

ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ TRYPSIN - EDTA ĐẾN HIỆU QUẢ TÁCH TẾ BÀO VÀ BẢO TOÀN CẤU TRÚC DA TRONG CHẾ TẠO TẤM TRUNG BÌ DA ĐỒNG LOẠI KHÔNG TẾ BÀO

Ngô Ngọc Hà[✉], Phạm Thị Huệ, Đinh Tiến Chung,
Nguyễn Thị Thu Hà, Nguyễn Tiến Dũng
Bệnh viện Bỏng quốc gia Lê Hữu Trác

TÓM TẮT

Tấm trung bì da người không tế bào (hADM) là vật liệu sinh học có nguồn gốc từ da người, được loại bỏ hoàn toàn lớp biểu bì và các thành phần tế bào của lớp trung bì, trong khi vẫn giữ lại cấu trúc collagen của trung bì.

Mục tiêu: *Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ enzyme Trypsin - EDTA đến hiệu quả tách tế bào và mức độ bảo toàn cấu trúc trung bì, nhằm xác định nồng độ tối ưu trong quy trình chế tạo hADM.*

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: *Nghiên cứu được thực hiện trên 30 mẫu da người hiến, chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm ($n = 10$), xử lý với 3 nồng độ Trypsin - EDTA khác nhau: 0,5X (0,125%), 1X (0,25%) và 1,5X (0,375%). Mỗi mẫu trải qua quy trình đông - rã, sau đó được xử lý enzyme hai bước: Ngâm ở 4°C trong 24 giờ, rồi ủ ở 37°C trong 3 giờ. Hiệu quả tách biểu bì và loại bỏ tế bào được đánh giá bằng chỉ số tách biểu bì và phân tích mô học.*

Kết quả: *Tăng nồng độ Trypsin - EDTA có mối tương quan rõ rệt với tỷ lệ tách biểu bì cao hơn sau xử lý enzyme ở 4°C trong 24 giờ ($p < 0,05$), lần lượt là $15,24 \pm 8,94\%$; $36,84 \pm 7,44\%$ và $45,99 \pm 7,10\%$. Sau xử lý enzyme ở 37°C trong 3 giờ, tỷ lệ tách biểu bì tiếp tục tăng, tương ứng từ $28,25 \pm 10,33\%$ đến $93,98 \pm 13,08\%$ và $95,47 \pm 11,99\%$; tuy nhiên sự khác biệt giữa nhóm 1X và 1,5X không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Hình ảnh mô học xác nhận loại bỏ hoàn toàn tế bào ở cả ba nhóm. Tuy nhiên, nhóm 1,5X cho thấy cấu trúc collagen bị phá vỡ nhiều hơn, mật độ sợi giảm và phân bố lỏng lẻo hơn.*

Kết luận: *Trypsin - EDTA là enzyme hiệu quả trong tách biểu bì và loại tế bào khi chế tạo hADM. Nồng độ 0,25% (1X) được xác định là tối ưu, giúp đạt hiệu quả loại bỏ tế bào cao đồng thời bảo tồn tốt cấu trúc collagen.*

Từ khóa: *Trung bì không tế bào, khử tế bào, Trypsin - EDTA, da đồng loại, công nghệ mô.*

¹Chịu trách nhiệm: Ngô Ngọc Hà, Bệnh viện Bỏng Quốc gia Lê Hữu Trác

Email: ngocha87.nib@gmail.com

Ngày gửi bài: 15/9/2025; Ngày nhận xét: 11/10/2025; Ngày duyệt bài: 26/10/2025

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

ABSTRACT

Human acellular dermal matrix (hADM) is a biological scaffold derived from human skin in which the epidermis and cellular components of the dermis are completely removed, while preserving the collagen structure of the dermis.

Objective: *This study aimed to evaluate the effect of different Trypsin-EDTA concentrations on cell removal efficiency and structural preservation of the dermis, in order to determine the optimal concentration for the preparation of hADM.*

Subjects and methods: *Thirty donated human skin samples were randomly assigned into three groups (n = 10 each) and treated with different Trypsin-EDTA concentrations: 0.5X (0.125%), 1X (0.25%) and 1.5X (0.375%). All samples underwent repeated freeze-thaw cycles, followed by a two-step enzymatic decellularization process: immersion at 4°C for 24 hours, then incubation at 37°C for 3 hours. Epidermal separation efficiency and cellular removal were evaluated using epidermal detachment rates and histological analysis.*

Results: *Increasing Trypsin - EDTA concentrations showed a strong correlation with higher epidermal separation rates after enzymatic treatment at 4°C for 24 hours ($p < 0.05$), with mean $15.24 \pm 8.94\%$, $36.84 \pm 7.44\%$, and $45.99 \pm 7.10\%$ for the 0.5X, 1X and 1.5X groups, respectively. After the second enzymatic treatment at 37°C for 3 hours, the separation rates continued to rise, reaching $28.25 \pm 10.33\%$, $93.98 \pm 13.08\%$, and $95.47 \pm 11.99\%$, respectively. However, the difference between the 1X and 1.5X groups was not statistically significant ($p > 0.05$). Histological evaluation confirmed complete cell removal in all groups. However, the 1.5X group exhibited more pronounced disruption of collagen structure, with lower fiber density and looser organization.*

Conclusion: *Trypsin - EDTA proved to be an effective agent for both epidermal separation and dermal decellularization in hADM preparation. A concentration of 0.25% (1X) was identified as optimal, providing high cell removal efficiency while better preserving collagen structure.*

Keywords: *Acellular dermal matrix, Decellularization, Trypsin - EDTA, Allogenic skin, Tissue engineering*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tái tạo mô da và điều trị các tổn thương da phức tạp, đặc biệt là vết thương sâu, bỏng, loét và các khuyết hổng mô vẫn là một thách thức trong lâm sàng hiện nay. Mặc dù phương pháp điều trị truyền thống như ghép da tự thân vẫn đem lại hiệu quả cao, tuy nhiên chúng bị giới hạn bởi nguồn da hạn chế, nguy cơ biến chứng tại vùng cho da, tăng gánh nặng điều trị. Tắm trung

bì da người không tế bào (Human Acellular Dermal Matrix - hADM) là vật liệu sinh học có nguồn gốc từ da người, được xử lý để loại bỏ toàn bộ tế bào của người hiến tặng (donor), trong khi vẫn bảo tồn mạng lưới nền ngoại bào (extracellular matrix - ECM), bao gồm các thành phần quan trọng như collagen, elastin, glycosaminoglycans và fibronectin [1, 2]. Nhờ đó, ADM duy trì được cấu trúc ba chiều và các tín hiệu sinh

học hỗ trợ cho sự bám dính, tăng sinh và biệt hóa tế bào bản địa sau khi cấy ghép. ADM hoạt động như một scaffold sinh học, cho phép các tế bào của cơ thể người nhận xâm nhập và tái tạo mô mới, đồng thời giảm thiểu nguy cơ phản ứng miễn dịch so với mô có tế bào [3]. Vì vậy, ADM được ứng dụng rộng rãi và hiệu quả trong phẫu thuật tạo hình, điều trị vết thương và tái tạo da.

Trong quá trình chế tạo ADM, một bước quan trọng và quyết định chất lượng sản phẩm là quá trình khử tế bào. Mục tiêu là loại bỏ toàn bộ tế bào và vật liệu di truyền (DNA, RNA) đồng thời bảo tồn tối đa cấu trúc nền ngoại bào. Kỹ thuật này cần được tối ưu hóa cẩn thận để đạt được sự cân bằng giữa hiệu quả loại bỏ tế bào và bảo tồn các thành phần sinh học có lợi. Trong nhiều nghiên cứu, phương pháp sử dụng enzyme Trypsin kết hợp với EDTA đã được chứng minh có hiệu quả cao trong việc loại bỏ tế bào. Trypsin là enzyme phân giải protein, có khả năng phá vỡ liên kết giữa biểu bì và trung bì; trong khi EDTA là chất tạo phức với ion canxi, làm suy giảm liên kết giữa tế bào và nền. Tuy nhiên, nếu xử lý không phù hợp, enzyme có thể gây tổn hại đến các thành phần collagen hoặc làm suy giảm tính chất sinh học của tấm trung bì [4].

Mặc dù quy trình tách biểu bì bằng Trypsin - EDTA đã được sử dụng trong nhiều nghiên cứu quốc tế, các dữ liệu đánh giá hệ thống về mức độ loại bỏ tế bào theo các điều kiện enzyme khác nhau vẫn còn hạn chế, đặc biệt trong bối cảnh ứng dụng tại Việt Nam.

Hiện nay, chưa có quy trình tiêu chuẩn hóa cho việc tách biểu bì trong chế tạo ADM từ da người. Điều này đặt ra nhu cầu

cần thiết về việc xây dựng quy trình chuẩn hóa, giúp tối ưu hóa cả hiệu quả khử tế bào và bảo toàn cấu trúc sinh học của tấm trung bì không tế bào từ da người.

Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu: đánh giá ảnh hưởng của nồng độ Trypsin - EDTA đến hiệu quả tách tế bào và mức độ bảo toàn cấu trúc của lớp trung bì từ đó đề xuất nồng độ tối ưu trong chế tạo tấm trung bì da đồng loại không tế bào. Kết quả của nghiên cứu có thể đóng vai trò cơ sở khoa học cho việc phát triển sản phẩm ADM có chất lượng ổn định, hướng tới quy trình tối ưu trong sản xuất nhằm ứng dụng trong lâm sàng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu nghiên cứu

Các thiết bị chủ yếu: Phòng sạch, Kính hiển vi đảo ngược, tủ hood lọc không khí vô trùng, Tủ ấm, Tủ lạnh âm sâu (-80°C), Pipet Aid.

Hóa chất chủ yếu: Trypsin - EDTA 0,25% (1X); PBS (Phosphate - Buffered Salines); DMEM high glucose (Dulbeco's Modified Eagle Media)

Nguồn mô nghiên cứu: Các mẫu da đồng loại từ người hiến da được thu hồi tại Ngân hàng Mô và Tế bào, Bệnh viện Bông Quốc gia Lê Hữu Trác. Tất cả các mẫu da đảm bảo các tiêu chuẩn thu hồi da đồng loại của Ngân hàng Mô.

2.2. Thiết kế nghiên cứu

Quy trình được xây dựng dựa trên các phương pháp khử tế bào đã được công bố, sử dụng kết hợp phương pháp vật lý và enzyme. Khoảng nồng độ enzyme Trypsin - EDTA trong nghiên cứu này được lựa

chọn dựa trên tổng hợp các nghiên cứu trước đây về da người và mô động vật, đồng thời điều chỉnh qua các thử nghiệm sơ bộ của nhóm nghiên cứu. Phương pháp nghiên cứu tập trung vào việc tối ưu hóa nồng độ enzyme để đạt hiệu quả loại bỏ tế bào cao nhất mà vẫn bảo tồn được cấu trúc nền ngoại bào (ECM).

* Chuẩn bị mẫu da nghiên cứu:

- Các mẫu da được cắt thành từng mảnh có kích thước khoảng 3×4 cm, độ dày khoảng 0,8 - 1,2 mm. Rửa các mảnh da 2 lần bằng dung dịch PBS để làm sạch các chất bẩn và dị vật. Bảo quản tươi trong dung dịch bảo quản tươi da đồng loại ở nhiệt độ 4 độ C trước khi tiến hành thí nghiệm.

- Các mẫu da được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm, mỗi nhóm 10 mẫu, được xử lý với 3 nồng độ enzyme Trypsin - EDTA khác nhau: Nhóm 1: 0,5X; Nhóm 2: 1X (0,25%); Nhóm 3: 1,5X.

* Quy trình nghiên cứu:

- Bước 1: Xử lý bằng phương pháp đông lạnh - rã đông: tất cả các mẫu da được đưa vào tủ đông ở nhiệt độ -80°C mà không sử dụng chất bảo quản lạnh sâu trong vòng 24 giờ sau đó rã đông trong nước ấm (37°C) cho đến khi tan hoàn toàn. Lặp lại quá trình này 3 - 5 lần.

- Bước 2: Xử lý bằng enzyme lần 1 (T1): sau khi rã đông, các mẫu da của từng nhóm được ngâm trong dung dịch Trypsin - EDTA với nồng độ tương ứng (0,5X; 1X; 1,5X) ở ngăn mát tủ lạnh (4°C) trong 24 giờ.

- Bước 3: Xử lý bằng enzyme lần 2 (T2): Sau 24 giờ các mẫu được chuyển sang ngâm trong dung dịch Trypsin - EDTA mới cùng nồng độ ở tủ ấm (37°C) trong 3 giờ.

2.3. Đánh giá kết quả

- Các chỉ tiêu đánh giá:

+ Kích thước mẫu da: Đo bằng thước kỹ thuật (đến 1 mm)

+ Tỷ lệ tách biểu bì sau mỗi lần xử lý enzyme: Sau khi xử lý enzyme, dễ dàng quan sát thấy phần biểu bì (màu nâu) sẽ tách ra khỏi lớp trung bì (màu trắng), đo diện tích mẫu da và diện tích vùng chưa tách biểu bì bằng phần mềm ImageJ. Tính tỷ lệ tách biểu bì theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ tách biểu bì (\%)} = \frac{\text{Diện tích mẫu} - \text{Diện tích vùng chưa tách}}{\text{Diện tích mẫu}} \times 100$$

- Đánh giá cấu trúc mô học: Các mẫu da được cố định bằng formalin, nhúng parafin và cắt thành các lát mỏng. Các lát cắt này được nhuộm bằng Hematoxylin & Eosin (H&E) để đánh giá cấu trúc và mức độ loại bỏ tế bào và nhuộm Masson Trichrome để đánh giá cấu trúc collagen.

- Các thời điểm đánh giá mô học: sau xử lý bằng phương pháp đông lạnh - rã đông, sau xử lý bằng enzyme 2 lần, so sánh với mẫu da bình thường không qua xử lý. Các xét nghiệm mô học được thực hiện tại Bộ môn Giải phẫu bệnh lý (Học viện Quân y).

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Phân tích số liệu được thực hiện bằng phần mềm SPSS 10. Các biến định lượng được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn và so sánh bằng kiểm định T-test độc lập. Các biến định tính được trình bày bằng tần suất và tỷ lệ phần trăm, so sánh bằng kiểm định chi bình phương hoặc kiểm định chính xác Fisher khi cần. Mức ý nghĩa thống kê được xác định khi $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Hiệu quả tách biểu bì theo từng nồng độ enzyme

Bảng 3.1. So sánh diện tích các mẫu da nghiên cứu

Chỉ tiêu \ Nhóm	Nhóm 1 (n = 10)	Nhóm 2 (n = 10)	Nhóm 3 (n = 10)
Diện tích mảnh da (cm ²)	11,47 ± 1,89	12,01 ± 1,85	11,85 ± 1,63
p	p ₂₋₁ , p ₃₋₁ , p ₃₋₂ > 0,05		

Nhận xét: Diện tích mảnh da trung bình ở cả 3 nhóm nghiên cứu là tương đương nhau (p > 0,05).

Bảng 3.2. Tỷ lệ tách biểu bì các mẫu da sau xử lý enzyme lần 1

Chỉ tiêu \ Nhóm	Nhóm 1 (n = 10)	Nhóm 2 (n = 10)	Nhóm 3 (n = 10)
Tỷ lệ tách biểu bì T1 (%)	15,24 ± 8,94	36,84 ± 7,44	45,99 ± 7,10
p	p ₂₋₁ , p ₃₋₁ < 0,01; p ₃₋₂ < 0,05		

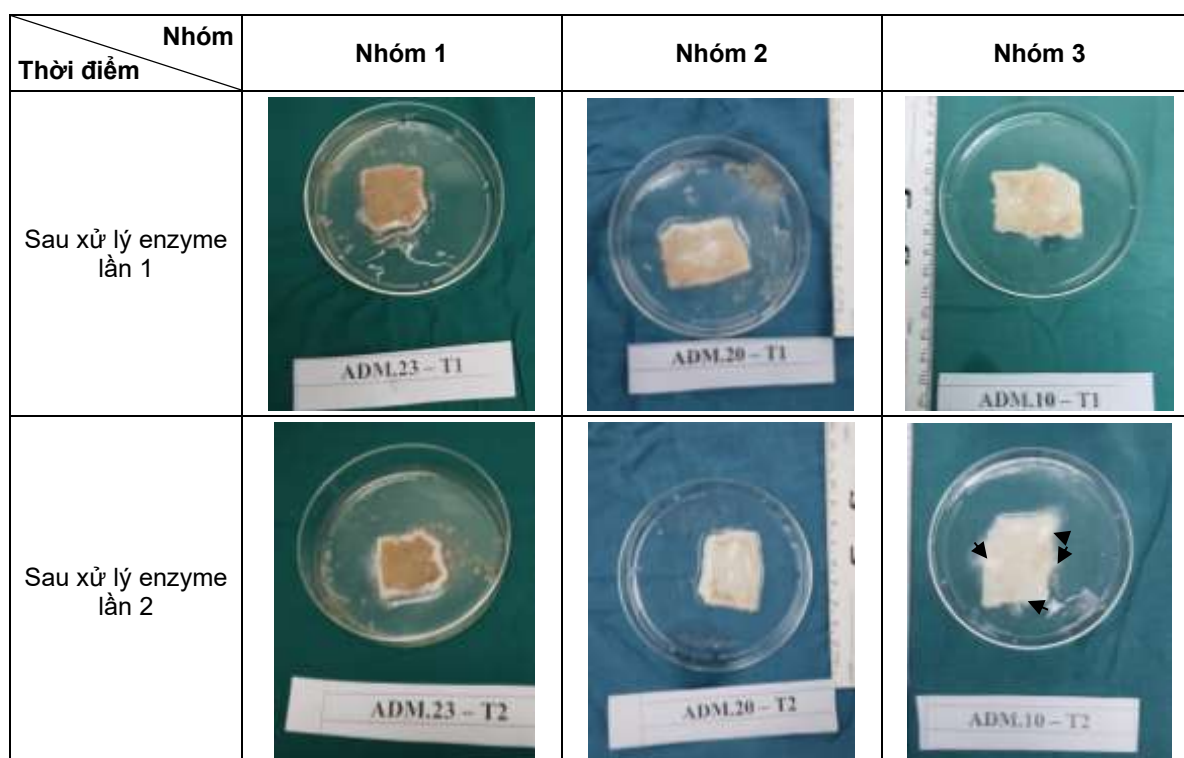
Nhận xét: Tỷ lệ tách biểu bì sau ngâm Trypsin - EDTA 24 giờ ở nhiệt độ 4°C tăng đáng kể khi nồng độ enzyme tăng (p < 0,05). Trong đó tỷ lệ tách biểu bì cao nhất ở nhóm nồng độ enzyme 1,5X đạt 45,99%.

Bảng 3.3. Tỷ lệ tách biểu bì các mẫu da sau xử lý enzyme lần 2

Chỉ tiêu \ Nhóm	Tỷ lệ tách biểu bì T2 (%)			p
	Mean ± SD	Min	Max	
Nhóm 1 (n=10)	28,25 ± 10,33	12,60	44,91	p ₂₋₁ , p ₃₋₁ < 0,01; p ₃₋₂ > 0,05
Nhóm 2 (n=10)	93,98 ± 13,08	57,82	100 (6/10 mẫu)	
Nhóm 3 (n=10)	95,47 ± 11,99	61,9	100 (8/10 mẫu)	

Nhận xét: Sau khi được ngâm Trypsin-EDTA 3 giờ trong tủ ẩm, tỷ lệ tách biểu bì cao hơn rõ rệt ở Nhóm 2 và Nhóm 3 so với Nhóm 1 (p < 0,01). Hiệu quả tách tế bào của Nhóm 1 cũng thấp hơn đáng kể khi tỷ lệ tách

tối đa chỉ đạt 44,91% trong khi Nhóm 2 và Nhóm 3 đã có nhiều mẫu đạt tỷ lệ tách tối đa lên tới 100%. Tuy nhiên sự khác biệt giữa tỷ lệ tách biểu bì của Nhóm 2 và Nhóm 3 không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05).



Hình 3.1. Hình ảnh kết quả tách biểu bì sau khi xử lý enzyme

Hình ảnh cho thấy tỷ lệ tách biểu bì cao hơn ở nhóm có nồng độ enzyme cao hơn. Sau 2 lần xử lý enzyme mẫu da ở nhóm 1 và 2 vẫn giữ được cấu trúc lớp trung bì dày, chắc, tương đối nguyên vẹn,

trong khi mẫu da ở nhóm 3 có hiện tượng tách các sợi ra khỏi lớp trung bì (mũi tên đen), mẫu da mềm, lỏng lẻo hơn.

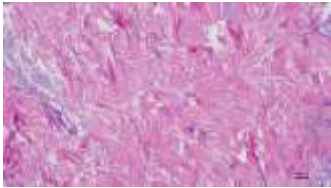
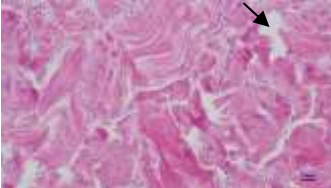
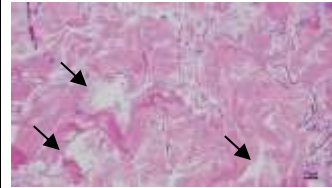
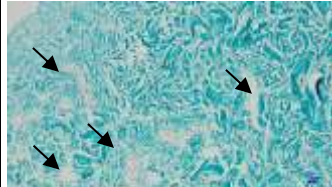
3.2. Đánh giá cấu trúc của mẫu da

Bảng 3.4. Đánh giá cấu trúc mẫu da bằng phương pháp nhuộm H&E

Mẫu	Chỉ tiêu	Cấu trúc da	Mức độ loại bỏ tế bào	Cấu trúc mạch máu
Da bình thường		Lớp biểu bì nguyên vẹn. Các thành phần phụ của da quan sát rõ, nguyên vẹn.	Các tế bào bình thường Nhân đều, tròn.	Bình thường
Sau xử lý bằng phương pháp đông lạnh - rã đông		Lớp biểu bì nguyên vẹn, tương tự mẫu da thường. Các thành phần phụ của da giảm mật độ, không quan sát rõ.	Còn tế bào. Một số nhân tế bào biểu bì đậm, co nhỏ, mật độ giảm.	Bình thường, giãn nhẹ
Sau xử lý bằng enzyme lần 2	Nhóm 1	Không còn thành phần phụ của da. Khoảng trống gian bào ít, các bó sợi dày đặc	Loại bỏ tế bào hoàn toàn, không còn nhân tế bào	Không còn
	Nhóm 2	Không còn thành phần phụ của da. Khoảng trống gian bào hẹp hơn giữa các bó sợi dày đặc	Loại bỏ tế bào hoàn toàn, không còn nhân tế bào	Không còn
	Nhóm 3	Không còn thành phần phụ của da, khoảng trống gian bào rộng hơn giữa các bó collagen lớn.	Loại bỏ tế bào hoàn toàn, không còn nhân tế bào	Không còn

Bảng 3.5. Đánh giá cấu trúc collagen bằng phương pháp nhuộm Masson Trichrome

Mẫu \ Chỉ tiêu		Sự nguyên vẹn của sợi collagen	Sắp xếp bó sợi collagen
Da bình thường		Nguyên vẹn	Song song bề mặt da, đan xen có bó vuông góc, mật độ sợi cao
Sau xử lý bằng phương pháp đông lạnh - rã đông		Nguyên vẹn	Song song bề mặt da, đan xen, có bó vuông góc, mật độ sợi cao
Sau xử lý bằng enzyme lần 2	Nhóm 1	Đứt gãy một phần	Bóc tách bó sợi collagen, mật độ sợi cao
	Nhóm 2	Đứt gãy nhiều hơn	Bóc tách bó sợi collagen, mật độ sợi trung bình cao
	Nhóm 3	Đứt gãy mạnh hơn	Bóc tách bó sợi collagen rõ, mật độ sợi thấp, lỏng lẻo hơn

Nhóm PP nhuộm	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3
H&E, 20X			
Masson, 10X			

Hình 3.2. Hình ảnh mô học mẫu da sau xử lý enzyme lần 2

Hình ảnh mô học cho thấy các mẫu da sau khi xử lý enzyme đều đạt được hiệu quả loại bỏ tế bào. So sánh cấu trúc collagen cho thấy ở nhóm 2 và 3 có sự đứt gãy collagen nhiều hơn, đặc biệt ở nhóm 3 có sự đứt gãy mạnh, bóc tách bó sợi collagen rõ, mật độ các sợi collagen thấp, lỏng lẻo, các khoảng trống gian bào (mũi tên đen) xuất hiện nhiều và rộng hơn phản ánh mức độ bảo tồn cấu trúc kém hơn các nhóm còn lại.

4. BÀN LUẬN

4.1. Hiệu quả tách tế bào của enzyme Trypsin - EDTA

Quy trình khử tế bào của chúng tôi được thiết lập dựa trên hai giai đoạn chính: (1) xử lý vật lý bằng chu kỳ đông - rã đông lặp lại ba lần, nhằm phá vỡ màng tế bào và cấu trúc nội bào cơ học; và (2) xử lý sinh học bằng enzyme Trypsin - EDTA ở hai pha nhiệt độ khác nhau (4°C trong 24 giờ và 37°C trong 3 giờ) để tách biểu bì và loại bỏ tế bào còn sót lại. Đây là sự kết hợp có

cơ sở khoa học rõ ràng: phương pháp vật lý giúp phá vỡ màng tế bào và giảm mật độ tế bào sống trước khi enzyme hoạt động, trong khi quá trình enzyme ở 4°C giúp enzyme thấm sâu vào mô mà không gây phân hủy mạnh ECM, còn giai đoạn 37°C tối ưu hóa hoạt lực enzyme để hoàn tất quá trình loại bỏ tế bào. Cơ chế hoạt động của Trypsin là một protease, có khả năng thủy phân protein, đặc biệt là các protein cấu trúc giữ vai trò neo giữ biểu bì vào trung bì, bao gồm các thành phần của màng đáy (basement membrane) như Fibronectin và Collagen loại IV, cũng như phá vỡ các cầu nối liên bào (desmosome) giữa các tế bào sừng. Trong khi đó Axit Ethylenediamine tetra acetic (EDTA) là một tác nhân tạo phức giúp khử tế bào ECM bằng cách nhắm vào các ion Ca^{2+} và Mg^{2+} , những ion duy trì liên kết giữa ECM và tế bào. Hầu hết các quy trình sử dụng EDTA cũng bao gồm trypsin để giúp cắt liên kết giữa các tế bào [5].

Các kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy mối tương quan rõ ràng giữa việc tăng nồng độ enzyme Trypsin - EDTA và sự tăng đáng kể của tỷ lệ tách biểu bì (từ 15,24% ở nhóm 0,5X đến 45,99% ở nhóm 1,5X; $p < 0,01$). Ở nồng độ Trypsin cao hơn sẽ đẩy nhanh quá trình này ngay cả ở nhiệt độ ngăn mát. (4°C). Sau xử lý enzyme lần hai, trong điều kiện 37°C trong 3 giờ, việc tăng nồng độ enzyme từ Nhóm 1 (nồng độ 0,5X) lên Nhóm 3 (nồng độ 1,5X) đã làm tăng đáng kể tỷ lệ tách biểu bì, từ 28,25% lên đến 95,47%. Điều này khẳng định Trypsin - EDTA là một tác nhân hiệu quả để phá vỡ màng đáy và các cầu nối giữa thượng bì và trung bì. Các hình ảnh mô học cũng cho thấy ở cả ba nhóm xử lý enzyme đều đạt được hiệu quả loại bỏ tế bào hoàn toàn, không còn nhân tế bào, các thành phần phụ của da và cấu

trúc mạch máu, so với mẫu da ở bước xử lý trước đó bằng phương pháp đông lạnh - rã đông vẫn còn các thành phần phụ của da và nhân tế bào (Bảng 3.4).

4.2. Lựa chọn nồng độ enzyme tối ưu

Nhiều nghiên cứu quốc tế đã sử dụng Trypsin với nồng độ trong khoảng 0,1-0,25% cho mô da người và động vật [6, 7, 8]. Tuy nhiên, nồng độ và thời gian xử lý của Trypsin cần được tối ưu cân trọng để tránh phá hủy sợi collagen và làm suy giảm cơ tính của vật liệu [9].

Khi quan sát mẫu da sau xử lý enzyme lần 2, mẫu da ở Nhóm 3 - 1,5X cho thấy tính chất cơ học thay đổi rõ, mẫu da mềm và lỏng lẻo hơn, các sợi collagen từ lớp trung bì có xu hướng tách ra (hình 3.1). Hình ảnh phân tích mô học cũng cho thấy nhóm có tỷ lệ tách tế bào cao nhất (1,5X) cũng đi kèm với mức độ phá vỡ cấu trúc sợi collagen rõ rệt hơn, các bó sợi bị tách rời và mật độ sợi trở nên lỏng lẻo. Ngược lại, nhóm 1 (0,5X) với nồng độ enzyme thấp nhất bảo tồn cấu trúc mô tốt nhất (Bảng 3.5), nhưng hiệu quả tách tế bào lại không đạt yêu cầu (chỉ đạt 28,25%, Bảng 3.3). Việc tăng nồng độ enzyme giúp thúc đẩy quá trình loại bỏ tế bào và DNA còn sót lại, đồng thời rút ngắn thời gian xử lý. Tuy nhiên, sử dụng nồng độ Trypsin quá cao có thể làm tổn thương đến các đặc tính cơ học của nền ngoại bào (ECM) [5]. Trong khi đó, mục tiêu chính của quá trình sản xuất hADM không chỉ là loại bỏ toàn bộ tế bào mà còn phải bảo tồn được cấu trúc khung nền ECM. Sự phá hủy cấu trúc ở Nhóm 3 có thể làm giảm đáng kể độ bền cơ học của sản phẩm cuối cùng, khiến nó kém phù hợp hơn cho các ứng dụng yêu cầu sự nâng đỡ mô.

Đáng chú ý, ở nhóm 1X, trên mẫu da quan sát được cũng như hình ảnh mô học

cho thấy sự thay đổi về cấu trúc ít hơn. Về đại thể mẫu da còn lớp trung bì dày, chắc, các sợi từ lớp trung bì tách ra ít (hình 3.1). Hình ảnh vi thể cho thấy các sợi collagen đứt gãy một phần, có sự bóc tách các bó sợi collagen tuy nhiên mật độ sợi collagen vẫn ở mức trung bình cao. Kết quả phân tích còn cho thấy sự khác biệt về tỷ lệ tách biểu bì sau xử lý enzyme lần 2 giữa nhóm 1X và 1,5X là không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), cho thấy hiệu quả tương đương. Dựa vào các kết quả nghiên cứu trên, nồng độ Trypsin - EDTA 1X (0,25%) được xác định là tối ưu hơn cả, đạt tỷ lệ tách biểu bì sau 2 lần xử lý enzyme cao ($93,98 \pm 13,08\%$), trong đó 6/10 mẫu đạt mức tách hoàn toàn 100%, đồng thời mức độ hư hại cấu trúc lại ít nghiêm trọng hơn so với nhóm 1,5X. Nồng độ này cũng phù hợp với khuyến nghị trong nhiều nghiên cứu trước đây. Tác giả Novotna và cộng sự (2023) cũng sử dụng kết hợp phương pháp đông - rã đông và Trypsin - EDTA 0,25% cho mô da người cho kết quả loại bỏ tế bào tốt và cấu trúc ECM được bảo tồn [7]. Tuy nhiên, phần lớn các nghiên cứu này còn kết hợp thêm với các chất tẩy rửa nhẹ như SDS hoặc Triton X - 100 để tăng hiệu quả loại bỏ tế bào và DNA dư, đồng thời vẫn giữ được các thành phần quan trọng của ECM như collagen, elastin và glycosaminoglycans (GAGs).

5. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu khẳng định hiệu quả tách biểu bì và loại bỏ tế bào bằng phương pháp sử dụng enzyme Trypsin - EDTA trong quá trình chế tạo hADM. Nồng độ Trypsin - EDTA tối ưu là 0,25% đảm bảo hiệu quả tách tế bào và bảo tồn cấu trúc collagen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mohammadyari F, Parvin S., Khorvash M., et al (2023) Acellular dermal matrix in reconstructive surgery: Applications, benefits, and cost. *Frontiers in transplantation*, 1133806.
2. Chen Y., Liu X., Zheng X., et al (2022) Advances on the modification and biomedical applications of acellular dermal matrices. *Journal of Leather Science and Engineering*, 4 (1), 19.
3. Liang R., Pan R., He L., et al (2025) Decellularized Extracellular Matrices for Skin Wound Treatment. *Materials*, 18 (12): 2752.
4. I saeva E.V., Beketov E.E., Arguchinskaya N.V., et al (2022) Decellularized extracellular matrix for tissue engineering. *Современные технологии в медицине*, 14 (3) (eng): 57-68.
5. Moffat D., Ye K. and Jin S. (2022) Decellularization for the retention of tissue niches. *Journal of tissue engineering*, 13, 20417314221101151.
6. Correa-Araujo L., Prieto-Abello L., Lara-Bertrand A., et al (2023) Bioengineered skin constructs based on mesenchymal stromal cells and acellular dermal matrix exposed to inflammatory microenvironment releasing growth factors involved in skin repair. *Stem Cell Research & Therapy*, 14 (1): 306.
7. Novotna O., Novakova Z. V., Galfiova P., et al (2023) Decellularization techniques of human foreskin for tissue engineering application. *Physiological Research*, 72 (Suppl 3), S287.
8. Ścieżyńska A., Nogowska A., Sikorska M., et al (2019) Isolation and culture of human primary keratinocytes a methods review. *Experimental dermatology*, 28 (2): 107-112.
9. Dussoyer M., Michopoulou A. and Rousselle P. (2020) Decellularized Scaffolds for Skin Repair and Regeneration. *Applied Sciences*, 10 (10), 3435.