

ĐẶC TÍNH SINH HỌC VÀ CHE PHỦ KHUYẾT HỔNG XƯƠNG CỦA MÀNG TIM HEO VÔ BÀO TRONG ĐIỀU KIỆN *IN VITRO*

Bùi Cúc^{1*}, Nguyễn Thị Ngọc Mỹ², Tô Minh Quân², Lê Minh Thuận⁴,
Trần Lê Bảo Hà², Lê Nguyễn Lâm³

1. Nha Khoa Thẩm Mỹ Châu Á, thành phố Hồ Chí Minh
 2. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hồ Chí Minh
 3. Trường Đại học Y Dược Cần Thơ
 4. Bệnh viện Đa khoa Trung ương Cần Thơ
- *Email: drbuicuc@gmail.com

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Màng tim heo vô bào (*Decellularized porcine pericardium – dPP*) là vật liệu lý tưởng sử dụng làm màng ngăn nha khoa. **Mục tiêu nghiên cứu:** Đánh giá đặc tính sinh học và ngăn chặn xâm nhập của màng dPP sản xuất trong nước trong điều kiện *in vitro*. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Màng dPP được cung cấp bởi tác giả Trần Lê Bảo Hà. Tính tương hợp *in vitro* được đánh giá theo ISO 10993-5 trên tế bào nguyên bào sợi nướu người (*Human gingival fibroblasts – hGF*) và tương hợp *in vivo* được đánh giá theo ISO 10993-6 trên mô hình chuột nhắt trắng *Mus musculus var. Albino* ($n=3$). Thử nghiệm ngăn chặn tế bào: tế bào hGF được cấy lên màng đáy giếng transwell có phủ màng dPP (10^4 tế bào/giếng). Sau 1 ngày, tiến hành đánh giá sự xâm nhập tế bào qua màng đáy. **Kết quả:** Sau khi tiếp xúc với dịch chiết dPP, tế bào hGF vẫn duy

trì hình dạng thon dài, rất ít tế bào bong khỏi bề mặt nuôi và tỉ lệ tế bào sống $90.33 \pm 11.33\%$, theo ISO 10993-5 thì màng dPP không gây độc cho tế bào ($n=3$). Sau 1 tháng ghép dưới da chuột, màng dPP vẫn duy trì toàn vẹn, không gây đáp ứng viêm tại vị trí ghép và toàn bộ cơ thể chuột ($n=3$) theo ISO 10993-6. Kết quả nhuộm mô học cho thấy không có hiện tượng tế bào hGF xuyên qua màng đáy có phủ với màng dPP ($n=3$). **Kết luận:** Màng dPP không gây độc với tế bào, nguyên vẹn trong cơ thể chuột và không kích thích đáp ứng viêm và ngăn chặn sự xâm nhập tế bào hGF.

Từ khoá: Màng tim vô bào, màng collagen, độc tính tế bào, tương hợp sinh học in vivo, sự xâm nhập tế bào.

ABSTRACT

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND BONE DEFECT COVERAGE OF NATIVE PORCINE PERICARDIUM IN VITRO

Bui Cuc^{1*}, Nguyen Thi Ngoc My², To Minh Quan², Le Minh Thuan⁴,
Tran Le Bao Ha², Le Nguyen Lam³

1. Dental Clinic Chau A, Ho Chi Minh City

2. The University of Science

3. Can Tho University of Medicine and Pharmacy

4. Can Tho Central General Hospital

Background: Decellularized porcine pericardium (dPP) is a suitable material for dental barrier membranes. **Objectives:** In this study, we aimed to determine the ability of the dPP to prevent cell invasion in vitro. **Materials and methods:** The dPP was gifted by Tran Le Bao Ha. In vitro biocompatibility testing was performed according to ISO 10993-5 on human gingival fibroblasts (hGF), and in vivo biocompatibility was performed according to ISO 10993-6 on *Mus musculus* var. Albino ($n=3$). The ability of dPP to prevent cell invasion was tested according to transwell migration assay: hGFs were seeded on the semi-permeable membrane covered by dPP (10^4 cells/well). After one day, the bottom side of SM was stained with Giemsa staining ($n=3$). **Results:** According to ISO 10993-5, hGFs remained in their elongated morphology, and cell viability was $90.33 \pm 11.33\%$, so dPP is not toxic to hGFs ($n=3$). One month after transplant, dPP did not evoke any inflammatory response at the injury site or whole body ($n=3$), and few inflammatory cells presented in dPP grafts. The results of the transwell migration assay showed the hGFs couldn't invade SM. **Conclusions:** dPP was not cytotoxic to fibroblast cells, did not elicit inflammatory responses in mice, and prevented cell migration in vitro.

Keywords: Acellular porcine pericardium, collagen membrane, cytotoxicity, in vivo biocompatibility, transwell migration assay.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Màng ngăn nha khoa (Dental barrier - DB) là màng thường được sử dụng trong ghép xương có định hướng (Guided bone regeneration - GBR) [2]. Vai trò màng ngăn nha khoa là ngăn chặn sự xâm nhập của mô nướu vào vị trí ghép xương, từ đó tạo điều kiện về thời gian và không gian để mô xương mới hình thành [4], [6]. Màng ngăn nha khoa được làm từ nhiều loại vật liệu khác nhau, trong đó màng collagen từ heo, bò thường được sử dụng nhất vì có tính tương hợp sinh học cao, có khả năng ngăn chặn sự xâm nhập của những tế bào xung quanh mô ghép và có khả năng phân hủy sinh học trong thời gian dài [1], [11]. Hiện nay màng ngăn nha khoa đang được sử dụng ở Việt Nam đều là màng ngoại nhập, được sản xuất bởi các nước Mỹ, Hàn, Đức. Hiện nay, Việt Nam vẫn chưa sản xuất được màng ngăn nha khoa. Trong thời gian gần đây, màng collagen từ heo được sản xuất thành công bởi

nhóm nghiên cứu trong nước của Trần Lê Bảo Hà [5]. Màng được tạo ra bằng cách loại bỏ hoàn toàn thành phần tế bào trong màng tim heo bằng phương pháp khử tế bào. Màng tim khử tế bào (dPP) được chứng minh là có cấu trúc collagen đặc, tính tương hợp sinh học, không gây độc cho tế bào, khả năng hỗ trợ tế bào tăng sinh tốt [10], [9]. Ngoài ra, việc sản xuất màng dPP hoàn toàn có thể tiến hành ở quy mô công nghiệp với giá thành rẻ vì đây làm sản phẩm thải trong chăn nuôi heo. Do đó, màng dPP là vật liệu tiềm năng để sử dụng làm màng ngăn nha khoa. Việc tự chủ sản xuất được màng ngăn nha khoa sẽ giúp giảm giá thành các ca phẫu thuật và tự chủ nguồn nguyên liệu. Chúng tôi thực hiện nghiên cứu với mục tiêu:

+ Đánh giá đặc tính tương hợp sinh học của màng tim heo vô bào.

+ Đánh giá khả năng ngăn chặn sự xâm nhập tế bào qua màng.

Kết quả này là tiền đề tiến tới những nghiên cứu sâu hơn trong việc ứng dụng màng dPP làm màng ngăn nha khoa.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Màng dPP được sản xuất màng tim heo tại phòng thí nghiệm Vật liệu sinh học – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

Nguyên bào sợi nướu người (hGF) được nuôi trong môi trường nuôi cơ bản (basal cell culture medium – bCC): DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture F-12) bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (FBS – Fetal Bovine Serum) và 1% penicillin/streptomycin, ủ ở 37°C, 5% CO₂.



Hình 1. Màng tim heo vô bào

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- **Thiết kế nghiên cứu:** Nghiên cứu mô tả thực nghiệm.

- **Cỡ mẫu nghiên cứu:**

+ 3 con chuột nhắt trắng *Mus musculus* var. albino.

+ 9 Màng tim heo vô bào (dPP), tế bào nguyên bào sợi nướu người (hGF).

- **Nội dung nghiên cứu:**

+ Nội dung 1: Phương pháp đánh giá độc tính tế bào *in vitro*:

Độc tính tế bào *in vitro* được đánh giá dựa theo tiêu chuẩn ISO 10993-5 theo phương pháp dịch chiết. Chuẩn bị dịch chiết: màng dPP được ngâm trong môi trường bCC trong 1 ngày để thu dịch chiết. Dịch chiết này được dùng để nuôi tế bào hGF trong đĩa 4 giếng (4x10⁴ tế bào/giếng) trong 1 ngày. Ngày tiếp theo, tiến hành nhuộm Giemsa và MTT (2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (theo hướng dẫn nhà sản xuất) để đánh giá hình dạng và

tỉ lệ sống tế bào (RGR). Thí nghiệm được chia thành 3 nhóm: Đối chứng âm (tế bào nuôi trong môi trường nuôi bCC), đối chứng dương (tế bào nuôi trong môi trường bCC bổ sung 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)) và nhóm thí nghiệm (tế bào nuôi trong môi trường dịch chiết). Công thức tính $RGR = (OD_{480}TN/OD_{480}ĐC \text{ âm}) \times 100\%$.

+ Nội dung 2: Phương pháp đánh giá độc tính trong cơ thể chuột:

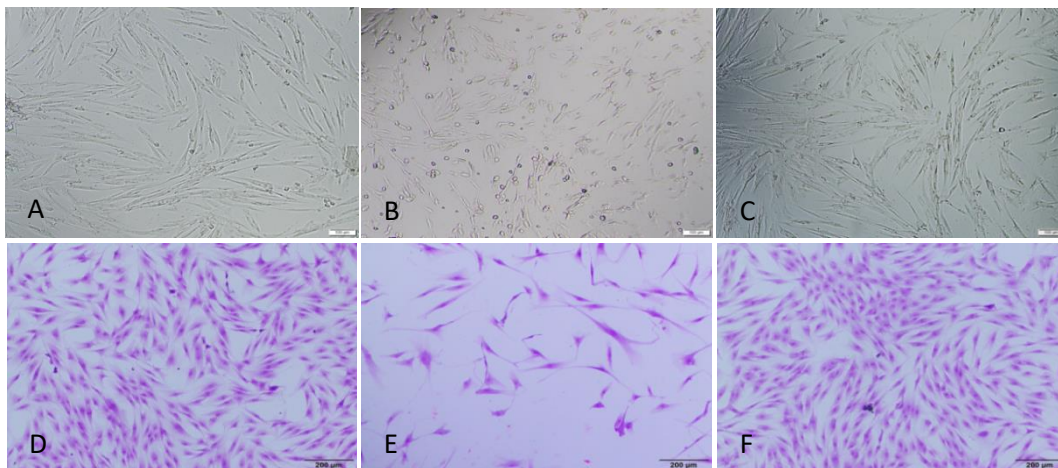
Độc tính cơ thể chuột được đánh giá theo tiêu chuẩn ISO 10993-6. Thí nghiệm được tiến hành với 3 con chuột nhắt trắng *Mus musculus var. albino*. Chuột được gây mê, cạo vùng lông trên lưng, tạo vết cắt trên da chuột và ghép mảnh dPP ($5 \times 5 \text{ mm}^2$) vào vùng giữa da và cơ chuột và khâu vết thương. Sau 1 tháng, mảnh ghép được thu nhận và nhuộm HE để đánh giá cấu trúc và sự xâm nhập tế bào viêm.

+ Nội dung 3: Phương pháp đánh giá hiệu quả ngăn chặn tế bào xâm nhập:

Phương pháp được tiến hành trên đĩa transwell có màng bám thấm có lỗ đường kính 8µm. Transwell đặt vào trong đĩa 24 giếng 1 transwell/giếng để tạo thành khoang môi trường trong transwell và môi trường ngoài giếng. Thí nghiệm được chia thành 2 nhóm: đối chứng (tế bào hGF cấy trực tiếp lên màng SM) và nhóm thí nghiệm (màng SM được phủ bằng màng dPP trước khi cấy tế bào) (lặp lại 3 lần với mỗi nhóm). Mật độ cấy tế bào là 10^4 tế bào/giếng. Sau khi 1 ngày, loại bỏ màng dPP, nhuộm mặt dưới màng SM với Giemsa để kiểm tra sự xâm nhập tế bào.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả đánh giá độc tính tế bào in vitro của màng tim vô bào



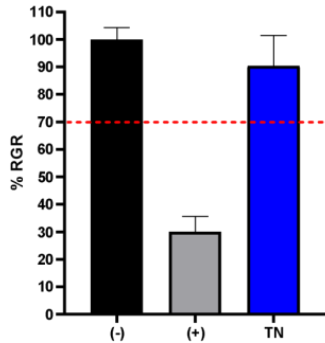
Hình 2. Nhuộm Giemsa nguyên bào sợi nước nuôi trong môi trường dịch chiết (x100)

A, B, C: tế bào quan sát bằng mắt thường, D, E, F: tế bào nhuộm Giemsa,

A, D: Đối chứng âm, B, E: Đối chứng dương, C, F: nhóm thí nghiệm

Nhận xét: Sau 1 ngày nuôi cấy, tế bào trong nhóm thí nghiệm (TN) và nhóm đối chứng (ĐC) âm vẫn duy trì hình dạng thon dài của nguyên bào sợi, rất ít tế bào co tròn bong ra khỏi bề mặt nuôi. Ngược lại, tế bào nuôi trong nhóm ĐC dương, đa phần tế bào co tròn và bong ra khỏi bề mặt nuôi.

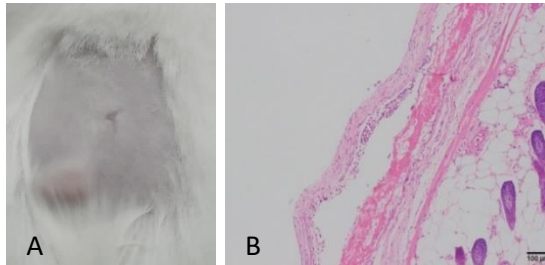
Kết quả MTT: Nghiên cứu ghi nhận giá trị OD_{480} nhóm TN là $0,308 \pm 0,032$, nhóm ĐC âm là $0,341 \pm 0,013$, do đó tỉ lệ RGR của nghiên cứu là $90,33 \pm 11,33\%$.



Hình 3. Kết quả độc tính in vivo của màng tim vô bào đánh giá bằng phương pháp MTT (-), (+), TN tương ứng với các nhóm đối chứng âm, đối chứng dương và thí nghiệm
Nét đứt màu đỏ: Tỷ lệ RGR 70% (cao hơn ngưỡng này là không độc)

Nhận xét: Tỷ lệ RGR của thí nghiệm là $90,33 \pm 11,33\%$, cao hơn 70%, theo tiêu chuẩn ISO 10993-6 ngưỡng này là không độc.

3.2. Kết quả đánh giá độc tính in vivo trên cơ thể chuột

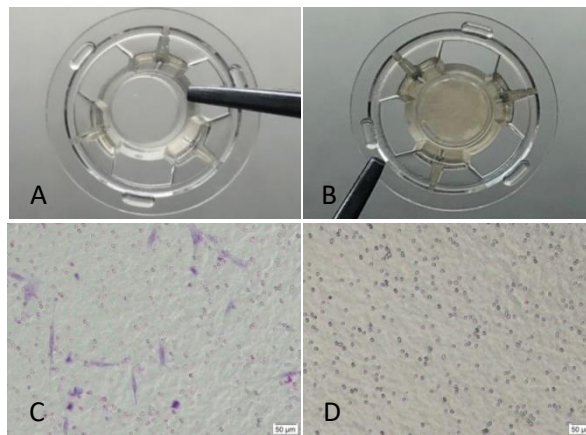


Hình 4. Kết quả sau 1 tháng ghép màng tim vô bào dưới da chuột

A: quan sát tổng thể; B: hình nhuộm HE (x100)

Nhận xét: Màng tim vô bào tồn tại được tối thiểu 1 tháng trong cơ thể chuột và không kích thích đáp ứng miễn dịch cấp tính.

3.3. Kết quả đánh giá khả năng chống xâm nhập tế bào của màng tim vô bào



Hình 5. Đánh giá hiệu quả ngăn chặn nguyên bào sợi của màng tim vô bào

A, C: Giếng transwell đối chứng dương và kết quả nhuộm Giemsa

B, D: Giếng transwell thí nghiệm và kết quả nhuộm Giemsa

Nhận xét: Kết quả nhuộm Giemsa cho thấy tế bào hGF đã di chuyển xuống mặt dưới màng đáy trong nhóm đối chứng (không phủ màng tim) sau 24 giờ nuôi cấy. Đối với nhóm phủ màng tim, tế bào hGF không di chuyển xuống màng đáy.

IV. BÀN LUẬN

4.1. Kết quả đánh giá độc tính tế bào in vitro của màng tim vô bào

Đối với phương pháp nhuộm Giemsa, tế bào chất bắt màu hồng nhạt, nhân tế bào bắt màu tím đậm, do đó dựa trên phương pháp nhuộm Giemsa hình dạng và số lượng tế bào được quan sát rõ ràng [8]. Để định lượng kết quả độc tính, tế bào được đánh giá bằng phương pháp MTT. MTT xâm nhập vào tế bào sống và được enzyme ti thể chuyển hóa thành formazan có màu tím, tinh thể này được hòa tan trong DMSO và có bước sóng hấp thụ cực đại 480nm. Giá trị OD₄₈₀ càng cao thì tế bào sống càng nhiều [3].

Kết quả nhuộm Giemsa cho thấy, sau 1 ngày nuôi cấy, tế bào trong nhóm thí nghiệm (TN) và nhóm đối chứng (ĐC) âm vẫn duy trì hình dạng thon dài của nguyên bào sợi, rất ít tế bào co tròn bong ra khỏi bề mặt nuôi. Ngược lại, tế bào nuôi trong nhóm ĐC dương, đa phần tế bào co tròn và bong ra khỏi bề mặt nuôi (Hình 2). Kết quả MTT cho thấy giá trị OD₄₈₀ nhóm TN là $0,308 \pm 0,032$, nhóm ĐC âm là $0,341 \pm 0,013$, do đó tỉ lệ RGR là $90,33 \pm 11,33\%$. Theo ISO 10993-5 tỉ lệ RGR hơn 70% có nghĩa là dịch chiết không gây độc cho tế bào (Hình 3), kết quả này cho thấy màng tim không gây độc cho tế bào. Như vậy, kết hợp kết quả nhuộm Giemsa và MTT cho thấy màng tim vô bào không gây độc cho nguyên bào sợi nước.

4.2. Kết quả đánh giá độc tính in vivo trên cơ thể chuột

Độc tính của màng tim trên cơ thể chuột được đánh giá theo tiêu chuẩn ISO 10993-6. Theo đó, màng tim vô bào được ghép dưới da lưng chuột đáp ứng viêm trên cơ thể chuột được đánh giá dựa vào quan sát sức khỏe tổng thể chuột, quan sát tại vị trí ghép và kết quả nhuộm mô học mảnh ghép sau 1 tháng. Kết quả nghiên cứu khi quan sát hoạt động của 3 con chuột sau 1 tháng cho thấy cả 3 con chuột đều khỏe mạnh, không có dấu hiệu lờ đờ biếng ăn. Vết mổ lành nhanh sau 5-7 ngày ghép, không quan sát thấy hiện tượng viêm tại vị trí vết mổ. Kết quả nhuộm mô học mảnh ghép sau 1 tháng cho thấy mảnh ghép tồn tại nguyên vẹn trong cơ thể sau 1 tháng, rất ít tế bào viêm xâm nhập, không có hiện tượng xung huyết xung quanh mảnh ghép. Điều này cho thấy mảnh ghép không kích thích đáp ứng miễn dịch cấp tính trong cơ thể chuột sau 1 tháng (Hình 4).

4.3. Kết quả đánh giá khả năng chống xâm nhập tế bào của màng tim vô bào

Kết quả nhuộm mô học mảnh ghép cho thấy sau 1 tháng, mảnh ghép vẫn tồn tại nguyên vẹn trong cơ thể chuột, không có hiện tượng phân rã thành nhiều mảnh nhỏ. Ngoài ra, mô sợi hình thành lớp mỏng xung quanh mảnh ghép, ít xuất hiện tế bào viêm, không có ổ viêm hình thành trên và xung quanh màng. Kết quả này cho thấy màng tim vô bào tồn tại được tối thiểu 1 tháng trong cơ thể chuột và không kích thích đáp ứng miễn dịch cấp tính (Hình 4).

Màng SM của transwell có những lỗ nhỏ đường kính 8 μ m. Những lỗ này cho phép tế bào di chuyển từ mặt trên màng đáy xuống mặt dưới màng đáy [7].

Kết quả nhuộm Giemsa cho thấy tế bào hGF đã di chuyển xuống mặt dưới màng đáy sau 24 giờ nuôi cấy (Hình 5). Đối với nhóm thí nghiệm, kết quả nhuộm Giemsa cho thấy

không phát hiện tế bào ở lớp dưới màng đáy. Kết quả này cho thấy màng DPP đã ngăn chặn sự xâm nhập của tế bào DPP. Điều này có thể là do bản thân DPP là có bản chất là tẩm collagen đặc, các sợi protein liên kết chặt chẽ với nhau với rất ít khoảng không bên trong màng. Cấu trúc đặc biệt này đã ngăn chặn được sự xâm nhập của tế bào hGF [5].

V. KẾT LUẬN

Màng tim heo vô bào có tính sinh học tương hợp tốt với tế bào nguyên bào sợi người và ngăn chặn sự xâm nhập tế bào *in vitro*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ana Marina Ferreira (2012), Collagen for bone tissue regeneration, *Acta Biomater*, 8, pp.3191-3200.
2. Chi C S., Andrade D B., Kim S G., Solomon C S. (2015), “Guided tissue regeneration in endodontic surgery by using a bioactive resorbable membrane”, *J Endod*, 41, pp. 559-562.
3. David M. Morgan (1998), “Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity”, *Methods Mol Biol*, 79, pp.179-83.
4. Gaia Pellegrini, Giorgio Pagni, Giulio Rasperini (2013), “Surgical Approaches Based on Biological Objectives: GTR versus GBR Techniques”, *Int J Dent*, 521547.
5. Ha Le Bao Tran, Trang Thi Huyen Dinh, My Thi Ngoc Nguyen, Quan Minh To, Anh Tho Tuan Pham (2016), “Preparation and characterization of acellular porcine pericardium for cardiovascular surgery”, *Turkish Journal of Biology*, 40, pp.1243-1250.
6. Hom-Lay Wang, Lakshmi Boyapati (2006), ““PASS” principles for predictable bone regeneration”, *Implant Dent*, 15, pp.8-17.
7. Jordi Pijuan, Carla Barceló, David F Moreno, *et al.* (2019), “In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis”, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 14, 7, 107.
8. Juan Jose Barcia (2007), The Giemsa stain: its history and applications, *Int J Surg Pathol*, 15, pp.292-296.
9. Nguyen MTN, Tran HLB (2018), “Effect of Modified Bovine Pericardium on Human Gingival Fibroblasts in vitro”, *Cells Tissues Organs*, 206, pp.296-307.
10. Nguyen MTN, Doan VN, Tran HLB (2019), “In vitro study on chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells on treated bovine pericardium”, *Turk J Biol*, 43, pp.360-370.
11. Yunia D R, Yasunori A, Akihiro F, Kiyoshi Ks (2013), “Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications”, *J Prosthodont Res*, 57, pp.3-14.

(Ngày nhận bài: 04/7/2022 – Ngày duyệt đăng: 09/9/2022)
