

Thu nhận chất nền vô bào từ da người bằng phương pháp sóng siêu âm kết hợp với dung dịch sodium dodecyl sulfate

Đoàn Nguyên Vũ^{1,2,*}, Nguyễn Thị Ngọc Mỹ^{1,2}, Tô Minh Quân^{1,2}, Vũ Thị Thanh Tâm³, Phan Hữu Hùng⁴, Lê Quang Trí³, Trần Lê Bảo Hà^{1,2}

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Bệnh viện Quân Y 7A, Việt Nam

⁴Bệnh viện Quân Dân Y Miền Đông, Việt Nam

Liên hệ

Đoàn Nguyên Vũ, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam
Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Email: dnvu@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 17-7-2023
- Ngày chấp nhận: 15-5-2024
- Ngày đăng: 30-6-2024

DOI:

<https://doi.org/10.32508/stdjns.v8i2.1298>



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.



TÓM TẮT

Chất nền ngoại bào (Extracellular matrix, ECM) từ da người là nguồn vật liệu tiềm năng cho các ứng dụng trong y học tái tạo thí dụ như điều trị tổn thương mất da, thay thế cơ quan khiếm khuyết và mực in ba chiều sinh học. Để thu nhận ECM có thể sử dụng được, thành phần tế bào gây ra phản ứng miễn dịch cần phải được loại bỏ. Các phương pháp khử tế bào của da thường chia thành ba loại (vật lý, hóa học và sinh học) và tối ưu khi được kết hợp thay vì sử dụng riêng lẻ. Bài báo này trình bày việc da người được thu nhận và bảo quản trong dung dịch muối (phosphate buffered saline, PBS) 1X có bổ sung kháng sinh trong 24 giờ. Sau đó, mẫu da thu nhận được khử tế bào bằng ba phương pháp, gồm sử dụng sóng siêu âm kết hợp với dung dịch sodium dodecyl sulfate (SDS), dung dịch NaCl ưu trương kết hợp với dung dịch SDS và dung dịch trypsin ở nhiều nồng độ. Hiệu quả khử tế bào được đánh giá bằng phương pháp nhuộm mô học và định lượng nồng độ DNA còn lại. Kết quả cho thấy phương pháp khử tế bào bằng sóng siêu âm kết hợp với SDS giúp loại bỏ hoàn toàn thành phần tế bào và bảo tồn cấu trúc của ECM tốt hơn. Hơn nữa, ECM không gây độc cho nguyên bào sợi của người khi được đánh giá *in vitro*. Kết quả này có thể làm cơ sở cho việc thu nhận ECM vô bào từ da người hướng đến các ứng dụng trong lĩnh vực y sinh.

Từ khoá: chất nền ngoại bào, sóng siêu âm, khử tế bào, ưu trương, sodium dodecyl sulfate

MỞ ĐẦU

Chất nền ngoại bào (ECM) từ da là cấu trúc cấu tạo nên lớp trung bì, bao gồm các protein dạng sợi đàn hồi như collagen, elastin, fibrillin, proteoglycans và laminin; đây là những phân tử có tính acid và hấp thụ nước cao. ECM rất đa dạng do liên kết với các thụ thể trên bề mặt tế bào và liên tục được biến đổi bởi nhiều loại enzyme. Các thành phần của ECM liên kết với nhau để tạo thành một hỗn hợp ổn định về mặt cấu trúc góp phần tạo nên các đặc tính cơ học của mô. Ngoài ra, ECM cũng là nơi chứa các yếu tố tăng trưởng và các phân tử có hoạt tính sinh học¹⁻³. ECM nói chung và ECM từ da, nói riêng, được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực y sinh. Hiện nay, với sự tiến bộ của kỹ nghệ mô, ECM ngày càng được sử dụng rộng rãi trong điều trị nhiều loại vết thương và đạt được kết quả tốt trên lâm sàng. Các ứng dụng có thể kể đến như điều trị bỏng độ 3, ghép che phủ chân răng do tụt nướu, sửa chữa gân cổ chân và tái tạo ngực^{2,4-7}.

Tế bào là thành phần kháng nguyên chính của mô; trong đó, các protein bề mặt tế bào chịu trách nhiệm cho phản ứng miễn dịch đào thải trong cấy ghép đồng loài và dị loài. Do đó, để ECM được sử dụng làm vật liệu cấy ghép đạt tiêu chuẩn, cần phải phát triển một phương pháp khử tế bào phù hợp. Ưu tiên hàng đầu

của một phương pháp tối ưu là loại bỏ hoàn toàn tế bào khỏi mô trong khi vẫn bảo tồn được các thành phần của ECM. Các phương pháp thường được sử dụng để khử tế bào bao gồm phương pháp hóa học, phương pháp sinh học và phương pháp vật lý. Nhìn chung, các phương pháp này không hiệu quả khi sử dụng riêng lẻ nên cần kết hợp từ hai phương pháp trở lên, để tạo ra quy trình khử tế bào phù hợp cho da^{8,9}. Về tác nhân hóa học, SDS thể hiện tác dụng hòa tan nhân tế bào, loại bỏ những protein trong tế bào chất. SDS đã được nghiên cứu sử dụng trong các quy trình khử tế bào một số loại mô và cơ quan, bao gồm ống mạch máu, màng tim, mô mỡ¹⁰⁻¹². Vì SDS cũng có thể gây ra các tác động phá hủy cấu trúc sinh học của ECM, cần xem xét nồng độ phù hợp cho quy trình khử tế bào với đối tượng là mô da. Đồng thời, sóng siêu âm được chỉ ra về khả năng hỗ trợ quá trình khử tế bào vì nó có khả năng loại bỏ tế bào khỏi ECM nhưng vẫn giữ nguyên cấu trúc của collagen, elastin, đồng thời bảo tồn các protein và phân tử chính của ECM. Sóng siêu âm cũng tạo điều kiện cho sự xâm nhập của hóa chất vào các mô, giúp tăng hiệu quả của quá trình khử tế bào, đã được ghi nhận ở các mô động mạch (kết hợp SDS) và mô da (kết hợp NaCl)¹³⁻¹⁶. Do đó, bài báo này trình bày việc kết hợp dung dịch SDS và

Trích dẫn bài báo này: Vũ D N, Mỹ N T N, Quân T M, Tâm V T T, Hùng P H, Trí L Q, Hà T L B. Thu nhận chất nền vô bào từ da người bằng phương pháp sóng siêu âm kết hợp với dung dịch sodium dodecyl sulfate. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2024; 8(2):2931-2938.

sóng siêu âm cho quy trình khử tế bào đối với mô da, nhằm thu nhận thành công chất nền vô bào, hướng đến các ứng dụng trong lĩnh vực y sinh.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu thí nghiệm

Mẫu da người được thu nhận bằng cách cắt lọc tại vùng rìa vết thương bởi các bác sĩ chuyên khoa của Bệnh viện Quân Y 7A, Thành phố Hồ Chí Minh (có sự chấp thuận của Hội đồng khoa học kỹ thuật bệnh viện). Mẫu da được chuyển vào ống dung dịch thu nhận gồm PBS 1X (Gibco, Hoa Kỳ) bổ sung penicillin 1000 IU/mL và streptomycin 1000 μ g/mL (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ). Mẫu được lưu trữ ở điều kiện lạnh với đá gel trong quá trình vận chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 24 giờ.

Phân lập và nuôi cấy nguyên bào sợi từ mẫu da thu nhận

Mẫu mô da thu nhận được cạo sạch lớp thượng bì và lớp mỡ, cắt thành các mảnh nhỏ kích thước khoảng $1 \times 1 \text{ mm}^2$. Sau đó, các mảnh mô được ủ trong 1 mL trypsin/EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) ¹⁷. Sau 45 phút, thêm môi trường nuôi cấy DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) có bổ sung 10% FBS (Fetal bovine serum) (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) với tỉ lệ 1:1; lọc dung dịch tế bào qua màng lọc 70 μ m và ly tâm 3000 vòng/phút trong 5 phút. Các tế bào được chuyển vào chai nuôi (Nunc, Hoa Kỳ), bổ sung môi trường nuôi cấy và ủ trong tủ ấm ở 37°C, 5% CO₂ (Panasonic, Nhật Bản). Khi tế bào đạt độ bao phủ khoảng 80% diện tích bình nuôi thì tiến hành cấy chuyển. Tế bào nuôi cấy thành công được đánh giá bằng cách quan sát hình dạng dưới kính hiển vi đảo ngược (Olympus, Nhật Bản) và nhuộm miễn dịch huỳnh quang với kháng thể vimentin.

Phương pháp khử tế bào mẫu da thu nhận

Mẫu da thu nhận được rửa bằng ethanol 100% (Merck, Đức); sau đó, rửa lại nhiều lần bằng PBS 1X và cắt lọc để loại bỏ các phần thừa như lông, mỡ. Mẫu được ngâm trong dung dịch PBS 1X, lắc qua đêm ở nhiệt độ phòng và được cắt thành các kích thước cỡ $1 \times 1 \text{ cm}^2$. Các mảnh da được chuyển sang falcon chứa isopropanol (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ), lắc qua đêm để loại bỏ mỡ và lắc mẫu với PBS 1X trong 4 giờ. Tiếp theo, mẫu được rửa lần lượt qua dung dịch PBS 1X có chứa kháng sinh 10X, 8X, 4X, 2X và không chứa kháng sinh (mỗi nồng độ ngâm trong 5 phút). Sau đó, các mảnh da được chuyển sang dung dịch PBS 1X có chứa kháng nấm amphotericin B (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) với nồng độ là 50 mg/L trong vòng 10 phút.

Cuối cùng rửa lắc mảnh da với PBS 1X qua đêm trước khi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Nghiệm thức 1

Các mẫu da được đặt trong falcon chứa 10 mL SDS 0,7% (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) ¹⁰⁻¹²; chuyển falcon vào bể siêu âm (Elma, Đức) ¹³⁻¹⁵; siêu âm liên tục trong 5 giờ ở nhiệt độ phòng, tần số 34 kHz. Các mẫu da sau khi siêu âm được rửa lại bằng PBS 1X và lắc trong tủ ấm với tốc độ 80 vòng/ phút, ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, mẫu được chuyển sang PBS 1X và bảo quản ở tủ mát khoảng 4°C.

Nghiệm thức 2

Các mẫu da được đặt trong falcon chứa 10 mL NaCl 1 M (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ), chuyển falcon vào tủ ấm 37°C trong 24 giờ. Sau đó, chuyển mẫu sang falcon mới chứa SDS 0,5% ¹⁰⁻¹²; đặt trong tủ ấm lắc với tốc độ 60 vòng/phút, ở nhiệt độ 37°C trong 2 giờ. Các mẫu da sau khi xử lý được rửa lại bằng PBS 1X và lắc trong tủ ấm 37°C trong 24 giờ với tốc độ 80 vòng/phút. Sau đó, mẫu được chuyển sang PBS 1X và bảo quản ở tủ mát khoảng 4°C.

Nghiệm thức 3

Các mẫu da được đặt trong falcon chứa 10 mL trypsin/EDTA ¹⁸ 0,25% ủ ở 4°C trong 48 giờ. Tiếp tục chuyển mẫu sang falcon chứa 10 mL trypsin/ EDTA 0,05% ủ ở 4°C trong 48 giờ. Sau đó, mẫu được chuyển sang PBS 1X và bảo quản ở tủ mát khoảng 4°C.

Phương pháp đánh giá hiệu quả việc khử tế bào mẫu da thu nhận

Nhuộm Hematoxylin & Eosin (H&E)

Mẫu da sau khi khử tế bào được cố định trong dung dịch formalin 10%, gửi nhuộm H&E tại phòng Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Đại Phước, Thành phố Hồ Chí Minh. Mẫu sau khi nhuộm được quan sát dưới kính hiển vi quang học.

Định lượng DNA

Mẫu da chưa qua xử lý và đã xử lý được đo nồng độ DNA bằng KIT Gen Elute™ (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi tách chiết được DNA, tiến hành đo nồng độ bằng máy NanoDrop (Thermo Scientific, Hoa Kỳ).

Đánh giá độc tính cấp tính trực tiếp của ECM vô bào trên nguyên bào sợi (NBS) nuôi cấy

NBS được cấy vào đĩa 6 giếng với mật độ 5×10^4 tế bào/giếng, bổ sung môi trường nuôi cấy, ủ trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂. Khi NBS đạt độ bao phủ 80–90%,

đặt mảnh ECM da vô bào lên bề mặt đĩa ở vị trí trung tâm (chiếm khoảng 1/10 bề mặt đĩa), ủ 24 giờ trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂. Quan sát, đánh giá mức độ gây độc dưới kính hiển vi đảo ngược dựa theo tiêu chuẩn ISO 10993-5:2009. Nếu phản ứng ở cấp độ 0–2, mẫu này được xem như không gây độc đối với NBS. Sau đó, các đĩa tế bào được tiến hành nhuộm MTT, đo OD ở bước sóng 570 nm, xác định mức độ độc tính thông qua %RGR (relative growth rate) với công thức: $\%RGR = (OD \text{ mẫu thí nghiệm}) / (OD \text{ mẫu chứng âm}) \times 100\%$

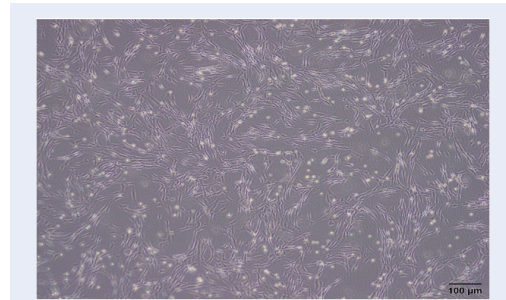
Mẫu được xem là không độc đối với tế bào khi giá trị %RGR cao hơn 70%.

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu nhận được xử lý theo chương trình Statgraphic 7.0 của Trường Đại học Michigan (Mỹ), theo phương pháp phân tích thống kê ANOVA one-way. Dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình ± độ lệch tiêu chuẩn và khác biệt thống kê có ý nghĩa ở mức giá trị p-value < 0,05.

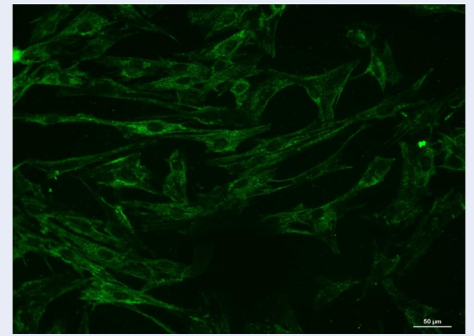
KẾT QUẢ

Kết quả phân lập và nuôi cấy nguyên bào sợi từ mẫu da thu nhận



Hình 1: Nguyên bào sợi được nuôi cấy 24 giờ (200X)

Nguyên bào sợi được phân lập từ mẫu mô da, nuôi cấy, và đánh giá các đặc tính về hình thái và sự biểu hiện vimentin. Theo kết quả quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược (Hình 1), nguyên bào sợi bám dính tốt, có dạng hình thoi đặc trưng và mật độ bao phủ cao cho thấy các yếu tố như môi trường nuôi cấy, nhiệt độ đủ ổn định để tạo điều kiện cho nguyên bào sợi phát triển. Đồng thời cũng cho thấy quá trình thu nhận mẫu da cũng như bảo quản bằng dung dịch PBS 1X có chứa kháng sinh tối ưu, đạt hiệu quả tốt, thích hợp dùng để quản mô sống trong 24 giờ. Ngoài ra, kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang (Hình 2) cho thấy vùng tế bào chất



Hình 2: Kết quả nhuộm vimentin nguyên bào sợi (400X)

xung quanh nhân bắt màu xanh lá, vùng nhân có màu xanh lợt hoặc không màu. Dấu hiệu cho thấy tế bào dương tính với vimentin. Nguồn nguyên bào sợi này được sử dụng làm nguyên liệu để đánh giá độc tính của ECM.

Kết quả đánh giá hiệu quả khử tế bào mẫu da thu nhận

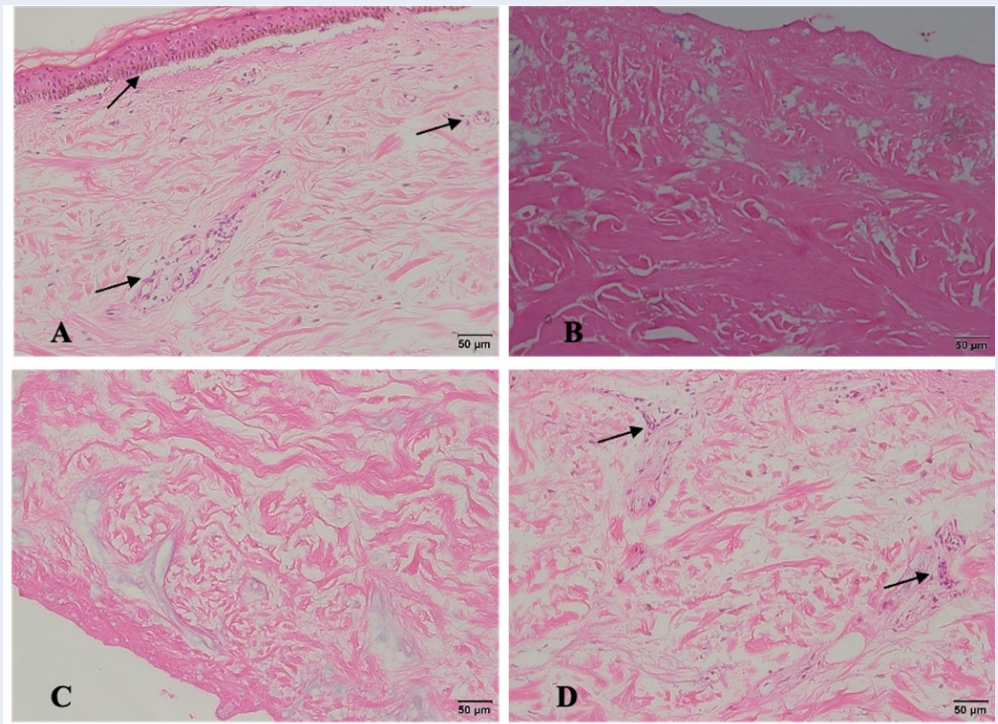
Kết quả nhuộm H&E

Quan sát mẫu mô da chưa qua xử lý (Hình 3A) cho thấy được cấu trúc của lớp thượng bì và trung bì vẫn còn nguyên vẹn. Kết quả ở nghiệm thức 1 (Hình 3B), không thấy sự xuất hiện của tế bào bắt màu tím xanh, thay vào đó các bó sợi ECM có xu hướng co cụm lại tạo thành mảng màu đậm hơn tạo ra những khoảng trống trong chất nền. Tương tự, đối với nghiệm thức 2 quan sát cũng không thấy sự xuất hiện của tế bào, cấu trúc ECM có nhiều khoảng trống hơn so với nghiệm thức 1 (Hình 3C). Ở nghiệm thức xử lý mô da với trypsin để loại bỏ tế bào (Hình 3D) cho thấy mật độ tế bào có xu hướng giảm so với mô da tự nhiên, nhưng vẫn xuất hiện khá nhiều, hiện diện ẩn sâu bên trong chất nền.

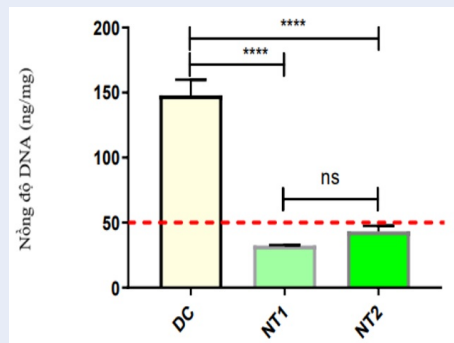
Kết quả đánh giá hàm lượng DNA tồn đọng

DNA là thành phần của nhân tế bào, là tác nhân gây ra hiện tượng đáp ứng miễn dịch đối với mô ghép. DNA cho phép của một mô khử tế bào cần phải thấp hơn 50 ng/mg trọng lượng khô⁸. Vì vậy, mô đã xử lý được tách chiết và đo nồng độ DNA tồn đọng. Ở kết quả nhuộm H&E, nghiệm thức trypsin cho thấy tế bào còn xuất hiện nhiều trong mô xử lý, nên nhóm nghiên cứu chỉ thực hiện so sánh nồng độ DNA của 2 nghiệm thức còn lại và so với mô tự nhiên.

Mô da tự nhiên với tế bào còn nguyên vẹn có nồng độ DNA cao 148±11,97 ng/mg trọng lượng khô. Nồng độ DNA của 2 nghiệm thức 1 và 2 lần lượt là



Hình 3: Các mẫu mô da nhuộm H&E (40X). A: Mô da chưa qua xử lý; B: Mô da xử lý theo nghiệm thức 1 (NT1); C: Mô da xử lý theo nghiệm thức 2 (NT2); D: Mô da xử lý theo nghiệm thức 3 (NT3). Mũi tên chỉ vị trí tế bào.



Hình 4: Biểu đồ nồng độ DNA đo được của các nghiệm thức. DC: mẫu chưa khử tế bào; NT1: Nghiệm thức 1; NT2: Nghiệm thức 2. ****: Khác biệt có ý nghĩa thống kê với p-value < 0,0001; ns: Khác biệt không có ý nghĩa thống kê với p-value > 0,05.

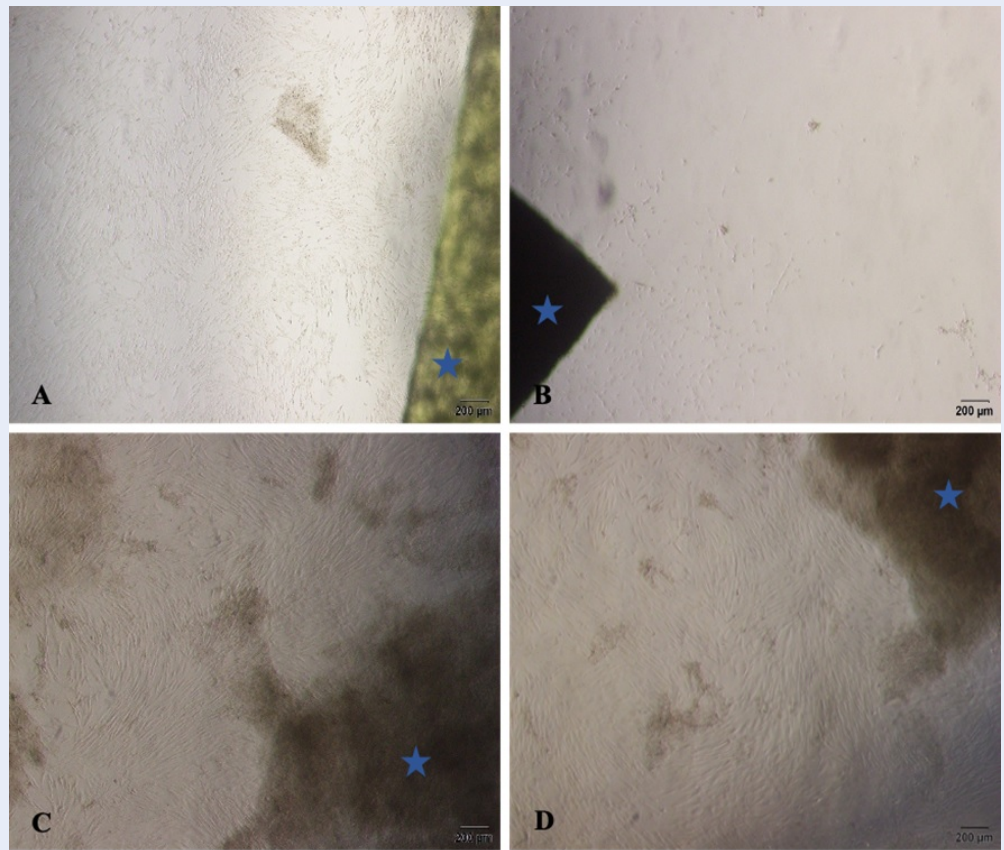
35,45±5,12 và 43,32±4,22; đều dưới 50 ng/mg trọng lượng khô (Hình 4). Khi so sánh kiểm định ANOVA-one way ($p > 0,05$) giữa trung bình nồng độ DNA của ba mẫu da, không thấy sự khác biệt rõ rệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nghiệm thức 1 và 2. Như vậy khả năng loại bỏ DNA của tế bào ở 2 nghiệm thức này là như nhau.

Kết quả đánh giá độc tính cấp tính trực tiếp của ECM vô bào trên nguyên bào sợi (NBS) nuôi cấy

Kết quả ở Hình 5 cho thấy, sau 24 giờ, đối với các đĩa chứng dương sử dụng màng latex làm vật liệu tiếp xúc, NBS xung quanh màng có mật độ thưa thớt. Ngược lại, đối với nhóm chứng âm và mẫu ECM da vô bào (xử lý theo NT1 và NT2), NBS tại vị trí tiếp xúc vẫn tiếp tục tăng sinh và phát triển. Thêm nữa, kết quả ở Bảng 1 cho thấy, 2 nhóm ECM da vô bào (xử lý theo NT1 và NT2) có %RGR lớn hơn 70%. Từ các kết quả nêu trên có thể kết luận ECM da vô bào không gây độc tính cấp tính cho NBS sau 24 giờ tiếp xúc trực tiếp.

THẢO LUẬN

Nguyên bào sợi là tế bào quan trọng nhất trong giai đoạn tăng sinh của quá trình lành hóa vết thương, tập trung nhiều ở lớp trung bì của da, tham gia sản xuất chất nền và các yếu tố tăng trưởng như TGF- β , PDGF, KGF...¹⁹. Mô da sau khi được thu nhận cần được bảo quản để phân lập được nguồn nguyên bào sợi phục vụ cho các thử nghiệm đánh giá sau này. Mô da người nên bảo quản trong dung dịch PBS, đây là dung dịch muối đệm có độ pH tương tự như pH trong cơ thể người là 7,4; đồng thời cũng là dung dịch đẳng



Hình 5: Nguyên bào sợi tiếp xúc với các vật liệu sau 24 giờ (100X). A: Màng collagen thương mại (Nhóm chứng âm); B: Màng latex (Nhóm chứng dương); C: ECM da vô bào xử lý theo NT1; D: ECM da vô bào xử lý theo NT2. Dấu sao chỉ vị trí đặt mẫu.

Bảng 1: %RGR của các nhóm thí nghiệm

	Nhóm chứng âm	Nhóm chứng dương	ECM da vô bào xử lý theo NT1	ECM da vô bào xử lý theo NT2
%RGR	100	14,73±0,002	101,88±0,002	103,76±0,008

trương không làm hư hại cấu trúc tế bào. Ngoài ra, nhiễm trùng do vi khuẩn và nấm gây ảnh hưởng đến kết quả thí nghiệm và các nhà nghiên cứu thường sử dụng kháng sinh, kháng nấm để ngăn ngừa các tác nhân gây nhiễm này. Penicillin/Streptomycin được sử dụng rộng rãi làm kháng sinh tiêu chuẩn trong nuôi cấy tế bào²⁰.

Vimentin là một loại protein dạng sợi trung gian được tìm thấy trong nhiều loại tế bào chưa trưởng thành trên khắp hệ thần kinh trung ương và cơ thể, bao gồm các tế bào biểu mô thần kinh nguyên thủy, nhưng cũng được biểu hiện trong một số loại tế bào trưởng thành, như tế bào nội mô của mạch máu, cơ trơn mạch máu và nguyên bào sợi²¹.

SDS được xem là tác nhân khử tế bào phổ biến nhất hiện nay. SDS hoạt động bằng cách hòa tan màng tế bào và màng nhân, loại bỏ hiệu quả tàn dư nhân và protein tế bào chất. Tuy nhiên, SDS cũng có thể làm biến tính protein, loại bỏ GAG và các yếu tố tăng trưởng, đồng thời gây ra thiệt hại cho collagen và cấu trúc ECM, ngoài ra, nó còn có thể gây độc cho cơ thể nếu sử dụng lượng quá cao mà không rửa sạch hoàn toàn sau quá trình xử lý tế bào⁹. Năng lượng điện cao tần được chuyển đổi thành năng lượng cơ học; sau đó truyền vào bể chứa mẫu trong máy phát sóng siêu âm; quá trình này tạo ra hàng triệu bong bóng và vỡ liên tục giúp loại bỏ thành phần tế bào khỏi ECM²². Việc kết hợp hai phương pháp vật lý và hóa học giúp gia tăng hiệu quả loại bỏ tế bào; đồng

thời hạn chế tác động của SDS lên cấu trúc ECM²³. Năm 2018, Hashemi và cộng sự²⁴ tiến hành khử tế bào mẫu da người bằng cách kết hợp nhiều loại hóa chất như NaCl, Triton X100, EDTA, Trypsin, SDS, PBS. Kết quả cho thấy rằng phương pháp kết hợp NaCl 1M và SDS 0,5% cho hiệu quả loại bỏ tế bào tốt nhất. Thêm nữa, năm 2019, Hazwani và cộng sự¹³ tiến hành khử tế bào động mạch chủ bằng sóng siêu âm kết hợp dung dịch SDS 0,1% và 2%. Kết quả cho thấy với cả 2 nồng độ SDS sử dụng đều có hiệu quả loại bỏ hoàn toàn thành phần tế bào; đồng thời giảm lượng DNA tồn dư lần lượt 87% và 92%. Trong khi, mẫu mạch 2 nghiệm thức chỉ ngâm trong dung dịch SDS 0,1% và 2% vẫn còn xuất hiện cấu trúc nhân tế bào ở kết quả nhuộm mô học²³. Kết quả trình bày trong bài báo này hoàn toàn tương đồng với các công trình nêu trên.

Các kết quả ban đầu về tiêu chí vô bào và an toàn *in vitro* cho phép dự đoán được khả năng tương hợp sinh học của chất nền ngoại bào từ mô da. Tuy nhiên, để cung cấp thêm dữ liệu hóa-sinh học của đối tượng vật liệu này, các đánh giá chuyên sâu cần được tiếp tục, như khảo sát thành phần collagen và GAG, cũng như các ảnh hưởng đến đặc tính sinh học của tế bào (sự di cư, tăng sinh, biệt hóa). Ngoài ra, để mang đối tượng chất nền ngoại bào từ mô da trở thành sản phẩm ứng dụng trong từng lĩnh vực y sinh cụ thể, việc chế tạo các dạng vật liệu như vi hạt, dung dịch đông hóa, gel – hydrogel, được xem là tiềm năng để tiếp tục phát triển trong các nghiên cứu tiếp theo.

KẾT LUẬN

Bài báo trình bày việc khử tế bào và thu nhận chất nền ngoại bào trung bì da bằng 2 phương pháp: (i) Kết hợp SDS 0,7% và sử dụng sóng siêu âm với tần số 34 kHz; (ii) Kết hợp NaCl 1 M và SDS 0,5%. Kết quả đạt được là chất nền vô bào thu nhận được chứng minh không gây độc tính cấp tính cho nguyên bào sợi người nuôi cấy. Nghiên cứu này làm cơ sở cho việc thu nhận chất nền vô bào từ da người, một loại vật liệu giàu tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực y sinh.

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

DNA: Deoxyribonucleic acid

ECM: Extracellular matrix - Chất nền ngoại bào

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

KGF: Keratinocyte growth factor - Yếu tố tăng trưởng tế bào sừng

PBS: Phosphate buffered saline - Muối đệm phosphate

PDGF: Platelet-derived growth factor - Yếu tố tăng trưởng từ tiểu cầu

SDS: Sodium dodecyl sulfate

TGF- β : Transforming Growth Factor- β - Yếu tố tăng trưởng chuyển dạng β

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả đồng ý không có bất kỳ xung đột lợi ích nào liên quan đến các kết quả đã công bố.

ĐÓNG GÓP CỦA TÁC GIẢ

Đoàn Nguyên Vũ thực hiện các thí nghiệm; thu thập, xử lý các dữ liệu và viết bản thảo

Nguyễn Thị Ngọc Mỹ thu nhận nguyên liệu; hỗ trợ thực hiện các thí nghiệm

Tô Minh Quân thực hiện các thí nghiệm; thu thập các dữ liệu

Vũ Thị Thanh Tâm cung cấp nguyên liệu, hỗ trợ nghiên cứu theo kế hoạch

Phan Hữu Hùng sàng lọc, chọn mẫu và cung cấp mẫu
Lê Quang Trí sàng lọc, chọn mẫu, cung cấp mẫu và định hướng nghiên cứu

Trần Lê Bảo Hà định hướng nghiên cứu, góp phần thảo luận các kết quả nghiên cứu, hoàn chỉnh bản thảo

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Bộ Quốc Phòng trong khuôn khổ Đề tài mã số 46.46.22.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 2010;123(24):4195-4200;PMID: 21123617. Available from: <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>.
2. Takami Y. Clinical application and histological properties of autologous tissue-engineered skin equivalents using an acellular dermal matrix. *J Nippon Med Sch.* 2014;81(6):356-63;PMID: 25744478. Available from: <https://doi.org/10.1272/jnms.81.356>.
3. Uitto J, Olsen DR, Fazio MJ. Extracellular matrix of the skin: 50 years of progress. *J Invest Dermatol.* 1989;92(4 Suppl):615-775;PMID: 2649616. Available from: <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep13075039>.
4. Ahmedbeyli C. Laterally positioned flap along with acellular dermal matrix graft in the management of maxillary localized recessions. *Clin Oral Investig.* 2019;23(2):595-601;PMID: 29725851. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2475-1>.
5. Cole W, Samsell B, Moore MA. Achilles tendon augmented repair using human acellular dermal matrix: A case series. *J Foot Ankle Surg.* 2018;57(6):1225-1229;PMID: 29779989. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.jfas.2018.03.006>.
6. Smith JM. Human acellular dermis increases surgical site infection and overall complication profile when compared with submuscular breast reconstruction: An updated meta-analysis incorporating new products. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2018;71(11):1547-1556;PMID: 30093286. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2018.06.012>.
7. Wainwright DJ. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Burns.* 1995;21(4):243-8;PMID: 7662122. Available from: [https://doi.org/10.1016/0305-4179\(95\)93866-1](https://doi.org/10.1016/0305-4179(95)93866-1).
8. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011;32(12):3233-43;PMID: 21296410. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>.

9. He M. Optimization of SDS exposure on preservation of ECM characteristics in whole organ decellularization of rat kidneys. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017;105(6):1352-1360;PMID: 27062181. Available from: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33668>.
10. 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>.
11. Nguyen MTN, Tran HLB. Fabrication of an injectable acellular adipose matrix for soft tissue regeneration. *J Sci Adv Mater Devices*. 2020;6(1):1-10; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2020.10.002>.
12. Tran HLB. Preparation and characterization of acellular porcine pericardium for cardiovascular surgery. *Turk J Biol*. 2016;40(6):1243-1250; Available from: <https://doi.org/10.3906/biy-1510-44>.
13. Hazwani A, Sha'Ban M, Azhim A. Characterization and in vivo study of decellularized aortic scaffolds using closed sonication system. *Organogenesis*. 2019;15(4):120-136;PMID: 31495272. Available from: <https://doi.org/10.1080/15476278.2019.1656997>.
14. Yusof F, Sha'ban M, Azhim A. Development of decellularized meniscus using closed sonication treatment system: potential scaffolds for orthopedics tissue engineering applications. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:5491-5502;PMID: 31410000. Available from: <https://doi.org/10.2147/IJN.S207270>.
15. Azhim A. The use of sonication treatment to decellularize aortic tissues for preparation of bioscaffolds. *J Biomater Appl*. 2014;29(1):130-141;PMID: 24384523. Available from: <https://doi.org/10.1177/0885328213517579>.
16. Koo MA. Preconditioning process for dermal tissue decellularization using electroporation with sonication. *Regen Biomater*. 2022;9(1);PMID: 35449827. Available from: <https://doi.org/10.1093/rb/rbab071>.
17. Belviso I. Decellularized human dermal matrix as a biological scaffold for cardiac repair and regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:229;PMID: 32266249. Available from: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00229>.
18. Trosan P. The enzymatic de-epithelialization technique determines denuded amniotic membrane integrity and viability of harvested epithelial cells. *PLoS One*. 2018;13(3);PMID: 29584778. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194820>.
19. Kubo K, Kuroyanagi Y. Development of a cultured dermal substitute composed of a spongy matrix of hyaluronic acid and atelo-collagen combined with fibroblasts: cryopreservation. *Artif Organs*. 2004;28(2):182-8;PMID: 14961958. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2004.47219.x>.
20. Allen-Hall A, McNevin D. Human tissue preservation for disaster victim identification (DVI) in tropical climates. *Forensic Sci Int Genet*. 2012;6(5):653-7;PMID: 22269964. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.12.005>.
21. Sliogeryte K, Gavara N. Vimentin plays a crucial role in fibroblast ageing by regulating biophysical properties and cell migration. *Cells*. 2019;8:1164-1181;PMID: 31569795. Available from: <https://doi.org/10.3390/cells8101164>.
22. Ciesielski A, Samori P. Graphene via sonication assisted liquid-phase exfoliation. *Chem Soc Rev*. 2014;43(1):381-98;PMID: 24002478. Available from: <https://doi.org/10.1039/C3CS60217F>.
23. Hazwani A, Sha'Ban M, Azhim A. Characterization and in vivo study of decellularized aortic scaffolds using closed sonication system. *Organogenesis*. 2019;15(4):120-136;PMID: 31495272. Available from: <https://doi.org/10.1080/15476278.2019.1656997>.
24. Hashemi SS. Biochemical methods in production of three-dimensional scaffolds from human skin: A window in aesthetic surgery. *World J Plast Surg*. 2018;7(2):204-211;.

Collection of human derived acellular dermal matrix by a combination of ultrasonic technique and sodium dodecyl sulfate solution

Doan Nguyen Vu^{1,2,*}, Nguyen Thi Ngoc My^{1,2}, To Minh Quan^{1,2}, Vu Thi Thanh Tam³, Phan Huu Hung⁴, Le Quang Tri³, Tran Le Bao Ha^{1,2}

ABSTRACT

Extracellular matrix (ECM) from the human skin is a potential source of materials for regenerative medicine in some applications: treatment of skin loss lesions, replacement of lost tissues or 3D bio-printing ink preparation. The ECM could only be used when the cellular component that induced the immune response was removed. Common decellularization methods could be divided into three categories: physical, chemical, and biological. This study showed that these categories could attain optimal when they were combined together rather than be individually used. This paper presented the study in which the human skin was collected and preserved in 1X phosphate buffered saline (PBS) supplemented with antibiotics in 24 hours. After that, the obtained skin samples were decellularized by three methods including using ultrasonic combining with sodium dodecyl sulfate (SDS) solution, hypertonic NaCl solution combining with SDS solution and a trypsin solution at some concentrations. The cell reduction efficiency was assessed by a histological staining and quantification of residual DNA concentrations. The results showed that the ultrasonic combining with SDS completely removed the cellular component and better preserved the structure of the ECM and the ECM was not cytotoxic to human fibroblasts *in vitro*. The result could be the basis for obtaining the acellular ECM from human skin for biomedical applications.

Key words: extracellular matrix, ultrasonic, decellularization, hypertonic, sodium dodecyl sulfate

¹University of Science Ho Chi Minh City, Vietnam

²Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

³A Military Hospital. Vietnam

⁴Eastern People Military Hospital, Vietnam

Correspondence

Doan Nguyen Vu, University of Science Ho Chi Minh City, Vietnam

Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

Email: dnvu@hcmus.edu.vn

History

- Received: 17-7-2023
- Accepted: 15-5-2024
- Published Online: 30-6-2024

DOI : <https://doi.org/10.32508/stdjns.v8i2.1298>



Copyright

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



Cite this article : Vu D N, My N T N, Quan T M, Tam V T T, Hung P H, Tri L Q, Ha T L B. **Collection of human derived acellular dermal matrix by a combination of ultrasonic technique and sodium dodecyl sulfate solution** . *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2024, 8(2):2931-2938.