

ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG CỦA HỖN DỊCH TẾ BÀO DA TỰ THÂN KHÔNG NUÔI CẤY SAU BẢO QUẢN LẠNH SÂU

Nguyễn Thị Hương✉, Đinh Văn Hân,
Nguyễn Thị Vân Anh, Đinh Thành Hưng,
Nguyễn Thị Hồng Liên, Hoàng Văn Tú¹, Lại Thị Nga
Bệnh viện Bỏng Quốc gia Lê Hữu Trác

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Trị liệu tế bào da tự thân không qua nuôi cấy đang dần trở thành một giải pháp tiềm năng trong điều trị vết thương, vết bỏng sâu diện rộng [1, 2]. Sử dụng hỗn dịch tế bào da không qua nuôi cấy là một trong những phương pháp đã được minh chứng có tác dụng tích cực đến quá trình liền vết thương cho bệnh nhân, việc chuẩn hoá quy trình bảo quản lạnh sâu hỗn dịch tế bào da có rất nhiều ý nghĩa khoa học và thiện tiên với các bệnh.

Mục tiêu: Đánh giá được chất lượng của tế bào sau bảo quản 4 tuần ở các nồng độ chất bảo quản DMSO khác nhau bằng phương pháp nhuộm xanh Trypan và nuôi cấy tế bào.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: 10 miếng da mảnh mỏng (0,25 mm) bằng enzyme trypsin- từ các mẫu da thu hồi trong phẫu thuật ghép da tự thân. Hỗn dịch tế bào sau phân tách được bảo quản lạnh sâu ở -80°C với các nồng độ DMSO khác nhau (9%, 10%, 11%). Sau giải đông, tế bào được đánh giá tỷ lệ sống/chết bằng nhuộm xanh Trypan và được nuôi cấy chuyên biệt để đánh giá được khả năng phân lập của tế bào.

Kết quả: Tỷ lệ tế bào sống trung bình sau tách đạt trung bình khoảng trên 80%, cao nhất là 92,1%. Nồng độ DMSO 10% (C2) được xác định là tối ưu cho bảo quản. Sau 4 tuần bảo quản lạnh sâu, tỷ lệ tế bào sống trung bình giảm nhẹ nhưng vẫn duy trì khả năng sống bám dính và phát triển trong môi trường nuôi cấy.

Kết luận: Đánh giá được tỷ lệ tế bào sống của hỗn dịch tế bào da tự thân không nuôi cấy sau thời gian bảo quản lạnh sâu; tế bào sau giải đông được nuôi cấy trong môi trường định hướng vẫn đảm bảo khả năng sống sau 6 ngày nuôi cấy, nồng độ chất bảo quản lạnh sau là 10%.

Từ khóa: Hỗn dịch tế bào da, DMSO, bảo quản lạnh sâu, tế bào không nuôi cấy, bỏng.

¹Chịu trách nhiệm: Nguyễn Thị Hương, Bệnh viện Bỏng Quốc gia Lê Hữu Trác

Email: nghuong86612@gmail.com

Ngày gửi bài: 05/9/2025; Ngày nhận xét: 11/10/2025; Ngày duyệt bài: 26/10/2025

<https://doi.org/10.54804/>

ABSTRACT

Autologous non-cultured skin cell therapy has gradually become a potential approach for the treatment of wounds and extensive deep burns [1, 2]. The use of non-cultured skin cell suspensions has been proven to positively influence the wound healing process. Standardizing the cryopreservation procedure for these suspensions holds significant scientific and clinical value.

Objective: *To evaluate cell quality after 4 weeks of cryopreservation at different DMSO concentrations using blue Trypan staining and cell culture methods.*

Materials and methods: *Ten thin split-thickness skin samples (0.25 mm) were collected from donor sites during autologous skin graft surgery. The isolated cell suspensions were cryopreserved at -80°C using different DMSO concentrations (9%, 10%, 11%). After thawing, cell viability was assessed using blue Trypan staining, and cultured to evaluate their ability of the cells to attach and proliferate.*

Results: *The mean post-isolation cell viability was above 80%, with the highest reaching 92.1%. A DMSO concentration of 10% (C2) was identified as optimal for cryopreservation. After 4 weeks of storage, cell viability slightly decreased, but the cells remained viable, adherent, and capable of proliferation in culture.*

Conclusion: *The study demonstrated that non-cultured autologous skin cell suspensions maintained high viability after 4 weeks of cryopreservation. Cells thawed and cultured in defined media remained viable after 6 days, with 10% DMSO identified as the optimal cryoprotectant concentration*

Keywords: *Skin cell suspension, DMSO, cryopreservation, non-cultured cells, burn.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Điều trị vết thương bỏng sâu diện rộng và vết thương khó lành luôn là thách thức đối lớn đối với y học. Ghép da tự thân bị hạn chế bởi nguồn da tự thân và tạo thêm một vết thương rộng thứ hai cho bệnh nhân [3]. Nhóm nghiên cứu tại Bệnh viện Bỏng Quốc gia Lê Hữu Trác đã phát triển thành công hỗn dịch tế bào da tự thân không nuôi cấy để điều trị các vết bỏng sâu diện rộng và vết thương khó lành.

Hiện tại, sản phẩm này chỉ được sử dụng một lần ngay sau khi phân lập tế bào. Nếu bệnh nhân cần thêm một hoặc

nhều mảnh ghép, toàn bộ quy trình phải được lặp lại từ đầu. Điều này, gây đau đớn và có thể nguy hiểm cho bệnh nhân trong quá trình phẫu thuật lấy mẫu da. Do đó, cần phải tối ưu hóa chất bảo quản lạnh sâu hỗn dịch tế bào da tự thân không nuôi cấy. Để đảm bảo sau bảo quản lạnh sâu, tế bào vẫn duy trì khả năng sống và hoạt tính ổn định của các tế bào chính của da trong hỗn dịch. Nghiên cứu này nhằm tìm được nồng độ chất bảo quản lạnh sâu DMSO và đánh giá chất lượng của tế bào da không nuôi cấy trong quá trình bảo quản lạnh sâu.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu nghiên cứu

Các thiết bị chủ yếu: Phòng sạch, kính hiển vi đảo ngược, máy ly tâm lạnh, tủ hood lọc không khí vô trùng, tủ ấm (incubator), Pipet Aid.

Hóa chất chủ yếu: DMEM high glucose (Dulbeco's Modified Eagle Media); PBS (Phosphate - Buffered Salines); Trypsin - EDTA.

Nguồn mô nghiên cứu: 10 mẫu da thu được từ phẫu thuật ở phòng mổ có độ dày 0,25 mm. Mảnh da thu được từ phẫu thuật và cho chìm ngập trong môi trường dung dịch bảo quản tạm thời ở điều kiện vô trùng và bảo quản trong 4°C.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách các tế bào chủ yếu của da bằng enzym trypsin

Lấy da mảnh mỏng có độ dày 0,25 mm trong các trường hợp ghép da tự do tại phòng mổ. Mảnh da được thu hồi từ phẫu thuật da của bệnh nhân bỏng trong phẫu thuật ghép da, mỗi mẫu có diện tích khoảng 2 - 5 cm². Rửa sạch 03 lần bằng nước muối sinh lý vô trùng để loại bỏ các thành phần tế bào máu. Sau đó bảo quản trong dung dịch nuôi dưỡng DMEM có bổ sung 500 U/ml penicillin, 500 microgam/ml streptomycin và amphotericin B ở 4°C cho đến khi tiến hành thí nghiệm [4].

Tại IAB, mảnh da được dó và cắt thành các mảnh, mỗi mảnh có diện tích 1 cm², sau đó các mảnh được cắt tiếp thành 6 mẫu da nhỏ, đặt các mẫu da từ mỗi mảnh da vào tube ly tâm dung tích 15 ml vô trùng, bổ sung mỗi loại 2 ml enzyme vào tube tương ứng. Nồng độ enzyme: Trypsin/EDTA 1X trong PBS [4].

Ủ các tube da trong khoảng thời gian nhất định ở điều kiện 37°C; đổ toàn bộ

dung dịch và mẫu da trong tube nhựa ra đĩa nhựa vô trùng d = 60mm; dùng dao mổ thường cạo nhẹ để tách các tế bào da ra khỏi lớp trung bì; dùng tác dụng của enzyme bằng cách bổ sung vào mỗi đĩa da 2 ml DMEM có 10% FBS.

Gấp bỏ mảnh trung bì da, thu hỗn dịch trở lại tube và ly tâm với vận tốc 1600 vòng/phút trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi để thu tế bào cho các đánh giá tiếp theo [4].

2.2.2. Đánh giá tỷ lệ sống chết của hỗn dịch tế bào.

Số lượng tế bào được xác định trong buồng đếm Neubauer [5].

Tỷ lệ sống của tế bào được xác định theo phương pháp nhuộm xanh trypan.

2.2.3. Phương pháp bảo quản lạnh sâu hỗn dịch tế bào da thu được sau tách

Môi trường bảo quản hỗn dịch tế bào gồm C1; C2; C3

- C1 (9% DMSO + 91% MTTT)
- C2 (10% DMSO + 90% MTTT)
- C3 (11% DMSO + 89% MTTT)

- Pha hỗn dịch tế bào thu được sau khi tách vào dung dịch bảo quản, hỗn dịch tế bào có thể để trong nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút.

- Bơm hỗn dịch tế bào vào các ống bảo quản lạnh sâu.

- Đặt các ống tế bào vào hộp bảo quản. Hạ nhiệt độ theo chương trình giảm với tốc độ 1 °C/phút cho tới âm 80°C.

2.2.4. Nuôi cấy tế bào da sau phân lập

Môi trường nuôi cấy dựa theo phương pháp của Freshney IR (2003) [6]:

- Nuôi cấy nguyên bào sợi: DMEM/10% FBS
- Nuôi cấy tế bào sừng: Là môi trường không huyết thanh Epilife.

Cách tiến hành:

Sau khi tách tế bào, toàn bộ hỗn dịch được ly tâm lạnh với vận tốc 1600 vòng/phút trong 5 phút loại bỏ bớt dịch nổi. Toàn bộ tế bào được đem bổ sung chất bảo quản lạnh sâu theo tỷ lệ. Sau 1 tuần và 4 tuần giã đông tế bào và được nuôi cấy trong các môi trường chuyên biệt và thay môi trường sau mỗi 24 giờ. Chụp ảnh theo dõi sự phát triển của tế bào qua kính hiển vi đảo ngược.

Bảng 1. Số lượng và chất lượng tế bào thu được sau xử lý enzyme

Mẫu da	Tỷ lệ tế bào sống (%)	Tỷ lệ tế bào chết (%)
M1	88,89	11,11
M2	73,68	26,32
M3	74,47	25,53
M4	70,7	29,3
M5	92,1	7,89
X	79,968	20,03

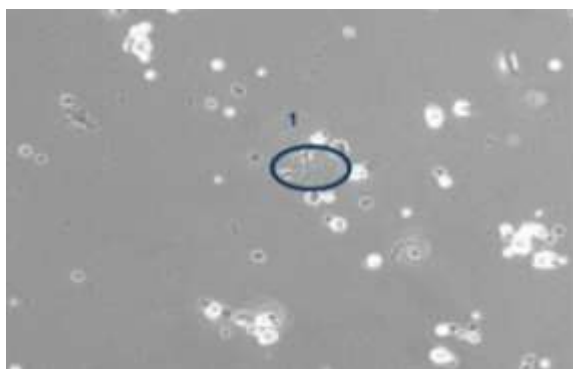
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**3.1. Kết quả đánh giá chất lượng tế bào sau tách***** Kết quả đánh giá số lượng tế bào sau tách**

Các mẫu da sau khi được lấy từ vô trùng từ phòng mổ cho vào dung dịch bảo tạm thời được xử lý trong Labo nuôi cấy. Sau khi thu được hỗn dịch tế bào, chúng tôi tiến hành đếm số lượng tế bào bằng phương pháp xanh Trypan. Sau khi có được kết quả, đem tính toán tỷ lệ tế bào sống, tỷ lệ tế bào chết trong hỗn dịch tế bào thu được.

Từ bảng kết quả 1, Tỷ lệ trung bình tế bào sống đạt 79,97%; cao nhất 92,1% (M5), thấp nhất 70,7% (M4) - phù hợp với các kết quả nghiên cứu trước đó của Đinh Văn Hân và cộng sự (2014) [4], của Fiona Wood và cộng sự. (2012) [1].

*** Kết quả đánh giá khả năng sống và ổn định của tế bào sau tách**

Sau tách theo quy trình của đề tài cơ sở năm 2014 [4]. Toàn bộ tế bào sẽ được nuôi cấy theo các môi trường định hướng [6]

**Hình 3.1. Hình ảnh tế bào sau nuôi cấy 4 ngày**

Qua 4 ngày nuôi cấy, từ kết quả hình 3.3 nhận thấy các tế bào đã bám dính ổn định và bắt đầu thể hiện rõ các hình thái đặc trưng. Quan sát dưới kính hiển vi, có thể phân biệt được ba loại tế bào chính: Tế bào sắc tố với hình dạng đặc thù (1), tế

bào sợi có hình thoi kéo dài (3) và tế bào sừng (2) có dạng đa giác điển hình kết quả phù hợp với nghiên cứu của Đinh Văn Hân và cộng sự (2014) [4], của Fiona Wood và cộng sự (2012) [1].

3.2. Kết quả nghiên cứu tối ưu nồng độ chất quản lạnh sâu hỗn dịch tế bào da

Sau khi chia 5 mẫu nghiên cứu thành 3 nhóm có bổ sung chất bảo quản lạnh sâu (DMSO) ở các nồng độ khác nhau.

Bảng 2: Số lượng tế bào trong các nồng độ nghiên cứu tại thời điểm T1 (thời gian bảo quản lạnh sâu 1 tuần)

Nhóm	Mean (%)	Min (%)	Max (%)	SD
TBT	78,21	69,28	90,14	8,47
C2	77,7	69,0	89,23	8,03
C1	76,59	69,23	89,0	8,12
C3	76,33	68,01	86,89	7,9

Sau 1 tuần, để tế bào trong tủ sâu âm 78°C. Chúng tôi tiến hành giải đông tế bào, sau đó đếm số lượng tế bào sống ở 3 nhóm nghiên cứu. Chúng tôi nhận thấy số lượng tế bào sống trung bình trong các mẫu ở 3 nhóm nghiên cứu sau bảo quản có giảm nhẹ. Nồng độ DMSO 10% cho kết quả tỷ lệ sống ổn định (77,7%), ít thay đổi so với DMSO 9% và 11% (76,59% và 76,33%). Vậy chọn nồng độ bổ sung chất bảo quản lạnh sâu DMSO cho mẫu nghiên cứu là 10%.

3.3. Kết quả chất lượng của hỗn dịch sau bảo quản lạnh sâu

3.3.1. Kết quả đánh giá số lượng tế bào sau bảo quản ở các thời điểm nghiên cứu

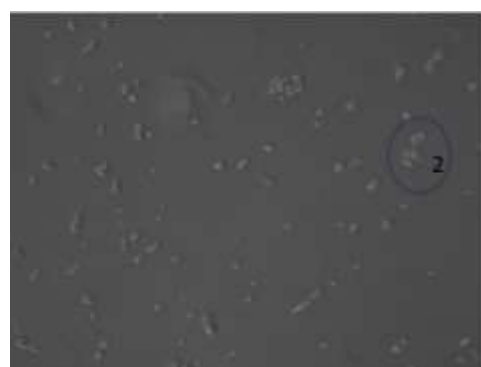
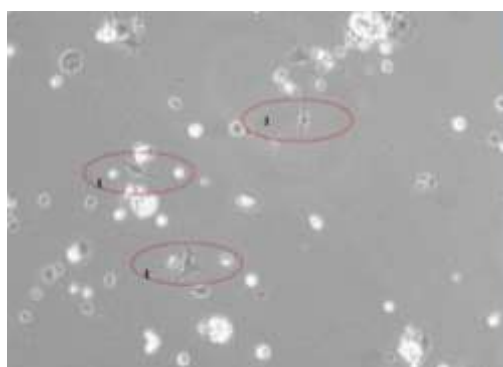
Bảng 3: Số lượng tế bào của hỗn dịch tế bào sau các thời điểm bảo quản lạnh sâu T1; T2; T3; T4 (1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần)

Nhóm	Mean (%)	Min (%)	Max (%)	SD
TBT	74,727	66,2	90,14	7,141
T1	74,017	65,67	89,23	7,059
T2	72,717	64,65	89,0	7,089
T3	72,073	63,55	86,89	7,222
T4	71,202	62,38	83,96	6,672

Sau các mốc bảo quản (1 tuần; 2 tuần; 3 tuần; 4 tuần), tỷ lệ tế bào sống có hiện tượng giảm dần theo thời gian tuy nhiên vẫn duy trì mức trung bình vẫn duy trì trên 71%. Mẫu sẽ được tiếp tục thực hiện nghiên cứu đánh giá khả năng sống của tế bào sau bảo quản lạnh sâu bằng phương pháp nuôi cấy trong môi trường định hướng [6].

3.4. Kết quả đánh giá khả năng sống của tế bào sau bảo quản 4 tuần bằng phương pháp nuôi cấy tế bào

Chúng tôi nuôi cấy mẫu nghiên cứu sau bảo quản lạnh sâu ở thời điểm sau bảo quản 4 tuần ở tủ âm 78°C thì nhận thấy sau 6 ngày nuôi cấy. Trong hỗn dịch tế bào sừng, tế bào sắc tố da soi đĩa nuôi cấy dưới kính hiển vi đảo ngược thì nhận thấy tế bào sống và có bám dính ở đĩa nuôi cấy. Như vậy, sau quá trình bảo quản lạnh sâu, tế bào vẫn đảm bảo sống trong quá trình nuôi cấy.



Hình 1. Kết quả nuôi cấy tế bào từ hỗn dịch tế bào da sau 6 ngày nuôi cấy

Từ hình ảnh 1 cho thấy hỗn dịch tế bào sau bảo quản vẫn đảm bảo được sự sống. Sau 6 ngày nuôi cấy, kiểm tra dưới kính hiển vi đảo ngược nhận thấy các tế bào bám vào đĩa nuôi, có hình thái đặc trưng của tế bào sừng (2), tế bào sắc tố da(1) [4].

4. BÀN LUẬN

Kết quả của thí nghiệm cho thấy: Số lượng tế bào sau tách thu được cao tỷ lệ tế bào sống trung bình lớn hơn 70%. Kết quả này phù hợp với tác giả Đinh Văn Hân và cộng sự năm 2014 [1] và của tác giả Wood và cộng sự (2011) [1]. Việc giữ nguyên khả năng sống của tế bào sau giải đông là yếu tố then chốt để hỗ trợ việc điều trị vết bỏng sâu diện rộng và vết thương mạn tính. Sử dụng hỗn dịch tế bào da tự thân có thể tiết kiệm vùng cho da bệnh nhân và sau khi tế bào được bảo quản lạnh sâu thì chỉ cần một lần lấy da tách có thể dùng được nhiều lần cho bệnh nhân từ đó giảm đau đớn cho bệnh nhân không phải thực hiện lại quy trình lấy da và thực hiện tách hỗn dịch cho các lần sử dụng sau [7, 8].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, các nồng độ DMSO thấp hơn (9%) hoặc cao hơn (11%) đều cho tỷ lệ sống thấp hơn, ở nồng độ 10% cho lượng tế bào sống sau một tuần cao nhất so với tế bào sau tách (TBT). Sau quá trình bảo quản lạnh sâu, nhận thấy tế bào sống có hiện tượng giảm dần theo thời gian. Tuy nhiên, tỷ lệ sống vẫn đạt ở ngưỡng cao trên 70%. Kết quả này cũng phù hợp với báo cáo của Niebergall-Roth và cộng sự năm 2025 [9], nhóm tác giả chỉ ra rằng với nồng độ 10% DMSO bổ sung vào môi trường bảo quản có tác dụng ngăn ngừa tổn thương do quá trình đông lạnh và duy trì được khả năng phục hồi và giảm được tỷ lệ tế bào chết trong quá trình bảo quản [9].

Nghiên cứu của Meneghel và cộng sự năm (2020) cũng khẳng định vai trò của chất bảo quản lạnh sâu trong quá trình lưu trữ tế bào giúp tế bào có thể bảo được khả năng sống cao sau thời gian bảo quản tuy nhiên quá trình bảo quản lạnh sâu cũng có thể làm tổn thương tế bào từ đó sẽ làm giảm khả năng tăng sinh thậm chí là gây chết tế bào [8, 10]. Sau các thời điểm bảo quản cách nhau 7 ngày, tỷ lệ tế bào sống có giảm dần theo thời gian. Điều đó có thể kết luận rằng, đối với hỗn dịch tế bào tự thân sau tách nếu được sử dụng tươi trên bệnh nhân là tốt nhất. Nhưng, nếu trong điều kiện không cho phép dùng cấy ghép một lần cho bệnh nhân mà phải tiếp tục nhiều lần cấy ghép thì nên chỉ sử dụng hỗn dịch tế bào sau thời gian bảo quản lạnh sâu ngắn.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi khẳng định rằng bảo quản lạnh sâu ở -80 °C với 10% DMSO là nồng độ tối ưu và hiệu quả cho bảo quản thời gian ngắn hỗn dịch tế bào da tự thân không nuôi cấy. Từ đó mở ra tiềm năng ứng dụng rộng rãi hơn trên cả bỏng sâu diện rộng và vết thương mạn tính để tiết kiệm được vùng hiến da và chỉ cần một lần lấy da có thể cấy ghép nhiều lần cho bệnh nhân.

5. KẾT LUẬN

Đã đánh giá được tỷ lệ tế bào sống của hỗn dịch sau bảo quản lạnh sâu có bổ sung thêm chất bảo quản lạnh sâu (DMSO) với nồng độ 10%. Tỷ lệ tế bào sống có giảm nhẹ sau các thời điểm bảo quản lạnh sâu. Sau bảo quản lạnh sâu 4 tuần, tế bào giải đông đem nuôi cấy trong môi trường định hướng nhận thấy sau 6 ngày tế bào sừng, tế bào sắc tố da sống, bám dưới đáy đĩa nuôi cấy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wood, F.M., et al., Characterisation of the cell suspension harvested from the dermal epidermal junction using a ReCell® kit. *Burns*, 2012. 38(1): p. 44-51.
2. Zhao, H., et al., Autologous epidermal cell suspension: a promising treatment for chronic wounds. *Journal of Tissue Viability*, 2016. 25(1): p. 50-56.
3. Sen, C.K., et al., Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound repair and regeneration*, 2009. 17(6): p. 763-771.
4. Dinh VH, Nguyen TH, Nguyen PT, Ngo NH. Đánh giá khả năng phân lập tế bào da của enzyme Dispase II và Trypsin và định hướng sử dụng enzyme trong chế tạo hỗn dịch tế bào da để điều trị vết thương và vết bỏng. *Tạp chí Y học Việt Nam*. 2014.
5. Strober, W., Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, 1997. 21(1): p. A. 3B. 1-A. 3B. 2.
6. Freshney, R.I., *Other Epithelial Cells. Culture of Epithelial Cells*, 2002: p. 401-436.
7. Atiyeh, B.S., et al., Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *burns*, 2007. 33(2): p. 139-148.
8. Meneghel, J., P. Kilbride, and G.J. Morris, Cryopreservation as a key element in the successful delivery of cell-based therapies: A review. *Frontiers in Medicine*, 2020. 7: p. 592242.
9. Niebergall-Roth, E. and M.A. Kluth, Dimethyl sulfoxide in cryopreserved mesenchymal stromal cell therapy products: is there a safety risk to patients? *Journal of Translational Medicine*, 2025. 23(1): p. 932.
10. Flahaut, M., et al., Reassessing long-term cryopreservation strategies for improved quality, safety, and clinical use of allogeneic dermal progenitor cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 2024. 144(10): p. 2125-2135.