



Original Article

The Capacity of Wharton's Jelly to Prolong the Survival of Skin Tissues *ex vivo*

Nguyen Quang Minh^{1,2}, Nguyen Dang Dai¹, Than Thi Trang Uyen^{2,*}

¹Vinmec Hi-Tech Center, Vinmec Healthcare System, 458 Minh Khai, Hai Ba Trung, Hanoi, Vietnam

²VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

Received 29 August 2023

Revised 21 April 2024; Accepted 23 April 2024

Abstract: Developing models for preclinical examinations to avoid using animals has been increasing worldwide. Besides creating cell lines or tissues specialized for *in vitro* testing, biological wastes are also utilized as a potential tissue source for *ex vivo* examinations. In particular, the human skin from plastic surgery can be an ideal source of skin models to evaluate the effectiveness of some biological products with the advantage of possessing a natural finished skin structure. However, to maintain skin viability under laboratory conditions, it is necessary to establish *ex vivo* skin tissue nurturing conditions. Therefore, we tested conditions for culturing skin tissue outside the body using the air-liquid interface tissue culture method paired with Wharton's Jelly (WJ) extracted from umbilical cords and a specialized nutrient medium. The results showed that the skin tissue could maintain and survive in the air-liquid interface tissue culture conditions. Results from observations showed a consistent in size and color of the skin tissues up to day 10 when cultured solely in the nutrient medium. However, when supplemented with Wharton's Jelly (WJ), the tissues maintained their characteristics until day 15. Additionally, the histological analysis indicated that cultured skin tissues could maintain their normal structure of three epidermis, dermis, and hypodermis layers; signs of epidermal detachment from the dermis were observed after 10 days in the nutrient medium alone, whereas this separation occurred after 15 days when supplemented with Wharton's Jelly (WJ). Moreover, hair follicles, melanocytes, and keratinocytes were observed to be appropriately positioned and exhibited their characteristic structures. These results indicated that skin could survive in a nutrient medium for ten days, particularly prolonged over 15 days in a when supplemented with WJ. These results indicated the potential to maintain skin tissue *ex vivo* and use it for different tests under laboratory conditions.

Keywords: Skin model, *ex vivo*, air-liquid interface, Wharton's Jelly (WJ).

* Corresponding author.

E-mail address: uyentthan@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5593>

Wharton's Jelly có khả năng hỗ trợ kéo dài thời gian sống mô da *ex vivo*

Nguyễn Quang Minh^{1,2}, Nguyễn Đăng Đại¹, Thân Thị Trang Uyên^{2,*}

¹Trung tâm Công nghệ Cao Vinmec, Hệ thống chăm sóc sức khỏe Vinmec, 458 Minh Khai, Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 29 tháng 8 năm 2023

Chỉnh sửa ngày 21 tháng 4 năm 2024; Chấp nhận đăng ngày 23 tháng 4 năm 2024

Tóm tắt: Việc phát triển các mô hình cho mục đích thử nghiệm tiền lâm sàng nhằm tránh sử dụng động vật đang là xu hướng mới trên thế giới. Bên cạnh việc tạo ra các dòng tế bào hoặc mô chuyên hoá cho thử nghiệm *in vitro*, các phế phẩm sinh học cũng đang được tận dụng như một nguồn mô tiềm năng cho thử nghiệm *ex vivo*. Trong đó, phần da người từ phẫu thuật tạo hình thẩm mỹ có thể là một nguồn mô hình da lý tưởng để đánh giá hiệu quả của một số sinh phẩm với ưu điểm sở hữu cấu trúc da hoàn thiện tự nhiên. Tuy nhiên, nhằm duy trì khả năng sống của da trong điều kiện phòng thí nghiệm thì cần phải thiết lập được điều kiện nuôi dưỡng mô da *ex vivo*. Do đó, chúng tôi tiến hành thử nghiệm các điều kiện nuôi cấy mô da bên ngoài cơ thể bằng phương pháp nuôi cấy mô bán tiếp xúc với môi trường dinh dưỡng và môi trường dinh dưỡng kết hợp lớp Wharton's Jelly (WJ) từ dây rốn. Kết quả cho thấy mô da có thể được duy trì ổn định trong các điều kiện nuôi cấy mô bán tiếp xúc. Các quan sát bên ngoài cho thấy kích thước và màu sắc mô da không bị biến đổi cho đến 10 ngày khi nuôi trong môi trường dinh dưỡng và đến 15 ngày khi nuôi trong môi trường dinh dưỡng kết hợp với lớp WJ. Đồng thời, kết quả phân tích mô học chỉ ra rằng da vẫn giữ được cấu trúc đầy đủ ba lớp gồm biểu bì, trung bì và hạ bì; chỉ xuất hiện sự bong tróc lớp biểu bì và tách rời khỏi trung bì từ sau ngày thứ 10 hoặc ngày thứ 15 tương ứng với mô được nuôi trong điều kiện môi trường dinh dưỡng hay môi trường dinh dưỡng kết hợp với WJ. Các nang lông, tế bào sắc tố và tế bào sừng cũng được quan sát thấy ở đúng vị trí và giữ được cấu trúc bình thường trong cấu trúc mô da. Các kết quả này cho thấy mô da có thể được nuôi sống trong môi trường dinh dưỡng đến 10 ngày ở phòng thí nghiệm; đặc biệt khi kết hợp môi trường dinh dưỡng với WJ có giúp kéo dài sự sống của mô da bên ngoài cơ thể đến trên 15 ngày. Kết quả từ nghiên cứu này cho thấy tiềm năng duy trì mô da *ex vivo* và sử dụng cho các thử nghiệm khác nhau ở điều kiện phòng thí nghiệm.

Từ khóa: Mô hình da, *ex vivo*, nuôi cấy bán tiếp xúc, Wharton's Jelly (WJ).

1. Mở đầu

Mô hình động vật từ lâu đã được sử dụng như là tiêu chuẩn bắt buộc của các thử nghiệm tiền lâm sàng trong điều trị nhiều loại bệnh lý khác nhau. Cho đến nay, mô hình động vật này vẫn đang được ưa chuộng dù phải đối mặt với

các vấn đề đạo đức và sự phản đối liên quan đến các vấn đề y đức, sáng kiến 3R và một số trường hợp chính thức của Viện Y tế Quốc gia Hoa Kỳ (NIH) [1]. Đối với mô hình nghiên cứu trên da trong lĩnh vực thẩm mỹ và da liễu trị liệu, đặc điểm mô da động vật cũng khác nhau về độ dày của lớp sừng, mật độ lông, khả năng hấp thụ nước, thành phần lipid và hình thái da; ngay cả da lợn hay da chuột có đặc điểm gần giống với da người nhất cũng có tính thẩm cao hơn so với da người [2, 3]. Việc các đặc điểm

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: uyentthan@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5593>

da động vật không đại diện cho da người đã đặt ra những nghi vấn về tác dụng thực tế của các loại thuốc hay những hợp chất sử dụng cho người được thử nghiệm trên mô hình động vật.

Do vậy, các giải pháp thay thế cũng đã được xem xét nhằm hạn chế thử nghiệm trên động vật [4]; ví dụ như thử nghiệm trên các dòng tế bào sừng, nguyên bào sợi da *in vitro* và sử dụng các phương pháp dự đoán dựa trên việc tổng hợp những dữ liệu sẵn có để phân tích mối tương quan giữa hoạt tính sinh học và cấu trúc của hợp chất thử nghiệm. Bên cạnh đó, các phé phẩm sinh học đang được tận dụng như một mô hình thử nghiệm *ex vivo* tiềm năng [5, 6]. Đã có nhiều nghiên cứu sử dụng mô da *ex vivo* cho các nghiên cứu thử nghiệm khác nhau như sửa chữa hàng rào bảo vệ da [7], hỗ trợ và điều trị vết thương [8], độc tính hoá học [9], bệnh lý viêm mãn tính [10], nhiễm nấm [11] và các thử nghiệm ngoài da [12]. Do vậy, mô da người *ex vivo* mới là mô hình tối ưu cho các thử nghiệm đánh giá độc tính và khả năng thẩm thấu của thuốc qua da [13].

Cấu trúc mô da có 3 lớp chính là biểu bì, trung bì và hạ bì. Lớp biểu bì là lớp ngoài cùng, chủ yếu chứa các tế bào sừng để tạo thành lớp sừng bảo vệ da, các tế bào hắc tố và tế bào Langerhans tham gia điều hòa các hoạt động của hệ thống miễn dịch trong da [14]. Lớp trung bì nằm ngay bên dưới lớp biểu bì qua màng đáy, chứa các loại tế bào gốc trung mô, nguyên bào sợi, các thành phần chất nền ngoại bào gồm có sợi collagen, elastin và proteoglycan tạo thành cấu trúc nâng đỡ da [15]. Lớp trung bì cũng chứa các mạch máu, dây thần kinh, các phần phụ của da như nang lông, tuyến bã và tuyến mồ hôi [15]. Lớp hạ bì, nằm dưới lớp trung bì, là lớp sâu nhất của da, bao gồm mô mỡ, mô liên kết và các mạch máu, là lớp cách nhiệt và lớp đệm cho cơ thể [15]. Phần mẫu mô da người được thu thập sau các ca phẫu thuật thẩm mỹ là một nguồn mẫu mô lý tưởng để kiểm tra tác dụng của các sinh phẩm và thuốc bôi ngoài da với ưu điểm sở hữu cấu trúc da tự nhiên bao gồm các quần thể tế bào (tế bào sừng, tế bào hắc tố, tế bào Langerhans, nguyên bào sợi) và ma trận các thành phần collagen, elastin và glycosaminoglycan [2]. Bên cạnh những thử

thử nghiệm ngắn hạn, một số khác yêu cầu các hoạt động sinh lý và cấu trúc của mô da phải được đảm bảo và theo dõi trong suốt thời gian dài thử thuốc. Nuôi cấy bán tiếp xúc môi trường (Air-liquid interface - ALI) đã được chứng minh là một phương pháp hiệu quả trong nuôi cấy mô và tế bào có nguồn gốc từ da và phôi [16, 17]. Cơ chế của phương pháp này là cho phép bề mặt trên của mẫu tiếp xúc với không khí và phần còn lại tiếp xúc với môi trường dinh dưỡng nhằm mục đích tạo điều kiện nuôi giống tối đa với mô tự nhiên trong cơ thể.

Wharton's jelly (WJ) là lớp màng nhầy nằm xen giữa các mạch máu trong dây rốn, chủ yếu chứa collagen, fibronectin và glycosaminoglycan là các phân tử có tính đàn hồi trong chất nền bên trong lớp hạ bì của da [18, 19]. Do đó, chúng tôi nhận thấy WJ có thể là thành phần hỗ trợ, giúp ổn định cấu trúc và cho phép môi trường dinh dưỡng tiếp cận bề mặt bên dưới cho mô hình nuôi cấy da *ex vivo* [20]. Hơn nữa, WJ chứa hàm lượng lớn axit hyaluronic và cung cấp các yếu tố tăng trưởng như yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (FGF), yếu tố tăng trưởng giống Insulin - 1 (IGF-I), yếu tố tăng trưởng giống Insulin - 1 (IGF-I), yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc tiêu cầu (PDGF) và yếu tố chuyển đổi tăng trưởng beta (TGF- β) giúp thúc đẩy sự phát triển mô da [21]. Mặc dù WJ đã được nghiên cứu làm chất phủ bề mặt chai nuôi cấy nhằm hỗ trợ tế bào gốc trung mô và tế bào nội mô người bám dính và phát triển [19]; tuy nhiên, chưa có báo cáo nào sử dụng WJ làm chất hỗ trợ nuôi mô da *ex vivo*.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thử nghiệm hai điều kiện nuôi mô da *ex vivo*, gồm môi trường dinh dưỡng thông thường và môi trường dinh dưỡng kết hợp WJ, nhằm tìm ra điều kiện kéo dài thời gian nuôi mô da trong phòng thí nghiệm. Kết quả của nghiên cứu sẽ cho phép thúc đẩy lợi thế của việc sử dụng mô da người *ex vivo* cho một số thử nghiệm thuốc trên da.

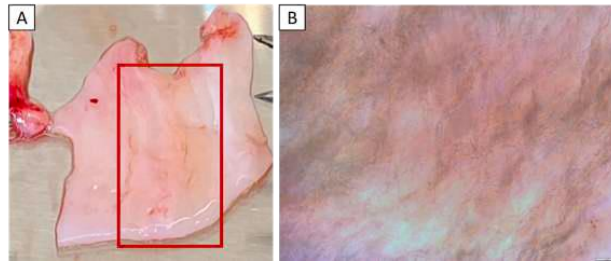
2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Chuẩn bị chất phủ bề mặt Wharton's Jelly (WJ)

Dây rốn được thu thập và bảo quản trong dung dịch Ringer lactate có bổ sung 5% kháng

sinh Penicilin/Streptomycin (P/S) ở 4 °C cho đến khi xử lý. Mẫu dây rốn được rửa một lần với cồn 70° trước khi rửa hai lần với đệm PBS bổ sung 1% P/S; sau đó dây rốn được cắt thành các đoạn nhỏ hơn có chiều dài khoảng 5 cm. Các đoạn này được cắt dọc theo chiều dài, loại bỏ phần mạch máu (động mạch, tĩnh mạch) bên trong để làm bộc lộ lớp WJ (Hình 1A). Thu lớp

WJ bằng cách bóc tách và ép ra từ phần mô còn lại của dây rốn. Lớp WJ được hòa loãng trong dung dịch muối được đệm hóa phosphate (PBS) với tỷ lệ 1 : 1 và khử tế bào bằng cách sốc nhiệt (đông lạnh ở -20 °C trong tối thiểu 24 giờ và rã đông ở 37 °C trong 30 phút). Khi sử dụng, phủ một lớp WJ đã pha loãng này lên bề mặt giếng nuôi cấy trước khi nuôi mô da (Hình 1B).



Hình 1. Hình ảnh lớp Wharton Jelly (WJ).

A) Hình ảnh lớp WJ bên trong dây rốn. B) Hình ảnh lớp WJ phủ lên bề mặt giếng nuôi mô được quan sát dưới kính hiển vi (độ phóng đại 10X).

2.2. Thu thập mô da

Mẫu mô da thu được từ phẫu thuật cắt bỏ vùng da ngực của bệnh nhân phì đại tuyến vú tại Trung tâm Thẩm mỹ Vinmec (đã được chấp thuận bởi Hội đồng Y đức trong nghiên cứu Y Sinh học - Công ty Cổ phần Bệnh viện ĐKQT Vinmec, Quyết định số 278/2020/QĐ-VINMEC). Mẫu được vận chuyển và bảo quản trong dung dịch Ringer lactate có bổ sung 5% P/S ở 4 °C trước khi được xử lý tiếp theo.

Tiêu chuẩn lựa chọn mẫu mô da cho nghiên cứu: Giới tính nữ; tuổi < 50 tuổi; người hiến không bị viêm da, không mắc các bệnh truyền nhiễm, không mắc các bệnh rối loạn sắc tố da (bạch biến, lupus ban đỏ, xơ cứng,...) hoặc các triệu chứng về da (vàng da, viêm da); mẫu da thu thập trước khi xử lý có độ dày khoảng 2 - 8 mm và diện tích tối thiểu là 10 cm²; cấu trúc mô nguyên vẹn ba lớp (biểu bì, trung bì, hạ bì); da có màu vàng tự nhiên, căng, sáng, không bị sạm, nám da, mô da không có dấu hiệu bị hoại tử và nhiễm trùng. Tiêu chuẩn loại trừ: mô bị tổn thương hoặc mô da không toàn vẹn cấu trúc ba lớp; da lấy từ vùng mô sẹo, vùng viêm, sạm da, nám da; mô có dấu hiệu bị nhiễm trùng, hoại tử hoặc dung dịch thu thập; lưu trữ mô có nguy cơ bị nhiễm khuẩn.

2.3. Thiết lập mô hình da ex vivo

Mẫu da (n = 3) được rửa với cồn 70° và dung dịch đệm PBS bổ sung 1% P/S. Mô da được cắt thành từng miếng có kích thước 1 x 1 cm² và chuyển vào các giếng của đĩa nuôi cấy 12 giếng (Corning, Mỹ) chứa sẵn các điều kiện thử nghiệm tương ứng như sau:

Nhóm 1: Dung dịch đệm PBS (đối chứng âm).

Nhóm 2: Môi trường dinh dưỡng (MTDD), gồm có DMEM/F12 (Gibco, Massachusetts, USA) + 10% FBS (Gibco, Massachusetts, USA) + 1 mM CaCl₂.

Nhóm 3: Môi trường dinh dưỡng (DMEM/F12 + 10% FBS) kết hợp lớp lót WJ (MTDD + WJ).

Các mẫu được ủ trong tủ ấm 37 °C và 5% CO₂ và thay môi trường định kỳ hai ngày một lần.

Mô da được đánh giá đại thể trong nuôi cấy theo các tiêu chí sau: sự thay đổi màu sắc, kích thước, cấu trúc, dấu hiệu nhiễm khuẩn và hoại tử.

2.4. Xử lý mô học và nhuộm hoá mô

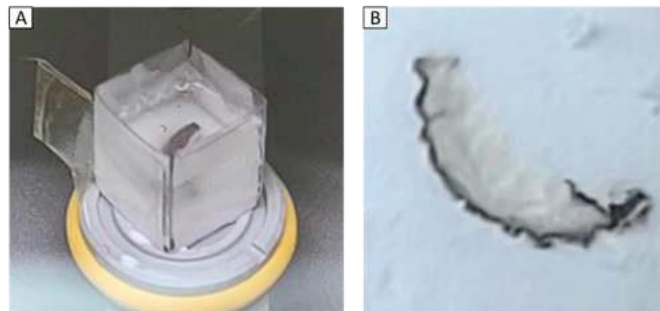
Các mẫu mô da được rửa trong đệm PBS và ngâm trong dung dịch formalin 4% trong vòng 48 giờ. Mẫu được chuyển vào ống chứa PBS chứa 15% saccharose cho đến khi chìm xuống hoàn toàn rồi chuyển sang PBS chứa 30%

saccharose. Mẫu được gắn lên khuôn đúc bằng dung dịch OCT và làm đông trong buồng lạnh -16 °C (Hình 2). Mẫu được cắt thành các lát mỏng có độ dày 5 - 8 μm sử dụng máy cắt lạnh Slee MNT (SLEE medical GmbH, Đức) và đặt lên lam kính. Sử dụng phương pháp nhuộm Hematoxylin và Eosin (H&E) để đánh giá đặc điểm cấu trúc da trong các điều kiện nuôi. Tiêu bản mô da được ngâm trong cồn 96° trong 15 phút, sau đó được rửa loại bỏ OCT với nước

cát. Mẫu lần lượt được nhuộm với Hematoxylin trong 10 phút và Eosin trong 30 giây. Mẫu được rửa với nước cất sau mỗi lần nhuộm. Mẫu tiêu bản được gắn lamên với glycerol và quan sát dưới kính hiển vi Zeiss AxioPlan 2 Imaging Microscope (Carl Zeiss, Đức).

2.5. Phương pháp xử lý dữ liệu

Dữ liệu số được trình bày dưới dạng Giá trị trung bình \pm Độ lệch chuẩn.



Hình 2. Hình ảnh đúc nén và cắt mẫu mô da.

- A) Mẫu da được gắn lên khuôn đúc bằng dung dịch OCT.
B) Mẫu da được cắt lát dọc để kiểm tra cấu trúc các lớp da.

3. Kết quả

3.1. Đặc điểm và hình thái mẫu mô da sau xử lý

Mẫu mô da sau khi xử lý sẽ được kiểm tra các đặc điểm trước khi nuôi theo dõi. Các mẫu

mô đều có đặc điểm khá tương đồng nhau, cụ thể là trọng lượng khoảng 0,3 gram, kích thước 1 x 1 cm^2 , màu da vàng đồng đều và quan sát không thấy hiện tượng mẫu bị hoại tử hay cấu trúc da bị tổn thương (Hình 3).

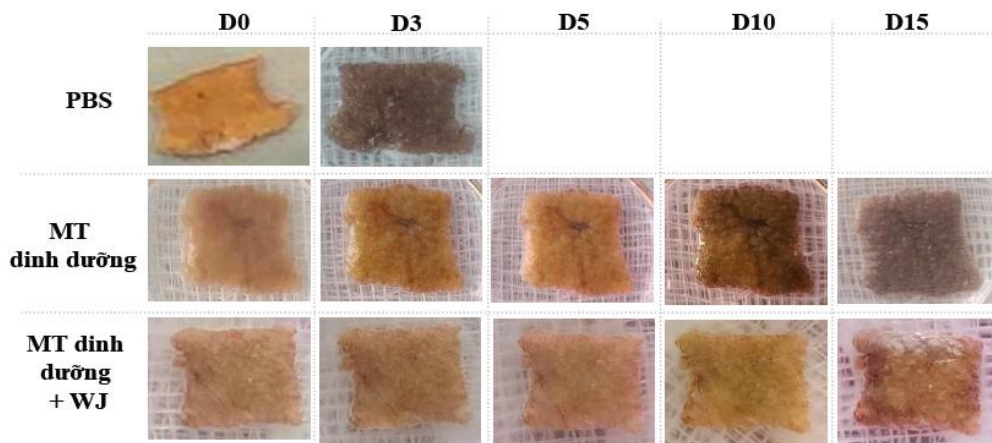


Hình 3. Sơ đồ quy trình xử lý và đặc điểm mảnh mô da sau xử lý sử dụng cho nuôi cấy thí nghiệm.

3.2. Đặc điểm mẫu mô da trong quá trình nuôi dưỡng

Các mẫu da sau khi xử lý đạt tiêu chuẩn được nuôi theo ba điều kiện như đã mô tả ở phần phương pháp. Qua thời gian, các mẫu da được nuôi cấy *ex vivo* dần thay đổi sắc tố bề mặt từ màu vàng sang màu đen (Hình 4). Với nhóm đối chứng âm (nuôi trong dung dịch PBS), da có sự thay đổi rõ rệt sau ba đến năm ngày. Cụ thể là mô bắt đầu thiếu liên kết tạo nên cấu trúc mô rời rạc, lỏng lẻo và màu da chuyển từ vàng nhạt sang nâu đen. Ngược lại, các mẫu được nuôi trong điều kiện môi trường dinh dưỡng (DMEM/F12, 10% FBS, 1 mM CaCl₂) không quan sát thấy có sự thay đổi đặc điểm da cho đến ngày thứ bảy nuôi cấy. Sau đó, các mẫu

mô chỉ nuôi trong môi trường dinh dưỡng bắt đầu thay đổi sắc tố từ vàng nhạt sang nâu từ ngày thứ 8 và quan sát rõ ở ngày thứ 10, sau đó màu da đổi hoàn toàn thành đen khi sang ngày thứ 15. Tuy nhiên, các mẫu mô được nuôi trong điều kiện môi trường dinh dưỡng có bổ sung WJ vẫn giữ nguyên đặc điểm bình thường về kích thước và màu sắc da cho tới ngày thứ 14, và chỉ bắt đầu có dấu hiệu đổi màu da từ ngày thứ 15. Đặc biệt, phần tiếp xúc với môi trường đổi thành màu đen trước và sau đó lan đến các phần không được tiếp xúc với môi trường, các mẫu mô bị đổi màu da thành đen hoàn toàn sau ngày thứ 20. Chi tiết đặc điểm cấu trúc da và màu sắc thay đổi trong quá trình nuôi cấy có thể xem trong Hình 4 và Bảng 1.



Hình 4. Đặc điểm hình thái đại thể mẫu mô da nuôi cấy trong nghiên cứu. Màu sắc da thay đổi tại các thời điểm khác nhau tùy thuộc vào điều kiện nuôi.

Bảng 1. Các đặc điểm phân loại của da ở các điều kiện thử nghiệm được theo dõi trong 20 ngày (n = 3).

Điều kiện nuôi	Ngày	Thay đổi màu sắc	Thay đổi kích thước	Biến đổi cấu trúc	Dấu hiệu nhiễm khuẩn	Hoại tử
PBS	D0-D1	-	-	-	-	-
	D2 - D7	++	+	++	-	-
	D8 - D14	+++	+++	+++	-	+
	D15 - D18	+++	+++	+++	-	+
	D19 - D20	+++	+++	+++	-	+
MTDD	D0-D1	-	-	-	-	-
	D2 - D7	-	-	-	-	-

	D8 – D14	+	-	-	-	-
	D15 – D18	++	++	++	-	+
	D19 - D20	+++	+++	+++	-	+
MTDD+ WJ	D0-D1	-	-	-	-	
	D2 – D7	-	-	-	-	-
	D8 – D14	-	-	-	-	-
	D15 – D18	+	-	-	-	-
	D19 - D20	+	+	-	-	-

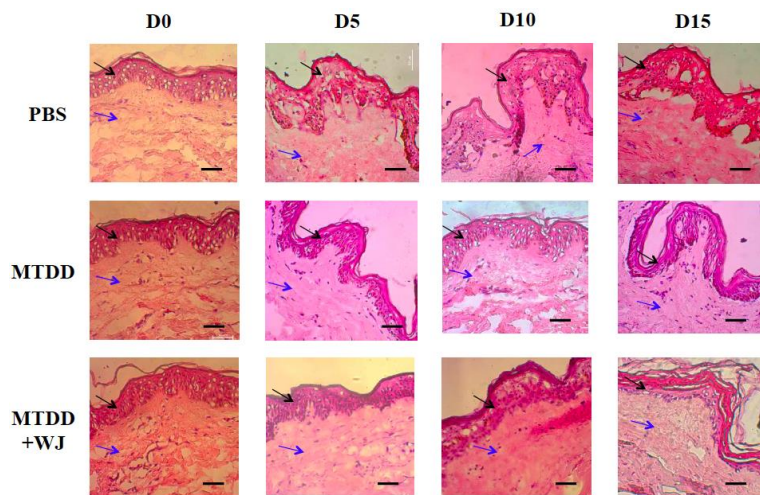
- *Màu sắc da*: thay đổi từ vàng nhạt sang nâu đen, trong đó: vàng nhạt tự nhiên: -, bắt đầu chuyển màu vàng đậm: +, chuyển màu nâu: ++, chuyển màu nâu đen hoại tử: +++
- *Kích thước*: kích thước mảnh mô da co nhỏ lại, trong đó không thay đổi kích thước: -, có dấu hiệu co lại: +, co lại ít: ++, co lại nhiều rõ rệt: +++
- *Cấu trúc da*: quan sát đặc điểm bong tróc da bên ngoài, trong đó: không bong tróc: -, có dấu hiệu bong tróc: +, bong tróc nhẹ: ++, bong tróc nhiều: +++
- *Nhiễm khuẩn*: không có dấu hiệu nhiễm khuẩn: -, có dấu hiệu nhiễm khuẩn nhẹ: +, có dấu hiệu nhiễm khuẩn trung bình: ++, có dấu hiệu nhiễm khuẩn nặng: +++
- *Hoại tử*: màu da nâu đen, có dấu hiệu bong tróc, kích thước thay đổi so với ban đầu.

3.3. Phân tích tiêu bản mô học

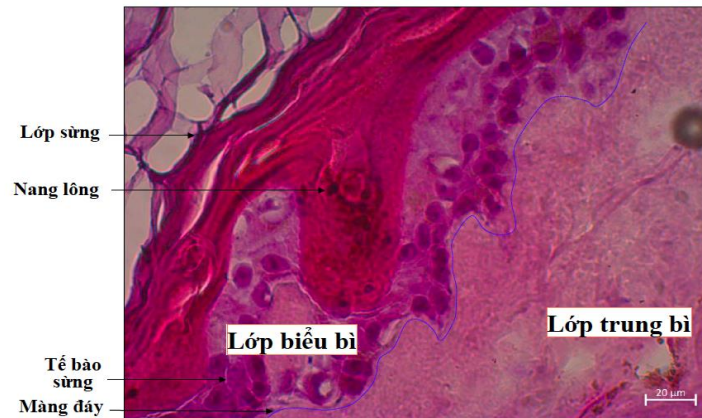
Tiếp theo, chúng tôi phân tích tiêu bản đánh giá sự toàn vẹn cấu trúc da bằng phương pháp nhuộm mô nhuộm H&E. Kết quả tiêu bản mô học cho thấy các mẫu mô ở các điều kiện thử nghiệm đều có đủ cấu trúc gồm 3 lớp biểu bì, trung bì và hạ bì (Hình 5). Đối với mẫu nuôi trong PBS, các vùng ở lớp thượng bì có dấu hiệu bị tách rời với nhau và bị bong khỏi lớp trung bì ở ngày thứ 5 và ngày thứ 10, hiện tượng này cũng xuất hiện ở mẫu nuôi

trong môi trường dinh dưỡng không có lớp WJ ở ngày thứ 15. Quan sát tiêu bản mô học các mẫu nuôi trong môi trường dinh dưỡng ở ngày thứ 10 không thấy có sự khác biệt đáng kể so với mẫu thu ngày đầu tiên (Hình 5).

Các mẫu mô ở điều kiện được bổ sung lớp WJ vẫn giữ được các cấu trúc đặc trưng của mô da ở ngày thứ 15 gồm biểu bì, trung bì, hạ bì, nang lông, các tế bào sừng, tế bào hắc tố da (melanocyte) (Hình 5, Hình 6).



Hình 5. Kết quả phân tích mô học đánh giá cấu trúc mô da nuôi *ex vivo* bằng phương pháp nhuộm H&E. Mũi tên đen chỉ lớp biểu bì; mũi tên xanh chỉ lớp trung bì; thanh tỷ lệ: 50 μm. MTDD: môi trường dinh dưỡng; MTDD + WJ: điều kiện môi trường dinh dưỡng kết hợp Wharton’s Jelly.



Hình 6. Tiêu bản mô học mẫu da ở ngày thứ 15 nuôi trong điều kiện môi trường dinh dưỡng có kết hợp lớp lót Wharton's Jelly.

4. Bàn luận

Với mục đích phát triển các phương pháp phù hợp để duy trì khả năng sống của mô da bên ngoài cơ thể, chúng tôi thử nghiệm nuôi mô da là phế phẩm sinh học từ phẫu thuật tạo hình thẩm mỹ trong điều kiện môi trường dinh dưỡng. Kết quả cho thấy rằng, tùy thuộc vào các điều kiện khác nhau thì mô da có thể duy trì sự sống bên ngoài cơ thể trong vòng 8 đến 15 ngày. Trong thời gian này, các đặc điểm quan sát bên ngoài gồm màu sắc và thể tích mô da không thay đổi. Khi phân tích cấu trúc mô của da thì thấy rằng mô da vẫn duy trì được cấu trúc các lớp và đặc điểm tế bào bình thường. Do vậy, phương pháp nuôi mô da trong môi trường dinh dưỡng (DMEM/F12 + 10% FBS) kết hợp lớp WJ từ mô dây rốn trong nghiên cứu này là phương pháp thích hợp để duy trì mô da *ex vivo* cho đến 15 ngày. Kết quả này tương đồng với các kết quả nghiên cứu trước đây về việc nuôi da *ex vivo* cũng kéo dài được đến 14 ngày trong phòng thí nghiệm [11, 12].

Trong nghiên cứu này, môi trường dinh dưỡng nuôi cấy tế bào thông thường (DMEM/F12 + 10% FBS) có thể sử dụng để duy trì khả năng sống của mô da trong một thời gian nhất định. Hơn nữa, việc kết hợp môi trường dinh dưỡng với WJ làm lớp lót mô có thể kéo dài thời gian sống của da hơn có thể là do WJ là một nguồn dồi dào các yếu tố tăng trưởng (IGFBP, TGF- α , PDGF-AA), cytokine

điều hoà miễn dịch (RANTES, IL-6R, IL-16), cytokine chống viêm (TNF-RI, TNF-RII, IL-1RA), cytokine liên quan đến quá trình liền thương (ICAM-1, G-CSF, GDF-1) cũng như hàm lượng lớn axit hyaluronic [22]. Mặc dù trước đây chưa có nghiên cứu nào sử dụng WJ để hỗ trợ nuôi mảnh mô da *ex vivo*, nhưng đã có nghiên cứu bổ sung yếu tố tăng trưởng như EGF, FGF, hydrocortisone, insulin-transferrin-selenite và vitamine E vào môi trường nuôi để tăng thời gian sống của mô da trong điều kiện phòng thí nghiệm [12]. Theo cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA), những nghiên cứu độc tính cấp như xét nghiệm Draize phải được thử nghiệm trên mắt hoặc da tối đa 14 ngày [23]. Do vậy, mô da nuôi theo điều kiện của nghiên cứu này hoàn toàn đáp ứng được thời gian trên. Điều này cho thấy rằng kết quả của nghiên cứu của chúng tôi chứng minh được khả năng mô da từ những phế phẩm sinh học sau phẫu thuật có thể nuôi và sử dụng cho thử nghiệm tiền lâm sàng để thay thế cho động vật sống đang gặp phải sự phản đối liên quan đến vấn đề đạo đức nói chung, cũng như sự phù hợp về tính hiệu quả tương thích với con người.

Một vấn đề cần lưu ý khi triển khai nghiên cứu này là kiểm soát vấn đề nhiễm khuẩn. Chúng tôi tiến hành bổ sung kháng sinh (P/S 1%) trong tất cả các dung môi bảo quản và môi trường nuôi mô da. Khi mẫu mô được vận chuyển đến phòng thí nghiệm, cần phải loại bỏ bất tác nhân gây nhiễm khuẩn bằng ngâm trong

ethanol 70% trong 1 phút trước khi tiến hành các bước tiếp theo. Đồng thời, các thao tác và nuôi trong điều kiện vô trùng. Sử dụng các biện pháp này, chúng tôi không quan sát thấy các dấu hiệu bị nhiễm khuẩn trong tất cả các mẫu nghiên cứu.

Bên cạnh các kết quả khả quan, nghiên cứu này cũng có những điểm yếu cần khắc phục trong các nghiên cứu về sau này. Thứ nhất, cỡ mẫu trong nghiên cứu còn nhỏ ($n = 3$), cần phải tăng số lượng cỡ mẫu lên, số lượng cỡ mẫu sẽ tùy theo kỳ vọng và sử dụng công cụ tính cỡ mẫu. Thứ hai là các quan sát chủ yếu là định tính, dựa vào quan sát đặc điểm bên ngoài và cấu trúc mô. Đồng thời, chưa có phân tích biểu hiện tế bào chết theo chu trình trong các lớp cấu trúc mô da. Cuối cùng, thiếu các định lượng các thành phần chính của cấu trúc ECM, chẳng hạn như collagen hay elastin trong lớp bì.

5. Kết luận

Mô da có thể duy trì đặc điểm hình thái và cấu trúc bên ngoài cơ thể bằng phương pháp nuôi bán tiếp xúc môi trường lỏng với điều kiện môi trường dinh dưỡng gồm DMEM/F12 có bổ sung huyết thanh thai bò và CaCl_2 trong vòng 8 đến 10 ngày, thời gian nuôi dưỡng có thể kéo dài đến 15 ngày khi kết hợp môi trường dinh dưỡng với lớp Wharton's Jelly từ mô dây rốn. Kết quả này cho thấy tính khả thi của việc sử dụng phế phẩm da như là một mô hình da tiềm năng có thể sử dụng cho các nghiên cứu dược sinh phẩm trong thời gian dưới 15 ngày. Điều này cũng có ý nghĩa đặc biệt quan trọng trong việc có thể tiếp tục nghiên cứu để làm nguồn mô da thử nghiệm thay thế cho các mô hình động vật nhằm mục đích nghiên cứu thuốc và mỹ phẩm bôi trên da.

Lời cảm ơn

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn nhóm nghiên cứu của PGS. TS. Nguyễn Lai Thành - Trung tâm Nghiên cứu Khoa học Sự sống, Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội đã hỗ trợ thực hiện nội dung xử lý mô học và nhuộm hoá mô.

Tài liệu tham khảo

- [1] G. A. V. Norman, Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials: is it Time to Rethink Our Current Approach? *JACC: Basic to Translational Science*, Vol. 4, No. 7, 2019, pp. 845-854.
- [2] T. Moniz, S. A. Costa Lima, S. Reis, Human Skin Models: From Healthy to Disease-Mimetic Systems; Characteristics and Applications. *British Journal of Pharmacology*, Vol. 177, No. 19, 2020, pp. 4314-4329.
- [3] S. Supe, P. Takudage, Methods for Evaluating Penetration of Drug into the Skin: A Review, *Skin Research and Technology*, Vol. 27, No. 3, 2021, pp. 299-308.
- [4] J. Ezendam, H. M. Braakhuis, R. J. Vandebriel, State of the Art in Non-Animal Approaches for Skin Sensitization Testing: from Individual Test Methods Towards Testing Strategies, *Archives of Toxicology*, Vol. 90, 2016, pp. 2861-2883.
- [5] T. Franz, P. Lehman, S. Raney, Use of Excised Human Skin to Assess the Bioequivalence of Topical Products, *Skin Pharmacology and Physiology*, Vol. 22, No. 5, 2009, pp. 276-286.
- [6] N. N. Ghalehlou, A. Feizkhal, M. Mobayen, Z. P. Bejarpasi, S. Shekarchi, A. M. Roushandeh, M. H. Roudkenar, Plumping up a Cushion of Human Biowaste in Regenerative Medicine: Novel Insights into a State-of-the-Art Reserve Arsenal, *Stem Cell Reviews and Reports*, Vol. 18, No. 8, 2022, pp. 2709-2739.
- [7] M. O. Danso, T. Berkers, A. Mieremet, F. Hausil, J. A. Bouwstra, An ex vivo Human Skin Model for Studying Skin Barrier Repair, *Experimental Dermatology*, Vol. 24, No. 1, 2015, pp. 48-54.
- [8] W. Xu, S. J. Hong, S. Jia, Y. Zhao, R. D. Galiano, T. A. Mustoe, Application of a Partial-Thickness Human ex vivo Skin Culture Model in Cutaneous Wound Healing Study, *Laboratory Investigation*, Vol. 92, No. 4, 2012, pp. 584-599.
- [9] M. Nakamura, T. Rikimaru, T. Yano, K. G. Moore, P. J. Pula, B. H. Schofield, A. M. Dannenberg Jr, Full-thickness Human Skin Explants for Testing the Toxicity of Topically Applied Chemicals, *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 95, No. 3, 1990, pp. 325-332.
- [10] K. Guilloteau, I. Paris, N. Pedretti, K. Boniface, F. Juchaux, V. Huguier, G. Guillet, F. X. Bernard, J. C. Lecron, F. Morel, Skin Inflammation Induced by the Synergistic Action of IL-17A, IL-22, Oncostatin M, IL-1 α , and TNF- α

- Recapitulates some Features of Psoriasis, *The Journal of Immunology*, Vol. 184, No. 9, 2010, pp. 5263-5270.
- [11] D. E. C. León, C. A. Munro, D. M. MacCallum, An ex vivo Human Skin Model to Study Superficial Fungal Infections. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 10, 2019, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01172>.
- [12] L. Zhou, W. Ji, T. Dicolandrea, D. Finlay, D. Supp, S. Boyce, K. Wei, A. L. Kadekaro, Y. Zhang, An Improved Human Skin Explant Culture Method for Testing and Assessing Personal Care Products, *Journal of Cosmetic Dermatology*, Vol. 22, No. 5, 2023, pp. 1585-1594.
- [13] J. Lai, H. Maibach, Experimental Models in Predicting Topical Antifungal Efficacy: Practical Aspects and Challenges, *Skin Pharmacology and Physiology*, Vol. 22, No. 5, 2009, pp. 231-239.
- [14] H. Yousef, M. Alhaji, S. Sharma, *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis.*, in *StatPearls [Internet]*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.
- [15] P. Kolarsick, M. A. Kolarsick, C. Goodwin, *Anatomy and Physiology of the Skin*, *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, Vol. 3, 2011, pp. 203-213.
- [16] S. Eberlin, M. S. D. Silva, G. Facchini, G. H. D. Silva, A. L. T. A. Pinheiro, S. Eberlin, A. D. S. Pinheiro, The ex vivo Skin Model as an Alternative Tool for the Efficacy and Safety Evaluation of Topical Products. *Alternatives to Laboratory Animals*, Vol. 48, No. 1, 2020, pp. 10-22.
- [17] S. Chen, J. Schoen, Air-liquid Interface Cell Culture: From Airway Epithelium to the Female Reproductive Tract, *Reproduction in Domestic Animals*, Vol. 54, 2019, pp. 38-45.
- [18] A. Can, S. Karahuseyinoglu, Concise Review: Human Umbilical Cord Stroma with Regard to the Source of Fetus-Derived Stem Cells, *Stem Cells*, Vol. 25, No. 11, 2007, pp. 2886-2895.
- [19] P. Dan, É. Velot, G. Francius, P. Menu, V. Decot, Human-derived Extracellular Matrix from Wharton's Jelly: An Untapped Substrate to Build up a Standardized and Homogeneous Coating for Vascular Engineering, *Acta Biomaterialia*, Vol. 48, 2017, pp. 227-237.
- [20] J. Huang, S. Heng, W. Zhang, Y. Liu, T. Xia, C. Ji, L. J. Zhang, Dermal Extracellular Matrix Molecules in Skin Development, Homeostasis, Wound Regeneration and Diseases, In *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Elsevier, 2022.
- [21] K. Sobolewski, A. Małkowski, E. Bańkowski, S. Jaworski, Wharton's Jelly as a Reservoir of Peptide Growth Factors, *Placenta*, Vol. 26, No. 10, 2005, pp. 747-752.
- [22] A. Gupta, S. F. E. Amin, H. J. Levy, R. S. Tu, S. E. Ibim, N. Maffulli, Umbilical Cord-derived Wharton's Jelly for Regenerative Medicine Applications, Vol. 15, No. 1, 2020, pp. 49.
- [23] J. L. Bormann, H. I. Maibach, Draize Human Repeat Insult Patch Test (HRIPT): Seven Decades of Pitfalls and Progress, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 121, 2021, pp. 104867.