

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Ngọc Hà

**NGHIÊN CỨU SỰ ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC CHẤT
PHÂN TÁCH TẾ BÀO TỚI SỰ SỐNG VÀ SỰ BIỂU HIỆN
KHÁNG NGUYÊN BỀ MẶT CỦA TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ
NGÀNH SINH HỌC**

Hà Nội - 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Ngọc Hà

**NGHIÊN CỨU SỰ ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC CHẤT
PHÂN TÁCH TẾ BÀO TỚI SỰ SỐNG VÀ SỰ BIỂU HIỆN
KHÁNG NGUYÊN BỀ MẶT CỦA TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

**LUẬN VĂN THẠC SĨ
NGÀNH SINH HỌC**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

TS. Nguyễn Trung Nam

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả luận văn

Nguyễn Thị Ngọc Hà

LỜI CẢM ƠN

Sau một thời gian tiến hành triển khai nghiên cứu, em cũng đã hoàn thành nội dung luận văn *“Nghiên cứu sự ảnh hưởng của các chất phân tách tế bào tới sự sống và sự biểu hiện kháng nguyên bề mặt của tế bào gốc trung mô”*. Luận văn được hoàn thành không chỉ là công sức của bản thân mà còn có sự giúp đỡ, hỗ trợ tích cực của nhiều cá nhân và tập thể.

Trước hết, em xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc đến TS. Nguyễn Trung Nam, người trực tiếp hướng dẫn luận văn. Thầy đã dành cho em nhiều thời gian, tâm sức, cho em nhiều ý kiến, nhận xét quý báu, chỉnh sửa những chi tiết nhỏ trong luận văn, giúp luận văn của em được hoàn thiện hơn về mặt nội dung và hình thức. Thầy cũng đã luôn quan tâm, động viên, nhắc nhở kịp thời để em có thể hoàn thành luận văn đúng tiến độ.

Nghiên cứu được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài: Phát triển liệu pháp mới cho bệnh não do thiếu máu cục bộ thiếu oxy sử dụng tế bào gốc tạo máu kích thích. Mã số QTJP01.01/20-22, chủ nhiệm: TS. Nguyễn Trung Nam

Em xin gửi lời cảm ơn tới bác sĩ CK2. Trần Trung Kiên và GS. Nguyễn Duy Ánh bệnh viện phụ sản Hà Nội đã cung cấp các mẫu nghiên cứu để tôi có thể hoàn thành luận văn này.

Em xin trân trọng cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện khoa học và Công nghệ và các thầy cô Khoa Công Nghệ Sinh Học - Học viện Khoa học Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về sự dạy dỗ và chỉ bảo tận tình trong quá trình em học tập.

Em xin cảm ơn các cán bộ Trung tâm nghiên cứu ứng dụng tế bào gốc và liệu pháp gen (STEMREC), Viện Công nghệ sinh học, đã giúp đỡ và tạo điều kiện để em hoàn thiện khóa luận này.

Em cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành đến gia đình, bạn bè vì đã luôn động viên, quan tâm giúp đỡ em trong quá trình học tập và thực hiện luận văn.

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT	v
DANH MỤC HÌNH ẢNH	vi
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. TỔNG QUAN VỀ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ	3
1.1.1. Tế bào gốc trung mô	3
1.1.2. Đặc điểm chung của tế bào gốc trung mô	4
1.1.3. Các nguồn thu nhận tế bào gốc trung mô	6
1.1.4. Ý đức trong các nghiên cứu về tế bào gốc trung mô	10
1.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÁCH TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ	10
1.2.1. Nguyên lý sự bám dính của tế bào	11
1.2.2. Các phương pháp phân tách	12
1.2.3. Một số nghiên cứu về các chất phân tách tế bào	16
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	17
2.1. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI NGHIÊN CỨU, NGUYÊN VẬT LIỆU	17
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	17
2.1.2. Hóa chất, dụng cụ và vật tư tiêu hao	17
2.1.3. Thiết bị sử dụng chính	17
2.1.4. Địa điểm nghiên cứu	17
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	17
2.2.1. Phân lập tế bào gốc trung mô từ dây rốn	17
2.2.2. Nuôi cấy tế bào	18
2.2.3. Đánh giá khả năng phân tách của các enzyme lên tế bào UC-MSc	18
2.2.4. Xác định số lượng và tỷ lệ sống sót của UC-MSc sau khi xử lý với chất phân tách	18
2.2.5. Đánh giá biểu hiện các marker bề mặt của MSC sau khi xử lý với chất phân tách	19
2.2.6. Thí nghiệm khả năng biệt hóa và nhuộm phát hiện biệt hoá của MSC	19

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	20
3.1. PHÂN LẬP TẾ BÀO GÓC TRUNG MÔ TỪ DÂY RÓN.....	20
3.2. NUÔI CÂY TẾ BÀO GÓC TRUNG MÔ.....	21
3.3. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÂN TÁCH CỦA TRYPSIN VÀ TRYPLE LÊN TẾ BÀO UC-MSc.....	22
3.4. XÁC ĐỊNH SỐ LƯỢNG VÀ TỶ LỆ SỐNG/CHẾT CỦA TẾ BÀO.....	26
3.4.1. Số lượng và tỷ lệ sống/chết của tế bào sau khi tiếp xúc với trypsin.....	26
3.4.2. Số lượng và tỷ lệ sống/chết của tế bào sau khi tiếp xúc với TrypLE.....	28
3.5. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG BIỆT HÓA CỦA MSC THÀNH NGUYÊN BÀO XƯƠNG.....	30
3.6. ĐÁNH GIÁ BIỂU HIỆN CÁC MARKER BỀ MẶT CỦA TẾ BÀO MSC.....	31
3.6.1. Đánh giá biểu hiện các marker bề mặt của tế bào MSC sau khi phân tách bằng trypsin.....	31
3.6.2. Đánh giá biểu hiện các marker bề mặt của tế bào MSC sau khi phân tách bằng TrypLE.....	35
KẾT LUẬN	43
KIẾN NGHỊ	44
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	45

DANH MỤC CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

AD-MSC	Adipose mesenchymal stem cells (Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ)
AF	Amniotic fluid (Nước ối)
AF-MSC	Amniotic fluid mesenchymal stem cells (Tế bào gốc trung mô từ nước ối)
AT	Adipose tissue (Mô mỡ)
BM	Bone marrow (Tủy xương)
BM-MSC	Bone marrow mesenchymal stem cells Tế bào gốc trung mô từ tủy xương
CSF	Colony stimulating factor (Yếu tố kích thích bạch cầu hạt)
DC	Dendritic cell (Tế bào đuôi gai)
DP	Dental pulp (Tủy răng)
DP-MSC	Dental pulp mesenchymal stem cells (Tế bào gốc trung mô từ tủy răng)
MSC	Mesenchymal stem cells Tế bào gốc trung mô
NK	Natural killer (Tế bào giết tự nhiên)
UC	Umbilical cord (Dây rốn)
UC-MSC	Umbilical cord mesenchymal stem cells (Tế bào gốc trung mô từ dây rốn)

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Một số nguồn phân lập tế bào gốc trung mô (Messenchymal Stem Cells)	6
Hình 1.2. Quá trình phân tách tế bào bằng enzyme	11
Hình 3.1. Quá trình phân lập MSC từ dây rốn.....	20
Hình 3.2. Quá trình nuôi cấy tế bào gốc trung mô. Hình ảnh tế bào được chụp ở độ phóng đại 40X.....	21
Hình 3.3. Hiệu quả phân tách tế bào của trypsin ở các thời gian khác nhau	22
Hình 3.4. Hiệu quả phân tách tế bào của trypsin ở các thời gian khác nhau sau 5 ngày nuôi cấy	23
Hình 3.5. Hiệu quả phân tách tế bào của TrypLE ở các khoảng thời gian khác nhau sau 5 ngày nuôi cấy.....	24
Hình 3.6. Hiệu quả phân tách tế bào của TrypLE ở các khoảng thời gian khác nhau sau 5 ngày nuôi cấy.....	25
Hình 3.7. Số lượng tế bào thu được sau khi sử dụng trypsin phân tách ở 5, 30, 60 và 120 phút.....	26
Hình 3.8. Số lượng tế bào UC-MSC sống (%) sau khi sử dụng trypsin phân tách ở 5, 30, 60 và 120 phút	27
Hình 3.9. Số lượng tế bào thu được sau khi sử dụng TrypLE phân tách ở các khoảng thời gian 5, 30, 60 và 120 phút	28
Hình 3.10 . Số tế bào UC-MSC sống (%) sau khi sử dụng TrypLE phân tách ở các mốc thời gian 5, 30, 60 và 120 phút.....	29
Hình 3.11. Hình ảnh nhuộm biệt hóa của tế bào gốc trung mô sau khi xử lý với trypsin và TrypLE ở các mốc thời gian khác nhau.....	30
Hình 3.12. Mức độ biểu hiện của các kháng nguyên bề mặt của tế bào sau khi xử lý với trypsin.....	34
Hình 3.13. Mức độ biểu hiện của các kháng nguyên bề mặt của tế bào sau khi xử lý với TrypLE	37

MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã chứng minh liệu pháp tế bào gốc có sự phát triển vượt bậc trong cả nghiên cứu in vitro và in vivo. Nhờ các đặc điểm nổi bật của tế bào gốc như có khả năng duy trì được đặc tính gốc trong thời gian dài cùng khả năng biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác nhau trong những điều kiện nhất định, nên tế bào gốc có khả năng thay thế các tế bào bị tổn thương và nhờ đó có khả năng điều trị một số bệnh. Đặc điểm này giúp tế bào gốc có thể được sử dụng trong điều trị bỏng sâu, rộng, khôi phục hệ thống máu ở những bệnh nhân bị các bệnh rối loạn về máu, chữa trị các tổn thương trong gan và não bộ. Đồng thời nó mở ra triển vọng hỗ trợ điều trị các bệnh ung thư [1]. Cho đến nay, các loại tế bào gốc không phải là tế bào gốc phôi bao gồm tế bào gốc tạo máu, tế bào gốc trung mô và tế bào gốc biểu mô được ứng dụng trong y học thành công hơn cả mặc dù tiềm năng của chúng đã ít nhiều bị hạn chế hơn so với tế bào gốc phôi.

Tế bào gốc trung mô (Mesenchymal Stem Cell - MSC) là một trong những loại tế bào được sử dụng nhiều nhất cho y học tái tạo. Trong những thập kỷ qua, MSC đã được sử dụng trong các nghiên cứu tiền lâm sàng để điều trị nhiều bệnh lý khác nhau, bao gồm rối loạn thần kinh, thiếu máu cục bộ tim, tiểu đường và các bệnh về xương và sụn [2]. Khi nhu cầu về MSC ngày càng lớn cho các phương pháp điều trị do đó, nhiệm vụ cấp bách là cần phải sản xuất một lượng lớn để đáp ứng nhu cầu trên. Lượng tế bào cho một liệu điều trị nằm trong khoảng từ 1,5 đến 120×10^6 MSC [3]. Trong quy trình tăng sinh tế bào gốc, tế bào sản xuất phải được thu hoạch và loại bỏ khỏi bình phản ứng với số lượng lớn và khả năng sống sót cao. Quá trình thu hoạch tế bào có thể ảnh hưởng đến chất lượng các tế bào thu được. Do đó, việc đánh giá ảnh hưởng của các phương pháp tách đến MSC là điều cần thiết. Hiện nay, mỗi phòng thí nghiệm sử dụng các phương pháp nuôi cấy và phân tách khác nhau, chưa có một quy chuẩn riêng cho quy trình nuôi cấy MSC tiêu chuẩn. Do đó, cần có một quy trình riêng cho từng phòng thí nghiệm để đảm bảo tối ưu cho việc nuôi cấy và thu hoạch MSC [4].

Trên thế giới đã có những nghiên cứu về ảnh hưởng của các phương pháp tách khác nhau lên MSC. Tuy nhiên, ở Việt Nam rất ít những nghiên cứu tìm hiểu các ảnh hưởng của các phương pháp tách trên MSC. Hiện nay có hai loại enzyme được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy tế bào là trypsin và

TrypLE. Trong đó, trypsin là một protease serine tuyến tụy với tính đặc hiệu cho các liên kết peptide liên quan đến nhóm carboxyl của các axit amin cơ bản, arginine và lysine, còn TrypLE Express là một protease tái tổ hợp được tạo ra bằng quá trình lên men. Ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào đánh giá ảnh hưởng của các enzyme lên UC-MSC. Xuất phát từ những vấn đề trên, em tiến hành thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của trypsin và TrypLE đến đặc điểm của MSC. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá hiệu quả của hai chất phân tách này trên tế bào gốc trung mô trong các khoảng khoảng thời gian khác nhau. Trên cơ sở đó, ***“Nghiên cứu sự ảnh hưởng của các chất phân tách tế bào tới sự sống và sự biểu hiện kháng nguyên bề mặt của tế bào gốc trung mô”*** được tiến hành với những mục tiêu nghiên cứu cụ thể sau:

- Đánh giá hiệu quả hai chất phân tách thành huyền phù tế bào UC-MSC.
- Đánh giá ảnh hưởng của hai chất phân tách đến khả năng biệt hóa (differentiation) của UC-MSC.
- Đánh giá ảnh hưởng của hai chất phân tách đến sự biểu hiện các kháng nguyên bề mặt tế bào sau bằng phương pháp phân tích dòng chảy (flow cytometry).

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. TỔNG QUAN VỀ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ

1.1.1. Tế bào gốc trung mô

Tế bào gốc trung mô là một lớp tế bào không đồng nhất có thể được phân lập từ tủy xương, mô mỡ, dây rốn và nhau thai, được phát hiện vào năm 1974 bởi Friedenstein [5]. Năm 1987, Simmon PJ đã đặt tên cho các tế bào này là tế bào nền tủy xương bởi chúng dường như được phát sinh từ những cấu trúc trong tủy xương [6]. Năm 1991, thuật ngữ 'tế bào gốc trung mô' lần đầu tiên sử dụng trong bài báo của Caplan xuất bản năm 1991 [7]. Ngày nay, thuật ngữ 'tế bào gốc trung mô' không chỉ đề cập đến các tế bào mô đệm có nguồn gốc từ tủy xương mà còn dùng để chỉ các tế bào từ nhiều nguồn mô liên kết khác. Ngoài ra, chữ viết tắt của thuật ngữ này MSC có thể được hiểu theo nhiều cách khác nhau, chẳng hạn như 'tế bào mô đệm đa năng', 'tế bào gốc đa năng', 'tế bào mô đệm trung mô',... Bên cạnh đó, các nhà nghiên cứu cũng đặt ra câu hỏi liệu khi ở trạng thái tế bào đơn, MSC có các đặc tính của tế bào gốc không (có khả năng tự làm mới và khả năng biệt hóa thành nhiều dòng tế bào). Nghiên cứu của Bonet D và cộng sự (2007) đã chứng minh tế bào đơn từ quần thể MSC tủy xương chuột biểu hiện kháng nguyên đặc biệt của phôi, từng tế bào có khả năng biệt hóa thành các tế bào khác ở điều kiện trong cơ thể sống (in vivo), do vậy chúng thực sự mang đặc điểm của tế bào gốc [8].

Sau hơn 50 năm nghiên cứu, tế bào MSC đã được phân lập từ các mô khác nhau, chẳng hạn như mô mỡ, da, tủy răng, giác mạc, máu ngoại vi, mô dây rốn (UC), cơ, phổi, máu kinh nguyệt, mô nhau thai, sữa mẹ và các mô sơ sinh [9]. Mặc dù giả thuyết MSC có thể được lấy từ hầu hết mọi mô trong cơ thể con người nhưng có những hạn chế thực tế liên quan đến y đức và sự không đồng nhất về sức khỏe ở những người hiến tặng khác nhau. Tuy nhiên, do việc sử dụng các kỹ thuật phân lập và nuôi cấy khác nhau, có những dữ liệu mâu thuẫn về các đặc điểm cụ thể được sử dụng để xác định MSC. Vì các tế bào này có thể được phân lập từ hầu hết mọi mô, nên người ta đã đề xuất rằng các MSC từ nhiều nguồn khác nhau có thể không đủ giống nhau để được

nhóm lại theo một phân loại duy nhất. Tuy nhiên, vấn đề này đã được giải quyết sau khi thiết lập các tiêu chí phòng thí nghiệm được chấp nhận rộng rãi cho phép xác định các đặc điểm chung của MSC. Theo Hiệp hội trị liệu tế bào quốc tế, các MSC đa năng phải đáp ứng ba tiêu chí sau: có khả năng bám dính nhựa vào bình nuôi cấy; biểu hiện kháng nguyên bề mặt CD105, CD73 và CD90 và thiếu biểu hiện của CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79 α /CD19 và kháng nguyên bạch cầu người (HLA) lớp II $\geq 95\%$ và $\leq 2\%$ quần thể tế bào, tương ứng; và có khả năng biệt hóa thành nguyên bào xương, nguyên bào sụn hoặc tế bào mỡ [10]. Ngoài ra, trong các điều kiện nuôi cấy cụ thể, MSC có thể biệt hóa thành các dòng không thuộc trung bì như tế bào gan, tế bào thần kinh, tế bào tuyến tụy, tế bào cơ tim hoặc tế bào hình sao [11].

1.1.2. Đặc điểm chung của tế bào gốc trung mô

Về mặt hình thái, MSC là loại tế bào gốc có hình thái khó phân biệt với nguyên bào sợi hay nguyên bào sao. Ở mức độ vi thể, MSC có hình thoi với kích thước khoảng 10-30 micromet. Đặc điểm siêu cấu trúc của MSC bao gồm [12]: Nhân tế bào: MSC có một nhân tế bào lớn, tròn hoặc bầu dục, có kích thước từ 5-15 micromet. Khối nhiễm sắc thể: MSC có một khối nhiễm sắc thể nằm gần nhân tế bào, chứa nhiều protein và enzyme đóng vai trò quan trọng trong quá trình trung hòa và tái tạo mô. Bào tương nghèo nàn: MSC có ít bào tương so với các tế bào khác, điều này giúp cho chúng không bị phân hóa quá nhanh và dễ dàng kiểm soát quá trình phát triển. Lưới nội bào: MSC có một lưới nội bào mịn, làm nhiệm vụ giữ cho các thành phần bên trong tế bào không bị phân tán.

Về chức năng, MSC có hai đặc điểm cơ bản của tế bào gốc là khả năng tự làm mới và khả năng biệt hóa thành nhiều dòng tế bào. Tự đổi mới là quá trình tế bào gốc phân chia để tạo ra nhiều tế bào gốc, duy trì nguồn tế bào gốc trong suốt cuộc đời. Tự đổi mới là sự phân chia với việc duy trì trạng thái không biệt hóa. Bên cạnh đó, MSC có tiềm năng biệt hóa thành nhiều dòng tế bào. Tính chất này đã được nghiên cứu để phát triển cấy ghép MSC như một liệu pháp tái tạo. Khả năng biệt hóa là một tiêu chí để xác định MSC. Khả năng biệt hóa có thể được quan sát thấy trong các điều kiện nuôi cấy kích thích sự biệt hóa tế bào thành ba dòng: tạo xương, sinh mỡ và tạo sụn [13].

Ngoài ra, MSC có thể biệt hóa thành các dòng khác nhau của trung bì, ngoại bì và nội bì như xương, mỡ, cơ, tế bào thần kinh, tế bào tiểu đảo và tế bào gan trong các điều kiện trong phòng thí nghiệm (in vitro) cụ thể. Khả năng biệt hóa cũng được quy định bởi các yếu tố di truyền, liên quan đến các yếu tố phiên mã [14]. Ngoài ra, MSC còn có một số đặc điểm khác giúp chúng trở thành một công cụ hứa hẹn trong y học tái tạo :

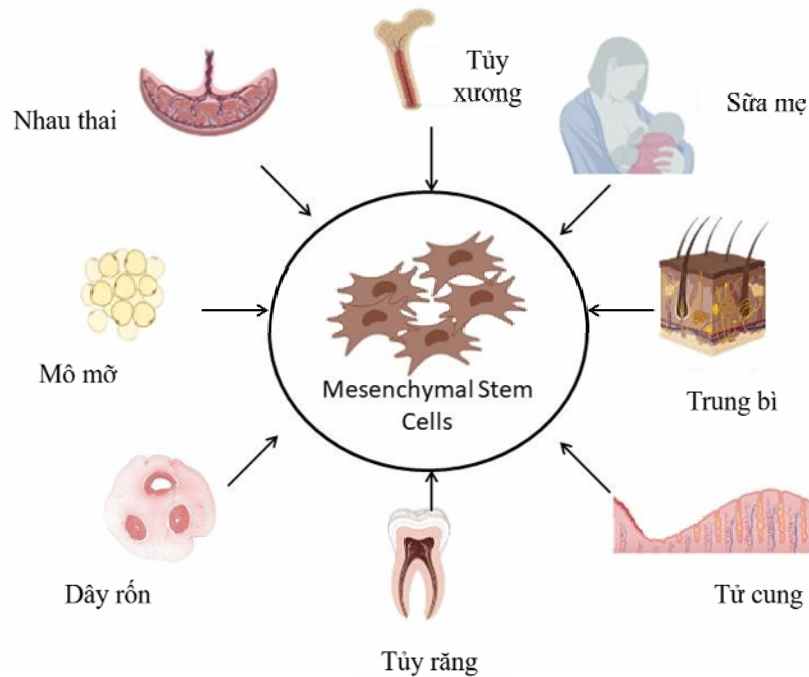
- Khả năng điều hòa miễn dịch:

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh đặc tính điều hòa miễn dịch của MSC. Những tế bào này ảnh hưởng đến phản ứng miễn dịch thông qua tương tác của chúng với các thành phần tế bào của hệ thống miễn dịch: tế bào lympho T, tế bào lympho B, tế bào giết tự nhiên (NK) và tế bào đuôi gai (DC). Điều hòa miễn dịch MSC có thể xảy ra thông qua tiếp xúc với tế bào và/hoặc bằng cách bài tiết các yếu tố khác nhau. Do những đặc tính này, MSC có thể ngăn chặn sự kích hoạt không phù hợp của tế bào lympho T và tạo ra môi trường dung nạp trong quá trình sửa chữa hoặc ngăn chặn phản ứng miễn dịch trong quá trình chữa bệnh, do đó góp phần duy trì cân bằng miễn dịch nội mô [15]. Các đặc tính điều hòa miễn dịch của MSC có thể được nhóm thành ba loại: gây giảm miễn dịch, điều chỉnh kiểu hình tế bào T và ức chế miễn dịch [16].

- Khả năng di chuyển đến mô và vị trí đích (homing)

Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng tế bào gốc trung mô có khả năng di chuyển đến các vị trí viêm và vi môi trường khối u [17]. Mặc dù cơ chế chính xác vẫn chưa được làm sáng tỏ, nhưng một số nghiên cứu đã làm rõ các yếu tố có thể chi phối việc di chuyển của MSC. MSC có hai cách di chuyển. Thứ nhất các MSC được cấy cục bộ tại mô đích và sau đó được dẫn hướng đến vị trí tổn thương thông qua một hướng (gradient) tín hiệu (chemokine). Thứ hai, MSC được huy động vào máu và sau đó phải trải qua một quá trình gồm nhiều bước để thoát khỏi hệ tuần hoàn và di chuyển đến vị trí chấn thương. Quá trình di chuyển của MSC trong cơ thể có thể được chia thành năm bước [18]. Nhận tín hiệu kích hoạt, kích hoạt, liên kết với màng nền, di chuyển qua màng nền, di chuyển đến mô đích.

1.1.3. Các nguồn thu nhận tế bào gốc trung mô



Hình 1.1. Một số nguồn phân lập tế bào gốc trung mô (Mesenchymal Stem Cells) (Sửa đổi và việt hoá từ hình minh hoạ của y văn của Zuk và cộng sự 2001 [19])

- Tủy xương

Sau khi được Friedenstein phát hiện vào năm 1976, tế bào gốc trung mô từ tủy xương (BM-MSC) lần đầu tiên được mô tả là MSC không biệt hóa vào năm 1987 [20]. Sau đó, BM trở thành nguồn phân lập chính của các tế bào gốc đa năng. Tuy nhiên, quá trình phân lập từ BM đòi hỏi một quy trình xâm lấn và đau đớn vì liên quan đến việc sử dụng nhiều thuốc mê; hơn nữa, năng suất tế bào, tuổi thọ và khả năng biệt hóa giảm dần theo tuổi của người hiến tặng. So với các MSC có nguồn gốc từ các nguồn khác, BM-MSC có thời gian tăng sinh dài hơn, lão hóa sớm hơn và chỉ chiếm 0,01-0,001% tế bào tủy có nhân [11]. Tuy nhiên, một ưu điểm của BM-MSC so với các loại tế bào khác là thời gian phân lập và ổn định nuôi cấy nhanh chóng, thuận lợi cho việc sử dụng tế bào gốc cho nghiên cứu cũng như cho các ứng dụng trong y tế [21].

- Mô mỡ

Ưu điểm chính của việc sử dụng mô mỡ làm nguồn MSC là sự tiện lợi, vì AT dưới da của con người thường có nhiều trên khắp cơ thể và là sản phẩm phụ của các quy trình hút mỡ thẩm mỹ và điều trị. Theo một vài nghiên cứu,

khoảng 98-100% tế bào thu được từ AT cao hơn so với các nguồn tế bào gốc trung mô khác [22]. Các đặc điểm hình thái, kiểu hình và chức năng của tế bào gốc từ mô mỡ (AD-MSC) tương tự như của BM-MSC. Bên cạnh tính ổn định trong nuôi cấy tế bào dài hạn, AD-MSC có thể tăng sinh hiệu quả trong điều kiện phòng thí nghiệm và sở hữu tiềm năng biệt hóa đa dòng cao. Do đó, AT đại diện cho nguồn MSC tự thân thiết thực hơn so với BM. Tuy nhiên, một hạn chế của AD-MSC là một số đặc điểm của người hiến tặng, chẳng hạn như tuổi tác, có thể ảnh hưởng đến khả năng tăng sinh và biệt hóa của AD-MSC, đặc biệt là đối với các dòng tạo xương và sụn, mặc dù khả năng tạo mỡ không bị ảnh hưởng [23]. Bên cạnh khả năng biệt hóa và tự làm mới, tế bào gốc trung mô từ mô mỡ tiết ra một số cytokine và các yếu tố tăng trưởng có đặc tính chống viêm, ức chế quá trình apoptosis và điều hòa miễn dịch [22]. Ngoài ra, do tác dụng điều hòa miễn dịch của AD-MSC, AT là nguồn cung cấp MSC tuyệt vời cho cấy ghép dị ghép bởi AD-MSC không biểu hiện các kháng nguyên phức hợp tương hợp mô chính loại II, nên nguy cơ thải ghép được giảm thiểu.

- Tủy răng

Các MSC có nguồn gốc từ tủy răng (DP) chuyên biệt hóa thành nguyên bào răng, tạo ra ngà răng. Những tế bào này được lấy từ mô tủy của răng khôn và được phân lập bằng quá trình phân giải bằng enzym. Nhìn chung, tế bào gốc trung mô từ tủy răng (DP-MSC) rất dễ bảo quản lạnh và tương tự như AD-MSC, có các đặc tính điều hòa miễn dịch. Do các tế bào gốc trung mô từ tủy răng có nguồn gốc từ mào thần kinh nên chúng có nguồn gốc từ ngoại trung mô, cả các dòng ngoại bì và trung mô. Do đó, ngoài việc biệt hóa thành nguyên bào xương/chondroblast và tế bào mỡ, DP-MSC còn có thể biệt hóa thành các dòng tế bào thần kinh. Khi được nuôi cấy trong khung ngà răng ba chiều (3D), DP-MSC có thể biệt hóa thành tế bào biểu mô giác mạc, tế bào hắc tố và tế bào gốc đa năng cảm ứng, khiến chúng rất hữu ích trong nghiên cứu y học tái tạo [24].

Các ứng dụng lâm sàng hứa hẹn nhất cho nguồn tế bào gốc này liên quan đến việc điều chỉnh các bệnh chuyển hóa và điều trị các bệnh gan có tỷ lệ tử vong cao, chẳng hạn như xơ gan và ung thư biểu mô tế bào gan. Theo thời gian, DP-MSC đã trở thành giải pháp thay thế ưa thích để thu thập tế bào

gốc trong quá trình ghép gan. DP-MSC cũng đã được sử dụng trong lĩnh vực tái tạo xương [25].

- Nước ối và nhau thai

Theo các phân tích mô hình miễn dịch, kiểu hình của các tế bào nuôi cấy thu được từ nước ối (AF) tương tự như của BM-MSC. Các tế bào MSC thu được từ nguồn này có thể biệt hóa thành các dòng trung mô. Khả năng tăng sinh của các MSC có nguồn gốc từ AF và nhau thai là tương tự nhau, không có sự khác biệt rõ rệt về số lượng tế bào, mặc dù về sau chúng phát triển với tốc độ chậm hơn và năng suất thấp hơn so với BM-MSC [26]. Tế bào gốc trung mô từ nước ối (AF-MSC) thể hiện khả năng tự đổi mới cao (>300 lần phân chia tế bào) và thời gian nhân đôi là 36 giờ. Hơn nữa, chúng đã được chứng minh là duy trì một kiểu nhân bình thường ngay cả ở những giai đoạn muộn [27]. Ngoài khả năng biệt hóa thành các dòng trung mô phổ biến, AF-MSC cũng có thể biệt hóa thành tế bào gan và tế bào thần kinh trong các điều kiện nuôi cấy cụ thể [26]. Mặc dù chưa có nghiên cứu nào trên người sử dụng AF-MSC được báo cáo, một số mô hình động vật đã nghiên cứu các ứng dụng lâm sàng khác nhau, bao gồm hình thành bàng quang bằng cách sử dụng AF-MSC biệt hóa thành tế bào cơ, điều trị chấn thương thần kinh, hình thành và tái tạo mạch máu và van tim, cơ hoành, thận, xương, phổi, tim và sụn [28].

- Máu ngoại vi

Các tế bào gốc máu ngoại vi có thể được huy động từ những người hiến tặng khỏe mạnh bằng cách sử dụng bạch cầu hạt (CSF) [11]. Chúng tương tự như BM-MSC ở hầu hết các khía cạnh, vì chúng có thể biệt hóa thành các dòng trung mô và có khả năng bám chặt vào các bình nuôi cấy bằng nhựa [29]. Tuy nhiên, các MSC được huy động từ máu bằng cách sử dụng CSF có thời gian nhân đôi là 95 giờ, lâu hơn so với các MSC từ các nguồn khác. Chúng biểu hiện kháng nguyên bề mặt tương tự như của BM-MSC với các kháng nguyên bề mặt cụ thể cho MSC. Khả năng biệt hóa thành các dòng sụn và xương của chúng thấp hơn so với BM-MSC, trong khi khả năng biệt hóa thành tế bào mỡ cao hơn [30]. Cho đến nay, chưa có thử nghiệm lâm sàng nào về việc sử dụng các tế bào này được công bố.

- Tế bào gốc từ dây rốn

Dây rốn chứa hai động mạch rốn và một tĩnh mạch rốn, cả hai được nằm trong một mô liên kết chất nhầy cụ thể, được gọi là Wharton's Jelly (WJ), được bao phủ bởi biểu mô màng ối. Thông thường, dây rốn được coi là rác thải y tế sau sinh, vì vậy không có tranh cãi về mặt đạo đức khi phân lập MSC từ mô dây rốn so với lấy MSC từ tủy xương. Trong khi nguồn thu MSC từ BM cực kỳ thấp, khả năng nhiễm virus cao. Quá trình thu nhận tế bào là một quy trình xâm lấn. Hơn nữa, số lượng tế bào gốc, khả năng tăng sinh và biệt hóa của BM-MSC giảm đáng kể theo tuổi tác, điều này hạn chế ứng dụng lâm sàng của chúng. Các nghiên cứu sau đó đã chỉ ra rằng dây rốn của con người chứa một lượng lớn MSC [31].

Hình thái, kiểu hình miễn dịch, khả năng biệt hóa đa hướng của UC- MSC hầu hết tương tự như các BM- MSC [32], nhưng tế bào gốc trung mô từ dây rốn (UC- MSC) có khả năng tăng sinh cao hơn và biểu hiện kháng nguyên bạch cầu người (HLA)-ABC và HLA-DR thấp hơn so với BM- MSC. Ngoài ra, các UC- MSC có nguồn gốc rõ ràng, dễ thu thập và bảo quản. UC- MSC được kỳ vọng là nguồn thay thế lý tưởng cho BM- MSC. UC- MSC đóng một vai trò quan trọng trong việc giảm tỷ lệ mắc và mức độ nghiêm trọng của bệnh mảnh ghép chống ký chủ (GVHD) xảy ra ở hơn 50% bệnh nhân được ghép tế bào gốc tạo máu (HSCT) [33]. Bên cạnh đó, dựa trên khả năng di chuyển của chúng đối với các tế bào ung thư, nhiều báo cáo đã đề xuất UC- MSC là liệu pháp tế bào để nhắm mục tiêu đến các khối u và cung cấp các phân tử chống ung thư tại chỗ.

UC- MSC thể hiện tỷ lệ tăng sinh cao nhất, cao gấp 3 đến 4 lần so với AD- MSC và BM- MSC [34]. UC- MSC có khả năng biệt hóa đa hướng và có khả năng biệt hóa thành xương, mỡ, sụn và các mô khác [35], do đó chúng có thể được sử dụng để sửa chữa các mô và cơ quan khác nhau, đồng thời là tế bào hạt giống lý tưởng trong lĩnh vực y học tái tạo. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng khi các mô cơ thể bị tổn thương do thiếu máu cục bộ-thiếu oxy hoặc viêm mãn tính, mô bị tổn thương sẽ giải phóng chemokine, huy động và hướng dẫn sự di chuyển của MSC đến vị trí tổn thương và tiếp tục gây ra sự biệt hóa thành các loại tế bào khác nhau [36]. Trong nuôi cấy in vitro, UC- MSC có thể biệt hóa trong những điều kiện nhất định để trở thành tế bào

trung bì như nguyên bào xương và tế bào cơ tim, tế bào nội mô, và cũng có thể biệt hóa thành tế bào thần kinh ở ngoại bì, tế bào gan tế bào tuyến tụy [37] ở lớp nội bì giữa lớp mầm. Khả năng sinh miễn dịch thấp, khả năng tăng sinh và biệt hóa cao của UC-MSC khiến chúng trở thành tế bào hạt giống cho liệu pháp tế bào.

1.1.4. Ý đức trong các nghiên cứu về tế bào gốc trung mô

Điều đầu tiên cần lưu ý là đạo đức trong nghiên cứu y sinh học là rất quan trọng và cần được tuân thủ đầy đủ. Vì vậy, việc đảm bảo rằng dự án nghiên cứu được thực hiện trong đạo đức là rất quan trọng để bảo vệ các quyền và lợi ích của các đối tượng nghiên cứu, đặc biệt là những người tự nguyện tham gia vào dự án nghiên cứu.

Đề tài thuộc dự án “Nghiên cứu xây dựng một số quy trình sản xuất và lưu giữ tế bào gốc trung mô định hướng ứng dụng” của Trung tâm nghiên cứu ứng dụng tế bào gốc và liệu pháp gen với tên: “Nghiên cứu sự ảnh hưởng của các chất phân tách tế bào tới sự sống và sự biểu hiện kháng nguyên bề mặt của tế bào gốc trung mô”. Nghiên cứu tuân thủ các quy định về đạo đức trong nghiên cứu y sinh (có giấy xác nhận phối hợp giữa hợp phần 2 và Bệnh viện phụ sản Hà Nội).

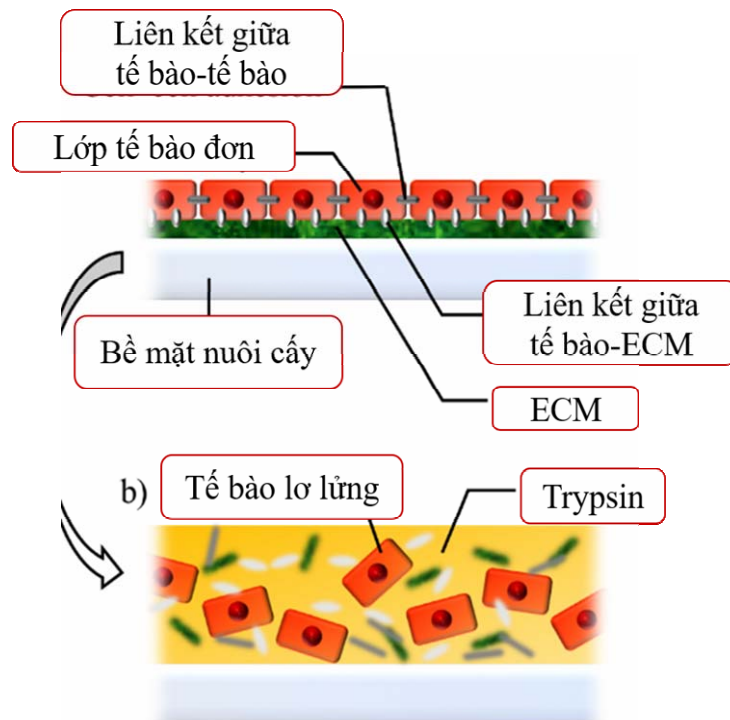
1.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÁCH TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ

Nuôi cấy tế bào bị ảnh hưởng bởi một số thông số hóa lý (nhiệt độ, pH, áp suất thẩm thấu, nồng độ O₂ và CO₂) và thông số sinh lý (hormone, nồng độ các chất dinh dưỡng) để tế bào có thể tăng trưởng. Ngoại trừ nhiệt độ, các thông số khác có thể được kiểm soát bởi môi trường nuôi cấy. Trong đó, hầu hết các tế bào không ác tính phát triển trong ống nghiệm di chuyển và phân chia cho đến khi chúng tạo thành một tế bào đơn lớp dày bao phủ hoàn toàn bề mặt của bình nuôi cấy. Sự tăng sinh của tế bào sẽ ngừng lại khi tế bào đã bao phủ toàn bộ diện tích nuôi cấy. Thu hoạch tế bào để nghiên cứu, xử lý hoặc nuôi cấy đòi hỏi phải phân tách và tách lớp tế bào. Một loạt các phương pháp phân tách đã được sử dụng để tách các tế bào bám dính được nuôi cấy trong ống nghiệm để phân tích chức năng và kiểu hình. Tuy nhiên, phương pháp tách tế bào có thể ảnh hưởng đến protein bề mặt và kiểu hình của tế bào nuôi cấy in vitro [38]. Khi nuôi cấy một số tế bào bám chặt vào đĩa nuôi cấy,

cần phải có một số chiến lược tách tế bào nhất định để đạt được hiệu quả tách đồng thời duy trì sự sống của tế bào. Các phương pháp tách tế bào cũng rất quan trọng đối với việc duy trì tính gốc của tế bào gốc [39].

1.2.1. Nguyên lý sự bám dính của tế bào

Sự bám dính của tế bào là kết quả của các tương tác đặc hiệu giữa các phân tử trên bề mặt tế bào với chất nền. Tách tế bào là quá trình phá vỡ các liên kết này bằng vật lý, hóa học, điện, quang hoặc bằng các phương pháp khác. Phương pháp tách tế bào thường được áp dụng rộng rãi là sử dụng enzyme phân giải protein như trypsin, TrypLE, accutase, collagenase [40]. Loại enzyme được sử dụng sẽ phụ thuộc vào loại mô/tế bào, và việc tìm ra sự kết hợp phù hợp sẽ dẫn đến kết quả tối ưu.



Hình 1.2. Quá trình phân tách tế bào bằng enzyme

(a) Lớp tế bào đơn trên một bề mặt nuôi cấy. (b) Trypsin phân tách ma trận ngoại bào (ECM) và các protein bề mặt khác. Do đó, các tế bào trở nên phân tán và mất đi các protein cần thiết để liên kết với bề mặt nuôi cấy và giữa các tế bào với nhau. (Sửa đổi và việt hoá từ hình minh hoạ của y văn của Uccelli và cộng sự 2008 [41])

Tế bào có điện tích bề mặt âm, phân bố không đều và thay đổi theo trạng thái sinh lý của tế bào. Mặc dù các tế bào có điện tích âm, chúng có thể

được nuôi cấy trên bề mặt tích điện dương cũng như trên bề mặt tích điện âm. Đa số các trường hợp liên kết giữa các tế bào và bề mặt chất nền do chúng có cùng điện tích, cho thấy rằng sự tiếp xúc sẽ được thực hiện thông qua tương tác ion (ví dụ: thông qua các cation hóa trị hai: Ca_2^+) hoặc thông qua các cầu nối protein. Những protein này đôi khi được gọi là các phân tử bám dính cơ chất, chúng tương tác bằng các thụ thể trên bề mặt tế bào với các phân tử ngoại bào có trong chất nền. Các phân tử bám dính cơ chất bao gồm 30 phân tử, trong số đó có collagen, laminin, fibronectin và vitronectin [42]. Bên cạnh đó, protein màng chịu trách nhiệm cho nhiều chức năng cần thiết để duy trì các hoạt động sinh lý bình thường. Ngoài ra, các protein kết dính, chẳng hạn như họ cadherin [43] trong màng tế bào, cung cấp các vị trí để liên kết các protein khung tế bào với ma trận ngoại bào để điều chỉnh sự di chuyển và sự kết dính của tế bào. Sự rối loạn điều hòa của các protein màng gây ra nhiều bệnh như trong quá trình hình thành khối u, đột biến của thụ thể ErbB-2 dẫn đến sự xuất hiện của ung thư dạ dày và ung thư tế bào gan [44]. Trong quá trình nuôi cấy, các tế bào kết dính thành các lớp tế bào đơn trên đĩa nuôi cấy và cần các phương pháp tách để phân giải chúng trước cấy chuyển hoặc các thí nghiệm tiếp theo và tránh việc tế bào bị lão hóa khi nuôi cấy ở mật độ quá cao. Tuy nhiên, phương pháp tách tế bào có thể ảnh hưởng đến các protein bề mặt và kiểu hình của các tế bào được nuôi cấy trong phòng thí nghiệm [7]. Do đó, các việc tối ưu phương pháp tách là rất quan trọng để nghiên cứu các đặc tính sinh học của tế bào.

1.2.2. Các phương pháp phân tách

- **Phương pháp không sử dụng enzyme**

- *Cơ học:*

Phương pháp cạo tế bào là một lựa chọn tốt cho các tế bào nhạy cảm với trypsin bởi phương pháp này không làm ảnh hưởng đến các kháng nguyên bề mặt tế bào [45]; cũng có thể được sử dụng khi thu thập các thành phần tế bào cho xét nghiệm Western blot hoặc phân tích biểu hiện thụ thể bề mặt tế bào.

- *Polyme phản ứng với nhiệt độ*

Các polyme phản ứng với nhiệt độ trên bề mặt nuôi cấy tế bào [46]. Khi nhiệt độ hạ xuống, các bề mặt này nhanh chóng được hydrat hóa, trở nên

ura nước và gây ra sự giải phóng tế bào tự phát. Phương pháp này đã được sử dụng để tạo ra các tấm tế bào và các mô [47]. Tuy nhiên, nhược điểm chính của phương pháp này là sự cần thiết của polyme đáp ứng nhiệt độ trên bề mặt nuôi cấy vừa đắt tiền vừa dễ giải phóng tế bào ngẫu nhiên hoặc sớm. Hơn nữa, phương pháp này đòi hỏi các kỹ thuật viên lành nghề được đào tạo để sử dụng nó, làm tăng thêm chi phí. Cuối cùng, vì những vật liệu này cần được xử lý đáng kể để tăng cường độ bám dính của tế bào và độ chính xác khi xử lý, cho đến nay chúng vẫn chưa được sử dụng trong các hệ thống nuôi cấy tế bào tự động. Vấn đề tách tế bào hiệu quả và không bị hư hại vẫn còn.

- *Ánh sáng*

Quá trình phân tách tế bào do ánh sáng gây ra thường sử dụng các polyme phản ứng với ánh sáng, các phân tử nhạy cảm với ánh sáng và bức xạ ánh sáng [48]. Mặc dù ánh sáng có thể tách 90% tế bào bám dính ra khỏi chất nền. Tuy nhiên, cơ chế tách của ánh sáng có một số vấn đề khiến phương pháp này có thể hạn chế ứng dụng. Các phân tử hoặc hạt nano cảm quang và các nguồn sáng bên ngoài không phổ biến; nói cách khác, cần có thiết bị đắt tiền, vật liệu cảm quang phải bảo quản an toàn và cần kỹ thuật viên có kinh nghiệm [49].

- *Phân tách điện hóa*

Phương pháp tách bằng điện hóa cũng đã xuất hiện gần đây; hiệu quả phân tách gần 100%. Phương pháp này bao gồm hai bộ phận thiết yếu: lớp đơn lớp tự lắp ráp (SAM) và nền kim loại dẫn điện. Trên bề mặt kim loại dẫn điện có phủ các phôi tử để bắt và gắn tế bào, các tế bào có thể được tách ra theo một số cơ chế [50]. So với phương pháp sử dụng các polyme, phương pháp điện hóa có thể được sự tách tế bào chỉ trong vài phút. Tuy nhiên, nó đòi hỏi việc chế tạo công phu các tính năng của cảm biến và lớp phủ chuyên dụng. Hơn nữa, không có dữ liệu chính xác để tiết lộ khả năng tồn tại của tế bào sau khi tách ra; các phân tử alkanethiol có thể vẫn liên kết với protein màng của các tế bào tách rời, điều này có thể ảnh hưởng xấu đến các tế bào sau khi tách. Ngoài ra, quá trình tách tế bào trong các phương pháp điện hóa có thể do sự co lại của màng tế bào [51]. Mối quan hệ giữa điện thế và mức độ co bóp của màng tế bào đến nay vẫn chưa được làm rõ. Như vậy, ánh sáng và dòng điện có ảnh hưởng mạnh đến khả năng tồn tại và chức năng của tế bào. Do đó các phương pháp này không phù hợp cho các loại tế bào gốc [49].

- *Dung dịch phân tách phi enzyme*

Một số tế bào bám dính yếu có thể được lấy ra khỏi đĩa đơn giản bằng cách rửa bằng dung dịch muối đệm phốt phát và gõ nhẹ vào đĩa. Một số tế bào kết dính mạnh hơn cần các phương pháp khác để phá vỡ sự tương tác giữa các protein của tế bào và bề mặt của đĩa. Axit ethylenediaminetetraacetic chelator canxi (EDTA) loại bỏ các ion canxi cần thiết cho các integrins để duy trì sự kết dính của tế bào. EDTA là một phương pháp tách tế bào nhẹ. Tuy nhiên, nó thường không đủ mạnh đối với các tế bào kết dính mạnh và cần phải loại bỏ cơ học bằng cách cạo, điều này có thể vô tình làm rách các tế bào.

• **Phương pháp enzyme**

Phân tách bằng enzyme proteolytic là một phương pháp thường được sử dụng để tách tế bào. Phương pháp enzyme có những lợi thế như dễ sử dụng, giảm nguy cơ nhiễm bẩn, và không yêu cầu thiết bị chuyên dụng, mặc dù chi phí của enzyme có thể khá lớn với các phòng thí nghiệm tham gia vào quy mô lớn sản xuất tế bào gốc. Tuy nhiên, hầu hết các protein bề mặt và các thành phần ma trận ngoại bào đều bị phân hủy trong quá trình tiêu hóa bằng enzym.

- *Trypsin*

Năm 1916, Rous và Jones đã sử dụng "bột trypsin của Merck, Brubler và Kahlbaum" để phân giải các cục huyết tương trong tế bào sống để thu được huyền phù tế bào cho quá trình cấy truyền. Vogelaar và Erlichman vào năm 1934 là những nhà nghiên cứu tiếp theo sử dụng các enzym tiêu hóa trong chế phẩm trypsin thô để hóa lỏng huyết tương đông tụ trước khi cấy truyền. Các kỹ thuật sử dụng trypsin tương tự như các kỹ thuật được sử dụng ngày nay đã được giới thiệu bởi Scherer, Syverton và Gey vào năm 1953 để thu hoạch dòng tế bào HeLa để cấy truyền và phân tích sinh hóa. Trước đây người ta cho rằng các chế phẩm trypsin chỉ đơn giản là thủy phân một chất liên kết có nguồn gốc protein chịu trách nhiệm cho sự gắn kết của các tế bào với chất nền, kết quả là tách tế bào ra khỏi bình nuôi cấy. Bây giờ người ta cảm thấy rằng cơ chế hoạt động của trypsin trong thu hoạch tế bào phức tạp hơn [52]. Trypsin có nhiều ứng dụng trong công nghệ và khoa học. Trong nuôi cấy tế bào động vật có vú, trypsin được dùng để phân tách tế bào với bề mặt nuôi cấy hoặc thu được những tế bào đơn lẻ từ các mô và cơ quan. Hơn nữa nó

được sử dụng dưới dạng thuốc xịt hoặc thuốc mỡ trong các phòng khám để loại bỏ các tế bào hoại tử [53].

Trypsin là một protease serine tuyến tụy với tính đặc hiệu cho các liên kết peptide liên quan đến nhóm carboxyl của các axit amin cơ bản, arginine và lysine, cụ thể nó phân cắt đầu cuối cacboxyl của các axit amin arginine và lysine. Có độ pH hoạt động tối ưu là khoảng 8 và nhiệt độ hoạt động tối ưu khoảng 37°C [54]. Cấu tạo của trypsin bao gồm một chuỗi polypeptit dài 223 axit amin có vị trí hoạt động tại axit amin His46 và Ser183. Nhiệt độ hoạt động tối ưu là 37°C. Trypsin là một trong những protease đặc hiệu cao nhất được biết đến, mặc dù nó cũng thể hiện một số hoạt tính esterase và amidase. Tách tế bào bằng enzym trypsin là một quy trình nuôi cấy tế bào thông thường. Trypsin được sử dụng để phá hủy các phân tử bám dính, chẳng hạn như liên kết giữa tế bào với tế bào và tế bào với chất nền. EDTA hoạt động như một chất chelator kim loại, phân hủy các ion Ca và Mg, được thêm vào dung dịch trypsin để tăng cường hoạt tính, cho phép trypsin thủy phân các liên kết peptit cụ thể. Vì vậy trypsin-EDTA được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu để phân tách tế bào [55]. Thời gian trypsin hóa có thể khác nhau tùy thuộc vào loại tế bào, mật độ tế bào, nồng độ huyết thanh và các yếu tố khác. Nồng độ trypsin được sử dụng dao động từ 0,05% đến 0,5% [56]. Tuy nhiên, tiếp xúc quá lâu với trypsin là nguyên nhân phổ biến khiến tế bào bị mất các protein bề mặt, nặng hơn là khiến tế bào bị ly giải. Ngoài ra, trypsin làm giảm protein trên màng tế bào, góp phần đẩy nhanh quá trình lão hóa tế bào. Tsuji và cộng sự đã chứng minh rằng quá trình phân tách bằng Trypsin có thể làm giảm đáng kể mức độ biểu hiện các kháng nguyên (bao gồm CD55) có trong tế bào gốc trung mô (MSC). Ngoài tổn thương bề mặt đối với tế bào, trypsin còn tạo ra tổn thương bên trong, chẳng hạn như thoái hóa polyribosome [57].

- *TrypLE Express*

TrypLE Express là một protease tái tổ hợp được tạo ra bằng quá trình lên men. Nó không chứa các thành phần có nguồn gốc từ động vật và người, đã được chứng minh là có hiệu quả trong việc tách nhiều tế bào động vật có vú. Nó được biết đến là một protease serine có hoạt tính giống trypsin (tức là nó phân cắt ở hai vị trí axit amin giống nhau - arginine và lysine - như trypsin và có hoạt tính pH tương tự) [58]. Tuy nhiên, TrypLE thể hiện độc tính tế bào thấp

hơn so với trypsin. Mặc dù thông tin chi tiết như nguồn gốc của cDNA và phương pháp sản xuất chưa được nhà sản xuất tiết lộ. Enzyme này hiện đang được sử dụng rộng rãi để tách MSC khỏi các đĩa nuôi cấy cho liệu pháp cấy ghép vì enzyme này được chứng nhận là nguồn không có động vật [59]. Tốc độ tách tế bào phụ thuộc vào dòng tế bào cũng như điều kiện nuôi cấy và có thể mất từ 2 phút (tế bào HEK293F được nuôi cấy trong DMEM + 5% FCS) đến 11 phút (tế bào PK-15 được nuôi cấy trong OptiPro™) đến 27 phút (PK-15 tế bào được nuôi cấy trong EMEM + 10% FCS) (www.invitrogen.com).

Tương tự như trypsin, TrypLE express đã được chứng minh là có ảnh hưởng đến tế bào phụ thuộc vào thời gian tiếp xúc. Nghiên cứu của Kunikazu Tsuji và cộng sự cho thấy sự biểu hiện kháng nguyên bề mặt CD44+, CD49c+, CD73+, CD140a+ và CD140b+ của tế bào MSC đã giảm đáng kể khi tiếp xúc với TrypLE express trong 60 phút. Trong khi đó, khi tiếp xúc với TrypLE trong 30 phút, không quan sát thấy sự giảm biểu hiện kháng nguyên bề mặt [59].

1.2.3. Một số nghiên cứu về các chất phân tách tế bào

Quá trình tách tế bào là điều cần thiết trong việc nuôi cấy và tăng sinh tế bào. Vì vậy trên thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng, các nhà khoa học đã nghiên cứu và đánh giá một số phương pháp tách, mỗi phương pháp đều có ưu và nhược điểm riêng và phù hợp với từng loại tế bào. Năm 1958, L. Weiss đánh giá ảnh hưởng của trypsin lên kích thước, khả năng sống và khối lượng khô của tế bào Sarcoma 37. Kết quả cho thấy trypsin làm giảm đáng kể khối lượng khô của tế bào so với kích thước và khả năng sống [60]. Đến năm 2017, trong bài nghiên cứu về đánh giá tác động của các phương pháp tách đến khả năng tồn tại và biểu hiện marker bề mặt của tế bào MSC ở bao hoạt dịch, Kunikazu Tsuji và cộng sự [59] đã chứng minh trypsin, TrypLE và collagenase có các mức độ ảnh hưởng khác nhau lên tế bào MSC bao hoạt dịch ở các khoảng thời gian khác nhau. Trysin là chất có mức độ ảnh hưởng nhiều nhất đối với các protein bề mặt tế bào. Gần đây nhất vào năm 2022, các nhà nghiên cứu tại Đại học quốc gia Đài Loan đã đánh giá ảnh hưởng của các phương pháp tách tế bào lên sự biểu hiện bề mặt của thụ thể Fas và phối tử Fas. Kết quả chứng minh việc sử dụng accutase để phân tách các tế bào đã làm tổn hại đến sự biểu hiện của các phối tử Fas và các thụ thể Fas trên bề mặt tế bào [45]. Tại Việt Nam, chưa có nhiều nghiên cứu tối ưu các phương pháp tách.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI NGHIÊN CỨU, NGUYÊN VẬT LIỆU

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu mô dây rốn được cung cấp từ bệnh viện phụ sản Hà Nội. Tế bào gốc trung mô được phân lập tại phòng lab Trung tâm nghiên cứu ứng dụng tế bào gốc và liệu pháp gen, Viện Công nghệ Sinh học.

0,25% Trypsin-EDTA, TrypLE, được cung cấp từ các hãng uy tín trên thế giới.

2.1.2. Hóa chất, dụng cụ và vật tư tiêu hao

Đệm PBS, FBS (Fetal Bovine Serum, ATCC Mỹ), Alizarin đỏ, môi trường DMEM high glucose, ethanol, chloroform, trypan blue stain (0,4% - Gilco, Mỹ), STEMdiff Trilineage Differentiation Kit, 4% paraformaldehyde, chai nuôi cấy, đĩa 24 giếng, đĩa 12 giếng, đĩa nuôi cấy (Corning, Mỹ), bộ kit MSC phenotyping (CD14-PE, CD19-PE, CD34-PE, CD45-PE, CD73-APC, CD90-FITC, anti-HLA-DR-VioGreen) và các hóa chất vật tư khác được cung cấp từ các hãng có uy tín trên thế giới.

2.1.3. Thiết bị sử dụng chính

Phòng sạch, kính hiển vi Olympus CKX53 (Nhật Bản), máy ly tâm Gyrozen (Hàn Quốc), tủ ấm CO₂, bể ổn nhiệt, máy ly tâm Eppendorft máy đếm dòng chảy tế bào, buồng đếm hồng cầu, box nuôi cấy tế bào,...

2.1.4. Địa điểm nghiên cứu

Trung tâm nghiên cứu và ứng dụng tế bào gốc và liệu pháp gen - Viện Công nghệ sinh học, viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phân lập tế bào gốc trung mô từ dây rốn

Mẫu dây rốn sau khi thu nhận được bảo quản trong dung dịch nước muối sinh lý và được chuyển ngay đến phòng thí nghiệm. Mẫu được rửa lại bằng dung dịch PBS bổ sung 1% kháng sinh cho đến khi sạch máu. Sau đó dây rốn được cắt thành các đoạn nhỏ có kích thước khoảng 2-4 cm. Các đoạn này được tách bỏ động mạch, tĩnh mạch và cắt thành các mảnh mô nhỏ với kích thước 2-3 mm³. Các mảnh mô sẽ được chuyển vào ống ficol 50 mL và bổ sung thêm collagenase theo tỷ lệ 1:1. Sau đó đưa ống vào máy lắc tốc độ

150 v/p ở nhiệt độ 37°C trong 3 giờ. Tiếp theo đưa ống fancol đi ly tâm, loại bỏ phần dịch nổi phía trên cùng, chỉ giữ lại lớp huyền phù ở giữa. Dịch huyền phù sau ly tâm sẽ cho qua màng lọc được sử dụng để loại bỏ một số tế bào không phải MSC. Cuối cùng, lượng dịch sau khi lọc được đưa vào đĩa nuôi, bổ sung thêm môi trường tối ưu cho MSC, ủ trong tủ ấm 37°C 5% CO₂. Sự phát triển của tế bào được quan sát dưới kính hiển vi.

2.2.2. Nuôi cấy tế bào

Tế bào MSC được nuôi cấy trong môi trường DMEM (DMEM bổ sung 10% FBS, 1% penicillin và Streptomycin - Gibco, Mỹ) nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂. Tế bào được nuôi cấy đến khi đạt được mật độ khoảng 90% diện tích bề mặt nuôi cấy, tiến hành cấy chuyển mới để tiến hành cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.3. Đánh giá khả năng phân tách của các enzyme lên tế bào UC-MSC

Để đánh giá khả năng phân tách của enzyme cần so sánh hình ảnh tế bào trước và sau khi tiếp xúc. Sau khi tế bào đạt 90% diện tích nuôi cấy, môi trường nuôi cấy được loại bỏ và rửa tế bào 2 lần bằng dung dịch đệm PBS. Chụp ảnh tế bào sau khi rửa làm hình ảnh đối chứng trước khi sử dụng chất tách. Sau đó bổ sung trypsin hoặc TrypLE vào từng đĩa, đặt trong tủ ấm trong các khoảng thời gian khác nhau: 5 phút, 30 phút, 60 phút, 120 phút. Tiếp theo, tế bào được bổ sung thêm môi trường để bất hoạt enzyme và thu tế bào các ống fancol. Chụp ảnh đĩa nuôi để làm hình ảnh so sánh sau khi tiếp xúc với các chất phân tách.

2.2.4. Xác định số lượng và tỷ lệ sống sót của UC-MSC sau khi xử lý với chất phân tách

Phương pháp nhuộm trypan blue được sử dụng để đánh giá tổng số tế bào và tỷ lệ sống/chết. Tế bào sau khi tái huyền phù nhờ trypsin hoặc TrypLE sẽ được ly tâm ở 1500 rpm trong 5 phút, sau đó hút loại bỏ dịch, thêm môi trường nuôi cấy để tái huyền phù tế bào. Cuối cùng lấy 10 µl dịch tế bào và thêm 10 µl 0,4% trypan blue để nhuộm. Lấy 10 µl dịch tế bào đã nhuộm cho lên buồng đếm hồng cầu và đếm. Những tế bào không bắt màu thuốc nhuộm là những tế bào còn sống, những tế bào bắt màu xanh là tế bào đã chết.

2.2.5. Đánh giá biểu hiện các marker bề mặt của MSC sau khi xử lý với chất phân tách

Cố định tế bào: Tế bào được tái huyền phù và ly tâm ở 1500 vòng/phút trong 5 phút. Dịch tế bào được loại bỏ, bổ sung thêm PBS và ly tâm 1500 vòng/phút trong 5 phút, lặp lại bước rửa này 2 lần. Cố định tế bào bằng 95% methanol lạnh trong 15 phút ở 4°C. Sau bước cố định, rửa tế bào bằng PBS và ly tâm tương tự như các bước bên trên 2 lần. Cuối cùng dịch tế bào sau rửa được bổ sung PBS để duy trì và tiến hành gắn kháng thể.

Gắn kháng thể: Chia các mẫu thành 2 ống dịch tế bào bằng nhau ghi nhãn isotype và mix, ly tâm và loại bỏ dịch ở 1500 rpm trong 10 phút. Lần lượt thêm 95 µl bufer và 5 µl kháng thể tương ứng với từng nhãn ống. Các ống được để trong bóng tối, nhiệt độ từ 2-8°C trong vòng 15 phút. Sau khi ủ, các ống được cho ly tâm 1500 rpm trong 10 phút, loại bỏ dịch và rửa 2 lần bằng dung dịch buffer, ly tâm 1500 rpm trong 10 phút, trước khi cho vào máy đếm dòng chảy tế bào để phân tích.

2.2.6. Thí nghiệm khả năng biệt hóa và nhuộm phát hiện biệt hoá của MSC

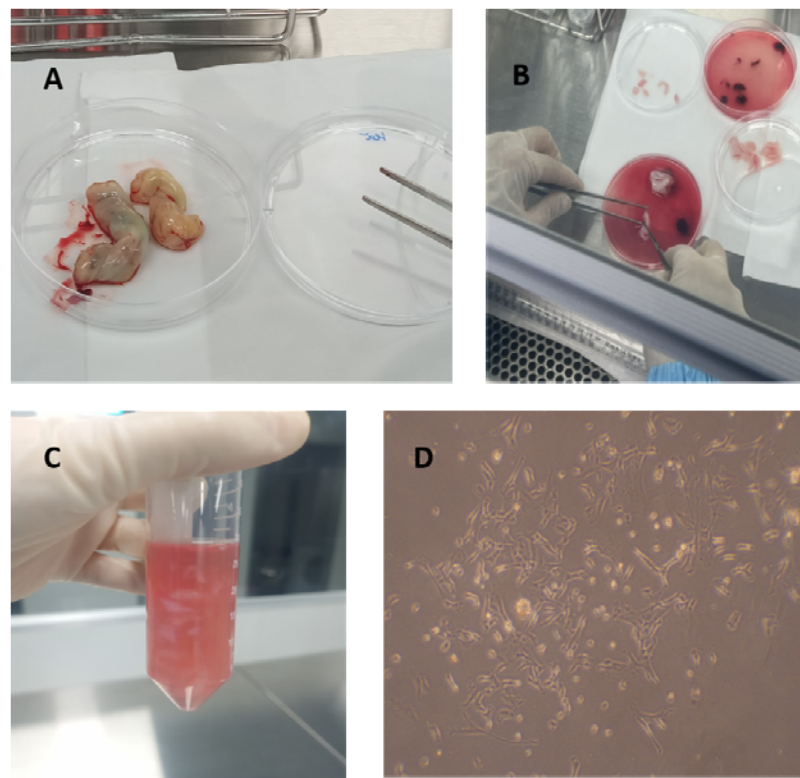
Nuôi cấy tế bào: các tế bào được cấy vào đĩa 24 giếng với mật độ 10^4 tế bào/cm² trong môi trường nuôi cấy cơ bản. Sau khi mật độ bao phủ của tế bào khoảng 50-70%, tiến hành bổ sung môi trường biệt hóa nguyên bào xương (StemMACS OsteoDiff media) vào các giếng trừ giếng đối chứng. Môi trường được thay 2 ngày một lần. Đến ngày thứ 14, các giếng sẽ được nhuộm Alizarin Red để thấy được sự biệt hóa rõ rệt nhất khi quan sát dưới kính hiển.

Phương pháp nhuộm biệt hóa: Nhuộm các nguyên bào xương qui trình được thực hiện như sau tế bào được rửa 2 lần bằng dung dịch PBS, sau đó cố định bằng paraformaldehyde 4% trong vòng 15 phút, rồi rửa lại 2 lần với PBS và nhuộm bằng Alizarin Red trong 45 phút và đặt đĩa trong bóng tối. Sau khoảng thời gian nhuộm, các giếng sẽ được rửa thuốc nhuộm bằng PBS đến khi quan sát thấy không còn cặn của thuốc nhuộm. Sau đó quan sát tế bào dưới kính hiển vi đảo ngược. Các giếng có tế bào biệt hóa sẽ bắt màu đỏ cam với thuốc nhuộm, trong đó giếng đối chứng tế bào không biệt hóa nên thuốc nhuộm bị rửa trôi, không bắt màu thuốc nhuộm.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. PHÂN LẬP TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ DÂY RÓN

Dây rón được bảo quản trong dung dịch PBS bổ sung 1% kháng sinh. Trước khi tiến hành phân lập, mẫu dây rón cần được xử lý hết máu bằng PBS 2 đến 3 lần (Hình 3.1A). Sau đó, phần tĩnh mạch và động mạch bên trong dây rón được loại bỏ bằng dao phẫu thuật, đồng thời cắt nhỏ dây rón thành những mảnh mô 2-4 cm² nhằm tăng diện tích tiếp xúc giữa mô và enzyme, tăng hiệu quả phân lập (Hình 3.1 B). Tiếp theo, các mảnh mô dây rón được rửa bằng dung dịch PBS, rồi bổ sung thêm enzyme collagenase với tỷ lệ 1 :1, ủ trong máy lắc 37°C trong vào 3 giờ (Hình 3.1 C). Cuối cùng hỗn hợp sau khi ủ enzyme được lọc quang màng lọc và chuyển vào đĩa nuôi cấy. Các tế bào bám dính xuống bề mặt nuôi cấy sẽ được nuôi cấy đến P3 trong điều kiện 5% CO₂, 37°C trước khi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo hoặc bảo quản trong nito lỏng.



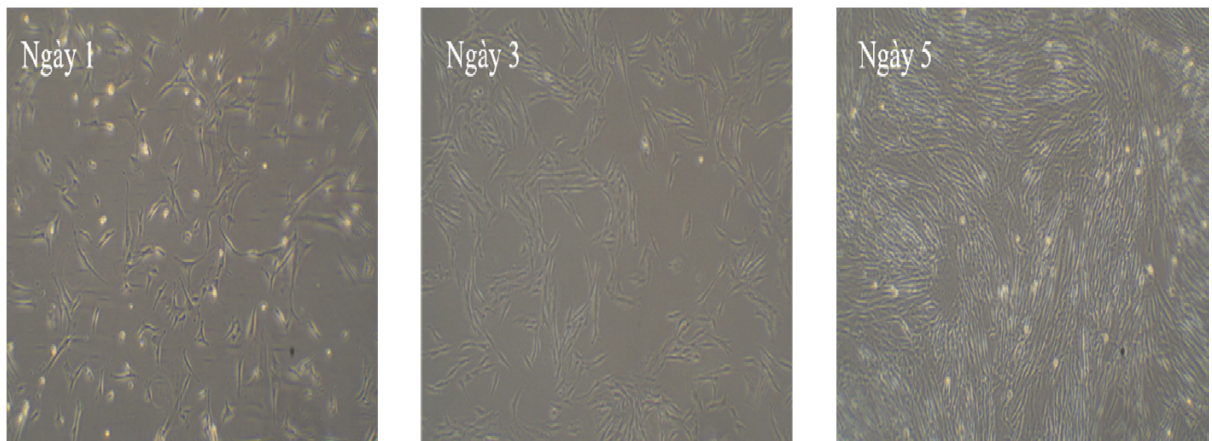
Hình 3.1. Quá trình phân lập MSC từ dây rón.

A. Mẫu dây rón được bảo quản và rửa sạch bằng dung dịch đệm PBS (thêm 1% kháng sinh), B. Loại bỏ động mạch và tĩnh mạch trong dây rón, C. Mô dây rón sau khi được ủ trong collagenase 3 giờ, D. Nuôi cấy tế bào MSC (độ phóng đại 40X)

Kết quả phân lập tế bào gốc từ dây rốn như trên hình 3.1D cho thấy tế bào sau khi phân lập đã phát triển ổn định, có khả năng bám vào bề mặt chai nuôi cấy, có khả năng tăng sinh và hình thái ban đầu giống với tế bào gốc trung mô.

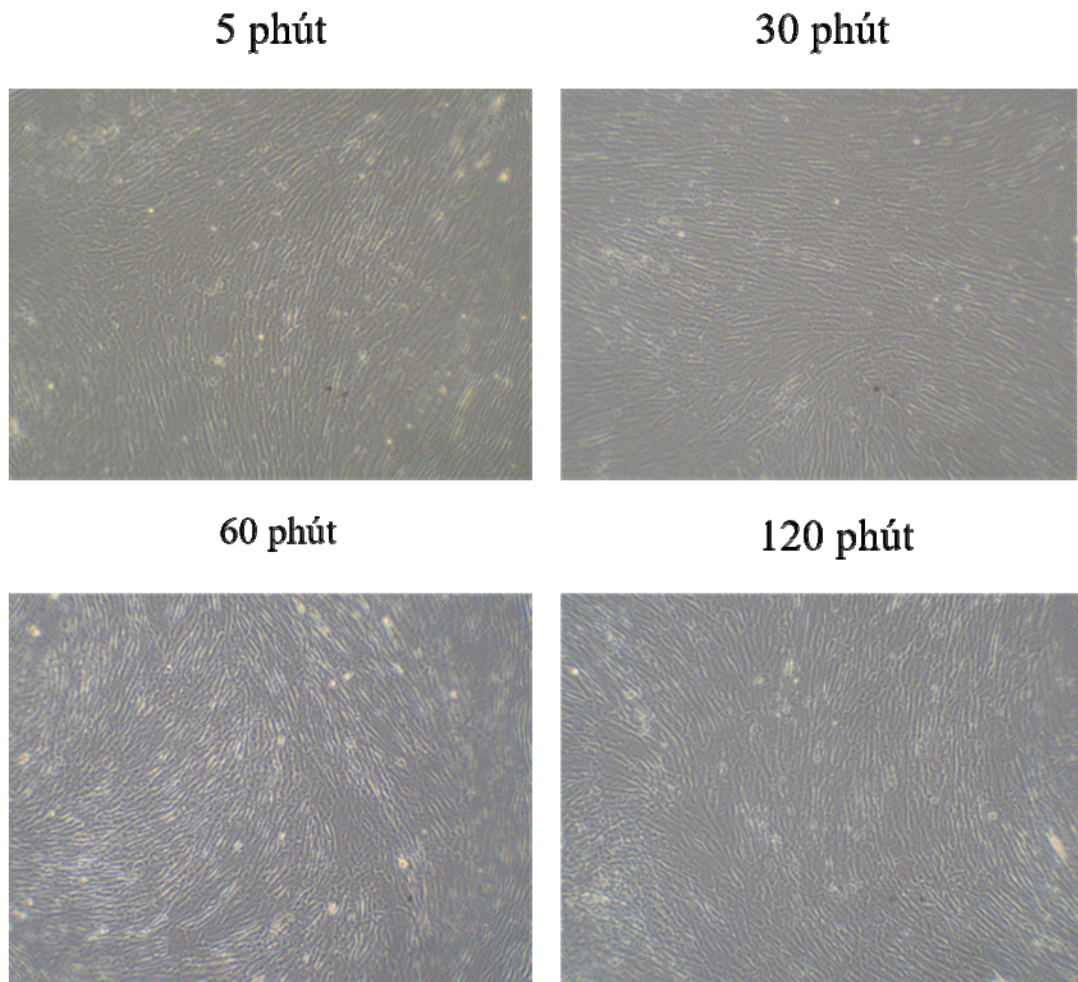
3.2. NUÔI CẤY TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ

Nhằm đánh giá chi tiết hơn hình thái và sự phát triển của tế bào sau khi phân lập, UC-MSC được cấy chuyển và đưa về cùng mật độ. Tế bào được cấy vào các đĩa ở mật độ giống nhau 10000 tế bào/cm² trong môi trường nuôi cấy cơ bản ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Tế bào có hình thái giống nguyên bào sợi, thuôn dài ở hai đầu và không có dấu hiệu nhiễm khuẩn nào được phát hiện.. Tế bào được thay môi trường 2 ngày một lần và được quan sát theo dõi bằng kính hiển vi. Khi mật độ tế bào đạt 90% diện tích nuôi cấy, tế bào được cấy chuyển để tiến hành thí nghiệm tiếp theo (Hình 3.2).



Hình 3.2. Quá trình nuôi cấy tế bào gốc trung mô. Hình ảnh tế bào được chụp ở độ phóng đại 40X

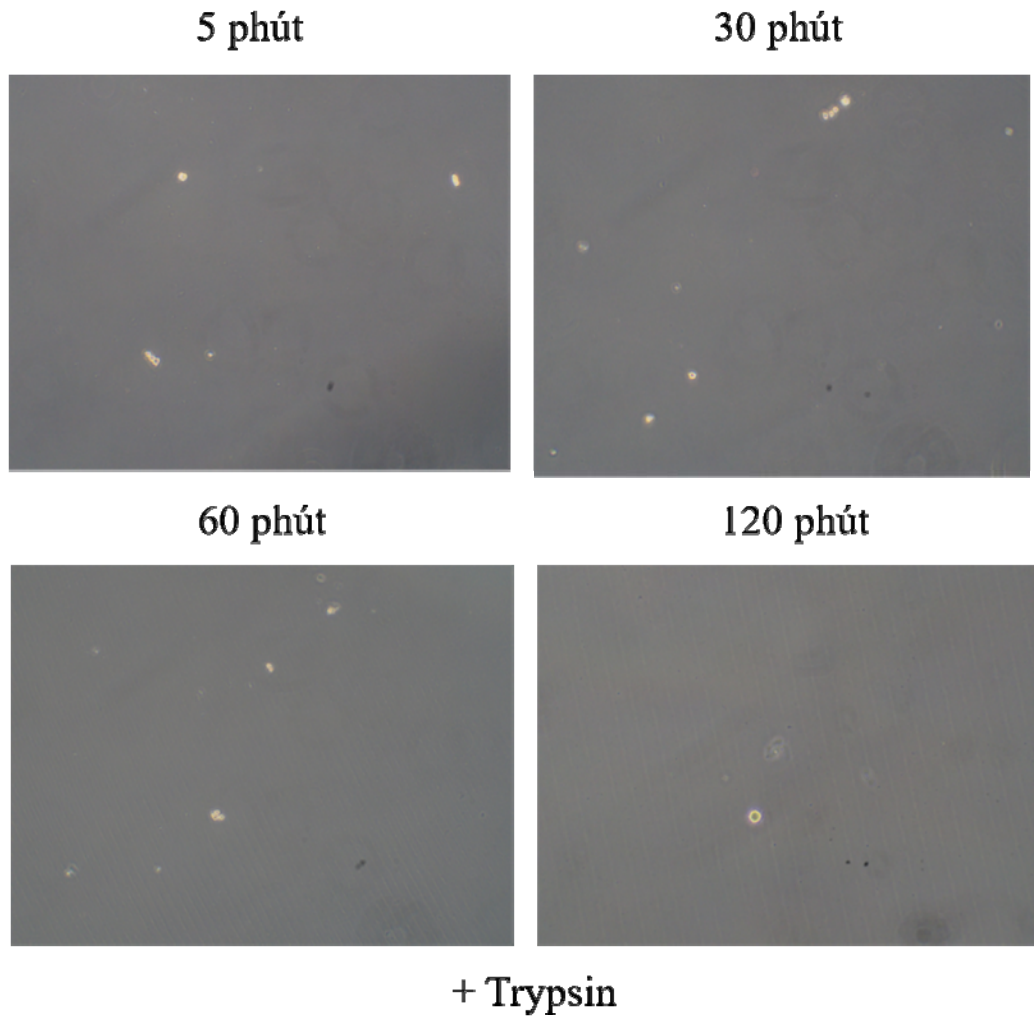
3.3. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÂN TÁCH CỦA TRYPSIN VÀ TRYPLE LÊN TẾ BÀO UC-MS



- Trypsin

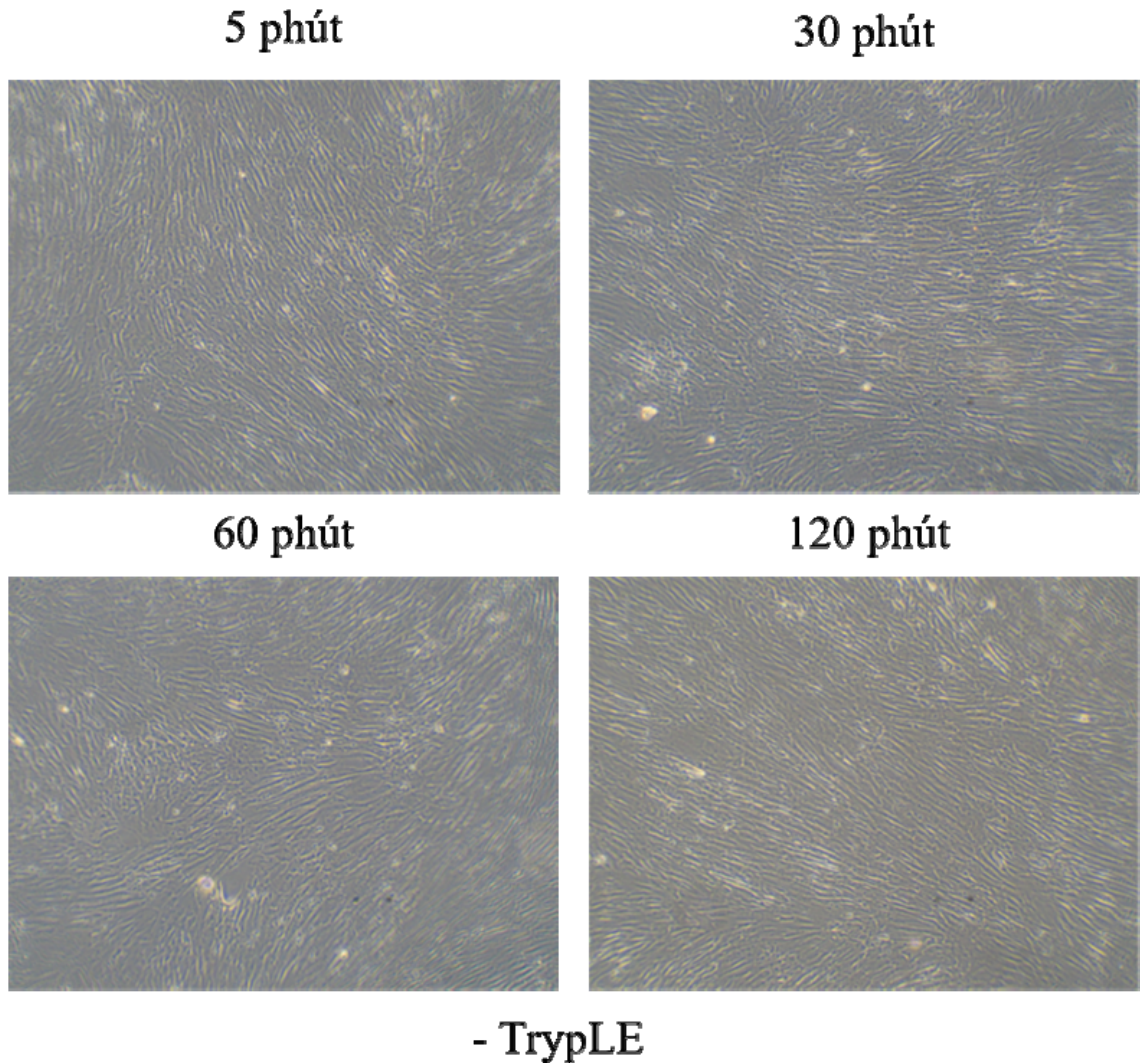
Hình 3.3. Hiệu quả phân tách tế bào của trypsin ở các thời gian khác nhau. Hình ảnh tế bào trước khi không tiếp xúc với enzyme trypsin sau 5 ngày nuôi cấy và được chụp ở độ phóng đại 40X

Sau 5 ngày nuôi cấy, trước khi bổ sung các chất phân tách, hình ảnh đối chứng trước khi bổ sung trypsin đều cho thấy tế bào ở đều đạt mật độ 100%, hình thái giống với nguyên bào sợi điển hình của MSC. Tế bào bám dính đều trên bề mặt đĩa tạo thành một lớp đơn tế bào. Tế bào được cấy ban đầu vào các đĩa ở mật độ giống nhau, điều kiện nuôi cấy ở 37°C, 5% CO₂ đảm bảo tính đồng nhất của thí nghiệm (Hình 3.3).



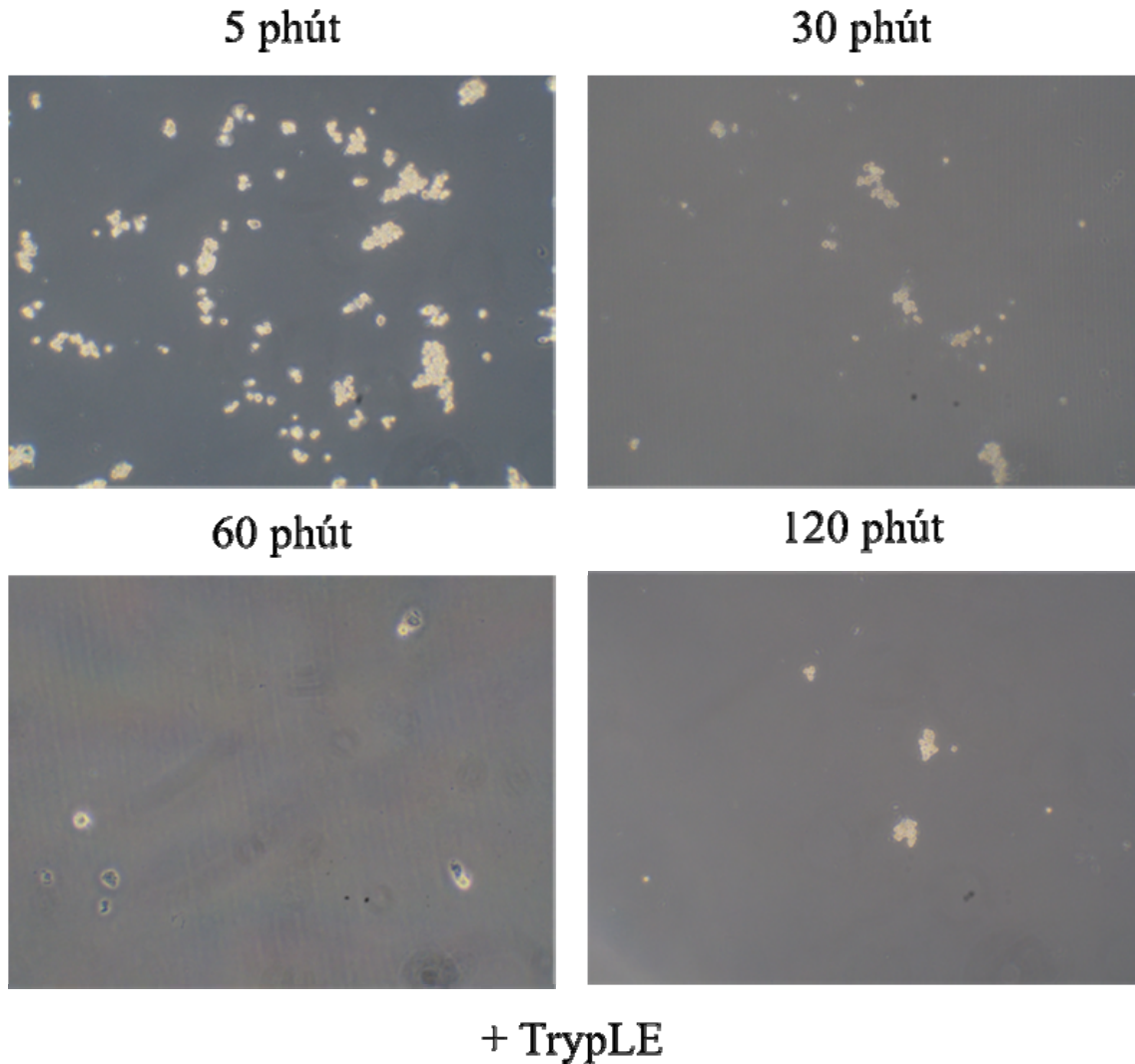
Hình 3.4. Hiệu quả phân tách tế bào của trypsin ở các thời gian khác nhau sau 5 ngày nuôi cấy. Hình ảnh tế bào sau khi tiếp xúc với enzyme trypsin và được chụp ở độ phóng đại 40X

Sau khi bổ sung trypsin, ngay ở 5 phút hầu hết tế bào đều đã bong ra khỏi bề mặt nuôi cấy thành từng tế bào riêng biệt. Hình thái tế bào ở dạng hình cầu sau khi tế bào bong lên khỏi bề mặt nuôi cấy. Kết quả cũng tương tự với các thời gian 30 phút, 60 phút và 120 phút. Như vậy, trypsin đã phân tách tế bào ra khỏi bề mặt đĩa nuôi cấy ngay từ khi ủ 5 phút. Bước đầu không nhận thấy sự khác biệt có ý nghĩa nào về hình thái và số lượng tế bào được phân tách ra khỏi đáy chai nuôi cấy (Hình 3.4).



Hình 3.5. Hiệu quả phân tách tế bào của TrypLE ở các khoảng thời gian khác nhau sau 5 ngày nuôi cấy. Hình ảnh tế bào khi chưa tiếp xúc với enzyme TrypLE và được chụp ở độ phóng đại 40X

Sau 5 ngày nuôi cấy, trước khi bổ sung các chất phân tách, hình ảnh đối chứng trước khi bổ sung TrypLE đều cho thấy tế bào ở đều đạt mật độ 100%, hình thái giống với nguyên bào sợi điển hình của MSC. Tế bào bám dính đều trên bề mặt đĩa tạo thành một lớp đơn tế bào. Tế bào được cấy ban đầu vào các đĩa ở mật độ giống nhau, điều kiện nuôi cấy ở 37°C, 5% CO₂ đảm bảo tính đồng nhất của thí nghiệm (Hình 3.5).

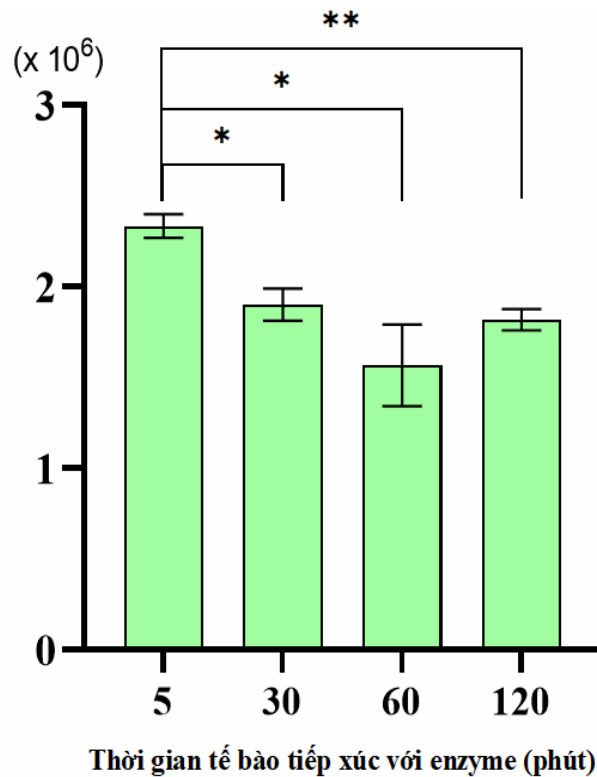


Hình 3.6. Hiệu quả phân tách tế bào của TrypLE ở các khoảng thời gian khác nhau sau 5 ngày nuôi cấy. Hình ảnh tế bào sau khi tiếp xúc với enzyme TrypLE và được chụp ở độ phóng đại 40X

Sau khi bổ sung TrypLE, ở 5 phút một lượng tế bào vẫn còn sót lại trên bề mặt đĩa, hình thái tế bào ở dạng hình cầu, tạo thành từng cụm. Tế bào tách ra gần hết sau 30 phút xử lý, lúc nào trên bề mặt đĩa gần như có khá ít tế bào. Tuy nhiên, những tế bào còn sót lại vẫn tạo thành các cụm nhỏ. Kết quả cũng tương tự với các khoảng thời gian 60 phút và 120 phút. Như vậy, TrypLE cần tới 30 phút để phân tách được hầu hết tế bào ra khỏi bề mặt nuôi cấy (Hình 3.6).

3.4. XÁC ĐỊNH SỐ LƯỢNG VÀ TỶ LỆ SỐNG/CHẾT CỦA TẾ BÀO

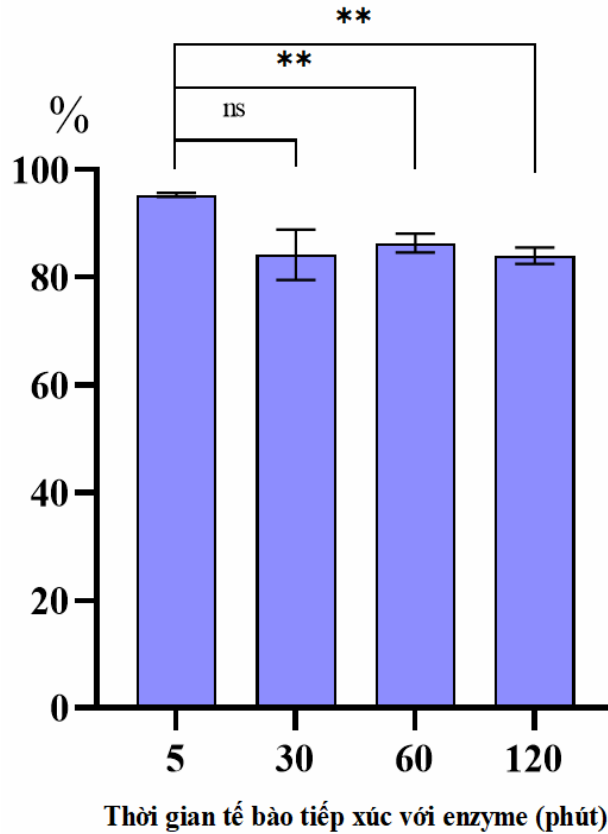
3.4.1. Số lượng và tỷ lệ sống/chết của tế bào sau khi tiếp xúc với trypsin



Hình 3.7. Số lượng tế bào thu được sau khi sử dụng trypsin phân tách ở 5, 30, 60 và 120 phút. Thí nghiệm lặp lại 3 lần, với độ lệch chuẩn trung bình (SEM), thống kê sự sai khác bằng tính bằng phần mềm GraphPad Prism.

******0.001 < P < 0,01; *****0.01 < P < 0,05, *ns* P > 0,05 so sánh với khoảng thời gian 5 phút

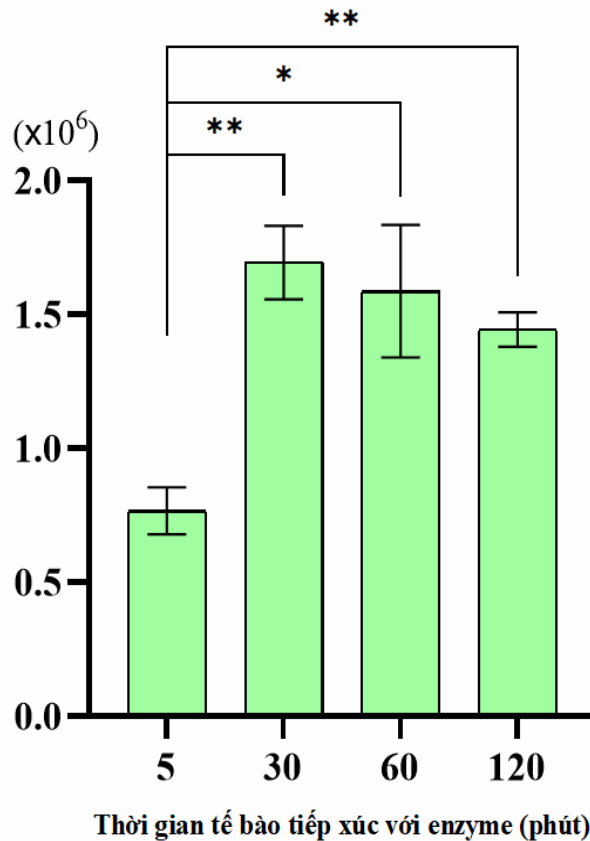
Lượng tế bào thu được nhiều nhất ở 5 phút (trung bình $2,45 \times 10^6 \pm 0,11$ tế bào) và giảm dần thấp nhất ở 60 phút (trung bình $1,57 \times 10^6 \pm 0,39$ tế bào). Số lượng tế bào thu được sau khi xử lý trypsin 30 phút và 120 phút tương đương nhau lần lượt là $1,9 \times 10^6 \pm 0,15$ và $1,82 \times 10^6 \pm 0,1$ tế bào (Hình 3.7).



Hình 3.8. Số lượng tế bào UC-MSC sống (%) sau khi sử dụng trypsin phân tách ở 5, 30, 60 và 120 phút. Thí nghiệm lặp lại 3 lần, với độ lệch chuẩn trung bình (SEM), thống kê sự sai khác bằng tính bằng phần mềm GraphPad Prism. ****** $0.001 < P < 0,01$; $*0.01 < P < 0,05$, *ns* $P > 0,05$ so sánh với khoảng thời gian 5 phút.

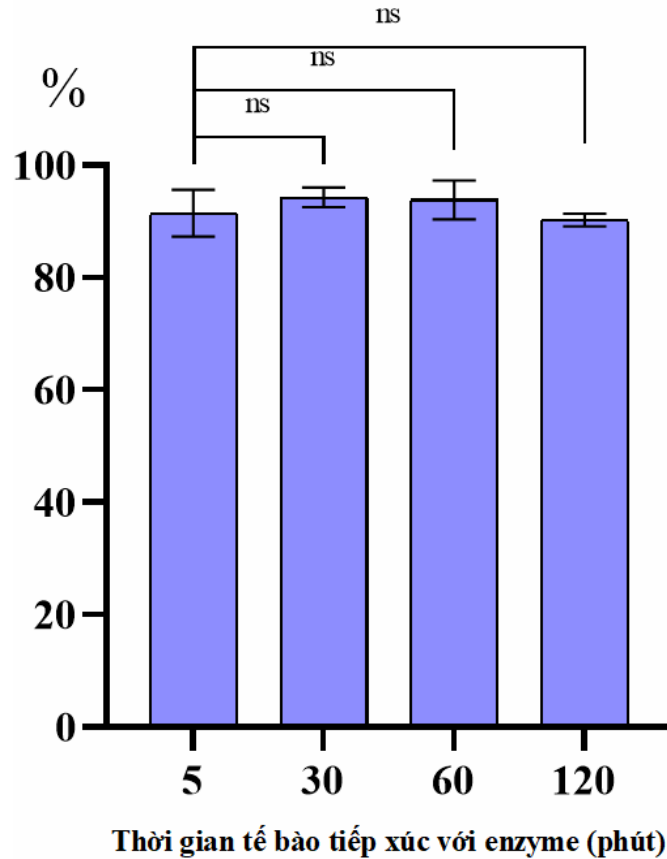
Như kết quả trên biểu đồ có thể thấy tỷ lệ tế bào sống cao nhất ở nhóm xử lý trypsin 5 phút (khoảng 95,35%) và giảm dần ở 3 nhóm còn lại. Cụ thể nhóm trypsin 30 có giá trị 84,23% (giảm 11,12% so với nhóm trypsin 5 phút), nhóm trypsin 60 phút có giá trị 86,42% (giảm 8,93% so với nhóm trypsin 5 phút) và cuối cùng là nhóm trypsin 120 phút với 84,04% (giảm 11,31% so với nhóm trypsin 5 phút). Như vậy sau khi xử dụng trypsin để phân tách tế bào UC-MSC, tỷ lệ phần trăm số tế bào sống sót giảm dần khi thời gian xử lý tăng lên (Hình 3.8).

3.4.2. Số lượng và tỷ lệ sống/chết của tế bào sau khi tiếp xúc với TrypLE



Hình 3.9. Số lượng tế bào thu được sau khi sử dụng TrypLE phân tách ở các khoảng thời gian 5, 30, 60 và 120 phút. Thí nghiệm lặp lại 3 lần, với độ lệch chuẩn trung bình (SEM), thống kê sự sai khác bằng tính bằng phần mềm GraphPad Prism. ***0.001 < P < 0,01; *0.01 < P < 0,05, ns P > 0,05 so sánh với khoảng thời gian 5 phút.*

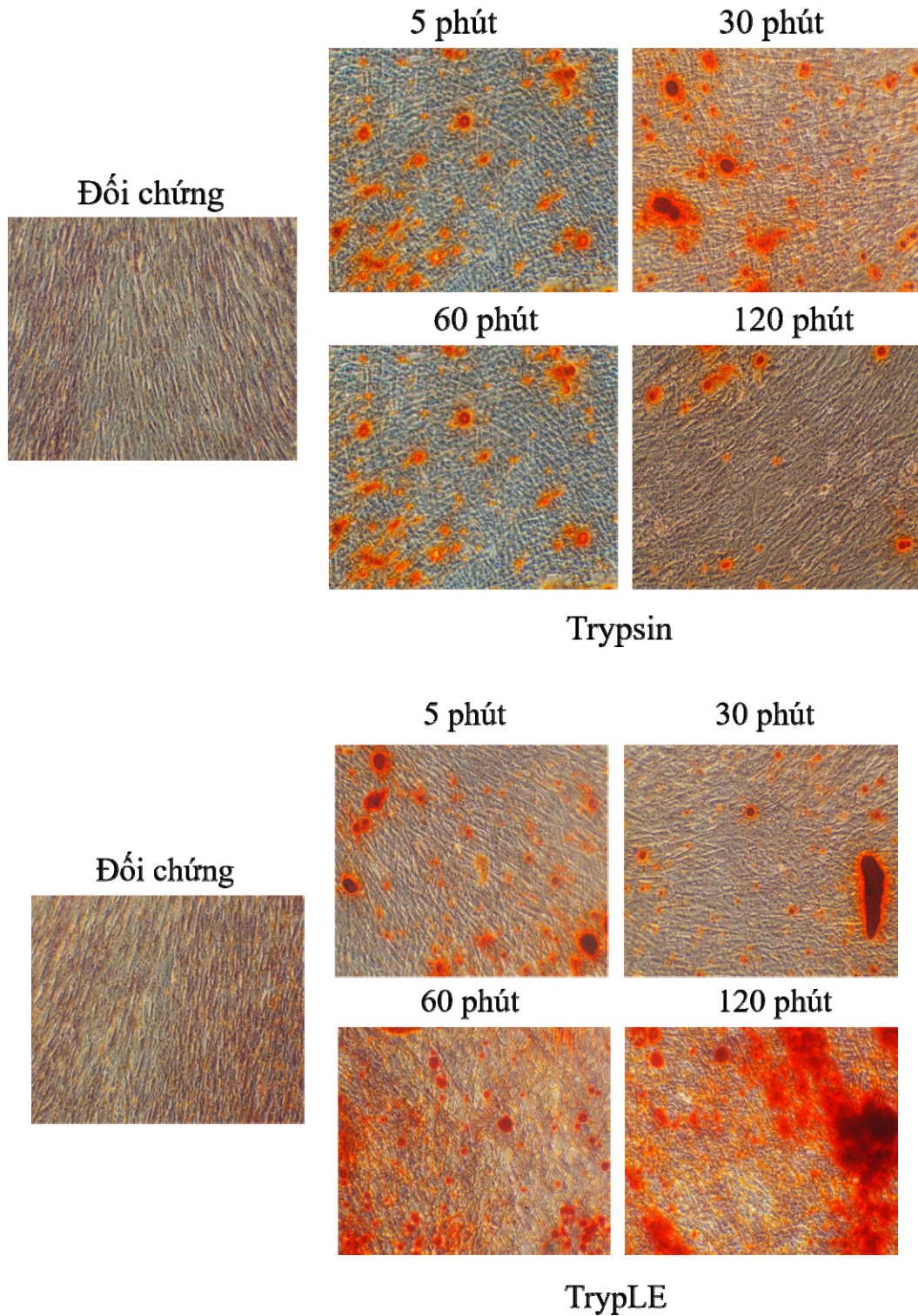
Tương tự với kết quả hình ảnh chụp bằng kính hiển vi quan sát thấy mốc thời gian 5 phút vẫn còn tế bào sót lại trên đĩa nuôi cấy. Vì vậy số lượng tế bào thu được ở nhóm 5 phút là thấp nhất (trung bình $0,77 \times 10^6 \pm 0,15$ tế bào) và cao nhất ở nhóm 30 phút với $1,69 \times 10^6 \pm 0,24$ tế bào. Tiếp theo là nhóm xử lý TrypLE 60 phút và 120 phút với số lượng tế bào thu được lần lượt là $1,58 \times 10^6 \pm 0,43$ tế bào và $1,44 \times 10^6 \pm 0,11$ tế bào. Sau khoảng mốc thời gian xử lý TrypLE 30 phút, số lượng tế bào giảm dần khi tăng thời gian tiếp xúc (Hình 3.9).



Hình 3.10 . Số tế bào UC-MS sống (%) sau khi sử dụng TrypLE phân tách ở các mốc thời gian 5, 30, 60 và 120 phút. Thí nghiệm lặp lại 3 lần, với độ lệch chuẩn trung bình (SEM), thống kê sự sai khác bằng tính bằng phần mềm GraphPad Prism. *ns* $P > 0,05$ so sánh với mốc thời gian 5 phút

Tỷ lệ số lượng tế bào sống sau khi tiếp xúc với TrypLE ở các nhóm đều cao hơn 90%. Mức độ chênh lệch giữa các nhóm không quá cao. Thấp nhất là nhóm xử lý TrypLE 120 phút (khoảng 90,27%) và cao nhất là nhóm xử lý TrypLE 30 phút 94,3%, chỉ chênh lệch 4,03%. Sự khác biệt giữa giá trị ở các nhóm thời gian không có giá trị thống kê ($P > 0,05$) (Hình 3.10).

3.5. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG BIỆT HÓA CỦA MSC THÀNH NGUYÊN BÀO XƯƠNG



Hình 3.11. Hình ảnh nhuộm biệt hóa của tế bào gốc trung mô sau khi xử lý với trypsin và TrypLE ở các mốc thời gian khác nhau. Hình ảnh tế bào được chụp ở độ phóng đại 40X

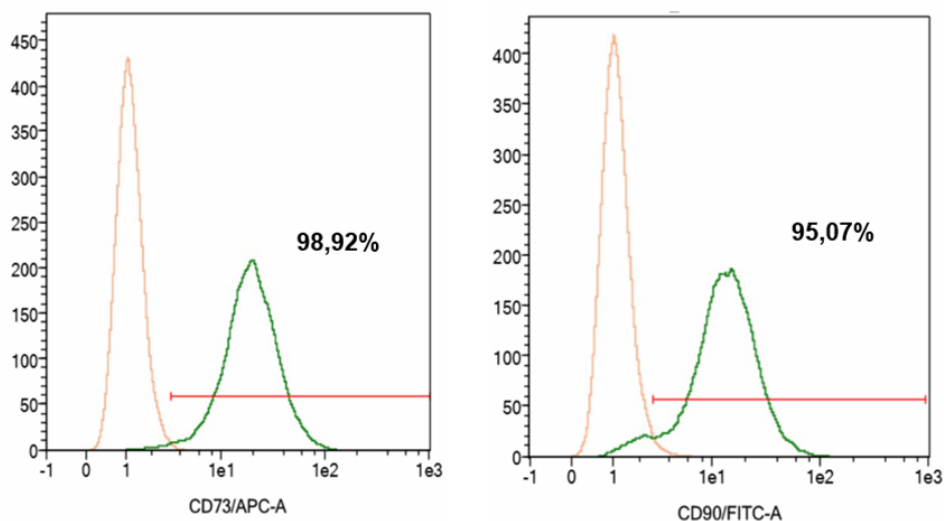
Kết quả hình ảnh 3.11 cho thấy có sự khác biệt giữa nhóm đối chứng (UC-MSC được nuôi cấy trong môi trường cơ bản và nhuộm Alizarin Red) và các nhóm xử lý chất phân tách (được nuôi cấy trong môi trường biệt hóa và nhuộm với Alizarin Red). MSC sau khi xử lý với trypsin và TrypLE ở tất cả các mốc thời gian đều biệt hóa thành nguyên bào xương và lượng canxi ngoại bào do tế bào tiết ra đã bắt màu thuốc nhuộm Alizarin Red (màu đỏ). Trong khi đó, nhóm đối chứng của trypsin và TrypLE đều không bắt màu thuốc nhuộm. Màu đỏ nhạt ở nhóm đối chứng là màu nền không phải màu đặc hiệu giống như trong các mẫu biệt hoá. Đặc biệt là hình thái có thể thấy rất rõ các cụm biệt hoá thành nguyên bào xương, còn ở đối chứng thì không xuất hiện các cụm nguyên bào xương đó.

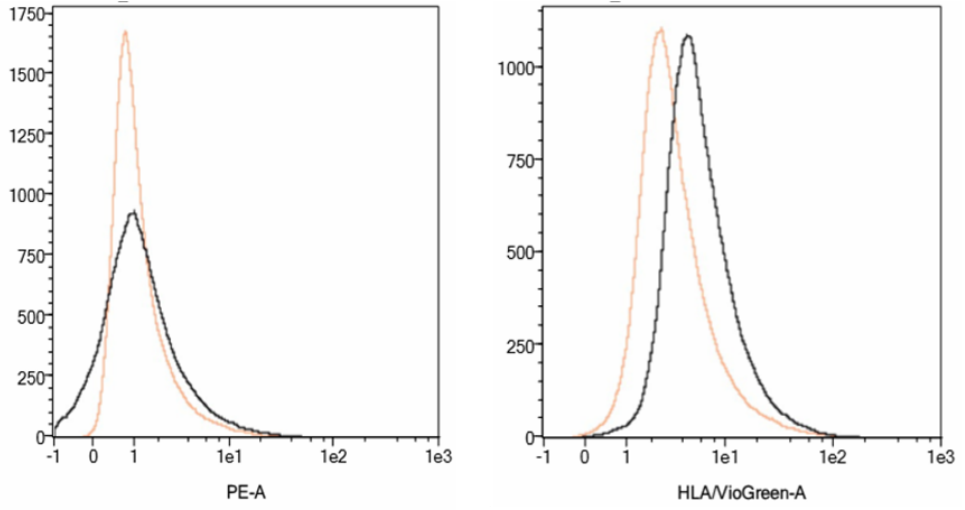
Như vậy, các mẫu tế bào UC-MSC xử lý với trypsin và TrypLE ở các thời gian khác nhau đều có khả năng biệt hoá thành nguyên bào xương.

3.6. ĐÁNH GIÁ BIỂU HIỆN CÁC MARKER BỀ MẶT CỦA TẾ BÀO MSC

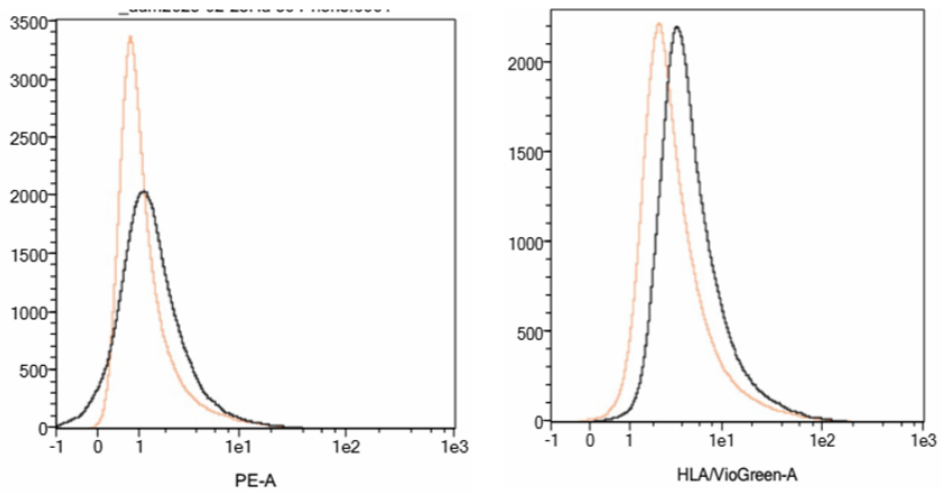
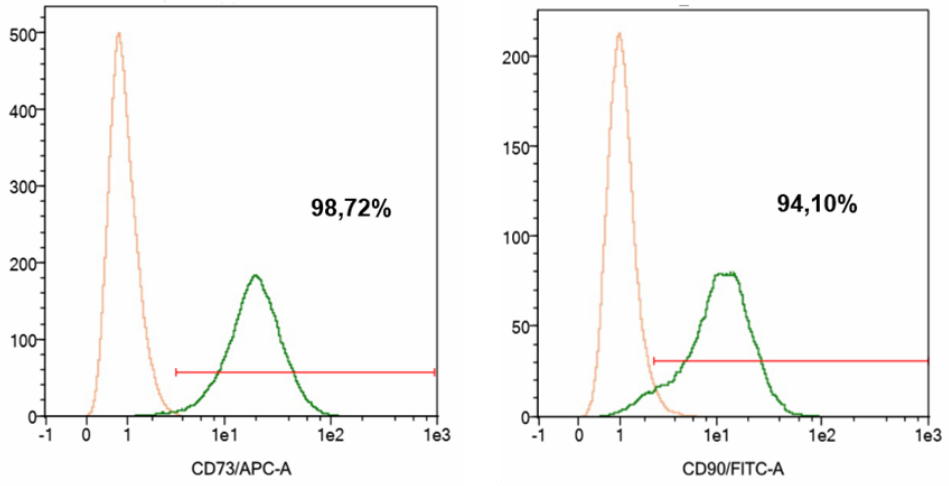
3.6.1. Đánh giá biểu hiện các marker bề mặt của tế bào MSC sau khi phân tách bằng trypsin

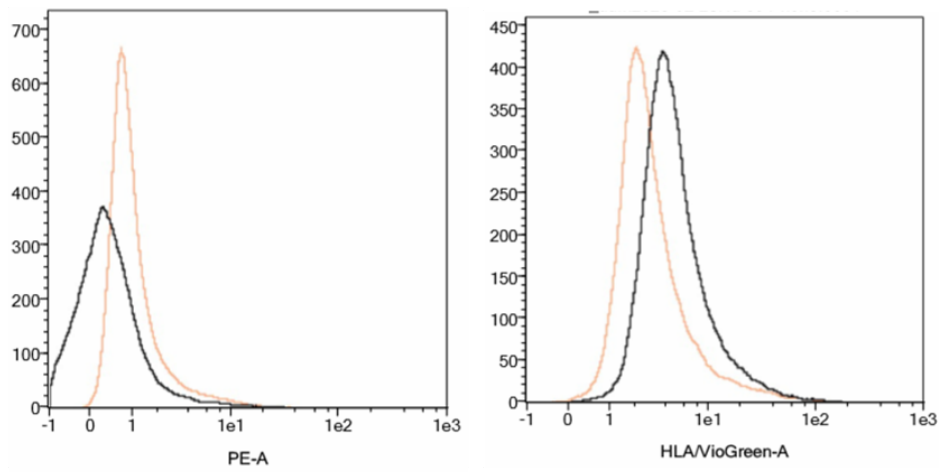
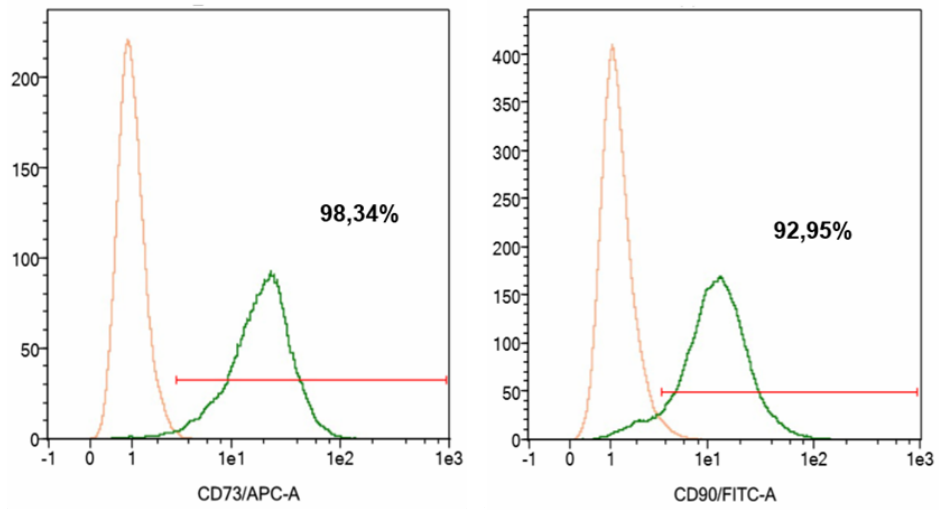
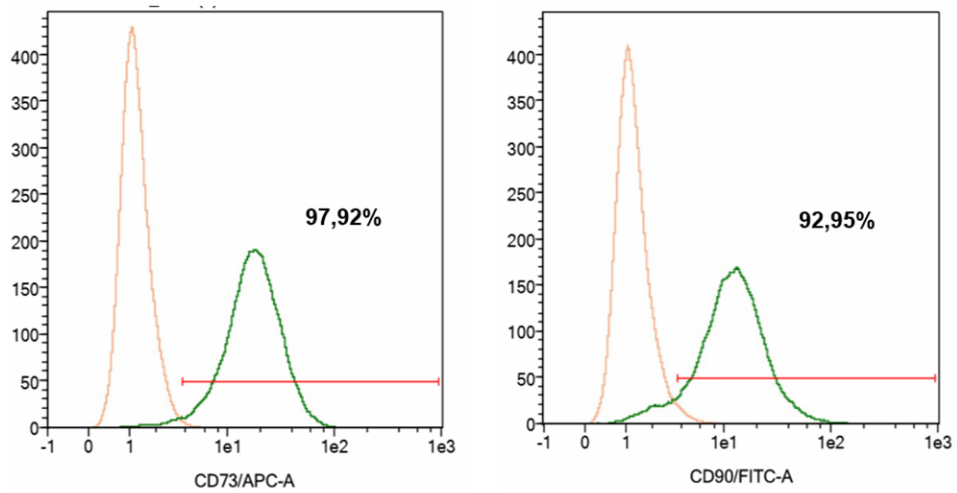
Trypsin 5 phút

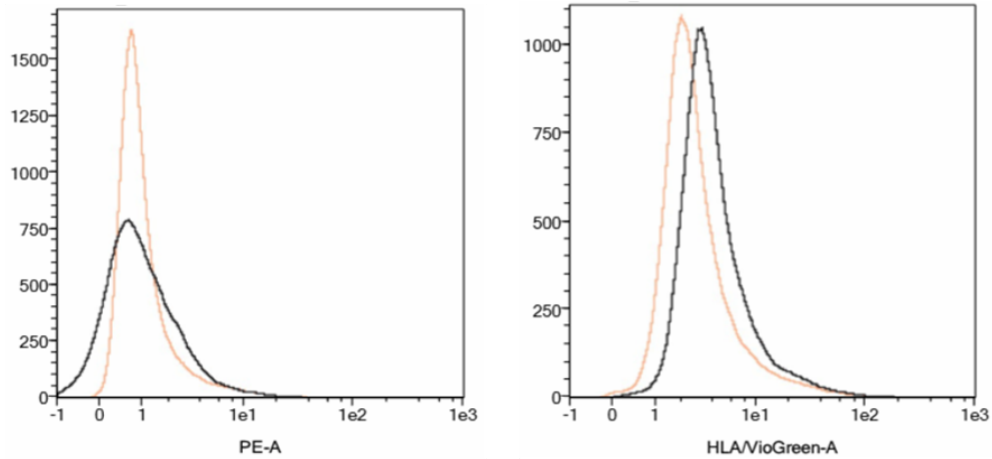




Trypsin 30 phút



Trypsin 60 phút**Trypsin 120 phút**



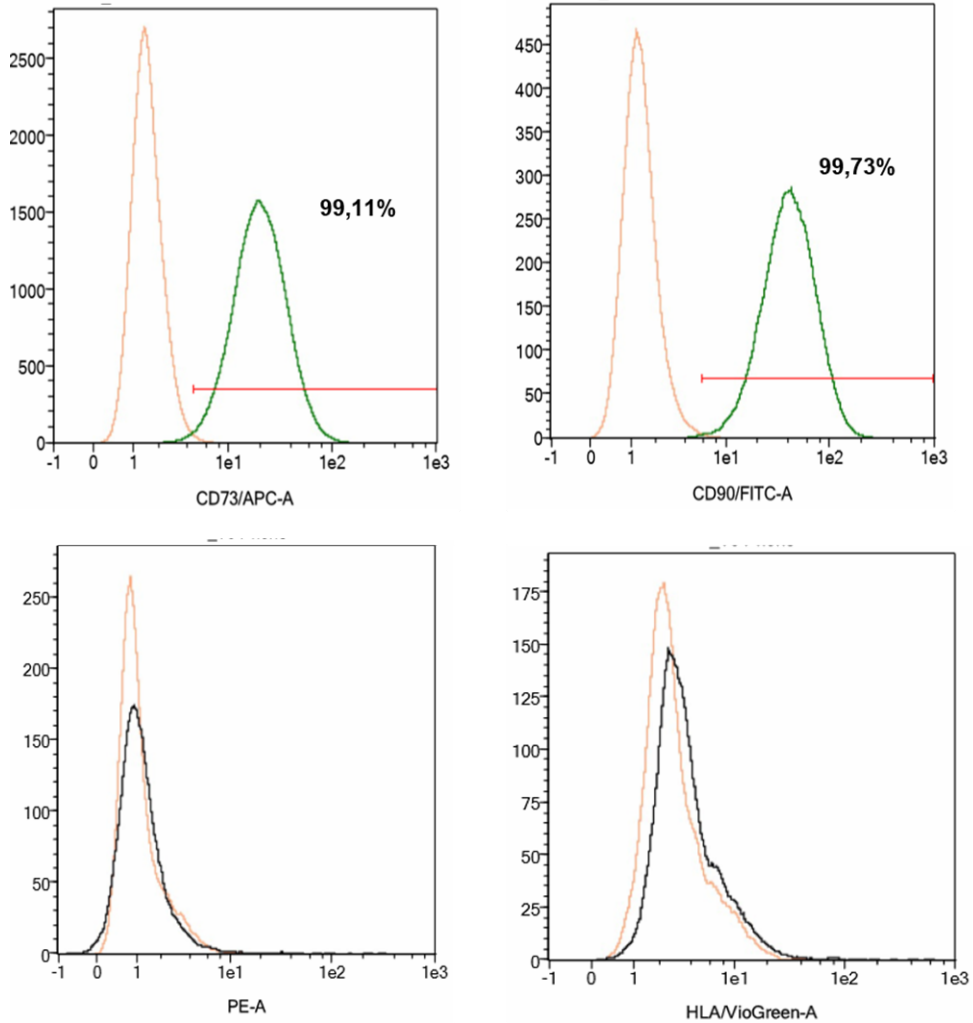
Hình 3.12. Mức độ biểu hiện của các kháng nguyên bề mặt của tế bào sau khi xử lý với trypsin. Trong đó PE: là hỗn hợp chứa CD14, CD19, CD34, CD45

Một trong những đặc điểm của MSC là các kháng nguyên bề mặt (CD marker) đặc hiệu. Trong đó tế bào gốc trung mô phải biểu hiện (dương tính) các CD73, CD90 và không biểu hiện (âm tính) các CD14, CD19, CD34, CD45. Bên cạnh đó HLA (kháng nguyên bạch cầu người) được sử dụng như một đối chứng âm cho kỹ thuật này. Trong phân tích dòng chảy, nếu một kháng nguyên bề mặt được biểu hiện (dương tính), chúng sẽ được phát hiện bằng màu quang phổ, thể hiện bằng hai đỉnh tách biệt. Trái lại, một kháng nguyên bề mặt sẽ thể hiện hai đỉnh không tách biệt, khá trùng khớp nhau.

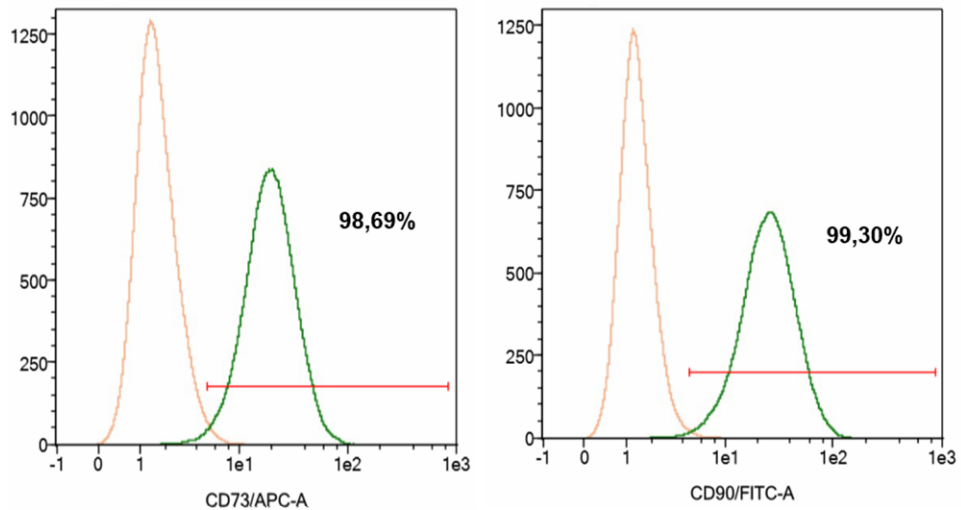
Kết quả kiểm tra kháng nguyên bề mặt cho thấy tỷ lệ phần trăm của CD73 và CD90 đều giảm dần theo thời gian, nhóm trypsin 5 phút là nhóm có tỷ lệ phần trăm CD73 và CD90 cao nhất là 98,92% và 95,07%,. Sau 30 phút xử lý trypsin, tỷ lệ của CD73 giảm 0,2% (còn 98,72%) và CD 90 giảm 0,97% (còn 94,10%) so với nhóm trypsin 5 phút. Nhóm trypsin 120 phút có mức giảm mạnh nhất, tỷ lệ phần trăm CD73 còn 97,92%, còn CD90 giảm còn 92,95% so với nhóm trypsin 5 phút. Tỷ lệ phần trăm của CD90 giảm mạnh hơn so với CD73 ở tất cả các nhóm. Trong cả 4 mốc thời gian, tỷ lệ CD14, CD19, CD34, CD45 và HLA đều âm tính (Hình 3.12).

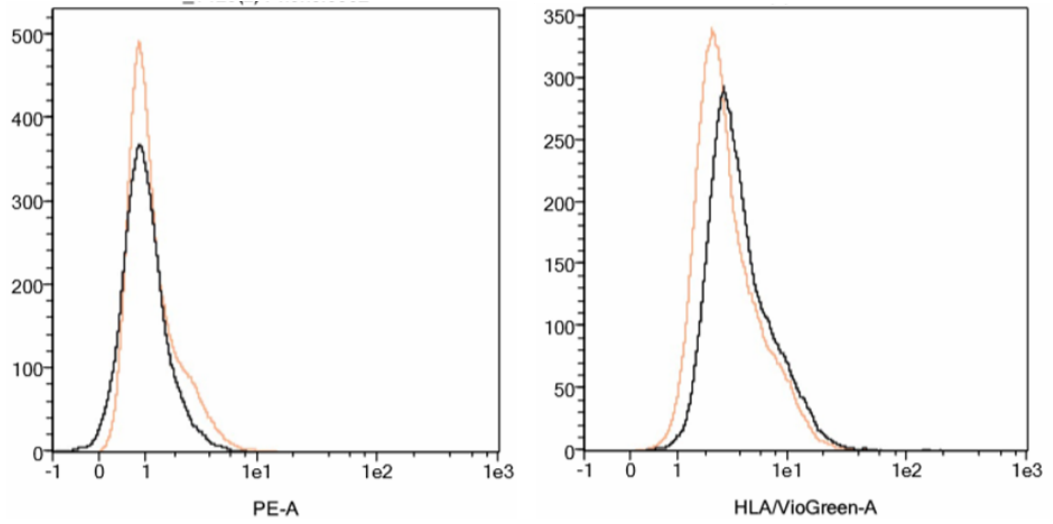
3.6.2. Đánh giá biểu hiện các marker bề mặt của tế bào MSC sau khi phân tách bằng TrypLE

TrypLE 5 phút

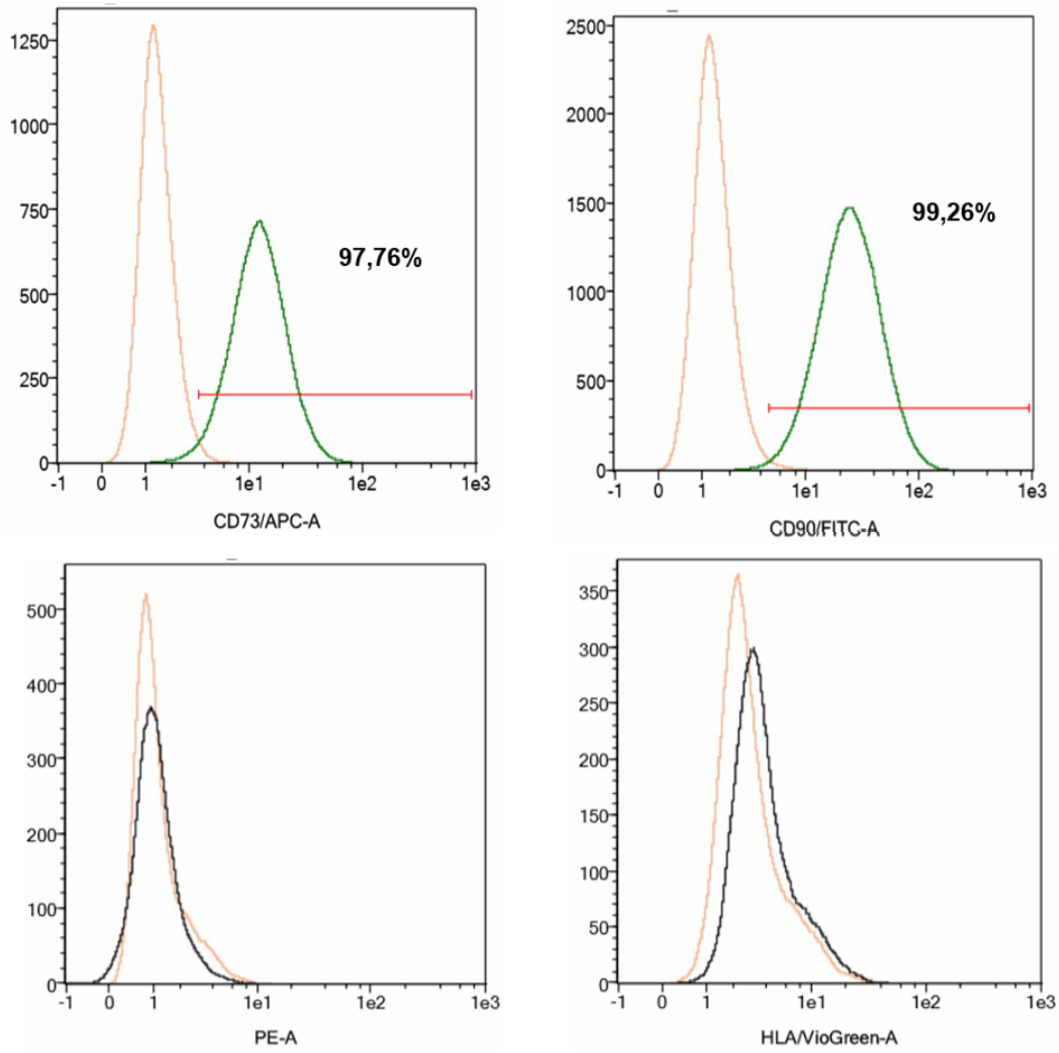


TrypLE 30 phút

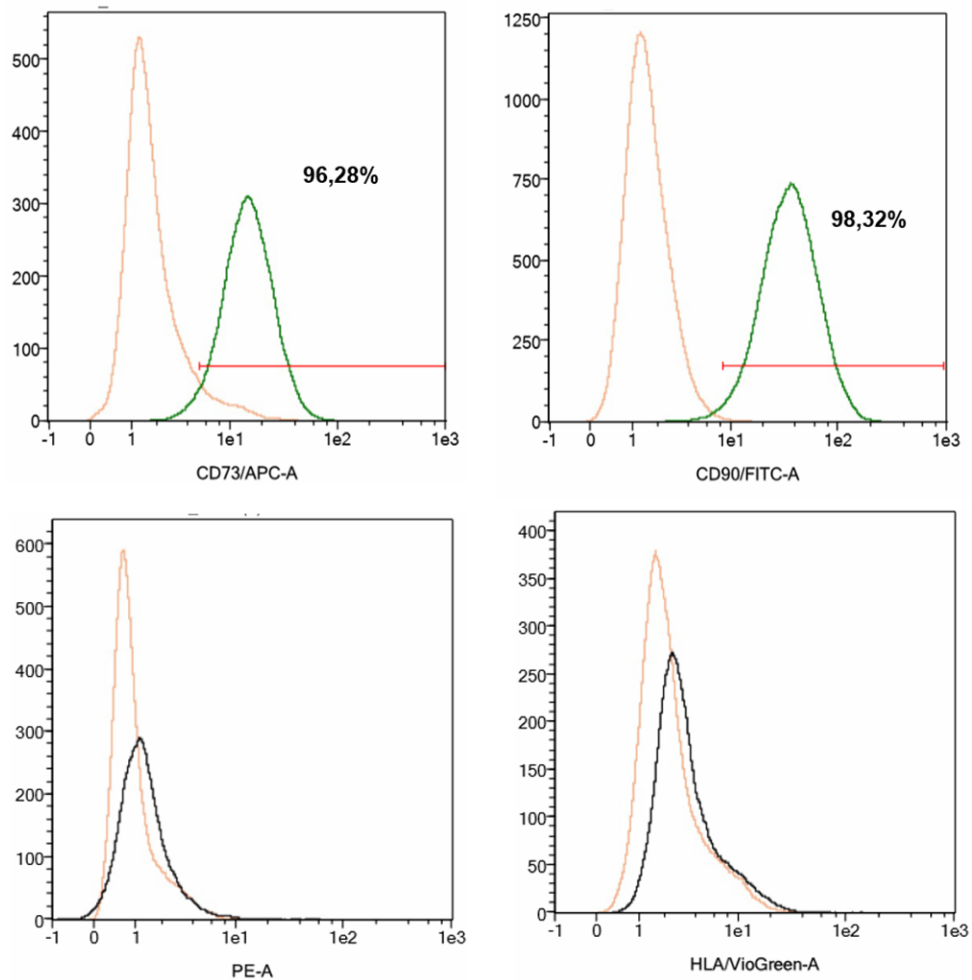




TrypLE 60 phút



TrypLE 120 phút



Hình 3.13. Mức độ biểu hiện của các kháng nguyên bề mặt của tế bào sau khi xử lý với TrypLE. Trong đó PE: là hỗn hợp chứa CD14, CD19, CD34, CD45

Kết quả kiểm tra kháng nguyên bề mặt cho thấy tỷ lệ phần trăm của CD73 giảm dần theo thời gian, nhóm xử lý TrypLE 5 phút là nhóm có tỷ lệ phần trăm CD73 cao nhất là 99,11%. Sau 30 phút xử lý TrypLE, tỷ lệ của CD73 giảm không đáng kể còn 98,69% (giảm 0,42%). Tương tự như vậy, so với nhóm 5 phút, nhóm TrypLE 60 phút giảm còn 97,76% (giảm 1,35%). Nhóm TrypLE 120 phút có mức giảm mạnh nhất, tỷ lệ phần trăm CD73 giảm còn 96,28%. Trong khi đó, tỷ lệ phần trăm của CD90 chênh lệch không quá nhiều ở 4 mốc thời gian, cao nhất ở nhóm 5 phút là 99,73%. Sau 30 phút xử lý TrypLE, tỷ lệ này giảm nhẹ 0,7% (còn 99,03%), rồi giảm nhẹ ở nhóm 60 phút là 99,26%. Nhóm có tỷ lệ phần trăm CD90 thấp nhất là nhóm 120 phút với 98,32%. Trong cả 4 mốc thời gian, tỷ lệ CD14, CD19, CD34, CD45 và HLA đều âm tính.

- **Thảo luận**

Hiện nay, mỗi phòng thí nghiệm khác nhau có một quy chuẩn riêng cho quá trình nuôi cấy, chưa có sự thống nhất trong quy trình nuôi cấy tiêu chuẩn cho MSC. Bên cạnh đó, MSC là các tế bào kết dính giống nguyên bào sợi, nên cần có quá trình tiêu hóa bằng enzyme. Tuy nhiên, các quy trình tách tế bào không phù hợp có thể gây ảnh hưởng đến khả năng sống hoặc chức năng của tế bào. Quá trình trypsin hóa bằng dung dịch trypsin-EDTA là một phương pháp enzyme được sử dụng rộng rãi để tách các tế bào kết dính khỏi chai nuôi cấy. Phương pháp này hoạt động nhờ sự phân hủy các protein của protease serine có tên là trypsin, giúp tách protein liên quan đến việc liên kết các tế bào vào bề mặt đĩa. Trypsin thường được sử dụng kết hợp với chất tạo phức ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) do vai trò của Ca^{2+} trong quá trình kết dính tế bào. Tuy nhiên, quá trình phân tách tế bào bằng enzyme có thể dẫn đến một số ảnh hưởng đối với khả năng sống và sự biểu hiện kháng nguyên bề mặt. Cụ thể, trong nghiên cứu của Dettmer và cộng sự [61] đã chứng minh việc sử dụng trypsin/EDTA gây rò rỉ các chất chuyển hóa trong tế bào biểu mô kết tràng SW480 khi so với việc sử dụng các dụng cụ cơ học. Tsuji và cộng sự [59] cho thấy trypsin hóa quá mức có thể là nguyên nhân gây giảm mức độ biểu hiện của các nhóm kháng nguyên trên MSC. Trong đó, các tác giả cũng chỉ ra rằng TrypLE, một loại enzyme tái tổ hợp, không có nguồn gốc từ động vật, là tác nhân tách hiệu quả nhất vì nó không ảnh hưởng đáng kể đến mức độ biểu hiện của các kháng nguyên được nghiên cứu. Tuy nhiên, một số nghiên cứu lại cho thấy việc sử dụng trypsin để phân tách tế bào gốc trung mô là phù hợp. Abhilok Garg và cộng sự [62] chứng minh việc sử dụng TrypLE tuy không ảnh hưởng đến khả năng sống và khả năng biệt hóa nhưng nó có ảnh hưởng đến sự biểu hiện các thụ thể chemokine và khả năng di chuyển của MSC đến các phối tử đích. Như vậy, việc mất các protein bề mặt tế bào do quá trình phân hủy enzyme quá mức có thể ảnh hưởng đến việc phân tích các dấu hiệu bề mặt và làm giảm khả năng sống

của tế bào, đặc biệt là tế bào gốc. Do đó, điều quan trọng là phải đánh giá tác động của các chất phân tách khác nhau và thời gian xử lý đối với sự biểu hiện kháng nguyên bề mặt và chức năng của tế bào để thiết lập một quy trình chuẩn cho các liệu pháp tế bào trong tương lai.

Mục tiêu chính trong nghiên cứu này đánh giá ảnh hưởng của enzyme phân tách đến MSC trong điều kiện phòng thí nghiệm. UC-MSC được chọn làm đối tượng nghiên cứu vì đây là dòng tế bào được phân lập, có sẵn tại địa điểm nghiên cứu và những tế bào này có thể được sử dụng trong các phương pháp trị liệu tế bào. MSC từ người nói chung là các tế bào kết dính mạnh, sau khi phân lập các tế bào gốc trung mô thường phải được nuôi cấy trong điều kiện nhân tạo trước khi sử dụng chúng trong các mục đích lâm sàng [62]. Vì tế bào chính là sản phẩm của toàn bộ quy trình nghiên cứu nên việc thu tế bào cần thực hiện nhẹ nhàng nhưng hiệu quả để thu được số lượng tế bào nhiều nhất có thể. Trong nghiên cứu này, em đã chỉ ra tầm quan trọng của việc lựa chọn phương pháp tách tế bào phù hợp cho tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ dây rốn. Em đã sử dụng 2 loại enzyme phổ biến là trypsin và TrypLE để đánh giá ảnh hưởng của chúng lên MSC ở các mốc thời gian khác nhau 5 phút, 30 phút, 60 phút và 120 phút (trong đó mốc thời gian 5 phút được coi là đối chứng với các mốc thời gian khác).

Để đánh giá khả năng sống của UC-MSC sau khi xử lý với các chất phân tách, em sử dụng phương pháp nhuộm trypan blue. Kết quả cho thấy trypsin nhanh chóng phân tách được hầu hết tế bào trong vòng 5 phút, còn TrypLE cần 30 phút để phân tách được hết tế bào. Số lượng tế bào thu được do sử dụng trypsin cao gấp 3 lần so với việc sử dụng TrypLE để phân tách. Kết hợp với kết quả hình thái tế bào, sau 5 phút trypsin còn có thể phân tách lớp đơn tế bào thành từng tế bào riêng rẽ trong khi đó, TrypLE xử lý trong 5 phút phân tách được tế bào ra khỏi bề mặt nuôi cấy nhưng tế bào bị phân tách ra thành từng cụm tế bào. Như vậy, trypsin dễ dàng phân tách tế bào và phân tách nhanh hơn so với TrypLE. Tuy nhiên trên đối tượng MSC bao hoạt dịch [59], khả năng phân tách của trypsin và TrypLE trong 5 phút đều tương tự

nhau (trypsin: $1,84 \pm 0,74 \times 10^5$, TrypLE: $1,61 \pm 0,59 \times 10^5$). Sự khác biệt này có thể đến từ khả năng bám dính của MSC ở các nguồn phân lập khác nhau thì sẽ không giống nhau.

Nghiên cứu cũng cho thấy, sau khi xử lý với trypsin, tỷ lệ phần trăm số tế bào sống giảm dần theo thời gian, trong đó nhóm 5 phút là cao nhất (95,3%). Sau 30 phút ủ với trypsin, khả năng sống của tế bào giảm hơn 10% (Hình 3.8). Đối với TrypLE, tỷ lệ phần trăm số tế bào sống không có sự chênh lệch quá lớn giữa các mốc thời gian, như vậy TrypLE có thể không ảnh hưởng nhiều đến khả năng sống của tế bào kể cả khi tế bào được xử lý với TrypLE trong 120 phút. Kết quả thống kê giữa các nhóm đều không cho thấy sự khác biệt ($P > 0,05$) (Hình 3.9). Một số nghiên cứu khác có kết quả tương tự nghiên cứu này, cho thấy khả năng sống của tế bào sụn ở ngựa giảm mạnh khi tiếp xúc với trypsin 20 phút (trypsin 5 phút: $> 95\%$, trypsin 20 phút khoảng 85%). Đồng thời, các tác giả cũng khẳng định quá trình trypsin hóa trong 5 phút với 0,25% trypsin-EDTA không có bất kỳ tác động bất lợi đáng kể nào đối với màng tế bào và khả năng sống của tế bào và là phương pháp tốt nhất để tách tế bào sụn của ngựa nguyên vẹn ra khỏi bề mặt nuôi cấy. Còn trong nghiên cứu năm 2017 của David Fong và cộng sự cho thấy tỷ lệ sống của tế bào sau trypsin 5 phút là $> 98\%$. Đồng thời, Abhilok Garg và cộng sự [62] lại cho thấy TrypLE ít ảnh hưởng đến khả năng sống của MSC (98,38%). Tương tự với các kết quả trên, Tsuji và cộng sự [59] cho thấy nhóm xử lý trypsin 5 phút có tỷ lệ sống của tế bào cao hơn so với TrypLE (cụ thể trypsin: 98%, TrypLE: 95%). Như vậy, cả hai enzyme trong khoảng 5 phút ít gây độc và làm chết tế bào, tác động của enzyme phân tách phụ thuộc vào thời gian xử lý. Trong đó, tỷ lệ tế bào sống của trypsin cao hơn TrypLE.

Để kiểm tra tác động của các chất phân tách tế bào và thời gian xử lý đối với sự biểu hiện của các kháng nguyên bề mặt UC-MSC, em đã phân tích biểu hiện của CD73, CD90 bằng phương pháp tế bào học dòng chảy, vì chúng là các dấu hiệu đại diện cho tế bào gốc trung mô. Các kết quả chỉ ra rằng kháng nguyên trên bề mặt tế bào bị ảnh hưởng bởi các phương pháp tách. Kết quả âm tính của các kháng nguyên bề mặt CD14, CD19, CD34, CD45 và

HLA ở tất các các nhóm thời gian sau khi ủ với chất phân tách phù hợp với đặc điểm của MSC.

Trong số các kháng nguyên được kiểm tra (CD73 và CD90), số lượng tế bào dương tính với CD73 sau khi xử lý bằng enzyme trypsin giảm trong vòng 30 phút (giảm 0,2%) (Hình 3.12) và giảm dần theo thời gian. Tương tự, số lượng tế bào dương tính với CD90 cũng giảm dần theo thời gian, tuy nhiên mức độ giảm mạnh hơn so với CD73. Điều này cho thấy kháng nguyên bề mặt CD90 có thể nhạy cảm với trypsin hơn kháng nguyên bề mặt CD73. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Tsuji và cộng sự (2017) [59]. TrypLE là một enzyme tái tổ hợp có hoạt tính giống với trypsin nhưng không có nguồn gốc từ động vật. Kết quả của em đã chỉ ra rằng hoạt tính của trypsin và TrypLE có thể giống nhau nhưng ảnh hưởng lên UC-MSC không giống nhau. Đối với TrypLE, số lượng tế bào dương tính với kháng nguyên bề mặt CD90 không có sự chênh lệch quá lớn giữa các nhóm thời gian. Tuy nhiên, ở nhóm TrypLE 120 phút, tỷ lệ phần trăm của CD73 từ 99,11% (nhóm TrypLE xử lý 5 phút) giảm còn 98,32% (nhóm TrypLE xử lý 120 phút) (Hình 3.13). Chúng tôi kháng nguyên bề mặt CD90 nhạy cảm với TrypLE hơn so với CD73. Trong số hai chất phân tách, trypsin là dường như ảnh hưởng tới kháng nguyên bề mặt mạnh hơn so với TrypLE. Tương tự, phân tích Western blot của David Fong [63] cho thấy trypsin 0,25% làm giảm đáng kể các kháng nguyên bề mặt. Vì vậy, ông kết luận trypsin 0,25% là nồng độ đủ cao để gây ra các tác động lên marker bề mặt tế bào. Các kết quả của nghiên cứu cũng cho thấy, tế bào sau khi tiếp xúc với trypsin 0,25% trong 5 phút vẫn có khả năng đáp ứng với các tín hiệu hóa học so với nhóm tiếp xúc với TrypLE 5 phút. Việc sử dụng trypsin ở thời gian xử lý phù hợp vẫn là phương pháp tách MSC tối ưu. Trong khi đó, Tsuji và cộng sự [59] cho rằng xử lý TrypLE trong vòng 30 phút là quy trình tách tế bào MSC bao hoạt dịch tốt nhất dựa trên số lượng tế bào thu được, khả năng sống và sự các bảo toàn kháng nguyên bề mặt [59].

Ngoài các đặc điểm về protein bề mặt tế bào, khả năng biệt hóa của MSC là chức năng cơ bản của một tế bào gốc. Khả năng biệt hóa đa dòng giúp cho MSC được ứng dụng trong các liệu pháp tái tạo. Vì vậy, trong

phạm vi nghiên cứu này, MSC sau khi xử lý với enzyme sẽ được nuôi cấy biệt hóa thành nguyên bào xương. Em nhận thấy rằng khả năng biệt hóa thành nguyên bào xương của UC-MSC sau khi xử lý với trypsin và TrypLE đều giống nhau (Hình 3.11). Trong nghiên cứu của Tsuji và cộng sự [59] chỉ đánh giá đại diện nhóm TrypLE 5 phút và trypsin 60 phút, kết quả hình ảnh cho thấy tỷ lệ tế bào bắt màu thuốc nhuộm ở cả hai nhóm là giống nhau. Tương tự, Abhilok Garg và cộng sự [62] cũng cho thấy, TrypLE không ảnh hưởng đến khả năng biệt hóa của MSC. Những dữ liệu này cho thấy tác động của quá trình tách tế bào đến khả năng biệt hóa của UC-MSC là khá hạn chế. Điều này có thể là do tính linh động của MSC, trong đó các tế bào này có thể tạm thời chịu những thay đổi ở bề mặt tế bào để duy trì các chức năng của tế bào gốc.

Tóm lại, kết quả của nghiên cứu này cho thấy trypsin và TrypLE đều có những ảnh hưởng đến khả năng sống và sự biểu hiện các protein bề mặt của UC-MSC tùy thuộc vào thời gian tiếp xúc của tế bào với enzyme. Tuy nhiên, các nghiên cứu phân tử là điều cần thiết để giải thích cụ thể cho phản ứng giữa tế bào và các enzyme phân tách. Hiện nay các nghiên cứu trên thế giới tập trung vào phân tích ảnh hưởng của các loại enzym trên quá trình phân tách tế bào gốc, để phát triển của công nghệ y học tái tạo (regenerative medicine) trong tương lai. Các nghiên cứu đó đã so sánh tác động của một số loại enzyme lên việc phân tách tế bào. Vì vậy, các kết quả trong nghiên cứu này có thể đóng góp một phần vào tình hình nghiên cứu chung trên thế giới. Đặc biệt, với sự gia tăng của sự phụ thuộc vào công nghệ in 3D trong lĩnh vực y học tái tạo, việc tìm ra phương pháp hiệu quả để tách các loại tế bào gốc là một thách thức lớn.

KẾT LUẬN

1. Trypsin có khả năng phân tách UC-MSC ra khỏi bề mặt nuôi cấy nhanh hơn (5 phút) so với TrypLE (30 phút). Tế bào được phân tách bởi trypsin tạo thành từng tế bào riêng lẻ.

2. Số lượng tế bào thu được sau khi phân tách bởi trypsin (trung bình $2,45 \times 10^6 \pm 0.11$ tế bào) cao hơn TrypLE (trung bình $0,77 \times 10^6 \pm 0,15$ tế bào).

3. Trypsin và TrypLE không ảnh hưởng đến khả năng biệt hóa thành nguyên bào xương của UC-MSC. Qua các mốc thời gian khác nhau đều biệt hóa thành nguyên bào xương.

4. Phân tích đếm dòng chảy tế bào cho thấy trypsin (CD73: 5 phút: 99,11%; 30 phút: 98,69%; 60 phút: 97,76%; 120 phút 96,28%, CD90: 5 phút: 99,73; 30 phút: 99,30%; 60 phút: 99,26% 120 phút: 98,32%) ảnh hưởng đến kháng nguyên bề mặt CD73, CD90 mạnh hơn so với TrypLE (CD73: 5 phút: 98,92; 30 phút: 98,72%; 60 phút: 98,34%; 120 phút 97,92%, CD90: 5 phút 95,07%; 30 phút 94,10%; 60 phút 92,95%; 120 phút: 92,95%) trong đó CD90 nhạy cảm với các enzyme phân tách hơn so với CD73.

KIẾN NGHỊ

Cần đánh giá thêm các kháng nguyên bề mặt khác và thiết kế, sử dụng để phân tích toàn diện hơn (ví dụ CD105, các marker cho qPCR như stemness markers, CD markers).

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Parekkadan B., Milwid J. M., 2010, Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics, *Annual review of biomedical engineering*, 12, p. 87. doi: 10.1146/ANNUREV-BIOENG-070909-105309.
2. Řehořová M., Vargová I., Forostyak S., Vacková I., Turnovcová K., Kupcová Skalníková H., Vodička P., Kubinová Š., Syková E., & Jendelová P., 2019, A Combination of Intrathecal and Intramuscular Application of Human Mesenchymal Stem Cells Partly Reduces the Activation of Necroptosis in the Spinal Cord of SOD1G93A Rats, *Stem Cells Translational Medicine*, 86,, pp. 535-547. doi: 10.1002/SCTM.18-0223.
3. Cierpka K., Elseberg C.L., Niss K., Kassem M., Salzig D., & Czermak P., 2013, hMSC Production in Disposable Bioreactors with Regards to GMP and PAT, *Chemie Ingenieur Technik*, 851-2,, pp. 67-75. doi: 10.1002/CITE.201200151.
4. Fernandez T. de S., Fernandez C.deS., 2016, Mesenchymal Stem Cells: Biological Characteristics and Potential Clinical Applications for Haematopoietic Stem Cell Transplantation, *Pluripotent Stem Cells - From the Bench to the Clinic*. doi: 10.5772/63772.
5. Friedenstein Alexander J., Chailakhyan, Ruben K., Latsinik, Nataly V., Panasyuk Andrey F., Keiliss-Borok I. V.: I. 4-p no date, Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues, *Cloning In Vitro and Replantation In Vivo*, 17, pp. 331-340.
6. Simmons P.J., Torok-Storb B., 1991, Identification of Stromal Cell Precursors in Human Bone Marrow by a Novel Monoclonal Antibody, STRO-1, *Blood*, 781,, pp. 55-62. doi: 10.1182/BLOOD.V78.1.55.55.
7. Andrzejewska A., Lukomska B., Janowski M., 2019, Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost, *Stem cells Dayton, Ohio*,, 377,, pp. 855-864. doi: 10.1002/STEM.3016.
8. Anjos-Afonso F., Bonnet D., 2007, Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1+ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment, *Blood*, 1093,, pp. 1298-1306. doi: 10.1182/BLOOD-2006-06-030551.

9. Nakamura Y., Miyaki S., Ishitobi H., Matsuyama S., Nakasa T., Kamei N., Akimoto T., Higashi Y., & Ochi M., 2015, Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration, *FEBS letters*, 58911,, pp. 1257-1265. doi: 10.1016/J.FEBSLET.2015.03.031.
10. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F. C., Krause D. S., Deans R. J., Keating A., Prockop D. J., & Horwitz, E. M., 2006, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 84,, pp. 315-317. doi: 10.1080/14653240600855905.
11. Berebichez-Fridman R., Gómez-García R., Granados-Montiel J., Berebichez-Fastlicht E., Olivos-Meza A., Granados J., Velasquillo C., & Ibarra C., 2017, The Holy Grail of Orthopedic Surgery: Mesenchymal Stem Cells-Their Current Uses and Potential Applications, *Stem cells international*, 2017. doi: 10.1155/2017/2638305.
12. Pittenger M. F., Martin B. J., 2004, Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics, *Circulation research*, 951,, pp. 9-20. doi: 10.1161/01.RES.0000135902.99383.6F.
13. Shi C., 2012, Recent progress toward understanding the physiological function of bone marrow mesenchymal stem cells, *Immunology*, 1362,, pp. 133-138. doi: 10.1111/J.1365-2567.2012.03567.X.
14. Kuo T. K., Ho J. H., and Lee O. K., 2009, Mesenchymal stem cell therapy for nonmusculoskeletal diseases: emerging applications, *Cell transplantation*, 189,, pp. 1013-1028. doi: 10.3727/096368909X471206.
15. Kim N., Cho S. G., 2013, Clinical applications of mesenchymal stem cells, *The Korean Journal of Internal Medicine*, 284,, p. 387. doi: 10.3904/KJIM.2013.28.4.387.
16. Atoui R., Chiu R. C. J., 2012, Concise Review: Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells in Cellular Transplantation: Update, Controversies, and Unknowns, *Stem Cells Translational Medicine*, 13,, p. 200. doi: 10.5966/SCTM.2011-0012.

17. Kollet O., Shivtiel S., Chen Y.Q., Suriawinata J., Thung S.N., Dabeva M. D., Kahn J., Spiegel A., Dar A., Samira S., Goichberg P., Kalinkovich A., Arenzana-Seisdedos F., Nagler A., Hardan I., Revel M., Shafritz D.A., & Lapidot T., 2003, HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver, *The Journal of clinical investigation*, 112,, pp. 160-169. doi: 10.1172/JCI17902.
18. Sackstein R., 2005, The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm, *Current opinion in hematology*, 126,, pp. 444-450. doi: 10.1097/01.MOH.0000177827.78280.79.
19. Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz, H. P., & Hedrick M. H., 2001, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue engineering*, 72,, pp. 211-228. doi: 10.1089/107632701300062859.
20. Friedenstein A.J., 1976, Precursor cells of mechanocytes, *International review of cytology*, 47C,, pp. 327-359. doi: 10.1016/S0074-769608,60092-3.
21. L.R. Rilo H., Cagliani J., Grande D., P Molmenti E., & J. Miller E., 2017, Immunomodulation by Mesenchymal Stromal Cells and Their Clinical Applications, *Journal of stem cell and regenerative biology*, 32,, pp. 1-14. doi: 10.15436/2471-0598.17.022.
22. Liras A., 2010, Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects, *Journal of translational medicine*, 8. doi: 10.1186/1479-5876-8-131.
23. Choudhery M. S., Badowski, M., Muise A., Pierce J., & Harris D. T., 2014, Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation, *Journal of translational medicine*, 121,. doi: 10.1186/1479-5876-12-8.
24. Gronthos S., Mankani M., Brahimi J., Robey P. G., & Shi, S., 2000, Postnatal human dental pulp stem cells DPSCs, in vitro and in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 9725,, pp. 13625-13630. doi: 10.1073/PNAS.240309797.

25. Ishkitiev N., Yaegaki K., Calenic B., Nakahara T., Ishikawa, H., Mitiev, V., & Haapasalo M., 2010, Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro, *Journal of endodontics*, 363,, pp. 469-474. doi: 10.1016/J.JOEN.2009.12.022
26. Joo S., Ko I. K., Atala A., Yoo J. J., & Lee S. J., 2012, Amniotic fluid-derived stem cells in regenerative medicine research, *Archives of pharmacal research*, 352,, pp. 271-280. doi: 10.1007/S12272-012-0207-7.
27. Koike C., Zhou K., Takeda Y., Fathy M., Okabe M., Yoshida T., Nakamura, Y., Kato, Y., & Nikaido, T. 2014, Characterization of amniotic stem cells, *Cellular reprogramming*, 164,, pp. 298-305. doi: 10.1089/CELL.2013.0090.
28. Pipino C., Shangaris P., Resca E., Zia S., Deprest J., Sebire N. J., David A. L., Guillot P. V., & De Coppi P., 2013, Placenta as a reservoir of stem cells: an underutilized resource?, *British medical bulletin*, 1051,, pp. 43-67. doi: 10.1093/BMB/LDS033.
29. Tondreau T., Meuleman N., Delforge A., Dejeneffe M., Leroy R., Massy M., Mortier C., Bron D., & Lagneaux L., 2005a, Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity, *Stem cells Dayton, Ohio*, 238,, pp. 1105-1112. doi: 10.1634/STEMCELLS.2004-0330.
30. Tondreau T., Meuleman N., Delforge A., Dejeneffe M., Leroy R., Massy M., Mortier C., Bron D., & Lagneaux L., 2005b, Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity, *Stem cells Dayton, Ohio*, 238,, pp. 1105-1112. doi: 10.1634/STEMCELLS.2004-0330.
31. Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H., Klüter K., & Bieback K., 2006, Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue, *STEM CELLS*, 245,, pp. 1294-1301. doi: 10.1634/STEMCELLS.2005-0342.

32. Thaweessaphithak S., Tantrawatpan C., Kheolamai P., Tantikanlayaporn D., Roytrakul S., & Manochantr., S.2019, Human serum enhances the proliferative capacity and immunomodulatory property of MSCs derived from human placenta and umbilical cord, *Stem Cell Research and Therapy*, 101,, pp. 1-18. doi: 10.1186/S13287-019-1175-3/FIGURES/9.
33. Zhao L., Chen S., Yang P., Cao H., & Li L., 2019, The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation: prevention and treatment of graft-versus-host disease, *Stem cell research & therapy*, 101,. doi: 10.1186/S13287-019-1287-9.
34. Amable P. R., Teixeira M. V. T., Carias R. B. V., Granjeiro J. M., & Borojevic R., 2014, Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Whartons jelly, *Stem Cell Research and Therapy*, 52, pp. 1-13.
35. Kfoury Y., and Scadden D. T., 2015, Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche, *Cell stem cell*, 163,, pp. 239-253. doi: 10.1016/J.STEM.2015.02.019.
36. Kidd S., Spaeth E., Dembinski J. L., Dietrich M., Watson K., Klopp A., Battula V. L., Weil M., Andreeff M., & Marini F. C., 2009, Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging, *Stem cells Dayton, Ohio*, 2710,, pp. 2614-2623. doi: 10.1002/STEM.187.
37. Van Pham P., Thi-My Nguyen P., Thai-Quynh Nguyen A., Minh Pham V., Nguyen-Tu Bui A., Thi-Tung Dang L., Gia Nguyen K., & Kim Phan, N., 2014, Improved differentiation of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into insulin-producing cells by PDX-1 mRNA transfection, *Differentiation; research in biological diversity*, 875,, pp. 200-208. doi: 10.1016/J.DIFF.2014.08.001.
38. Hmadcha A., Martin-Montalvo A., Gauthiez B. R., Soria B., & Capilla-Gonzalez, V. 2020, Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for Cancer Therapy, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, p. 43. doi: 10.3389/FBIOE.2020.00043/BIBTEX.

39. Jager L. D., Canda C. M. A., Hall C. A., Heilingoetter C. L., Huynh J., Kwok, S. S., Kwon J. H., Richie J. R., & Jensen M. B., 2016, Effect of enzymatic and mechanical methods of dissociation on neural progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells, *Advances in Medical Sciences*, 611,, pp. 78-84. doi: 10.1016/J.ADVMS.2015.09.005.
40. Nowak-Terpiłowska A., Śledziński P., and Zeyland J., 2021, Impact of cell harvesting methods on detection of cell surface proteins and apoptotic markers, *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 542,, pp. 1-7. doi: 10.1590/1414-431X202010197.
41. Uccelli A., Moretta L., Pistoia V., 2008, Mesenchymal stem cells in health and disease, *Nature reviews. Immunology*, 89,, pp. 726-736. doi: 10.1038/NRI2395.
42. Merten O.-W., 2010, Cell Detachment, *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, pp. 1-22. doi: 10.1002/9780470054581.EIB195.
43. Peralta Soler A., Knudsen K. A., Tecson-Miguel A., McBrearty F. X., Han A. C., & Salazar H., 1997, Expression of E-cadherin and N-cadherin in surface epithelial-stromal tumors of the ovary distinguishes mucinous from serous and endometrioid tumors, *Human Pathology*, 286,, pp. 734-739. doi: 10.1016/S0046-817797,90184-2.
44. Bekaii-Saab T., Williams N., Plass C., Calero M. V., & Eng C., 2006, A novel mutation in the tyrosine kinase domain of ERBB2 in hepatocellular carcinoma, *BMC Cancer*, 61,, pp. 1-5. doi: 10.1186/1471-2407-6-278/FIGURES/1.
45. Lai T. Y., Cao J., Ou-Yang P., Tsai C. Y., Lin C. W., Chen C. C., Tsai M. K., & Lee, C. Y., 2022, Different methods of detaching adherent cells and their effects on the cell surface expression of Fas receptor and Fas ligand, *Scientific Reports 2022 12:1*, 121,, pp. 1-8. doi: 10.1038/s41598-022-09605-y.
46. Kim J. Y., Kim Y. G., and Lee G. M., 2012, CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential, *Applied microbiology and biotechnology*, 933,, pp. 917-930. doi: 10.1007/S00253-011-3758-5.

47. Nagamori E., Ngo T. X., Takezawa Y., Saito A., Sawa Y., Shimizu T., Okano, T., Taya M., & Kino-oka M., 2013, Network formation through active migration of human vascular endothelial cells in a multilayered skeletal myoblast sheet, *Biomaterials*, 343,, pp. 662-668. doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2012.08.055.
48. Higuchi A., Hamamura A., Shindo Y., Kitamura H., Yoon B. O., Mori T., Uyama, T., & Umezawa, A.2004, Photon-modulated changes of cell attachments on polyspiropyran-co-methyl methacrylate, membranes, *Biomacromolecules*, 55,, pp. 1770-1774. doi: 10.1021/BM049737X.
49. Zheng Q., Iqbal S. M., Wan Y., 2013, Cell detachment: Post-isolation challenges, *Biotechnology Advances*, 318,, pp. 1664-1675. doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2013.08.013.
50. Guillaume-Gentil O., Akiyama Y., Schuler M., Tang C., Textor M., Yamato M., Okano T., & Vörös J., 2008, Polyelectrolyte Coatings with a Potential for Electronic Control and Cell Sheet Engineering, *Advanced Materials*, 203,, pp. 560-565. doi: 10.1002/ADMA.200700758.
51. Inaba R., Khademhosseini A., Suzuki H., & Fukuda J., 2009, Electrochemical desorption of self-assembled monolayers for engineering cellular tissues, *Biomaterials*, 3021,, pp. 3573-3579. doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2009.03.045.
52. Cindy Santangelo., James Zacka P. T., 2016, Tissue Dissociation Guide, *Worthington Biochemical Corporation*.
53. Cruz H. J., Dias E. M., Moreira J. L., & Carrondo M. J. T., 1997, Cell-dislodging methods under serum-free conditions, *Applied microbiology and biotechnology*, 475,, pp. 482-488. doi: 10.1007/S002530050960
54. Brown M. A., Wallace C. S., Anamelechi C. C., Clermont E., Reichert W. M., & Truskey G. A., 2007, The use of mild trypsinization conditions in the detachment of endothelial cells to promote subsequent endothelialization on synthetic surfaces, *Biomaterials*, 2827,, pp. 3928-3935. doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2007.05.009.
55. Amano H., Kurosaka R., Ema M., & Ogawa Y., 1996, Trypsin promotes C6 glioma cell proliferation in serum- and growth factor-free medium, *Neuroscience research*, 253,, pp. 203-208.

56. Shibeshi W., Abraham G., Kneuer C., Ellenberger C., Seeger J., Schoon H. A., & Ungemach F. R., 2008, Isolation and culture of primary equine tracheal epithelial cells, *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 447,, pp. 179-184. doi: 10.1007/S11626-008-9099-8.
57. Hosick H. L., Strohman R. C., 1971, Changes in ribosome-polyribosome balances in chick muscle cells during tissue dissociation, development in culture, and exposure to simplified culture-medium, *Journal of cellular physiology*, 772,, pp. 145-155. doi: 10.1002/JCP.1040770204.
58. Lori Nestler, Ethel Evege, Jennifer McLaughlin, Donald Munroe, Teresa Tan, Kate Wagner, and B. S., no date, TrypLE™ Express: A Temperature Stable Replacement for Animal Trypsin in Cell Dissociation Applications, *Gibco*, 11,. Available at: https://www.researchgate.net/publication/268293142_TrypLE_Express_A_Temperature_Stable_Replacement_for_Animal_Trypsin_in_Cell_Dissociation_Applications.
59. Tsuji K., Ojima M., Otabe K., Horie M., Koga H., Sekiya I., & Muneta T., 2017, Effects of Different Cell-Detaching Methods on the Viability and Cell Surface Antigen Expression of Synovial Mesenchymal Stem Cells, *Cell Transplantation*, 266,, p. 1089. doi: 10.3727/096368917X694831.
60. Weiss L., 1958, The effects of trypsin on the size, viability and dry mass of Sarcoma 37 cells, *Experimental Cell Research*, 141,, pp. 80-83. doi: 10.1016/0014-482758,90214-3.
61. Dettmer K., Nürnberger N., Kaspar H., Gruber M. A., Almstetter M. F., Oefner, P. J., 2011, Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for metabolomics studies: optimization of harvesting and extraction protocols. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(3), p. 1127-1139. <https://doi.org/10.1007/S00216-010-4425-X>.
62. Garg A., Houlihan D.D., Aldridge V., Suresh S., Li K.K., King A.L., Sutaria R., Fear, J., Bhogal R. H., Lalor P.F., & Newsome P.N., 2014,

“Non-Enzymatic Dissociation of Human Mesenchymal Stromal Cells Improves Chemokine-Dependent Migration and Maintains Immunosuppressive Function.” *Cytotherapy* 16(4), pp. 545-59. doi: 10.1016/J.JCYT.2013.10.003.

63. Fong D., Duceppe N., and Hoemann C. D., 2017, Mesenchymal stem cell detachment with trace trypsin is superior to EDTA for in vitro chemotaxis and adhesion assays, *Biochemical and biophysical research communications*, 4843,, pp. 656-661. doi: 10.1016/J.BBRC.2017.01.171.