

THÂM NHIỄM BẠCH CẦU ÁI TOAN VÀO VẾT THƯƠNG BÔNG Ở BỆNH NHÂN CAO TUỔI VÀ TRẺ TUỔI

Lược dịch: Hoàng Văn Vụ
Theo Burns Journal số 46 - 2020

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Tuổi cao làm thay đổi nhiều quá trình sinh lý trong cơ thể, bao gồm cả phản ứng miễn dịch bẩm sinh và mắc phải, ảnh hưởng đến quá trình liền vết thương. Nghiên cứu này tập trung xem xét vấn đề thâm nhiễm bạch cầu ái toan vào vết thương bông ở bệnh nhân cao tuổi.

Phương pháp: Nghiên cứu mô bệnh học vết thương bông được tiến hành trên các bệnh nhân nam và nữ từ 30 tuổi trở xuống và 65 tuổi trở lên. Các mô tổn thương bông trung bì sâu được thu thập từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 6 sau bông trong quá trình phẫu thuật, được cố định bằng bloc nén và được đánh giá bằng H&E để xác định độ sâu của tổn thương. Làm hoá mô miễn dịch (Immunohistochemistry - IHC) cho các protein chính cơ bản (Major Basic Protein - MBP) để xác định số lượng bạch cầu ái toan. Phần mềm Welch's Test được sử dụng để xác định sự khác biệt về số lượng bạch cầu ái toan giữa hai nhóm bệnh nhân trẻ tuổi và cao tuổi.

Kết quả: 13 mẫu được chia thành hai nhóm: Nhóm I: Bệnh nhân trẻ tuổi (≤ 30 tuổi), gồm 10 bệnh nhân; nhóm II: Bệnh nhân cao tuổi (≥ 65 tuổi) gồm 3 bệnh nhân. Nhóm I: Có tuổi trung bình là 23 tuổi và trung vị từ 17 - 30 tuổi. Nhóm II: Có tuổi trung bình là 81 tuổi và tuổi trung vị là 84 (giá trị trung vị từ 67 - 93 tuổi). Nghiên cứu cho thấy số lượng bạch cầu ái toan thâm nhiễm vào vết thương bông ở nhóm I là 0,171 bạch cầu/mm thấp hơn ở nhóm II là 0,910 bạch cầu/mm ($p = 0,017$).

Kết luận: Nhóm các bệnh nhân người cao tuổi (nhóm II) có biểu hiện tăng thâm nhiễm bạch cầu ái toan vào vết thương bông. Cần mở rộng nghiên cứu với số lượng mẫu lớn hơn để làm rõ kết quả này.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tỷ lệ bệnh nhân bông mới ở nhóm bệnh nhân cao tuổi của Hoa Kỳ là gần 20%, trong khi ở các nước đang phát triển là 5%. Nhiều nghiên cứu dịch tễ học đã ghi nhận những bệnh nhân cao tuổi bị bông có thời gian lành bệnh lâu hơn, tiên lượng nặng hơn và tỷ lệ tử vong cao hơn. Tuổi cao làm thay đổi nhiều quá trình sinh lý trong cơ thể, đặc biệt là các cơ chế bảo

vệ như đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và mắc phải.

Thay đổi miễn dịch diễn ra trong quá trình liền vết thương bông là một lĩnh vực tương đối mới vẫn đang được khám phá, đó là lý do tại sao nghiên cứu in vitro của chúng tôi đã ghi nhận sự khác biệt của các cytokine/chemokine biểu hiện tại mô tổn thương, cụ thể là EGF và RANTES, giữa hai nhóm bệnh cao tuổi và trẻ tuổi. Nghiên

cứu thực nghiệm trên chuột cũng ghi nhận sự khác biệt của nồng độ Eotaxin, một loại protein hoá học thu hút các bạch cầu ái toan, giữa hai nhóm chuột “già” và chuột “trẻ”.

Bạch cầu ái toan đóng một vai trò quan trọng trong quá trình liền vết thương. Chúng tiết ra TGF- α và TGF- β , thúc đẩy quá trình liền vết thương bằng cách lắng đọng/tái cấu trúc chất nền ngoại bào, tạo các mô xơ, lắng đọng collagen, di chuyển các tế bào sừng, tăng biểu hiện của TGF- α trong các tế bào sừng, tân tạo các mạch máu và phân bào. Ngoài ra, các nghiên cứu gần đây còn phát hiện tác dụng của bạch cầu ái toan trong việc thúc đẩy quá trình liền vết thương trong các can thiệp phẫu thuật chẳng hạn như tái tạo tế bào gan sau phẫu thuật cắt gan. Tuy nhiên, một nghiên cứu của Tyler và cộng sự đưa ra giả thuyết rằng ngay cả khi bạch cầu ái toan có thể xâm nhập ồ ạt vào vết thương, nhưng nếu chúng bị khiếm khuyết trong quá trình biểu hiện và bài tiết của TGF- α/β , thì thời gian và hiệu quả chữa lành vết thương sẽ bị ảnh hưởng. Điều này cho thấy bạch cầu ái toan liên quan đến nhiều quá trình viêm bệnh lý và hiện nay, sự xâm nhập và tiết ra các chất trung gian viêm từ bạch cầu ái toan đã ảnh hưởng xấu đến khả năng chữa lành vết thương.

Fear và cộng sự đã nghiên cứu mối liên quan giữa thời điểm cắt lọc tổn thương bỏng với sự thay đổi đáp ứng miễn dịch tại vết thương và thấy rằng: nhóm được cắt lọc tổn thương bỏng vào ngày thứ 8 sau bỏng có số lượng bạch cầu ái toan lớn hơn đáng kể so với nhóm được cắt lọc vào ngày thứ nhất. Nguyên nhân là do ở nhóm được cắt lọc tổn thương bỏng ở ngày thứ 8 có sự tăng tiết chemokine từ các tế bào viêm, liên quan đến phản ứng viêm cấp tính, tăng tổn thương mô và làm chậm liền vết thương.

Nghiên cứu cụ thể về sự thâm nhiễm bạch cầu ái toan vào vết thương bỏng trên thực tế còn ít. Nghiên cứu này trên cơ sở đó nhằm đánh giá sự thay đổi số lượng bạch cầu ái toan tại vết thương giữa hai nhóm tuổi và ảnh hưởng đến quá trình liền vết thương như thế nào.

2. PHƯƠNG PHÁP VÀ CHẤT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1. Thu thập số liệu nghiên cứu

Một nghiên cứu được thực hiện với sự chấp thuận của Hội đồng đạo đức Đại học Vanderbilt và phù hợp với thực tiễn. Các mẫu được thu thập từ các mô bỏng đã cắt lọc và được sự đồng ý của bệnh nhân. Các tiêu chuẩn lựa chọn được sử dụng là những bệnh nhân là nữ và nam dưới 30 tuổi và trên 65 tuổi. Tất cả các mẫu bỏng trung bì sâu được thu thập tại thời điểm phẫu thuật giữa ngày thứ 2 và ngày thứ 6 sau bỏng từ các bệnh nhân tại Trung tâm Bỏng khu vực/Trung tâm Y tế Đại học Vanderbilt. Các tiêu chí loại trừ bao gồm các bệnh nhân với bỏng thượng bì, bỏng trung bì sâu và bỏng sâu toàn bộ lớp da, bỏng mà không trải qua phẫu thuật cắt bỏ hoại tử, bệnh nhân không đồng ý. Có 15 bệnh nhân đã được đưa vào nghiên cứu này.

2.2. Lấy mẫu

Mẫu nghiên cứu là mô tổn thương bỏng trung bì sâu được thu thập từ rìa của tổn thương trong quá trình phẫu thuật cắt lọc hoại tử, không phải là da bị loại bỏ thêm do tham gia nghiên cứu. Tất cả các mẫu sau đó được cắt nhỏ thành từng mảnh khoảng 2,5 cm x 2,5cm và bảo quản trong chất liệu đệm trung tính Formalin 10% (NBF). Các mô được cố định với Formalin sau đó sẽ được gắn với Paraffin

(lổc nền). Các mô đã cố định bằng lổc nền sẽ được cắt thành các lát mỏng 5 μ m và nhuộm qua đêm, sau đó nhuộm qua Hematoxylin và Eosin (H & E) để xác định độ sâu của tổn thương.

2.3. Hoá mô miễn dịch

Hoá mô miễn dịch (Immunohistochemistry - IHC) được thực hiện cho các protein chính cơ bản (Major Basic Protein - MBP). Một trong những protein nổi bật được tìm thấy trong hạt bạch cầu ái toan và có thể được sử dụng để phát hiện bạch cầu ái toan còn nguyên vẹn hoặc mới bị thoái hóa.

Nhuộm hóa mô miễn dịch được thực hiện bằng cách sử dụng kháng thể đặc biệt chống lại MBP. Các mô được cắt thành các lát dày 5mm và để ở nhiệt độ 60°C. Các mẫu được khử parafin/hydrat hoá trong một bộ đệm đẳng trương có tên Tris-Buffered Saline (TBS). Các enzyme sẽ bị phân hủy bằng một hóa chất đặc biệt Pepsin Solution Digest-All 3 ở 37°C trong 10 phút. Các chất không đặc hiệu và các peroxidase nội sinh bị "block" bởi các lần ủ sau đó. Kháng thể đầu tiên của MBP đã được sử dụng với tỷ lệ 1:50 trong 1 giờ, sau đó được ủ trong chất *EnVision+HRP Labelled Polymer*. Các mẫu được nhuộm với hematoxylin của Mayer, dehydrat hoá thông qua một loạt các alcohol và xylene, và sau đó được phủ lên chất *Acrytol Mounting Media*.

2.4. Định lượng và thống kê

Hình ảnh kỹ thuật số của các phần nhuộm màu được thu thập bằng phần mềm ImagePro Plus 7.0 với kính hiển vi Olympus C-35AD-4 ở độ phóng đại thấp (2x). Các mẫu nghiên cứu được xem xét ở độ phóng đại 20x và tổng số bạch cầu ái

toan được tính ở độ sâu 400 - 800 μ m trong vùng bông (Hình 1). Các mẫu không đủ độ dày từ 400 - 800 μ m bị loại khỏi nghiên cứu của chúng tôi. Phần mềm Welch's Test được sử dụng để xác định sự khác biệt về số lượng bạch cầu ái toan giữa các nhóm bệnh nhân già và trẻ.

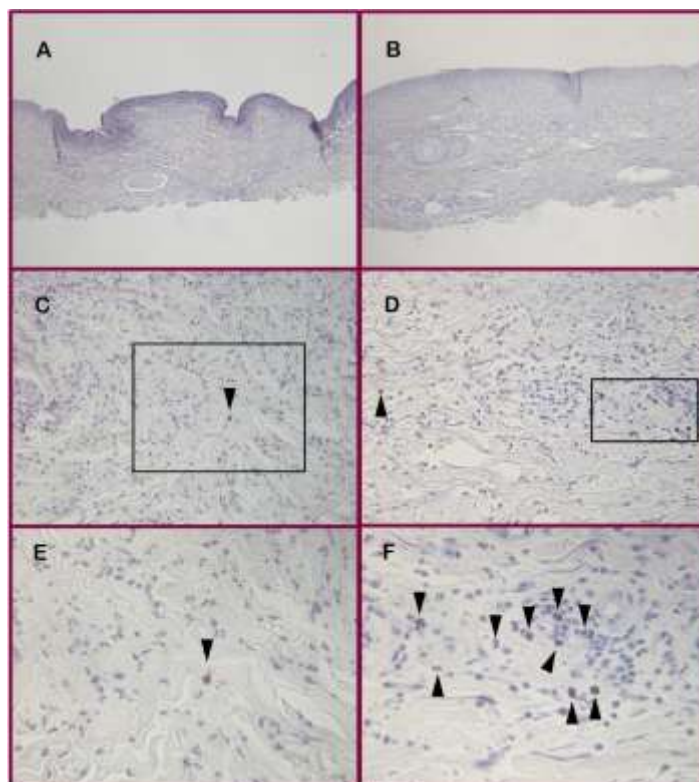
3. KẾT QUẢ

Hai mẫu đã bị loại do không đủ mô, để lại mười ba mẫu, được chia thành hai nhóm, trẻ (n = 10) và già (n = 3). Các thiết bị cắt da khác nhau như lưỡi Dermatome, lưỡi Weck, dao mổ và các phương pháp phẫu thuật khác nhau dẫn đến các mẫu mô có độ dày khác nhau. Thêm vào đó, việc đạt được mục tiêu với hoá mô miễn dịch là rất khó khăn đối với các mô mỏng và có thể dẫn đến mất mô trong quá trình xử lý.

Giá trị trung bình và trung vị của tuổi bệnh nhân ở nhóm trẻ là 23 tuổi (cao nhất là 23 tuổi, thấp nhất là 17 tuổi). Đối với nhóm bệnh nhân già, tuổi trung bình là 81 tuổi và giá trị trung vị là 83 tuổi (cao nhất là 93 tuổi, thấp nhất là 67 tuổi) (Bảng 1). Các yếu tố dịch tễ khác bao gồm chủng tộc, có thể tìm thấy ở bảng 2. Nghiên cứu cho thấy số lượng bạch cầu ái toan ở nhóm bệnh nhân cao tuổi là 0,171 bạch cầu/mm, cao hơn có ý nghĩa so với số lượng bạch cầu ái toan ở nhóm bệnh nhân trẻ tuổi là 0,910 bạch cầu/mm.

Bảng 1. Thống kê mô tả nhóm

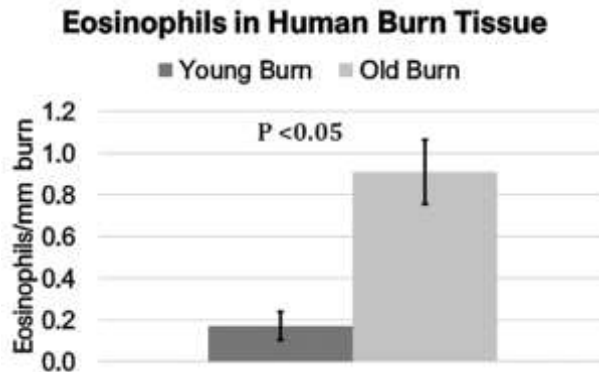
Nhóm	n	Tuổi			
		Trung bình	Trung vị	Cao nhất	Thấp nhất
Trẻ	10	23	23	30	17
Già	3	81	84	93	67



Hình 1: Hóa mô miễn dịch thực hiện trên mô tổn thương bong trung bì sâu đã cố định bằng bloc nền, nhuộm cho MBP trong các bạch cầu ái toan (đỏ). Tổn thương bong trung bì sâu ở bệnh nhân trẻ (trái) và già (phải). Các bạch cầu ái toan được đánh dấu bởi đầu mũi tên và hộp đen
A-B: Độ phóng đại 4 lần; C-D: Độ phóng đại 20 lần; E-F: Độ phóng đại 40 lần.

Bảng 2. Dịch tễ học

Bệnh nhân	Tuổi	Giới tính	Chủng tộc	Thời điểm sau bong (ngày)
Trẻ ≤ 30 tuổi				
1	17	Nam	Da trắng	4
2	20	Nam	Da trắng	4
3	21	Nữ	Mỹ gốc Phi	2
4	21	Nam	Mỹ gốc Phi	2
5	23	Nam	Da trắng	3
6	23	Nam	Da trắng	4
7	24	Nam	Da trắng	3
8	26	Nam	Da trắng	2
9	27	Nam	Da trắng	6
10	30	Nữ	Mỹ gốc Phi	3
Già ≥ 65 tuổi				
11	67	Nam	Da trắng	3
12	84	Nam	Da trắng	2
13	93	Nam	Không xác định	4



Hình 2. Số lượng bạch cầu ái toan/mm mô tổn thương bỏng ở nhóm bệnh nhân trẻ tuổi (≤ 30 tuổi) so với nhóm bệnh nhân cao tuổi (≥ 65 tuổi)

4. BÀN LUẬN

Y văn đều ghi nhận diễn biến lâm sàng ở bệnh nhân bỏng bị ảnh hưởng rất nhiều bởi tuổi tác. Các bệnh nhân cao tuổi thường có nguy cơ cao mắc các bệnh nội khoa như bệnh tim mạch, tiểu đường, rối loạn chức năng phổi do thay đổi đáp ứng miễn dịch, giảm tưới máu mô và giảm khả năng liền vết thương. Chính điều này là nguyên nhân khiến cho tổn thương bỏng ở bệnh nhân cao tuổi dễ chuyển sâu hơn so với các bệnh nhân trẻ tuổi.

Cơ chế chính xác của việc chuyển độ sâu tổn thương bỏng vẫn chưa được hiểu rõ. Singh và cộng sự đã mô tả những thay đổi liên quan đến các yếu tố sinh lý bệnh, phân tử, tế bào, tại chỗ và toàn thân trong quá trình chuyển độ tại vết thương bỏng. Họ cũng đã tìm thấy nhiều các yếu tố khác nhau thúc đẩy quá trình chuyển độ sâu như: giãn mạch, co mạch, giảm tưới máu, giảm tiểu cầu và phá hủy gốc tự do. Cơ chế chính được đề xuất dẫn đến tình trạng giãn mạch trong bỏng là do có sự điều hòa của các chất trung gian viêm như cytokine, iNOS, NO và NF-kB, dẫn đến tăng huyết áp, viêm và tăng các gốc tự do khi hoạt hóa bạch cầu trung tính và xanthine oxydase. Mặt khác, tình trạng co mạch được cho là do có sự tăng lên của nồng độ các chất gây co mạch và giảm nồng độ các chất gây giãn mạch sinh ra do tình trạng

giảm tưới máu tới mô bỏng. Theo đó, thuyết giảm tưới máu mô cho rằng sự tăng lên của các cytokin viêm, histamine, prostaglandins và bradykinin gây ra tình trạng ứ dịch và phù nề mô bỏng. Thuyết *huyết khối vi mạch* suy đoán sự gia tăng của bradykinin có thể dẫn đến huyết khối trong mô tổn thương, cũng gây nên tình trạng giảm tưới máu mô.

Tại vị trí tổn thương bỏng, khả năng chuyển độ sâu còn có sự đóng góp của các yếu tố như: Nhiễm trùng huyết, sốc, hội sức dịch thể không đủ và thiếu oxy dẫn đến chết tế bào thông qua viêm và các yếu tố độc lực của vi khuẩn. Ngoài ra, giảm các cytokine viêm, giải phóng axit lactic và hấp thu glucose cũng là các yếu tố gây tăng khả năng chuyển độ sâu.

Ở mức toàn thân, các yếu tố gây chuyển độ sâu cũng tương tự như các yếu tố tại chỗ; ví dụ, nhiễm trùng, phù nề và hội sức dịch thể được cho là có ảnh hưởng nhất đến tưới máu mô. Tình trạng giảm tưới máu mô này dẫn đến giảm dinh dưỡng tế bào, thiếu các chất cần thiết để sửa chữa vết thương, từ đó tăng khả năng chuyển độ sâu. Cần lưu ý rằng đáp ứng miễn dịch và thâm nhiễm tế bào là một yếu tố lớn ở cả mức tại chỗ và toàn thân trong các tổn thương bỏng, đặc biệt là bạch cầu ái toan.

Trong nghiên cứu này đã so sánh trực tiếp sự xâm lấn của bạch cầu ái toan vào mô tổn thương bỏng giữa nhóm các bệnh nhân cao tuổi và trẻ tuổi. Nghiên cứu đã cho thấy nhóm bệnh nhân cao tuổi có số lượng bạch cầu ái toan cao hơn đáng kể so với nhóm trẻ tuổi. Đây cũng có thể là nguyên nhân làm tăng tỷ lệ chuyển độ sâu tổn thương bỏng ở các bệnh nhân cao tuổi.

Y văn hiện nay có đề cập đến nhiều vai trò khác nhau của bạch cầu ái toan đối với cơ thể con người. Ví dụ, bạch cầu ái toan có liên quan đến quá trình chữa lành vết thương, tiêu diệt mầm bệnh giun sán, viêm khớp dạng thấp, hen suyễn, ung thư, rối loạn tiêu hóa và duy trì cân bằng nội môi miễn dịch. Bạch cầu ái toan có thể thực hiện nhiều chức năng khác nhau của chúng chủ yếu thông qua bốn quần thể hạt khác nhau được tìm thấy trong các tế bào và khả năng tiết ra các chemokine và cytokine khác nhau để đáp ứng miễn dịch.

Tuy nhiên, cần phải duy trì sự cân bằng để có khả năng chữa lành vết thương đúng cách. Ví dụ, trong một nghiên cứu của Leitch và cộng sự, người ta thấy rằng sự biểu hiện quá mức của Interleukin-5 (IL-5) ở bạch cầu ái toan dẫn đến chậm tái biểu mô, lắng đọng collagen và vết thương hở rộng hơn so với các IL-5 bình thường khác.

Trong một nghiên cứu tương tự của Yang và cộng sự, các tác giả đã sử dụng mô hình chuột đồng với vết thương ở da và điều trị bằng kháng thể đơn dòng IL-5 làm suy giảm sự xâm nhập của bạch cầu ái toan vào vết thương. Điều này dẫn đến việc tái biểu mô và đóng vết thương xảy ra sớm hơn 4 ngày so với nhóm đối chứng, đồng thời cũng chứng minh thêm rằng bạch cầu ái toan có tác động tiêu cực đến việc chữa lành vết thương. Tuy nhiên, một số nghiên cứu khác lại chứng minh rằng tỷ lệ bạch cầu ái toan là một chỉ số quan trọng giúp tăng khả năng liền vết thương của mô.

Ví dụ, Wight và cộng sự, đã phát hiện ra rằng việc không có bạch cầu ái toan xâm nhập vào mô bỏng dẫn đến tiên lượng xấu và thậm chí tử vong ở 8 trong số 29 bệnh nhân nếu không đạt được số lượng bạch cầu ái toan trên 33 bạch cầu/m³ mô trong tuần đầu tiên sau bỏng. Cơ chế dẫn đến tăng chuyển độ sâu do tăng bạch cầu ái toan vẫn chưa được hiểu rõ. Chúng tôi đưa ra giả thuyết rằng nguyên nhân là do tăng tiết các cytokine và chemokine từ bạch cầu ái toan trong quá trình chữa lành vết thương.

Mặc dù đã đưa ra được những kết quả có giá trị nhưng nghiên cứu của chúng tôi vẫn còn nhiều hạn chế như cỡ mẫu còn quá nhỏ, đặc biệt là nhóm bệnh nhân cao tuổi. Với cỡ mẫu lớn, chúng tôi có thể kiểm nghiệm xem rằng liệu phương pháp kiểm soát số lượng bạch cầu ái toan xâm nhập vào vết thương có thực sự giảm hoặc ức chế quá trình chuyển độ sâu tổn thương hay không. Tuy nhiên, bạch cầu ái toan lại rất cần thiết trong phản ứng viêm và chữa lành vết thương; do đó, cần phải tìm ra sự cân bằng thích hợp của ức chế và thu hút. Ngoài ra, điều cần thiết phải lưu ý là một số bệnh nhân có tình trạng rối loạn bạch cầu ái toan, điều này cũng cần được tính đến khi nghĩ về liệu pháp điều trị tăng bạch cầu ái toan.

Tóm lại, trong nghiên cứu này, các bệnh nhân cao tuổi có biểu hiện tăng thâm nhiễm bạch cầu ái toan trong giai đoạn đầu của quá trình liền vết thương bỏng. Số lượng mẫu cần phải được tăng lên để kiểm chứng điều này. Nghiên cứu trong tương lai với mô hình chuột sử dụng các phương pháp khác nhau có thể làm giảm hoặc ức chế sự xâm nhập của bạch cầu ái toan và có khả năng giảm thiểu tình trạng chuyển độ sâu tổn thương bỏng. Các nghiên cứu sâu hơn sẽ bao gồm điều chỉnh đáp ứng bạch cầu ái toan ở bệnh nhân cao tuổi.