

# Thiết lập quy trình khử hóa tế bào kết hợp khử khoáng xương bò để chế tạo mô xương ghép ứng dụng trong nha khoa tái tạo

Võ Thị Thủy Tiên<sup>1,\*</sup>, Nguyễn Khánh Hòa<sup>2</sup>, Huỳnh Duy Thảo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Răng Hàm Mặt, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

<sup>2</sup>Khoa Khoa học Cơ bản – Y học Cơ sở, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

\*vtttien@ntt.edu.vn

## Tóm tắt

Mục tiêu nghiên cứu là đánh giá hiệu quả của quy trình khử hóa tế bào kết hợp khử khoáng xương bò để chế tạo mô xương ghép ứng dụng trong nha khoa tái tạo. Mô xương được thu nhận từ chỏm xương đùi bò, làm sạch và khử trùng. Sau đó mô xương được khử hóa tế bào bằng cách ngâm lần lượt trong NaCl 1 M, hỗn hợp KCl 0,075 M và EDTA 0,1 %, hỗn hợp SDS 0,5 % và EDTA 0,1 %. Mô xương tiếp tục được khử khoáng bằng hỗn hợp HCl 8 % và axit formic 8 %. Phổ tán xạ năng lượng tia X ghi nhận hàm lượng canxi và photpho trong mô xương giảm gần 90 % so với ban đầu ( $p < 0,001$ ). Trọng lượng khô của mô xương sau xử lý cũng bị chiết rút rõ rệt lên đến 30,29 % so với trước xử lý ( $p < 0,001$ ). Hình ảnh mô học và hình chụp dưới kính hiển vi điện tử quét cho thấy mô xương không chứa thành phần tế bào mà vẫn duy trì hình thái cấu trúc của khung ngoại bào. Như vậy quy trình khử hóa tế bào kết hợp khử khoáng trong nghiên cứu có tiềm năng chế tạo mô xương ghép từ xương bò cho ứng dụng tái tạo mô xương trong nha khoa.

Nhận 11/10/2024

Được duyệt 07/12/2024

Công bố 28/12/2024

## Từ khóa

axit formic, EDTA, HCl, khung ngoại bào, khử khoáng, khử tế bào, SDS, xương ghép dị loài

© 2024 Journal of Science and Technology - NTTU

## 1 Đặt vấn đề

Phẫu thuật ghép xương là một phương pháp thường dùng để điều trị các khuyết hổng xương ở vùng hàm mặt. Xương ghép tự thân được xem là tiêu chuẩn vàng vì có những đặc tính cần thiết cho tái tạo xương gồm độ bền cơ học, tính tương hợp sinh học, dẫn tạo xương, kích tạo xương và thoái biến sinh học. Tuy nhiên, hạn chế của xương ghép tự thân chủ yếu liên quan đến quá trình lấy mảnh ghép, bao gồm đau, mất máu và nhiễm trùng tại vị trí lấy xương, kéo dài thời gian phẫu thuật, khối lượng xương lấy được không nhiều [1]. Khung xương khử khoáng (KXKK) là một loại vật liệu ghép giàu tiềm năng cho việc sửa chữa hoặc tái tạo mô xương trong thực hành nha khoa. KXKK đồng loài thương mại CGDBM100 giúp gia tăng thể tích xương khi nâng xoang hở trong phẫu thuật cấy ghép nha khoa nhờ

tác động tích cực lên sự hình thành mô xương mới và thao tác dễ dàng [2]. Ghép khung xương bò khử khoáng (Bovine-derived demineralized bone matrix - BDMBM) làm tăng thể tích xương ổ răng sau ghép sáu tháng tương tự như ghép mào xương chậu tự thân ở bệnh nhân bị khe hở môi - vòm miệng một bên [3]. Nghiên cứu tổng quan hệ thống gần đây cũng kết luận rằng xương đông khô khử khoáng có hiệu quả tương đương với các vật liệu ghép xương khác trong phẫu thuật nâng xoang và ghép xương, giúp giảm thiểu chi phí và hạn chế phẫu thuật lấy xương ghép tự thân [4].

KXKK là sản phẩm của quá trình xử lý mô xương ghép bằng dung dịch axit để loại bỏ các thành phần chất khoáng trong khi giữ lại khung ngoại bào (Extracellular matrix - ECM) cấu tạo bởi collagen, các protein không



collagen, các yếu tố sinh học có khả năng tạo xương như các protein hình thái xương và một phần nhỏ các mảnh vụn tế bào [5]. Thành phần tế bào còn sót lại có nguy cơ gây ra các phản ứng miễn dịch, ảnh hưởng đến tính an toàn và hiệu quả của mô ghép. Do đó KXKK cần phải được loại bỏ yếu tố tế bào để giảm nguy cơ gây phản ứng miễn dịch dẫn đến thải ghép [1].

Khử tế bào là kỹ thuật loại bỏ tế bào và các yếu tố gây phản ứng miễn dịch khỏi mô và cơ quan mà vẫn bảo tồn cấu trúc và các yếu tố sinh học bên trong ECM. Hiện nay, có ba phương pháp khử tế bào chính là vật lý, hóa học và sinh học [6]. Vì quy trình khử tế bào khỏi KXKK chưa được chuẩn hóa nên có thể dẫn đến sự khác biệt về chất lượng sản phẩm. Hơn nữa, các kỹ thuật thực hiện chủ yếu được báo cáo cho ứng dụng công nghệ mô xương nói chung, trong khi nghiên cứu về quy trình chế tạo vật liệu ghép tủy chính, đáp ứng được đặc thù riêng cho từng lĩnh vực chuyên ngành còn hạn chế. Để phát triển BDMBM ứng dụng trong nha khoa tái tạo, cần tập trung vào nghiên cứu thiết lập và cải tiến quy trình xử lý mô xương, ứng dụng các công nghệ tiên tiến, đánh giá an toàn sinh học và thực hiện các nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng để kiểm chứng hiệu quả của sản phẩm. Trong nghiên cứu này, một quy trình khử tế bào bằng phương pháp hóa học (gọi tắt là khử hóa tế bào - KHTB) kết hợp khử khoáng (KHTB-KK) được thiết lập nhằm chế tạo BDMBM từ chỏm xương đùi bò. Đây là tiền đề để tạo ra các sản phẩm mô xương ghép dị loài mang lại hiệu quả tốt, chi phí hợp lý, đáp ứng nhu cầu điều trị các khuyết hổng xương trong thực hành nha khoa.

## 2 Phương pháp nghiên cứu

### 2.1 Chế tạo khung xương bò khử khoáng từ chỏm xương đùi bò

#### 2.1.1 Thu nhận và chuẩn bị mẫu xương ban đầu

Mẫu xương ban đầu được thu nhận từ chỏm xương đùi tươi (không để quá sáu giờ ở nhiệt độ phòng) lấy từ bò tơ đực 24 tháng tuổi tại lò mổ địa phương. Sau khi thu nhận, mẫu xương được làm sạch toàn bộ gân, mô mềm và ngâm trong dung dịch nước javen 10 % trong 15 phút để khử trùng ban đầu, sau đó rửa sạch bằng nước muối sinh lý vô trùng. Tiếp theo mẫu xương được cắt thành các khối xương có kích thước 20 mm × 10 mm × 10 mm (đài × rộng × cao), chứa cả phần xương vỏ và xương xốp. Các khối xương được chia ngẫu nhiên

thành hai nhóm, gồm nhóm BDMBM được xử lý bằng quy trình KHTB-KK (Hình 1) và nhóm chứng không được xử lý gì để làm mẫu đối chứng khi đánh giá sự thay đổi của mô xương.

#### 2.1.2 Quy trình khử hóa tế bào kết hợp khử khoáng

Các khối xương trong nhóm BDMBM bắt đầu được KHTB bằng cách ngâm lần lượt trong các dung dịch với thể tích gấp 10 lần thể tích khối xương, gồm NaCl 1 M (Merck, USA) trong 18 giờ, hỗn hợp KCl 0,075 M (Merck, USA) và EDTA 0,1 % (Merck, USA) (tỷ lệ 1:1, v/v) trong 16 giờ, hỗn hợp sodium dodecyl sulfate (SDS) 0,5 % (Sigma, USA) và ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0,1 % (Merck, USA) (tỷ lệ 1:1, v/v) trong 24 giờ. Các khối xương tiếp tục được khử khoáng bằng cách ngâm trong hỗn hợp dung dịch HCl 8 % (Merck, USA) và axit formic 8 % (Merck, USA) (tỷ lệ 1:1, v/v) với thể tích dung dịch gấp 20 lần thể tích khối xương trong 12 ngày. Hỗn hợp dung dịch khử khoáng được thay mới mỗi 24 giờ. Sau mỗi bước xử lý, các khối xương được rửa kỹ với dung dịch phosphate buffer saline (PBS) 1X (Gibco, USA) lạnh, vô trùng bằng cách quay ly tâm lạnh 200 vòng/phút trong 5 phút, lặp lại 3 lần nhằm làm sạch các hóa chất còn sót lại rồi để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng. Vào cuối quy trình, lượng axit dư còn lại trong các khối xương được trung hòa bằng dung dịch ammonia 5 % trong 15 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất lạnh, vô trùng cho đến khi đạt giá trị pH ~ 7,0 và để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng.



**Hình 1** Sau khi thu nhận và chuẩn bị mẫu xương ban đầu, các khối xương được xử lý bằng quy trình KHTB-KK. BDMBM có hình thái gần giống miếng bột biển màu trắng, sạch, không có mô mềm hoặc mảnh vụn còn sót lại.

#### 2.1.3 Đông lạnh, đông khô và khử trùng

BDMBM được đông lạnh lần lượt ở 4 °C trong 30 phút, -20 °C trong một giờ và -80 °C trong 24 giờ rồi tiếp tục được đông khô lạnh ở áp suất 0,4 mbar trong 48 giờ.

Sau đó BDMBM được đóng gói và khử trùng bằng tia gamma với liều chiếu 25 kGy ở 4 °C.

2.2 Đánh giá hiệu quả của quy trình khử hóa tế bào kết hợp khử khoáng

2.2.1 Đo trọng lượng khô

Trọng lượng khô của các khối xương được đo bằng cân phân tích AB204 (Mettler Toledo, USA). Các khối xương được khảo sát sau mỗi bước xử lý với các dung dịch khác nhau vào các ngày 1, 2, 3, 5, 6 và 15. Các khối xương chưa xử lý biểu thị ngày 0.

2.2.2 Phổ tán xạ năng lượng tia X (Energy-dispersive X-ray spectroscopy - EDX)

Phân tích hàm lượng canxi (Ca) và photpho (P) trong mô xương được thực hiện bằng thiết bị EMAX ENERGY EX-400 (Horiba, Japan) tại Trung tâm Thiết bị - Phân tích Sinh Hóa Lý, Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2.3 Đánh giá mô học

Tiêu bản mô học nhuộm Hematoxylin (Sigma, USA) và Eosin (Sigma, USA) cho mô xương được thực hiện

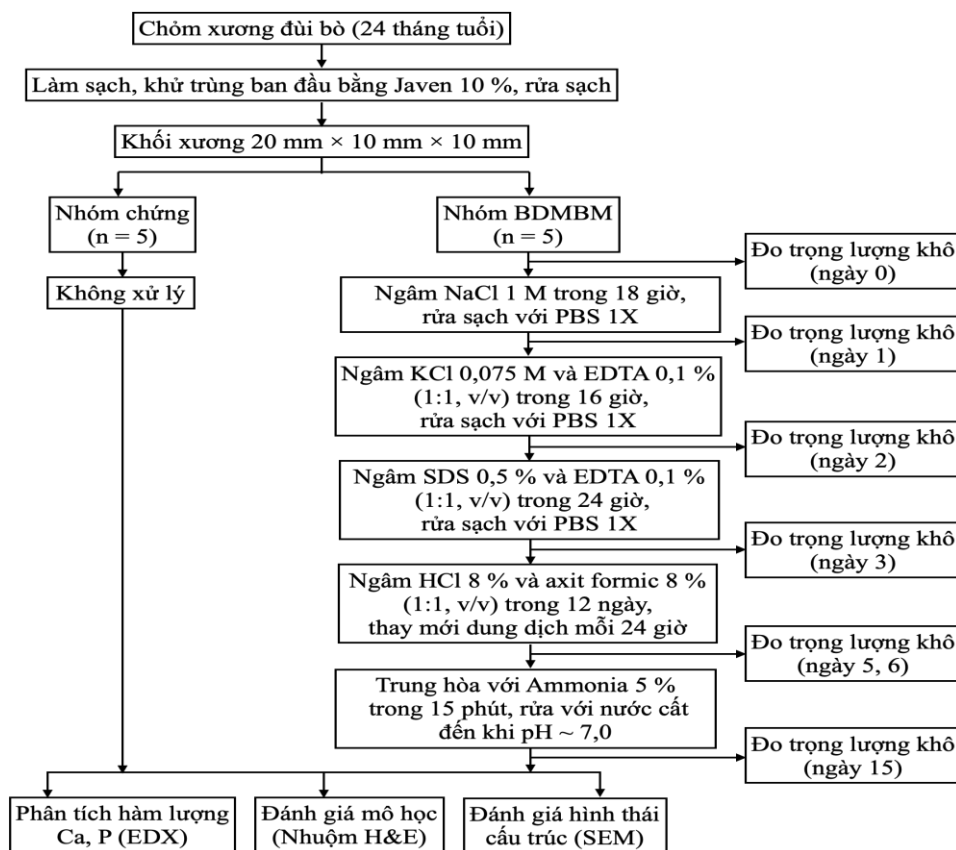
theo quy trình của phòng thí nghiệm Trung tâm Nghiên cứu Y sinh, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch. Hình ảnh mô học được chụp bằng kính hiển vi soi ngược Olympus IX73 (Japan).

2.2.4 Kính hiển vi điện tử quét (Scanning electron microscopy - SEM)

Hình thái cấu trúc của mô xương được khảo sát bằng kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường SU 8010 (Hitachi, Japan) tại Viện Công nghệ Nano, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

2.3 Phương pháp xử lý số liệu

Quy trình chế tạo BDMBM từ chỏm xương đùi bò bằng quy trình KHTB-KK và các bước đánh giá hiệu quả của quy trình xử lý được minh họa trong Hình 2. Các thí nghiệm được thực hiện trên 5 mẫu độc lập với độ lặp lại 3 lần. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn và được phân tích thống kê bằng phần mềm Prism 10 (GraphPad Software, USA). Phép kiểm  $t$  được sử dụng để so sánh giữa hai nhóm nghiên cứu. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi giá trị  $p < 0,05$ .



**Hình 2** Sơ đồ tóm tắt các bước của quy trình KHTB-KK và đánh giá hiệu quả của quy trình xử lý để chế tạo BDMBM từ chỏm xương đùi bò.

Theo Hình 2, để đánh giá hiệu quả chiết rút chất khoáng, trọng lượng khô của các khối xương sau mỗi bước xử lý với các dung dịch khác nhau được đo vào các ngày 1, 2, 3, 5, 6 và 15 và so sánh với các khối xương chưa xử lý (ngày 0). Hàm lượng Ca và P trong mô xương trước và sau xử lý được phân tích định lượng bằng EDX. Để đánh giá hiệu quả khử tế bào, mô xương trước và sau xử lý được đánh giá mô học và khảo sát hình thái cấu trúc dưới SEM.

### 3 Kết quả

**Bảng 1** Hàm lượng nguyên tố canxi và photpho trong mô xương trước và sau xử lý bằng quy trình KHTB-KK

Hàm lượng (%)	Nhóm chứng (n = 5)	Nhóm BDMBM (n = 5)	Giá trị p
Ca	15,76 ± 5,63	1,78 ± 1,29	< 0,001***
P	7,41 ± 1,81	0,77 ± 0,38	< 0,001***

*Phép kiểm t so sánh hàm lượng Ca và P trung bình trong mô xương giữa nhóm chứng với nhóm BDMBM.*

*\*\*\*: Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p < 0,001.*

Sự thay đổi trọng lượng khô của mô xương theo thời gian xử lý bằng quy trình KHTB-KK được trình bày trong Bảng 2. Trọng lượng khô của mô xương chưa xử lý là (3,07 ± 0,16) g. Trong ba ngày đầu tiên xử lý với các dung dịch khử tế bào, trọng lượng khô của mô xương lần lượt giảm xuống còn (3,06 ± 0,15) g, (3,02 ± 0,15) g và (3,03 ± 0,16) g nhưng không đáng kể (giá trị p lần lượt là 0,857, 0,562 và 0,701). Trọng lượng

### 3.1 Hiệu quả chiết rút chất khoáng

Kết quả phân tích định lượng thành phần chất khoáng trong mô xương bằng EDX được trình bày trong Bảng 1. Ở nhóm chứng, Ca chiếm 15,76 % và P chiếm 7,42 % khối lượng của mô xương. Ở nhóm BDMBM, Ca chỉ chiếm 1,78 % khối lượng và gần như không phát hiện được P (0,77 %) trong mô xương. Sự khác biệt giữa hai nhóm có ý nghĩa thống kê (p < 0,001). Những kết quả này cho thấy quy trình KHTB-KK đạt hiệu quả cao trong việc chiết rút chất khoáng khỏi mô xương.

khô của mô xương thay đổi có ý nghĩa thống kê kể từ ngày thứ năm (p < 0,001) khi mô xương được khử khoáng bằng hỗn hợp HCl 8 % và axit formic 8 %, với trọng lượng bị chiết rút lên đến 30,29 % sau khi kết thúc quy trình vào ngày thứ 15 (p < 0,001). Những kết quả này gợi ý rằng khả năng chiết rút chất khoáng khỏi mô xương chủ yếu là nhờ sử dụng hỗn hợp dung dịch axit khử khoáng.

**Bảng 2** Sự thay đổi trọng lượng khô của mô xương theo thời gian xử lý bằng quy trình KHTB-KK

n = 5	Ngày 0	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 5	Ngày 6	Ngày 15
Trọng lượng khô (g)	3,07 ± 0,16	3,06 ± 0,15	3,02 ± 0,15	3,03 ± 0,16	2,46 ± 0,09	2,23 ± 0,08	2,14 ± 0,25
Trọng lượng bị chiết rút (%)	0	0,33	1,63	1,30	19,87	27,33	30,29
Giá trị p	-/-	0,857	0,562	0,701	< 0,001***	< 0,001***	< 0,001***

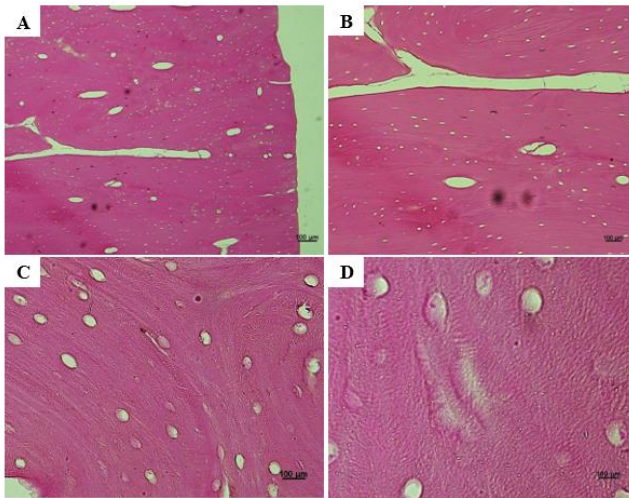
*Phép kiểm t so sánh trọng lượng khô trung bình của mô xương vào các ngày 1, 2, 3, 5, 6 và 15 với ngày 0.*

*\*\*\*: Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p < 0,001.*

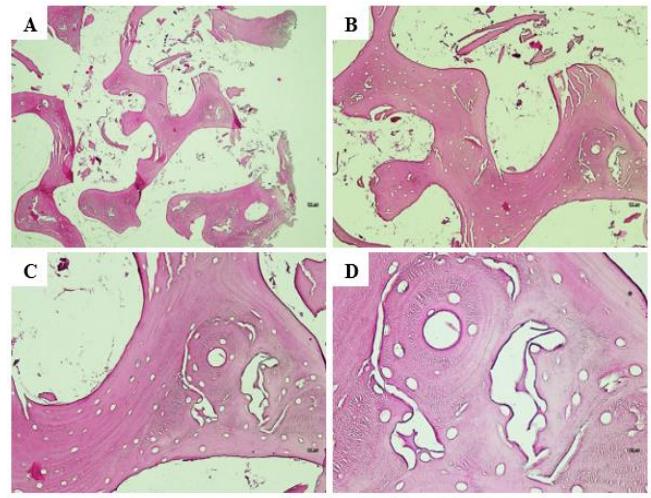
### 3.2 Đặc điểm mô học

Kết quả phân tích mô học của mô xương không xử lý (nhóm chứng) cho thấy cấu trúc mô xương ổn định và có một vài vết nhân tế bào (Hình 3). Ngược lại ở nhóm BDMBM, cấu trúc mô xương trở nên xốp, mỏng hơn

với nhiều bè xương nhỏ và không còn các vết nhân tế bào (Hình 4). Những kết quả này chỉ ra rằng các hóa chất có thể xâm nhập vào sâu bên trong mô xương để khử khoáng và loại bỏ các thành phần tế bào hiệu quả mà không làm phá hủy cấu trúc của mô.



**Hình 3** Hình ảnh mô học của mô xương không xử lý (nhóm chứng) lần lượt chụp ở các vật kính (A) 4×, (B) 10×, (C) 20× và (D) 40× cho thấy cấu trúc mô xương ổn định và có một vài vết nhân tế bào.

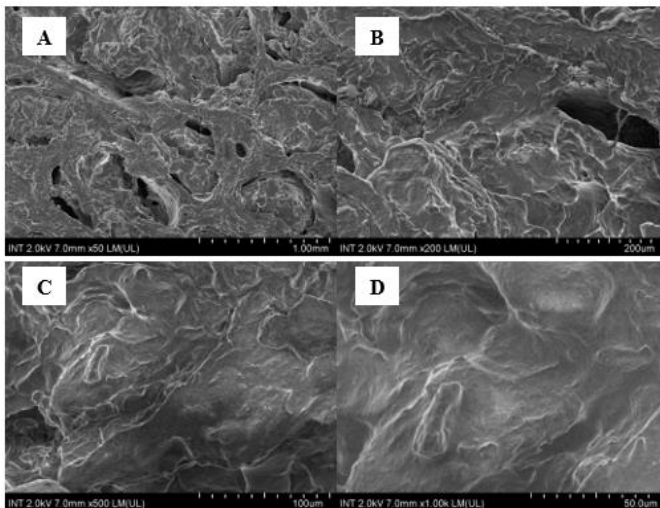


**Hình 4** Hình ảnh mô học của mô xương xử lý bằng quy trình KHTB-KK (nhóm BDMBM) lần lượt chụp ở các vật kính (A) 4×, (B) 10×, (C) 20× và (D) 40× cho thấy cấu trúc mô xương xốp, mỏng hơn với nhiều bè xương nhỏ và không còn các vết nhân tế bào.

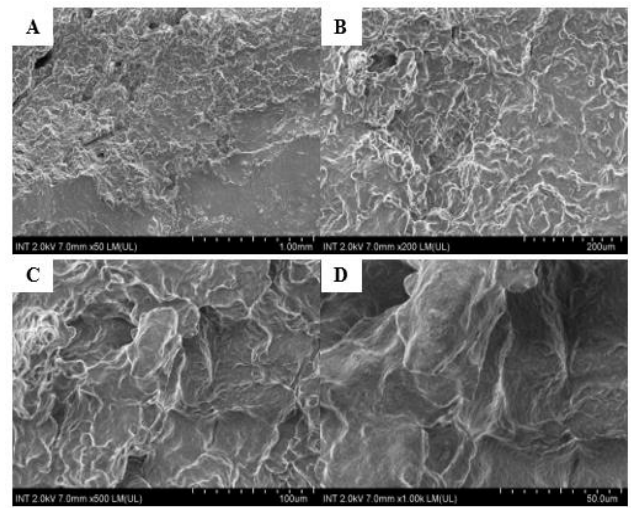
### 3.3 Hình thái cấu trúc

Kết quả khảo sát hình thái cấu trúc bằng SEM cho thấy cấu trúc không gian ba chiều xốp với mạng lưới liên kết chặt chẽ, dày đặc của mô xương không xử lý (nhóm chứng) (Hình 5). Trong khi đó mô xương ở nhóm

BDMBM cũng thể hiện cấu trúc không gian ba chiều xốp nhưng mỏng hơn và có chiều sâu hơn (Hình 6). Những kết quả này một lần nữa cho thấy ưu điểm của quy trình KHTB-KK là duy trì được tính toàn vẹn về mặt hình thái cấu trúc của mô xương.



**Hình 5** Ảnh SEM của mô xương không xử lý (nhóm chứng) ở các độ phóng đại (A) 50×, (B) 200×, (C) 500× và (D) 1000× cho thấy cấu trúc không gian ba chiều xốp với mạng lưới liên kết chặt chẽ, dày đặc.



**Hình 6** Ảnh SEM của mô xương xử lý bằng quy trình KHTB-KK (nhóm BDMBM) ở các độ phóng đại (A) 50×, (B) 200×, (C) 500× và (D) 1000× cho thấy cấu trúc không gian ba chiều xốp nhưng mỏng hơn và có chiều sâu hơn.

#### 4 Thảo luận

Ngày càng nhiều nghiên cứu được thực hiện nhằm thiết lập một quy trình hiệu quả để khử tế bào trong ECM sử dụng làm vật liệu ghép xương. Một nghiên cứu công bố vào năm 2018 đã báo cáo quy trình khử tế bào của mô xương thu nhận từ xương đùi bệnh nhân bằng cách sử dụng HCl 0,6 N để khử khoáng rồi sử dụng kỹ thuật đông lạnh - rã đông kết hợp trypsin 0,25 % và SDS 2,5 % để khử tế bào [7]. Mặc dù kỹ thuật đông lạnh - rã đông giúp duy trì tính chất cơ học của ECM, nó không thể khử toàn bộ tế bào. Bên cạnh đó, hoạt động đặc hiệu của trypsin lên các peptide có thể phá hủy nghiêm trọng các protein trong ECM như elastin và collagen [6]. Như vậy quy trình khử tế bào cần cân bằng giữa việc loại bỏ hoàn toàn yếu tố tế bào và vật liệu di truyền với việc bảo tồn ECM, từ đó duy trì được cấu trúc ba chiều, đặc tính cơ học và hoạt động sinh học của mô xương tự nhiên. Một bài báo tổng quan gần đây chỉ ra rằng phương pháp hóa học có khả năng loại bỏ tế bào khỏi mô một cách nhanh chóng và hiệu quả. Ngoài ra, các hóa chất có thể được sử dụng kết hợp với nhau để đẩy nhanh quá trình khử tế bào [8]. Trong nghiên cứu này, quy trình KHTB được dựa trên nguyên lý tối ưu hóa tác dụng và giảm thiểu tác hại của hóa chất lên mô xương. Theo một báo cáo vào năm 2022 về quy trình sản xuất mô ghép sụn dị loại khử tế bào, quy trình sóc thẩm thấu bao gồm ngâm mẫu mô trong dung dịch ưu trương NaCl 1 M trong 18 giờ, sau đó ngâm trong dung dịch nước khử ion nhược trương trong 18 giờ đã được sử dụng để ly giải tế bào, giúp cải thiện hiệu quả khử tế bào [9]. Tương tự, quy trình KHTB cũng bắt đầu từ việc ly giải tế bào bằng cách ngâm mô xương trong dung dịch ưu trương NaCl 1 M trong 18 giờ rồi đến dung dịch nhược trương KCl 0,075 M trong 16 giờ, tạo thuận lợi cho các bước xử lý tiếp theo. Kỹ thuật khử tế bào bằng phương pháp hóa học hiện nay sử dụng ba nhóm tác nhân chính gồm chất tẩy rửa, axit-bazơ và chất chelat hóa. Trong số đó, chất tẩy rửa thường được sử dụng nhất vì phổ biến, rẻ tiền, nhanh chóng và hiệu quả [8]. SDS là một chất tẩy rửa phân cực có khả năng hòa tan màng bào tương và màng nhân, loại bỏ nhân tế bào và vật liệu di truyền, phá vỡ liên kết protein-protein. SDS còn có lợi thế loại bỏ hiệu quả vật liệu di truyền

trong thời gian ngắn hơn so với các hóa chất khác nên nó được dùng khá rộng rãi trong quy trình khử tế bào. Tuy nhiên, SDS có nguy cơ làm thay đổi cấu trúc vi mô của ECM, ảnh hưởng đến sự toàn vẹn của mô [6]. Một nghiên cứu so sánh thực nghiệm báo cáo rằng xử lý mô nhau thai lợn bằng SDS 0,5 % trong 24 giờ đem lại hiệu quả khử tế bào tốt hơn và giảm thiểu tổn thương mô nhiều hơn so với các nồng độ và các thời gian xử lý khác [10]. Dựa trên những bằng chứng khoa học hiện có, BDMBM trong nghiên cứu này đã được KHTB bằng SDS 0,5 % trong 24 giờ. Trong khi đó EDTA là một tác nhân chelat hóa có thể liên kết với các ion kim loại, góp phần gây phân tách tế bào. Nó thường được sử dụng kết hợp với DNase, RNase hoặc SDS để làm sạch mảnh vụn tế bào khỏi mô xương [6,8]. Cần lưu ý rằng dung dịch axit cũng có khả năng hòa tan màng tế bào và vật liệu trong nhân tế bào nhờ tính phân cực của nó. Ngoài ra, quá trình khử khoáng sẽ giúp loại bỏ các thành phần tế bào và vật liệu di truyền khỏi ECM tốt hơn nếu diễn ra sau quá trình khử tế bào [11]. Vì vậy trong nghiên cứu này, mô xương được KHTB rồi mới khử khoáng nhằm tối ưu hóa hiệu quả của các hóa chất. Trong công nghệ tái tạo mô xương, khung xương khử tế bào cho thấy nhiều tiềm năng vì có cấu trúc ba chiều, tính chất cơ học, tính dẫn tạo xương và kích tạo xương tương tự như mô xương tự nhiên [6]. Trong nghiên cứu này, quy trình KHTB đã loại bỏ hiệu quả các thành phần tế bào, đồng thời duy trì tính toàn vẹn cấu trúc của ECM, qua đó tạo thuận lợi cho hoạt động dẫn tạo xương. Điều này cũng rất quan trọng cho việc điều hòa hình thái tế bào và biểu hiện gen [12], điều hòa sự biệt hóa của tế bào gốc thành dòng tế bào tạo xương [13], góp phần vào hoạt động kích tạo xương. Những kết quả này khá tương đồng với một công bố trước đó, trong đó mô xương xộp thu nhận từ xương đùi bò được khử tế bào bằng dung dịch SDS và Triton X-100 1 %, khử khoáng bằng dung dịch HCl 37 % rồi thủy phân bằng dung dịch kiềm. Kết quả cho thấy nhân tế bào và vật liệu di truyền được loại bỏ hoàn toàn, vùng khoáng hóa chiếm từ 4,95 % đến 22,11 % và cấu trúc ECM được bảo tồn [14]. Tuy nhiên, các dung dịch kiềm được ghi nhận là làm giảm đáng kể hàm lượng các glycosaminoglycan, gây ảnh hưởng đến tính chất cơ

học của ECM nên hầu như không được sử dụng trong quy trình khử tế bào ở mô xương [8]. Nghiên cứu trên còn chỉ ra rằng mô xương thu được có đặc tính dẫn tạo xương và kích tạo xương [14]. So sánh khả năng thúc đẩy tái tạo xương tại các vị trí khuyết hổng xương sọ ở chuột cũng cho thấy cả xương bò khử khoáng và xương bò khử tế bào đều có tiềm năng tạo xương thuận lợi. Tuy nhiên xương khử tế bào thể hiện các đặc tính dẫn tạo xương, kích tạo xương và tạo xương vượt trội hơn đáng kể so với xương khử khoáng [15]. Mặt khác, một tổng quan y văn gần đây kết luận rằng đặc tính kích tạo xương của mô xương khử khoáng chịu ảnh hưởng rất nhiều bởi loại hóa chất khử khoáng. Dung dịch HCl (0,5-0,6) M cùng với hỗn hợp axit formic và axit citric (tỷ lệ 1:1, v/v) được báo cáo là tạo ra KXKK có đặc tính kích tạo xương đạt yêu cầu [16]. Xương không khử khoáng đồng loại được khử khoáng bằng HCl (0,5-0,6) N có khung hữu cơ nguyên vẹn, hàm lượng phần trăm khoáng canxi phosphat chiếm từ 1 % đến 6 % và chứa nhiều protein hình thái xương cần thiết cho sự tái tạo xương [5]. Tương tự, nghiên cứu này cũng cho thấy khả năng chiết rút chất khoáng khỏi mô xương lên đến gần 90 % của hỗn hợp HCl và axit formic. Tuy nhiên, nghiên cứu đã không khảo sát đặc tính kích tạo xương của BDMBM.

Tóm lại, quy trình KHTB-KK cho thấy tiềm năng chế tạo BDMBM ứng dụng trong nha khoa tái tạo. So với những quy trình khử tế bào đã báo cáo trước đó, quy trình KHTB khắc phục được nhược điểm của phương pháp vật lý là không thể khử toàn bộ tế bào cũng như những hạn chế của phương pháp sinh học như phá hủy các protein trong ECM hoặc gây ra phản ứng miễn dịch [6]. Hơn nữa quy trình chỉ sử dụng những hóa chất có sẵn, chi phí phải chăng, không đòi hỏi thiết bị phức tạp hoặc điều kiện kỹ thuật đặc biệt. Vì vậy quy trình cho thấy tiềm năng mở rộng trên quy mô sản xuất lớn hơn. Tuy nhiên, ứng dụng rộng rãi của SDS trong công nghiệp và đời sống có nguy cơ thải SDS quá mức vào môi trường, gây ảnh hưởng đến cả sinh vật lẫn môi trường, đặc biệt là môi trường đất và nước. Hiện nay loại bỏ SDS thông qua phục hồi sinh học đang được xem là một biện pháp hiệu quả để giảm thiểu tác động môi trường của chất tẩy rửa này [17]. Ngoài ra EDTA cũng là một hóa chất quan trọng trong quy trình KHTB. Vì

EDTA tan trong nước và không dễ bay hơi nên nó thường được thải ra môi trường cùng với nước thải. Mặc dù EDTA ít gây độc đối với con người và môi trường, vẫn có nhiều lo ngại về khả năng phân hủy sinh học kém của nó và tình trạng huy động các kim loại nặng từ pha rắn gây nguy cơ cho nước ngầm [18]. Do EDTA được xem là một chất gây ô nhiễm tồn tại dai dẳng trong môi trường nên việc xử lý và xả nước thải có chứa EDTA cần được kiểm soát một cách nghiêm ngặt. Nhìn chung khi sử dụng các hóa chất mạnh trong quy trình sản xuất, cần hướng đến mục tiêu bền vững thông qua việc đánh giá và lựa chọn hóa chất, tối ưu hóa quy trình, tuân thủ các quy định an toàn khi sử dụng hoá chất và xử lý chất thải, ứng dụng công nghệ xanh nhằm hạn chế tác động tiêu cực lên môi trường, sinh vật và con người đồng thời tăng cường hiệu quả sản xuất.

## 5 Kết luận và đề xuất

Nghiên cứu này đã bước đầu thiết lập thành công quy trình KHTB-KK để chế tạo BDMBM, hướng đến làm vật liệu ghép xương trong nha khoa tái tạo. Tuy nhiên, hiệu quả của quy trình có sự biến thiên theo nồng độ của hóa chất, thời gian xử lý và các đặc điểm của mô xương như nguồn gốc, độ tuổi, vị trí, thành phần. Do đó, cần từng bước hoàn thiện và chuẩn hóa quy trình trong các nghiên cứu thực nghiệm tiếp theo. Ngoài ra, trong điều kiện thí nghiệm hiện tại, khung xương thành phẩm có thể được xem là một vật liệu tương hợp sinh học và tương thích miễn dịch, giúp hỗ trợ các cơ chế dẫn tạo xương và kích tạo xương. Bên cạnh đó, các tính chất cơ học của BDMBM như kích thước lỗ liên thông, độ bền nén, độ biến dạng và độ chịu lực cũng như các tiêu chuẩn sinh học như độ vô khuẩn, độ gây độc tế bào và độ an toàn tế bào cũng cần được phân tích. Tất cả những đặc tính này sẽ được đánh giá trong các nghiên cứu tiếp theo. Cần lưu ý rằng sự chuyển dịch từ kết quả nghiên cứu sang ứng dụng lâm sàng là một quá trình lâu dài và phức tạp, cần được kiểm chứng qua hàng loạt các thí nghiệm, nghiên cứu tiền lâm sàng và thử nghiệm lâm sàng dưới nhiều điều kiện khác nhau. Hơn nữa, quy trình được đề xuất từ nghiên cứu phải được điều chỉnh để phù hợp với tình hình thực tế như cơ sở hạ tầng, tài nguyên và nhân lực trước khi triển khai trên quy mô lớn hơn.

**Lời cảm ơn** Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ - Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, đề tài mã số 2024.01.42/HĐ-KHCN.

### Tài liệu tham khảo

1. V.A. Georgeanu, O. Gingu, I.V. Antoniac, H.O. Manolea. (2023). Current options and future perspectives on bone graft and biomaterials substitutes for bone repair, from clinical needs to advanced biomaterials research. *Applied Sciences*, 13, 8471.
2. Trần Xuân Thắng, Lê Đức Lánh. (2015). Đánh giá hiệu quả sử dụng xương khử khoáng CGDBM100 để nâng xoang hõ đồng thời đặt implant nha khoa. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, 19, 303.
3. V. Kumar, V. Rattan, S. Rai, S.P. Singh, J.K. Mahajan. (2022). Comparative assessment of autogenous cancellous bone graft and bovine-derived demineralized bone matrix for secondary alveolar bone grafting in patients with unilateral cleft lip and palate. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 59, 833.
4. Phan Huy Hoàng, Nguyễn Phú Thắng, Đàm Văn Việt, Bùi Tiến Đạt. (2022). Tổng quan hệ thống về can thiệp nâng xoang cửa sổ bên có ghép xương trong cây ghép implant nha khoa. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 519, 345.
5. E. Gruskin, B.A. Doll, F.W. Futrell, J.P. Schmitz, J.O. Hollinger. (2012). Demineralized bone matrix in bone repair: History and use. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 1063.
6. H. Amirzad, M. Dadashpour, N. Zarghami. (2022). Application of decellularized bone matrix as a bioscaffold in bone tissue engineering. *Journal of Biological Engineering*, 16, 1.
7. E. Abedin, R. Lari, N.M. Shahri, M. Fereidoni. (2018). Development of a demineralized and decellularized human epiphyseal bone scaffold for tissue engineering: A histological study. *Tissue & Cell*, 55, 46.
8. D. Moffat, K. Ye, S. Jin. (2022). Decellularization for the retention of tissue niches. *Journal of Tissue Engineering*, 13, 20417314221101151.
9. N.A. Vernice, N. Berri, R.J. Bender, X. Dong, J.A. Spector. (2022). Production of a low-cost, off-the-shelf, decellularized cartilage xenograft for tissue regeneration. *Annals of Plastic Surgery*, 88, S296.
10. J.H. Son, D.J. Kim, D.M. Lee, B.B. Seo. (2021). Establishment of optimal decellularization conditions using porcine placenta. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 36, 253.
11. A. Al Qabbani, K.G.A. Rani, J. Syarif, S. AlKawas, S. Sheikh Abdul Hamid, A.R. Samsudin, A. Azlina. (2023). Evaluation of decellularization process for developing osteogenic bovine cancellous bone scaffolds in-vitro. *PLoS One*, 18, e0283922.
12. E.K.F. Yim, S.W. Pang, K.W. Leong. (2007). Synthetic nanostructures inducing differentiation of human mesenchymal stem cells into neuronal lineage. *Experimental Cell Research*, 313, 1820.
13. M.J. Dalby, N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, M.O. Riehle, P. Herzyk, C.D. Wilkinson, R.O. Oreffo. (2007). The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nature Materials*, 6, 997.
14. A. Malagón-Escandón, M. Hautefeuille, E. Jimenez-Díaz, J. Arenas-Alatorre, J.M. Saniger, I. Badillo-Ramírez, N. Vazquez, G. Piñón-Zarate, A. Castell-Rodríguez. (2021). Three-dimensional porous scaffolds derived from bovine cancellous bone matrix promote osteoinduction, osteoconduction, and osteogenesis. *Polymers*, 13, 4390.
15. A. Al Qabbani, K.G.A. Rani, S. AlKawas, S. Sheikh Abdul Hamid, A. Yap Abdullah, A.R. Samsudin, A. Azlina (2023). Evaluation of the osteogenic potential of demineralized and decellularized bovine bone granules following implantation in rat calvaria critical-size defect model. *PLoS One*, 18, e0294291.

16. M. Ciszynski, S. Dominiak, M. Dominiak, T. Gedrange, J. Hadzik. (2023). Allogenic bone graft in dentistry: A review of current trends and developments. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 16598.
17. F.H. Muhamad, S.A. Ahmad, N.A. Yasid. (2017). Biodegradation of sodium dodecyl sulfate: A mini review. *Journal of Environmental Microbiology and Toxicology*, 5, 7.
18. C. Oviedo, J. Rodríguez (2003). EDTA: the chelating agent under environmental scrutiny. *Química Nova*, 26, 6.

## **Establishment of a decellularization combined demineralization process to fabricate bovine-derived xenografts for regenerative dentistry**

Vo Thi Thuy Tien<sup>1,\*</sup>, Nguyen Khanh Hoa<sup>2</sup>, Huynh Duy Thao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Dentistry, Nguyen Tat Thanh University

<sup>2</sup>Faculty of Basic Medical Science, Pham Ngoc Thach University of Medicine

\*vtttien@ntt.edu.vn

**Abstract** Elimination of the immune response elicited by grafting remains a challenge for the fabrication of non-autologous bone grafts. The aim of this study was to assess the effectiveness of a decellularization-combined demineralization process to produce bovine-derived demineralized bone matrix (BDMBM) for regenerative dentistry. Bone tissues were harvested from bovine femoral heads, cleaned, and disinfected. The tissues were then decellularized by sequentially soaking in 1 M NaCl, a mixture of 0.075 M KCl and 0.1 % EDTA (1:1, v/v), and a mixture of 0.5 % SDS and 0.1 % EDTA (1:1, v/v). They were further demineralized using a mixture of 8 % HCl and 8 % formic acid (1:1, v/v). The energy-dispersive X-ray spectroscopy found that the contents of calcium and phosphorus in the bone tissues after treatment were significantly reduced by nearly 90 % compared to before treatment ( $p < 0.001$ ). The dry weight of bone tissues also showed a significant weight loss of up to 30.29 % at the end of process compared to the beginning ( $p < 0.001$ ). The analysis of histological morphology and structural topography under scanning electron microscopy indicated that BDMBM contained no cellular components while maintaining the structure of the extracellular matrix. In conclusion, the decellularization-combined demineralization process used in this study may offer promising method to fabricate BDMBM for bone regeneration applications in dentistry.

**Keywords** formic acid, EDTA, HCl, extracellular matrix, demineralization, decellularization, SDS, xenograft