

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ QUỐC PHÒNG

**HỌC VIỆN QUÂN Y**

NGUYỄN BẢO TRÂN

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI MÀNG ỎI, TẾ BÀO  
GỐC MÀNG ỎI NGƯỜI VÀ KHẢ NĂNG BIỆT HÓA THÀNH  
TẾ BÀO GIỐNG TẾ BÀO BÊ TA TUY NỘI TIẾT**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2018

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ QUỐC PHÒNG

**HỌC VIỆN QUÂN Y**

NGUYỄN BẢO TRÂN

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI MÀNG ỎI, TẾ BÀO  
GỐC MÀNG ỎI NGƯỜI VÀ KHẢ NĂNG BIỆT HÓA THÀNH  
TẾ BÀO GIỐNG TẾ BÀO BÊ TA TỤY NỘI TIẾT**

Chuyên ngành: Giải phẫu người

Mã số: 62 72 01 04

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

*1. PGS.TS. Trần Ngọc Anh*

*2. PGS.TS. Phạm Văn Trân*

HÀ NỘI - 2018

## LỜI CAM ĐOAN

Luận án này là sản phẩm khoa học thuộc đề tài nghiên cứu khoa học cấp Nhà nước “Hợp tác nghiên cứu quy trình sản xuất một số chế phẩm sinh học từ tế bào gốc màng ôi” do Học viện Quân y chủ trì.

Là người tham gia trực tiếp thực hiện các nội dung thuộc đề tài được trình bày trong luận án này, tôi xin cam đoan những số liệu và kết quả nghiên cứu trong luận án là trung thực và chưa từng được các tác giả khác công bố trong các luận văn, luận án nào và đã được chủ nhiệm đề tài cho phép sử dụng vào luận án này.

*Hà Nội, ngày ... tháng ... năm 2018*  
*Nghiên cứu sinh*

*Nguyễn Bảo Trân*

# MỤC LỤC

**TRANG PHỤ BÌA**

**LỜI CAM ĐOAN**

**MỤC LỤC**

<b>DANH MỤC CÁC TỪ VÀ THUẬT NGỮ VIẾT TẮT .....</b>	<b>i</b>
<b>DANH MỤC BẢNG .....</b>	<b>ii</b>
<b>DANH MỤC BIỂU ĐỒ.....</b>	<b>ii</b>
<b>DANH MỤC HÌNH.....</b>	<b>iii</b>
<b>ĐẶT VẤN ĐỀ .....</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Đặc điểm cấu trúc màng ối .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Nguồn gốc màng ối .....	3
1.1.2. Cấu trúc màng ối .....	4
1.1.3. Chức năng của màng ối.....	5
<b>1.2. Tế bào gốc màng ối .....</b>	<b>6</b>
1.2.1. Một số khái niệm tế bào gốc .....	6
1.2.2. Các đặc điểm màng ối liên quan công nghệ tế bào gốc.....	10
1.2.3. Khả năng biệt hóa của tế bào gốc màng ối .....	15
<b>1.3. Một số nghiên cứu tế bào gốc .....</b>	<b>21</b>
1.3.1. Tế bào gốc và bệnh đái tháo đường .....	21
1.3.2. Tình hình nghiên cứu và ứng dụng tế bào gốc ở Việt nam.....	26
<b>CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1. Đối tượng nghiên cứu .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2. Phương pháp nghiên cứu .....</b>	<b>30</b>
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu:.....	30
2.2.2. Thu thập màng ối.....	30

2.2.3. Xác định các đặc điểm hình thái vi thể của màng ối bằng tiêu bản nhuộm HE.....	32
2.2.4. Nghiên cứu đặc điểm hình thái siêu vi thể của màng ối bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) .....	34
2.2.5. Nghiên cứu đặc điểm hình thái siêu vi thể của màng ối bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM).....	35
2.2.6. Xác định các đặc tính màng ối và tế bào màng ối bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch .....	37
2.2.7. Phân lập, nuôi cấy và bảo quản các tế bào gốc màng ối người .....	38
2.2.8. Biệt hóa tế bào gốc thành tế bào beta tụy đảo.....	41
2.2.9. Các kỹ thuật khác: .....	42
<b>2.3. Hóa chất và thiết bị máy móc nghiên cứu .....</b>	<b>45</b>
2.3.1. Môi trường sinh phẩm và hóa chất.....	45
2.3.2. Các thiết bị máy móc.....	46
<b>2.4. Thời gian và địa điểm nghiên cứu:.....</b>	<b>49</b>
<b>2.5 Phương pháp xử lý số liệu.....</b>	<b>49</b>
<b>2.5. Đạo đức trong nghiên cứu.....</b>	<b>49</b>
<b>CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. Mô tả đặc điểm hình thái vi thể và siêu vi thể màng ối .....</b>	<b>51</b>
3.1.1. Thu thập mẫu màng ối.....	51
3.1.2. Đặc điểm hình thái vi thể màng ối trên tiêu bản nhuộm HE.....	53
3.1.3. Đặc điểm hình thái siêu vi thể của màng ối quan sát dưới kính hiển vi điện tử .....	62
3.1.4. Xác định đặc tính màng ối và tính gốc của tế bào biểu mô màng ối.....	70
<b>3.2. Phân lập, nuôi cấy và bước đầu đánh giá khả năng biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết .....</b>	<b>72</b>
3.2.1. Phân lập tế bào gốc từ màng ối người.....	72

3.2.2. Xác định tính gốc của tế bào phân lập được .....	74
3.2.3. Nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc màng ối .....	75
3.2.4. Bảo quản và phục hồi thành công tế bào gốc màng ối.....	79
3.2.5. Biệt hóa tế bào gốc thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết .....	81
<b>CHƯƠNG 4.....</b>	<b>85</b>
<b>BÀN LUẬN.....</b>	<b>85</b>
<b>4.1. Mô tả đặc điểm cấu trúc vi thể, siêu vi thể màng ối và tế bào gốc màng người.....</b>	<b>85</b>
4.1.1. Đặc điểm hình thái màng ối trên tiêu bản nhuộm HE.....	85
4.1.2. Đặc điểm hình thái siêu vi thể của màng ối quan sát dưới kính hiển vi điện tử .....	91
4.1.3. Xác định đặc tính màng ối và tính gốc của tế bào biểu mô màng ối.....	95
<b>4.2. Phân lập, nuôi cấy và bước đầu đánh giá khả năng biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết .....</b>	<b>98</b>
4.2.1. Phân lập tế bào gốc từ màng ối người.....	98
4.2.2 Xác định tính gốc của tế bào phân lập được .....	102
4.2.3 Nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc màng ối .....	102
4.2.4 Bảo quản và phục hồi thành công tế bào gốc màng ối.....	105
4.2.5. Bước đầu đánh giá khả năng biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết .....	106
<b>KẾT LUẬN .....</b>	<b>111</b>
<b>KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>113</b>
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI LUẬN ÁN .....</b>	<b>114</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>115</b>
<b>PHỤ LỤC .....</b>	<b>132</b>

## DANH MỤC CÁC TỪ VÀ THUẬT NGỮ VIẾT TẮT

TT	Phần viết tắt	Phần viết đầy đủ
1	BMP	Bone Morphogenetic Protein
2	CK	Cytokeratin
3	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
4	DMSO	Dimethyl Sulfoxide
5	ES cells	Embryonic Stem Cells: tế bào gốc phôi
6	FBS	Fetal Bovine Serum: Huyết thanh bào thai bò
7	HAE	Human Amniotic Epithelial Cells
8	HAM	Human Amniotic Mesenchymal Stromal Cells
9	HLA	Human Leukocyte Antigen
10	HNF-4	Hepatocyte Nuclear Factor -4
11	ICAM	Intercellular Adhesion Molecule-1, CD54
12	NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
13	HE	Hematoxilyn/Eosin
14	Oct-4	Octamer-binding transcription factor-4
15	PBS	Phosphate Buffer Salin
16	SEM	Scanning Electron Microscope: kính hiển vi điện tử quét
17	TEM	Transmission Electron Microscopy: kính hiển vi điện tử truyền qua

## DANH MỤC BẢNG

<b>Bảng</b>	<b>Tên bảng</b>	<b>Trang</b>
3.1	Độ dày màng ối gần cuống rốn và xa cuống rốn	54
3.2	Độ dày màng ối gần cuống rốn	55
3.3	Độ dày màng ối xa cuống rốn	56
3.4	Độ dày của lớp tế bào biểu mô và màng đáy	58
3.5	Độ dày của lớp trung mô ở gần và xa cuống rốn	59
3.6	Số lượng tế bào biểu mô ở vị trí gần và xa cuống rốn	60
3.7	Số lượng tế bào trung mô ở vị trí gần và xa cuống rốn	61
3.8	Số lượng tế bào biểu mô và trung mô gần cuống rốn	62
3.9	Số lượng tế bào biểu mô đếm dưới kính hiển vi điện tử	69
4.1	Độ dày màng ối từ các nghiên cứu	86
4.2	Độ dày lớp biểu mô và màng đáy của màng ối	88
4.3	So sánh số lượng tế bào biểu mô và trung mô các nghiên cứu	90

## DANH MỤC BIỂU ĐỒ

<b>Biểu đồ</b>	<b>Tên biểu đồ</b>	<b>Trang</b>
3.1	Biểu hiện mRNA (A) và protein (B) của Insulin.	83



## DANH MỤC HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
1.1	Sơ đồ rau thai và màng ối	3
1.2	Sơ đồ cấu trúc màng ối	5
1.3	Một số tế bào gốc	7
2.1	Bánh rau và màng ối thu nhận được từ sản phụ	29
2.2	Chuẩn bị và thu nhận mẫu màng ối	31
2.3	Bóc tách màng ối và rửa bằng PBS	31
2.4	Màng ối thu nhận được phục vụ cho nghiên cứu	32
2.5	Quy trình phân lập tế bào gốc từ màng ối	41
2.6	Kính hiển vi điện tử quét JSM – 5410LV (JEOL- Nhật Bản)	48
2.7	Kính hiển vi điện tử truyền qua JEM 1400	48
2.8	Một số dụng cụ máy móc phục vụ nghiên cứu	49
3.1	Hình ảnh bánh rau sau khi thu nhận	51
3.2	Hình ảnh màng ối sau khi tách phục vụ nghiên cứu	52
3.3	Cấu trúc màng ối trên tiêu bản nhuộm HE.	52
3.4	Kết quả đo đếm các kết quả tiêu bản HE	53
3.5	Các lớp màng ối tiêu bản nhuộm HE	57
3.6	Hình ảnh lớp biểu mô có nhiều hàng tế bào	59
3.7	Mô hình sắp xếp tế bào biểu mô dạng 1	63
3.8	Mô hình sắp xếp tế bào biểu mô dạng 2	63
3.9	Mô hình sắp xếp tế bào biểu mô dạng 3	64
3.10	Mô hình sắp xếp tế bào biểu mô dạng 4	64
3.11	Một số hình thái tế bào khác thường	65
3.12	Tế bào biểu mô màng ối	66
3.13	Liên kết giữa tế bào biểu mô với màng đáy	66
3.14	Liên kết giữa hai tế bào biểu mô màng ối	67

<b>Hình</b>	<b>Tên hình</b>	<b>Trang</b>
3.15	Hai tế bào biểu mô màng ối có đậm độ điện tử khác nhau	68
3.16	Các vi nhung mao và kênh gian bào	68
3.17	Lớp trung mô và các tế bào trung mô màng ối	69
3.18	Kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch	70
3.19	Kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch	71
3.20	Kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch	71
3.21	Các tế bào thu được sau khi phân lập từ màng ối người	72
3.22	Các tế bào phân lập từ màng ối sau 24h	73
3.23	Các tế bào biểu mô màng ối dưới tác dụng của trypsin	74
3.24	Biểu hiện dấu ấn OCT-4.	75
3.25	Hình ảnh các tế bào gốc tăng sinh sau 24 giờ	76
3.26	Hình ảnh các tế bào gốc tăng sinh sau 48 giờ	77
3.27	Hình ảnh các tế bào gốc tăng sinh sau 72 giờ	78
3.28	Hình ảnh tăng sinh tế bào sau 72h và sau 10 ngày	79
3.29	Hình ảnh tế bào sau 24 giờ sau khi bảo quản và phục hồi	80
3.30	Nhuộm Trypan blue xác định tỷ lệ tế bào sống	80
3.31	Hình ảnh tế bào gốc màng ối người sau 7 ngày nuôi cấy	82

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ những năm 1950 đến nay, chúng ta đã được chứng kiến nhiều thành tựu quan trọng trong nghiên cứu về tế bào gốc và nhân bản cũng như những tranh cãi về tính đạo đức trong nghiên cứu lĩnh vực này. Nghiên cứu về tế bào gốc và nhân bản mang lại cho nhân loại hy vọng chữa được nhiều bệnh mạn tính và nan giải mà hiện nay chưa có biện pháp điều trị hiệu quả.

Tế bào gốc là tế bào nền móng của tất cả các tế bào, mô và cơ quan trong cơ thể, đây là những tế bào chưa biệt hoá có khả năng biệt hoá mạnh thành các dòng tế bào mong muốn trong những môi trường nuôi cấy đặc biệt [1]. Tế bào gốc có nguồn gốc từ nhiều nơi như máu cuống rốn, tuỷ xương, phôi thai, mô của bào thai, tế bào chuyển nhân và màng ối [1], [2], [3]. Từ một loại tế bào gốc có thể biệt hoá thành nhiều loại tế bào chuyên biệt để điều trị cho các bệnh thoái hoá hoặc tổn thương mất tế bào như các bệnh Alzheimer [4], chấn thương tuỷ sống, đột quỵ não [5], [6], nhồi máu cơ tim [7], [8], bỏng và nhiều bệnh khác [3], [9]. Tuy nhiên, việc đi sâu tìm hiểu, nghiên cứu tế bào gốc chỉ mới bắt đầu từ cuối những năm 1990 của thế kỷ XX, nguồn tế bào gốc có những khó khăn về số lượng và qui trình thu thập tế bào.

Ở Việt Nam, nhiều cơ sở y tế đã bắt đầu nghiên cứu ứng dụng tế bào gốc trong điều trị. Tuy nhiên, lĩnh vực này vẫn còn biểu hiện nhiều hạn chế: nguồn tế bào gốc còn hạn chế, các nghiên cứu áp dụng tế bào gốc biệt hóa thành các dòng tế bào áp dụng điều trị còn chưa đạt hiệu quả cao. Thêm nữa, các hướng nghiên cứu về tế bào gốc ở trong nước còn chưa đa dạng, chưa quan tâm nhiều đến những hướng tạo sinh tế bào gốc từ nguồn các tế bào khác nhau. Trong khi đó, nhu cầu điều trị các khuyết hỏng mô và suy chức năng tế bào/cơ quan rất lớn mà triển vọng có thể áp dụng trị liệu tế bào gốc càng là con số lớn hơn.

Hiện nay, khả năng biệt hóa đa tiềm năng của các tế bào có nguồn gốc từ màng ối đã được công bố và thu hút sự chú ý của rất nhiều nhà nghiên cứu như là một nguồn tế bào cho trị liệu ghép tế bào [10]. Các tế bào gốc từ màng ối của người có những ưu điểm rõ rệt sau: chúng có thể biệt hóa thành tất cả ba lớp tế bào mầm; chúng ít có yếu tố sinh miễn dịch và chúng là nguồn rác thải sinh học nên tránh được những tranh cãi liên quan đến việc sử dụng tế bào gốc phôi thai (human ES cell) [11]. Bên cạnh đó, do có thể kéo dài thời gian sử dụng bằng các phương pháp bảo quản như: chiếu xạ, sấy, đông khô hay đông lạnh [12], [13], màng ối hiện nay đã được áp dụng nhiều trong y học như điều trị các tổn thương, che phủ vết mổ tránh nhiễm khuẩn, ghép giác mạc và trong công nghệ tế bào gốc [14], [15]. Tuy nhiên, hiện nay vẫn còn nhiều vấn đề cần nghiên cứu về hiệu quả, cơ chế của những ứng dụng này [16], [17], [18], cũng như khả năng duy trì các đặc tính sinh học lâu dài của màng ối [19].

Trong những năm gần đây, tình trạng bệnh đái tháo đường ngày càng là một vấn đề nổi trội về sức khỏe ở Việt Nam cũng như trên toàn thế giới. Theo Liên đoàn bệnh đái tháo đường quốc tế (IDF), ước tính có 285 triệu người mắc bệnh đái tháo đường vào năm 2009 và đến năm 2017 thì số người mắc ước tính khoảng 415 triệu người. Hướng điều trị bệnh đái tháo đường type I bằng cách thay thế và bổ sung các tế bào tiết insulin mới cho bệnh nhân bằng liệu pháp tế bào gốc đã mở ra một triển vọng tốt và nhiều hứa hẹn cho người bệnh.

Xuất phát từ những thực tiễn đó, đề tài này được tiến hành nhằm những mục tiêu sau:

- 1. Mô tả đặc điểm cấu trúc vi thể, siêu vi thể màng ối và tế bào gốc màng ối người.***
- 2. Phân lập, nuôi cấy và bước đầu đánh giá khả năng biệt hóa tế bào gốc màng ối người thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết.***

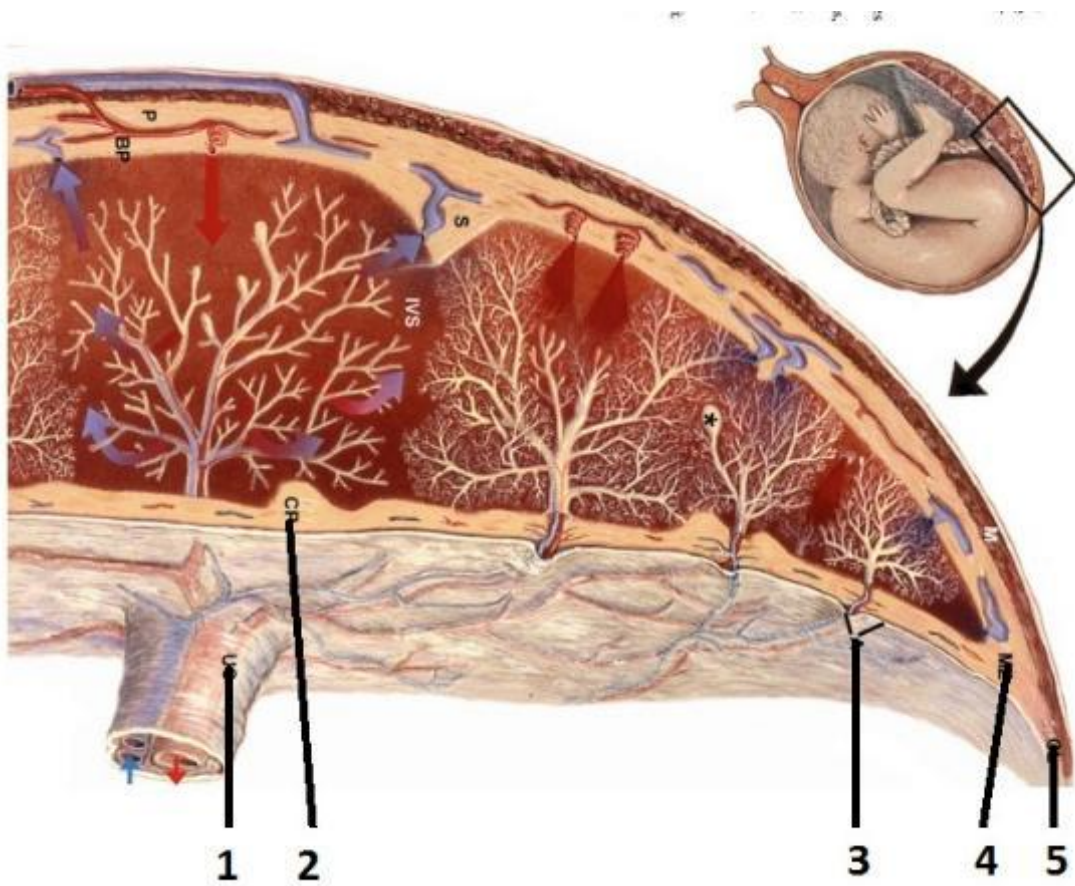
## CHƯƠNG 1

### TỔNG QUAN

#### 1.1. Đặc điểm cấu trúc màng ối

##### 1.1.1. Nguồn gốc màng ối

Màng ối được hình thành từ lá phôi ngoài có nguồn gốc từ khối nội bào. Ở loài người, đến ngày thứ 8 sau thụ tinh, ở cực phôi xuất hiện một khoang nhỏ dần dần lớn lên, tạo thành khoang ối. Những tế bào phủ trần khoang này tạo thành màng ối [20].



*Hình 1.1. Sơ đồ rau thai và màng ối*

1. Cuống rốn, 2: Đĩa đệm, 3: Màng ối, 4: Vùng ranh giới giữa rau thai và màng bào thai, 5: Màng đệm

*Nguồn: theo Kurt Benirschke và CS [21]*

Khoang ối, từ một khoang nhỏ nằm ở mặt lưng phôi (mặt ngoài bì) đến cuối tháng thứ nhất khi phôi đã khép mình trở thành một khoang ngày càng lớn chứa đựng toàn bộ phôi. Trong khoang ối, phôi tắm mình trong nước ối. Còn màng ối được cấu tạo bởi 2 lớp mô có nguồn gốc khác nhau: biểu mô phủ trên mặt có nguồn gốc từ ngoài bì và một lớp trung mô có nguồn gốc từ lá thành trung bì ngoài phôi [20]. Khi phôi tiếp tục lớn lên, khoang ối ngày càng to ra, nước ối ngày càng được tạo ra nhiều, màng ối ngày càng giãn rộng ra tiến sát tới màng đệm. Phần lá thành trung bì ngoài phôi phủ ngoài bì màng ối tới sát nhập vào màng đệm. Vì vậy, khoang ngoài phôi ngày càng hẹp lại và cuối cùng biến mất.

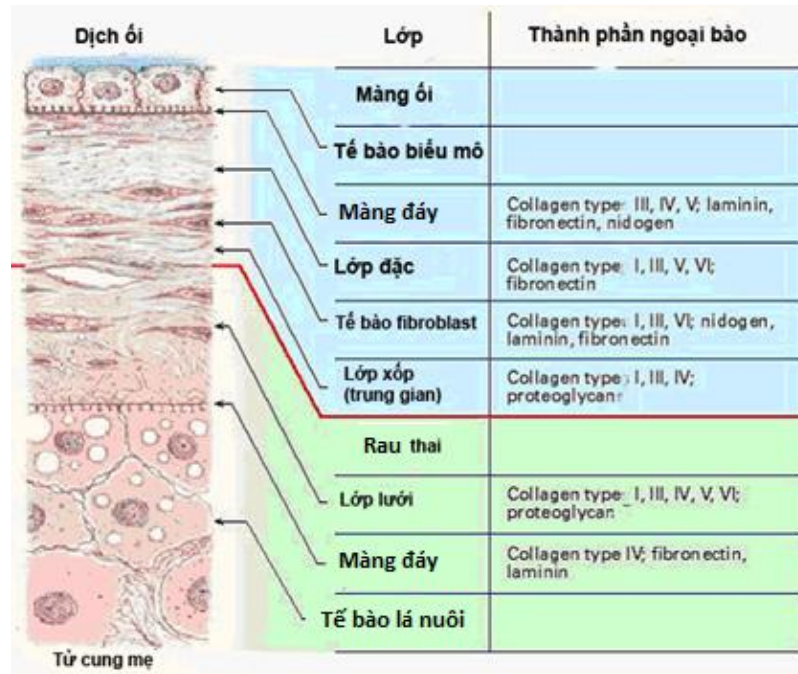
Theo tác giả Đỗ Kính, khi phôi nang bắt đầu làm tổ trong nội mạc tử cung mẹ, về mặt cấu tạo phôi nang được cấu thành từ hai dòng tế bào: đại phôi bào và tiểu phôi bào. Những đại phôi bào sẽ tạo ra phôi chính thức và một số bộ phận phụ của phôi như biểu mô màng ối, các biểu mô túi noãn hoàng và niệu nang [20].

### **1.1.2. Cấu trúc màng ối**

Màng ối được cấu tạo bởi 3 lớp chính: lớp biểu mô đơn (single epithelial layer), màng đáy dày (basement membrane) và lớp vô mạch (avascular mesenchyme) [22]. Màng ối không có thần kinh, mạch máu hay bạch huyết (Hình 1.2), nằm ngay sát khoang ối (amniotic cavity) và các tế bào lá nuôi (trophoblast cell) và có thể dễ dàng phân tách khỏi màng đệm (chorion) nằm ngay dưới đó. Màng ối được nuôi dưỡng bởi chất dinh dưỡng và oxy từ dịch ối bao xung quanh và mạch máu của thai.

Phân tích về mặt mô học, màng ối gồm hai lớp biểu mô đơn và trung mô. Lớp biểu mô đơn là một lớp tế bào biểu mô đơn hình trụ, một phần tự do và

một phần tiếp xúc với màng đáy. Nằm dưới màng đáy là lớp trung mô màng ối gồm các mô liên kết được tạo bởi các tế bào giống nguyên bào sợi.



Hình 1.2. Sơ đồ cấu trúc màng ối

Nguồn theo Parry và CS [23]

Màng ối ở vùng rìa cách cuống rốn khoảng 10 cm được bao phủ bởi 1 lớp biểu mô vuông đơn. Đây là vùng chứa ít tế bào gốc nhưng lại rất tốt khi sử dụng để sản xuất tấm màng ối đông khô trong điều trị. Màng ối lấy từ vùng này có độ đàn hồi cao.

### 1.1.3. Chức năng của màng ối

Màng ối đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển thai nhi và chuyển dạ. Trong khởi điểm và duy trì co thắt tử cung, prostaglandin đóng vai trò cốt yếu. Biểu mô màng ối không chỉ là một trong những nguồn cung cấp prostaglandin, đặc biệt là prostaglandin E2 [24], mà nó còn tạo ra các enzym sinh tổng hợp prostaglandin (prostaglandin - biosynthesis enzyme) ví dụ như phospholipase, prostaglandin synthase và cyclooxygenase. Hơn nữa, các

enzyme này được điều hòa bởi human chorionic gonadotropin (hCG), các thụ cảm thể của chúng cũng tìm thấy trong màng biểu mô màng ối. Biểu mô màng ối có mức độ hoạt động chuyển hóa cao trong quá trình thai nghén và nó có chức năng điều hòa pH của dịch ối, giữ nó ở trạng thái hằng định là khoảng 7,1.

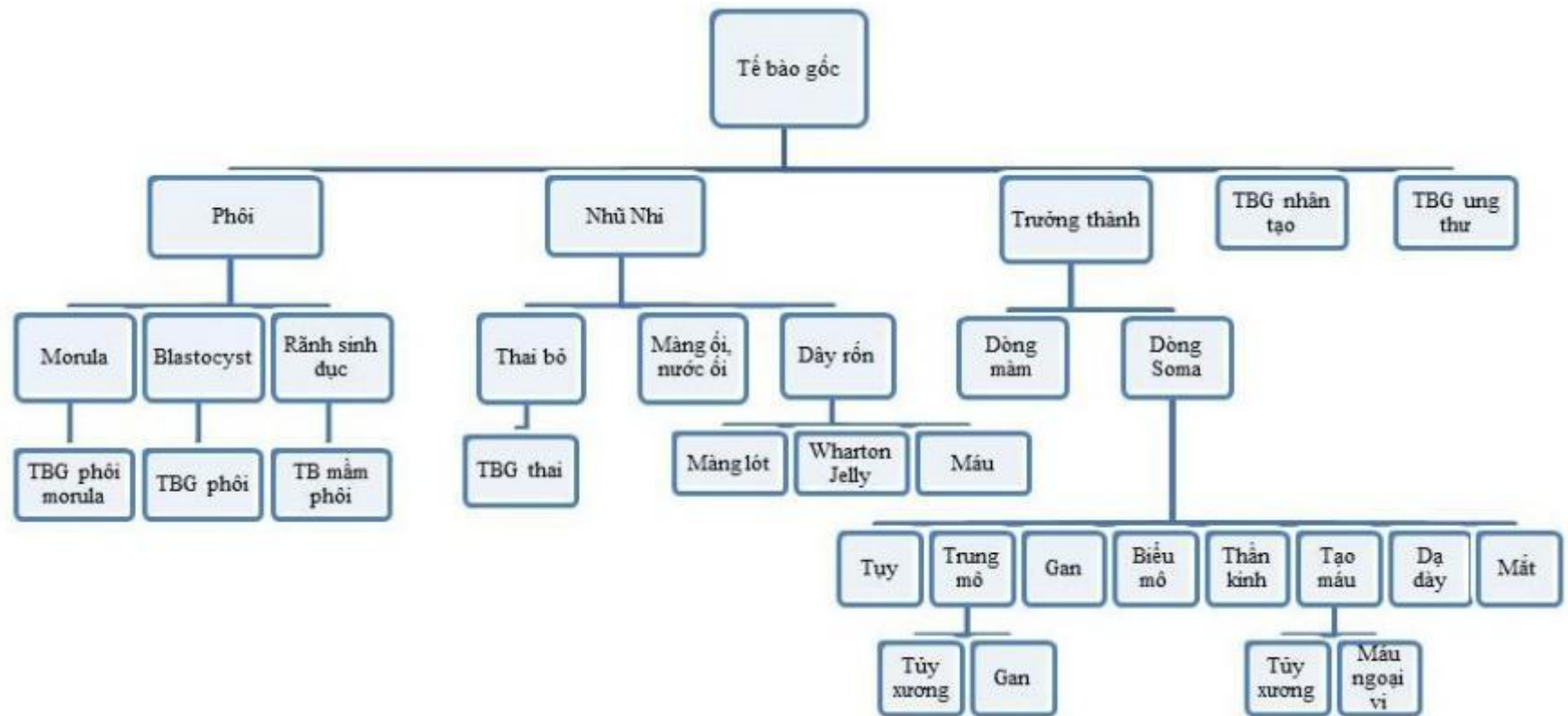
Laminin là thành phần chính của màng đáy tế bào gốc màng ối tham gia vào quá trình biệt hóa tế bào, duy trì hình dạng và hoạt động tế bào, duy trì kiểu cấu trúc mô đồng thời thúc đẩy sự tồn tại của các mô thông qua các thụ cảm thể của tế bào như integrin và dystroglycan [25]. Vì vậy, xác định đặc điểm các chuỗi dưới đơn vị của laminin ở màng ối người là rất quan trọng. Laminin có nhiều đồng dạng khác nhau bao gồm các chuỗi  $\alpha$ -,  $\beta$ -, và  $\gamma$ - mà mỗi chuỗi này có nhiều dạng chuỗi dưới đơn vị :  $\alpha 1-5$ ,  $\beta 1-3$ ,  $\gamma 1-3$  [24]. Laminin được tạo ra và bài tiết từ ngay biểu mô nằm trên màng đáy vì vậy biểu hiện gen của các chuỗi dưới đơn vị laminin trong các tế bào biểu mô màng ối (human amniotic epithelial cells - HAE) được phát hiện bằng phản ứng reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

## **1.2. Tế bào gốc màng ối**

### **1.2.1. Một số khái niệm tế bào gốc**

Tế bào gốc (TBG) là các tế bào chưa có chức năng chuyên biệt, có tiềm năng phát triển thành nhiều loại tế bào khác nhau (hình 1.1) và có khả năng tự thay mới (selfrenewal). Các tế bào này là các tế bào chưa biệt hóa (unspecialized cell) hoặc đang ở những giai đoạn khác nhau nhưng chưa kết thúc quá trình biệt hóa (tế bào vạn tiềm năng, tế bào đa tiềm năng, tế bào ít tiềm năng, tế bào đơn tiềm năng), do vậy chúng có thể đi theo nhiều hướng khác nhau để tạo thành nhiều loại tế bào khác nhau [26].





Hình 1.3. Một số tế bào gốc  
 Nguồn: Phan Kim Ngọc và CS[26]

**+ Tế bào gốc phôi (*embryonic stem cells - ESCs*) và tế bào mầm phôi (*embryonic germ cells*)**

Tế bào gốc phôi là các tế bào gốc vạn năng được lấy từ phôi giai đoạn sớm (4 - 7 ngày tuổi). Ở giai đoạn này phôi có hình cầu và được gọi là phôi túi (blastocyst). Blastocyst có một nhóm có khoảng 30 tế bào vạn năng nằm lệch về một cực gọi là khối tế bào bên trong (inner cell mass). Dùng một loại enzyme đặc biệt để phân tách các tế bào của khối này sẽ thu được các tế bào gốc phôi. Tế bào mầm phôi là các tế bào mầm nguyên thủy có tính vạn năng. Đó là các tế bào sẽ hình thành nên giao tử (trứng và tinh trùng) ở người trưởng thành. Các tế bào mầm nguyên thủy này được phân lập từ phôi 5-9 tuần tuổi hoặc từ thai nhi. So với tế bào gốc phôi, các tế bào mầm phôi khó duy trì dài hạn hơn trong nuôi cấy nhân tạo do chúng ở giai đoạn biệt hóa cao hơn.

**+ Tế bào gốc thai (*foetal stem cells*)**

Là các tế bào vạn năng hoặc đa năng được phân lập từ tổ chức thai sau nạo phá thai. Nhiều người cho rằng, tế bào gốc thai thuộc loại tế bào gốc trưởng thành ở giai đoạn biệt hóa thấp. Việc nghiên cứu và sử dụng các tế bào này có ảnh hưởng khá nặng nề về đạo đức nghiên cứu, nên thường chỉ giới hạn vào mục đích tìm hiểu quá trình phát triển phôi thai.

**+ Tế bào gốc nhũ nhi (*infant stem cell*)**

Tế bào gốc nhũ nhi được phân lập từ trẻ sơ sinh hoặc các phần phụ của thai như dây rốn, nhau thai, màng ối, dịch ối... Các tế bào này thường là đa tiềm năng hoặc vạn tiềm năng. Tùy theo cách thu thập có thể ảnh hưởng hoặc không ảnh hưởng đến đối tượng cho tế bào. Chọc dịch ối trước khi sinh hoặc chọc tĩnh mạch dây rốn trước sinh để lấy tế bào gốc của em bé có trong dịch ối hoặc trong máu dây rốn có những nguy cơ của các kỹ thuật này là nhiễm trùng, chảy máu, sảy thai hoặc đẻ non... Tuy nhiên, lấy máu dây rốn từ dây rốn hoặc

bánh rau sau khi đã “mẹ tròn con vuông” vừa được tế bào có thành phần giống hệt máu tĩnh mạch của trẻ sơ sinh lại không ảnh hưởng gì đến em bé. Tương tự như vậy, lấy các tế bào từ mô dây rốn và bánh rau sau khi sinh cũng không ảnh hưởng đến sức khỏe của em bé vì các thành phần này là sản phẩm bỏ đi sau khi sinh.

**+ Tế bào gốc trưởng thành (*adult stem cells / somatic stem cells*)**

Còn gọi là tế bào gốc thân, là các tế bào chưa biệt hóa được tìm thấy với một số lượng ít trong các mô của người trưởng thành (máu ngoại vi, mô não, mô da, mô cơ...). Tuy nhiên, cũng có thể tìm thấy ở trẻ em, thai nhi và có thể tách chiết từ máu cuống rốn. Trong cơ thể, vai trò chủ yếu của các tế bào gốc trưởng thành là duy trì và sửa chữa tổ chức mà ở đó chúng được tìm ra.

Bình thường, các tế bào gốc trưởng thành được cho là có tính đa năng, chúng có thể phát triển thành nhóm các tế bào có quan hệ mật thiết với nhau trong cùng một tổ chức. Ví dụ tế bào gốc tạo máu có khả năng hình thành nên tất cả các loại tế bào máu khác nhau bao gồm hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, lympho.... Tuy nhiên, các bằng chứng gần đây cho thấy một số loại tế bào gốc trưởng thành còn có thể có tính vạn năng, hoặc ít nhất có khả năng biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác nhau (tức là có tính mềm dẻo - plasticity).

**+ Tế bào giống tế bào gốc phôi (*embryonic - like stem cell*) hay tế bào gốc vạn năng cảm ứng (*induced pluripotent stem cell - iPS*)**

Được tạo ra bằng cách cảm ứng các tế bào đã biệt hoá của cơ thể trở lại trạng thái giống như tế bào gốc phôi hay còn gọi là tế bào gốc nhân tạo. Đây là kỹ thuật chủ yếu thao tác trong phòng thí nghiệm, người cho tế bào để cảm ứng (ví dụ tế bào da) bị ảnh hưởng rất ít, có thể là sinh thiết để lấy một miếng da nhỏ

### + *Tế bào gốc ung thư (cancer stem cell)*

Được phân lập từ các khối u, các tế bào gốc này được coi là nguồn gốc của khối u. Trong chiến lược trị liệu miễn dịch chống ung thư, tế bào này đang được chú ý để làm vaccine chống ung thư với hy vọng điều trị được “tận gốc” ung thư. Các tế bào gốc ung thư từ khối u của chính bệnh nhân hoặc khối u cùng loại của bệnh nhân khác được dùng làm vaccine kích thích hệ thống miễn dịch của bệnh nhân chống lại các thành phần của khối u.

## 1.2.2. Các đặc điểm màng ối liên quan công nghệ tế bào gốc

### 1.2.2.1. *Tính vạn tiềm năng (pluripotent)*

Trong lĩnh vực biệt hóa tế bào gốc, các nhà nghiên cứu quan tâm đến vấn đề liệu các tế bào gốc màng ối có thuộc tính vạn tiềm năng (pluripotent) hay không. Trong quá trình phát triển, khối nội bào của túi phôi, phần tạo nên các tế bào gốc dòng phôi (embryonic stem cells - ES cells), sẽ phát triển thành cả ngoại bì lẫn nội bì. Ngoại bì phôi sẽ phát triển thành thai nhi còn nội bì phôi sẽ hình thành túi noãn hoàng. Từ ngoại bì phôi, lớp biểu mô màng ối sẽ được hình thành vào ngày thứ 8 sau khi thụ tinh, trong khi các tế bào trung mô (lớp trung mô màng ối) được hình thành từ lá trung mô ngoài phôi (extraembryonic mesoderm) của dải nguyên thủy (primitive streak) [27]. Một điều cần lưu ý là ngoại bì phôi cũng có thể tạo nên tất cả các lớp mầm của phôi, đồng thời lớp biểu mô màng ối được hình thành trước phôi vị. Mặt khác, chúng ta cũng cần lưu ý các tế bào ung thư phôi vạn tiềm năng (pluripotent embryonal carcinoma cells) chỉ có thể được hình thành trước khi có phôi vị. Điều này cho thấy tầm quan trọng của sự hình thành phôi vị trong quá trình biệt hóa và chuyên biệt của tế bào. Chính vì vậy, chúng ta có thể kỳ vọng tính mềm dẻo của các tế bào trong tiền phôi vị cũng xuất hiện ở các tế bào lớp biểu mô màng ối [28]

Bên cạnh đó, đã có một số báo cáo chứng minh rằng cả hai lớp tế bào biểu mô và trung mô màng ối biểu hiện một số marker tế bào gốc như OCT-4 (octamer - binding transcription factor), nanog, GATA-4, HNF-3 $\beta$  (hepatocyte nuclear factor - 3 $\beta$ ) và nestin [28], [29]. Mà như chúng ta đã biết, Oct-4 là marker biểu hiện đặc trưng cho các tế bào gốc phôi và các tế bào mầm, GATA-4 là marker để xác định phôi và các tạng nội bì phôi, HNF-3 $\beta$  là marker để xác định nội bì phôi, nestin một dạng protein trung gian biểu hiện đặc trưng cho các tế bào gốc thần kinh. Các vấn đề trên đã gợi ý cho chúng ta thấy rằng cả các tế bào của các lớp biểu mô và trung mô màng ối có đặc tính vạn năng [28], [29], [30].

#### ***1.2.2.2. Tính chống viêm và sinh miễn dịch thấp***

Màng ối và các tế bào gốc màng ối được xem như là những mô hoặc tế bào thích hợp để ghép tự thân, ý kiến này căn cứ vào tính kháng viêm và sinh miễn dịch thấp. Có rất nhiều bằng chứng chứng minh cho quan điểm này dựa vào các nghiên cứu đã thực hiện và được đúc kết lại.

Về tính kháng viêm, Hao và cộng sự đã nghiên cứu và báo cáo rằng cả hai lớp tế bào biểu mô và trung mô màng ối biểu hiện các protein kháng tạo mạch và kháng viêm như thụ thể đối kháng interleukin-1 (IL-1), yếu tố ức chế mô TIMPs-1,-2,-3,-4 (tissue inhibitors of metalloproteinase) và IL-10 [31]. Khối chất nền màng ối (Amniotic membrane stromal matrix) ức chế rõ rệt quá trình điều chỉnh tổng hợp polysaccharide của cả IL-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  ở những tế bào rìa biểu mô giác mạc người khi được ghép [32]. Hơn nữa, lớp nền màng ối cũng ức chế tổng hợp DNA và biệt hóa kế tiếp của nguyên bào sợi cơ (myofibroblasts) của giác mạc thông qua việc ức chế hệ thống tín hiệu TGF- $\beta$ . Các hoạt động này không chỉ giải thích cho việc chống sẹo hóa (antiscarring)

của màng ối dùng để cấy ghép mà còn giải thích sự liền vết thương của thai nhi không để lại sẹo [33].

Các tế bào biểu mô màng ối cũng biểu hiện mRNA của yếu tố hoại tử u TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor), Fas ligand (protein chuyển màng type-II thuộc họ TNF), TRAIL (TNF - related apoptosis - inducing ligand) TGF- $\beta$ , và yếu tố ức chế chuyển đổi của đại thực bào (MIF - macrophage migration-inhibitory factor). Phần nổi của dịch chiết sau nuôi cấy các tế bào biểu mô màng ối có khả năng ức chế quá trình hoạt hóa của bạch cầu đa nhân trung tính và các đại thực bào thành các protein 2 đối với marker gây viêm MIP-2 (macrophage inflammatory protein 2), làm giảm quá trình sinh sản các tế bào T và B sau kích thích phân bào và tăng quá trình chết rụng (apoptosis) các tế bào T và B [34], và cũng ngăn chặn quá trình tân tạo mạch ở vùng rìa biểu mô và quá trình chuyển đổi của phức hợp tương thích mô chính loại II (major histocompatibility complex - MHC class II) và các tế bào trình diện kháng nguyên (antigen-presenting cells - APCs) ở vùng giác mạc chuột bị gây bỏng [35]. Về thuộc tính kháng khuẩn, màng ối người làm giảm số lượng vi khuẩn và thúc đẩy quá trình liền vết thương [36].

Về tính chất sinh miễn dịch thấp, theo Akle và CS, không quan sát được các dấu hiệu lâm sàng của tình trạng thải loại cấp mảnh ghép ở các mảnh màng ối được ghép vào người tình nguyện [37]. Mức độ trình diện của phức hợp tương thích mô chính lớp I vẫn còn là vấn đề tranh luận giữa các nhà khoa học. Mặc dù có các báo cáo rằng HLA-A, -B, -C và -DR không được phát hiện trong biểu mô màng ối được nuôi cấy [38], sự phát hiện kháng nguyên lớp I trong hầu hết tất cả các tế bào ở màng ối cũng được công bố sau đó [39], [40]. Ngược lại, kháng nguyên lớp II cũng được biểu hiện không chỉ trong một số fibroblasts ở màng ối của người [40]. Nhiều nghiên cứu kiểm tra thấy hiện tượng chết của mảnh ghép màng ối. Wang và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu ghép màng ối

đồng loại ở chuột (allogeneic GFP+ mouse amniotic membrane grafts) vào mắt [41], Kubo và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu màng ối đồng dị loại ở mắt chuột [40]. Kết quả từ những nghiên cứu này cho thấy khả năng tồn tại của các tế bào biểu mô màng ối phụ thuộc vào vị trí ghép. Ví dụ, mảnh ghép ở tiền phòng hay trong giác mạc tồn tại dài hơn ghép ở bề mặt nhãn cầu. Các tế bào biểu mô màng ối khi ghép vào bề mặt nhãn cầu sẽ mất đi khả năng sống vì vậy không trình diện đủ kháng nguyên đối với các tế bào CD4+, CD8 + và T [41]. Hơn nữa, từ chỗ quan sát các tế bào màng ối biến mất không có phản ứng thải ghép, các tác giả ước đoán rằng sự tồn tại ngắn của các tế bào biểu mô có nguồn gốc từ màng ối cho trên bề mặt nhãn cầu có thể do quá trình chết theo chương trình của tế bào (apoptosis) [40], [41]. Thực tế, các báo cáo đã mô tả cả tế bào biểu mô và trung mô màng ối đều có biểu hiện Fas ligand, và có thể dễ dàng được giải phóng từ các tế bào màng ối bị chết theo chương trình như các tế bào hòa tan và có thể tạo ra một hiệu quả ức chế miễn dịch [34], [40].

Kháng nguyên HLA-G không phân lớp có nguồn gốc bào thai (class Ib antigen) cũng được biểu hiện trong màng ối của người [39], [40]. Do các phân tử HLA-G có tính đa hình thấp so với các kháng nguyên lớp Ia, sự xâm nhập chống lại thai nhi không dễ dàng được khởi phát do biểu hiện của HLA-G trong sự tương tác giữa mẹ và thai nhi. Kubo và cộng sự công bố biểu hiện HLA-G trong màng ối ám chỉ hai khả năng có thể đối với hệ thống miễn dịch của vật chủ. Đầu tiên, HLA-G có thể đóng vai trò là một peptide tolerogenic và các lymphocyte chủ hoặc các tế bào dendritic có thể bị bất hoạt do sự gắn kết của HLA-G với các thụ thể ức chế. Sau đó, HLA-G có thể được nhận diện bởi các tế bào T do CD8 có thể gắn vào HLA-G và những tế bào này có thể có chức năng tiêu diệt vi khuẩn [40]. Biểu hiện của các yếu tố ức chế miễn dịch hay điều hòa miễn dịch có thể giải thích được một phần. Vì vậy, vấn đề của yếu tố thai ghép có thể khắc phục bằng cách sử dụng màng ối.

Thời gian tồn tại của mảnh ghép ở chuột sau khi đã trải qua nhiều lần ghép mô ngắn hơn đáng kể so với nhóm bình thường trong nghiên cứu của Wang và CS, điều này gợi ý rằng ghép màng ối tươi dị loại ở chuột đã tạo ra các sản phẩm sinh miễn dịch [41]. Tuy nhiên trong điều trị lâm sàng nguy cơ sinh miễn dịch phụ thuộc vào nơi ghép và sự thải loại xảy ra sau khi lặp lại ghép màng ối từ cùng nguồn cho. Vì vậy, việc sử dụng màng ối và các tế bào màng ối được xem như rất phù hợp cho ghép do đặc tính chống viêm và sinh miễn dịch thấp.

### ***1.2.2.3. Không gây tạo khối u***

Không có bằng chứng cho thấy tạo khối u khi ghép các tế bào được phân lập từ màng ối vào người tình nguyện nhằm đánh giá tình trạng sinh miễn dịch (immunogenicity) hoặc ghép vào các bệnh nhân bị bệnh rối loạn tích đọng ở lysosome (lysosomal storage diseases - LSD) [37], [42]. Tuy nhiên, hiện tượng thể khảm 3 nhiễm sắc thể (trisomy mosaicism) trong màng ối cũng đã được công bố, đặc biệt tế bào biểu mô màng ối. Kết quả nghiên cứu của Robinson và CS cho thấy 16/33 trường hợp (48%) được chẩn đoán là thể khảm tiền sinh 3 nhiễm sắc thể (trisomy) được khẳng định bằng cách phân tích màng ối ở mức độ phân tử, mặc dù hiện tượng trisomy không quan sát được ở các mô thai nhi và dịch ối [43].

### ***1.2.2.4. Vấn đề đạo đức trong sử dụng***

Do màng ối được bỏ đi sau khi sinh nên nó dễ dàng thu nhận mà không ảnh hưởng đến người mẹ hay đứa trẻ và vì vậy khắc phục được vấn đề đạo đức liên quan đến các tế bào ES. Tuy nhiên, vẫn còn vấn đề trong sở hữu của người mẹ. Vì vậy, sử dụng màng ối ở người phải được cơ quan về y đạo đức của các viện nghiên cứu cho phép thông tin cho người mẹ và được người mẹ chấp thuận.



### 1.2.3. Khả năng biệt hóa của tế bào gốc màng ối

#### 1.2.3.1. Biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào thần kinh

Cả tế bào HAE và HAM đều có những đặc tính của các tế bào tiền thân kinh. Một số dấu ấn sự biệt hóa của não bộ, neuron và tế bào thần kinh đệm đều xuất hiện ở các tế bào HAE như tổng hợp và phóng thích acetylcholine [44], catecholamines, dopamine [45], neurotrophic factors [46], activin và noggin [47] đã được ghi nhận.

Các tế bào HAM cũng biểu hiện các dấu ấn của các tế bào tiền thân kinh đệm. Khi các tế bào HAM được biệt hóa hướng thần kinh, thân của các tế bào này mở rộng thành các tế bào lưỡng hoặc đa cực. Các tế bào HAM khi mới được phân lập dù chưa biệt hóa đã có biểu hiện Nestin và Musashi 1 và tăng lên nhẹ sau khi sử dụng các yếu tố cảm ứng biệt hóa thần kinh. Sau đó, các nghiên cứu khác cũng đưa ra nhận định rằng các tế bào HAM mặc dù chưa biệt hóa đã là môi cho quá trình biệt hóa thần kinh [48], [49].

Một số nghiên cứu khi cấy các tế bào HAE vào nội sọ để điều trị bệnh Parkinson ở chuột cho thấy rằng các tế bào HAE có những ưu điểm trong điều trị bệnh Parkinson, bởi vì chúng có thể tổng hợp và phóng thích catecholamine và các yếu tố dinh dưỡng thần kinh như yếu tố tăng trưởng thần kinh, neurotrophin-3, và yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não [45], [46].

Gần đây hơn, Yan và CS đã công bố những thành công ban đầu trong việc sử dụng các tế bào gốc màng ối trong điều trị chấn thương sọ não. Sau khi ghép, các tế bào gốc này đã tăng sinh và biệt hóa thành các neuron và các tế bào thần kinh đệm. Các tế bào ghép này đã giải phóng GDNF có khả năng phòng các tổn thương thứ phát cho các tế bào thần kinh, đồng thời cải thiện nhận thức của bệnh nhân. Kết quả nghiên cứu của Yan và CS cũng cho thấy điều trị bằng các

tế bào gốc màng ối đã biệt hóa thành tế bào gốc thần kinh hiệu quả hơn các tế bào gốc chưa biệt hóa [50].

### ***1.2.3.2. Biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào biểu bì da (keratinocytes)***

Da động vật có vú là một tổ chức đặc biệt bao gồm những quần thể tế bào gốc biểu bì. Chúng có khả năng tăng sinh mạnh trước khi biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác của biểu bì đồng thời luôn tồn tại một nhóm tế bào có khả năng tăng sinh trên màng đáy.

Rất nhiều các sản phẩm da nhân tạo được ứng dụng trong điều trị vết thương, vết bỏng nhưng nó vẫn không được đưa vào sử dụng thường quy vì giá thành cao, hiệu quả điều trị thấp và đặc biệt không chứa các thành phần phụ của da như nang lông, tuyến mồ hôi, tuyến bã... Tế bào gốc dựa trên những phát hiện của Ernest A. McCulloch và James E. Till [51], [52] là các tế bào có khả năng tự làm mới và có thể biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác nhau trong đó có tế bào biểu bì có thể giúp chế tạo da nhân tạo in vitro. Nguồn tế bào gốc quan trọng được sử dụng trong y học tái tạo là các tế bào gốc phôi, tế bào gốc trưởng thành và gần đây là các tế bào gốc màng ối.

Năm 1996, Bagutti và CS đã thành công trong việc biệt hóa tế bào gốc phôi thành tế bào có biểu hiện marker của tế bào biểu bì [53]. Trên cơ sở đó, một số tác giả đã thành công trong biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tổ chức giống biểu bì [54].

Khả năng biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào biểu bì đem đến hy vọng sản xuất các tế bào giống tế bào gốc da đa tiềm năng khu trú ở trung bì, gốc lông và tuyến bã cho phép da tự làm mới lớp biểu mô phủ và các phần phụ của chúng. Những tế bào biểu bì có khả năng tự làm mới cao sẽ có thể là nguồn tế bào phục vụ trong y học tái tạo đặc biệt trong lĩnh vực điều trị bỏng.

### ***1.2.3.3. Biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào gan (Hepatocytes)***

Để điều trị các bệnh gan nặng như viêm gan cấp tính và suy gan nặng, một số tác giả thực hiện cấy ghép tế bào gan. Tuy nhiên, vẫn tồn tại rất nhiều vấn đề về cách tiếp cận này, đặc biệt là liên quan đến người cho tế bào. Năm 2000, các tế bào gốc gan đã được tìm ra từ quá trình phát triển của gan chuột, và tế bào gốc gan được đề xuất như là một nguồn tế bào cấy ghép. Các tế bào không thuộc dòng tế bào gan có thể biệt hóa thành tế bào gan cũng đã được đề xuất cho việc cấy ghép. Các nguồn tế bào từ tủy xương cho thấy có thể biệt hóa thành tế bào gan cả ở in vivo và in vitro trên chuột, cũng như các tế bào gốc phôi chuột [55], [56]. Ở người, tế bào gốc phôi thai, các tế bào nguồn gốc tủy xương và các tế bào máu dây rốn cũng đã được xác định là nguồn cho có thể cấy ghép [57]. Tuy nhiên, khả năng biệt hóa của các tế bào gốc tủy xương thành tế bào gan thấp nên việc ứng dụng có nhiều hạn chế.

Marongiu và CS đã báo cáo khả năng biệt hóa hAEC thành các tế bào có các tính năng của tế bào gan trong điều kiện in-vitro. Tiến hành thực nghiệm trong các điều kiện khác nhau, Marongiu và CS cho rằng phương pháp hiệu quả nhất là đồng nuôi cấy với tế bào gan, hoặc nuôi cấy trong môi trường ngoại bào có nguồn gốc gan (L-ECM). Các tác giả cũng đã tiến hành biệt hóa hAEC thành các tế bào gan bằng cách sử dụng các hỗn hợp khác nhau của các yếu tố tăng trưởng, cytokines và hormone. Tuy nhiên, Marongiu và CS cho rằng sự tương tác trực tiếp với các tế bào gan chuột xung quanh hoặc L-ECM là điều kiện rất quan trọng để biệt hóa các hAEC thành tế bào giống tế bào gan [58].

Các tế bào HAE biểu hiện albumin,  $\alpha$ 1-antitrypsin ( $\alpha$ 1-AT), cytokeratin 18, phosphoenolpyruvate cacboxykinaza và đặc biệt là cytochrome P450. Sau khi nuôi cấy HAE, tế bào bắt đầu xuất hiện  $\alpha$ -fetoprotein ( $\alpha$ -FP), transthyretin, tyrosine aminotransferase (TAT) và CYP-450 [57]. Ngoài ra, albumin và

glycogen được phát hiện bằng hóa miễn dịch ở hầu hết các tế bào HAE nuôi cấy cũng phù hợp với các nghiên cứu trước cho rằng sản xuất albumin cũng đã được quan sát thấy trong một nửa các tế bào màng ối chuột.

Điều đó chứng tỏ rằng có thể dùng tế bào gốc màng ối để tái sinh gan.

#### ***1.2.3.4. Biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào cơ tim***

Tạo hình cơ tim mức độ tế bào là phương pháp chính để điều trị bệnh thiếu máu cục bộ, hậu quả của suy tim do cơ tim của người trưởng thành không được tái tạo đầy đủ. Việc tìm kiếm nguồn tế bào phù hợp hiện vẫn còn đang được nghiên cứu từ các tế bào cơ tim ở tâm thất, hay nguyên bào cơ ở tủy xương đến tế bào gốc phôi hay tế bào gốc trưởng thành. Mỗi loại nguồn tế bào dù có những thuận lợi nhất định nhưng vẫn còn tồn tại các vấn đề liên quan như: số lượng tế bào, hiện tượng miễn dịch thải ghép, khả năng sinh u cũng như các vấn đề về đạo đức [59].

Kết quả phân tích RT-PCR từ các tế bào HAM được phân lập cho thấy có sự hiện diện của các yếu tố phiên mã đặc hiệu của tim như GATA-4, các gen đặc hiệu của tim như chuỗi myosin nhẹ (MLC)-2a, MLC-2v, cTnI, và cTnT; và kênh calci type L đặc hiệu của tim  $\alpha$ -subunits ( $\alpha 1c$ ) và kênh kali gắn bên ngoài (Kv4.3) [60]. Sau khi kích thích bằng yếu tố phát triển nguyên bào sợi hoặc activin A, các tế bào HAM biểu hiện Nkx2.5, một yếu tố phiên mã đặc hiệu của tim và ANP (atrial natriuretic peptid) một marker đặc hiệu của tim. Nkx2.5 được biểu hiện sớm trong quá trình phát triển của tim và có tác dụng điều hòa một vài yếu tố phiên mã khác không chỉ trong giai đoạn phát triển mà cả trong giai đoạn muộn của quá trình biệt hóa thành tế bào cơ tim [61]. Nkx2.5 cũng có thể hoạt hóa vận chuyển gen ANF hiệp đồng với yếu tố phiên mã GATA-4 [62]. Hơn nữa, gen đặc hiệu của tim, chuỗi myosin nặng  $\alpha$  ( $\alpha$ -myosin heavy chain -  $\alpha$ -MHC) cũng được biểu hiện sau khi kích thích bằng activin A

[63]. Bên cạnh đó, từ các nghiên cứu của Kehat và CS, Mummery và CS cho thấy các gen ANP, MLC-2a, MLC-2v, GATA-4,  $\alpha$ -MHC, Nkx2.5, cTnT, cTnI,  $\alpha$ 1c, và Kv4.3 cũng được biểu hiện từ các tế bào cơ tim có nguồn gốc phôi người [64], [65].

Zhao và CS cũng xác nhận rằng các tế bào HAM có cả khả năng tích hợp vào tế bào cơ tim lần biệt hóa thành các tế bào giống tế bào cơ tim. Trong thực nghiệm ghép khác loài ở chuột, các tế bào HAM có thể tồn tại đến 2 tháng ở các tổ chức sẹo của tim tổn thương và biệt hóa thành các tế bào giống tế bào cơ tim. Điều này chứng tỏ rằng các yếu tố nội sinh có thể biệt hóa các tế bào HAM thành các tế bào cơ tim [60].

Tóm lại, các tế bào HAM có những đặc điểm như các tế bào cơ tim và có khả năng là một nguồn tế bào cho thích hợp để tạo hình cơ tim mức độ tế bào, mặc dù các thuộc tính và tiềm năng của chúng chưa được tìm hiểu hoàn toàn.

#### ***1.2.3.5. Biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào sụn (Chondrocytes)***

Cũng đã có nhiều công trình mô tả, phân tích tế bào gốc màng ối HAM và tiềm năng cho việc điều trị các tổn thương ở sụn [66], [67]. Tế bào HAM liên quan đến gen, bao gồm Sox-9, Sox-5, Sox-6, protein bone morphogenetic (BMP) -2 và -4, cũng như thụ thể BMP. Trong thí nghiệm in vitro, collagen loại II và aggrecan được biểu hiện sau khi cho chất cảm ứng của chondrogenesis với BMP-2. Trong điều kiện in vitro, các tế bào HAM được cấy vào sụn mô của chuột với BMP-2 hoặc cấy ghép với giá đỡ collagen vào vị trí bị khuyết tật, tạo ra xương của chuột dựa vào thay đổi hình thái với sự lắng đọng của collagen loại II. Những kết quả này cho thấy, tế bào HAM có tiềm năng biệt hóa thành tế bào sụn trong in vitro và in vivo, có tiềm năng điều trị cho bệnh về sụn hoặc sụn bị tổn thương [68].

### ***1.2.3.6. Sử dụng tấm tế bào gốc màng ối người trong lĩnh vực kỹ thuật tái tạo mô***

Thông thường, cấy ghép tế bào được thực hiện bằng tiêm tế bào. Tuy nhiên, trực tiếp tiêm tế bào phân tách khó kiểm soát kích thước của vị trí ghép và chức năng của các tế bào biệt hóa, do đó nó không đủ để thay thế khuyết tật bẩm sinh. Chính vì vậy các tấm tế bào đã được nghiên cứu ứng dụng để khắc phục vấn đề này. Một số tác giả sử dụng poly-N-iso-propylacrylamide (PNIPAM) như một chất liệu che phủ bề mặt, tuy nhiên, tính độc tế bào của PNIPAM không thể loại bỏ hoàn toàn [69], [70]. Để phát triển tạo bề mặt môi trường mới không độc, đáp ứng co giãn, đàn hồi theo nhiệt độ người ta có thể sử dụng protein dạng như polymer, không bị vi khuẩn làm thối rữa [71]. Polymer có thể được tiêm vào mô và biến mất trong vòng 2 tuần mà không để lại di chứng. Có tác giả dùng Matrigel, một dạng sản phẩm nhân tạo tương tự như chất nền ngoại bào trong tổ chức giúp cho tế bào HAE hoặc HAM có thể tồn tại, di chuyển và tăng sinh nhanh chóng trên môi trường mới che phủ bề mặt mô ở 37°C. Đồng thời khi giảm nhiệt độ đến 4°C, lớp phủ bề mặt của môi trường tan chảy làm tế bào HAE hoặc HAM có thể tách ra từ bề mặt [72], [73]. Để hỗ trợ hạn chế này, có tác giả đã sử dụng màng polyvinylidene difluoride (PVDF), các tế bào trên tấm này có thể phục hồi được tăng sinh nhanh chóng trên bề mặt môi trường [74], [75]. Trong hệ thống này, ngược lại với enzym thủy phân, chỉ có sự tương tác giữa protein bám dính và bề mặt vật liệu bị phá vỡ. Các tế bào này như một tấm liên tục với màng protein và bám dính nguyên vẹn protein khi nhiệt độ giảm xuống. Kỹ thuật mới về tạo tấm tế bào sẽ hữu ích trong kỹ thuật mô cũng như trong cấy ghép tế bào.

### **1.3. Một số nghiên cứu tế bào gốc**

#### **1.3.1. Tế bào gốc và bệnh đái tháo đường**

Hiện nay, có rất nhiều phương pháp điều trị thông thường đối với bệnh tiểu đường chẳng hạn như tiêm insulin và uống thuốc hạ đường huyết. Nhiều phương pháp điều trị có thể làm giảm hoặc trì hoãn sự khởi phát và phát triển của bệnh tiểu đường và các biến chứng liên quan. Tuy nhiên, các phương pháp này không giải quyết gốc rễ của vấn đề tức là nguyên nhân gây ra suy chức năng của tế bào beta tuyến tụy.

Các tế bào  $\beta$  của tụy bị hỏng là nguyên nhân của đái tháo đường type I và cũng là một phần gây nên đái tháo đường type II. Chính vì vậy thay thế tế bào  $\beta$  là một phần quan trọng trong việc điều trị đái tháo đường.

##### ***1.3.1.1. Nguyên tắc điều trị đái tháo đường bằng tế bào gốc***

Mục tiêu của phương pháp điều trị tế bào gốc cho bệnh tiểu đường là bảo vệ các tế bào còn lại và bổ sung đầy đủ các tế bào beta. Phương pháp điều trị này cho phép bệnh nhân giảm hoặc thậm chí ngưng sử dụng insulin và thuốc hạ đường huyết trong một số trường hợp, đồng thời làm giảm các biến chứng tiểu đường mạn tính [76].

Liệu pháp điều trị xa hơn là phải thay thế và bổ sung các tế bào tiết insulin mới cho bệnh nhân. Để thực hiện mục đích này, chúng ta có thể tiến hành hai chiến lược sau:

- Cấy ghép tế bào gốc: thu nhận nguồn tế bào gốc có khả năng biệt hoá (hay chuyển biệt hoá) thành các tế bào tiết insulin để ghép vào bệnh nhân. Thông thường, chiến lược này sử dụng các tế bào gốc trưởng thành vì nguy cơ gây ung thư thấp. Cơ sở của phương pháp là khi các tế bào gốc đi vào cơ thể ở điều kiện thích hợp, chúng sẽ biệt hoá thành tế bào thích hợp. Tuy nhiên tế bào này phải có khả năng biệt hoá thành tế bào tiết insulin.

- Ghép tế bào tiết insulin được biệt hoá từ tế bào gốc trước đó : đối với chiến lược này, các tế bào gốc thu nhận từ các mô được nuôi cấy tăng sinh và biệt hoá thành các tế bào tiết insulin in vivo; sau đó cấy ghép tế bào này vào cơ thể nhận.

Với mục tiêu này, chúng ta có thể xuất phát ba loại nguồn tế bào gốc khác nhau cho điều trị: 1) từ các tế bào đã biệt hóa, 2) từ tế bào gốc đa tiềm năng trưởng thành và 3) từ các tế bào gốc đa năng, ví dụ như các tế bào gốc phôi và tế bào gốc đa năng cảm ứng.

### ***1.3.1.2. Các nhân tố ảnh hưởng đến sự phát triển của tụy in vivo***

Khi tìm hiểu cách tái tạo tế bào beta trong cơ thể, các nhà khoa học nhận thấy khối tế bào beta bình thường dao động để đáp ứng với thay đổi môi trường và sinh lý. Tế bào beta có thể nhân lên trong suốt cuộc đời, mặc dù ở mức thấp. Quá trình nhân lên này có thể bị thay đổi khi mang thai và hoặc do các tác nhân kích thích đái tháo đường chuyển hóa, chẳng hạn như glucose và acid béo tự do, Điều này cho thấy rằng có thể tác động đến sự phát triển của tế bào beta bằng các phương thức nhân tạo [77].

Các yếu tố tăng trưởng, chẳng hạn như activin A và yếu tố tăng trưởng tế bào gan, đã được sử dụng để kích thích tái tạo tế bào beta. Các yếu tố khác, như một sự kết hợp của các yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF) và gastrin, yếu tố tăng trưởng keratinocyte, betacellulin (BTC), và GLP-1 (glucagon-like peptide-1) hoặc homolog, exendin-4, cũng đã được sử dụng để kích thích tái tạo tế bào beta. Ngoài ra, các thành viên của họ tái tạo protein, chẳng hạn như protein Reg và INGAP (islet neogenesis gene associated protein), có thể kích thích sự gia tăng của các tế bào beta và đã được đánh giá là liệu pháp tiềm năng cho bệnh tiểu đường [77].



Những hiểu biết về sự biệt hoá thành đảo tụy và tuyến tụy sẽ giúp cung cấp những thông tin quan trọng về ES. Khi phát hiện ở chuột bị khiếm khuyết *pdx-1* không có sự phát triển thành tụy, người ta cho rằng gen này có vai trò cực kỳ quan trọng cho sự phiên mã này, khác với vai trò của nó ở giai đoạn muộn, trong sự biệt hoá tế bào phôi thành tế bào beta. Một gen quan trọng khác là *Ngn3* (*neurogenein-3*) [78], biểu hiện trong tế bào cơ chất, có vai trò trong cơ chế biệt hoá đảo tụy. *Ngn3* biểu hiện tạm thời là nhờ sự cảm ứng từ một quá trình kết hợp: ức chế sự truyền tín hiệu notch và kích thích của sự truyền tín hiệu bởi các phân tử thuộc họ TGF- $\beta$ .

Zhou và CS đã chứng minh rằng sự kết hợp của ba yếu tố phiên mã, *Pdx-1*, *Ngn3*, và *MafA* (*musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A*) mang lại những cải thiện rõ rệt trong việc hạn chế tình trạng tăng đường huyết. Các yếu tố phiên mã này đã được sử dụng trong quá trình tái lập chương trình các tế bào nang chùm của tụy ngoại tiết thành tế bào beta qua adenovirus trung gian. Những tế bào beta mới được tạo lập giống hệt các tế bào beta về hình dạng, kích thước và siêu cấu trúc [79]

Khi tiêm toàn thân *Pdx-1* tái tổ hợp, cho thấy kết quả có sự biểu hiện của insulin và các gen khác liên quan đến chức năng tuyến tụy không chỉ có ở tuyến tụy mà còn có cả ở trong gan [80]. Nhiều phương pháp đã được thử nghiệm để biệt hóa các tế bào gan thành tế bào sản xuất insulin. Khi ghép gen *Pdx-1* hoặc gen *NeuroD* và *betacellulin* (*BTC*) cho gan dẫn đến sự biểu hiện dấu ấn các gen của insulin và đảo tụy khác trong gan. Các gen này đã có tác động cải thiện tình trạng tăng đường huyết ở những con chuột bị tiểu đường. Khi sử dụng các gen *Pdx-1/VP16* hoặc *Ngn-3* và gen *BTC* dẫn đến hiện tượng sản xuất insulin ở gan [48], [81].

### ***1.3.1.3. Nguồn tế bào gốc sử dụng cho điều trị***

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng có thể biệt hóa in vitro các tế bào gốc và tiền tế bào trở thành các tế bào sản xuất insulin [82]. Các tế bào gốc phôi (ES) có khả năng tạo ra số lượng không giới hạn các tế bào sản xuất insulin. Về mặt lý thuyết, các tế bào ES có thể được nhân lên không giới hạn ở trạng thái chưa biệt hóa và sau đó biệt hóa thành tế bào beta chức năng. Để biệt hoá định hướng tế bào gốc phôi thành các tế bào chức năng, có nhiều cách: dùng nhân tố môi trường biệt hoá, nhân tố phát triển hoà tan, nguyên liệu chất nền, tương tác tế bào - tế bào. Một báo cáo gần đây cho thấy sự biệt hóa theo từng bước của các tế bào ES theo mô hình như phát triển tuyến tụy nội tiết, có thể tạo ra các tế bào beta chức năng [83]. Tuy nhiên, năng suất vẫn còn rất thấp và các tế bào beta được biệt hóa này chức năng tiết insulin chưa được như các tụy đảo chính thức. Tìm kiếm một quy trình biệt hóa các tế bào ES thành các tế bào beta chức năng trưởng thành hiệu quả hơn vẫn cần phải được nghiên cứu nhiều hơn.

Tế bào gốc người trưởng thành là nguồn tế bào quan trọng nhất đối với liệu pháp tế bào cho các mô hình bệnh tật khác, chúng không bị vướng mắc bởi các vấn đề đạo đức như của các tế bào ES và là một nguồn tế bào không giới hạn. Nhiều nghiên cứu báo cáo rằng tế bào sản xuất insulin có thể được tạo ra từ tế bào gốc trưởng thành / tiền tế bào có mặt trong tủy xương, mô mỡ, gan, ruột, lá lách, tuyến nước bọt, mô tế bào thần kinh và máu cuống rốn [84].

Tế bào gốc trưởng thành hoặc tiền tế bào của mô gan cũng là một nguồn cung cấp tốt để tạo nên tế bào sản xuất insulin, bởi vì gan và tụy có chung nguồn gốc từ các tế bào có tiềm năng kép (bipotential) trong nội bì phôi. Các tế bào dương tính với Ngn-3 (neurogenein 3) được phân lập từ tuyến tụy của chuột trưởng thành hoặc các tế bào nhân bản vô tính từ quần thể tế bào của đảo tụy hoặc ống tụy cũng có khả năng biệt hóa các tế bào beta chức năng [85].

Tế bào gốc trung mô (MSC) được phân lập từ máu cuống rốn có thể là một nguồn cung cấp lý tưởng các tế bào gốc có thể đạt được mà không làm đau hoặc gây nguy cơ nhiễm virus đối với nguồn hiến tế bào ghép. Tế bào gốc trung mô được phân lập từ máu cuống rốn có khả năng biệt hóa thành nhiều dòng tế bào bằng những tác động cụ thể trong các điều kiện nuôi cấy. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng các tế bào máu cuống rốn gốc có thể được phân thành các tế bào sản xuất insulin.

Tế bào gốc có nguồn gốc từ mô mỡ được phân lập với số lượng lớn từ mô mỡ (Adipose tissue-derived stem cells ADSCs) của người cũng là một nguồn cung cấp tế bào ghép có nguy cơ thấp cho bệnh nhân. Một nghiên cứu thú vị đã báo cáo sự biệt hóa thành công của chức năng tế bào sản xuất insulin từ tế bào gốc mô mỡ mí mắt của con người bằng cách sử dụng phương pháp nuôi cấy hai bước. Tương tự như các tế bào gốc khác, ADSCs biến đổi Pdx-1 có nguồn gốc từ mô người hoặc chuột có thể biệt hóa thành các tế bào có biểu hiện insulin trong những điều kiện nuôi cấy cụ thể [86]. Vì vậy, ADSCs có tiềm năng như là một nguồn hữu ích cho các liệu pháp thay thế tế bào trong bệnh tiểu đường.

#### ***1.3.1.4. Biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào tụy***

Zhou và CS đã chứng minh các tế bào biểu mô và trung mô màng ối có thể biến chuyển thành các tiểu đảo tụy nhờ yếu tố phiên mã Pdx-1 [87]. Trong điều kiện in vitro, sau khi kích thích với nicotinamide, tế bào gốc màng ối biểu hiện mRNA của insulin. Trong điều kiện in vivo, HAE có khả năng làm giảm đường máu ở chuột gây tiểu đường bằng mô hình streptozotocin sau một vài lần ghép tế bào. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của Wei và CS có tới 20% chuột tiểu đường được điều trị bằng ghép tế bào gốc màng ối bị tái phát sau 6 tuần [30]. Điều này có thể phụ thuộc vào thời gian tồn tại của các tiểu đảo tế bào

ghép. Vấn đề là làm thế nào để kéo dài thời gian tồn tại của các nhóm tế bào này. Các nhà nghiên cứu cũng đã thành công trong việc sử dụng các tế bào bắt tử HAE chuyển nạp sản xuất insulin để ghép điều trị tiểu đường thực nghiệm [88], [89]. Kim và CS cũng đã công bố các tế bào gốc màng ối có khả năng duy trì đường máu bình thường trong 210 ngày khi ghép vào các mẫu chuột bị gây bệnh tiểu đường thực nghiệm [90].

Quá trình biệt hóa tế bào HAE thành tế bào tiết insulin dưới tác dụng kích thích của glucose cũng là một trong những vấn đề cần được tiếp tục nghiên cứu. Trong điều trị bệnh đái tháo đường, việc ghép tế bào beta có nguồn gốc từ màng ối cần thiết phải chứng minh được các yếu tố kích thích biệt hóa sau ghép đặc biệt ở giai đoạn cuối thành tế bào beta hoàn toàn trưởng thành. Mặc dù cơ chế điều chỉnh sự biệt hóa vẫn chưa sáng tỏ, nhưng vai trò của một số yếu tố như Maf, HB9, hoặc snail đã được chứng minh. Dựa trên những phát hiện này, hiệu quả của cấy ghép các tế bào HAE cho điều trị bệnh tiểu đường có thể được cải thiện.

Mặc dù đã có nhiều quy trình biệt hóa tế bào beta đã được mô tả, nhưng vẫn chưa có quy trình nào là hoàn hảo để tạo nên một tế bào beta trưởng thành đầy đủ các chức năng. Chính vì vậy việc nghiên cứu để biệt hóa thành các tế bào beta đầy đủ các chức năng trong tương lai vẫn là cần thiết.

### **1.3.2. Tình hình nghiên cứu và ứng dụng tế bào gốc ở Việt nam**

Năm 1995, Bệnh viện Huyết Học-Truyền Máu Thành phố Hồ Chí Minh lần đầu sử dụng tuỷ xương (thực chất là liệu pháp tế bào gốc tạo máu) để ghép điều trị cho 1 bệnh nhân 27 tuổi bị bệnh bạch cầu mạn dòng tuỷ (CML). Tiếp đó, năm 1996 thực hiện ghép tế bào gốc máu ngoại vi tự thân để điều trị bệnh lý ác tính về máu. Năm 2002 bệnh viện này tiến hành ghép tế bào gốc tạo máu từ máu cuống rốn để điều trị bệnh bạch cầu cấp dòng lympho (ALL) [1]. Sau

đó Viện Huyết học truyền máu Trung ương cũng bắt đầu tiến hành nghiên cứu ghép tuỷ xương để điều trị bệnh suy tuỷ, một số bệnh lý máu ác tính. Từ năm 2004, Trung tâm Huyết học và Truyền máu - Bệnh viện trung ương Huế cũng đã triển khai ghép tế bào gốc từ máu ngoại vi để điều trị bệnh Lơ-xe-mi cấp. Tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, năm 2004 đã tiến hành các ca ghép tế bào máu từ máu tự thân cho các bệnh nhân ung thư máu.

Năm 2007, Bệnh viện Việt Đức và Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 tiến hành ghép tế bào gốc từ tuỷ xương điều trị tổn thương xương khó lành hoặc khớp giả [2], [91]. Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh tiến hành các nghiên cứu cơ bản về tế bào gốc, biệt hóa tế bào gốc trung mô dây rốn [92]... Năm 2009, Ngân hàng tế bào gốc dây rốn đầu tiên của Việt Nam được thành lập để lưu trữ các tế bào gốc từ mẫu mô dây rốn. Hiện tại ở Việt Nam đang có một số ngân hàng tế bào gốc được thành lập. Đó là ngân hàng tế bào gốc của các đơn vị Công ty cổ phần Mekophar; Học viện quân y; Viện Huyết học - Truyền máu thành phố Hồ Chí Minh.

Viện Bông quốc gia, Học viện Quân y trong nhiều năm đã nghiên cứu trị liệu tế bào trong điều trị vết thương, vết bỏng, các tấm da nuôi cấy đã được chế tạo và sử dụng trong điều trị đạt kết quả tốt. Viện Bông quốc gia hiện nay đã nuôi cấy thành công nguyên bào sợi và tế bào biểu bì để điều trị vết thương, vết bỏng.

Bên cạnh các nghiên cứu ứng dụng tế bào gốc tạo máu được triển khai ở các cơ sở nêu trên, các nghiên cứu tế bào gốc phôi chuột nhắt và tế bào gốc phôi gà cũng đã được tiến hành tại hai trường Đại học khoa học tự nhiên thuộc Đại học Quốc gia Hà nội và Thành phố Hồ Chí Minh. Một dự án nghiên cứu tế bào gốc phôi người và tế bào gốc từ người trưởng thành cũng đã được thông qua và bắt đầu triển khai tại Trường Đại học Y Hà Nội và các đơn vị phối hợp.

Tuy nhiên các dự án và nghiên cứu kể trên chưa đề cập đến việc lập ngân hàng bảo quản lâu dài và sử dụng tế bào gốc màng ối.

Về tế bào gốc màng ối, bên cạnh những nghiên cứu của Học viện Quân Y, Trường Đại học Y Hà Nội cũng đã có những nghiên cứu rất thành công về tạo tấm màng ối làm nền nuôi cấy tế bào gốc vùng rìa giác mạc [93].

Về nghiên cứu biệt hóa tế bào gốc thành tế bào tiết insulin thì đã có những nghiên cứu ban đầu của Phòng thí nghiệm nghiên cứu và ứng dụng tế bào gốc thuộc Đại học Khoa học tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh trong thời gian gần đây, với nguồn tế bào gốc thu nhận được từ máu cuống rốn với những kết quả ban đầu rất khả quan [94].

Ở nước ta, ước tính hàng năm riêng nhu cầu điều trị bệnh máu bằng ghép tế bào gốc cũng đã khoảng 300 - 500 trường hợp. Nhu cầu điều trị các khuyết hồng mô và suy chức năng tế bào/cơ quan rất lớn mà triển vọng có thể áp dụng trị liệu tế bào gốc càng là con số lớn hơn. Tuy nhiên, lĩnh vực này vẫn còn biểu hiện nhiều hạn chế. Đó là nguồn tế bào gốc còn hạn chế (mới chỉ dừng lại từ dây rốn, tủy xương) đặc biệt là các nghiên cứu áp dụng tế bào gốc biệt hóa thành các dòng tế bào áp dụng điều trị còn chưa đạt hiệu quả cao. Thêm nữa, các hướng nghiên cứu về tế bào gốc ở trong nước còn chưa đa dạng, chưa quan tâm nhiều đến những hướng tạo sinh tế bào gốc từ nguồn các tế bào khác.

## CHƯƠNG 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Màng ối của các sản phụ mổ đẻ trên 18 tuổi, thai đủ tháng > 37 tuần.

Số lượng mẫu nghiên cứu: 30 màng ối



*Hình 2.1. Bánh rau và màng ối thu nhận được từ sản phụ*

Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu 30 mẫu nhuộm HE, 10 mẫu soi kính hiển vi điện tử quét (SEM), 5 mẫu kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM).

Do điều kiện nghiên cứu bước đầu tiến hành nuôi cấy, bảo quản tế bào gốc phân lập từ màng ối và biệt hóa tế bào gốc phân lập từ màng ối thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết nên chúng tôi đã tiến hành phân lập, nuôi cấy và bảo quản 10 mẫu. Biệt hóa thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết từ các mẫu thu gom, phân lập được tế bào gốc từ màng ối.

## **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

### **2.2.1. Thiết kế nghiên cứu:**

Nghiên cứu mô tả cắt ngang, lấy mẫu thuận tiện theo thời gian: mô tả các đặc điểm cấu trúc vi thể và siêu vi thể màng ối thu nhận được từ thai phụ đến viện sinh mổ

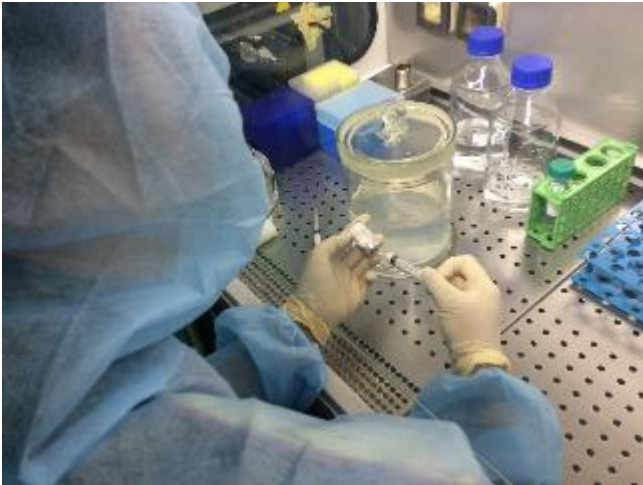
Nghiên cứu thực nghiệm: Phân lập, nuôi cấy và bước đầu đánh giá khả năng biệt hóa tế bào gốc màng ối người thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết.

### **2.2.2. Thu thập màng ối**

Bánh rau được thu nhận từ Bệnh viện 103- Học viện Quân y, của các sản phụ mổ đẻ, thai đủ tháng, nước ối bình thường. Mẫu được thu nhận ngay sau khi sản phụ sinh em bé và được cho vào bảo quản trong bình chứa PBS có bổ sung kháng sinh (Hình 2.2). Sau đó chuyển về phòng thí nghiệm xử lý mẫu ngay (hoặc bảo quản ở 4<sup>0</sup>C không quá 4 giờ).

Bánh rau được đưa vào buồng thao tác, đặt trên khay inox tiến hành bóc tách lớp màng ối, trong quá trình bóc tách tránh làm rách nát (Hình 2.3). Rửa sạch lớp màng ối nhiều lần (4-6 lần) bằng dung dịch đệm PBS đã được hấp khử trùng để loại bỏ máu đông trên màng ối cho đến khi sạch tạo thành một màng mỏng trong suốt. Quá trình thao tác phải đảm bảo vô trùng.





*Sử dụng bình bảo quản chứa PBS có bổ sung kháng sinh*



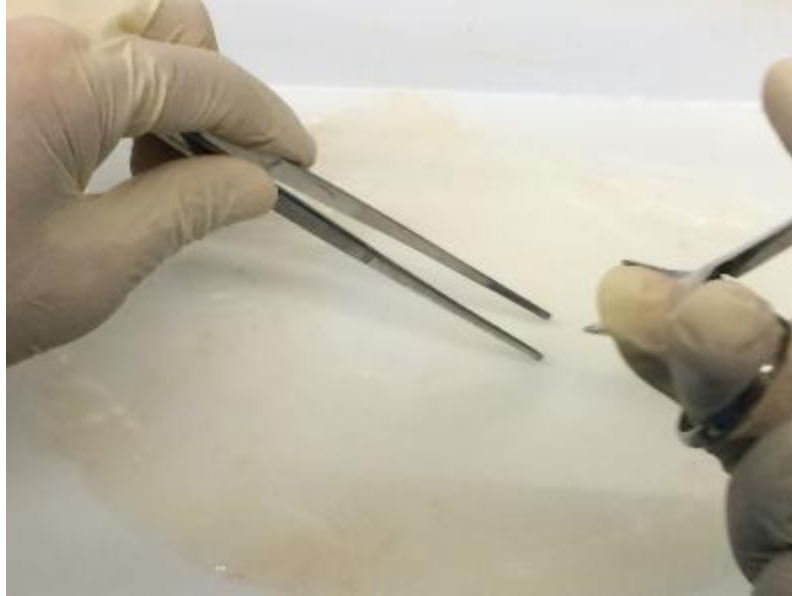
*Mẫu màng ối được thu nhận, bảo quản và chuyển đến phòng thí nghiệm*

*Hình 2.2. Chuẩn bị và thu nhận mẫu màng ối*



*Hình 2.3. Bóc tách màng ối và rửa bằng PBS*

Kết quả thu được là màng ối gần như trong suốt đảm bảo không bị rách nát, đảm bảo vô khuẩn trong quá trình vận chuyển từ bệnh viện về trung tâm nghiên cứu (Hình 2.4).



*Hình 2.4. Màng ối thu nhận được phục vụ cho nghiên cứu*

### **2.2.3. Xác định các đặc điểm hình thái vi thể của màng ối bằng tiêu bản nhuộm HE**

#### **Chuẩn bị mẫu:**

- Cắt mẫu có kích thước 1 x 1 cm từ màng ối
- Mẫu được cố định trong Glutaraldehyde 2,5%
- Khử nước bằng cồn, khử cồn bằng Xylen.
- Đúc trong parafin bằng tay theo khuôn có sẵn.
- Cắt bằng máy cắt lạnh độ dày 5  $\mu\text{m}$
- Tẩy parafin bằng xylen
- Rửa tiêu bản
- Tiến hành nhuộm HE

### **Cơ chế nhuộm:**

- Hematein (sản phẩm tạo thành từ oxy hóa hematoxylin) với sự giúp đỡ của chất gắn màu (trong trường hợp này là  $Al^{3+}$ ) có điện tích dương mạnh nên gắn vào các axit nucleic, đặc biệt là axit nucleic của nhân.

- Eosin Y: thuộc nhóm chất nhuộm mang tính axit nên có khả năng liên kết (nhuộm) với các ba-dơ hay các protein trong bào tương.

### *Tiến hành nhuộm:*

1. Nhuộm nhân bằng hematoxylin với thời gian từ 5 đến 15 phút (tùy vào độ dày lát cắt tiêu bản).

2. Rửa tiêu bản dưới vòi nước chảy cho đến khi tiêu bản màu xanh (từ hồng sang xanh), thời gian rửa khoảng 10 phút dưới vòi nước chảy

3. Kiểm tra tiêu bản, nếu thấy nhân nhuộm đậm thì tiến hành biệt hóa nhân bằng cồn – axit (kháng 3-5giây). Cồn lắ tiêu bản, sau đó rửa bằng nước cất. Kiểm tra, nếu biệt hóa chưa đủ thì nhúng lại vào cồn-axit, nếu màu nhạt, sau khi rửa qua nước cất, có thể nhuộm lại Hematoxylin từ 10-15 phút. Sau đó biệt hóa trở lại.

4. Nhúng tiêu bản vào dung dịch lithi carbonat bão hòa cho đến khi tiêu bản có màu xanh, rửa dưới vòi nước chảy 10 phút;

5. Nhuộm bào tương bằng cách nhúng tiêu bản trong dung dịch Eosin 1% với thời gian từ 2 đến 4 phút, rửa tiêu bản trong nước cất từ 3 đến 4 phút;

6. Kiểm tra tiêu bản trên kính hiển vi;

7. Khử nước:

Nhúng tiêu bản trong cồn ethanol 90<sup>0</sup> trong khoảng 10 - 15 giây;

Nhúng tiêu bản trong cồn ethanol 100<sup>0</sup> lần 1 trong khoảng 10 - 15 giây;

Nhúng tiêu bản trong cồn ethanol 100<sup>0</sup> lần 2 trong khoảng 10 - 15 giây;

Nhúng tiêu bản trong cồn ethanol 100<sup>0</sup> lần 3 trong khoảng 10 - 15 giây;

#### 8. Làm sáng tiêu bản

Nhúng nhanh tiêu bản trong xylen lần 1, khoảng 5 giây;

Nhúng nhanh tiêu bản trong xylen lần 2, khoảng 5 giây;

Nhúng nhanh tiêu bản trong xylen lần 3, khoảng 5 giây;

#### 9. Gắn lamên bằng Bôm.

*Kết quả:* Nhân bắt màu xanh - đen, bào tương và các bó sợi collagen bắt màu đỏ tươi.

Soi trên kính hiển vi Nikon (Nhật Bản), chụp ảnh bằng phần mềm ACT-1, đo đếm bằng phần mềm tự động Image Pro Plus

### **2.2.4. Nghiên cứu đặc điểm hình thái siêu vi thể của màng ối bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM)**

1. Cố định mẫu trong glutaraldehyd 2,5% trong 12 giờ (để qua đêm), ở 40C;

2. Rửa mẫu bằng đệm cacodylat, 2 lần x 10 phút/lần;

3. Cố định bổ sung bằng axit osmic 1% trong 4-6 giờ), ở 40°C;

4. Rửa lại mẫu bằng đệm cacodylat 0,3M, 2 lần x 10 phút/lần.

5. Khử nước các mẫu theo qui trình:

- Cồn ethanol 500, 2 lần x 15 phút/lần;

- Cồn ethanol 700, 2 lần x 15 phút/lần;

- Cồn ethanol 800, 2 lần x 15 phút/lần;

- Cồn ethanol 900, 2 lần x 15 phút/lần;

- Cồn ethanol 950, 2 lần x 15 phút/lần;
- Cồn ethanol 1000, 2 lần x 15 phút/lần.

#### 6. Làm khô mẫu:

Làm khô tại điểm tới hạn (là phương pháp tối ưu nhất để bảo tồn bề mặt mẫu) được thực hiện bằng máy làm khô tại điểm tới hạn với các bước chính sau:

- Ngâm các mẫu trong isoamyl acetate;
- Thay thế isoamyl acetate bằng CO<sub>2</sub> lỏng;
- Làm bay hơi CO<sub>2</sub> lỏng ở điểm tới hạn.

#### 7. Mạ phủ mẫu:

Gắn mẫu trên đế mang mẫu của kính hiển vi điện tử quét bằng băng dính cacbon, hướng bề mặt quan sát lên trên.

Mạ phủ mẫu bằng vàng trên máy JFC-1200, JEOL - Nhật Bản, với thời gian 45 - 60 giây (hoặc có thể mạ phủ mẫu bằng các bon và sau đó là đồng trên máy mạ phủ mẫu JFC 420T, JEOL - Nhật Bản)

Mẫu sau khi mạ phủ đã sẵn sàng để soi trên kính HVĐT quét.

### **2.2.5. Nghiên cứu đặc điểm hình thái siêu vi thể của màng ôi bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM)**

Pha mẫu mô thành các mảnh nhỏ có kích thước 1mm x 1mm x 1mm

Cố định mẫu trong glutaraldehyde 2,5 % trong 2 giờ;

Rửa mẫu bằng đệm cacodylat 0,3M 2 lần x 10 phút/lần;

Cố định mẫu bằng axit osmic 1% trong đệm cocodylat trong 2 giờ;

Rửa lại mẫu bằng đệm cacodylat 0,3M 2 lần x 10 phút/lần;

Khử nước các mẫu bằng cồn ethanol; khử cồn ethanol bằng propylen oxide

Đúc mẫu bằng chất đúc epoxy, để ủ ấm 35°C trong 24 giờ, sau đó 45°C trong 24 giờ và 60°C trong 24 giờ.

Cắt tiêu bản siêu mỏng và nhuộm:

Chuẩn bị lưới

Sử dụng lưới đồng loại 200 mắt lưới.

Làm sạch lưới: lưới được rửa sạch bằng siêu âm trong ethanol và tiếp đó trong acetone. Sau khi để lưới nằm ổn định ở đáy một chiếc cốc nhỏ và rót đổ chất lỏng đi, cốc được lật úp trên một tờ giấy lọc và đặt vào sấy ở 60°C cho tới khi thật sự khô.

Tạo màng đỡ của lưới bằng màng formvar

Cắt tiêu bản siêu mỏng

Gọt tinh: Sau khi xác định được những vùng block mẫu đúc cần phải quan tâm. Kiểm tra độ dày các lát cắt, nếu cần thiết có thể tiếp tục gọt thêm block mẫu để loại bỏ những phần mẫu không phù hợp

Tiến hành cắt lát siêu mỏng trên máy ultramicrotom: Quy trình cắt cần tuân theo đúng hướng dẫn vận hành thiết bị của hãng sản xuất. Sau khi đó gọt tinh block thì kẹp nó vào giá đỡ và gắn giá đỡ lên thanh đỡ block mẫu. Tiến hành những điều chỉnh cần thiết như điều chỉnh mức nước, điều chỉnh góc đặt lưới dao, vị trí mép lưới dao và sự tiếp xúc của lưới dao với block mẫu. Sau đó đặt độ dày cắt với giá trị thích hợp (ban đầu thường từ 80 đến 90 nm). Cắt những lát cắt siêu mỏng đầu tiên và các lát cắt này được vớt lại trong khuôn nước của lưới dao. Điều chỉnh độ dày lát cắt nhỏ dần cho tới khi đạt được độ dày mong muốn (thường khoảng 50 nm)

Vớt các lát cắt lên lưới

Nhuộm tiêu bản siêu mỏng và quan sát trên TEM:

1. Đặt giấy lọc vào đáy của đĩa petri và làm ướt bằng một lượng nước cất nhỏ
2. Đặt giấy paraffin lên trên miếng giấy lọc ướt
3. Nhỏ các giọt thuốc nhuộm uranyl acetat lên trên bề mặt giấy paraffin
4. Đặt các lưới đỡ mẫu nổi riêng rẽ trên các giọt thuốc nhuộm sao cho mặt có dính lát cắt hướng xuống dưới và đập nắp đĩa petri lại, che sáng; để 15 phút
5. Rửa lưới bằng cách nhẹ nhàng nhúng vào trong một số cốc đựng nước cất, khoảng 15-20 lần nhúng/trong một cốc. (Sau khi rửa có thể để khô và bảo quản riêng cho đến khi nhuộm chì hoặc nhuộm chì ngay)
6. Chuyển lưới tới một giọt thuốc nhuộm chì citrate để 30 giây đến 15 phút
7. Lấy lưới ra khỏi giọt chì citrat sao cho còn giữ lại được giọt dung dịch trên lát cắt và nhúng trực tiếp 25 lần vào cốc đựng NaOH 1N
8. Tiếp tục nhúng lưới trực tiếp vào cốc đựng nước cất 25 lần
9. Đặt lưới trên giấy lọc và để khô trước khi kiểm tra trên TEM.

#### **2.2.6. Xác định các đặc tính màng ối và tế bào màng ối bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch**

Mẫu màng ối sau khi được đúc parafin theo khuôn bằng tay được cắt mỏng, dán lên lam kính, làm khô ở 45°C. Khử parafin trong xylen (Sigma-Việt nam) và còn theo quy trình khuyến cáo của nhà cung cấp xylen. Ước chế

peroxydase nội bào bằng hydrogen peroxide 0,03% 20 phút. Ủ với kháng thể đơn dòng kháng Oct  $\frac{3}{4}$ , 1 giờ và rửa tiêu bản bằng PBS. Ủ với kháng thể thứ hai có gắn Biotin 1 giờ. Ủ với phức hợp Streptavidine peroxydase 20 phút. Hiện thị màu với cơ chất DAB. Rửa tiêu bản với nước cất. Nhuộm với Hematoxylin tạo nền tương phản 2 phút. Rửa tiêu bản với nước cất. Khử nước bằng cồn và xylen. Dán lamén và quan sát, chụp lưu lại hình ảnh trên kính hiển vi.

Kết quả nhuộm sau khi nhuộm hóa mô miễn dịch: Kết quả âm tính chỉ có màu xanh tím của Hematoxylin nhuộm nhân. Dương tính nếu có hiện diện của kháng nguyên trên tế bào là hình ảnh màu vàng nâu (màu của DAB) của phức hợp kháng nguyên - kháng thể - streptavidine.

## **2.2.7. Phân lập, nuôi cấy và bảo quản các tế bào gốc màng ối người**

### ***2.2.6.1. Phân lập tế bào gốc từ màng ối***

Chúng tôi đã tiến hành phân lập tế bào bằng phương pháp sử dụng enzym phân cắt mô phối hợp với các biên pháp cơ học của Miki và cộng sự [95] quy trình đã cũng đã thực hiện thành công và ghi nhận bởi các tác giả khác [57].

- Bóc tách màng ối khỏi rau thai. Cắt lọc, rửa sạch nhiều lần bằng dung dịch PBS 1X cho tới khi màng ối trở nên trong suốt.

- Lựa chọn phần màng ối gần trung tâm cuống rốn để phân lập tế bào. Phần ngoại vi màng ối dùng để chế tạo tấm màng ối đông khô.

- Cắt nhỏ màng ối thành những mảnh nhỏ có kích thước khoảng 1cm<sup>2</sup>. Cho 8-10 mảnh màng ối vào tuýp eppendorf 50ml có chứa 5 ml dung dịch enzym phân cắt mô trypsin 0.25% (Sigma), ủ trong 5 phút/37°C nhằm làm sạch thêm các mảnh màng ối.

- Chuyển các mảnh màng ối sang tuýp khác có chứa dung dịch trypsin 0.25%. Ủ màng ối ở 37°C trong dung dịch enzym thời gian 30 – 60 phút phối



hợp với máy lắc 20 dao động/phút. Màng ối tan rã hết sẽ trở thành dung dịch thuần nhất. Dùng dụng cụ vớt bỏ hết những mảnh mô còn sót lại.

- Lọc dung dịch qua màng lọc. Chuyển dung dịch có tế bào sang tuýp 15ml (Falcon). Ly tâm 1200 vòng/phút x 5 phút, loại bỏ dịch nổi, thu giữ cặn tế bào.

- Rửa cặn tế bào 3 lần bằng dung dịch DMEM để loại bỏ hết enzym.

- Ly tâm với percoll 40,8% và 50,8% (Sigma). Trong quá trình nghiên cứu, nhiều nồng độ khác nhau của các dung dịch này được sử dụng để chọn ra nồng độ tối ưu giúp phân lập các khối tế bào tốt nhất.

- Hút lấy khối tế bào nằm ở phân lớp thứ 3 từ đáy lên của tuýp. Hòa tan khối tế bào trong 10ml môi trường DMEM. Ly tâm loại bỏ dịch nổi thu giữ cặn tế bào.

- Hòa tan khối tế bào trong 10ml môi trường nuôi cấy cơ bản (DMEM, FCS 10%, kháng sinh anti-anti (Sigma, Việt nam). Đếm số lượng tế bào sau đó cho vào đĩa nuôi cấy đường kính 10cm.

#### ***2.2.6.2. Nuôi cấy tăng sinh tế bào.***

Tế bào gốc màng ối sau khi phân lập từ màng ối được nuôi cấy trong môi trường DMEM có bổ sung thêm penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml), L-glutamin ( $2 \times 10^{-3}$ M), huyết thanh bào thai bò (10%) trong tủ ấm 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Tế bào gốc màng ối sau khi được phân lập nuôi cấy đạt mật độ từ 60-80% diện tích bề mặt đĩa nuôi cấy. Tiến hành cấy chuyển và nuôi cấy tăng sinh: hút loại bỏ môi trường cũ, rửa tế bào bằng PBS khoảng 2-3 lần. Cho một lượng enzym trypsin vào ủ để bong tách tế bào ra khỏi mặt đĩa nuôi cấy. Hút toàn bộ phần dung dịch có chứa cả tế bào vừa được bóc tách cho vào ống Falcon cho

thêm PBS sau đó đem ly tâm 1500 vòng/phút trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi thu cạn tế bào, rửa lại tế bào 3 lần bằng PBS. Sau khi đã rửa xong chia phần cạn tế bào ra các đĩa nuôi cấy mới trong môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS và 1% kháng sinh, để ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Cứ 2-3 ngày thay môi trường nuôi cấy một lần và kiểm tra tốc độ sinh trưởng của tế bào và quan sát hình thái của tế bào ở mỗi giai đoạn dưới kính hiển vi. Khi tế bào đạt mật độ 60-80% diện tích bề mặt đĩa nuôi cấy, tiếp tục cấy chuyển nuôi cấy tăng sinh như trên. Sau mỗi lần cấy chuyển các tế bào được lưu giữ bảo quản phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo.

### **2.2.6.3. Bảo quản tế bào.**

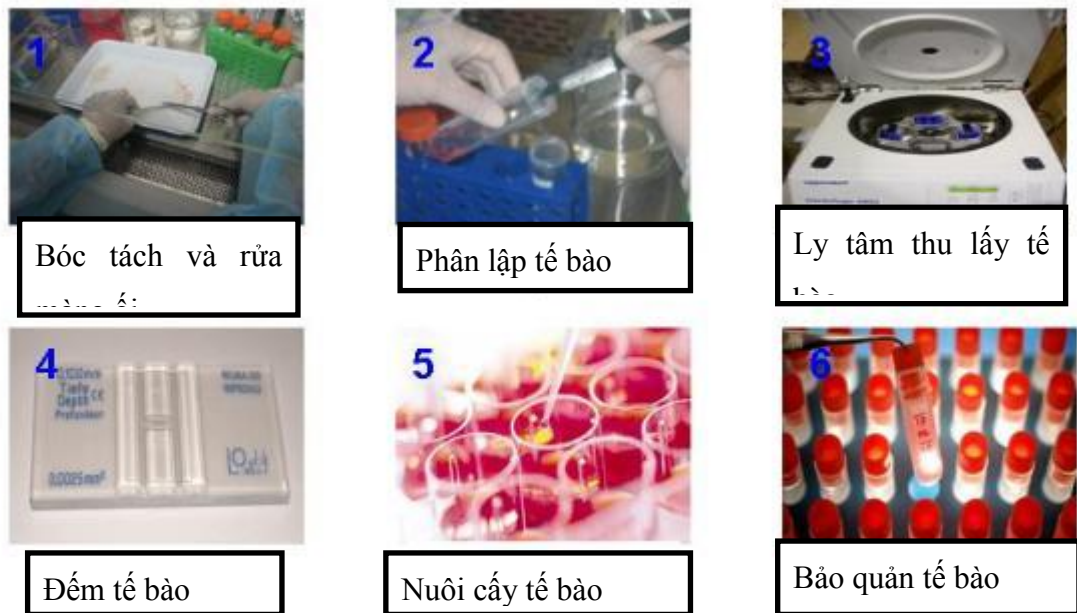
Lấy đĩa nuôi cấy tế bào ra khỏi tủ nuôi cấy. Hút bỏ môi trường cũ. Rửa đĩa tế bào bằng PBS.

Cho Trypsin/EDTA 0,25% tách tế bào khỏi bề mặt đĩa nuôi cấy. Cho bổ sung môi trường cơ bản, ly tâm bỏ dịch nổi thu cạn tế bào.

Rửa lại tế bào bằng PBS 3 lần và ly tâm 1200 vòng/phút trong 5 phút, bỏ dịch nổi, thu cạn tế bào. Hòa cạn tế bào với môi trường cơ bản. Đếm tế bào bằng buồng đếm hồng cầu.

Ly tâm 1200 vòng/phút trong 5 phút, bỏ dịch nổi, thu cạn tế bào. Hòa cạn tế bào với môi trường cơ bản có 10% DMSO để có khoảng 10<sup>6</sup> tế bào/ml.

Chuyển dịch tế bào vào mỗi tuýp bảo quản, bảo quản để trong tủ -80°C. Chuyển tuýp tế bào vào nitơ lỏng và kiểm tra định kỳ tế bào 3 tháng 1 lần.



Hình 2.5. Quy trình phân lập tế bào gốc từ màng ối

#### 2.2.6.4. Giải đông tế bào.

Trong khuôn khổ đề tài chúng tôi tiến hành nuôi cấy tế bào gốc biểu mô mang ối từ hai nguồn riêng biệt bao gồm tế bào gốc sau khi phân lập và tế bào gốc sau khi bảo quản.

Tế bào trong tuýp bảo quản trước khi đưa ra nuôi cấy được giải đông trong khoảng 5 phút ở nhiệt độ 37°C trong bể ổn nhiệt. Sau khi giải đông, tế bào được cho ra đĩa nuôi cấy petri và bổ sung môi trường DMEM-Complex.

Sau 24 giờ kiểm tra sức sống và khả năng bám dính của tế bào, và sau 48 giờ phải tiến hành thay môi trường và kiểm tra mật độ tế bào một lần.

#### 2.2.8. Biệt hóa tế bào gốc thành tế bào beta tụy đảo

Tế bào gốc màng ối được nuôi cấy trong môi trường cơ bản bao gồm DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) có bổ sung thêm penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml), L-glutamin ( $2 \times 10^{-3}$ M), huyết thanh bào thai bò (10%) đồng thời cấy chuyển tế bào 2 tuần một lần để duy trì trong phòng thí nghiệm.

Biệt hóa tế bào gốc thành tế bào beta bằng nuôi cấy trong môi trường cơ bản khoảng 7 ngày để tế bào gốc tăng sinh phủ kín bề mặt đĩa nuôi cấy. Sau đó bổ sung thêm vào môi trường cơ bản các yếu tố định hướng biệt hóa bao gồm 10mM nicotinamide, 55  $\mu$ M  $\beta$ - mercaptoethanol, 1mM sodium pyruvate [96], [97]. Thu hoạch tế bào vào ngày thứ 1 (N1) ngày thứ 7 (N7) và ngày thứ 14 (N14) sau khi bổ sung yếu tố biệt hóa vào môi trường nuôi cấy.

Đánh giá kết quả biệt hóa thành tế bào beta tụy đảo bằng cách theo dõi hiện tượng giảm dấu ấn tế bào gốc (OCT-4) đồng thời quan sát sự xuất hiện và tăng dấu ấn insulin ở cả mức độ protein (định lượng theo phương pháp hóa miễn dịch phát quang) và mức độ mRNA (RT-PCR).

## **2.2.9. Các kỹ thuật khác:**

### ***2.2.8.1. Nhận biết tế bào bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang***

- Tùy điều kiện phòng thí nghiệm có thể thực hiện kỹ thuật trực tiếp trên đĩa nuôi cấy hoặc thu lấy tế bào bằng trypsin rồi dàn tế bào trên lam kính.
- Cố định tế bào bằng Ethanol 98% trong 10 phút.
- Rửa tiêu bản 3 lần x 5 phút bằng PBS.
- Tạo tính thấm bằng Triton X-100 0,5% trong 5 phút.
- Rửa tiêu bản 3 lần x 5 phút bằng PBS.
- Ủ tiêu bản với dung dịch 2% BSA 10 phút.
- Ủ với kháng thể thứ 1 thời gian 60 phút.
- Rửa tiêu bản 3 lần x 5 phút bằng PBS.
- Ủ với kháng thể thứ 2 có gắn huỳnh quang, thời gian 60 phút.
- Rửa tiêu bản 3 lần x 5 phút bằng PBS.
- Nhuộm nhân bằng Hoechst 33342 hoặc DAPI.
- Nhỏ dung dịch Immu-mount (Thermo) lên lam kính, đặt lam men.
- Quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, chụp ảnh và phân tích kết quả.

- Kết quả nhận biết tế bào biểu mô màng ối dương tính cho kết quả màu xanh lục (Fluorescein, FITC) hoặc màu đỏ (Indocarbocyanine, Cy3).

### 2.2.8.2. Nhận biết tế bào gốc bằng kỹ thuật RT-PCR

- Tách chiết RNA tổng số từ tế bào thu được theo quy trình của nhà sản xuất (kit tách RNA của hãng Qiagen, Mỹ).
- Định lượng RNA tổng số.
- Bảo quản RNA tổng số ở - 80°C.
- Tổng hợp cDNA từ RNA tổng số theo qui trình của nhà sản xuất (kit tổng hợp cDNA của hãng Quiagen, Mỹ).
- Đo nồng độ cDNA.
- cDNA được giữ ở nhiệt độ - 20°C cho đến khi sử dụng cho PCR.

Phản ứng PCR: cDNA thu được tiến hành chạy PCR sử dụng cặp mồi trong bảng sau:

<i>18S rRNA</i>	<i>Forward: 5'-TGAGAAACGGCTACCACATC-3'</i>
	<i>Reverse: 5'-TTACAGGGCCTCGAAAGAGT-3'</i>
<i>Insulin</i>	<i>Forward: 5'-TGGTGCAGGCAGCCTGCAG-3'</i>
	<i>Reverse: 5'- GTTCAAGGGCTTTATTCCATCTCTC-3'</i>
<i>Oct-4 (Octamer-binding protein 4)</i>	<i>Forward: 5'-GAGGAGTCCCAGGACATGAA-3'</i>
	<i>Reverse: 5'-GTGGTCTGGCTGAACACCTT-3'</i>

Chu trình nhiệt: Biến tính 5 phút: 95°C, (15 giây:95°C, 25 giây : 58°C, 20 giây : 72°C) x 40 chu kỳ. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose,

sau đó nhuộm gel trong dung dịch Ethidium bromide, thời gian 10 phút và chụp ảnh bằng thiết bị chụp gel (Biorad).

### **2.2.8.3. Kỹ thuật Western blot**

Tế bào được ly giải ở 4°C trong dung dịch Tris–HCl 50 mmol/l, pH 7.5, PMSF 3 mmol/l, aprotinin 10 µg/ml, pepstatin 1 µg/ml, leupeptin 1 µg/ml. Ly tâm loại bỏ xác tế bào. Định lượng protein dịch trong theo phương pháp dùng thuốc thử Coomassie (Greiner). 10 µl dịch trong chứa 25 µg protein được cho vào mỗi giếng điện di. Điện di trên gel polyacrylamide 10% (SDS-PAGE). Protein trên gel được chuyển lên màng nitrocellulose, sau đó được ủ với kháng thể chuột nhắt (Sigma) kháng OCT-4, CK-14 của người. Protein phản ứng với kháng thể thứ nhất sẽ được xác định bởi kháng thể thứ hai gắn với peroxidase (Sigma, Việt nam). Kết quả được biểu hiện bằng hình ảnh trên phim sau khi tác dụng với chất phát quang (ECL<sup>+</sup>, Amersham Biosciences). Insulin được định lượng theo phương pháp điện hóa phát quang trên máy Asxym (Abbott). Protein toàn phần được định lượng theo phương pháp dùng thuốc thử coomassie.

### **2.2.8.4. Nhuộm Trypan blue xác định tỷ lệ tế bào sống**

Trypan blue là một thuốc nhuộm màu xanh dương chỉ có thể đi xuyên qua màng tế bào chết. Do đó, khi dịch huyền phù tế bào được hòa với trypan blue, những tế bào sống, màng còn nguyên vẹn, không hấp thu thuốc nhuộm nên có kích thước nhỏ, tròn và khúc xạ. Những tế bào chết, màng bị vỡ, sẽ hấp thu thuốc nhuộm nên phồng lên, lớn hơn và có màu xanh đen. Thử nghiệm này được sử dụng xác định ảnh hưởng của bảo quản đông lạnh lên khả năng sống của tế bào gốc màng ối.

Thử nghiệm được thực hiện như sau:

- Để tuýp tế bào được bảo quản đã đông ở ra nhiệt độ phòng 15 phút. Ly tâm 1500 vòng/phút/10 phút, loại bỏ dịch nổi giữ lại cặn tế bào. Trộn đều tế

bào trong dung dịch trypan blue 0,4% (w/v) với mật độ tế bào khoảng  $6 \times 10^5$  tế bào/ml.

- Đếm số tế bào sống và chết trong mỗi mẫu bằng buồng đếm hồng cầu.
- Tỷ lệ tế bào sống có trong mẫu được xác định như sau:

$$\% V = \frac{V}{V + D} \times 100$$

V: số tế bào sống có trong mẫu

D: số tế bào chết có trong mẫu

%V: tỷ lệ (%) tế bào sống của mẫu

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập, ở mỗi lần lặp, mỗi nồng độ thử nghiệm được lặp lại trên 4 giếng.

#### ***2.2.8.5. Xác định khả năng biệt hóa bằng định lượng nồng độ insulin trong dịch ly giải tế bào***

Ly giải tế bào ở 4°C trong dung dịch Tris–HCl 50 mmol/l, pH 7.5, PMSF 3 mmol/l, aprotinin 10 µg/ml, pepstatin 1 µg/ml, leupeptin 1 µg/ml.

Ly tâm 11.000 vòng/10 phút để loại bỏ xác tế bào. Định lượng nồng độ protein toàn phần trong dịch trong theo phương pháp dùng thuốc thử coomasie.

Định lượng nồng độ insulin theo phương pháp miễn dịch điện hóa phát quang sử dụng kit (Abbott) trên máy miễn dịch tự động hoàn toàn Asxym (Abbott).

### **2.3. Hóa chất và thiết bị máy móc nghiên cứu**

#### **2.3.1. Môi trường sinh phẩm và hóa chất**

Các hóa chất phục vụ nghiên cứu bao gồm:

Glutaraldehyde 2,5%, Cồn 90, Xylen, Parafin, Hematoxylin, Eosin, dung dịch đệm Cacodylat, Acid osmic 1%, Propylen Oxide, chất đúc Epoxy, dung dịch Uranyl acetat, Chì citrat.

Trypsin 0,25% - EDTA, dung dịch đệm PBS 1X (Phosphate Buffered Saline), môi trường nuôi cấy DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), huyết thanh bò FBS (Fetal Bovine Serum – ATCC Mỹ), kháng sinh: penicilline – streptomycine (Sigma Mỹ), môi trường DMSO (Dimethyl Sulfoxide), Ethanol, D-PBS, primer (Invitrogen, Mỹ), Percoll (Sigma, Mỹ) Glycerol, (Merck), Nicotinamide,  $\beta$ - mercaptoethanol, Sodium pyruvate.

Hoechst 33342 (Invitrogen, Mỹ), kháng thể đơn dòng octamer-binding transcription factor (Oct-4), Sox 2, SSEA4, vimentin, CK18 (Santa Cruz, Mỹ), kháng thể thứ hai gắn huỳnh quang: goat anti-mouse IgG, goat anti Rabbit IgG, donkey anti mouse IgG (Invitrogen, Mỹ). Kit tách RNA, Kit tổng hợp cDNA (Quiagen, Mỹ) Taq Polymerase, dNTP.

### **2.3.2. Các thiết bị máy móc**

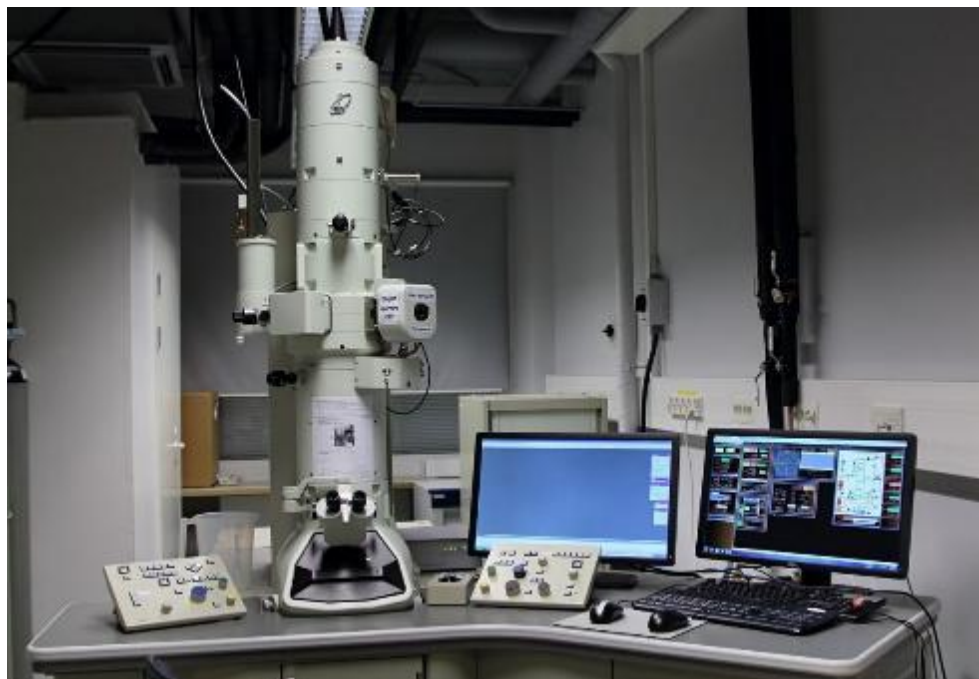
- Phòng sạch
- Tủ cấy an toàn sinh học (BioAir, Mỹ)
- Đĩa plastic nuôi cấy 24, 6 giếng, đĩa plastic 10 cm nuôi cấy (Corning)..
- Tủ ấm CO<sub>2</sub> (Nuaire, Mỹ),
- Máy ly tâm văng ngang ROTANDA 460R, (Hettich, Đức)
- Máy ly tâm lạnh (Hettich, Đức)
- Tủ cấy (Hepa-Nuaire, Mỹ),
- Kính hiển vi Nikon (Nhật Bản) kết hợp chụp ảnh bằng phần mềm ACT-1, đo đếm bằng phần mềm tự động Image Pro Plus.
- Kính hiển vi điện tử quét (SEM) JSM – 5410LV (JEOL- Nhật Bản)



- Kính hiển vi điện tử truyền qua JEM 1400 kèm bộ chụp ảnh Xray và phần mềm chụp ảnh 3D - kết nối máy tính (JEOL - Nhật Bản)
- Máy bốc bay cồng JFD 100 (JEOL - Nhật Bản)
- Máy mạ phủ mẫu JFC-1200, (JEOL - Nhật Bản)
- Kính hiển vi đảo ngược (Leica, Đức)
- Kính hiển vi huỳnh quang (Carl Zeiss, Đức)
- Máy PCR (BioRad, Mỹ),
- Máy Nanodrop (Thermo, Mỹ)
- Máy điện di (BioRad, Mỹ)
- Bể ổn nhiệt (Sellab, Mỹ)
- Hệ thống lọc nước siêu sạch, Ultral clear basic (Đức)
- Pipet Accupipex (Assistant, Đức)
- Cân điện tử Sartorius CP224S (Đức)
- Nồi hấp CL-40LDP (ALP-Nhật Bản)
- Tủ lạnh -80 (Nuair, Mỹ)
- Tủ lạnh âm (-20) và 4oC Sanyo (Nhật Bản)
- Bình nitơ lỏng XL 45, IC 50 (Mỹ)
- Tủ sấy Sellab (Mỹ)
- Lưới đồng loại 200 mắt lưới
- Màng đỡ Formvar
- Máy cắt ultramicrotom



Hình 2.6. Kính hiển vi điện tử quét JSM – 5410LV (JEOL- Nhật Bản)



Hình 2.7. Kính hiển vi điện tử truyền qua JEM 1400  
(Ảnh chụp kèm bộ chụp ảnh Xray và phần mềm chụp ảnh 3D - kết nối máy tính (JEOL - Nhật Bản))



*Hình 2.8. Một số dụng cụ máy móc phục vụ nghiên cứu*

#### **2.4. Thời gian và địa điểm nghiên cứu:**

Nghiên cứu được tiến hành trong thời gian 2010-2015, tại các địa điểm sau:

- Trung tâm nghiên cứu Y Dược học Quân sự - Học viện Quân Y
- Khoa Hóa Sinh - Bệnh viện 103
- Viện 69 - Bộ Tư lệnh Bảo vệ Lăng Chủ tịch Hồ Chí Minh

#### **2.5 Phương pháp xử lý số liệu**

Số liệu thu thập được xử lý thống kê, phân tích số liệu dựa trên phần mềm thống kê y học SPSS 16.1. Các chỉ số đưa ra trong quá trình phân tích: tỷ lệ phần trăm, giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, p.

#### **2.5. Đạo đức trong nghiên cứu.**

Đề tài được thực hiện nhằm mục đích tạo nguồn tế bào gốc phục vụ cho công tác nghiên cứu trong lĩnh vực y sinh học. Nhóm nghiên cứu chúng tôi cam đoan không sử dụng sản phẩm của đề tài với bất kỳ mục đích nào khác. Nguồn

phân lập tế bào gốc biểu mô màng ối cũng không gây tranh cãi về vấn đề đạo đức nên sản phẩm của đề tài có giá trị sử dụng theo cam kết.

Cung cấp thông tin cho các sản phụ đồng ý hiến màng ối:

- Nội dung, các bước tiến hành nghiên cứu
- Quy trình thực hiện nghiên cứu: Các sản phụ hiến màng ối có chỉ định mổ đẻ tại khoa Sản Bệnh viện 103, Học viện Quân Y. Các màng ối bỏ đi sau mổ đẻ được sử dụng phục vụ cho nghiên cứu.
- Đảm bảo bí mật riêng tư của các cá nhân sản phụ hiến màng ối

Thực hiện theo quy định về đạo đức y học trong khuôn khổ của đề tài nghiên cứu khoa học cấp Nhà nước: “Hợp tác nghiên cứu quy trình sản xuất một số chế phẩm sinh học từ tế bào gốc màng ối” do Học viện Quân y chủ trì.

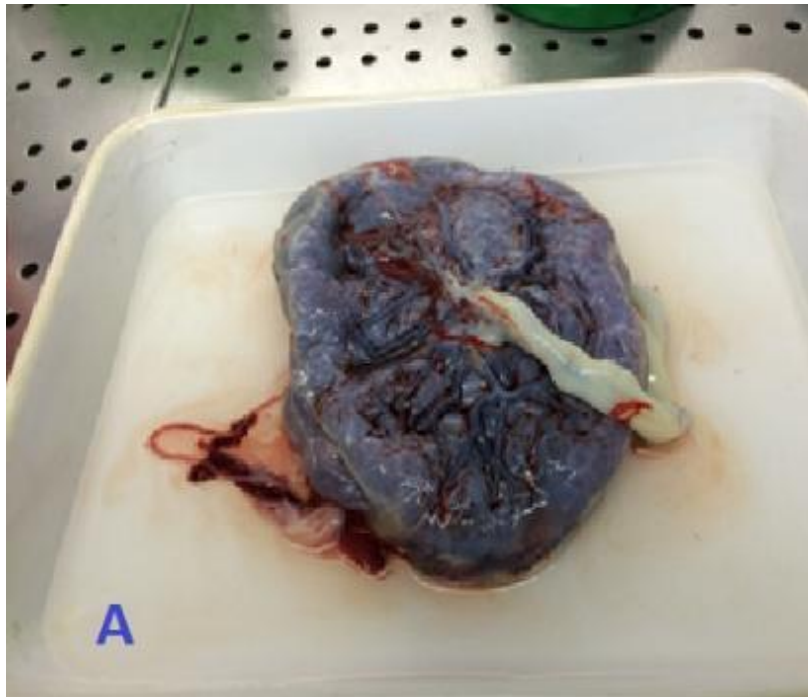
## CHƯƠNG 3

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

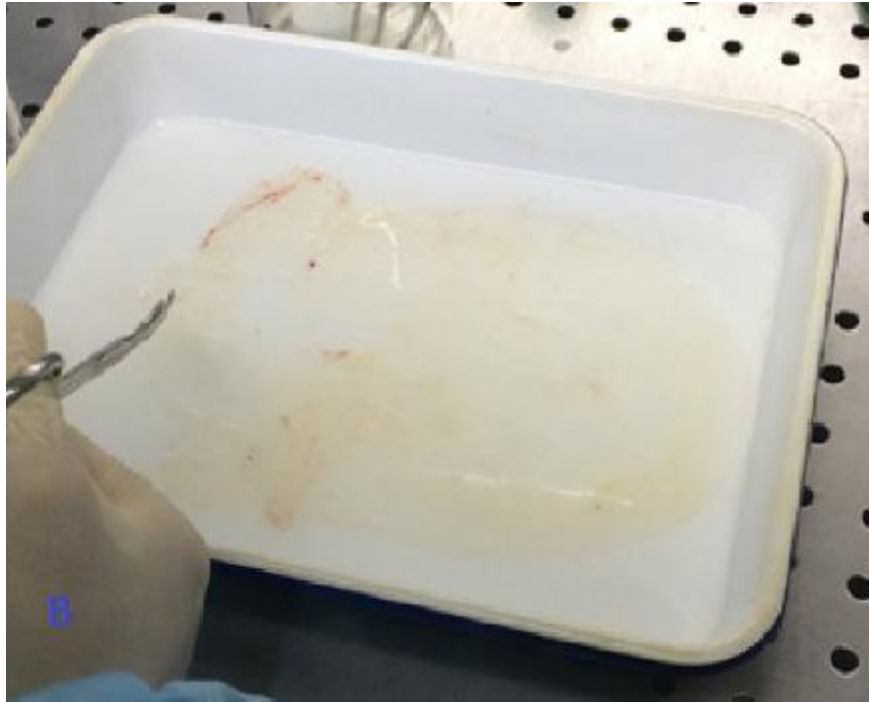
#### 3.1. Mô tả đặc điểm hình thái vi thể và siêu vi thể màng ối người Việt Nam

##### 3.1.1. Thu thập mẫu màng ối

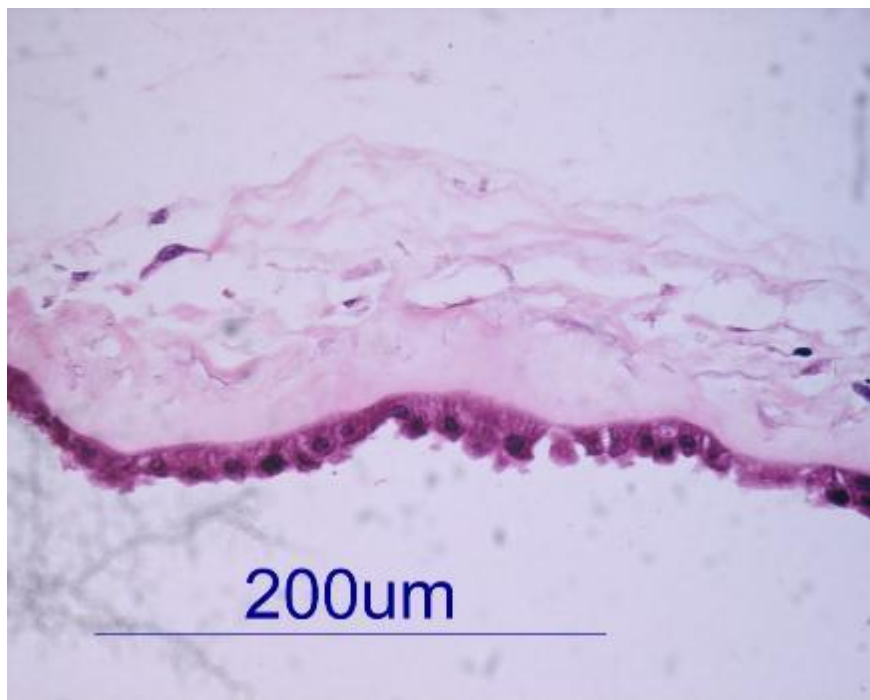
Bánh rau được thu nhận từ Bệnh viện 103 - Học viện Quân y, được cho vào bảo quản trong bình chứa PBS có bổ sung kháng sinh. Sau đó chuyển về phòng thí nghiệm xử lý mẫu ngay (hoặc bảo quản ở 4<sup>0</sup>C không quá 4 giờ). (Hình 3.1). Sau khi tiến hành bóc tách màng ối, nhóm nghiên cứu đã thu thập được 30 mẫu màng ối của các sản phụ hiến cho nghiên cứu: Các mẫu màng ối được thu thập đều đạt các tiêu chí chọn lọc không rách nát đảm bảo cho nghiên cứu. (Hình 3.2)



Hình 3.1. Hình ảnh bánh rau sau khi thu nhận



Hình 3.2. Hình ảnh màng ối sau khi tách phục vụ nghiên cứu



Hình 3.3. Cấu trúc màng ối trên tiêu bản nhuộm HE.

Hình ảnh nhuộm HE màng ối độ phóng đại 100x

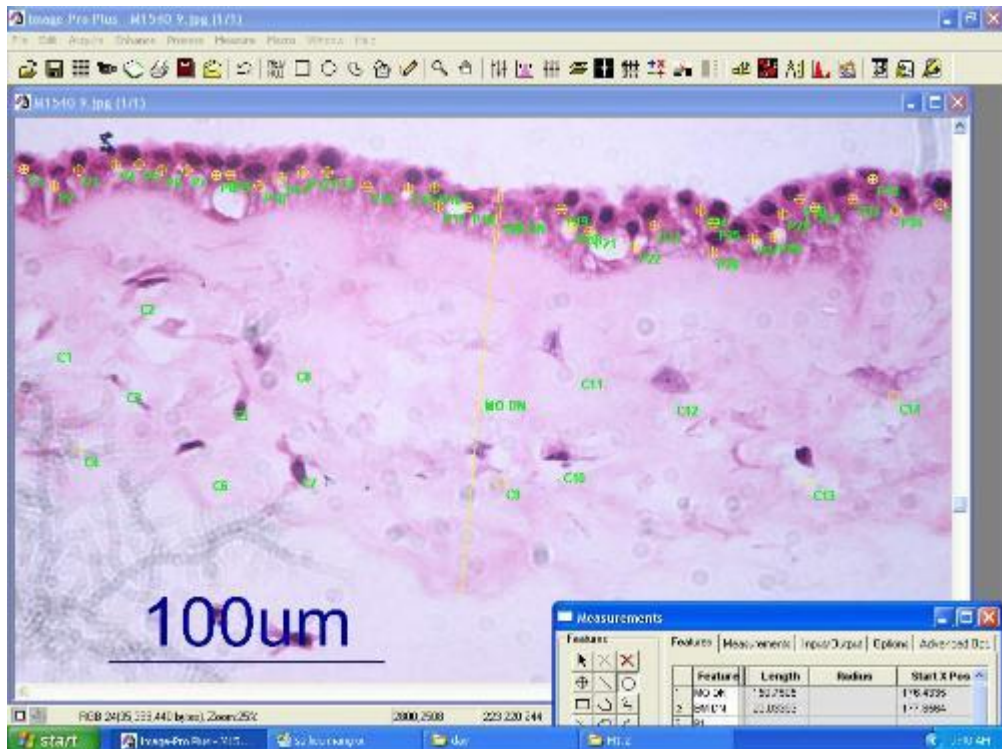
Tiến hành cắt mẫu màng ối ở hai vị trí cách cuống rốn 1-3cm (trên bánh rau) và ở vùng ngoại vi cách cuống rốn 10cm (ngoài bánh rau). Thu được 60



mẫu màng ối (30 mẫu gần cuống rốn và 30 mẫu vùng xa cuống rốn). Các mẫu màng ối được làm tiêu bản nhuộm Hematoxylin Eosin (HE) để sử dụng cho nghiên cứu (Hình 3.3)

### 3.1.2. Đặc điểm hình thái vi thể màng ối trên tiêu bản nhuộm HE

#### 3.1.2.1. Độ dày của màng ối



Hình 3.4. Kết quả đo đếm các kết quả tiêu bản HE

(Hình ảnh chụp màn hình máy tính sử dụng phần mềm Image Pro Plus, cửa sổ nhỏ ở góc màn hình hiển thị các thông số đo)

Để đánh giá độ dày của màng ối và các lớp màng ối, chúng tôi soi tiêu bản HE và đo ở điểm dày nhất trên mỗi tiêu bản bằng kính hiển vi huỳnh quang Nikon chụp ảnh bằng phần mềm ACT-1 và đo đếm bằng phần mềm tự động Image Pro Plus (Hình 3.4). Chúng tôi thu được kết quả như sau:

**Bảng 3.1. Độ dày màng ối gần cuống rốn và xa cuống rốn**

Độ dày màng ối (đơn vị: $\mu\text{m}$ )	Màng ối gần cuống rốn	Màng ối xa cuống rốn
60 – 80	0	1
80-100	0	2
100-120	4	10
120-140	3	7
140-160	11	4
160-180	7	3
180-200	3	3
$\geq 200$	2	0
n	30	30
Trung bình:	$156.31 \pm 25.4718$	$130.72 \pm 29.0684$
p	<0,05	

Độ dày của màng ối thay đổi tùy theo vị trí, ở vị trí gần quanh cuống rốn khoảng 1-2cm, chúng tôi đo được kích thước  $156.31 \pm 25.4718 \mu\text{m}$ , ở vị trí xa cuống rốn chúng tôi đo được  $130.72 \pm 29.0684 \mu\text{m}$ . Sử dụng test thống kê t cặp đôi (paired t test) cho thấy sự khác biệt về độ dày màng ối ở hai vị trí gần và xa cuống rốn có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .



**Bảng 3.2. Độ dày màng ối gần cuống rốn**

Độ dày màng ối (đơn vị: $\mu\text{m}$ )	Màng ối gần cuống rốn (Vị trí dày nhất)	Màng ối gần cuống rốn (vị trí mỏng nhất)
<60	0	9
60 – 80	0	15
80-100	0	5
100-120	4	1
120-140	3	0
140-160	11	0
160-180	7	0
180-200	3	0
$\geq 200$	2	0
n	30	30
Trung bình:	$156.3146 \pm 25.47185$	$69.6613 \pm 13.7257$
p	<0,05	

Kích thước trung bình của màng ối ở vùng gần cuống rốn ở điểm dày nhất là  $156.3146 \pm 25.47185\mu\text{m}$ , ở vị trí mỏng nhất là  $69.6613 \pm 13.7257\mu\text{m}$ . Sử dụng test thống kê t cặp đôi (paired t test) cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

**Bảng 3.3. Độ dày màng ối xa cuống rốn**

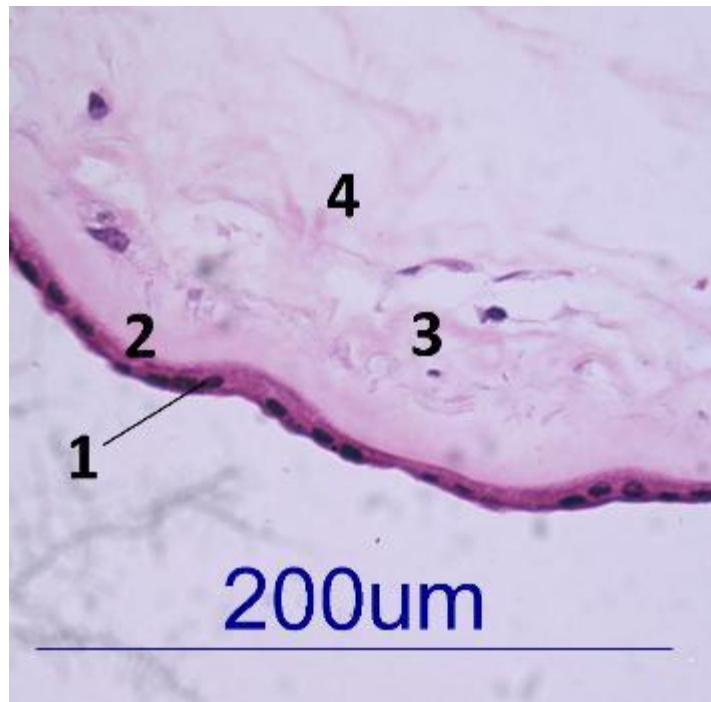
Độ dày màng ối (đơn vị: $\mu\text{m}$ )	Màng ối xa cuống rốn (Vị trí dày nhất)	Màng ối xa cuống rốn (vị trí mỏng nhất)
<40	0	1
40 – 60	0	19
60 – 80	1	6
80 – 100	2	2
100 – 120	10	1
120 – 140	7	1
140 – 160	4	0
160 – 180	3	0
180 – 200	3	0
$\geq 200$	2	0
n	30	30
Trung bình:	$130.72 \pm 29.0684$	$61.57 \pm 19.8423$
p	<0,05	

Kích thước trung bình của màng ối ở vùng xa cuống rốn ở điểm dày nhất là  $130.72 \pm 29.0684 \mu\text{m}$ , ở vị trí mỏng nhất là  $61.57 \pm 19.8423 \mu\text{m}$ . Sử dụng test thống kê t cặp đôi (paired t test) cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$

Quan sát trên các tiêu bản HE trong nghiên cứu đã tiến hành, chúng tôi cũng nhận thấy kích thước về độ dày của màng ối trên từng tiêu bản cũng thay đổi khá lớn. Đối với vị trí gần cuống rốn, kích thước dày nhất hơn kích thước mỏng nhất của màng ối khoảng  $86,65 \mu\text{m}$  với  $p < 0,05$ . Còn đối với vị trí xa cuống rốn, kích thước dày nhất hơn kích thước mỏng nhất của màng ối khoảng  $69,15 \mu\text{m}$  với  $p < 0,05$ , test thống kê t cặp đôi (paired t test).

Nhìn chung, độ dày màng ối ở vị trí gần cuống rốn dày hơn ở vị trí xa cuống, tuy nhiên cũng có biến động về độ dày màng ối trong cùng khu vực gần và xa cuống rốn.

### 3.1.2.2. Các lớp của màng ối



Hình 3.5. Các lớp màng ối tiêu bản nhuộm HE

(1): Lớp tế bào biểu mô và màng đáy, (2): lớp đặc, (3): Lớp nguyên bào sợi, (4): Lớp xốp

Để xác định ranh giới giữa các lớp của màng ối, chúng tôi đã tiến hành nhuộm HE (Hematoxylin/Eosin) màng ối đã phân tách được. Kết quả, chúng tôi nhận thấy trên tiêu bản HE, màng ối có thể phân chia thành ba lớp rõ rệt: lớp tế bào biểu mô, lớp màng đáy và lớp trung mô. Lớp trung mô bao gồm 3 lớp nhỏ: (i): lớp đặc, (ii): lớp nguyên bào sợi và (iii): lớp xốp (Hình 3.5)

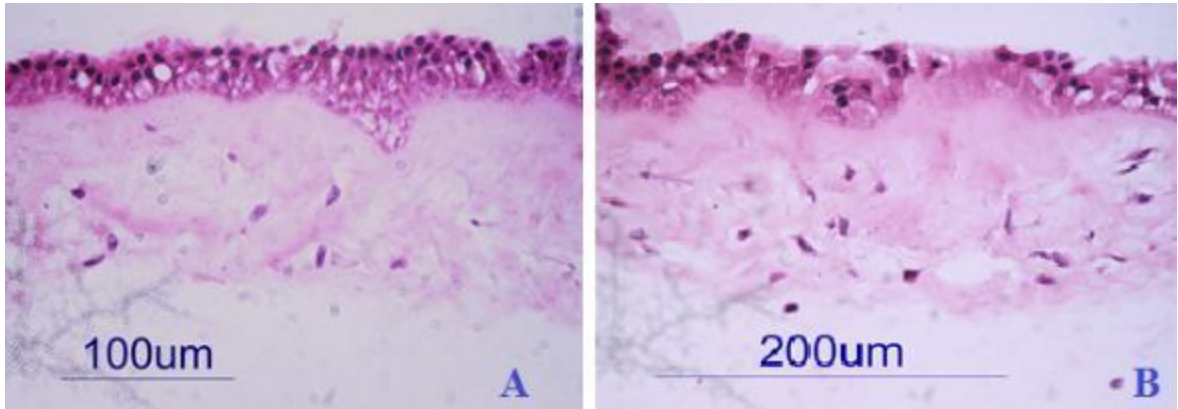
**Bảng 3.4. Độ dày của lớp tế bào biểu mô và màng đáy ở vị trí gần và xa cuống rốn**

Độ dày lớp biểu mô màng ối (đơn vị: $\mu\text{m}$ )	Gần cuống rốn	Xa cuống rốn
<10	2	3
10-20	16	2
20-30	7	10
30-40	2	7
40-50	2	4
>50	1	3
Trung bình:	$20.55 \pm 11.8893 (\mu\text{m})$	$17.54 \pm 8.1532 (\mu\text{m})$
p	> 0,05	

Chúng tôi đã tiến hành đo gộp kích thước lớp tế bào biểu mô và màng đáy do sự liên kết chặt chẽ giữa tế bào biểu mô và màng đáy. So sánh kết quả độ dày của hai lớp này ở hai vị trí gần và xa cuống rốn bằng Sử dụng test thống kê t cặp đôi, chúng tôi thấy sự khác biệt giữa hai lớp không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

Trên một số tiêu bản chúng tôi quan sát thấy hình ảnh của các lớp tế bào biểu mô xếp chồng lên nhau chứ không chỉ một lớp tế bào biểu mô đơn thuần (hình 3.6). Hình ảnh này chỉ xuất hiện ở các mẫu màng ối có vị trí gần cuống rốn. Điều này phù hợp tính liên tục giữa màng cuống rốn và màng ối.

Lớp trung mô vô mạch (Avascular mesenchymal tissue): Chứa các mạng các sợi lưới đan xen phức tạp, mạng lưới các nguyên bào sợi lỏng nhúng trong khối chất lưới, các bó sợi ngấm trong chất nhầy, các bó sợi này thường bị trương lên làm tăng độ dày của màng ối. Quan sát trên tiêu bản HE thấy các tế bào trung mô trong lớp trung mô này. (Hình 3.6)



Hình 3.6. Hình ảnh lớp biểu mô gần cuống rốn có nhiều hàng tế bào (tiêu bản nhuộm HE x40)

**Bảng 3.5. Độ dày của lớp trung mô ở gần và xa cuống rốn**

Độ dày lớp trung mô màng ôi (đơn vị: $\mu\text{m}$ )	Gần cuống rốn	Xa cuống rốn
<80	0	3
80-100	2	7
100-120	8	11
120-140	6	3
140-160	7	3
160-180	3	3
>180	3	0
n	30	30
Trung bình:	$135.76 \pm 27.8093 (\mu\text{m})$	$113.18 \pm 28.3680 (\mu\text{m})$
p	$\leq 0,05$	

Nhận xét:

So sánh kết quả độ dày của hai lớp trung mô gần và xa cuống rốn bằng cách sử dụng phép test thống kê t cặp đôi (paired t test), chúng tôi thấy sự khác biệt giữa hai lớp có ý nghĩa thống kê với  $p \leq 0,05$ .

Kích thước của lớp trung mô cũng thay đổi như kích thước chung của màng ối vì kích thước lớp tế bào biểu mô và màng đáy là tương đối hằng định. Dày hơn ở phần gần cuống rốn và mỏng dần về phía xa cuống rốn. Sự khác biệt này là do sự khác nhau về kích thước của lớp trung mô vô mạch, trong đó là do sự thay đổi về kích thước của lớp nguyên bào sợi và lớp xốp.

### 3.1.2.3. Số lượng tế bào đếm trên tiêu bản HE

Chúng tôi tiến hành đếm số lượng tế bào biểu mô bằng phần mềm tự động Image Pro Plus trên mặt cắt ngang lớp biểu mô tương ứng với chiều dài màng đáy 300  $\mu\text{m}$ . Kết quả thu được như bảng sau

**Bảng 3.6. Số lượng tế bào biểu mô ở vị trí gần và xa cuống rốn**

Số lượng tế bào	Vị trí gần cuống rốn	Vị trí xa cuống rốn
<20	2	0
20-30	11	18
30-40	11	9
40-50	2	3
50-60	3	0
>60	1	0
n	30	30
Trung bình:	$33.8 \pm 13.17$	$29.63 \pm 7.43$
P	$> 0,05$	

Từ kết quả đếm số lượng tế bào chúng tôi nhận thấy sự khác biệt về số lượng tế bào biểu mô ở hai vị trí gần và xa cuống rốn không có ý nghĩa thống kê.

**Bảng 3.7. Số lượng tế bào trung mô ở vị trí gần và xa cuống rốn**

Số lượng tế bào trung mô	Vị trí gần cuống rốn	Vị trí xa cuống rốn
<5	0	1
5-10	13	10
10-15	13	8
15-20	2	7
20-25	1	3
>25	0	1
n	30	30
Trung bình:	11.2 ± 0,07	12,6 ± 1,11
P	> 0,05	

Tế bào trung mô: Chúng tôi tiến hành đếm số lượng tế bào trung mô tương tự như đã đếm số lượng tế bào biểu mô. Kết quả thu được như bảng 3.7

Kết quả đếm số lượng tế bào trung mô cho kết quả tương đối hằng định khoảng 11 tế bào trên một vi trường tương đương 300µm độ dài. Sự khác biệt về số lượng tế bào ở hai vị trí gần và xa cuống rốn cũng không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

**Bảng 3.8. Số lượng tế bào biểu mô và trung mô gần cuống rốn đếm trên tiêu bản HE**

Số lượng tế bào	Biểu mô	Trung mô
<10	0	10
10-20	2	19
20-30	11	1
30-40	11	0
40-50	2	0
50-60	3	0
>60	1	0
Trung bình:	33,80 ± 13,171	11.20 ± 0,0700
P < 0,05		

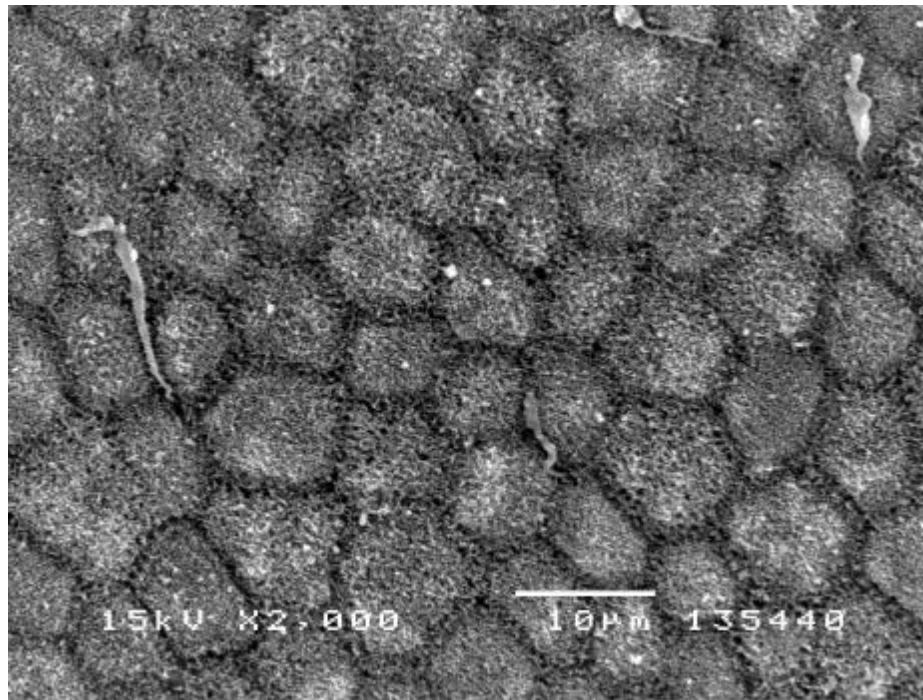
Tuy nhiên so sánh về số lượng tế bào biểu mô và trung mô với test thống kê t cặp đôi (paired t test) thì số lượng tế bào biểu mô đếm được nhiều hơn số lượng tế bào trung mô ở cùng khu vực, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ . Điều này thể hiện ở bảng 3.8

### **3.1.3. Đặc điểm hình thái siêu vi thể của màng ối quan sát dưới kính hiển vi điện tử**

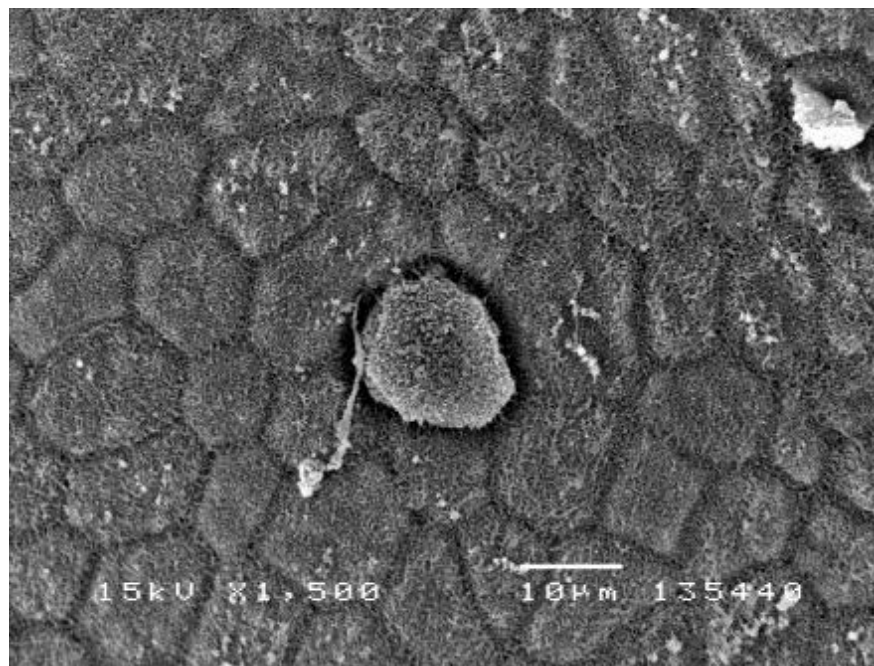
#### **3.1.3.1. Đặc điểm hình thái siêu vi thể của màng ối quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM)**

Quan sát dưới kính hiển vi điện tử, chúng tôi nhận thấy các tế bào biểu mô màng ối có hình dạng khác nhau từ dạng trụ, đa diện đến hình cầu, đa số sắp xếp tạo thành một lớp tế bào trên màng đáy. Trên màng đáy, các tế bào biểu mô sắp xếp theo bốn dạng mô hình chính hoặc các dạng chuyển tiếp giữa các mô hình:

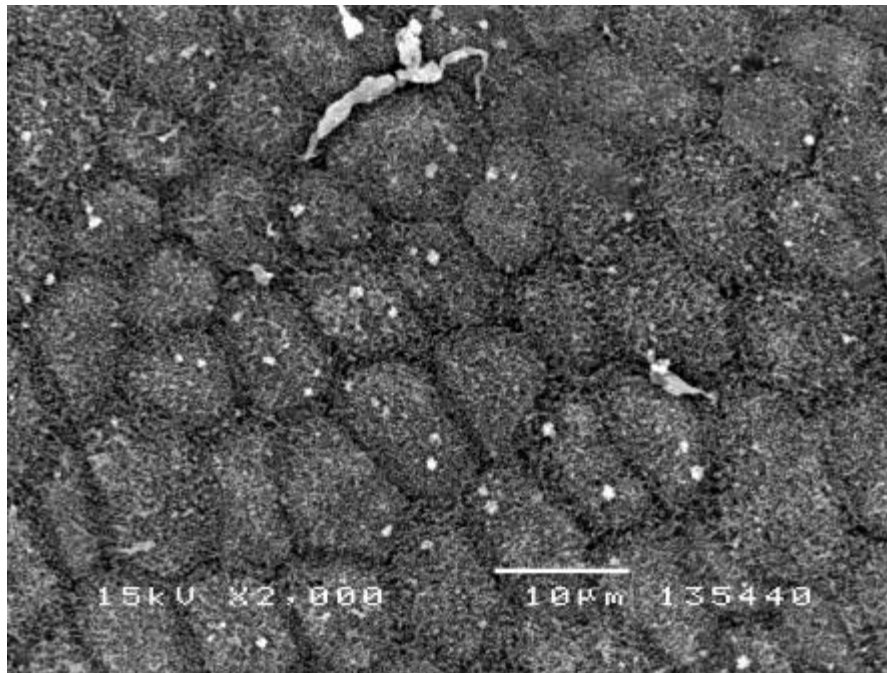




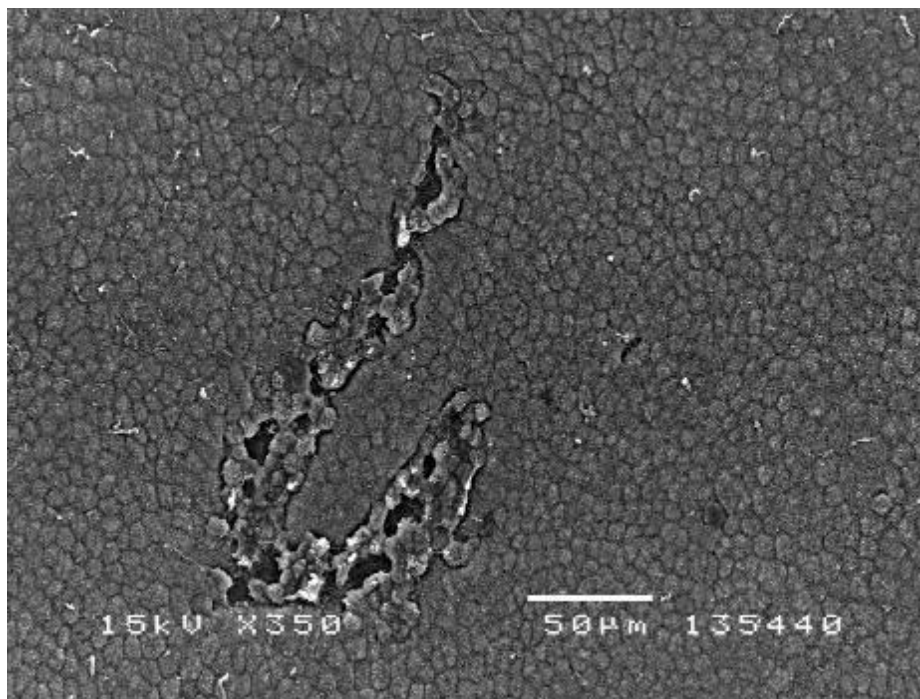
*Hình 3.7. Mô hình sắp xếp tế bào biểu mô dạng 1 (SEM x2.000)  
 Các tế bào biểu mô màng ối có hình đa giác sắp xếp trên một mặt phẳng*



*Hình 3.8. Mô hình sắp xếp tế bào biểu mô dạng 2 (SEM x1.500)  
 Hình ảnh tế bào hình bầu dục, lớn hơn và ngăn cách với các tế bào xung  
 quanh bởi các kênh được tạo bởi các sợi tế bào chất mỏng*

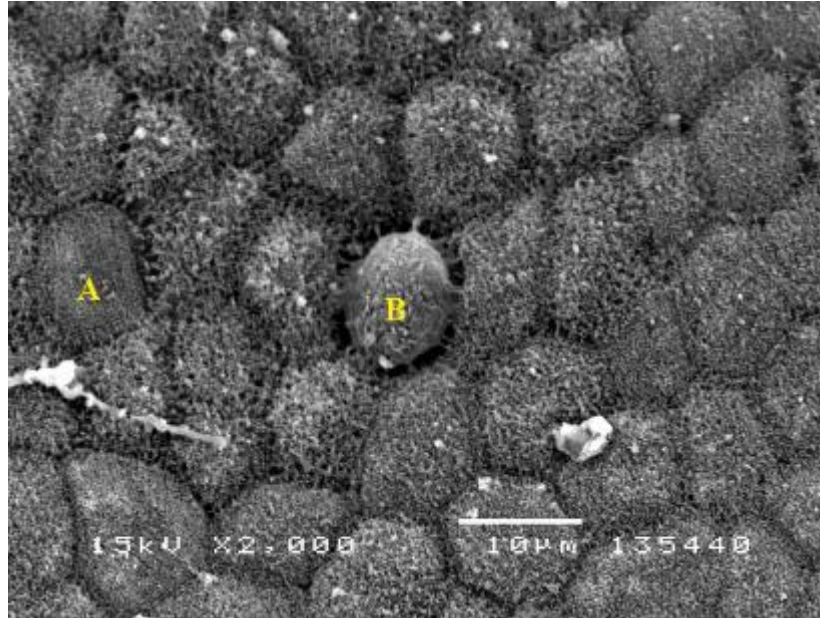


*Hình 3.9. Mô hình sắp xếp tế bào biểu mô dạng 3 (SEM x2.000)  
Các tế bào hình đa giác khá dài, có xu hướng nằm song song với nhau*



*Hình 3.10. Mô hình sắp xếp tế bào biểu mô dạng 4 (SEM x350)  
Xuất hiện bất thường một mảng tế bào hình tròn, ngăn cách với các tế bào xung quanh bằng những khe sâu*

Chúng tôi cũng đã quan sát được một số hình thái tế bào khác thường như trong hình sau:



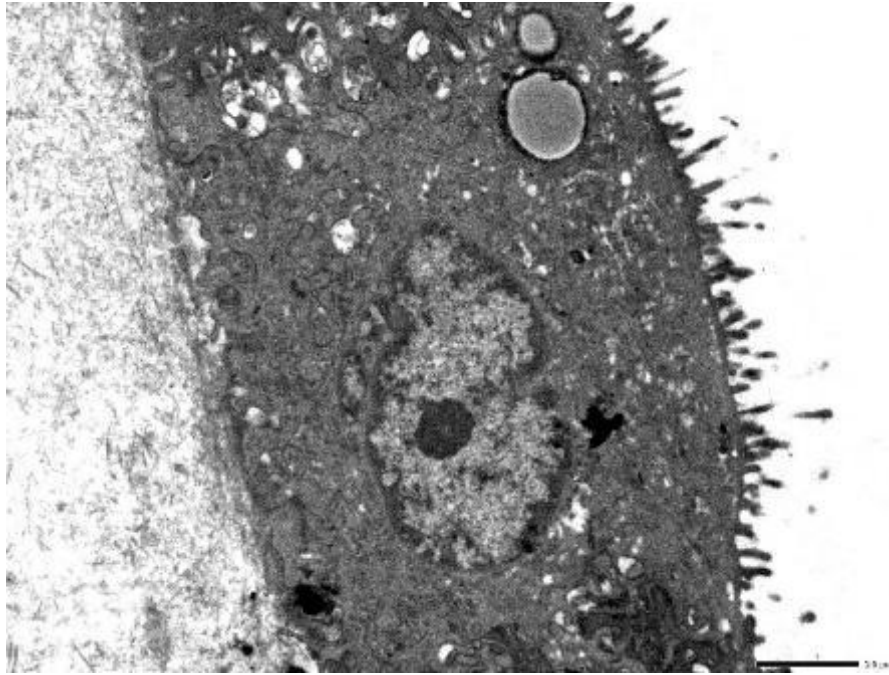
*Hình 3.11. Một số hình thái tế bào khác thường (SEM x3.000)  
(A) tế bào có bề mặt bằng phẳng và (B) tế bào có hình bầu dục, nằm  
ngăn cách với xung quanh bởi những khoảng trống và nối với tế bào xung  
quanh bằng sợi tế bào chất*

### **3.1.3.2. Đặc điểm hình ảnh siêu vi thể của màng ối quan sát qua kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM)**

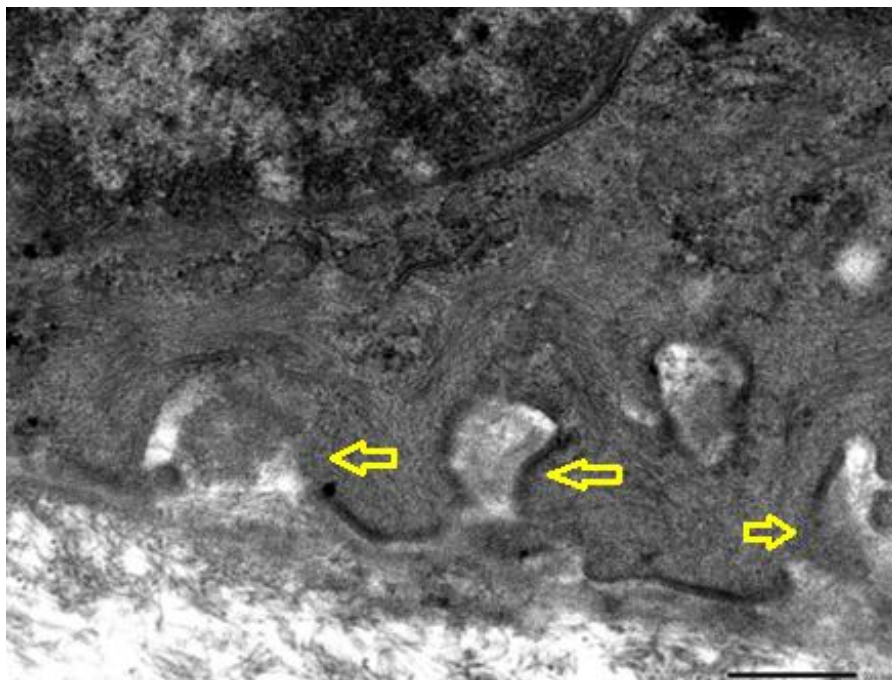
Quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) (Hình 3.12), chúng tôi nhận thấy các tế bào biểu mô màng ối có những chung đặc điểm sau:

Các tế bào biểu mô màng ối là các tế bào biểu mô đơn, có hình khối hoặc hình tròn với nhiều vi nhung mao ở đỉnh.

Nhân tế bào có kích thước tương đối hằng định, tuy nhiên hình dáng màng nhân không đều, có các hình dáng thay đổi: múi, khía hoặc cuộn lại. Chất nhân có đậm độ điện tử không đều.

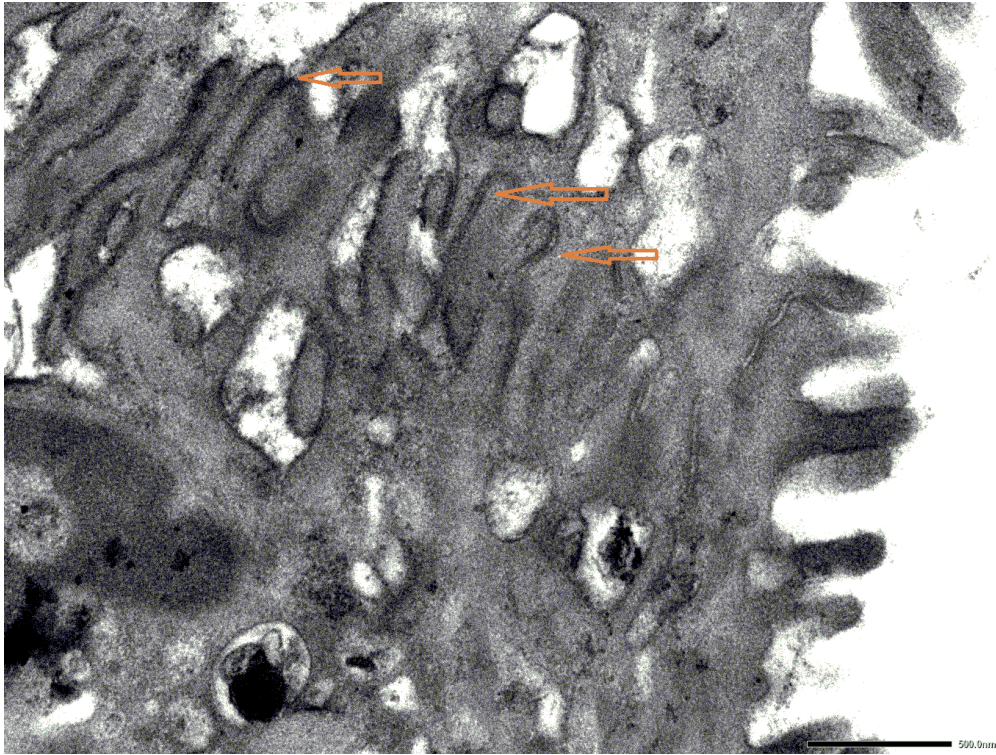


*Hình 3.12. Tế bào biểu mô màng ối (TEM x2.000)*



*Hình 3.13. Liên kết giữa tế bào biểu mô với màng đáy (TEM x10.000)  
Liên kết tế bào biểu mô màng ối với màng đáy như hình dạng mỏm chêm (vị trí các mũi tên)*

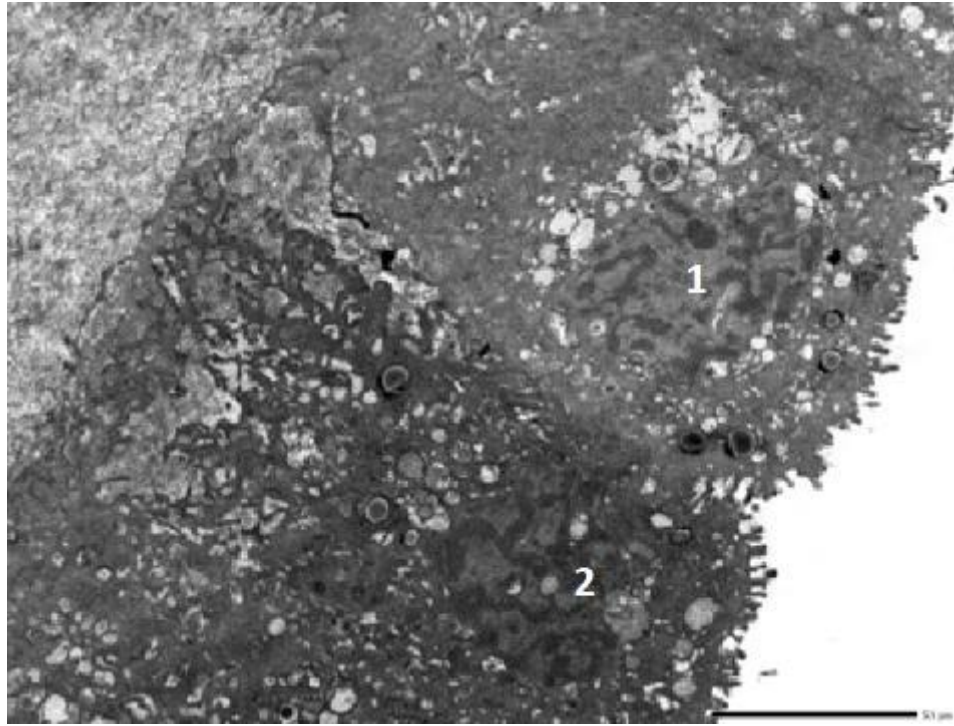




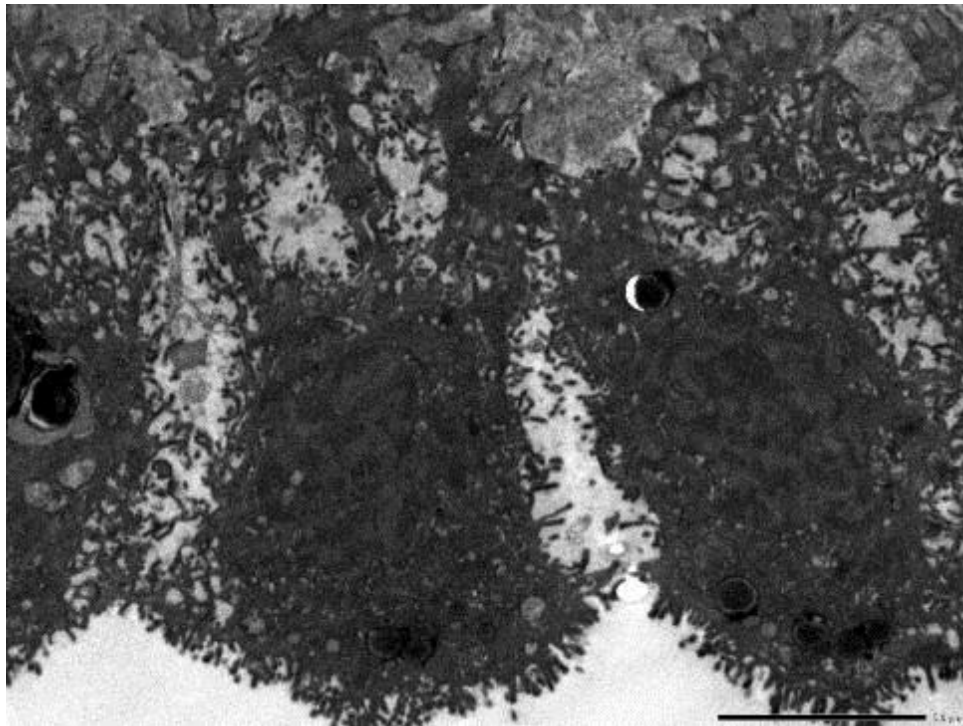
*Hình 3.14. Liên kết giữa hai tế bào biểu mô màng ối (TEM x10.000)  
Quan sát bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM), vùng liên kết giữa hai  
tế bào tăng đậm độ điện tử (vị trí các mũi tên)*

Cạnh bên tế bào tương đối phức tạp với các liên kết dạng cầu nối gian bào tại vị trí liên kết có tăng đậm độ điện tử nhưng không có tơ trương lực như các liên kết desmosom và không có liên kết dính (Hình 3.14).

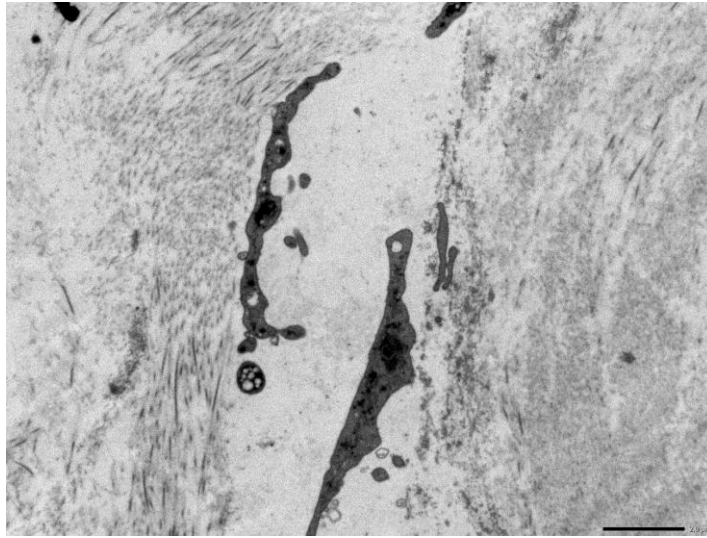
Đặc biệt, chúng tôi quan sát có hai loại tế bào với tế bào chất có đậm độ điện tử khác nhau: đậm hoặc nhạt hơn. Như hai tế bào (1) và (2) ở hình 3.15



Hình 3.15. Hai tế bào biểu mô (1) và (2) màng ối có đậm độ điện tử khác nhau (TEM x1500)



Hình 3.16. Các vi nhung mao và kênh gian bào (TEM x1.500)



Hình 3.17. Lớp trung mô và các tế bào trung mô màng ối (TEM x2000)

**3.1.3.3. Số lượng tế bào biểu mô màng ối đếm trên kính hiển vi điện tử quét**

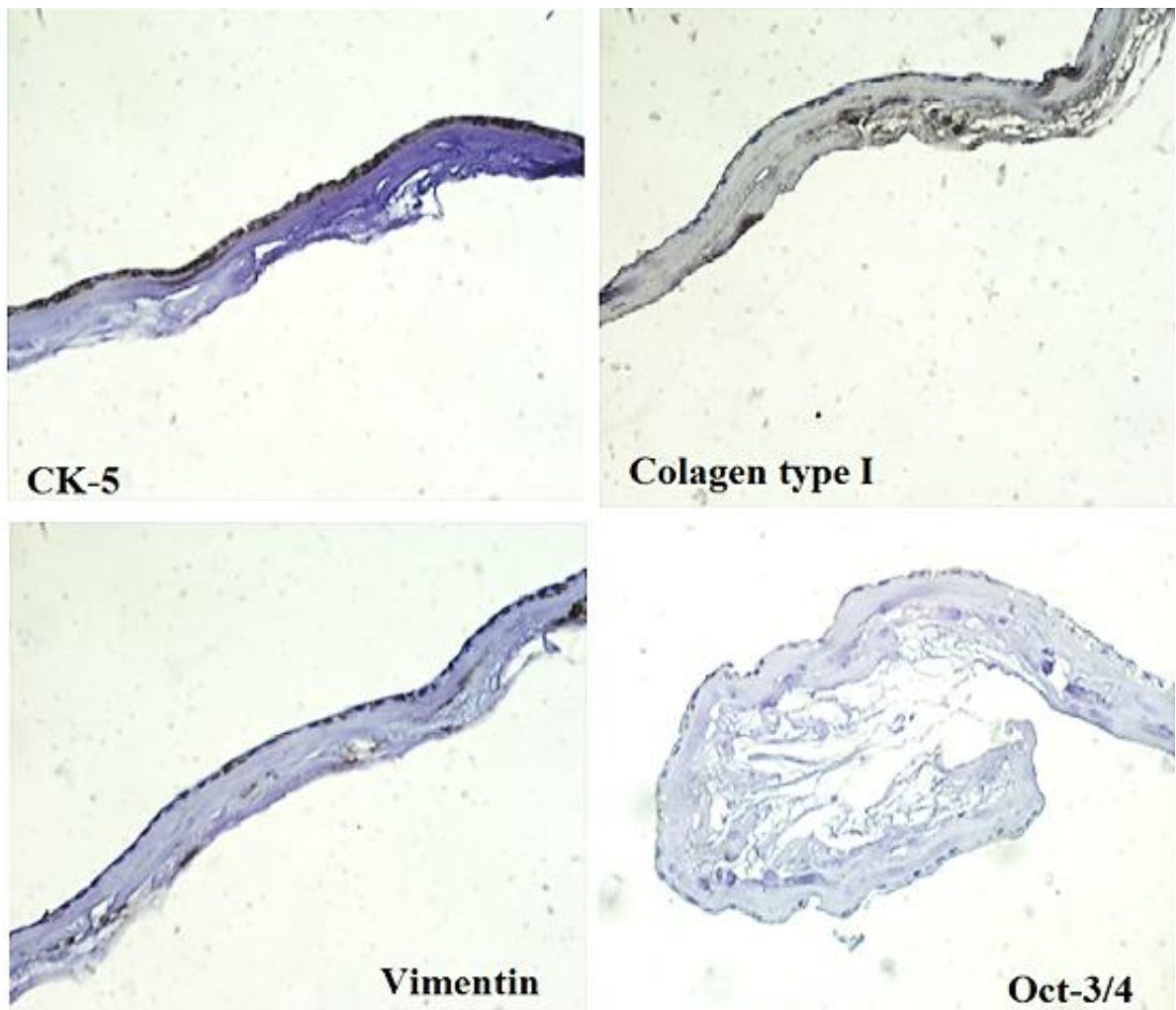
**Bảng 3.9. Số lượng tế bào biểu mô đếm dưới kính hiển vi điện tử**

Mẫu	Số lượng tế bào biểu mô	
	Gần cuống rốn	Xa cuống rốn
1	152	113
2	169	109
3	133	105
4	185	121
5	184	120
6	217	89
7	210	163
8	256	210
9	232	213
10	189	88
Mean ± SD	192.7 ± 37.08	133.1 ± 46.26



So sánh kết quả đếm số lượng tế bào biểu mô trên kính hiển vi điện tử: số lượng tế bào biểu mô ở vị trí gần cuống rốn nhiều hơn ở vị trí xa cuống rốn là 36-83 tế bào với độ tin cậy 95%,  $p < 0,05$ .

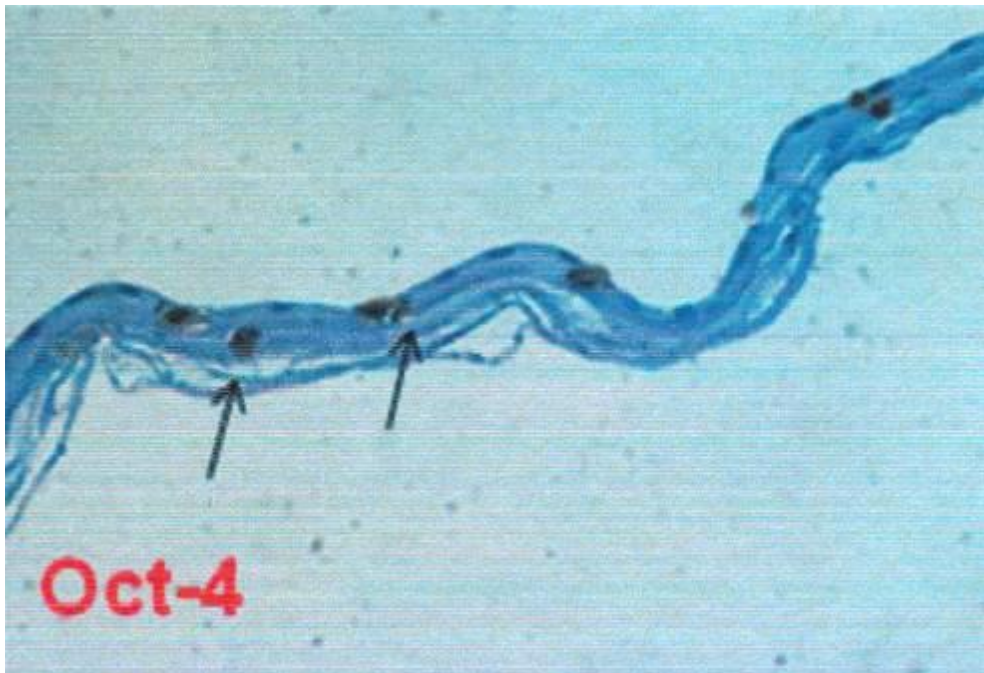
#### 3.1.4. Xác định đặc tính màng ối và tính gốc của tế bào biểu mô màng ối



Hình 3.18. Kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch  
(dương tính với các dấu ấn Oct-3/4, Vimentin, CK-5, Collagen type I)

Trong khuôn khổ của nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật hóa mô miễn dịch để xác định sự biểu hiện một số dấu ấn của màng ối đã qua xử lý. Kết quả cho thấy tế bào biểu mô hiện dương tính với các dấu ấn Oct-3/4, Collagen type I, vimentin, CK5





*Hình 3.19. Kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch  
(dương tính với các dấu ấn Oct-4)*

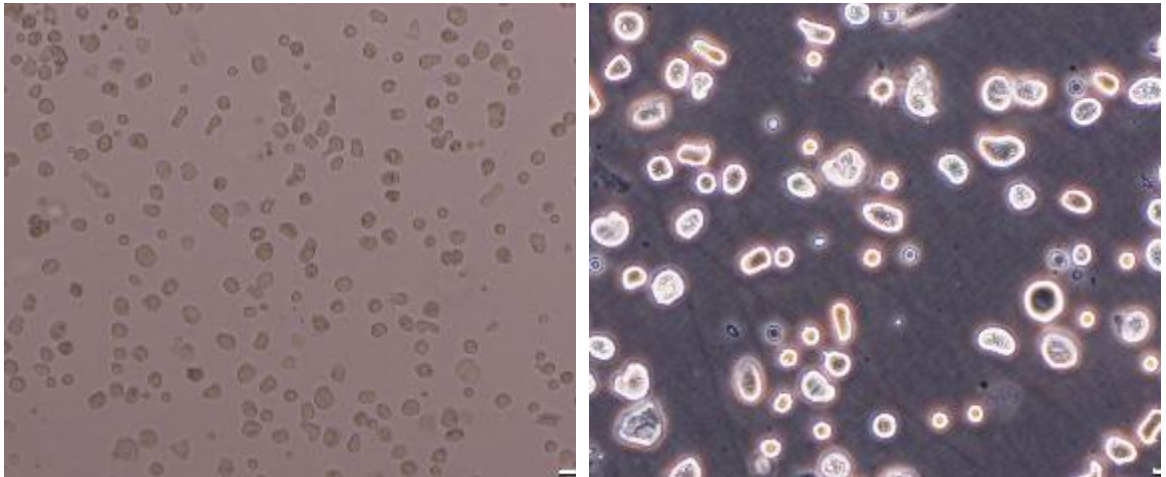


*Hình 3.20. Kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch  
(dương tính với các dấu ấn SSEA-4)*

## 3.2. Phân lập, nuôi cấy và bước đầu đánh giá khả năng biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết

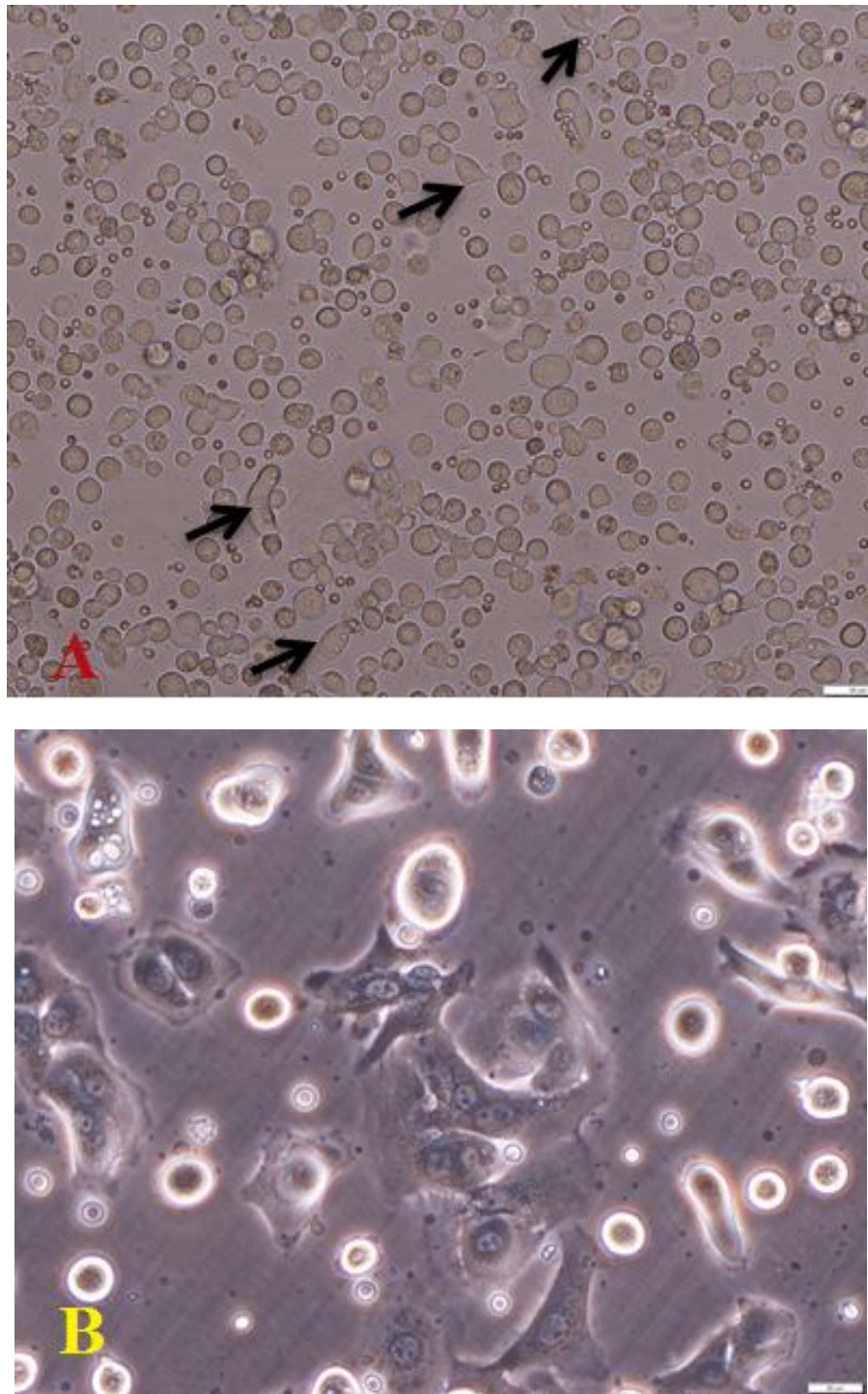
### 3.2.1. Phân lập tế bào gốc từ màng ối người

Chúng tôi tiến hành theo phương pháp của Toshio Miki. và CS [95], phân lập tế bào bằng phương pháp sử dụng enzym phân cắt mô phối hợp với các biện pháp cơ học. Hỗn dịch tế bào thu được nuôi cấy trong 10ml môi trường nuôi cấy cơ bản (DMEM, FBS 10%, kháng sinh anti-anti (Sigma, Việt nam). Sau đó cho vào đĩa nuôi cấy đường kính 10cm. Quan sát các tế bào thu được bằng kính hiển vi quang học.



*Hình 3.21. Các tế bào thu được sau khi phân lập từ màng ối người  
(A: độ phóng đại 20X, B: độ phóng đại 40X)*

Kết quả nghiên cứu cho thấy các tế bào sau khi phân lập có hình tròn lơ lửng trong môi trường nuôi cấy (Hình 3.20 A). Sau khoảng 24 giờ nuôi cấy tế bào gốc biểu mô màng ối có dấu hiệu bắt đầu bám dính xuống bề mặt đĩa nuôi cấy (Hình 3.21A). Số lượng tế bào gốc biểu mô tăng lên sau 2 ngày. Sau 3 ngày nuôi cấy tế bào có hình dạng đặc trưng của tế bào gốc biểu mô (Hình 3.21 B).

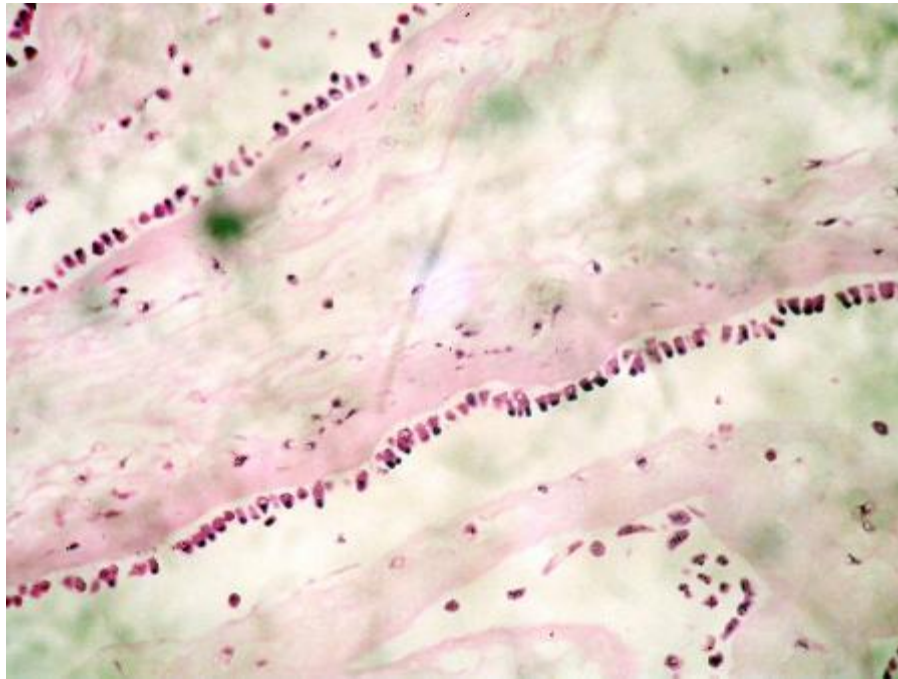


*Hình 3.22. Các tế bào phân lập từ màng ối sau 24h*

*Hình ảnh các tế bào nuôi cấy bắt đầu tăng sinh bám dính và có dạng hình thoi hoặc đa diện. (A: sau 24h - với độ phóng đại 20X, B: sau 72h - với độ phóng đại 40X)*



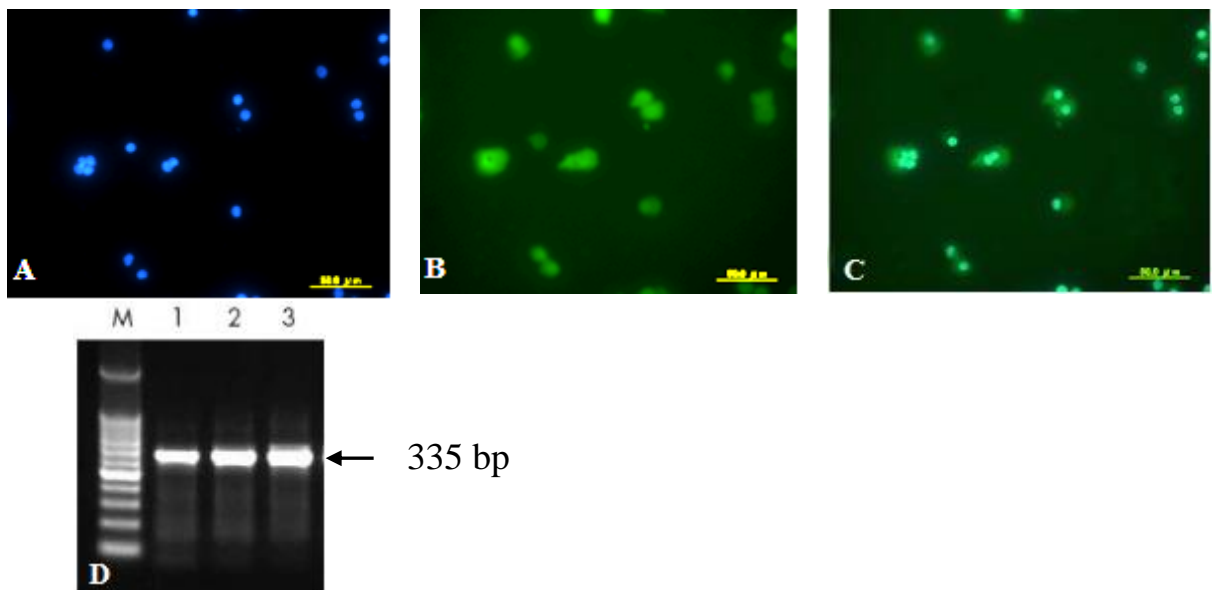
Qua nghiên cứu chúng tôi thấy nếu tế bào gốc biểu mô màng ối được phân lập sau 4h kể từ khi thu nhận mẫu sẽ giảm khả năng sống và nguy cơ nhiễm cao hơn so với các tế bào được phân lập đúng quy trình và trong thời gian sớm hơn trước 4h.



*Hình 3.23. Các tế bào biểu mô màng ối bị bong tróc dưới tác dụng của trypsin*

### **3.2.2. Xác định tính gốc của tế bào phân lập được**

Trong khuôn khổ nghiên cứu, chúng tôi cũng đã xác định biểu hiện của dấu ấn Oct-3/4 nhằm xác định tính gốc của tế bào màng ối. Kết quả PCR cho thấy trong các tế bào màng ối chúng tôi đã thu nhận được có biểu hiện dấu ấn Oct-4 (Hình 3.24D). Kết quả phù hợp với kết quả nhuộm hóa miễn dịch tế bào với kháng thể kháng Oct-4 (Hình 3.24 A,B,C) của người.



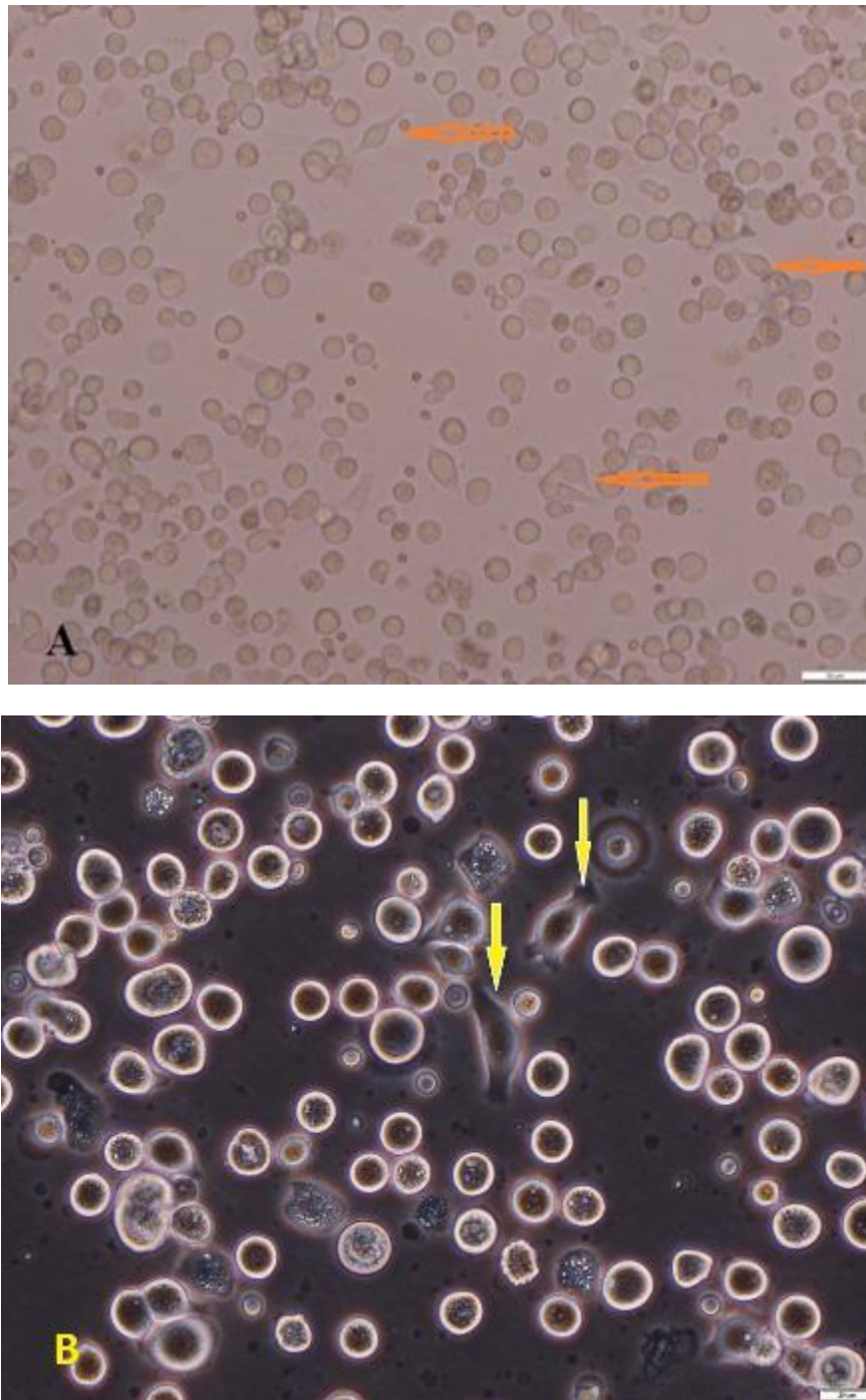
Hình 3.24. Biểu hiện dấu ấn OCT-4.

A, B, C: Hình ảnh tế bào nhuộm hóa miễn dịch với OCT-4, A: Nhuộm nhân bằng DAPI, B: Nhuộm OCT-4. C: Hình ảnh lồng ghép của A và B, D: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của OCT-4. Ba mẫu tế bào gốc màng ối khác nhau được cho vào 3 giếng điện di đánh số 1, 2, 3.

### 3.2.3. Nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc màng ối

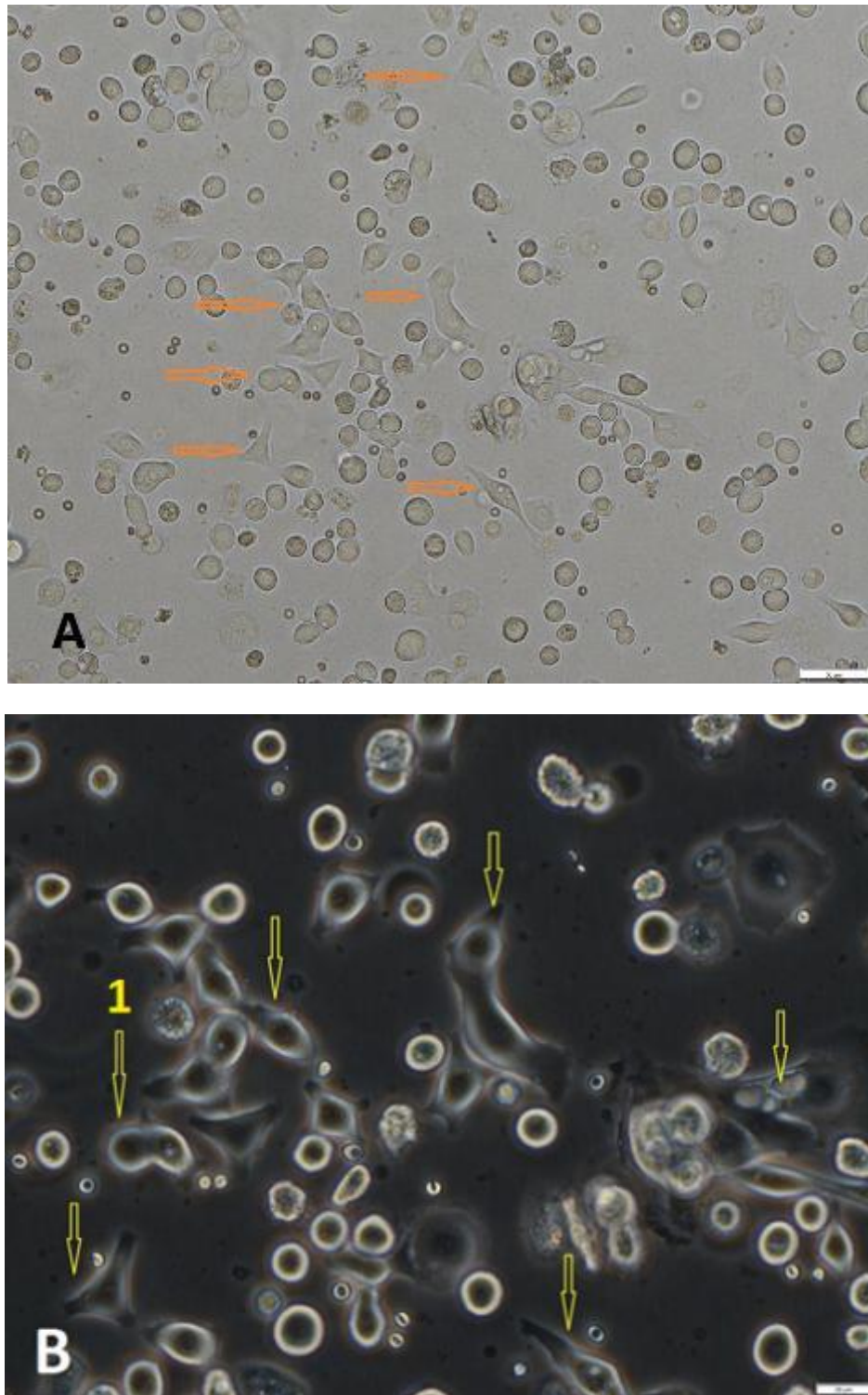
Sau khi tế bào gốc biểu mô màng ối được phân lập bởi các kỹ thuật chuyên biệt sẽ được nuôi cấy trong môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) có bổ sung thêm penicillin (50 U/ml), streptomycin (50  $\mu$ g/ml), L-glutamin ( $2 \times 10^{-3}$ M), huyết thanh bào thai bò - FBS (10%), hai ngày thay môi trường một lần đồng thời cấy chuyển tế bào 2 tuần một lần để duy trì trong phòng thí nghiệm. Tế bào gốc màng ối được duy trì nuôi cấy trong tủ nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C và 5% CO<sub>2</sub>. Điều kiện nuôi cấy tế bào gốc biểu mô màng ối phải đảm bảo vô trùng tuyệt đối tránh nhiễm khuẩn và nấm.

Ngay sau khi nuôi cấy 24 giờ, các tế bào màng ối thể hiện tính gốc (tăng sinh, bám dính, có hình dạng đặc trưng tế bào gốc): có xu hướng bám dính vào bề mặt đĩa nuôi cấy, phát triển thành những cụm tế bào hình đa diện hoặc hình thoi và có kích thước trung bình. Số lượng tế bào thể hiện tính gốc tăng lên rõ sau 48 giờ và 72 giờ



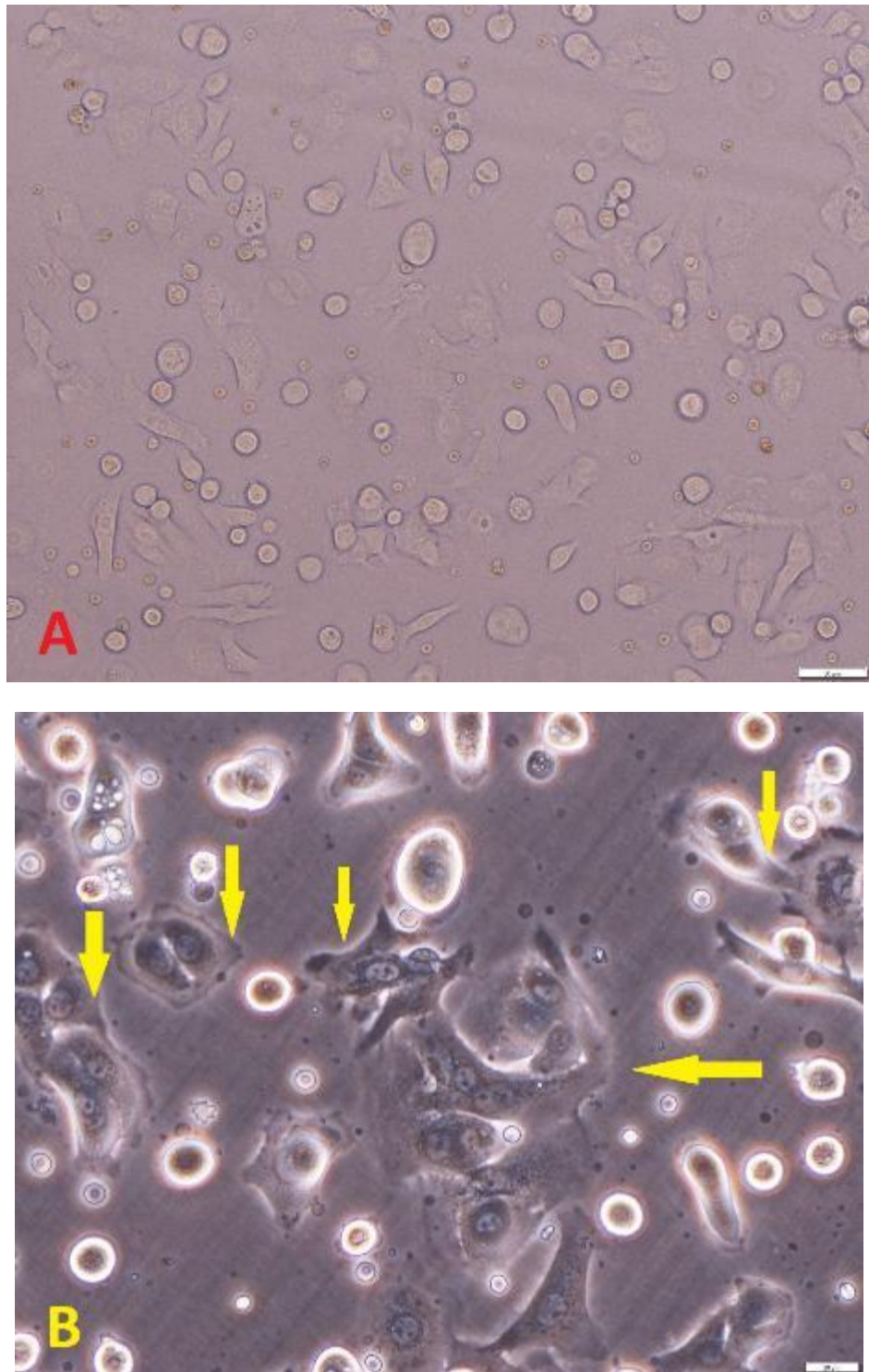
Hình 3.25. Hình ảnh các tế bào gốc tăng sinh sau 24 giờ  
Hình ảnh các tế bào nuôi cấy bắt đầu tăng sinh bám dính và có dạng hình  
thoi hoặc đa diện. (A: độ phóng đại 20X, B: độ phóng đại 40X)





Hình 3.26. Hình ảnh các tế bào gốc tăng sinh sau 48 giờ

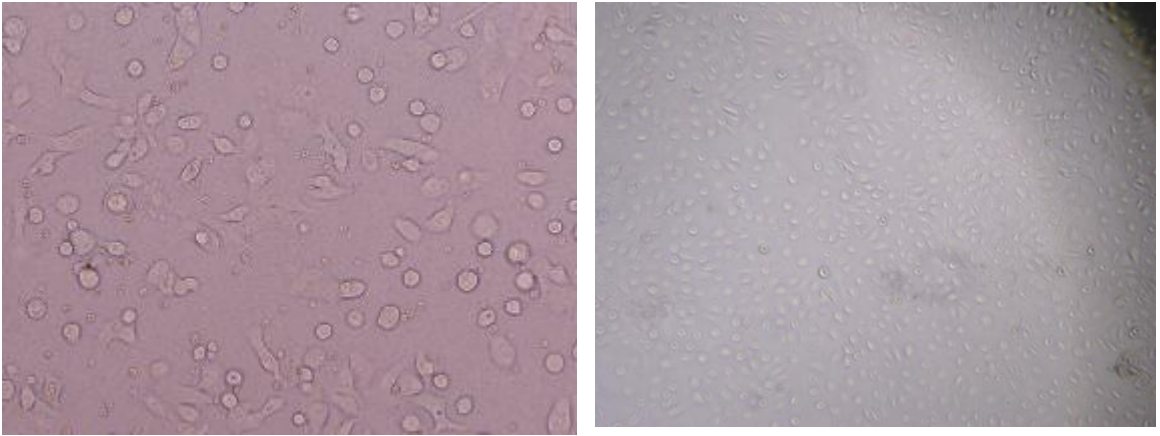
Hình ảnh các tế bào nuôi cấy bắt đầu tăng sinh bám dính và có dạng hình thoi hoặc đa diện. Ghi nhận được hình ảnh tế bào đang phân chia ở vị trí mũi tên đánh số 1 (A: độ phóng đại 20X, B: độ phóng đại 40X)



*Hình 3.27. Hình ảnh các tế bào gốc tăng sinh sau 72 giờ  
Hình ảnh số lượng các tế bào bám dính và có dạng hình thoi hoặc đa diện  
tăng lên rõ. (A: độ phóng đại 20X, B: độ phóng đại 40X)*



### Theo dõi sự tăng sinh tế bào



Hình 3.28. Hình ảnh tăng sinh tế bào sau 72h và sau 10 ngày (độ phóng đại 20X và 10X)

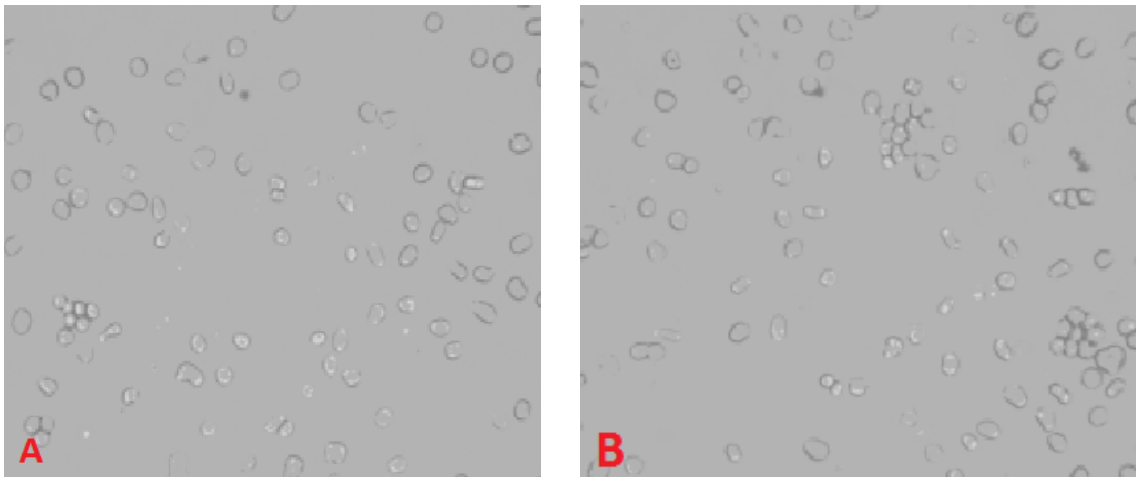
Ở ngày thứ nhất tế bào tăng sinh chậm do giai đoạn đầu tế bào còn làm quen với môi trường chưa bám dính hết. Tế bào tăng sinh mạnh mẽ nhất từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 10 (hình). Từ ngày thứ 10 trở đi tế bào có dấu hiệu tăng sinh chậm lại do diện tích che phủ của tế bào đã đạt khoảng 60-80% bề mặt đĩa nuôi cấy, còn rất ít không gian cho tế bào tiếp tục tăng sinh. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi rất phù hợp với các tác giả trên thế giới [98], [99]

Kết quả chúng tôi quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào gốc màng ối đạt hiệu quả. Như vậy tế bào có thể sử dụng trong nghiên cứu cũng như trong công nghệ mô phù hợp với nghiên cứu của các tác giả khác.

#### 3.2.4. Bảo quản và phục hồi thành công tế bào gốc màng ối

Bảo quản 1 mẫu tế bào biểu mô màng ối trong điều kiện lạnh âm sâu trong nitơ lỏng trong môi trường DMEM có 10% DMSO, 10% huyết thanh bào thai bê. Thời gian bảo quản: 3 tháng.

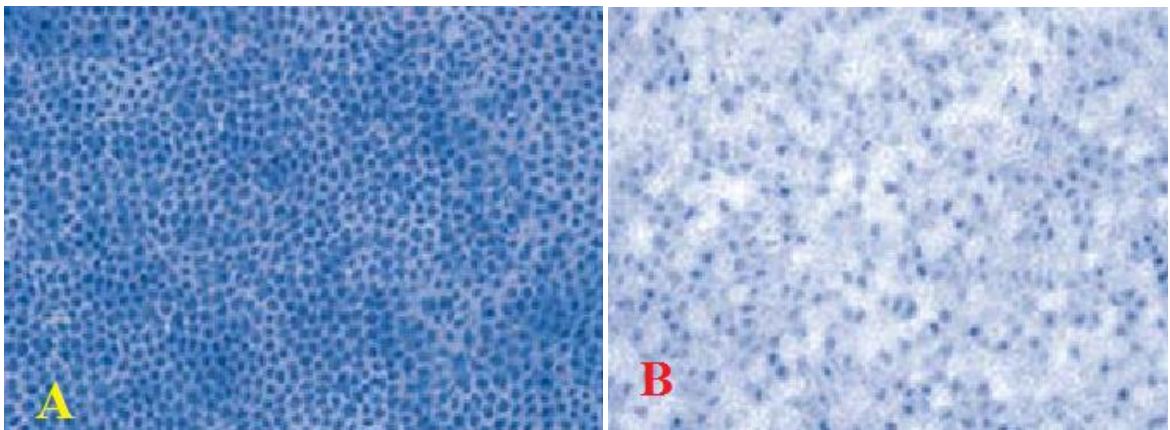
Nuôi cấy phục hồi tế bào. Kết quả, sau 3 tháng bảo quản, các tế bào phục hồi thành công và tiếp tục tăng sinh trong môi trường nuôi cấy cơ bản



*Hình 3.29. Hình ảnh tế bào sau 24 giờ nuôi cấy sau khi bảo quản và phục hồi*

*A: Tế bào gốc cấy chuyển lần 2. B: Tế bào rã đông sau bảo quản 3 tháng.*

Để xác định tỷ lệ tế bào sống sau khi bảo quản chúng tôi nhuộm tế bào sau 3 tháng bảo quản ở nhiệt độ  $-80^{\circ}\text{C}$  với trypan blue. Kết quả sau 3 tháng bảo quản, các tế bào phục hồi thành công và tiếp tục tăng sinh trong môi trường nuôi cấy cơ bản.



*Hình 3.30. Nhuộm Trypan blue xác định tỷ lệ tế bào sống.*

*A: Tế bào bị chết bắt màu trypan blue đậm (mẫu chứng). B: Tế bào bảo quản 3 tháng trong môi trường DMEM, 10% DMSO, 10% FBS ở nhiệt độ  $-80^{\circ}\text{C}$  (mẫu nghiên cứu). Rất ít các tế bào chết bắt màu trypan blue.*

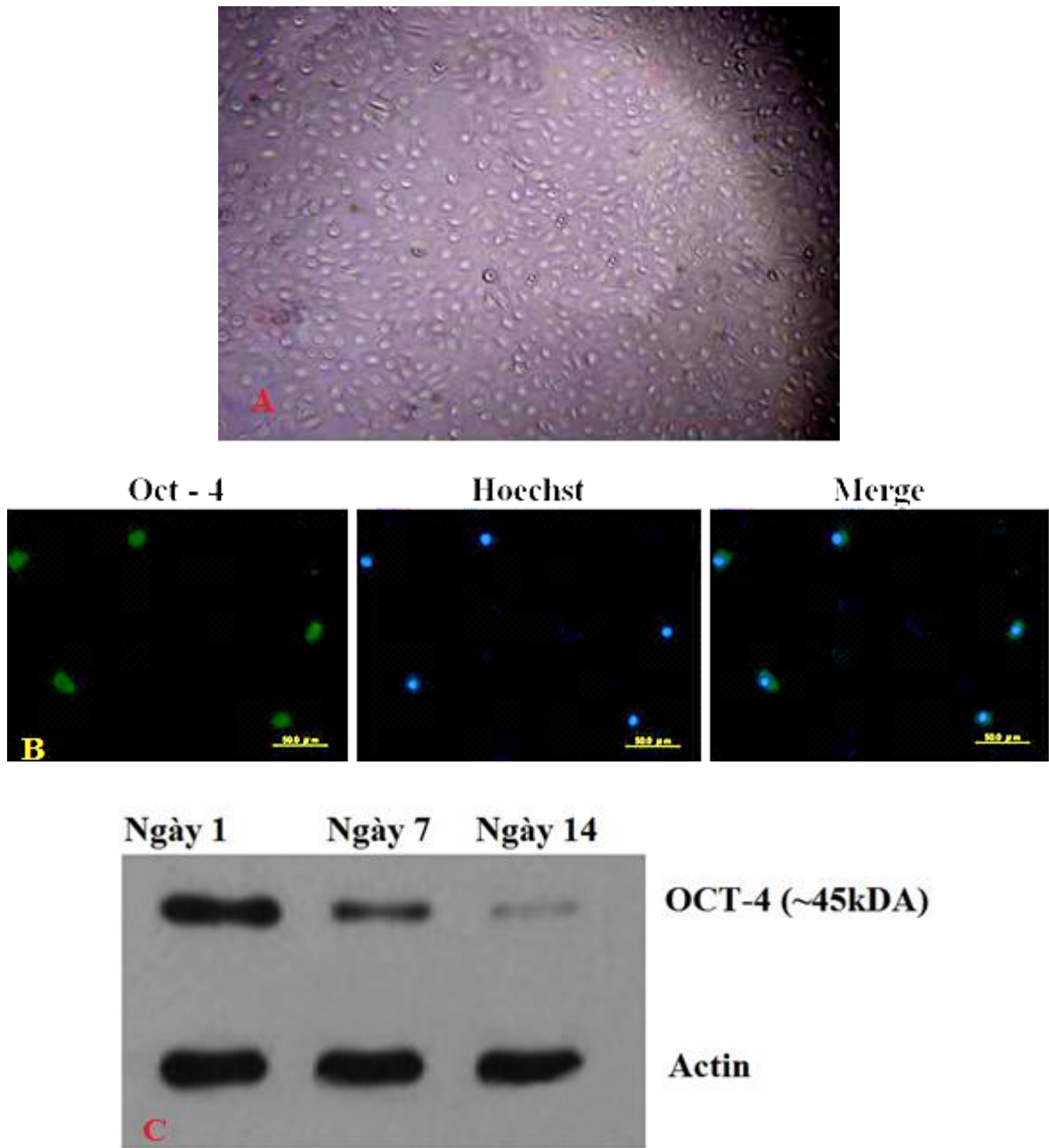
### **3.2.5. Biệt hóa tế bào gốc thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết**

Biệt hóa tế bào gốc thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết bằng môi trường định hướng biệt hóa sử dụng môi trường cơ bản (DMEM) có bổ sung 10mM nicotinamide, 55  $\mu$ M  $\beta$ - mercaptoethanol, 1mM sodium pyruvate.

Xác định sự thay đổi dấu ấn tế bào gốc OCT-4 đồng thời theo dõi dấu ấn insulin – dấu ấn biểu hiện sự biệt hóa tế bào gốc thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết.

#### ***3.2.5.1. Biểu hiện của OCT-4 - dấu ấn của tế bào gốc***

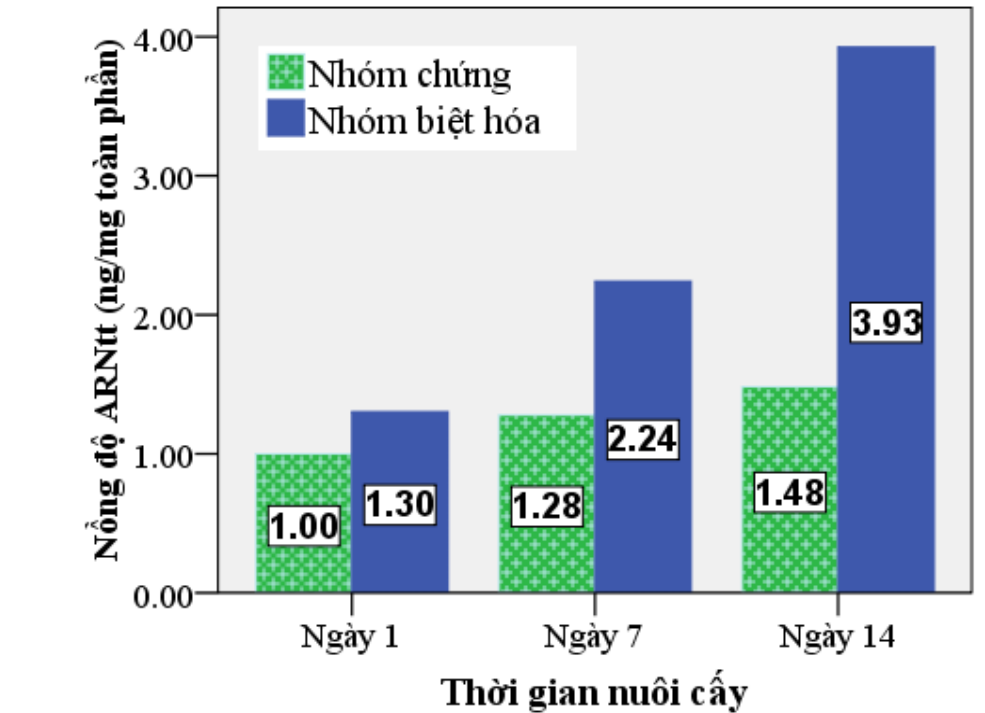
Trái với dấu ấn insulin, nồng độ mRNA OCT-4, dấu ấn tế bào gốc giảm dần theo thời gian trong nhóm được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung nicotinamid và  $\beta$ -mercaptoetanol. Hình ảnh western blot cho thấy OCT-4 giảm dần theo thời gian trong quá trình biệt hóa (Hình 3.30c).



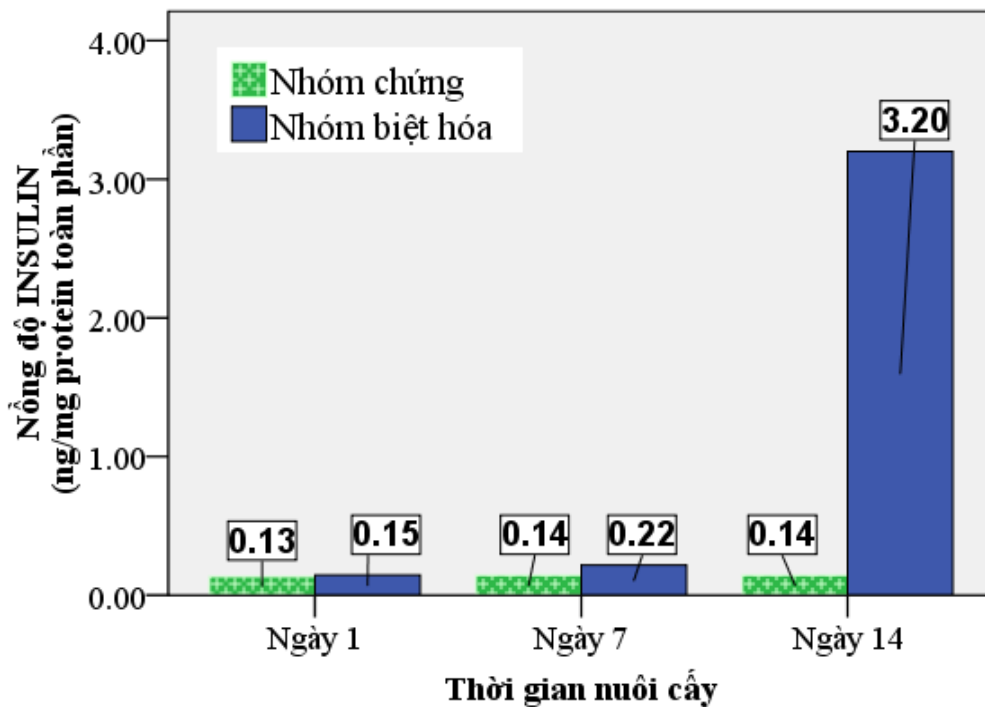
Hình 3.31. Hình ảnh tế bào gốc màng ối người sau 7 ngày nuôi cấy.

A: Chụp ảnh trực tiếp trên đĩa nuôi cấy qua kính hiển vi đối pha (Độ phóng đại 200X). B: Nhuộm hóa miễn dịch tế bào với OCT-4, màu xanh lá OCT-4. c: Western blot OCT-4. Dịch ly giải tế bào gốc màng ối nuôi cấy trong môi trường định hướng biệt hóa thành tế bào Beta ngày thứ 1, 7, 14. 25  $\mu\text{g}$  protein/10 $\mu\text{l}$  của mỗi mẫu dịch ly giải tế bào được cho vào mỗi giếng trên gel điện di. Actin được dùng để kiểm tra lượng protein cho vào mỗi giếng.

**3.2.5.2. Biểu hiện của Insulin - Dấu ấn tế bào gốc biệt hóa thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết**



A



B

**Biểu đồ 3.1. Biểu hiện mARN (A) và protein (B) của Insulin.**

Biểu hiện mRNA của insulin chứng tỏ có sự biệt hóa của tế bào gốc thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết (Hình 3.1a). Sau 7 ngày nuôi cấy trên đĩa plastic thấy nồng độ mRNA của insulin (xác định bằng RT-PCR) không tăng. Sau 14 ngày nuôi cấy trên plastic, trong nhóm có bổ sung trong môi trường nuôi cấy Nicotinamide và  $\beta$ -mercaptoetanol thấy tăng cao insulin. Kết quả định lượng protein insulin cũng phù hợp với kết quả định lượng mRNA (Biểu đồ 3.1b). Kết quả hóa miễn dịch tế bào thấy tế bào gốc biểu hiện rõ nét insulin trong nhóm được xử lý với nicotinamide và  $\beta$ -mercaptoetanol.

Nồng độ mRNA và protein tăng sau 7 ngày (ngày 7-14) sau khi tế bào được nuôi cấy với nicotinamide và  $\beta$ -mercaptoethanol. Kết quả mRNA được tính toán so với nhóm chứng. Kết quả định lượng protein được tính toán dựa trên nồng độ protein toàn phần trong dung dịch ly giải tế bào.

## CHƯƠNG 4

### BÀN LUẬN

#### 4.1. Mô tả đặc điểm cấu trúc vi thể, siêu vi thể màng ối và tế bào gốc màng người

##### 4.1.1. Đặc điểm hình thái màng ối trên tiêu bản nhuộm HE

###### 4.1.1.1 Độ dày của màng ối

Để đánh giá độ dày của màng ối và các lớp màng ối, chúng tôi soi tiêu bản HE và đo ở điểm dày nhất trên mỗi tiêu bản bằng kính hiển vi huỳnh quang Nikon chụp ảnh bằng phần mềm ACT-1 và đo đếm bằng phần mềm tự động Image Pro Plus. Chúng tôi nhận thấy độ dày của màng ối thay đổi tùy theo vị trí, ở vị trí gần quanh cuống rốn 1-2cm, chúng tôi đo được kích thước  $156.3146 \pm 25.47185 \mu\text{m}$ , ở vị trí xa cuống rốn chúng tôi đo được  $130.7173 \pm 29.06836 \mu\text{m}$ . Sự khác biệt về độ dày màng ối ở hai vị trí gần và xa cuống rốn có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

Tuy nhiên so với các công bố khác đã tiến hành thì cho ra các kết quả khác nhau từ 20 - 500  $\mu\text{m}$ . Các kết quả nghiên cứu thể hiện ở bảng 4.1

Theo Benirschke thì độ dày màng ối khoảng 200 - 300  $\mu\text{m}$ , trong đó độ dày lớp biểu mô và màng đáy là 20–30  $\mu\text{m}$ , độ dày lớp nguồn gốc từ trung bì phôi 15–30  $\mu\text{m}$ , vùng chuyển tiếp có kích thước không cố định, dày và có cấu trúc lỏng lẻo [21]. Theo Bourne và CS thì độ dày màng ối thì thay đổi rất lớn trong khoảng khoảng 20-500  $\mu\text{m}$  [100]. Trong khi đó theo Danforth và CS thì độ dày màng ối chỉ khoảng 50  $\mu\text{m}$  [101] gần tương tự như nghiên cứu của von Versen-Hoynck và CS [102]. Từ các công bố của các tác giả này cũng như qua nghiên cứu của chúng tôi, chúng ta thấy độ dày màng ối rất thay đổi theo các nghiên cứu, nguyên nhân chính là do sự thay đổi về kích thước ở lớp xốp (spongy layer).

**Bảng 4.1. Độ dày màng ối từ các nghiên cứu**

Tác giả	Độ dày màng ối (đơn vị $\mu\text{m}$ )	Phương pháp
Bourne [100]	20 - 500 $\mu\text{m}$	Nhuộm HE
Danforth và CS [101]	50 $\mu\text{m}$	Nhuộm HE
von Versen-Hoynck [102]	20 - 500 $\mu\text{m}$	Nhuộm HE
Benirschke [21]	200 - 300 $\mu\text{m}$	
NC chúng tôi	GCR: $156.3146 \pm 25.47185$ XCR: $130.7173 \pm 29.06836$	Nhuộm HE

Quan sát trên các tiêu bản HE trong nghiên cứu đã tiến hành, chúng tôi cũng nhận thấy kích thước về độ dày của màng ối trên từng tiêu bản cũng thay đổi khá lớn. Đối với vị trí gần cuống rốn, kích thước dày nhất hơn kích thước mỏng nhất của màng ối khoảng 86,65  $\mu\text{m}$  với  $p < 0,05$  (bảng 3.2). Còn đối với vị trí xa cuống rốn, kích thước dày nhất hơn kích thước mỏng nhất của màng ối khoảng 69,15  $\mu\text{m}$  với  $p < 0,05$  (bảng 3.3).

Nhìn chung, độ dày màng ối ở vị trí gần cuống rốn dày hơn vị trí xa cuống, tuy nhiên cũng có biến động về độ dày màng ối trong cùng khu vực gần và xa cuống rốn.

#### **4.1.1.2. Các lớp của màng ối**

Để xác định ranh giới giữa các lớp của màng ối, chúng tôi đã tiến hành nhuộm HE (Hematoxilyn/Eosin) màng ối đã phân tách được. Kết quả, chúng tôi nhận thấy trên tiêu bản HE, màng ối có thể phân chia thành ba lớp rõ rệt.

Lớp tế bào biểu mô là lớp trong cùng và tiếp xúc với dịch ối. Lớp này là một lớp tế bào biểu mô đơn dẹt, hình hộp hay trụ, phần tự do hướng về dịch ối



tạo thành các vi nhung mao giữ chức năng chế tiết và vận chuyển các chất ra vào tế bào. Các tế bào này có nhân lớn không đều. Đáy của các tế bào lớp biểu mô đơn này tiếp xúc với lớp màng đáy. Phần đáy của lớp biểu mô đơn này có hình dáng phức tạp và không đều, nhờ vậy lớp biểu mô đơn bám chặt được vào lớp màng đáy. Các tế bào biểu mô sau được nuôi cấy sau 3 ngày phân lập có hình đa diện hoặc hình thoi.

Chúng tôi đã tiến hành đo gộp kích thước lớp tế bào biểu mô và màng đáy do sự liên kết chặt chẽ giữa tế bào biểu mô và màng đáy. Kết quả nghiên cứu được ghi lại ở bảng 3.4. So sánh kết quả độ dày của hai lớp này ở hai vị trí gần và xa cuống rốn tương ứng là  $20.55 \pm 11.8893$  ( $\mu\text{m}$ ) và  $17.54 \pm 8.1532$  ( $\mu\text{m}$ ), chúng tôi thấy sự khác biệt giữa hai lớp không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

Kết quả về độ dày của lớp biểu mô màng ối và màng đáy của chúng tôi tương tự như của Benirschke, trong khi theo công bố của Hebertson và CS thì chỉ là 8-12  $\mu\text{m}$ . Sự khác biệt này có thể do quan sát của Hebertson và CS chỉ tiến hành trên 2 bệnh nhân. Hebertson và CS cũng đã nêu ra tình trạng tăng độ dày lớp biểu mô ở các trường hợp mẹ bị tiểu đường thai kỳ/ đa ối, 18-56  $\mu\text{m}$  so với bình thường là 8 -12  $\mu\text{m}$  [103].

Trên các tiêu bản chúng tôi quan sát thấy hình ảnh của các lớp tế bào biểu mô xếp chồng lên nhau và xác định đây là loại biểu mô giả tầng (Hình 3.6), chính vì vậy trong màng ối có khả năng tồn tại các tế bào gốc nằm xen giữa các tế bào đã biệt hóa. Hình ảnh này xuất hiện nhiều ở các mẫu màng ối có vị trí gần cuống rốn. Điều này gợi ý đến khả năng thu nhận được tế bào gốc ở vị trí gần cuống nhiều hơn ở vị trí xa cuống rốn.

Lớp trung mô vô mạch: Chứa các mạng các sợi lưới đan xen phức tạp, mạng lưới các nguyên bào sợi lỏng nhúng trong khối chất lưới, các bó sợi ngấm trong chất nhầy, các bó sợi này thường bị trương lên làm tăng độ dày của màng

ôi. Trong lớp trung mô này quan sát trên tiêu bản HE thấy các tế bào trung mô (Hình 3.3).

**Bảng 4.2. Độ dày lớp biểu mô và màng đáy của màng ối**

Tác giả	Độ dày lớp biểu mô và màng đáy (đơn vị $\mu\text{m}$ )	Phương pháp
Hebertson và CS [103]	8 -12 $\mu\text{m}$	Kính hiển vi điện tử TEM
Benirschke [21]	20 - 30 $\mu\text{m}$	
NC chúng tôi	GCR: $20.55 \pm 11.8893$ ( $\mu\text{m}$ ) XCR: $17.54 \pm 8.1532$ ( $\mu\text{m}$ )	Nhuộm HE

Bản chất lớp trung mô gồm 3 lớp nhỏ hơn: lớp đặc, lớp nguyên bào sợi và lớp xốp

**Lớp đặc:** Là một lớp đặc chứa các mạng các sợi lưới đan xen phức tạp, sự thay đổi về mặt cấu trúc các sợi lưới của lớp này so với lớp màng đáy nhằm mang lại tính dẻo dai của màng ối và chống lại sự thâm nhập của bạch cầu khi màng ối bị viêm

**Lớp nguyên bào sợi:** Đây là lớp dày nhất của màng ối, cấu trúc của lớp này là một mạng lưới các nguyên bào sợi lỏng nhúng trong khối chất lưới

**Lớp xốp:** các phần của màng ối cùng màng đệm nén các mô của khoang ngoài phôi dẫn đến hình thành lớp xốp. Cấu tạo của lớp xốp là các bó sợi ngậm trong chất nhầy, các bó sợi này thường bị trương lên làm tăng độ dày của màng ối. Chức năng của lớp xốp là làm cho màng ối trượt dễ dàng trên màng đệm trong khi màng đệm bám chặt vào màng rụng.

So sánh kết quả độ dày của hai lớp trung mô gần và xa cuống rốn, kết quả ghi lại ở bảng 3.5. Độ dày của hai lớp trung mô gần cuống rốn là:  $135.76 \pm 27.8093$  ( $\mu\text{m}$ ), trong khi ở vị trí xa cuống rốn là:  $113.18 \pm 28.3680$  ( $\mu\text{m}$ ). Từ kết quả nghiên cứu, chúng tôi thấy sự khác biệt giữa hai lớp có ý nghĩa thống kê với  $p \leq 0,05$ .

Kích thước của lớp trung mô cũng thay đổi tương tự như kích thước chung của màng ối dày hơn ở phần gần cuống rốn và mỏng dần về phía xa cuống rốn. Sự khác biệt này là do sự thay đổi về kích thước của lớp nguyên bào sợi và lớp xốp trong khi kích thước lớp tế bào biểu mô và màng đáy là tương đối hằng định. Kết quả này của chúng tôi cũng tương tự như nhận định của các tác giả Benirschke, Bourne hay Danforth và CS [21], [100], [101].

#### ***4.1.1.3. Số lượng tế bào màng ối đếm trên tiêu bản HE***

Đã có nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng các phần của màng ối là nguồn cung cấp tế bào gốc [28], [11], [104]. Màng ối hình thành từ rất sớm, từ lá phôi ngoài có nguồn gốc từ khối nội bào vào ngày thứ 8 sau thụ tinh. Vì hình thành từ sớm nên màng ối có nhiều các tế bào non chưa trưởng thành của màng ối có thể biệt hóa thành 3 lớp tế bào mầm. Ở màng ối tồn tại hai loại tế bào khác nhau (1) các tế bào biểu mô màng ối (hAECs), tạo thành một lớp tế bào tiếp xúc với dịch ối, và (2) các tế bào màng ối trung mô đệm (hAMSCs), được phân bố rải rác trong lớp trung mô vô mạch làm nền tảng cho màng ối biểu mô.

Quan sát quần thể các tế bào biểu mô và trung mô qua các mẫu nhuộm HE và kính hiển vi điện tử, chúng tôi nhận thấy: Tế bào biểu mô tập trung nhiều ở phần liên tục với cuống rốn, số lượng tế bào giảm dần ở phần xa cuống rốn. Còn các tế bào trung mô tập trung rải rác ở lớp trung mô.

Chúng tôi tiến hành đếm số lượng tế bào biểu mô bằng phần mềm tự động Image Pro Plus trên mặt cắt ngang lớp biểu mô tương ứng với chiều dài màng

đáy 300  $\mu\text{m}$  từ các mẫu ở hai vị trí: (i) gần cuống rốn, cách cuống rốn 2-3cm (trên bánh rau) và ở vùng ngoại vi xa cuống rốn, cách cuống rốn 10cm (ngoài bánh rau). Kết quả thu được thể hiện ở bảng 3.6, số lượng tế bào biểu mô ở vị trí gần và xa cuống rốn lần lượt là:  $33.8 \pm 13.17$  và  $29.63 \pm 7.43$ . Từ kết quả đếm số lượng tế bào chúng tôi nhận thấy số lượng của tế bào biểu mô ở vị trí gần cuống rốn nhiều hơn ở vị trí xa cuống rốn, tuy nhiên sự khác biệt về số lượng tế bào biểu mô không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

Chúng tôi tiến hành đếm số lượng tế bào trung mô tương tự như đã đếm số lượng tế bào biểu mô. Kết quả thu được như bảng 3.7, sự khác biệt về số lượng tế bào ở hai vị trí gần và xa cuống rốn cũng không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

Tuy nhiên so sánh về số lượng tế bào biểu mô và trung mô thì số lượng tế bào biểu mô đếm được nhiều hơn số lượng tế bào trung mô ở cùng khu vực, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ . Một số các tác giả Bilic và cộng sự hay Soncini và cộng sự cũng đã nghiên cứu so sánh số lượng tế bào biểu mô và trung mô trong quá trình phân lập tế bào từ màng ối thể hiện ở bảng sau:

**Bảng 4.3. So sánh số lượng tế bào biểu mô và trung mô của màng ối từ các nghiên cứu**

<b>Nghiên cứu</b>	<b>Số lượng tế bào biểu mô</b>	<b>Số lượng tế bào trung mô</b>
Bilic và cộng sự [105]	$6,3 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$
Soncini và cộng sự [106]	$147 \pm 42 \times 10^6$	$24 \pm 10 \times 10^6$

Tính tỷ lệ trung bình số tế bào biểu mô/trung mô trong nghiên cứu của chúng tôi là 3/1, tương tự như nghiên cứu của Bilic và cộng sự 3,7/1 [105],

trong khi kết quả nghiên cứu của Soncini và cộng sự là 6,1/1 [106] tính trên cùng một phương pháp và một đơn vị màng ối nghiên cứu. Tỷ lệ này có sự khác biệt, nhưng nhìn chung số lượng tế bào biểu mô đếm được luôn nhiều hơn tế bào trung mô trên cùng một màng ối. Đây cũng là một yếu tố cần quan tâm trong việc thu nhận tế bào gốc biểu mô hay trung mô từ màng ối, bên cạnh yếu tố khả năng tồn tại của hai loại tế bào này trong quá trình nuôi cấy sau phân lập.

#### **4.1.2. Đặc điểm hình thái siêu vi thể của màng ối quan sát dưới kính hiển vi điện tử**

##### ***4.1.2.1. Đặc điểm hình thái siêu vi thể của màng ối quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM)***

Quan sát dưới kính hiển vi điện tử, chúng tôi nhận thấy các tế bào biểu mô màng ối có hình dạng khác nhau từ dạng trụ, đa diện đến hình cầu, đa số sắp xếp tạo thành một lớp tế bào trên màng đáy. Bờ tự do của các tế bào biểu mô có rất nhiều vi nhung mao, bờ bên các vi nhung mao này phân nhánh hoặc kết hợp với nhau tạo thành các kênh gian bào. Sự đa dạng về hình thái của các tế bào biểu mô màng ối có thể do ảnh hưởng của bước cố định trong quá trình chuẩn bị mẫu, tương tự như nhận định của tác giả Benirschke [21].

Trên màng đáy, các tế bào biểu mô sắp xếp theo bốn dạng mô hình chính hoặc các dạng chuyển tiếp giữa các mô hình:

Mô hình 1: Các tế bào biểu mô màng ối có hình đa giác sắp xếp trên một mặt phẳng. Thỉnh thoảng có thể nhìn thấy các kênh gian bào ở các góc của tế bào biểu mô (Hình 3.7)

Mô hình 2: Phần lớn các tế bào sắp xếp như mô hình 1. Tuy nhiên có nhiều kênh gian bào hơn ở mô hình, đồng thời rải rác có những tế bào hình bầu dục,

lớn hơn và ngăn cách với các tế bào xung quanh bởi các kênh được tạo bởi các sợi tế bào chất mỏng (Hình 3.8).

Mô hình 3: Mô hình này hay gặp nhất, gồm những mảng tế bào hình đa giác khá dài, có xu hướng nằm song song với nhau. Rải rác có những tế bào lớn bằng phẳng, đơn độc hoặc tập trung thành một nhóm. Trong mô hình này, khó nhìn thấy các kênh gian bào (Hình 3.9).

Mô hình 4: Xuất hiện bất thường một mảng tế bào hình tròn, ngăn cách với các tế bào xung quanh bằng những khe sâu, dưới đáy khe có các sợi lưới. Ở một số vị trí lại là nhóm các tế bào hình đa giác chứ không phải là hình tròn. Bên cạnh đó chúng tôi cũng quan sát thấy một số vị trí không có tế bào mà chỉ là màng đáy đơn thuần (Hình 3.10).

Trong nghiên cứu của chúng tôi, khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét, chúng tôi thỉnh thoảng quan sát được một số tế bào có hình thái khác thường: (A) tế bào có bề mặt bằng phẳng và (B) tế bào có hình bầu dục, nằm ngăn cách với xung quanh bởi những khoảng trống và nối với tế bào xung quanh bằng sợi tế bào chất (Hình 3.11).

Do các mẫu thu nhận trong quá trình mổ đẻ, nên chúng tôi có thể gặp phải những vấn đề nhất định trong việc bảo quản hình thái mẫu, trong quá trình tiến hành thủ thuật có thể có những tác động đến mẫu nghiên cứu dẫn đến sự thay đổi kết quả, tạo nên những mô hình sắp xếp tế bào biểu mô màng ối không đúng như trong thực tế. Tuy nhiên, những mô hình sắp xếp tế bào này không thể là hậu quả của động tác rạch màng ối trong quá trình mổ đẻ do chúng có xuất hiện trong những vùng còn nguyên vẹn của mẫu. Bên cạnh đó, chúng tôi có nhận thấy sự xuất hiện đồng thời các mô hình sắp xếp tế bào trên cùng một màng ối thu nhận được, cũng như có những khoảng trung gian chuyển tiếp giữa các mô hình này. Chính vì vậy, chúng ta có thể ghi nhận sự sắp xếp các tế bào

biểu mô trên màng đáy là phù hợp, tương tự như những mô tả của Stella và cộng sự [107].

#### ***4.1.2.2. Đặc điểm hình thái siêu vi thể của màng ối quan sát bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM)***

Nghiên cứu quan sát các mẫu màng ối trên kính hiển vi điện tử quét (SEM) đơn thuần là một nghiên cứu về hình thái bề mặt, nên không thể đưa ra kết luận về chức năng chuyên biệt của các tế bào.

Quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM), chúng tôi nhận thấy các tế bào biểu mô màng ối có những chung đặc điểm sau (Hình 3.11):

Các tế bào biểu mô màng ối thường là các tế bào biểu mô đơn, có hình khối hoặc hình tròn với nhiều vi nhung mao ở đỉnh.

Nhân tế bào có kích thước tương đối hằng định, tuy nhiên màng nhân không đều, có các hình dáng thay đổi: múi, khía hoặc cuộn lại. Chất nhân có đậm độ điện tử không đều.

Ở đỉnh của các tế bào biểu mô màng ối, có rất nhiều vi nhung mao hình thành từ bờ tự do hướng về dịch ối của các tế bào biểu mô

Cực đáy tế bào liên kết với màng đáy bởi các liên kết dạng bán liên kết không liên tục, trong mỗi liên kết này chỉ có hình ảnh tăng đậm độ điện tử phía tế bào biểu mô. Màng đáy đi theo đường viền bề mặt tế bào biểu mô màng ối như hình dạng mồm chêm (hình 3.12). Chính vì do kiểu liên kết này nên tế bào dễ bị phân hủy bởi trypsin.

Cạnh bên tế bào tương đối phức tạp với các liên kết dạng cầu nối gian bào tại vị trí liên kết có tăng đậm độ điện tử nhưng không có tơ trương lực như các liên kết desmosom và không có liên kết dính (Hình 3.13).

Quan sát qua kính hiển vi điện tử quét (SEM) và xuyên (TEM) cho thấy cả hai bề mặt đỉnh và đáy của các tế bào biểu mô màng ối đang hoạt động trong vận chuyển các chất hòa tan và nước theo dạng tế bào lưỡng cực. Như vậy, màng ối có cấu trúc phù hợp với việc chuyển giao nhiều chất tan qua con đường cạnh bào (paracellular) – qua các kênh gian bào và con đường xuyên bào.

Đặc biệt, chúng tôi quan sát có hai loại tế bào với tế bào chất có đậm độ điện tử khác nhau: đậm hoặc nhạt hơn, như hai tế bào (1) và (2) ở hình 3.14

Tuy nhiên các nghiên cứu về mặt hình thái học chưa thể xác định sự khác biệt về mặt đậm độ điện tử này có nguyên nhân từ đâu, do chỉ tồn tại một loại tế bào biểu mô duy nhất ở màng ối. Sự khác biệt giữa các tế bào trong màng ối chỉ là do vị trí tồn tại, mức độ thoái hóa hay các tác nhân tác động từ bên ngoài hoặc là do các tế bào này đang ở những giai đoạn hoạt động chức năng khác nhau.

Quan sát màng ối dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM), chúng tôi nhận thấy màng đáy dày và có cấu trúc từ các sợi collagen. Theo Al-Yahya và cộng sự, thì màng đáy là một trong những màng dày nhất trong các mô ở người [108].

Lớp trung mô vô mạch của màng ối được tạo từ các sợi collagen và có các tế bào trung mô (hình 3.12). Theo Hu Jingfwei và cộng sự, cũng như ghi nhận của Pasquinelli và cộng sự, các tế bào trung mô màng ối người có đặc điểm cấu trúc siêu cấu trúc lai trung – biểu mô: biểu hiện biểu mô ở đặc điểm có vi nhung mao đặc ở bề mặt, khoang tế bào chất được lót bởi vi nhung mao và có các liên kết gian bào. Biểu hiện tế bào trung mô ở đặc điểm có lưới nội chất ít phát triển, các ổ sợi co thắt phát triển [109], [110].

Lớp trung mô vô mạch cũng có thể chia nhỏ thành 3 lớp là lớp đặc, lớp nguyên bào sợi và lớp xốp.



Lớp đặc: chứa các bó sợi collagen, các sợi đàn hồi nằm rải rác. Lớp nguyên bào sợi là mạng lưới các nguyên bào sợi. Ranh giới giữa hai lớp này tương đối không rõ ràng. Nằm trong cùng là lớp xốp, thành phần là các bó sợi lưới và mucin, chính vì vậy khó bắt màu được trong nhuộm HE.

#### ***4.1.2.3. Số lượng tế bào biểu mô màng ối đếm trên kính hiển vi điện tử quét***

Từ những mẫu màng ối quan sát trên kính hiển vi chỉ có một hàng tế bào biểu mô, chúng tôi chọn làm mẫu để đếm các tế bào biểu mô dựa trên kính hiển vi điện tử quét dựa trên phần mềm tự động Image Pro Plus.

Kết quả nghiên cứu (Bảng 3.9) cho thấy: Số lượng tế bào biểu mô ở vị trí gần cuống rốn là:  $192.7 \pm 37.08$ , trong khi số lượng tế bào biểu mô ở xa cuống rốn là  $133.1 \pm 46.26$ . Sự khác nhau giữa hai giá trị này là có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

#### **4.1.3. Xác định đặc tính màng ối và tính gốc của tế bào biểu mô màng ối**

Trong khuôn khổ của nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật hóa mô miễn dịch để xác định sự biểu hiện một số dấu ấn của màng ối đã qua xử lý với các dấu ấn Oct-3/4, SSEA-4, Collagen type I, vimentin, CK5. Màng ối có nhiều đặc điểm và khả năng thích hợp để sử dụng trong công nghệ mô. Các lớp biểu mô của màng ối bao gồm các tế bào có đặc tính của tế bào gốc. Các tế bào gốc được xác định bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch với các dấu ấn của tế bào gốc biểu mô. Kết quả cho thấy tế bào biểu hiện dương tính với các dấu ấn Oct-3/4, SSEA-4, Collagen type I, vimentin, CK5.

Oct-4 là yếu tố phiên mã, một protein điều chỉnh hoạt động của gen, duy trì tính vạn năng của tế bào gốc, ngăn chặn không cho tế bào gốc trở thành các dòng tế bào chuyên biệt. Oct-4 hoạt động bằng cách gắn vào DNA có thể hoạt động vừa như một nhân tố hoạt hóa phiên mã vừa như một nhân tố ức chế phiên

mã [111]. Sự hiện diện của Oct-4 là bằng chứng cho thấy màng ối là một nguồn cung cấp tế bào gốc tiềm năng [112], [113].

Cùng với kết quả dương tính với dấu ấn Oct-4, chúng tôi cũng ghi nhận được kết quả hóa mô miễn dịch màng ối dương tính với dấu ấn SSEA-4 (Stage-specific embryonic antigen 4). SSEA-4 là một glycoprotein hiện diện sớm trong giai đoạn phôi và cũng biểu hiện cho tế bào gốc đa năng nhưng thường không biểu hiện cho các tế bào gốc trưởng thành [114].

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy màng ối dương tính với các dấu ấn CK-5. Ck-5 là protein sợi trung gian có ở đáy tế bào biểu mô. Từ những kết quả dương tính với dấu ấn Oct-4, SSEA-4, CK-5 chứng tỏ ở màng ối người tồn tại tế bào gốc biểu mô .

Quá trình chuyển dạng của các tế bào biểu mô thành tế bào trung mô là quá trình thay đổi đáng kể về hình dạng và khả năng di động của tế bào. Các tế bào mất tính phân cực đỉnh – đáy, mất liên kết với các tế bào xung quanh và với màng đáy. Ngược lại, hiện tượng chuyển dạng tế bào trung mô thành tế bào biểu mô cũng đã được ghi nhận với hiện tượng giảm di động và biểu hiện các đặc điểm của tế bào biểu mô. Hiện tượng chuyển dạng này gắn liền với sự thay đổi vimentin như Mendez và CS đã mô tả [115] và có liên quan đến CK-5 [116]. Tuy nhiên do điều kiện nghiên cứu, chúng tôi không đánh giá quá trình chuyển dạng tế bào này.

Vật liệu sinh học được sử dụng trong công nghệ tái tạo mô phải đáp ứng được các yêu cầu: không gây độc, không tạo u và sinh miễn dịch ở mô đích thấp. Bên cạnh đó, các tế bào của mô đích phải có khả năng gắn kết được với giá thể mà vẫn đảm bảo được yếu tố điều hòa sinh học như các yếu tố tăng trưởng và các vật liệu di truyền [117]. Các tế bào gắn kết được lên giá thể là nhờ các thành phần của chất nền gian bào của giá thể (scaffold's extracellular

matrix - ECM). Sự hiện diện của các phân tử collagen, laminin, fibronectin.. có những ảnh hưởng to lớn đến khả năng gắn kết và phát triển của tế bào trên giá thể. Với những yêu cầu trên thì rõ ràng màng ối là một giá thể phù hợp cho công nghệ mô với cấu trúc của khuôn gian bào điển hình. Các tế bào biểu mô màng ối tiết ra tiết ra collagen và các glycoprotein non-collagenous hình thành màng đáy. Trong lớp xốp có nhiều của proteoglycans và các glycoprotein và có một mạng lưới nonfibrillar chủ yếu collagen III. Trong màng đáy, tồn tại một lượng lớn perlecan. Perlecan là yếu tố quan trọng cho tăng trưởng và tương tác với các phân tử protein ngoại bào và kết dính tế bào [118]. Như vậy, màng ối hứa hẹn là một sản phẩm có nhiều triển vọng lớn trong công nghệ mô.

Sự tồn tại các xơ trung gian biểu hiện qua các dấu ấn vimentin đóng một vai trò đặc biệt trong quá trình biệt hóa và tăng sinh của tế bào. Trong quá trình biệt hóa, tăng sinh hoặc hình thành ung thư, Bouwens và CS đã mô tả sự thay đổi mạnh mẽ về sợi trung gian và các tổ chức [119], nhất là trong tuyến tụy. Biểu hiện dấu ấn vimentin đã được Rosenbeg và CS xác định ở tế bào biểu mô tuyến trong bào thai [120], Zulewski xác định có trong quá trình biệt hóa từ tế bào trưởng thành thành tiền tế bào beta [121] và trong quá trình tăng sinh ở ung thư biểu mô tuyến [122]. Do đó, vimentin có thể được xem là một dấu hiệu có giá trị để nhận biết các tiền tế bào tụy [123].

Sự hiện diện các dấu ấn Oct-4, SSEA-4, vimentin, CK-5 chứng tỏ sự tồn tại các tế bào gốc biểu mô trong màng ối, các tế bào này là tế bào gốc đa năng có khả năng biệt hóa thành tế bào beta tụy nội tiết.

## **4.2. Phân lập, nuôi cấy và bước đầu đánh giá khả năng biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết**

### **4.2.1. Phân lập tế bào gốc từ màng ối người**

Có nhiều phương pháp phân lập tế bào, có thể nuôi cấy sơ cấp thu nhận trực tiếp tế bào từ các mô, miếng mô để cho tế bào phát triển từ miếng mô ra bên ngoài hoặc có thể tách thành tế bào đơn bằng cơ học hay enzym như trypsin, collagenase, dispase, hyaluronidase.

Quy trình phân lập tế bào gốc màng ối dựa theo quy trình của các tác giả đã đăng tải trên tạp chí quốc tế. Phần lớn các tác giả đều sử dụng các enzym phân cắt mô có phối hợp với các biện pháp cơ học để phân lập. Theo Toda A. và CS (2007) [22], cắt màng ối thành các mảnh nhỏ kích thước khoảng  $1\text{cm}^2$ , sau đó thug om tế bào biểu mô màng ối bằng phương pháp trypsinase. Số lượng tế bào thu được từ mỗi màng ối khoảng từ  $8 \times 10^6$  đến  $50 \times 10^6$  tế bào [22].

Tế bào gốc trung mô màng ối thu được sau khi đã lấy được hết tế bào gốc biểu mô. Thu gom tế bào trung mô màng ối bằng phương pháp collagenase. Tế bào thu được được lọc qua màng lọc và ly tâm. Số lượng tế bào gốc trung mô thu được khoảng  $1 \times 10^6$ /màng ối. Một số tác giả còn đưa ra con số tính toán tỷ lệ tế bào biểu mô/tế bào trung mô là 4,3:1 ở màng ối của sản phụ đẻ thiếu tháng (23– 36 tuần) và 7,8:1 ở sản phụ đẻ đủ tháng [22].

Sở dĩ sử dụng trypsin trong quá trình phân lập vì trypsin là enzym protease có khả năng phân giải protein ngoại bào tương tự như collagenase. Ngoài ra các enzym này hầu như không có tác dụng trên màng tế bào do cấu trúc đặc biệt của màng tế bào. Việc phân lập tế bào gốc màng ối của các tác giả cũng không hoàn toàn giống nhau. Có thể phân chia các phương pháp này theo hai nhóm: Nhóm thứ nhất, phân lập tế bào gốc biểu mô riêng theo quy trình nghiêm ngặt về thời gian ủ với enzym. Sau khi màng ối giải phóng hết các tế bào biểu

mô thì mới tiếp tục phân lập tế bào trung mô. Nhóm thứ hai, cho phân rã toàn bộ màng ối, sau đó dùng Ficoll hoặc Percoll hoặc Nicodenz để tách các phân lớp tế bào theo tỷ trọng.

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phương pháp phân lập tế bào gốc màng ối theo nhóm thứ hai dựa trên quan điểm thu nhận tối đa số lượng tế bào gốc trong những điều kiện kinh phí và kỹ thuật hạn chế của đề tài. Chúng tôi đã tiến hành phân lập tế bào từ màng ối bằng trypsin nhằm phục vụ cho việc nghiên cứu kỹ thuật nuôi cấy tế bào gốc thu nhận từ màng ối người.

Tế bào gốc được phân lập từ màng ối bằng cách sử dụng enzym phân cắt mô trypsin phối hợp với các biện pháp cơ học [95]. Các tế bào phân lập được cho vào đĩa nuôi cấy đường kính 10cm. Quan sát các tế bào thu được bằng kính hiển vi quang học.

Kết quả nghiên cứu cho thấy các tế bào sau khi phân lập có hình tròn lơ lửng trong môi trường nuôi cấy (Hình 3.20). Sau khoảng 24 giờ nuôi cấy tế bào gốc biểu mô màng ối có dấu hiệu bắt đầu bám dính xuống bề mặt đĩa nuôi cấy (Hình 3.21). Số lượng tế bào gốc biểu mô tăng lên sau 2 ngày, chúng tôi ghi nhận được hình ảnh tế bào đang phân chia tăng sinh số lượng (Hình 3.25B). Sau 3 ngày nuôi cấy tế bào có hình dạng đặc trưng của tế bào gốc biểu mô (Hình 3.26).

Các tế bào gốc đều được phân lập từ nguồn rau thai của các sản phụ cung cấp từ Khoa Sản Bệnh viện 103. Tế bào gốc biểu mô màng ối phân lập được là hoàn toàn cùng loại, không bị lẫn với các tế bào khác như tế bào hồng cầu hay tế bào trung mô... Các tế bào gốc biểu mô từ màng ối sau khi phân lập đều có khả năng sống tốt trong môi trường nuôi cấy invitro. Tỷ lệ tế bào chết sau khi phân lập rất thấp, không đáng kể, không có dấu hiệu biến đổi hay biệt hóa của tế bào trong quá trình phân lập. Số lượng các tế bào sau mỗi lần phân lập là

tương đối nhiều, hiệu suất thu được tế bào nhờ enzyme phân cắt trypsin là tương đối cao. Các tế bào gốc đều được phân lập trong điều kiện vô khuẩn, đảm bảo không xảy ra hiện tượng nhiễm khuẩn và nấm trong quá trình thao tác.

Qua nghiên cứu chúng tôi thấy nếu tế bào gốc biểu mô màng ối được phân lập sau 4h kể từ khi thu nhận mẫu sẽ giảm khả năng sống và nguy cơ nhiễm cao hơn so với các tế bào được phân lập đúng quy trình và trong thời gian sớm hơn trước 4h. Tương tự như các tác giả Miki cũng như Tabatabaei và cộng sự, chúng tôi nhận thấy tế bào gốc biểu mô màng ối được phân cắt bằng enzyme trypsin trong khoảng 40 phút đây là loại enzyme thích hợp cho việc phân cắt mô [95], [124].

Việc phân lập tế bào gốc biểu mô từ màng ối để đạt được số lượng tế bào nhiều nhất còn phụ thuộc vào vị trí phần màng ối chọn phân lập. Phần trung tâm của màng ối sẽ chứa nhiều tế bào gốc biểu mô màng ối hơn các phần còn lại, dựa vào đặc điểm này chúng tôi có thể lựa chọn phần màng ối phân lập giúp đạt hiệu suất cao nhất. Điều này cũng đã được làm sáng tỏ qua kết quả đếm tế bào biểu mô trên kính hiển vi điện tử của chúng tôi đã tiến hành. Nghiên cứu của chúng tôi hoàn toàn phù hợp với các tác giả Akle CA, Miki T [28], [37].

Do những điều kiện hạn chế nên chúng tôi chỉ tiến hành thu nhận màng ối từ các thai phụ đủ tháng và phân lập tế bào gốc từ những nguồn này. Điều này cũng phù hợp với nhận định của Lim và cộng sự rằng việc thu nhận tế bào gốc từ màng ối của các thai phụ đủ tháng cho hiệu quả cao hơn và các tế bào gốc thu nhận từ màng ối của các thai phụ sinh non đáp ứng ít hiệu quả trong điều trị ghép tự thân cho trẻ [125].

Hiện nay chưa có nhiều nghiên cứu so sánh hiệu quả sử dụng giữa tế bào gốc màng ối với tế bào gốc thu nhận từ các nguồn khác. Trong nghiên cứu so sánh về khả năng đáp ứng miễn dịch của tế bào gốc màng ối và tế bào gốc trung

mô thu nhận từ mô mỡ, Kronsteiner và cộng sự đã cho thấy các tế bào gốc màng ối có biểu hiện kháng thể HLA-DR thấp hơn, biểu hiện kháng nguyên PD-L1 cao hơn và có sản sinh nhiều cytokine miễn dịch IL-10 và IL-6. Bên cạnh đó, các tế bào gốc màng ối có khả năng ức chế tăng sinh tế bào đơn nhân máu ngoại vi cao hơn so với tế bào gốc trung mô thu nhận từ mô mỡ [126].

Trước đây, nhiều nghiên cứu đã chứng minh cả tế bào HAE (human amniotic epithelial cells) và tế bào HAM (human amniotic mesenchymal cells) biểu hiện nhiều marker tế bào gốc như Oct-4 (octamer - binding transcription factor 4), GATA-4, HNF-3 $\beta$  (hepatocyte nuclear factor-3 $\beta$ )... Những yếu tố này cho thấy không chỉ tế bào HAE mà còn cả tế bào HAM cũng là tế bào gốc đa tiềm năng.

Tế bào gốc màng ối không chỉ biểu hiện dấu ấn của tế bào biểu bì như CA125 mà còn biểu hiện các dấu ấn của tế bào biểu mô nói chung như cytokeratin, vimentin [127], [128], [129]. Tế bào gốc màng ối cũng dương tính với CD44 và desmin. Vimentin dương tính với trên 97.5% trong tổng số tế bào gốc màng ối nuôi cấy, trong khi chỉ 3.6% tổng số tế bào HAM biểu hiện dương tính với CK19+/vimentin+. Như vậy, tế bào gốc màng ối đồng thời biểu hiện cả marker của tế bào gốc trung mô và các tế bào gốc biểu mô [127]. Điều này chỉ ra rằng tế bào gốc màng ối không hoàn toàn là tế bào gốc biểu mô và ngược lại chúng cũng không hoàn toàn là tế bào gốc trung mô. Trong quá trình phát triển phôi, có sự chuyển dạng tế bào gốc biểu mô - trung mô (epithelial - mesenchymal transition - EMT) và ngược lại trung mô - biểu mô (mesenchymal - epithelial transition - MET) trên màng ối [127]. Tuy nhiên, do điều kiện nghiên cứu hạn chế về mặt quy mô và kinh phí, nên chúng tôi không ghi nhận được hiện tượng chuyển dạng tế bào này.

Như vậy, việc thu nhận tế bào gốc từ màng ối của các sản phụ thai đủ tháng bằng phương pháp trypsine có hiệu quả cao, các tế bào thu nhận được có tiềm năng sử dụng an toàn hơn trong điều trị bằng liệu pháp tế bào gốc về sau này.

#### **4.2.2 Xác định tính gốc của tế bào phân lập được**

Trong khuôn khổ nghiên cứu, chúng tôi đã xác định biểu hiện của dấu ấn Oct-4 để xác định tính gốc của tế bào phân lập từ màng ối và nuôi cấy tăng sinh được. Kết quả PCR cho thấy trong các tế bào màng ối chúng tôi đã thu nhận được có biểu hiện dấu ấn Oct-4 (Hình 3.24D). Kết quả phù hợp với kết quả nhuộm hóa miễn dịch tế bào với kháng thể kháng Oct-4 (Hình 3.24 A,B,C) của người.

Đồng thời, trong quá trình nuôi cấy chúng tôi ghi nhận hiện tượng các tế bào đã phân lập được từ màng ối có dấu hiệu bắt đầu bám dính xuống bề mặt đĩa nuôi cấy sau khoảng 24 giờ (hình). Số lượng tế bào tăng lên sau 2 ngày. Sau 3 ngày nuôi cấy tế bào có hình dạng đặc trưng của tế bào gốc biểu mô

Dựa theo khả năng bám dính trên bề mặt dụng cụ nuôi cấy, khả năng tăng sinh và sự biểu hiện dấu ấn của tế bào gốc là Oct-4, chúng ta có thể ghi nhận rằng tế bào phân lập được là tế bào gốc màng ối.

#### **4.2.3 Nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc màng ối**

Sau khi tế bào gốc biểu mô màng ối được phân lập sẽ được duy trì nuôi cấy trong tủ nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C và 5% CO<sub>2</sub>. Điều kiện nuôi cấy tế bào gốc biểu mô màng ối phải đảm bảo vô trùng tuyệt đối tránh nhiễm khuẩn và nấm. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã thu nhận được hình ảnh các tế bào gốc sau 24h dựa trên quan sát bằng kính hiển vi quang học. Nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với tác giả Phan Kim Ngọc và CS [26]



Trong quá trình nuôi cấy phải theo dõi giám sát tế bào thường xuyên để đánh giá tình trạng mọc của tế bào và điều chỉnh môi trường nuôi cấy cho phù hợp. Sau 48h phải thay môi trường một lần để đảm bảo môi trường đủ chất dinh dưỡng cung cấp cho tế bào phát triển. Tất cả các thao tác thay môi trường cũng như kiểm tra mật độ tế bào phải đảm bảo vô trùng tuyệt đối tránh nhiễm. Do tế bào gốc màng ối là tế bào từ người nên rất nhạy cảm với môi trường vì vậy môi trường và điều kiện nuôi cấy phải luôn ổn định nếu không rất dễ gây ra hiện tượng biệt hóa hoặc gây chết tế bào.

Ngay sau khi nuôi cấy 24 giờ, các tế bào màng ối thể hiện tính gốc (tăng sinh, bám dính, có hình dạng đặc trưng tế bào gốc): có xu hướng bám dính vào bề mặt đĩa nuôi cấy, phát triển thành những cụm tế bào hình đa diện hoặc hình thoi và có kích thước trung bình. Số lượng tế bào thể hiện tính gốc tăng lên rõ sau 48 giờ và 72 giờ

Sau khi phân lập và nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc biểu mô màng ối đạt đến một độ phủ nhất định khoảng 60-80% bề mặt đĩa nuôi cấy. Nhóm nghiên cứu chúng tôi đã thực hiện kỹ thuật cấy chuyển và tiếp tục tăng sinh như trong môi trường nuôi cấy ban đầu. Kết quả cho thấy tế bào mọc tốt, không có dấu hiệu của sự biệt hóa hay thay đổi cấu trúc.

Tế bào gốc biểu mô màng ối phát triển và bám dính tốt trên bề mặt đĩa nuôi cấy petri chứa dung dịch môi trường DMEM - Complex trong điều kiện nhiệt độ 37°C và 5% CO<sub>2</sub>. Đây là điều kiện tốt nhất giúp nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc từ màng ối do nguồn phân lập là tế bào người nên phải nuôi cấy trong 37°C cùng nhiệt độ với cơ thể người. Nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các nghiên cứu của Evron và cộng sự [99]. Không nên ủ tế bào với enzym trypsin EDTA 0,25% quá lâu vì sẽ làm giảm khả năng sống của tế bào. Tế bào nếu được rửa quá nhiều lần sẽ làm giảm các yếu tố tăng trưởng và gây ảnh

hưởng đến khả năng sống của tế bào. Tất cả các công đoạn trong quy trình cấy chuyển phải được thực hiện trong môi trường vô khuẩn tránh để tế bào tiếp xúc với môi trường bên ngoài quá lâu gây ra hiện tượng nhiễm khuẩn. Do nuôi cấy tế bào dài ngày nên mọi dụng cụ phải đảm bảo vô trùng tuyệt đối, các thao tác phải thực hiện chính xác tránh va chạm, tiếp xúc không cần thiết giảm thiểu nguy cơ gây nhiễm. Các nghiên cứu này tương tự và phù hợp với các nghiên cứu của Phan Kim Ngọc và CS, Ayelet Everon và CS, cũng như của Toshio Miki và CS [26], [95], [99].

### **Theo dõi sự tăng sinh tế bào**

Với những điều kiện nuôi cấy trong môi trường DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) bổ sung FBS và kháng sinh, nhóm nghiên cứu chúng tôi đã thu được kết quả tốt trong việc nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc màng ối như số lượng tế bào tăng sinh rất nhanh, khả năng bám dính tốt, tỷ lệ tế bào chết trong quá trình nuôi cấy là rất thấp. Ở ngày thứ nhất tế bào tăng sinh chậm do giai đoạn đầu tế bào còn làm quen với môi trường chưa bám dính hết. Tế bào tăng sinh mạnh mẽ nhất từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 10. Từ ngày thứ 10 trở đi tế bào có dấu hiệu tăng sinh chậm lại do diện tích che phủ của tế bào đã đạt khoảng 60-80% bề mặt đĩa nuôi cấy, còn rất ít không gian cho tế bào tiếp tục tăng sinh. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi rất phù hợp với các tác giả trên thế giới [98], [99]. Bên cạnh đó, công bố mới nhất của Motedayyen và cộng sự vào năm 2017 lại cho thấy khả năng tăng sinh của các tế bào gốc biểu mô màng ối cao hơn hẳn so với chúng tôi, sau 48h đã đạt được 80% bề mặt đĩa nuôi cấy [130]. Nguyên nhân có thể do nhóm nghiên cứu của Motedayyen thu gom được nhiều tế bào gốc từ màng ối hơn nghiên cứu chúng tôi. Điều này chứng tỏ chúng ta có thể thu nhận được nhiều tế bào gốc từ màng ối hơn nếu cải thiện được phương pháp và quy trình thu gom tế bào biểu mô từ màng ối.

Kết quả chứng tỏ quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào gốc màng ối đạt hiệu quả. Như vậy tế bào có thể sử dụng trong nghiên cứu cũng như trong công nghệ mô phù hợp với nghiên cứu của các tác giả khác.

#### **4.2.4 Bảo quản và phục hồi thành công tế bào gốc màng ối**

Tiến hành bảo quản 10 mẫu tế bào biểu mô màng ối trong điều kiện lạnh âm sâu trong nitơ lỏng trong môi trường DMEM có 10% DMSO, 10% huyết thanh bào thai bê. Thời gian bảo quản: 3 tháng.

##### ***Đánh giá quá trình bảo quản***

Nuôi cấy phục hồi tế bào. Kết quả, sau 3 tháng bảo quản, các tế bào phục hồi thành công và tiếp tục tăng sinh trong môi trường nuôi cấy cơ bản như hình 3.27: Không có sự khác biệt về khả năng sống và bám dính vào đĩa nuôi cấy giữa (A): Tế bào gốc cấy chuyển lần 2 và (B): Tế bào rã đông sau thời gian bảo quản 3 tháng.

Quá trình làm rã đông tế bào để nuôi cấy phục hồi có thể tóm tắt như sau: Lấy tuýp chứa tế bào bảo quản cho vào bể ấm nước 37°C. Chuyển tế bào sang tuýp falcon 50ml, rửa tế bào 3 lần bằng dung dịch DMEM sau đó cho tế bào vào môi trường nuôi cấy cơ bản để nuôi cấy tăng sinh.

Sau 24 giờ các tế bào sống sẽ bám dính vào bề mặt đĩa nuôi cấy. Thay môi trường rửa sạch đĩa nuôi cấy để loại bỏ các tế bào chết.

Để xác định tỷ lệ tế bào sống sau khi bảo quản chúng tôi nhuộm tế bào với trypan blue. Kỹ thuật nhuộm được mô tả trong phần đối tượng và phương pháp nghiên cứu và có thể tóm tắt như sau: Để tuýp tế bào được bảo quản rã đông ở nhiệt độ phòng 15 phút. Ly tâm 1500 vòng/phút/10 phút, loại bỏ dịch nổi giữ lại cặn tế bào. Trộn đều tế bào trong dung dịch trypan blue 0,4% (w/v) với mật độ tế bào khoảng  $6 \times 10^5$  tế bào/ml. Đếm số tế bào sống và chết trong

mỗi mẫu bằng buồng đếm hồng cầu. Kết quả sau 3 tháng bảo quản ở nhiệt độ -80°C, tỷ lệ tế bào sống trong các mẫu đạt được từ 70-90% (Hình 3.28)

Như vậy sau 3 tháng bảo quản, các tế bào phục hồi thành công và tiếp tục tăng sinh trong môi trường nuôi cấy cơ bản.

#### **4.2.5. Bước đầu đánh giá khả năng biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết**

Để điều trị tiểu đường type I, việc ghép tụy một phần hay toàn phần đã được thực hiện. Tuy nhiên, nguồn cho tụy ghép có hạn, chính vì vậy Bruin và cộng sự đã cho rằng phương pháp sử dụng các tế bào gốc điều trị tiểu đường type 1 là phù hợp nhất [131]. Đã có nhiều nghiên cứu chứng minh được khả năng sử dụng nguồn tế bào gốc phôi hoặc tế bào gốc trưởng thành để biệt hóa thành tế bào beta tụy đảo để phục vụ cho cấy ghép. Nhiều tác giả đã thành công biệt hóa từ tế bào phôi (Nestin dương tính) thành tế bào sản xuất insulin nhưng không tạo thành tế bào beta trưởng thành hoàn toàn [89], [132]. Tế bào sản xuất insulin được kích thích bởi TGF  $\beta$ 2 hoặc pdx-1, những yếu tố quan trọng trong sự phát triển của tụy. Nguồn gốc của các tế bào beta tụy đảo vẫn còn nhiều tranh cãi. Các tế bào beta có thể có nguồn gốc từ các tế bào gốc đa tiềm năng hoặc cũng có thể có nguồn gốc từ các tế bào đã biệt hóa tồn tại trong tụy qua quá trình giải biệt hóa (de/trans-differentiation). Có tác giả cho rằng tế bào beta có nguồn gốc từ các tế bào gốc (stem cells) khu trú ở biểu mô ống tụy, ở tiểu đảo Langerhans [132], [133], [134]. Các nghiên cứu trước đây của Gelling và CS, Miki và CS và của Suzuki và CS đã chứng minh rằng glucagon like peptide 1-(1-37) (GLP) làm tăng sản xuất insulin của tế bào biểu mô đường tiêu hóa ở cả in vivo và in vitro [88], [89], [135]. Chúng tôi cũng đã chứng minh được khả năng biệt hóa thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết của tế bào gốc màng ối bằng cách nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 10mM nicotinamide.

Trong điều kiện in-vitro, sau khi kích thích với nicotinamide, tế bào gốc màng ối biểu hiện mRNA của insulin. In vivo, HAE có khả năng làm giảm đường máu ở chuột gây tiểu đường bằng mô hình streptozotocin sau một vài lần ghép tế bào. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này có tới 20% chuột tiểu đường được điều trị khỏi bằng ghép tế bào gốc màng ối bị tái phát sau 6 tháng. Điều này có thể phụ thuộc vào thời gian tồn tại của các tiểu đảo tế bào ghép. Vấn đề là làm thế nào để kéo dài thời gian tồn tại của các nhóm tế bào này. Các nhà nghiên cứu cũng đã thành công trong việc sử dụng các tế bào bắt tử HAE chuyển nạp sản xuất insulin để ghép điều trị tiểu đường thực nghiệm [88], [89].

Để tiến hành đánh giá khả năng biệt hóa tế bào gốc thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu theo các bước:

- Biệt hóa tế bào gốc thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết bằng môi trường định hướng biệt hóa sử dụng môi trường cơ bản (DMEM) có bổ sung 10mM nicotinamide, 55  $\mu$ M  $\beta$ - mercaptoethanol, 1mM sodium pyruvate.
- Xác định sự thay đổi dấu ấn tế bào gốc OCT-4 đồng thời theo dõi dấu ấn insulin – dấu ấn biểu hiện sự biệt hóa tế bào gốc thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết.

#### ***4.2.5.1. Biểu hiện của OCT-4 - dấu ấn của tế bào gốc***

Trái với dấu ấn insulin, nồng độ mRNA OCT-4, dấu ấn tế bào gốc giảm dần theo thời gian trong nhóm được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung nicotinamid và  $\beta$ -mercaptoethanol. Hình ảnh western blot cho thấy OCT-4 giảm dần theo thời gian trong quá trình biệt hóa (Hình 3.11c).

#### ***4.2.5.2. Biểu hiện của Insulin - Dấu ấn tế bào gốc biệt hóa thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết***

Biểu hiện mRNA của insulin chứng tỏ có sự biệt hóa của tế bào gốc thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết (Biểu đồ 3.1a). Sau 7 ngày nuôi cấy trên

đĩa plastic thấy nồng độ mRNA của insulin (xác định bằng RT-PCR) không tăng. Sau 14 ngày nuôi cấy trên plastic, trong nhóm có bổ sung trong môi trường nuôi cấy nicotinamide và  $\beta$ -mercaptoetanol thấy tăng cao insulin. Kết quả định lượng protein insulin cũng phù hợp với kết quả định lượng mRNA (Biểu đồ 3.1b). Kết quả hóa miễn dịch tế bào thấy tế bào gốc biểu hiện rõ nét insulin trong nhóm được xử lý với nicotinamide và  $\beta$ -mercaptoetanol.

Nồng độ mRNA và protein tăng sau 7 ngày (ngày 7-14) sau khi tế bào được nuôi cấy với nicotinamide và  $\beta$ -mercaptoethanol. Kết quả mRNA được tính toán so với nhóm chứng. Kết quả định lượng protein được tính toán dựa trên nồng độ protein toàn phần trong dung dịch ly giải tế bào.

Tế bào trong nhóm chứng được nuôi cấy trong môi trường cơ bản DMEM. Tế bào định hướng biệt hóa thành tế bào beta tụy, sau khi cấy được 7 ngày, các tế bào phát triển bao phủ 50-60% bề mặt đĩa nuôi cấy, bổ sung thêm nicotinamide và  $\beta$ -mercaptoetanol nhằm định hướng tế bào biệt hóa thành tế bào tụy.

Kết quả thấy, sau 2 - 3 ngày các tế bào bám dính tốt vào bề mặt đĩa nuôi cấy, phát triển nhưng chưa thấy sự biệt hóa. Các tế bào vẫn phát triển hình tròn giống như tế bào ban đầu. Điều này chứng tỏ, ở mật độ thấp, khi các tế bào chưa tiếp xúc với nhau, thì các tế bào vẫn chưa biệt hóa mặc dù đã có các cytokin định hướng biệt hóa.

Quá trình biệt hóa tế bào gốc thành tế bào tụy có thể chia thành hai giai đoạn: Giai đoạn biệt hóa về hình thái, hình thành nên các hạt chế tiết có tiền chất insulin. Giai đoạn thứ hai là giai đoạn biệt hóa chức năng, tức là giai đoạn mà các tế bào gốc bắt đầu biểu hiện các dấu ấn đặc hiệu của tế bào tụy và bắt đầu giữ vai trò chế tiết insulin. Sau quá trình biệt hóa này, các tế bào tụy sắp xếp tạo thành tiểu đảo Langerhans và hình thành các cấu trúc hình thái của tụy

[28], [30], [133]. Chúng tôi dùng kỹ thuật phân tử để xác định các tế bào đó có biểu hiện của các dấu ấn tế bào tụy hay không. Trong khuôn khổ của đề tài, chúng tôi chỉ xác định dấu ấn sinh học của tế bào beta tụy là insulin vì đây là loại tế bào tiết insulin.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, ở ngày thứ 7 thì đã có sự biểu hiện của insulin ở cả mức độ ARN và protein, đến ngày thứ 14 thì biểu hiện insulin tăng rõ ràng so với ngày thứ 7 (Biểu đồ 3.1). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của G. Carnevale và cộng sự trong nghiên cứu biệt hóa tế bào gốc thành tế bào beta tiết insulin [136]. Nghiên cứu của Hua Xiu-feng và cộng sự cũng cho thấy giai đoạn biệt hóa thành tế bào tiết insulin chuyển biến rõ rệt bắt đầu trong khoảng từ ngày thứ 7 đến ngày thứ 14 [137].

Sở dĩ chúng tôi chọn dấu ấn này vì insulin có biểu hiện cả ở tế bào gốc và tế bào tụy với mức độ khác nhau. Khi tế bào gốc biệt hóa thành tế bào tụy thì biểu hiện của insulin tăng lên. Như vậy, khi tế bào tăng sản xuất insulin có thể nói về chức năng, tế bào gốc đã trở thành tế bào có chức năng của tế bào tụy. Tuy nhiên để tế bào gốc phát triển hoàn toàn thành tế bào tụy, tạo các cấu trúc giống tụy, cần phải có môi trường ngoại bào đặc biệt mà ở đó có các giá đỡ giàu collagen type IV, giàu laminin [89], [132]. Chúng tôi chưa có đủ điều kiện để tạo môi trường này trong quá trình nghiên cứu.

Qua sự biểu hiện của các dấu ấn sinh học này đã chứng tỏ các tế bào gốc màng ối có khả năng biệt hóa thành tế bào tụy. Nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với các tác giả khác [30], [88], [89], [96], [132], [134], [136], [137].

Cùng với các nghiên cứu khác về tế bào gốc màng ối như: biệt hóa tế bào gốc màng ối thành tế bào xương, tế bào gan, tế bào thần kinh, tế bào cơ tim... Trong tương lai tế bào gốc màng ối sẽ mở ra một hướng mới trong điều trị lâm sàng về cấy ghép mô, điều trị đái tháo đường, sản xuất inssulin invitro dùng

cho bệnh nhân tiểu đường tít I... Từ những kết quả thu được trong nghiên cứu trên, chúng tôi đã biệt hóa được tế bào có chức năng của tế bào beta tụy từ tế bào gốc màng ối biểu hiện bằng hình thái dấu ấn sinh học insulin.



## KẾT LUẬN

Từ kết quả thu được của đề tài “Nghiên cứu đặc điểm hình thái màng ối, tế bào gốc màng ối người và khả năng biệt hóa thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết”, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

### 1. Đặc điểm hình thái màng ối

Độ dày màng ối ở vị trí gần cuống rốn dày hơn ở vị trí xa cuống rốn. Số lượng tế bào biểu mô màng ối giảm dần từ vị trí gần cuống rốn ra ngoại vi. Vùng gần cuống rốn các tế bào sắp xếp dạng biểu mô giả tầng nên có khả năng thu nhận được tế bào gốc nhiều hơn ở vị trí xa cuống rốn.

Các tế bào biểu mô màng ối có hình dạng khác nhau từ dạng trụ, đa diện đến hình cầu, đa số sắp xếp tạo thành một lớp tế bào trên màng đáy. Trên màng đáy, các tế bào biểu mô liên kết với màng đáy theo dạng bán liên kết không hoàn toàn nên dễ phân tách bằng trypsin để thu gom và phân lập được tế bào gốc từ màng ối.

### 2. Phân lập, nuôi cấy, bảo quản tế bào gốc màng ối và bước đầu biệt hóa được các tế bào gốc đã phân lập thành tế bào giống tế bào beta tụy nội tiết

Thu gom tế bào biểu mô màng ối và đã phân lập được tế bào gốc biểu mô màng ối bằng trypsin kết hợp các biện pháp cơ học.

Nuôi cấy tế bào gốc biểu mô màng ối được phân lập trong môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) có bổ sung thêm huyết thanh bào thai bò - FBS (10%), penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml), L-glutamin ( $2 \times 10^{-3}$ M).

Thành công bước đầu trong việc nghiên cứu lựa chọn môi trường, điều kiện biệt hóa tế bào gốc màng ối người thành tế bào giống tế bào beta tụy nội

tiết: sử dụng môi trường cơ bản (DMEM) có bổ sung 10mM nicotinamide, 55  $\mu$ M  $\beta$ - mercaptoethanol, 1mM sodium pyruvate.

## **KIẾN NGHỊ**

Tiến hành nghiên cứu sâu hơn về cấu trúc và các đặc tính của màng ối, sử dụng làm giá thể phục vụ cho công nghệ mô.

Tiếp tục nghiên cứu cải thiện phương pháp và quy trình thu gom tế bào biểu mô từ màng ối nhằm thu được số lượng tế bào gốc nhiều hơn.

Tiến hành nghiên cứu bảo quản và sử dụng tế bào gốc màng ối ở quy mô lớn hơn.

## **DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI LUẬN ÁN**

1. **Nguyễn Bảo Trân**, Đỗ Minh Trung, Nguyễn Duy Bắc, Nguyễn Việt Trung, Trần Hải Anh, Phạm Văn Trân, Trần Ngọc Anh (2017). Đặc điểm cấu trúc siêu vi thể của màng ối người. *Tạp chí Y Dược học Quân sự*. 42: 115-120

2. **Nguyễn Bảo Trân**, Đỗ Minh Trung, Nguyễn Duy Bắc, Nguyễn Việt Trung, Trần Hải Anh, Trần Ngọc Anh, Phạm Văn Trân (2014). Xác định đặc điểm sinh học màng ối người. *Tạp chí Y học Việt Nam*. 424: 208 – 214.

3. Đỗ Minh Trung, Trần Hải Anh, **Nguyễn Bảo Trân**, Toshio Nikaido, Phạm Văn Trân (2012). Nghiên cứu chế tạo và xác định biểu hiện của một số dấu ấn của tế bào gốc trong màng ối người đông khô. *Tạp chí Y Dược học Quân sự*. 37(7): 29 - 34

4. Đỗ Minh Trung, Phạm Văn Trân, **Nguyễn Bảo Trân**, Trần Hải Anh, Toshiko Yoshida, Toshio Nikaido (2012). Nghiên cứu phân lập, nuôi cấy và nhận biết tế bào gốc từ màng ối người. *Tạp chí Sinh lý học Việt Nam*. 16(1): 36-41.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Lê Văn Đông, Phạm Mạnh Hùng** (2006). Công nghệ tế bào gốc và tạo Clone. *Thông tin Y Dược*. 8: 8-15.
2. **Nguyễn Thị Thu Hà** (2004). Tế bào gốc và ứng dụng trong y sinh học. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*. 32 (Phụ bản): 13-25.
3. **Balasubramanian S., Jasty S., Sitalakshmi G., et al.** (2008). Influence of feeder layer on the expression of stem cell markers in cultured limbal corneal epithelial cells. *Indian Journal of Medical Research*. 128(5): 616.
4. **Larijani B., Esfahani E. N., Amini P., et al.** (2012). Stem cell therapy in treatment of different diseases. *Acta Medica Iranica*. 50(2): 79.
5. **Eggleston K.K.** (2012). Stem cell-based therapies: promises, obstacles, discordance, and the agora. *Perspectives in biology and medicine*. 55(1): 1-25.
6. **Zhang Z., Alexanian A.R.** (2012). Dopaminergic - like cells from epigenetically reprogrammed mesenchymal stem cells. *Journal of cellular and molecular medicine*. 16(11): 2708-2714.
7. **Spoel T.I.G., Vrijzen K.R., Koudstaal S., et al.** (2012). Transendocardial cell injection is not superior to intracoronary infusion in a porcine model of ischaemic cardiomyopathy: a study on delivery efficiency. *Journal of cellular and molecular medicine*. 16(11): 2768-2776.
8. **Wei H., Tan G., Qiu S., et al.** (2012). One-step derivation of cardiomyocytes and mesenchymal stem cells from human pluripotent stem cells. *Stem cell research*. 9(2): 87-100.
9. **Wang D.Y., Cheng C.C., Kao M.H., et al.** (2005). Regulation of limbal keratinocyte proliferation and differentiation by TAp63 and  $\Delta$ Np63

- transcription factors. *Investigative ophthalmology & visual science*. 46(9): 3102-3108.
10. **Ilancheran S., Moodley Y., Manuelpillai U.** (2009). Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta*. 30(1): 2-10.
  11. **Miki T., Strom S.C.** (2006). Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem cell reviews*. 2(2): 133-141.
  12. **Dobрева M.P., Pereira P.N., Deprest J., et al.** (2010). On the origin of amniotic stem cells: of mice and men. *Int J Dev Biol*. 54(5): 761-77.
  13. **Kitagawa K., Okabe M., Yanagisawa S., et al.** (2011). Use of a hyperdried cross-linked amniotic membrane as initial therapy for corneal perforations. *Japanese journal of ophthalmology*. 55(1): 16-21.
  14. **Meller D., Pauklin M., Thomasen H., et al.** (2011). Amniotic membrane transplantation in the human eye. *Dtsch Arztebl Int*. 108(14): 243-248.
  15. **Parolini O., Soncini M., Evangelista M., et al.** (2009). Amniotic membrane and amniotic fluid-derived cells: potential tools for regenerative medicine?
  16. **Branski L.K., Herndon D.N., Celis M.M., et al.** (2008). Amnion in the treatment of pediatric partial-thickness facial burns. *Burns*. 34(3): 393-9.
  17. **Dua H.S., Azuara-Blanco A.** (1999). Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol*. 83(6): 748-52.
  18. **Fernandes M., Sridhar M.S., Sangwan V.S., et al.** (2005). Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Cornea*. 24(6): 643-653.

19. **Rennie K., Gruslin A., Hengstschläger M., et al.** (2012). Applications of amniotic membrane and fluid in stem cell biology and regenerative medicine. *Stem cells international*. 2012.
20. **Đỗ Kính** (2008). Phôi thai học thực nghiệm và ứng dụng lâm sàng. Nhà xuất bản Y học.
21. **Benirschke K., Burton J.G., Baergen N.R.** (2012). Pathology of the human placenta, Sixth edition ed. Springer
22. **Toda A., Okabe M., Yoshida T., et al.** (2007). The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci*. 105(3): 215-28.
23. **Parry S., Strauss J.F.** (1998). Premature rupture of the fetal membranes. *New England Journal of Medicine*. 338(10): 663-670.
24. **Niknejad H., Peirovi H., Jorjani M., et al.** (2008). Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 15: 88-99.
25. **Lee P.H., Tsai S.H., Kuo L., et al.** (2012). A prototype tissue engineered blood vessel using amniotic membrane as scaffold. *Acta biomaterialia*. 8(9): 3342-3348.
26. **Phan Kim Ngọc, Phạm Văn Phúc, Trương Định** (2009). Công nghệ tế bào gốc. NXB Giáo dục Việt Nam.
27. **Enders A.C., King B.F.** (1988). Formation and differentiation of extraembryonic mesoderm in the rhesus monkey. *American journal of anatomy*. 181(4): 327-340.
28. **Miki T., Lehmann T., Cai H., et al.** (2005). Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. 23(10): 1549-59.

29. **Takashima S., Ise H., Zhao P., et al.** (2004). Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. *Cell Struct Funct.* 29(3): 73-84.
30. **Wei J.P., Zhang T.S., Kawa S., et al.** (2003). Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant.* 12(5): 545-52.
31. **Hao Y., Ma D.H., Hwang D.G., et al.** (2000). Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea.* 19(3): 348-52.
32. **Solomon A., Rosenblatt M., Monroy D., et al.** (2001). Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol.* 85(4): 444-9.
33. **Tseng S.C., Li D.Q., Ma X.** (1999). Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol.* 179(3): 325-35.
34. **Li H., Niederkorn J.Y., Neelam S., et al.** (2005). Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science.* 46(3): 900-907.
35. **Kamiya K., Wang M., Uchida S., et al.** (2005). Topical application of culture supernatant from human amniotic epithelial cells suppresses inflammatory reactions in cornea. *Experimental eye research.* 80(5): 671-679.
36. **Inge E., Talmi Y.P., Sigler L., et al.** (1991). Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta.* 12(3): 285-288.



37. **Akle C.A., Welsh K.I., Adinolfi M., et al.** (1981). Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *The Lancet*. 318(8254): 1003-1005.
38. **Adinolfi M., Akle C.A., McColl I., et al.** (1982). Expression of HLA antigens, beta 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature*. 295(5847): 325-327.
39. **Hammer A., Hutter H., Blaschitz A., et al.** (1997). Amnion Epithelial Cells, in Contrast to Trophoblast Cells, Express All Classical HLA Class I Molecules Together With HLA - G. *American journal of reproductive immunology*. 37(2): 161-171.
40. **Kubo M., Sonoda Y., Muramatsu R., et al.** (2001). Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 42(7): 1539-46.
41. **Wang M., Yoshida A., Kawashima H., et al.** (2006). Immunogenicity and antigenicity of allogeneic amniotic epithelial transplants grafted to the cornea, conjunctiva, and anterior chamber. *Investigative ophthalmology & visual science*. 47(4): 1522-1532.
42. **Sakuragawa N., Yoshikawa H., Sasaki M.** (1992). Amniotic tissue transplantation: clinical and biochemical evaluations for some lysosomal storage diseases. *Brain and Development*. 14(1): 7-11.
43. **Robinson W.P., McFadden D.E., Barrett I.J., et al.** (2002). Origin of amnion and implications for evaluation of the fetal genotype in cases of mosaicism. *Prenatal diagnosis*. 22(12): 1076-1085.
44. **Sakuragawa N., Misawa H., Ohsugi K., et al.** (1997). Evidence for active acetylcholine metabolism in human amniotic epithelial cells: applicable to intracerebral allografting for neurologic disease. *Neuroscience letters*. 232(1): 53-56.

45. **Kakishita K., Elwan M.A., Nakao N., et al.** (2000). Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: a potential source of donor for transplantation therapy. *Experimental neurology*. 165(1): 27-34.
46. **Uchida S., Inanaga Y., Kobayashi M., et al.** (2000). Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells. *J Neurosci Res*. 62(4): 585-90.
47. **Koyano S., Fukui A., Uchida S., et al.** (2002). Synthesis and release of activin and noggin by cultured human amniotic epithelial cells. *Development, growth & differentiation*. 44(2): 103-112.
48. **Kaneto H., Nakatani Y., Miyatsuka T., et al.** (2005). PDX-1/VP16 fusion protein, together with NeuroD or Ngn3, markedly induces insulin gene transcription and ameliorates glucose tolerance. *Diabetes*. 54(4): 1009-1022.
49. **Sakuragawa N., Kakinuma K., Kikuchi A., et al.** (2004). Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. *Journal of neuroscience research*. 78(2): 208-214.
50. **Yan Z.J., Zhang P., Hu Y.Q., et al.** (2013). Neural stem-like cells derived from human amnion tissue are effective in treating traumatic brain injury in rat. *Neurochemical research*. 38(5): 1022-1033.
51. **Becker A.J., McCulloch E.A., Till J.E.** (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells.
52. **Siminovitch L., McCulloch E. A., Till J. E.** (1963). The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol*. 62: 327-36.

53. **Bagutti C., Wobus A. M., Fassler R., et al.** (1996). Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: comparison of wild-type and beta 1 integrin-deficient cells. *Dev Biol.* 179(1): 184-96.
54. **Díaz-Prado S., Muiños-López E, Hermida-Gómez T., et al.** (2011). Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. *Differentiation.* 81(3): 162-171.
55. **Narumi K., Ashizawa K., Takashima R., et al.** (2012). Development of a repeated-dose liver micronucleus assay using adult rats: an investigation of diethylnitrosamine and 2, 4-diaminotoluene. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 747(2): 234-239.
56. **Pan G.Z., Yang Y., Zhang J., et al.** (2012). Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia/reperfusion injuries via inactivation of the MEK/ERK signaling pathway in rats. *journal of surgical research.* 178(2): 935-948.
57. **Parolini O., Alviano F., Bagnara G. P., et al.** (2008). Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells.* 26(2): 300-11.
58. **Marongiu F., Gramignoli R., Dorko K., et al.** (2011). Hepatic differentiation of amniotic epithelial cells. *Hepatology.* 53(5): 1719-1729.
59. **Hughes S.** (2002). Cardiac stem cells. *The Journal of pathology.* 197(4): 468-478.
60. **Zhao P., Ise H., Hongo M., et al.** (2005). Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation.* 79(5): 528-35.

61. **Tanaka M., Chen Z., Bartunkova S., et al.** (1999). The cardiac homeobox gene *Csx/Nkx2.5* lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. *Development*. 126(6): 1269-1280.
62. **Kasahara H., Usheva A., Ueyama T., et al.** (2001). Characterization of homo- and heterodimerization of cardiac *Csx/Nkx2.5* homeoprotein. *Journal of Biological Chemistry*. 276(7): 4570-4580.
63. **Logan M., Mohun T.** (1993). Induction of cardiac muscle differentiation in isolated animal pole explants of *Xenopus laevis* embryos. *Development*. 118(3): 865-875.
64. **Kehat I., Kenyagin-Karsenti D., Snir M., et al.** (2001). Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *The Journal of clinical investigation*. 108(3): 407-414.
65. **Mummery C., Ward-van O.D., Doevendans P.A., et al.** (2003). Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation*. 107(21): 2733-2740.
66. **Diaz-Prado S., Muinos-Lopez E., Hermida-Gomez T., et al.** (2010). Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Human Amniotic Membrane. *Tissue Eng Part C Methods*.
67. **Kunisaki S. M., Jennings R. W., Fauza D. O.** (2006). Fetal cartilage engineering from amniotic mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 15(2): 245-53.
68. **Diaz-Prado S., Muinos-Lopez E., Hermida-Gomez T., et al.** (2010). Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *J Cell Biochem*. 111(4): 846-57.

69. **Liao T., Moussallem M.D., Kim J., et al.** (2010). N-isopropylacrylamide-based thermoresponsive polyelectrolyte multilayer films for human mesenchymal stem cell expansion. *Biotechnol Prog.* 26(6): 1705-13.
70. **Yang L., Cheng F., Liu T., et al.** (2012). Comparison of mesenchymal stem cells released from poly(N-isopropylacrylamide) copolymer film and by trypsinization. *Biomed Mater.* 7(3): 035003.
71. **Trappmann B., Gautrot J.E., Connelly J.T., et al.** (2012). Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. *Nature materials.* 11(7): 642-649.
72. **Bell E., Richardson G.D., Jahoda C.A., et al.** (2012). Dermal stem cells can differentiate down an endothelial lineage. *Stem cells and development.* 21(16): 3019-3030.
73. **Kang B. J., Ryu H. H., Park S. R., et al.** (2012). Effect of matrigel on the osteogenic potential of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Veterinary Medical Science.* 74(7): 827-836.
74. **Hung C.H., Lin Y.L., Young T.H.** (2006). The effect of chitosan and PVDF substrates on the behavior of embryonic rat cerebral cortical stem cells. *Biomaterials.* 27(25): 4461-9.
75. **Sadvakassova G., Dobocan M.C., Congote L.F.** (2009). Osteopontin and the C-terminal peptide of thrombospondin-4 compete for CD44 binding and have opposite effects on CD133+ cell colony formation. *BMC Res Notes.* 2: 215.
76. **Thakkar Umang G, Vanikar Aruna V, Trivedi Hargovind L** (2017). Stem cells: An emerging novel therapeutic for type-1 diabetes mellitus. *diabetes research and clinical practice.* 130: 130-132.

77. **Jun H.S** (2010), In vivo regeneration of insulin-producing  $\beta$ -cells, *The Islets of Langerhans*, Springer: 627-640.
78. **Xu X., D'Hoker J., Stange G., et al.** (2008).  $\beta$  cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell*. 132(2): 197-207.
79. **Zhou Q., Brown J., Kanarek A., et al.** (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*. 455(7213): 627-632.
80. **Koya V., Lu S., Sun Y., et al.** (2008). Reversal of Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice by Cellular Transduction With Recombinant Pancreatic Transcription Factor Pancreatic Duodenal Homeobox-1 A Novel Protein Transduction Domain–Based Therapy. *Diabetes*. 57(3): 757-769.
81. **Yechool V., Liu V., Espiritu C., et al.** (2009). Neurogenin3 is sufficient for transdetermination of hepatic progenitor cells into neo-islets in vivo but not transdifferentiation of hepatocytes. *Developmental cell*. 16(3): 358-373.
82. **Bhonde R.R., Sheshadri P., Sharma S., et al.** (2014). Making surrogate  $\beta$ -cells from mesenchymal stromal cells: perspectives and future endeavors. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 46: 90-102.
83. **Kroon E., Martinson L.A., Kadoya K., et al.** (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nature biotechnology*. 26(4): 443-452.
84. **Jun H.S, Park E.Y.** (2009). Adult stem cells as a renewable source of insulin-producing cells. *International journal of stem cells*. 2(2): 115.

85. **Seaberg R.M., Smukler S.R., Kieffer T.J., et al.** (2004). Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nature biotechnology*. 22(9): 1115-1124.
86. **Lin G., Wang G., Liu G., et al.** (2009). Treatment of type 1 diabetes with adipose tissue-derived stem cells expressing pancreatic duodenal homeobox 1. *Stem cells and development*. 18(10): 1399-1406.
87. **Zhou Y., Mack D.L., Williams J.K., et al.** (2013). Genetic modification of primate amniotic fluid-derived stem cells produces pancreatic progenitor cells in vitro. *Cells Tissues Organs*. 197(4): 269-282.
88. **Gelling R.W., Du X.Q., Dichmann D.S., et al.** (2003). Lower blood glucose, hyperglucagonemia, and pancreatic alpha cell hyperplasia in glucagon receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(3): 1438-43.
89. **Suzuki A., Nakauchi H., Taniguchi H.** (2003). Glucagon-like peptide 1 (1-37) converts intestinal epithelial cells into insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(9): 5034-9.
90. **Kim B., Yoon B., Moon J. H., et al.** (2012). Differentiation of human labia minora dermis-derived fibroblasts into insulin-producing cells. *Experimental & molecular medicine*. 44(1): 26.
91. **Nguyễn Mạnh Khánh, Nguyễn Thị Thu Hà, Nguyễn Tiến Bình và CS** (2007). Ghép tế bào gốc tự thân điều trị khớp giả thân xương chày. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*. 51 (Phụ trương): 4-8.
92. **Phan Kim Ngọc và CS** (2008). Thu nhận tế bào gốc trung mô đa năng từ máu cuống rốn người. *Tạp chí y dược học quân sự*. 33: 119-124.

93. **Nguyễn Thị Bình, Trịnh Bình, Nguyễn Khang Sơn và CS** (2009). Nghiên cứu quy trình tạo tấm màng ối làm nền nuôi cấy tế bào gốc vùng rìa giác mạc. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*. 63(4).
94. **Phạm Văn Phúc, Nguyễn Đăng Khoa, Trần Bảo Kiêm và CS** (2008). Nghiên cứu biệt hóa tế bào gốc trung mô từ máu cuống rốn người thành tế bào giống thần kinh, cơ tim và tiết insulin bằng dịch chiết. *Tạp chí Công nghệ sinh học*. 6: 415-421.
95. **Miki T., Marongiu F., Ellis E., et al.** (2010). Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. Chapter 1: Unit 1E 3.
96. **Sumi S., Gu Y., Hiura A., et al.** (2004). Stem cells and regenerative medicine for diabetes mellitus. *Pancreas*. 29(3): e85-9.
97. **Trovato L., De Fazio R., Annunziata M., et al.** (2009). Pluripotent stem cells isolated from human amniotic fluid and differentiation into pancreatic beta-cells. *J Endocrinol Invest*. 32(11): 873-6.
98. **Evans M.J., Kaufman M.H.** (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292(5819): 154-156.
99. **Evron A., Goldman S., Shalev E.** (2011). Human amniotic epithelial cells cultured in substitute serum medium maintain their stem cell characteristics for up to four passages. *International journal of stem cells*. 4(2): 123.
100. **Bourne G.L.** (1960). The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *American journal of obstetrics and gynecology*. 79(6): 1070-1073.
101. **Danforth D.N., Hull R.W.** (1958). The microscopic anatomy of the fetal membranes with particular reference to the detailed structure of the amnion. *American journal of obstetrics and gynecology*. 75(3): 536-550.



102. **von Versen-Höynck F., Syring C., Bachmann S., et al.** (2004). The influence of different preservation and sterilisation steps on the histological properties of amnion allografts—light and scanning electron microscopic studies. *Cell and Tissue banking*. 5(1): 45-56.
103. **Hebertson R.M., Hammond M.E., Bryson M.J.** (1986). Amniotic epithelial ultrastructure in normal, polyhydramnic, and oligohydramnic pregnancies. *Obstetrics & Gynecology*. 68(1): 74-79.
104. **Scherjon S.A., van der Keur C.K., de Groot S.G., et al.** (2004). Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem cells*. 22(7): 1338-1345.
105. **Bilic G., Zeisberger S.M., Mallik A.S., et al.** (2008). Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy. *Cell Transplant*. 17(8): 955-68.
106. **Soncini M., Vertua E., Gibelli L., et al.** (2007). Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med*. 1(4): 296-305.
107. **Pollard S. M., Aye N.N., Symonds E.M.** (1976). Scanning electron microscope appearances of normal human amnion and umbilical cord at term. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 83(6): 470-477.
108. **AL-Yahya A.A., Makhlof M.M.** (2013). Characterization of the Human Amniotic Membrane: Histological, Immunohistochemical and Ultrastructural Studies. *Life Science Journal*. 4: 10.
109. **Hu J., Cai Z., Zhou Z.W.** (2009). Progress in studies on the characteristics of human amnion mesenchymal cells. *Progress in Natural Science*. 19(9): 1047-1052.

110. **Pasquinelli G., Tazzari P., Ricci F., et al.** (2007). Ultrastructural characteristics of human mesenchymal stromal (stem) cells derived from bone marrow and term placenta. *Ultrastructural pathology*. 31(1): 23-31.
111. **Simandi Z., Horvath A., Wright L.C., et al.** (2016). OCT4 acts as an integrator of pluripotency and signal-induced differentiation. *Molecular Cell*. 63(4): 647-661.
112. **Boyer L. A., Lee T. I., Cole M.F., et al.** (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 122(6): 947-956.
113. **Manuelpillai U., Moodley Y., Borlongan C.V., et al.** (2011). Amniotic membrane and amniotic cells: potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis? *Placenta*. 32: S320-S325.
114. **De Coppi P., Bartsch G., Siddiqui M.M., et al.** (2007). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature biotechnology*. 25(1): 100-106.
115. **Mendez M. G., Kojima S., Goldman R. D.** (2010). Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *The FASEB Journal*. 24(6): 1838-1851.
116. **Savagner P.** (2010). The epithelial–mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Annals of Oncology*. 21(suppl 7): vii89-vii92.
117. **Walgenbach K. J., Voigt M., Riabikhin A. W., et al.** (2001). Tissue engineering in plastic reconstructive surgery. *Anat Rec*. 263(4): 372-8.
118. **Murdoch A. D., Iozzo R. V.** (1993). Perlecan: the multidomain heparan sulphate proteoglycan of basement membrane and extracellular matrix. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 423(4): 237-42.

119. **Bouwens L., Lu W.G., De Krijger R.** (1997). Proliferation and differentiation in the human fetal endocrine pancreas. *Diabetologia*. 40(4): 398-404.
120. **Rosenberg L.** (1995). In vivo cell transformation: neogenesis of beta cells from pancreatic ductal cells. *Cell transplantation*. 4(4): 371-383.
121. **Zulewski H., Abraham E.J., Gerlach M.J., et al.** (2001). Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes*. 50(3): 521-533.
122. **Petersen O.W., Nielsen H.L., Gudjonsson T., et al.** (2003). Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *The American journal of pathology*. 162(2): 391-402.
123. **Ko S-H, Suh S-H, Kim B-J, et al.** (2004). Expression of the intermediate filament vimentin in proliferating duct cells as a marker of pancreatic precursor cells. *Pancreas*. 28(2): 121-128.
124. **Tabatabaei M., Mosaffa N., Nikoo S., et al.** (2014). Isolation and partial characterization of human amniotic epithelial cells: the effect of trypsin. *Avicenna journal of medical biotechnology*. 6(1): 10-20.
125. **Lim R, Chan ST, Tan JL, et al.** (2013). Preterm human amnion epithelial cells have limited reparative potential. *Placenta*. 34(6): 486-492.
126. **Kronsteiner B., Wolbank S., Peterbauer A., et al.** (2011). Human mesenchymal stem cells from adipose tissue and amnion influence T-cells depending on stimulation method and presence of other immune cells. *Stem cells and development*. 20(12): 2115-2126.

127. **Kobayashi M., Yakuwa T., Sasaki K., et al.** (2008). Multilineage potential of side population cells from human amnion mesenchymal layer. *Cell Transplant.* 17(3): 291-301.
128. **Ochs B. A., Franke W. W., Moll R., et al.** (1983). Epithelial character and morphologic diversity of cell cultures from human amniotic fluids examined by immunofluorescence microscopy and gel electrophoresis of cytoskeletal proteins. *Differentiation.* 24(2): 153-73.
129. **Ochsenbein-Kolble N., Bilic G., Hall H., et al.** (2003). Inducing proliferation of human amnion epithelial and mesenchymal cells for prospective engineering of membrane repair. *J Perinat Med.* 31(4): 287-94.
130. **Motedayyen H., Esmaeil N., Tajik N., et al.** (2017). Method and key points for isolation of human amniotic epithelial cells with high yield, viability and purity. *BMC research notes.* 10(1): 552.
131. **Bruin J. E., Rezania A., Kieffer T. J.** (2015). Replacing and safeguarding pancreatic  $\beta$  cells for diabetes. *Science translational medicine.* 7(316): 316ps23-316ps23.
132. **Maeda H., Rajesh K.G., Suzuki R., et al.** (2004). Epidermal growth factor and insulin inhibit cell death in pancreatic beta cells by activation of PI3-kinase/AKT signaling pathway under oxidative stress. *Transplant Proc.* 36(4): 1163-5.
133. **Suzuki A., Nakauchi H., Taniguchi H.** (2004). Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes.* 53(8): 2143-52.
134. **Suzuki S., Takiguchi S., Sato N., et al.** (2001). Importance of CCK-A receptor for gallbladder contraction and pancreatic secretion: a study in CCK-A receptor knockout mice. *Jpn J Physiol.* 51(5): 585-90.

135. **Miki H., Namba M., Nishimura T., et al.** (1996). Glucagon-like peptide-1(7-36)amide enhances insulin-stimulated glucose uptake and decreases intracellular cAMP content in isolated rat adipocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1312(2): 132-6.
136. **Carnevale G., Riccio M., Pisciotta A., et al.** (2013). In vitro differentiation into insulin-producing  $\beta$ -cells of stem cells isolated from human amniotic fluid and dental pulp. *Digestive and Liver Disease*. 45(8): 669-676.
137. **Hua X., Wang Y., Tang Y., et al.** (2014). Pancreatic insulin-producing cells differentiated from human embryonic stem cells correct hyperglycemia in SCID/NOD mice, an animal model of diabetes. *PLoS One*. 9(7): e102198.

## **PHỤ LỤC**

1. Giấy xác nhận đồng ý cho sử dụng số liệu nghiên cứu của đề tài cấp Nhà nước “Hợp tác nghiên cứu quy trình sản xuất một số chế phẩm sinh học từ tế bào gốc màng ôi” vào luận án tiến sỹ.
2. Giấy xác nhận đồng ý cho sử dụng số liệu của các đồng tác giả về các công trình nghiên cứu đã được công bố trên các tạp chí khoa học
3. Danh sách các sản phụ cung cấp nhau thai

**CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM**  
**Độc lập – Tự do – Hạnh phúc**

**GIẤY XÁC NHẬN**

Họ và tên: PGS.TS Phạm Văn Trân

Cấp bậc: Đại tá

Chức vụ: Chủ nhiệm Bộ môn Hóa Sinh, Học viện Quân y.

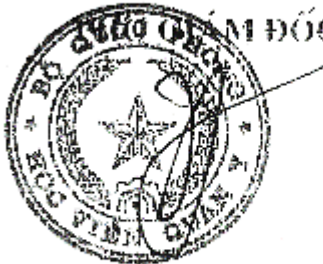
Là Chủ nhiệm đề tài nghị định thư với Nhật Bản: “Hợp tác nghiên cứu quy trình sản xuất một số chế phẩm sinh học từ tế bào gốc màng ối” do Học viện Quân y chủ trì. Tôi xin xác nhận:

- Nghiên cứu sinh Nguyễn Bảo Trân, chuyên ngành Giải phẫu của Học viện Quân y là thành viên chính thực hiện đề tài.
- Tôi đồng ý cho nghiên cứu sinh Nguyễn Bảo Trân, được sử dụng các số liệu trong đề tài trên phục vụ vào luận án tiến sỹ.

*Hà Nội, ngày 1 tháng 12 năm 2016*

**XÁC NHẬN**

**KT. GIÁM ĐỐC**  
**KT. GIÁM ĐỐC**



Thiếu tướng  
Hoàng Văn Lương

**CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI**

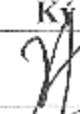


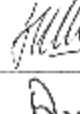
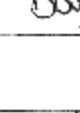

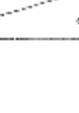


**PGS.TS PHẠM VĂN TRÂN**

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM  
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

**GIẤY XÁC NHẬN**  
(V/v cho phép sử dụng số liệu nghiên cứu)

Chúng tôi là các thành viên cùng thực hiện đề tài nghiên cứu khoa học cấp Nhà nước: “Hợp tác nghiên cứu quy trình sản xuất một số chế phẩm sinh học từ tế bào gốc màng ối” do Học viện Quân y chủ trì. ThS.BS. Nguyễn Bảo Trân, nghiên cứu sinh chuyên ngành Giải phẫu của Học viện Quân y cũng là thành viên của nhóm nghiên cứu

Chúng tôi đồng ý cho ThS.BS. Nguyễn Bảo Trân được sử dụng và báo cáo các số liệu trong công trình nghiên cứu trên trong bản Luận án Tiến sĩ của mình như là các kết quả nghiên cứu độc lập.

STT	Đồng tác giả	Ký tên
1	GS.TS Hoàng Văn Lương Học viện Quân Y	
2	PGS.TS Phạm Văn Trân Học viện Quân Y	
3	PGS.TS. Trần Hải Anh Học viện Quân Y	
4	PGS.TS Nguyễn Linh Toàn Học viện Quân Y	
5	PGS.TS Trần Văn Khoa Học viện Quân Y	
6	PGS.TS Nguyễn Duy Bắc Học viện Quân Y	
7	PGS.TS. Nguyễn Việt Trung Học viện Quân Y	
8	TS. Đỗ Minh Trung Học viện Quân Y	
9	ThS. Lê Thanh Hà	



**CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM**  
**Độc lập – Tự do – Hạnh phúc**

**GIẤY XÁC NHẬN**



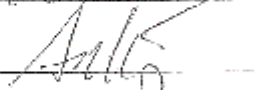


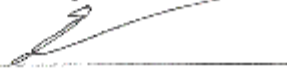
*(Viv: cho phép sử dụng số liệu nghiên cứu)*

Chúng tôi là các đồng tác giả với ThS.BS. Nguyễn Bảo Trân về các công trình nghiên cứu tại Học viện Quân y đã được công bố trên các tạp chí khoa học sau:

1. Nguyễn Bảo Trân, Đỗ Minh Trung, Nguyễn Duy Bắc, Nguyễn Việt Trung, Trần Hải Anh, Trần Ngọc Anh, Phạm Văn Trân (2015). Đặc điểm sinh học màng ối người - Y học Việt Nam – Số chuyên đề Hình thái học
2. Đỗ Minh Trung, Trần Hải Anh, Nguyễn Bảo Trân, Toshio Nikaido, Phạm Văn Trân (2012) Nghiên cứu chế tạo và xác định biểu hiện của một số dấu ấn của tế bào gốc trong màng ối người đông khô. Tạp chí Y Dược học Quân sự. Số 37(7). Tr. 29-34
3. Đỗ Minh Trung, Phạm Văn Trân, Nguyễn Bảo Trân, Trần Hải Anh, Toshiko Yoshida, Toshio Nikaido (2012). Nghiên cứu phân lập, nuôi cấy và nhận biết tế bào gốc từ màng ối người. Tạp chí Sinh lý học Việt Nam. Số 16(1), tr. 6-41.
4. Nguyễn Bảo Trân, Đỗ Minh Trung, Nguyễn Duy Bắc, Nguyễn Việt Trung, Trần Hải Anh, Trần Ngọc Anh, Phạm Văn Trân - Nghiên cứu đặc điểm hình thái siêu vi thể màng ối người - Dự kiến đăng tạp chí Y học Việt Nam số /2017

Chúng tôi đồng ý cho ThS.BS. Nguyễn Bảo Trân được sử dụng và báo cáo các số liệu trong các công trình nghiên cứu trên trong bản Luận án Tiến sĩ của mình như là các kết quả nghiên cứu độc lập.

Danh sách các đồng tác giả:

STT	Đồng tác giả	Ký tên
1	PGS.TS Trần Ngọc Anh Học viện Quân Y	
2	PGS.TS Phạm Văn Trân Học viện Quân Y	
3	PGS.TS. Trần Hải Anh Học viện Quân Y	
4	PGS.TS Nguyễn Duy Bắc Học viện Quân Y	
5	PGS.TS. Nguyễn Việt Trung Học viện Quân Y	
6	TS. Đỗ Minh Trung Học viện Quân Y	

### DANH SÁCH SẢN PHỤ CHO MÀNG ỒI

(Thực hiện luận án: *Nghiên cứu đặc điểm hình thái màng ối và tế bào gốc màng ối. Trong khuôn khổ đề tài “Hợp tác nghiên cứu quy trình sản xuất một số chế phẩm sinh học từ tế bào gốc màng ối” do Học viện Quân y chủ trì*)

STT	Màng ối từ sản phụ	Ngày lấy mẫu	Tuổi	Bệnh án	Mã số
1.	Hoàng Thị Ng.	6/1/2010	36	39	MO01
2.	Vũ Thị Đ.	10/1/2010	29	78	MO02
3.	Ngô Thị Ngọc H.	12/1/2010	25	99	MO03
4.	Nguyễn Thị L.	21/1/2010	23	145	MO04
5.	Trần Thị Kim T.	25/1/2010	27	170	MO05
6.	Nguyễn Thị Thùy L.	28/1/2010	29	184	MO06
7.	Lương Thị Mai H.	31/1/2010	36	195	MO07
8.	Nguyễn Thị Ng.	3/2/2010	30	210	MO08
9.	Phùng Thị Th.	4/2/2010	30	215	MO09
10.	Lê Thị H.	9/3/2010	38	349	MO10
11.	Đỗ Thị Minh Th.	11/3/2010	23	359	MO11
12.	Hồ Quỳnh G.	16/3/2010	27	373	MO12
13.	Nguyễn Thị H.	19/3/2010	28	393	MO13
14.	Nguyễn Thị Th.	28/3/2010	27	442	MO14
15.	Nguyễn Minh Q.	29/3/2010	37	419	MO15
16.	Mai Thị Hà H.	2/4/2010	26	441	MO16
17.	Chử Thị L.	4/4/2010	36	473	MO17
18.	Điêu Thị Hồng T.	18/5/2010	33	675	MO18
19.	Phạm Thị Minh Th.	31/5/2010	39	747	MO19
20.	Nguyễn Thị D.	29/6/2010	30	886	MO20
21.	Lương Thị Thu H.	5/8/2010	34	1106	MO21
22.	Nguyễn Thị H.	17/9/2010	29	1406	MO22
23.	Nguyễn Thị Thu H.	12/10/2010	32	1598	MO23
24.	Nguyễn Thị Minh Ph.	19/11/2010	30	1887	MO24
25.	Đinh Thị G.	1/12/2010	37	1969	MO25
26.	Đỗ Thị L.	15/12/2010	26	2051	MO26
27.	Nguyễn Thị Hương M.	11/1/2011	26	97	MO27
28.	Nguyễn Thị Th.	9/3/2011	26	461	MO28
29.	Lê Thị Th.	22/4/2011	35	749	MO29
30.	Nguyễn Thị H.	18/8/2011	27	1565	MO30

