

Nghiên cứu đặc tính ống ghép mạch máu hỗ trợ tế bào nội mô bám dính trong điều kiện nuôi cấy dòng chảy

Lâm Minh Hoàng¹, Trương Thanh Vân^{1,2}, Nguyễn Thuần Nho², Lê Việt Hoàng¹,
Bùi Quốc Thắng³, Trần Lê Bảo Hà^{1,2,3}, Nguyễn Thị Ngọc Mỹ^{2,3*}

¹Phòng Thí nghiệm Kỹ nghệ mô và Vật liệu Y sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, khu Đô thị Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, phường Đông Hòa, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Bộ môn Sinh lý học và Công nghệ Sinh học Động vật, Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường Chợ Quán, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Bệnh viện Chợ Rẫy, 201B Nguyễn Chí Thanh, phường Chợ Lớn, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 18/7/2025; ngày chuyển phản biện 22/7/2025; ngày nhận phản biện 25/8/2025; ngày chấp nhận đăng 28/8/2025

Tóm tắt:

Tế bào nội mô tạo lớp lót chống đông máu và ổn định sinh lý mạch máu. Do đó, việc nuôi cấy và khảo sát tương tác giữa ống ghép mạch máu với tế bào nội mô cung cấp thông tin về tiềm năng ứng dụng trong cấy ghép mạch máu. Trong nghiên cứu này, hệ thống bioreactor được thiết lập nhằm tạo điều kiện nuôi cấy dòng chảy. Hệ thống được điều chỉnh về tốc độ phù hợp để duy trì trạng thái dòng kín và vô trùng. Ở điều kiện dòng chảy mô phỏng, tế bào nội mô được lưu chuyển theo dòng chảy vận hành bằng bioreactor và theo dõi khả năng sống và bám dính trên bề mặt ống ghép. Ống ghép mạch máu thể hiện khả năng hỗ trợ tế bào nội mô bám dính. Trong nuôi cấy dòng chảy, hình ảnh nhuộm calcein thể hiện tế bào nội mô bám dính sau 72 giờ khảo sát. Ống ghép mạch máu đã được chứng minh hỗ trợ sự bám dính của các tế bào nội mô trong nuôi cấy *in vitro*. Hệ thống nuôi cấy dòng chảy phù hợp cho nghiên cứu tái lập lớp nội mô tế bào, qua đó giúp dự đoán hiệu ứng tương tự sau cấy ghép ống mạch máu *in vivo*.

Từ khóa: bioreactor, khung nền ngoại bào, nuôi cấy dòng chảy, ống ghép mạch máu, tế bào nội mô.

Chỉ số phân loại: 1.6, 2.6, 3.2

Study on vascular grafts characteristics supporting endothelial cell attachment under flow culture conditions

Minh Hoang Lam¹, Thanh Van Truong^{1,2}, Thuan Nho Nguyen², Viet Hoang Le¹,
Quoc Thang Bui³, Le Bao Ha Tran^{1,2,3}, Thi Ngoc My Nguyen^{2,3*}

¹Laboratory of Tissue Engineering and Biomedical Materials, University of Science, VNU-HCM, Ho Chi Minh City National University Urban Area, Dong Da Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Department of Physiology and Animal Biotechnology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, VNU-HCM, 227 Nguyen Van Cu Street, Cho Quan Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Cho Ray Hospital, 201B Nguyen Chi Thanh Street, Cho Quan Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 18 July 2025; revised 25 August 2025; accepted 28 August 2025

Abstract:

Endothelial cells form the innermost vascular layer, regulating blood coagulation and vascular physiology. Therefore, culturing and investigating the interaction of vascular grafts and endothelial cells provide insight into their potential applications in vascular transplantation. In this study, a bioreactor system was established to enable flow culture conditions. The flow rate was appropriately adjusted to maintain a closed and sterile culture environment. Under simulated flow conditions, endothelial cells were circulated using a bioreactor, and cell viability and attachment were evaluated on the graft surface. The vascular grafts showcased the ability to support endothelial cell attachment. Under flow culture conditions, the calcein staining images also addressed endothelial cell adhesion on vascular grafts after 72-hour culture. The vascular grafts were also demonstrated to support the adhesion of endothelial cells in *in vitro* culture. The flow culture system is suitable for cellular studies, thereby enabling prediction of potential endothelialisation effects following vascular graft implantation *in vivo*.

Keywords: bioreactor, endothelial cells, extracellular matrix, flow culture, vascular graft.

Classification numbers: 1.6, 2.6, 3.2

*Tác giả liên hệ: Email: ntnmy@hcmus.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Sự phát triển công nghệ vật liệu y sinh cung cấp hướng tiếp cận mới trong sử dụng các nguyên liệu mô động vật tạo ra các sản phẩm cấy ghép. Các ống mạch máu từ lợn và bò được nghiên cứu loại bỏ các yếu tố gây đáp ứng miễn dịch và giữ lại khung nền ngoại bào phù hợp cấy ghép. Thành phần khung nền ngoại bào từ protein collagen, elastin, laminin và các glucosaminoglycan thể hiện đặc tính định hướng cho sự bám dính, di cư, tăng sinh và biệt hóa của tế bào, từ đó được sáp nhập và phát triển cùng với mô chủ [1, 2]. Vì vậy, vật liệu có nguồn gốc khung nền ngoại bào có tiềm năng ứng dụng lâm sàng nói chung và trong lĩnh vực cấy ghép mạch máu nói riêng.

Các nghiên cứu về cấu trúc thay thế cho mạch máu đã và đang được triển khai, đặc biệt trên đối tượng ống mạch máu có đường kính nhỏ (đường kính <6 mm) do nguy cơ hình thành huyết khối cao. Với ống mạch máu có bản chất từ khung ngoại bào, tỷ lệ huyết khối lòng mạch được ghi nhận cao đáng kể (33,3%) so với mạch máu tự thân 12,5% [3]. Nhằm khắc phục tình trạng này, hướng chế tạo ống ghép mạch máu có biến đổi bề mặt chống đông máu được tiếp cận. Heparin là hoạt chất chống đông máu được sử dụng phổ biến trong cố định lên bề mặt ống ghép mạch máu, nhờ tác dụng giảm sự hấp thụ protein huyết tương, nguy cơ tiểu cầu bám dính và hoạt hóa trên bề mặt vật liệu. Xu hướng thải heparin cũng được ghi nhận, nhờ đó cho phép tạo vi môi trường chống đông máu cho ống ghép mạch máu [4, 5]. Tuy nhiên, xu hướng này cho thấy khả năng tạo vi môi trường chống đông máu chỉ được duy trì trong khoảng thời gian giới hạn và rủi ro huyết khối lòng mạch vẫn tồn tại.

Về mặt cấu trúc, mạch máu trong cơ thể được lót bởi một lớp tế bào nội mô (endothelial cell) tương tác trực tiếp với dòng máu. Các tế bào nội mô tiết ra các chất: nitric oxide, heparin, plasmin... có vai trò điều hòa quá trình đông máu và phân hủy fibrin, ổn định tính thấm thành mạch và vận mạch. Nghiên cứu tạo ống ghép từ mô mạch máu, kết quả tương tác tế bào đã chỉ ra sự bám dính của tế bào nội mô có liên quan đến khả năng chống đông máu trong lòng ống ghép [6-8]. Điển hình là kết quả ghép động mạch cảnh vô bào từ lợn được tái lập tế bào nội mô tự thân đạt chỉ số thông mạch 71% sau 60 ngày. Kết quả thử nghiệm lâm sàng trên 12 bệnh nhân, tĩnh mạch vô bào đồng loài được tái lập tế bào nội mô tự thân đã cho kết quả khoảng 80% tình trạng thông mạch sau 6 tháng ghép [8]. Đặt trong bối cảnh ống ghép mạch máu có cố định heparin, sau một giai đoạn thải cụ thể, bề mặt ống ghép mạch máu hỗ trợ sự bám dính của tế bào nội mô có thể cho phép dự đoán khả năng hình thành

lại lớp lót nội mô và đóng góp vào việc duy trì đặc tính kháng đông máu trong giai đoạn sau. Do đó, các khảo sát nhằm đánh giá đặc tính nội mô hóa được xem là cần thiết để dự đoán khả năng tồn tại và đặc tính tương hợp máu lâu dài của ống ghép mạch máu dị loài.

Trong điều kiện *in vitro*, đặc tính hỗ trợ tế bào bám dính có thể được thực hiện và đánh giá bằng cách cấy trực tiếp tế bào lên bề mặt vật liệu. Phức hợp tế bào - mẫu vật liệu được nuôi cấy trong điều kiện tĩnh, sau đó ghi nhận sự hiện diện của tế bào trên mẫu [9]. Thực tế, trong điều kiện sinh lý, tế bào nội mô trực tiếp chịu tác động của dòng máu, thích nghi và duy trì trên lòng mạch [10]. Do đó, để phản ánh phù hợp về đặc tính bám dính của tế bào nội mô trên bề mặt vật liệu *in vitro*, điều kiện nuôi cấy với dòng chảy mô phỏng cần thiết được tiếp cận. Trong đó, môi trường nuôi cấy tế bào được luân chuyển liên tục với áp lực, tốc độ dòng và lưu lượng dòng được điều chỉnh thông qua hệ thống phản ứng sinh học (còn gọi là hệ thống bioreactor). Các hệ thống bioreactor (Tisxell, Singapore; myControl, Hà Lan; LumeGen, Ấn Độ; Aptus Bioreactors, Hoa Kỳ) cho phép điều chỉnh điều kiện nuôi cấy về nhiệt độ và hàm lượng CO₂, có thể tăng thể tích nuôi, số lượng vật liệu thao tác và kéo dài thời gian theo dõi [11, 12]. Hệ thống bioreactor dạng dòng chảy với cấu phần gồm bơm và hệ ống dẫn giúp tạo điều kiện thuận lợi trong đánh giá các vật liệu dạng ống, trong trường hợp này là ống mạch máu nhân tạo.

Trong bối cảnh Việt Nam, ống ghép mạch máu được chế tạo thành công bằng công nghệ khử tế bào động mạch cảnh của lợn [13]. Ống ghép mạch máu được chứng minh đạt được tiêu chuẩn vô bào và độ bền cơ tính phù hợp cho cấy ghép. Trong nghiên cứu này, đặc tính hỗ trợ tế bào nội mô bám dính được tiếp tục khảo sát, nhằm hướng tới tạo ra nguồn ống ghép mạch máu cung cấp cho liệu pháp điều trị tái tạo.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Ống ghép mạch máu (gọi tắt là OGMM) được chế tạo theo quy trình đã công bố của nhóm nghiên cứu [13] với những thay đổi nhỏ cho phù hợp với điều kiện thí nghiệm. Trong đó, mẫu được gia cường và cố định heparin với hàm lượng 5 mg/ml. Thử nghiệm ban đầu đã ghi nhận được khả năng chống đông máu cùng với đặc tính thải heparin của mẫu OGMM. Sau 28 ngày khảo sát ở điều kiện ủ sinh lý, phần lớn hàm lượng heparin đã được giải phóng. Ở giai đoạn này, việc xác định đặc tính tương tác tế bào nội mô có ý nghĩa về khả năng tương hợp máu lâu dài của mẫu OGMM.

Dòng tế bào nội mô từ tĩnh mạch dây rốn người (HUVEC) gọi tắt là tế bào nội mô được mua từ Ngân hàng Chuẩn Hoa Kỳ (ATCC, PCS-100-010, Hoa Kỳ). Hệ thống bioreactor (3D Biotek, Hoa Kỳ) bao gồm các bộ phận chính: (1) Bình chứa môi trường nuôi cấy, (2) Bình trao đổi khí, (3) Hệ dây dẫn truyền dịch, (4) Bơm nhu động.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thiết lập hệ thống bioreactor: Hệ thống bioreactor được lắp ráp theo sơ đồ từ Hãng sản xuất 3D Biotek - Hoa Kỳ (hình 1A). Trong đó, một phần đoạn dây dẫn được thiết kế mang buồng chứa mẫu OGMM nhằm vận hành trong điều kiện vô trùng (hình 1B, ký hiệu *). Hệ thống được vận hành với tốc độ dòng chảy 10-500 μl /phút và được đánh giá khả năng duy trì truyền dịch kín. Sau thời gian vận hành, dịch truyền trong hệ thống được thu nhận và xác định độ đục ở bước sóng 600 nm. Mẫu dịch truyền được cấy trải và ủ trên môi trường thạch vi sinh, ở 37°C trong 48 giờ, nhằm xác định tính vô trùng của hệ thống.

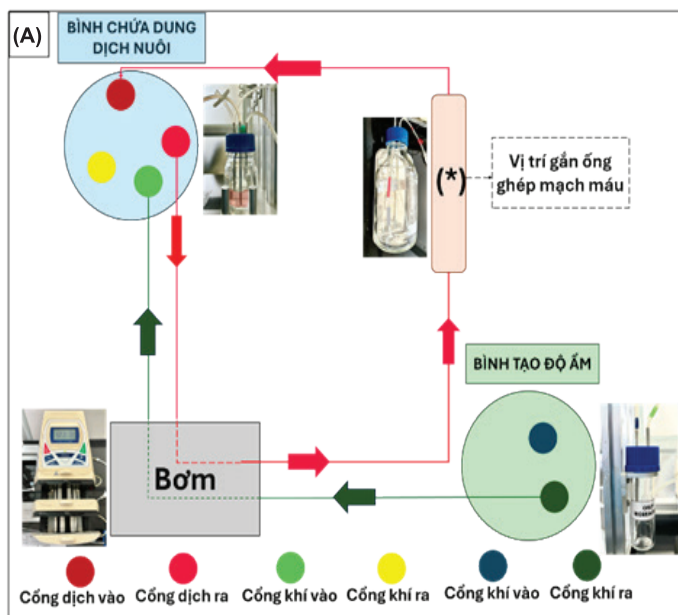
Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của mẫu OGMM đến khả năng sống của tế bào nội mô: Tế bào nội mô được cấy vào các đĩa nuôi (đường kính 35 mm, với 5×10^4 tế bào/đĩa) (Nunc, Hoa Kỳ) và nuôi cấy ổn định ở 37°C, 5% CO_2 trong 24 giờ. Mẫu OGMM (tỷ lệ kích thước 1/10 diện tích đĩa nuôi) được đặt lên trên bề mặt lớp tế bào nội mô và duy trì trong 24 giờ. Khả năng sống của tế bào nội mô được đánh giá thông qua hình thái tế bào được nhuộm

Crystal Violet (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ) xung quanh mẫu OGMM.

Phương pháp cấy tĩnh và xác định sự bám dính tế bào nội mô trên mẫu OGMM: Mẫu OGMM được cắt mở lòng ống và điều chỉnh kích thước (dạng tròn với đường kính 8 mm) để cố định lên bề mặt giếng của đĩa nuôi 96 giếng. Theo đó, tế bào được định hướng tiếp xúc trực tiếp với bề mặt trong của mẫu OGMM, mô phỏng cấu trúc tự nhiên của lớp trong lòng mạch máu. Tế bào nội mô (mật độ 2×10^5 tế bào/ml) được cấy vào đĩa 96 giếng chứa mẫu OGMM và nuôi ổn định trong 24 giờ tiếp theo. Sự bám dính của tế bào trên mẫu OGMM được xác định bằng thử nghiệm Calcein và nhuộm mô học Hematoxyline và Eosin (nhuộm H&E). Trong đó, thuốc thử Calcein (Thermo Scientific, Hoa Kỳ) được bổ sung vào các giếng khảo sát và ủ trong 45 phút.

Mẫu được thu nhận, rửa bằng dung dịch PBS1X và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang (Olympus, Nhật Bản) để phát hiện sự hiện diện của các tế bào bám dính. Ngoài ra, sau khi được cấy tế bào, mẫu OGMM được thu nhận và cố định trong dung dịch 10% Formalin và nhuộm H&E để quan sát hình thái dưới kính hiển vi quang học (Olympus, Nhật Bản).

Phương pháp nuôi cấy dòng chảy và đánh giá khả năng sống của tế bào nội mô trong hệ thống bioreactor: Để xác định khả năng sống của tế bào nội mô trong điều kiện nuôi cấy dòng chảy, tế bào nội mô được chuẩn bị dưới dạng dung dịch huyền phù với mật độ 2×10^4 tế bào/ml



Hình 1. Sơ đồ hệ thống bioreactor. (A) Sơ đồ thiết kế vận hành hệ thống bioreactor; **(B)** Hệ thống bioreactor kết hợp buồng nuôi OGMM. Ký hiệu (*) chỉ vị trí buồng mang mẫu OGMM.

để nạp vào hệ thống bioreactor. Trong quá trình vận hành hệ thống bioreactor, 100 ml mẫu dịch nuôi cấy tế bào được thu nhận sau mỗi 24 giờ. Mật độ tế bào sống được xác định bằng kỹ thuật nhuộm Trypan Blue (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ) và đếm bằng buồng đếm tế bào.

Khảo sát sự bám của tế bào nội mô trên mẫu OGMM trong điều kiện nuôi cấy dòng chảy: Để khảo sát sự bám dính của tế bào nội mô trong điều kiện nuôi cấy dòng chảy, hệ thống bioreactor mang buồng chứa mẫu OGMM được thiết lập (hình 1B, ký hiệu *). Tại thời điểm bắt đầu, dung dịch huyền phù (mật độ 2×10^4 tế bào/ml) được nạp bình chứa môi trường. Bơm nhu động được khởi động để truyền dung dịch huyền phù tế bào luân chuyển trong hệ thống, qua đó tương tác với bề mặt mẫu OGMM. Hệ thống bioreactor được duy trì vận hành ở điều kiện 37°C , 5% CO_2 . Sự bám dính của tế bào trên mẫu OGMM được xác định bằng thử nghiệm Calcein và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang (Olympus, Nhật Bản).

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 $\pm$ độ lệch chuẩn và phân tích thống kê bằng phần mềm Prism 6 (GraphPad Software, Hoa Kỳ). Khác biệt so sánh có ý nghĩa thống kê khi giá trị $p < 0,05$.

3. Kết quả và bàn luận

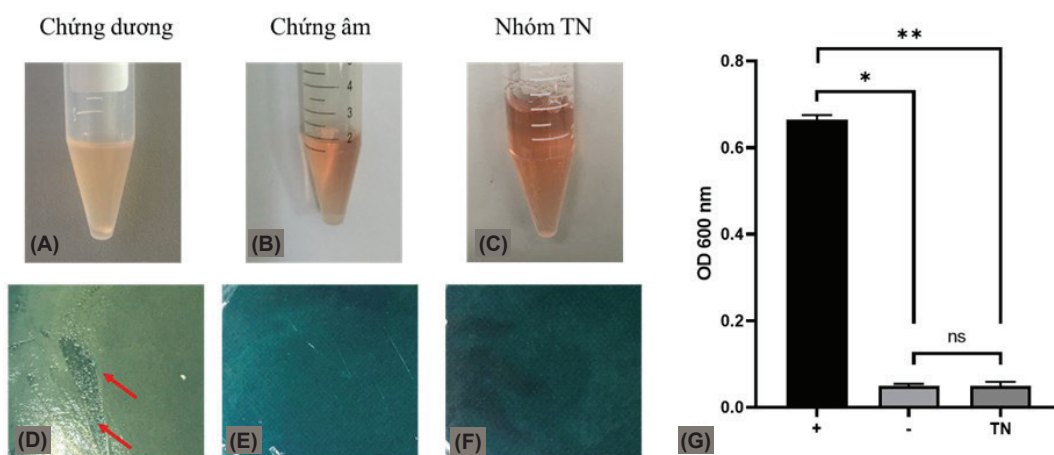
3.1. Vận hành hệ thống bioreactor nuôi cấy dòng chảy kín và vô trùng

Nhằm khảo sát ảnh hưởng của dòng chảy mô phỏng sinh lý đến đặc tính bám dính của tế bào nội mô trên mẫu ống ghép mạch máu, hệ thống bioreactor được

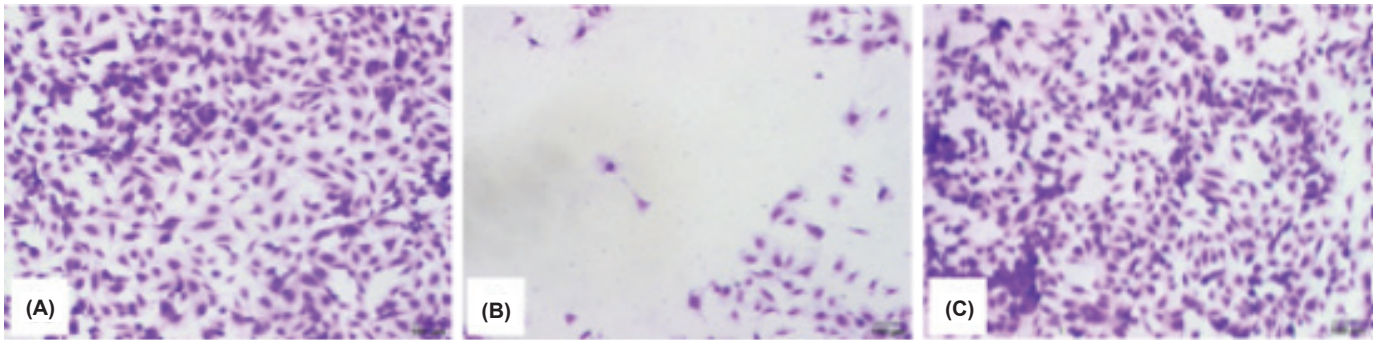
sử dụng. Trong đó, ống ghép mạch máu cần được tích hợp vào đường dẫn dung dịch nuôi cấy, đặt ra yêu cầu về thiết lập mới về buồng chứa mẫu, hệ dây dẫn và điều kiện vận hành vô trùng. Thông số tốc độ dòng chảy mô phỏng sinh lý cũng cần được tối ưu trên hệ thống này. Theo đó, hệ thống bioreactor mang ống ghép mạch máu được thiết lập và đánh giá về tốc độ dòng chảy và tình trạng vô trùng trong thời gian vận hành. Sau khi thiết lập hệ thống bioreactor (hình 1A), bơm nhu động được điều chỉnh với 10, 100, 150, 200, 250, 500 $\mu\text{l}/\text{phút}$ để xác định tốc độ phù hợp cho vận hành hệ thống kín.

Quan sát tại vị trí liên kết dây - bơm nhu động - các bình chứa, các mức tốc độ 10-500 $\mu\text{l}/\text{phút}$ đã duy trì được hệ thống ở trạng thái khép kín, không gặp phải tình trạng xê dịch dây truyền và rò rỉ dịch nuôi cấy. Sau 7 ngày vận hành, dịch nuôi cấy được thu nhận và xác định tình trạng vô trùng. So sánh với đối chứng dương (hình 2A, 2D) có nhiễm khuẩn, mẫu dịch nuôi của hệ thống bioreactor (hình 2C, 2F, ký hiệu nhóm TN) tương đồng với mẫu đối chứng âm (hình 2B, 2E, không nhiễm khuẩn) và với chỉ số độ đục tại OD600 nm không có sự khác biệt thống kê (hình 2G, ký hiệu ns so sánh giữa (-) và TN). Theo đó, các tốc độ dòng chảy trong khoảng 10-500 $\mu\text{l}/\text{phút}$ có thể được xem xét vận hành và đảm bảo được hệ thống truyền dịch kín và vô trùng cho khảo sát nuôi dòng chảy cho mẫu OGMM.

Trong giai đoạn đầu khảo sát đặc tính bám dính tế bào, tốc độ dòng chảy cần được lựa chọn phù hợp nhằm duy trì được sự sống của tế bào và tạo điều kiện cho dòng



Hình 2. Kết quả đánh giá độ vô trùng của hệ thống bioreactor. (A, D) Mẫu chứng dương: môi trường nhiễm vi khuẩn; (B, E) Mẫu chứng âm: môi trường nuôi cấy vô trùng; (C, F) Nhóm thí nghiệm: môi trường thử nghiệm được thu từ hệ thống bioreactor sau khi vận hành 7 ngày; (G) Biểu đồ so sánh sự khác biệt về chỉ số OD đo độ đục của mẫu môi trường ở bước sóng 600 nm (OD600) (+: mẫu chứng dương, -: mẫu chứng âm, TN: mẫu thí nghiệm). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê; ns: sự khác biệt không mang ý nghĩa thống kê.



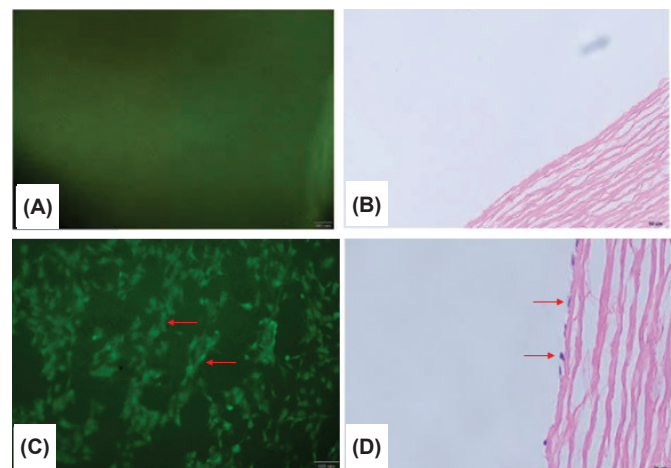
Hình 3. Hình thái tế bào sau khi tiếp xúc với mẫu vật liệu và được nhuộm Crystal violet. (A) Môi trường nuôi cấy tế bào; (B) Màng cao su Latex; (C) Mẫu OGMM. Độ phóng đại 100 lần.

huyền phù tế bào tiếp xúc với bề mặt giá thể OGMM. Trong đó, nghiên cứu của N. Ucciferri và cs (2013) [14] đã chỉ ra các tốc độ 0, 80, 100, 250 $\mu\text{l/phút}$ hạn chế ảnh hưởng đến khả năng sống của HUVECs duy trì bên trong hệ thống dòng chảy. J. Schmid và cs (2018) [15] đã ghi nhận ở tốc độ dòng chảy 10-250 $\mu\text{l/phút}$, hệ thống bioreactor tạo ra dòng chảy phân bố đồng đều xuyên suốt giá thể, giúp đảm bảo cung cấp oxy và dưỡng chất hiệu quả cho toàn bộ thể tích giá thể. Theo đó, tốc độ 150 $\mu\text{l/phút}$ được lựa chọn cho khảo sát nuôi cấy dòng chảy tế bào HUVEC và xem xét khả năng bám dính của HUVEC lên bề mặt lòng ống của giá thể OGMM.

3.2. Mẫu ống ghép mạch máu an toàn và hỗ trợ sự bám dính của tế bào nội mô

Trong mô hình thử nghiệm mẫu vật liệu tiếp xúc trực tiếp tế bào, môi trường nuôi cấy (hình 3A) và mẫu vật liệu gây độc tế bào - mẫu cao su Latex (hình 3B) được sử dụng tương ứng làm đối chứng âm và đối chứng dương. Tế bào nội mô duy trì hình dạng bám trải đặc trưng ở nhóm đối chứng âm. Trong điều kiện tiếp xúc đối chứng dương, hình thái tế bào được ghi nhận biến dạng và bong tách khỏi bề mặt đĩa nuôi. Đối với nhóm tế bào được đặt mẫu OGMM (hình 3C) có mật độ và hình thái tế bào ở tương đương nhóm đối chứng âm, chỉ ra tính an toàn *in vitro* của mẫu OGMM đối với tế bào nội mô.

Tế bào nội mô được cấy lên trên bề mặt mẫu OGMM và nuôi cấy ở điều kiện tĩnh. Sau 24 giờ, sự bám dính của tế bào nội mô được phát hiện thông qua tín hiệu tế bào phát huỳnh quang màu xanh lá (hình 4C, ký hiệu mũi tên). Tín hiệu huỳnh quang cũng thể hiện tình trạng sống của tế bào, do khả năng chuyển hóa nội bào đối với thuốc thử Calcein. Ngoài ra, sự hiện diện của tế bào nội mô trên bề mặt mẫu OGMM cũng được phát hiện bằng nhuộm mô

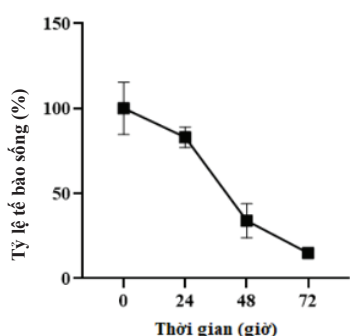


Hình 4. Tế bào nội mô bám trên bề mặt mẫu OGMM điều kiện nuôi cấy tĩnh. (A) Nhuộm Calcein - Mẫu trống; (B) Nhuộm H&E - Mẫu trống; (C) Nhuộm Calcein - Mẫu được cấy tế bào nội mô; (D) Nhuộm H&E - Mẫu được cấy tế bào nội mô. Mũi tên đỏ chỉ các tế bào nội mô. (A, C): Độ phóng đại 100 lần; (B, D): Độ phóng đại 200 lần.

học H&E (hình 4D, ký hiệu mũi tên), với vùng nhân tế bào gồ về phía lòng mạch và bắt màu xanh tím. Tại điều kiện nuôi cấy tĩnh, các hình ảnh kết quả giúp xác định về đặc tính hỗ trợ tế bào nội mô bám dính của mẫu OGMM.

3.3. Khả năng sống của tế bào nội mô trong điều kiện nuôi cấy bằng hệ thống bioreactor

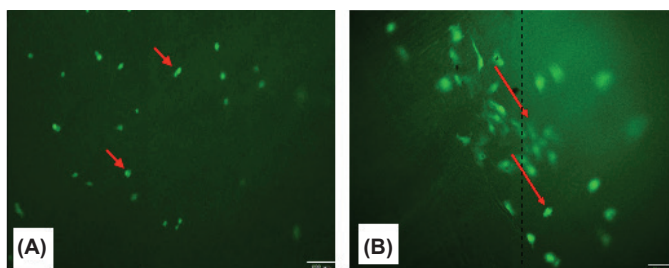
Sau khoảng 24 giờ vận hành bioreactor với tốc độ 150 $\mu\text{l/phút}$, tỷ lệ tế bào sống được ghi nhận khoảng 80%. Ở mốc thời gian 48 và 72 giờ sau vận hành, tỷ lệ tế bào sống có sự giảm đáng kể, với lần lượt xấp xỉ 20 và 10% so với thời điểm nuôi cấy ban đầu (hình 5). Số liệu này cho thấy khả năng sống tế bào nội mô giới hạn trong khoảng 24 giờ khi nuôi cấy dạng huyền phù trong dòng chảy. Theo đó, thử nghiệm liên quan đến đánh giá tương tác nội mô và mẫu OGMM bằng dòng chảy động cần xem xét tiến hành trong khoảng thời gian trong vòng 24 giờ kể từ khi nạp dịch huyền phù tế bào.



Hình 5. Biểu đồ biểu diễn tỷ lệ sống của dịch tế bào nội mô trong điều kiện nuôi cấy dòng chảy.

3.4. Khảo sát sự bám dính của tế bào nội mô trên mẫu OGMM trong điều kiện nuôi cấy dòng chảy

Mẫu OGMM được đặt trong buồng chứa (hình 1B, ký hiệu *). Hệ thống bioreactor được vận hành với dòng huyền phù tế bào nội mô trong vòng 24 giờ ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂. Bằng thử nghiệm với calcein, tế bào nội mô được phát hiện trên mẫu OGMM (hình 6A, ký hiệu mũi tên) với mật độ thưa thớt. Để gia tăng thời gian vận hành và đảm bảo tỷ lệ sống cao cho tế bào nội mô trong dịch nuôi, huyền phù tế bào nội mô được thay mới vào hệ thống và tiếp tục duy trì nuôi cấy dòng chảy.



Hình 6. Tế bào bám dính trên bề mặt OGMM trong điều kiện nuôi cấy dòng chảy. (A) Sau 24 giờ nuôi cấy dòng chảy; (B) Sau 72 giờ nuôi cấy dòng chảy. Độ phóng đại 200 lần.

Sau 72 giờ, mẫu OGMM được thu nhận cho thử nghiệm calcein. Quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang cũng ghi nhận được sự hiện diện của các tế bào nội mô trên mẫu OGMM (hình 6B, ký hiệu mũi tên). Tế bào bám với dạng vượn dài hoặc đa giác, với mật độ gia tăng và có xu hướng phân bố theo dòng dịch truyền, giúp dự đoán hình thái thích nghi dưới tác động của dòng dung dịch nuôi cấy.

Trong điều kiện dòng chảy mô phỏng *in vitro*, quá trình tương tác với bề mặt vật liệu giúp tế bào dần hình thành và ổn định các liên kết, từ đó duy trì trạng thái bám trải của tế bào theo thời gian [10, 16, 17]. Kết quả nghiên

cứu cho thấy, bằng cách áp dụng nuôi cấy dòng chảy với vận tốc 150 μ l/phút đã xác định được đặc tính hỗ trợ tế bào nội mô bám dính của mẫu OGMM. Kết quả này có sự tương đồng với nghiên cứu của S. Rizzi và cs (2022) [18], trong đó nhóm tác giả khảo sát ống mạch nhân tạo từ fibroin tơ tằm, kết hợp tế bào nội mô bằng phương pháp nuôi cấy động trong 72 giờ. Tế bào nội mô thể hiện dạng bám trải đặc trưng và sản xuất laminin. Như vậy, kết quả *in vitro* của nghiên cứu đã xác định được mẫu OGMM đã hỗ trợ tế bào nội mô bám dính ở cả điều kiện nuôi cấy tĩnh và dưới tác động dòng chảy động. Nghiên cứu có ý nghĩa dự đoán quá trình tái lập lớp nội mô chức năng và đảm bảo tính tương hợp máu *in vivo* của ống ghép mạch máu chế tạo.

4. Kết luận

Hệ thống phản ứng sinh học đã thể hiện khả năng vận hành khép kín và đảm bảo độ vô trùng phù hợp cho nghiên cứu ống ghép mạch máu ở điều kiện nuôi cấy dòng chảy. Trong mô phỏng gần - thải heparin, ống ghép mạch máu chế tạo từ động mạch cảnh lợn đã thể hiện đặc tính hỗ trợ tế bào nội mô bám dính, cụ thể trong điều kiện nuôi cấy dòng chảy 24-72 giờ. Các kết quả *in vitro* về bám dính của tế bào nội mô trên ống ghép mạch máu giúp dự đoán khả năng tương thích và cho phép tế bào nội mô tái khu trú trên bề mặt ống ghép sau cấy ghép.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Bộ Khoa học và Công nghệ thông qua Chương trình phát triển khoa học cơ bản trong lĩnh vực Hóa học, Khoa học sự sống, Khoa học trái đất và Khoa học biển giai đoạn 2017-2025 (Chương trình 562), trong khuôn khổ đề tài mã số ĐTĐL.CN-49/22. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] U. Mendibil, R.R. Hernandez, S.R. Carrion, et al. (2020), "Tissue-specific decellularization methods: Rationale and strategies to achieve regenerative compounds", *International Journal of Molecular Sciences*, **21(15)**, DOI: 10.3390/ijms21155447.
- [2] G.I. Barbulescu, F.M. Bojin, V.L. Ordodi, et al. (2022), "Decellularized extracellular matrix scaffolds for cardiovascular tissue engineering: Current techniques and challenges", *Int. J. Mol. Sci*, **23(21)**, pp.1-20, DOI: 10.3390/ijms232113040.

- [3] R. Palek, M.S. Massaro, L. Cervenkova, et al. (2024), "Decellularized porcine vena cava grafts are fully repopulated after orthotopic implantation", *Discover Applied Sciences*, **6**(5), pp.242-259, DOI: 10.1007/s42452-024-05910-5.
- [4] M.T.N. Nguyen, H.L.B. Tran (2022), "Heparinization of the bovine pericardial scaffold by layer-by-layer (LBL) assembly technique", *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, **7**(2), DOI: 10.1016/j.jsamd.2021.11.007.
- [5] J. Cheng, C. Wang, L. Guo, et al. (2024), "Development of heparinized and hepatocyte growth factor-coated acellular scaffolds using porcine carotid arteries", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **112**(1), DOI: 10.1002/jbm.b.35317.
- [6] A. Goins, A.R. Webb, J.B. Allen (2019), "Multi-layer approaches to scaffold-based small diameter vessel engineering: A review", *Materials Science and Engineering: C*, **97**, pp.896-912, DOI: 10.1016/j.msec.2018.12.067.
- [7] X. Wang, V. Chan, P.R.J.F. Corridon, et al. (2022), "Decellularized blood vessel development: Current state-of-the-art and future directions", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **10**, DOI: 10.3389/fbioe.2022.951644.
- [8] S. Fang, D.G. Ellman, D.C. Andersen (2021), "Review: Tissue engineering of small-diameter vascular grafts and their *in vivo* evaluation in large animals and humans", *Cells*, **10**(3), DOI: 10.3390/cells10030713.
- [9] H.H.G. Song, R.T. Rumma, C.K. Ozaki, et al. (2018), "Vascular tissue engineering: Progress, challenges, and clinical promise", *Cell Stem Cell*, **22**(3), pp.340-354, DOI: 10.1016/j.stem.2018.02.009.
- [10] A.G. Kutikhin, M.Y. Sinitsky, A.E. Yuzhalin, et al. (2018), "Shear stress: An essential driver of endothelial progenitor cells", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **118**, pp.46-69, DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.03.007.
- [11] N. Castro, S. Ribeiro, M. Fernandes, et al. (2020), "Physically active bioreactors for tissue engineering applications", *Advanced Biosystems*, **4**(10), DOI: 10.1002/adbi.202000125.
- [12] E. Bayir, M. Sahinler, M.M. Celtikoglu, et al. (2020), *Biomaterials for Organ and Tissue Regeneration*, Elsevier, DOI: 10.1016/B978-0-08-102906-0.00018-0.
- [13] N.T. Nguyen, H.M. Lam, T.Q. Bui, et al. (2024), "Freezing and bioreactor in the low-concentration detergents: A novel approach in the decellularization of small-diameter arteries", *Int. J. Artif. Organs*, **47**(11), pp.816-825, DOI: 10.1177/03913988241288369.
- [14] N. Ucciferri, E.M. Collnot, B.K. Gaiser, et al. (2014), "In vitro toxicological screening of nanoparticles on primary human endothelial cells and the role of flow in modulating cell response", *Nanotoxicology*, **8**(6), pp.697-708, DOI: 10.3109/17435390.2013.831500.
- [15] J. Schmid, S. Schwarz, R. Meier-Staude, et al. (2018), "A perfusion bioreactor system for cell seeding and oxygen-controlled cultivation of three-dimensional cell cultures", *Tissue Eng. Part C Methods*, **24**(10), pp.585-595, DOI: 10.1089/ten.TEC.2018.0204.
- [16] L. Li, H. Tang, J. Wang, et al. (2018), "Rolling adhesion of cell in shear flow: A theoretical model", *Journal of The Mechanics and Physics of Solids*, **119**, pp.369-381, DOI: 10.1016/j.jmps.2018.07.013.
- [17] C.E. Evans, M.L. Iruela-Arispe, Y.Y. Zhao (2021), "Mechanisms of endothelial regeneration and vascular repair and their application to regenerative medicine", *The American Journal of Pathology*, **191**(1), pp.52-65, DOI: 10.1016/j.ajpath.2020.10.001.
- [18] S. Rizzi, S. Mantero, F. Boschetti, et al. (2022), "Luminal endothelialization of small caliber silk tubular graft for vascular constructs engineering", *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, **9**, DOI: 10.3389/fcvm.2022.1013183.