Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ – Khoa học Tự nhiên 2022, 6(3):2251-2259

Open Access Full Text Article

Bài nghiên cứu

Đánh giá khả năng kháng đông máu và hỗ trợ nội mô hóa *in vitro* của màng tim bò vô bào gia cường có cố định heparin

Nguyễn Thị Ngọc Mỹ[1,2,3,*], Phan Thị Hiếu Nghĩa[1,2,3], Lâm Minh Hoàng[2,3], Trần Lê Bảo Hà[1,2,3]

Use your smartphone to scan this QR code and download this article

TÓM TẮT

Đông máu là một trong những vấn đề cần giải quyết khi sử dụng màng ghép trong điều trị bệnh tim mạch. Do đó, bài báo trình bày việc chế tạo màng tim bò vô bào có cố định heparin nhằm cải thiện đặc tính kháng đông máu định hướng ứng dụng làm màng ghép. Màng được chế tạo bằng phương pháp cố định từng lớp (LbL) heparin vào màng tim bò vô bào, gia cường thông qua cầu nối liên kết ion phức sắt-hydroxyl (DHI). Các đánh giá về cấu trúc, sinh hóa, kháng đông máu, bám dính tế bào nội mô được thực hiện nhằm xác định khả năng cố định heparin (83,63 ± 9,475 $\mu g/cm^2$) , hiệu quả kháng đông máu và hỗ trợ nội mô hóa *in vitro* của màng tim bò vô bào có heparin. Các hình ảnh nhuộm mô học và chụp kính hiển vi điện tử quét đã chỉ ra sự hiện diện của heparin trên khung nền màng tim bò vô bào. Hơn nữa, kết quả định lượng chứng minh phương pháp cố định từng lớp đã làm tăng đáng kể lượng heparin được cố định vào màng. Màng tim bò vô bào có heparin thể hiện hoạt tính kháng đông máu sau khi ủ trong mẫu máu toàn phần, và khả năng chống huyết khối của màng được duy trì sau 30 ngày thử nghiệm. Ngoài ra, màng không gây độc và hỗ trợ cho sự sống và bám dính của tế bào nội mô trên màng sau 48 giờ quan sát. Các kết quả thu nhận này cho thấy màng tim bò vô bào gia cường cố định heparin có tiềm năng ứng dụng trong cấy ghép tim mạch.

Từ khoá: cố định từng lớp, heparin, hỗ trợ nội mô hóa, kháng đông máu, màng tim bò

[1]*Bộ môn Sinh lý học và Công nghệ sinh học Động vật, Khoa Sinh học – Công nghệ sinh học*

[2]*Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, Hồ Chí Minh, Việt Nam*

[3]*Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam*

Liên hệ

Nguyễn Thị Ngọc Mỹ, Bộ môn Sinh lý học và Công nghệ sinh học Động vật, Khoa Sinh học – Công nghệ sinh học

Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, Hồ Chí Minh, Việt Nam

Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Email: ntnmy@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 10-01-2022
- Ngày chấp nhận: 16-9-2022
- Ngày đăng: 30-9-2022

DOI : 10.32508/stdjns.v6i3.1159

Check for updates

Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

VNUHCM PRESS

GIỚI THIỆU

Bệnh tim mạch (cardiovascular diseases, CVDs) được xem là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trên toàn thế giới. Theo báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới năm 2019, số ca tử vong do CVDs lên đến 17,9 triệu người (chiếm 32% trên tổng số ca tử vong trên toàn cầu). Khoảng 85% số ca tử vong là do nhồi máu cơ tim và đột quỵ, và phân bố hơn một phần ba ở các nước có thu nhập trung bình và thấp (chiếm 82%) (thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới 2021). Một số bệnh tim mạch bẩm sinh như thông liên nhĩ, thông liên thất, hẹp van động mạch, hoặc tổn thương tim mạch như xơ vữa động mạch, bệnh màng ngoài tim… cần có phẫu thuật can thiệp để điều trị. Trong đó, các màng ghép đã được sử dụng phổ biến trong phẫu thuật nhằm hỗ trợ quá trình sửa chữa và tái cấu trúc tim mạch. Cụ thể, các màng ghép đã được sử dụng trong phẫu thuật ở động mạch, tĩnh mạch, và cho thấy hiệu quả giảm đáng kể nguy cơ đột quỵ/tử vong hậu phẫu (còn 14,6%), tái nghẽn mạch máu (còn 4,8%) và phẫu thuật lần hai (còn 1,1% sau 30 ngày) so với không sử dụng màng vá (tương ứng là 24,1%; 18,6% và 3,1%) [1]. Thống kê từ năm 2003 đến 2014 đã chỉ ra xu hướng tăng sử dụng các màng vá trong phẫu thuật mạch máu (chiếm 91% tổng số ca điều trị) [2].

Màng ghép tự thân luôn được xem là ưu tiên do không vướng phải rào cản đáp ứng miễn dịch. Các loại động mạch và tĩnh mạch tự thân có thể được thu nhận như động mạch vú trong, động mạch quay và tĩnh mạch hiển (được sử dụng phổ biến nhất). Tuy nhiên, nguồn mẫu mạch máu ghép tự thân luôn gặp trở ngại chủ yếu ở số lượng rất hạn chế và các biến chứng trầm trọng có thể mắc phải tại vị trí mạch thu nhận [3]. Nguồn mô động vật cũng được xem là giải pháp phù hợp để cung cấp số lượng lớn màng ghép. Sau khi được xử lý loại bỏ kháng nguyên dị loài bằng quá trình khử tế bào, khung nền ngoại bào của mô được thu nhận, có chứa các thành phần sinh học như collagen, fibronectin, elastin, glycosaminoglycan, và các nhân tố tăng trưởng [4]. So với các vật liệu tổng hợp, vật liệu từ khung nền ngoại bào có khả năng tham gia vào quá trình tái tạo và thống nhất mô chủ. Màng tim bò đã được sử dụng nhiều trong chế tạo các màng ghép tim mạch như màng vá tim, màng vá mạch máu [5]. Các sản phẩm màng ghép từ màng tim bò phần lớn đã được xử lý loại tế bào và khâu mạch bằng glutaraldehyde nhằm giảm đáp ứng miễn dịch, tăng cường độ bền và thời gian tồn tại trong cơ thể. Ngoài ra, màng ghép từ màng tim bò giúp hạn chế hiện tượng chảy máu tại vết khâu tốt hơn các màng ghép tổng hợp (tỷ lệ chảy máu mũi khâu sau 3 phút ở nhóm màng vá từ màng

Trích dẫn bài báo này: Mỹ N T N, Nghĩa P T H, Hoàng L M, Hà T L B. **Đánh giá khả năng kháng đông máu và hỗ trợ nội mô hóa *in vitro* của màng tim bò vô bào gia cường có cố định heparin**. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.;* 6(3):2251-2259.

tim bò là 14%, trong khi đó, đến 55% ở nhóm màng vá Dacron) [5,6]. Tuy nhiên, các thành phần khung nền ngoại bào dễ dàng cho phép sự hấp thụ của các protein huyết tương, bám dính tiểu cầu và thúc đẩy quá trình đông máu bề mặt vật ghép. Đây là một bất lợi không chỉ của các loại vật liệu tổng hợp, mà còn ở các vật liệu có nguồn gốc tự nhiên và mô nói chung do chịu sự tiếp xúc với dòng máu trong thời gian dài.

Cố định heparin được xem là giải pháp hạn chế huyết khối do heparin được thải chậm, ngăn cản sự bám dính tiểu cầu trên bề mặt vật liệu [7,8] theo đó đảm bảo cho vật ghép kháng đông máu, đồng thời tạo điều kiện phù hợp cho nội mô hóa [9]. Heparin, một chất kháng đông máu thuộc nhóm các glycosaminoglycan, đã được nghiên cứu cố định lên các bề mặt vật liệu tương tác máu [10]. Cấu trúc phân tử heparin chứa mật độ cao nhất các nhóm tích điện âm, như carboxylate và sulfate. Do đó, heparin có khả năng tương tác tĩnh điện với phổ rộng các protein. Điển hình là albumin và fibronectin, hai loại protein quan trọng trong tương tác tiểu cầu và khởi phát đông máu, cũng có đặc tính tích điện âm trong điều kiện pH máu. Chính nhờ vào lực đẩy tĩnh điện giữa các protein này và heparin cố định trên bề mặt vật liệu đã ngăn cản sự thấm hút của protein, dẫn đến bất hoạt sự bám dính và hoạt hóa tiểu cầu trên bề mặt vật liệu [10]. Việc ủ trực tiếp trong dung dịch heparin không có hiệu quả đưa một lượng đáng kể heparin vào vật liệu và dễ dàng bị rửa trôi [11]. Để đạt được lượng heparin cao và có khả năng thải dần ra môi trường, phương pháp cố định heparin từng lớp (layer-by-layer, LbL) lên khung nền ngoại bào từ mô gan đã được báo cáo và cho kết quả tốt, cùng với hoạt tính kháng huyết khối tốt (12). Ngoài ra, trong hướng tiếp cận cố định heparin bằng LbL, ion sắt (II) dihydroxyl (gọi tắt là DHI) được sử dụng làm cầu nối, liên kết tĩnh điện với phân tử heparin và khung nền của mạch máu vô bào [8]. Phương pháp LbL cố định heparin vào khung nền thông qua DHI đã tăng cường hàm lượng và sự ổn định của heparin trên mạch máu vô bào, kháng huyết khối và không gây độc *in vitro*, qua đó, dự đoán có thể mang lại hiệu quả tương tự trong cố định heparin lên các vật liệu có bản chất từ khung nền ngoại bào.

Bài báo trình bày việc chế tạo màng tim bò vô bào gia cường có cố định heparin bằng phương pháp LbL cùng với sự tham gia của các ion DHI. Sau khi được xử lý, màng thí nghiệm được định lượng heparin và vi cấu trúc. Màng có cố định heparin được khảo sát khả năng kháng đông máu tức thời, và sau một khoảng thời gian thải rửa. Đặc tính màng hỗ trợ sự bám dính của các tế bào nội mô cũng được đánh giá nhằm dự đoán khả năng cho phép tái lập nội mô của màng trong định hướng sử dụng làm màng ghép tim mạch.

VẬT LIỆU PHƯƠNG PHÁP

Chuẩn bị màng tim bò vô bào gia cường có cố định heparin

Màng tim bò vô bào gia cường (gọi tắt màng M) được chuẩn bị theo phương pháp đã công bố của nhóm nghiên cứu [12,13]. Theo đó, màng tim bò tươi được thu nhận và xử lý loại bỏ thành phần tế bào bằng dung dịch Tris-HCl 10 mM trong 8 giờ (Sigma, Hoa Kỳ) và dung dịch sodium dodecyl sulfate 0,15% trong 12 giờ (Sigma, Hoa Kỳ). Tiếp theo, màng vô bào được gia cường bằng cách ủ trong dung dịch glutaraldehyde 0,1% trong 6 giờ (Merck, Đức). Màng vô bào gia cường trải qua hai giai đoạn rửa với dung dịch ammonium acetate 50 mM (Sigma-Aldrich) trong 24 giờ và dung dịch đệm phosphate (PBS 1X; Gibco, USA) trong 24 giờ. Cuối cùng, màng được xử lý đông lạnh khô và khử trùng bằng chiếu xạ tia gamma với liều 25 KGy.

Màng M được cố định heparin bằng quy tắc LbL. Trong đó, một chu kỳ LbL bao gồm các bước ngâm (i) dung dịch NaCl 0,9% (Merck, Đức), (ii) dung dịch DHI 0,05 mol/L (Sigma, Hoa Kỳ) và (iii) dung dịch heparin 5 mg/mL (Sigma, Hoa Kỳ). Màng M được cố định heparin (màng MDH) sau khi hoàn thành 7 chu kỳ LbL liên tiếp (8). Màng MDH được sử dụng cho các bước đánh giá sau. Nhóm màng đối chứng được chuẩn bị bằng quy trình LbL tương tự, nhưng không có sự hiện diện của heparin, được ký hiệu là màng MD.

Đánh giá cấu trúc của màng

Các mẫu sau khi được cố định heparin sẽ được trữ trong formaldehyde 10% (Merck, Đức) trong vòng 24 giờ để được xử lý cho đánh giá mô học bằng nhuộm hematoxyline và eosin (H&E). Ngoài ra, cấu trúc bề mặt màng được ghi nhận bằng kỹ thuật chụp kính hiển vi điện tử quét (SEM, Scanning electron microscope) (JSM-6510, JEOL, Nhật).

Thử nghiệm toluidine blue O

Thử nghiệm toluidine blue O (TBO) được thực hiện nhằm xác định hàm lượng heparin đã được cố định trên màng. Các màng thử nghiệm được đông khô, cắt thành kích thước 1 $\times$ 1 cm^2, và ngâm trong 250 μL dung dịch TBO 0,04% (Sigma, Hoa Kỳ) ở 37°C trong 4 giờ. Mẫu màng được rửa lại bằng nước khử ion và thấm ra bằng giấy Whatman. Mẫu màng được ngâm trong hỗn hợp dung dịch ethanol 80% / NaOH 0,1 M (Merck, Đức) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Dịch nổi được thu nhận và đo độ hấp thụ của phức hợp hòa tan ở bước sóng 492 nm (OD492) (EZ Read 400, Biochrom, Anh) [8]. Hàm lượng heparin được xác

định từ giá trị OD_{492} và đường chuẩn heparin. Nhóm màng đối chứng được chuẩn bị bằng quy trình LbL tương tự, nhưng không có sự hiện diện của heparin, được ký hiệu là màng MD, giúp loại trừ giá trị nền do sự bám thuốc nhuộm toluidine blue O không đặt hiệu.

Thử nghiệm đông máu

Khả năng chống đông máu trên bề mặt màng thí nghiệm được thử nghiệm bằng cách cho tiếp xúc máu trực tiếp. Máu sử dụng cho thí nghiệm này là máu toàn phần có chứa chất kháng đông ACD (Anticoagulant Citrate Dextrose). Các màng thí nghiệm được ủ với 500 μL máu toàn phần trong 5 phút ở 37°C. Sau đó, 50 μL $CaCl_2$ (Merck, Đức) 100 mM (Tỉ lệ 1:10 thể tích máu) để kích hoạt quá trình hình thành cục máu đông[14,15]. Sau 60 phút, ghi nhận hình ảnh ảnh để xác định sự tạo thành huyết khối trên bề mặt màng thí nghiệm. Thí nghiệm được chia làm 05 nhóm: chứng dương là mẫu thủy tinh mỏng - cho phép huyết khối bám vào bề mặt; chứng âm là mẫu polyethylene – không xảy ra sự bám huyết khối; màng M, màng MDH và màng MD. Thử nghiệm được thực hiện ở hai mốc thời gian: thời điểm ngay sau khi cố định heparin và sau 30 ngày ngâm màng trong dung dịch PBS 1X nhằm dự đoán khả năng kháng đông máu sau 30 ngày thải heparin.

Đánh giá độc tính dịch chiết *in vitro*

Khả năng gây độc của màng MDH được đánh giá gián tiếp thông qua dịch chiết màng đối với nguyên bào sợi L929 (tế bào L929, ATCC, Hoa Kỳ). Tế bào L929 được nuôi bằng môi trường CM, với thành phần DMEM-F12 (Sigma, Hoa Kỳ) có huyết thanh bào thai bò (FBS, Sigma, Hoa Kỳ) và kháng sinh 1X (Sigma, Hoa Kỳ). Dịch chiết màng MDH được chuẩn bị bằng cách ngâm màng trong môi trường CM (Sigma, Hoa Kỳ) ở 37°C, trong 24 giờ (3 cm^3/mL, theo ISO 10993-12)[16].

Tế bào L929 được cấy vào các giếng của đĩa 96 giếng (Nunc, Hoa Kỳ) (mật độ 10^4 tế bào/giếng) và nuôi ở điều kiện 37 °C, 5% CO_2. Sau khi tế bào bám, môi trường nuôi cấy ở mỗi giếng được thay thế bằng dịch chiết mẫu màng MDH và được ủ ở điều kiện 37 °C, 5% CO_2 trong 24 giờ. Dung dịch MTT 0,5 mg/mL (Sigma, Hoa Kỳ) được bổ sung vào các giếng thử nghiệm và ủ trong 4 giờ. Các tế bào sống tạo thành tinh thể formazan và được hòa tan bằng dung dịch ethanol/DMSO (Sigma, Hoa Kỳ). Dung dịch trong giếng được ghi nhận giá trị mật độ quang ở bước sóng 570 nm (OD570). Mức độ sống tương đối của tế bào (%V) được tính theo công thức: %V= (OD570 của nhóm thí nghiệm/ OD570 của nhóm chứng âm) × 100%. Màng được xem là không gây độc cho tế bào nếu %V > 70% (theo ISO 10993-5) (17). Trong đó, môi trường CM được sử dụng như đối chứng chứng âm, môi trường CM chứa 20% DMSO (Sigma, Hoa Kỳ) được xem là đối chứng chứng dương do khả năng gây độc cao đối với tế bào.

Đánh giá khả năng hỗ trợ nội mô hóa của khung nâng đỡ

Khả năng hỗ trợ nội mô hóa của màng MDH được dự đoán thông qua sự bám của tế bào nội mô trên màng sau khi được cấy. Màng MDH được cắt thành hình tròn, có kích thước bằng với giếng của đĩa 96 giếng và được đặt cố định vào giếng. Tế bào nội mô (HUVEC, ATCC, Hoa Kỳ) được cấy vào giếng đã có đặt màng, với mật độ 5×10^4 tế bào/giếng. Màng chứa tế bào được nuôi ở điều kiện 37^{o}C, 5% CO_2 trong 24 giờ. Sau đó, môi trường nuôi cấy được thay mới và tiếp tục nuôi trong 24 giờ. Để xác định tế bào nội mô sống và bám trên màng, các mẫu màng được tương ứng ủ với thuốc thử MTT 0,5 mg/mL trong 4 giờ, và thuốc thử Calcein (tỷ lệ 1:1000, Thermo Scientific, Hoa Kỳ) trong 30 phút. Tế bào sống trên màng được xác định thông qua sự hình thành tinh thể formazan và hình ảnh quan sát dưới kính hiển vi soi nổi (Zeiss, Đức). Sau khi nhuộm Calcein, sự bám của tế bào nội mô trên màng được quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược, có tích hợp huỳnh quang (Olympus, Nhật).

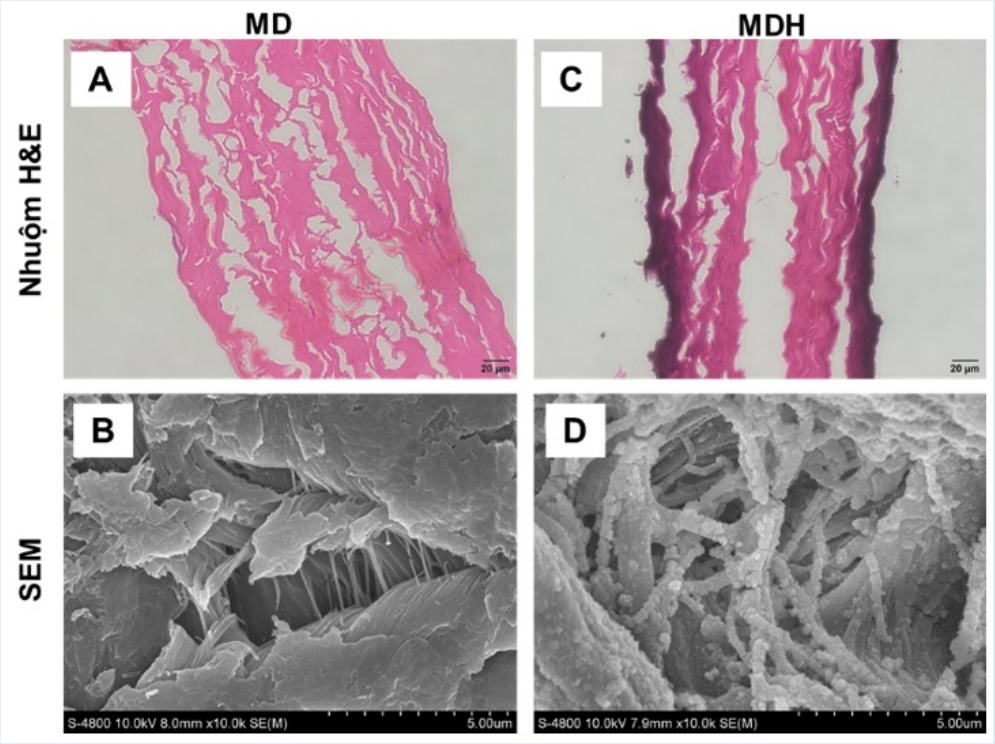
Phương pháp xử lý số liệu

Các đánh giá được thực hiện với độ lặp lại 3 lần. Đồ thị được thể hiện ở dạng trung bình ± độ lệch chuẩn và phân tích thống kê bằng phần mềm Prism 6 (GraphPad Software, Mỹ). Khác biệt so sánh có ý nghĩa thống kê khi giá trị $p < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Cấu trúc màng tim bò vô bào gia cường có cố định heparin

Màng tim bò vô bào gia cường có bản chất là khung nền ngoại bào, chứa phần lớn sợi collagen loại I, có xu hướng mang tính kiềm, nên dễ dàng được nhuộm bởi thuốc nhuộm có tính acid là eosin và hiển thị thành các sợi màu hồng. Phân tử heparin chứa nhiều nhóm sulfate và carboxylic acid nên thể hiện tính acid[17,18], nên có khả năng tương tác bắt màu bởi thuốc nhuộm có tính kiềm hematoxyline, do đó hiển thị vùng màu xanh tím trên tiêu bản nhuộm. Hình ảnh H&E cho thấy tại nhóm màng MD (Hình 1A), khung nền ngoại bào bắt màu hồng và không có vùng dương tính với hematoxyline. Sau khi được cố định heparin, vùng ngoại vi của mẫu MDH có sự nhuộm



Hình 1: Kết quả đánh giá cấu trúc màng. (A) Mẫu màng không có heparin – nhuộm H&E; (B) Mẫu màng không có heparin – SEM; (C) Mẫu màng được cố định heparin – nhuộm H&E; (D) Mẫu màng được cố định heparin – SEM.

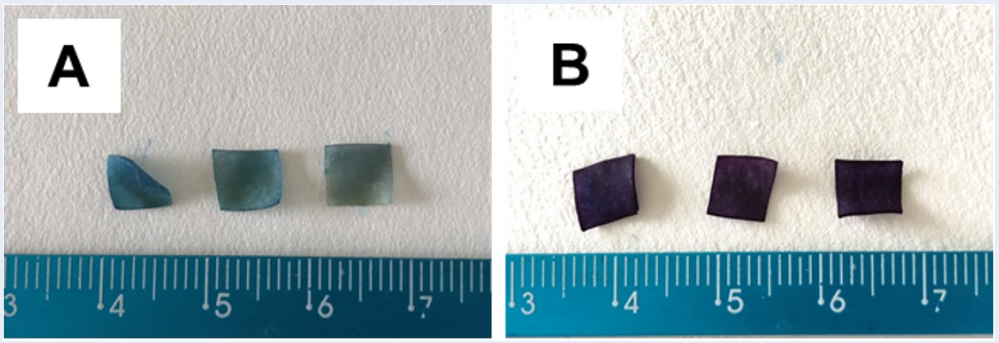
màu xanh tím đậm, trong khi thành phần của khung nền ngoại bào thể hiện màu hồng (Hình 1C). Ngoài ra, phức hợp DHI/heparin còn được phát hiện với dạng các vi hạt bám lên các sợi và phân bố khắp trên bề mặt màng MDH (Hình 1D), điều này không xuất hiện với màng MD khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (Hình 1B).

Định lượng heparin

Heparin trên màng được đánh giá dựa trên sự hình thành phức hợp heparin–toluidine bền dạng không hòa tan, làm cho màng bắt màu xanh tím sau khi ủ trong dung dịch toluidine blue. Kết quả quan sát đại thể cho thấy màng MD có màu xanh nhạt (Hình 2A), trong khi đó, màng MDH thể hiện màu xanh tím đậm, dự đoán có sự hiện diện một lượng heparin đáng kể ở nhóm màng MDH (Hình 2B). Sau khi được ngâm trong dung dịch ly giải ethanol/NaOH và đo độ hấp thụ quang học, hàm lượng heparin ở màng MDH là 83,64 $\pm$ 8,657 μg/cm^2 (n = 9) (Bảng 1). Kết quả này chứng minh phương pháp LbL đã cố định thành công heparin vào màng tim bò vô bào gia cường với hiệu suất cao.

Thử nghiệm đông máu

Thử nghiệm đông máu nhằm kiểm tra hiệu quả hạn chế sự bám của huyết khối trên bề mặt màng có cố định heparin. Trong thử nghiệm, máu toàn phần chứa chất kháng đông được sử dụng. Sự đông máu được khởi phát nhờ vào bổ sung ion Ca^{2+} ngoại sinh. Bề mặt thủy tinh mỏng (đối chứng dương) và các thành phần khung nền ngoại bào cho phép tương tác bám và hấp thụ tốt các thành phần protein huyết tương, do đó tạo điều kiện cho huyết khối bám dính và tích tụ (Hình 3A). Cơ sở này lý giải cho kết quả quan sát đại thể về sự hình thành khối máu đông trên bề mặt của mẫu thủy tinh và màng MD (Hình 3C, D). Ở đối chứng âm (Hình 3B), mẫu nhựa polyethylene không có sự hình thành huyết khối. Tương tự với vật liệu polyethylene, tại nhóm màng MDH (Hình 3E), không có huyết khối được phát hiện trên bề mặt mẫu. Sự hiện diện của nhiều nhóm sunfate và axit cacboxylic quy định đặc tính tích điện âm mạnh của phân tử heparin. Bề mặt vật liệu có cố định heparin cũng được biến đổi theo hướng tích điện âm, do đó hạn chế được hấp thụ protein huyết tương nhờ vào lực đẩy tĩnh điện [17,18]. Nhờ vậy, bề mặt vật liệu có cố định heparin, cụ thể là nhóm màng MDH, được hạn chế

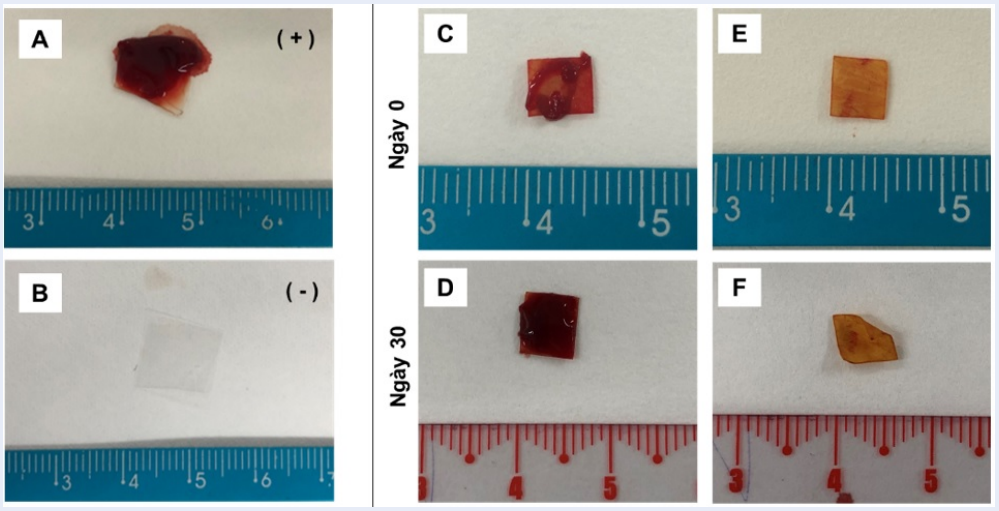


Hình 2: Kết quả quan sát đại thể màng sau khi ủ với toluidine blue O. (A) Mẫu màng không có heparin; (B) Mẫu màng được cố định heparin bằng phương pháp LbL

Bảng 1: Kết quả định lượng heparin trên màng

Mẫu	Hàm lượng heparin ($\mu g/cm^2$)									Trung bình
MD	4,67	5,91	4,06	2,62	3,65	1,98	1,98	1,98	1,98	3,20
MDH	90,82	98,23	94,11	71,88	79,09	77,65	90,20	91,23	88,35	
MDH sau khi loại bỏ giá trị nền	87,62	95,03	90,91	68,68	75,89	74,44	87,00	88,03	85,15	83,64

MD (Mẫu màng không có heparin), MDH (Mẫu màng được cố định heparin bằng phương pháp LbL)



Hình 3: Kết quả thử nghiệm đông máu trên bề mặt màng thử nghiệm. (A) Chứng dương: mẫu thủy tinh; (B) Chứng âm: mẫu nhựa polyethylene; (C) Mẫu màng không có heparin, ngày 0; (D) Mẫu màng không có heparin, ngày 30; (E) Mẫu màng được cố định heparin, ngày 0; (D) Mẫu màng được cố định heparin, ngày 30.

đáng kể sự bám dính huyết khối. Sau 30 ngày ngâm trong dung dịch PBS 1X, màng MDH vẫn duy trì được hiệu quả kháng huyết khối (Hình 3F), dự đoán vẫn còn một lượng heparin hoạt tính tồn tại trên màng. Vài nghiên cứu về mảnh ghép mạch máu đã công bố cho thấy tình trạng huyết khối có thể được phát hiện trong vòng 10 ngày sau ghép, tuy nhiên nguy cơ huyết khối thấp được ghi nhận sau 30 ngày[19,20]. Dựa trên sự tham chiếu này, mẫu màng MDH ứng viên có tiềm năng ứng dụng làm mảnh ghép mạch máu.

Đánh giá độc tính dịch chiết

Theo tiêu chuẩn ISO 10993-5, đánh giá độc tính tế bào *in vitro* là cần thiết nhằm đảm bảo các chất tiết ra từ màng không gây ảnh hưởng đến các tế bào và phản ứng thải loại với mô sau khi ghép[21]. Sau khi ủ với dung dịch MTT, tinh thể formazan màu tím được hình thành nhờ vào hoạt động khử muối tetrazolium của enzyme dehydrogenase có mặt trong các tế bào sống. Kết quả cho thấy có sự xuất hiện tinh thể formazan ở giếng nhóm đối chứng âm và màng thí nghiệm (Hình 4A, C). Ngược lại, ở các giếng chứng dương hầu như không xuất hiện tinh thể màu tím, do sự xuất hiện của DMSO đã gây độc đối với tế bào (Hình 4B).

Để xác định %RGR và độ độc tính, tinh thể formazan được hòa tan trong dung môi Ethanol/DMSO tạo thành dung dịch màu tím và đo mật độ quang ở bước sóng 570 nm. %RGR ghi nhận được ở nhóm chứng âm là 96,44 6,489%, ở dịch chiết màng thí nghiệm là 93,99 9,165% (Hình 4D), cao hơn mức tối thiểu là 70%, điều này chứng tỏ màng không gây độc cho tế bào.

Đánh giá khả năng hỗ trợ nội mô hóa của khung nâng đỡ

Khả năng hỗ trợ nội mô hóa được đánh giá thông qua sự sống và bám dính của tế bào nội mô trên màng MDH. Thuốc thử MTT được chuyển hóa bởi enzyme của ty thể trong tế bào sống và hình thành các tinh thể formazan màu tím. Tại nhóm màng không được cấy tế bào hoặc không có tế bào sống, các tinh thể formazan sẽ không được hình thành (Hình 5A). Quan sát dưới kính hiển vi soi nổi đã ghi nhận sự hiện diện của các tinh thể formazan màu tím trên màng MDH đã cấy tế bào (Hình 5B). Các tinh thể formazan được tạo thành và phân bố đồng đều trên bề mặt màng MDH, chứng tỏ màng MDH cho phép sự hiện diện và sống sót của các tế bào nội mô sau 48 giờ được cấy lên màng. Ngoài ra, thuốc thử Calcein cũng được hấp thụ bởi tế bào sống, do đó, nhuộm và hiển thị hình thái bám của tế bào trên màng. Quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, các tế bào bắt màu Calcein có màu xanh lá (Hình 5C). Các tế bào nội mô thể hiện hình thái bám thuôn dài trên màng. Do màng có cấu trúc dạng sợi ba chiều, một số tế bào có thể bám và phân bố theo các sợi đang xen ba chiều và hiển thị dưới dạng các đốm xanh. Như vậy, các kết quả với thuốc thử MTT và calcein chứng minh màng MDH đã đảm bảo sự sống và bám trải của các tế bào nội mô trên màng, giúp dự đoán khả năng hỗ trợ nội mô hóa của màng.

KẾT LUẬN

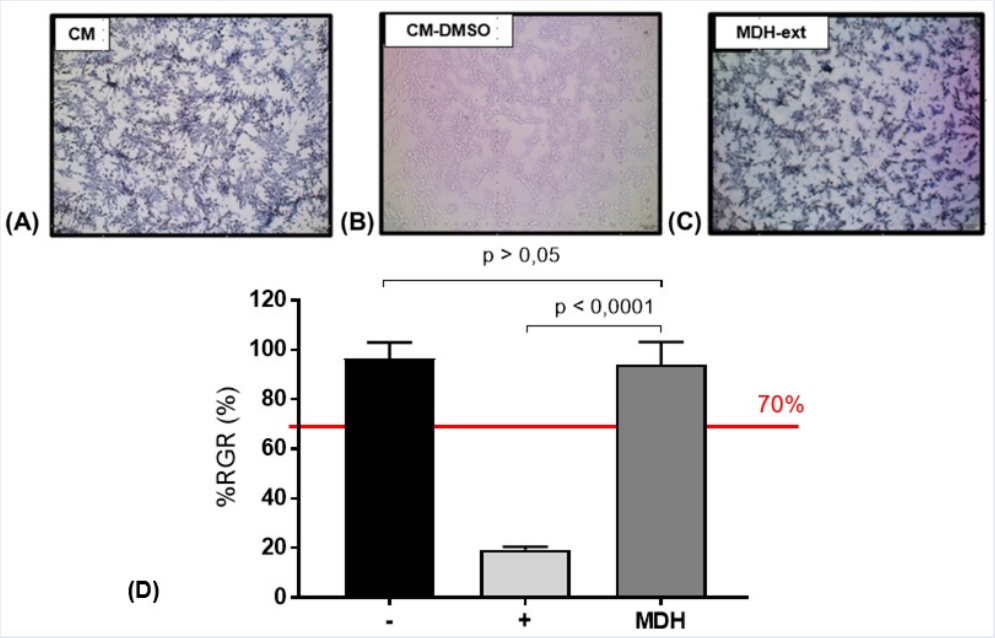
Bài báo trình bày việc chế tạo màng tim bò vô bào gia cường được cố định heparin nhằm cải thiện đặc tính chống đông máu. Đánh giá cấu trúc và định lượng heparin đã chỉ ra phương pháp cố định từng lớp (LbL) và kết hợp với ion DHI đã cho phép cố định được heparin lên bề mặt màng tim bò vô bào gia cường. Bề mặt màng có cố định heparin đã thể hiện đặc tính chống đông máu và duy trì đặc tính này lên đến 30 ngày thử nghiệm. Ngoài ra, màng tim bò vô bào gia cường có cố định heparin đã hỗ trợ sự bám của tế bào nội mô sau 48 giờ cấy. Các kết quả đánh giá ban đầu đã cho thấy hiệu quả cố định heparin trong cải thiện khả năng chống đông máu và hỗ trợ nội mô hóa *in vitro* của màng tim bò vô bào gia cường, do đó, được định hướng nghiên cứu ứng dụng trong phẫu thuật mạch máu.

LỜI CẢM ƠN

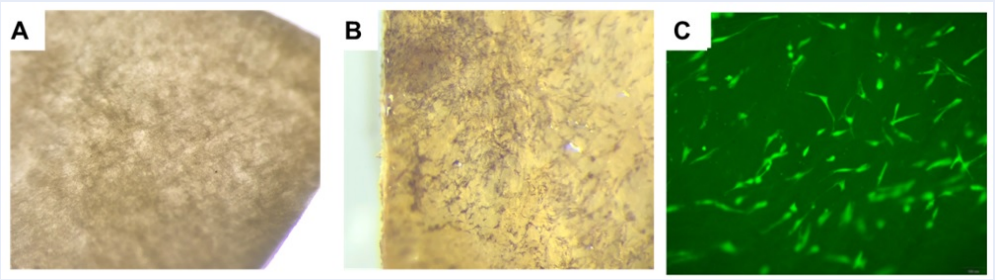
Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) trong khuôn khổ Đề tài mã số B2021-18-03.

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

CVD Cardio Vascular Diseases Bệnh tim mạch
ACD Anticoagulant Citrate Dextrose Chất chống đông máu
LBL Layer-by-Layer Cố định từng lớp
FBS Fetal Bovine Serum Huyết thanh bào thai bò
SEM Scanning Electron Microscope Kính hiển vi điện tử quét
CM Complete Medium Môi trường nuôi cấy
HUVEC Human umbilical vein endothelial cells Tế bào nội mô tĩnh mạch rốn của con người
TBO Toluidine Blue O Thuốc nhuộm Toluidine Blue O
RGR Relative growth rate Tỉ lệ tăng trưởng tương đối
DHI Dihydroxy-ironDMEM-F12 Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO Dimethyl sulfoxide
H&E Hematoxyline & Eosin
MTT 3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide



Hình 4: Kết quả đánh giá độc tính dịch chiết màng MDH. (A) Chứng âm: môi trường CM, (B) Chứng dương: CM bổ sung 20% DMSO (CM-DMSO); (C) Dịch chiết màng thí nghiệm MDH (MDH-ext); (D) Biểu đồ biểu diễn tỷ lệ tế bào sống tương đối ở các nhóm thí nghiệm.



Hình 5: Đánh giá sự hiện diện của tế bào nội mô trên màng MDH. (A) Màng không cấy tế bào (thuốc thử MTT); (B) Màng được cấy tế bào (thuốc thử MTT); (C) Màng được cấy tế bào (thuốc thử calcein).

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Nhóm tác giả xin cam đoan rằng không có bất kỳ xung đột lợi ích nào trong công bố bài báo.

ĐÓNG GÓP TÁC GIẢ

Nguyễn Thị Ngọc Mỹ lên kế hoạch nghiên cứu, thực hiện các thí nghiệm, thu thập và xử lý dữ liệu và đóng góp viết bản thảo. Phan Thị Hiếu Nghĩa và Lâm Minh Hoàng đóng góp viết bản thảo, khảo sát và hoàn thiện bản thảo. Trần Lê Bảo Hà định hướng và lên kế hoạch nghiên cứu, hướng dẫn nghiên cứu, đóng góp khảo sát và góp ý bản thảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Muto A, Nishibe T, Dardik H, Dardik A. Patches for carotid artery endarterectomy: current materials and prospects. Journal of vascular surgery. 2009;50(1):206-13;PMID: 19563972. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jvs.2009.01.062.
2. Edenfield L, Blazick E, Healey C, Hawkins R, Bloch P, Eldrup-Jorgensen J. Long-term impact of the vascular study group of New England carotid patch quality initiative. Journal of Vascular Surgery. 2019;69(6):1801-6;PMID: 31159983. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jvs.2018.07.078.
3. Pashneh-Tala S, MacNeil S, Claeyssens F. The tissue-engineered vascular graft-Past, Present, and future. Tissue Eng Part B Rev. 2016;22(1):68-100;PMID: 26447530. Available from: https://doi.org/10.1089/ten.teb.2015.0100.
4. Brown B, Lindberg K, Reing J, Stolz DB, Badylak SF. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. Tissue Engineering. 2006;12(3):519-26;PMID: 16579685. Available from: https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.519.

5. Li X, Guo Y, Ziegler KR, Model LS, Eghbalieh SD, Brenes RA. Current usage and future directions for the bovine pericardial patch. Annals of Vascular Surgery. 2011;25(4):561-8;PMID: 21276709. Available from: https://doi.org/10.1016/j.avsg.2010.11.007.
6. Ren S, Li X, Wen J, Zhang W, Liu P. Systematic review of randomized controlled trials of different types of patch materials during carotid endarterectomy. Plos One. 2013;8(1):e55050;PMID: 23383053. Available from: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055050.
7. Liu Z, Fang L, Delaittre G, Ke Y, Wu G. Heparinized polyurethane surface via a one-step photografting method. Molecules. 2019;24(4):758;PMID: 30791534. Available from: https://doi.org/10.3390/molecules24040758.
8. Tao Y, Hu T, Wu Z, Tang H, Hu Y, Tan Q, Heparin nanomodification improves biocompatibility and biomechanical stability of decellularized vascular scaffolds. International Journal of Nanomedicine. 2012;7:5847-58;PMID: 23226016. Available from: https://doi.org/10.2147/IJN.S37113.
9. Mi HY, Jing X, Thomsom JA, Turng LS. Promoting endothelial cell affinity and antithrombogenicity of polytetrafluoroethylene (PTFE) by mussel-inspired modification and RGD/heparin grafting. Journal of Materials Chemistry B. 2018;6:3475-85;PMID: 30455952. Available from: https://doi.org/10.1039/C8TB00654G.
10. Aslani S, Kabiri M, HosseinZadeh S, Hanaee-Ahvaz H, Taherzadeh ES, Soleimani M. The applications of heparin in vascular tissue engineering. Microvascular Research. 2020;131:104027;PMID: 32505610. Available from: https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104027.
11. Li C, Mao J, Li Q, Wang F, Jiao Y, Zhang Z. Long-term anticoagulation and selective cells adhesion surface via combination of covalent grafting and layer by layer assembly. Biomedical Materials (Bristol, England). 2019;14(6):065012;PMID: 31530752. Available from: https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab452b.
12. Nguyen MTN, Tran HLB. Effect of modified bovine pericardium on human gingival fibroblasts in vitro. Cells Tissues Organs. 2018;206(6):296-307;PMID: 31357195. Available from: https://doi.org/10.1159/000501807.
13. Nguyen MTN, Doan VN, Tran HLB. In vitro study on chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells on treated bovine pericardium. Turk J Biol. 2019;43(6):360-70;PMID: 31892811. Available from: https://doi.org/10.3906/biy-1908-10.
14. Weber M, Steinle H, Golombek S, Hann L, Schlensak C, Wendel HP. Blood-contacting biomaterials: In vitro evaluation of the hemocompatibility. Frontiers in bioengineering and biotechnology. 2018;6(99);PMID: 30062094. Available from: https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00099.
15. Mohan CC, Chennazhi KP, Menon D. In vitro hemocompatibility and vascular endothelial cell functionality on titania nanostructures under static and dynamic conditions for improved coronary stenting applications. Acta Biomaterialia. 2013;9(12):9568-77;PMID: 23973390. Available from: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.08.023.
16. Jansen T, Wallin R. A practical guide to ISO 10993-12: sample preparation and reference materials. Medical Device and Diagnostic Industry. 1998;20:61-2;.
17. Patel HJBC, Fibrinolysis. Blood biocompatibility enhancement of biomaterials by heparin immobilization: a review. Blood Coagulation & Fibrinolysis. 2021;32(4):237-47;PMID: 33443929. Available from: https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000001011.
18. Biran R, Pond DJAddr. Heparin coatings for improving blood compatibility of medical devices. Advanced Drug Delivery Reviews. 2017;112:12-23;PMID: 28042080. Available from: https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.12.002.
19. Farb A, Weber DK, Kolodgie FD, Burke AP, Virmani R. Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. Circulation. 2002;105(25):2974-80;PMID: 12081990. Available from: https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000019071.72887.BD.
20. Korantzopoulos P, Letsas KP, Liu T, Fragakis N, Efremidis M, Goudevenos JA. Anticoagulation and antiplatelet therapy in implantation of electrophysiological devices. EP Europace. 2011;13(12):1669-80;PMID: 21788280. Available from: https://doi.org/10.1093/europace/eur210.
21. ISO I. 10993-5: 2009 Biological evaluation of medical devices-part 5: tests for in vitro cytotoxicity. International Organization for Standardization, Geneva. 2009;.

Science & Technology Development Journal – Natural Sciences 2022, 6(3):2251-2259

Open Access Full Text Article

In vitro antithrombogenicity and endothelialization evaluation of heparin immobilized bovine pericardial scaffold

Nguyen Thi Ngoc My[1,2,3,*], Phan Thi Hieu Nghia[1,2,3], Lam Minh Hoang[2,3], Tran Lê Bao Ha[1,2,3]

Use your smartphone to scan this QR code and download this article

ABSTRACT

Thrombogenicity is one of the challenges when using membrane grafts in cardiovascular surgery. Therefore, this paper presented the fabrication of bovine pericardial scaffold immobilized with heparin in order to improve its antithrombogenicity for the application in the cardiovascular field. Heparin was immobilized on the scaffolds by the layer-by-layer method, based on the interaction of heparin and dihydroxy-iron (DHI). The structure, biochemistry, anticoagulation, and ability to support the endothelial cell attachment were evaluated to determine the effectiveness of the heparin immobilization. Histology staining and scanning electron microscopy images revealed the presence of heparin on the bovine pericardial scaffolds. The quantitative result demonstrated that the layer-by-layer method significantly increased the heparin content on bovine pericardial scaffolds. The heparin-immobilized scaffolds performed a good antithrombogenicity after direct incubation in the whole blood samples. This antithrombogenicity was maintained after 30 days of testing. Additionally, the scaffolds were shown to cause no cytotoxicity and support endothelial cell adhesion after 48 hours. These results indicated the potential of heparin-immobilized bovine pericardial scaffolds for the application in cardiovascular transplantation.

Key words: anticoagulation, bovine pericardium, endothelialization support, heparin, layer-by-layer immobilization

[1]*Department of Physiology and Animal Biotechnology, Faculty of Biology - Biotechnology*

[2]*University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam*

[3]*Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam*

Correspondence

Nguyen Thi Ngoc My, Department of Physiology and Animal Biotechnology, Faculty of Biology - Biotechnology

University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam

Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

Email: ntnmy@hcmus.edu.vn

History

- Received: 10-01-2022
- Accepted: 16-9-2022
- Published: 30-9-2022

DOI : 10.32508/stdjns.v6i3.1159

Check for updates

Copyright

© VNUHCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

VNUHCM PRESS

Cite this article : My N T N, Nghia P T H, Hoang L M, Ha T L B. ***In vitro*** **antithrombogenicity and endothelialization evaluation of heparin immobilized bovine pericardial scaffold**. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*;2022, 6(3):2251-2259.