã công bố trong nhiều nghiên cứu trước đây. Với vai trò là một đại phân tử sinh học tích điện dương, CS hoàn toàn có khả năng kích thích sự kết dính hồng cầu, hấp phụ fibrinogen và kích hoạt tiểu cầu, thúc đẩy tốc độ phản ứng đông máu (He et al., 2013; Wang et al., 2021).

## KẾT LUẬN

Hai loại vật liệu sơ cấp cứu trên nền chitosan CS-MC và CS-MP đã được chế tạo có đặc tính vô khuẩn và kháng được ba loài vi khuẩn có tỷ lệ thường gặp cao nhất trên vết thương, bao gồm tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus*, trực khuẩn mủ xanh *Pseudomonas aeruginosa* và trực khuẩn lỵ *Escherichia coli*. Các kết quả thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* cũng đã chứng minh rằng hai loại vật liệu này đều có khả năng kích hoạt tốc độ phản ứng đông máu nhanh hơn so với điều kiện bình thường. Do đó, CS-MC và CS-MP hoàn toàn là hai loại vật liệu có nguồn gốc sinh học phù hợp ứng dụng trong sơ cấp cứu, mang đồng thời các đặc tính cầm máu, sát khuẩn và sẵn sàng sử dụng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmed, S., Ahmad, M., & Ikram, S. (2014). Chitosan: a natural antimicrobial agent-a review. *Journal of Applicable Chemistry*, 3(2), 493-503.
- He, Q., Gong, K., Ao, Q., Ma, T., Yan, Y., Gong, Y., & Zhang, X. (2013). Positive charge of chitosan retards blood coagulation on chitosan films. *Journal of biomaterials applications*, 27(8), 1032-1045.
- Hense, D., & Strube, O. I. (2023). Thrombin-Free Fibrillogenesis and Gelation of Fibrinogen Triggered by Magnesium Sulfate. *Gels*, 9(11), 892.
- Hu, Z., Lu, S., Cheng, Y., Kong, S., Li, S., Li, C., & Yang, L. (2018). Investigation of the effects of molecular parameters on the hemostatic properties of chitosan. *Molecules*, 23(12), 3147.
- Lopes-Pires, M. E., Frade-Guanaes, J. O., & Quinlan, G. J. (2021). Clotting dysfunction in sepsis: a role for ROS and potential for therapeutic intervention. *Antioxidants*, 11(1), 88.
- Moratti, S., & Cabral, J. (2017). Antibacterial properties of chitosan. In *Chitosan Based Biomaterials Volume 1* (pp. 31-44). Elsevier.
- Puca, V., Marulli, R. Z., Grande, R., Vitale, I., Niro, A., Molinaro, G., Prezioso, S., Muraro, R., & Di Giovanni, P. (2021). Microbial species isolated from infected wounds and antimicrobial resistance analysis: Data emerging from a three-years retrospective study. *Antibiotics*, 10(10), 1162.
- Wang, C.-H., Cherng, J.-H., Liu, C.-C., Fang, T.-J., Hong, Z.-J., Chang, S.-J., Fan, G.-Y., & Hsu, S.-D. (2021). Procoagulant and antimicrobial effects of chitosan in wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7067.

## STUDY ON CREATING CHITOSAN-BASED FIRST AID MATERIALS

Hoang Viet Le<sup>1,3\*</sup>, Nhut Minh Nguyen<sup>2,3</sup>, Ha Le Bao Tran<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Tissue Engineering and Biomedical Materials, University of Science, VNU-HCM, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>2</sup>Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, VNU-HCM, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>3</sup>Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam

## SUMMARY

Previous studies have demonstrated that chitosan has the ability to promote the process of coagulation and antibacterial activity. These properties are also the requirements for a first aid material. In this study, chitosan-based first aid materials CS-MC and CS-MP were created in a GMP-WHO laboratory. CS-MC and CS-MP materials were sterilized and resistant to the three most common bacteria found in wounds, including *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*. In addition, *in vitro* and *in vivo* test results also demonstrated that CS-MC and CS-MP materials were capable of activating the rate of blood coagulation reaction faster than under normal conditions. Therefore, CS-MC and CS-MP are biological materials suitable for first aid applications, with the advantages of being hemostatic, antiseptic and ready-to-use.

**Keywords:** Antibacterial test, chitosan, first aid, *in vitro* coagulation test, *in vivo* coagulation test.

\* Author for correspondence: Tel: 0902087083; Email: lvhoang@hcmus.edu.vn

# PHÂN LẬP VÀ KHẢO SÁT TÍNH GỐC CỦA TẾ BÀO SỤN HEO MỘT NGÀY TUỔI DÙNG TRONG TẠO MÀNG SINH HỌC

Phạm Thị Vàng, Võ Trung Nhân, Trần Thái Dương,  
Võ Vy Khanh, Nguyễn Thị Thanh Tâm, Trương Minh Dũng\*

Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

## TÓM TẮT

Tổn thương sụn khớp gối được quan tâm hàng đầu trong những bệnh về xương khớp ở bệnh nhân. Hiện nay, kỹ thuật cấy ghép tế bào đang được sử dụng rộng rãi trong điều trị tổn thương sụn khớp gối. Sự kết hợp giữa tế bào sụn tự thân và màng xương giúp hình thành mô mới tương tự sụn tại vị trí tổn thương. Phương pháp này gặp nhiều hạn chế do: 1) sự hạn chế về số lượng tế bào; 2) quá trình phẫu thuật hai lần phức tạp và tăng khả năng rủi ro đối với bệnh nhân; 3) quá trình cố định màng xương kéo dài thời gian phẫu thuật. Mục tiêu của nghiên cứu này là sử dụng nguồn tế bào mới từ sụn heo một ngày tuổi để chế tạo màng sinh học nhằm thay thế màng xương trong kỹ thuật cấy ghép tế bào điều trị tổn thương khớp gối. Tế bào được phân lập từ sụn heo một ngày tuổi được định danh và khảo sát về khả năng tăng sinh, khả năng biệt hóa, khả năng hình thành màng. Kết quả đánh giá âm tính với các bệnh truyền nhiễm trên heo là cơ sở quan trọng để lựa chọn heo con đủ điều kiện cung cấp mô sụn cho nghiên cứu. Tế bào được phân lập thành công từ mô sụn heo một ngày tuổi biểu hiện đặc điểm tương tự như tế bào gốc, có khả năng tăng sinh cao, biệt hóa thành các loại tế bào khác nhau. Màng sinh học được tạo thành công từ tế bào gốc từ mô sụn heo một ngày tuổi, tạo tiền đề để chế tạo màng thay thế màng xương trong điều trị bệnh tổn thương sụn khớp gối.

*Từ khóa:* Heo một ngày tuổi, màng sinh học, sụn heo, tế bào gốc, tổn thương sụn khớp gối.

## MỞ ĐẦU

Thoái hóa khớp gối (THKG) là một căn bệnh phổ biến hiện nay trên thế giới nói chung và tại Việt Nam nói riêng. THKG là nguyên nhân gây đau và ảnh hưởng tới hoạt động của khớp gối và là một trong những nguyên nhân chủ yếu gây tàn tật ở bệnh nhân lớn tuổi. Ngày nay, do chế độ dinh dưỡng (béo phì, dư thừa trọng lượng) và ảnh hưởng của nguyên nhân ngoại cảnh (tai nạn, thể thao), tuổi của người bị THKG có xu hướng trẻ hóa (Hunter et al., 2019). Vì vậy, việc tối ưu phương pháp điều trị bệnh THKG là nhu cầu thiết yếu và cấp bách của các thập niên gần đây.

Nhiều phương pháp đã được nghiên cứu và ứng dụng trong cải tạo chức năng, phục hồi hoạt động tại vị trí tổn thương cho bệnh nhân THKG; như là, điều trị không dùng thuốc (phát đồ vật lý trị liệu) (Hambly et al., 2012), điều trị nội khoa (sử dụng thuốc, cytokine,...) (Goggs et al., 2005, Kang et al., 2008, Thosani et al., 2012, Fotopoulos et al., 2015, Ohashi et al., 2021) và điều trị ngoại khoa (sự can thiệp của các phương pháp phẫu thuật) (LaPrade, 2003, Trương et al., 2017, Betzler et al., 2021, Stotter et al., 2021, Totlis et al., 2021). Tùy thuộc vào mức độ của tổn thương mà bệnh nhân được đề nghị phương pháp điều trị phù hợp. Hiện nay, phương pháp ghép tế bào tự thân là một phương pháp mới trong điều trị bệnh nhân THKG tại Việt Nam. Sự thành công của phương pháp này phụ thuộc vào nhiều yếu tố; trong đó, yếu tố tế bào tự thân và miếng dán màng xương là quan trọng nhất, quyết định sự hình thành mô tái sinh có đặc tính giống mô sụn hyaline. Yếu tố tế bào (tế bào trung mô từ tủy xương, tế bào gốc có nguồn gốc từ mô mỡ, và tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ dây rốn) đã được nhiều nghiên cứu trong nước chứng minh là có hiệu quả tốt trong quá trình điều trị bệnh THKG (LaPrade, 2003, Ohashi et al., 2021, Stotter et al., 2021). Tuy nhiên, những nghiên cứu về cải tiến miếng dán màng xương hoặc thay thế bằng màng sinh học vẫn còn khiêm tốn hiện nay.

Mặt khác, tế bào gốc phân lập từ cơ thể chưa trưởng thành được biết đến như nguồn tế bào an toàn tương tự như tế bào tự thân trong cấy ghép. Tế bào này có khả năng tăng sinh, biệt hóa tốt so với tế bào gốc phân lập từ cơ thể trưởng thành (adult stem cells). Chức năng, đặc điểm của tế bào gốc từ cơ thể trưởng thành không ổn định do chúng được phân lập từ nhiều cơ thể khác nhau; tuy nhiên, tế bào gốc phân lập từ cơ thể chưa trưởng thành có khả năng tăng sinh thành số lượng lớn tế bào cùng chức năng, đặc điểm do phân lập từ một cơ thể. Và, tế bào gốc phân lập từ cơ thể chưa trưởng thành giống tế bào gốc phôi về chức năng, giống tính an toàn so với tế bào gốc từ cơ thể trưởng thành (Park et al., 2020). Với những đặc trưng trên, tế bào gốc từ cơ thể chưa trưởng thành có tiềm năng ứng dụng cao trong các ứng dụng liệu pháp tế bào.

Mục tiêu của nghiên cứu này là sử dụng nguồn tế bào mới từ sụn heo một ngày tuổi để chế tạo màng sinh học nhằm thay thế màng xương trong kỹ thuật cấy ghép tế bào điều trị tổn thương khớp gối. Nghiên cứu tiến hành phân lập, định danh tế bào phân lập từ sụn heo một ngày tuổi. Khả năng tăng sinh, biệt hóa của tế bào này, cũng như khả năng tạo màng sinh học của chúng được đánh giá.

**NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP****Chọn lựa heo 1 ngày tuổi cho thí nghiệm**

Thí nghiệm được tiến hành tại Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, các quy trình thí nghiệm trên động vật được tiến hành thông qua Hội đồng tư vấn về đạo đức với động vật trong nghiên cứu (01-2023-ĐĐĐV). Máu từ tĩnh mạch (1 mL) được thu từ heo một ngày tuổi vào ống đựng máu 4 mL có chứa K<sub>2</sub>EDTA (BD, Mỹ). Xét nghiệm máu phát hiện các bệnh truyền nhiễm được thực hiện bằng phương pháp HD/PPT 22\* (rtRT-PCR- TCVN 8400-21: 2014) (virus PRRS dòng châu Âu, virus PRRS dòng Bắc Mỹ, và virus PRRS chủng độc lực cao), HD/PPT 17\* (rtRT-PCR- TCVN 8400-47: 2019) (virus dịch tả heo), và HD/PPT 60\* (rtRT-PCR- TCVN 8400-41: 2019) (virus dịch tả heo châu Phi).

**Thu thập, phân lập nguồn tế bào gốc từ mô sụn của heo một ngày tuổi**

Khớp gối của cá thể heo một ngày tuổi được thu nhận ngay sau khi khử trùng và phẫu thuật. Quy trình được tiến hành trong môi trường sạch, vô trùng, tránh gây nhiễm mẫu. Mô sụn được thu nhận và rửa sạch ba lần trong 10 mL dung dịch phosphate buffered saline (PBS) nồng độ 1X. Mô sụn được cắt nhỏ với kích thước nhỏ hơn 1 mm và được xác định khối lượng. Dựa vào khối lượng của mô tăng trưởng, dung dịch men phân hủy các cấu trúc sợi (collagenase 0,1%, trong 16 giờ) (Worthington, Mỹ) được thêm vào và được ủ trong tủ nuôi tế bào (điều kiện nuôi cấy: 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Sau 16 giờ ủ trong tủ nuôi tế bào, các đơn bào sau đó được thu nhận trong môi trường nuôi cấy tế bào có bổ sung 10% huyết thanh (fetal bovine serum, Gibco, Mỹ), 1% kháng sinh Penicillin-Streptomycin (Gibco, Mỹ) và nuôi trong môi trường nuôi cấy cơ bản. Quá trình nuôi cấy được tiến hành trong tủ nuôi tế bào. Hình thái tế bào được theo dõi thường xuyên bằng kính hiển vi soi ngược (Nikon, Nhật Bản) và môi trường nuôi cấy được thay mỗi 3 ngày.

**Đánh giá đặc tính sinh học của tế bào từ mô sụn của heo một ngày tuổi**

Hình thái tế bào phân lập từ mô sụn heo một ngày tuổi được quan sát qua các lần cấy chuyển (đến lần cấy chuyển 20) bằng kính hiển vi soi ngược. Tốc độ tăng sinh của tế bào được đánh giá dựa vào thời gian tăng sinh gấp đôi về số lượng của tế bào (doubling time) đến lần cấy chuyển thứ 20. Thu nhận tế bào đơn và cấy chuyển sang đĩa nuôi cấy mới. Tiếp tục cấy chuyển đến thế hệ thứ 20 khi quan sát mật độ tế bào phủ từ 80% bề mặt mỗi giếng. Xác định thời gian tăng sinh gấp đôi (T<sub>2</sub>) bằng công thức sau:  $T_2 = \Delta t / \log_2(\Delta N / N_0 + 1)$ ; trong đó,  $\Delta t$  là thời gian nuôi cấy (ngày),  $\Delta N$  là số lượng tế bào tăng sinh trong khoảng thời gian nuôi cấy (tế bào),  $N_0$  là số lượng tế bào ban đầu (tế bào). Bên cạnh đó, tế bào được định danh bằng FACS, thông qua sự biểu hiện các phân tử bề mặt tế bào: CD34, CD45, CD90 và CD105 (Thermo Fisher, Anh).

**Đánh giá khả năng biệt hóa của tế bào gốc từ mô sụn của heo một ngày tuổi**

Tế bào tại P2 được đánh giá về khả năng biệt hóa thành 3 dòng tế bào căn bản: tế bào mỡ, tế bào xương và tế bào sụn. Trong biệt hóa tế bào mỡ, tế bào được nuôi cấy trong môi trường biệt hóa thành tế bào mỡ (bao gồm: môi trường alphaMEM (Gibco, Mỹ), bổ sung 10% FBS, 100 nM dexamethasone, 10 µg/mL insulin, 0,1 mM indomethacine và 0,5 mM 3-Isobutyl-2-methylxanthane (Sigma, Mỹ)). Tế bào được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy cơ bản (alphaMEM (Gibco, Mỹ), bổ sung 10% FBS) là đối chứng âm. Khả năng hình thành tế bào mỡ được đánh giá tại 14 ngày bởi phương pháp nhuộm Oil Red O (Sigma, Mỹ).

Trong biệt hóa tế bào xương, tế bào được nuôi cấy trong môi trường biệt hóa thành tế bào xương (bao gồm: môi trường alphaMEM (Gibco, Mỹ), bổ sung 10% FBS, 100 nM dexamethasone, 50 µg/mL ascorbic acid và 10 mM β-glycerol 2-phosphate (Sigma, Mỹ)). Tế bào được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy cơ bản (alphaMEM (Gibco, Mỹ), bổ sung 10% FBS) là đối chứng âm. Khả năng hình thành tế bào xương được đánh giá tại 21 ngày bởi phương pháp nhuộm Alizarin Red (Sigma, Mỹ). Trong biệt hóa tế bào sụn, tế bào được nuôi cấy thành khối 3D trong môi trường biệt hóa thành tế bào sụn (bao gồm: môi trường DMEM (Gibco, Mỹ), TGFbeta 1ng/mL, 1% Pen/Strep, insulin transferrin selenium (ITS), 40 µg/mL L-proline, BSA, 100 µg/mL sodium pyruvate, 50 µg/mL ascorbate-2 phosphate và 100 nM dexamethasone (Sigma, Mỹ)). Tế bào được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy không chứa TGFbeta là đối chứng. Khả năng biệt hóa thành tế bào sụn được đánh giá bằng phương pháp nhuộm Safranin-O (Sigma, Mỹ) (Truong et al., 2017, Park et al., 2020).

**Đánh giá khả năng tạo màng sinh học của tế bào gốc từ mô sụn của heo một ngày tuổi**

Tế bào tại P2 được nuôi cấy trong đĩa 6 giếng với mật độ  $0,5 \times 10^6$  tế bào/cm<sup>2</sup>. Môi trường tạo màng là môi trường nuôi cấy tế bào có bổ sung các thành phần insulin-transferrin-selenium (ITS), 50 mg/mL ascorbate 2-phosphate, 100 nM dexamethasone, 40 mg/mL proline và 1,25 mg/mL BSA (Sigma, Mỹ). Sau hai tuần nuôi cấy, tấm tế bào được tiến hành khử bào bằng dung dịch SDS là 1% (Sigma, Mỹ). Vật liệu di truyền được loại bỏ bằng enzyme DNase/RNase. Tấm tế bào được làm khô bằng phương pháp freeze dry tại -80°C và tạo màng sinh học. Sự khác biệt của màng sinh học trước và sau khi khử bào được đánh giá bằng phương pháp SEM và nhuộm mô học Hematoxylin & Eosin (Park et al., 2020).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Chọn lựa heo một ngày tuổi cho thí nghiệm

Cá thể heo một ngày tuổi được chọn từ Công ty Cổ Phần GreenFeed Việt Nam (Hình 1). Heo con có sức khỏe tốt, tứ chi đầy đủ được lựa chọn làm đối tượng cung cấp mô sụn cho đề tài.



Hình 1. Cá thể heo 1 ngày tuổi được chọn cho thí nghiệm

Cá thể heo một ngày tuổi sau khi được chọn, 1 mL máu được thu thành công từ tĩnh mạch và cho vào ống đựng máu. Kết quả thử nghiệm phát hiện âm tính đối với các bệnh truyền nhiễm (virus PRRS dòng châu Âu, virus PRRS dòng Bắc Mỹ, virus dịch tả heo, virus PRRS chủng độc lực cao, virus dịch tả heo châu Phi) đã được tiến hành. Kết quả đánh giá âm tính với các bệnh truyền nhiễm trên heo là cơ sở quan trọng để lựa chọn heo con đủ điều kiện cung cấp mô sụn cho nghiên cứu.

### Thu thập, phân lập nguồn tế bào gốc từ mô sụn của heo một ngày tuổi

Mô sụn được thu từ khớp gối heo một ngày tuổi với khối lượng mô sụn là  $0,90 \pm 0,27$  g, lượng tế bào phân lập được là  $28 \pm 8,51$  triệu tế bào, số lượng tế bào phân lập được trên 1 g mô sụn là  $31,03 \pm 4,39$  triệu tế bào, lượng tế bào thu được tại P0 là  $100 \pm 30,41$  triệu tế bào (Bảng 1). Hình dạng tế bào sau khi phân lập đồng nhất giữa các mẫu và được biểu hiện trong Hình 3. Tế bào tại P0 được thu nhận và dự trữ trong nitơ lỏng. Kết quả chứng minh quy trình thu thập, phân lập nguồn tế bào từ mô sụn của heo 1 ngày tuổi có tính ổn định cao thể hiện ở hàm lượng cao tế bào phân lập trong 1 g mô sụn và năng suất cao tạo nguồn tế bào dồi dào phục vụ nghiên cứu và tạo ra các sản phẩm.

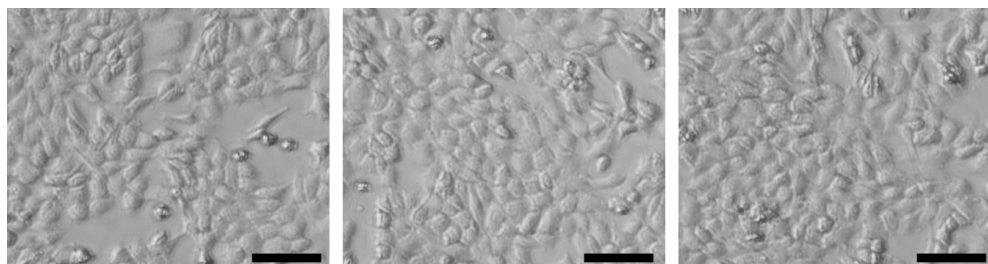
Bảng 1. Thu thập, phân lập nguồn tế bào từ mô sụn của heo 1 ngày tuổi

	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Trung bình
Khối lượng mô sụn (g)	1,2327	0,9135	0,56088	$0,90 \pm 0,27$
Số lượng tế bào phân lập (triệu tế bào)	30,86	29,80	19,87	$26,85 \pm 4,95$
Số lượng tế bào/ 1 g mô sụn (triệu tế bào)	25,04	32,62	35,43	$31,03 \pm 4,39$
Số lượng tế bào thu nhận tại P0 (triệu tế bào)	136	101	62	$100 \pm 30,41$

Mẫu 1

Mẫu 2

Mẫu 3

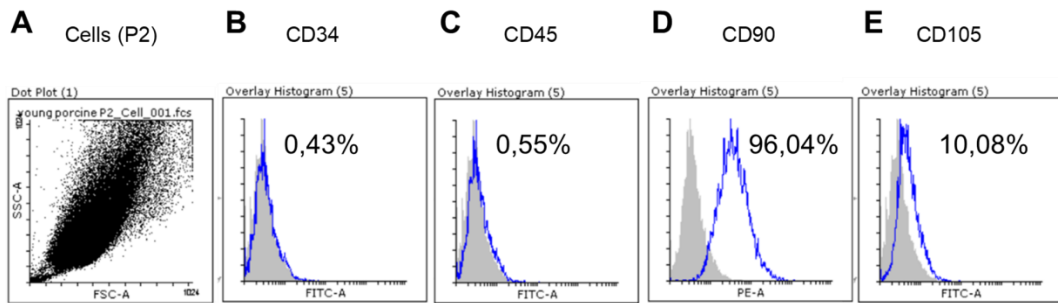


Hình 2. Hình ảnh tế bào phân lập từ mô sụn được quan sát bằng kính hiển vi soi ngược (scale bar: 100  $\mu$ m).

### Đánh giá đặc tính sinh học của tế bào từ mô sụn của heo một ngày tuổi

Tế bào được định danh bằng phương pháp dòng chảy tế bào cho kết quả như hình 3. Tại P2, tế bào biểu hiện với CD34, CD45, CD90 và CD105 lần lượt là  $0,19 \pm 0,18\%$ ;  $0,28 \pm 0,19\%$ ;  $95,57 \pm 0,48\%$  và  $9,58 \pm 1,48\%$ . Tế bào phân lập từ sụn heo một ngày tuổi có đặc điểm tương tự tế bào gốc trung mô khi không biểu hiện CD34, CD45 và biểu hiện CD90, CD105. Tuy nhiên, biểu hiện của CD105 trên các tế bào P2 thấp hơn so với tế bào gốc trung mô.

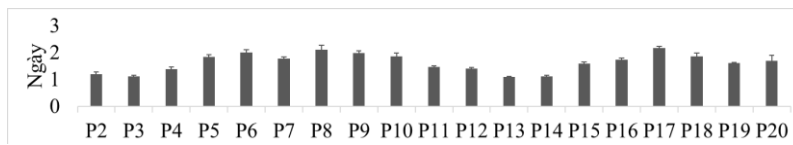




**Hình 3. Định danh tế bào bằng phương pháp dòng chảy**

A: Thể hiện sự phân bố tế bào lợn một ngày tuổi, B: Phần trăm biểu hiện dấu ấn bề mặt CD34 là 0,43% (âm tính), C: Phần trăm biểu hiện dấu ấn bề mặt CD45 là 0,55% (âm tính), D: Phần trăm biểu hiện dấu ấn bề mặt CD90 là 96,04% (dương tính), E: Phần trăm biểu hiện dấu ấn bề mặt CD105 là 10,08% (dương tính).

Tốc độ tăng sinh của tế bào tính theo thời gian tăng đôi số lượng của tế bào (doubling time) là từ một đến hai ngày được khảo sát từ giai đoạn P1 đến P20 (Hình 4).

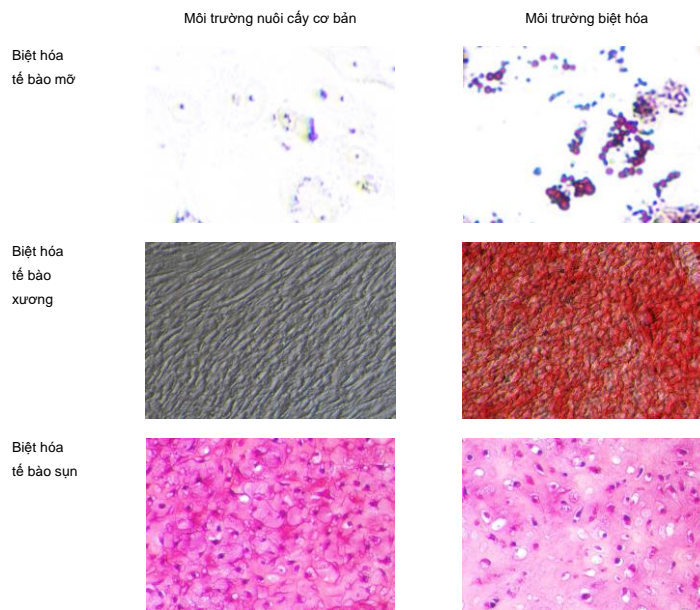


**Hình 4. Tốc độ tăng sinh của tế bào được tính theo thời gian tăng đôi số lượng của tế bào (doubling time)**

**Đánh giá khả năng biệt hóa của tế bào gốc từ mô lợn của heo một ngày tuổi**

Khả năng biệt hóa mỡ được quan sát bằng phương pháp nhuộm Oil Red O khi sử dụng môi trường biệt hóa. Các giọt mỡ được nhuộm màu đỏ được quan sát tại 14 ngày nuôi trong môi trường biệt hóa, so sánh đối chứng âm (tế bào không biệt hóa thành tế bào mỡ trong môi trường nuôi cấy căn bản) (Hình 5). Khả năng biệt hóa xương được quan sát bằng phương pháp nhuộm Alizarin Red khi sử dụng môi trường biệt hóa tế bào xương. Sự biệt hóa thành tế bào xương được xác định bằng khả năng nhuộm màu đỏ của Alizarin Red được quan sát tại 21 ngày nuôi trong môi trường biệt hóa, so sánh đối chứng âm (tế bào không biệt hóa thành tế bào xương trong môi trường nuôi cấy căn bản) (Hình 5).

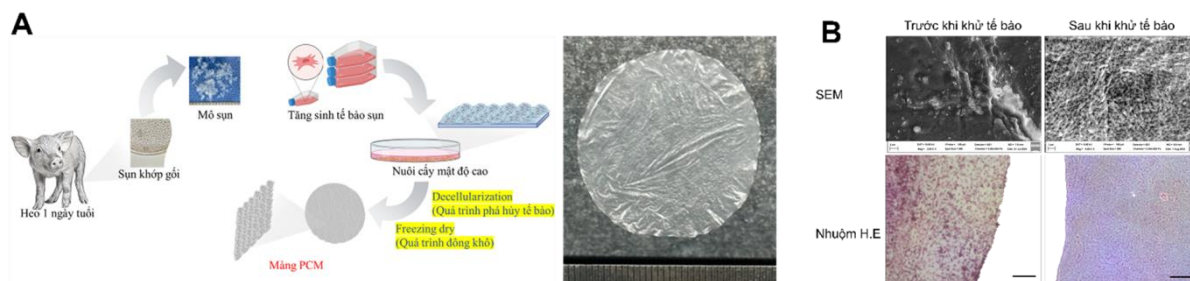
Khả năng biệt hóa sụn, tế bào được nuôi cấy thành công thành khối 3D trong môi trường nuôi cấy căn bản lẫn môi trường biệt hóa sụn. Trong cả 2 môi trường nuôi, hình cắt lớp mỏng mẫu mô 3D đều biểu hiện màu của thuốc nhuộm Safranin-O. Tuy nhiên, tế bào sụn và lacunar (hốc nhỏ chứa tế bào sụn) được hình thành nhiều trong môi trường biệt hóa thành tế bào sụn. Ngược lại, lacunar không được hình thành trong môi trường nuôi cấy căn bản (Hình 5).



**Hình 5. Kết quả đánh giá khả năng biệt hóa thành mỡ, xương, sụn của tế bào gốc phân lập từ sụn heo một ngày tuổi**

**Đánh giá khả năng tạo màng sinh học của tế bào gốc từ mô sụn của heo một ngày tuổi**

Màng sinh học được tạo thành công trong môi trường tạo màng, sử dụng tế bào gốc từ mô sụn của heo một ngày tuổi (Hình 6A). Cấu trúc màng tế bào trước và sau khi khử bào được quan sát bằng phương pháp SEM và nhuộm H.E (Hình 6B). Kết quả thể hiện sự hiện diện của tế bào trong màng tế bào trước khi khử bào; ngược lại, tế bào bị khử và cấu trúc sợi được quan sát trên màng sau quá trình khử bào. Màng được tạo ra với độ dày 10 µm, nồng độ DNA là 17,67 ± 2,63 ng/mL (kết quả chưa công bố). Vật liệu này là cơ sở để nghiên cứu sản phẩm màng sinh học ứng dụng trong hỗ trợ điều trị tổn thương sụn khớp gối bằng phương pháp cấy ghép tế bào gốc.



**Hình 6. (A) Quy trình tạo màng sinh học từ tế bào gốc cơ thể heo chưa trưởng thành; (B) Hình ảnh mô tả cấu trúc màng tế bào trước và sau khi khử tế bào bằng phương pháp SEM và nhuộm H.E.**

**KẾT LUẬN**

Nguồn tế bào gốc được phân lập thành công từ mô sụn heo một ngày tuổi đã cho kết quả âm tính với các các bệnh truyền nhiễm (virus PRRS dòng châu Âu, virus PRRS dòng Bắc Mỹ, virus dịch tả heo, virus PRRS chủng độc lực cao, virus dịch tả heo châu Phi). Tế bào phân lập từ mô sụn heo 1 ngày tuổi có đặc điểm hình thái ổn định, tốc độ tăng sinh cao đến giai đoạn cấy chuyển thứ 20 (P20). Tế bào có đặc điểm tương tự tế bào gốc: i) Biểu hiện âm tính với CD34, CD45, dương tính với CD90 và CD105; ii) Có khả năng biệt hóa thành nhiều loại tế bào (mỡ, xương, sụn). Cuối cùng, màng sinh học được chế tạo từ tế bào gốc từ sụn heo một ngày tuổi, tạo tiền đề trong chế tạo màng thay thế màng xương trong điều trị bệnh tổn thương sụn khớp gối.

**Lời cảm ơn:** Công trình được thực hiện nhờ kinh phí đề tài do Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh cấp (03/2023/HĐ-QKHCN): “Nghiên cứu chế tạo màng sinh học từ tế bào gốc cơ thể heo chưa trưởng thành sử dụng trong điều trị tổn thương sụn khớp gối”.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Betzler, B. K., A. H. Bin Muhammad Ridzwan Chew and H. R. Bin Abd Razak (2021). "Intra-articular injection of orthobiologics in patients undergoing high tibial osteotomy for knee osteoarthritis is safe and effective - a systematic review." *J Exp Orthop* 8(1): 83.

Fotopoulos, V., G. Mouzopoulos, T. Floros and M. Tzurbakis (2015). "Steroid-induced femoral head osteonecrosis in immune thrombocytopenia treatment with osteochondral autograft transplantation." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 23(9): 2605-2610.

Goggs, R., A. Vaughan-Thomas, P. D. Clegg, S. D. Carter, J. F. Innes, A. Mobasheri, M. Shakibaei, W. Schwab and C. A. Bondy (2005). "Nutraceutical therapies for degenerative joint diseases: a critical review." *Crit Rev Food Sci Nutr* 45(3): 145-164.

Hambly, K., H. J. Silvers and M. Steinwachs (2012). "Rehabilitation after Articular Cartilage Repair of the Knee in the Football (Soccer) Player." *Cartilage* 3(1 Suppl): 50S-56S.

Hunter, D. J. and S. Bierma-Zeinstra (2019). "Osteoarthritis." *Lancet* 393(10182): 1745-1759.

Kang, S. W., L. P. Bada, C. S. Kang, J. S. Lee, C. H. Kim, J. H. Park and B. S. Kim (2008). "Articular cartilage regeneration with microfracture and hyaluronic acid." *Biotechnol Lett* 30(3): 435-439.

LaPrade, R. F. (2003). "Autologous chondrocyte implantation was superior to mosaicplasty for repair of articular cartilage defects in the knee at one year." *J Bone Joint Surg Am* 85(11): 2259.

Ohashi, H., K. Nishida, A. Yoshida, Y. Nasu, R. Nakahara, Y. Matsumoto, A. Takeshita, D. Kaneda, M. Saeki and T. Ozaki (2021). "Adipose-Derived Extract Suppresses IL-1beta-Induced Inflammatory Signaling Pathways in Human Chondrocytes and Ameliorates the Cartilage Destruction of Experimental Osteoarthritis in Rats." *Int J Mol Sci* 22(18).

Park, D. Y., B. H. Min, S. R. Park, H. J. Oh, M. D. Truong, M. Kim, J. Y. Choi, I. S. Park and B. H. Choi (2020). "Engineered cartilage utilizing fetal cartilage-derived progenitor cells for cartilage repair." *Sci Rep* 10(1): 5722.

Stotter, C., S. Nehrer, T. Klestil and P. Reuter (2021). "[Autologous chondrocyte transplantation with bone augmentation for the treatment of osteochondral defects of the knee: Treatment of osteochondral defects of the femoral condyles using autologous cancellous bone from the iliac crest combined with matrix-guided autologous chondrocyte transplantation]." *Oper Orthop Traumatol*.

Thosani, R., V. Pawar, R. Giridhar and M. R. Yadav (2012). "Improved percutaneous delivery of some NSAIDs for the treatment of arthritis." *J Pharm Bioallied Sci* 4(Suppl 1): S12-13.

Totlis, T., T. Marin Fermin, G. Kalifis, I. Terzidis, N. Maffulli and E. Papakostas (2021). "Arthroscopic debridement for focal articular cartilage lesions of the knee: A systematic review." *Surgeon* **19**(6): 356-364.

Truong, M. D., B. H. Choi, Y. J. Kim, M. S. Kim and B. H. Min (2017). "Granulocyte-macrophage - colony-stimulating factor (GM-CSF) significantly enhances articular cartilage repair potential by microfracture." *Osteoarthritis Cartilage* **25**(8): 1345-1352.

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF STEMNESS IN ONE-DAY-OLD PORCINE CHONDROCYTES FOR BIO-MEMBRANE FABRICATION

**Vang Thi Pham, Trung-Nhan Vo, Thai-Duong Tran,  
Vy-Khanh Vo, Thanh-Tam Nguyen-Thi, Minh-Dung Truong\***

*Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh city, Vietnam*

### SUMMARY

Stem cells successfully isolated from one-day-old porcine cartilage revealed negative results for infectious diseases (European PRRS virus, North American PRRS virus, swine fever virus, high virulent PRRS virus, and African swine fever virus). The isolation process yielded a high quantity of cells with stable morphology. This procedure provides an adequate supply of cells for research and future development directions. Cells isolated from one-day-old piglet cartilage exhibit stable morphology and high proliferation rates up to passage 20 (P20). These cells display characteristics similar to stem cells: i) Negative for CD34 and CD45, positive for CD90 and CD105; ii) Ability to differentiate into various cell types (adipocytes, osteocytes, chondrocytes). This research successfully isolated stem cells from one-day-old pig cartilage for application in creating a biological membrane. This bio-membrane has properties suitable for serving as a substitute for periosteal patches in the treatment of knee cartilage injuries via cell grafting techniques.

*Keywords:* Bio-membrane, knee cartilage injury, one-day-old porcine, porcine cartilage, stem cell.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0916680124; Email: truongminhdung@gmail.com

# BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ PHỤC HỒI CHỨC NĂNG VẬN ĐỘNG Ở BỆNH NHÂN ĐỘT QUY NHỒI MÁU NÃO ĐƯỢC SỬ DỤNG TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ DÂY RÓN

Nguyễn Thị Ngọc Thủy<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Phương Anh<sup>2</sup>, Ngô Văn Đoàn<sup>2</sup>, Lê Thu Hương<sup>2</sup>, Lê Thị Tuyết<sup>2</sup>, Nguyễn Trung Kiên<sup>2</sup>, Phạm Văn Minh<sup>1</sup>, Nguyễn Thanh Liêm<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Hà Nội, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Bệnh viện Vinmec Times City, Hà Nội, Việt Nam

## TÓM TẮT

Phục hồi chức năng vận động đối với bệnh nhân đột quy nhồi máu não luôn đóng vai trò quan trọng và rất được quan tâm. Sự kết hợp giữa liệu pháp tế bào sử dụng nguồn tế bào gốc trung mô dây rón và các biện pháp can thiệp phục hồi chức năng hứa hẹn mang lại kết quả đáng mong đợi. Nghiên cứu được tiến hành nhằm bước đầu đánh giá kết quả phục hồi chức năng vận động ở bệnh nhân đột quy nhồi máu não được sử dụng tế bào gốc trung mô dây rón. Phương pháp nghiên cứu: thử nghiệm lâm sàng pha I, nhãn mở với 20 bệnh nhân chia thành 04 nhóm. Tỷ lệ bệnh nhân đột quy não là nam giới chiếm 80%, độ tuổi trung bình  $54,5 \pm 9,2$ , thời gian trung bình bị đột quy não là  $7,4 \pm 5,1$  tháng, biểu hiện lâm sàng liệt 01 bên chiếm tỷ lệ lớn với 90%. Chúng tôi nhận thấy có sự cải thiện chức năng vận động theo thang điểm Fugl-Meyer thời điểm trước và sau can thiệp ở nhóm được truyền tế bào gốc và giữa nhóm chứng. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa sự cải thiện điểm chức năng vận động theo Fugl-Meyer giữa nhóm truyền đường tĩnh mạch và đường khoang tủy sống. Kết quả nghiên cứu cho thấy sự kết hợp giữa liệu pháp tế bào gốc và phục hồi chức năng bước đầu thu được kết quả cải thiện chức năng vận động ở nhóm truyền, nghiên cứu cần tiếp tục triển khai giai đoạn pha II.

*Từ khóa:* Đột quy nhồi máu não, phục hồi chức năng vận động, tế bào gốc trung mô dây rón.

## MỞ ĐẦU

Đột quy não là nguyên nhân gây ra gần sáu triệu ca tử vong, ít nhất 10% tổng số ca tử vong hàng năm và 2/3 số người sống sót sau đột quy phải sống với tình trạng khuyết tật (Deng et al., 2019). Trên thế giới, hơn tám mươi triệu người đã sống sót sau cơn đột quy; 70% trường hợp đột quy do nhồi máu não (Le Danseur, 2020). Một trong những gánh nặng suốt đời của đột quy não là tình trạng khuyết tật vận động với 85% bệnh nhân biểu hiện liệt nửa người với sự suy giảm chức năng chi trên và khả năng di chuyển (Chương trình Avant Phục hồi chức năng thần kinh sau đột quy não, 2007). Đây là tình trạng khuyết tật lâu dài, dai dẳng, khó điều trị dẫn đến giảm khả năng độc lập về chức năng trong sinh hoạt hàng ngày. Phục hồi chức năng (PHCN) đóng vai trò quan trọng trong quá trình khắc phục di chứng về vận động, giúp người bệnh tối ưu hóa chức năng và hòa nhập cuộc sống tại gia đình, cộng đồng. Tuy nhiên, quá trình PHCN bệnh nhân sau đột quy não phụ thuộc vào nhiều yếu tố như mức độ tổn thương não, khoảng thời gian tác dụng của tính mềm dẻo não, tính phổ biến của các kỹ thuật PHCN. Hiện nay, trên thế giới, có rất nhiều quốc gia đã áp dụng liệu pháp tế bào gốc trong điều trị bệnh lý đột quy nhồi máu não như Mỹ, Brazil, Tây Ban Nha, Anh, Trung Quốc và Ấn Độ, với 52 nghiên cứu và phần lớn kết quả nghiên cứu cho thấy liệu pháp tế bào mang lại sự phục hồi thần kinh (dáng đi, chức năng vận động, ngôn ngữ) thông qua quan sát hoặc thông qua các thang điểm NIHSS, mBI, F-M test (Kawabori et al., 2020). Nguồn tế bào gốc trung mô từ dây rón được đánh giá là vô cùng tiềm năng và 11 thử nghiệm lâm sàng đã được đăng ký trên clinicaltrials.gov. Trong đó, hai nghiên cứu đã báo cáo hoàn thành nhưng chưa công bố kết quả, còn lại 9 thử nghiệm lâm sàng đang tuyển chọn bệnh nhân. Tại Việt Nam, chưa có nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng nào được triển khai trên đối tượng bệnh nhân đột quy nhồi máu não nên chúng tôi tiến hành nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng pha I nhằm bước đầu đánh giá kết quả phục hồi chức năng vận động ở bệnh nhân đột quy nhồi máu não được sử dụng tế bào gốc trung mô dây rón.

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng là những bệnh nhân đột quy nhồi máu não có hồ sơ bệnh án hoặc giấy ra viện và/hoặc có kết quả trên phim chụp cộng hưởng từ sọ não hoặc CT-Scanner sọ não biểu hiện hình ảnh đột quy nhồi máu não và thỏa mãn các tiêu chí sau:

- Tiêu chuẩn lựa chọn: Tuổi từ 40 đến 75; thời gian đột quy lọc  $\leq 24$  tháng; toàn trạng ổn định (tự thờ, không dùng thuốc vận mạch, không có hội chứng nhiễm trùng cấp, không có suy gan, suy tim, suy thận); điểm NIHSS  $\geq 5$  và đồng ý tham gia nghiên cứu.

## HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024

- Tiêu chuẩn loại trừ: Bệnh nhân mắc các bệnh lý (suy gan, suy thận, rối loạn đông máu, ung thư,...); phụ nữ có thai; hôn mê, sống thực vật hoặc đang mở khí quản; liệt hoàn toàn tứ chi.

### Phương pháp nghiên cứu

- Thiết kế nghiên cứu: Thử nghiệm lâm sàng pha I, có nhóm chứng, nhãn mở trên 20 bệnh nhân đột quy nhồi máu não. Nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng được phê duyệt bởi Hội đồng đạo đức Công ty CP BVĐK QT Vinmec số 48/2020/QĐ-VMC ngày 31/12/2020; Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học Quốc gia số 3322/QĐ-BYT ngày 06/07/2021 và Hội đồng đạo đức Đại học Y Hà Nội (Số 674/GCN HỒĐĐNCYSH- ĐHYHN) cấp ngày 21/06/2022. Nghiên cứu này cũng được đăng ký trên trang ClinicalTrials.gov theo số NCT05292625.

- Địa điểm và thời gian nghiên cứu: Tại Bệnh viện Vinmec Times City Hà Nội và Bệnh viện Phục hồi chức năng Hà Nội từ tháng 7/2021 đến tháng 6/2024.

- Cơ mẫu: 20 bệnh nhân đột quy nhồi máu não cho nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng pha I, trong đó 10 bệnh nhân nhóm truyền (05 truyền đường tĩnh mạch và 05 truyền đường khoang tủy sống) và 10 bệnh nhân nhóm chứng được chọn với tiêu chí: cùng tuổi (tuổi  $\pm$  5); cùng giới và cùng mức độ nặng theo thang điểm NIHSS.

- Quá trình can thiệp: người bệnh và gia đình được giải thích cụ thể, rõ ràng về nghiên cứu, tự nguyện ký mẫu phiếu đồng ý tham gia nghiên cứu. Bệnh nhân được thăm khám lâm sàng, chỉ định các xét nghiệm máu, chẩn đoán hình ảnh tại các thời điểm ban đầu, 3 tháng, 6 tháng và 12 tháng. Nhóm truyền là nhóm được truyền TBGTM dây rốn kết hợp tập phục hồi chức năng. Nhóm truyền bao gồm nhóm truyền qua đường tĩnh mạch (Nhóm truyền IV) và nhóm truyền qua đường tủy sống (Nhóm truyền IT). Nhóm chứng là nhóm chỉ được tập phục hồi chức năng, không truyền TBG.

+ Quá trình tiến hành truyền TBGTM dây rốn:

- Chuẩn bị TBGTM dây rốn: để đảm bảo tính đồng nhất trong nghiên cứu, chỉ duy nhất 01 nguồn TBGTM dây rốn được chọn sử dụng. TBGTM dây rốn được phân lập, sàng lọc sơ cấp, thứ cấp (Bảng 1), tăng sinh và lưu trữ từng mẻ ở  $-196^{\circ}\text{C}$ , sẵn sàng sử dụng cho bệnh nhân khi có yêu cầu. Các xét nghiệm về Mycoplasma, khuẩn nấm, endotoxin được sử dụng sau phân lập, nuôi cấy và rã đông và đảm bảo âm tính.

**Bảng 1. Các tiêu chí đánh giá sàng lọc thứ cấp TBGTM dây rốn dựa trên đặc tính sinh học của TBGTM**

Đặc tính	Tiêu chuẩn của Hiệp hội Quốc tế về liệu pháp tế bào và gen	Tiêu chuẩn Sàng lọc thứ cấp
Chỉ thị bề mặt dương tính của TBGTM (CD105, CD73, CD90)	$\geq 95\%$	$\geq 95\% +$
Chỉ thị bề mặt âm tính của TBGTM (CD11, CD19a, CD34, CD45, HLR-DR)	$\leq 2\%$	$\leq 2\% +$
Karyotype	-	Karyotype bình thường
Khả năng biệt hóa thành tế bào xương, mỡ, sụn	Có	Có
Khả năng hình tạo cụm tế bào (CFU-F)	-	$\geq 200$ CFU-F trên 1000 tế bào được nuôi

- Liều truyền:  $1,5 \times 10^6$  tế bào/kg cân nặng. Thời gian truyền: 30 phút. Số lần truyền: 02 lần, mỗi lần cách nhau 03 tháng. Bệnh nhân được truyền trong môi trường vô trùng. TBGTM dây rốn được rã đông và truyền qua đường tĩnh mạch ngoại vi hoặc đường qua khoang tủy sống bằng kỹ thuật chọc dò tủy sống.

+ Quá trình tập phục hồi chức năng: Thời gian tập: 60 phút/1 buổi x 05 buổi/1 tuần x 03 tuần/1 đợt x 02 đợt, cách nhau 03 tháng với các kỹ thuật tập: Vận động trị liệu, Hoạt động trị liệu, Ngôn ngữ trị liệu.

- Các công cụ lượng giá: sử dụng thang điểm đánh giá chức năng vận động Fugl-Meyer (Fugl-Meyer Assessment, FMA) đánh giá sự suy giảm vận động ở người sau đột quy não; được chia thành công cụ đánh giá chức năng vận động chi trên (FMA upper extremity, FMA-UE) và đánh giá chức năng vận động chi dưới (FMA lower extremity, FMA-LE). Điểm càng cao chức năng vận động càng tốt.

- Xử lý số liệu: Sử dụng phần mềm SPSS 20.0 để nhập và xử lý số liệu. Thống kê mô tả với giá trị trung bình, trung vị, khoảng biến thiên, độ lệch chuẩn và sử dụng các thuật toán thống kê T-test, Anova one-way để so sánh điểm trung bình giữa các thời điểm và giữa các nhóm.

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

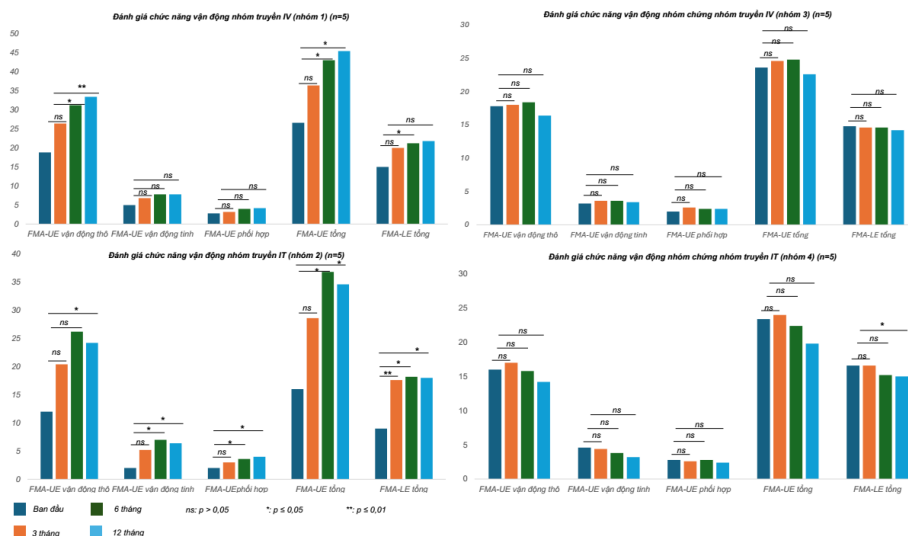
Bệnh nhân đột quy não là nam trong nghiên cứu chiếm tỷ lệ lớn với 80%, độ tuổi trung bình giữa các nhóm là khá tương đồng nhau (Bảng 2). Thời gian đột quy não trung bình thấp nhất là  $6,2 \pm 3,4$  tháng và tình trạng liệt 01 bên chiếm tỷ lệ cao ở đối tượng nghiên cứu với 90%. Điểm trung bình NIHSS giữa các nhóm là khá tương đồng nhau

và tương ứng với mức độ đột quy não trung bình theo thang điểm NIHSS; các bệnh nhân đều có biểu hiện co cứng tăng trương lực cơ và cần hỗ trợ mức độ trung bình trong sinh hoạt hàng ngày theo thang điểm FIM.

**Bảng 2. Thông tin chung về nhóm nghiên cứu (n = 20)**

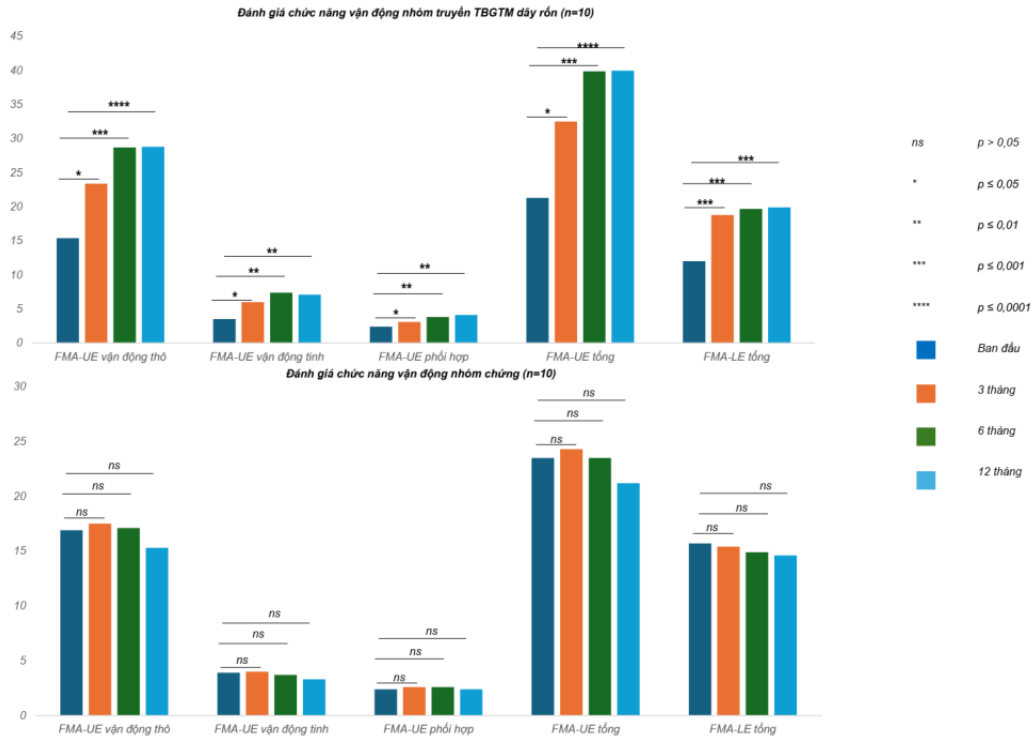
	Nhóm truyền IV (n = 5)	Nhóm truyền IT (n = 5)	Nhóm chứng nhóm truyền IV (n = 5)	Nhóm chứng nhóm truyền IT (n = 5)
<b>Giới</b>				
Nam	4 (20%)	4 (20%)	4 (20%)	4 (20%)
Nữ	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)
<b>Tuổi, năm</b>	54,5 ± 9,2			
Mean (SD)	54,6 ± 13,1	53,8 ± 6,8	56,0 ± 10,5	53,8 ± 8,7
<b>Thời gian đột quy (tháng)</b>	7,4 ± 5,1			
Mean (SD)	8,2 ± 4,3	10,2 ± 7,1	6,2 ± 3,4	7,6 ± 3,8
<b>Bên liệt</b>				
Trái	0 (0%)	1 (5%)	1 (5%)	2 (10%)
Phải	4 (20%)	4 (20%)	3 (15%)	3 (15%)
Cả 2 bên	1(5%)	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)
<b>Điểm NIHSS</b>				
Mean (SD)	8,4 ± 4,4	5,8 ± 1,1	9,0 ± 5,4	6,8 ± 1,6
<b>Điểm Ashworth cải tiến</b>				
Mean (SD)	1,45 ± 1,4	1,77 ± 0,6	1,2 ± 0,8	1,45 ± 0,5
<b>Điểm FIM ban đầu</b>				
FIM vận động Mean (SD)	55,8 ± 25,5	45,0 ± 26,5	50,8 ± 21,7	62,0 ± 5,4
Tổng điểm FIM Mean (SD)	78,0 ± 23,9	77,8 ± 12,8	70,0 ± 24,3	86,0 ± 9,8

Điểm chức năng vận động chi trên và chi dưới ở nhóm truyền IV (nhóm 1) và nhóm truyền IT (nhóm 2) biểu hiện tăng rõ giữa thời điểm ban đầu và các thời điểm 3 tháng, 6 tháng và 12 tháng (Hình 1). Trong đó, với nhóm truyền IV, sự tăng điểm FMA-UE vận động thô thời điểm 6 tháng, điểm FMA-UE tổng thời điểm 6 tháng- 12 tháng, điểm FMA-LE thời điểm 6 tháng ở nhóm truyền IV có ý nghĩa thống kê với  $p \leq 0,05$  và sự tăng điểm FMA-UE thời điểm 12 tháng có ý nghĩa thống kê với  $p \leq 0,01$ . Với nhóm truyền IT, sự tăng điểm FMA-UE vận động thô thời điểm 12 tháng, điểm FMA-UE vận động tinh, điểm FMA-UE phối hợp, điểm FMA-UE và điểm FMA-LE thời điểm 6 tháng - 12 tháng có ý nghĩa thống kê với  $p \leq 0,05$  và điểm FMA-LE thời điểm 3 tháng tăng, có ý nghĩa thống kê với  $p \leq 0,01$ . Đối với nhóm chứng, điểm chức năng vận động theo Fugl-Meyer có sự tăng không rõ ràng khi so sánh thời điểm ban đầu với thời điểm 3 tháng, 6 tháng, 12 tháng và không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$  (Hình 1). Điểm FMA-LE có xu hướng giảm tại thời điểm 12 tháng ở nhóm chứng nhóm truyền IT và có ý nghĩa thống kê với  $p \leq 0,05$ .



**Hình 1. Sự thay đổi chức năng vận động theo điểm FMA của từng nhóm nghiên cứu**

Điểm chức năng vận động theo Fugl-Meyer có sự tăng rõ khi so sánh thời điểm ban đầu với thời điểm 3 tháng, 6 tháng và 12 tháng ở nhóm được truyền TBGTM dây rốn và có ý nghĩa thống kê với  $p \leq 0,05$  (Hình 2, Bảng 3). Đối với nhóm chứng, điểm chức năng vận động theo Fugl-Meyer có sự tăng không đáng kể khi so sánh giữa các thời điểm và không có ý nghĩa thống kê. Điểm FMA-UE vận động thô, điểm FMA-UE phối hợp và FMA-UE ở nhóm truyền tăng hơn so với nhóm chứng tại thời điểm 12 tháng và có ý nghĩa thống kê với  $p \leq 0,05$ . Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của tác giả Chung J.W và đồng tác giả (2021).



Hình 2. Điểm chức năng vận động theo Fugl-Meyer của nhóm truyền và nhóm chứng tại các thời điểm Bảng 3. So sánh điểm chức năng vận động theo Fugl-Meyer giữa nhóm truyền và nhóm chứng

		Nhóm truyền (n = 10)	Nhóm chứng (n = 10)	p	95% CI	
		Mean ± SD	Mean ± SD		Min	Max
FMA-UE vận động thô	3 tháng	23,4 ± 14,4	17,5 ± 14,5	0,375	-7,7	19,5
	6 tháng	28,7 ± 13,6	17,1 ± 13,4	0,071	-1,1	24,3
	12 tháng	28,8 ± 12,7	15,3 ± 12,3	<b>0,027</b>	1,7	25,2
FMA-UE vận động tinh	3 tháng	6,0 ± 4,9	4,0 ± 5,4	0,405	-2,9	6,9
	6 tháng	7,4 ± 5,3	3,7 ± 4,9	0,127	-1,2	8,5
	12 tháng	7,1 ± 5,27	3,3 ± 4,4	0,099	-0,7	8,4
FMA-UE phối hợp	3 tháng	3,1 ± 1,8	2,6 ± 1,2	0,480	-0,9	1,9
	6 tháng	3,8 ± 1,9	2,6 ± 1,1	0,103	-2,6	2,7
	12 tháng	4,1 ± 1,7	2,4 ± 1,2	<b>0,022</b>	0,3	3,1
FMA-UE tổng	3 tháng	32,5 ± 20,3	24,3 ± 20,9	0,385	-11,1	27,5
	6 tháng	39,9 ± 19,8	23,6 ± 19,3	0,079	-2,1	34,7
	12 tháng	40,0 ± 18,8	21,2 ± 18,1	<b>0,035</b>	1,5	36,1
FMA-LE tổng	3 tháng	18,8 ± 8,1	15,4 ± 8,8	0,381	-4,5	11,3
	6 tháng	19,7 ± 7,7	14,9 ± 8,5	0,203	-2,8	12,4
	12 tháng	19,9 ± 7,9	14,6 ± 8,7	0,172	-2,5	13,1

Không có sự khác biệt về điểm chức năng vận động theo Fugl-Meyer giữa nhóm truyền IV và nhóm truyền IT (sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê, Bảng 4). Hiện nay, trên thế giới đường truyền tĩnh mạch là đường truyền thông dụng nhất trong ứng dụng liệu pháp tế bào gốc điều trị bệnh nhân đột quỵ nhồi máu não (Jingli et al., 2022). Tuy nhiên, nhược điểm lớn của đường truyền tĩnh mạch này là một số lượng lớn tế bào gốc bị giữ lại sau truyền tại gan, phổi, mô bạch huyết (Kurtz, 2008), do đó số lượng TBG di chuyển lên não và thực hiện chức năng tại vùng não tổn thương là không nhiều. Đường truyền TBG qua khoang tủy sống đã được ứng dụng và cho thấy hiệu quả trong một số bệnh lý như tự kỷ, bại não tại Bệnh viện Vinmec Timescity - Hà Nội (Nguyen Thanh Liem et al., 2020; 2021).

**Bảng 4. So sánh điểm chức năng vận động theo Fugl-Meyer giữa nhóm truyền đường IV và đường IT**

		Nhóm truyền IV	Nhóm truyền IT	p	95% CI	
		Mean ± SD	Mean ± SD		Min	Max
FMA-UE vận động thô	3 tháng	26,4 ± 18,2	20,4 ± 10,7	0,543	-15,8	27,8
	6 tháng	31,2 ± 16,1	26,2 ± 11,8	0,592	-15,6	25,6
	12 tháng	33,4 ± 13,4	24,2 ± 11,3	0,276	-8,9	27,3
FMA-UE vận động tinh	3 tháng	6,8 ± 5,9	5,2 ± 4,3	0,641	-6,0	9,2
	6 tháng	7,8 ± 5,4	7,0 ± 5,8	0,829	-7,4	9,1
	12 tháng	7,1 ± 5,27	6,4 ± 5,5	0,7	-6,6	9,4
FMA-UE phối hợp	3 tháng	3,2 ± 2,4	3,0 ± 1,1	0,876	-2,6	3,1
	6 tháng	4,0 ± 2,4	3,6 ± 1,5	0,764	-2,5	3,4
	12 tháng	4,2 ± 2,4	4,0 ± 0,7	0,867	-2,4	2,8
FMA-UE tổng	3 tháng	36,4 ± 25,9	28,6 ± 14,5	0,574	-22,9	38,5
	6 tháng	43,0 ± 23,9	36,8 ± 16,9	0,649	-24,1	36,4
	12 tháng	45,4 ± 21,2	34,6 ± 16,4	0,395	-16,9	38,5
FMA-LE tổng	3 tháng	20,0 ± 11,5	17,6 ± 3,3	0,667	-9,9	14,7
	6 tháng	21,2 ± 10,1	18,2 ± 5,2	0,570	-8,6	14,6
	12 tháng	21,8 ± 10,4	18,0 ± 4,8	0,483	-8,1	15,7

Hạn chế trong nghiên cứu của chúng tôi là cỡ mẫu nhỏ nên khó có thể phân tích chuyên sâu dưới nhóm, như dựa vào độ tuổi, thời gian đột quỵ, các biểu hiện cơ cứng cơ trước và sau điều trị. Do đó, chúng tôi cần mở rộng thêm nghiên cứu ở giai đoạn sau với số lượng mẫu nhiều hơn để có thể phân tích dưới nhóm chuyên sâu hơn.

## KẾT LUẬN

Sự kết hợp giữa liệu pháp tế bào gốc và phục hồi chức năng bước đầu thu được kết quả cải thiện chức năng vận động tại thời điểm trước và sau truyền ở nhóm truyền và giữa nhóm truyền với nhóm đối chứng. Nghiên cứu cần tiếp tục triển khai giai đoạn pha II.

**Lời cảm ơn:** N.T.N.T xin được trân trọng cảm ơn Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF) đã hỗ trợ theo chương trình học bổng đào tạo tiến sĩ trong nước (mã số VINIF.2022.TS131).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chung J.W, Chang W.H.C, et al (2021). Efficacy and safety of intravenous mesenchymal stem cells for ischemic stroke. *Neurology*. 96(7) e1012-e1023
- Chương trình Avant Phục hồi chức năng thần kinh sau đột quỵ não (2007). *Tài liệu lý thuyết rối loạn vận động và rối loạn nuốt*.
- Deng L, Peng Q, Wang H, et al (2019). Intrathecal Injection of Allogenic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Treatment of Patients with Severe Ischemic Stroke: Study Protocol for a Randomized Controlled Observer-Blinded Trial. *Transl Stroke Res*, 10(2): 170-177.
- Jingli Y, Jing W, Saeed Y (2022). Ischemic Brain Stroke and Mesenchymal Stem Cells: An Overview of Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Hindawi Stem Cells International*.
- Kawabori M, Shichinohe H, et al (2020). Review Clinical Trials of Stem Cell Therapy for Cerebral Ischemic Stroke. *International Journal of Molecular Sciences*. 21: 7380.
- Kurtz A (2008). Mesenchymal stem cell delivery routes and fate. *Int J stem cells*. 1(1): 1-7.
- Le Danseur M (2020). Stroke Rehabilitation. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 32(1): 97-108.
- Lee JS, Hong JM, Moon GJ, et al (2010). A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells Dayt Ohio*. 28(6): 1099-1106.



Liem NT, Kien NT, Chinh ND et al (2019). Improvement in gross motor function and muscle tone in children with cerebral palsy related to neonatal icterus: an open-label, uncontrolled clinical trial. *BMC Pediatr.* 19: 290.

Liem NT, Hoang-Phuong N, Minh DN et al (2021). Outcomes of bone marrow mononuclear cell transplantation combined with interventional education for autism spectrum disorder. *Stem Cells Transl Med.* 10(1): 14-26.

## INITIAL RESULTS OF MOTOR FUNCTIONAL REHABILITATION IN ISCHEMIC STROKE PATIENTS TREATED WITH UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS

**Nguyen Thi Ngoc Thuy<sup>1\*</sup>, Nguyen Thi Phuong Anh<sup>2</sup>, Le Thu Huong<sup>2</sup>, Le Thi Tuoi<sup>2</sup>, Nguyen Trung Kien<sup>2</sup>, Pham Van Minh<sup>1</sup>, Nguyen Thanh Liem<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Ha Noi Medical University, Hanoi, Vietnam*

<sup>2</sup>*Vinmec Times City International Hospital, Hanoi, Vietnam*

### SUMMARY

Motor functional rehabilitation for ischemic stroke patients always plays an important role and is the one of the greatest concern. The combination of cell therapy using umbilical cord mesenchymal stem cells and rehabilitation interventions promises to bring desirable results. The study was conducted to initially evaluate the results of motor function recovery in ischemic stroke patients used umbilical cord mesenchymal stem cells. Research method: Clinical Phase I, open-label with 20 patients divided into 4 groups. Eighty percent of stroke patients were men, with an average age of  $54.5 \pm 9.2$ , average time of stroke is  $7.4 \pm 5.1$  months, clinical manifestations of one-sided paralysis account for a large proportion of 90%. There was an improvement in motor function according to the Fugl-Meyer scale before and after intervention in the stem cell infusion group and between the infusion group and the control group. There was no statistically significant difference between the improvement in motor function scores according to Fugl-Meyer between the intravenous and intrathecal groups. Research results show that the combination of stem cell therapy and rehabilitation initially achieved results in improving motor function in the infusion group. Research needs to continue in phase II.

*Keywords:* Ischemic stroke, motor function recovery, umbilical cord mesenchymal stem cells.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0936883877; Email: drthuy.rehab@gmail.com

# TẠO KHỐI SPHEROID TỪ TẾ BÀO NHÚ BÌ NANG TÓC NGƯỜI NHẪM LÀM MÔ HÌNH NGHIÊN CỨU SỰ PHÁT TRIỂN NANG TÓC

Nguyễn Phan Như Quỳnh<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Mộng Thu<sup>1</sup>, Lưu Trần Thanh Uyên<sup>1</sup>, Lưu Trần Phương Thảo<sup>2</sup>, Hồ Nguyễn Quỳnh Chi<sup>3</sup>, Lê Thành Long<sup>3</sup>, Đặng Nguyễn Tường Vân<sup>4</sup>, Tô Minh Quân<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>3</sup>Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam

<sup>4</sup>Trường Đại học Khoa học Sức khỏe, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT

Tế bào nhú bì nang tóc (tế bào DP) đóng vai trò điều khiển chu trình phát triển và chu kỳ tái sinh của tóc. Tế bào DP khi nuôi cấy 3D (khối spheroid) có thể khắc phục một số nhược điểm của mô hình nuôi cấy 2D (đĩa nuôi cấy) như mất dần khả năng tăng sinh và suy giảm khả năng kích thích nang tóc. Khối spheroid được thử nghiệm theo phương pháp giọt treo (hanging drop) với những mật độ tế bào:  $1-2,5-5-10 \times 10^3$  tế bào/giọt. Kết quả cho thấy tế bào DP ở P3 cho hiệu quả hình thành spheroid tương tự nhau ở các mật độ tế bào (gần 100%) và tế bào liên kết chặt tạo thành cấu trúc tương tự mô tự nhiên và viên tế bào bao bên ngoài. Tuy nhiên, kích thước và thời gian tạo spheroid khác nhau tùy theo mật độ. Đồng thời, mức độ biểu hiện mRNA marker CD133 và Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) của spheroid cao hơn so với tế bào 2D, lần lượt là  $6,96 \pm 0,57$  và  $7,34 \pm 0,38$  lần và FGF-7 không thay đổi. Ngoài ra, tế bào P9 có suy giảm về tỷ lệ hình thành, gia tăng thời gian tạo spheroid và cấu trúc mô học một số spheroid trở nên lỏng lẻo hơn. Spheroid ( $1-10 \times 10^3$  tế bào DP) có cấu trúc tương tự mô tự nhiên, phù hợp để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

*Từ khóa:* CD133, IGF-1, phương pháp hanging drop, spheroid, tế bào nhú bì.

## MỞ ĐẦU

Nhú bì (dermal papilla, DP) là một quần thể tế bào trung mô nằm dưới vùng bầu tóc. Nhú bì điều hoà chu kỳ phát triển sợi tóc (phát triển – dừng – nghỉ – phát triển) thông qua việc tiết các tác nhân tác động lên tế bào biểu bì xung quanh (Schneider et al. 2009). Vì vậy, tế bào DP được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu kích thích mọc tóc hoặc sự phát triển của nang tóc. Tuy nhiên, khi nuôi cấy trên bề mặt 2D (chai nuôi cấy) *in vitro*, khả năng tăng sinh và khả năng tái tạo nang tóc mới của tế bào DP giảm dần theo thể hệ nuôi cấy. Do đó, việc thử nghiệm trên tế bào DP 2D không phản ánh được hoàn toàn tác dụng của liệu pháp. Mô hình nuôi cấy tế bào 3D có thể cải thiện nhược điểm của 2D và là mô hình tốt để đánh giá tế bào DP trong điều trị rụng tóc. Trong điều kiện nuôi cấy 3D, tế bào DP kết tụ với nhau hình thành cấu trúc gọi là spheroid. Spheroid là cụm tế bào được hình thành bởi sự tự kết tụ và sự tạo thành các liên kết giữa các tế bào trong điều kiện nuôi cấy 3D hoặc trên bề mặt không bám dính để tạo thành cấu trúc giống mô tự nhiên. Trong spheroid, các tế bào DP lân cận kết nối với nhau và tăng tính tương tác giữa tế bào. Đồng thời sự truyền tín hiệu, biểu hiện gen của tế bào trong spheroid ở mức độ cao hơn so với nuôi cấy tế bào bám dính và các hoạt động của tế bào có cách thức tương tự như trong nhú bì tự nhiên (Bejaoui et al. 2022; Białkowska et al. 2020; Chae et al. 2021). Phương pháp giọt treo (hanging drop, HD) thường được sử dụng để tạo môi trường 3D. Trong phương pháp này, giọt môi trường chứa tế bào được bám mặt trong của nắp đĩa petri và treo lơ lửng trong không trung. Tế bào DP trong giọt môi trường kết tụ dưới tác động trọng lực và liên kết với nhau và hợp thành cấu trúc tương tự mô tự nhiên (Białkowska et al. 2020). Spheroid được dùng để đánh giá hoạt tính của hoạt chất kích thích/ức chế tái tạo nang tóc hoặc chất ức chế rụng tóc. Việc đánh giá trên spheroid cho kết quả chính xác và có giá trị thực tế hơn so với tế bào nuôi cấy 2D. Đồng thời, spheroid là mô hình dùng để nghiên cứu quá trình phục hồi nang tóc bằng tế bào tự thân ở những bệnh nhân bị mất chân nang hoặc cây tóc (Bejaoui et al. 2022). Trong nghiên cứu này, spheroid được tạo thử nghiệm từ tế bào DP nhằm làm mô hình cho các nghiên cứu tiếp theo.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Môi trường nuôi tế bào DP (MTNC): DMEM/F12 (Sigma) bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (FBS, Sigma), 1% kháng sinh penicillin/streptomycin và amphotericin B (Sigma). Tế bào Dermal Papilla (DP) được phân lập từ nang tóc của người cấy tóc với sự đồng ý của bệnh nhân. Nang tóc được thu nhận từ vùng da gáy của 3 bệnh nhân nam, độ tuổi 30-38. Tế bào DP thể hệ P2 trữ lạnh  $-196^{\circ}\text{C}$  trong MTNC bổ sung DMSO 10% và được rã đông trong MTNC bổ sung 20% FBS để sử dụng trong nghiên cứu. Tế bào sau rã đông được nuôi trong MTNC ở điều kiện  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  cho tới khi sử dụng để tạo spheroid.

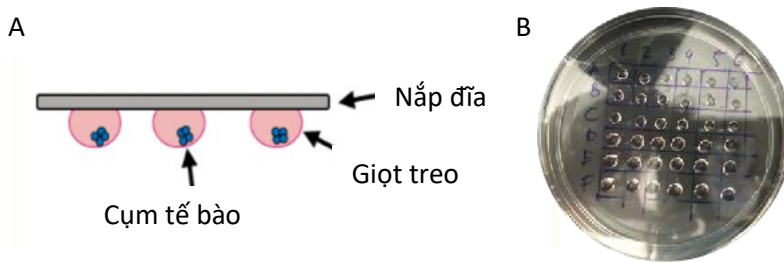
**Phương pháp**

**Phương pháp nhuộm vimentin và  $\alpha$ -SMA**

Tế bào sau khi nuôi cấy thể hệ P3 được kiểm tra sự biểu hiện marker: vimentin và  $\alpha$ -SMA. Tế bào được cố định bằng methanol lạnh, sau đó tăng tính thấm bằng Triton-X100. Sau đó, tế bào được nhuộm với kháng thể sơ cấp đặc hiệu với vimentin (ab8979, abcam) (anti-vimen) hoặc  $\alpha$ -SMA (ab7817, abcam) (anti-SMA), ủ trong 4°C qua đêm trong điều kiện tránh sáng. Sau đó, tế bào đều được ủ với kháng thể thứ cấp phát huỳnh quang xanh lá (ab150113, abcam) liên kết với anti-vimen và anti-SMA. Tiếp theo, tế bào được nhuộm với 0,1 nM DAPI trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau 30 phút, dung dịch DAPI được loại bỏ và tế bào được rửa bằng PBS 3 lần và quan sát dưới kính hiển vi.

**Phương pháp tạo spheroid**

Phương pháp tạo spheroid được dựa theo Helena Topouzi và đồng tác giả (2017) (Topouzi et al. 2017) với một số thay đổi. Tế bào được thu nhận bằng Trypsin/EDTA và ly tâm để thu sinh khối. Nắp đĩa petri nhựa 90 mm được lật ngược để mặt trong của nắp đĩa hướng lên và tạo những giọt 40  $\mu$ L môi trường MTNC chứa tế bào trên mặt trong của nắp đĩa (mật độ tế bào là 1; 2,5; 5 hoặc  $10 \times 10^3$  tế bào/giọt). Sau đó lật úp nắp đĩa để phủ trên đáy đĩa như ban đầu và đem nuôi ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong 5 ngày. Sự hình thành spheroid và kích thước được quan sát và đo bằng kính hiển vi.



Hình 1. Phương pháp Hanging drop

A: Mô hình giọt treo, B: Giọt môi trường chứa tế bào được treo mặt trong nắp đĩa nhìn từ bên trên.

**Phương pháp nhuộm Haematoxyline và Eosin (HE)**

Cấu trúc của spheroid được đánh giá bằng phương pháp nhuộm HE. Spheroid được cố định trong khung fibrin được tạo từ huyết tương bò để thuận tiện cho quá trình cắt nhuộm. Spheroid được cố định trong dung dịch 10% Neutral Phosphate Buffered Formalin (NBF 10%) khoảng 1 giờ, sau đó spheroid được thả vào gel fibrin bò đã chuẩn bị từ trước. Tiếp tục cố định toàn bộ khối spheroid/fibrin trong NBF 10% trong 1 giờ. Sau đó mẫu được gửi nhuộm HE tại trường Đại học Y Dược TP. HCM.

**Phương pháp realtime-PCR đánh giá sự biểu hiện mRNA CD133, IGF-1, FGF-7**

Sự biểu hiện của *CD133*, *IGF-1* và *FGF-7* được đánh giá trên spheroid 5 ngày tuổi ( $5 \times 10^3$  tế bào/spheroid). Đầu tiên, mRNA tổng được tách bằng Trizol và thực hiện phản ứng realtime PCR bằng bộ kit qScript 1-Step, SYBR Green qRT-PCR (Quanta Bioscience), trình tự mỗi phát hiện mRNA của *CD133*, *IGF-1* và *FGF-7* được thể hiện trong bảng 1. Dựa trên giá trị C<sub>t</sub> sau khi thực hiện phản ứng, áp dụng phương thức 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup> để tính sự biểu hiện tương đối của các gen mục tiêu *CD133*, *IGF-1*, *FGF-7*.

Bảng 1. Trình tự mỗi được sử dụng trong RT-PCR.

Gen mục tiêu	Mũi	Trình tự	Tài liệu tham khảo
<i>IGF-1</i>	F	TGTCCTCCTCGCATCTCTTCTACC	Yamauchi et al., 2009
	R	TAAAAGCCCCTGTCTCCACACACG	
<i>FGF-7</i>	F	TTGTGGCAATCAAAGGGGTG	Yamauchi et al., 2009
	R	CCTCCGTTGTGTGCCATTTAGC	
<i>CD133</i>	F	TTGCGGTAAAAGTGGCTAAG	Pellacani et al., 2011
	R	TGGGCTTGTCATAACAGGAT	

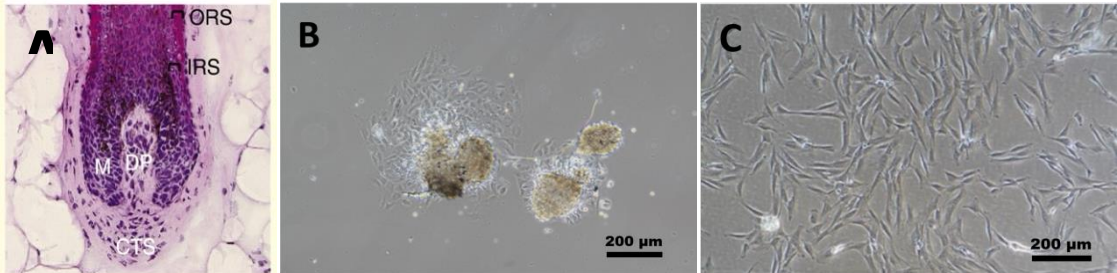
**Phương pháp thu thập và phân tích số liệu**

Số liệu được trình bày theo cách Mean  $\pm$  SD, thống kê và đồ thị được thống kê và vẽ bằng GraphPad Prism.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Kết quả biểu hiện marker vimentin và  $\alpha$ -SMA**

Khi nuôi cấy sơ cấp, sau 5 ngày nuôi cấy, tế bào di cư khỏi DP và bắt đầu tăng sinh. Hình dạng tế bào dạng thon dài tương tự như nguyên bào sợi. Khi nuôi tới thế hệ P2, tế bào được đông lạnh cho tới khi sử dụng. Sau rã đông, tế bào DP ở thế hệ P3 sau rã đông được kế thừa hình dạng thon dài: hẹp ở hai đầu và phình to ở giữa do có nhân lớn hình elip, bám trên bề mặt đĩa nuôi cấy (Hình 2). Tế bào P3 được kiểm tra lại sự biểu hiện marker vimentin và  $\alpha$ -SMA. Kết quả cho thấy phần lớn tế bào bắt màu với kháng thể đặc hiệu cho vimentin ( $97,3 \pm 1,8\%$  tế bào trong quần thể tế bào quan sát có màu xanh lá) và kháng thể đặc hiệu cho  $\alpha$ -SMA ( $98,7 \pm 0,8\%$  tế bào trong quần thể tế bào quan sát có màu xanh lá) (Hình 3).

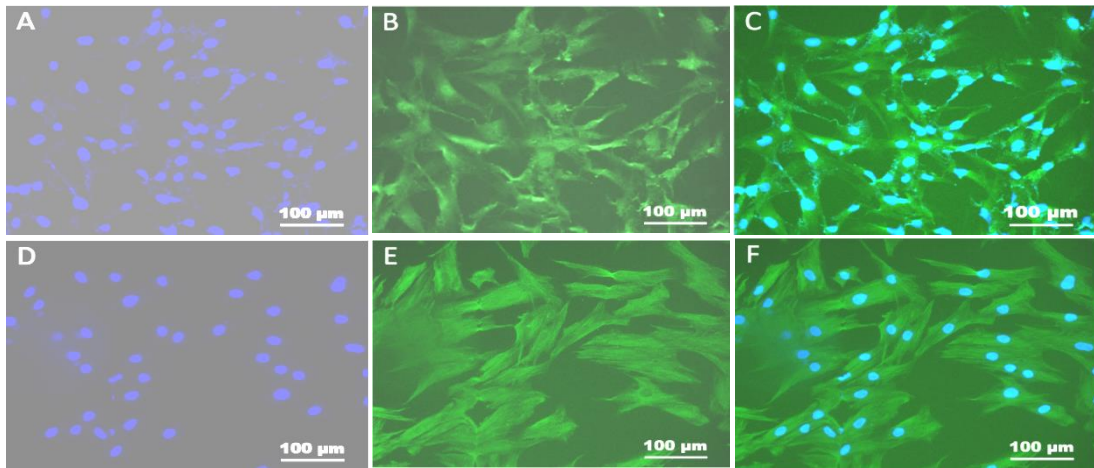


**Hình 2. Tế bào DP nuôi cấy ở các thế hệ khác nhau**

A: Nhuộm mô học DP Schneider et al. 2009 (CTS: Vỏ bao nang tóc, M: Vùng tế bào tăng sinh, ORS: Vỏ nang ngoài, IRS: Vỏ nang trong), B: Nuôi sơ cấp, tế bào di cư khỏi DP, C: Tế bào DP thế hệ P3.

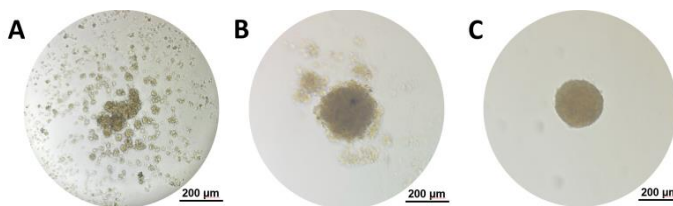
**Kết quả tạo spheroid**

Sau khi cấy lên giọt môi trường, dưới tác động của trọng lực, tế bào bắt đầu kết cụm với nhau hình thành những cụm tế bào nhỏ (sau 24 giờ). Sau đó, các cụm tế bào nhỏ liên kết với nhau tạo thành một cụm tế bào hoàn chỉnh (sau 72 giờ). Sau đó viên spheroid xuất hiện trở nên rõ ràng, rất ít tế bào rời xuất hiện trong giọt môi trường (Hình 4). Đây cũng là một trong những tính chất đặc trưng của tế bào DP.



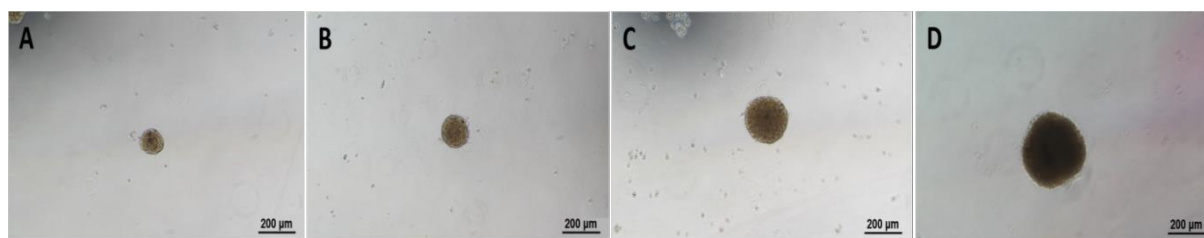
**Hình 3. Tế bào DP nhuộm kháng thể phát hiện vimentin và  $\alpha$ -SMA**

Hàng 1: Kết quả nhuộm với kháng thể đặc hiệu vimentin. Hàng 2: Kết quả nhuộm kháng thể đặc hiệu  $\alpha$ -SMA. A, D: Tế bào nhuộm DAPI, B, E: Tế bào nhuộm với kháng thể đặc hiệu vimentin (B) hoặc  $\alpha$ -SMA (E), tế bào dương tính với kháng thể phát màu xanh lá, C là hình gộp của A và B, F là hình gộp D và E.



**Hình 4. Quá trình hình thành khối spheroid của tế bào DP theo phương pháp Hanging drop**

A: Sau 24 giờ, B: 48 giờ, C: 72 giờ.



**Hình 5. Sự hình thành khối spheroid của tế bào DP ở các mật độ khác nhau**

A:  $1 \times 10^3$  tế bào, B:  $2,5 \times 10^3$  tế bào, C:  $5 \times 10^3$  tế bào, D:  $10 \times 10^3$  tế bào.

Hiện tượng này xảy ra ở tất cả các nhóm thí nghiệm với mật độ tế bào 1; 2,5; 5 và  $10 \times 10^3$  tế bào/giọt. Tuy nhiên, giữa các nhóm thí nghiệm vẫn có sự khác nhau về tỷ lệ hình thành spheroid và đường kính trung bình, kết quả này được liệt kê trong bảng 2. Tỷ lệ hình thành spheroid ở các nhóm không có sự khác biệt về mặt thống kê. Trong khi đó, mật độ ban đầu càng cao thì ngày hình thành spheroid hoàn chỉnh càng dài và đường kính của spheroid càng tăng. Điều này là do mật độ tế bào càng cao thì xuất hiện nhiều cụm tế bào ban đầu và các cụm tế bào cần nhiều thời gian để kết thành khối hoàn chỉnh hơn so với giọt ít tế bào. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Topouzi và cộng sự (2017).

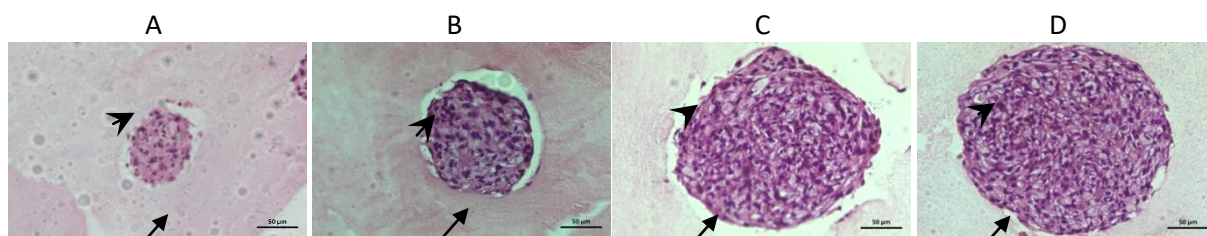
**Bảng 2. Kết quả hình thành spheroid ở các nồng độ tế bào khác nhau.**

<sup>a, b, c, d</sup>: Sự khác biệt về mặt thống kê với  $\alpha = 0,05$

Mật độ tế bào ban đầu	Tỷ lệ hình thành spheroid (%)	Ngày hình thành spheroid	Đường kính trung bình (μm)
$1 \times 10^3$	$98,1 \pm 1,6\%^a$	$2,5 \pm 0,6^a$	$101,44 \pm 10,28^a$
$2,5 \times 10^3$	$98,5 \pm 1,2\%^a$	$2,8 \pm 0,4^a$	$140,43 \pm 15,93^b$
$5 \times 10^3$	$96,7 \pm 2,6\%^a$	$3,2 \pm 0,8^{ab}$	$205,23 \pm 27,62^c$
$10 \times 10^3$	$96,1 \pm 2,9\%^a$	$3,8 \pm 1,1^b$	$252,19 \pm 24,82^d$

### Kết quả nhuộm HE

Kết quả nhuộm HE cho thấy lớp fibrin cho ra kết quả nhuộm HE là hệ thống dạng lưới sợi protein liên kết với nhau tạo ra cấu trúc lỗ (Hình 6). Khối spheroid được bao bọc bởi fibrin nhưng không hình thành liên kết. Cấu trúc spheroid giữa các nhóm thí nghiệm tương tự nhau, đều có cấu trúc đặc bên trong với sự liên kết dày đặc của tế bào DP, nhân tế bào được thấy bởi lớp màu tím có hình elip. Các tế bào bên ngoài spheroid liên kết với nhau tạo thành lớp viền bao bọc các tế bào bên trong một cách rõ ràng. Tổng hợp các kết quả cho thấy tỷ lệ hình thành spheroid giữa các nồng độ 1; 2,5; 5 và  $10 \times 10^3$  tế bào/spheroid là tương đương nhau. Mật độ tế bào trung bình trong DP người là 1300 tế bào/DP. Do đó, tất cả các nồng độ trên đều có thể sử dụng để tiếp tục nghiên cứu sâu hơn.



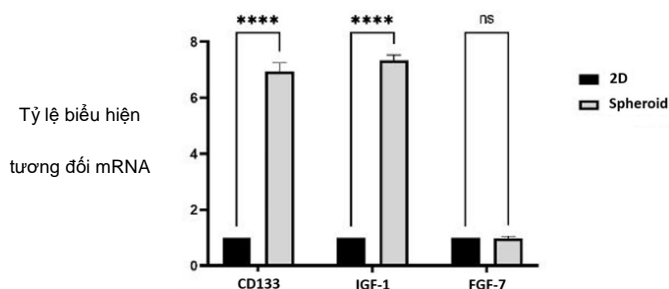
**Hình 6. Kết quả nhuộm mô học spheroid ngày 4 được cố định trong khung fibrin**

A:  $1 \times 10^3$  tế bào, B:  $2,5 \times 10^3$  tế bào, C:  $5 \times 10^3$  tế bào, D:  $10 \times 10^3$  tế bào. Mũi tên: Spheroid, đầu mũi tên: Khung fibrin. Scale bar: 50 μm.

### Kết quả đánh giá sự biểu hiện mRNA CD133, IGF-1, FGF-7

Tế bào DP tiết ra yếu tố tăng trưởng và có sự biểu hiện khác nhau đối với hai trạng thái tế bào bám dính bình thường, và 3D spheroid tự do trong môi trường ở mật độ  $5 \times 10^3$  tế bào/spheroid, sau 5 ngày nuôi cấy. CD133 là một trong những marker tốt giúp phân biệt tế bào DP với các quần thể tế bào da khác. CD133 được biểu hiện bằng DP spheroid cao hơn nhiều so với tế bào ở trạng thái bám dính, thể hiện được tính chất của tế bào đã khô phục và có khả năng tạo ra sự hình thành nang tóc trong cơ thể (Zhou et al., 2016). Tiết IGF-1 giúp kích thích sự tăng sinh tế bào trong pha phát triển và kích hoạt chuyển đổi chu kỳ nang tóc từ pha nghỉ qua pha phát triển, tăng sinh nang tóc. Trong nuôi cấy tế bào DP 2D *in vitro* quá trình sản xuất IGF-1 giảm dần. FGF-7 là chất kích thích

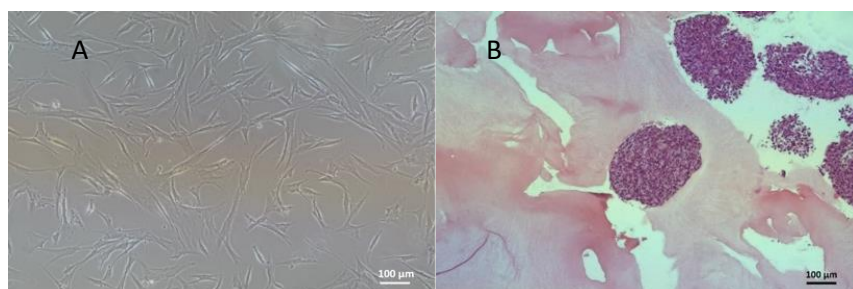
tăng trưởng được tiết bởi tế bào DP theo cơ chế cận tiết (Iino et al. 2007; Panchaprateep et al. 2014). Sự biểu hiện mRNA CD133 của spheroid gấp  $6,96 \pm 0,57$  lần so với biểu hiện trong tế bào đối chứng (tế bào nuôi cấy 2D trong cùng thể hệ). Tương tự như CD133, mRNA IGF-1 có mức độ biểu hiện cao vượt trội của spheroid gấp  $7,34 \pm 0,38$  lần so với nhóm đối chứng. Trong khi đó, biểu hiện của mRNA FGF-7 gần như không có sự khác biệt nào giữa spheroid và tế bào đối chứng (Hình 7). Các tế bào nhú bì (DP) được biết là có chức năng điều hoà sự phát triển của tất cả tế bào và chu kỳ của nang tóc. Tuy nhiên, tế bào DP nhanh chóng mất đi tính tự cảm ứng trong quá trình cấy chuyên qua *in vitro* (Žnidarič et al. 2021). Kết quả này cho thấy spheroid gia tăng sự biểu hiện maker cấu trúc và chức năng tế bào nhú bì so với tế bào nuôi cấy 2D.



Hình 7. Đồ thị biểu hiện sự biểu hiện tương đối mRNA các marker của khối spheroid tế bào DP so với nuôi cấy 2D  
\*\*\*\*:  $p < 0,00005$ , ns:  $p > 0,05$ .

### Kết quả đánh giá hiệu quả tạo spheroid tế bào DP P9

Tế bào DP ở thể hệ P9 vẫn tăng sinh tốt, tuy nhiên hình dạng tế bào bắt đầu có sự thay đổi ở cuối thể hệ P9 và thể hiện rõ hơn ở những thể hệ sau. Tế bào trở nên dẹt hơn, tế bào phình to hơn về chiều ngang. Những thay đổi ban đầu về hình dạng tế bào cho thấy bắt đầu có sự thay đổi về tính chất tế bào. Hiện tượng này cũng được ghi nhận bởi Upton và cộng sự (2015) (Upton et al., 2015). Do đó, tế bào P9 được lựa chọn để tạo spheroid và đánh giá lại hiệu quả tạo spheroid. Mật độ  $10 \times 10^3$  tế bào là mật độ spheroid hình thành chậm nhất ở thể hệ P3, do đó mật độ này được sử dụng để so sánh sự hình thành spheroid giữa tế bào P3 và P9 (Bảng 3). Kết quả cho thấy tỷ lệ hình thành spheroid giảm từ thể hệ P3 xuống P9, thời gian hình thành spheroid kéo dài (sau 6 ngày). Đồng thời, kết quả nhuộm mô học cho thấy một số spheroid P9 có cấu trúc rời rạc, tế bào không liên kết chặt chẽ, viền không được quan sát rõ ràng. Kết quả này cho thấy hiệu quả hình thành spheroid của tế bào P3 tốt hơn so với thể hệ P9. Do đó, tế bào P3 được sử dụng để tạo spheroid cho các thí nghiệm đánh giá chuyên sâu.



Hình 8. Spheroid được hình thành từ tế bào P9 với mật độ  $10 \times 10^3$  tế bào.

A: Tế bào DP P9 trên đĩa nuôi (2D), B: Nhuộm HE spheroid từ tế bào DP P9. Scale bar: 100  $\mu$ m.

Bảng 3. So sánh kết quả tạo spheroid tế bào DP P3 và DP P9

(<sup>a, b</sup>: Sự khác biệt về mật thống kê trong cùng 1 cột với  $\alpha = 0,05$ )

Tỷ lệ tạo spheroid	Ngày hình thành spheroid	Cấu trúc spheroid
P3 $96,1 \pm 2,9\%^a$	$3,8 \pm 1,1^a$	Đặc tròn, có viền bao rõ ràng
P9 $73,3\% \pm 9,5\%^b$	$6,1 \pm 0,3^b$	Một số pheroid có tế bào rời rạc, nhiều spheroid không có viền tế bào, spheroid dễ bị cắt nát khi nhuộm mô học

**KẾT LUẬN**

Nghiên cứu tiến hành để tạo spheroid tế bào DP để tạo mô hình đánh giá cho các nghiên cứu tiếp theo. Kết quả thu được cho thấy spheroid có thể được tạo thành công từ tế bào DP, spheroid này có cấu trúc tương tự như cấu trúc tự nhiên và gia tăng sự biểu hiện marker kích thích tái tạo nang tóc như CD133 và IGF-1. Do đó, spheroid có thể sử dụng làm mô hình cho các nghiên cứu đánh giá hoạt chất hoặc cơ chế kích thích mọc tóc.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Bejaoui M., Oliva A. K., et al., (2022). 3D spheroid human dermal papilla cell as an effective model for the screening of hair growth promoting compounds: examples of minoxidil and 3, 4, 5-tri-O-caffeoylquinic acid (TCQA). *Cells*, 11(13), 2093.
- Białkowska K., Komorowski P., et al., (2020). Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures—examples of methods of preparation and the most important application. *Int J Mol Sci*, 21(17), 6225.
- Chae S., Hong J., et al., (2021). The utility of biomedical scaffolds laden with spheroids in various tissue engineering applications. *Theranostics*, 11(14), 6818.
- Iino M., Ehama R., et al., (2007). Adenosine stimulates fibroblast growth factor-7 gene expression via adenosine A2b receptor signaling in dermal papilla cells. *J Invest Dermatol*, 127(6), 1318-1325.
- Panchaprateep R., & Asawanonda P. (2014). Insulin-like growth factor-1: roles in androgenetic alopecia. *Exp Dermatol* 23(3), 216-218.
- Pellacani D., Packer R. J., et al., (2011). Regulation of the stem cell marker CD133 is independent of promoter hypermethylation in human epithelial differentiation and cancer. *Mol Cancer*, 10, 1-14.
- Schneider M. R., Schmidt-Ullrich R., et al., (2009). The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr Biol*, 19(3), R132-R142.
- Topouzi H., Logan N. J., et al., (2017). Methods for the isolation and 3D culture of dermal papilla cells from human hair follicles. *Exp Dermatol*, 26(6), 491-496.
- Upton J. H., Hannen R. F., et al., (2015). Oxidative stress-associated senescence in dermal papilla cells of men with androgenetic alopecia. *J Invest Dermatol*, 125(5), 1244-1252.
- Yamauchi K., & Akira K. (2009). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 enhances the expression of alkaline phosphatase and insulin-like growth factor-1 in human primary dermal papilla cell culture and maintains mouse hair bulbs in organ culture. *Arch Dermatol Res*, 301(5), 357-365.
- Zhou L., Yang K., et al., (2016). Activating  $\beta$ -catenin signaling in CD133-positive dermal papilla cells increases hair inductivity. *FEBS J* 283(15), 2823-2835.
- Žnidarič M., Žurga Ž. M., et al., (2021). Design of In Vitro Hair Follicles for Different Applications in the Treatment of Alopecia—A Review. *Biomedicines* 9(4), 435.

## STUDY ON THE FORMATION OF SPHEROIDS FROM HUMAN DERMAL PAPILLA CELLS AS A MODEL FOR HAIR FOLLICLE DEVELOPMENT

**Nguyen Phan Nhu Quynh<sup>1</sup>, Nguyen Thi Mong Thu<sup>1</sup>, Luu Tran Thanh Uyen<sup>1</sup>, Luu Tran Phuong Thao<sup>2</sup>, Ho Nguyen Quynh Chi<sup>3</sup>, Le Thanh Long<sup>3</sup>, Dang Nguyen Tuong Van<sup>4</sup>, To Minh Quan<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Faculty Of Biology and Biotechnology, University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

<sup>2</sup>University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City

<sup>3</sup>Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>4</sup>University of Health Sciences, Vietnam National University, Ho Chi Minh City

**SUMMARY**

Dermal papilla cells (DP cells) play a pivotal role in regulating the hair growth cycle. DP cells cultured in a three-dimensional (3D) (spheroid) can overcome the limitations of 2D culture models (cell culture dishes), such as the loss of proliferative capacity and hair inductivity. The hanging-drop method was used to form spheroids with cell densities of 1, 2.5, 5 or  $10 \times 10^3$  cells/drop. The results indicated that DP cells at passage 3 (P3) effectively formed spheroids at all cell densities (nearly 100%) with histological structure similar to natural tissues: tight cellular junctions and an outer cellular border. However, the spheroid size and formation time varied with cell density. Additionally, the mRNA expression levels of the markers CD133 and Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) in the spheroids were  $6.96 \pm 0.57$  and  $7.34 \pm 0.38$  times higher, respectively, than those in 2D cells, while FGF-7 levels remained unchanged. Moreover, cells at passage 9 (P9) showed a decreased spheroid formation rate, increased formation time and relatively looser histological structure. In conclusion, spheroids can be formed from P3 DP cells at cell densities of 1, 2.5, 5 or  $10 \times 10^3$  cells/drop, resulting in increased expression of CD133 and IGF-1.

**Keywords:** CD133, Dermal papilla cells, hanging-drop, IGF-1, spheroid.

\* Author for correspondence: Tel: 0908761697. Email: tomquan@hcmus.edu.vn

## ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ HỒI PHỤC TỔN THƯƠNG SỤN *EX VIVO* VÀ *IN VIVO* CỦA VẬT LIỆU SINH HỌC 3D TRÊN MÔ HÌNH THỎ TRƯỜNG THÀNH

Trương Minh Dũng<sup>1\*</sup>, Võ Ngọc Bích Trâm<sup>1</sup>, Nguyễn Hoàng Vinh<sup>1</sup>,  
Dương Thị Hoàng Yến<sup>1</sup>, Mai Hoàng Đức Quý<sup>1</sup>, Cao Ngọc Minh Trang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Văn Lang, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

### TÓM TẮT

Liệu pháp tế bào gốc, đặc biệt là sử dụng tế bào gốc trung mô hoặc tế bào gốc tự thân, mang lại nhiều tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực y học tái tạo, bao gồm cả tái tạo mô sụn. Tuy nhiên, liệu pháp này cũng tồn tại một số hạn chế bao gồm lượng tế bào thu được thấp và khả năng tăng sinh sụn chưa cao. Việc phát triển các phương pháp tối ưu hóa hiệu quả liệu pháp này là vô cùng cần thiết. Trong nghiên cứu này, hiệu quả tái tạo sụn của vật liệu sinh học 3D từ tế bào gốc mô sụn khớp thỏ một ngày tuổi đánh giá. Đầu tiên, chúng tôi phân lập tế bào từ mô sụn khớp thỏ một ngày tuổi, nuôi tăng sinh và đánh giá các đặc điểm sinh học. Chế tạo vật liệu sinh học 3D dựa trên bốn phương pháp: tạo khối sụn, giọt treo (hanging drop), nuôi cấy viên (pellet culture) và nuôi trong dome matrigel. Các mẫu mô sụn tổn thương được cấy ghép vật liệu *ex vivo* và *in vivo* và đánh giá khả năng hồi phục bằng phương pháp nhuộm mô học. Kết quả thu được nguồn tế bào có hình thái giống nguyên bào sợi, bám trái tốt và có tiềm năng biệt hóa *in vitro* thành nguyên bào xương, nguyên bào sụn và tế bào mỡ. Dựa vào hình ảnh mô học, cả bốn phương pháp chế tạo cấu trúc vi mô sụn 3D đều cho thấy sự hình thành mô mới tại vị trí khiếm khuyết sụn. Từ kết quả đó có thể kết luận tế bào gốc mô sụn khớp thỏ một ngày tuổi có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực làm lành mô sụn bị tổn thương. Mặc dù thời gian thử nghiệm còn hạn chế, các phương pháp chế tạo vật liệu sinh học 3D đều đạt hiệu quả khả quan, mở ra hướng nghiên cứu và ứng dụng thực tế đầy hứa hẹn.

**Từ khóa:** Giọt treo, nuôi cấy viên, nuôi trong dome matrigel, tạo khối sụn, tế bào gốc mô sụn khớp thỏ một ngày tuổi, vật liệu sinh học 3D.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Liệu pháp tế bào gốc, hay còn gọi là liệu pháp tái tạo, là một phương pháp hiện đại, sử dụng tế bào gốc tự thân, đồng loại hoặc các sản phẩm từ tế bào gốc để phục hồi mô bị tổn thương (Whitney et al., 2017). So với các phương pháp điều trị truyền thống, liệu pháp tế bào gốc sở hữu nhiều ưu điểm vượt trội. Thay vì chỉ tập trung vào việc kiểm soát triệu chứng hoặc khắc phục tạm thời, liệu pháp này hướng đến mục tiêu thay thế tế bào bị tổn thương hoặc tạo ra môi trường nuôi dưỡng để kích thích quá trình tái tạo tự nhiên của cơ thể.

Trong lĩnh vực y học tái tạo, liệu pháp tế bào gốc được đánh giá là phương pháp đầy hứa hẹn, mở ra khả năng điều trị nhiều bệnh lý, đặc biệt là tái tạo sụn. Cấy ghép tế bào tự thân là phương pháp điều trị bằng tế bào đầu tiên được áp dụng và được sử dụng thường xuyên để phục hồi các khiếm khuyết sụn, cho thấy khả năng phục hồi tốt từ ngắn hạn đến trung hạn (Alves da Silva et al., 2017). Tuy nhiên, liệu pháp này có một số hạn chế, đặc biệt là khả năng tăng sinh sụn chưa được tối ưu (Lee et al., 2007).

Để khắc phục những hạn chế trên và nâng cao hiệu quả điều trị, các nghiên cứu gần đây đã tập trung vào việc tìm kiếm các nguồn tế bào gốc mới có tiềm năng tái tạo sụn tốt hơn. Một trong những hướng đi đầy hứa hẹn là sử dụng nguồn tế bào gốc tiền thân sụn từ cơ thể chưa trưởng thành có đặc điểm của cả tế bào gốc phôi và tế bào gốc trung mô (Lee et al., 2015). Khi so sánh khả năng tăng sinh và tổng hợp từ nguồn tế bào gốc tiền thân sụn ở các giai đoạn khác nhau từ cơ thể chuột chưa trưởng thành, ở giai đoạn ngày 20 của thai kỳ (gần ngày sinh của chuột) cho khả năng tăng sinh cao và là nguồn tế bào tốt nhất để tái tạo sụn (Kim et al., 2016). Dựa trên kết quả đó, nghiên cứu này sử dụng nguồn tế bào gốc mô sụn thỏ một ngày tuổi là nguồn tế bào chính để tạo vật liệu sinh học 3D dựa trên kỹ thuật mô và tránh các vấn đề liên quan đến đạo đức.

Kỹ thuật mô là một lĩnh vực của y học tái tạo nhằm tạo ra các cấu trúc mô nhân tạo để thay thế hoặc sửa chữa các mô và cơ quan bị tổn thương (Li et al., 2017). Quá trình này bao gồm việc sử dụng nguồn tế bào sống, kết hợp với các vật liệu sinh học và các yếu tố tăng trưởng để tạo ra các mô mới có cấu trúc và chức năng sinh học tương tự mô tự nhiên (Li et al., 2017). Vì vậy, nghiên cứu sử dụng nguồn tế bào gốc tiền thân sụn kết hợp với 4 phương pháp kỹ thuật mô: tạo khối sụn, giọt treo, nuôi cấy viên và nuôi trong dome matrigel để tạo vật liệu sinh học 3D ứng dụng trong lĩnh vực tái tạo mô sụn. Kết quả nghiên cứu mở ra hướng đi mới đầy tiềm năng cho lĩnh vực y học tái tạo, góp phần nâng cao hiệu quả điều trị và cải thiện chất lượng cuộc sống.



## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Mẫu mô sụn khớp thỏ một ngày tuổi (giống New Zealand) được cung cấp từ trại nuôi, có sức khỏe tốt và không mắc các bệnh truyền nhiễm.

### Phương pháp nghiên cứu

#### **Phân lập và nuôi cấy tế bào gốc mô sụn khớp thỏ một ngày tuổi**

Mẫu mô sụn được thu trong điều kiện vô trùng của phòng mổ và bảo quản trong dung dịch PBS có bổ sung 1% kháng sinh Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) ở 4°C cho tới khi xử lý để phân lập tế bào. Mẫu mô sụn được rửa 3 lần với PBS có chứa 1% Pen/Strep và được cắt thành từng mẫu mô nhỏ (< 1 mm) sau khi đã loại bỏ mô xương, mô mỡ và mô sợi. Sau đó, các mẫu mô nhỏ được ủ với enzyme collagenase loại II 0,1% trong tủ ấm 37°C. Sau 16 giờ, dịch tế bào được thu và ly tâm với tốc độ 1.700 vòng/phút trong 10 phút. Sau đó, phần sinh khối tế bào được lọc qua màng lọc tế bào 100 µm trong môi trường DMEM. Dịch tế bào thu được được ly tâm lại 2 lần trong môi trường DMEM với tốc độ 1.700 vòng/phút trong 10 phút. Mật độ tế bào được đánh giá trên buồng đếm Naebaer và nuôi trong tủ ấm 37°C có 5% CO<sub>2</sub> với môi trường nuôi cấy dinh dưỡng DMEM, bổ sung 10% FBS, 1% Pen/Strep và 5 ng/mL bFGF-2. Tế bào được theo dõi thường xuyên và môi trường nuôi cấy được thay 3 ngày/lần. Khi mật độ tế bào cao đạt từ 80% diện tích bề mặt đĩa, thực hiện quy trình cấy chuyển bằng Trypsin/EDTA sang đĩa nuôi cấy mới.

#### **Biệt hóa tế bào gốc mô sụn thành nguyên bào xương, tế bào mỡ và tế bào sụn**

Tế bào được cảm ứng biệt hóa thành nguyên bào xương trong 21 ngày trong môi trường DMEM, bổ sung 10% FBS, 100 nM dexamethasone, 50 µg/mL ascorbic acid và 10 mM β-glycerol 2-phosphate. Thực hiện quy trình nhuộm với Alizarin Red S để đánh giá hiệu quả biệt hóa nguyên bào xương. Tế bào được cố định bằng dung dịch paraformaldehyde 2% trong 1 giờ và rửa sạch bề mặt tế bào bằng PBS hai lần. Nhuộm với thuốc nhuộm Alizarin Red S trong 30 phút và rửa bằng PBS.

Quy trình biệt hóa mỡ được tiến hành trong 14 ngày trong môi trường DMEM, bổ sung 10% FBS, 100 nM dexamethasone, 10 µg/mL insulin, 0,1 mM indomethacine và 0,5 mM 3-Isobutyl-2-methylxanthane. Đánh giá hiệu quả biệt hóa tạo mỡ qua quy trình nhuộm với Oil Red O. Quy trình nhuộm tiến hành tương tự như biệt hóa nguyên bào xương, chỉ thay thuốc nhuộm thành Oil Red O. Mẫu tế bào đối chứng được nuôi trong môi trường DMEM có 10% FBS và 1% Pen/Strep.

Để biệt hóa thành tế bào sụn, tế bào được tạo viên bằng phương pháp ly tâm ở tốc độ 300 rcf trong 20 phút và nuôi trong môi trường DMEM, bổ sung 10% FBS, 1% Pen/Strep, insulin transferrin selenium (ITS), 40 µg/mL L-proline, BSA, 100 µg/mL sodium pyruvate, 50 µg/mL ascorbate-2 phosphate và 100 nM dexamethasone. Thí nghiệm được thực hiện bao gồm hai nhóm: có bổ sung TGF-β3 và không bổ sung TGF-β3. Sau 21 ngày, đánh giá hiệu quả biệt hóa tạo sụn thông qua quy trình nhuộm với Safranin O. Cố định mẫu bằng 2% formaldehyde và đúc khối trong sáp paraffin. Mẫu được cắt thành các lát mỏng 5 µm và nhuộm với dung dịch thuốc nhuộm.

#### **Tạo vật liệu 3D từ tế bào gốc mô sụn**

##### **Kỹ thuật tạo khối sụn**

Tế bào được nuôi ở mật độ cao trong môi trường biệt hóa sụn DMEM có 10% FBS, 1% Pen/Strep, insulin, 40 µg/mL L-proline, BSA, 100 µg/mL sodium pyruvate, 50 µg/mL ascorbate-2 phosphate và 100 nM dexamethasone để tạo thành một lớp màng tế bào. Sau 7 ngày nuôi, môi trường cũ được loại bỏ và rửa hai lần bằng dung dịch PBS. Màng tế bào được tách ra khỏi đĩa nuôi bằng Trypsin và ly tâm ở tốc độ 3000 rcf trong 20 phút. Các khối sụn sau khi ly tâm được nuôi cấy tĩnh kéo dài trong môi trường biệt hóa sụn trong vòng 14 ngày và môi trường được thay 3 ngày/lần.

##### **Kỹ thuật giọt treo**

Tế bào được huyền phù trong môi trường nuôi cấy DMEM, bổ sung 10% FBS, 1% Pen/Strep và 5 ng/mL bFGF-2. Tạo thành các giọt treo 50 µL/giọt trên nắp đĩa úp ngược và nuôi trong tủ ấm 37°C, có 5% CO<sub>2</sub>. Hình thái tế bào được quan sát và theo dõi bằng kính hiển vi soi ngược.

##### **Kỹ thuật nuôi cấy viên**

Dịch tế bào được ly tâm ở tốc độ 300 rcf trong 10 phút để tạo thành viên sinh khối tế bào và nuôi trong eppendorf. Môi trường nuôi cấy gồm DMEM, 10% FBS, 1% Pen/Strep và 5 ng/ml bFGF-2. Sau 24 giờ, viên sinh khối được chuyển sang đĩa 48 giếng và nuôi trong môi trường cảm ứng biệt hóa sụn bao gồm DMEM, 10% FBS, 1% Pen/Strep, insulin, 40 µg/mL L-proline, BSA, 100 µg/mL sodium pyruvate, 50 µg/mL ascorbate-2 phosphate và 100 nM dexamethasone. Môi trường nuôi cấy được thay 3 ngày/lần và quá trình biệt hóa tế bào được theo dõi liên tục.

**Kỹ thuật nuôi trong dome matrigel**

Dịch tế bào được trộn với matrigel theo tỷ lệ 1:1. Hỗn hợp này được tạo thành các dome với 50 µL/dome trong đĩa 48 giếng. Sau đó, các dome được ủ trong tủ ẩm 37°C, 5% CO<sub>2</sub> cho đông đặc lại. Sau 30 phút, môi trường nuôi cấy DMEM bổ sung 10% FBS, 1% Pen/Strep và 5 ng/mL bFGF-2 được thêm vào mỗi giếng (1 mL). Các dome được quan sát và môi trường được thay mới 3 ngày/lần.

**Thử nghiệm hiệu quả hồi phục của vật liệu sinh học**

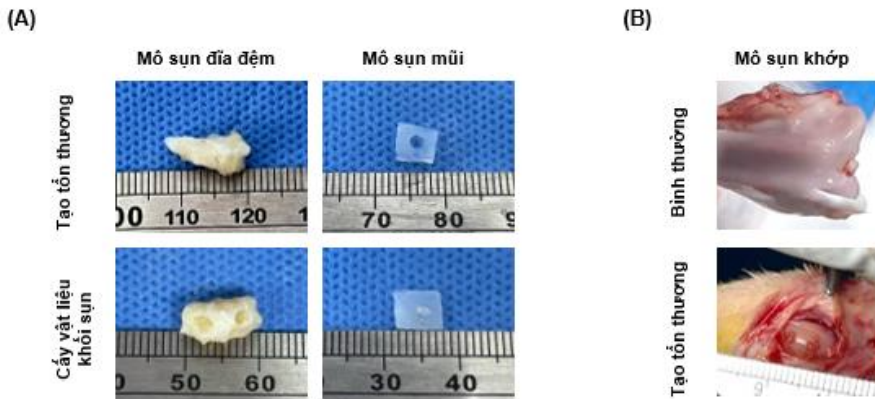
**Thử nghiệm ex vivo trên mô sụn đĩa đệm và mũi thỏ**

Thí nghiệm được tiến hành trên mẫu mô sụn đĩa đệm và mũi ở thỏ trưởng thành. Sau khi thu mẫu đĩa đệm và sụn mũi, vị trí khiếm khuyết được tạo trên mẫu mô sụn với đường kính 2 mm (Hình 1). Sau đó, vật liệu khối sụn được cấy vào vị trí khiếm khuyết và các mẫu được nuôi trong môi trường biệt hoá sụn có bổ sung 10 µL TGF-β3 ở tủ ẩm 37°C, có 5% CO<sub>2</sub>. Mẫu mô hình ex vivo bao gồm một nhóm chứng âm, một nhóm chứng dương và ba nhóm thử nghiệm vật liệu. Các mẫu được theo dõi và môi trường được thay định kỳ 3 ngày/lần. Sau 14 ngày nuôi, các mẫu mô được kiểm tra hiệu quả hồi phục tổn thương bằng phương pháp mô học.

**Thử nghiệm in vivo trên mô sụn khớp thỏ**

Lựa chọn các giống thỏ đực trưởng thành cân nặng từ 2,0 – 2,5 kg, được nuôi trong điều kiện môi trường như nhau. Thí nghiệm được thiết kế với 6 nhóm bao gồm một nhóm mô bình thường, một nhóm mô tổn thương và 4 nhóm thử nghiệm cấy ghép vật liệu. Để kiểm tra độ tin cậy và tính nhất quán của kết quả, thử nghiệm được lặp lại 2 lần trên mỗi mô hình (chân phải và chân trái) và mỗi chân tạo 2 tổn thương khiếm khuyết sụn. Vị trí khiếm khuyết được tạo trên bề mặt sụn khớp với đường kính 2 mm, độ sâu vừa đủ có thể làm lộ phần xương dưới sụn nhưng không xuyên qua xương (Hình 1). Các tổn thương trên bề mặt các mẫu mô sụn khớp được tạo bằng dụng cụ chuyên dụng để đảm bảo về độ tương đồng.

Thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện ánh sáng đầy đủ và đảm bảo các tiêu chuẩn vệ sinh. Sau phẫu thuật, thỏ được chăm sóc đặc biệt để đảm bảo quá trình hồi phục diễn ra nhanh chóng và hiệu quả. Điều kiện lý tưởng bao gồm không gian thoáng mát, yên tĩnh, chuồng thỏ được vệ sinh thường xuyên và thỏ được cung cấp thức ăn, nước uống đầy đủ. Ngoài ra, thỏ được theo dõi và kiểm tra vết mổ thường xuyên. Sau 4 tuần, các mẫu mô được đánh giá hiệu quả hồi phục tổn thương bằng phương pháp mô học. Mẫu mô sụn thu tại vị trí cấy ghép được nhuộm H&E để quan sát và đánh giá mức độ sửa chữa sụn. Đồng thời, mẫu mô cũng được nhuộm Safranin O để xác định hàm lượng GAGs tại vị trí cấy ghép.

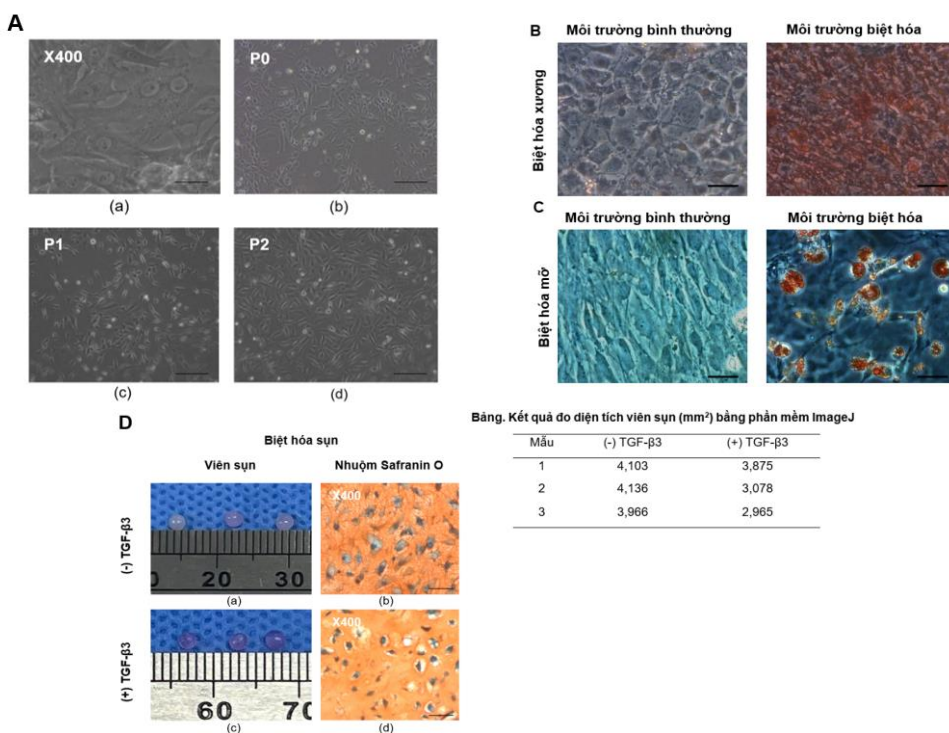


Hình 1. Thử nghiệm vật liệu sinh học ex vivo trên mô sụn đĩa đệm và mũi (A) và in vivo trên mô sụn khớp (B)

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Hình thái và khả năng tăng sinh tế bào gốc mô sụn**

Sau 24 giờ nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng, tế bào từ dạng hình cầu trôi lơ lửng chuyển sang dạng hình dẹt và bám dính trên bề mặt đĩa nuôi cấy (Hình 2A). Tế bào tiếp tục phát triển mạnh thành hình sợi dài như nguyên bào sợi với bên trong chứa nhân, nhánh bào tương kéo dài, màng tế bào hoàn chỉnh đồng nhất bám trải trên bề mặt đĩa nuôi cấy. Trong nghiên cứu này, tế bào được phân lập từ mô sụn khớp thỏ có hình thái tương tự như tế bào gốc trung mô phân lập từ tủy xương người (Baghaei et al., 2017). Sau mỗi lần cấy chuyển, mật độ tế bào thu được cao hơn và tốc độ tăng sinh nhanh hơn so với lượng tế bào thu được trước đó.



**Hình 2. Hình thái tế bào và kết quả biệt hóa *in vitro*.** (A) Tế bào ở độ phóng đại x 400 scale bar 20  $\mu$ m (a) và qua từng thế hệ P0 (b), P1 (c), P2 (d) ở độ phóng đại x100 scale bar 100  $\mu$ m. (B) Kết quả nhuộm Alizarin Red S cho biệt hóa xương và (C) Kết quả nhuộm Oil Red O cho biệt hóa tạo mỡ ở độ phóng đại x400 scale bar 20  $\mu$ m. (D) Kích thước biệt hóa viên sụn không bổ sung TGF- $\beta$ 3 (a) và có TGF- $\beta$ 3 (c) lần lượt với kết quả nhuộm Safranin O (b) và (d) ở độ phóng đại x400 scale bar 20  $\mu$ m.

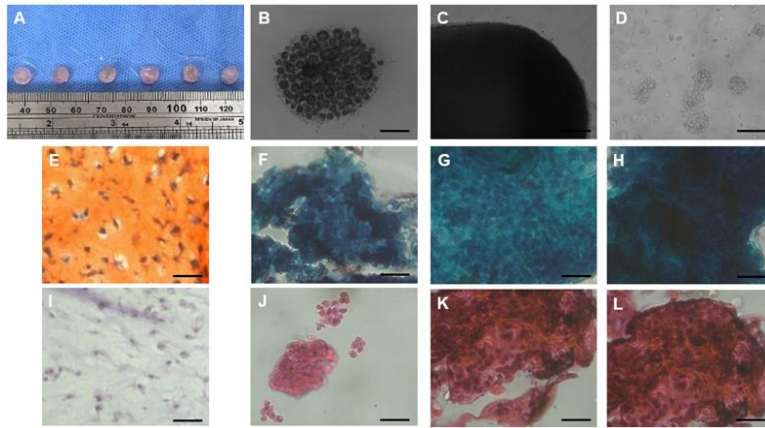
### Tiềm năng biệt hóa *in vitro* thành ba dòng

Tế bào gốc mô sụn có sự thay đổi hình thái khi nuôi trong môi trường cảm ứng biệt hóa đặc hiệu thành nguyên bào xương, tế bào mỡ và tế bào sụn. Trong môi trường cảm ứng biệt hóa tạo xương, hình thái tế bào chuyển sang dạng hạt đậu, tổng hợp chất nền ngoại bào xương, Alizarin Red S sẽ liên kết với các ion calcium trong chất nền và bắt màu cam thuốc nhuộm (Hình 2B). Khi được cảm ứng biệt hóa tạo mỡ, tế bào chuyển sang dạng hình cầu, bào tương chứa các hạt lipid nhỏ kết tụ vào nhau tạo thành các hạt lipid lớn hơn và bắt màu đỏ đặc trưng của thuốc nhuộm Oil Red O (Hình 2C). Ngược lại, đối với mẫu đối chứng, tế bào không có sự thay đổi về mặt hình thái và bắt khá ít màu thuốc nhuộm Alizarin Red S và Oil Red O.

Khi được nuôi cảm ứng biệt hóa tạo sụn, viên sụn được nuôi biệt hóa trong môi trường có bổ sung TGF- $\beta$ 3 có màu sắc trong hơn và kích thước nhỏ hơn viên sụn nuôi biệt hóa trong môi trường không bổ sung TGF- $\beta$ 3 (Hình 2D). GAGs trong chất nền ngoại bào ở cả hai mẫu viên sụn đều bắt màu đỏ cam của thuốc nhuộm Safranin O (Hình 2D). Chứng tỏ, tế bào gốc mô sụn khớp thỏ một ngày tuổi có tiềm năng biệt hóa thành sụn ngay cả khi có bổ sung TGF- $\beta$ 3 hay không. Như vậy, tế bào gốc mô sụn khớp thỏ một ngày tuổi có tiềm năng biệt hóa thành ba dòng trung mô, tương đồng với kết quả của các nghiên cứu trước đó (Ouzin et al., 2023).

### Kết quả tạo vật liệu 3D từ tế bào gốc mô sụn

Nghiên cứu tạo vật liệu 3D bằng bốn kỹ thuật khác nhau mang đến những ưu điểm riêng biệt trong nghiên cứu và ứng dụng. Trong kỹ thuật tạo khối sụn, tế bào được nuôi ở mật độ cao, tạo thành một lớp màng màu trắng đục có cấu trúc ổn định. Qua đánh giá cảm quan sau khi ly tâm, khối sụn thu được có kích thước khoảng 6 mm, dẻo dai và kết dính tốt (Hình 3A). Kỹ thuật giọt treo tận dụng lực căng bề mặt và lực hấp dẫn để giữ các tế bào trên bề mặt đĩa úp ngược, tạo thành cấu trúc 3D. Ban đầu, tế bào được phân tán đều trong giọt treo, diện tích tiếp xúc nhỏ, tạo điều kiện cho tế bào tương tác với nhau và hình thành các cụm tế bào hình cầu tròn đều, thể hiện đúng cấu trúc đặc trưng của Spheroid (Hình 3B). Trong kỹ thuật nuôi cấy viên, sau khi ly tâm, tế bào tạo thành cấu trúc dạng viên (pellet) rắn do các tế bào tương tác liên kết chặt chẽ với nhau (Hình 3C). Trong quá trình nuôi, tế bào còn tiết ra chất nền ngoại bào hỗ trợ cho sự phát triển và kết dính tế bào, giúp vật liệu có độ bền và khả năng chịu lực cao. Kỹ thuật nuôi trong dome matrigel sử dụng matrigel đông đặc ở 37°C như giá đỡ, tạo thành một mạng lưới 3D cung cấp không gian cho tế bào tăng sinh và hình thành các cụm tế bào cấu trúc 3D (Hình 3D).

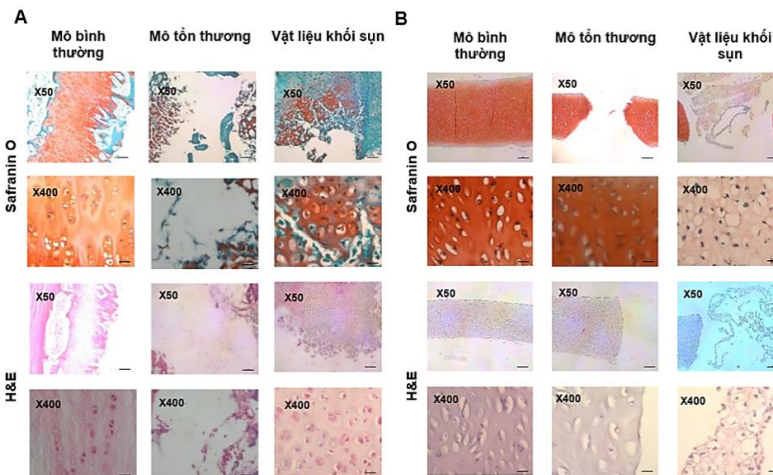


**Hình 3. Hình thái và kết quả nhuộm mô học của 4 mẫu vật liệu. Kích thước vật liệu khối sụn (A); vật liệu giọt treo, scale bar 200  $\mu\text{m}$  (B) và vật liệu nuôi cấy viên (C), nuôi trong dome matrigel (D) scale bar 100  $\mu\text{m}$ . Kết quả nhuộm Safranin O (E-H) và H&E (I-L) của 4 mẫu vật liệu, scale bar 20  $\mu\text{m}$ .**

Từ hình ảnh mô học, vật liệu sinh học được tạo ra từ phương pháp giọt treo, nuôi cấy viên và nuôi trong dome matrigel, chất nền không bắt màu đỏ cam khi nhuộm Safranin O (Hình 3F-H). Điều này có thể giải thích bởi sự khác biệt trong môi trường nuôi cấy. Cụ thể, các phương pháp trên sử dụng môi trường cơ bản, không đặc biệt ưu tiên cho quá trình biệt hóa thành mô sụn. Trong khi đó, phương pháp tạo khối sụn được nuôi trong môi trường biệt hóa để kích thích quá trình biệt hóa thành tế bào sụn. Chính vì vậy, vật liệu từ phương pháp tạo khối sụn có chất nền bắt màu đỏ cam khi nhuộm Safranin O, một màu đặc trưng của các chất nền ngoại bào trong mô sụn (Hình 3E). Chứng tỏ vật liệu khối sụn được tạo thành có chứa hàm lượng GAGs tương đồng với kết quả nghiên cứu tạo vật liệu sụn từ tế bào tiền thân sụn thai nhi trước đó (Park et al., 2020). Phân tích hình ảnh nhuộm H&E, cả 4 phương pháp tạo vật liệu đều thấy sự phân bố của tế bào với nhân tế bào nhuộm màu xanh đậm của Hematoxylin và chất nền bắt màu hồng của Eosin. Cả 4 phương pháp đều thành công trong việc tạo ra một môi trường nuôi cấy hỗ trợ cho sự tổng hợp và phát triển của tế bào, mở ra triển vọng ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực công nghệ tế bào và y học tái tạo.

**Đánh giá khả năng làm lành mô sụn bằng mô học**

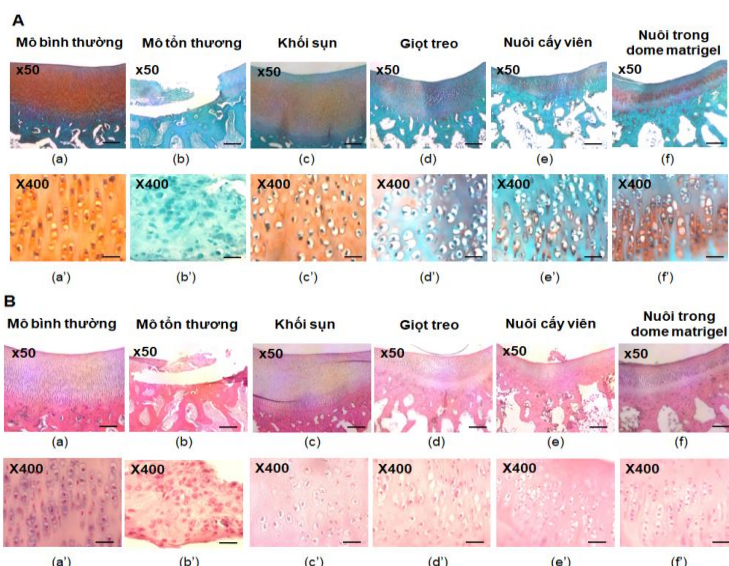
Trong thử nghiệm *ex vivo*, kết quả nhuộm Safranin O cho thấy sự hình thành ban đầu của chất nền sụn tại vị trí cấy ghép. Chất nền bắt màu đỏ đậm, không đồng nhất và thể hiện hàm lượng proteoglycan thấp (Hình 4). Do thời gian thí nghiệm ngắn, quá trình làm lành mô tại vị trí tổn thương chưa được quan sát rõ. Tuy nhiên, khi so sánh với nghiên cứu trước đây, kết quả này phù hợp với giai đoạn hình thành ban đầu tại vị trí tổn thương sau 2 tuần trên mô hình chuột nude khiếm khuyết sụn (Park et al., 2020). Phân tích kết quả nhuộm H&E, tế bào sụn trong các mẫu cấy ghép có sự khác biệt so với mô sụn bình thường. Chất nền bắt màu hồng của Eosin và nhân tế bào bắt màu xanh đậm Hematoxylin, kích thước tế bào khác nhau, phân bố rời rạc và sắp xếp không trật tự. Do đó cần thêm thời gian thử nghiệm *ex vivo* để đạt được hiệu quả tối ưu hơn.



**Hình 4. Kết quả nhuộm Safranin O và H&E của các mẫu trong thử nghiệm *ex vivo* trên mô sụn đĩa đệm (A) và mô sụn mũi (B) với độ phóng đại x50 (scale bar 200  $\mu\text{m}$ ) hoặc x400 (scale bar 20  $\mu\text{m}$ ).**

Sau 4 tuần cấy ghép vật liệu *in vivo*, kết quả nhuộm Safranin O cho thấy, sự hình thành chất nền sụn tại vị trí cấy ghép trong tất cả 4 phương pháp điều trị. Tuy nhiên, hàm lượng GAGs trong chất nền này thấp hơn so với mô sụn bình thường (Hình 5A). Khi so sánh giữa các phương pháp tạo vật liệu, phương pháp tạo khối sụn cho kết quả nhuộm Safranin O tốt nhất (Hình 5A.c). Điều này là do lượng lớn tế bào và chất nền ngoại bào đã được bổ sung vào vị trí tổn thương, từ đó thúc đẩy quá trình làm lành tổn thương hiệu quả hơn như trong nghiên cứu trước đây (Park et al., 2020). Bên cạnh đó, bề mặt các mẫu mô sụn cấy ghép đều phẳng mịn và không có dấu hiệu bong tróc. Ngược lại, ở mẫu mô tổn thương không cấy ghép vật liệu, lượng chất nền sụn hình thành khá ít do màu nhuộm Safranin O nhạt màu hơn so với mô bình thường và mô cấy ghép vật liệu (Hình 5A.b). Ngoài ra, mô mới được tạo thành không bám dính vào mô chủ (Hình 5B.b), vì mô sụn có khả năng tự tái tạo hạn chế.

Kết quả nhuộm H&E cho thấy, các mẫu cấy ghép đều có sự hình thành các tế bào sụn mới. Tuy nhiên, khi so sánh với mô sụn bình thường, các tế bào sụn này có một số đặc điểm khác biệt (Hình 5B). Cụ thể, ở hầu hết các mẫu, tế bào sụn tồn tại dưới dạng tế bào đơn, phân bố không đều và sắp xếp lộn xộn (hình 5B.c'-e'). Ngược lại, đối với phương pháp nuôi trong dome matrigel, các tế bào sụn có xu hướng xếp chồng lên nhau tạo thành cấu trúc hình cột, tương tự như mô bình thường nhưng với mật độ tế bào thấp hơn (Hình 5B.f'). Đặc biệt, cả 4 phương pháp điều trị đều hình thành mô mới có cấu trúc tương tự mô bình thường và cải thiện đáng kể quá trình phục hồi tổn thương so với mô tổn thương không cấy ghép vật liệu. Những kết quả thu được từ nghiên cứu này không chỉ củng cố thêm các bằng chứng khoa học về khả năng tái tạo mô sụn mà còn mở ra hướng đi mới, hiệu quả hơn so với các phương pháp trước đây (Chen et al., 2020; Cheung et al., 2008; Li et al., 2024, Park et al., 2020).



**Hình 5. Kết quả nhuộm mô học của các mẫu thử nghiệm *in vivo* trên mô sụn. Hình ảnh tiêu bản nhuộm với Safranin O (A) và H&E (B). Mẫu mô bình thường, mô tổn thương ở độ phóng đại x50 scale bar 200  $\mu$ m (a,b) và ở độ phóng đại x400 scale bar 20  $\mu$ m (a',b'); mô đã cấy ghép vật liệu bằng 4 phương pháp ở độ phóng đại x50 scale bar 200  $\mu$ m (c-f) và ở độ phóng đại x400 scale bar 20  $\mu$ m (c'-f').**

## KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu này là cơ sở cho việc ứng dụng kỹ thuật mô từ nguồn tế bào gốc mô sụn khớp thỏ một ngày tuổi trong lĩnh vực làm lành mô sụn tổn thương. Mặc dù thời gian thử nghiệm còn hạn chế, các phương pháp chế tạo vật liệu sinh học 3D đều đạt hiệu quả khả quan, mở ra hướng nghiên cứu và ứng dụng thực tế đầy hứa hẹn.

**Lời cảm ơn:** Công trình được thực hiện nhờ kinh phí đề tài do Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh cấp (03/2023/HĐ-QKHCN): “Nghiên cứu chế tạo màng sinh học từ tế bào gốc cơ thể heo chưa trưởng thành sử dụng trong điều trị tổn thương sụn khớp gối”.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alves da Silva, M., Martins, A., Costa - Pinto, A. R., Monteiro, N., Faria, S., Reis, R. L., & Neves, N. M. (2017). Electrospun nanofibrous meshes cultured with Wharton's jelly stem cell: an alternative for cartilage regeneration, without the need of growth factors. *Biotechnology Journal*, 12(12), 1700073.
- Baghaei, K., Hashemi, S. M., Tokhanbigli, S., Rad, A. A., Assadzadeh-Aghdaei, H., Sharifian, A., & Zali, M. R. (2017). Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 10(3), 208.
- Chen, Y., Ma, M., Teng, Y., Cao, H., Yang, Y., Wang, Y., ... & Zhang, X. (2020). Efficient manufacturing of tissue engineered cartilage in vitro by a multiplexed 3D cultured method. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(10), 2082-2095.

- Cheung, W. H., Chow, K. H., Lee, K. M., & Leung, K. S. (2008). Chondrocyte-Pellet Culture for Cartilage Repair Research. *A Practical Manual For Musculoskeletal Research*, 165.
- Kim, M., Kim, J., Park, S. R., Park, D. Y., Kim, Y. J., Choi, B. H., & Min, B. H. (2016). Comparison of fetal cartilage-derived progenitor cells isolated at different developmental stages in a rat model. *Development, Growth & Differentiation*, 58(2), 167-179.
- Lee, S. H., & Shin, H. (2007). Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, 59(4-5), 339-359.
- Lee, S. J., Oh, H. J., Truong, M. D., Lee, K. B., Kim, J., Kim, Y. J., ... & Min, B. H. (2015). Therapeutic possibility of human fetal cartilage-derived progenitor cells in rat arthritis model. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12, 147-154.
- Li, S., Qian, T., Wang, X., Liu, J., & Gu, X. (2017). Noncoding RNAs and their potential therapeutic applications in tissue engineering. *Engineering*, 3(1), 3-15.
- Li, X., Sheng, S., Li, G., Hu, Y., Zhou, F., Geng, Z., & Su, J. (2024). Research Progress in Hydrogels for Cartilage Organoids. *Advanced Healthcare Materials*, 2400431.
- Ouzin, M., & Kogler, G. (2023). Mesenchymal stromal cells: heterogeneity and therapeutical applications. *Cells*, 12(16), 2039.
- Park, D. Y., Min, B. H., Park, S. R., Oh, H. J., Truong, M. D., Kim, M., ... & Choi, B. H. (2020). Engineered cartilage utilizing fetal cartilage-derived progenitor cells for cartilage repair. *Scientific Reports*, 10(1), 5722.
- Whitney, K. E., Liebowitz, A., Bolia, I. K., Chahla, J., Ravuri, S., Evans, T. A., ... & Huard, J. (2017). Current perspectives on biological approaches for osteoarthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1410(1), 26-43.

## EVALUATION OF *EX VIVO* AND *IN VIVO* CARTILAGE REPAIR EFFICACY OF 3D BIOMATERIALS IN ADULT RABBIT MODELS

Minh-Dung Truong<sup>1\*</sup>, Vo Ngoc Bich Tram<sup>1</sup>, Nguyen Hoang Vinh<sup>1</sup>,  
Duong Thi Hoang Yen<sup>1</sup>, Mai Hoang Duc Quy<sup>1</sup>, Cao Ngoc Minh Trang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>2</sup>Van Lang University, Ho Chi Minh City, Vietnam

### SUMMARY

Stem cell therapy, particularly utilizing mesenchymal stem cells (MSCs) or autologous stem cells, holds immense promise in regenerative medicine, including cartilage regeneration. However, this therapeutic approach has limitations, including low cell yield and limited cartilage regeneration capacity. Therefore, the development of strategies to optimize the efficacy of this therapy is of paramount importance. This study aimed to investigate the fabrication of 3D biomaterials from one-day-old rabbit articular chondrocyte progenitor cells for cartilage regenerative medicine applications. In this study, we isolated cells from the articular cartilage of one-day-old rabbits, expanded them in culture, and evaluated their biological characteristics. 3D biomaterials were fabricated using four methods: cartilage construct formation, hanging drop, pellet culture, and matrigel dome culture. *Ex vivo* and *in vivo* experiments were performed in a cartilage defect rabbit model, and the repair capacity was assessed using histological staining. The isolated cell population exhibited fibroblast-like morphology, adhered to the culture dish surface, and possessed the *in vitro* differentiation potential towards three cell lineages: osteoblasts, chondroblasts and adipocytes. Histological analysis revealed new tissue formation at the cartilage defect site in the damage model for all methods of fabricating 3D biomaterials. In conclusion, one-day-old rabbit articular chondrocyte progenitor cells is potentially useful for biomedical application in repairing damaged cartilage tissue. Despite the short experimental duration, the various 3D biomaterial fabrication methods demonstrated satisfactory outcomes, paving the way for future research and practical applications.

**Keywords:** Cartilage construct formation, hanging drop, matrigel dome culture, one-day-old rabbit articular chondrocyte progenitor cells, pellet culture, 3D biomaterials.

\* Author for correspondence: Tel: 0916680124; Email: truongminhdung@gmail.com