

TẾ BÀO GỐC

SO SÁNH CÁC PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ VÀ DUNG DỊCH BẢO QUẢN KHÁC NHAU TRONG BẢO QUẢN LẠNH SÂU MÔ DÂY RỐN LÀM NGUỒN CUNG CẤP TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ

Trần Thùy Dương¹, Lê Hoàng Hà¹, Nguyễn Xuân Hương¹, Nguyễn Thị Bích¹,
Nguyễn Tâm Long¹, Trịnh Thanh Thảo¹, Trịnh Tuấn Việt¹, Phạm Thị Thu¹,
Nguyễn Thị Huyền¹, Nguyễn Trung Hiệp¹, Nguyễn Thị Hằng Nga¹, Thẩm Thị Thu Nga¹

TÓM TẮT

Bảo quản lạnh sâu mô dây rốn nguyên khối được xem là một giải pháp tối ưu giúp lưu trữ lâu dài nguồn cung cấp tế bào gốc trung mô giàu tiềm năng cho y học tái tạo. Nghiên cứu này thực hiện nhằm đánh giá và so sánh ảnh hưởng của hai kích thước xử lý mô (1×1×1 mm và 5×2×2 mm) kết hợp với hai loại dung dịch bảo quản (môi trường thương mại và huyết tương máu dây rốn, cùng bổ sung 10% DMSO) đến hiệu quả bảo quản lạnh sâu mô dây rốn. Kết quả cho thấy tế bào gốc trung mô được phân lập thành công từ tất cả các mẫu mô bảo quản lạnh được rã đông tại các mốc 1, 3 và 6 tháng, đồng thời duy trì nguyên vẹn các đặc tính sinh học (hình thái, động học tăng trưởng, kiểu hình miễn dịch và khả năng biệt hóa) tương đương với mẫu đối chứng tươi ($p > 0,05$). Nghiên cứu này đã chứng minh tính an toàn và hiệu quả của các phương pháp bảo quản lạnh thử nghiệm, đặt cơ sở cho việc lưu trữ dài hạn mô dây rốn tại các ngân hàng mô.

SUMMARY

COMPARISON OF DIFFERENT PROCESSING METHODS AND CRYOPRESERVATION SOLUTION FOR HUMAN UMBILICAL CORD TISSUE AS A SOURCE OF MESENCHYMAL STEM CELLS

Cryopreservation of intact umbilical cord tissue is considered an optimal strategy for long-term preservation of a promising source of mesenchymal stem cells (MSCs)

for regenerative medicine. This study aimed to evaluate and compare the effects of two tissue-processing sizes (1×1×1 mm and 5×2×2 mm) combined with two types of cryoprotective media (commercial medium and umbilical cord blood plasma, both supplemented with 10% DMSO) on the efficiency of umbilical cord tissue cryopreservation. Experimental results demonstrated that MSCs were successfully isolated from all cryopreserved tissue samples thawed at 1, 3, 6 months, while maintaining their biological properties (morphology, growth kinetics, immunophenotype, and differentiation potential) comparable to the fresh control group ($p > 0,05$). This study demonstrates the safety and efficacy of the tested cryopreservation methods for umbilical cord tissue, establishing a solid foundation for long-term storage of umbilical cord tissue in tissue banks.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong thập kỷ qua, tế bào gốc trung mô (Mesenchymal stem cells - MSCs) đã được nghiên cứu và thử nghiệm để điều trị cho nhiều rối loạn, bệnh lý khác nhau ở người nhờ khả năng tự đổi mới, biệt hóa đa dòng, tăng sinh *ex vivo*, chức năng cận tiết và điều hòa miễn dịch [4].

So với các nguồn mô từ người trưởng thành, mô dây rốn là nguồn cung cấp MSCs dồi dào với nhiều ưu điểm vượt trội như quy trình thu thập không xâm lấn, nguy cơ mắc bệnh từ người hiến thấp, tế bào non trẻ và khả năng tăng sinh cao. Thêm vào đó, MSCs từ dây rốn có khả năng sinh miễn dịch thấp và

¹Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh Hà Nội
Chịu trách nhiệm chính: Thẩm Thị Thu Nga
Email: ngattt@tamanhospital.vn
Ngày nhận bài: 5/6/2026
Ngày phản biện khoa học: 18/7/2026
Ngày duyệt bài: 6/8/2026

duy trì kiểu nhân ổn định hơn qua các đời cấy chuyển so với MSCs từ tủy xương [5]. Với những đặc tính đó, dây rốn được kỳ vọng sẽ là nguồn cung cấp MSCs lý tưởng thay thế cho tủy xương và các nguồn mô khác.

Tuy nhiên, khác với các nguồn mô trưởng thành tồn tại lâu dài ở người hiến, mô dây rốn chỉ có thể được thu nhận trong một khoảng thời gian ngắn sau khi sinh. Do đó, việc xây dựng quy trình bảo quản đông lạnh hiệu quả là giải pháp thiết yếu nhằm lưu giữ nguồn mô dây rốn dài hạn [1, 10]. Bảo quản đông lạnh mô dây rốn dưới dạng mô sống không chỉ giúp duy trì các ổ tế bào gốc tự nhiên, mà còn giúp giảm thiểu thao tác, thời gian, chi phí xử lý ban đầu, cho phép chủ động và linh hoạt về thời gian phân lập MSCs phục vụ nghiên cứu hoặc điều trị [10]. Tuy nhiên, rào cản lớn nhất của việc đông lạnh toàn bộ mô dây rốn là chất bảo quản khó xâm nhập và khuếch tán vào sâu trong cấu trúc mô, dẫn đến sự hình thành tinh thể băng nội bào và gây hoại tử mô [9].

Hiện nay, quy trình xử lý và tiêu chí đánh giá trong lưu trữ mô dây rốn chưa có sự thống nhất giữa các Ngân hàng mô [10], do đó việc xây dựng một quy trình chuẩn là hết sức cần thiết. Nhằm định hướng phát triển nguồn mô lưu trữ dài hạn phục vụ điều trị tại Bệnh viện đa khoa Tâm Anh, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này để đánh giá và so sánh ảnh hưởng của hai kích thước xử lý mô kết hợp với hai loại dung dịch bảo quản lạnh đến các đặc tính sinh học của MSCs phân lập từ các mẫu mô sau rã đông.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu và đạo đức nghiên cứu

Ba mẫu dây rốn (N=3) được thu thập từ ba

sản phụ sinh khỏe mạnh tại Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh. Tất cả sản phụ tham gia hiến mẫu đều âm tính với các bệnh truyền nhiễm (HIV, HBV, HCV, CMV, Rubella, giang mai), không có tiền sử bệnh di truyền hay tai biến sản khoa và đã ký đơn tình nguyện cho phép sử dụng mô dây rốn cho nghiên cứu và điều trị. Thông tin cá nhân của người hiến được bảo mật và mã hóa bằng các ký hiệu mẫu UCT01, UCT02 và UCT03.

2. Thu thập mẫu dây rốn

Ba mẫu dây rốn (chiều dài khoảng 10 – 15cm) sau khi thu thập được chuyển vào lọ vô trùng chứa dung dịch Ringer's lactate bổ sung 1% kháng sinh, bảo quản ở 4°C và được xử lý trong vòng 24 giờ.

3. Xử lý mẫu mô dây rốn

Mỗi mẫu dây rốn sau khi thu thập được rửa sạch nhiều lần với dung dịch Ringer's lactate bổ sung 1% kháng sinh, cắt thành các đoạn ngắn và loại bỏ hoàn toàn các mạch máu. Các đoạn mô từ mỗi mẫu dây rốn được chia đều vào ba nhóm nghiên cứu:

- *Nhóm đối chứng (CTRL)*: sử dụng mô tươi ngay sau khi thu thập để phân lập MSCs đối chứng. Các đoạn mô được cắt thành các mảnh có kích thước khoảng 1×1×1 mm và được chuyển ngay sang bước phân lập và nuôi cấy MSCs.

- *Nhóm đông lạnh M1*: các đoạn mô được cắt nhỏ theo kích thước khoảng 1×1×1 mm trước khi tiến hành đông lạnh.

- *Nhóm đông lạnh M2*: các đoạn mô được cắt thành dạng khối có kích thước 5×2×2 mm trước khi thực hiện đông lạnh.

Đông lạnh và rã đông mẫu mô dây rốn

Chuẩn bị hai loại dung dịch bảo quản

đông lạnh gồm: dung dịch CS1 (môi trường StemMACS™ MSC Expansion Medium XF-Miltenyi, bổ sung 10% DMSO) và dung dịch CS2 (huyết tương máu dây rốn tự thân, bổ sung 10% DMSO).

Các mảnh mô cắt theo phương pháp M1 và M2 được chuyển vào các ống chứa dung dịch CS1 và CS2 (tạo thành bốn tổ hợp đông lạnh: M1.CS1, M2.CS1, M1.CS2 và M2.CS2). Tiến hành hạ nhiệt theo chu trình kiểm soát tốc độ $-1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ từ nhiệt độ phòng xuống -80°C . Sau 24 giờ, các ống mẫu mô được chuyển sang bảo quản dài hạn trong nitơ lỏng.

Sau 1, 3 và 6 tháng lưu trữ trong nitơ lỏng (ký hiệu: 1M, 3M, 6M), mẫu mô được rã đông nhanh ở 37°C trong 5 phút. Sau khi rã đông, loại bỏ dung dịch bảo quản và rửa sạch mẫu mô bằng dung dịch Ringer's lactate chứa 1% kháng sinh, trước khi chuyển sang bước phân lập và nuôi cấy MSCs.

Phân lập và nuôi cấy MSCs

MSCs được phân lập bằng phương pháp nuôi cấy mảnh mô với các nhóm như sau:

- *Nhóm đối chứng (CTRL)*: các mảnh mô tươi với kích thước $1 \times 1 \times 1$ mm từ bước xử lý sẽ được đặt ngay vào đĩa 6 giếng với mật độ 10 mảnh mô/giếng.

- *Nhóm đông lạnh M1*: các mảnh mô sau rã đông được đặt vào đĩa 6 giếng với mật độ 10 mảnh mô/giếng.

- *Nhóm đông lạnh M2*: các khối mô sau rã đông được cắt nhỏ về kích thước khoảng $1 \times 1 \times 1$ mm, sau đó đặt vào đĩa 6 giếng với mật độ 10 mảnh mô/giếng.

Bổ sung môi trường nuôi cấy chứa 1% kháng sinh vào các giếng, nuôi trong tủ ẩm

37°C , 5% CO_2 và độ ẩm bão hòa. Hình thái tế bào được đánh giá bằng kính hiển vi sau 7 ngày nuôi cấy. Vào ngày thứ 11, tiến hành thu hoạch tế bào ở đời P0, xác định tổng số lượng tế bào và tỷ lệ tế bào sống, sau đó cấy chuyển sang đời P1.

Tế bào ở đời P1 được thu hoạch và cấy chuyển nhân rộng nhằm phục vụ cho các đánh giá đặc tính sinh học tiếp theo.

Đánh giá các đặc tính sinh học của MSCs

Đặc tính sinh học của MSCs phân lập từ các nhóm mẫu mô được đánh giá thông qua các đặc điểm sau: khả năng tạo cụm, đặc điểm tăng trưởng, kiểu hình miễn dịch và khả năng biệt hóa đa dòng.

Khả năng tạo cụm: đánh giá thông qua xét nghiệm đơn vị hình thành cụm nguyên bào sợi (Colony Forming Unit - Fibroblast – CFU-F). Tế bào ở đời P1 được cấy với mật độ 200 tế bào/giếng trên đĩa 6 giếng, thực hiện lặp lại ba lần cho mỗi nhóm. Sau 10 ngày, cố định và nhuộm mẫu tế bào với dung dịch Giemsa để xác định hiệu suất gieo cấy (Plating efficiency – PE). PE được tính theo công thức:

$$\text{PE} = \left[\frac{\text{Tổng số lượng cụm tế bào}}{\text{Tổng số lượng tế bào ban đầu}} \right] \times 100 (\%)$$

Đặc điểm tăng trưởng: đánh giá thông qua đường cong tăng trưởng và thời gian nhân đôi quần thể (Population doubling time – PDT). Tế bào thu hoạch từ đời P1 sẽ được cấy với mật độ 4000 tế bào/ cm^2 trên đĩa 6 giếng, lặp lại ba lần và nuôi cấy trong 5 ngày. Tiến hành thu hoạch và xác định số lượng tế bào tại các thời điểm 24 - 120 giờ. Giá trị PDT được tính theo công thức:

$$\text{PDT} = t \times (\log 2) / (\log N_t - \log N_0);$$

Trong đó: t là thời gian nuôi cấy, N_0 là số

lượng tế bào ban đầu, N_t là số lượng tế bào tại thời điểm t .

Đặc điểm kiểu hình miễn dịch: MSCs ở đời P2 được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy (flow cytometry) trên hệ thống Navios EX Flow cytometer (Beckman Coulter) với các chỉ thị dương tính (CD73, CD90, CD105) và các chỉ thị âm tính (NEG, gồm: CD11b, CD19, CD34, CD45, HLA-DR).

Khả năng biệt hóa đa dòng: đánh giá khả năng biệt hóa thành tế bào mỡ, tế bào tạo xương và tế bào sụn với tế bào ở đời P3. Với nhóm mẫu đông lạnh, đặc tính biệt hóa được đánh giá tại thời điểm rã đông 1 và 6 tháng.

- *Biệt hóa thành tế bào mỡ:* Tế bào được nuôi cấy trong môi trường MesenCult™ Adipogenic Differentiation Kit. Sau 25–35 ngày nuôi cấy, nhuộm tế bào với Oil Red O để quan sát sự hình thành các giọt mỡ nội bào.

- *Biệt hóa thành tế bào tạo xương:* Tế bào được nuôi cấy trong môi trường MesenCult™ Osteogenic Differentiation trong 10–15 ngày, sau đó nhuộm Alizarin Red S để quan sát sự khoáng hóa.

- *Biệt hóa thành tế bào sụn:* Tế bào được nuôi cấy trong môi trường MesenCult™-ACF Chondrogenic Differentiation Kit trong 21 ngày, sau đó được nhuộm với Alcian Blue để quan sát khả năng biệt hóa sụn.

4. Phân tích thống kê

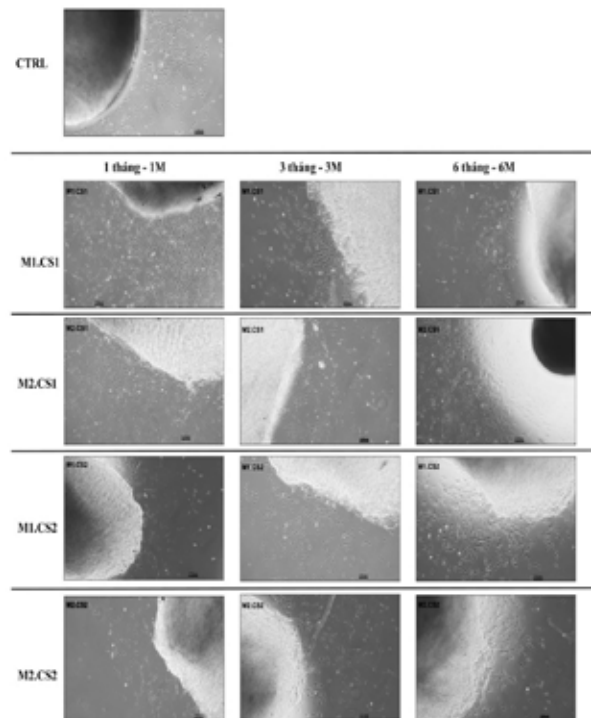
Khác biệt giữa các nhóm nghiên cứu được phân tích bằng kiểm định phân tích phương sai đo lường lặp lại (Repeated Measures One-way ANOVA) trên phần mềm Graphpad Prism 8.0.1. Kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn với khoảng tin cậy là 95% ($p < 0,05$).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Kết quả phân lập và nuôi cấy sơ cấp MSCs

Về hình thái tế bào:

Sau 7 ngày nuôi cấy, có sự xuất hiện của các tế bào xung quanh mảnh mô ở tất cả các mẫu mô thuộc bốn nhóm thử nghiệm đông lạnh, tại cả ba thời điểm rã đông (Hình 1). Tế bào phân lập có khả năng bám dính và hình thái đặc trưng của MSCs (dạng nguyên bào sợi, hình thoi, thuôn dài hai đầu), tương đồng với tế bào quan sát được ở nhóm đối chứng tươi.



Hình 1. Hình thái tế bào quan sát sau 7 ngày nuôi cấy sơ cấp (10X, thanh tỷ lệ: 100 μ m)

Kết quả thu hoạch tế bào và tỷ lệ tế bào sống ở P0 vào ngày 11

Tổng số lượng tế bào và tỷ lệ tế bào sống ở thể hệ P0 từ mẫu mô tươi và các mẫu mô đã đông vào ngày 11 được thể hiện tại Bảng 1:

Bảng 1. Tổng số lượng tế bào và tỷ lệ tế bào sống thu hoạch ở thể hệ P0 vào ngày 11

Loại mẫu		Tổng số lượng tế bào thu hoạch ở P0 ($\times 10^6$)	Tỷ lệ tế bào sống (%)
CTRL		$0,35 \pm 0,06$	$89,00 \pm 6,08$
M1.CS1	1M	$1,63 \pm 0,78$	$91,43 \pm 8,38$
	3M	$0,70 \pm 0,45$	$90,50 \pm 1,50$
	6M	$0,45 \pm 0,27$	$87,67 \pm 5,20$
M2.CS1	1M	$1,13 \pm 0,60$	$92,40 \pm 5,76$
	3M	$1,00 \pm 0,57$	$91,50 \pm 1,50$
	6M	$0,58 \pm 0,15$	$91,83 \pm 7,52$
M1.CS2	1M	$0,36 \pm 0,15$	$93,77 \pm 2,93$
	3M	$0,48 \pm 0,20$	$90,83 \pm 2,02$
	6M	$1,03 \pm 0,17$	$90,50 \pm 4,92$
M2.CS2	1M	$0,26 \pm 0,17$	$91,17 \pm 6,25$
	3M	$0,22 \pm 0,08$	$92,83 \pm 8,69$
	6M	$0,61 \pm 0,35$	$89,50 \pm 6,54$

Tại thời điểm rã đông 1 và 3 tháng, phương pháp M1.CS1 và M2.CS1 thu được tổng số lượng tế bào cao hơn so với hai phương pháp M1.CS2 và M2.CS2. Tại thời điểm 6 tháng, tổng số lượng tế bào từ M1.CS2 và M2.CS2 có dấu hiệu tăng nhẹ so với hai thời điểm rã đông trước đó. Kết quả kiểm định thống kê cho thấy việc bảo quản lạnh sâu không làm thay đổi đáng kể tổng số lượng tế bào thu hoạch ở P0 ở các mẫu mô đã đông so với mẫu đối chứng tươi ($p > 0,05$).

Kết quả về tỷ lệ tế bào sống thu hoạch ở đời P0 ở tất cả các phương pháp bảo quản và ở cả ba mốc thời gian rã đông đều được duy trì ổn định ở mức khá cao luôn trên 80%, dao động từ $87,67 \pm 5,20\%$ đến $93,77 \pm 2,93\%$. Kiểm định thống kê

cho thấy tỷ lệ sống của tế bào ở các nhóm bảo quản lạnh duy trì ở mức tương đương và khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng tươi ($89,00 \pm 6,08\%$) ($p > 0,05$).

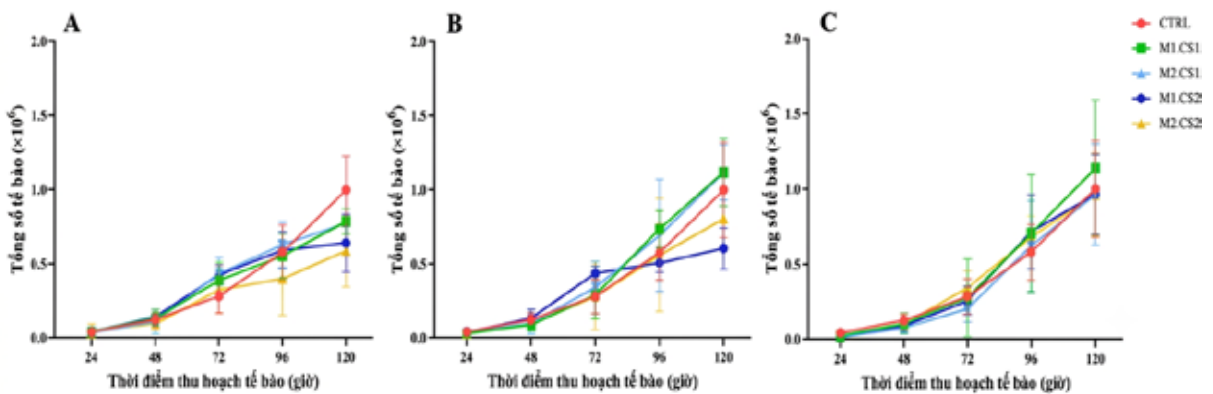
2. Kết quả về khả năng tạo cụm

Tại thời điểm rã đông 1 tháng, PE của MSCs phân lập từ các phương pháp M1.CS1, M2.CS1, M1.CS2 và M2.CS2 lần lượt đạt $19,06 \pm 4,40\%$; $14,69 \pm 6,57\%$; $16,83 \pm 0,87\%$ và $17,11 \pm 1,42\%$. Tại thời điểm 3 tháng, khả năng tạo cụm của MSCs từ các phương pháp bảo quản lạnh khác nhau vẫn được duy trì ổn định với PE lần lượt là $20,03 \pm 3,95\%$; $20,69 \pm 5,08\%$; $18,92 \pm 5,19\%$ và $17,92 \pm 5,70\%$. PE của MSCs từ mẫu rã đông tại thời điểm 6 tháng của các nhóm tương ứng đạt $19,47$

$\pm 8,70\%$; $14,22 \pm 4,43\%$; $13,11 \pm 7,21\%$ và $14,06 \pm 2,60\%$. Phân tích thống kê cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa về PE của MSCs phân lập từ các mẫu rã đông khác nhau và mẫu đối chứng ($16,78 \pm 5,11\%$) tại cả ba mốc thời điểm rã đông ($p > 0,05$).

3. Kết quả về đặc điểm tăng trưởng

Đường cong tăng trưởng của MSCs phân lập từ các mẫu mô rã đông thể hiện mô hình tăng trưởng tương tự với MSCs phân lập từ mẫu mô tươi (Hình 2). Tại các mốc thời gian 24 – 120 giờ, số lượng tế bào của các mẫu rã đông không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mẫu đối chứng ($p > 0,05$).



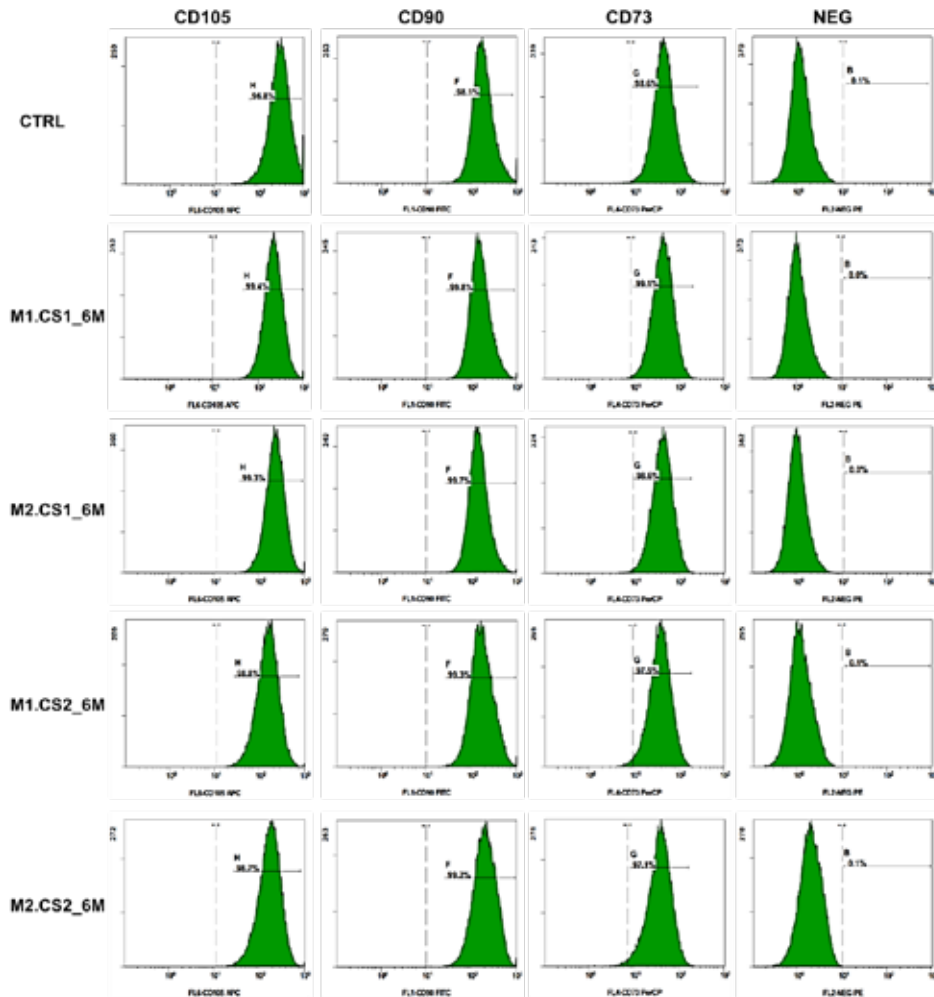
Hình 2. Đường cong tăng trưởng của MSCs từ mẫu đối chứng và mẫu rã đông: (A) thời điểm 1 tháng, (B) thời điểm 3 tháng, (C) thời điểm 6 tháng

PDT ở đời P2 của MSCs từ mẫu rã đông thời điểm 1 tháng ở các nhóm M1.CS1, M2.CS1 và M1.CS2 lần lượt là $25,29 \pm 2,31$ giờ; $24,18 \pm 2,51$ giờ và $24,52 \pm 1,83$ giờ, khá tương đương với mẫu đối chứng tươi là $25,17 \pm 3,39$ giờ, nhóm M2.CS2 có PDT dài nhất là $33,34 \pm 13,01$ giờ. Khi kéo dài thời gian bảo quản đến 3 và 6 tháng, động học tăng trưởng vẫn được duy trì tương đối ổn định, mẫu rã đông thời điểm 3 tháng PDT dao động từ 22,64 – 28,54

giờ và ở mốc 6 tháng là từ 23,36 - 25,97 giờ. Mặc dù có sự chênh lệch nhỏ về PDT giữa các nhóm bảo quản lạnh so với mẫu tươi nhưng phân tích thống kê cho thấy sự khác biệt này là không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

4. Kết quả về đặc điểm kiểu hình miễn dịch

Hình 3 biểu diễn kết quả phân tích kiểu hình miễn dịch của MSCs (biểu đồ đại diện ghi nhận tại mốc rã đông 6 tháng).



Hình 3. Kết quả đếm tế bào theo dòng chảy kiểu hình miễn dịch MSCs phân lập từ mẫu đối chứng và mẫu mô rã đông (Mốc rã đông 6 tháng)

Tỷ lệ tế bào dương tính với các chỉ thị CD90, CD73 và CD105 của các mẫu rã đông thuộc bốn nhóm bảo quản lạnh, tại ba thời điểm rã đông đều đạt trên 95%. Cụ thể, tỷ lệ biểu hiện của các chỉ thị này dao động trong khoảng 97,26% – 98,46% ở mốc 1 tháng; 98,26% – 99,36% tại mốc 3 tháng và 97,56% – 99,50% tại mốc rã đông 6 tháng. Kết quả này không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mẫu đối chứng ($p > 0,05$).

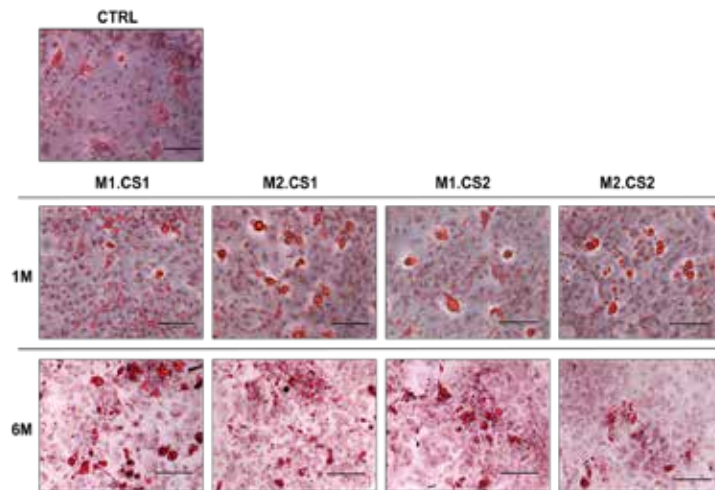
Tỷ lệ tế bào mang kiểu hình âm tính (NEG+) ở các mẫu mô rã đông từ bốn nhóm bảo quản lạnh, tại ba mốc thời gian đều dưới 1%. Cụ thể, tại thời điểm rã đông 1 tháng, tỷ lệ tế bào NEG+ dao động từ 0,14% – 0,32%. Tỷ lệ tế bào NEG+ tại mốc 3 tháng cũng cho giá trị tương tự, dao động từ 0,08% – 0,23%, và ở mốc 6 tháng dao động từ 0,04% – 0,09%. Kiểm định thống kê cho thấy sự khác biệt giữa các nhóm đông lạnh so với mẫu đối chứng (0,08%) là không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

5. Kết quả về khả năng biệt hóa đa dòng

Biệt hóa thành tế bào mỡ

Sau khi nuôi cấy trong môi trường biệt hóa mỡ, tế bào có sự thay đổi hình thái, chuyển dần từ dạng hình thoi thon dài sang dạng tròn ngắn. Kết quả nhuộm Oil Red O ghi nhận sự

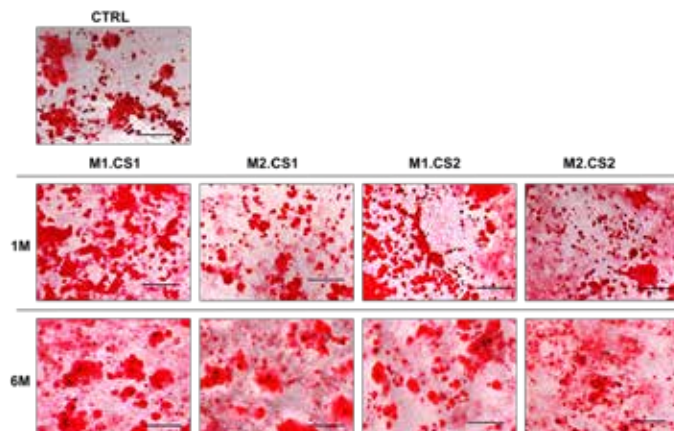
hình thành các giọt mỡ tích lũy nội bào bắt màu đỏ đặc trưng, xuất hiện ở cả mẫu đối chứng và các nhóm mẫu rễ đông (Hình 4). Khả năng tích lũy giọt mỡ giữa nhóm mẫu rễ đông sau 6 tháng bảo quản tương đương với nhóm 1 tháng cũng như mẫu đối chứng tươi.



Hình 4. Kết quả nhuộm biệt hóa mỡ (Oil Red O, 20X, thanh tỷ lệ: 150µm)

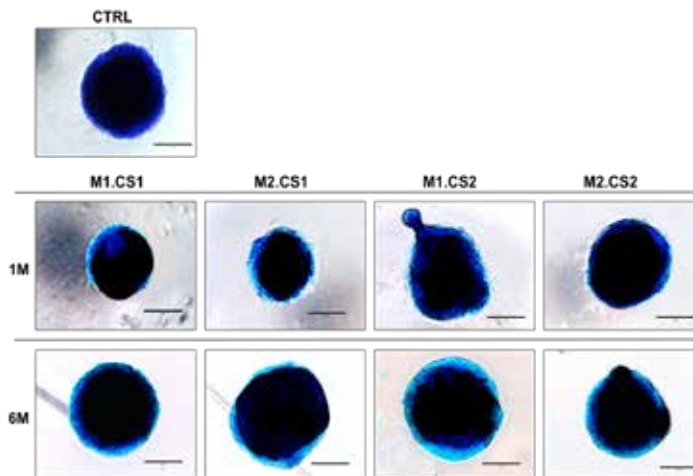
Biệt hóa thành tế bào tạo xương

Kết quả nhuộm Alizarin Red S ghi nhận sự xuất hiện của các nốt khoáng hóa bắt màu đỏ ở tất cả các nhóm thử nghiệm, cho thấy có sự lắng đọng canxi ở chất nền ngoại bào đặc trưng của quá trình biệt hóa xương. Kết quả nhuộm thu được ở các mốc rễ đông 1 và 6 tháng là tương tự nhau và tương tự với nhóm đối chứng tươi (Hình 5).



Hình 5. Kết quả nhuộm biệt hóa xương (Alizarin Red S, 10X, thanh tỷ lệ: 300µm)

Biệt hóa thành tế bào sụn



Hình 6. Kết quả nhuộm biệt hóa sụn (Alcian Blue, 10X, thanh tỷ lệ: 300 μ m)

Tất cả các nhóm thử nghiệm đều bắt màu xanh với Alcian blue, thể hiện sự lắng đọng proteoglycan sulfate ở chất nền ngoại bào – đặc trưng của quá trình biệt hóa sụn. Khả năng biệt hóa sụn ở các nhóm mô đã đông được ghi nhận tương đương với mẫu mô tươi. Kết quả nhuộm không có sự khác biệt đáng kể giữa tế bào phân lập từ mẫu đã đông tại mốc 6 tháng và 1 tháng.

IV. BÀN LUẬN

Việc phân lập thành công MSCs với đặc điểm hình thái và khả năng bám dính đặc trưng chỉ sau 7 ngày nuôi cấy từ các mẫu mô thuộc cả bốn phương pháp bảo quản đã cho thấy hiệu quả tích cực của quá trình bảo quản lạnh sâu. Sự tương đồng về khả năng mọc tế bào giữa nhóm mô đông lạnh và nhóm mô tươi là minh chứng cho thấy tính toàn vẹn cấu trúc mô vẫn được bảo vệ tối ưu, qua đó duy trì nguyên vẹn khả năng phân lập MSCs. Quan sát này hoàn toàn thống nhất với các nghiên cứu trước đây [2, 7, 9].

Theo phân tích thống kê, tổng số lượng tế bào và tỷ lệ tế bào sống thu hoạch ở P0 của các mẫu mô đã đông tại cả ba mốc thời gian đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mẫu đối chứng tươi. Kết quả này khẳng định lượng DMSO tồn dư sau khi đã đông hầu như không gây độc ảnh hưởng đến khả năng sống của tế bào. Trái ngược với quan điểm của một số nghiên cứu trước đây cho rằng DMSO với nồng độ 10% là chưa đủ để bảo quản mô với cấu trúc phức tạp – điển hình như công bố của Diego Raffo và cộng sự [6], cũng như Yu A Romanov và cộng sự [7] đã nâng nồng độ DMSO lên đến 20% – nghiên cứu của chúng tôi chứng minh việc sử dụng DMSO 10% kết hợp với hai kích thước xử lý mô (M1 và M2) vẫn đảm bảo phân lập thành công MSCs với hiệu suất và tỷ lệ sống cao. Điều này là minh chứng cho thấy với quy trình xử lý đã thực hiện trong thử nghiệm của chúng tôi, dung dịch bảo quản đã đủ khả năng khuếch tán vào sâu trong cấu trúc mô và có tác động bảo quản tế bào. Đồng thời, kết quả trên cũng cho thấy

quy trình rửa loại bỏ dung dịch bảo quản sau rã đông loại bỏ đáng kể DMSO tồn dư, tạo điều kiện lý tưởng cho quần thể tế bào phục hồi ổn định.

Thử nghiệm đánh giá khả năng tạo cụm cho thấy các tế bào được phân lập từ mẫu mô rã đông khi nuôi cấy ở mật độ thấp (khoảng 20 tế bào/cm²) vẫn bám dính tốt và phát triển thành các cụm nguyên bào sợi tương tự như MSCs phân lập từ mẫu mô tươi. Hiệu suất gieo cấy của MSCs trong nghiên cứu của chúng tôi đạt từ 13,11% đến 20,69%, tương đương hoặc thậm chí cao hơn một số nghiên cứu đã công bố trước đây, cụ thể trong nghiên cứu của Choudhery và cộng sự, hiệu suất gieo cấy chỉ đạt khoảng 10% [2], và ở nghiên cứu của Shivakumar và cộng sự, chỉ số này đạt từ 8 – 14% [9]. Kết quả này đã khẳng định tế bào từ mô rã đông vẫn bảo tồn khả năng tạo dòng và tự làm mới của tế bào gốc trung mô.

Động học tăng trưởng của MSCs từ các mẫu mô rã đông cho thấy sự tương đồng với nhóm đối chứng tươi về cả mô hình đường cong tăng trưởng lẫn thời gian nhân đôi quần thể. Kết quả này hoàn toàn tương đồng với các công bố trước đây [3,8], đồng thời khẳng định các phương pháp bảo quản thử nghiệm cũng như quy trình đông – rã đông không làm suy giảm tiềm năng tăng sinh của quần thể tế bào. Việc duy trì thời gian nhân đôi quần thể ổn định sau rã đông giúp tối ưu hóa thời gian, chi phí và nguồn lực nuôi cấy, đảm bảo thu hoạch đủ số lượng tế bào đạt chuẩn cho điều trị.

Kết quả phân tích kiểu hình miễn dịch bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy cho thấy mức độ biểu hiện của MSCs phân lập từ các mẫu mô đông lạnh đều biểu hiện mạnh các chỉ thị dương tính đặc trưng của MSCs

(CD90, CD73 và CD105) với tỷ lệ luôn đạt trên 95%. Ngược lại, tỷ lệ biểu hiện với các chỉ thị âm tính (CD11b, CD19, CD34, CD45, HLA-DR) luôn được duy trì ở mức dưới 1%. Các chỉ số này hoàn toàn đáp ứng tiêu chuẩn định danh của ISCT và tương đồng với các công bố trước đây [3, 6]. Hơn nữa, mức độ biểu hiện kiểu hình miễn dịch giữa nhóm mô bảo quản lạnh và nhóm mô tươi không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, khẳng định việc bảo quản mô dây rốn bằng các phương pháp đã thử nghiệm không gây ra ảnh hưởng tiêu cực đến kiểu hình miễn dịch của MSCs.

Dưới tác động của các môi trường cảm ứng thích hợp, MSCs phân lập từ các mẫu mô rã đông ở cả bốn phương pháp bảo quản đều biệt hóa thành công thành ba dòng tế bào: mỡ, xương và sụn, tương tự với nhóm mô tươi. Đặc biệt, khả năng biệt hóa thành ba dòng tế bào này vẫn được duy trì ổn định sau 6 tháng lưu trữ, không có sự khác biệt so với mốc 1 tháng cũng như nhóm đối chứng. Kết quả này tương đồng với nhiều công bố trên thế giới [3, 9], khẳng định tính ổn định của quy trình thử nghiệm trong việc bảo tồn đặc tính biệt hóa của MSCs.

Kết quả nghiên cứu cho thấy các đặc tính sinh học cốt lõi của tế bào - bao gồm tỷ lệ sống, tiềm năng tăng sinh, kiểu hình miễn dịch và tiềm năng biệt hóa đều được duy trì ổn định, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các phương pháp xử lý và dung dịch thử nghiệm. Theo hiểu biết của chúng tôi, đây là một trong những nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam tiến hành so sánh hệ thống các quy trình xử lý cũng như dung dịch bảo quản lạnh đối với mô dây rốn. Sự tương đồng về độ an toàn và hiệu quả này tạo tiền đề cho các Ngân

hàng mô lựa chọn phương án bảo quản linh hoạt, tối ưu về chi phí và thao tác thực hành mà vẫn đảm bảo chất lượng mẫu.

V. KẾT LUẬN

Tóm lại, các kết quả thực nghiệm đã chứng minh tính an toàn và khả thi của cả bốn phương pháp bảo quản lạnh sâu mô dây rốn chỉ sử dụng 10% DMSO. Quy trình xử lý mẫu mô giúp dung dịch bảo quản khuếch tán hiệu quả vào sâu trong cấu trúc mô, đồng thời quy trình rã đông – rửa mẫu đã loại bỏ tối đa lượng DMSO tồn dư mà không gây ảnh hưởng tiêu cực đến tế bào. MSCs phân lập từ các mẫu mô rã đông tại cả ba mốc thời gian đều duy trì tỷ lệ sống cao, bảo tồn toàn vẹn các đặc tính sinh học về hình thái, động học tăng trưởng, kiểu hình miễn dịch và tiềm năng biệt hóa thành ba dòng đạt chuẩn định danh của ISCT, tương đương với nhóm đối chứng tươi. Nghiên cứu này mang lại một giải pháp lưu trữ mô dây rốn dài hạn an toàn và hiệu quả, góp phần chuẩn bị sẵn sàng nguồn MSCs đạt chất lượng tốt phục vụ cho các liệu pháp điều trị trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arutyunyan, Irina, Fatkhudinov, Timur, and Sukhikh, Gennady. "Umbilical cord tissue cryopreservation: a short review", *Stem Cell Research & Therapy*. 2018, 9(1), p. 236.
2. Choudhery, M. S., Badowski, M., Muise, A., and Harris, D. T.. "Utility of cryopreserved umbilical cord tissue for regenerative medicine", *Curr Stem Cell Res Ther*. 2013, 8(5), pp. 370-80.
3. Dulugiac, M., Moldovan, L., and Zarnescu, O. "Comparative studies of mesenchymal stem cells derived from different cord tissue compartments - The influence of cryopreservation and growth media", *Placenta*. 2015, 36(10), pp. 1192-203.
4. Margiana, Ria, Markov, Alexander, Zekiy, Angelina O., Hamza, Mohammed Ubaid, Al-Dabbagh, Khalid A., Al-Zubaidi, Sura Hasan, Hameed, Noora M., Ahmad, Irshad, Sivaraman, R., Kzar, Hamzah H., Al-Gazally, Moaed E., Mustafa, Yasser Fakri, and Siahmansouri, Homayoon. "Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review", *Stem Cell Research & Therapy*. (2022), 13(1), p. 366.
5. Mebarki, Miryam, Abadie, Camille, Larghero, Jérôme, and Cras, Audrey. "Human umbilical cord-derived mesenchymal stem/stromal cells: a promising candidate for the development of advanced therapy medicinal products", *Stem Cell Research & Therapy*. 2021, 12(1), p. 152.
6. Raffo, D., Maglioco, A., and Fernandez Sasso, D. "A protocol for umbilical cord tissue cryopreservation as a source of mesenchymal stem cells", *Mol Biol Rep*. 2021, 48(2), pp. 1559-1565.
7. Romanov, Yu A., Balashova, E. E., Volgina, N. E., Kabaeva, N. V., Dugina, T. N., and Sukhikh, G. T. "Isolation of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells from Cryopreserved Human Umbilical Cord Tissue", *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016, 160(4), pp. 530-534.
8. Roy, S., Arora, S., Kumari, P., and Ta, M. "A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Wharton's jelly mesenchymal stem cells", *Cryobiology*. 2014, 68(3), pp. 467-72.
9. Shivakumar, S. B., Bharti, D., Subbarao, R. B., Jang, S. J., Park, J. S., Ullah, I., Park, J. K., Byun, J. H., Park, B. W., and Rho, G. J. "DMSO- and Serum-Free Cryopreservation of Wharton's Jelly Tissue Isolated From Human Umbilical Cord", *J Cell Biochem*. 2016, 117(10), pp. 2397-412.
10. Skiles, M. L., Brown, K. S., Tatz, W., Swingle, K., and Brown, H. L.. "Quantitative analysis of composite umbilical cord tissue health using a standardized explant approach and an assay of metabolic activity", *Cytotherapy*. 2018, 20(4), pp. 564-575.