NGHIÊN CỨU BIẾN ĐỔI HÓA MÔ MIỄN DỊCH VÀ SIÊU CẤU TRÚC MÔ TẠI CHỖ VẾT THƯƠNG THỰC NGHIỆM SAU CHIẾU LASER CÔNG SUẤT THẤP

[1]Nguyễn Thị Bích Phượng, [1]Nguyễn Ngọc Tuấn, [1]Nguyễn Như Lâm, [1]Đinh Văn Hân, [1]Nguyễn Thị Hương, [2]Nguyễn Thuỳ Linh, [3]Vũ Văn Dưỡng

[1]Bệnh viện Bỏng quốc gia Lê Hữu Trác

[2]Bệnh viện Quân y 103,

[3]Viện 69/Bộ TL Bảo vệ Lăng Chủ tịch Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Mục tiêu: *Đánh giá đặc điểm hình thái hóa mô miễn dịch và siêu cấu trúc mô tại chỗ vết thương thực nghiệm sau chiếu Laser công suất thấp (780nm, liều 3 J/cm^2).*

Đối tượng và phương pháp*: Nghiên cứu tiến cứu trên 30 thỏ, mỗi thỏ tạo 2 vết thương ở đối xứng 2 bên lưng có đường kính 2R = 4cm: vết thương A (được điều trị bằng Laser công suất thấp, bước sóng 780nm, liều 3 J/cm^2 với thời gian chiếu 72 giây, 1 lần/ngày), vết thương B (chứng: không chiếu Laser). Các vết thương được thay băng và chiếu Laser 1 lần/ngày theo quy trình cho đến khi tổn thương biểu mô hóa hoàn toàn. Sinh thiết vết thương được lấy vào thời điểm: trước điều trị (D_0), sau điều trị 7 ngày (D7), sau điều trị 14 ngày (D14).*

Kết quả*: Hình ảnh hóa mô miễn dịch tại D7, D14 cho thấy vùng chiếu Laser công suất thấp xuất hiện nhiều tế bào nội mô mạch máu (+) với CD34 và các nguyên bào sợi, tế bào cơ trơn thành mạch (+) SMA nhiều hơn khi so với bên vùng chứng. Trên hình ảnh siêu cấu trúc truyền qua (TEM) thời điểm D7 cho thấy vùng chiếu Laser công suất thấp còn ít tổn thương phá hủy mô hơn bên chứng và có hình ảnh tái tạo mô. Đến D14, tốc độ tái tạo mô bên vùng chiếu Laser công suất thấp mạnh hơn vùng không chiếu, tăng hoạt động các bào quan nguyên bào sợi (ty thể, lưới nội chất có hạt) và tăng chế tiết collagen ra chất nền ngoại bào.*

Kết luận*: Laser công suất thấp (780nm, liều 3 J/cm^2) làm tăng quá trình liền vết thương trên mô hình thỏ thực nghiệm, kích thích tăng sinh mạch máu và tăng sinh nguyên bào sợi tổng hợp collagen.*

Từ khóa*: Laser công suất thấp, hóa mô miễn dịch*

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Thị Bích Phượng, Bệnh viện Bỏng quốc gia Lê Hữu Trác

Email: bsphuongvbqg@gmail.com

Ngày nhận bài: 15/6/2023; Ngày phản biện: 12/7/2023; Ngày duyệt bài: 20/7/2023

https://doi.org/10.54804/yhthvb.3.2023.233

ABSTRACT

Objective: *Evaluation of immunohistochemical morphological characteristics and tissue ultrastructural at the experimental wound site after low-power laser irradiation (780nm, dose 3J/cm^2).*

Subjects and methods: *Prospective study on 30 rabbits, each rabbit created two full thickness 2R = 4cm wounds on both sides of the back: Wound A (treated with LLLT, 780nm, 3 J/cm^2 with 72s irradiation time, 1 time per day); Wound B (control: no laser). Wounds are bandaged and laser irradiated once a day according to the procedure until the lesion is completely epithelialized. Wound biopsies were taken: Before treatment (D0), after 7 days (D7), and after 14 days (D14) of treatment.*

Results: *Immunohistochemical images at D7, D14 showed that the low-level laser therapy area appeared more vascular endothelial cells (+) with CD34 and more fibroblasts, vascular smooth muscle cells (+) SMA when compared to the control side. On the transmitted ultrastructural image (TEM) at D7, the low-level laser therapy area showed less tissue damage than the control side and there was tissue regeneration. Up to D14, the tissue regeneration rate in the low-level laser therapy area is stronger than in the non-irradiated area, increasing the activity of fibroblast organelles (mitochondrial, granular endoplasmic reticulum) and increasing collagen secretion into the extracellular matrix.*

Conclusions: *Low-level laser therapy (780nm, dose 3 J/cm^2) accelerates the wound healing process in experimental rabbit models, stimulates vascular proliferation, and increases collagen synthesis in fibroblasts.*

Keywords: *Low-level laser therapy, immunohistochemistry*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Laser công suất thấp (LLLT) là ứng dụng ánh sáng laser trong dải công suất (1mW - 500mW) để kích thích tái tạo mô, giảm viêm và giảm đau. Liệu pháp laser công suất thấp đã được coi là một liệu pháp lựa chọn hiệu quả cho liền vết thương từ 40 năm trở lại khi Adre Mester, một nhà vật lý người Hungary lần đầu tiên nghiên cứu về hiệu quả sinh học của của laser công suất thấp. Từ đó tới nay, liệu pháp laser đã được nghiên cứu rộng khắp về tác dụng sinh lý bệnh đến cấu trúc mô. Bước sóng sử dụng chủ yếu phổ hẹp là đỏ hay hồng ngoại gần (NIR) phổ (600nm - 1000nm), với mật độ năng lượng nằm trong khoảng 1mv - 5W/cm^2. Trái ngược với các hiệu ứng nhiệt được tạo ra bởi các tia laser công suất cao được sử dụng trong các thủ thuật thẩm mỹ và phẫu thuật để phá hủy mô, hiệu ứng trị liệu laser bán dẫn công suất thấp là hiệu ứng quang hóa. Khi nguồn sáng tiếp xúc với da, cho phép năng lượng photon xuyên qua mô, tương tác với các phân tử sinh học nội bào khác nhau để phục hồi chức năng tế bào và tăng cường quá trình chữa bệnh của cơ thể [1], [2].

Trong vài thập kỷ qua, một số lượng lớn các báo cáo chứng minh tác động tích cực của Laser công suất thấp trên in vitro, in vivo và nghiên cứu lâm sàng đã được xuất bản. Trên in vivo, laser công suất thấp được nghiên cứu trên nhiều mô hình động vật gây các bệnh lý khác nhau và chứng minh hiệu quả trên cả bệnh lý cấp và mạn tính.

Trong phạm vi nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá tác dụng của laser công suất thấp trên mô hình vết thương thực nghiệm qua nghiên cứu đặc điểm hình thái hóa mô miễn dịch và siêu cấu trúc mô tại chỗ vết thương.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

30 thỏ trắng chủng Newzealand white - Việt Nam, cả hai giống, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, khoẻ mạnh, nhanh nhẹn, lông trắng mượt, không có bệnh ngoài da và đường tiêu hóa, trọng lượng 2,2 - 2,7kg. Các động vật được nhốt riêng. Nhiệt độ phòng thực nghiệm động vật ở 25°C (± 3°), độ ẩm tương đối 30 - 70%. Ánh sáng được chiếu nhân tạo, theo quy luật 12 giờ sáng, 12 giờ tối. Thỏ ăn thức ăn chuẩn, uống nước tự do và được nuôi ở điều kiện trên trong 5 ngày trước khi làm thí nghiệm.

2.2. Chất liệu nghiên cứu

- Thiết bị laser bán dẫn công suất thấp của Viện Khoa học vật liệu/Viện Hàn Lâm Khoa học công nghệ Việt Nam (4 kênh tương ứng 4 bước sóng 670nm, 780nm, 805nm và 980nm), công suất quang: 0 - 300mW, nguồn điện: 100V - 240V, 50/60Hz.

- Dao mổ vô trùng, kính hiển vi quang học Leica DM1000, phần mềm chụp ảnh Proview của Optica.

- Kháng thể CD34 với Clone QBEnd/10 và kháng thể SMA với Clone Alpha sm-1 của hãng Leica.

- Dung dịch DAB, dung dịch để rửa và cố định mẫu: đệm Cacodylte 0,2M và 0,3M; dung dịch cố định Glutaraldehyt 2,5%; dung dịch axit Osmic 2%.

- Khẩu phần thay băng (dụng cụ thay băng, bông, băng, gạc), nước muối sinh lý NaCl 0,9%, dung dịch Betadin 10%, Vaselin.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu thực nghiệm đối chứng tự thân, cỡ mẫu: thuận tiện.

2.3.1. Phương pháp gây vết thương thực nghiệm trên động vật

Gây vết thương thực nghiệm trên thỏ theo phương pháp tạo mô hình vết thương thực nghiệm của của Wong V.W và cộng sự [3]. Thỏ nghiên cứu được đưa về nơi thực nghiệm trước vài ngày để chăn nuôi theo một chế độ nhất định và theo dõi tình trạng sức khoẻ. Thỏ được cạo sạch lông và vệ sinh sạch sẽ vùng lưng. Cố định vào bàn thí nghiệm chuyên dụng. Trên lưng của cùng một thỏ, đánh dấu vùng tạo vết thương hình tròn 2R = 4cm ở 2 vị trí đối xứng nhau hai bên cột sống. Thỏ được gây mê toàn thân đường tĩnh mạch tai thỏ bằng dung dịch Ketamine.

Sát khuẩn vùng tạo vết thương bằng dung dịch Povidin 3%. Dùng dao mổ tạo

vết thương tương ứng với vùng đã thiết kế, cắt bỏ toàn bộ chiều dày da lưng thỏ. Cầm máu và băng kín vết thương với gạc vaselin.

(1) (2)

Ảnh 2.1. Tạo vết thương thực nghiệm trên thỏ

** Nguồn: Thỏ nghiên cứu số 20 được tạo vết thương tại Bộ môn Dược lý K58 - Viện đào tạo Dược/Học viện Quân y*

- Vùng A ở lưng trái là vùng nghiên cứu điều trị bằng laser công suất thấp.
- Vùng B ở lưng phải là vùng đối chứng (không chiếu laser).

2.3.2. Thời gian - địa điểm nghiên cứu

Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 11 năm 2022 đến tháng 12 năm 2022.

Địa điểm nghiên cứu: Bộ môn Dược lý K58 - Viện đào tạo Dược/Học viện Quân y.

2.3.3. Quy trình chiếu laser điều trị vết thương thực nghiệm

Mỗi thỏ có 2 vết thương thực nghiệm, vết thương A được điều trị bằng LLLT, vết thương B không chiếu Laser (chứng), cả hai vết thương đều được thay băng 1 lần/ngày theo quy trình cho đến khi tổn thương biểu mô hóa hoàn toàn. Theo dõi, đánh giá diễn biến tại chỗ vết thương, chụp ảnh.

Quy trình chiếu laser (theo hướng dẫn của nhà sản xuất) ở lô A như sau: Thỏ nghiên cứu được giữ cố định trên bàn. Giữ đầu chiếu laser vuông góc và cách bề mặt vết thương 3,5cm. Đặt chế độ máy chiếu laser để đạt mật độ năng lượng quang 3J/cm2 với đầu phát laser có bước sóng 780nm, cụ thể: Điện áp: 10 V; Tần số f = 0 Hz; Thời gian chiếu t = 72s, 1 lần/ngày cho tới khi tổn thương biểu mô hóa hoàn toàn.

Ảnh 2.2. Hình ảnh chiếu laser công suất thấp trên thỏ

** Nguồn: Thỏ nghiên cứu được chiếu Laser tại Bộ môn Dược lý K58 - Viện đào tạo Dược/Học viện Quân y*

2.3.4. Đánh giá hiệu quả điều trị tại chỗ

- Sinh thiết mô vết thương bằng dụng cụ sinh thiết tại bờ mép vết thương (bao gồm cả vùng da còn biểu bì và vùng vết thương) tại các thời điểm: Trước điều trị (D_0), sau chiếu laser 7 ngày (D7), sau chiếu laser 14 ngày (D14).

**** Quy trình nhuộm trên máy hóa mô miễn dịch tự động***

- Chuẩn bị tiêu bản: Cắt mỏng mẫu mô 3µm và đặt vào lam kính mang điện tích dương, trên mỗi tiêu bản có thêm mẫu mô chứng dương tương ứng với từng dấu ấn.

- Quá trình nhuộm được thực hiện trên máy hóa mô miễn dịch tự động của Leica theo chương trình điều khiển chung đã được cài đặt sẵn cho máy. Chọn kháng thể thứ nhất để nhuộm theo chỉ định. Bộc lộ kháng nguyên bằng dung dịch bộc lộ kháng nguyên 1. Phủ kháng thể 1 trên mô với từng loại kháng thể đã chỉ định và với tỷ lệ kháng thể thích hợp. Sau đó máy tiếp tục ủ mẫu với dung dịch DAB (hỗn hợp kháng thể 2 và chất chỉ thị màu).

- Sau khi kết thúc quy trình nhuộm, lấy tiêu bản ra nhuộm nhân bằng Hematoxylin, sau đó dán lamen.

- Đánh giá kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch trên kính hiển vi quang học đạt yêu cầu như sau: Các dấu ấn bắt màu tại vị trí đặc hiệu trong tế bào, không có nhuộm màu nền, mẫu chứng dương phải dương tính với dấu ấn đã chỉ định.

- Các dấu ấn CD34 và SMA được xác định.

+ Dương tính: Khi bào tương tế bào nội mô mạch máu (CD34) và bào tương nguyên bào sợi cơ (SMA) bắt màu vàng nâu.

+ Âm tính: Khi bào tương tế bào nội mô mạch máu (CD34) và bào tương nguyên bào sợi cơ (SMA) không bắt màu vàng nâu.

Địa điểm nghiên cứu: Bộ môn - Khoa Giải phẫu bệnh lý - Pháp y, Bệnh viện Quân y 103/Học viện Quân y.

**** Xét nghiệm hình thái siêu cấu trúc mô vết thương trên kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM)***

Pha mẫu mô thành các mảnh nhỏ có kích thước (1 x 1 x 1mm). Rửa mẫu bằng nước cất, 2 lần x 10 phút/lần. Cố định mẫu trong glutaraldehyde 2,5% trong 2 giờ. Rửa mẫu bằng đệm cacodylate 0,3M 2 lần x 10 phút/lần. Cố định mẫu bằng axit Osmic 1% trong đệm Cocadylat trong 2 giờ. Rửa lại mẫu bằng đệm Cacodylate 0,3M 2 lần x 10 phút/lần. Khử nước bằng chuyển liên tục qua các dung dịch cồn 50^0, 70^0, 80^0, 90^0, 95^0, 100^0, 2 lần x 15 phút/lần. Sau khi khử nước, các mẫu được chuyển qua khử cồn ethanol theo qui trình: Propylen oxide, 3 lần x 10 phút/lần; chuyển mẫu vào hỗn hợp Propylen oxide + Epon tỷ lệ 2/1 để trong 30 phút; hỗn hợp Propylen oxide + Epon tỷ lệ 1/1 để trong 1 giờ; hỗn hợp Propylen oxide + Epon tỷ lệ 1/2 để trong 1 giờ. Cuối cùng cho mẫu vào Epon trong 2 giờ (hoặc qua đêm). Đúc mẫu trong hỗn hợp Epon, Để tủ ấm 35^0C trong 24 giờ; 45^0C trong 24 giờ và 60^0C trong 24 giờ.

Tiến hành gọt mẫu thô, cắt tiêu bản bán mỏng trên máy cắt siêu mỏng, nhuộm tiêu bản bằng dung dịch xanh Toluidin 1%

hoặc xanh Metylen 1% trong nước. Sau đó chuẩn bị lưới phủ màng Formvar thích hợp để giữ mẫu cho quan sát trong kính hiển vi điện tử. Tiến hành gọt tinh và cắt lát siêu mỏng trên máy Utramicrotom để đạt được độ dày mong muốn (thường khoảng 50nm). Nhuộm tiêu bản siêu mỏng với dung dịch Uranyl acetat 1% và chì Citrat. Soi, đọc kết quả trên kính hiển vi điện tử truyền qua TEM 1400, JEOL, Nhật Bản.

Địa điểm nghiên cứu: Khoa Hình thái - Viện 69, Bộ tư lệnh Lăng Chủ tịch Hồ Chí Minh.

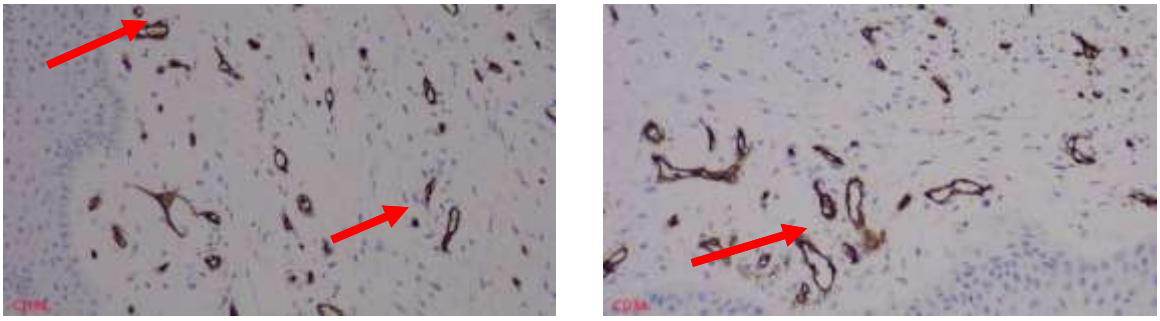
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xét nghiệm hóa mô miễn dịch

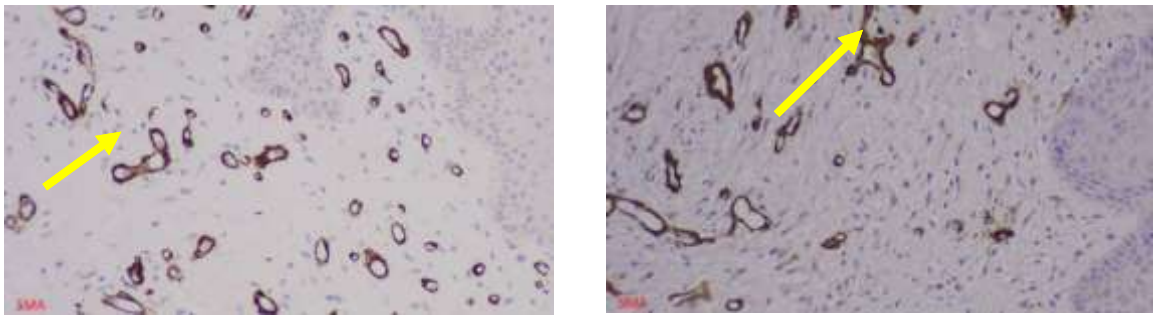
Có sự khác nhau của các mẫu bệnh phẩm lấy 3 thời điểm khác nhau: trước điều trị (D0), sau chiếu laser 1 tuần (D1) và sau chiếu laser 2 tuần (D14).

- Đối với các mẫu mô lấy tại thời điểm D0:

Vùng A - chiếu laser (n = 5) **Vùng B - không chiếu laser (n = 5)**



Bào tương các tế bào nội mô mạch máu (+) CD34 (mũi tên đỏ)



Bào tương các tế bào cơ trơn thành mạch (+) SMA (mũi tên vàng)

Hình 3.1. Ảnh vi thể nhuộm hóa mô miễn dịch tại chỗ vết thương thời điểm D0

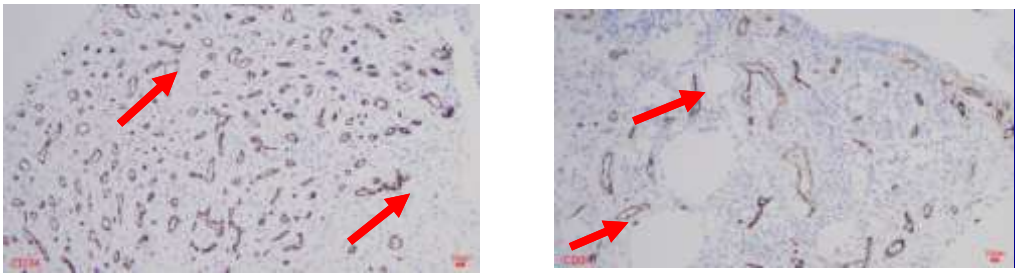
** Nguồn: Ảnh chụp vi thể da thỏ nghiên cứu số 19 tại Bộ môn - Khoa Giải phẫu bệnh lý - Pháp y, Bệnh viện Quân y 103/Học viện Quân y*

Nhận xét: Mô da vùng chân bì có các mao mạch máu và mô liên kết sợi. Bào tương các tế bào nội mô mạch máu (+) CD34, các tế bào cơ trơn thành mạch (+) SMA. Đậm độ vàng nâu hai vùng là tương đương chứng tỏ vết thương thực nghiệm được tạo ra ở hai nhóm là như nhau.

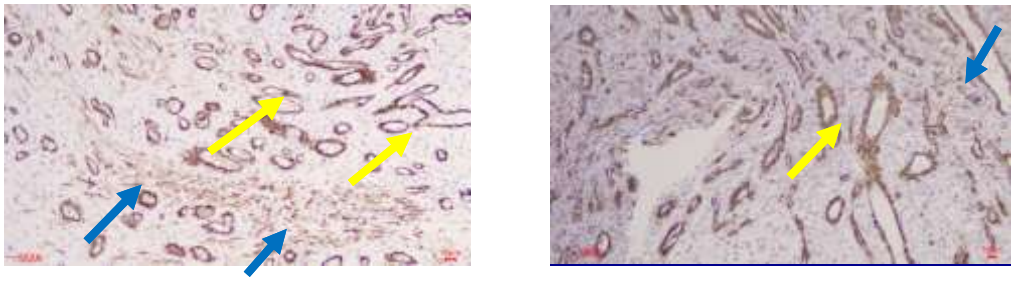
- Đối với các mẫu mô lấy tại thời điểm D7:

Vết thương

Vùng A - chiếu laser (n = 5) **Vùng B - không chiếu laser (n = 5)**



Bào tương tế bào nội mô mạch máu vùng chiếu laser (+) CD34 nhiều hơn bên vùng không chiếu (mũi tên đỏ)



Bào tương các nguyên bào sợi (+) SMA (mũi tên xanh)
Bào tương các tế bào cơ trơn thành mạch (+) SMA (mũi tên vàng)

Hình 3.2. Ảnh vi thể nhuộm hóa mô miễn dịch tại chỗ vết thương thời điểm D7

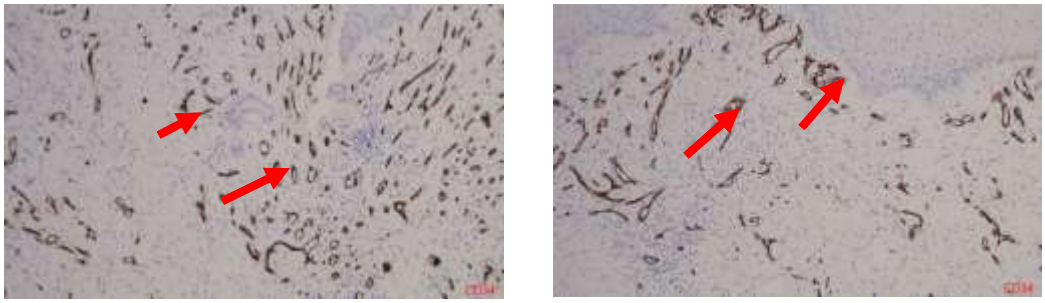
** Nguồn: Ảnh chụp vi thể da thỏ nghiên cứu số 19 tại Bộ môn, khoa Giải phẫu bệnh lý - Pháp y, Bệnh viện Quân y 103/Học viện Quân y*

Nhận xét: Mô hạt có các mao mạch máu, các nguyên bào sợi (NBS) và thâm nhiễm các tế bào viêm. Bào tương các tế bào nội mô mạch máu bên vùng A (+) CD34 nhiều hơn (đậm màu vàng nâu hơn) bên vùng B. Bào tương các NBS và tế bào cơ trơn thành mạch (+) với SMA. Điều này chứng tỏ vùng được chiếu laser đã có sự gia tăng mạch máu.

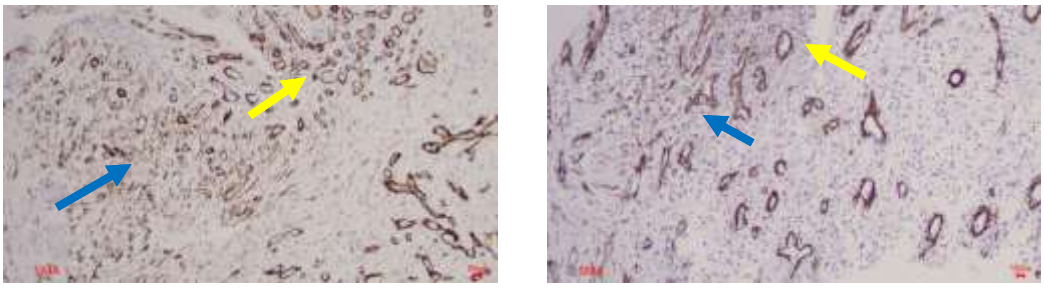
- Đối với các mẫu mô lấy tại thời điểm D14.

Vết thương

Vùng A - chiếu laser (n = 5) **Vùng B - không chiếu laser (n = 5)**



Bào tương tế bào nội mô mạch máu vùng chiếu Laser (+) CD34 nhiều hơn bên vùng không chiếu (mũi tên đỏ)



Bào tương các nguyên bào sợi (+) SMA (mũi tên xanh)

Bào tương các tế bào cơ trơn thành mạch (+) SMA (mũi tên vàng)

Hình 3.3. Ảnh vi thể nhuộm hóa mô miễn dịch tại chỗ vết thương thời điểm D14

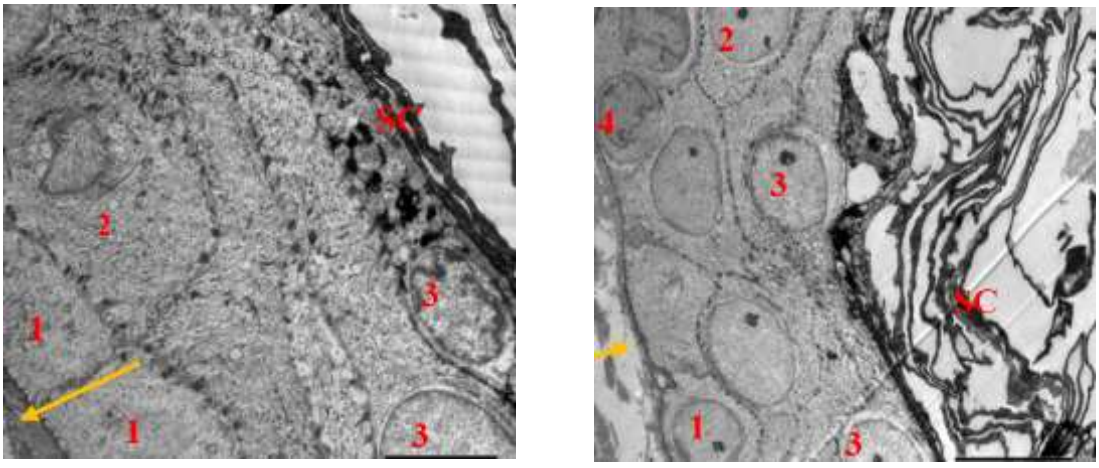
** Nguồn: Ảnh chụp vi thể da thỏ nghiên cứu số 19 tại Bộ môn, khoa Giải phẫu bệnh lý - Pháp y, Bệnh viện Quân y 103/Học viện Quân y*

Nhận xét: Mô da vùng chân bì có các mao mạch máu thành dày và mô liên kết sợi với tăng sinh tế bào sợi và sợi tạo keo. Bào tương các tế bào nội mô mạch máu bên vùng A (+) CD34 nhiều hơn bên vùng B. Bào tương các NBS và tế bào cơ trơn thành mạch vùng A (+) SMA nhiều hơn bên vùng B. Điều này cho thấy quá trình tăng sinh mạch máu, tăng sinh nguyên bào sợi tổng hợp collagen bên vùng được chiếu Laser công suất thấp mạnh hơn so với vùng chứng.

3.2. Xét nghiệm siêu cấu trúc

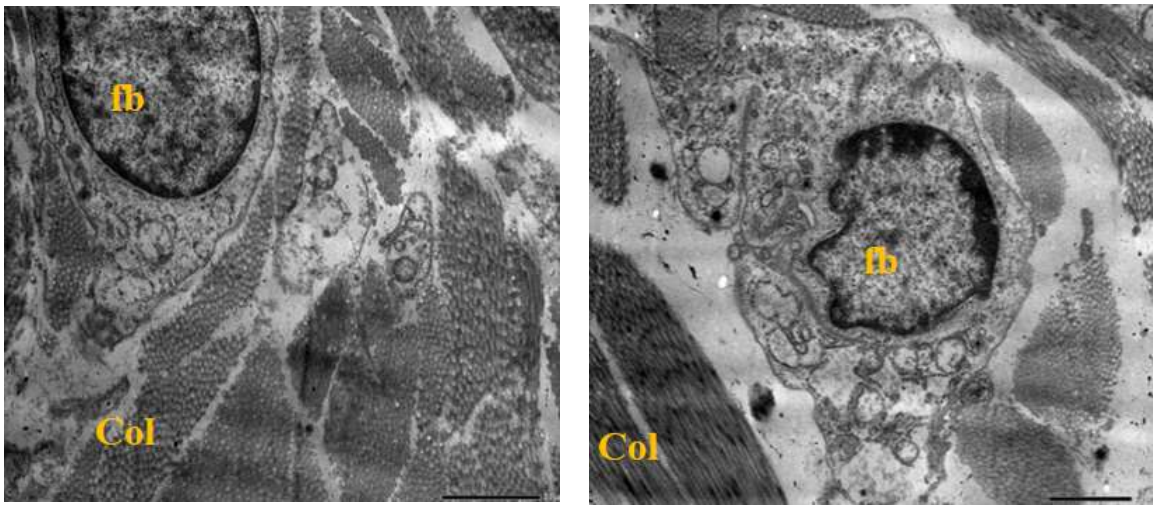
- Thời điểm D0

Vùng A - chiếu laser (n = 5) **Vùng B - không chiếu laser (n = 5)**



A (TEM x 1500)

Các lớp TB biểu bì: TB mầm (1), TB gai (2), TB hạt (3), lớp sừng (SC), TB Merken (4), màng đáy (→).



B (TEM x 3000)
Chân bì: NBS (fb) và các bó sợi collagen (Col)

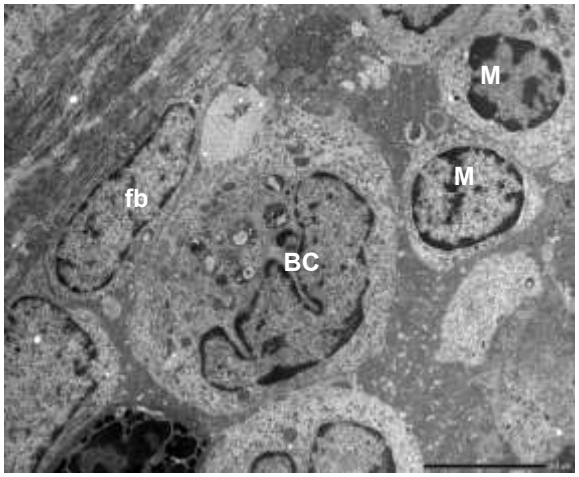
Hình 3.4. Hình ảnh siêu cấu trúc vết thương thỏ thời điểm D0

** Nguồn: Ảnh chụp vi thể da thỏ nghiên cứu số 19 tại Khoa Hình thái - Viện 69/Bộ tư lệnh Lăng Chủ tịch Hồ Chí Minh*

Nhận xét: Hình ảnh mô da có cấu trúc bình thường: Các lớp tế bào biểu bì còn nguyên vẹn. Chân bì: Có các nguyên bào sợi và các bó sợi collagen sắp xếp có trật tự.

- Thời điểm D7

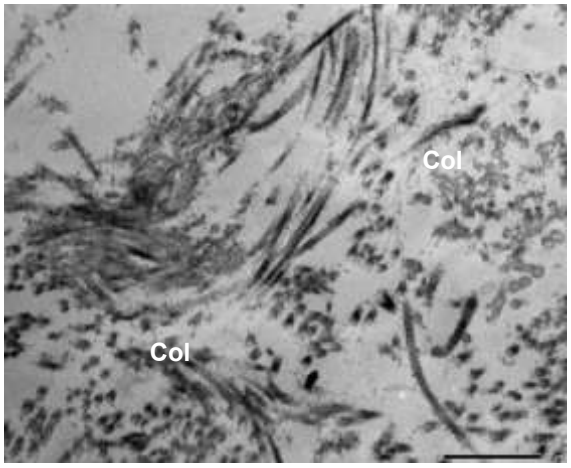
Vùng A - chiếu laser (n = 5)



Ax3000

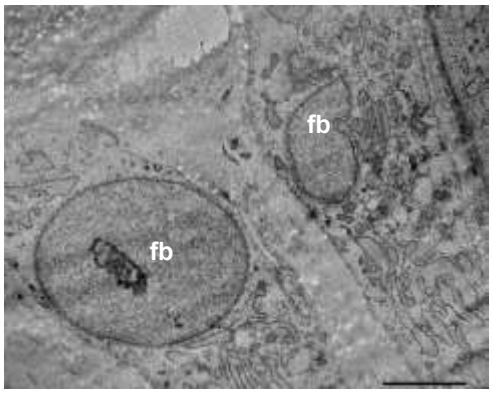
Hình ảnh thâm nhiễm các TB viêm: Bạch cầu đa nhân trung tính (BC), tế bào Mast (M)

Vùng B - không chiếu laser (n=5)

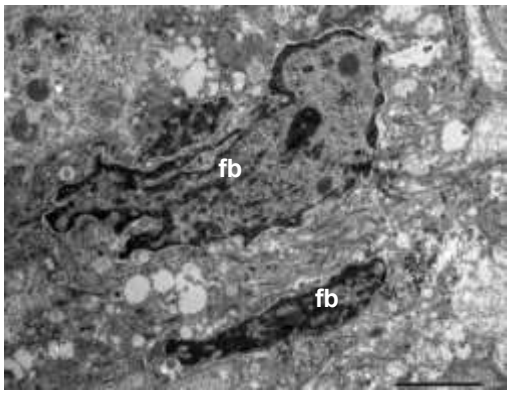


Ax6000

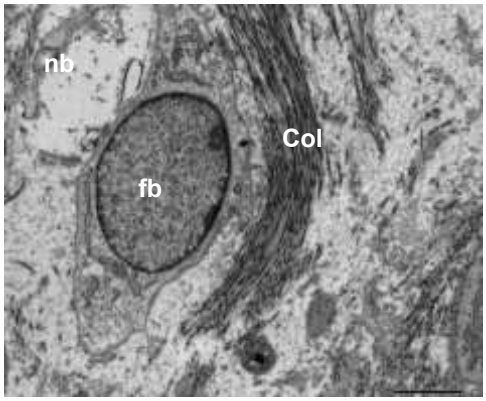
Hình ảnh phá hủy collagen, chất nền ngoại bào chân bì



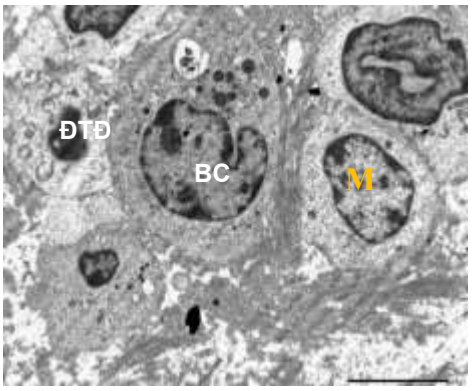
Bx4000



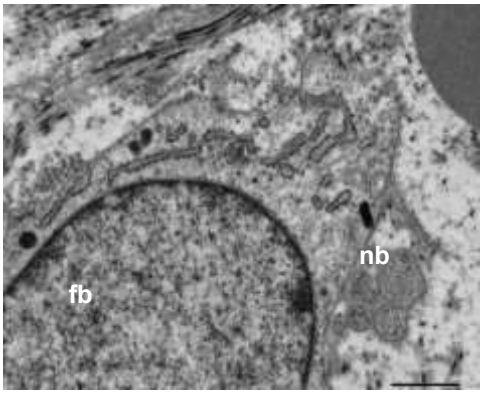
Bx3000



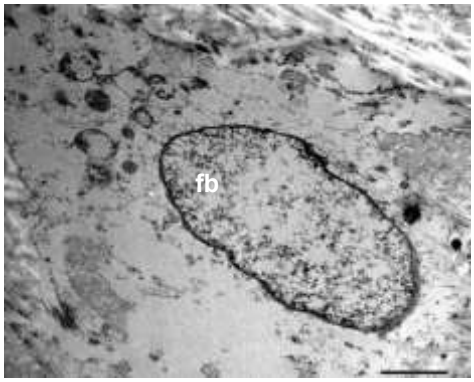
Cx4000



Cx1500



Dx5000



Dx5000

- Hình ảnh tái tạo sau tổn thương viêm (B), (C), (D): Xuất hiện các NBS (fb), bắt đầu sản xuất collagen mới (Col) với chất nền ngoại bào (nb) mật độ thấp.

- (B): Thoái hóa các nguyên bào sợi (NBS)
- (C): Thâm nhiễm các TB viêm: BC, M, đại thực bào (ĐTB).
- (D): Hình ảnh tái tạo sau tổn thương viêm: thâm nhập các NBS mới với bào tương nghèo nàn, chất nền ngoại bào mật độ thấp.

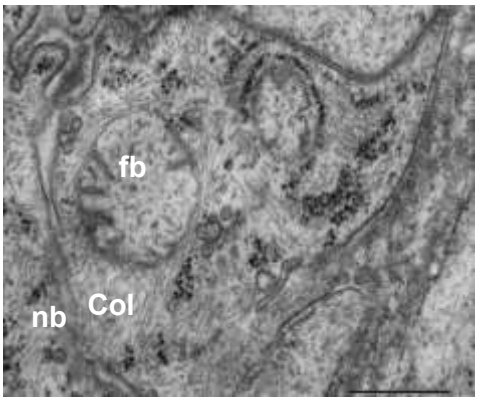
Hình 3.5. Hình ảnh siêu cấu trúc vết thương thỏ thời điểm D7

** Nguồn: Ảnh chụp vi thể da thỏ nghiên cứu số 19 tại Khoa Hình thái - Viện 69, Bộ tư lệnh Lăng Chủ tịch Hồ Chí Minh*

Nhận xét: Thời điểm D7 cho thấy mô vẫn còn hình ảnh tổn thương viêm với các đặc điểm: thoái hóa NBS, phá hủy collagen và chất nền ngoại bào (vùng B nhìn thấy rõ), thâm nhiễm các tế bào viêm (cả hai vùng). Song song đó là hình ảnh tái tạo mô với sự xuất hiện của NBS, collagen và chất nền ngoại bào (vùng A diễn ra quá trình tái tạo mạnh hơn vùng B).

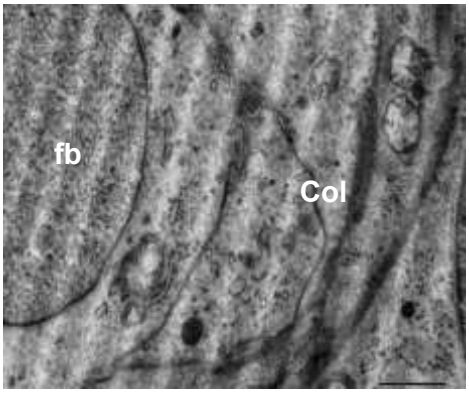
- Thời điểm D14

Vùng A - chiếu laser (n = 5)

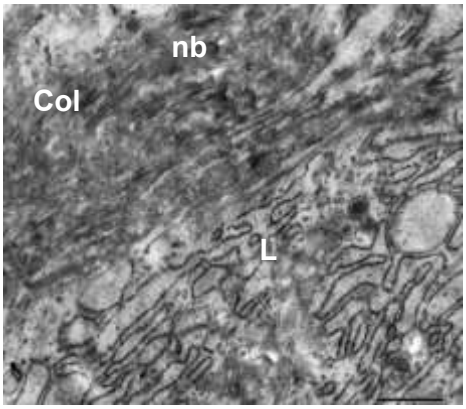


Ax5000

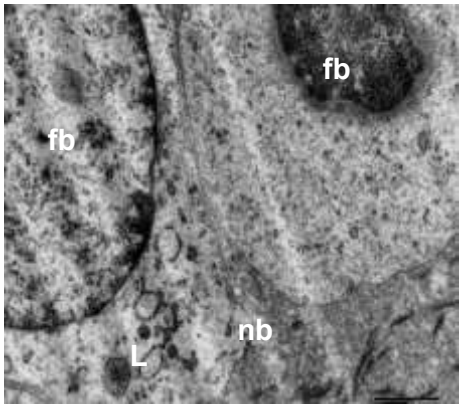
Vùng B - không chiếu laser (n = 5)



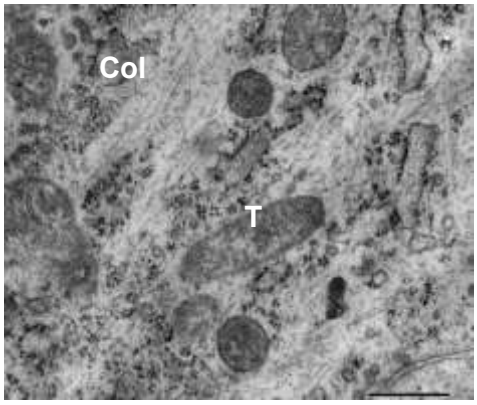
Ax6000



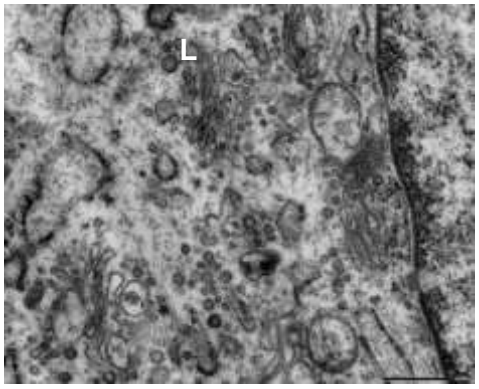
Bx8000



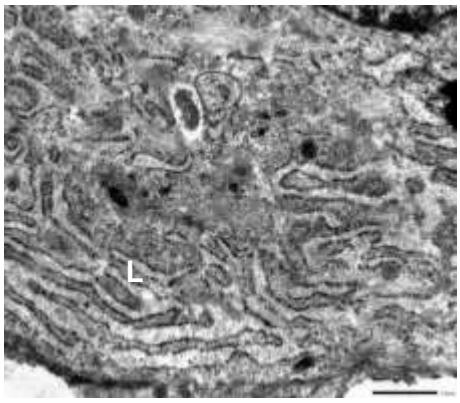
Bx6000



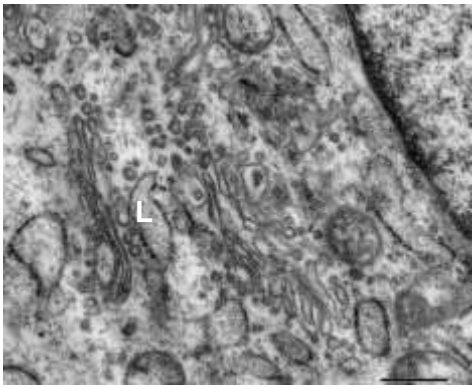
Cx8000



Cx8000



Dx12000



Dx10000

Hình 3.6. Hình ảnh siêu cấu trúc vết thương thỏ thời điểm D14

** Nguồn: Ảnh chụp vi thể da thỏ nghiên cứu số 19 tại Khoa Hình thái - Viện 69, Bộ tư lệnh Lăng Chủ tịch Hồ Chí Minh*

Nhận xét: Cả hai vùng A, B đều có hình ảnh da đang hồi phục sau tổn thương viêm: tăng chế tiết collagen ra chất nền ngoại bào, các bào quan NBS (ty thể (T), lưới nội chất có hạt (L) phát triển mạnh, tăng hoạt động. Các collagen trưởng thành phủ khắp chất nền ngoại bào. Tuy nhiên vùng A cho thấy tốc độ hồi phục mạnh mẽ hơn.

4. BÀN LUẬN

Chúng tôi sử dụng LLLT bước sóng 780nm, liều 3 J/cm^2 nằm trong dải bước sóng (630 - 790nm) và dải liều tối ưu (từ 1 - 5 J/cm^2) mà tác giả Chaves M.E.d.A. và cộng sự (2014) khuyến cáo [4]. Nhóm tác giả AlGhamdi K.M., Kumar A và cộng sự (2012) cũng đưa ra kết luận dải liều (0,5 - 4,0 J/cm^2) làm tăng cường tốc độ tăng sinh của các dòng tế bào mà không gây ra bất kỳ tác dụng gây độc tế bào nào [5] .

Trong nghiên cứu, chúng tôi ứng dụng mô hình tạo vết thương thực nghiệm bằng cách phẫu thuật cắt bỏ tất cả các lớp da (biểu bì, hạ bì và mỡ dưới da) của động vật thực nghiệm là một trong những phương pháp được sử dụng phổ biến nhất và được coi là giống với vết thương cấp tính trên lâm sàng. Các vết thương sẽ liền kỳ hai và trải qua các giai đoạn chữa lành: Viêm, tăng sinh và tái tạo. Do vậy, mô hình này cho phép theo dõi diễn biến quá trình liền vết thương: viêm, hình thành mô hạt, tái tạo biểu mô, hình thành mạch và tu sửa.

Về nghiên cứu hình thái vết thương, chúng tôi sử dụng các xét nghiệm vi thể quan sát biến đổi hóa mô miễn dịch tại chỗ vết thương và siêu cấu trúc sử dụng kính hiện vi điện tử truyền qua (TEM). Có nhiều dấu hiệu hóa mô miễn dịch khác nhau có thể được đánh giá dựa vào từng giai đoạn khác nhau của quá trình liền vết thương. Các dấu hiệu thích hợp như: collagen I, III và IV, IL-1β, IL-10, IL-17, TGF-β, VEGF, cytokeratin 10, 14, vimentin, fibronectin, laminin, α-SMA, CD31, CD34 [6]. Trong quá trình liền vết thương, có sự tham gia của nhiều loại tế bào. Pha tăng sinh đặc trưng bởi quá trình hình thành mạch, sự di chuyển và tăng sinh mạnh mẽ của các tế bào để tổng hợp mô hạt, hình thành chất nền ngoại bào (ECM) và biểu mô hóa [7] [8]. Chính vì vậy chúng tôi lựa chọn nhuộm tiêu bản với các dấu ấn CD34 và SMA để đánh giá mạch máu và nguyên bào sợi tại các thời điểm nghiên cứu.

Tại thời điểm D0 là thời điểm bắt đầu tạo vết thương, mô da có cấu trúc bình thường với lớp tế bào biểu bì và chân bì có các nguyên bào sợi và bó sợi collagenda sắp xếp có trật tự (tiêu bản siêu cấu trúc sử dụng kính hiển vi điện tử truyền qua TEM). Trên tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch, mô da vùng chân bì có các mạch máu và mô liên kết sợi. Bào tương các tế bào nội mô mạch máu (+) với CD34, các tế bào cơ trơn thành mạch và nguyên bào sợi (+) với SMA.

Thời điểm D7 cho thấy sự tương đồng giữa hình ảnh tại chỗ vết thương, với hình ảnh tiêu bản siêu cấu trúc và nhuộm hóa mô miễn dịch. Vết thương giai đoạn này vẫn còn lớp mỏng hoại tử, giả mạc và có tổ chức hạt nhợt. Trên tiêu bản siêu cấu trúc cũng cho thấy mô da còn thâm nhiễm các tế bào viêm (bạch cầu đa nhân trung tính, đại thực bào, tế bào Mast) và có hình ảnh phá hủy collagen và chất nền ngoại bào vùng không chiếu laser rất mạnh mẽ. Đồng thời cũng có dấu hiệu tái tạo: Hình thành mạch máu và xuất hiện nguyên bào sợi mới. Trên tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch, đã có mô hạt với các mạch máu, các nguyên bào sợi và sự thâm nhiễm các tế bào viêm. Bào tương tế bào nội mô mạch máu vùng chiếu LLLT (+) CD34 nhiều hơn bên vùng chứng cho thấy quá trình tái tạo sau tổn thương viêm vùng chiếu Laser mạnh mẽ hơn. Bào thương các nguyên bào sợi và tế bào cơ trơn thành mạch (+) với SMA.

Thời điểm D14 là thời điểm vết thương có tổ chức hạt đỏ, đẹp, biểu mô hóa nhanh. Trên hình ảnh tiêu bản siêu cấu trúc tương ứng với mô da đang hồi phục, mạch máu hình thành, tăng sinh và tổng hợp collagen, hình thành chất nền ngoại bào. Tuy nhiên có thể thấy tốc độ tái tạo bên vùng chiếu laser nhanh hơn, collagen và chất nền ngoại bào tổng hợp nhiều hơn. Trên ảnh vi thể nhuộm hóa mô miễn dịch chỉ ra mô da vùng chân bì có các mao mạch máu thành dày, mô liên kết sợi với tăng sinh tế bào sợi và sợi tạo keo. Mật độ các bào tương tế bào nội mô mạch máu (dấu ấn CD34) bên vùng A bắt màu vàng nâu nhiều hơn bên vùng B, gián tiếp cho thấy mạch máu bên vùng A (được chiếu laser) nhiều hơn so với vùng không chiếu. Trên tiêu bản nhuộm dấu ấn SMA cho thấy mật độ bắt màu vàng nâu của bào tương các nguyên bào sợi và tế bào cơ trơn thành mạch bên chiếu laser dày hơn so với bên chứng. Điều này cho thấy quá trình tăng sinh mạch máu, tăng sinh nguyên bào sợi tổng hợp collagen bên vùng được chiếu laser công suất thấp mạnh hơn so với vùng chứng.

Các diễn biến của vết thương và sự thay đổi cấu trúc mô trên hình ảnh tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch và siêu cấu trúc cho thấy vết thương diễn biến thuận lợi và tuần tự, đan xen qua các giai đoạn của quá trình liền vết thương: Viêm, tăng sinh, tái tạo [7], [9], [8]. Giai đoạn viêm diễn ra mạnh mẽ trong tuần đầu tiên với đặc trưng trên lâm sàng là vết thương còn hoại tử, giả mạc, viêm nề, xung huyết và hình ảnh cấu trúc mô là sự tham gia của các tế bào viêm. Quá trình này giảm dần và kết thúc ở tuần thứ hai. Pha tăng sinh với đặc trưng là hình thành các mạch máu tân tạo, các nguyên bào sợi để hình thành chất nền ngoại bào (tương ứng với mô hạt trên lâm sàng). Và cuối cùng là pha tái tạo (cấu trúc lại collagen), biểu mô mô vết thương, hình thành sẹo.

Một trong những vấn đề thường xảy ra ở vết thương là cung cấp oxy không đủ, điều này sẽ ngăn cản quá trình chữa lành

bình thường. LLLT đã được chứng minh cải thiện tình trạng thiếu oxy và thiếu máu cục bộ [10]. Trong quá trình liền vết thương, một sự kiện quan trọng là hình thành tân mạch. Các mạch máu mới là một thành phần cơ bản trong quá trình tạo hạt mô vì chúng cung cấp oxy và chất dinh dưỡng cần thiết để hỗ trợ chuyển hóa tế bào ở vùng vết thương [11].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, kháng thể đơn dòng kháng CD34 được sử dụng để xác định số lượng mạch máu. Chúng tôi đã quan sát thấy rằng mạch máu tại D7, D14 ở vùng chiếu Laser công suất thấp nhiều hơn vùng không chiếu. Điều đó cho thấy LLLT kích thích tăng sinh mạch máu.

Kết quả này phù hợp với tác giả Chaves M.E.d.A. và cộng sự (2014) đưa ra sau khi thu thập và phân tích từ 68 nghiên cứu trên in vitro và động vật về LLLT. Laser có hiệu quả sinh học là giảm tế bào viêm, tăng sinh nguyên bào sợi, kích thích tân tạo mạch, hình thành mô hạt và tăng tổng hợp collagen [4].

Nghiên cứu của Hussein A.J. và cộng sự (2011) trên các mẫu mô bệnh giữa hai nhóm vết thương được tạo ra trên thỏ được chiếu Laser và nhóm không chiếu Laser vào ngày thứ 3, 7 và 14 đã chỉ ra LLLT cho thấy khả năng tái tạo tốt hơn và phục hồi nhanh hơn tính toàn vẹn về cấu trúc và chức năng khi so với nhóm đối chứng [12].

Nghiên cứu của Demidova-Rice TN và cộng sự (2007) cũng chỉ ra LLLT có tác dụng trong việc kích thích co rút vết thương trên da chuột sau 1 liều chiếu duy nhất LLLT sau 30 phút tạo vết thương khi so sánh với nhóm không chiếu laser. Đồng thời, LLLT làm tăng số lượng actin cơ trơn (SMA) - tế bào dương tính ở mép vết thương, kích thích vết thương co lại bằng cách thúc đẩy NBS biệt hóa thành NBS cơ [13].

5. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu đặc điểm hình thái hóa mô miễn dịch và siêu cấu trúc mô trên thỏ thực nghiệm sau chiếu laser công suất thấp (bước sóng 780nm, liều 3 J/cm^2), chúng tôi rút ra kết luận sau:

- Hình ảnh hóa mô miễn dịch tại D7, D14 chỉ ra mật độ các bào tương tế bào nội mô mạch máu (dấu ấn CD34) và bào tương các nguyên bào sợi và tế bào cơ trơn thành mạch (dấu ấn SMA) bên vùng chiếu Laser bắt màu vàng nâu nhiều hơn bên không chiếu. Điều đó cho thấy vùng chiếu laser công suất thấp tăng sinh mạch máu, tăng sinh nguyên bào sợi tổng hợp collagen mạnh hơn so với vùng không chiếu.

- Trên hình ảnh siêu cấu trúc truyền qua (TEM) thời điểm D7 cho thấy vùng chiếu laser công suất thấp còn ít tổn thương phá hủy mô hơn bên chứng và có hình ảnh tái tạo mô. Đến D14, tốc độ tái tạo mô bên vùng chiếu laser công suất thấp mạnh hơn vùng không chiếu, tăng hoạt động các bào quan nguyên bào sợi (ty thể, lưới nội chất có hạt) và tăng chế tiết collagen ra chất nền ngoại bào.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Cotler H.B., Chow R.T., Hamblin M.R., et al. (2015).** The use of low-level laser therapy (LLLT) for musculoskeletal pain. *MOJ orthopedics rheumatology.* 2(5): 1-16.
2. **Huang Y.-Y., Chen A.C.-H., Carroll J.D., et al. (2009).** Biphasic dose response in low-level light therapy. *Dose-response.* 7(4): 358-383.
3. **Đinh Văn Hân, Nguyễn Mạnh Hùng, Ngô Ngọc Hà (2014).** Đánh giá ảnh hưởng của Laser

bán dẫn vùng ánh sáng đỏ (630-670nm) tới quá trình liền vết thương cấp tính và mạn tính. *Tạp chí Y học Thảm hoạ và Bỏng,* số 5-2014: tr 160-169.

4. **Chaves M.E.d.A., Araújo A.R.d., Piancastelli A.C.C., et al. (2014).** Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. *Anais brasileiros de dermatologia.* 89: 616-623.
5. **AlGhamdi K.M., Kumar A., Moussa N.A. (2012).** Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers in medical science.* 27(1): 237-249.
6. **Masson-Meyers D.S., Andrade T.A., Caetano G.F., et al. (2020).** Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *International journal of experimental pathology.* 101(1-2): 21-37.
7. C**hilds D.R., Murthy A.S. (2017).** Overview of wound healing and management. *Surgical Clinics.* 97(1): 189-207.
8. **Gushiken L.F.S., Beserra F.P., Bastos J.K., et al. (2021).** Cutaneous wound healing: An update from physiopathology to current therapies. *Life.* 11(7): 665.
9. **Tottoli E.M., Dorati R., Genta I., et al. (2020).** Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. *Pharmaceutics.* 12(8): 735.
10. **Rashidi S., Yadollahpour A., Mirzaiyan M. (2015).** Low-level laser therapy for the treatment of chronic wound: Clinical considerations. *Biomedical and Pharmacology Journal.* 8(2): 1121-1127.
11. **Fortuna T., Gonzalez A.C., Sá M.F., et al. (2018).** Effect of 670 nm laser photobiomodulation on vascular density and fibroplasia in late stages of tissue repair. *International wound journal.* 15(2): 274-282.
12. **Hussein A.J., Alfars A.A., Falih M.A., et al. (2011).** Effects of a low-level laser on the acceleration of wound healing in rabbits. *North American journal of medical sciences.* 3(4): 193-197.
13. **Demidova-Rice T.N., Salomatina E.V., Yaroslavsky A.N., et al. (2007).** Low-level light stimulates excisional wound healing in mice. *Lasers Surg Med.* 39(9): 706-715.