

# TỔNG QUAN MÔ HÌNH NGHIÊN CỨU VẾT THƯƠNG THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ QUÁ TRÌNH LIÊN VẾT THƯƠNG

## PHẦN 1: TỔNG QUAN VỀ MỘT SỐ MÔ HÌNH NGHIÊN CỨU LIÊN VẾT THƯƠNG TRÊN ĐỘNG VẬT

**Nguyễn Ngọc Tuấn**

*Bệnh viện Bông quốc gia Lê Hữu Trác*

Liên vết thương (LVT) là quá trình phức tạp, chủ yếu do tính chất đa yếu tố của môi trường vết thương (VT) và sự phức tạp của quá trình liền, có sự tích hợp nhiều loại tế bào và gồm nhiều giai đoạn chồng chéo nhau (viêm, tăng sinh, tái biểu mô và tái tạo). Có nhiều mô hình tiền lâm sàng tiến hành trên động vật (chuột, thỏ, lợn...) để cố gắng mô phỏng các vết thương cấp tính hoặc suy giảm (như vết thương do tiểu đường và dinh dưỡng...) ở người [1]. Sau khi xác định phương pháp gây vết thương, cần lựa chọn các phương pháp nghiên cứu thích hợp, cho phép theo dõi tiến triển vết thương theo thời gian. Việc đánh giá có thể bằng các quy trình không xâm lấn như theo dõi lâm sàng, hình ảnh, lý sinh và/hoặc bằng các quy trình xâm lấn (sinh thiết vết thương).

Bài tổng quan gồm hai phần chính:

Phần 1: Tổng quan về một số mô hình nghiên cứu liền vết thương trên động vật.

Phần 2: Các phương pháp đánh giá tiến triển vết thương được sử dụng nhiều nhất.

### 1. ĐẠI CƯƠNG LIÊN VẾT THƯƠNG<sub>1</sub>

Vết thương được định nghĩa là sự phá vỡ tính liên tục của tế bào, giải phẫu và

chức năng của một mô sống và có thể gây ra do yếu tố vật lý, hóa học, nhiệt, vi sinh vật hoặc miễn dịch học. Nói cách khác, vết thương là sự phá vỡ tính toàn vẹn của biểu mô và có thể đi kèm với sự phá vỡ cấu trúc và chức năng của mô bình thường bên dưới. Để phục hồi cấu trúc của mô bị thương, phải xảy ra một quá trình phức tạp liên quan đến sự di chuyển, tăng sinh, tương tác và biệt hóa của nhiều loại tế bào, tương tác các phân tử sinh học, tổng hợp các thành phần nền matrix và mạng lưới tín hiệu phức tạp [2, 3].

Tương tác tế bào với môi trường là hai chiều và động, tế bào có thể điều chỉnh cấu trúc và thành phần của chất nền ngoại bào (extra cellular matrix- ECM) và ngược lại, EMC định hướng hình thái và hành vi của tế bào trong quá trình liền vết thương (LVT) và cân bằng nội môi mô. ECM có cấu trúc ba chiều, bao gồm các đại phân tử ngoại bào như collagen, elastin, fibronectin, vitronectin, integrin và laminin tạo cấu trúc, hỗ trợ sinh hóa và tạo neo đậu cho các tế bào xung quanh [1].

Sự tương tác ECM và tế bào nhờ sự hiện diện của các thụ thể bề mặt tế bào xuyên màng là integrin. Integrin có vai trò quan trọng trong biệt hóa, di chuyển và tăng sinh tế bào trong LVT; kết dính tế bào thông qua cơ chế truyền tín hiệu hai chiều giữa tế bào và ECM. Các integrin quan trọng nhất không thể thiếu trong LVT và các tế bào biểu hiện bao gồm  $\beta 3$ ,  $\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  (nguyên bào sợi, tế bào sừng),  $\alpha 9$ ,  $\alpha 11\beta 1$

*Chịu trách nhiệm:* Nguyễn Ngọc Tuấn, Bệnh viện Bông quốc gia Lê Hữu Trác

Email: ngoctuan64@gmail.com

Ngày nhận bài: 07/10/2021; Ngày nhận xét: 19/11/2021; Ngày duyệt bài: 30/1/2021

<https://doi.org/10.54804/yhthvb.5.2021.75>

(nguyên bào sợi),  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha \nu\beta 5$ ,  $\alpha \nu\beta 6$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  (tế bào sừng),  $\alpha 3\beta 1$  (tế bào sừng, nội mô),  $\alpha \nu\beta 3$  (tế bào nội mô) và  $\alpha \nu\beta 2$  (bạch cầu trung tính, bạch cầu đơn nhân [4]).

Laminin là nhóm protein khác trong ECM, là glycoprotein nhiều nhất của màng đáy, có vai trò thiết yếu trong việc thiết lập cấu trúc và ổn định mô, cung cấp cho tế bào một khung cấu trúc; góp phần vào tạo mạch và tái biểu mô. Laminin-8 ( $\alpha 4\beta 1\gamma 1$ ), laminin-10 ( $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ ) và laminin-5 ( $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ ) là các laminin chính tham gia tích cực vào quá trình sửa chữa vết thương [5].

Trong quá trình tạo mạch, laminin-8 thúc đẩy tế bào nội mô gắn kết, di chuyển và tạo ống mạch ở da, laminin-10 biểu hiện nhiều trong các mạch máu quanh vết thương. Trong giai đoạn biểu mô hoá, các laminin tạo chất nền cho tế bào sừng biểu mô di chuyển và che phủ vết thương, tái lập hàng rào bảo vệ cơ thể. Trong quá trình di chuyển, tế bào sừng ở bờ mép lắng đọng laminin-5, laminin chính trong các mô biểu mô, có chức năng như một đường dẫn cho phép các tế bào sừng tiếp theo di chuyển [5].

Liên vết thương cấp tính là một quá trình được điều chỉnh tốt, bao gồm 3 giai đoạn chồng chéo (viêm, tăng sinh và tái tạo sửa chữa), có tương tác các sự kiện ở mức phân tử, tế bào và ngoại bào, kết thúc bằng việc đóng vết thương trong vòng vài ngày hoặc vài tuần [6].

Khi liên vết thương không diễn ra như mong đợi, vết thương bị đình trệ ở giai đoạn viêm hoặc mất cân bằng giữa Metalloproteinase (MMPs) và các chất ức chế metalloproteinase (TIMP), đặc biệt là trong giai đoạn hình thành mô, tạo vết thương mạn tính (VTMT). Căn nguyên của VTMT đa dạng, nhưng trên 80% liên quan đến suy mạch, huyết áp cao hoặc đái đường. Hầu hết VTMT có biểu hiện và tiến triển giống nhau do cơ chế bệnh sinh đa yếu tố: Thiếu oxy mô cục bộ, xâm nhập/xâm

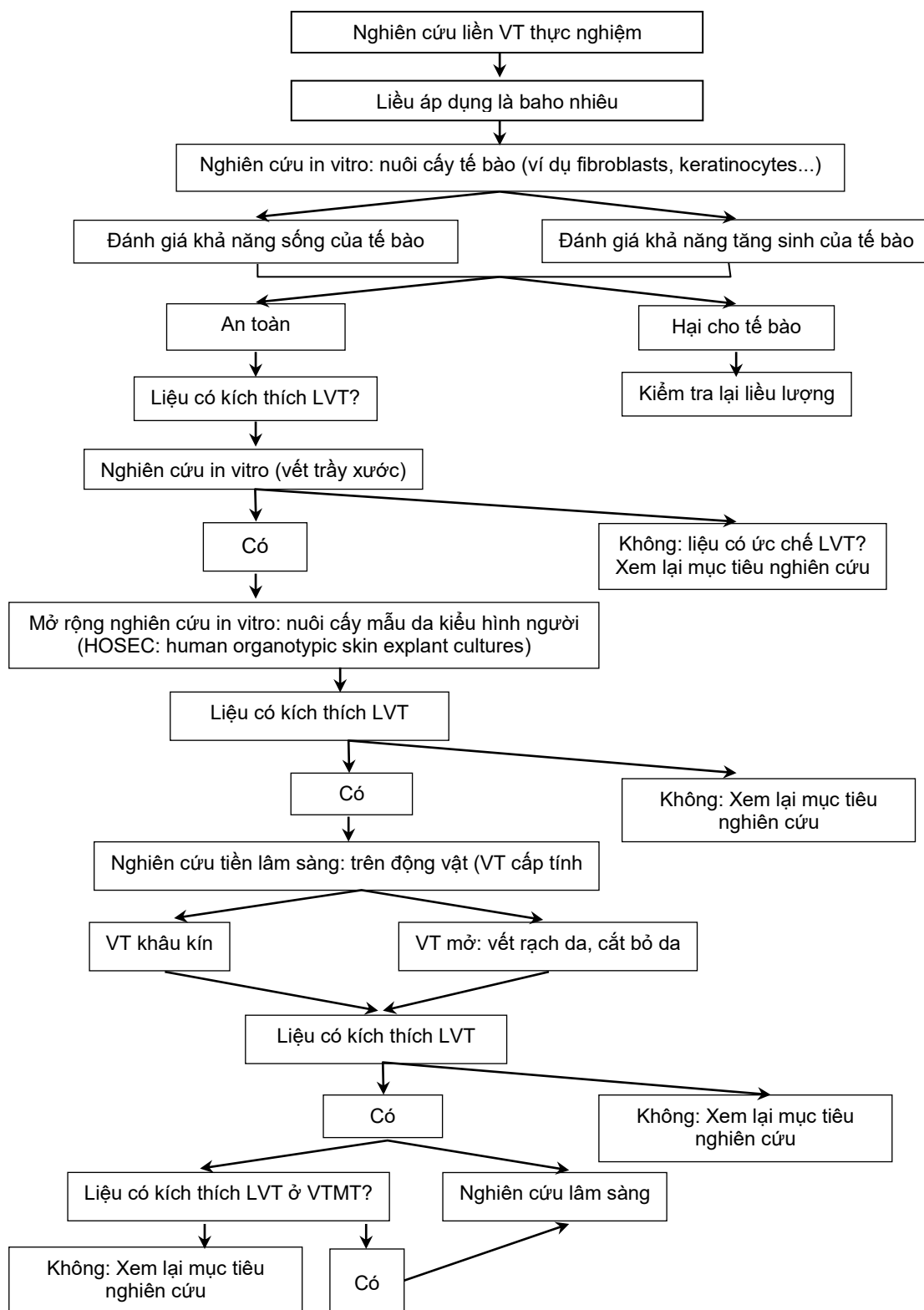
lấn của vi khuẩn, tổn thương tái tưới máu do thiếu máu cục bộ lặp đi lặp lại và những thay đổi cấp độ tế bào và hệ thống [7].

Nghiên cứu sinh lý bệnh LVT, phát triển các công cụ và quy trình mới theo dõi LVT góp phần tối ưu hóa phương pháp điều trị và đạt được kết quả tốt hơn cho bệnh nhân. Việc khảo sát bất kỳ quá trình sinh lý nào phụ thuộc vào việc sử dụng các mô hình LVT in vitro và in vivo.

Trong quá trình nghiên cứu LVT, cần xem xét một số vấn đề liên quan đến thiết kế, bao gồm mục tiêu nghiên cứu, loại vết thương, đặc điểm mẫu và khả năng tiếp cận, chi phí, thời gian và cơ sở vật chất sẵn có. Hơn nữa, sự kết hợp của nhiều phương pháp đánh giá vết thương sẽ làm tăng độ tin cậy và tính khách quan của kết quả; cung cấp hiểu biết sâu hơn về các cơ chế liên quan đến việc sửa chữa mô. Ngoài ra, khi một mô hình LVT thích hợp được chọn ngay từ đầu thử nghiệm một sản phẩm mới, thời gian thử nghiệm có thể giảm xuống, cần ít động vật và vật tư hơn, do đó giảm chi phí và tổng giá trị cho sản phẩm cuối cùng [1, 2, 8].

## 2. MÔ HÌNH GÂY VẾT THƯƠNG THỰC NGHIỆM

Việc sử dụng động vật làm mô hình thí nghiệm trong các nghiên cứu sinh học khác nhau để chuyển đổi sang sinh lý con người ban đầu được Bernard mô tả vào năm 1865. Theo thời gian, những điểm tương đồng đáng chú ý về giải phẫu và sinh lý giữa người và động vật đã khuyến khích nhiều nghiên cứu tìm hiểu một loạt các cơ chế và liệu pháp điều trị trong các mô hình động vật trước khi chuyển sang người. Các mô hình LVT thực nghiệm đã được phát triển trong nhiều thập kỷ, thường được chia thành hai nhóm: In vitro và mô hình động vật (in vivo hoặc tiền lâm sàng), mỗi mô hình có những ưu điểm và khuyết điểm riêng [3]. Hình 1 mô tả một thiết kế tổng thể để hỗ trợ các nhà nghiên cứu lựa chọn các mô hình chữa LVT khác nhau.



Hình 1. Các bước tiến hành nghiên cứu liên vết thương

Mô hình in vitro như nuôi cấy tế bào, mô hình vết thương và nuôi cấy mẫu da rất cần thiết trong một số nghiên cứu, kết quả quan trọng sẽ dẫn đến nghiên cứu tiếp theo.

Các mô hình in vivo liên quan đến việc thay băng vết thương cho động vật và quan sát LVT theo thời gian, cung cấp mô phỏng vết thương cấp hoặc mạn tính tương tự ở người [1, 3].

Mô hình nghiên cứu trên động vật phải tuân theo nguyên tắc 3R (*Replacement, reduction and refinement* - thay thế, giảm thiểu và sàng lọc) để đảm bảo tuân thủ, tôn trọng quyền lợi, đối xử có đạo đức và nhân đạo động vật.

Cụ thể như sau:

+ Thay thế: Sử dụng động vật không có tri giác (ví dụ như cá) hoặc các vật liệu hơn là động vật sống có ý thức.

+ Giảm thiểu: Giảm số lượng động vật trong thí nghiệm hoặc quy trình.

+ Sàng lọc: Sử dụng các kỹ thuật để giảm tỷ lệ hoặc số lượng động vật đau đớn và đau khổ [9].

Mô hình in vivo vẫn là mô hình dự đoán tốt nhất để nghiên cứu LVT, cho phép mô tả thực tế môi trường vết thương bao gồm các loại tế bào khác nhau, các tín hiệu và tương tác nội tiết. Căn cứ lựa chọn mô hình dựa vào khả năng tái tạo của tổn thương, khả năng nhiều cuộc điều tra, khả năng thu được nhiều mẫu sinh thiết, khả năng tương thích với cơ sở động vật, dễ dàng xử lý và thời gian cần thiết để thu được kết quả có giá trị. Mô hình lý tưởng là mô hình đại diện cho một số khía cạnh nhất định của sinh lý con người nhưng không yêu cầu thí nghiệm trên người tình nguyện [1].

*Một số đặc điểm giải phẫu và sinh lý của động vật:*

- Động vật nhỏ thường có thời gian LVT nhanh hơn so với người, và do đó thời gian thí nghiệm tính theo ngày, trái ngược với hàng tuần hoặc hàng tháng trong các nghiên cứu trên người [1].

- Chuột cống và chuột nhắt là loài được sử dụng rộng rãi nhất. Mặc dù có sự khác biệt về cấu trúc và sinh lý học loài gặm nhấm so với da người, các nghiên cứu LVT vẫn có thể cung cấp thông tin hữu ích [1]. Chuột cống có kích thước cơ thể lớn hơn và ít dễ bị căng thẳng hơn khi tiếp xúc với con người. Động vật gặm nhấm dễ nuôi, đề kháng tốt có thể tiến hành nhiều đánh giá với nhiều liệu pháp điều trị.

Da chuột có các lớp chính như của da người (ví dụ: Biểu bì, hạ bì) và cung cấp những hiểu biết chính về các con đường tín hiệu liên quan đến quá trình chữa bệnh do nhiều loại thuốc thử dành riêng cho chuột và tính khả thi chuyển gen ở chuột. Chuột cũng có chung một số đặc điểm sinh lý và bệnh lý với con người, bao gồm tim mạch, cơ xương và các hệ thống cơ quan nội tạng khác. Ngoài ra, tỷ lệ mắc bệnh của chuột trong nghiên cứu là tương đối thấp do thời gian chữa bệnh giảm nhiều và hệ thống miễn dịch vượt trội [10]. Bên cạnh đó, chuột có kích thước nhỏ, rẻ, dễ kiếm và dễ bảo quản, sinh sản nhanh.

- Da của động vật gặm nhấm đặc biệt có một lớp cơ mỏng *panniculus carnosus* (tương tự chỉ có ở cổ người), tạo ra sự co lại vết thương nhanh chóng sau khi bị thương. Ngược lại, LVT ở người chủ yếu thông qua tái biểu mô hóa và tạo mô hạt, đây là khác biệt quan trọng với LVT ở loài

gặm nhấm. Ngoài ra, có sự khác biệt về giới tính trong giải phẫu da và sinh lý học ở người. Ví dụ, da nam giới khỏe hơn 40% do lớp trung bì (derme) dày hơn, nữ giới lại có thượng bì (epiderrme) và lớp hạ bì dày hơn. Dẫu vậy, mô hình động vật góp phần đáng kể vào sự hiểu biết LVT [11].

Khi sử dụng loài gặm nhấm, chuột cống là lựa chọn tốt hơn chuột nhắt. Chuột nhắt có một vài khác biệt về da và kích thước nhỏ hơn chuột cống. Da chuột nhắt mỏng hơn, có ít lớp tế bào sừng hơn và vết thương sẽ liền trong khoảng 7 ngày, trong khi ở chuột cống, LVT kéo dài hơn trong khoảng 12 - 14 ngày. Kích thước vết thương phải tỷ lệ thuận với kích thước động vật, do đó, vết thương ở chuột nhắt nhỏ hơn ở chuột cống và sẽ nhanh liền. Tuy nhiên, với thí nghiệm chỉ yêu cầu kích thước vết thương tối thiểu, chuột nhắt sẽ phù hợp hơn. Khi cần kích thước vết thương lớn hơn, một con vật lớn hơn, chẳng hạn như chuột cống hoặc thỏ sẽ phù hợp hơn vì một con vật có thể gây ra nhiều vết thương [1].

Mặc dù mô hình chuột có những ưu điểm cụ thể nhưng cũng không thể mô phỏng hoàn toàn quá trình LVT ở người. Da chuột lông lẻo với cấu trúc lông rậm rạp. Liền vết thương ở chuột xảy ra chủ yếu thông qua sự co lại của vết thương và sự hiện diện của các tế bào tiền thân rất phong phú từ lớp lông dày trên da, tạo điều kiện cho liền da và sừng hóa nhanh chóng. Để giảm bớt vấn đề co thắt vết thương, có thể sử dụng các biện pháp cố định mép da như dùng ghim bấm, khâu mép da... Ngoài ra, có sự khác biệt hệ thống chemokine và hệ thống thụ thể chemokine giữa người và chuột như chemokine IL-8, peptide kích

hoạt bạch cầu trung tính-2, chất hóa trị tế bào T cảm ứng và chất hóa trị monocyte... Đây là những marker quan trọng LVT, gây ra các hiện tượng viêm [10].

- Thỏ là động vật được sử dụng trong nhiều năm cho mô hình LVT, đặc biệt mô hình chuyên biệt vết thương ở tai thỏ. Vết thương được tạo ra bởi một sinh thiết toàn bộ da, bao gồm tổn thương lớp biểu bì, hạ bì và sụn. Ưu điểm: Liền vết thương xảy ra từ bờ mép vào trong bằng tái biểu mô hóa, không có sự co kéo như các mô hình khác. Hơn nữa, mô hình này làm tăng khả năng sử dụng một số lượng nhỏ động vật, cung cấp đủ dữ liệu cho các lần tái tạo bên trong động vật: Ví dụ, có thể tạo ra tối đa 6 vết thương cho mỗi tai [3].

Thỏ có sự giống nhau đáng kể về sự thay đổi chuyển hóa và bệnh lý của vết bỏng với con người. Các vết thương bỏng nặng gây ra các thay đổi hệ thống chuyển hóa và bệnh lý tương tự ở thỏ và người. Do có sự tương đồng đáng kể về các đặc điểm trao đổi chất, thỏ được coi là một mô hình động vật đầy hứa hẹn cho nghiên cứu bỏng. Thỏ cũng là một lựa chọn hiệu quả về chi phí làm mô hình động vật gây bỏng so với việc sử dụng lợn. Mô hình thỏ cung cấp cơ sở vật chất để tiến hành nghiên cứu các tác động toàn thân của chấn thương bỏng. Thỏ có mức tiêu hao năng lượng nghỉ ngơi cao sau chấn thương nhiệt tương tự ở bệnh nhân bỏng. Hơn nữa, mô hình thỏ đã chứng minh được sự tham gia của leucine như một acid amin quan trọng trong quá trình đồng hóa tương tự sau chấn thương nhiệt ở người [10].

Thỏ là động vật dễ gần với con người (hơn chuột), dễ nuôi, sẵn có do khả năng sinh sản nhanh; tuy nhiên, chúng lại có

nhược điểm là sức đề kháng kém hơn, do vậy dễ mắc bệnh nhiễm trùng hoặc các bệnh khác có thể dẫn tới tử vong [10].

- Lợn có cấu trúc da gần giống da người, nhất về mặt giải phẫu và sinh lý học. Về mặt cấu trúc, tỷ lệ độ dày biểu bì và độ dày biểu bì ở lợn và người tương tự nhau. Da của chúng tương đối không có lông và có lớp dưới da cố định và các nang lông ở da giống như người. Về mặt sinh hóa, da lợn chứa collagen da và hàm lượng sợi đàn hồi giống với người hơn các động vật khác. Lợn cũng có những phản ứng sinh lý và đáp ứng phân tử với các yếu tố tăng trưởng khác nhau tương tự người [3, 11]. Da lợn có quá trình tái biểu mô thay vì co lại trong quá trình LVT tương tự như ở người. Ngoài ra, chúng cũng có những điểm tương đồng quan trọng như các dạng enzym biểu bì, thời gian chu chuyển của mô biểu bì, các protein sừng và thành phần của màng lipid của bề mặt da. Do đó, lợn sau đó đã được sử dụng rộng rãi làm mô hình bông thí nghiệm hơn hầu hết các mô hình động vật khác [10].

Tuy nhiên, nuôi dưỡng chúng tốn kém hơn, nguy cơ nhiễm bệnh cao hơn; ít sử dụng trong nghiên cứu đáp ứng phân tử [1].

- Chó có thể được sử dụng trong mô hình nghiên cứu thương tích kết hợp bỏng - cháy nổ, đánh giá thay đổi huyết động học trong giai đoạn đầu của sốc bỏng và hồi phục dịch thể trong sốc chấn thương kết hợp bỏng - nổ. Tuy nhiên, cần lưu ý các quy định về đạo đức, da chó lỏng lẻo hơn, vết thương liền chủ yếu nhờ sự co kéo. Co rút nhanh là đặc điểm chung của động vật có da lỏng lẻo, trong khi ở các loài khác như người và lợn, vết thương liền lại chủ yếu là kết quả của tái biểu mô [10].

Một lưu ý về vị trí gây vết thương ở động vật: Hầu hết các nghiên cứu lựa chọn phần lưng động vật, nguyên nhân do động vật rất khó liếm hoặc gãi lưng do đó khó có thể gây thêm tổn thương. Do nguy cơ con vật tự cọ xát vào thành lồng làm tổn thương thêm, cần phải băng vết thương. Phải tránh vùng bụng của động vật do chúng dễ dàng tiếp cận vùng này bằng cách liếm và thậm chí dẫn đến cắt xén vùng tổn thương.

- *Nhìn chung, các mô hình vết thương in vivo có nhiều ưu điểm, cho phép:*

+ Nghiên cứu sự tương tác của nhiều quần thể tế bào / hệ thống cơ thể trong quá trình sửa chữa.

+ Nghiên cứu các yếu tố của quá trình LVT.

+ Đánh giá sự suy giảm có chọn lọc của các gen cụ thể để xác định ảnh hưởng của chúng với LVT.

+ Nghiên cứu chức năng hệ thống miễn dịch.

+ Có thể tạo ra nhiều vết thương trong một con vật; mô hình hóa các nguyên nhân gây vết thương khác nhau (bỏng, phẫu thuật, chấn thương...) [3].

- *Mặt khác, các mô hình in vivo cũng có những nhược điểm:*

+ Sự phức tạp của toàn bộ động vật ngăn cản việc phân tích rõ ràng vai trò riêng biệt của mô / tế bào trong LVT và có thể tốn kém;

+ Da động vật không phải là bản sao chính xác của da người.

+ Cần số lượng lớn động vật thường để đạt được ý nghĩa thống kê.

+ Phản ứng miễn dịch có thể khác với người.

+ Khó kiểm soát kích thước / độ sâu / độ rộng của vết thương.

+ Không có đại diện mô hình vết thương mạn tính chính xác [3].

Cần lưu ý nếu thử nghiệm sơ bộ trên động vật cho thấy kết quả không hữu ích về mặt lâm sàng, thì việc thử nghiệm trên người có thể không cần thiết.

### 2.1. Mô hình nghiên cứu vết thương do rạch

Mô hình này có lợi cho các nghiên cứu vật liệu vết mổ, như sự thoái hoá các loại chỉ khâu, ưu thế cơ học thông qua việc đánh giá độ bền kéo của da. Vết thương do rạch có thể được phân loại là vết thương liền kỳ đầu hoặc kỳ 2, tương ứng với việc đóng kín bằng khâu ngay sau khi tạo vết thương hoặc muộn hơn. Vết thương liền kỳ đầu là một mô hình tuyệt vời để phân tích cơ học và sinh học về độ bền của vết thương nhưng ít phù hợp hơn cho đánh giá mô học LVT hoặc hóa mô hoặc biểu mô của vết thương do hạn chế về thể tích vết thương và các hoạt động LVT. Mô hình liền vết thương thứ phát có thể có giá trị để nghiên cứu sự tạo sẹo ở thời điểm muộn (hơn 65 ngày sau khi rạch) [1].

Có thể sử dụng chuột nhắt, chuột cống, thỏ và lợn làm mô hình nghiên cứu này. Reid đã báo cáo một số mô hình động vật thí nghiệm để nghiên cứu LVT do vết rạch trên lưng chuột, đo độ bền kéo bằng phương pháp đo lực căng. Most đã sử dụng chuột iNOS để giải thích cơ chế tế bào LVT trong một mô hình rạch [1]. Januszyk đã sử dụng kỹ thuật này để đánh giá mức độ căng kéo vết mổ ở lợn [13].

### 2.2. Mô hình nghiên cứu liền vết thương do cắt bỏ toàn bộ da

Đây là một trong những mô hình LVT sử dụng phổ biến nhất và giống vết thương cấp tính trên lâm sàng, cần chữa LVT kỳ 2, tức là các mép da không được khâu lại với nhau. Vết thương được tạo ra do cắt bỏ tất cả các lớp da (biểu bì, hạ bì và lớp mỡ dưới da) của con vật. Mô hình cho phép khảo sát tình trạng xuất huyết, viêm nhiễm, tạo mô hạt, tái tạo biểu mô, tạo mạch và sửa chữa. Diện tích vết thương có thể được ghi lại (chụp ảnh thường xuyên) theo thời gian và việc đóng vết thương được tính dựa trên kích thước vết thương so với kích thước ban đầu (tỷ lệ liền vết thương). Đối với phân tích mô học, động vật có thể được gây mê (ví dụ như chuột nhắt, chuột cống) hoặc gây tê cục bộ (ví dụ như mô hình tai thỏ), sinh thiết được thu thập, xử lý và kiểm tra cả khoảng trống biểu mô (khoảng cách có thể đo được giữa các mép vết thương biểu mô), các đặc điểm của mô hạt (quần thể tế bào thâm nhiễm, thay đổi mạch máu và chất nền) và collagen mô da. [2, 3]

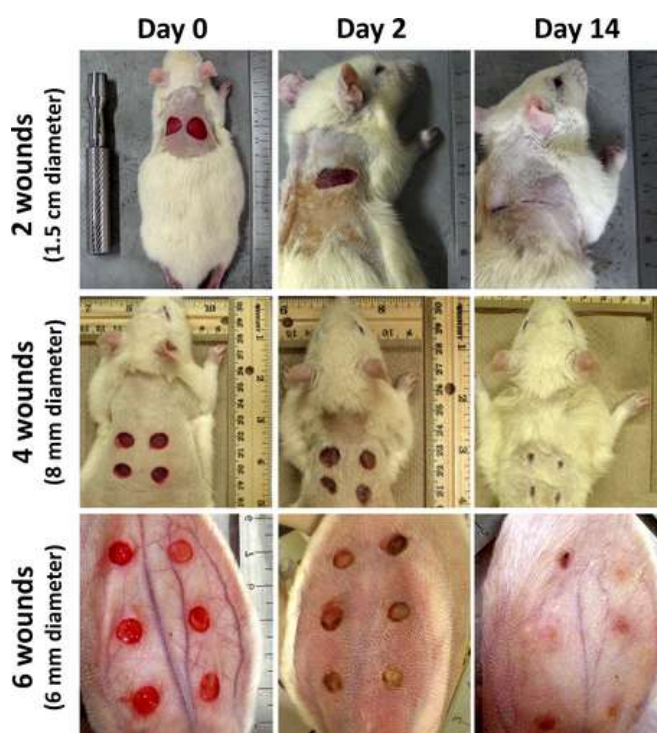
Vật liệu và kỹ thuật cần thiết để sử dụng mô hình này tương đối đơn giản, thiết thực. Có thể dễ dàng tiếp cận nền vết thương để bôi các chất bôi ngoài da (ví dụ như các dược phẩm, tế bào, vật liệu sinh học, băng vết thương) và đánh giá ảnh hưởng của chúng đối với quá trình sửa chữa [1].

Có thể sử dụng các động vật khác nhau như chuột cống, chuột nhắt, thỏ và lợn. Có thể tạo ra một số vết thương khác nhau trên mỗi con vật. Ví dụ: lên đến 2 hoặc 4 vết thương ở chuột, 4 vết thương trở lên ở lợn và 6 vết thương ở thỏ [1] (Hình 2). Số lượng vết thương trên mỗi con

vật phụ thuộc vào loại vết cắt và đường kính lỗ sinh thiết.

Đáng chú ý vết thương ở một số mô hình cổ điển, đặc biệt là chuột, sẽ liền bằng cách co kéo chiếm một phần lớn trong quá trình đóng vết thương. Sự co kéo vết thương là một trong những hạn chế lớn nhất khi sử dụng da động vật làm mô hình vết thương ở người. Một số biện pháp khắc phục như chọn vị trí giải phẫu có lớp hạ bì và mô dưới da gắn chặt (ví dụ như tai thỏ) hoặc thực hiện cố định cơ học

da bằng cách sử dụng một số thiết bị hoặc thanh nẹp, khâu cố định bờ mép...[14]. Ví dụ mô hình tạo ra hai vết thương toàn bộ da kéo dài qua cột sống trên lưng chuột, đặt các thanh nẹp silicone vào giữa và cố định vào da bằng chất kết dính ngay và chỉ khâu nylon [14]. Hoặc sử dụng nẹp chuyên dụng dành cho chuột, vòng nẹp dính chặt vào da xung quanh vết thương, ngăn chặn sự co lại. Vết thương liền thông qua tạo mô hạt và tái biểu mô, tương tự như ở người [1].



**Hình 2. Một số mô hình tạo vết thương**

(vết thương cắt trên lưng chuột và tai thỏ), đường kính vết thương khác nhau, theo dõi ngày 0, giai đoạn viêm (ngày 2), tái biểu mô (ngày 14)

### 2.3. Vết thương bỏng (Burn wounds)

Các mô hình LVT bỏng có thể được tạo ra bằng cách làm bỏng nước trên da (để vùng da cố định tiếp xúc với nước nóng) hoặc do tổn thương nhiệt khô (áp

tắm kim loại nóng trực tiếp lên da). Kết quả tạo một vết bỏng có thể được bóc bỏ vòm tổn thương, để lộ lớp hạ bì và để lại vết thương hở... Diện tích bỏng phụ thuộc vào mục tiêu nghiên cứu, thời gian cần thiết để theo dõi tác động của liệu pháp thử



nghiệm. Diện tích nhỏ sẽ nhanh liền, có thể không thu thập đủ dữ liệu [3].

Tác giả Caliaro-Oliveira đã sử dụng mô hình gây bỏng diện rộng và sâu ở chuột để đánh giá tiềm năng của tế bào đệm trung mô dị loài đối với bỏng nặng và đẩy nhanh LVT. Các vết bỏng rộng (2cm x 3cm) sâu toàn bộ da được tạo ra bằng áp và ấn nhẹ tấm kim loại nóng 200°C lên vùng lưng của chuột trong 25 giây. Theo dõi LVT bằng hình ảnh kỹ thuật số, mô bệnh học (mạch máu, mô hạt, tổng số tế bào viêm N và sợi collagen), myeloperoxidase (MPO) [1].

Sự khác biệt đáng kể nhất về mô học da giữa người và động vật là mật độ lông. Quá trình tái tạo biểu mô nhanh chóng và hình thái của nang tóc bị ảnh hưởng rất nhiều bởi chu kỳ tóc; do đó ảnh hưởng đáng kể đến diện tích vết thương và dữ liệu kính hiển vi của sinh thiết da.

Ví dụ, chu kỳ lông của loài gặm nhấm ngắn. Để tránh ảnh hưởng chu kỳ lông tới đánh giá vết thương, nên sử dụng các loài gặm nhấm có cùng độ tuổi. Vì các loài động vật khác nhau sở hữu chu kỳ lông khác nhau, nên việc cân nhắc thời gian cụ thể của từng mẫu động vật là cần thiết phải được làm nổi bật. Ngoài ra, lông có thể giảm sự truyền nhiệt khi gây bỏng trên da động vật và một số nguồn nhiễm trùng nghiêm trọng có thể ẩn trong lông; do đó lông động vật cần được làm sạch triệt để. Cạo lông bằng tông đơ và sau đó bôi kem tẩy lông có thể loại bỏ lông hoàn toàn. Tuy nhiên, kem tẩy lông có thể gây viêm da tiếp xúc nên cần kiểm soát cẩn thận thời gian sử dụng.

Việc chăm sóc sau tạo vết thương thích hợp cũng cần được xem xét để nâng

cao tỷ lệ sống của động vật. Sử dụng hợp lý thuốc kháng sinh ngăn ngừa nhiễm trùng vết thương, sử dụng thuốc giảm đau thích hợp có thể cải thiện sự thèm ăn và khả năng tự hại của động vật. Hơn nữa, diện tích bỏng rộng còn có thể khiến cơ thể mất nhiều dịch; do đó, việc giám sát và xử lý tích cực đối với tình trạng mất nước của động vật là cần thiết. Việc lựa chọn đúng phương pháp gây bỏng và duy trì nó trên các mô hình động vật là rất quan trọng vì điều này ảnh hưởng đến kết quả bỏng và quyết định cách xử lý vết thương. Có sự đa dạng giữa các loài trong cấu trúc và giải phẫu của da cùng với ưu và nhược điểm của chúng như một mô hình tổn thương bỏng thực nghiệm [10].

#### **2.4. Mô hình vết thương bị suy quá trình liền (Impaired wound models)**

Có nhiều cách tiếp cận khác nhau để có được các mô hình vết thương bị suy. Ví dụ, mạch máu có thể gây ra các điều kiện chuyển hóa tương tự như biến đổi gen. Hầu hết các mô hình liền vết thương cấp tính bị suy giảm đều có thể cung cấp thông tin hữu ích về việc điều trị vết thương chậm liền; tuy nhiên, chúng không được coi là mô hình của vết thương mạn tính thực sự. Một số mô hình được sử dụng thường xuyên nhất để mô phỏng liền vết thương bị suy giảm là bệnh tiểu đường và các tình trạng liên quan đến dinh dưỡng [15, 16].

##### **2.4.1. Mô hình vết thương do tiểu đường**

Suy yếu liền vết thương tiểu đường là đa yếu tố, trong đó nổi bật là đáp ứng viêm bất thường và giảm tân mạch. Mô hình tạo động vật mắc tiểu đường bằng cách sử dụng hóa chất, chế độ ăn uống, phẫu thuật

hoặc thông qua các đột biến toàn thân tương tự như bệnh tiểu đường và chuột béo phì [1].

Gây bệnh tiểu đường loại 1 do hóa chất thường sử dụng các loại thuốc như Alloxan, Streptozotocin.

Alloxan (từ 1943) gây hoại tử tế bào  $\beta$ , phá hủy các đảo nhỏ  $\beta$  của tuyến tụy dẫn đến thiếu Insulin, tăng đường huyết và nhiễm ceton.

Streptozotocin gây tăng đường huyết do gây độc trực tiếp trên tế bào  $\beta$  tuyến tụy. Ở những loài động vật gặm nhấm nhạy cảm, nó gây ra bệnh tiểu đường không phụ thuộc Insulin, trong đó có vai trò phá hủy hệ miễn dịch như ở bệnh tiểu đường loại 1 ở người [1].

Mô hình bệnh tiểu đường do hóa chất gây ra đơn giản và tương đối rẻ nhưng không hoàn toàn đại diện cho bệnh tiểu đường ở người. Mặt khác, các mô hình di truyền cho phép điều tra cơ chế tự nhiên của bệnh tiểu đường mà không có các tác dụng phụ tiềm ẩn liên quan đến điều trị hóa chất. Mô hình chuột tiểu đường hoặc béo phì của bệnh tiểu đường loại 2 gần với bệnh của người do tăng đường huyết tự nhiên do béo phì và nhiều triệu chứng cũng gặp ở bệnh nhân tiểu đường loại 2. Đặc biệt, những con chuột đái đường có tăng Insulin máu vào khoảng 2 tuần tuổi và phát triển đề kháng với Insulin, cuối cùng biểu hiện tăng đường huyết do suy tế bào beta [1].

#### **2.4.2. Mô hình vết thương liên quan suy dinh dưỡng (Malnutrition)**

Trong quá trình LVT có sự gia tăng nhu cầu trao đổi chất các chất dinh dưỡng để khôi phục tính toàn vẹn cấu trúc và

chức năng của các mô bị tổn thương tiến triển. Suy dinh dưỡng protein-năng lượng (PEM) ảnh hưởng đến da, gây ra những thay đổi đáng kể về hình thái và chức năng khiến da bị tổn thương (loét) với hậu quả là suy giảm khả năng liền. Suy dinh dưỡng dẫn đến thay đổi phản ứng viêm, chức năng miễn dịch và sửa chữa mô, gây gia tăng các cytokine tiền viêm, làm chậm quá trình LVT và nguy cơ nhiễm trùng cao hơn [1, 16].

Leite nghiên cứu những thay đổi xảy ra trên da thiếu dưỡng của chuột trong một mô hình thí nghiệm suy dinh dưỡng (loại PEM). Động vật được phân ngẫu nhiên nhóm nuôi dưỡng tốt (1) hoặc nhóm nhận 1/2 khẩu phần ăn hàng ngày (2) (nhóm bị suy dinh dưỡng), theo dõi trong hai tháng. Kết quả mô học cho thấy lớp trung bì của nhóm (1) mỏng hơn đáng kể và tỷ lệ % collagen thấp hơn so với da của nhóm (2) [17]. Các nghiên cứu khác cũng ghi nhận suy dinh dưỡng làm suy yếu liền vết thương và làm chậm quá trình tổng hợp collagen [1, 16].

#### **2.4.3. Mô hình vết thương do hội chứng chuyển hóa hoặc béo phì**

Các yếu tố toàn thân khác như các bệnh chuyển hóa (hội chứng chuyển hóa, béo phì) làm tăng nồng độ các loại oxy phản ứng (ROS) và làm thay đổi LVT [1]. Trong điều kiện này, giai đoạn viêm bị kéo dài, rối loạn tạo mạch, giảm tạo mô hạt, chậm biểu mô hóa. Ngoài ra, môi trường oxy hóa khử của tế bào thay đổi dẫn đến stress oxy hóa, có thể gây ra những thay đổi quan trọng của tế bào. Sự phát triển các bệnh chuyển hóa có thể được kích hoạt bởi chế độ ăn nhiều calo; do đó nhiều

ngiên cứu đã sử dụng chế độ ăn nhiều chất béo ở động vật để mô phỏng những thay đổi chuyển hóa này ở người.

Leite đã sử dụng mô hình thực nghiệm chế độ ăn nhiều chất béo để nghiên cứu LVT ở chuột, mục đích bắt chước VTMT ở bệnh nhân rối loạn chuyển hóa / béo phì. Sau khi nhận được chế độ ăn uống bình thường và có hàm lượng lipid cao trong 45 ngày, đánh giá tình trạng dinh dưỡng và tạo ra các vết thương trên lưng chuột. So với nhóm chứng, nhóm chế độ ăn giàu chất béo có glucose máu, TG và cholesterol toàn phần tăng; hàm lượng hydroxyproline thấp hơn, nồng độ Malondialdehyde (MDA) cao hơn và mức độ Glutathione (GSH) thấp hơn. Đây là những phản ánh của stress oxy hóa liên quan đến tình trạng rối loạn chuyển hóa (do tăng lipid máu) [1].

Cùng với việc lựa chọn một mô hình thích hợp, cần hướng tới khả năng lặp lại thí nghiệm, tính phù hợp lâm sàng, điều trị nhân đạo và chỉ tiêu định lượng, điều quan trọng là phải xác định phương pháp nào sẽ phù hợp với một mô hình cụ thể và mục đích của nghiên cứu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Daniela S. Masson-Meyers, Thiago A. M. Andrade, Guilherme F. Caetano, Francielle R. Guimaraes, Marcel N. Leite, Saulo N. Leite, Marco Andrey C. Frade, *Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment*. Int J Exp Pathol, 2020. 101(1-2): p. 21-37.
- Koschwanetz HE, Broadbent E, *The use of wound healing assessment methods in psychological studies: a review and recommendations*. Br J Health Psychol., 2011. 16: p. 1-32.
- Stephens P, Caley M, Peake M., *Alternatives for animal wound model systems*. New York, NY: Humana Press; 2013: In: RG Gourdie, TA Myers, eds. Wound Regeneration and Repair Methods and Protocols, 2013: p. 177- 201.
- Jakhu H, Gill G, Singh A., *Role of integrins in wound repair and its periodontal implications*. 2018; 8(2): 122- 125. J Oral Biol Craniofac Res., 2018. 8(2): p. 122-125.
- Ishihara J, Ishihara A, Fukunaga K et al., *Laminin heparin-binding peptides bind to several growth factors and enhance diabetic wound healing*. Nat Commun., 2018. 9(1): p. 2163.
- Li J, Chen J, Kirsner R., *Pathophysiology of acute wound healing*. Clin Dermatol., 2007. 25(1): p. 9-18.
- Mustoe TA, O'Shaughnessy K, Kloeters O., *Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis*. Plast Reconstr Surg., 2006. 117: p. 355-415.
- Romanelli M, Miteva M, Romanelli P, Barbanera S, Dini V., *Use of diagnostics in wound management*. Curr Opin Support Palliat Care, 2013: p. 106-110.
- Bratcher NA, Reinhard G., *Creative implementation of 3Rs principles within industry programs: beyond regulations and guidelines*. J Am Assoc Lab Anim Sci., 2015. 54: p. 133-138.
- Shu jen Chang, Dewi Sartika, Gang Yi Fan, Juin Hong Cheng and Yi Wen Wang; *Animal models of burn wound management*, 2019, DOI: 10.5772/intechopen.89188
- Abdullahi A, Amini-Nik S., Jeschke MG., *Animal models in burn research*. Cell Mol Life Sci., 2014. 71: p. 3241-3255.
- Sullivan TP, Eaglstein W., Davis SC, Mertz P., *The pig as a model for human wound healing*. Wound Repair Regen., 2001. 9: p. 66-76.
- Januszyk M, Wong V., Bhatt KA et al., *Mechanical offloading of incisional wounds is associated with transcriptional down regulation of inflammatory pathways in a large animal model*. Organogenesis, 2014. 10: p. 186-193.
- Davidson JM, Yu F., Opalenik SR., *Splinting strategies to overcome confounding wound*

- contraction in experimental animal models. Adv Wound Care.*, 2013. 2: p. 142-148.
15. Anderson K, Hamm R., *Factors that impair wound healing. 2012; 4: 84- 91. J Am Coll Clin Wound Spec.*, 2012. 4(84-91).
  16. Little MO, *Nutrition and skin ulcers. 2013; 16: 39- 49. Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*, 2013. 16: p. 39-49.
  17. Leite SN, Jordao Junior AA, Andrade TA, Masson DS, Frade MA., *Experimental models of malnutrition and its effect on skin trophism. An Bras Dermatol.*, 2011. 86: p. 681-688.
  18. Park S, Gonzalez DG., Guirao B et al., *Tissue-scale coordination of cellular behavior promotes epidermal wound repair in live mice. Nat Cell Biol.*, 2017. 19(2): p. 155-163.
  19. Papier A, Peres MR., Bobrow M, Bhatia A., *The digital imaging system and dermatology. Int J Dermatol.*, 2000. 39: p. 561-575.
  20. Greaves NS, Benatar B., Whiteside S, Alonso-Rasgado T, Baguneid M, Bayat A., *Optical coherence tomography: a reliable alternative to invasive histological assessment of acute wound healing in human skin? Br J Dermatol.*, 2014. 170: p. 840-850.
  21. Weingarten MS, Samuels JA, Neidrauer M et al., *Diffuse near-infrared spectroscopy prediction of healing in diabetic foot ulcers: a human study and cost analysis. Wound Repair Regen.* 2012. 20: p. 911- 917.
  22. Planz V, Franzen L, Windbergs M., *Novel in vitro approaches for the simulation and analysis of human skin wounds. Skin Pharmacol Physiol.*, 2015. 28: p. 91-96.
  23. Velidandla S, Gaikwad P, Ealla KK, Bhorgonde KD, Hunsingi P, Kumar A., *Histochemical analysis of polarizing colors of collagen using Picrosirius Red staining in oral submucous fibrosis. J Int Oral Health.*, 2014. 6: p. 33-38.
  24. Sabol F, Dancakova L, Gal P et al., *Immunohistological changes in skin wounds during the early periods of healing in a rat model. Vet Med.*, 2012. 57(2): p. 77-82.
  25. Qiu B, Wei F., Sun X et al., *Measurement of hydroxyproline in collagen with three different methods. Mol Med Rep.*, 2014. 10: p. 1157-1163.
  26. Nauseef WM, *Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. Cell Microbiol.*, 2014. 16: p. 1146-1155.
  27. Rodero MP, Khosrotehrani K., *Skin wound healing modulation by macrophages. Int J Clin Exp Pathol.*, 2010. 3: p. 643-653.
  28. Moon JK, Shibamoto T., *Antioxidant assays for plant and food components. J Agric Food Chem.*, 2009. 57: p. 1655-16666.
  29. Tsuji JM, Whitney JD., Tolentino EJ, Perrin ME, Swanson PE., *Evaluation of cellular wound healing using flow cytometry and expanded polytetrafluoroethylene implants. Wound Repair Regen.*, 2010. 18: p. 335-340.
  30. Krzyszczyk P, Rene SR, Andre PA, Berthiaume F., *The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. Front Physiol.*, 2018. 9: p. 419.
  31. Bashir S, Sharma Y., Elahi A, Khan F, *Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. Inflamm Res.*, 2016. 65(1): p. 1-11.
  32. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S., Vazini H et al., *Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. J Cell Physiol.* 2018, 2018. 233(9): p. 6425-6440.