p-ISSN 1859 - 3461
e-ISSN 3030 - 4008

TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH KHỬ TẾ BÀO ĐỘNG MẠCH CUỐNG RỐN NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐÔNG - RÃ ĐÔNG KẾT HỢP TRUYỀN RỬA BẰNG SDS NỒNG ĐỘ THẤP

Nguyễn Trung Chức✉[1], Lê Tài Thế[3], Bùi Khắc Cường[2], Đinh Thị Thanh Xuân[1], Đỗ Xuân Hai[1]

[1]Học viện Quân y
[2]Bệnh viên Trung ương Quân đội 108
[3]Viện 69, Bộ Tư lệnh Bảo vệ Lăng Chủ tịch Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Mục tiêu: *Tối ưu hóa quy trình khử tế bào từ động mạch cuống rốn người (ĐMCR) bằng phương pháp đông-rã đông kết hợp truyền dung dịch Sodium dodecyl sulfate (SDS) nồng độ thấp nhằm tạo giá thể vô bào mạch máu nhỏ có tính tương thích sinh học cao.*

Đối tượng và phương pháp: *ĐMCR sau ba chu kỳ đông - rã đông được chia thành ba nhóm: (Tx-0,3-A) lắc cơ học SDS 0,3% trong 6 giờ sau khi ngâm trong Triton X-100 24 giờ, (Tx-0,3-P) truyền rửa bằng bơm nhu động với SDS 0,3% trong 6 giờ sau khi ngâm trong Triton X-100 24 giờ, và (1-P) truyền rửa bằng bơm nhu động với SDS 1%. Các mẫu được đánh giá hiệu quả khử tế bào bằng nhuộm H&E, DAPI, định lượng DNA; bảo tồn ECM qua nhuộm Masson, Alcian Blue, định lượng collagen; và đánh giá đặc tính cơ học.*

Kết quả: *Nhóm Tx-0,3-P đạt hiệu quả khử tế bào vượt trội, bảo tồn tốt collagen, GAGs và duy trì đặc tính cơ học (độ bền kéo 1899 ± 242 kPa; độ biến dạng tối đa 1,18 ± 0,05). Nhóm 1-P gây tổn thương ECM nhiều hơn do SDS nồng độ cao.*

Kết luận: *Quy trình truyền rửa SDS 0,3% sau đông - rã đông là lựa chọn tối ưu để tạo giá thể vô bào mạch máu nhỏ từ ĐMCR, hứa hẹn ứng dụng trong tái tạo mạch máu sinh học.*

Từ khóa: *Động mạch cuống rốn, khử tế bào, chất nền ngoại bào, sodium dodecyl sulfate; mạch máu nhỏ; đông - rã đông*

ABSTRACT

Objective: *To optimize the decellularization protocol for human umbilical arteries (HUAs) by combining freeze-thaw cycles with low-concentration Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) perfusion to create a biocompatible small-caliber vascular scaffold.*

[1]Chịu trách nhiệm: Nguyễn Trung Chức, Học viện Quân y
Email: nguyentrungek@gmail.com
Ngày gửi bài: 05/4/2025; Ngày nhận xét: 15/6/2025; Ngày duyệt bài: 26/6/2025
https://doi.org/10.54804/yhthvb.3.2025.431

p-ISSN 1859 - 3461
e-ISSN 3030 - 4008

Subjects and methods: *HUAs, after three freeze-thaw cycles, were divided into three groups: (Tx-0.3-A) mechanical shaking with 0.3% SDS after Triton X-100 immersion for 24 hours, (Tx-0.3-P) perfusion with 0.3% SDS after Triton X-100 immersion for 24 hours, and (1-P) perfusion with 1% SDS. Decellularization efficiency was evaluated using H&E and DAPI staining, DNA quantification; ECM preservation was assessed via Masson's trichrome, Alcian Blue staining, and hydroxyproline assay; and mechanical properties were evaluated.*

Results: *The Tx-0.3-P group showed superior decellularization efficiency, with excellent preservation of collagen, GAGs, and mechanical properties (tensile strength 3232 ± 400 kPa; maximum strain 1.18 ± 0.05). The group with 1% SDS caused more ECM damage due to the high SDS concentration.*

Conclusion: *The 0.3% SDS perfusion following freeze-thaw preconditioning is the optimal protocol for generating small-caliber vascular scaffolds from HUAs, with promising potential for biomedical applications in vascular tissue regeneration.*

Keywords: *Human umbilical artery; Decellularization; Extracellular matrix; Sodium dodecyl sulfate; Small-caliber blood vessels; Freeze-thaw.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh lý tim mạch, bao gồm cả bệnh động mạch tắc nghẽn, tiếp tục là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong trên toàn cầu, với 17,9 triệu ca tử vong hàng năm theo báo cáo của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO). Khoảng 85% các trường hợp tử vong này là do nhồi máu cơ tim và đột quỵ, và một phần ba trong số đó xảy ra ở những người dưới 70 tuổi [1]. Một trong những thách thức lớn trong điều trị bệnh lý này là việc khôi phục tuần hoàn máu qua những mạch máu có đường kính nhỏ (< 6 mm), thường bằng cách sử dụng các đoạn ghép mạch máu tự thân từ tĩnh mạch hoặc động mạch. Tuy nhiên, chỉ 40% bệnh nhân có đủ điều kiện sử dụng mạch máu tự thân do hạn chế về tình trạng mạch máu hoặc bệnh lý nền [2]. Vật liệu tổng hợp như ePTFE hay Dacron đã được thử nghiệm, nhưng chúng không đạt hiệu quả trong ghép mạch máu nhỏ vì nguy cơ huyết khối cao và thiếu tính tương thích sinh học [2], [3].

Tái tạo mạch máu nhờ công nghệ khử tế bào từ các động mạch cuống rốn (ĐMCR) đã trở thành một giải pháp đầy triển vọng trong lĩnh vực kỹ thuật mô và y học tái tạo. Động mạch cuống rốn cung cấp một nguồn vang dồi dào, thuận tiện và đường kính phù hợp với yêu cầu của các đoạn ghép mạch máu nhỏ [3], [4]. Quá trình khử tế bào nhằm loại bỏ toàn bộ tế bào cũng như các thành phần gây miễn dịch trong động mạch, nhưng đồng thời bảo tồn cấu trúc và chức năng của chất nền ngoại bào (CNNB), đặc biệt là collagen và elastin, những thành phần quan trọng quyết định tính chất cơ học và khả năng tái cấu trúc mô của giá thể vô bào [2], [3]. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy tiềm năng của phương pháp này trong phát triển các giá thể mạch máu đường kính nhỏ, với các đặc tính nổi bật như khả năng tương thích sinh học cao, giảm nguy cơ huyết khối và

p-ISSN 1859 - 3461
e-ISSN 3030 - 4008

khả năng hỗ trợ hình thành tế bào nội mô mới [4], [5], [6].

Trong nghiên cứu trước đây, Tuan-Mu và cộng sự (2020) đã cải thiện quá trình khử tế bào từ động mạch cuống rốn bằng cách loại bỏ lớp abluminal không thấm nước, qua đó gia tăng hiệu quả thẩm thấu của dung dịch khử tế bào 1% SDS và đạt được khử hoàn toàn deoxyribonucleic acid (DNA) trong vòng 24 giờ [4]. Các nghiên cứu trước đây đã báo cáo hiệu quả khử tế bào ở các nồng độ SDS khác nhau, từ 0,1% đến 1%, nhưng các tham số cụ thể để tối ưu hóa vẫn chưa rõ ràng đối với mạch máu đường kính nhỏ như ĐMCR. Mặc dù phương pháp này giảm thời gian so với các quy trình truyền thống, thời gian 24 giờ vẫn là một thách thức đối với các yêu cầu ứng dụng lâm sàng nhanh chóng. Phương pháp đông - rã đông được biết đến với khả năng làm vỡ màng tế bào thông qua hình thành các tinh thể băng nội bào, giúp tăng tính thấm của mô đối với các chất tẩy rửa ở giai đoạn sau [7].

Trong bối cảnh đó, chúng tôi đề xuất kết hợp sử dụng phương pháp đông - rã đông theo chu kỳ làm bước xử lý sơ bộ trước khi áp dụng đồng thời kỹ thuật perfusion với dung dịch SDS. Các thông số sau khử tế bào sẽ được đánh giá qua nhiều khía cạnh, bao gồm mô, cấu trúc chất nền ngoại bào (CNNB) và các đặc tính cơ học nhằm tìm ra nồng độ tối ưu

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Động mạch cuống rốn người.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

**** Loại bỏ tế bào động mạch cuống rốn***

ĐMCR dài 5 cm được bảo quản trong dung dịch PBS có bổ sung 0,1% (w/v) ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), đông lạnh ở nhiệt độ -80^{0}C sau đó rã đông nhanh ở 37^{0}C. Quy trình này được thực hiện 3 chu kỳ. Sau đó, các mẫu được rửa hai lần bằng nước cất. Các động mạch đã qua xử lý đông - rã đông được phân ngẫu nhiên thành ba nhóm để thực hiện xử lý theo các phương pháp khác nhau:

- Nhóm Tx-0,3-A (n = 5): Ngâm trong Triton X-100 (Tx-100) 24 giờ sau đó, sau đó được lắc (agitation) trong dung dịch SDS 0,3 %, EDTA 25 mM chu kỳ 100 vòng/phút trong 6 giờ.

- Nhóm Tx-0,3-P (n = 5): Ngâm trong Tx-100 24 giờ dung dịch SDS 0,3%, EDTA 25 mM được truyền (perfusion) qua lòng mạch bằng hệ thống bơm nhu động 1 Hz, lưu lượng 30 ml/phút, áp lực truyền 10 ± 5 mmHg trong 6 giờ [8].

- Nhóm 1-P (n = 5): Mạch được truyền (perfusion) trực tiếp với SDS 1%, EDTA 25 mM bằng hệ thống bơm nhu động với thông số cài đặt như nhóm Tx-0,3-P [4].

Sau đó, các mẫu được rửa sạch bằng PBS trong 24 giờ (thay dung dịch mỗi 4 giờ) để loại bỏ SDS dư, sau đó được ngâm trong nước cất bảo quản ở 4^{0}C để đánh giá các đặc điểm nghiên cứu.

Động mạch cuống rốn không xử lý (CRT) (n = 3) được sử dụng làm đối chứng.

**** Đánh giá hiệu quả khử tế bào***

- Đánh giá mô học

Hiệu quả khử tế bào của các nhóm xử lý được đánh giá thông qua đánh giá cấu trúc mô học. 5 mẫu mỗi nhóm, mỗi đoạn dài 1 cm được cố định trong formalin 10% tại nhiệt độ phòng trong 24 giờ, sau đó rửa

p-ISSN 1859 - 3461
e-ISSN 3030 - 4008

PBS, khử nước tuần tự bằng ethanol tăng dần (70 - 100%) và làm trong bằng xylene. Mẫu được đúc paraffin và cắt lát dày 5 µm. Các lát cắt được khử paraffin, tái hydrat hóa qua dãy ethanol giảm dần và rửa bằng nước cất.

Các tiêu bản được nhuộm H&E để đánh giá nhân tế bào và cấu trúc chung; Masson's Trichrome để quan sát sự bảo tồn sợi collagen và Alcian Blue để phát hiện glycosaminoglycans (GAGs). Sau nhuộm, các mẫu được quan sát bằng kính hiển vi quang học để đánh giá mức độ loại bỏ tế bào và sự bảo tồn cấu trúc chất nền ngoại bào (CNNB).

- Nhuộm DAPI

Sau khi được cắt lát dày 5 µm, khử paraffin và tái ngậm nước, mỗi nhóm (n = 5) nhuộm với dung dịch DAPI ((4',6-diamidino-2-phenylindole) ở nồng độ 1 µg/ml trong bóng tối trong vòng 10 phút, sau đó quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang (Nikon Eclipse Ci).

- Đánh giá đặc điểm siêu cấu trúc bằng kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscopy - SEM)

2 mẫu mô bất kỳ từ mỗi nhóm, mỗi mẫu dài 5 mm được xẻ dọc để bộ lộ lòng mạch, sau đó được cố định trong glutaraldehyde 2,5% (trong PBS, pH = 7,4) ở 4^0C trong 24 giờ, sau đó rửa bằng PBS và cố định tiếp bằng Osmium tetroxide 1% trong 1 giờ. Mẫu được khử nước tuần tự bằng ethanol tăng dần (30% đến 100%), mỗi bước 15 phút, và làm khô tới điểm tới hạn bằng CO_2. Sau đó, mẫu được gắn lên phiến dẫn và phủ vàng bằng máy phủ sputter. Quan sát hình ảnh bề mặt mô được thực hiện bằng kính hiển vi điện tử quét.

- Đánh giá cơ học

Để đánh giá các đặc tính cơ học của động mạch cuống rốn sau khử tế bào, 5 mẫu mỗi nhóm được cắt thành đoạn hình trụ có chiều dài khoảng 4 mm. Các mẫu được ngâm trong dung dịch PBS ở 37^0C trong 30 phút trước khi tiến hành đo đạc. Thử nghiệm kéo căng được thực hiện bằng máy cơ tính QC-506B1 (Qctech - Đài Loan). Hai đầu mẫu được cố định bằng kẹp có lót giấy nhám nhằm tránh trượt trong quá trình kéo, thiết lập preload 0,1 N với tốc độ kéo 7 mm/phút.

- Ứng suất chu vi được tính theo công thức:

$$\sigma_q = \frac{F}{2 \cdot L_0 \cdot t}$$

Trong đó:

σ_q: ứng suất chu vi (circumferential stress), đơn vị: kPa

F: lực tác dụng (N)

L_0: chiều dài mẫu vòng (mm)

t: độ dày thành mạch máu (mm)

Độ bền kéo (ultimate tensile strength) được tính khi F đạt giá trị lớn nhất

- Độ biến dạng tối đa được tính theo công thức:

$$\varepsilon = \frac{\Delta D}{D_i} = \frac{D_f - D_i}{D_i}$$

Trong đó:

ε: Độ biến dạng tối đa (max strain)

D_f: đường kính vòng tại điểm đứt

D_i: đường kính vòng ban đầu (tại preload 0,1 N)

- Định lượng collagen

Hàm lượng collagen trong mô mạch máu được xác định gián tiếp thông qua định lượng hydroxyproline theo phương pháp Stegemann và Stalder (1967). Mẫu

p-ISSN 1859 - 3461
e-ISSN 3030 - 4008

mô (n = 3 mỗi nhóm) sau khi làm khô được thủy phân trong HCl 6 N tại 110^0C trong 18 - 24 giờ. Dịch thủy phân được trung hòa và phản ứng với chloramine-T để ô xy hóa hydroxyproline, sau đó được thêm thuốc thử Ehrlich (DMAB) và ủ ở 60^0C trong 15 phút để tạo phức màu. Cường độ màu được đo ở bước sóng 560 nm bằng máy quang phổ, so sánh với đường chuẩn hydroxyproline. Hàm lượng collagen được ước tính bằng cách nhân hydroxyproline với hệ số 7,4.

*** Đạo đức nghiên cứu**

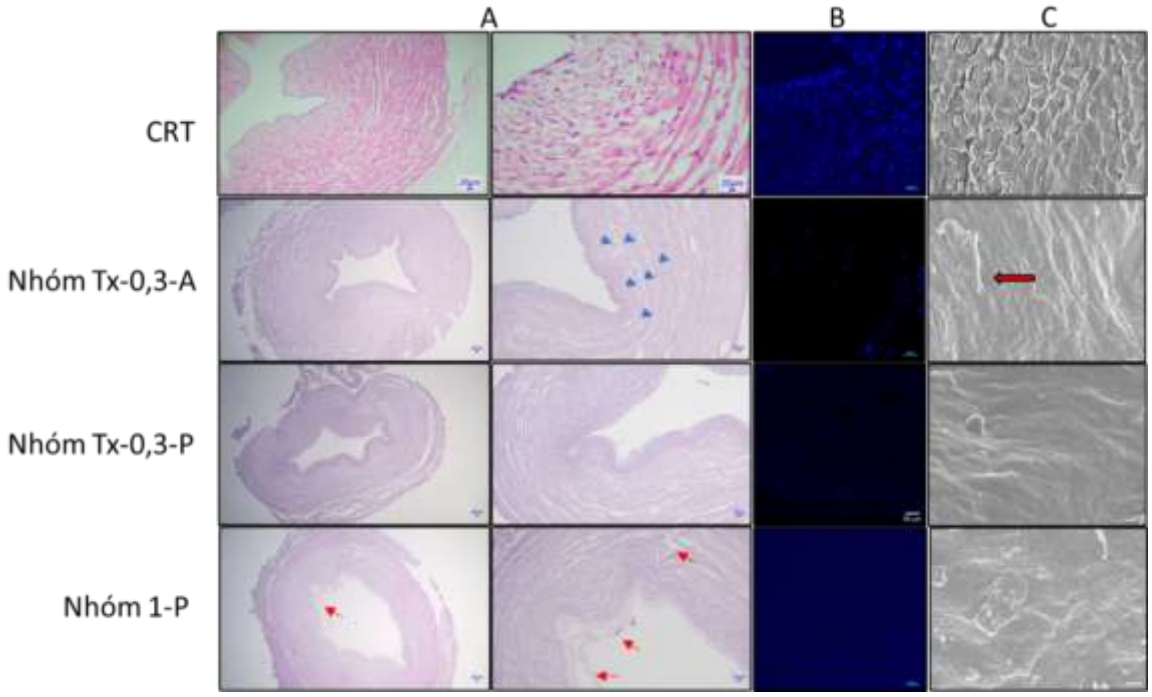
Mẫu động mạch dây rốn được cung cấp bởi đề tài VINIF.2020.DA0, tuân thủ Tuyên ngôn Helsinki.

*** Phân tích thống kê**

Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm GraphPad Prism (phiên bản 8.4). Giá trị các nhóm được so sánh bằng phân tích phương sai một chiều (one-way ANOVA) kèm theo phép thử hậu nghiệm Tukey (Tukey's post hoc test) nếu tuân theo phân phối chuẩn hoặc kiểm định Kruskal-Wallis với phép thử hậu nghiệm Dunn (Dunn's multiple comparisons test) khi giá trị không tuân theo phân phối chuẩn. Mức ý nghĩa thống kê được thiết lập tại $p < 0.05$.

3. KẾT QUẢ

3.1. Hiệu quả khử tế bào qua mô học



Hình 3.1. Đánh giá hiệu quả khử tế bào bằng nhuộm H&E (A), scale bar = 20 µm, mũi tên xanh chỉ các nhân tế bào còn sót lại, mũi tên đỏ chỉ các điểm bong/ đứt gãy sợi collagen. Hình ảnh nhuộm DAPI trên mô động mạch cuống rốn người (B), scale bar = 50 µm và đặc điểm siêu cấu trúc bằng SEM (C), scale bar = 10 µm.

Kết quả nhuộm H&E cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa các nhóm xử lý về mức độ loại bỏ tế bào và tình trạng tổn thương mô học. Nhóm Tx-0,3-A mặc dù đã loại bỏ phần

p-ISSN 1859 - 3461
e-ISSN 3030 - 4008

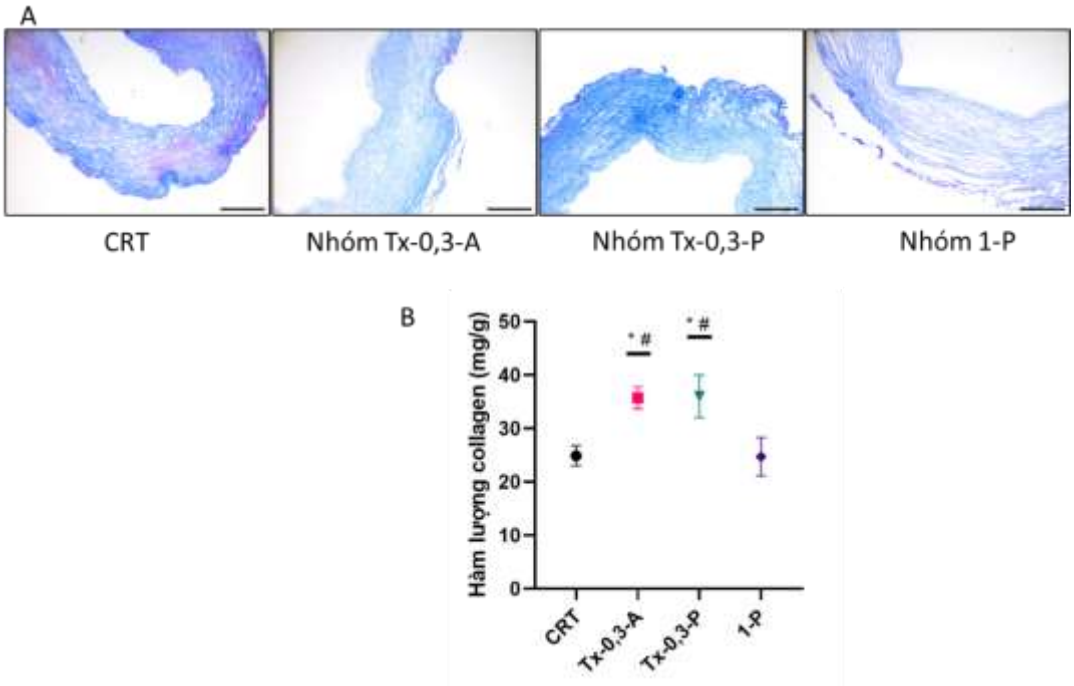
lớn tế bào, vẫn quan sát thấy một số nhân còn sót lại, chủ yếu nằm sâu trong lớp áo giữa (mũi tên xanh). Đáng chú ý, nhóm Tx-0,3-P thể hiện hiệu quả vượt trội khi gần như không còn dấu hiệu của nhân tế bào, đồng thời cấu trúc mô được bảo tồn tốt, không phát hiện tổn thương tại thành mạch. Ngược lại, nhóm 1-P tuy đạt hiệu quả loại bỏ tế bào tương đương nhóm II, nhưng lại xuất hiện các vùng tổn thương mô học (Hình 3.1A, mũi tên đỏ), bao gồm bong tróc lớp màng đáy và phân rã sợi collagen thành mạch, cho thấy tác dụng phụ của nồng độ SDS cao đến cấu trúc CNNB.

Kết quả này được củng cố bởi hình ảnh nhuộm DAPI (Hình 3.1B). Nhóm CRT hiển thị tín hiệu huỳnh quang mạnh với nhân tế bào phân bố rõ ràng, trong khi nhóm Tx-0,3-A vẫn còn tín hiệu mờ rải rác - xác nhận hiện tượng sót DNA. Nhóm Tx-0,3-P cho thấy sự giảm mạnh tín hiệu, gần như không còn hiện diện nhân tế bào, phản ánh quá trình khử hoàn toàn hiệu quả. Ở nhóm 1-P, tín hiệu DAPI cũng biến mất gần như hoàn toàn. Như vậy, nhóm Tx-0,3-P cân bằng hiệu quả khử tế bào cao với khả năng bảo tồn cấu trúc mô.

Trên hình ảnh SEM, nhóm Tx-0,3-P và 1-P cho thấy đã loại bỏ được hoàn toàn lớp nội mạc mạch máu, trong khi nhóm Tx-0,3-A vẫn còn sót lại một số tế bào (mũi tên đỏ hình 3.1C)

3.2. Đặc điểm vi cấu trúc và chất nền ngoại bào bảo tồn

- Thành phần collagen



Hình 3.2. Đánh giá sự bảo tồn collagen trong động mạch sau khử tế bào thông qua nhuộm Masson's Trichrome (A), sacle bar = 100 µm và định lượng collagen (B), *: p < 0,05 so với nhóm chứng (CRT), #: p < 0,05 so với nhóm 1-P.

Kết quả nhuộm Masson's Trichrome cho thấy sự khác biệt đáng kể về mức độ bảo tồn sợi collagen giữa các nhóm. Ở nhóm đối chứng (CRT), màu nhuộm xanh

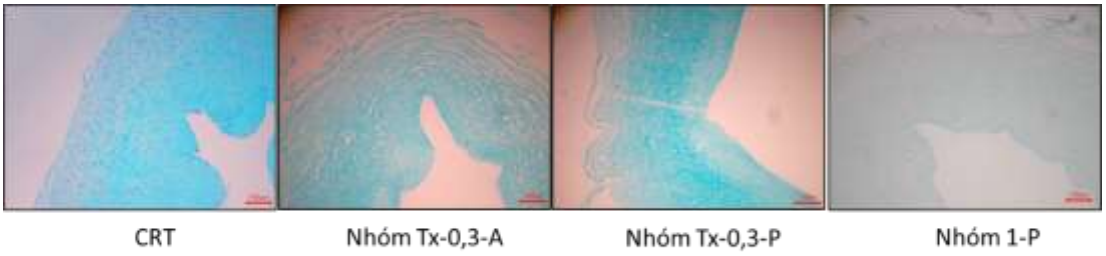
p-ISSN 1859 - 3461
e-ISSN 3030 - 4008

lam đặc trưng cho collagen được phân bố dày đặc, đồng đều trong toàn bộ lớp áo giữa và áo ngoài, phản ánh cấu trúc mô liên kết bình thường của động mạch cuống rốn. Trong nhóm Tx-0,3-A và Tx-0,3-P, màu nhuộm xanh vẫn được bảo tồn khá rõ, mặc dù có sự giảm nhẹ về mật độ tại một số vùng, cho thấy phần lớn cấu trúc collagen vẫn nguyên vẹn. Trong khi đó, nhóm 1-P mặc dù vẫn còn hiện diện collagen, nhưng màu nhuộm nhạt hơn và có dấu hiệu phân mảnh.

Kết quả định lượng collagen củng cố các quan sát mô học nêu trên. Cụ thể, cả hai nhóm Tx-0,3-A và Tx-0,3-P đều có mức collagen cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng, trong đó nhóm II đạt mức trung bình gần 40 mg/g mô khô. Điều này phù hợp với giả thuyết rằng quá trình khử tế bào giúp loại bỏ protein tế bào và làm giàu tỷ lệ thành phần chất nền ngoại bào tương đối, trong khi collagen được bảo tồn. Ngược lại, nhóm 1-P ghi nhận mức collagen thấp hơn đáng kể so với nhóm I và II ($p < 0,05$), phản ánh sự mất mát collagen.

- Thành phần glycosaminoglycans

Kết quả nhuộm Alcian Blue cho thấy sự khác biệt rõ rệt về mức độ bảo tồn glycosaminoglycans (GAGs) giữa các nhóm (Hình 3.3). Trong nhóm đối chứng (CRT), màu xanh lam đặc trưng của GAGs được phân bố đậm nét, đồng đều khắp lớp áo giữa của thành mạch, cho thấy mô nguyên bản vẫn giữ được thành phần nền ngoại bào đầy đủ. Ở nhóm Tx-0,3-A và Tx-0,3-P, tín hiệu xanh lam vẫn còn rõ ràng, mặc dù có hiện tượng giảm nhẹ mật độ, cho thấy một phần GAGs bị rửa trôi nhưng vẫn giữ lại tương đối. Ngược lại, nhóm 1-P thể hiện tín hiệu xanh lam nhạt hơn rõ rệt so với các nhóm còn lại.



Hình 3.3. Đánh giá sự bảo tồn glycosaminoglycans (GAGs) trong động mạch cuống rốn người trước và sau khử tế bào bằng nhuộm Alcian Blue, scale bar = 100 µm. Các thành phần GAGs được nhuộm màu xanh lam đặc trưng, phản ánh mật độ và sự phân bố của chất nền ngoại bào trong mô

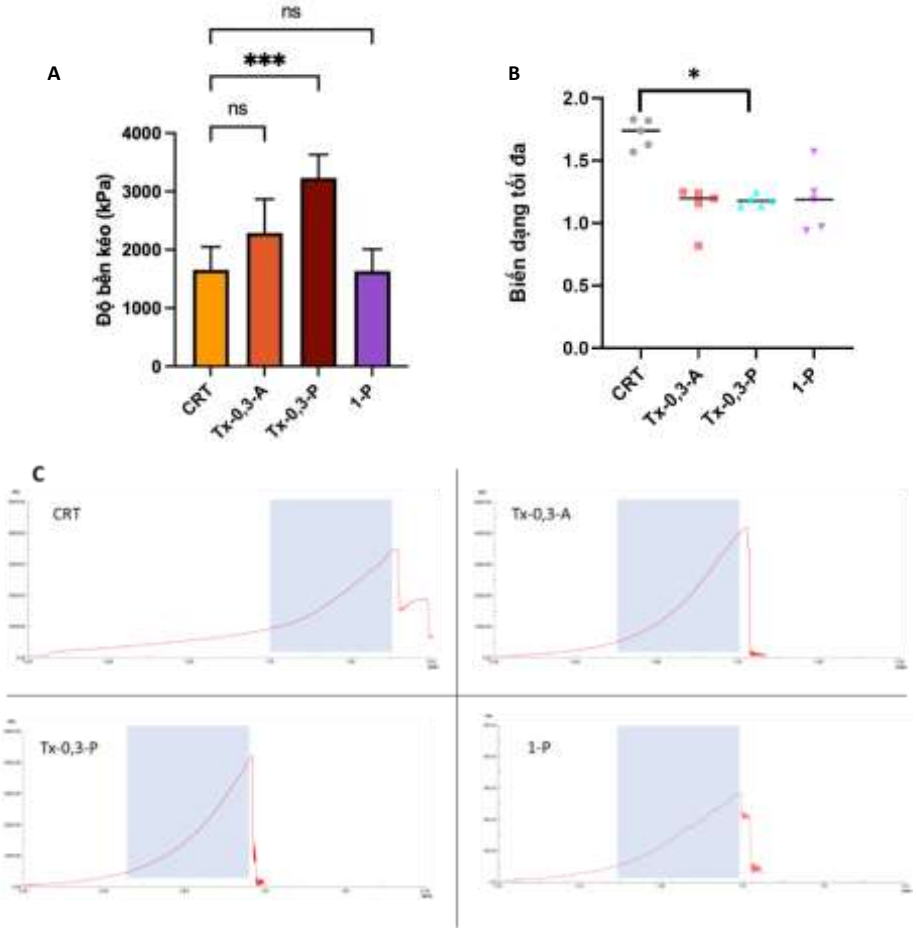
3.4. Tính chất cơ học

Kết quả khảo sát độ bền kéo cho thấy nhóm xử lý truyền rửa với SDS 0,3% (Tx-0,3-P) sau tiền xử lý đông-rã đông đạt giá trị cao nhất (3232 ± 400 kPa), tăng có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (1656 ± 391 kPa, $p < 0,001$) cũng như so với các phương pháp còn lại, bao gồm lức đơn thuần với SDS 0,3% (2289 ± 579 kPa) và truyền rửa SDS 1% (1632 ± 374 kPa). Đặc biệt, nhóm truyền rửa bằng SDS 1% cho kết quả không cải thiện so với đối chứng, thậm chí còn thấp hơn nhóm Tx-0,3-P rất rõ rệt.

Về độ biến dạng tối đa, tất cả các nhóm sau xử lý đều giảm so với nhóm CRT. Cụ thể, nhóm đối chứng CRT có độ biến dạng tối đa trung bình là 1,74 ± 0,10,

p-ISSN 1859 - 3461
e-ISSN 3030 - 4008

trong khi đó các nhóm xử lý ghi nhận sự giảm rõ rệt: Nhóm Tx-0,3-A (1,13 ± 0,19), nhóm Tx-0,3-P (1,18 ± 0,05) và nhóm 1-P (1,18 ± 0,26). Trong đó, nhóm Tx-0,3-P có sự giảm đáng kể độ biến dạng tối đa so với CRT (*p = 0,0319*). Kết quả này phản ánh rằng quá trình khử tế bào, dù duy trì tốt độ bền kéo, nhưng có ảnh hưởng nhất định đến độ đàn hồi của mô do mất đi một số thành phần đàn hồi trong CNNB. Trong biểu đồ tương quan giữa ứng suất - biến dạng (hình 3.4C) ở pha collagen ưu thế (phần biểu đồ được tô đậm) có thể thấy 2 nhóm Tx-0,3-A và Tx-0,3-P có độ dốc phần tuyến tính tăng đáng kể so với CRT, biểu thị mô mạch máu trở nên cứng hơn sau khi được xử lý, song ở nhóm 1-P lại không thấy có hiện tượng này, với độ dốc của pha collagen ưu thế không thay đổi nhiều so với CRT. Hiện tượng này xảy ra với nhóm 1-P cùng với sự giảm độ bền kéo có thể do sự sụt giảm đáng kể của tổ chức collagen trong thành mạch.



Hình 3.4. Đánh giá đặc tính cơ học của mô động mạch cuống rốn người trước và sau khử tế bào

(A) Độ bền kéo (tensile strength) trung bình của các nhóm mô.
Dữ liệu biểu diễn dưới dạng trung bình ± SD.

(B) Biến dạng tối đa (maximum strain) của các mẫu. Dữ liệu biểu diễn dưới dạng trung vị.

(C) biểu đồ ứng suất-biến dạng (stress-strain curve)

p-ISSN 1859 - 3461
e-ISSN 3030 - 4008

4. BÀN LUẬN

Trong mọi quy trình khử tế bào, mục tiêu chính là giảm thiểu các thành phần miễn dịch còn sót lại đồng thời duy trì tính toàn vẹn của cấu trúc chất nền ngoại bào (ECM) và khả năng cơ học ban đầu [9]. Trong nghiên cứu này, việc kết hợp phương pháp đông - rã đông và ngâm trong Tx-100 với phương pháp truyền rửa liên tục ở nồng độ thấp SDS (0,3%) mang lại hiệu quả tối ưu để khử tế bào từ động mạch cuống rốn người (HUAs). Quy trình này không chỉ đạt hiệu quả cao trong loại bỏ tế bào và DNA mà còn bảo tồn được cấu trúc nền ngoại bào (ECM), đặc biệt là collagen và glycosaminoglycans (GAGs), từ đó duy trì tốt các đặc tính cơ học cần thiết cho giá thể vô bào mạch máu nhỏ. Kết quả này tương thích với nghiên cứu của Cheng và cộng sự (2019) trên động mạch cảnh lợn truyền rửa SDS nồng độ thấp sau đông - rã đông không những không làm giảm mà còn có thể tăng cường độ bền kéo của mạch máu, trái ngược với các phương pháp dùng SDS cao hoặc enzyme dễ làm giảm sức chịu kéo hoặc làm mô cứng, kém thích hợp cho ứng dụng mô ghép [7]. Tiền xử lý bằng phương pháp đông - rã đông đóng vai trò then chốt trong quá trình khử tế bào.

Theo Cheng và cộng sự (2019), quá trình đông lạnh ở -80^{0}C và rã đông nhanh ở 37^{0}C tạo ra các tinh thể băng nội bào làm vỡ màng tế bào và mở rộng khoảng gian bào, qua đó tăng tính thấm của mô mà không ảnh hưởng đáng kể đến cấu trúc ECM [7]. Điều này tạo tiền đề thuận lợi cho các tác nhân khử tế bào thâm nhập sâu hơn vào cấu trúc mô trong các bước tiếp theo.

Nghiên cứu của Tuan-Mu và cộng sự (2020) mô tả quy trình khử tế bào ĐMCR sử dụng phương pháp truyền rửa hoặc lắc cơ học với dung dịch SDS 1% kéo dài tới 24 giờ, trên các mẫu đã xử lý loại bỏ lớp áo ngoài [4]. Mặc dù quy trình này cho hiệu quả loại bỏ DNA hoàn toàn, việc sử dụng SDS nồng độ cao trong thời gian dài được ghi nhận là có thể làm tổn thương cấu trúc nền ngoại bào ở mức độ đáng kể, đặc biệt là collagen và các thành phần khác của ECM. Phương pháp tryền rửa với áp suất 10 ± 5 mmHg được chứng minh tạo dòng chảy đối lưu xuyên thành mạch [4], từ đó tạo ra lực cắt xen kẽ giúp "rửa trôi" hiệu quả các mảnh vỡ tế bào. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Nguyen và cộng sự (2024) khi sử dụng bioreactor perfusion giúp giảm thời gian xử lý từ 72 giờ xuống 24 giờ [10]. Việc loại bỏ lớp abluminal không thấm nước theo Tuan-Mu và cộng sự (2020) đã được thay thế bằng cơ chế tăng tính thấm qua đông - rã đông.

Một số nghiên cứu cùng lĩnh vực cho thấy SDS nồng độ cao thường dẫn đến tổn hại vi cấu trúc, làm giảm độ bền cơ học cũng như tiềm năng sinh học của giá thể mạch máu [9], [10]. Nghiên cứu của Rodríguez-Rodríguez (2019) tiến hành trên động mạch cuống rốn người không bảo quản đông lạnh với 1% Triton X-100, 0,1% SDS và 1% SDS cho thấy Triton X-100 làm sạch tế bào không triệt để, vẫn còn sót hạt nhân và gây tổn hại rõ rệt lên sợi đàn hồi cùng giảm lượng collagen. Ngược lại, SDS - đặc biệt ở mức 0,1% - vừa loại bỏ hoàn toàn nhân tế bào vừa bảo tồn tốt các thành phần ECM như collagen, elastin và laminin, song thời gian xử lý mạch lại không được tác giả đề cập đến. SDS 1% vẫn loại bỏ tế bào hiệu quả nhưng gây giảm elastin và collagen nhiều hơn SDS 0,1% [11] .

p-ISSN 1859 - 3461
e-ISSN 3030 - 4008

Xu hướng áp dụng SDS nồng độ thấp phối hợp với các kỹ thuật vật lý nhằm cân bằng tối ưu giữa hiệu quả loại bỏ tế bào và bảo tồn ECM được chú ý thời gian gần đây. Đơn cử, nghiên cứu của Nguyen và cộng sự (2024) trên động mạch cảnh lợn chỉ ra rằng sử dụng SDS 0,3% kết hợp đông - rã đông và truyền rửa trong 24 giờ đã đạt hiệu quả loại bỏ tế bào (DNA còn lại < 50 ng/mg), trong khi vẫn bảo tồn cấu trúc ECM, không làm thay đổi đáng kể các tính chất cơ học và hỗ trợ tốt cho tái tạo nội mô [10]. Trong nghiên cứu này, tác giả sử dụng hệ thống Bioreactor để truyền rửa, trong khi đó chúng tôi chỉ sử dụng hệ thống bơm nhu động và truyền rửa trong 6 giờ mang lại tính đơn giản cho quy trình xử lý. Sự khác biệt trong thời gian truyền rửa có thể đến từ đặc tính cấu trúc mô của từng loại mạch khác nhau.

Một đặc điểm thú vị trong nghiên cứu của chúng tôi đó là mặc dù được tiền xử lý bằng đông - rã đông, ngâm trong Trition X-100 trong 24 giờ và truyền rửa trong 6 giờ, các mẫu mạch thuộc nhóm này lại có độ bền kéo cải thiện độ bền kéo (3232 ± 400 kPa) so với mô nguyên bản (1656 ± 391 kPa). Sự gia tăng độ bền kéo này có thể được giải thích bởi ba cơ chế chính: (1) việc loại bỏ tế bào cơ trơn làm tăng mật độ tương đối của collagen trong mô; (2) quá trình khử tế bào nhẹ nhàng giữ được cấu trúc sợi collagen nguyên vẹn và mạng lưới elastin và (3) có thể xảy ra hiện tượng "crosslinking tự nhiên" giữa các sợi collagen sau khi loại bỏ protein tế bào. Cheng và cộng sự (2019) cũng ghi nhận hiện tượng tương tự trên động mạch cảnh lợn, cho thấy phương pháp đông - rã đông kết hợp SDS nồng độ thấp không chỉ không làm giảm mà còn có thể tăng cường độ bền kéo của mạch máu [7], [12].

Sự giảm độ biến dạng và tăng độ cứng của mạch sau xử lý khử tế bào có thể được giải thích thông qua các cơ chế chính.

Thứ nhất, việc loại bỏ hoàn toàn tế bào cơ trơn, thành phần chiếm 30 - 40% thể tích thành mạch, đã làm mất đi tính hấp phụ lực sinh lý, khiến chất nền ngoại bào (ECM) trở nên cứng hơn [7].

Thứ hai, quá trình tái tổ chức collagen và elastin đóng vai trò then chốt: SDS nồng độ thấp (0,3%) kích thích hiện tượng "crosslinking tự nhiên" giữa các sợi collagen, làm tăng mật độ sợi, đồng thời gây phân mảnh elastin dẫn đến giảm 35% độ đàn hồi [7].

Thứ ba, phương pháp đông - rã đông (-80^{0}C/ 37^{0}C) gây co rút sợi collagen và giảm độ ẩm ECM mudule đàn hồi.

Thứ tư, sự suy giảm glycosaminoglycans (GAGs) - thành phần giữ nước và điều hòa tính mềm dẻo của ECM - do tác động của chất tẩy đã làm khô cấu trúc mô. Kết quả về độ biến dạng tối đa và độ cứng của mẫu mạch tương đồng với nghiên cứu của Tuan-Mu và cộng sự (2020) khi ghi nhận giảm 35% độ biến dạng sau khi loại bỏ lớp abluminal [4], và Mallis và cộng sự (2020) khi báo cáo tăng 40% độ cứng do mất GAGs [13]. Mặc dù độ cứng tăng giúp mạch chịu được áp lực huyết động cao (> 300 mmHg), nhưng nó làm giảm độ giãn nở (compliance), từ đó có thể gây bất tương đồng cơ học với mạch chủ, dẫn đến nguy cơ tan sản nội mạc [7].

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã chứng minh rằng việc kết hợp kỹ thuật đông - rã đông với truyền rửa có áp lực dung dịch SDS nồng

p-ISSN 1859 - 3461
e-ISSN 3030 - 4008

độ thấp (0,3%) là phương pháp tối ưu để khử tế bào động mạch cuống rốn người (ĐMCR).

Quy trình này không chỉ đạt hiệu quả cao trong việc loại bỏ tế bào và DNA, mà còn bảo tồn cấu trúc chất nền ngoại bào (CNNB), đặc biệt là collagen và glycosaminoglycans, qua đó duy trì tốt các đặc tính cơ học cần thiết cho scaffold mạch máu nhỏ. Kết quả nghiên cứu cung cấp thêm bằng chứng quan trọng cho tính khả thi của việc ứng dụng động mạch cuống rốn vô bào như là giá thể tiềm năng trong kỹ thuật mô và tái tạo mạch máu, mở ra triển vọng lớn cho các ứng dụng lâm sàng trong tương lai. Tuy nhiên, các nghiên cứu tiếp theo cần tập trung vào đánh giá khả năng tái tạo nội mô, các thử nghiệm ex vivo và in vivo, cũng như khảo sát chi tiết hơn về các thông số xử lý để hoàn thiện hơn nữa chất lượng và hiệu quả ứng dụng của scaffold.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Di Francesco D., Pigliafreddo A., Casarella S., et al. (2023). Biological Materials for Tissue-Engineered Vascular Grafts: Overview of Recent Advancements. *Biomolecules*. 13(9): p. 1389.
2. Mallis P., Gontika I., Poulogiannopoulos T., et al. (2014). Evaluation of Decellularization in Umbilical Cord Artery. *Transplantation Proceedings*. 46(9): p. 3232-3239.
3. Massaro M.S., Kochová P., Pálek R., et al. (2022). Decellularization of Porcine Carotid Arteries: From the Vessel to the High-Quality Scaffold in Five Hours. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 10p. 833244.
4. Tuan-Mu H.-Y., Chang Y.-H., and Hu J.-J. (2020). Removal of an abluminal lining improves decellularization of human umbilical arteries. *Scientific Reports*. 10(1): p. 10556.
5. Rodríguez-Soto M.A., Polanía-Sandoval C.A., Aragón-Rivera A.M., et al. (2022). Small-Diameter Cell-Free Tissue-Engineered Vascular Grafts: Biomaterials and Manufacture Techniques to Reach Suitable Mechanical Properties. *Polymers*. 14(17): p. 3440.
6. Chen S., Li J., and Dong P. (2013). Utilization of Pulsatile Flow to Decellularize the Human Umbilical Arteries to Make Small-Caliber Blood Vessel Scaffolds. *Acta Cardiologica Sinica*. 29(5): p. 451-456.
7. Cheng J., Wang C., and Gu Y. (2019). Combination of freeze-thaw with detergents: A promising approach to the decellularization of porcine carotid arteries. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 30(2): p. 191-205.
8. Cheng J., Li J., Cai Z., et al. (2021). Decellularization of porcine carotid arteries using low-concentration sodium dodecyl sulfate. *The International Journal of Artificial Organs*. 44(7): p. 497–508.
9. Yuanming Li, Zhou Y., Qiao W., et al. (2023). Application of decellularized vascular matrix in small-diameter vascular grafts. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 10p. 1081233.
10. Nguyen N.T., Lam H.M., Bui T.Q., et al. (2024). Freezing and bioreactor in the low-concentration detergents: A novel approach in the decellularization of small-diameter arteries. *The International Journal of Artificial Organs*. 47(11): p. 816-825.
11. Rodríguez-Rodríguez V.E., Martínez-González B., Quiroga-Garza A., et al. (2018). Human Umbilical Vessels: Choosing the Optimal Decellularization Method. *ASAIO Journal*. 64(5): p. 575-580.
12. Nguyen T.-C., Nguyen T., Nguyen X.-H., et al. (2024). Fresh Human Umbilical Cord Arteries as a Potential Source for Small-Diameter Vascular Grafts. *ACS biomaterials science & engineering*.
13. Mallis P., Katsimpoulas M., Kostakis A., et al. (2020). Vitrified Human Umbilical Arteries as Potential Grafts for Vascular Tissue Engineering. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 17(3): p. 285–299.