(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) **1-0042029**

(51)[2021.01] **A01N 1/02**; A61K 45/06; A61B 17/122 (13) **B**

(21) 1-2022-04305 (22) 08/07/2022
(45) 25/12/2024 441 (43) 26/09/2022 414
(73) Viện nghiên cứu Tế bào gốc và Công nghệ gen Vinmec (VN)
458 Minh Khai, phường Vĩnh Tuy, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội
(72) Đỗ Xuân Hai (VN); Nguyễn Thanh Liêm (VN); Hoàng Thị Mỹ Nhung (VN); Nguyễn Lĩnh Toàn (VN); Nguyễn Trung Chức (VN); Nguyễn Thị Hoa (VN); Ngô Thu Hằng (VN).

(54) MẪU CHUỘT CỐNG TRẮNG ĐƯỢC GHÉP ĐỘNG MẠCH DỊ LOÀI

(57) Sáng chế đề cập đến mẫu chuột cống trắng được ghép động mạch dị loài từ dây rốn của cuống rốn của trẻ sơ sinh. Trong đó mẫu chuột cống trắng (*Rattus norvegicus*) được ghép vào động mạch chủ bụng dưới thận một đoạn động mạch dây rốn được phân lập từ cuống rốn trẻ sơ sinh, có khả năng dung nạp và không gây ức chế miễn dịch. Mẫu chuột này cho thấy không phát sinh các hiện tượng huyết khối, tắc mạch, thích hợp dùng làm mẫu tiêu bản sống, ứng dụng trong hướng nghiên cứu điều trị lâm sàng và cận lâm sàng các bệnh lý liên quan đến tim mạch.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực y sinh ứng dụng trong điều trị ghép dị loài mạch máu từ dây rốn người với động mạch chủ bụng dưới thận chuột công trắng để tạo ra mẫu chuột cống trắng được ghép dị loài giữ động mạch dây rốn người dùng trong nghiên cứu y học lâm sàng điều trị bệnh lý tim mạch trên người.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh tim mạch (Cardiovascular disease-CVDs) là thuật ngữ sử dụng để chỉ một nhóm các bệnh liên quan đến tim hoặc mạch máu, như các bệnh liên quan đến dị tật bẩm sinh, rối loạn chức năng hay cấu trúc dẫn đến sự đình trệ hoặc phá hủy hoạt động bình thường của tim. Với hơn 17,5 triệu ca mỗi năm, thậm chí có thể tăng lên tới hơn 20 triệu trong năm 2030, bệnh tim mạch được cho là nguyên nhân chủ yếu dẫn tới các ca tử vong trên toàn cầu, đặc biệt là ở các nước đang phát triển.

Tại Việt Nam, theo thống kê của Bộ Y tế, số người mắc các bệnh về tim mạch khoảng 200.000 ca, chiếm 33% ca tử vong toàn quốc. Trong số các bệnh về tim mạch, các nhóm bệnh liên quan đến xơ vữa động mạch và động mạch vành chiếm tỉ lệ lớn về mức độ gây tử vong. Nhằm khắc phục căn bệnh này, biện pháp tối ưu là tái lưu thông mạch vành để tăng cường lượng máu tới tim, bằng cách sử dụng ống thông tổng hợp (Synthetic vascular prostheses) hoặc sử dụng kỹ thuật phẫu thuật bắc cầu (bypass surgeries). Tuy vậy các biện pháp này đều có những nhược điểm lớn khó khắc phục được hoàn toàn. Trong khi các ống thông tổng hợp thiếu các thành phần chống huyết khối (antithrombotic), thiếu độ tương thích sinh học và có nguy cơ nhiễm trùng, thì kỹ thuật phẫu thuật bắc cầu gặp phải vấn đề về nguồn cung cấp do sự thiếu hụt về nguồn mô từ người hiến tặng cũng như nguy cơ đào thải miễn dịch.

Các biện pháp phát triển nhằm cấy ghép các đoạn mạch thay thế (kỹ thuật phẫu thuật bắc cầu) mặc dù cho phép thay thế các đoạn mạch bị vỡ, tắc, nhưng lại bị giới hạn do đặc tính tự đào thải vật cấy ghép. Mặc dù ngay cả khi việc sử dụng mạch máu ghép tự thân là tiêu chuẩn vàng cho điều trị, rất nhiều bệnh nhân không có mạch máu phù hợp để thay thế, do đa số đều là những người cao tuổi với các vấn đề về hệ mạch. Sự gia

tăng nhu cầu về các mạch ghép trên toàn cầu, đặc biệt là các động mạch có đường kính nhỏ, đã và đang thúc đẩy các nhà khoa học khám phá các kỹ thuật mô ghép mới.

Để phát triển các kỹ thuật cũng như các nghiên cứu lâm sàng và cận lâm sàng, cần có những mẫu động vật có khả năng mang, tiếp nhận, nuôi dưỡng hoặc chứng minh có khả năng tiếp nhận các vật ghép dị loài hoặc đồng loài. Các mẫu chuột này là công cụ nhằm đánh giá hiệu quả của việc cấy ghép cũng như là công cụ trong nghiên cứu tiền lâm sàng nhằm phát triển, tìm ra các hướng điều trị tốt nhất đối với các bệnh về tim mạch, ví dụ như các nghiên cứu về thông tắc mạch, huyết khối, sự tương thích sinh học hoặc đơn giản như các công cụ trong thực hành lâm sàng.

Do đó, vẫn cần có những quy trình cho phép thu được các vật liệu tiềm năng cho phép sử dụng rộng rãi trong việc cấy ghép đồng loài, tự thân hoặc dị loài. Ngoài ra, vẫn cần phát triển những mẫu động vật làm mẫu vật để nghiên cứu tiền lâm sàng ứng dụng trong điều trị các bệnh liên quan đến tim mạch.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế nhằm khắc phục các vấn đề nêu trên, cụ thể là sáng chế đề cập đến một quy trình phân lập động mạch từ dây rốn, quy trình ghép động mạch được phân lập này vào động vật và mẫu động vật được cấy ghép để nuôi giữ động mạch dây rốn từ cuống rốn trẻ sơ sinh dùng để nghiên cứu bệnh học lâm sàng ứng dụng điều trị bệnh tim mạch ở người.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình phân lập động mạch từ dây rốn, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) thu nhận mẫu dây rốn, trong đó cuống dây rốn đã cắt bỏ từ trẻ sơ sinh sau khi sinh được thu gom trong vòng 2 giờ, chuyển vào chai thủy tinh vô trùng chứa dung dịch PBS vô trùng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin sao cho mẫu dây rốn được đặt ngập trong dung dịch;

b) rửa mẫu dây rốn bằng cách cắt bỏ hai đầu dây rốn, sau đó dùng xi lanh bơm rửa dung dịch dung dịch PBS vô trùng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin vào dây rốn, lặp lại quá trình rửa này 3 lần để loại bỏ hoàn toàn máu có trong động mạch dây rốn sau đó cắt dây rốn thành những đoạn kích thước từ 4 đến 5 cm; và

c) thu nhận động mạch dây rốn bằng cách cắt dọc thành dây rốn và dùng kẹp rút động mạch ra khỏi dây rốn tách bỏ lớp thạch bám trên thành động mạch, sau khi cắt bỏ đầu mạch bị kẹp, cắt động mạch dây rốn thành những đoạn có chiều dài từ 4 đến 5mm, thu được động mạch dây rốn được phân lập.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến quy trình ghép động mạch dây rốn được phân lập từ cuống rốn vào chuột cống trắng để tạo ra mẫu chuột cống trắng được ghép động mạch chủ bụng dưới thận mà không sử dụng các biện pháp ức chế miễn dịch, dùng trong nghiên cứu y học lâm sàng điều trị bệnh lý tim mạch cũng như cấy ghép mô dị loài, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) phân lập động mạch dây rốn, trong đó động mạch dây rốn được cắt bỏ từ trẻ sơ sinh được thu gom trong vòng 2 giờ và ngâm rửa trong dung dịch PBS vô trùng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin sau đó cắt thành đoạn kích thước từ 4 đến 5 cm rồi kẹp rút động mạch, sau khi loại bỏ lớp thạch bên ngoài, thu được động mạch dây rốn được phân lập;

b) ghép dây rốn được phân lập vào động mạch chủ của chuột cống trắng bằng cách cấy ghép động mạch dây rốn phân lập vào động mạch chủ bụng dưới thận của chuột cống trắng, trong đó đoạn động mạch chủ bụng dưới thận của chuột cống trắng được kẹp giữ, cắt và ghép nối bằng động mạch dây rốn được phân lập, trong đó độ chênh lệch đường kính giữa động mạch dây rốn được phân lập với đường kính động mạch chủ bụng dưới thận của chuột cống trắng là nhỏ hơn 2,5 lần; và

c) thu mẫu chuột cống trắng được ghép đoạn động mạch dây rốn được phân lập bằng cách chuyển các con chuột cống trắng được ghép đoạn động mạch dây rốn vào nuôi trong điều kiện bình thường thu được mẫu chuột cống trắng mang và nuôi dưỡng đoạn động mạch dây rốn được ghép.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến mẫu chuột cống trắng được ghép động mạch dị loài, trong đó mẫu chuột này là chuột cống trắng (*Rattus norvegicus*) được ghép vào động mạch chủ bụng dưới thận một đoạn động mạch dây rốn được phân lập từ cuống rốn trẻ sơ sinh, có khả năng dung nạp và không gây ức chế miễn dịch, mẫu chuột cống trắng này được tạo ra bằng quy trình sau:

a) phân lập động mạch dây rốn, trong đó:

- thu nhận mẫu dây rốn, trong đó cuống dây rốn đã cắt bỏ từ trẻ sơ sinh sau khi sinh được thu gom trong vòng 2 giờ, chuyển vào chai thủy tinh vô trùng chứa dung dịch PBS vô trùng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin sao cho mẫu dây rốn được đặt ngập trong dung dịch;

- rửa mẫu dây rốn bằng cách cắt bỏ hai đầu dây rốn, sau đó dùng xi lanh bơm rửa dung dịch dung dịch PBS vô trùng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin vào dây rốn, lặp lại quá trình rửa này 3 lần để loại bỏ hoàn toàn máu có trong động mạch dây rốn sau đó cắt dây rốn thành những đoạn kích thước từ 4 đến 5 cm; và

- thu nhận động mạch dây rốn bằng cách cắt dọc thành dây rốn và dùng kẹp rút động mạch ra khỏi dây rốn tách bỏ lớp thạch bám trên thành động mạch, sau khi cắt bỏ đầu mạch bị kẹp, cắt động mạch dây rốn thành những đoạn có chiều dài từ 4 đến 5mm, thu được động mạch dây rốn được phân lập; và

b) ghép động mạch dây rốn được phân lập với động mạch chủ bụng dưới thận của chuột cống trắng để thay thế đoạn động mạch chủ bụng dưới thận bằng động mạch dây rốn được phân lập để thu được mẫu chuột cống trắng được cấy ghép nuôi giữ động mạch từ dây rốn trẻ sơ sinh, trong đó độ chênh lệch đường kính giữa động mạch dây rốn được phân lập với đường kính động mạch chủ bụng dưới thận của chuột cống trắng là nhỏ hơn 2,5 lần.

Trong đó động mạch phân lập từ dây rốn dây rốn của trẻ sơ sinh thu được bằng quy trình theo sáng chế đạt được độ toàn vẹn và cho phép cấy ghép dị loài, tương thích tốt với chuột cống trắng để tạo ra mẫu chuột cống trắng được cấy ghép ứng dụng trong nghiên cứu lâm sàng tim mạch.

Mẫu chuột cống trắng được cấy ghép động mạch phân lập từ dây rốn của trẻ sơ sinh thu được từ quy trình theo sáng chế có khả năng tương thích và mang, giữ được động mạch dây rốn khác loài, quá trình ghép không cần sử dụng thuốc chống thải loại.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh chụp đoạn động mạch dây rốn thu được từ cuống rốn trẻ sơ sinh phân lập được với cấu trúc được bảo toàn.

Hình 2 là hình ảnh cấy ghép động mạch dây rốn trẻ sơ sinh vào động mạch chủ bụng dưới thận chuột cống trắng trước khi tháo kẹp mạch máu.

Hình 3 là hình ảnh giải phẫu chụp kết quả cấy ghép động mạch dây rốn thu được từ cuống rốn trẻ sơ sinh với động mạch chủ bụng dưới thận chuột cống trắng, kết quả cho thấy động mạch tương thích tốt với chuột cống trắng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên các phương án thực hiện này chỉ nhằm mục đích làm rõ bản chất của sáng chế chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Theo sáng chế, phương pháp phân lập động mạch dây rốn được thực hiện từ cuống rốn trẻ sơ sinh sau khi đã được cắt bỏ. Đoạn dây rốn này thường được bỏ đi sau khi sinh, và do đó không ảnh hưởng và không tác động đến thai phụ cũng như trẻ sơ sinh sau khi sinh. Đoạn dây rốn được thu nhận này cũng không bị ảnh hưởng bởi các vấn đề liên quan đến đạo đức xã hội và chỉ đơn thuần được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu.

Các phương pháp thực hiện trên mẫu động vật, cụ thể là mẫu chuột cống trắng không nhằm mục đích điều trị, ngăn ngừa hoặc phòng chữa bệnh. Các mục đích ứng dụng, sử dụng mẫu chuột chỉ giới hạn ở việc nghiên cứu nhằm phát triển kỹ thuật cấy ghép dị loài, nuôi giữ mẫu trong cơ thể động vật mà không cần sử dụng thuốc chống thải loại, ứng dụng trong nghiên cứu các bệnh về tim mạch.

Sáng chế đề cập đến một quy trình phân lập động mạch từ dây rốn, quy trình ghép động mạch được phân lập này vào động vật và mẫu động vật được cấy ghép để nuôi giữ động mạch dây rốn từ cuống rốn trẻ sơ sinh dùng để nghiên cứu bệnh học lâm sàng ứng dụng điều trị bệnh tim mạch ở người.

Việc xử lý mẫu là một vấn đề cần quan tâm, đối với các mẫu sinh học, ngoài việc bị lây nhiễm chéo từ các tác nhân ngoại lai, bản thân mẫu sinh học cũng thường trực đối mặt với việc kích ứng miễn dịch gây đào thải từ vật chủ do tính chất dị loài. Việc lựa chọn mẫu, xử lý cũng như các xử lý khác nhằm hạn chế tối đa sự đào thải mẫu cấy ghép, cho phép dung nạp để nuôi dưỡng tốt mẫu mẫu cấy ghép là một vấn đề cần quan tâm và quyết định đến kết quả cấy ghép dị loài. Bằng kỹ thuật xử lý mẫu dây rốn thu được từ trẻ sơ sinh ở một nồng độ kháng sinh thích hợp trong dung dịch nước muối đệm phosphat

(phosphate buffered saline: PBS) các tác giả bất ngờ nhận thấy rằng mẫu động mạch từ dây rốn này có khả năng tương thích rất tốt với chuột cống trắng, cho phép cấy ghép, thay thế cũng như nuôi dưỡng mẫu trong cơ thể chuột cống trắng để phục vụ cho việc nghiên cứu lâm sàng mà không cần sử dụng các thuốc chống đào thải.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình phân lập động mạch từ dây rốn, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) thu nhận mẫu dây rốn; b) rửa mẫu dây rốn; và c) thu nhận động mạch dây rốn.

Trong bước thu nhận mẫu dây rốn, sau khi cuống rốn được cắt bỏ khỏi trẻ sơ sinh và thai phụ được thu gom. Tốt nhất các mẫu này được thu gom trong vòng 2 giờ kể từ khi cắt khỏi trẻ sơ sinh. Các mẫu cuống rốn này được chuyển vào chai thủy tinh vô trùng chứa dung dịch PBS vô trùng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin. Các mẫu dây rốn thu được này cần được đặt ngập trong dung dịch bảo quản. Quá trình này giúp mẫu dây rốn không bị khô, hỏng, đồng thời ngăn sự lây nhiễm, tạp nhiễm của các tác nhân ngoại lai, đặc biệt là các tác nhân gây bệnh, nhưng không ảnh hưởng hoặc tác động bất lợi đến các mô của động mạch, tĩnh mạch dây rốn cũng như không gây kích thích miễn dịch đào thải từ chuột cống trắng được cấy ghép, cho phép cấy ghép dị loài nhưng không bị đào thải bởi miễn dịch của cơ thể chuột cống trắng.

Sau khi mẫu được thu gom, chuyển mẫu vào buồng vô khuẩn thao tác để tách, thu nhận động mạch của dây rốn. Tiến hành rửa mẫu dây rốn bằng cách cắt bỏ hai đầu dây rốn và rửa sạch bằng dung dịch dung dịch PBS vô trùng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin. Quá trình rửa này có thể sử dụng xi lanh bơm rửa loại bỏ máu có trong lòng tĩnh mạch và động mạch dây rốn bằng cách dùng xi lanh bơm rửa dung dịch dung dịch PBS vô trùng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin vào dây rốn. Quá trình rửa này có thể lặp lại 3 lần để loại bỏ hoàn toàn máu có trong động mạch dây rốn sau đó cắt dây rốn thành những đoạn kích thước từ 4 đến 5 cm. Theo các phương án ưu tiên, có thể cắt dây rốn thành những đoạn có kích thước từ 4 đến 5cm, sau đó rửa để thu động mạch, tuy nhiên việc cắt dây rốn thành những đoạn ngắn này mặc dù thuận lợi cho việc rửa loại sạch máu có trong động mạch tránh được các phản ứng ghép, nhưng lại không thu được những đoạn động mạch dài. Tuy nhiên, tùy theo kích thước mong muốn của

đoạn động mạch cần thu mà có thể cắt hoặc giữ nguyên các đoạn dây rốn với kích thước mong muốn, miễn sao rửa loại bỏ được máu có trong động mạch này.

Sau khi rửa loại bỏ hoàn toàn máu có trong dây rốn, tiến hành cắt dọc thành dây rốn, lưu ý không được động chạm đến động mạch và tĩnh mạch. Tốt nhất là dùng panh kẹp một đầu động mạch, cắt thành dây rốn và dùng kẹp rút động mạch ra khỏi dây rốn tách bỏ lớp thạch Wharton bám trên động mạch dây rốn. Sau khi cắt bỏ đầu mạch bị kẹp vì bị tổn thương cơ học, cắt động mạch dây rốn thành những đoạn có kích thước mong muốn, thường là có chiều dài từ 4 đến 5mm. Sau khi cắt, thu được động mạch dây rốn được phân lập.

Động mạch dây rốn được phân lập ở dạng các ống toàn vẹn, màu trắng không dính máu và lớp thạch Wharton bên ngoài được loại bỏ hoàn toàn thích hợp để cấy ghép, thay thế động mạch trong vật chủ dị loài mà không gây kích thích miễn dịch đào thải.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến quy trình ghép động mạch dây rốn được phân lập từ cuống rốn vào chuột cống trắng để tạo ra mẫu chuột cống trắng được ghép động mạch chủ dùng trong nghiên cứu y học lâm sàng điều trị bệnh lý tim mạch cũng như cấy ghép mô dị loài, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) phân lập động mạch dây rốn; và b) ghép dây rốn được phân lập vào động mạch chủ của chuột cống trắng; và c) thu mẫu chuột cống trắng được ghép đoạn động mạch dây rốn được phân lập.

Trong bước phân lập động mạch dây rốn, trong đó động mạch dây rốn được cắt bỏ từ trẻ sơ sinh được thu gom trong vòng 2 giờ. Các mẫu cuống rốn này được chuyển vào chai thủy tinh vô trùng chứa dung dịch PBS vô trùng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin. Các mẫu dây rốn thu được này cần được đặt ngập trong dung dịch bảo quản. Quá trình này giúp mẫu dây rốn không bị khô, hỏng, đồng thời ngăn sự lây nhiễm, tạp nhiễm của các tác nhân ngoại lai, đặc biệt là các tác nhân gây bệnh, nhưng không ảnh hưởng hoặc tác động bất lợi đến các mô của động mạch, tĩnh mạch dây rốn. Sau đó mẫu đươc rửa trong dung dịch PBS vô trùng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin.

Tiến hành rửa mẫu dây rốn bằng cách cắt bỏ hai đầu dây rốn và rửa sạch bằng dung dịch dung dịch PBS vô trùng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin. Quá trình rửa này có thể sử dụng xi lanh bơm rửa loại bỏ máu

có trong lòng tĩnh mạch và động mạch dây rốn bằng cách dùng xi lanh bơm rửa dung dịch dung dịch PBS vô trùng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin vào dây rốn. Quá trình rửa này có thể lặp lại 3 lần để loại bỏ hoàn toàn máu có trong động mạch dây rốn sau đó cắt dây rốn thành những đoạn kích thước từ 4 đến 5 cm. Theo các phương án ưu tiên, có thể cắt dây rốn thành những đoạn có kích thước từ 4 đến 5cm, sau đó rửa để thu động mạch, tuy nhiên việc cắt dây rốn thành những đoạn ngắn này mặc dù thuận lợi cho việc rửa loại sạch máu có trong động mạch tránh được các phản ứng ghép, nhưng lại không thu được những đoạn động mạch dài. Tuy nhiên, tùy theo kích thước mong muốn của đoạn động mạch cần thu mà có thể cắt hoặc giữ nguyên các đoạn dây rốn với kích thước mong muốn, miễn sao rửa loại bỏ được máu có trong động mạch này.

Sau khi rửa loại bỏ hoàn toàn máu có trong dây rốn, tiến hành cắt dọc thành dây rốn, lưu ý không được động chạm đến động mạch và tĩnh mạch. Tốt nhất là dùng panh kẹp một đầu động mạch, cắt thành dây rốn và dùng kẹp rút động mạch ra khỏi dây rốn tách bỏ lớp thạch Wharton bám trên động mạch dây rốn. Sau khi cắt bỏ đầu mạch bị kẹp vì bị tổn thương cơ học, cắt động mạch dây rốn thành những đoạn có kích thước mong muốn, thường là có chiều dài từ 4 đến 5mm. Sau khi cắt, thu được động mạch dây rốn được phân lập.

Mẫu động mạch dây rốn được phân lập này có độ toàn vẹn và cho phép cấy ghép dị loại, tương thích tốt với chuột cống trắng để tạo ra mẫu chuột cống trắng được cấy ghép ứng dụng trong nghiên cứu lâm sàng tim mạch.

Trong bước ghép dây rốn được phân lập vào động mạch chủ của chuột cống trắng, chuột cống trắng được sử dụng làm vật chủ cấy ghép tốt nhất là giống chuột Wistar có tên khoa học là *Rattus norvegicus*. Chuột được sử dụng làm vật chủ cấy ghép giữ mẫu động mạch theo sáng chế có trọng lượng từ 300 g trở lên, khỏe mạnh. Chuột được gây mê bằng cách chụp ete trong bình chứa ete hoặc tiêm bằng pentobarbital 6% để thuận lợi cho quá trình cấy ghép.

Trường hợp gây mê chuột bằng ete, tiến hành chụp chuột bằng chuông hoặc bình chứa ete để chuột ngất xỉu. Sau đó chuyển ra ngoài tiếp tục gây mê bằng mặt nạ chứa bông tẩm ete để duy trì tình trạng ngất xỉu, mặt nạ này cần cách mũi chuột 1cm đủ để duy trì tình trạng ngất xỉu của chuột, nhưng không gây chết chuột để thuận lợi cho quá

trình phẫu thuật cấy ghép. Tốt nhất tạo mặt nạ ete bằng cách cắt ống tiêm bằng nhựa cỡ 10ml làm đôi theo chiều ngang, giữ phía đầu lại, nhét bông vào khoảng 1/3 thể tích rồi rót ete mê vào bông. Mặt nạ này không chụp hẳn vào mũi chuột mà nên để cách mũi chuột một khoảng cách 1cm. Trong thời gian phẫu thuật phải theo dõi nhịp thở, sắc diện của chuột, nếu thấy chuột thở kém và bắt đầu tím tái thì phải hồi sức cho chuột bằng cách dùng một lọ thuốc nhỏ mắt hay nhỏ mũi rỗng có ống dài nhét vào miệng chuột để bơm không khí vào cho đến khi chuột thở đều trở lại.

Trường hợp gây mê chuột bằng pentobarbital 6%, dung dịch pentobarbital 6% được tiêm trực tiếp vào chuột. Liều dùng là 0,1ml (0,6 mg) cho 100 gram cân nặng. Có thể sử dụng liều từ 1- 3mg cho 100gram chuột nhưng có nhiều nguy hiểm, với liều này nên ta chỉ coi đó là tổng liều sử dụng cho chuột khi cần tiêm nhiều lần. Chuột đươc tiêm xuyên qua da vào thành bụng để gây mê trước khi tiến hành cấy ghép.

Để cấy ghép động mạch dây rốn phân lập vào bụng dưới thận của chuột, tiến hành mổ giữa trên và dưới rốn, dài 4cm, sau đó mở bóc tách để hở động mạch chủ bụng dưới thận, dùng kẹp để kẹp động mạch và nhỏ dùng dung dịch lidocain 2% nhỏ giọt hoặc tẩm bông đắp lên trên thành động mạch và chờ 2 -3 phút để động mạch hết co thắt, nở lớn trở lại. Sau đó cắt và ghép đoạn động mạch, cầm máu, kiểm tra thông mạch và khâu vết mổ lại. Đoạn động mạch được ghép động mạch dây rốn được phân lập có kích thước thích hợp, cụ thể là độ chênh lệch đường kính giữa động mạch dây rốn được phân lập với đường kính động mạch chủ bụng dưới thận của chuột cống trắng là nhỏ hơn 2,5 lần.

Các mẫu chuột công trắng sau khi cấy ghép được chuyển vào nuôi trong điều kiện bình thường, giữ vệ sinh tránh nhiễm trùng vết mổ, thu được mẫu chuột cống trắng mang và nuôi dưỡng đoạn động mạch dây rốn được ghép.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến mẫu chuột cống trắng (*Rattus norvegicus*) được cấy ghép động mạch dị loài. Mẫu chuột này cho phép nuôi giữ động mạch dây rốn từ cuống rốn của trẻ sơ sinh, có khả năng dung nạp và không cần phải gây ức chế miễn dịch. Trong đó động mạch chủ dưới thận của chuột cống trắng được ghép một đoạn động mạch dây rốn được phân lập từ cuống rốn trẻ sơ sinh, mẫu chuột này được tạo ra bằng quy trình sau: a) phân lập động mạch dây rốn; và b) ghép động mạch dây rốn được phân lập với động mạch chủ bụng dưới thận của chuột cống trắng.

Trong bước phân lập động mạch dây rốn, trong đó, mẫu cuống rốn đã cắt bỏ từ trẻ sơ sinh sau khi sinh được thu gom trong vòng 2 giờ, chuyển vào chai thủy tinh vô trùng chứa dung dịch PBS vô trùng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, streptomycin và 150 µg/ml gentamycin sao cho mẫu dây rốn được đặt ngập trong dung dịch. Các mẫu dây rốn thu được này cần được đặt ngập trong dung dịch bảo quản. Quá trình này giúp mẫu dây rốn không bị khô, hỏng, đồng thời ngăn sự lây nhiễm, tạp nhiễm của các tác nhân ngoại lai, đặc biệt là các tác nhân gây bệnh, nhưng không ảnh hưởng hoặc tác động bất lợi đến các mô của động mạch, tĩnh mạch dây rốn. Sau đó mẫu đươc rửa trong dung dịch PBS vô trùng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin.

Tiến hành rửa mẫu dây rốn bằng cách cắt bỏ hai đầu dây rốn và rửa sạch bằng dung dịch dung dịch PBS vô trùng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin. Quá trình rửa này có thể sử dụng xi lanh bơm rửa loại bỏ máu có trong lòng tĩnh mạch và động mạch dây rốn bằng cách dùng xi lanh bơm rửa dung dịch dung dịch PBS vô trùng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin vào dây rốn. Quá trình rửa này có thể lặp lại 3 lần để loại bỏ hoàn toàn máu có trong động mạch dây rốn sau đó cắt dây rốn thành những đoạn kích thước từ 4 đến 5 cm. Theo các phương án ưu tiên, có thể cắt dây rốn thành những đoạn có kích thước từ 4 đến 5cm, sau đó rửa để thu động mạch, tuy nhiên việc cắt dây rốn thành những đoạn ngắn này mặc dù thuận lợi cho việc rửa loại sạch máu có trong động mạch tránh được các phản ứng ghép, nhưng lại không thu được những đoạn động mạch dài. Tuy nhiên, tùy theo kích thước mong muốn của đoạn động mạch cần thu mà có thể cắt hoặc giữ nguyên các đoạn dây rốn với kích thước mong muốn, miễn sao rửa loại bỏ được máu có trong động mạch này.

Sau khi rửa loại bỏ hoàn toàn máu có trong dây rốn, tiến hành cắt dọc thành dây rốn, lưu ý không được động chạm đến động mạch và tĩnh mạch. Tốt nhất là dùng panh kẹp một đầu động mạch, cắt thành dây rốn và dùng kẹp rút động mạch ra khỏi dây rốn tách bỏ lớp thạch Wharton bám trên động mạch dây rốn. Sau khi cắt bỏ đầu mạch bị kẹp vì bị tổn thương cơ học, cắt động mạch dây rốn thành những đoạn có kích thước mong muốn, thường là có chiều dài từ 4 đến 5mm. Sau khi cắt, thu được động mạch dây rốn được phân lập.

Trong bước ghép động mạch dây rốn được phân lập với động mạch chủ bụng dưới thận của chuột cống trắng để thay thế đoạn động mạch chủ dưới thận bằng động mạch dây rốn được phân lập để thu được mẫu động vật được cấy ghép nuôi dưỡng đoạn động mạch từ dây rốn trẻ sơ sinh. Quá trình này được thực hiện như sau:

Sử dụng chuột cống trắng, tốt nhất là giống chuột Wistar có tên khoa học là (*Rattus norvegicus*). Chuột được sử dụng làm vật chủ cấy ghép giữ mẫu động mạch theo sáng chế có trọng lượng từ 300 g trở lên, khỏe mạnh. Chuột được gây mê bằng cách chụp ete trong bình chứa ete hoặc tiêm bằng pentobarbital 6% để thuận lợi cho quá trình cấy ghép. Quá trình gây mê chuột được thực hiện như mô tả ở trên.

Để cấy ghép động mạch dây rốn phân lập vào bụng dưới thận của chuột, tiến hành mổ giữa trên và dưới rốn, dài 4cm, sau đó mở bóc tách để hở động mạch chủ bụng dưới thận, dùng kẹp để kẹp động mạch và nhỏ dùng dung dịch lidocain 2% nhỏ giọt hoặc tẩm bông đắp lên trên thành động mạch và chờ 2 -3 phút để động mạch hết co thắt, nở lớn trở lại. Sau đó cắt và ghép đoạn động mạch, cầm máu, kiểm tra thông mạch và khâu vết mổ lại. Đoạn động mạch được ghép động mạch dây rốn được phân lập có kích thước thích hợp, cụ thể là độ chênh lệch đường kính giữa động mạch dây rốn được phân lập với đường kính động mạch chủ bụng dưới thận của chuột cống trắng là nhỏ hơn 2,5 lần.

Các mẫu chuột công trắng sau khi cấy ghép được chuyển vào nuôi trong điều kiện bình thường, giữ vệ sinh tránh nhiễm trùng vết mổ, thu được mẫu chuột cống trắng mang và nuôi dưỡng đoạn động mạch dây rốn được ghép.

Mẫu chuột cống trắng cấy ghép thu được từ quy trình theo sáng chế có khả năng tương thích và mang, giữ được động mạch dây rốn khác loài, quá trình ghép không cần sử dụng thuốc chống thải loại.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Thu nhận động mạch dây rốn từ mẫu cuống rốn của trẻ sơ sinh

Đoạn cuống rốn dài 20 cm được cắt bỏ sau khi sinh từ trẻ sơ sinh được thu gom từ bệnh viện phụ sản. Chuyển mẫu vào chai thủy tinh vô trùng 500 mL chứa 200 mL dung dịch PBS vô trùng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin. Mẫu dây rốn được đặt ngập trong dung dịch và chuyển về phòng vi phẫu để tiến hành phân lập động mạch dây rốn.

Khử trùng bề mặt chai thủy tinh và đặt vào trong tủ cấy vô trùng. Dùng panh vô trùng gắp đoạn dây rốn đặt dây rốn vào bát innox vô trùng có dung dịch PBS chứa 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin. Cắt bỏ hai đầu dây rốn, sau đó cắt dây rốn thành những đoạn dài 4-5 cm.

Rửa dây rốn bằng cách dùng xilanh để bơm rửa loại bỏ máu có trong tĩnh mạch và động mạch dây rốn. Thực hiện lặp lại 3 lần để thu được mẫu để vi phẫu phân lập động mạch.

Dùng kéo cắt dọc thành dây rốn, không chạm vào động mạch và tĩnh mạch. Dùng panh kẹp một đầu động mạch và kéo tách khỏi lớp thạch Wharton. Loại bỏ những phần dính vào trong động mạch.

Chuyển đoạn mạch vừa phân lập vào dung dịch PBS vô trùng, cắt bỏ đầu mạch vừa bị kẹp và cắt mạch thành đoạn với chiều dài 5 mm. Thu được các đoạn động mạch cuống rốn được phân lập.

Ví dụ 2: Ghép động mạch dây rốn với động mạch chủ bụng dưới thận chuột cống trắng

Chuột cống trắng đực Wistar có tên khoa học là *Rattus norvegicus*, trọng lượng 350 g được chuẩn bị 2 ngày trước khi phẫu thuật, cho ăn uống đầy đủ, đánh giá tình trạng khỏe mạnh khi làm thực nghiệm.

Tiêm cho chuột một liều bao gồm 0,35 mL dung dịch pentobarbital 6% qua da bụng với kim cỡ G.25. Góc xuyên qua cơ tạo thành một góc 30° với thành bụng, bơm hết lượng thuốc tương đương 0,35 mL dung dịch Pentobarbital 6% để gây mê chuột.

Tiến hành mổ một đường giữa trên và dưới rốn, dài 4cm. Dùng kẹp kéo một điểm ở da lên, dùng kéo cắt một lỗ cho kéo vào bóc tách da và cắt da theo đường mổ này. Kéo căng da hai bên để nhìn thấy rõ các lớp. Cầm máu kỹ thành bụng. Sử dụng gạc ẩm đẩy ruột sang trái và lên trên, tiến hành bóc tách vào động mạch chủ bụng (đoạn dưới thận), chú ý chỉ cành kẹp xé và tăm bông để bộc lộ mạch máu. Nhỏ giọt nước muối sinh lý để cho phẫu trường luôn luôn ẩm ướt. Bộc lộ đủ dài để kẹp HEIFETZ vào. Cắt 2 đoạn chỉ nhỏ để luồn dưới động mạch chủ bụng. Nhỏ giọt nước làm ẩm và làm sạch phẫu trường. Để làm giảm sự co thắt động mạch khi bóc tách, tẩm bông với dung dịch Lidocain 2% và đắp lên thành mạch trong 2 – 3 phút. Sau khi mạch hết co thắt mới tiếp tục phẫu thuật.

Xử lí mạch máu tổn thương và miệng nối: dùng kẹp mạch máu đôi HEIFETZ kẹp một đoạn động mạch với khoảng cách giữa hai nhánh của kẹp là 20 mm. Dùng kéo cắt một đường thẳng góc với trục động mạch làm đứt đôi đoạn động mạch được kẹp. Tiếp theo, dùng một ống tiêm 10ml có gắn một kim cỡ G.25 – G.26 mài tròn đầu, rút dung dịch nước muối sinh lý có pha Heparin theo liều lượng 500ml nước muối sinh lý cộng với 5.000đv Heparin Sulfate vào trong ống tiêm. Dùng một kẹp vi phẫu cầm nhẹ thành động mạch rồi luồn kim G.25 vào trong lòng động mạch, bơm nhẹ để đuổi hết máu ở hai đầu cắt ra ngoài.

Làm dãn nở đầu động mạch: sau khi cắt xong thành động mạch xẹp xuống, dính hai bờ cắt với nhau do tác động của kéo cắt. Để làm cho động mạch trở lại hình ống để dễ dàng quan sát, dùng đầu kẹp vi phẫu tích (loại nhỏ nhất) cho vào trong lòng mạch máu rồi mở ra dần dần.

Lấy đoạn động mạch dây rốn (Hình 1) có chiều dài 4,8 mm, đường kính 3,1 mm đặt vào vị trí cắt của động mạch chủ bụng dưới thận. Vị trí của hai bờ cắt của động mạch khoảng 1mm. Tiến hành ghép nối đoạn động mạch này vào đoạn động mạch được cắt của chuột, sau khi khâu, cầm máu, kiểm tra thông mạch, kết quả sau khi ghép được thể hiện trên Hình 2. Trong đó trên Hình 2, vị trí đoạn động mạch nối được chỉ ra ở mũi tên.

Kiểm tra tình trạng thông mạch: quan sát thấy mạch máu có nhịp đập ở phần xa khâu nối, có nhịp đập rộng và nhịp đập dãn dài. Ngoài ra quan sát thấy đoạn mạch có sự tương xứng về được kính, chứng tỏ sự thông mạch.

Làm các thử nghiệm thông mạch: đầu tiên thực hiện thử nghiệm áp lực. Dùng kẹp vi phẫu nâng đoạn xa động mạch lên đến khi động mạch bị xẹp và chuyển màu trắng. Khi có một nhịp đập quan sát thấy đoạn động mạch đó nở ra và hồng lại. Tiếp theo, thực hiện thử nghiệm vuốt mạch. Dùng hai kẹp vi phẫu tích kẹp một đoạn động mạch ở đầu xa, kẹp đầu trên giữ nguyên không cho dòng máu chảy, kẹp đầu dưới, vuốt sạch máu trong động mạch một khoảng 3 – 5mm. Lúc này máu trong đoạn động mạch đã hết nên động mạch xẹp xuống, nhỏ lại và trắng ra. Giữ nguyên kẹp ở đầu dưới, mở kẹp vi phẫu tích ở đầu trên ra. Quan sát thấy đoạn động mạch bị xẹp nở ra, có màu đỏ tươi và có nhịp đập, chứng tỏ đã có một dòng máu chảy qua chỗ khâu nối vào đoạn động mạch bị xẹp.

Chuột sau khi cấy ghép được chuyển về chăm sóc, thu được mẫu chuột cống trắng ghép để nuôi giữ động mạch dây rốn từ cuống rốn của trẻ sơ sinh. Mẫu chuột sau khi thu được này được đặt tên là Spring 2.

Sau 48 giờ cấy ghép, tiến hành đánh giá và kiểm tra mẫu ghép nối cho thấy đoạn mạch ghép có sự tương thích tốt, không xuất hiện đào thải, kết quả được thể hiện trên Hình 3 với vị trí nối tương thích là ở chỗ mũi tên.

Kết quả thu được chuột cống trắng được cấy ghép động mạch chủ của dây rốn một cách tương thích, cho phép dung hợp tốt với chuột mà không gây phản ứng kích ứng miễn dịch hoặc đào thải. Mẫu chuột được ghép giữ động mạch dây rốn sống khỏe mạnh và không có bất kỳ biểu hiện sốc hoặc ảnh hưởng đến miễn dịch.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình phân lập động mạch từ dây rốn trẻ sơ sinh theo sáng chế cho phép phân lập được động mạch dây rốn có khả năng tương thích tốt trong việc ghép dị loài, cho phép nghiên cứu, phát triển các phương pháp điều trị lâm sàng cũng như các nghiên cứu lâm sàng về bệnh tim mạch.

Mẫu chuột cống trắng được ghép động mạch dây rốn được phân lập từ cuống rốn trẻ sơ sinh cho thấy có khả năng tương thích tốt, không gây ra các đáp ứng miễn dịch, đào thải, đây là một hướng nghiên cứu triển vọng cho phép phát triển các kỹ thuật ghép đồng loài. Mẫu chuột cống trắng được ghép động mạch dây rốn người cho phép mang, nuôi dưỡng, lưu giữ ổn định mạch ghép, đây là một tiền đề quan trọng đối với các nghiên cứu về tim mạch cũng như các nghiên cứu về cấy ghép mạch dị loài.

Bằng cách phân lập trong môi trường vô trùng chứa dung dịch PBS bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin, động mạch dây rốn thu được toàn vẹn có khả năng tương thích tốt cho phép ghép dị loài mà không gây kích thích miễn dịch. Mẫu chuột được ghép đoạn động mạch dây rốn được phân lập từ cuống rốn trẻ sơ sinh cho thấy dung nạp tốt, không gây ức chế miễn dịch cũng như phát sinh các hiện tượng huyết khối, tắc mạch mở ra hướng nghiên cứu điều trị các bệnh lý liên quan đến tim mạch.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Mẫu chuột cống trắng được ghép động mạch dị loài, trong đó mẫu chuột này là cống trắng (*Rattus norvegicus*) được ghép vào động mạch chủ bụng dưới thận một đoạn động mạch dây rốn được phân lập từ cuống rốn trẻ sơ sinh, có khả năng dung nạp và không gây ức chế miễn dịch, mẫu chuột cống trắng này được tạo ra bằng quy trình sau:

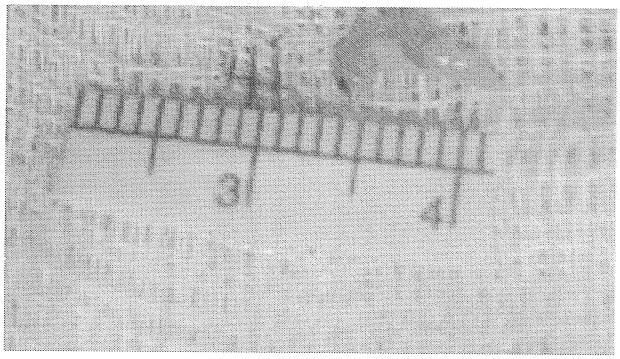
a) phân lập động mạch dây rốn, trong đó:

- thu nhận mẫu dây rốn, trong đó cuống dây rốn đã cắt bỏ từ trẻ sơ sinh sau khi sinh được thu gom trong vòng 2 giờ, chuyển vào chai thủy tinh vô trùng chứa dung dịch PBS vô trùng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin sao cho mẫu dây rốn được đặt ngập trong dung dịch;
- rửa mẫu dây rốn bằng cách cắt bỏ hai đầu dây rốn, sau đó dùng xi lanh bơm rửa dung dịch dung dịch PBS vô trùng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin và 150 µg/ml gentamycin vào dây rốn, lặp lại quá trình rửa này 3 lần để loại bỏ hoàn toàn máu có trong động mạch dây rốn sau đó cắt dây rốn thành những đoạn kích thước từ 4 đến 5 cm; và
- thu nhận động mạch dây rốn bằng cách cắt dọc thành dây rốn và dùng kẹp rút động mạch ra khỏi dây rốn tách bỏ lớp thạch bám trên thành động mạch, sau khi cắt bỏ đầu mạch bị kẹp, cắt động mạch dây rốn thành những đoạn có chiều dài từ 4 đến 5mm, thu được động mạch dây rốn được phân lập; và

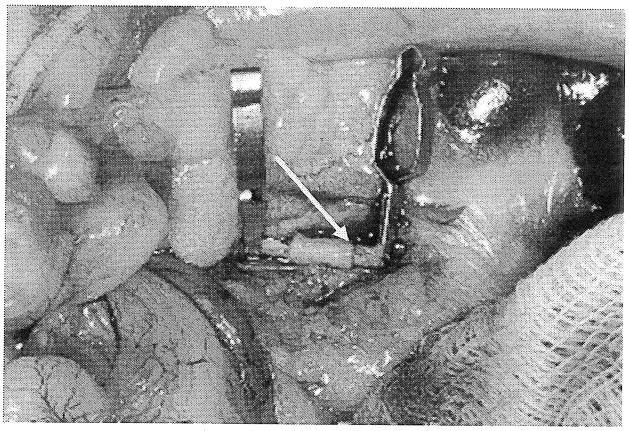
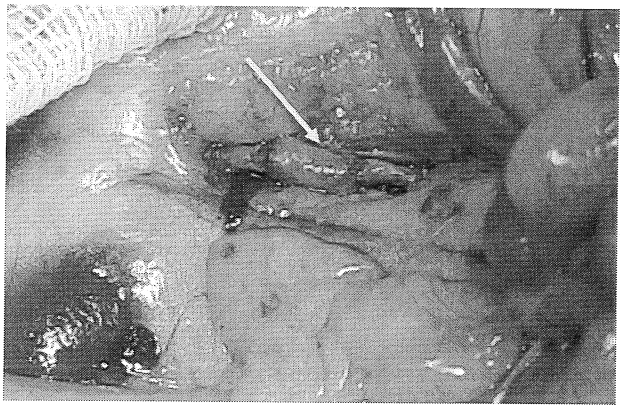
b) ghép động mạch dây rốn được phân lập với động mạch chủ bụng dưới thận của chuột cống trắng để thay thế đoạn động mạch chủ bụng dưới thận bằng động mạch dây rốn được phân lập để thu được mẫu chuột cống trắng được cấy ghép động mạch từ dây rốn trẻ sơ sinh, trong đó độ chênh lệch đường kính giữa động mạch dây rốn được phân lập với đường kính động mạch chủ bụng dưới thận của chuột cống trắng là nhỏ hơn 2,5 lần.

1/1

HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3