

ỦY BAN NHÂN DÂN  
THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH  
SỞ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

THÀNH ĐOÀN TP. HỒ CHÍ MINH  
TRUNG TÂM PHÁT TRIỂN  
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ TRẺ

**CHƯƠNG TRÌNH KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP THÀNH PHỐ**

## **BÁO CÁO TÓM TẮT**

**KẾT QUẢ NHIỆM VỤ NGHIÊN CỨU KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

# **THỬ NGHIỆM CHẾ TẠO MÀNG GHÉP MẠCH MÁU TỪ MÀNG TIM LỢN**

*Cơ quan chủ trì nhiệm vụ: Trung tâm Phát triển Khoa học và Công nghệ Trẻ*

*Chủ nhiệm nhiệm vụ: ThS. Lê Thị Vĩ Tuyết*

**Thành phố Hồ Chí Minh - 2020**

## PHẦN 1. MỞ ĐẦU

Trong các bệnh lý mạch máu, bệnh hẹp tắc các động mạch dẫn máu đến nuôi tim (coronary artery disease) được coi như kẻ thù số một của người dân Mỹ, gây ra 550.000 cái chết mỗi năm. Khoảng 7% số người ở Mỹ bị bệnh hẹp tắc động mạch tim, nhất là sau tuổi 55. Chi phí y tế hàng năm riêng cho bệnh này lên đến 8 tỉ đô la Mỹ. Hẹp động mạch cảnh cũng là một bệnh khá được quan tâm như là một trong những nguyên nhân chủ yếu (30 %) gây ra tai biến mạch máu não. Thông thường, các bệnh hẹp động mạch sẽ bắt đầu từ các tổn thương trên thành mạch máu do các nguyên nhân như tăng huyết áp, chấn thương do tai nạn,.. Chỗ tổn thương là một nơi tốt để mỡ, cùng các tế bào tiểu cầu (platelet) luôn luôn có sẵn trong máu bám vào. Điều này lại gây nhiều phản ứng liên tiếp, làm vị trí này càng lúc càng dày thêm. Lòng của động mạch chỗ tổn thương hẹp dần dần đến giảm lượng máu đến nuôi tim. Hậu quả của trường hợp này nhẹ là các cơn đau tức ngực, nặng là nhồi máu cơ tim, có thể dẫn đến đột tử. Giải phẫu, thay các động mạch đã bị tắc bằng các tĩnh mạch lấy từ dưới chân lên được tiến hành với các bệnh nhân có các động mạch đã bị hẹp tắc đến một mức độ khá nặng. Còn ở giai đoạn đầu, khi chỗ hẹp của động mạch mới chỉ chiếm diện tích nhỏ, các bác sĩ sẽ tiến hành phẫu thuật lới rộng lòng động mạch bằng cách sử dụng các miếng vá mạch máu. Các miếng vá cũng có thể được sử dụng ở ngay giai đoạn đầu tiên, khi mạch máu mới bắt đầu xuất hiện các tổn thương nhỏ để tránh việc hình thành các mảng bám xơ vữa về sau. Miếng vá mạch máu cũng được sử dụng khá nhiều để điều trị cho các bệnh nhân mắc bệnh tim mạch bẩm sinh.

Các miếng vá mạch máu có thể được thiết kế từ các vật liệu sinh học tự nhiên hay tổng hợp. Các vật liệu tổng hợp thường được sử dụng như polytetrafluoroethylene, polyethylene terephthalate, poly(lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone, polyurethane,.. Các loại vật liệu này có một ưu điểm lớn là khả năng dễ dàng điều chỉnh các tính chất vật lý, hóa học như khả năng đàn hồi, tính mềm dẻo,.. để đáp ứng các yêu cầu cơ học cho vật liệu cấy ghép. Tuy nhiên, khả năng gây độc, khả năng tạo huyết khối và khả năng thúc đẩy sự lắng đọng canxi của những loại vật liệu này lại ẩn chứa những mối nguy hiểm tiềm tàng cho bệnh nhân. Hiện nay, những vật liệu sinh học tự nhiên, đặc biệt là các vật liệu có nguồn gốc từ động vật đang

thu hút được khá nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học vì các ưu điểm như lượng mẫu dồi dào, thông qua các phương pháp thích hợp loại bỏ tác nhân kháng nguyên nên hạn chế nguy cơ đáp ứng thải loại. Hơn nữa, chúng đã được nghiên cứu và chứng minh khả năng hỗ trợ sự tái tạo vùng điều trị. Trong đó, màng ngoài tim từ động vật là đối tượng đã được sử dụng khá nhiều trong điều trị các bệnh tim mạch, như làm màng vá trong phẫu thuật cắt lớp áo trong động mạch cảnh, tạo hình mạch máu hay thậm chí phục hồi màng tim trong phẫu thuật lồng ngực. Nhiều nghiên cứu trước đó đã chứng minh sau khi thành phần tế bào của màng tim được loại sạch, khuôn nền ngoại bào vẫn được bảo tồn tốt, thành phần ngoại bào của màng tim bao gồm collagen, elastin và glycosaminoglycan, trong đó phần lớn là collagen loại I có thể được thu nhận lại. Khuôn nền ngoại bào của màng tim đã được chứng minh có tính tương hợp sinh học cao và có thể độ bền phù hợp để làm các miếng vá mạch máu. Hiện nay, các sản phẩm cấy ghép dùng trong điều trị các bệnh tim mạch đều phải nhập từ nước ngoài. Các sản phẩm này đều có giá thành rất cao. Với điều kiện trong nước, màng tim lợn là loại vật liệu có thể thu nhận khá dễ dàng từ các lò mổ với số lượng lớn, giá thành thấp. Do đó, đề tài quyết định chọn màng tim lợn làm đối tượng nghiên cứu với hy vọng có thể hạ thấp được giá thành của sản phẩm đầu ra, mở ra thêm nhiều cơ hội điều trị cho các bệnh nhân. Đây là đề tài đầu tiên trong nước nghiên cứu chế tạo ra miếng vá mạch máu từ một loại vật liệu sinh học là màng tim lợn. Đề tài được thực hiện với cơ sở dựa trên các nghiên cứu đã được tiến hành, mang tính kế thừa từ đề tài **Tạo màng tim vô bào dị loại làm giá thể cho tế bào gốc hướng đến điều trị các bệnh lý tim mạch** thuộc chương trình Vườn Ươm Sáng tạo Khoa học và Công nghệ Trẻ do CN. Nguyễn Thị Ngọc Mỹ làm chủ nhiệm.

## PHẦN 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Phương pháp xử lý màng ngoài tim lợn vô bào bằng glutaraldehyde

- Rửa mẫu màng ngoài tim vô bào bằng dung dịch PBS 1X trong 5 phút.
- Ngâm màng trong glutaraldehyde theo tỉ lệ  $6\text{cm}^2/30\text{ml}$ , ở  $4^\circ\text{C}$ .
- Khảo sát thời gian và nồng độ ủ glutaraldehyde
- Lắc rửa mỗi màng trong 1000ml NaCl 0.9%, trong 3 lần, mỗi lần 1 giờ
- Cất giữ trong PBS 1X, ở  $4^\circ\text{C}$

### 2.2. Phương pháp đánh giá màng sau xử lý

Mẫu sau khi được cố định trong formalin 10%, gửi đi nhuộm H&E ở Bộ môn Mô phôi và Di Truyền, Đại học Y Dược TP.HCM.

Gửi mẫu xác định độ bền cơ học tại phòng nghiên cứu vật liệu polymer của trường Đại học Bách Khoa TP. HCM. Độ bền kéo tối thiểu của một mô vô bào ứng dụng trở thành mảnh vá mạch máu là 4.34 MPa; % biến dạng tối thiểu là 21.9%.

Độ bền vết khô là đặc tính quan trọng của mảnh vá tim mạch. Thí nghiệm này nhằm mục tiêu đánh giá được khả năng chịu đựng và sự dẻo dai của mạch máu sau khi được khâu với màng tim vô bào. Màng được khâu vào động mạch cảnh bằng chỉ khâu chuyên dụng và đo cơ tính.

### 2.3. Phương pháp đánh giá sự phân hủy của màng

- *Phân hủy trong môi trường huyết tương*
  - Ngâm màng trong huyết tương ( $6\text{cm}^2/10\text{ml}$  huyết tương), trong 14 ngày ( $5\% \text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ ). Thay môi trường huyết tương 2 ngày/lần.
  - Gấp ra rửa lại với PBS 1X.
  - Đo cơ tính tại phòng nghiên cứu vật liệu polymer của trường Đại học Bách Khoa TP.HCM.
- *Phân hủy trong collagense*
  - Để khô tự nhiên trong 24 giờ.
  - Xác định khối lượng màng trước khi ngâm trong dung dịch phân hủy ( $m_1$ )

- Ngâm màng trong dung dịch collagenase 0.25mg/ml, tỷ lệ ~50mg/1ml, trong 24 giờ (5% CO<sub>2</sub>, 37°C).
- Rửa lại trong PBS 1X.
- Để khô tự nhiên trong 24 giờ.
- Xác định khối lượng màng sau khi ngâm trong dung dịch phân hủy (m<sub>2</sub>)
- Tính phần trăm khối lượng (%M) còn lại sau khi ngâm trong collagenase:

$$\%M = \frac{m_2}{m_1} \times 100\%$$

#### **2.4. Phương pháp đánh giá độc tính in vitro**

##### ***Thử nghiệm tiếp xúc trực tiếp***

- Cấy tế bào vào đĩa
- Đặt mẫu vào giếng, với diện tích mẫu tương đương 1/10 diện tích bề mặt nuôi cấy
- Nhuộm và quan sát tế bào

##### ***Thử nghiệm tiếp xúc trực tiếp***

- Chuẩn bị dịch chiết bằng cách ngâm mẫu với môi trường nuôi cấy tế bào với tỷ lệ 6cm<sup>2</sup>/ml môi trường nuôi cấy tế bào
- Cấy tế bào vào đĩa 96 giếng
- Ủ tế bào trong dịch chiết
- Thử nghiệm MTT
- Xác định mức độ độc tính thông qua %RGR (relative growth rate – giá trị tốc độ tăng trưởng) của từng nghiệm thức:

$$\%RGR = \frac{\text{OD nhóm tế bào thí nghiệm}}{\text{OD nhóm tế bào đối chứng}} \times 100\%$$

Nếu giá trị tốc độ tăng trưởng tương đối %RGR từ 70% trở lên thì vật liệu được cho là không gây độc tính cho tế bào, có thể ứng dụng trong y sinh.

#### **2.5. Phương pháp đánh giá sự bám dính và tăng sinh của tế bào tiền thân nội mô trên màng**

##### ***Chuẩn bị tế bào***

- Tế bào tiền thân nội mô người được nuôi cấy đạt mật độ 75 – 80 % bề mặt chai nuôi

- Tế bào được cố định lên màng với mật độ  $10^4$  tế bào/màng tim
- Ủ tế bào và màng tim trong tủ nuôi trong 1 giờ
- Sau 24 giờ, hình thái tế bào trên khung nâng đỡ được khảo sát bằng phương pháp sử dụng kính hiển vi điện tử quét (SEM). Sự tồn tại của tế bào trên màng tim được xác định khi so sánh với mẫu màng tim không được cấy tế bào.
- Sau các mốc thời gian 1, 3, 5, 7 ngày, chuyển màng tim sang các giếng mới
- Sự tăng sinh của tế bào trên màng được xác định bằng thử nghiệm MTT

## **2.6. Xử lý số liệu**

Số liệu sau khi thu nhận được xử lý thống kê trên phần mềm Graph Pad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) với độ tin cậy P value < 0,05.

## PHẦN 3. KẾT QUẢ

### 3.1. Nội dung 1: Xây dựng quy trình xử lý màng tim lợn vô bào bằng Glutaraldehyde

#### *Kiểm tra đặc tính vô trùng*

Trong hầu hết các sản phẩm màng tim lợn vô bào thương mại, glutaraldehyde được sử dụng là dung dịch khử trùng và bảo quản. Nồng độ glutaraldehyde thường được sử dụng là 0,1 – 2%. Tuy nhiên, bản chất glutaraldehyde vẫn là hóa chất có khả năng gây độc. Nhiều nghiên cứu trước đó đã chứng minh lượng glutaraldehyde tồn dư trên các sản phẩm cấy ghép là nguyên nhân quan trọng gây ra sự lắng đọng canxi ở các mô. Thí nghiệm này khảo sát khả năng khử trùng của glutaraldehyde ở các nồng độ 0,01%, 0,05% và 0,1%. Thời gian ủ với glutaraldehyde được khảo sát bao gồm 6, 12, 24 và 48 giờ. Các nồng độ khảo sát nhỏ hơn so với các nồng độ glutaraldehyde thường dùng với mục đích hạ thấp nồng độ khử trùng hiệu quả, nhằm hạn chế tối đa lượng glutaraldehyde đưa vào cơ thể. Nhóm nghiệm thức với nồng độ glutaraldehyde và thời gian ủ tối ưu có hiệu quả khử trùng màu sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ở nhóm màng tim lợn vô bào, không được xử lý bằng glutaraldehyde hoặc chiếu xạ, ngay sau 24 giờ đầu tiên, trên bề mặt thạch xung quanh màng tim không được xử lý khử trùng đã xuất hiện khối vi khuẩn. Sau 7 ngày, khối vi khuẩn lan rộng, bao tròn xung quanh miếng màng tim. Với các màng tim xử lý khử trùng chiếu xạ tia gamma liều lượng 25 kGy, không nhận thấy có sự xuất hiện của khối vi khuẩn.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, nồng độ glutaraldehyde 0,01% chưa thể hiện khả năng khử trùng mẫu, được quan sát qua sự hình thành vùng khuẩn lạc xung quanh mẫu. Ngoài ra, việc kéo dài thời gian ủ với glutaraldehyde 0,01% cũng không giúp nâng cao hiệu quả khử trùng. Trong 24 giờ ủ trên đĩa thạch môi trường cơ bản, nhóm nồng độ glutaraldehyde 0,05% và 0,1% đạt hiệu quả khử trùng mẫu màng tim lợn vô bào khi tăng thời gian ủ từ 12 – 48 giờ. Tuy nhiên, hiệu quả này không ổn định ở nhóm nghiệm thức màng được ủ glutaraldehyde 0,05% trong 12 giờ. Với các màng tim xử lý khử trùng bằng glutaraldehyde 0,05% hoặc 0,1%, trong 24 – 48 giờ, hiệu quả khử trùng được đảm bảo, thể hiện qua sự vắng mặt của khuẩn lạc xung quanh mẫu sau 7 ngày ủ trên đĩa thạch môi trường cơ bản.

### ***Khảo sát cấu trúc mô học của màng***

Màng ngoài tim lợn có cấu trúc các sợi fibrous collagen liên kết có định hướng và sắp xếp thành nhiều lớp. Ở nhóm màng tim lợn thô (không trải qua quá trình khử tế bào), thể hiện rõ thành phần tế bào trong mô, điển hình ở nhân tế bào nhuộm màu xanh tím đậm. Phân tích dưới kính hiển vi sẽ thấy các sợi collagen màng ngoài tim lợn được nhuộm màu đỏ hồng, sắp xếp đa định hướng (định hướng đa chiều) tạo thành một mạng lưới đan xen chặt chẽ với nhau, với số lượng lớn các sợi định hướng chéo, khiến các sợi collagen không chỉ xếp chồng lên nhau mà còn tạo ra các cấu trúc lợn sóng hay các bó sợi xoắn chặt. Sau khi khử tế bào, kết quả nhuộm H&E cho thấy cấu trúc màng ngoài tim lợn vô bào có các sợi collagen lợn sóng, tuy nhiên, sự liên kết giữa các sợi fibrous collagen có phần thưa hơn do bị thoái hóa và đứt gãy do quá trình xử lý loại tế bào.

Ở các nhóm màng được khi xử lý bằng glutaraldehyde 0,05% và 0,1% trong 12 – 24 giờ, kết quả nhuộm H&E cho thấy đổi cấu trúc khuôn nền collagen có xu hướng tạo các sợi lợn sóng, xếp lớp đan xen chặt chẽ hơn so với màng tim lợn vô bào. Cấu trúc sợi collagen này đồng nhất hơn ở các nhóm được gia tăng thời gian ủ trong glutaraldehyde từ 24-48 giờ. Điều này chỉ ra việc nâng dần hàm lượng và thời gian ủ mẫu trong glutaraldehyde có tác dụng gia tăng hiệu quả tạo liên kết chéo được hình thành giữa các sợi collagen trong cấu trúc, do đó, dự kiến sẽ cải thiện đặc tính cơ học của màng tim.

### ***Khảo sát độ bền cơ học của màng***

Sau khi ủ với glutaraldehyde, màng ngoài tim lợn vô bào được đo độ bền cơ học, xác định các thông số về độ bền ứng với yêu cầu thông số của một mảnh vá mạch máu. Ứng suất kéo thể hiện trạng thái ứng suất khi vật chịu tác động kéo. Độ bền kéo là giới hạn lớn nhất của ứng suất kéo làm đứt vật liệu. Đơn vị của độ bền kéo thường làm MPa hay N/mm<sup>2</sup>. Ứng suất tối thiểu cho phép của một mảnh vá mạch máu có nguồn gốc từ mô sinh học vô bào là 4.34 MPa, phần trăm biến dạng tối thiểu là 21.9%.

Kết quả cho thấy ứng suất kéo của màng ngoài tim lợn vô bào sau khi ủ với GA ở các nồng độ (0,05%, 0,1%) và thời gian (12 giờ, 24 giờ, 48 giờ) có sự khác biệt không có ý nghĩa



về mặt thống kê. Tuy nhiên ứng suất của màng vẫn đạt được yêu cầu của một mảnh vá mạch máu, tất cả các nhóm đều cho kết quả ứng suất lớn hơn ứng suất tối thiểu của một mảnh vá sinh học đã khử tế bào (4.34 MPa).

Tương tự, phần trăm biến dạng của màng ngoài tim lợn vô bào sau khi ủ với GA ở các nồng độ (0,05%, 0,1%) và thời gian (12 giờ, 24 giờ, 48 giờ) hầu như khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê. Tuy nhiên, phần trăm biến dạng của màng vẫn đạt được yêu cầu của một mảnh vá mạch máu (biến dạng lớn hơn 21.9%).

Như vậy, các nồng độ và thời gian ủ glutaraldehyde khả sát chưa cho thấy tác dụng cải thiện đáng kể độ bền cơ tính của màng tim lợn vô bào. Xét về khả năng khử trùng, glutaraldehyde 0,05% và 0,1% đều đạt hiệu quả tốt. Trong hai nồng độ đạt yêu cầu xét về tính an toàn với cơ thể cấy ghép và hiệu quả thời gian, nồng độ glutaraldehyde 0,05% và thời gian ủ 24 giờ được chọn làm nhóm quy trình xử lý tối ưu và được dùng để tạo ra màng tim lợn vô bào gia cường (gP) cho các nội dung thí nghiệm tiếp theo.

#### ***Khảo sát độ độ bền vết khâu ở mô hình màng-mạch máu***

Mô hình màng-mạch máu được tạo ra bằng cách khâu nối màng thử nghiệm (màng tim lợn vô bào được gia cường bằng glutaraldehyde 0,05% trong 24 giờ - gP) vào động mạch cảnh của lợn (viết tắt là CA). Mô hình nhằm mục đích đánh giá độ bền vết khâu của màng thử nghiệm gP.

Các quan sát ban đầu cho thấy trong tất cả các tác dụng lực căng kéo, mô hình màng-mạch máu đều bị đứt ở phía mạch máu. Trong khi đó, phần màng tim của mô hình vẫn còn nguyên vẹn, không hề bị đứt gãy. Ngoài ra, vị trí vết chỉ khâu không bị biến đổi hay bung đứt. Kết quả đánh giá cơ tính cho thấy, động mạch cảnh có độ biến dạng trung bình đạt  $73,76\% \pm 8,073\%$ . Mẫu mô hình có độ biến dạng trung bình đạt  $65,66\% \pm 8,110\%$ . Số liệu này chỉ ra việc khâu màng vào mạch máu đã phần nào ảnh hưởng đến khả năng chống chịu lực kéo biến dạng của động mạch cảnh, tuy nhiên, so sánh thống kê giữa hai nhóm không có sự khác biệt đáng kể. Bên cạnh đó, vết khâu giữa mạch máu và màng gP được bảo toàn trong quá trình tác dụng lực. Do đó, kết quả này có thể bước đầu nhận thấy màng tim lợn vô bào lợn vô bào và

được xử lý với glutaraldehyde đã thể hiện tính bền chắc và có khả năng chịu lực tốt và giữa chắc vết chỉ khâu.

### **3.2. Nội dung 2: Đánh giá đặc tính phân hủy in vitro của màng**

#### ***Phân hủy trong môi trường huyết tương và đo độ bền cơ học***

Ngâm phân hủy trong dung dịch huyết tương đòi hỏi màng ngoài tim phải được vô trùng, vì thế màng ngoài tim vô bào chưa xử lý GA để loại bỏ các tác nhân gây nhiễm trùng không thể ngâm phân hủy để xác định độ bền sau khi thực hiện phân hủy in vitro được.

Sau 14 ngày ủ trong huyết tương, màng được đo xác định độ bền cơ học, mục đích là khảo sát xem sau khi phân hủy in vitro màng ngoài tim ở nhóm nào có độ bền ổn định hơn cả. Kết quả cho thấy, sau 14 ngày khảo sát, ứng suất kéo và độ biến dạng của các mẫu màng không có khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm.

#### ***Phân hủy trong collagenase và xác định khối lượng khô còn lại***

Sau khi ngâm phân hủy trong collagenase 48 giờ, màng vô bào bị phân hủy đến hơn 90%, không còn giữ nguyên cấu trúc hình dạng ban đầu, các màng được xử lý GA vẫn bảo toàn được cấu trúc ban đầu.

Số liệu khảo sát tỷ lệ phần trăm khối lượng khô còn lại cho thấy màng tim vô bào bị phân hủy mạnh, cụ thể khối lượng khô của màng tại 24 giờ chỉ còn 20,32% và chỉ còn 5,91% sau 48 giờ ủ trong collagnase. Nhóm màng thử nghiệm đều có mức bảo toàn khối lượng trên 80% sau các mốc thời gian khảo sát, cho việc xử lý với glutaraldehyde 0,05% trong 24 giờ đã có tác dụng khâu mạch và hạn chế quá trình phân hủy của mẫu màng.

### **3.3. Nội dung 3: Đánh giá độc tính in vitro của màng đã tạo theo tiêu chuẩn ISO 10993**

Bất kì một sản phẩm nào, muốn đưa vào ứng dụng thực tế thì trước hết nó phải không gây độc cho cơ thể. Phương pháp đánh giá độc tính cấp tính của màng thử nghiệm được tiến hành dựa theo tiêu chuẩn ISO 10993-5:2009 (Tests for *in vitro* cytotoxicity). Nguyên bào sợi là các tế bào rất dễ nuôi cấy nhưng lại rất nhạy cảm, chỉ một lượng độc tố nhỏ cũng có thể gây ra ảnh hưởng mạnh mẽ đến sự tăng trưởng của các tế bào này. Do đó, nguyên bào sợi thường là lựa chọn tối ưu cho các khảo sát thử nghiệm độc tố. Ở đây, thử nghiệm độc tính in vitro bao gồm hai phương thức: tiếp xúc trực tiếp – đánh giá bằng nhuộm Giemsa, thử nghiệm

gián tiếp – dùng dịch chiết mẫu và thử nghiệm MTT. Trong thử nghiệm gián tiếp, MTT được dùng để xác định lượng tế bào còn lại trong dịch chiết sau một thời gian nuôi cấy nhất định.

#### ***Xác định độc tính in vitro bằng phương pháp tiếp xúc trực tiếp***

Ở thử nghiệm tiếp xúc trực tiếp, mẫu màng thử nghiệm được đặt lên trên lớp đơn tế bào nguyên bào sợi. Sau 24 giờ, tế bào được nhuộm với thuốc nhuộm Giemsa và quan sát hình thái dưới kính hiển vi. Nhóm đối chứng âm – tế bào không được tiếp xúc với vật liệu. Nhóm đối chứng dương – mẫu gây độc là màng Latex được đặt tiếp xúc với tế bào.

Hình ảnh nhuộm Giemsa cho thấy tế bào có hình thái thuận dài và phát triển bình thường trong môi trường nuôi cấy tế bào. Ở đối chứng dương, lớp tế bào gần như bị phá hủy hoàn toàn, không thể quan sát thấy hình thái của tế bào. Ở nhóm màng thử nghiệm, các nguyên bào sợi vẫn phát triển bình thường, có hình thái thuận dài giống như nhóm đối chứng âm.

#### ***Xác định độc tính in vitro bằng phương pháp gián tiếp qua dịch chiết mẫu***

Sau khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy, MTT được chuyển hóa thành tinh thể formazan màu tím. Điều này chứng tỏ có sự hiện diện của tế bào sống. Số lượng tế bào càng lớn sẽ tạo ra một lượng formazan càng lớn, giá trị OD dung dịch formazan càng cao. Từ đó, giúp ta đánh giá được số tế bào còn sống hoặc khả năng tăng trưởng của tế bào ở thời điểm khảo sát.

Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy sau 24 giờ khảo sát, các tế bào nuôi trong dịch chiết màng thử nghiệm GP, và môi trường nuôi cấy đầy đủ CM10 (nhóm chứng âm) đều phát triển bình thường, không nhận thấy có sự thay đổi hình thái của các tế bào. Ngược lại, đa số nguyên bào sợi người nuôi trong dịch chiết sao su Latex (nhóm chứng dương) sau 24 giờ bị chết, những tế bào còn sống và bám dính được trên bề mặt đĩa nuôi đều có sự thay đổi rõ rệt hình thái, các tế bào không còn giữ được hình thon dài như ban đầu mà chuyển dạng thành hình bầu dục hoặc hình tròn. Sau khi được ủ với dung dịch MTT, sự hình thành tinh thể formazan tương ứng với các tế bào sống. Trong nhóm chứng âm và dịch chiết của màng thử nghiệm, tinh thể formazan hình thành rõ nét và với số lượng nhiều. Ở nhóm dịch chiết màng Latex, hầu như không có sự hình thành của tinh thể formazan, chỉ ra tính độc đáng kể của nhóm dịch chiết này. Kết quả tính chỉ số tăng trưởng tương đối cũng cho thấy dịch chiết của

màng thử nghiệm gP không gây độc đối với nguyên bào sợi. Từ kết quả của thử nghiệm tiếp xúc trực tiếp và thử nghiệm gián tiếp, màng thử nghiệm gP được chứng minh không gây độc đối với nguyên bào sợi.

### **3.4. Nội dung 4: Đánh giá khả năng hỗ trợ sự bám và tăng sinh của tế bào tiền thân nội mô trên màng**

#### ***Xác định sự bám của tế bào trên màng***

Tế bào nội mô là các tế bào lót mặt trong của tất cả các mạch máu trong cơ thể và tạo nên một lớp màng ngăn chống đông máu. Ngoài ra tế bào nội mô còn có vai trò cực kỳ quan trọng trong các quá trình tạo mạch (angiogenesis).

Sau 24 giờ nuôi cấy, kết quả chụp SEM cho thấy tế bào nội mô có khả năng bám dính lên màng màng thử nghiệm gP. Đây là kết quả vô cùng quan trọng, là điều kiện cần thiết để tiến tới khảo sát khả năng tăng sinh của tế bào nội mô trên màng tim vô bào.

#### ***Khảo sát sự tăng trưởng của tế bào trên màng***

Khả năng bám dính và tăng sinh của tế bào nội mô trên màng tim vô bào chính là tiền đề cho quá trình hợp nhất màng tim với các vùng mô mạch máu xung quanh và phục hồi cấu trúc mạch máu như ban đầu.

Kết quả thí nghiệm cho thấy sau 7 ngày khảo sát, số liệu OD 570 nm có xu hướng tăng dần và có khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p \text{ value} < 0.0001$ ). Sự gia tăng mật độ quang chính là do sự gia tăng của các tinh thể formazan trong các tế bào sống do MTT chuyển hóa thành. Lượng formazan càng nhiều chứng tỏ lượng tế bào sống càng nhiều. Từ kết quả thí nghiệm này ta nhận thấy tế bào nội mô có khả năng tăng trưởng trên cả màng thử nghiệm gP.

## **PHẦN 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ**

### **Kết luận**

1. Xây dựng được quy trình chế tạo màng ghép mạch máu từ màng tim lợn vô bào, xử lý bằng glutaraldehyde 0,05% trong 24 giờ
2. Màng thử nghiệm đạt tiêu chí vô khuẩn, thỏa tiêu chí về độ bền cơ học của màng ghép mạch máu
3. Màng thử nghiệm có độ bền cơ tính không biến đổi trong môi trường phân hủy của huyết tương sau 14 ngày ủ, và thể hiện sự phân hủy hạn chế trong collagenase trong 48 giờ khảo sát
4. Theo tiêu chuẩn ISO10993-5:2009, màng thử nghiệm không gây độc cho nguyên bào sợi.
5. Màng thử nghiệm có khả năng hỗ trợ sự bám dính và tăng sinh của tế bào tiền thân nội mô người trong 7 ngày khảo sát

Các kết quả trên chỉ ra màng thử nghiệm chế tạo từ màng tim lợn vô bào kết hợp xử lý bằng glutaraldehyde 0,05% trong 24 giờ có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực giải phẫu tim mạch, cụ thể là định hướng làm màng ghép mạch máu.

### **Kiến nghị**

1. Tiến hành thử nghiệm in vivo chứng minh tính an toàn của màng
2. Do màng được xử lý với Glutaraldehyde, vấn đề khoáng hóa mảnh ghép cần được lưu ý. Tiến hành định lượng hàm lượng Glutaraldehyde tồn dư
3. Các đánh giá chức năng miêng vá sâu hơn cần được tiến hành, đặc biệt là đánh giá khả năng rò rỉ của chất lỏng trong lòng mạch dưới áp suất xác định

Thực hiện các thử nghiệm in vivo để kiểm chứng vấn đề khoáng hóa màng ghép, tương hợp máu, chức năng màng ghép

## PHẦN 5. DANH MỤC KẾT QUẢ ĐẠT ĐƯỢC

<b>Dạng I: Sản phẩm cứng</b>						
<b>Số TT</b>	<b>Tên sản phẩm cụ thể</b>	<b>Đơn vị đo</b>	<b>Mức chất lượng</b>			<b>Số lượng sản phẩm tạo ra</b>
			<b>Cần đạt</b>	<b>Mẫu tương tự</b>		
				<b>Trong nước</b>	<b>Thế giới</b>	
1	Màng tim lợn vô bào xử lý với glutaraldehyde	Cm <sup>2</sup>	Thỏa các tiêu chí đã thiết lập	Không có	Sản phẩm thương mại	2 × 3 cm <sup>2</sup> 3 màng
<b>Dạng II: Sản phẩm mềm: Quy trình kỹ thuật</b>						
<b>STT</b>	<b>Tên sản phẩm</b>	<b>Yêu cầu khoa học cần đạt</b>			<b>Ghi chú</b>	
1	Quy trình xử lý màng tim lợn vô bào bằng glutaraldehyde	Hiệu quả thành công đạt > 90%, tạo màng thỏa các tiêu chí đã thiết lập			Đạt	
<b>Dạng III: Công bố khoa học</b>						
<b>Số TT</b>	<b>Tên sản phẩm</b>	<b>Yêu cầu khoa học cần đạt</b>	<b>Tạp chí/nơi công bố</b>	<b>Ghi chú</b>		
1	Bài báo khoa học	Được chấp nhận đăng	International Journal of Current Research and Review	Đạt		

## **PHẦN 6. TÁC ĐỘNG VÀ LỢI ÍCH MANG LẠI CỦA KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

### ***6.1. Đối với lĩnh vực KH&CN có liên quan***

Thông qua các đề tài, nhóm nghiên cứu đã có nhiều công bố khoa học trong nước và quốc tế. Các công bố này đã được trích dẫn bởi nhiều nhóm nghiên cứu khác, giúp rút ngắn khoảng cách chênh lệch về trình độ khoa học và công nghệ giữa các nhóm nghiên cứu trong và ngoài nước. Tiếp nối thành quả đó, nhóm nghiên cứu hướng đến các nghiên cứu đỉnh cao nhằm tạo ra các sản phẩm có ý nghĩa khoa học và thực tiễn. Sản phẩm của đề tài này có tiềm năng ứng dụng trong phẫu thuật mạch máu, hứa hẹn một hướng đi mới trong lĩnh vực nghiên cứu này. Ngoài ra, nhóm nghiên cứu đã có thể kết hợp nhân sự đa ngành, đa lĩnh vực, đa trung tâm để phục vụ một mục tiêu chung là phát triển Khoa học Y Sinh.

### ***6.2. Đối với tổ chức chủ trì và các cơ sở ứng dụng kết quả nghiên cứu***

Hướng nghiên cứu của đề tài phù hợp với mục tiêu và định hướng đầu tư đề tài Khoa học và Công nghệ của Sở, đóng góp vào công trình nghiên cứu của đơn vị chủ trì. Ngoài ra, kỹ nghệ mô và vật liệu y sinh là lĩnh vực nghiên cứu đang được quan tâm trên thế giới. Trong khi Việt Nam chưa có công bố liên quan đến hướng nghiên cứu tạo màng ghép mạch máu từ màng tim lợn. Đề tài mở ra một hướng nghiên cứu mới có thể đóng góp những kết quả có giá trị trong đào tạo và ứng dụng công nghệ sinh học và khoa học y sinh.

### ***6.3. Đối với kinh tế - xã hội và môi trường***

Sản phẩm nghiên cứu có thể cung cấp một vật liệu sinh học phục vụ trong lĩnh vực Y học hiện đại, có thể giúp giảm chi phí và tăng liệu pháp điều trị cho bệnh nhân. Đây là một hướng điều trị có tính công nghệ cao nhưng kinh tế, có ý nghĩa quan trọng trong định hướng chăm sóc sức khỏe con người trong điều kiện khoa học công nghệ phát triển như hiện nay.