

4. Abdulrazak A, Bitar ZI, Al-Shamali AA, et al. (2005) Bacteriological study of diabetic foot infections J Diabetes Complications 19(3):138–141.
5. Armstrong DG, Liswood PJ, Todd WF. (1995) 1995 William J. Stickel Bronze Award. Prevalence of mixed infections in the diabetic pedal wound. A retrospective review of 112 infections. J Am Podiatr Med Assoc. 85(10):533–537.
6. Bansal E, Garg A, Bhatla S, et al. (2008) Spectrum of microbial flora in diabetic foot ulcers, Indian J Pathol Microbiol. 51(2):204–208.
7. Raja NS (2007) Microbiology of diabetic foot infections in a teaching hospital in Malaysia: a retrospective study of 194 cases, J Microbiol Immunol Infect. 40(1):39–44.
8. Strbova L, Krahulec B, Waczulkova J, et al. (2011) Influence of infection on clinical picture of diabetic foot syndrome. Bratisl Lek Listy. 112(4):177–182.

SUMMARY

Drug resistance of bacteria at infectious diabetic foot ulcers in patients at Cho Ray hospital

Nguyen Thi Le, Le Quoc Tuan,
Nguyen Phuc Hau

*Ho Chi Minh city University of Medicine
and Pharmacy*

*Received 16 October 2012; revised 24
October 2012; accepted 15 November 2012*

*This study was conducted with aims at evaluating the drug resistant characteristics of bacteria at infectious diabetic foot ulcers in patients at Cho Ray hospital from 2010 October to 2011 June. This was a prospective and cross section descriptive study. The results showed that proportion of used-antibiotics patients was high, accounting for 82% cases. The average amount of HbA1c in the patients was $11.00 \pm 3.79\%$. An average of 1.24 ± 0.43 bacterial species per patient was isolated. Gram-negative aerobes were most frequently isolated (56.55%), followed by Gram-positive aerobes (43.45%). The bacteria became resistant to antibiotic, especially *E. coli* and *Staphylococcus* sp. Most patients controlled the glycemia poorly, not obeyed the treatment. The infectious diabetic foot ulcers were often deep and had been used antibiotics on them before. Gram-negative aerobes prevailed more than Gram-positive ones at the ulcers. The percentage of antibiotic-resistant species increased over time.*

Key words: *diabetes mellitus, infectious diabetic foot ulcer*

NGHIÊN CỨU BẢO QUẢN KHỐI U UNG THƯ TẾ BÀO GAN ĐỂ TÁCH TẾ BÀO KHỐI U

Vũ Bích Ngọc¹, Bùi Nguyễn Tú Anh¹, Nguyễn Thanh Tâm¹, Nguyễn Minh Hoàng¹,
Trần Công Duy Long², Đỗ Đình Công², Nguyễn Hoàng Bắc²,
Phan Kim Ngọc¹, Phạm Văn Phúc¹

¹Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

²Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh

Nhận bài 16/10/2012; sửa bài 22/10/2012; chấp nhận đăng 15/11/2012

Ung thư gan là một trong những ung thư phổ biến trên toàn thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng. Tuy hiện nay nhiều liệu pháp điều trị mới được đưa ra nhưng hiệu quả còn thấp. Do đó, việc nghiên cứu phương pháp mới trong điều trị căn bệnh này vẫn tiếp tục được thực hiện. Để tạo nguồn gen và tế bào cho nghiên cứu và ứng dụng điều trị, các khối u gan từ bệnh nhân

cần được lưu trữ. Vì thế, mục tiêu của nghiên cứu này là nhằm thiết lập quy trình để bảo quản các khối u ung thư tế bào gan người, để làm nguyên liệu cho các nghiên cứu khai thác tế bào ung thư, tế bào gốc ung thư gan hay nguồn gen từ chúng. Mảnh mô ung thư tế bào gan được thu nhận tại bệnh viện và chuyển về phòng thí nghiệm. Các khối mô được cắt thành từng mảnh có kích thước $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$, được bảo quản trong môi trường bảo quản lạnh chứa 10% DMSO. Hai quy trình hạ lạnh được khảo sát bao gồm: hạ lạnh theo ba bước (còn gọi là phương pháp đông lạnh ba bước) và hạ lạnh cực nhanh (còn gọi là phương pháp đông lạnh cực nhanh). Sau 1,5 tháng, 3 tháng và 5 tháng, các khối mô được rã đông theo phương pháp rã đông nhanh để đánh giá sự sống sót của các tế bào thông qua việc nhuộm tế bào với trypan blue và nuôi tế bào từ mảnh mô. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ sống sót của các tế bào nằm trong khối u giảm dần theo thời gian là 37,83%, 0,31% và 0% ở phương pháp đông lạnh 3 bước và 8,29%, 0,19% và 0% ở phương pháp đông lạnh cực nhanh, sau lượng ứng 1,5 tháng, 3 tháng và 5 tháng bảo quản. Hiệu quả đông lạnh còn thấp với thời gian bảo quản chưa cao. Tuy vậy, kết quả cho thấy có thể bảo quản khối u ung thư tế bào gan để phục vụ cho nghiên cứu và cần cải tiến quy trình để nâng cao hiệu quả bảo quản.

Từ khóa: ung thư gan, bảo quản đông lạnh, đông lạnh ba bước, đông lạnh cực nhanh

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư tế bào gan (UTTBG) là dạng ung thư phổ biến thứ năm trên toàn thế giới. Bệnh nhân bệnh ung thư này có thời gian sống trung bình từ 6 đến 16 tháng. Tại Mỹ, ước tính có khoảng 22.620 trường hợp ung thư gan và ung thư ống mật trong gan mới, 18.160 trường hợp chết cho hai loại ung thư trên xảy ra trong năm 2009. Trong hơn hai thập kỷ qua, tỷ lệ mắc và tử vong của UTTBG đã gia tăng đáng kể tại không chỉ ở các nước đang phát triển mà kể cả ở các nước phương Tây như Úc, Anh, Pháp... Phạm vi tác động và tỷ lệ tử vong do căn bệnh này gây ra dự tính sẽ gia tăng gấp đôi trong 2 thập kỷ sắp tới. Nguyên nhân của bệnh phần lớn là do mắc bệnh viêm gan B và C mạn tính và do tiếp xúc với độc tố nấm mốc như aflatoxin. Nhiều nghiên cứu cho thấy khối u UTTBG chứa một lượng lớn các loại tế bào khác nhau bao gồm tế bào gan, tế bào ung thư gan, tế bào gốc ung thư gan... Các loại tế bào này khi được phân lập sẽ giúp ích nhiều cho việc giải thích căn nguyên sâu xa gây bệnh cũng như thúc đẩy các liệu pháp trị liệu và tiêu diệt tế bào ung thư. Hơn thế, gần đây các phương pháp chữa trị cá nhân hoá (personalized medicine), đặc biệt dựa vào tế bào miễn dịch rất cần các tế bào từ khối u để thu nhận kháng nguyên. Hiện nay, việc bảo quản mô

nói chung và mô ung thư nói riêng đang được quan tâm để lưu trữ nguồn tế bào phục vụ cho nghiên cứu và trị liệu. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm thiết lập quy trình bảo quản khối u UTTBG nhằm phục vụ cho việc khai thác tế bào có trong khối u sau một thời gian bảo quản.

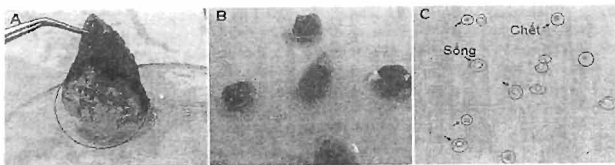
Bảo quản mô nói chung và mô khối u nói riêng đã được nghiên cứu và sử dụng rộng rãi. Hầu hết các nghiên cứu bảo quản lựa chọn kỹ thuật đông lạnh sâu, sử dụng môi trường bảo quản lạnh thích hợp với các chương trình hạ nhiệt độ để đảm bảo các tế bào có thể sống sót sau quy trình bảo quản và giải đông. Các môi trường đông lạnh thường dùng bao gồm các chất dinh dưỡng và chất bảo quản lạnh như propanediol, dimethylsulphoxide (DMSO) hay ethylene glycol và có thể kết hợp với sucrose [2]. Trong đó, DMSO là một chất bảo quản đông lạnh thường được sử dụng nhất do tính thấm và hòa tan cao của nó vào tế bào [2], [9]. DMSO có thể đi vào tế bào và giảm mức độ tổn thương. Nó cũng có vai trò như một chất gây ổn định màng tế bào chất vì DMSO là dung môi phân cực [1]. Về chương trình hạ nhiệt, có 3 kiểu chương trình hạ nhiệt được sử dụng đến nay trên hầu hết các mô và tế bào là hạ nhiệt 3 bước (4°C, -20°C và -80°C), hạ nhiệt cực nhanh (cho trực tiếp vào bình nitơ lỏng -

196°C) và hạ nhiệt theo chương trình cài đặt sẵn (hạ nhiệt chậm) Quy trình bảo quản đông lạnh không chỉ đòi hỏi việc xử lý mẫu sinh học phức tạp để bảo vệ mẫu khỏi sự hư hại cấu trúc và chức năng do việc giảm nhiệt độ gây ra, mà còn đòi hỏi sau giải đông, mô phải phục hồi hoàn toàn đặc tính sinh học và hình thái vốn có của nó trước khi đông băng [2], [5]. Những hư hại tế bào liên quan tới tình trạng mất nước và hình thành các tinh thể băng có thể bị tác động khi thêm các chất bảo quản đông lạnh. Tuy nhiên, tùy thuộc vào nồng độ và thời gian tác động của chúng mà mức độ gây độc trên tế bào sẽ khác nhau. Thông thường, khi tốc độ làm lạnh cực chậm có thể khiến tế bào tiếp xúc với nồng độ cao chất bảo quản lạnh cũng như sự thay đổi pH trong thời gian dài và gây chết tế bào; song, nếu tốc độ làm lạnh quá nhanh, các tinh thể đá có thể hình thành trong tế bào cũng giết chết tế bào vì không đủ thời gian để nước đi ra ngoài [3]. Vì thế, nghiên cứu này nhằm đánh giá tác động của tốc độ làm lạnh chậm theo quy trình hạ nhiệt 3 bước và cực nhanh lên khả năng sống sót của mô UTTBG người khi bảo quản trong môi trường sử dụng chất bảo

quản lạnh DMSO để từ đó thiết lập quy trình bảo quản mẫu mô UTTBG.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thu nhận và xử lý khối mô UTTBG người. Khối mô UTTBG được thu nhận từ các bệnh nhân được chẩn đoán ung thư tại Bệnh viện Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh. Mẫu mô được bảo quản trong dung dịch PBS bổ sung 12,5 µg/ml gentamycin, vận chuyển trong đá gel về phòng thí nghiệm (PTN). Tại PTN, khối mô được rửa 3 lần bằng dung dịch PBS có bổ sung 12,5 µg/ml gentamycin (GeneWorld, thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam) và cắt lọc các mô hoại tử. Mô được cắt nhỏ thành từng mảnh có kích thước 2x2x2 mm³ (hình 1A và B). Cuối cùng, các mảnh mô được cho vào môi trường bảo quản lạnh CryoSave (DMEM/F12 bổ sung 50% FBS và 20% DMSO, GeneWorld, Việt Nam) và đông lạnh theo một trong hai quy trình như trình bày dưới đây Trong nghiên cứu này, có 49 mẫu khối mô UTTBG từ 49 bệnh nhân được thu nhận để nghiên cứu.



Hình 1. Khối mô ung thư tế bào gan và xác định tế bào sống chết. (A) Khối mô UTTBG được loại bỏ mô hoại tử và (B) cắt nhỏ thành từng mảnh 2x2x2 mm³ sau khi rửa. (C) Tế bào từ mảnh mô trước và sau đông lạnh được tách thành tế bào đơn và xác định tính sống chết dựa vào thuốc nhuộm trypan blue trên buồng đếm hồng cầu.

Đông lạnh 3 bước. Các mẫu mô sau khi xử lý được chuyển vào ống đông lạnh (cryotube) 1,8 ml. Cứ 3 mẫu mô được bổ sung vào ống có chứa sẵn 1 ml môi trường đông lạnh

(DMEM/F12 bổ sung 10% DMSO, 50% FBS; tất cả mua từ GeneWorld, Việt Nam). Sau đó, các cryotube này được đặt vào tủ 4°C trong 60 phút, rồi chuyển sang tủ -20°C trong 120

phút, sau đó chuyển vào tủ lạnh -80°C để qua đêm, cuối cùng, đặt vào bình nitơ lỏng (-196°C) để bảo quản [9].

Đông lạnh cực nhanh. Các mẫu mô sau khi xử lý được chuyển vào ống đông lạnh cryotube 1,8 ml có chứa sẵn 1 ml môi trường đông lạnh (gồm DMEM/F12 bổ sung 10% DMSO, 40% FBS; tất cả mua từ GeneWorld, Việt Nam) Sau đó, các cryotube này được cho vào bình nitơ lỏng (-196°C).

Giải đông. Cryotube được lấy ra khỏi bình nitơ lỏng (-196°C) sau các mốc thời gian khảo sát là 45 ngày, 3 tháng và 5 tháng. Nhanh chóng, chúng được làm tan đá bằng cách đặt vào bể ổn nhiệt 37°C trong 3 - 5 phút. Sau đó, mảnh mô này được chuyển vào ống ly tâm 15 ml mới có chứa sẵn 10 ml môi trường giải đông (DMEM/F12 bổ sung 50% FBS; tất cả mua từ GeneWorld, Việt Nam) đã làm ấm trước ở 37°C và rửa lại 1-2 lần. Cuối cùng, mảnh mô này được sử dụng để đếm tỷ lệ tế bào sống/chết và nuôi cấy sơ cấp [9].

Xác định tỷ lệ tế bào sống/chết. Tỷ lệ tế bào sống/chết trong mảnh mô được đánh giá bằng phương pháp đếm tế bào sống/chết trong buồng đếm hồng cầu sau khi nhuộm với thuốc nhuộm trypan blue 0,4%. Đầu tiên, mảnh mô được cắt nhuyễn trong dung dịch PBS bằng kéo, sau đó ủ với dung dịch trypsin/EDTA 0,25% trong 30 phút để tách thành tế bào đơn. Hỗn hợp tế bào sau khi tách được ly tâm ở tốc độ 2500 vòng/phút trong 5 phút để thu cặn tế bào. Các tế bào

đơn được trộn và nhuộm với thuốc nhuộm trypan blue 0,4% (GeneWorld, Hồ Chí Minh, Việt Nam) theo quy trình của nhà sản xuất. Sau đó, mẫu tế bào được nạp vào buồng đếm hồng cầu. Tế bào chết sẽ có màu xanh của thuốc nhuộm trong khi đó các tế bào sống không bị nhuộm màu (hình 1C). Ở mỗi mẫu, thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Nuôi cấy mảnh mô sơ cấp. Mẫu mô sau khi xử lý được chuyển vào bình nuôi tế bào T25 (Nunc, Denmark) và dàn đều trên bề mặt bình nuôi. Các mảnh mô được nuôi bằng môi trường DMEM/F12 bổ sung 15% FBS, 2mM L-glutamine, 1% MEM (non - essential amino acid), 1% antibiotic-antimycotic (tất cả mua từ GeneWorld) trong tủ nuôi ở 37°C , 5% CO_2 trong 5 giờ.

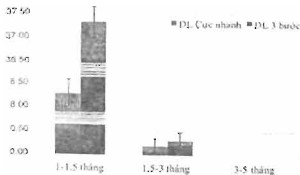
Xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm lặp lại ít nhất 3 lần. Các giá trị được xử lý thống kê với độ tin cậy 95%.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Tỷ lệ tế bào sống/chết

Tỷ lệ tế bào sống trong mảnh mô ung thư trung bình là 48,58%. Điều này cho thấy, các tế bào trong khối mô ung thư ngay trước khi bảo quản đã bị hoại tử. Sự hoại tử của khối u có thể do việc điều trị bệnh, sử dụng các liệu pháp điều trị như hóa trị liệu, xạ trị nhằm tiêu diệt khối u. Tuy nhiên, với tỷ lệ sống chưa đạt tới 50% của các tế bào trong khối u như vậy, việc nuôi cấy cũng như bảo quản khối mô sẽ giảm hiệu quả.



Hình 2. Tỷ lệ sống sót của tế bào sau khi đông lạnh so với trước khi đông lạnh ở hai phương pháp đông lạnh cực nhanh và đông lạnh 3 bước.

Sau khi giải đông, tỷ lệ sống của tế bào trong mô ung thư (hình 2) là 37,83% \pm 9,45%, 0,31% \pm 0,22% và 0% ở phương pháp đông lạnh 3 bước và 8,29% \pm 8,29%, 0,19% \pm 0,19 và 0% ở phương pháp đông lạnh cực nhanh, sau 1,5 tháng, 3 tháng và 5 tháng bảo quản. Kết quả cho thấy, tỷ lệ sống của tế bào trong mô giảm dần theo thời gian bảo quản, đến tháng thứ 5, tất cả các tế bào trong mô đều chết và việc đông lạnh theo phương pháp 3 bước cho hiệu quả bảo quản mô tốt hơn so với phương pháp đông lạnh cực nhanh. Sự chết của tế bào có thể được giải thích như sau:

Thứ nhất, phương pháp bảo quản đông lạnh được nghiên cứu và phát triển cho từng loại tế bào khác nhau. Mỗi loại tế bào đòi hỏi một điều kiện chuẩn để bảo quản chúng. Tuy nhiên, mô là một hệ thống phức tạp gồm nhiều loại tế bào khác nhau, yêu cầu để bảo quản mỗi loại tế bào trong mô cũng khác nhau. Trong quy trình bảo quản đông lạnh, tất cả các loại tế bào trong mô đều được thực hiện theo một quy trình với các thông số về nhiệt độ và thời gian đông lạnh cũng như giải đông là như nhau. Do đó, trong cùng điều kiện đông lạnh, không thể đảm bảo mọi tế bào trong mô đều sống. Bảo quản đông lạnh mô đã dẫn tới những hư hại và mất mát nhất định của các tế bào gốc ung thư, tế bào ung thư hay tế bào gốc trong mô gan.

Thứ hai, chất bảo quản, cách bổ sung chất bảo quản và loại bỏ các chất này khỏi mô đều có thể ảnh hưởng tới mức độ tổn thương mô trong suốt quá trình bảo quản. Do các tế bào nhạy cảm với việc phình ra hơn so với việc co tế bào nên việc loại bỏ chất bảo quản có thể gây hư hại tế bào nhiều hơn so với việc bổ sung. Để giới hạn sự hình thành và tăng trưởng của các tinh thể băng trong mẫu đông lạnh, việc giải đông nhanh là cần thiết. Tuy nhiên, việc giải đông các mô ở tốc độ làm ấm cao có thể gây gãy mô do tác động của lực cơ học.

Thứ ba, các nhân tố khác như sự tương tác giữa tế bào – tế bào, tế bào - chất nền,

hiệt độ và gradient dung dịch trong mô có tác động đáng kể đến hoạt động của tế bào trong mô, làm hạn chế sự trao đổi nước qua màng, gây tổn thương nặng hơn cho tế bào trong quá trình đông băng. Sự hình thành tinh thể, đặc biệt ở ngoại bào, đóng vai trò quyết định trong suốt quá trình bảo quản đông lạnh mô. Thực tế, việc hình thành tinh thể băng trong gian bào đã làm thay đổi môi trường hóa học với sự gia tăng nồng độ muối trong dịch ngoại bào, từ đó làm thay đổi và biến tính protein cũng như phức hợp lipoprotein, kết quả là gây hư hại màng tế bào [7].

Sự mất nước của tế bào có thể giải thích như sau: ở nhiệt độ thấp, tác động cơ học trên thành tế bào gia tăng làm biến dạng màng, từ đó, tính thấm của màng bị thay đổi và màng trở nên hoạt động như một màng bán thấm. Cũng có thể do sự hình thành các tinh thể muối đem dẫn tới sự thay đổi lớn trong pH, gây ra sự biến tính ngược các protein quan trọng. Một gradient nồng độ hình thành giữa khoảng không gian ở trong và ngoài tế bào, làm chất tan có thể đi vào tế bào và nước đi ra khỏi tế bào. Kết quả là các tế bào phản ứng với nhiệt lạnh bằng cách mất nước tế bào chất. Hóa chất, cơ học và nhiệt độ đều có tác động gây hư hại tới chức năng của mô. Mặc dù các phản ứng trao đổi chất ở nhiệt độ -196°C, theo lý thuyết là giúp bảo vệ mô, tuy nhiên, giai đoạn đông lạnh và giải đông lại không đảm bảo được yêu cầu đó. Có thể chính vì vậy mà tỷ lệ tế bào sống sau giải đông không cao.

Sự chết của tế bào biểu hiện thông qua khả năng bắt màu thuốc nhuộm trypan blue (hình 1C). Ở tế bào sống, màng tế bào là một màng bán thấm có tính thấm chọn lọc, trypan blue không thể đi qua màng nên tế bào không bắt màu thuốc nhuộm. Tuy nhiên, khi tế bào bị tổn thương, màng sinh chất sẽ mất dần tính chất thấm chọn lọc này nên trypan blue có thể đi xuyên qua màng tế bào, vào trong tế bào chất làm tế bào chất bắt màu xanh, có thể quan sát rõ dưới kính hiển vi. Ở phương pháp

bảo quản đông lạnh tế bào bằng phương pháp đông lạnh 3 bước, trong thời gian bảo quản từ 1,5 tháng, tỷ lệ tế bào sống của mô sau đạt trung bình 37,83%, trong khi bảo quản ở thời gian dài hơn, từ 3 tháng, tỷ lệ sống của tế bào giảm khoảng 122 lần (còn 0,31%) và sau 3 tháng, tỷ lệ này bằng không. Điều này cho thấy, thời gian mảnh mô tiếp xúc với hóa chất bảo quản đông lạnh trong thời gian bảo quản càng dài, khả năng sống sót của tế bào trong mô càng giảm. Theo kết quả này, thời gian bảo quản mô tối ưu nhất không lớn hơn 1,5 tháng.

Tại cùng thời điểm khảo sát, tỷ lệ sống của tế bào trong mảnh mô được đông lạnh bằng phương pháp đông lạnh cực nhanh luôn thấp hơn so với phương pháp đông lạnh 3 bước (Hình 1). Khoảng thời gian 1,5 tháng, tỷ lệ sống của tế bào trong mảnh mô được đông lạnh bằng phương pháp đông lạnh cực nhanh chỉ chiếm 8,29%, thấp hơn 4,5 lần so với phương pháp đông lạnh 3 bước (37,83%). Đối với các mảnh mô được bảo quản đông lạnh từ 1,5-3 tháng, tỷ lệ sống của tế bào theo phương pháp đông lạnh cực nhanh là 0,19%, thấp hơn gần 2 lần so với phương pháp đông lạnh ba bước (0,31%). Tuy nhiên, sau 3 tháng, khả năng sống của tế bào trong các mô gần như không có. Ở cả hai phương pháp đông lạnh, số lượng tế bào sống sau giải đông đều bằng không.

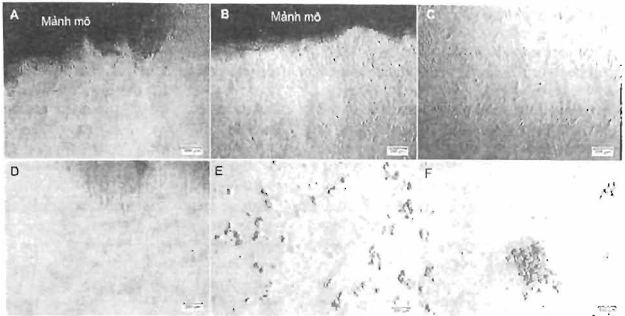
Như vậy, sử dụng phương pháp bảo quản đông lạnh ba bước trong thời gian nhỏ hơn 3 tháng cho hiệu quả tế bào sống sau giải đông tốt hơn so với phương pháp đông lạnh cực nhanh. Tuy nhiên, nếu thời gian bảo quản lâu hơn 3 tháng, việc sử dụng phương pháp bảo quản đông lạnh nào cũng đều không có hiệu quả. Tỷ lệ sống của tế bào trong mô được bảo quản đông lạnh 3 bước cao hơn so với phương pháp đông lạnh cực nhanh có thể được giải thích như sau: quá trình đông lạnh liên quan tới tốc độ làm lạnh tế bào và quá trình giải đông mô ung thư liên quan tới việc làm ấm mô từ nhiệt độ bảo quản cũng có thể

gây ra hư hại đáng kể cho tế bào và mô. Trong suốt quá trình làm mát tới giai đoạn nhiệt độ dưới 0 độ, nước có xu hướng thoát khỏi tế bào và đông lại ở ngoài tế bào, tế bào co lại trong suốt giai đoạn này. Nếu làm lạnh quá nhanh, các tế bào bị tổn thương bởi sự hình thành tinh thể băng trong tế bào. Sự hình thành tinh thể băng sẽ tác động đến màng tế bào chất nói chung và màng nhân nói riêng, từ đó sự hư hại tế bào càng lớn. Nếu làm lạnh chậm nước sẽ đóng băng bên ngoài. Đa ngoại bào thường vô hại với huyền phù tế bào nhưng vẫn tồn tại trong mô bảo quản và có thể phá vỡ cấu trúc mô khi mô được trữ lạnh. Vì vậy, các tế bào với mật độ dày đặc trong mô dễ bị hư hỏng do cơ chế tổn thương vi tác động bảo quản đông lạnh hơn [5]. Hậu quả của việc thay đổi cả nhiệt độ và nồng độ muối ngoại bào là màng tế bào bị tổn thương, chúng sẽ dễ bị rò rỉ và dễ dàng cho các chất lạ đi vào tế bào.

3.2. Hiệu quả nuôi cấy mảnh mô sơ cấp sau giải đông

Sau khi giải đông các mảnh mô (ở cả phương pháp đông lạnh cực nhanh và đông lạnh theo ba bước), tất cả các mảnh mô đều không mọc lan khỏi mảnh mô (hình 3D, E, F), các tế bào tách khỏi mảnh mô thành các cụm rời rạc, tế bào vỡ làm tế bào chất thoát ra ngoài, bám vào bề mặt đĩa nuôi hình thành các mảnh rác vụn. Trong khi đó đối với các mảnh mô tươi, 10,2% tổng số mảnh mô có tế bào mọc lan khỏi mảnh mô (hình 3A, B, C). Trong đó, có 2% số mô có tế bào phát triển đến lần cấy chuyển thứ 2 cho tới thời điểm khảo sát.

Những tổn thương nghiêm trọng nhất mà mô đông lạnh bị tác động là những ảnh hưởng do nhiệt, xảy ra trong quy trình giải đông. Việc giải đông tế bào thường được thực hiện với tốc độ nhanh nhằm giới hạn sự hình thành và phát triển của các tinh thể băng trong mẫu đông lạnh. Đối với mẫu mô, tốc độ làm ấm cao là cần thiết. Tuy nhiên, điều này sẽ dẫn tới sự đứt gãy các thành phần trong tế bào, gây tổn thương nghiêm trọng cho tế bào.



Hình 3. (A, B, C) Mảnh mô nuôi sơ cấp trước khi bảo quản đông lạnh. Các tế bào từ mảnh mô ung thư mọc lan ra sau 5-10 ngày nuôi cấy (D, E, F) Mảnh mô sau giải đông được nuôi cấy sơ cấp, các tế bào từ mảnh mô bị mất liên kết với nhau, tách khỏi mảnh mô và lắng xuống bề mặt đĩa nuôi

Sự không đồng nhất về thành phần tế bào và sự liên kết chặt chẽ giữa các tế bào trong mô càng hạn chế hiệu quả tác động của nhiệt nhằm giải đông nhanh mẫu mô. Hạn chế này càng làm tăng mức độ tổn thương mô nói chung và tổn thương tế bào nói riêng. Vì vậy, một tỷ lệ lớn các tế bào chết là không tránh khỏi.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã thiết lập quy trình bảo quản khối mô ung thư gan theo phương pháp đông lạnh với quy trình đông lạnh nhanh và đông lạnh ba bước. Kết quả cho thấy tỷ lệ sống của các tế bào nằm trong khối u theo thời gian giảm dần. Ở cả hai phương pháp, sau 1,5 tháng bảo quản đông lạnh, tỷ lệ sống của các tế bào trong mô giảm nhanh (tỷ lệ tế bào sống nhỏ hơn 0,31%). Thời gian bảo quản nhỏ hơn 1,5 tháng cho hiệu quả sống của tế bào tốt hơn. Trong khoảng thời gian này, bằng phương pháp đông lạnh theo 3 bước, tỷ lệ sống của tế bào sau giải đông

(37,83%) cao hơn so với phương pháp đông lạnh cực nhanh (8,29%). Như vậy, sử dụng phương pháp đông lạnh 3 bước, thời gian bảo quản đông lạnh mô dưới 1,5 tháng cho hiệu quả sống của tế bào trong mô sau giải đông là tốt nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anchoroguy TJ, Cecchini CA, Crowe JH, et al. (1991) Insights into the cryoprotection mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers. *Cryobiology* 28:467–473
2. Chao NH, Liao IC (2001) Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture* 197(1-4): 161–189
3. De Leeuw FE, Hsiao-Ching C, Colenbrander B, et al. (1990) Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology* 27:171–183.
4. Donnez J, Martínez-Madrid B, Jadoul P, et al. (2006) Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum Reprod Update* 12:519–535.

5. Müller-Schweinitze E (2009) Cryopreservation of vascular tissue. *Organogenesis* 5(3):97–104.
6. Franks F (1985) *Biophysics and biochemistry at low temperature*. Cambridge Univ Press.
7. Leung LKP (1991) Principles of biological cryopreservation, in: *Fish evolution and systematics: evidence from Spermatozoa* (Jamleson BGM, Ed.), pp 231–244. Cambridge Univ. Press.
8. Liu Q, Song Y, Zhou Y, et al. (2006) A useful agent for chemoprevention of hepatocellular carcinoma? *Cancer Biol Ther.* 5(12):1674–1676.
9. Saks NM (1978) The preservation of salt marsh algae by controlled liquid nitrogen freezing. *Cryobiology* 15:563–568.
10. Terry C, Dhawan A, Mitry RR, et al. (2006) Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: state of the art. *Cryobiology* 53:149–159.

SUMMARY

Study on hepatocellular carcinoma tumor cryopreservation to isolate tumor cells

Vu Bich Ngoc¹, Bui Nguyen Tu Anh¹,
 Nguyen Thanh Tam¹, Nguyen Minh Hoang¹,
 Tran Cong Duy Long², Do Dinh Cong²,
 Nguyen Hoang Bac², Phan Kim Ngoc¹,
 Pham Van Phuc¹

¹University of Science, Vietnam National University at Ho Chi Minh city

²University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh city

Received 16 October 2012; revised 22 October 2012;
 accepted 15 November 2012

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common cancer worldwide. Many present methods were applied with low efficiency. Therefore, new methods are being studied for treating this cancer. It is necessary to store HCC tumors to isolate cancer cells. So, this study aims to establish a protocol to cryopreserve the HCC tumors. HCC tumors were transferred to laboratory at cool condition. The tissues were dissected into pieces 2x2x2 mm³ and stored in cryopreservation medium with 10% DMSO. Two cooling down processes were investigated in this research, included: three-step protocol and ultra-rapid cryopreservation. After 1.5; 3 and 5 months, tumors were thawed by quick-thaw method. Cell viability in the tumor was estimated by trypan blue based on counting. Then viable tumors were cultured to determine the cellular expansion. The result showed that the viable cell rate decreased gradually after 1.5, 3 and 5 months of cryopreservation with 3783%, 0.31% and 0% by the three-step protocol and 8.29%, 0.19% and 0% by the ultrarapid cryopreservation, respectively. Both methods had low efficiency when tumors were cryopreserved more than 3 months. However, these results also showed that it is possible to cryopreserve HCC tumors for further research and application.

Key words: Hepatocellular carcinoma, cryopreservation, three-step protocol, ultrarapid cryopreservation