

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ

CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Thu Hằng

**NGHIÊN CỨU SỰ ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI GIAN SỬ DỤNG
COLLAGENASE TỚI SỰ PHÂN TÁCH MẠCH MÔ ĐỆM SVF
VÀ SỰ SỐNG 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



Trần Thu Hằng

**NGHIÊN CỨU SỰ ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI GIAN SỬ DỤNG
COLLAGENASE TỚI SỰ PHÂN TÁCH MẠCH MÔ ĐỆM SVF
VÀ SỰ SỐNG 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 toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả luận văn

Trần Thu Hằng

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên, em xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc nhất tới TS. Nguyễn Trung Nam - người thầy đã tận tâm, nhiệt tình chỉ bảo, hướng dẫn cũng như động viên, cổ vũ tinh thần cho em trong suốt quá trình thực hiện đề tài luận văn thạc sĩ.

Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ hợp phần 2 “ Nghiên cứu xây dựng một số quy trình sản xuất và lưu giữ tế bào gốc trung mô định hướng ứng dụng”, mã số TĐTBG0.02/21-23, chủ nhiệm hợp phần TS.Trần Trung Thành thuộc dự án, “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học trong tăng sinh các dòng tế bào gốc nhằm định hướng ứng dụng trong điều trị ung thư” chủ nhiệm dự án TS.Nguyễn Trung Nam từ Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Em xin gửi lời cảm ơn tới các anh chị của 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 cho em hoàn thành luận án thạc sĩ này.

Em xin cảm ơn 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 em có thể thực hiện luận văn thạc sĩ.

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.

Cuối cùng, em xin được gửi lời tri ân đến gia đình, bạn bè và tất cả những người thân yêu đã luôn động viên, khích lệ, quan tâm giúp đỡ em trong quá trình học tập để có thể hoàn thành bản luận văn này!

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC CHỮ 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	3
1.1.1. Khái niệm tế bào gốc	3
1.1.2. Phân loại tế bào gốc.....	3
1.2. TỔNG QUAN TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ MÔ MỠ.....	4
1.2.1. Tế bào gốc trung mô	4
1.2.2. Nguồn phân lập tế bào gốc trung mô.....	5
1.2.3. Đặc điểm của tế bào gốc trung mô	6
1.2.4. Phân đoạn mạch mô đệm (Stromal Vascular Fraction Cells - SVF).....	8
1.2.5. Tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ mô mỡ.....	9
1.2.6. Tình hình nghiên cứu trên thế giới và ở Việt Nam.....	11
1.2.7. Các phương pháp phân lập SVF từ mô mỡ	12
1.2.8. Phân tách tế bào gốc trung mô.....	12
1.2.9. Collagenase.....	14
1.2.10. Phân loại collagenase	15
1.3. VẤN ĐỀ ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU Y SINH	16
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	17
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	17
2.1.1. Hóa chất, dụng cụ vật tư tiêu hao	17
2.1.2. Thiết bị sử dụng chính.....	17
2.1.3. Địa điểm nghiên cứu	17
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	17
2.2.1. Phân lập SVF từ mô mỡ bằng phương pháp xử lý collagenase	17
2.2.2. Nuôi cấy tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ mô mỡ	19
2.2.3. Đánh giá hình thái của tế bào ASC	19
2.2.4. Đánh giá tỷ lệ sống/chết của tế bào ASC	19

2.2.5. Đánh giá biểu hiện các marker bề mặt của tế bào ASC	20
2.2.6. Đánh giá khả năng biệt hóa của ASC.....	20
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	22
3.1. PHÂN LẬP SVF TỪ MÔ MỠ BẰNG PHƯƠNG PHÁP Ủ COLLAGENASE..	22
3.2. NUÔI CẤY TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ CÓ NGUỒN GỐC TỪ MÔ MỠ.	24
3.2.1. Nuôi cấy tế bào sơ cấp.....	24
3.2.2. Nuôi cấy thứ cấp.....	28
3.3. TỶ LỆ SỐNG CHẾT Ở GIAI ĐOẠN NUÔI CẤY BAN ĐẦU	28
3.4. PHÂN TÍCH DÒNG CHẢY TẾ BÀO.....	31
3.5. BIỆT HÓA CỦA TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ MÔ MỠ.....	34
KẾT LUẬN	43
KIẾN NGHỊ	44
TÀI LIỆU THAM KHẢO	45

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ASC	Adipose Derived Stem cells (Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ)
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease (Bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's - Medium (Môi trường nuôi cấy cải tiến của Dulbecco)
ECM	Extra cellular matrix (Chất nền ngoại bào)
FBS	Fetal Bovine Serum (Huyết thanh bào thai bò)
HSC	Hematopoietic stem cells (Tế bào gốc tạo máu)
iPSCs	Induced Pluripotent Stem Cells (Tế bào gốc tiềm năng cảm ứng)
ISCT	International Society for Cellular Therapy (Hiệp hội Quốc tế về Liệu pháp Tế bào)
MSC	Mesenchymal Stem Cell (Tế bào gốc trung mô)
SVF	Stromal Vascular Fraction Cells (Phân đoạn mạch mô đệm)

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Khả năng biệt hóa của tế bào gốc trung mô.....	8
Hình 1.2. Phân đoạn mạch mô đệm SVF	9
Hình 1.3. Quá trình biệt hóa của tế bào gốc trung mô từ mô mỡ	11
Hình 2.1. Sơ đồ quy trình phân lập SVF từ mô mỡ	18
Hình 3.1. Quá trình phân lập SVF từ mô mỡ	23
Hình 3.2. Mô mỡ sau khi xử lý collagenase đã được ly tâm.....	24
Hình 3.3. Hình thái tế bào sau 24 giờ phân lập từ mô mỡ (xử lý collagenase).....	25
Hình 3.4. Hình ảnh ở các ngày 2, 7 và 16 sau khi nuôi cấy sơ cấp tế bào gốc trung mô từ mô mỡ không xử lý collagenase ở độ phóng đại 40X.....	25
Hình 3.5. Hình ảnh ở các ngày 2,3,7,10 và 16 sau khi nuôi cấy sơ cấp tế bào gốc trung mô từ mô mỡ được phân giải bằng collagenase ở các thời gian 30 phút, 60 phút, 180 phút và 360 phút ở độ phóng đại 40X.....	27
Hình 3.6. Nuôi cấy thứ cấp tế bào gốc trung mô từ mô mỡ ở độ phóng đại 100X	28
Hình 3.7. Hình ảnh biểu đồ số lượng tế bào ASC ở giai đoạn đầu.....	29
Hình 3.8. Biểu đồ phần trăm sống của tế bào ASC với các mẫu không xử lý phân tách (-), mẫu xử lý phân giải tế bào bằng collagenase ở các thời gian 30, 60, 180, 360 phút. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. * $p < 0.05$	30
Hình 3.9. Đánh giá kháng nguyên bề mặt của ASC ở các thời gian xử lý collagenase khác nhau (30, 60, 180, 360 phút) sau khi xử lý với collagenase	33
Hình 3.10. Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ biệt hóa trong môi trường biệt hóa tạo mỡ và xương sau 14 ngày chưa nhuộm ở độ phóng đại 40X.....	35
Hình 3.11. Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ biệt hóa trong môi trường biệt hóa tạo mỡ và xương sau 14 ngày nhuộm bằng Oil red - O và Alizarin đỏ ở độ phóng đại 200X	37
Hình 3.12. Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ biệt hóa trong môi trường biệt hóa tạo mỡ sau 14 ngày nhuộm bằng Oil red - O các giọt mỡ bắt màu đỏ độ phóng đại 200X.....	38
Hình 3.13. Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ biệt hóa trong môi trường biệt hóa tạo xương sau 14 ngày nhuộm bằng Alizarin đỏ nguyên bào xương bắt màu cam độ phóng đại 200X.	38

MỞ ĐẦU

Tế bào gốc có tiềm năng ứng dụng lớn trong y học tái tạo nhờ khả năng đặc tính biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác nhau. Tế bào gốc (TBG) là những tế bào chưa chuyên hoá hoặc chuyên hoá một phần, có khả năng biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác nhau trong cơ thể. Chúng có khả năng tự phân chia và tái tạo, và được coi là nguồn gốc của tất cả các tế bào chuyên hóa trong cơ thể. Tế bào gốc còn là công cụ rất quan trọng trong nghiên cứu và có tiềm năng lớn để sử dụng trong lâm sàng. Cho đến nay, các loại tế bào gốc không phải là tế bào gốc phôi 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. Loại tế bào gốc hiện đang được sử dụng cho điều trị gồm ba nhóm chính: Tế bào gốc tạo máu, tế bào gốc trung mô và tế bào gốc biểu mô. Trong ba nhóm nói trên, tế bào gốc từ mô mỡ (Adipose Derived Stem cells - ASCs) đã và đang được quan tâm rất nhiều bởi tiềm năng to lớn. Thứ nhất mô mỡ là loại mô rất phổ biến, có nhiều trong cơ thể người, dễ dàng thu nhận mà không ảnh hưởng lớn tới sức khỏe của con người như việc thu tủy xương. Thứ hai, mô mỡ của con người là một nguồn dồi dào và đồng thời chứa nhiều tế bào gốc trung mô phục vụ trong y học điều trị và y học thẩm mỹ. SVF (stroma vascular fraction - SVF) là một tập hợp các tế bào không đồng nhất chứa trong mô mỡ vì vậy việc sử dụng phân đoạn mạch đệm có nguồn gốc từ mỡ ở người trong điều trị đã tăng lên trong những năm gần đây.

Có hai phương pháp phân lập SVF từ mô mỡ chính đó là sử dụng enzyme (collagenase) và phương pháp cơ học (lực cắt, lực ly tâm, lực bức xạ và áp suất [1]. Đặc biệt phương pháp enzyme collagenase được chỉ định trong phân lập SVF vì nó phá vỡ chất nền ngoại bào (ECM) và sự liên kết của các tế bào mỡ và các tế bào khác [2]. Collagenase là một loại enzyme thường được sử để phân tách tế bào ở các loại mô khác nhau, bao gồm tuyến tụy, tế bào thần kinh và gan. Collagenase hoạt động bằng cách cắt các protein ma trận ngoại bào, đặc biệt là collagen giúp rời lỏng các mô và giải phóng các tế bào. Xử lý collagenase có thể gây ra những thay đổi trong protein bề mặt tế bào, hình thái tế bào có thể ảnh hưởng đến chức năng của tế bào. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá hiệu quả của enzyme collagenase, đối với

việc phân lập SVF từ mô mỡ ở các khoảng thời gian ủ khác nhau. Mục tiêu chính là xác định enzyme và thời gian phân tách tối ưu để đạt được hiệu quả phân lập SVF để thu được nhiều tế bào gốc trung mô có khả năng sống cao đồng thời đảm bảo được tính gốc của tế bào và khả năng biệt hoá phải được đảm bảo. Vì vậy trên cơ sở đó đã lựa chọn đề tài: ***“Nghiên cứu sự ảnh hưởng của thời gian sử dụng collagenase tới sự phân tách mạch mô đệm SVF và sự sống của tế bào gốc trung mô”*** nhằm mục tiêu nghiên cứu:

- Đánh giá khả năng phân lập SVF từ mô mỡ của collagenase ở các thời gian xử lý khác nhau.
- Đánh giá ảnh hưởng của collagenase tới chất lượng của tế bào ASC qua sự biểu hiện các marker bề mặt bằng phương pháp phân tích dòng chảy (flow cytometry).
- Đánh giá ảnh hưởng của collagenase tới khả năng biệt hoá (differentiation) của ASC.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. TỔNG QUAN VỀ TẾ BÀO GỐC

1.1.1. Khái niệm tế bào gốc

Tế bào gốc là loại tế bào có khả năng phân chia không giới hạn để tạo ra các tế bào gốc có chức năng tương tự (duy trì tính gốc) và trong những điều kiện nhất định, chúng có thể biệt hóa thành các loại tế bào có chức năng riêng biệt nhằm bổ sung hoặc thay thế các tế bào bị tổn thương hay già hóa.

Tế bào gốc được phân biệt với tế bào thông thường bởi 2 đặc điểm chính: Thứ nhất, chúng là các tế bào chưa biệt hóa có khả năng tự đổi mới thông qua quá trình nguyên phân, thường ở trạng thái ít hoạt động (đôi khi chúng ở trạng thái bất hoạt trong thời gian dài). Thứ hai, dưới tác động của các điều kiện môi trường xung quanh, chúng có thể biến đổi thành các tế bào đặc hiệu cho mô hoặc cơ quan với các chức năng đặc biệt. Ở một số cơ quan như niêm mạc ruột, biểu bì da hay tủy xương, các tế bào gốc thường phân chia liên tục để sửa chữa và thay thế các tế bào già yếu hoặc bị tổn thương. Tuy nhiên, ở nhiều cơ quan khác như tụy, tim, cơ, thần kinh thì các tế bào gốc chỉ phân chia dưới các điều kiện đặc biệt [3].

1.1.2. Phân loại tế bào gốc

Dựa theo khả năng biệt hóa, tế bào gốc có phân loại thành các loại sau [4]: Tế bào gốc toàn năng (Totipotent Stem Cells) chỉ thấy ở thời kỳ sớm của phôi thai trong giai đoạn phôi 8 tế bào. Mỗi tế bào đều có khả năng tạo thành một cơ thể hoàn chỉnh với khả năng biệt hóa thành tất cả các loại tế bào trong cơ thể. Tế bào gốc vạn năng (Pluripotent Stem Cells) loại tế bào này tồn tại dạng không biệt hóa ở lớp tế bào trong của túi phôi, có thể biệt hóa thành hơn 200 loại tế bào khác nhau trong cơ thể. Tế bào gốc đa tiềm năng (Multipotent Stem Cells) đây là loại tế bào có nguồn gốc từ mô của bào thai, máu cuống rốn, và tế bào gốc trưởng thành. Chúng có thể biệt hóa thành một số loại tế bào có quan hệ mật thiết với nhau. Tế bào gốc vài tiềm năng (Oligopotent stem cells) loại tế bào này sở hữu khả năng biệt hóa thành một số ít loại tế bào như các tế bào gốc lympho. Tế bào gốc đơn tiềm năng đây là loại tế bào có khả năng biệt hóa thành một loại tế bào nhất định. Hầu hết các mô biểu mô đều được tự đổi mới trong suốt đời sống nhờ sự có mặt của các tế bào gốc đơn tiềm năng này. Theo nguồn gốc tế bào cho đến nay các nhà khoa học đã tiếp cận với 4 loại tế bào gốc trong cơ thể người và động vật: Tế bào gốc phôi, tế

bào gốc trưởng thành, tế bào gốc ung thư và tế bào gốc tiềm năng cảm ứng (iPSCs).

Tế bào gốc phôi là các tế bào gốc phôi được tách từ phôi đầu và phôi nang ở giai đoạn phát triển trước khi làm tổ trong tử cung. Mỗi tế bào nút phôi đều có tiềm năng biệt hóa thành tất cả các loại tế bào thuộc các cơ quan khác nhau trong cơ thể như tim, phổi, tinh trùng, trứng và các mô khác nhưng khả năng này của chúng giảm nhanh chóng sau khi làm tổ. Chúng là những tế bào vạn năng [4].

Tế bào gốc trưởng thành là tế bào gốc của cơ thể từ giai đoạn thai nhi đến cơ thể trưởng thành, được tìm thấy ở mô hay cơ quan xác định và thường tồn tại trong các ổ như máu cuống rốn, nhau thai, dịch ối, tủy xương. Chúng là các tế bào gốc đơn tiềm năng hay đa tiềm năng vì có thể tự đổi mới và biệt hóa thành một hay một số loại tế bào đặc hiệu mô. Vai trò chính của các tế bào gốc trưởng thành trong cơ thể sống là duy trì và sửa chữa mô mà chúng có khả năng biệt hóa thành các tế bào chuyên hóa cho mô đó. Gần đây, nhiều nghiên cứu tập trung khai thác các tế bào gốc có thể được lấy từ bánh nhau và dây rốn của em bé sau khi sinh ra. Thực tế, bánh nhau và dây rốn được coi là một nguồn tế bào gốc tiềm năng, bởi vì chúng có khả năng tái tạo và phát triển thành các loại tế bào khác nhau. Hiện nay, chỉ có số ít người lưu trữ dây rốn hay bánh nhau của em bé sau khi sinh do chi phí bảo quản khá tốn kém và xác suất những người lưu trữ mô lại có bệnh cần được điều trị bằng tế bào gốc này cũng không phải cao.

1.2. TỔNG QUAN TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ MÔ MỠ

1.2.1. Tế bào gốc trung mô

Tế bào gốc trung mô (MSC) là một loại tế bào gốc trưởng thành có nguồn gốc từ trung bì. MSC lần đầu tiên được phát hiện bởi Friedenstein và các đồng nghiệp của ông trong nuôi cấy tủy xương chuột cách đây nửa thế kỷ [5]. Sau đó, các tế bào được phân lập từ một số mô trưởng thành, bao gồm mô mỡ [6], tủy [7] và mô bị loại bỏ sau sinh, chẳng hạn như dây rốn [8] [9] [10] và máu cuống rốn [11]. Việc phát hiện ra tính chất đa tiềm năng của tế bào gốc trung mô là một bước đột phá trong lĩnh vực tế bào gốc. Tế bào gốc trung mô lần đầu tiên được mô tả là dạng tế bào từ tủy xương có khả năng tạo dòng, bám dính bề mặt nuôi cấy và có khả năng biệt hóa thành tế bào mỡ, tế bào xương và tế bào sụn. Ngoài ra, chúng còn được tìm thấy trong nhau thai, máu

cuống rốn, lớp Wharton's jelly, dịch ối, tủy rang, mô mỡ, lớp trung bì của da [12]. Thuật ngữ “Tế bào gốc trung mô” được đặt ra vào năm 1991 bởi Arnold Caplan để mô tả các tế bào này đặc tính tương tự như đã nêu từ khi được phát hiện. [13] Trong đó “trung mô” là thuật ngữ để chỉ mô liên kết thừa đang phát triển của một phôi, chủ yếu bắt nguồn từ trung bì, và tạo ra phần lớn các tế bào của mô liên kết. Định nghĩa thường được mở rộng để bao hàm các tế bào mô liên kết ở mô trưởng thành như mô nguyên bào sợi (cơ), xương, sụn, mỡ. Định nghĩa về tế bào gốc trung mô (MSC) được xác định bởi Hiệp hội Quốc tế về Liệu pháp tế bào (ISCT) năm 2006, theo xác định tế bào gốc trung mô bao gồm ba tiêu chí tối thiểu: thứ nhất, tế bào gốc trung mô bám dính lên bề mặt trong điều kiện nuôi cấy in vitro tạo thành quần thể tế bào có hình thái tương tự nguyên bào sợi. Thứ hai, tế bào gốc trung mô có khả năng biệt hóa thành tế bào xương, tế bào mỡ và tế bào sụn trong điều kiện nuôi cấy thích hợp. Thứ ba, tế bào gốc trung mô có biểu hiện các phân tử chỉ thị bề mặt bao gồm dương tính với CD105, CD73 và CD90 đồng thời âm tính với CD45, CD34, CD14, hoặc CD11b, CD79a hoặc CD19 và HLA-DR. [14]. Chúng có khả năng duy trì tính gốc và biệt hóa thành một vài loại tế bào chuyên hóa khác nhau. Vai trò nội sinh của MSC nói chung là duy trì các ổ tế bào gốc và từ đó, chúng tham gia vào cân bằng nội mô, chữa lành vết thương và tái tạo mô. Nguồn tế bào gốc này vượt trội hơn so với tế bào gốc phôi hay tế bào gốc trưởng thành bởi những ưu điểm sau: Không gặp phải vấn đề y đức, việc sử dụng mỗi tế bào gốc phôi đồng nghĩa với việc phá hủy một cá thể người nên tế bào gốc phôi bị cấm sử dụng trong nghiên cứu khoa học.

1.2.2. Nguồn phân lập tế bào gốc trung mô

Trước đây, nguồn thu nhận chủ yếu của tế bào gốc trung mô là tủy, xương. Tuy nhiên, việc phân lập tế bào từ tủy xương gây đau đớn cho bệnh nhân vì dễ gặp những rủi ro như nhiễm khuẩn, tiềm năng của tế bào gốc trung mô bị giảm dần theo tuổi tác của bệnh nhân. Do vậy, việc nghiên cứu tìm ra các nguồn thu nhận mới hiệu quả khắc phục được những nhược điểm của tế bào gốc trung mô phân lập từ tủy xương là một vấn đề cần thiết và đang được phát triển mạnh mẽ hiện nay. Đã có nhiều báo cáo về việc phân lập tế bào gốc trung mô từ nhiều nguồn khác nhau như máu ngoại vi, mô mỡ, dây rốn, màng hoạt dịch, tủy rang.

Các MSC có nguồn gốc từ mỡ (ASC) và phân đoạn mạch mô đệm (SVF) đóng một vai trò quan trọng trong y học tái tạo và trong điều trị viêm xương khớp [2]. Trong đó, mô mỡ là nguồn thu nhận tế bào gốc trung mô số lượng lớn và ít gây tranh cãi trong cộng đồng vì mô mỡ vừa là rác thải y tế vừa là nguồn tự thân dễ lấy, được biết đến là nguồn cung cấp tế bào gốc trung mô lý tưởng bởi có nhiều ưu điểm: dễ thu nhận, không gây tranh cãi về mặt đạo đức, nguồn cung cấp dồi dào, tiềm năng biệt hóa và tăng sinh cao.

Trong khi đó, việc sử dụng tế bào gốc mỡ rất ít ảnh hưởng tới sức khỏe của người hiến tặng và mô mỡ khá dễ được tái tạo trở lại. Ngoài ra MSC từ mô mỡ giảm thiểu hiện tượng đào thải miễn dịch, có khả năng tăng sinh mạnh mẽ khi nuôi cấy trong môi trường thích hợp và tiềm năng biệt hóa cao. Gần đây nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy khối tế bào gốc SVF (stromal vascular fraction) là một loại tế bào được lấy từ mỡ cơ thể, và được sử dụng để tái tạo các mô và cơ quan khác nhau trong cơ thể. SVF chứa nhiều loại tế bào, bao gồm tế bào mềm mạch máu, tế bào bạch cầu, tế bào bạch huyết và tế bào gốc. Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng SVF có thể được sử dụng để tái tạo xương, sụn, mô mỡ và các cơ quan khác trong cơ thể [15] [16]. Nhờ những ưu điểm này mà MSCs thu hút được nhiều sự quan tâm của các nhà nghiên cứu và là nguồn tế bào hứa hẹn đầy triển vọng trong tái tạo mô.

1.2.3. Đặc điểm của tế bào gốc trung mô

Friedenstein AJ [5] đã mô tả tế bào gốc trung mô là tế bào bám bề mặt đĩa nuôi và có khả năng tạo cụm (colony formation) và chúng có khả năng tự làm mới, 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 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 quan sát thấy trong các điều kiện nuôi cấy kích thích sự biệt hóa tế bào thành ba dòng: tạo xương, tạo mỡ và tạo sụn. Ngoài ra, MSC có thể biệt hóa thành các dòng khác nhau của trung bì, ngoại và nội bì như xương, mỡ, cơ, tế bào thần kinh trong các điều kiện 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.

- **Khả năng tự đổi mới.**

Một trong những đặc trưng của tế bào gốc là khả năng tự đổi mới. Đó là quá trình mà trong đó một tế bào gốc phân chia đối xứng hoặc không đối xứng để tạo ra một hoặc hai tế bào con có tiềm năng phát triển tương tự như tế bào mẹ. Khả năng tự đổi mới là điều cần thiết cho tế bào gốc mở rộng số lượng của chúng trong quá trình phát triển và duy trì trong các mô trưởng thành hay khôi phục lại tế bào gốc sau khi bị tổn thương [17]. Khả năng tự đổi mới của tế bào gốc dùng chỉ những con đường và cơ chế sinh học giúp bảo tồn tình trạng gốc không biệt hóa của tế bào gốc. Nhìn chung cơ chế này đều liên quan đến quá trình điều hòa sự phân chia và tăng sinh của tế bào [18].

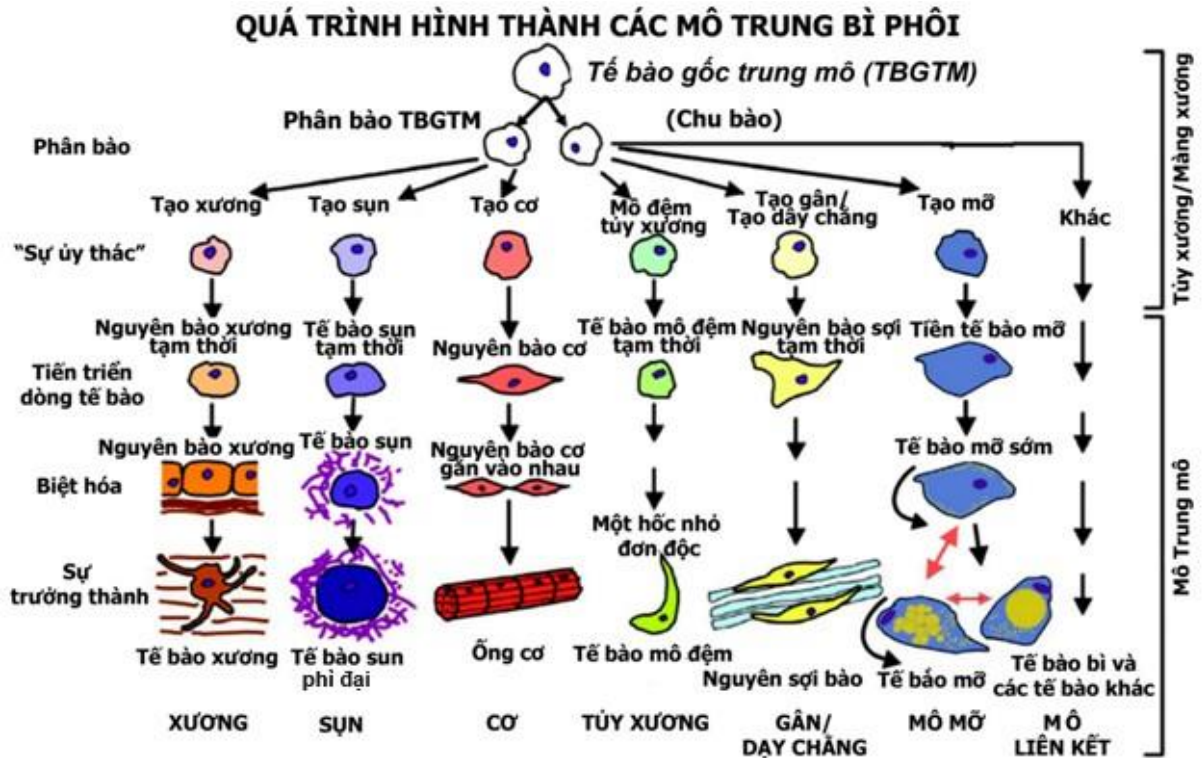
- **Tiềm năng biệt hóa**

Ngay từ những năm 1960, sau khi có phát hiện về tế bào gốc trung mô, người ta đã bắt đầu nghiên cứu về tiềm năng biệt hóa của nó trong in vitro. Trong những nghiên cứu ban đầu này, các nhà khoa học đã chứng minh được rằng MSC phân lập từ tủy xương người, chó, thỏ, chuột có khả năng biệt hóa thành các tế bào gốc trung bì [19] [20]. Các nghiên cứu gần đây của nhà khoa học cho thấy, MSC không chỉ có khả năng biệt hóa thành các tế bào có nguồn gốc từ trung bì mà còn có thể biệt hóa thành nhiều loại tế bào có nguồn gốc nội bì và ngoại bì, chẳng hạn như tế bào gan, tế bào thần kinh, tế bào tim. Tiềm năng biệt hóa đa năng của tế bào gốc trung mô thường được kiểm tra in vitro bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy đặc biệt kích thích tế bào biệt hóa thành dòng chức năng mong muốn.

- **Khả năng di trú**

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. Một số báo cáo đã cho thấy rằng sự di chuyển của tế bào gốc trung mô phụ thuộc vào các tương tác của chemokine và thụ thể khác nhau [21] [22]. Các cặp thụ thể chemokine và cytokine này có vai trò quan trọng trong bạch cầu trong việc đáp ứng với tổn thương và phản ứng viêm hoặc tế bào gốc máu (HSC) và được cho là hoạt động tương tự trong tế bào gốc trung mô. Một vết thương không lành liên tục

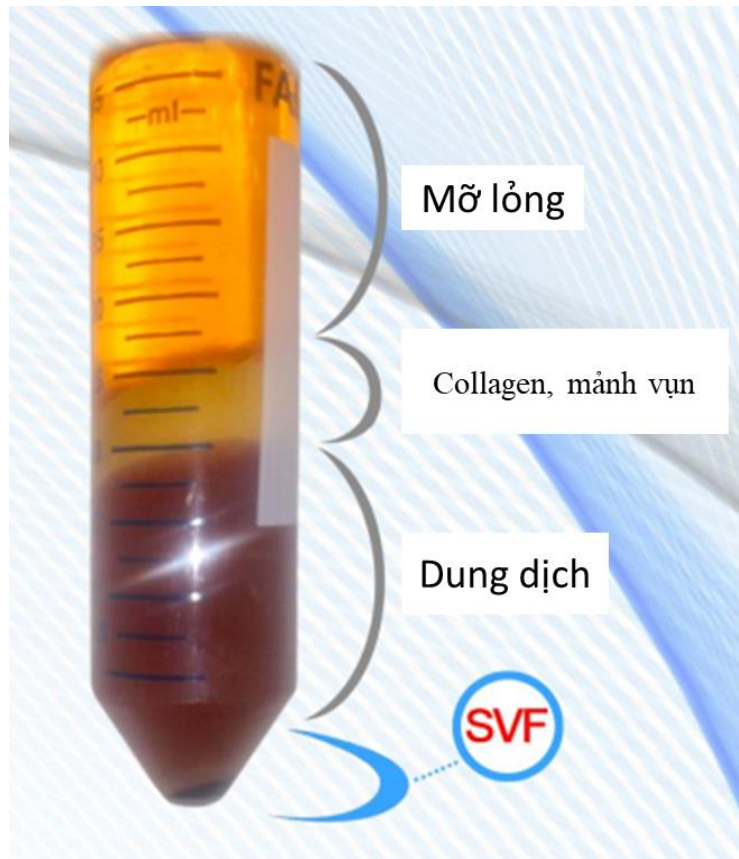
tạo ra các chất trung gian gây viêm, bao gồm các cytokine, chemokine và các phân tử hóa học khác. Các tín hiệu viêm liên tục này có thể trở thành đích cho việc di chuyển của tế bào gốc trung mô.



Hình 1.1. Khả năng biệt hóa của tế bào gốc trung mô [23]

1.2.4. Phân đoạn mạch mô đệm (Stromal Vascular Fraction Cells - SVF)

Phân đoạn mạch mô đệm (SVF) (hình 1.2) là một tập hợp các tế bào không đồng nhất chứa trong mô mỡ được phân lập theo cách truyền thống là sử dụng các enzyme như collagenase. Với việc loại bỏ các tế bào mỡ, mô liên kết và máu từ lipoaspirate, SVF (hình 1.2) được tạo ra, một hỗn hợp bao gồm tế bào gốc trung mô, tế bào thiên thân nội mô, tế bào điều hòa T, đại thực bào và tế bào tiền mỡ.



Hình 1.2. Phân đoạn mạch mô đệm SVF [24]

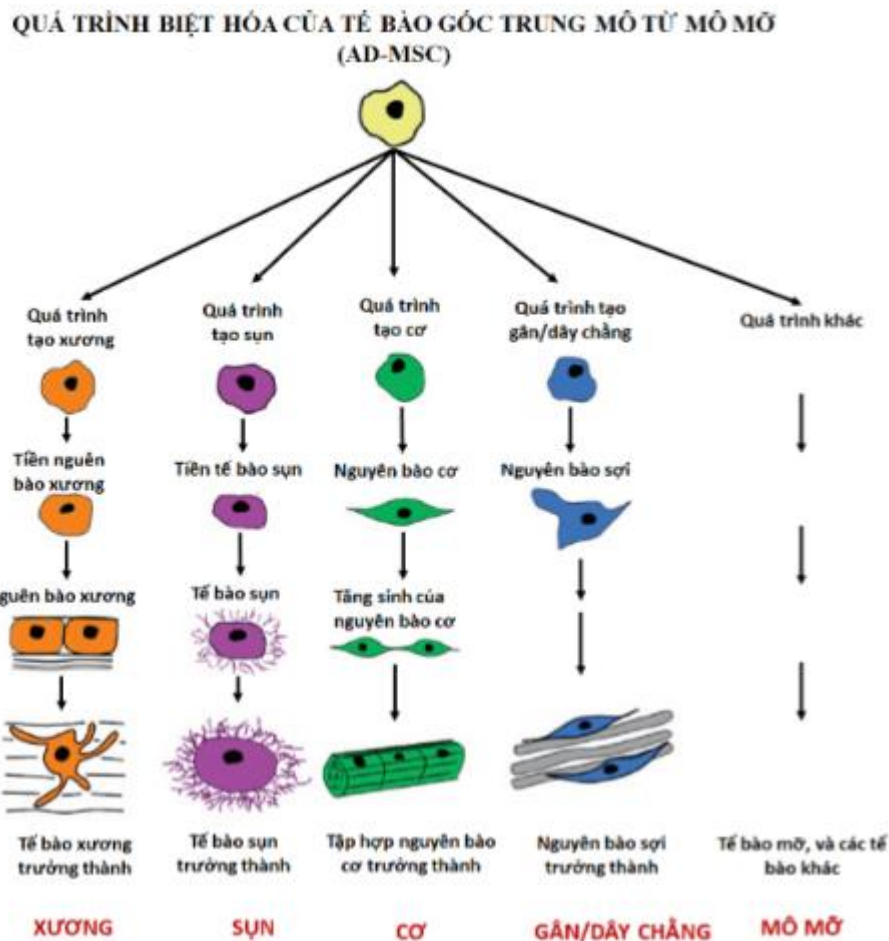
1.2.5. Tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ mô mỡ

Tế bào gốc đa tiềm năng được phát hiện trong mô mỡ của người được gọi là tế bào gốc mô mỡ (ASC). Tế bào gốc mô mỡ lần đầu tiên được xác định là tế bào gốc trung mô vào năm 2001 [25] và từ đó mô mỡ được nghiên cứu trong công nghệ mô và y học tái tạo. Trong mô mỡ của chúng ta, có một phân phân lớp chứa mạch máu mô đệm (SVF) bao gồm các tế bào nội mô mạch máu, tế bào gốc trung mô ngoài các tế bào mỡ.

Các nhà nghiên cứu đề xuất nhiều cách thức phân lập và nuôi cấy tế bào gốc trung mô chủ yếu dựa vào hình thái cùng đặc tính bám dính vào bề mặt nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng thích hợp. Môi trường nuôi cấy cũng được công bố ở nhiều dạng công thức khác nhau. Các môi trường cơ bản thường được dùng là D'MEM, DMEM-F12, CMRL1066... với thành phần và hàm lượng các chất bổ sung như glucose chưa có sự thống nhất. Do tế bào gốc mô mỡ biểu hiện các marker tế bào đặc hiệu cho tế bào gốc trung mô: CD34, CD44, CD106, CD117, và STRO-1 mà không biểu hiện các marker dòng tạo máu (CD31, CD144, yếu tố von willebrand) nên các nhà nghiên cứu

dựa vào sự liên kết giữa kháng thể và kháng nguyên bề mặt tế bào gốc trung mô để tách tế bào gốc trung mô khỏi nhóm các tế bào khác [26]. Các tế bào trung mô từ mô mỡ trong điều kiện nuôi cấy có thể biệt hóa thành nguyên bào xương, nguyên bào sụn, nguyên bào cơ, và các dòng tế bào mầm của mô mỡ [4]. Ngày nay, tế bào gốc từ tủy xương và mô mỡ được xác định là rất giống nhau về quần thể tế bào và kiểu hình tế bào.

Có hai kiểu mô mỡ chính khác nhau về hình thái và chức năng: mô mỡ màu trắng và mô mỡ nâu. Mỡ trắng trữ năng lượng dưới dạng lipid và sản xuất các hormone trong khi mỡ nâu cung cấp nhiệt lượng cho cơ thể. ASCs được tìm thấy ở mô mỡ trắng ở khu vực quanh mạch máu. Zuk và cs [25] đã phát triển một phương pháp được sử dụng rộng rãi để phân lập ASCs từ mô mỡ trắng vào năm 2001: Mô mỡ được cắt nhỏ và bị phân cắt với enzyme collagenase loại I rời ly tâm. Sau khi ly tâm, phần lắng được gọi là phân lớp mạch nền (stroma vascular fraction - SVF) chứa khoảng 2.000.000 - 6.000.000 tế bào sau khi tách từ 1ml mỡ hút được sau khi xử lý. SVF chứa gồm các loại tế bào khác nhau như tế bào gốc trung mô, tế bào gốc mỡ, tế bào gốc tạo máu và các tế bào không phải tế bào gốc như nguyên bào sợi, tế bào máu, tiền thân tế bào mỡ và tế bào quanh mao mạch, các tế bào nội mô, tế bào tiền thân nội mô, các tế bào cơ trơn, bạch cầu, hồng cầu. Nhưng hiệu quả của kỹ thuật này còn thấp do tỷ lệ tế bào gốc trong phân lớp mạch nền không cao [26]. Để phân lập tế bào gốc trung mô từ mô mỡ, tất cả các tế bào đều được nuôi trên bề mặt nuôi cấy plastic trong một khoảng thời gian. Khi đó, các tế bào có khả năng bám dính trên bề mặt nuôi cấy có khả năng sống sót trong khi các tế bào phát triển huyền phù như tế bào tạo máu không có khả năng tăng sinh sẽ bị loại bỏ trong quá trình nuôi cấy. Sau vài lần cấy truyền, các tế bào không phải tế bào gốc như tế bào nội mô có khả năng tăng sinh và chu kỳ sống có giới hạn không thể duy trì trong điều kiện nuôi cấy nên cũng mất đi trong quá trình nuôi. Quần thể tế bào bám dính vào bề mặt nuôi cấy này có thể được duy trì trong điều kiện in vitro trong thời gian tương đối dài với khả năng tăng sinh ổn định và có khả năng biệt hóa thành các dạng tế bào khác nhau.



Hình 1.3. Quá trình biệt hóa của tế bào gốc trung mô từ mô mỡ [27]

1.2.6. Tình hình nghiên cứu trên thế giới và ở Việt Nam

Đúng với những thông tin đã đề cập trước đó, cơ quan quản lý Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) đã cho phép thực hiện các thí nghiệm lâm sàng để đánh giá tính an toàn và hiệu quả của việc sử dụng tế bào gốc trung mô trong điều trị các bệnh lý lâm sàng. Cụ thể, trên trang web clinicaltrials.gov, có hơn 115 nghiên cứu độc lập trên toàn thế giới về việc sử dụng tế bào gốc trung mô để điều trị cho 374 loại bệnh khác nhau [28], bao gồm rối loạn chuyển hóa, rối loạn hệ miễn dịch, Alzheimer, chấn thương thần kinh, bệnh lý liên quan đến tim mạch và nhiều loại bệnh khác. Những bệnh được quan tâm nhiều nhất bao gồm các bệnh tim mạch, tiểu đường, tự kỷ, chấn thương não, tủy sống, các bệnh tự miễn, viêm xương khớp và xơ gan. Tuy nhiên, việc sử dụng tế bào gốc trung mô để điều trị các bệnh lý vẫn còn nhiều thử thách và nghiên cứu cần được tiếp tục để có thể áp dụng rộng rãi và hiệu quả trong thực tế. Trong các nghiên cứu lâm sàng đã được tiến hành, việc truyền tế bào gốc trung mô vào cơ thể bệnh nhân không ghi nhận được các trường hợp có ảnh hưởng bất

lợi đến sức khỏe người bệnh, [29] chứng tỏ tính an toàn của phương pháp này. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cũng đã chứng minh được tính hiệu quả của tế bào gốc trung mô trong điều trị nhiều loại bệnh khác nhau.

1.2.7. Các phương pháp phân lập SVF từ mô mỡ

- **Phân lập bằng enzyme**

Phương pháp enzyme (collagenase) đặc biệt được dùng để phân lập tế bào SVF từ mô mỡ [2]. Các phương pháp sử dụng enzyme (collagenase) phân giải protein để phá vỡ chất nền ngoại bào giữa các mô mỡ với nhau.

Xử lý collagenase để tách tế bào có một số ưu điểm so với phương pháp cơ học hoặc hóa học. Nó cho phép tách tế bào nhẹ nhàng và hiệu quả mà không làm hỏng màng tế bào hoặc làm thay đổi kiểu hình tế bào. Hơn nữa collagenase đặc hiệu cao đối với sự phân hủy collagen và không ảnh hưởng đến các phân tử ngoại bào khác, điều này có thể rất quan trọng để bảo tồn chức năng của tế bào trong môi trường nuôi cấy [30].

Các phương pháp cơ học hấp dẫn vì chúng đơn giản, nhanh chóng và thường không liên quan đến thiết bị đắt tiền, mặc dù đắt hơn so với các phương pháp cơ học nhưng phương pháp sử dụng enzyme đã cho năng suất tế bào cao hơn nhiều so với phương pháp cơ học.

- **Phân lập cơ học**

Các phương pháp cơ học như cắt, rung, ly tâm để phân lập SVF cho sản lượng tế bào mỡ thấp hơn đáng kể. Sản lượng tế bào từ 10.000 tế bào có nhân/cc đến 240.000 tế bào có nhân/cc [31]. Do ASC tập trung trong các cấu trúc mạch máu vừa và nhỏ của mô mỡ và không có sự phân giải của enzyme nên nhiều tế bào tiền thân vẫn chưa được phân tách ra khỏi mạch máu. Mặc dù phương pháp cơ học giúp tiết kiệm nhiều chi phí hơn nhưng năng suất tế bào khá thấp.

1.2.8. Phân tách tế bào gốc trung mô

Phương pháp enzyme có những lợi thế như dễ sử dụng, giảm nguy cơ nhiễm bẩn, mặc dù chi phí của enzyme có thể mắc hơn nhưng cho hiệu quả tương đối. 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 dày bao phủ hoàn toàn bề mặt đĩa nuôi cấy. Sự tăng sinh của tế bào sẽ chậm lại khi tế bào đã bao phủ toàn bộ bề mặt đĩa. Ta tiến hành thu hoạch tế bào để nghiên cứu, xử lý hoặc nuôi cấy đòi hỏi phải phân tách và tách lớp tế bào [32]. Một loạt

các phương pháp phân tách đã được sử dụng để tách các tế bào bám dính được nuôi cấy trong các đĩa nuôi để phân tách 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 [33]. Các phương pháp tách tế bào cũng rất quan trọng đối với việc duy trì tính gốc của tế bào gốc [34] [35].

Ứng dụng lâm sàng tế bào gốc trung mô

- *Ứng dụng MSC điều trị bệnh gan*

Liên quan đến bệnh gan, MSC đã được sử dụng để điều trị xơ gan ở một số bệnh nhân hạn chế. Trong một thử nghiệm giai đoạn I, bốn bệnh nhân bị xơ gan. Họ được truyền MSC tự thân qua tĩnh mạch ngoại biên. Không có tác dụng phụ ở bệnh nhân trong quá trình theo dõi. Chất lượng cuộc sống của cả bốn bệnh nhân đều được cải thiện khi kết thúc theo dõi. Trong một thử nghiệm lâm sàng giai đoạn I-II khác, 8 bệnh nhân (bốn người viêm gan B, một người viêm gan C, một người nghiện rượu và hai người mắc bệnh gan mật) mắc bệnh gan giai đoạn cuối đã được đưa vào. Sau khi tiêm MSC tự thân, tất cả bệnh nhân dung nạp tốt và chức năng gan của họ được cải thiện, cho thấy tính khả thi, an toàn và hiệu quả của việc sử dụng MSC như một phương pháp điều trị bệnh gan giai đoạn cuối [36].

- *Ứng dụng tế bào gốc trung mô nguồn gốc từ mô mỡ điều trị tái tạo mô mềm/ phẫu thuật sọ mặt*

Trong phẫu thuật tái tạo, SVF và AD-MSC là một nguồn quan trọng do khả năng kích thích sự hình thành mạch, điều hòa miễn dịch và đa biệt hóa. Lâm sàng các liệu pháp sử dụng khả năng của AD-MSC để phân biệt tế bào sụn, tế bào xương và tế bào mỡ cho phẫu thuật tái tạo để sửa chữa các khiếm khuyết về sụn, xương hoặc mô mềm. Khả năng phân biệt tế bào sụn tự nhiên của AD-MSC được hỗ trợ bởi hỗn hợp các thành phần đặc biệt và các yếu tố tăng trưởng: TGF β , dexamethasone và ascorbate. Một số nhóm khoa học đã sử dụng các kỹ thuật nuôi cấy và vật liệu sinh học đặc biệt (nuôi cấy micromass 3D, khung axit hyaluronic xốp, khung keo fibrin, microbead alginate, thêm TGF- β) đã chứng minh sự cải thiện về hiệu quả của quá trình biệt hóa sụn trong cơ thể [37].

AD-MSC lần đầu tiên được sử dụng vào năm 2004 trong tái tạo xương [38]. AD-MSCs, kết hợp với xương tự thân và chất keo fibrin, có thể kích thích sự hình thành xương mới. sử dụng hạt (β -tricalcium phosphate) và giàn

giáo giúp xương sửa chữa. AD-MSK có tiềm năng cao để phân biệt thành tế bào mỡ và để thúc đẩy sự hình thành mạch. Việc thêm ADMSC vào mô ghép mỡ có thể làm tăng khả năng sống sót của các tế bào được cấy ghép. Sử dụng kết hợp quần thể SVF và mô mỡ tạo ra kết quả tốt hơn về tỷ lệ sống sót sau cấy ghép so với sử dụng tế bào không có SVF, như đã thực hiện ở 9 bệnh nhân [39].

Bên cạnh một số ứng dụng kể trên, tế bào gốc trung mô từ mô mỡ còn được sử dụng để tái tạo da, xương, tái tạo mô gan và cải thiện chức năng gan [40], sửa chữa một số tổn thương trên tim và mạch máu [41],..

1.2.9. Collagenase

Collagenase là một loại enzyme thường được sử dụng để phân tách tế bào ở các loại mô khác nhau, bao gồm hệ thần kinh, tuyến tụy và gan. Collagenase hoạt động bằng cách cắt các protein ma trận ngoại bào, đặc biệt là collagen giúp nối lỏng các mô và giải phóng các tế bào. Tác dụng của collagenase đối với tế bào trong quá trình phân ly đã được nghiên cứu rộng rãi [42]. Xử lý collagenase có thể gây ra những thay đổi trong protein bề mặt tế bào, hình thái tế bào và đường truyền tín hiệu, ảnh hưởng đến chức năng của tế bào. Đặc biệt, điều trị collagenase đã được chứng minh là ảnh hưởng đến sự biểu hiện và hoạt động của integrins, một họ các phân tử kết dính tế bào đóng vai trò quan trọng trong việc di chuyển, tăng sinh và biệt hóa tế bào.

Việc sử dụng collagenase để tách tế bào đã được báo cáo rộng rãi. Đặc biệt. Lasfargues và Moore đã phát triển một phương pháp nuôi cấy liên tục biểu mô tuyến vũ bằng cách sử dụng phương pháp xử lý collagenase để tách tế bào. Phương pháp này liên quan đến việc xử lý mô tuyến vũ bằng collagenase để giải phóng các tế bào, sau đó ly tâm và tái huyền phù các tế bào trong môi trường nuôi cấy giàu chất dinh dưỡng. Các tác giả đã lưu ý rằng việc sử dụng collagenase tạo điều kiện thuận lợi cho việc tách tế bào trong khi vẫn duy trì khả năng tồn tại và hình thái của chúng. Cách tiếp cận này đã được điều chỉnh để nuôi cấy nhiều loại tế bào khác, bao gồm các tế bào gan và tế bào mỡ. Xử lý collagenase để tách tế bào có một số ưu điểm so với phương pháp cơ học hoặc hóa học. Nó cho phép tách tế bào nhẹ nhàng và hiệu quả mà không làm hỏng màng tế bào hoặc làm thay đổi kiểu hình tế bào. Hơn nữa, collagenase đặc hiệu cao đối với sự phân hủy collagen và không gây ảnh hưởng đến các thành phần ngoại bào khác, điều này có thể rất

quan trọng để bảo tồn chức năng của tế bào trong môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên các điều kiện tối ưu để xử lý collagenase có thể khác nhau tùy thuộc vào loại tế bào và nguồn mô. Các yếu tố như nồng độ collagenase thời gian và sự hiện diện của các enzyme hoặc chất ức chế khác đều có thể ảnh hưởng đến hiệu quả của việc tách tế bào.

Tóm lại, collagenase là một công cụ hữu ích để tách tế bào và đã được sử dụng trong nhiều ứng dụng nuôi cấy tế bào. Phương pháp được phát triển bởi Lasfargues và Moore là một ví dụ về việc sử dụng thành công collagenase để nuôi cấy liên tục biểu mô tuyến vú. Tuy nhiên việc tối ưu hóa tách tế bào bằng collagenase là cần thiết đối với từng loại tế bào và nguồn mô cụ thể để đảm bảo tách tế bào hiệu quả và nhẹ nhàng trong khi vẫn duy trì được chức năng và tính gốc của tế bào.

1.2.10. Phân loại collagenase

Collagenase từ *Clostridium histolyticum*, lần đầu tiên được điều chế bởi Mandl và cộng sự, đã được nghiên cứu kỹ lưỡng nhất. Collagenase có sẵn trên thị trường. Clostridial collagenase cũng làm suy giảm các vùng xoắn ốc trong collagen tự nhiên tốt hơn ở liên kết X-GLY trong trình tự Pro-X-Gly-Pro trong đó X thường là axit amin trung tính nhất. Một mình clostridiopeptidase A tinh khiết thường không hiệu quả trong việc phân tách các mô, do quá trình thủy phân không hoàn toàn của tất cả các polypeptide collagen và hoạt động hạn chế của nó đối với nồng độ cao của các protein không phải collagen và các đại phân tử khác được tìm thấy trong chất nền ngoại bào. Collagenase được sử dụng phổ biến nhất để phân ly mô là một chế phẩm thô có chứa clostridiopeptidase A cùng với một số protease polysaccharidase và lipase khác. Collagenase thô rất phù hợp cho sự phân ly mô vì nó chứa enzyme cần thiết để tấn công collagen tự nhiên và các sợi lưới ngoài các enzyme thủy phân các protein, polysaccharit và lipid khác trong ngoại bào của các mô liên kết và biểu mô.

Collagenase thương mại đầu tiên được cung cấp bởi Worthington vào năm 1959. Vào thời điểm đó họ đã cung cấp một loại enzyme thô mà họ chỉ thử nghiệm cho hoạt động collagenase. Cuối cùng với sự hợp tác của nhiều người trong nghiên cứu đã cho ra được 4 loại cơ bản.

Loại 1. Chứa hàm lượng hoạt tính trung bình được thử nghiệm (collagenase, caseinase, clostripain và hoạt tính tryptic). Nó thường được

khuyên dùng cho các chế phẩm tế bào tạo mô biểu mô, gan, phổi, mỡ và tuyến thượng thận.

Loại 2. Chứa hoạt tính clostripain lớn hơn nó thường được sử dụng cho tim, xương, cơ, tuyến giáp và sụn.

Loại 3. Được chọn vì hoạt động phân giải protein thấp. Nó thường được sử dụng cho các tế bào tuyến vú.

Loại 4. Được chọn vì hoạt động tryptic thấp. Nó thường được sử dụng cho các ứng dụng khác mà tính toàn vẹn của thụ thể là quan trọng.

1.3. VẤN ĐỀ ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU Y SINH

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 thời gian sử dụng collagenase tới sự phân tách mạch mô đệm SVF và sự sống 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).

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Các mảnh mô mỡ (âm tính với HBV, HCV, HIV) từ người hiến tặng khỏe mạnh được thông qua Hội đồng Y đức Bệnh viện Phụ sản Hà Nội. Các mảnh mô mỡ được thu nhận từ vùng bụng của người mẹ sau khi sinh (25-35 tuổi), các mảnh mô mỡ được bảo quản trong Phosphate Buffered Saline (PBS) có bổ sung 1% kháng sinh Antibiotic-Antimycotic (Sigma Aldrich) ở nhiệt độ 4°C và vận chuyển về phòng thí nghiệm trong khoảng một giờ sau khi sinh.

2.1.1. Hóa chất, dụng cụ vật tư tiêu hao

Chất enzyme phân tách Collagenase, đệm PBS, FBS (Fetal Bovine Serum, ATCC Mỹ), trizol, Oil Red-O, Alizarin đỏ, PBS, môi trường DMEM high glucose, môi trường biệt hóa, isopropanol, ethanol, chloroform, trypan blue stain (0,4% - Gilco, Mỹ), 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.

2.1.2. 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 flow cytometry, buồng đếm hồng cầu, box cấy, ...

2.1.3. Địa điểm nghiên cứu

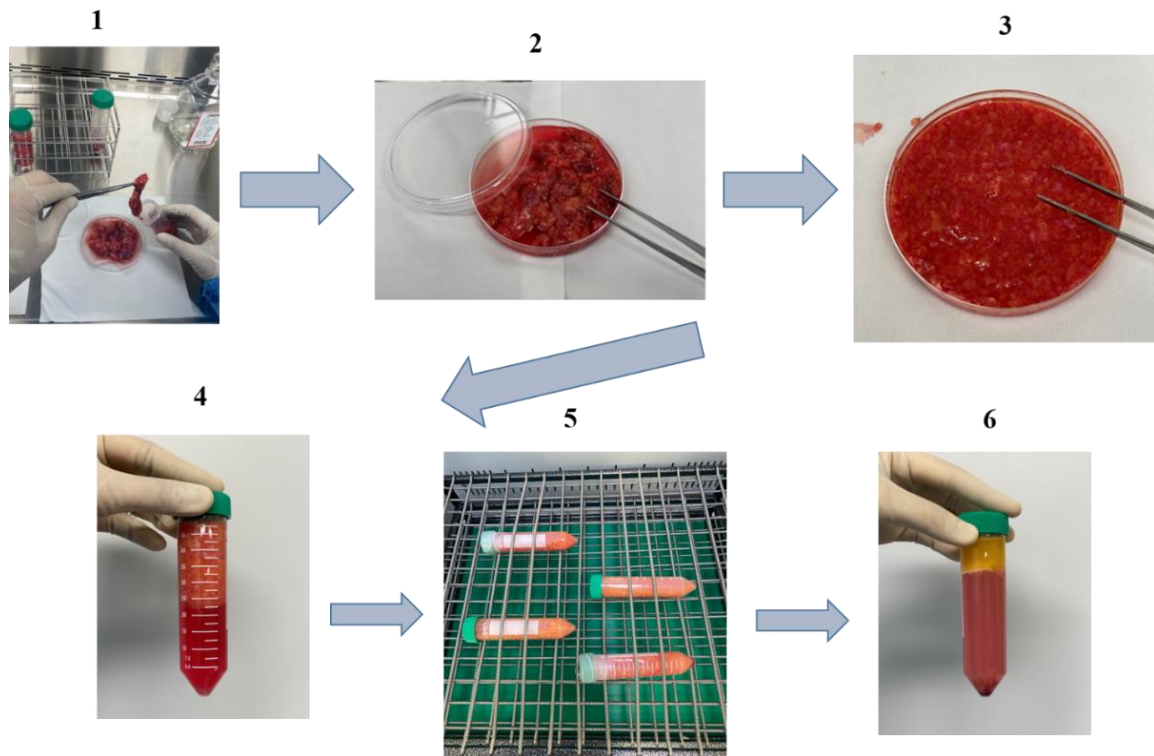
Trung tâm nghiên cứu và ứng dụng tế bào gốc và liệu pháp gen - Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phân lập SVF từ mô mỡ bằng phương pháp xử lý collagenase

Các mảnh mô mỡ sau khi được chuyển đến phòng thí nghiệm, được rửa lại bằng dung dịch PBS bổ sung 1% kháng sinh cho đến khi sạch máu. Chuyển mô mỡ đã rửa sạch vào đĩa nuôi cấy dùng kéo cắt nhuyễn cho tới khi hỗn hợp được cắt đồng nhất, dùng pipet hút mảnh mỡ vào các ống fancol, sau đó quan sát lượng thể tích mỡ thu được sau khi cắt. Tiếp đó, loại bỏ PBS và bổ sung tỉ lệ 1:1 dung dịch collagenase (có bổ sung 1% Antibiotic -

Antimycotic (Sigma Aldrich)). Dùng parafilm quấn kín quanh nắp ống rồi đưa vào máy lắc tốc độ 150 v/p ở nhiệt độ 37°C trong các khung giờ khác nhau (30 phút, 60 phút, 180 phút, 360 phút). Sau đó mang ống fancel đi ly tâm 1500 v/phút ở 4°C trong 5 phút. Phần mạch mô đệm sẽ hiện rõ khi các tế bào màu đỏ sẫm kết thành tầng viên ở phía dưới cần thận loại bỏ lớp dầu và phía trên và các tế bào mỡ chính, lớp tế bào này sẽ xuất hiện dưới dạng một lớp tế bào nổi màu vàng. Để lại một lượng nhỏ dung dịch collagenase màu nâu sao cho phần mạch mô đệm (SVF) không bị xáo trộn được rửa hai lần bằng môi trường nuôi sơ cấp rồi đem ly tâm. Bổ sung 10 ml môi trường nuôi cấy sơ cấp và tiến hành cho qua màng lọc 100 μm được sử dụng để loại bỏ một số loại tế bào không phải MSC. Cuối cùng thu được lượng dịch sau khi lọc, cho các dịch tế bào thu được vào các chai nuôi T-flask bổ sung thêm môi trường tối ưu cho MSC, ủ ở 37°C 5% CO_2 . Tế bào được quan sát dưới kính hiển vi soi ngược Olympus, thời gian tế bào đạt đến mật độ tối đa 80-90%.



Hình 2.1. Sơ đồ quy trình phân lập SVF từ mô mỡ

1. Mô mỡ được bảo quản và gắp ra đĩa nuôi, 2. Rửa sạch mô mỡ bằng dung dịch đệm PBS, 3. Mô mỡ được cắt nhuyễn, 4. Hút mô mỡ đã cắt nhuyễn vào ống fancel, 5. Mô mỡ sau khi được phân giải collagenase ở các mốc thời gian, 6. Mô mỡ sau khi được ủ và phân tách lớp.

2.2.2. Nuôi cấy tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ mô mỡ

Tiến hành nuôi cấy: Nuôi cấy được tiến hành theo hai giai đoạn, sơ cấp và thứ cấp

Nuôi cấy sơ cấp

Sau 24 giờ phân lập, hút môi trường cũ ra khỏi đĩa, rửa tế bào bằng dung dịch PBS đã được làm ấm trước ở 37°C sau đó hút. Kiểm tra các tế bào bằng kính hiển vi đảo ngược, nếu các tế bào dư thừa vẫn còn sót lại sau lần rửa PBS đầu tiên thì sẽ tiến hành lặp lại rửa lần hai. Tiếp đó sẽ bổ sung môi trường mới, môi trường sẽ được thay 2-3 ngày một lần cho đến khi đạt mật độ 80-90% diện tích bề mặt đĩa nuôi, các tế bào sẽ được tiến hành cấy chuyển.

Nuôi cấy thứ cấp

Hút bỏ môi trường cũ trong chai nuôi tế bào, rửa tế bào hai lần bằng PBS (có bổ sung 1% kháng sinh). Cho vào mỗi chai 2 ml trypsin/EDTA để trong 5 phút. Quan sát dưới kính hiển vi khi tế bào co tròn thì bất hoạt trypsin bằng môi trường DMEM và 10 % huyết thanh. Thu dịch huyền phù vào ống falcol 50 ml, ly tâm với tốc độ 1500v/phút trong 5 phút. Thu lấy tế bào, pha loãng các tế bào vào môi trường mới. Cho tế bào vào chai flask đặt ở tủ nuôi 37°C, 5% CO₂.

Nuôi cấy thứ cấp 5-7 ngày tế bào mọc đạt 70-80% diện tích đáy chai nuôi, có hình dạng tế bào giống như nuôi cấy sơ cấp. Trong nghiên cứu này phương pháp chọn lọc MSC được tiến hành.

2.2.3. Đánh giá hình thái của tế bào ASC

Quan sát hình thái tế bào ASC dưới kính hiển vi ở giai đoạn nuôi cấy sơ cấp và nuôi cấy thứ cấp ở các thời gian xử lý collagenase 30, 60, 180, và 360 phút về hình dạng của tế bào gốc trung mô có hình dạng với nguyên bào sợi, tế bào gốc trung mô có thân bầu hơn các nguyên bào sợi và thuôn dài về hai đầu.

2.2.4. Đánh giá tỷ lệ sống/chết của tế bào ASC

Phương pháp nhuộm trypan blue được sử dụng để đánh giá tổng số tế bào và tỷ lệ sống/chết ở từng giai đoạn nuôi cấy. Tế bào sau khi tái huyền phù nhờ trypsin sẽ được ly tâm ở 1500 rpm trong 5 phút, sau đó hút loại bỏ dịch, thêm expansion để tái huyền phù tế bào và mix đều hòa dung dịch tế bào sau ly tâm với dung dịch xanh trypan blue với tỷ lệ 1:1 về thể tích, để ở nhiệt độ phòng. Chuẩn bị buồng đếm Neubauer, hút 10 µl dung dịch trên

nhỏ vào buồng đếm. Đếm tế bào trên kính hiển vi ở 4 ô vuông lớn của buồng đếm, đếm số tế bào sống, số tế bào chết. Các tế bào chết bắt màu xanh do màng tế bào bị tổn thương nên ngấm thuốc nhuộm xanh trypan blue, các tế bào sống có màng tế bào còn nguyên vẹn nên sáng màu do không ngấm màu thuốc nhuộm.

2.2.5. Đánh giá biểu hiện các marker bề mặt của tế bào ASC

Ở nghiên cứu này em đánh giá các marker của ASC sau nuôi cấy được tiến hành dựa theo kỹ thuật đo dòng chảy tế bào và các tế bào ở lần cấy chuyển P3 để phân tích marker đặc trưng cho ASC. Quy trình tiến hành như sau:

Cố định tế bào: Tế bào được tái huyền phù bằng trypsin và ly tâm ở 1500 vòng/phút trong 5 phút. Dịch tế bào cũ được loại bỏ, bổ sung thêm PBS và ly tâm 1500 vòng/phút trong 5 phút, rửa lại 2 lần như vậy. 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. Cuối cùng tế bào đã được rửa sạch và 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 mix, ly tâm và loại bỏ dịch ở 1500 rpm trong 10 phút. Lần lượt thêm 95 μ l buffer và 5 μ l kháng thể isotype. 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 đo dòng chảy tế bào để phân tích.

2.2.6. Đánh giá khả năng biệt hóa của ASC

Phương pháp biệt hóa mỡ và xương của tế bào ASC

Các tế bào được cấy vào đĩa 12 giếng với mật độ 10^4 tế bào/giếng trong môi trường nuôi cấy cơ bản. Sau khi mật độ bao phủ của tế bào khoảng 50-70% ta tiến hành bổ sung môi trường biệt hóa nguyên bào mỡ (StemMACS AdipoDiff media) và 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. Ở ngày 3-5 thì các tế bào MSC bắt đầu có dấu hiệu biệt hóa, ở giếng đối chứng thì tế bào không biệt hóa. Ở ngày 14 có quan sát tế bào biệt hóa dưới kính hiển vi.

Phương pháp nhuộm đánh giá khả năng biệt hóa của tế bào ASC

Nhuộm các nguyên bào mỡ qui trình được thực hiện như sau tế bào được rửa 2 lần bằng PBS, sau đó cố định bằng paraformaldehyde 4% 15 phút, rửa lại 2 lần với PBS và nhuộm bằng Oil Red-O. Sau đó quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược. Những tế bào mỡ tích trữ những giọt mỡ sẽ có màu đỏ của thuốc nhuộm. Oil red là thuốc nhuộm màu đỏ hòa tan trong lipid. Khi nhuộm mẫu tế bào đã cố định, bất kỳ nơi nào có chứa giọt mỡ, Oil red sẽ hòa tan trong đó làm chúng có màu đỏ.

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.

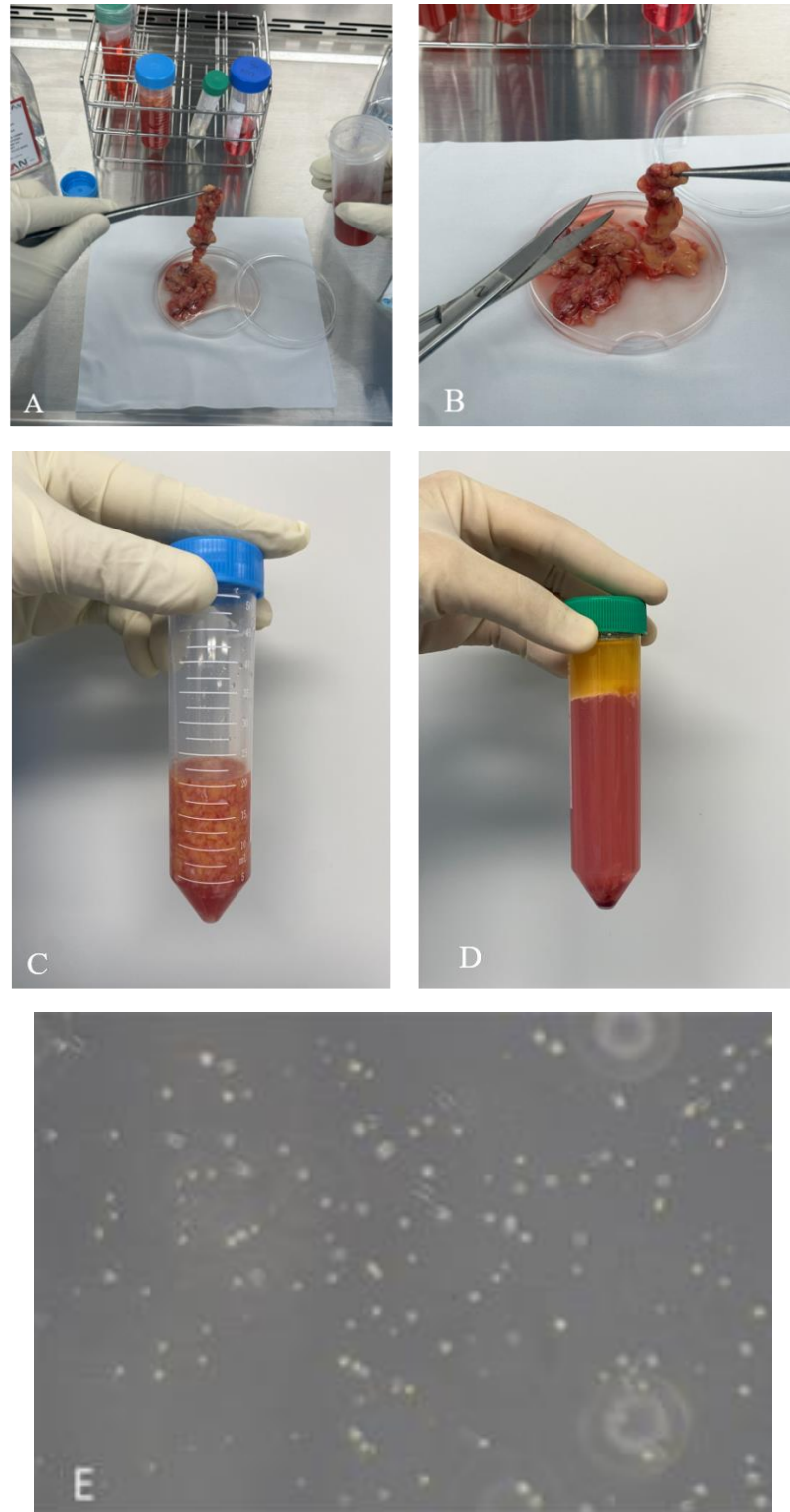
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. PHÂN LẬP SVF TỪ MÔ MỠ BẰNG PHƯƠNG PHÁP Ủ COLLAGENASE

Việc tách SVF (stromal vascular fraction) từ mô mỡ được thực hiện để thu thập tế bào gốc đa năng. SVF là một phần của mô mỡ và bao gồm các tế bào bạch cầu, tế bào mỡ, tế bào sợi collagen, tế bào thần kinh, tế bào miễn dịch và các tế bào gốc. Tế bào gốc đa năng được tách ra từ SVF để sử dụng trong các ứng dụng y tế. Các tế bào gốc này có khả năng tự tái tạo và phát triển thành các loại tế bào khác nhau trong cơ thể, chẳng hạn như tế bào da, tế bào xương, tế bào cơ và tế bào thần kinh. Việc thu thập tế bào gốc đa năng từ SVF cung cấp một nguồn tế bào giàu tiềm năng cho các ứng dụng trong điều trị y tế.

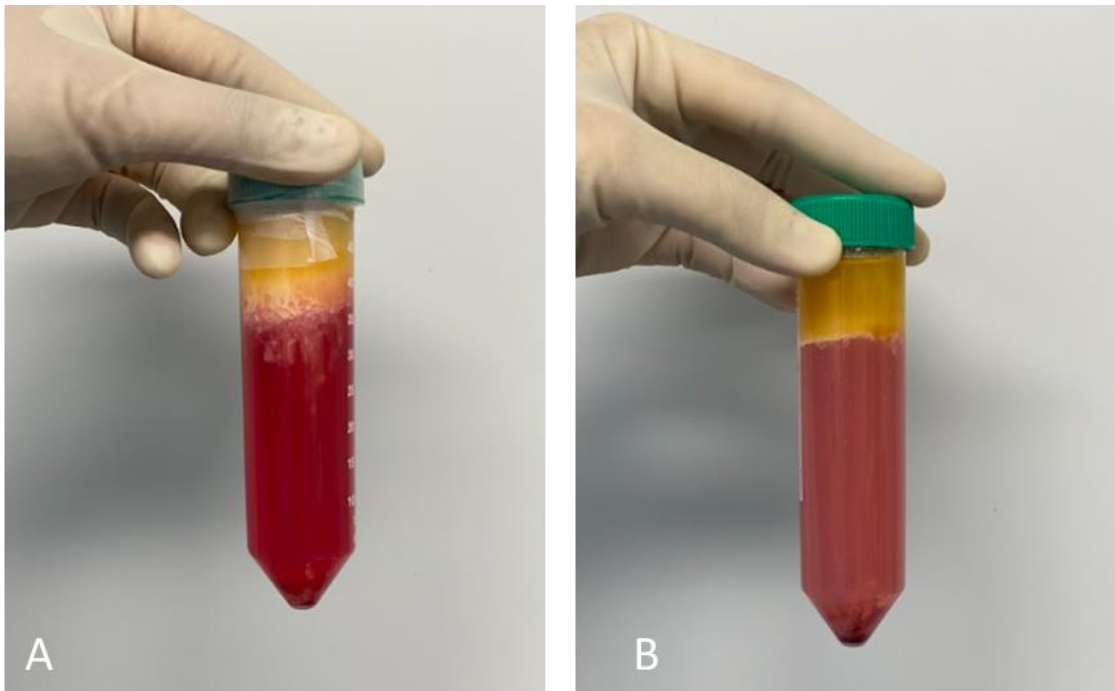
Trong nghiên cứu này, mô mỡ sau khi được bảo quản sẽ đưa vào đĩa và tiến hành rửa sạch bằng dung dịch đệm PBS (1% kháng sinh). Mô mỡ sau khi được cắt nhuyễn và xử lý trong collagenase ở các thời gian 30 phút, 60 phút, 180 phút và 360 phút (Hình 3.1). Thời gian xử lý collagenase tới sự phân giải mô mỡ sẽ khác nhau. Ở thời gian 30 phút thì mô mỡ chưa được phân giải hoàn toàn. Đối với thời gian 60 phút mô mỡ được phân giải tương đối (khoảng 80%) có thể nhìn thấy lớp mỡ lỏng màu vàng xuất hiện phía trên (Hình 3.2). Sau 180 phút xử lý với collagenase toàn bộ mô mỡ đã được phân giải hết (Hình 3.2).

Kết quả của nghiên cứu cho thấy quá trình phân giải mô mỡ trong collagenase được thực hiện trong thời gian từ 30 phút đến 360 phút tương đối hiệu quả và tùy thuộc vào thời gian xử lý mà mô mỡ được phân giải khác nhau. Qua đó, ở thời gian 60 phút, khoảng 80% mô mỡ đã được phân giải và có thể thấy lớp mỡ lỏng màu vàng phía trên, trong khi đó, ở thời gian 180 phút, toàn bộ mô mỡ đã được phân giải tốt nhất. Kết quả này cho thấy việc sử dụng collagenase để phân giải mô mỡ và thu được SVF hiệu quả.



Hình 3.1. Quá trình phân lập SVF từ mô mỡ

A. Mẫu mô mỡ được bảo quản và rửa sạch bằng dung dịch đệm PBS (thêm 1% kháng sinh), B. Cắt mô mỡ thành nhuyễn, C. Mô mỡ được cắt nhuyễn hút vào ống fancel, D. Mô mỡ sau khi cắt được ủ trong collagenase ở thời gian 180 phút, E. Nuôi cấy tế bào ASC ở độ phóng đại 40X.



Hình 3.2. Mô mỡ sau khi xử lý collagenase đã được ly tâm

A. Mô mỡ sau khi xử lý collagenase 60 phút, B. Mô mỡ khi xử lý collagenase thời gian 180 phút

3.2. NUÔI CÂY TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ CÓ NGUỒN GỐC TỪ MÔ MỠ

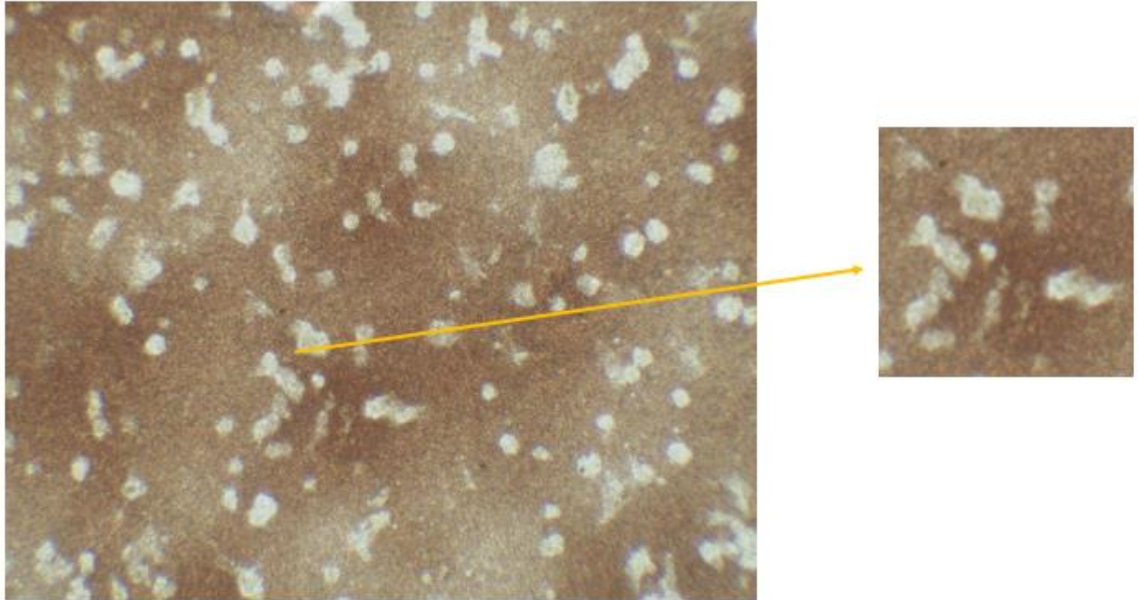
3.2.1. Nuôi cấy tế bào sơ cấp

Nhiều nghiên cứu về kỹ thuật nuôi cấy tế bào trung mô từ mô mỡ đã chỉ ra rằng: các tế bào gốc thường phải được phân lập và phát triển trong môi trường tế bào ở điều kiện nhất định. Sau khi phân lập SVF từ mô mỡ, tế bào gốc adipose (AD-MSc) thường được phát triển trong môi trường nuôi cấy tế bào để duy trì sự sống và mở rộng số lượng. Quá trình nuôi cấy tế bào sơ cấp này giúp tăng số lượng tế bào và là bước quan trọng trong phục vụ nghiên cứu tiếp theo.

Quan sát sau 24 giờ phân lập cho thấy tế bào đã bám vào bề mặt đáy ở chai nuôi cấy, một số tế bào có hình thái giống nguyên bào sợi bên cạnh đó còn nhiều tế bào nổi lơ lửng trong dung dịch nuôi. Về mặt lý thuyết, đối với tế bào thường thì các tế bào gốc trung mô có khả năng bám dính và nuôi cấy được ở môi trường phòng thí nghiệm. Các tế bào không phải tế bào gốc sẽ trôi nổi trong môi trường nuôi cấy và chết đi. Các tế bào này sau đó sẽ được loại bỏ trong môi trường nuôi cấy khi thay môi trường (Hình 3.3). Ở mốc thời gian sau 24 giờ phân lập chưa rửa không thể quan sát được mật độ tế bào khác

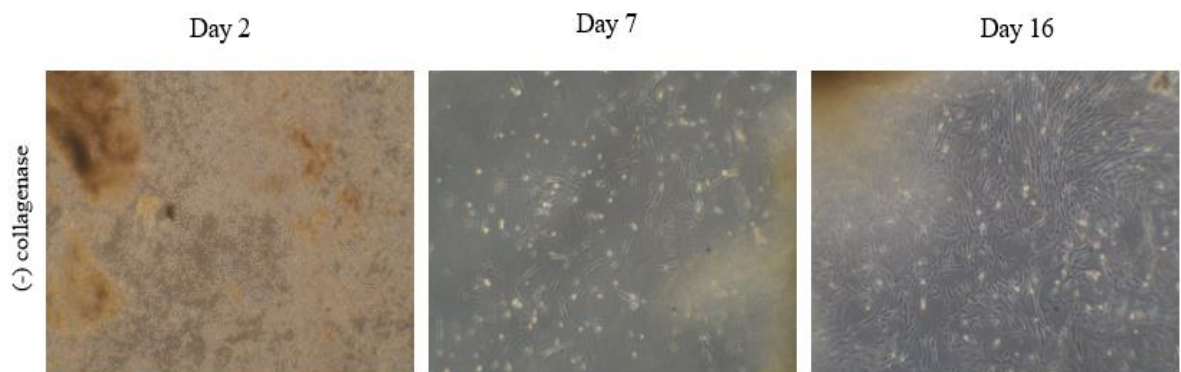
nhau chỉ quan sát được các khoảng trắng mà tế bào bám xuống. Đánh giá tế bào thông qua hình thái, và mật độ tế bào sẽ được đánh giá từ các ngày sau (ngày thứ 2,3,7,10 và 16) (Hình 3.4).

Kết quả này sẽ cung cấp cơ sở cho việc tiếp tục nuôi cấy và sàng lọc tế bào gốc trung mô AD-MSC trong những thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3.3. Hình thái tế bào sau 24 giờ phân lập từ mô mỡ (xử lý collagenase).

Các tế bào bám đáy chai nuôi cấy ở độ phóng đại 40X. Hình ảnh nhỏ (hình ảnh phóng to), các tế bào đã bắt đầu bám dính vào bề mặt chai nuôi cấy, hình thái ban đầu giống nguyên bào sợi ở độ phóng đại 40X

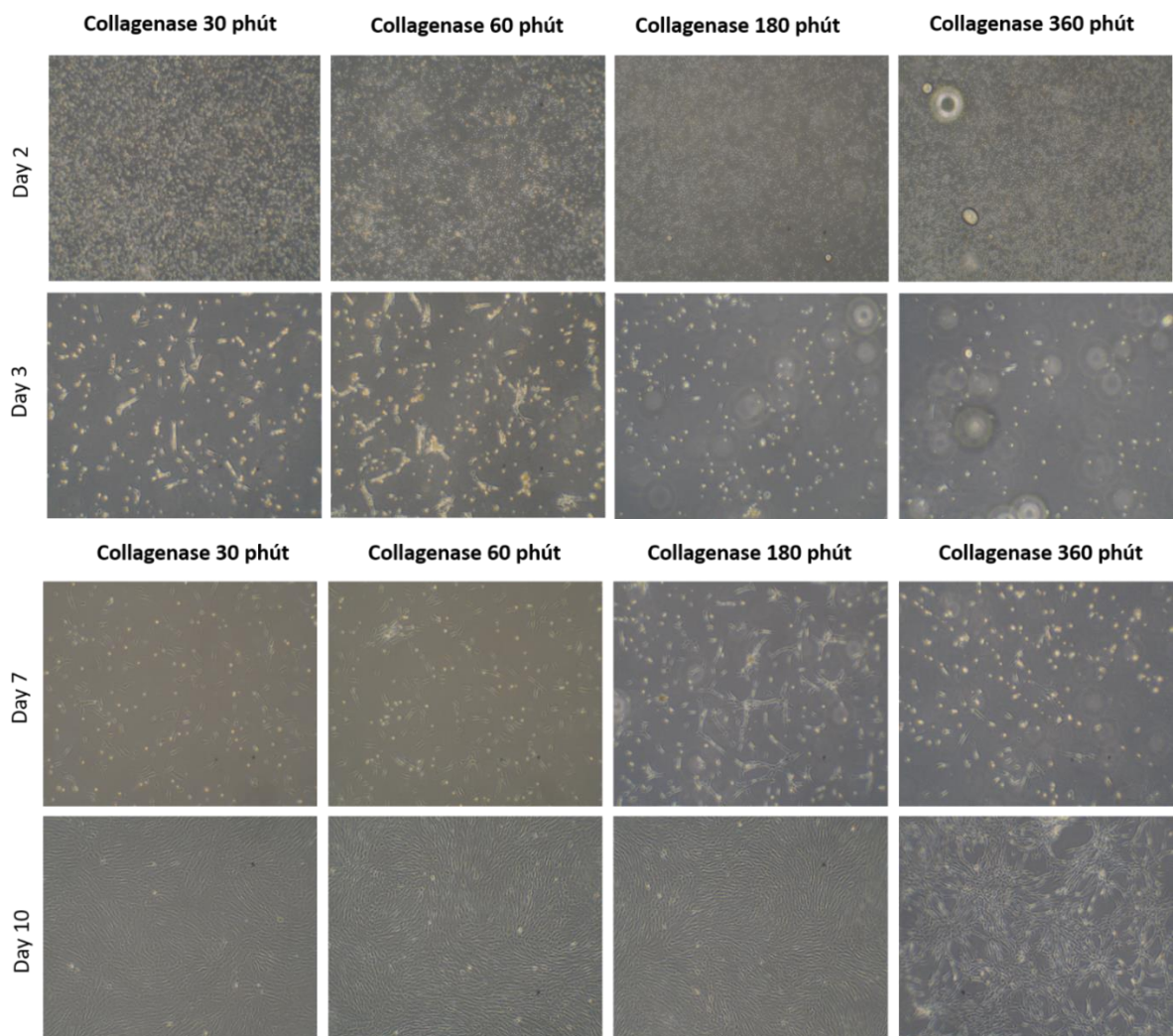


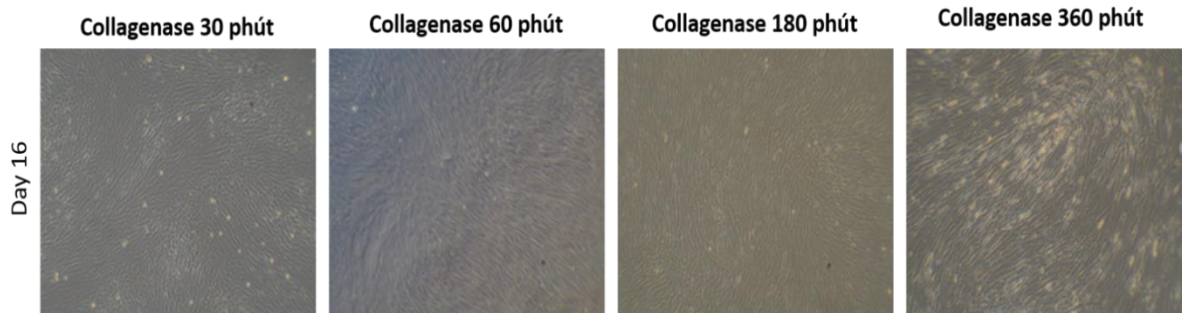
Hình 3.4. Hình ảnh ở các ngày 2, 7 và 16 sau khi nuôi cấy sơ cấp tế bào gốc trung mô từ mô mỡ không xử lý collagenase ở độ phóng đại 40X

Tiếp tục theo dõi tế bào liên tục trong vòng 16 ngày sau khi bắt đầu nuôi cấy sơ cấp để kiểm tra chất lượng, khả năng tăng sinh và hình thái của chúng. Các thay đổi dễ quan sát ở các ngày thứ 2, thứ 7 và thứ

16 tính từ thời điểm bắt đầu nuôi cấy sơ cấp, hình ảnh được thể hiện trên Hình 3.4.

Quan sát thấy ở tế bào ASC khi không ủ collagenase ở ngày thứ 2 sau khi rửa vẫn thấy có nhiều tế bào không phải ASC lơ lửng. Trong khi đó số lượng tế bào bám đáy thấp, chỉ khoảng 1%. Sang đến ngày thứ 7 có thể thấy mật độ tế bào tăng lên được khoảng 10%, ở các chỗ có mảnh mô mỡ tế bào mới bám đáy và phát triển còn những chỗ không có mảnh mô mỡ thì không xuất hiện tế bào, ngày thứ 16 mật độ tế bào khoảng 40-50%. Cho tới thời điểm nhận thấy tế bào không có dấu hiệu phát triển tiếp và quan sát số lượng tế bào chết tăng dần. Để phân lập tế bào gốc trung mô từ quá trình nuôi cấy sơ cấp, tế bào được thu và cấy chuyển sang nuôi cấy thứ cấp để quan sát và đánh giá khả năng phân lập tế bào MSC từ điều kiện chỉ nuôi cấy mảnh mô (không phân tách bằng collagenase).





Hình 3.5. Hình ảnh ở các ngày 2,3,7,10 và 16 sau khi nuôi cấy sơ cấp tế bào gốc trung mô từ mô mỡ được phân giải bằng collagenase ở các thời gian 30 phút, 60 phút, 180 phút và 360 phút ở độ phóng đại 40X.

Để đánh giá hiệu quả của quá trình phân lập tế bào gốc trung mô từ mô mỡ ASC, một nghiên cứu đã được thực hiện bằng cách quan sát và so sánh hình thái của các tế bào sau khi được xử lý collagenase tại các thời gian khác nhau 30, 60, 180 và 360 phút. Kết quả cho thấy sự thay đổi về hình thái của các tế bào hàng ngày, từ đó tạo nên một sự phân bố đầy đủ về hình thái của các tế bào trong suốt quá trình nuôi cấy sơ cấp. Hình 3.5 thể hiện sự phát triển của các tế bào từ ngày thứ 2, 3, 7, 10 cho đến ngày thứ 16 kể từ thời điểm bắt đầu nuôi cấy sơ cấp.

Kết quả ở hình 3.5 cho thấy: ở ngày thứ 2 sau khi rửa trôi hết các tế bào không phải là ASC có thể quan sát được hình thái giống với nguyên bào sợi điển hình của tế bào ASC ở mật độ chỉ khoảng 2-3%, sang đến ngày thứ 3 và 7 mật độ tế bào ở các thời gian có sự khác nhau. Ngày thứ 3 thời gian 30 phút và 60 phút tế bào phát triển nhiều hơn so với đĩa nuôi ở thời gian 180 phút và 360 phút. Đối với ngày thứ 10 mật độ tế bào ở các thời gian 30 phút, 60 phút và 180 phút về mặt hình thái đã đạt được 70-80%. Về mặt số lượng tế bào ở các thời gian 30, 60 và 180 phút không có sự khác biệt nào lớn, tuy nhiên ở thời gian 360 phút tế bào phát triển chậm hơn, mật độ hình thái tế bào mới chỉ đạt khoảng 50% không khác biệt với 3 mốc thời gian còn lại. Khi mật độ tế bào đạt khoảng trên 90% thì sẽ tiến hành chuyển sang nuôi cấy thứ cấp để tiếp tục đánh giá những thay đổi về mặt hình thái.

Dựa vào kết quả quan sát và đánh giá hình thái tế bào nuôi cấy sơ cấp ban đầu, có thể rút ra kết luận rằng thời gian ủ collagenase trong khoảng từ 30 tới 180 phút không ảnh hưởng nhiều đến số lượng và hình thái của tế bào thu được. Tuy nhiên, việc xử lý collagenase lâu hơn, cụ thể

là tại thời gian 360 phút, dẫn đến sự giảm đáng kể về số lượng tế bào nuôi cấy. Vì vậy, để đánh giá chính xác hơn những quan sát về số lượng và hình thái tế bào này các phương pháp nuôi cấy thứ cấp sẽ được nghiên cứu tiếp theo bằng cách đếm số lượng tế bào sống và chết.

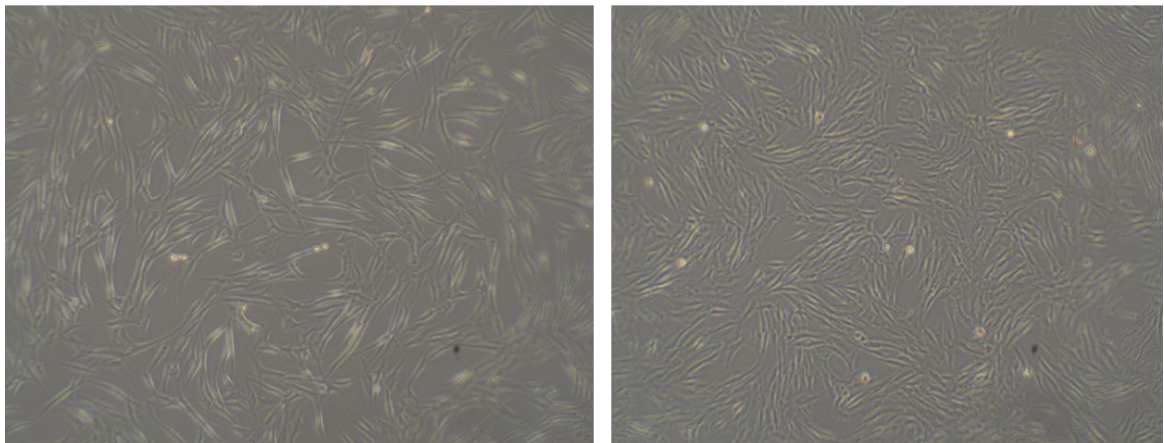
3.2.2. Nuôi cấy thứ cấp

Sau 7-16 ngày nuôi sơ cấp, quần thể tế bào bắt đầu hợp dòng và chiếm 80-90% diện tích bề mặt chai nuôi. Thời điểm này thích hợp cho cấy chuyển tế bào. Sau cấy chuyển từ 3-7 ngày, tế bào phát triển có sự thay đổi, bắt đầu từ P1 đã có sự thay đổi về hình thái tế bào đối với thời gian 60 và 180 phút tế bào có mang hình thái tương tự nguyên bào sợi kích thước nhỏ, tạo thành các cụm, bám vào bề mặt chai nuôi cấy đặc trưng của tế bào MSC (Hình 3.6).

Ở mẫu nuôi cấy mảnh mô (không xử lý collagenase), tế bào không phát triển khi được nuôi cấy thứ cấp, không có tế bào bám dính vào bề mặt đĩa nuôi. Điều này cho thấy, để phân lập được MSC từ mô mỡ, cần phải sử dụng enzyme collagenase để phân giải thành tế bào đơn để nuôi cấy ở môi trường phòng thí nghiệm.

Collagenase 60 phút

Collagenase 180 phút



Hình 3.6. Nuôi cấy thứ cấp tế bào gốc trung mô từ mô mỡ ở độ phóng đại 100X

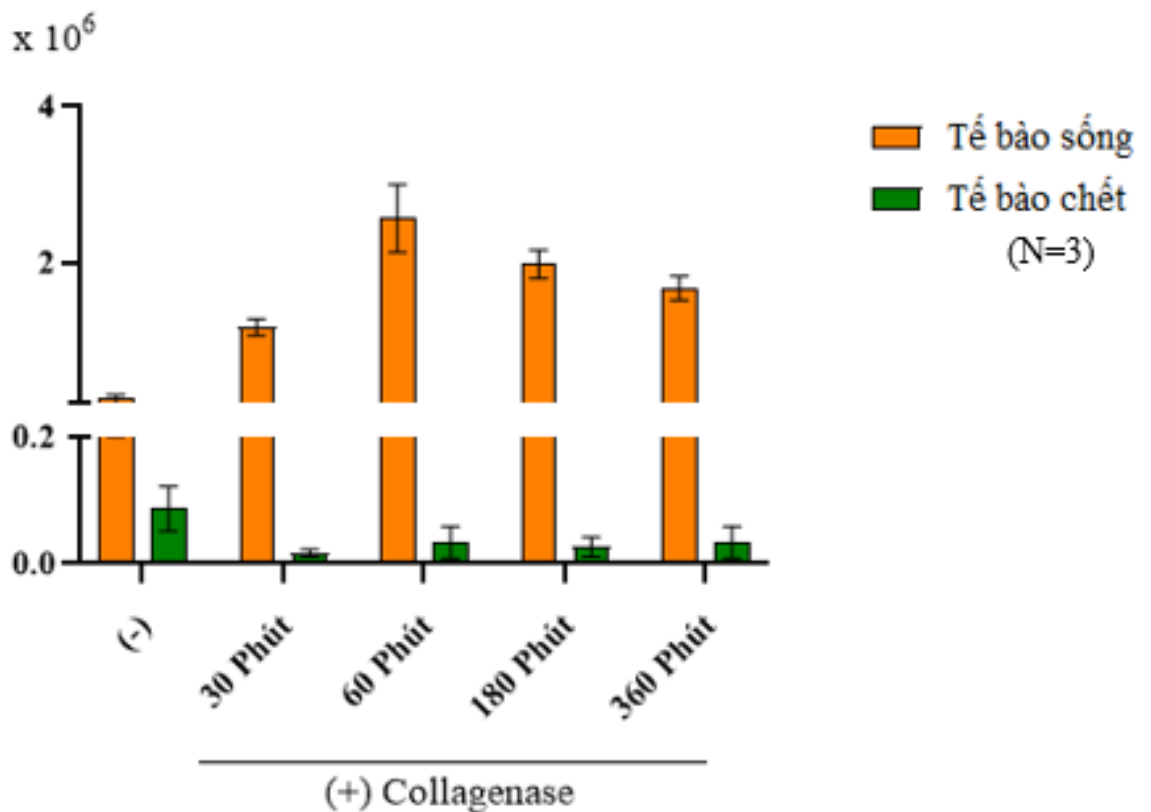
3.3. TỶ LỆ SỐNG CHẾT Ở GIAI ĐOẠN NUÔI CẤY BAN ĐẦU

Ở các mẫu không xử lý phân giải mô bằng collagenase, và phân giải bằng collagenase với các mốc thời gian xử lý khác nhau đều thu được tế bào sống ở môi trường nuôi cấy. Số lượng tế bào thu được sau khi nuôi cấy trải từ

$0,25 \times 10^6$ (mẫu không xử lý collagenase) tới $2,6 \times 10^6$ (mẫu xử lý collagenase 60 phút), trong khi đó, số lượng tế bào chết đếm được ít hơn đáng kể, chỉ từ $0,017 \times 10^6$ (ở mẫu 30 phút) tới $0,087 \times 10^6$ (ở mẫu không xử lý collagenase) (Hình 3.7)

Tuy nhiên việc đánh giá và đưa về cùng số lượng tế bào trong các mô sống là rất khó để thực hiện, nên sự khác nhau về số lượng tế bào sống hoặc chết ở số liệu thô này là điều dễ hiểu. Chính vì vậy, để đánh giá mức độ ảnh hưởng của thời gian ủ collagenase tới chất lượng sống chết, không thể sử dụng số liệu ở hình 3.5. Một phương pháp thường được sử dụng để đánh giá, và so sánh các mẫu đó là đưa về tỷ lệ phần trăm tế bào sống trên tổng số tế bào [43].

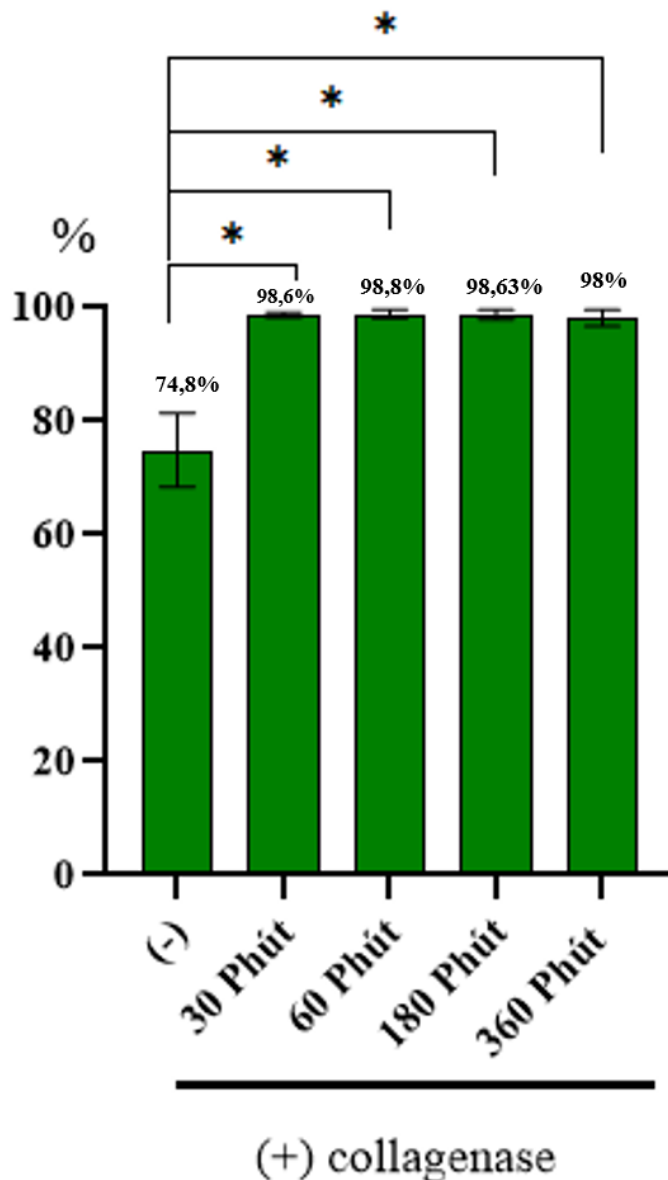
Đặc biệt, mẫu không xử lý collagenase vẫn thu nhận được tế bào bám vào bề mặt đĩa nuôi cấy mặc dù số lượng tế bào sống thấp nhất, và số lượng tế bào chết cao nhất, so với các mẫu xử lý bằng enzyme phân giải. Điều này chứng tỏ các tế bào ở mô mỡ có khả năng di trú ra môi trường nuôi cấy, đặc biệt là lớp bám dính ở mặt đáy đĩa.



Hình 3.7. Hình ảnh biểu đồ số lượng tế bào ASC ở giai đoạn đầu

Như kết quả ở trên, để đánh giá ảnh hưởng của collagenase ở các thời gian ủ khác nhau lên sự sống chết của tế bào, tỷ lệ phần trăm tế bào sống trên tổng số tế bào đếm được đã được tính toán. Các mẫu mô được phân giải bằng collagenase đều có tỷ lệ sống cao >98%. Không thấy sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mẫu xử lý với collagenase này.

Ở mẫu nuôi cấy mảnh mô mỡ (không xử lý phân giải bằng enzyme) tỷ lệ tế bào sống thấp hơn hẳn 74,8%, nhận thấy rõ sự khác biệt có ý nghĩa so với các mẫu xử lý bằng collagenase.



Hình 3.8. Biểu đồ phần trăm sống của tế bào ASC với các mẫu không xử lý phân tách (-), mẫu xử lý phân giải tế bào bằng collagenase ở các thời gian 30, 60, 180, 360 phút. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. * $p < 0.05$.

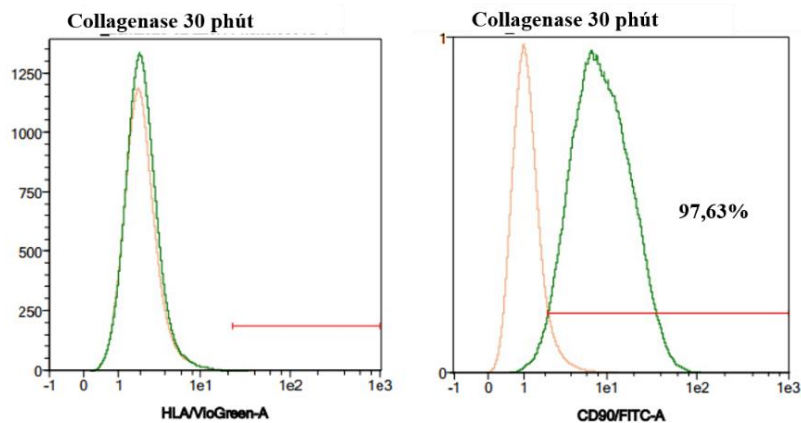
3.4. PHÂN TÍCH DÒNG CHẢY TẾ BÀO

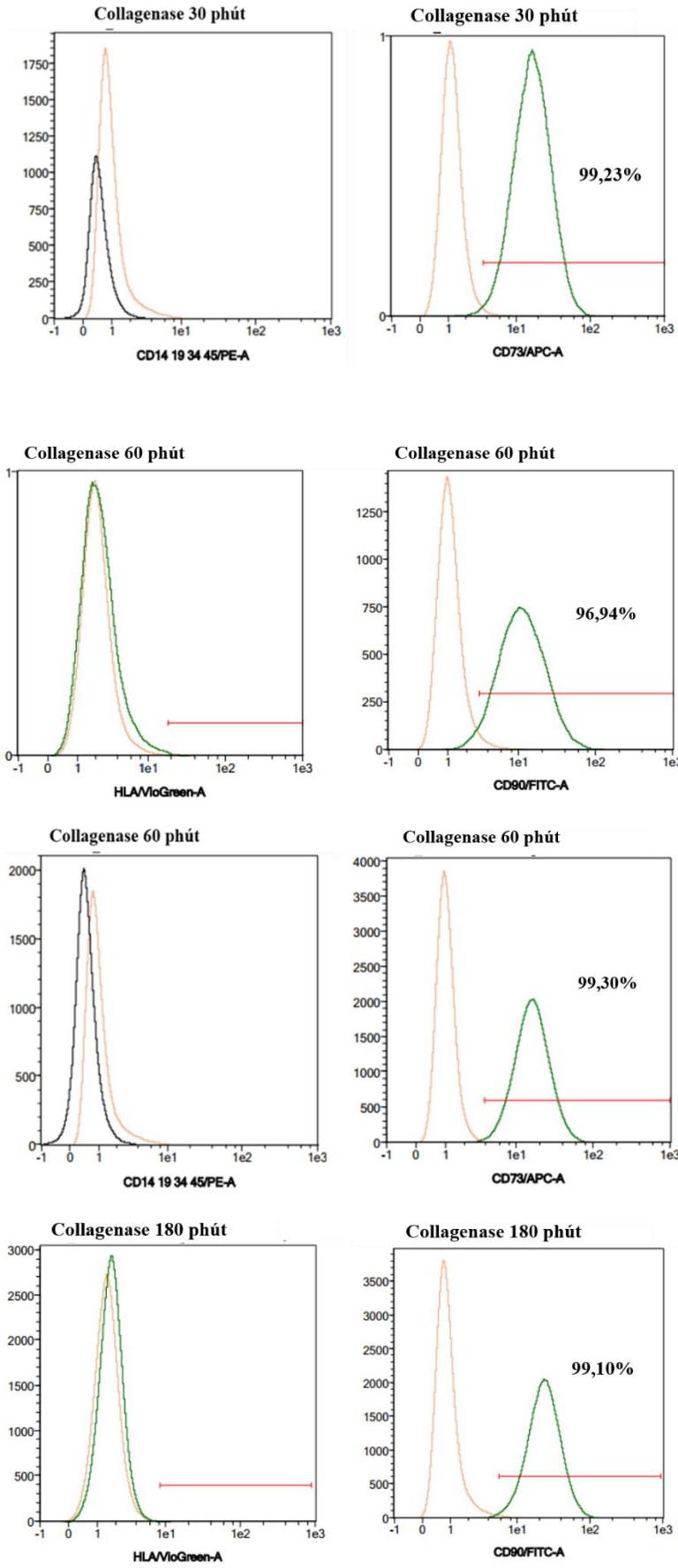
Ngoài các đặc tính như hình dạng, khả năng bám đáy chai nuôi, phát triển tập trung thành các cụm tế bào, một kỹ thuật được sử dụng để xác định xem tế bào đó có phải tế bào gốc không là phương pháp phân tích dòng chảy kết hợp với các marker bề mặt (thường là các cụm biệt hóa cluster differentiation CD)

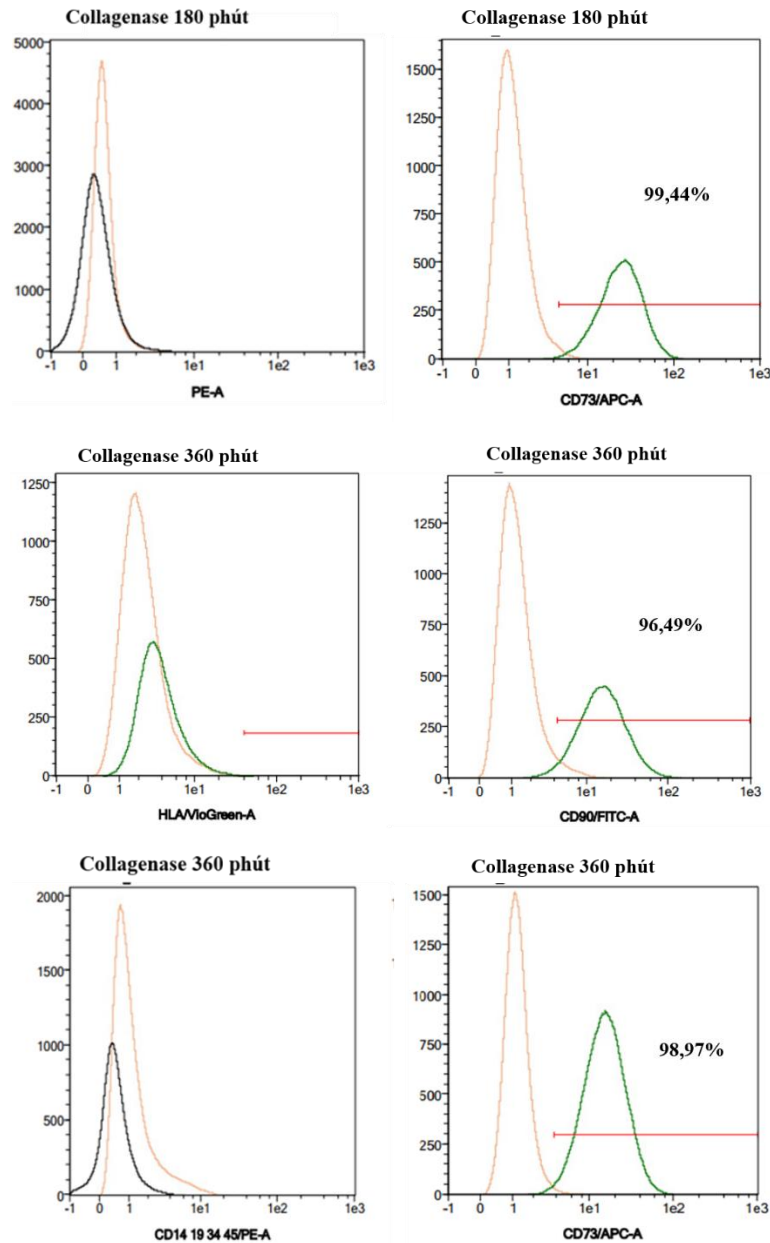
Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ thường phải biểu hiện (dương tính) các cụm biệt hóa CD73, CD90, và không biểu hiện (âm tính) với các cụm biệt hóa CD14, CD19, CD34, CD45, HLA.

Trong phân tích dòng chảy, nếu một cụm biệt hóa được biểu hiện (dương tính), chúng sẽ được phát hiện bằng màu quang phổ, thể hiện bằng 2 đỉnh tách biệt. Trái ngược lại, một cụm biệt hóa sẽ thể hiện hai đỉnh không tách biệt, khá trùng khớp nhau.

Trong nghiên cứu này, ASC được nuôi cấy đến giai đoạn cấy chuyển thứ 3 (P3), sau đó, quần thể tế bào thu được tương đối đồng nhất. Tiếp theo, xác định marker bề mặt tế bào bằng phương pháp phân tích dòng chảy (flow cytometry) với các mẫu phân lập ASC xử lý collagenase ở 30, 60, 180, 360 phút







Hình 3.9. Đánh giá kháng nguyên bề mặt của ASC ở các thời gian xử lý collagenase khác nhau (30, 60, 180, 360 phút) sau khi xử lý với collagenase

Kết quả đánh giá kháng nguyên bề mặt cho thấy nhóm được xử lý bằng collagenase trong 180 phút có tỷ lệ cao nhất của kháng nguyên bề mặt CD73 và CD90 với lần lượt 99,44% và 99,10%. Nhóm được xử lý trong 60 phút tiếp theo có tỷ lệ phần trăm của CD73 là 99,30% (giảm 0,1% so với nhóm được xử lý trong 180 phút) và CD90 là 96,94% (giảm 2,16% so với nhóm được xử lý trong 180 phút). Nhóm được xử lý trong 360 phút có tỷ lệ thấp nhất với tỷ lệ CD73 giảm (còn 0,47% so với nhóm được xử lý trong 180 phút) và tỷ lệ CD90 giảm (còn 2,61% so với nhóm được xử lý trong 180 phút). Tỷ lệ phần trăm của

CD73 thấp hơn so với CD90 ở tất cả các nhóm. Trong cả 4 mốc thời gian, tỷ lệ các kháng nguyên bề mặt CD14, CD19, CD34, CD34, và HLA đều âm tính.

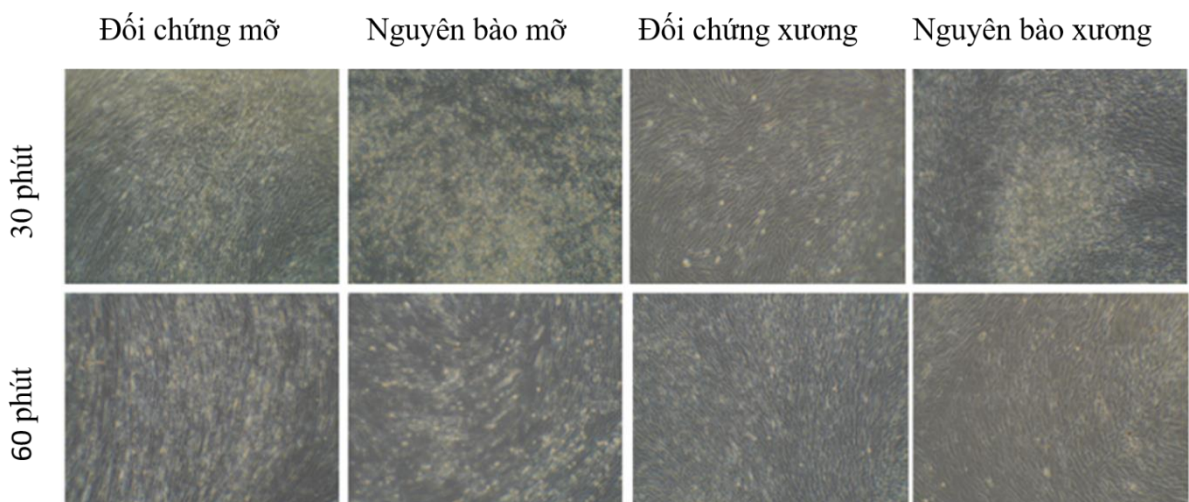
Kết quả trên cho thấy, ở tất cả các mốc thời gian sau khi xử lý bằng collagenase MSC đã được phân lập và nuôi cấy ở phòng thí nghiệm. Theo hình 3.9 thời gian ủ 180 phút cho marker CD73 và CD90 của MSC cao nhất.

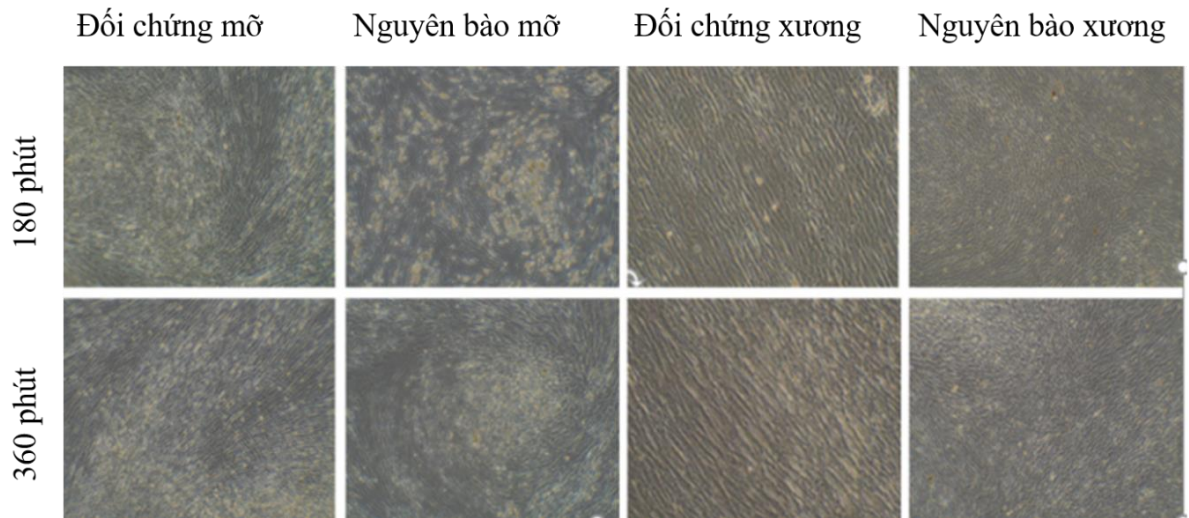
3.5. BIỆT HÓA CỦA TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ MÔ MỠ

Ngoài việc xác định tỷ lệ sống chết và biểu hiện các cụm biệt hóa bề mặt. Đánh giá tính gốc của ASCs còn phải được thực hiện bằng phương pháp biệt hóa. Trong nghiên cứu này sử dụng phương pháp biệt hóa ASCs thành nguyên bào mỡ và nguyên bào xương, đây là 2 hướng biệt hóa phổ biến để đánh giá chất lượng của ASCs.

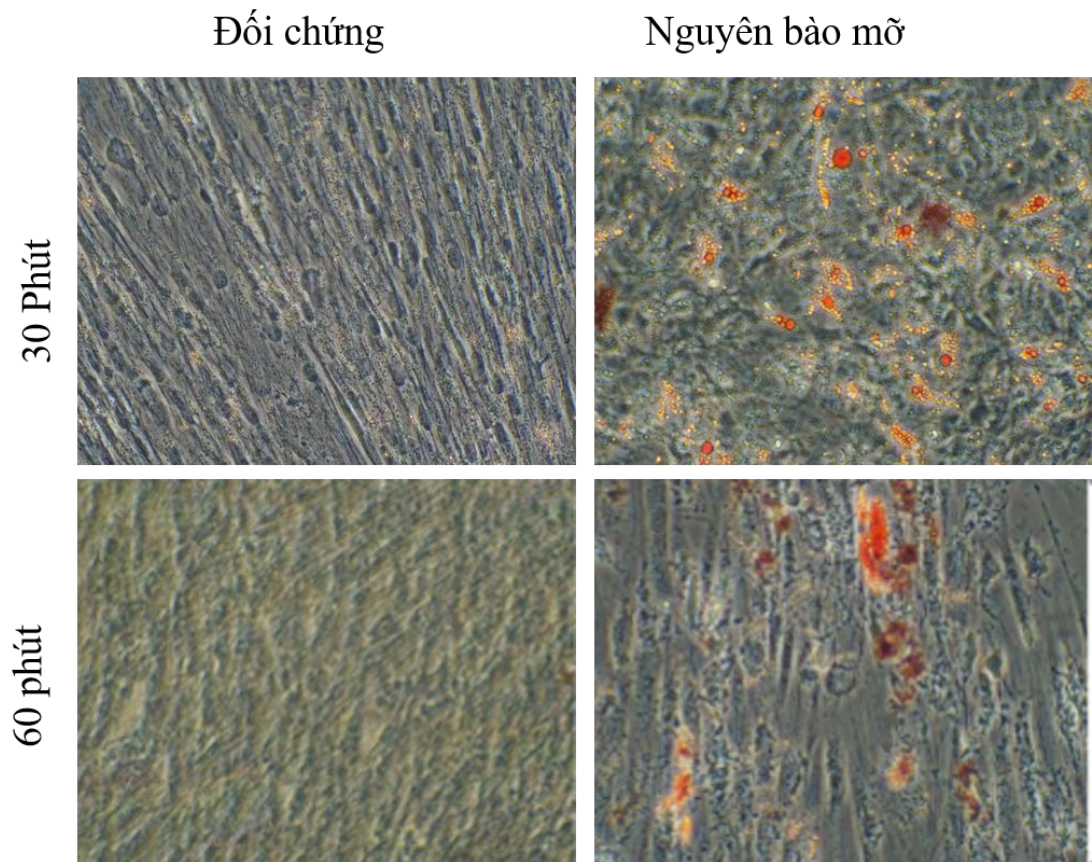
Về mặt hình thái, tế bào ASC có hình dạng đặc trưng. Khi biệt hóa, hình thái tế bào mỡ có kích thước lớn và xuất hiện các giọt mỡ (lipid droplets), trong khi hình thái tế bào xương cũng khác biệt và tập trung thành cụm dày đặc so với tế bào gốc trung mô từ mô mỡ. Khi sử dụng thuốc nhuộm Oil Red-O, Alizarin đỏ, tế bào ASC khi chưa biệt hóa sẽ không bắt màu với thuốc nhuộm.

Trong thí nghiệm này, em cấy các mẫu ASC thu được trong môi trường biệt hóa tế bào mỡ và tế bào xương ở các mốc thời gian khác nhau và nuôi trong môi trường không biệt hóa. Kết quả cho thấy các mẫu tế bào nuôi trong môi trường biệt hóa sau thời gian 3-5 ngày bắt đầu chuyển dần thành dạng đa diện với sự xuất hiện của các giọt mỡ nhỏ và xương, ngược lại các mẫu trong môi trường không cảm ứng tạo mỡ và xương hoàn toàn không có hiện tượng trên. Ở các mốc thời gian có thể thấy được biệt hóa mỡ và xương có sự khác nhau về hình thái và số lượng biệt hóa như hình 3.10.





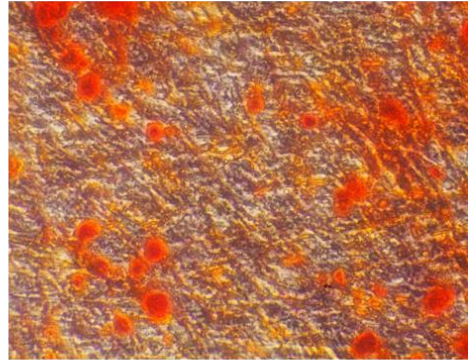
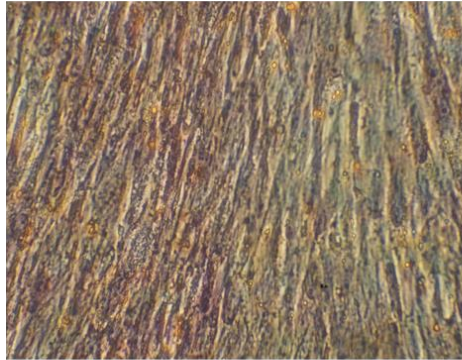
Hình 3.10. Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ biệt hóa trong môi trường biệt hóa tạo mỡ và xương sau 14 ngày chưa nhuộm ở độ phóng đại 40X



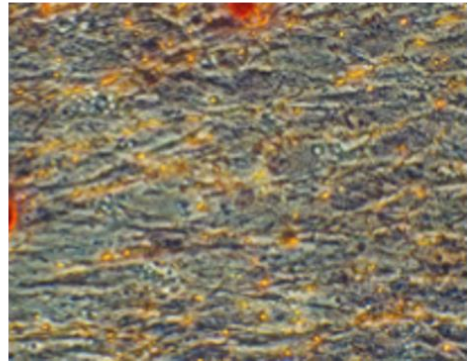
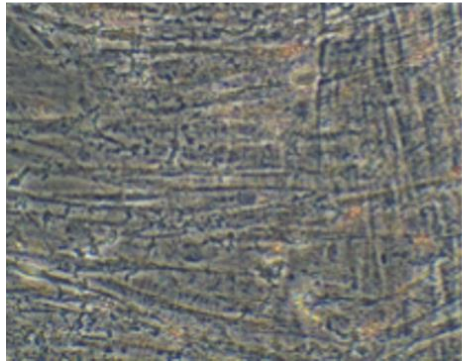
Đối chứng

Nguyên bào xương

30 Phút



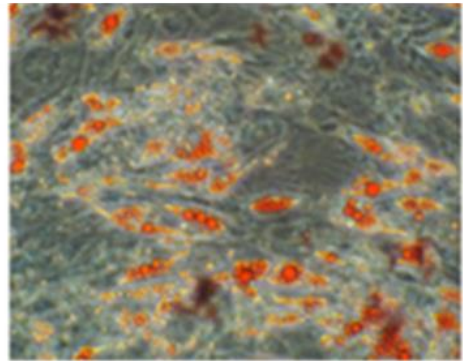
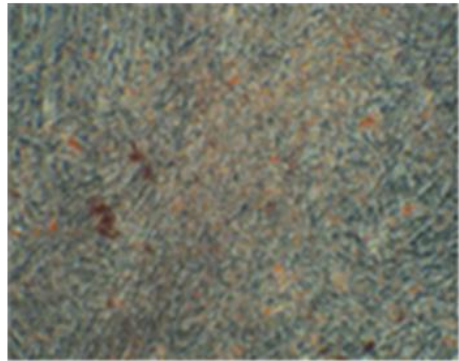
60 phút



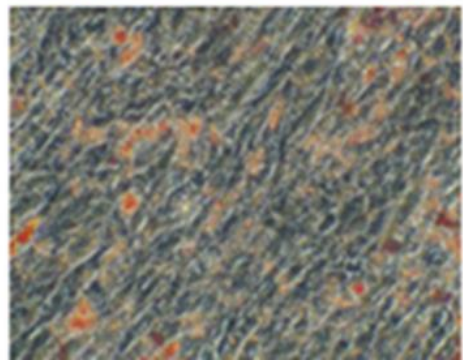
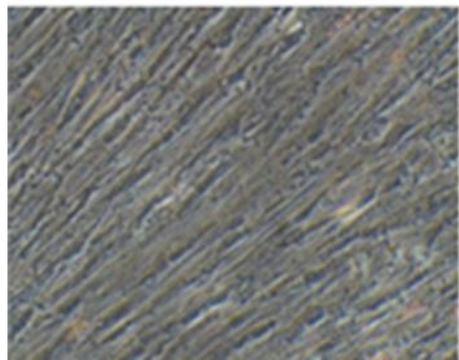
Đối chứng

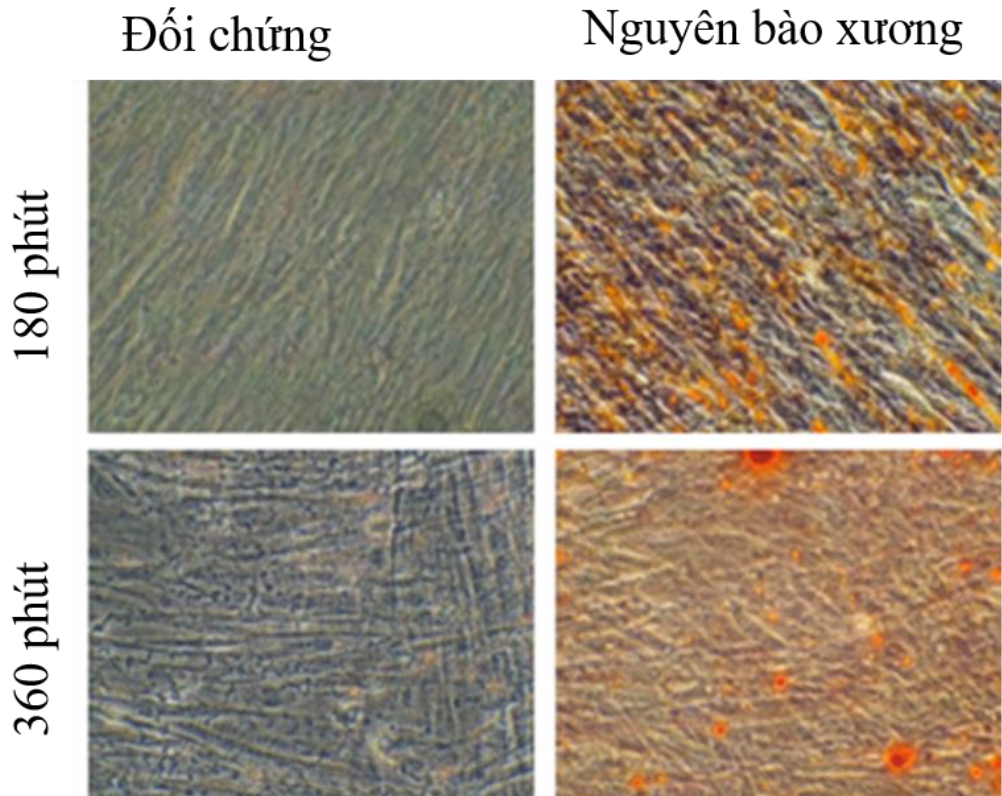
Nguyên bào mỡ

180 phút



360 phút

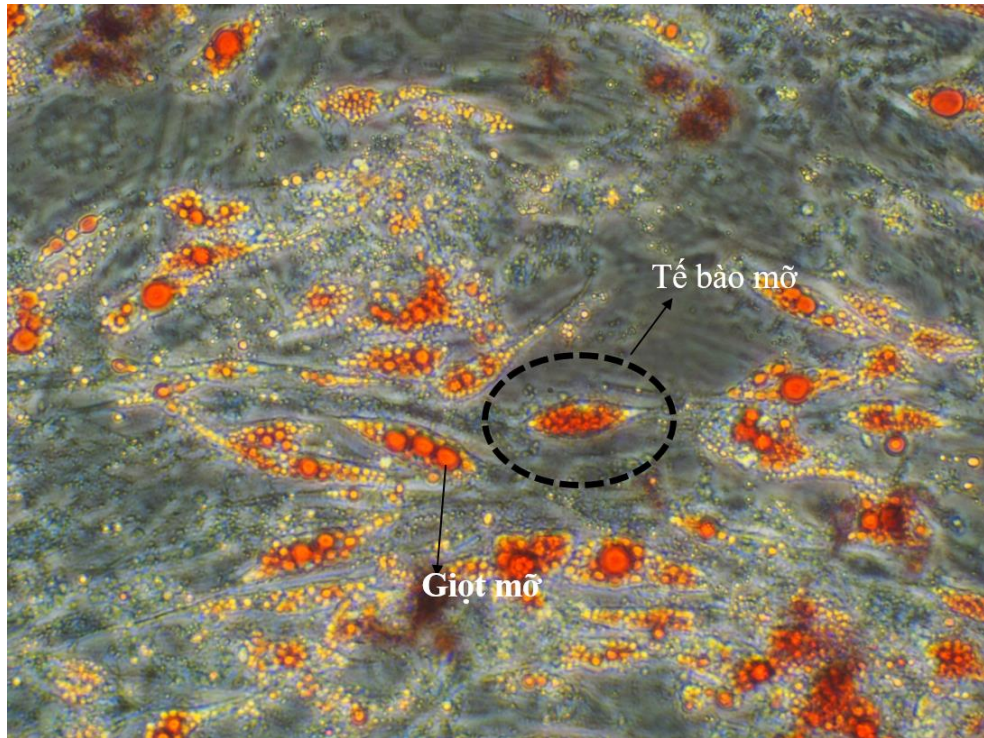




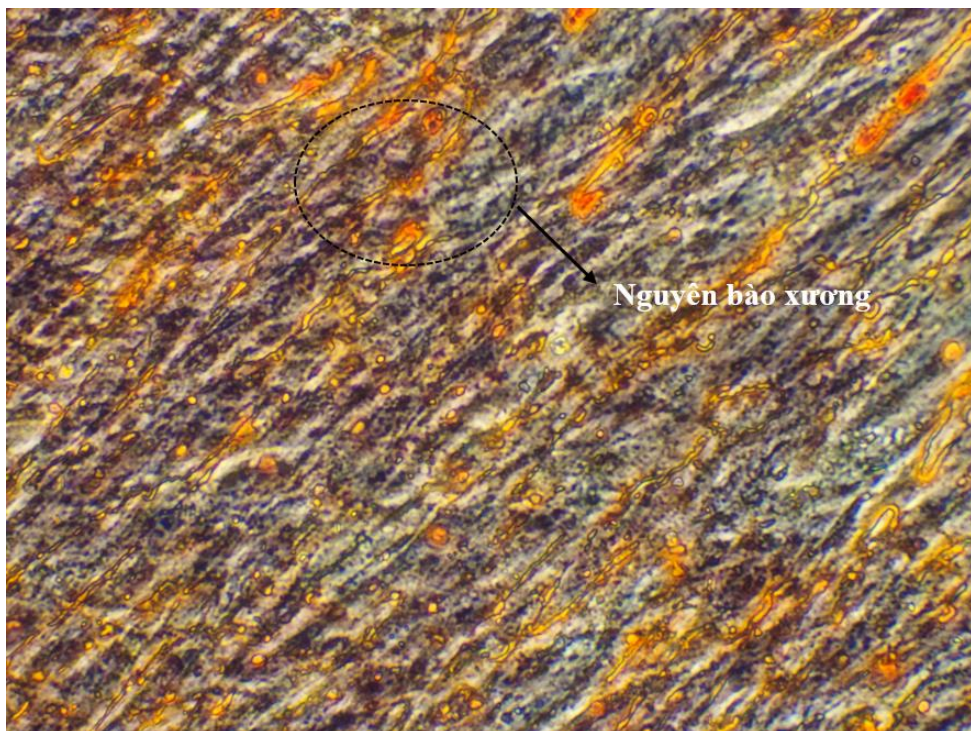
Hình 3.11. Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ biệt hóa trong môi trường biệt hóa tạo mỡ và xương sau 14 ngày nhuộm bằng Oil red - O và Alizarin đỏ ở độ phóng đại 200X

Hình 3.11 quan sát cho thấy rõ sự khác biệt giữa các tế bào đã được biệt hóa và chưa biệt hóa. Các tế bào mô mỡ và xương đã được nhuộm đặc hiệu và được quan sát bằng kính hiển vi soi ngược, thấy các tế bào bắt màu thuốc nhuộm rõ ràng so với đối chứng. Trong khi đó, các tế bào không biệt hóa lại không bắt màu, chứng tỏ chúng giữ nguyên tính gốc và chưa biệt hóa thành các tế bào đích

Đối với các mẫu được xử lý collagenase trong khoảng thời gian khác nhau, kết quả cho thấy rằng thời gian xử lý collagenase ở 180 phút đem cho số lượng và chất lượng tế bào ASC tốt nhất, với các giọt mỡ và tế bào mỡ được biệt hóa rõ nhất ở hình 3.12. Tương tự, các tế bào xương ở thời gian xử lý collagenase 180 phút cũng biệt hóa rõ hơn hình 3.13. Điều này cho thấy tác động của thời gian xử lý collagenase lên quá trình phân lập tế bào gốc ASC và cần được xem xét để đảm bảo độ tinh khiết và chất lượng của sản phẩm phân lập.



Hình 3.12. Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ biệt hóa trong môi trường biệt hóa tạo mỡ sau 14 ngày nhuộm bằng Oil red - O các giọt mỡ bắt màu đỏ độ phóng đại 200X



Hình 3.13. Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ biệt hóa trong môi trường biệt hóa tạo xương sau 14 ngày nhuộm bằng Alizarin đỏ nguyên bào xương bắt màu cam độ phóng đại 200X.

Thảo luận

Tế bào gốc nói chung và tế bào gốc trung mô từ mô mỡ nói riêng có khả năng biệt hoá thành nhiều loại tế bào, mô và cơ quan có chức năng trong cơ thể, ví dụ cơ, xương, tế bào máu, tế bào thần kinh. Các liệu pháp trong y học tái tạo chủ yếu sử dụng tế bào gốc bởi những khả năng đặc biệt của chúng để phục hồi và thay thế các mô và cơ quan bị hư hại.

Có một số kỹ thuật khác nhau được sử dụng để phân lập mô mỡ, tuy nhiên số lượng và chất lượng tế bào gốc thu được là khác nhau. Phổ biến nhất trong các kỹ thuật phân lập là dựa trên quá trình phân giải của enzyme như collagenase và trypsin. Tuy nhiên sử dụng trypsin trong thời gian dài có thể gây phân rã extracellular matrix và màng tế bào chất vì một số tế bào nhạy cảm với trypsin nhưng không nhạy cảm với collagenase [44]. Enzyme collagenase được cho là có hiệu quả để phân giải mà ít ảnh hưởng tới tế bào hơn các loại enzyme khác. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng collagenase loại I để xác định thời gian tối ưu, cũng như khoảng thời gian phân lập để thu thập được tế bào gốc trung mô từ mô mỡ có chất lượng tốt cho các nghiên cứu và ứng dụng ở Việt Nam.

Sau khi các hạt mỡ đã được phân lập từ các nguồn tương ứng, mẫu được thêm vào collagenase, có chức năng phân giải mô. Có nhiều loại collagenase khả dụng để cô lập tế bào gốc mesenchymal từ mỡ (ASCs). Phân lập các tế bào gốc trung mô từ mô mỡ là một trong những bước quan trọng, có ảnh hưởng tới chất lượng của tế bào gốc. Việc phân lập có thể được thực hiện bằng lực cơ học, phân giải bằng enzyme, hoặc kết hợp cả hai [45].

Việc Nghiên cứu phân lập tế bào gốc MSC (mesenchymal stem cell) từ mô mỡ bằng collagenase đã được thực hiện khá phổ biến trong các nghiên cứu sinh học và y học hiện đại. Tuy nhiên, rất hiếm không nhiều bài báo mô tả chi tiết về ảnh hưởng của thời gian xử lý phân tách mô mỡ bằng collagenase lên chất lượng thu hồi ASC. Điều này gây ra sự bất đồng quan điểm trong kết quả của các nghiên cứu và gây khó khăn trong việc so sánh kết quả giữa các nghiên cứu khác nhau. Do đó, thảo luận này tập trung vào việc giải quyết phương pháp phân lập tế bào gốc MSC từ mô mỡ bằng collagenase, các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phân lập, và kết quả của các nghiên cứu mới nhất về tác động của thời gian xử lý collagenase lên chất lượng thu hồi ASCs.

Theo một nghiên cứu gần đây [46], mô mỡ được xử lý bởi collagenase trong 20-60 phút để phân lập tế bào gốc ASC. Nghiên cứu cho thấy sự giống nhau với các nghiên cứu trên rằng việc xử lý bằng collagenase ở 30 - 50 phút cũng đem lại kết quả tốt về số lượng và chất lượng của ASC [46].

Nhằm khảo sát ảnh hưởng của thời gian xử lý mô mỡ lên chất lượng tế bào gốc thu được, bằng collagenase ở điều kiện phòng thí nghiệm ở Việt Nam, chúng tôi chọn các mốc thời gian rộng từ 0 tới 360 phút. Ngoài ra, để làm sáng tỏ thêm về ảnh hưởng của collagenase, em đã thí nghiệm xử lý enzyme các mốc thời gian lâu, 30 phút, 60 phút, 180 phút, 360 phút. SVF được phân lập từ mô mỡ của được tuyển chọn từ những người hiến tặng khỏe mạnh. Những mô mỡ hiến phải đảm bảo âm tính với các bệnh truyền nhiễm (HIV, HCV, HCB, giang mai) và được bảo quản lạnh trong PBS, 1% kháng sinh.

Trong nhiều nghiên cứu liên quan đến phân tích tế bào, việc sử dụng nuôi cấy mảnh mô mà không xử lý collagenase làm đối chứng đã được đưa ra để đánh giá tác động của collagenase đến tính chính xác của kết quả nghiên cứu. Điều này là cần thiết để loại trừ những sai sót có thể xảy ra do tác động của collagenase đến cấu trúc và hoạt động của tế bào. Mặc dù việc sử dụng nuôi cấy mảnh mô mà không xử lý collagenase làm đối chứng có thể đem lại những kết quả nghiên cứu tương đối chính xác, nhưng không thể hoàn toàn loại bỏ tác động của collagenase. Do đó, việc đánh giá tác động của collagenase đến tính chính xác của kết quả nghiên cứu là cần thiết, đặc biệt đối với những nghiên cứu liên quan đến sử dụng collagenase để phân tích tế bào gốc.

Trong nghiên cứu này, việc sử dụng nuôi cấy mảnh mô mà không xử lý collagenase làm đối chứng đóng vai trò quan trọng trong việc xác định tác động của collagenase đến tính chính xác của kết quả nghiên cứu. Các nghiên cứu cần cân nhắc đến việc sử dụng đối chứng này để đảm bảo tính chính xác và độ tin cậy của kết quả nghiên cứu.

Kết quả cho thấy, ở hình 3.3 và 3.4, mặc dù không xử lý phân giải vẫn thu được tế bào bám vào bề mặt nuôi cấy, nhưng chất lượng dựa theo tỷ lệ sống chết thấp hơn hẳn so với phân giải bằng enzyme. Sau khi nuôi cấy lâu hơn thì các tế bào đó chết dần và không thể nuôi cấy tiếp được. Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu của Parvin và cộng sự [47], phương pháp phân

lập bằng enzyme thu được số lượng và chất lượng tế bào tốt hơn phương pháp nuôi cấy mảnh mô. Điều này có thể do các tế bào bám dính ban đầu phần lớn không phải tế bào gốc, mà chỉ là những tế bào có khả năng di trú, phần lớn tế bào gốc trong mô mỡ có thể vẫn nằm ở trong mảnh mô và không thể di trú ra ngoài do chưa được phân giải. Số lượng nhỏ tế bào gốc vẫn có thể di chuyển ra ngoài mảnh mô, tuy nhiên mật độ thấp sẽ làm các liên kết về tín hiệu yếu gây ra sự bong tách và nổi lên bề mặt, làm cho kết quả cuối cùng là không thu được sản phẩm ASC từ việc chỉ nuôi cấy mảnh mô mà không sử dụng các phương pháp phân giải, cụ thể là collagenase [47].

Việc không sử dụng collagenase mà vẫn thu được tế bào có khả năng bám dính ở bề mặt đĩa, và chất lượng thấp của tế bào ở điều kiện này sau khi nuôi cấy có ý nghĩa quan trọng đối với việc nuôi cấy, phân lập SVF từ mô mỡ. Thông tin này ngoài cung cấp thêm cơ sở để đánh giá hiệu quả của việc sử dụng collagenase so với nuôi cấy mảnh mô để thu được kết quả tốt nhất. Bên cạnh đó, theo em, thông tin này còn cung cấp một hướng nghiên cứu khác trong tương lai để có thể nuôi cấy mảnh mô bằng các phương pháp vật lý, cơ học để phân giải mô triệt để rồi để tế bào gốc bám dính mà không phải sử dụng enzyme khi cần.

Để đánh giá khả năng tăng sinh của tế bào sau khi phân lập ở các thời gian, tế bào được quan sát và theo dõi ở cả mức độ nuôi cấy sơ cấp và thứ cấp. Kết quả nuôi cấy sơ cấp (trong vòng 16 ngày) cho thấy nhóm xử lý collagenase có tốc độ tế bào tăng sinh cao hơn so với nhóm không xử lý enzyme. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Chaput và cộng sự [48] cũng cho thấy các tế bào phân lập bằng phương pháp enzyme có tốc độ tăng sinh ban đầu cao hơn so với các phương pháp phi enzyme. Trong đó, 3 ngày đầu tiên sau phân lập, tế bào ở nhóm xử lý collagenase 30 phút và 60 phút có tốc độ tăng sinh cao nhất, sau đó là nhóm 180 phút và cuối cùng là nhóm 360 phút (Hình 3.4 và 3.5). Hình thái tế bào ở tất cả các nhóm đều giống với nguyên bào sợi, phù hợp với đặc điểm của ASC. Tuy nhiên, bắt đầu từ ngày nuôi cấy thứ 10, cả 3 nhóm 30 phút, 60 phút, 180 phút đều đạt mật độ tế bào 100% diện tích nuôi cấy. Như vậy, khi thử nghiệm xử lý enzyme ở các thời gian 360 phút có ảnh hưởng đến số lượng tế bào thu được.

Như vậy, trong nghiên cứu này, em thử nghiệm xử lý collagenase ở các thời điểm khác nhau và tìm thấy rằng thời gian xử lý collagenase trong

khoảng 180 phút cho kết quả tốt nhất. Nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng, việc xử lý collagenase quá lâu, vượt quá 180 phút, không cải thiện số lượng và chất lượng của ASC. Vì vậy, cần cân nhắc đến thời gian xử lý collagenase để đảm bảo tối ưu hóa quá trình phân lập SVF từ mô mỡ.

Với những kết quả này, hy vọng rằng luận văn của em sẽ đóng góp vào việc cung cấp thêm thông tin và bằng chứng cho các nghiên cứu về phân lập SVF từ mô mỡ bằng collagenase và giúp họ đưa ra các quyết định phù hợp khi thực hiện các nghiên cứu liên quan đến lĩnh vực này.

KẾT LUẬN

1. Sự phân tách SVF từ mô mỡ bằng collagenase ở 180 phút có khả năng phân tách ASCs ra khỏi bề mặt nuôi cấy hiệu quả hơn so với các thời gian 30, 60, 360 phút
2. Chất lượng của tế bào ASC qua sự biểu hiện các marker CD73 ở 30 phút là 99,23%, 60 phút 99,30%, 180 phút 99,44%, 360 phút 98,97% còn marker CD90 ở 30 phút 97,63%, 60 phút là 96,94%, 180 phút 99,10% và 360 phút là 96,49% bằng phương pháp phân tích dòng chảy tế bào.
3. Ảnh hưởng của collagenase tới khả năng biệt hoá nguyên bào mỡ và nguyên bào xương (differentiation) của ASC ở thời gian 180 phút tốt hơn so với các thời gian 30, 60, 360 phút.

KIẾN NGHỊ

Cần đánh giá khả năng biệt hóa tế bào bằng một số các marker khác được thiết kế và sử dụng để phân tích toàn diện hơn (các marker cho qPCR như stemness marker).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Oberbauer E., Steffenhagen C., Wurzer C., Gabriel C., Redl, H., & Wolbank, S., 2015. Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art. *Cell Regeneration London, England*, 41, 4:7. <https://doi.org/10.1186/S13619-015-0020-0>
2. Senesi, L., De Francesco, F., Farinelli, L., Manzotti, S., Gagliardi, G., Papalia, G. F., Riccio, M., & Gigante, A., 2019. Mechanical and Enzymatic Procedures to Isolate the Stromal Vascular Fraction From Adipose Tissue: Preliminary Results. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 88. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2019.00088>
3. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., & Middleton, J., 2007. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells Dayton, Ohio*, 2511, 2739-2749. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2007-0197>
4. *New: Essentials of Stem Cell Biology | EurekAlert!* n.d.
5. Friedenstein, A. J., Gorskaja, U. F., & Kulagina, N. N., 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology*, 45, 267-274. <https://europepmc.org/article/med/976387>
6. Liu, Y., Goldberg, A. J., Dennis, J. E., Gronowicz, G. A., & Kuhn, L. T., 2012. One-step derivation of mesenchymal stem cell MSC-like cells from human pluripotent stem cells on a fibrillar collagen coating. *PloS One*, 73. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0033225>
7. Asutay, F., Acar, A. H., Yolcu, Ü., Kirtay, M., & Alan, H., 2015. Dental stem cell sources and their potentials for bone tissue engineering. *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*, 492, 51. <https://doi.org/10.17096/JIUFD.42908>
8. Dong, H., Li, G., Shang, C., Yin, H., Luo, Y., Meng, H., Li, X., Wang, Y., Lin, L., & Zhao, M., 2018. Umbilical cord mesenchymal stem cell UC-MSC transplantations for cerebral palsy. *American Journal of Translational Research*, 103, 901.

9. M., & Chaudhry, G. R., 2017. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stromal Cells from Human Umbilical Cord and Fetal Placenta. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2017122. <https://doi.org/10.3791/55224>
10. Zang Chao Han., 2009. Umbilical cord mesenchymal stem cells UC- MSC: biology, banking and clinical applications - PubMed. *Bull Acad Natl Med*, 1933, 545-547.
11. Wagner W., Wein F., Seckinger A., Frankhauser M., Wirkner, U., Krause U., Blake J., Schwager C., Eckstein V., Ansorge W., & Ho A.D., 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology*, 3311, 1402-1416. <https://doi.org/10.1016/J.EXPHEM.2005.07.003>
12. Wang H., Hung S., Peng S., Huang C., Wei H., Guo Y., Fu Y., Lai M., & Chen C., 2004. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells Dayton, Ohio*, 227, 1330-1337. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2004-0013>
13. Caplan A. I., 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 95, 641-650. <https://doi.org/10.1002/JOR.1100090504>
14. 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, 315-317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
15. Hahn H. M., Jeong K. S., Yoo B. Y., Park J. H., Jung H. J., & Lee I. J., 2018. Effect of the Bowl Structure in an Automated Cell-Isolation Device on Stromal Vascular Fraction's Isolation Yield. *Journal of Medical Devices, Transactions of the ASME*, 124. <https://doi.org/10.1115/1.4041191>
16. Moon K. C., Chung H. Y., Han S. K., Jeong S. H., & Dhong E. S., 2019. Possibility of injecting adipose-derived stromal vascular fraction cells to accelerate microcirculation in ischemic diabetic feet: A pilot study. *International Journal of Stem Cells*, 121, 107-113. <https://doi.org/10.15283/IJSC18101>

17. Kolf C. M., Cho E., & Tuan R. S., 2007. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy*, 91. <https://doi.org/10.1186/AR2116>
18. He S., Nakada D., & Morrison S. J., 2009. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25, 377-406. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.042308.113248>
19. Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., & Marshak D. R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science New York, N.Y.*, 2845411, 143-147. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.284.5411.143>
20. Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., & Marshak D. R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science New York, N.Y.*, 2845411, 143-147. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.284.5411.143>
21. Son B., Marquez-Curtis L. A., Kucia M., Wysoczynski M., Turner A. R., Ratajczak J., Ratajczak M. Z., & Janowska-Wieczorek A., 2006. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells Dayton, Ohio*, 245, 1254-1264. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2005-0271>
22. Forte G., Minieri M., Cossa P., Antenucci D., Sala M., Gnocchi V., Fiaccavento R., Carotenuto F., De Vito P., Baldini P. M., Prat M., & Di Nardo P., 2006. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation. *Stem Cells Dayton, Ohio*, 241, 23-33. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2004-0176>
23. *Bệnh viện Đại học Y Dược*. n.d..
24. Nguyen A., Guo J., Banyard D. A., Fadavi D., Toranto J. D., Wirth G. A., Paydar K. Z., Evans G. R. D., & Widgerow A. D., 2016. Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 1: Current concepts and review of the literature. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery: JPRAS*, 692, 170-179. <https://doi.org/10.1016/J.BJPS.2015.10.015>

25. Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte, D. A., Huang J. I., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraser J. K., Benhaim P., & Hedrick M. H., 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 1312, 4279-4295. <https://doi.org/10.1091/MBC.E02-02-0105>
26. Josh F., Kobe K., Tobita M., Tanaka,R., Suzuki,K., Ono,K., Hyakusoku,H., & Mizuno H., 2012. Accelerated and safe proliferation of human adipose-derived stem cells in medium supplemented with human serum. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku Zasshi*, 796, 444-452. <https://doi.org/10.1272/JNMS.79.444>
27. Chamberlain Sharun K., Musa T. H., Musa H. H., Kumar R., Pawde A. M., Chandra V., Tuli H. S., Dhama K., Amarpal & Sharma, G. T., 2022. Mapping global trends in adipose-derived mesenchymal stem cell research: A bibliometric analysis using scopus database. *Annals of Medicine and Surgery*, 77, 103542. <https://doi.org/10.1016/J.AMSU.2022.103542>
28. Wang S., Qu X., & Zhao R. C., 2012. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 5. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-5-19>
29. Hogg J. C., 2012. A brief review of chronic obstructive pulmonary disease. *Canadian Respiratory Journal: Journal of the Canadian Thoracic Society*, 196, 381. <https://doi.org/10.1155/2012/496563>
30. Lasfargues E. Y., & Moore D. H., 1971. A method for the continuous cultivation of mammary epithelium. *In Vitro*, 71, 21-25. <https://doi.org/10.1007/BF02619001/METRICS>
31. Raposio E., Caruana G., Bonomini S., & Libondi G., 2014. A novel and effective strategy for the isolation of adipose-derived stem cells: minimally manipulated adipose-derived stem cells for more rapid and safe stem cell therapy. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1336, 1406-1409. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000000170>
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, 1-18. <https://doi.org/10.1186/S13287-019-1175-3/FIGURES/9>

33. Chen S., So E. C., Strome S. E., & Zhang X., 2015. Impact of Detachment Methods on M2 Macrophage Phenotype and Function. *Journal of Immunological Methods*, 426, 56-61. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2015.08.001>
34. Quan Y., Yan Y., Wang X., Fu Q., Wang W., Wu J., Yang G., Ren J., & Wang Y., 2012. Impact of cell dissociation on identification of breast cancer stem cells. *Cancer Biomarkers : Section A of Disease Markers*, 123, 125-133. <https://doi.org/10.3233/CBM-130300>
35. 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, 78-84. <https://doi.org/10.1016/J.ADVMS.2015.09.005>
36. Kharaziha P., Hellström P. M., Noorinayer B., Farzaneh F., Aghajani K., Jafari, F., Telkabadi M., Atashi, A., Honardoost M., Zali M. R., & Soleimani, M., 2009. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: A phase I-II clinical trial. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2110, 1199-1205. <https://doi.org/10.1097/MEG.0B013E32832A1F6C>
37. Leslie S. K., Cohen D. J., Sedlacek J., Pinsker E. J., Boyan B. D., & Schwartz Z., 2013. Controlled release of rat adipose-derived stem cells from alginate microbeads. *Biomaterials*, 3433, 8172-8184. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2013.07.017>
38. Gimble J. M., Katz A. J., & Bunnell B. A., 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation Research*, 1009, 1249-1260. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000265074.83288.09>
39. Lee S. K., Kim, D. W., Dhong E. S., Park S. H., & Yoon E. S., 2012. Facial Soft Tissue Augmentation using Autologous Fat Mixed with Stromal Vascular Fraction. *Archives of Plastic Surgery*, 395, 534. <https://doi.org/10.5999/APS.2012.39.5.534>
40. Al Battah F., De Kock J., VanhaeckeT., & Rogiers, V., 2011, Current status of human adipose-derived stem cells: differentiation into hepatocyte-like cells. *TheScientificWorldJournal*, 11, 1568-1581. <https://doi.org/10.1100/TSW.2011.146>

41. Rotter N., Oder J., Schlenke P., Lindner U., Böhrnsen F., Kramer, J., Rohwedel J., Huss, R., Brandau S., Wollenberg B., & Lang S., 2008. Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem Cells and Development*, 173, 509-518. <https://doi.org/10.1089/SCD.2007.0180>
42. Kurashina Y., Takemura K., Miyata S., Komotori J., & Koyama T., 2014. Effective cell collection method using collagenase and ultrasonic vibration. *Biomicrofluidics*, 85. <https://doi.org/10.1063/1.4899054>
43. Gojanovich, A. D., Gimenez, M. C., Masone, D., Rodriguez, T. M., Dewey, R. A., Delgui, L. R., Bustos, D. M., & Uhart, M. (2018). Human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells handling protocols. Lipid droplets and proteins double-staining. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(APR), 33. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2018.00033/BIBTEX>
44. Furcht, L. T., & Wendelschafer-Crabb, G. (1978). Trypsin-induced coordinate alterations in cell shape, cytoskeleton, and intrinsic membrane structure of contact-inhibited cells. *Experimental Cell Research*, 114(1), 1-14. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(78\)90029-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(78)90029-0)
45. Francis, S. L., Duchi, S., Onofrillo, C., Di Bella, C., & Choong, P. F. M. (2018). Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Use of Cartilage Tissue Engineering: The Need for a Rapid Isolation Procedure. *Stem Cells International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8947548>
46. N-BIOTEK. (n.d.). User manual stempia kit.
47. Salehinejad, P., Banu Alitheen, N., Ali, A. M., Omar, A. R., Mohit, M., Janzamin, E., Samani, F. S., Torshizi, Z., & Nematollahi-Mahani, S. N. (2012). Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 48(2), 75-83. <https://doi.org/10.1007/S11626-011-9480-X/METRICS>
48. Koellensperger Eva*, Gramley Felix, G. G. and, & Uwe, L. (n.d.). Use of collagenase to isolate adipose tissue-derived stem cells - substantial manipulation or not?