

Tế bào gốc trung mô mô dây rốn người an toàn khi được ghép trên chuột C57BL/6

Safety of human umbilical cord mesenchymal stem cells in C57BL/6 mice

Phạm Nguyễn Thanh Thủy¹, Lê Văn Đông⁴, Mai Văn Điền⁵, Ngô Thị Tuyết Hạnh⁶,
Luu Thị Thu Thảo⁶, Trương Thị Thu Huyền¹, Phạm Lê Bửu Trúc^{1,2,3*}

¹Ngân hàng Tế bào gốc MekoStem, Công ty CP Hóa - Dược phẩm MekoPhar,
Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁴Viện Y học dự phòng Quân đội, Hà Nội, Việt Nam

⁵Bệnh viện Đa khoa An Sinh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁶Đại học Y Dược, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: butruc@gmail.com

THÔNG TIN

TÓM TẮT

DOI:10.46223/HCMCOUJS.
tech.vi.19.1.3112.2024

Ngày nhận: 04/12/2023

Ngày nhận lại: 25/12/2023

Duyệt đăng: 05/01/2024

Từ khóa:

chuột; mô dây rốn; tế bào gốc;
tế bào gốc trung mô; tính an
toàn

Keywords:

mice; umbilical cord; stem
cells; mesenchymal stem cells;
safety

Tế bào gốc trung mô từ mô dây rốn người (human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells, hUC-MSCs) thường nằm ở lớp nội mô dưới vỏ dây rốn, vùng quanh mạch máu, Wharton's Jelly, là nguồn tế bào gốc đa tiềm năng. Đặc tính nổi bật của hUC-MSCs là khả năng điều biến miễn dịch và tính sinh miễn dịch thấp do thiếu sự hoạt động của HLA-DR và biểu hiện thấp MHC lớp I. Chúng tôi đã thực hiện phân lập, tăng sinh các tế bào gốc này trong môi trường không FBS, không kháng sinh và đánh giá tính an toàn của liệu pháp bằng cách ghép tế bào gốc trung mô này trên chuột C57BL/6. Các con chuột (n = 9) được truyền hUC-MSCs (3×10^5 tế bào/con) theo đường tĩnh mạch đuôi. Sau khi truyền thành công, các con chuột được theo dõi sức khỏe theo các mốc thời gian cố định. Sau 21 ngày tiêm, các bộ phận của chuột như não, tim, gan, lá lách, phổi, thận, mô nơi tiêm được thu nhận để đánh giá việc sinh u và xơ hóa mô; các mẫu máu và nước tiểu được thu nhận để đánh giá các chỉ tiêu sinh hóa và thành phần tế bào máu. Việc ghép hUC-MSCs theo đường truyền tĩnh mạch đuôi bước đầu cho thấy tính an toàn cao trên chuột, làm tiền đề cho việc ứng dụng liệu pháp trị liệu tế bào trên lâm sàng.

ABSTRACT

hUC-MSCs are multipotent stem cells found in the endothelial layer beneath the umbilical cord sheath, the perivascular area, and Wharton's jelly. hUC-MSCs are notable for their ability to modulate immunity, low immunogenicity due to the lack of HLA-DR activity, and low MHC class I expression. We isolated and cultured these stem cells in an antibiotic- and FBS-free medium before transplanting them into C57BL/6 mice to assess the safety of therapy. hUC-MSCs (3×10^5 cells/mouse)

were infused into nine mice via the tail vein. Following a successful infusion, the mice's health was evaluated at predetermined intervals. Mouse organs such as the brain, heart, liver, spleen, lungs, kidneys, and tissues at the injection site were obtained 21 days after the infusion to analyze carcinogenesis and tissue fibrosis; blood and urine samples were collected to examine biochemical markers and blood cell composition. Transplantation of hUC-MSCs by tail vein infusion first showed good safety in mice, paving the path for therapeutic cell therapy applications.

1. Giới thiệu

Liệu pháp tế bào dựa trên Tế bào gốc trung mô (Mesenchymal Stem Cells - MSCs) chiếm phân khúc lớn nhất trong lĩnh vực y học tái tạo hiện nay nhờ vào một số lợi thế của chúng. Các tế bào gốc này có thể được thu nhận tương đối dễ từ nhiều nguồn khác nhau như mô dây rốn, mô mỡ, mô nướu, tủy xương và tủy rang, ... Đồng thời, việc thu nhận này tránh được các vấn đề liên quan đến đạo đức như sử dụng mô thai nhi hoặc phôi thai và chúng có thể được tăng sinh dễ dàng với số lượng lớn đủ để điều trị cho hàng trăm bệnh nhân. Thêm vào đó, MSCs có khả năng di cư đến các mô bị hư hỏng và tiết ra các yếu tố cận tiết góp phần sửa chữa và tái tạo mô. MSCs cho thấy khả năng điều hòa miễn dịch mạnh mẽ và có thể vừa ngăn chặn, vừa tăng cường phản ứng miễn dịch theo nhu cầu của liệu pháp điều trị ung thư (Barkholt & ctg., 2013). Vì vậy, MSCs đã được coi là một nguồn nguyên liệu điều trị đầy hứa hẹn, sử dụng cấy ghép trong các bệnh khác nhau, đặc biệt là các bệnh tự miễn và viêm nhiễm.

MSCs được dùng điều trị nhiều bệnh mãn tính, chẳng hạn như đột quỵ, nhồi máu cơ tim, tăng áp động mạch phổi, tổn thương tủy sống và bệnh đái tháo đường trong nghiên cứu của Almeida, Skelton, Adigopula, và Ardehali (2015), Gu và cộng sự (2015), Liao và cộng sự (2020). Việc truyền MSC giúp điều chỉnh tình trạng tăng đường huyết và giảm insulin trong máu ở mô hình động vật gặm nhấm bị đái tháo đường (Gu & ctg., 2015). Ngoài ra, liệu pháp MSC cũng đã được sử dụng trên các mặt bệnh ở trẻ sơ sinh, chẳng hạn như viêm ruột, hoại tử, xuất huyết não thất và loạn sản phế quản phổi (Surwit, Kuhn, Cochrane, McCubbin, & Feinglos, 1988). Các thử nghiệm lâm sàng sử dụng cấy ghép tế bào MSC dị sinh cho thấy sự phục hồi đồng đều các chức năng tim và phổi với nguy cơ rối loạn nhịp tim thấp (Almeida & ctg., 2015).

Tế bào gốc trung mô mô dây rốn người (human Umbilical Cord - Mesenchymal Stem Cell, hUC-MSC) thường nằm ở lớp nội mô dưới vỏ dây rốn, vùng quanh mạch máu, Wharton Jelly [10]. Phân tích dấu ấn miễn dịch bằng kỹ thuật tế bào dòng chảy cho thấy hUC-MSC dương tính với HLA-ABC; các thụ thể bám dính như CD29, CD44; các thụ thể đặc trưng của MSC như CD73, CD90 và CD105.

hUC-MSC là tế bào đa tiềm năng, ngoài biệt hóa thành ba dòng tế bào chính là tế bào xương, tế bào sụn và tế bào mỡ; hUC-MSC có khả năng biệt hóa thành tế bào cơ tim, tế bào thần kinh và tế bào gan. Đặc tính nổi bật của hUC-MSC chính là khả năng điều biến miễn dịch. Tuy rằng cơ chế vẫn chưa hoàn toàn rõ ràng, khả năng điều biến miễn dịch của hUC-MSC được cho rằng thông qua tương tác trực tiếp giữa tế bào với tế bào hoặc thông qua cận tiết. Khả năng điều biến miễn dịch của hUC-MSC thể hiện mạnh trong việc ảnh hưởng đến hoạt động của các tế bào lympho T thông qua hoạt động của IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β và TNF- α . Ngoài ra, hUC-MSC được đánh giá là có khả năng sinh đáp ứng miễn dịch thấp do thiếu sự hoạt động của HLA-DR và biểu hiện thấp của MHC lớp I.

Bất chấp sự gia tăng các ứng dụng MSC, tính an toàn của liệu pháp tế bào vẫn còn gây tranh cãi do sự phân tích an toàn không thường xuyên và thiếu các thử nghiệm toàn diện để đánh giá (Lukomska & ctg., 2019).

Nghiên cứu này nhằm xác định tính an toàn của việc ghép tế bào gốc hUC-MSc theo đường truyền tĩnh mạch đuôi ở chuột. hUC-MSc được truyền bằng hệ thống có kiểm soát đã cho thấy tính an toàn của tế bào được truyền thông qua các kết quả thu nhận được như liệu pháp truyền hUC-MSc vào chuột đã không có tác động xấu nào đến thể chất, sinh hóa, huyết học và mô bệnh học của mô hình động vật được sử dụng; thêm vào đó còn có dấu hiệu tác động tích cực lên nhóm được truyền so với nhóm đối chứng không truyền tế bào. Thông qua nghiên cứu, chúng tôi muốn cung cấp thêm các số liệu làm tiền đề cho việc ứng dụng liệu pháp trị liệu tế bào trên lâm sàng.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Động vật nghiên cứu

Chuột C57BL/6 là dòng chuột nội phối phổ biến, thường được dùng để làm mô hình động vật trong các nghiên cứu. Chuột 08 - 12 tuần tuổi có trọng lượng từ 25 - 30g, không phân biệt giới tính, được nuôi ở các điều kiện chuẩn như nhiệt độ 20 - 24°C, độ ẩm 50 - 55%, theo chu kỳ 12 giờ sáng tối luân phiên. Chuột được cung cấp bởi Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, thuộc giống chuột C57BL/6NTac, công ty Taconic. Chuột C57BL/6 được nuôi ổn định trong 02 tuần trước khi tiến hành thử nghiệm tiêm tế bào trong điều kiện nuôi chuẩn.

2.2. Nguồn tế bào

Tế bào hUC-MSc từ ba nguồn mẫu hiến trong vòng 72 giờ theo quy trình của Ngân hàng tế bào gốc MekoStem từ Ngân hàng Tế bào gốc MekoStem được phân lập và nuôi cấy trong môi trường không chứa FBS, không chứa kháng sinh. Các tế bào hUC-MSc được nuôi trong tủ ấm 37°C cung cấp 5% CO₂. Các mẫu tế bào hUC-MSc ở passage 3 - passage 5 được kiểm tra sự biểu hiện marker tế bào gốc Theo Hiệp hội Trị liệu Tế bào Quốc tế (the International Society for Cellular Therapy - ISCT), cụ thể dương tính đối với các marker CD90, CD105 và CD73 ($\geq 95\%$); và âm tính với các marker CD45, CD34, CD11b, CD19 và HLA-DR ($\leq 5\%$) bằng hệ thống Flow cytometry. Ba mẫu tế bào cũng được kiểm tra âm tính với mycoplasma bằng xét nghiệm MycoAlert™ PLUS được thực hiện tại Ngân hàng tế bào gốc Mekostem, đồng thời xét nghiệm endotoxin được gửi qua công ty TNHH Thiết bị khoa học Lan Oanh trước khi truyền vào chuột. Đối với liều lượng tế bào sử dụng cho việc tiêm tế bào, liều lượng WJ-MSc được ước tính bằng cách sử dụng liều lượng tương đương với người. Công thức sau đây được thông qua từ nghiên cứu của Nair và Jacob (2016):

$$HED (mg/kg) = \frac{NOAEL \text{ động vật } (mg/kg) \times (\text{trọng lượng của động vật thử nghiệm } [kg])}{\text{trọng lượng người } [kg]} \quad (1)$$

HED được chọn từ một thử nghiệm lâm sàng với tổng số tế bào là 1×10^8 và liều tiêm (10×10^6 tế bào/kg thể trọng ở loài gặm nhấm) trong các nghiên cứu tiền lâm sàng có hiệu quả như một phương pháp điều trị. Đối với chuột C57BL/6 từ 08 - 12 tuần tuổi có trọng lượng từ 25 - 30g, không phân biệt giới tính thì liều cao 3×10^5 tế bào/con được sử dụng trong một lần tiêm duy nhất theo đường tĩnh mạch đuôi của chuột được chọn để tiêm cho chuột ở nhóm MSC (Chan & ctg., 2022).

2.3. Phân nhóm chuột nghiên cứu

Những con chuột được tiến hành phân loại ngẫu nhiên thành ba nhóm (n = 9): nhóm chuột đối chứng không tiến hành tiêm giả dược hay tế bào; nhóm PBS được tiêm 200 μ l/con

dung dịch đệm sinh lý PBS (Phosphate-buffered saline) và nhóm MSC được tiêm 3×10^5 tế bào/con, tế bào được pha trong 200 μ l PBS 1X bằng hệ thống tiêm tự động Pump 11 elite, hãng Harvard Apparatus ở tốc độ 0.1 ml/min theo đường tĩnh mạch đuôi.

2.4. Đánh giá cận lâm sàng chuột nghiên cứu

Theo dõi sức khỏe chuột theo các mốc thời gian: (1) ngay sau khi tiêm tế bào, (2) 30 phút sau khi tiêm, và (3) hàng ngày sau khi tiêm cho đến khi kết thúc thí nghiệm thông qua các chức năng sinh lý cơ thể như: sự khó thở, xanh tím, liệt tứ chi, chứng mất lồi cũng như tỷ lệ chuột tử vong. Sau đó, các con chuột tiếp tục quan sát, ghi nhận các biểu hiện, hành vi, số lượng tử vong, cân nặng từ sau thời điểm thử nghiệm tiêm tế bào đến khi kết thúc thử nghiệm. Đồng thời, các mẫu máu được thu nhận từ động mạch và tĩnh mạch bên tai, cũng như nước tiểu được thu nhận trong vòng 24 giờ bằng dụng cụ đặc biệt và được gửi qua bệnh viện An Sinh bảo quản ở nhiệt độ 4°C để tiến hành đánh giá trong vòng 02 giờ. Mẫu máu được chia làm hai phần nhằm hai mục đích: xử lý để đánh giá các chỉ tiêu sinh hóa bằng máy phân tích sinh hóa tự động Cobas 6000, hãng Roche như xét nghiệm BUN, nồng độ creatine trong máu, tổng cholesterol (TC), tổng protein (TP), Albumin, tổng bilirubin (TB), Alkaline phosphate (ALP), aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), gamma-glutamyltransferase (γ GT), triglyceric (TG), glucose, K, Na, Ca, P, pH; và thành phần tế bào máu như: số lượng tế bào bạch cầu (WBC), số lượng tế bào hồng cầu (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), số lượng tiểu cầu (PLT), thể tích trung bình hồng cầu (MCV), lượng huyết sắc tố trung bình hồng cầu (MCH), nồng độ huyết sắc tố trung bình hồng cầu (MCHC) được đo bằng máy tự động Sysmex XN-550. Đối với mẫu nước tiểu, các chỉ tiêu được đánh giá bao gồm các chỉ số leukocyte, nitrite, protein, chỉ số KET, urobilinogen bằng hệ thống máy tự động Cobas U601, hãng Roche.

2.5. Đánh giá lâm sàng chuột nghiên cứu

Ngày 21 sau thời điểm tiêm tế bào, hy sinh chuột, tiến hành thu nhận các bộ phận như não, tim, gan, lá lách, phổi, thận, mô nơi tiêm để đánh giá việc sinh khối u và xơ hóa mô bằng phương pháp nhuộm Hematoxylin và nhuộm Eosin - HE. Số lượng chuột hy sinh tùy mỗi nhóm cụ thể, nhóm chuột đối chứng (n = 6), nhóm PBS (n = 6), và nhóm MSC (n = 9).

2.6. Phân tích số liệu

Các dữ liệu thu thập sẽ được xử lý bằng phần mềm Excel và xử lý thống kê bằng phần mềm GraphPad Prism phiên bản 9.4.1. Các chỉ số thống kê mô tả (tỷ lệ chuột tử vong, các chức năng sinh lý cơ thể, ...) được đo lường bằng tỷ lệ phần trăm. Phép kiểm One-Way ANOVA ở mức ý nghĩa $P < 0.05$ được sử dụng để xác định mối liên quan giữa các nhóm chuột thử nghiệm khác nhau về các chỉ số sinh hóa máu và nước tiểu.

3. Kết quả

3.1. Kết quả đánh giá ngay sau khi truyền tế bào vào chuột

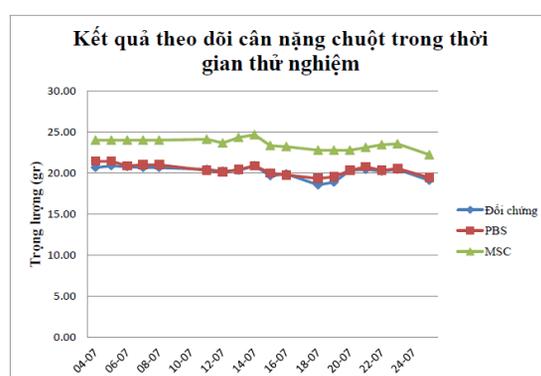
Sau khi được truyền tế bào hay giả dược, chuột được theo dõi và kiểm tra các dấu hiệu sinh lý ngay khi vừa tỉnh lại và 30 phút sau truyền trên tất cả các chỉ tiêu. Các chỉ tiêu sinh lý được theo dõi không có gì bất thường. Chuột hoàn toàn khỏe mạnh và hoạt động bình thường, cũng như không có gì khác biệt khi tiến hành so sánh 02 nhóm được truyền với nhóm chuột đối chứng không được truyền. Đồng thời, không có bất kỳ chuột nào của nhóm truyền tế bào và nhóm truyền PBS có bất kỳ bất thường nào về các chỉ tiêu theo dõi cũng như không có hiện tượng sụt cân bất thường nào xảy ra, tương tự với kết quả trên nhóm chuột đối chứng. Kết quả được thể hiện ở **Bảng 1** và **Hình 1**.

Bảng 1

Kết quả theo dõi các chỉ tiêu sinh lý chuột hàng ngày trong suốt thời gian thử nghiệm

Các chỉ tiêu đánh giá	Tình trạng trước tiêm	Sau khi tỉnh	30	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21
Sự khó thở	BT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xanh tím	BT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Liệt tứ chi	BT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chứng mất lồi	BT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tỷ lệ tử vong (%)	BT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

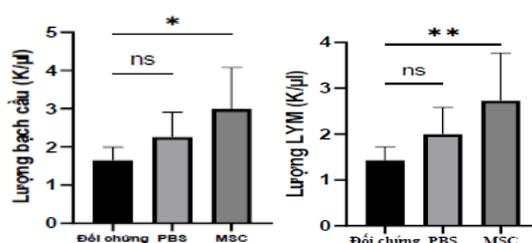
(-) Không có dấu hiệu bất thường



Hình 1. Kết quả theo dõi cân nặng chuột hàng ngày trong thời gian thử nghiệm

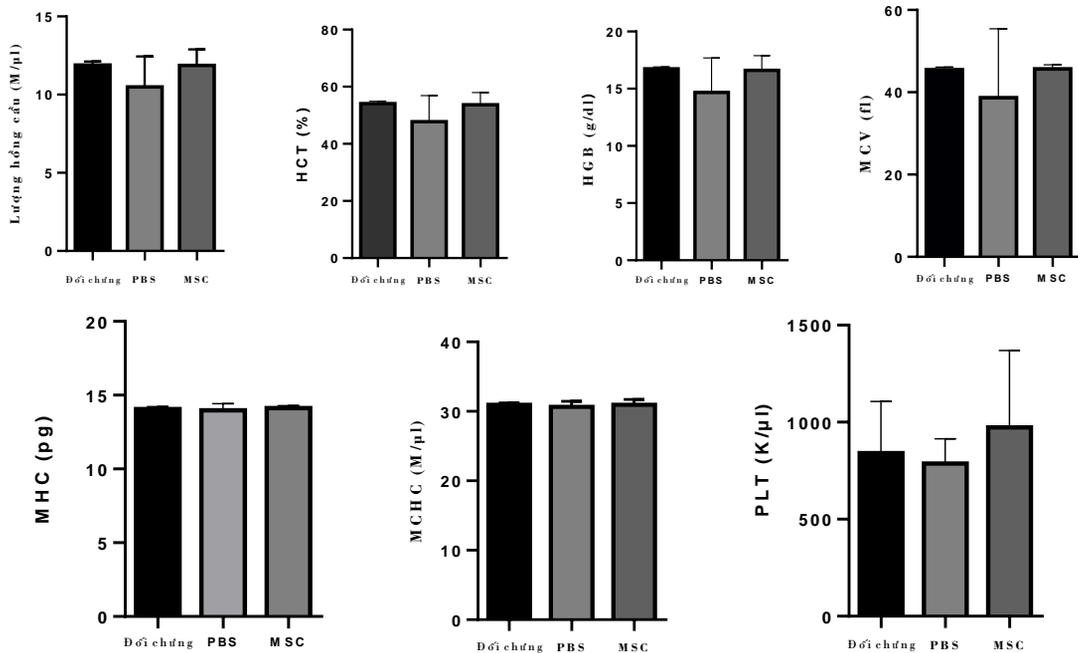
3.2. Kết quả huyết đồ

Lượng bạch cầu (WBC) nhóm truyền hUC-MSc cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$) so với nhóm đối chứng trong khi giữa nhóm truyền giả dược PBS với nhóm đối chứng không có sự khác biệt này. Việc này có thể do sự bất thường của thành phần bạch cầu của sinh lý chuột nhóm được truyền vì các ghi chép quan sát không thấy có bất kỳ hiện tượng chán ăn hay sụt cân từ chuột trong suốt giai đoạn theo dõi 21 ngày thử nghiệm. Đối với sự khác biệt này, nhóm nghiên cứu đã kiểm tra và phân tích thống kê các chỉ số khác như lượng Neu, Lym, Mono, Baso, Eos. Trong các giá trị trên, lượng Lym cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$) giữa nhóm tiêm MSC so với nhóm đối chứng tương ứng, theo như **Hình 2**. Trong khi các chỉ số còn lại, đặc biệt là chỉ số Neu không có khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm tiêm MSC so với nhóm đối chứng tương ứng. Điều này có thể là do các con chuột sau khi tiêm có phản ứng viêm làm kết quả Lym của nhóm MSC tăng lên. Tuy nhiên chỉ số Neu không tăng lên có thể được giải thích do thời gian tồn tại của Neu trong máu (0.75 ngày tương đương 12.5 giờ) ngắn hơn thời gian tồn tại của Lym (hơn 06 tuần) (Gu & ctg., 2015; Liau & ctg., 2020).



Hình 2. Kết quả lượng bạch cầu (bên trái) và lượng Lym (bên phải) (K/μl) giữa 03 nhóm chuột. Giá trị là trung bình \pm SD

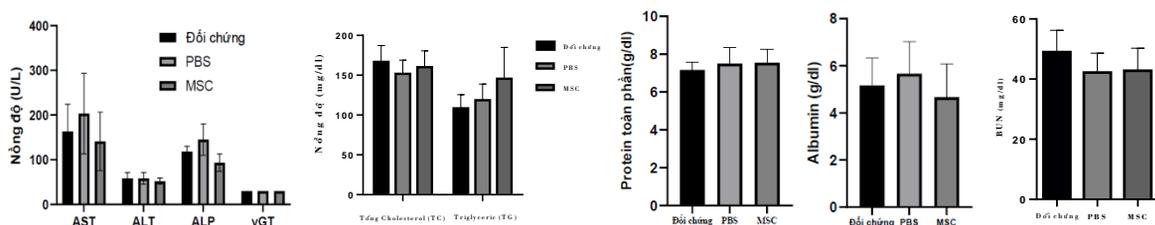
Kết quả các chỉ số huyết đồ còn lại ở **Hình 3**, kết quả lượng hồng cầu (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), thể tích trung bình hồng cầu (MCV), lượng huyết sắc tố trung bình hồng cầu (MCH), nồng độ huyết sắc tố trung bình hồng cầu (MCHC), lượng tiểu cầu (PLT), cho thấy không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$) giữa nhóm chuột được truyền PBS với nhóm đối chứng, cũng như giữa nhóm truyền hUC-MSc so với nhóm đối chứng trên tất cả các chỉ số huyết đồ hồng cầu trong máu. Điều đó cho thấy không có bất thường nào về sự thiếu máu hoặc bất thường hồng cầu giữa các nhóm chuột.



Hình 3. Kết quả lượng hồng cầu (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), thể tích trung bình hồng cầu (MCV), lượng huyết sắc tố trung bình hồng cầu (MCH), nồng độ huyết sắc tố trung bình hồng cầu (MCHC), lượng tiểu cầu (PLT) (K/μl). Giá trị là trung bình ± SD

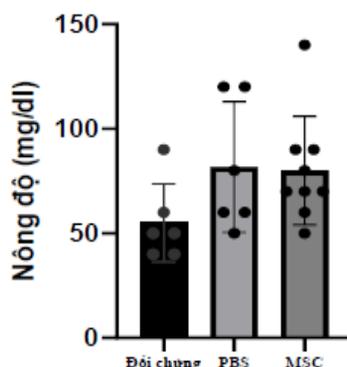
3.3. Kết quả công thức máu

Kết quả **Hình 4** thể hiện chỉ số chức năng gan (ALP, AST, ALT, γGT) và thận (BUN, creatine) giữa 02 nhóm chuột truyền giả dược và nhóm truyền tế bào hUC-MSc ở mức bình thường và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$), khi so sánh với nhóm chuột đối chứng. Cho thấy không có sự bất thường nào về chức năng gan và thận sau khi truyền hUC-MSc trên nhóm chuột được truyền tế bào. Kết quả tương tự việc chuyển hóa lipid như triglyceric, tổng cholesterol, protein toàn phần và albumin thay đổi không có ý nghĩa thống kê giữa 02 nhóm chuột được truyền với PBS và truyền hUC-MSc so với nhóm đối chứng.



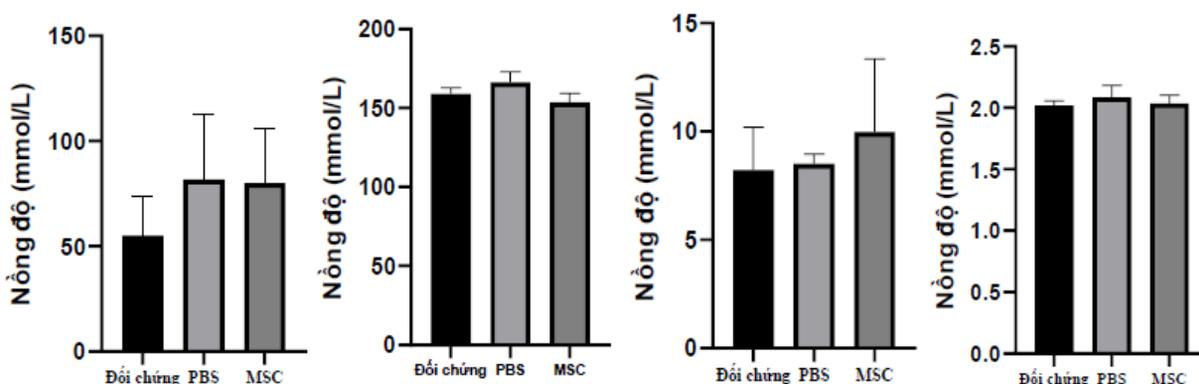
Hình 4. Kết quả lần lượt từ trên xuống dưới và từ trái sang phải: aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), Alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyl transferase (γGT), tổng cholesterol (TC), triglyceric (TG), protein toàn phần, albumin trong máu, BUN giữa 03 nhóm chuột thí nghiệm. Giá trị là trung bình ± SD

Kết quả ở **Hình 5** cho thấy tất cả các con chuột trong cả 03 nhóm đều có mức đường huyết bình thường của chuột (dưới 200 mg/dL) [5,12]. Điều đó cho thấy không có bất kỳ sự bất thường nào về việc chuyển hóa đường ở các con chuột trong nhóm chuột được tiêm tế bào.



Hình 5. Kết quả nồng độ glucose (mg/dL) giữa 03 nhóm chuột thí nghiệm. Giá trị là trung bình \pm SD

Đối với nồng độ các chất điện giải như Phospho (P), Natri (Na), Kali (K) và Canxi (Ca) thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$) giữa nhóm chuột được truyền PBS với nhóm đối chứng, cũng như giữa nhóm truyền hUC-MSC so với nhóm đối chứng. Điều đó cho thấy, so với nhóm đối chứng bình thường thì hai nhóm thử nghiệm không có sự bất thường nào trong quá trình chuyển hóa trong cơ thể cũng như không có sự mất cân bằng điện giải.

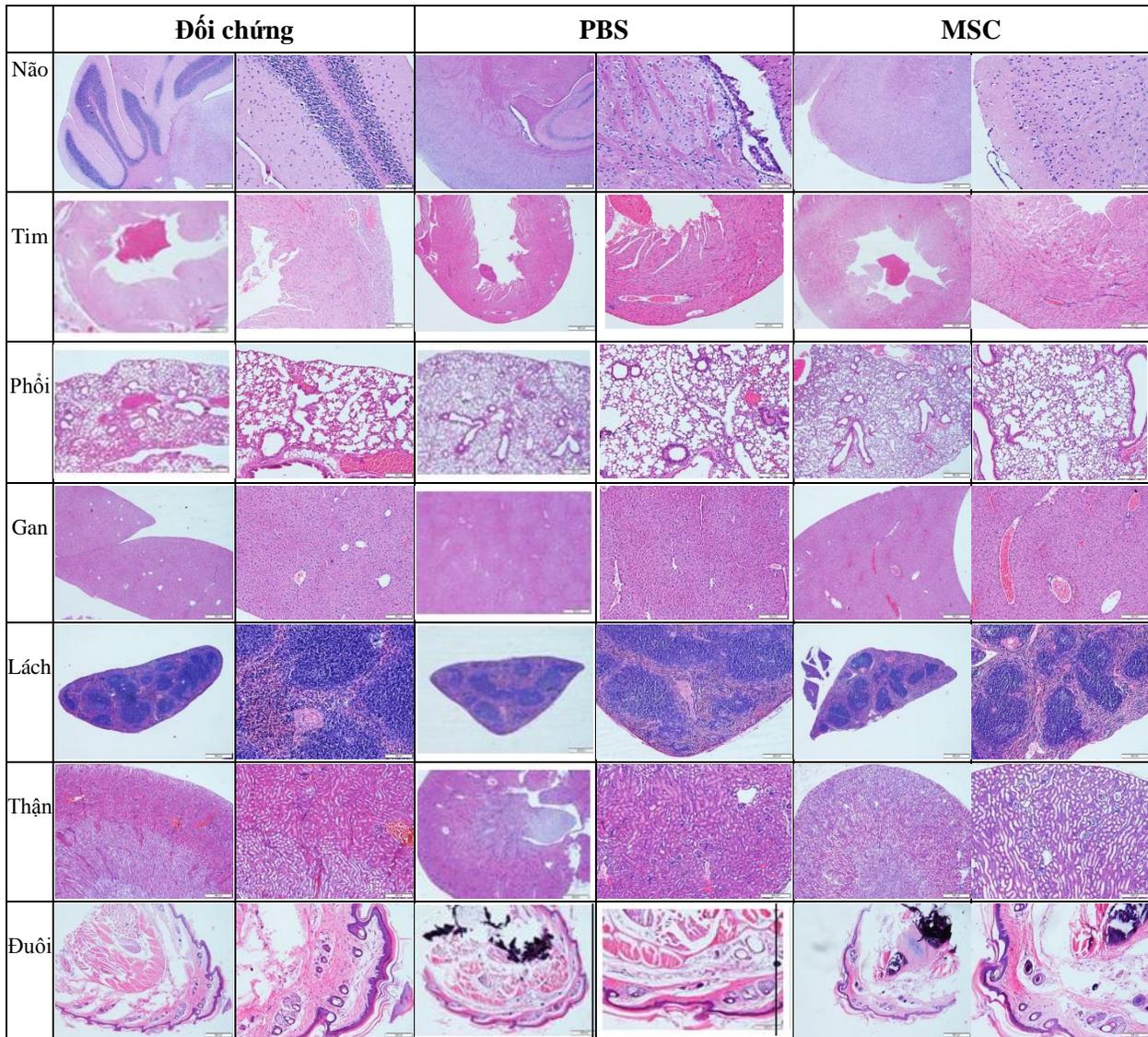


Hình 6. Kết quả lần lượt từ trái sang phải: chỉ số Phospho (P), Natri (Na), Kali (K) và Canxi (Ca). Giá trị là trung bình \pm SD

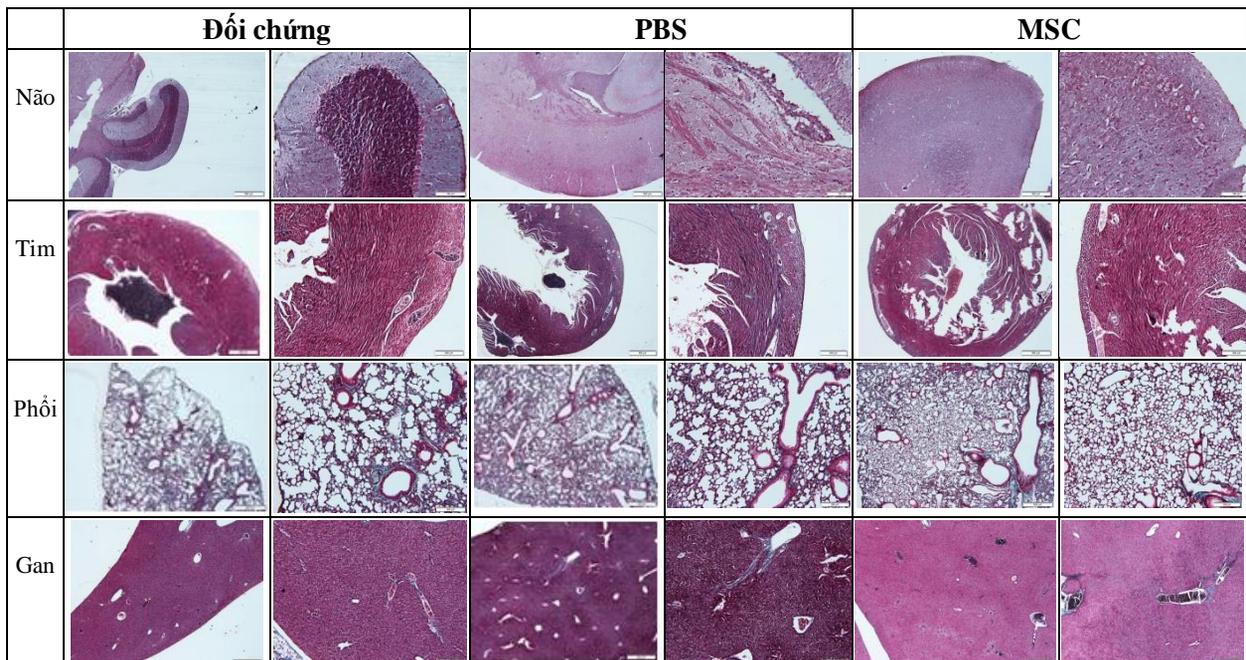
Đối với chỉ số leukocyte, nitrite, protein, chỉ số KET, urobilinogen của nước tiểu chuột được đánh giá (kết quả không được thể hiện trong bài báo), các kết quả phân tích đã bị nhiễu do những lí do khách quan như có vết thương trong quá trình nuôi hoặc mẫu thu nhận có lẫn phân.

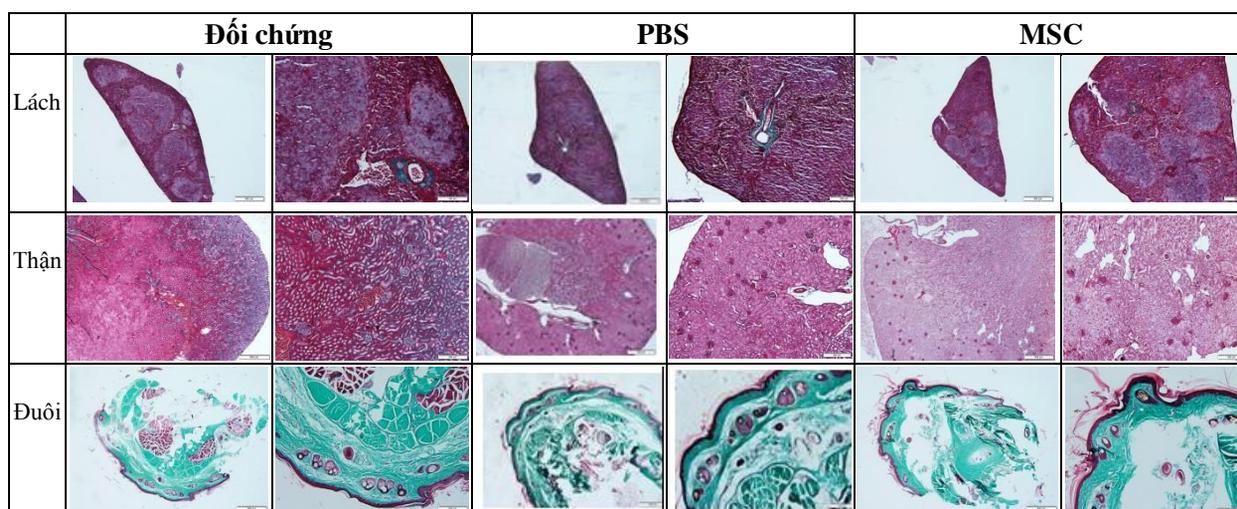
3.4. Kết quả mô học

Kết quả **Hình 7** và **Hình 8** cho thấy không có việc sinh u và xơ hóa mô ở hai nhóm chuột truyền PBS và truyền MSC. Các tế bào được nhuộm đều không có bất thường ở nhóm chuột truyền MSC cho thấy việc truyền tế bào hUC-MSC là an toàn, không tạo khối u. Kết quả phân tích mô học ở hầu hết các con chuột trong cả 03 nhóm trừ hai mẫu chuột C4 và C6 trong nhóm chuột đối chứng đều là “không tìm thấy mô u và không xơ hóa trên tất cả các mẫu thử”. Trong kết quả mô học, có hai chuột thuộc nhóm đối chứng có hiện tượng xơ hóa, cụ thể là chuột C4 bị xơ hóa ở phổi và chuột C6 ở lách có thể do chuột đã xơ hóa trước đó.



Hình 7. Hình nhuộm HE thu nhận từ 07 bộ phận của chuột đại diện ở 03 nhóm chuột thí nghiệm





Hình 8. Hình nhuộm Trichrome thu nhận từ 07 bộ phận của chuột đại diện ở 03 nhóm chuột thí nghiệm

4. Thảo luận

Với các kết quả về tình trạng sinh lý được quan sát, cũng như kết quả phân tích thành phần máu cho thấy không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm giả được truyền PBS và nhóm được truyền tế bào hUC-MSC so với nhóm chuột đối chứng. Điều này cho thấy, tình trạng sinh lý chuột giữa hai nhóm thử nghiệm không có sự bất thường. Đối với kết quả phân tích lượng bạch cầu có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa nhóm truyền MSC và nhóm đối chứng tương ứng. Điều này có thể do chính tình trạng sinh lý chuột hoặc một vài lý do nào khác của việc truyền tế bào, cần được thảo luận thêm. Các kết quả sinh lý, sinh hóa huyết thanh và huyết đồ hoàn chỉnh cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm, tương tự như kết quả nghiên cứu của Chan và cộng sự (2022) trên chuột Sprague Dawley.

Đối với kết quả phân tích nước tiểu chuột, nhóm thí nghiệm thấy rằng kết quả thu nhận được rất khó phân tích do cần phải tối ưu hóa hơn trong quá trình lấy mẫu nước tiểu. Do đó, tình trạng cơ thể chuột thông qua việc phân tích thành phần nước tiểu chuột không mang lại các kết quả rõ ràng để qua đó có thể đánh giá tình trạng sinh lý chuột ở chỉ tiêu này.

Kết quả mô học cho thấy việc truyền tế bào gốc không gây xơ hóa hay sinh u nào ở bất kỳ con chuột nào của nhóm được truyền tế bào. Điều này cho thấy việc truyền các tế bào gốc ở nồng độ 3×10^5 tế bào/con trong $200 \mu\text{l}$ ở tốc độ 0.1 ml/min theo đường tĩnh mạch đuôi trong 01 lần truyền không gây ra tình trạng tắc mạch ở khu vực tiêm hay bất cứ cơ quan nào, tương tự như kết quả của nhóm nghiên cứu được thực hiện bởi Chan và cộng sự (2022).

5. Kết luận

Việc truyền tế bào gốc hUC-MSC được phân lập và nuôi cấy theo Quy trình đã được MekoStem hiệu chỉnh, theo đường tĩnh mạch ở chuột C57BL/6 (3×10^5 tế bào/ $200 \mu\text{l}$ /con) cho thấy tính an toàn cao, không làm thay đổi tình trạng sinh lý, không gây tắc mạch cũng như không gây xơ hóa hoặc sinh u ở tất cả các mô của các cơ quan chủ yếu, đồng thời tỷ lệ chuột sống là 100% qua 21 ngày quan sát và ghi nhận các kết quả.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự tài trợ của Ngân hàng tế bào gốc MekoStem - Công ty cổ phần Hóa Dược Phẩm MekoPhar, cũng như sự hỗ trợ chuyên môn từ các bác sĩ Bệnh viện An Sinh, Trung tâm Công Nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh và Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh.

Tài liệu tham khảo

- Almeida, S. O., Skelton, R. J., Adigopula, S., & Ardehali, R. (2015). Arrhythmia in stem cell transplantation. *Cardiac Electrophysiology Clinics*, 7(2), 357-370.
- Barkholt, L., Flory, E., Jekerle, V., Lucas-Samuel, S., Ahnert, P., Bisset, L., ... Salmikangas, P. (2013). Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies-bridging scientific observations and regulatory viewpoints. *Cytotherapy*, 15(7), 753-759.
- Basu, J., Assaf, B. T., Bertram, T. A., & Rao, M. (2015). Preclinical biosafety evaluation of cell-based therapies: Emerging global paradigms. *Toxicologic Pathology*, 43(1), 115-125.
- Chan, A. M. L., Ng, A. M. H., Yunus, M. H. M., Idrus, R. B. H., Law, J. X., Yazid, M. D., ... Lokanathan, Y. (2022). Safety study of allogeneic mesenchymal stem cell therapy in animal model. *Regenerative Therapy*, 19, 158-165.
- Gu, L. H., Zhang, T. T., Li, Y., Yan, H. J., Qi, H., & Li, F. R. (2015). Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells transplanted via different routes in diabetic rats. *Cellular & Molecular Immunology*, 12(4), 444-455.
- Liau, L. L., Al-Masawa, M. E., Koh, B., Looi, Q. H., Foo, J. B., Lee, S. H., ... Law, J. X. (2020). The potential of mesenchymal stromal cell as therapy in neonatal diseases. *Frontiers in Pediatrics*, 8, Article 591693.
- Liu, G., Zhou, H., Li, Y., Li, G., Cui, L., Liu, W., & Cao, Y. (2008). Evaluation of the viability and osteogenic differentiation of cryopreserved human adipose-derived stem cells. *Cryobiology*, 57(1), 18-24.
- Lukomska, B., Stanaszek, L., Zuba-Surma, E., Legosz, P., Sarzynska, S., & Drela, K. (2019). Challenges and controversies in human mesenchymal stem cell therapy. *Stem Cells International*, 2019(2), 1-10.
- Musiał-Wysocka, A., Kot, M., & Majka, M. (2019). The pros and cons of mesenchymal stem cell-based therapies. *Cell Transplantation*, 28(7), 801-812.
- Nagamura-Inoue, T., & He, H. (2014). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World Journal of Stem Cells*, 6(2), Article 195.
- Nair, A. B., & Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7(2), Article 27.
- Surwit, R. S., Kuhn, C. M., Cochrane, C., McCubbin, J. A., & Feinglos, M. N. (1988). Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 37(9), 1163-1167.
- Zhao, J., Wang, J., Dang, J., Zhu, W., Chen, Y., Zhang, X., ... Zheng, S. G. (2019). A preclinical study - systemic evaluation of safety on mesenchymal stem cells derived from human gingiva tissue. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 1-14.

