

NGHIÊN CỨU HIỆU QUẢ CỦA TRỊ LIỆU HUYẾT TƯƠNG GIÀU TIỂU CẦU TỰ THÂN LÊN BIẾN ĐỔI SIÊU CẤU TRÚC CỦA VẾT THƯƠNG MẠN TÍNH TRÊN KÍNH HIỂN VI ĐIỆN TỬ QUÉT

Nguyễn Tiến Dũng, Nguyễn Ngọc Tuấn

Bệnh viện Bỏng Quốc gia Lê Hữu Trác

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá sự biến đổi siêu cấu trúc của vết thương mạn tính trên kính hiển vi điện tử quét sau trị liệu huyết tương giàu tiểu cầu tự thân.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu dọc, mô tả trước sau điều trị được thực hiện tại Trung tâm Liền vết thương, Bệnh viện Bỏng Quốc gia Lê Hữu Trác từ tháng 5 năm 2019 đến tháng 5 năm 2020.

Ba mươi bệnh nhân với 33 vết thương mạn tính đã được trị liệu huyết tương giàu tiểu cầu. Chúng tôi đã tiến hành sinh thiết mô tại chỗ vết thương mạn tính tại các thời điểm trước khi trị liệu, sau trị liệu 1 tuần và 2 tuần để đánh giá biến đổi siêu cấu trúc của vết thương mạn tính trên kính hiển vi điện tử quét.

Kết quả: Sau trị liệu huyết tương giàu tiểu cầu tự thân tại chỗ vết thương mạn tính tình trạng viêm giảm sau 1 tuần điều trị, tăng sinh nguyên bào sợi và collagen sau 2 tuần điều trị.

Kết luận: Huyết tương giàu tiểu cầu tự thân hỗ trợ và thúc đẩy tăng sinh các tế bào tham gia vào quá trình liền vết thương tại chỗ vết thương mạn tính.

Từ khoá: Vết thương mạn tính, huyết tương giàu tiểu cầu, siêu cấu trúc, kính hiển vi điện tử quét.

ABSTRACT

Objective: We aimed to characterize the ultrastructural of chronic wound response to autologous Platelet - Rich Plasma therapy (PRP).

Methods: We performed a descriptive longitudinal study at the Wound Healing Center of National Burn Hospital, from May 2019 to May 2020. Thirty patients with 33 chronic wounds were was injected subcutaneously inside and around the periphery of the chronic wound by autologous PRP. We biopsied the wound bed tissue before autologous PRP therapy, after 1 and 2 weeks of therapy process to observe the ultrastructural of chronic wounds on Scanning Electron Microscope (SEM).

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Tiến Dũng, Bệnh viện Bỏng Quốc gia Lê Hữu Trác
Email: ntzung_0350@yahoo.com

Ngày nhận bài: 03/4/2021

Ngày phân biện: 09/4/2021

Ngày duyệt bài: 20/4/2021

Results: After autologous PRP therapy, In ultrastructural of the subcutaneous, looking at the inflammatory decreased after 1 week of therapy, and the proliferation of fibroblast and collagen fibers after 2 weeks of therapy.

Conclusion: Autologous PRP supported and promoted the wound healing of a chronic wound.

Keywords: Chronic wound, platelet-rich plasma, ultrastructural, scanning electron microscope.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, huyết tương giàu tiểu cầu được sử dụng khá phổ biến tại các cơ sở y tế để điều trị nhiều mặt bệnh khác nhau như thoái hoá khớp, lão hoá da... Đặc biệt trong chuyên ngành liền vết thương, huyết tương giàu tiểu cầu được cho là có vai trò tích cực tham gia vào cơ chế của quá trình liền vết thương do tiểu cầu khi hoạt hoá sẽ giải phóng ra các yếu tố tăng trưởng như EGF, TGF, VEGF, FGF, PDGF, tham gia vào quá trình cấu trúc lại chất nền ngoại bào một thành phần quan trọng của trung bì da [1].

Vết thương mạn tính có thể do nhiều nguyên nhân khác nhau nhưng đều có một đặc điểm chung đó là quá trình liền vết thương bị trì hoãn, có giai đoạn viêm kéo dài và cấu trúc chất nền ngoại bào ở lớp trung bì da bị tổn thương nặng nề dẫn tới quá trình liền vết thương không thực hiện theo tiến trình như bình thường được [2, 3].

Hiện nay, ở Việt nam kỹ thuật trị liệu huyết tương giàu tiểu cầu điều trị vết thương mạn tính đã được đưa vào danh mục bảo hiểm y tế. Cũng có nhiều nghiên cứu đánh giá vai trò của huyết tương giàu tiểu cầu trong điều trị vết thương mạn tính được công bố, nhưng chưa có nghiên cứu nào đánh giá sâu về sự biến đổi của siêu

cấu trúc tại chỗ vết thương mạn tính trên kính hiển vi điện tử quét.

Bởi vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài này nhằm mục tiêu đánh giá vai trò của huyết tương giàu tiểu cầu tự thân lên diễn biến siêu cấu trúc mô tại chỗ vết thương mạn tính thông qua kính hiển vi điện tử quét.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

30 bệnh nhân (BN) từ 18 - 65 tuổi có vết thương mạn tính (VTMT) vào điều trị tại Trung tâm Liền vết thương, Bệnh viện Bông Quốc gia từ tháng 5 năm 2019 đến tháng 5 năm 2020.

Tiêu chuẩn lựa chọn: Những VTMT không có triệu chứng nhiễm khuẩn trên lâm sàng (như sưng, nóng, đỏ, đau), vết thương không tổn thương lộ gân xương.

Tiêu chuẩn loại trừ: Phụ nữ có thai, bệnh nhân trong tình trạng có những bệnh lý toàn thân nặng, đang dùng thuốc chống đông, có HbsAg, HcV, HIV dương tính.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Trong nghiên cứu này chúng tôi triển khai mô hình nghiên cứu dọc, có so sánh các chỉ tiêu theo dõi trước và sau trị liệu PRP tự thân.

- Tất cả các bệnh nhân nghiên cứu đều được lựa chọn ngẫu nhiên, khi vào viện, được khai thác các yếu tố liên quan đến quá trình bệnh lý như nguyên nhân, thời gian tồn tại vết thương, những bệnh lý kết hợp kèm theo và đặc điểm tại chỗ VTMT. Bệnh nhân cũng được điều trị các bệnh lý kết hợp theo phác đồ chung của bệnh viện, chăm sóc tại chỗ vết thương đến khi đạt tiêu chuẩn trị liệu PRP.

- *Trị liệu PRP tự thân điều trị VTMT:*

+ Chuẩn bị PRP tự thân: Chúng tôi đã tiến hành tách PRP từ máu toàn phần của bệnh nhân bằng bộ Kit New-PRPpro và theo quy trình sử dụng bộ Kit của Genne World Corp., Vietnam.

+ Trị liệu PRP tại chỗ VTMT: Tiến hành tiêm PRP vào mô dưới da, xung quanh của VTMT. Băng vết thương bằng các băng có tính kháng khuẩn (Betablast Siver, Aquacel Ag...). Thay băng vết thương sau 2 - 3 ngày. Sau đó tiêm PRP tự thân nhắc lại 1 lần/tuần, trong 3 tuần.

- *Đánh giá biến đổi siêu cấu trúc mô VTMT qua kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscope - SEM):*

+ Thời điểm đánh giá: T0: Trước khi trị liệu PRP; T1: Sau trị liệu PRP 1 tuần; T2: Sau trị liệu PRP 2 tuần.

+ Chuẩn bị mẫu: Sinh thiết mô VTMT tại vùng bờ mép vết thương sao 50% mảnh sinh thiết là nền vết thương và 50% là da lành mép vết thương bằng kim sinh thiết Epitheasy của hãng Medax - Italia có đường kính 5mm.

+ Xử lý mẫu và đánh giá qua SEM: Mảnh sinh thiết được cố định ngay trong dung dịch glutaraldehyde 2,5% trong

khoảng 2 - 6 giờ. Tiến hành pha lại mẫu với kích thước 0,3 x 0,3 x 0,3cm. Rửa qua đệm Cacodylate 0,3M. Cố định lần 2 trong acid Osmic 1% trong 2 giờ. Rửa qua đệm Cacodylate 0,3M.

Thực hiện các bước chuyển tiếp qua cồn với nồng độ tăng dần (50^o, 60^o, 70^o, 80^o, 90^o, 100^o). Chuyển tiếp mẫu qua T-butyl dạng lỏng rồi đặt vào buồng nhiệt độ - 5^oC trong 1 giờ (để T butyl chuyển sang dạng rắn), chuẩn bị cho quá trình làm khô mẫu bằng máy JFD - 310 của hãng JEOL của Nhật Bản (trong 2- 3 giờ). Sau khi làm khô mẫu thì gắn mẫu lên, mang mẫu bằng băng dính carbon, mạ phủ vàng mẫu bằng máy JFC - 1200 của hãng JOEL. Soi trên kính hiển vi điện tử quét. Đánh giá biến đổi siêu cấu trúc bề mặt VTMT tại các thời điểm nghiên cứu.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu thu được của nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm Excel-Office 2010.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm bệnh nhân nghiên cứu

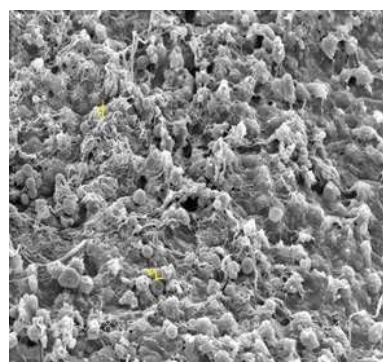
30 bệnh nhân được trị liệu PRP tự thân, trong đó có 21 (70%) BN là nam và 9 (30%) BN là nữ, bệnh nhân có tuổi trung bình là $49,52 \pm 12,38$ tuổi. Những bệnh nhân này có 33 vết thương trong đó tại vùng chi thể (10 (30,3%)), vùng cùi cụt (21, (63,63%)), vùng đầu (1 (3,03%)) và lưng (1 (3,03%)). Diện tích vết thương trung bình là $55,62 \pm 29,81\text{cm}^2$ (Min-max: 25 - 108) (Bảng 1). Nguyên nhân gây nên VTMT có 3 (10%) vết loét tĩnh mạch, 5 (16,67%) vết loét do đáí tháo đường, 20 (66,67%) vết loét do tì đề và 2 (6,67) vết loét khác.

Bảng 3.1. Thời gian tồn tại, vị trí và kích thước VTMT

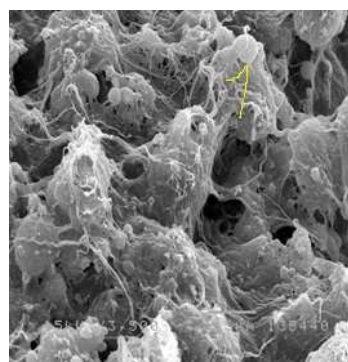
Thời gian tồn tại (tuần)	Số BN (n)	Phần trăm (%)
4 - 6	10	33.33
7 - 9	17	56.67
9 - 12	3	10
Vị trí VTMT		
Chi thể	10	30.3
Cùng cụt	21	63.63
Lưng	1	3.03
Đầu	1	3.03
Kích thước VT (n=33)	X±SD	Min-max
	55.62 ± 29.81cm ²	25 - 108

3.2. Biến đổi siêu cấu trúc của VTMT trên SEM trước và sau điều trị PRP tự thân

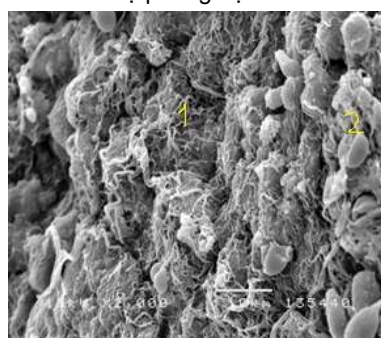
- Thời điểm T0: Bề mặt vết thương (VT) bị che phủ dày đặc hoại tử tơ huyết, hồng cầu thoát mạch và nhiều bạch cầu Lympho (hình 1).



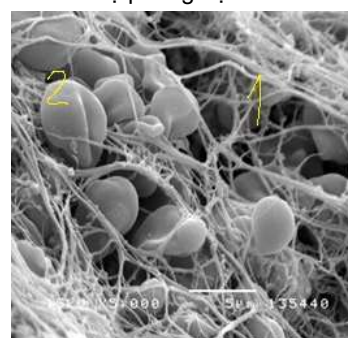
a. Độ phóng đại 750X



b. Độ phóng đại 3500X



c. Độ phóng đại 2000X

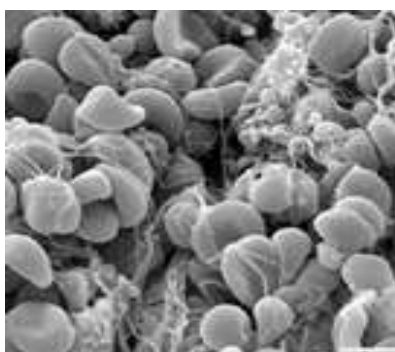


d. Độ phóng đại 5000X

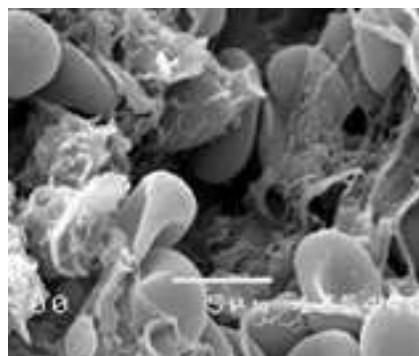
Hình 1. Hình ảnh SEM của VTMT ở thời điểm T0
(a,b: BN Cao X.H. 22 tuổi, SBA 3448; c,d: BN Ngô Th. S. 59 tuổi, SBA 0011)

- *Thời điểm T1*: Sau 1 tuần trị liệu PRP tự thân, bề mặt VTMT đọng ít tơ huyết, hồng cầu thoát mạch nhưng số lượng giảm

hẳn so với thời điểm T0. Xuất hiện bạch cầu các bạch cầu đa nhân trung tính và Mono trên bề mặt VTMT (*hình 2.*)



a. Độ phóng đại 2000X



b. Độ phóng đại 3500X



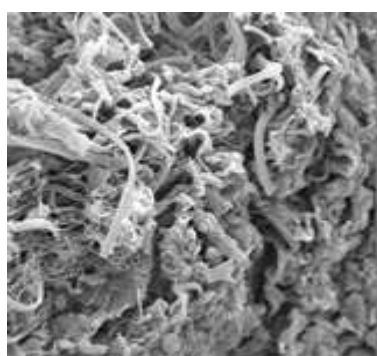
c. Độ phóng đại 1500X



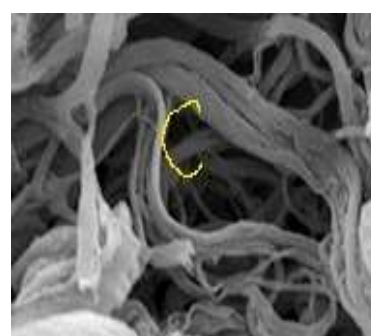
d. Độ phóng đại 5000X

**Hình 2. Hình ảnh SEM của VTMT tại thời điểm T1
(a, b: BN Trần. V.Th, SBA 3202; c và d: BN Hứa M.H. 46 tuổi, SBA 1336)**

- *Thời điểm T2*: Hình ảnh SEM của VTMT sau 2 tuần điều trị liệu PRP tự thân thấy các sợi collagen (c) tăng sinh mạnh, sắp xếp thành bó, xuất hiện các nguyên bào sợi không thấy hình ảnh bạch cầu cũng như các hồng cầu thoát mạch như ở thời điểm T0 và T1 (*hình 3*).



a. Độ phóng đại 750X



b. Độ phóng đại 5000X

Hình 3. Hình ảnh SEM của VTMT tại thời điểm T2, BN Trần Xuân Tr. 36 tuổi, SBA 2403

4. BÀN LUẬN

PRP được sử dụng lần đầu tiên trong y học tái tạo từ những năm 1980. Năm 1999 tác giả Anitua là người lần đầu tiên mô tả một các chi tiết kỹ thuật tách PRP từ máu toàn phần [4]. Đối với VTMT, PRP được sử dụng lần đầu tiên bởi tác giả Martinez và cộng sự năm 2016 [5].

Ngày nay, kỹ thuật tách PRP từ khối máu toàn phần trở nên phổ biến và được sử dụng thông dụng trong thực hành lâm sàng. Việc áp dụng PRP trong điều trị vết thương chủ yếu dùng đường tiêm hoặc đắp trên bề mặt, tuy nhiên hiện nay cũng chưa có nghiên cứu nào so sánh hiệu quả của hai phương pháp này. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành tiêm PRP xung quanh vết thương.

Về cấu trúc VTMT theo Nguyễn Tiến Dũng và cộng sự, khi tiến hành nghiên cứu đặc điểm tại chỗ VTMT đã nhận định trên hình ảnh cấu trúc VTMT soi trên tiêu bản nhuộm HE, bề mặt VTMT dưới lớp hoại tử là màng fibrin, tại chỗ xâm nhiễm nhiều tế bào viêm chủ yếu là tế bào Lympho và đại thực. Các mạch máu xung huyết, nguyên bào sợi, collagen thừa thớt và chỉ tập chung ở một số vị trí [6].

Trong nghiên cứu này, hình ảnh siêu cấu trúc trên SEM của VTMT trước khi tiến hành trị liệu PRP, nhận thấy mặc dù được chuẩn bị nền vết thương rất kỹ càng bằng điều trị toàn thân, tại chỗ thay bằng đắp các vật liệu tiên tiến có tác dụng kháng khuẩn nhưng tình trạng viêm mạn tính vẫn thể hiện rõ với sự xuất hiện của nhiều tế bào Lympho tại chỗ vết thương, các hồng cầu thoát mạch cùng các sợi tơ huyết (hình 1). Chúng tôi chưa thấy những

tế bào thường xuất hiện tham gia vào cấu tạo chất nền ngoại bào như nguyên bào sợi, collagen...

Khi tiểu cầu được hoạt hoá và tiêm tại chỗ vết thương sẽ tiết ra các yếu tố tăng trưởng tham gia vào quá trình liền vết thương và tái tạo mô. Các yếu tố tăng trưởng được trữ trong các hạt alpha và khi được giải phóng sẽ tham gia thúc đẩy phát triển, tăng sinh và biệt hóa các tế bào khác nhau. Nhờ vậy làm gia tăng collagen, elastin, chất nền nội bào, mạch máu tham gia vào quá trình liền vết thương [7]. Đáp ứng diễn ra ở những vết thương đang liền, các nguyên bào sợi di chuyển vào nền vết thương và tiết ra collagen loại III, sau đó được thay thế bằng collagen loại I. Sự tổng hợp và lắng đọng các collagens này thực hiện bởi các nguyên bào sợi được kích thích bởi các yếu tố như TGF- β 1, - β 2 và - β 3, PDGF, IL-1 α , -1 β và -4, và tryptase tế bào mast. Khi collagen đã được tạo ra đầy đủ, quá trình tổng hợp của nó sẽ ngừng lại; do đó, trong quá trình sửa chữa mô, sản xuất cũng như sự phân hủy của collagens nằm dưới sự kiểm soát chính xác về thời gian và không gian [7].

Kết quả trong nghiên cứu này, cũng phản ảnh tiến trình liền vết thương diễn ra thuận lợi hơn sau trị liệu PRP tự thân. Khi hình ảnh siêu cấu trúc trên SEM của VTM sau 1 tuần tình trạng viêm mạn tính được cải thiện thể hiện là không thấy các tế bào viêm Lympho mà có sự xuất hiện của bạch cầu đa nhân trung tính và bạch cầu Mono (hình 2). Sang tuần thứ 2 sau trị liệu PRP tự thân thấy xuất hiện, tăng sinh các nguyên bào sợi và sợi collagen được sắp xếp thành từng bó (hình 3).

Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu trên lâm sàng đã được công bố trước đây của chúng tôi khi đánh giá hiệu quả của PRP trên diễn biến tại chỗ VTMT. Trên lâm sàng chúng tôi cũng nhận thấy sau 1 tuần trị liệu PRP, số VTMT có tổ chức hạt tăng lên, sau 2 tuần xuất hiện tình trạng biểu mô hoá làm thu hẹp kích thước vết thương [8].

5. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu tác dụng của trị liệu huyết tương giàu tiểu cầu tự thân lên biến đổi hình ảnh siêu cấu trúc trên kính hiển vi điện tử quét (SEM) trên vết thương mạn tính của 30 bệnh nhân điều trị tại Trung tâm Liền vết thương/Bệnh viện Bỏng Quốc gia từ tháng 5 năm 2019 đến tháng 5 năm 2020, chúng tôi rút ra một số kết luận sau: Sau trị liệu huyết tương giàu tiểu cầu tự thân tình trạng viêm mạn tính và quá trình liền vết thương tại chỗ vết thương mạn tính được cải thiện rõ rệt với biểu hiện là giảm số lượng các tế bào viêm Lympho và xuất hiện nhiều nguyên bào sợi và collagen tại chỗ vết thương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Nurden AT, Nurden P, Sanchez M, Andia I, Anitua E.** Platelets and wound healing. *Front Biosci.* 2008;13:3532-3548.
2. **Phillips T. Ulceras.** In: **Bolognia JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors.** *Dermatologia.* 2nd ed. London: Mosby. 2008;1597-1614.
3. **Lazaro JL, Izzo V, Meaume S, Davies AH, Lobmann R, Uccioli L.** Elevated levels of matrix metalloproteinases and chronic wound healing: an updated review of clinical evidence. *J Wound Care.* 2016;25:277-287.
4. **Anitua E.** Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14:529-535.
5. **Martinez-Zapata MJ, Martí-Carvajal AJ, Solà I, et al.** Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;5:CD006899
6. **Nguyễn Tiến Dũng, Đinh Văn Hân, Quán Hoàng Lâm.** Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng và vi thể vết thương mạn tính. *Y dược lâm sàng* 108. 2016; Tập 11- Số 5, 79-88.
7. **Lisa M, Coussens, Zena Werb, Inflammation and cancer.** *Nature* 2002;420:860-867.
8. **Nguyen Ngoc Tuan, Nguyen Tien Dung et al.** The Effectiveness of Platelet - Rich Plasma (PRP) on the Chronic Wound Healing Process: A Descriptive Longitudinal Study at the Wound Healing Center of National Burn Hospital. 2020; 6: 13-25.