



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

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

(11)



2-0004418

(51) **C12N 5/0775; A61P 17/14**
2024.01

(13) **Y**

(21) 2-2025-00432

(22) 08/02/2023

(67) 1-2023-00778

(45) 27/10/2025 451

(43) 26/06/2023 423A

(73) Tập đoàn Vingroup - Công ty CP (VN)

Số 7, Đường Bằng Lăng 1, Khu đô thị Vinhomes Riverside, Phường Việt Hưng,
Quận Long Biên, Thành phố Hà Nội, Việt Nam

(72) Thân Thị Trang Uyên (VN); Phạm Hồng Thái (VN); Nguyễn Xuân Hưng (VN); Đào
Huy Hoàng (VN); Nguyễn Đắc Tú (VN); Nguyễn Thùy Dương (VN).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) QUY TRÌNH PHÂN LẬP VÀ NUÔI CẤY TẾ BÀO GỐC NANG TÓC

(21) 2-2025-00432

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào gốc nang tóc, trong đó sáng chế cho phép nuôi cấy tế bào gốc nang tóc từ tế bào nhú gốc nang trong môi trường nuôi cấy để thu được tế bào gốc nang tóc. Quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào gốc nang tóc cho phép thu được tế bào gốc nang tóc có khả năng tăng sinh trong môi trường nuôi cấy mà vẫn duy trì được đặc tính biệt hóa của tế bào gốc. Tế bào gốc nang tóc thu được có khả năng tăng sinh trong điều kiện môi trường DMEM/F12 + 10% FBS hoặc môi trường nuôi cấy tế bào gốc (StemMACS) có đặc điểm của tế bào gốc trung mô là tạo cụm và biệt hoá thành các tế bào xương, tế bào sụn và tế bào mỡ. Sáng chế cũng đề cập đến tế bào gốc nang tóc thu được từ quy trình theo sáng chế biểu hiện dấu sinh học của dòng tế bào gốc trung mô CD73, CD90 và CD105 trên 98% và có kháng nguyên phôi đặc hiệu theo giai đoạn 3 SSEA3 từ 0,1 đến 0,5 % thích hợp để phát triển chế phẩm kích thích mọc tóc.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ tế bào ứng dụng, cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình phân lập tế bào gốc nang tóc của người để tạo ra sản phẩm tế bào gốc ứng dụng để kích thích mọc tóc và/hoặc điều trị bệnh rụng tóc.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong cấu trúc của tóc, lớp vỏ bì bao xung quanh chân nang tóc (Dermal Sheath Cup - DSC) bao gồm hai lớp sợi collagen và tế bào có hình thái giống như nguyên bào sợi, trong đó lớp bên trong được xếp theo hình tròn xung quanh sợi tóc. Phần bên ngoài dày hơn của vỏ rễ trung mô chứa các sợi collagen và sợi đàn hồi chạy song song với thân tóc. Lớp vỏ biểu bì này có chứa nhiều loại tế bào và hợp nhất với phần nhú (Dermal Pappilia - DP) còn gọi là tế bào nhú gốc nang tóc ở phần cuối nang lông. Trong quá trình phát triển tóc, các tế bào lớp vỏ bì bao xung quanh chân nang tóc đóng vai trò duy trì và tái tạo tế bào nhú gốc nang tóc và chúng đóng vai trò then chốt trong quá phát triển của tóc.

Các nguyên nhân gây rụng tóc hoặc tóc phát triển kém là do có sự mất cân bằng giữa tế bào lớp vỏ bì và tế bào nhú gốc nang tóc khiến cho không có sự kích thích, biệt hóa tế bào biểu mô kích thích tái tạo nang tóc. Cụ thể là cần có sự di chuyển tế bào từ vị trí lớp vỏ bì bao quanh chân tóc vào vị trí phần nhú để duy trì sự khởi phát hoạt động mọc tóc và hình thành sợi tóc. Tế bào phần nhú (DP) tiết ra tín hiệu cần thiết để hoạt hoá tế bào gốc biểu mô và kích hoạt tái tạo nang tóc. Theo tài liệu của Waleed Rahmani, Sepideh Abbasi, Andrew Hagner, Scott Magness, Daniel Metzger, Jeff Biernaskieet. Hair Follicle Dermal Stem Cells Regenerate the Dermal Sheath, Repopulate the Dermal Papilla, and Modulate Hair Type. Developmental Cell, Volume 31, Issue 5, 543 – 558 cho thấy một nhóm tế bào trong quần thể tế bào DSC có khả năng tự tăng sinh và tái tạo các tế bào lớp vỏ bì bao quanh chân nang tóc và phần nhú. Đồng thời, nghiên cứu của tác giả này cũng đề cập đến vai trò quan trọng của các tế bào lớp vỏ bì bao quanh chân tóc trong việc phục hồi sự phát triển của tóc sau chấn thương, bệnh tật và lão hoá.

Do đó, để kích thích mọc tóc và/hoặc điều trị bệnh rụng tóc cần có quần thể tế bào gốc nang tóc có khả năng duy trì biểu hiện đặc điểm của tế bào gốc, từ đó có thể kích thích

tăng sinh quần thể tế bào gốc nang tóc. Các tế bào này có biểu hiện đặc điểm của tế bào gốc và có thể có hiệu quả trong kích thích mọc tóc theo cơ chế kích thích tín hiệu hoạt hóa tế bào tóc nội sinh.

Vì vậy, cần có một quy trình cho phép phân lập và nuôi cấy tế bào gốc nang tóc để thu quần thể tế bào gốc nang tóc để cho phép phát triển chế phẩm kích thích mọc tóc và/hoặc điều trị bệnh rụng tóc trên cơ sở kích thích tế bào gốc nang tóc.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là khắc phục các vấn đề còn tồn tại trong tình trạng kỹ thuật, cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào gốc nang tóc có khả năng phát triển thành chế phẩm kích thích mọc tóc. Ngoài ra sáng chế cũng đề cập đến tế bào gốc nang tóc thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào gốc nang tóc, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) thu thập mô nang tóc bằng cách thu nhận từng mẫu nang tóc riêng biệt đã được cắt khỏi lớp biểu bì trên da đầu bằng mũi khoan sinh thiết đường kính 0,7mm, các mẫu mô này được đưa vào môi trường chứa dung dịch đệm PBS chứa 2% kháng sinh penicillin hoặc streptomycin;

b) xử lý mô nang tóc bằng cách chuyển mẫu thu thập được sang môi trường DMEM/F12 chứa 2% kháng sinh penicillin hoặc streptomycin trong 30 phút trong khoảng nhiệt độ từ 4 °C đến 25 °C thu được các cụm mô nang tóc đã được xử lý;

c) phân lập tế bào nang tóc bằng cách cấy từng cụm mô nang tóc đã được xử lý sang giọt môi trường DMEM/F12 bổ sung 1% kháng sinh penicillin hoặc streptomycin, sau khi xuất hiện tế bào nhú nang tóc, tiến hành cắt phần chân nang chứa phần tế bào nhú gốc nang tóc và phần vỏ bao quanh rồi lộn phần vỏ bao ở gốc nang tóc để lộ ra phần tế bào nhú gốc nang tóc và phần vỏ bao quanh gốc nang tóc, sau đó cấy cố định tế bào nhú gốc nang tóc và phần vỏ này vào giếng nuôi cấy chứa môi trường nuôi cấy tế bào gốc hoặc môi trường DMEM/F12 được bổ sung 10% huyết thanh phôi thai bò rồi ủ ở 37 °C trong môi trường 5% CO₂ trong 14 ngày để tăng sinh tế bào gốc nang tóc; và

d) thu tế bào gốc nang tóc bằng cách bổ sung enzym phân cắt trypsin để tách tế bào gốc nang tóc ra khỏi bề mặt giếng nuôi cấy, sau đó chuyển tế bào gốc nang tóc đã tách khỏi mô này sang môi trường nuôi cấy tế bào gốc hoặc môi trường DMEM/F12 được bổ sung 10% huyết thanh phôi thai bò rồi ủ ở 37 °C để tăng sinh số lượng, thu được tế bào gốc nang tóc.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó môi trường để cấy tế bào gốc nang tóc sau khi được tách khỏi mô còn được tráng phủ một lớp chất nền giúp tế bào gốc bám dính và mật độ tế bào gốc nang tóc được cấy trên bề mặt môi trường này là 500 tế bào/cm².

Theo một phương án ưu tiên, trong đó chất kháng sinh được sử dụng là penicillin và streptomycin và môi trường nuôi cấy là môi trường bao gồm hỗn hợp của môi trường DMEM/F12 và FBS (Foetal Bovine Serum) được phối trộn theo tỷ lệ thể tích là 9:1.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó chất kháng sinh được sử dụng là penecillin và streptomycin theo tỷ lệ 1:1 về thể tích và môi trường nuôi cấy cụm mô nang tóc là môi trường nuôi cấy tế bào gốc.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó tế bào gốc nang tóc này thể hiện dấu sinh học của tế bào gốc trung mô CD90, CD105 và CD73 trên 98% và có khả năng biệt hóa thành tế bào xương, tế bào sụn, tế bào mỡ đồng thời tạo cụm tế bào nang tóc để kích thích mọc tóc.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó tế bào gốc này có biểu hiện dấu sinh học của kháng nguyên phôi đặc hiệu theo giai đoạn 3 SSEA3 (Stage-Specific Embryonic Antigen-3) từ 0,1 đến 0,5%.

Tế bào gốc nang tóc thu được từ quy trình theo sáng chế thích hợp được dùng để phát triển chế phẩm mọc tóc giúp điều trị bệnh rụng tóc và/hoặc kích thích mọc tóc.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Ảnh chụp mô bao gồm cấu trúc nang tóc và phần mô sử dụng phân lập và nuôi cấy tế bào gốc nang tóc. (A) phần nang tóc được thu thập theo sáng chế; (B) Cấu trúc tế bào gốc nang tóc phân tách rời khỏi mô nang tóc; (C) Tế bào gốc nang tóc ở P0; (D) tế bào gốc nang tóc ở P3.

Hình 2: Đặc điểm hình thái tế bào gốc nang tóc nuôi cấy dưới hai điều kiện môi trường khác nhau. (A): tế bào nuôi trong môi trường StemMACS; (B): tế bào nuôi trong môi trường DMEM/F12 + 10% FBS.

Hình 3: Kết quả đánh giá chất chỉ thị tế bào CD73, CD90 và CD105 sử dụng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy.

Hình 4: Kết quả đánh giá chất chỉ thị SSEA3 sử dụng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy.

Hình 5: Đặc điểm cụm tế bào gốc nang tóc nuôi trong điều kiện DMEM/F12 + 10% FBS với ba mẫu tế bào gốc nang tóc khác nhau.

Hình 6: Đặc điểm biệt hoá tế bào của tế bào gốc nang tóc. (A): mẫu tế bào biệt hoá tạo thành tế bào xương; (B): mẫu tế bào biệt hoá tạo thành tế bào mỡ; (C): mẫu tế bào biệt hoá tạo thành tế bào sụn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây sáng chế được mô tả chi tiết với các phương án với các ví dụ thực hiện được viện dẫn với các hình vẽ kèm theo, tuy nhiên các phương án với các ví dụ thực hiện cụ thể này chỉ nhằm làm rõ bản chất của sáng chế chứ không nhằm thu hẹp phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Theo sáng chế, mẫu nang tóc được thu nhận là từ mẫu da đầu của người, phần có tóc với các nang chân tóc phát triển. Việc thu nhận mẫu không bao gồm bước thực hiện trên cơ thể người và các bước liên quan đến cơ thể người được loại trừ và không thuộc phạm vi của sáng chế.

Thuật ngữ “tế bào gốc nang tóc” chỉ tế bào gốc đa năng có ở nang tóc mà được biệt hóa một phần, tế bào này có khả năng phân lập và nuôi cấy từ chân tóc, đây là phần tế bào có khả năng biệt hóa thành một số loại tế bào khác nhau như tế bào mô mỡ, tế bào sụn hoặc tóc.

Các môi trường nuôi cấy tế bào, ví dụ môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) đã được bổ sung thành phần F12 và StemMACS là những môi trường nuôi cấy đã được biết rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể pha chế hoặc mua

từ các nhà cung cấp. Các môi trường nuôi cấy này không thuộc phạm vi của sáng chế và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thay thế môi trường nuôi cấy bằng các môi trường nuôi cấy tế bào gốc thích hợp có bán trên thị trường.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào gốc nang tóc, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) thu thập mô nang tóc; b) xử lý mô nang tóc; c) phân lập tế bào nang tóc; và d) thu tế bào gốc nang tóc.

Trong bước thu thập mô nang tóc, mẫu mô nang tóc được thu nhận bằng cách phân tách từng mẫu nang tóc riêng biệt ra khỏi lớp da. Theo đó, mẫu nang tóc được cắt khỏi lớp biểu bì trên da đầu bằng mũi khoan sinh thiết đường kính 0,7mm với chiều sâu tính từ gốc sợi tóc là 5mm. Sau khi lấy mẫu, các mẫu mô này được đưa vào môi trường chứa dung dịch đệm PBS chứa 2% kháng sinh penicillin và streptomycin.

Theo các phương án cụ thể, việc thu thập mẫu nang tóc được thực hiện trên mẫu da đầu trên cơ thể. Theo một phương án ví dụ, mẫu này có thể được lấy trực tiếp từ mẫu da đầu. Việc thu thập nang tóc được tiến hành bằng cách cắt tóc vùng da chứa chân sợi tóc và sát trùng vùng da được thu nhận nang tóc bằng Betadin trong 2 phút. Sau khi vệ sinh vùng da gáy đầu đã sát trùng bằng nước muối sinh lý rồi để khô trong vòng một đến hai phút. Sau đó dùng máy khoan với mũi khoan sinh thiết (punch) có đường kính trong 0,7 mm để lấy nang tóc. Thiết lập thông số máy ở tốc độ 1500 vòng/phút. Sau khi khởi động máy, hướng mũi khoan vào từng chân tóc, vuông góc với da đầu hoặc hướng theo chiều nghiêng của tóc và khoan vào dưới da với độ sâu khoảng 5 mm. Rút mũi khoan sinh thiết ra và dung kẹp nhỏ rút nang tóc ra khỏi da đầu. Để mô nang tóc vào ống 15 mL hoặc 50 mL dung dịch đệm PBS (phosphate buffered saline, Gibco™, USA) có chứa 2 % kháng sinh penicillin/streptomycin (P/S). Lặp lại các bước khoan để thu được các mẫu mô nang tóc độc lập cho mỗi một sợi tóc. Mỗi mẫu mô nang tóc sau khi thu nhận được chuyển vào môi trường chứa dung dịch đệm PBS chứa 2% kháng sinh penicillin và streptomycin, tốt nhất là chứa 2% penicillin và streptomycin theo tỷ lệ 1:1 về thể tích để bảo quản trước khi đưa vào phân lập tế bào gốc nang tóc.

Sau khi thu nhận mẫu mô nang tóc, mẫu này được xử lý trước khi tiến hành phân lập bằng cách chuyển mẫu thu thập được sang môi trường DMEM/F12 chứa 2% kháng

sinh penicillin và streptomycin. Tốt hơn là môi trường DMEM/F12 chứa 2% kháng sinh penicillin và streptomycin. Theo một phương án cụ thể, môi trường xử lý này là môi trường bao gồm hỗn hợp của môi trường DMEM/F12 và FBS được phối trộn theo tỷ lệ thể tích là 9:1. Mẫu mô nang tóc này được xử lý 30 phút trong khoảng nhiệt độ từ 4 °C đến 25 °C, tốt nhất là từ 4 °C đến 8 °C để thu được các cụm mô nang tóc đã được xử lý.

Để phân lập tế bào nang tóc, tiến hành cấy từng cụm mô nang tóc đã được xử lý sang giọt môi trường DMEM/F12 bổ sung 1% kháng sinh penicillin và streptomycin. Quá trình này cần đảm bảo sao cho mỗi nang tóc được cấy trong một giọt môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy tốt hơn là môi trường DMEM/F12 chứa 1% kháng sinh penicillin và streptomycin, tốt nhất là hỗn hợp kháng sinh này là penicillin và streptomycin theo tỷ lệ 1:1 về thể tích. Theo một phương án cụ thể, môi trường xử lý này là môi trường bao gồm hỗn hợp của môi trường DMEM đã bổ sung F12 và FBS được phối trộn theo tỷ lệ thể tích là 9:1. Sau khi xuất hiện phần mô chứa tế bào nhú nang tóc, tiến hành cắt phần chân nang chứa phần tế bào nhú gốc nang tóc và phần vỏ bao quanh. Các tế bào chân nang theo kết cấu sẽ bao quanh phần tế bào nhú nang tóc tạo thành kết cấu bao dạng túi. Để các tế bào u nhú nang tóc có thể tiếp cận và phát triển trong môi trường nuôi cấy cần phải lột phần vỏ bao ở gốc nang tóc để lộ ra phần tế bào nhú gốc nang tóc và phần vỏ bao quanh gốc nang tóc. Quá trình này quyết định đến hiệu quả nuôi cấy tế bào gốc nang tóc. Việc lột phần vỏ bao ở gốc nang tóc cho phép tế bào gốc nang tóc phát triển mạnh hơn mà không bị bao bởi phần vỏ và không tạo thành sợi.

Để lột phần vỏ bao, tiến hành giữ nang tóc bằng kẹp và cắt phần chân nang có chứa phần nhú của gốc nang tóc (Dermal papilla) và phần vỏ bao xung quanh chân nang tóc (Dermal sheath cup) bằng kim tiêm tiết trùng 18G. Sau đó dùng kim tiêm nhẹ nhàng lột phần nhú của gốc nang tóc ra ngoài để bộc lộ cả phần nhú gốc nang tóc (Dermal papilla) và phần vỏ bao quanh gốc nang tóc (Dermal sheath cup) ra ngoài môi trường.

Để nuôi cấy, tiến hành cấy cố định tế bào nhú gốc nang tóc và phần vỏ này vào giếng nuôi cấy chứa môi trường nuôi cấy. Tiến hành ghim nhẹ cả phần nhú gốc nang tóc (Dermal papilla) và phần vỏ bao quanh gốc nang tóc (Dermal sheath cup) xuống bề mặt giếng nuôi cấy (loại đĩa 12 giếng) để cố định cho mô nang tóc bám vào bề mặt giếng

có chứa sẵn môi trường nuôi cấy tế bào gốc, ví dụ môi trường StemMACS™ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Đức) hoặc DMEM/F12 đã bổ sung 10% huyết thanh phôi thai bò (Foetal Bovine Serum - FBS, Gibco, USA). Theo các phương án ưu tiên, môi trường nuôi cấy là môi trường bao gồm hỗn hợp của môi trường DMEM/F12 và FBS được phối trộn theo tỷ lệ thể tích là 9:1. Sau khi cấy, tiến hành ủ ở 37 °C trong môi trường 5% CO₂ trong 14 ngày để tăng sinh tế bào gốc nang tóc.

Để thu nhận tế bào, tiến hành phân tách tế bào ra khỏi bề mặt giếng bằng enzym. Ví dụ về enzym phân cắt trypsin được sử dụng để tách tế bào ra khỏi bề mặt giếng nuôi cấy là enzym CTS™ TrypLE™ (Thermo Fisher Scientific, USA). Sau đó chuyển tế bào gốc nang tóc đã tách khỏi mô này sang môi trường nuôi cấy tế bào gốc hoặc môi trường DMEM/F12 được bổ sung 10% huyết thanh phôi thai bò.

Sau khi nuôi cấy, tế bào thu được có thể gồm một hỗn hợp tế bào gốc nang tóc, gồm có tế bào gốc biểu bì (dermal stem cells), tế bào biểu bì nang tóc (dermal sheath cup cell - DSC) và tế bào nhú nang tóc (dermal papillia cell -DP), với phần lớn tế bào là tế bào biểu bì nang tóc (DSC) và tế bào nhú nang tóc (DP).

Tế bào sau 14 ngày nuôi cấy ở bước trên (giai đoạn P0) được cấy chuyển sang chai nuôi cấy (giai đoạn P1) với mật độ 500 tế bào/cm² bề mặt chai nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy tế bào gốc, ví dụ StemMACS hoặc môi trường DMEM/F12 đã bổ sung 10% FBS. Trước khi gieo tế bào vào, chai nuôi cấy được tráng phủ chất nền CTS™ CELLstart™ substrate (Gibco, Massachusetts, USA) giúp tế bào bám dính. Tế bào tiếp tục được ủ và nuôi trong điều kiện 37 °C và 5% CO₂ để tăng sinh thu được tế bào gốc nang tóc.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến tế bào gốc nang tóc thu được từ quy trình theo sáng chế. Trong đó tế bào gốc nang tóc này thể hiện dấu sinh học của tế bào gốc trung mô CD90, CD105 và CD73 trên 98% và có khả năng biệt hóa thành tế bào xương, tế bào sụn, tế bào mỡ đồng thời tạo cụm tế bào nang tóc để kích thích mọc tóc.

Tế bào gốc nang tóc thu được từ quy trình theo sáng chế gồm một hỗn hợp tế bào gốc nang tóc, gồm có tế bào gốc biểu bì (dermal stem cells), tế bào biểu bì nang tóc (dermal sheath cup cell - DSC) và tế bào nhú nang tóc (dermal papillia cell -DP), với phần lớn tế bào là tế bào biểu bì nang tóc (DSC) và tế bào nhú nang tóc (DP), trong đó

tế bào gốc này có biểu hiện dấu sinh học của kháng nguyên phôi đặc hiệu theo giai đoạn 3 SSEA3 (Stage-Specific Embryonic Antigen-3) từ 0,1 đến 0,5%.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập và nuôi cấy tế bào gốc nang tóc

Để đánh giá hiệu suất phân lập, tiến hành trên 05 mẫu sinh học, mỗi mẫu thu thập từ 12 đến 15 nang tóc để phân lập và tăng sinh tế bào. Mỗi mẫu sinh học được cắt bỏ phần tóc, để phần chân tóc để phân lập tế bào gốc nang tóc. Vùng mẫu da chứa chân sợi tóc để thu thập nang tóc được sát trùng bằng Betadin trong 2 phút. Sau đó rửa lại bằng nước muối sinh lý rồi để khô trong hai phút để làm mẫu phân lập.

Tiếp đó dùng máy khoan với mũi khoan sinh thiết (punch) có đường kính trong 0,7 mm để lấy nang tóc. Thiết lập thông số máy ở tốc độ 1500 vòng/phút. Sau khi khởi động máy, hướng mũi khoan vào từng chân tóc, vuông góc với da đầu hoặc hướng theo chiều nghiêng của tóc và khoan vào dưới da với độ sâu khoảng 5 mm. Rút mũi khoan sinh thiết ra và dùng kẹp nhỏ rút nang tóc ra khỏi da đầu. Để mô nang tóc vào ống 15 mL hoặc 50 mL dung dịch đệm PBS (phosphate buffered saline, Gibco™, USA) chứa 2 % kháng sinh Penicillin/Streptomycin (P/S) theo tỷ lệ 1:1 về thể tích. Lặp lại các bước khoan để thu được các mẫu mô nang tóc độc lập cho mỗi một sợi tóc. Phần nang tóc được thu thập như được thể hiện trên Hình 1A.

Mô nang tóc được xử lý trong môi trường DMEM/F12 chứa 2% kháng sinh penicillin và streptomycin trong 30 phút ở 8 °C để thu được các cụm mô nang tóc đã được xử lý.

Tiến hành cấy từng mô nang vào đĩa nuôi cấy, mỗi mô nang được cấy vào một giọt môi trường DMEM/F12 và FBS (tỷ lệ 9:1 theo thể tích) có bổ sung 1% kháng sinh penicillin và streptomycin. Tiến hành nuôi cấy ở 37 °C trong môi trường 5% CO₂. Sau khi xuất hiện tế bào nhú nang tóc, tiến hành cắt phần chân nang chứa phần tế bào nhú gốc nang tóc và phần vỏ bao quanh rồi lột phần vỏ bao ở gốc nang tóc để lộ ra phần tế bào nhú gốc nang tóc và phần vỏ bao quanh gốc nang tóc. Hình ảnh tế bào gốc nang tóc được tách khỏi mô nang tóc được thể hiện trên Hình 1B.

Tiến hành ghim nhẹ cả phần nhú gốc nang tóc (Dermal papilla) và phần vỏ bao quanh gốc nang tóc (Dermal sheath cup) xuống bề mặt giếng nuôi cấy (loại đĩa 12 giếng)

để cố định cho mô nang tóc bám vào bề mặt giếng có chứa sẵn môi trường StemMACS™ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Đức). Nuôi cấy ở 37 °C trong môi trường 5% CO₂ trong 14 ngày để tăng sinh tế bào gốc nang tóc.

Tế bào sau 14 ngày nuôi cấy (giai đoạn P0) được bổ sung enzym CTS™ TrypLE™ (Thermo Fisher Scientific, USA) vào mỗi giếng theo hướng dẫn của nhà sản xuất để phân tách tế bào gốc nang tóc ra khỏi bề mặt giếng nuôi cấy. Hình ảnh tế bào gốc nang tóc ở giai đoạn P0 được thể hiện trên hình 1C.

Cấy chuyển tế bào sang chai nuôi cấy (P1) với mật độ 500 tế bào/cm² bề mặt chai nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy tế bào gốc StemMACS và môi trường DMEM/F12 + 10% FBS. Bề mặt các môi trường này đã được tráng phủ chất nền CTS™ CELLstart™ substrate (Gibco, Massachusetts, USA) giúp tế bào bám dính. Tế bào tiếp tục được ủ và nuôi trong điều kiện 37 °C và 5% CO₂ để tăng sinh thu được tế bào gốc nang tóc. Với mỗi lần cấy chuyển thu được tế bào P2, P3 tương ứng. Hình ảnh tế bào gốc nang tóc ở giai đoạn P3 được thể hiện trên hình 1D. Hiệu suất thu thập tế bào được thể hiện về số lượng tế bào ở giai đoạn P0. Với mỗi đợt qua các giai đoạn cấy chuyển được mô tả trong bảng 1.

Bảng 1: Hiệu suất phân lập và tăng sinh tế bào trong môi trường StemMACS

Mẫu	Số lượng TB P0	Số lượng TB P1	Số lượng TB P2	Số lượng TB P3
1 (15 nang tóc)	400.000	2,4 x 10 ⁶	7,3 x 10 ⁶	60,5 x 10 ⁶
2 (15 nang tóc)	400.000	2,7 x 10 ⁶	6,2 x 10 ⁶	60,4 x 10 ⁶
3 (14 nang tóc)	280.000	2,2 x 10 ⁶	7,1 x 10 ⁶	58,5 x 10 ⁶
4 (12 nang tóc)	210.000	1,675 x10 ⁶	5,8 x 10 ⁶	62,2 x 10 ⁶
5 (12 nang tóc)	150.000	1,3 x 10 ⁶	6,5 x 10 ⁶	60,7 x 10 ⁶

Tế bào phát triển qua các giai đoạn được đánh giá khả năng tăng sinh thông qua thông số thời gian nhân đôi quần thể. Công thức tính thời gian nhân đôi quần thể như sau. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

$$\text{Tốc độ tăng trưởng} = \frac{\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right)}{t}$$

N_t : Tổng số tế bào thu được ở thời điểm t (giờ)

N_0 : Số tế bào thu được tại thời điểm 0 giờ

t (giờ): khoảng thời gian giữa hai lần cấy chuyển

$$\text{Thời gian nhân đôi quần thể} = \frac{\ln(2)}{\text{Tốc độ tăng trưởng}}$$

Bảng 2: Kết quả thời gian nhân đôi quần thể của tế bào trong điều kiện môi trường DMEM/F12 + 10% FBS

Mẫu	DMEM/F12 + 10 % FBS	
	P1 - P2 (giờ)	P2 - P3 (giờ)
1	39,74	39,38
2	38,14	39,75
3	38,09	37,85
4	38,67	38,48
5	39,38	39,22
Trung bình	$38,38 \pm 0,41$	$38,8 \pm 1,34$

Kết quả cho thấy tế bào có khả năng phát triển tốt trong cả hai loại môi trường nuôi cấy là StemMACS và DMEM/F12 + 10% FBS. Thời gian nhân đôi tế bào khoảng từ 37-40 giờ, điều này cho thấy tế bào gốc nang tóc thu được có khả năng phát triển mạnh.

Ví dụ 2: Đánh giá đặc tính, hình thái tế bào gốc nang tóc nuôi cấy

Để đánh giá đặc tính hình thái, tế bào gốc nang tóc (P0) thu được từ Ví dụ 1 được nuôi cấy trong môi trường DMEM/F12 hoặc StemMACS trong các điều kiện như nêu trong Ví dụ 1. Trong cả hai điều kiện môi trường nuôi cấy này, tế bào gốc phân lập được đều có khả năng sống, tăng sinh và có đặc điểm điển hình như: hình thái tế bào gốc trung mô (dạng giống nguyên bào sợi thuần dài).

Hình thái tế bào gốc nang tóc nuôi cấy trong môi trường StemMACS (Hình 2A) và trong môi trường DMEM/F12 + 10% FBS (Hình 2B). Trong cả hai điều kiện môi trường nuôi cấy này, tế bào gốc phân lập được đều có khả năng sống, tăng sinh và có đặc điểm điển hình như: hình thái tế bào gốc trung mô (dạng giống nguyên bào sợi thuôn dài). Hình thái tế bào nuôi trong hai loại môi trường này đều cho thấy một quần thể tế bào khá đồng nhất về hình thái, có hình dạng điển hình thuôn dài giống tế bào sợi. Không có sự khác nhau giữa hai môi trường nuôi cấy.

Để đánh giá đặc tính của tế bào gốc nang tóc tiến hành đánh giá chỉ thị tế bào CD73, CD90 và CD105 và SSEA3 tại P3 bằng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy. Các dấu sinh học được phân tích gồm có CD90, CD105, CD73 và SSEA3. Đồng thời nhóm chất chỉ thị âm tính của tế bào gốc trung mô cũng được phân tích, gồm có CD45, CD34, CD11b, CD19 và HLA-DR. Các dấu sinh học được nhuộm theo quy trình của nhà cung cấp.

Các kháng thể CD90, CD105, CD73, CD45, CD34, CD11b, CD19 và HLA-DR sử dụng bộ kit Human MSC Analysis Kit (BD Biosciences, California, USA) và SSEA3 sử dụng bộ kit kháng thể SSEA-3 Rat FITC (BD Biosciences, California, USA) và phân tích kết quả trên máy Beckman Coulter flow cytometer và phần mềm Navios (Navios Software 3.2) tích hợp trên máy.

Kết quả cho thấy các dấu ấn chỉ thị thuộc nhóm tế bào gốc trung mô CD90, CD105 và CD73 đều có biểu hiện $\geq 98\%$, nhóm đối chứng âm của tế bào gốc trung mô $< 1,5\%$, nhóm SSEA3 (Stage-Specific Embryonic Antigen-3) từ 0,1 đến 0,5%. Tổng hợp kết quả chi tiết thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3: Biểu hiện dấu sinh học của tế bào gốc nang tóc

Mẫu	CD73	CD90	CD105	Đối chứng âm	SSEA3
1	99%	99,5%	99,7%	0,4%	0,4%
2	100%	100%	99,9%	0,2%	0,5%
3	99,9%	99%	98%	0,2%	0,1%
4	99,5%	99,7%	99%	1,4%	0,1%

5	99,9%	99,9%	98,6%	0,1%	0,1%
TB $\pm$ SD	99,66 $\pm$ 0,41	99,62 $\pm$ 0,39	99,04 $\pm$ 0,78	0,46 $\pm$ 0,53	0,24 $\pm$ 0,19

Kết quả cho thấy tế bào gốc nang tóc phân lập được theo sáng chế có biểu hiện chất chỉ thị của nhóm tế bào gốc trung mô CD90, CD105 và CD73 là $\geq 98\%$ (Hình 3), và có biểu hiện nhóm SSEA3 (Stage-Specific Embryonic Antigen-3) từ 0,1 đến 0,5% (Hình 4).

So với tế bào gốc nang tóc thu được từ US 8431400 B2 (Ví dụ 2A), trong đó tế bào được nuôi cấy trong AmnioMax C100 basal medium + AmnioMax C100 supplement có biểu hiện alkaline phosphatase và MSP. Điều này cho thấy quy trình theo sáng chế cho phép phân lập và nuôi cấy tế bào gốc nang tóc có biểu hiện đặc tính của tế bào đa năng, có khả năng biệt hóa tốt hơn. Điều này kỳ vọng cho phép phát triển sản phẩm cho phép kích thích mọc tóc và/hoặc ngăn ngừa rụng tóc.

Ví dụ 3: Đánh giá khả năng biệt hóa của tế bào gốc nang tóc nuôi cấy

Tế bào gốc nang tóc tiếp tục được kiểm tra tiềm năng của tế bào gốc đa năng bằng khả năng tạo cụm (CFU) và khả năng biệt hoá thành dòng tế bào xương và tế bào sụn.

Sử dụng phương pháp đánh giá khả năng tạo cụm để kiểm tra đặc tính tự làm mới của tế bào gốc nang tóc. Đánh giá khả năng tạo cụm dựa trên thông số Hiệu suất tạo cụm: Hiệu suất tạo cụm = $\text{CFU}/\text{Số tế bào đã gieo} \times 100\%$. Môi trường nuôi cấy và tế bào được trải trên bề mặt đĩa nuôi cấy 6 giếng với mật độ 4 tế bào/cm². Tế bào được nuôi cấy và duy trì ở điều kiện 37 °C, 5% CO₂. Môi trường được thay mới sau mỗi 3 đến 4 ngày. Khả năng tạo cụm được tiến hành cố định và nhuộm sau 14 ngày nuôi cấy. Số cụm tạo được ở mẫu 01 là $13,3 \pm 2,33$ cụm, mẫu 02 là $16,3 \pm 1,86$ cụm và mẫu 03 là $17,3 \pm 3,77$ cụm. Dựa vào số cụm đã đếm được, hiệu suất tạo cụm của mẫu 01 là $37,03 \pm 6,49$ (%), mẫu 02 là $45,37 \pm 5,17$ (%) và mẫu 03 là $48,1 \pm 10,49$ (%) (Bảng 4). Bên cạnh đó, hình ảnh cụm được chụp dưới kính hiển vi, nhận thấy các cụm có mật độ tế bào có tập hợp tế bào với một số lượng lớn (Hình 4 – Vật kính 4X), đặc điểm này của cụm tế bào có thể quan sát được trong Hình 5.

Bảng 4: Khả năng tạo cụm (CFU-F) của tế bào

Mẫu	Số cụm	Hiệu suất tạo cụm
01	$13,3 \pm 2,33$ cụm	$37,03 \pm 6,49$ %
02	$16,3 \pm 1,86$ cụm	$45,37 \pm 5,17$ %
03	$17,3 \pm 3,77$ cụm	$48,1 \pm 10,49$ %
Trung bình $\pm$ SD	$15,6 \pm 2$ cụm	$43,5 \pm 5,7$ %

Đánh giá khả năng biệt hóa của tế bào gốc nang tóc thông qua đặc tính biệt hóa tạo xương và sụn. Quá trình tạo mỡ là sự tích tụ của các giọt lipid, tạo xương là sự tích tụ của Canxi và biệt hóa tạo sụn tạo ra chất nền ngoại bào có sự xuất hiện của các phân tử đặc trưng cho sụn như collagen loại II và Aggrecan. Mẫu tế bào được gieo với mật độ 4000 tế bào/ giếng trên đĩa 96 giếng ở giai đoạn 4 (P4). Tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM/F12 + 10% FBS. Sau 2-3 ngày, mật độ tế bào đạt 70 – 80% bề mặt giếng nuôi cấy, thay môi trường biệt hóa ở các giếng biệt hóa đồng thời.

Biệt hoá tạo tế bào xương được kiểm tra bằng thuốc nhuộm Alizarin Red S nhờ đặc tính bắt màu ion Calcium sau 14 ngày nuôi cấy. Các tế bào biệt hoá bắt màu đỏ (Hình 6A). Biệt hoá tạo tế bào tạo mỡ được phát hiện bằng thuốc nhuộm Oil Red sau khoảng 21 ngày nuôi cấy. Các tế bào biệt hóa sẽ tạo các giọt mỡ hình tròn và có màu vàng (Hình 6B). Biệt hóa tạo sụn được nhuộm thuốc nhuộm Alcan Blue sau 14 ngày nuôi cấy. Các tế bào biệt hoá có cấu trúc giống sụn và bắt màu xanh của thuốc nhuộm (Hình 6C). Kết quả này cho thấy tế bào gốc nang tóc thu được theo sáng chế thể hiện đặc tính của tế bào gốc đa năng cho phép biệt hóa thành một số tế bào chuyên biệt.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào gốc nang tóc theo sáng chế đơn giản, dễ thực hiện cho phép thu được tế bào gốc nang tóc đa năng có khả năng phát triển mạnh. Điều này mở ra tiềm năng phát triển chế phẩm tế bào gốc ứng dụng để kích thích mọc tóc và/hoặc điều trị bệnh rụng tóc.

Quy trình theo sáng chế cho phép phân lập từ mẫu chứa nang tóc nên có tiềm năng ứng dụng rộng rãi. Tế bào gốc nang tóc thu được tế bào gốc nang tóc, gồm có tế bào gốc biểu bì (dermal stem cells), tế bào biểu bì nang tóc (dermal sheath cup cell - DSC) và tế bào nhú nang tóc (dermal papillia cell -DP), với phần lớn tế bào là tế bào

biểu bì nang tóc (DSC) và tế bào nhú nang tóc (DP) chứa đặc tính của tế bào đa năng tạo cụm tế bào nang tóc để kích thích mọc tóc.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào gốc nang tóc, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) thu thập mô nang tóc bằng cách thu nhận từng mẫu nang tóc riêng biệt đã được cắt khỏi lớp biểu bì trên da đầu bằng mũi khoan sinh thiết đường kính 0,7mm với chiều sâu tính từ gốc sợi tóc là 5mm, các mẫu mô này được đưa vào môi trường chứa dung dịch đệm PBS chứa 2% kháng sinh penicillin và streptomycin;

b) xử lý mô nang tóc bằng cách chuyển mẫu thu thập được sang môi trường DMEM/F12 chứa 2% kháng sinh penicillin và streptomycin trong 30 phút trong khoảng nhiệt độ từ 4 °C đến 25 °C thu được các cụm mô nang tóc đã được xử lý;

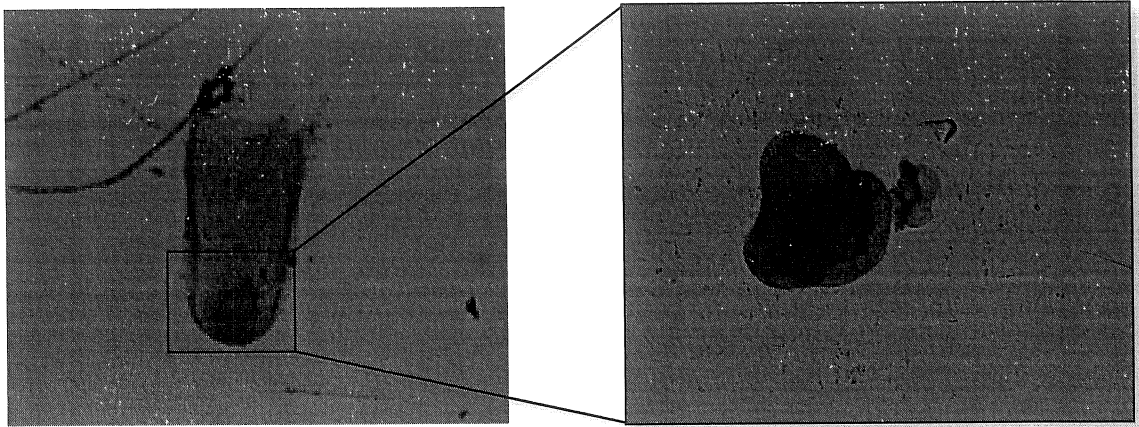
c) phân lập tế bào nang tóc bằng cách cấy từng cụm mô nang tóc đã được xử lý sang giọt môi trường DMEM/F12 bổ sung 1% kháng sinh penicillin và streptomycin, sau khi xuất hiện tế bào nhú nang tóc, tiến hành cắt phần chân nang chứa phần tế bào nhú gốc nang tóc và phần vỏ bao quanh rồi lộn phần vỏ bao ở gốc nang tóc để lộ ra phần tế bào nhú gốc nang tóc và phần vỏ bao quanh gốc nang tóc, sau đó cấy cố định tế bào nhú gốc nang tóc và phần vỏ này vào giếng nuôi cấy chứa môi trường nuôi cấy tế bào gốc hoặc môi trường DMEM/F12 được bổ sung 10% huyết thanh phôi thai bò rồi ủ ở 37 °C trong môi trường 5% CO₂ trong 14 ngày để tăng sinh tế bào gốc nang tóc; và

d) thu tế bào gốc nang tóc bằng cách bổ sung enzym phân cắt trypsin để tách tế bào gốc nang tóc ra khỏi bề mặt giếng nuôi cấy, sau đó chuyển tế bào gốc nang tóc đã tách khỏi mô này sang môi trường nuôi cấy tế bào gốc hoặc môi trường DMEM/F12 được bổ sung 10% huyết thanh phôi thai bò rồi ủ ở 37 °C để tăng sinh số lượng, thu được tế bào gốc nang tóc.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó môi trường để cấy tế bào gốc nang tóc sau khi được tách khỏi mô còn được tráng phủ một lớp chất nền giúp tế bào gốc bám dính và mật độ tế bào gốc nang tóc được cấy trên bề mặt môi trường này là 500 tế bào/cm².

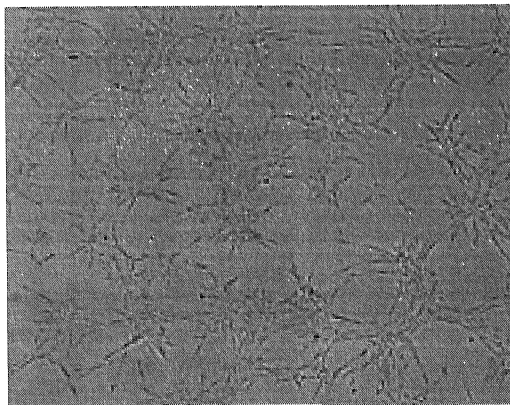
3. Quy trình theo điểm 1, trong đó chất kháng sinh được sử dụng là penicillin và streptomycin và môi trường nuôi cấy là môi trường bao gồm hỗn hợp của môi trường DMEM/F12 và FBS được phối trộn theo tỷ lệ thể tích là 9:1.

HÌNH 1

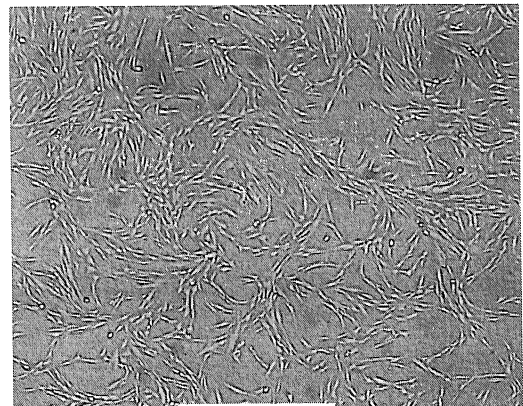


(A)

(B)

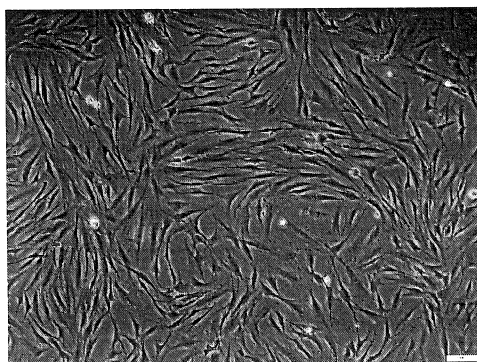


(C)

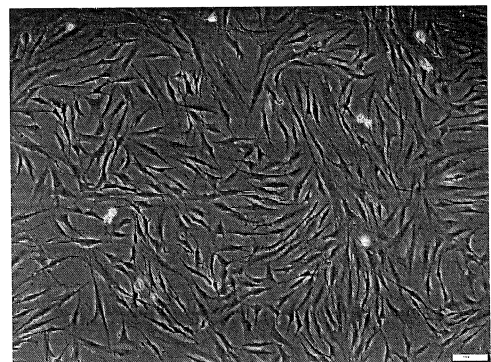


(D)

HÌNH 2

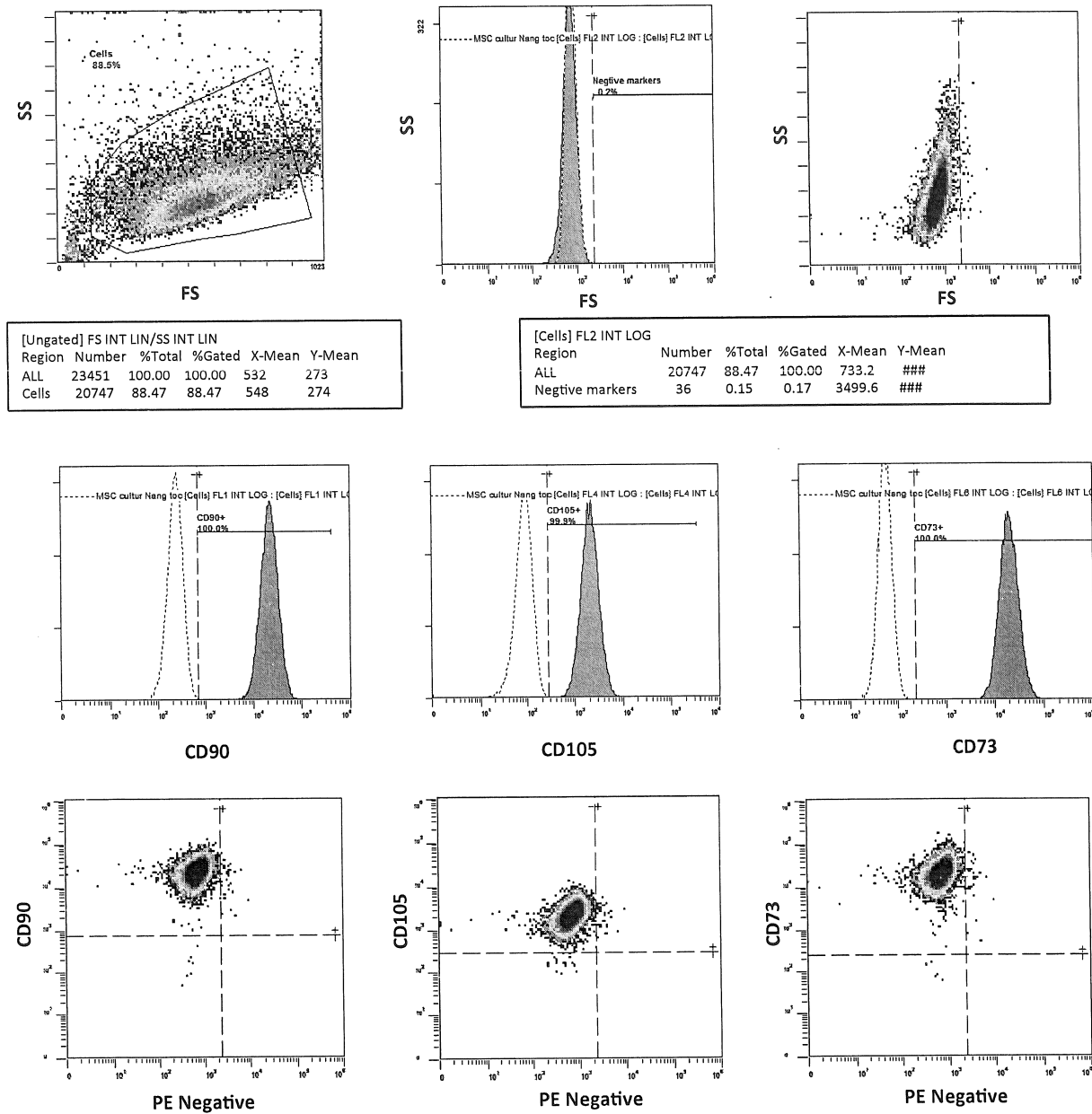


(A)

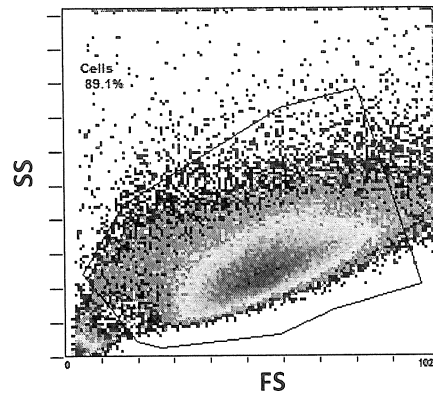


(B)

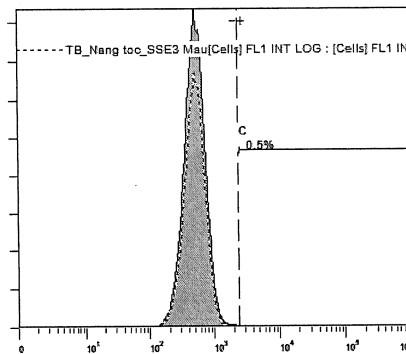
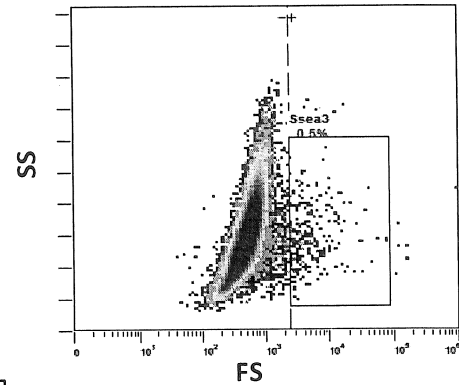
HÌNH 3



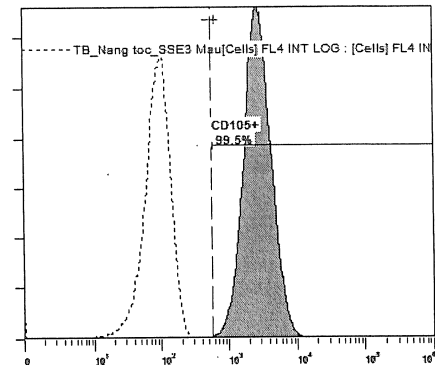
HÌNH 4



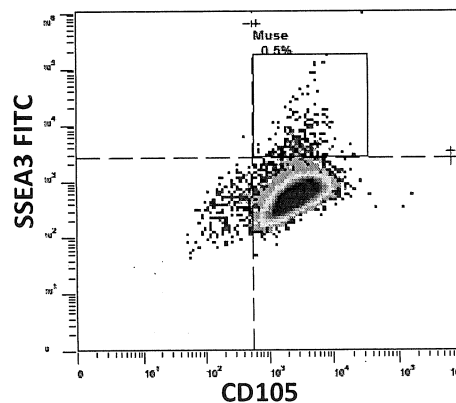
[Ungated] FS INT LIN/SS INT LIN					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	61599	100.00	100.00	533	283
Cells	54911	89.14	89.14	543	282



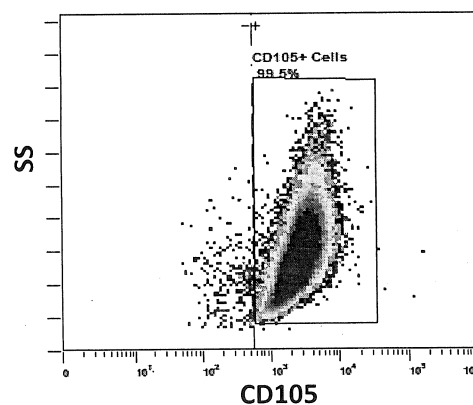
[Cells] FL1 INT LOG					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	54911	89.14	100.00	600.2	###
C	279	0.45	0.51	13017.3	###



[Cells] FL1 INT LOG					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	54911	89.14	100.00	3000.1	###
CD105+	54634	88.69	99.50	3013.6	###

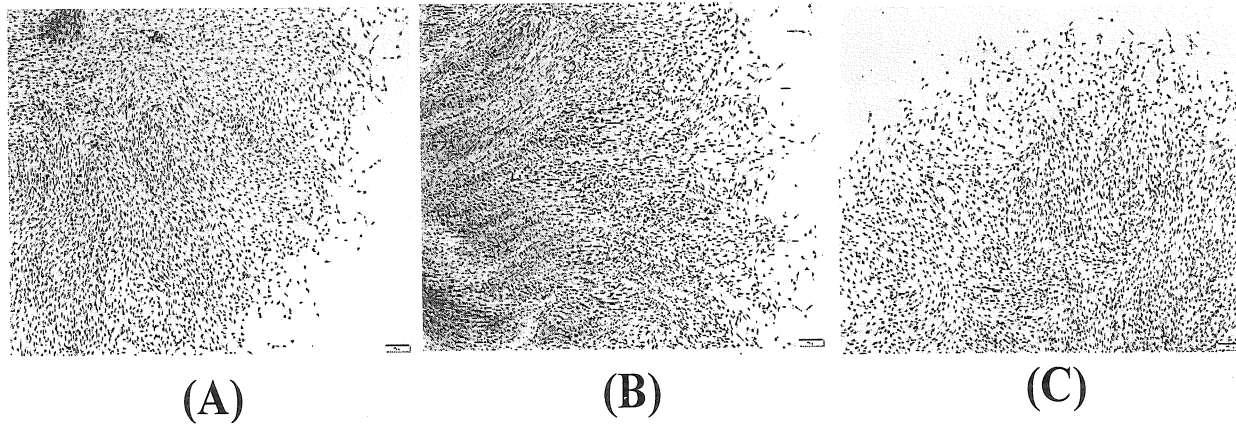


[Cells] FL1 INT LOG					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	54911	89.14	100.00	3000.1	600.2
Muse	258	0.42	0.47	4057.4	8701.1



[Cells] FL1 INT LOG					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	54911	89.14	100.00	3000.1	282
CD105+	54623	88.68	99.48	3007.2	282

HÌNH 5



HÌNH 6

