

ĐÁNH GIÁ ĐỘ BỀN VÀ TÍNH TƯƠNG TÍCH SINH HỌC TRÊN TẾ BÀO CỦA GIÁ THỂ VÔ BÀO TỪ ĐỘNG MẠCH CUỐNG Rốn NGƯỜI ĐƯỢC XỬ LÝ BẰNG GLUTARALDEHYDE

Nguyễn Trung Chức¹✉, Trần Nhật Hoàng², Lê Tài Thế³,
Bùi Khắc Cường⁴, Hoàng Thị Mỹ Nhung², Đỗ Xuân Hai¹

¹Học viện Quân y

²Đại học Khoa học tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội

³Viện 69, Bộ Tư lệnh Bảo vệ Lăng Chủ tịch Hồ Chí Minh

⁴Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu này nhằm đánh giá độ bền sinh học, cơ học và tính tương thích tế bào của giá thể vô bào từ động mạch cuống rốn (DUA - Decellularized Umbilical Artery) được xử lý bằng Glutaraldehyde (GA) 0,1%.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Giá thể vô bào động mạch cuống rốn sau khi được xử lý bằng GA 0,1% (G - DUA) được ngâm trong dung dịch PBS (pH 7,4) ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 2 tuần, 4 tuần và 8 tuần, sự thay đổi về khả năng chịu lực và khối lượng còn lại được so sánh với nhóm mạch chưa được xử lý bằng GA (DUA). Tính tương thích sinh học được đánh giá bằng thử nghiệm độc tính gián tiếp (MTT assay), khả năng di trú (Scratch wound healing assay) và sự bám dính trực tiếp của nguyên bào sợi lên bề mặt giá thể (G - DUA) thông qua nhuộm H&E.

Kết quả: Quá trình xử lý bằng Glutaraldehyde cho thấy hiệu quả rõ rệt trong việc cải thiện độ bền của giá thể. Về sự thay đổi khối lượng, tại tuần thứ 4, nhóm DUA đã mất khoảng 25% khối lượng (còn lại $75,2 \pm 2,41\%$), trong khi nhóm G - DUA gần như không thay đổi ($101,94 \pm 0,77\%$)¹. Sự suy giảm này tiếp diễn đến tuần thứ 8, khối lượng còn lại của nhóm DUA chỉ là $55,38 \pm 2,18\%$, trong khi con số này ở nhóm G - DUA là $99,46 \pm 1,361\%$ ($p < 0,0001$).

Tương tự, về độ bền cơ học, khả năng chịu lực của nhóm DUA đã giảm gần một nửa sau 4 tuần ($2,886 \pm 0,67$ N) và tiếp tục giảm mạnh ở tuần thứ 8 ($1 \pm 0,31$ N). Ngược lại, nhóm G - DUA duy trì độ bền tốt hơn một cách đáng kể, với khả năng chịu lực lần lượt là $5,526 \pm 0,67$ N tại tuần 4 và $4,4 \pm 0,58$ N tại tuần 8 ($p < 0,0001$). Về tính tương thích sinh học, kết quả cho thấy dịch chiết từ G - DUA không gây độc cho tế bào; tỷ lệ tế

¹Chịu trách nhiệm: Nguyễn Trung Chức, Học viện Quân y

Email: nguyentrungck@gmail.com

Ngày gửi bài: 05/8/2025; Ngày nhận xét: 10/10/2025; Ngày duyệt bài: 26/10/2025

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

bào sống đạt trên 99% ở tất cả các thời điểm, tương đương với nhóm đối chứng âm PTFE ($p > 0,05$)¹. Giá thể G - DUA cũng không ảnh hưởng đến sự di trú và bám dính của nguyên bào sợi trên bề mặt.

Kết luận: Việc xử lý bằng Glutaraldehyde giúp cải thiện đáng kể độ bền cơ học và sinh học của giá thể DUA mà không gây độc tính tế bào nguyên bào sợi chuột trong ống nghiệm.

Từ khoá: Giá thể vô bào, Glutaraldehyde, liên kết chéo, tương thích sinh học.

ABSTRACT

Objectives: This study aimed to evaluate the biomechanical durability and cytocompatibility of decellularized umbilical artery (DUA) scaffolds treated with 0.1% glutaraldehyde (GA).

Subjects and methods: The 0.1% GA-treated decellularized umbilical artery scaffolds (G - DUA) were incubated in PBS (pH 7.4) at 37°C for 2, 4, and 8 weeks. Changes in tensile strength and remaining mass were compared with the untreated group (DUA). Biocompatibility was assessed using an indirect cytotoxicity test (MTT assay), a cell migration test (scratch wound healing assay), and by evaluating the direct adhesion of fibroblasts onto the G - DUA scaffold surface via H&E staining.

Results: Glutaraldehyde treatment demonstrated a pronounced effect on enhancing the durability of the scaffold. Regarding mass change, at week 4, the DUA group lost approximately 25% of its mass ($75.2 \pm 2.41\%$ remaining), whereas the G - DUA group showed almost no change ($101.94 \pm 0.77\%$). This degradation continued to week 8, where the remaining mass of the DUA group was only $55.38 \pm 2.18\%$, in contrast to $99.46 \pm 1.361\%$ for the G-DUA group ($p < 0.0001$). Similarly, in terms of mechanical strength, the tensile strength of the DUA group decreased by nearly half after 4 weeks (2.886 ± 0.67 N) and continued to decline sharply by week 8 (1 ± 0.31 N). Conversely, the G-DUA group maintained significantly better durability, with tensile strengths of 5.526 ± 0.67 N at week 4 and 4.4 ± 0.58 N at week 8, respectively ($p < 0.0001$). Regarding biocompatibility, the results indicated that the extract from G-DUA was not cytotoxic; cell viability rates exceeded 99% at all time points, comparable to the PTFE negative control group ($p > 0.05$). The G - DUA scaffold also did not adversely affect migration and adhesion of fibroblasts on its surface.

Conclusion: Glutaraldehyde treatment significantly enhances the mechanical strength and biodegradation resistance of decellularized human umbilical artery scaffolds without inducing in vitro cytotoxicity in fibroblasts.

Keywords: Decellularized scaffold, Glutaraldehyde, Cross-linking, Biocompatibility.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhu cầu về các mảnh ghép mạch máu đường kính nhỏ (< 6 mm) trong phẫu thuật tim mạch, đặc biệt là phẫu thuật bắc cầu động mạch vành, ngày càng gia tăng do sự phổ biến của các bệnh lý như xơ vữa động mạch [1]. Hiện nay, mạch máu tự thân vẫn được coi là tiêu chuẩn vàng, tuy nhiên, nguồn cung cấp này rất hạn chế, với ước tính chỉ khoảng 20% bệnh nhân có mạch máu phù hợp để sử dụng [2]. Các loại mạch máu tổng hợp từ vật liệu expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) và polyethylene terephthalate (Dacron) thường dẫn đến các vấn đề nghiêm trọng như huyết khối, tỷ lệ duy trì thông suốt thấp và không tương thích về mặt cơ học khi ghép cho các mạch máu đường kính nhỏ [3]. Để giải quyết những hạn chế này, kỹ thuật mô (Tissue engineering) nổi lên như một hướng tiếp cận đầy tiềm năng với mục tiêu tạo ra các mạch máu nhân tạo có cấu trúc và chức năng tương tự mạch máu tự nhiên, hứa hẹn khắc phục các nhược điểm của vật liệu tổng hợp [4].

Trong các hướng tiếp cận để chế tạo mạch máu nhân tạo, khung chất nền ngoại bào (Extracellular Matrix - ECM) thu được từ quá trình khử tế bào (decellularization) các nguồn mạch máu đồng loài hoặc dị loài đã thu hút sự chú ý rộng rãi. Quá trình này giúp loại bỏ các thành phần tế bào mang tính kháng nguyên, nhờ đó giảm thiểu phản ứng miễn dịch và thải ghép, trong khi vẫn bảo tồn được cấu trúc vi mô và các thành phần sinh học quan trọng của ECM như collagen và elastin [2]. Collagen đóng vai trò then chốt trong việc đảm bảo độ bền cơ học, cung cấp cấu trúc nền cho sự bám dính và tăng sinh của tế bào [5], trong khi elastin cung cấp khả năng đàn hồi, giúp

cấu trúc ghép chịu được áp lực trong quá trình lưu thông máu, đồng thời elastin cũng điều chỉnh sự di cư và tăng sinh của tế bào cơ trơn mạch máu từ đó ức chế sự tăng sản lớp nội mạc, đặc biệt tại vị trí miến nối nơi có sự bất tương đồng về độ đàn hồi giữa mạch ghép và mạch nhận [6]. Nhờ những ưu điểm này, ECM có khả năng tương thích sinh học cao và hỗ trợ quá trình tái tạo mô của cơ thể chủ. Trong số các nguồn mô tiềm năng, động mạch cuống rốn người (Human umbilical arteries - HUAs) là một lựa chọn khả thi để tạo ra các mảnh ghép mạch máu đường kính nhỏ với chiều dài phù hợp và không cần các thủ thuật xâm lấn để thu thập [1].

Tuy nhiên, một trong những nhược điểm của quá trình khử tế bào động mạch cuống rốn là nguy cơ làm tổn hại đến các thành phần chịu lực của ECM, dẫn đến sự suy giảm các đặc tính cơ học của mạch ghép, nghiên cứu trên thực nghiệm của Gui (2009) và Hsia (2023) sử dụng động mạch cuống rốn khử tế bào là mạch ghép đều ghi nhận tình trạng giãn mạch sau khi ghép [5], [7]. Glutaraldehyde (GA) là một hoá chất thường được sử dụng trong các vật liệu cấy ghép như van tim sinh học [8] để tăng cường sự ổn định của cấu trúc ECM, cải thiện độ bền cơ học và kiểm soát tốc độ phân hủy sinh học. GA tạo ra các liên kết bền vững với các nhóm amin trong protein trong đó chủ yếu là collagen, giúp tăng cường đáng kể độ bền và kéo dài thời gian tồn tại của vật liệu trong cơ thể [9]. Song lượng GA tồn dư sau quá trình xử lý có thể gây độc cho tế bào và là một trong những nguyên nhân chính dẫn đến hiện tượng vôi hóa mảnh ghép, làm suy giảm chức năng và tuổi thọ của vật liệu cấy ghép [10].

Đến nay, việc ứng dụng GA để tăng cường ổn định và khả năng chịu lực của giá thể vô bào từ động mạch cuống rốn có thể là một giải pháp tiềm năng và vẫn chưa được nghiên cứu một cách hệ thống. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu bước đầu đánh giá các độ ổn định cơ học, sự phân hủy sinh học và tính tương thích *in vitro* của giá thể vô bào từ động mạch cuống rốn người được xử lý bằng glutaraldehyde.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Giá thể vô bào từ động mạch cuống rốn người (DUA), xử lý bằng Glutaraldehyde (G - DUA) được chuẩn bị Bộ môn Phẫu thuật Thực hành Thực nghiệm (Học viện Quân y).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thu thập, bảo quản, vận chuyển động mạch cuống rốn người

Dây rốn được bảo quản ở 4°C ngay sau khi sinh. Tất cả các mẫu dây rốn được xử lý trong vòng 12 giờ kể từ khi thu thập. Các đoạn dây rốn, dài khoảng 5-7 cm, trải qua quy trình làm sạch. Đầu tiên, chúng được rửa bằng Betadine 5% (Sigma, Hoa Kỳ) trong khoảng 30 giây, sau đó rửa hai lần với PBS chứa 1% Penicillin - Streptomycin trong (Gibco, Hoa Kỳ) 1 phút mỗi lần. Các động mạch dây rốn sau đó được tách vô khuẩn. Tưới rửa lòng mạch bằng PBS lạnh cho đến khi cặn máu được loại bỏ hoàn toàn. Các mạch máu sau đó được bảo quản trong môi trường DMEM (Gibco, Hoa Kỳ), bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (Gibco, Hoa Kỳ) và 10% dimethyl sulfoxide (Kanto chemical, Nhật Bản) rồi bảo quản ở -80°C.

2.2.2. Phương pháp tạo và xử lý giá thể DUA bằng glutaraldehyde.

Động mạch cuống rốn được khử tế bào theo quy trình đã được nghiên cứu trước đây của nhóm nghiên cứu [11]. Cụ thể, động mạch cuống rốn được xử lý sốc nhiệt để phá vỡ màng tế bào bằng 3 chu kỳ đông - rã đông từ nhiệt độ - 80°C đến 25°C, sau đó được ngâm trong dung dịch Triton X-100 trong 24 giờ rồi truyền rửa bằng hệ thống bơm nhu động với dung dịch SDS 0,3%/EDTA trong 6 giờ. Sau đó, mẫu được rửa trong PBS 24 giờ. Tiếp đó, mẫu được xử lý bằng glutaraldehyde 0,1% trong 6 giờ [12], rửa trong PBS 24 giờ, thay dung dịch mới mỗi 8 giờ, phần glutaraldehyde dư thừa được trung hoà bằng glycine 0,2 M trong 24 giờ [8].

2.2.3. Phương pháp đánh giá độ bền sinh học của giá thể vô bào DUA và G-DUA

- Đánh giá sự thay đổi khối lượng:

Thử nghiệm phân hủy trong dung dịch đệm phosphate (PBS) là một phương pháp được sử dụng để nghiên cứu cách mà vật liệu phân hủy trong một dung dịch mô phỏng điều kiện của dịch cơ thể [13]. Thử nghiệm thực hiện bằng cách như sau: Các mẫu từ hai nhóm G-DUA và DUA (n = 5 cho mỗi nhóm tại mỗi mốc thời gian) được cắt thành đoạn dài 1 cm, sấy khô và cân để xác định khối lượng khô ban đầu (m_0). Mỗi mẫu được ngâm trong 5 mL dung dịch PBS 1X, pH 7,4 vô trùng và ủ ở 37°C. Tại các mốc thời gian tuần 2 (T2), tuần 4 (T4) và tuần 8 (T8), các mẫu được lấy ra, rửa sạch, sấy khô và cân để xác định khối lượng cuối cùng (m_t) [14], [15].

Tỷ lệ khối lượng còn lại của mỗi nhóm được tính theo công thức:

$$\% \text{ Khối lượng còn lại} = (m_t/m_0) \times 100\%$$

Khối lượng còn lại được so sánh giữa 2 nhóm để đánh giá mức độ bị thủy phân trong môi trường PBS.

- *Đánh giá khả năng chịu lực còn lại:*

Các mẫu từ hai nhóm G - DUA và DUA được chuẩn bị ($n = 5$ ở mỗi thời điểm [16]). Khả năng chịu lực (N) của các mẫu được đo tại hai thời điểm: ban đầu (T_0), sau 4 tuần (T_4) và 8 tuần ngâm trong PBS ở 37°C . Các mẫu được đánh giá bằng hệ thống máy QC-506B1 (Qctech, Đài Loan). Khả năng chịu lực sẽ được ghi nhận để so sánh sự thay đổi về đặc tính chịu lực giữa hai nhóm theo thời gian.

2.2.4. Phương pháp đánh giá độ bền sinh học của giá thể vô bào G - DUA

- *Dòng tế bào sử dụng để đánh giá độc tính*

Nguyên bào sợi được phân lập từ da chuột cống trắng theo quy trình sau [17]: Lớp thượng bì được loại bỏ bằng cách ủ với Trypsin-EDTA (Gibco, Hoa Kỳ). Sau đó, phần trung bì được xử lý bằng Collagenase Type I (Gibco, Hoa Kỳ) trong 3 giờ để thu nhận tế bào. Tế bào được lọc, ly tâm và nuôi cấy trong môi trường hoàn chỉnh (DMEM F12 với 10% FBS và 1% Penicillin-Streptomycin) ở điều kiện 37°C , 5% CO_2 . Môi trường được thay định kỳ sau 2 - 3 ngày, và tế bào được thu hoạch khi đạt độ phủ 80 - 90%. Nguyên bào sợi sẽ được cấy chuyển đến lần cấy chuyển thứ 2 đến thứ 5 để sử dụng cho các thí nghiệm.

- *Đánh giá độc tính tế bào gián tiếp*

Độc tính tế bào gián tiếp của giá thể vô bào G - DUA được đánh giá theo tiêu

chuẩn ISO 10993-5 (Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2020) [18], sử dụng phương pháp dịch chiết. Vật liệu Polytetrafluoroethylene (PTFE) được sử dụng làm vật liệu đối chứng âm tính. Polytetrafluoroethylene (PTFE), đặc biệt là ePTFE, là một vật liệu phổ biến cho các mạch ghép vì nó tương thích sinh học, có tính hình thành cục máu đông thấp [19]. DMSO (Kanto Chemical, Nhật Bản) được sử dụng ở nồng độ 10% làm chất gây độc tế bào.

Đầu tiên, dịch chiết vật liệu được chuẩn bị bằng cách ngâm G-DUA và PTFE trong môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh (DMEM/F12, 10% FBS, 1% Penicillin - Streptomycin) ở 37°C trong 24 giờ, với tỷ lệ bề mặt/thể tích là $2,5 \text{ ml/cm}^2$ [10].

Phương pháp đánh giá tính tương thích sinh học của giá thể G-DUA được tham khảo theo quy trình của Nguyễn Thị Lê Na và cộng sự [20]: Tế bào nguyên bào sợi được gieo vào đĩa 96 giếng với mật độ 8×10^3 tế bào/ cm^2 trong 100 μL môi trường nuôi cấy đầy đủ (DMEM/F12, 10% FBS, 1% Penicillin - Streptomycin) và nuôi cấy trong 24 giờ. Sau đó, môi trường cũ được thay thế bằng 100 μL dịch chiết từ các nhóm vật liệu ($n = 6$) đã được chuẩn bị ở trên trong 37°C , 5% CO_2 . Các nhóm thí nghiệm bao gồm: (1) Nhóm G-DUA - Mẫu thử nghiệm, (2) Nhóm PTFE - Vật liệu đối chứng âm tính, (3) Nhóm Mẫu trắng (Blank) - môi trường nuôi cấy thông thường, và (4) DMSO (môi trường chứa 10% DMSO) - Đối chứng dương tính.

Sau 24, 48 và 72 giờ tiếp xúc với dịch chiết, độc tính với nguyên bào sợi được đánh giá bằng:

- Phương pháp định tính: tế bào được quan sát bằng nhuộm crystal violet. Cụ thể:

+ Với dịch chiết không gây độc tính, hình thái nguyên bào sợi khoẻ mạnh đặc trưng bởi hình dạng hình thoi đặc trưng, kích thước tế bào tương đương với nhóm đối chứng và bào tương đồng nhất, không xuất hiện các hạt hoặc không bào bất thường, mật độ tế bào tương đương với nhóm chứng môi trường nuôi cấy thông thường.

+ Với dịch chiết gây độc tính, tế bào có thể co tròn hoặc mất hình dạng hình thoi đặc trưng, kích thước có thể thay đổi lớn hơn hoặc nhỏ hơn bình thường, và bào tương có thể không đồng nhất, xuất hiện các hạt hoặc không bào bất thường, hoặc bị co rút. Về mật độ, số lượng tế bào sẽ ít hơn so với nhóm chứng môi trường nuôi cấy do tế bào chết hoặc bong ra, và sự phân bố trở nên không đều trên bề mặt nuôi cấy, có thể tập trung thành đám hoặc tạo thành các vùng trống.

- Phương pháp định lượng: tỷ lệ tế bào sống được định lượng bằng thử nghiệm MTT (Invitrogen, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nguyên lý của thử nghiệm MTT dựa trên khả năng của các enzyme reductase trong ty thể (mitochondria) của tế bào sống để khử muối tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) thành tinh thể formazan có màu tím. Tinh thể formazan này tích lũy bên trong tế bào. Các tinh thể formazan được hoà tan trong DMSO. Độ hấp thụ quang (absorbance) của dung dịch được đo bằng máy quang phổ (spectrophotometer) tại bước sóng thường là 570 nm. Độ hấp thụ quang tỷ lệ thuận với số lượng tế bào sống trong mẫu. Để thực hiện thí nghiệm, môi trường thử nghiệm được thay thế bằng 110 μ L dung dịch MTT (100 μ L môi trường DMEM/F12 +10 μ L dung dịch MTT (12 mM)). Sau 4 giờ ủ với tế bào, dung dịch MTT được hút bỏ

và 100 μ L DMSO được thêm vào mỗi giếng. Độ hấp thụ quang (OD) được đo ở bước sóng 570 nm. Tỷ lệ sống được tính theo công thức [16]:

$$\text{Tỷ lệ sống (\%)} = (\text{OD}_{\text{thí nghiệm}}/\text{OD}_{\text{blank}}) \times 100\%$$

Tỷ lệ lớn hơn 70% có nghĩa là mẫu G-DUA không gây độc với tế bào [12], [16].

- **Đánh giá khả năng di trú của tế bào (Scratch Wound Healing Assay)**

Phương pháp đánh giá khả năng di trú của tế bào được tham khảo theo quy trình của tác giả Nguyễn Thị Lê Na và cộng sự [20]. Nguyên bào sợi từ da chuột được gieo vào các giếng của đĩa 24 giếng với mật độ 8×10^3 tế bào/giếng. Khi các tế bào đạt đến mật độ > 95% của đĩa nuôi cấy, môi trường nuôi cấy được bổ sung mitomycin (Thermo Fisher, Hoa Kỳ) đạt nồng độ 10 μ g/mL trong 2 giờ để ức chế sự tăng sinh tế bào trước khi tạo vết xước bằng cách sử dụng dụng cụ cào (SLP, Hàn Quốc). Các giếng sau đó được rửa hai lần bằng PBS (Gibco, Hoa Kỳ) để loại bỏ các tế bào đã bong ra. Môi trường cũ được thay thế bằng các loại dịch chiết đã chuẩn bị từ mẫu G-DUA, PTFE với đối chứng là môi trường nuôi cấy (ĐC). Hình ảnh của vùng trống được chụp tại các thời điểm 0, 12, 24, 48 và 54 giờ bằng kính hiển vi đảo ngược. Mức độ di trú của tế bào vào vùng trống được phân tích và định lượng bằng phần mềm ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Hoa kỳ). Thí nghiệm được lặp lại ba lần (n = 3).

- **Đánh giá sự bám dính tế bào nguyên bào sợi lên giá thể G-DUA**

Thí nghiệm đánh giá sự bám dính nguyên bào sợi lên giá thể được thực hiện theo quy trình của tác giả Nguyễn Thị Ngọc

Mỹ và cộng sự [12]. Các mẫu giá thể G - DUA (n = 5) (kích thước 5 x 5 mm) được chiếu tia cực tím trong 2 giờ, ngâm trong cồn y tế 75% trong 1 giờ, sau đó rửa lại bằng dung dịch Natri clorua 0,9% 3 lần mỗi lần 30 phút và đặt vào giếng của đĩa 24 giếng [21]. Nguyên bào sợi được gieo trực tiếp lên bề mặt mỗi mẫu với mật độ 5×10^4 tế bào/mẫu. Sau khi nuôi cấy trong 48 giờ tại điều kiện 37°C, 5% CO₂, các mẫu được thu thập, cố định trong dung dịch formalin 10% trong 24 giờ để cố định cấu trúc mô.

Các mẫu sau đó được nhuộm H&E để đánh giá sự có mặt của nguyên bào sợi trên giá thể. Quy trình cụ thể như sau: Các mẫu sau khi cố định trong formalin 10% được khử nước tuần tự bằng ethanol với các nồng độ tăng dần: 50%, 70%, 80%, 90%, và cuối cùng là 100%, mỗi bước kéo dài trong 30 phút. Tiếp theo, mẫu được ngâm trong xylene 3 lần x 30 phút để loại bỏ ethanol hoàn toàn. Mẫu sau đó được nhúng trong paraffin 60⁰ trong 12 giờ trước khi chuyển đúc. Các lát cắt paraffin có độ dày 4 µm được thực hiện bằng máy cắt lát microtome HM325 (Thermo Scientific, Hoa Kỳ), sau đó được loại paraffin và nhuộm bằng hematoxylin và eosin (Cancer Diagnostics, Hoa Kỳ). Hình ảnh nguyên bào sợi trên giá thể được đánh giá bằng kính hiển vi Eclipse Ei (Nikon, Nhật Bản).

2.2.5. Hoá chất sử dụng trong nghiên cứu

- Dung dịch: Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7,4) (Gibco, Hoa Kỳ), Trypsin-EDTA (Gibco, Hoa Kỳ), dung dịch Collagenase Typel (Gibco, Hoa Kỳ).

- Môi trường nuôi cấy: DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) (Gibco, Hoa Kỳ) bổ sung 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, Hoa Kỳ)

và 1% Penicillin - Streptomycin (Gibco, Hoa Kỳ).

- Hóa chất phân tích: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Invitrogen, Hoa Kỳ), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Kanto Chemical, Nhật Bản).

2.3. Địa điểm nghiên cứu

Thí nghiệm đánh giá độ bền sinh học và cơ học của giá thể G-DUA được thực hiện tại Bộ môn Phẫu thuật thực hành, Học viện Quân y.

Thí nghiệm đánh giá độc tính và tính tương thích sinh học được thực hiện tại Khoa Sinh học, Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học quốc gia Hà Nội.

2.4. Đạo đức trong nghiên cứu

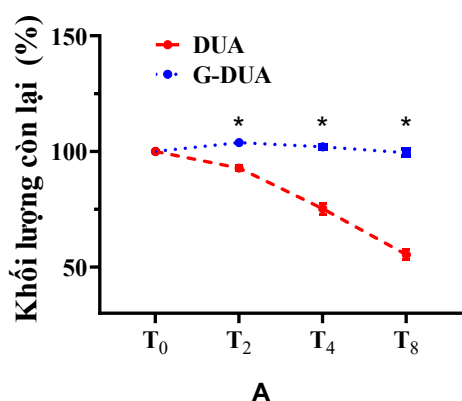
Mẫu động mạch dây rốn được cung cấp bởi đề tài VINIF.2020.DA07, theo các quy trình được phê duyệt bởi Hội đồng Đạo đức của Bệnh viện Đa khoa Quốc tế Vinmec (số 40/2020/QĐ-VINMEC), tuân thủ Tuyên ngôn Helsinki.

Nghiên cứu trên động vật được thực hiện theo sự chấp thuận của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu trên động vật, Học viện Quân y số 07/CNChT-HĐĐĐĐV.

2.5. Phân tích Thống kê

Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm GraphPad Prism 8.4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, Hoa Kỳ). Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (SD). Kiểm định Shapiro-Wilk được sử dụng để đánh giá sự phân phối chuẩn của dữ liệu, và kiểm định Levene để đánh giá tính đồng nhất của phương sai. Đối với dữ liệu tuân theo phân phối chuẩn, phân tích

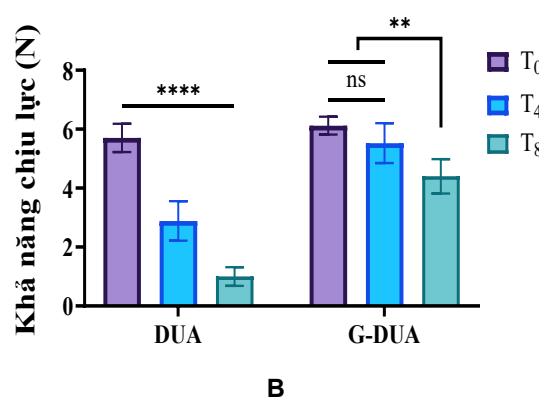
phương sai (ANOVA) được tiến hành để so sánh đa nhóm, kiểm định hậu nghiệm bằng Tukey post-hoc. Trong trường hợp phân phối không chuẩn, kiểm định Kruskal - Wallis được sử dụng để so sánh đa nhóm, sau đó là kiểm định Dunn để hiệu chỉnh các so sánh cặp. Sự khác biệt được coi là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.



3. KẾT QUẢ

3.1. Đánh giá độ bền sinh học và cơ học của giá thể vô bào G - DUA

Để mô phỏng sử dụng phân hủy sinh học trong môi trường dịch thể một cách đơn giản nhất chúng tôi đã sử dụng PBS (Phosphate - Buffered Saline), pH 7,4.



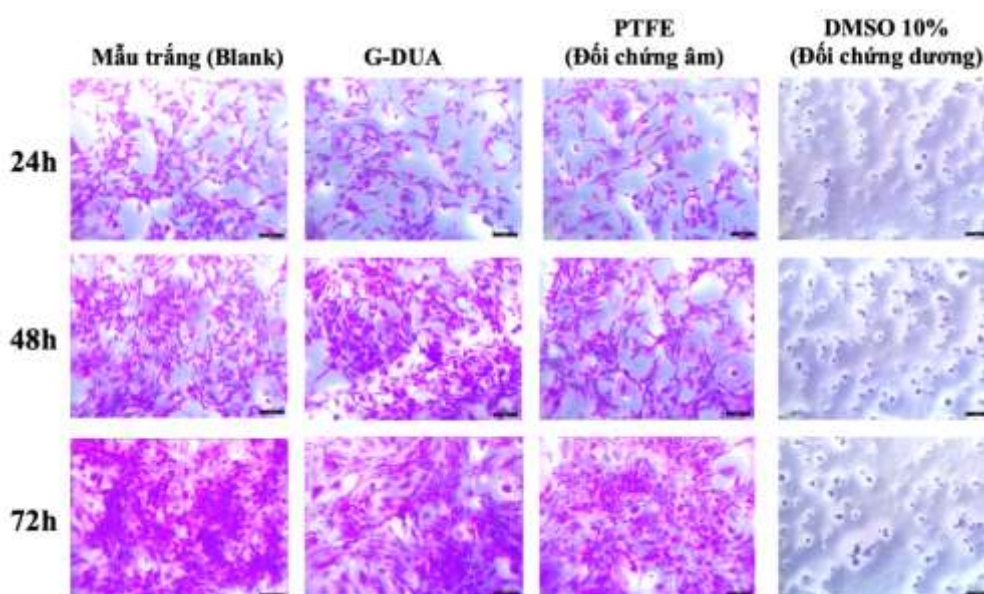
Hình 1. (A) Biểu đồ so sánh phần trăm khối lượng còn lại của mẫu G - DUA và DUA tại các thời điểm 0, 2, 4 và 8 tuần. * $p < 0,05$: sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với DUA. (B) Đánh giá độ bền cơ học của giá thể trước và sau khi ngâm trong PBS 4 tuần. ns: sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. * $p < 0,05$: Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Kết quả về sự phân hủy sinh học cho thấy nhóm G - DUA duy trì được khối lượng gần trong thời gian 8 tuần. Cụ thể, khối lượng còn lại của nhóm G - DUA tăng nhẹ tại tuần 2 ($103,84 \pm 1,021\%$) và tuần thứ 4 ($101,94 \pm 0,77\%$) và sau đó giảm không đáng kể tại tuần thứ 8 ($99,46 \pm 1,361\%$) (Hình 1A). Ngược lại, khi không được xử lý bằng GA các mẫu bị thủy phân nhanh chóng trong môi trường PBS, dẫn đến sự suy giảm khối lượng đáng kể theo thời gian, cụ thể khối lượng giảm xuống còn $92,82 \pm 1,22\%$ ở tuần 2, $75,2 \pm 2,41\%$ ở tuần 4, và chỉ còn $55,38 \pm 2,18\%$ tại cuối tuần thứ 8. Sự khác biệt này là có ý nghĩa thống kê tại tất cả các thời điểm khảo sát ($p < 0,0001$, kiểm định ANOVA, Hình 1A).

Đánh giá độ bền cơ học của giá thể cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa nhóm DUA và G-DUA 4. Trong khi nhóm G-DUA duy trì khả năng chịu lực tương đối ổn định trong 4 tuần đầu (giảm không đáng kể từ $6,118 \pm 0,30$ N xuống $5,526 \pm 0,67$ N, $p > 0,05$), nhóm DUA cho thấy sự suy giảm đáng kể (giảm gần một nửa từ $5,706 \pm 0,48$ N xuống $2,886 \pm 0,67$ N, $p < 0,0001$) 4. Đến tuần thứ 8, khả năng chịu lực của nhóm G - DUA giảm xuống $4,4 \pm 0,58$ N, tuy nhiên vẫn cao hơn đáng kể so với nhóm DUA ($1 \pm 0,31$ N, $p < 0,0001$) (Hình 1B).

Kết quả này cho thấy quá trình liên kết chéo bằng GA cải thiện được độ bền cơ học và khả năng kháng phân hủy của giá thể trong điều kiện *in vitro*.

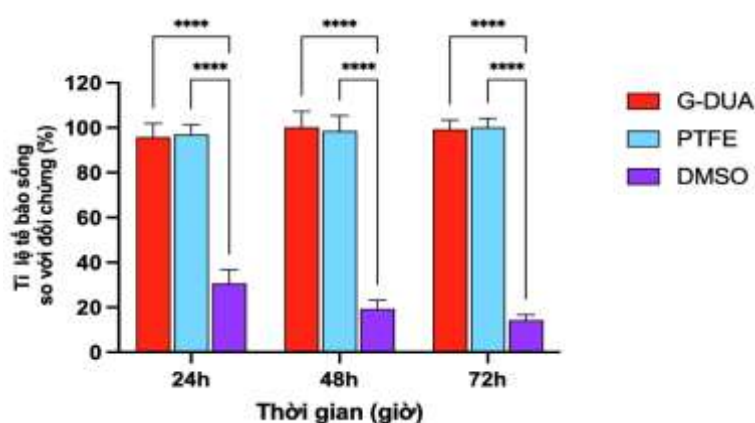
3.2. Kết quả đánh giá tương thích sinh học của giá thể G-DUA



Hình 2. Hình thái và mật độ của tế bào nguyên bào sợi trên nhuộm crystal violet sau khi được nuôi cấy trong các môi trường khác nhau tại các thời điểm 24, 48 và 72 giờ

Hình ảnh hiển vi quang học cho thấy tế bào trong nhóm đối chứng âm vẫn duy trì hình dạng thon dài, tăng sinh tốt trong khi tế bào trong nhóm đối chứng dương bị co tròn và bong ra khỏi bề mặt nuôi cấy. Kết quả các nhóm chứng cho thấy thí nghiệm đang tiến hành tốt và kết quả thu được đáng tin cậy. Ở các nhóm thí nghiệm, sau 24, 48 và

72 giờ, tế bào nguyên bào sợi được nuôi cấy trong dịch chiết G - DUA và vật liệu tham chiếu PTFE đều duy trì hình thái hình thoi khỏe mạnh và tăng sinh ổn định, với mật độ tương đương nhóm đối chứng âm. Những kết quả này chứng tỏ dịch chiết từ G - DUA không gây độc cho nguyên bào sợi, tương tự như vật liệu y tế PTFE.

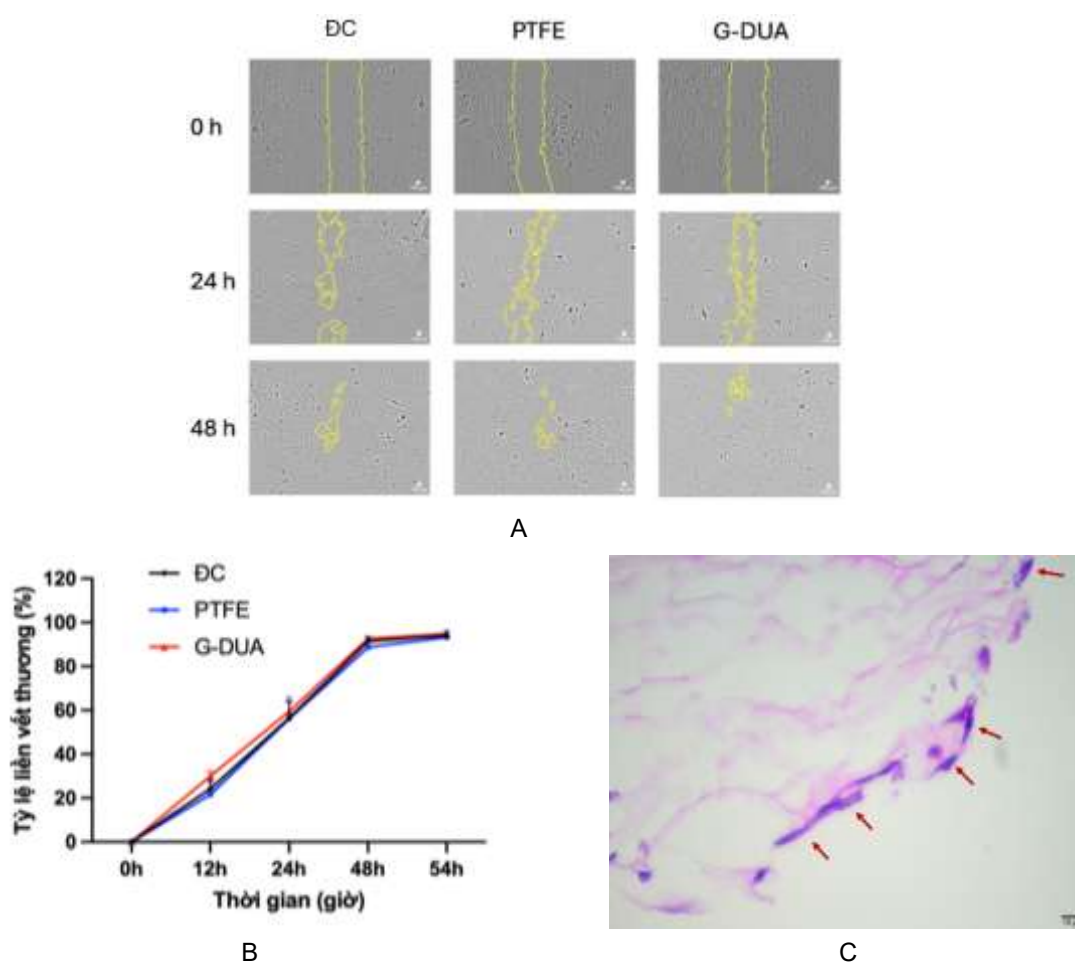


Hình 3. Đánh giá định lượng sự tăng sinh của tế bào nguyên bào sợi (MDFs) thông qua thử nghiệm MTT. Biểu đồ thể hiện giá trị mật độ quang (OD) ở bước sóng 570nm, phản ánh số lượng tế bào sống trong các nhóm thí nghiệm tại các thời điểm 24, 48 và 72 giờ

Tương đồng với kết quả hình thái tế bào, thử nghiệm MTT cho thấy tại các thời điểm 24, 48 và 72 giờ, tỷ lệ tế bào sống của nhóm G - DUA lần lượt là $95,86\% \pm 5,95\%$, $100,24\% \pm 7,00\%$ và $99,29\% \pm 4,11\%$, cao hơn ngưỡng an toàn 70% theo tiêu chuẩn ISO 10993-5 và tương đương với nhóm vật liệu tham chiếu PTFE (lần lượt là $97,07\% \pm 4,36\%$, $98,60\% \pm 6,72\%$ và $100,26\% \pm 3,86\%$, $p > 0,05$). Trong khi đó, nhóm DMSO cho thấy độc tính tế bào

nghiêm trọng, với tỷ lệ sống giảm mạnh từ $30,64\% \pm 6,16\%$ sau 24 giờ xuống chỉ còn $14,37\% \pm 2,25\%$ sau 72 giờ ($p < 0,0001$) khi so sánh với 2 nhóm G - DUA và PTFE. Những kết quả này chứng tỏ dịch chiết từ G - DUA không gây độc tế bào trên dòng tế bào nguyên bào sợi da chuột, tương tự vật liệu y tế PTFE.

3.2. Kết đánh giá khả năng di trú của tế bào



Hình 4. Đánh giá khả năng di trú của tế bào nguyên bào sợi bằng thử nghiệm làm lành vết thương (Scratch Wound Healing Assay).
(A) Hình ảnh đại diện khả năng di trú của tế bào tại các thời điểm 0, 24 và 48 giờ.
(B) Biểu đồ định lượng tỷ lệ liền vết thương (%) theo thời gian.
(C) Hình ảnh nhuộm H&E nguyên bào sợi bám dính trên giá thể (Mũi tên đỏ).
Scale bar = 10 μ m.

Cả ba nhóm (ĐC, PTFE, và G - DUA) đều cho thấy một xu hướng liền vết thương tương tự nhau theo thời gian. Đường cong biểu diễn của G-DUA (màu đỏ) gần như trùng khớp với đường cong của nhóm đối chứng và PTFE trong suốt quá trình thí nghiệm, đạt tỷ lệ liền vết thương trên 90% sau khoảng 48-54 giờ. Hình ảnh nhuộm H&E cung cấp bằng chứng về tương tác trực tiếp giữa tế bào và bề mặt vật liệu. Các tế bào nguyên bào sợi (mũi tên đỏ) đã bám dính thành công, trải phẳng và thể hiện hình thái thon dài đặc trưng trên bề mặt của giá thể G - DUA (Hình 4C). Từ các kết quả thu được, có thể kết luận rằng vật liệu G - DUA không gây ảnh hưởng bất lợi đến khả năng bám dính và di chuyển của tế bào nguyên bào sợi da chuột, cho thấy tính tương thích sinh học tốt và môi trường bề mặt thuận lợi cho hoạt động của tế bào.

4. BÀN LUẬN

Hiện nay, các nguồn mạch máu cho phẫu thuật ghép mạch đường kính nhỏ (< 6mm) đều có những hạn chế nhất định. Với mạch ghép tự thân như tĩnh mạch hiển lớn, động mạch ngực trong mặc dù đạt được hiệu quả sau ghép lớn nhất song nguồn cung hạn chế, khoảng một phần ba số bệnh nhân không đủ điều kiện để ghép mạch máu tự thân do thiếu mạch máu tự thân phù hợp do các bệnh lý toàn thân, đã lấy cho trước đó. Phẫu thuật lấy mạch tự thân bản thân nó có thể dẫn đến thiếu máu chi, viêm mô tế bào, bệnh thần kinh, nhiễm trùng vết thương và vết thương không lành tại vị trí lấy mạch [22]. Các vật liệu tổng hợp như PTFE và Dacron thường gặp các vấn đề nghiêm trọng như huyết khối, tỷ lệ duy trì thông mạch thấp [7]. Các vật liệu này có bề mặt không tương thích với máu,

dẫn đến kích hoạt quá trình đông máu và hình thành huyết khối, bề mặt kỵ nước của chúng làm tăng tương tác với tế bào máu và hấp phụ protein, thúc đẩy quá trình đông máu, thêm vào đó sự khác biệt về độ đàn hồi và độ cứng giữa vật liệu tổng hợp và mạch máu tự nhiên gây ra sự không tương thích cơ học tại miệng nối, dẫn đến tăng sinh nội mạc tại vị trí nối và làm hẹp lòng mạch. Giá thể vô bào từ động mạch là một tổ chức vô bào có cấu trúc phức tạp, được tạo ra bởi sự kết hợp của các protein chức năng và cấu trúc do tế bào chủ tiết ra [23]. Các protein này được tiết ra theo cách đặc hiệu cho mô để đáp ứng các nhu cầu cho mô, để tạo ra một cấu trúc tổng hợp với các đặc tính cơ học và các phân tử tín hiệu phù hợp để hỗ trợ chức năng mạch máu bình thường và cân bằng nội môi tế bào [23]. Vì vậy, đây có thể là một vật liệu lý tưởng để điều chế các mạch máu nhân tạo. Giá thể vô bào từ động mạch cuống rốn được nghiên cứu từ lâu mới kỳ vọng tạo ra một dạng mạch ghép có thể sử dụng sẵn [5], [7], [24], [25].

Hiện tượng giãn mạch đã được ghi nhận bởi Gui (2009) và Hsia (2023) khi nghiên cứu ghép giá thể vô bào từ động mạch cuống rốn trên mô hình động vật [5], [7]. Xử lý giá thể vô bào bằng GA có thể là một giải pháp để tăng cường độ bền sinh học và cơ học của giá thể vô bào từ động mạch cuống rốn, trên cơ sở phương pháp này đã được ứng dụng rộng rãi trong xử lý van tim sinh học [8]. Nghiên cứu này được thực thiết kế để đánh giá độ bền và tính tương thích sinh học của giá thể vô bào từ động mạch cuống rốn người được xử lý bằng tác nhân liên kết chéo Glutaraldehyde (G - DUA). Các kết quả ban đầu thu được cho thấy phương pháp gia cường này cải

thiện đáng kể sự ổn định về mặt cơ học và khả năng kháng phân hủy sinh học của giá thể mà không gây độc tính tế bào.

Kết quả nghiên cứu cho thấy việc được xử lý bằng glutaraldehyde 0,1% có thể cải thiện đáng kể độ bền của giá thể vô bào động mạch cuống rốn trong môi trường PBS (pH 7,4 37⁰), dung dịch để môi trường mô phỏng dịch cơ thể. Sau khi ngâm 8 tuần, nhóm DUA mất gần một nửa khối lượng, trong khi khối lượng của nhóm G - DUA gần như được bảo toàn (99,46%) (Hình 1A). Tương tự, độ bền cơ học của nhóm G - DUA gần như không đổi sau 4 tuần, trái ngược hoàn toàn với sự suy giảm gần 50% khả năng chịu lực ở nhóm DUA (Hình 1B). Sự ổn định này có thể được lý giải bởi cơ chế hoạt động của glutaraldehyde, một tác nhân tạo ra các liên kết cộng hóa trị bền vững giữa các chuỗi protein, chủ yếu là collagen trong cấu trúc chất nền ngoại bào (ECM) [10]. Tương tự, độ bền cơ học của nhóm G - DUA được duy trì ổn định trong 4 tuần đầu ($5,526 \pm 0,7$ N), giảm khoảng 27% sau 8 tuần ($4,4 \pm 0,58$ N), trong khi đó với giá thể không được xử lý với GA, khả năng chịu lực giảm nhanh chóng gần 50% sau 4 tuần đầu ($2,886 \pm 0,67$ N) và 80% sau 8 tuần ($1 \pm 0,31$ N) (Hình 1B).

Sự ổn định sau khi được xử lý bằng GA do quá trình phản ứng với các nhóm amin bậc một của lysine và hydroxylysine trong collagen cạnh nhau tạo thành các base Schiff trung gian, tạo ra các liên kết cộng hóa trị bền vững giữa các chuỗi protein sau đó chuyển đổi các monome sợi lỏng lẻo thành các polyme sợi ổn định, chủ yếu là collagen trong cấu trúc nền ngoại bào (ECM) [10]. Việc hình thành một mạng

lưới liên kết chéo dày đặc giúp cấu trúc chất nền ngoại bào (ECM) trở nên kháng lại sự phân hủy của các enzyme và quá trình thủy phân tự nhiên, một yếu tố cốt lõi để đảm bảo mảnh ghép duy trì được sự toàn vẹn cấu trúc trong giai đoạn đầu sau cấy ghép.

Mặc dù hiệu quả trong việc tăng cường độ bền cho các loại mảnh ghép tim mạch, việc sử dụng Glutaraldehyde luôn đi kèm với lo ngại về độc tính tế bào do lượng GA tồn dư [7]. Do đó, xác định độc tính trên mô hình tế bào là đánh giá ban đầu của bất kỳ loại vật liệu y tế nào [26]. Nguyên bào sợi đóng vai trò quan trọng bằng cách cung cấp môi trường hỗ trợ cho sự hình thành mạch máu bằng cách tiết ra các yếu tố tăng trưởng và các protein cấu trúc nên chất nền ngoại bào (ECM), điều chỉnh hành vi của tế bào nội mô và cung cấp một khung cấu trúc. Chúng cũng tăng cường sự nảy chồi của tế bào nội mô và sự hình thành mạng lưới, và là yếu tố thiết yếu cho cả việc xây dựng và ổn định các cấu trúc mạch nhân tạo [27]. Mô hình sử dụng nguyên bào sợi đã được sử dụng bởi nhiều tác giả nhằm đánh giá sự tồn dư GA trong mảnh ghép. Trong nghiên cứu này, kết quả đánh giá tương thích sinh học trong nghiên cứu của chúng tôi đã cho thấy những kết quả bước đầu khả quan. Trong thử nghiệm đánh giá định tính, hình thái tế bào được đánh giá bằng nhuộm crystal violet (Hình 2). Theo đó, kết quả nhuộm mẫu trắng (blank) (tế bào được nuôi trong môi trường nuôi cơ bản), nguyên bào sợi có dạng hình sợi, thuôn dài ở 2 đầu với nhân nhỏ nằm ở vị trí trung tâm (Hình 2, cột mẫu trắng (blank)). Đây là hình dạng đặc trưng của tế bào dòng nguyên bào sợi khỏe mạnh. Đối với mẫu đối chứng dương, DMSO nồng độ

10% là chất gây độc tế bào. Sau 24 giờ, phần lớn tế bào trong nhóm đối chứng bị chết, co tròn, bong khỏi bề mặt nuôi, còn rất ít tế bào còn bám lại trên đĩa nuôi cấy (Hình 2, cột đối chứng dương tính). Hai nhóm đối chứng âm và đối chứng dương cho thấy thử nghiệm diễn ra ổn định, quy trình đảm bảo tính tin cậy. Kết quả nhóm G - DUA và nhóm vật liệu đối chứng âm (PTFE) cho thấy gần như không xuất hiện tế bào co tròn, bong tróc khỏi bề mặt nuôi, phần lớn tế bào vẫn tăng sinh tốt, tế bào vẫn duy trì hình dạng thon dài, nhân nhỏ ở vị trí trung tâm, mật độ tế bào tăng dần theo thời gian tương tự như tế bào trong nhóm blank (Hình 2, cột G - DUA và PTFE). Kết quả quan sát ban đầu cho thấy dịch chiết không gây độc cho nguyên bào sợi. Trong thử nghiệm đánh giá định lượng, dịch chiết từ G - DUA không cho thấy bất kỳ ảnh hưởng tiêu cực nào đến khả năng tăng sinh của nguyên bào sợi, với tỷ lệ tế bào sống tương đương với nhóm chứng và vật liệu y tế tham chiếu là PTFE (Hình 3). Kết quả này chứng tỏ rằng glycine đã loại bỏ hiệu quả lượng glutaraldehyde tự do, giảm thiểu nguy cơ gây độc. Hơn nữa, thử nghiệm đánh giá khả năng di trú của tế bào cũng cho thấy dịch chiết G - DUA không ảnh hưởng đến quá trình di trú của tế bào, một hoạt động sinh lý nền tảng cho việc tái tạo mô (Hình 4 A, B). Quan sát hình thái học qua nhuộm H&E cũng xác nhận rằng nguyên bào sợi có khả năng bám dính và trải đều trên bề mặt giá thể, đây là bước khởi đầu quan trọng cho sự tích hợp của vật liệu cấy ghép với mô chủ (Hình 4 C).

Tuy nhiên, nghiên cứu này vẫn còn một số hạn chế. Toàn bộ các đánh giá mới chỉ được thực hiện trong điều kiện in vitro.

Môi trường in vivo phức tạp hơn rất nhiều với sự tham gia của hệ miễn dịch, các yếu tố huyết động và các quá trình tái tạo mô kéo dài. Thử nghiệm ngâm trong PBS chỉ mô phỏng môi trường dịch cơ thể đơn giản, trong khi môi trường in vivo thực tế chứa nhiều loại enzyme có khả năng phân hủy vật liệu. Việc sử dụng enzyme như collagenase, elastase, hoặc lysozyme trong thí nghiệm in vitro có thể cung cấp thông tin giá trị về tốc độ và cơ chế phân hủy của vật liệu dưới tác động của các enzyme đặc hiệu.

Để đánh giá toàn diện tiềm năng của G - DUA trong ứng dụng làm mảnh ghép mạch máu, cần nghiên cứu chi tiết tương tác giữa G - DUA với tế bào nội mô và tế bào cơ trơn mạch máu, cũng như ảnh hưởng của yếu tố tăng trưởng và stress cơ học lên tế bào. Bên cạnh đó, khả năng chống huyết khối và chống viêm của G - DUA cũng cần được tiếp tục đánh giá để có được một góc nhìn toàn diện về vật liệu này.

5. KẾT LUẬN

Kết quả từ nghiên cứu của chúng tôi cho thấy việc xử lý giá thể vô bào từ động mạch cuống rốn người bằng Glutaraldehyde (G - DUA) góp phần bảo tồn được độ bền cơ học và khả năng kháng phân hủy sinh học trong môi trường in vitro sau 8 tuần thử nghiệm. Đồng thời, vật liệu G - DUA không biểu hiện độc tính và không gây ảnh hưởng tiêu cực đến sự phát triển hay di trú của nguyên bào sợi. Những phát hiện này gợi ý rằng G - DUA là một vật liệu tiềm năng, cần được tiếp tục nghiên cứu và phát triển sâu hơn cho ứng

dụng chế tạo mảnh ghép mạch máu đường kính nhỏ trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wong V., Gada S., Singh M., et al. (2023). The Development of Small-Caliber Vascular Grafts Using Human Umbilical Artery: An Evaluation of Methods. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 29(1), 1-10.
2. Mallis P., Michalopoulos E., Pantsios P., et al. (2019). Recellularization potential of small diameter vascular grafts derived from human umbilical artery. *BME*, 30(1), 61-71.
3. Mallis P., Kostakis A., Stavropoulos-Giokas C., et al. (2020). Future Perspectives in Small-Diameter Vascular Graft Engineering. *Bioengineering*, 7(4), 160.
4. Afarin Neishabouri, Alireza Soltani Khaboushan, Faeze Daghigh, et al. (2022). Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10.
5. Gui L., Muto A., Chan S.A., et al. (2009). Development of Decellularized Human Umbilical Arteries as Small-Diameter Vascular Grafts. *Tissue Engineering Part A*, 15(9), 2665-2676.
6. Obiweluozor F.O., Emechebe G.A., Kim D.-W., et al. (2020). Considerations in the Development of Small-Diameter Vascular Graft as an Alternative for Bypass and Reconstructive Surgeries: A Review. *Cardiovasc Eng Tech*, 11(5), 495-521.
7. Hsia K., Wang T.-S., Liu C.-S., et al. (2023). Decellularized Human Umbilical Artery Exhibits Adequate Endothelialization in Xenogenic Transplantation. *Biotechnol Bioproc E*, 28(3), 439-450.
8. Jiang Z., Wu Z., Deng D., et al. (2022). Improved Cytocompatibility and Reduced Calcification of Glutaraldehyde-Crosslinked Bovine Pericardium by Modification with Glutathione. *Front Bioeng Biotechnol*, 10, 844010.
9. Liu C., Chen D., Li Z., et al. (2022). Adventitial Collagen Cross-Linking by Glutaraldehyde Reinforcing Human Saphenous Vein - Implication for Coronary Artery Bypass Grafting. *Braz J Cardiovasc Surg*, 37(4), 439-446.
10. Qi X., Jiang Z., Song M., et al. (2022). A Novel Crosslinking Method for Improving the Anti-Calcification Ability and Extracellular Matrix Stability in Transcatheter Heart Valves. *Front Bioeng Biotechnol*, 10, 909771.
11. Nguyễn T.C., Lê T.T., Bùi K.C., et al. (2025). 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. *ynthvb*, (3), 96-106.
12. Nguyen M.T.N. and Tran H.L.B. (2018). Effect of Modified Bovine Pericardium on Human Gingival Fibroblasts in vitro. *Cells Tissues Organs*, 206(6), 296-307.
13. Woo S.-H. and Wee J.-W. (2024). Characterization of accelerated hydrolysis degradation of poly (lactic acid) in phosphate buffered saline solution. *Polymer Degradation and Stability*, 223, 110726.
14. Yang L., Li X., Wu Y., et al. (2020). Preparation of PU/Fibrin Vascular Scaffold with Good Biomechanical Properties and Evaluation of Its Performance in vitro and in vivo. *IJN*, Volume 15, 8697-8715.
15. Alasvand N., Behnamghader A., Milan P.B., et al. (2023). Tissue-engineered small-diameter vascular grafts containing novel copper-doped bioactive glass biomaterials to promote angiogenic activity and endothelial regeneration. *Materials Today Bio*, 20, 100647.
16. Liu J., Li B., Jing H., et al. (2020). Curcumin-crosslinked acellular bovine pericardium for the application of calcification inhibition heart valves. *Biomed Mater*, 15(4), 045002.
17. Walmsley G.G., Maan Z.N., Hu M.S., et al. (2016). Murine Dermal Fibroblast Isolation by FACS. *J Vis Exp*, (107), 53430.

18. Bộ Khoa học và Công nghệ (2020). 10993-5:2009 Đánh giá sinh học trang thiết bị y tế - Phần 5: Phép thử độc tính tế bào in vitro..
19. Russu E., Mureşan A.V., Ivănescu A.D., et al. (2023). Polytetrafluorethylene (PTFE) vs. Polyester (Dacron®) Grafts in Critical Limb Ischemia Salvage. *IJERPH*, 20(2), 1235.
20. Nguyen L.-N.T., Do X.-H., Pham H.B., et al. (2024). Different Biocompatibility and Radioprotective Activity of Squid Melanin Nanoparticles on Human Stromal Cells. *ACS Omega*, 9(35), 36926-36938.
21. Zhao L., Li X., Yang L., et al. (2021). Evaluation of remodeling and regeneration of electrospun PCL/fibrin vascular grafts in vivo. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 118, 111441.
22. Lopera Higueta M. and Griffiths L.G. (2020). Small Diameter Xenogeneic Extracellular Matrix Scaffolds for Vascular Applications. *Tissue Eng Part B Rev*, 26(1), 26-45.
23. Higueta M.L., Giraldo J.F.L., Sarrafian T.L., et al. (2021). Tissue engineered bovine saphenous vein extracellular matrix scaffolds produced via antigen removal achieve high in vivo patency rates. *Acta Biomater*, 134, 144-159.
24. Mallis P., Michalopoulos E., Katsimpoulas M., et al. (2024). Development of histocompatible vessel conduits utilizing human umbilical arteries: Emerging evidence for the establishment of a vascular graft bank..
25. Mallis P., Michalopoulos E., Dinou A., et al. (2018). Development of HLA-matched vascular grafts utilizing decellularized human umbilical artery. *Human Immunology*, 79(12), 855-860.
26. Wiegand C. and Hipler U.-C. (2009). Evaluation of Biocompatibility and Cytotoxicity Using Keratinocyte and Fibroblast Cultures. *Skin Pharmacol Physiol*, 22(2), 74-82.
27. Kosyakova N., Kao D.D., Figetakis M., et al. (2020). Differential functional roles of fibroblasts and pericytes in the formation of tissue-engineered microvascular networks in vitro. *npj Regen Med*, 5(1), 1.