

PHÂN LẬP VÀ KHẢO SÁT TÍNH GỐC CỦA TẾ BÀO SỤN HEO MỘT NGÀY TUỔI DÙNG TRONG TẠO MÀNG SINH HỌC

Phạm Thị Vàng, Võ Trung Nhân, Trần Thái Dương,
Võ Vy Khanh, Nguyễn Thị Thanh Tâm, Trương Minh Dũng*

Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

TÓM TẮT

Tổn thương sụn khớp gối được quan tâm hàng đầu trong những bệnh về xương khớp ở bệnh nhân. Hiện nay, kỹ thuật cấy ghép tế bào đang được sử dụng rộng rãi trong điều trị tổn thương sụn khớp gối. Sự kết hợp giữa tế bào sụn tự thân và màng xương giúp hình thành mô mới tương tự sụn tại vị trí tổn thương. Phương pháp này gặp nhiều hạn chế do: 1) sự hạn chế về số lượng tế bào; 2) quá trình phẫu thuật hai lần phức tạp và tăng khả năng rủi ro đối với bệnh nhân; 3) quá trình cố định màng xương kéo dài thời gian phẫu thuật. Mục tiêu của nghiên cứu này là sử dụng nguồn tế bào mới từ sụn heo một ngày tuổi để chế tạo màng sinh học nhằm thay thế màng xương trong kỹ thuật cấy ghép tế bào điều trị tổn thương khớp gối. Tế bào được phân lập từ sụn heo một ngày tuổi được định danh và khảo sát về khả năng tăng sinh, khả năng biệt hóa, khả năng hình thành màng. Kết quả đánh giá âm tính với các bệnh truyền nhiễm trên heo là cơ sở quan trọng để lựa chọn heo con đủ điều kiện cung cấp mô sụn cho nghiên cứu. Tế bào được phân lập thành công từ mô sụn heo một ngày tuổi biểu hiện đặc điểm tương tự như tế bào gốc, có khả năng tăng sinh cao, biệt hóa thành các loại tế bào khác nhau. Màng sinh học được tạo thành công từ tế bào gốc từ mô sụn heo một ngày tuổi, tạo tiền đề để chế tạo màng thay thế màng xương trong điều trị bệnh tổn thương sụn khớp gối.

Từ khóa: Heo một ngày tuổi, màng sinh học, sụn heo, tế bào gốc, tổn thương sụn khớp gối.

MỞ ĐẦU

Thoái hóa khớp gối (THKG) là một căn bệnh phổ biến hiện nay trên thế giới nói chung và tại Việt Nam nói riêng. THKG là nguyên nhân gây đau và ảnh hưởng tới hoạt động của khớp gối và là một trong những nguyên nhân chủ yếu gây tàn tật ở bệnh nhân lớn tuổi. Ngày nay, do chế độ dinh dưỡng (béo phì, dư thừa trọng lượng) và ảnh hưởng của nguyên nhân ngoại cảnh (tai nạn, thể thao), tuổi của người bị THKG có xu hướng trẻ hóa (Hunter et al., 2019). Vì vậy, việc tối ưu phương pháp điều trị bệnh THKG là nhu cầu thiết yếu và cấp bách của các thập niên gần đây.

Nhiều phương pháp đã được nghiên cứu và ứng dụng trong cải tạo chức năng, phục hồi hoạt động tại vị trí tổn thương cho bệnh nhân THKG; như là, điều trị không dùng thuốc (phát đồ vật lý trị liệu) (Hambly et al., 2012), điều trị nội khoa (sử dụng thuốc, cytokine,...) (Goggs et al., 2005, Kang et al., 2008, Thosani et al., 2012, Fotopoulos et al., 2015, Ohashi et al., 2021) và điều trị ngoại khoa (sự can thiệp của các phương pháp phẫu thuật) (LaPrade, 2003, Truong et al., 2017, Betzler et al., 2021, Stotter et al., 2021, Totlis et al., 2021). Tùy thuộc vào mức độ của tổn thương mà bệnh nhân được đề nghị phương pháp điều trị phù hợp. Hiện nay, phương pháp ghép tế bào tự thân là một phương pháp mới trong điều trị bệnh nhân THKG tại Việt Nam. Sự thành công của phương pháp này phụ thuộc vào nhiều yếu tố; trong đó, yếu tố tế bào tự thân và miếng dán màng xương là quan trọng nhất, quyết định sự hình thành mô tái sinh có đặc tính giống mô sụn hyaline. Yếu tố tế bào (tế bào trung mô từ tủy xương, tế bào gốc có nguồn gốc từ mô mỡ, và tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ dây rốn) đã được nhiều nghiên cứu trong nước chứng minh là có hiệu quả tốt trong quá trình điều trị bệnh THKG (LaPrade, 2003, Ohashi et al., 2021, Stotter et al., 2021). Tuy nhiên, những nghiên cứu về cải tiến miếng dán màng xương hoặc thay thế bằng màng sinh học vẫn còn khiêm tốn hiện nay.

Mặt khác, tế bào gốc phân lập từ cơ thể chưa trưởng thành được biết đến như nguồn tế bào an toàn tương tự như tế bào tự thân trong cấy ghép. Tế bào này có khả năng tăng sinh, biệt hóa tốt so với tế bào gốc phân lập từ cơ thể trưởng thành (adult stem cells). Chức năng, đặc điểm của tế bào gốc từ cơ thể trưởng thành không ổn định do chúng được phân lập từ nhiều cơ thể khác nhau; tuy nhiên, tế bào gốc phân lập từ cơ thể chưa trưởng thành có khả năng tăng sinh thành số lượng lớn tế bào cùng chức năng, đặc điểm do phân lập từ một cơ thể. Và, tế bào gốc phân lập từ cơ thể chưa trưởng thành giống tế bào gốc phôi về chức năng, giống tính an toàn so với tế bào gốc từ cơ thể trưởng thành (Park et al., 2020). Với những đặc trưng trên, tế bào gốc từ cơ thể chưa trưởng thành có tiềm năng ứng dụng cao trong các ứng dụng liệu pháp tế bào.

Mục tiêu của nghiên cứu này là sử dụng nguồn tế bào mới từ sụn heo một ngày tuổi để chế tạo màng sinh học nhằm thay thế màng xương trong kỹ thuật cấy ghép tế bào điều trị tổn thương khớp gối. Nghiên cứu tiến hành phân lập, định danh tế bào phân lập từ sụn heo một ngày tuổi. Khả năng tăng sinh, biệt hóa của tế bào này, cũng như khả năng tạo màng sinh học của chúng được đánh giá.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**Chọn lựa heo 1 ngày tuổi cho thí nghiệm**

Thí nghiệm được tiến hành tại Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, các quy trình thí nghiệm trên động vật được tiến hành thông qua Hội đồng tư vấn về đạo đức với động vật trong nghiên cứu (01-2023-ĐĐĐV). Máu từ tĩnh mạch (1 mL) được thu từ heo một ngày tuổi vào ống đựng máu 4 mL có chứa K₂EDTA (BD, Mỹ). Xét nghiệm máu phát hiện các bệnh truyền nhiễm được thực hiện bằng phương pháp HD/PPT 22* (rtRT-PCR- TCVN 8400-21: 2014) (virus PRRS dòng châu Âu, virus PRRS dòng Bắc Mỹ, và virus PRRS chủng độc lực cao), HD/PPT 17* (rtRT-PCR- TCVN 8400-47: 2019) (virus dịch tả heo), và HD/PPT 60* (rtRT-PCR- TCVN 8400-41: 2019) (virus dịch tả heo châu Phi).

Thu thập, phân lập nguồn tế bào gốc từ mô sụn của heo một ngày tuổi

Khớp gối của cá thể heo một ngày tuổi được thu nhận ngay sau khi khử trùng và phẫu thuật. Quy trình được tiến hành trong môi trường sạch, vô trùng, tránh gây nhiễm mẫu. Mô sụn được thu nhận và rửa sạch ba lần trong 10 mL dung dịch phosphate buffered saline (PBS) (Gibco, Mỹ) nồng độ 1X. Mô sụn được cắt nhỏ với kích thước nhỏ hơn 1 mm và được xác định khối lượng. Dựa vào khối lượng của mô tăng trưởng, dung dịch men phân hủy các cấu trúc sợi (collagenase 0,1%, trong 16 giờ) (Worthington, Mỹ) được thêm vào và được ủ trong tủ nuôi tế bào (điều kiện nuôi cấy: 37°C, 5% CO₂). Sau 16 giờ ủ trong tủ nuôi tế bào, các đơn bào sau đó được thu nhận trong môi trường nuôi cấy tế bào có bổ sung 10% huyết thanh (fetal bovine serum, Gibco, Mỹ), 1% kháng sinh Penicillin-Streptomycin (Gibco, Mỹ) và nuôi trong môi trường nuôi cấy cơ bản. Quá trình nuôi cấy được tiến hành trong tủ nuôi tế bào. Hình thái tế bào được theo dõi thường xuyên bằng kính hiển vi soi ngược (Nikon, Nhật Bản) và môi trường nuôi cấy được thay mỗi 3 ngày.

Đánh giá đặc tính sinh học của tế bào từ mô sụn của heo một ngày tuổi

Hình thái tế bào phân lập từ mô sụn heo một ngày tuổi được quan sát qua các lần cấy chuyển (đến lần cấy chuyển 20) bằng kính hiển vi soi ngược. Tốc độ tăng sinh của tế bào được đánh giá dựa vào thời gian tăng sinh gấp đôi về số lượng của tế bào (doubling time) đến lần cấy chuyển thứ 20. Thu nhận tế bào đơn và cấy chuyển sang đĩa nuôi cấy mới. Tiếp tục cấy chuyển đến thế hệ thứ 20 khi quan sát mật độ tế bào phủ từ 80% bề mặt mỗi giếng. Xác định thời gian tăng sinh gấp đôi (T₂) bằng công thức sau: $T_2 = \Delta t / \log_2(\Delta N / N_0 + 1)$; trong đó, Δt là thời gian nuôi cấy (ngày), ΔN là số lượng tế bào tăng sinh trong khoảng thời gian nuôi cấy (tế bào), N_0 là số lượng tế bào ban đầu (tế bào). Bên cạnh đó, tế bào được định danh bằng FACS, thông qua sự biểu hiện các phân tử bề mặt tế bào: CD34, CD45, CD90 và CD105 (Thermo Fisher, Anh).

Đánh giá khả năng biệt hóa của tế bào gốc từ mô sụn của heo một ngày tuổi

Tế bào tại P2 được đánh giá về khả năng biệt hóa thành 3 dòng tế bào căn bản: tế bào mỡ, tế bào xương và tế bào sụn. Trong biệt hóa tế bào mỡ, tế bào được nuôi cấy trong môi trường biệt hóa thành tế bào mỡ (bao gồm: môi trường alphaMEM (Gibco, Mỹ), bổ sung 10% FBS, 100 nM dexamethasone, 10 µg/mL insulin, 0,1 mM indomethacine và 0,5 mM 3-Isobutyl-2-methylxanthane (Sigma, Mỹ)). Tế bào được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy cơ bản (alphaMEM (Gibco, Mỹ), bổ sung 10% FBS) là đối chứng âm. Khả năng hình thành tế bào mỡ được đánh giá tại 14 ngày bởi phương pháp nhuộm Oil Red O (Sigma, Mỹ).

Trong biệt hóa tế bào xương, tế bào được nuôi cấy trong môi trường biệt hóa thành tế bào xương (bao gồm: môi trường alphaMEM (Gibco, Mỹ), bổ sung 10% FBS, 100 nM dexamethasone, 50 µg/mL ascorbic acid và 10 mM β-glycerol 2-phosphate (Sigma, Mỹ)). Tế bào được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy cơ bản (alphaMEM (Gibco, Mỹ), bổ sung 10% FBS) là đối chứng âm. Khả năng hình thành tế bào xương được đánh giá tại 21 ngày bởi phương pháp nhuộm Alizarin Red (Sigma, Mỹ). Trong biệt hóa tế bào sụn, tế bào được nuôi cấy thành khối 3D trong môi trường biệt hóa thành tế bào sụn (bao gồm: môi trường DMEM (Gibco, Mỹ), TGFβ₁ 1ng/mL, 1% Pen/Strep, insulin transferrin selenium (ITS), 40 µg/mL L-proline, BSA, 100 µg/mL sodium pyruvate, 50 µg/mL ascorbate-2 phosphate và 100 nM dexamethasone (Sigma, Mỹ)). Tế bào được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy không chứa TGFβ₁ là đối chứng. Khả năng biệt hóa thành tế bào sụn được đánh giá bằng phương pháp nhuộm Safranin-O (Sigma, Mỹ) (Truong et al., 2017, Park et al., 2020).

Đánh giá khả năng tạo màng sinh học của tế bào gốc từ mô sụn của heo một ngày tuổi

Tế bào tại P2 được nuôi cấy trong đĩa 6 giếng với mật độ $0,5 \times 10^6$ tế bào/cm². Môi trường tạo màng là môi trường nuôi cấy tế bào có bổ sung các thành phần insulin-transferrin-selenium (ITS), 50 mg/mL ascorbate 2-phosphate, 100 nM dexamethasone, 40 mg/mL proline và 1,25 mg/mL BSA (Sigma, Mỹ). Sau hai tuần nuôi cấy, tấm tế bào được tiến hành khử bào bằng dung dịch SDS là 1% (Sigma, Mỹ). Vật liệu di truyền được loại bỏ bằng enzyme DNase/RNase. Tấm tế bào được làm khô bằng phương pháp freeze dry tại -80°C và tạo màng sinh học. Sự khác biệt của màng sinh học trước và sau khi khử bào được đánh giá bằng phương pháp SEM và nhuộm mô học Hematoxylin & Eosin (Park et al., 2020).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chọn lựa heo một ngày tuổi cho thí nghiệm

Cá thể heo một ngày tuổi được chọn từ Công ty Cổ Phần GreenFeed Việt Nam (Hình 1). Heo con có sức khỏe tốt, tứ chi đầy đủ được lựa chọn làm đối tượng cung cấp mô sụn cho đề tài.



Hình 1. Cá thể heo 1 ngày tuổi được chọn cho thí nghiệm

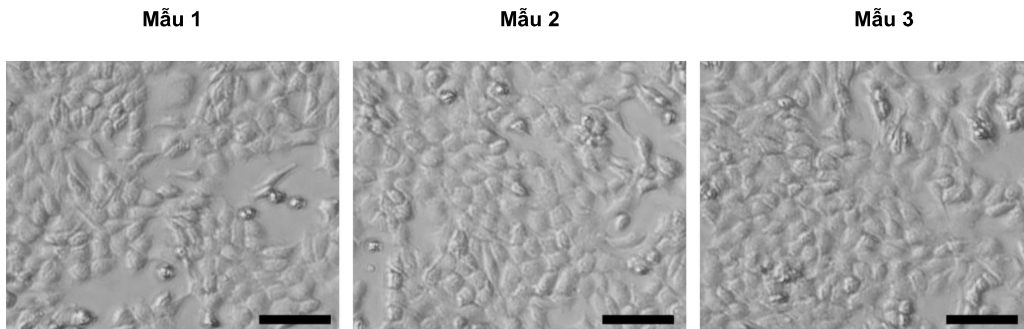
Cá thể heo một ngày tuổi sau khi được chọn, 1 mL máu được thu thành công từ tĩnh mạch và cho vào ống đựng máu. Kết quả thử nghiệm phát hiện âm tính đối với các bệnh truyền nhiễm (virus PRRS dòng châu Âu, virus PRRS dòng Bắc Mỹ, virus dịch tả heo, virus PRRS chủng độc lực cao, virus dịch tả heo châu Phi) đã được tiến hành. Kết quả đánh giá âm tính với các bệnh truyền nhiễm trên heo là cơ sở quan trọng để lựa chọn heo con đủ điều kiện cung cấp mô sụn cho nghiên cứu.

Thu thập, phân lập nguồn tế bào gốc từ mô sụn của heo một ngày tuổi

Mô sụn được thu từ khớp gối heo một ngày tuổi với khối lượng mô sụn là $0,90 \pm 0,27$ g, lượng tế bào phân lập được là $28 \pm 8,51$ triệu tế bào, số lượng tế bào phân lập được trên 1 g mô sụn là $31,03 \pm 4,39$ triệu tế bào, lượng tế bào thu được tại P0 là $100 \pm 30,41$ triệu tế bào (Bảng 1). Hình dạng tế bào sau khi phân lập đồng nhất giữa các mẫu và được biểu hiện trong Hình 3. Tế bào tại P0 được thu nhận và dự trữ trong nitơ lỏng. Kết quả chứng minh quy trình thu thập, phân lập nguồn tế bào từ mô sụn của heo 1 ngày tuổi có tính ổn định cao thể hiện ở hàm lượng cao tế bào phân lập trong 1 g mô sụn và năng suất cao tạo nguồn tế bào dồi dào phục vụ nghiên cứu và tạo ra các sản phẩm.

Bảng 1. Thu thập, phân lập nguồn tế bào từ mô sụn của heo 1 ngày tuổi

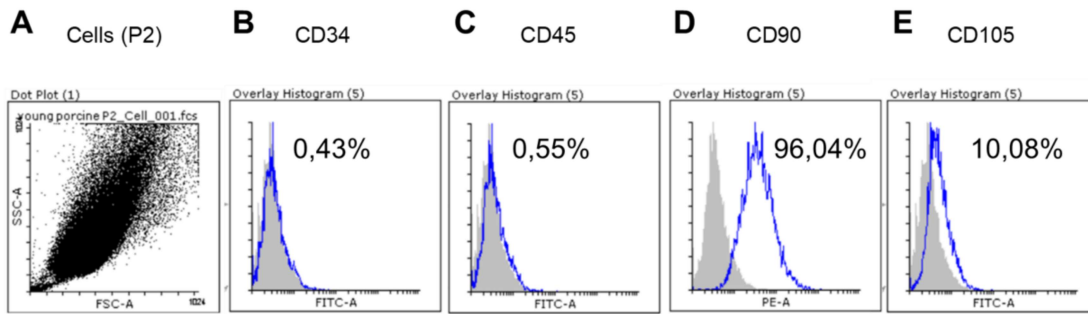
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Trung bình
Khối lượng mô sụn (g)	1,2327	0,9135	0,56088	$0,90 \pm 0,27$
Số lượng tế bào phân lập (triệu tế bào)	30,86	29,80	19,87	$26,85 \pm 4,95$
Số lượng tế bào/ 1 g mô sụn (triệu tế bào)	25,04	32,62	35,43	$31,03 \pm 4,39$
Số lượng tế bào thu nhận tại P0 (triệu tế bào)	136	101	62	$100 \pm 30,41$



Hình 2. Hình ảnh tế bào phân lập từ mô sụn được quan sát bằng kính hiển vi soi ngược (scale bar: 100 μ m).

Đánh giá đặc tính sinh học của tế bào từ mô sụn của heo một ngày tuổi

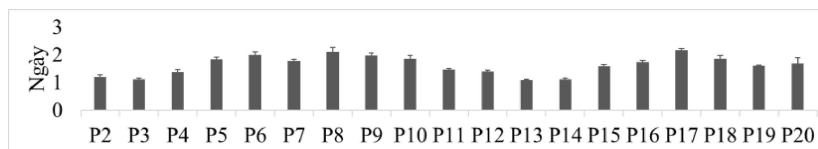
Tế bào được định danh bằng phương pháp dòng chảy tế bào cho kết quả như hình 3. Tại P2, tế bào biểu hiện với CD34, CD45, CD90 và CD105 lần lượt là $0,19 \pm 0,18\%$; $0,28 \pm 0,19\%$; $95,57 \pm 0,48\%$ và $9,58 \pm 1,48\%$. Tế bào phân lập từ sụn heo một ngày tuổi có đặc điểm tương tự tế bào gốc trung mô khi không biểu hiện CD34, CD45 và biểu hiện CD90, CD105. Tuy nhiên, biểu hiện của CD105 trên các tế bào P2 thấp hơn so với tế bào gốc trung mô.



Hình 3. Định danh tế bào bằng phương pháp dòng chảy

A: Thể hiện sự phân bố tế bào lợn một ngày tuổi, B: Phần trăm biểu hiện dấu ấn bề mặt CD34 là 0,43% (âm tính), C: Phần trăm biểu hiện dấu ấn bề mặt CD45 là 0,55% (âm tính), D: Phần trăm biểu hiện dấu ấn bề mặt CD90 là 96,04% (dương tính), E: Phần trăm biểu hiện dấu ấn bề mặt CD105 là 10,08% (dương tính).

Tốc độ tăng sinh của tế bào tính theo thời gian tăng đôi số lượng của tế bào (doubling time) là từ một đến hai ngày được khảo sát từ giai đoạn P1 đến P20 (Hình 4).

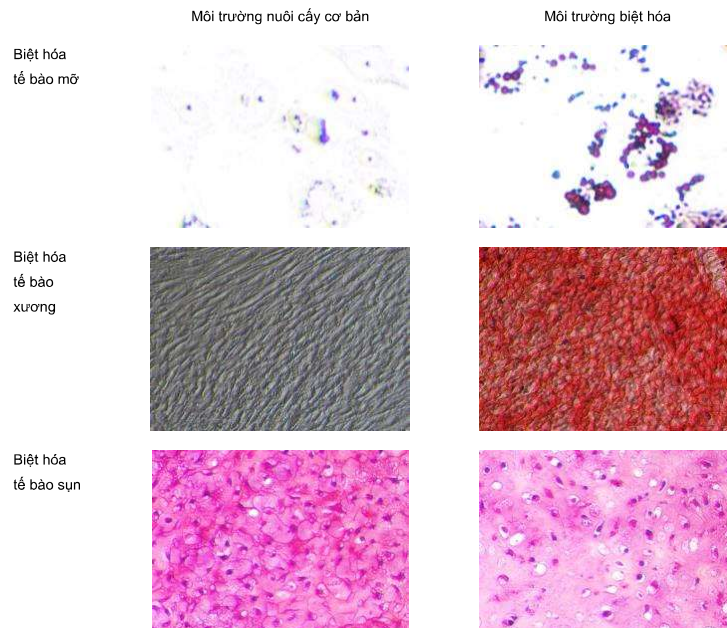


Hình 4. Tốc độ tăng sinh của tế bào được tính theo thời gian tăng đôi số lượng của tế bào (doubling time)

Đánh giá khả năng biệt hóa của tế bào gốc từ mô sụn của heo một ngày tuổi

Khả năng biệt hóa mỡ được quan sát bằng phương pháp nhuộm Oil Red O khi sử dụng môi trường biệt hóa. Các giọt mỡ được nhuộm màu đỏ được quan sát tại 14 ngày nuôi trong môi trường biệt hóa, so sánh đối chứng âm (tế bào không biệt hóa thành tế bào mỡ trong môi trường nuôi cấy căn bản) (Hình 5). Khả năng biệt hóa xương được quan sát bằng phương pháp nhuộm Alizarin Red khi sử dụng môi trường biệt hóa tế bào xương. Sự biệt hóa thành tế bào xương được xác định bằng khả năng nhuộm màu đỏ của Alizarin Red được quan sát tại 21 ngày nuôi trong môi trường biệt hóa, so sánh đối chứng âm (tế bào không biệt hóa thành tế bào xương trong môi trường nuôi cấy căn bản) (Hình 5).

Khả năng biệt hóa sụn, tế bào được nuôi cấy thành công thành khối 3D trong môi trường nuôi cấy căn bản lẫn môi trường biệt hóa sụn. Trong cả 2 môi trường nuôi, hình cắt lớp mỏng mẫu mô 3D đều biểu hiện màu của thuốc nhuộm Safranin-O. Tuy nhiên, tế bào sụn và lacunar (hốc nhỏ chứa tế bào sụn) được hình thành nhiều trong môi trường biệt hóa thành tế bào sụn. Ngược lại, lacunar không được hình thành trong môi trường nuôi cấy căn bản (Hình 5).



Hình 5. Kết quả đánh giá khả năng biệt hóa thành mỡ, xương, sụn của tế bào gốc phân lập từ sụn heo một ngày tuổi

Đánh giá khả năng tạo màng sinh học của tế bào gốc từ mô sụn của heo một ngày tuổi

Màng sinh học được tạo thành công trong môi trường tạo màng, sử dụng tế bào gốc từ mô sụn của heo một ngày tuổi (Hình 6A). Cấu trúc màng tế bào trước và sau khi khử bào được quan sát bằng phương pháp SEM và nhuộm H.E (Hình 6B). Kết quả thể hiện sự hiện diện của tế bào trong màng tế bào trước khi khử bào; ngược lại, tế bào bị khử và cấu trúc sợi được quan sát trên màng sau quá trình khử bào. Màng được tạo ra với độ dày 10 µm, nồng độ DNA là 17,67 ± 2,63 ng/mL (kết quả chưa công bố). Vật liệu này là cơ sở để nghiên cứu sản phẩm màng sinh học ứng dụng trong hỗ trợ điều trị tổn thương sụn khớp gối bằng phương pháp cấy ghép tế bào gốc.



Hình 6. (A) Quy trình tạo màng sinh học từ tế bào gốc cơ thể heo chưa trưởng thành; (B) Hình ảnh mô tả cấu trúc màng tế bào trước và sau khi khử tế bào bằng phương pháp SEM và nhuộm H.E.

KẾT LUẬN

Nguồn tế bào gốc được phân lập thành công từ mô sụn heo một ngày tuổi đã cho kết quả âm tính với các các bệnh truyền nhiễm (virus PRRS dòng châu Âu, virus PRRS dòng Bắc Mỹ, virus dịch tả heo, virus PRRS chủng độc lực cao, virus dịch tả heo châu Phi). Tế bào phân lập từ mô sụn heo 1 ngày tuổi có đặc điểm hình thái ổn định, tốc độ tăng sinh cao đến giai đoạn cấy chuyển thứ 20 (P20). Tế bào có đặc điểm tương tự tế bào gốc: i) Biểu hiện âm tính với CD34, CD45, dương tính với CD90 và CD105; ii) Có khả năng biệt hóa thành nhiều loại tế bào (mỡ, xương, sụn). Cuối cùng, màng sinh học được chế tạo từ tế bào gốc từ sụn heo một ngày tuổi, tạo tiền đề trong chế tạo màng thay thế màng xương trong điều trị bệnh tổn thương sụn khớp gối.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện nhờ kinh phí đề tài do Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh cấp (03/2023/HĐ-QKHCN): “Nghiên cứu chế tạo màng sinh học từ tế bào gốc cơ thể heo chưa trưởng thành sử dụng trong điều trị tổn thương sụn khớp gối”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Betzler, B. K., A. H. Bin Muhammad Ridzwan Chew and H. R. Bin Abd Razak (2021). "Intra-articular injection of orthobiologics in patients undergoing high tibial osteotomy for knee osteoarthritis is safe and effective - a systematic review." *J Exp Orthop* **8**(1): 83.

Fotopoulos, V., G. Mouzopoulos, T. Floros and M. Tzurbakis (2015). "Steroid-induced femoral head osteonecrosis in immune thrombocytopenia treatment with osteochondral autograft transplantation." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **23**(9): 2605-2610.

Goggs, R., A. Vaughan-Thomas, P. D. Clegg, S. D. Carter, J. F. Innes, A. Mobasheri, M. Shakibaei, W. Schwab and C. A. Bondy (2005). "Nutraceutical therapies for degenerative joint diseases: a critical review." *Crit Rev Food Sci Nutr* **45**(3): 145-164.

Hambly, K., H. J. Silvers and M. Steinwachs (2012). "Rehabilitation after Articular Cartilage Repair of the Knee in the Football (Soccer) Player." *Cartilage* **3**(1 Suppl): 50S-56S.

Hunter, D. J. and S. Bierma-Zeinstra (2019). "Osteoarthritis." *Lancet* **393**(10182): 1745-1759.

Kang, S. W., L. P. Bada, C. S. Kang, J. S. Lee, C. H. Kim, J. H. Park and B. S. Kim (2008). "Articular cartilage regeneration with microfracture and hyaluronic acid." *Biotechnol Lett* **30**(3): 435-439.

LaPrade, R. F. (2003). "Autologous chondrocyte implantation was superior to mosaicplasty for repair of articular cartilage defects in the knee at one year." *J Bone Joint Surg Am* **85**(11): 2259.

Ohashi, H., K. Nishida, A. Yoshida, Y. Nasu, R. Nakahara, Y. Matsumoto, A. Takeshita, D. Kaneda, M. Saeki and T. Ozaki (2021). "Adipose-Derived Extract Suppresses IL-1beta-Induced Inflammatory Signaling Pathways in Human Chondrocytes and Ameliorates the Cartilage Destruction of Experimental Osteoarthritis in Rats." *Int J Mol Sci* **22**(18).

Park, D. Y., B. H. Min, S. R. Park, H. J. Oh, M. D. Truong, M. Kim, J. Y. Choi, I. S. Park and B. H. Choi (2020). "Engineered cartilage utilizing fetal cartilage-derived progenitor cells for cartilage repair." *Sci Rep* **10**(1): 5722.

Stotter, C., S. Nehrer, T. Klestil and P. Reuter (2021). "[Autologous chondrocyte transplantation with bone augmentation for the treatment of osteochondral defects of the knee: Treatment of osteochondral defects of the femoral condyles using autologous cancellous bone from the iliac crest combined with matrix-guided autologous chondrocyte transplantation]." *Oper Orthop Traumatol*.

Thosani, R., V. Pawar, R. Giridhar and M. R. Yadav (2012). "Improved percutaneous delivery of some NSAIDs for the treatment of arthritis." *J Pharm Bioallied Sci* **4**(Suppl 1): S12-13.

Totlis, T., T. Marin Fermin, G. Kalifis, I. Terzidis, N. Maffulli and E. Papakostas (2021). "Arthroscopic debridement for focal articular cartilage lesions of the knee: A systematic review." *Surgeon* **19**(6): 356-364.

Truong, M. D., B. H. Choi, Y. J. Kim, M. S. Kim and B. H. Min (2017). "Granulocyte-macrophage - colony-stimulating factor (GM-CSF) significantly enhances articular cartilage repair potential by microfracture." *Osteoarthritis Cartilage* **25**(8): 1345-1352.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF STEMNESS IN ONE-DAY-OLD PORCINE CHONDROCYTES FOR BIO-MEMBRANE FABRICATION

**Vang Thi Pham, Trung-Nhan Vo, Thai-Duong Tran,
Vy-Khanh Vo, Thanh-Tam Nguyen-Thi, Minh-Dung Truong***

Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh city, Vietnam

SUMMARY

Stem cells successfully isolated from one-day-old porcine cartilage revealed negative results for infectious diseases (European PRRS virus, North American PRRS virus, swine fever virus, high virulent PRRS virus, and African swine fever virus). The isolation process yielded a high quantity of cells with stable morphology. This procedure provides an adequate supply of cells for research and future development directions. Cells isolated from one-day-old piglet cartilage exhibit stable morphology and high proliferation rates up to passage 20 (P20). These cells display characteristics similar to stem cells: i) Negative for CD34 and CD45, positive for CD90 and CD105; ii) Ability to differentiate into various cell types (adipocytes, osteocytes, chondrocytes). This research successfully isolated stem cells from one-day-old pig cartilage for application in creating a biological membrane. This bio-membrane has properties suitable for serving as a substitute for periosteal patches in the treatment of knee cartilage injuries via cell grafting techniques.

Keywords: Bio-membrane, knee cartilage injury, one-day-old porcine, porcine cartilage, stem cell.

* Author for correspondence: Tel: 0916680124; Email: truongminhdung@gmail.com