

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

## PHẦN 2: CÁC PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ QUÁ TRÌNH LIỀN VẾT THƯƠNG

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).

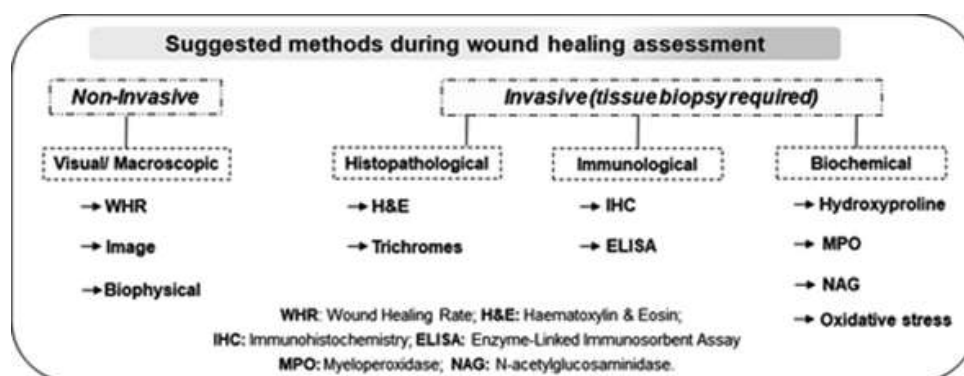
Bài tổng quan gồm hai phần chính:

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

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

### 3. PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ LVT

Các phương pháp đánh giá sự tiến triển của vết thương bao gồm các giao thức định tính và định lượng nên thực hiện đến khi mô được phục hồi.



Sơ đồ 2. Một số phương pháp đánh giá liền vết thương [1].

<sup>1</sup>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.1.2022.96>

### 3.1. Tỷ lệ liền vết thương (Wound healing rate - WHR)

Trong thực hành lâm sàng, tốc độ thay đổi diện tích bề mặt vết thương, còn được gọi là tốc độ liền vết thương, là cách tốt nhất để định lượng tiến trình liền vết thương (LVT), là dấu hiệu lâm sàng theo dõi nhiều nhất trong liền vết thương. Kinh điển là cách đo diện tích bề mặt có sẵn, từ đo chiều dài và chiều rộng bằng thước đến các thuật toán phân tích hình ảnh. Có thể áp tấm phim trong suốt lên bề mặt vết thương, vẽ theo chu vi vết thương, từ đó thực hiện đo diện tích bề mặt vết thương [1].

Một phương pháp hiện đại là nghiên cứu hoạt động sửa chữa tế bào phối hợp linh hoạt ở cấp độ đơn bào và mô. Park đã theo dõi hình ảnh tế bào sống trong thời gian liền của vết thương bằng cách sử dụng chuột sống được đánh dấu gen protein dung hợp histone H2B bằng protein huỳnh quang (Green fluorescent protein - GFP) được điều khiển bởi promoter keratin 14 (chuột K14-H2BGFP). Tạo vết thương hình tròn toàn bộ da ở mặt lưng của tai chuột, chụp ảnh; đánh giá hình ảnh bằng kính hiển vi quét laser (laser scanning microscope), xác định tỷ lệ di chuyển và tăng sinh (tái biểu mô hóa) bằng phần mềm phân tích hình ảnh [18].

Chỉ số tốc độ liền vết thương (Wound healing rate - WHR) hoặc tỷ lệ liền vết loét (UHR) đánh giá quá trình tái biểu mô vết thương trên lâm sàng và thực nghiệm (in vivo và in vitro) được tính theo công thức:  $(A_i - A_f)/A_i$ .

*Trong đó:*

- +  $A_i$ : Diện tích vết thương ban đầu
- +  $A_f$ : Diện tích thời điểm đánh giá.

Đơn vị tùy ý, nằm trong khoảng từ -1,0 đến 1,0 hoặc theo tỷ lệ %. WHR bằng 1 hoặc 100% có nghĩa là hoàn toàn tái biểu mô; khi WHR bằng 0 hoặc 0% có nghĩa là không có dấu hiệu tái biểu mô;  $WHR > 0$  hoặc 0% nghĩa là thu hẹp diện tích và  $WHR < 0$  hoặc 0% là tăng [1].

Theo dõi vết thương là một phương pháp rẻ tiền, dễ tiếp cận, sử dụng cả in vivo và in vitro để đo kích thước vết thương, cho phép theo dõi tiến triển vết thương. Mặc dù việc theo dõi tương đối không xâm lấn, nhưng có nguy cơ gây khó chịu cho bệnh nhân, nhiễm trùng và tổn thương nền vết thương khi thực hiện phép đo bằng phần mềm hình ảnh khác nhau [1].

### 3.2. Phân tích vết thương bằng hình ảnh (Wound analysis by image)

Đây là một công cụ có giá trị trong y học; đặc biệt là trong da liễu; hình ảnh có thể cung cấp thông tin thường đồng nghĩa với chẩn đoán, không xâm lấn và giúp lập hồ sơ các trường hợp và theo dõi diễn biến. Hình ảnh cũng có thể cung cấp thông tin quan trọng về các thay đổi hình thái, các biến thể màu sắc... trong suốt quá trình LVT ở cả lâm sàng và thực nghiệm. Hơn nữa, ảnh kỹ thuật số là lý tưởng cho việc quản lý vết thương từ xa và các phân tích liên ngành [2, 19].

*Một số lưu ý khi chụp ảnh kỹ thuật số:*

Sử dụng máy ảnh có độ phân giải cao, số điểm ảnh (pixel) phải đủ lớn. Ảnh có độ phân giải cao giúp xác định biểu mô hoá ở rìa vết thương, cải thiện độ tin cậy của kết quả.

Đặc biệt, cần chuẩn hóa khoảng cách đặt máy ảnh, tránh nhận biết bằng mắt không chính xác. Ảnh nên được chụp theo phương vuông góc với vết thương, ảnh

không vuông góc làm đánh giá thấp đáng kể diện tích bề mặt; ánh sáng không nên tập trung trực tiếp vào nền vết thương tránh phản chiếu; không khuyến khích dùng đèn flash máy ảnh vì có thể gây chói hoặc đổ bóng. Nên có thước cặp hoặc thước đo đặt bên cạnh vết thương.

Một giao thức chụp ảnh tiêu chuẩn sẽ cho phép sử dụng các phần mềm phân tích vết thương tiếp theo [2]. Việc đánh giá LVT bằng phần mềm phân tích hình ảnh được sử dụng rộng rãi và mang lại độ chính xác trên lâm sàng cũng như trên mô hình động vật [19].

#### **\* Phân tích hình ảnh vết thương bằng phần mềm chuyên dụng**

Việc tích hợp máy ảnh kỹ thuật số, máy tính cá nhân và phần mềm đo độ phân giải cho phép phân tích hình ảnh vết thương chính xác, tiết kiệm, dễ sử dụng và thiết thực trong các cơ sở nghiên cứu và lâm sàng. Khi hình ảnh vết thương có trong máy tính, chu vi vết thương sẽ được vẽ thủ công bằng chuột máy tính. Nhiều phần mềm có sẵn để tính toán và phân tích kích thước vết thương, diện tích bề mặt và thể tích (nếu độ sâu vết thương được cung cấp). Đồng thời, phần mềm cung cấp dữ liệu lâm sàng bằng các phân tích màu theo dõi thay đổi trên bề mặt theo loại mô và màu tương ứng như mô hạt (đỏ), fibrin/sợi nấm (vàng), hoại tử (đen)... [2].

Có nhiều phần mềm còn thiết kế để hỗ trợ phân tích hình ảnh mô học, thực hiện hóa mô miễn dịch, enzym và huỳnh quang. Từ các slide của mô sinh thiết, thực hiện định lượng (ví dụ: đếm nguyên bào sợi, mạch máu) và phân tích collagen. Công nghệ này không xâm lấn; không gây khó chịu, nguy cơ nhiễm bẩn hoặc khả năng

làm hỏng nền vết thương trong quá trình đo [2, 17].

Một số phần mềm hiện nay để đo diện tích vết thương/tái biểu mô, thay đổi về kích thước và màu sắc vết thương như: AutoCAD® 14 (Autodesk®, Inc), Image House Program; DigiSkin™; Verge Videometer - VeV (Verg, Inc; Image-Pro Plus; Visiopharm và LEICA QWin Image [1].

Phần mềm phân tích hình ảnh ImageJ được cung cấp miễn phí trên trang web của Viện Y tế Quốc gia Hoa Kỳ (NIH), có thể xác định chu vi và diện tích bề mặt từ hình ảnh kỹ thuật, thực hiện phân tích màu sắc. ImageJ được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu và trên lâm sàng (loét do tiểu đường, bệnh tĩnh mạch... [1, 2, 17].

Đã có nhiều công bố sử dụng phần mềm đánh giá LVT. Geer đã sử dụng ImageJ để nghiên cứu quá trình tái tạo biểu mô vết thương và sự hình thành mạch. Chiquetti-Jr đã sử dụng Image-Pro® plus 4.5 (Media Cybernetics, Inc) để phân tích mô học (số lượng tế bào và định lượng sợi collagen) để đánh giá tác dụng của thuốc ức chế miễn dịch trong việc chữa LVT ở chuột. Mendonça đã áp dụng 2 chương trình: Scion corp cho hình ảnh vi mô đối xứng của bệnh phẩm được nhuộm bằng trichrome Masson để đếm tế bào viêm và đo lường kích thước vùng biểu bì và hạ bì; Image-Pro® plus 4.5 để định lượng collagen (tổng số collagen và collagen type I và III) trong các phiên kính nhuộm Picrosirius. Gonçalves đã sử dụng Sigma-pro® (St. Louis, MO, Hoa Kỳ) để đếm tế bào viêm, tạo collagen và tái biểu mô [1].

### **3.3. Đánh giá sinh lý liên vết thương (Biophysical assessment of wound healing)**

Một phương pháp tiếp cận không xâm lấn khác để đánh giá quá trình liền VT bao

gồm việc sử dụng các kỹ thuật lý sinh như chụp cắt lớp kết hợp quang học (Optical coherence tomography - OCT), kính hiển vi quét laser đồng tiêu (confocal laser scanning microscopy - CLSM) và quang phổ cận hồng ngoại khuếch tán (diffuse near-infrared spectroscopy - DNIRS)...

Chụp cắt lớp kết hợp quang học là một công nghệ mới để chẩn đoán và theo dõi tình trạng viêm trong bệnh da liễu, tạo ra hình ảnh thời gian thực có độ phân giải cao về cấu trúc da. Greaves [20] đã so sánh OCT với phương pháp sinh thiết mô bệnh về đánh giá mô học (viêm, tăng sinh và tái tạo) của quá trình LVT cấp tính in vivo. Tác giả cho rằng OCT có thể là phương pháp chẩn đoán thay thế cho sinh thiết đục lỗ.

Một số công trình nghiên cứu khác như sử dụng OCT cho các nghiên cứu LVT in vivo sau khi điều trị bằng laser phân đoạn không bóc tách hoặc bóc tách. Các khu vực điều trị được quét ở các thời điểm khác nhau, sử dụng thuật toán để định lượng những thay đổi hình thái ở các độ sâu mô khác nhau. Hoặc một công trình sử dụng kỹ thuật OCT và CLSM để định lượng động LVT, ghi nhận OCT giúp hình dung những thay đổi của da và độ sâu của hình ảnh vượt trội hơn so với CLSM [1].

Phương pháp DNIRS là công nghệ đo mức độ oxy trong máu tại vết thương, sử dụng ánh sáng 70MHz trong khoảng 650 - 900nm để định lượng oxy và deoxy-hemoglobin ở vết thương, theo thời gian cho thấy xu hướng tiến triển vết thương liền hay không [21].

### 3.4. Phân tích mô bệnh học (Histopathological analysis)

Mô bệnh học vết thương là một công cụ hữu ích để loại trừ nguyên nhân ác tính,

theo dõi tiến trình liền vết thương, sinh lý bệnh của vết thương không liền, đánh giá sự thay đổi hình thái và giúp chẩn đoán. Trên lâm sàng, nơi sinh thiết tốt nhất là rìa của vết thương vì cho phép so sánh giữa vùng tổn thương và vùng da xung quanh. Trong phòng thí nghiệm, sinh thiết phân tích mô bệnh học bao gồm toàn bộ vết thương (cả mép vết thương) [1, 22].

Ngay sau khi lấy bệnh phẩm, mẫu mô phải được đặt vào các dung dịch bảo quản để duy trì tính toàn vẹn của mô mà không bị thay đổi cấu trúc tế bào; chất cố định phổ biến nhất là Formaldehyde 10%. Khi cần phân tích phân tử, bệnh phẩm cũng có thể được đông lạnh bằng đặt mẫu vào nhiệt độ cắt tối ưu, sau đó bảo quản ở -80°C cho đến khi xử lý. Mẫu mô sẽ được trải qua một số bước xử lý, bao gồm nhúng, cắt và nhuộm. Chất nhuộm sử dụng rộng rãi nhất trong bệnh lý vết thương, da liễu nói chung là Haematoxylin và Eosin (H&E). Một số bệnh phẩm đặc biệt (không nhuộm H&E), nhuộm trichromes và nhuộm chuyên biệt để phát hiện các dấu ấn hóa mô miễn dịch để làm nổi bật các thành phần mô hoặc dị vật không quan sát được ở tiêu bản H&E [1].

Phân tích mô bệnh học vết thương thường bao gồm định lượng bạch cầu (đại thực bào, tế bào mast, tế bào lympho và bạch cầu trung tính) để đánh giá giai đoạn viêm; định lượng mạch máu để đánh giá sự hình thành mạch; nguyên bào sợi và collagen. Sự sắp xếp và định hướng collagen đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn tái tạo. Nhuộm Picrosirius để phát hiện cả sợi collagen mỏng và dày [23].

Các vết màu trichrome bao gồm ba màu khác nhau (đỏ, xanh lá cây và xanh dương) làm nổi bật các sợi collagen và cơ.

Một số phương pháp nhuộm trichromes phổ biến nhất [17]:

(a) Phương pháp Gomori, làm ó các sợi cơ có màu đỏ, collagen có màu xanh lá cây và các nhân có màu xanh lam đến đen; collagen cũng có thể bị nhuộm màu xanh lam khi màu xanh lá cây nhanh hoặc xanh lục nhạt từ trichrome được thay thế bằng Aniline Blue.

(b) Phương pháp Masson, nhuộm màu cơ và sợi gian bào, tế bào chất và keratin màu đỏ, collagen màu xanh lam và hạt nhân màu đen.

### **3.5. Phương pháp miễn dịch (Immunological methods)**

Trong dòng thác phức tạp của các sự kiện sinh học của LVT, một cách các tế bào giao tiếp với nhau và với chất nền ngoại bào. Một cơ chế giao tiếp giữa tế bào với tế bào in vivo là thông qua các yếu tố hòa tan hoặc liên kết màng (cytokine và các yếu tố tăng trưởng), kích thích cơ chế sửa chữa nội sinh bằng cách cung cấp tín hiệu cho tế bào và do đó dẫn đến phục hồi chức năng mô tổn thương. Các phân tử tín hiệu có thể được xác định và định lượng bằng các kỹ thuật khác nhau như hóa mô miễn dịch và xét nghiệm ELISA.

#### **3.5.1. Nhuộm hoá mô miễn dịch (Immunohistochemistry)**

Nhuộm hoá mô miễn dịch (*Immunohistochemistry - IHC*) mô vết thương rất hữu ích để xác định dấu ấn bề mặt phân tử, cytokine và GF để dự đoán tiến triển của vết thương. Có thể sử dụng phần mô được bảo quản lạnh hoặc nhúng parafin. IHC liên quan đến liên kết kháng thể chính với kháng nguyên tương ứng,

được phát hiện bằng một hệ thống phát hiện/hình ảnh hóa. Có sẵn nhiều loại enzym, ví dụ: Peroxidase avidin-biotin cộng với 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) hoặc hệ thống huỳnh quang... có mức chi phí, độ tin cậy, độ nhạy, tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu và sự tiện lợi khác nhau [1].

Các phần mô nhúng parafin sẽ được xử lý trước khi nhuộm miễn dịch để làm lộ các vị trí kháng nguyên của các protein mô. Việc thu hồi kháng nguyên có thể được thực hiện bằng enzym như pepsin, trypsin và K-proteinase, hoặc bằng xử lý nhiệt với đệm xitrat. Việc xử lý này không cần thiết đối với các mô bảo quản đông lạnh [1].

Việc sử dụng vỏ bọc polyme (ví dụ: Hệ thống phát hiện polyme NovoLink™, Novocastra Laboratories Ltd) bằng công nghệ trùng hợp có kiểm soát để chuẩn bị các liên hợp kháng thể polyme peroxidase HRP (horseradish peroxidase) có thể tránh hiện tượng nhuộm màu không đặc hiệu với hệ thống phát hiện streptavidin/biotin do biotin nội sinh. Hệ thống này cho phép xác định các kháng nguyên trong các phần của mô được cố định bằng formalin và nhúng parafin. Sau khi hoàn thành các phản ứng miễn dịch, các phần được sao lại bằng haematoxylin, phủ lên và phân tích [1].

Các chất đánh dấu thích hợp để theo dõi LVT bằng IHC bao gồm collagen type I, III và IV, IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-17, TGF- $\beta$ , VEGF, cytokeratins 10, 14, vimentin, fibronectin, laminin,  $\alpha$ -SMA, CD31, CD34... [1, 23].

Đánh giá sự hình thành mạch bằng IHC sử dụng các chất đánh dấu nội mô như CD31 và CD34 là một cách tiếp cận phổ biến trong nghiên cứu LVT. Mô được ủ với kháng thể sơ cấp (ví dụ: kháng thể

kháng CD31, kháng CD34) và kháng thể thứ cấp (được đánh dấu sinh học hoặc được ghép nối với HRP, hoặc kháng thể huỳnh quang) và nhuộm màu. Sau khi nhuộm miễn dịch, xác định mật độ mạch máu bằng đếm các tế bào nội mô được nhuộm màu và/hoặc tính phần trăm tổng diện tích mạch máu được nhuộm. Số lượng mạch máu trung bình được đếm trong tất cả các trường cung cấp mật độ vi mạch. Các phần mô được chụp ảnh bằng kính hiển vi quang học hoặc huỳnh quang (khi kháng thể thứ cấp có liên hợp huỳnh quang) và trung bình 10 hình ảnh được chụp ở các vùng quan tâm xác định (ROI) có mật độ mạch máu cao nhất. Việc đếm mạch máu được thực hiện trên các hình ảnh thu được bằng các hệ thống phân tích hình ảnh vi tính, chẳng hạn như ImageJ [1].

### **3.5.2. Kỹ thuật hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA)**

ELISA là một kỹ thuật labo phổ biến để đo nồng độ của chất phân tích (thường là kháng thể, kháng nguyên) trong dung dịch và có thể cung cấp thông tin quan trọng về LVT bằng cách định lượng các thành phần quan trọng như cytokine, GF từ các mẫu mô (chất đồng nhất) hoặc chất nổi nuôi cấy tế bào. Mẫu bệnh phẩm sau khi sinh thiết được chuyển vào một ống chứa chất đệm ức chế protease cho ELISA, đồng nhất và ly tâm mẫu mô hoặc chất nổi nuôi cấy tế bào. Cytokine và GF được nghiên cứu nhiều nhất trong LVT là: cytokine tiền viêm (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ), cytokine chống viêm như IL-10; EGF, PDGF, TGF- $\beta$ 1, VEGF và FGF [1].

## **3.6. Phương pháp sinh hoá (Biochemical methods)**

### **3.6.1. Xác định hàm lượng Hydroxyproline**

Collagen là thành phần protein chính của mô liên kết, được cấu tạo chủ yếu từ glycine, proline và hydroxyproline. Tổng hợp collagen đòi hỏi quá trình hydroxyl hóa lysine và proline. Phân hủy collagen giải phóng hydroxyproline tự do và các peptide. Do đó, hydroxyproline có thể được sử dụng như một dấu hiệu sinh hóa cho collagen mô và một chỉ số cho sự luân chuyển collagen. Sự gia tăng hydroxyproline cho thấy sự tổng hợp collagen tăng lên, tương ứng với việc tăng cường chữa LVT. Nói cách khác, hydroxyprolin là một dấu hiệu sinh hóa quan trọng theo dõi LVT và chuyển hóa của collagen (được coi như tiêu chuẩn vàng). Có thể xác định hydroxyproline trong mô (sinh thiết) và trong dịch nuôi cấy tế bào [1, 2].

Phép đo hydroxyproline có thể được thực hiện bằng các phương pháp so màu, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), sắc ký khí/khối phổ và phương pháp enzym. Tất cả các phương pháp đều có hai bước chung:

(a) Thủy phân mẫu bằng hoặc là axit mạnh hoặc kiềm để giải phóng hydroxyproline.

(b) Phát hiện acid amin tự do bằng kỹ thuật so màu, huỳnh quang hoặc HPLC [25].

Stegemann giới thiệu phương pháp sử dụng đệm axetat-xitrat, cloramin-T và thuốc thử Ehrlich, đánh giá ở bước sóng 550nm bằng máy quang phổ, sau đó được Huszar sửa đổi. Các sửa đổi bao gồm thay đổi quy trình thủy phân, giảm thể tích mẫu và bỏ qua bước trung hòa, các sửa đổi nhỏ khác để tối ưu hóa các điều kiện cho phép đo hydroxyproline trong mẫu sinh học hoặc chất nổi nuôi cấy tế bào.

Phương pháp này về cơ bản dựa trên sự thủy phân mẫu có tính axit hoặc kiềm, sau đó định lượng hydroxyproline tự do trong dịch thủy phân.

Toàn bộ quy trình bao gồm ba bước [1]:

- (a) thủy phân
- (b) oxy hóa
- (c) phát triển chromophores

Một phương pháp khác xác định hàm lượng hydroxyprolin là so sánh hình thái mô học có sự hỗ trợ của máy tính đơn giản, thuận tiện và đáng tin cậy [1].

### 3.6.2. Xác định Myeloperoxidase

Xét nghiệm Myeloperoxidase (MPO) đánh giá việc thâm nhiễm và tích tụ bạch cầu trung tính trong mô, đánh giá giai đoạn viêm của quá trình LVT. MPO là một thành viên của siêu họ peroxidase-cyclooxygenase bao gồm lysozyme, elastases, cathepsins, acid hydrolase và lactoferrins. Nó là một enzym phân giải protein có trong các hạt của bạch cầu đa nhân trung tính, tham gia vào cơ chế bảo vệ miễn dịch bẩm sinh thông qua sự hình thành ROS [1, 26].

Mẫu mô sau khi sinh thiết ngay lập tức được đông lạnh trong đệm phosphat và bảo quản ở  $-80^{\circ}\text{C}$  cho đến khi thực hiện xét nghiệm. Tiến hành cân và làm đồng nhất, xử lý mẫu qua quá trình ly giải nhược trương. Sau khi ly tâm, viên pellet được tái lơ lửng trong đệm có chứa hexadecyltrimethylammonium bromide và được đồng nhất lại. Pha nước ngoài trải qua hai chu kỳ đông lạnh - tan băng bằng nitơ lỏng và được ly tâm, phần nổi phía trên được pha loãng trong Natri photphat được sử dụng cho xét nghiệm. Hoạt tính Myeloperoxidase được đo bằng cách sử dụng chất nền tạo màu (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine) ở bước sóng 450nm.

Kết quả được biểu thị bằng tổng số lượng bạch cầu trung tính  $\times 10^3/\text{mg}$  mô so với đối chứng trong một đường cong chuẩn hoặc là mật độ quang học trên miligam mô [1].

### 3.6.3. Xét nghiệm N-acetylglucosaminidase

Đại thực bào vết thương có mặt trong tất cả các giai đoạn chữa lành vết thương, thực bào mầm bệnh và tế bào chết tại vết thương, sản xuất các cytokine và chemokine quan trọng. N-acetylglucosaminidase (NAG) là enzyme lysosome thể hiện cao trong các đại thực bào hoạt hóa, là một dấu hiệu viêm quan trọng. Các phép đo gián tiếp NAG trong đại thực bào hoạt hóa như sau: Phần nổi phía trên (một phần của phần nổi phía trên được sử dụng để đo hoạt tính MPO có thể được sử dụng cho xét nghiệm này) ủ với dung dịch p-nitrophenyl-2-acetamide- $\beta$ -D-glucopyranoside và đệm citrate, sau đó phản ứng kết thúc bằng cách thêm đệm glycine. Thủy phân chất nền được xác định bằng đo độ hấp thụ màu ở bước sóng 405 nm, hoạt tính NAG được biểu thị bằng sự thay đổi mật độ quang trên mỗi mg mô [27].

### 3.6.4. Đánh giá stress oxy hóa (Oxidative stress)

Các loại phản ứng oxy và nitơ (Reactive oxygen and nitrogen species - ROS, RNS) là cơ bản trong nhiều quá trình sinh lý và sinh hóa, duy trì cân bằng nội môi của tế bào và luôn có sự cân bằng giữa sự hình thành - loại bỏ chúng. Thay đổi cân bằng sẽ gây tổn thương mô, trạng thái tiền oxy hóa tạo ra dẫn đến stress oxy hóa. Các ROS đa là các gốc hydroxyl ( $\text{HO}^{\bullet}$ ), superoxide ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), alkoxyl ( $\text{RO}_2^{\bullet}$  và  $\text{RO}^{\bullet}$ ), oxy đơn ( $1\text{O}_2$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) và các (ROOH) hữu cơ. Bên cạnh ROS, các chất trung gian khác, chẳng hạn như  $^{\bullet}\text{NO}$  (Nitric oxide) tham gia vào quá trình oxy hóa khử có tầm quan trọng sinh học

đáng kể. Một số dấu ấn sinh học về stress tế bào và cơ chế bảo vệ chống oxy hóa có giá trị trong LVT như Malondialdehyde (MDA) và hydrogen peroxide [1, 26].

MDA là sản phẩm thứ cấp của quá trình peroxy hóa lipid, một dấu ấn sinh học tiềm ẩn tổn thương do quá trình oxy hóa. Nó là chất chỉ thị chính của quá trình peroxy hóa lipid, được xác định bằng cách chuẩn độ với axit thiobarbituric (TBA), một chất chỉ thị tổn thương tế bào. Hydrogen peroxide là một dấu hiệu khác của stress tế bào, khi sản xuất quá mức sẽ làm mất khả năng LVT, có thể được xác định bằng xét nghiệm màu cam xylenol oxy hóa sắt (FOX) [28].

Định lượng stress oxy hóa trong da cũng có thể được đánh giá bằng phương pháp quang hóa, cho phép phát hiện mức độ gốc oxy tự do (khi chúng tăng lên) bằng cách phát ra các photon. Kỹ thuật này chỉ có thể được sử dụng khi có stress oxy hóa, vì trong các trường hợp bình thường, lượng ROS được tạo ra bởi các quá trình sinh lý là quá thấp để có thể phát hiện được [1].

### 3.7. Đo dòng chảy tế bào (Flow cytometry)

Công nghệ này đo và phân tích nhiều đặc tính vật lý của các tiểu phân đơn lẻ (thường là tế bào) khi chảy trong dòng chất lỏng thông qua một chùm ánh sáng. Kích thước tương đối, độ hạt tương đối hoặc độ phức tạp bên trong và cường độ huỳnh quang tương đối của tiểu phân được xác định bởi một hệ thống ghép nối quang - điện tử, ghi lại cách tế bào hoặc tiểu phân phân tán ánh sáng laser tới và phát ra huỳnh quang.

Phương pháp đo dòng chảy tế bào tập trung vào các tế bào nội mô và tế bào miễn dịch có liên quan đặc biệt đến việc thiết lập lại mạng lưới mao mạch và bảo vệ vết

thương khỏi vi khuẩn. Các dấu ấn được sử dụng nhiều nhất là tế bào tiền thân nội mô (CD133), tế bào nội mô (CD31, CD34 và VEGFR-2), đại thực bào (CD68), tế bào T (CD3, CD4, CD8) và tế bào B (CD20). Có thể ứng dụng trong mô hình LVT ở động vật, nhưng phải sử dụng các kháng thể tùy thuộc vào loài động vật (chuột nhắt, chuột cống, thỏ) [1, 29].

### 3.8. Phân tích kiểu hình đại thực bào (Macrophage polarization)

Đại thực bào là một chìa khoá quan trọng điều chỉnh quá trình liền vết thương. Khi quá trình này tiến triển, kiểu hình của chúng thay đổi, phản ánh một quá trình biệt hóa thay đổi chức năng từ đáp ứng viêm sang tăng sinh và được gọi là phân cực [1].

Trong quá trình liền vết thương cấp tính, đại thực bào gây viêm, được gọi là phenotype M1, thâm nhập để làm sạch vi sinh vật vết thương, mảnh vụn lạ và tế bào chết. Khi mô bắt đầu sửa chữa, quần thể đại thực bào tổng thể chuyển sang đại thực bào thay thế (M2) cùng với sự di cư và tăng sinh của nguyên bào sợi, tế bào sừng và tế bào nội mô để khôi phục lớp hạ bì, biểu bì và mạch máu [30].

Đại thực bào M1 ở chuột là CCR2<sup>high</sup> Ly6C<sup>+</sup>, được kích hoạt bởi các cytokine Th-1 như IFN- $\gamma$  và TNF- $\alpha$ , hoặc bởi sự nhận dạng lipopolysaccharide của vi khuẩn. Các M1 sản xuất và tiết ra mức độ cao các cytokine tiền viêm TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23 và cyclooxygenase-2 (COX-2) và mức IL thấp -10. M1 có hoạt động kháng khuẩn và chống khối u mạnh, làm trung gian các tổn thương mô do ROS gây ra và làm suy giảm khả năng sửa chữa mô. Phản ứng viêm bị ức chế bởi cơ chế điều hòa chống viêm của đại thực bào M2 để chống lại tổn thương mô [31].



Các đại thực bào M2 là CCR2<sup>low</sup> Ly6C<sup>-low</sup>. M2 phân cực bởi các cytokine Th-2, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-13, IL-33 và IL -21 thông qua kích hoạt STAT6 thông qua thụ thể IL-4 alpha (IL-4R $\alpha$ ). M2 điều phối tái tạo mô, hình thành mạch, điều hòa miễn dịch, hình thành và tiến triển khối u [1, 30].

Tùy thuộc vào loại kích thích hoạt hóa, M2 có thể được chia thành 4 tập con khác nhau: M2a, M2b, M2c và M2d.

M2a được tạo ra bởi IL-4 và IL-13, kích thích nguyên bào sợi, tham gia vào quá trình hình thành ECM, tổng hợp collagen và tăng tạo mạch. M2b có thể được tạo ra bằng kích thích phức hợp miễn dịch (immune complexes IC) và chất chủ vận thụ thể giống Toll (TLR) hoặc phối tử thụ thể IL-1. Chúng tạo ra cả cytokine tiền viêm và chống viêm IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6 và TNF- $\alpha$ , hoạt động trên cơ chế điều hòa miễn dịch.

M2c được tạo ra bởi glucocorticoid và IL-10, thể hiện mạnh mẽ hoạt động chống

viêm chống lại apoptotic tế bào bằng cách giải phóng một lượng lớn IL-10 và TGF- $\beta$ .

M2d được tạo ra bởi các chất chủ vận TLR thông qua hoạt hóa các thụ thể adenosine, sau đó là ức chế các cytokine tiền viêm và cảm ứng các cytokine chống viêm (IL-10<sup>high</sup> IL-12<sup>low</sup>) và yếu tố VEGF [1].

Sự thay đổi kiểu hình - phân cực - là một bước quan trọng trong LVT; cả đại thực bào M1 và M2 đều rất quan trọng cho một quá trình sửa chữa thích hợp. Để khảo sát kiểu hình và phân lớp của đại thực bào, có thể sử dụng các phương pháp khác nhau để phát hiện các dấu hiệu bề mặt tế bào cụ thể, tiết ra cytokine, chemokine và các yếu tố tiết khác, chẳng hạn như hóa mô miễn dịch, Western Blotting hoặc PCR thời gian thực.

Tóm tắt các đặc điểm sinh học và sinh lý của kiểu hình đại thực bào M1 và M2 được trình bày trong Bảng 1 [32].

**Table 1. Biological and physiological features of M1 and M2 macrophage phenotypes**

Pheno-type	Stimuli	Cell expression markers	Cytokine, chemokine, secreted mediator	Chức năng
M1	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LPS	CD80, CD86, CD68, MHC-II, IL-1R, TLR-2, TLR-4, iNOS, IL-10 low, IL-12 high	TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23, IL-27, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL16, CCL5, Arg-2 (chuột), iNOS (chuột), ROS	Đáp ứng tiền viêm Th1, kháng u
M2a	IL-4, IL-13	Người: MMR/CD206, L1Ra; IL-1R II Chuột: Arg-1, FIZZ1, Ym1/2	IL-10, TGF- $\beta$ , CCL17, CCL18, CCL22, CCL24	chống viêm, sửa chữa mô
M2b	IC, TLR ligands, IL-1 $\beta$	IL-10 high, IL-12 low, CD86	TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, CCL1	Hoạt hóa Th2, điều hòa miễn dịch
M2c	IL-10, TGF- $\beta$ , glucocorticoids	Người: MMR/CD206, TLR-1, TLR-8 Chuột: Arg-1	IL-10, TGF- $\beta$ , CCL16, CCL18, CXCL13	Thực bào Tế bào chết theo chương trình
M2d	TLR ligands, adenosine receptor ligands	VEGF, IL-12 low, TNF- $\alpha$ low, IL-10 high	IL-10, VEGF	Tạo mạch, phát triển u

Viết tắt: Arg-1: Arginase-1; FIZZ1: Found in inflammatory zone 1; IL1-ra: IL-1 receptor antagonist; iNOS: Inducible nitric oxide synthase; MMR (CD206): Macrophage mannose receptor; TLR: Toll-like receptor.

#### 4. KẾT LUẬN

Một số mô hình và phương pháp đánh giá LVT đã cải thiện đáng kể hiểu biết về việc sửa chữa mô trong những năm qua. Mỗi mô hình đều có ưu điểm và nhược điểm cụ thể. Việc sử dụng các phương pháp đánh giá vết thương đáng tin cậy sẽ góp phần thu được kiến thức về cơ chế chữa liền vết thương và tối đa hóa nỗ lực vào các biện pháp can thiệp hiệu quả tiềm năng để cải thiện việc chữa liền.

#### 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.
- Anderson K, Hamm R., *Factors that impair wound healing*. 2012; 4: 84-91. J Am Coll Clin Wound Spec., 2012. 4(84-91).
- Little MO, *Nutrition and skin ulcers*. 2013; 16: 39-49. Curr Opin Clin Nutr Metab Care., 2013. 16: p. 39-49.
- 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.
- 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. Krzyszczuk 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.