

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG NỒNG ĐỘ HUYẾT THANH BÀO THAI BÒ LÊN TỶ LỆ TĂNG SINH CỦA PHÂN ĐOẠN TẾ BÀO TẠO MẠCH NỀN (SVF) TỪ MÔ MỠ CHÓ

Trần Nguyễn Bảo Anh¹, Nguyễn Thị Bé Mười², Trần Thị Thanh Khương^{1,*}

¹Phòng Thí nghiệm Tế bào gốc, Viện Công nghệ sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Thú y, Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

*Email: tttkhuong@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của các nồng độ huyết thanh bào thai bò (FBS) khác nhau đến khả năng tăng sinh của phân đoạn tế bào tạo mạch nền (SVF), một hỗn hợp tế bào có chứa tế bào gốc trung mô (MSCs), được phân lập từ mô mỡ chó bằng enzyme collagenase 0,1%. SVF được nuôi cấy trong 48 giờ với các nồng độ FBS 0%, 3%, 5%, 8%, 10%. Kết quả cho thấy, nồng độ FBS 8% đạt mật độ tế bào sống cao nhất, $51,17 \times 10^4$ tế bào/mL ($p < 0,05$), đồng thời không có thay đổi về hình thái tế bào giữa các nồng độ FBS. Nghiên cứu cung cấp dữ liệu thực nghiệm về tối ưu hóa môi trường nuôi cấy SVF, hỗ trợ hiệu quả của phương pháp phân lập MSCs từ mô mỡ chó. Những phát hiện này mở ra tiềm năng ứng dụng SVF và MSCs trong điều trị các bệnh lý ở chó, với các nghiên cứu tiếp theo tập trung vào khả năng biệt hóa và các ứng dụng lâm sàng của SVF trong y học tái tạo thú y.

Từ khóa: Huyết thanh bào thai bò, mô mỡ chó, phân đoạn tế bào tạo mạch nền (SVF), tế bào gốc trung mô (MSCs), y học tái tạo thú y.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong y học tái tạo, tế bào gốc trung mô (Mesenchymal Stem Cells, MSCs), đặc biệt là tế bào gốc trung mô từ mô mỡ (Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells, AD-MSCs), đã thu hút sự chú ý nhờ vào khả năng tự tái tạo, biệt hóa đa dạng và điều hòa miễn dịch của chúng, mở ra triển vọng mới trong điều trị các bệnh lý thoái hóa, tổn thương mô và bệnh tự miễn dịch [1, 2]. Được phân lập từ mô mỡ, phân đoạn tế bào tạo mạch nền (SVF) chứa nhiều loại tế bào khác nhau như MSCs, tế bào nội mô, tế bào pericyte và tế bào miễn dịch, làm cho SVF trở thành nguồn cung cấp MSCs dễ tiếp cận mà không cần quy trình tinh sạch phức tạp [3 - 5]. Nhờ tính chất đa dạng tế bào, SVF còn giữ lại các yếu tố hỗ trợ quan trọng, giúp tăng cường khả năng chữa lành và hỗ trợ chức năng MSCs trong môi trường sinh học đa dạng của cơ thể. Điều này tạo điều kiện để SVF được sử dụng trực tiếp như một nguồn MSC hiệu quả, đặc biệt trong các ứng dụng tái tạo xương khớp ở thú y.

SVF có tiềm năng lớn trong y học tái tạo thú y nhờ vào khả năng tái tạo mô và điều hòa phản ứng viêm của MSCs, đặc biệt hữu ích trong điều trị các bệnh mãn tính và tổn thương ở động vật. Chó là mô hình động vật lý tưởng trong nghiên cứu bệnh lý xương khớp và viêm nhiễm, do cấu trúc xương khớp của chúng có nhiều điểm tương đồng với con người [3, 4]. Các nghiên cứu cho thấy, MSCs từ SVF có thể biệt hóa thành mô xương, sụn và góp phần giảm viêm, đặc biệt hiệu quả trong điều trị viêm xương khớp (OA) ở chó, một căn bệnh phổ biến gây đau và giảm chất lượng cuộc sống của thú cưng, nhất là khi chúng già đi [3]. Sử dụng SVF hoặc MSCs từ SVF trong điều trị OA đã cho thấy nhiều hứa hẹn trong việc giảm đau và cải thiện chức năng khớp. Đồng bằng sông Cửu Long là một khu vực đa dạng sinh học và có ngành chăn nuôi phát triển mạnh, là môi trường phù hợp cho các nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học tiên tiến. Đây là nghiên cứu đầu tiên trong khu vực đánh giá ảnh hưởng của nồng độ huyết thanh bào

thai bò (Fetal Bovine Serum, FBS) lên khả năng tăng sinh của SVF, qua đó mở ra hướng phát triển các phương pháp nuôi cấy hiệu quả cho tế bào gốc từ mô mỡ [5 – 8].

Nghiên cứu này không phân lập MCSs mà thay vào đó là phân lập SVF, qua đó gián tiếp đánh giá khả năng tăng sinh của MSCs trong môi trường tế bào hỗn hợp này. Phương pháp tiếp cận gián tiếp này cho phép nghiên cứu ảnh hưởng của các nồng độ FBS khác nhau trong một môi trường gần với sinh lý học tự nhiên của tế bào, đồng thời phù hợp với mục tiêu tìm ra điều kiện tối ưu để nuôi cấy MSCs trong y học thú y. Mục tiêu chính của nghiên cứu là xác định nồng độ FBS tối ưu để đạt được mật độ tế bào cao nhất và duy trì hình thái ổn định của SVF, tạo cơ sở khoa học cho các ứng dụng tế bào gốc trong điều trị lâm sàng. Kết quả này sẽ mở ra triển vọng cho việc sử dụng SVF và MSCs từ SVF trong điều trị các bệnh lý thường gặp ở chó như bệnh xương khớp và viêm mãn tính, góp phần nâng cao hiệu quả điều trị trong y học thú y.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, hóa chất và dụng cụ

- *Vật liệu*: Mô mỡ bụng chó thu từ các phòng khám thú y trong thành phố Cần Thơ. Mục đích nghiên cứu, phương pháp và ý nghĩa nghiên cứu đã được Hội đồng Tư vấn đạo đức trong nghiên cứu động vật, Trường Đại học Cần Thơ xét duyệt và thông qua với mã số: CTU-AEC24027.

- *Hóa chất và dụng cụ*: Môi trường hoàn chỉnh DMEM Low Glucose (Gibco), FBS (Gibco), penicillin-streptomycin (Gibco), L-glutamine (Gibco), trypsin/EDTA 0,25% (Gibco), trypan blue (Sigma-Aldrich), collagenase I C0130 (Sigma-Aldrich)... Dụng cụ thí nghiệm: Đĩa nuôi cấy 24 giếng, chai nuôi T25, ống nghiệm, pipet, tủ cấy vô trùng, kính hiển vi, lưới lọc tế bào 100 μ m (Biologix), máy ly tâm, buồng đếm hồng cầu Neubauer...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thu thập mô mỡ: Mô mỡ bụng tươi được thu thập từ các phòng khám thú y trong thành phố Cần Thơ. Các mẫu mô (khoảng 5 mm³) được vận chuyển trong dung dịch bảo quản chứa 1%

penicillin-streptomycin (100X, Gibco) và được đặt trong các lọ đựng mẫu tiết trùng có ký hiệu nhận diện rõ ràng. Toàn bộ mẫu được bảo quản trong thùng xốp có đá lạnh để duy trì nhiệt độ thấp trong quá trình vận chuyển về phòng thí nghiệm.

Xử lý sơ bộ: Tại phòng thí nghiệm, trong điều kiện vô trùng, mô mỡ được xử lý bằng cách rửa 4 - 5 lần với dung dịch phosphate-buffered saline tiết trùng (PBS 1X, Sigma-Aldrich) để loại bỏ các tạp chất như tơ máu và các phần mô hoại tử quan sát được. Sau khi rửa, mô mỡ được cắt thành các khối nhỏ có kích thước khoảng 2 – 3 mm² nhằm tạo điều kiện thuận lợi cho các bước xử lý và nuôi cấy tiếp theo.

2.2.1. Phân lập và nuôi cấy SVF từ mô mỡ

Phân giải mô bằng enzyme collagenase: Các mảnh mô sau khi xử lý để yên trong 5 phút tách pha nước khỏi phần chất béo. Sau đó, 5 - 10 g mỡ được xử lý bằng 10 mL dung dịch collagenase 0,1% trong PBS 1X ở 37°C và 5% CO₂ trong 2 giờ. Trong quá trình này, dung dịch được vortex nhẹ mỗi 30 phút trong 30 giây. Sau khi phân giải hoàn tất, dung dịch collagenase được trung hòa bằng 10 mL (DMEM) chứa 10% FBS và 1% penicillin-streptomycin. Dung dịch sau đó được lọc qua màng lọc tế bào 100 μ m (Biologix, Hoa Kỳ) để loại bỏ mô chưa được phân giải hoàn toàn.

Ly tâm và thu hồi tế bào: Dịch lọc sau phân giải được ly tâm ở 300 x g trong 30 phút ở 4°C để thu cặn chứa các tế bào. Dịch nổi sau ly tâm chứa phần lớn tế bào mỡ được loại bỏ. Cặn tế bào được rửa hai lần với PBS 1X để loại bỏ hoàn toàn các tạp chất, đặc biệt là giọt mỡ còn sót lại. Cuối cùng, cặn tế bào được hoà tan trong 1 mL môi trường nuôi cấy ấm (DMEM với 10% FBS) và chuyển vào các chai nuôi.

Xác định tỷ lệ sống của tế bào: Số lượng tế bào sống được xác định bằng phương pháp nhuộm trypan blue (Sigma-Aldrich), dựa trên nguyên tắc loại trừ tế bào chết. Mật độ tế bào sống được tính toán chính xác để tiến hành nuôi cấy.

Nuôi cấy in vitro: Sau khi ủ trong tủ nuôi ấm (37°C, 5% CO₂) trong 24 giờ, phần tế bào không bám dính được loại bỏ bằng cách rửa mẫu 1 - 2 lần bằng PBS 1X. Môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh

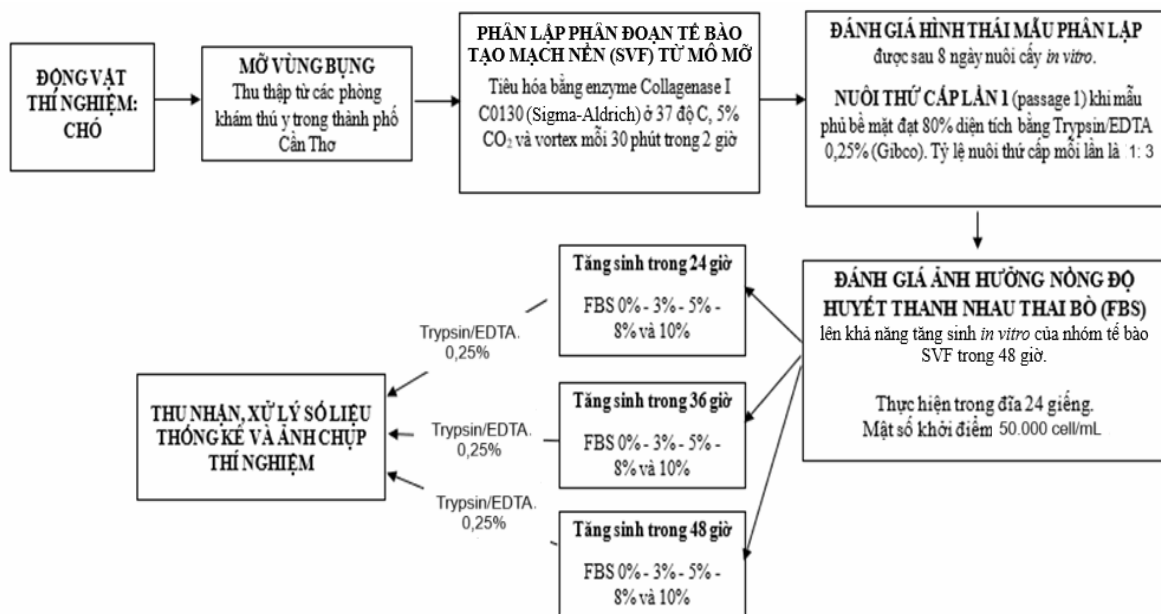
(DMEM với 10% FBS) được thay mới 2 ngày. Tiến hành nuôi cấy thứ cấp (passage 1) sau 8 ngày khi tế bào đạt độ phủ khoảng 80% đáy chai. Việc tách tế bào được thực hiện bằng dung dịch trypsin/EDTA 0,25% (Gibco) với tỷ lệ tách 1: 3 cho mỗi lần nuôi cấy thứ cấp.

2.2.2. Thiết kế thí nghiệm

Thí nghiệm được thiết kế để xác định tác động của các nồng độ FBS khác nhau đến khả năng tăng sinh của SVF. Nhóm đối chứng âm - dương được thiết lập với các tế bào nuôi cấy trong môi trường không chứa FBS (0% FBS) và môi trường nuôi khởi điểm (10% FBS), nhằm tạo cơ sở so sánh với các nghiệm thức khác. Các nghiệm thức thí nghiệm

gồm các nhóm tế bào được nuôi cấy trong môi trường chứa FBS với các nồng độ lần lượt là 3%, 5%, 8%. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Toàn bộ quá trình thí nghiệm được thể hiện ở hình 1.

Khả năng tăng sinh của tế bào được đánh giá thông qua lượng tế bào sống đếm trực tiếp tại các thời điểm 24, 36 và 48 giờ sau khi nuôi cấy, bằng cách tách tế bào với trypsin/EDTA 0,25%, trung hòa và đếm số lượng bằng buồng đếm, nhuộm trypan blue được sử dụng để xác định tỷ lệ sống. Ngoài ra, hình thái học của tế bào được đánh giá thông qua quan sát dưới kính hiển vi, để theo dõi sự thay đổi về hình dạng, kích thước và các đặc điểm khác của tế bào trong suốt quá trình nuôi cấy.



Hình 1. Sơ đồ mô tả quá trình thực hiện khảo sát ảnh hưởng FBS lên tỷ lệ tăng sinh SVF phân lập trực tiếp từ mô mỡ

2.3. Phân tích thống kê

Số liệu được ghi nhận bằng phần mềm Excel 2019. Mô hình hỗn hợp tuyến tính ANOVA được sử dụng để phân tích dữ liệu, sau đó so sánh giá trị trung bình giữa các nghiệm thức bằng phương pháp Turkey trong phần mềm Minitab 2016. Các kết quả được trình bày $\pm$ sai số chuẩn (SE). Ý nghĩa thống kê được đặt ở $p < 0,05$ cho thấy, mức độ đáng tin cậy cao đối với kết quả thu được. Hình ảnh biểu đồ được vẽ bằng phần mềm R.4.3.1.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc trưng hình thái của SVF phân lập và nuôi cấy được

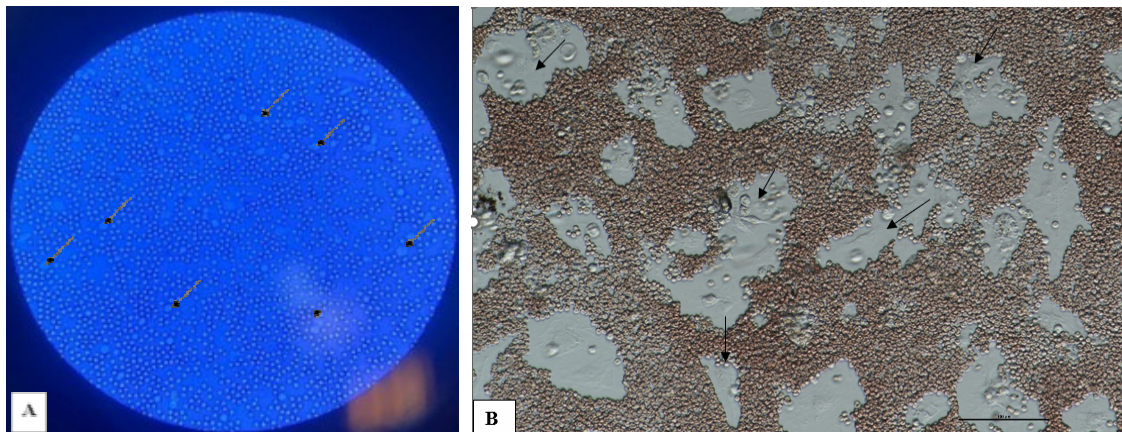
Quá trình phân lập SVF đã được thực hiện thành công thông qua phương pháp sử dụng enzyme collagenase. Sau khi phân lập, các tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM bổ sung FBS với các nồng độ khác nhau. Kết quả cho thấy, SVF có khả năng bám dính và tăng sinh mạnh mẽ trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Sau 24 giờ nuôi cấy, các tế bào bắt đầu bám dính lên bề mặt đĩa

nuôi cấy, với hình dạng ban đầu tương đối tròn, sau đó dần lan rộng. Một số tế bào đã xuất hiện hình thái thon dài và đa cực, điển hình của nguyên bào sợi, chứng tỏ quá trình phân lập thành công và tế bào đang thích nghi với môi trường nuôi cấy (Hình 2). Các tế bào không thể bám dính sẽ bị loại dần theo mỗi lần thay mới môi trường nuôi cấy.

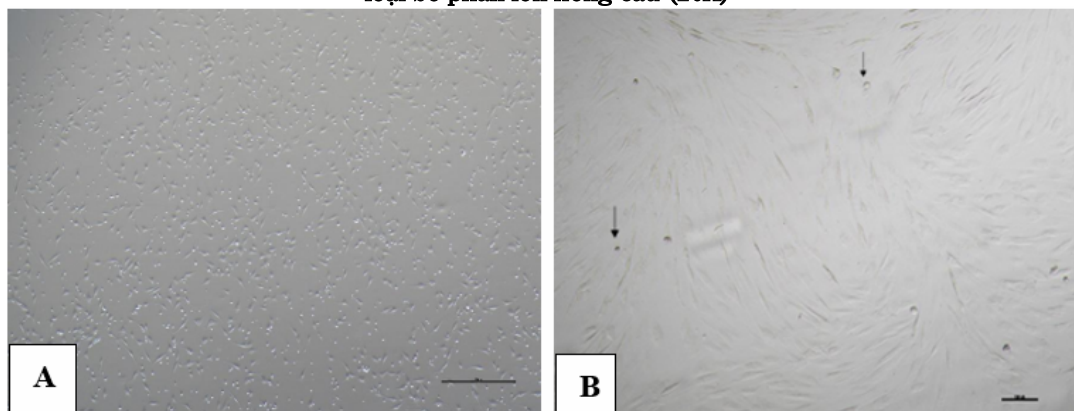
Việc thu nhận ASC từ những nơi khác nhau trên cơ thể từ những năm đầu thế kỷ thứ XXI là một trong những mối quan tâm hàng đầu của giới khoa học. Các vùng từ da đuôi, xương bả vai, liềm, vùng bẹn, dây chằng và mô mỡ bao quanh buồng trứng được cho là những vùng có tiềm năng phân lập ASC nhất trên loài chó [3, 4]. Mặc dù vậy, SVF ở chó được sử dụng rộng rãi trong các phòng khám thú y, nhưng có rất ít nghiên cứu điều tra thành phần tế bào của SVF mới phân lập cũng như kiểu hình miễn dịch của chúng [5 - 8].

Sau 4 ngày, các tế bào bám chặt hơn, hình thành các cụm nhỏ và tiếp tục phát triển. Đến ngày thứ 8, các cụm tế bào lớn hơn rõ rệt, phản ánh khả năng tăng sinh và thích nghi tốt của tế bào (Hình 3). Sau 16 và 24 ngày nuôi cấy, tế bào SVF đã phủ kín bề mặt đĩa nuôi cấy, tạo thành một lớp tế bào liên tục và đồng nhất. Hình thái tế bào đồng đều, thể hiện sự ổn định và khả năng tăng sinh mạnh mẽ của quần thể tế bào qua thời gian (Hình 4). Tóm lại, quá trình phân lập và nuôi cấy SVF từ mô mỡ chó đã đạt kết quả khả quan. Các tế bào này thể hiện đặc tính bám dính, tăng sinh nhanh và có hình dạng điển hình của MSC, tạo tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về tiềm năng ứng dụng của SVF trong y học tái tạo.

Hình 2 cho thấy, các tế bào thu được (mũi tên màu đen) chen lẫn giữa hồng cầu vỡ ra từ mạch máu trong các khối mô. Thước đo: 100 μm .

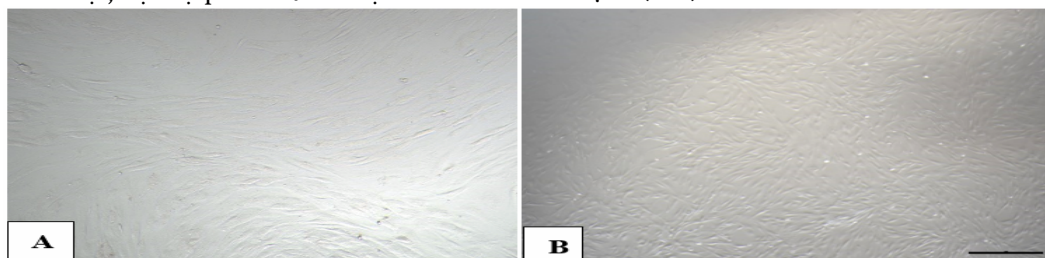


Hình 2. (A) Mẫu phân đoạn mô mỡ được nhuộm với trypan blue sau khi xử lý bằng enzyme collagenase 0,1% xem dưới kính hiển vi quang học 40X và (B) mẫu tế bào sau 24 giờ nuôi cấy *in vitro* trước khi rửa loại bỏ phần lớn hồng cầu (20X)



Hình 3. (A) SVF sau 4 ngày nuôi cấy *in vitro* (4X) và (B) 8 ngày nuôi cấy *in vitro* (10X)

Hình 3 cho thấy, các tế bào đã bám dính hoàn toàn, độ phủ bề mặt đáy đạt 50% ở ngày thứ 4 sau phân lập. Ở ngày thứ 8 sau phân lập, các cụm tế bào có hình dạng thon dài, đã hợp dòng như nguyên bào sợi, đạt độ phủ 80% bề mặt chai nuôi.



Hình 4. (A) SVF sau 16 ngày nuôi cấy *in vitro* (10X) và (B) 24 ngày nuôi cấy *in vitro* (4X).

Hình 4 cho thấy, các cụm tế bào đã hình thành, bám dính hoàn toàn, độ phủ bề mặt đáy đạt 80%. Hình thái tế bào quan sát được ở cuối giai đoạn cấy thứ cấp lần 2 và 3 có dạng đồng nhất với hình thái mẫu phân lập trực tiếp sau 8 ngày *in vitro*. Thước đo: 500 µm.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ FBS đến khả năng tăng sinh của SVF

Nghiên cứu nhằm đánh giá ảnh hưởng của FBS đến khả năng tăng sinh của SVF trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Số lượng tế bào của mỗi mẫu được nhuộm trypan blue và đếm bằng buồng đếm hồng cầu ở ngày 8, chuẩn bị cho giai đoạn cấy thứ cấp lần 1. Mật số tế bào sống thu được từ $0,85 \times 10^6$ - $1,1 \times 10^6$ cell/mL ($\pm 0,2 \times 10^6$).

Các tế bào SVF được tách ra khỏi bề mặt nuôi cấy bằng phương pháp trypsin/EDTA 0,25% và được phân phối vào các đĩa 24 giếng với mật độ ban đầu là 5×10^4 tế bào/mL. Môi trường nuôi cấy sử dụng DMEM (glucose 1 g/L) bổ sung các nồng

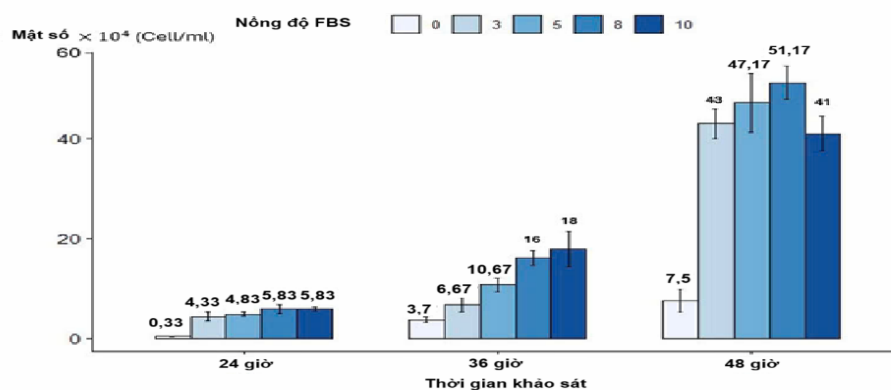
Các tế bào có sức sống yếu hơn, cuộn tròn (mũi tên đen) trên mặt lớp tế bào hình dạng sợi thon dài. Ở giai đoạn này, mẫu có thể tiến hành nuôi cấy thứ cấp lần 1. Thước đo độ dài: 500 µm (4X) và 100 µm (10X).

độ FBS khác nhau, bao gồm: 0%, 3%, 5%, 8%, 10%. Sau 48 giờ nuôi cấy, mật độ tế bào sống được xác định thông qua phương pháp nhuộm trypan blue. Kết quả cho thấy, SVF tăng sinh tốt nhất trong môi trường chứa 8% FBS, đạt mật độ cao nhất tại thời điểm 48 giờ, trong khi tế bào nuôi cấy trong môi trường không chứa FBS có tốc độ tăng sinh chậm nhất. Điều này khẳng định rằng, FBS đóng vai trò quan trọng trong việc cung cấp các yếu tố tăng trưởng cần thiết cho sự phát triển và tăng sinh của SVF [8 - 11]. Hình 5 thể hiện rõ ràng ảnh hưởng của nồng độ FBS đến khả năng tăng sinh của SVF cho thấy, sự khác biệt đáng kể về mật độ tế bào giữa nhóm đối chứng dương (10% FBS) và nhóm đối chứng âm (0% FBS) với ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Những phát hiện này cho thấy, tầm quan trọng của FBS trong việc tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy cho tế bào gốc trung mô, mở ra triển vọng cho các nghiên cứu và ứng dụng trong y học tái tạo.

Bảng 1. Mật độ tế bào sống sau thời gian 24, 36 và 48 giờ (mean $\pm$ SE, N = 3)

Nồng độ FBS (%)	Mật số tế bào sống ($\times 10^4$)		
	24 giờ	36 giờ	48 giờ
0	$0,33^d \pm 0,14$	$3,7^{b,c,d} \pm 0,46$	$7,5^{c,d} \pm 1,84$
3	$4,33^{c,d} \pm 1,96$	$6,67^{c,d} \pm 1,16$	$43^{a,b,c} \pm 8,72$
5	$4,83^{c,d} \pm 2,14$	$10,67^{b,c,d} \pm 1,16$	$47,17^{a,b} \pm 9,32$
8	$5,83^{c,d} \pm 3,04$	$16^{a,b,c,d} \pm 1,18$	$51,17^a \pm 12,40$
10	$5,83^{c,d} \pm 2,41$	$18^{a,b,c,d} \pm 2,84$	$41^{a,b,c} \pm 2,83$

Ghi chú: ^{a, b, c, d} trong bảng không cùng ký hiệu có ý nghĩa khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$).

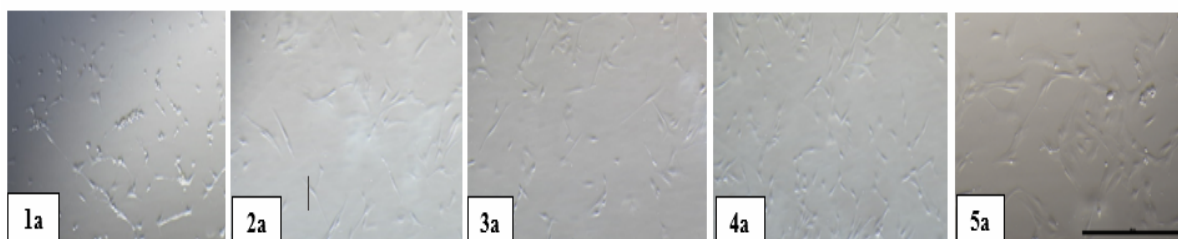


Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ FBS đến mật số tế bào SVF tăng sinh *in vitro* sau thời gian 24, 36 và 48 giờ nuôi cấy

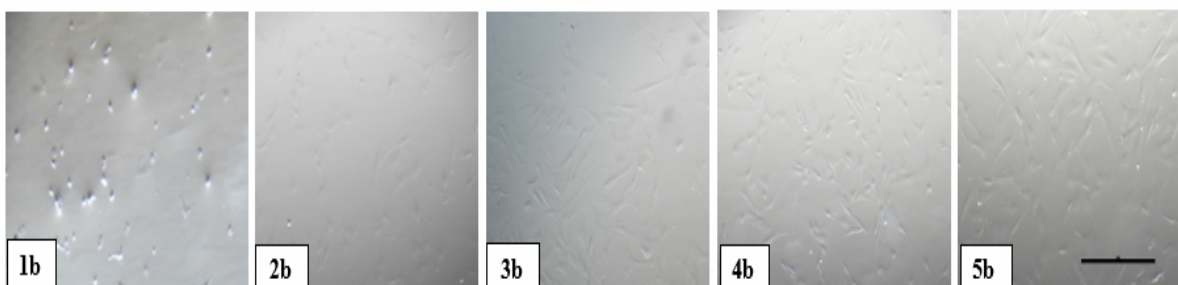
3.3. Ảnh hưởng của FBS đến hình thái tế bào *in vitro*

Hình thái của tế bào được quan sát ở từng nồng độ FBS trong ba mốc thời gian khác nhau bằng kính hiển vi quang học với độ phóng đại 4X. Ảnh chụp của các quần thể cAD-MSC được nuôi cấy ở các nồng độ FBS đã được trình bày theo trình tự thời gian 24 giờ (Hình 6), 36 giờ (Hình 7) và 48 giờ (Hình 8). Kết quả cho thấy, không có sự khác biệt đáng kể về mặt hình thái của các quần thể tế bào *in vitro* khi nồng độ FBS nằm trong khoảng từ 3 - 10%. Ngược lại, quần thể cAD-MSC

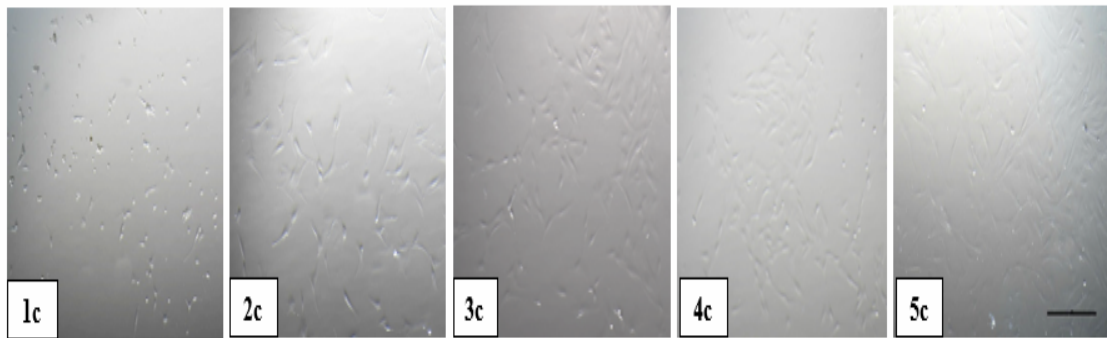
nuôi cấy trong môi trường không chứa FBS thể hiện sự khác biệt rõ rệt về hình thái. Cụ thể, tế bào trong điều kiện thiếu hụt FBS có xu hướng nhỏ hơn, co lại và ít bám dính hơn, cho thấy sự suy giảm khả năng sống sót và nhân lên của tế bào. Những kết quả này chứng minh rằng, nồng độ FBS trong môi trường nuôi cấy đóng vai trò thiết yếu trong việc duy trì hình thái và khả năng tăng sinh của SVF, đồng thời nhấn mạnh tầm quan trọng của các yếu tố tăng trưởng có trong FBS đối với sự phát triển và duy trì quần thể tế bào trong điều kiện *in vitro*.



Hình 6. SVF sau 24 giờ nuôi tăng sinh theo các mức nồng độ FBS
(1a) nồng độ FBS 0%; (2a) nồng độ FBS 3%; (3a) nồng độ FBS 5%; (4a) nồng độ FBS 8%;
(5a) nồng độ FBS 10%. Thang tỷ lệ = 500 μ m



Hình 7. SVF sau 36 giờ nuôi tăng sinh theo các mức nồng độ FBS
(1b) nồng độ FBS 0%; (2b) nồng độ FBS 3%; (3b) nồng độ FBS 5%; (4b) nồng độ FBS 8%;
(5b) nồng độ FBS 10%. Thang tỷ lệ = 500 μ m



Hình 8. SVF sau 48 giờ nuôi tăng sinh theo các mức nồng độ FBS
(1c) nồng độ FBS 0%; (2c) nồng độ FBS 3%; (3c) nồng độ FBS 5%; (4c) nồng độ FBS 8%;
(5c) nồng độ FBS 10%. Thang tỷ lệ = 500 μ m

3.4. Thảo luận

Nghiên cứu đã phân lập thành công và nuôi cấy các tế bào thuộc SVF từ mô mỡ của chó bằng phương pháp enzyme collagenase kết hợp với xử lý cơ học. Phương pháp này không chỉ tách chiết SVF hiệu quả mà còn giữ được tính toàn vẹn của tế bào, giúp duy trì khả năng bám dính và tăng sinh mạnh mẽ trong môi trường nuôi cấy *in vitro* [12]. Kết quả này khẳng định rằng, collagenase là một phương pháp phù hợp để thu nhận SVF từ mô mỡ, đồng thời làm rõ giá trị tiềm năng của SVF như một nguồn chứa tế bào gốc đầy triển vọng trong y học tái tạo thú y [2 - 6], [13 - 15].

Một trong những phát hiện quan trọng của nghiên cứu là kiểu hình của các tế bào SVF có sự tương đồng lớn với MSCs, đặc biệt trong các đặc điểm hình thái và khả năng bám dính bề mặt. Điều này cho thấy, SVF chứa tỉ lệ lớn MSCs [3 - 5], [16]. Kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, nồng độ FBS 8% là tối ưu cho sự tăng sinh của các tế bào SVF, đạt mật độ tế bào cao nhất tại thời điểm 48 giờ nuôi cấy. FBS đóng vai trò quan trọng cung cấp các yếu tố tăng trưởng như: Insulin-like growth factor (IGF), platelet-derived growth factor (PDGF) và fibroblast growth factor (FGF), vốn có khả năng kích thích sự phân chia tế bào và tăng sinh khối lượng tế bào [17, 18]. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả của các nghiên cứu khác trên MSCs từ nhiều nguồn khác nhau, đồng

thời cho thấy rằng, điều kiện tối ưu của FBS có thể thay đổi phụ thuộc vào loại tế bào và đặc điểm nuôi cấy [19].

Mặc dù FBS là nguồn cung cấp yếu tố tăng trưởng quan trọng, nhưng vẫn còn nhiều thách thức liên quan đến sự thay đổi về chất lượng và thành phần của FBS, ảnh hưởng bởi yếu tố như: Tuổi, giới tính và tình trạng dinh dưỡng của động vật [8, 20, 21]. Biến động này có thể gây ra sự khác biệt trong kết quả thí nghiệm giữa các nghiên cứu. Theo Liu và cs (2023) [8], cần kiểm soát chặt chẽ thành phần FBS để cải thiện độ lặp lại của các kết quả thực nghiệm, đặc biệt là trong các nghiên cứu liên quan đến phản ứng miễn dịch của tế bào.

Ngoài ra, việc sử dụng FBS trong nghiên cứu đang gặp phải các vấn đề đạo đức về phúc lợi động vật, dẫn đến nhu cầu thay thế FBS bằng các yếu tố tăng trưởng tổng hợp hoặc huyết thanh tự thân từ động vật cùng loài [7, 21, 22]. Tuy nhiên, hiệu quả của các phương pháp thay thế này đối với sự tăng sinh và biệt hóa của SVF vẫn cần được đánh giá thêm.

Nghiên cứu đã cung cấp nền tảng khoa học cho việc sử dụng SVF trong y học tái tạo thú y tại Việt Nam, đặc biệt trong điều trị các bệnh lý ở chó như thoái hóa khớp và bệnh tim mạch [23, 24]. Kết quả này không chỉ đóng góp vào sự phát triển của công nghệ tế bào gốc trong thú y mà còn mang tiềm năng ứng dụng trong các nghiên cứu y học tái tạo cho các loài động vật khác.

4. KẾT LUẬN

Đã phân lập thành công và nuôi cấy SVF từ mô mỡ chó bằng enzyme collagenase cho thấy, nồng độ FBS 8% là tối ưu cho sự tăng sinh và sức sống của tế bào, trong đó các tế bào có đặc điểm hình thái tương đồng với MSCs. Kết quả này mở ra tiềm năng ứng dụng SVF chứa MSCs trong điều trị bệnh lý ở chó, góp phần phát triển y học tái tạo thú y. Các nghiên cứu tiếp theo sẽ tập trung vào khả năng biệt hóa của SVF để tối ưu hóa ứng dụng trong lâm sàng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Cần Thơ, mã số: T2024-130.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Argentati, C., Morena, F., Bazzucchi, M., Armentano, I., Emiliani, C. & Martino, S. (2018). Adipose stem cell translational applications: from bench-to-bedside. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3475.
2. Regmi, S., Pathak, S., Kim, J. O., Yong, C. S. & Jeong, J. H. (2019). Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: challenges, opportunities and future perspectives. *European Journal of Cell Biology*, 98(5 - 8), 151041.
3. Teunissen, M., Verseijden, F., Riemers, F. M., Van Osch, G. J. V. M. & Tryfonidou, M. A. (2021). The lower in vitro chondrogenic potential of canine adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (MSC) compared to bone marrow-derived MSC is not improved by BMP-2 or BMP-6. *The Veterinary Journal*, 269, 105605.
4. Hendawy, H., Uemura, A., Ma, D., Namiki, R., Samir, H., Ahmed, M. F., ... & Tanaka, R. (2021). Tissue harvesting site effect on the canine adipose stromal vascular fraction quantity and quality, *Animals*, 11(2), 460.
5. Senesi, L., De Francesco, F., Farinelli, L., Manzotti, S., Gagliardi, G., Papalia, G. F., ... & Gigante, A. (2019). Mechanical and enzymatic procedures to isolate the stromal vascular fraction from adipose tissue: preliminary results. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 88.
6. Somal, A., Bhat, I. A., Pandey, S., Ansari, M. M., Indu, B., Panda, B. S., ... & Sharma, G. T. (2021). Comparative analysis of the immunomodulatory potential of caprine fetal adnexa derived mesenchymal stem cells. *Molecular Biology Reports*, 48(5), 3913 - 3923.
7. Wright, A., Arthaud-Day, M. L. & Weiss, M. L. (2021). Therapeutic use of mesenchymal stromal cells: the need for inclusive characterization guidelines to accommodate all tissue sources and species. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 632717.
8. Liu, S., Yang, W., Li, Y. & Sun, C. (2023). Fetal bovine serum, an important factor affecting the reproducibility of cell experiments. *Scientific reports*, 13(1), 1942. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29060-7>.
9. Krampera, M. & Le Blanc, K (2021). Mesenchymal stromal cells: Putative microenvironmental modulators become cell therapy. *Cell Stem Cell*, 28(10), 1708 – 1725.
10. Sharun, K., Jambagi, K., Kumar, R., Gugjoo, M. B., Pawde, A. M., Tuli, H. S., ... & Amarpal (2022). Clinical applications of adipose-derived stromal vascular fraction in veterinary practice. *Veterinary Quarterly*, 42(1), 151 - 166.
11. Hu, C. & Li, L (2018). Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in

vitro and *in vivo*. *Journal of Cellular and Molecular medicine*, 22(3), 1428 - 1442.

12. Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V. & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A*, 93(1), 19 - 31.

13. Hendijani, F. (2017). Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. *Cell proliferation*, 50(2), e12334.

14. Sasaki, A., Mizuno, M., Ozeki, N., Katano, H., Otabe, K., Tsuji, K., ... & Sekiya, I. (2018). Canine mesenchymal stem cells from synovium have a higher chondrogenic potential than those from infrapatellar fat pad, adipose tissue and bone marrow. *PLoS One*, 13(8), e0202922.

15. Rashid, U., Yousaf, A., Yaqoob, M., Saba, E., Moaen-ud-Din, M., Waseem, S., ... & Sandhu, M. A (2021). Characterization and differentiation potential of mesenchymal stem cells isolated from multiple canine adipose tissue sources. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 1 - 12.

16. Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte, D. A., Huang J. I., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraser J. K., Benhaim P. & Hedrick M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 1312, 4279 - 4295. <https://doi.org/10.1091/MBC.E02-02-0105>

17. Krešić, N., Šimić, I., Lojkić, I. & Bedeković, T (2017). Canine adipose derived mesenchymal stem cells transcriptome composition alterations: a step towards standardizing therapeutic. *Stem Cells International*, 1, 4176292.

18. Czaplá, J., Matuszczak, S., Kulik, K., Wiśniewska, E., Pilny, E., Jarosz-Biej, M., ... & Cichoń, T. (2019). The effect of culture media on

large-scale expansion and characteristic of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Stem cell Research & Therapy*, 10, 1 - 11.

19. Kandoi, S., Patra, B., Vidyasekar, P., Sivanesan, D., K. R. & Verma, R. S. (2018). Evaluation of platelet lysate as a substitute for FBS in explant and enzymatic isolation methods of human umbilical cord MSCs. *Scientific reports*, 8(1), 12439.

20. Santos, L. M., Cardoso, P. E. S., Diniz, E. A., Rahhal, J. G. & Sipert, C. R. (2023). Different concentrations of fetal bovine serum affect cytokine modulation in Lipopolysaccharide-activated apical papilla cells *in vitro*. *Journal of Applied Oral Science*, 31, e20230020.

21. Martin, C., Olmos, E., Collignon, M. L., De Isla, N., Blanchard, F., Chevalot, I., ... & Guedon, E. (2017). Revisiting MSC expansion from critical quality attributes to critical culture process parameters. *Process Biochemistry*, 59, 231 - 243.

22. Devireddy LR, Myers M, Screven R, Liu Z, Boxer L (2019). A serum-free medium formulation efficiently supports isolation and propagation of canine adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. *PLoS ONE*, 14: e210250. doi: 10.1371/journal.pone.0210250.

23. Jeong, Y., Choi, W. Y., Park, A., Lee, Y. J., Lee, Y., Park, G. H., ... & Kang, D. H (2021). Marine cyanobacterium *Spirulina maxima* as an alternate to the animal cell culture medium supplement, *Scientific Reports*, 11(1), 4906.

24. Ivanovska, A., Wang, M., Arshaghi, T. E., Shaw, G., Alves, J., Byrne, A., ... & Barry, F. (2022). Manufacturing mesenchymal stromal cells for the treatment of osteoarthritis in canine patients: challenges and recommendations. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 897150.

THE EFFECT OF FETAL BOVINE SERUM (FBS) CONCENTRATION ON CANINE STROMAL VASCULAR FRACTION CELL PROLIFERATION RATE

Tran Nguyen Bao Anh¹, Nguyen Thi Be Muoi², Tran Thi Thanh Khuong¹

¹*Stem Cell Laboratory, Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University*

²*Faculty of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Can Tho University*

Summary

This study examines the impact of fetal bovine serum (FBS) concentration on the proliferation of stromal vascular fraction (SVF) cells, a heterogeneous cell population enriched with mesenchymal stem cells (MSCs) and isolated from canine adipose tissue through 0.1% collagenase digestion. SVF cells were then cultured for 48 hours in media supplemented with FBS at concentrations of 0%, 3%, 5%, 8%, 10%. Optimal cell viability and proliferation were achieved with 8% FBS, resulting in the highest cell density of 51.17×10^4 cells/mL ($p < 0.05$), with consistent cell morphology observed across all FBS conditions. These findings provide critical data for optimizing SVF culture conditions and validate the efficiency of collagenase digestion for MSC isolation from canine adipose tissue. The study underscores the potential of SVF and MSCs for clinical applications in canine disease management, particularly in regenerative veterinary medicine, with future research directed toward exploring SVF differentiation potential and broader therapeutic applications.

Keywords: *Canine adipose tissue, fetal bovine serum (FBS), mesenchymal stem cells (MSCs), regenerative veterinary medicine, stromal vascular fraction (SVF).*

Ngày nhận bài: 16/9/2024

Ngày chuyển phản biện: 25/9/2024

Ngày thông qua phản biện: 30/10/2024

Ngày duyệt đăng: 30/11/2024