

NGHIÊN CỨU SỰ THAY ĐỔI HÀM LƯỢNG EGF, VEGF CỦA BỆNH NHÂN CÓ VẾT THƯƠNG MẠN TÍNH ĐƯỢC ĐIỀU TRỊ BẰNG HUYẾT TƯƠNG GIÀU TIỂU CẦU

Nguyễn Ngọc Tuấn, Nguyễn Tiến Dũng
Bệnh viện Bỏng Quốc gia Lê Hữu Trác

TÓM TẮT

Vết thương mạn tính (VTMT) có sự rối loạn quá trình tái tạo và biểu mô hóa, một trong những nguyên nhân là có sự suy giảm các growth factor (GF). Huyết tương giàu tiểu cầu (platelet-rich plasma - PRP) điều trị vết thương mạn tính là một liệu pháp hiệu quả, an toàn cao, xâm lấn tối thiểu. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhằm:

1. Đánh giá sự thay đổi hàm lượng EGF (epidermal growth factor) và VEGF (vascular endothelial growth factor) trong PRP trước và sau khi hoạt hóa.

2. Đánh giá sự thay đổi hàm lượng EGF, VEGF tại chỗ VTMT được điều trị bằng PRP.

Nghiên cứu tiến hành trên 24 bệnh nhân (BN) có VTMT, từ 18 tuổi trở lên, điều trị tại Bệnh viện Bỏng Quốc gia từ 11/2018 - 2/2020 bằng phương pháp tiêm PRP tại VTMT. Định lượng EGF và VEGF theo nguyên lý phản ứng Elisa, sử dụng chất chuẩn là EGF/VEGF và kháng thể đặc hiệu với EGF/VEGF.

Kết quả cho thấy sau hoạt hóa, hàm lượng EGF/VEGF trong PRP đều tăng; hàm lượng EGF và VEGF mô vết thương cũng tăng sau 1 tuần điều trị.

Kết luận: Liệu pháp PRP điều trị tại chỗ có tác dụng kích thích liền vết thương do đã làm tăng EGF và VEGF tại VTMT.

SUMMARY

In chronic wounds, there is a disorder of the regeneration and epithelization process. One of the reasons is the depletion of GF. Platelet-rich plasma for the treatment of chronic wounds is an effective, highly safe, minimally invasive therapy. Objectives of the study are:

1. To evaluate the difference between EGF and VEGF concentrations in PRP before and after activation.

2. To evaluate the difference between EGF, VEGF concentrations in the area of chronic wounds treated with PRP.

The study was conducted on 24 patients with chronic wounds, aged from 18 years old and above, treated (by injection of PRP at wound site) at the National Burns Hospital from

11/2018 to 2/2020. Quantification of EGF and VEGF based on the Elisa principle, using the standard substances EGF/VEGF and antibodies specific to EGF/VEGF.

The results showed that the concentrations of EGF/VEGF in PRP increased after activation; concentrations of EGF and VEGF in wound tissue also increased after 1 week of treatment.

Conclusion: The PRP therapy at a wound site has the effect of stimulating wound healing through increasing EGF and VEGF in chronic wounds.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vết thương mạn tính (VTMT) là vấn đề quan trọng của sức khỏe đang được xã hội quan tâm hiện nay. Tại Mỹ, VTMT ảnh hưởng tới khoảng 3 - 6 triệu người với tỷ lệ người trên 65 tuổi chiếm 85%. Chi phí điều trị VTMT ước tính hàng năm khoảng 3 tỉ USD (Mathieu D 2006 [1]; Menke NB 2007 [2]).

Cho tới năm 2014, riêng chi phí chăm sóc loét tỳ đè ước tính gần 11 tỷ (USD) mỗi năm và chi phí cho mỗi vết loét trung bình khoảng 500 - 70.000 (USD). Tại Anh, chi phí chăm sóc vết thương (VT) hàng năm được ước tính là 2.165 tỷ USD năm 2014 (Dowsett C., 2014 [3]). Ở các nước phát triển, khoảng 1 - 2% dân số sẽ có một VTMT trong suốt cuộc đời của họ. Chi phí chăm sóc VTMT tới 2 - 3% ngân sách y tế [4].

Hậu quả và biến chứng của VTMT nặng nề, ảnh hưởng tới chất lượng cuộc sống, thậm chí là tính mạng bệnh nhân như: Cắt cụt chi, nhiễm khuẩn huyết, suy kiệt... VTMT có đặc trưng cơ bản là rối loạn quá trình tái tạo phục hồi, trên nền bệnh lý toàn thân. Điều trị vết loét mạn tính là quá trình phức tạp, kéo dài, tốn kém và đòi hỏi sự phối hợp của nhiều biện pháp. Việc hỗ trợ tế bào và các thành phần thúc đẩy tăng sinh và biểu mô

hóa tại chỗ vết thương là một hướng điều trị cần thiết. Một xu hướng hiện nay là sử dụng Platelet-rich plasma (PRP) điều trị vết loét mạn tính.

PRP có nồng độ tiểu cầu cao gấp nhiều lần so với huyết tương trong máu bình thường. Khi tiểu cầu hoạt hóa dẫn tới ly giải hạt α bên trong tiểu cầu, từ đó giải phóng ra hàng loạt các protein là các cytokine chống viêm, các chemokine và hàng chục các yếu tố tăng trưởng (growth factor - GF) có vai trò quan trọng trong liền vết thương [5, 6].

Hiện nay, PRP được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như chỉnh hình, y khoa, thể thao, nha khoa, tai mũi họng, phẫu thuật thần kinh, nhãn khoa, tiết niệu, tái tạo vết thương, thẩm mỹ và mỹ phẩm... do tính hiệu quả và an toàn cao, sản xuất nhanh và dễ dàng, chi phí tương đối thấp và xâm lấn tối thiểu [7]. Cần có những nghiên cứu chỉ số khách quan để làm sáng tỏ cơ chế tác dụng của PRP tại chỗ VTMT. Do vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mục tiêu:

1. Đánh giá sự thay đổi của EGF, VEGF trong PRP trước và sau khi hoạt hóa.

2. Đánh giá sự thay đổi hàm lượng EGF, VEGF tại chỗ VTMT được điều trị bằng PRP. Kết quả nghiên cứu sẽ cho những minh chứng khách quan về tác dụng của PRP trên VTMT.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- PRP thu được sau tách chiết của bệnh nhân (BN) nghiên cứu.

- Bệnh nhân nghiên cứu: Gồm 24 BN có VTMT, từ 18 tuổi trở lên, điều trị tại Trung tâm Liền vết thương - Bệnh viện Bông Quốc gia Lê Hữu Trác từ tháng 11/2018 - 2/2020.

Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân nghiên cứu:

Bệnh nhân có vết thương, vết loét mạn tính độ III IV (điều trị sau 4 tuần bằng phương pháp thông thường không khỏi [8, 9, 10]).

Tuổi: Từ 18 tuổi trở nên. Loét độ III, IV (theo phân loại của NPUAP của Mỹ và EPUAP của Châu Âu) [9]. Bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu và không có chống chỉ định với PRP.

Tiêu chuẩn loại trừ [9]:

Chống chỉ định tuyệt đối: Hội chứng mất chức năng tiểu cầu; giảm tiểu cầu nặng (< 50G/l), giảm fibrinogen; trạng thái toàn thân nặng, cần hồi sức tích cực, có rối loạn huyết động; nhiễm khuẩn huyết; viêm nhiễm tại vị trí tiến hành quy trình; bệnh nhân xạ trị, bị vết loét do ung thư; phụ nữ có thai, cho con bú; bệnh nhân không đồng ý nghiên cứu.

Chống chỉ định tương đối: Sốt; Hb < 100g/L; tiểu cầu < 150G/L.

2.2. Chất liệu nghiên cứu

- **Nguyên liệu để tách chiết PRP:** Bộ kit "New-PRP^{Pro} Kit" để tách chiết PRP gồm: Bộ kim lấy máu chuyên dụng và ống kim lấy máu; ống đựng chứa sẵn chất chống đông máu vô trùng; ống li tâm chứa

các hoạt chất để hoạt hóa tiểu cầu. Máy ly tâm EBA-20 (Đức). Tủ an toàn sinh học cấp 2.

- **Bộ dụng cụ xét nghiệm EGF và VEGF:** Protease Inhibitor Cocktail, 50X (G652A, Promega). Bộ kit xét nghiệm EGF: Sử dụng Human EGF ELISA Kit (EK193-96, Multi Sciences); gồm: Đĩa 96 giếng phủ sẵn kháng thể kháng EGF; EGF chuẩn: Protein tái tổ hợp, với nồng độ biết trước; Kháng thể phát hiện EGF: kháng thể đặc hiệu của EGF gắn với biotin; Streptavidin - HRP: Dung dịch 100x. Assay Buffer (10x): PBS với 0,5% Tween-20 và 5% BSA; chất Tetramethyl-benzidine (TMB); dung dịch acid Sulfuric 0.18M; dung dịch đệm để rửa (20x): PBS với 1% Tween-20; Plate Covers (tấm phủ đĩa 96 giếng).

Bộ kit xét nghiệm VEGF: Human VEGF ELISA Kit (EK183-96, Multi Sciences). Thành phần tương tự như trên, trong đó khác biệt đĩa 96 giếng phủ sẵn kháng thể kháng VEGF; VEGF chuẩn. Kháng thể phát hiện VEGF: Kháng thể đặc hiệu của VEGF được gắn với biotin.

Các thiết bị yêu cầu khác: Microplate reader: Có khả năng đo độ hấp thụ ở bước sóng 450nm, với bước sóng hiệu chỉnh là 570nm hoặc 630nm. Pipettes và pipette tips, micropipette (3.50µl to 300µl). Multichannel micropipette reservoir. Cốc, bình, ống xét nghiệm cần thiết. Nước cất hoặc nước khử ion. Tubes Polypropylene để hòa loãng.

* *Xét nghiệm EGF, VEGF tại vết thương:* Ngoài danh mục trên cần có dụng cụ: Cân vi lượng Shimadzu, AUW220D, Japan; máy để nghiền mô Glass Homogenizer, DY89-II, Scientz, China; máy ly tâm MIKRO 200R - Hettich - Đức.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Quy trình nghiên cứu trên bệnh nhân

- Lựa chọn bệnh nhân. Thay băng hàng ngày theo quy trình tới khi VTMT ổn định.

- Tách chiết và tiêm PRP tại chỗ vết thương: Chỉ tiến hành liệu pháp PRP khi tại chỗ không còn hoại tử, viêm nhiễm cấp tính [7, 8, 11, 12]. Tiêm lần 2 sau 1 tuần [10].

- Xét nghiệm EGF và VEGF trong PRP ở thời điểm trước hoạt hóa và sau hoạt hóa tiểu cầu ở cả 2 lần thu nhận PRP.

- Xét nghiệm EGF, VEGF mô vết thương ở thời điểm trước khi tiêm tại chỗ PRP lần 1 và lần 2 (sau đó 1 tuần); lần 3: Sau 2 tuần.

2.3.2. Quy trình thu nhận PRP (theo hướng dẫn của hãng GeneWorld).

- **Giai đoạn 1 (thu nhận PRP chưa hoạt hóa):** Lấy máu tĩnh mạch bằng kim cánh bướm nối với ống lấy máu có áp lực âm, cho vào ống máu 8,5ml. Ly tâm lần 1 ống máu ở tốc độ 2.000 vòng/phút x 10 phút để phân tách huyết tương, hồng cầu và tiểu cầu. Hút nhẹ nhàng lớp Plasma màu vàng bên trên cho vào ống ly tâm có ghi chữ PLASMA (tổng thể tích khoảng 12 - 14ml). Ly tâm lần 2 ống PLASMA tốc độ 3500 vòng/phút x 5 phút, thu được dịch phân thành 2 lớp. Hút nhẹ nhàng phần phía trên bỏ đi, để lại 6ml PRP phía đáy ống. Đây chính là PRP chưa hoạt hóa.

- **Giai đoạn 2 (hoạt hóa PRP bằng CaCl₂):** Tiếp tục hút toàn bộ 6ml PRP còn lại sang ống có chứa chất hoạt hóa CaCl₂, vừa cho vừa trộn đều trong 2 - 5 phút tới khi xuất hiện khối đông đặc. Dùng pipet

xoay nhẹ đến khi khối đông đặc tách ra khỏi thành ống. Chờ đến khi khối đông đặc co hoàn toàn (5 - 15 phút), hút bỏ khối đông đặc. Sản phẩm cuối cùng chứa 4 - 5 ml dung dịch PRP đã hoạt hóa có màu vàng trong suốt. Hút toàn bộ dung dịch vào xilanh vô trùng để chuẩn bị tiêm tại chỗ vết thương.

2.3.3. Tiến hành tiêm PRP tại chỗ vết thương

PRP được tiêm trực tiếp vào vùng da ngoại vi cách mép vết thương 1cm ở các vị trí tương ứng với các điểm 3 - 6 - 9 - 12h; mỗi vị trí tiêm khoảng 1ml [10]. Việc tiêm PRP được tiến hành ngay trong vòng 10 - 30 phút đầu tiên sau thu nhận PRP. Tiêm lần 2 cách lần 1 từ 5 - 7 ngày.

Các nghiên cứu ghi nhận, tiểu cầu trong PRP sau khi kích hoạt giải phóng khoảng 70% các GF trong vòng 10 phút đầu tiên; sự giải phóng các GF hoàn thành trong vòng 1h. Tiểu cầu tiếp tục tổng hợp các GF từ nguồn dự trữ trong ít nhất 7 ngày nữa [6, 7, 11]. Với quy trình thu nhận 1 lần của hãng Genworld có thể ứng dụng để điều trị cho vết thương có diện tích 40 - 60cm².

2.3.4. Chỉ tiêu theo dõi lâm sàng

- Tuổi; giới tính; bệnh lý nền của bệnh nhân; số ngày điều trị khỏi.

- Tại chỗ: Vị trí; số lượng; thời gian tồn tại ổ loét; tính chất bờ mép và nền vết thương.

2.3.5. Phương pháp định lượng một số marker liên vết thương

2.3.5.1. Định lượng EGF và VEGF

- **Nguyên lý của kỹ thuật:** Theo phương pháp phản ứng Elisa. Định lượng

sự hiện diện của một kháng thể/kháng nguyên bằng phương pháp “sandwich”. Một lớp kháng thể đặc hiệu cho EGF/VEGF được phủ sẵn lên khay giếng. Các mẫu chuẩn, mẫu thử và kháng thể phát hiện có gắn biotin đặc hiệu cho EGF/VEGF được đưa vào trong các giếng. EGF/VEGF sẽ gắn vào các kháng thể được phủ cố định ở đáy giếng và với kháng thể phát hiện gắn biotin sau khi ủ. Rửa sạch các chất không bám đặc hiệu, cho thêm streptavidin - HRP. Rửa và thêm dung dịch chất nền vào các giếng. Phản ứng tạo màu sẽ diễn ra, đậm độ màu sắc của giếng sẽ tương ứng với lượng EGF/VEGF. Dừng phản ứng tạo màu bằng một dung dịch khác. Đo cường độ màu, từ đó có thể tính được nồng độ của EGF/VEGF trong mẫu cần phân tích.

- Các bước tiến hành định lượng EGF trong PRP

+ Chuẩn bị mẫu và dung dịch thử:

Mẫu thử PRP trước hoạt hóa: Khi kết thúc giai đoạn 1 của quy trình tạo PRP, thu được 6ml PRP.

Mẫu thử PRP sau hoạt hóa: Khi kết thúc quy trình tạo PRP, sản phẩm cuối cùng chứa 4 - 5ml dung dịch màu vàng trong suốt.

+ Pha loãng chuẩn thử nghiệm; pha dung dịch; trộn đều kháng thể và dung dịch hòa loãng HRP rửa theo quy trình.

+ Tiến hành phản ứng ELISA định lượng EGF theo hướng dẫn. Đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 450nm (trong vòng 30 phút sau khi cho Stop Solution). Hiệu chỉnh ở bước sóng 570 hoặc 630nm. Tính toán kết quả: Dựa trên mối tương quan giữa nồng độ của các mẫu chuẩn và mẫu thử EGF, xây dựng đường chuẩn, xác

định hàm lượng EGF (pg/ml) được máy tính xử lý bằng phần mềm chuyên dụng.

- **Định lượng VEGF trong PRP:** Kỹ thuật tương tự như định lượng EGF, thay chất chuẩn bằng VEGF và kháng thể VEGF.

- **Định lượng EGF và VEGF trong mô vết thương:** Lấy bệnh phẩm mô da có trọng lượng trong khoảng 8 - 30mg bằng cân Shimadzu, AUW220D, Japan. Cho Protease Inhibitor Cocktail 1X theo tỉ lệ 1mg (mô da) ~ 10 μ l. Nghiền mô bằng máy Homogenizer với tốc độ 2800g x 01 phút, đặt mẫu trong đá lạnh. Ly tâm thu mẫu bằng máy MIKRO 200R- Hettich (Đức) sau khi nghiền ở 10.000 g trong 10 phút ở 4°C, thu dịch nổi, chia thành 2 tube, lưu ở - 80°C. Sử dụng dịch nổi để chạy phản ứng ELISA; các bước tiến hành tương tự như định lượng EGF/VEGF trong PRP nêu trên.

Định lượng EGF, VEGF và MMP12 tiến hành tại Bộ môn Sinh lý bệnh - Học viện Quân y

2.3.6. Xử lý kết quả nghiên cứu

- Kết quả nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm thống kê y học SPSS 20.0. Giá trị $p < 0,05$ là có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Một số đặc điểm bệnh nhân

Tuổi trung bình: 56,3 \pm 20,7 (18 - 85).
Nam: 14 (58,3%), nữ 10 (41,7%).

Bệnh lý nền: Chấn thương sọ não, tử vong, gãy xương lớn: 13 BN (54,2%), trong đó có hạ liệt, liệt tứ chi gặp 9 BN (37,5%); bệnh lý tim mạch (nhồi máu, đột quy, tai biến mạch não): 9 (37,5%); bệnh đái đường: 7 (29,2%); tăng huyết áp: 5 (20,8%); còn ống Sjöberg: 5 (20,8%); hôn

mê: 4 (16,6%), bệnh khác (viêm màng não, teo não, Parkinson, Gút, Lupus ban đỏ, hẹp động mạch ngoại vi...): 12 (49,9%).

Số bệnh lý nền trung bình / bệnh nhân: $2,04 \pm 1,07$ (1 - 5).

Loét do tỳ đè: 20 BN (83,3%). Số ổ loét trung bình: $2,1 \pm 1,3$ (50% BN có từ 2 - 5 ổ

loét); thời gian tồn tại ổ loét: $67,8 \pm 71,8$ (30 - 360) ngày; diện tích ổ loét nghiên cứu trung bình: $39,23 \pm 9,18\text{cm}^2$.

Phương pháp điều trị sau tiêm PRP: Thay băng tời khỏi 2 BN (8,33%), phẫu thuật (chuyển vạt, ghép da): 22 (91,67%). Thời gian điều trị: $35,7 \pm 16,9$ ngày.

Bảng 3.1. Diễn biến lâm sàng tại chỗ VT mạn tính

Triệu chứng	Số BN tại thời điểm		
	T0	T1	T2
Dịch xuất tiết: Nhiều	13	0	0
Vừa	8	15	5
Ít	3	9	19
Bờ mép VT: thâm nhiễm, xơ chai	17	7	5
Biểu mô hóa	10	18	21
Viêm nề, sung huyết	7	4	0
Nền tổn thương: Giả mạc	15	7	5
Lộ gân cơ xương	15	5	3
Tính chất mô hạt: Chưa có	10	2	0
Mô hạt xấu	14	16	10
Mô hạt đẹp	0	6	14

Ghi chú: T0: Trước khi tiêm PRP; T1, T2: Sau tiêm 1 tuần và 2 tuần

3.2. Thay đổi nồng độ một số marker liên vết thương

* Một số chỉ tiêu chất lượng của PRP: Cảm quan vàng trong; pH $7,38 \pm$

$0,26$; thể tích: $4,9 \pm 0,105\text{ml}$; không mọc vi khuẩn; số lượng tiểu cầu trước hoạt hóa: $482,1 \pm 264,5\text{G/L}$ (số lượng tiểu cầu trong huyết thanh của bệnh nhân: $195,8 \pm 60,1\text{G/L}$).

Bảng 3.2. Hàm lượng EGF và VEGF (pg/ml) trong PRP

Chỉ số	Trước hoạt hóa PRP	Sau hoạt hóa PRP	P
Hàm lượng EGF	$142,78 \pm 91,56$	$323,72 \pm 153,73$	< 0,05
Hàm lượng VEGF	$131,93 \pm 137,73$	$238,37 \pm 221,53$	< 0,05

Bảng 3.3. Hàm lượng EGF và VEGF tại mô vết thương

Chỉ số	trước tiêm PRP lần 1	Trước tiêm PRP lần 2	P
Hàm lượng EGF	$0,83 \pm 0,43$	$1,81 \pm 0,58$	< 0,05
Hàm lượng VEGF	$4,53 \pm 2,76$	$12,18 \pm 6,84$	< 0,05

4. BÀN LUẬN

4.1. Tác dụng điều trị của PRP trên lâm sàng

4.1.1. Một số đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân

- Bệnh lý nền của bệnh nhân: 100% bệnh nhân có bệnh lý kết hợp (trung bình là $2,04 \pm 1,07$). Nhóm bệnh gây mất, giảm khả năng vận động, cảm giác ở 1 phần cơ thể (đặc biệt liệt hai chi dưới) như chấn thương sọ não, cột sống có tỷ lệ cao nhất. Ở Mỹ, 3 - 5% trong tổng số các bệnh nhân nằm viện do thương tích tủy sống bị loét [13].

- Thời gian tồn tại ổ loét kéo dài, số bệnh nhân có từ 2 ổ loét trở lên chiếm tỷ lệ tới 50% phản ánh sự thất bại của phương pháp điều trị trước đó. Điều trị VTMT nếu chỉ bằng những biện pháp kinh điển như chăm sóc vết thương, cắt lọc hoại tử, kháng sinh, VAC, HBO... thì vẫn chỉ có thể khỏi 50 - 60% [6, 14].

- Vị trí ổ loét hay gặp: Cẳng cụt, mấu chuyển, ụ ngồi. Đây là những vị trí dễ bị nhiễm bẩn (phân, nước tiểu...), dễ bị ẩm, gây khó khăn cho chăm sóc, dự phòng loét.

4.1.2. Tác dụng điều trị của PRP trên lâm sàng

- **Tác dụng kích thích liền vết thương:** VTMT có đặc trưng cơ bản là rối loạn biểu mô hóa và tái tạo trung bì. Quai mạch máu thoái triển trở nên già và ít, tế bào nội mô giảm phân chia. Các tế bào biểu mô giảm hoặc ngừng phân bào, không phát triển được. Cấu trúc đệm gian bào bị tổn thương. NBS nghèo nàn hoặc không thực hiện đầy đủ chức năng [1, 15].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy vết thương trước áp dụng liệu pháp

PRP trong tình trạng rối loạn quá trình liền vết thương. Biểu hiện rối loạn biểu mô hóa: Bờ mép vết thương không có hiện tượng biểu mô hoặc chỉ biểu mô hóa 1 phần, ranh giới bờ mép với da lành rõ ràng. Rối loạn tái tạo biểu hiện nền vết thương không có mô hạt hoặc mô hạt xấu, nhiều giả mạc, lộ gân cơ xương. Sau khi áp dụng liệu pháp, biểu mô hóa từ bờ mép rõ rệt, làm thay đổi tính chất bờ mép thâm nhiễm cứng, góp phần làm thu hẹp đáng kể diện tích ($p < 0,05$). Sau 2 tuần, số mô hạt đẹp tăng lên rõ rệt, 100% vết thương đều có mô hạt. Mô hạt đã dần phủ kín gân, cơ (số vết thương lộ gân cơ tăng rõ rệt so với trước điều trị). Diễn biến lâm sàng cũng tương ứng với diễn biến xét nghiệm marker EGF, VEGF, hydroxyprolin (sẽ được trình bày ở phần tiếp theo).

- **Tác dụng chống viêm:** VTMT là vết thương không liền theo quá trình sinh lý và kéo dài tuổi của vết thương. Thiếu hoặc kéo dài giai đoạn viêm đều làm trì trệ liền vết thương. Khi viêm kéo dài tạo nhiều tế bào viêm, làm chậm phản hồi của các GF tại chỗ. Viêm kéo dài làm tăng MMPs nhưng làm giảm các chất ức chế protease; gây ra phân hủy nhanh chóng các GF tại VTMT [15, 16, 17]. PRP có tác dụng làm giảm viêm.

Trên lâm sàng, VTMT biểu hiện viêm kéo dài như bờ mép biểu hiện thâm nhiễm, xơ chai (fibrosis/ sclerosis) [13], nền vết thương nhiều giả mạc, dịch xuất tiết nhiều. Sau khi áp dụng liệu pháp PRP 1 - 2 tuần, viêm tại chỗ giảm rõ rệt. Số lượng dịch tiết giảm, số vết thương dịch tiết ít tăng đáng kể, không còn vết thương có dịch tiết nhiều, vết thương có bờ mép thâm nhiễm cứng giảm rõ rệt ($p < 0,05$).

4.2. Thay đổi nồng độ của một số marker trong nghiên cứu

Liên vết thương là một quá trình phức tạp, có sự tham gia của nhiều loại tế bào, xảy ra trên da, nhằm mục đích phục hồi hàng rào bảo vệ của cơ thể. Quá trình này bao gồm các nỗ lực phối hợp của nhiều loại tế bào như keratinocytes, fibroblasts, tế bào nội mô, đại thực bào và tiểu cầu.

Sự di chuyển, xâm nhập vào nơi tổn thương, tăng sinh và biệt hóa của các tế bào này sẽ đạt đến đỉnh điểm trong một đáp ứng viêm, sự hình thành mô mới và cuối cùng là đóng vết thương. Quá trình phức tạp này được thực hiện và điều chỉnh bởi một mạng tín hiệu phức tạp, liên quan đến nhiều GF, cytokine và chemokine [18].

Sự thành công của liên vết thương phụ thuộc vào các GF là các phân tử tín hiệu nội sinh điều chỉnh các phản ứng của tế bào; được tiết ra bởi tiểu cầu, bạch cầu, nguyên bào sợi và tế bào biểu mô [16, 19]. Ngay cả ở nồng độ thấp, các GF vẫn có tác động rõ rệt đến môi trường vi mô vết thương, dẫn đến sự gia tăng nhanh chóng trong việc di chuyển tế bào, tăng sinh và biệt hóa [20]. Trong đó, marker quan trọng tới liên vết thương là EGF, VEGF. Thay đổi những marker này phản ánh trung thành quá trình liên vết thương.

4.2.1. Thay đổi hàm lượng EGF và VEGF của PRP trước và sau hoạt hóa

Chúng tôi thu nhận được PRP theo quy trình của hãng Genworld. Số lượng tiểu cầu trong PRP trước khi hoạt hóa gấp khoảng 2,5 lần số lượng tiểu cầu trong huyết thanh của bệnh nhân. Các nghiên cứu ghi nhận việc áp dụng quy trình khác nhau dẫn đến số lượng tiểu cầu trong PRP khác nhau. Đến nay, vẫn chưa có số lượng

giả định là liều điều trị lý tưởng của PRP, nhiều tác giả cho rằng tính toàn vẹn của tiểu cầu quan trọng hơn nồng độ tiểu cầu [6, 7].

Trong nghiên cứu, hàm lượng EGF và VEGF trong PRP sau hoạt hóa tăng lên rõ rệt so với hàm lượng trước hoạt hóa, $p < 0,05$. Xu hướng GF tăng sau hoạt hóa đều được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu nhưng hàm lượng có mức chênh lệch khác nhau do các phương pháp thu nhận PRP khác nhau, dẫn tới số lượng tiểu cầu khác nhau [6, 7].

Qua kết quả trên có thể khẳng định, PRP hoạt hóa đã giải phóng không chỉ EGF và VEGF mà hàng loạt các GF khác ảnh hưởng tới liên vết thương. Khi tiểu cầu hoạt hóa dẫn tới ly giải hạt α bên trong tiểu cầu, từ đó giải phóng ra các cytokine chống viêm, các chemokine và các GF có vai trò quan trọng trong liên vết thương [12, 13]. Sự tăng lên hàm lượng của các marker trong nghiên cứu của chúng tôi là cơ sở khách quan để giải thích được cơ chế tác dụng của PRP tại VTTM.

4.2.2. Thay đổi hàm lượng EGF và VEGF tại vết thương

4.2.2.1. Thay đổi EGF

EGF là GF đặc trưng nhất trong liên vết thương, tạo điều kiện tái biểu mô hóa (tái tạo lại biểu bì và màng nền) bằng cách kích thích sự tăng sinh và di chuyển của keratinocytes; tế bào nội mô và nguyên bào sợi [21, 22], chịu trách nhiệm tăng độ bền kéo của da mới [23]. Tế bào sừng từ mép vết thương hoặc từ nang lông và tuyến ở trung bì được kích hoạt để di cư, sau đó tăng sinh, biệt hóa, tăng sản xuất GF để tăng biểu mô hóa nhằm khôi phục sự toàn vẹn của biểu bì [16]. Ở VTMT,

mức độ của EGF giảm [19], thụ cảm thể EGF khu trú sai vị trí (trong bào tương của keratinocytes thay vì màng) có thể gây ức chế biểu mô hóa [16].

Trong nghiên cứu, hàm lượng EGF tại mô có xu hướng tăng lên trong quá trình điều trị, biểu hiện sự phục hồi của quá trình biểu mô hóa, là bằng chứng rõ ràng, khách quan về tác dụng kích thích liền vết thương của PRP. Diễn biến hàm lượng EGF tại vết thương cũng phù hợp trên lâm sàng (tăng biểu mô hóa bờ mép VT).

4.2.2.2. Thay đổi hàm lượng VEGF tại vết thương

Kế tiếp giai đoạn viêm của liền vết thương là giai đoạn tăng sinh với biểu hiện tăng sinh tế bào mạch mề, lắng đọng và tái tạo extracellular matrix (ECM), tăng tạo mạch. VEGF là một trong những phân tử proangiogen quan trọng với liền vết thương. VEGF gây tăng tính thấm mạch máu cao hơn hàng nghìn lần so với histamine [24]; gây tăng tạo mạch và kích thích các chức năng tế bào nội mô (tăng sinh, di cư, biệt hóa và sống sót), cần thiết cho sự hình thành mạch máu mới [16, 24]. VEGF là một mitogen đặc hiệu tế bào nội mô mạch máu, điều hòa một số thụ thể integrin nội mô trong quá trình mọc lên của các mạch máu mới [25].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, hàm lượng VEGF tại vết thương có xu hướng tăng lên trong quá trình điều trị. Đây là chứng cứ quan trọng về hiệu quả của PRP tại VTMT.

Các nghiên cứu ghi nhận ở vết thương cấp tính, VEGF mô da bắt đầu tăng sau chấn thương 1 ngày so với da lành, VEGF tăng đáng kể sau 3 và 5 ngày và trở về bình thường hóa trong khoảng từ 7 - 14

ngày. Nồng độ VEGF có xu hướng thấp bất thường dẫn tới tuần hoàn hóa vết thương không đủ ở người có vết thương mạn tính. Có mối tương quan chặt chẽ giữa mức độ VEGF hoặc hoạt động VEGF và lượng mô hạt hình thành ở cả động vật khỏe mạnh và bệnh nhân tiểu đường [24].

Trong nghiên cứu, VEGF tăng dẫn đến sự gia tăng số lượng mạch máu tại vị trí tổn thương. Sự hình thành mạch, phát triển các mạch máu mới từ các mạch hiện có đã phục hồi lưu lượng máu đến các mô bị tổn thương; cung cấp oxy và chất dinh dưỡng cần thiết để hỗ trợ sự tăng trưởng và phục hồi chức năng tế bào [17]. Sự thay đổi hàm lượng VEGF cũng tương ứng với tiến triển trên lâm sàng. Sau điều trị số vết thương có mô hạt tăng, tính chất mô hạt đẹp tăng, che phủ phần lộ gân xương.

Như vậy, với sự thay đổi hàm lượng của EGF, VEGF cho thấy PRP có tác dụng kích thích liền vết thương.

• Cơ chế tác dụng kích thích liền vết thương của PRP

PRP chứa nhiều cytokin và các GF khác nhau với nồng độ cao (đặc biệt các EGF, PDGF, VEGF; những GFs đóng vai trò quan trọng trong tất cả các giai đoạn của liền vết thương), mặt khác chính những GF này cảm ứng tế bào lân cận vết thương tăng chế tiết các GF; thu hút các tế bào tiền thân (progenitor cells) để kích thích các hoạt động tăng sinh và biệt hóa, thúc đẩy lành vết thương thông qua cơ chế autocrine và paracrine. PDGF, TGF- β , VEGF và EGF tăng từ 3 đến 7 lần trong PRP. Các GF có tính hóa ứng động và kích thích phân chia tế bào, điều chỉnh các quá trình quan trọng liên quan đến việc sửa chữa mô, bao gồm tăng sinh tế bào, hóa ứng động, di cư, biệt hóa tế bào và tổng

hợp chất nền ngoại bào. GF trong PRP kích thích các tế bào nội mô phát triển và hình thành các mạch mới [6, 7, 12].

Tatiana N. (2012) xác định, một peptide mới có trong PRP có khả năng làm tăng 50% tăng sinh tế bào nội mô, tăng 250% đáp ứng tạo mạch và tăng gấp 3 lần di chuyển tế bào biểu mô để đáp ứng với tổn thương [26].

Tiểu cầu kích hoạt còn tiết ra một số lượng lớn các fibrinogen. Fibrin tạo thành thúc đẩy sự thâm nhập các bạch cầu mono, NBS và các tế bào tiền thân khác có vai trò quan trọng trong chữa loét [6, 7].

4.3. Kết quả điều trị của liệu pháp PRP

Kết quả nghiên cứu cho thấy: 100% vết loét khỏi hoàn toàn, thời gian điều trị trung bình là $35,7 \pm 16,9$ ngày. Trong đó có 2 bệnh nhân tự liền sẹo, còn lại 22 bệnh nhân được phẫu thuật ghép da hoặc chuyển vạt che phủ. Cần nhắc lại là bệnh nhân trong nhóm nghiên cứu đều mắc bệnh lý nền, có tình trạng chung như suy mòn... Đặc biệt, các bệnh nhân có vết loét tồn tại kéo dài, trước đó đã được điều trị bằng các biện pháp thông thường có nhưng không / chưa liền. Việc ứng dụng liệu pháp đã góp phần kích thích liền vết thương, tạo điều kiện thuận lợi cho sự thành công của phẫu thuật điều trị triệt để vết thương.

5. KẾT LUẬN

5.1. Một số đặc điểm lâm sàng tại chỗ vết loét lâu liền

100% bệnh nhân đều có bệnh lý kết hợp; loét do tỳ đè chiếm tỷ lệ cao: 21 BN (70%), chủ yếu do chấn thương tủy sống chiếm tỷ lệ cao nhất (56,7%); Loét cùng cụt chiếm tỷ lệ cao nhất (66,7%). Thời gian tồn

tại của ổ loét kéo dài, trung bình là 8,6 tháng (từ 1 tháng tới 1 năm). Tại chỗ nổi bật là quá trình viêm nhiễm; rối loạn biểu mô hóa và tái tạo tại trung bì. Liệu pháp PRP điều trị vết loét lâu liền có tác dụng giảm viêm, kích thích biểu mô hóa và tái tạo mô. Tất cả các VTMT được điều trị khỏi.

5.2. Thay đổi hàm lượng một số marker liên vết thương

- Hàm lượng EGF, VEGF trong PRP sau hoạt hóa đã tăng lên đáng kể so với trước hoạt hóa

- Thay đổi marker tại vết thương minh chứng PRP có tác dụng kích thích liền vết thương (hàm lượng EGF, VEGF tăng sau 1 tuần điều trị)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Mathieu D., Linke J.C., Wattel F.** "Non-healing wounds". In: *Handbook on hyperbaric medicine*, Mathieu D.E. Netherlands: Springer, 2006, pp. 401-427.
2. **Menke N.B., Ward K.R., Witten T.M., Bonchev D.G., Diegelmann R.F.** "Impaired wound healing". *Clin Dermatol.* 2007, 25:19-25
3. **Dowsett C.** "Breaking the cycle of hard-to-heal wounds: balancing cost and care". *Wounds International* 2015, Vol 6 Issue 2]
4. **Marta Otero-Viñas and Vincent Falanga.** "Mesenchymal Stem Cells in Chronic Wounds: The Spectrum from Basic to Advanced Therapy". *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2016, Apr 1; 5(4): 149-163.
5. **Banfi G.** "Platelet-rich plasma". *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 2012;26, 1.
6. **Amable P.R., Carias, R.B., Teixeira, M.V., da Cruz Pacheco, I., Correa do Amaral R.J., Granjeiro J.M. and Borojevic R.** "Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors". *Stem cell research & therapy*, 2013, 4 (3): 67

7. **Elena Conde-Montero, Pablo de la Cueva Dobao, José María Martínez González.** "Platelet-rich plasma for the treatment of chronic wounds: evidence to date". *Chronic Wound Care Management and Research*. 2017, Vol 2017:4 107-120
8. **Krister Järbrink, Gao Ni, Henrik Sönnergren, Artur Schmidtchen, Caroline Pang, Ram Bajpai and Josip Ca.** "Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review". *Syst Rev*. 2016; 5(1): 152
9. **National Pressure Ulcer Advisory Panel (NPUAP);** Pressure Injury Stages, <http://www.npuap.org>, 2016.
10. **Vladimir N. Obolenskiy, Darya A. Ermolova, Leonid A. Laberko.** "Efficacy of platelet-rich plasma for the treatment of chronic wounds". *The EWMA Journal*, volume 14, No 1, April 2014, p. 37-40.
11. **Mehrannia M., Vaezi M., Yousefshahi F., Rouhipour N.** "Platelet-rich plasma for treatment of nonhealing diabetic foot ulcers: a case report". *CJD (Canadian journal of diabetes)*, February 2014, Volume 38, Issue 1, Pages 5 - 8.
12. **Javier Ramos-Torrecillas, Elvira De Luna-Bertos, Olga García-Martínez.** "Clinical Utility of Growth Factors and Platelet-Rich Plasma in Tissue Regeneration: A Review". *Wounds*. 2014; 26(7):207-213
13. **Diegelmann R.F. and Evans M.C.** "Wound Healing: An Overview of acute, fibrotic and delayed healing". *Frontiers in Bioscience* 9, 283-289
14. **George Han and Roger Ceilley.** "Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments". *Adv Ther*. 2017; 34(3): 599-610.
15. **Sabine Werner and Richard;** Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines; *Gros Physiol Rev* 83: 835-870, 2003;
16. **Stephan Barrientos; Olivera Stojadinovic, Michael S. Golinko, Harold Brem, Marjana Tomic-Canic (2008),** Growth factors and cytokines in wound healing; *Wound Repair and RegenerationWound*, (2008), 16, 585-601
17. **Hart J.** Inflammation. 1: Its role in the healing of acute wounds. *J Wound Care*. 2002 Jun; 11(6):205-9.
18. **Zhang Y, Wang T, Dong J (2016);** Growth factor therapy in patients with partial-thickness burns: a systematic review and meta-analysis. *Wound J*. 2016 Jun; 13(3): 354-66.
19. **Sho Yamakawa & Kenji Hayashida.** Advances in surgical applications of growth factors for wound healing; *Burns & Trauma*, Volume 7, Article number: 10 (2019).
20. **Park JW, Hwang SR, Yoon IS.** Advanced growth factor delivery systems in wound management and skin regeneration. *Molecules*. 2017; 22:E1259.
21. **Nanney LB.** Epidermal and dermal effects of epidermal growth factor during wound repair. *J Invest Dermatol*. 1990; 94:624-9.
22. **J.Hardwicke, D.Schmaljohann, D.Boyce, D.Thomas;** Epidermal growth factor therapy and wound healing — past, present and future perspectives; *The SurgeonVolume* 6, Issue 3, June 2008, Pages 172-177
23. **Brown GL, Curtsinger LJ, White M, Mitchell RO, Pietsch J, Nordquist R, et al.** Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-beta. *Ann Surg*. 1988; 208:788-94.
24. **Kelly E. Johnson and Traci A. Wilgus (2014);** Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair; *Adv Wound Care*. 2014 Oct 1; 3(10): 647-661.
25. **Thittamaranahalli Muguregowda Honnegowda, Pramod Kumar, Echalarasa Govindarama Padmanabha Udupa, Sudesh Kumar, Udaya Kumar, Pragna Rao (2015);** Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing; *Plast Aesthet Res* 2015; 2:243-249
26. **Tatiana N. Demidova-Rice, Lindsey Wolf, Jeffrey Deckenback, Michael R. Hamblin, Ira M. Herman (2012).** "Human Platelet-Rich Plasma- and Extracellular Matrix-Derived Peptides Promote Impaired Cutaneous Wound Healing In vivo". **PLOS**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032146>