

XÂY DỰNG QUY TRÌNH TẠO TẤM NGUYÊN BÀO SỢI NGƯỜI

Trần Công Toại^{*}; Tô Minh Quân^{**}

TÓM TẮT

Các tác giả sử dụng fibrin từ huyết thanh người làm scaffold để phát triển vật liệu thay thế trung bì. Nguyên bào sợi người nuôi cấy tới lần cấy chuyển thứ 2. Để hình thành tấm nguyên bào sợi, nguyên bào sợi người huyền phù trong keo fibrin, thêm CaCl_2 để tạo thành tấm nguyên bào sợi. Kiểm tra mô học HE tấm nguyên bào sợi ở các ngày 8, 13, 15, 18. Ngoài ra, còn nuôi nguyên bào sợi trên bề mặt tấm fibrin để chứng minh khả năng làm giá thể nuôi cấy tế bào.

* Từ khóa: Nguyên bào sợi; Keo fibrin; Tấm trung bì.

CREATION OF HUMAN FIBROBLASTS

Tran Cong Toai; To Minh Quan

SUMMARY

The aim of this study was to develop a new method to create dermal graft composite for the treatment of various skin defects. We utilized human plasma derived fibrin as the scaffold for the development of a living human dermal equivalent: fibrin - fibroblast (B - FF). Skin cells were cultured to passage 2. For B - FF formation, human fibroblasts were suspended in human fibrin matrix and add CaCl_2 to solution for making dermal sheet. Dermal sheet were tested with HE staining on 8th, 13th, 15th, 18th day. Another hand, we seeded a layer of fibroblast on the surface of fibrin sheet to prove the ability of scaffold for cell culture.

* Key words: Fibroblast; Fibrin glue; Dermal sheet.

ĐẶT VẤN ĐỀ

- Công nghệ mô da rất hiệu quả trong chữa trị vết bỏng. Rheinwald và Green nuôi cấy tế bào sừng và phát triển tấm tế bào sừng làm vật liệu thay thế cho những bệnh nhân (BN) mất da [6]. Tuy nhiên sự tồn tại của lớp feeder nguyên bào sợi chuột và protein động vật từ huyết thanh phôi bò trong nuôi cấy có thể tạo ra phản ứng thải loại chậm. Sử dụng tấm tế bào sừng còn hạn chế trong ứng dụng lâm sàng do nó

mỏng manh, tỉ lệ chấp nhận mảnh ghép thấp [1, 6]. Vì vậy, phát triển mảnh ghép da bằng cách kết hợp một tấm nguyên bào sợi nuôi trên vật liệu sinh học khắc phục tốt hơn, làm tăng tỉ lệ chấp nhận mảnh ghép, quá trình lành vết thương nhanh hơn và tốt hơn về mặt thẩm mỹ [1, 7].

- Nhiều vật liệu đã được thử nghiệm tạo cấu trúc 3D cho nguyên bào sợi như collagen, collagen/chitosan, keo fibrin thương mại, huyết thanh... [3]. Trong nghiên cứu này,

* Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch; ** Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh
Phản biện khoa học: GS. TS. Lê Gia Vinh

sử dụng fibrin như vật liệu sinh học vì nó được thu nhận từ huyết thanh người. Vì vậy, có thể thu nhận từ chính người bệnh, có thể tạo thành tấm trung bì tự thân từ fibrin và nguyên bào sợi tự thân [1, 4].

- Mục đích của nghiên cứu này là tạo cấu trúc 3D fibrin - nguyên bào sợi bằng cách kết hợp nguyên bào sợi trong khuôn nền fibrin.

VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu.

- Lấy da sản phụ mổ đẻ trong cả hai lần sinh. Sau lần mổ đẻ đầu tiên, vết cắt cổ tử cung hình thành vết sẹo. Ở lần sinh thứ hai, cắt bỏ vết sẹo giữ vết sẹo ở 4°C trong PBS kháng sinh cho đến khi sử dụng.

- Máu cuống rốn thu từ trẻ sinh theo phương pháp tự nhiên, thai đủ tháng.

- Da người và huyết tương xét nghiệm âm tính với HIV, HCV, HBV. Cả hai được sử dụng càng nhanh càng tốt.

2. Phương pháp nghiên cứu.

• *Tách nguyên bào sợi. [2]:*

- Thu da từ vết sẹo của thai phụ hay vết da bong, lưu giữ trong PBS vô trùng.

- Dùng dao phẫu thuật cắt bỏ lớp tế bào mỡ trên tấm thớt đĩa petri.

- Da người được ủ trong trypsin - EDTA ở 4°C trong 18 giờ.

- Tách lớp tế bào sừng, dùng kéo cắt lớp trung bì thành những mảnh mô nhỏ, sau đó chuyển mảnh mô vào trong bình Roux ủ trong 1 giờ.

- Sau 1 giờ thêm 2 ml môi trường vào trong bình Roux.

- Sau 1 ngày, thay môi trường cũ bằng môi trường mới.

- Cứ 3 ngày một lần tiến hành thay môi trường cho đến khi tế bào đạt đến mật độ cấy chuyển (khoảng 70 - 80% diện tích môi trường).

- Tiến hành cấy chuyển đến lần thứ ba.

• *Thu nhận huyết thanh máu cuống rốn:*

- Máu cuống rốn thu nhận từ thai nhi mổ đẻ.

- Sau khi sinh, thu nhận máu cuống rốn trong ống ly tâm 15 ml có chứa 1,25 ml natri citrate.

- Ly tâm 3000 vòng/phút/5 phút. Hút huyết thanh, lọc vào ống ly tâm.

• *Tạo tấm nguyên bào sợi trong keo fibrin [1]:*

- Tiến hành cấy chuyển nguyên bào sợi F2.

- Rửa bình nuôi bằng PBS vô trùng hai lần.

- Ủ 2,5 ml trypsin - EDTA 2,5% trong 5 phút.

- Thêm 2,5 ml môi trường để bất hoạt trypsin - EDTA.

- Hút 5 ml dung dịch tế bào đem ly tâm 3000 vòng/phút/5 phút.

- Thêm 1 ml huyết tương vào ống ly tâm có tế bào, huyền phù, đếm tế bào, chỉnh về mật độ 5.10^5 tế bào/ml.

- Cho 1 ml huyết tương có tế bào vào trong mỗi giếng trong đĩa 6 giếng.

- Thêm 25 μl CaCl_2 vào trong mỗi giếng.
- Ngày kế tiếp, hút bỏ huyết tương dư, thay bằng 1,5 ml môi trường nuôi nguyên bào sợi, thay môi trường 3 ngày/lần.

- Đem tẩm nguyên bào sợi ngày 4, 8, 13, 15, 18 đi xét nghiệm mô học.

• Nuôi một lớp nguyên bào sợi trên keo fibrin [6]:

- Cho 1 ml huyết thanh cuống rốn vào 1 đĩa trong đĩa 6 giếng.

- Cấy 1 ml dịch tế bào mật độ $5 \cdot 10^5$ tế bào/ml lên bề mặt đĩa.

- Hai ngày thay môi trường một lần cho đến ngày thứ 8 đem đi nhuộm HE.

3. Những phương pháp xác định trong nghiên cứu.

- Xác định nguyên bào sợi: sử dụng nhuộm vimentin để xác định nguyên bào sợi.

- Xác định tẩm nguyên bào sợi: sử dụng phương pháp nhuộm HE để xác định cấu trúc lớp nguyên bào sợi.

4. Các chỉ tiêu cần khảo sát.

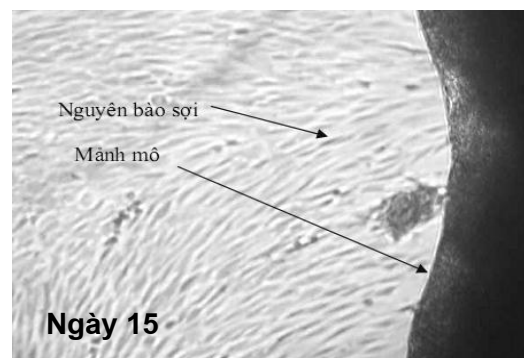
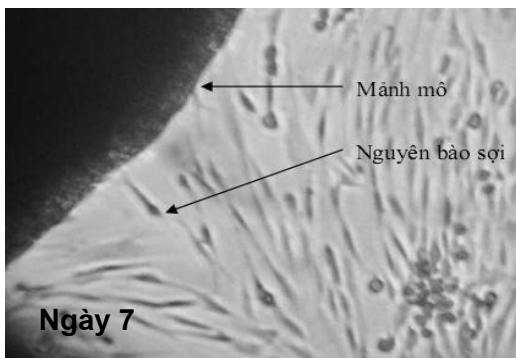
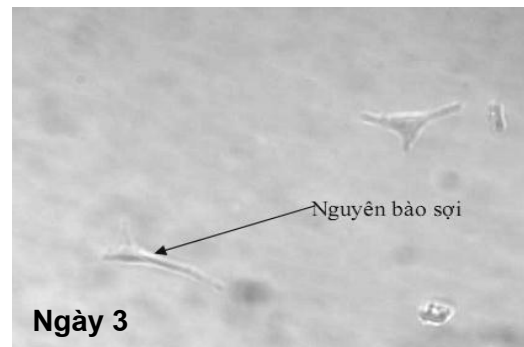
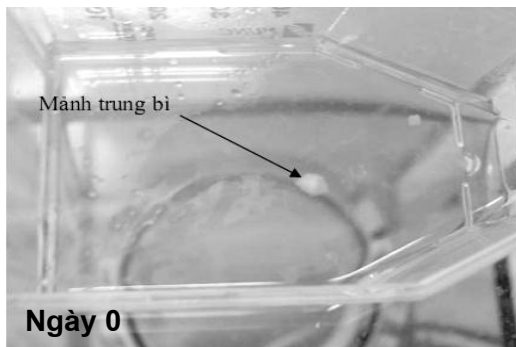
- Sự hình thành tẩm nguyên bào sợi.

- Thời gian hình thành tẩm nguyên bào sợi.

- Tách rời tẩm nguyên bào sợi bằng tay.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả nuôi trung bì sơ cấp.



Hình 1: Nguyên bào sợi Po lan ra từ mảnh mô (x 10).

- Sau ba ngày nuôi cấy, tế bào bắt đầu lan ra mảnh mô, ngày thứ 3 có những tế bào đơn trải dài thành hình thoi.

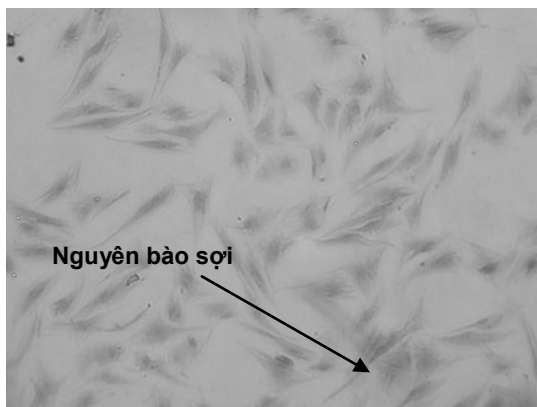
- Ngày thứ 7, nguyên bào sợi ngày càng nhiều, trong giai đoạn này nguyên bào sợi tăng trưởng mạnh, xung quanh mảnh mô có nhiều tế bào.

- Ngày thứ 15, tế bào hợp dòng, tạo thành một lớp đơn trên bề mặt nuôi cấy.

* *Kết quả nhuộm vimentin*: sau khi nhuộm, tế bào bắt màu dương tính với vimentin. Tế bào có màu nâu đậm.

2. Kết quả tạo keo fibrin.

- Huyết thanh nhận từ máu cuống rốn sau khi thêm CaCl₂ vào, khoảng 5 phút sau dịch fibrin đông đặc lại tạo thành tấm fibrin. Tấm fibrin có màu vàng, hơi xốp, dễ dàng tách ra khỏi vật chứa và có hình dạng của vật chứa.

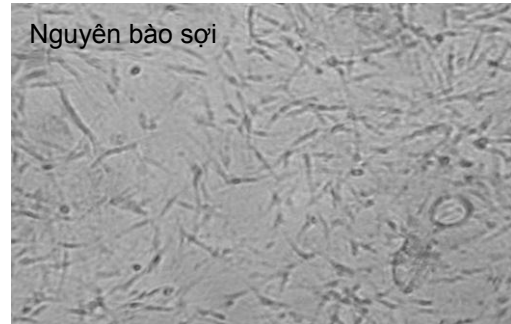


Hình 2: Nguyên bào sợi nhuộm vimentin.

3. Kết quả tạo tấm nguyên bào sợi.

- Một ngày sau khi tạo thành tấm fibrin, nguyên bào sợi trong tấm fibrin trải dài và có hình dạng cong, uốn khúc. Điều này khác với nguyên bào sợi trên đĩa Roux, có thể là do tế bào trải dài trong không gian

3D, nó phải len lỏi giữa những khoảng trống của tấm fibrin.



Hình 3: Nguyên bào sợi trong keo fibrin ngày 8 (x 10).

- Tấm nguyên bào sợi cắt ngang cho thấy nguyên bào sợi phân bố đều trong tấm fibrin. Dựa vào hình ảnh nhuộm HE cắt ngang của tấm nguyên bào sợi các ngày 4, 8, 13, 15, 18, lượng nguyên bào sợi trong các ngày 4, 8, 13 nhiều hơn so với các ngày 15, 18, đã xác định sinh trưởng tốt trong 13 ngày đầu, giảm dần ở các ngày sau.

4. Nguyên bào sợi trên màng fibrin.

Sau khi cấy lên bề mặt tấm fibrin, một ngày sau nguyên bào sợi bắt đầu bám, trải dài. Hình cắt ngang tấm fibrin đã cho thấy 1 lớp nguyên bào sợi mọc trên bề mặt tấm fibrin. Ngoài ra một số tế bào len lỏi vào bên trong tuy nhiên đâm không sâu và số lượng tế bào không nhiều.

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu, chúng tôi rút ra một số nhận xét:

- Tạo được tấm nguyên bào sợi người trong fibrin.

- Tấm nguyên bào sợi bóc bằng tay dễ dàng.

- Thời gian sử dụng tấm nguyên bào sợi khoảng 2 tuần sau khi tạo.

- Fibrin có khả năng làm giá thể nuôi tế bào.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *A. L. Mazlyzam, B. S. Aminuddin, N. H. Fuzina, M. M. Norhayati, O. Fauziah, M. R. Isa, L. Saimh, B. H. I. Ruszymah.* Reconstruction of living bilayer human skin equivalent utilizing human fibrin as a scaffold. *Burns*, 2007, 33, pp. 355 - 363.

2. *Akira Takashima.* *Current Protocols in cell biology*, 1998, pp. 211 - 212.

3. *B. L. Seal, T. C. Otero, A. Panich.* Polymer material for tissue and organ regeneration, *Material science and Engineering R.* 2001, 34, pp. 147 - 230.

4. *Béatrice Mis, Eric Rolland, Vincent Ronfard.* Combined use of a collagen - based dermal substitute and a fibrin - based cultured epithelium: a step toward a total skin replacement for acute wounds. *Burns*, 2004, 30, pp. 713 - 719.

5. *Grant, K. Warwick, J. Marshall, C. Green và R. Martin.* The co - application of sprayed cultured autologous keratinocytes and autologous fibrin sealant in a porcine wound model. *British Journal of Plastic Surgery*, 2002, 55, pp. 219 - 227.

6. *L. P. Kamolza, M. Luegmair, N. Wickb, B. Eisenbocka, S. Burjaka, R. Koller, G. Meissl, M. Frey.* The Viennese culture method: cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on fibroblast containing fibrin glue gels. *Burns*, 2005, 31, pp. 25 - 29.

7. *R. E. Horch, H. Banasch, G. B. Stark.* Translation of cultured autologous keratinocytes in fibrin sealant biomatrix to resurface chronic wounds. *Transplantation Proceedings*, 2001, 33, pp. 642 - 644.