

NGHIÊN CỨU TẠO TẤM BIỂU MÔ HƯỚNG ĐẾN SỬ DỤNG TRONG CÁC TRƯỜNG HỢP TỔN THƯƠNG MÁT DA

Nguyễn Thanh Bình^(1,2), Trần Thị Thanh Thuý⁽²⁾, Nhan Ngọc Hiền⁽²⁾,
Nguyễn Khánh Hoà⁽²⁾, Hoàng KC Hương⁽²⁾, Ngô Thái Minh Quân⁽²⁾,
Nguyễn Thị Thu Hiền⁽¹⁾, Trần Anh Huy⁽¹⁾, Huỳnh Duy Thảo⁽²⁾, Nguyễn Tuấn Kiệt⁽³⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một, (2) Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch,

(3) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên

Ngày nhận bài 10/05/2023; Ngày gửi phản biện 17/07/2023; Chấp nhận đăng 30/7/2023

Liên hệ email: thao_huynhduy@pnt.edu.vn

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2023.05.473>

Tóm tắt

Màng ối đã được nghiên cứu và ứng dụng từ nhiều năm qua do chúng có những đặc tính như khả năng kháng viêm, kháng khuẩn, kháng virus, khả năng gây ra các đáp ứng miễn dịch thấp. Do đó, màng ối là một trong những vật liệu sinh học tự nhiên được sử dụng phổ biến trong lĩnh vực y học tái tạo. Sự kết hợp của công nghệ tế bào gốc và công nghệ mô đã tạo ra các loại mảnh ghép có cấu tạo và chức năng gần giống với các loại mô cần tái tạo. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng màng collagen thu nhận từ màng ối làm giá thể mang các tế bào gốc trung mô thu nhận từ máu cuống rốn để tạo ra các tấm tế bào dạng biểu mô hướng đến ứng dụng trong các trường hợp tổn thương mất da.

Tế bào gốc trung mô được thu nhận từ máu cuống rốn được định danh theo tiêu chuẩn quốc tế (ISCT), tế bào gốc này sau đó sẽ được chuyển lên màng collagen và tạo tấm biểu mô bằng cách sử dụng kit biệt hoá và đĩa nuôi cấy chuyên biệt. Kết quả tạo tấm biểu mô được đánh giá bằng các phương pháp phân tích hình ảnh (H&E, Trichrome, TEM), phương pháp nhuộm hoá mô miễn dịch (p63, keratin 1/10).

Các tế bào gốc trung mô thoả mãn các tiêu chí của ISCT để định danh tế bào gốc như là đặc điểm tế bào bám dính, tiềm năng biệt hoá thành các nguyên bào xương, nguyên bào sụn và tế bào mỡ in vitro cũng như biểu hiện các markers như các marker dương tính CD73, CD90, CD105 và một số marker âm tính CD14, CD45. Màng collagen thu nhận từ màng ối đã loại bỏ được các tế bào để trở thành màng vô bào dùng làm giá thể. Tấm tế bào dạng biểu mô có chứa các tế bào biểu hiện được đặc tính của tế bào dạng biểu mô sau khi biệt hoá (dương tính với marker p63, ck 1/10) cũng như đã tạo được nhiều lớp tế bào gần giống với đặc điểm của lớp biểu mô.

Nhóm nghiên cứu đã tạo thành công tấm tế bào biểu mô với đặc điểm tế bào về hình thái, chức năng có mang các đặc điểm của tế bào biểu mô. Kết quả nghiên cứu này

có tiềm năng ứng dụng rất lớn và hữu ích trong các trường hợp tổn thương mất da diện rộng như bỏng, tai nạn khi có sẵn tấm biểu mô để tiến hành điều trị.

Từ khóa: màng collagen, tấm tế bào biểu mô, tế bào gốc trung mô

Abstract

AN EXPERIMENTAL STUDY TO CREATE EPITHELIAL CELL SHEETS ORIENTED TO THE APPLICATION IN CASE OF SKIN TISSUE LOSS

Amniotic membranes have been studied and applied for many years because they have anti-inflammatory, antibacterial, and antiviral properties, especially the ability to cause inadequate immune responses, which is one of the causes important for graft rejection. Therefore, amniotic membrane is one of the natural biological materials of great interest in many research and application fields. Recently, the amniotic membrane has been used as a scaffold in tissue engineering to create various types of tissue engineering grafts. Along with the continuous development of stem cell technology and the combination with tissue engineering, it is possible to develop grafts with the characteristics and functions necessary for the tissues that need regeneration. In this study, our research team used collagen membranes obtained from the amniotic membrane as a carrier for mesenchymal stem cells obtained from umbilical cord blood to create epithelial cell sheets aimed at applications in cases of skin damage.

Mesenchymal stem cells were obtained from cord blood and identified according to international standards (ISCT). These stem cells will then be transferred onto collagen membranes and epithelial sheets using a differentiation kit and specialized culture plates to create epithelial sheets. The results of epithelial sheet formation were evaluated by imaging analysis methods (H&E, TEM) and immunohistochemical staining methods (p63, keratin 1/10).

Mesenchymal stem cells satisfy the ISCT criteria for stem cell identification, such as adhesion cell characteristics, the potential to differentiate into osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes in vitro, as well as expression showing markers such as positive markers CD73, CD90, CD105, and negative for some markers CD14, CD45. The collagen membrane obtained from the amniotic membrane has removed the cells to become an acellular membrane to serve as a cell carrier. The epithelial cell sheet showed that the cells exhibited the characteristics of epithelial cells after differentiation (positive with some markers such as p63, ck 1/10) and formed multiple layers of cells that closely resembled the features of the epithelial layer.

The research team has successfully created epithelial cells with morphological and functional characteristics of epithelial cells. This research result has excellent application potential and is helpful in skin loss injuries such as burns and accidents when epithelial sheets are available for treatment.

1. Đặt vấn đề

Ở những bệnh nhân bị vết thương lóc da, vết loét lớn hay bỏng độ II trở lên, hàng rào bảo vệ da bị mất đi, dẫn đến nhiều nguy cơ nhiễm trùng. Trong những trường hợp này, ghép da tự thân được xem là “*tiêu chuẩn vàng*” để che phủ và tái tạo bề mặt tổn thương da. Việc lấy da tự thân không những làm đau cho bệnh nhân mà không thể thu nhận được nhiều da ghép cho các trường hợp bỏng hoặc tổn thương mất da diện rộng. Do đó, việc tìm kiếm một loại mô ghép để thay thế nguồn da tự thân điều trị các tổn thương mất da là cần thiết trên lâm sàng. Ngày nay, có rất nhiều sản phẩm có nguồn gốc sinh học hoặc tổng hợp dùng để che phủ và tái tạo bề mặt tổn thương da. Tuy nhiên, nhược điểm chung của các sản phẩm này là không chứa các tế bào sống cũng như không có đầy đủ các thành phần cần thiết của mô cần tái tạo để điều trị hiệu quả hơn.

Đối với kỹ nghệ mô có thể giải quyết nhu cầu cấp thiết trên khi có thể tạo ra các loại mảnh ghép có chứa các loại tế bào của mô cần tái tạo và các khuôn nền ngoại bào phù hợp giúp quá trình sửa chữa và tái tạo mô hiệu quả hơn. Đối với công nghệ này yêu cầu cần phải thoả mãn ba tiêu chí là có giá thể phù hợp để mang các tế bào, tế bào của loại mô cần thay thế và các yếu tố sinh học như môi trường nuôi cấy, huyết thanh, yếu tố tăng trưởng để tạo ra các mảnh ghép (Pham và cs., 2007; Martínez-Santamaría và cs., 2012).

Đối với công nghệ tái tạo và sửa chữa tổn thương mất da thì màng ối được xem như là một loại giá thể (Alex và cs., 2009) đặc biệt phù hợp để mang các tế bào tạo ra mảnh ghép vì màng ối có nhiều đặc điểm hấp dẫn như vật liệu vô bào, có tính tương hợp sinh học, phân hủy sinh học và quan trọng hơn màng ối là một loại vật liệu sinh học tự nhiên được ứng dụng thành công trong y học từ rất sớm (Eskandarlou và cs., 2016; Abul và cs., 2020; Huddleston và cs., 2020; Shaghayegh và cs., 2022). Ngày nay, ứng dụng của tế bào gốc là vô cùng lớn và đa dạng (Stefan và cs., 2008; Huang và cs., 2020). Các nhà khoa học đã tìm ra trong máu cuống rốn có chứa các loại tế bào gốc khác nhau có khả năng biệt hoá thành nhiều loại tế bào (Goodwin và cs., 2001; Eun và cs., 2004) trong đó có tế bào có mang đặc điểm của tế bào biểu mô da (Yavari và cs., 2016; Ghauri và cs., 2020). Do đó, sự kết hợp giữa màng collagen từ màng ối và tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn để tạo ra tấm biểu mô sẽ là một giải pháp điều trị mới, khả thi trong điều trị các vết bỏng, tổn thương mất da diện rộng (Dos và cs., 2019; Fénelon và cs., 2021).

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Máu cuống rốn và màng ối người được thu nhận trong điều kiện vô trùng tại Phòng mổ. Sau đó, mẫu được vận chuyển về phòng thí nghiệm và xử lý trong ngày. Mẫu máu cuống rốn và màng ối được thu nhận khi thỏa các tiêu chí sau: (i) sản phụ và mẫu máu cuống rốn có xét nghiệm âm tính với HIV, HBV, HCV, giang mai, không có bệnh lý đi kèm, không xảy ra các tai biến khi chuyển dạ, thai nhi không bị nhiễm trùng bào thai và dị tật bẩm sinh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu nhận và xử lý màng ối thành màng collagen làm giá thể nuôi tế bào

Màng ối sau khi thu nhận được lắ trong dung dịch PBS vô trùng để làm sạch. Sau đó, ủ trong hỗn hợp Trypsin (0,25%) - EDTA (0,02%) trong 30 phút ở 37°C kèm lắ với tốc độ 200 vòng/phút. Cao nhẹ nhàng để loại bỏ lớp tế bào biểu mô màng ối và rửa lại bằng dung dịch PBS lạnh vô trùng. Hiệu quả bóc tách lớp tế bào biểu mô màng ối được đánh giá bằng cách soi mẫu trực tiếp dưới kính hiển vi, qua phương pháp nhuộm Giemsa, nhuộm Hematoxylin – Eosin (H&E) để đánh giá cấu trúc của màng collagen.

2.2.2. Chuẩn bị đĩa insert khoát lớp màng collagen làm giá thể nuôi tế bào

Màng collagen được cắt thành từng mảnh nhỏ, có diện tích tương ứng với bề mặt đĩa insert (có đường kính 24mm). Màng collagen được căng trải lên bề mặt đĩa insert với bề mặt màng đáy hướng lên trên. Đĩa insert sau khi được trải lớp màng collagen để khô tự nhiên trong tủ cấy vô trùng. Các đĩa này sẽ được chuyển lên đĩa nuôi 6 giếng, đóng gói, vô trùng bằng tia gamma với liều 25kGy và bảo quản ở nhiệt độ phòng.

2.2.3. Thu nhận, phân lập và định danh tế bào gốc từ máu cuống rốn

Máu cuống rốn được thu nhận bằng ống tiêm từ tĩnh mạch rốn ngay sau khi sơ thai vào túi đựng máu (CPDA-1 Single Blood Bag, GREETMED®) và được giữ lạnh ở 4°C để chờ chuẩn bị phân lập tế bào gốc máu cuống rốn.

Máu cuống rốn chứa trong túi đựng máu được chia đều vào các tube ly tâm 50ml vô trùng (*Falcon*), khoảng 30ml máu cuống rốn/tube. Quay ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút trong 20 phút. Thu nhận 3ml dịch tế bào đơn nhân cho vào tube 15ml mới vô trùng (*Falcon*). Pha loãng dịch tế bào đơn nhân này với dung dịch PBS theo tỉ lệ 1:1. Đặt hỗn hợp dung dịch tế bào lên trên lớp Ficoll-Paque™ Premium (1.077g/ml, *Cytiva Sweden A8*) với tỉ lệ 2 thể tích dịch tế bào: 1 thể tích dịch Ficoll- Paque. Ly tâm với tốc độ 2000 vòng/phút trong 20 phút, ở 4°C. Thu nhận lớp tế bào đơn nhân cho vào tube 15ml mới vô trùng. Bổ sung dung dịch PBS để rửa dịch tế bào với tỉ lệ 1 thể tích tế bào: 8 thể tích dịch PBS, quay ly tâm với tốc độ 2000 vòng/phút trong 10 phút, ở 4°C. Thu phần cặn lắng tế bào ở đáy tube. Xác định mật độ tế bào bằng máy đếm tế bào (*Vi-CELL-XR, Beckman Coulter, USA*).

Tế bào sau khi phân lập được nuôi trong môi trường DMEM/F12, bổ sung 15% FBS, 100IU/ml penicillin và 100µg/ml streptomycin trong chai nuôi T-25cm² ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂. Môi trường nuôi tế bào được thay mới mỗi 3 ngày/lần, khi tế bào tăng trưởng đạt 70-80% diện tích bề mặt chai nuôi thì tiến hành cấy chuyển để nhân khối tế bào.

Định danh tế bào gốc từ máu cuống rốn là tế bào gốc trung mô theo tiêu chuẩn của The International Society for Cellular Therapy (ISCT) (Dominici, 2006). Theo tiêu chuẩn

ISCT, tế bào gốc là tế bào gốc trung mô phải thoả mãn ba tiêu chí sau đây: Thứ nhất, đó là các tế bào bám dính vào đáy chai nuôi, có hình thái đặc trưng của tế bào trung mô. Thứ hai, đó là các tế bào có khả năng biệt hoá thành các tế bào mỡ, nguyên bào sụn, nguyên bào xương trong điều kiện *in vitro* (Goodwin, 2001). Thứ 3, đó là các tế bào biểu hiện được một số marker đặc trưng của tế bào gốc trung mô, đặc biệt là các marker CD73, CD90, CD105 (biểu hiện dương tính > 95%) và các marker như CD34, CD45 và HLA-DR âm tính (biểu hiện < 5%) (Martins, 2009).

2.2.4. Tạo tấm biểu mô từ tế bào gốc trung mô và màng collagen

Tế bào gốc trung mô được nuôi cấy ở lần cấy chuyển thứ hai đạt mật độ tế bào khoảng 70-80% diện tích bề mặt chai nuôi sẽ được thu nhận và chuyển lên màng collagen bên trong đĩa insert với mật độ khoảng 10^6 tế bào/cm² và được nuôi bằng môi trường DMEM/F12, bổ sung 15% FBS, kháng sinh (Pen/Strep) ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂.

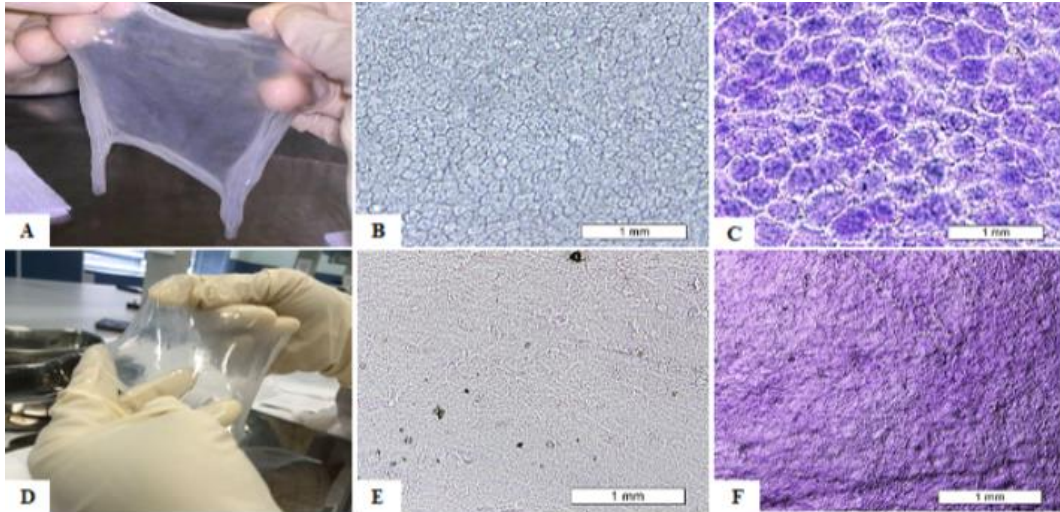
Sau một tuần nuôi cấy để tế bào phát triển sẽ cảm ứng biệt hoá thành các tế bào dạng biểu mô da bằng Kit biệt hoá gồm môi trường nuôi K-SFM + HKGS (Human Keratinocyte Growth Supplement). Tế bào sẽ được nuôi cấy duy trì trong môi trường biệt hoá hai tuần và sau đó kích thích tạo lớp tế bào bằng kỹ thuật nuôi Air-Liquid Interface Culture trong hai tuần tiếp theo để hoàn tất quy trình nuôi cấy (Horch, 2000; Kamolz, 2006).

Sau 2 tuần nuôi cấy duy trì trong điều kiện Air-Liquid Interface Culture, tấm biểu mô sẽ được thu nhận để đánh giá kết quả dựa vào hình thái như sự thay đổi hình dạng của tế bào (quan sát trực tiếp dưới kính hiển vi đảo ngược) và nhuộm Trichrome đánh giá hình thái của tấm biểu mô. Nhuộm hóa mô miễn dịch với marker p63 và ck 1/10 để đánh giá quá trình biệt hoá của tế bào gốc trung mô thành tế bào dạng keratinocytes của biểu mô da. Đánh giá các thể liên kết tế bào của tế bào nuôi cấy trên màng collagen bằng hình ảnh qua kính hiển vi điện tử truyền xuyên (TEM).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Thu nhận màng collagen từ màng ối

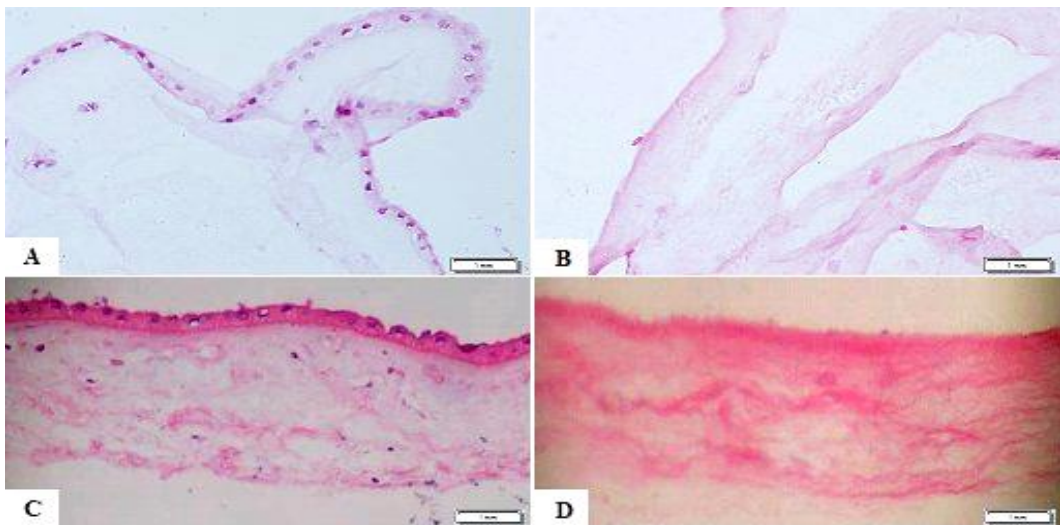
Màng ối sau khi được xử lý với quy trình mà nhóm chúng tôi nghiên cứu cho thấy có hiệu quả để loại bỏ lớp biểu mô trên bề mặt màng ối nhưng vẫn giữ lại được cấu trúc của lớp chất nền dùng làm giá thể nuôi tế bào (hình 1). Cấu trúc mô của màng ối vẫn được duy trì nguyên vẹn, không thấy có hiện tượng phá huỷ cấu trúc chất nền hoặc bị rách, huỷ hoại sau khi hoàn tất quy trình xử lý. Quy trình xử lý cho thấy có hiệu quả và đạt được kết quả mong đợi để thu nhận màng collagen dùng làm vật liệu giá thể để nuôi cấy tế bào trong kỹ nghệ mô.



Hình 1. Thu nhận và xử lý màng ối thành màng collagen.

(A). Màng ối trước khi xử lý. (B). Quan sát màng ối trực tiếp dưới kính hiển vi đảo ngược. (C). Tế bào lớp biểu mô màng ối trước khi xử lý được nhuộm Giemsa. (D). Màng ối sau khi xử lý thành màng collagen. (E). Màng ối sau khi đã loại bỏ lớp biểu mô khi quan sát trực tiếp dưới kính hiển vi đảo ngược. (F). Màng ối sau khi đã loại bỏ lớp biểu mô được nhuộm Giemsa.

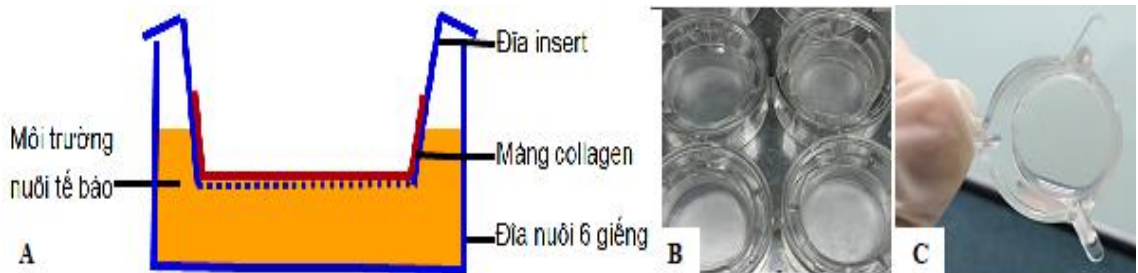
Màng ối được xử lý thành màng collagen có kích thước mỏng hơn màng ối do lớp tế bào biểu mô và các thành phần tế bào trong khung nền ngoại bào của lớp màng đáy đã được loại bỏ (hình 2A-D).



Hình 2. Xử lý loại bỏ lớp biểu mô và tế bào khung nền ngoại bào màng ối.

(A). và (C). Màng ối được xử lý và nhuộm H&E lần lượt ở vật kính 10X và 40X. Trước khi xử lý cho thấy màng ối có chứa một lớp biểu mô vuông đơn trên bề mặt. (B). và (D). Màng ối sau khi xử lý loại bỏ tế bào được nhuộm H&E lần lượt ở vật kính 10X và 40X. Sau khi xử lý cấu trúc màng ối không còn lớp biểu mô vuông đơn trên bề mặt và các tế bào không còn hiện diện trong khung nền ngoại bào.

Tấm collagen thu nhận được trải lên đĩa insert trong hệ thống đĩa nuôi 6 (hình 3). Hệ thống đĩa nuôi insert được khoát màng collagen sử dụng để nuôi tế bào gốc từ máu cuống rốn tạo tấm biểu mô.

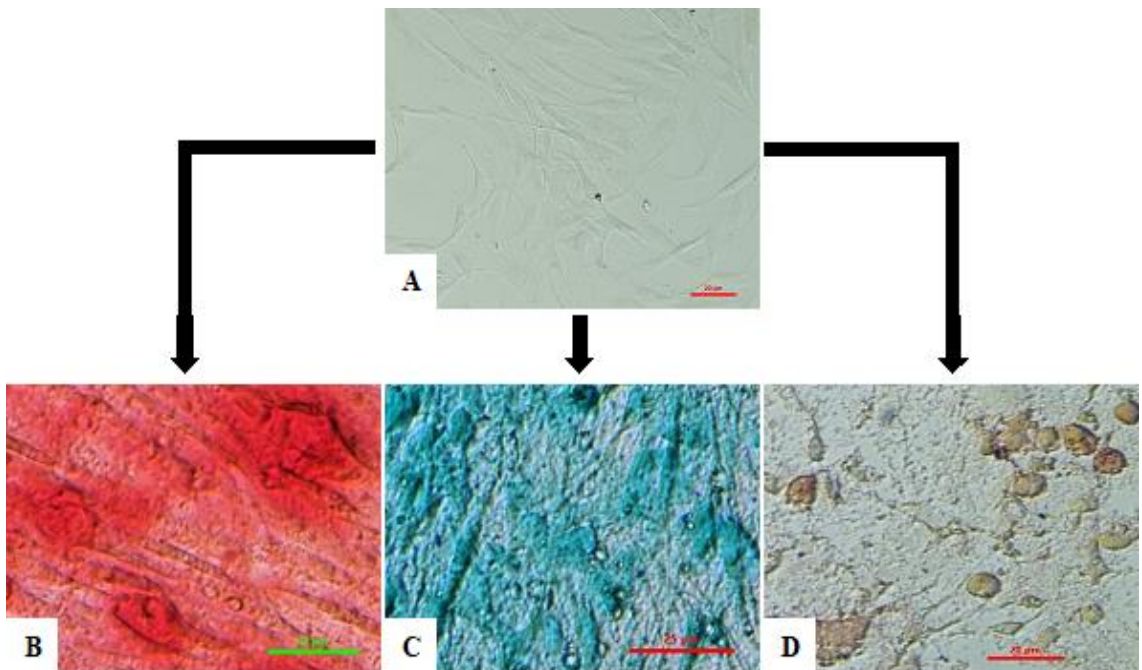


Hình 3. Mô hình tạo tấm tế bào sử dụng màng collagen.

(A). Mô hình tạo tấm tế bào. (B). Màng collagen được trải trên đĩa insert trong đĩa nuôi 6 giếng. (C). Mẫu màng collagen khi nuôi cấy tế bào.

3.2. Thu nhận, phân lập và định danh tế bào gốc từ máu cuống rốn

Tế bào đơn nhân sau khi được thu nhận bằng phương pháp tách tế bào với dung dịch Ficoll-Paque sẽ được nuôi trong môi trường DMEM/F12, bổ sung 15% huyết thanh và kháng sinh (hình 4A).



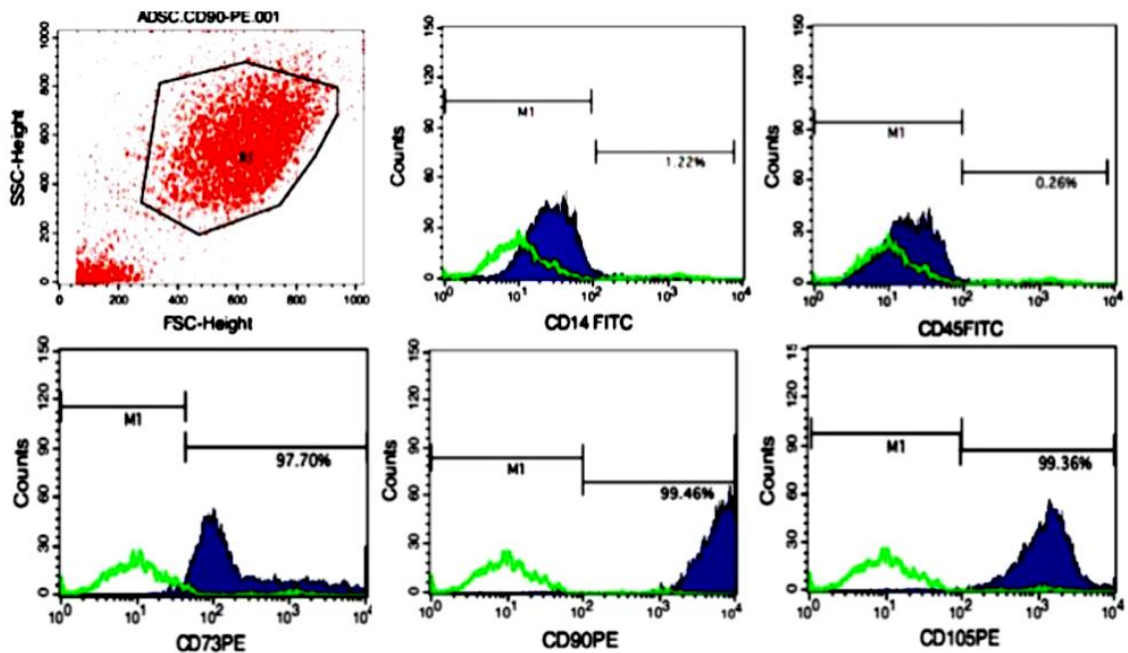
Hình 4. Kết quả nuôi cấy và định danh tế bào gốc máu cuống rốn qua phương pháp cảm ứng biệt hoá

(A). Tế bào gốc ứng viên nuôi cấy không cảm ứng biệt hoá, 20X. (B). Biệt hoá tế bào thành nguyên bào xương, nhuộm Alizarin Red để đánh giá, 20X. (C). Biệt hoá tế bào thành nguyên bào sụn, nhuộm Alcian Blue để đánh giá, 20X. (D). Biệt hoá tế bào thành tế bào mỡ, nhuộm Oil Red O để đánh giá, 20X.

Quan sát kết quả nuôi tế bào dưới kính hiển vi đảo ngược cho thấy, tế bào phát triển tốt, có thể cấy chuyển trong khoảng thời gian từ 2-4 tuần sau giai đoạn nuôi cấy sơ cấp. Trong những ngày đầu của quá trình nuôi sơ cấp, các tế bào bắt đầu bám dính vào đáy chai nuôi. Sau 3 ngày nuôi, trong chai nuôi bắt đầu xuất hiện những tế bào có dạng hình thoi, giống nguyên bào sợi, đó là những tế bào điển hình của dòng tế bào trung mô, các tế bào này bám dính vào đáy chai nuôi để phát triển. Kết quả này thỏa mãn tiêu chí thứ 1 của tiêu chuẩn ISCT dùng để định danh tế bào gốc trung mô (Kamolz và cs., 2006). Ngoài ra, còn có lẫn tạp các tế bào máu. Tuy nhiên, ở các lần thay môi trường tiếp theo, sử dụng dung dịch PBS để rửa chai nuôi nhằm loại bỏ các tế bào không bám dính trong chai nuôi, giúp tế bào bám dính phát triển tốt hơn.

Kết quả thử nghiệm biệt hoá các tế bào gốc máu cuống rốn ở lần cấy chuyển thứ 2 thành các tế bào nguyên bào xương, nguyên bào sụn và tế bào mỡ trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*, cho thấy các tế bào gốc máu cuống rốn đã biệt hoá thành công thành các tế bào nguyên bào xương, nguyên bào sụn và tế bào mỡ trong điều kiện *in vitro* (hình 4B-4D). Kết quả này thỏa mãn tiêu chí thứ 2 của tiêu chuẩn ISCT dùng để định danh tế bào gốc trung mô (Kamolz và cs., 2006).

Kết quả chạy Flow Cytometry với CD panel: CD14, CD45, CD73, CD90, CD105 cho kết quả trong Hình 5. Kết quả cho thấy quần thể tế bào gốc máu cuống rốn dương tính với các marker CD73, CD90 và CD105. Đây là 3 marker rất quan trọng để định danh theo tiêu chuẩn của ISCT, kết quả cho thấy 3 marker trên có mức biểu hiện rất cao ($\geq 98\%$). Bên cạnh đó, các marker như CD14, CD45 có kết quả âm tính ($< 2\%$). Kết quả này thỏa mãn tiêu chí thứ 3 của tiêu chuẩn ISCT dùng để định danh tế bào gốc trung mô.



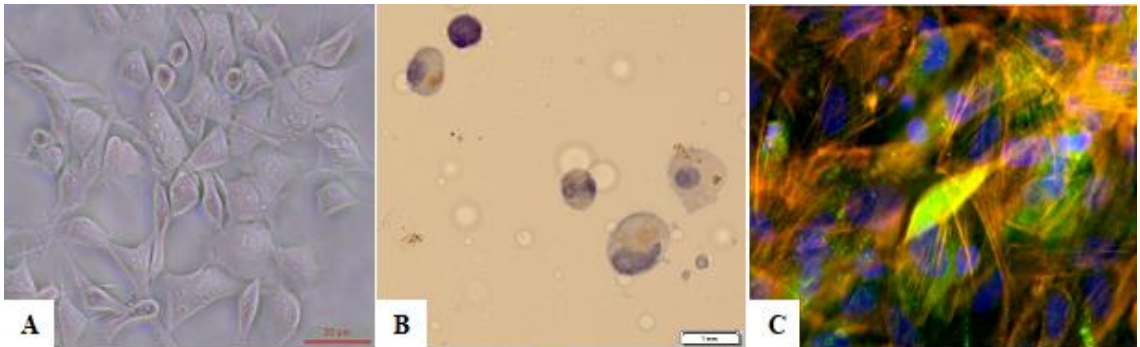
Hình 5. Kết quả chạy Flow Cytometry định danh tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn

Kết quả khảo sát sự biểu hiện của một số marker bề mặt để định danh tế bào gốc trung mô, kết quả cho thấy tế bào dương tính với các marker như CD73, CD90 và CD105. Trong khi đó, các tế bào biểu hiện âm tính với các marker như CD14, CD45. Như vậy, kết quả chạy Flow Cytometry hoàn toàn thoả mãn tiêu chí thứ 3 của ISCT.

Từ các kết quả nghiên cứu phân lập, nhân khối và định danh tế bào gốc từ máu cuống rốn cho thấy các tế bào gốc thu nhận từ máu cuống rốn đáp ứng được các tiêu chí định danh tế bào gốc trung mô của ISCT. Như vậy, các tế bào gốc từ máu cuống rốn mà nhóm nghiên cứu của chúng tôi phân lập đó là các tế bào gốc trung mô. Các tế bào này đáp ứng các tiêu chuẩn quốc tế từ hình thái, sự biểu hiện marker bề mặt cũng như tiềm năng biệt hoá *in vitro*.

3.3. Kết quả biệt hoá tế bào gốc trung mô thành tế bào dạng biểu mô da

Sau khi thu nhận, phân lập và định danh được tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn, tiếp tục nuôi cấy và duy trì tế bào đến lần cấy chuyển thứ hai và sử dụng các tế bào này để biệt hoá thành các tế bào dạng biểu mô bằng kit biệt hoá gồm K-SFM và HKGS. Kết quả sau hai tuần biệt hoá, tế bào bắt đầu thay đổi hình thái từ trung mô (thon, dài) thành tế bào có hình thái đa diện. Khi nhuộm tế bào với các marker p63 và ck 1/10 đều cho kết quả dương tính (hình 6).



Hình 6. Kết quả biệt hoá tế bào gốc trung mô thành tế bào dạng biểu mô da. (A). Tế bào gốc trung mô bắt đầu thay đổi hình thái từ dạng thon dài thành các tế bào có hình thái đa diện. (B). Các tế bào dương tính với marker p63, trong bào tương bắt màu đỏ cam, đặc trưng của lớp tế bào đáy của lớp biểu mô da. (C). Các protein bộ xương tế bào biểu mô của marker ck 1/10 dương tính biểu hiện màu xanh lá cây khi bắt đầu biệt hoá, đây là marker đặc trưng của tế bào lớp đáy biểu mô da.

Kết quả nuôi cấy và biệt hoá tế bào gốc trung mô thành tế bào dạng biểu mô da, các tế bào gốc đã biệt hoá thành các tế bào dạng biểu mô về hình thái (hình 6A) cũng như biểu hiện một số marker đặc trưng của tế bào lớp biểu mô da như marker p63 (hình 6B) và ck 1/10 (hình 6C).

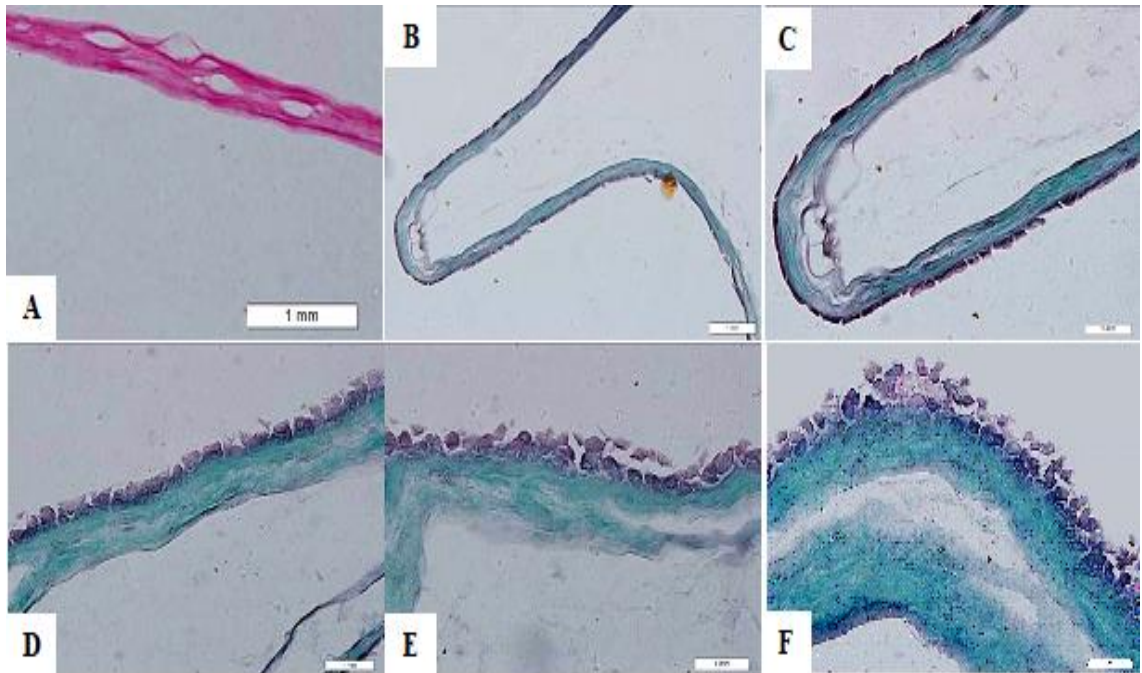
3.4. Kết quả tạo tâm biểu mô

Sau khi phân lập tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn, các tế bào này sẽ được nhân khối và duy trì nuôi cấy đến lần cấy chuyển thứ 2. Khi các tế bào phát triển đạt

khoảng 70-80% diện tích bề mặt đáy chai nuôi sẽ thu nhận và chuyển sang màng collagen. Các tế bào được nuôi ổn định trong một tuần và sau đó sử dụng kit biệt hoá gồm K-SFM và HKGS để cảm ứng biệt hoá các tế bào gốc trung mô thành tế bào dạng biểu mô.

Các tế bào này được duy trì nuôi cấy trong hai tuần và sau đó sử dụng kỹ thuật nuôi Air-Liquid Interface Culture để tạo lớp tế bào với mục tiêu là tạo nhiều lớp tế bào trên màng collagen theo đặc điểm của lớp biểu mô da người.

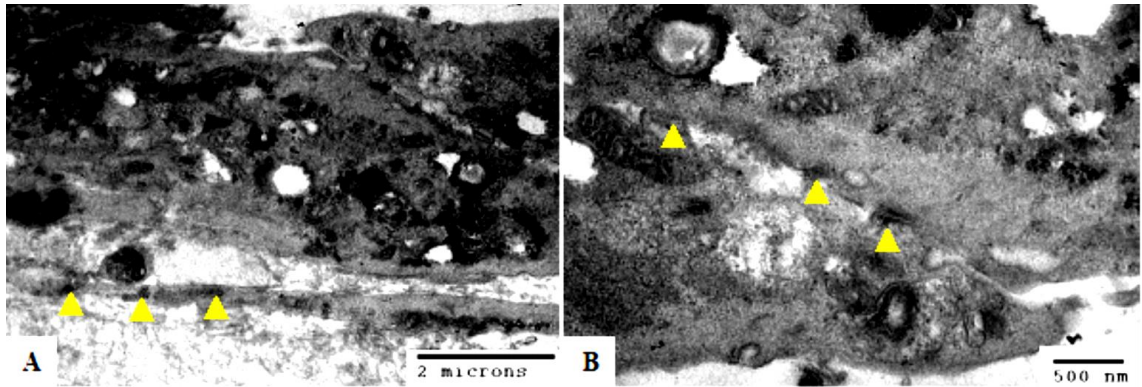
Quá trình nuôi cấy tế bào gốc trung mô trên màng collagen được mô tả trong hình 7. Trong quá trình nuôi cấy và cảm ứng biệt hoá các tế bào dần chuyển dạng hình thái từ thon dài đặc trưng của tế bào gốc trung mô (hình 7B-7C) thành tế bào dạng biểu mô (tế bào có dạng hình vuông hoặc đa diện khi nuôi cấy trong môi trường cảm ứng biệt hoá (hình 7D) và theo thời gian nuôi cấy air-liquid culture bắt đầu tạo lớp trên màng collagen (hình 7E), theo thời gian nuôi thì tế bào đã chuyển dạng thành hình thái và cấu trúc đặc trưng của lớp biểu mô da (2-4 hàng lớp tế bào, hình 7F).



Hình 7. Kết quả tạo tấm biểu mô

(A). Màng collagen nhuộm H&E, 40X. (B) và (C). Kết quả nuôi cấy tế bào gốc trung mô trên màng collagen được nhuộm Trichrome lần lượt chụp ở vật kính 20X, 40X. (D), (E) và (F). Kết quả tạo tấm biểu mô, theo thời gian cảm ứng biệt hoá và tạo lớp tế bào, kết quả cho thấy tế bào bắt đầu thay đổi hình thái từ thon dài (của tế bào gốc trung mô) chuyển sang dạng tế bào biểu mô vuông, đa diện và bắt đầu tạo lớp tế bào (2-4 hàng tế bào, hình 7F).

Các tế bào được nuôi cấy trên màng collagen biểu hiện các thể liên kết chặt chẽ với nhau như qua các thể liên kết tế bào – tế bào (desmosome) cũng như bám dính chặt trên màng collagen qua các thể liên kết tế bào – khung nền ngoại bào (hemidesmosome) thể hiện trong (hình 8).



Hình 8. Đánh giá kết quả nuôi cấy trên màng collagen qua TEM

(A). Tế bào bám dính trên màng collagen qua các thể hemidesmosome (tam giác màu vàng). (B). Tế bào liên kết chặt chẽ với nhau để tạo lớp trên màng collagen (tam giác màu vàng).

Với kết quả tạo lớp thành công trên màng collagen, chúng tôi đã thành công khi kết hợp màng collagen và tế bào gốc trung mô để tạo ra các tấm biểu mô.

4. Bàn luận

Màng ôi người đã được sử dụng từ rất sớm trên lâm sàng để điều trị các tổn thương trên da như bỏng, các chấn thương mất da (Shaghayegh và cs., 2022). Dần dần màng ôi được nghiên cứu và ứng dụng trong nhiều chuyên ngành khác như dùng làm vật liệu che phủ vết thương như chấn thương chỉnh hình, chuyên khoa mắt ... (Huddleston và cs., 2020). Màng ôi cho thấy là một loại vật liệu sinh học tự nhiên an toàn và hiệu quả để sử dụng trên lâm sàng (Shaghayegh và cs., 2022).

Theo thời gian, màng ôi được nghiên cứu như một loại vật liệu lý tưởng để làm giá thể nuôi cấy tế bào trong kỹ nghệ mô để tạo ra các mảnh ghép dùng để sửa chữa, tái tạo mô (Wilshaw và cs., 2006; Fénelon và cs., 2021). Hiện tại có nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới đã sử dụng màng ôi làm giá thể để nuôi tế bào keratinocyte người để tạo ra các mảnh ghép kỹ nghệ để điều trị các tổn thương bỏng (Horch và cs., 2000; Kamolz và cs., 2006), nuôi tế bào rìa giác mạc để điều trị các bệnh lý về mắt (Alex và cs., 2009), nuôi tế bào gốc để phát triển ra các mảnh ghép hướng đến ứng dụng điều trị trong y học tái tạo (Wilshaw và cs., 2008).

Tế bào gốc không còn xa lạ với các nhà nghiên cứu và được triển khai ứng dụng trên lâm sàng trong thời gian qua bởi những tiềm năng và ứng dụng to lớn của nó mang lại. Có thể nói tế bào gốc đã tạo ra một cuộc cách mạng trong y học và ngày càng ảnh hưởng sâu rộng đến mọi khía cạnh trong xã hội (Huang và cs., 2020, Ria và cs., 2022).

Hiện nay, máu cuống rốn là một trong những nguồn mô thường được sử dụng để thu nhận tế bào gốc trung mô vì những lý do sau: thu nhận máu cuống rốn dễ dàng, không gây đau đớn, không ảnh hưởng đến mẹ và trẻ sơ sinh, ít ảnh hưởng đến vấn đề y đức. Ngoài ra,

tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn có khả năng điều biến miễn dịch nên ít gây ra quá trình đào thải mảnh ghép ở người nhận (Goodwin và cs., 2001; Eun và cs., 2004).

Trong máu cuống rốn đã được chứng minh là có chứa nhiều loại tế bào gốc, trong đó có tế bào gốc trung mô là một trong những loại tế bào gốc được nghiên cứu và ứng dụng để điều trị trong y học tái tạo trong những thập niên gần đây (Huang và cs., 2020; Ria và cs., 2022). Đây là loại tế bào gốc được quan tâm rất lớn vì những tiềm năng mà nó mang lại, tuy nhiên việc thu nhận và định danh tế bào gốc trung mô là một trong những nghiên cứu bắt buộc thực hiện để có thể thu nhận chính xác và đánh giá được chức năng của chúng và nhóm chúng tôi cũng đã được quy trình phân lập và định danh thành công tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn theo tiêu chuẩn quốc tế ISCT (Dominici và cs., 2006).

Ngoài ra, nhóm nghiên cứu cũng đạt được kết quả cảm ứng biệt hoá tế bào gốc trung mô thành tế bào dạng lớp đáy của biểu mô da dựa vào hình thái, chức năng (như biểu hiện marker p63, marker ck 1/10). Đây là minh chứng hiệu quả để giúp cho quá trình tạo tấm biểu mô từ sự kết hợp của tế bào gốc trung mô trên màng collagen (hình 6).

Từ các phân tích trên cho thấy, tấm biểu mô được tạo ra có các đặc tính của lớp biểu mô da (có chứa 2-4 hàng tế bào), các tế bào có đặc điểm của lớp tế bào đáy như dương tính với marker p63 và có chức năng của tế bào biểu mô (ck 1/10) (hình 7). Kết quả tạo tấm tế bào biểu mô cũng đạt được một số đặc điểm tương tự như các tấm biểu mô của một số tác giả trên thế giới (Horch và cs., 2000; Kamolz và cs., 2006; Yavari và cs., 2016). Tấm tế bào biểu mô cho thấy tính sẵn sàng ghép là một ưu điểm to lớn mà kỹ nghệ mô mang lại khi có sẵn nguồn tế bào và giá thể để tạo tấm biểu mô trong khi không cần chờ đợi tạo tấm tế bào sừng theo quy trình nghiên cứu truyền thống phải thu nhận tế bào từ chính người bệnh và phải chờ đợi lâu để chế tạo ra mảnh ghép.

Từ các kết quả nghiên cứu đạt được, tấm tế bào biểu mô sẽ bổ sung thêm một lựa chọn trong kỹ nghệ mô để phát triển thành tấm tế bào ứng dụng trong các tổn thương mất da như bỏng và chấn thương mất da (Pham và cs., 2007; Martínez-Santamaría và cs., 2012).

5. Kết luận

Nghiên cứu đã hoàn chỉnh được quy trình tạo tấm tế bào biểu mô từ tế bào gốc trung mô máu cuống rốn và màng collagen từ màng ối và đánh giá chính xác từ các bước thu nhận màng collagen và định danh tế bào gốc trung mô (theo tiêu chuẩn của quốc tế - ISCT) và tấm tế bào (đánh giá hình thái, đặc điểm và chức năng cả tế bào).

Tấm biểu mô mà nhóm nghiên cứu chúng tôi tạo ra có ưu thế rất lớn về tính sẵn sàng sử dụng khi không phải chờ đợi như nuôi cấy tế bào sừng tự thân từ chính tế bào của bệnh nhân (thường thời gian tạo tấm tế bào sừng tự thân của người bệnh ít nhất là 1 tháng) mà người bệnh có thể sử dụng ngay tấm biểu mô từ nguồn tế bào gốc trung mô máu cuống rốn và màng collagen có sẵn, giúp rút ngắn thời gian điều trị cho người bệnh (là một trong những tiêu chuẩn được quan tâm rất lớn khi điều trị các tổn thương mất da), làm tăng khả năng cứu sống bệnh nhân.

Hồ sơ y đức: đề tài nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học theo quyết định số 219/QĐ-HĐTr ngày 07/02/2022 của chủ tịch Hội đồng Trường Đại học Thủ Dầu Một (Số HĐĐĐ.22.06-001).

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Thủ Dầu Một trong đề tài mã số DT.22.1-035.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Abul A., Karam M., Rahman S. (2020). Human Amniotic Membrane: A New Option for Graft Donor Sites - Systematic Review and Meta-analysis. *Int Wound J*, 17(3), 547-554.
- [2] Alex JS., Genevieve AS., Richard JL., Stacy PW., Jonh NK., Stephen JT., Julie TD. (2009). The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials*, 30, 1056-1065.
- [3] Dos Santos JF., Borçari NR., da Silva Araújo M., Nunes VA. (2019). Mesenchymal stem cells differentiate into keratinocytes and express epidermal kallikreins: Towards an in vitro model of human epidermis. *J Cell Biochem*, 120(8), 13141-13155.
- [4] Eskandarlou M., Azimi M., Rabiee S., Seif Rabiee M.A. (2016). The Healing Effect of Amniotic Membrane in Burn Patients. *World J Plast Surg*, 5(1), 39-44.
- [5] Eun J. G., Seung H. H., Ju AJ., Soo H. H., Seong W. K., Il H. Y., Chiyoung A., Hoon H., Hoon K. (2004), In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 321, 102-108.
- [6] Fénelon M, Catros S, Meyer C, Fricain JC, Obert L, Auber F, Louvrier A, Gindraux F. (2021). Applications of Human Amniotic Membrane for Tissue Engineering. *Membranes*, 11(6), 387.
- [7] Ghauri AK., Wahid M., Mirza T., Uddin JAA. (2020). Direct differentiation of cord blood derived mesenchymal stem cells into keratinocytes without feeder layers and cAMP inducers. *Pak J Med Sci*, 36(5), 946-951.
- [8] Goodwin H. S., Bicknese A. R., Chien S. N., Bogucki B. D., Quinn C. O., Wall D. A. (2001), Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers, *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 7(11), 581-588.
- [9] Horch RE., Debus M., Wagner G., Stark GB. (2000). Cultured human keratinocytes on type I collagen membranes to reconstitute the epidermis. *Tissue Eng*, 6(1), 53-67.
- [10] Huang YZ., Gou M., Da LC., Zhang WQ., Xie HQ. (2020). Mesenchymal Stem Cells for Chronic Wound Healing: Current Status of Preclinical and Clinical Studies. *Tissue Eng Part B Rev*, 26(6), 555-570.
- [11] Huddleston HP., Cohn MR., Haunschild ED., Wong SE., Farr J., Yanke AB. (2020). Amniotic Product Treatments: Clinical and Basic Science Evidence. *Curr Rev Musculoskelet Med*, 13(2), 148-154.
- [12] Kamolz L. P., Kolbus A., Wick N., Mazal P. R., Eisenbock B., Burjak S., et al. (2006). Cultured human epithelium: human umbilical cord blood stem cells differentiate into keratinocytes under in vitro conditions. *Burns*, 32(1), 16-19.

- [13] M. Dominici, MD, K. Le Blanc, I. Mueller, A. Keating, D.J. Prockop, E.M. Horwitz (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Short communication*, 8(4), 315-317.
- [14] Martínez-Santamaría L., Guerrero-Aspizua S., Del Río M. (2012). Skin bioengineering: preclinical and clinical applications. *Actas Dermosifiliogr*, 103(1), 5-11.
- [15] Martins A.A., Paiva A., Morgado J.M., Gomes A., and Pais M.L. (2009). Quantification and Immunophenotypic Characterization of Bone Marrow and Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells by Multicolor Flow Cytometry, *Transplantation Proceedings*, 41, 943-946.
- [16] Pham C., Greenwood J., Cleland H., Woodruff P., Maddern G. (2007), Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review, *Burns*, 33(8), 946-957.
- [17] Ria M., Alexander M., Angelina O Z., Mohammed U. H., Khalid A Al-D., Sura H. Al-Zubaidi, Noora M H., Irshad A., Hamzah H K., Moaed E Al-Gazally, Yasser F. M., Homayoon S. (2022). Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review. *Stem Cell Res Ther*, 13(1), 366.
- [18] Shaghayegh D., Mansoureh B., Elham A. T., Mohammad E., Arian E., Karen S., Jonathan S. A., Majid S. (2022). Applications of acellular human amniotic membrane in regenerative medicine. *Life Sciences*, 310, 121032.
- [19] Stefan B., Irena M., James B R., Nureddin A. (2008). Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*, 2(4), 169-83.
- [20] Wilshaw SP., Kearney J., Fisher J., Ingham E. (2008). Biocompatibility and potential of acellular human amniotic membrane to support the attachment and proliferation of allogeneic cells. *Tissue Eng Part A*, 14(4), 463-472.
- [21] Wilshaw SP., Kearney JN., Fisher J., Ingham E. (2006). Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue Eng*, 12(8), 2117-2129.
- [22] Yavari K., Abolhassani S., Mohammadnejad J. (2016). Human Umbilical Cord Blood Stem Cells Differentiate into Keratinocytes under In Vitro Conditions and Culturing Differentiated Cells on Bacterial Cellulose Film. *Int J Stem Cell Res Transplant*, 04(7), 216-219.