

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đỗ Thanh Vân

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP, NHÂN NUÔI TẾ BÀO GỐC MỠ BÒ
ĐỊNH HƯỚNG TẠO THỊT NHÂN TẠO**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội – 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đỗ Thanh Vân

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP, NHÂN NUÔI TẾ BÀO GỐC MỠ BÒ
ĐỊNH HƯỚNG TẠO THỊT NHÂN TẠO**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Mã số: 842 01 14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

TS. Nguyễn Văn Hạnh

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'NVH', is written over a horizontal blue line.

Hà Nội – 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Hà Nội, ngày 30 tháng 10 năm 2024

Học viên



Đỗ Thanh Vân

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, em xin bày tỏ sự kính trọng và biết ơn sâu sắc nhất tới TS. **Nguyễn Văn Hạnh** – Phó Trưởng phòng Phòng Công nghệ sinh học động vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, là người thầy đã luôn dạy em những kiến thức và kỹ năng trong suốt quá trình thực hiện đề tài luận văn thạc sĩ.

Em xin gửi lời cảm ơn tới các anh chị trong Phòng Công nghệ sinh học động vật, Viện Công nghệ sinh học đã giúp đỡ em rất nhiệt tình và đóng góp những ý kiến bổ ích cũng như tận tình chỉ dạy, tạo điều kiện giúp đỡ em thực hiện luận văn này.

Em xin trân trọng cảm ơn đến Ban giám đốc, các thầy giáo, cô giáo thuộc Khoa Công nghệ sinh học, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam đã tạo mọi điều kiện, hướng dẫn, truyền đạt cho em rất nhiều kiến thức trong quá trình học tập tại Học viện.

Sau cùng, em xin gửi lời biết ơn sâu sắc đến gia đình, bạn bè và đồng nghiệp đã đồng hành và hỗ trợ em rất nhiều trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Hà Nội, ngày 30 tháng 10 năm 2024

Học viên



Đỗ Thanh Vân

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT.....	v
DANH MỤC BẢNG.....	vi
DANH MỤC HÌNH ẢNH	vii
MỞ ĐẦU.....	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. TỔNG QUAN VỀ THỊT NHÂN TẠO.....	3
1.2. TỔNG QUAN VỀ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ	4
1.2.1. Khái niệm tế bào gốc trung mô.....	4
1.2.2. Nguồn gốc tế bào gốc trung mô.....	5
1.2.3. Marker biểu hiện	8
1.3. TỔNG QUAN VỀ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ MÔ MỠ.....	9
1.3.1. Tình hình nghiên cứu	9
1.3.2. Phương pháp phân lập, nhân nuôi tế bào gốc trung mô mỡ	11
1.3.3. Khả năng tăng sinh, độ ổn định của tế bào gốc trung mô mỡ	12
1.3.4. Tiềm năng biệt hoá của tế bào gốc trung mô mỡ.....	12
1.3.5. Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ bò.....	13
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	15
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	15
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	15
2.2.1. Phân lập và nuôi cấy tế bào gốc trung mô mỡ.....	15
2.2.1.1. <i>Phân lập tế bào</i>	15
2.2.1.2. <i>Phương pháp cấy chuyên</i>	16
2.2.2. Phương pháp đánh giá sự tăng sinh của tế bào	16
2.2.2.1. <i>Phương pháp đánh giá thời gian tăng gấp đôi số lượng tế bào (population doubling time, PDT)</i>	16

2.2.2.2. Phương pháp đánh giá sự tăng sinh tế bào theo ngày	16
2.2.3. Phương pháp tách ARN	17
2.2.4. Phương pháp chạy điện di mẫu DNA sau PCR	19
2.2.5. Phương pháp biệt hóa tế bào gốc trung mô mỡ thành tế bào mỡ	19
2.2.6. Phương pháp biệt hóa tế bào gốc trung mô mỡ thành nguyên bào xương	19
2.2.7. Phương pháp biệt hóa tế bào gốc trung mô mỡ thành tế bào cơ.....	20
2.2.8. Phương pháp xử lý số liệu	20
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	21
3.1. KẾT QUẢ PHÂN LẬP TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ MỠ.....	21
3.1.1. Vị trí thu thập mẫu mô mỡ bò.....	21
3.1.2. Kết quả phân lập tế bào gốc trung mô từ mô mỡ.....	22
3.1.2.1. Kết quả phân lập tế bào gốc trung mô từ mô mỡ theo phương pháp nuôi cấy mảnh mô mỡ.....	22
3.1.2.2. Kết quả phân lập tế bào gốc trung mô mỡ theo phương pháp ủ trypsin	24
3.1.3. So sánh hiệu quả phân lập tế bào gốc trung mô mỡ từ hai phương pháp nuôi cấy mảnh mô mỡ và phương pháp ủ trypsin.....	26
3.2. TỐC ĐỘ TĂNG SINH VÀ ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ MỠ TRONG ĐIỀU KIỆN NUÔI IN VITRO.	29
3.3. BIỂU HIỆN CỦA MỘT SỐ MARKERS ĐẶC TRƯNG CỦA TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ MỠ.....	35
3.4. KẾT QUẢ BIỆT HÓA TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ MỠ BÒ	37
3.4.1. Biệt hóa tế bào gốc trung mô mỡ thành tế bào mỡ.....	37
3.4.2. Tế bào gốc trung mô mỡ biệt hóa thành tế bào xương	38
3.4.3. Tế bào gốc trung mô mỡ biệt hóa thành tế bào cơ.....	39
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	42
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	43

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Viết tắt	Tên đầy đủ	Tên tiếng Việt
ASC	Adipose-derived stem cells	Tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ mô mỡ
BM-MSC	Bone marrow-derived mesenchymal stem cells	Tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ tuỷ xương
cDNA	Complementary DNA	DNA bổ sung
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium	Môi trường DMEM
DMEM HG	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium High glucose	Môi trường DMEM giàu glucose
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylene Diaminetetraacetic Acid	Ethylene Diaminetetraacetic Acid
ESC	Embryonic stem cell	Tế bào gốc phôi
FBS	Fetal Bovine Serum	Huyết thanh thai bò
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
iPSC	Induced pluripotent stem cell	Tế bào gốc vạn năng cảm ứng
MSC	Mesenchymal stem cells	Tế bào gốc trung mô
PBS	Phosphate Buffered Saline	Nước muối đệm photphate
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
PDT	Population doubling time	Thời gian nhân đôi quần thể
RNA	Ribonucleic acid	Ribonucleic acid
SC	Satellite cell	Tế bào vệ tinh
UC-MSC	Umbilical cord derived mesenchymal stem cells	Tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ dây rốn

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1. Trình tự môi 18

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1. Tiềm năng biệt hoá của MSC.....	4
Hình 3. 1. Hình ảnh vùng bàn chân bê và mô mỡ sau khi bộc lộ	21
Hình 3. 2. Hình ảnh tế bào mọc ra từ mảnh mô mỡ sau khi nuôi ngày 3	22
Hình 3. 3. Hình ảnh tế bào mọc từ mảnh mô mỡ sau 6 ngày nuôi cấy.....	23
Hình 3. 4. Hình ảnh tế bào sau khi cấy chuyển lần 1 ngày 3	23
Hình 3. 5. Hình ảnh ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin sau khi nuôi sơ cấp ngày 3.....	24
Hình 3. 6. Hình ảnh ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin sau khi nuôi sơ cấp ngày 6.....	25
Hình 3. 7. Hình ảnh ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin sau khi cấy chuyển lần 1 ngày 3.....	26
Hình 3. 8. Hình ảnh biểu đồ thời gian tăng sinh gấp đôi số lượng tế bào (PDT) của ASC phân lập theo hai phương pháp ủ trypsin và nuôi cấy mảnh mô	27
Hình 3. 9. Hình ảnh ASC ở lần cấy chuyển 2 sau khi nuôi ngày 5	28
Hình 3. 10. Hình ảnh biểu đồ so sánh tăng sinh tế bào ở P2 theo ngày của ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin và phương pháp nuôi cấy mảnh mô	30
Hình 3. 11. Hình ảnh ASC sau khi cấy chuyển ở P2 ngày thứ 1 và 3	31
Hình 3. 12. Hình ảnh ASC sau khi cấy chuyển ở P2 ngày thứ 5 và 7	32
Hình 3. 13. Tăng sinh ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin ở hai lần cấy chuyển khác nhau (P9 và P11).....	33
Hình 3. 14. Thời gian tăng sinh gấp đôi số lượng tế bào ở các lần cấy chuyển từ 2 - 6 của ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin.....	35
Hình 3. 15. Hình ảnh nhuộm gel sau khi chạy điện di các marker đặc trưng của ASC với sản phẩm cDNA.....	36
Hình 3. 16. Hình ảnh nhuộm gel sau khi chạy điện di các marker đặc trưng của ASC với sản phẩm cDNA từ ASC bò ở lần cấy chuyển 6	36
Hình 3. 17. Hình ảnh ASC ở lần cấy chuyển 4 sau khi biệt hoá tạo mỡ	38
Hình 3. 18. ASC sau biệt hóa xương bắt màu với Azidin Red.....	39
Hình 3. 19. Hình ảnh ASC sau khi biệt hoá cơ.....	40

MỞ ĐẦU

Thịt nhân tạo là thực phẩm thay thế mới nhằm mục đích cung cấp một loại thực phẩm lành mạnh, bền vững hơn so với thịt thông thường. Khác với chăn nuôi truyền thống, việc sản xuất thịt nhân tạo gần như không bị ảnh hưởng bởi những điều kiện tự nhiên, dịch bệnh.... Nhu cầu sử dụng ngày càng tăng cao do sự gia tăng dân số mà ngành chăn nuôi truyền thống có thể chưa đáp ứng được thì thịt nhân tạo có thể là một giải pháp thay thế với những ưu điểm như không gây ô nhiễm môi trường, chất lượng thịt đảm bảo [1]. Ngoài ra hàm lượng chất dinh dưỡng trong thịt nhân tạo sẽ được điều chỉnh như mong muốn [2].

Năm 1999, Willem Frederik Van Eelen được cấp bằng sáng chế đầu tiên về sản xuất thịt trong phòng thí nghiệm cho người và động vật [3]. Đến năm 2013, Marc Post công bố miếng thịt nhân tạo đầu tiên ra thị trường đã làm lĩnh vực này được mở rộng đáng kể. Một số công ty khởi nghiệp công nghiệp quy mô nhỏ thu hút số lượng đầu tư ngày càng tăng, hiện đang tập trung vào việc cung cấp sản phẩm thịt nhân tạo đầu tiên dựa trên tế bào bò, lợn, gia cầm. Tuy nhiên, hệ thống để sản xuất thịt nhân tạo đòi hỏi các kỹ thuật công nghệ phức tạp và sự tương tác giữa nhiều lĩnh vực nghiên cứu, chẳng hạn như phân lập và mô tả đặc điểm tế bào gốc, thiết kế lò phản ứng sinh học và mở rộng quy mô nuôi cấy tế bào, tối ưu hóa môi trường tăng trưởng, giàn giáo ba chiều và đánh giá cảm quan và dinh dưỡng [4].

Thịt nhân tạo có thể tạo ra bằng cách nuôi cấy các tế bào động vật có khả năng tăng sinh cao, có khả năng biệt hóa thành các sợi cơ trưởng thành, tức là thành phần chính của thịt truyền thống. Một số loại tế bào gốc về mặt lý thuyết có thể được sử dụng cho mục đích này, ví dụ: tế bào gốc phôi (ESC) [5, 6], tế bào gốc trung mô (MSC) [7], tế bào gốc vạn năng cảm ứng (iPSC) [8], tế bào vệ tinh (SC) [4].

Các MSC có nguồn gốc từ mô mỡ (ASC) là một quần thể các tế bào kết dính dẻo, đa năng thu được thông qua quá trình tiêu hóa collagenase của mô mỡ trắng [9]. ASC được phân lập từ động vật đáp ứng các tiêu chí định tính của MSC, bao gồm khả năng tự làm mới cao, phân biệt thành các dòng như

tạo xương, tạo sụn, tạo thần kinh hoặc tạo cơ, cũng như khả năng điều hoà miễn dịch [10].

Xuất phát từ những cơ sở khoa học và tiềm năng ứng dụng của tế bào gốc trung mô mỡ, chúng tôi tiến hành nghiên cứu: “*Nghiên cứu phân lập, nhân nuôi tế bào gốc mỡ bò định hướng tạo thịt nhân tạo*” nhằm phân lập, đánh giá khả năng tăng sinh của tế bào gốc trung mô mỡ bò trong nuôi cấy và khả năng biệt hoá tế bào trung mô mỡ thành tế bào cơ định hướng tạo thịt nhân tạo.

1. Mục đích của đề tài

Nghiên cứu thực hiện với mục đích có thông tin về khả năng phân lập, nhân nuôi, đánh giá độ tăng sinh, độ ổn định, khả năng biệt hóa của tế bào gốc trung mô từ mẫu mô mỡ bò.

2. Nội dung chi tiết của luận văn thạc sĩ

Nội dung 1: Phân lập, nhân nuôi cấy tế bào gốc trung mô mỡ. Đánh giá khả năng tăng sinh và độ ổn định của tế bào gốc trung mô mỡ trong điều kiện nuôi in vitro. Đánh giá biểu hiện của một số markers đặc trưng của tế bào gốc trung mô mỡ.

Nội dung 2: Đánh giá khả năng biệt hóa của tế bào gốc trung mô mỡ trong điều kiện in vitro.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. TỔNG QUAN VỀ THỊT NHÂN TẠO

Ngành chăn nuôi truyền thống chiếm hơn 18% lượng khí thải nhà kính gây ra biến đổi khí hậu toàn cầu và có liên quan đến nhiều vấn đề khác nhau, chẳng hạn như ô nhiễm môi trường, bệnh tật và các vấn đề về đạo đức động vật [4]. Ngoài ra, theo Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp của Liên Hợp Quốc, mức tiêu thụ thịt sẽ tăng 14% vào năm 2030 so với giai đoạn cơ sở trung bình trong giai đoạn 2018–2020, chủ yếu do tăng trưởng thu nhập và dân số [11]. Vì những vấn đề này, mối quan tâm nghiên cứu và thị trường cho các sản phẩm thay thế thịt để thay thế thịt thật đã được hồi sinh. Các sản phẩm thay thế thịt từ thực vật khá hạn chế vì hàm lượng dinh dưỡng và hương vị của chúng rất khác so với thịt thật [12]. Do đó, trong những năm gần đây, nghiên cứu quan trọng đã được thực hiện trên thịt nhân tạo. Năm 2013, Mark Post và cộng sự giới thiệu một loại bánh mì kẹp thịt được sản xuất bằng cách nuôi cấy tế bào gốc cơ được thu hoạch từ một con bò vào năm 2013, từ đó nhiều loại thịt nhân tạo khác nhau đã được sản xuất [13]. Thịt nhân tạo đã được đề xuất nghiên cứu tại nhiều quốc gia trên thế giới. Cuối năm 2020, Singapore đã chính thức cho phép bán các sản phẩm chứa thịt nhân tạo. Thịt nhân tạo được kỳ vọng là một loại thực phẩm trong tương lai giúp đối phó với tình trạng tăng dân số và hạn chế ô nhiễm do khí thải chăn nuôi hiện nay. Thịt nhân tạo những sinh khối ăn được được tạo ra bằng cách nuôi cấy in vitro tế bào thu nhận từ động vật sống.

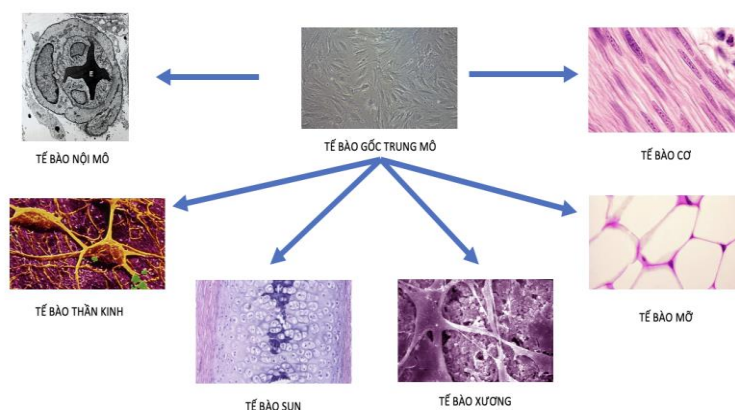
Thịt nhân tạo (còn được gọi là thịt “dựa trên tế bào” hoặc “được nuôi cấy”) là một lĩnh vực công nghệ sinh học mới nổi nhằm giải quyết các vấn đề bền vững liên quan đến sản xuất thịt truyền thống, bằng cách tận dụng khả năng tăng sinh và biệt hóa của tế bào gốc để tạo ra các mô trưởng thành, ăn được cho con người tiêu thụ trong ống nghiệm. Những công nghệ như vậy có thể mang lại những lợi ích đáng kể về môi trường, tính bền vững và phúc lợi động vật khi so sánh với thịt được nuôi truyền thống [14].

1.2. TỔNG QUAN VỀ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ

1.2.1. Khái niệm tế bào gốc trung mô

Việc phát hiện ra tính đa tiềm năng của MSC là một bước đột phá trong lĩnh vực tế bào gốc. MSC thường cư trú trong các mô trung mô, có nguồn gốc từ trung bì trong quá trình phát triển phôi thai [15]. MSC lần đầu tiên được mô tả là dạng tế bào từ tủy xương có khả năng tạo dòng, là một nguồn tế bào giống như nguyên bào sợi và bám dính trên môi trường nuôi cấy [16]. Nhiều thuật ngữ được đề nghị nhằm chỉ định cho MSC như MSC, tế bào tiền thân trung mô, tế bào gốc mô đệm, tế bào tiền thân tủy xương hay tế bào đệm trung mô đa năng [17].

Các MSC được tìm thấy trong tủy xương, nhau thai và dịch bào thai, dây rốn, mô mỡ, dịch ối, tủy răng, lớp trung bì của da [18]. Chúng có khả năng biệt hóa thành các loại tế bào khác nhau, bao gồm cả tế bào xương, tế bào sụn, chất béo và cơ, cũng như các quần thể giống như dây thần kinh, tế bào biểu mô và tế bào nội mô [19-21] (Hình 1.1). Các tế bào tái tạo này có chức năng chữa lành vết thương và tái tạo mô bình thường, duy trì các mô trong suốt cuộc đời của chúng.



Hình 1. Tiềm năng biệt hoá của MSC

MSC được đánh giá cao vì liên quan đến ít vấn đề đạo đức hơn việc sử dụng ESC. Có khả năng tránh được các phản ứng miễn dịch khi thu hoạch tế bào tự thân. Ngoài ra chúng có khả năng tăng sinh mạnh khi nuôi cấy trong môi trường thích hợp và tiềm năng biệt hoá cao. Ngoài ra MSC cũng có những hạn chế, không giống như ESC, về mặt lý thuyết có khả năng sao chép

vô hạn, MSC có xu hướng mất khả năng tăng sinh và biệt hóa sau thời gian dài cấy chuyên trong ống nghiệm [22]. Sự thoái hóa này là không mong muốn và thường không thể đoán trước. Tuy vậy, với những điểm yếu đã được ghi nhận nhưng những nghiên cứu về MSC ngày càng tăng và được xác định đã hiện diện ở nhiều loài. MSC được đánh giá là nguồn tế bào tiềm năng, có những ứng dụng to lớn trong nhiều công nghệ khác.

1.2.2. Nguồn gốc tế bào gốc trung mô

Tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ tủy xương

Tủy xương là mô đầu tiên được mô tả là nguồn cung cấp các tế bào giống như nguyên bào sợi, bám dính bằng chất dẻo, phát triển các đơn vị hình thành nguyên bào sợi khi được cấy vào các đĩa nuôi cấy mô. Các MSC có nguồn gốc từ tủy xương (BM-MSCs) lần đầu tiên được phân lập và xác định ở chuột và được mô tả là các tế bào không tạo máu có khả năng biệt hóa thành các mô trung mô, chẳng hạn như tế bào mỡ, nguyên bào xương, tế bào sụn và tế bào cơ xương [23].

Ở gia súc, tủy xương là nguồn cung cấp MSC trong một số nghiên cứu [24]. Trong quy trình này, các tế bào tủy được hút từ bê và được phân lập để phân tích thêm. Quá trình tạo sụn tự phát của MSC bò trong nuôi cấy xảy ra mà không cần bổ sung bất kỳ chất kích thích hoạt tính sinh học bên ngoài nào, tức là các yếu tố tăng trưởng biến đổi TGF- β , trước đây được coi là cần thiết [25]. Cùng một nhóm đã phân lập MSC của bò từ tám con bê và khiến chúng trải qua quá trình biệt hóa tạo xương, tạo sụn và tạo mỡ [26]. Một năm sau, cùng một nhóm đã phân tích phản ứng tạo sụn của MSC trong quá trình nuôi cấy trên các loại chất nền ngoại bào khác nhau. MSC của bò được nuôi cấy trong lớp đơn lớp cũng như trong hydrogel alginate và collagen loại I và II, trong cả môi trường không có huyết thanh và môi trường bổ sung TGF- β 1 [27]. Sự khác biệt nổi bật nhất trong các tế bào được nuôi cấy trong hydrogel collagen loại II và nó tăng lên theo cách phụ thuộc vào thời gian. Sử dụng TGF- β 1 với sự có mặt của collagen loại II đã tạo điều kiện thuận lợi hơn cho sự tạo sụn. Người ta đã kết luận rằng collagen loại II có khả năng tạo ra và duy trì quá trình tạo sụn của MSC, nhưng với sự hiện diện của TGF- β 1, các tế bào biểu hiện mức độ phiên mã cao hơn của các gen liên quan đến sự biệt hóa, cho thấy sự khác biệt có độ chính xác cao hơn. Sự hiện diện của MSC có

nguồn gốc từ tủy xương với cấu hình đa năng đã được chứng minh trong các thí nghiệm sau này. Các tế bào bám chặt vào bề mặt đĩa nuôi cấy và thể hiện hình thái giống như nguyên bào sợi. Ngoài ra, các tế bào biểu thị các dấu hiệu đa năng, chẳng hạn như OCT4, SOX2 và NANOG, cũng như các dấu hiệu MSC điển hình, bao gồm CD29, CD90 và CD105. Khi các tế bào được phân lập từ tủy xương của thai nhi, chúng biểu hiện hình thái giống như nguyên bào sợi và có thể biệt hóa thành các dòng tế bào thần kinh và tế bào gan. Các tế bào không chỉ dương tính với các dấu hiệu MSC CD29 và CD73 mà còn đối với các dấu hiệu đa năng, trong khi chúng âm tính với các dấu hiệu tạo máu CD34 và CD45 [28].

Tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ mô mỡ

Hiện nay, tủy xương và mô mỡ là nguồn MSC chính trong thú y [29]. Tuy nhiên, ASC có một số lợi thế so với BM-ASC, phân lập dễ dàng hơn và các tế bào có mật sự phát triển nhanh hơn trong ống nghiệm độ cao hơn [30]. Cho đến nay, chỉ có hai nghiên cứu ở loài bò với MSC được phân lập từ mô mỡ [31-33]. Trong cả hai nghiên cứu, các tế bào biểu hiện hình thái giống như nguyên bào sợi và có thể biệt hóa thành các dòng tạo xương, tạo sụn và tạo mỡ; chúng thể hiện các dấu hiệu MSC khác nhau trong mỗi nghiên cứu. Trong một nghiên cứu, các tế bào dương tính với các dấu hiệu CD105, CD73, CD29, CD90 và H2A và âm tính với các dấu hiệu CD45, CD34 và CD44 [31], trong khi ở nghiên cứu khác, các tế bào dương tính với CD90, CD105 và CD79 và âm tính đối với CD45, CD34 và CD73 [32]. MSC được biết là thể hiện sự biến đổi đáng kể giữa các quần thể trong sự tăng sinh, biệt hóa và kiểu hình phân tử của chúng [34-36].

Tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ dây rốn

Dây rốn có hai nguồn MSC (UC-ASC). Một là máu dây rốn, từ đó các tế bào được phân lập bằng gradient mật độ, và thứ hai là mô dây rốn, từ đó các tế bào có thể được phân tách bằng tác động của enzym. Máu dây rốn được thu thập không xâm lấn và đại diện cho một nguồn tế bào gốc thay thế khi so sánh với mô mỡ và tủy xương. Ngoài ra, tính khả dụng cao và khả năng sinh miễn dịch thấp hơn của các tế bào máu dây rốn so với các nguồn tế bào gốc khác như tủy xương đã khiến chúng trở thành nguồn khả thi và có giá trị cho liệu pháp tế bào [37].

Người ta đã báo cáo rằng các tế bào được phân lập từ máu cuống rốn của con người có nhiều MSC và độ dẻo cao hơn, linh hoạt hơn về mặt di truyền so với BM-MSC [38, 39]. Mặc dù các UC-MSC ở người, chuột và các loài gia cầm được nghiên cứu nhiều, nhưng người ta biết rất ít về các tế bào này ở các loài vật nuôi [40]. Nghiên cứu đầu tiên phân lập MSC của bò từ máu cuống rốn đã quan sát thấy rằng các tế bào phát triển thành các tấm tế bào đơn lớp và có thể mở rộng thành các đoạn cao. Ngoài ra, các tế bào biểu hiện OCT4 và CD73 và có thể biệt hóa thành các dòng tạo xương, tạo sụn và tạo mỡ [37].

Hơn nữa, những tế bào đó có thể biệt hóa thành xương, phôi bào, nguyên bào mỡ, tế bào gan, tế bào tụy tạng và tế bào thần kinh, cho thấy tiềm năng sử dụng của chúng cho các ứng dụng thử nghiệm và lâm sàng đối với bò, và rất quan trọng cho thấy bằng chứng rằng MSC có khả năng biệt hóa thành các dòng không thuộc trung bì [40].

Tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ nhau thai và nước ối

Nhau thai thực hiện một số vai trò rất quan trọng trong thai kỳ, bao gồm chịu trách nhiệm cung cấp chất dinh dưỡng, sản xuất hormone, loại bỏ chất thải và tạo điều kiện trao đổi khí [41]. Nhau thai có thể được phân lập dễ dàng bằng cách thu hoạch không xâm lấn sau khi sinh mà không có bất kỳ lo ngại nào về đạo đức [42]. Chỉ có một nghiên cứu với các MSC có nguồn gốc từ nhau thai bò đã được công bố, trong đó các tác giả đã biệt hóa thành công các tế bào từ các tế bào gốc nhau thai. Các tế bào được phân lập biểu thị các dấu hiệu MSC điển hình, bao gồm CD73 và CD166, và một dấu hiệu đa năng, OCT4, nhưng không phải là dấu hiệu tạo máu, chẳng hạn như CD45 [42].

Đã có báo cáo rằng nước ối là nguồn MSC dồi dào có thể được thu hoạch với chi phí thấp và không vi phạm về đạo đức [43]. Các tác giả đã phân lập MSC từ nước ối và các tế bào biểu hiện hình thái giống như nguyên bào sợi chỉ bắt đầu từ đoạn thứ tư, không đồng nhất trong quá trình nuôi cấy sơ cấp. Kết quả miễn dịch huỳnh quang cho thấy MSC dịch ối dương tính với CD44, CD73 và CD166 nhưng âm tính với CD34 và CD45. Ngoài ra, các tế bào biểu hiện OCT4 và khi được cảm ứng một cách thích hợp có thể phân biệt thành các dòng ngoại bì và trung bì [43].

Tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ nội mạc tử cung

Các tế bào mô đệm nội mạc tử cung phát triển và biệt hóa trong suốt chu kỳ động dục và mang thai [44]. Ngoài ra, những tế bào này được biết là điều chỉnh hệ thống miễn dịch và có thể có các ứng dụng lâm sàng cho sức khỏe con người và động vật [33]. Một số nghiên cứu đã phân lập và mô tả các MSC của bò trong nội mạc tử cung [33]. Các tế bào có hình thái giống như nguyên bào sợi và khi được nuôi cấy trong môi trường tạo xương cụ thể, chúng nhanh chóng phát triển các đặc điểm của xương khoáng hóa [44]. Các tế bào có nguồn gốc từ nội mạc tử cung được phát hiện biểu hiện các dấu hiệu MSC như CD29 và CD44 [45] và các dấu hiệu đa năng như OCT4, SOX2 và c-KIT [46]. Hơn nữa, các tế bào đã thể hiện tính vô tính cao, khả năng biệt hóa trong các dòng tế bào trung mô và khả năng duy trì chất lượng tốt sau quá trình bảo quản lạnh [33]. Một báo cáo gần đây cho thấy khả năng của các tế bào nội mạc tử cung bám dính vào các đĩa nuôi cấy, hiển thị hình thái giống như nguyên bào sợi, khả năng tăng sinh cao và khả năng biệt hóa thành các dòng sụn, tạo xương và tạo mỡ.

1.2.3. Marker biểu hiện

MSC biểu hiện CD105, CD73 và CD90 và thiếu biểu hiện của các dấu hiệu tạo máu như CD45, CD34, CD14 hoặc CD11b, CD79 α hoặc CD19 và các phân tử bề mặt HLA-DR [17]. Tuy nhiên, các MSC từ các loài khác nhau không thể hiện tất cả các dấu hiệu giống nhau [42]. Ngoài ra, người ta đã chứng minh rằng các MSC được phân lập từ các mô khác nhau thể hiện các dấu hiệu khác nhau và có độ dẻo khác nhau [47].

Ví dụ, MSC của chó đã được chứng minh là dương tính với các dấu hiệu STRO-1 và CD44 và âm tính với CD73, một dấu hiệu MSC điển hình của con người [48]. Sau đó, khi các dấu hiệu phân tử MSC từ mô mỡ của chó và mô buồng trứng được so sánh, người ta thấy rằng cả hai loại tế bào dẫn xuất đều biểu hiện CD44, CD90 và CD105; tuy nhiên, các tế bào có nguồn gốc từ MSC buồng trứng biểu hiện mức OCT4 cao hơn so với các tế bào có nguồn gốc từ mỡ [49].

Ở người, BM-MS, ASC và UC-MS được so sánh và chứng minh là thể hiện các mức độ khác nhau của một số dấu MSC nhất định, bao gồm biểu hiện thấp hơn của CD90 và biểu hiện cao hơn của CD105 bởi UC-MS so

với các nguồn khác [50], tương tự như kết quả được tìm thấy ở các loài ngựa. Các tế bào có nguồn gốc từ mô mỡ, tủy xương và máu cuống rốn của con người được so sánh về các dấu hiệu đa năng của chúng. Nó đã chỉ ra rằng ASC có biểu hiện cao nhất của Sox2, Klf4 và Lin28 nhưng thấp nhất của gen Oct4 và cMyc. Trong khi đó, BM-ASC có nhiều biểu hiện Nanog và cMyc hơn và biểu hiện thấp nhất của Rex1. UC-ASC có nhiều biểu hiện hơn của Rex-1 và Oct4 [51].

Liên quan đến các loài bò, các MSC của bò có nguồn gốc từ các mô khác nhau đã được chứng minh là dương tính với các dấu hiệu trung mô liên quan đến độ bám dính như CD29, CD166, CD105, các enzym bề mặt như CD73, các thụ thể như CD44 và glycoprotein như CD90 [52]. Thật thú vị, MSC của bò cũng thể hiện các dấu hiệu đa năng như OCT4, SOX2 và NANOG [53], ủng hộ ý kiến cho rằng MSC có tiềm năng trở thành đa năng và biệt hóa thành ba lớp mầm, điều này đã được chứng minh trước đây bằng sự biệt hóa thành công MSC của bò thành nguyên bào xương, nguyên bào mỡ, tế bào gan, tế bào đảo nhỏ và tế bào thần kinh [54].

Bất kể nguồn tế bào hoặc quy trình phân lập, MSC phải biểu hiện CD105, CD73 và CD90 và không biểu hiện các dấu hiệu tạo máu như CD45, CD34, CD14 hoặc CD11b, CD79 α hoặc CD19 và các phân tử bề mặt HLA-DR, như được thiết lập bởi Hiệp hội Liệu pháp Tế bào Quốc tế như là tiêu chí tối thiểu để mô tả đặc điểm của MSC ở người [17]. Hiện tại, không có tiêu chí cụ thể cho đặc tính của MSC ở gia súc. Những thách thức trong tương lai bao gồm việc xác định một giao thức mô tả đặc tính tiêu chuẩn của MSC trong loài này. Mặc dù thiếu kháng thể thương mại cho gia súc, PCR có thể được sử dụng để nghiên cứu hồ sơ phân tử MSC. Đối với y học dịch mã, cần thực hiện đánh giá đầy đủ các nguồn MSC khác nhau để đánh giá sự tương đồng giữa MSC của người và bò.

1.3. TỔNG QUAN VỀ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ MÔ MỠ

1.3.1. Tình hình nghiên cứu

MSC đại diện cho một nguồn chính của các tế bào đa tiềm năng, là tiền thân của các tế bào từ các mô cụ thể [21]. Ví dụ, ASC là các tế bào giống như nguyên bào sợi có khả năng hỗ trợ quá trình tạo máu và biệt hóa

thành các tế bào mỡ, nguyên bào sợi, nguyên bào cơ, tế bào sụn và nguyên bào xương [20]. ASC là một quần thể các tế bào kết dính dẻo, đa năng thu được thông qua quá trình tiêu hóa collagenase của mô mỡ trắng [9].

Năm 1977, Van và Roncari báo cáo những tế bào có khả năng tăng trưởng và có những đặc điểm hình thái tương tự các tế bào mỡ ở mô mỡ chuột trưởng thành [55].

Đến năm 2001, A. Zuk đã đăng bài báo trên tạp chí Tissue Engineering, là nhóm nghiên cứu đầu tiên thu nhận các tế bào gốc trưởng thành từ dịch hút mô mỡ, đây là những tế bào gốc đa tiềm năng được phân lập từ phân đoạn chất nền – mạch máu từ mô mỡ [56].

Năm 2002, nhóm nghiên cứu của Patrick CW tiến hành nghiên cứu nuôi các tế bào tiền thân tạo mỡ từ chuột trên giá thể PLGA, sau đó ghép lại trên chuột thực nghiệm và theo dõi kết quả trong thời gian 1-12 tháng. Kết quả cho thấy có thể tái tạo mô mỡ trong điều kiện in vivo [57].

Năm 2003, Lee và cộng sự đã thu nhận các ASC chuột Lewis, sau đó cảm ứng biệt hóa thành các tế bào xương và tế bào mỡ. Đây là nhóm nghiên cứu đầu tiên báo cáo kết quả về khả năng tạo mô mỡ và mô xương in vivo từ ASC. Đây là chìa khóa cho các ứng dụng kỹ thuật mô mỡ và mô xương trong tương lai [58].

Năm 2007, Niemela và cộng sự đã thu nhận ASC, đánh giá khả năng biệt hóa in vitro và in vivo của các tế bào gốc này. Nhóm nghiên cứu kết luận ASC ứng dụng trong kỹ thuật mô là rất tiềm năng [59]

ASC có thể dễ dàng thu được với số lượng lớn từ mô mỡ của người trưởng thành và được nuôi cấy trong ống nghiệm, khiến việc sử dụng các tế bào này trở thành một lựa chọn khả thi cho các ứng dụng tiếp theo, chẳng hạn như cấy ghép tự thân [60].

Nghiên cứu ứng dụng tế bào gốc là một lĩnh vực còn khá mới không chỉ ở Việt Nam mà ngay cả trên thế giới. Hiện tại thì lĩnh vực nghiên cứu và ứng dụng mô mỡ và tế bào gốc thu nhận từ mô mỡ chủ yếu phục vụ nghiên cứu và ứng dụng lâm sàng nhằm tái tạo các khuyết hỏng liên quan đến mô mềm, tái tạo cấu trúc mô, phẫu thuật thẩm mỹ hoặc bù đắp các khuyết hỏng do chấn thương.

Ngoài những ứng dụng về liệu pháp tế bào và y học tái tạo, cũng đã có những nghiên cứu tạo thịt nhân tạo hướng đến nguồn thực phẩm tốt cho người ăn kiêng, ăn chay, mắc các bệnh suy thận, gout... bằng cách sinh thiết miếng thịt bò và đưa vào phòng thí nghiệm để nuôi cấy. Bước đầu, đã tạo ra được giá đỡ bằng kỹ thuật in sinh học 3D, tạo được độ dai của miếng thịt. Đây chỉ là những nghiên cứu bước đầu, để nghiên cứu ra thịt nhân tạo thì phải qua rất nhiều bước, tốn nhiều kinh phí.

1.3.2. Phương pháp phân lập, nhân nuôi tế bào gốc trung mô mỡ

Phương pháp ban đầu để phân lập MSC đã được Rodbell và cộng sự (1966) nghiên cứu [61]. Phương pháp phân lập này sử dụng enzyme collagenase để phân tách các MSC từ mô mỡ chuột. Mô mỡ chuột được cắt nhỏ, rửa sạch để loại bỏ các tế bào tạo máu bị ô nhiễm, ủ các mảnh mô bằng collagenase và ly tâm để thu cặn tế bào. Các tế bào sau khi nuôi bám dính nhựa là các tế bào ASC. Sau đó, quy trình này đã được sửa đổi để phân lập tế bào từ mẫu mô mỡ của con người [62]. Trên bò, hai phương pháp được sử dụng để phân lập ASC từ mô mỡ là phương pháp nuôi cấy mảnh mô và phương pháp xử lý bằng enzyme [63-66] đã so sánh hiệu quả phân lập ASC bằng phương pháp xử lý enzyme và nuôi cấy mảnh mô lên khả năng tăng sinh và khả năng biệt hóa thành tế bào mỡ của ASC phân lập từ mô mỡ dưới da và nội tạng. Phương pháp phân lập ASC theo phương pháp nuôi cấy mảnh mô rất đơn giản và không cần enzyme đắt tiền trong khi phương pháp xử lý bằng enzyme phức tạp, tốn thời gian và chi phí. Bằng phương pháp nuôi cấy mô, một số lượng lớn ASC được phân lập từ các kho mỡ dưới da và nội tạng. Ngược lại, phương pháp xử lý bằng enzyme thu được ít ASC hơn, đặc biệt là từ mỡ nội tạng. ASC được phân lập bằng phương pháp nuôi cấy mô có khả năng tăng sinh tế bào và biệt hóa tế bào mỡ tốt nhưng thấp hơn so với phương pháp xử lý bằng enzyme. ASC được phân lập từ mỡ nội tạng có khả năng tăng sinh và khả năng biệt hóa thành tế bào mỡ cao hơn.

Với phương pháp phân lập ASC sử dụng enzyme, nhiều nghiên cứu trên động vật cho thấy nồng độ collagenase (chủ yếu là loại I hoặc II) thay đổi trong khoảng từ 0,01% đến 0,2%, nhưng nồng độ 0,1% là độ pha loãng thích hợp của enzyme. Ngoài ra còn có báo cáo mô tả quy trình enzyme kết hợp bao gồm trypsin (w/v, 0,25%) và collagenase loại I (w/v, 0,1% hoặc

0,2%) được sử dụng để phân lập ASC từ mỡ bụng của gia súc [65]. Các sản phẩm y tế, bao gồm MatrascTM, cũng đã được báo cáo là đã được sử dụng.

1.3.3. Khả năng tăng sinh, độ ổn định của tế bào gốc trung mô mỡ

Sự tăng sinh của ASC đã được chứng minh là đặc trưng cho loài và phụ thuộc nhiều vào môi trường nuôi cấy được sử dụng. Thật vậy, Schwartz và cộng sự [67] phát hiện ra rằng thời gian nhân đôi quần thể (PDT) của ASC lợn thay đổi trong khoảng 65 ± 7 giờ đối với tế bào nuôi cấy trong môi trường bổ sung FBS và 54 ± 3 giờ trong môi trường bổ sung chất thay thế huyết thanh. Các nghiên cứu khác cho thấy rằng PDT của ASC lợn là 54 ± 19 giờ trong môi trường chứa huyết thanh [68]. Một sự khác biệt tương tự đã được quan sát thấy trong các nghiên cứu sử dụng ASC của bò [69]. Các nghiên cứu độc lập từ hai phòng thí nghiệm đã chứng minh rằng PDT của các từ đoạn 1 đến đoạn 5 được mở rộng và đạt giá trị tương ứng là $16,44 \pm 0,33$ giờ và $22,06 \pm 0,32$ giờ, trong khi các nhà nghiên cứu khác đã báo cáo PDT không đổi từ đoạn 1 đến đoạn 9 tương đương với $30 \pm 1,9$ giờ [69]. Tương tự như vậy, không có sự khác biệt về tỷ lệ tăng sinh của ASC được quan sát thấy trong môi trường nuôi cấy ASC của cừu trong quá trình mở rộng lũy tiến cho đến đoạn 6 [70]. Ở ngựa, PDT được hiển thị là $24,23 \pm 4,45$ giờ [71]. Ngược lại, những nhà nghiên cứu khác cho rằng trong các điều kiện nuôi cấy có thể so sánh được, PDT của ASC ngựa là $2,2 \pm 0,2$ ngày [72]. Mặc dù sự tăng sinh của ASC ngựa đã được chứng minh là rất khác nhau, nhưng có bằng chứng đáng kể rằng chức năng này ở ASC lớn hơn so với MSC tủy xương hoặc MSC dây rốn.

1.3.4. Tiềm năng biệt hoá của tế bào gốc trung mô mỡ

Những nghiên cứu trước đây cho rằng tế bào gốc chỉ có thể biệt hóa thành tế bào của cùng một cơ quan nhưng những bằng chứng gần đây cho thấy chúng cũng có khả năng biệt hóa thành các loại tế bào khác nhau và thậm chí thành tế bào của ngoại bì, trung bì và nội bì [73].

Trong những năm gần đây, ASC có nguồn gốc từ động vật đã thu hút được nhiều sự chú ý hơn do các đặc tính như tính dẻo, khả năng biệt hóa, biểu hiện của các dấu hiệu đa năng và các đặc tính điều hòa miễn dịch ở mức tương đương với các đặc tính được quan sát thấy trong ASC ở người [74].

Từ đó, các ASC trở thành đối tượng được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu về quy trình phân lập tế bào [75], đặc điểm tế bào và khả năng biệt hóa của các ASC như biệt hóa thành tế bào mỡ [76]; tế bào xương [58]; khả năng biệt hóa thành tế bào sụn [77]; biệt hóa thành tế bào cơ và dòng tế bào thần kinh [78]. Quá trình này gọi là sự biệt hóa chuyên biệt dòng.

Cơ trơn và cơ xương được cho là đã được tạo ra bằng cách biệt hóa ASC trong môi trường hoàn chỉnh với 5% huyết thanh ngựa và glucocorticoid như hydrocortisone và/hoặc dexamethasone. Khi nuôi cấy trong những điều kiện này, các tế bào được cho là sẽ hợp nhất và hình thành các ống cơ đa nhân, tạo ra các dấu hiệu protein cho tế bào cơ. Tuy nhiên, sự biệt hóa tế bào cơ xảy ra với năng suất và khả năng tái tạo thấp nhất so với tất cả các loại tế bào đã biệt hóa trong môi trường nuôi cấy [79].

Mặc dù các sản phẩm thịt như bít tết chủ yếu bao gồm cơ, nhưng sự hiện diện của chất béo và thành phần lipid của nó đóng vai trò quan trọng đối với chất lượng thịt, góp phần vào cảm nhận về hương vị, cảm giác ngon miệng, hình thức, kết cấu và giá trị dinh dưỡng. Chất béo, hoặc mô mỡ, được hình thành thông qua quá trình tạo mỡ do các MSC biệt hóa thành. Đầu tiên, các MSC biệt hoá thành các tiền tế bào mỡ. Sau đó, các tế bào trải qua quá trình biệt hóa ở giai đoạn cuối, trong thời gian đó, chúng lớn lên thông qua tích lũy chất béo trung tính trong tế bào và sau đó trở thành tế bào mỡ trưởng thành. Khi được tạo ra trong môi trường nuôi cấy, môi trường biệt hóa tế bào mỡ thường bao gồm môi trường tiêu chuẩn được bổ sung một số phân tử hóa học. Tuy nhiên, để sản xuất mô ăn được cần phải thay thế các hóa chất này và đảm bảo tính tương thích của quy trình với thị trường thực phẩm. Điều đó cho thấy, việc phân lập, nuôi cấy các dòng tế bào MSC từ ASC có ý nghĩa lớn trong việc nghiên cứu sản xuất thịt nhân tạo.

1.3.5. Tế bào gốc trung mô từ mô mỡ bò

ASC đã được phân lập từ mô mỡ bò [52, 80]. Trong cả hai nghiên cứu, các tế bào biểu hiện hình thái giống nguyên bào sợi và có thể biệt hóa thành các dòng tạo xương, tạo sụn và tạo mỡ; chúng thể hiện các dấu hiệu MSC khác nhau trong mỗi nghiên cứu. Trong một nghiên cứu, các tế bào dương tính với các dấu hiệu CD105, CD73, CD29, CD90 và H2A và âm tính với các dấu hiệu CD45, CD34 và CD44 [80], trong khi ở nghiên cứu khác, các tế

bào dương tính với CD90, CD105 và CD79 và âm tính đối với CD45, CD34 và CD73 [52]. Những sự khác biệt này có thể do sự khác biệt trong phương pháp phân lập và nuôi cấy ASC. Kiểu hình miễn dịch tế bào cũng thay đổi khi truyền trong ống nghiệm. Trong số tất cả các dấu hiệu mà ASC thể hiện, một số dấu hiệu liên quan đến tế bào đệm (CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90, CD166), ban đầu biểu hiện thấp các tế bào SVF bị cô lập, tăng lên đáng kể theo thời gian và thời gian nuôi cấy. Tuy nhiên, dấu hiệu liên quan đến tế bào gốc CD34 được thể hiện nhiều nhất trong giai đoạn sơ cấp cô lập, và giảm dần khi cấy chuyên nhiều lần.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

MSC được phân lập từ mô mỡ tại bàn chân bê Lai Zêbu thu tại lò mổ. Mẫu được vận chuyển về phòng Công nghệ sinh học động vật trong vòng 30 phút và tiến hành xử lý để thu mẫu.

Hoá chất được dùng cho các thí nghiệm trong nghiên cứu được mua từ các hãng Sigma, Gibco, Merk, Miltanyl.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phân lập và nuôi cấy tế bào gốc trung mô mỡ

2.2.1.1. *Phân lập tế bào*

Phần cẳng chân bò sau khi rửa vô trùng được đặt vào khay vô trùng trong tủ box vô trùng. Phần đệm móng bò được đặt ngửa lên trên. Dùng dao mổ và kẹp cắt phần da dưới móng bò bộc lộ phần mỡ đệm móng chân bò, phần mỡ này có màu vàng. Dùng dao mổ và kẹp vô trùng khác cắt các miếng mô mỡ này cho vào đĩa petri. Rửa mô mỡ 3 lần với PBS (-) (PAN Biotech, Anh) bổ sung 1% kháng sinh và cắt phần màng trắng bọc khối mô mỡ.

Mẫu mô được rửa và loại bỏ màng bó cơ trong dung dịch PBS (-) bổ sung 1% kháng sinh. Sau đó, miếng mô được cắt nhỏ theo kích thước 1×1 cm. Tiếp theo, tiến hành nhặt các miếng mô nhỏ đặt vào đĩa petri đường kính 35 mm, và nuôi trong môi trường DMEM (Sigma, Hoa Kỳ) bổ sung 10% FBS (Sigma, Hoa Kỳ) với phương pháp nuôi mảnh mô. Thay môi trường nuôi sau mỗi 3 - 4 ngày nuôi. Sau 10 ngày nuôi cấy, tế bào mọc lan ra từ miếng mô chiếm khoảng 80% diện tích bề mặt đĩa nuôi thì tiến hành cấy chuyển tế bào lần thứ nhất (P1).

Trong trường hợp phân lập ASC bằng phương pháp sử dụng enzyme. Các miếng mô nhỏ được cho vào ống 15 ml, thêm 7 ml trypsin/EDTA, và ủ ở bể ổn nhiệt 37°C trong 4h. Sau đó trung hoà với 7 ml DMEM bổ sung 10% FBS, rồi lọc tế bào bằng màng lọc kích thước $70 \mu\text{m}$. Tiếp đó, ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút để thu tủa tế bào. Thêm môi trường nuôi vào pha loãng cấy tế bào để cho vào đĩa nuôi. Thay môi trường nuôi sau mỗi 3 - 4

ngày nuôi. Sau khi tế bào mọc chiếm khoảng 90% diện tích bề mặt đĩa nuôi thì tiến hành cấy chuyển tế bào lần thứ nhất (P1).

2.2.1.2. Phương pháp cấy chuyển

Khi tế bào phát triển đến khoảng 90% diện tích nuôi cấy được cấy chuyển với tỉ lệ 1:3. Sau khi lấy ra khỏi tủ nuôi, môi trường nuôi tế bào được loại bỏ và tế bào được rửa với PBS. Sau đó, ủ tế bào với trypsin 0,25% trong 5 phút ở 37°C để tách khỏi bề mặt nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy với thể tích tương ứng được bổ sung vào để bất hoạt trypsin. Tế bào được thu hoạch và ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng để thu tủa tế bào. Tủa tế bào ở mỗi bình nuôi được tái huyền phù hóa và được chia ra các đĩa nuôi trong môi trường nuôi cấy. Môi trường sử dụng để nuôi tế bào là DMEM HG (DMEM, high glucose) bổ sung 10% FBS và 1% Pen/Strep. Các bình nuôi tế bào được cho vào tủ nuôi ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂.

2.2.2. Phương pháp đánh giá sự tăng sinh của tế bào

Phương pháp đánh giá khả năng tăng sinh và độ ổn định của tế bào được đánh giá qua hai phương pháp.

2.2.2.1. Phương pháp đánh giá thời gian tăng gấp đôi số lượng tế bào (population doubling time, PDT)

Các tế bào ở P3 - P10 được gieo vào đĩa petri 35 mm với mật độ 5000 tế bào/cm² và được nuôi cấy trong môi trường DMEM HG bổ sung 10% FBS. Sau 3 - 4 ngày, số lượng tế bào sống được đếm bằng cách nhuộm với Trypan Blue. PDT được tính bằng công thức sau:

$$PDT = (CT \times \ln 2) / \ln(N_f / N_i),$$

Trong đó CT là thời gian nuôi cấy tế bào (giờ), N_i và N_f lần lượt là số lượng tế bào ban đầu và cuối cùng [81].

2.2.2.2. Phương pháp đánh giá sự tăng sinh tế bào theo ngày

Các tế bào ở một số lần cấy chuyển được gieo vào đĩa 96 giếng với mật độ 4000 tế bào/well, mỗi lô tế bào gieo trong 24 giếng. Tế bào sau cấy khi gieo được nuôi cấy trong môi trường DMEM HG bổ sung 10% FBS, thay môi trường nuôi sau 3 - 4 ngày nuôi. Sau đó, số lượng tế bào sau 1 - 8 ngày nuôi cấy được đếm (3 giếng tế bào/ngày nuôi). Đầu tiên, tế bào được rửa với PBS,

sau đó phân tách tế bào bằng trypsin. Tiếp theo trung hoà trypsin bằng môi trường nuôi cấy. Sau đó, tiến hành ly tâm thu tế bào lắng. Thêm môi trường PBS vào và sục đều và tiến hành lấy 10 μ l hỗn dịch tế bào ra nhuộm với thuốc nhuộm Trypan Blue để đếm số lượng tế bào sống trên buồng đếm hồng cầu.

2.2.3. Phương pháp tách ARN

RNA tổng số được phân lập từ mỗi mẫu bằng phương pháp sử dụng TRIZOL (Ambion, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Các ASC được thu từ lần cấy chuyển 4 được thu từ các đĩa petri đường kính 35 mm. Số lượng tế bào 5×10^5 tế bào được sử dụng cho mỗi lần thu RNA. Đầu tiên, tiến hành đồng nhất mẫu bằng cách thêm 0,5 ml Trizol vào tế bào lắng trong ống eppendorf 1,5 ml. Ly giải tế bào trong ống bằng cách hút lên xuống nhiều lần bằng pipet rồi để ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Sau đó, cho thêm 0,1 ml chloroform rồi vortex nhẹ 15 giây và ủ trong 3 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp đó, ly tâm mẫu ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C để tách pha. Chuyển pha nước (phần trong suốt trên cùng của ống) sang ống mới. Tiến hành kết tủa RNA bằng cách thêm vào ống 0,25 ml isopropyl alcohol tuyệt đối và trộn đều nhẹ nhàng bằng cách búng tay rồi ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Sau đó ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để thu phần tủa RNA. Loại bỏ phần nổi và rửa RNA bằng cách cho vào ống 0,75 ml ethanol 75%, vortex nhẹ rồi cho vào ly tâm ống ở tốc độ 7500 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Loại bỏ ethanol nổi và rửa lại 1 lần nữa. Sau đó mở nắp, đảo ngược ống và làm khô tủa RNA trong tủ hút vô trùng trong 10 phút. Cuối cùng, hoà tan RNA bằng nước không có RNase (20 - 50 μ L) bằng cách cho dung dịch lên xuống nhiều lần qua đầu pipet. Nồng độ RNA thu được được xác định bằng máy NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (ND-LITE-PR, Thermo Fisher Scientific).

Tổng số RNA (5 μ g) được sử dụng cho tổng hợp cDNA bằng kit Gostript™ Reverse Transcription system (A5001, Promega, Mỹ). Đầu tiên RNA được trộn với primer oligo (dT)₁₅ (Bảng 2) [63], nước rồi ủ ở nhiệt độ 70°C trong 5 phút. Sau đó thêm master mix vào rồi ủ ở 25°C trong 5 phút, 50°C trong 55 phút, 70°C trong 15 phút. Nồng độ cDNA được xác định bằng máy NanoDrop.

Bảng 1. Trình tự mồi

Gene	Trình tự mồi (5' – 3')	Nhiệt độ khuếch đại (Ta)	Kích thước (bp)
NT5E (CD73)	Forward: AGGTGTCACAAGAAGAGAACCT Reverse: TCAACCTTGTCTTTCCTCTGGA	55	173
PTPRC (CD45)	Forward: ATATTTTGC GCGTTGTTCAACC Reverse: AATTGGTATTGCTCGAAGGTGG	56	128
THY1 (CD90)	Forward: TTCGTCTAGACTGCCATCATGA Reverse: TGAAGTTGGACAGGTAGAGGAC	56	183
CD44	Forward: TCAAGTATCATCTCAGCAGGCT Reverse: TCTCCGTAAGCACTGGTACTAC	55	266
ITGB1 (CD29)	Forward: GTGTATACAAGCAGGGCCAAAT Reverse: TGATCGTAACTGCAGAACCAAC	56	265
	Reverse: GAAGTAGGTGAGAGCGTTTGTC		
	Reverse: ATCATAGAAGTCGTCCGCTGTT		
GAPDH	Forward: GATAGCCGTA ACTTCTGTGCTG Reverse: TTTCCATTGATGACGAGCTTCC	56	255
Actin (ACTB)	Forward: ATGCTTCTAGGCGGACTGTTAG Reverse: ACCTTCACCGTTCCAGTTTTTA	55	174

cDNA tổng hợp được sử dụng làm khuôn mẫu trong chuỗi polymerase phản ứng (PCR), được thực hiện với kit My TagTM Mix (BIO-25042, Meridian Bioscience, Mỹ). Phản ứng được tiến hành theo chu trình: biến tính ban đầu ở 95°C trong 3 phút; tiếp theo là 35 chu kỳ 95°C trong 30 giây, nhiệt độ khuếch đại (Nhiệt độ, Bảng 2) trong 30 giây, 72°C trong 30 giây; độ giãn dài cuối cùng ở 72°C trong 5 phút). Mẫu sau khi chạy PCR sử dụng chạy điện di. cDNA từ ASC được thu ở lần cấy chuyển 4 được chạy PCR với các marker là: CD73, CD90, CD44, CD45, CD29, Actin và GAPDH.

2.2.4. Phương pháp chạy điện di mẫu DNA sau PCR

Mẫu DNA sau khi chạy PCR được trộn loading dye theo tỷ lệ 1 DNA Gel Loading Dye (6x) (R0611, Thermo Fisher Scientific): 5 DNA (v/v) sau đó load vào gel agarose 2% trong dung dịch TBE buffer và chạy điện di trong 30 phút ở 100V. Sau đó bản gel được nhuộm bằng Ethidium bromide trong tối ở RT và hiển thị dưới hệ thống chụp bản gel với tia UV. Kích thước của băng DNA được xác định dựa vào ladder chuẩn (HyperLadderTM 100bp, BIO-33056, Bioline, Meridian Bioscience hoặc HyperLadderTM 1kb, BIO-33053).

2.2.5. Phương pháp biệt hóa tế bào gốc trung mô mỡ thành tế bào mỡ

Trong thử nghiệm biệt hóa *in vitro*, để tạo ra sự biệt hoá tế bào mỡ [82], tế bào sau khi phát triển kín 60 - 80% bề mặt đĩa nuôi ở lần cấy chuyển thứ 4 được nuôi trong môi trường cảm ứng tạo mỡ: DMEM/F12 (Sigma) bổ sung 10% FBS (Gibco), 1% kháng sinh (Sigma), 0,1 µM Dexamethasone 100X (Sigma), 500 µM 3-Isobutyl-1-methylxanthin 1000X (IBMX) (Sigma), 200 µM Indomethacin 1000X (Sigma), 1 µM Insuline 100X. Nuôi cấy trong khoảng 21 - 28 ngày và thay môi trường 2 lần/tuần. Đánh giá biệt hóa tế bào khi quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 200X thấy có sự xuất hiện các giọt mỡ nhỏ. Các tế bào tạo mỡ được xác định dựa vào phương pháp nhuộm với thuốc nhuộm Oil red (Merck).

2.2.6. Phương pháp biệt hóa tế bào gốc trung mô mỡ thành nguyên bào xương

Tế bào sau khi phát triển kín 60 - 80% bề mặt đĩa nuôi ở lần cấy chuyển thứ 5 - 7 được nuôi trong môi trường cảm ứng tạo tế bào nguyên bào xương: DMEM 10% FBS có bổ sung 0,1 µM Dexamethasone 100X (Sigma), 100 µM

L-ascorbic acid 2-phosphat (AsAP) (Sigma) và 10 mM β - glycerolphosphate (Sigma) [83]. Nuôi cấy trong khoảng 14 - 21 ngày và thay môi trường 2 lần/tuần. Đánh giá sự biệt hoá tế bào xương bằng khả năng tích tụ của calcium trong chất nền với thuốc nhuộm Alizarin Red (Sigma).

2.2.7. Phương pháp biệt hóa tế bào gốc trung mô mỡ thành tế bào cơ

Sau khi tế bào đạt được độ hợp chất 70% bề mặt đĩa nuôi, tiến hành biệt hóa thành tế bào cơ bằng cách thêm môi trường M1 (DMEM, 5% huyết thanh ngựa, 0,1 μ M dexamethasone và 50 μ M hydrocortisone) trong 5 ngày, sau đó phân tích so sánh hình thái tế bào dưới kính hiển vi hoặc nhuộm bằng orcein để quan sát nhân tế bào.

2.2.8. Phương pháp xử lý số liệu

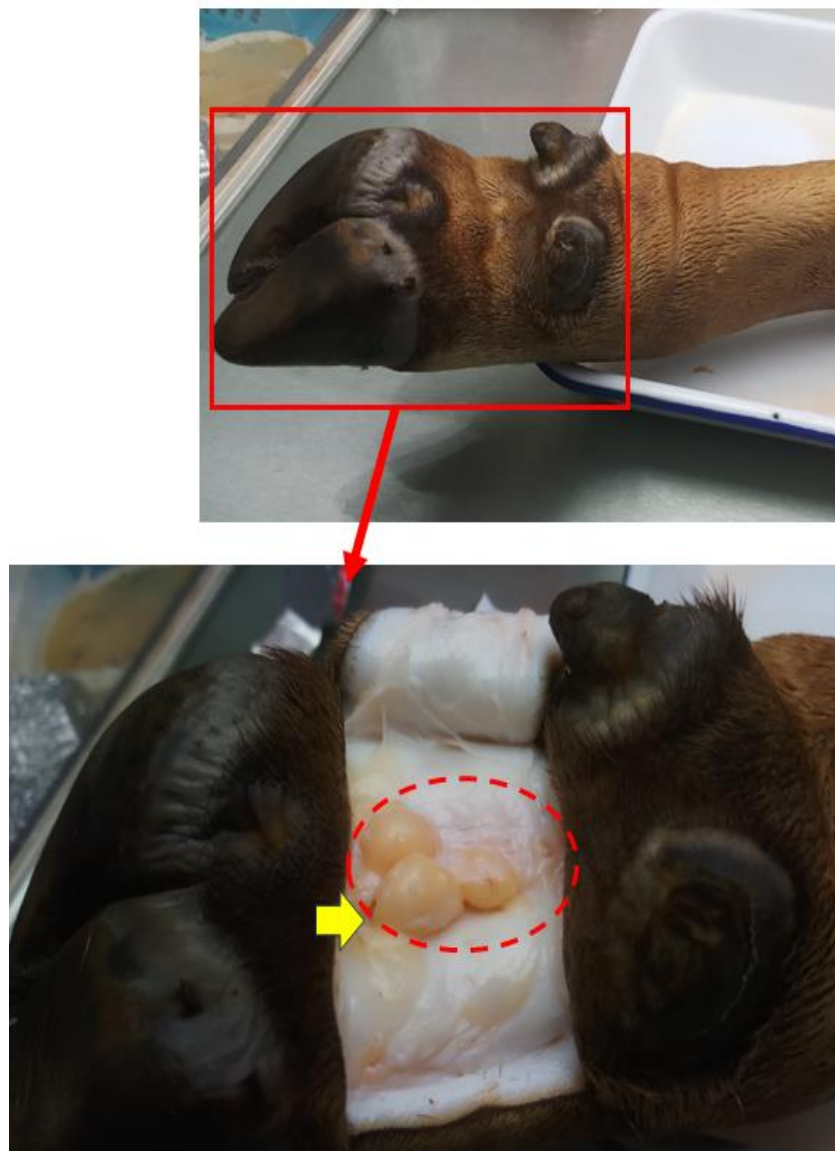
Số liệu được xử lý thống kê sinh học trong chương trình Excel, sử dụng phân tích T-test. Thống kê có ý nghĩa khi so sánh sự khác nhau giữa các số liệu với giá trị $P < 0,05$ và được thể hiện bằng $TB \pm SEM$ trong các thí nghiệm lặp lại.

Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ PHÂN LẬP TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ MỠ

3.1.1. Vị trí thu thập mẫu mô mỡ bò

Sau khi mổ phần đệm chân bò, phần mô mỡ phía dưới có màu vàng nhạt và ở dạng các cục mô mỡ tách biệt với phần mỡ trắng xung quanh. Phần mô mỡ màu vàng này không có mạch máu xung quanh. Hình ảnh thu mẫu mô mỡ được thể hiện trong hình 3.1 trong phần khoanh tròn nét đứt màu đỏ.

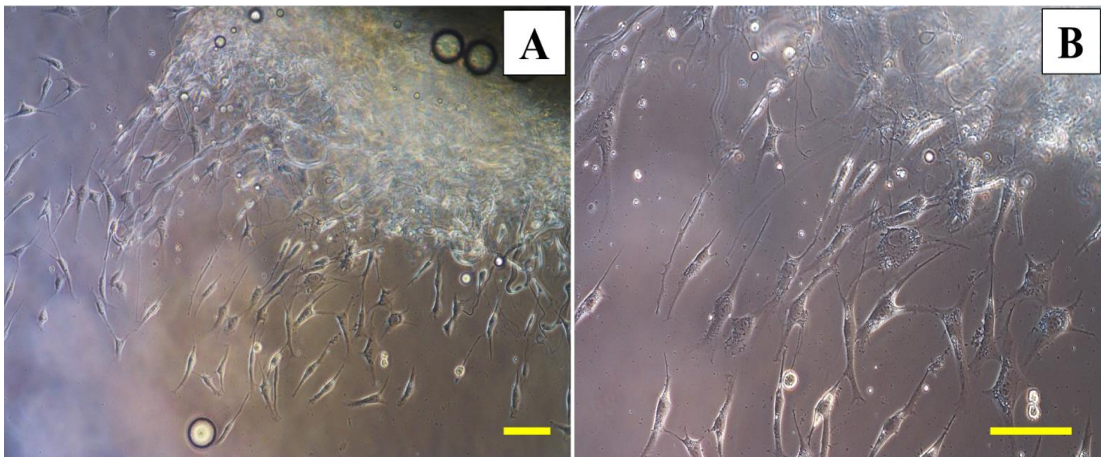


Hình 3. 1. Hình ảnh vùng bàn chân bê và mô mỡ sau khi bóc lộ

3.1.2. Kết quả phân lập tế bào gốc trung mô từ mô mỡ

3.1.2.1. Kết quả phân lập tế bào gốc trung mô từ mô mỡ theo phương pháp nuôi cấy mảnh mô mỡ

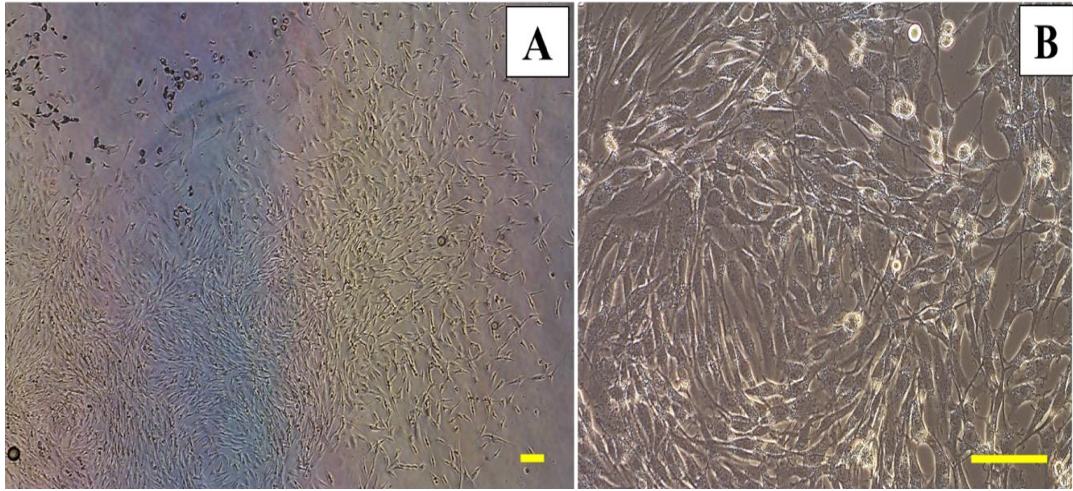
Sau 3 ngày nuôi cấy, một số tế bào mọc ra từ mảnh mô mỡ và bám dính bề mặt đĩa nuôi. Các tế bào này có hình sợi trục thon dài, một số tế bào có xu hướng dính kết với nhau, trong khi một số khác lại tách rời và phân tán đều trên bề mặt nuôi cấy. Hình ảnh hiển vi ở độ phóng đại 100x và 200x (Hình 3.2) cho thấy rõ hình thái đặc trưng của các ASC, với đặc điểm nổi bật là sự dài mảnh và khả năng bám dính cao.



Hình 3. 2. Hình ảnh tế bào mọc ra từ mảnh mô mỡ sau khi nuôi ngày 3

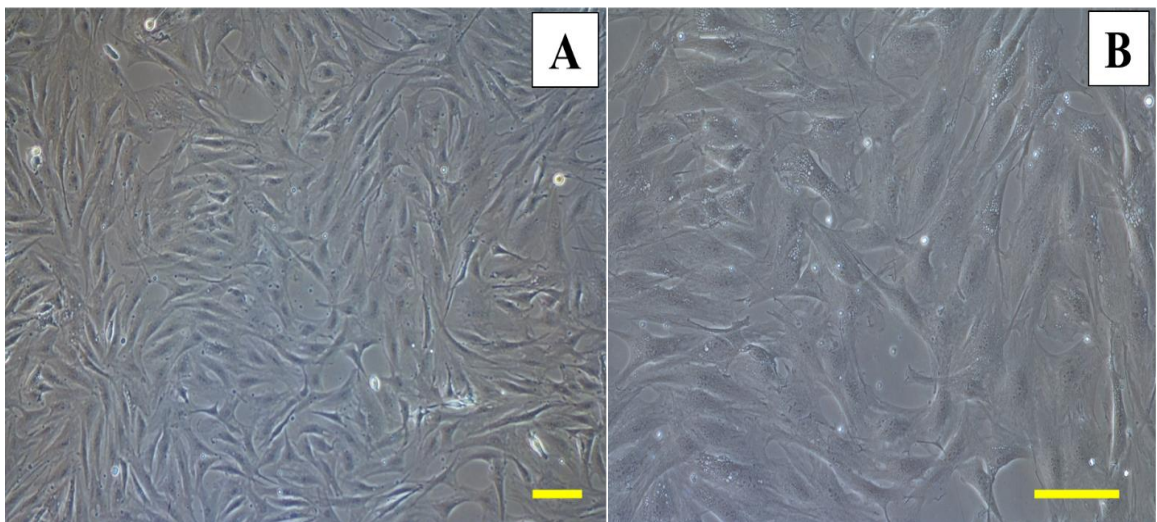
(A) độ phóng đại 100x và (B) độ phóng đại 200x. Thước đo màu vàng = 100 μm .

Sau khi nuôi cấy đến ngày 6, các tế bào phát triển, tăng sinh đáng kể, hình thành nên các cụm tế bào rõ rệt (Hình 3.3 A). Trong các cụm tế bào này, các tế bào bám sát nhau và bắt đầu hình thành một mạng lưới tế bào, tạo nên một cấu trúc chặt chẽ (Hình 3.3 B). Các tế bào trong mạng lưới này vẫn giữ nguyên hình thái sợi trục thon dài như ở ngày thứ 3, nhưng mật độ tế bào đã tăng lên rõ rệt, cho thấy tốc độ tăng sinh nhanh chóng và ổn định.



Hình 3. 3. Hình ảnh tế bào mọc từ mảnh mô mỡ sau 6 ngày nuôi cấy
 (A) độ phóng đại 40x và (B) độ phóng đại 200x. Thước đo màu vàng = 100 μm .

Sau khi nuôi tế bào từ 9 - 11 ngày, tế bào mọc kín khoảng 80% diện tích bề mặt đĩa nuôi. Tại thời điểm này, quá trình cấy chuyển tế bào lần 1 được thực hiện. Sau khi cấy chuyển 3 ngày, tế bào tiếp tục mọc kín 80% bề mặt đĩa nuôi, cho thấy khả năng tăng sinh mạnh mẽ của chúng. Điều đáng chú ý là các tế bào vẫn giữ được hình thái của nguyên bào sợi, một dấu hiệu chứng tỏ sự ổn định về mặt hình thái qua các lần cấy chuyển (Hình 3.4).

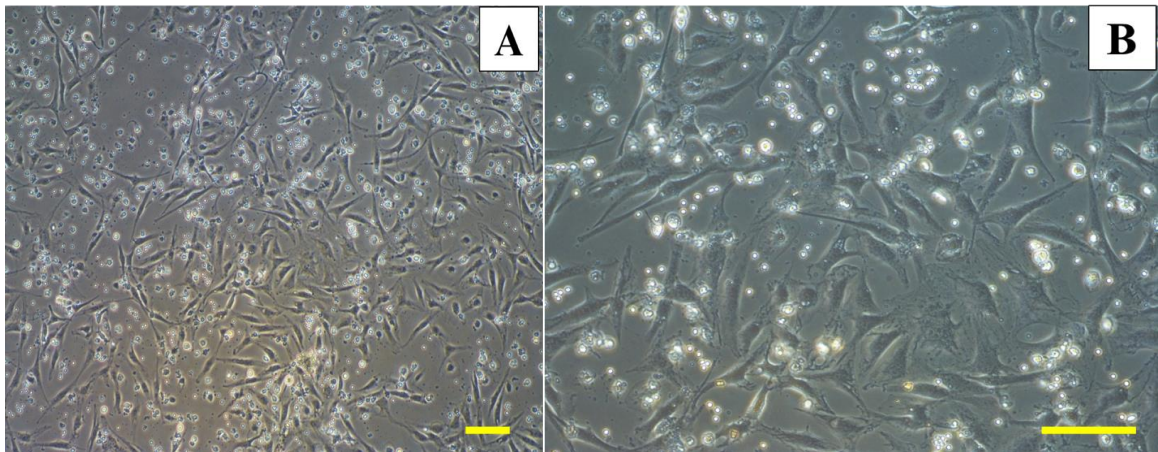


Hình 3. 4. Hình ảnh tế bào sau khi cấy chuyển lần 1 ngày 3
 (A) độ phóng đại 40x và (B) độ phóng đại 200x. Thước đo màu vàng = 100 μm .

Như vậy, kết quả phân lập ASC theo phương pháp nuôi cấy mảnh mô mỡ cho thấy các ASC đã sinh trưởng ổn định. Các tế bào sau khi phân lập đã thể hiện khả năng tăng sinh tốt, hình thành các cụm tế bào và mạng lưới tế bào chặt chẽ trong thời gian ngắn, đồng thời duy trì hình thái và đặc điểm sinh học cơ bản, cho thấy quá trình nuôi cấy đã thành công trong việc bảo tồn các đặc tính quan trọng của tế bào.

3.1.2.2. Kết quả phân lập tế bào gốc trung mô mỡ theo phương pháp ủ trypsin

Sau 3 ngày nuôi cấy, các ASC bám dính bề mặt đĩa nuôi, tế bào có dạng hình thoi, giống hình thái của nguyên bào sợi (Hình 3.5). Tế bào bám kính khoảng 50% bề mặt đĩa nuôi. Tuy nhiên, không phải tất cả các tế bào đều sống sót qua quá trình xử lý enzyme; một số tế bào chết có thể quan sát thấy dưới dạng các đốm trắng, hình tròn, nổi lờ lững trong môi trường nuôi cấy. Những tế bào này sau đó được loại bỏ khi môi trường nuôi cấy được thay mới sau 3 ngày. Quá trình thay môi trường này không chỉ giúp loại bỏ tế bào chết mà còn tạo điều kiện tối ưu cho các tế bào sống tiếp tục phát triển.

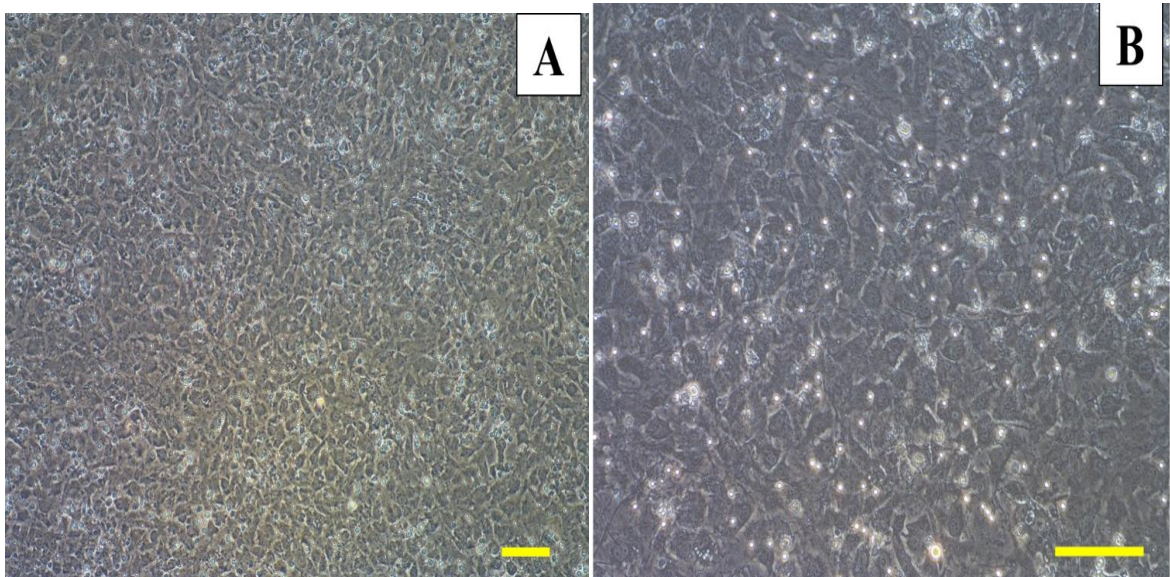


Hình 3. 5. Hình ảnh ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin sau khi nuôi sơ cấp ngày 3

(A) độ phóng đại 100x và (B) độ phóng đại 200x. Thước đo màu vàng = 100 μ m.

Sau 6 ngày nuôi cấy, các tế bào mọc kín toàn bộ bề mặt đĩa nuôi (Hình 3.6). Điều này chứng tỏ khả năng tăng sinh nhanh chóng và hiệu quả của ASC khi được phân lập bằng phương pháp ủ trypsin. Việc tế bào có thể đạt đến mật

độ cao như vậy trong thời gian ngắn là một dấu hiệu tích cực, cho thấy tế bào đã thích nghi tốt với môi trường nuôi cấy.

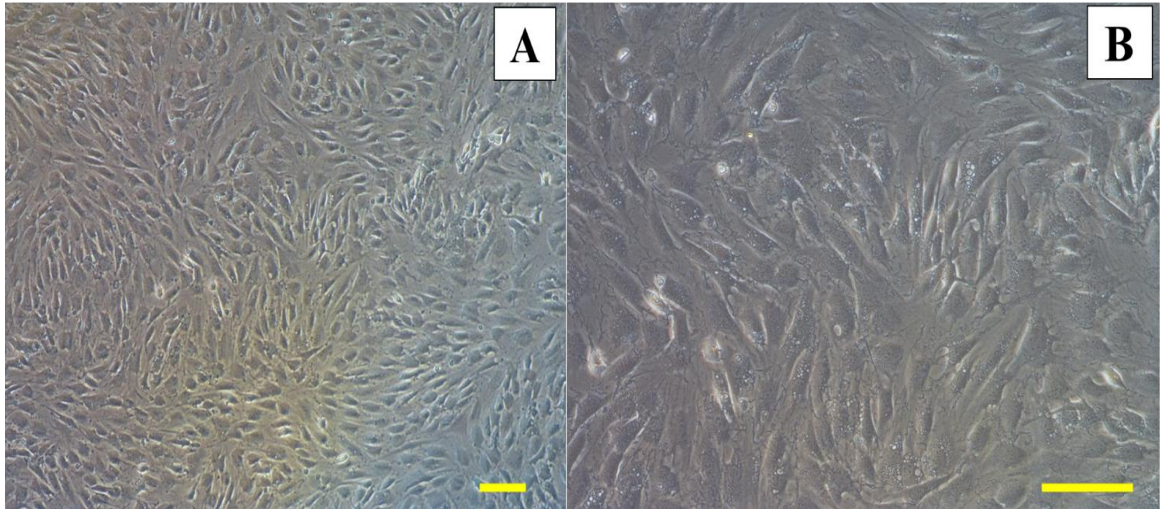


Hình 3. 6. Hình ảnh ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin sau khi nuôi sơ cấp ngày 6

(A) độ phóng đại 100x và (B) độ phóng đại 200x. Thước đo màu vàng = 100 μm .

Tại thời điểm sau 6 ngày nuôi cấy, các tế bào được cấy chuyển lần đầu tiên. Sau khi cấy chuyển 3 ngày, tế bào tiếp tục mọc kín 80 - 90% diện tích bề mặt đĩa nuôi, cho thấy khả năng tăng sinh ổn định và liên tục của chúng (Hình 3.7). Đặc biệt, hình thái của tế bào vẫn giữ nguyên đặc điểm hình thoi của nguyên bào sợi, một yếu tố cho thấy quá trình cấy chuyển không ảnh hưởng đến tính toàn vẹn của tế bào.

Các tế bào tiếp tục được cấy chuyển đến lần cấy chuyển thứ 3 (P3) để đảm bảo rằng tế bào vẫn giữ được khả năng tăng sinh qua nhiều thế hệ. Sau mỗi lần cấy chuyển, tế bào vẫn giữ được hình thái và khả năng bám dính tốt, điều này càng khẳng định tính ổn định của ASC khi sử dụng phương pháp ủ trypsin. Cuối cùng, tế bào được bảo quản lạnh để sử dụng cho các công việc nghiên cứu tiếp theo, đảm bảo rằng các tế bào có thể được sử dụng trong tương lai mà không mất đi đặc tính quan trọng.



Hình 3. 7. Hình ảnh ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin sau khi cấy chuyển lần 1 ngày 3

(A) độ phóng đại 100x và (B) độ phóng đại 200x. Thước đo màu vàng = 100 μm .

3.1.3. So sánh hiệu quả phân lập tế bào gốc trung mô mỡ từ hai phương pháp nuôi cấy mảnh mô mỡ và phương pháp ủ trypsin

Số lượng tế bào gốc trung mô mỡ phân lập theo hai phương pháp

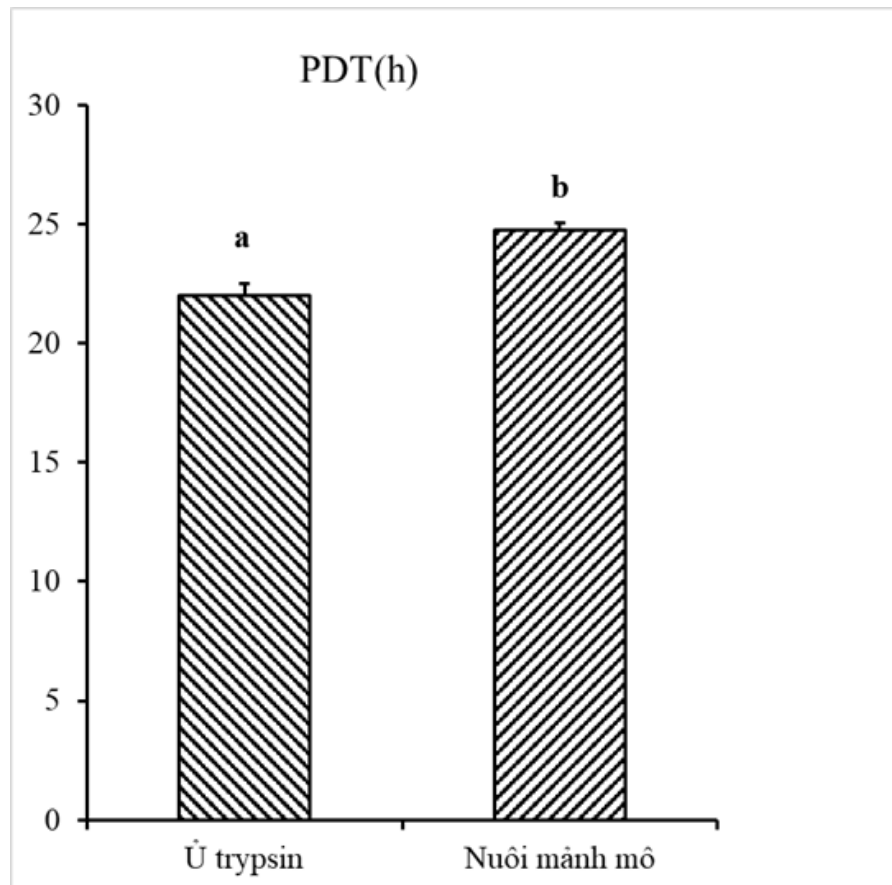
Sau khi nuôi cấy sơ cấp sau 6 ngày nuôi, tế bào thu được từ phương pháp ủ trypsin tăng sinh đạt trung bình $1,1 \times 10^6$ tế bào/đĩa nuôi 35 mm (tế bào mọc kín hơn 90% bề mặt đĩa nuôi). Trong khi đó, theo phương pháp nuôi cấy mảnh mô, số lượng tế bào thu được sau 9 ngày nuôi sơ cấp đạt khoảng 2×10^4 tế bào/đĩa nuôi 35 mm. Số lượng tế bào thu được/ đĩa nuôi sơ cấp của ASC theo phương pháp phân lập bằng trypsin cao hơn so với phương pháp phân lập mảnh mô. Điều này cho thấy phương pháp ủ trypsin có thể tạo ra một quần thể tế bào lớn hơn trong thời gian ngắn hơn, làm tăng hiệu quả của quá trình nuôi cấy trong các thí nghiệm liên quan đến ASC.

Tuy nhiên, phương pháp ủ trypsin cũng có những hạn chế nhất định. Một lần thu mẫu tế bào từ mô mỡ đệm chân của một mẫu cừu chân bò bằng phương pháp này chỉ có thể nuôi được từ 1 đến 3 đĩa nuôi 35 mm. Ngược lại, phương pháp nuôi cấy mảnh mô có khả năng mở rộng số lượng đĩa nuôi sơ cấp lên tới vài chục đĩa, mặc dù tổng số lượng tế bào thu được trên mỗi đĩa là ít hơn. Điều này làm cho phương pháp nuôi cấy mảnh mô trở thành một lựa chọn tối ưu khi cần thu được số lượng tế bào sơ cấp lớn hơn cho các nghiên

cứ quy mô lớn. Tuy nhiên, phương pháp nuôi cấy mảnh mô đòi hỏi chi phí cao hơn do phải sử dụng nhiều đĩa nuôi và môi trường nuôi cấy hơn, so với chi phí dành cho enzyme và màng lọc tế bào trong phương pháp ủ trypsin.

Khả năng tăng sinh của tế bào gốc trung mô mỡ sau lần cấy chuyển thứ 2

Kết quả so sánh về khả năng tăng sinh ASC ở lần cấy chuyển thứ 2 được thể hiện trong hình 3.8. Thời gian tăng gấp đôi số lượng tế bào (PDT) của ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin là $22,01 \pm 0,47$ giờ, ngắn hơn so với PDT $24,76 \pm 0,29$ giờ của ASC phân lập theo phương pháp nuôi cấy mảnh mô. Khác biệt PDT ở P2 giữa hai phương pháp nuôi cấy có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



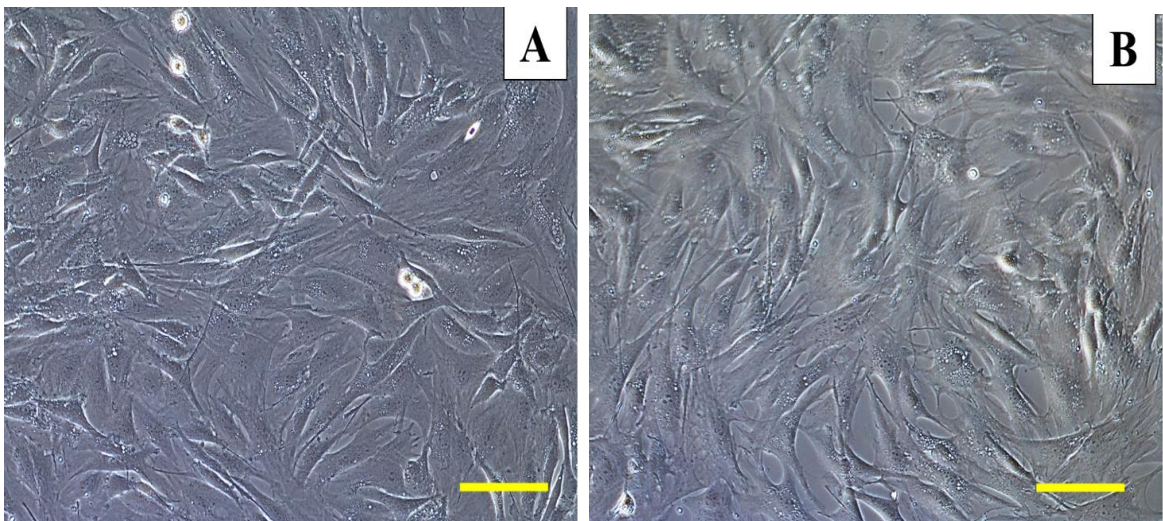
Hình 3. 8. Hình ảnh biểu đồ thời gian tăng sinh gấp đôi số lượng tế bào (PDT) của ASC phân lập theo hai phương pháp ủ trypsin và nuôi cấy mảnh mô

Các chữ cái a, b trên các cột của biểu đồ biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm ($p < 0,05$).

Sự khác biệt về khả năng tăng sinh của ASC phân lập theo hai phương pháp này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Zhu và cộng sự năm 2024 [66]. Thời gian tăng sinh gấp đôi số lượng tế bào của ASC ở cả hai phương pháp đều tương đối ngắn (dưới 30 giờ). Thời gian tăng sinh gấp đôi số lượng tế bào ở P2 trong nghiên cứu này cao hơn thời gian tăng sinh gấp đôi số lượng tế bào ở P1 - P4 (dao động từ $16,44 \pm 0,33$ tới $18,66 \pm 0,11$ giờ) trong nghiên cứu trước đó của Zhao và cộng sự năm 2012 [63]. Tuy nhiên ở P5, Zhao và cộng sự báo cáo rằng PDT là $22,06 \pm 0,32$ giờ, tương tự PDT ở P2 của tế bào ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin trong nghiên cứu hiện tại. Điều này có thể được giải thích bởi sự khác biệt về điều kiện nuôi cấy, loại tế bào được sử dụng, hoặc phương pháp đo lường.

Đánh giá hình thái và khả năng bám dính của tế bào gốc trung mô

Cả hai phương pháp phân lập đều thu được quần thể tế bào bám dính bề mặt đĩa nhựa nuôi cấy và có hình dạng tế bào giống với nguyên bào sợi, các tế bào kéo dài, tập hợp với nhau. Hình thái tế bào sau khi nuôi ở P2 được thể hiện trong hình 3.9. Kết quả này giống với hình thái ASC của bò trong các nghiên cứu trước đây [63, 66].



Hình 3. 9. Hình ảnh ASC ở lần cấy chuyển 2 sau khi nuôi ngày 5

(A) ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin. (B) ASC phân lập theo phương pháp nuôi cấy mảnh mô. Thước đo màu vàng = $100\mu\text{m}$. Độ phóng đại $200x$

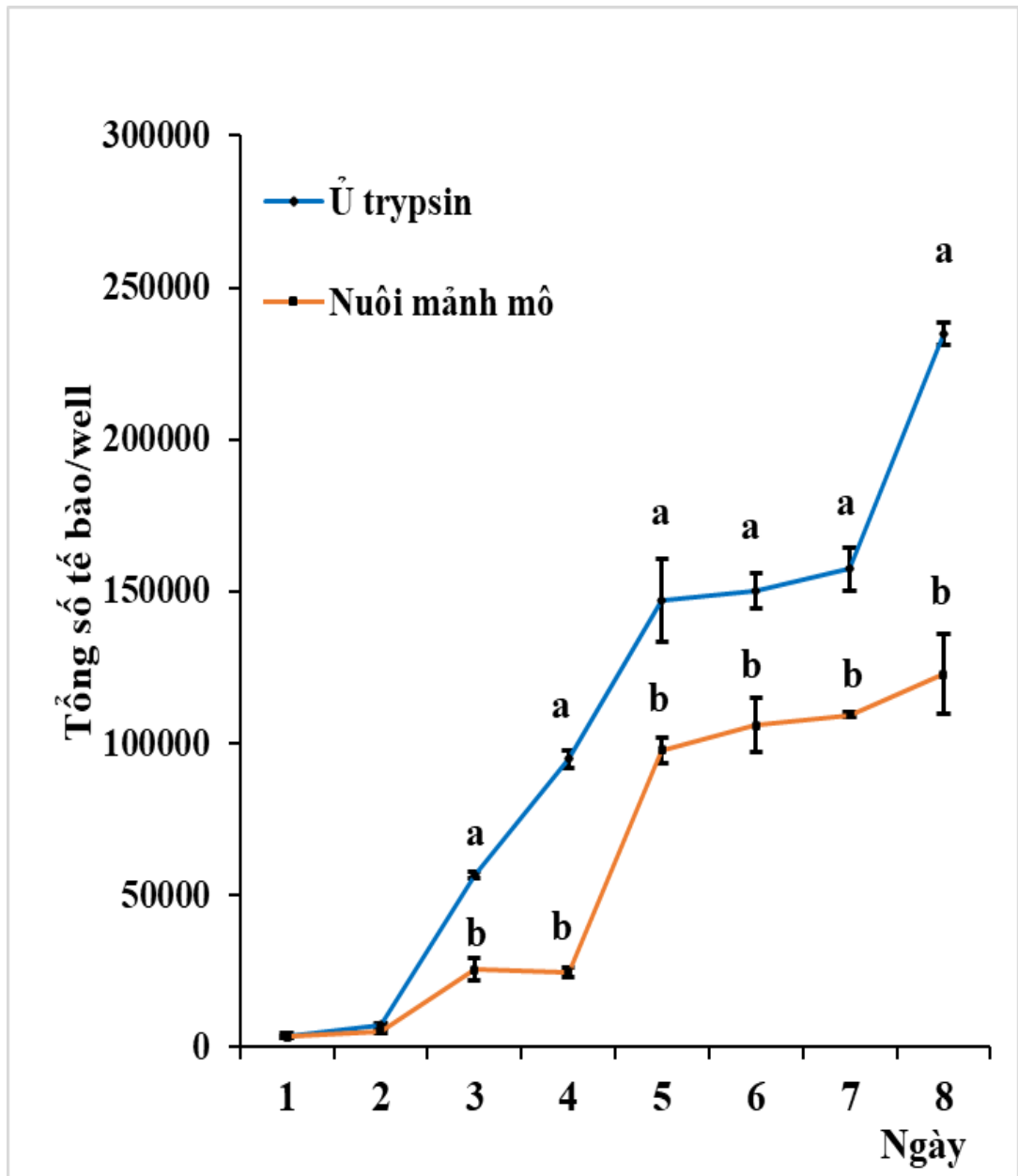
3.2. TỐC ĐỘ TĂNG SINH VÀ ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ MỠ TRONG ĐIỀU KIỆN NUÔI IN VITRO.

Tăng sinh tế bào ở P2 theo ngày của tế bào gốc trung mô mỡ phân lập theo phương pháp ủ trypsin và phương pháp nuôi cấy mảnh mô

Kết quả tăng sinh tế bào theo ngày ở lần cấy chuyển thứ 2 (P2) của ASC phân lập theo hai phương pháp ủ trypsin và nuôi cấy mảnh mô được thể hiện trong hình 3.10. Số lượng tế bào theo ngày cho thấy sự khác biệt đáng kể về khả năng tăng sinh giữa hai phương pháp này, đặc biệt từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 8 của quá trình nuôi cấy.

Trong hai ngày đầu tiên, sự tăng sinh tế bào không khác biệt rõ rệt giữa hai nhóm ASC phân lập từ hai phương pháp khác nhau. Tuy nhiên, từ ngày thứ 3 trở đi, sự khác biệt rõ rệt bắt đầu xuất hiện. Phương pháp ủ trypsin có tốc độ tăng sinh tế bào vượt trội hơn hẳn so với phương pháp nuôi cấy mảnh mô. Cụ thể, vào ngày thứ 3, số lượng tế bào ủ trypsin đạt hơn 50.000 tế bào/giếng, trong khi phương pháp nuôi cấy mảnh mô chỉ đạt khoảng $\frac{1}{2}$ số lượng tế bào ủ bằng trypsin. Sự khác biệt này tiếp tục được duy trì và mở rộng trong những ngày tiếp theo khi tế bào tăng sinh nhanh chóng.

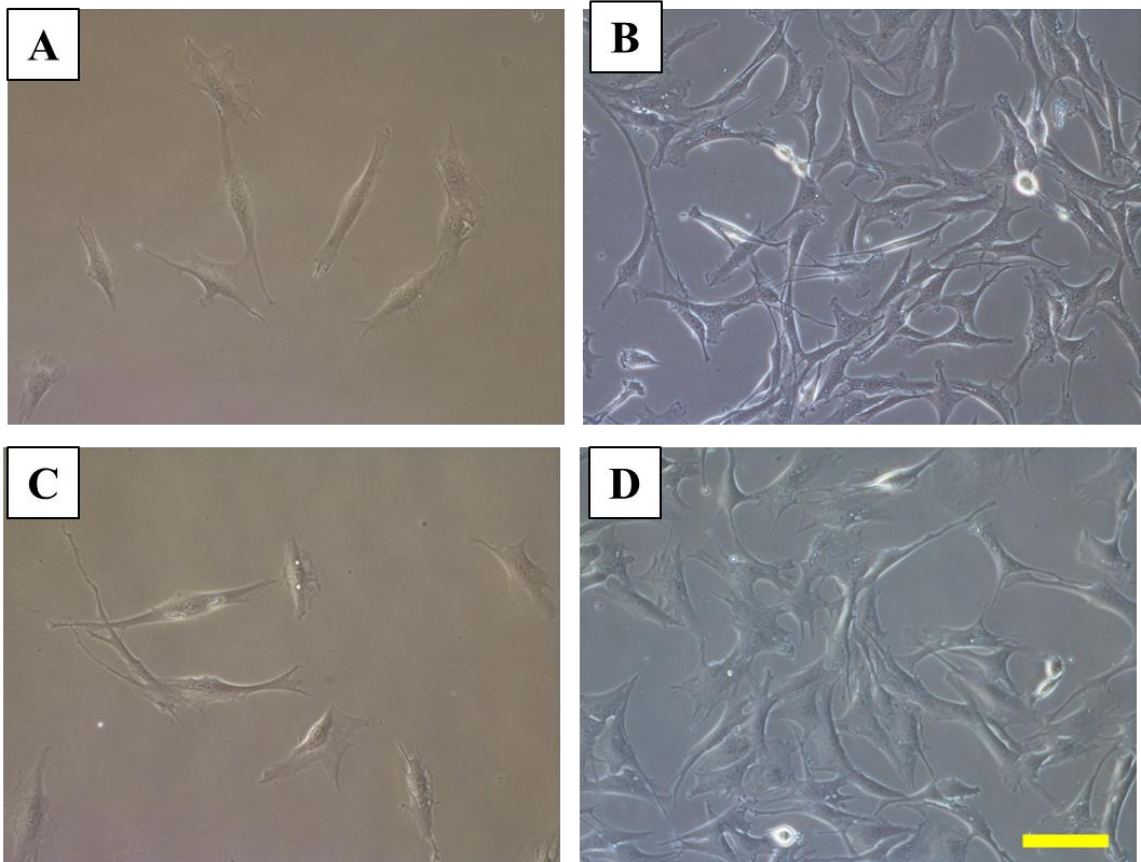
Vào ngày thứ 5, tế bào ủ trypsin đạt khoảng 150.000 tế bào/giếng, trong khi phương pháp nuôi cấy mảnh mô đạt chỉ 100.000 tế bào/ giếng. Từ ngày thứ 5 đến thứ 7, tăng trưởng tế bào chậm lại ở cả 2 phương pháp nhưng đến ngày thứ 8, số lượng tế bào của phương pháp ủ trypsin tăng mạnh lên tới gần 250.000 tế bào/giếng, tuy nhiên số lượng tế bào từ phương pháp nuôi cấy mảnh mô chỉ tăng nhẹ, ở mức hơn 100.000 tế bào/ giếng và đạt đến pha cân bằng. Như vậy, tế bào ASC ở P2, nhóm tế bào phân lập theo phương pháp ủ trypsin thể hiện khả năng tăng sinh vượt trội hơn hẳn so với nhóm tế bào phân lập theo phương pháp nuôi cấy mảnh mô về mặt số lượng tế bào và độ dài quá trình tăng trưởng. Điều này có thể được lý giải bởi việc xử lý trypsin có thể tạo ra các điều kiện thuận lợi hơn cho quá trình phân chia và tăng trưởng của ASC, làm giảm sự ức chế tiếp xúc giữa các tế bào, và từ đó thúc đẩy sự tăng sinh mạnh mẽ hơn.



Hình 3. 10. Hình ảnh biểu đồ so sánh tăng sinh tế bào ở P2 theo ngày của ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin và phương pháp nuôi cấy mảnh mô

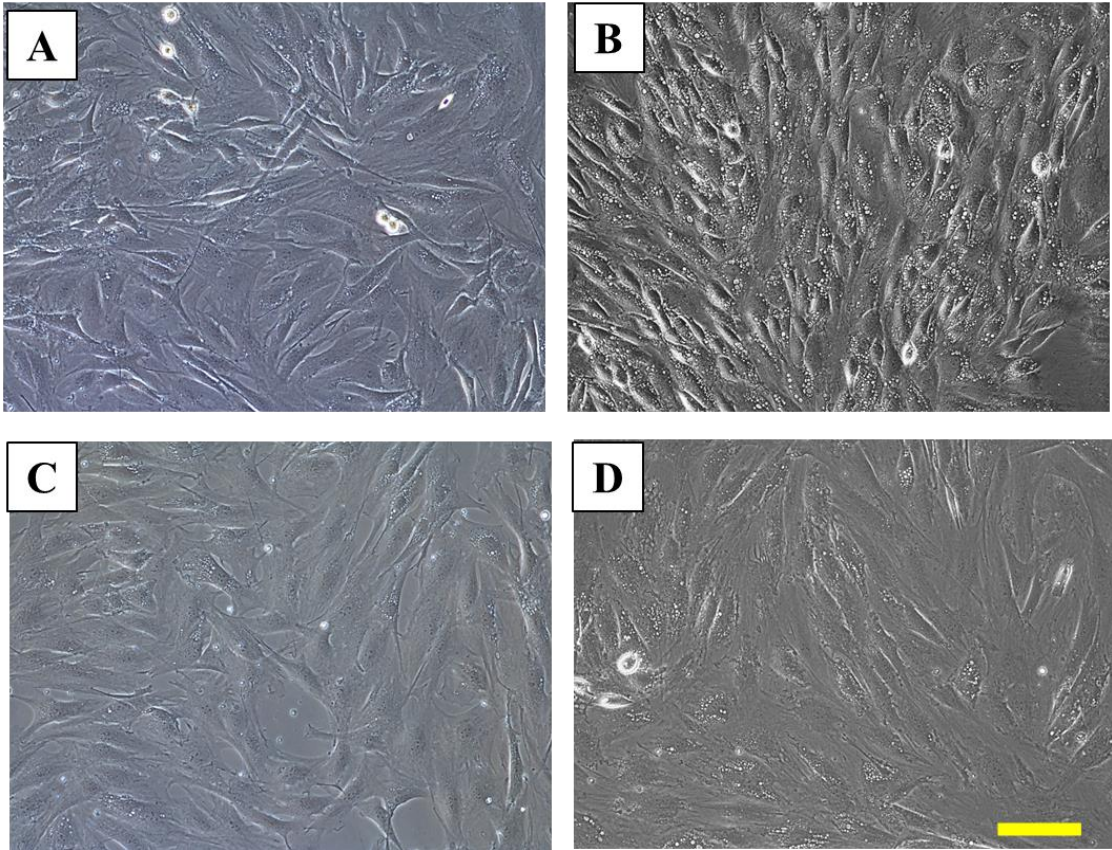
Các chữ cái a, b trong biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Số lượng tế bào được trình bày dưới dạng trung bình \pm SEM.

Hình thái tế bào của tế bào gốc trung mô mỡ phân lập theo phương pháp ủ trypsin và phương pháp nuôi cấy mảnh mô ở P2 theo ngày



Hình 3. 11. Hình ảnh ASC sau khi cấy chuyển ở P2 ngày thứ 1 và 3
(A, B) phân lập từ phương pháp ủ trypsin và (C, D) phương pháp nuôi cấy mảnh mô. Thước đo màu vàng = 100 μ m.

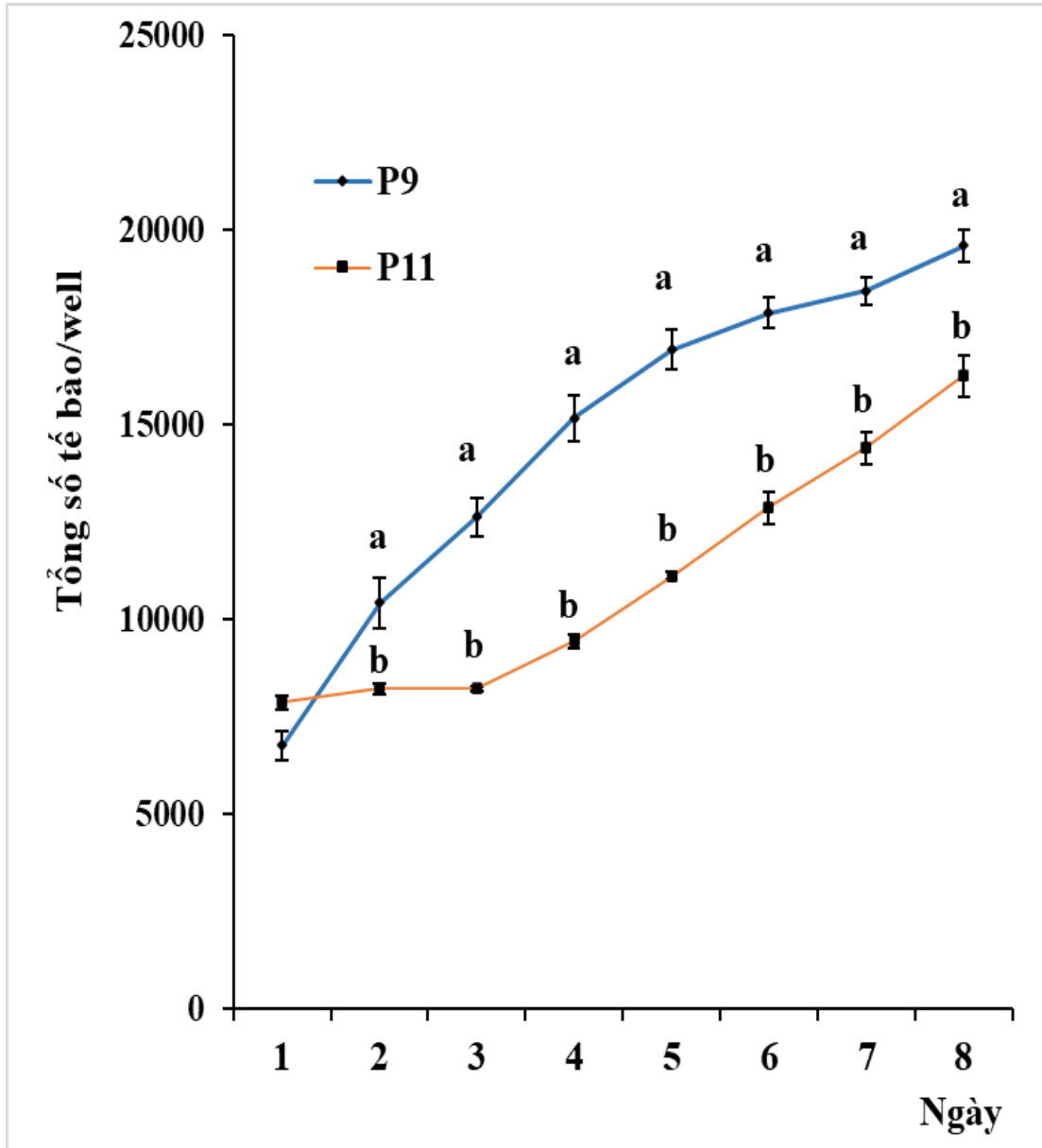
Hình ảnh tế bào sau khi cấy chuyển ở các ngày 1, 3 của 2 nhóm ASC được thể hiện trong hình 3.11 và ở ngày 5, 7 được thể hiện trong hình 3.12. Ở ngày đầu tiên (Hình 3.11 A, C), số lượng tế bào bám dính trên bề mặt đĩa nuôi của cả hai nhóm tương đương nhau, với hình thái điển hình của nguyên bào sợi. Tuy nhiên, đến ngày thứ 3, sự tăng sinh mạnh mẽ hơn của nhóm ASC phân lập bằng phương pháp ủ trypsin đã trở nên rõ rệt. Ở các ngày thứ 5 và 7 (Hình 3.12), số lượng tế bào trong nhóm này đã tăng lên đáng kể, trong khi nhóm nuôi cấy từ mảnh mô có tốc độ tăng sinh chậm hơn.



Hình 3. 12. Hình ảnh ASC sau khi cấy chuyên ở P2 ngày thứ 5 và 7
(A, B) phân lập từ phương pháp ủ trypsin và (C, D) phương pháp nuôi cấy
mảnh mô. Thước đo màu vàng = 100 μ m.

Hình thái tế bào của cả hai nhóm vẫn duy trì đặc trưng của nguyên bào sợi, thể hiện khả năng bám dính tốt và sự sắp xếp đồng đều trên bề mặt đĩa nuôi cấy. Tuy nhiên, sự khác biệt về số lượng tế bào trong các giai đoạn muộn của quá trình nuôi cấy chỉ ra rằng phương pháp ủ trypsin không chỉ thúc đẩy khả năng tăng sinh mà còn có thể duy trì được độ ổn định hình thái tế bào qua nhiều lần cấy chuyên.

Tăng sinh tế bào gốc trung mô mỡ phân lập theo phương pháp ủ trypsin ở hai lần cấy chuyển khác nhau



Hình 3. 13. Tăng sinh ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin ở hai lần cấy chuyển khác nhau (P9 và P11)

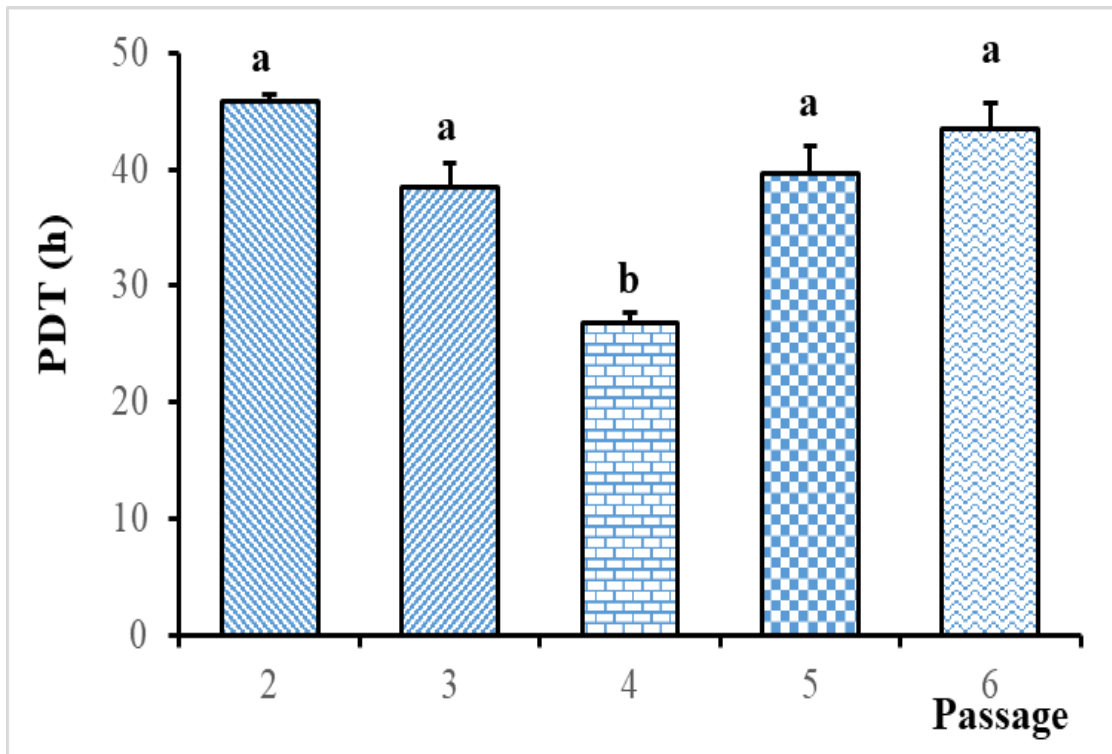
Các chữ cái a, b trong biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Số lượng tế bào được trình bày dưới dạng trung bình \pm SEM.

Biểu đồ trong Hình 3.13 cho thấy sự khác biệt về tốc độ tăng sinh của ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin giữa hai lần cấy chuyển P9 và P11 trong khoảng thời gian từ ngày 1 đến ngày 8. Vào ngày đầu tiên, số lượng tế bào ở cả hai lần cấy chuyển bắt đầu gần như tương đương nhau,. Tuy nhiên, từ ngày thứ hai, tế bào ở P9 bắt đầu tăng trưởng nhanh hơn, đạt hơn 10.000 tế

bào/giếng, so với P11 chỉ đạt khoảng 8.000 tế bào/giếng. Các tế bào tiếp tục tăng sinh mạnh mẽ và sự chênh lệch số lượng tế bào giữa hai phương pháp tiếp tục duy trì đến ngày thứ bảy và thứ tám, khi số lượng tế bào ở P9 đạt cao hơn nhiều số lượng tế bào ở P11. Kết quả này cho thấy khả năng tăng sinh của ASC ở lần cấy chuyển P9 cao hơn rõ rệt so với P11 trong suốt thời gian nuôi cấy. Tổng sản lượng tế bào từ mỗi đoạn khác nhau về mặt thống kê trong suốt thời gian nuôi cấy, và tốc độ tăng trưởng giảm khi số lần cấy chuyển tăng. Kết quả này khá tương tự với nghiên cứu của Zhao và cộng sự 2012 [63].

Thời gian tăng sinh gấp đôi số lượng tế bào ở các lần cấy chuyển từ 2 - 6 của tế bào gốc trung mô mỡ phân lập theo phương pháp ủ trypsin

Thời gian tăng gấp đôi số lượng tế bào (PDT) của ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin với các lần cấy chuyển khác nhau được thể hiện trong hình 3.14. PDT của ASC ở P4 thấp hơn rõ rệt so với ở P2, P3, P5, P6 (kết quả tương ứng là $26,78 \pm 0,92$ giờ so với $45,86 \pm 0,62$ giờ; $38,48 \pm 1,99$ giờ; $39,66 \pm 2,32$ giờ; $43,40 \pm 2,34$ giờ; $p < 0,05$). PDT của ASC ở các lần cấy chuyển P2, P3, P5, P6 không khác biệt mang ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), dao động từ 39,66 giờ tới 45,86 giờ. Kết quả này thấp hơn so với trong nghiên cứu trên ASC của bò của Zhao và cộng sự năm 2012 [63]. Trong nghiên cứu đó, PDT của các ASC từ lần cấy chuyển từ 1 - 5 tăng dần và đạt giá trị dao động từ $16,44 \pm 0,33$ giờ và $22,06 \pm 0,32$ giờ. Sự sai khác giữa nghiên cứu này với nghiên cứu của Zhao và cộng sự năm 2012 [63] có thể do giống bò khác nhau trong hai nghiên cứu, cũng như mật độ tế bào nuôi khác nhau. Kết quả nghiên cứu của Wall và cộng sự năm 2007 [22] đã chỉ ra rằng PDT của ASC người ở P6 cao hơn so với các lần cấy chuyển sớm hơn.



Hình 3. 14. Thời gian tăng sinh gấp đôi số lượng tế bào ở các lần cấy chuyển từ 2 - 6 của ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin.

Các chữ cái a, b trong biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Thời gian tăng sinh gấp đôi số lượng tế bào (PDT) được trình bày dưới dạng trung bình \pm SEM.

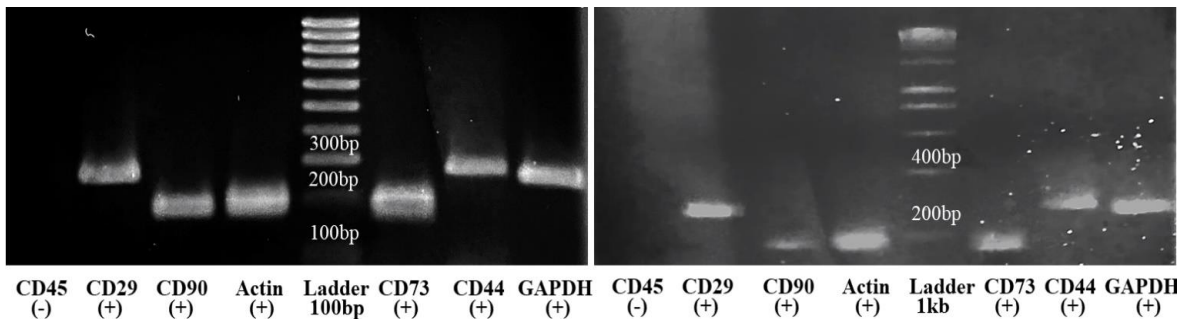
Kết quả nuôi tăng sinh theo ngày chỉ ra ASC phân lập theo cả hai phương pháp đều có khả năng tự đổi mới. Đây chính là một đặc tính quan trọng của ASC. Tế bào duy trì hình thái tế bào nguyên bào sợi và bám dính bề mặt đĩa nhựa nuôi cấy. Tuy nhiên, khả năng tăng sinh của ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin cao hơn rõ rệt so với phân lập theo phương pháp nuôi cấy mảnh mô. Theo dõi tốc độ tăng sinh sau các lần cấy chuyển liên tiếp từ P2 - P6 của ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin cho thấy các tế bào này có tốc độ tăng sinh gấp đôi tế bào khá ổn định (dưới 50 giờ). Tế bào vẫn duy trì được khả năng tự đổi mới tới lần cấy chuyển thứ 11 mặc dù tốc độ tăng sinh giảm thấp hơn trước.

3.3. BIỂU HIỆN CỦA MỘT SỐ MARKERS ĐẶC TRƯNG CỦA TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ MỀM.

ASC phân lập theo phương pháp ủ trypsin ở lần cấy chuyển 4 được đánh giá biểu hiện của các marker đặc trưng của MSC. Kết quả kiểm tra 2 lô

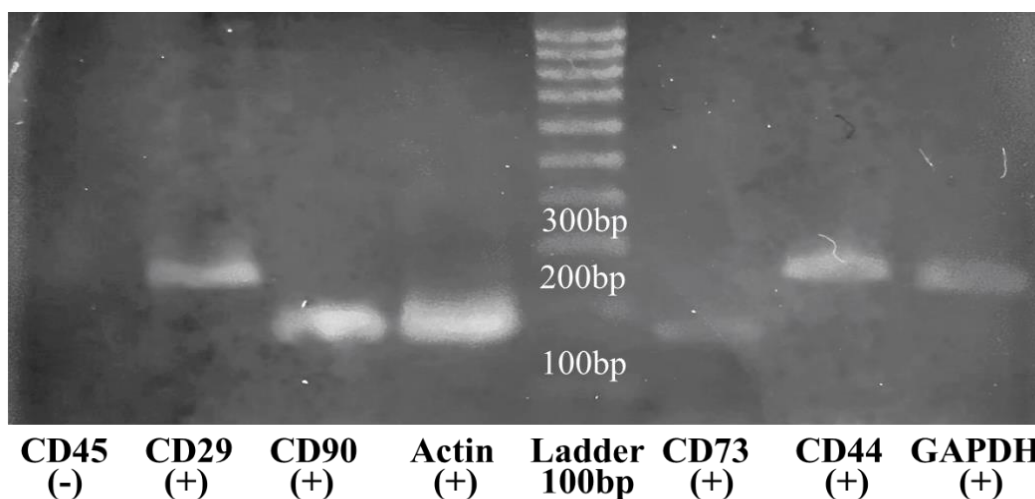
tế bào được thể hiện trong hình 3.15 cho thấy ASC từ cả 2 lô tế bào đều dương tính với CD90, CD29, CD73, CD44 và âm tính với CD45, một marker của tế bào gốc tạo máu. Điều này cho thấy quần thể tế bào ASC không bị lẫn với các tế bào gốc tạo máu, đảm bảo tính đặc trưng và thuần khiết của MSC trong nghiên cứu.

Khi các tế bào được cấy chuyển đến lần thứ 6 (P6), chúng vẫn duy trì biểu hiện các marker giống như ở lần cấy chuyển thứ 4 (Hình 3.16). Kết quả này chứng tỏ rằng tế bào ASC từ mô mỡ khá ổn định về hình thái và các marker đặc trưng của chúng qua nhiều lần cấy chuyển, thể hiện tính bền vững trong điều kiện nuôi cấy in vitro.



Hình 3. 15. Hình ảnh nhuộm gel sau khi chạy điện di các marker đặc trưng của ASC với sản phẩm cDNA

Tế bào gốc trung mô mỡ bò lô 1 (trái) và tế bào gốc trung mô mỡ bò lô 2 (phải) ở lần cấy chuyển 4



Hình 3. 16. Hình ảnh nhuộm gel sau khi chạy điện di các marker đặc trưng của ASC với sản phẩm cDNA từ ASC bò ở lần cấy chuyển 6

CD73, CD44 và CD90 là các dấu hiệu của MSC nói chung cũng như ASC nói riêng. Trong nghiên cứu này, các ASC bò cũng biểu hiện các marker đặc trưng này. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu khác về MSC của bò. MSC của bò có nguồn gốc từ các mô khác nhau đã được chứng minh là dương tính với các dấu hiệu phân tử trung mô liên quan đến độ bám dính như CD29, CD166, CD105, các enzyme bề mặt như CD73, các thụ thể như CD44 và glycoprotein như CD90 [52, 84]. Trong các nghiên cứu về ASC bò, các tác giả cũng chỉ ra ASC từ mô mỡ bò có hình thái nguyên bào sợi và dương tính với CD90 [52, 80]. Tuy nhiên, nghiên cứu của Silva và cộng sự năm 2014 [80] chỉ ra các tế bào ASC này dương tính với CD73, CD105, âm tính với CD45, CD44 trong khi Sampaio và cộng sự năm 2015 [52] báo cáo rằng các tế bào ASC thu được âm tính với CD45, CD24 và CD73. Những sự khác biệt này có thể do sự khác biệt trong phương pháp phân lập và nuôi cấy ASC.

Trong nghiên cứu này, các tế bào ASC thu được âm tính với CD45 và dương tính với CD73, CD29, CD44 và CD90, điều này củng cố thêm tính ổn định và đặc trưng của ASC được phân lập theo phương pháp ủ trypsin. Kết quả này góp phần khẳng định tính khả thi và hiệu quả của phương pháp này trong việc thu nhận và duy trì các ASC bò.

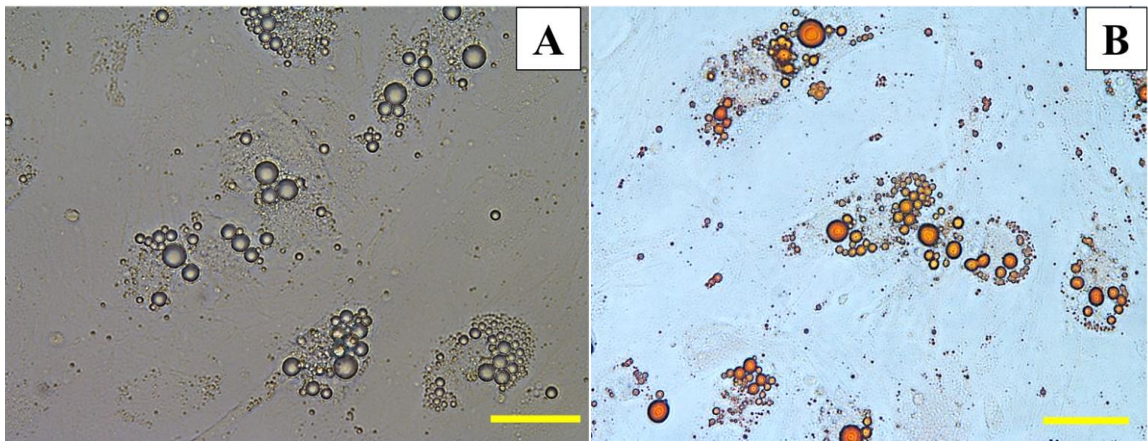
3.4. KẾT QUẢ BIỆT HÓA TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ MỠ BÒ

3.4.1. Biệt hóa tế bào gốc trung mô mỡ thành tế bào mỡ

Trong quá trình cảm ứng tạo mỡ, ASC ở lần cấy chuyển thứ 4 có sự thay đổi biểu hiện hình thái. Sau 7 ngày kích thích biệt hóa, tế bào mất dần hình thái nguyên bào sợi ban đầu và bắt đầu co tròn. Giai đoạn đầu, các giọt mỡ có kích thước nhỏ, sau đó kết hợp với nhau tạo nên những giọt mỡ lớn hơn. Sau 21 ngày tiếp xúc với môi trường cảm ứng tạo mỡ, các tế bào giống như tế bào mỡ xuất hiện một cách rõ ràng hơn với các không bào giàu lipid. Sau khi được nhuộm bằng Oil red O, các giọt lipid được ghi nhận là bắt màu đỏ tươi với các cụm giọt có thể được quan sát khi kiểm tra bằng kính hiển vi quang học (Hình 3.17). Các kết quả này phù hợp với những báo cáo trước đó về quá trình biệt hóa tế bào mỡ, chẳng hạn như nghiên cứu của Yu và cộng sự năm 2020 [85] cho thấy rằng sự xuất hiện của các giọt dạng tròn và ovan có kích thước khác nhau sau 7 ngày trong môi trường cảm ứng, và tế bào mỡ tăng trưởng về kích thước ở các ngày nuôi cấy tiếp theo. Tương tự trong

ngiên cứu của Lu và cộng sự năm 2014 [86], sau khi nuôi trong môi trường tạo mỡ trong 7 ngày, các ASC chuyển từ hình thoi sang hình dẹt và chứa nhiều giọt lipid nội bào. Khi quá trình biệt hóa tiến triển, số lượng giọt lipid tăng lên và kết tụ lại để tạo thành các giọt lớn hơn.

Nghiên cứu lựa chọn ASC ở lần cấy chuyển 4 do tế bào cấy chuyển ở những lần sau sẽ có độ đồng nhất cao hơn do có sự chọn lọc tế bào thích nghi với môi trường nuôi dẫn đến tốc độ tăng sinh cao hơn, trong khi ở những lần cấy chuyển đầu tế bào còn hỗn tạp. Tế bào hỗn tạp do khi phản giải enzyme sẽ có nhiều loại tế bào trong hỗn hợp đó như tế bào gốc mỡ, tế bào thành mạch, thậm chí vẫn còn cả tế bào máu... Ở những lần cấy đầu, tế bào gần với trạng thái in vivo nhất, nên việc đánh giá tiềm năng của ASC là phù hợp hơn.



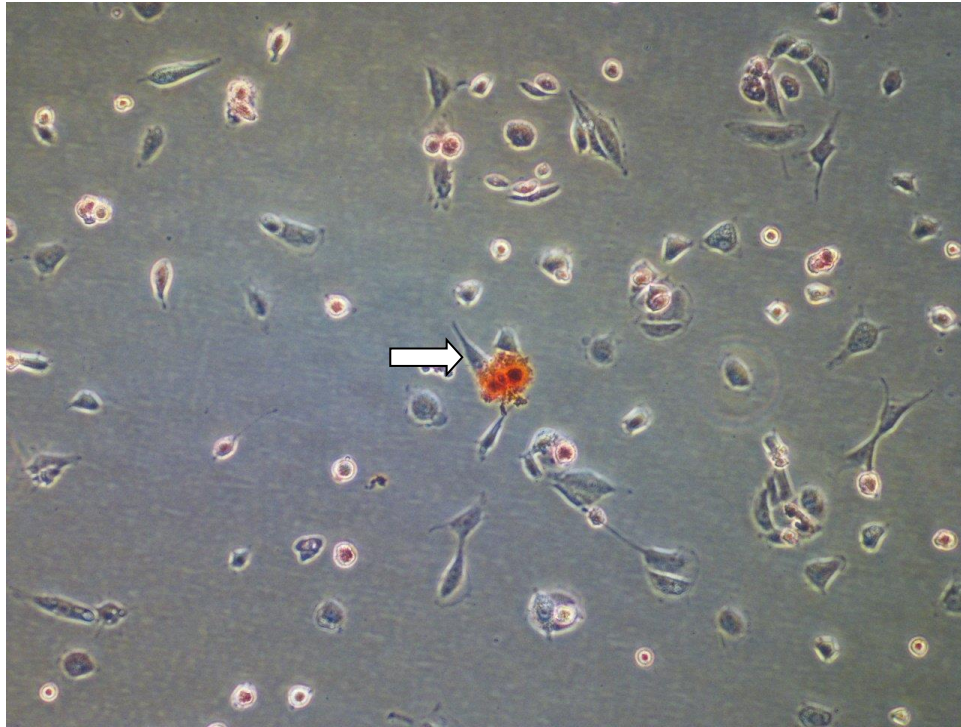
Hình 3. 17. Hình ảnh ASC ở lần cấy chuyển 4 sau khi biệt hoá tạo mỡ

(A) trước khi nhuộm Oil Red O và (B) sau khi nhuộm Oil Red O. Độ phóng đại 400 lần. Thước đo màu vàng = 50 μm .

3.4.2. Tế bào gốc trung mô mỡ biệt hóa thành tế bào xương

Khả năng biệt hóa đa dòng của MSC đã được đánh giá trong điều kiện in vitro là một phần của tiêu chí tối thiểu để xác định MSC. Cùng với sự biệt hoá tạo mỡ, nghiên cứu tiến hành đồng thời cho ASC biệt hoá tạo xương. Khi nuôi cấy ASC trong môi trường biệt hóa thích hợp, hiện tượng canxi hóa được quan sát bằng cách nhuộm đỏ alizarin, một loại thuốc nhuộm thường dùng để nhuộm các cặn canxi. Như thể hiện trong hình 3.18, sau 21 ngày cảm ứng, các tế bào được nuôi trong môi trường biệt hóa tạo xương tích tụ khoáng chất được thể hiện bởi các cụm nhuộm tinh thể màu dày đặc, tế bào thay đổi hình thái, chuyển sang dạng tròn hay hình hạt đậu có màu đỏ cam dưới kính hiển vi

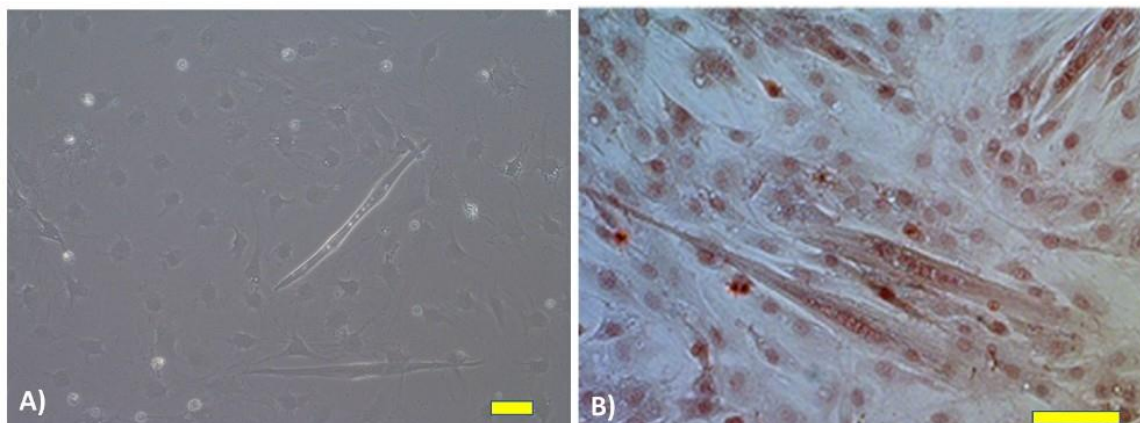
ánh sáng đảo ngược. Nghiên cứu của Lu và cộng sự năm 2014 [86] cũng cho những kết quả khá tương tự. Sau khi ủ trong môi trường tạo xương trong 7 ngày, ASC cho thấy những thay đổi rõ ràng về mặt hình thái. Sau 14 ngày biệt hóa, các tế bào đã tập hợp lại và hình thành các nốt khoáng hóa được nhuộm bằng alizarin đỏ (mũi tên màu trắng trong hình 3.18). Ngoài ra, số lượng và kích thước của các nốt tăng lên.



Hình 3. 18. ASC sau biệt hóa xương bắt màu với Azidin Red

3.4.3. Tế bào gốc trung mô mỡ biệt hóa thành tế bào cơ

Sau 5 ngày nuôi trong môi trường biệt hoá, tế bào mất đi hình dạng ban đầu của ASC và thay vào đó có hình thái kéo dài đặc trưng của tế bào cơ (Hình 3.19 A). Để khẳng định quá trình biệt hóa, tế bào được nhuộm bằng orcein, giúp làm nổi bật các cấu trúc nhân tế bào (Hình 3.19 B).



Hình 3. 19. Hình ảnh ASC sau khi biệt hoá cơ

(A) tế bào sau 5 ngày biệt hoá và (B) tế bào sau 5 ngày biệt hoá nhuộm Orcein (B). Thước đo màu vàng = 100 μ m.

Như vậy, trong nghiên cứu này, ASC đã được phân lập thành công từ phần đệm chân bê. Qua việc sử dụng hai phương pháp: phân lập mảnh mô và xử lý bằng enzyme, các tế bào đã được thu nhận và đánh giá về khả năng tăng trưởng và tiềm năng biệt hóa thành các dạng tế bào khác nhau. Cả hai phương pháp đều cho thấy kết quả khả quan với các tế bào ASC có hình thái đặc trưng dạng hình thoi và khả năng bám dính cao. Tuy nhiên, sự khác biệt đáng chú ý giữa hai phương pháp đó là với phương pháp xử lý bằng enzyme cho ra lượng tế bào nhiều hơn và giữ được tính toàn vẹn của tế bào tốt hơn, nhờ khả năng phá vỡ hiệu quả hơn các thành phần của chất nền ngoại bào. Không có sự khác biệt rõ ràng nào giữa các lô tế bào khi các lô tế bào này đều biểu hiện các marker tương tự nhau.

Trong nghiên cứu này, các tế bào ASC có khả năng biệt hóa thành lipid đã được nuôi trong môi trường nuôi cấy in vitro gồm các yếu tố tăng trưởng để tế bào tăng sinh và biệt hóa thành chất béo của thịt nhân tạo. Các ASC được kích thích biệt hóa bằng nhiều loại nhân tố cảm ứng biệt hóa, ví dụ như Insulin (INS), dexamethasone (DEX) và 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) là nhân tố cảm ứng biệt hóa phổ biến nhất. Kết quả từ nghiên cứu cho thấy, các ASC đã biệt hóa thành công thành các tế bào mỡ. Hiệu quả của quá trình biệt hóa tạo mỡ quan sát được trong nghiên cứu này tương đồng với những nghiên cứu trước đó [85, 86]. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng dexamethasone và IBMX đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn đầu của quá trình biệt hóa thông qua việc kích hoạt các gene chỉ thị, trong khi insulin hỗ trợ quá trình

trưởng thành và tích lũy lipid ở giai đoạn sau. Sự xuất hiện của các giọt lipid theo thời gian và quá trình biệt hóa thành công của ASC thành tế bào mỡ đã khẳng định tính đúng đắn của phương pháp áp dụng trong nghiên cứu này.

Bên cạnh đó, các nhân tố cảm ứng biệt hóa MSC thành tế bào xương và tế bào cơ cũng đã được sử dụng. Việc bổ sung các hợp chất hoá học vào môi trường nuôi cấy là một cách đơn giản để biệt hoá MSC. Kết quả cho thấy tế bào cơ đã được tạo ra bằng cách biệt hoá ASC trong môi trường với 5% huyết thanh ngựa và glucocorticoid như hydrocortisone và dexamethasone. Khi nuôi cấy trong điều kiện này, các tế bào được cho là sẽ hợp nhất và hình thành các ống cơ đa nhân, tạo ra các dấu hiệu protein cho tế bào cơ. Tuy nhiên sự biệt hoá tế bào cơ tạo ra với năng suất và khả năng tái tạo thấp nhất với các loại tế bào đã biệt hoá trong môi trường nuôi cấy.

Mặc dù ASC không đặc hiệu với cơ như SC, nhưng chúng có ưu điểm là dễ thu nhận và nuôi cấy. Cùng với khả năng biệt hoá thành cả tế bào cơ, tế bào mỡ và tế bào xương khiến chúng trở thành một lựa chọn thay thế có giá trị cho nghiên cứu và sản xuất thịt nhân tạo.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

- Tế bào gốc trung mô mỡ có thể được phân lập theo cả hai phương pháp: nuôi cấy mảnh mô và ủ với trypsin. Tuy nhiên, tế bào phân lập theo phương pháp ủ trypsin có khả năng tăng sinh nhanh hơn so với nuôi cấy từ mảnh mô.
- Đã đánh giá biểu hiện hình thái nguyên bào sợi, tính bám dính bề mặt đĩa nhựa của mẫu nghiên cứu. Tế bào gốc trung mô mỡ phân lập theo hai phương pháp ủ trypsin có tốc độ tăng sinh cao hơn so với phương pháp nuôi cấy mảnh mô.
- Mẫu nghiên cứu biểu hiện các dấu hiệu đặc trưng của tế bào gốc trung mô (dương tính với CD73, CD90, CD44, CD29 và âm tính với CD45).
- Đã biệt hoá tế bào gốc trung mô mỡ nghiên cứu thành tế bào mỡ, xương và cơ trong môi trường chuyên biệt.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục thực hiện một số nghiên cứu chuyên sâu để hoàn thiện phương pháp biệt hoá tế bào gốc trung mô bò trong điều kiện in vitro định hướng tạo thịt nhân tạo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hong T.K., Shin D.M., Choi J., Do J.T., Han S.G., 2021., Current issues and technical advances in cultured meat production: a review, *Food Science of Animal Resources*, 41(3), pp. 355.
2. Bryant C.J., 2020, Culture, meat, and cultured meat, *Journal of animal science*, 98(8), pp. skaa172.
3. Van E.W.F., Van K.W.J., Westerhof W., 1999, *Industrial scale production of meat from in vitro cell culture*,
4. Ben A.T., Levenberg S., 2019, Tissue engineering for clean meat production, *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, pp. 46.
5. Bogliotti Y.S., Wu J., Vilarino M., Okamura D., Soto D.A., Zhong C., Sakurai M., Sampaio R.V., Suzuki K., Belmonte J.C.I.B., Ross P.J., 2018, Efficient derivation of stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(9), pp. 2090-2095.
6. Yuan Y., 2018, Capturing bovine pluripotency, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(9), pp. 1962-1963.
7. Okamura L.H., Cordero P., Palomino J., Parraguez V.H., Torres C.G., Peralta O.A., 2018, Myogenic differentiation potential of mesenchymal stem cells derived from fetal bovine bone marrow, *Animal biotechnology*, 29(1), pp. 1-11.
8. Specht E.A., Welch D.R., Clayton E.M.R., Lagally C.D., 2018, Opportunities for applying biomedical production and manufacturing methods to the development of the clean meat industry, *Biochemical Engineering Journal*, 132, pp. 161-168.
9. Frese L., Dijkman P.E., Hoerstrup S.P., 2016, Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine, *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43(4), pp. 268-274.
10. Astori G., Vignati F., Bardelli S., Tubio M., Gola M., Albertini V., Bambi F., Scali G., Castelli D., Rasini V., 2007, "In vitro" and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified

in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells, *Journal of Translational Medicine*, 5, pp. 1-10.

11. OECD Food Agriculture Organization of the United Nations, 2021, *OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030*.
12. Choudhury D., Tseng T.W., Swartz E., 2020, The business of cultured meat, *Trends in biotechnology*, 38(6), pp. 573-577.
13. <https://www.mosameat.com/our-story>
14. Post M.J., Levenberg S., Kaplan D.L., Genovese N., Fu J., Bryant C.J., Negowetti N., Verzijden K., Moutsatsou P., 2020, Scientific, sustainability and regulatory challenges of cultured meat, *Nature Food*, 1(7), pp. 403-415.
15. Choi J.H., Gimble J.M., Lee K., Marra K.G., Rubin J.P., Yoo J.J., Vunjak N.G., Kaplan D.L., 2010, Adipose tissue engineering for soft tissue regeneration, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 16(4), pp. 413-426.
16. Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Gerasimov U.V., 1987, Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers, *Cell proliferation*, 20(3), pp. 263-272.
17. Dominici M., Blanc K.L., Mueller I., Slaper C.I., Marini F.C., Krause D.S., Deans R.J., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E.M., 2006, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 8(4), pp. 315-317.
18. Wang H.S., Hung S.C., Peng S.T., Huang C.C., Wei H.M., Guo Y.J., Fu Y.S., Lai M.C., Chen C.C., 2004, Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord, *Stem cells*, 22(7), pp. 1330-1337.
19. De A.D.U., Morizono K., Elbarbary A., Zuk P.A. Alfonso Z., Zhu M., Drago J.L., Ashjian P., Thomas B., Benhaim P., Chen I., Fraser J.,

- 2003, Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow, *Cells tissues organs*, 174(3), pp. 101-109.
20. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., Ugarte D.A.D., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C.A., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H., 2002, Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, *Molecular biology of the cell*, 13(12), pp. 4279-4295.
 21. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R., 1999, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *science*, 284(5411), pp. 143-147.
 22. Wall M.E., Bernacki S.H., Lobo E.G., 2007, Effects of serial passaging on the adipogenic and osteogenic differentiation potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells, *Tissue engineering*, 13(6), pp. 1291-1298.
 23. Gotoh N., 2009, Control of stemness by fibroblast growth factor signaling in stem cells and cancer stem cells, *Current stem cell research & therapy*, 4(1), pp. 9-15.
 24. Parker A.M., Shang H., Khurgel M., Katz A.J., 2007, Low serum and serum-free culture of multipotential human adipose stem cells, *Cytotherapy*, 9(7), pp. 637-646.
 25. DiGirolamo C.M., Stokes D., Colter D., Phinney D.G., Class R., Prockop D.J., 1999, Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate, *British journal of haematology*, 107(2), pp. 275-281.
 26. Friedenstein A.J., Piatetzky S.I.I., Petrakova K.V., 1966, Osteogenesis in transplants of bone marrow cells, *Development*, 16(3), pp. 381-390.
 27. Awad H.A., Butler D.L., Boivin G.P., Smith F.N.L., Malaviya P., Huibregtse B., Caplan A.I., 1999, Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon, *Tissue engineering*, 5(3), pp. 267-277.

28. Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz D.M., Nakano Y., Meyer E.M., Morel L., Petersen B.E., Scott E.W., 2002, Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion, *Nature*, 416(6880), pp. 542-545.
29. Dennis J.E., Merriam A., Awadallah A., Yoo J.U., Johnstone B., Caplan A.I., 1999, A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse, *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(5), pp. 700-709.
30. Jiang L., Zhu J.K., Liu X.L., Xiang P., Hu J., Yu W.H., 2008, Differentiation of rat adipose tissue-derived stem cells into Schwann-like cells in vitro, *Neuroreport*, 19(10), pp. 1015-1019.
31. Caplan A.I., 1994, The mesengenic process, *Clinics in plastic surgery*, 21(3), pp. 429-435.
32. Kras K.M., Hausman D.B., Hausman G.J., Martin R.J., 1999, Adipocyte development is dependent upon stem cell recruitment and proliferation of preadipocytes, *Obesity research*, 7(5), pp. 491-497.
33. Lee S.Y., Lim J., Khang G., Son Y., Choung P.H., Kang S.S., Chun S.Y., Shin H.I., Kim S.Y., Park E.K., 2009, Enhanced Ex vivo expansion of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells by fibroblast growth factor-2 and dexamethasone, *Tissue Engineering Part A*, 15(9), pp. 2491-2499.
34. Aubin J.E., 1998, Bone stem cells, *Journal of cellular biochemistry*, 72(S30-31), pp. 73-82.
35. Strem B.M., Hedrick M.H., 2005, The growing importance of fat in regenerative medicine, *Trends in biotechnology*, 23(2), pp. 64-66.
36. Hedrick M.H., Fraser J.K., Schulzki M.J., Byrnes B., Carlson G., Shanahan R.K., 2009, Systems and methods for separating and concentrating adipose derived stem cells from tissue, *Google Patents*.
37. Doyonnas R., LaBarge M.A., Sacco A., Charlton C., Blau H.M., 2004, Hematopoietic contribution to skeletal muscle regeneration by

- myelomonocytic precursors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(37), pp. 13507-13512.
38. Sarugaser R., Hanoun L., Keating A., Stanford W.L., Davies J.E., 2009, Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy, *PLOS One*, 4(8), pp. e6498.
 39. Panetta N.J., Gupta D.M., Lee J.K., Wan D.C., Commons G.W., Longaker M.T., 2010, Human adipose-derived stromal cells respond to and elaborate bone morphogenetic protein-2 during in vitro osteogenic differentiation, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 125(2), pp. 483-493.
 40. Christodoulides C., Lagathu C., Sethi J.K., Vidal P.A., 2009, Adipogenesis and WNT signalling, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(1), pp. 16-24.
 41. Xu Y., Balooch G., Chiou M., Bekerman E., Ritchie R.O., Longaker M.T., 2007, Analysis of the material properties of early chondrogenic differentiated adipose-derived stromal cells (ASC) using an in vitro three-dimensional micromass culture system, *Biochemical and biophysical research communications*, 359(2), pp. 311-316.
 42. Chamberlain G., Fox J., Ashton B., Middleton J., 2007, Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing, *Stem cells*, 25(11), pp. 2739-2749.
 43. Smith B.T., Shum J., Wong M., Mikos A.G., Young S., 2015, Bone tissue engineering challenges in oral & maxillofacial surgery, *Engineering mineralized and load bearing tissues*, pp. 57-78.
 44. Yamamoto N., Akamatsu H., Hasegawa S., Yamada T., Nakata S., Ohkuma M., Miyachi E.I., Marunouchi T., Matsunaga K., 2007, Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue, *Journal of dermatological science*, 48(1), pp. 43-52.
 45. Friedenstein, Alexander J., 1976, Precursor cells of mechanocytes, *International review of cytology*, 47, pp. 327-359.

46. Ling L., Nurcombe V., Cool S.M., 2009, Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells, *Gene*, 433(1-2), pp. 1-7.
47. Trivanović D., Jauković A., Popović B., Krstić J., Mojsilović S., Okić D.I., Kukolj T., Obradović H., Santibanez J.F., Bugarski D., 2015, Mesenchymal stem cells of different origin: comparative evaluation of proliferative capacity, telomere length and pluripotency marker expression, *Life Sciences*, 141, pp. 61-73.
48. Hodgkiss G.H.M., Argyle D.J., Corcoran B.M., Whitelaw B., Milne E., Bennett D., Argyle S.A., 2012, Characterisation and differentiation potential of bone marrow derived canine mesenchymal stem cells, *The Veterinary Journal*, 194(3), pp. 361-368.
49. Trindade H.A.B., Therrien J., Garcia J.M., Smith L.C., 2017, Mesenchymal-like stem cells in canine ovary show high differentiation potential, *Cell proliferation*, 50(6), pp. e12391.
50. Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H., Bieback K., 2006, Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue, *Stem cells*, 24(5), pp. 1294-1301.
51. Adegani F.J., Langroudi L., Arefian E., Shafiee A., Dinarvand P., Soleimani M., 2013, A comparison of pluripotency and differentiation status of four mesenchymal adult stem cells, *Molecular biology reports*, 40(5), pp. 3693-3703.
52. Sampaio R.V., Chiaratti M.R., Santos D.C.N., Bressan F.F., Sangalli J. R., Sá A.L.A., Silva T.V.G., Costa N.N., Cordeiro M.S., Santos S.S.D., 2015, Generation of bovine (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) adipose tissue derived stem cells: isolation, characterization, and multipotentiality, *Genet Mol Res*, 14(1), pp. 53-62.
53. Lee S.H., Cha S.H., Kim C.L., Lillehoj H.S., Song J.Y., Lee K.W., 2015, Enhanced adipogenic differentiation of bovine bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Journal of Applied Animal Research*, 43(1), pp. 15-21.

54. Xiong H., Bai C., Wu S., Gao Y., Lu T., Hu Q., Guan W., Ma Y., 2014, Biological characterization of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord, *Animal Cells and Systems*, 18(1), pp. 59-67.
55. Van R.L.R., Roncari D.A.K., 1977, Isolation of fat cell precursors from adult rat adipose tissue, *Cell and tissue research*, 181(2), pp. 197-203.
56. Zhu M.I.N., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H., 2001, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue engineering*, 7(2), pp. 211-228.
57. Patrick J.C.W., Zheng B., Johnston C., Reece G.P., 2002, Long-term implantation of preadipocyte-seeded PLGA scaffolds, *Tissue engineering*, 8(2), pp. 283-293.
58. Lee J.A., Parrett B.M., Conejero J.A., Laser J., Chen J., Kogon A.J., Nanda D., Grant R.T., Breitbart A.S., 2003, Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells, *Annals of Plastic Surgery*, 50(6), pp. 610-617.
59. Niemelä S.M., Miettinen S., Konttinen Y., Waris T., Kellomäki M., Ashammakhi N.A., Ylikomi T., 2007, Fat tissue: views on reconstruction and exploitation, *Journal of Craniofacial Surgery*, 18(2), pp. 325-335.
60. McCoy M.K., Martinez T.N., Ruhn K.A., Wrage P.C., Keefer E.W., Botterman B.R., Tansey K.E., Tansey M.G., 2008, Autologous transplants of Adipose-Derived Adult Stromal (ADAS) cells afford dopaminergic neuroprotection in a model of Parkinson's disease, *Experimental neurology*, 210(1), pp. 14-29.
61. Rodbell M., Jones A.B., 1966, Metabolism of Isolated Fat Cells: III. THE SIMILAR INHIBITORY ACTION OF PHOSPHOLIPASE C (CLOSTRIDIUM PERFRINGENS α TOXIN) AND OF INSULIN ON LIPOLYSIS STIMULATED BY LIPOLYTIC HORMONES AND THEOPHYLLINE, *Journal of Biological Chemistry*, 241(1), pp. 140-142.

62. Van R.L., Bayliss C.E., Roncari D.A., 1976, Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture, *The Journal of clinical investigation*, 58(3), pp. 699-704.
63. Zhao Y., Waldman S.D., Flynn L.E., 2012, The effect of serial passaging on the proliferation and differentiation of bovine adipose-derived stem cells, *Cells Tissues Organs*, 195(5), pp. 414-427.
64. Cebo, Daniel, 2017, Characterization of bovine adipose-derived stem cells, *Int J Sci Technol Res*, 6(5), pp. 16-18.
65. Lu W., Xu Z.M., Liu Q., Yu N.N., Yu J.B., Li W.L., Mao Y.Y., Du Z., Si L., Yuan S., 2021, Inhibitory effect of bovine adipose-derived mesenchymal stem cells on lipopolysaccharide induced inflammation of endometrial epithelial cells in dairy cows, *Frontiers in Veterinary Science*, 8, pp. 726328.
66. Zhu R., Feng Y., Li R., Wei K., Ma Y., Liu Q., Shi D., Huang J., 2024, Isolation methods, proliferation, and adipogenic differentiation of adipose-derived stem cells from different fat depots in bovines, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 479(3), pp. 643-652.
67. Schwarz C., Leicht U., Rothe C., Drosse I., Luibl V., Röcken M., Schieker M., 2012, Effects of different media on proliferation and differentiation capacity of canine, equine and porcine adipose derived stem cells, *Research in veterinary science*, 93(1), pp. 457-462.
68. Arrigoni E., Lopa S., de Girolamo L., Stanco D., Brini A.T., 2009, Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models, *Cell and tissue research*, 338(3), pp. 401-411.
69. Marycz K., Kornicka K., Basinska K., Czyrek A., 2016, Equine metabolic syndrome affects viability, senescence, and stress factors of equine adipose-derived mesenchymal stromal stem cells: new insight into EqASCs isolated from EMS horses in the context of their aging, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016,
70. Vahedi P., Soleimanirad J., Roshangar L., Shafaei H., Jarolmasjed S., Charoudeh H.N., 2016, Advantages of sheep infrapatellar fat pad

adipose tissue derived stem cells in tissue engineering, *Advanced pharmaceutical bulletin*, 6(1), pp. 105.

71. Castro F.O., Torres A., Cabezas J., Rodriguez A.L.L., 2014, Combined use of platelet rich plasma and vitamin C positively affects differentiation in vitro to mesodermal lineage of adult adipose equine mesenchymal stem cells, *Research in Veterinary Science*, 96(1), pp. 95-101.
72. Ranera B., Ordovás L., Lyahyai J., Bernal M.L., Fernandes F., Remacha A.R., Romero A., Vázquez F.J., Osta R., Cons C., 2012, Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells, *Equine veterinary journal*, 44(1), pp. 33-42.
73. Ren Y., Wu H., Zhou X., Wen J., Jin M., Cang M., Guo X., Wang Q., Liu D., Ma Y., 2012, Isolation, expansion, and differentiation of goat adipose-derived stem cells, *Research in veterinary science*, 93(1), pp. 404-411.
74. Hillmann A., Ahrberg A.B., Brehm W., Heller S., Josten C., Paebst F., Burk J., 2016, Comparative characterization of human and equine mesenchymal stromal cells: a basis for translational studies in the equine model, *Cell transplantation*, 25(1), pp. 109-124.
75. Dubois S.G., Floyd E.Z., Zvonic S., Kilroy G., Wu X., Carling S., Halvorsen Y.D.C., Ravussin E., Gimble J.M., 2008, Isolation of human adipose-derived stem cells from biopsies and liposuction specimens, *Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols*, pp. 69-79.
76. Drago J.L., Samimi B., Zhu M., Hame S.L., Thomas B.J., Lieberman J.R., Hedrick M.H., Benhaim P., 2003, Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads, *The Journal of Bone & Joint Surgery British Volume*, 85(5), pp. 740-747.
77. Jin X.B., Sun Y.S., Zhang K., Wang J., Shi T.P., Ju X.D., Lou S.Q., 2008, Tissue engineered cartilage from hTGF β 2 transduced human adipose derived stem cells seeded in PLGA/alginate compound in vitro and in vivo, *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An*

Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 86(4), pp. 1077-1087.

78. Declercq H.A., De C.T., Krysko O., Bachert C., Cornelissen M.J., 2013, Bone grafts engineered from human adipose-derived stem cells in dynamic 3D-environments, *Biomaterials*, 34(4), pp. 1004-1017.
79. Tholpady S.S., Llull R., Ogle R.C., Rubin J.P., Futrell J., Katz A.J., 2006, Adipose tissue: stem cells and beyond, *Clinics in plastic surgery*, 33(1), pp. 55-62.
80. Silva C.G., Martins C.F., Cunha E.R., Bessler H.C., Cardoso T., Martins G.H.L., 2014, Isolation, characterization and differentiation of bovine derived mesenchymal stem cells from amniotic fluid, Wharton's jelly and adipose tissue, *Animal Reproduction*, 11(3), pp. 476.
81. Redaelli S., Bentivegna A., Foudah D., Miloso M., Redondo J., Riva G., Baronchelli S., Dalprà L., Tredici G., 2012, From cytogenomic to epigenomic profiles: monitoring the biologic behavior of in vitro cultured human bone marrow mesenchymal stem cells, *Stem cell research & therapy*, 3, pp. 1-17.
82. Do T. K., Nguyen V.H., Nguyen T.N., Nguyen V.L., Pham D.M., Nguyen T.N., Tran T.T.H., Ngo T.T.H., Chu H.H., 2020, Efficient Isolation and Long-term Red Fluorescent Nanodiamond Labeling of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells for the Effective Differentiation into Hepatocyte-like Cells, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 63, pp. e20200082.
83. Eftekhari V.S.H., Zahmatkesh L., Salehinejad P., Totonchi S., Shams A.A., 2015, Evaluation of neurogenic potential of human umbilical cord mesenchymal cells; a time- and concentration-dependent manner, *Iranian biomedical journal*, 19(2), pp. 82.
84. Lee A.Y., Lee J., Kim C.L., Lee K.S., Lee S.H., Gu N.Y., Kim J.M., Lee B.C., Koo O.J., Song J.Y., 2015, Comparative studies on proliferation, molecular markers and differentiation potential of mesenchymal stem cells from various tissues (adipose, bone marrow,

ear skin, abdominal skin, and lung) and maintenance of multipotency during serial passages in miniature pig, *Research in Veterinary Science*, 100, pp. 115-124.

85. Yu X., Fang X., Gao., Mi J., Zhang X., Xia L., Zhao Z., Albrecht E., Maak S., Yang R., 2020, Isolation and identification of bovine preadipocytes and screening of MicroRNAs associated with adipogenesis, *Animals*, 10(5), pp. 818.
86. Lu T., Xiong H., Wang K., Wang S., Ma Y., Guan W., 2014, Isolation and characterization of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) from cattle, *Applied biochemistry and biotechnology*, 174, pp. 719-728.