

DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.054

SO SÁNH HIỆU QUẢ KHẢ NĂNG LÀM LÀNH VẾT THƯƠNG Ở CHUỘT *Swiss* BẰNG TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ MỠ VÀ TẾ BÀO GỐC ĐƠN NHÂN TỪ MỠ

Lâm Phạm Phước Hùng², Lê Hoàng Duy Minh¹, Ngô Thị Minh Thu³ và Nguyễn Ngọc Hiếu^{1*}

¹Trường Đại học Khoa học - Đại học Huế

²Bệnh viện Da liễu thành phố Hồ Chí Minh

³Trường Đại học Duy Tân

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Ngọc Hiếu (email: ngochieu0707@gmail.com)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 07/09/2019

Ngày nhận bài sửa: 07/05/2020

Ngày duyệt đăng: 29/06/2020

Title:

Compare the ability to heal wounds in Swiss mice by transplant adipose derived stem cells and adipose-derived mononuclear cells

Từ khóa:

Làm lành vết thương, loét, tế bào đơn nhân từ mỡ, tế bào gốc trung mô từ mỡ

Keywords:

Adipose-derived mononuclear cells (MNADSCs), adipose derived stem cells (ADSCs), ulcers, wound healing

ABSTRACT

Adipose-derived stem cells have immunomodulation and the ability to differentiate into matured cells and repair damaged organs in body. This research is aimed to evaluate the impact of adipose-derived stem cells on wound healing in Swiss mice. After being ulcerated, 15 mice had been randomly divided into three groups: NaCl injection, 1×10^6 adipose-derived mononuclear cells (MNADSCs) injection and 1×10^6 adipose derived stem cells (ADSCs) injection. All groups were injected into caudal vein, tracked for 13 days continuously and assessed the ability to heal by wound morphology and histological anatomy. The research results showed that the group of mice grafted cells healed the wound faster than the control group; in the group of ADSCs, the wound was healed fastest and completely after 9 days of transplantation. In conclusion, adipose-derived stem cells have important meaning for the wound treatment, especially adipose-derived mesenchymal stem cells.

TÓM TẮT

Tế bào gốc từ mỡ có khả năng điều hòa miễn dịch và biệt hóa thành các tế bào chuyên hóa nhằm sửa chữa các cơ quan tổn thương của cơ thể. Nghiên cứu này nhằm đánh giá tác động của tế bào từ mỡ đến quá trình làm lành vết thương ở chuột *Swiss*. Sau khi gây loét, 15 con chuột được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm, tiêm NaCl, tiêm 1×10^6 tế bào gốc đơn nhân từ mỡ và tiêm 1×10^6 tế bào gốc trung mô từ mỡ. Tất cả các nhóm đều tiêm vào tĩnh mạch đuôi của chuột, theo dõi liên tục trong 13 ngày và đánh giá khả năng làm lành vết thương thông qua hình thái vết thương và giải phẫu mô học. Kết quả nghiên cứu cho thấy, nhóm chuột ghép tế bào làm lành vết thương nhanh hơn so với nhóm đối chứng, ở nhóm ghép ADSCs, vết thương làm lành nhanh nhất và lành hoàn toàn sau 9 ngày ghép. Kết luận, tế bào gốc từ mỡ có ý nghĩa quan trọng trong điều trị vết thương, đặc biệt là tế bào gốc trung mô từ mỡ có khả năng làm lành vết thương nhanh và không tạo sẹo.

Trích dẫn: Lâm Phạm Phước Hùng, Lê Hoàng Duy Minh, Ngô Thị Minh Thu và Nguyễn Ngọc Hiếu, 2020. So sánh hiệu quả khả năng làm lành vết thương ở chuột *Swiss* bằng tế bào gốc trung mô từ mỡ và tế bào gốc đơn nhân từ mỡ. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(3B): 60-68.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Các tổn thương như rách, bỏng, loét da làm gián đoạn cấu trúc và chức năng sinh lý bình thường của da. Tuỳ thuộc mức độ tổn thương nặng và sâu làm phá hủy hoàn toàn ba lớp cấu trúc mô học của da, các tế bào tự thân định vị ở vết thương không đủ khả năng tự làm lành và hồi phục cấu trúc da như cũ. Vì vậy, điều trị tổn thương da là một quá trình phức tạp đòi hỏi sự tham gia của nhiều yếu tố như các yếu tố tăng trưởng, các cytokine, chemokine cùng nhiều tế bào khác. Bất kỳ sự mất cân bằng của các quá trình hay yếu tố nào đều khiến thời gian phục hồi kéo dài, dẫn đến các biến chứng cấp tính, mạn tính hoặc tạo sẹo (Nunan *et al.*, 2014). Hậu quả này có thể trở thành gánh nặng kinh tế xã hội, ảnh hưởng nặng nề đến tâm lý bệnh nhân.

Các nghiên cứu gần đây cho thấy tế bào gốc từ mỡ có nhiều tiềm năng lớn trong y học tái tạo bởi khả năng tổng hợp và giải phóng các yếu tố tăng trưởng, biệt hóa thành các dòng tế bào chuyên biệt trong quá trình tái tạo mô. Liệu pháp ghép tế bào gốc từ mô mỡ đã tiến hành và thành công ở nhiều nước trên thế giới (Gaur *et al.*, 2017). Điển hình như điều trị lão hóa da, loét tĩnh mạch, điều trị thoái hóa sụn khớp, tái tạo mô tim và cơ tim, ...

Trong y học tái tạo hiện nay, tế bào gốc được sử dụng từ nhiều nguồn khác nhau như từ xương, cuống rốn,... và mang lại hiệu quả nhất định. Tuy nhiên, tùy theo từng bệnh mà sử dụng tế bào gốc điều trị từ những nguồn khác nhau sẽ mang lại hiệu quả điều trị khác nhau. Nghiên cứu này nhằm cung cấp một dữ liệu mới về cơ chế sửa chữa, tốc độ làm lành vết thương tế bào gốc từ mô mỡ, nhằm đưa ra một liệu pháp điều trị hiệu quả và an toàn.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Chuột nhắt trắng (*Swiss*) đực từ 8-10 tuần tuổi có khối lượng trung bình 35 ± 7 g do Bộ môn Sinh lý động vật và người - Khoa Sinh học - Trường Đại học Khoa học Huế cung cấp và thẩm định.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phân lập và nuôi ADSCs

Dựa theo phương pháp của Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.* (2013), tiến hành thu 1 g mỡ màng bụng chuột *Swiss* cho vào 1 mL Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/collagenase (mg/mL), ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng và 50 phút ở nhiệt độ 37°C , khuấy nhẹ sau 10 phút và lọc bằng

màng lọc 70 μm thu được dịch. Dịch lọc được ly tâm với 2.500 vòng/phút trong 5 phút ở 37°C . Loại bỏ dịch nổi, thêm 1 mL Phosphate Buffered Saline (PBS), ly tâm 2.500 vòng/phút trong 3 phút ở 37°C . Loại bỏ dịch nổi và cho vào 0,5 mL Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) + 10% Fetal Bovine Serum (FBS) + 1% penicillin. Xác định tỷ lệ sống chết của tế bào sau khi phân lập và tiến hành nuôi tế bào với mật độ 50.000 tế bào/cm² trong điều kiện ở 37°C , 5% CO₂. Sau 3 ngày thay môi trường một lần.

2.2.2 Nuôi tạo cụm collony forming unit – fibroblast (CFU-F)

Nuôi sơ cấp khi mật độ tế bào đạt 70 - 80% diện tích chai nuôi tiến hành nuôi thứ cấp và tạo cụm theo phương pháp của Penformis (2016). Mật độ nuôi 100 tế bào/cm², sau 7 - 10 ngày tiến hành nhuộm H&E (Hematoxyline-Eosyn) quan sát số lượng và hình thái cụm CFU-F.

2.2.3 Xác định đặc tính tế bào

Lấy khoảng 1×10^5 tế bào MNADSCs và 1×10^5 tế bào ADSCs rửa sạch bằng PBS và lần lượt cho vào hai eppendorf, sau đó ủ với kháng thể huỳnh quang với các marker CD34-PE, CD90-FITC và CD146-PC5 ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Các tế bào lấy ra rửa lại hai lần với PBS, sau đó được phân tích fluorescence-activated cell sorting (FACS) (Penformis, 2016) bằng máy Canto II.

2.2.4 Biệt hóa ADSCs

Dựa theo quy trình của Megaloikononimos *et al.* (2018), tiến hành nuôi thứ cấp lần thứ 3 với mật độ nuôi $2,5 \times 10^5$ tế bào ADSCs/ giếng trong 2 ngày, sau đó bổ sung chất cảm ứng vào môi trường nuôi và theo dõi. Môi trường nuôi bổ sung: 0,2 mM ascorbic acid + 10 mM β -glycerophosphate + 0,1 μM dexamethasone đối với biệt hóa xương; và 0,5 nM isobutyl methylxanthine + 0,1 $\mu\text{g/mL}$ insulin đối với biệt hóa mỡ. Tiến hành theo dõi khả năng biệt hóa trong 3 tuần khi bổ sung chất cảm ứng, tiến hành nhuộm đánh giá khả năng biệt hóa. Sau 3 ngày thay môi trường một lần.

2.2.5 Thử nghiệm làm lành vết loét bằng tế bào gốc từ mỡ

Mùi lăm con chuột khỏe mạnh được gây mê bằng hỗn hợp Xylazil : Ketamil : NaCl bằng cách tiêm vào màng bụng. Dùng dao phẫu thuật cạo sạch phần lông trên lưng, lấy ống sinh thiết tạo vết thương ở lưng với đường kính 7 mm và chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm: Nhóm 1: tiêm NaCl, Nhóm 2: tiêm 1×10^6 MNADSCs, Nhóm 3: tiêm 1×10^6 ADSCs, tất

cả các nhóm đều tiêm vào tĩnh mạch đuôi và theo dõi liên tục trong 13 ngày.

Tế bào MNADSCs sau khi được phân lập từ mỡ bụng, đánh giá chất lượng tế bào, tiến hành pha loãng với dung dịch NaCl 0,9% và tiêm vào tĩnh mạch đuôi của chuột. Tế bào ADSCs sau khi tách ra khỏi chai nuôi, tiến hành kiểm tra chất lượng tế bào, đếm số lượng và pha loãng với NaCl và tiến hành tiêm vào tĩnh mạch đuôi chuột.

2.2.6 Nhuộm hóa mô miễn dịch

Mẫu mô của chuột ở tất cả nhóm thí nghiệm được thu vào ngày thứ 13 sau khi điều trị. Mẫu mô được cố định trong formol 10% tiến hành được đúc khối parafin, cắt mẫu và nhuộm Hematoxylin & Eosin. Quan sát tiêu bản trên kính hiển vi Olympus (Nhật Bản) với độ phóng xạ 10x.

2.2.7 Đánh giá chỉ số huyết học và chỉ số men gan, thận

Sau khi điều trị 13 ngày, chuột được lấy máu ở tim để đánh giá các chỉ số huyết học (hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu) và men gan, thận (Creatinine - Urea). Khoảng 2 mL máu được cho vào 2 ống chống đông chứa Heparin lithium và EDTA, tiến hành phân tích

chỉ số huyết học ở Khoa Huyết học và chỉ số men gan, thận tại Khoa Hóa Sinh, Bệnh viện Trung ương Huế.

2.2.8 Phân tích thống kê

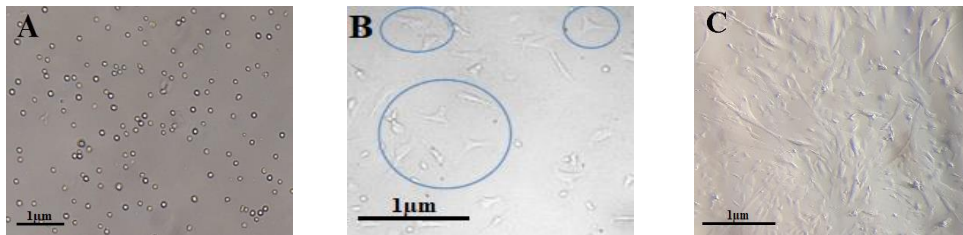
Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Phân tích thống kê bằng phần mềm SPSS, mức ý nghĩa là $P < 0,05$. Kết quả được trình bày dưới dạng trung bình \pm sai số chuẩn của giá trị trung bình.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập và nuôi tăng sinh ADSCs

Sau khi phân lập mỡ từ màng bụng chuột Swiss tiến hành nuôi sơ cấp, kết quả thu được như Hình 1.

Sau 24 giờ nuôi cấy sơ cấp trong môi trường 0,5 mL DMEM/F12 + 10% FBS + 1% L-glutamine, các tế bào bắt đầu bám vào bề mặt chai nuôi. Trong 72 giờ nuôi, một lượng nhỏ tế bào trải trên bề mặt chai nuôi, có hình dạng hình thoi đặc trưng. Từ 5-7 ngày nuôi, tế bào hợp dòng, trải rộng và tăng sinh. Ngày thứ 10 - 15, mật độ tế bào đạt 70-80% diện tích chai nuôi. Kết quả nghiên cứu này cho thấy thời gian tế bào bám dính vào bề mặt chai nuôi và trải trên bề mặt chai nuôi phù hợp với nghiên cứu của Wang *et al.* (2017).



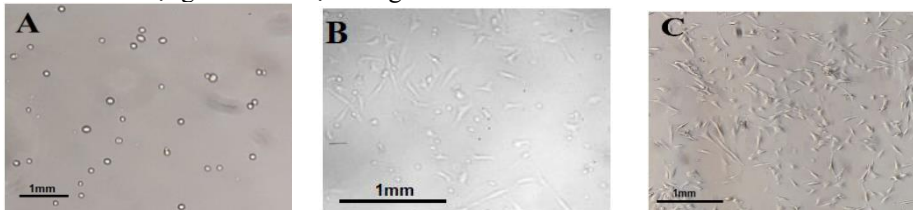
Hình 1: Tế bào ADSCs được nuôi sơ cấp trong môi trường DMEM/F12 + 10% FBS + 1% L-glutamine

A. Tế bào sau 24 giờ nuôi cấy; B. Tế bào sau 24 giờ nuôi cấy; C. Tế bào sau 10 ngày nuôi cấy

Mật độ nuôi sơ cấp đạt 70-80% diện tích chai nuôi, tiến hành nuôi thứ cấp với mật độ nuôi 100 tế bào/cm² và kết quả thu được thể hiện qua Hình 2.

Sau 24 giờ sau khi cấy chuyển, tế bào ADSCs bắt đầu bám dính và trải dạng hình thoi đặc trưng và

tăng sinh. Từ 4 - 5 ngày, tế bào ADSCs hợp dòng, trải đều trên bề mặt chai nuôi và tiếp tục tăng sinh mạnh kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Yin *et al.* (2015) khi tách từ mỡ người.



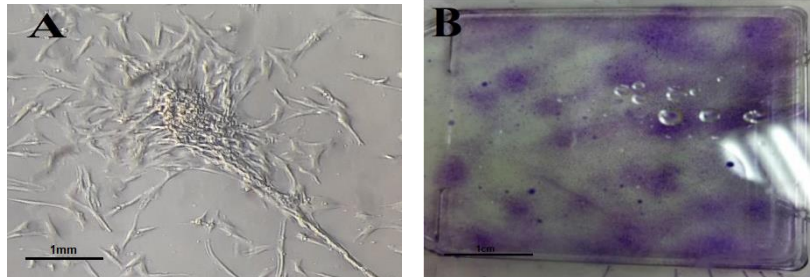
Hình 2: Tế bào ADSCs nuôi thứ cấp trong môi trường DMEM/F12 + 10% FBS + 1% L-glutamine

A. Tế bào khi vừa được cấy chuyển; B. Tế bào sau 24 giờ cấy chuyển; C. Tế bào sau 5 ngày cấy chuyển

3.2 Khả năng tạo cụm CFU-F và chạy FACS

Sau 3 - 5 ngày nuôi cấy thứ cấp, các tế bào ADSCs bắt đầu phân chia và hình thành những cụm nhỏ xung quanh tế bào mẹ ban đầu. Từ 7 - 10 ngày,

các cụm CFU-F hình thành rõ với số lượng tế bào lớn hơn 50 tế bào/cụm và đường kính hơn 1 mm (Hình 3A). Khi nhuộm Eosin, các cụm CFU-F bắt màu đậm tạo thành chấm lớn trên chai nuôi có thể quan sát bằng mắt thường (Hình 3B).

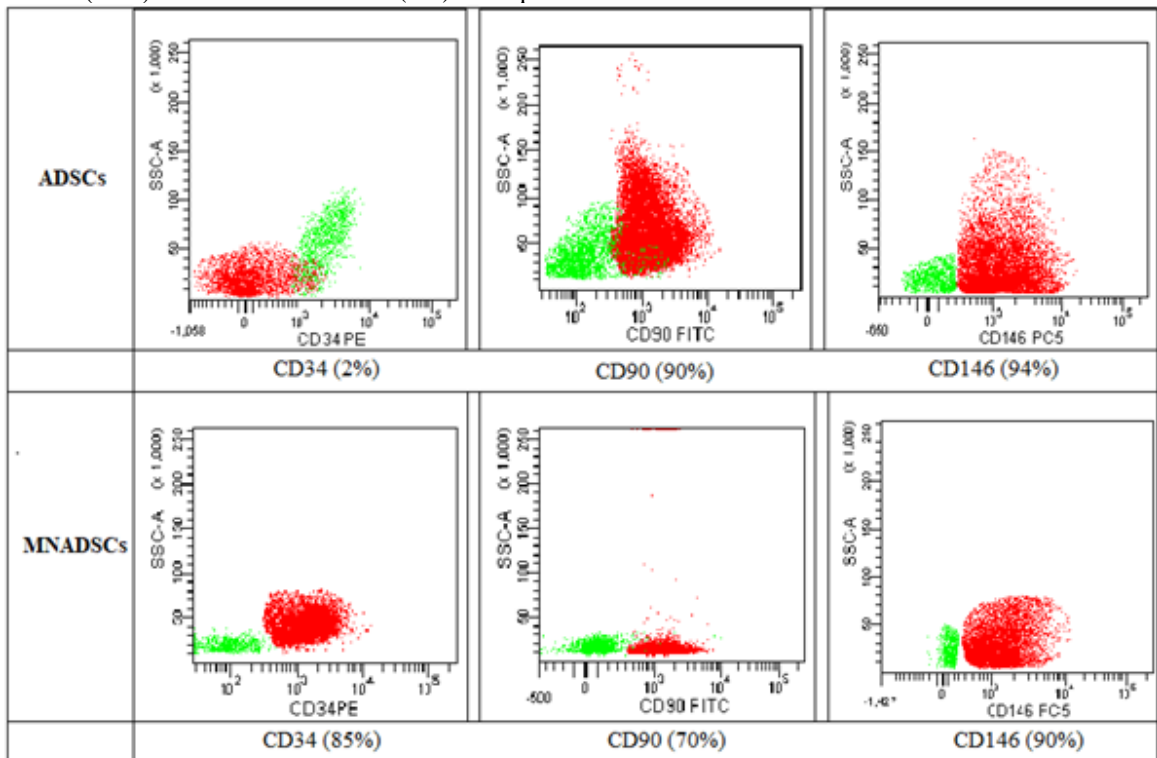


Hình 3: Nuôi tạo cụm CFU-F

A. Cụm tế bào ADSCs ở vật kính 10×; B. Các cụm tế bào ADSCs nhuộm bằng Eosin

Sau khi ủ với kháng thể đơn dòng đánh dấu huỳnh quang tương thích CD34, CD90, CD146 và xác định độ đồng nhất bằng máy Facs Canto II, kết quả của ADSCs dương tính với CD90 (90%), CD146 (94%) và âm tính với CD34 (2%). Kết quả

của MNADSCs dương tính cả CD90 (70%), CD146 (90%) và CD34 (85%) (Hình 4). Kết quả nghiên cứu này tương tự như nghiên cứu Megaloikonos *et al.* (2018).



Hình 4: Đặc tính của tế bào

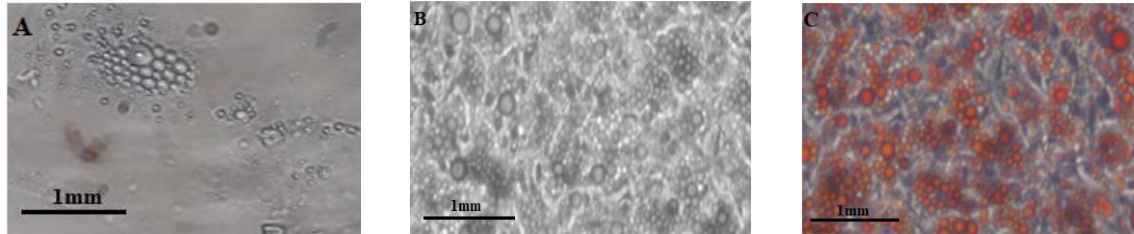
* Màu đỏ: thể hiện dương tính của marker, màu xanh: thể hiện âm tính của marker biệt hóa ADSCs

Sau 2 ngày cấy chuyển thứ cấp lần 3, tiến hành bổ sung 0,5 nM isobutyl methylxanthine + 0,1

µg/mL insulin vào môi trường nuôi để biệt hóa ADSCs thành tế bào mỡ và kết quả thu được như

Hình 5. Ở ngày thứ 7 sau khi bổ sung chất cảm ứng biệt hóa, bắt đầu xuất hiện các tế bào mỡ nhỏ dần tích tụ trong tế bào chất. Các giọt mỡ nhỏ này dần dần góp thành giọt mỡ lớn và chiếm gần hết thể tích tế bào vào ngày thứ 21. Các tế bào mỡ được nhuộm

với thuốc nhuộm Oil Red, thuốc nhuộm này chỉ hòa tan được trong lipid và tạo màu đỏ, trên vi trường thấy các giọt mỡ bắt màu đỏ. Điều này cho thấy các tế bào ADSCs đã được cảm ứng biệt hóa thành tế bào mỡ thành công.

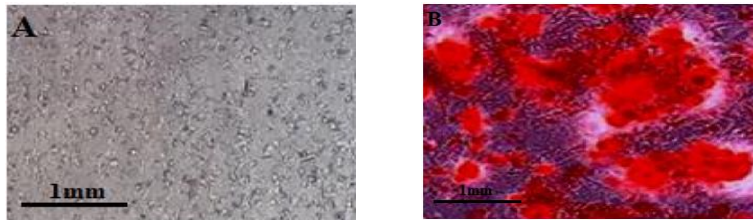


Hình 5: ADSCs biệt hóa thành tế bào mỡ

A. Tế bào ADSCs sau 7 ngày bổ sung chất cảm ứng; B. Tế bào mỡ sau 14 ngày bổ sung chất cảm ứng; C. Tế bào mỡ sau 21 ngày bổ sung chất cảm ứng và nhuộm bằng Oil Red

Môi trường nuôi bổ sung 0,2 mM ascorbic acid + 10 mM β -glycerophosphate + 0,1 μ M dexamethasone biệt hóa ADSCs thành tế bào xương. Các tế bào ADSCs có dấu hiệu tích tụ ion calcium trong tế bào chất dưới tác động của các chất cảm ứng và kích thích biệt hóa. Sự tích tụ calcium nhiều dần theo thời gian, các tế bào chuyển từ hình dạng trải

dài sang dạng tròn và sau đó có hình giống hạt đậu đặc trưng của nguyên bào xương. Các tế bào xương nhuộm với thuốc nhuộm Alizarin Red, các ion calcium bắt màu đỏ với thuốc nhuộm (Hình 6). Kết quả biệt hóa tế bào ADSCs thành tế bào mỡ và tế bào xương của nhóm nghiên cứu chúng tôi giống với nhiều nghiên cứu trước đây (Araña *et al.*, 2013; Arnhold *et al.*, 2015; Megaloikonomos *et al.*, 2018).



Hình 6: ADSCs biệt hóa thành tế bào xương

A. Tế bào ADSCs sau 8 ngày bổ sung chất cảm ứng biệt hóa; B. Tế bào xương sau biệt hóa nhuộm với Alizarin Red

3.3 Quá trình làm lành vết loét ở chuột bằng ADSCs

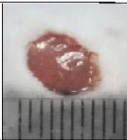
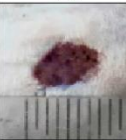
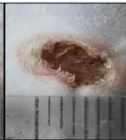
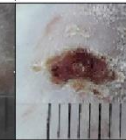

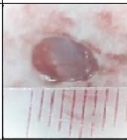

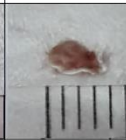

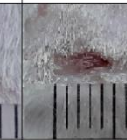
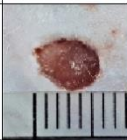

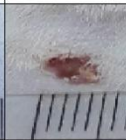


Chuột sau khi gây loét được tiêm tế bào MNADSCs và ADSC vào tĩnh mạch đuôi, theo dõi quá trình làm lành vết thương liên tục trong 13 ngày, kết quả thu được ở Hình 7.

Ở ngày thứ 2 sau khi ghép, nhóm đối chứng không có sự thay đổi về hình thái vết thương. Ở hai nhóm ghép MNADSCs và ADSCs, vết thương đã khô, đóng vảy và bắt đầu co lại.

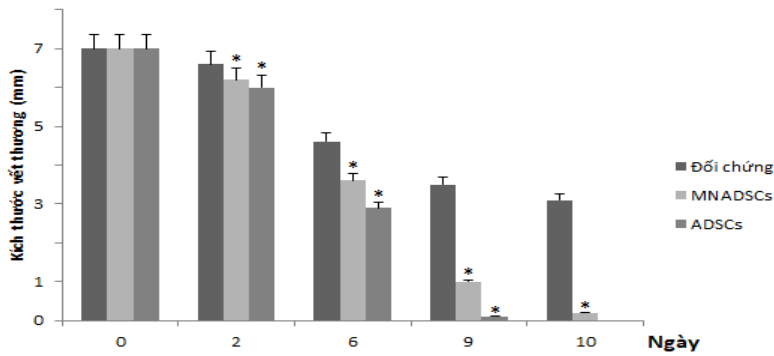
Ngày thứ 6 sau khi ghép, vết thương nhóm đối chứng bắt đầu khô và co lại, trong khi, ở cả hai nhóm ghép tế bào diện tích vết thương co lại hơn 50% diện tích ban đầu, vảy chuẩn bị bong ra.

Ngày thứ 9, vết thương nhóm đối chứng bắt đầu đóng vảy. Nhóm tiêm MNADSCs vết đã bong vảy ra, còn nhóm tiêm ADSCs vết thương đã lành hoàn toàn.

Ngày thứ 10, vết thương ở nhóm chuột tiêm MNADSCs lành hoàn toàn. Còn ở nhóm đối chứng vết thương lành hoàn toàn vào ngày thứ 13.

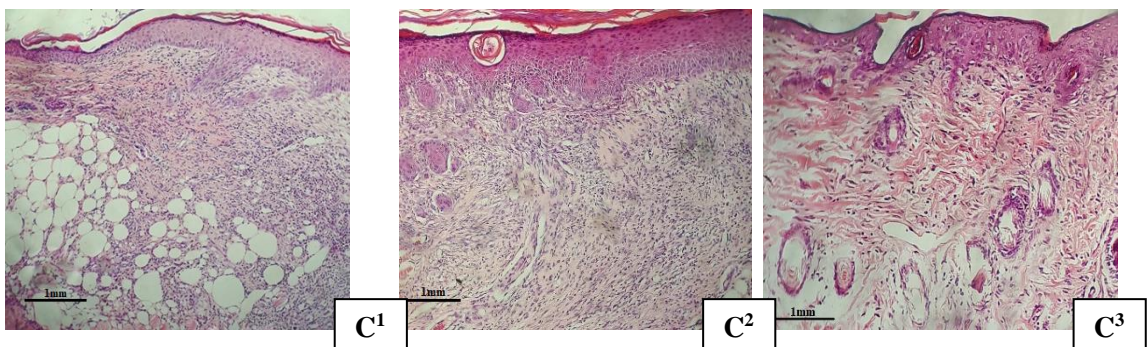
	Ngày 0	Ngày 2	Ngày 6	Ngày 9	Ngày 13
Control					
D(mm)	7.0	6.6	4.6	3.5	3.0
MNADSCs					
D(mm)	7.0	6.3	3.5	1.0	0.2
ADSCs					
D(mm)	7.0	6.0	2.9	0.1	0.0

A. Hình thái vết thương của chuột sau 13 ngày điều trị bằng tế bào gốc



B. Biểu đồ biểu hiện kích thước vết thương trung bình ở các nhóm khác nhau những ngày điều trị.

So sánh với mức ý nghĩa $*P < 0,05$



C. Cấu trúc mô học của các nhóm chuột sau 13 ngày điều trị

C¹: Mô học nhóm đối chứng, C²: Tiêm ADSCs, C³: Tiêm MNADSCs

Hình 7: Ảnh hưởng của MNADSCs và ADSCs lên quá trình làm lành vết thương ở chuột

Kết quả mô học cho thấy ở hai nhóm chuột ghép tế bào có cấu trúc mô học tốt hơn so với nhóm đối chứng, đặc biệt ở nhóm ghép ADSCs. Nhóm đối chứng, cấu trúc các tầng trung bì và thượng bì không đều, mô hạt lỏng lẻo so với bình thường, mạch máu và các tế bào fibroblast ít, nang lông hầu như không có so với nhóm ghép tế bào. Ở các nhóm ghép tế bào, cấu trúc của các tầng trung bì và thượng bì tăng sinh ổn định và đều. Tuy nhiên, nhóm ghép ADSCs có tổ chức mô hạt ở tầng trung bì dày, chứa nhiều tế bào fibroblast và xuất hiện nhiều tế bào viêm, nang

lông và tăng sừng tốt hơn so với nhóm MNADSCs. Ở nhóm đối chứng, khả năng tạo mạch máu rất kém, trong khi nhóm tiêm tế bào khả năng tạo mạch máu tốt hơn, nhất là ở nhóm ghép ADSCs có số lượng mạch máu nhiều và có xu hướng tạo thành từng cụm và tăng dần từ tầng trung bì đến thượng bì.

3.4 Chỉ số huyết học và chỉ số men gan, thận

Kết quả chỉ số huyết học và chỉ số men gan, thận được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1: Chỉ số huyết học của chuột

Thông số	Tham khảo Ingrid R.T. et al. (2014)	Lô đối chứng	Tiêm MNADSCs	Tiêm ADSCs
Hồng cầu (1x10 ⁶)	8,66 ± 0,36	8,16 ± 0,22	7,87 ± 0,15	7,77 ± 0,25
Bạch cầu (1x10 ³)	7,0 ± 1,4	6,53 ± 2,1	6,3 ± 1,1	6,25 ± 1,1
Mono (%)	3,7 ± 0,3	3,9 ± 0,1	4,2 ± 0,2	3,3 ± 0,1
Lympho (%)	68,5 - 73,1	74,8 ± 1,1	73,5 ± 0,5	71,5 ± 1,0
Trung tính (%)	19,7 - 21,8	20,3 ± 0,2	21,2 ± 0,8	22,5 ± 0,15
Acid (%)	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,3	1,1 ± 0,2
Basophils (%)	0,13 ± 0,23	0,2 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,02
Tiểu cầu (x10 ³)	810 ± 55,1	517 ± 52,1	425 ± 42,1	363 ± 29,2

Các giá trị được trình bày dưới dạng trung bình ± SEM

Ngoài ra, còn theo dõi số AST và ALT, Creatinine và Urea để đánh giá chức năng gan, thận sau khi ghép tế bào (Bảng 2).

Như vậy, kết quả các thông số huyết học nghiên cứu này tương đồng với các chỉ số huyết học của

nhóm chuột Swiss của nghiên cứu Restell et al.(2014) và chỉ số men gan, thận tương đương với kết quả nhóm chuột Swiss bình thường như nghiên cứu trước đây (Vũ Văn Hạnh, 2014).

Bảng 2: Chỉ số Creatinine - Urea- AST- ALT

Lô	Tiêm MNADSCs	Tiêm ADSCs	Đối chứng
Creatinine (µmol/L)	27,5±2	28±2	29,5±1,5
Urea (mmol/L)	11,4±1,12	12,3±1,2	11,58±0,82
AST (U/L)	106±10	105±10	101±9
ALT (U/L)	36±13	36±11	35±10

Các giá trị được trình bày dưới dạng trung bình ± SEM

Trong nghiên cứu này, ghép tế bào gốc có nguồn gốc từ mỡ có hiệu quả trong việc chữa lành vết thương, ở nhóm ghép tế bào vào ngày thứ 2 sau khi ghép, vết thương đã khô và bắt đầu co lại. Theo Galiano et al. (2004), tiến trình vết thương co lại là do cơ chế chủ đạo trong quá trình làm lành của vết thương nhằm ngăn chặn sự viêm nhiễm và tái tạo lớp da mới.

Sau 6 ngày ghép tế bào, ở nhóm ghép MNADSCs và ADSCs vết thương lành nhanh hơn so với nhóm đối chứng. Điều này cho thấy tế bào gốc có khả năng sửa chữa các mô bị hư hỏng, vì chúng có thể di chuyển đến các vùng bị thương để đáp ứng với tình trạng viêm, biệt hóa thành các dòng tế bào và ảnh hưởng đến vi môi trường thông qua

việc giải phóng các phân tử liên quan đến các quá trình làm đầy vết thương (reparative) và tái tạo mô như các cytokine: PGE₂, GM-CSF, IL-1, RA, IL-7, IL-8, IL-10 và IL-11; chemokine (như SDF-1) và các yếu tố tăng trưởng (García-Gómez et al., 2010).

Vết thương lành hoàn toàn và không để lại sẹo ở ngày thứ 9 đối với nhóm ghép ADSCs, ngày thứ 10 đối với nhóm ghép MNADSCs. Kết quả nghiên cứu này tương ứng với Jiang et al. (2007) và Nuschke (2014) khi chứng minh rằng trong giai đoạn cuối của việc chữa lành vết thương, các tế bào gốc điều chỉnh sự hình thành vết sẹo thông qua tiết PGE₂, điều chỉnh IL-10, IL-6 và giảm IL-8 và giảm sản xuất collagen.

Dựa vào giải phẫu mô học, vết thương của nhóm ghép tế bào hồi phục nhanh hơn so với nhóm đối chứng. Sự biểu hiện các marker bề mặt ở nhóm ghép tế bào như CD146, CD90 là các marker quan trọng cho quá trình tăng lên các tổ chức mô hạt và các mạch máu, tuy nhiên các yếu tố này không xuất hiện ở nhóm đối chứng. Điều này có thể giải thích cho sự kích thích tái tạo mạch máu và các bó sợi fibroblast nhanh hơn ở nhóm ghép tế bào. Cammarota and Laukkanen (2016) cũng đưa ra giả thuyết về việc tế bào gốc có khả năng tăng tái tạo mạch và nguyên bào sợi. Trong quá trình tái tạo mạch máu, nhằm giữ sự ổn định trong việc tái tạo các mạch máu mới, các tế bào phải sử dụng các tế bào tiền thân biểu hiện CD146+ (Thomas *et al.*, 2017). Các tế bào này có khuynh hướng tạo ra các tế bào nội mô già, từ đó tăng cường tái tạo mạch máu, mạng lưới vi mạch và cung cấp các cytokine cần cho sự tiền tái tạo mạch (Rafii *et al.*, 2003; Watt *et al.*, 2010). Ngoài ra, ADSCs và MNADSCs có khả năng tăng tái biểu mô hóa và tái tạo vết thương một cách nhanh chóng có thể là do sự tăng biểu hiện marker CD90, một marker đặc trưng cho các tế bào keratinocyte ở biểu mô. Sự tăng tốc quá trình liền vết thương sử dụng các tế bào gốc từ mỡ tương ứng với các kết quả nghiên cứu trước đó của Rodriguez *et al.* (2015).

Quan sát hình thái vết thương có thể thấy khả năng hồi phục vết thương ở nhóm ghép tế bào ADSCs tốt hơn so với nhóm ghép MNADSCs và nhóm đối chứng. Nhóm ghép ADSCs làm lành vết thương nhanh hơn ghép MNADSCs, từ kết quả này giả thiết có thể được đặt ra rằng khả năng phục hồi vết thương phụ thuộc vào dòng tế bào sử dụng. Các tế bào đơn nhân phân lập từ chuột vẫn còn nhiều tế bào tạp do đó mức độ biểu hiện các marker cần thiết cho quá trình làm lành vết thương thấp như CD90, CD 146+,..., do đó khả năng kích thích tăng sinh các tế bào keratinocyte, nguyên bào sợi và khả năng hình thành mạch máu không nhiều. Trong khi đó, ADSCs là quần thể các tế bào trung mô thuần, mức độ biểu hiện của cao của các marker CD90, CD146+,... nên thúc đẩy quá trình làm lành vết thương nhanh hơn so với nhóm ghép MNADSCs. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Jia *et al.* (2018), các tế bào ADSCs có biểu hiện cao các marker CD29, CD44, CD90 và CD45 với tỷ lệ lần lượt là 99,39%, 94,6%, 89,6% (Jia *et al.*, 2018). Do đó, với một quần thể thuần ADSCs, khả năng kích thích các nhân tố tăng trưởng và cytokine như nhân tố sinh trưởng nội mạch (VEGF), TGF- β , PDGF (Song *et al.*, 2011), nhân tố tăng trưởng tế bào sừng và nguyên bào sợi, từ đó kích thích sự tăng sinh và di chuyển của các tế bào keratinocyte (Moon *et al.*,

2012) làm lành vết thương nhanh hơn so với MNADSCs (chứa tế bào tạp). Mặc khác, Jia *et al.* (2018) cũng cho thấy các yếu tố tăng trưởng β -FGF và EGF ở nồng độ 10 ng/ml kích thích tăng sinh nguyên bào sợi tốt hơn nhiều với nồng độ 1 ng/ml (Jia *et al.*, 2018). Điều này cho thấy nhóm ghép ADSCs có mức độ biểu hiện cao các marker kích thích tiết ra nhiều yếu tố tăng trưởng β -FGF và EGF thì khả năng tăng sinh nguyên bào sợi sẽ tốt hơn so với nhóm ghép MNADSCs nên nó thúc đẩy làm lành vết thương nhanh hơn.

4 KẾT LUẬN

Nhóm chuột ghép tế bào gốc ADSCs và MNADSCs làm lành vết thương nhanh hơn so với nhóm đối chứng. Nhóm ghép ADSCs có tác động trong việc hồi phục vết thương ở chuột *Swiss* nhanh nhất, tiếp đến là nhóm ghép MNADSCs và cuối cùng là nhóm đối chứng 13 ngày vẫn chưa lành hoàn toàn.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Phòng Sinh lý Người và Động vật, Trường Đại học Khoa học (Đại học Huế); Khoa Vi sinh, Khoa Giải phẫu bệnh, Khoa Huyết học xét nghiệm, Bệnh viện Trung ương Huế; Bệnh viện Da liễu thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Araña, M., Mazo, M., Aranda, P., *et al.*, 2013. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, and characterization. Cellular Cardiomyoplasty: Methods and Protocols. 47-61.
- Arnhold, S., Wenisch, S., 2015. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal repair in veterinary medicine. Am J Stem Cells. 4(1): 1-12.
- Cammarota, F., Laukkanen, M.O., 2016. Mesenchymal stem/stromal cells in stromal evolution and cancer progression. Stem Cells Int. 2016: 4824573.
- Galiano, R.D., Michaels, J., Dobryansky, M., *et al.*, 2004. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. Wound Repair Regen. 12(4):485-92.
- García-Gómez, I., Elvira, G., Zapata, A.G., *et al.*, 2010. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. Expert Opinion on Biological Therapy. 10(10): 1453-1468.
- Gaur, M., Dobke, M., Lunyak, V.V., 2017. Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue in Clinical Applications for Dermatological

- Indications and Skin Aging. *Int J Mol Sci.* 18(1):208
- Jia, Y.Y., Zhou, J.Y., Chang, Y., *et al.*, 2018. Effect of Optimized Concentrations of Basic Fibroblast Growth Factor and Epidermal Growth Factor on Proliferation of Fibroblasts and Expression of Collagen: Related to Pelvic Floor Tissue Regeneration. *Chin Med J (Engl)*. 131(17): 2089-2096.
- Jiang, X.X., Chen, J.S., Su, Y.F., *et al.*, 2007. Endothelial cells derived from mesenchymal stem cells harbor immunoregulatory effects. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 15(1):175-8.
- Megaloikonos, P.D., Panagopoulos, G.N., Bami, M., *et al.*, 2018. Harvesting, Isolation and Differentiation of Rat Adipose-Derived Stem Cells. *Curr Pharm Biotechnol.* 19(1):19-29.
- Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shafiee, A., Seyedjafari, E., *et al.*, 2013. Isolation, characterization, and mesodermic differentiation of stem cells from adipose tissue of camel (*Camelus dromedarius*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal.* 49(2): 147-154.
- Moon, K.M., Park, Y.H., Lee, J.S., *et al.*, 2012. The effect of secretory factors of adipose-derived stem cells on human keratinocytes. *Int J Mol Sci.* 13(1):1239-1257.
- Nunan, R., Harding, K.G., Martin P., 2014. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Dis Model Mech.* 7(11):1205-1213.
- Nuschke, A., 2014. Activity of mesenchymal stem cells in therapies for chronic skin wound healing. *Organogenesis.* 10: 29-37.
- Penforis, P., Pochampally, R., 2016. Colony Forming Unit Assays. *Mesenchymal Stem Cells.* 1416, 159-169.
- Rafii, S., Lyden, D., 2003. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med.* 9(6): 702-712.
- Restell, T.I., Porfirio, L.C., Souza, A.S., Silva, I.S., 2014. Hematology of Swiss mice (*Mus musculus*) of both genders and different ages. *Acta Cir Bras.* 29(5):306-12.
- Song, S.Y., Jung, J.E., Jeon, Y.R., *et al.*, 2011. Determination of adipose-derived stem cell application on photo-aged fibroblasts, based on paracrine function. *Cytherapy.* 13(3):378-384.
- Thomas, H.M., Cowin, A.J., Mills, S.J., 2017. The importance of Pericytes in healing: wounds and other pathologies. *Int J Mol Sci.* 18(6): E1129.
- Vũ Văn Hạnh, 2014. Thử nghiệm độc tính cấp và bán trường diễn của Xanthan Gum trên chuột nhắt trắng giống Swiss. *Tạp chí Công nghệ sinh học.* 36(3).
- Wang, J.M., Gu, Y., Pan, C.J., Yin, L.R., 2017. Isolation, culture and identification of human adipose-derived stem cell. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 13(3):1039-1043.
- Watt, S.M., Athanassopoulos, A., Harris, A.L., Tsaknakis, G., 2010. Human endothelial stem/progenitor cells, angiogenic factors and vascular repair. *J R Soc Interface.* 7(Suppl 6):S731-S751.
- Yin, L., Zhu, Y., Yang, J., *et al.*, 2015. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiated into hepatocyte-like cells *in vivo* and *in vitro*. *Molecular Medicine Reports.* 11(3): 1722-1732.