



(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)



1-0031899

(51)⁸ C12N 5/0775

(13) B

(21) 1-2018-01507

(22) 06/12/2016

(86) PCT/JP2016/086206 06/12/2016

(87) WO2017/099067 15/06/2017

(30) 2015-238349 07/12/2015 JP; 2016-218144 08/11/2016 JP

(45) 25/05/2022 410

(43) 25/09/2018 366A

(73) KINTAROCCELLSPOWER CO., LTD. (JP)

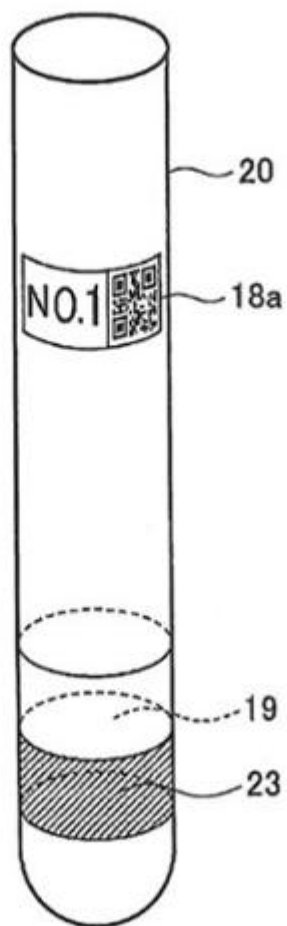
22-37, Higashi-gotanda 5-chome, Shinagawa-ku, Tokyo 1410022, Japan

(72) GLADKOV Alexei (RU).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY TẾ BÀO GỐC

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp nuôi cấy tế bào gốc trong đó phần chọc hút tủy xương thứ hai (23) là lớp trung gian được chiết ra khỏi phần chọc hút tủy xương thứ nhất (19) mà đã được tách ra thành các lớp; phần chọc hút tủy xương thứ hai (23) được nuôi cấy cùng với môi trường nuôi cấy và các tế bào gốc thứ nhất được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất; nếu tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất đạt đến tỷ lệ đích thứ nhất thì các tế bào gốc thứ nhất được chiết ra khỏi bình nuôi cấy thứ nhất; các tế bào gốc thứ hai ở lớp trên được chiết ra khỏi các tế bào gốc thứ nhất mà đã tách thành các lớp và các tế bào gốc thứ hai này được nuôi cấy cùng với môi trường nuôi cấy, và các tế bào gốc thứ hai này được cố định lên bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai; và, nếu tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai đạt đến tỷ lệ đích thứ hai thì các tế bào gốc thứ hai được chiết ra khỏi bình nuôi cấy thứ hai.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp nuôi cấy tế bào gốc để nuôi cấy các tế bào gốc bằng cách sử dụng phân chóc hút tủy xương được lấy từ đối tượng cho.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đã có bộc lộ về phương pháp nuôi cấy tế bào gốc có môi trường để nuôi cấy các tế bào gốc và các phương tiện chiếu xạ laze để hoạt hóa các tế bào gốc bằng cách chiếu xạ ánh sáng chiếu xạ laze khí cacbon dioxit công suất thấp có năng lượng chiếu xạ lớn hơn 0 và bằng hoặc nhỏ hơn 10 Jun/cm^2 , mật độ năng lượng laze là bằng hoặc nhỏ hơn $0,1 \text{ W/cm}^2$, ánh sáng này được đặt lệch tiêu đến năng lượng chiếu xạ là nằm trong khoảng từ 0,1 đến $2,5 \text{ Jun/cm}^2$ để chiếu xạ cho toàn bộ môi trường, trong đó các tế bào gốc được hoạt hóa bằng cách chiếu xạ laze công suất thấp để hoạt hóa chúng và sau đó thời gian nghỉ đã xác định trước được thiết lập trong trong các tế bào gốc để tăng sinh đến mức tăng sinh đích. Theo phương pháp nuôi cấy tế bào gốc này, các tế bào gốc tồn tại trong các mô hoặc các tế bào của chúng thu được từ người hoặc động vật không phải người được hoạt hóa và có thể được tăng sinh một cách đột ngột.

Tài liệu trong tình trạng kỹ thuật

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: JP 2015-186465A

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề cần được giải quyết bởi sáng chế

Vì các tế bào gốc khác nhau có trong các mô hoặc các tế bào của chúng thu được từ đối tượng cho, nên thậm chí nếu các tế bào gốc có trong các mô hoặc các tế bào được nuôi cấy thì các tế bào gốc khác nhau cũng được tăng sinh và chỉ các loại tế bào gốc cụ thể mới không thể nuôi cấy. Các tế bào gốc được sử dụng trong các ứng dụng điều trị, y khoa hồi phục hoặc trong các ứng dụng phi điều trị đối với các bệnh khác nhau (các bệnh hệ tim mạch và hệ thần kinh trung ương v.v.), nhưng các tế bào gốc khác nhau được nuôi cấy có tác dụng điều trị nhỏ đối với các bệnh khác nhau hoặc có tác dụng hồi phục trong y khoa hồi phục nhỏ, khả năng chữa khỏi hoàn toàn các bệnh khác nhau là thấp và khả năng hồi phục các mô và các cơ quan khác nhau là thấp so với trường hợp mà nó chỉ chứa các loại các tế bào gốc cụ thể. Trong phương pháp nuôi cấy tế bào

gốc nêu trên được bộc lộ trong tài liệu sáng chế 1, các tế bào gốc khác nhau được nuôi cấy và chỉ các loại tế bào gốc cụ thể mới không thể nuôi cấy được.

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp nuôi cấy tế bào gốc có khả năng ngăn chặn sự tăng sinh của các tế bào gốc khác nhau và chỉ nuôi cấy các loại tế bào gốc cụ thể. Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp nuôi cấy tế bào gốc mà có thể nuôi cấy các tế bào gốc có tác dụng chữa bệnh lớn đối với các bệnh khác nhau hoặc có tác dụng hồi phục trong y khoa hồi phục, có khả năng cao chữa khỏi hoàn toàn các bệnh khác nhau và có khả năng cao hồi phục các mô hoặc các cơ quan khác nhau.

Biện pháp giải quyết vấn đề

Tiền đề của sáng chế để giải quyết các vấn đề nêu trên là phương pháp nuôi cấy tế bào gốc để nuôi cấy loại tế bào gốc cụ thể bằng cách sử dụng phần chọc hút tủy xương thứ nhất được lấy từ đối tượng cho.

Dấu hiệu đặc trưng của sáng chế trong tiền đề nêu trên là ở chỗ phương pháp nuôi cấy tế bào gốc này bao gồm bước tách phần chọc hút tủy xương để tách phần chọc hút tủy xương thứ nhất lấy từ đối tượng cho thành các lớp, bước chiết phần chọc hút tủy xương để chiết phần chọc hút tủy xương thứ hai nằm ở lớp trung gian trong phần chọc hút tủy xương thứ nhất đã được tách thành các lớp trong bước tách phần chọc hút tủy xương, bước chiết thứ nhất tế bào gốc gồm việc tiêm phần chọc hút tủy xương thứ hai đã được chiết ra trong bước chiết phần chọc hút tủy xương và môi trường nuôi cấy đã xác định trước vào bình nuôi cấy thứ nhất có thể tích đã xác định trước và diện tích bề mặt đáy đã xác định trước, để yên bình nuôi cấy thứ nhất trong thời gian đã xác định trước để cố định các tế bào gốc thứ nhất vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất và tăng sinh các tế bào gốc thứ nhất, và khi tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất đạt đến tỷ lệ đích thứ nhất do sự mở rộng hình dạng phẳng của các tế bào gốc thứ nhất ở bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất, chiết các tế bào gốc thứ nhất ra khỏi bình nuôi cấy thứ nhất, bước ly tâm tế bào gốc để ly tâm các tế bào gốc thứ nhất đã được chiết ra trong bước chiết thứ nhất tế bào gốc thành các lớp, bước chiết thứ hai tế bào gốc để chiết các tế bào gốc thứ hai nằm ở lớp dưới cùng sau khi tách các tế bào gốc thứ nhất thành các lớp trong bước ly tâm tế bào gốc, và bước chiết thứ ba tế bào gốc gồm việc tiêm các tế bào gốc thứ hai chiết được trong bước chiết thứ hai tế bào gốc và môi trường nuôi cấy đã xác định trước vào bình nuôi cấy thứ hai có dung tích và diện tích của bề mặt đáy lớn hơn dung tích và diện tích của bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất, để yên bình nuôi cấy thứ hai này trong thời gian đã xác định trước để cố định các tế bào gốc thứ hai vào bề mặt đáy của

bình nuôi cấy thứ hai và tăng sinh các tế bào gốc thứ hai này, và khi tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai đạt đến tỷ lệ đích thứ hai do sự mở rộng hình dạng phẳng của các tế bào gốc thứ hai ở bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai, chiết các tế bào gốc thứ hai từ bình nuôi cấy thứ hai này.

Theo một ví dụ của sáng chế, phương pháp nuôi cấy tế bào gốc bao gồm bước quan sát thứ nhất sự biến dạng gồm việc tiêm phần chọc hút tủy xương thứ hai được chiết trong bước chiết phần chọc hút tủy xương và môi trường nuôi cấy vào bình nuôi cấy thứ nhất, sau đó, quan sát sự biến dạng của các tế bào gốc thứ nhất trong bình nuôi cấy thứ nhất từ hình dạng phẳng ban đầu trong khi để yên nó trong thời gian đã xác định trước trong trạng thái đặt nghiêng bình nuôi cấy thứ nhất ở góc đã xác định trước với các khoảng cách thời gian đã xác định trước, và bước quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt gồm việc tiêm môi trường nuôi cấy mới vào bình nuôi cấy thứ nhất trong khi tháo bỏ môi trường nuôi cấy trong bình nuôi cấy thứ nhất bằng cách đánh giá kết quả của sự quan sát trong bước quan sát thứ nhất sự biến dạng là các tế bào gốc thứ nhất đã được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất khi các tế bào gốc thứ nhất được biến dạng từ hình dạng phẳng ban đầu thành hình dạng phẳng đã xác định trước, và quan sát tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất trong khi để yên nó trong thời gian đã xác định trước trong trạng thái đặt nghiêng bình nuôi cấy thứ nhất ở góc đã xác định trước với các khoảng cách thời gian đã xác định trước, và trong bước chiết thứ nhất tế bào gốc, nếu kết quả của sự quan sát trong bước quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt là hình dạng phẳng của các tế bào gốc thứ nhất được mở rộng do sự tăng sinh các tế bào gốc thứ nhất và tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất đạt đến tỷ lệ đích thứ nhất thì các tế bào gốc thứ nhất được chiết ra khỏi bình nuôi cấy thứ nhất.

Theo ví dụ khác của sáng chế, phương pháp nuôi cấy tế bào gốc bao gồm bước quan sát thứ hai sự biến dạng gồm việc tiêm các tế bào gốc thứ hai được chiết trong bước chiết thứ hai tế bào gốc và môi trường nuôi cấy vào bình nuôi cấy thứ hai, sau đó, quan sát sự biến dạng của các tế bào gốc thứ hai trong bình nuôi cấy thứ hai từ hình dạng phẳng ban đầu trong khi để yên nó trong thời gian đã xác định trước trong trạng thái đặt nghiêng bình nuôi cấy thứ hai ở góc đã xác định trước trong thời gian đã xác định trước với các khoảng cách thời gian đã xác định trước, và bước quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt gồm việc tiêm môi trường nuôi cấy mới vào bình nuôi cấy thứ hai trong khi tháo bỏ môi trường nuôi cấy trong bình nuôi cấy thứ hai bằng cách đánh giá

kết quả của sự quan sát trong bước quan sát thứ hai sự biến dạng là các tế bào gốc thứ hai được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai khi các tế bào gốc thứ hai được biến dạng từ hình dạng phẳng ban đầu thành hình dạng phẳng đã xác định trước, và quan sát tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai trong khi để yên nó trong thời gian đã xác định trước trong trạng thái đặt nghiêng bình nuôi cấy thứ hai ở góc đã xác định trước với các khoảng cách thời gian đã xác định trước, và trong bước chiết thứ ba tế bào gốc, nếu kết quả của sự quan sát trong bước quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt là hình dạng phẳng của các tế bào gốc thứ hai được mở rộng do sự tăng sinh các tế bào gốc thứ hai và tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai đạt đến tỷ lệ đích thứ hai thì các tế bào gốc thứ hai được chiết ra khỏi bình nuôi cấy thứ hai.

Theo ví dụ khác của sáng chế, trong bước tách phần chọc hút tủy xương, 2 đến 3 ml phần chọc hút tủy xương thứ nhất được lấy từ đối tượng cho, 2 đến 3 ml phần chọc hút tủy xương thứ nhất này được tiêm vào bình tách chạy dài theo hướng thẳng đứng, và bình tách này được để yên ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời gian đã xác định trước để tách phần chọc hút tủy xương thứ nhất trong bình tách thành các lớp theo hướng thẳng đứng, và trong bước chiết phần chọc hút tủy xương, phần chọc hút tủy xương thứ hai mà nằm ở lớp trung gian trong phần chọc hút tủy xương thứ nhất đã được tách thành các lớp trong bình tách được chiết ra.

Theo ví dụ khác của sáng chế, dung tích của bình nuôi cấy thứ nhất là khoảng 20 đến 30 ml, hình dạng phẳng ban đầu của các tế bào gốc thứ nhất về cơ bản là hình tròn, hình dạng phẳng của các tế bào gốc thứ nhất sau khi biến dạng là hình phẳng dẹt trong đó các tế bào gốc thứ nhất được mở rộng không đều về một hướng với lõi về cơ bản là hình tròn, và trong bước quan sát thứ nhất sự biến dạng, sự biến dạng của các tế bào gốc thứ nhất trong bình nuôi cấy thứ nhất từ hình dạng phẳng ban đầu được quan sát trong thời gian từ 12 đến 24 giờ với các khoảng cách thời gian là khoảng 1 đến 2 giờ trong khi để yên bình nuôi cấy thứ nhất ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời gian 12 đến 24 giờ, và nếu các tế bào gốc thứ nhất được biến dạng thành hình dạng phẳng dẹt không đều, thì các tế bào gốc thứ nhất được đánh giá là được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất.

Theo ví dụ khác của sáng chế, trong bước quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất đã được cố định và bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất được

quan sát trong thời gian 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian 1 đến 2 giờ trong khi để yên bình nuôi cấy thứ nhất ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời gian 36 đến 48 giờ.

Theo ví dụ khác của sáng chế, tỷ lệ đích thứ nhất giữa tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất và diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất là từ 70% đến 80%.

Theo ví dụ khác của sáng chế, trong bước ly tâm tế bào gốc, các tế bào gốc thứ nhất được tiêm vào bình tách, bình tách này được đặt trong thiết bị tách ly tâm để ly tâm các tế bào gốc thứ nhất, và trong bước chiết thứ hai tế bào gốc, các tế bào gốc thứ nhất được ly tâm thành các lớp trong bình tách, và sau đó, các tế bào gốc thứ hai nằm ở lớp dưới cùng được chiết ra.

Theo ví dụ khác của sáng chế, dung tích của bình nuôi cấy thứ hai là khoảng 40 đến 60 ml, hình dạng phẳng ban đầu của các tế bào gốc thứ hai về cơ bản là hình tròn, hình dạng phẳng của các tế bào gốc thứ hai sau khi biến dạng các tế bào gốc thứ hai là hình phẳng dẹt trong đó các tế bào gốc thứ hai được mở rộng không đều về một hướng với lõi về cơ bản là hình tròn, và trong bước quan sát thứ hai sự biến dạng, sự biến dạng của các tế bào gốc thứ hai trong bình nuôi cấy thứ hai từ hình dạng phẳng ban đầu được quan sát trong thời gian từ 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian là khoảng 1 đến 2 giờ trong khi để yên bình nuôi cấy thứ hai ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời gian 36 đến 48 giờ, và nếu các tế bào gốc thứ hai được biến dạng thành hình dạng phẳng dẹt không đều, thì các tế bào gốc thứ hai được đánh giá là được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai.

Theo ví dụ khác của sáng chế, trong bước quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt, tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai đã được cố định và bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai được quan sát trong thời gian 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ trong khi để yên bình nuôi cấy thứ hai ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời gian 36 đến 48 giờ.

Theo ví dụ khác của sáng chế, tỷ lệ đích thứ hai giữa tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai và diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai là từ 88% đến 92%.

Theo ví dụ khác của sáng chế, các tế bào gốc thứ nhất và thứ hai là các tế bào gốc trung mô.

Hiệu quả đạt được bởi sáng chế

Theo phương pháp nuôi cấy tế bào gốc theo sáng chế, phần chọc hút tủy xương thứ hai mà nằm ở lớp trung gian trong phần chọc hút tủy xương thứ nhất đã được tách ra thành các lớp được chiết ra, phần chọc hút tủy xương thứ hai này được nuôi cấy với môi trường nuôi cấy để cố định các tế bào gốc thứ nhất vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất và các tế bào gốc thứ nhất này được tăng sinh. Nếu tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất đạt đến tỷ lệ đích thứ nhất, thì các tế bào gốc thứ nhất được chiết ra khỏi bình nuôi cấy thứ nhất, các tế bào gốc thứ hai nằm ở lớp dưới cùng trong số các lớp mà được tạo ra bằng cách ly tâm từ các tế bào gốc thứ nhất được chiết ra, các tế bào gốc thứ hai này được nuôi cấy với môi trường nuôi cấy để cố định các tế bào gốc thứ hai vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai và các tế bào gốc thứ hai này được tăng sinh. Nếu tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai đạt đến tỷ lệ đích thứ hai, thì các tế bào gốc thứ hai được chiết ra khỏi bình nuôi cấy thứ hai. Do đó, bằng cách chiết phần chọc hút tủy xương thứ hai cụ thể từ phần chọc hút tủy xương thứ nhất đã được tách thành các lớp, và bằng cách chiết các tế bào gốc thứ hai cụ thể từ các tế bào gốc thứ nhất đã được tách thành các lớp, sự tăng sinh các tế bào gốc khác nhau có thể được ngăn chặn và chỉ các loại tế bào gốc cụ thể (các tế bào gốc thứ hai) mà là đối tượng cần được sản xuất có thể được nuôi cấy, nhờ đó có thể sản xuất được các tế bào gốc tinh khiết (chính cống) mà các tế bào gốc không cần thiết đã được loại bỏ khỏi chúng. Phương pháp nuôi cấy tế bào gốc có thể chỉ nuôi cấy các loại tế bào gốc cụ thể nhờ đó có thể nuôi cấy được các tế bào gốc có tác dụng điều trị bệnh lớn đối với các bệnh khác nhau và có tác dụng hồi phục trong y khoa hồi phục, và có khả năng cao chữa khỏi hoàn toàn các bệnh khác nhau cũng như có khả năng cao hồi phục các mô hoặc các cơ quan khác nhau.

Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc trong đó, sau khi tiêm phần chọc hút tủy xương thứ hai đã được chiết ra và môi trường nuôi cấy vào bình nuôi cấy thứ nhất, sự biến dạng của các tế bào gốc thứ nhất trong bình nuôi cấy thứ nhất từ hình dạng phẳng ban đầu được quan sát trong khi để yên nó trong thời gian đã xác định trước trong trạng thái đặt nghiêng bình nuôi cấy thứ nhất ở góc đã xác định trước với các khoảng cách thời gian đã xác định trước, và khi xem xét kết quả của sự quan sát sự biến dạng của các tế bào gốc thứ nhất, nếu các tế bào gốc thứ nhất được biến dạng từ hình dạng phẳng ban đầu thành hình dạng phẳng đã xác định trước thì các tế bào gốc thứ nhất được đánh giá là được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất, và môi trường nuôi cấy mới

được tiêm vào bình nuôi cấy thứ nhất trong khi tháo bỏ môi trường nuôi cấy trong bình nuôi cấy thứ nhất, tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất đã cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất được quan sát trong khi để yên nó trong thời gian đã xác định trước trong trạng thái đặt nghiêng bình nuôi cấy thứ nhất ở góc đã xác định trước với các khoảng cách thời gian đã xác định trước, và khi xem xét kết quả của sự quan sát tổng diện tích bề mặt, nếu tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất đạt đến tỷ lệ đích thứ nhất do sự tăng sinh các tế bào gốc thứ nhất để mở rộng hình dạng phẳng của các tế bào gốc thứ nhất thì các tế bào gốc thứ nhất được chiết ra khỏi bình nuôi cấy thứ nhất, các tế bào gốc thứ nhất này có thể được cố định chắc chắn vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất bằng cách để yên nó trong trạng thái để nghiêng bình nuôi cấy thứ nhất ở góc đã xác định trước trong thời gian đã xác định trước, và sau khi cố định các tế bào gốc thứ nhất vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất, môi trường nuôi cấy mới được tiêm vào bình nuôi cấy thứ nhất trong khi tháo bỏ môi trường nuôi cấy trong bình nuôi cấy thứ nhất cũng như để yên nó trong trạng thái để nghiêng bình nuôi cấy thứ nhất ở góc đã xác định trước trong thời gian đã xác định trước, nhờ đó sự tăng sinh các tế bào gốc thứ nhất có thể được thúc đẩy một cách chắc chắn. Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, sự cố định của các tế bào gốc thứ nhất vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất có thể được xác nhận một cách chính xác bằng cách quan sát sự biến dạng của các tế bào gốc thứ nhất trong bình nuôi cấy thứ nhất từ hình dạng phẳng ban đầu, và mức độ đạt được đến tỷ lệ đích thứ nhất của tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất có thể được xác nhận một cách chính xác. Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, các tế bào gốc thứ nhất có thể được cố định một cách chắc chắn và được tăng sinh trong bình nuôi cấy thứ nhất cũng như mức độ đạt được đến tỷ lệ đích thứ nhất của tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất có thể được xác nhận một cách chính xác, nhờ đó chỉ các tế bào gốc thứ nhất không chứa các tế bào gốc khác có thể được nuôi cấy, và chỉ các loại tế bào gốc cụ thể (các tế bào gốc thứ hai) mà là đối tượng cần được sản xuất có thể được nuôi cấy trong khi ngăn chặn được sự tăng sinh của các tế bào gốc khác nhau.

Phương pháp nuôi cấy tế bào gốc trong đó, sau khi tiêm các tế bào gốc thứ hai đã được chiết và môi trường nuôi cấy vào bình nuôi cấy thứ hai, sự biến dạng của các tế bào gốc thứ hai trong bình nuôi cấy thứ hai từ hình dạng phẳng ban đầu được quan sát trong khi để yên nó trong trạng thái đặt nghiêng bình nuôi cấy thứ hai ở góc đã xác định trước trong thời gian đã xác định trước với các khoảng cách thời gian đã xác định trước, và khi xem xét kết quả của sự quan sát sự biến dạng của các tế bào gốc thứ hai, nếu các

tế bào gốc thứ hai được biến dạng từ hình dạng phẳng ban đầu thành hình dạng phẳng đã xác định trước thì các tế bào gốc thứ hai được đánh giá là đã được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai, và môi trường nuôi cấy mới được thêm vào bình nuôi cấy thứ hai trong khi tháo bỏ môi trường nuôi cấy trong bình nuôi cấy thứ hai, tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai đã cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai được quan sát trong khi để yên nó trong trạng thái đặt nghiêng bình nuôi cấy thứ hai ở góc đã xác định trước trong thời gian đã xác định trước với các khoảng cách thời gian đã xác định trước, và khi xem xét kết quả của sự quan sát tổng diện tích bề mặt, nếu tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai đạt đến tỷ lệ đích thứ hai do sự tăng sinh các tế bào gốc thứ hai để mở rộng hình dạng phẳng của các tế bào gốc thứ hai, thì các tế bào gốc thứ hai được chiết ra khỏi bình nuôi cấy thứ hai, các tế bào gốc thứ hai này có thể được cố định chắc chắn vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai bằng cách để yên nó trong trạng thái đặt nghiêng bình nuôi cấy thứ hai ở góc đã xác định trước trong thời gian đã xác định trước, và có thể thúc đẩy một cách chắc chắn sự tăng sinh của các tế bào gốc thứ hai bằng cách thêm môi trường nuôi cấy mới vào bình nuôi cấy thứ hai trong khi tháo bỏ môi trường nuôi cấy trong bình nuôi cấy thứ hai sau khi cố định các tế bào gốc thứ hai vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai cũng như để yên bình nuôi cấy thứ hai trong trạng thái đặt nghiêng ở góc đã xác định trước trong thời gian đã xác định trước. Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, sự cố định của các tế bào gốc thứ hai vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai có thể được xác nhận một cách chính xác bằng cách quan sát sự biến dạng của các tế bào gốc thứ hai trong bình nuôi cấy thứ hai từ hình dạng phẳng ban đầu, và mức độ đạt được đến tỷ lệ đích thứ hai của tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai có thể được xác nhận một cách chính xác. Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, các tế bào gốc thứ hai có thể được cố định một cách chắc chắn và được tăng sinh trong bình nuôi cấy thứ hai cũng như mức độ đạt được đến tỷ lệ đích thứ hai của tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai có thể được xác nhận một cách chính xác, nhờ đó chỉ các tế bào gốc thứ hai không chứa các tế bào gốc khác có thể được nuôi cấy, và chỉ các loại tế bào gốc cụ thể (các tế bào gốc thứ hai) mà là đối tượng cần được sản xuất có thể được nuôi cấy trong khi ngăn chặn được sự tăng sinh của các tế bào gốc khác nhau.

Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc trong đó 2 đến 3 ml phần chọc hút tủy xương thứ nhất nêu trên được lấy từ đối tượng cho, 2 đến 3 ml phần chọc hút tủy xương thứ nhất này được thêm vào bình tách chạy dài theo hướng thẳng đứng, và bình tách này được để yên ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời gian đã xác

định trước để tách phần chọc hút tủy xương thứ nhất trong bình tách thành các lớp theo hướng thẳng đứng, và phần chọc hút tủy xương thứ hai nằm ở lớp trung gian trong phần chọc hút tủy xương thứ nhất đã được tách thành các lớp trong bình tách được chiết ra, phần chọc hút tủy xương thứ hai cụ thể có thể được chiết ra một cách chắc chắn từ phần chọc hút tủy xương thứ nhất bằng cách để yên phần chọc hút tủy xương thứ nhất chứa các tế bào gốc khác nhau ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời gian đã xác định trước để tách nó thành các lớp theo hướng thẳng đứng, và các tế bào gốc không cần thiết có trong phần chọc hút tủy xương thứ nhất có thể được loại bỏ cũng như chỉ các loại tế bào gốc cụ thể (các tế bào gốc thứ hai) mà là đối tượng cần được sản xuất có thể được nuôi cấy. Mặc dù 150 đến 200 ml phần chọc hút tủy xương thường là cần thiết để nuôi cấy các tế bào gốc nhưng trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc này, 2 đến 3 ml phần chọc hút tủy xương có thể được lấy từ đối tượng cho, và các loại tế bào gốc cụ thể (các tế bào gốc thứ hai) có thể được nuôi cấy với lượng nhỏ phần chọc hút tủy xương, do đó thời gian lấy mẫu của phần chọc hút tủy xương có thể được rút ngắn rất nhiều và phần chọc hút tủy xương có thể được lấy với chi phí thấp, và gánh nặng đối với đối tượng cho tại thời điểm lấy phần chọc hút tủy xương có thể được tối thiểu hóa.

Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc trong đó dung tích của bình nuôi cấy thứ nhất là khoảng 20 đến 30 ml, hình dạng phẳng ban đầu của các tế bào gốc thứ nhất về cơ bản là hình tròn, hình dạng phẳng của các tế bào gốc thứ nhất sau khi biến dạng là hình dạng phẳng dẹt trong đó các tế bào gốc thứ nhất được mở rộng không đều về một hướng với lõi về cơ bản là hình tròn, sự biến dạng của các tế bào gốc thứ nhất trong bình nuôi cấy thứ nhất từ hình dạng phẳng ban đầu được quan sát trong 12 đến 24 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ trong khi để yên bình nuôi cấy thứ nhất ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời gian 12 đến 24 giờ, và nếu các tế bào gốc thứ nhất được biến dạng thành hình dạng phẳng dẹt không đều, thì các tế bào gốc thứ nhất được đánh giá là đã được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất, nếu bình nuôi cấy lớn có dung tích vượt quá 30 ml được sử dụng tại thời điểm cố định các tế bào gốc thứ nhất, thì khó cố định các tế bào gốc thứ nhất vào đáy của bình và sự tăng sinh các tế bào gốc thứ nhất giảm xuống, nhưng bằng cách sử dụng bình nuôi cấy thứ nhất có dung tích nêu trên, các tế bào gốc thứ nhất có thể được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất một cách nhanh chóng và dễ dàng, và các tế bào gốc thứ nhất có thể được tăng sinh một cách nhanh chóng trong bình nuôi cấy thứ nhất. Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc này, vì sự biến dạng của các tế bào gốc thứ nhất trong bình nuôi cấy thứ nhất được quan sát từ hình dạng phẳng ban đầu trong suốt thời gian 12 đến 24 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ trong khi

để yên bình nuôi cấy thứ nhất ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời gian 12 đến 24 giờ, nên sự biến dạng của các tế bào gốc thứ nhất không bao giờ bị bỏ sót, sự cố định của các tế bào gốc thứ nhất vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất có thể được xác nhận một cách chính xác, và sau khi xác nhận sự cố định của các tế bào gốc thứ nhất, bằng cách tiêm môi trường nuôi cấy mới vào bình nuôi cấy thứ nhất trong khi tháo bỏ môi trường nuôi cấy trong bình nuôi cấy thứ nhất, sự tăng sinh của các tế bào gốc thứ nhất có thể được thúc đẩy một cách chắc chắn. Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, các tế bào gốc thứ nhất được đánh giá là được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất nếu các tế bào gốc thứ nhất được biến dạng thành hình dạng phẳng dẹt được mở rộng không đều về một hướng với lõi về cơ bản là hình tròn, sự cố định của các tế bào gốc thứ nhất vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất không bao giờ bị bỏ sót, và sự cố định của các tế bào gốc thứ nhất vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất có thể nắm được một cách chính xác bằng sự thay đổi về hình dạng phẳng của các tế bào gốc thứ nhất.

Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc trong đó tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất được quan sát trong thời gian 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ trong khi để yên bình nuôi cấy thứ nhất ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời gian 36 đến 48 giờ, tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất có thể được xác nhận một cách chính xác bằng cách quan sát tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất đã cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ, và có thể nắm được một cách chắc chắn rằng tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất đã đạt đến tỷ lệ đích thứ nhất. Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc này, các tế bào gốc thứ nhất có thể được chiết ra từ bình nuôi cấy thứ nhất trong khi duy trì hoạt tính của các tế bào gốc thứ nhất mà không có nhầm lẫn gì về việc xác định thời điểm chiết các tế bào gốc thứ nhất từ bình nuôi cấy thứ nhất.

Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc trong đó tỷ lệ đích thứ nhất giữa tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất và diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất là 70% đến 80%, hoạt tính của các tế bào gốc thứ nhất bị mất đi dần dần khi các tế bào gốc thứ nhất được tăng sinh vượt quá mức tỷ lệ 80% giữa tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất và diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất, do đó các tế bào gốc thứ nhất này được chiết ra khỏi bình nuôi cấy thứ nhất khi tỷ lệ giữa tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất và diện tích bề mặt đáy của bình nuôi

cây thứ nhất đạt đến 70% đến 80%, nhờ đó hoạt tính của các tế bào gốc thứ nhất có thể được giữ lại và các tế bào gốc thứ nhất có thể được tăng sinh với trạng thái giữ lại hoạt tính.

Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc trong đó các tế bào gốc thứ nhất được tiêm vào bình tách, bình tách này được đặt trong thiết bị tách ly tâm để ly tâm các tế bào gốc thứ nhất, các tế bào gốc thứ nhất này được ly tâm thành các lớp trong bình tách, và sau đó, các tế bào gốc thứ hai nằm ở lớp dưới cùng được chiết ra, các tế bào gốc thứ nhất chứa các tế bào gốc lai không cần thiết được tách thành các lớp bằng cách ly tâm sử dụng thiết bị tách ly tâm và các tế bào gốc thứ hai nằm ở lớp dưới cùng trong các tế bào gốc thứ nhất đã được ly tâm thành các lớp này được chiết ra, nhờ đó các tế bào gốc thứ hai cụ thể có thể được chiết một cách chắc chắn ra khỏi các tế bào gốc thứ nhất, và các tế bào gốc không cần thiết có thể được loại bỏ ra khỏi các tế bào gốc thứ nhất cũng như chỉ các loại tế bào gốc cụ thể (các tế bào gốc thứ hai) mà là đối tượng cần được sản xuất có thể được nuôi cấy.

Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc trong đó dung tích của bình nuôi cấy thứ hai là khoảng 40 đến 60 ml, hình dạng phẳng ban đầu của các tế bào gốc thứ hai về cơ bản là hình tròn, hình dạng phẳng của các tế bào gốc thứ nhất sau khi biến dạng các tế bào gốc thứ hai là hình dạng phẳng dẹt trong đó các tế bào gốc thứ hai được mở rộng không đều về một hướng với lõi về cơ bản là hình tròn, sự biến dạng của các tế bào gốc thứ hai trong bình nuôi cấy thứ hai từ hình dạng phẳng ban đầu được quan sát trong 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ trong khi để yên bình nuôi cấy thứ hai ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời gian 36 đến 48 giờ, và các tế bào gốc thứ hai được đánh giá là đã cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai nếu các tế bào gốc thứ hai được biến dạng thành hình dạng phẳng dẹt không đều, nếu bình nuôi cấy lớn có dung tích vượt quá 60 ml được sử dụng tại thời điểm cố định các tế bào gốc thứ hai, thì khó cố định các tế bào gốc thứ hai vào bề mặt đáy của bình và sự tăng sinh các tế bào gốc thứ hai giảm xuống, nhưng bằng cách sử dụng bình nuôi cấy thứ hai có dung tích nêu trên, các tế bào gốc thứ hai có thể được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai một cách nhanh chóng và dễ dàng, và các tế bào gốc thứ hai có thể được tăng sinh một cách nhanh chóng trong bình nuôi cấy thứ hai. Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, vì sự biến dạng của các tế bào gốc thứ hai trong bình nuôi cấy thứ hai được quan sát từ hình dạng phẳng ban đầu trong suốt thời gian 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ trong khi để yên bình nuôi cấy thứ hai ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời gian 36 đến 48 giờ, nên sự biến dạng của các tế bào gốc thứ hai không bao giờ bị bỏ sót, sự cố định của

các tế bào gốc thứ hai vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai có thể được xác nhận một cách chính xác, và sau khi xác nhận sự cố định của các tế bào gốc thứ hai, bằng cách tiêm môi trường nuôi cấy mới vào bình nuôi cấy thứ hai trong khi tháo bỏ môi trường nuôi cấy trong bình nuôi cấy thứ hai, sự tăng sinh của các tế bào gốc thứ hai có thể được thúc đẩy một cách chắc chắn. Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, các tế bào gốc thứ hai được đánh giá là được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai nếu các tế bào gốc thứ hai được biến dạng thành hình dạng phẳng dẹt được mở rộng không đều về một hướng với lõi về cơ bản là hình tròn, sự cố định của các tế bào gốc thứ hai vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai không bao giờ bị bỏ sót, và sự cố định của các tế bào gốc thứ hai vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai có thể được nắm được một cách chính xác bằng sự thay đổi về hình dạng phẳng của các tế bào gốc thứ hai.

Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc trong đó tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai được quan sát trong thời gian 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ trong khi để yên bình nuôi cấy thứ hai ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời gian 36 đến 48 giờ, tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai có thể được xác nhận một cách chính xác bằng cách quan sát tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai đã cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ, và có thể nắm được một cách chắc chắn rằng tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai đã đạt đến tỷ lệ đích thứ hai. Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, các tế bào gốc thứ hai có thể được chiết ra từ bình nuôi cấy thứ hai trong khi duy trì hoạt tính của các tế bào gốc thứ hai mà không có nhầm lẫn gì về việc xác định thời điểm chiết các tế bào gốc thứ hai từ bình nuôi cấy thứ hai.

Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc trong đó tỷ lệ đích thứ hai giữa tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai và diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai là 88% đến 92%, hoạt tính của các tế bào gốc thứ hai bị mất đi dần dần khi các tế bào gốc thứ hai được tăng sinh vượt quá mức tỷ lệ 92% giữa tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai và diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai, do đó các tế bào gốc thứ hai này được chiết ra khỏi bình nuôi cấy thứ hai khi tỷ lệ giữa tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai và diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai đạt đến 88% đến 92%, nhờ đó hoạt tính của các tế bào gốc thứ hai có thể được giữ lại và có thể sản xuất được các tế bào gốc thứ hai có hoạt tính cao. Theo phương pháp nuôi

cây tế bào gốc này, chỉ các loại tế bào gốc cụ thể (các tế bào gốc thứ hai) có hoạt tính cao mới có thể được nuôi cấy nhờ đó có thể nuôi cấy được các tế bào gốc có tác dụng điều trị bệnh lớn đối với các bệnh khác nhau và có tác dụng hồi phục trong y khoa hồi phục, và có khả năng cao chữa khỏi hoàn toàn các bệnh khác nhau cũng như có khả năng cao hồi phục các mô hoặc các cơ quan khác nhau.

Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc trong đó các tế bào gốc thứ nhất và thứ hai là các tế bào gốc trung mô, bằng cách chiết phần chọc hút tủy xương thứ hai cụ thể từ phần chọc hút tủy xương thứ nhất đã được tách thành các lớp và bằng cách chiết các tế bào gốc trung mô thứ hai cụ thể từ các tế bào gốc trung mô thứ nhất đã được tách thành các lớp, các tế bào gốc trung mô lai không cần thiết được loại bỏ và sự tăng sinh các tế bào gốc trung mô khác nhau có thể được ngăn chặn, nhờ đó chỉ các loại tế bào gốc trung mô cụ thể (các tế bào gốc trung mô thứ hai) mà là đối tượng cần được sản xuất mới có thể được nuôi cấy. Phương pháp nuôi cấy tế bào gốc có thể chỉ nuôi cấy các loại tế bào gốc trung mô cụ thể nhờ đó có thể nuôi cấy được các tế bào gốc trung mô có tác dụng điều trị bệnh lớn đối với các bệnh khác nhau và có tác dụng hồi phục trong y khoa hồi phục, và có khả năng cao chữa khỏi hoàn toàn các bệnh khác nhau cũng như có khả năng cao hồi phục các mô hoặc các cơ quan khác nhau.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là sơ đồ cấu hình của hệ thống nuôi cấy tế bào gốc được thể hiện dưới dạng ví dụ;

Fig.2 là hình vẽ diễn giải thể hiện ví dụ về bước tách phần chọc hút tủy xương;

Fig.3 là hình vẽ diễn giải về bước tách phần chọc hút tủy xương tiếp theo Fig.2;

Fig.4 là hình vẽ diễn giải về bước tách phần chọc hút tủy xương tiếp theo Fig.3;

Fig.5 là hình vẽ diễn giải thể hiện ví dụ về bước quan sát thứ nhất sự biến dạng;

Fig.6 là hình chiếu cạnh của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất;

Fig.7 là hình phóng to một phần thể hiện ví dụ về hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất;

Fig.8 là hình phóng to một phần thể hiện ví dụ khác về hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất;

Fig.9 là hình phóng to một phần thể hiện ví dụ khác về hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất;

Fig.10 là hình vẽ diễn giải thể hiện ví dụ về bước ly tâm tế bào gốc;

Fig.11 là hình vẽ diễn giải thể hiện ví dụ về bước chiết thứ hai tế bào gốc;

Fig.12 là hình vẽ diễn giải thể hiện ví dụ về bước quan sát thứ hai sự biến dạng;

Fig.13 là hình chiếu cạnh của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai;

Fig.14 là hình phóng to một phần thể hiện ví dụ về hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai;

Fig.15 là hình phóng to một phần thể hiện ví dụ khác về hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai;

Fig.16 là hình phóng to một phần thể hiện ví dụ khác về hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai; và

Fig.17 là hình thể hiện ví dụ về sự bảo quản các tế bào gốc trung mô thứ hai.

Mô tả chi tiết sáng chế

Bằng cách viện dẫn đến các hình vẽ kèm theo như Fig.1 mà là sơ đồ cấu hình của hệ thống nuôi cấy tế bào gốc 10 được thể hiện dưới dạng ví dụ, v.v., chi tiết về phương pháp nuôi cấy tế bào gốc theo sáng chế được giải thích như sau. Theo đó, Fig.2 là hình vẽ diễn giải thể hiện ví dụ về bước tách phần chọc hút tủy xương, và Fig.3 là hình vẽ diễn giải về bước tách phần chọc hút tủy xương tiếp theo Fig.2. Fig.4 là hình vẽ diễn giải về bước tách phần chọc hút tủy xương tiếp theo Fig.3.

Phương pháp nuôi cấy tế bào gốc sử dụng phần chọc hút tủy xương thứ nhất lấy từ nhiều đối tượng cho (người), và bằng cách thực hiện bước tách phần chọc hút tủy xương, bước chiết phần chọc hút tủy xương, bước quan sát thứ nhất sự biến dạng), bước quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, bước chiết thứ nhất tế bào gốc, bước ly tâm tế bào gốc, bước chiết thứ hai tế bào gốc, bước quan sát thứ hai sự biến dạng, bước quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt và bước chiết thứ ba tế bào gốc, các loại tế bào gốc trung mô cụ thể thuộc một chủng loại được nuôi cấy (sản xuất) trong số nhiều chủng loại tế bào gốc trung mô có trong phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19.

Hệ thống nuôi cấy tế bào gốc 10 được tạo ra từ máy vi tính 11, dụng cụ đọc mã vạch 12 và kính hiển vi điện tử 13. Máy vi tính 11 có bộ xử lý trung tâm (CPU hoặc CPU ảo), bộ lưu trữ nhớ (bộ nhớ hoặc bộ nhớ ảo) và bộ lưu trữ dung lượng lớn (ổ đĩa cứng hoặc ổ đĩa cứng ảo, v.v.), và được vận hành bằng hệ điều hành vật lý (OS - operating system) hoặc hệ điều hành ảo (virtual OS). Máy vi tính 11 được kết nối với

linh kiện đầu vào như bàn phím 14 và con chuột 15, v.v., và linh kiện đầu ra như màn hình 16 và máy in (không được thể hiện trên hình vẽ), v.v., thông qua giao diện kết nối (không dây hoặc có dây).

Trong hệ thống nuôi cấy tế bào gốc 10, dữ liệu đối tượng cho (thông tin có thể nhận diện đối tượng cho) được quản lý bằng cách sử dụng mã QR (nhãn hiệu đã đăng ký). Dữ liệu đối tượng cho gồm có tên, địa chỉ, số điện thoại, ngày sinh, giới tính, nhóm máu, chiều cao, cân nặng, địa chỉ e-mail, v.v. của đối tượng cho. Trong hệ thống 10, mã QR được sử dụng dưới dạng mã hai chiều, và ngoài mã QR, mã SP hệ ma trận, vericode (VeriCode), maxicode (MaxiCode), mã CP, DataMatrix, Code1, AztecCode, mã intacta và thẻ e có thể được sử dụng. Nhân tiện, mã hai chiều được sử dụng trong hệ thống 10 bao gồm tất cả các mã sẽ được phát triển trong tương lai. Tương tự, dữ liệu đối tượng cho (thông tin có thể nhận diện đối tượng cho) có thể được quản lý bằng thẻ IC (IC chip).

Trong bước tách phần chọc hút tủy xương, phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 lấy từ đối tượng cho được tách thành các lớp. Trong quy trình lấy phần chọc hút tủy xương, 2 đến 3 ml phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 được lấy từ xương ức hoặc xương chậu (chậu) của đối tượng cho. Phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 được lấy bằng thủ thuật “chọc hút tủy xương” (lấy dấu) trong đó việc gây mê cục bộ được áp dụng đối với đối tượng cho và sau đó tủy xương được chọc vào và phần chọc hút tủy xương (máu tủy xương) được hút ra. Đồng thời với phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19, người chịu trách nhiệm như bác sỹ, y tá và nhà nghiên cứu, v.v., khởi động hệ thống 10 trong máy vi tính 11 và sử dụng linh kiện đầu vào như bàn phím 14 và con chuột 15, v.v., để nhập dữ liệu đối tượng cho vào máy vi tính 11.

Máy vi tính 11 tạo ra ký hiệu nhận dạng đối tượng cho duy nhất mà định rõ mỗi đối tượng cho mỗi khi dữ liệu đối tượng cho được nhập vào (mỗi khi phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 được lấy từ đối tượng cho) và lưu trữ (nhớ) trong bộ lưu trữ trong trạng thái mà dữ liệu đối tượng cho được kết hợp với ký hiệu nhận dạng đối tượng cho (phương tiện lưu trữ dữ liệu đối tượng cho). Máy vi tính 11 chuyển hóa dữ liệu đối tượng cho nhập vào thành mã QR (mã hai chiều) bằng chức năng ghi mã hai chiều (phương tiện chuyển hóa mã hai chiều (mã QR)), xuất ra các tấm mã từ thứ nhất đến thứ tư 18a đến 18d trên đó mã QR được in (phương tiện xuất mã hai chiều (mã QR)), và lưu trữ (nhớ) vào bộ lưu trữ ở trạng thái mà mã QR được kết hợp với ký hiệu nhận diện đối tượng cho mà định rõ mỗi đối tượng cho (phương tiện lưu trữ mã hai chiều (mã QR)).

Nhân tiện, trong mã QR được in trên tấm mã thứ nhất 18a trên đó NO.1 đã được in, số 1 đối với bước tách phần chọc hút tủy xương và bước chiết phần chọc hút tủy

xương được lưu trữ, và trong mã QR được in trên tấm mã thứ hai 18b trên đó NO.2 đã được in, số 2 đối với bước quan sát thứ nhất sự biến dạng, bước quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt và bước chiết thứ nhất tế bào gốc được lưu trữ. Trong mã QR được in trên tấm mã thứ ba 18c trên đó NO.3 đã được in, số 3 đối với bước ly tâm tế bào gốc và bước chiết thứ hai tế bào gốc được lưu trữ, và trong mã QR được in trên tấm mã thứ tư 18d trên đó NO.4 đã được in, số 4 đối với bước quan sát thứ hai sự biến dạng, bước quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt và bước chiết thứ ba tế bào gốc được lưu trữ. Máy vi tính 11 so sánh dữ liệu đối tượng cho được lưu trữ trong bộ lưu trữ với dữ liệu đối tượng cho được thể hiện bằng mã QR đọc bằng dụng cụ đọc mã vạch 12 đối với mỗi bước từ bước tách phần chọc hút tủy xương đến bước chiết thứ ba tế bào gốc.

Như được thể hiện trên Fig.2, 2 đến 3 ml phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 được lấy từ đối tượng cho được tiêm (nạp) vào ống nghiệm thủy tinh 20 (bình tách) chạy dài theo hướng thẳng đứng. Nhân tiện, trong 2 đến 3 ml phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 có chứa 0,5 đến 1 ml (khoảng 5×10^7 (tế bào/ml)) của nhiều chủng loại tế bào gốc trung mô. Tấm mã thứ nhất 18a được dán vào bề mặt bên ngoài của ống nghiệm thủy tinh 20 mà phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 đã được tiêm vào trong đó. Như được thể hiện trên Fig.3, ống nghiệm thủy tinh 20 mà phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 đã được tiêm vào trong đó được đặt trong giá đựng ống nghiệm 21, và được đưa vào bộ ổn nhiệt 22 cùng với giá đựng ống nghiệm 21.

Người chịu trách nhiệm như bác sỹ, y tá và nhà nghiên cứu, v.v., dán tấm mã thứ nhất 18a mà trên đó mã QR đã được in lên bề mặt bên ngoài của ống nghiệm thủy tinh 20, và sau đó, dùng dụng cụ đọc mã vạch 12 đọc mã QR của ống nghiệm thủy tinh 20. Dụng cụ đọc mã vạch 12 được kết nối với máy vi tính 11 qua giao diện kết nối (có dây hoặc không dây). Dụng cụ đọc mã vạch 12 truyền mã QR đọc được đến máy vi tính 11.

Máy vi tính 11 trích số 1 và dữ liệu đối tượng cho được thể hiện bằng mã QR được truyền từ dụng cụ đọc mã vạch 12 từ bộ lưu trữ và đọc chúng vào bộ nhớ đệm, và hiển thị màn hình thứ nhất về quy trình (không được thể hiện trên hình vẽ) lên màn hình 16. Trong màn hình thứ nhất về quy trình này, số 1 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị, và đồng thời, nút tách phần chọc hút tủy xương, nút chiết phần chọc hút tủy xương, nút quan sát thứ nhất sự biến dạng, nút quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, nút chiết thứ nhất tế bào gốc, nút ly tâm tế bào gốc, nút chiết thứ hai tế bào gốc, nút quan sát thứ hai sự biến dạng, nút quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt, nút chiết thứ ba tế bào gốc và nút thoát ra được hiển thị. Nếu việc nuôi cấy các tế bào gốc không được thực hiện,

nút thoát ra được kích vào. Nếu nút thoát ra được kích vào, hệ thống 10 được dừng lại trong máy vi tính 11.

Sau khi kích nút tách phần chọc hút tủy xương mà được hiển thị trên màn hình 16, người chịu trách nhiệm sẽ tiêm phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 vào ống nghiệm thủy tinh 20 từ ống tiêm, và ống nghiệm thủy tinh 20 mà phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 đã được tiêm vào trong đó được đưa (đặt) vào giá đựng ống nghiệm 21. Như được thể hiện trên Fig.3, người chịu trách nhiệm đưa giá đựng ống nghiệm 21 vào bộ ổn nhiệt 22, và ống nghiệm thủy tinh 20 mà phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 đã được tiêm vào trong đó được để yên (để nó yên lặng mà không dịch chuyển nó) trong bộ ổn nhiệt 22 trong thời gian đã xác định trước (khoảng 2 giờ). Nhiệt độ bên trong bộ ổn nhiệt 22 được duy trì ở mức khoảng 36°C đến 37°C là nhiệt độ về cơ bản là giống với nhiệt độ cơ thể. Máy vi tính 11 hiển thị số 1 mà được thể hiện bằng mã QR được in trên tấm mã thứ nhất 18a và dữ liệu đối tượng cho trên màn hình 16, và cũng hiển thị thông điệp đang diễn ra sự tách phần chọc hút tủy xương và nút kết thúc việc tách phần chọc hút tủy xương trên màn hình 16.

Như được thể hiện trên Fig.4, bằng cách để yên ống nghiệm thủy tinh 20 trong bộ ổn nhiệt 22 trong thời gian đã xác định trước (khoảng 2 giờ), phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 mà đã được tiêm vào ống nghiệm 20 được tách thành các lớp với một số lớp (3 lớp) trong ống nghiệm 20 theo hướng thẳng đứng. 150 đến 200 ml phần chọc hút tủy xương thường là cần thiết để nuôi cấy các tế bào gốc, nhưng theo phương pháp nuôi cấy tế bào gốc này, chỉ cần lấy 2 đến 3 ml phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 từ đối tượng cho, và có thể nuôi cấy được các loại tế bào gốc trung mô cụ thể (các tế bào gốc trung mô thứ hai 31) với lượng nhỏ phần chọc hút tủy xương 19, do đó thời gian lấy mẫu của phần chọc hút tủy xương 19 có thể được rút ngắn rất nhiều, và phần chọc hút tủy xương 19 có thể được lấy với chi phí thấp và gánh nặng đối với đối tượng cho tại thời điểm lấy phần chọc hút tủy xương 19 có thể được tối thiểu hóa.

Sau bước tách phần chọc hút tủy xương trong đó phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 được tách thành các lớp, bước chiết phần chọc hút tủy xương được thực hiện. Trong bước chiết phần chọc hút tủy xương, phần chọc hút tủy xương thứ hai 23 được chiết ra khỏi phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 mà đã được tách thành các lớp. Sau khi xác nhận rằng phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 đã tách thành các lớp, người chịu trách nhiệm sẽ kích vào nút kết thúc sự tách phần chọc hút tủy xương được hiển thị trên màn hình 16.

Khi nút kết thúc sự tách phần chọc hút tủy xương được kích vào, máy vi tính 11

sẽ hiển thị màn hình thứ hai về quy trình (không được thể hiện trên hình vẽ) trên màn hình 16. Trong màn hình thứ hai về quy trình này, số 1 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị, và đồng thời, thông điệp kết thúc sự tách phần chọc hút tủy xương, nút chiết phần chọc hút tủy xương, nút quan sát thứ nhất sự biến dạng, nút quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, nút chiết thứ nhất tế bào gốc, nút ly tâm tế bào gốc, nút chiết thứ hai tế bào gốc, nút quan sát thứ hai sự biến dạng, nút quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt và nút chiết thứ ba tế bào gốc được hiển thị.

Người chịu trách nhiệm sẽ kích vào nút chiết phần chọc hút tủy xương trên màn hình thứ hai về quy trình và khiến cho dụng cụ đọc mã vạch 12 đọc mã QR của ống nghiệm thủy tinh 20. Khi mã QR được truyền từ dụng cụ đọc mã vạch 12 đến máy vi tính 11, máy vi tính 11 sẽ so sánh dữ liệu đối tượng cho (dữ liệu đối tượng cho được đọc vào bộ nhớ) được hiển thị trên màn hình 16 và dữ liệu đối tượng cho được thể hiện bởi mã QR được đọc bởi dụng cụ đọc mã vạch 12, và nếu các dữ liệu đối tượng cho này khớp nhau, số 1 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị trên màn hình 16, và đồng thời, thông điệp kết thúc việc tách phần chọc hút tủy xương, thông điệp đang diễn ra việc chiết phần chọc hút tủy xương và nút kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương được hiển thị trên màn hình. Nếu các dữ liệu đối tượng cho này không khớp với nhau thì máy vi tính 11 sẽ hiển thị thông điệp sai lỗi và thông điệp dừng nuôi cấy trên màn hình 16.

Người chịu trách nhiệm sẽ lấy giá đựng ống nghiệm 21 ra khỏi bộ ổn nhiệt 22, rút ống nghiệm thủy tinh 20 ra khỏi giá đựng ống nghiệm 21, và chiết phần chọc hút tủy xương thứ hai 23 có trong lớp cụ thể của phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 mà đã tách ra thành các lớp. Người chịu trách nhiệm sẽ chiết (hút) phần chọc hút tủy xương thứ hai 23 với độ dày lớp từ 3 đến 4 mm nằm ở lớp trung gian trong phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 mà đã tách thành các lớp bằng cách sử dụng ống tiêm (không được thể hiện trên hình vẽ). Hoặc cách khác là, phần chọc hút tủy xương thứ hai 23 với độ dày lớp từ 3 đến 4 mm nằm ở lớp trung gian trong phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 mà đã tách thành các lớp được chiết (hút) bằng cách sử dụng pipet (không được thể hiện trên hình vẽ). Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, sau khi tách phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 chứa các tế bào gốc trung mô khác nhau thành các lớp (3 lớp) theo hướng thẳng đứng, phần chọc hút tủy xương thứ hai (trung gian) cụ thể 23 có thể được chiết một cách chắc chắn ra khỏi phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 bằng cách sử dụng ống tiêm hoặc pipet, và các tế bào gốc trung mô không cần thiết chứa trong phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 có thể được loại bỏ.

Fig.5 là hình vẽ diễn giải thể hiện ví dụ về bước quan sát thứ nhất sự biến dạng,

và Fig.6 là hình chiếu cạnh của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 (bình nuôi cấy thứ nhất). Fig.7 là hình phóng to một phần thể hiện ví dụ về hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35, và Fig.8 là hình phóng to một phần thể hiện ví dụ khác về hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35. Fig. 7 và 8 thể hiện hình phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 được chụp bởi kính hiển vi điện tử 13.

Sau bước chiết phần chọc hút tủy xương trong đó phần chọc hút tủy xương thứ hai cụ thể 23 nằm ở lớp trung gian được chiết ra khỏi phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19, bước quan sát thứ nhất sự biến dạng được thực hiện. Trong bước quan sát thứ nhất sự biến dạng, phần chọc hút tủy xương thứ hai 23 và môi trường nuôi cấy 24 được tiêm (nạp) vào bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 (bình nuôi cấy thứ nhất) (bình nuôi cấy tế bào), bình này được để yên (để nó yên tĩnh mà không dịch chuyển nó) trong thời gian 12 đến 24 giờ trong khi giữ phần bên trong của bình nuôi cấy 25 ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể (khoảng 36°C đến 37°C), sự biến dạng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 (các tế bào gốc thứ nhất) có trong phần chọc hút tủy xương thứ hai 23 trong bình nuôi cấy 25 từ hình dạng phẳng ban đầu được quan sát bằng kính hiển vi điện tử 13 trong thời gian 12 đến 24 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ, và các tế bào gốc 35 có được cố định vào bề mặt đáy 36 của bình nuôi cấy 25 hay không sẽ được đánh giá. Trên bề mặt đáy 36 (bề mặt ngoài thành đáy) của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 mà phần chọc hút tủy xương thứ hai 23 và môi trường nuôi cấy 24 được tiêm vào trong đó, tám mã thứ hai 18b trên đó mã QR mà định rõ đối tượng cho được dán lên.

Người chịu trách nhiệm như bác sỹ, y tá và nhà nghiên cứu, v.v., sẽ kích vào nút kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương được hiển thị trên màn hình 16 sau khi chiết phần chọc hút tủy xương thứ hai cụ thể 23 ra khỏi phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19. Khi nút kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương được kích vào, máy vi tính 11 sẽ hiển thị màn hình thứ ba về quy trình (không được thể hiện trên hình vẽ) trên màn hình 16. Trong màn hình thứ ba về quy trình này, số 1 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị, và đồng thời, thông điệp kết thúc sự tách phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương, nút quan sát thứ nhất sự biến dạng, nút quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, nút chiết thứ nhất tế bào gốc, nút ly tâm tế bào gốc, nút chiết thứ hai tế bào gốc, nút quan sát thứ hai sự biến dạng, nút quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt và nút chiết thứ ba tế bào gốc được hiển thị.

Người chịu trách nhiệm sẽ dán tám mã thứ hai 18b trên đó mã QR đã được in

vào bề mặt đáy 36 (bề mặt ngoài thành đáy) của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25. Tiếp theo, nút quan sát thứ nhất sự biến dạng trên màn hình thứ ba về quy trình được kích vào để khiến cho dụng cụ đọc mã vạch 12 đọc mã QR của bình nuôi cấy 25. Khi mã QR được truyền từ dụng cụ đọc mã vạch 12 đến máy vi tính 11, máy vi tính 11 sẽ so sánh dữ liệu đối tượng cho (dữ liệu đối tượng cho được đọc vào bộ nhớ) được hiển thị trên màn hình 16 và dữ liệu đối tượng cho được thể hiện bởi mã QR được đọc bởi dụng cụ đọc mã vạch 12, và nếu các dữ liệu đối tượng cho này khớp nhau, số 2 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị trên màn hình 16, và đồng thời, thông điệp kết thúc việc tách phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương, thông điệp đang diễn ra việc quan sát thứ nhất sự biến dạng và nút kết thúc việc quan sát thứ nhất sự biến dạng được hiển thị trên màn hình. Nếu các dữ liệu đối tượng cho này không khớp với nhau thì máy vi tính 11 sẽ hiển thị thông điệp sai lỗi và thông điệp dừng nuôi cấy trên màn hình 16.

Bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 được sử dụng trong bước quan sát thứ nhất sự biến dạng là bình phẳng dẹt được làm từ thủy tinh trong suốt hoặc nhựa trong suốt và có bề mặt đáy 36 với dung tích nhỏ và diện tích đã xác định trước và có hình dạng phẳng về cơ bản là vuông. Bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 có phần đỉnh 26, phần đáy 28, phần tâm 27 nằm giữa phần đỉnh 26 và phần đáy 28, và cửa tiêm 29 được tạo ra ở phần đỉnh 26. Cửa tiêm 29 được bịt kín nước bằng nắp 30. Bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 có dung lượng khoảng 20 đến 30 ml (tốt hơn là 25 ml), và diện tích bề mặt đáy của nó là khoảng 25 đến 36 mm². Bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 có chiều dài một cạnh là từ 5 đến 6 mm. Nhân tiện, đối với bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25, bình phẳng dẹt với hình dạng phẳng tròn hoặc elip và có bề mặt đáy 28 với dung tích nhỏ và diện tích đã xác định trước có thể được sử dụng.

Người chịu trách nhiệm sẽ mở nắp 30 ra khỏi cửa tiêm 29, tiêm (nạp) phần chọc hút tủy xương thứ hai 23 được hút ra bằng ống tiêm hoặc pipet vào bên trong của bình nuôi cấy 25 từ cửa tiêm 29 của bình nuôi cấy 25, và tiêm (nạp) môi trường nuôi cấy 24 được hút bằng ống tiêm hoặc pipet vào bên trong của bình nuôi cấy 25 từ cửa tiêm 29 của bình nuôi cấy 25, và đóng cửa tiêm 29 bằng nắp 30.

Môi trường nuôi cấy 24 chứa dung dịch muối khoáng mà đã được bổ sung penicillin (khoảng 100 U/ml), amphotericin (khoảng 100 ng/ml), streptomycin (khoảng 100 mcg/ml), L-glutamin (khoảng 2 đến 4 ml) và huyết thanh thai bò 20%, và các axit amin. Các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 có trong phần chọc hút tủy xương thứ hai 23 được tiêm vào bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 được nuôi cấy với môi trường nuôi

cây 24 trong khi được cố định lên bề mặt đáy 36 của bình nuôi cấy 25 theo thời gian, và dần dần tăng sinh (biệt hóa) trên bề mặt đáy 36 của bình nuôi cấy 25 để tạo thành các khuẩn lạc.

Sau khi tiêm phần chọc hút tủy xương thứ hai 23 và môi trường nuôi cấy 24 vào bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25, người chịu trách nhiệm sẽ đưa (đặt) bình nuôi cấy 25 vào giá giữ mẫu 31 của kính hiển vi điện tử 13. Nhân tiện, miếng đệm 33 được đặt vào giữa bề mặt trên 32 của giá giữ mẫu 31 của kính hiển vi điện tử 13 và phần đáy 28 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 sao cho phần đáy 28 của bình nuôi cấy 25 được giữ ở trạng thái được nâng lên bằng miếng đệm 33, và bình nuôi cấy 25 được giữ ở trạng thái được nghiêng ở góc đã xác định trước sao cho phần đáy 28 của bình nuôi cấy 25 ở trên và phần đỉnh 26 (cửa tiêm 29) của bình nuôi cấy 25 ở dưới. Tương tự, miếng đệm 33 được đặt vào giữa bề mặt trên 32 của giá giữ mẫu 31 của kính hiển vi điện tử 13 và phần đỉnh 26 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25, phần đỉnh 26 của bình nuôi cấy 25 được giữ ở trạng thái được nâng lên bằng miếng đệm 33, bình nuôi cấy 25 được giữ ở trạng thái được nghiêng ở góc đã xác định trước sao cho phần đỉnh 26 của bình nuôi cấy 25 ở trên và phần đáy 28 của bình nuôi cấy 25 ở dưới. Góc nghiêng α_1 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 so với bề mặt trên 32 của giá giữ mẫu 31 là nằm trong khoảng từ 2° đến 5° , tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2° đến 3° .

Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, bằng cách đặt nghiêng bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 so với bề mặt trên 32 của giá giữ mẫu 31 ở góc nghiêng nêu trên, phần chọc hút tủy xương thứ hai 23 và môi trường nuôi cấy 24 được nghiêng về phía phần đỉnh 26 (hoặc về phía phần đáy 28) của bình nuôi cấy 25 trong bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25, và về phía phần đỉnh 26 (hoặc phía phần đáy 28) của bình nuôi cấy 25, áp lực nước của phần chọc hút tủy xương thứ hai 23 và môi trường nuôi cấy 24 trở nên lớn và các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 được tập trung ở phía bề mặt đáy 36 của bình nuôi cấy 25, nhờ đó hoạt động của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 được gia tăng và các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 có thể dễ dàng và nhanh chóng được cố định vào bề mặt đáy 36 của bình nuôi cấy 25.

Kính hiển vi điện tử 13 được kết nối với máy vi tính 11 thông qua giao diện kết nối (có dây hoặc không dây). Kính hiển vi điện tử 13 có chức năng chụp ảnh để chụp hình ảnh phóng to của đối tượng bằng chi tiết thu biến hình ảnh và có chức năng truyền ảnh để gửi hình ảnh phóng to đến máy vi tính 11. Kính hiển vi điện tử 13 chụp hình ảnh phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 có trong phần chọc hút tủy xương thứ hai 23 mà được tiêm vào bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25

với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ, và hình ảnh phóng to chụp được của hình dạng phẳng của các tế bào gốc 35 được truyền đến máy vi tính 11 với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ. Khoảng cách thời gian chụp ảnh và khoảng cách thời gian truyền ảnh trong kính hiển vi điện tử 13 có thể được cài đặt một cách tự do trong khoảng 1 đến 2 giờ bằng linh kiện đầu vào như bàn phím 14 và con chuột 15, v.v.

Máy vi tính 11 lưu trữ (nhớ) hình ảnh phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 và thời gian chụp được truyền từ kính hiển vi điện tử 13 trong bộ lưu trữ ở trạng thái kết hợp với ký hiệu nhận diện đối tượng cho (phương tiện lưu trữ hình ảnh các tế bào gốc). Máy vi tính 11 hiển thị hình ảnh phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 và thời gian chụp được truyền từ kính hiển vi điện tử 13 trên màn hình 16. Người chịu trách nhiệm xác nhận (xem) hình ảnh phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 được hiển thị trên màn hình 16 trong thời gian 12 đến 24 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ, và quan sát sự thay đổi về hình dạng phẳng của các tế bào gốc 35 có trong phần chọc hút tủy xương thứ hai 23. Nhân tiện, người chịu trách nhiệm có thể trực tiếp quan sát sự thay đổi về hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 từ cửa sổ quan sát của kính hiển vi điện tử 13 trong thời gian 12 đến 24 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ.

Hình dạng phẳng ban đầu của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 về cơ bản là hình tròn, và nếu hình dạng phẳng của các tế bào gốc 35 về cơ bản là hình tròn, thì các tế bào gốc 35 không được cố định vào bề mặt đáy 36 (bề mặt trong thành đáy) của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 và sự tăng sinh (biệt hóa) của các tế bào gốc 27 chưa được bắt đầu. Hình dạng phẳng sau khi biến dạng tế bào gốc trung mô thứ nhất 27 là hình dạng phẳng dẹt trong đó các tế bào gốc 27 được mở rộng (trải dài) một cách không đều theo một hướng (hướng đã xác định trước) với lõi về cơ bản là hình tròn trước khi cố định, và các tế bào gốc 27 được cố định vào bề mặt đáy 36 (bề mặt trong thành đáy) của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 và sự tăng sinh (biệt hóa) của các tế bào gốc 27 được bắt đầu.

Như được thể hiện trên Fig.6, nếu kết quả của sự quan sát trong bước quan sát thứ nhất sự biến dạng là hình phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 được hiển thị trên màn hình 16 quan sát được về cơ bản là hình tròn, thì người chịu trách nhiệm sẽ đánh giá rằng các tế bào gốc 35 không được cố định vào bề mặt đáy 36 (bề mặt trong của thành đáy) của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25, và liên tục quan sát các thay đổi về hình dạng phẳng của các tế bào gốc 35 với các khoảng

cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ. Như được thể hiện trên Fig.7, nếu kết quả của sự quan sát trong bước quan sát thứ nhất sự biến dạng là hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 được hiển thị trên màn hình 16 được biến dạng từ hình dạng về cơ bản là hình tròn thành hình dạng phẳng dẹt không đều với lõi về cơ bản là hình tròn, thì người chịu trách nhiệm sẽ đánh giá rằng các tế bào gốc 35 được cố định vào bề mặt đáy 35 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25.

Nếu sử dụng bình nuôi cấy lớn có dung tích vượt quá 30 ml và diện tích đáy vượt quá 36 mm² tại thời điểm cố định tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 thì các tế bào gốc 35 có xu hướng khó được cố định vào bề mặt đáy của bình và sự tăng sinh của các tế bào gốc 35 trở nên chậm chạp, nhưng theo phương pháp nuôi cấy tế bào gốc của sáng chế, bằng cách sử dụng bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 có dung tích nêu trên và có diện tích bề mặt đáy nêu trên, các tế bào gốc 35 có thể dễ dàng được cố định vào bề mặt đáy 36 của bình nuôi cấy 25 và các tế bào gốc 27 có thể nhanh chóng được tăng sinh trong bình nuôi cấy 25.

Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, vì sự biến dạng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 trong bình nuôi cấy 25 từ hình dạng phẳng ban đầu được quan sát trong thời gian 12 đến 24 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ trong khi để yên bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời gian 12 đến 24 giờ, nên sự biến dạng của các tế bào gốc 35 không bao giờ bị bỏ sót và sự cố định của các tế bào gốc 35 vào bề mặt đáy 36 của bình nuôi cấy 25 có thể được xác nhận một cách chính xác.

Fig.9 là hình vẽ phóng to một phần thể hiện ví dụ khác về hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35. Fig.9 thể hiện hình phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 được chụp bởi kính hiển vi điện tử 13. Kết quả của sự quan sát trong bước quan sát thứ nhất sự biến dạng là các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 (các tế bào gốc thứ nhất) được biến dạng từ hình dạng về cơ bản là hình tròn (hình dạng phẳng ban đầu) thành hình dạng phẳng dẹt không đều với lõi về cơ bản là hình tròn, và sau khi bước quan sát thứ nhất sự biến dạng xác nhận sự cố định của các tế bào gốc 35 vào bề mặt đáy 36 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 (bình nuôi cấy thứ nhất), bước quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt được thực hiện.

Trong bước quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, môi trường nuôi cấy 24 đã được tiêm vào bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 được tháo bỏ ra khỏi bình nuôi cấy 25, và môi trường nuôi cấy 24 mới được tiêm (nạp) vào bình nuôi cấy 25. Tiếp theo, tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 đã được cố định vào bề

mặt đáy 36 của bình nuôi cấy 25 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy 25 được quan sát bằng kính hiển vi điện tử 13 trong thời gian 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ trong khi để yên (để yên lạnh mà không dịch chuyển nó) bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể (khoảng 37°C) trong thời gian 36 đến 48 giờ, và đánh giá liệu tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc 35 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy 25 đã đạt đến tỷ lệ đích thứ nhất hay chưa. Tỷ lệ đích thứ nhất giữa tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 và diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 là 70% đến 80% (70% đến 80% hợp dòng).

Người chịu trách nhiệm như bác sỹ, y tá và nhà nghiên cứu v.v. sẽ kích vào nút kết thúc sự quan sát thứ nhất sự biến dạng được hiển thị trên màn hình 16 sau khi xác nhận sự cố định của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 có trong phần chọc hút tủy xương thứ hai 23 vào bề mặt đáy 36 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25. Khi nút kết thúc sự quan sát thứ nhất sự biến dạng được kích vào, máy vi tính 11 sẽ hiển thị màn hình thứ tư về quy trình (không được thể hiện trên hình vẽ) trên màn hình 16. Trong màn hình thứ tư về quy trình này, số 2 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị, và đồng thời, thông điệp kết thúc sự tách phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất sự biến dạng, nút quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, nút chiết thứ nhất tế bào gốc, nút ly tâm tế bào gốc, nút chiết thứ hai tế bào gốc, nút quan sát thứ hai sự biến dạng, nút quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt và nút chiết thứ ba tế bào gốc được hiển thị.

Người chịu trách nhiệm sẽ kích vào nút quan sát thứ hai các tế bào gốc trên màn hình thứ tư về quy trình, và bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 được loại bỏ khỏi giá giữ mẫu 31 của kính hiển vi điện tử 16 và mã QR của bình nuôi cấy 25 được đọc bằng dụng cụ đọc mã vạch 12. Khi mã QR được truyền từ dụng cụ đọc mã vạch 12 đến máy vi tính 11, máy vi tính 11 sẽ so sánh dữ liệu đối tượng cho (dữ liệu đối tượng cho được đọc vào bộ nhớ) được hiển thị trên màn hình 16 và dữ liệu đối tượng cho được thể hiện bởi mã QR được đọc bởi dụng cụ đọc mã vạch 12, và nếu các dữ liệu đối tượng cho này khớp nhau, số 2 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị trên màn hình 16, và đồng thời, thông điệp kết thúc việc tách phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất sự biến dạng, thông điệp đang diễn ra sự quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt và nút kết thúc sự quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt được hiển thị trên màn hình 16. Nếu các dữ liệu đối tượng cho này không khớp với nhau thì máy vi tính 11 sẽ hiển thị thông điệp sai lỗi và thông điệp dừng nuôi cấy trên màn hình 16.

Người chịu trách nhiệm sẽ tháo bỏ môi trường nuôi cấy 24 đã được tiêm vào bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 trong bước quan sát thứ nhất sự biến dạng ra khỏi bình nuôi cấy 25 bằng cách sử dụng ống tiêm hoặc pipet, và tiêm (nạp) môi trường nuôi cấy 24 mới được hút bằng ống tiêm hoặc pipet vào bình nuôi cấy 25. Môi trường nuôi cấy 24 mới là giống như môi trường được tiêm trong bước quan sát thứ nhất sự biến dạng. Người chịu trách nhiệm sẽ đưa (đặt) bình nuôi cấy 25 vào giá giữ mẫu 31 của kính hiển vi điện tử 13 sau khi tiêm môi trường nuôi cấy 24 mới vào bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25.

Nhân tiện, miếng đệm 33 được đặt vào giữa bề mặt trên 32 của giá giữ mẫu 31 của kính hiển vi điện tử 13 và phần đáy 28 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25, phần đáy 28 của bình nuôi cấy 25 được giữ ở trạng thái được nâng lên bằng miếng đệm 33, và bình nuôi cấy 25 được giữ ở trạng thái được nghiêng ở góc đã xác định trước sao cho phần đáy 28 của bình nuôi cấy 25 ở trên và phần đỉnh 26 (cửa tiêm 29) của bình nuôi cấy 25 ở dưới (xem Fig.6). Tương tự, miếng đệm 33 được đặt vào giữa bề mặt trên 32 của giá giữ mẫu 31 của kính hiển vi điện tử 13 và phần đỉnh 26 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25, phần đỉnh 26 của bình nuôi cấy 25 được giữ ở trạng thái được nâng lên bằng miếng đệm 33, và bình nuôi cấy 25 có thể được giữ ở trạng thái được nghiêng ở góc đã xác định trước sao cho phần đỉnh 26 của bình nuôi cấy 25 ở trên và phần đáy 28 của bình nuôi cấy 25 ở dưới. Góc nghiêng α_1 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 so với bề mặt trên 32 của giá giữ mẫu 31 là nằm trong khoảng từ 2° đến 5° , tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2° đến 3° .

Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, sau khi xác nhận sự cố định của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35, bằng cách tiêm môi trường nuôi cấy 24 mới vào bình nuôi cấy 25 trong khi tháo bỏ môi trường nuôi cấy 24 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25, sự tăng sinh của các tế bào gốc 35 có thể được thúc đẩy một cách chắc chắn. Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, bằng cách đặt nghiêng bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 so với bề mặt trên 32 của giá giữ mẫu 31 ở góc nghiêng nêu trên, các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 và môi trường nuôi cấy 24 được nghiêng về phía phần đỉnh 26 (hoặc về phía phần đáy 26) của bình nuôi cấy 25 trong bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25, áp lực nước của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 và môi trường nuôi cấy 24 trở nên lớn về phía phần đỉnh 26 (hoặc về phía phần đáy 26) của bình nuôi cấy 25 và các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 được tập trung về phía bề mặt đáy 36 của bình nuôi cấy 25, nhờ đó hoạt động của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 được gia tăng và các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 có thể dễ dàng và nhanh chóng được tăng sinh (biệt hóa) ở bề mặt đáy 36 của bình nuôi cấy 25.

Kính hiển vi điện tử 13 chụp hình ảnh phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 trong bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ, và hình ảnh phóng to chụp được của hình dạng phẳng của các tế bào gốc 35 được truyền đến máy vi tính 11 với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ. Máy vi tính 11 lưu trữ (nhớ) hình ảnh phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 và thời gian chụp được truyền từ kính hiển vi điện tử 13 trong bộ lưu trữ ở trạng thái kết hợp với ký hiệu nhận diện đối tượng cho (phương tiện lưu trữ hình ảnh các tế bào gốc). Máy vi tính 11 hiển thị hình ảnh phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 và thời gian chụp được truyền từ kính hiển vi điện tử 13 trên màn hình 16.

Người chịu trách nhiệm sẽ xác nhận (nhìn) hình ảnh phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 được hiển thị trên màn hình 16 trong thời gian 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ, và đánh giá liệu tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc 25 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy 25 đã đạt đến tỷ lệ đích thứ nhất (70% đến 80% hợp dòng) hay chưa trong khi quan sát tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc 35 đã cố định vào bề mặt đáy 36 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy 25. Nhân tiện, người chịu trách nhiệm có thể trực tiếp quan sát tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 từ cửa sổ quan sát của kính hiển vi điện tử 13 trong thời gian 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ, và có thể đánh giá liệu tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc 35 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy 25 đã đạt đến tỷ lệ đích thứ nhất (70% đến 80% hợp dòng) hay chưa.

Như được thể hiện trên Fig.8, nếu kết quả của việc quan sát trong bước quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt là tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 được hiển thị trên màn hình 16 chưa đạt đến tỷ lệ đích thứ nhất (70% đến 80% hợp dòng) thì người chịu trách nhiệm sẽ liên tục quan sát tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc 35 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy 25 với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ. Theo đó, nếu tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 đạt đến tỷ lệ đích thứ nhất khi xem xét tổng diện tích bề mặt của hình ảnh phóng to được hiển thị trên màn hình 16, thì đánh giá rằng tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc 35 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 đạt đến tỷ lệ đích thứ nhất.

Kết quả của việc quan sát trong bước quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt là các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 đã được tăng sinh trên bề mặt đáy 36 (bề mặt trong của thành đáy) của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25, các tế bào gốc 35 tạo thành các khuẩn lạc và hình dạng phẳng của các tế bào gốc 35 được mở rộng, và khi tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc 35 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy 25 được hiển thị trên màn hình 16 đạt đến tỷ lệ đích thứ nhất (70% đến 80% hợp đồng) như được thể hiện trên Fig.9, thì bước chiết thứ nhất tế bào gốc để chiết các tế bào gốc 35 ra khỏi bình nuôi cấy 25 được thực hiện. Trong bước chiết thứ nhất tế bào gốc, các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 đã tăng sinh (biệt hóa) trong bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 được chiết ra khỏi bình nuôi cấy 25.

Người chịu trách nhiệm như bác sỹ, y tá và nhà nghiên cứu v.v., sẽ kích vào nút kết thúc sự quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt được hiển thị trên màn hình 16 sau khi xác nhận rằng tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 đã đạt đến tỷ lệ đích thứ nhất. Khi nút kết thúc sự quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt được kích vào, máy vi tính 11 sẽ hiển thị màn hình thứ năm về quy trình (không được thể hiện trên hình vẽ) trên màn hình 16. Trong màn hình thứ năm về quy trình này, số 2 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị, và đồng thời, thông điệp kết thúc sự tách phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ hai sự biến dạng, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, nút chiết thứ nhất tế bào gốc, nút ly tâm tế bào gốc, nút chiết thứ hai tế bào gốc, nút quan sát thứ hai sự biến dạng, nút quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt và nút chiết thứ ba tế bào gốc được hiển thị.

Người chịu trách nhiệm sẽ kích vào nút chiết thứ nhất tế bào gốc trên màn hình thứ năm về quy trình, và khiến cho dụng cụ đọc mã vạch 12 đọc mã QR của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25. Khi mã QR được truyền từ dụng cụ đọc mã vạch 12 đến máy vi tính 11, máy vi tính 11 sẽ so sánh dữ liệu đối tượng cho (dữ liệu đối tượng cho được đọc vào bộ nhớ) được hiển thị trên màn hình 16 và dữ liệu đối tượng cho được thể hiện bởi mã QR được đọc bởi dụng cụ đọc mã vạch 12, và nếu các dữ liệu đối tượng cho này khớp nhau, số 2 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị trên màn hình 16, và đồng thời, thông điệp kết thúc việc tách phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ hai sự biến dạng, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, thông điệp đang diễn ra sự chiết thứ nhất các tế bào gốc và nút kết thúc sự chiết thứ nhất các tế bào gốc được hiển thị trên màn hình 16. Nếu các dữ liệu đối tượng cho này không khớp với nhau thì máy vi

tính 11 sẽ hiển thị thông điệp sai lỗi và thông điệp dừng nuôi cấy trên màn hình 16.

Người chịu trách nhiệm sẽ tháo bỏ môi trường nuôi cấy 24 đã được tiêm vào bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 tại bước quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt ra khỏi bình nuôi cấy 25 bằng cách sử dụng ống tiêm hoặc pipet, và sau khi rửa phần trong của bình nuôi cấy 25 bằng PBS, tiêm dung dịch trypsin mà được hút bằng ống tiêm hoặc pipet vào bình nuôi cấy 25. Khi dung dịch trypsin được tiêm vào bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25, các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 đã cố định vào bề mặt đáy 36 của bình nuôi cấy 25 được lột ra khỏi bề mặt đáy 36 bằng dung dịch trypsin và nổi lên trên bề mặt của dung dịch trypsin. Người chịu trách nhiệm sẽ sử dụng pipet để hút các tế bào gốc 35 và nạp các tế bào gốc 35 chứa trong pipet này.

Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, bằng cách quan sát tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ, tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc 35 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 có thể được xác nhận một cách chính xác, và có thể nắm được một cách chắc chắn rằng tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc 27 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy 25 đã đạt đến tỷ lệ đích thứ nhất.

Fig.10 là hình vẽ diễn giải thể hiện ví dụ về bước ly tâm tế bào gốc. Sau bước chiết thứ nhất tế bào gốc trong đó các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 được chiết ra khỏi bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25, bước ly tâm tế bào gốc được thực hiện. Trong bước ly tâm tế bào gốc, các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 được chiết trong bước chiết thứ nhất tế bào gốc được ly tâm thành các lớp bằng thiết bị tách ly tâm 37. Người chịu trách nhiệm như bác sĩ, y tá và nhà nghiên cứu v.v., sẽ hút các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 từ bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 bằng pipet, và kích vào nút kết thúc việc chiết thứ nhất các tế bào gốc được hiển thị trên màn hình 16.

Khi nút kết thúc sự chiết thứ nhất các tế bào gốc được kích vào, máy vi tính 11 sẽ hiển thị màn hình thứ sáu về quy trình (không được thể hiện trên hình vẽ) trên màn hình 16. Trong màn hình thứ sáu về quy trình này, số 2 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị, và đồng thời, thông điệp kết thúc sự tách phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất sự biến dạng, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, thông điệp kết thúc việc chiết thứ nhất tế bào gốc, nút ly tâm tế bào gốc, nút chiết thứ hai tế bào gốc, nút quan sát thứ hai sự biến dạng, nút quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt và nút chiết thứ ba tế bào gốc được hiển thị.

Người chịu trách nhiệm sẽ dán tấm mã thứ ba 18c trên đó mã QR đã được in

vào bề mặt biên ngoài của ống nghiệm thủy tinh 38 mà trong ống nghiệm này các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 đã được tiêm vào. Tiếp theo, nút ly tâm tế bào gốc trên màn hình thứ sáu về quy trình được kích vào để khiến cho dụng cụ đọc mã vạch 12 đọc mã QR của ống nghiệm thủy tinh 38. Khi mã QR được truyền từ dụng cụ đọc mã vạch 12 đến máy vi tính 11, máy vi tính 11 sẽ so sánh dữ liệu đối tượng cho (dữ liệu đối tượng cho được đọc vào bộ nhớ) được hiển thị trên màn hình 16 và dữ liệu đối tượng cho được thể hiện bởi mã QR được đọc bởi dụng cụ đọc mã vạch 12, và nếu các dữ liệu đối tượng cho này khớp nhau, số 3 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị trên màn hình 16, và đồng thời, thông điệp kết thúc việc tách phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất sự biến dạng, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, thông điệp kết thúc sự chiết thứ nhất các tế bào gốc, thông điệp đang diễn ra sự ly tâm tế bào gốc và nút kết thúc sự ly tâm tế bào gốc được hiển thị trên màn hình 16. Nếu các dữ liệu đối tượng cho này không khớp với nhau thì máy vi tính 11 sẽ hiển thị thông điệp sai lỗi và thông điệp dừng nuôi cấy trên màn hình 16.

Người chịu trách nhiệm sẽ tiêm (nạp) các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 trong pipet vào ống nghiệm thủy tinh 38 và đưa (đặt) ống nghiệm thủy tinh 38 vào trong thiết bị tách ly tâm 37. Người chịu trách nhiệm sẽ thực hiện bước tách ly tâm các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 trong thời gian đã xác định trước bằng thiết bị tách ly tâm 37 và sau đó lấy ống nghiệm thủy tinh 38 ra khỏi thiết bị tách ly tâm 37. Các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 trong ống nghiệm thủy tinh 38 được tách thành hai lớp theo hướng thẳng đứng bằng thiết bị tách ly tâm 37.

Fig.11 là hình vẽ diễn giải thể hiện ví dụ về bước chiết thứ hai tế bào gốc. Sau bước ly tâm tế bào gốc trong đó các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 được tách thành các lớp, bước chiết thứ hai tế bào gốc được thực hiện. Trong bước chiết thứ hai tế bào gốc, các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 nằm ở lớp dưới (lớp dưới cùng) được chiết ra khỏi các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 đã tách thành các lớp. Người chịu trách nhiệm như bác sỹ, y tá và nhà nghiên cứu v.v., sẽ thực hiện việc tách các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 thành các lớp theo hướng thẳng đứng bằng thiết bị tách ly tâm 37, sau đó, ống nghiệm thủy tinh 38 được lấy ra khỏi thiết bị tách ly tâm 37, và nút kết thúc sự ly tâm tế bào gốc được hiển thị trên màn hình 16 được kích vào.

Khi nút kết thúc sự ly tâm tế bào gốc được kích vào, máy vi tính 11 sẽ hiển thị màn hình thứ bảy về quy trình (không được thể hiện trên hình vẽ) trên màn hình 16. Trong màn hình thứ bảy về quy trình này, số 3 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị,

và đồng thời, thông điệp kết thúc sự tách phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất sự biến dạng, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, thông điệp kết thúc việc chiết thứ nhất tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự ly tâm tế bào gốc, nút chiết thứ hai tế bào gốc, nút quan sát thứ hai sự biến dạng, nút quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt và nút chiết thứ ba tế bào gốc được hiển thị.

Người chịu trách nhiệm sẽ kích vào nút chiết thứ hai tế bào gốc trên màn hình thứ bảy về quy trình và khiến cho dụng cụ đọc mã vạch 12 đọc mã QR của ống nghiệm thủy tinh 38. Khi mã QR được truyền từ dụng cụ đọc mã vạch 12 đến máy vi tính 11, máy vi tính 11 sẽ so sánh dữ liệu đối tượng cho (dữ liệu đối tượng cho được đọc vào bộ nhớ) được hiển thị trên màn hình 16 và dữ liệu đối tượng cho được thể hiện bởi mã QR được đọc bởi dụng cụ đọc mã vạch 12, và nếu các dữ liệu đối tượng cho này khớp nhau, số 3 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị trên màn hình 16, và đồng thời, thông điệp kết thúc việc tách phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất sự biến dạng, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, thông điệp kết thúc sự chiết thứ nhất các tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự ly tâm tế bào gốc, thông điệp đang diễn ra sự chiết thứ hai tế bào gốc và thông điệp kết thúc sự chiết thứ hai tế bào gốc được hiển thị trên màn hình 16. Nếu các dữ liệu đối tượng cho này không khớp với nhau thì máy vi tính 11 sẽ hiển thị thông điệp sai lỗi và thông điệp dừng nuôi cấy trên màn hình 16.

Người chịu trách nhiệm sẽ chiết các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 nằm ở lớp dưới (lớp dưới cùng) của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 đã tách thành các lớp trong ống nghiệm thủy tinh 38. Người chịu trách nhiệm sẽ chiết (hút) các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 nằm ở lớp dưới (lớp dưới cùng) của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 đã tách thành các lớp bằng cách sử dụng ống tiêm. Cách khác, các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 nằm ở lớp dưới (lớp dưới cùng) của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 đã tách thành các lớp được chiết (hút) bằng cách sử dụng pipet.

Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, bằng cách ly tâm các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 chứa các tế bào gốc không cần thiết trong thiết bị tách ly tâm 37 để tách nó thành các lớp theo hướng thẳng đứng và chiết các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 nằm ở lớp dưới (lớp dưới cùng) của các tế bào gốc 35 đã ly tâm thành các lớp, có thể chiết một cách chắc chắn các tế bào gốc trung mô thứ hai cụ thể 39 ra khỏi các tế bào gốc 35 và có thể loại bỏ các tế bào gốc trung mô không cần thiết ra khỏi các tế bào gốc 35.

Nếu các tế bào gốc 35 được tăng sinh vượt mức 80% tỷ lệ tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 (bình nuôi cấy thứ nhất), thì hoạt tính của các tế bào gốc 35 bị mất đi dần dần, nhưng theo phương pháp nuôi cấy tế bào gốc này, khi tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc 35 được tăng sinh đến mức 70% đến 80% so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy 25, các tế bào gốc 35 được chiết ra khỏi bình nuôi cấy 25, nhờ đó hoạt tính của các tế bào gốc 35 có thể được giữ lại và các tế bào gốc 35 có thể được tăng sinh trong khi duy trì hoạt tính của nó, nhờ đó có thể chiết các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 có hoạt tính ra khỏi các tế bào gốc 35.

Fig.12 là hình vẽ diễn giải thể hiện ví dụ về bước quan sát thứ hai sự biến dạng và Fig.13 là hình chiếu cạnh của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 25 (bình nuôi cấy thứ hai). Fig.14 là hình phóng to một phần thể hiện ví dụ về hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 và Fig.15 là hình phóng to một phần thể hiện ví dụ khác về hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39. Các Fig. 14 và 15 thể hiện các hình phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 được chụp bởi kính hiển vi điện tử 13.

Sau bước chiết thứ hai tế bào gốc trong đó các tế bào gốc trung mô thứ hai cụ thể 39 nằm ở lớp dưới (lớp dưới cùng) được chiết ra khỏi các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35, bước quan sát thứ hai sự biến dạng được thực hiện. Trong bước quan sát thứ hai sự biến dạng, các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 và môi trường nuôi cấy 24 được tiêm (nạp) và bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 (bình nuôi cấy thứ hai) (bình nuôi cấy tế bào), trong khi để yên bình nuôi cấy 34 ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể (khoảng 37°C) trong thời gian 36 đến 48 giờ (để nó yên tĩnh mà không dịch chuyển nó), sự biến dạng của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 (các tế bào gốc thứ hai) trong bình nuôi cấy 34 từ hình dạng phẳng ban đầu được quan sát bằng kính hiển vi điện tử 13 trong thời gian 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ, và đánh giá liệu các tế bào gốc 39 có được cố định vào bề mặt đáy 45 của bình nuôi cấy 34 hay không. Trên bề mặt đáy 45 (bề mặt ngoài thành đáy) của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 mà trong bình này các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 và môi trường nuôi cấy 24 được tiêm vào, tám mã thứ tư 18d mà mã QR định rõ đối tượng cho được in trên đó được dán vào.

Người chịu trách nhiệm như bác sỹ, y tá và nhà nghiên cứu v.v., sẽ kích vào thông điệp kết thúc sự chiết thứ hai tế bào gốc được hiển thị trên màn hình 16 sau khi chiết các tế bào gốc trung mô thứ hai cụ thể 39 ra khỏi các tế bào gốc trung mô thứ nhất

35. Khi thông điệp kết thúc sự chiết thứ hai tế bào gốc được kích vào, máy vi tính 11 sẽ hiển thị màn hình thứ tám về quy trình (không được thể hiện trên hình vẽ) trên màn hình 16. Trong màn hình thứ tám về quy trình này, số 4 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị, và đồng thời, thông điệp kết thúc sự tách phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất sự biến dạng, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, thông điệp kết thúc việc chiết thứ nhất tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự ly tâm tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự chiết thứ hai tế bào gốc, nút quan sát thứ hai sự biến dạng, nút quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt và nút chiết thứ ba tế bào gốc được hiển thị.

Người chịu trách nhiệm sẽ dán tám mã thứ tư 18d trên đó mã QR đã được in vào bề mặt đáy 45 (bề mặt ngoài thành đáy) của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34. Tiếp theo, nút quan sát thứ hai sự biến dạng trên màn hình thứ tám về quy trình được kích vào để khiến cho dụng cụ đọc mã vạch 12 đọc mã QR của bình nuôi cấy 34. Khi mã QR được truyền từ dụng cụ đọc mã vạch 12 đến máy vi tính 11, máy vi tính 11 sẽ so sánh dữ liệu đối tượng cho (dữ liệu đối tượng cho được đọc vào bộ nhớ) được hiển thị trên màn hình 16 và dữ liệu đối tượng cho được thể hiện bởi mã QR được đọc bởi dụng cụ đọc mã vạch 12, và nếu các dữ liệu đối tượng cho này khớp nhau, số 4 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị trên màn hình 16, và đồng thời, thông điệp kết thúc việc tách phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất sự biến dạng, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, thông điệp kết thúc sự chiết thứ nhất các tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự ly tâm tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự chiết thứ hai tế bào gốc, thông điệp quan sát thứ hai sự biến dạng và nút kết thúc sự quan sát thứ hai sự biến dạng được hiển thị trên màn hình 16. Nếu các dữ liệu đối tượng cho này không khớp với nhau thì máy vi tính 11 sẽ hiển thị thông điệp sai lỗi và thông điệp dừng nuôi cấy trên màn hình 16.

Người chịu trách nhiệm sẽ tiêm (nạp) các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 được hút bằng ống tiêm hoặc pipet vào bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 và cũng tiêm (nạp) môi trường nuôi cấy 24 được hút bằng ống tiêm hoặc pipet vào bình nuôi cấy 34. Bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 (bình nuôi cấy thứ hai) được sử dụng trong bước quan sát thứ hai sự biến dạng là bình phẳng dẹt được làm từ thủy tinh trong suốt hoặc nhựa trong suốt và có bề mặt đáy 45 với dung lượng nhỏ và diện tích đã xác định trước và có hình dạng phẳng về cơ bản là hình tứ giác, và diện tích của bề mặt đáy 45 là gấp khoảng 2 lần diện tích tương ứng của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 (bình nuôi cấy thứ nhất). Bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 có phần đỉnh 40 và phần đáy 42, phần tâm 41 nằm giữa phần đỉnh 40 và phần đáy 42, và cửa tiêm 43 được tạo ra ở phần đỉnh 40. Cửa tiêm

43 được bịt kín nước bằng nắp 44.

Bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 (bình nuôi cấy thứ hai) có dung tích khoảng 40 đến 60 ml (tốt hơn là 50 ml), và diện tích bề mặt đáy của nó là khoảng 50 đến 72 mm². Bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 26 có chiều dài một cạnh là khoảng từ 7 đến 8,5 mm. Nhân tiện, đối với bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34, bình phẳng dẹt với hình dạng phẳng tròn hoặc elip và có bề mặt đáy 45 với dung tích nhỏ và diện tích đã xác định trước có thể được sử dụng. Môi trường nuôi cấy 24 là giống như môi trường được tiêm trong bước quan sát thứ nhất sự biến dạng. Các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 được tiêm vào bình nuôi cấy 34 được nuôi cấy với môi trường nuôi cấy 24 trong khi được cố định lên bề mặt đáy 45 của bình nuôi cấy 34 theo thời gian, và dần dần tăng sinh (biệt hóa) trên bề mặt đáy 45 của bình nuôi cấy 34 để tạo thành các khuẩn lạc.

Người chịu trách nhiệm sẽ mở nắp 44 ra khỏi cửa tiêm 43, tiêm (nạp) các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 được hút bằng pipet vào bên trong của bình nuôi cấy 34 từ cửa tiêm 43 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34, và tiêm (nạp) môi trường nuôi cấy 24 được hút bằng ống tiêm hoặc pipet vào bên trong của bình nuôi cấy 34 từ cửa tiêm 43 của bình nuôi cấy 34 và đóng cửa tiêm 43 bằng nắp 44. Sau khi tiêm các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 và môi trường nuôi cấy 24 vào bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34, người chịu trách nhiệm sẽ đưa (đặt) bình nuôi cấy 34 vào giá giữ mẫu 31 của kính hiển vi điện tử 13.

Miếng đệm 33 được đặt vào giữa bề mặt trên 32 của giá giữ mẫu 31 của kính hiển vi điện tử 13 và phần đáy 42 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34, phần đáy 42 của bình nuôi cấy 34 được giữ ở trạng thái được nâng lên bằng miếng đệm 33, và bình nuôi cấy 34 được giữ ở trạng thái được nghiêng ở góc đã xác định trước sao cho phần đáy 42 của bình nuôi cấy 34 ở trên và phần đỉnh 40 (cửa tiêm 43) của bình nuôi cấy 34 ở dưới. Tương tự, miếng đệm 33 được đặt vào giữa bề mặt trên 32 của giá giữ mẫu 31 của kính hiển vi điện tử 13 và phần đỉnh 40 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34, phần đỉnh 40 của bình nuôi cấy 34 được giữ ở trạng thái được nâng lên bằng miếng đệm 33, bình nuôi cấy 34 được giữ ở trạng thái được nghiêng ở góc đã xác định trước sao cho phần đỉnh 40 của bình nuôi cấy 34 ở trên và phần đáy 42 của bình nuôi cấy 34 ở dưới. Góc nghiêng α_2 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 so với bề mặt trên 32 của giá giữ mẫu 31 là nằm trong khoảng từ 2° đến 5°, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2° đến 3°.

Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, bằng cách đặt nghiêng bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 so với bề mặt trên 32 của giá giữ mẫu 31 ở góc nghiêng nêu trên, các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 và môi trường nuôi cấy 24 được nghiêng về phía

phần đỉnh 40 (hoặc về phía phần đáy 42) của bình nuôi cấy 34 trong bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34, áp lực nước của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 và môi trường nuôi cấy 24 trở nên lớn về phía phần đỉnh 40 (hoặc về phía phần đáy 42) của bình nuôi cấy 34 và các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 được tập trung về phía bề mặt đáy 45 của bình nuôi cấy 34, nhờ đó hoạt tính của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 được gia tăng và các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 có thể dễ dàng và nhanh chóng được cố định lên bề mặt đáy 45 của bình nuôi cấy 34.

Kính hiển vi điện tử 13 chụp hình ảnh phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 đã được tiêm vào trong bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ, và hình ảnh phóng to chụp được của hình dạng phẳng của các tế bào gốc 39 được truyền đến máy vi tính 11 với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ. Máy vi tính 11 lưu trữ (nhớ) hình ảnh phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 và thời gian chụp được truyền từ kính hiển vi điện tử 13 trong bộ lưu trữ ở trạng thái kết hợp với ký hiệu nhận diện đối tượng cho (phương tiện lưu trữ hình ảnh các tế bào gốc). Máy vi tính 11 hiển thị hình ảnh phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 và thời gian chụp được truyền từ kính hiển vi điện tử 13 trên màn hình 16. Người chịu trách nhiệm xác nhận (xem) hình ảnh phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 được hiển thị trên màn hình 16 trong thời gian 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ, và quan sát sự thay đổi về hình dạng phẳng của các tế bào gốc 39. Nhân tiện, người chịu trách nhiệm có thể trực tiếp quan sát sự thay đổi về hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 từ cửa sổ quan sát của kính hiển vi điện tử 13 trong thời gian 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ.

Hình dạng phẳng ban đầu của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 về cơ bản là hình tròn, và nếu hình dạng phẳng của các tế bào gốc 39 về cơ bản là hình tròn, thì các tế bào gốc 39 không được cố định vào bề mặt đáy 45 (bề mặt trong thành đáy) của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34, và sự tăng sinh (biệt hóa) của các tế bào gốc 39 chưa được bắt đầu. Hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 sau khi biến dạng là hình dạng phẳng dẹt trong đó các tế bào gốc 39 được mở rộng không đều về một hướng với lõi về cơ bản là hình tròn, và các tế bào gốc 39 được cố định vào bề mặt đáy 45 (bề mặt trong của thành đáy) của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 và sự tăng sinh (biệt hóa) của các tế bào gốc 39 được bắt đầu.

Như được thể hiện trên Fig.14, nếu kết quả của sự quan sát trong bước quan sát

thứ hai sự biến dạng là hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 được hiển thị trên màn hình 16 quan sát được vẫn duy trì hình dạng về cơ bản là hình tròn, thì người chịu trách nhiệm sẽ đánh giá rằng các tế bào gốc 39 không được cố định vào bề mặt đáy 45 (bề mặt trong của thành đáy) của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34, và liên tục quan sát các thay đổi về hình dạng phẳng của các tế bào gốc 39 với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ. Như được thể hiện trên Fig.15, nếu kết quả của sự quan sát trong bước quan sát thứ hai sự biến dạng là hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 được hiển thị trên màn hình 16 được biến dạng từ hình dạng về cơ bản là hình tròn thành hình dạng phẳng dẹt không đều với lõi về cơ bản là hình tròn, thì người chịu trách nhiệm sẽ đánh giá rằng các tế bào gốc 39 được cố định vào bề mặt đáy 45 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34.

Nếu sử dụng bình nuôi cấy lớn có dung tích vượt quá 60 ml và diện tích bề mặt đáy vượt quá 72 mm² tại thời điểm cố định các tế bào gốc trung mô thứ hai 39, thì các tế bào gốc 39 có xu hướng khó được cố định vào bề mặt đáy của bình và sự tăng sinh các tế bào gốc 39 trở nên chậm chạp, nhưng theo phương pháp nuôi cấy tế bào gốc này, các tế bào gốc 39 có thể dễ dàng được cố định vào bề mặt đáy 45 của bình nuôi cấy 34 bằng cách sử dụng bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 có dung tích nêu trên và diện tích bề mặt đáy nêu trên, và các tế bào gốc 39 có thể nhanh chóng được tăng sinh trong bình nuôi cấy 34.

Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, vì sự biến dạng của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 trong bình nuôi cấy 34 từ hình dạng phẳng ban đầu được quan sát trong thời gian 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ trong khi để yên bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời gian 36 đến 48 giờ, nên sự biến dạng của các tế bào gốc 39 không bao giờ bị bỏ sót và sự cố định của các tế bào gốc 39 vào bề mặt đáy 45 của bình nuôi cấy 34 có thể được xác nhận một cách chính xác.

Fig.16 là hình phóng to một phần thể hiện ví dụ khác về hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 và Fig.17 là hình vẽ thể hiện ví dụ về sự bảo quản các tế bào gốc trung mô thứ hai 39. Fig.16 thể hiện hình phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 được chụp bởi kính hiển vi điện tử 13. Kết quả của sự quan sát trong bước quan sát thứ hai sự biến dạng là các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 (các tế bào gốc thứ hai) được biến dạng từ hình dạng về cơ bản là hình tròn (hình dạng phẳng ban đầu) thành hình dạng phẳng dẹt không đều với lõi về cơ bản là hình tròn, và sau khi bước quan sát thứ ba tế bào gốc xác nhận sự cố định của các tế bào gốc

39 vào bề mặt đáy 45 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 (bình nuôi cấy thứ hai), bước quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt được thực hiện.

Trong bước quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt, môi trường nuôi cấy 24 đã được tiêm vào bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 được tháo bỏ ra khỏi bình nuôi cấy 34, và môi trường nuôi cấy 24 mới được tiêm (nạp) vào bình nuôi cấy 34. Tiếp theo, tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 đã được cố định vào bề mặt đáy 45 của bình nuôi cấy 34 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy 34 được quan sát bằng kính hiển vi điện tử 13 trong thời gian 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ trong khi để yên (để yên lặng mà không dịch chuyển nó) bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể (khoảng 36°C đến 37°C) trong thời gian 36 đến 48 giờ, và đánh giá liệu tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc 39 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy 34 đã đạt đến tỷ lệ đích thứ hai hay chưa. Tỷ lệ đích thứ hai giữa tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 và diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 là 88% đến 92% (88% đến 92% hợp dòng).

Người chịu trách nhiệm như bác sĩ, y tá và nhà nghiên cứu v.v. sẽ kích vào nút kết thúc sự quan sát thứ hai sự biến dạng được hiển thị trên màn hình 16 sau khi xác nhận sự cố định của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 vào bề mặt đáy 45 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34. Khi nút kết thúc sự quan sát thứ hai sự biến dạng được kích vào, máy vi tính 11 sẽ hiển thị màn hình thứ chín về quy trình (không được thể hiện trên hình vẽ) trên màn hình 16. Trong màn hình thứ chín về quy trình này, số 4 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị, và đồng thời, thông điệp kết thúc sự tách phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất sự biến dạng, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, thông điệp kết thúc việc chiết thứ nhất tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự ly tâm tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự chiết thứ hai tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ hai sự biến dạng, nút quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt và nút chiết thứ ba tế bào gốc được hiển thị.

Người chịu trách nhiệm sẽ kích vào nút quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt trên màn hình thứ chín về quy trình để lấy bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 từ giá giữ mẫu 31 của kính hiển vi điện tử 13, và khiến cho dụng cụ đọc mã vạch 12 đọc mã QR của bình nuôi cấy 34. Khi mã QR được truyền từ dụng cụ đọc mã vạch 12 đến máy vi tính 11, máy vi tính 11 sẽ so sánh dữ liệu đối tượng cho (dữ liệu đối tượng cho được đọc vào bộ nhớ) được hiển thị trên màn hình 16 và dữ liệu đối tượng cho được thể hiện bởi

mã QR được đọc bởi dụng cụ đọc mã vạch, và nếu các dữ liệu đối tượng cho này khớp nhau, số 4 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị trên màn hình 16, và đồng thời, thông điệp kết thúc việc tách phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất sự biến dạng, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, thông điệp kết thúc sự chiết thứ nhất các tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự ly tâm tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự chiết thứ hai tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ hai sự biến dạng, thông điệp đang diễn ra sự quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt và nút kết thúc sự quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt được hiển thị trên màn hình 16. Nếu các dữ liệu đối tượng cho này không khớp với nhau thì máy vi tính 11 sẽ hiển thị thông điệp sai lỗi và thông điệp dừng nuôi cấy trên màn hình 16.

Người chịu trách nhiệm sẽ tháo bỏ môi trường nuôi cấy 24 đã được tiêm vào bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 trong bước quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt ra khỏi bình nuôi cấy 34 bằng cách sử dụng ống tiêm hoặc pipet và tiêm (nạp) môi trường nuôi cấy 24 mới được hút bằng ống tiêm hoặc pipet vào bình nuôi cấy 34. Môi trường nuôi cấy 24 mới là giống như môi trường được tiêm trong bước quan sát thứ nhất sự biến dạng. Người chịu trách nhiệm sẽ đưa (đặt) bình nuôi cấy 34 vào giá giữ mẫu 31 của kính hiển vi điện tử 13 sau khi tiêm môi trường nuôi cấy 24 mới vào bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34.

Miếng đệm 33 được đặt vào giữa bề mặt trên 32 của giá giữ mẫu 31 của kính hiển vi điện tử 13 và phần đáy 42 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34, phần đáy 42 của bình nuôi cấy 34 được giữ ở trạng thái được nâng lên bằng miếng đệm 33, và bình nuôi cấy 34 được giữ ở trạng thái được nghiêng ở góc đã xác định trước sao cho phần đáy 42 của bình nuôi cấy 34 ở trên và phần đỉnh 40 (cửa tiêm 43) của bình nuôi cấy 34 ở dưới (xem Fig.13). Tương tự, miếng đệm 33 được đặt vào giữa bề mặt trên 32 của giá giữ mẫu 31 của kính hiển vi điện tử 13 và phần đỉnh 40 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34, phần đỉnh 40 của bình nuôi cấy 34 được giữ ở trạng thái được nâng lên bằng miếng đệm 33, và bình nuôi cấy 34 được giữ ở trạng thái được nghiêng ở góc đã xác định trước sao cho phần đỉnh 40 của bình nuôi cấy 34 ở trên và phần đáy 42 của bình nuôi cấy 34 ở dưới. Góc nghiêng α_2 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 so với bề mặt trên 32 của giá giữ mẫu 31 là nằm trong khoảng từ 2° đến 5° , tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2° đến 3° .

Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, sau khi xác nhận sự cố định của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39, bằng cách tiêm môi trường nuôi cấy 24 mới vào bình nuôi

cây 34 trong khi tháo bỏ môi trường nuôi cấy 24 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34, sự tăng sinh của các tế bào gốc 39 có thể được thúc đẩy một cách chắc chắn. Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, bằng cách đặt nghiêng bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 so với bề mặt trên 32 của giá giữ mẫu 31 ở góc nghiêng nêu trên, các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 và môi trường nuôi cấy 24 được nghiêng về phía phần đỉnh 40 (hoặc về phía phần đáy 42) của bình nuôi cấy 34 trong bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34, và về phía phần đỉnh 40 (hoặc phía phần đáy 42) của bình nuôi cấy 34, áp lực nước của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 và môi trường nuôi cấy 24 trở nên lớn và các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 được tập trung ở phía bề mặt đáy 45 của bình nuôi cấy 34, nhờ đó hoạt tính của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 được gia tăng và các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 có thể dễ dàng và nhanh chóng được tăng sinh (biệt hóa) trên bề mặt đáy 45 của bình nuôi cấy 34.

Kính hiển vi điện tử 13 chụp hình ảnh phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 trong bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ, và hình ảnh phóng to chụp được của hình dạng phẳng của các tế bào gốc 39 được truyền đến máy vi tính 11 với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ. Máy vi tính 11 lưu trữ (nhớ) hình ảnh phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 và thời gian chụp được truyền từ kính hiển vi điện tử 13 trong bộ lưu trữ ở trạng thái kết hợp với ký hiệu nhận diện đối tượng cho (phương tiện lưu trữ hình ảnh các tế bào gốc). Máy vi tính 11 hiển thị hình ảnh phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 và thời gian chụp được truyền từ kính hiển vi điện tử 13 trên màn hình 16.

Người chịu trách nhiệm sẽ xác nhận (nhìn) hình ảnh phóng to của hình dạng phẳng của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 được hiển thị trên màn hình 16 trong thời gian 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ, và đánh giá liệu tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc 39 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy 34 đã đạt đến tỷ lệ đích thứ hai (82 đến 92% hợp dòng) hay chưa trong khi quan sát tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc 39 đã cố định vào bề mặt đáy 45 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy 34. Cách khác, người chịu trách nhiệm có thể trực tiếp quan sát tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 từ cửa sổ quan sát của kính hiển vi điện tử 13 trong thời gian 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ, và có thể đánh giá liệu tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc 39 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy 34 đã đạt đến tỷ lệ đích thứ hai (88% đến 92% hợp dòng) hay chưa.

Như được thể hiện trên Fig.15, nếu kết quả của việc quan sát trong bước quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt là tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 được hiển thị trên màn hình 16 chưa đạt đến tỷ lệ đích thứ hai (88% đến 92% hợp dòng) thì người chịu trách nhiệm sẽ liên tục quan sát tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc 39 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy 34 với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ. Mặt khác, nếu tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 đạt đến tỷ lệ đích thứ hai khi xem xét tổng diện tích bề mặt của hình ảnh phóng to được hiển thị trên màn hình 16, thì đánh giá rằng tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc 39 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 đạt đến tỷ lệ đích thứ hai.

Kết quả của việc quan sát trong bước quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt là các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 đã được tăng sinh trên bề mặt đáy 45 (bề mặt trong của thành đáy) của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34, các tế bào gốc 39 tạo thành các khuẩn lạc và hình dạng phẳng của các tế bào gốc 39 được mở rộng, và khi tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc 39 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy 34 được hiển thị trên màn hình 16 đạt đến tỷ lệ đích thứ hai (88% đến 92% hợp dòng) như được thể hiện trên Fig.16, thì bước chiết thứ ba tế bào gốc để chiết các tế bào gốc 39 ra khỏi bình nuôi cấy 34 được thực hiện. Trong bước chiết thứ ba tế bào gốc, các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 đã tăng sinh (biệt hóa) trong bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 được chiết ra khỏi bình nuôi cấy 34. Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, bằng cách quan sát tổng diện tích bề mặt với các khoảng cách thời gian khoảng 1 đến 2 giờ, tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 có thể được xác nhận một cách chính xác, và có thể nắm được một cách chắc chắn rằng tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc 39 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy 34 đã đạt đến tỷ lệ đích thứ hai.

Người chịu trách nhiệm như bác sỹ, y tá và nhà nghiên cứu v.v., sẽ kích vào nút kết thúc sự quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt được hiển thị trên màn hình 16 sau khi xác nhận rằng tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 đã đạt đến tỷ lệ đích thứ hai. Khi nút kết thúc sự quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt được kích vào, máy vi tính 11 sẽ hiển thị màn hình thứ mười về quy trình (không được thể hiện trên hình vẽ) trên màn hình 16. Trong màn hình thứ mười về quy trình này, số 4 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị, và đồng thời, thông điệp kết thúc sự tách phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất sự

biến dạng, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, thông điệp kết thúc việc chiết thứ nhất tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự ly tâm tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự chiết thứ hai tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ hai sự biến dạng, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt và nút chiết thứ ba tế bào gốc được hiển thị.

Người chịu trách nhiệm sẽ kích vào nút chiết thứ ba tế bào gốc trên màn hình thứ mười về quy trình và khiến cho dụng cụ đọc mã vạch 12 đọc mã QR của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34. Khi mã QR được truyền từ dụng cụ đọc mã vạch 12 đến máy vi tính 11, máy vi tính 11 sẽ so sánh dữ liệu đối tượng cho (dữ liệu đối tượng cho được đọc vào bộ nhớ) được hiển thị trên màn hình 16 và dữ liệu đối tượng cho được thể hiện bởi mã QR được đọc bởi dụng cụ đọc mã vạch 12, và nếu các dữ liệu đối tượng cho này khớp nhau, số 4 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị trên màn hình 16, và đồng thời, thông điệp kết thúc việc tách phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất sự biến dạng, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, thông điệp kết thúc sự chiết thứ nhất các tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự ly tâm tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự chiết thứ hai tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ hai sự biến dạng, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt và nút kết thúc sự chiết thứ ba tế bào gốc được hiển thị trên màn hình 16. Nếu các dữ liệu đối tượng cho này không khớp với nhau thì máy vi tính 11 sẽ hiển thị thông điệp sai lỗi và thông điệp dừng nuôi cấy trên màn hình 16.

Trong bước quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt, người chịu trách nhiệm sẽ tháo bỏ môi trường nuôi cấy 24 đã được tiêm vào bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 ra khỏi bình nuôi cấy 34 bằng cách sử dụng ống tiêm hoặc pipet, và sau khi rửa phần bên trong của bình nuôi cấy 34 bằng PBS, dung dịch trypsin được hút bằng ống tiêm hoặc pipet được tiêm vào bình nuôi cấy 34. Khi dung dịch trypsin được tiêm vào bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34, các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 đã cố định vào bề mặt đáy 45 của bình nuôi cấy 34 được lột ra khỏi bề mặt đáy 45 bằng dung dịch trypsin và được nổi lên trên bề mặt của dung dịch trypsin.

Người chịu trách nhiệm sẽ sử dụng pipet để hút các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 và tiêm (nạp) các tế bào gốc 39 này vào bình bảo quản 46 từ pipet. Các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 đã được tiêm vào bình bảo quản 46 là loại tế bào gốc trung mô tinh khiết cụ thể (về cơ bản là một chủng loại duy nhất) có hoạt tính với mục đích cần nuôi cấy mà trong đó các tế bào gốc trung mô không cần thiết đã được loại bỏ. Sau khi tiêm

các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 vào bình bảo quản 46 từ pipet, người chịu trách nhiệm sẽ dán tấm mã thứ tư 18d mà trên đó đã in mã QR vào bề mặt bên ngoài của bình bảo quản 46.

Người chịu trách nhiệm sẽ kích vào nút kết thúc sự chiết thứ ba tế bào gốc trên màn hình thứ mười về quy trình được hiển thị trên màn hình 16, khiến cho dụng cụ đọc mã vạch 12 đọc mã QR của bình bảo quản 46, và sau đó bình bảo quản 46 mà trong đó các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 đã được tiêm vào này được khuấy trong máy làm lạnh 47. Các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 được bảo quản trong máy làm lạnh 47 ở nhiệt độ khoảng 3°C đến 4°C.

Khi mã QR được truyền từ dụng cụ đọc mã vạch 12 đến máy vi tính 11, máy vi tính 11 sẽ so sánh dữ liệu đối tượng cho (dữ liệu đối tượng cho được đọc vào bộ nhớ) được hiển thị trên màn hình 16 và dữ liệu đối tượng cho được thể hiện bởi mã QR được đọc bởi dụng cụ đọc mã vạch 12, và nếu các dữ liệu đối tượng cho này khớp nhau, số 4 và dữ liệu đối tượng cho được hiển thị trên màn hình 16, và đồng thời, thông điệp kết thúc việc tách phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc việc chiết phần chọc hút tủy xương, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất sự biến dạng, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, thông điệp kết thúc sự chiết thứ nhất các tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự ly tâm tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự chiết thứ hai tế bào gốc, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ hai sự biến dạng, thông điệp kết thúc sự quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt và thông điệp kết thúc sự chiết thứ ba tế bào gốc được hiển thị trên màn hình 16.

Nếu các tế bào gốc 39 được tăng sinh vượt mức 92% tỷ lệ tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 (bình nuôi cấy thứ hai), thì hoạt tính của các tế bào gốc 39 bị mất đi dần dần, nhưng theo phương pháp nuôi cấy tế bào gốc này, khi tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc 39 được tăng sinh đến mức 88% đến 92% so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy 34, các tế bào gốc 39 được chiết ra khỏi bình nuôi cấy 34, nhờ đó hoạt tính của các tế bào gốc 39 có thể được giữ lại và các tế bào gốc 39 có thể được tăng sinh trong khi duy trì hoạt tính của nó.

Trong phương pháp nuôi cấy tế bào gốc, phần chọc hút tủy xương thứ hai 23 nằm ở lớp trung gian được chiết ra khỏi phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 đã tách thành các lớp, phần chọc hút tủy xương thứ hai 23 được nuôi cấy với môi trường nuôi cấy 24 để cố định các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 (các tế bào gốc thứ nhất) vào bề mặt đáy 36 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25 (bình nuôi cấy thứ nhất) và các tế

bào gốc trung mô thứ nhất 35 được tăng sinh. Nếu tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 đạt đến tỷ lệ đích thứ nhất so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất 25, thì các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 sẽ được chiết ra khỏi bình nuôi cấy 25, các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 (các tế bào gốc thứ hai) nằm ở lớp dưới (lớp dưới cùng) trong các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 đã ly tâm thành các lớp được chiết ra, các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 được nuôi cấy với môi trường nuôi cấy 24 để cố định các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 vào bề mặt đáy 45 của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 và các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 được tăng sinh. Nếu tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai 34 đạt đến tỷ lệ đích thứ hai, thì các tế bào gốc trung mô thứ hai 39 được chiết ra khỏi bình nuôi cấy 34. Do đó, bằng cách chiết phần chọc hút tủy xương thứ hai cụ thể 23 từ phần chọc hút tủy xương thứ nhất 19 đã tách thành các lớp và bằng cách chiết các tế bào gốc trung mô thứ hai cụ thể 39 ra khỏi các tế bào gốc trung mô thứ nhất 35 đã tách thành các lớp, sự tăng sinh các tế bào gốc khác nhau có thể được ngăn chặn và các loại tế bào gốc cụ thể (các tế bào gốc trung mô thứ hai) mà là đối tượng cần được sản xuất mới có thể được nuôi cấy, và có thể sản xuất được các tế bào gốc tinh khiết (chuẩn) mà các tế bào gốc không cần thiết đã được loại bỏ khỏi chúng.

Phương pháp nuôi cấy tế bào gốc có thể chỉ nuôi cấy các loại tế bào gốc cụ thể (các tế bào gốc trung mô thứ hai 39), nhờ đó có thể nuôi cấy được các tế bào gốc có tác dụng điều trị bệnh lớn đối với các bệnh khác nhau và có tác dụng hồi phục trong y khoa hồi phục và có khả năng cao chữa khỏi hoàn toàn các bệnh khác nhau cũng như có khả năng cao hồi phục các mô hoặc các cơ quan khác nhau.

Giải thích các số chỉ dẫn

- 10 Hệ thống nuôi cấy tế bào gốc
- 11 Máy vi tính
- 12 Dụng cụ đọc mã vạch
- 13 Kính hiển vi điện tử
- 14 Bàn phím
- 15 Con chuột
- 16 Màn hình
- 18a Tấm mã thứ nhất
- 18b Tấm mã thứ hai

- 18c Tắm mã thứ ba
- 18d Tắm mã thứ tư
- 19 Phần chọc hút tủy xương thứ nhất
- 20 Ống nghiệm thủy tinh
- 21 Giá đựng ống nghiệm
- 22 Bộ ôn nhiệt
- 23 Phần chọc hút tủy xương thứ hai
- 24 Môi trường nuôi cấy
- 25 Bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ nhất (bình nuôi cấy thứ nhất)
- 26 Phần đỉnh
- 27 Phần tâm
- 28 Phần đáy
- 29 Cửa tiêm
- 30 Nắp
- 31 Giá giữ mẫu
- 32 Bề mặt trên
- 33 Miếng đệm
- 34 Bình nuôi cấy phẳng dẹt thứ hai (bình nuôi cấy thứ hai)
- 35 Các tế bào gốc trung mô thứ nhất (các tế bào gốc thứ nhất)
- 36 Bề mặt đáy
- 37 Thiết bị tách ly tâm
- 38 Ống nghiệm thủy tinh
- 39 Các tế bào gốc trung mô thứ hai (các tế bào gốc thứ hai)
- 40 Phần đỉnh
- 41 Phần tâm
- 42 Phần đáy
- 43 Cửa tiêm
- 44 Nắp
- 45 Bề mặt đáy
- 46 Bình bảo quản
- 47 Máy làm lạnh

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp nuôi cấy tế bào gốc để nuôi cấy các loại tế bào gốc cụ thể sử dụng phần chọc hút tủy xương thứ nhất lấy từ đối tượng cho, trong đó:

phương pháp nuôi cấy tế bào gốc này bao gồm bước tách phần chọc hút tủy xương để tách phần chọc hút tủy xương thứ nhất lấy từ đối tượng cho thành các lớp, bước chiết phần chọc hút tủy xương để chiết phần chọc hút tủy xương thứ hai nằm ở lớp trung gian trong phần chọc hút tủy xương thứ nhất đã được tách thành các lớp trong bước tách phần chọc hút tủy xương, bước quan sát thứ nhất sự biến dạng để quan sát sự biến dạng của các tế bào gốc thứ nhất trong bình nuôi cấy thứ nhất từ hình dạng phẳng ban đầu trong khi để yên nó trong thời gian đã xác định trước trong trạng thái đặt nghiêng bình nuôi cấy thứ nhất ở góc nghiêng từ 2° đến 5° với các khoảng cách thời gian đã xác định trước sau khi tiêm phần chọc hút tủy xương thứ hai đã được chiết ra trong bước chiết phần chọc hút tủy xương và môi trường nuôi cấy đã xác định trước vào bình nuôi cấy thứ nhất có thể tích đã xác định trước và diện tích bề mặt đáy đã xác định trước, bước quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt gồm việc tiêm môi trường nuôi cấy mới vào bình nuôi cấy thứ nhất trong khi tháo bỏ môi trường nuôi cấy trong bình nuôi cấy thứ nhất bằng cách đánh giá kết quả của sự quan sát trong bước quan sát thứ nhất sự biến dạng là các tế bào gốc thứ nhất đã được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất nếu các tế bào gốc thứ nhất được biến dạng từ hình dạng phẳng ban đầu thành hình dạng phẳng đã xác định trước, và quan sát tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất trong khi để yên nó trong thời gian đã xác định trước trong trạng thái đặt nghiêng bình nuôi cấy thứ nhất ở góc nghiêng từ 2° đến 5° với các khoảng cách thời gian đã xác định trước, bước chiết thứ nhất tế bào gốc để chiết các tế bào gốc thứ nhất ra khỏi bình nuôi cấy thứ nhất nếu kết quả của sự quan sát trong bước quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt là hình dạng phẳng của các tế bào gốc thứ nhất được mở rộng do sự tăng sinh các tế bào gốc thứ nhất ở diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất và tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất đạt đến tỷ lệ đích thứ nhất, bước ly tâm tế bào gốc để ly tâm các tế bào gốc thứ nhất đã được chiết ra trong bước chiết thứ nhất tế bào gốc thành cách lớp, bước chiết thứ hai tế bào gốc để chiết các tế bào gốc thứ hai nằm ở lớp dưới cùng sau khi tách các tế bào gốc thứ nhất thành các lớp trong bước ly tâm tế bào gốc, và bước chiết thứ ba tế bào gốc gồm việc tiêm các tế bào gốc thứ hai chiết được trong bước chiết thứ hai tế bào gốc và môi trường nuôi cấy đã xác định trước vào bình nuôi cấy thứ hai có dung tích và diện tích của bề mặt đáy lớn hơn dung tích và diện tích của bề mặt đáy

của bình nuôi cấy thứ nhất, để yên bình nuôi cấy thứ hai này trong thời gian đã xác định trước để cố định các tế bào gốc thứ hai vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai và tăng sinh các tế bào gốc thứ hai này, và nếu tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai đạt đến tỷ lệ đích thứ hai do sự mở rộng hình dạng phẳng của các tế bào gốc thứ hai ở diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai, thì chiết các tế bào gốc thứ hai ra khỏi bình nuôi cấy thứ hai này.

2. Phương pháp nuôi cấy tế bào gốc theo điểm 1, trong đó phương pháp nuôi cấy tế bào gốc này bao gồm bước quan sát thứ hai sự biến dạng gồm việc tiêm các tế bào gốc thứ hai được chiết trong bước chiết thứ hai tế bào gốc và môi trường nuôi cấy vào bình nuôi cấy thứ hai, sau đó, quan sát sự biến dạng của các tế bào gốc thứ hai trong bình nuôi cấy thứ hai từ hình dạng phẳng ban đầu trong khi để yên nó trong trạng thái đặt nghiêng bình nuôi cấy thứ hai ở góc nghiêng từ 2° đến 5° trong thời gian đã xác định trước với các khoảng cách thời gian đã xác định trước, và bước quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt gồm việc tiêm môi trường nuôi cấy mới vào bình nuôi cấy thứ hai trong khi tháo bỏ môi trường nuôi cấy trong bình nuôi cấy thứ hai bằng cách đánh giá kết quả của sự quan sát trong bước quan sát thứ hai sự biến dạng là các tế bào gốc thứ hai đã được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai nếu các tế bào gốc thứ hai được biến dạng từ hình dạng phẳng ban đầu thành hình dạng phẳng đã xác định trước, và quan sát tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai đã cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai trong khi để yên nó trong thời gian đã xác định trước trong trạng thái đặt nghiêng bình nuôi cấy thứ hai ở góc nghiêng từ 2° đến 5° với các khoảng thời gian đã xác định trước, và trong bước chiết thứ ba tế bào gốc, nếu kết quả của việc quan sát trong bước quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt là hình dạng phẳng của các tế bào gốc thứ hai được mở rộng do sự tăng sinh các tế bào gốc thứ hai và tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai đạt đến tỷ lệ đích thứ hai, thì các tế bào gốc thứ hai được chiết ra khỏi bình nuôi cấy thứ hai.

3. Phương pháp nuôi cấy tế bào gốc theo điểm 2, trong đó dung tích của bình nuôi cấy thứ hai là 40 đến 60 ml, hình dạng phẳng ban đầu của các tế bào gốc thứ hai về cơ bản là hình tròn, hình dạng phẳng của các tế bào gốc thứ hai sau khi biến dạng là hình phẳng dẹt trong đó các tế bào gốc thứ hai được mở rộng không đều về một hướng với lõi về cơ bản là hình tròn, và trong bước quan sát thứ hai sự biến dạng, sự biến dạng của các tế bào gốc thứ hai trong bình nuôi cấy thứ hai từ hình dạng phẳng ban đầu được quan sát trong thời gian từ 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian là 1 đến 2 giờ trong khi để yên bình nuôi cấy thứ hai ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời

gian 36 đến 48 giờ, và nếu các tế bào gốc thứ hai được biến dạng thành hình dạng phẳng dẹt không đều, thì các tế bào gốc thứ hai được đánh giá là đã được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai.

4. Phương pháp nuôi cấy tế bào gốc theo điểm 2 hoặc điểm 3, trong đó, trong bước quan sát thứ hai tổng diện tích bề mặt, tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai đã được cố định và bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai được quan sát trong thời gian 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian 1 đến 2 giờ trong khi để yên bình nuôi cấy thứ hai ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời gian 36 đến 48 giờ.

5. Phương pháp nuôi cấy tế bào gốc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4, trong đó tỷ lệ đích thứ hai giữa tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ hai và diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ hai là từ 88% đến 92%.

6. Phương pháp nuôi cấy tế bào gốc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó, trong bước tách phần chọc hút tủy xương, 2 đến 3 ml phần chọc hút tủy xương thứ nhất được lấy từ đối tượng cho, 2 đến 3 ml phần chọc hút tủy xương thứ nhất này được tiêm vào bình tách chạy dài theo hướng thẳng đứng, và bình tách này được để yên ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời gian đã xác định trước để tách phần chọc hút tủy xương thứ nhất trong bình tách thành các lớp theo hướng thẳng đứng, và trong bước chiết phần chọc hút tủy xương, phần chọc hút tủy xương thứ hai mà nằm ở lớp trung gian trong phần chọc hút tủy xương thứ nhất đã được tách thành các lớp trong bình tách được chiết ra.

7. Phương pháp nuôi cấy tế bào gốc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó dung tích của bình nuôi cấy thứ nhất là 20 đến 30 ml, hình dạng phẳng ban đầu của các tế bào gốc thứ nhất về cơ bản là hình tròn, hình dạng phẳng của các tế bào gốc thứ nhất sau khi biến dạng là hình phẳng dẹt trong đó các tế bào gốc thứ nhất được mở rộng không đều về một hướng với lõi về cơ bản là hình tròn, và trong bước quan sát thứ nhất sự biến dạng, sự biến dạng của các tế bào gốc thứ nhất trong bình nuôi cấy thứ nhất từ hình dạng phẳng ban đầu được quan sát trong thời gian từ 12 đến 24 giờ với các khoảng cách thời gian là 1 đến 2 giờ trong khi để yên bình nuôi cấy thứ nhất ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời gian 12 đến 24 giờ, và nếu các tế bào gốc thứ nhất được biến dạng thành hình dạng phẳng dẹt không đều, thì các tế bào gốc thứ nhất được đánh giá là được cố định vào bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất.

8. Phương pháp nuôi cấy tế bào gốc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó, trong bước quan sát thứ nhất tổng diện tích bề mặt, tổng diện tích bề mặt của

các tế bào gốc thứ nhất đã được cố định và bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất so với diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất được quan sát trong thời gian 36 đến 48 giờ với các khoảng cách thời gian 1 đến 2 giờ trong khi để yên bình nuôi cấy thứ nhất ở nhiệt độ về cơ bản là giống như nhiệt độ cơ thể trong thời gian 36 đến 48 giờ.

9. Phương pháp nuôi cấy tế bào gốc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó tỷ lệ đích thứ nhất giữa tổng diện tích bề mặt của các tế bào gốc thứ nhất và diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy thứ nhất là từ 70% đến 80%.

10. Phương pháp nuôi cấy tế bào gốc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó, trong bước ly tâm tế bào gốc, các tế bào gốc thứ nhất được tiêm vào bình tách, bình tách này được đặt trong thiết bị tách ly tâm để ly tâm các tế bào gốc thứ nhất, và trong bước chiết thứ hai tế bào gốc, các tế bào gốc thứ nhất được ly tâm thành các lớp trong bình tách, và sau đó, các tế bào gốc thứ hai nằm ở lớp dưới cùng được chiết ra.

11. Phương pháp nuôi cấy tế bào gốc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó các tế bào gốc thứ nhất và các tế bào gốc thứ hai là các tế bào gốc trung mô.

Fig.1

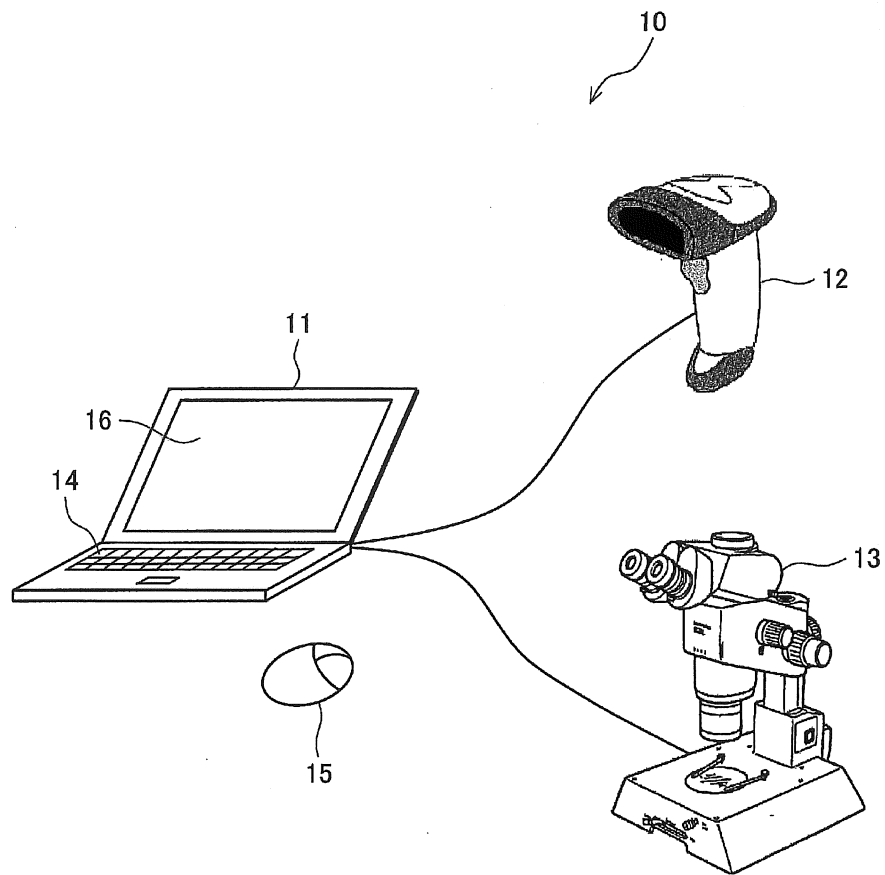


Fig.2

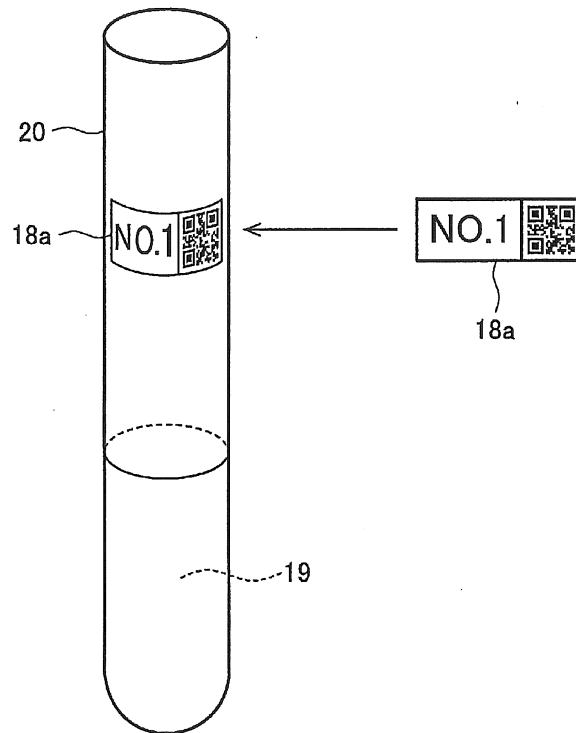


Fig.3

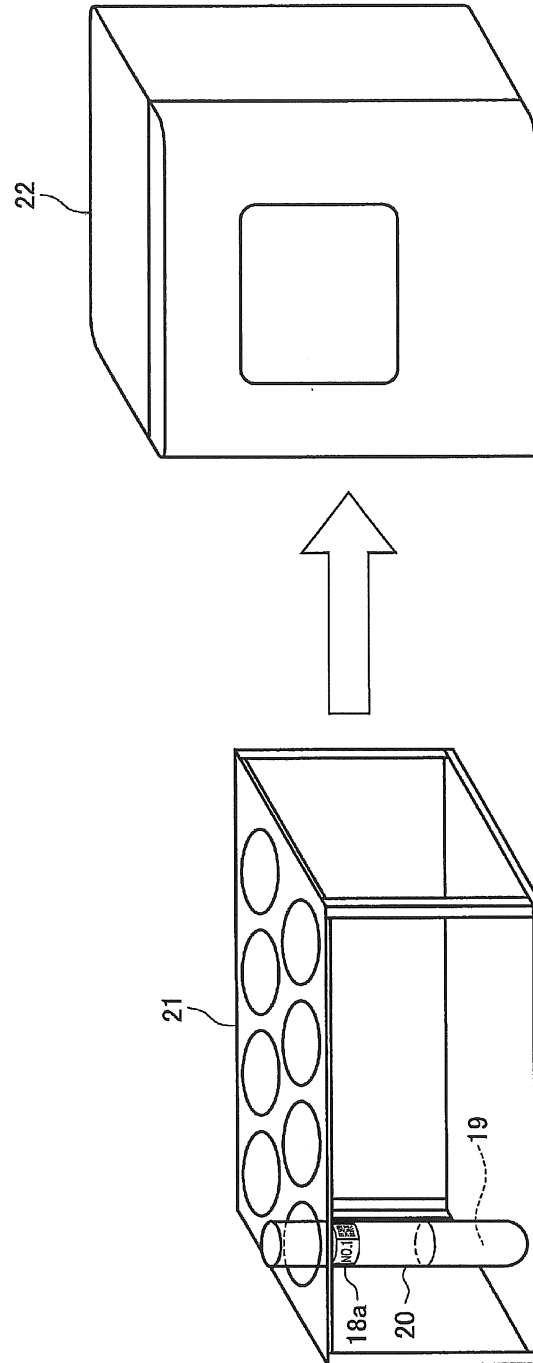


Fig.4

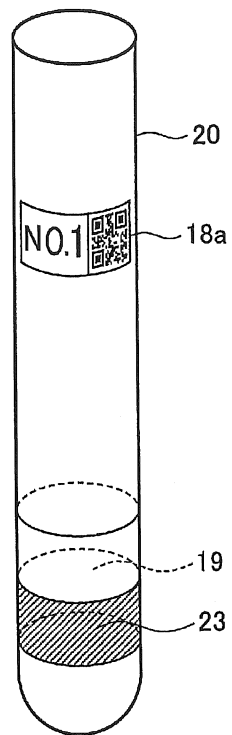


Fig.5

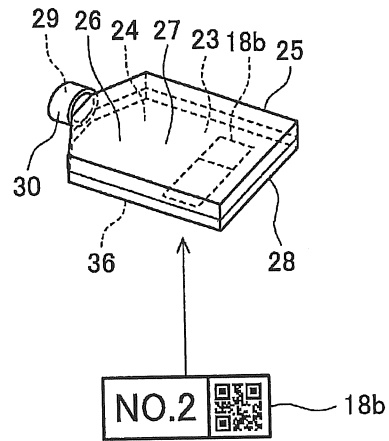


Fig.6

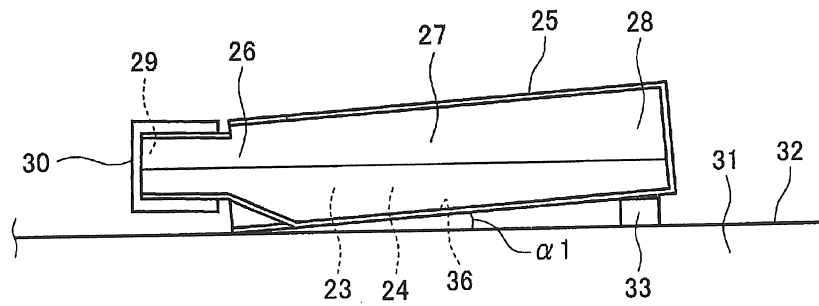


Fig.7

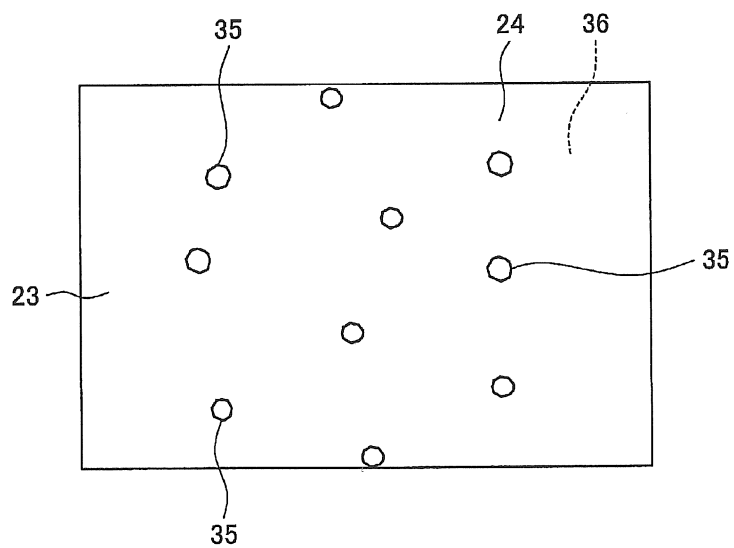


Fig.8

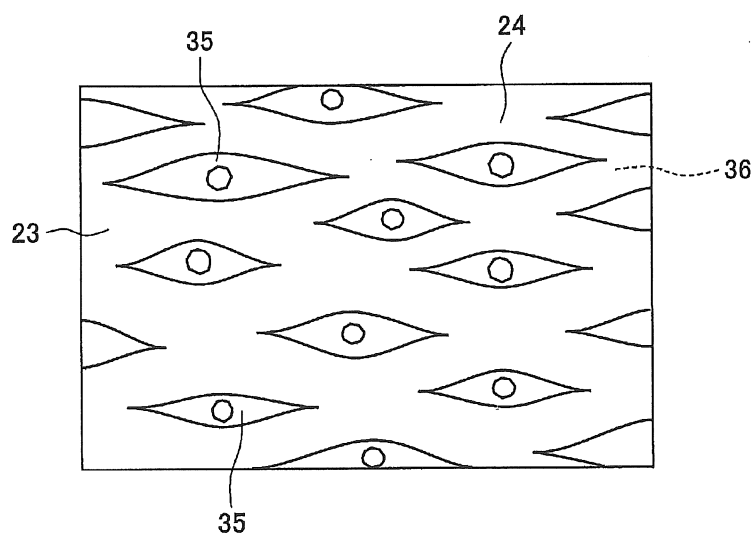


Fig.9

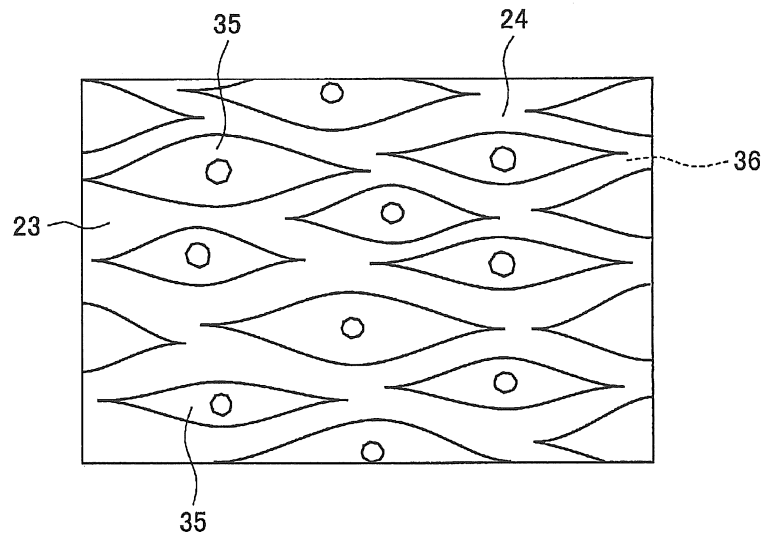


Fig.10

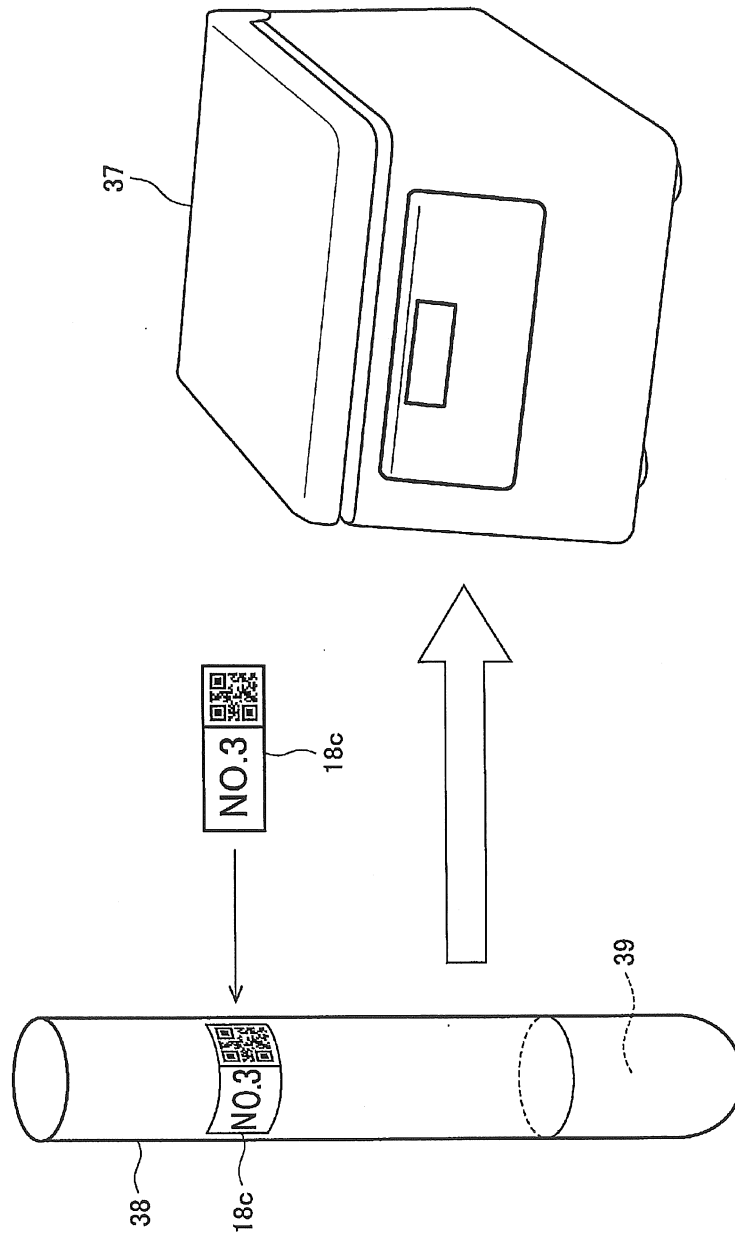


Fig.11

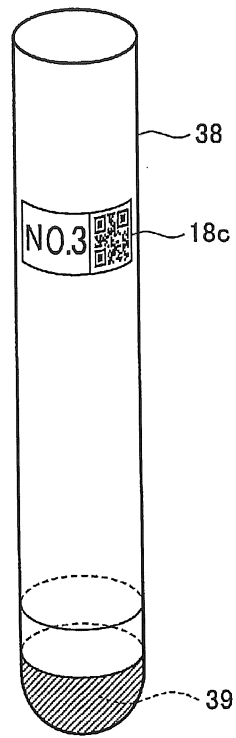


Fig.12

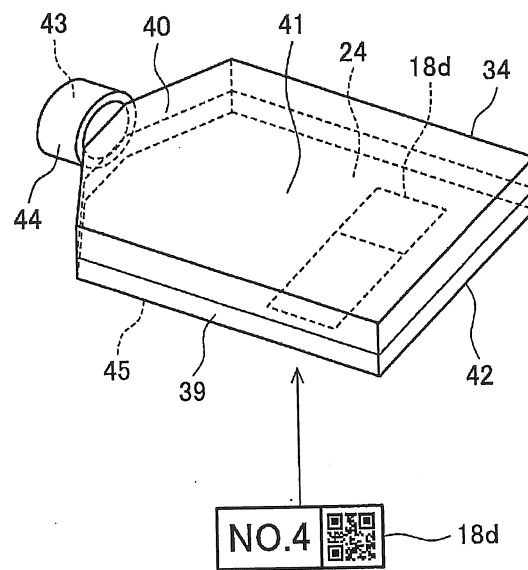


Fig.13

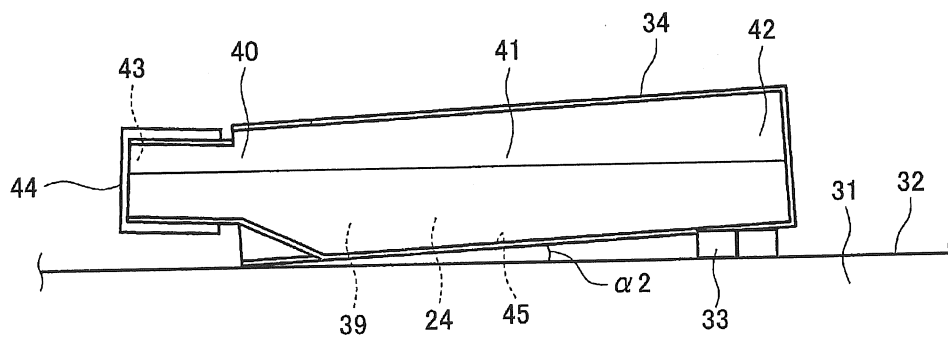


Fig.14

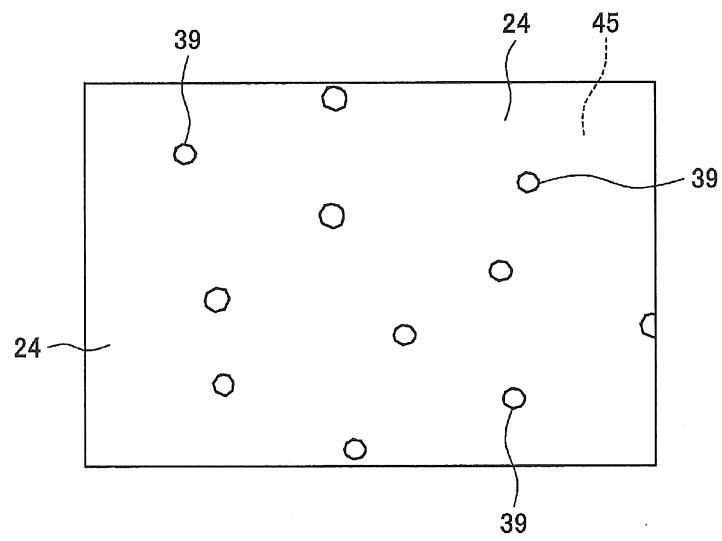


Fig.15

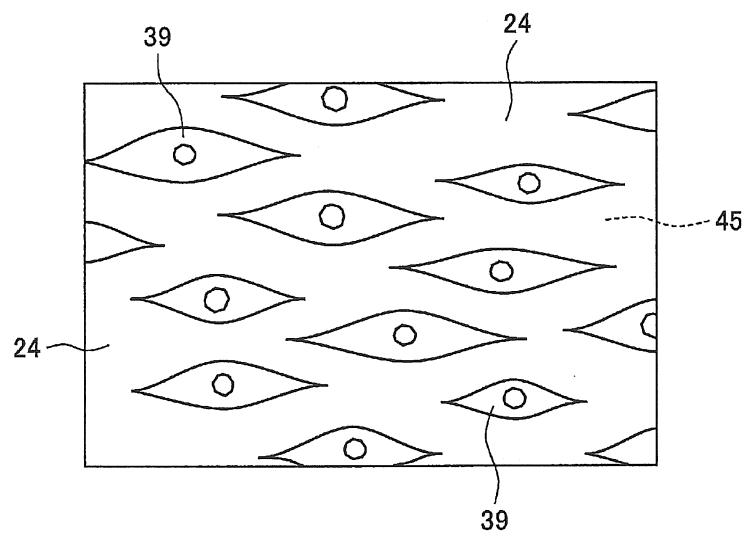


Fig.16

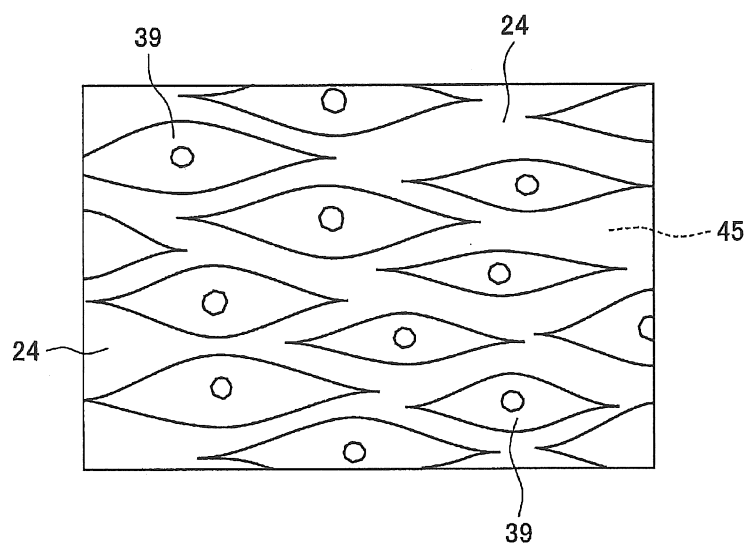


Fig.17

