

**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 HOA

**NGHIÊN CỨU TÍNH AN TOÀN CỦA THỂ TIẾT NGOẠI BÀO
TỪ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ DÂY RÓN
TRÊN IN VITRO VÀ TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ
NGÀNH SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

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 HOA

**NGHIÊN CỨU TÍNH AN TOÀN CỦA THỂ TIẾT NGOẠI BÀO
TỪ TẾ BÀO GÓC TRUNG MÔ DÂY RÓN
TRÊN IN VITRO VÀ TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ
NGÀNH SINH HỌC THỰC NGHIỆM
Mã số: 8420114**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Lê Thị Thuỳ Dương
2. PGS.TS Lê Thị Đông Phương

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to Lê Thị Đông Phương, one of the supervisors listed.

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 và nhóm nghiên cứu thực hiện. 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.

**Nguyễn Thị Hoa**

Lời cảm ơn

Trước tiên, em xin gửi lời cảm ơn và biết ơn sâu sắc đến TS. Lê Thị Thùy Dương - Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam và PGS.TS Lê Thị Đông Phương - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, người đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo, giúp đỡ em trong suốt thời gian nghiên cứu làm luận văn.

Em cũng xin gửi lời cảm ơn đến toàn thể các thầy cô Học viện Khoa học và Công nghệ, ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng đã tạo điều kiện cho em trong quá trình học tập, nghiên cứu tại trường. Những kiến thức mà em nhận được sẽ là hành trang giúp em vững bước trong tương lai.

Em xin cảm ơn các thầy, cô và nhóm nghiên cứu Viện nghiên cứu tế bào gốc và công nghệ gen Vinmec, Bộ môn Sinh lý bệnh, Bộ môn Phẫu thuật thực hành, thực nghiệm - Học viện Quân y, đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ để hoàn thành luận văn này.

Cuối cùng, em xin cảm ơn gia đình, bạn bè, người thân đã luôn ở bên để động viên và là nguồn cổ vũ lớn lao, là động lực giúp em hoàn thành luận văn này. Mặc dù đã cố gắng hoàn thành luận văn trong khả năng có thể. Tuy nhiên sẽ không tránh khỏi những thiếu sót. Em rất mong nhận được sự cảm thông và tận tình chỉ bảo của quý thầy cô và toàn thể các bạn.

Mục lục

	<i>Trang</i>
Trang phụ bìa	
Lời cam đoan	i
Lời cảm ơn	ii
Mục lục	iii
Danh mục chữ, ký hiệu viết tắt trong luận án	v
Danh mục bảng	vi
Danh mục biểu đồ	vii
Danh mục hình	vii
Mở đầu	1
NỘI DUNG	3
Chương 1: TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. Tế bào gốc và thể tiết ngoại bào	3
1.1.1 Tế bào gốc	3
1.1.2 Thể tiết ngoại bào	4
1.2. Ảnh hưởng của môi trường oxy trong nuôi cấy tế bào gốc	8
1.3. Ứng dụng tế bào gốc và thể tiết ngoại bào trong y học	12
1.4. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước	14
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	18
2.1. Đối tượng nghiên cứu	18
2.1.1. Thể tiết ngoại bào	18
2.1.2. Động vật nghiên cứu	18
2.2. Phương pháp nghiên cứu	18
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu	18
2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu	19

2.2.3.	Nội dung nghiên cứu và đánh giá	19
2.2.3.1.	<i>Đánh giá nội độc tố, vi sinh vật, nấm và gây tan máu trên invitro</i>	19
2.2.3.2	<i>Đánh giá độc tính cấp, độc tính bán trường diễn, quá mẫn hệ thống và kích ứng bề mặt nhãn cầu</i>	21
2.2.4	Xử lý số liệu	24
2.2.5.	Đạo đức trong nghiên cứu	24
	Sơ đồ các bước tiến hành nghiên cứu	25
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN		26
3.1.	Kết quả nội độc tố, vi sinh vật, nấm và gây tan máu trên in vitro	26
3.2.	Kết quả độc tính cấp, bán trường diễn, quá mẫn hệ thống và kích ứng bề mặt nhãn cầu	29
3.2.1.	Đánh giá độc tính cấp trên chuột nhắt trắng	29
3.2.2.	Độc tính bán trường diễn	29
3.2.3.	Đánh giá tính gây quá mẫn hệ thống trên thỏ	31
3.2.4.	Đánh giá tính kích ứng bề mặt nhãn cầu	49
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ		52
TÀI LIỆU THAM KHẢO		53
PHỤ LỤC		62

Danh mục các ký hiệu, các chữ viết tắt

Viết tắt	Phần viết đầy đủ
EV	: Extracellular Vesicles (thể tiết ngoại bào)
LAL	: Limulus Amebocyte Lysate (chất thử nội độc tố)
LD50	: Lethal Dose 50% (liều chết 50%)
TBGTM	: Tế bào gốc trung mô
MSC	: Mesenchymal Stem Cells (tế bào gốc trung mô)
MV	: Microvesicles (vi hạt)
HIF	: Hypoxia Inducible Factor (yếu tố điều hòa oxy)
PDGF	: Platelet-Derived Growth Factor (yếu tố tăng trưởng tiểu cầu)
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor (yếu tố tăng trưởng nội mạch)
AD	: Average dose (liều trung bình)
HGF	: Hepatocyte Growth Factor (yếu tố tăng trưởng tế bào gan)
CAR-T	: Chimeric antigen Receptor T-cell therapy (liệu pháp tế bào thụ thể kháng nguyên dạng khảm)
PBS	: Phosphate Buffered Saline (dung dịch đệm)
TNF	: Tumor Necrosis Factor (yếu tố hoại tử khối u)

Danh mục bảng

Bảng	Tên bảng	Trang
1.1.	Các tiêu chí đánh giá chất lượng của sản phẩm thể tiết ngoại bào	7
3.1.	Kết quả xét nghiệm vi sinh vật, nội độc tố và tồn dư dung môi	26
3.2.	Toàn trạng và số chuột chết trong 72 giờ	29
3.3.	Kết quả theo dõi sức khỏe toàn thân thỏ	32
3.4.	Kết quả theo dõi trọng lượng thỏ trong thí nghiệm	33
3.5.	Nhiệt độ thỏ trong thí nghiệm	34
3.6.	Số lượng hồng cầu thỏ trong thí nghiệm	35
3.7.	Lượng huyết sắc tố thỏ trong thí nghiệm	35
3.8.	Số lượng bạch cầu thỏ trong thí nghiệm	36
3.9.	Số lượng tiểu cầu thỏ trong thí nghiệm	36
3.10.	Nồng độ ure thỏ trong thí nghiệm	37
3.11.	Nồng độ creatinin thỏ trong thí nghiệm	38
3.12.	Nồng độ AST thỏ trong thí nghiệm	39
3.13.	Nồng độ ALT thỏ trong thí nghiệm	39
3.14.	Kích ứng bề mặt nhãn cầu	49

Danh mục các biểu đồ

Biểu đồ	Tên biểu đồ	Trang
3.1.	Nồng độ Histamin huyết tương thỏ sau khi tiêm EV	43
3.2.	Nồng độ IL-1 huyết tương thỏ sau khi tiêm EV từ TBG	44
3.3.	Nồng độ IL-6 huyết tương thỏ sau khi tiêm EV từ TBG	44
3.4.	Nồng độ IFN-gama huyết tương thỏ sau khi tiêm EV	45
3.5.	Nồng độ IgE huyết tương	46
3.6.	Nồng độ TNF-alpha huyết tương thỏ sau khi tiêm EV	47

Danh mục hình

Hình	Tên hình	Trang
1.1.	Các loại thể tiết ngoại bào (EVs) do một tế bào tiết ra	5
1.2.	Quá trình hình thành và vật chất mang của mỗi loại thể tiết khác nhau	6
1.3.	Quy trình nuôi cấy tế bào, phân lập thể tiết và kiểm soát chất lượng	6
1.4.	Cơ chế của điều kiện oxy sinh lý đối với thúc đẩy tiềm năng ứng dụng trị liệu	10
1.5.	Thành phần của exosomes	13
1.6.	Thể tiết tiết ra từ TBGTM của người trong các mô hình bệnh	15
2.1.	Tiêm EV tĩnh mạch đuôi chuột	23
3.1.	Giải phẫu đại thể chuột thí nghiệm	30
3.2.	Giải phẫu bệnh gan, thận	31
3.3.	Hình ảnh giải phẫu đại thể vùng bụng và vi thể gan, thận của thỏ	48

MỞ ĐẦU

- Lý do chọn đề tài:

Ở Việt Nam cũng như nhiều nước trên thế giới, sử dụng tế bào gốc trung mô (TBGTM) và thể tiết của tế bào gốc trung mô (EV) được nuôi cấy trong môi trường có nồng độ oxy cao (khoảng 20%), cao hơn nhiều so với nồng độ oxy sinh lý của tế bào trong cơ thể là từ 2 - 9% để điều trị một số bệnh mà hiện nay chưa có phương pháp điều trị hiệu quả. Gần đây, các công bố cho thấy rằng các tế bào được nuôi cấy trong điều kiện có nồng độ oxy cao khi truyền vào cơ thể có thời gian sống ngắn hơn khi so sánh với tế bào gốc trung mô được nuôi cấy trong môi trường oxy sinh lý. Bên cạnh những công bố TBGTM dây rốn có tốc độ tăng sinh và khả năng tự làm mới kéo dài hơn so với các dòng TBGTM từ tủy xương và mô mỡ thì các dòng tế bào này còn có có tốc độ tăng sinh và chất lượng tốt hơn khi nuôi cấy trong điều kiện có nồng độ oxy cơ thể. Hơn nữa các nghiên cứu cũng chỉ ra các TBGTM nói chung và TBGTM dây rốn nói riêng khi nuôi cấy trong môi trường có nồng độ oxy sinh lý cũng tiết ra lượng thể tiết nhiều hơn, hoạt tính sinh học cao được ứng dụng nhiều trong y học tái tạo, trị liệu tế bào. Sử dụng thể tiết TBGTM dây rốn vào y học đã được nhiều nghiên cứu công bố, Bệnh viện Đa khoa Quốc tế Vinmec là trung tâm đầu tiên nghiên cứu ứng dụng thể tiết vào điều trị bệnh và đang nghiên cứu thể tiết của TBGTM nuôi cấy trong điều kiện oxy sinh lý. Vì vậy, đánh giá tính an toàn của sản phẩm là yêu cầu cơ bản đầu tiên nên chúng tôi thực hiện nghiên cứu này tập trung đánh giá chất lượng sản phẩm trước khi thử nghiệm in vivo như nội độc tố, tính vô khuẩn, độc tính, quá mẫn và kích ứng nhãn cầu... qua đó làm tiền đề cho tiến tới thử nghiệm với các mô hình bệnh lý ở mắt hoặc các cơ quan khác.

- Mục đích nghiên cứu:

Đánh giá nội độc tố, vi sinh vật và gây tan máu của thể tiết ngoại bào từ tế bào gốc trung mô dây rốn trên in vitro

Đánh giá độc tính cấp, độc tính bán trường diễn, tính gây quá mẫn và kích ứng bề mặt nhãn cầu của EV từ TBGTM dây rốn trên động vật thực nghiệm.

- Nội dung nghiên cứu:

+ Đánh giá nội độc tố, vi sinh vật và gây tan máu: sản phẩm EV từ tế bào gốc trung mô dây rốn đã được đánh giá các chỉ tiêu như: Protein tổng số; Số lượng thể tiết thu được; Kích thước trung bình thể tiết; Dầu ấn thể tiết.

Đánh giá một số nội dung như nội độc tố bằng phương pháp LAL, vi sinh vật với hệ thống BACTEX.

+ Đánh giá độc tính cấp, độc tính bán trường diễn, tính gây quá mẫn và kích ứng bề mặt nhãn cầu: Độc tính cấp được thử nghiệm liều cao trên chuột nhắt trắng chủng Swiss nhằm xác định liều chết 100% từ đó xác định LD50. Với độc tính bán trường diễn thử nghiệm trên chuột cống trắng chủng Wistar đánh giá bằng theo dõi toàn trạng, xét nghiệm huyết học, sinh hóa và giải phẫu đại thể, vi thể gan, thận, lách. Tính quá mẫn được thử nghiệm trên thỏ nhằm đánh giá các cytokines sau quá trình tiêm EV từ TBGTM dây rốn. Tính kích ứng nhãn cầu được thử nghiệm trên thỏ nhằm đánh giá kích ứng tăng tiết nước mắt, cương tụ mạch máu, vỡ phim nước mắt và tổn thương giác mạc với nhuộm fluorescein.

- Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài:

EV đã được chứng minh là có hiệu quả sinh học tương tự tế bào gốc, trong điều kiện oxy sinh lý có những nghiên cứu cho thấy có nhiều đặc điểm nổi bật như sự tăng sinh, biểu hiện bề mặt ổn định và tăng tỷ lệ sống khi đưa vào cơ thể. Ở nước ta, nhiều mắt bệnh hiện nay chưa có phương pháp điều trị hiệu quả nhưng những thử nghiệm điều trị với tế bào gốc và thể tiết đã cho thấy có nhiều kết quả khả quan. Từ cơ sở các thử nghiệm và kết quả đã có cho thấy nghiên cứu này vừa có tính khoa học và ý nghĩa thực tiễn cao.

- Những đóng góp của luận văn:

Luận văn đã cung cấp những thông tin quý giá về tính an toàn của EV từ TBGTM dây rốn và là cơ sở cho các thử nghiệm EV này ở mô hình bệnh và thử nghiệm lâm sàng trong tương lai. Bên cạnh đó, kết quả luận văn cho thấy EV thu được khi nuôi cấy TBGTM trong môi trường với nồng độ oxy sinh lý có nhiều ưu điểm và các thử nghiệm trên động vật có tính an toàn cao.

NỘI DUNG

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Tế bào gốc và thể tiết ngoại bào

1.1.1. Tế bào gốc

Tế bào gốc là loại tế bào đặc biệt với khả năng tự đổi mới và biệt hóa thành các loại tế bào có các chức năng khác nhau trong cơ thể. Các loại tế bào gốc có thể giúp bổ sung, thay thế, sửa chữa những tế bào già yếu hoặc bị tổn thương. Có nhiều tế bào gốc được quan tâm nghiên cứu như tế bào gốc phôi, tế bào gốc nhũ nhi, tế bào gốc trưởng thành, tế bào gốc đa năng cảm ứng. Tuy nhiên có 2 loại tế bào gốc được ứng dụng nhiều trong y học là tế bào gốc trung mô từ dây rốn và từ mô mỡ.

TBGTM (MSCs) là những tế bào gốc trưởng thành đa năng có trong nhiều mô như dây rốn, tuỷ răng sữa, tuỷ xương và mô mỡ [1]. TBGTM có khả năng tự tăng sinh và có thể biệt hoá thành các tế bào thuộc mô liên kết như xương, sụn, mỡ và tế bào các dòng khác như tế bào thần kinh, gan, tụy và thận... [2]. TBGTM có thể tiết ra các chất tăng trưởng kích thích tạo mạch máu mới và tái tạo các mô/cơ quan trong cơ thể cũng như điều hoà hệ thống miễn dịch và ức chế phản ứng viêm (hình 1.1). Với khả năng cung cấp một nguồn TBGTM dồi dào nên có tiềm năng ứng dụng rất lớn khi sử dụng cho liệu pháp tế bào đồng loài.

- TBGTM từ dây rốn có thể được phân lập từ toàn bộ các phần của dây rốn như từ động mạch, màng dây rốn và lấy từ khối nhầy Wharton Jelly. Những ưu điểm MSCs này là dễ dàng thu thập, không gặp trở ngại về y đức, cũng như khả năng tăng sinh vượt trội nên có thể sản xuất một số lượng lớn tế bào từ một nguồn cho duy nhất [3]. Hơn nữa, chúng là một lựa chọn lý tưởng để sử dụng ghép đồng loài do đặc tính sinh miễn dịch thấp và khả năng điều hoà miễn dịch cao [4]. Ngoài ra, chúng tiết ra nhiều chất sinh trưởng có thể kích thích các tế bào gốc, tế bào tiền thân nội sinh phát triển cũng như hình thành mạch máu mới

nuôi dưỡng mô, giúp cơ thể sửa chữa các tổn thương và thúc đẩy quá trình tái tạo. Các chất đóng vai trò quan trọng trong quá trình này là yếu tố tăng trưởng tế bào gan, yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi, yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu, yếu tố tăng trưởng thần kinh, yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não và yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc tế bào thần kinh đệm [5].

- TBGTM từ mô mỡ là các tế bào tiền thân đa năng được tìm thấy trong mô mỡ trưởng thành đã được nghiên cứu rộng rãi như một nguồn tế bào cho kỹ thuật mô và y học tái tạo trong hơn 15 năm qua [6]. TBGTM từ mô mỡ chủ yếu là mesodermal, nhưng một số có nguồn gốc thần kinh (ectodermal) [7] và có khả năng biệt hóa thành các tế bào mô mỡ, sụn và xương [8]. Ngoài ra, có khả năng giảm viêm, qua trung gian chủ yếu thông qua các hiệu ứng paracrine [9].

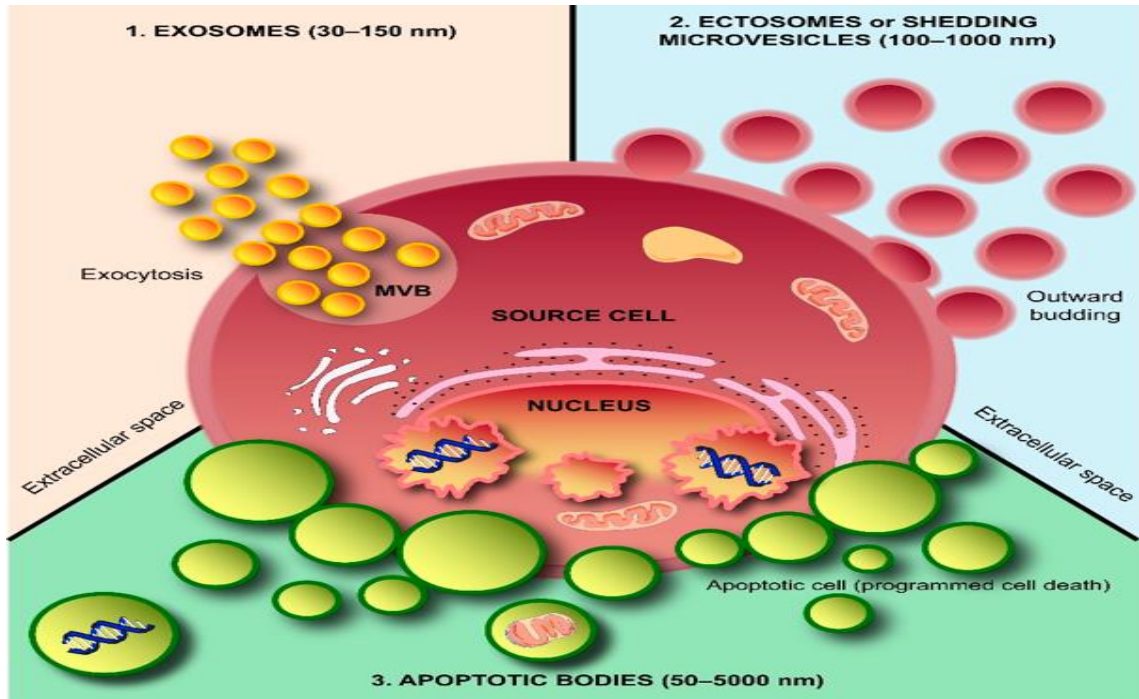
Như vậy, tiềm năng trị liệu của MSC dựa vào các đặc tính độc đáo của chúng như i) khả năng biệt hóa thành các dòng tế bào khác nhau, ii) khả năng tiết ra các yếu tố hòa tan rất quan trọng cho tế bào sống sót và tăng sinh, iii) khả năng điều hòa phản ứng miễn dịch, iv) khả năng di chuyển đến vị trí chính xác tổn thương.

1.1.2. Thể tiết ngoại bào

- Thể tiết ngoại bào (EV): là các túi có cấu trúc màng kép lipid được tế bào tiết ra không gian ngoại bào và có kích thước nano từ 30-5000 nm [10]. Thể tiết có chức năng vận chuyển các phân tử sinh học quan trọng giữa các tế bào [11], duy trì cân bằng nội môi sinh lý [12] và ảnh hưởng đến cơ chế bệnh sinh [13]. Thể tiết được chia làm 3 loại chính là microvesicles (MV), exosomes và apoptotic bodies, chúng được phân biệt dựa trên quá trình hình thành, quá trình phóng thích, kích thước, vật chất mang và chức năng [14]. Các vật chất mang hay còn gọi là “cargo” (hàng hoá) của thể tiết bao gồm lipid, DNA, RNA, protein và các chất chuyển hoá liên quan đến tế bào tiết ra (Hình 1.2).

Exosomes là các thể tiết ngoại bào với lớp màng đơn bên ngoài và được tiết ra bởi tất cả các loại tế bào, chúng được tìm thấy ở chất nền, nước tiểu, tinh dịch, dịch phế quản, dịch não tủy, huyết thanh, mật, bạch huyết, mật và axit dịch

vị. Các hạt exosomes có đường kính khoảng từ 30 - 150 nm được hình thành trong các ngăn nội bào (endosome), sau đó được giải phóng ra bằng quá trình xuất bào hay còn gọi hiện tượng ngoại bào [15]. Một lượng lớn rất đa dạng các vật chất mang được xác định trong exosomes bao gồm khoảng 4400 proteins, 194 lipids, 1639 mRNAs, 764 miRNAs và các chất chuyển hoá [16].

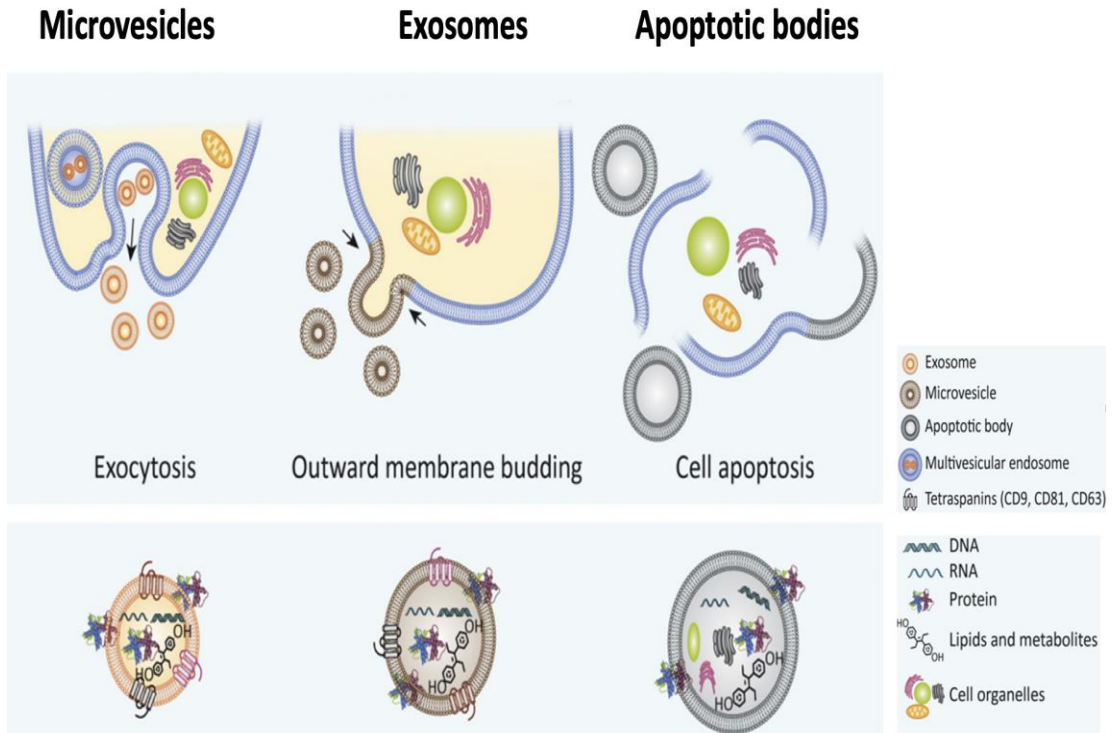


Hình 1.1: Các loại thể tiết ngoại bào (EVs) do một tế bào tiết ra [15].

Microvesicles được tiết ra bởi sự nảy chồi trực tiếp ra ngoài của các vi bào hoặc của màng sinh chất và có kích thước trong khoảng 50 - 1000 nm. Do vậy, các MV chủ yếu chứa các protein liên quan đến bào tương và màng sinh chất, đặc biệt là các protein tập trung ở bề mặt màng sinh chất ví dụ như tetraspanins [17]. Ngoài ra, MV cũng chứa các protein khung xương tế bào, protein sốc nhiệt, integrins và các protein chứa các biến đổi sau dịch mã như glycosyl hoá và phosphoryl hoá.

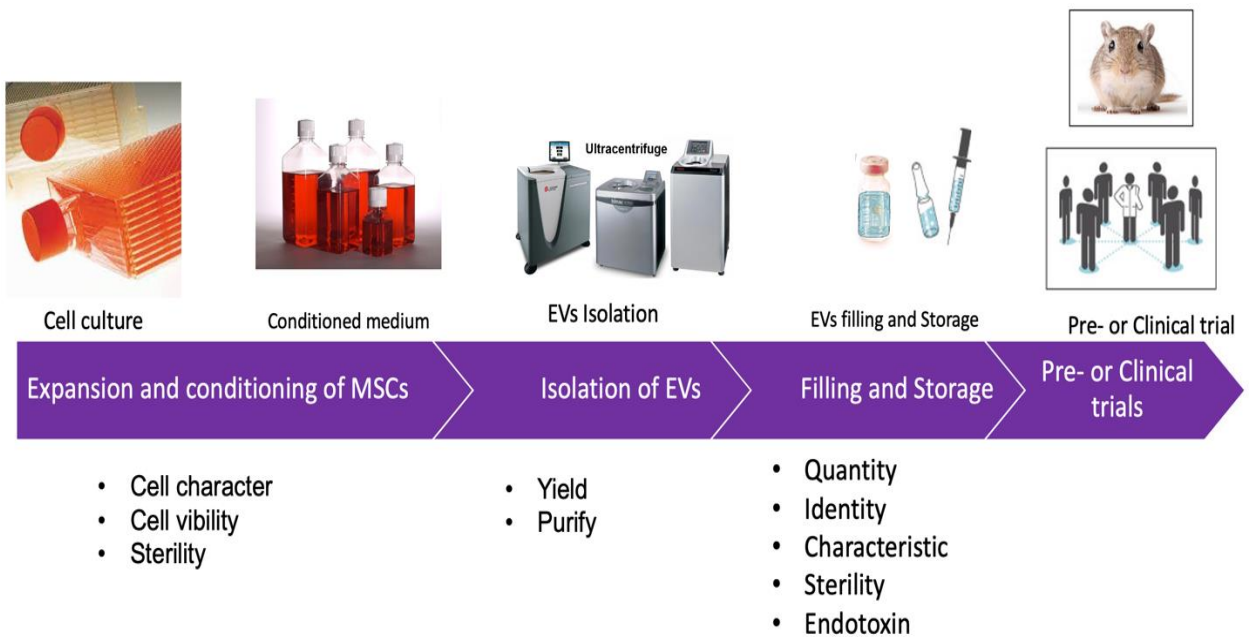
Apoptosis bodies được giải phóng bởi các tế bào chết hoặc trong quá trình apoptosis và có kích thước 500 - 2000 nm. Không giống với exosomes và MV, các thể tiết apoptosis bodies chứa các bào quan nguyên vẹn, chất nhiễm sắc và một lượng nhỏ protein glycosyl hoá. Ngoài ra, thành phần protein của apoptosis

bodies tương tự với tế bào ly giải, trong khi có một sự khác biệt rõ rệt giữa thành phần protein giữa exosomes và tế bào ly giải.



Hình 1.2: Quá trình hình thành và vật chất mang của mỗi loại thể tiết khác nhau [16]

- Phương pháp tách thể tiết: Trong nhiều nghiên cứu, thể tiết được phân lập bằng các phương pháp ly tâm siêu tốc, đây được coi như một phương pháp tiêu chuẩn “vàng” [18].



Hình 1.3: Quy trình nuôi cấy tế bào, phân lập thể tiết và kiểm soát chất lượng [18]

Những phương pháp phân lập thể tiết khác được phát triển dựa trên sự phân tách kích thước, sự bắt giữ ái lực miễn dịch (immunoaffinity capture), kết tủa (Hình 1.3). Tuy nhiên, những phương pháp này vẫn chưa thể phân lập một loại thể tiết riêng rẽ, đặc biệt là exosomes. Sản phẩm thường chứa hỗn hợp các loại thể tiết và một số thành phần của không gian ngoại bào. Nhiều phương pháp phân lập kết hợp đã được sử dụng để làm giàu hàm lượng của loại thể tiết mong muốn thu được. Tuy nhiên, điều này cũng làm tăng chi phí, thời gian và đào tạo kỹ thuật. Phát triển một phương pháp phân lập thể tiết có thể phân tách các loại thể tiết khác nhau với thời gian ngắn, hiệu quả, công suất lớn và đạt tiêu chuẩn sử dụng vẫn còn đang là một thách thức.

Sản phẩm thể tiết sau khi được phân lập được đánh giá chất lượng bằng nhiều phương pháp khác nhau như xác định danh tính, độ tinh khiết, tạp chất, hiệu lực, độ an toàn và độ ổn định (Bảng 1.1).

Bảng 1.1: Các tiêu chí đánh giá chất lượng của sản phẩm thể tiết ngoại bào

Tiêu chí	Chỉ số	Phương pháp
Kích thước trung bình của thể tiết	50 - 150 nm	TEM
Dấu ấn bề mặt thể tiết	Ít nhất là 3 dấu ấn dương tính và ít nhất 1 dấu ấn âm tính: CD9 ⁺ , CD29 ⁺ , CD44 ⁺ , CD 49e ⁺ , CD63 ⁺ , CD81 ⁺ , CD73 ⁺ , CD105 ⁺ , MCSP ⁺ , CD14 ⁻ , CD19 ⁻ , CD34 ⁻ , CD45 ⁻ , CD142 ⁻ , MHC class I , class II	Đo tế bào theo dòng chảy
Phân tích các cytokine	Thành phần các cytokine	ProcartaPlex multiplex panels assay
Nội độc tố	< 0,2 EU/mL cho đường truyền tuỷ sống và < 5 EU/mL cho các đường truyền khác	
Mycoplasma	Âm tính	
Tính vô trùng	Âm tính	

1.2. Ảnh hưởng của môi trường oxy trong nuôi cấy tế bào gốc

- Các nghiên cứu cho thấy nuôi cấy trong môi trường oxy sinh lý giúp tăng về số lượng và chất lượng của TBGTM. Tuy có thành công đầy hứa hẹn ở các nghiên cứu ban đầu nhưng hiệu quả của liệu pháp TBGTM lại chỉ ở mức trung bình trong một số thử nghiệm lâm sàng giai đoạn 3. Một trong những nguyên nhân là thời gian sống ngắn của TBGTM trong môi trường cơ thể do các tế bào này cần phải thích nghi với môi trường mới với mức oxy sinh lý thấp hơn nhiều sau khi chúng được truyền vào bệnh nhân. Nồng độ oxy tự nhiên nằm trong khoảng 1% - 6% cụ thể trong tủy xương, 2 - 8% trong mô mỡ và khoảng 2 - 3% trong nhau thai. Bằng chứng cho thấy rằng nồng độ oxy cao có thể gây tổn thương ADN và sự lão hóa của tế bào do sự tích tụ các gốc tự do chứa oxy (ROS). Nồng độ oxy sinh lý giúp tăng số lượng tế bào gốc đa năng và duy trì các tế bào ở trạng thái không biệt hóa lâu dài hơn [19]. Các TBGTM sinh sôi chậm hơn ở giai đoạn đầu (passage 0) và có khả năng tăng sinh cao hơn ở những lần cấy chuyển sau trong điều kiện oxy sinh lý [20]. Các tế bào này tăng mức biểu hiện của yếu tố phiên mã Oct4 và hoạt động của enzyme telomerase [21]. Điều này có thể giải thích cho thực tế là TBGTM duy trì thời gian tăng sinh của chúng trong điều kiện oxy sinh lý lâu hơn trước khi đạt đến sự lão hóa so với điều kiện oxy thông thường [22]. Cần phải nhấn mạnh rằng lão hóa là một yếu tố quan trọng hạn chế khả năng tăng sinh trong phòng thí nghiệm cũng như sự thích nghi sau cấy ghép của TBGTM trong cơ thể sống.

Ở cấp độ phân tử, điều kiện oxy sinh lý cảm ứng sự biểu hiện nhiều gen chi phối sự tồn tại, di chuyển và tăng sinh của tế bào, phản ứng viêm và điều hòa miễn dịch, biệt hóa sụn và chuyển hóa, cũng như quá trình tạo mạch của TBGTM tủy xương [23]. Điều kiện oxy sinh lý cũng ảnh hưởng tới sự biểu hiện của các miRNA. Phân tích cơ chế cho thấy rằng oxy sinh lý kiểm soát các miRNA được làm giàu trong tín hiệu HIF [24]. HIF-1 α là yếu tố điều hòa chính của điều kiện oxy sinh lý, kiểm soát nhiều chức năng thiết yếu của tế bào gốc, bao gồm các chức năng tự làm mới, tăng trưởng và biệt hóa. Nó cũng làm chủ

sự ổn định của ADN và điều khiển nhiều quá trình quan trọng của tế bào như trao đổi chất cũng như khả năng tiết ra các yếu tố tiền sinh mạch như yếu tố tăng trưởng nội mô mạch (VEGF) và erythropoietin, một cytokine kích thích tạo hồng cầu [25]. Sự biểu hiện quá mức của HIF-1 α trong TBGTM đã làm tăng quá trình hình thành mạch trong các mô được cấy ghép và thúc đẩy khả năng tái tạo của chúng trong các thí nghiệm trên mô hình động vật đối với bệnh liên quan đến thiếu máu cục bộ [26].

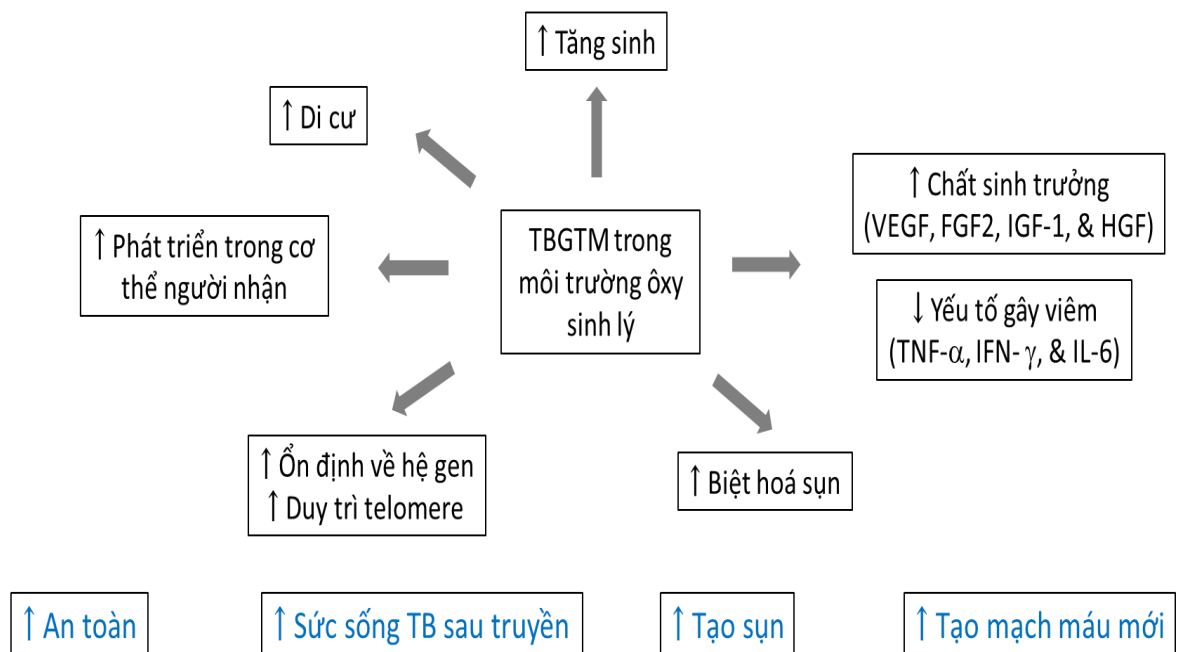
Vì giao tiếp cận tiết giữa các tế bào đóng vai trò quan trọng trong hoạt động điều trị của TBGTM, các nghiên cứu về hệ ngoại tiết của chúng rất được quan tâm. Các TBGTM tiết ra nhiều yếu tố tăng trưởng và chemokine như VEGF, yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (PDGF), yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi cơ bản (bFGF), yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF), yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF), yếu tố tăng trưởng thần kinh (NGF), yếu tố tăng trưởng giống insulin 1 (IGF-1), interleukin và yếu tố tế bào gốc (SCF) [27]. Những yếu tố này thúc đẩy sự hình thành mạch, sự tồn tại và tăng sinh của tế bào, cũng như hoạt hoá tế bào gốc nội sinh. Các TBGTM cũng tạo ra interleukin-10 (IL-10), interleukin-6 (IL-6), yếu tố tăng trưởng biến đổi (TGF)- β 1, prostaglandin-E2 (PGE2), nitric oxide (NO), các phân tử kháng nguyên-G của bạch cầu người (HLA-G5), yếu tố ức chế bệnh bạch cầu (LIF) và enzymIDO để điều hoà phản ứng miễn dịch [28]. Trong những yếu tố kể trên, điều kiện oxy sinh lý làm tăng mức độ của các yếu tố tiền sinh mạch: VEGF, IGF, HGF và bFGF, cũng như các phân tử điều hoà miễn dịch TGF- β [29].

Không chỉ trong môi trường in vitro, điều kiện oxy sinh lý cũng tác động có lợi cho sự tồn tại của TBGTM ở trong cơ thể sống. Các tế bào này có thể tồn tại lâu hơn ở những chuột được ghép TBG bị suy giảm miễn dịch. Các cơ chế giải thích cho điều này bao gồm tăng cường tiết các yếu tố tạo mạch, cải thiện khả năng di chuyển - xâm nhập, hoạt hóa các con đường tín hiệu liên quan đến sống còn và tăng dự trữ glycogen [30]. Trong mô hình thiếu máu cục bộ chi sau ở chuột, các TBGTM được nuôi cấy trong điều kiện oxy sinh lý tăng sinh và

thích nghi tốt hơn sau khi cấy ghép. Chúng cũng cảm ứng sự di cư của các tế bào nội mô và biệt hóa nguyên bào. Do đó, các mô thiếu máu được phục hồi toàn diện hơn, trong đó việc tưới máu lưu thông, phục hồi chi, hình thành mạch máu mới và tái tạo cơ xương được cải thiện đáng kể [31].

Hoạt tính sinh học của TBGTM đã được nuôi cấy trong điều kiện thiếu oxy đã được thử nghiệm trên mô hình chuột cho các bệnh phổi bao gồm tổn thương phổi do bức xạ và xơ phổi do bleomycin. Trong các mô hình này, điều kiện thiếu oxy thúc đẩy sự tồn tại của tế bào, giảm viêm và cải thiện chức năng phổi so với điều kiện oxy thông thường [32].

Gần đây, các nhà khoa học đã cho thấy các TBGTM tiếp xúc nồng độ oxy sinh lý và nồng độ ion Ca^{2+} cao sẽ kích thích tiềm năng điều hòa miễn dịch của chúng và làm giảm bệnh ghép chống chủ ở chuột có hệ miễn dịch của người [33].



Hình 1.4: Cơ chế của điều kiện oxy sinh lý đối với thúc đẩy tiềm năng ứng dụng trị liệu [28]

Trong một mô hình cho thiếu máu cục bộ chi dưới của bệnh tiểu đường, TBGTM nuôi cấy trong điều kiện oxy sinh lý đã tăng cường hoạt động tiết các yếu tố tạo mạch và thúc đẩy sự tăng sinh của các tế bào nội mô, dẫn đến cải thiện mạch máu để đáp ứng với thiếu máu cục bộ mô. Đáng kể là, môi trường nuôi cấy thiếu

oxy cũng kéo dài thời gian lưu giữ TBGTM in vivo với khoảng 5% số tế bào được tiêm vẫn sống sau 14 ngày [34]. Những lợi ích của việc nuôi cấy MSCs trong điều kiện oxy sinh lý được tóm tắt trong (Hình 1.5).

- Tác động của nuôi cấy trong môi trường oxy sinh lý lên thể tiết của TBGTM: Biester và cộng sự đã tổng hợp các nghiên cứu về thể tiết trong môi trường oxy thấp trong một bài review xuất bản vào năm 2020 [35]. Các nghiên cứu chỉ ra rằng thể tiết thu được sau khi kích ứng TBGTM bằng nồng độ oxy thấp hơn điều kiện oxy môi trường có thể giúp tăng cường khả năng di cư và tăng trưởng của tế bào đích, tái tạo mạch, đồng thời giảm chết tế bào và kích ứng miễn dịch. Một cơ chế quan trọng của quá trình này là do nồng độ oxy thấp ngăn quá trình phân huỷ của HIF1-alpha, giúp cho yếu tố phiên mã này có thể tổng hợp biểu hiện của hơn 100 gene đích, trong đó có VEGF-A, PDGF-B. Môi trường oxy thấp làm tăng quá trình sản xuất các miRNA đóng vai trò quan trọng trong điều khiển quá trình biểu hiện gen như miRNA-210, miRNA-21, miRNA146a, miRNA17, miRNA-22 và miRNA-23a. Ngoài ra, các con đường truyền tín hiệu khác cũng được kích thích như NFkB, mTOR và STAT3 để tăng sức sống của tế bào .

Thể tiết chiết xuất từ TBGTM dây rốn của người nuôi cấy trong môi trường oxy thấp (1%) cho thấy khả năng kích thích tế bào nội mô tăng sinh và di cư tốt hơn, do đó thúc đẩy tái tạo mạch máu và chữa lành tổn thương ở xương ở mô hình chuột nhanh hơn thể tiết của TBG ở điều kiện oxy thường [36]. Phân tích các miRNA ở hai loại thể tiết này cho thấy, nồng độ miR-126, miR-855-5p, miR-146b và miR-223 tăng lên nhiều lần khi nuôi cấy TBGTM dây rốn ở điều kiện oxy thấp. Một nghiên cứu khác trên mô hình chuột cống bị gây hoại tử xương cũng chứng tỏ thể tiết thu được trong môi trường oxy sinh lý (2%) tiết ra nhiều VEGF hơn và có hoạt tính cao hơn trong tái tạo mạch máu và giảm mức độ xương bị hoại tử.

Almeria và đồng sự chỉ ra rằng môi trường oxy sinh lý (5%) không làm thay đổi số lượng và kích thước thể tiết phân lập trong môi trường nuôi cấy của

TBGTM từ mô mỡ so với nồng độ oxy môi trường [36]. Các dấu ấn bề mặt của thể tiết ở hai điều kiện cũng tương tự nhau, ngoại trừ CD44 được biểu hiện thấp hơn ở môi trường oxy sinh lý. Mặt khác, điều kiện này giúp tăng cường khả năng tăng sinh vào tạo mạch của tế bào nội mô tốt hơn [37]. Trong mô hình chuột cống bị nhồi máu cơ tim, thể tiết tách ra từ TBGTM từ tuỷ xương giúp hỗ trợ tế bào cơ tim tăng khả năng sống sót và giảm những tổn thương do môi trường oxy thấp gây ra. Trong đó, miR-210 có trong thể tiết đóng một vai trò quan trọng [38]. Ngoài ra, miR-125b có trong thể tiết của TBGTM từ tuỷ xương và đây rón ở điều kiện oxy thấp ức chế phân tử p53 và BAK1, ngăn quá trình chết ở các tế bào cơ tim [39].

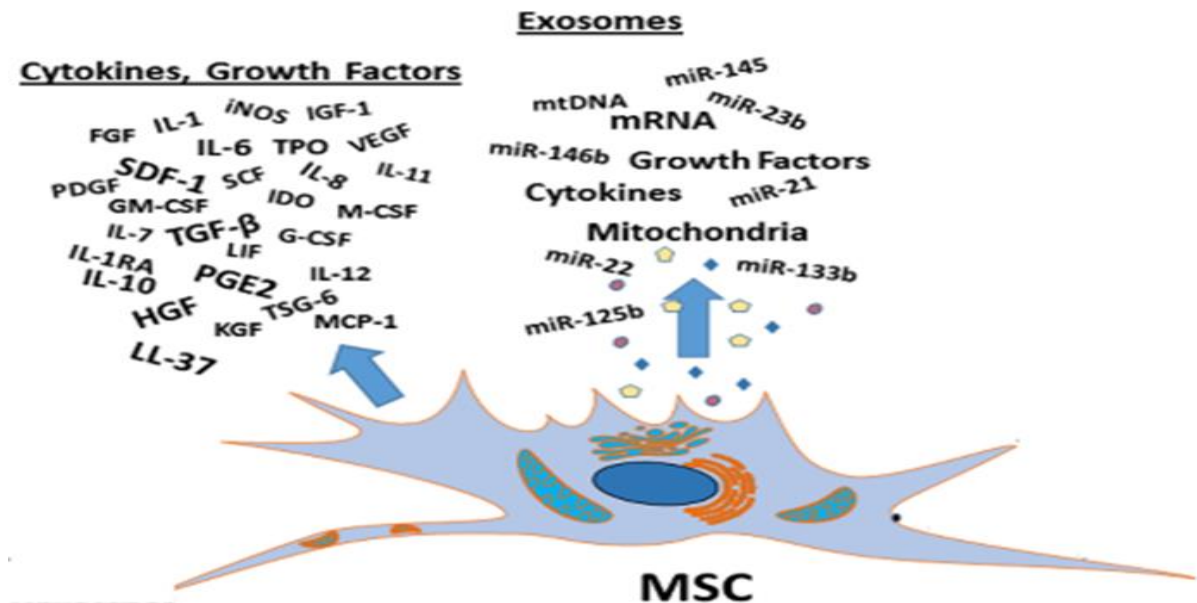
Khả năng điều hoà miễn dịch của thể tiết cũng được nghiên cứu rộng rãi [40]. TBGTM được nuôi cấy trong môi trường oxy sinh lý thúc đẩy hoạt tính điều hoà miễn dịch [41], tuy nhiên ảnh hưởng của nồng độ oxy lên hoạt tính này của thể tiết chưa được báo cáo nhiều. Thể tiết do TBG từ mô mỡ của chó được mô tả có khả năng chuyển hoá đại thực bào sang thể M2 với chức năng ức chế hệ miễn dịch.

Các nghiên cứu trên cho thấy môi trường oxy sinh lý có nhiều tiềm năng để tăng chất lượng thể tiết của TBGTM. Tuy nhiên, vẫn cần thêm nhiều nghiên cứu để có thể có một điều kiện nuôi cấy và phân lập thể tiết chuẩn hoá cũng như tìm hiểu về cơ chế hoạt động của thể tiết trên nhiều mặt bệnh khác nhau.

1.3. Đánh giá tính an toàn của thể tiết từ tế bào gốc trung mô

Chất tiết ngoại bào từ TBGTM là các túi nhỏ có lớp màng lipid kép bao gồm các proteins, lipid, vật chất di truyền (miRNA, RNAs), HGF, FGF, VEGF, PDGF, TGF-beta. Khi được giải phóng ra khỏi tế bào vào không gian ngoại bào, chúng sẽ gây tác dụng sinh học tại chỗ hoặc theo đường máu đến tế bào nhận thông màng tế bào và giải phóng các phân tử gồm lipid, axit nucleic và protein tới tế bào nhận (cơ chế truyền tin). Từ các hoạt tính sinh học này có thể thay đổi các đặc điểm ở cơ thể sinh vật. Nên trong các nghiên cứu thường đánh giá các đặc điểm như nội độc tố, vi sinh vật, sự thay đổi hình thái chức năng ở một số cơ quan

như gan thận và đánh giá tính gây quá mẫn của sản phẩm. Với gây quá mẫn thường xét nghiệm các cytokine [42]:



Hình 1.5. Thành phần của Exosomes

- Cytokin là một nhóm protein đa dạng không phải là kháng thể và là các chất trung gian giữa các tế bào. Hiện nay cytokin đang được sử dụng trên lâm sàng như những chất sửa đổi đáp ứng sinh học để điều trị các rối loạn khác nhau. Tín hiệu cytokin rất linh hoạt và có thể gây ra cả 2 phản ứng bảo vệ và làm hư hại. Các thụ thể cytokin loại 1 (gia đình IL-2R) là gia đình lớn nhất của các thụ thể cytokin. Gia đình này được chia thành ba lớp con dựa trên các thành phần chung: IL2R γ , β chung và gp130. Các thụ thể cytokin loại 2 (gia đình IFNR) có các cystein nằm ở vùng ngoại bào của các tiểu đơn vị. Đáp ứng tế bào với các cytokin nói chung là chậm (hàng giờ) bởi vì chúng cần tổng hợp ra mRNA và protein mới. Các cytokin có thể được xếp thành các loại khác nhau dựa vào chức năng của chúng hay nguồn gốc của chúng, nhưng điều quan trọng là chúng có thể được sản xuất bởi các tế bào khác nhau và hoạt động trên các tế bào khác nhau, bất kỳ nỗ lực nào để phân loại chúng cũng sẽ bị hạn chế.

+ Các chất trung gian của miễn dịch tự nhiên gồm: TNF- α , IL-1, IL-10, IL-12, interferon loại I (IFN- α và IFN- β), IFN- γ và chemokin.

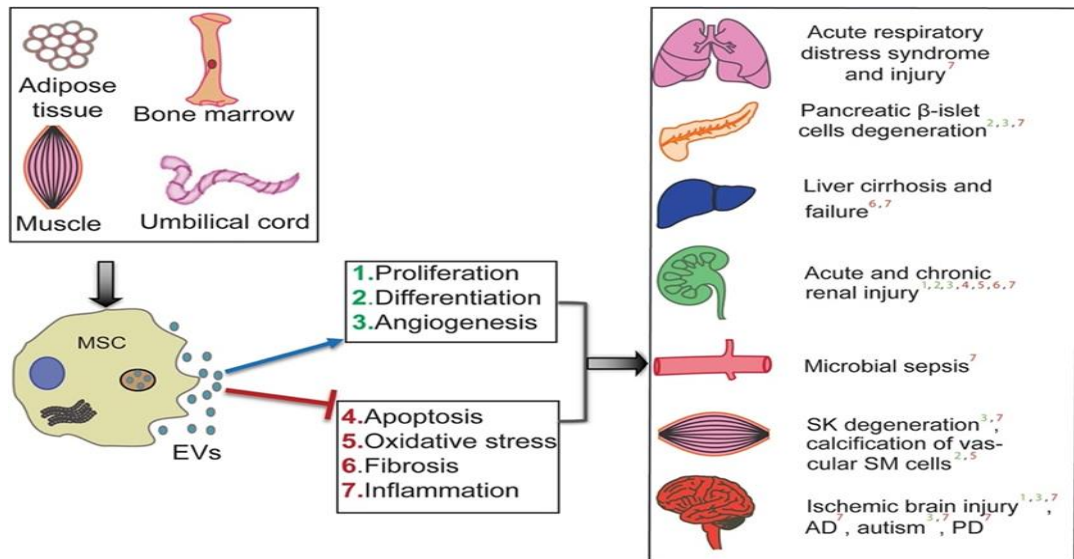
+ Các chất trung gian của miễn dịch thu được gồm: IL-2, IL-4, IL-5, TGF- β , IL-10 và IFN- γ .

- Hình thái và chức năng gan thận [43]: khi đưa bất kỳ chất nào vào cơ thể chúng đều gây các phản ứng với cơ thể sự thay đổi này diễn ra nhiều ở gan và thận. Gan có nhiều chức năng: chuyển hóa, dự trữ, tạo mật, chống độc, nội tiết và một số chức năng khác... Những chức năng này có liên quan một cách chặt chẽ với đặc điểm giải phẫu và tổ chức học của gan. Về mặt tổ chức học, các tế bào gan sắp xếp thành các tiểu thùy gan. Tiểu thùy gan là đơn vị cấu trúc cũng như đơn vị chức năng của gan chúng có cấu trúc hình đa giác, ở giữa hình đa giác là tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy. Từ đây, các tế bào gan xếp thành bè gồm 2 hàng liền nhau tỏa ra phía ngoại vi như hình nan hoa và gọi là bè Remak. Giữa 2 hàng tế bào gan của bè Remak có các đường ống nhỏ gọi là ống mật vi ti. Giữa các bè có xoang mạch nhận máu từ cả động mạch gan và tĩnh mạch cửa rồi đổ về tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy. Vách của xoang mạch được lót bởi một lớp tế bào nội mô không liên tục, có nhiều lỗ thủng, xen vào lớp tế bào nội mô này là các đại thực bào hình sao được gọi là tế bào Kupffer. Giữa các tế bào gan và lớp tế bào nội mô xoang mạch có một khoảng gọi là khoảng Disse, đây là nơi xuất phát hệ bạch huyết trong gan và cũng qua đây tế bào gan trao đổi chất với xoang mạch. Thận cũng có nhiều chức năng như lọc, tạo máu, bài tiết... Nhu mô thận được cấu tạo chủ yếu bởi những đơn vị chức năng thận gọi là nephron. Mỗi nephron gồm một tiểu thể thận và một hệ thống ống sinh niệu. Tiểu thể thận gồm một bao ở ngoài và một cuộn bao mạch bên trong. Hệ thống ống sinh niệu gồm có: các tiểu quản lượn, ống lượn gần, quai Henle, ống lượn xa và ống thu thập. Bên cạnh sự thay đổi này các xét nghiệm huyết học và sinh hóa có thể sẽ thay đổi theo.

1.4. Nghiên cứu thử nghiệm điều trị bệnh của tế bào gốc và thể tết ngoại bào

Ứng dụng trong y học tái tạo do có nhiều hoạt tính sinh học quý giá như điều hòa miễn dịch, thúc đẩy tái tạo mô, hình thành mạch và các vi mạch. Các nguồn TBGTM được sử dụng nhiều nhất là tủy xương, mô mỡ và dây rốn [44]. Các nghiên cứu gần đây cho thấy được vai trò quan trọng của các thể tiết ngoại bào do

TBGTM tiết ra tương tự với các hiệu ứng sinh học của TBGTM và làm trung gian cho các tác động nội tiết của TBGTM



Hình 1.6: Thể tiết tiết ra từ TBGTM của người trong các mô hình bệnh

Hiện nay có nhiều nghiên cứu chứng minh hiệu quả thể tiết từ TBGTM có nguồn gốc khác nhau (dây rốn, mô mỡ và tuỷ xương) được chứng minh là cải thiện các tình trạng bệnh suy giảm trí nhớ, Parkinson, xơ gan, chấn thương tủy sống, xơ phổi, Alzheimer, liền vết thương, thẩm mỹ...

Các nghiên cứu chứng minh do chúng có nhiều cơ chế tác động làm giảm tình trạng phát triển của bệnh như: khả năng di trú qua lớp hàng rào máu não, khả năng di chuyển đến khu vực viêm trong não, khả năng tái tạo các kết nối thần kinh tại vùng hồi hải mã, và khả năng làm giảm tích tụ của Beta-amyloid, hợp chất gây ra bệnh suy giảm trí nhớ. TBGTM sau khi được truyền thông qua đường tĩnh mạch (chủ đích truyền tế bào đến mọi nơi trong cơ thể - truyền tế bào hệ thống) có khả năng đi đến các vùng bị thương tổn, bị viêm, nhiễm trùng, hay các khối u hình thành trong cơ thể kể cả các vị trí trong não. Một số nghiên cứu cho thấy TBGTM sở hữu cơ chế vượt hàng rào máu não tương tự khả năng thâm nhập mạch của tế bào bạch cầu như khả năng di chuyển thành mạch (rolling), khả năng bám vào tế bào biểu mô thành mạch và khả năng xuyên màng sau bám. Trên bề mặt của TBGTM có biểu hiện các dấu ấn bề mặt như thụ thể hướng khu trú bạch cầu (leukocyte homing molecule, như CXCR4, CCR2)

hay các phân tử bám dính tế bào (cell adhesion molecule, như CD4, integrin, hay CD99). Việc biểu hiện các phân tử bề mặt phục vụ cho quá trình bám và xuyên màng giúp cho TBGTM có thể di chuyển qua hàng rào máu não để vào bên trong não bộ. Thêm vào đó, TBGTM thường hay bám vào các tế bào nội mô đã được kích hoạt bởi yếu tố miễn dịch TNF-alpha thông qua thụ thể bám dính tế bào VCAM-1 và cơ chế truyền tín hiệu thụ thể liên hợp protein G (G-protein coupled receptor signalling pathways) [45], [46], [47]. Ngoài ra, TBGTM còn làm giảm sự tăng sinh của các tế bào T CD3⁺ và các tế bào T gây độc, đồng thời điều phối hoạt động của các tế bào T giúp đỡ nhằm kiểm soát hoạt động miễn dịch tại vị trí viêm phổi và tiết ra HGF của TBGTM cũng tham gia vào quá trình giảm xơ ở phổi thông qua con đường tín hiệu PI3K/AKT/mTOR

1.4. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước

Tại Việt Nam, TBGTM từ dây rốn được thử nghiệm chữa trị thiếu máu cục bộ ở chân (2014) [48] và chấn thương cơ tim ở chuột (2015) [49]. Ở trên người, TBGTM từ dây rốn đã được báo cáo sử dụng để điều trị hai bệnh nhân phổi tắc nghẽn mạn tính (2016) [50]. TBGTM từ mô mỡ đã được nghiên cứu trên động vật để điều trị chấn thương sụn khớp (2013) [51] và chấn thương tủy sống (2016) [52]. Phân đoạn mô đệm mạch tách từ mô mỡ đã được ứng dụng trong các thử nghiệm lâm sàng để điều trị thoái hóa khớp gối (2014 và 2017) [53], [54]. TBGTM từ tủy xương đã được nghiên cứu điều trị tiểu đường tuýp 1 (2011) [55], xơ gan (2015) [56] và đánh giá hiệu quả điều trị cho các bệnh nhân suy tim sau nhồi máu cơ tim (2014) [57]...

Trên thế giới, các sản phẩm của TBGTM đã được phê duyệt để điều trị cho trẻ em mắc bệnh ghép chống chủ kháng trị ở Canada và New Zealand từ năm 2012, ở Nhật Bản từ năm 2015 và cho bệnh rò ruột - Crohn's ở Châu Âu từ năm 2018. Các nghiên cứu gần đây cho thấy được vai trò quan trọng của các thể tiết ngoại bào do TBGTM tiết ra là có tác dụng sinh học tương tự với các hiệu ứng sinh học của TBGTM và làm trung gian cho các tác động nội tiết của TBGTM [58]: giúp tái tạo và chống viêm trong các mô hình động vật bị đột quy

[59], xơ gan [60], nhồi máu cơ tim [61], bệnh suy giảm trí nhớ [62] và Huntington [63]. Thể tiết thu được từ TBGTM dây rốn ở người cho thấy hiệu quả trong việc cải thiện tình trạng viêm màng bồ đào tự miễn bằng cách ức chế sự di chuyển của tế bào viêm [64], mô hình bệnh suy giảm trí nhớ... đặc biệt, thể tiết từ TBGTM tuỷ xương bảo vệ sự phát triển não bộ của thai nhi bị thiếu oxy [65]. Thể tiết làm tăng sự hình thành mạch máu, giảm bớt tình trạng viêm và quá trình chết theo chu trình ở tuỷ sống bị chấn thương và do đó cải thiện chức năng tuỷ sống [66], ngăn cản sự chết của các tế bào thần kinh tuỷ sống và giảm phù nề ở tuỷ sống [67]. Th thể tiết được sử dụng cho bệnh như hội chứng suy hô hấp cấp, loạn sản phế quản, xơ phổi, tăng huyết áp động mạch phổi, hen suyễn và bệnh bụi phổi silic [68]. Ngoài ra, các exosomes tiết ra từ TBGTM có mang một enzyme hoạt động liên quan đến neprilysin và giảm mức độ β -amyloid trong các tế bào u nguyên bào thần kinh [69], khôi phục lại hợp nhất ký ức sợ hãi và giảm các hành vi lo lắng [70], bảo vệ chống lại sự mất synapse và song song với nó là cải thiện nhận thức [71].

Ứng dụng của tế bào gốc điều trị một số bệnh lý nhãn khoa như khô mắt, viêm loét giác mạc, teo thần kinh thị giác, thoái hoá điểm vàng, bệnh võng mạc sắc tố, ... đã được nhiều nghiên cứu công bố [72], [73], [74]. Tuy nhiên chưa thấy báo cáo của thể tiết TBGTM từ dây rốn với điều kiện oxy sinh lý trong điều trị bệnh mắt.

Từ các nội dung trên cho thấy tiềm năng lớn của tế bào gốc và thể tiết của TBGTM dây rốn ứng dụng trong y học đặc biệt là thể tiết TBGTM được nuôi cấy trong điều kiện oxy sinh lý. Để tiến tới các ứng dụng trên lâm sàng việc đánh giá tính an toàn của thể tiết TBGTM dây rốn là vấn đề quan trọng cần được nghiên cứu, vì vậy chúng tôi nghiên cứu đề tài này.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Thử tiết ngoại bào

- Sản phẩm thử tiết ngoại bào thu nhận của tế bào gốc trung mô dây rốn từ 5 thai phụ hiến tặng khỏe mạnh được nuôi cấy trong điều kiện oxy sinh lý 2% tại Bệnh viện đa khoa quốc tế Vinmec từ 01 đến 03 năm 2023 (đảm bảo tiêu chuẩn cơ sở theo phụ lục 2).

- Tiêu chuẩn lựa chọn:

+ Sản phụ là người trưởng thành trên 18 tuổi, có sức khỏe tốt.

+ Sản phụ đồng ý cho phép lưu trữ tế bào gốc sau khi đã được các bác sỹ giải thích về lợi ích, các nguy cơ, rủi ro có thể xảy ra và đồng ý sử dụng cho nghiên cứu.

- Tiêu chuẩn loại trừ:

+ Sản phụ có vấn đề nghiêm trọng về sức khỏe như nhiễm khuẩn huyết, bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn, nấm, virus

+ Sản phụ đã từng bị bệnh tật hoặc biến chứng liên quan đến thai nghén.

- Tiêu chuẩn xác định liều lượng: thử tiết TBGTM liều thấp 200 microgam/kg, liều trung bình 500 microgam/kg, liều cao 1000 microgam/kg.

2.1.2. Động vật nghiên cứu

Gồm 36 con chuột nhắt trắng chủng Swiss trọng lượng 20 - 25 g, 30 chuột cống trắng chủng Wistar trọng lượng từ 210 - 240 g và 36 thỏ trọng lượng 2,1 - 2,2 kg khỏe mạnh, không phân biệt đực, cái. Tiêu chuẩn động vật đáp ứng các yêu cầu nghiên cứu về động vật thực nghiệm của Học viện Quân y. Các thí nghiệm được tiến hành tại Labo nghiên cứu của Bộ môn Phẫu thuật thực hành, thực nghiệm và Bộ môn Sinh lý bệnh - Học viện Quân Y, trong thời gian từ 01/2023 - 08 /2023.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu thử nghiệm mô tả, cắt ngang tiến cứu, có thiết kế đối chứng

2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

Sử dụng công thức tính cỡ mẫu (ANOVA một chiều):

$$n = DF/k + 1$$

trong đó:

DF (Degree of Freedom): bậc tự do

k: số nhóm nghiên cứu

n: số mẫu mỗi nhóm

Từ đó dựa theo hệ thống tệp phân tán (DFs - Depth First Search) có số lượng động vật nghiên cứu là $10/k + 1 \leq n \leq 20/k + 1$, số động vật nghiên cứu mỗi nhóm chúng tôi lấy là 6 con.

2.2.3. Nội dung nghiên cứu và đánh giá

2.2.3.1. Đánh giá nội độc tố, vi sinh vật, nấm và gây tan máu trên invitro

- Đánh giá tính vô khuẩn, nấm:

+ Thiết bị sử dụng: Hệ thống máy BACTEC FX TOP; Máy Endosafe® nexgen-PTS™ instrument (Charles River, Mỹ) định lượng Endotoxin; Tủ cấy vô trùng Class II Type A2 (ESCO); Tủ âm CO2 (Memmerk)

+ Kỹ thuật cấy khuẩn: Tính vô trùng của sản phẩm chế tiết từ tế bào gốc được kiểm tra bằng phương pháp cấy khuẩn. Tiêu chuẩn chấp nhận là không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm

+ Các bước tiến hành cấy khuẩn trên hệ thống máy BACTEC:

10ml dịch nuôi cấy tế bào TBGTM bơm vào 02 chai cấy máu (1 chai ái khí và 1 chai kỵ khí) và nuôi cấy, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp trong bệnh phẩm máu bằng máy cấy máu tự động FX TOP - STACK.

Chai cấy máu được theo dõi hàng ngày nhờ hệ thống máy cấy máu tự động ủ và lắc liên tục. Máy cấy máu sử dụng đèn huỳnh quang trong máy quét 10 phút/lần vào lớp màng ở đáy chai để phát hiện nồng độ CO₂ hoặc sử dụng bộ phận cảm ứng đo màu và ánh sáng phản chiếu để phát hiện nồng độ CO₂ hòa tan

trong môi trường nuôi cấy. Khi vi sinh vật phát triển trong chai cấy máu, CO₂ sẽ được sản sinh. Bộ phận cảm nhận ở đáy chai cấy máu có khả năng hấp thụ khí CO₂, sẽ chuyển từ màu xanh sẫm sang màu vàng. Máy cấy máu sẽ cảm nhận được thay đổi của phản chiếu qua sự đổi màu từ sẫm sang nhạt. Máy cấy máu sẽ quét và ghi lại sự thay đổi này 10 phút/lần.

Chai cấy máu dương tính được cấy trên các môi trường thạch đĩa giàu chất dinh dưỡng để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn gây bệnh. Các vi khuẩn và vi nấm được định danh dựa trên hệ thống định danh bằng khối phổ Vitek MS.

+ Đánh giá tính vô khuẩn: Tính vô khuẩn của sản phẩm chế tiết từ tế bào gốc được kiểm tra bằng phương pháp cấy khuẩn trên hệ thống máy BACTEC. Các vi khuẩn và vi nấm được định danh dựa trên hệ thống định danh bằng khối phổ Vitek MS.

- Nội độc tố:

+ Quy trình xét nghiệm bằng phương pháp Kinetic LAL của Charles River Endosafe®. Việc phân tích được tiến hành bằng cách thiết lập phân tích sắc độ động học hoặc đo độ đục do việc hình thành gel (*Gel-clot*) khi ủ dịch ly giải từ các tế bào máu (*amoebocytes*) của loài cua móng ngựa (*horseshoe crab*) với mẫu có chứa nội độc tố và được kiểm soát thích hợp sử dụng đường chuẩn 2 log từ 0,05 đến 5 EU/mL và thử nghiệm độ pha loãng của mẫu đối chứng dương tính và mẫu không pha loãng của mẫu nung hoặc phơi.

+ Đánh giá nội độc tố: (+/-)

- Đánh giá tính gây tan máu trên invitro:

+ Trang bị sử dụng: Tủ ấm (Memmerk); PBS, NaCl 0,9%

+ Các bước tiến hành:

Máu được lấy từ người hiến khỏe mạnh, ly tâm ở 3000 rpm trong 10 phút, hồng cầu cần được rửa 3 lần với PBS 1X. Thể tích hồng cầu được xác định và trộn với PBS tạo thành dung dịch 2%.

Cho 2,5 mL dung dịch hồng cầu 2% vào các ống. Thêm 0,1 - 0,5 mL dung dịch tế bào gốc nồng độ $1,2 \times 10^5$ tế bào/mL hoặc sản phẩm tiết của tế bào gốc

vào mỗi ống trên. Sử dụng 2,5 mL NaCl 0,9% và nước cất không phân cực làm đối chứng âm và đối chứng dương. Trộn nhẹ nhàng sau đó ủ ấm ở tủ 37°C.

+ Đánh giá gây tan máu: Quan sát sự tan máu ở các thời điểm sau 15 phút, 30 phút, 45 phút, 1h, 2h và 3h.

2.2.3.2. Đánh giá độc tính cấp, quá mẫn hệ thống và kích ứng bề mặt nhũn cầu

- Đánh giá độc tính cấp trên chuột nhắt trắng:

+ Tiêm thể tiết TBGTM trên chuột nhắt trắng bằng đường tĩnh mạch đuôi theo phương pháp Litchfield - Wilcoxon dựa trên hướng dẫn của Quyết định 141/QĐ-K2ĐT của Cục khoa học công nghệ và Đào tạo - Bộ Y tế và hướng dẫn WHO. Chuột nhắt trắng chủng Swiss (trọng lượng 20 ± 2 g) được chia ngẫu nhiên thành 6 nhóm nghiên cứu (mỗi nhóm 6 con). Nhóm chứng được tiêm dung dịch đệm, các nhóm nghiên cứu được tiêm thể tiết TBG từ dây rốn với liều tăng dần. Chuột ở các nhóm được tiêm dung dịch đệm hoặc thể tiết tế bào gốc với các liều khác nhau tăng dần từ liều cao nhất không gây chết đến liều thấp nhất gây chết 100% chuột. Chuột được tiêm tĩnh mạch đuôi với lượng 0,1 mL/10 g. Thực tế sử dụng liều 50; 200; 500; 1000 microgam/kg.

+ Đánh giá số chuột chết trong 72 giờ, xác định LD50; Chuột được theo dõi hằng ngày trong 7 ngày nhằm xác định các dấu hiệu nhiễm độc gồm: Tình trạng vận động, lượng thức ăn tiêu thụ; Tiêu chảy; Co giật; Sự thay đổi cân nặng; Nôn.

Ở ngày thứ 7, giải phẫu đại thể được tiến hành phẫu thuật theo đường trắng giữa trên và dưới rốn bộc lộ toàn bộ vùng ngực, bụng. Quan sát đánh giá những bất thường tại phổi, gan, thận... sau đó phẫu tích lấy gan, thận quan sát giải phẫu bệnh. Bệnh phẩm nhận từ phòng mô thí nghiệm được xử lý và quan sát tại Khoa Giải phẫu bệnh, pháp y - Bệnh viện Quân y 103, các kết quả được xác định bởi bác sĩ giải phẫu bệnh đọc và phẫu thuật viên. Tại Khoa Giải phẫu bệnh, bệnh phẩm được quan sát, định hướng cắt mảnh mô thành những lát dọc song song, mỗi lát cắt có chiều dày 3 - 5 mm được để chung trong 1 khuôn đúc bệnh phẩm giải phẫu bệnh. Bệnh phẩm được pha thành các mảnh đánh số rồi cho vào

cassette và xử lý theo phương pháp thông thường bằng máy xử lý mô tự động Tissue - Tek VIP6AI của hãng Sakura, Nhật Bản. Các tiêu bản được đọc trên kính hiển vi quang học với độ phóng đại 40 - 400 lần. Đánh giá đặc điểm của gan, thận và hình ảnh tổn thương vi thể.

- Độc tính bán trường diễn:

+ Chuột cống trắng chủng Wistar (trọng lượng 200 - 300 g) được chia ngẫu nhiên thành 5 nhóm nghiên cứu (mỗi nhóm 6 con):

Nhóm NC1: Nhóm thể tiết TBGTM dây rốn liều thấp: chuột được tiêm dung dịch thể tiết TBGTM dây rốn (liều tương đương dự kiến sử dụng trên người) vào tĩnh mạch đuôi chuột

Nhóm NC2: tiêm với liều trung bình: liều gấp 2 lần liều thấp

Nhóm NC3: tiêm với liều cao: liều gấp 3 lần liều thấp

Nhóm NC4: Tiêm nước muối sinh lí cùng thể tích

Nhóm NC5: chứng khỏe mạnh không tiêm

+ Đánh giá kết quả:

• Dấu hiệu nhiễm độc của chuột được theo dõi hằng ngày gồm: Tình trạng vận động, lượng thức ăn tiêu thụ; Tiêu chảy; Co giật; Sự thay đổi cân nặng; Nôn; Số chuột chết.

Chuột được lấy máu ở các thời điểm trước tiêm và sau tiêm 10, 20 và 30 ngày để xác định: Các chỉ số huyết học: Số lượng hồng cầu, số lượng bạch cầu, số lượng tiểu cầu; Chỉ số sinh hóa: men gan (Hoạt độ AST, ALT huyết tương) và men thận (Hoạt độ Ure và Creatinin huyết tương). Máy xét nghiệm sinh hoá Evolution 3000 (Italia) sử dụng hóa chất của hãng; máy xét nghiệm huyết học Humacount 30TS (Đức) sử dụng kit xét nghiệm của hãng và phần mềm xét nghiệm cho chuột.

Ở ngày thứ 30, 4 chuột ở mỗi nhóm được tiến hành phẫu thuật để quan sát hình ảnh đại thể gan, thận và lách và làm mô học để đánh giá cấu trúc vi thể của gan, thận (qui trình tương tự như phần ở trên).



Hình 2.1: Tiêm EV tĩnh mạch đuôi chuột

- Đánh giá tính gây quá mẫn hệ thống trên thỏ:

+ Thỏ được chia thành 5 nhóm nghiên cứu mỗi nhóm 6 con:

Nhóm NC1: Tiêm tĩnh mạch đuôi thỏ liều thấp thể tích 200 microgam/kg.

Nhóm NC2: Tiêm tĩnh mạch đuôi thỏ liều trung bình thể tích 500 microgam/kg.

Nhóm NC3: Tiêm tĩnh mạch đuôi thỏ liều cao thể tích 1000 microgam/kg.

Nhóm NC4: Tiêm NaCl 0,9% với cùng thể tích vào tĩnh mạch đuôi thỏ.

Nhóm chứng: Động vật khỏe mạnh không tiêm gì.

+ Thỏ được tiêm tĩnh mạch đuôi sản phẩm tiết của TBGTM với tuần tự 3 lần tiêm, cách nhau 2 ngày. Đến ngày thứ 14, tiến hành tiêm thể tiết với liều gấp đôi một liều duy nhất.

+ Đánh giá kết quả về gây quá mẫn thỏ được đánh giá bằng các chỉ số:

Hành vi của thỏ: co giật, nôn.... được theo dõi liên tục trước và sau tiêm

Lấy 2 ml máu mỗi lần ở các thời điểm trước tiêm, trước khi tiêm liều gấp đôi và sau tiêm liều gấp đôi.

Làm công thức máu đánh giá sự thay đổi của các tế bào máu Kít định lượng các enzym và chất chuyển hóa trong máu: Urea/bun-color, Creatinine, Aspartate aminotransferase (AST/GOT), Alanine

Aminotransferase (ALT/GPT), của Hãng Biosystems/ Tây Ban Nha.

Máu được ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút trong 10 phút. Tách lấy phần huyết tương ở trên và tiến hành định lượng nồng độ histamin bằng kit ELISA định lượng histamin, IgE, cytokine viêm (IL-1, IL-6, TNF-alpha) cung cấp bởi Thermo Fisher Scientific

- Đánh giá tính kích ứng bề mặt nhãn cầu của thỏ:

- Sử dụng 06 thỏ khỏe mạnh, trọng lượng 1,8 - 2,0 kg
- + Mắt phải: được nhỏ dung dịch chứa sản phẩm thể tiết của TBGTM từ đây rôn với liều cao ngày 1, 2, 3, 7.
- + Mắt trái: được nhỏ nước muối sinh lý NaCl 0,9% với cùng liều lượng
- Đánh giá bề mặt nhãn cầu ở ngày thứ nhất, ngày thứ 3 và ngày thứ 6 với các biểu hiện ở mi mắt, kết mạc, giác mạc, tình trạng chảy nước mắt, nhuộm Fluorescein đánh giá giác mạc, thời gian vỡ phim nước mắt. Test TBUT: Nhỏ fluorescein vào mắt người bệnh, thực hiện nháy mắt nhiều lần để dàn đều lớp phim nước mắt. Người bệnh nhìn thẳng, canh thời gian cho đến khi TBUT được xác định. Màng nước mắt được quan sát dưới ánh sáng màu xanh cobalt ở đèn khe. Nếu thời gian vỡ ngắn (< 10 giây) nghĩa là mắt bị khô.

Tình trạng toàn thân cân nặng, nhiệt độ

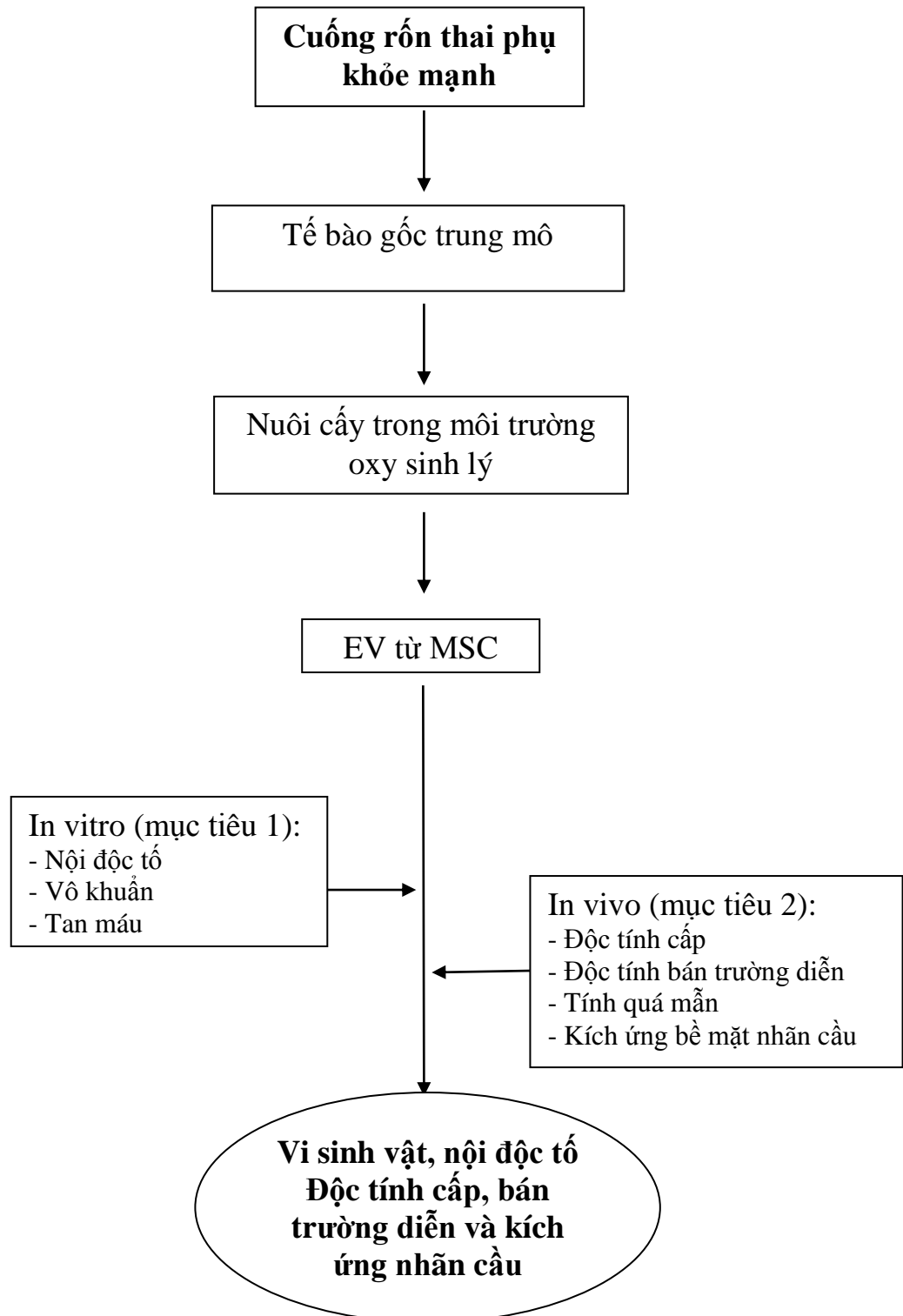
2.2.4. Xử lý số liệu

Các số liệu được thu thập và nhập theo mẫu biểu thống nhất, xử lý bằng phần mềm SPSS 22.0, so sánh có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$

2.2.5. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu này đã được thông qua Hội đồng đạo đức của Bệnh viện ĐKQT Vinmec và Viện nghiên cứu y học Đỉnh Tiên Hoàng.

Kết quả nghiên cứu chỉ nhằm phục vụ mục đích khoa học không nhằm mục đích thương mại khác.

SƠ ĐỒ CÁC BƯỚC NGHIÊN CỨU

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sản phẩm thể tiết của tế bào gốc trung mô dây rốn về tính an toàn đã đáp ứng được các tiêu chuẩn cơ sở như protein tổng số, số lượng thể tiết thu được, kích thước trung bình thể tiết, dấu ấn thể tiết, tồn dư dung dịch nuôi cấy (-) với qui trình đảm bảo vô trùng tuyệt đối. Các mẫu EV trước khi tiến hành thử nghiệm trên in vivo, chúng tôi tiến hành đánh giá một số kết quả như nội độc tố, vi sinh vật, gây tan máu

3.1. Kết quả nội độc tố, vi sinh vật, nấm và gây tan máu trên in vitro

- Trong nghiên cứu này EV được thu nhận theo một qui trình thống nhất từ chuẩn bị mẫu, ly tâm, thu EV, đóng gói và bảo quản. Môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô dây rốn được thu thập và bảo quản trong chai sạch, đóng kín và chuyển sang ly tâm. Khử trùng các ống ly tâm bằng ethanol 70%, rửa lại với PBS 1X và để khô trong tủ an toàn sinh học. Sau khi hoàn thành quá trình ly tâm, thu dịch nổi chuyển sang một chai sạch và bảo quản trong tủ lạnh để chuyển sang bước thu exosomes và bảo quản ở -80°C . Dịch nổi sau ly tâm được giữ lại và lấy mẫu xét nghiệm vi khuẩn, vi nấm, endotoxin. 8 mẫu của 4 nhóm nghiên cứu được xét nghiệm ngẫu nhiên

Bảng 3.1. Kết quả xét nghiệm vi sinh vật, nội độc tố và tồn dư dung môi (n = 8)

Chỉ số	Tồn dư dung môi (không phát hiện)	Vi sinh vật, nấm ($< 500 \text{ CFU/g}$)	Nội độc tố ($< 0,5 \text{ EU/ml}$)
EV	-	-	-

Sản phẩm thể tiết ngoại bào từ TBGTM đảm bảo an toàn về nội độc tố, kết hợp với vô khuẩn và nấm.

+ Vi khuẩn, nấm: Kết quả xét nghiệm về vi khuẩn, nấm trong các mẫu thể tiết được định danh dựa trên hệ thống định danh bằng khối phổ Vitek MS thu nhận sau nuôi cấy tế bào gốc trung mô dây rốn được xét nghiệm đạt độ tinh khiết và vô khuẩn cao, ở các mẫu nuôi cấy không phát hiện vi khuẩn và nấm. Theo dược điển Việt Nam, chất lượng sản phẩm sử dụng cần vô khuẩn, đạt độ

trong, pH... ngoài ra với các yêu cầu nhỏ mắt dung dịch này cần đạt độ tinh khiết, đẳng trương, không được thêm chất màu và kích thước tiểu phân đáp ứng được với yêu cầu theo phụ lục 11.8, phần A của dược điển Việt Nam.

+ Nội độc tố: Kết quả xét nghiệm nội độc tố trong các mẫu EV được thu nhận trong quá trình nuôi cấy tế bào gốc trung mô không phát hiện nội độc tố. Quy trình xét nghiệm bằng phương pháp Kinetic LAL. Một phương pháp thuận tiện để phân tích các chỉ số nội độc tố là sử dụng phương pháp LAL động học của Charles River Endosafe®. Việc phân tích được tiến hành bằng cách thiết lập phân tích sắc độ động học hoặc đo độ đục do việc hình thành gel (Gel-clot) khi ủ dịch ly giải từ các tế bào máu (*amoebocytes*) của loài cua móng ngựa (horseshoe crab) với mẫu có chứa nội độc tố và được kiểm soát thích hợp sử dụng đường chuẩn 2 log từ 0,05 đến 5 EU/mL, và thử nghiệm độ pha loãng của mẫu đối chứng dương tính và mẫu không pha loãng của mẫu nung hoặc phơi Theo dược điển Việt Nam mẫu sản phẩm này nội độc tố < 0,5 EU/ml.

Nội độc tố liên quan đến sự nhiễm khuẩn của thể tiết ngoại bào, là một dạng của chất gây sốt (pyrogen), bản chất là các lipopolysaccharides (LPS) có nguồn gốc từ thành ngoài vi khuẩn gram âm. LPS cấu tạo từ 3 phần: kháng nguyên O (antigen) phía ngoài cùng, lõi trong polysaccharides và phần Lipid A chứa các axit béo, đây là phần chính quyết định độc lực của nội độc tố. Các vi khuẩn này giải phóng ra môi trường một lượng nhỏ nội độc tố như là sản phẩm của quá trình trao đổi chất của chúng và lượng lớn nội độc tố được giải phóng khi thành tế bào bị hư hại hay khi vi khuẩn gram âm bị chết hoặc bị ly giải. Do đó vi khuẩn gram âm đang sống không thể giải phóng nội độc tố. Nội độc tố là một chất kích thích mạnh đối với hệ miễn dịch biểu hiện lâm sàng là viêm, sản sinh ra các cytokine như interleukin 1 và yếu tố hoại tử khối u, sau đó thu hút bạch cầu đa nhân trung tính, kích hoạt cơ chế thực bào. Khi bệnh nhân có hệ thống miễn dịch kém, đã có bệnh nền hoặc bị nhiễm lượng lớn nội độc tố thì sẽ biểu hiện triệu chứng trên lâm sàng của shock nhiễm khuẩn gồm sốt, giảm huyết áp, giảm tuần hoàn ở các tổ chức, gây tổn thương các tổ chức mô cơ quan của cơ

thể như tim, phổi, gan, thận... hệ thống miễn dịch tiết ra enzyme tiêu diệt tế bào, rối loạn chuyển hoá do thiếu oxy tế bào, tổn thương tế bào nội mạc, tăng tính thấm thành mạch và có thể dẫn tới tử vong. Giới hạn nội độc tố được tính trên cơ sở liều dùng cho người theo công thức: $EL = K/M$. trong đó K là ngưỡng nội độc tố tính cho 1 kg cân nặng cơ thể người trong 1 giờ có thể chịu đựng được mà không xảy ra phản ứng độc hại.

Việc xử lý và nuôi cấy tế bào gốc, tế bào miễn dịch cũng như sản xuất các sản phẩm từ tế bào phục vụ cho trị liệu lâm sàng là một quá trình kéo dài trong đó những sản phẩm này đã tiếp xúc với rất nhiều loại vật tư tiêu hao như chai, đĩa nuôi cấy, pipet, màng lọc và hóa chất như môi trường nuôi cấy, đệm... Đây có thể là nguyên nhân làm tăng nồng độ nội độc tố vi khuẩn trong sản phẩm cuối cùng trước khi sử dụng cho bệnh nhân. Nếu không có biện pháp kiểm soát vấn đề này, sản phẩm tế bào được sử dụng không chỉ không có hiệu quả điều trị mà còn gây nguy hiểm cho người bệnh bởi lượng nội độc tố có trong đó. Đây là lý do mà những tiêu chuẩn quốc tế về liệu pháp tế bào như ISCT, FACT, AABB xếp xét nghiệm xác định nội độc tố vào danh mục bắt buộc cần kiểm tra cho các sản phẩm tế bào trước khi sử dụng cho điều trị. Dựa trên quy định của FDA về giới hạn nội độc tố vi khuẩn cho từng đường truyền và kết quả xét nghiệm xác định nồng độ nội độc tố, các bác sỹ sẽ có đủ cơ sở để tính toán được thời gian truyền thích hợp để đảm bảo sự an toàn cho bệnh nhân.

Theo quy định của các tiêu chuẩn quốc tế về trị liệu tế bào như ISCT, FACT, AABB, xét nghiệm xác định nội độc tố được xếp vào danh mục bắt buộc cần kiểm tra cho các sản phẩm tế bào trước khi sử dụng cho bệnh nhân.

Như vậy có thể thấy sản phẩm thể tiết ngoại bào từ TBGTM đảm bảo an toàn về nội độc tố, kết hợp với vô khuẩn và nấm đã chứng minh qui trình vô khuẩn về thu hoạch EV tại Vinmec rất hiệu quả.

- Gây tan máu: Đánh giá tính gây tan máu trên invitro thông qua quan sát sự tan máu ở các thời điểm sau 15 phút, 30 phút, 45 phút, 1h, 2h và 3h. Ở các ống nghiệm quan sát thấy một dung dịch màu hồng đồng nhất, trong suốt mà không

còn cặn lắng hồng cầu ở đáy ống. Điều này cho thấy EV từ TBGTM không gây tan máu.

3.2. Kết quả độc tính cấp, bán trường diễn, quá mẫn hệ thống và kích ứng bề mặt nhãn cầu

3.2.1. Đánh giá độc tính cấp trên chuột nhắt trắng

Bảng 3.2: Toàn trạng và số chuột chết trong 72 giờ

Nhóm NC	Liều sử dụng (mL/microgam/kg)	Tình trạng chuột sau tiêm	Số chuột chết
Nhóm 5 (n = 6)	0,1	Bình thường	0
Nhóm 4 (n = 6)	0,1/1000	Bình thường	0
Nhóm 3 (n = 6)	0,1/500	Bình thường	0
Nhóm 2 (n = 6)	0,1/200	Bình thường	0
Nhóm 1 (n = 6)	0,1/50	Bình thường	0

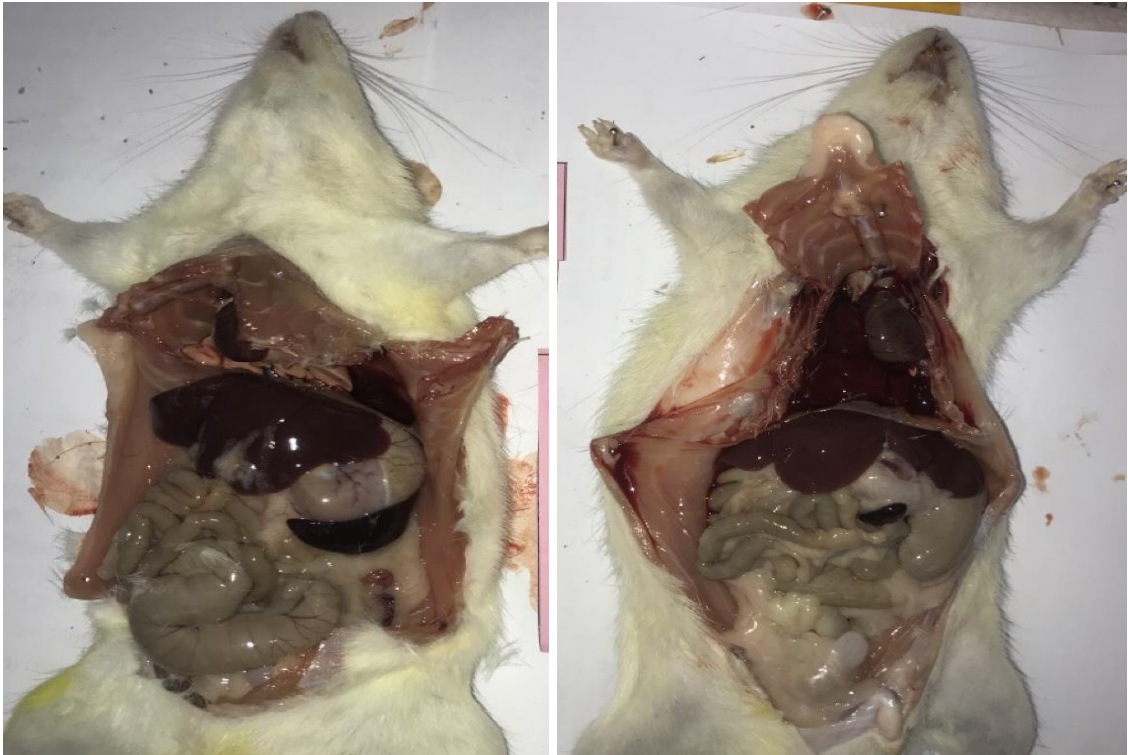
Độc tính cấp của thể tiết ngoại bào từ TBGTM được xác định theo phương pháp Litchfield - Wilcoxon và của WHO. Tính LD50 của thể tiết trong nghiên cứu này theo phương pháp Behrens - Karber, kết quả nghiên cứu này không xác định được liều chết 100% ở chuột thí nghiệm nên không xác định được LD50. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu khác đã công bố về tính an toàn của EV từ các nguồn gốc khác nhau [10], [12], [14].

3.2.2. Độc tính bán trường diễn

Kết quả quan sát hàng ngày tình trạng vận động, lượng thức ăn tiêu thụ, tiêu chảy, co giật... nhận thấy chuột khỏe mạnh phát triển bình thường.

Các kết quả huyết học và sinh hóa máu gan, thận trong giới hạn bình thường. Vì vậy có thể thấy EV không ảnh hưởng đến toàn trạng ở các liều tiêm nhẹ, trung bình và cao. Kết quả tương tự ở nhóm chứng tiêm nước muối sinh lí và nhóm chứng khỏe mạnh.

Kết quả giải phẫu đại thể 4 chuột ở mỗi nhóm đánh giá tại ngày thứ 30 nhận thấy gan, thận, lách không có biểu hiện bất thường.



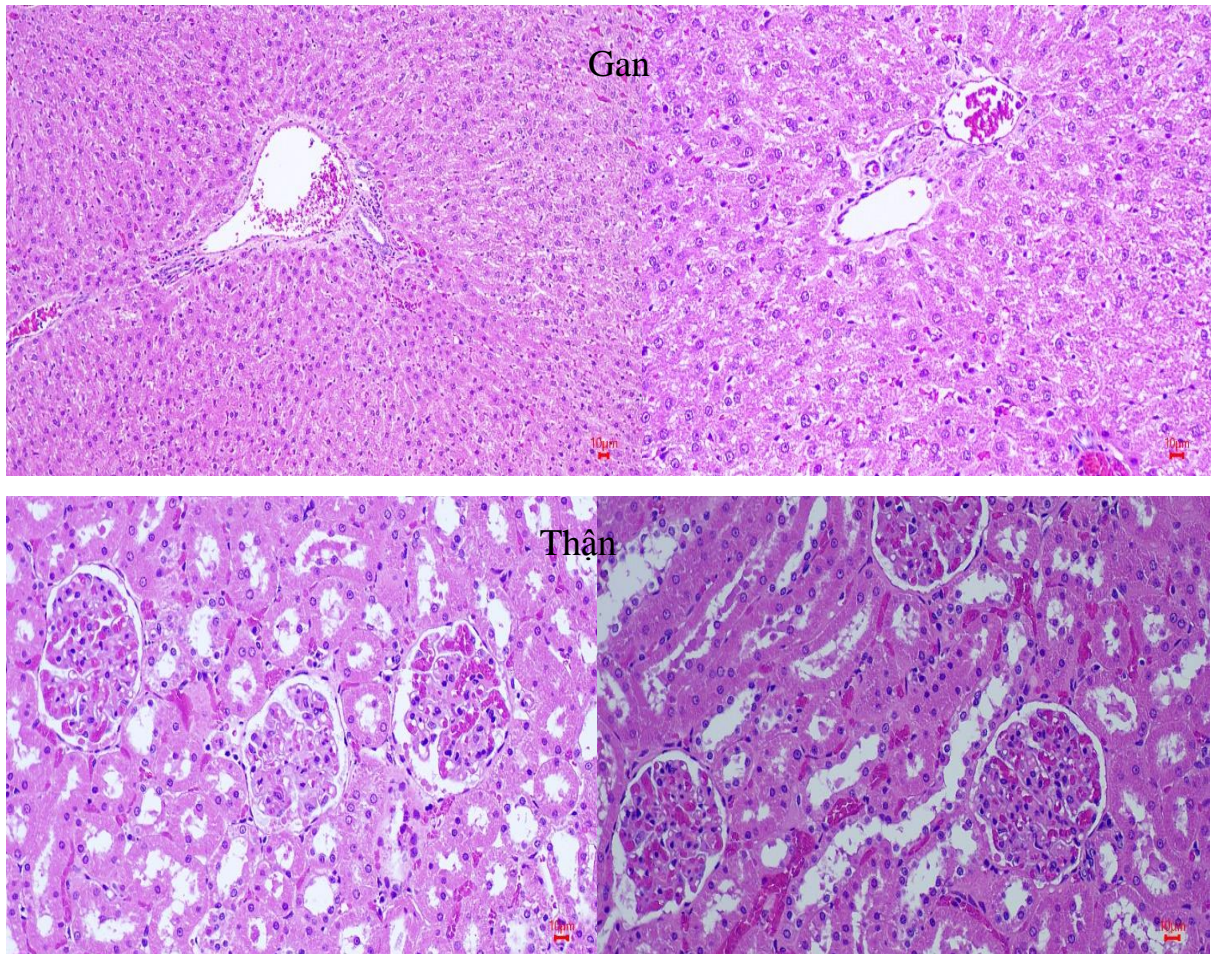
Hình 3.1: Giải phẫu đại thể chuột thí nghiệm

Chúng tôi tiến hành gây mê chuột với ketamin với liều 1mg/kg cân nặng qua đường tiêm màng bụng. Khi chuột mê, được cố định trên bàn mổ thí nghiệm, phẫu thuật rạch da và tổ chức dưới da theo đường trắng giữa trên và dưới rốn, bộc lộ gan, thận, lách, ruột, tim, phổi... quan sát và đánh giá đại thể ổ bụng, lồng ngực và các tạng. Lấy máu, phẫu tích lấy gan, thận... làm giải phẫu bệnh lý.

Kết quả giải phẫu bệnh gan, thận:

Các tế bào gan xếp thành dải, thành bè, giữa chúng có xoang mạch. Các tế bào gan không bị thoái hóa hay viêm, cấu trúc vi thể của gan không khác biệt so với nhóm chứng.

Vỏ thận có các cầu thận, các ống thận và các mạch máu giữa các ống thận. Các tế bào biểu mô ống thận không bị thoái hóa hay viêm, cấu trúc thận khôkhoothay đổi khi so sánh với nhóm chứng.



Hình 3.2: Giải phẫu bệnh gan, thận chuột thí nghiệm

3.2.3. Đánh giá tính gây quá mẫn hệ thống trên thỏ

- Tỷ lệ tử vong:

Sau tiêm thể tiết (EV) với các liều: thấp (nhóm 1), trung bình (nhóm 2), cao (nhóm 3), dung dịch đệm (nhóm 4) và nhóm chứng khỏe mạnh (nhóm 5) vào các thời điểm ngày đầu tiên (N0), ngày 1 (N1), ngày 3 (N3) và ngày 7 (N7). Sau đó theo dõi tình trạng thỏ trong thời gian 15 ngày tính từ mũi tiêm cuối cùng. Kết quả cho thấy 100% thỏ khỏe mạnh bình thường không phát hiện các bất thường về sức khỏe. Sản phẩm thể tiết sau khi được phân lập được đánh giá chất lượng bằng nhiều phương pháp khác nhau như xác định danh tính, độ tinh khiết, tạp chất, hiệu lực, độ an toàn và độ ổn định, đặc biệt trong nghiên cứu này chúng tôi nuôi cấy trong môi trường oxy sinh lý, theo Biester và cộng sự đã tổng hợp các nghiên cứu về thể tiết trong môi trường oxy thấp trong một bài review xuất bản vào năm 2020 chỉ ra rằng thể tiết thu được sau khi kích ứng TBGTM

bằng nồng độ oxy thấp hơn điều kiện oxy môi trường có thể giúp tăng cường khả năng di cư và tăng trưởng của tế bào đích, tái tạo mạch, đồng thời giảm chết tế bào và kích ứng miễn dịch. Một cơ chế quan trọng của quá trình này là do nồng độ oxy thấp ngăn quá trình phân huỷ của HIF1-alpha, giúp cho yếu tố phiên mã này có thể tổng hợp biểu hiện của hơn 100 gene đích, trong đó có VEGF-A, PDGF-B. Môi trường oxy thấp làm tăng quá trình sản xuất các miRNA đóng vai trò quan trọng trong điều khiển quá trình biểu hiện gen như miRNA-210, miRNA-21, miRNA146a, miRNA17, miRNA-22 và miRNA-23a [24]. Ngoài ra, các con đường truyền tín hiệu khác cũng được kích thích như NFkB, mTOR và STAT3 để tăng sức sống của tế bào. Bên cạnh sự an toàn sản phẩm thể tiết còn giúp tăng khả năng sống sót của tế bào cơ tim trên mô hình chuột gây nhồi máu cơ tim. Trong đó, miR-210 có trong thể tiết đóng một vai trò quan trọng. Ngoài ra, miR-125b có trong thể tiết của TBGTM từ tuỷ xương và dây rốn ở điều kiện oxy thấp ức chế phân tử p53 và BAK1, ngăn quá trình chết ở các tế bào cơ tim [39]. Vì vậy, kết quả thí nghiệm này với sự sống 100% của 30 thử nghiệm với EV từ TBGTM dây rốn một lần nữa khẳng định EV là an toàn và ứng dụng EV trong điều trị là có cơ sở khoa học.

- Tình trạng toàn thân

+ Vận động, ăn uống:

Bảng 3.3: Kết quả theo dõi sức khỏe toàn thân thử (n = 30)

Chỉ số	Thời gian tiêm EV				Tổng
	N0 (n/%)	N1 (n/%)	N3 (n/%)	N7 (n/%)	
Vận động	-	-	-	-	-
Kích thích	-	-	-	-	-
Lông	-	-	-	-	-
Ăn uống kém	1/2,8 NC5	1 (2,8) NC5	1 (2,8) NC5	-	1 (2,8) NC5
Đi lỏng	1 (2,8) NC5	1 (2,8) NC5	1 (2,8) NC5	-	1 (2,8) NC5

Thỏ ở các nhóm ăn uống, vận động bình thường, nhanh nhẹn, đáp ứng với kích thích bình thường. Có 1 thỏ nhóm 5 (tiêm EV từ AD liều trung bình tiêu chảy kéo dài). Theo dõi sau 15 ngày tiêm thể tiết ngoại bào thấy thỏ vận động, đáp ứng kích thích, tình trạng lông, ăn uống, đi lỏng... nhận thấy thỏ bình thường, riêng thỏ chứng khỏe mạnh không tiêm có 1 thỏ ăn uống kém (2,8%), đi lỏng (2,8%). Điều này có thể EV kích thích các yếu tố có lợi ở thỏ thí nghiệm làm giảm khả năng mắc các bệnh mà thỏ chứng hay gặp viêm kết mạc, nhiễm khuẩn, đường ruột... Ở nghiên cứu này cho thấy bên cạnh tính an toàn là không ảnh hưởng đến toàn trạng động vật mà còn có nhiều tác dụng sinh học khác tương tự với các hiệu ứng sinh học của TBGTM và làm trung gian cho các tác động nội tiết của TBGTM. Thể tiết từ TBGTM được chứng minh là có đặc tính tái tạo và chống viêm trong các mô hình động vật bị đột quy, chấn thương sọ não, chữa lành vết thương, xơ gan, nhồi máu cơ tim, bệnh suy giảm trí nhớ, Huntington, bảo vệ mô tim khỏi tổn thương do thiếu máu cục bộ bằng việc thúc đẩy quá trình hình thành mạch và bảo vệ thần kinh trong mô hình chuột mang bệnh Huntinton [44], [45], [46], [47], [48].

+ Trọng lượng thỏ:

Bảng 3.4: Kết quả theo dõi trọng lượng thỏ trong thí nghiệm

Nhóm	Trọng lượng trung bình TB \pm SD (g)			
	N0	N1	N3	N7
Nhóm NC1 (n = 6)	2450 \pm 8,5	2507 \pm 8,0	2510 \pm 5,0	2530 \pm 8,0
Nhóm NC2 (n = 6)	2580 \pm 6,0	2648 \pm 10,5	2630 \pm 7,0	2667 \pm 6,5
Nhóm NC3 (n = 6)	2508 \pm 5,5	2527 \pm 9,0	2583 \pm 6,5	2657 \pm 8,0
Nhóm NC4 (n = 6)	2692 \pm 5,0	2708 \pm 8,5	2667 \pm 5,0	2640 \pm 8,5
Nhóm chứng (n = 6)	2345 \pm 7,5	2425 \pm 7,5	2330 \pm 6,5	2303 \pm 5,5

- Sau tiêm EV từ TBGTM và dung dịch đệm (nhóm chứng), theo dõi thỏ ở 5 nhóm thỏ trong thời gian 15 ngày thấy trọng lượng của các nhóm thỏ có xu hướng tăng dần, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa trọng lượng của các nhóm thử nghiệm với nhau, giữa nhóm thử nghiệm và nhóm chứng Ringer

lactate ($p > 0,05$). Kết quả này cho thấy thỏ được tiêm EV từ TBGTM cơ bản không ảnh hưởng tới quá trình ăn uống và phát triển cơ thể.

+ Nhiệt độ thỏ thí nghiệm:

Bảng 3.5: Nhiệt độ thỏ trong thí nghiệm

Nhóm	Nhiệt độ trung bình tai thỏ (°C)				p
	N0	N1	N3	N7	
Nhóm NC1 (n = 6)	37,0 ± 0,2	37,1 ± 0,1	36,9 ± 0,2	36,9 ± 0,2	>0,05
Nhóm NC2 (n = 6)	36,8 ± 0,1	37,0 ± 0,1	36,5 ± 0,2	36,9 ± 0,1	>0,05
Nhóm NC3 (n = 6)	37,1 ± 0,2	37,0 ± 0,2	36,8 ± 0,3	37,2 ± 0,1	>0,05
Nhóm NC4 (n = 6)	36,9 ± 0,1	37,1 ± 0,1	37,0 ± 0,1	37,0 ± 0,1	>0,05
Nhóm chứng (n = 6)	36,6 ± 0,3	36,8 ± 0,3	37,0 ± 0,1	36,9 ± 0,2	>0,05

Nhiệt độ cơ thể được xác định bằng sự cân bằng giữa sản xuất nhiệt bởi các mô, đặc biệt là gan và cơ và mất nhiệt ra môi trường. Thông thường, trung tâm điều nhiệt vùng dưới đồi duy trì nhiệt độ bên trong từ 36,6°C - 37,2°C. Chất gây sốt ngoại sinh thường là vi sinh vật, các thể ngoại lai (các sản phẩm sinh học truyền vào cơ thể)... Đây là phản ứng có lợi của cơ thể khi có yếu tố lạ xâm nhập. Kết quả nghiên cứu sau tiêm EV từ TBGTM và dung dịch đệm thấy nhiệt độ giữa các nhóm thỏ không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa trọng lượng của các nhóm thử nghiệm với nhau và với các nhóm chứng ($p > 0,05$), điều này chứng tỏ EV từ TBGTM không gây kích ứng với các liều khác nhau ở thỏ thí nghiệm. Theo y văn, Sốt xuất hiện khi có hiện tượng tăng điểm đặt nhiệt, gây ra sự co thắt mạch máu và giảm máu ra ngoại vi để giảm sự mất nhiệt; đôi khi xuất hiện run rẩy để làm tăng sản xuất nhiệt. Các quá trình này tiếp tục cho đến khi nhiệt độ máu đạt tới điểm đặt nhiệt của vùng dưới đồi. Đặt lại điểm đặt nhiệt xuống thấp hơn (ví dụ với thuốc hạ sốt) bắt đầu làm mất nhiệt qua mồ hôi và giãn mạch. Sốt do chất gây sốt ngoại sinh gây ra sự giải phóng các chất gây sốt nội sinh, như interleukin-1 (IL-1), yếu tố hoại tử khối u-alpha (TNF-alpha) và IL-6 và các cytokine khác, sau đó kích hoạt thụ thể cytokine,

hoặc các chất gây sốt ngoại sinh trực tiếp kích hoạt các thụ thể giống Toll. EV từ TBGTM có thể coi là yếu tố ngoại sinh, tuy nhiên không gây phản ứng sốt ở thử nghiệm có thể thấy EV không kích thích giải phóng các chất gây sốt nội sinh.

- *Xét nghiệm công thức máu:*

+ Số lượng hồng cầu (RBC)

Bảng 3.6: Số lượng hồng cầu thô trong thí nghiệm

Nhóm	Số lượng trung bình hồng cầu (G/L)				p
	N0	N1	N3	N7	
Nhóm NC1 (n = 6)	8,66 ± 0,02	8,54 ± 0,25	8,66 ± 0,08	8,54 ± 0,01	> 0,05
Nhóm NC2 (n = 6)	8,68 ± 0,05	8,31 ± 0,15	8,45 ± 0,05	8,46 ± 0,10	> 0,05
Nhóm NC3 (n = 6)	8,49 ± 0,02	8,56 ± 0,05	8,66 ± 0,05	8,80 ± 0,02	> 0,05
Nhóm NC4 (n = 6)	8,59 ± 0,25	8,71 ± 0,02	8,47 ± 0,20	8,36 ± 0,25	> 0,05
Nhóm chứng (n = 6)	8,02 ± 0,30	8,31 ± 0,12	8,19 ± 0,25	8,22 ± 0,30	> 0,05

Số lượng hồng cầu trung bình không có sự thay đổi trong mỗi nhóm và giữa các nhóm với nhau với $p > 0,05$.

+ Số lượng HGB trung bình (g/L)

Bảng 3.7: Lượng huyết sắc tố thô trong thí nghiệm

Nhóm	Số lượng HGB trung bình (g/L)				p
	N0	N1	N3	N7	
Nhóm NC1 (n = 6)	153,3 ± 0,2	141,3 ± 10,0	153,2 ± 0,5	148,3 ± 5,0	> 0,05
Nhóm NC2 (n = 6)	154,7 ± 0,5	148,0 ± 5,5	149,0 ± 2,5	148,0 ± 6,5	> 0,05
Nhóm NC3 (n = 6)	153,0 ± 0,3	151,8 ± 3,5	153,6 ± 1,2	155,7 ± 2,1	> 0,05
Nhóm NC4 (n = 6)	154,3 ± 0,8	154,7 ± 1,0	147,8 ± 5,0	147,7 ± 5,5	> 0,05
Nhóm chứng (n = 6)	141,2 ± 0,2	144,0 ± 0,25	160,2 ± 1,0	141,2 ± 8,0	> 0,05
p	p1-2 > 0,05; p1-3 < 0,05; p1-4 < 0,05				

Số lượng HGB trung bình sau tiêm thể tiết lần 3 không có sự khác biệt trong nhóm với $p > 0,05$. Khi so sánh nhóm tiêm liều thấp với liều cao và nhóm tiêm Ringer lactate sự khác biệt có ý nghĩa $p < 0,05$.

Hồng cầu và HGB là 2 chỉ số huyết học quan trọng đánh giá thiếu máu, các kết quả cho thấy kết quả trong giới hạn bình thường, điều này có thể EV không ảnh hưởng quá trình tạo máu.

+ Số lượng bạch cầu (G/L)

Bảng 3.8: Số lượng bạch cầu thô trong thí nghiệm

Nhóm	Số lượng trung bình bạch cầu (G/L)				p
	N0	N1	N3	N7	
Nhóm NC1 (n = 6)	14,5 ± 1,2	18,7 ± 0,3	16,4 ± 0,5	13,5 ± 3,5	>0,05
Nhóm NC2 (n = 6)	17,9 ± 0,2	13,5 ± 4,2	16,3 ± 0,6	14,4 ± 1,8	>0,05
Nhóm NC3 (n = 6)	14,7 ± 2,2	12,0 ± 3,0	16,8 ± 0,6	12,7 ± 4,5	>0,05
Nhóm NC4 (n = 6)	18,2 ± 0,1	13,5 ± 1,6	15,7 ± 1,0	14,9 ± 3,0	>0,05
Nhóm chứng (n = 6)	15,4 ± 1,5	15,1 ± 1,8	11,5 ± 1,2	13,8 ± 3,2	>0,05
p	p1-3 < 0,05				

+ Số lượng tiểu cầu (G/L)

Bảng 3.9: Số lượng tiểu cầu thô trong thí nghiệm

Nhóm	Số lượng trung bình tiểu cầu (G/L)				p
	N0	N1	N3	N7	
Nhóm NC1 (n = 6)	674,0 ± 60	816,0 ± 20	706,5 ± 50	799,7 ± 30	>0,05
Nhóm NC2 (n = 6)	756,5 ± 20	744,0 ± 30	862,2 ± 20	898,3 ± 32	>0,05
Nhóm NC3 (n = 6)	827,3 ± 40	928,7 ± 10	865,6 ± 10	851,3 ± 12	>0,05
Nhóm NC4 (n = 6)	666,8 ± 50	804,8 ± 15	719,6 ± 60	772,2 ± 54	>0,05
Nhóm chứng (n = 6)	675,2 ± 40	779,0 ± 25	889,0 ± 24	984,5 ± 21	>0,05
p	p2-3 < 0,05				

Nhằm đánh giá ảnh hưởng EV với công thức máu, chúng tôi tiến hành xét nghiệm đánh giá số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, huyết sắc tố... theo y văn bạch cầu bảo vệ cơ thể chống lại nhiễm vi sinh vật hoặc yếu tố ngoại lai... chúng sẽ tấn công và tiêu diệt, hồng cầu mang oxy từ phổi đến mô, cơ quan và mang carbon dioxide về phổi, huyết sắc tố nhằm đánh giá tình trạng thiếu máu và tiểu cầu tham gia vào quá trình đông máu. Sau tiêm EV từ TBGTM và dung dịch đệm, theo dõi thỏ ở các nhóm thỏ trong thời gian 15 ngày thấy số lượng hồng cầu, huyết sắc tố, số lượng bạch cầu, tiểu cầu giữa các nhóm thỏ không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tuy nhiên sự khác biệt có ý nghĩa giữa các liều EV sử dụng. Kết quả này chỉ ra rằng tế bào gốc không ảnh hưởng tới chức năng tạo máu của thỏ. Tiểu cầu đóng vai trò quan trọng trong nhiều quá trình bao gồm đông cầm máu, tạo cục máu đông, co cục máu đông, co mạch và sửa chữa, miễn dịch, viêm, xơ vữa động mạch. Chức năng chính của tiểu cầu là cầm máu, tức là quá trình dừng chảy máu tại nơi nội mạc mạch máu. Số lượng tiểu cầu khôn thay đổi khi xét nghiệm và giữa các liều sử dụng EV, điều này cho thấy EV không ảnh hưởng đến quá trình đông máu của cơ thể.

- Xét nghiệm sinh hóa máu:

+ Chức năng thận ure và creatinin

Bảng 3.10: Nồng độ ure thỏ trong thí nghiệm

Nhóm	Urê máu trung bình (mmol/L)				p
	N0	N1	N3	N7	
Nhóm NC1 (n = 6)	5,8 ± 0,7	5,5 ± 0,5	7,6 ± 0,2	6,5 ± 0,3	> 0,05
Nhóm NC2 (n = 6)	5,7 ± 0,4	5,4 ± 0,2	7,6 ± 0,3	6,2 ± 0,6	> 0,05
Nhóm NC3 (n = 6)	5,6 ± 0,3	5,8 ± 0,4	7,7 ± 0,3	6,4 ± 0,5	> 0,05
Nhóm NC4 (n = 6)	5,7 ± 0,3	6,0 ± 0,2	8,7 ± 0,2	6,4 ± 0,2	> 0,05
Nhóm chứng (n = 6)	5,5 ± 0,2	6,4 ± 0,1	8,7 ± 0,1	6,0 ± 0,2	> 0,05
p	p2-5 < 0,05				

Kết quả urê máu thử trước thí nghiệm và các ngày 1, 3 và 7 sau khi tiêm EV từ TBGTM thấy xét nghiệm trong giới hạn bình thường.

Bảng 3.11: Nồng độ creatinin thử trong thí nghiệm

Nhóm	Creatinin máu trung bình (mmol/L)				p
	N0	N1	N3	N7	
Nhóm NC1 (n = 6)	50,3 ± 20	64,5 ± 16	48,3 ± 22	43,4 ± 16	>0,05
Nhóm NC2 (n = 6)	52,1 ± 10	63,3 ± 6	46,8 ± 8	43,1 ± 10	>0,05
Nhóm NC3 (n = 6)	50,7 ± 9	62,6 ± 5	48,0 ± 11	46,2 ± 13	>0,05
Nhóm NC4 (n = 6)	49,2 ± 12	62,2 ± 6	49,8 ± 10	42,0 ± 18	>0,05
Nhóm chứng (n = 6)	52,3 ± 8	49,9 ± 9	51,0 ± 8	42,4 ± 15	>0,05
p	p1-5 < 0,05; p3-5 < 0,05				

Urê là sản phẩm thoái hóa protein của cơ thể, là các protein ngoại sinh được chuyển hóa thành axit amin nhờ các protease của đường tiêu hóa sau đó được chuyển hóa tiếp và cuối cùng thành CO₂ và NH₃. Urê luôn tồn tại trong máu, được lọc qua cầu thận và đào thải ra ngoài cơ thể qua nước tiểu. Xét nghiệm urê máu được dùng để đánh giá chức năng thận và theo dõi các căn bệnh về thận bình thường từ 2,5 - 7,5 mmol/l. Creatinin là sản phẩm của sự thoái hóa creatin trong các cơ, được đào thải qua thận và thận duy trì Creatinin trong máu ở một nồng độ hằng định nên nồng độ của Creatinin phản ánh chính xác chức năng lọc của thận 40 -110 umol/l. Khi nồng độ creatinin trong máu tăng cao đồng nghĩa với việc có rối loạn chức năng thận suy giảm thì khả năng lọc creatinin sẽ giảm, dẫn tới nồng độ chất này trong máu sẽ tăng cao hơn bình thường. Theo tổ chức thận Mỹ đã chia thành 5 mức độ suy thận dựa trên độ lọc cầu thận: Chỉ số creatinin dưới 130 mmol/l - suy thận độ I; Chỉ số creatinin 130 - 299 mmol/l - suy thận độ II; Chỉ số creatinin 300 - 499 mmol/l - suy thận độ IIIa; Chỉ số creatinin 500 - 899 mmol/l - suy thận độ III b; Chỉ số creatinin trên 900 mmol/l - suy thận độ IV.

Kết quả đánh giá chức năng thận qua xét nghiệm urê và creatinin máu thỏ trước thí nghiệm và các ngày 1, 3 và 7 sau khi tiêm EV từ TBGTM thấy xét nghiệm trong giới hạn bình thường, không có sự khác biệt trong các nhóm nghiên cứu ($p > 0,05$). Tác giả Li T. và cộng sự 2013 cho rằng EV có nguồn gốc từ TBGTM có thể làm giảm tổn thương thiếu máu cục bộ, tái tưới máu cơ tim và bảo vệ chống lại tổn thương ống thận cấp tính [75].

+ Xét nghiệm chức năng gan AST và ALT:

Bảng 3.12: Nồng độ AST thỏ trong thí nghiệm

Nhóm	AST máu trung bình (UI/L)				p
	N0	N1	N3	N7	
Nhóm NC1 (n = 6)	110,3 ± 10	104,0 ± 12	130,3 ± 3	112,2 ± 3	> 0,05
Nhóm NC2 (n = 6)	113,6 ± 15	104,9 ± 20	124,6 ± 5	93,6 ± 9	> 0,05
Nhóm NC3 (n = 6)	106,6 ± 12	112,4 ± 5	121,8 ± 6	110,6 ± 6	> 0,05
Nhóm NC4 (n = 6)	114,8 ± 10	122,7 ± 7	115,8 ± 4	120,1 ± 5	> 0,05
Nhóm chứng (n = 6)	119,5 ± 9	109,2 ± 10	119,8 ± 5	115,6 ± 6	> 0,05

Nồng độ AST trước thí nghiệm và sau thí nghiệm ngày 1, 3, 7 có thay đổi không đáng kể và sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Bảng 3.13: Nồng độ ALT thỏ trong thí nghiệm

Nhóm	ALT máu trung bình (UI/L)				p
	N0	N1	N3	N7	
Nhóm NC1 (n = 6)	67,2 ± 6	63,8 ± 10	73,2 ± 2	61,6 ± 9	> 0,05
Nhóm NC2 (n = 6)	69,7 ± 5	61,2 ± 12	93,8 ± 4	67,9 ± 6	> 0,05
Nhóm NC3 (n = 6)	67,2 ± 7	65,7 ± 9	87,4 ± 2	71,2 ± 8	> 0,05
Nhóm NC4 (n = 6)	67,9 ± 8	66,6 ± 7	85,4 ± 4	73,8 ± 6	> 0,05
Nhóm chứng (n = 6)	65,6 ± 5	84,6 ± 5	99,0 ± 3	60,6 ± 6	> 0,05

AST phân bố rộng rãi trong các mô của cơ thể, có nhiều ở gan, tim và cơ xương. ALT phân bố chính ở gan, ít hơn ở thận và cơ xương. Trong viêm gan hoặc các tổn thương khác như chấn thương, tắc mật, ung thư gan thì 2 men này đều tăng, mức độ tăng ở từng bệnh khác nhau. Các kết quả đánh giá chức năng gan trong nghiên cứu này cho thấy với các liều lượng EV khác nhau vẫn không gây ảnh hưởng đến chức năng gan. Các nghiên cứu khác cho thấy ngoài EV có nguồn gốc từ TBGTM cũng làm giảm xơ hóa bề mặt, giảm viêm gan và lắng đọng collagen trong gan chuột bị xơ hóa do carbon tetrachloride (CCl₄) và hồi phục đáng kể hoạt độ AST [75] Ngoài ra, chúng có thể tạo ra tác dụng bảo vệ gan chống lại tổn thương gan do thuốc hoặc hóa chất, chủ yếu thông qua việc kích hoạt các phản ứng tăng sinh, tái tạo và ức chế quá trình apoptosis tế bào gan do APAP- và H₂O₂ gây ra thông qua việc điều chỉnh tăng biểu hiện protein Bcl-xL [76].

- Kết quả định lượng cytokine

Định lượng nồng độ các cytokin giúp xác định chức năng và đáp ứng miễn dịch hay đáp ứng điều trị. Cytokin được xét nghiệm từ bệnh phẩm là máu. Ngoài ra các cytokin có thể được nghiên cứu ở các loại bệnh phẩm khác như dịch não tủy, dịch khớp, phân và nước tiểu. Cytokin là một nhóm protein đa dạng không phải là kháng thể, chúng đóng vai trò là các chất trung gian giữa các tế bào. Trước hết chúng là sản phẩm của các tế bào miễn dịch, hoạt động như các chất trung gian và điều hòa các quá trình miễn dịch, nhưng đến hiện nay nhiều cytokin đã biết được sản xuất bởi các tế bào khác không phải là tế bào miễn dịch và cytokin cũng có tác dụng trên những tế bào không phải của hệ miễn dịch. Hiện nay cytokin đang được sử dụng trên lâm sàng như những chất sửa đổi đáp ứng sinh học để điều trị các rối loạn khác nhau.

Các cytokin là một thuật ngữ chung được sử dụng để mô tả một nhóm lớn các protein, nhưng cũng có những thuật ngữ khác dùng để mô tả các loại cytokin đặc biệt, chúng bao gồm:

+ Monokin là cytokin được sản xuất bởi các tế bào thực bào đơn nhân

+ Lymphokin là cytokin được sản xuất bởi tế bào lympho được hoạt hóa, đặc biệt là các tế bào Th

+ Interleukin là cytokin có vai trò trung gian giữa các bạch cầu

+ Chemokin là một phân tử nhỏ chủ yếu chịu trách nhiệm cho việc di chuyển bạch cầu

Cytokin có chức năng như là một phần của hệ thống lớn hơn liên quan đến nhau của protein và thác tín hiệu, đó là mạng lưới cytokin. Đây là những tương tác phức tạp trong đó các tế bào khác nhau có thể phản ứng khác nhau đối với cùng một cytokin tùy thuộc vào các tín hiệu được tiếp nhận bởi tế bào. Tín hiệu cytokin rất linh hoạt và có thể gây ra cả hai phản ứng bảo vệ và làm hư hại. Một cytokin thường ảnh hưởng đến sự tổng hợp các cytokin khác. Chúng có thể tạo ra các thác, hoặc tăng cường hay ức chế sản xuất cytokin khác. Ngoài ra, chúng thường có thể ảnh hưởng đến hoạt động của các cytokin khác. Các hiệu ứng có thể là đối kháng, phụ thêm, hoặc hiệp đồng. Các cytokin thường không được lưu trữ như protein đã tạo ra từ trước. Thay vì sự tổng hợp của cytokin được bắt đầu bằng phiên mã gen và mRNA của chúng tồn tại ngắn ngủi và được sản xuất khi cần thiết trong phản ứng miễn dịch. Các gen mã hóa cho cytokin có thể sản xuất các biến thể thông qua việc cắt nối để tạo ra các protein hơi khác nhau nhưng có hoạt tính sinh học. Nhiều cytokin được sản xuất bởi nhiều loại tế bào và tham gia vào cả hai đáp ứng miễn dịch tự nhiên và thu được. Các cytokin riêng rẽ cũng tác động lên nhiều loại tế bào và trong nhiều trường hợp cytokin có cùng hoạt tính.

Các thụ thể cytokin loại 1 (gia đình IL-2R) là gia đình lớn nhất của các thụ thể cytokin. Gia đình này được chia thành ba lớp con dựa trên các thành phần chung: IL2R γ , β chung, và gp130. Các thụ thể này thiếu hoạt tính tyrosine kinase có bản chất protein. Liên kết với phối tử (cytokin) dẫn đến dimer hóa thụ thể và bắt đầu phát tín hiệu nội bào.

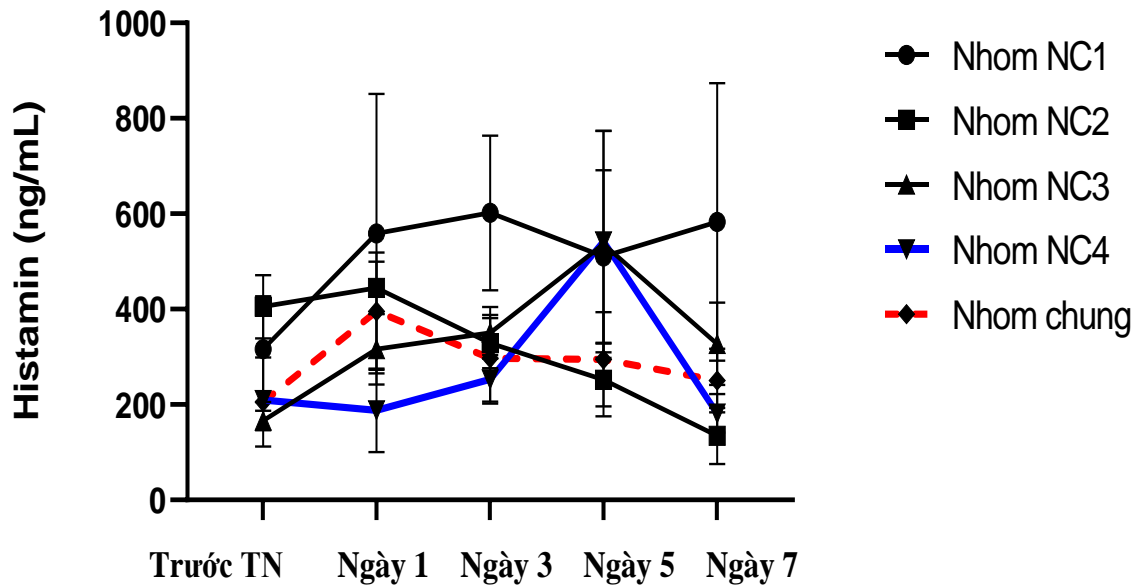
Các thụ thể cytokin loại 2 (gia đình IFNR) có các cystein nằm ở vùng ngoại bào của các tiểu đơn vị. Các vùng ngoại bào cũng có các vùng giống kháng thể nối tiếp nhau có đặc điểm của gia đình thụ thể cytokin này. Các tiểu đơn vị của thụ thể này cũng có hoạt tính tyrosine kinase nội bào.

Tất cả các thụ thể chemokin đều có bảy phân đoạn xuyên màng liên kết với protein gắn GTP. Chúng được chọn lọc biểu lộ trên các quần thể tế bào lympho đặc biệt và được đặt tên dựa trên các gia đình của các chemokin mà chúng liên kết; CCR (thụ thể CC) liên kết với chemokin CC như là phối tử của nó, trong khi CXCR liên kết với chemokin CXC như là phối tử của nó (các chemokin có tên truyền thống sẽ được thảo luận dưới đây).

Khi một tiểu đơn vị chung cho tất cả các thành viên của gia đình trong cytokin có chức năng liên kết và dẫn truyền tín hiệu, một thụ thể đối với một cytokin thường có thể đáp ứng với cytokin khác trong cùng một gia đình. Vì vậy một người thiếu IL-2 chẳng hạn thì cũng không bị ảnh hưởng vì các cytokin khác (IL-15, IL-7, IL-9...) đảm đương chức năng của nó. Tương tự, một đột biến trong một tiểu đơn vị thụ thể cytokin ở ngoài vùng chung thường có ít ảnh hưởng. Mặt khác, một đột biến trong các tiểu đơn vị chung thường có ảnh hưởng sâu sắc. Ví dụ, một đột biến ở gen đối với các tiểu đơn vị gamma IL-2R là nguyên nhân gây ra suy giảm miễn dịch nặng liên kết với nhiễm sắc thể X ở người (XSCID) đặc trưng bởi sự khiếm khuyết hoàn toàn hoặc gần hoàn toàn của tế bào T và B.

Trong nghiên cứu này chúng tôi tập trung vào đánh giá Histamin huyết tương, IL-1 beta, IL-6, IFN-gamma, IgE.

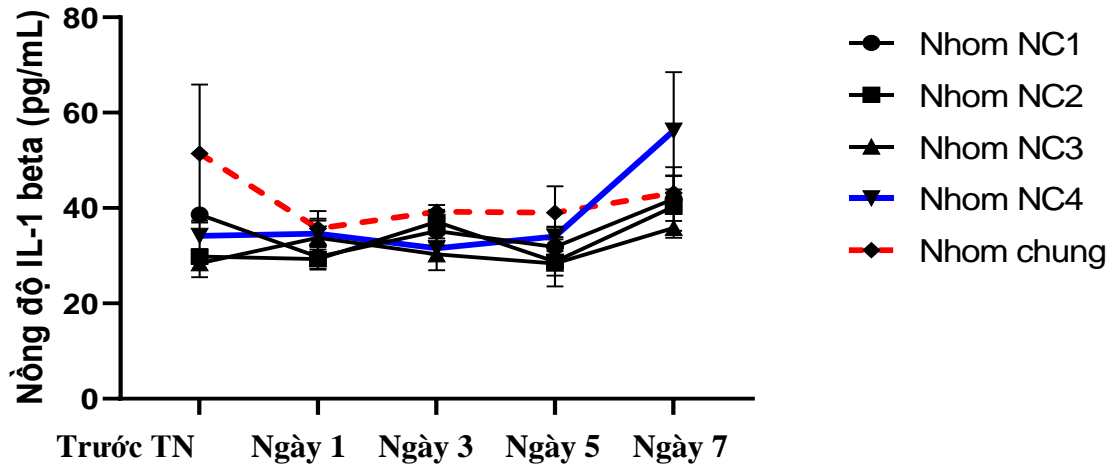
+ Nồng độ Histamin huyết tương:



Biểu đồ 3.1: Nồng độ Histamin huyết tương thỏ sau khi tiêm EV

Trạng thái bình thường, các tế bào chứa Histamin thường không có hoạt tính vì đang tồn tại ở dạng phức hợp với protein. Khi cơ thể bị dị ứng, có xu hướng miễn cảm với thuốc, hóa chất hoặc các tác nhân ngoại cảnh khác thì các chất kháng nguyên sẽ tác động lên phức hợp protein này và giải phóng ra Histamin dạng tự do, gây ra những phản ứng dị ứng từ nhẹ đến trầm trọng như: phát ban, đỏ da, sưng phù, khó thở, ngứa, ho, buồn nôn, sốc phản vệ... Kết quả nghiên cứu này thấy nồng độ Histamin huyết tương không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm nghiên cứu và nhóm chứng ($p > 0,05$). Nồng độ histamin nhóm EV từ AD liều cao sau tiêm EV lần 2 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm EV từ UC liều trung bình ($p = 0,035$) và EV từ AD liều trung bình ($p = 0,003$). Nồng độ histamin nhóm EV từ UC liều trung bình sau tiêm EV lần 4 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm EV từ AD liều trung bình ($p = 0,036$). Nhóm EV từ UC liều cao có nồng độ Histamin sau tiêm EV lần 4 thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nồng độ sau tiêm lần 1 ($p = 0,042$) và sau tiêm EV lần 3 ($p = 0,005$) và sau tiêm lần 2 ($p = 0,041$). Nồng độ Histamin huyết tương không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các thời điểm của các nhóm nghiên cứu còn lại ($p > 0,05$).

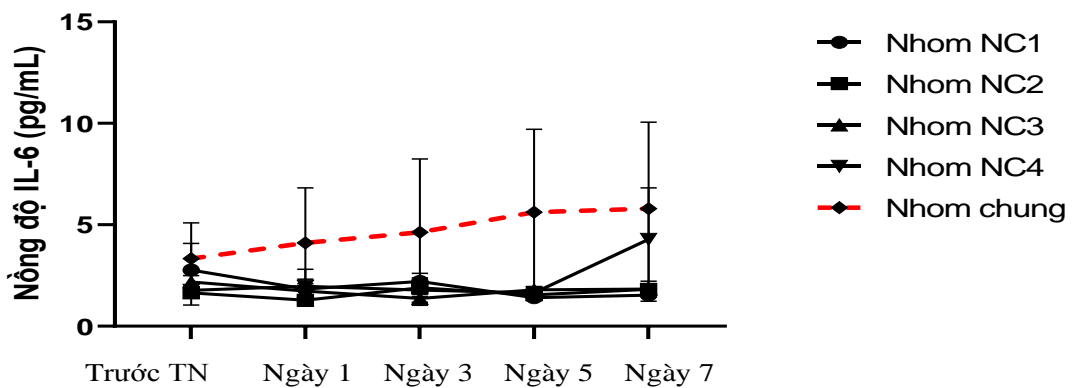
+ **Nồng độ IL-1 beta huyết tương:**



Biểu đồ 3.2: Nồng độ IL-1 beta huyết tương thở sau khi tiêm EV

Hiệu ứng của nó là tương tự như của $TNF-\alpha$ và nó cũng giúp hoạt hóa các tế bào T. Nồng độ IL-1 beta huyết tương không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm nghiên cứu và nhóm chứng ($p > 0,05$). Nhóm EV từ AD liều trung bình có nồng độ IL-1 beta sau tiêm EV lần 4 cao hơn có ý nghĩa thống kê so sau tiêm EV lần 1 ($p = 0,028$). Nhóm EV từ AD cao có nồng độ IL-1 beta sau tiêm EV lần 4 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nồng độ trước tiêm ($p = 0,007$), sau tiêm EV lần 1 ($p = 0,005$) và sau tiêm lần 2 ($p = 0,005$). Nồng độ IL-1 beta huyết tương không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các thời điểm của các nhóm khác ($p > 0,05$). Interleukin 1 là một cytokin viêm được sản xuất bởi các đại thực bào hoạt hóa.

+ **Nồng độ IL-6 huyết tương:**

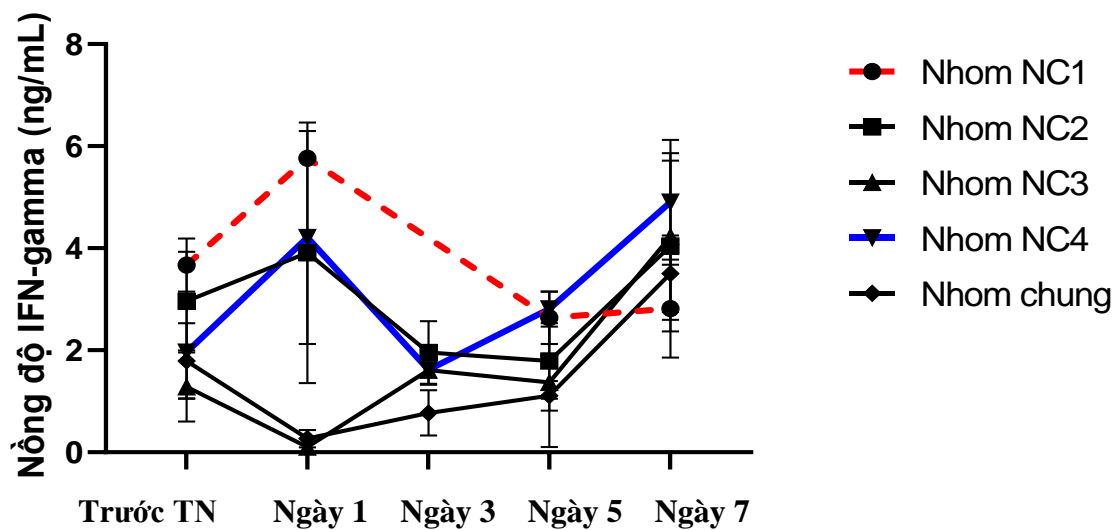


Biểu đồ 3.3: Nồng độ IL-6 huyết tương thở sau khi tiêm EV

Nồng độ IL-6 huyết tương không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm nghiên cứu và nhóm chứng ($p > 0,05$).

Nồng độ IL-6 huyết tương không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm nghiên cứu của cùng một thời điểm và giữa các thời điểm của mỗi nhóm nghiên cứu ($p > 0,05$).

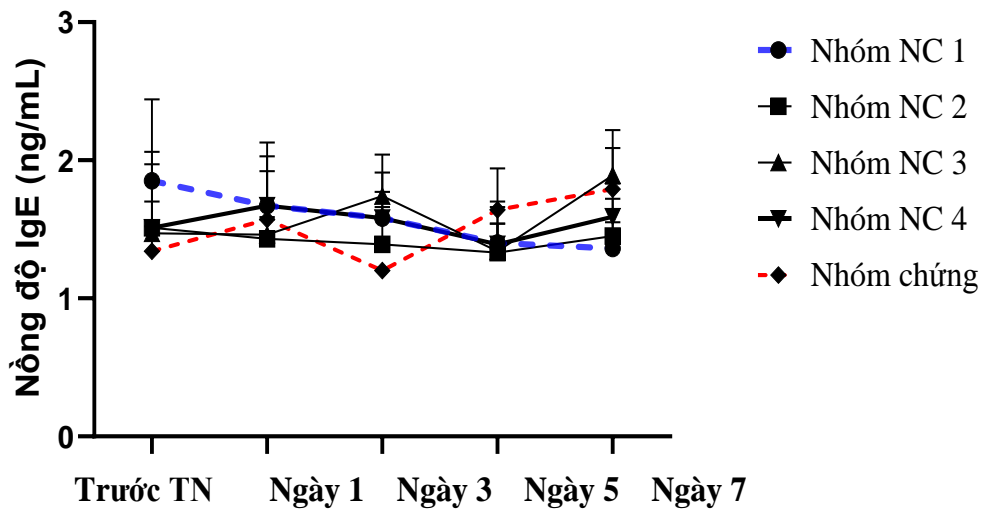
+ Nồng độ IFN-gama huyết tương:



Biểu đồ 3.4: Nồng độ IFN-gama huyết tương thở sau khi tiêm EV

Interferon loại I (IFN- α và IFN- β) được sản xuất bởi nhiều loại tế bào và chúng có chức năng ức chế nhân lên của virút trong tế bào. Chúng cũng gia tăng biểu lộ các phân tử MHC lớp I trên các tế bào làm cho chúng dễ bị tiêu diệt bởi các CTL. Interferon loại I cũng hoạt hóa các tế bào NK. Nồng độ IFN-gama huyết tương không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm nghiên cứu và nhóm chứng ($p > 0,05$). Nhóm EV từ AD liều trung bình có nồng độ IFN-gama sau tiêm EV lần 3 cao hơn có ý nghĩa thống kê so trước tiêm ($p = 0,037$), sau tiêm EV lần 1 ($p = 0,037$) và sau tiêm lần 2 ($p = 0,035$). Nhóm EV từ AD trung bình có nồng độ IFN-gama sau tiêm EV lần 3 và lần 4 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nồng độ trước tiêm ($p = 0,003$), sau tiêm EV lần 1 ($p = 0,001$) và sau tiêm lần 3 ($p = 0,003$). Nồng độ IFN-gama huyết tương không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các thời điểm của các nhóm khác ($p > 0,05$).

+ **Nồng độ IgE huyết tương:**



Biểu đồ 3.5: Nồng độ IgE huyết tương

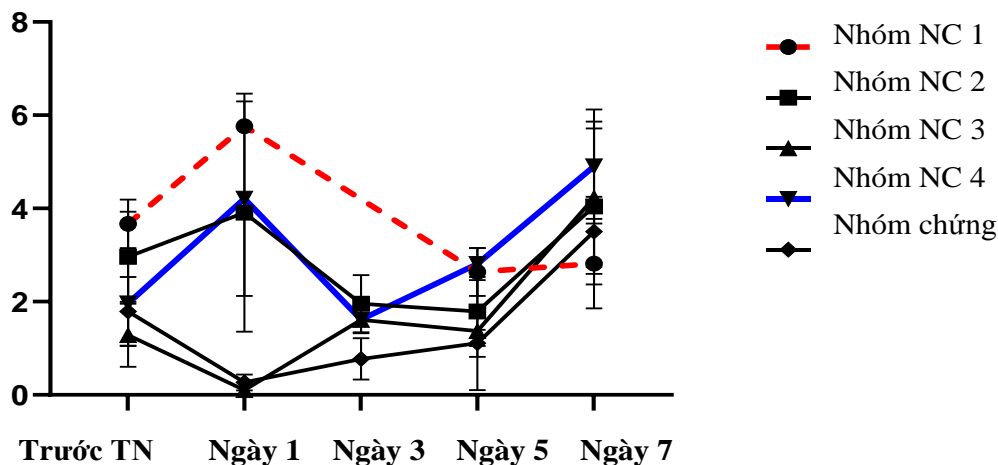
Globulin miễn dịch E (IgE) là một loại kháng thể (hoặc immunoglobulin (Ig) "isotype") mà chỉ được tìm thấy ở động vật có vú. IgE được tổng hợp bởi các tế bào plasma. Monome của IgE bao gồm hai chuỗi nặng (ϵ chain) và hai chuỗi nhẹ, với chuỗi ϵ chứa 4 Ig liên tục giống nhau (Ce1-Ce4). Chức năng chính của IgE là miễn dịch, có vai trò thiết yếu trong phản ứng quá mẫn loại I, biểu hiện trong các bệnh dị ứng khác nhau và các loại nổi mề đay mãn tính và viêm da dị ứng. IgE cũng đóng một vai trò then chốt trong phản ứng với các chất gây dị ứng, chẳng hạn như: thuốc phản vệ, ong đốt và các chế phẩm kháng nguyên được sử dụng trong liệu pháp miễn dịch dị ứng.

Nồng độ IgE huyết tương không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm nghiên cứu và nhóm chứng ($p > 0,05$). Nhóm EV từ AD liều trung bình có nồng độ IgE sau tiêm EV lần 4 cao hơn có ý nghĩa thống kê so trước tiêm ($p = 0,04$), sau tiêm EV lần 1 ($p = 0,038$) và sau tiêm lần 3 ($p = 0,015$). Nồng độ IgE huyết tương không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các thời điểm của các nhóm khác ($p > 0,05$). IgE có vai trò quan trọng trong bệnh sinh của các bệnh dị ứng, đặc biệt là trong sự hoạt hóa các dưỡng bào, bạch cầu ái kiềm và trong sự trình diện kháng nguyên. IgE cũng có vai trò quan trọng trong việc bảo vệ cơ thể chống lại các bệnh ký sinh trùng, đặc biệt là

những bệnh gây ra bởi giun và một số động vật nguyên sinh. Tuy nhiên, một phần do sự dư thừa của hệ thống miễn dịch, các mức độ thấp hoặc vắng mặt của IgE có thể làm cho những người này không dễ bị nhiễm các bệnh ký sinh trùng nặng. Mặc dù còn chưa được hoàn toàn sáng tỏ, IgE còn có thể đóng một vai trò trong hệ thống miễn dịch của bệnh ung thư, trong đó IgE có khả năng kích thích một phản ứng độc tế bào mạnh để chống lại các tế bào thể hiện một lượng nhỏ các dấu ấn ung thư sớm.

+ **Nồng độ TNF-alpha huyết tương**

TNF α là một thành tố quan trọng của hệ miễn dịch đáp ứng với nhiều loại nhiễm trùng. Việc sử dụng ức chế TNF-alpha có thể liên quan với tăng nguy cơ nhiễm trùng nghiêm trọng, đặc biệt là viêm phổi, lao, zona và các nhiễm trùng cơ hội khác. TNF có 2 typ, ký hiệu TNF α và TNF β .

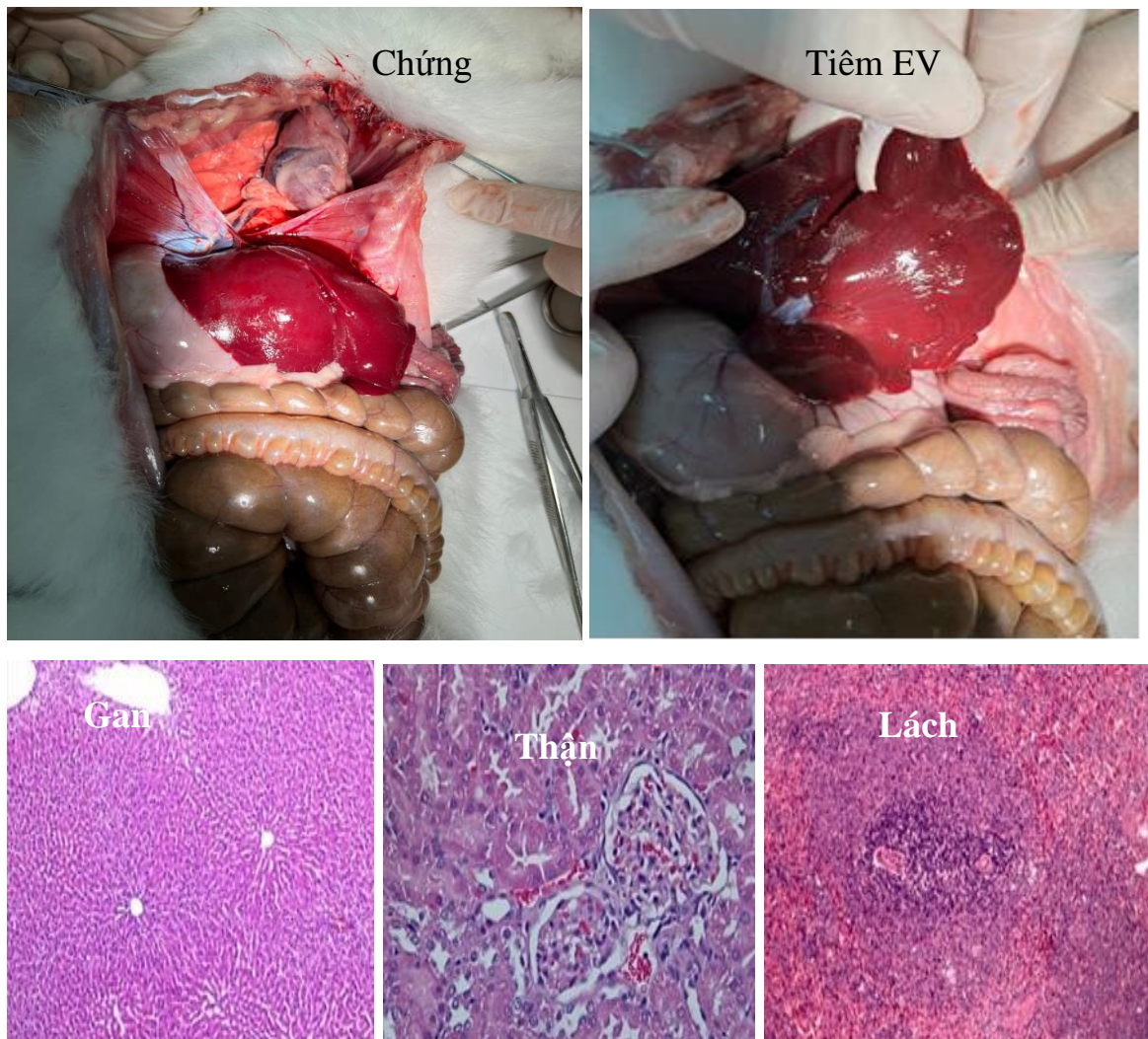


Biểu đồ 3.6: Nồng độ TNF-alpha huyết tương thở sau khi tiêm EV

TNF α tác dụng huỷ hoại tế bào ung thư gây chảy máu. Hoạt tính này nhận thấy trong huyết thanh của động vật thí nghiệm kích thích bằng lipopolysaccharid. TNF α được sản xuất chủ yếu bởi đại thực bào đã hoạt hoá (trước hết là AF3) hay tế bào T hoạt hoá cho nên gọi là lymphotoxin. TNF α gắn vào receptor của nó trên bề mặt tế bào đích giống như IL-1. Khả năng kích thích của TNF α chiếm khoảng 28% tổng aminoacid và cần có sự hỗ trợ của MHC nhưng không giống cấu trúc của lớp I và lớp II, đôi khi thể hiện như là lớp III. về cấu

trúc TNF α có 157 aminoacid và TNF β có 171 aminoacid. TNF α có khả năng gắn màng tế bào ung thư và huỷ hoại trực tiếp tế bào này.

Nồng độ TNF-alpha huyết tương không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm nghiên cứu và nhóm chứng ($p > 0,05$). Nhóm EV từ UC liều cao có nồng độ TNF-alpha sau tiêm EV lần 2 thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với thời điểm trước tiêm ($p = 0,027$); nồng độ TNF-alpha sau tiêm EV lần 4 cao hơn có ý nghĩa thống kê so thời điểm sau tiêm lần 1 ($p = 0,003$), sau tiêm EV lần 2 ($p = 0,003$). Nồng độ TNF-alpha huyết tương không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các thời điểm của các nhóm khác ($p > 0,05$).



Hình 3.3: Hình ảnh giải phẫu đại thể vùng bụng và vi thể gan, thận của thỏ

Như vậy, sau tiêm EV từ TBGTM và dung dịch đệm (nhóm chứng), lấy máu thỏ ở 5 thời điểm trước tiêm và sau tiêm TBG lần 1, 2, 3 và 4 định lượng

nồng độ các cytokine. Kết quả cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ Histamin, IL-1 beta, IL-6, IFN-gama, TNF-alpha và IgE huyết tương giữa các nhóm nghiên cứu và nhóm chứng ($p > 0,05$) (Biểu đồ 7-12). Điều này chứng tỏ khi tiêm EV từ TBGTM không làm thay đổi đáng kể nồng độ các cytokin và chất trung gian hóa học trên tương đồng với kết quả thân nhiệt, nếu thân nhiệt tăng do chất gây sốt ngoại sinh gây ra sự giải phóng các chất gây sốt nội sinh, như interleukin-1 (IL-1), yếu tố hoại tử khối u-alpha (TNF-alpha) và IL-6 và các cytokine khác, sau đó kích hoạt thụ thể cytokine, hoặc các chất gây sốt ngoại sinh trực tiếp kích hoạt các thụ thể giống Toll.

Kết quả giải phẫu bệnh lý gan, thận: Kết thúc thí nghiệm chúng tôi tiến hành phẫu thuật đánh giá đại thể tim, phổi, gan, thận... kết quả cho thấy giải phẫu đại thể vùng ngực, bụng không thấy tổn thương. Kết quả cầu thận, các ống thận và các mạch máu giữa các ống thận bình thường. Các tế bào gan xếp thành dải, thành bè, giữa chúng có xoang mạch. Phẫu tích lấy gan, thận làm giải phẫu bệnh với nhuộm HE thấy rằng gan, thận mổ thí nghiệm không khác biệt với mổ chứng và không có tổn thương vi thể ở gan thận

3.2.4. Đánh giá tính kích ứng bề mặt nhãn cầu

+ Một số đặc điểm chung

Bảng 3.14. Kích ứng bề mặt nhãn cầu (n = 6)

Tiêu chí theo dõi	Trước TN	Ngày 3		Ngày 7		Tổng
		MT	MP	MT	MP	
Co quắp mi	-	-	-	-	-	-
Chảy nước mắt	-	-	1/6	-	-	1/6
Dử mắt	-	-	-	-	-	-
Phản ứng ánh sáng	-	-	-	-	-	-
Cương tụ kết mạc	-	-	1/6	-	-	1/6
Nhuộm Flu giác mạc	-	-	-	-	-	-
Thời gian vỡ phim nước mắt (s)	9,8 ± 0,8	10,2 ± 0,2	10,8 ± 0,4	12 ± 0,5	11,5 ± 0,3	

Bình thường (-)

Trong thời 7 ngày với 4 lần sử dụng EV nhỏ mắt thô với liều cao và theo dõi đánh giá tình trạng co quắp mi, chảy nước mắt, đờ mắt... thông qua khám lâm sàng, tình trạng phản ứng ánh sáng, cương tụ kết mạc và tình trạng bắt màu qua nhuộm fluorescein giác mạc thông qua sinh hiển vi cầm tay ngày 3 và ngày 7. Kết quả cho thấy ngày 2 xuất hiện chảy nước mắt và cương tụ kết mạc nhẹ ở 1/6 thô nghiên cứu với mắt phải (MP) sử dụng EV liều cao, tuy nhiên phản ứng chỉ thoáng qua không xuất hiện lại ở các ngày sau đó. Một kết quả thú vị khi theo dõi tình trạng vỡ phim nước mắt thấy có sự tăng thời gian vỡ film nước mắt, điều này cho thấy có thể EV từ tế bào gốc sẽ là tiềm năng trong điều trị khô mắt. Thê tiết thu được từ TBGTM dây rốn ở người cho thấy hiệu quả trong việc cải thiện tình trạng viêm màng bồ đào tự miễn bằng cách ức chế sự di chuyển của tế bào viêm. Trong những năm gần đây, tiềm năng điều trị của các túi ngoại bào (EV) do tế bào tiết ra để điều hòa sự giao tiếp giữa tế bào và tế bào là một chủ đề ngày càng được quan tâm. EV có nguồn gốc từ tế bào gốc trung mô, đặc biệt là tế bào gốc mô đệm giác mạc của con người, có tác dụng chống xơ hóa, chống viêm và tái tạo ở giác mạc bị tổn thương. Cơ chế hoạt động chính xác của EV này phần lớn vẫn chưa được biết rõ. Sự phát triển trị liệu của chúng đang ở giai đoạn đầu và cần có những nghiên cứu tiền lâm sàng sâu hơn [77].

Bên cạnh đó tác giả Shekari F. và cộng sự năm 2023 cho rằng các liệu pháp dựa trên tế bào tái tạo đã nổi lên như một phương pháp đầy hứa hẹn để thay đổi các lựa chọn điều trị mù lòa và Holoclar gần đây đã nhận được sự chấp thuận của Ủy ban Châu Âu là phương pháp điều trị dựa trên tế bào gốc đầu tiên cho các bệnh về mắt [78]. Theo tác giả Habibi A. và cộng sự năm 2023, thê tiết ngoại bào chứa nhiều loại lipid, protein và axit nucleic tham gia vào cả quá trình sinh lý bình thường và bệnh lý của của mắt sẽ giúp sự hiểu biết toàn diện hơn về cơ chế bệnh sinh, chẩn đoán và thậm chí cả các phương pháp điều trị tiềm năng cho nhiều loại bệnh khác nhau. Vai trò của thê tiết ngoại bào trong bệnh lý viêm mắt được nghiên cứu nhiều trong những năm gần đây đặc biệt tình trạng thoái hóa ở mắt [79]. Bên cạnh các bệnh lý do viêm, các bệnh tổn thương giác mạc do bỏng, loét, chấn thương, bệnh khô mắt, bệnh vông mạc cũng được nhiều quan

tâm nghiên cứu và thể tiết ngoại bào có những hiệu quả được công bố đặc biệt là tổn thương giác mạc. Theo Deng S.X. và cộng sự năm 2020 thấy rằng: Nhiễm trùng, chấn thương và tiếp xúc với hóa chất trên bề mặt nhãn cầu có thể làm tổn thương giác mạc nghiêm trọng và sẹo giác mạc được hình thành, đến nay các phương pháp điều trị không có hiệu quả trong việc giảm thiểu sẹo giác mạc và ghép giác mạc là liệu pháp duy nhất có thể phục hồi thị lực cho đôi mắt này [80]. Tuy nhiên, do tình trạng thiếu mô giác mạc trầm trọng nên nguy cơ biến chứng mù lòa liên quan đến ghép giác mạc, một liệu pháp thay thế hiệu quả và khả thi để phòng ngừa và điều trị sẹo giác mạc vẫn là một nhu cầu y tế đáng kể chưa được đáp ứng trên toàn cầu.

Trong những năm gần đây, tiềm năng điều trị của các túi ngoại bào (EV) được tiết ra bởi các tế bào để làm trung gian cho sự giao tiếp giữa tế bào có nguồn gốc từ tế bào gốc trung mô, đặc biệt là tế bào gốc mô đệm giác mạc của con người có tác dụng chống xơ hóa, chống viêm và tái tạo ở giác mạc bị tổn thương (hình 3.4). Các cơ chế hoạt động chính xác của các EV chức năng này phần lớn vẫn chưa được biết rõ những thử nghiệm lâm sàng đang ở giai đoạn đầu và cần có những nghiên cứu tiền lâm sàng sâu hơn [80].

Tác giả Deng S.X. nghiên cứu cho thấy sử dụng EV trong điều trị sẹo giác mạc là an toàn, giảm sẹo giác mạc, tái tạo độ trong suốt của giác mạc.

Bên cạnh thể tiết từ tế bào gốc trung mô dây rốn, tác giả Guo R. và cộng sự 2023, nghiên cứu EV từ tế bào đệm trung mô thử nghiệm trên chuột cho thấy tiềm năng điều trị khô mắt, quan sát chúng tôi thấy có tăng nhẹ thời gian vỡ phim nước mắt, điều này gợi ý sử dụng điều trị bệnh lý khô mắt tương tự tác giả Guo R. [81]. Ngoài ra tác giả Guo R. thấy rằng EV từ MSC có tác dụng chống viêm, ức chế sự biểu hiện của cytokine gây viêm, ức chế miễn dịch ... điều này hứa hẹn như một giải pháp trong điều trị bệnh khô mắt và bệnh bề mặt nhãn cầu khác. Như vậy EV từ MSC bước đầu đã cho thấy các hiệu quả điều trị bệnh lý mắt, không gây kích ứng nhãn cầu, giảm viêm, ức chế miễn dịch... là cơ sở khoa học tốt cho các thử nghiệm điều trị trong tương lai.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu sản phẩm thể tiết của tế bào gốc trung mô dây rốn trên in vitro và động vật thực nghiệm, chúng tôi rút ra kết luận như sau:

Sản phẩm thể tiết của tế bào gốc trung mô dây rốn của Vinmec trong nghiên cứu này đảm bảo không có nội độc tố, vô khuẩn và không gây tan máu.

Không xác định được liều gây độc tính cấp trên động vật thực nghiệm, với gây độc bán trường diễn nhận thấy kết quả huyết học, sinh hóa máu và kết quả giải phẫu bệnh gan, thận bình thường sau 4 tuần tiêm EV liều cao. Tính quá mẫn trên thỏ chưa ghi nhận được trong nghiên cứu này với các xét nghiệm bình thường. Tình trạng kích ứng nhãn cầu thoáng qua với 01 mắt xuất hiện tăng tiết và cương tụ mạch máu.

Từ một số kết quả trên có thể khẳng định thể tiết của tế bào gốc trung mô là an toàn có hoạt tính sinh học và tiềm năng trong điều trị các bệnh mạn tính y học nói chung và bệnh về mắt nói riêng.

KIẾN NGHỊ

Thử nghiệm thể tiết của tế bào gốc trung mô trên một số mô hình bệnh mắt như khô mắt, viêm loét giác mạc, bỏng... và một số mô hình bệnh khác như alzheimer, Parkinson, chấn thương tủy sống, xơ phổi... nhằm xác định hiệu quả trên in vivo tiến tới thử nghiệm điều trị bệnh trên người.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JAW. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology* 2015;71:181–97.
2. Gao F, Chiu SM, Motan D a. L, Zhang Z, Chen L, Ji H-L, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis* 2016;7:e2062. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.327>.
3. Xie Q, Liu R, Jiang J, Peng J, Yang C, Zhang W, et al. What is the impact of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on clinical treatment? *Stem Cell Res Ther* 2020;11:519. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02011-z>.
4. Mattar P, Bieback K. Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. *Front Immunol* 2015;6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00560>.
5. Qi L, Xue X, Sun J, Wu Q, Wang H, Guo Y, et al. The Promising Effects of Transplanted Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on the Treatment in Traumatic Brain Injury. *J Craniofac Surg* 2018;29:1689–92.
6. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211–28. <https://doi.org/10.1089/107632701300062859>.
7. Robey PG. “Mesenchymal stem cells”: fact or fiction, and implications in their therapeutic use. *F1000Research* 2017;6:524.
8. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279–95. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105>.
9. Patrikoski M, Mannerström B, Miettinen S. Perspectives for Clinical Translation of Adipose Stromal/Stem Cells. *Stem Cells Int* 2019;2019:1–21.

10. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *BioScience* 2015;65:783–97.
11. Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:328–35.
12. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci* 2019;9:19. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>.
13. Vakhshiteh F, Atyabi F, Ostad SN. Mesenchymal stem cell exosomes: a two-edged sword in cancer therapy. *Int J Nanomedicine* 2019;Volume 14:2847–59.
14. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Bedina Zavec A, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 2015;4:27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>.
15. Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci* 2016;17:170. <https://doi.org/10.3390/ijms17020170>.
16. Wei H, Chen Q, Lin L, Sha C, Li T, Liu Y, et al. Regulation of exosome production and cargo sorting. *Int J Biol Sci* 2021;17:163–77. <https://doi.org/10.7150/ijbs.53671>.
17. Zöller M. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009;9:40–55. <https://doi.org/10.1038/nrc2543>.
18. Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell* 2018;22:824–33.
19. Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M, Tran N, et al. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol* 2011;12:12.
20. Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitingner S, Kloss F, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell* 2007;6:745–57.
21. Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;358:948–53.

22. Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol* 2006;207:331–9. <https://doi.org/10.1002/jcp.20571>.
23. Elabd C, Ichim TE, Miller K, Anneling A, Grinstein V, Vargas V, et al. Comparing atmospheric and hypoxic cultured mesenchymal stem cell transcriptome: implication for stem cell therapies targeting intervertebral discs. *J Transl Med* 2018;16:222.
24. Agrawal R, Dale TP, Al-Zubaidi MA, Benny Malgulwar P, Forsyth NR, Kulshreshtha R. Pluripotent and Multipotent Stem Cells Display Distinct Hypoxic miRNA Expression Profiles. *PLoS ONE* 2016;11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164976>.
25. Lee HJ, Jung YH, Choi GE, Kim JS, Chae CW, Han HJ. Role of HIF1 α Regulatory Factors in Stem Cells. *Int J Stem Cells* 2019;12:8–20.
26. Gonzalez-King H, García NA, Ontoria-Oviedo I, Ciria M, Montero JA, Sepúlveda P. Hypoxia Inducible Factor-1 α Potentiates Jagged 1-Mediated Angiogenesis by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: Angiogenesis Mediated by Jagged1 in MSC Exosomes. *STEM CELLS* 2017;35:1747–59. <https://doi.org/10.1002/stem.2618>.
27. Gao D, Xie J, Zhang J, Feng C, Yao B, Ma K, et al. MSC attenuate diabetes-induced functional impairment in adipocytes via secretion of insulin-like growth factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;452:99–105. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.060>.
28. Noronha N de C, Mizukami A, Caliári-Oliveira C, Cominal JG, Rocha JLM, Covas DT, et al. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Res Ther* 2019;10:131. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1224-y>.
29. Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, Karp JM. Harnessing the Mesenchymal Stem Cell Secretome for the Treatment of Cardiovascular Disease. *Cell Stem Cell* 2012;10:244–58.

30. Beegle J, Lakatos K, Kalomoiris S, Stewart H, Isseroff RR, Nolta JA, et al. Hypoxic Preconditioning of Mesenchymal Stromal Cells Induces Metabolic Changes, Enhances Survival, and Promotes Cell Retention In Vivo. *STEM CELLS* 2015;33:1818–28.
31. Han Y-S, Lee JH, Yoon YM, Yun CW, Noh H, Lee SH. Hypoxia-induced expression of cellular prion protein improves the therapeutic potential of mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis* 2016;7:e2395–e2395. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.310>.
32. Li B, Li C, Zhu M, Zhang Y, Du J, Xu Y, et al. Hypoxia-Induced Mesenchymal Stromal Cells Exhibit an Enhanced Therapeutic Effect on Radiation-Induced Lung Injury in Mice due to an Increased Proliferation Potential and Enhanced Antioxidant Ability. *Cell Physiol Biochem* 2017;44:1295–310. <https://doi.org/10.1159/000485490>.
33. Kim Y, Jin HJ, Heo J, Ju H, Lee H-Y, Kim S, et al. Small hypoxia-primed mesenchymal stem cells attenuate graft-versus-host disease. *Leukemia* 2018;32:2672.
34. Liu J, Hao H, Xia L, Ti D, Huang H, Dong L, et al. Hypoxia Pretreatment of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Facilitates Angiogenesis by Improving the Function of Endothelial Cells in Diabetic Rats with Lower Ischemia. *PLOS ONE* 2015;10:e0126715.
35. Bister N, Pistono C, Huremagic B, Jolkkonen J, Giugno R, Malm T. Hypoxia and extracellular vesicles: A review on methods, vesicular cargo and functions. *J Extracell Vesicles* 2020;10. <https://doi.org/10.1002/jev2.12002>.
36. Liu W, Li L, Rong Y, Qian D, Chen J, Zhou Z, et al. Hypoxic mesenchymal stem cell-derived exosomes promote bone fracture healing by the transfer of miR-126. *Acta Biomater* 2020;103:196–212. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.12.020>.
37. Almeria C, Weiss R, Roy M, Tripisciano C, Kasper C, Weber V, et al. Hypoxia Conditioned Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Induce Increased Vascular Tube Formation in vitro. *Front Bioeng Biotechnol* 2019;7:292.

38. Cheng H, Chang S, Xu R, Chen L, Song X, Wu J, et al. Hypoxia-challenged MSC-derived exosomes deliver miR-210 to attenuate post-infarction cardiac apoptosis. *Stem Cell Res Ther* 2020;11:224. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01737-0>.
39. Zhang X-F, Wang T, Wang Z-X, Huang K-P, Zhang Y-W, Wang G-L, et al. Hypoxic ucMSC-secreted exosomal miR-125b promotes endothelial cell survival and migration during wound healing by targeting TP53INP1. *Mol Ther - Nucleic Acids* 2021;26:347–59.
40. Martin-Rufino JD, Espinosa-Lara N, Oslugui L, Sanchez-Guijo F. Targeting the Immune System With Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles: What Is the Cargo's Mechanism of Action? *Front Bioeng Biotechnol* 2019;7:308.
41. Yaghoubi S, Najminejad H, Dabaghian M, Karimi MH, Abdollahpour- Alitappeh M, Rad F, et al. How hypoxia regulate exosomes in ischemic diseases and cancer microenvironment? *IUBMB Life* 2020;72:1286–305. <https://doi.org/10.1002/iub.2275>.
42. Tạ Thành Văn (2022). Hóa sinh lâm sàng, Nhà xuất bản y học
43. Trần Ngọc Dũng (2022). Giao trình giải phẫu bệnh. Nhà xuất bản Quân đội nhân dân.
44. Pham PV, Vu NB, Huynh OT, Truong MT-H, Pham TL-B, Dang LT, et al. An evolution of stem cell research and therapy in Viet Nam. *Prog Stem Cell* 2018;5.
45. Ngoc Vu, Anh Bui, Van Trinh, Lan Phi, Ngoc Phan. A comparison of umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cell transplantation and mononuclear cell transplantation for the treatment of acute hindlimb ischemia in a murine model. *Biomed Res Ther* 2014;1.
46. Truc Pham, Tam Nguyen, Anh Bui, Ho Pham, Ngoc Phan, My Nguyen, et al. Preliminary evaluation of treatment efficacy of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell-differentiated cardiac progenitor cells in a myocardial injury mouse model. *Biomed Res Ther* 2015;2.
47. Phuong Le, Tuan Duong, Ngoc Vu, Phuc Pham. Umbilical cord derived stem cell (ModulatisTM) transplantation for severe chronic obstructive pulmonary disease: a report of two cases. *Biomed Res Ther* 2016;3.

48. Van Pham P, Bui KH-T, Ngo DQ, Vu NB, Truong NH, Phan NL-C, et al. Activated platelet-rich plasma improves adipose-derived stem cell transplantation efficiency in injured articular cartilage. *Stem Cell Res Ther* 2013;4:91–91.
49. Lam HTM, Tran MNT, Bui KA, Le TTT, Bui KHT, Phan NK, Pham PV. Adipose tissue derived stromal vascular fraction transplantation can recover spinal cord injury in mice | *Progress in Stem Cell* 2016.
50. Bui KH-T, Duong TD, Nguyen NT, Nguyen TD, Le VT, Mai VT, et al. Symptomatic knee osteoarthritis treatment using autologous adipose derived stem cells and platelet-rich plasma: a clinical study. *Biomed Res Ther* 2014;1:02.
51. Nguyen PD, Tran TD-X, Nguyen HT-N, Vu HT, Le PT-B, Phan NL-C, et al. Comparative Clinical Observation of Arthroscopic Microfracture in the Presence and Absence of a Stromal Vascular Fraction Injection for Osteoarthritis: ADSC and PRP Injection for Osteoarthritis. *STEM CELLS Transl Med* 2017;6:187–95. <https://doi.org/10.5966/sctm.2016-0023>.
52. Ngoc PK, Phuc PV, Nhung TH, Thuy DT, Nguyet NTM. Improving the efficacy of type 1 diabetes therapy by transplantation of immunoisolated insulin-producing cells. *Hum Cell* 2011;24:86–95. <https://doi.org/10.1007/s13577-011-0018-z>.
53. Truong NH, Nguyen NH, Le TV, Vu NB, Huynh N, Nguyen TV, et al. Comparison of the Treatment Efficiency of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation via Tail and Portal Veins in CCl4-Induced Mouse Liver Fibrosis. *Stem Cells Int* 2015;2016:5720413. <https://doi.org/10.1155/2016/5720413>.
54. Viet NL, D.D.L., Yen NTB, Hung PM, Anh NQ, Khai LT, Quang NN, Dat PT, Hieu TB. Evaluating the results of treatment of heart failure after myocardial infarction by transplantation of autologous bone marrow stem cells. *J Vietnam Cardiol* 2014;8.
55. Nguyen LT, Hoang DM, Nguyen KT, Bui DM, Nguyen HT, Le HTA, et al. Type 2 diabetes mellitus duration and obesity alter the efficacy of autologously transplanted bone marrow- derived mesenchymal stem/stromal cells. *STEM CELLS Transl Med* 2021:sctm.20-0506. <https://doi.org/10.1002/sctm.20-0506>.

56. Xin H, Li Y, Cui Y, Yang JJ, Zhang ZG, Chopp M. Systemic Administration of Exosomes Released from Mesenchymal Stromal Cells Promote Functional Recovery and Neurovascular Plasticity After Stroke in Rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013;33:1711–5. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.152>.
57. Kim D, Nishida H, An SY, Shetty AK, Bartosh TJ, Prockop DJ. Chromatographically isolated CD63 + CD81 + extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells rescue cognitive impairments after TBI. *Proc Natl Acad Sci* 2016;113:170–5.
58. Li T, Yan Y, Wang B, Qian H, Zhang X, Shen L, et al. Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Alleviate Liver Fibrosis. *Stem Cells Dev* 2013;22:845–54. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0395>.
59. Bian S, Zhang L, Duan L, Wang X, Min Y, Yu H. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *J Mol Med* 2014;92:387–97. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1110-5>.
60. Lee M, Ban J-J, Yang S, Im W, Kim M. The exosome of adipose-derived stem cells reduces β -amyloid pathology and apoptosis of neuronal cells derived from the transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 2018;1691:87–93.
61. Lee M, Liu T, Im W, Kim M. Exosomes from adipose-derived stem cells ameliorate phenotype of Huntington's disease *in vitro* model. *Eur J Neurosci* 2016;44:2114–9.
62. Bai L, Shao H, Wang H, Zhang Z, Su C, Dong L, et al. Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes on Experimental Autoimmune Uveitis. *Sci Rep* 2017;7:4323.
63. Ophelders DRMG, Wolfs TGAM, Jellema RK, Zwanenburg A, Andriessen P, Delhaas T, et al. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Protect the Fetal Brain After Hypoxia-Ischemia. *Stem Cells Transl Med* 2016;5:754–63.
64. Kim HY, Kumar H, Jo M-J, Kim J, Yoon J-K, Lee J-R, et al. Therapeutic Efficacy-Potentiated and Diseased Organ-Targeting Nanovesicles Derived from

- Mesenchymal Stem Cells for Spinal Cord Injury Treatment. *Nano Lett* 2018;18:4965–75.
65. Lu Y, Zhou Y, Zhang R, et al. Bone Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Recovery Following Spinal Cord Injury via Improvement of the Integrity of the Blood-Spinal Cord Barrier. *Front Neurosci* 2019;13:209.
 66. Worthington EN, Hagood JS. Therapeutic Use of Extracellular Vesicles for Acute and Chronic Lung Disease. *Int J Mol Sci* 2020;21:2318.
 67. Bodart-Santos V, de Carvalho LRP, de Godoy MA, Batista AF, Saraiva LM, Lima LG, et al. Extracellular vesicles derived from human Wharton’s jelly mesenchymal stem cells protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid- β oligomers. *Stem Cell Res Ther* 2019;10:332.
 68. Datta S, O’Malley MW. Fear Extinction Memory Consolidation Requires Potentiation of Pontine-Wave Activity during REM Sleep. *J Neurosci* 2013;33:4561–9.
 69. Ma Shisi, Yin Jiayang, Hao Lili, et al. Exosomes From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Treat Corneal Injury via Autophagy Activation, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.879192>
 70. Atienzar-Aroca, S., Serrano-Heras, G., Freire Valls, A., Ruiz de Almodovar, C., Muriach, M., Barcia, J. M., et al. (2018). Role of Retinal Pigment Epithelium-Derived Exosomes and Autophagy in New Blood Vessel Formation. *J. Cel Mol Med* 22 (11), 5244–5256.
 71. Zarbin M. Cell-Based Therapy for Degenerative Retinal Disease. *Trends Mol Med*. 2016;22:115–134
 72. Yilmaz G, Vital S, Yilmaz CE, Stokes KY, Alexander JS, Granger DN. Selectin-Mediated Recruitment of Bone Marrow Stromal Cells in the Postischemic Cerebral Microvasculature. *Stroke* 2011;42:806–11.
 73. Bagheri-Mohammadi S. Adult neurogenesis and the molecular signalling pathways in brain: the role of stem cells in adult hippocampal neurogenesis. *Int J Neurosci* 2021:1–13.

74. Ding M, Shen Y, Wang P, Xie Z, Xu S, Zhu Z, et al. Exosomes Isolated From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Alleviate Neuroinflammation and Reduce Amyloid-Beta Deposition by Modulating Microglial Activation in Alzheimer's Disease. *Neurochem Res* 2018;43:2165–77.
75. Young-Eun C., Byoung-Joon S., Mohammed A. Extracellular vesicles as potential biomarkers for alcohol- and drug-induced liver injury and their therapeutic applications, *pharmacy and therapy* 2018; S0163-7258(18)30057-3
76. Cheau Yih Tan, Ruenn Chai Lai, Winnie Wong. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models, *Stem Cell Research & Therapy*, 2014, 5:76
77. Sophie X.D., Aurelie D.S., Serina G. Therapeutic Potential of Extracellular Vesicles for the Treatment of Corneal Injuries and Scars, *Extracellular Vesicles to Treat Corneal Scars*, 2020, 9(12):1-10
78. Faezeh Shekari, Morteza Abyadeh, Anna Meyfour. Extracellular vesicles as reconfigurable therapeutics for eye diseases: Promises and hurdles. *Progress in Neurobiology*, 225, 102437.
79. Habibi A., Falamarzi K., Malepour M. et al (2023). Extracellular vesicles as a new horizon in the diagnosis and treatment of inflammatory eye diseases: A narrative review of the literature. *Frontiers in Immunology*, 1-10.
80. Deng S.X., Santos A.D., Gee S. (2020). Therapeutic Potential of Extracellular Vesicles for the Treatment of Corneal Injuries and Scars. *Extracellular Vesicles to Treat Corneal Scars*, 9(12): 1-10.
81. Guo R., Liang Q., He Y. et al (2023). Mesenchymal Stromal Cells-Derived Extracellular Vesicles Regulate Dendritic Cell Functions in Dry Eye Disease. *Cell*. 12,33.

PHỤ LỤC 1**QUY TRÌNH PHÂN LẬP THỂ TIẾT NGOẠI BÀO THỂ TIẾT TỪ MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ DÂY RÓN****1. Trang thiết bị**

Tên thiết bị	Hãng
Tủ an toàn sinh học cấp II	ThermoFisher
Máy siêu ly tâm Optima XPN-100	Beckman Coulter
Rotor SW 45 Ti Swinging-Becket	Beckman Coulter
Rotor SW 40 Ti Swinging-Becket	Beckman Coulter
Rotor SW 32 Ti Swinging-Becket	Beckman Coulter
Pipet aid	Ependorf

2. Vật tư tiêu hao và hoá chất

Vật tư tiêu hao:

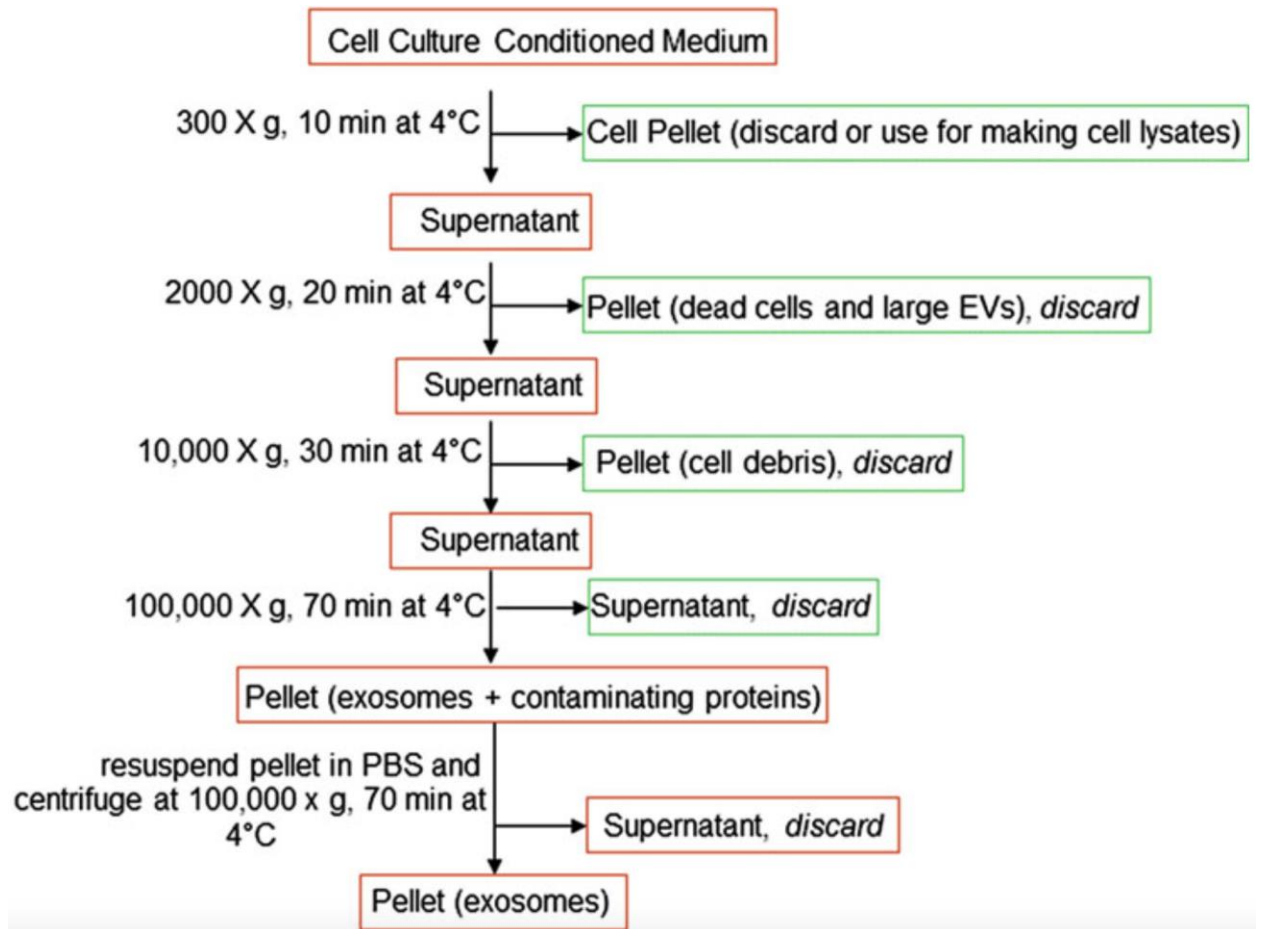
Tên dụng cụ	Hãng
Ống ly tâm	Beckman Coulter
Pipet 5mL	Thermo Scientific
Pipet 10mL	Thermo Scientific
Pipet 25mL	Thermo Scientific
Pipet 50mL	Thermo Scientific
Ống ly tâm 50mL	Corning
Ống lưu mẫu	Corning
Đầu tip 1000 uL	Corning
Gạc vô khuẩn	Danameco, Việt Nam

Hoá chất:

Tên thiết bị	Hãng
Ethanol 70%	ThermoFisher
PBS 1X	Gibco

3. Các bước tiến hành

Quy trình tiến hành thu mẫu thể tiết được tóm tắt trong sơ đồ phía dưới đây:



Sơ đồ 1: Quy trình các bước chính thu hoạch thể tiết từ môi trường nuôi cấy TBGTM.

Bước 1: Chuẩn bị mẫu:

- Môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô dây rốn được thu thập và bảo quản trong chai sạch, đóng kín và chuyển sang ly tâm.

Bước 2: chuẩn bị máy ly tâm

- Vệ sạch các rotor bằng ethanol 70% và bảo quản ở 4°C để làm lạnh trước khi sử dụng.
- Khử trùng các ống ly tâm bằng ethanol 70%, rửa lại với PBS 1X và để khô trong tủ an toàn sinh học.

Bước 3: Ly tâm loại bỏ tế bào chết, mảnh vỡ tế bào và các vi thể.

- Môi trường được ly tâm ở 300xg trong 10 phút ở 4°C để loại bỏ cặn tế bào còn sót lại trong môi trường sau nuôi cấy.

- Tiếp tục loại bỏ tế bào chết và các thể tiết có kích thước lớn (Apoptotic bodies) trong môi trường bằng cách ly tâm trong điều kiện 2000xg, 20 phút ở 4°C.
- Sử dụng pipet hút môi trường vào ống ly tâm Thinwall Ultraclear 38.5mL với thể tích tối thiểu đạt 2/3 thể tích ống ly tâm.
- Lưu ý chuẩn bị mẫu và ống đối trọng để đảm bảo cân bằng.
- Chuyển các ống ly tâm chứa mẫu vào bộ adaptor của rotor SW 45Ti theo đúng số thứ tự.
- Đặt rotor vào trong máy siêu ly tâm, đóng chặt và thiết lập chương trình ly tâm: tốc độ 10 000xg, thời gian 30 phút.
- Sau khi hoàn thành quá trình ly tâm, thu dịch nổi chuyển sang một chai sạch và bảo quản trong tủ lạnh để chuyển sang bước thu exosomes.

Bước 4: thu exosomes và đóng gói bảo quản

- Hút dịch nổi thu được ở bước trên vào ống ly tâm, chuẩn bị mẫu và ống đối trọng đảm bảo cân bằng, lắp vào bộ adaptor của rotor SW32Ti theo đúng thứ tự.
- Đặt rotor vào máy ly tâm và thiết lập chương trình ly tâm: 100 000xg, 70 phút, 4°C và tiến hành ly tâm.
- Loại bỏ dịch nổi và tiếp tục bổ sung dung dịch vào ly tâm cho đến khi hết dung dịch nuôi cấy môi trường.
- Sau khi hoàn thành ly tâm, thu cặn ly tâm và hoà bằng PBS 1X.
- Rửa mẫu với PBS 1X, rồi chuyển vào rotor SW 40Ti và ly tâm với tốc độ 100 000xg, 70 phút ở 4°C.
- Loại bỏ dịch nổi và thêm PBS 1X để thu lại mẫu.
- Mẫu thu được, chia vào các ống lưu mẫu và bảo quản ở -80°C.

Bước 5: Đánh giá chất lượng thể tiết

- Dịch nổi sau ly tâm được giữ lại và lấy mẫu xét nghiệm Vi khuẩn, vi nấm, endotoxin
- Chất lượng thể tiết được đánh giá:
 - o Protein tổng số
 - o Số lượng thể tiết thu được
 - o Kích thước trung bình thể tiết
 - o Dầu ấn thể tiết
 - o Cytokine từ thể tiết

PHỤ LỤC 2

Tiêu chuẩn EV từ UCMSC trước khi thử nghiệm

TT	Tiêu chuẩn	Đặc điểm cần đạt
1	Hình thái mà mức độ đồng nhất	- Dạng cái chén (cup-shape) khi nhuộm âm tính và soi bằng TEM - >70 % EV đồng dạng về hình thái
2	Kích thước	40 nm - 250 nm quan sát dưới TEM Hoặc 40 - 350 nm đo bằng NTA
3	Biểu hiện dấu ấn sinh học	Biểu hiện nhóm tetraspanin (CD9 hoặc CD63 hoặc CD81), HSP10 hoặc AGO2, GAPDH hoặc Tubulin hoặc alpha actin