

# NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP NUÔI TẠO TẤM BIỂU MÔ GIÁC MẠC TỪ TẾ BÀO GỐC VÙNG RÌA GIÁC MẠC

Đỗ Thùy Hương<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Bình<sup>1</sup>, Nguyễn Khang Sơn<sup>1</sup>, Trịnh Bình<sup>1</sup>, Trịnh Sinh Tiên<sup>1</sup>,  
Đào Thị Thuý Phương<sup>1</sup>, Hoàng Thị Minh Châu<sup>2</sup>, Vũ Thị Tuệ Khanh<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Kim Oanh<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thu Lan<sup>1</sup>, Nguyễn Phú Thiện<sup>1</sup>, Phan Thị Phương<sup>1</sup>, Hoàng Thị Thanh<sup>1</sup>, Đỗ Doãn Lợi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Hà Nội, <sup>2</sup>Bệnh viện Mắt Trung ương

**Mục tiêu:** lựa chọn phương pháp nuôi tạo tấm biểu mô giác mạc từ tế bào gốc vùng rìa giác mạc. **Chất liệu và phương pháp nghiên cứu:** sử dụng các kỹ thuật hiển vi quang học, hiển vi điện tử, hoá mô, hoá mô miễn dịch để theo dõi, đánh giá sự phát triển và chất lượng của tấm biểu mô giác mạc được nuôi cấy theo hai phương pháp: nuôi bằng mảnh mô và nuôi bằng dịch treo. **Kết quả:** (1). Kỹ thuật nuôi cấy tấm biểu mô giác mạc bằng mảnh mô đơn giản, thời gian nuôi cấy ngắn hơn và cho tấm biểu mô có chất lượng tốt hơn nuôi bằng dịch treo; (2). Tấm biểu mô nuôi cấy có đầy đủ đặc điểm về cấu trúc hình thái, hoá học của tấm biểu mô giác mạc. **Kết luận:** chọn phương pháp nuôi bằng mảnh mô để tạo tấm biểu mô giác mạc nuôi cấy.

**Từ khoá:** nuôi bằng mảnh mô, nuôi bằng dịch treo, vùng rìa củng giác mạc

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong nhãn khoa, hội chứng suy giảm vùng rìa thường gặp và do nhiều nguyên nhân khác nhau gây ra. Một trong các phương pháp hiện đại nhất để điều trị hội chứng này là ghép tấm biểu mô giác mạc nuôi cấy từ tế bào gốc vùng rìa giác mạc. Trên thế giới đã có nhiều công bố về việc nuôi tạo và ghép thành công tấm biểu mô giác mạc nuôi cấy từ tế bào gốc vùng rìa giác mạc cho thỏ và cho người. Ở Việt Nam, đây là một vấn đề hoàn toàn mới mẻ. Để tiến công vào lĩnh vực sử dụng tế bào gốc điều trị một số bệnh nan y, chúng tôi tiến hành đề tài này với **mục tiêu:**

**Lựa chọn quy trình nuôi tạo tấm biểu mô giác mạc từ tế bào gốc vùng rìa giác mạc.**

## II. CHẤT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Chất liệu

- Mảnh vùng rìa mắt thỏ chủng *Orytolagus Cuniculus*.

- Mảnh vùng rìa mắt người được lấy từ giác mạc hiến hoặc từ mắt lạnh của bệnh nhân.

- Màng ối người đã được xử lý.

- Môi trường SEM.

### 2. Phương pháp nghiên cứu

#### 1.1. Nghiên cứu thực nghiệm trên thỏ

- Nuôi cấy bằng mảnh mô: trích thủ vùng rìa giác mạc với kích thước 1 x 3 mm tại vị trí 11 - 1h. Cắt nhỏ thành các mảnh 1 x 1 mm. Nuôi mảnh mô trên màng ối căng trong lồng nuôi cấy bằng môi trường SEM trong tủ 37°C và nồng độ CO<sub>2</sub> là 5%.

- Nuôi cấy bằng dịch treo: nạo biểu mô của giác mạc thỏ, tạo dịch treo với mật độ 5 x 10<sup>5</sup> tế bào/ml. Nuôi cấy trong lồng có căng màng ối bằng môi trường SEM ở 37°C và nồng độ CO<sub>2</sub> là 5%.

- Theo dõi sự phát triển của các tế bào gốc vùng rìa giác mạc bằng kính hiển vi soi nổi.

- Tạo tầng cho tấm biểu mô khi các tế bào đã phủ kín đáy lồng.

- Định danh tấm biểu mô giác mạc nuôi cấy.

- Ghép cho thỏ bị bỏng giác mạc.

#### 1.2. Nghiên cứu trên người

Tiến hành sau khi có kết quả thực nghiệm trên thỏ.

### 1.3. Chỉ tiêu nghiên cứu

- Tỷ lệ thành công nuôi tạo tấm biểu mô.
- Chất lượng của tấm biểu mô: cấu trúc vi thể, cấu trúc siêu vi thể, cấu trúc hoá học

## III. KẾT QUẢ

### 1. Nghiên cứu thực nghiệm trên thỏ

Sau khi nghiên cứu lựa chọn được phương pháp xử lý màng ối làm nền nuôi cấy, phương pháp trích thủ, phương pháp xử lý mảnh mô vùng rìa và giác mạc, xác định được môi trường nuôi cấy, chúng tôi nuôi tạo tấm biểu mô giác mạc theo 2 phương pháp: bằng mảnh mô và bằng dịch treo.

**Bảng 1. Tỷ lệ nuôi tạo thành công tấm biểu mô giác mạc**

Đợt	Nuôi bằng mảnh mô			Nuôi bằng dịch treo		
	Số mẫu nuôi	Số mẫu mọc	Tỷ lệ mọc (%)	Số mẫu nuôi	Số mẫu mọc	Tỷ lệ mọc (%)
1	6	3	50	6	0	0
2	3	2	66	2	0	0
3	6	6	100	6	6	100
<b>Tổng</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	<b>80</b>	<b>14</b>	<b>6</b>	<b>42,8</b>

**Nhận xét:** qua 3 đợt nuôi cấy đầu tiên, chúng tôi thấy rằng tỷ lệ mọc của phương pháp nuôi bằng mảnh mô cao hơn nuôi bằng dịch treo. Ngay lần nuôi đầu tiên bằng mảnh mô đã có 50% số mẫu mọc, sau mỗi lần rút kinh nghiệm tỷ lệ mọc ngày càng cao. Đến lần nuôi thứ ba 100% số mẫu đều mọc.

Chúng tôi quyết định tạo tấm biểu mô bằng phương pháp nuôi mảnh mô. Để chuẩn kỹ thuật cho quy trình nuôi cấy, chúng tôi đã tiến hành nuôi tiếp 81 mẫu mô vùng rìa, tỷ lệ mọc của đợt nuôi này là 100%

### 1.2. Chất lượng của tấm biểu mô

**Nuôi cấy bằng dịch treo:**

- 4 ngày sau nuôi cấy: rải rác có một số tế bào bám vào nền màng ối.

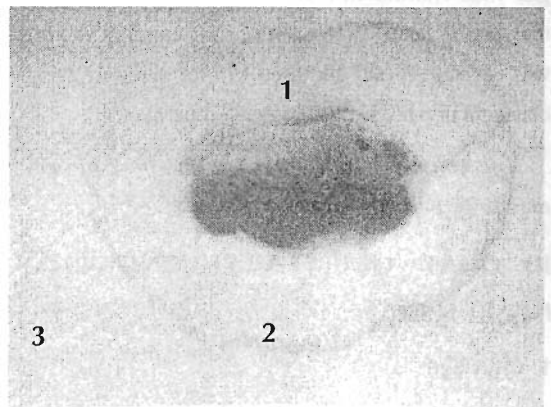
- 12 - 14 ngày sau nuôi cấy: các tế bào biểu mô mọc kín đáy lồng nuôi cấy.

- 16 - 18 ngày sau nuôi cấy: tấm biểu mô đã tạo tầng, bề mặt của tấm biểu mô không phẳng, độ dày của biểu mô không đều, nơi có 2 - 3 hàng tế bào, nơi

có 5 - 6 hàng tế bào. Các tế bào biểu mô lớp trên cùng dẹt. Các tế bào lớp đáy dãn sát vào màng ối (hình 1).

**Nuôi cấy bằng mảnh mô:**

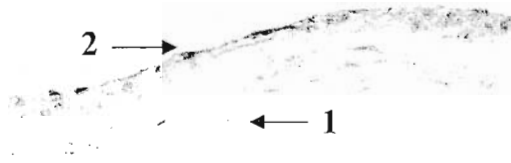
- 3 ngày sau nuôi cấy: quan sát thấy các tế bào biểu mô đã phát triển lan ra xung quanh mảnh mô (hình 2).



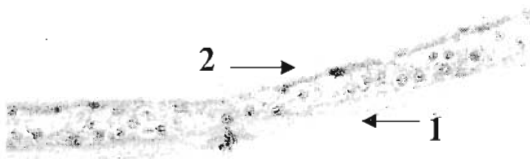
**Hình 2. Tấm biểu mô nuôi cấy ngày thứ 3**  
(Kính hiển vi soi nổi x 30) 1. Mảnh mô vùng rìa; 2. Bờ của tấm biểu mô; 3. Nền màng ối

- 10 - 12 ngày sau nuôi cấy: các tế bào biểu mô đã phủ kín đáy của lồng nuôi cấy.

- 14 - 16 ngày sau nuôi cấy: bề mặt tấm biểu mô phẳng, các tế bào có hình đa diện, ranh giới rõ. Biểu mô có độ dày đều đặn và gồm 4 - 5 hàng tế bào. Các tế bào lớp trên cùng dẹt, còn nhân. Lớp đáy của biểu mô gắn chặt vào màng ối (hình 3).



Hình 1. Tấm biểu mô nuôi cấy bằng dịch treo 18 ngày (H.E x500); (1) Màng ối; (2) Tế bào biểu mô



Hình 3. Tấm biểu mô nuôi cấy bằng mảnh mô vùng rìa 16 ngày (H.E x500); (1) Màng ối; (2) Tế bào biểu mô

### 1.3. Kết quả định danh của tấm biểu mô nuôi cấy

Cấu trúc siêu vi thể:

Quan sát mô bằng kính hiển vi điện tử quét: bề mặt của tấm biểu mô không bằng phẳng, phần chứa nhân tế bào nổi lên. Trên bề mặt các tế bào có rất nhiều vi nhung mao nhỏ.

Kính hiển vi điện tử xuyên cho thấy: tấm biểu mô nuôi cấy là biểu mô tầng, gồm 4 - 5 hàng tế bào, càng lên trên cao tế bào càng dẹt lại; lớp tế bào đáy nằm sát với màng ối có hình trụ, tiếp đến là 1 - 2 hàng tế bào hình khối đa diện, và trên cùng là hàng tế bào dẹt. Các tế bào lớp đáy bám chặt vào màng ối. Các tế bào biểu mô của tấm

biểu mô nuôi cấy liên kết với nhau tương đối chặt chẽ nhờ các mộng bào tương và thể liên kết. Bào tương của các tế bào biểu mô lớp trên không thấy xuất hiện các hạt keratohyalin.

Cấu trúc hóa học:

Bằng phương pháp phát hiện glycogen và chất nhầy của Mac - manus, trong tấm biểu mô không thấy tế bào tiết nhầy, trong bào tương các tế bào biểu mô ở lớp trên của tấm biểu mô có ít hạt glycogen.

Khi nhuộm hoá mô miễn dịch để phát hiện keratin đặc hiệu, trong bào tương của tất cả các tế bào của tấm biểu mô đều có chứa K3, còn K12 chỉ có ở bào tương của các tế bào lớp trung gian và lớp trên.

## 2. Nghiên cứu trên người

Dựa trên kết quả nghiên cứu trên thực nghiệm thỏ, chúng tôi đã nuôi cấy tấm biểu mô giác mạc người theo phương pháp dùng mảnh mô vùng rìa. Tổng số nuôi 14 mẫu, trong đó có 10 mẫu mọc, còn 4 mẫu không mọc. Sơ bộ nhận thấy rằng phần lớn những mẫu không mọc là vùng rìa của những bệnh nhân trên 50 tuổi, những mẫu mọc là vùng rìa của những bệnh nhân trẻ tuổi hơn.

- Thời gian quan sát được sự phát triển của tế bào biểu mô trung bình từ 6 - 7 ngày.

- Thời gian các tế bào biểu mô mọc kín đáy lồng nuôi cấy là 18 - 20 ngày.

- Thời gian nuôi cấy tấm biểu mô: 25 - 28 ngày.

## IV. BÀN LUẬN

Qua nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy phương pháp nuôi tạo tấm biểu mô giác mạc bằng mảnh mô vùng rìa có những ưu điểm vượt trội hơn so với phương pháp nuôi cấy bằng dịch treo. Mẫu mô lấy nuôi cấy có kích thước nhỏ, phần vùng rìa còn lại nhanh chóng được hồi phục. Điều này rất có ý nghĩa khi áp dụng trên người. Với những bệnh nhân tổn thương một mắt, chúng tôi có thể lấy mảnh mô vùng rìa ở mắt lành để nuôi tạo tấm biểu mô và sẽ ghép tự thân cho bệnh nhân. Trong

khi đó, để thực hiện phương pháp nuôi cấy bằng dịch treo cần sử dụng toàn bộ giác mạc của một bên mắt thỏ. Như vậy, trên người sẽ chỉ thực hiện được ghép đồng loại. Hơn nữa, quy trình xử lý mẫu của phương pháp nuôi cấy bằng mảnh mô rất đơn giản và không đòi hỏi trang thiết bị hiện đại như nuôi cấy bằng dịch treo. Thời gian nuôi tạo tấm biểu mô từ mảnh mô vùng rìa ngắn hơn. Cấu trúc hình thái vi thể, siêu vi thể, hoá học của tấm biểu mô nuôi cấy giống với biểu mô giác mạc. Hiện nay, trên thế giới đa số các tác giả cũng sử dụng phương pháp nuôi cấy bằng mảnh mô để tạo tấm biểu mô giác mạc [1, 2, 3, 4].

Chúng tôi cũng đã tiến hành ghép tấm biểu mô giác mạc nuôi cấy cho thỏ bị bỏng giác mạc. Kết quả là các mảnh ghép bám dính tốt và tồn tại trên bề mặt nhãn cầu, quá trình biểu mô hoá bề mặt nhãn cầu diễn ra bình thường, hạn chế được sự phát triển của tân mạch từ bên ngoài lan vào giác mạc. Trên cơ sở đó, chúng tôi đã ghép tự thân tấm biểu mô giác mạc nuôi cấy cho 4 bệnh nhân. Sau ghép, bề mặt giác mạc đã được cải thiện rất nhiều, biểu mô hoá hoàn toàn, giảm hẳn tình trạng xơ mạch phát triển lan vào giác mạc. Các bệnh nhân này đang được tiếp tục theo dõi để đánh giá tuổi thọ của tấm biểu mô nuôi cấy.

## V. KẾT LUẬN

Phương pháp nuôi tạo tấm biểu mô giác mạc bằng mảnh mô được chọn vì:

- Nuôi cấy tấm biểu mô giác mạc bằng mảnh mô đơn giản, thời gian nuôi cấy ngắn hơn và cho tấm biểu mô đẹp hơn nuôi bằng dịch treo.

- Tấm biểu mô nuôi cấy có đầy đủ đặc điểm về cấu trúc hình thái, hoá học của tấm biểu mô giác mạc.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. M Fernandes, Virender S Sangwan, Srinivas K Rao, S Basti, Mittanamalli S Sridhar, Aashish K Bansal, Harminder S Dua. (2004), "Limbal stem cell transplantation", India journal of ophthalmology, 52(1), p.5 - 22.

2. Ray Jui - Fang Tsai, M.D., Lien - Min Li, B.S., and Jan - Kan Chen, Ph.D. (2000), "Reconstruction of Damaged Corneas. by Transplantation of Autologous Limbal Epithelial Cells", The New England journal of medicine, 343 (2), p.86 - 93.

3. Noriko Koizumi, et al. (2000), "Cultivation of Corneal Epithelial Cells on Intact and Denuded Human Amniotic Membrane", Investigative Ophthalmology and Visual Science, 4, p. 2506 - 2513.

4. Noriko Koizumi, Leanne J. Cooper, Nigel J. Fullwood, Takahiro Nakamura, Keiko Inoki, Masakatsu Tsuzuki and Shigeru Kinoshita. (2002), "An Evaluation of Cultivated Corneal Limbal Epithelial Cells, Using Cell - Suspension Culture", Investigative Ophthalmology and Visual Science, 43: 2114 - 2121.

### Summary

## RESEARCHING THE CULTURE METHOD TO FORM CORNEAL EPITHELIAL SHEET FROM CORNEOSCLERAL LIMBAL STEM CELL

**Purpose:** To determine the culture method to create corneal epithelial sheet from corneoscleral limbal stem cell. **Methods:** using light, electron microscopy, histochemistry, immunohistochemistry to observe and evaluate the development and quality of epithelial sheets that were formed by two different methods: the cell - suspension culture and the explant culture. **Result:** 1. The explant culture technique is easier, less time - consuming and has a better epithelial sheet's quality than the cell - suspension culture. 2. The cultured epithelial sheet has morphological, chemical characteristics of corneal epithelial sheet. **Conclusion:** The explants culture are used to create the cultured corneal epithelial sheet.

**Keywords:** The explant culture, the cell - suspension culture, corneoscleral limbus