



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0031068

(51)^{2015.01} A61K 35/35; A61K 35/34; A61K
35/545; A61K 35/51; A61K 35/28

(13) B

(21) 1-2018-03634

(22) 18/01/2017

(86) PCT/JP2017/001538 18/01/2017

(87) WO 2017/126549 A1 27/07/2017

(30) 2016-008096 19/01/2016 JP

(45) 25/02/2022 407

(43) 25/01/2019 370A

(73) OSAKA UNIVERSITY (JP)

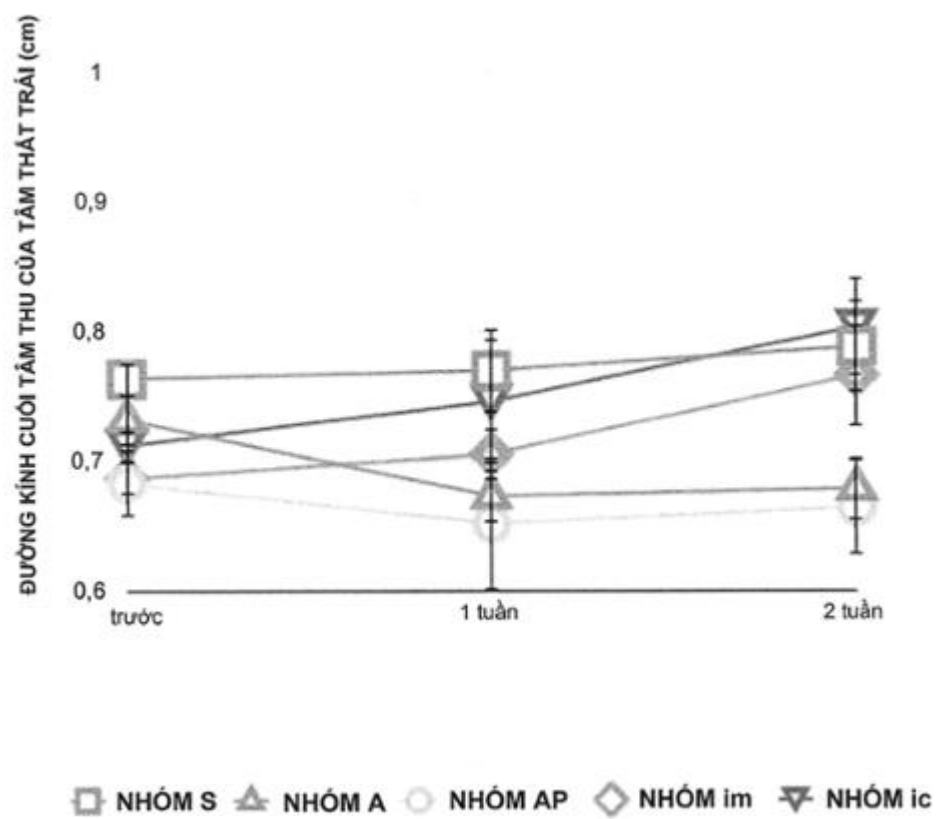
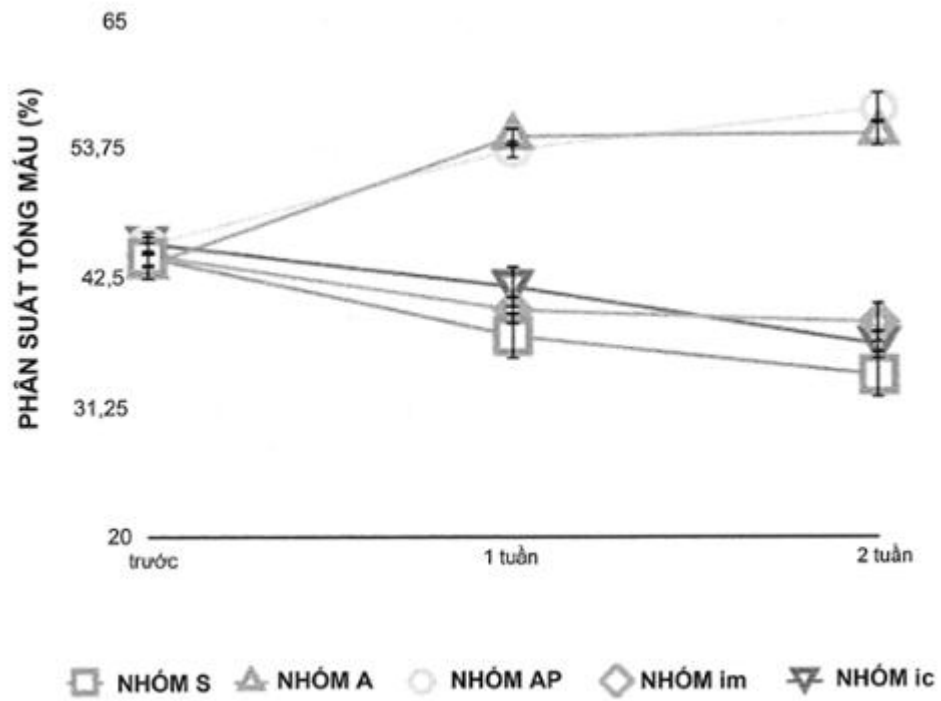
1-1, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan

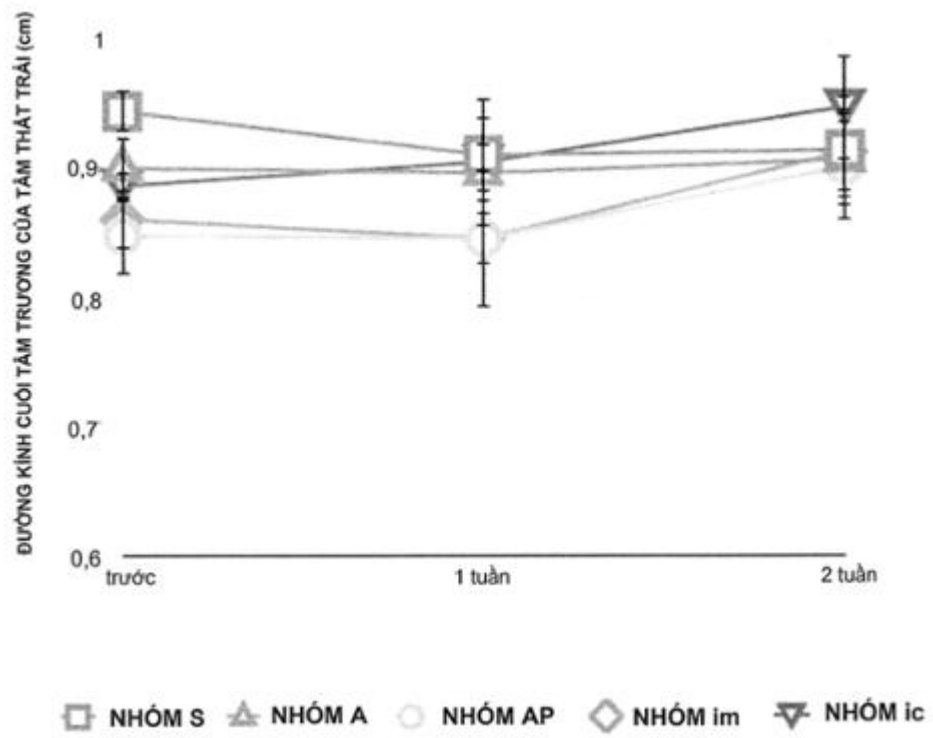
(72) KAJITA Daisuke (JP); FUKUSHIMA Satsuki (JP); MIYAGAWA Shigeru (JP);
SAWA Yoshiki (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) VẬT LIỆU CẮY GHÉP ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH TIM

(57) Sáng chế đề cập đến vật liệu cấy ghép để điều trị bệnh tim bao gồm cụm tế bào nhận được bằng cách làm các tế bào vừa được phân lập bám dính vào với nhau tiết ra adiponectin sau khi cấy ghép vào tim, và bằng cách đó có hiệu quả điều trị tuyệt vời đối với bệnh tim.





Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vật liệu cấy ghép để điều trị bệnh tim bao gồm một cụm tế bào nhận được bằng cách làm cho các tế bào đã được phân lập bám dính vào với nhau bằng chất kết dính và phương pháp điều trị bệnh tim bằng cách sử dụng vật liệu cấy ghép này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nhồi máu cơ tim là một tổn thương không thuận nghịch của các tế bào cơ tim (tài liệu phi sáng chế 1). Bệnh tim thiếu máu cục bộ chiếm 50% toàn bộ nguyên nhân tử vong do bệnh tim-mạch và là nguyên nhân hàng đầu của bệnh suy tim xung huyết. Nếu bệnh nhân được chẩn đoán bị suy tim xung huyết không được cải thiện bằng điều trị thì tiên lượng của họ rất xấu và tỷ lệ tử vong trong vòng một năm xấp xỉ 20% (tài liệu phi sáng chế 2). Hiện nay, nhiều phương pháp điều trị sẵn có để thầy thuốc có thể loại bỏ các nguyên nhân của nhồi máu cơ tim cấp, nhưng khoảng thời gian từ khi khởi phát nhồi máu đến tái tưới máu quyết định mức độ tổn thương cơ tim không thuận nghịch (tài liệu phi sáng chế 3). Phẫu thuật tạo hình cơ tim đã được đề xuất là phương pháp phẫu thuật để cải thiện chức năng tâm thất trái (LV: Left Ventricular) ở các bệnh nhân bị suy tim xung huyết, nhưng hiệu quả lên chức năng tim và tiên lượng của bệnh nhân không đạt yêu cầu (các tài liệu phi sáng chế từ 4 đến 7). Thuốc và phương pháp điều trị bất kỳ sẵn có về mặt lâm sàng cũng không có hiệu quả trong việc thay thế vết sẹo ở cơ tim bằng mô có chức năng, và có nhu cầu về phương pháp điều trị mới để tái tạo các tế bào cơ tim bình thường.

Trong quá trình cấy ghép cơ quan (ví dụ, tim, mạch máu, hoặc cơ quan tương tự) như là phương pháp điều trị thay thế, việc sử dụng mô ghép như dị ghép (allogeneic graft hoặc allograft) hoặc ghép ngoại lai đã được báo cáo là gây ra sự thải ghép miễn dịch (các tài liệu phi sáng chế từ 8 đến 11). Ví dụ, việc cấy ghép mảnh ghép tim được thao tác sinh học bằng cách sử dụng các giá đỡ thoái biến sinh học đã chứng minh các lợi ích rất nhỏ trong việc cải thiện chức năng tim, do mảnh ghép tim khó ghép vào lớp cơ tim (các tài liệu phi sáng chế 12 và

13). Trong lúc đó, việc cấy ghép toàn bộ tim không phải là sự lựa chọn hàng đầu đối với bệnh suy tim do thiếu người hiến tặng.

Gần đây, liệu pháp cấy ghép tế bào đã thu hút sự chú ý như là phương pháp điều trị có sử dụng các chất sinh học như các tế bào gốc đa năng cảm ứng (iPS cell: induced Pluripotent Stem cell) và các tế bào gốc trung mô (MSC: Mesenchymal Stem Cell). Các liệu pháp cấy ghép tế bào này cũng đã được báo cáo rằng chúng có khả năng thay thế mô cơ tim bị tổn thương và cải thiện chức năng tim. Ví dụ, đã có các nghiên cứu về phương pháp chuẩn bị và cấy ghép các tế bào có nguồn gốc từ mỡ, trong đó chúng được sử dụng trực tiếp bằng cách tiêm trong cơ tim hoặc tiêm trong lòng mạch. Tuy nhiên, có báo cáo cho rằng các phương pháp sử dụng này không thể đạt được các hiệu quả điều trị đủ hoặc thậm chí gây ra các tác dụng có hại nghiêm trọng (như loạn nhịp) sau khi cấy ghép (tài liệu sáng chế 1 và các tài liệu phi sáng chế 14 và 15).

Để giải quyết vấn đề này, các nghiên cứu về phương pháp sử dụng không cần tiêm đã dẫn đến việc phát triển phương pháp trong đó tế bào gốc được nuôi cấy trên đĩa nuôi cấy đáp ứng nhiệt độ và được xử lý thành tấm và sau đó tấm này được cấy ghép lên trên bề mặt tim. Phương pháp này có thể cấy ghép tế bào mà không gây ra các tác dụng có hại nghiêm trọng và đã thu hút sự chú ý vì mang lại các hiệu quả điều trị bởi tác động cận tiết của các xytokin được tiết ra từ các tế bào cấy ghép và có tác dụng bảo vệ cơ tim và tác dụng tạo mạch (tài liệu sáng chế 2).

Ngoài ra, cũng đã có báo cáo rằng adiponectin được biết đến là xytokin được tiết ra từ tế bào mỡ có khả năng bảo vệ tế bào cơ tim sau tổn thương và ngăn chặn sự suy giảm chức năng tim nhờ các tác dụng chống chết tế bào theo chương trình, chống viêm, tạo mạch, chống xơ hóa, và chống phì đại tim (các tài liệu phi sáng chế 16 và 17). Hơn nữa, các nghiên cứu về các cấy ghép tế bào mỡ dưới dạng hệ phân phối thuốc (DDS: Drug Delivery System) cũng đã được thực hiện như là cách để sử dụng adiponectin nhắm vào mô tim trong một khoảng thời gian dài. Kết quả là, đã phát hiện ra rằng adiponectin được tiết ra từ tấm tế bào được điều chế từ các tế bào mỡ trưởng thành được biệt hóa bằng cách nuôi cấy

và cấy ghép lên trên bề mặt tim có thể cải thiện chức năng tim trong một thời gian dài (tài liệu sáng chế 3).

Tuy nhiên, việc điều chế các tấm tế bào này để cấy ghép đòi hỏi rất nhiều thời gian và nỗ lực và do đó có vấn đề khi sử dụng trong các trường hợp lâm sàng.

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: patent Nhật số 5210155

Tài liệu sáng chế 2: patent Nhật số 5103626

Tài liệu sáng chế 3: patent Nhật số 5661048

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Ho KK et al., Circulation 1993; 88: 107-115

Tài liệu phi sáng chế 2: American Heart Association., Dallas, Tex: American Heart Association; 2001

Tài liệu phi sáng chế 3: Ryan TJ et al., J Am Coll Cardiol 1999; 34: 890-911

Tài liệu phi sáng chế 4: Corin WJ et al., J Thorac Cardiovasc Surg 1992; 104: 1662-71

Tài liệu phi sáng chế 5: Kratz JM et al., J Thorac Cardiovasc Surg 1994; 107: 868-78

Tài liệu phi sáng chế 6: Carpentier A, Chachques JC., Lancet, 1985; 8840:1267

Tài liệu phi sáng chế 7: Hagege AA et al., Lancet 1990; 335: 1122-4

Tài liệu phi sáng chế 8: Carrel A, J Exp Med 1907; 9: 226-8

Tài liệu phi sáng chế 9: Carrel A, J Exp Med 1912; 9: 389-92

Tài liệu phi sáng chế 10: Calne RY, Transplant Proc 1970; 2: 550

Tài liệu phi sáng chế 11: Auchincloss, Transplantation 1988; 46:1

Tài liệu phi sáng chế 12: Leor J et al., Circulation 2000; 102[suppl III] III-56-III-61

Tài liệu phi sáng chế 13: Li RK et al., Circulation 1999; 100[suppl II]: II-63-II-69

Tài liệu phi sáng chế 14: Yamada Y et al., Biochem Biophys Res Commun 2006; 342(2): 662-670

Tài liệu phi sáng chế 15: Sanz-Ruiz R et al., J Cardiovasc Transl Res 2008; 1(1): 55-63

Tài liệu phi sáng chế 16: Shibata R et al., Circ J 2009; 73(4): 608-614

Tài liệu phi sáng chế 17: Eren P et al., Stem Cells 2009; 27(11): 2712-2721

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Sáng chế đã được thực hiện dựa trên các trường hợp nêu trên.

Mục đích của sáng chế là đề xuất vật liệu cấy ghép có hiệu quả điều trị tuyệt vời đối với bệnh tim và có thể được điều chế dễ dàng trong một khoảng thời gian ngắn. Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp điều trị bệnh tim bằng cách sử dụng vật liệu cấy ghép này.

Giải pháp cho vấn đề

Theo kết quả của các nghiên cứu chuyên sâu để giải quyết các vấn đề nêu trên, tác giả của sáng chế đã phát hiện ra rằng cụm tế bào, thu được theo cách mà các tế bào tái sinh vừa được phân lập từ mô mỡ sống được làm cho bám dính vào với nhau mà không cần nuôi cấy, tiết ra adiponectin sau khi cấy ghép vào tim và bằng cách đó có hiệu quả điều trị tuyệt vời đối với bệnh tim. Trong quá trình tạo ra cụm tế bào này, cụm tế bào có thể dễ dàng được tạo ra bằng cách sử dụng fibrinogen làm vật liệu bám dính của các tế bào. Ngoài ra, hiệu quả điều trị này còn được tăng cường hơn nữa bằng cách sử dụng tế bào tiền thân trung mô có nguồn gốc từ mỡ được xử lý bằng chất chủ vận thụ thể hoạt hóa chất tăng sinh peroxisom gama (PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma) trong quá trình tạo ra cụm tế bào này.

Thông thường, trong trường hợp điều trị bệnh tim bằng tấm tế bào được tạo ra từ tế bào mỡ hoặc tế bào gốc có nguồn gốc từ mô mỡ, việc nuôi cấy tế bào

trong một khoảng thời gian dài là bắt buộc trước khi tạo ra tấm tế bào. Ví dụ, theo tài liệu sáng chế 3, để biệt hóa các tế bào thành tế bào mỡ trưởng thành, các tế bào này thường được nuôi cấy trong môi trường quy định trong 5 đến 10 ngày trước khi gây biệt hóa sau khi gieo, trong khoảng thời gian từ 36 đến 60 giờ trong quá trình gây biệt hóa, và trong khoảng thời gian từ 5 đến 14 ngày sau khi gây biệt hóa. Bước nuôi cấy tế bào trong các khoảng thời gian ngắn hơn khoảng thời gian nêu trên được cho là không tốt trong thực tế do các lý do như các tế bào thu được chỉ tiết ra một lượng nhỏ adiponectin (đoạn 0025).

Trong lúc đó, phương pháp theo tài liệu sáng chế 2 tạo ra hiệu quả điều trị đối với bệnh tim bằng cách sử dụng tấm tế bào không chứa tế bào mỡ trưởng thành nhưng chứa tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ mô mỡ. Cũng theo phương pháp này, các tế bào gốc thu nhận được được nuôi cấy trong môi trường quy định thường là trong vài ngày, và sau đó các tế bào này được nuôi cấy cấp hai trong vài thế hệ để tạo ra tấm tế bào (đoạn 0013 và 0014). Tuy nhiên, tài liệu sáng chế 2 chỉ cho rằng các tế bào gốc trung mô trong tấm tế bào này biệt hóa thành tế bào cơ tim, tế bào nội mô mạch, và tế bào cơ trơn mạch sau khi cấy ghép vào tim, và không đề cập chút nào đến sự biệt hóa thành tế bào mỡ trưởng thành và kèm theo là tiết ra adiponectin (đoạn 0017 và 0018).

Trong các trường hợp như vậy, điều cực kỳ đáng ngạc nhiên là cụm tế bào nhận được bằng cách làm cho các tế bào vừa được phân lập từ mô mỡ sống bám dính vào với nhau tiết ra adiponectin sau khi cấy ghép vào tim, và chứng minh hiệu quả điều trị tuyệt vời đối với bệnh tim.

Như đã mô tả trên đây, sáng chế được dự định để đề xuất vật liệu cấy ghép mà có thể được điều chế dễ dàng trong một khoảng thời gian ngắn và có hiệu quả điều trị tuyệt vời đối với bệnh tim, và phương pháp điều trị bệnh tim bằng cách sử dụng vật liệu cấy ghép này, và cụ thể hơn là đề xuất các đối tượng được mô tả dưới đây.

[1] Vật liệu cấy ghép để điều trị bệnh tim, vật liệu cấy ghép này bao gồm cụm tế bào nhận được bằng cách làm cho các tế bào đã được phân lập bám dính vào với nhau bằng chất kết dính.

[2] Vật liệu cấy ghép theo mục [1], trong đó các tế bào đã được phân lập được chọn từ nhóm bao gồm tế bào tái sinh có nguồn gốc từ mỡ, tế bào tái sinh có nguồn gốc từ tủy xương, tế bào tái sinh có nguồn gốc từ dây rốn, tế bào tái sinh có nguồn gốc từ cơ trơn, tế bào gốc có khả năng phát triển thành nhiều loại tế bào khác nhau, tế bào tái sinh có nguồn gốc từ tế bào gốc có khả năng phát triển thành nhiều loại tế bào khác nhau, tế bào nội mô mạch, và bạch cầu đơn nhân.

[3] Vật liệu cấy ghép theo mục [1], trong đó các tế bào đã được phân lập là tế bào tái sinh có nguồn gốc từ mỡ được xử lý bằng chất chủ vận PPAR γ .

[4] Vật liệu cấy ghép theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [3], trong đó các tế bào đã được phân lập là các tế bào không được nuôi cấy.

[5] Vật liệu cấy ghép theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [4], trong đó chất kết dính chứa fibrinogen.

[6] Phương pháp điều trị bệnh tim bao gồm bước bao phủ bề mặt tim của đối tượng bị bệnh tim bằng vật liệu cấy ghép theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [5].

[7] Phương pháp điều trị theo mục [6], trong đó đối tượng bị bệnh tim là đối tượng mà từ đó tế bào dùng cho vật liệu cấy ghép được thu nhận.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Theo sáng chế, các tế bào vừa được phân lập có thể được xử lý thành cụm tế bào, mà sau đó có thể được cấy ghép. Hơn nữa, các tế bào này có thể được xử lý dễ dàng thành cụm tế bào bằng cách sử dụng fibrinogen hoặc chất tương tự. Do đó, thời gian, nỗ lực, và chi phí có thể được giảm đáng kể so với phương pháp điều trị cấy ghép thông thường bằng cách sử dụng tâm tế bào.

Ngoài ra, phương pháp theo sáng chế an toàn hơn nhiều so với phương pháp điều trị cấy ghép thông thường trong đó các tế bào tiền thân trung mô có nguồn gốc từ mỡ được tiêm vào động mạch vành hoặc tế bào cơ tim, và còn đạt được hiệu quả phục hồi chức năng tim cao phối hợp với tiết adiponectin.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 bao gồm các hình vẽ thể hiện kết quả của xét nghiệm mô học trên cụm tế bào gồm có tế bào tái sinh có nguồn gốc từ mỡ (ADRC: Adipose-Derived Regenerative Cell) (sau đây còn được gọi đơn giản là “cụm tế bào ADRC”).

Fig.1A thể hiện ảnh chụp hiển vi (đánh giá in vitro) của cụm tế bào ADRC sau khi nuôi cấy.

Fig.1B bao gồm các đồ thị thể hiện kết quả của phép đo adiponectin (APN), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor), yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF: Hepatocyte Growth Factor), và interleukin 6 (IL-6) trong phần nuôi cấy nổi lên trên của cụm tế bào ADRC bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (phương pháp ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)) (đánh giá in vitro).

Fig.1C là vi ảnh (đánh giá in vitro) của cụm tế bào ADRC sau khi nuôi cấy. Các hình cầu trong ảnh là các giọt dầu nhỏ.

Fig.2A là ảnh chụp hiển vi (đánh giá in vivo) của mô cơ tim của chuột trên mô hình nhồi máu cơ tim được lấy vào ngày 5 sau khi cấy ghép cụm tế bào ADRC vào chuột.

Fig.2B là ảnh chụp hiển vi (đánh giá in vivo) chứng minh sự biểu hiện của hiện tượng tạo mạch mới trên phía lá tạng màng ngoài tim và giữa cụm tế bào và vùng nhồi máu cơ tim.

Fig.3 bao gồm các biểu đồ thể hiện kết quả của kiểm tra siêu âm tim về cách mà liệu pháp cấy ghép cụm tế bào ADRC vào chuột trên mô hình nhồi máu cơ tim ảnh hưởng đến chức năng tim. Fig.3A là đồ thị của phân suất tống máu (EF: ejection fraction) tâm thất trái.

Fig.3B là đồ thị của đường kính cuối tâm thu của tâm thất trái (LVESd: Left Ventricular End Systolic diameter).

Fig.3C là đồ thị của đường kính cuối tâm trương của tâm thất trái (LVEDd: Left Ventricular End Diastolic diameter).

Fig.3D là đồ thị của tỷ lệ sống sót.

Fig.4 bao gồm các biểu đồ, mỗi biểu đồ thể hiện kết quả của kiểm tra siêu âm tim về cách mà liệu pháp cấy ghép cụm tế bào ADRC, tiêm trong cơ tim ADRC, và sử dụng trong lòng mạch ADRC cho chuột trên mô hình nhồi máu cơ tim mạn tính ảnh hưởng lên chức năng tim. Fig.4A là đồ thị của phân suất tống máu tâm thất trái (EF).

Fig.4B là đồ thị của đường kính cuối tâm thu của tâm thất trái (LVESd).

Fig.4C là đồ thị của đường kính cuối tâm trương của tâm thất trái (LVEDd).

Fig.5 bao gồm các biểu đồ thể hiện kết quả của các kiểm tra về cách mà liệu pháp cấy ghép cụm tế bào ADRC cho chuột trên mô hình nhồi máu cơ tim ảnh hưởng đến mô cơ tim. Fig.5A là ảnh chụp hiển vi thể hiện hình ảnh có độ phóng đại thấp được nhuộm đỏ Picro-Sirius của nhóm S.

Fig.5B là ảnh chụp hiển vi thể hiện hình ảnh có độ phóng đại thấp được nhuộm đỏ Picro-Sirius của nhóm A.

Fig.5C là ảnh chụp hiển vi thể hiện hình ảnh có độ phóng đại thấp được nhuộm đỏ Picro-Sirius của nhóm AP.

Fig.5D là đồ thị thể hiện kết quả của phép đo độ dày thành trước cuối tâm trương của tâm thất trái (left-ventricular end-diastolic anterior wall thickness) (LVAWD) của nhóm S, nhóm A, và nhóm AP.

Fig.5E là đồ thị thể hiện kết quả của phép đo diện tích xơ hóa trong diện tích mặt cắt ngang tâm thất trái của nhóm S, nhóm A, nhóm AP, nhóm ic, và nhóm im.

Fig.5F là ảnh chụp hiển vi thể hiện hình ảnh được nhuộm yếu tố von Willebrand của vùng biên nhồi máu-bình thường của nhóm S.

Fig.5G là ảnh chụp hiển vi thể hiện hình ảnh được nhuộm yếu tố von Willebrand của vùng biên nhồi máu-bình thường của nhóm A.

Fig.5H là ảnh chụp hiển vi thể hiện hình ảnh được nhuộm yếu tố von Willebrand của vùng biên nhồi máu-bình thường của nhóm AP.

Fig.5I là đồ thị thể hiện kết quả của phép đo mật độ mao mạch ở vùng biên nhồi máu-bình thường của nhóm S, nhóm A, nhóm AP, nhóm ic, và nhóm im.

Fig.6 bao gồm các bức ảnh thể hiện kết quả kiểm tra các ảnh hưởng lên mô cơ tim của chuột trên mô hình nhồi máu cơ tim mạn tính ở tuần 8 sau liệu pháp cấy ghép cụm tế bào ADRC ở chuột. Fig.6A là ảnh chụp hiển vi thể hiện hình ảnh có độ phóng đại thấp được nhuộm hematoxylin-eosin của nhóm S.

Fig.6B là ảnh chụp hiển vi thể hiện hình ảnh có độ phóng đại thấp được nhuộm hematoxylin-eosin của nhóm A.

Fig.6C là ảnh chụp hiển vi thể hiện hình ảnh có độ phóng đại thấp được nhuộm hematoxylin-eosin của nhóm AP.

Fig.6D là ảnh chụp mô đại diện thể hiện kết quả sự nhuộm màu axit periodic-Shiff (PAS: Periodic Acid-Shiff) của vùng biên nhồi máu-bình thường của nhóm S.

Fig.6E là ảnh chụp mô đại diện thể hiện kết quả sự nhuộm màu axit periodic-Shiff (PAS) của vùng biên nhồi máu-bình thường của nhóm A.

Fig.6F là ảnh chụp mô đại diện thể hiện kết quả sự nhuộm màu axit periodic-Shiff (PAS) của vùng biên nhồi máu-bình thường của nhóm AP.

Fig.6G là đồ thị thể hiện kết quả định lượng đường kính tế bào cơ tim trong vùng biên nhồi máu cơ tim-bình thường của các nhóm thử nghiệm.

Fig.7 bao gồm các biểu đồ thể hiện kết quả kiểm tra hiệu quả chống viêm bởi việc cấy ghép cụm tế bào ADRC. Fig.7A là đồ thị thể hiện kết quả định lượng mức phiên mã của adiponectin (APN) trong vùng nhồi máu và vùng biên nhồi máu-bình thường.

Fig.7B là đồ thị thể hiện kết quả định lượng mức phiên mã của thụ thể Adiponectin 1 (Adipo-R1) trong vùng nhồi máu và vùng biên nhồi máu-bình thường.

Fig.7C là đồ thị thể hiện kết quả định lượng mức phiên mã của thụ thể Adiponectin 2 (Adipo-R2) trong vùng nhồi máu và vùng biên nhồi máu-bình thường.

Fig.7D là đồ thị thể hiện kết quả định lượng mức phiên mã của T-cadherin trong vùng nhồi máu và vùng biên nhồi máu-bình thường.

Fig.7E là đồ thị thể hiện kết quả định lượng mức phiên mã của yếu tố tăng trưởng nội mô mạch (VEGF) trong vùng nhồi máu và vùng biên nhồi máu-bình thường.

Fig.7F là đồ thị thể hiện kết quả định lượng mức phiên mã của yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF- α) trong vùng nhồi máu và vùng biên nhồi máu-bình thường.

Fig.8 bao gồm các bức ảnh thể hiện khả năng sản xuất liên tục adiponectin và ghép ADRC trong cơ tim thành công. Fig.8A là ảnh chụp mô được chụp 1 tuần sau khi cấy ghép cụm tế bào ADRC thu được từ chuột LEW/Sea chuyển gen GFP (Green Fluorescent Protein: protein phát huỳnh quang xanh lá) vào tâm thất trái của chuột LEW/Sea, phần phía trên trong bức ảnh này là cụm tế bào ADRC, và phần thấp hơn trong bức ảnh này là tim.

Fig.8B là ảnh chụp hiển vi thể hiện kết quả nhuộm miễn dịch adiponectin trong mô được chụp 3 tuần sau khi cấy ghép cụm tế bào ADRC thu được từ chuột LEW/Sea chuyển gen GFP vào tâm thất trái của chuột LEW/Sea. Các vùng có màu nhạt cho biết adiponectin.

Fig.8C bao gồm các ảnh chụp hiển vi thể hiện kết quả của việc tiêm ADRC thu được từ chuột LEW/Sea chuyển gen GFP trong cơ tim của tâm thất trái.

Fig.8D bao gồm các ảnh chụp hiển vi thể hiện kết quả của việc sử dụng ADRC thu được từ chuột LEW/Sea chuyển gen GFP trong lòng mạch.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất vật liệu cấy ghép để điều trị bệnh tim, vật liệu này bao gồm cụm tế bào nhận được bằng cách làm cho các tế bào đã được phân lập bám dính vào với nhau bằng chất kết dính.

Các tế bào đã được phân lập có thể là tế bào bất kỳ không bị giới hạn cụ thể miễn là các tế bào này có hiệu quả điều trị bệnh tim. Ví dụ về chúng bao gồm các tế bào tái sinh có nguồn gốc từ mô mỡ (ví dụ, mô mỡ dưới da, mạc nối lớn,

và chất béo lá tạng màng ngoài tim), tế bào tái sinh có nguồn gốc từ tủy xương, tế bào tái sinh có nguồn gốc từ dây rốn, tế bào tái sinh có nguồn gốc từ cơ trơn (ví dụ, cơ trơn quanh mạch), tế bào gốc đa năng (ví dụ, tế bào iPS, tế bào gốc phôi (ES cell: Embryonic Stem cell), và tế bào Muse), và các tế bào tái sinh có nguồn gốc từ tế bào gốc đa năng. Ngoài ra, cũng có thể sử dụng các tế bào đã được biệt hóa như tế bào nội mô mạch và bạch cầu đơn nhân.

Theo sáng chế, thuật ngữ “tế bào tái sinh” có nghĩa là tế bào có khả năng khôi phục lại cấu trúc và chức năng trong cơ quan hoặc mô được sử dụng tế bào này. Theo phương án được ưu tiên, các tế bào tái sinh là nhóm tế bào bao gồm tế bào gốc trung mô và tế bào tiền thân trung mô. Ở đây, thuật ngữ “tế bào gốc trung mô” có nghĩa là tế bào gốc có khả năng biệt hóa thành tế bào trung mô như tế bào xương, tế bào mỡ, tế bào cơ, hoặc tế bào sụn, và thuật ngữ “tế bào tiền thân trung mô” có nghĩa là tế bào trong quá trình biệt hóa từ tế bào gốc trung mô thành tế bào trung mô. Vậy thì, thuật ngữ “tế bào gốc” có nghĩa là tế bào có khả năng tự tái sinh và có tính đa năng. Việc các tế bào tái sinh đã được phân lập có phải là tế bào gốc trung mô hoặc tế bào tiền thân trung mô hay không có thể được đánh giá bằng cách sử dụng chất đánh dấu bề mặt tế bào đã được xác định trước (Lin K et al., *Cytherapy* 2008; 10(4): 417-426).

Theo sáng chế, tốt hơn là, cụm từ “tế bào tái sinh có nguồn gốc từ mỡ” được sử dụng cụ thể. Thuật ngữ “mô mỡ” là mô liên kết chủ yếu bao gồm các tế bào mỡ. Các mô mỡ mà từ đó các tế bào tái sinh được phân lập là không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể là mô mỡ dưới da, mạc nối lớn, chất béo lá tạng màng ngoài tim, hoặc mô tương tự. Mô mỡ có thể được thu nhận từ cơ thể sống, ví dụ, bằng cách hút từ một vết rạch nhỏ hoặc bằng cách cắt khi phẫu thuật.

Theo phương án được ưu tiên, cụm tế bào nhận được bằng cách bầm dính các tế bào bao gồm tế bào tiền thân trung mô và tế bào gốc trung mô với lượng tổng cộng ít nhất là lớn hơn hoặc bằng 1%, và tốt hơn là lớn hơn hoặc bằng 5% (ví dụ, lớn hơn hoặc bằng 10%, lớn hơn hoặc bằng 20%, lớn hơn hoặc bằng 30%, lớn hơn hoặc bằng 40%, hoặc lớn hơn hoặc bằng 50%). Ngoài các tế bào này, cụm tế bào có thể chứa, ví dụ, các tế bào được trộn lẫn trong quá trình phân lập, và v.v..

Các tế bào này có thể được phân lập từ mô theo cách mà đầu tiên mô được phân mảnh, và các mảnh thu được được xử lý bằng collagenaza, tiếp theo lọc qua máy lọc và sau đó ly tâm. Bước ly tâm để phân lập các tế bào tái sinh có thể được thực hiện trong các điều kiện, ví dụ, ở tốc độ nằm trong khoảng từ 500 đến 800G trong khoảng thời gian từ 5 đến 10 phút.

Theo sáng chế, các tế bào đã được phân lập được làm cho bám dính vào với nhau để tạo ra cụm tế bào. Phương pháp làm cho các tế bào bám dính vào với nhau không bị giới hạn cụ thể, nhưng tốt hơn là fibrinogen có thể được sử dụng. Fibrinogen trở thành polyme fibrin sền sệt khi được trộn với thrombin, và do đó trở nên có khả năng bám dính các tế bào với nhau. Do đó, như được thể hiện trong phần ví dụ thực hiện sáng chế, các tế bào có thể được làm cho bám dính vào với nhau một cách dễ dàng bằng cách trộn huyền phù chứa các tế bào mà fibrinogen được thêm vào đó cùng với dung dịch chứa thrombin. Nếu dung dịch đã trộn nêu trên được giữ ấm, quá trình bám dính có thể xảy ra nhanh hơn.

Theo cách này, không cần phải nuôi cấy các tế bào để tạo thành cụm tế bào. Do đó, có thể xử lý một cách nhanh chóng các tế bào tái sinh đã được phân lập thành cụm tế bào và sử dụng cụm tế bào này trong quá trình cấy ghép vào tim. Do đó, quá trình từ thu nhận để điều chế cụm tế bào có thể được thực hiện trong một khoảng thời gian rất ngắn. Ví dụ, không giống như sáng chế, phương pháp thông thường sử dụng tấm tế bào làm cho các tế bào bám dính vào với nhau bằng cách nuôi cấy (chất kết dính được sử dụng cho mục đích như là gia cố tấm tế bào) và nói chung cần đến khoảng thời gian từ vài ngày đến vài tuần kể từ lúc thu nhận mô sinh học để tạo ra tấm tế bào. Ngược lại, sáng chế chỉ cần vài giờ từ lúc thu nhận mô sinh học để tạo ra tấm tế bào, điều này có nghĩa là làm giảm đáng kể thời gian.

Trong quá trình hình thành cụm tế bào, tốt hơn là sử dụng tế bào tái sinh có nguồn gốc từ mỡ được xử lý bằng chất chủ vận PPAR γ . Điều này cho phép tăng cường hơn nữa sự tiết adiponectin từ cụm tế bào sau khi cấy ghép vào tim. Ví dụ về chất chủ vận PPAR γ bao gồm, nhưng không bị giới hạn cụ thể ở, các thuốc trên cơ sở thiazolidin như pioglitazon. Bên cạnh các chất nêu trên, có các chất có tác dụng thúc đẩy gây biệt hóa thành tế bào mỡ như insulin và steroid,

chất đối kháng thụ thể angiotensin (ARB: Angiotensin Receptor Antagonist), chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin (ACEi: Angiotensin Converting Enzyme inhibitor), xytokin như VEGF và HGF, và v.v.. là chất mà các tế bào có nguồn gốc từ mỡ được xử lý

Trong trường hợp sử dụng để điều trị bệnh tim bằng cách cấy ghép, cụm tế bào có thể được điều chỉnh về kích thước và độ dày, nếu thích hợp, theo vị trí mà cụm tế bào này cần được cấy ghép hoặc tương tự. Nói chung, cụm tế bào được ưu tiên có hình dạng đĩa có đường kính nằm trong khoảng từ 5mm đến 5cm hoặc hình vuông có cạnh nằm trong khoảng từ 5mm đến 5cm, và có độ dày nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2mm để có đủ độ bền. Để nhận được một cụm tế bào như vậy, huyền phù có thể được sử dụng có nồng độ tế bào, ví dụ, nằm trong khoảng từ 2×10^5 đến 2×10^7 tế bào/ml.

Vật liệu cấy ghép theo sáng chế có thể còn chứa thêm các yếu tố khác có ích để điều trị bệnh tim, miễn là nó chứa cụm tế bào nêu trên. Ví dụ về các yếu tố khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cụm tế bào hoặc tâm tế bào gồm có tế bào khác loại, chất gian bào ngoại bào, và protein yếu tố bám dính.

Ví dụ về “bệnh tim” cần được điều trị bằng vật liệu cấy ghép theo sáng chế là, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh hoặc bệnh đi kèm với rối loạn, bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh suy tim, bệnh tim thiếu máu cục bộ, bệnh nhồi máu cơ tim, bệnh cơ tim, viêm cơ tim, bệnh cơ tim phì đại, bệnh cơ tim phì đại tâm trương, và bệnh cơ tim giãn.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị bệnh tim, phương pháp này bao gồm bước bao phủ bề mặt tim của đối tượng bị bệnh tim bằng vật liệu cấy ghép nêu trên.

Phương pháp điều trị theo sáng chế có thể được áp dụng cho đối tượng là người và đối tượng không phải là người. Các sinh vật cần được điều trị không bị giới hạn cụ thể miễn là chúng có tim là đích điều trị, và ví dụ về các đối tượng này bao gồm người, động vật có vú không phải là người, chim, loài bò sát, động vật lưỡng cư và cá. Động vật có vú không phải là người bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, động vật linh trưởng như tinh tinh và khỉ, cũng như gia súc và động vật đồng hành như trâu bò, lợn, ngựa, gà, mèo và chó.

Là các tế bào mà từ đó vật liệu cấy ghép theo sáng chế được tạo ra, các tế bào tương hợp với sinh vật cần được điều trị có thể được sử dụng. Tuy nhiên, xét về việc ức chế phản ứng thải bỏ miễn dịch hoặc tương tự, được sử dụng là tế bào có nguồn gốc từ cùng một loài và đặc biệt tốt hơn là tế bào tự thân. Do đó, đặc biệt tốt hơn là, vật liệu cấy ghép theo sáng chế được cấy ghép vào đối tượng mà từ đối tượng này các tế bào được thu nhận.

Cần lưu ý rằng, về nguyên tắc ngay cả khi phản ứng thải bỏ là chắc chắn, thì phản ứng thải bỏ này có thể được ức chế bằng cách sử dụng các cách đã được biết đến một cách công khai như các chất ức chế miễn dịch. Theo cách này, loại tế bào có thể áp dụng cho một sinh vật cụ thể có thể được mở rộng.

Tốt hơn là, vị trí mà vật liệu cấy ghép theo sáng chế được cấy ghép là bề mặt tim. Trong trường hợp này, bệnh tim có thể được điều trị bằng cách bao phủ bề mặt tim bằng vật liệu cấy ghép theo sáng chế. Trong quá trình cấy ghép vật liệu cấy ghép vào bề mặt tim, ví dụ, vật liệu cấy ghép có thể được gắn vào chỗ tổn thương (ví dụ, vùng nhồi máu cơ tim), và sau đó được cố định bằng cách phẫu thuật vào lá tạng màng ngoài tim bằng kim prolin hoặc cố định vào bề mặt tim bằng thuốc phun fibrin. Tốt hơn là, vật liệu cấy ghép được đặt lên bề mặt tim để bao phủ đủ ranh giới giữa vị trí tổn thương (ví dụ, vị trí nhồi máu cơ tim) và vị trí bình thường xung quanh.

Để cấy ghép, tim cần được cấy ghép được điều trị trước nếu cần. Ví dụ, trong trường hợp phẫu thuật đầu tiên, bước cấy ghép tốt hơn là được thực hiện sau khi máu và ỉm trên bề mặt tim được lau một cách thích hợp. Trong lúc đó, trong trường hợp phẫu thuật thứ hai hoặc tiếp sau, bước cấy ghép tốt hơn là được thực hiện sau khi mô sẹo trên bề mặt tim được loại bỏ càng nhanh càng tốt.

Trong phương pháp điều trị theo sáng chế, phương pháp điều trị bằng vật liệu cấy ghép theo sáng chế có thể được phối hợp với một phương pháp điều trị khác. Ví dụ, đối với nhồi máu cơ tim mạn tính, phương pháp điều trị theo sáng chế có thể được phối hợp với phẫu thuật bắc cầu động mạch vành, phẫu thuật tạo hình mạch vành qua da, hoặc phẫu thuật tái cấu trúc tâm thất trái. Đối với nhồi máu cơ tim cấp, phương pháp điều trị theo sáng chế có thể được phối hợp với phẫu thuật bắc cầu động mạch vành hoặc phẫu thuật tạo hình mạch vành qua da.

Ngoài ra, phương pháp điều trị theo sáng chế có thể được phối hợp với phẫu thuật thay van hoặc phẫu thuật tim nhi khoa.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế được mô tả chi tiết hơn dựa trên các ví dụ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ được mô tả dưới đây.

Ví dụ 1

Nguyên liệu và phương pháp

(1) Chuẩn bị tế bào tái sinh có nguồn gốc từ mỡ (ADRC)

Mô mỡ được thu nhận từ cả hai vùng bẹn của chuột LEW/Sea cái 9 tuần tuổi. Mô mỡ được cắt thành các mảnh nhỏ bằng kéo, và các mảnh mô thu được được tạo huyền phù trong dung dịch collagenase typ II 0,1% và lắc trong bể nước ấm 37°C trong 1 giờ. Huyền phù được lọc qua bộ lọc có kích thước lỗ rây 100µm và 70µm, tiếp theo ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 1800 vòng/phút. Phần cặn lắng tạo ra được tạo huyền phù trong môi trường nuôi cấy (môi trường D-MEM chứa huyết thanh bào thai bò 10% và kháng sinh) được sử dụng làm tế bào (tiền thân trung mô) tái sinh có nguồn gốc từ mỡ (ADRC). Tế bào ADRC nhận được bao gồm tế bào gốc trung mô và tế bào tiền thân có nguồn gốc từ mô mỡ.

(2) Chuẩn bị cụm tế bào ADRC

Sau khi chiết ADRC ra khỏi mô mỡ, các cụm tế bào trong đó mỗi cụm chứa 5×10^6 ADRC được tạo ra ngay lập tức. Dung dịch A được điều chế bằng cách bổ sung 60µl fibrinogen vào 140µl huyền phù tế bào ADRC, ngược lại dung dịch B được điều chế bằng cách bổ sung 30ml thrombin vào 170µl môi trường nuôi cấy (môi trường D-MEM chứa huyết thanh bào thai bò 10% và kháng sinh), tiếp theo trộn kỹ. Sau đó, dung dịch A đầu tiên được nhỏ giọt vào đĩa nuôi cấy, dung dịch B được cho vào dung dịch A đã được nhỏ giọt, và hỗn hợp thu được được tạo ra ở hình dạng thích hợp để cấy ghép, và sau đó được giữ ấm trong môi trường ấm ở 37°C trong môi trường khí 5% cacbon dioxide trong khoảng thời gian từ 5 đến 10 phút để làm cho các tế bào bám dính vào với nhau để tạo ra cụm tế bào ADRC. Sau khi tạo ra cụm tế bào ADRC, cụm tế bào này được cấy ghép ngay vào vị trí nhồi máu.

(3) Đo mức độ tiết xytokin như adiponectin bởi cụm tế bào ADRC

Phần nổi lên trên sau khi cụm tế bào ADRC được nuôi cấy trong 24, 48, 72, 96, 120, và 144 giờ được thu hồi, và mức tiết adiponectin, VEGF, HGF, và IL-6 trong phần nổi lên trên được đo bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA).

(4) Xét nghiệm mô học của cụm tế bào ADRC

Các phần đã được làm đông lạnh của cụm tế bào ADRC được chuẩn bị, cố định bằng paraformaldehyt 4%, và sau đó được nhuộm Oil Red O và nhuộm miễn dịch adiponectin.

5) Tạo mô hình suy tim và cấy ghép cụm tế bào ADRC

Mô hình nhồi máu cơ tim được tạo ra bằng cách sử dụng chuột LEW/Sea cái 7 tuần tuổi bằng cách thắt ở nhánh xuống trước của động mạch vành trái. Với cách gây mê toàn thân được thực hiện theo cách gây mê hô hấp bằng isofluran trong điều kiện hô hấp nhân tạo (isofluran 1,5%, thể tích thông khí 4ml, 110 chu kỳ/phút), thủ thuật mở ngực trái được thực hiện để lộ tim. Vị trí động mạch vành trái ở khoảng cách từ 2 đến 3mm từ gốc của động mạch vành trái được thắt lại bằng chỉ khâu 7-0 prolin. Hai tuần sau khi buộc động mạch vành, cụm tế bào ADRC được đặt lên trên kẹp đầu cong, và đặt nhẹ nhàng trên vị trí nhồi máu của vách trước tâm thất trái. Đối với nhóm giả (sham), ADRC không chứa fibrin đã làm ổn định được cấy ghép theo cùng một cách.

(6) Phác đồ thử nghiệm trên động vật

Hai tuần sau khi thắt động mạch vành, chuột được chia thành 5 nhóm, và sau đó được điều trị như sau. Cụ thể, các nhóm sau được chuẩn bị là: nhóm trong đó cụm tế bào ADRC được cấy ghép vào vách trước tâm thất trái (nhóm A; n = 26); nhóm trong đó cụm tế bào ADRC chứa pioglitazon (PGZ, 50mM) được cấy ghép (nhóm AP; n = 26); nhóm giả trong đó không tiến hành cấy ghép cụm tế bào nào (nhóm S; n = 26); và nhóm cấy ghép trực tiếp trong cơ tim (nhóm im; n = 6) và nhóm cấy ghép trong lòng mạch (nhóm ic; n=6) ADRC vào các vùng quanh nhồi máu của vách trước tâm thất trái. Sau đó, đánh giá mô học và đánh

giá phân tử được thực hiện vào ngày 12 và 56 sau khi phẫu thuật. Ngoài ra, chức năng tim được đánh giá bằng siêu âm tim mỗi tuần sau khi phẫu thuật.

(7) Kiểm tra siêu âm tim

Sau trạng thái an thần đạt được nhờ phương pháp gây mê hô hấp bằng isofluran, các hình chiếu theo trục ngắn của tâm thất trái ở vị trí cơ nhú thu được bằng cách sử dụng hệ siêu âm tim được trang bị bộ cảm biến 14MHz. Đường kính cuối tâm trương của tâm thất trái (LVEDd) và đường kính cuối tâm thu của tâm thất trái (LVESd) được đo. Các phép đo được lặp lại nhiều hơn hoặc bằng 3 lần, và thu được giá trị trung bình. Phân suất tổng máu tâm thất trái (EF%) được tính từ các công thức sau.

$$\text{Phân suất tổng máu tâm thất trái (EF)} = \{(LVEDV - LVESV) / LVEDV\} \times 100 = (SV / LVEDV) \times 100$$

$$\text{Thể tích cuối tâm trương của tâm thất trái (LVEDV: Left Ventricular End-Diastolic Volume)} = \{7,0 / (2,4 + LVEDd)\} \times LVEDd^3$$

$$\text{Thể tích cuối tâm thu của tâm thất trái (LVESV: Left Ventricular End-Systolic Volume)} = \{7,0 / (2,4 + LVESd)\} \times LVESd^3$$

(8) Đánh giá mô học

Vào các ngày 14 và 56 sau khi phẫu thuật, trạng thái ngủ được tạo ra nhờ phương pháp gây mê sâu bằng isofluran, và sau đó tim đang đập liên tục được lấy ra. Mỗi phần mô được chuẩn bị bằng cách cắt tâm thất trái thành lát mỏng theo chiều trục ngắn, lát cắt này được nhúng vào hộp chất, làm đông lạnh lát cắt trong nitơ lỏng. Thực hiện các bước nhuộm hematoxylin-eosin, nhuộm đỏ Picro-Sirius, nhuộm Masson trichrom, nhuộm Oil Red O, nhuộm miễn dịch adiponectin, nhuộm miễn dịch actin cơ trơn (SMA: Smooth Muscle Actin), và nhuộm miễn dịch yếu tố von Willebrand. Tốc độ xơ hóa được xác định bằng cách phân tích hình ảnh được nhuộm bằng đỏ Picro-Sirius. Đối với kích thước tế bào sống ở vị trí biên quanh vùng nhồi máu, đường kính ngắn của tế bào trong một trường nhìn (ở độ phóng đại 400) của hình ảnh được nhuộm hematoxylin-eosin được đo và giá trị trung bình của 10 trường nhìn mỗi mẫu được tính. Ngoài ra, số lượng mao mạch mỗi trường nhìn (ở độ phóng đại 400) của hình ảnh được

nhuộm miễn dịch yếu tố von Willebrand được đo, và giá trị trung bình của 5 trường mỗi mẫu được tính.

(9) Nghiên cứu sinh học phân tử

Vào các ngày 14 và 56 sau khi cấy ghép, mẫu tim đã lấy ra được phân chia thành phần nhồi máu (sẹo), phần biên giữa phần nhồi máu và phần bình thường (biên), và phần quanh vùng nhồi máu (xa), và tiến hành chiết ARN thông tin (mRNA: messenger RNA) trong mỗi phần. Sau đó, ADN bổ trợ (cDNA: complementary DNA) được tổng hợp từ mRNA bằng phản ứng phiên mã ngược. Mức phiên mã của mỗi trong số yếu tố tăng trưởng tế bào nội mô mạch (VEGF), adiponectin (APN), thụ thể adiponectin-1 (Adipo-R1), thụ thể adiponectin-2 (Adipo-R2), T-cadherin (CDH-13), và yếu tố hoại tử khối u (TNF- α) được định lượng bằng phương pháp phản ứng chuỗi polymeraza (PCR: Polymerase Chain Reaction) định lượng, và được phân chia bởi mức phiên mã của glyceraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza (GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), mà là chất kiểm soát nội sinh. Sau đó, tỷ số của giá trị thu được trên giá trị bình thường của mỗi mẫu được biểu hiện.

(10) Phân tích thống kê

Số liệu được biểu hiện dưới dạng giá trị trung bình của $\pm$ sai số chuẩn. So sánh giữa các nhóm được tiến hành bằng thử nghiệm t, và giá trị P nhỏ hơn 0,05 được cho là thể hiện sự khác biệt đáng kể. Để phân tích tỷ lệ sống sót, tỷ lệ sống sót được tính bằng phương pháp Kaplan-Meier, và sự khác biệt giữa mỗi nhóm thử nghiệm được xác định bởi thử nghiệm log rank.

Kết quả

(1) Khả năng tiết xytokin và biệt hóa thành tế bào mỡ của cụm tế bào ADRC

Cụm tế bào ADRC (Fig.1A) và cụm tế bào ADRC chứa pioglitazon (PGZ) được chuẩn bị và nuôi cấy trong 144 giờ trong môi trường ẩm ở 37°C trong môi trường khí 5% cacbon dioxit, và sau đó khả năng tiết xytokin của chúng được kiểm tra. Các lượng adiponectin (APN), VEGF, HGF, và IL-6 được tiết ra từ cụm tế bào ADRC và cụm tế bào chứa PGZ tăng theo thời gian trong môi trường nuôi cấy. Cụ thể, nồng độ adiponectin sau khi nuôi cấy trong 144 giờ

tương ứng là $21,7 \pm 0,9 \text{ ng}/5 \times 10^6$ tế bào/ngày và $51 \pm 3,9 \text{ ng}/5 \times 10^6$ tế bào/ngày, và môi trường nuôi cấy của cụm tế bào ADRC chứa PGZ có nồng độ cao hơn đáng kể môi trường nuôi cấy của cụm tế bào chỉ chứa ADRC (Fig.1B).

Ngoài ra, cụm tế bào ADRC được xử lý bằng huyết thanh bản thân hoặc huyết thanh bào thai bò (FBS: fetal bovine serum) từ 10 đến 15%, insulin từ 0,5 đến $2,0 \mu\text{M}$, dexametason từ 0,1 đến $1,0 \mu\text{M}$, và isobutyl-methylxantin từ 0,2 đến 2mM, và bằng cách đó được gây biệt hóa thành tế bào mỡ. Kết quả là, tế bào mỡ dương tính đối với Oil Red O xuất hiện 7 ngày sau khi gây biệt hóa (Fig.1C). Số lượng tế bào tạo nên một cụm tế bào bằng khoảng 5×10^6 và cụm tế bào chứa tế bào dương tính với Oil Red O với độ dày khoảng $1000 \mu\text{m}$. Do đó, phát hiện thấy rằng cụm tế bào này duy trì được khả năng biệt hóa.

(2) Ghép cụm tế bào ADRC lên bề mặt cơ tim

Để kiểm tra việc ghép cụm tế bào ADRC lên tế bào cơ tim, các cụm tế bào được cấy ghép vào tế bào cơ tim của chuột ngay sau khi tạo ra. Kết quả là, cụm tế bào sau từ vài ngày đến 1 tuần bám dính vào bề mặt tim (Fig.2A). Do cụm tế bào này được quan sát thấy có liên lạc với tế bào cơ tim qua các mao mạch (Fig.2B), xác nhận rằng cụm tế bào đã cấy ghép được ghép thành công lên tế bào cơ tim.

(3) Ảnh hưởng của việc cấy ghép cụm tế bào ADRC lên chức năng tim

Fig.3 minh họa kết quả đánh giá của chức năng tim vào ngày 28 sau khi cấy ghép cụm tế bào ADRC lên chuột trên mô hình nhồi máu cơ tim mạn tính. Ở đây, phân suất tống máu tâm thất trái (EF), đường kính cuối tâm thu của tâm thất trái (LVESd), đường kính cuối tâm trương của tâm thất trái (LVEDd), và độ dày thành trước cuối tâm trương của tâm thất trái (LVAWD) trong kiểm tra siêu âm tim được sử dụng làm các chỉ số đánh giá chức năng tim. Hai tuần sau khi thắt động mạch vành, chuột của mô hình này được chia thành 5 nhóm và được thử nghiệm sau các bước xử lý sau. Cụ thể, được thử nghiệm là nhóm trong đó cụm tế bào ADRC được cấy ghép vào vách trước tâm thất trái (nhóm A); nhóm trong đó cụm tế bào ADRC chứa pioglitazon (PGZ, 50mM) được cấy ghép vào vách trước tâm thất trái (nhóm AP); nhóm giả trong đó không tiến hành cấy ghép cụm tế bào nào (nhóm S); và nhóm được cấy ghép trong cơ tim trực tiếp (nhóm im)

và nhóm có cấy ghép ADRC trong lòng mạch ở tâm thất trái (nhóm ic) vào các vùng quanh nhồi máu của vách trước tâm thất trái.

Từ việc kiểm tra siêu âm tim, nhóm A và nhóm AP có giá trị EF lớn hơn đáng kể so với nhóm S, và được phát hiện là có sự cải thiện tính co của tâm thất trái. Hơn nữa, ở tuần 8 sau khi cấy ghép, nhóm AP thể hiện sự cải thiện EF lớn hơn nhóm A (Fig.3A). Trong lúc đó, khi so sánh với nhóm S, nhóm A và nhóm AP thì không có sự khác biệt đáng kể về giá trị LVEDd (Fig.3C), và có giá trị LVESd nhỏ (Fig.3B). Do đó, nhóm A và nhóm AP được quan sát thấy là có sự cải thiện tính co của tâm thất trái bằng cách cấy ghép. Ngoài ra, tỷ lệ sống sót của các nhóm cũng được đánh giá. Kết quả là, tỷ lệ sống sót của nhóm A và nhóm AP cao hơn đáng kể ($p = 0,0424$) so với tỷ lệ sống sót của nhóm S (Fig.3D). Từ các kết quả nêu trên, phát hiện thấy rằng phương pháp cấy ghép cụm tế bào ADRC có hiệu quả điều trị tuyệt vời đối với bệnh nhồi máu cơ tim.

Hơn nữa, kết quả của các thử nghiệm so sánh với các phương pháp sử dụng khác với phương pháp cấy ghép cụm tế bào ADRC, tức là, với nhóm cấy ghép trong cơ tim trực tiếp (nhóm im) và nhóm cấy ghép trong lòng mạch của tâm thất trái (nhóm ic) ADRC vào các vùng quanh nhồi máu của vách trước tâm thất trái, nhóm A và AP có giá trị EF lớn đáng kể so với giá trị EF của các nhóm S, im, và ic (Fig.4A), có giá trị LVESd nhỏ hơn giá trị của các nhóm S, im, và ic (Fig.4A), và không có sự khác biệt đáng kể về LVEDd (Fig.4C). Các kết quả nêu trên chứng minh rằng việc cấy ghép cụm tế bào ADRC có hiệu quả điều trị cao trong điều trị nhồi máu cơ tim so với hiệu quả điều trị của phương pháp tiêm trực tiếp ADRC vào tế bào cơ tim hoặc động mạch vành.

(4) Ảnh hưởng lên mô cơ tim bằng việc cấy ghép cụm tế bào ADRC

Phép phân tích mô học được thực hiện vào ngày 14 và 56 sau khi cấy ghép cụm tế bào ADRC ở chuột trên mô hình nhồi máu cơ tim. Nhóm S không được điều trị cho thấy vách trước tâm thất trái rất mỏng (Fig.5A), trong khi nhóm A (Fig.5B) và nhóm AP (Fig.5C) được phát hiện là có vách trước tâm thất trái dày hơn so với vách trước tâm thất trái của nhóm S, nhóm im, và nhóm ic, và duy trì mô vách trước tâm thất trái (Fig.5D). Kết quả của việc định lượng kích thước nhồi máu, kích thước nhồi máu của nhóm A và nhóm AP có xu hướng nhỏ

hơn so với nhóm S, nhóm im, và nhóm ic, mặc dù không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Fig.5E). Hơn nữa, kết quả của phép đo mật độ mao mạch ở vùng quanh nhồi máu, nhóm A (Fig.5G) và nhóm AP (Fig.5H) thể hiện mật độ mao mạch cao hơn đáng kể so với mật độ mao mạch của nhóm S (Fig.5F), nhóm im, và nhóm ic (Fig.5I).

(5) Tác dụng bảo vệ tim bởi cụm tế bào ADRC

Phép phân tích mô học được thực hiện vào ngày 14 và 56 sau khi cấy ghép cụm tế bào ADRC vào chuột trên mô hình nhồi máu cơ tim. Đường kính tế bào ở vùng quanh nhồi máu của mỗi nhóm được phát hiện bằng phép nhuộm màu hematoxylin-eosin (Fig.6A đến Fig.6C) và nhuộm màu PAS (Fig.6D đến Fig.6F), và đường kính ngắn của tế bào trong nhóm A và nhóm AP có giá trị thấp hơn đáng kể so với đường kính ngắn của tế bào trong nhóm S, nhóm im, và nhóm ic (Fig.6G). Các kết quả nêu trên đưa ra giả thuyết rằng có khả năng là việc cấy ghép cụm tế bào ADRC có thể có tác dụng bảo vệ như chống chết tế bào theo chương trình trên các tế bào cơ tim còn lại.

(6) Hiệu quả chống chết tế bào theo chương trình và chống viêm bởi cụm tế bào ADRC

Fig.7 thể hiện các kết quả của nghiên cứu về hiệu quả bảo vệ cơ tim và chống viêm trên mô cơ tim vào ngày 56 sau khi cấy ghép cụm tế bào ADRC. Mức độ phiên mã của quá trình tạo mạch mới và xytokin bảo vệ cơ tim ở vùng quanh nhồi máu của mỗi nhóm được đánh giá. Kết quả là, mức phiên mã của adiponectin (APN) ở ngoại biên vùng nhồi máu trong nhóm AP là cao hơn đáng kể so với trong các nhóm khác (Fig.7A). Ngoài ra, nhóm A có mức phiên mã APN cao hơn đáng kể so với nhóm S. Không có sự khác biệt đáng kể về mức phiên mã của các yếu tố khác Adipo-R1, Adipo-R2, CDH-13, VEGF, và TNF- α (Fig.7B đến Fig.7F). Phát hiện nêu trên đưa ra giả thuyết về khả năng bổ sung PGZ vào cụm tế bào ADRC có thể làm tăng thêm hiệu quả cải thiện đối với chức năng tim sau nhồi máu cơ tim.

(7) Ghép và tạo ra APN của cụm tế bào ADRC trên vùng nhồi máu cơ tim

Cụm tế bào ADRC được cấy ghép vào vách trước tâm thất trái của chuột

trên mô hình nhồi máu cơ tim được ghép thành công lên vùng sẹo ở vách trước tâm thất trái vào ngày 28 sau khi cấy ghép (Fig.8A), và thể hiện adiponectin dương tính ở vị trí cấy ghép (Fig.8B). Điều này đưa ra giả thuyết là cụm tế bào đã cấy ghép thành công tiết ra adiponectin liên tục. Ngoài ra, ở các nhóm, là các đích so sánh, được điều trị bằng cách cấy ghép ADRC trong cơ tim (Fig.8C) và trong lòng mạch (Fig.8D), việc ghép thành công ở tế bào cơ tim cũng được quan sát vào ngày 3 sau khi cấy ghép.

Ví dụ 2

Để phân tích các tế bào cấu thành của ADRC, các kháng nguyên bề mặt tế bào được phân tích bằng cách sử dụng kỹ thuật phân tích tế bào theo dòng chảy (kỹ thuật phân tách tế bào hoạt hóa huỳnh quang (FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting)). ADRC vừa mới điều chế được chiết tách từ mô mỡ bằng phương pháp mô tả trong ví dụ 1 được tạo huyền phù trong dung dịch nhuộm FACS (dung dịch nước muối được tạo đệm phosphat được bổ sung huyết thanh bào thai bò 5%). Phép phân tích này sử dụng các kháng thể của chuột nhất kháng lại CD11b, CD31, CD45, CD73, và CD90 làm chất đánh dấu kháng nguyên bề mặt, và isotyp IgG1 của chuột nhất tương ứng làm chất đánh dấu âm tính. Các tế bào được nhuộm trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, rửa và sau đó phân tích bằng cách sử dụng kỹ thuật phân tích tế bào theo dòng chảy (BD FACS cant II instrument (BD Biosciences, San Jose, CA)).

Kết quả là, các tế bào cấu thành của ADRC chủ yếu là tế bào gốc trung mô/tế bào tiền thân trung mô (CD90+, CD31-, CD45-, và CD73+), tế bào nội mô (CD90+, CD31+, và CD45-), tế bào cơ trơn mạch (CD90-, CD31-, và CD45-), và tế bào tạo huyết (CD90+/-, CD31-, và CD45+). Tỷ lệ cấu thành gần đúng được thể hiện trong bảng 1. Cụ thể là, chứa 6,5% tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ mô mỡ.

Bảng 1

Loại tế bào	Tỷ lệ cấu thành
Tế bào gốc trung mô/tế bào tiền thân trung mô (CD90+, CD31-, CD45-, CD73+)	6,5%
Tế bào cơ trơn mạch (CD90-, CD31-, CD45-)	13,2%
Tế bào nội mô mạch (CD90+, CD31-, CD45-)	5,6%
Tế bào tạo huyết (CD90+/-, CD31-, CD45+)	26,5%

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Như đã đề cập đến ở trên, vật liệu cấy ghép theo sáng chế bao gồm cụm tế bào trong đó các tế bào đã được phân lập được làm cho bám dính vào với nhau, và có thể được tạo ra một cách dễ dàng trong một khoảng thời gian ngắn. Hơn nữa, vật liệu cấy ghép này tiết ra adiponectin, và có hiệu quả điều trị tuyệt vời trong điều trị bệnh tim. Do đó, sáng chế có thể góp phần rất lớn vào sự phát triển chăm sóc y tế nhờ biện pháp cấy ghép chủ yếu đối với bệnh tim.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vật liệu cấy ghép để điều trị bệnh tim bao gồm cụm tế bào,

trong đó cụm tế bào này là các tế bào đã được phân lập bám dính vào với nhau bằng chất kết dính chứa fibrinogen, và

trong đó các tế bào đã được phân lập được chọn từ nhóm bao gồm tế bào tái sinh có nguồn gốc từ mỡ, tế bào tái sinh có nguồn gốc từ tủy xương, tế bào tái sinh có nguồn gốc từ dây rốn, tế bào tái sinh có nguồn gốc từ cơ trơn, tế bào gốc có khả năng phát triển thành nhiều loại tế bào khác nhau, tế bào tái sinh có nguồn gốc từ tế bào gốc có khả năng phát triển thành nhiều loại tế bào khác nhau, và tế bào nội mô mạch.

2. Vật liệu cấy ghép theo điểm 1, trong đó các tế bào đã được phân lập là tế bào tái sinh có nguồn gốc từ mỡ được xử lý bằng chất chủ vận thụ thể hoạt hóa chất tăng sinh peroxisom gama (PPAR γ).

3. Vật liệu cấy ghép theo điểm 1 hoặc 2, trong đó tế bào đã được phân lập là tế bào không được nuôi cấy.

Fig. 1A

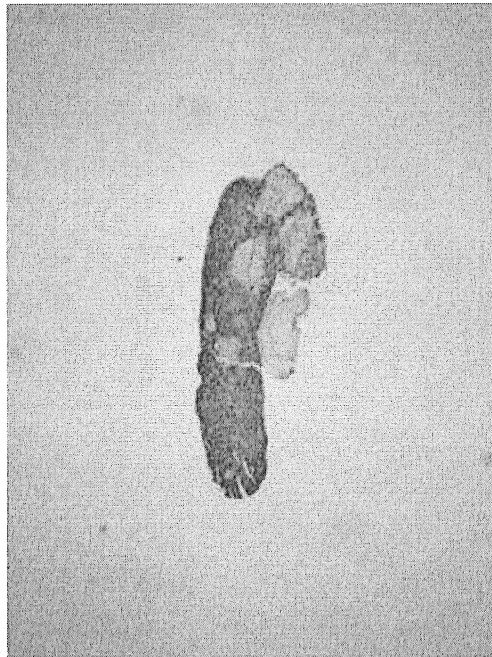
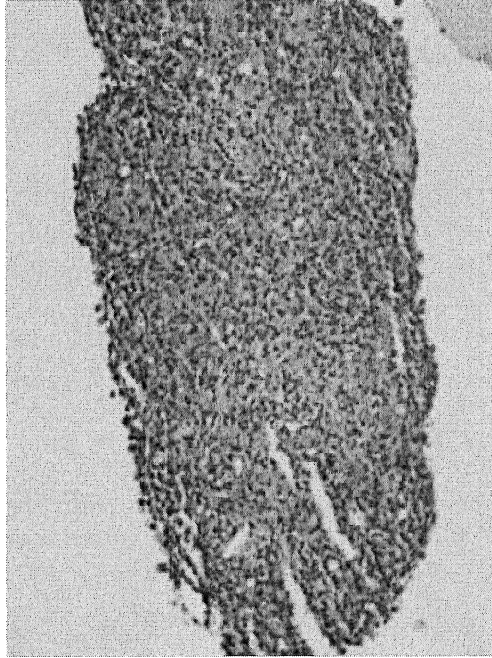


Fig. 1B

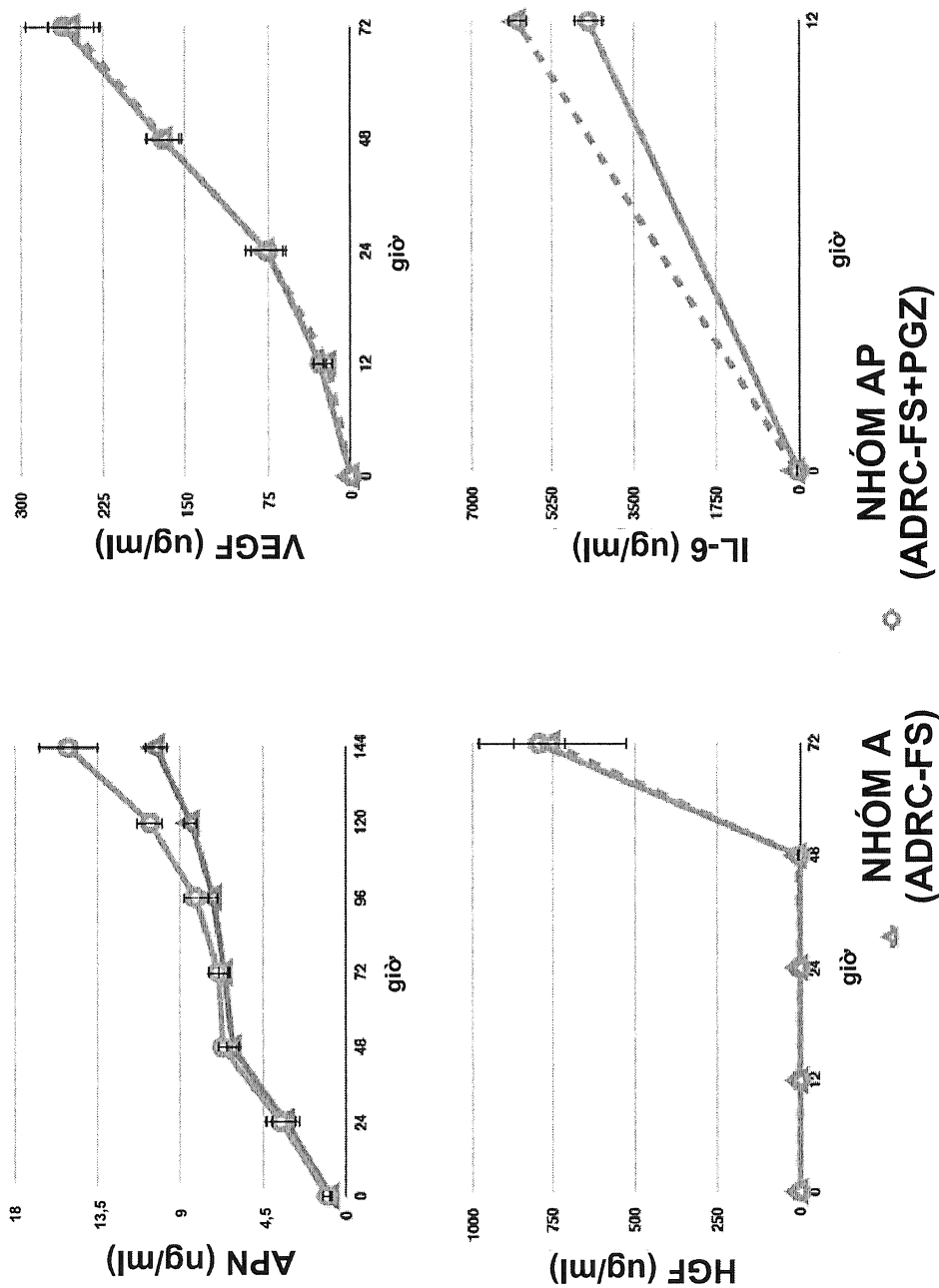


Fig. 1C

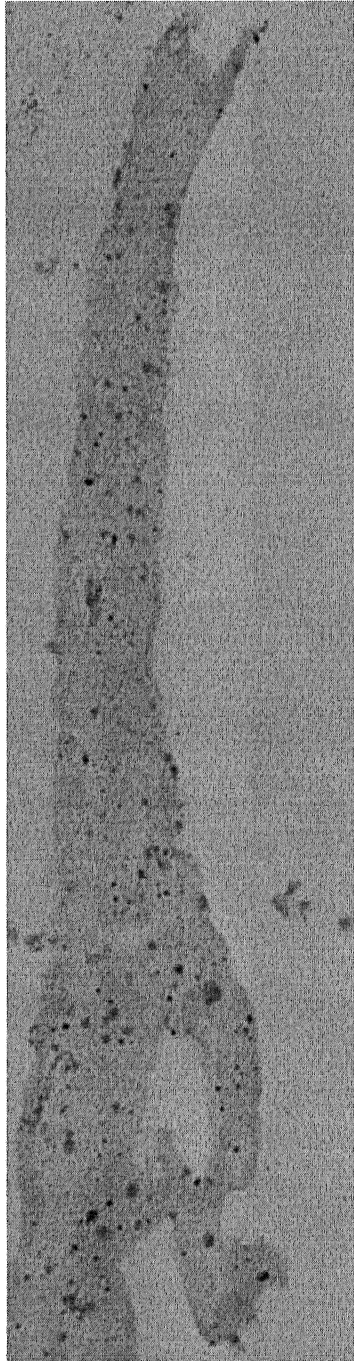


Fig. 2A

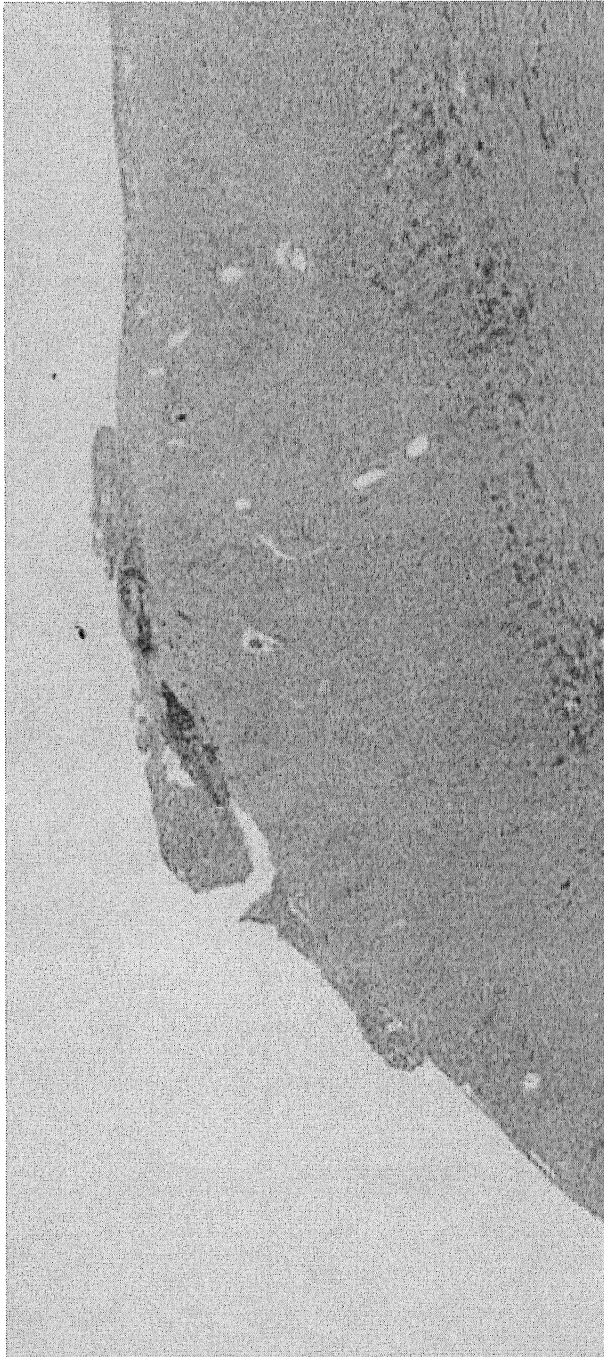


Fig. 2B

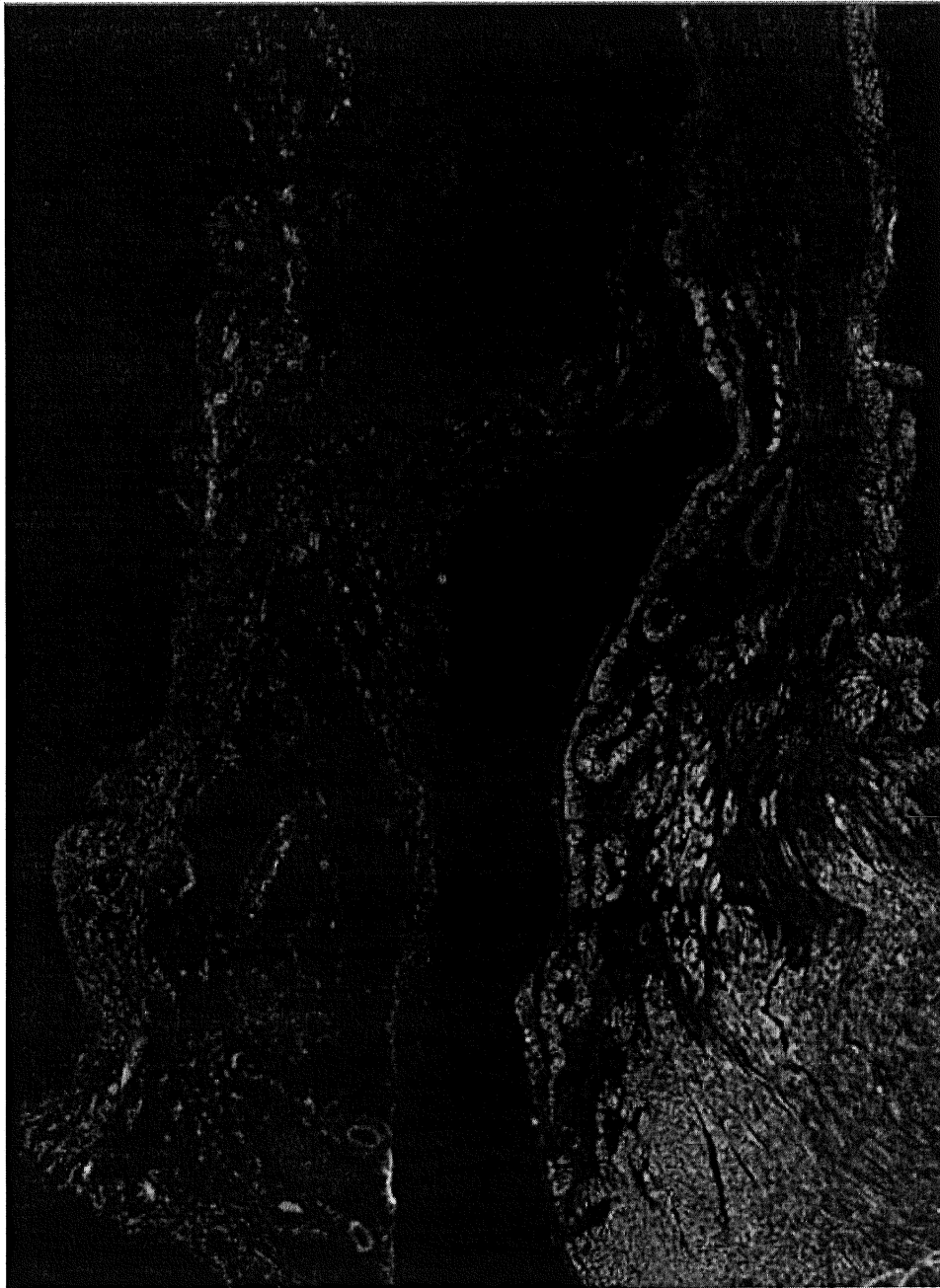


Fig. 3A

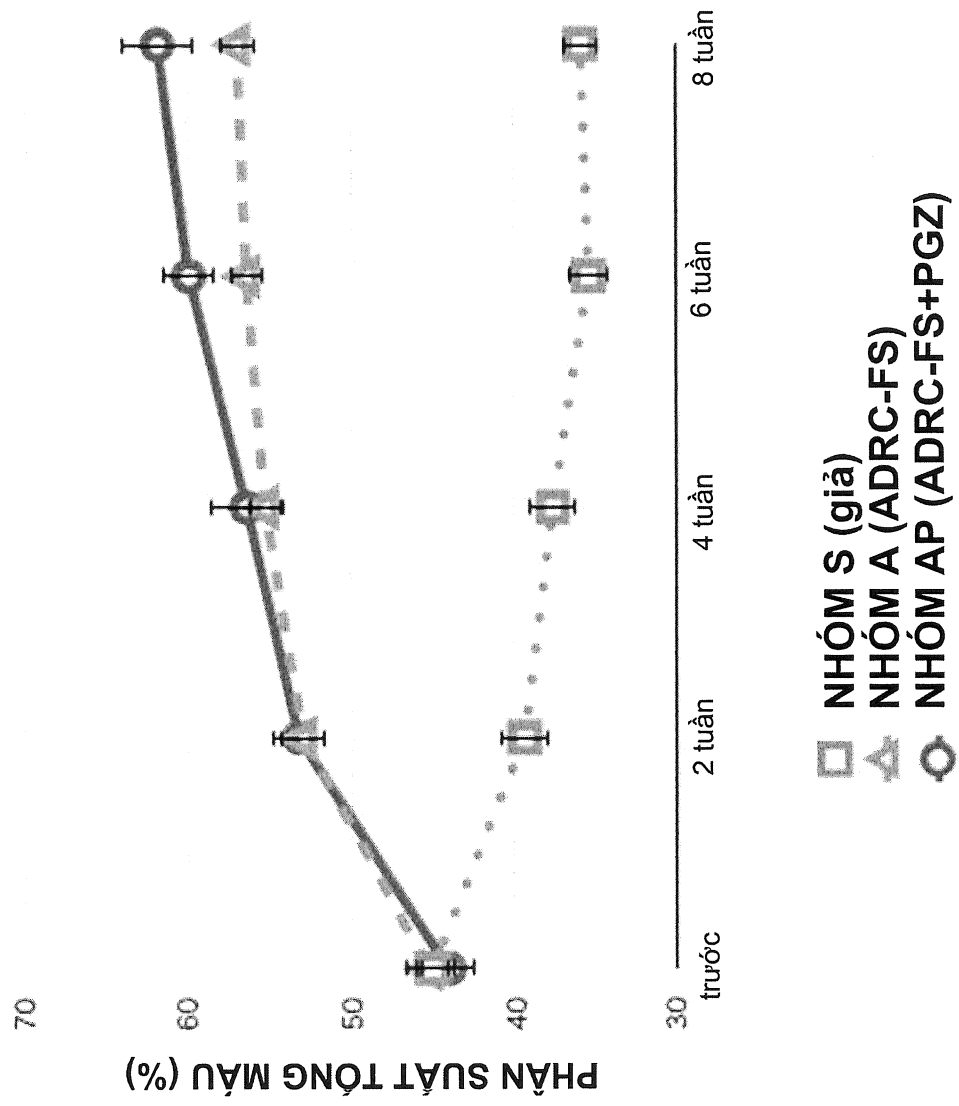


Fig. 3B

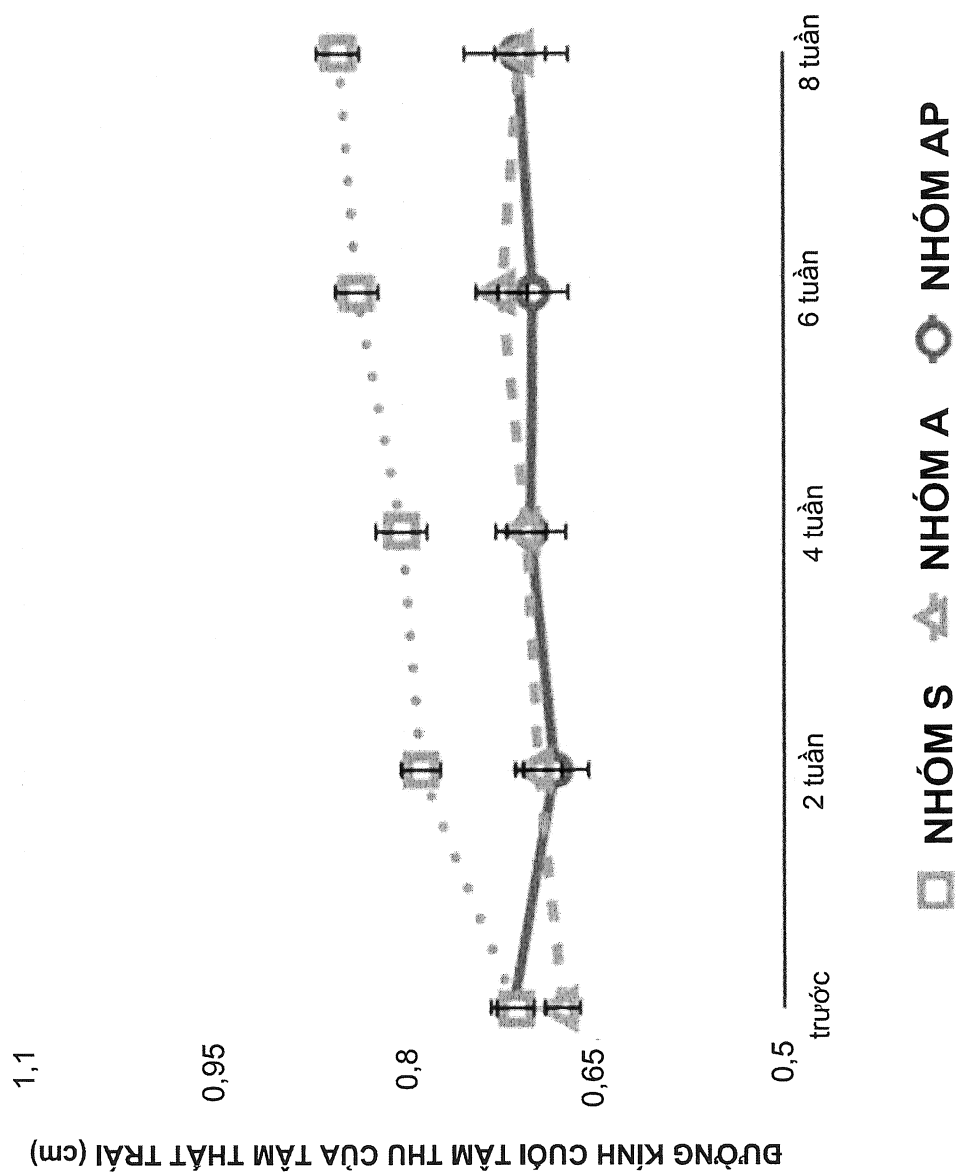


Fig. 3C

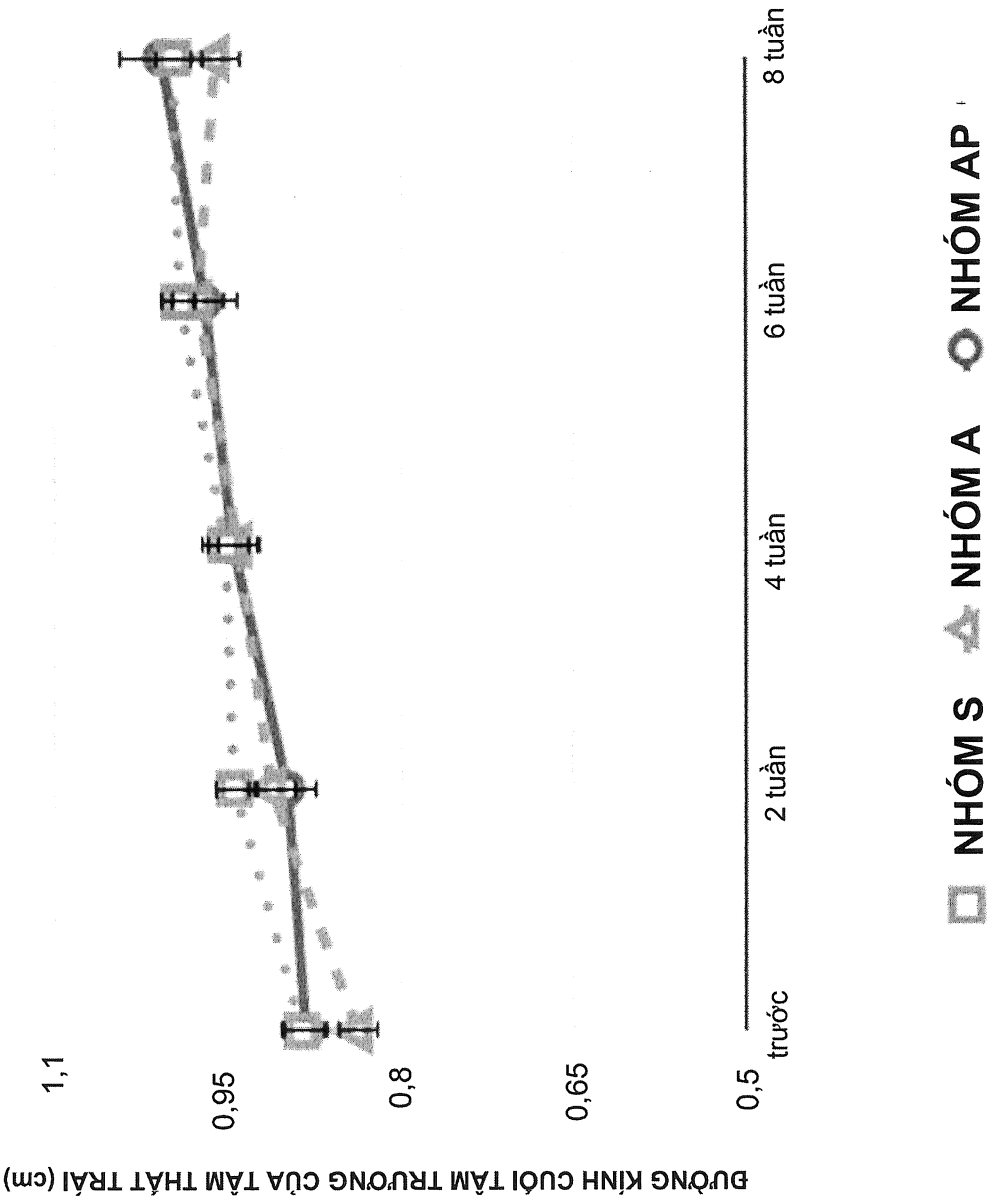


Fig. 3D

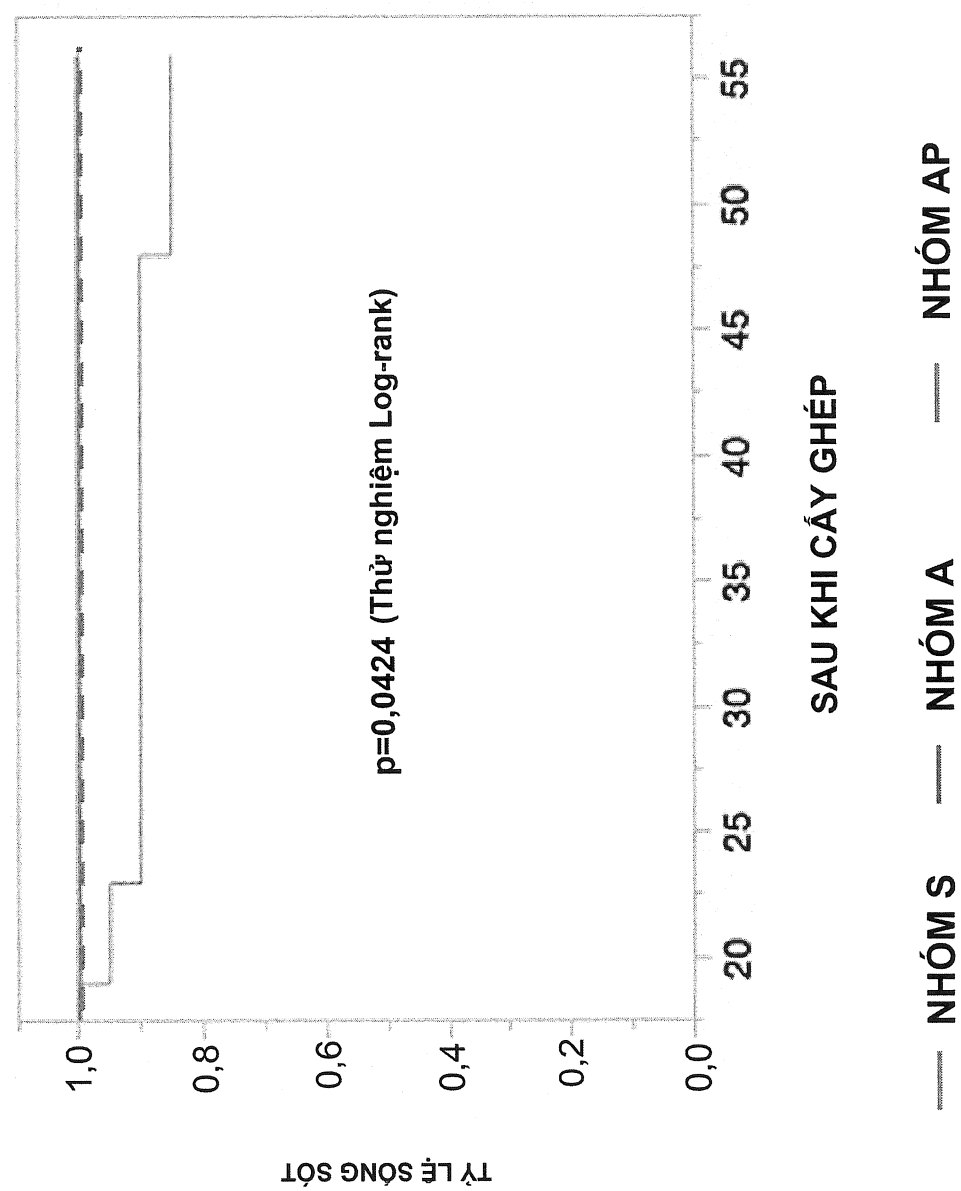


Fig. 4A

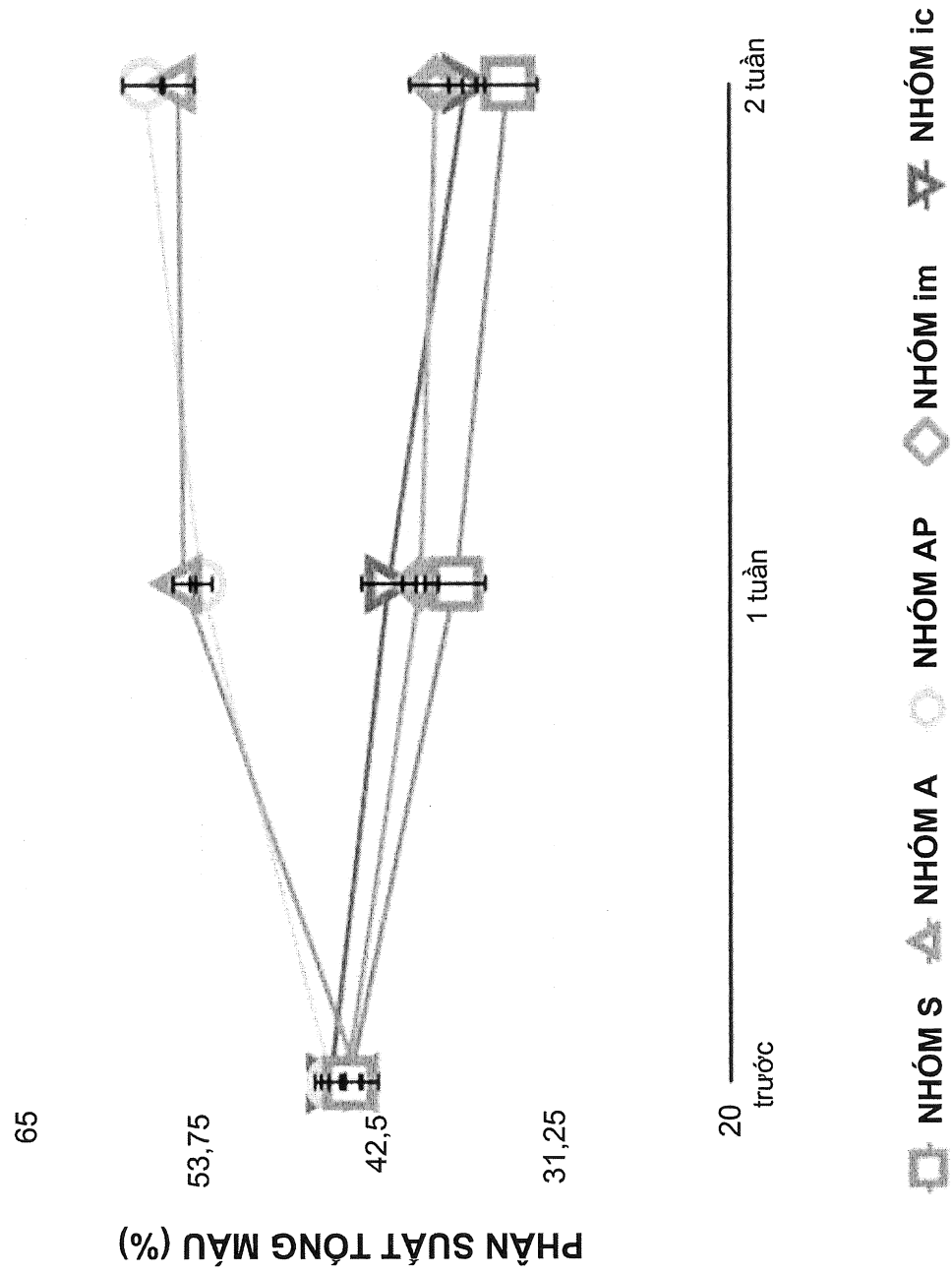


Fig. 4B

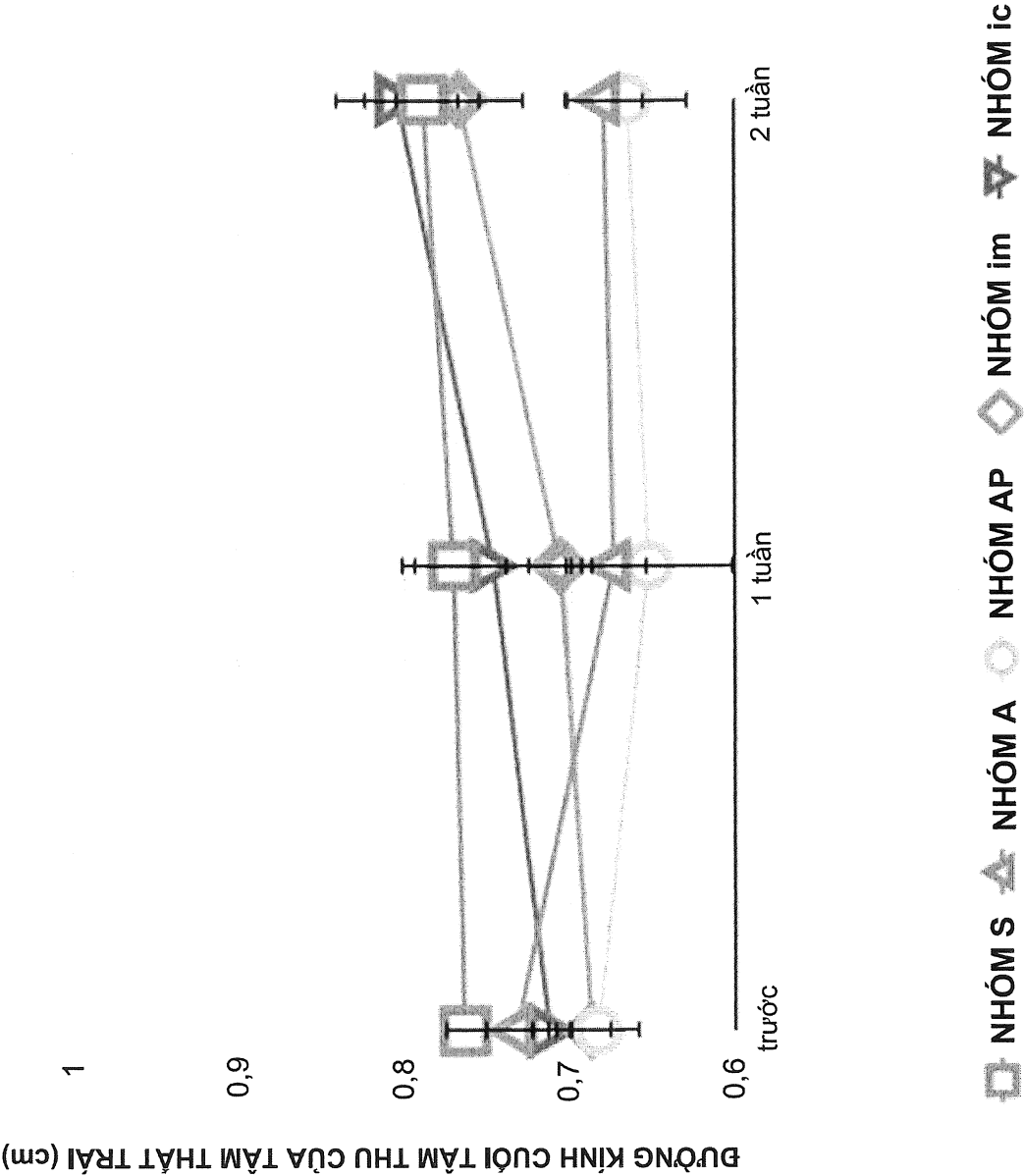


Fig. 4C

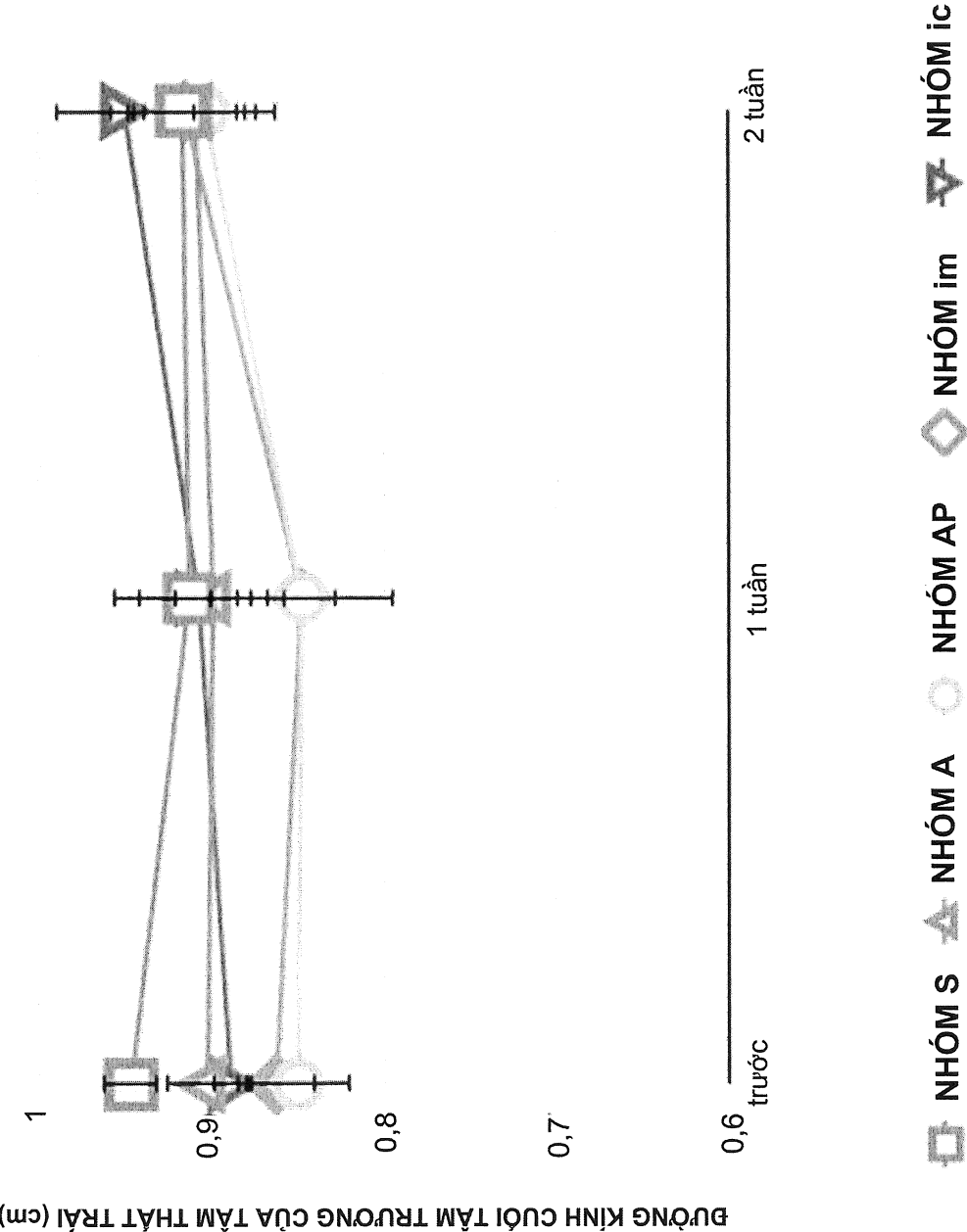


Fig. 5A

**NHÓM S**

Fig. 5B

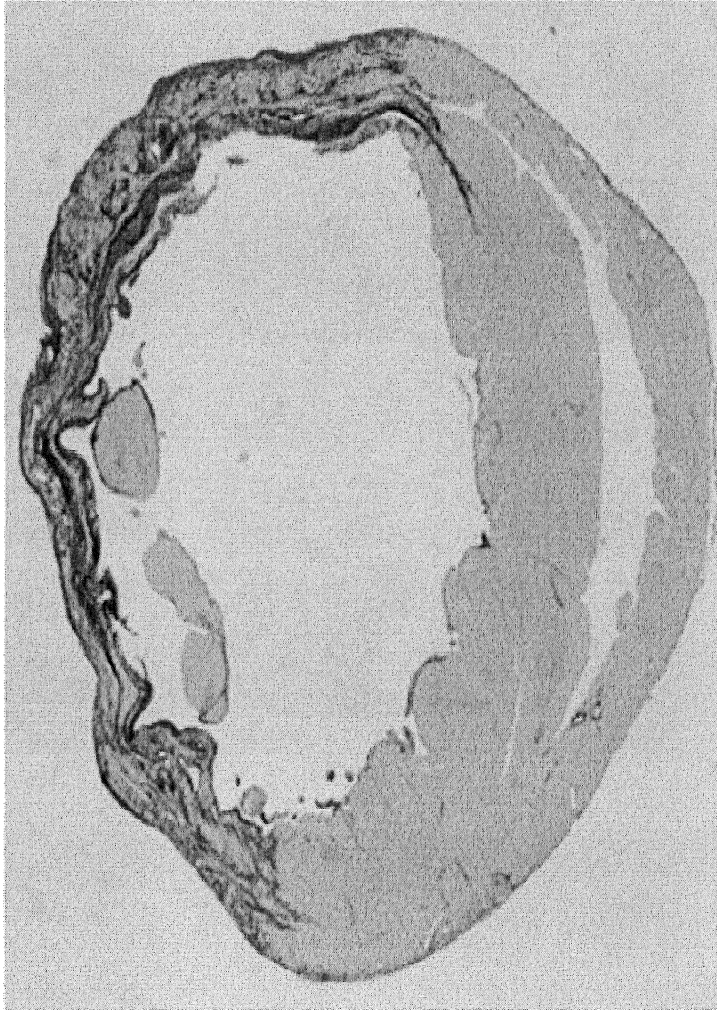
**NHÓM A**

Fig. 5C



NHÓM AP

Fig. 5D

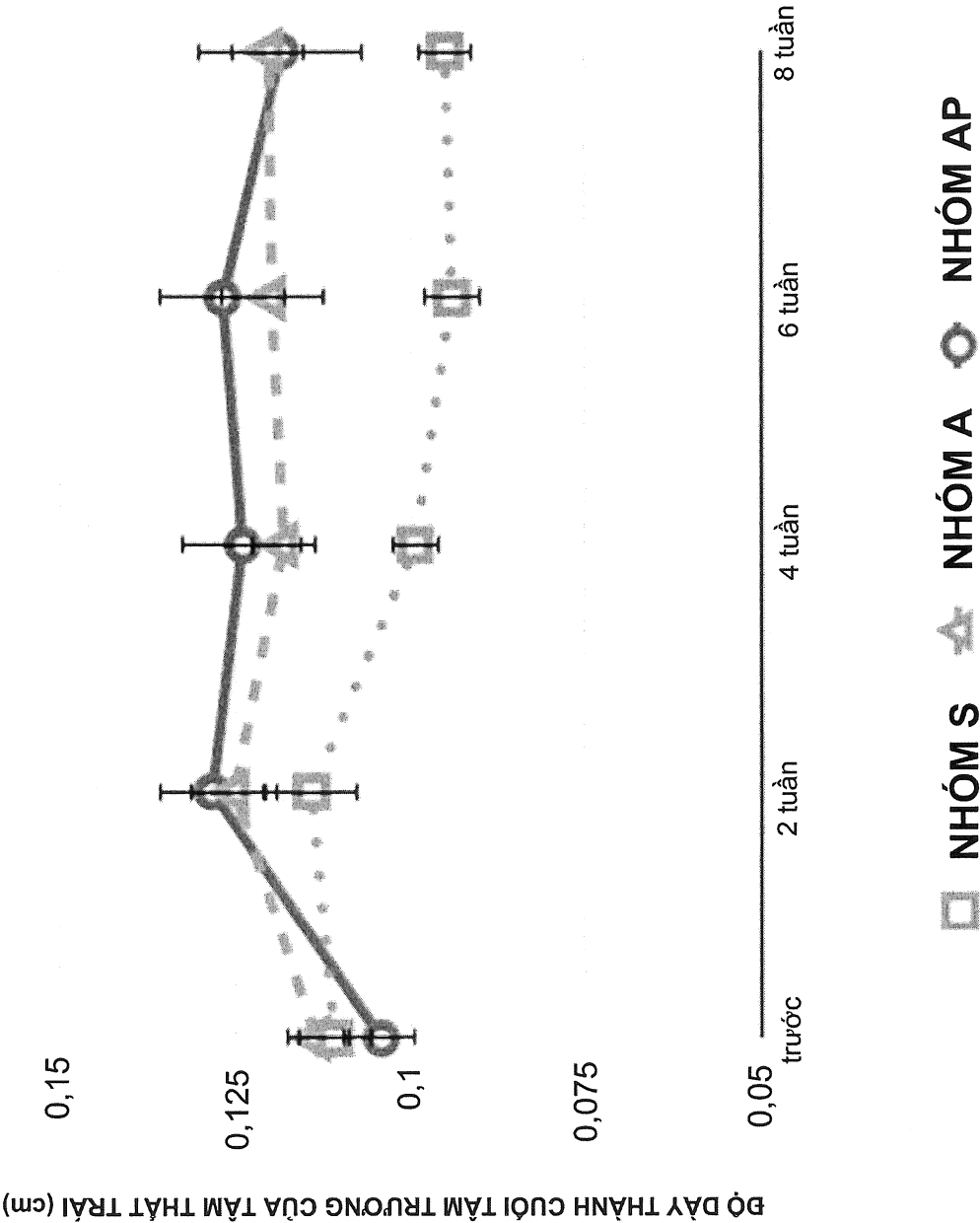


Fig. 5E

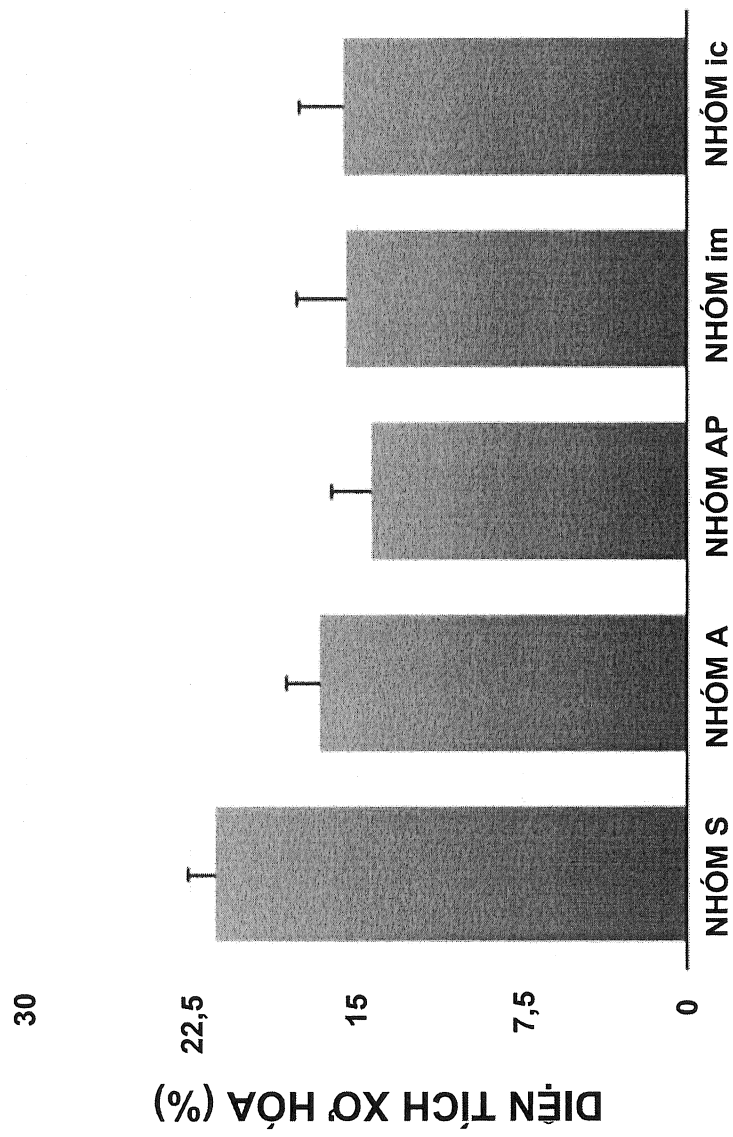


Fig. 5F

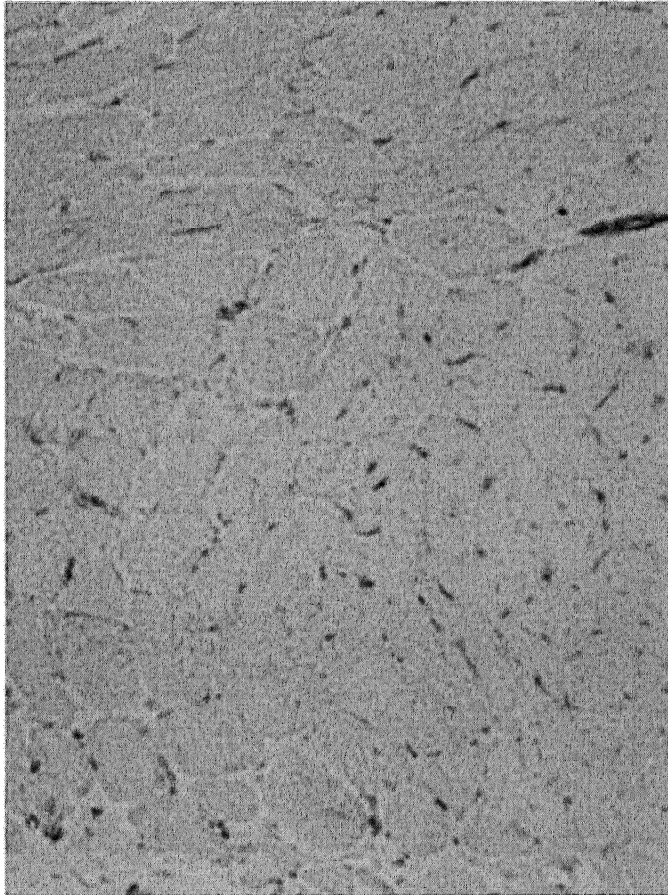
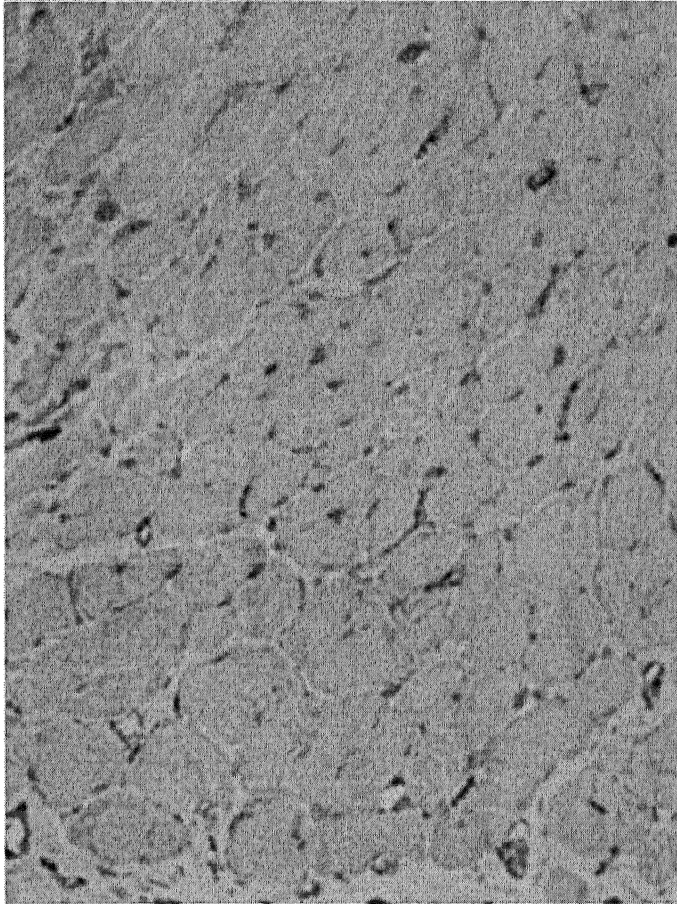
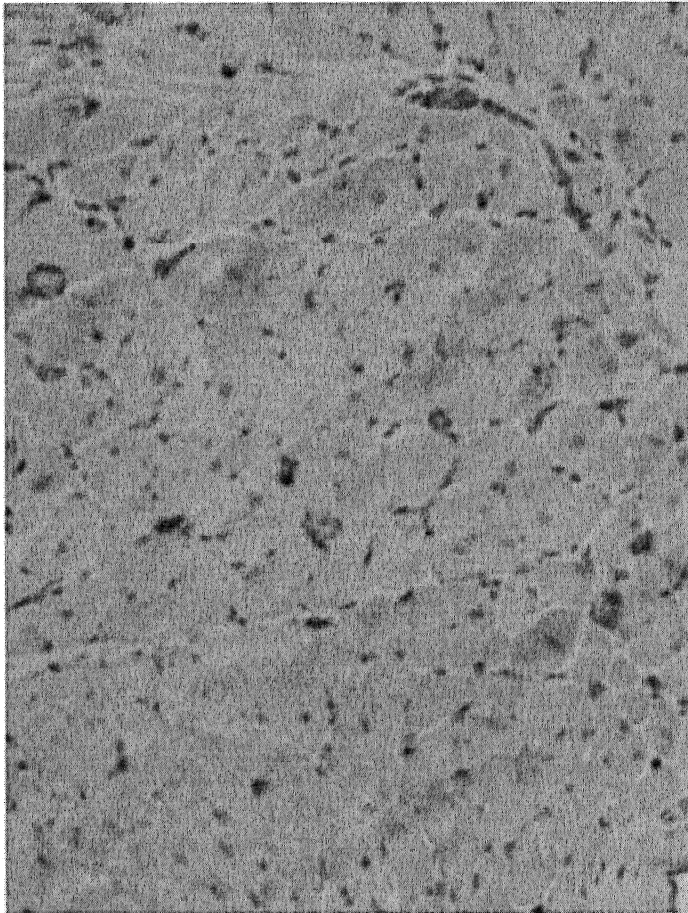
**NHÓM S**

Fig. 5G



NHÓM A

Fig. 5H



NHÓM AP

Fig. 5I

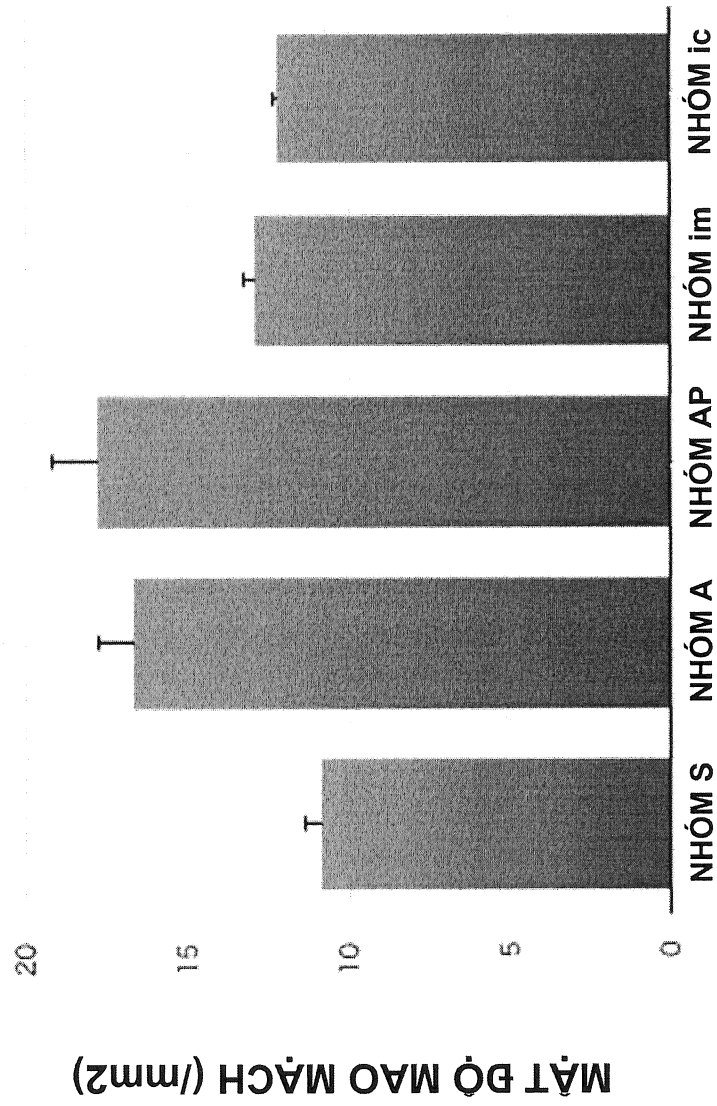


Fig. 6A

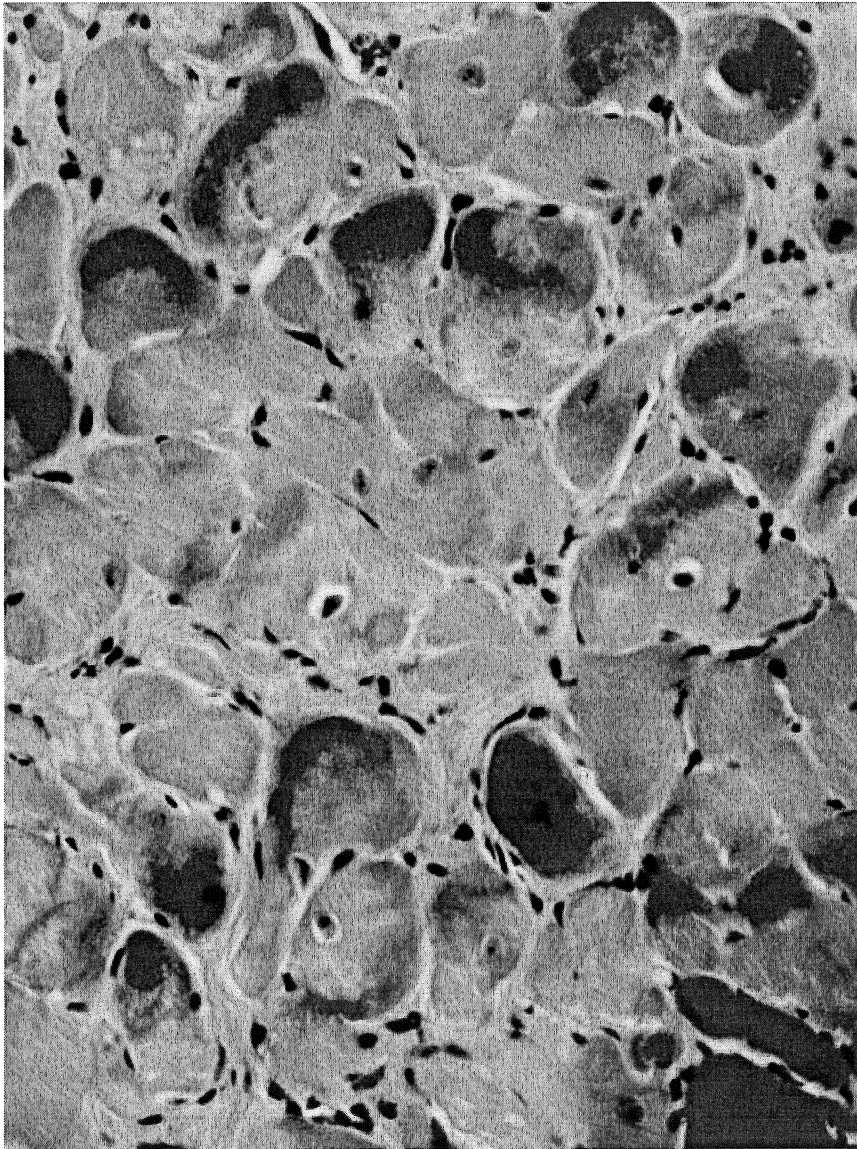
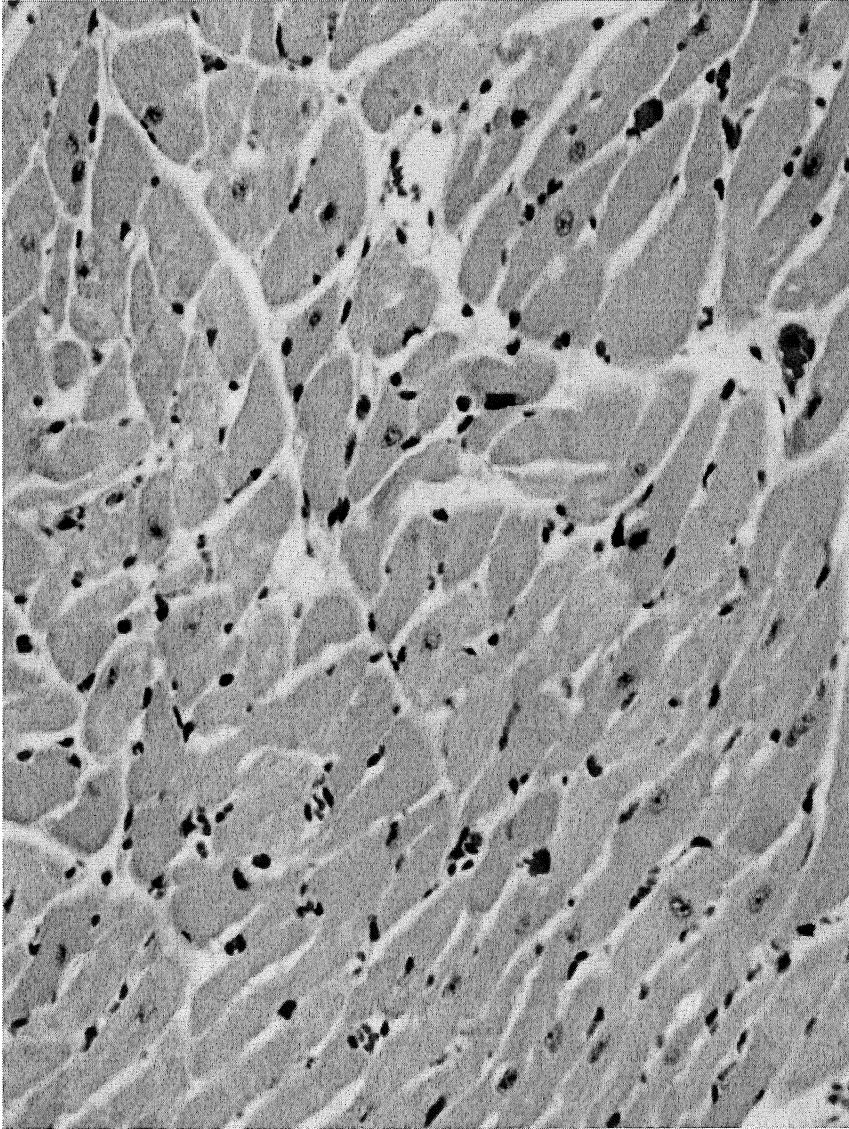
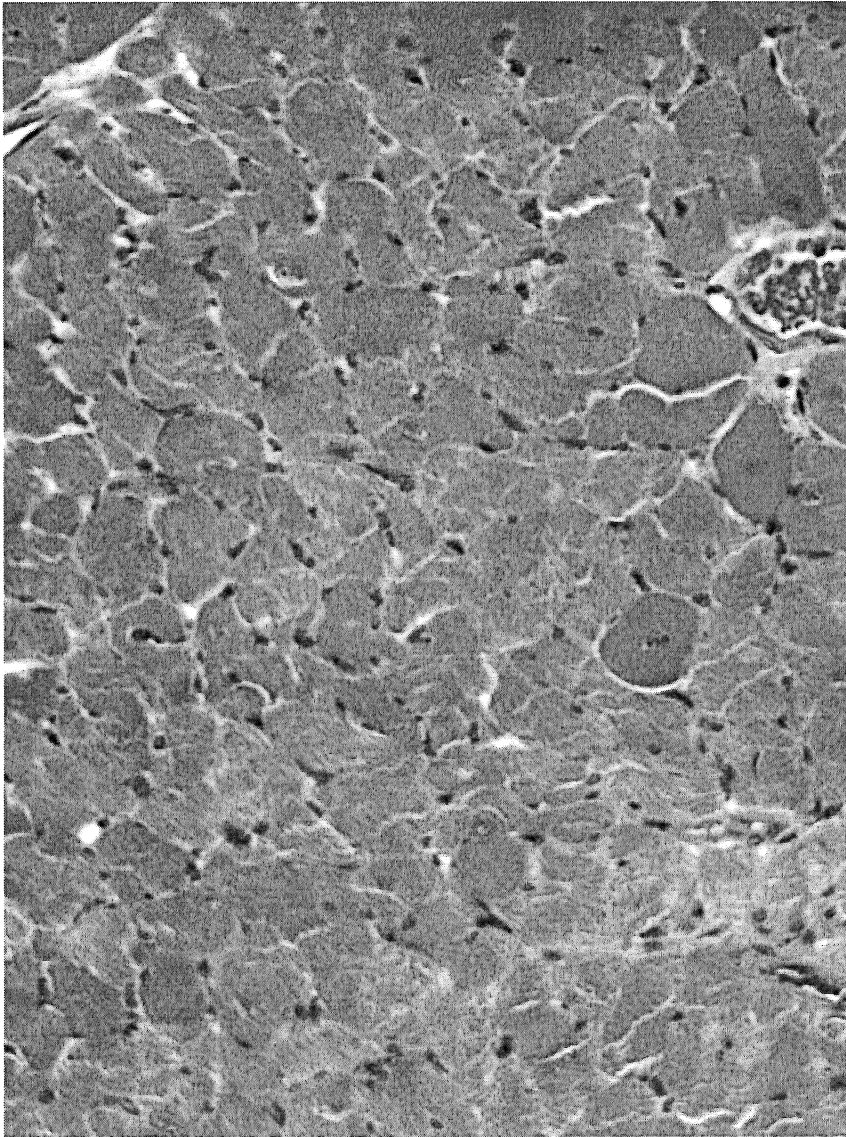
**NHÓM S**

Fig. 6B



NHÓM A

Fig. 6C



NHÓM AP

Fig. 6D

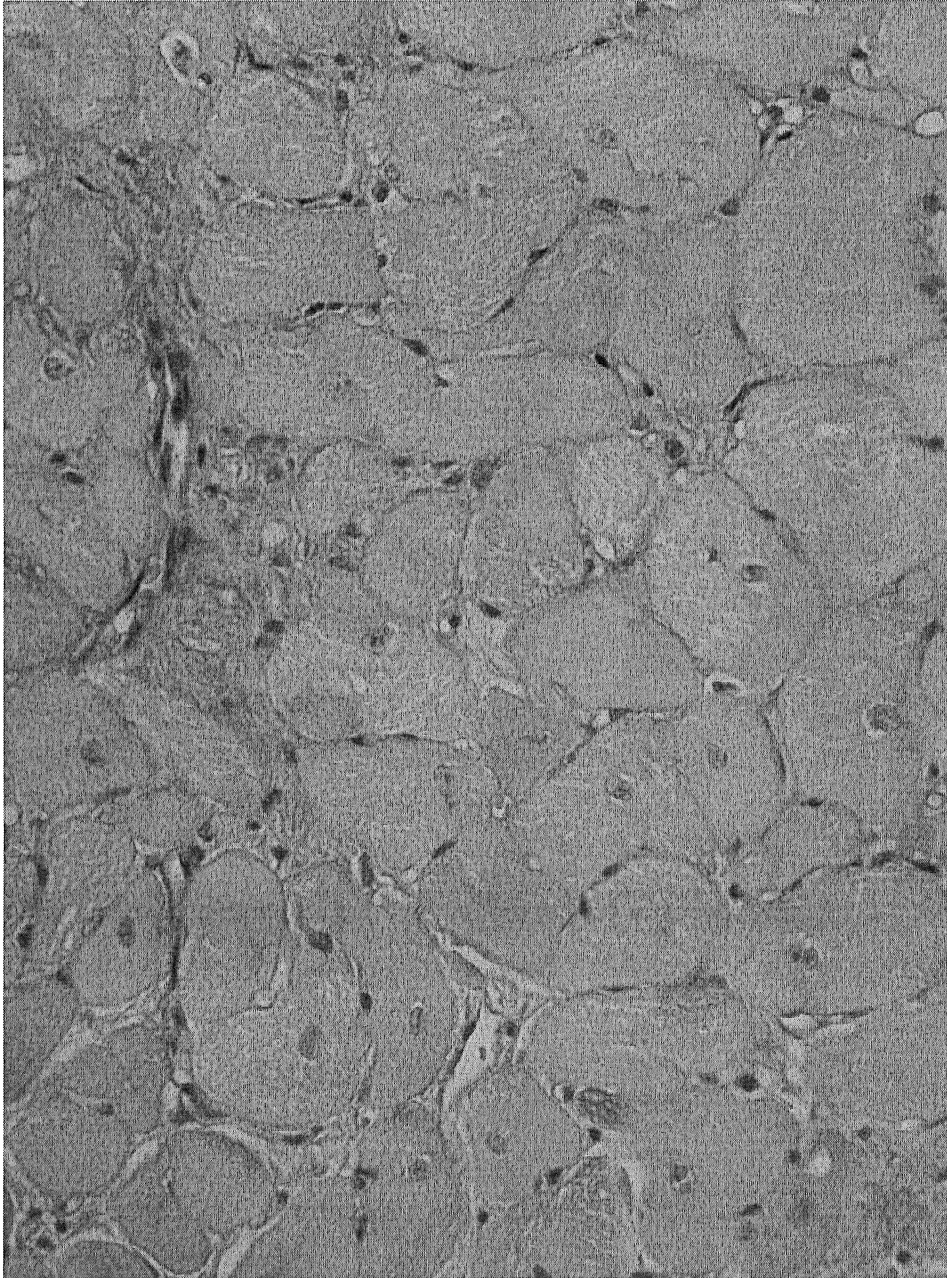


Fig. 6E

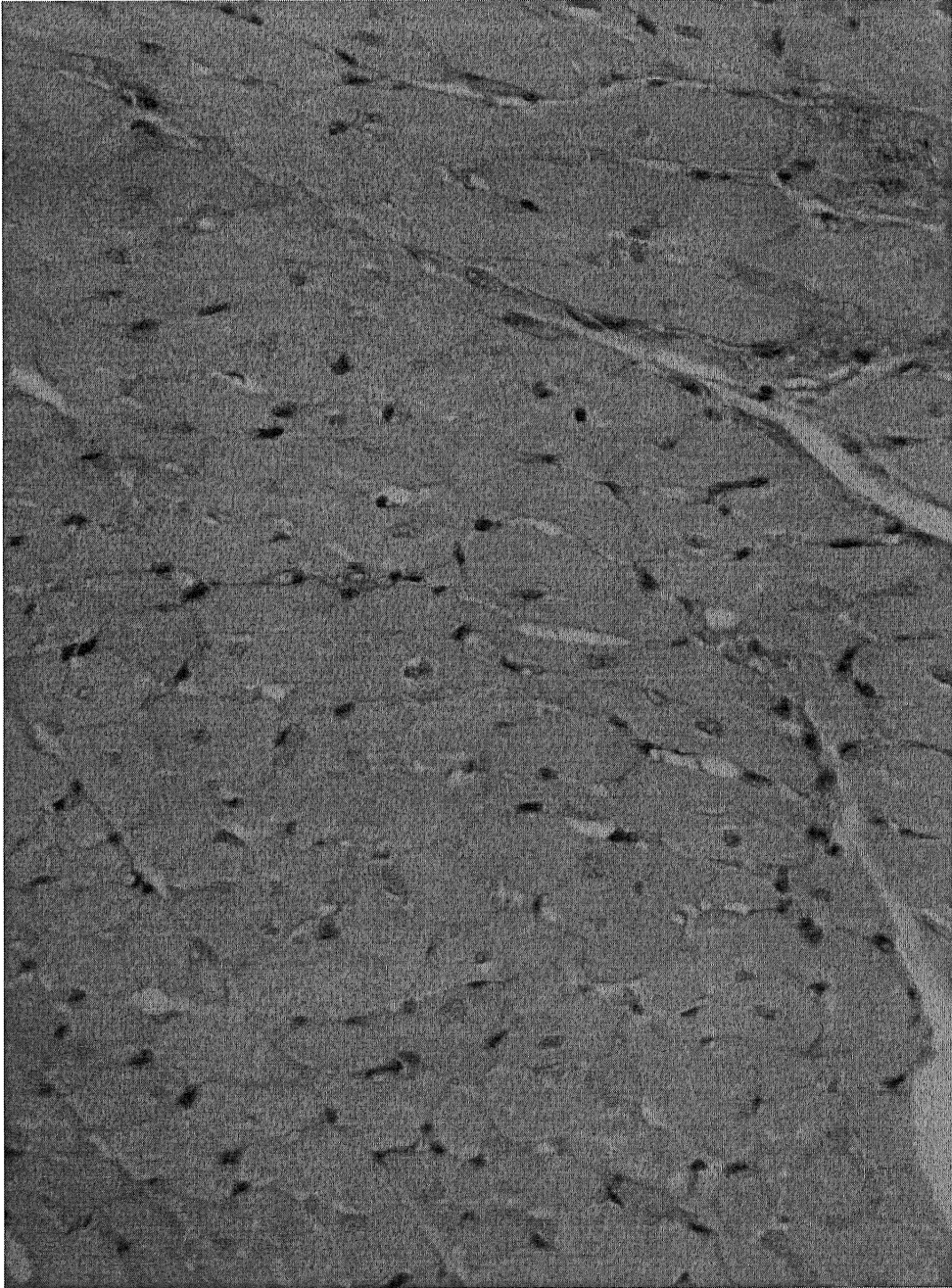


Fig. 6F

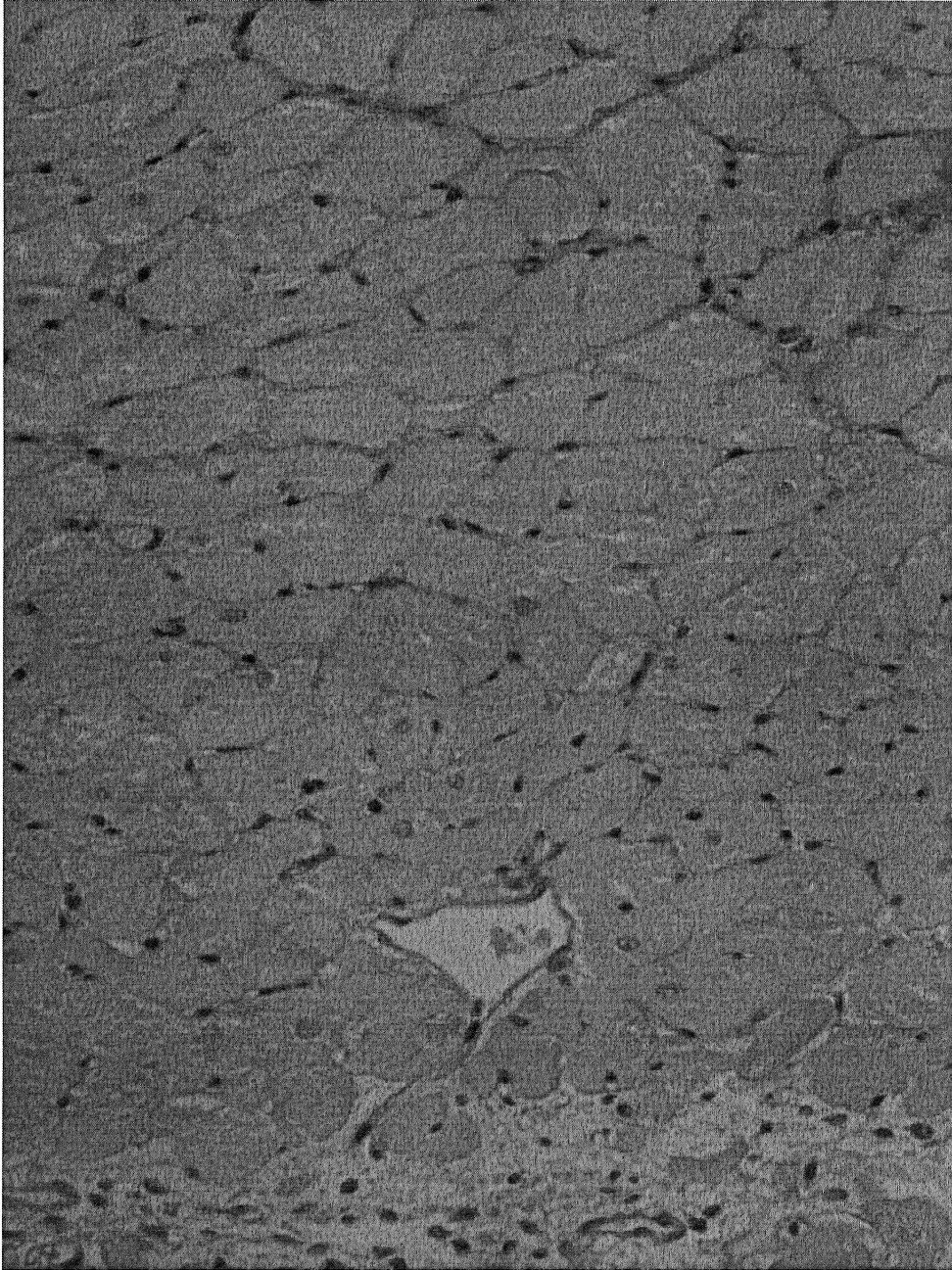


Fig. 6G

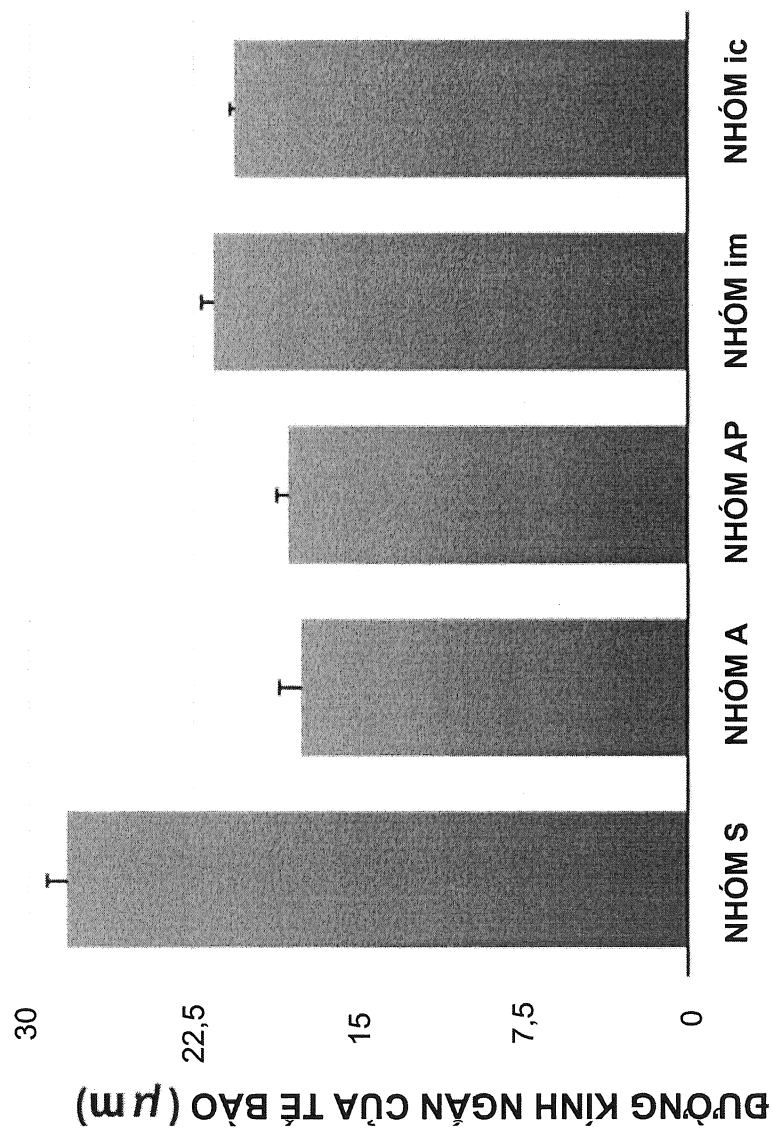


Fig. 7A

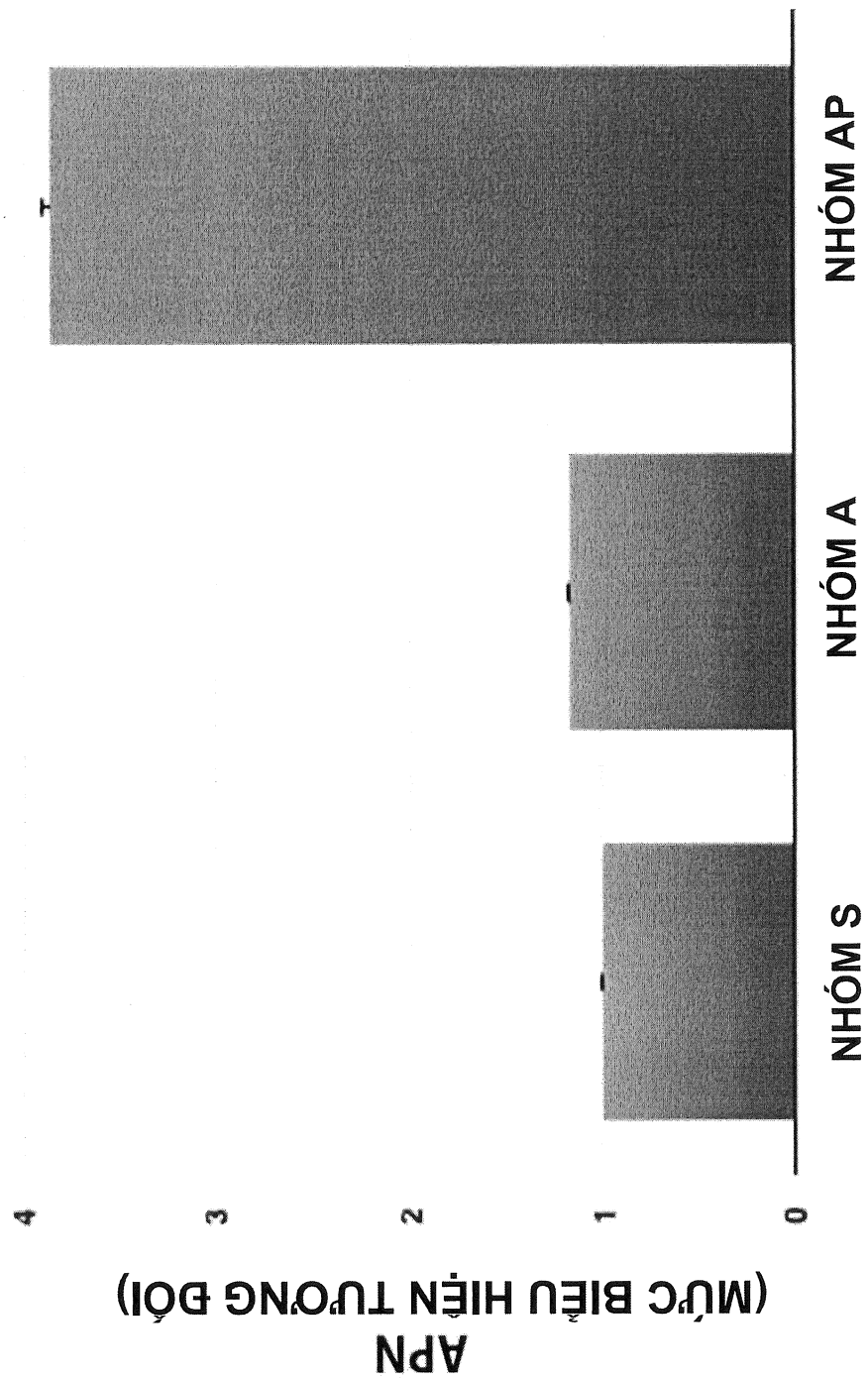


Fig. 7B

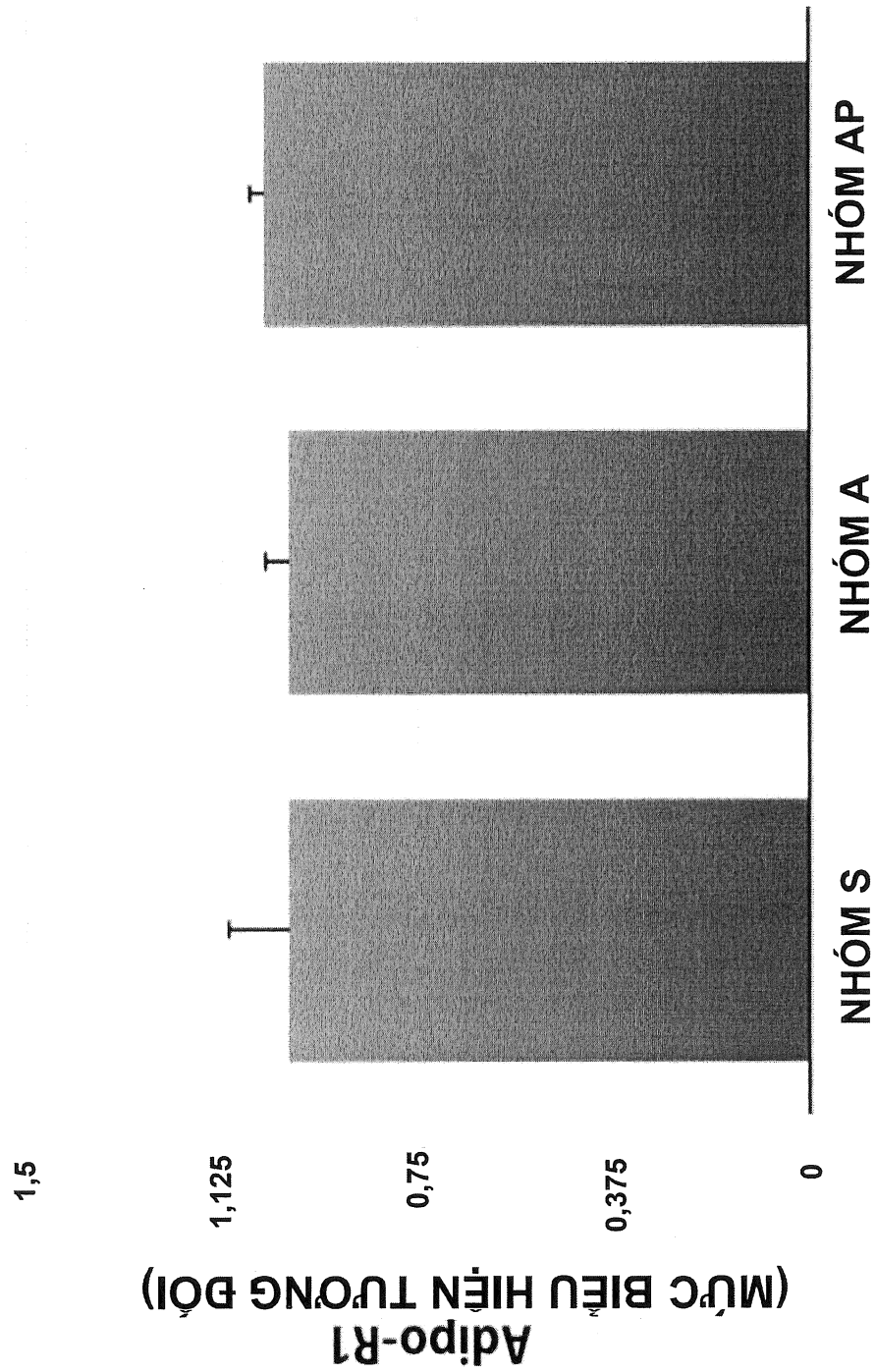


Fig. 7C

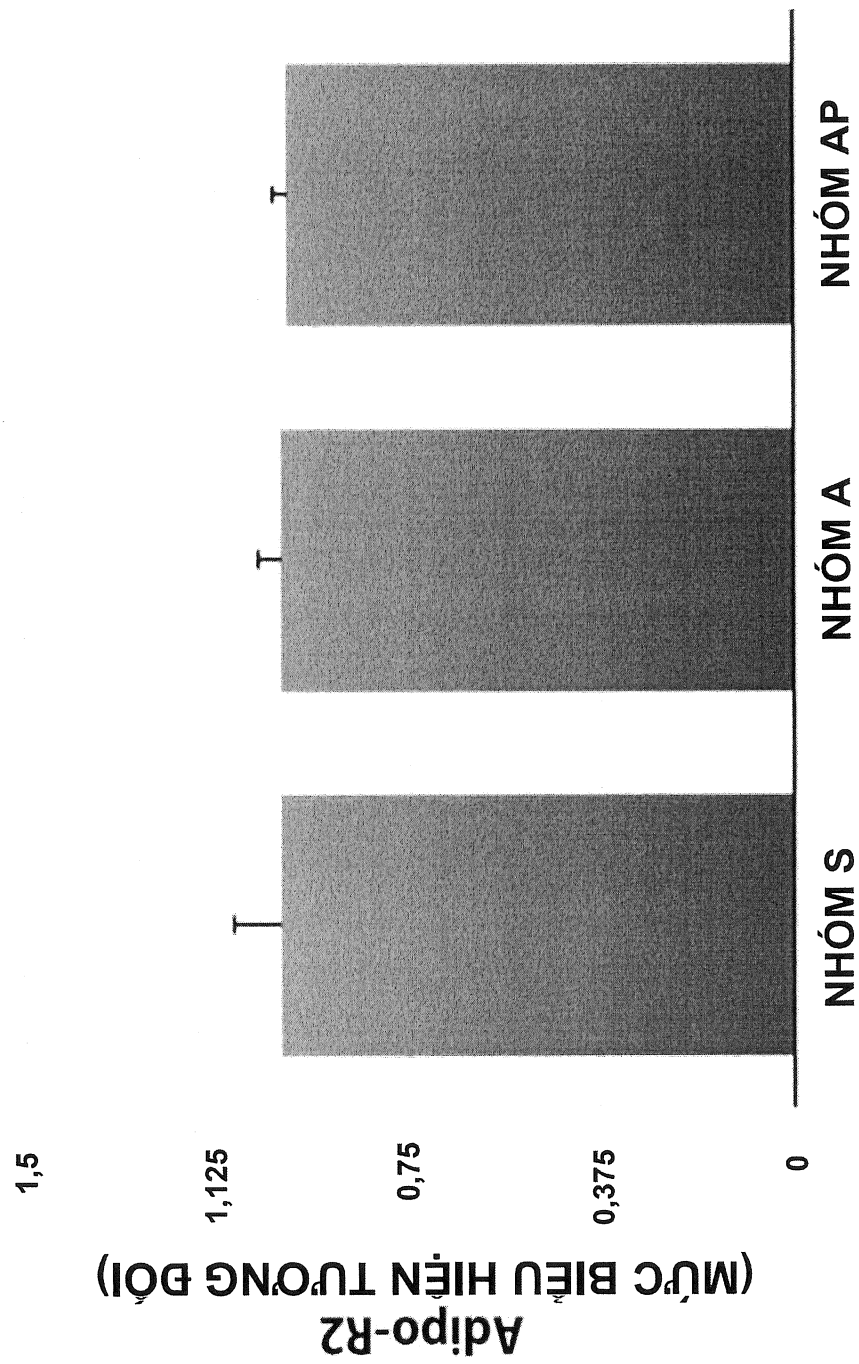


Fig. 7D

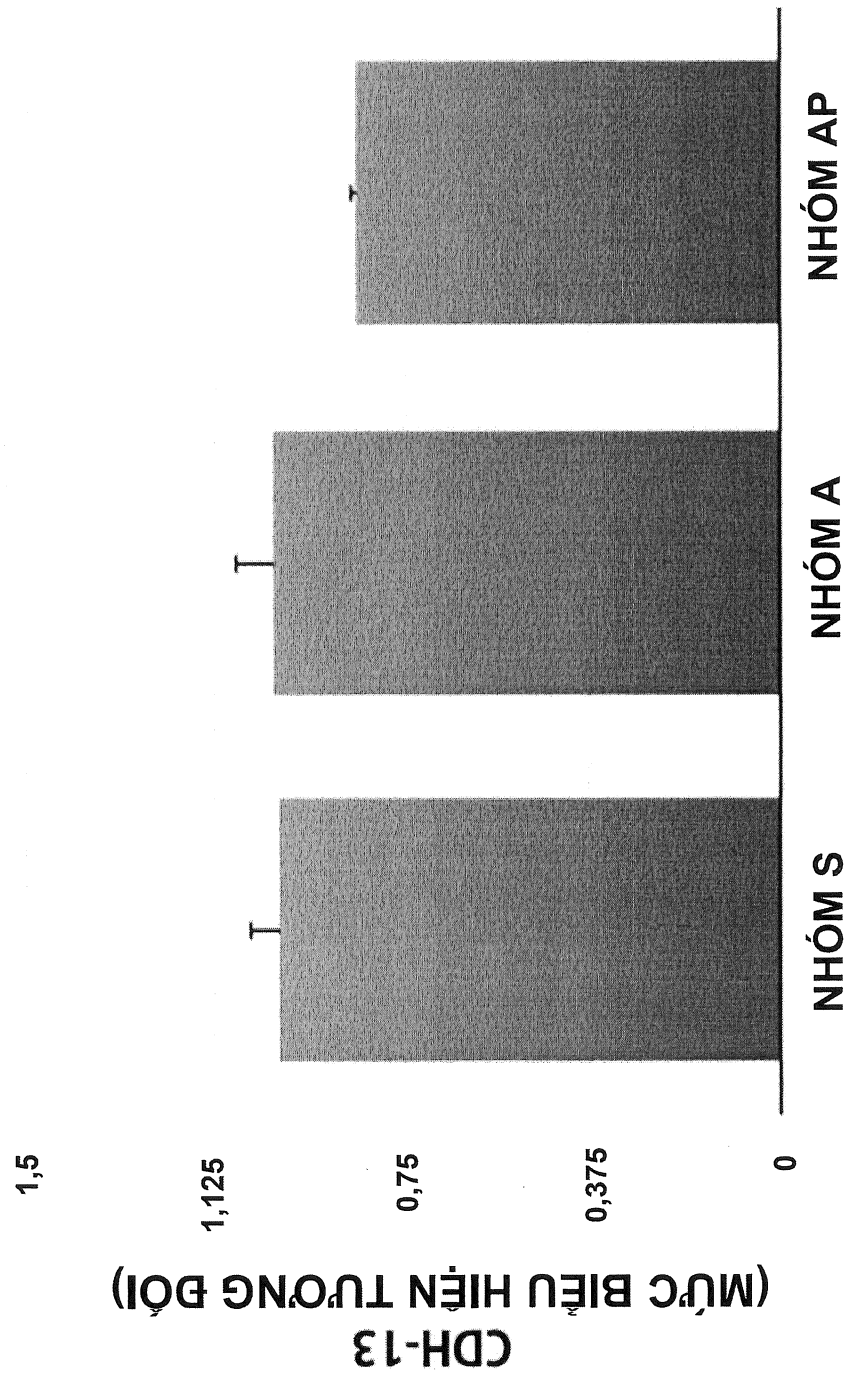


Fig. 7E

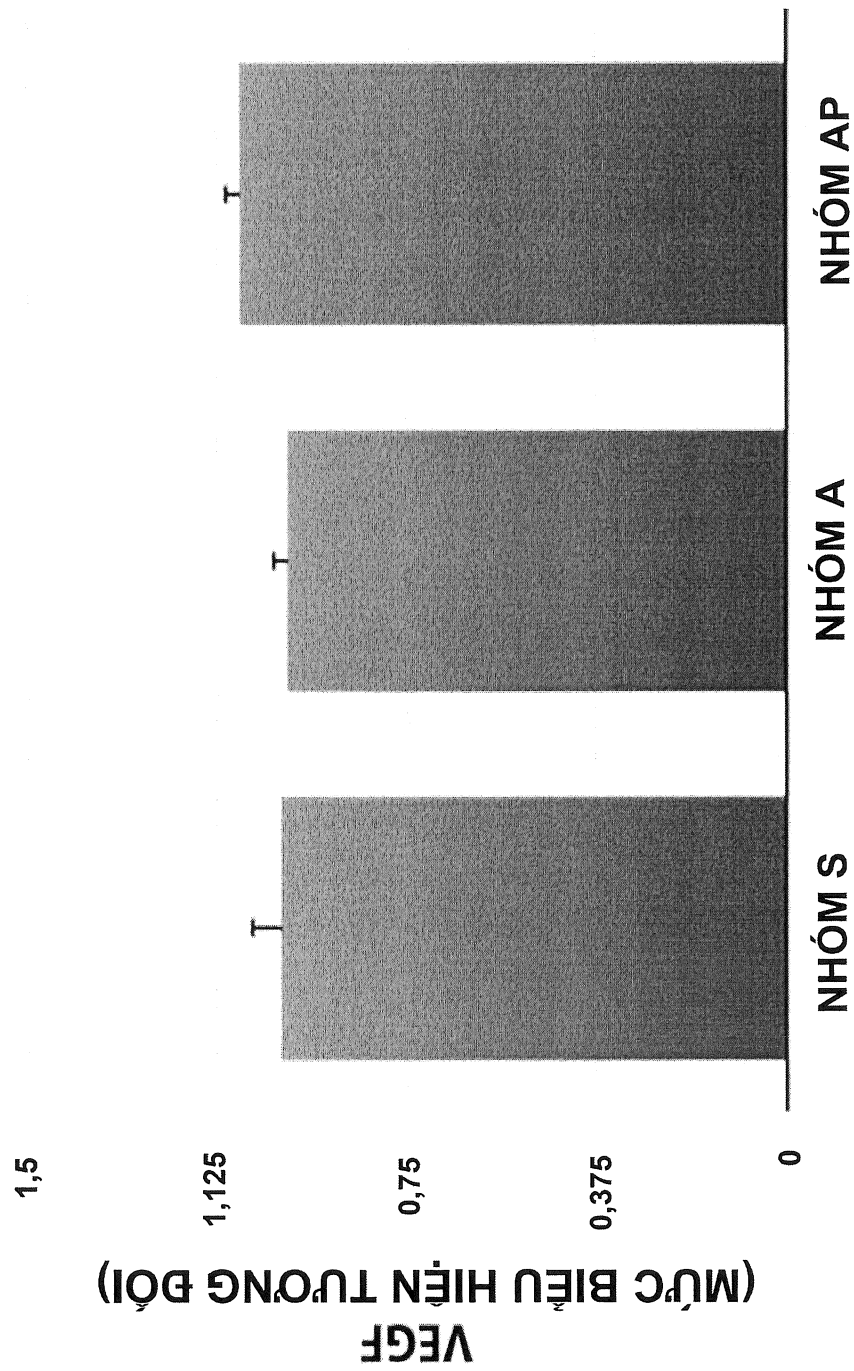


Fig. 7F

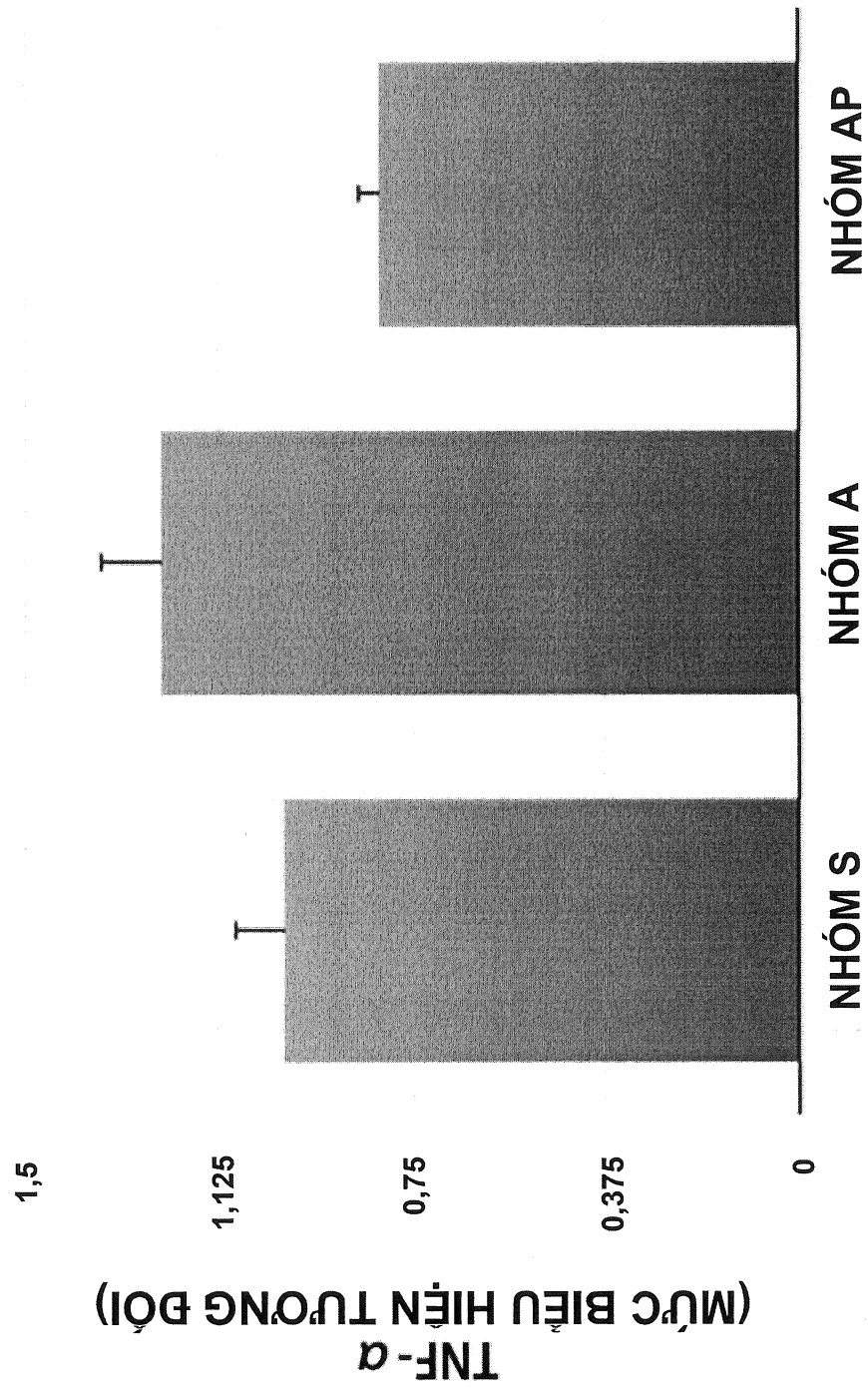
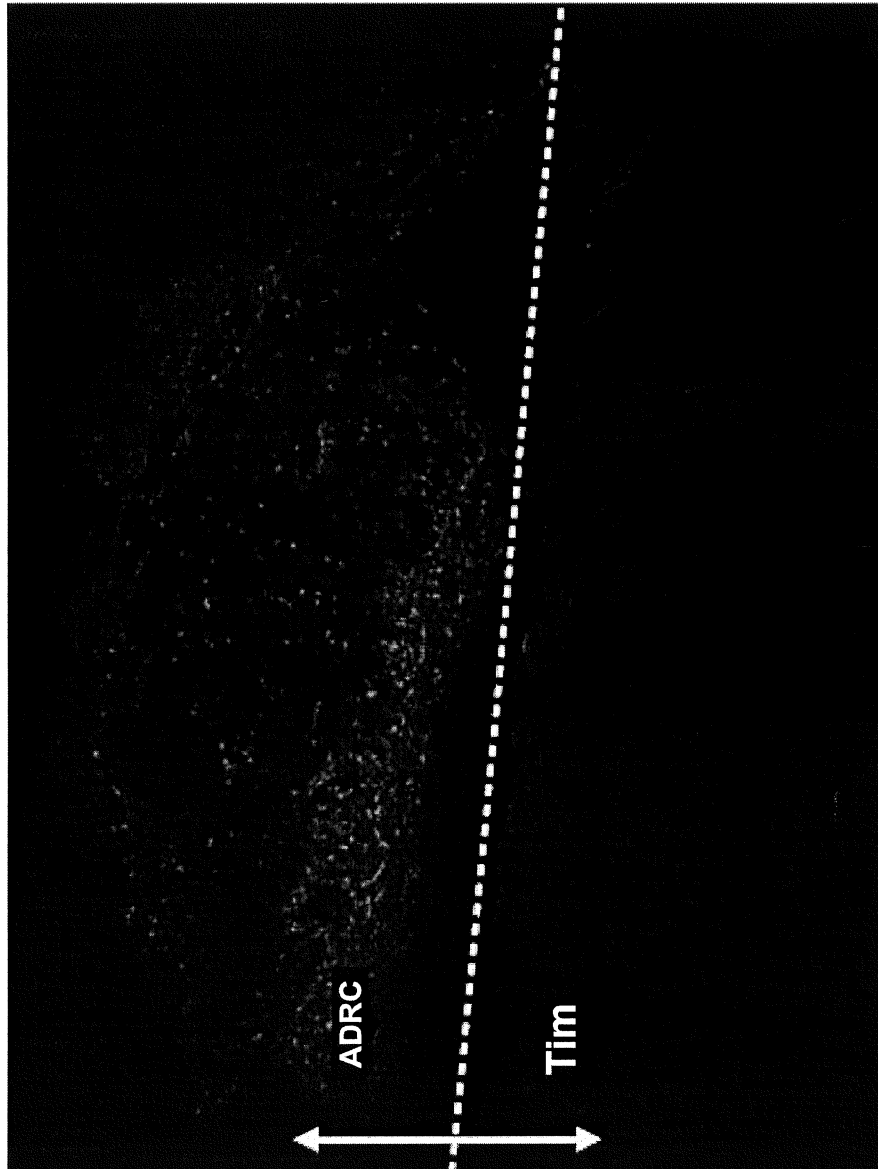


Fig. 8A



31068

36/38

Fig. 8B



Fig. 8C

NHÓM im

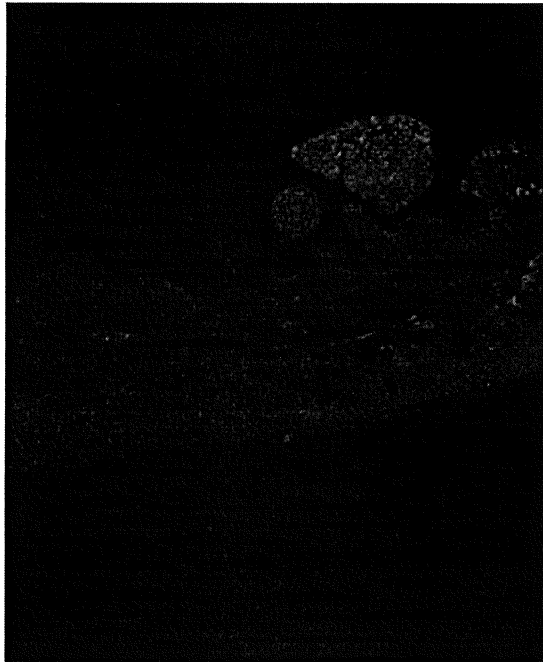


Fig. 8D

NHÓM ic