NGHIÊN CỨU HÌNH THÁI SIÊU CẤU TRÚC CỦA VẾT LOÉT MẠN TÍNH TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM ĐƯỢC ĐIỀU TRỊ BẰNG BÀI THUỐC GTK108

Nguyễn Thu Trang[1], Phạm Xuân Thắng[2], Lương Thị Kỳ Thuỷ[1], Nguyễn Thị Mai Phương[1], Phùng Thu Hương[1], Đào Thị Thanh Bình[1]

[1]Bệnh viện Trung ương Quân đội 108,
[2]Bộ Tư lệnh Bảo vệ Lăng Chủ tịch Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Loét da mạn tính (chronic skin ulcer - CSU) được định nghĩa là những vết thương không có xu hướng liền sau 4 tuần dù đã được chăm sóc y tế phù hợp.

Mục tiêu: *Nghiên cứu về mặt hình thái siêu cấu trúc của các vết loét da mạn tính trên động vật thực nghiệm được điều trị bằng bài thuốc GTK108 bôi ngoài.*

Đối tượng và phương pháp: *Nghiên cứu thực nghiệm đối chứng tự thân trên 30 thỏ. Hiệu quả của bài thuốc GTK108 được đánh giá dựa trên hình ảnh siêu cấu trúc về tổn thương mô, xâm nhập tế bào viêm, di trú của nguyên bào sợi và hoạt tính sinh tổng hợp collagen của chúng, tăng sinh mạch, cấu trúc collagen chất nền ngoại bào và biểu mô hoá.*

Kết quả: *Bài thuốc GTK108 giúp đẩy nhanh quá trình liền vết loét mạn tính trên động vật thực nghiệm: thúc đẩy quá trình tăng sinh, sửa chữa chất nền ngoại bào.*

Kết luận: *Đánh giá siêu cấu trúc cho thấy bài thuốc GTK108 có hiệu quả trong điều trị loét da mạn tính thực nghiệm.*

Từ khoá: *Loét da mạn tính, động vật thực nghiệm, GTK108, siêu cấu trúc*

ABSTRACT

Chronic skin ulcers are lesions that do not tend to heal after 4 weeks of appropriate treatment.

Objective: *To analyze the microbiology of wounds that were applied to the GTK108 formula as topical ulcer dressings on experimental animals.*

Subjects and methods: *Experimental research on 30 rabbits. The effect of the GTK108 formula was evaluated by ultrastructure images of tissue damage, inflammatory cell infiltration, fibroblast migration and their collagen biosynthetic activity, extracellular matrix collagen structure, and epithelialization.*

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Thu Trang, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108
Email: tranghmu@gmail.com
Ngày nhận bài: 12/6/2023; Ngày nhận xét: 05/10/2023; Ngày duyệt bài: 29/10/2023
https://doi.org/10.54804/yhthvb.5.2023.265

Result: *GTK108 formula enhanced healing of the CSU on experimental animals: promote proliferation, repair extracellular matrix on ultrastructure image.*

Conclusion: *Ultrastructure analysis showed that the experimental chronic skin ulcers which applied with GTK108 formula healed faster.*

Keywords: *Chronic skin ulcers, experimental animal, GTK108, ultrastructure*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Loét da mạn tính (chronic skin ulcer - CSU) được định nghĩa là những tổn thương da không có xu hướng liền sau 4 tuần dù đã được chăm sóc y tế phù hợp [1], nguyên nhân do rối loạn trật tự và thời gian sửa chữa về mặt giải phẫu và chức năng tại vị trí tổn thương [2 - 4]. Loét da mạn tính gồm loét do tỳ đè, loét bàn chân do đái tháo đường và bệnh lý tĩnh mạch chi dưới... Tỷ lệ loét da mạn tính cao do số lượng bệnh nhân cao tuổi và mắc nhiều bệnh lý liên quan tăng dần theo thời gian, gây tác động xấu đến tâm lý của bệnh nhân và tăng gánh nặng tài chính cho cả hệ thống y tế.

Theo Y học cổ truyền (YHCT), loét da mạn tính thuộc các chứng ngoan sang, kim thương, sang thương, liêm sang, ác sang... Nguyên nhân chính của bệnh chủ yếu do nhiệt tà (viêm) gây hoại tử sinh hủ nhục (mô hoại tử), hủ nhục không được loại bỏ lại làm cho vết loét tiến triển nặng thêm, lâu ngày gây chứng hư.

Từ xa xưa, dầu lòng đỏ trứng gà đã được Tuệ Tĩnh sử dụng trong điều trị nhọt, lở, phỏng... và đã được chứng minh hiệu quả bằng nghiên cứu hiện đại. Y văn cũng chỉ ra, nước sắc Đại hoàng và Hoàng đằng dùng để rửa vết thương mang lại hiệu quả rất tốt. Cao lỏng GTK108 được xây dựng dựa trên ý tưởng kết hợp các vị thuốc trên nhằm tăng tác dụng thanh nhiệt, khứ hủ, sinh tân (chống viêm, loại bỏ hoại tử, tăng sinh mô mới).

Để làm rõ hiệu quả điều trị loét da mạn tính và bước đầu xác định cơ chế tác dụng của cao lỏng, chúng tôi tiến hành **"Nghiên cứu hiệu quả điều trị loét da mạn tính của bài thuốc GTK108 trên động vật thực nghiệm"** với mục tiêu: *Nghiên cứu hình thái siêu cấu trúc của các vết loét da mạn tính trên động vật thực nghiệm được điều trị bằng bài thuốc GTK108.*

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Chất liệu

Thuốc:

- Bài thuốc GTK 108 được bào chế tại Khoa Y học cổ truyền - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, dạng cao lỏng, gồm: Dầu lòng đỏ trứng gà, dịch chiết Đại hoàng và Hoàng đằng bằng isopropanol 96%. Bài thuốc đã được nghiên cứu thành phần và độc tính trên động vật thực nghiệm, nghiên cứu về hình thái đại thể kích thước vết loét, mô bệnh học và hoá mô miễn dịch.

- Mỡ Silver Sulfadiazine 1%: lọ 125ml dùng ngoài (Mundipharma).

Các dụng cụ và hoá chất chính: Kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscopy - SEM) và kính hiển vi điện tử truyền qua (Transmission Electron Microscopy - TEM); các hoá chất dùng để cố định, khử nước, nhuộm bệnh phẩm...

2.2. Đối tượng

30 thỏ chủng Newzealand White, cả 2 giống, khỏe mạnh, trọng lượng 1,8 - 2,2kg, thỏ cái chưa có con, không mang thai.

2.3. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm đối chứng tự thân trên động vật.

Địa điểm nghiên cứu: Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

Thời gian nghiên cứu: 10 tháng (09/2017 - 07/2018)

Cỡ mẫu: 30 thỏ, với 60 vết loét mạn tính được tạo bởi doxorubicin theo mô hình của Rudolph R. [3].

Mô hình gây loét da mạn tính: Thỏ được chăm sóc trong điều kiện thí nghiệm theo tiêu chuẩn của OECD tại Khoa Thực nghiệm - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

Thỏ được đánh số theo thứ tự bằng số tự nhiên vào mặt trong tai, cố định tư thế sấp trên bàn, cạo sạch lông vùng lưng 2 bên, đối xứng nhau qua cột sống, đánh dấu vị trí tiêm thuốc gây loét (Hình 1). Tiêm 1 ml doxorubicin (Doxorubicin "Ebewe" 10mg) hàm lượng 10 mg/5 ml, tương đương với 2000 µg, vào trong da tại mỗi vị trí.

Theo dõi tổn thương tại các vùng tiêm từ 10 - 14 ngày, khi các hoại tử xuất hiện rõ (da đổi màu vàng nhạt đến xám, cứng), tiến hành cắt lọc da hoại tử, tạo hình vết loét dưới gây mê bằng Thiopental. Sau đó đắp gạc khô, vô trùng từ 6 - 10 ngày. Kết thúc quá trình gây loét da mạn tính.

Hình 1. Chuẩn bị thỏ tạo vết loét da mạn tính thực nghiệm

Mô hình điều trị thực nghiệm:

Sau khi gây loét da mạn tính thực nghiệm, thỏ được lựa chọn ngẫu nhiên để tiến hành đồng thời 2 phương pháp điều trị trên 2 vết loét, trong đó 1 vết loét nghiên cứu và 1 vết loét chứng:

- Vết loét nghiên cứu (30 vết loét): thay băng, rửa và bôi đều một lớp mỏng GTK108 trên toàn bộ bề mặt vết loét, che phủ bằng 2 lớp gạc mỏng, sau đó băng lại.

- Vết loét chứng: Được chia thành 2 nhóm:

Nhóm 1 (10 vết loét): Thay băng, rửa và đắp ổ loét bằng gạc tẩm dung dịch NaCl 0,9%, sau đó băng lại.

Nhóm 2 (20 vết loét): Thay băng, rửa vết thương bằng dung dịch NaCl 0,9%, sau đó bôi mỡ Silver Sulfadiazine 1% (SSD) và băng lại.

Nguyên tắc thay băng và rửa vết thương sạch và sạch nhiễm theo hướng dẫn của WHO (2009) [67], quy trình cụ thể theo quy trình thay băng rửa vết thương của Bệnh viện Trung ương quân đội 108.

Thời gian thay băng: 2 ngày/lần.

Theo dõi, đánh giá diễn biến hình thái vết thương bằng ảnh chụp tại chỗ mỗi lần thay băng. Ngày thứ 1 (D_0), ngày thứ 14 (D_{14}) và ngày thứ 21 (D_{21}), ghi phiếu theo dõi và tiến hành sinh thiết ngẫu nhiên 30% vết loét mỗi nhóm dưới gây mê.

Mẫu sinh thiết được lấy ở giữa bờ và trung tâm vết loét bằng dụng cụ biopsy punch, mỗi mẫu lại được chia thành 2 mảnh nhỏ: một mảnh cố định bằng dung dịch formaldehyd 10% gửi đến Đại học Y Hà Nội để chuẩn bị mẫu cho nghiên cứu mô bệnh học và hóa mô miễn dịch, một mảnh được cố định bằng dung dịch glutaraldehyde 5% trong đệm cacodylate và gửi đến Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương tiến hành một loạt các bước xử lý mẫu bệnh phẩm để nghiên cứu siêu cấu trúc, kết quả được đọc bởi nghiên cứu viên của đơn vị này.

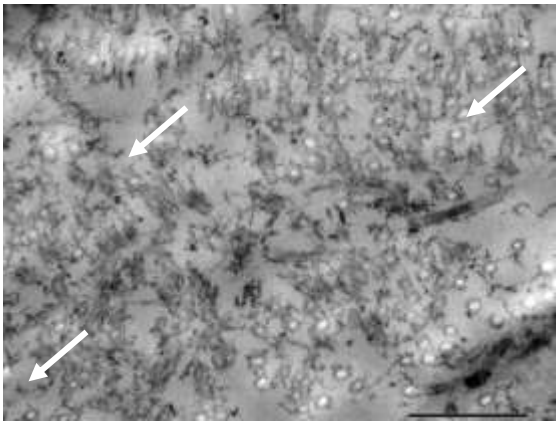
Chỉ tiêu nghiên cứu:

- Tổn thương mô: tế bào, chất nền ngoại bào
- Xâm nhập tế bào viêm
- Di trú của nguyên bào sợi và hoạt tính sinh tổng hợp collagen của chúng
- Tăng sinh mạch
- Cấu trúc collagen chất nền ngoại bào
- Biểu mô hóa

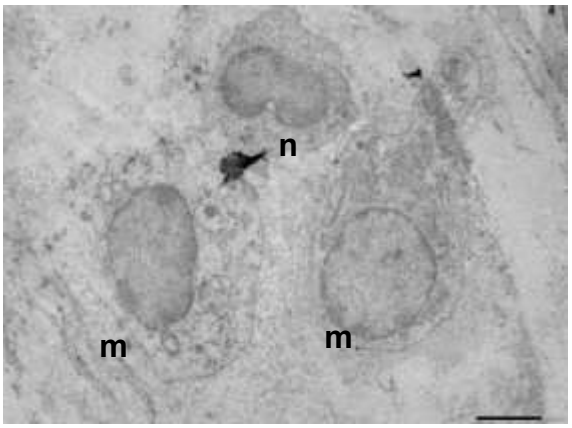
Đạo đức trong nghiên cứu: Nghiên cứu được tiến hành chỉ nhằm mục đích nghiên cứu, đánh giá hiệu quả của bài thuốc YHCT trên các vết loét da mạn tính, có ý nghĩa trong tìm ra một phương pháp điều trị tổn thương tương tự trên người bệnh. Quy trình tạo vết loét thực nghiệm, lấy mẫu được tiến hành không đau dưới gây mê. Cuối nghiên cứu, thỏ được gây chết nhân đạo bằng gây mê sâu. Nghiên cứu đã được thông qua các hội đồng khoa học.

3. KẾT QUẢ

3.1. Đặc điểm hình thái siêu cấu trúc vết loét trước điều trị



Hình 3.2. Siêu cấu trúc vết loét trước điều trị. Collagen, bó sợi collagen trương phồng, bị đứt đoạn, tan rã (→). TEM x15000 (Thỏ 25)



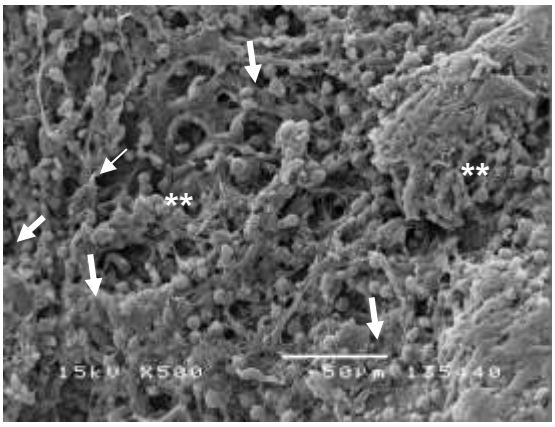
Hình 3.3. Siêu cấu trúc vết loét trước điều trị

Thâm nhập bạch cầu (N), đại thực bào (M). TEM x 12000 (Thỏ 1).

Nhận xét: Các vết loét trước điều trị có hình ảnh siêu cấu trúc với tổn thương chủ yếu là thâm nhập của các tế bào viêm: bạch cầu đa nhân, đại thực bào, chất nền ngoại bào giảm mật độ, các bó sợi collagen bị đứt đoạn, trương phồng, tan rã.

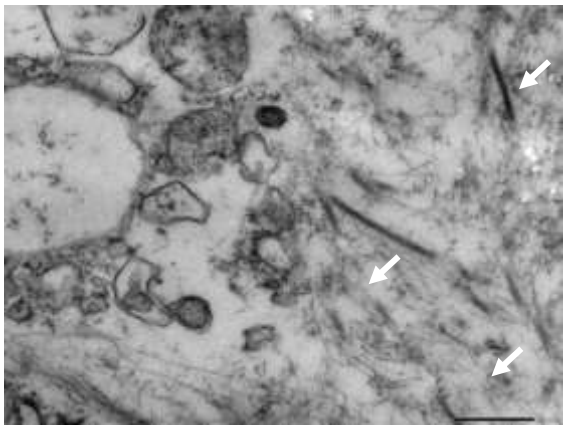
3.2. Đặc điểm hình thái siêu cấu trúc sau 14 ngày điều trị

Nhóm NaCl 0,9%



Hình 3.4. Hình ảnh bề mặt vết loét nhóm NaCl 0,9%, D_{14}

Bạch cầu (→), tơ huyết (**). SEM x500 (Thỏ 20)

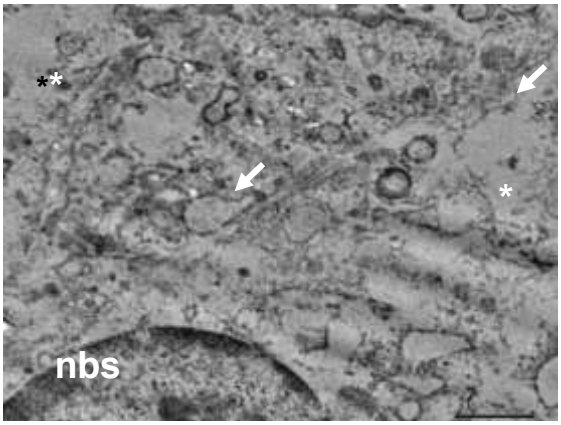


Hình 3.5. Chất nền ngoại bào vết loét nhóm NaCl 0,9%, D_{14}

Hình ảnh sợi collagen bị phá hủy (→). TEM x10000 (Thỏ 7)

Nhận xét: Hình ảnh siêu cấu trúc các vết loét nhóm NaCl 0,9% ngày thứ 14 vẫn còn biểu hiện quá trình viêm, phá hủy chất nền ngoại bào.

Nhóm SSD

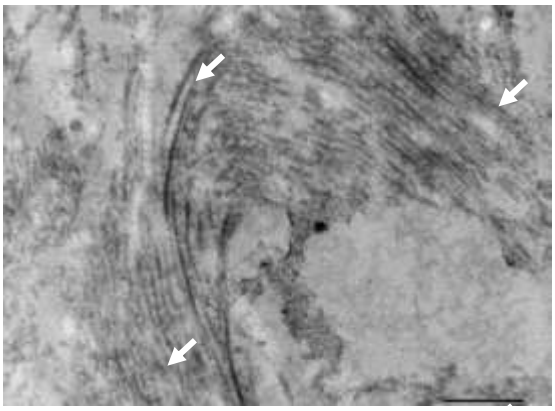


Hình 3.6. Siêu cấu trúc vết loét nhóm SSD, D_{14}

Nguyên bào sợi (nbs) xâm nhập, chất nền ngoại bào mật độ thấp (*), các tơ collagen mới được tạo thành (→). TEM x10000 (Thỏ 14)

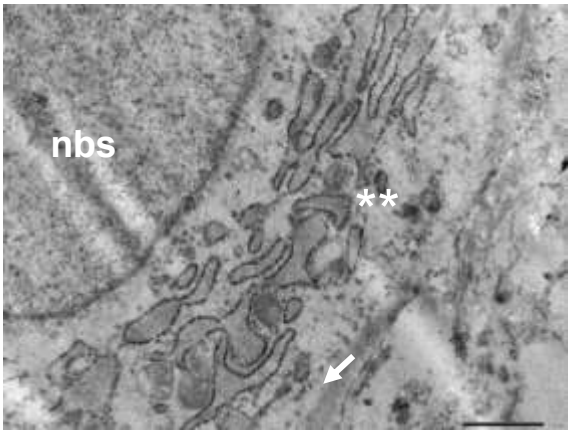
Nhận xét: Vết loét nhóm SSD xuất hiện các nguyên bào sợi di trú, tăng hoạt tính sinh tổng hợp collagen nhưng mật độ chất nền ngoại bào còn thấp.

Nhóm GTK108



Hình 3.7. Một phần chất nền ngoại bào nhóm GTK108, D_{14}

Collagen mới ở ngoại bào (→). TEM x10000 (Thỏ 13)



Hình 3.8. Siêu cấu trúc vết loét điều trị bằng GTK108, D_{14}

Nguyên bào sợi (nbs), lưới nội bào hạt (**), vi tơ collagen (→). TEM x10000 (Thỏ 22)

Nhận xét: Hình ảnh siêu cấu trúc các vết loét điều trị bằng GTK108 cho thấy sự tăng sinh, di trú của các nguyên bào sợi, tăng mạnh mẽ hoạt tính sinh tổng hợp và chế tiết collagen. Collagen mới tổng hợp, sắp xếp có hướng.

3.3. Đặc điểm hình thái siêu cấu trúc sau 21 ngày điều trị

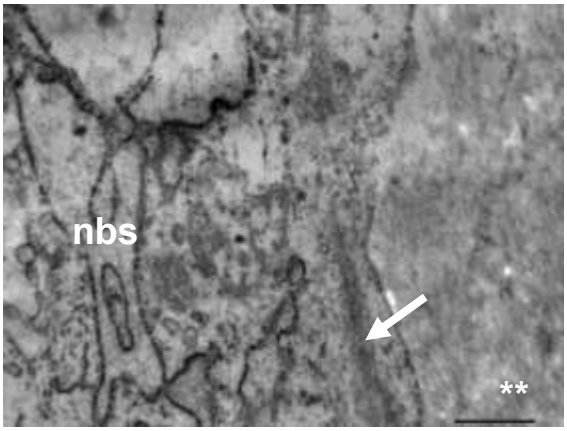
Nhóm NaCl 0,9%

Hình 3.9. Một phần vết loét nhóm NaCl 0,9%, D_{21}

Bào tương nguyên bào sợi (**) tế bào viêm (→). TEM x10000 (Thỏ 25)

Nhận xét: Ngày thứ 21, các vết loét nhóm NaCl 0,9% tăng xâm nhập nguyên bào sợi. Mật độ chất nền ngoại bào thấp, thành phần hữu hình thưa thớt. Còn tế bào viêm.

Nhóm SSD

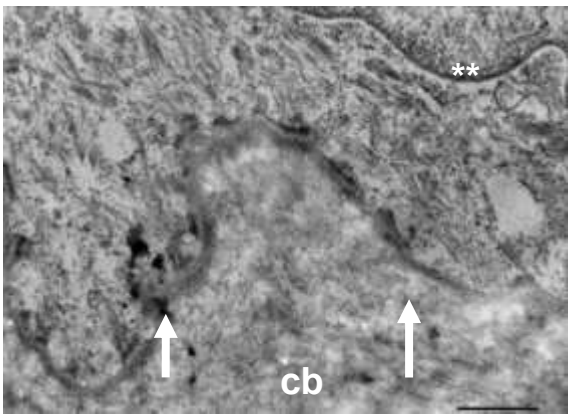


Hình 3.10. Chất nền ngoại bào nhóm SSD, D_{21}

Collagen ngoại bào (**), tơ collagen nội bào (→), nguyên bào sợi (nbs). TEM x10000 (Thỏ 13)

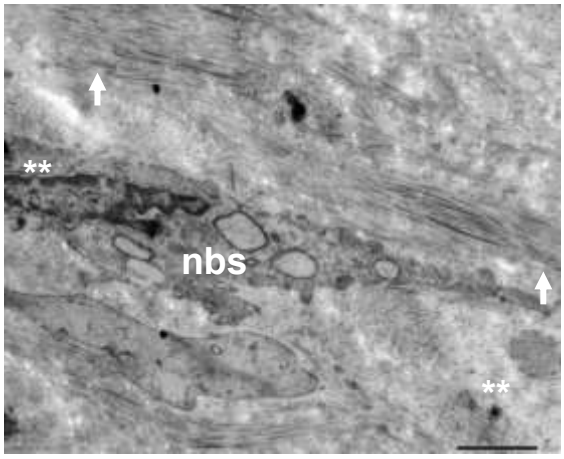
Nhận xét: Ngày thứ 21, ở nhóm điều trị bằng SSD, quá trình tăng sinh biểu hiện mạnh mẽ. Nguyên bào sợi tăng các hoạt tính, tăng chế tiết collagen ra ngoại bào. Collagen ngoại bào hình thành không đồng đều, ở các mức trưởng thành khác nhau.

Nhóm GTK108



Hình 3.11. Siêu cấu trúc vết loét điều trị GTK108, D_{21}

Tế bào đáy (**), màng đáy (→), cb - chân bì. TEM x10000 (Thỏ 18)



Hình 3.12. Một phần chất nền ngoài bào vết loét nhóm GTK108, D_{21}

Nguyên bào sợi thoái hóa (**), các bó collagen ngoại bào (→).TEM x2000 (Thỏ 19)

Nhận xét: Ở ngày thứ 21, các vết loét điều trị bằng GTK108 đã được các tế bào biểu mô che phủ gần như hoàn toàn, cấu trúc màng đáy tương đối hoàn chỉnh. Collagen trưởng thành, tạo thành các bó sợi, có hướng. Mật độ các thành phần hữu hình của chất nền ngoại bào trở lại bình thường.

4. BÀN LUẬN

Quá trình liền vết thương thường trải qua 4 giai đoạn: xung huyết, viêm, tăng sinh và tái tạo. Hình ảnh thường thấy ở các vết loét mạn tính là giai đoạn viêm kéo dài hoặc quá mức, nhiễm trùng dai dẳng, hình thành màng sinh học vi khuẩn kháng thuốc, tế bào chân bì và/hoặc biểu bì mất khả năng đáp ứng với kích thích sửa chữa. Các rối loạn tại chỗ này chính là nguyên nhân làm vết thương không thể tự liền được và trở thành vết thương mạn tính [5], [6].

Hình ảnh ban đầu của các vết loét biểu hiện quá trình thâm nhiễm viêm, hoại tử và phá hủy chất nền ngoại bào, tương đồng giữa nhóm nghiên cứu và các nhóm chứng. Biểu hiện viêm còn tiếp tục kéo dài đến ngày 21 ở nhóm NaCl 0,9%. Quá trình tăng sinh diễn ra chậm chạp khi hình ảnh viêm và hoại tử còn thấy rõ ở ngày thứ 14. Ngày 21, tuy có biểu hiện của tăng sinh nguyên bào sợi, song tế bào viêm vẫn tồn tại.

Ở nhóm chứng SSD, tiến triển của vết loét khá tốt, khi ở ngày 14 đã có sự tăng sinh nguyên bào sợi và tăng hoạt tính sinh tổng hợp collagen, tuy nhiên, mật độ chất nền ngoại bào còn thấp. Hoạt động tăng sinh chỉ thực sự rõ ràng ở ngày thứ 21, nhưng các bó sợi collagen ở các mức trưởng thành khác nhau, không sắp xếp theo trật tự.

Ở nhóm nghiên cứu điều trị bằng GTK108, quá trình tăng sinh diễn ra nhanh chóng, biểu hiện bằng hình ảnh siêu cấu trúc ở ngày thứ 14 đã có các collagen mới trong chất nền ngoại bào, nguyên bào sợi tăng hoạt tính chế tiết collagen, lưới nội bào hạt cho thấy hoạt động của tế bào rất mạnh mẽ. Đến ngày thứ 21, các vết loét nhóm GTK108 đã có hình ảnh siêu cấu trúc như một mô da bình thường với biểu mô che kín vết loét, màng đáy và collagen đã trưởng thành, mật độ chất nền ngoại bào bình thường.

Sự khác biệt giữa hình ảnh siêu cấu trúc của các nhóm đã chứng tỏ hiệu quả của GTK108 trên các vết loét mạn tính so với các nhóm chứng. Kết quả này tương đồng với kết quả của Lương Thị Kỳ Thủy và cộng sự (2014), khi nghiên cứu tác dụng của cao lòng đỏ trứng gà (là một thành phần trong bài thuốc của chúng tôi) điều trị loét da mạn tính trên thỏ [7]. Sự khác biệt ở đây chưa được thể hiện rõ rệt

do thiếu các yếu tố định lượng chỉ tiêu nghiên cứu.

Các kết quả về hình ảnh siêu cấu trúc cũng tương thích với kết quả nghiên cứu tác dụng của bài thuốc GTK108 trên các vết loét mạn tính thực nghiệm về mặt hình thái: giảm diện tích vết loét, tăng tỷ lệ và rút ngắn thời gian liền hoàn toàn vết loét, giúp giảm điểm DESIGN tốt hơn so với các nhóm chứng (p < 0,05) [8].

A (Thỏ 2) B (Thỏ 2) C (Thỏ 5)

Hình 3.13. Kích thước vết loét sau 21 ngày của nhóm GTK108 (A), nhóm SSD (B) và nhóm NaCl 0,9% (C)

Kết quả của chúng tôi cũng thể hiện sự tương đồng khi nghiên cứu mô bệnh học và hoá mô miễn dịch, cho thấy bài thuốc GTK108 giúp giảm quá trình viêm, thúc đẩy quá trình tăng sinh chất nền ngoại bào với việc xuất hiện các bó sợi collagen sắp xếp có hướng, tăng sinh mạch và đẩy nhanh quá trình biểu mô hoá khi so sánh với nhóm chứng [9]. Kết quả của nghiên cứu này khi kết hợp với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, có thể lý giải một phần cơ chế giúp co gọn vết loét thực nghiệm trên động vật một cách hiệu quả, điều này là rất hợp lý.

5. KẾT LUẬN

Theo kết quả nghiên cứu siêu cấu trúc, bài thuốc GTK108 giúp co gọn vết loét mạn tính hiệu quả so với nhóm chứng: Kích thích quá trình biểu mô hoá, giảm nhanh giai đoạn viêm và thúc đẩy quá trình tăng sinh mạch, việc tái tạo chất nền ngoại bào với collagen đã trưởng thành được kích thích nhanh và mạnh mẽ hơn.

Hạn chế của nghiên cứu

Nghiên cứu của chúng tôi chưa định lượng các chỉ tiêu để thể hiện rõ hơn sự khác nhau giữa các nhóm, do nghiên cứu viên chưa có kinh nghiệm về nghiên cứu siêu cấu trúc. Đồng thời, số liệu dùng đối chứng với nghiên cứu của chúng tôi cũng ít do đối tượng, phương pháp, nhất là chất liệu nghiên cứu tương đồng rất hạn chế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Rudolph R., Woodward M., and Hurn I. (1979). Ultrastructure of doxorubicin (Adriamycin)-induced skin ulcers in rats. *Cancer Res*, **39**(**9**), 3689-3693.

2. Nguyễn Bá Tĩnh (2015). Quyển đầu: Các vị thuốc Nam; Quyển IX: Các bệnh nhi khoa; Quyển X: Các bệnh ngoại khoa. *Tuệ Tĩnh toàn tập*. NXB Y học, 40, 341, 387, 402.

3. Frykberg R.G. and Banks J. (2015). Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Adv Wound Care*, 4(9), 560-582.

4. WHO (2009). Basic surgical procedures. *Surgical care at the district hospital*. WHO, 5-1-5-4.

5. Lu F., Wang C., Zhao R., et al. (2018). Review of Stratum Corneum Impedance Measurement in Non-Invasive Penetration Application. *Biosensors*, 8(2), 31.

6. Khavkin J. and Ellis D.A.F. (2011). Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. *Facial Plast Surg Clin N Am*, 19(2), 229-234.

7. Lương Thị Kỳ Thủy, Lê Đình Roanh, Phạm Viết Dự, và cs. (2014). Đánh giá tác dụng điều trị loét da mạn tính của cao TG trên mô hình thực nghiệm. *Tạp Chí Dược Học Cổ Truyền Quân Sự*, 4(2), 15-22.

8. Nguyễn Thu Trang, Đỗ Thuý Hằng, Lương Thị Kỳ Thuỷ và cộng sự (2020), Nghiên cứu hiệu quả điều trị loét da mạn tính về mặt hình thái đại thể của bài thuốc GTK108 trên động vật thực nghiệm. *Tạp chí Y dược Lâm sàng 108*, 15(4).

9. Nguyễn Thu Trang, Lương Thị Kỳ Thuỷ, Nguyễn Thị Mai Phương và cs (2022), Nghiên cứu mô bệnh học và hoá mô miễn dịch vết loét mạn tính trên động vật thực nghiệm điều trị bằng bài thuốc GTK108. *Tạp chí Y học Quân sự*, 359(7-8/2022), 20-24.