



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0002776

(51) **C12N 5/0775; C12N 5/02; C12N 5/07**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00382

(22) 20/03/2019

(67) 1-2019-01403

(45) 25/01/2022 406

(43) 27/05/2019 374A

(73) Viện nghiên cứu tế bào gốc và công nghệ gen Vinmec (VN)
458 Minh Khai, Phường Vĩnh Tuy, Quận Hai Bà Trưng, Thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thanh Liêm (VN); Hoàng Minh Đức (VN); Bùi Việt Anh (VN).

(74) CÔNG TY LUẬT TRÁCH NHIỆM HỮU HẠN AMBYS HÀ NỘI (AMBYS
HANOI)

(54) QUY TRÌNH PHÂN LẬP VÀ NUÔI CẤY TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ DÂY RÓN

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ dây rốn, trong đó bằng cách xử lý dây rốn bằng hỗn hợp enzym kết hợp với cơ học cho phép phá vỡ mô liên kết từ dây rốn, rút ngắn thời gian phân lập tế bào xuống còn từ 2,5 đến 4 giờ mà không ảnh hưởng đến chất lượng tế bào gốc thu được. Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép xử lý trực tiếp dây rốn mà không phải qua khâu tách lớp màng dây rốn. Tế bào gốc trung mô từ dây rốn thu được cho thấy nhanh chóng phục hồi và phát triển trong môi trường nuôi cấy. Quy trình theo giải pháp hữu ích có thể thu nhận, nuôi cấy tế bào gốc trung mô tự thân mà không ảnh hưởng đến cơ thể, cho phép lưu giữ tế bào gốc tự thân, mở ra các ứng dụng tiềm năng trong y học lâm sàng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực tế bào và di truyền học ứng dụng trong y học, cụ thể giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ dây rốn. Quy trình cho phép tận dụng được nguồn tế bào gốc tự thân từ nguồn dây rốn để thu được tế bào gốc, mở ra khả năng ứng dụng tế bào gốc trong y học lâm sàng.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Trong quá trình phát triển phôi ở người, dây rốn được hình thành từ màng phôi sau thụ tinh và màng niệu nang trở thành một bộ phận đặc biệt kết nối giữa thai nhi, nhau thai và người mẹ. Trong dây rốn có chứa một loại chất nhầy dạng sệt được tìm ra bởi Thomas Wharton và thường được gọi là Wharton's jelly (WJ). Chức năng chính của lớp màng nhầy này là bảo vệ các mạch máu bên trong dây rốn (bao gồm 2 tĩnh mạch và 1 động mạch) cũng như ngăn ngừa các hiện tượng tắc nghẽn, xoắn vặn dây rốn. Lớp màng nhầy chủ yếu bao gồm các glycosaminoglycan, đặc biệt là hợp chất axit hyaluronic và chondroitin sulfate. Ngoài các hợp chất trên, dây rốn còn được tạo thành từ các sợi collagen chạy dọc chiều dài làm tăng độ dẻo dai, độ bền và tính toàn vẹn của cấu trúc. Các thành phần tế bào cấu tạo nên dây rốn đa phần là các tế bào thuộc lớp trung mô như tế bào sợi, tế bào cơ, tế bào cơ trơn và tế bào gốc trung mô. Khác với các loại mô khác trong cơ thể con người, lớp WJ không hề chứa mạng lưới mao mạch hay các mạch máu nhỏ. Theo các nghiên cứu về sự phát triển của phôi, quá trình phát triển hệ mạch máu và tái tạo máu bên trong dây rốn được bắt đầu từ tuần thứ 6 của quá trình hình thành phôi thai, nhưng đến tuần thứ 9 của thai kỳ, quá trình này dừng hẳn và các mao mạch bắt đầu mất dần trong toàn bộ cấu trúc dây rốn.

Từ năm 1974 các nghiên cứu đã chỉ ra rằng trong dây rốn có nguồn tế bào gốc, tạo máu, tuy nhiên tại thời điểm đó dây rốn vẫn được coi là một phế phẩm trong y khoa và không có giá trị về khoa học. Đến năm 1991, McElreavey và các cộng sự phân lập thành công các tế bào dạng sợi (fibroblast-like cells) từ lớp màng nhầy Wharton's Jelly và tiến hành phân tích đặc tính sinh học của các dòng tế bào này thì tế bào gốc từ dây rốn mới được chú ý. Năm 2004, đặc tính sinh học của các dòng tế bào dạng sợi từ

dây rốn được chứng minh là tế bào gốc trung mô thông qua khả năng tăng sinh, khả năng biệt hoá và có các chất đánh dấu bề mặt như CD29, CD44, CD51, CD73, CD90 và CD105. Quan trọng nhất là các tế bào này không có các chất đánh dấu bề mặt của tế bào gốc tạo máu như CD34 và CD45. Các đặc tính trên tương đồng hoàn toàn với khái niệm tế bào gốc trung mô được hiệp hội tế bào gốc thế giới (International Society for Cell Therapy: ISCT) đưa ra. Hiện tại, tế bào gốc trung mô từ dây rốn có thể được phân lập từ toàn bộ các phần của dây rốn hay từ những bộ phận riêng lẻ cấu thành của dây rốn như các tế bào TBGTMDR lấy từ động mạch và tĩnh mạch, màng dây rốn và lấy từ khối nhầy WJ.

Theo định nghĩa của tổ chức ISCT (International Society for Cellular Therapy), một tế bào được xác định là tế bào gốc trung mô khi và chỉ khi tế bào này có khả năng bám dính trên bề mặt nuôi cấy sau khi tách ra khỏi mô gốc và có các biểu hiện chất đánh dấu bề mặt như CD73, CD90, và CD105, nhưng không biểu hiện các chất đánh dấu bề mặt của dòng tế bào tạo máu như CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79alpha hay CD19, và HLA-DR. Ngoài ra, tế bào gốc sau khi phân lập được phải có khả năng biệt hoá thành các tế bào xương, sụn, và mỡ *in vitro*.

Hiện đã có nhiều quy trình phân lập tế bào gốc trung mô từ dây rốn bao gồm phân lập từ toàn bộ các phần của dây rốn hay từ những bộ phận riêng lẻ cấu thành của dây rốn như các tế bào gốc trung mô MSC-UC từ động mạch và tĩnh mạch, MSC-UC từ màng dây rốn, và MSC-UC từ khối nhầy WJ. Tuy nhiên các quy trình phân lập tế bào gốc trung mô từ dây rốn thường bao gồm 3 bước chính (Li and Cai 2012, Batsali, Kastrinaki et al. 2013):

- Loại bỏ lớp màng bao bọc dây rốn, động mạch, tĩnh mạch, và hệ thống các mô liên kết bằng quy trình cơ học.

- Sử dụng các enzym như trypsin, collagenaza I, II, hay IV, dispaza, protaza, hoặc hyaluronidaza để phân huỷ các cấu trúc dạng sợi cũng như hệ thống các mô liên kết của dây rốn, giải phóng các tế bào ra môi trường bên ngoài. Tiếp đó, dùng quy trình cơ học để nghiền nhỏ các mô.

- Chuyển các mô đã được nghiền nhỏ và xử lý bằng enzym vào môi trường nuôi cấy có chứa huyết thanh từ người hoặc từ động vật (FBS) đồng thời bổ sung thêm một số cơ chất kích thích sự phát triển MSC như nhân tố sinh trưởng nguyên bào sợi beta

(Fibroblast growth factor beta: FGFb), nhân tố sinh trưởng biểu bì (Epidermal growth factor: EGF), nhân tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (Platelet-derived growth factor: PDGF), và nhân tố sinh trưởng nội mạc mạch máu (Vascular Endothelial growth factor: VEGF).

Do cấu trúc của dây rốn có chứa nhiều mô liên kết và lớp màng nhầy Wharton Jelly (WJ) dày, nên việc phân lập tế bào gốc trung mô từ dây rốn gặp nhiều khó khăn. Hiện có hai kỹ thuật chính dùng để phân tách tế bào gốc trung mô từ dây rốn là phân lập từ mô (Yusoff, Maqbool et al. 2016), và phân lập bằng enzym (Nazari-Shafti, Bruno et al. 2015, Smith, Pfeifer et al. 2016).

Theo quy trình của Yusoff, Maqbool và cộng sự, dây rốn được cắt nhỏ thành từng mảnh với thể tích từ 1 đến 2 mm³. Những mảnh nhỏ này được xếp vào trong đĩa nuôi cấy và dung dịch nuôi cấy được cho vào đĩa nuôi cấy để cung cấp chất dinh dưỡng cũng như bắt đầu quá trình phân lập tế bào gốc từ các mô trên. Quá trình nuôi cấy kéo dài từ 2 đến 4 tuần cho đến khi các tế bào có hình thái giống với tế bào sợi bắt đầu phát triển trên bề mặt đĩa nuôi cấy và có mật độ bao phủ từ 80% đến 90%. Những tế bào này sau đó sẽ được thu thập bằng quy trình enzym và sau đó tiến hành nuôi cấy để xác định tính chất của dòng tế bào. Quy trình này ưu điểm là đơn giản, có thể phân lập được các dòng tế bào gốc trung mô tách các dòng MSC từ những phần khác nhau của dây rốn như WJ, tĩnh mạch (Umbilical cord vein: UCV), hay động mạch (Umbilical cord artery: UCA). Tuy nhiên, kỹ thuật này có thời gian nuôi cấy ban đầu kéo dài, từ 2 đến 4 tuần, nên khả năng nhiễm khuẩn cao. Đồng thời, những mẫu mô để nổi trên bề mặt của đĩa nuôi cấy làm giảm khả năng tạo thành tế bào gốc trung mô MSC nên khó thu được lượng tế bào MSC bằng nhau giữa các mẫu dây rốn.

Trong kỹ thuật phân lập tế bào gốc trung mô sử dụng enzym, phần dây rốn có thể được xử lý trực tiếp với enzym hoặc cắt nhỏ mịn trước khi xử lý với enzym để tăng hoạt tính và khả năng phân tách của enzym với mô. Hỗn hợp enzym thường được sử dụng để xử lý tế bào dây rốn là collagenaza, hyalurodinaza, dipaza II. Tuy nhiên, loại enzym, hỗn hợp enzym, thời gian ủ, và nồng độ enzym được sử dụng là tùy vào kinh nghiệm từng người.

Tài liệu VN 1-0007538 của Phan Toàn Thắng và các cộng sự đã đề cập đến kỹ thuật phân tách MSC-UC từ lớp màng ngoài cùng của dây rốn (subammion

membrane). Theo đó, dây rốn sau khi khử trùng toàn bộ bằng cách ủ trong môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: DMEM) chứa nồng độ glucoza cao có bổ sung antimycotic 2X được cắt thành những mảnh nhỏ có độ dài khoảng 2,5 cm và ngâm trong dung dịch DMEM ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂ trong vòng 24 giờ. Do DMEM chứa phenol đỏ nên toàn bộ lớp WJ sẽ hấp thụ DMEM và chuyển sang màu hồng nhạt, nhờ đó có thể dễ dàng tách bỏ hoàn toàn lớp WJ và các mạch máu ra khỏi dây rốn. Lớp màng ngoài cùng của dây rốn sau khi đã loại bỏ các lớp mô khác sẽ được nuôi cấy trong môi trường có chứa 10% huyết thanh bò đã được bất hoạt bằng nhiệt ở 56°C trong 30 phút. Sau khoảng từ 10 đến 14 ngày nuôi cấy, tế bào bắt đầu tăng sinh và mọc trên bề mặt của đĩa nuôi cấy. Về mặt hình thái học thì những tế bào này có dạng hình sợi, và một lượng nhỏ tế bào có dạng tế bào biểu mô. Các tế bào này có thể tăng sinh tới đa 10 lần cấy chuyển mà vẫn giữ được độ ổn định của nhiễm sắc thể và có khả năng biệt hoá thành các mô khác nhau và có các chất đánh dấu biểu hiện bề mặt tương tự như MSC (bao gồm CD73+, CD90+, CD105+, và âm tính với CD34 và CD45). Một kết quả cũng khá bất ngờ đó là dòng tế bào này có nhiều chất đánh dấu bề mặt giống như tế bào gốc vạn năng như SSEA-4 và các yếu tố sao mã chỉ tìm thấy ở tế bào gốc phôi như OCT-4 và NANOG.

Theo CN107805626, tế bào gốc trung mô từ dây rốn có thể được phân tách bằng cách nuôi cấy mô hoặc sử dụng enzym để phân huỷ dây rốn với thời gian xử lý dây rốn kéo dài khoảng 16 giờ. Ngoài ra, WO2017096615 cho thấy, để lưu trữ tế bào gốc trung mô từ dây rốn sau khi nuôi cấy, thường sử dụng dung dịch FBS bổ sung 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO) để bảo quản tế bào gốc khi làm lạnh.

Tài liệu WO 06/019357 đề cập đến việc bảo quản tế bào bằng dung dịch FBS với plasmalyt A (60%), huyết thanh người (human serum, 5%) (30%), và 10% DMSO. Tế bào gốc được hạ lạnh với tốc độ -1°C/phút cho đến -90°C trong điều kiện môi trường chứa isopropanolol. Khi khối tế bào đã đạt -90°C thì sẽ được bảo quản trong nitơ lỏng với nhiệt độ từ -170°C đến -200°C.

Tuy nhiên, các quy trình phân lập tế bào gốc trung mô thường có thời gian kéo dài, ít nhất trên 8 giờ và thường phải mất từ 16 đến 18 giờ và có thể phải trải qua bước bóc tách lớp màng dây rốn phức tạp. Do quá trình phân lập kéo dài nên tế bào gốc thu được có khả năng tăng sinh kém, thời gian cần thiết để tế bào tăng sinh kéo dài, từ 14 đến 21 ngày nên dễ lây nhiễm và tốn thời gian. Do đó, vẫn cần có quy trình nhằm rút

ngăn quá trình phân lập tế bào gốc, đồng thời rút ngắn quá trình tăng sinh, phát triển tế bào gốc trung mô từ dây rốn để thuận lợi trong việc thu nhận, nuôi cấy và bảo quản để có thể ứng dụng rộng rãi trong y học lâm sàng.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích nhằm khắc phục các nhược điểm trên, cụ thể giải pháp hữu ích đề xuất quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ dây rốn và tế bào gốc trung mô từ dây rốn thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ dây rốn, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) xử lý dây rốn bằng cách thu thập đoạn dây rốn được cắt từ trẻ sơ sinh cách đoạn nối với sản phụ trên 10cm, sau khi loại bỏ máu, cắt nhỏ toàn bộ dây rốn thành từng mảnh diện tích khoảng 2mm² thu được mẫu dây rốn đã được cắt nhỏ;

b) xử lý với enzym bằng cách ủ mẫu dây rốn đã được cắt nhỏ với hỗn hợp enzym trong khoảng từ 15 đến 90 phút ở khoảng nhiệt độ từ 31°C đến 39°C trong điều kiện lắc từ 150 đến 800 vòng/phút theo tỷ lệ 1:1 (trọng lượng/thể tích), trong đó hỗn hợp enzym được chọn từ nhóm bao gồm:

+ hỗn hợp enzym bao gồm collagenaza, axit etylenđiaminetetraaxetic (EDTA) trong dung dịch đệm RPMI, trong đó collagenaza được chọn từ nhóm bao gồm collagenaza typ I, collagenaza typ I hoặc collagenaza typ IV với hoạt độ cuối đạt từ 100 đến 1000 đơn vị/ml; hoặc

+ hỗn hợp enzym với tỷ lệ thành phần % theo thể tích bao gồm trypsin từ 0,1 đến 60%, axit etylenđiaminetetraaxetic (EDTA) từ 0,1 đến 60% và dung dịch đệm RPMI từ 0,1 đến 40%;

c) phá vỡ mô liên kết bằng cách chuyển mẫu sau khi xử lý với hỗn hợp enzym vào ống chứa mẫu và chuyển vào thiết bị xử lý và tiến hành xử lý mẫu với khoảng 8 chu kỳ, trong đó mỗi chu kỳ này bao gồm các công đoạn:

+ gia nhiệt đến khoảng từ 31°C đến 39°C và ủ trong khoảng thời gian từ 3 đến 10 phút;

+ lắc ống mẫu theo chiều kim đồng hồ với tốc độ từ 100 vòng/phút đến 1200 vòng/phút trong khoảng thời gian từ 1,5 phút đến 9,5 phút;

+ lắc ống mẫu ngược chiều kim đồng hồ với tốc độ từ 100 vòng/phút đến 1200 vòng/phút trong khoảng thời gian từ 1,5 phút đến 9,5 phút;

trong đó tổng thời gian lắc ống mẫu trong mỗi chu kỳ xử lý mẫu không quá 18 phút và tổng thời gian tiến hành xử lý mẫu không quá 180 phút để thu được hỗn hợp tế bào dây rốn và mô liên kết;

d) thu tế bào dây rốn bằng cách pha loãng hỗn hợp tế bào dây rốn và mô liên kết với dung dịch nước muối đệm phosphat (phosphate buffer saline: PBS) ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C trong điều kiện lắc với tốc độ từ 100 vòng/phút đến 1200 vòng/phút trong khoảng từ 2 đến 6 phút, sau đó ly tâm với tốc độ từ 200g đến 1400g trong tối đa 20 phút để loại bỏ dịch nổi thu được hỗn hợp tế bào;

e) nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ dây rốn bằng cách cấy hỗn hợp tế bào vào chai nuôi cấy đã được xử lý bề mặt chứa môi trường nuôi cấy không chứa chiết xuất từ huyết thanh và chất chiết từ động vật và nuôi cấy ở nhiệt độ trong khoảng từ 34°C đến 39°C, nồng độ CO₂ duy trì từ 3,5 đến 6%, độ ẩm trên 90%, định kỳ thay môi trường từ 2 đến 5 ngày/lần trong thời gian từ 4 đến 10 ngày thu được chai nuôi cấy có mật độ phủ tế bào trên 85%;

f) sàng lọc tế bào gốc trung mô bằng cách loại bỏ dung dịch nuôi cấy, rửa tế bào bằng dung dịch PBS và rửa lại bằng dung dịch chứa enzym trypsin theo tỷ lệ thể tích từ 0,2ml/cm² đến 1 ml/cm² trong thời gian từ 2 phút đến 7 phút ở nhiệt độ từ 34°C đến 39°C, sau khi bổ sung môi trường nuôi cấy để bất hoạt enzym rồi ly tâm tế bào ở tốc độ từ 200g đến 1400g trong thời gian từ 2 đến 10 phút, sau đó cấy vào chai nuôi cấy đã được xử lý bề mặt với mật độ khoảng 2000 tế bào/cm² và nuôi cấy trong cùng điều kiện đến khi tế bào đạt mật độ phủ trên 85%; và

g) thu tế bào gốc trung mô bằng cách rửa bề mặt tế bào thu được bằng dung dịch PBS và ủ tế bào thu được với lượng enzym trypsin theo tỉ lệ thể tích là 0,2ml/cm² đến 1 ml/cm² trong thời gian từ 2 phút đến 7 phút ở nhiệt độ từ 34°C đến 39°C, sau đó bổ sung môi trường nuôi cấy để bất hoạt enzym, sau khi ly tâm ở tốc độ từ 200g đến 1400g trong thời gian từ 2 đến 10 phút thu được tế bào gốc trung mô từ dây rốn.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó chai nuôi cấy tế bào được xử lý bề mặt bằng cách:

a) chuẩn bị chất xử lý bề mặt bằng cách pha loãng hợp chất dính bám bề mặt được chọn từ nhóm bao gồm fibronectin, vitronectin, intergrin tái tổ hợp với dung dịch đệm phosphat (PBS) theo tỷ lệ từ 0,2 đến 1%;

b) phủ chất dính bám bề mặt đã được pha loãng lên bề mặt chai nuôi cấy nhiều tầng đã được vô trùng có diện tích bề mặt trên 25 cm^2 với tỷ lệ từ 0,2 đến 1 ml/cm^2 và ủ chai nuôi cấy này ở nhiệt độ từ 31°C đến 39°C trong khoảng thời gian từ 45 phút đến 180 phút để chất dính bám bề mặt bám trên bề mặt chai nuôi cấy và tạo ra một lớp dính bám phủ trên bề mặt chai nuôi cấy.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó chai nuôi cấy còn được xử lý bằng tia gama hoặc plasma trước khi xử lý bề mặt.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó quy trình này còn bao gồm bước bảo quản tế bào gốc trung mô từ dây rốn với các công đoạn:

a) phân tán tế bào gốc trung mô từ dây rốn bằng dung dịch môi trường nuôi cấy không chứa các chất từ huyết thanh và các chất từ động vật có bổ sung dimethyl sulfoxide (DMSO) với lượng 2,5% đến 15% theo trọng lượng đến nồng độ cuối đạt từ $0,5 \times 10^6$ tế bào/ml đến 50×10^6 tế bào/ml;

b) đóng gói dung dịch chứa tế bào gốc trung mô vào các ống với thể tích từ 0,5 đến 2ml, tiếp đó đông sâu với tốc độ giảm nhiệt -1°C/phút đến khi đạt -90°C thu được mẫu tế bào gốc trung mô đông lạnh; và

c) lưu trữ bằng cách chuyển mẫu chứa tế bào gốc trung mô đông lạnh vào bảo quản trong hệ thống đông sâu ở nhiệt độ từ -150°C đến -200°C để bảo quản tế bào gốc.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến tế bào gốc thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó tế bào gốc trung mô này có khả năng biệt hóa thành các tế bào xương, sụn và mỡ. Tế bào gốc trung mô theo giải pháp hữu ích có khả năng cấy chuyển trên 15 lần với tốc độ tăng sinh duy trì từ 20 đến 28 giờ. Tế bào gốc trung mô theo giải pháp hữu ích thể hiện dương tính với CD73, CD90, và CD105 lớn hơn 90% ($>90\%$), và tăng giá trị dương tính của CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79alpha hay CD19, và HLA-DR nhỏ hơn 10%.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình chụp mô tả hình ảnh và màng ối của dây rốn, (A) là ảnh chụp màng ối nhau thai và màng lót dây rốn; (B) là ảnh chụp tế bào gốc trung mô và tế bào gốc biểu mô; (C) là hình vẽ mô tả tế bào gốc trung mô trong dây rốn.

Hin 2 là sơ đồ khối mô tả quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ dây rốn theo giải pháp hữu ích.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết các phương án và các ví dụ thực hiện cụ thể, tuy nhiên các phương án và các ví dụ thực hiện này chỉ nhằm làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ giải pháp hữu ích.

Thuật ngữ "tế bào gốc trung mô từ dây rốn" chỉ sản phẩm tế bào gốc trung mô được phân lập toàn phần từ dây rốn thu được từ trẻ sơ sinh, được tách chiết từ toàn bộ mô dây rốn, bao gồm toàn bộ các thành phần cấu tạo nên dây rốn như lớp vỏ ngoài dây rốn, lớp chất nhầy Wharton Jelly, hệ thống mạch máu (động mạch và tĩnh mạch) và lớp tế bào nội mô dây rốn. Dòng tế bào gốc trung mô từ dây rốn này không bao gồm dòng tế bào gốc trung mô được tạo ra từ từng phần riêng biệt bao gồm màng dây rốn, lớp chất nhầy Wharton Jelly, hệ thống mạch máu (động mạch và tĩnh mạch) và lớp tế bào nội mô dây rốn. Cụm từ này cũng chỉ thành phần tế bào gốc trung mô được phân lập và tách chiết từ toàn bộ dây rốn, nhưng có thể chứa thành phần tế bào khác tại thời điểm phân lập thành công (P0) với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,001% đến 5% tổng số tế bào.

Theo giải pháp hữu ích, thuật ngữ "môi trường nuôi cấy không chứa chiết xuất từ huyết thanh và chất chiết từ động vật" chỉ môi trường nuôi cấy tế bào động vật, trong đó loại trừ các thành phần có nguồn gốc từ động vật (xeno-free) hoặc thành phần có nguồn gốc từ huyết thanh (serum-free). Các môi trường nuôi cấy này có thể là môi trường nuôi cấy thương mại, ví dụ MesenCult-ACF culture kit (Cat: 5449, hãng sản xuất Stemcell Technologies); MesenCult-ACF plus culture kit (Cat: 5448, hãng sản xuất Stemcell Technologies); môi trường nuôi cấy tế bào gốc PowerStem MSC1-Serum-free (hãng sản xuất Pan Biotech); môi trường StemMACS MSC Expansion Media Kit Xeno-free và Serum-free (hãng sản xuất Miltenyi Biotec – Đức); môi

trường nuôi cấy StemPro-34 SFM (hãng sản xuất ThermoFisher Scientific). Việc sử dụng môi trường không chứa chiết xuất từ huyết thanh và chất chiết từ động vật nhằm đảm bảo các tế bào gốc trung mô không bị kích thích biệt hóa trong quá trình nuôi cấy.

Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ dây rốn và tế bào gốc trung mô từ dây rốn thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ dây rốn, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) xử lý dây rốn; b) xử lý với enzym; c) phá vỡ mô liên kết; d) thu tế bào dây rốn; e) nuôi cấy tế bào gốc trung mô; f) sàng lọc tế bào gốc trung mô; và g) thu tế bào gốc trung mô.

Dây rốn được sử dụng để phân lập tế bào gốc trung mô là đoạn dây rốn thu được từ sản phụ sau khi sinh, đoạn dây rốn được cắt khỏi rốn của trẻ sơ sinh được thu gom để làm nguyên liệu mẫu phân lập tế bào gốc trung mô.

Trong bước xử lý dây rốn bằng cách thu thập đoạn dây rốn được cắt từ trẻ sơ sinh cách đoạn nối với sản phụ trên 10cm. Dây rốn sau khi thu thập được bảo quản trong kit vận chuyển là ống đựng mẫu có thể thích từ 25 ml đến 250 ml chứa dung dịch DMEM với thể tích từ 25 ml đến 150 ml bổ sung từ 0,1 đến 5% chất kháng sinh như penicillin, streptomycin, normycin. Mẫu chứa trong dung dịch này được bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C, thời gian bảo quản không quá 48 giờ, tốt nhất là từ 12 giờ đến 48 giờ. Quá trình lấy mẫu, thao tác, bảo quản, vận chuyển tốt nhất được xử lý trong môi trường vô khuẩn và ở nhiệt độ phòng (từ 18°C đến 25°C) nhằm hạn chế tối đa các lây nhiễm từ nguồn vi sinh vật có hại như vi khuẩn, vi nấm và dung dịch vận chuyển được bảo quản lạnh ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C. Dây rốn sau khi thu thập trong kit vận chuyển sẽ được bảo quản ở nhiệt độ 2°C đến 8°C trong thời gian từ 12 giờ đến 48 giờ. Dây rốn sau thu thập và lưu trữ sẽ được xử lý trong môi trường vô khuẩn và ở nhiệt độ phòng (từ 18°C đến 25°C) nhằm hạn chế tối đa các lây nhiễm từ nguồn vi sinh vật có hại như vi khuẩn, vi nấm. Trước khi thao tác, dây rốn được rửa bằng dung dịch chứa cồn trên 60° trong khoảng thời gian từ 2 đến 6 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó rửa lại bằng dung dịch đệm phosphat. Lượng dây rốn mẫu trung bình khoảng từ 7 đến 50 g. Trong quá trình rửa máu được loại bỏ, tiến hành cắt nhỏ toàn bộ dây rốn thành từng mảnh diện tích khoảng 2mm² thu được mẫu dây rốn đã được cắt nhỏ.

Trong bước xử lý với enzym bằng cách ủ mẫu dây rốn đã được cắt nhỏ với hỗn hợp enzym. Hỗn hợp enzym được sử dụng nhằm phá vỡ mô liên kết, nhưng không tác động đến tế bào gốc trung mô nhằm thu được tế bào gốc trung mô khỏe mạnh. Điều kiện xử lý mô liên kết bằng enzym nằm trong khoảng từ 15 đến 90 phút ở khoảng nhiệt độ từ 31°C đến 39°C trong điều kiện lắc từ 150 đến 800 vòng/phút. Hỗn hợp enzym được chọn từ nhóm bao gồm hỗn hợp chứa enzym collagenaza hoặc hỗn hợp enzym chứa trypsin. Thể tích hỗn hợp enzym xử lý được tính theo trọng lượng của dây rốn với tỉ lệ là 1:1 (trọng lượng/thể tích).

Theo một phương án ưu tiên, hỗn hợp enzym được sử dụng để xử lý mẫu chứa enzym collagenaza bao gồm collagenaza, axit etylenđiaminetetraaxetic (EDTA) trong dung dịch đệm RPMI. Trong đó collagenaza được chọn từ nhóm bao gồm collagenaza typ I, collagenaza typ I hoặc collagenaza typ IV với hoạt độ cuối đạt từ 100 đến 1000 đơn vị/ml. Theo một phương án ưu tiên, nồng độ enzym collagenaza có trong hỗn hợp enzym là 200 đơn vị/ml. Lượng hỗn hợp enzym chứa collagenaza được sử dụng theo lượng mẫu đạt 1/1 (trọng lượng/thể tích).

Theo một phương án ưu tiên, hỗn hợp enzym được sử dụng để xử lý mẫu chứa trypsin với tỷ lệ thành phần % theo thể tích bao gồm trypsin từ 0,1 đến 60%, axit etylenđiaminetetraaxetic (EDTA) từ 0,1 đến 60% và dung dịch đệm RPMI từ 0,1 đến 40%. Lượng hỗn hợp enzym chứa collagenaza được sử dụng theo lượng mẫu đạt 1/1 (trọng lượng/thể tích).

Tốt nhất hỗn hợp enzym được sử dụng để xử lý mẫu là các enzym tái tổ hợp không có nguồn gốc từ động vật. Ví dụ các enzym được sử dụng là enzym trypsin tái tổ hợp có bán trên thị trường là CTS™ TrypLE select Enzym, A1285901, ThermoFisher Scientific hoặc được cung cấp bởi các công ty sinh hóa phẩm.

Trong bước phá vỡ mô liên kết, sau khi xử lý bằng enzym, mẫu được chuyển vào ống chứa mẫu và chuyển vào thiết bị xử lý. Các thiết bị xử lý có thể được sử dụng như thiết bị xử lý mô tự động gentleMACS Octo Dissociator (MACS Miltenyi Biotec) có khả năng thiết lập chương trình xử lý tự động theo yêu cầu. Tiến trình xử lý mẫu được thực hiện với khoảng 8 chu kỳ, trong đó mỗi chu kỳ này bao gồm các công đoạn:

+ gia nhiệt đến khoảng từ 31°C đến 39°C và ủ trong khoảng thời gian từ 3 đến 10 phút;

+ lắc ống mẫu theo chiều kim đồng hồ với tốc độ từ 100 vòng/phút đến 1200 vòng/phút trong khoảng thời gian từ 1,5 phút đến 9,5 phút;

+ lắc ống mẫu ngược chiều kim đồng hồ với tốc độ từ 100 vòng/phút đến 1200 vòng/phút trong khoảng thời gian từ 1,5 phút đến 9,5 phút.

Các công đoạn này được thiết lập trên thiết bị xử lý mô tự động và được cài đặt cho phép vận hành theo chương trình đặt trước. Tiến trình xử lý này rất quan trọng do ảnh hưởng đến chất lượng tế bào gốc thu được. Cụ thể là nếu thời gian xử lý ngắn, các mô liên kết không được phá vỡ dẫn đến không thu được tế bào gốc rời. Quá trình nuôi cấy tiếp theo chỉ cho phép tăng sinh một lượng tế bào bề mặt, giảm hiệu suất thu được tế bào gốc. Ngược lại, nếu thời gian xử lý kéo dài, trên 180 phút, khi đó tế bào gốc trung mô từ dây rốn thu được bị ảnh hưởng, sẽ kéo dài thời gian nuôi cấy để có thể phục hồi. Do đó, quá trình xử lý này phải đảm bảo sao cho các mô liên kết của khối mô được phá hủy để thu được tế bào, nhưng không ảnh hưởng đến chất lượng tế bào gốc thu được. Các tác giả bằng thực nghiệm đã xác định được tiến trình xử lý được tiến hành với chu kỳ ủ, lắc ngược chiều kim đồng hồ, lắc xuôi chiều kim đồng hồ với các chu kỳ thời gian được khổng chế, cụ thể trong mỗi chu kỳ xử lý mẫu, thời gian lắc mẫu không quá 18 phút và tổng thời gian tiến hành xử lý mẫu không quá 180 phút. Khi đó sẽ thu được để thu được hỗn hợp tế bào dây rốn khỏe mạnh và mô liên kết được phá hủy hoàn toàn.

Cần lưu ý rằng, việc quay mẫu ngược chiều kim đồng hồ hoặc xuôi chiều kim đồng hồ có thể thực hiện thay thế nhau, và tùy ý có thể thực hiện việc quay mẫu ngược chiều kim đồng hồ trước hoặc quay xuôi chiều kim đồng hồ trước và ngược lại, miễn sao có thể đảo trộn mẫu để phá vỡ mô liên kết. Việc phá vỡ mô bằng phương pháp cơ học này cho phép phá vỡ mô liên kết mà ít ảnh hưởng đến tế bào gốc trung mô.

Trong bước thu tế bào dây rốn, tiến hành pha loãng hỗn hợp tế bào dây rốn và mô liên kết sau khi đã xử lý bằng enzyme với dung dịch nước muối đệm phosphat (phosphate buffer saline: PBS). Việc pha loãng này được thực hiện ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C trong điều kiện lắc. Tốc độ lắc từ 100 vòng/phút đến 1200 vòng/phút trong khoảng từ 2 đến 6 phút. Quá trình này nhằm đảm bảo phân tách hoàn toàn tế bào dính trong các mô ra khỏi các mô liên kết. Tiếp đó, tiến hành ly tâm với tốc độ từ 200g đến 1400g trong tối đa 20 phút để loại bỏ dịch nổi thu được hỗn hợp tế bào. Sau khi ly tâm,

hỗn hợp tế bào chứa tế bào gốc được co cụm lại và được tách ra để tiến hành nuôi cấy tăng sinh để chọn lọc tế bào gốc.

Trong bước nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ dây rốn, tiến hành hòa tế bào thu được vào nước muối sinh lý và cấy hỗn hợp tế bào vào chai nuôi cấy. Chai nuôi cấy tế bào gốc là chai đã được xử lý bề mặt bằng các thành phần dính bám bề mặt cho phép tế bào gốc trung mô giữ được đặc tính tế bào gốc.

Chai nuôi cấy tế bào gốc được xử lý bề mặt nhằm đảm bảo tế bào gốc có khả năng dính bám và phát triển cho phép giữ được đặc tính tế bào gốc, thuận lợi cho việc nuôi cấy và phân lập tế bào. Chai nuôi cấy tế bào tốt nhất là chai có diện tích bề mặt lớn, từ khoảng từ 25 đến 1000 cm². Tốt nhất là loại chai cỡ 25, 75 hoặc 225cm². Chai nuôi cấy được rửa sạch, và tốt nhất được xử lý bề mặt tiệt trùng bằng các tia có bước sóng ngắn, cụ thể là tia gama hoặc tia plasma để tạo độ bám dính tốt hơn trong nuôi cấy tế bào. Việc xử lý bề mặt chai nuôi cấy được thực hiện bằng các công đoạn: a) chuẩn bị chất xử lý bề mặt; và b) phủ chất dính bám bề mặt đã được pha loãng lên trên bề mặt chai nuôi cấy.

Trong công đoạn chuẩn bị chất xử lý bề mặt, chất xử lý bề mặt được sử dụng là các chất dính bám bề mặt được chọn từ nhóm bao gồm fibronectin, vitronectin, integrin tái tổ hợp. Các chất dính bám bề mặt này được thương mại hóa dưới dạng chất dính bám tế bào (extracellular matrix) được bán dưới dạng chế phẩm thương mại, ví dụ, CTSTM CELLStartTM substrate (Gibco, USA, A1014201); Recombinant human fibronectin GMP, CF (4305-GMP, R&D system); MesenCultTM-SF attachment substrate (Cat: 05424, Stemcell Technologies); hoặc tổ hợp của các sản phẩm trên. Các chất này được tiến hành pha loãng với dung dịch đệm phosphat (phosphate buffer saline: PBS) theo tỷ lệ từ 0,2 đến 1%. Cụ thể các dung dịch này được pha loãng với dung dịch đệm theo các tỷ lệ 1/100, 1/200, 1/300, 1/400 hoặc 1/500 theo thể tích. Các chất dính bám bề mặt tốt nhất là các chất không có nguồn gốc từ động vật để tránh các tác nhân kích thích gây biệt hóa tế bào. Nồng độ chất dính bám bề mặt nếu trên 1% thì khả năng dính bám của tế bào giảm đi, nhưng thấp hơn 0,2% thì khó tạo được lớp dính bám trên bề mặt chai nuôi cấy đủ bền để lớp tế bào có thể dính bám lên đó.

Trong công đoạn phủ chất dính bám bề mặt đã được pha loãng lên bề mặt chai nuôi cấy, các nhiều tầng đã được vô trùng có diện tích bề mặt trên 25 cm² với tỷ lệ từ

0,2 đến 1ml/cm². Các chai này tốt nhất là loại chai nhiều tầng nuôi cấy có nắp, mỗi chai được phủ lớp chất dính bám bề mặt và chai nuôi cấy này ở nhiệt độ từ 31°C đến 39°C trong khoảng thời gian từ 45 phút đến 180 phút. Quá trình này nhằm để chất dính bám bề mặt bám trên bề mặt chai nuôi cấy và tạo ra một lớp dính bám phủ trên bề mặt chai nuôi cấy. Sau khi phủ, bề mặt chai hình thành một lớp phủ dính bám đều.

Các chai nuôi cấy sau khi được phủ lớp dính bám bề mặt được bổ sung môi trường nuôi cấy không chứa chiết xuất từ huyết thanh và chất chiết từ động vật. Các môi trường nuôi cấy này có thể là môi trường nuôi cấy thương mại, ví dụ MesenCult-ACF culture kit (Cat: 5449, hãng sản xuất Stemcell Technologies); MesenCult-ACF plus culture kit (Cat: 5448, hãng sản xuất Stemcell Technologies); môi trường nuôi cấy tế bào gốc PowerStem MSC1-Serum-free (hãng sản xuất Pan Biotech); môi trường StemMACS MSC Expansion Media Kit Xeno-free và Serum-free (hãng sản xuất Miltenyi Biotec – Đức); môi trường nuôi cấy StemPro-34 SFM (hãng sản xuất ThermoFisher Scientific). Sau đó cấy tế bào thu được và nuôi cấy ở nhiệt độ trong khoảng từ 34°C đến 39°C, nồng độ CO₂ duy trì từ 3,5 đến 6%, độ ẩm trên 90%. Tốt nhất là nhiệt độ duy trì ở 36° C 5% CO₂ và định kỳ thay môi trường từ 2 đến 5 ngày/lần trong thời gian từ 4 đến 10 ngày. Sau thời gian này, chai nuôi cấy được phủ lớp tế bào với mật độ phủ tế bào trên 85%. Tế bào phát triển và bám trên bề mặt chai nuôi cấy. Trong giai đoạn nuôi cấy, môi trường nuôi cấy được thay định kỳ từ 2-4 ngày/lần, thời gian nuôi mỗi lần không quá 10 ngày.

Trong bước sàng lọc tế bào gốc trung mô, tiến hành loại bỏ dung dịch nuôi cấy và rửa bề mặt tế bào bằng dung dịch PBS để loại bỏ dung dịch nuôi cấy. Tiếp đó rửa lại bằng dung dịch chứa enzyme trypsin theo tỷ lệ thể tích từ 0,2ml/cm² đến 1 ml/cm² trong thời gian từ 2 phút đến 7 phút ở nhiệt độ từ 34°C đến 39°C. Quá trình này nhằm loại bỏ các protein dính bám bề mặt tế bào. Sau khi bổ sung môi trường nuôi cấy để bất hoạt enzyme, tiến hành nhuộm trypan blue để kiểm tra các tế bào sống, các tế bào gốc trung mô được nhuộm màu xanh. Tiến hành xác định tế bào gốc trung mô, tiếp đó ly tâm tế bào ở tốc độ từ 200g đến 1400g trong thời gian từ 2 đến 10 phút để thu được tế bào nuôi cấy. Tiếp đó cấy tế bào này vào chai nuôi cấy đã được xử lý bề mặt với mật độ khoảng 2000 tế bào/cm². Tiến hành nuôi cấy trong cùng điều kiện đến khi tế bào đạt mật độ phủ trên 85%.

Trong bước thu tế bào gốc trung mô, tiến hành bằng cách rửa bề mặt tế bào thu được bằng dung dịch PBS. Tiếp đó, tiến hành ủ tế bào thu được với lượng enzym trypsin theo tỉ lệ thể tích là 0,2ml/cm² đến 1 ml/cm². Ví dụ về enzym trypsin được sử dụng là CTS™ TrypLE select Enzym, A1285901, của hãng ThermoFisher Scientific, nồng độ 1X được hòa trong dung dịch EDTA và đệm RPMI theo tỷ lệ 60:20:20 theo thể tích. Thời gian ủ tế bào trong enzym trong khoảng từ 2 phút đến 7 phút ở nhiệt độ từ 34°C đến 39°C. Sau đó bổ sung môi trường nuôi cấy để bất hoạt enzym và tiến hành nhuộm trypan blue để kiểm tra tế bào sống. Sau khi ly tâm ở tốc độ từ 200g đến 1400g trong thời gian từ 2 đến 10 phút thu được tế bào gốc trung mô từ dây rốn. Tế bào sau khi thu hoạch được hòa với dung dịch nuôi cấy và cho chai nuôi cấy theo tỷ lệ 4000 tế bào/cm².

Tế bào gốc trung mô từ dây rốn sau khi phân lập và nuôi cấy được bảo quản ở ở chế độ đông sâu. Theo đó các bước bảo quản tế bào gốc trung mô từ dây rốn này được thực hiện với các công đoạn: a) phân tán tế bào gốc trung mô từ dây rốn; b) đóng gói dung dịch chứa tế bào gốc trung mô; và c) lưu trữ.

Trong công đoạn phân tán tế bào gốc trung mô từ dây rốn, tiến hành pha loãng tế bào gốc trung mô thu được bằng dung dịch môi trường nuôi cấy không chứa các chất từ huyết thanh và các chất từ động vật có bổ sung dimethyl sulfoxide (DMSO) với lượng 2,5% đến 15% theo trọng lượng. Nồng độ pha loãng được chuẩn độ đến nồng độ cuối đạt từ 0,5x10⁶ tế bào/ml đến 50x10⁶ tế bào/ml. Quá trình này nhằm phân tán tế bào đến một nồng độ thích hợp cho việc bảo quản đông sâu.

Trong công đoạn đóng gói dung dịch chứa tế bào gốc trung mô, tiến hành đóng gói dung dịch thu được ở trên vào các ống với thể tích từ 0,5 đến 2ml. Tiếp đó tiến hành đông sâu với tốc độ giảm nhiệt -1°C/phút đến khi đạt -90°C thu được mẫu tế bào gốc trung mô đông lạnh. Quá trình này nhằm đảm bảo tế bào được làm lạnh từ từ, tránh sốc gây chết tế bào, đảm bảo tế bào có thể khôi phục sau khi tan đông.

Trong công đoạn lưu trữ, tiến hành chuyển mẫu chứa tế bào gốc trung mô đông lạnh vào bảo quản trong hệ thống đông sâu. Nhiệt độ bảo quản được duy trì trong khoảng nhiệt độ từ -150°C đến -200°C để bảo quản tế bào gốc. Quá trình này cho phép bảo quản tế bào gốc trung mô lên tới 20 năm.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến tế bào gốc thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó tế bào gốc trung mô này có khả năng biệt hóa thành các tế bào xương, sụn và mỡ. Tế bào gốc trung mô theo giải pháp hữu ích sau khi tan đông được khôi phục và có khả năng cấy chuyển trên 15 lần với tốc độ tăng sinh duy trì từ 20 đến 28 giờ. Tế bào gốc trung mô theo giải pháp hữu ích thể hiện dương tính với CD73, CD90, và CD105 lớn hơn 90% (>90%), và tăng giá trị dương tính của CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79alpha hay CD19, và HLA-DR nhỏ hơn 10%.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Phân lập và tách chiết tế bào gốc trung mô từ dây rốn

Để phân lập và nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ dây rốn, tiến hành thử nghiệm tách chiết và nuôi cấy tế bào từ dây rốn thu được từ sản phụ. Ngay sau khi trẻ được sinh ra, đoạn dây rốn sát với trẻ được cắt và thu một đoạn dài khoảng 15cm. Đoạn dây rốn này được vuốt dọc theo chiều dài khoảng 5 lần để ép hết máu trong dây rốn ra ngoài.

Khi đã sạch máu bên trong, dây rốn được khử trùng bằng dung dịch chứa cồn và cho vào ống vận chuyển chứa 25 ml dung dịch DMEM bổ sung 0,5% penicillin, dây rốn được bảo quản ngập sâu bên trong dung dịch vận chuyển. Hộp vận chuyển sau đó sẽ được niêm phong và dán nhãn đồng thời chuyển trực tiếp về phòng thí nghiệm tiêu chuẩn, nhiệt độ được duy trì ở 18°C.

Tiếp đó, mẫu dây rốn sẽ được rửa với dung dịch cồn 60° trong thời gian 2 phút để khử trùng bề mặt của dây rốn. Mẫu có trọng lượng 24 gam. Tiếp đó mẫu được rửa bằng dung dịch đệm phosphat và cắt nhỏ thành từng mảnh có diện tích khoảng 2mm². Chuyển 10 g dây rốn vào ống nghiệm 50 ml có chứa 10 ml dung dịch enzym trypsin 60%, EDTA 20% và RPMI 20% (theo thể tích) và ủ ấm ở nhiệt độ 31°C trong điều kiện lắc 150 vòng/phút.

Sau khi xử lý bằng enzym, tế bào được chuyển vào thiết bị xử lý mô tự động gentleMACS Octo Dissociator (MACS Miltenyi Biotec) được thiết lập chương trình xử lý tự động như sau:

+ gia nhiệt mẫu đến 39°C và ủ trong 3 phút;

- + lắc ống mẫu theo chiều kim đồng hồ với tốc độ 1200 vòng/phút trong 9,5 phút;
- + lắc ống mẫu ngược chiều kim đồng hồ với tốc độ 1200 vòng/phút trong 9,5 phút.

Quá trình xử lý được thực hiện với 8 chu kỳ, tổng thời gian 176 phút. Sau đó tiến hành thu thập tế bào bằng cách pha loãng dịch huyền phù với nước muối đệm phosphat (PBS) ở nhiệt độ 2°C và lắc với tốc độ 100 vòng/phút trong 6 phút. Sau đó, tiến hành ly tâm hỗn hợp ở tốc độ 200g trong 20 phút, loại bỏ dịch nổi để thu thập tế bào.

Chai nuôi cấy có diện tích 75cm² được rửa sạch, chiếu tia gama khử trùng bề mặt, sau đó phủ chất dính bám CTS™ CELLStart™ substrate (Gibco, USA, A1014201) bằng cách pha loãng cơ chất CTS™ CELLStart™ (Gibco, USA) với dung dịch đệm đến nồng độ 1%. Sau đó phủ lên bề mặt chai nuôi cấy với tỷ lệ 1ml/cm². Tiếp đó để yên ở nhiệt độ 39°C trong 45 phút để làm khô bề mặt, thu được chai nuôi cấy được phủ lớp dính bám bề mặt.

Tiếp đó bổ sung môi trường nuôi cấy không chứa huyết thanh MesenCult-ACF culture kit (Cat: 5449, hãng sản xuất Stemcell Technologies). Cây tế bào và nuôi cấy ở nhiệt độ 34,5°C, nồng độ CO₂ được duy trì ở mức 5% với độ ẩm 95%. Các tế bào khi được nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ trên sẽ tăng sinh trong môi trường nuôi cấy đặc hiệu sẽ cần từ 4 đến 5 ngày để có thể đạt được mật độ cấy chuyển với độ bao phủ bề mặt chai nuôi cấy là trên 85%. Mật độ tế bào khi thu hoạch với chai 75 cm² (T75) đạt 63,75 cm². Tiến hành thay môi trường nuôi cấy định kỳ 2 ngày/lần.

Tiến hành sàng lọc tế bào gốc trung mô bằng cách rửa bề mặt tế bào bằng dung dịch PBS. Sau khi loại bỏ dịch rửa, tế bào sẽ được ủ với dung dịch enzym trypsin (TryPLE Select, 1X) theo tỷ lệ thể tích 1 ml/cm² trong thời gian 7 phút ở nhiệt độ 37°C. Tổng thể tích là 5 ml (đủ để phủ toàn bộ bề mặt của chai nuôi cấy). Sau đó, enzym sẽ được bất hoạt bằng cách bổ sung 5 ml dung dịch nuôi cấy đã được làm ấm và dùng serological pipet (10ml) để tách lớp tế bào ra khỏi bề mặt chai nuôi cấy bằng cách hút nhả dung dịch từ 5 đến 10 lần. Dung dịch chứa tế bào sau đó được chuyển qua ống ly tâm 50 ml để đếm tế bào bằng buồng đếm và kiểm tra độ sống chết bằng trypan blue. Tổng lượng tế bào gốc trung mô từ dây rốn thu hoạch được từ 1 chai nuôi cấy T75 trung bình khoảng 4x10⁶ tế bào. Tiếp đó cấy tế bào này vào chai nuôi cấy đã

được xử lý bề mặt với mật độ khoảng 2000 tế bào/cm². Tiến hành nuôi cấy trong cùng điều kiện đến khi tế bào đạt mật độ phủ trên 85%.

Tế bào sau khi nuôi cấy được thu rửa bề mặt tế bào thu được bằng dung dịch PBS. Tiếp đó, tiến hành ủ tế bào thu được với lượng enzym trypsin (CTSTM TrypLE select Enzym, A1285901, của hãng ThermoFisher Scientific), nồng độ 1X được hòa trong dung dịch EDTA và đệm RPMI theo tỷ lệ 60:20:20 theo tỉ lệ thể tích là 1 ml/cm². Thời gian ủ tế bào trong enzym trong 2 phút ở nhiệt độ 37°C. Sau đó bổ sung môi trường nuôi cấy để bất hoạt enzym và tiến hành nhuộm trypan blue để kiểm tra tế bào sống. Sau khi ly tâm ở tốc độ 1400g trong thời gian 2 phút thu được tế bào gốc trung mô từ dây rốn. Lấy một lượng 2x10⁶ tế bào sẽ được sử dụng để kiểm tra chất lượng, và số còn lại sẽ được bảo quản và trữ đông.

Tiến hành phân tán tế bào gốc trung mô từ dây rốn thu được trong môi trường nuôi cấy có bổ sung dimethyl sulfoxide (DMSO) 2,5%. Nồng độ pha loãng được chuẩn độ đến nồng độ cuối đạt 50x10⁶ tế bào/ml. Tiếp đó chuyển vào các ống 1,8 ml và tiến hành đông sâu với tốc độ giảm nhiệt -1°C/phút đến khi đạt -90°C. Sau đó chuyển vào bảo quản trong hệ thống đông sâu ở khoảng nhiệt độ từ -150°C để bảo quản tế bào gốc.

Ví dụ 2: Phân tích chất lượng tế bào gốc trung mô từ dây rốn

Để thử nghiệm khả năng của tế bào gốc trung mô, tiến hành thu hoạch tế bào tại các thời điểm P0 (ở ví dụ 1), P1, và P3 (sau các lần cấy chuyển lần 1 và lần 2) được đếm và thu giữ 2x10⁶ tế bào để kiểm tra chất lượng sản phẩm bằng quy trình phân tích tế bào dòng chảy (Flowcytometry).

Các tế bào được nuôi cấy kiểm tra khả năng phát triển sau những lần cấy chuyển, Kết quả cho thấy các tế bào gốc trung mô thu được từ quy trình ở Ví dụ 1 có thể cấy chuyển trên 15 lần (>P15) và duy trì tốc độ tăng sinh nhanh (20 đến 28 giờ) đến P15.

Sử dụng kit kiểm tra tính chất tế bào gốc trung mô “BD Stemflow hMSC analysis kit” để kiểm tra các chất đánh dấu bề mặt đặc hiệu của tế bào gốc trung mô như dương tính với CD73, CD90, và CD105, âm tính với CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79alpha hay CD19, và HLA-DR. Kết quả trung bình sau khi nuôi cấy của tế bào gốc trung mô từ dây rốn sau khi phân tích cho thấy: CD73 (99%), CD90 (100%) và CD105 (100%), âm tính với CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79alpha hay CD19, và HLA-DR với tỉ lệ dưới 5% sau khi phân tích.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ dây rốn theo giải pháp hữu ích cho phép kết hợp giữa kỹ thuật enzym và kỹ thuật phân tách cơ học cho phép giảm thời gian phân lập, xử lý mô xuống từ 2,5 đến 4 giờ, rút ngắn đáng kể thời gian xử lý so với quá trình xử lý truyền thống (khoảng từ 16 đến 18 giờ, nhanh nhất là 8 giờ).

Quy trình phân lập cho phép tự động hóa quá trình phân lập bằng cách lập trình và xử lý trên thiết bị xử lý tự động, ví dụ thiết bị GentleMACS Octo Dissociator với khả năng lập trình, cài đặt quy trình xử lý, cho phép tự động hóa, giảm thiểu các thao tác trong quá trình chiết tách. Kết hợp với việc sử dụng hỗn hợp enzym để phân hủy cấu trúc mô của dây rốn, quy trình theo giải pháp hữu ích giúp tách tế bào gốc ra khỏi khối mô dây rốn một cách nhanh chóng, nhờ đó các tế bào gốc này có thể nhân lên và tăng sinh *in vitro* do tế bào này hồi phục nhanh hơn và có tốc độ tăng sinh tốt, giảm thiểu tác động bất lợi từ quá trình phân lập lên tế bào.

Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép thu tế bào gốc trung mô từ dây rốn có khả năng phát triển sau nhiều lần cấy chuyển, Kết quả cho thấy các tế bào gốc trung mô thu được từ quy trình ở Ví dụ 1 có thể cấy chuyển trên 15 lần (>P15) và duy trì tốc độ tăng sinh nhanh (20 đến 28 giờ) đến P15.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ dây rốn, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) xử lý dây rốn bằng cách thu thập đoạn dây rốn được cắt từ trẻ sơ sinh cách đoạn nối với sản phụ trên 10cm, sau khi loại bỏ máu, cắt nhỏ toàn bộ dây rốn thành từng mảnh diện tích khoảng 2mm² thu được mẫu dây rốn đã được cắt nhỏ;

b) xử lý với enzym bằng cách ủ mẫu dây rốn đã được cắt nhỏ với hỗn hợp enzym trong khoảng từ 15 đến 90 phút ở khoảng nhiệt độ từ 31°C đến 39°C trong điều kiện lắc từ 150 đến 800 vòng/phút theo tỷ lệ 1:1 (trọng lượng/thể tích), trong đó hỗn hợp enzym được chọn từ nhóm bao gồm:

+ hỗn hợp enzym bao gồm collagenaza, axit etylenđiaminetetraaxetic (EDTA) trong dung dịch đệm RPMI, trong đó collagenaza được chọn từ nhóm bao gồm collagenaza typ I, collagenaza typ I hoặc collagenaza typ IV với hoạt độ cuối đạt từ 100 đến 1000 đơn vị/ml; hoặc

+ hỗn hợp enzym với tỷ lệ thành phần % theo thể tích bao gồm trypsin từ 0,1 đến 60%, axit etylenđiaminetetraaxetic (EDTA) từ 0,1 đến 60% và dung dịch đệm RPMI từ 0,1 đến 40%;

c) phá vỡ mô liên kết bằng cách chuyển mẫu sau khi xử lý với hỗn hợp enzym vào ống chứa mẫu và chuyển vào thiết bị xử lý và tiến hành xử lý mẫu với khoảng 8 chu kỳ, trong đó mỗi chu kỳ này bao gồm các công đoạn:

+ gia nhiệt đến khoảng từ 31°C đến 39°C và ủ trong khoảng thời gian từ 3 đến 10 phút;

+ lắc ống mẫu theo chiều kim đồng hồ với tốc độ từ 100 vòng/phút đến 1200 vòng/phút trong khoảng thời gian từ 1,5 phút đến 9,5 phút;

+ lắc ống mẫu ngược chiều kim đồng hồ với tốc độ từ 100 vòng/phút đến 1200 vòng/phút trong khoảng thời gian từ 1,5 phút đến 9,5 phút;

trong đó tổng thời gian lắc ống mẫu trong mỗi chu kỳ xử lý mẫu không quá 18 phút và tổng thời gian tiến hành xử lý mẫu không quá 180 phút để thu được hỗn hợp tế bào dây rốn và mô liên kết;

d) thu tế bào dây rốn bằng cách pha loãng hỗn hợp tế bào dây rốn và mô liên kết với dung dịch nước muối đệm phosphat (phosphate buffer saline: PBS) ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C trong điều kiện lắc với tốc độ từ 100 vòng/phút đến 1200 vòng/phút trong khoảng từ 2 đến 6 phút, sau đó ly tâm với tốc độ từ 200g đến 1400g trong tối đa 20 phút để loại bỏ dịch nổi thu được hỗn hợp tế bào;

e) nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ dây rốn bằng cách cấy hỗn hợp tế bào vào chai nuôi cấy đã được xử lý bề mặt chứa môi trường nuôi cấy không chứa chiết xuất từ huyết thanh và chất chiết từ động vật và nuôi cấy ở nhiệt độ trong khoảng từ 34°C đến 39°C, nồng độ CO₂ duy trì từ 3,5 đến 6%, độ ẩm trên 90%, định kỳ thay môi trường từ 2 đến 5 ngày/lần trong thời gian từ 4 đến 10 ngày thu được chai nuôi cấy có mật độ phủ tế bào trên 85%;

f) sàng lọc tế bào gốc trung mô bằng cách loại bỏ dung dịch nuôi cấy, rửa tế bào bằng dung dịch PBS và rửa lại bằng dung dịch chứa enzym trypsin theo tỷ lệ thể tích từ 0,2ml/cm² đến 1 ml/cm² trong thời gian từ 2 phút đến 7 phút ở nhiệt độ từ 34°C đến 39°C, sau khi bổ sung môi trường nuôi cấy để bất hoạt enzym rồi ly tâm tế bào ở tốc độ từ 200g đến 1400g trong thời gian từ 2 đến 10 phút, sau đó cấy vào chai nuôi cấy đã được xử lý bề mặt với mật độ khoảng 2000 tế bào/cm² và nuôi cấy trong cùng điều kiện đến khi tế bào đạt mật độ phủ trên 85%; và

g) thu tế bào gốc trung mô bằng cách rửa bề mặt tế bào thu được bằng dung dịch PBS và ủ tế bào thu được với lượng enzym trypsin theo tỉ lệ thể tích là 0,2ml/cm² đến 1 ml/cm² trong thời gian từ 2 phút đến 7 phút ở nhiệt độ từ 34°C đến 39°C, sau đó bổ sung môi trường nuôi cấy để bất hoạt enzym, sau khi ly tâm ở tốc độ từ 200g đến 1400g trong thời gian từ 2 đến 10 phút thu được tế bào gốc trung mô từ dây rốn.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó chai nuôi cấy tế bào được xử lý bề mặt bằng cách:

a) chuẩn bị chất xử lý bề mặt bằng cách pha loãng hợp chất dính bám bề mặt được chọn từ nhóm bao gồm fibronectin, vitronectin, intergrin tái tổ hợp với dung dịch đệm phosphat (PBS) theo tỷ lệ từ 0,2 đến 1%;

b) phủ chất dính bám bề mặt đã được pha loãng lên bề mặt chai nuôi cấy nhiều tầng đã được vô trùng có diện tích bề mặt trên 25 cm² với tỷ lệ từ 0,2 đến 1ml/cm² và ủ chai nuôi cấy này ở nhiệt độ từ 31°C đến 39°C trong khoảng thời gian từ 45 phút đến 180

phút để chất dính bám bề mặt bám trên bề mặt chai nuôi cấy và tạo ra một lớp dính bám phủ trên bề mặt chai nuôi cấy.

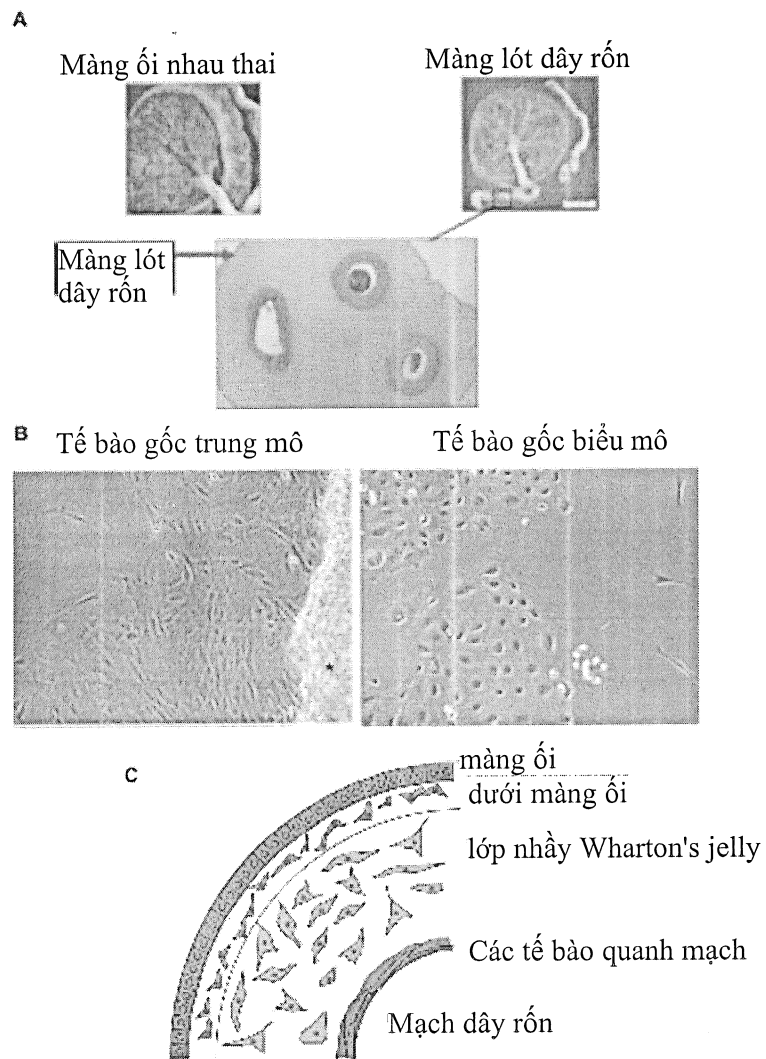
3. Quy trình theo điểm 2, trong đó chai nuôi cấy còn được xử lý bằng tia gama hoặc plasma trước khi xử lý bề mặt.

4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó quy trình này còn bao gồm bước bảo quản tế bào gốc trung mô từ dây rốn với các công đoạn:

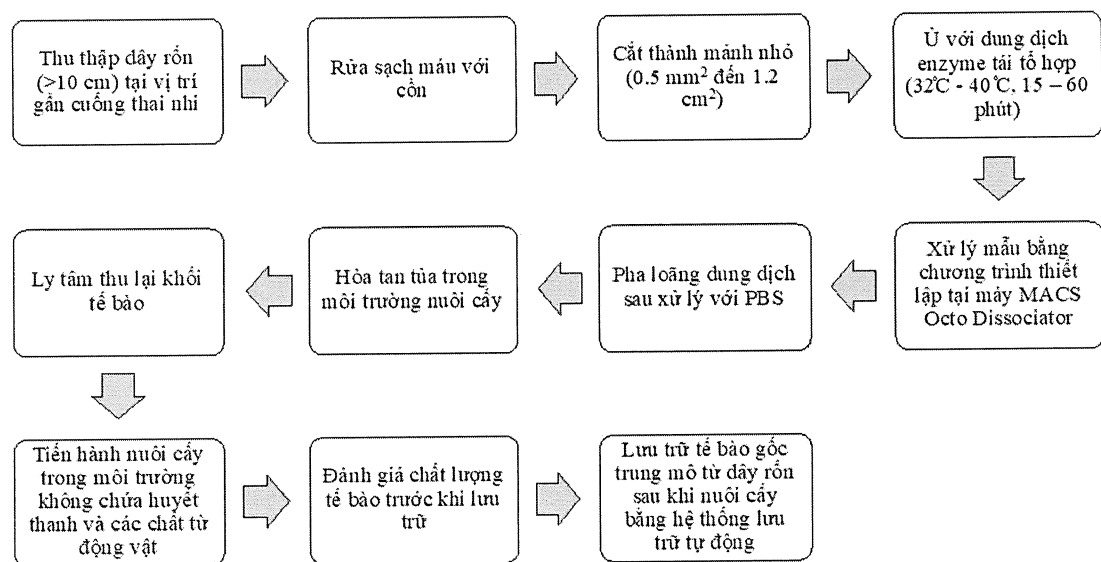
a) phân tán tế bào gốc trung mô từ dây rốn bằng dung dịch môi trường nuôi cấy không chứa các chất từ huyết thanh và các chất từ động vật có bổ sung dimethyl sulfoxide (DMSO) với lượng 2,5% đến 15% theo trọng lượng đến nồng độ cuối đạt từ $0,5 \times 10^6$ tế bào/ml đến 50×10^6 tế bào/ml;

b) đóng gói dung dịch chứa tế bào gốc trung mô vào các ống với thể tích từ 0,5 đến 2 ml, tiếp đó đông sâu với tốc độ giảm nhiệt $-1^\circ\text{C}/\text{phút}$ đến khi đạt -90°C thu được mẫu tế bào gốc trung mô đông lạnh; và

c) lưu trữ bằng cách chuyển mẫu chứa tế bào gốc trung mô đông lạnh vào bảo quản trong hệ thống đông sâu ở nhiệt độ từ -150°C đến -200°C để bảo quản tế bào gốc.



Hình 1



Hình 2