

NGHIÊN CỨU THIẾT LẬP ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY TẾ BÀO ĐƠN NHÂN MÁU NGOẠI VI TỪ CHÓ (*Canis lupus familiaris*) PHỤC VỤ MÔ HÌNH MIỄN DỊCH VÀ SÀNG LỌC *in vitro*

Nguyễn Trung Khang¹, Nguyễn Thanh Lâm², Trần Thị Thanh Khuong^{1*}

¹ PTN Tế bào gốc, Viện Công nghệ sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ, Cần Thơ, Việt Nam

² Khoa Thú Y, Trường Nông Nghiệp, Đại học Cần Thơ, Cần Thơ, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Trần Thị Thanh Khuong <tttkhuong@ctu.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 18-09-2025; Hoàn thành phản biện: 27-02-2026; Ngày chấp nhận đăng: 14-03-2026)

Tóm tắt. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm nghiên cứu điều kiện nuôi cấy tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral Blood Mononuclear Cells – PBMCs) từ chó (*Canis lupus familiaris*) để ứng dụng trong các mô hình miễn dịch và thử nghiệm *in vitro*. PBMCs được phân lập từ máu toàn phần bằng phương pháp phân lớp Ficoll, sau đó nuôi cấy trong đĩa 96 giếng với hai loại môi trường (RPMI-1640 và DMEM) và ba nồng độ huyết thanh bò thai (FBS: 5, 10, 15%). Các chỉ tiêu gồm hình thái tế bào, mật độ, tỷ lệ sống của tế bào huyền phù, và khả năng sống của tế bào bám dính (phép thử MTT) được đánh giá tại các mốc thời gian 1, 3, 6 và 9 ngày. Kết quả cho thấy môi trường RPMI-1640 duy trì mật độ tế bào huyền phù cao hơn, đặc biệt vào ngày thứ 6 ($2,733 \pm 0,104 \times 10^5$ tế bào/mL; $p < 0,05$), trong khi môi trường DMEM kết hợp với 10% FBS thúc đẩy tốt khả năng bám dính và duy trì mức OD MTT cao hơn, phản ánh sự hiện diện của nhiều tế bào sống có hoạt động enzyme chuyển hóa nội bào tích cực. Tỷ lệ sống và OD MTT trong nhóm 10% FBS không khác biệt có ý nghĩa so với 15% FBS, cho thấy đây là nồng độ phù hợp cho các ứng dụng nuôi cấy.

Từ khóa: tế bào đơn nhân máu ngoại vi, chó, nuôi cấy tế bào, FBS, MTT

Establishment of culture conditions for peripheral blood mononuclear cells from dogs (*Canis lupus familiaris*) for *in vitro* immunological modeling and screening

Nguyễn Trung Khang¹, Nguyễn Thanh Lâm², Trần Thị Thanh Khuong^{1*}

¹ Stem Cell Laboratory, Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University, Cantho, Vietnam

² Faculty of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Can Tho University, Cantho, Vietnam

* Correspondence to Trần Thị Thanh Khuong <tttkhuong@ctu.edu.vn>

(Received: 18 September 2025; Revised: 27 February 2026; Accepted: 14 March 2026)

Abstract. This study aimed to establish culture conditions for peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from dogs (*Canis lupus familiaris*) for application in immunological models and *in vitro* testing. PBMCs were isolated from whole blood using Ficoll gradient centrifugation and then cultured in 96-well plates using two different media (RPMI-1640 and DMEM) supplemented with three concentrations of fetal bovine serum (FBS: 5%, 10%, 15%). Parameters including cell morphology, cell density, viability of suspended cells, and adhesion cell viability (assessed by the MTT assay) were

evaluated at days 1, 3, 6, and 9. The results showed that RPMI-1640 medium maintained a higher density of suspended cells, particularly on day 6 ($2.733 \pm 0.104 \times 10^5$ cells/mL; $p < 0.05$), while DMEM supplemented with 10% FBS promoted better cell adhesion and sustained higher MTT optical density (OD) values, reflecting the presence of more viable cells with active intracellular metabolic enzyme activity. There was no significant difference in viability or MTT OD between the 10% and 15% FBS groups, indicating that 10% FBS is an appropriate concentration for culture applications.

Keywords: cell culture, dog, FBS, MTT, peripheral blood mononuclear cells

1 Mở đầu

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral Blood Mononuclear Cells – PBMCs) là một quần thể tế bào miễn dịch lưu hành trong máu, gồm các dòng lymphocyte (T, B, NK) và monocyte, có vai trò trung tâm trong phản ứng miễn dịch tự nhiên và thích nghi. Các tế bào này phản ánh trực tiếp trạng thái miễn dịch và sinh lý tại thời điểm thu mẫu, do đó thường được sử dụng trong các nghiên cứu về cơ chế bệnh học, đánh giá độc tính miễn dịch, phát triển liệu pháp điều hòa miễn dịch và sàng lọc tiền lâm sàng [1, 2]. Trong mô hình *in vitro*, PBMCs cho phép tái hiện các phản ứng miễn dịch trong điều kiện kiểm soát, hỗ trợ đánh giá hiệu quả và an toàn của nhiều loại tác nhân sinh học, bao gồm thuốc, hóa chất và vắc-xin [3, 4].

Trong khi PBMCs từ người đã được ứng dụng rộng rãi trong y sinh học, PBMCs từ động vật, đặc biệt là chó (*Canis lupus familiaris*), đang nổi lên như một mô hình thay thế đáng quan tâm. So với loài gặm nhấm, chó sở hữu hệ thống miễn dịch có nhiều điểm tương đồng với người, bao gồm cơ chế phân tử và thành phần tế bào miễn dịch [5]. Nhờ các đặc điểm này, PBMCs từ chó ngày càng được ứng dụng trong nghiên cứu tiền lâm sàng, độc học miễn dịch, và phát triển dược phẩm hoặc liệu pháp miễn dịch cho thú y và người [6].

Tại Việt Nam, đặc biệt ở khu vực Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), nhu cầu chăm sóc sức khỏe thú cưng, bao gồm chó, đang gia tăng đáng kể cùng với sự phát triển của ngành thú y.

Tuy nhiên, các nghiên cứu cơ bản về nuôi cấy tế bào đơn nhân máu ngoại vi từ chó tại địa phương còn hạn chế. Việc thiết lập một quy trình chuẩn hóa, khả thi và phù hợp với điều kiện cơ sở vật chất vùng ĐBSCL là tiền đề quan trọng để khai thác mô hình PBMCs trong các hướng nghiên cứu đặc thù như đánh giá độc tính thuốc thú y, sàng lọc dược liệu bản địa, thử nghiệm vắc-xin mới, cũng như nghiên cứu ảnh hưởng môi trường đến sức khỏe thú cưng [7, 8].

Trong bối cảnh đó, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu thiết lập và đánh giá bước đầu quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào đơn nhân máu ngoại vi từ chó. Nghiên cứu tập trung vào việc khảo sát khả năng duy trì và phát triển của quần thể PBMCs trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Từ đó tạo tiền đề cho các nghiên cứu chuyên sâu hơn trong tương lai, bao gồm đánh giá chức năng miễn dịch, nghiên cứu độc học miễn dịch, lưu trữ tế bào trong cryobank, cũng như phát triển các mô hình bệnh *in vitro* trên chó phục vụ nghiên cứu thú y và y học so sánh tại khu vực ĐBSCL và các vùng nhiệt đới có điều kiện tương đồng [9].

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Mẫu vật

Máu toàn phần được thu từ ba cá thể chó trưởng thành khỏe mạnh (giống chó nội, độ tuổi 10–12 tháng, khối lượng cơ thể 8–12 kg) tại thành phố Cần Thơ. Các cá thể được tuyển chọn dựa trên tiêu chí sức khỏe tốt, không có biểu hiện bệnh lý, âm tính với các bệnh truyền nhiễm thường gặp

và có lịch sử tiêm phòng đầy đủ. Ngoài ra, chó đã được tẩy giun định kỳ và thời điểm thu mẫu cách ít nhất ba tháng kể từ mũi tiêm phòng gần nhất. Việc lấy mẫu máu được thực hiện tuân thủ nghiêm ngặt các quy định về đạo đức trong nghiên cứu sử dụng động vật thí nghiệm. Mỗi cá thể được lấy máu từ tĩnh mạch chi trước bằng bơm tiêm vô trùng, có bổ sung 1 mL dung dịch EDTA 10% (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) làm chất chống đông. Tất cả các thao tác được tiến hành trong điều kiện vô trùng nhằm đảm bảo chất lượng mẫu và giảm thiểu tối đa ảnh hưởng đến sức khỏe động vật. Nghiên cứu đã được Hội đồng Tư vấn Đạo đức trong Nghiên cứu trên Động vật – Trường Đại học Cần Thơ thẩm định và phê duyệt, với mã số: CTU-AEC24027.

2.2 Phân lập PBMCs

PBMCs được phân lập bằng phương pháp phân lớp mật độ sử dụng Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Hoa Kỳ). Mẫu máu được pha loãng tỷ lệ 1:1 với PBS không $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ và nhẹ nhàng đổ lên lớp Ficoll trong ống ly tâm 15 mL. Sau khi ly tâm ở 20°C (không phanh), lớp tế bào đơn nhân tại giao diện được thu thập, rửa 2 lần bằng PBS, ly tâm 400 ×g trong 10 phút [10]. Sau đó, tế bào được đếm bằng buồng đếm Neubauer và nhuộm Trypan Blue để xác định mật độ và tỷ lệ sống.

2.3 Thiết kế thí nghiệm

Trước khi triển khai các thí nghiệm chính, một giai đoạn chuẩn hóa được thực hiện nhằm xác định điều kiện ly tâm tối ưu cho phân lập PBMCs từ máu chó. Thí nghiệm được bố trí theo mô hình hai nhân tố: ba tốc độ ly tâm (600 ×g, 800 ×g, 1200 ×g) kết hợp với hai thời gian ly tâm (10 và 20 phút), tạo thành 6 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Tiêu chí đánh giá gồm tổng số PBMCs thu được, tỷ lệ sống và mức độ tạp nhiễm hồng cầu, tiểu cầu. Điều kiện tối ưu được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo:

- Thí nghiệm 1: So sánh ảnh hưởng của hai loại môi trường nuôi cấy: RPMI-1640 và DMEM (Gibco, Hoa Kỳ), mỗi loại có bổ sung 10% FBS (Gibco), 1% Penicillin-Streptomycin và 2 mM L-glutamine.

- Thí nghiệm 2: Đánh giá ảnh hưởng của ba nồng độ FBS (5%, 10%, 15%) trong môi trường DMEM.

PBMCs sau phân lập được cấy vào đĩa 96 giếng với mật số ban đầu 4×10^5 tế bào/mL, thể tích 100 μL /giếng, 3 lặp lại/nghiệm thức. Mẫu được ủ tại 37°C, 5% CO_2 . Các chỉ tiêu được đánh giá tại các thời điểm: ngày 1, 3, 6 và 9.

2.4 Xác định mật số và tỷ lệ sống của tế bào huyền phù

Tại các thời điểm khảo sát (ngày 1, 3, 6 và 9), phần dịch nổi chứa tế bào huyền phù được thu để đánh giá mật số và tỷ lệ sống tế bào bằng kỹ thuật nhuộm Trypan Blue 0,4% (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ). Phương pháp này dựa trên đặc tính của thuốc nhuộm: chỉ thâm nhập vào các tế bào chết có màng bị tổn thương, trong khi các tế bào sống không bắt màu [11]. Mẫu sau nhuộm được đếm bằng buồng đếm Neubauer dưới kính hiển vi quang học (Olympus CX23, Nhật Bản). Mật số tế bào sống được biểu diễn dưới dạng $\times 10^5$ tế bào/mL, và tỷ lệ sống được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ sống (\%)} = (\text{số tế bào sống} / \text{tổng số tế bào}) \times 100$$

Phép thử được thực hiện lặp lại ba lần độc lập cho mỗi nghiệm thức.

2.5 Quan sát hình thái và khả năng bám dính của tế bào

Hình thái và trạng thái bám dính của tế bào được quan sát tại các mốc thời gian nghiên cứu (ngày 1, 3, 6 và 9) bằng kính hiển vi đảo ngược (Axio Vert.A1, Carl Zeiss, Đức). Tế bào PBMCs

được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng đáy phẳng (Nunc, Thermo Fisher, Hoa Kỳ), thể tích mỗi giếng 100 μ L. Các hình ảnh được chụp với thang đo 100 μ m để đánh giá sự thay đổi về hình thái, mức độ bám dính, sự kéo dài, dàn trải của tế bào cũng như sự hình thành cụm tế bào (clustering). Quan sát hình thái là bước quan trọng đánh giá sự thích nghi và biệt hóa sơ khởi của PBMCs, đồng thời phân biệt rõ giữa quần thể tế bào huyền phù (không bám) và quần thể bám dính (monocytes/progenitors), như đã thấy ở các nghiên cứu trước đây [12, 13].

2.6 Đánh giá hoạt tính tế bào bám dính bằng thử nghiệm MTT

Để định lượng khả năng sống và chuyển hóa năng lượng của tế bào bám dính, phép thử MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) được thực hiện tại các mốc ngày 3, 6 và 9, theo phương pháp mô tả bởi Mosmann (1983) [14] với một số hiệu chỉnh. Sau khi loại bỏ dịch nổi, mỗi giếng được thêm 10 μ L dung dịch MTT (5 mg/mL trong PBS, Sigma-Aldrich) và ủ 4 giờ ở 37°C, 5% CO₂. Tế bào sống có khả năng chuyển hóa MTT thành tinh thể formazan màu tím. Sau thời gian ủ, 100 μ L DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich) được thêm vào để hòa tan các tinh thể formazan. Mật độ quang học (OD) được đo tại bước sóng 570 nm bằng máy đo ELISA (BioTek Epoch, Hoa Kỳ). Kết quả được chuẩn hóa bằng cách trừ OD nền (giếng không có tế bào) và được trình bày dưới dạng OD – OD_{nền}. Phép thử được lặp lại ba lần độc lập cho mỗi nghiệm thức.

2.7 Phân tích thống kê

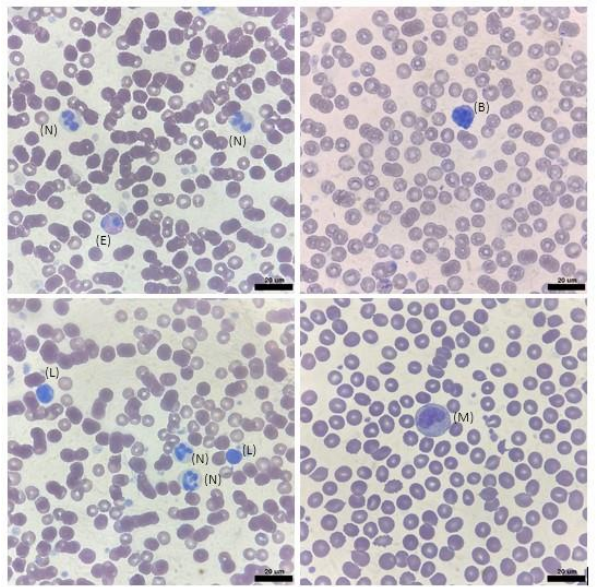
Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm SPSS phiên bản 26.0. Phép kiểm định ANOVA một yếu tố được sử dụng để so sánh giữa các nghiệm thức tại cùng một thời điểm, kết hợp với phép kiểm Tukey HSD để xác định sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Kết quả được trình

bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (mean $\pm$ SD).

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Cấu trúc tế bào máu chó toàn phần

Mẫu máu toàn phần sau nhuộm bằng bộ thuốc Diff-Quik (Hình 1) cho thấy sự hiện diện đầy đủ của các dòng tế bào máu ngoại vi, bao gồm hồng cầu (erythrocytes), lymphocyte, monocyte, và các loại bạch cầu hạt như neutrophil, eosinophil và basophil. Trong đó, lymphocyte và monocyte là hai loại tế bào chính cấu thành phân đoạn PBMCs, do đó cần được bảo toàn tối đa trong quy trình phân lập [15].



Hình 1. Cấu trúc tế bào máu chó toàn phần chó sau nhuộm Diff-Quik

Mẫu được quan sát dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 100 $\times$. Các tế bào bắt màu hồng đỏ là hồng cầu (erythrocytes). Các ký hiệu chữ trên ảnh thể hiện các loại bạch cầu: (N) – Bạch cầu trung tính (neutrophil), (E) – Bạch cầu ái toan (eosinophil), (B) – Bạch cầu ái kiềm (basophil), (L) – Lympho bào (lymphocyte), (M) – Bạch cầu đơn nhân (monocyte). Thang đo 20 μ m.

3.2 Ảnh hưởng của tốc độ và thời gian ly tâm đến hiệu quả phân lập PBMCs

Việc tối ưu hóa điều kiện ly tâm là bước quyết định đến hiệu quả phân lập PBMCs. Trong quá trình phân lập PBMCs, lực ly tâm cần đủ lớn để phân tách tế bào theo khối lượng riêng nhưng không gây tổn thương cơ học lên màng tế bào. Kết quả định lượng trong Bảng 1 cho thấy rằng tốc độ ly tâm 800 ×g trong 20 phút là điều kiện tối ưu, cho mật số tế bào sống đạt $9,13 \times 10^5$ tế bào/mL và tỷ lệ sống 92,20%. Đây là mức cao nhất trong tất cả các nghiệm thức, phản ánh sự cân bằng giữa lực ly tâm hiệu quả và độ an toàn tế bào. Đồng thời, môi trường nuôi cấy sau phân lập và sau 3 ngày nuôi cấy ở nghiệm thức này sạch, ít lẫn hồng cầu và tiểu cầu hơn (Hình 2 (a) và Hình 2 (b)).

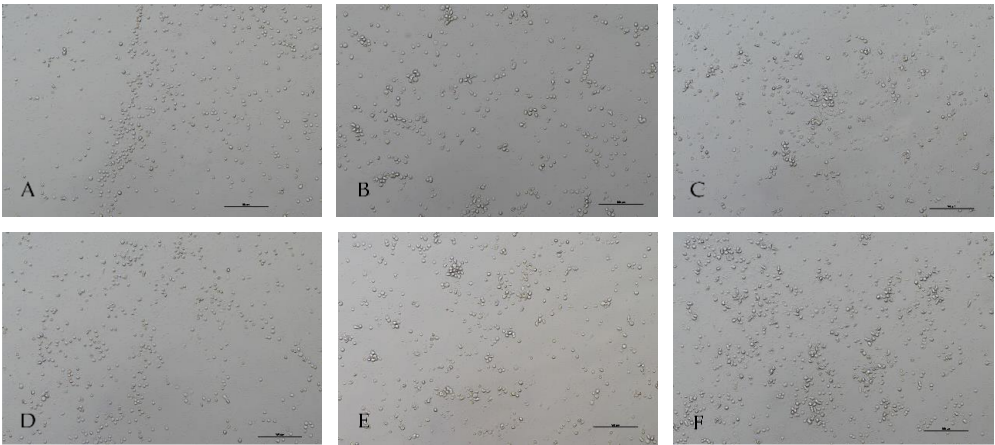
Ngược lại, tốc độ ly tâm thấp (600 ×g) với thời gian ngắn (10 phút) tạo ra lực tách yếu, dẫn đến mật số PBMCs thu nhận thấp ($4,20 \times 10^5$ tế bào/mL). Trong khi đó, tốc độ cao hơn (1200 ×g) làm tăng lực nén và khả năng vỡ màng tế bào, làm giảm đáng kể tỷ lệ sống. Sự khác biệt về mật số và tỷ lệ sống giữa các nghiệm thức đều có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), khẳng định vai trò quan trọng của tối ưu hóa ly tâm trong phân lập PBMCs.

Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với các hướng dẫn kỹ thuật trên người [16], trong đó quá trình ly tâm thường được thực hiện trong thời gian dài (20–30 phút) và ở tốc độ thấp (400–800 ×g) nhằm đảm bảo hiệu suất tách lớp PBMCs ổn định và tỷ lệ sống cao. Điều này đặc biệt quan trọng trong các nghiên cứu sử dụng PBMCs từ chó cho phân tích chức năng miễn dịch, thử nghiệm kháng nguyên, hoặc nuôi cấy dài hạn trong các mô hình *in vitro* [17].

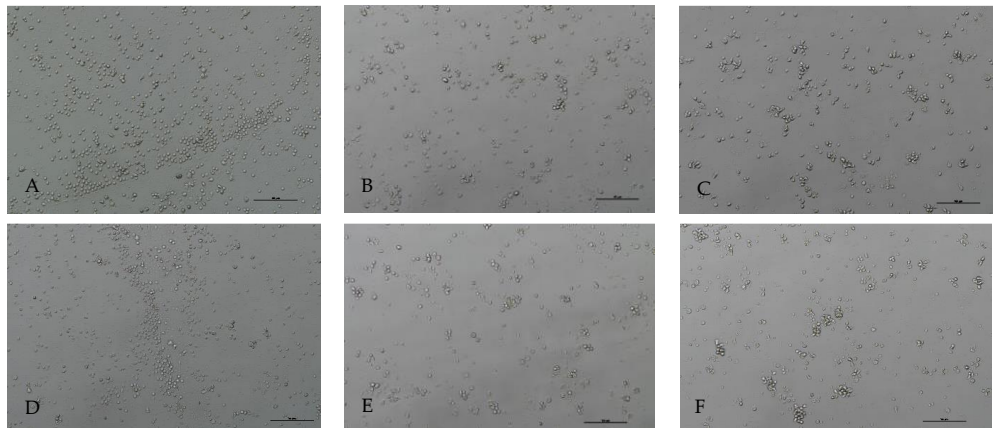
Bảng 1. Ảnh hưởng của tốc độ và thời gian ly tâm đến mật số và tỷ lệ sống của PBMCs phân lập từ máu chó.

Tốc độ ly tâm (×g)	Thời gian ly tâm (phút)	Mật số tế bào sống (×10 ⁵ tế bào/mL)	Tỷ lệ sống (%)
600	10	4,200 ± 0,492 ^c	93,04 ± 3,11 ^a
800	10	5,167 ± 0,952 ^{bc}	90,92 ± 2,03 ^{ab}
1200	10	5,600 ± 0,984 ^{bc}	85,73 ± 0,54 ^c
600	20	7,383 ± 1,360 ^{ab}	94,64 ± 2,00 ^a
800	20	9,133 ± 0,895 ^a	92,20 ± 1,00 ^{ab}
1200	20	8,750 ± 0,826 ^a	88,28 ± 1,97 ^{bc}

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$.



Hình 2. (a) PBMCs chó ngay sau khi phân lập



Hình 2. (b) PBMCs chó ngày 3

Hình được chụp bằng kính hiển vi đảo ngược với các nghiệm thức: (A) 600 $\times$ g – 10 phút; (B) 800 $\times$ g – 10 phút; (C) 1200 $\times$ g – 10 phút; (D) 600 $\times$ g – 20 phút; (E) 800 $\times$ g – 20 phút; (F) 1200 $\times$ g – 20 phút. Độ phóng đại áp dụng 20x. Thang đo 100 μ m.

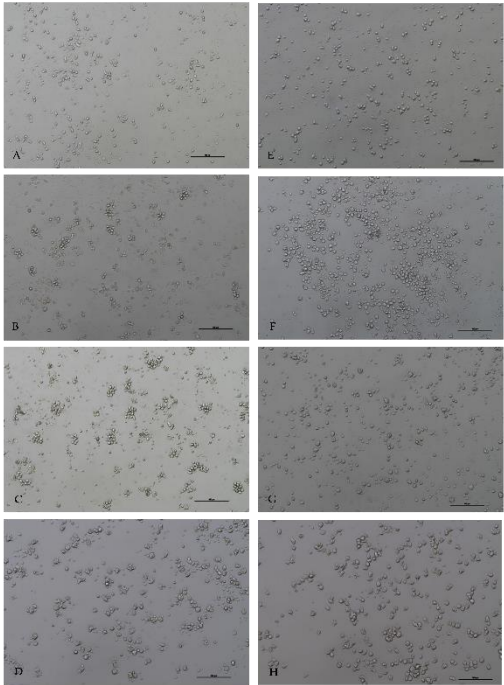
3.3 Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sự sống, mật số và hình thái của PBMCs chó *in vitro*

Kết quả quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược (Hình 3) cho thấy sự khác biệt rõ rệt về hình thái và mức độ bám dính của tế bào PBMCs chó giữa hai môi trường nuôi cấy: RPMI-1640 và DMEM. Trong giai đoạn đầu (ngày 1), tế bào từ cả hai nhóm đều xuất hiện dưới dạng hình tròn, lơ lửng, điều này phản ánh trạng thái sau phân lập. Tuy nhiên, từ ngày 3 trở đi, tế bào nuôi trong môi trường DMEM bắt đầu lan rộng và dẹt hơn rõ rệt, đặc trưng cho quá trình bám dính và biệt hóa, trong khi RPMI-1640 vẫn duy trì trạng thái huyền phù là chủ yếu.

Bổ sung cho quan sát vi học, dữ liệu định lượng mật số tế bào huyền phù sống ở Bảng 2 cung cấp bằng chứng rõ ràng hơn. Trong ba ngày đầu, mật số tế bào ở hai môi trường là tương đương, khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, từ ngày 6 trở đi, môi trường RPMI-1640 duy trì mật số cao hơn đáng kể, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với DMEM. Sự suy giảm nhanh ở môi trường DMEM cho thấy rằng phần lớn tế bào đã bám dính thay vì còn lơ lửng.

Tỷ lệ sống tế bào trong Bảng 3 phản ánh xu hướng tương tự: kể từ ngày 6, môi trường RPMI-

1640 duy trì tỷ lệ sống cao hơn, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với môi trường DMEM. Điều này cho thấy RPMI-1640 phù hợp hơn trong việc duy trì sự sống của tế bào huyền phù không bám dính – đặc biệt quan trọng khi mục tiêu là thu nhận PBMCs dạng lơ lửng.



Hình 3. Sự thay đổi hình thái tế bào PBMCs chó trong hai môi trường nuôi cấy qua các mốc thời gian

A–D: PBMCs nuôi trong RPMI-1640 tại ngày 1, 3, 6 và 9. E–H: PBMCs nuôi trong DMEM tại ngày 1, 3, 6 và 9. 20x. Thang đo: 100 μ m.

Bảng 2. Mật số tế bào huyền phù sống ($\times 10^5$ tế bào/mL) tại các mốc thời gian trong hai môi trường nuôi cấy

Thời gian (ngày)	RPMI-1640 ($\times 10^5$ tế bào/mL)	DMEM ($\times 10^5$ tế bào/mL)
1	3,633 $\pm$ 0,643 ^a	3,567 $\pm$ 0,362 ^a
3	3,183 $\pm$ 0,247 ^a	2,683 $\pm$ 0,764 ^a
6	2,733 $\pm$ 0,104 ^a	1,400 $\pm$ 0,150 ^b
9	1,683 $\pm$ 0,176 ^a	0,567 $\pm$ 0,104 ^b

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$, Tukey HSD).

Bảng 3. Tỷ lệ sống (%) của tế bào huyền phù tại các mốc thời gian trong hai môi trường nuôi cấy

Thời gian (ngày)	RPMI-1640 (%)	DMEM (%)
1	91,68 $\pm$ 3,31 ^a	91,17 $\pm$ 1,64 ^a
3	91,37 $\pm$ 1,37 ^a	90,19 $\pm$ 1,94 ^a
6	76,66 $\pm$ 1,40 ^a	62,14 $\pm$ 2,27 ^b
9	49,81 $\pm$ 4,66 ^a	29,60 $\pm$ 0,37 ^b

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$, Tukey HSD).

Ngược lại, kết quả phép thử MTT (Bảng 4) cho thấy môi trường DMEM vượt trội hơn về khả năng hỗ trợ tế bào bám dính và duy trì hoạt tính chuyển hóa. Cụ thể, giá trị OD ở nghiệm thức DMEM tại các ngày 3, 6 và 9 đều cao hơn RPMI-1640, khác biệt có ý nghĩa thống kê. Điều này cho thấy sự khác biệt rõ rệt về sinh lý chức năng giữa hai quần thể tế bào trong hai điều kiện nuôi cấy.

Bảng 4. Độ hấp thụ quang ($OD - OD_{\text{trắng}}$) của tế bào PBMCs bám dính tại bước sóng 570 nm

Thời gian (ngày)	RPMI-1640 ($OD - OD_{\text{trắng}}$, 570 nm)	DMEM ($OD - OD_{\text{trắng}}$, 570 nm)
3	0,099 $\pm$ 0,017 ^b	0,123 $\pm$ 0,010 ^a
6	0,184 $\pm$ 0,008 ^b	0,222 $\pm$ 0,021 ^a
9	0,150 $\pm$ 0,008 ^b	0,208 $\pm$ 0,005 ^a

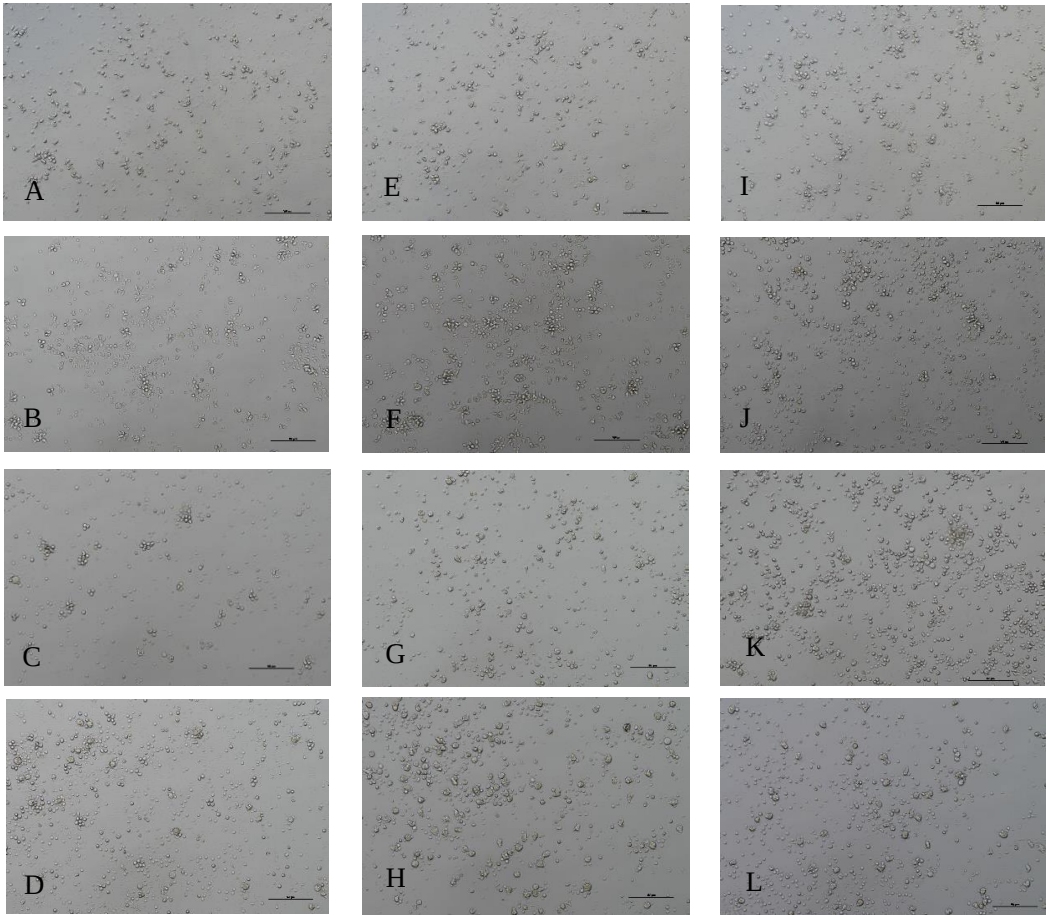
Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$, Tukey HSD).

Với các kết quả trên, có thể nhận định rằng môi trường DMEM thúc đẩy quá trình bám dính và hoạt hóa chuyển hóa của PBMCs hiệu quả hơn, do đó phù hợp cho mục tiêu biệt hóa hoặc nuôi cấy dài ngày các dòng đơn nhân như monocyte/macrophage [18, 19]. Ngược lại, môi trường RPMI-1640 thể hiện ưu thế trong việc duy trì tế bào huyền phù sống, thích hợp cho các nghiên cứu phân tích miễn dịch ở dòng lympho chưa biệt hóa [19]. Sự khác biệt này có thể liên quan đến thành phần dinh dưỡng giữa hai loại môi trường, đặc biệt là nồng độ amino acids không thiết yếu cao hơn trong DMEM so với RPMI, góp phần điều chỉnh chuyển hóa và trạng thái hoạt hóa của tế bào đơn nhân [20].

3.4 Ảnh hưởng của nồng độ FBS đến khả năng sống và tăng trưởng của PBMCs *in vitro*

Sự thay đổi hình thái bám dính của PBMCs theo thời gian trong các nồng độ FBS khác nhau được thể hiện rõ qua Hình 4. Ở cả ba nồng độ FBS (5%, 10% và 15%), tế bào PBMCs bắt đầu bám dính từ ngày thứ 3 và dần hình thành cụm, lan tỏa đầy giếng ở các mốc ngày 6 và 9. Tuy nhiên, sự khác biệt về mật độ và hình thái tế bào bám dính được quan sát rõ hơn ở các nghiệm thức có nồng độ FBS cao hơn, đặc biệt là 15%.

Số liệu định lượng từ Bảng 5 cho thấy xu hướng giảm dần về mật số tế bào huyền phù sống theo thời gian ở cả ba nồng độ FBS (5%, 10% và 15%). Ở thời điểm ngày 1, mật số tế bào không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức ($p > 0,05$), phản ánh tính đồng nhất ban đầu của quần thể tế bào. Đến ngày 3, mặc dù mật số có giảm so với ngày 1, nhưng vẫn không có sự khác biệt thống kê giữa các nồng độ FBS ($p > 0,05$).



Hình 4. Sự thay đổi hình thái PBMCs chó trong các nồng độ FBS khác nhau tại các mốc thời gian A–D: PBMCs nuôi với 5% FBS tại ngày 1, 3, 6 và 9. E–H: PBMCs nuôi với 10% FBS tại ngày 1, 3, 6 và 9. I–L: PBMCs nuôi với 15% FBS tại ngày 1, 3, 6 và 9. Độ phóng đại 20x. Thang đo 100 μ m.

Bảng 5. Mật số tế bào huyền phù sống ($\times 10^5$ tế bào/mL) tại các mốc thời gian khi nuôi cấy với ba nồng độ FBS

Thời gian (ngày)	5% FBS ($\times 10^5$ tế bào/mL)	10% FBS ($\times 10^5$ tế bào/mL)	15% FBS ($\times 10^5$ tế bào/mL)
1	3,667 $\pm$ 0,431 ^a	3,700 $\pm$ 0,400 ^a	3,717 $\pm$ 0,732 ^a
3	2,333 $\pm$ 0,275 ^a	2,367 $\pm$ 0,225 ^a	2,317 $\pm$ 0,503 ^a
6	1,167 $\pm$ 0,202 ^b	1,800 $\pm$ 0,304 ^a	1,733 $\pm$ 0,325 ^a
9	0,733 $\pm$ 0,176 ^a	1,600 $\pm$ 0,087 ^a	1,450 $\pm$ 0,250 ^a

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$, Tukey HSD).

Từ ngày nuôi cấy thứ 6 trở đi, mật số PBMCs huyền phù sống ở nghiệm thức 5% FBS giảm rõ rệt và thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức có nồng độ FBS cao hơn. Xu hướng này tiếp tục duy trì đến cuối thời gian nuôi cấy, cho thấy nồng độ huyết thanh thấp không đủ duy trì ổn định quần thể PBMCs trong điều kiện

nuôi cấy kéo dài. Ngược lại, các nghiệm thức bổ sung $\geq 10\%$ FBS giúp duy trì mật độ tế bào huyền phù sống cao hơn. Điều này có thể liên quan đến việc FBS cung cấp các yếu tố tăng trưởng, protein huyết thanh và các phân tử chống oxy hóa, qua đó giúp tế bào giảm stress nuôi cấy và hạn chế quá trình chết theo chương trình trong môi trường *in vitro*.

Bảng 6. Tỷ lệ sống (%) của tế bào huyền phù tại các mốc thời gian khi nuôi cấy với ba nồng độ FBS

Thời gian (ngày)	5% FBS (%)	10% FBS (%)	15% FBS (%)
1	91,57 ± 3,25 ^a	91,31 ± 4,77 ^a	90,95 ± 8,39 ^a
3	90,19 ± 2,55 ^a	90,47 ± 1,47 ^a	90,58 ± 4,03 ^a
6	52,91 ± 4,78 ^b	75,16 ± 6,70 ^a	77,66 ± 4,14 ^a
9	29,65 ± 3,80 ^b	50,61 ± 1,72 ^a	56,05 ± 4,89 ^a

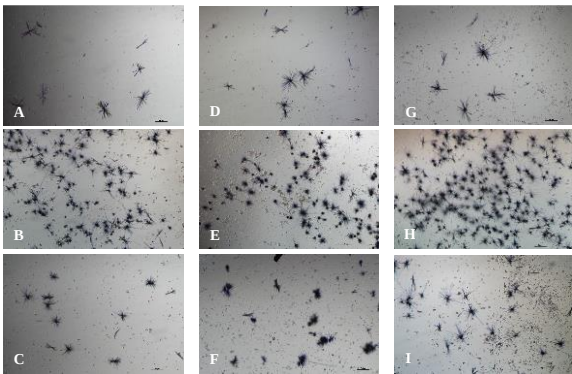
Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$, Tukey HSD).

Phân tích tỷ lệ sống của PBMCs huyền phù ở Bảng 6 cho thấy trong 3 ngày đầu nuôi cấy, các nhóm FBS đều duy trì tỷ lệ sống cao và không có sự khác biệt đáng kể giữa các nồng độ. Tuy nhiên, từ ngày thứ 6 trở đi, sự suy giảm tỷ lệ sống bắt đầu xuất hiện rõ rệt ở nhóm sử dụng 5% FBS, trong khi các nhóm 10% và 15% vẫn duy trì khả năng sống cao hơn đáng kể. Xu hướng này tiếp tục được ghi nhận ở ngày thứ 9, cho thấy nồng độ FBS thấp không đủ duy trì khả năng sống của các tế bào huyền phù trong điều kiện nuôi cấy kéo dài.

Kết quả này có thể liên quan đến vai trò của FBS như một nguồn cung cấp protein, yếu tố tăng trưởng và các thành phần bảo vệ màng tế bào. Khi nồng độ FBS thấp, các yếu tố này không đủ để duy trì ổn định màng tế bào và cân bằng nội môi, dẫn đến gia tăng quá trình chết tế bào theo chương trình trong quá trình nuôi cấy dài ngày.

Thử nghiệm MTT được sử dụng để đánh giá hoạt động sống (cell viability) của các tế bào bám dính thông qua sự hình thành tinh thể formazan (Hình 5). Hình ảnh quan sát cho thấy sự gia tăng mật độ tinh thể ở nhóm 10% và 15% FBS

từ ngày 6 trở đi, phản ánh mức độ sống và tăng trưởng của tế bào tốt hơn so với nhóm 5%. Giá trị OD sau trừ nền ($OD_{nền}$) trong Bảng 7 cho thấy ở ngày 6 và 9, nhóm 15% FBS có OD cao nhất ($0,207 \pm 0,012$ và $0,190 \pm 0,014$), cao hơn đáng kể so với nhóm 5% ($0,165 \pm 0,012$ và $0,143 \pm 0,009$; $p < 0,05$). Nhóm 10% cũng cho kết quả cao hơn nhóm 5%, mặc dù không có sự khác biệt thống kê so với 15%. Những dữ liệu này cho thấy FBS $\geq 10\%$ hỗ trợ hiệu quả hoạt động sống của tế bào trong suốt quá trình nuôi cấy.



Hình 5. Sự hình thành tinh thể formazan sau thử nghiệm MTT ở các nồng độ FBS khác nhau tại các mốc thời gian
A, B, C: 5% FBS tại ngày 3, 6 và 9 tương ứng. D, E, F: 10% FBS tại ngày 3, 6 và 9 tương ứng. G, H, I: 15% FBS tại ngày 3, 6 và 9 tương ứng. Thang đo: 100 μm .

Bảng 7. Mức độ chuyển hóa tế bào bám dính thông qua giá trị OD, 570 nm sau thử nghiệm MTT tại các mốc thời gian và nồng độ FBS khác nhau

Thời gian (ngày)	5% FBS ($OD - OD_{nền}, 570\text{ nm}$)	10% FBS ($OD - OD_{nền}, 570\text{ nm}$)	15% FBS ($OD - OD_{nền}, 570\text{ nm}$)
3	0,111 ± 0,014 ^a	0,102 ± 0,005 ^a	0,100 ± 0,007 ^a
6	0,165 ± 0,012 ^b	0,189 ± 0,015 ^{ab}	0,207 ± 0,012 ^a
9	0,143 ± 0,009 ^b	0,168 ± 0,011 ^{ab}	0,190 ± 0,014 ^a

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$, Tukey HSD).

Mặc dù nghiên cứu hiện tại đã xây dựng thành công một quy trình phân lập và nuôi cấy PBMCs từ chó hiệu quả và có tính ứng dụng cao, vẫn tồn tại một số hạn chế cần được ghi nhận nhằm định hướng cho các cải tiến trong nghiên cứu tiếp theo. Trước hết, nghiên cứu được thực hiện trên số lượng cá thể hạn chế (3 cá thể chó), do đó chưa phản ánh đầy đủ sự biến thiên sinh học trong quần thể chó với các đặc điểm khác nhau về giống, giới tính, độ tuổi và tình trạng sinh lý. Những yếu tố này đã được chứng minh có ảnh hưởng rõ rệt đến thành phần và hoạt tính miễn dịch của PBMCs từ chó, trong đó sự thay đổi tỷ lệ giữa các dòng tế bào đơn nhân và mức độ đáp ứng viêm có thể dẫn đến sai lệch trong việc đánh giá khả năng ứng dụng của hệ thống nuôi cấy [21]. Tuy nhiên, nghiên cứu này được thiết kế theo hướng nghiên cứu phương pháp nhằm tối ưu hóa quy trình phân lập và điều kiện nuôi cấy PBMCs *in vitro*, hơn là đánh giá sự khác biệt sinh học giữa các cá thể. Do đó, việc sử dụng một số lượng mẫu giới hạn vẫn có thể cung cấp thông tin ban đầu quan trọng để xác định các điều kiện nuôi cấy phù hợp, đồng thời đóng vai trò như một nghiên cứu thăm dò làm cơ sở cho các nghiên cứu quy mô lớn hơn trong tương lai.

Bên cạnh đó, nghiên cứu chưa thực hiện các kỹ thuật định danh chi tiết các tiểu quần thể tế bào trong PBMCs, vốn là thông tin quan trọng để đánh giá chất lượng và đặc điểm miễn dịch học của mô hình nuôi cấy. Trong nghiên cứu này, PBMCs chủ yếu được xác định dựa trên đặc điểm hình thái học và hành vi bám dính đặc trưng trong điều kiện nuôi cấy. Mặc dù cách tiếp cận này thường được sử dụng trong các nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy ban đầu, việc thiếu các phương pháp phân tích marker bề mặt như CD3, CD4, CD8, CD21, $\gamma\delta$ TCR, CD14 và MHC-II thông qua flow cytometry hoặc hóa mô miễn dịch khiến cho thành phần chính xác của các tiểu quần thể tế bào như T-lymphocyte, monocyte hay NK cell chưa được xác định đầy đủ, đồng thời chưa

loại trừ hoàn toàn các tế bào không mong muốn có thể hiện diện trong mẫu [21, 22]. Sự thiếu vắng dữ liệu định danh khiến cho tính đặc hiệu của mô hình nuôi cấy PBMCs từ chó trong nghiên cứu miễn dịch học chưa được làm rõ một cách toàn diện. Ngoài ra, khả năng ứng dụng của mô hình vẫn chưa được đánh giá đầy đủ do chưa kiểm tra các chỉ số chức năng miễn dịch chuyên sâu như hoạt tính tiết cytokine (IL-6, TNF- α , IFN- γ), đáp ứng với chất kích thích miễn dịch (ví dụ LPS, PHA) hoặc khả năng thực bào. Các chỉ tiêu này đóng vai trò thiết yếu trong việc xác định hiệu năng của PBMCs từ chó khi được sử dụng để mô phỏng đáp ứng viêm, độc tính tế bào hoặc các tương tác thuốc – miễn dịch trong điều kiện *in vitro* [23, 24]. Tuy nhiên, mục tiêu chính của nghiên cứu là thiết lập và tối ưu hóa điều kiện phân lập và nuôi cấy PBMCs từ chó, thay vì đánh giá chức năng miễn dịch của các tế bào này. Do đó, các phân tích chức năng chuyên sâu không được đưa vào trong phạm vi của nghiên cứu hiện tại và sẽ là hướng phát triển quan trọng cho các nghiên cứu tiếp theo khi mô hình nuôi cấy đã được chuẩn hóa.

Dựa trên những giới hạn này, các nghiên cứu tiếp theo nên mở rộng quy mô mẫu nhằm nâng cao độ tin cậy thống kê, đồng thời tích hợp các kỹ thuật phân tích marker miễn dịch đặc hiệu để định danh và theo dõi sự thay đổi thành phần tế bào qua thời gian nuôi cấy. Song song đó, việc đánh giá chức năng miễn dịch thông qua các chỉ số phân tử, gene và đáp ứng chức năng sẽ giúp làm rõ tiềm năng ứng dụng của hệ thống PBMCs từ chó trong các bối cảnh nghiên cứu cụ thể. Cũng cần lưu ý rằng các yếu tố khác như loại môi trường nuôi cấy, nguồn FBS, sự có mặt của cytokine bổ sung (GM-CSF, IL-4) hay điều kiện oxy hóa (normoxia/hypoxia) đều có thể ảnh hưởng đáng kể đến sự sống, tăng trưởng và biệt hóa của tế bào và do đó cần được khảo sát có hệ thống trong các mô hình tiếp theo [25, 26].

Tổng thể, mô hình PBMCs từ chó được thiết lập trong nghiên cứu này đã chứng minh được tính khả thi và ổn định trong điều kiện *in vitro* với môi trường nuôi cấy chứa FBS ở mức 10%–15%. Đây là tiền đề quan trọng cho các nghiên cứu ứng dụng trong lĩnh vực miễn dịch học và độc chất học thú y. Các ứng dụng tiềm năng bao gồm đánh giá độc tính miễn dịch của các tác nhân sinh học, thuốc hoặc hóa chất thú y [27]; mô phỏng đáp ứng viêm và miễn dịch bẩm sinh/thích nghi trên mô hình loài chó vốn có hệ miễn dịch gần với người hơn so với chuột [28]; hoặc nghiên cứu bảo quản lạnh và biệt hóa dòng đơn nhân phục vụ liệu pháp miễn dịch và thử nghiệm tiền lâm sàng [29, 30]. Việc chuẩn hóa và hoàn thiện hệ thống nuôi cấy PBMCs từ chó không chỉ góp phần phục vụ nghiên cứu miễn dịch học và bệnh học trong lĩnh vực thú y, mà còn tạo nền tảng quan trọng cho các nghiên cứu y sinh học so sánh và xây dựng mô hình tiền lâm sàng. Điều này đặc biệt có ý nghĩa tại Việt Nam, nơi hiện chưa có hệ thống nuôi cấy tế bào chuẩn từ động vật để làm mô hình phục vụ đánh giá đáp ứng miễn dịch, thử nghiệm vắc-xin và nghiên cứu cơ chế bệnh truyền nhiễm ở cấp độ tế bào.

4 Kết luận

Nghiên cứu đã thiết lập thành công quy trình phân lập và nuôi cấy tế bào đơn nhân máu ngoại vi từ chó (*Canis lupus familiaris*) trong điều kiện *in vitro*. Trong giai đoạn chuẩn hóa phân lập, ly tâm ở 800 ×g trong 20 phút được xác định là điều kiện tối ưu để thu nhận PBMCs bằng phương pháp ly tâm với Ficoll, khi thu được mật độ tế bào cao, tỷ lệ sống cao và mức tạp nhiễm hồng cầu thấp, qua đó có thể áp dụng như bước chuẩn trong các quy trình phân lập PBMCs từ máu chó.

Trong thí nghiệm nuôi cấy, môi trường DMEM hỗ trợ tốt hơn cho sự bám dính và duy trì hoạt động sống của các tế bào đơn nhân có xu hướng bám

dính, trong khi RPMI-1640 giúp duy trì mật độ PBMCs huyền phù cao hơn trong giai đoạn đầu nuôi cấy. Điều này cho thấy việc lựa chọn môi trường có thể được điều chỉnh tùy theo mục tiêu nghiên cứu: DMEM phù hợp cho nghiên cứu biệt hóa hoặc hoạt động của các tế bào bám dính, RPMI-1640 dùng cho nghiên cứu duy trì quần thể PBMCs trong huyền phù.

Khi khảo sát nồng độ huyết thanh, môi trường bổ sung 10% FBS được xác định là nồng độ phù hợp và kinh tế để duy trì khả năng sống và tăng trưởng của PBMCs trong suốt 9 ngày nuôi cấy, do đó có thể được xem là nồng độ huyết thanh khuyến nghị cho các hệ thống nuôi cấy PBMCs từ chó trong các thí nghiệm *in vitro* kéo dài.

Quy trình được thiết lập trong nghiên cứu này cung cấp nền tảng kỹ thuật khả thi cho việc sử dụng PBMCs từ chó trong các nghiên cứu *in vitro* liên quan đến miễn dịch học, độc tính sinh học và sàng lọc tác nhân sinh học trong lĩnh vực thú y và y sinh học so sánh.

Lời cảm ơn

Đề tài này được tài trợ bởi Trường Đại học Cần Thơ, Mã số: TSV2024-214.

Tài liệu tham khảo

- Sen P, Kemppainen E, Orešič M. Perspectives on systems modeling of human peripheral blood mononuclear cells. *Front Mol Biosci*. 2018;4:96.
- Alexović M, Lindner JR, Bober P, Longuespée R, Sabo J, Davalieva K. Human peripheral blood mononuclear cells: A review of recent proteomic applications. *Proteomics*. 2022;22(15-16):e2200026.
- Kooijman R, Devos S, Hooghe-Peters E. Inhibition of *in vitro* cytokine production by human PBMCs treated with xenobiotics: Implications for prediction of general toxicity and immunotoxicity. *Toxicol In vitro*. 2010;24(6):1782-9.
- Ticha O, Klemm D, Moos L, Bekeredjian-Ding I. A cell-based *in vitro* assay for testing of

- immunological integrity of tetanus toxoid vaccine antigen. NPJ Vaccines. 2021;6(1):88.
5. Chow L, Wheat W, Ramirez D, Impastato R, Dow S. Direct comparison of canine and human immune responses using transcriptomic and functional analyses. Sci Rep. 2024;14(1):2207.
6. Morrison T, Gunn-Moore DA, Hope JC, O'Halloran C. Cytokine and chemokine responses of PBMCs from dogs infected with *Mycobacterium bovis*. Pathogens. 2024;14(1):17.
7. Nguyen TT Minh, Le NT Thao. Inhibitory effect of medicinal plants on *in vitro* human PBMC proliferation, IL-2 secretion and antioxidant activity. MedPharmRes. 2021;5(1):22-9.
8. Schmitz S, Henrich M, Neiger R, Werling D, Allenspach K. Comparison of TNF α responses induced by TLR ligands and probiotic *Enterococcus faecium* in canine blood and PBMCs. Vet Immunol Immunopathol. 2013;153(1-2):170-4.
9. Rodrigues CA, Batista LF, Teixeira MC, Pereira AM, Santos PO, de Sá Oliveira GG, de Freitas LA, Veras PS. PBMC supernatants from asymptomatic dogs immunized and challenged with *Leishmania chagasi* stimulate canine macrophages *in vitro*. Vet Parasitol. 2007;143(3-4):197-205.
10. Cytiva. *Ficoll-Paque PLUS: Instructions for use – Isolation of mononuclear cells by density gradient centrifugation*. Marlborough (MA): Cytiva; 2022. Available from: <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-16156-pdf>
11. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. Curr Protoc Immunol. 2001;Appendix 3:3B.
12. Boyette LB, Macedo C, Hadi K, Elinoff BD, Walters JT, Ramaswami B, et al. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. PLoS One. 2017;12(4):e0176460.
13. Meskini M, Amanzadeh A, Salehi F, Bouzari S, Karimipoor M, Fuso A, et al. A protocol to isolate and characterize pure monocytes and generate dendritic cells via FBS-coated flasks. Sci Rep. 2024;14:23956.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. J Immunol Methods. 1983;65(1-2):55-63.
15. Bryant PA, Smyth GK, Robins-Browne R, Curtis N. Detection of gene expression in individual cell types using microarray. PLoS One. 2009;4(2):e4427.
16. STEMCELL Technologies. How to isolate mononuclear cells by density gradient [Internet]. Vancouver (BC): STEMCELL Technologies; 2024 [cited 2025 Jul 25]. Available from: <https://www.stemcell.com/isolating-mononuclear-cells-from-whole-blood-by-density-gradient-centrifugation.html>
17. Mallone R, Mannering SI, Brooks-Worrell BM, Durinovic-Belló I, Cilio CM, Wong FS, et al. Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. Clinical and Experimental Immunology. 2011;163(1):33-49.
18. Ziegler-Heitbrock L. The CD14⁺CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. J Leukoc Biol. 2007;81(3):584-92.
19. Gong S, Fajar P, De Vries-Idema J, Huckriede A. Comparison of media for a human peripheral blood mononuclear cell-based *in vitro* vaccine evaluation system. Clin Exp Vaccine Res. 2023;12(4):328-36.
20. Antonsen KW, Friis HN, Sorensen BS, Etzerodt A, Moestrup SK, Møller HJ. Comparison of culture media reveals that non-essential amino acids strongly affect the phenotype of human monocyte-derived macrophages. Immunology. 2023;170(3):344-58.
21. Withers SS, Moore PF, Chang H, Choi JW, McSorley SJ, Kent MS, et al. Multi-color flow cytometry to evaluate memory lymphocyte changes in dogs. Dev Comp Immunol. 2018;87:64-74.
22. Pantelyushin S, Ranninger E, Bettschart-Wolfensberger R, Vom Berg J. OMIP-065: Dog immunophenotyping with a 14-color panel. Cytometry A. 2020;97(10):1024-7.
23. Dandrieux JRS, Narayanan L, Firestone S, Archer TM, Mansfield CS. Effect of immunosuppressive drugs on cytokine production in canine blood. Vet Med Sci. 2019;5(2):199-205.
24. Ide K, Momoi Y, Iwasaki T. Canine PHA-stimulated adherent cells enhance IFN- γ production. Vet Comp Oncol. 2005;3(1):25-31.
25. Wang YS, Chi KH, Liao KW, Liu CC, Cheng CL, Lin YC, et al. Characterization of canine monocyte-derived dendritic cells with phenotypic and functional differentiation. Can J Vet Res. 2007;71(3):165-74.

-
26. Lyu Q, Veldhuizen EJA, Ludwig IS, Rutten VPMG, van Eden W, Sijts AJAM, Broere F. Characterization of polarization states of canine monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. 2023;18(11):e0292757.
 27. Lebrech H, O'Lone R, Freebern W, Komocsar W, Moore P. Survey: immune function and immunotoxicity assessment in dogs. *Journal of Immunotoxicology*. 2012;9(1):1-14.
 28. Kosukwatthana P, Rungsuriyawiboon O, Rattanasrisomporn J, Kimram K, Tansakul N. Cytotoxicity and immunomodulatory effects of cannabidiol on canine PBMCs: a study in LPS-stimulated and epileptic dogs. *Animals (Basel)*. 2024;14(24):3683.
 29. Li B, Yang C, Jia G, Liu Y, Wang N, Yang F, et al. Comprehensive evaluation of the effects of long-term cryopreservation on peripheral blood mononuclear cells using flow cytometry. *BMC Immunology*. 2022;23:30.
 30. Goto-Koshino Y, Ohno K, Nakajima M, Mochizuki H, Kanemoto H, Tsujimoto H. A rapid and simple method to obtain canine peripheral blood-derived macrophages. *J Vet Med Sci*. 2011;73(6):773-8.