

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ HỒI PHỤC TỔN THƯƠNG SỤN *EX VIVO* VÀ *IN VIVO* CỦA VẬT LIỆU SINH HỌC 3D TRÊN MÔ HÌNH THỎ TRƯỞNG THÀNH

Trương Minh Dũng^{1*}, Võ Ngọc Bích Trâm¹, Nguyễn Hoàng Vinh¹,
 Dương Thị Hoàng Yến¹, Mai Hoàng Đức Quý¹, Cao Ngọc Minh Trang²

¹Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Văn Lang, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

TÓM TẮT

Liệu pháp tế bào gốc, đặc biệt là sử dụng tế bào gốc trung mô hoặc tế bào gốc tự thân, mang lại nhiều tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực y học tái tạo, bao gồm cả tái tạo mô sụn. Tuy nhiên, liệu pháp này cũng tồn tại một số hạn chế bao gồm lượng tế bào thu được thấp và khả năng tăng sinh sụn chưa cao. Việc phát triển các phương pháp tối ưu hóa hiệu quả liệu pháp này là vô cùng cần thiết. Trong nghiên cứu này, hiệu quả tái tạo sụn của vật liệu sinh học 3D từ tế bào gốc mô sụn khớp thỏ một ngày tuổi đánh giá. Đầu tiên, chúng tôi phân lập tế bào từ mô sụn khớp thỏ một ngày tuổi, nuôi tăng sinh và đánh giá các đặc điểm sinh học. Chế tạo vật liệu sinh học 3D dựa trên bốn phương pháp: tạo khối sụn, giọt treo (hanging drop), nuôi cấy viên (pellet culture) và nuôi trong dome matrigel. Các mẫu mô sụn tổn thương được cấy ghép vật liệu *ex vivo* và *in vivo* và đánh giá khả năng hồi phục bằng phương pháp nhuộm mô học. Kết quả thu được nguồn tế bào có hình thái giống nguyên bào sợi, bám trải tốt và có tiềm năng biệt hóa *in vitro* thành nguyên bào xương, nguyên bào sụn và tế bào mỡ. Dựa vào hình ảnh mô học, cả bốn phương pháp chế tạo cấu trúc vi mô sụn 3D đều cho thấy sự hình thành mô mới tại vị trí khiếm khuyết sụn. Từ kết quả đó có thể kết luận tế bào gốc mô sụn khớp thỏ một ngày tuổi có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực làm lành mô sụn bị tổn thương. Mặc dù thời gian thử nghiệm còn hạn chế, các phương pháp chế tạo vật liệu sinh học 3D đều đạt hiệu quả khả quan, mở ra hướng nghiên cứu và ứng dụng thực tế đầy hứa hẹn.

Từ khóa: Giọt treo, nuôi cấy viên, nuôi trong dome matrigel, tạo khối sụn, tế bào gốc mô sụn khớp thỏ một ngày tuổi, vật liệu sinh học 3D.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Liệu pháp tế bào gốc, hay còn gọi là liệu pháp tái tạo, là một phương pháp hiện đại, sử dụng tế bào gốc tự thân, đồng loại hoặc các sản phẩm từ tế bào gốc để phục hồi mô bị tổn thương (Whitney et al., 2017). So với các phương pháp điều trị truyền thống, liệu pháp tế bào gốc sở hữu nhiều ưu điểm vượt trội. Thay vì chỉ tập trung vào việc kiểm soát triệu chứng hoặc khắc phục tạm thời, liệu pháp này hướng đến mục tiêu thay thế tế bào bị tổn thương hoặc tạo ra môi trường nuôi dưỡng để kích thích quá trình tái tạo tự nhiên của cơ thể.

Trong lĩnh vực y học tái tạo, liệu pháp tế bào gốc được đánh giá là phương pháp đầy hứa hẹn, mở ra khả năng điều trị nhiều bệnh lý, đặc biệt là tái tạo sụn. Cấy ghép tế bào tự thân là phương pháp điều trị bằng tế bào đầu tiên được áp dụng và được sử dụng thường xuyên để phục hồi các khiếm khuyết sụn, cho thấy khả năng phục hồi tốt từ ngắn hạn đến trung hạn (Alves da Silva et al., 2017). Tuy nhiên, liệu pháp này có một số hạn chế, đặc biệt là khả năng tăng sinh sụn chưa được tối ưu (Lee et al., 2007).

Để khắc phục những hạn chế trên và nâng cao hiệu quả điều trị, các nghiên cứu gần đây đã tập trung vào việc tìm kiếm các nguồn tế bào gốc mới có tiềm năng tái tạo sụn tốt hơn. Một trong những hướng đi đầy hứa hẹn là sử dụng nguồn tế bào gốc tiền thân sụn từ cơ thể chưa trưởng thành có đặc điểm của cả tế bào gốc phôi và tế bào gốc trung mô (Lee et al., 2015). Khi so sánh khả năng tăng sinh và tổng hợp từ nguồn tế bào gốc tiền thân sụn ở các giai đoạn khác nhau từ cơ thể chuột chưa trưởng thành, ở giai đoạn ngày 20 của thai kỳ (gần ngày sinh của chuột) cho khả năng tăng sinh cao và là nguồn tế bào tốt nhất để tái tạo sụn (Kim et al., 2016). Dựa trên kết quả đó, nghiên cứu này sử dụng nguồn tế bào gốc mô sụn thỏ một ngày tuổi là nguồn tế bào chính để tạo vật liệu sinh học 3D dựa trên kỹ thuật mô và tránh các vấn đề liên quan đến đạo đức.

Kỹ thuật mô là một lĩnh vực của y học tái tạo nhằm tạo ra các cấu trúc mô nhân tạo để thay thế hoặc sửa chữa các mô và cơ quan bị tổn thương (Li et al., 2017). Quá trình này bao gồm việc sử dụng nguồn tế bào sống, kết hợp với các vật liệu sinh học và các yếu tố tăng trưởng để tạo ra các mô mới có cấu trúc và chức năng sinh học tương tự mô tự nhiên (Li et al., 2017). Vì vậy, nghiên cứu sử dụng nguồn tế bào gốc tiền thân sụn kết hợp với 4 phương pháp kỹ thuật mô: tạo khối sụn, giọt treo, nuôi cấy viên và nuôi trong dome matrigel để tạo vật liệu sinh học 3D ứng dụng trong lĩnh vực tái tạo mô sụn. Kết quả nghiên cứu mở ra hướng đi mới đầy tiềm năng cho lĩnh vực y học tái tạo, góp phần nâng cao hiệu quả điều trị và cải thiện chất lượng cuộc sống.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**Vật liệu**

Mẫu mô sụn khớp thỏ một ngày tuổi (giống New Zealand) được cung cấp từ trại nuôi, có sức khỏe tốt và không mắc các bệnh truyền nhiễm.

Phương pháp nghiên cứu***Phân lập và nuôi tăng sinh tế bào gốc mô sụn khớp thỏ một ngày tuổi***

Mẫu mô sụn được thu trong điều kiện vô trùng của phòng mổ và bảo quản trong dung dịch PBS có bổ sung 1% kháng sinh Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) ở 4°C cho tới khi xử lý để phân lập tế bào. Mẫu mô sụn được rửa 3 lần với PBS có chứa 1% Pen/Strep và được cắt thành từng mẫu mô nhỏ (< 1 mm) sau khi đã loại bỏ mô xương, mô mỡ và mô sợi. Sau đó, các mẫu mô nhỏ được ủ với enzyme collagenase loại II 0,1% trong tủ ấm 37°C. Sau 16 giờ, dịch tế bào được thu và ly tâm với tốc độ 1.700 vòng/phút trong 10 phút. Sau đó, phần sinh khối tế bào được lọc qua màng lọc tế bào 100 µM trong môi trường DMEM. Dịch tế bào thu được được ly tâm lại 2 lần trong môi trường DMEM với tốc độ 1.700 vòng/phút trong 10 phút. Mật độ tế bào được đánh giá trên buồng đếm Nauebaer và nuôi trong tủ ấm 37°C có 5% CO₂ với môi trường nuôi cấy dinh dưỡng DMEM, bổ sung 10% FBS, 1% Pen/Strep và 5 ng/mL bFGF-2. Tế bào được theo dõi thường xuyên và môi trường nuôi cấy được thay 3 ngày/lần. Khi mật độ tế bào cao đạt từ 80% diện tích bề mặt đĩa, thực hiện quy trình cấy chuyển bằng Trypsin/EDTA sang đĩa nuôi cấy mới.

Biệt hóa tế bào gốc mô sụn thành nguyên bào xương, tế bào mỡ và tế bào sụn

Tế bào được cảm ứng biệt hóa thành nguyên bào xương trong 21 ngày trong môi trường DMEM, bổ sung 10% FBS, 100 nM dexamethasone, 50 µg/mL ascorbic acid và 10 mM β-glycerol 2-phosphate. Thực hiện quy trình nhuộm với Alizarin Red S để đánh giá hiệu quả biệt hóa nguyên bào xương. Tế bào được cố định bằng dung dịch paraformaldehyde 2% trong 1 giờ và rửa sạch bề mặt tế bào bằng PBS hai lần. Nhuộm với thuốc nhuộm Alizarin Red S trong 30 phút và rửa bằng PBS.

Quy trình biệt hóa mỡ được tiến hành trong 14 ngày trong môi trường DMEM, bổ sung 10% FBS, 100 nM dexamethasone, 10 µg/mL insulin, 0,1 mM indomethacine và 0,5 mM 3-Isobutyl-2-methylxanthane. Đánh giá hiệu quả biệt hóa tạo mỡ qua quy trình nhuộm với Oil Red O. Quy trình nhuộm tiến hành tương tự như biệt hóa nguyên bào xương, chỉ thay thuốc nhuộm thành Oil Red O. Mẫu tế bào đối chứng được nuôi trong môi trường DMEM có 10% FBS và 1% Pen/Strep.

Để biệt hóa thành tế bào sụn, tế bào được tạo viên bằng phương pháp ly tâm ở tốc độ 300 rcf trong 20 phút và nuôi trong môi trường DMEM, bổ sung 10% FBS, 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. Thí nghiệm được thực hiện bao gồm hai nhóm: có bổ sung TGF-β3 và không bổ sung TGF-β3. Sau 21 ngày, đánh giá hiệu quả biệt hóa tạo sụn thông qua quy trình nhuộm với Safranin O. Cố định mẫu bằng 2% formaldehyde và đúc khối trong sáp paraffin. Mẫu được cắt thành các lát mỏng 5 µm và nhuộm với dung dịch thuốc nhuộm.

Tạo vật liệu 3D từ tế bào gốc mô sụn***Kỹ thuật tạo khối sụn***

Tế bào được nuôi ở mật độ cao trong môi trường biệt hóa sụn DMEM có 10% FBS, 1% Pen/Strep, insulin, 40 µg/mL L-proline, BSA, 100 µg/mL sodium pyruvate, 50 µg/mL ascorbate-2 phosphate và 100 nM dexamethasone để tạo thành một lớp màng tế bào. Sau 7 ngày nuôi, môi trường cũ được loại bỏ và rửa hai lần bằng dung dịch PBS. Màng tế bào được tách ra khỏi đĩa nuôi bằng Trypsin và ly tâm ở tốc độ 3000 rcf trong 20 phút. Các khối sụn sau khi ly tâm được nuôi cấy tĩnh kéo dài trong môi trường biệt hóa sụn trong vòng 14 ngày và môi trường được thay 3 ngày/lần.

Kỹ thuật giọt treo

Tế bào được huyền phù trong môi trường nuôi cấy DMEM, bổ sung 10% FBS, 1% Pen/Strep và 5 ng/mL bFGF-2. Tạo thành các giọt treo 50 µL/giọt trên nắp đĩa úp ngược và nuôi trong tủ ấm 37°C, có 5% CO₂. Hình thái tế bào được quan sát và theo dõi bằng kính hiển vi soi ngược.

Kỹ thuật nuôi cấy viên

Dịch tế bào được ly tâm ở tốc độ 300 rcf trong 10 phút để tạo thành viên sinh khối tế bào và nuôi trong eppendorf. Môi trường nuôi cấy gồm DMEM, 10% FBS, 1% Pen/Strep và 5 ng/ml bFGF-2. Sau 24 giờ, viên sinh khối được chuyển sang đĩa 48 giếng và nuôi trong môi trường cảm ứng biệt hóa sụn bao gồm DMEM, 10% FBS, 1% Pen/Strep, insulin, 40 µg/mL L-proline, BSA, 100 µg/mL sodium pyruvate, 50 µg/mL ascorbate-2 phosphate và 100 nM dexamethasone. Môi trường nuôi cấy được thay 3 ngày/lần và quá trình biệt hóa tế bào được theo dõi liên tục.

Kỹ thuật nuôi trong dome matrigel

Dịch tế bào được trộn với matrigel theo tỷ lệ 1:1. Hỗn hợp này được tạo thành các dome với 50 µL/dome trong đĩa 48 giếng. Sau đó, các dome được ủ trong tủ ẩm 37°C, 5% CO₂ cho đông đặc lại. Sau 30 phút, môi trường nuôi cấy DMEM bổ sung 10% FBS, 1% Pen/Strep và 5 ng/mL bFGF-2 được thêm vào mỗi giếng (1 mL). Các dome được quan sát và môi trường được thay mới 3 ngày/lần.

Thử nghiệm hiệu quả hồi phục của vật liệu sinh học

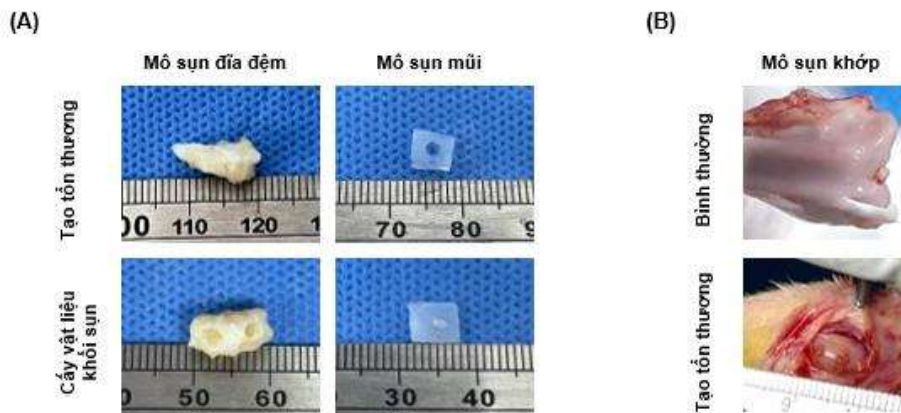
Thử nghiệm ex vivo trên mô sụn đĩa đệm và mũi thỏ

Thí nghiệm được tiến hành trên mẫu mô sụn đĩa đệm và mũi ở thỏ trưởng thành. Sau khi thu mẫu đĩa đệm và sụn mũi, vị trí khiếm khuyết được tạo trên mẫu mô sụn với đường kính 2 mm (Hình 1). Sau đó, vật liệu khối sụn được cấy vào vị trí khiếm khuyết và các mẫu được nuôi trong môi trường biệt hoá sụn có bổ sung 10 µL TGF-β3 ở tủ ẩm 37°C, có 5% CO₂. Mẫu mô hình ex vivo bao gồm một nhóm chứng âm, một nhóm chứng dương và ba nhóm thử nghiệm vật liệu. Các mẫu được theo dõi và môi trường được thay định kỳ 3 ngày/lần. Sau 14 ngày nuôi, các mẫu mô được kiểm tra hiệu quả hồi phục tổn thương bằng phương pháp mô học.

Thử nghiệm in vivo trên mô sụn khớp thỏ

Lựa chọn các giống thỏ đực trưởng thành cân nặng từ 2,0 – 2,5 kg, được nuôi trong điều kiện môi trường như nhau. Thí nghiệm được thiết kế với 6 nhóm bao gồm một nhóm mô bình thường, một nhóm mô tổn thương và 4 nhóm thử nghiệm cấy ghép vật liệu. Để kiểm tra độ tin cậy và tính nhất quán của kết quả, thử nghiệm được lặp lại 2 lần trên mỗi mô hình (chân phải và chân trái) và mỗi chân tạo 2 tổn thương khiếm khuyết sụn. Vị trí khiếm khuyết được tạo trên bề mặt sụn khớp với đường kính 2 mm, độ sâu vừa đủ có thể làm lộ phần xương dưới sụn nhưng không xuyên qua xương (Hình 1). Các tổn thương trên bề mặt các mẫu mô sụn khớp được tạo bằng dụng cụ chuyên dụng để đảm bảo về độ tương đồng.

Thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện ánh sáng đầy đủ và đảm bảo các tiêu chuẩn vệ sinh. Sau phẫu thuật, thỏ được chăm sóc đặc biệt để đảm bảo quá trình hồi phục diễn ra nhanh chóng và hiệu quả. Điều kiện lý tưởng bao gồm không gian thoáng mát, yên tĩnh, chuồng thỏ được vệ sinh thường xuyên và thỏ được cung cấp thức ăn, nước uống đầy đủ. Ngoài ra, thỏ được theo dõi và kiểm tra vết mổ thường xuyên. Sau 4 tuần, các mẫu mô được đánh giá hiệu quả hồi phục tổn thương bằng phương pháp mô học. Mẫu mô sụn thu tại vị trí cấy ghép được nhuộm H&E để quan sát và đánh giá mức độ sửa chữa sụn. Đồng thời, mẫu mô cũng được nhuộm Safranin O để xác định hàm lượng GAGs tại vị trí cấy ghép.

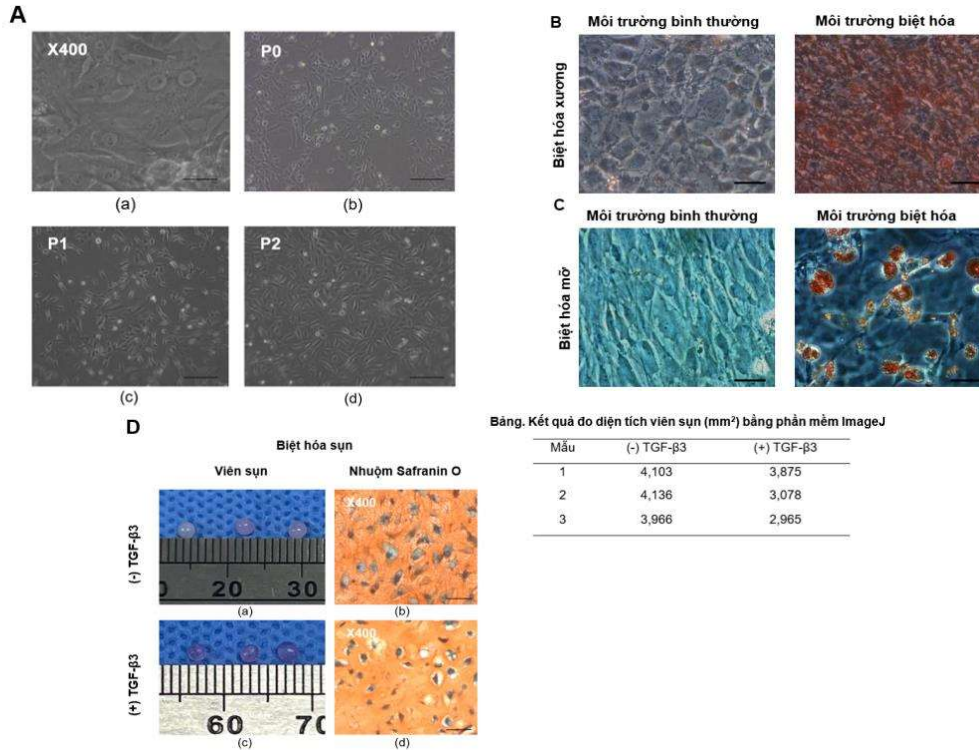


Hình 1. Thử nghiệm vật liệu sinh học ex vivo trên mô sụn đĩa đệm và mũi (A) và in vivo trên mô sụn khớp (B)

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hình thái và khả năng tăng sinh tế bào gốc mô sụn

Sau 24 giờ nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng, tế bào từ dạng hình cầu trôi lơ lửng chuyển sang dạng hình dẹt và bám dính trên bề mặt đĩa nuôi cấy (Hình 2A). Tế bào tiếp tục phát triển mạnh thành hình sợi dài như nguyên bào sợi với bên trong chứa nhân, nhánh bào tương kéo dài, màng tế bào hoàn chỉnh đồng nhất bám trải trên bề mặt đĩa nuôi cấy. Trong nghiên cứu này, tế bào được phân lập từ mô sụn khớp thỏ có hình thái tương tự như tế bào gốc trung mô phân lập từ tủy xương người (Baghaei et al., 2017). Sau mỗi lần cấy chuyển, mật độ tế bào thu được cao hơn và tốc độ tăng sinh nhanh hơn so với lượng tế bào thu được trước đó.



Hình 2. Hình thái tế bào và kết quả biệt hóa *in vitro*. (A) Tế bào ở độ phóng đại x 400 scale bar 20 μ m (a) và qua từng thế hệ P0 (b), P1 (c), P2 (d) ở độ phóng đại x100 scale bar 100 μ m. (B) Kết quả nhuộm Alizarin Red S cho biệt hóa xương và (C) Kết quả nhuộm Oil Red O cho biệt hóa tạo mỡ ở độ phóng đại x400 scale bar 20 μ m. (D) Kích thước biệt hóa viên sụn không bổ sung TGF- β 3 (a) và có TGF- β 3 (c) lần lượt với kết quả nhuộm Safranin O (b) và (d) ở độ phóng đại x400 scale bar 20 μ m.

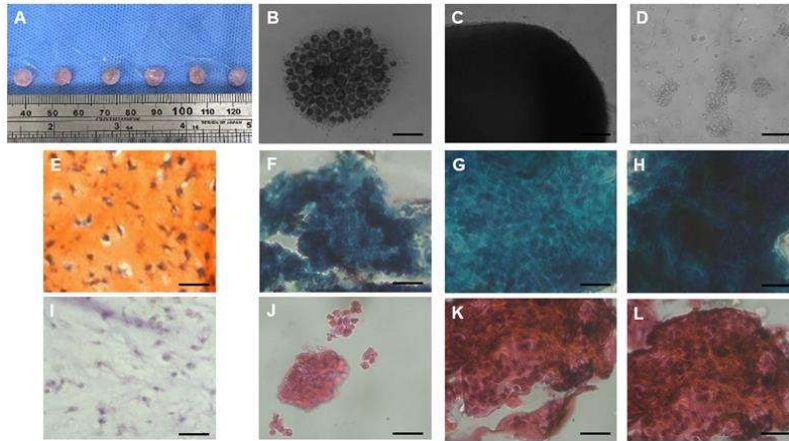
Tiềm năng biệt hóa *in vitro* thành ba dòng

Tế bào gốc mô sụn có sự thay đổi hình thái khi nuôi trong môi trường cảm ứng biệt hóa đặc hiệu thành nguyên bào xương, tế bào mỡ và tế bào sụn. Trong môi trường cảm ứng biệt hóa tạo xương, hình thái tế bào chuyển sang dạng hạt đậu, tổng hợp chất nền ngoại bào xương, Alizarin Red S sẽ liên kết với các ion calcium trong chất nền và bắt màu cam thuốc nhuộm (Hình 2B). Khi được cảm ứng biệt hóa tạo mỡ, tế bào chuyển sang dạng hình cầu, bào tương chứa các hạt lipid nhỏ kết tụ vào nhau tạo thành các hạt lipid lớn hơn và bắt màu đỏ đặc trưng của thuốc nhuộm Oil Red O (Hình 2C). Ngược lại, đối với mẫu đối chứng, tế bào không có sự thay đổi về mặt hình thái và bắt khá ít màu thuốc nhuộm Alizarin Red S và Oil Red O.

Khi được nuôi cảm ứng biệt hóa tạo sụn, viên sụn được nuôi biệt hóa trong môi trường có bổ sung TGF- β 3 có màu sắc trong hơn và kích thước nhỏ hơn viên sụn nuôi biệt hóa trong môi trường không bổ sung TGF- β 3 (Hình 2D). GAGs trong chất nền ngoại bào ở cả hai mẫu viên sụn đều bắt màu đỏ cam của thuốc nhuộm Safranin O (Hình 2D). Chứng tỏ, tế bào gốc mô sụn khớp thỏ một ngày tuổi có tiềm năng biệt hóa thành sụn ngay cả khi có bổ sung TGF- β 3 hay không. Như vậy, tế bào gốc mô sụn khớp thỏ một ngày tuổi có tiềm năng biệt hóa thành ba dòng trung mô, tương đồng với kết quả của các nghiên cứu trước đó (Ouzin et al., 2023).

Kết quả tạo vật liệu 3D từ tế bào gốc mô sụn

Nghiên cứu tạo vật liệu 3D bằng bốn kỹ thuật khác nhau mang đến những ưu điểm riêng biệt trong nghiên cứu và ứng dụng. Trong kỹ thuật tạo khối sụn, tế bào được nuôi ở mật độ cao, tạo thành một lớp màng màu trắng đục có cấu trúc ổn định. Qua đánh giá cảm quan sau khi ly tâm, khối sụn thu được có kích thước khoảng 6 mm, dẻo dai và kết dính tốt (Hình 3A). Kỹ thuật giọt treo tận dụng lực căng bề mặt và lực hấp dẫn để giữ các tế bào trên bề mặt đĩa úp ngược, tạo thành cấu trúc 3D. Ban đầu, tế bào được phân tán đều trong giọt treo, diện tích tiếp xúc nhỏ, tạo điều kiện cho tế bào tương tác với nhau và hình thành các cụm tế bào hình cầu tròn đều, thể hiện đúng cấu trúc đặc trưng của Spheroid (Hình 3B). Trong kỹ thuật nuôi cấy viên, sau khi ly tâm, tế bào tạo thành cấu trúc dạng viên (pellet) rắn do các tế bào tương tác liên kết chặt chẽ với nhau (Hình 3C). Trong quá trình nuôi, tế bào còn tiết ra chất nền ngoại bào hỗ trợ cho sự phát triển và kết dính tế bào, giúp vật liệu có độ bền và khả năng chịu lực cao. Kỹ thuật nuôi trong dome matrigel sử dụng matrigel đông đặc ở 37°C như giá đỡ, tạo thành một mạng lưới 3D cung cấp không gian cho tế bào tăng sinh và hình thành các cụm tế bào cấu trúc 3D (Hình 3D).

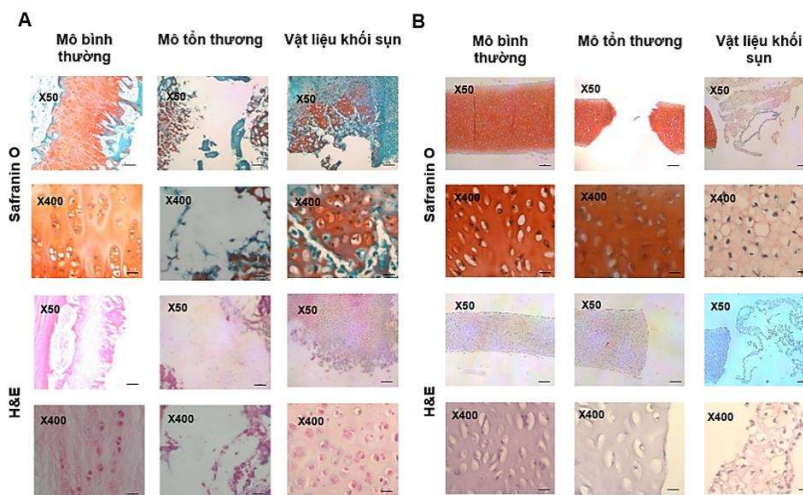


Hình 3. Hình thái và kết quả nhuộm mô học của 4 mẫu vật liệu. Kích thước vật liệu khối sụn (A); vật liệu giọt treo, scale bar 200 μm (B) và vật liệu nuôi cấy viên (C), nuôi trong dome matrigel (D) scale bar 100 μm . Kết quả nhuộm Safranin O (E-H) và H&E (I-L) của 4 mẫu vật liệu, scale bar 20 μm .

Từ hình ảnh mô học, vật liệu sinh học được tạo ra từ phương pháp giọt treo, nuôi cấy viên và nuôi trong dome matrigel, chất nền không bắt màu đỏ cam khi nhuộm Safranin O (Hình 3F-H). Điều này có thể giải thích bởi sự khác biệt trong môi trường nuôi cấy. Cụ thể, các phương pháp trên sử dụng môi trường cơ bản, không đặc biệt ưu tiên cho quá trình biệt hóa thành mô sụn. Trong khi đó, phương pháp tạo khối sụn được nuôi trong môi trường biệt hóa để kích thích quá trình biệt hóa thành tế bào sụn. Chính vì vậy, vật liệu từ phương pháp tạo khối sụn có chất nền bắt màu đỏ cam khi nhuộm Safranin O, một màu đặc trưng của các chất nền ngoại bào trong mô sụn (Hình 3E). Chứng tỏ vật liệu khối sụn được tạo thành có chứa hàm lượng GAGs tương đồng với kết quả nghiên cứu tạo vật liệu sụn từ tế bào tiền thân sụn tại nhi trước đó (Park et al., 2020). Phân tích hình ảnh nhuộm H&E, cả 4 phương pháp tạo vật liệu đều thấy sự phân bố của tế bào với nhân tế bào nhuộm màu xanh đậm của Hematoxylin và chất nền bắt màu hồng của Eosin. Cả 4 phương pháp đều thành công trong việc tạo ra một môi trường nuôi cấy hỗ trợ cho sự tổng hợp và phát triển của tế bào, mở ra triển vọng ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực công nghệ tế bào và y học tái tạo.

Đánh giá khả năng làm lành mô sụn bằng mô học

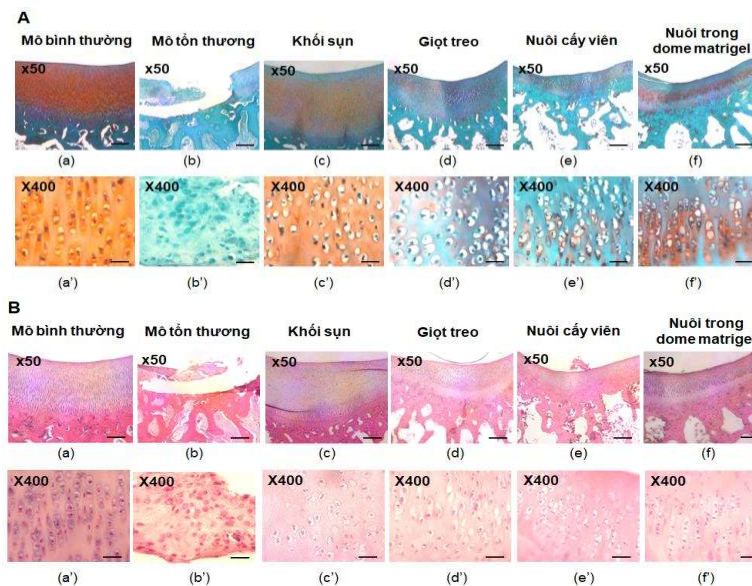
Trong thử nghiệm *ex vivo*, kết quả nhuộm Safranin O cho thấy sự hình thành ban đầu của chất nền sụn tại vị trí cấy ghép. Chất nền bắt màu đỏ đậm, không đồng nhất và thể hiện hàm lượng proteoglycan thấp (Hình 4). Do thời gian thí nghiệm ngắn, quá trình làm lành mô tại vị trí tổn thương chưa được quan sát rõ. Tuy nhiên, khi so sánh với nghiên cứu trước đây, kết quả này phù hợp với giai đoạn hình thành ban đầu tại vị trí tổn thương sau 2 tuần trên mô hình chuột nude thiếu hụt sụn (Park et al., 2020). Phân tích kết quả nhuộm H&E, tế bào sụn trong các mẫu ghép có sự khác biệt so với mô sụn bình thường. Chất nền bắt màu hồng của Eosin và nhân tế bào bắt màu xanh đậm Hematoxylin, kích thước tế bào khác nhau, phân bố rải rác và sắp xếp không trật tự. Do đó cần thêm thời gian thử nghiệm *ex vivo* để đạt được hiệu quả tối ưu hơn.



Hình 4. Kết quả nhuộm Safranin O và H&E của các mẫu trong thử nghiệm *ex vivo* trên mô sụn đĩa đệm (A) và mô sụn mũi (B) với độ phóng đại x50 (scale bar 200 μm) hoặc x400 (scale bar 20 μm).

Sau 4 tuần cấy ghép vật liệu *in vivo*, kết quả nhuộm Safranin O cho thấy, sự hình thành chất nền sụn tại vị trí cấy ghép trong tất cả 4 phương pháp điều trị. Tuy nhiên, hàm lượng GAGs trong chất nền này thấp hơn so với mô sụn bình thường (Hình 5A). Khi so sánh giữa các phương pháp tạo vật liệu, phương pháp tạo khối sụn cho kết quả nhuộm Safranin O tốt nhất (Hình 5A.c). Điều này là do lượng lớn tế bào và chất nền ngoại bào đã được bổ sung vào vị trí tổn thương, từ đó thúc đẩy quá trình làm lành tổn thương hiệu quả hơn như trong nghiên cứu trước đây (Park et al., 2020). Bên cạnh đó, bề mặt các mẫu mô sụn cấy ghép đều phẳng mịn và không có dấu hiệu bong tróc. Ngược lại, ở mẫu mô tổn thương không cấy ghép vật liệu, lượng chất nền sụn hình thành khá ít do màu nhuộm Safranin O nhạt màu hơn so với mô bình thường và mô cấy ghép vật liệu (Hình 5A.b). Ngoài ra, mô mới được tạo thành không bám dính vào mô chủ (Hình 5B.b), vì mô sụn có khả năng tự tái tạo hạn chế.

Kết quả nhuộm H&E cho thấy, các mẫu cấy ghép đều có sự hình thành các tế bào sụn mới. Tuy nhiên, khi so sánh với mô sụn bình thường, các tế bào sụn này có một số đặc điểm khác biệt (Hình 5B). Cụ thể, ở hầu hết các mẫu, tế bào sụn tồn tại dưới dạng tế bào đơn, phân bố không đều và sắp xếp lộn xộn (hình 5B.c'-e'). Ngược lại, đối với phương pháp nuôi trong dome matrigel, các tế bào sụn có xu hướng xếp chồng lên nhau tạo thành cấu trúc hình cột, tương tự như mô bình thường nhưng với mật độ tế bào thấp hơn (Hình 5B.f). Đặc biệt, cả 4 phương pháp điều trị đều hình thành mô mới có cấu trúc tương tự mô bình thường và cải thiện đáng kể quá trình phục hồi tổn thương so với mô tổn thương không cấy ghép vật liệu. Những kết quả thu được từ nghiên cứu này không chỉ củng cố thêm các bằng chứng khoa học về khả năng tái tạo mô sụn mà còn mở ra hướng đi mới, hiệu quả hơn so với các phương pháp trước đây (Chen et al., 2020; Cheung et al., 2008; Li et al., 2024, Park et al., 2020).



Hình 5. Kết quả nhuộm mô học của các mẫu thử nghiệm *in vivo* trên mô sụn. Hình ảnh tiêu bản nhuộm với Safranin O (A) và H&E (B). Mẫu mô bình thường, mô tổn thương ở độ phóng đại x50 scale bar 200 μ m (a,b) và ở độ phóng đại x400 scale bar 20 μ m (a',b'); mô đã cấy ghép vật liệu bằng 4 phương pháp ở độ phóng đại x50 scale bar 200 μ m (c-f) và ở độ phóng đại x400 scale bar 20 μ m (c'-f').

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu này là cơ sở cho việc ứng dụng kỹ thuật mô từ nguồn tế bào gốc mô sụn khớp thỏ một ngày tuổi trong lĩnh vực làm lành mô sụn tổn thương. Mặc dù thời gian thử nghiệm còn hạn chế, các phương pháp chế tạo vật liệu sinh học 3D đều đạt hiệu quả khả quan, mở ra hướng nghiên cứu và ứng dụng thực tế đầy hứa hẹn.

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/HD-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

- Alves da Silva, M., Martins, A., Costa - Pinto, A. R., Monteiro, N., Faria, S., Reis, R. L., & Neves, N. M. (2017). Electrospun nanofibrous meshes cultured with Wharton's jelly stem cell: an alternative for cartilage regeneration, without the need of growth factors. *Biotechnology Journal*, 12(12), 1700073.
- Baghaei, K., Hashemi, S. M., Tokhanbigli, S., Rad, A. A., Assadzadeh-Aghdaei, H., Sharifian, A., & Zali, M. R. (2017). Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 10(3), 208.
- Chen, Y., Ma, M., Teng, Y., Cao, H., Yang, Y., Wang, Y., ... & Zhang, X. (2020). Efficient manufacturing of tissue engineered cartilage *in vitro* by a multiplexed 3D cultured method. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(10), 2082-2095.

- Cheung, W. H., Chow, K. H., Lee, K. M., & Leung, K. S. (2008). Chondrocyte-Pellet Culture for Cartilage Repair Research. *A Practical Manual For Musculoskeletal Research*, 165.
- Kim, M., Kim, J., Park, S. R., Park, D. Y., Kim, Y. J., Choi, B. H., & Min, B. H. (2016). Comparison of fetal cartilage-derived progenitor cells isolated at different developmental stages in a rat model. *Development, Growth & Differentiation*, 58(2), 167-179.
- Lee, S. H., & Shin, H. (2007). Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, 59(4-5), 339-359.
- Lee, S. J., Oh, H. J., Truong, M. D., Lee, K. B., Kim, J., Kim, Y. J., ... & Min, B. H. (2015). Therapeutic possibility of human fetal cartilage-derived progenitor cells in rat arthritis model. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12, 147-154.
- Li, S., Qian, T., Wang, X., Liu, J., & Gu, X. (2017). Noncoding RNAs and their potential therapeutic applications in tissue engineering. *Engineering*, 3(1), 3-15.
- Li, X., Sheng, S., Li, G., Hu, Y., Zhou, F., Geng, Z., & Su, J. (2024). Research Progress in Hydrogels for Cartilage Organoids. *Advanced Healthcare Materials*, 2400431.
- Ouzin, M., & Kogler, G. (2023). Mesenchymal stromal cells: heterogeneity and therapeutical applications. *Cells*, 12(16), 2039.
- Park, D. Y., Min, B. H., Park, S. R., Oh, H. J., Truong, M. D., Kim, M., ... & Choi, B. H. (2020). Engineered cartilage utilizing fetal cartilage-derived progenitor cells for cartilage repair. *Scientific Reports*, 10(1), 5722.
- Whitney, K. E., Liebowitz, A., Bolia, I. K., Chahla, J., Ravuri, S., Evans, T. A., ... & Huard, J. (2017). Current perspectives on biological approaches for osteoarthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1410(1), 26-43.

EVALUATION OF *EX VIVO* AND *IN VIVO* CARTILAGE REPAIR EFFICACY OF 3D BIOMATERIALS IN ADULT RABBIT MODELS

Minh-Dung Truong^{1*}, Vo Ngoc Bich Tram¹, Nguyen Hoang Vinh¹,
Duong Thi Hoang Yen¹, Mai Hoang Duc Quy¹, Cao Ngoc Minh Trang²

¹Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Van Lang University, Ho Chi Minh City, Vietnam

SUMMARY

Stem cell therapy, particularly utilizing mesenchymal stem cells (MSCs) or autologous stem cells, holds immense promise in regenerative medicine, including cartilage regeneration. However, this therapeutic approach has limitations, including low cell yield and limited cartilage regeneration capacity. Therefore, the development of strategies to optimize the efficacy of this therapy is of paramount importance. This study aimed to investigate the fabrication of 3D biomaterials from one-day-old rabbit articular chondrocyte progenitor cells for cartilage regenerative medicine applications. In this study, we isolated cells from the articular cartilage of one-day-old rabbits, expanded them in culture, and evaluated their biological characteristics. 3D biomaterials were fabricated using four methods: cartilage construct formation, hanging drop, pellet culture, and matrigel dome culture. *Ex vivo* and *in vivo* experiments were performed in a cartilage defect rabbit model, and the repair capacity was assessed using histological staining. The isolated cell population exhibited fibroblast-like morphology, adhered to the culture dish surface, and possessed the *in vitro* differentiation potential towards three cell lineages: osteoblasts, chondroblasts and adipocytes. Histological analysis revealed new tissue formation at the cartilage defect site in the damage model for all methods of fabricating 3D biomaterials. In conclusion, one-day-old rabbit articular chondrocyte progenitor cells is potentially useful for biomedical application in repairing damaged cartilage tissue. Despite the short experimental duration, the various 3D biomaterial fabrication methods demonstrated satisfactory outcomes, paving the way for future research and practical applications.

Keywords: Cartilage construct formation, hanging drop, matrigel dome culture, one-day-old rabbit articular chondrocyte progenitor cells, pellet culture, 3D biomaterials.

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