

NGHIÊN CỨU THU HỒI, BẢO QUẢN DA ĐỒNG LOẠI BẰNG GLYCEROL 85% ĐỂ ĐIỀU TRỊ VẾT THƯƠNG, VẾT BỎNG

Chu Anh Tuấn, Đinh Văn Hàn, Nguyễn Quang Đông, Lê Quốc Chiếu
Bệnh viện Bỏng Quốc gia Lê Hữu Trác

TÓM TẮT

Từ những năm đầu 1980, Ngân hàng da Châu Âu đã nghiên cứu sử dụng Glycerol 85% trong bảo quản da đồng loại. Da đồng loại bảo quản trong Glyceron (Glycerol preserved allograft - GPA) được thử nghiệm trên lâm sàng lần đầu tiên vào năm 1984 tại Trung tâm Bỏng, Bệnh viện Chữ thập đỏ Beverwijk, Hà Lan. Từ năm 1991, GPA trở thành "tiêu chuẩn vàng" trong che phủ tạm thời vết thương bỏng.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng quy trình thu hồi, bảo quản da đồng loại bằng Glycerol 85% và ứng dụng chế tạo 200 tấm da đồng loại bảo quản bằng Glycerol 85%. Qua theo dõi cho thấy, dung dịch Glycerol 85% có tác dụng diệt khuẩn và vi nấm, sau 3 tháng bảo quản thì xét nghiệm vi khuẩn, vi nấm đều trở nên âm tính; đồng thời hình thái cấu trúc mô của da bảo quản bằng Glycerol 85% không bị thay đổi trong thời gian bảo quản. Đây là cơ sở để ứng dụng tấm da đồng loại bảo quản bằng Glycerol 85% trong điều trị vết thương, vết bỏng.

Từ khóa: Da đồng loại, da đồng loại bảo quản bằng Glycerol, hình thái học, vi sinh vật.

SUMMARY

Since the early 1980s, the European skin bank has been studying the use of 85% Glycerol in preserving allograft skin. The first clinical research about Glycerol-preserved allograft (GPA) was performed in 1984 at the Burn Center, Beverwijk Red Cross Hospital, Netherlands. Since 1991, GPA became the "gold standard" for temporary burn wound coverage.

In this study, we have established a procedure to harvest and preserve the allograft skin in 85% Glycerol and apply it to make 200 pieces of GPA. Follow-up showed that, 85% Glycerol solution has anti-bacterial and fungal effects, after 3 months of storage, test for bacteria, fungi all gave result negative; at the same time, the morphological structure of GPA does not change during storage. This is the basis for using the Glycerol preserved skin allograft samples to treat wounds and burns.

Keywords: Skin allograft, Glycerol preserved allograft (GPA), microorganism, morphology.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Da đồng loại được coi là vật liệu thay thế da tạm thời lý tưởng nhất, vì phù hợp hoàn toàn về cấu trúc giải phẫu và chức năng với da

tự thân. Nhu cầu da đồng loại trong điều trị vết thương bỏng là rất lớn, chỉ tính riêng tại Bệnh viện Bỏng Quốc gia, hàng năm nhu cầu cần hàng ngàn đơn vị da đồng loại. Phát triển vật liệu thay thế da, trong đó có tạo nguồn dự trữ da đồng loại là hướng chủ yếu để tăng cường khả năng cứu sống bệnh nhân bỏng sâu, diện rộng [8].

Người chịu trách nhiệm chính: Chu Anh Tuấn,
Bệnh viện Bỏng Quốc gia Lê Hữu Trác
Email: drchuanhtuan@gmail.com

Ứng dụng da đồng loại để che phủ vết bỏng đã được Pollock GD và Schareski G khởi xướng từ năm 1870, hiện đang được sử dụng rộng rãi trên thế giới. Da đồng loại có thể được sử dụng ngay sau thu hồi, không qua bảo quản hoặc được bảo quản để sử dụng lâu dài. Các phương pháp bảo quản chính gồm bảo quản lạnh sâu, đông khô hoặc bảo quản bằng Glycerol. Với phương pháp bảo quản lạnh sâu: Mảnh da gần giống như khi sử dụng tươi, tuy nhiên cần tủ lạnh sâu (- 160°C) - > (- 180°C), tốn kém về hóa chất và phương tiện bảo quản, không phải đơn vị nào cũng có thể thực hiện được, khó khăn khi vận chuyển đến các cơ sở y tế.

Đối với phương pháp bảo quản bằng Glycerol: Từ những năm đầu 1980, Ngân hàng da Châu Âu đã nghiên cứu sử dụng Glycerol 85% trong bảo quản da đồng loại; kỹ thuật đơn giản, có thể thực hiện tại các bệnh viện tuyến dưới, thuận tiện khi vận chuyển,... giúp các bệnh viện có thể chủ động đáp ứng nhu cầu điều trị cho người bệnh bỏng, nhất là trong tình trạng chiến tranh hoặc bỏng hàng loạt.

Tại Bệnh viện Bỏng Quốc gia, đã có những nghiên cứu ban đầu về bảo quản da đồng loại trong Glycerol 85% để điều trị vết thương bỏng sâu [3]. Tuy nhiên các quy trình chưa đầy đủ, thống nhất và cập nhật. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm các mục tiêu sau:

1. Xây dựng quy trình thu hồi, bảo quản da đồng loại bằng Glycerol 85%.

2. Đánh giá sự thay đổi về khía cạnh vi sinh, mô học của da đồng loại trong quá trình thu hồi, xử lý và bảo quản bằng Glycerol 85%.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Nguồn cho mô để thu hồi da

Mô để nghiên cứu chế tạo mô ghép là các mẫu da được lấy từ phần mô bệnh nhân bị tai nạn được cắt cụt và từ người cần được can thiệp tái tạo thành bụng; từ tử thi.

2.1.2. Thiết bị, vật tư xử lý và bảo quản da

- Dao lấy da có định mức Lagrot và Zimmer; tủ lạnh thường; Tub chứa mẫu mô bảo quản (50ml); Tub chứa mẫu mô làm thí nghiệm (loại 2ml); ống đong polyethylen,...

- Dung dịch rửa da sơ bộ: NaCl 0,9% pha Penixilin 50 UI/ml; dung dịch vận chuyển da; dung dịch bảo quản da Glycerol 85% (85ml Glycerol nguyên chất + 15ml nước muối sinh lý 0,9%).

2.1.3. Nghiên cứu sự thay đổi vi sinh, mô học trong quá trình thu hồi, bảo quản

Lấy ngẫu nhiên 30 tấm da đồng loại được thu hồi, bảo quản bằng Glycerol 85%, theo dõi về vi sinh, mô học tại các thời điểm: Sau thu hồi, xử lý chế tạo; sau bảo quản bằng Glycerol 85%: 01 tháng, 03 tháng, 06 tháng, 12 tháng và 18 tháng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Mô hình nghiên cứu

Bước 1: Xây dựng quy trình lý thuyết (Tham khảo tài liệu của các ngân hàng mô và thực tế triển khai bước đầu tại Ngân hàng Mô & Tế bào, Bệnh viện Bỏng Quốc gia).

Bước 2: Tiến hành thu hồi, xử lý, bảo quản da đồng loại bằng Glycerol 85% theo các quy trình lý thuyết đã xây dựng.

Bước 3: Tiến hành đánh giá, xét nghiệm (trên labo) về các tiêu chuẩn chất lượng mô ghép, về tính khoa học và hợp lý của quy trình đã tiến hành.

Bước 4: Thử nghiệm lâm sàng

Tiến hành đánh giá hiệu quả của ghép tấm da đồng loại bảo quản bằng Glycerol 85% trên vết thương bỏng sâu ở các bệnh nhân tình nguyện theo đúng quy định của Bộ Y tế về quy tắc đạo đức trong nghiên cứu y sinh.

Bước 5: Từ kết quả đánh giá, khảo sát trên labo và trên lâm sàng, chúng tôi sẽ bổ sung, sửa đổi hay điều chỉnh lại các tiêu chuẩn, quy

trình lý thuyết đã xây dựng để đưa ra quy trình và tiêu chuẩn chính thức.

Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi chỉ trình bày các bước 1 - 3.

2.2.2. Phương pháp bảo quản da đồng loại bằng Glycerol 85%

** Nguồn mô để thu hồi da:*

Da đồng loại được lấy từ phần mô bệnh nhân bị tai nạn được cắt cụt và từ người cần được can thiệp tái tạo thành bọng; từ tử thi. Việc hiến các phần mô này đều được sự đồng ý của bệnh nhân hoặc người nhà bệnh nhân. Các thủ tục hiến và nhận đều theo quy định của pháp luật. Giới hạn thời gian, tuổi và các tiêu chuẩn loại trừ theo bệnh lý được tra cứu bệnh án thực hiện theo tiêu chuẩn của Hiệp hội Ngân hàng Mô Châu Âu, Hiệp hội Ngân hàng Mô Hoa Kỳ (AATB 1993) [15] và quy định của Chính phủ, Bộ Y tế Việt Nam [1], [7].

** Thu hồi da đồng loại:*

Quy trình lấy mô (da) là “sạch nhất trong điều kiện có thể”:

- Phần mô dự kiến lấy da được sát trùng trước phẫu thuật, gồm lần 1 bằng dung dịch Betadin 10%, lần 2 bằng cồn 70°. Rửa phần mô hoặc chi thể bị cắt rời 2 lần bằng Phitasep với nước sạch và nước muối vô trùng.

- Đặt chi thể lên bàn đã trải xăng vô trùng, lấy da bằng dao Lagrot định mức độ dày 0,38mm, kích thước 10 x 10 cm. Ngâm và rửa mảnh da 2 lần bằng dung dịch rửa da sơ bộ là NaCl 0,9%.

- Chuyển mảnh da sang chai chứa dung dịch vận chuyển, đặt trong hộp chứa nước đá (nhiệt độ tương đương 4°C).

** Xử lý da đồng loại:*

Tiến hành các kỹ thuật trong hood lọc không khí vô trùng.

- Đặt mảnh da lên khay có trải gạc đệm ở dưới với mặt biểu mô quay lên trên, dùng dụng cụ nhựa sắc mảnh gạc nhẹ trên bề mặt da để loại bỏ những chất bẩn còn bám vào bề mặt da. Dùng dao mổ cắt gọn các mép da, dùng thước

đo và dao mổ để cắt mảnh da thành các đơn vị 100 cm² (10 x 10cm).

- Rửa các đơn vị da bằng dung dịch loại bỏ các chất bôi trơn còn sót lại trên tấm da trong quá trình thu hồi da. Rửa da 2 lần bằng PBS hoặc dung dịch Ringerlactat để làm sạch các chất bẩn.

- Nhúng các đơn vị da vào dung dịch cồn 70% trong 30 giây, sau đó rửa lại mảnh da bằng PBS hoặc dung dịch Ringerlactat để loại bỏ cồn.

- Rửa các đơn vị da bằng dung dịch Ringerlactat có pha Penixilin 50UI/ml, Streptomycin 50µg/ml, Amphotericin B 0,125µg/ml, 3 lần trong vòng 10 phút.

** Bảo quản da đồng loại:*

- Môi trường bảo quản là Glycerol 85% (85ml Glycerol nguyên chất + 15ml nước muối sinh lý 0,9%).

- Đặt mẫu da vào tub nhựa vô trùng, dung tích 50ml, mỗi tub chứa một đơn vị da 100 cm².

- Bơm môi trường bảo quản cho đến khi ngập mẫu da;

- Đặt tub da vào ngăn mát tủ lạnh (tương đương 4°C).

Nghiên cứu thu hồi, bảo quản da đồng loại bằng Glycerol 85% được tiến hành tại Ngân hàng Mô & Tế bào / Bệnh viện Bông Quốc gia, từ tháng 03/2017 - 8/2018.

2.2.3. Theo dõi vi sinh da bảo quản

Mẫu da sau thu hồi, xử lý, trong quá trình bảo quản (01 tháng, 03 tháng, 06 tháng, 12 tháng, 18 tháng) được kiểm tra định kỳ về vi khuẩn, nấm:

- Lấy bệnh phẩm là mẫu da kích thước 1cm², đặt mẫu da vào tub nước muối sinh lý 0,9%. Lắc nhẹ ống nước muối sinh lý có mẫu da cần xét nghiệm trong 30 giây.

- Dùng loop cấy định lượng 0,1 và 0,01ml đã khử trùng, lấy bệnh phẩm trong nước muối sinh lý cấy vào ba đĩa môi trường thạch dinh dưỡng (thạch thường, thạch máu và thạch Sabouraud).

- Kỹ thuật cấy: Đầu tiên cấy một đường thẳng theo hết đường kính đĩa thạch, sau đó dàn đều sang hai bên. Để đĩa cấy khuẩn ở 37°C, theo dõi trong 72 giờ, sau đó đếm số lượng khuẩn lạc có trong đĩa thạch. Đối với đĩa cấy nấm (thạch Sabouraud): Để ở nhiệt độ + 30°C, theo dõi trong 21 ngày [14].

Xét nghiệm được tiến hành tại Labo vi sinh vật, Bệnh viện Bông Quốc gia.

2.2.4. Theo dõi mô học da bảo quản

Mẫu da sau thu hồi, xử lý, trong quá trình bảo quản (01 tháng, 03 tháng, 06 tháng, 12 tháng, 18 tháng) được kiểm tra định kỳ về mô học: Làm tiêu bản nhuộm HE, quan sát tiêu bản dưới kính hiển vi quang học có độ phóng đại 5 - 20 lần, nhận xét sự biến đổi hình thái và cấu trúc mô.

Xét nghiệm được tiến hành tại Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Quân y 103.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả chế tạo tấm da đồng loại bảo quản bằng Glycerol 85%

Bảng 3.1. Kết quả chế tạo tấm da đồng loại bảo quản bằng Glycerol 85%

STT	Nguồn gốc	Số lượng tấm da n, (%)
1	Người cho chết não (*)	25 (12,5)
2	Chi thể bị cắt cụt (**)	18 (9,0)
3	Người phẫu thuật thẩm mỹ thành bụng	157 (78,5)
	Cộng	200 (100)

- (*) Người cho chết não: 01

- (**) Chi thể bị cắt cụt: 01

Nhận xét: Đã chế tạo được 200 tấm da đồng loại, kích thước 10 x 10cm (100cm²), bảo quản trong Glycerol 85%. Phần lớn các tấm da đồng loại được thu hồi, chế tạo từ da thừa trong các phẫu thuật thẩm mỹ tái tạo thành bụng (78,5%).

3.2. Kết quả xét nghiệm vi sinh da đồng loại

Bảng 3.2. Kết quả cấy khuẩn mẫu da sau thu hồi và xử lý, chế tạo mẫu.

STT	Thời điểm xét nghiệm	Kết quả cấy khuẩn (n = 30)	
		Dương tính n (%)	Âm tính n (%)
1	Thu hồi da	07 (23,3) (*)	23 (76,7)
2	Xử lý, chế tạo mẫu	04 (13,3) (*)	26 (86,7)

- (*): Tổng cộng có 11 mẫu cấy khuẩn (+). Các vi khuẩn phân lập được: *Bacillus spp* (06 mẫu); *Staphylococcus epidermidis* (02), *Staphylococcus capitis* (02) và *Propionibacterium acnes* (01).

Nhận xét: Việc thu hồi da theo đúng quy trình đã giúp các mẫu da đạt mức vô khuẩn tới 76,7%, chỉ có 07/30 mẫu cấy khuẩn (+), đồng thời quá trình xử lý, chế tạo mẫu cũng giúp loại bỏ vi khuẩn, tuy vẫn còn đến 4/30 mẫu cấy khuẩn (+).

- Các chủng vi khuẩn phân lập được lần lượt là *Bacillus spp* (6/11, 54,5%), *Staphylococcus spp* (4/11, 36,4%); đều là những vi khuẩn thường có trên da, gây bệnh cơ hội.

Bảng 3.3. Kết quả cấy khuẩn mẫu da trong quá trình bảo quản bằng Glycerol 85%

STT	Thời điểm xét nghiệm	Kết quả cấy khuẩn (n = 30)	
		Dương tính n (%)	Âm tính n (%)
1	Sau 01 tháng	01 (3,3) (*)	29 (96,7)
2	Sau 03 tháng	00 (00)	30 (100)
3	Sau 6 tháng	00 (00)	30 (100)
4	Sau 12 tháng	00 (00)	30 (100)
5	Sau 18 tháng	00 (00)	30 (100)

(*): Vi khuẩn phân lập được là *Bacillus spp*.

Nhận xét: Sau 01 tháng bảo quản bằng Glycerol 85%, chỉ còn 01 mẫu da cho kết quả (+). Sau 3 tháng bảo quản, các mẫu da đều cho kết quả cấy khuẩn (-) và duy trì trong suốt quá trình bảo quản (18 tháng).

Bảng 3.4. Kết quả cấy nấm trong quá trình thu hồi, xử lý và bảo quản bằng Glycerol 85%

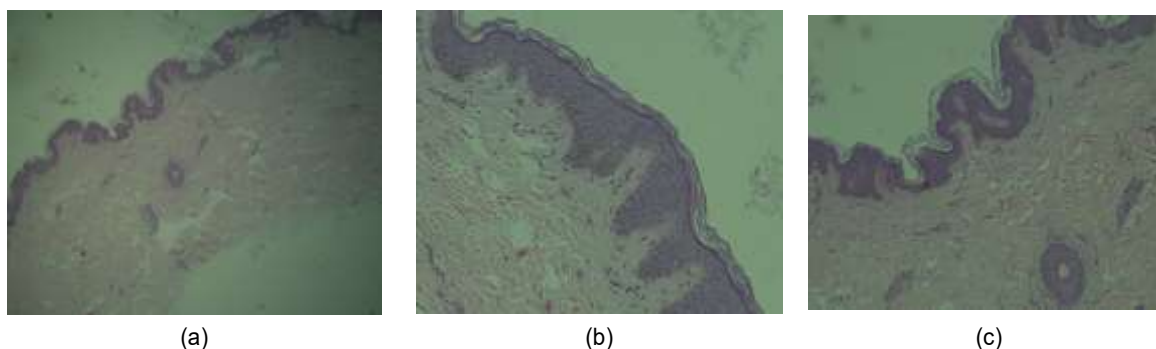
STT	Thời điểm xét nghiệm	Kết quả cấy nấm (n = 30)	
		Dương tính n (%)	Âm tính n (%)
1.	Thu hồi da	05 (16,7) (*)	25 (83,3)
2.	Xử lý, chế tạo mẫu	02 (6,7) (*)	28 (93,7)
3.	Sau bảo quản 01 tháng	00 (00)	30 (100)
4.	Sau bảo quản 03 tháng	00 (00)	30 (100)
5.	Sau bảo quản 6 tháng	00 (00)	30 (100)
6.	Sau bảo quản 12 tháng	00 (00)	30 (100)
7.	Sau bảo quản 18 tháng	00 (00)	30 (100)

(*): Tổng cộng có 07 mẫu cấy nấm (+), bao gồm *Trichophyton rubrum* (03 mẫu), nấm mốc (02 mẫu).

Nhận xét: Sau quá trình xử lý, chế tạo mẫu: Tỷ lệ cấy nấm (+) giảm dần; hoàn toàn (-) sau 01 tháng và trong suốt quá trình bảo quản da bằng Glycerol 85%.

3.3. Hình thái cấu trúc của da đồng loại bảo quản bằng Glycerol 85%

* Hình thái cấu trúc da đồng loại sau thu hồi, xử lý (trước bảo quản)



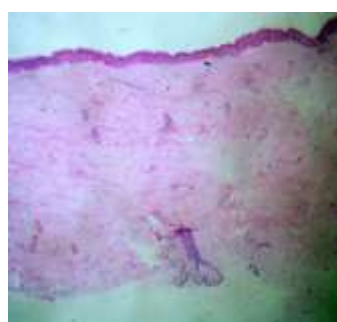
Ảnh 3.1. Hình thái cấu trúc da bình thường trước bảo quản: Các mẫu da gồm lớp thượng bì và 1 phần chân bì. Thượng bì với lớp sừng rõ, lớp gai gồm 7 - 10 hàng, các nhú thượng bì rõ. Chân bì gồm các sợi tạo keo tạo thành các bó, một số mẫu còn thấy các thành phần phụ của da như tuyến mồ hôi, tuyến bã; một số mạch máu. Hoàn toàn không có lớp mỡ (Mẫu da số NA1002, H&E 5X (a), 10X (b), 20X (c)).

* Hình thái cấu trúc da đồng loại qua các thời gian bảo quản

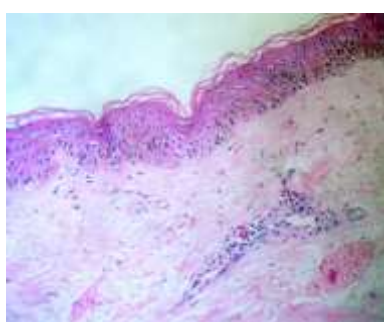
Bảng 3.5. Hình thái cấu trúc da đồng loại qua các thời gian bảo quản

Thời gian bảo quản	Thượng bì	Chân bì	Tế bào da
Sau 1 tháng	Thượng bì với lớp sừng khá dày, có màu kiềm đậm; lớp gai gồm 7-10 hàng, rõ các cầu nối gian bào; lớp hạt rõ. Có khoảng sáng quanh nhân. Lớp đáy có các tế bào sinh sắc tố; các nhú thượng bì rõ.	Chân bì gồm các sợi tạo keo tạo thành các bó, một số mẫu còn thấy các thành phần phụ của da như tuyến mồ hôi, tuyến bã; một số mạch máu với lòng mạch hẹp, tế bào nội mô trương to. Hoàn toàn không có lớp mỡ.	Tế bào da bình thường.

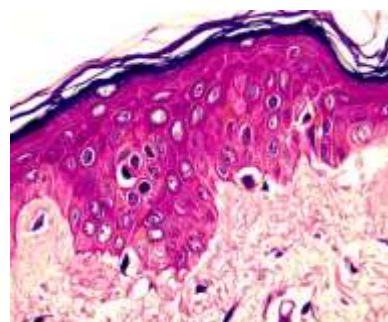
Thời gian bảo quản	Thượng bì	Chân bì	Tế bào da
Sau 3 tháng	Thượng bì với lớp sừng còn khá dày, tuy nhiên bắt màu kiềm nhạt hơn; lớp gai gồm 7-10 hàng, rõ các cầu nối gian bào; lớp hạt rõ. Có khoảng sáng quanh nhân. Lớp đáy có các tế bào sinh sắc tố; các nhú thượng bì rõ.	Chân bì gồm các sợi tạo keo tạo thành các bó, một số mẫu còn thấy các thành phần phụ của da như tuyến mồ hôi, tuyến bã; một số mạch máu với lòng mạch hẹp, tế bào nội mô trương to. Hoàn toàn không có lớp mỡ.	Tế bào da bình thường.
Sau 6 tháng	Thượng bì rõ các lớp sừng mỏng hơn, có độ trong suốt hơn bình thường; tế bào sáng, tế bào hạt, tế bào gai, tế bào đáy. Tế bào gai rõ các gai nổi, nhân tế bào tròn, màng nhân rõ chất màu phân tán đồng đều; các nhú thượng bì còn rõ.	Các sợi tạo keo trương to, xen lẫn các thành phần phụ của da như tuyến mồ hôi, tuyến bã; mạch máu có thành dày, tế bào nội mô trương to. Hoàn toàn không có lớp mỡ.	Tế bào da bình thường.
Sau 12 tháng	Lớp sừng mỏng hơn và nhiều hốc sáng. Lớp gai có 7 - 10 hàng tế bào. Ranh giới lớp đáy với phần chân bì được phân biệt rõ rệt, trong lớp đáy có ít hạt sắc tố melanin. Không rõ nhú chân bì, màng đáy trông như bề mặt phẳng.	Các sợi tạo keo trương to, một số nơi bị thoái hóa, xen lẫn các thành phần phụ của da như tuyến mồ hôi, tuyến bã; mạch máu có thành dày, tế bào nội mô trương to. Hoàn toàn không có lớp mỡ.	Tế bào da bình thường.
Sau 18 tháng	Lớp sừng mỏng hơn và nhiều hốc sáng. Lớp gai có 7 - 10 hàng tế bào. Ranh giới lớp đáy với phần chân bì được phân biệt rõ rệt, trong lớp đáy có ít hạt sắc tố melanin. Không rõ nhú chân bì, màng đáy trông như bề mặt phẳng.	Các sợi tạo keo trương to, một số nơi bị thoái hóa, xen lẫn các thành phần phụ của da như tuyến mồ hôi, tuyến bã; mạch máu có thành dày, tế bào nội mô trương to. Hoàn toàn không có lớp mỡ.	Tế bào da bình thường.



(a)



(b)



(c)

Ảnh 3.2. Hình ảnh vi thể mô học da bình thường sau 12 tháng bảo quản bằng Glycerol 85%: Mẫu da gồm lớp thượng bì và chân bì. Thượng bì với lớp sừng rõ và nhiều hốc sáng; lớp gai gồm 7-10 hàng, các nhú thượng bì rõ. Chân bì gồm các sợi tạo keo tạo thành các bó, trương to, xen lẫn các thành phần phụ của da như tuyến mồ hôi, tuyến bã; một số mạch máu. Hoàn toàn không có lớp mỡ (Mẫu da số ME1358, H&E 5X (a), 10X (b), 20X (c)).

Từ kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi đã xây dựng quy trình chi tiết từ khâu lựa chọn người hiến mô cho tới các khâu thu hồi, xử lý và bảo quản da đồng loại bằng Glycerol 85%. Các bước cơ bản của quy trình được tóm tắt như sau:

Bước 1. Người hiến da được thăm khám lâm sàng và xét nghiệm máu sàng lọc bệnh lý. Lựa chọn những người đủ tiêu chuẩn hiến da gồm: người cho còn sống hoặc đã chết ở mọi lứa tuổi, các xét nghiệm huyết thanh âm tính với HIV, HCV, HBV, VDRL và không thuộc nhóm tiêu chuẩn loại trừ hiến da.

Bước 2. Phẫu thuật lấy da có độ dày 0,25 - 0,38mm. Thời gian thu hồi da trong vòng 12 giờ sau khi mô bị ngừng cấp máu hoặc 24 giờ trong trường hợp được bảo quản lạnh.

Bước 3. Da được xử lý tại labo trong điều kiện vô trùng, loại bỏ các tổ chức không cần thiết, gia công chế tác thành các đơn vị da. Rửa da bằng dung dịch Ringerlactat có pha Penicilin 50UI/ml, Streptomycin 50µg/ml, Amphotericin B 0,125µg/ml, 3 lần trong vòng 10 phút.

Bước 4. Bảo quản da trong môi trường glycerol 85% (85ml Glycerol nguyên chất + 15 ml nước muối sinh lý 0,9%);

Bước 5. Lưu trữ các mảnh da trong ngăn mát tủ lạnh (tương đương 4°C) tối thiểu 3 tháng trước khi sử dụng.

Bước 6. Cấp phát theo hồ sơ, loại bỏ sạch Glycerol và ghép mảnh da trên vết thương.

4. BÀN LUẬN

4.1. Xây dựng quy trình lấy và bảo quản da đồng loại bằng Glycerol 85%

4.1.1. Nguồn da thu hồi

Da đồng loại là da của người khác, được sử dụng làm vật liệu thay thế da bệnh nhân từ giữa thế kỷ 19, nhưng thực sự phổ biến từ những năm 1950 đến nay [5], [6], [8]. Da đồng

loại được lấy từ người thân, từ tử thi dưới dạng da mảnh mỏng, đây là vật liệu tốt nhất nếu ghép ngay sau khi da được lấy khỏi cơ thể [2]. Nhưng hiện nay, tại các nước phát triển chi phí vẫn cao và không đủ cung cấp cho các cơ sở điều trị do nguồn cung cấp da rất hạn chế. Đối với các nước Phương Tây, da thu hồi từ các tử thi đã tự nguyện hiến cho y học nên công tác thu hồi được tiến hành như phẫu thuật lấy da thông thường trên bệnh nhân.

Nước ta việc hiến mô hoặc hiến xác vẫn còn chưa phổ biến bởi quan niệm trong xã hội. Các nghiên cứu trước kia chỉ là quy mô nhỏ, chủ yếu lấy da từ người thân cho da. Da đồng loại lấy từ người sống có khả năng bám sống cao, tái lập tuần hoàn tốt, nhưng vẫn có sự thải loại mảnh ghép, trừ trường hợp sinh đôi cùng trứng. Da đồng loại lấy từ người sống thường được ứng dụng trong điều trị bỏng sâu diện rộng ở trẻ em do diện tích che phủ thực tế ở trẻ em ít hơn đáng kể so với người lớn có cùng diện tích. Tuy nhiên sử dụng da đồng loại từ người sống có khó khăn lớn nhất là nguồn cho rất hạn chế, liên quan đến nhiều yếu tố như sự sẵn sàng của người thân, phong tục tập quán, diện tích lấy da không được nhiều do vậy không phải lúc nào cũng thực hiện được.

Theo Lê Năm, Nguyễn Ngọc Tuấn và cộng sự thì diện tích trung bình da được lấy từ người thân cũng chỉ 4,7% DTCT (tương đương với 600 - 700cm², đây là diện tích nhỏ đối với mỗi mẫu cho da. Việc lấy da từ người sống còn gây hậu quả nặng nề về tâm lý của người cho, bởi sau khi lấy da phải chịu đau đớn, vùng lấy để lại sẹo ảnh hưởng lâu dài về khía cạnh thẩm mỹ và tinh thần người cho da [5]. Đồng thời cũng cần phải lưu ý đến thời kỳ cửa sổ của các bệnh truyền nhiễm dẫn đến có thể bị bỏ qua trong quá trình sàng lọc [10], [12].

Từ năm 2007, chúng ta đã có *Luật Hiến, lấy, ghép mô, bộ phận cơ thể người và hiến, lấy xác* [7], mở đường cho nhiều nghiên cứu và ứng dụng ghép mô tạng để cứu sống người bệnh. Việc nghiên cứu quy trình thu hồi, bảo

quản da từ tử thi được đặt ra để khi có nguồn da là chúng ta có thể ứng dụng được ngay. Lê Năm, Đinh Văn Hân và cộng sự (2014) đã nghiên cứu xây dựng quy trình thu hồi xử lý và bảo quản da đồng loại dạng lạnh sâu [6].

Trên thực tế, mặc dù đã có *Luật Hiến, lấy, ghép mô, bộ phận cơ thể người và hiến, lấy xác*, nhưng việc hiến xác hoặc hiến mô vẫn chưa được phổ biến, do đó, trong điều kiện khó khăn về nguồn da thu hồi hiện nay, nguồn lấy da của chúng tôi bao gồm: Từ tử thi, từ nguồn mô đã cắt rời khỏi cơ thể (chi thể cắt cụt, phần da thừa sau phẫu thuật thẩm mỹ), trong đó phần lớn (78,5%) là từ nguồn da thừa sau phẫu thuật thẩm mỹ thành bụng. Các nguồn mô này cũng có thể được coi như mô lấy từ tử thi về khía cạnh khoa học. Mặt khác, việc thuyết phục bệnh nhân hiến phần mô có da sau phẫu thuật cắt cụt, phẫu thuật thẩm mỹ dễ dàng hơn.

Tại nhiều quốc gia trên thế giới, như Ấn Độ, Ai Cập,... việc lấy da từ tử thi vẫn chưa được hợp pháp hóa, các bác sĩ đã sử dụng da đồng loại lấy các trường hợp phẫu thuật cắt bỏ da bụng thừa, thu gọn vú hai bên,... bảo quản bằng Glycerol 85% để điều trị các bệnh nhân bỏng sâu, vết thương mắt da rộng và vết thương mạn tính cho kết quả tốt. Các tác giả khuyến cáo đây là một nguồn cung cấp khá dồi dào cho các ngân hàng da, đặc biệt tại các quốc gia mà việc lấy da từ tử thi chưa được hợp pháp hóa [23]. Da từ tử thi, da từ nguồn mô đã cắt rời khỏi cơ thể được lấy trong vòng từ 6 - 8 giờ sau khi chết hoặc tách rời khỏi cơ thể; nếu tử thi hoặc nguồn mô được bảo quản trong môi trường đông lạnh có thể lấy từ khoảng 10 - 24 giờ sau chết, để đảm bảo tế bào da còn nguyên vẹn, điều kiện quyết định chất lượng mảnh da bảo quản.

Về các tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ người hiến da: Các tiêu chuẩn lựa chọn, cũng như loại trừ người hiến mô da được chúng tôi xây dựng dựa trên sự tham khảo các tiêu chuẩn của Hiệp hội Ngân hàng Mô Châu Âu (European Association of Tissue Banks: EATB),

Hiệp hội Ngân hàng Mô Hoa Kỳ (American Association of Tissue Banks: AATB) - 1993 [15]; Luật Hiến, lấy, ghép mô, bộ phận cơ thể người và hiến, lấy xác [7], Thông tư số 28/2012/TT-BYT ngày 01 tháng 12 năm 2012 của Bộ Y tế quy định “Danh mục bệnh mà người mắc bệnh đó không được lấy mô, bộ phận cơ thể để ghép cho người bệnh” [1] và trên cơ sở tham khảo, kế thừa kết quả nghiên cứu của các công trình khoa học liên quan [6]. Đặc biệt, có sự đồng thuận phổ biến rộng rãi ở tất cả các ngân hàng mô về xét nghiệm loại trừ một số virus gây bệnh từ nguồn cho, bao gồm HIV, HBV, HCV, giang mai. Xét nghiệm loại trừ CMV (Cytomegalovirus) là quan trọng khi người nhận là CMV âm tính và được nhận thuốc ức chế miễn dịch. Tuy nhiên, ghép da đồng loại không cần sử dụng thuốc ức chế miễn dịch, cũng như ức chế miễn dịch tự nhiên liên quan đến bỏng đường như không dẫn đến các vấn đề liên quan đến CMV ở người nhận cấy ghép da nên nhiều ngân hàng mô không tiến hành sàng lọc CMV [14]. Mặt khác, Glycerol 85% có tác dụng diệt vi rút mạnh đối với nhiều loại vi rút, trong đó có CMV (Astegiano S và cộng sự - 2012) [9], do đó, chúng tôi cũng không tiến hành sàng lọc cho CMV.

4.1.2. Sử dụng dung dịch Glycerol 85% để bảo quản da đồng loại

Da đồng loại sau khi được thu hồi cần phải có công đoạn xử lý và làm sạch, sau đó bảo quản để duy trì tác dụng của mảnh da cho đến khi được ghép vào vết thương bệnh nhân [14], [15].

Bảo quản lạnh sâu và bảo quản bằng Glycerol là hai phương pháp thành công chính để bảo tồn lâu dài cho da đồng loại. Tuy nhiên, bảo quản phải tuân theo các tiêu chí nghiêm ngặt để giảm thiểu nguy cơ truyền bệnh [20]; liên quan đến sàng lọc các nguồn cho da còn sống hay đã chết; truy xuất thông tin của người cho, người nhận; ngăn ngừa nhiễm khuẩn thứ cấp và lây nhiễm chéo trong quá trình xử lý và

lưu trữ các mô được thu nhận; bằng chứng kiểm tra vi sinh;... [14].

Việc lựa chọn Glycerol làm chất bảo quản đã được nhiều ngân hàng mô trên thế giới sử dụng trong bảo quản mô ghép như bảo quản xương, giác mạc, màng ối, da đồng loại, dị loại,... Glycerol đóng vai trò như một chất bảo vệ cho việc lưu trữ các mô đông lạnh, bởi vì nó liên kết mạnh mẽ với nước và ngăn chặn sự hình thành các tinh thể nước đá làm hư hại tế bào [22]. Glycerol có độc tính rất thấp với tế bào sống, được sử dụng trong nhiều lĩnh vực như y tế, dược phẩm và công nghiệp...

Trong lĩnh vực nuôi cấy tế bào, Glycerol được sử dụng ở nồng độ 10 - 15% để chống sốc lạnh khi hạ nhiệt độ lạnh sâu. Từ năm 1980, Ngân hàng da Châu Âu đã nghiên cứu sử dụng Glycerol 85% trong bảo quản da đồng loại. Chúng làm mất nước tế bào nhưng vẫn giữ nguyên cấu trúc mô và tế bào. Các tế bào trong da đồng loại bảo quản Glycerol đã chết nhưng hình thái tế bào vẫn được bảo quản tốt, cấu trúc da vẫn nguyên vẹn so với da tươi mới, ngoại trừ sự co rút của tế bào sừng (Richters CD và cộng sự - 1996); người ta chỉ phát hiện thấy có một vài nếp nhăn trên tế bào sừng khi bảo quản là do tế bào bị mất nước trong điều kiện ưu trương, các cấu trúc bào tương hoặc đệm gian bào không bị phá vỡ [17]. Các nghiên cứu đã chứng minh rằng nồng độ 85% được lựa chọn bởi Ngân hàng da Châu Âu là tối ưu để giảm thiểu các phản ứng phân hủy, duy trì tế bào lâu dài [18], [23], đồng thời vẫn giữ được sự mềm mại và dễ dàng sử dụng trên lâm sàng [19].

4.2. Kết quả thu hồi, xử lý bảo quản da đồng loại bằng Glycerol 85%

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng quy trình và tiến hành thu hồi, xử lý, bảo quản được 200 tấm da đồng loại, kích thước 10 x 10 cm, kết quả nghiên cứu cho thấy:

4.2.1. Về xét nghiệm vi sinh

Trong thực tế hiện nay, nguồn da thu hồi của chúng tôi chủ yếu được lấy từ các chi thể sau cắt cụt, từ các phần mô thừa sau phẫu thuật thẩm mỹ thành bụng. Mặc dù các phẫu thuật này đã có sự đảm bảo vô trùng, cũng như chúng tôi chủ động lựa chọn các vùng lấy da không có biểu hiện viêm, nhiễm trùng, loại trừ các bệnh nhân có bệnh nhiễm trùng cấp hoặc mạn tính toàn thân hay tại chỗ lấy da,... tuy vậy vẫn có tới 07/30 (23,3%) mẫu da thu hồi được cấy khuẩn (+), 05/30 (16,7) mẫu da cấy nấm (+). Công tác xử lý, chế tạo mẫu đã giúp loại bỏ phần lớn các vi sinh vật còn sót lại: Tỷ lệ cấy khuẩn, cấy nấm (+) còn lần lượt là 13,3% và 6,7%. Sau 01 tháng bảo quản bằng Glycerol 85%, tỷ lệ mẫu da đồng loại nhiễm khuẩn giảm xuống còn 3,3%, không còn mẫu da cấy nấm (+); từ tháng thứ 3 trở đi, 100% mẫu da cấy khuẩn, cấy nấm đều (-). Kết quả nghiên cứu còn cho thấy, các loài vi khuẩn và nấm phân lập được là các loài thông thường có mặt trên da và trong không khí, chúng không thuộc loại vi sinh vật gây bệnh nguy hiểm. Kết quả này tương đối phù hợp với các nghiên cứu của các tác giả khác trước đây [2-4, 16, 18, 21].

Glycerol có tác dụng diệt khuẩn chậm nhưng hiệu quả. Hàng năm trên 1.550.000 cm² da đồng loại bảo quản trong Glycerol được sử dụng trên lâm sàng tại các trung tâm bỏng Châu Âu nhưng không ghi nhận các báo cáo nghi ngờ truyền bệnh [11].

4.2.2. Về xét nghiệm hình thái mô tế bào

Các vật liệu thay thế da tạm thời có cấu trúc càng giống da bình thường càng tốt. Các phương pháp bảo quản da đồng loại phải duy trì được cấu trúc và chức năng của da, nhằm đảm bảo tính an toàn cho da bảo quản một thời gian dài và đạt mục đích điều trị lâm sàng.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy: Tấm da đồng loại bảo quản bằng Glycerol 85% có đủ 2 lớp gồm biểu bì và một phần trung

bì và duy trì được hình thái cấu trúc của da, không bị thay đổi trong thời gian bảo quản. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, chúng tôi thấy chỉ một thời gian ngắn sau khi đưa tấm da vào dung dịch Glycerol 85%, quá trình mất nước tại mô diễn ra nhanh do tính chất ưu trương của môi trường bảo quản nên tấm da mỏng lại và có độ trong suốt hơn bình thường. Về hình thái cấu trúc mô của da bảo quản trong Glycerol 85%, các lớp của tấm da tuy giữ nguyên cấu trúc nhưng có sự thay đổi nhỏ về hình thái giữa các lớp như mất các nhú chân bì, màng đáy trông như hình phẳng và khi tái hợp nước thì các sợi tạo keo ở phần trung bì trương to hơn bình thường. Điều hiển nhiên là các tế bào của da bảo quản trong Glycerol 85% bị bất hoạt, mặt dù cấu trúc tế bào vẫn nguyên vẹn nhưng vì mất nước nên tế bào trên ở dạng không hoạt động.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả khác: Theo Richters C. và cộng sự (1996), việc bảo quản bằng Glycerol 85% không ảnh hưởng đến tính toàn vẹn cấu trúc cơ bản của da. Các tế bào Keratinocytes và Langerhans còn nguyên vẹn với các hạt Birbeck đặc trưng của chúng vẫn còn tồn tại trong da được bảo quản bằng Glycerol 85% [17].

Kua EH, Goh CQ, Ting Y và cộng sự (2012) nghiên cứu đánh giá về mô học cho thấy: Tính toàn vẹn cấu trúc mô học mảnh da đồng loại được bảo toàn tốt ở cả hai phương pháp bảo quản, mặc dù phương pháp bảo quản lạnh sâu có tính khả thi hơn [13].

Đình Văn Hân và cộng sự (2012) [3] nghiên cứu ban đầu về bảo quản da đồng loại trong Glycerol 85% để điều trị vết thương bỏng sâu cho thấy: Da bảo quản trong Glycerol 85% không duy trì được khả năng sống của các tế bào da nhưng duy trì được hình thái cấu trúc của da. Đây là cơ sở để ứng dụng tấm da đồng loại bảo quản bằng Glycerol 85% trong điều trị vết thương, vết bỏng.

5. KẾT LUẬN

1. Chúng tôi đã xây dựng được quy trình thu hồi, bảo quản da đồng loại bằng Glycerol 85% và ứng dụng chế tạo được 200 tấm da đồng loại kích thước 100cm², từ nguồn da thừa sau phẫu thuật thẩm mỹ thành bụng, da tử thi và chi thể bị cắt cụt, bảo quản bằng Glycerol 85% để sử dụng trong nghiên cứu labo và lâm sàng.

2. Tỷ lệ cấy khuẩn, cấy nấm dương tính của tấm da đồng loại sau thu hồi lần lượt là 23,3% và 16,7%. Quá trình xử lý, chế tác da làm giảm tỷ lệ cấy khuẩn và nấm dương tính xuống còn 13,3% và 6,7%. Sau 01 tháng bảo quản trong dung dịch Glycerol 85%, tỷ lệ mẫu da đồng loại nhiễm khuẩn giảm xuống còn 3,3%, không còn mẫu da nhiễm nấm; tại các thời điểm 3 tháng, 6 tháng, 12 tháng và 18 tháng: 100% mẫu da cấy khuẩn và nấm là âm tính.

Tấm da đồng loại bảo quản bằng Glycerol 85% dày từ 0,25 - 0,38mm, có đủ 2 lớp gồm biểu bì và một phần trung bì, hình thái cấu trúc của da cơ bản không bị thay đổi trong suốt thời gian bảo quản (18 tháng).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu Tiếng Việt

1. Bộ Y tế (2012), Thông tư số 28/2012/TT-BYT quy định "Danh mục bệnh mà người mắc đó không được lấy mô, bộ phận cơ thể để ghép cho người bệnh".
2. Đình Văn Hân (2011), "Nghiên cứu thu hồi, xử lý và bảo quản tươi da đồng loại để điều trị bỏng sâu diện tích rộng"; *Tạp chí Y học thẩm họa & Bỏng*, số 3, tr. 23-31.
3. Đình Văn Hân (2012), "Nghiên cứu ban đầu về bảo quản da đồng loại trong glycerol 85% để điều trị vết thương bỏng sâu" *Tạp chí Y học thẩm họa và Bỏng*.4: 28-34.
4. Đình Văn Hân, Ngô Ngọc Hà (2014), "Đánh giá sự thay đổi về khía cạnh vi sinh và hình thái mô tế bào của da đồng loại trong quá trình thu hồi, xử lý và bảo quản lạnh sâu", *Tạp chí Y học thẩm họa và Bỏng*, số 1, trang 49-58.
5. Lê Năm (2003) *Nghiên cứu sử dụng ghép da đồng loại lấy từ người thân điều trị bệnh nhân bỏng sâu diện tích rộng*, Báo cáo Tổng kết đề tài cấp Bộ Quốc Phòng.

6. Lê Năm (2014), *Nghiên cứu xây dựng quy trình thu nhận, xử lý và bảo quản một số loại mô ghép*; Báo cáo Tổng kết đề tài độc lập cấp Nhà nước.
7. Luật Hiến, lấy, ghép mô, bộ phận cơ thể người và hiến, lấy xác; Số 75/2006/QH11 ngày 29 tháng 11 năm 2006.
8. Lê Thế Trung (2003), *Bông - những kiến thức chuyên ngành*, Nhà xuất bản y học, Hà Nội.
15. Pianigiani E et al (2005), "Skin bank organization", *Clin Dermatol*, 23(4): 353-6.
16. Pianigiani E et al (2010), "Processing efficacy in relation to microbial contamination of skin allograft from 723 donors". *Burns*, Vol. 36, Issue 3: 347-351.
17. Richters C., Hoekstra M., Van Baare J. et al. (1996), "Morphology of glycerol-preserved human cadaver skin", *Burns*.22 (2): 113-116.

Tài liệu Tiếng Anh

9. Astegiano S, Alotto D, Castagnoli C et al (2012), "In vitro CMV-infection model in fresh and glycerolized skin graft", *New Microbiol*. 2012 Jan; 35 (1): 67-71.
10. Balasubramani M., Kumar T. R. and Babu M. (2001), "Skin substitutes: a review". *Burns*.27 (5): 534-544.
11. Brusselaers N., Pirayesh A., Hoeksema H. et al. (2010), "Skin replacement in burn wounds", *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*.68 (2): 490-501.
12. Cameron P. U., Pagnon J. C., van Baare J. et al. (2000), "Efficacy and kinetics of glycerol inactivation of HIV-1 in split skin grafts", *Journal of medical virology*.60 (2): 182-188.
13. Kua EH, Goh CQ, Ting Y et al (2012), "Comparing the use of glycerol preserved and cryopreserved allogenic skin for the treatment of severe burns: differences in clinical outcomes and in vitro tissue viability", *Cell Tissue Bank*, 13(2): 269-79.
14. Liangpeng Ge, Zhenggen Huang and Hong Wei (2011), "Skin Grafts Preservation", In: Skin Grafts - Indication, Application and Current Resaerch; Publisher InTech.
18. Tognetti L, Pianigiani E, Ierardi F et al. (2017), "Current insights into skin banking: storage, preservation and clinical importance of skin allografts", *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*, Volume 5, pp. 41 - 56.
19. Van Baare J., Buitenwerf J., Hoekstra M. et al. (1994), "Virucidal effect of glycerol as used in donor skin preservation", *Burns*.20: S77-S80.
20. Van Baare J., Cameron PU, Vardaxis N et al (1998), "Comparison of glycerol preservation with cry preservation methods on HIV-1 inactivation", *J Burn Care Rehabil*, 19 (6): 496-500.
21. Van Baare J, Ligtvoet EE, Middelkoop E (1998), "Microbiological evaluation of glycerolized cadaveric donor skin", *Transplantation*, 65(7): 966-70.
22. Vloemans A., Middelkoop E. and Kreis R. (2002) "A historical appraisal of the use of cryopreserved and glycerol-preserved allograft skin in the treatment of partial thickness burns". *Burns*.28: 16-20.
23. Zidan SM, Eleowa SA (2014), "Banking and use of glycerol preserved full-thickness skin allograft harvested from body contouring procedures", *Burns*, 40 (4): 641-7.