

SO SÁNH HIỆU QUẢ ĐIỀU TRỊ BỆNH THIẾU MÁU CẤP TÍNH KHÍ GHÉP TẾ BÀO TIỀN THÂN NỘI MÔ MÁU VÀ TẾ BÀO ĐƠN NHÂN MÁU CUỐNG RỖN NGƯỜI TRÊN MÔ HÌNH CHUỘT

Vũ Bích Ngọc*, Bùi Nguyễn Tú Anh, Trịnh Ngọc Lê Vân, Phí Thị Lan, Phan Kim Ngọc, Phạm Văn Phúc
 Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Thiếu máu chi cấp tính là một dạng phổ biến của các bệnh về động mạch ngoại biên. Cây ghép tế bào gốc được cân nhắc như một phương pháp mới và đầy hứa hẹn trong điều trị căn bệnh này. Máu cuống rốn là một nguồn giàu tế bào gốc, bao gồm tế bào gốc tạo máu (HSC), tế bào gốc trung mô (MSC) và tế bào tiền thân nội mô (EPC). Tuy nhiên, trước đây, máu cuống rốn mới chỉ được sử dụng chủ yếu trong điều trị bệnh liên quan đến máu. Nghiên cứu này so sánh hiệu quả điều trị bệnh thiếu máu chi cấp tính trong mô hình chuột khỉ: ghép tế bào đơn nhân với tế bào tiền thân nội mô từ máu cuống rốn. Tế bào đơn nhân được phân lập từ máu cuống rốn sử dụng Ficoll, sau đó EPC được phân lập được chọn lọc với marker CD34+ và CD133- và được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường chọn lọc. Để tạo chuột thiếu máu chi cấp tính, chuột được gây suy giảm miễn dịch bằng Busulfan (BU) và cyclophosphamide (CY), sau đó, động mạch đùi chi được đốt. Các chỉ tiêu kiểm tra chuột thiếu máu chi suy giảm miễn dịch được đánh giá với các chỉ tiêu: mức độ tổn thương mô, khả năng đáp nước, sự phù nề mô, sự thay đổi cấu trúc mô, bạch cầu tổng và thành phần tế bào bạch cầu. Kết quả cho thấy chuột 6-12 tháng tuổi phù hợp để tạo mô hình chuột thiếu máu chi với tỷ lệ 100% chuột biểu hiện tổn thương, trong đó 10% tổn thương cấp độ I, 50% cấp độ III và 40% cấp độ IV. Trong tất cả các chuột thiếu máu chi, mức độ tăng các biểu hiện khả năng đáp nước, tăng phù nề mô, hoại tử mô cơ và mất chức năng chi được quan sát thấy sau 20 ngày. Cây ghép MNC và EPC cải thiện đáng kể các biến chứng thiếu máu chi so với lời đối chứng. Hơn nữa, ghép EPC cải thiện đáng kể tình trạng thiếu máu chi so với ghép MNC với mức độ hồi phục hoàn toàn (tổng thương cấp độ 0) lần lượt là 44,44% và 33,33%. Đặc biệt, tất cả cá thể chuột hồi phục đều biểu hiện khả năng hoạt động giống với các chuột bình thường. Cây ghép tế bào đơn nhân và tế bào tiền thân nội mô là liệu pháp đầy hứa hẹn cho điều trị thiếu máu chi.

Từ khóa: Thiếu máu chi, tế bào gốc máu cuống rốn, tế bào đơn nhân, tế bào tiền thân nội mô, tạo mạch máu mới.

MỞ ĐẦU

Thiếu máu là nguyên nhân gây ra sự giảm cung cấp máu cho mô dẫn đến thiếu nguồn cung cấp oxy và chất dinh dưỡng cần thiết cho hoạt động của tế bào. Nguyên nhân chính của thiếu máu là do những hư hại của mạch máu. Thiếu máu cục bộ chi cấp tính (ALI) là tình trạng bệnh lý do thiếu đột ngột nguồn cung cấp máu cho chi sau mà nguyên nhân chính là do sự tắc hoặc nghẽn mạch (Ratajczak J, 2013). Thiếu máu cục bộ cấp tính trong thời gian dài hoặc không điều trị kịp thời có thể gây tình trạng ốm yếu, phải cắt cụt chi hoặc gây tử vong. Do đó, ALI đã được nghiên cứu và điều trị trong nhiều năm. Các liệu pháp hiện tại điều trị bệnh đều dựa trên việc thông mạch. Các tác nhân gây nghẽn mạch có thể được loại bỏ bằng nhiều phương pháp khác nhau như sử dụng streptokinase, hoạt hóa plasminogen mô, urokinase và anistreplase (Wardlaw JM *et al.*, 2012; Andaz S *et al.*, 1993; Burlacu A *et al.*, 2013) hay ly giải cục máu đông sử dụng sóng siêu âm hoặc sử dụng các ống thông mạch máu (Kim MH *et al.*, 2011).

Trong những năm gần đây, liệu pháp tế bào gốc được cân nhắc như một phương pháp điều trị ALI. So với các phương pháp để cấp ôxy trên, liệu pháp tế bào gốc mang những ưu điểm đầy hứa hẹn hơn. Tế bào gốc có thể tạo mạch máu mới giúp cung cấp oxy và chất dinh dưỡng cho vùng thiếu máu. Tế bào gốc có thể thu nhận từ hai nguồn chính, từ phổi hoặc mô trưởng thành: Sử dụng tế bào gốc phôi bị hạn chế khả năng hình thành khối u quái và các vấn đề về đạo đức, trong khi tế bào gốc trưởng thành có thể đòi hỏi các kỹ thuật xâm lấn để thu nhận nó.

Máu cuống rốn là một nguồn giàu tế bào gốc với ít nhất 3 loại tế bào gốc gồm MSC, EPC và HSC. Các tế bào gốc từ máu cuống rốn đã được sử dụng trong các thí nghiệm tiền lâm sàng và các ứng dụng lâm sàng trong nhiều năm. Ngày nay, hơn 25.000 ca ghép máu cuống rốn dị gen thực hiện trên toàn thế giới kể từ khi ca ghép máu cuống rốn đầu tiên được tiến hành năm 1998 (Butler MG *et al.*, 2011). Cả MNC và EPC đều được sử dụng trong điều trị thiếu máu chi từ một thập kỷ nay. EPC tiết các cytokine, nhân tố tế bào gốc, IL-3, bFGF (O E *et al.*, 2011) và VEGF (Phuc PV *et al.*, 2012) cải thiện đáng kể dòng máu cũng như khả năng tạo mạch máu mới trong chi thiếu máu. Điều trị với MNC máu cuống rốn cũng cho thấy sự cải thiện tình trạng thiếu máu (Finney MR *et al.*, 2010; Kim MH *et al.*, 2011). MNC máu cuống rốn khi được tiêm với 5 nhân tố tăng trưởng Fit-3L, EGF, TPO, FGF và IGF-1 giúp ngăn chặn sự mất chi và cải thiện sự tưới máu, tăng mật độ mao mạch, giúp trưởng thành mạch và hoạt hóa cytokine tạo mạch trong các mô bị tổn thương.

Hiện tại, hiệu quả điều trị thiếu máu chi ghép MNC và EPC vẫn chưa được so sánh. Do đó, nghiên cứu này so sánh hiệu quả của ghép MNC và EPC trong điều trị thiếu máu chi trên mô hình chuột, đánh giá sự phù hợp khi ghép dị loại trong điều trị thiếu máu chi.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Phân lập tế bào đơn nhân từ máu cuống rốn người

Máu cuống rốn thu nhận từ người tình nguyện tại bệnh viện Phụ sản Hùng Vương, TP.HCM được xử nghiệm và đảm bảo âm tính với HBV, HCV, HIV. Sau đó, máu được chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 3 giờ. Tế bào đơn nhân được (MNC) phân lập sử dụng Ficoll-Histopaque 1.077 (GE Healthcare) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Lớp tế bào đơn nhân được thu nhận và rửa 3 lần với PBS. Tế bào được nhuộm với 7-AAD (7-amino actinomycin; BD Bioscience, USA) để xác định tỷ lệ sống sử dụng hệ thống phân tích Flow cytometry (FACSCalibur, BD Bioscience, USA). Sự hiện diện HSC, MSC, EPC được xác định bằng phương pháp Flow cytometry.

Phân lập tế bào tiền thân nội mô từ tế bào đơn nhân

Hệ thống phân lập tế bào FACSJazz (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) được sử dụng để phân lập EPC CD34⁺CD133⁺ từ phân đoạn MNC. MNC được rửa hai lần với PBS bổ sung 1% BSA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Fc receptor được bất hoạt bằng cách ủ với IgG (Santa Cruz Biotechnology, CA) trong 15 phút. MNC được nhuộm kép với anti-CD34-FITC và anti-CD133-PE monoclonal antibodies (BD Pharmingen, USA) 30 phút, chấn sáng. Sau khi rửa, MNC được phân tích và chọn lọc các tế bào EPC biểu hiện marker CD34⁺ và CD133⁺.

Tế bào EPC đã phân lập được nuôi cấy trong môi trường EBM-2 medium bổ sung EGM-2 (Gibco, invitrogen) và 1% antibiotic-mycotic (Sigma, St, Louis, MO, USA). Quần thể tế bào EPC ứng viên được nuôi trong cùng môi trường ở 37°C, 5% CO₂ từ 18-30 ngày, thay môi trường sau mỗi 3 ngày trước khi thu nhận để phân tích flow cytometry.

Nhận dạng tế bào gốc từ phân đoạn MNC và EPC

Sự hiện diện của MSC biểu hiện CD44⁺ và CD90⁺, EPC biểu hiện CD34⁺ và CD133⁺, HSC biểu hiện CD34⁺ và CD45⁺ trong phân đoạn MNC được phân tích bằng flow cytometry sử dụng hệ thống FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Tế bào được rửa 2 lần với PBS chứa 1% BSA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Fc receptor được bất hoạt bởi IgG (Santa Cruz Biotechnology, CA), ủ trong 15 phút. Tế bào được nhuộm kép với anti-CD34-FITC và anti-CD45-APC monoclonal antibodies cho HSC, anti-CD44-PE và anti-CD90-FITC cho MSC, anti-CD34-FITC and anti-CD133-PE cho EPC (Tất cả kháng thể được mua BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) ở 4°C trong 30 phút. Sau đó, tế bào được phân tích bằng flow cytometry sử dụng phần mềm CellQuest Pro (BD Biosciences, Franklin lake, NJ).

Thiết lập mô hình chuột thiếu máu chi cấp tính bị ức chế miễn dịch

Chuột ức chế miễn dịch được tạo sử dụng busulfan (BU) và cyclophosphamid (CY) với liều tằm 20 mg/kg BU và 50 mg/kg CY liên tiếp trong 4 ngày, liều duy trì được dùng là 25mg/kg CY, mỗi liều tằm cách nhau 3 ngày. Mô hình chuột thiếu máu chi được thiết lập trên chuột ức chế miễn dịch theo nghiên cứu đã được công bố của Goto và đồng tác giả. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chứng minh hiệu quả của độ tuổi chuột tác động đến hiệu quả tạo mô hình chuột. Chuột 3-5 tháng tuổi (N1, 15 con) và 6-12 tháng tuổi (N2, 15 con) được sử dụng để đánh giá. Trong cả hai thí nghiệm, chuột được gây mê bằng 7,5 mg/kg zoletil, sau đó được loại bỏ lông đuôi. Vùng da đuôi chuột được rạch một đoạn dài khoảng 1 cm bằng dao phẫu thuật. Động mạch đùi được phân tách khỏi lớp cơ đùi và được cắt bằng hệ thống điện (ESU-X, Geister, Germany) tại hai vị trí gồm động mạch đùi gần đầu gối và động mạch đùi gần gạc. Các vết mổ hở sau đó được khâu kín và chuột được chăm sóc ở điều kiện sạch.

Đánh giá hiệu quả thiết lập mô hình chuột thiếu máu

Trước tiên, cấp độ tổn thương do thiếu máu được đánh giá theo hướng dẫn của Goto và đồng tác giả (2006). Mức độ tổn thương được ghi nhận và phân cấp như sau: Mức 0: không có sự hoại tử; Mức I: hoại tử đến ngón chân; Mức II: hoại tử đến bàn chân; Mức III: hoại tử đến cẳng chân; Mức IV: hoại tử đến đùi. Thứ hai, để đánh giá sự lưu thông dòng máu đến toàn bộ chi sau, dung dịch trypan blue 0,4% được tiêm vào tĩnh mạch đùi. Thứ ba, chuột được đánh giá khả năng nạp nước mỗi 10 ngày khi thả vào bể nước. Thứ tư, sự phù nề mô được đánh giá sau 3 -7 ngày ghép tế bào bằng cách thu nhận và cân khối lượng mô đùi chuột, sau đó đặt mô đùi ở 55°C cho tới khi trọng lượng không đổi (khoảng 36-48 giờ). Mức độ phù nề được đánh giá dựa trên tỷ lệ khối lượng mô khô/ướt giữa lá chuột thí nghiệm so với chuột đối chứng. Cuối cùng, cấu trúc mô học được phân tích trong 4 tuần. Mẫu mô được cắt với độ dày 2-5 μm, sau đó nhuộm với hematoxylin-eosin (H-E) và quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 20X (Carl-Zeiss, Germany).

Ghép tế bào

Chuột thiếu máu chi bị ức chế miễn dịch được phân thành 3 nhóm với 30 con không được điều trị, 30 con được ghép MNC máu cuồng rôn và 18 con được ghép EPC. Nhóm không điều trị được tiêm PBS và sử dụng như đối chứng âm. Ở nhóm ghép MNC hoặc EPC, chuột được tiêm 10⁶ tế bào vào vùng thiếu máu. Tất cả chuột được theo dõi và đánh giá hiệu quả ghép đến ngày thứ 21. Quy trình được thực hiện như sau: sau khi đốt động mạch đùi trên chuột ức chế miễn dịch 3-4 giờ, tất cả chuột được ghép MNC, EPC hoặc PBS. Tế bào được ghép trực tiếp vào vị trí mạch bị đứt. Hiệu quả điều trị được đánh giá theo sự hồi phục của mô hư hại tại chi thiếu máu bằng cách sử dụng các chuột không tổn thương (tổn thương ở Mức 0) trong ba nhóm, nhóm chuột bình thường, chuột được ghép MNC và chuột được ghép EPC. Các chuột này được đánh giá sự phù nề mô, tần số nạp nước và nhuộm mô học vào ngày thứ 21.

Phân tích thống kê

Giá trị được thể hiện bằng giá trị trung bình ± sai số chuẩn. Phép so sánh được thực hiện sử dụng phân tích ANOVA và Student's t-test. Giá trị P<0,05 được coi như đáng kể.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập MNC và EPC

Mười mẫu máu cuồng rôn được sử dụng trong nghiên cứu này. MNC được phân lập từ tất cả các mẫu máu với hiệu quả 100% (10/10 mẫu) bằng ly tâm đẳng tỷ trọng với Ficoll. Phân tích trên các mẫu MNC cho thấy tỷ lệ HSC, EPC và MSC lần lượt là 0,13 ± 0,03%; 1,27 ± 0,11% và 4,73 ± 0,27%. Các EPC đã được lựa chọn được nuôi cấy đến lần cấy chuyển thứ 2 hoặc thứ 3. Chúng biểu hiện hình dạng đặc trưng tương tự như các nghiên cứu đã được công bố (Phuc PV et al. 2012) và sự biểu hiện các marker bề mặt được xác nhận lại trước khi ghép (Hình 1). Kết quả cho thấy 90,32 ± 0,33% tế bào biểu hiện kiểu hình CD34⁺CD133⁺.

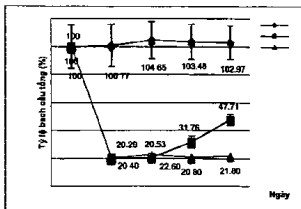


Hình 1: EPC nuôi cấy biểu hiện hình dạng đặc trưng. EPC CD34⁺CD133⁺ được nuôi cấy sau 48 giờ(A), colony hình thành sau 1 tuần(B), hợp đồng sau 2 tuần(C).

Mô hình chuột thiếu máu chỉ ức chế miễn dịch

Bạch cầu tổng giảm dần từ ngày 0 đến ngày 7, thấp nhất ở ngày 7 (20,29%) và có xu hướng tăng từ ngày 7 đến ngày 20 (47,71%) ở lô thí nghiệm (N1), tỷ lệ này thấp hơn đáng kể so với chuột bình thường (102,97%) (N0). Như vậy, phác đồ 20mg/kg BU kết hợp với 50 mg/kg Cy tiêm trong 4 ngày liên tiếp cho hiệu quả ức chế hệ miễn dịch của chuột tốt. Tuy nhiên, để duy trì mức suy giảm miễn dịch ổn định, thí nghiệm N2 được thiết kế sử dụng CY với liều tiêm 20mg/kg, tiêm mỗi 3 ngày và bắt đầu liều tiêm duy trì vào ngày thứ 7 đến hết ngày 20. Kết quả cho thấy liều duy trì này ổn định sự suy giảm miễn dịch ở mức tỷ lệ bạch cầu tổng giảm còn 21,8% so với trước đó (Hình 2).

Sau đó, với các chuột ức chế miễn dịch đã tạo được, mô hình chuột thiếu máu chỉ được khảo sát với hai độ tuổi: chuột 3-5 tháng tuổi (Nhóm 1) và 6-12 tháng tuổi (Nhóm 2). Kết quả cho thấy có sự khác biệt đáng kể trong mức độ tổn thương ở chuột, khả năng đáp nước, độ phủ nề và cấu trúc mô học của mô thiếu máu giữa hai nhóm tuổi. Trong cả hai nhóm, dòng máu không thể lưu thông qua chi sau khi đốt động mạch. Sau 1-2 giờ, chi thiếu máu trên cả hai nhóm chuột bị thâm đen và không nhuộm màu sau khi tiêm trypan blue, trong khi chi bình thường bắt màu xanh của thuốc nhuộm (Hình 3). Do đó, việc đốt động mạch đùi đã ngăn cản sự lưu thông dòng máu trong cả hai nhóm chuột thí nghiệm.



Hình 2: BU và CY gây ức chế hệ miễn dịch ở chuột. (A) Mức bạch cầu tổng ở nhóm N1 được duy trì thấp hơn so với chuột đối chứng (N0). (B) mức bạch cầu tổng duy trì ổn định ở chuột được tiêm CY nhóm N2.



Hình 3. Mức độ hư hại mô.Đốt mạch đùi trước (A) và sau (B) khi đốt điện.Chi bình thường biểu hiện màu sắc hồng hào (C), và có thể nhuộm màu khi tiêm trypan blue 0,4% (D).Đốt động mạch đùi gây tím tái chi và không nhuộm màu trypan blue (E).Chi bị đốt động mạch đùi bị hoại tử (F).

Tuy nhiên, sau 10 ngày, mức độ tổn thương có sự khác biệt giữa hai nhóm. Trong nhóm 1, 70% chuột biểu hiện thiếu máu chi với 20% tổn thương cấp độ I, 10% cấp độ II, 10% cấp độ III và 30% cấp độ IV. Trong nhóm 2, 100% chuột biểu hiện các hội chứng thiếu máu chi với 10% cấp độ I, 50% cấp độ III và 40% cấp độ IV. Theo các dữ liệu này, chúng tôi sử dụng 70% chuột thiếu máu chi nhóm 1 và tất cả chuột nhóm 2 cho các phân tích sâu hơn. Trong phân tích thứ hai, chúng tôi đánh giá tần số đáp nước mỗi 10 giây trong nhóm 1, 2 và nhóm đối chứng. Phân ứng bình thường của chuột khi đặt vào trong nước là đáp ứng đặc. Tần số đáp nước trong nhóm đối chứng là 40,67 ± 2,52 lần/10 giây. Tần số đáp nước ở nhóm N1 và N2 là 0 do chi chúng đã bị cụt. Ba ngày sau khi đốt động mạch, tỷ lệ khối lượng mô ướt/khối lượng chuột bình thường, nhóm 1 và nhóm 2 lần lượt là 3,45±0,09; 4,3±0,09 và 4,59 ±0,18. Do đó, trong nhóm chuột thí nghiệm (nhóm 1 và 2), sự phủ nề mô khác biệt đáng kể so với chuột bình thường. Tuy nhiên, không có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm 1 và nhóm 2. Cuối cùng, cấu trúc mô học được phân tích cho tới sau 4 tuần cho thấy sau 72 giờ, ở nhóm 1 và 2, tế bào mô có sự căng phồng và sau đó bị vỡ, lúc này nhân, tế bào chất và màng tế bào có sự phá vỡ cấu trúc. Trong một số chuột tổn thương mức độ IV và V ở cả hai nhóm, nhân tách xa màng tế bào đi vào tế bào chất trong khi ở tế bào bình thường, nhân nằm sát màng tế bào. Trong những chuột này, cấu trúc mô thay đổi đáng kể, liên kết giữa các tế bào bị mất đi, hầu hết các tế bào không kết nối với với nhau. Từ những kết quả này, chúng tôi chọn chuột 6-12 tháng tuổi để thiết lập mô hình chuột thiếu máu chi

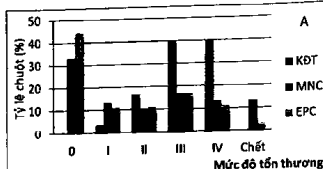
Hiệu quả điều trị thiếu máu chi

Mức độ thiếu máu chi trong các nhóm

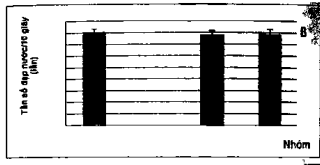
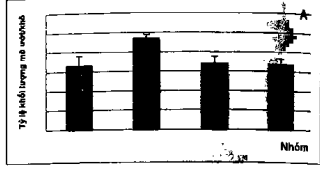
Mô hư hại được đánh giá dựa trên mức độ sửa chữa tổn thương. Hình 4 cho thấy ghép MNC và EPC giúp cải thiện đáng kể mô hư hại. Thực tế, ở chuột không được điều trị, sau 20 ngày không có chuột nào hồi phục ở mức 0 trong khi ở

1276

chuột được ghép MNC và EPC, tỷ lệ chuột hồi phục hoàn toàn với mức độ 0 lần lượt là 33,33% (10/30 con) và 44,44% (8/18 con). Hơn nữa, tỷ lệ chuột được điều trị với mức độ tổn thương II, III và IV cũng giảm. Cụ thể như sau, ở chuột không điều trị, chuột ghép MNC và chuột ghép EPC tỷ lệ chuột tổn thương ở cấp độ I lần lượt là 3,33% (1/30 con), không điều trị, chuột ghép MNC và chuột ghép EPC tỷ lệ chuột tổn thương ở cấp độ I lần lượt là 16,67% (5/30 con), 10% (3/30 con) và 11,11% (2/18 con); cấp độ II là 13,33% (4/30), 11,11(2/18 con); cấp độ III lần lượt là 16,67% (5/30 con) và 16,67 (2/18 con); ở cấp độ IV là 40% (12/30 con), 13,33% (4/30 con) và 11,11% (2/18 con). Như vậy, ghép MNC và EPC cải thiện đáng kể mức độ hư hại mô trong chuột thiếu máu chi. Tuy nhiên, ghép MNC và EPC cũng gây chết với tỷ lệ lần lượt là 13,34% (4/30 con) và 5,56% (1/18 con) so với nhóm không điều trị (0%).



Hình 4. Mức độ tổn thương trong nhóm chuột điều trị so với nhóm điều trị. (A) ghép MNC và EPC cải thiện sự hư hại mô so với chuột không điều trị. Chuột được ghép MNC (D) và EPC (E) của thiện chức năng giống như chuột bình thường (B) trong khi nhóm chuột không được điều trị mất hoàn toàn chi (C)



Hình 5. Sự hồi phục tần số nạp nước và độ phù nề mô ở chuột được ghép MNC và EPC. Chuột được ghép MNC và EPC tổn thương cấp độ 0 được sử dụng để đánh giá tần số nạp nước (A) và sự hồi phục sự phù nề mô (B) so với chuột điều trị (KĐT) và chuột bình thường (BT). Không có sự khác biệt đáng kể giữa chuột điều trị và chuột bình thường nhưng có khác biệt đáng kể so với chuột không điều trị.

Đồng thời, chúng tôi cũng nhận thấy sự khác biệt trong hiệu quả điều trị giữa ghép MNC và EPC. Có sự tăng đáng kể về tỷ lệ chuột hồi phục hoàn toàn sau khi ghép EPC so với MNC (lần lượt là 44,44% và 33,33%). Ghép EPC cũng giảm đáng kể tỷ lệ chuột tổn thương ở mức độ I, II, III và IV là tương tự ($P < 0,05$).

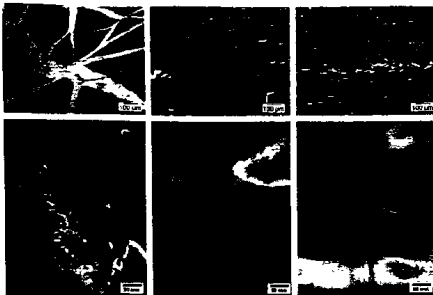
Tần số nạp nước và độ phù nề:

Sự hồi phục chức năng của chi thiếu máu là một thước đo quan trọng trong việc chứng minh khả năng sửa chữa tổn thương. Trong nghiên cứu này, chức năng chi được đánh giá với chỉ tiêu tần số nạp nước và độ phù nề. Tần số nạp nước trong mỗi 10 giây được so sánh giữa nhóm chuột được ghép MNC và EPC với mức độ tổn thương ở cấp độ 0 và với chuột bình thường và chuột không điều trị. Không có sự khác biệt trong tần số nạp nước giữa nhóm điều trị ghép MNC và EPC (lần lượt là $39,21 \pm 1,54$ lần và $39,43 \pm 1,89$ lần) so với chuột bình thường ($40,44 \pm 1,24$ lần) (Hình 5A). Như vậy, ở chuột được ghép MNC, EPC đã có sự hồi phục chức năng tương tự với chuột bình thường. Sự di động của chi trong nước chứng minh rằng mô cơ còn sống và có chức năng.

Độ phù nề trong chuột tổn thương cấp độ 0 giảm mạnh về mức bình thường ($3,35 \pm 0,45$), từ $4,72 \pm 0,19$ ở chuột không được điều trị xuống còn $3,43 \pm 0,32$ trong chuột được ghép MNC và $3,4 \pm 0,26$ trong chuột ghép EPC (Hình 5B). Điều này cho thấy mạch máu đã có sự lưu thông tốt, giúp máu đi tới mô thiếu máu và có thể sửa chữa các tổn thương tế bào. Phân tích nhuộm mô học đã bổ sung cho kết quả này.

Cấu trúc mô và sự hình thành mạch mới

Chuột điều trị với cấp độ tổn thương ở mức 0 được sử dụng để phân tích mô học. Kết quả (Hình 6A-B) cho thấy cấu trúc mô được phục hồi hoàn toàn với các bó cơ có kết cấu bình thường. Tế bào cơ chứa nhân nằm sát màng tế bào, tế bào chất đồng nhất, các bó cơ liên kết với nhau một cách chặt chẽ. Hơn nữa, sau 20 ngày ghép tế bào, nhiều mạch máu mới hình thành ở cả chuột được ghép EPC và MSC. Mạch máu mới hình thành nối 2 đầu của động mạch bị đứt với nhau (Hình 6E-F). Hầu hết mạch máu được hình thành bằng cách tái tạo hoàn toàn mạch máu mới do cấu trúc này không quan sát thấy trong chuột không điều trị (Hình 6D). Bằng cách phân tích mô cơ, chúng tôi cũng quan sát thấy sự hình thành một số mạch máu nhỏ mới dọc theo mô cơ (Hình 6C).



Hình 6. Phân tích mô học và sự hình thành mạch máu mới trong chuột điều trị với tổn thương cấp độ 0. Chuột có sự sửa chữa mô hư hại ở cấp 0 được sử dụng để phân tích mô học và sự hình thành mạch máu mới. Các lát cắt ngang và dọc của mô cho thấy sự phục hồi hoàn toàn mô (A-B) và sự tạo mạch mới (C). Phân tích dưới kính hiển vi cho thấy sự hình thành của nhiều mạch máu mới (E-F) với sự liên kết mạch máu ở hai đầu bị đứt so với chuột đối chứng (D)

MNC cũng như EPC biểu hiện một số vai trò trong sự tái sinh. Các phân tích trước khi tiêm cho thấy MNC chứa ít nhất hai loại tế bào gốc bao gồm MSC và EPC. Hai loại tế bào này đóng vai trò tạo mạch máu mới hoàn toàn hoặc tạo mạch máu mới từ mạch máu có sẵn. Cơ chế đầu tiên liên quan tới sự biệt hoá của MSC hoặc EPC thành tế bào nội mô. Tế bào này góp phần vào sự tạo mạch mới theo con đường *de novo*. MSC từ máu cuống rốn có thể biệt hoá thành tế bào nội mô chức năng và định hướng sự tạo mạch (Ratajczak *J et al.*, 2013). Cây ghép EPC vào chi thiếu máu có thể cầm ứng tạo mao mạch, gia tăng sự tạo mạch mới hoàn toàn và cải thiện khả năng cứu chi thiếu máu. Ngoài ra, trong các mô thiếu máu, sự biểu hiện của VEGF và SDF-1 alpha cũng được hoạt hoá dưới tác động của EPC (Yang *C et al.*, 2004). Cơ chế thứ hai liên quan tới sự tạo mạch từ các mạch tồn tại từ trước theo con đường *de novo* cũng được cảm ứng bởi sự tiết nhân tố từ MSC hoặc EPC. Các tế bào tiền thân từ máu cuống rốn biểu hiện cao các thụ thể dự dẫn tế bào gốc như CXCR4, các phân tử bám dính và LFA-1. Khi ghép vào mô hình chuột tổn thương mạch máu chi, tế bào này giúp phục hồi lại sự lưu thông mạch máu (Das *H et al.*, 2009). Trong một nghiên cứu gần đây, Ratajczak và đồng tác giả (2013) quan sát thấy tế bào CD133⁺ biểu hiện mRNA của một số nhân tố kháng apoptosis và nhân tố tiền tạo mạch như kit ligand, IGF-1, VEGF, bFGF và IL-8. Các nhân tố này cũng được xác định trong môi trường nuôi cấy tế bào CD133⁺ (Ratajczak *J et al.*, 2013). Môi trường điều kiện MSC và EPC định hướng cho cả sự bám dính và tăng sinh của tế bào nội mô nhờ kích thích sự tiết nhân tố từ MSC hoặc EPC (Finney *MR et al.*, 2010). Các nhân tố này cũng hoạt hoá các protein tác động đến sự sống của tế bào, Akt, trong tế bào cơ tim và tế bào nội mô, giúp hạn chế sự apoptosis và sự hoại tử trong suốt quá trình sinh oxy máu (Finney *MR et al.*, 2010).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thấy rằng ghép EPC có hiệu quả rõ ràng hơn ghép MNC trong điều trị thiếu máu chi. Ghép EPC làm tăng đáng kể khả năng cứu chữa chuột, giảm tỷ lệ tử vong. Một số lý do có thể giải thích cho kết quả này như sau. Đầu tiên, mặc dù MNC chứa một số quần thể tế bào gốc, chúng lại chứa nhiều tế bào đơn nhân trưởng thành. Sự tồn tại của các tế bào đơn nhân trưởng thành này có thể gây hại cho cơ thể như gây ra các đáp ứng miễn dịch với các kháng nguyên tế bào khác loại. Thực vậy, trong thí nghiệm này, cả chuột được ghép MNC và EPC, một số chuột bị tử vong sau ghép trong khi 100% chuột không điều trị vẫn sống sót, đồng thời, tỷ lệ chuột chết sau ghép MNC cao hơn đáng kể so với ghép EPC. Hơn nữa, sự tồn tại của tế bào đơn nhân trưởng thành trong MNC có thể làm giảm thành phần tế bào gốc, do đó, với cùng liều tiêm, tỷ lệ tế bào gốc trong EPC luôn cao hơn trong MNC. Do vai trò then chốt như vậy, số lượng EPC nhiều có thể chứng minh hiệu quả tốt hơn số lượng nhỏ tế bào gốc trong MNC.

Thứ hai, có hai loại EPC trong máu cuống rốn liên quan đến tế bào tạo mạch tuần hoàn (CAC) và EPC có tiềm năng tăng sinh cao (HPP). Cả hai loại tế bào này biểu hiện CD31, EC-cadherin, KDR và nhân tố von Willebrand. CAC biểu hiện CD14 nhưng không biểu hiện CD133 trong khi HPP-EPC biểu hiện CD133 mà không biểu hiện CD14. HPP-EPC biểu hiện khả năng tăng sinh mạnh và tiềm năng tạo colony tốt *in vitro* và cho thấy khả năng định hướng tạo mạch mạnh trong mô hình chuột thiếu máu *chiến vivo* hơn CAC (Duan *H et al.*, 2006). Trong nghiên cứu này, việc sử dụng HPP-EPC được phân lập từ CD34⁺CD133⁺ đã cho thấy hiệu quả điều trị với tỷ lệ chuột phục hồi hoàn toàn tăng.

Kết quả của chúng tôi cũng được bổ sung từ một số nghiên cứu khác. Năm 2010, Finney và cs đã so sánh chức năng tạo mạch giữa EPC máu cuống rốn (CD133⁺) và tế bào đơn nhân từ tủy xương. Họ cho thấy rằng CD133⁺ máu cuống rốn biểu hiện chức năng tạo mạch mạnh so với MNC từ tủy xương trong các đáp ứng với sự thiếu máu (Finney *MR et al.*, 2010). Tuy nhiên, EPC từ máu cuống rốn và tủy xương biểu hiện khả năng tạo mạch *in vivo* như nhau (Callum *K et al.*, 2000). Trước đó, để chứng minh vai trò của MSC và MNC từ tủy xương, Iwase và cs (2005) đã cho thấy cây ghép MNC từ tủy xương làm cải thiện đáng kể tình trạng thiếu máu chi so với ghép MNC từ tủy xương. So với MNC, MSC từ tủy xương sống sót tốt trong môi trường thiếu máu hơn và không chỉ biệt hoá thành tế bào nội mô mà còn biệt hoá thành tế bào cơ trơn mạch (Iwase *T et al.*, 2005).

KẾT LUẬN

Phân đoạn MNC hay EPC từ nguồn tế bào này có thể cải thiện sự thiếu máu chi ở mô hình chuột. Cây ghép cả MNC và EPC đều giúp giảm đáng kể sự thiếu máu chi trên mô hình chuột. Thúc đẩy sự tạo mạch máu mới, giúp cung cấp chất dinh dưỡng cho tế bào cơ và các loại tế bào khác trong chi, đồng thời hoạt hoá chức năng sinh lý của chúng, đặc biệt là khả năng di chuyển. Tuy nhiên, cấy ghép EPC có hiệu quả hơn MNC thể hiện bằng tỷ lệ chuột hồi phục hoàn toàn cao

và tỷ lệ chuột tử giảm. Các kết quả này cho thấy EPC máu cuống rốn thích hợp trong điều trị thiếu máu chi. Nghiên cứu này hứa hẹn các ứng dụng mới trong ngân hàng máu cuống rốn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Burlacu A, Gngorescu G, Rosca AM, Preda MB, Simionescu M (2013) Factors secreted by mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells have complementary effects on angiogenesis in vitro. *Stem Cells Dev*, 22:643-653.
- Butler MG, Menitove JE (2011). Umbilical cord blood banking: an update. *J Assist Reprod Genet*, 28:669-676.
- Finney MR, Fanning LR, Joseph ME, Goldberg JL, Greco NJ, Bhakta S, Winter DG, Forster M, Scheid PE, Sabe M, et al (2010) Umbilical cord blood-selected CD133(+) cells exhibit vasculogenic functionality in vitro and in vivo. *Cytotherapy*, 12:67-78.
- Henning RJ, Dennis S, Sawmiller D, Hunter L, Sanberg P, Miller L (2012) Human umbilical cord blood mononuclear cells activate the survival protein Akt in cardiac myocytes and endothelial cells that limits apoptosis and necrosis during hypoxia. *Transl Res*, 159:497-506.
- Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, Kangawa K, Kitamura S (2005). Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res*, 66:543-551.
- Goto T, Fukuyama N, Aki A, Kanabudhi K, Kimura K, Taira H, Tanaka E, Wakana N, Mori H, Inoue H (2006). Search for appropriate experimental methods to create stable hind-limb ischemia in mouse. *Tohoku J Exp Clin Med*, 31:128-132.
- Kim MH, Zhang HZ, Kim SW (2011) Combined growth factors enhanced angiogenic potential of cord blood-derived mononuclear cells transplanted to ischemic limbs. *J Mol Cell Cardiol*, 51:702-712.
- Phuc PV, Ngoc VB, Lam DH, Tam NT, Viet PQ, Ngoc PK (2012). Isolation of three important types of stem cells from the same samples of banked umbilical cord blood. *Cell Tissue Bank*, 13:341-351.
- Pimental-Coeelho PM, Rosado-de-Castro PH, da Fonseca LM, Mendez-Olato R (2012) Umbilical cord blood mononuclear cell transplantation for neonatal hypoxicischemic encephalopathy. *Pediatr Res*, 71:464-473.
- Ratajczak J, Kucia M, Mierzejewska K, Marlicz W, Piebzkowski Z, Wojakowski W, Greco NJ, Tendera M, Ratajczak MZ (2013). Paracrine proangiogenic effects of human umbilical cord blood-derived purified CD133+ cells—implications for stem cell therapies in regenerative medicine. *Stem Cells Dev*, 22:422-430.
- Xu Y, Meng H, Li C, Hao M, Wang Y, Yu Z, Li Q, Han J, Zhai Q, Qiu L (2010) Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells isolated by a novel explantation technique can differentiate into functional endothelial cells and promote revascularization. *Stem Cells Dev*, 19:1511-1522.
- Yu JX, Huang XF, Lv WM, Ye CS, Peng XZ, Zhang H, Xiao LB, Wang SM (2009). Combination of stromal-derived factor-1alpha and vascular endothelial growth factor gene-modified endothelial progenitor cells is more effective for ischemic neovascularization. *J Vasc Surg*, 50:608-616.

A COMPARISON OF UMBILICAL CORD BLOOD DERIVED ENDOTHELIAL PROGENITOR CELL TRANSPLANTATION AND MONONUCLEAR CELL TRANSPLANTATION FOR THE TREATMENT OF ACUTE HINDLIMB ISCHEMIA IN A MURINE MODEL

Vu Bich Ngoc, Bui Nguyen Tu Anh, Trinh Ngoc Le Van, Phi Thi Lan, Phan Kim Ngoc, Pham Van Phuc

University of Science, Vietnam National University

SUMMARY

Acute lower limb ischemia is a common peripheral artery disease whose treatment presents many difficulties. Stem cell transplantation is considered a novel and promising method of treating this disease. Umbilical cord blood (UCB) is rich in stem cells, including hematopoietic stem cells (HSCs), mesenchymal stem cells (MSCs) and endothelial progenitor cells (EPCs). However, historically, banked umbilical cord blood has been used mainly to treat blood-related diseases. Therefore, this study compared the efficacy of umbilical cord blood-derived mononuclear cells (UCB-MNCs) with EPC transplantation for the treatment of acute hindlimb ischemia (ALI) in mouse models. MNCs were isolated from UCB by Ficoll gradient centrifugation, after which the EPCs were sorted based on CD34+ and CD133+ markers and cultured according to a previously published protocol. To induce ALI, mice were immune-suppressed using busulfan (BU) and cyclophosphamide (CY), after which the femoral arteries were burned. Induction of ALI in the immune suppressed mice was confirmed by the grade of tissue damage, pedal frequency in water, tissue edema, changes in histology, total white blood cell count, and white blood cell composition. Model mice were injected with a dose of MNCs or EPCs and un-treated control mice were injected with phosphate buffered saline. The efficiency of treatment was evaluated by comparing the grade of tissue damage between the three groups of mice. Mice aged 6–12 months were suitable for ALI, with 100% of mice exhibiting ischemia from grade I 10%, grade III 50%, grade IV 40%. For all ALI mice, a gradual increase in pedal frequency in water, increased tissue edema, necrosis of muscle tissue, and loss of hindlimb function were observed after 20 days. Transplanted MNCs and EPCs significantly improved hindlimb ischemia compared with control treatment. Moreover, EPC transplantation significantly improved hindlimb ischemia compared with MNC transplantation. Following EPC and MNC transplantation, 44.44% and 33.33% of the mice recovered fully (grade 0), respectively. Specifically, all recovered mice exhibited hindlimb activities similar to those of normal mice. Transplantation of UCB-derived MNCs and EPCs are promising therapies for hindlimb ischemia.

Keywords: Hindlimb ischemia, Umbilical cord blood-derived stem cells, Mononuclear cells, Endothelial progenitor cells, Neovascularization.

* Author for correspondence: Tel. +84 9 15637474; Email: finsamac@gmail.com