

lympho TCD8 đều giảm về số lượng, nhưng chỉ có sự thay đổi trong TCD4 là đáng kể và những bệnh có số lượng tế bào lympho giảm nhiều nhất khả năng phát tán virus cao hơn. Những dữ liệu này cho thấy tế bào lympho T (đặc biệt là TCD4) có liên quan đến cả sự tiến triển của nhiễm trùng và các triệu chứng của cảm lạnh thông thường do rhinovirus [9]. Như vậy, nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với cơ chế đáp ứng chung và kết quả của một số nghiên cứu khác. Trong viêm phổi do virus hay vi khuẩn đều có giảm số lượng lympho T, lympho TCD4 nhưng có tăng mạnh lympho TCD8 ở nhóm do căn nguyên virus.

Đối với sự thay đổi tế bào lympho B và tế bào NK, chúng tôi chưa thấy có nhiều báo cáo về vấn đề này. Nghiên cứu của Raes M và cộng sự (1997) ở trẻ sơ sinh bị viêm tiểu phế quản cấp tính do virus hợp bào có số lượng tuyệt đối và tỷ lệ phần trăm của tế bào lympho B tăng. Trong nghiên cứu của chúng tôi không thấy sự thay đổi rõ rệt số lượng các tế bào lympho B và tế bào NK ở cả 2 nhóm viêm phổi do virus và do vi khuẩn. Cần có nhiều nghiên cứu hơn nữa để làm sáng tỏ thêm vấn đề này.

V. KẾT LUẬN

Trong viêm phổi nói chung, tỷ lệ các bệnh nhân có giảm số lượng tế bào lympho T máu ngoại vi là 24,48%, giảm số lượng các tế bào lympho TCD4 chiếm đến 36,46% các trường hợp. Trong khi các tế bào lympho TCD8 tăng trong 28,13% các trường hợp. Tuy nhiên các trường hợp bệnh nhân tăng lympho TCD8 chủ yếu gặp trong viêm phổi do căn nguyên virus, ít

gặp trong viêm phổi do vi khuẩn. Lympho B và tế bào NK chưa thấy có sự thay đổi rõ ràng trong viêm phổi ở trẻ em.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bài giảng Miễn dịch học** (2005). Nhà xuất bản Y học.
2. **Lê Văn Tráng** (2020). Nghiên cứu căn nguyên gây bệnh và yếu tố nguy cơ ở trẻ bị viêm phổi kéo dài trên 2 tuần tại khoa hô hấp Bệnh viện nhi Thanh Hóa. Tạp chí nghiên cứu và thực hành Nhi khoa. Số 1, 58-64.
3. **Nguyễn Thị Hà và CS** (2020). Đặc điểm lâm sàng và căn nguyên vi khuẩn gây viêm phổi cộng đồng trẻ em tại khoa Quốc tế Bệnh viện Nhi Trung ương. Tạp chí nghiên cứu Y học, 131 (7), 67-73.
4. **Dagan R, Phillip M, Sarov I et al** (1987). Cellular immunity and T-lymphocyte subsets in young children with acute measles. J Med Virol, 22(2), 175-182.
5. **Eman M. Saleh, Nidhal Abdul Mohymen, Majed Al-Jelawy** (2008). Abnormal Lymphocyte Subsets in Children With Type 1 Diabetes Mellitus. MMJ, 1, 9-14.
6. **Erwin W. Gelfand, Anthony Joetham, Meiqin Wang et al** (2017). Spectrum of T-lymphocyte activities regulating allergic lung inflammation. Immunol Rev, 278(63-86).
7. **Jonathan S Boomer, Jonathan M Green, Richard S Hotchkiss** (2014). The changing immune system in sepsis. Is individualized immuno-modulatory therapy the answer? Virulence, 5(1), 45-56.
8. **Kayser W, Spiegel K, Schmitz N et al** (1987). Application of a microseparation technique allowing for extensive marker studies on small bone marrow specimens. Journal of immunological methods, 97(2), 245-249.
9. **Levandowski RA, Ou DW, Jackson GG** (1986). Acute-phase decrease of T lymphocyte subsets in rhinovirus infection. J Infect Dis, 153(4), 743-748.

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÂN LẬP, TĂNG SINH VÀ DI CƯ CỦA NGUYÊN BÀO SỢI CÓ NGUỒN GỐC TỪ BỆNH NHÂN VẾT THƯƠNG MẠN TÍNH

Nguyễn Thị Bích Phượng¹, Đinh Văn Hân¹, Nguyễn Ngọc Tuấn¹,
Nguyễn Như Lâm¹, Nguyễn Thị Hương¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá hình thái, khả năng phân lập, tăng sinh và di cư của NBS nuôi cấy có nguồn gốc từ bệnh nhân vết thương mạn tính (VTMT). **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu tiền cứu trên 60 mẫu da từ 3 vị trí khác nhau của 20 bệnh nhân có VTMT do

loét tỳ đè và loét đài tháo đường (ĐTĐ). Các mẫu da được nuôi cấy theo quy trình của Freshney RI 2003 để đánh giá thời gian mọc NBS, thời gian phân lập qua các thế hệ, tốc độ tăng sinh và di cư giữa các vị trí khác nhau của hai nhóm và so sánh với NBS da khỏe mạnh. **Kết quả:** Các mẫu da tại các vị trí khác nhau đều mọc NBS, tuy nhiên vị trí nền vết thương (vị trí 1) có hiện tượng già hóa, không giữ được hình thái và chết nổi trên bề mặt đĩa nuôi cấy, không thể phân lập đến thế hệ P4. NBS ở vị trí mép vết thương (vị trí 2) và da lành cạnh vết thương (vị trí 3) có thể phân lập đến thế hệ P3, P4, P5 và không bị thay đổi hình thái. Các NBS từ VTMT ở vị trí 2, 3 có tốc độ tăng sinh, di cư liền vết thương thực nghiệm chậm hơn khi so sánh

¹Bệnh viện Bông Quốc gia Lê Hữu Trác

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Thị Bích Phượng

Email: bsphuongvbq@gmail.com

Ngày nhận bài: 9.01.2023

Ngày phản biện khoa học: 20.3.2023

Ngày duyệt bài: 28.3.2023

với NBS da khỏe mạnh. **Kết luận:** VTMT do loét tỳ đè, loét ĐTD có thể phân lập được NBS ở vị trí mép vết thương và da lành cạnh vết thương mà không thay đổi hình thái khi nuôi cấy. Tuy nhiên tốc độ tăng sinh, di cư liên vết thương thực nghiệm của NBS vết thương mạn tính chậm hơn khi so sánh với NBS da khỏe mạnh.

Từ khóa: Nguyên bào sợi, vết thương mạn tính

SUMMARY

ASSESSMENT OF THE ISOLATION, PROLIFERATION AND MIGRATION ABILITY OF FIBROBLASTS DERIVED FROM PATIENTS WITH CHRONIC WOUND

Objective: To evaluate the morphology, isolation, proliferation and migration ability of cultured fibroblasts derived from patients with chronic wounds. **Subjects and methods:** Prospective study on 60 dermal samples from 3 distinct locations of 20 patients with chronic pressure ulcers and diabetic ulcers. Skin samples were cultured according to the Freshney RI 2003 procedure to assess fibroblast growth time, generation time of isolation, proliferation and migration rates between different sites of the two groups and comparison with normal dermal fibroblasts. **Results:** The dermal samples at 3 different locations all grew fibroblasts. However, the wound base fibroblasts (position 1) showed aging, did not retain its phenotype and died floating on the surface of the culture plate, could not be isolated to the P4 generation. Fibroblasts from the wound edge (position 2) and the healing skin next to the wound (position 3) could be isolated to the P3, P4, P5 generation and did not change morphology. Fibroblasts from chronic wound at positions 2, 3 have slower proliferation rate, experimental wound healing migration when compared with normal dermal fibroblasts. **Conclusions:** Fibroblasts at the wound edges and in healing skin adjacent to the wound from chronic ulcers can be established in culture without changing morphology. However, the proliferation rate and migratory capacity of fibroblasts deriving from chronic wound was slower than that of normal dermal fibroblasts.

Keywords: Fibroblasts, chronic wound

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Liên vết thương là quá trình phức tạp, đan xen, kế tiếp nhau của các giai đoạn: cầm máu, viêm, tăng sinh và tái tạo với sự tham gia của nhiều loại tế bào. NBS đóng vai trò quan trọng trong liên vết thương, từ giai đoạn viêm muộn cho đến khi biểu mô hóa hoàn toàn của mô bị thương. NBS sản sinh ra collagen và mucopolysaccharid, các chất nền tảng và một số thành phần khác của chất nền tảng. Ngoài ra NBS còn tiết ra một số cytokine và các yếu tố kích thích tăng trưởng có vai trò quan trọng trong quá trình liên vết thương [1]. Trong khi vết thương cấp tính liên theo trình tự, thì VTMT thường trì hoãn ở giai đoạn viêm, mà nguyên nhân là do tình trạng viêm nhiễm kéo dài và quá

trình lão hóa các tế bào. Sự già đi của NBS trong các VTMT có liên quan nhiều đến dịch viêm mãn tính, biểu hiện qua hai đặc điểm đặc trưng là thay đổi hình thái và khả năng sinh trưởng giảm [2]. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu: Đánh giá hình thái, khả năng tăng sinh và di cư của NBS nuôi cấy có nguồn gốc từ bệnh nhân VTMT.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu: gồm 60 mẫu da từ 20 bệnh nhân có VTMT, trong đó 10 bệnh nhân loét tỳ đè và 10 bệnh nhân loét ĐTD, có tuổi từ 18 trở lên và được điều trị tại Trung tâm Liên vết thương - Bệnh viện Bông Quốc gia Lê Hữu Trác (06/2021 - 12/2021). Các NBS khỏe mạnh sử dụng làm nhóm chứng được nuôi cấy, phân lập từ da bao quy đầu trẻ em.

Tiêu chuẩn loại trừ: Bệnh nhân mắc các bệnh truyền nhiễm, viêm gan, viêm nhiễm tại vị trí tiến hành sinh thiết.

2.2. Chất liệu nghiên cứu. Dao mổ vô trùng lưỡi số 15 dùng sinh thiết, kính hiển vi đảo ngược, máy ly tâm lạnh, tủ hood lọc không khí vô trùng, tủ ấm (incubator), hóa chất và vật tư tiêu hao phục vụ nuôi cấy tế bào.

2.3. Phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu tiền cứu, cỡ mẫu: thuận tiện.

2.3.1. Sinh thiết mô để phân lập NBS. Tiến hành sinh thiết các mẫu da tại phòng mổ bằng dao vô trùng lưỡi số 15 tại ba vị trí: nền vết thương (vị trí 1), mép vết thương (vị trí 2) và da lành cạnh vết thương (vị trí 3) với kích thước: 0,5 × 0,5 cm [3]. Bảo quản mẫu mô trong dung dịch DMEM có 5% AB 1X và bảo quản trong ngăn mát tủ lạnh cho đến khi tiến hành nuôi cấy phân lập và tinh lọc NBS.

2.3.2. Cấy mẫu mô, phân lập, tinh lọc và bảo quản NBS. Cấy mẫu da theo quy trình của Freshney RI 2003 phát triển dựa trên phương pháp cấy mô của Harrison (1907) và Carrel (1912).

- Tách NBS khỏi mẫu da và nhân rộng số lượng NBS bằng quy trình cấy chuyển dùng Trypsin/EDTA với số lượng 0,1mL/cm².

- Lựa chọn NBS từ lần cấy chuyển thứ 3 để bảo quản trong điều kiện lạnh sâu môi trường bảo quản tế bào là DMEM và 10% DMSO.

- NBS thể hệ P3 được dùng trong nghiên cứu và chia ra 2 nhóm: Nhóm loét tỳ đè, nhóm loét đài tháo đường và so sánh với NBS khỏe mạnh.

2.3.3. Quy trình đánh giá tăng sinh NBS. Đánh giá tăng sinh của NBS được áp dụng theo mô hình của Pansani và cộng sự (2014) [4]. NBS da ở thể hệ P3 được cấy trong đĩa ở mật độ 5×10⁴ TB/giếng và duy trì trong môi trường tăng

trường DMEM có bổ sung 10% FBS và 1% AB 1X, đĩa tế bào được duy trì trong tủ ấm 37°C với 5% CO₂. Tế bào được cấy trên đĩa 6 giếng và được để trong tủ nuôi cấy sau 24 giờ để tế bào ổn định và bám vào bề mặt đĩa nuôi cấy. Thay môi trường sau mỗi 24 giờ, chụp ảnh kiểm tra và tiến hành đếm số lượng tế bào bằng thử nghiệm màu xanh trypan. Thử nghiệm này đánh giá trực tiếp về tổng số tế bào sống sót trong các mẫu vì thuốc nhuộm màu xanh trypan chỉ có thể xuyên qua màng xốp, thậm chí của các tế bào bị tổn thương (chết), có thể phát hiện rõ ràng dưới kính hiển vi quang học.

2.3.4. Quy trình đánh giá di cư NBS.

Đánh giá quá trình di cư của NBS được thực hiện thông qua thí nghiệm làm liền vết cạo trong mô hình vết thương in vitro của Hourelid, Abrahamse và cộng sự dựa trên phương pháp kinh điển của Cha và cộng sự [5]. NBS ở thể hệ P3 được cấy trong đĩa ở mật độ 5×10⁴ TB/giếng và duy trì trong tủ ấm 37°C với 5% CO₂ cho đến khi đạt 90% độ che phủ. Một đầu pipet 5 mL vô trùng được sử dụng để tạo vết xước trên bề mặt đĩa nuôi cấy tạo vết thương in vitro với khoảng rộng tương tự nhau để đánh giá sự di cư của NBS ở các vị trí vết thương khác nhau. Sau mỗi 24 giờ,

tiến hành thay môi trường và chụp ảnh. Chỉ tiêu đánh giá khoảng thời gian liền hoàn toàn vết cạo và số lượng tế bào thu được.

2.3.5. Xử lý số liệu. Các kết quả nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS 22. Các số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình (±) độ lệch chuẩn, tỷ lệ phần trăm. Sử dụng kiểm định phi tham số Mann-Whitney. Giá trị p có ý nghĩa khi p < 0,05.

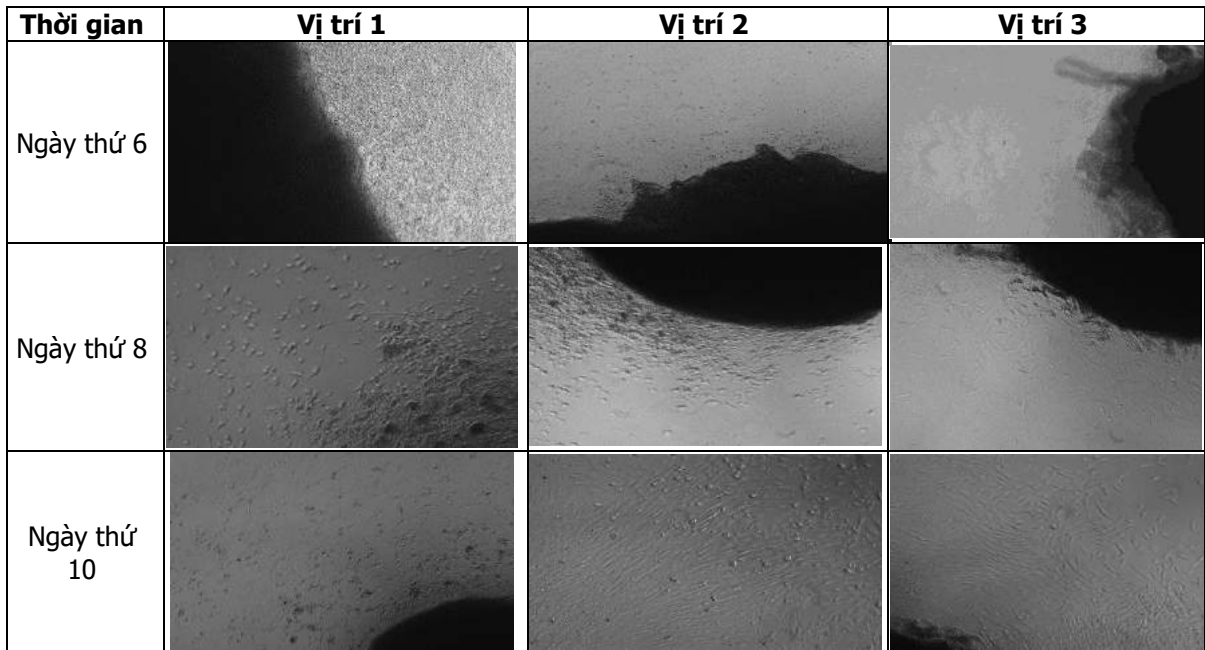
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả phân lập và tăng sinh NBS

Bảng 3.1. Đặc điểm chung mẫu mô trong quá trình phân lập

Đặc điểm	Vị trí 1 (n=20)	Vị trí 2 (n=20)	Vị trí 3 (n=20)
Mô nhiễm khuẩn	0	0	0
Mô nhiễm nấm	0	0	0
Mọc NBS	20	20	20
Không mọc NBS	0	0	0

Nhận xét: 100% mẫu ở cả 3 vị trí không bị nhiễm khuẩn hoặc nhiễm nấm. Kết quả này cho thấy các mẫu da nghiên cứu được xử lý tốt từ khâu chuẩn bị lấy da tại phòng mổ đến cấy chuyển trong Labo.



Hình 3.1. Hình ảnh mẫu mô nuôi cấy phân lập NBS của bệnh nhân Trần Hữu T, 42T, SBA: 3035

Nhận xét: Vị trí số 1 mọc chủ yếu là tế bào nội mô, có ít NBS, tăng sinh chậm, tế bào chết nhiều nổi lên bề mặt đĩa nuôi cấy. Hình thái NBS tại vị trí 2,3 ở thể hệ P1 đều có hình thoi, thuộc loại tế bào bám dính vào bề mặt đĩa nuôi cấy, và chỉ tạo đơn lớp. Vị trí số 2 có rải rác tế bào chết và vị trí số 3 gần như không có tế bào chết nổi lên bề mặt đĩa nuôi cấy.

Bảng 3.2. Khả năng nhân lên của tế bào tại các vị trí

Thể hệ NBS	Nhóm bệnh	Vị trí 1 (n=10)	Vị trí 2 (n=10)	Vị trí 3 (n=10)
P1	Nhóm tỳ đề (n=10)	100%	100%	100%
	Nhóm ĐTĐ (n=10)	50%	80%	100%
P2	Nhóm tỳ đề (n=10)	20%	100%	100%
	Nhóm ĐTĐ (n=10)	30%	80%	100%
P3	Nhóm tỳ đề (n=10)	0%	100%	100%
	Nhóm ĐTĐ (n=10)	0%	60%	90%
P4	Nhóm tỳ đề (n=10)	0%	100%	100%
	Nhóm ĐTĐ (n=10)	0%	60%	90%
P5	Nhóm tỳ đề (n=10)	0%	100%	100%
	Nhóm ĐTĐ (n=10)	0%	60%	90%

Nhận xét: - Khả năng nhân lên của NBS ở vị trí 1 là kém nhất, đến thể hệ P3 không còn đủ mật độ tế bào để phân lập đến thể hệ P4, P5.

- NBS ở vị trí 2, 3 có khả năng tăng sinh tốt, có thể phân lập đến thể hệ P3, P4, P5. Tế bào đảm bảo để bảo quản lạnh sâu phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo. Trong đó, NBS vị trí 3 là tốt nhất ở cả hai nhóm tỳ đề và ĐTĐ.

Bảng 3.3. Thời gian mọc, phân lập qua các thể hệ của NBS ở các vị trí

Thời gian (ngày)	Nhóm	Vị trí 1 (n=10)	Vị trí 2 (n=10)	Vị trí 3 (n=10)	P
Ngày NBS bắt đầu mọc	Nhóm tỳ đề (n=10)	6,20 ± 2,35	5,60 ± 2,46	4,40 ± 1,08	P ₁₋₂ , P ₂₋₃ > 0,05 P ₁₋₃ = 0,038
	Nhóm ĐTĐ (n=10)	7,50 ± 1,65	5,50 ± 1,58	4,50 ± 1,78	P ₁₋₂ = 0,013 P ₁₋₃ = 0,001; P ₂₋₃ > 0,05
	Nhóm chứng (n=5)	4,40 ± 0,55			
	P (tỳ đề-chứng)	P _{1-C} , P _{2-C} , P _{3-C} > 0,05			
	P (ĐTĐ- chứng)	P _{1-C} = 0,007		P _{2-C} , P _{3-C} > 0,05	
Thời gian phân lập NBS (P1)	Nhóm tỳ đề (n=10)	9,70 ± 4,9	8,60 ± 2,79	7,60 ± 1,27	P ₁₋₂ , P ₂₋₃ , P ₁₋₃ > 0,05
	Nhóm ĐTĐ (n=10)	11,8 ± 1,3	14,63 ± 6,8	13,3 ± 4,97	P ₁₋₂ , P ₂₋₃ , P ₁₋₃ > 0,05
	Nhóm chứng (n=5)	7,80 ± 1,48			
	P (tỳ đề-chứng)	P _{1-C} , P _{2-C} , P _{3-C} > 0,05			
	P (ĐTĐ- chứng)	P _{1-C} = 0,008	P _{2-C} = 0,008	P _{3-C} = 0,014	
Thời gian phân lập NBS (P2)	Nhóm tỳ đề (n=10)	14 ± 1,41	6,20 ± 2,39	5,80 ± 2,04	P ₁₋₂ = 0,028 P ₁₋₃ = 0,031; P ₂₋₃ > 0,05
	Nhóm ĐTĐ (n=10)	6,33 ± 1,15	6,25 ± 1,16	7,5 ± 3,86	P ₁₋₂ , P ₂₋₃ , P ₁₋₃ > 0,05
	Nhóm chứng (n=5)	6,0 ± 1,73			
	P (tỳ đề-chứng)	P _{1-C} = 0,044		P _{2-C} , P _{3-C} > 0,05	
	P (ĐTĐ- chứng)	P _{1-C} , P _{2-C} , P _{3-C} > 0,05			
Thời gian phân lập NBS (P3)	Nhóm tỳ đề (n=10)		6,10 ± 1,59	4,60 ± 1,07	P ₂₋₃ = 0,038
	Nhóm ĐTĐ (n=10)		5,5 ± 1,38	5,89 ± 2,89	P ₂₋₃ > 0,05
	Nhóm chứng (n=5)	5,2 ± 0,45			
	P (tỳ đề-chứng)		P _{2-C} , P _{3-C} > 0,05		
	P (ĐTĐ- chứng)		P _{2-C} , P _{3-C} > 0,05		

Nhận xét:

* Thời gian mọc NBS

- Vị trí 3 cả hai nhóm (tỳ đề và ĐTĐ) mọc tốt nhất với thời gian mọc tương đương như nhóm chứng (4,4 ngày), không có sự khác biệt với p > 0,05.

- Vị trí 1 ở hai nhóm bệnh mọc kém nhất với thời gian mọc lần lượt là: 6,2 và 7,5 ngày.

- Sự khác biệt giữa vị trí 1 và vị trí 3 có ý nghĩa với p < 0,05. Vị trí 2 và 3 không có sự khác

biệt giữa hai nhóm và nhóm chứng với p > 0,05.

- Sự khác biệt ở vị trí 1 giữa nhóm ĐTĐ và nhóm chứng có ý nghĩa với (p = 0,007).

* Thời gian phân lập P1

- Nhóm tỳ đề: không có sự khác biệt giữa các vị trí và nhóm chứng với p > 0,05

- Nhóm ĐTĐ: Thời gian phân lập P1 cả 3 vị trí đều dài ngày hơn so với nhóm chứng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p < 0,05.

* Thời gian phân lập P2

- Nhóm tỳ đề: vị trí 1 phân lập dài ngày nhất với thời gian lên đến 14 ngày, có sự khác biệt với vị trí 2, 3 và nhóm chứng với $p < 0,05$

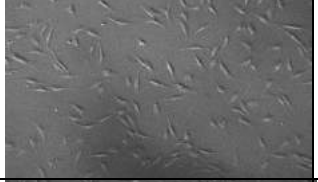
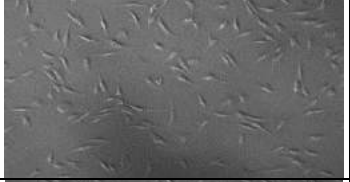
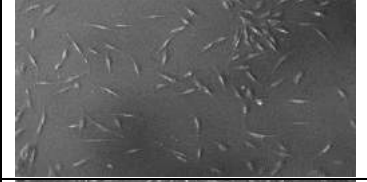
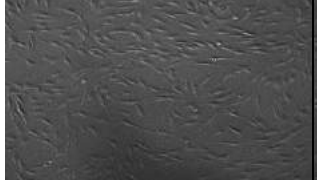
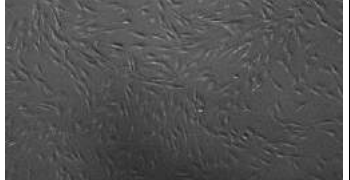
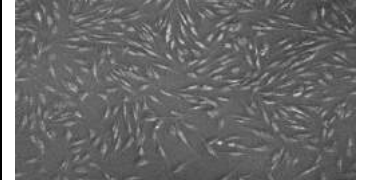
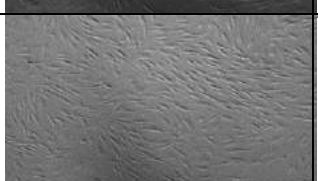
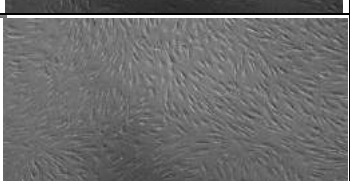
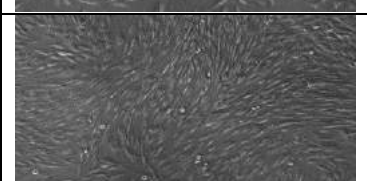
- Nhóm ĐTĐ: không thấy sự khác biệt

* Thời gian phân lập P3

- Vị trí 1: Tế bào không tăng sinh, bị chết, không đủ mật độ trypsin.

- Vị trí 2 và 3 phân lập được đến P3, không có sự khác biệt so với nhóm chứng. Tuy nhiên ở nhóm tỳ đề có sự khác biệt, cụ thể vị trí 3 mọc tốt hơn vị trí 2 ($p < 0,05$)

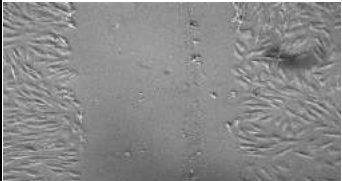
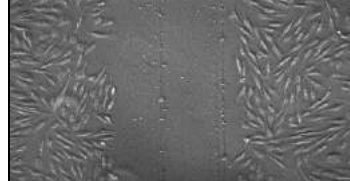
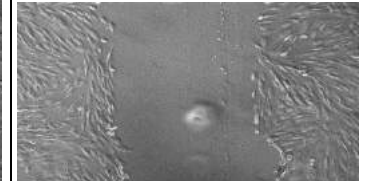
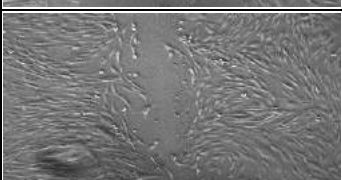
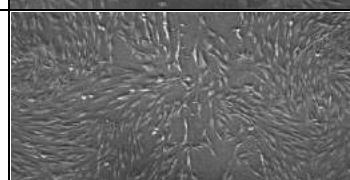
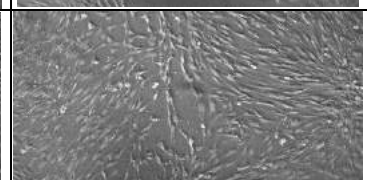
3.2. Đánh giá tăng sinh NBS nuôi cấy ở vị trí số 2 và vị trí số 3

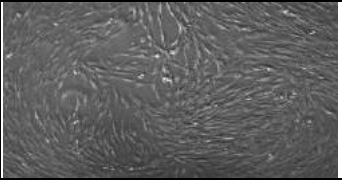
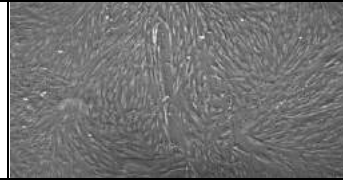
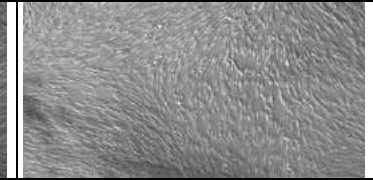
	Vị trí 2 (n=5)	Vị trí 3 (n=5)	Chứng (NBS khỏe mạnh) (n=5)
D1			
D2			
D3			
Số lượng tế bào trung bình D3 (SLTBTB)	$4,29 \times 10^5 \pm 0,46$	$4,39 \times 10^5 \pm 0,25$	$5,0 \times 10^5 \pm 0,32$
P	$P_{2-3} = 0,83, P_{2-chứng} = 0,02, P_{3-chứng} = 0,01$		

Hình 3.2. Hình ảnh tăng sinh của NBS ở vị trí 2,3 so sánh với NBS khỏe mạnh tại các thời điểm ngày thứ 1 (D1), ngày thứ 2 (D2), ngày thứ 3 (D3)

Nhận xét: Hình thái tế bào không thay đổi, có hình thoi, bám vào bề mặt đĩa nuôi cấy, tạo đơn lớp. Số lượng tế bào ở hai vị trí 2, 3 đều tăng sinh kém hơn so với nhóm chứng, với $p < 0,05$. và không có sự khác biệt giữa vị trí 2 và 3 ($p > 0,05$)

3.3. Đánh giá di cư NBS nuôi cấy ở vị trí số 2 và vị trí số 3

	Vị trí 2 (n=5)	Vị trí 3 (n=5)	Chứng (NBS khỏe mạnh)
D1			
D2			

D3			
SLTBTB D3	$3,88 \times 10^5 \pm 0,27$	$4,32 \times 10^5 \pm 0,37$	$5,15 \times 10^5 \pm 0,38$
P	$P_{2-3}=0,072; P_{2-chứng} < 0,01 P_{2-chứng}, P_{3-chứng} = 0,02$		

Hình 3.3. Hình ảnh di cư của NBS ở vị trí 2,3 so sánh với NBS khỏe mạnh tại các thời điểm ngày thứ 1 (D1), ngày thứ 2 (D2), ngày thứ 3 (D3)

Nhận xét: - D1: NBS bắt đầu di cư vào vết thương thực nghiệm.

- D2: sự di cư của NBS vào vết thương thực nghiệm ở vị trí số 3 và nhóm chứng dày hơn so với vị trí số 2.

- D3: NBS đã che phủ hoàn toàn vết thương thực nghiệm ở hai vị trí và nhóm chứng

- Sau khi trypsin đếm tế bào: Số lượng tế bào thu được ở vị trí số 3 nhiều hơn so với vị trí số 2 nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Và số lượng tế bào ở vị trí 2, 3 đều ít hơn so với nhóm chứng ($p < 0,05$).

IV. BÀN LUẬN

Hiện nay, các nghiên cứu trên NBS vẫn chủ yếu sử dụng các NBS khỏe mạnh. Các NBS vết thương hay bệnh lý (như NBS đái tháo đường) thường được tạo ra theo các mô hình trên in vitro. Thực tế nuôi cấy, phân lập NBS từ vết thương mạn tính rất khó khăn, dễ nhiễm khuẩn, và chậm tăng sinh. Tuy nhiên các tác giả trên thế giới cũng đã phân lập thành công NBS từ vết loét tĩnh mạch, loét ĐTĐ và loét tỳ đè để làm cơ sở cho các nghiên cứu thử nghiệm trên các tế bào nuôi cấy có thể giúp đánh giá liệu pháp tiềm năng trên các tế bào vết thương đích. Trong nghiên cứu của chúng tôi đã nuôi cấy, phân lập thành công 60 mẫu mô từ 20 bệnh nhân loét tỳ đè và ĐTĐ, không có mẫu nào nhiễm khuẩn với sự chuẩn bị vết thương trước lấy mô theo quy trình.

NBS sau khi phân lập không có sự thay đổi về hình thái, có hình thoi, là loại tế bào bám dính vào bề mặt đĩa nuôi cấy và chỉ tạo đơn lớp. Kết quả này tương tự nghiên cứu của Harold Brem và cộng sự khi tiến hành phân lập NBS từ 4 mẫu mô bệnh nhân loét tĩnh mạch cũng nhận thấy NBS vẫn giữ được kiểu hình [3]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra NBS ở vùng da lành cạnh vết thương (vị trí 3) và mép vết thương (vị trí 2) đều có khả năng tăng sinh tốt, có thể phân lập đến thế hệ P3, P4, P5; trong khi nền vết thương (vị trí 1) tuy mọc NBS, nhưng trong quá trình trypsin qua các thế hệ thì có hiện tượng già hóa và chết nổi trên bề mặt đĩa nuôi cấy, đến thế hệ P3 không còn đủ mật độ tế bào để trypsin

đến P4. Trong nghiên cứu của Harold Brem và cộng sự [3] chỉ ra các NBS từ da lành cạnh vết thương có phản ứng tốt nhất, các tế bào từ nền vết thương có phản ứng trung bình và các tế bào từ mép vết thương cho thấy phản ứng tối thiểu.

Khả năng sinh trưởng giảm và thay đổi hình thái là 2 đặc điểm đặc trưng của quá trình lão hóa tế bào. Khi so sánh quá trình tăng sinh giữa vị trí 2, 3 với NBS khỏe mạnh thì không thấy sự khác biệt giữa hai vị trí, tuy nhiên thấy rõ sự chậm tăng sinh của nhóm NBS từ VTMT so với NBS khỏe mạnh ($p < 0,05$). Sự di chuyển và tăng sinh của tế bào NBS là những sự kiện cần thiết để chữa lành mô. Trên mô hình vết thương in vitro, NBS ở vị trí 2, 3 và chúng đều di chuyển và che phủ hoàn toàn bề mặt vết thương thực nghiệm ở ngày thứ 3. Vị trí 3, mật độ tế bào dày hơn vị trí 2, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$). Cả hai vị trí 2, 3 đều có số lượng tế bào giảm hơn rõ rệt so với nhóm chứng ($p < 0,05$), chứng tỏ NBS vết thương mạn tính chậm tăng sinh, di cư hơn so với NBS khỏe mạnh. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu kinh điển của Miriam Loots và cộng sự chỉ ra các NBS được phân lập từ vết loét của bệnh nhân ĐTĐ type II biểu hiện giảm khả năng tăng sinh [6]. Trong nghiên cứu của Wall và cộng sự cũng ghi nhận NBS vết thương mạn tính giảm tăng sinh, giảm khả năng liền vết thương thực nghiệm, lão hóa sớm hơn so với NBS bình thường, đồng thời cũng chỉ ra sự tích tụ của các NBS già hóa trên bệnh nhân tiểu đường và người già ở cả VTMT và vùng da không bị thương, chiếm trên 15% [7]. Vande Berg và Robson nhận thấy rằng trong vết loét tỳ đè và tĩnh mạch, các NBS giảm tăng sinh, hiển thị kiểu hình lão hóa. Các NBS từ vết loét tỳ đè giảm tốc độ nhân đôi khi so với các NBS bình thường bên cạnh [8].

V. KẾT LUẬN

Vết thương mạn tính do loét tỳ đè, loét đái tháo đường có thể phân lập được nguyên bào sợi ở vị trí mép vết thương và da lành cạnh vết thương mà không thay đổi hình thái khi nuôi cấy.

Tuy nhiên tốc độ tăng sinh, di cư liền vết thương thực nghiệm của nguyên bào sợi vết thương mạn tính kém hơn khi so sánh với nguyên bào sợi khỏe mạnh.

VI. LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ nguồn đề tài NĐT.73.BLR/19

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Addis, R., et al.,** Fibroblast proliferation and migration in wound healing by phytochemicals: Evidence for a novel synergic outcome. 2020. 17(8): p. 1030-1042.
2. **Mendez, M.V., et al.,** The proliferative capacity of neonatal skin fibroblasts is reduced after exposure to venous ulcer wound fluid: a potential mechanism for senescence in venous ulcers. Journal of vascular surgery, 1999. 30(4): p. 734-743.
3. **Brem, H., et al.,** Primary cultured fibroblasts derived from patients with chronic wounds: a methodology to produce human cell lines and test putative growth factor therapy such as GMCSF. Journal of translational medicine, 2008. 6(1): p. 1-9.
4. **Pansani, T.N., et al.,** Effects of low-level laser therapy on the proliferation and apoptosis of gingival fibroblasts treated with zoledronic acid. 2014. 43(8): p. 1030-1034.
5. **Hourelid, N., H.J.P. Abrahamse, and I. surgery,** In vitro exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 J/cm². 2007. 25(2): p. 78-84.
6. **Loots, M.A., et al.,** Cultured fibroblasts from chronic diabetic wounds on the lower extremity (non-insulin-dependent diabetes mellitus) show disturbed proliferation. 1999. 291(2): p. 93-99.
7. **Wall, I.B., et al.,** Fibroblast dysfunction is a key factor in the non-healing of chronic venous leg ulcers. 2008. 128(10): p. 2526-2540.
8. **Vande Berg, J.S., et al.,** Cultured pressure ulcer fibroblasts show replicative senescence with elevated production of plasmin, plasminogen activator inhibitor-1, and transforming growth factor-β1. Wound repair and regeneration, 2005. 13(1): p. 76-83.

HIỆU QUẢ CẢI THIỆN KHÔ MẮT Ở BỆNH NHÂN SỬ DỤNG OCUSOFT ĐIỀU TRỊ VIÊM BỜ MI DO DEMODEX

Trần Tất Thắng¹, Lê Thị Thanh Thủy¹, Nguyễn Sa Huỳnh¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá hiệu quả cải thiện khô mắt ở bệnh nhân sử dụng ocusoft điều trị viêm bờ mi do demodex. **Đôi tượng và phương pháp nghiên cứu:** Mô tả, tiến cứu trên 102 mắt của bệnh nhân khô mắt, xét nghiệm tìm thấy 1 Demodex trên nang lông mi được điều trị bằng Ocusoft tại Bệnh viện Mắt Nghệ An từ tháng 7 năm 2021 đến tháng 7 năm 2022. **Kết quả:** Sau 1 tháng điều trị, có tới 92,2% số bệnh nhân các triệu chứng cải thiện tốt, còn 7,8% số bệnh nhân đánh giá cải thiện ít triệu chứng, không có bệnh nhân nào đánh giá không cải thiện hoặc xấu hơn. Số lượng bệnh nhân chẩn đoán khô mắt có kết quả test Schimer I <10mm giảm dần qua các lần khám lại, số lượng bệnh nhân bình thường có kết quả >15mm tăng dần, sự khác biệt trước điều trị và sau điều trị 1 tháng là có ý nghĩa thống kê với p<0,05. Số lượng bệnh nhân khô mắt có thời gian test BUT dưới 10 giây giảm dần qua các lần khám lại, các bệnh nhân có thời gian BUT trên 10 giây tăng dần sau 2 tuần và 1 tháng. Sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê với p<0,05. Điểm OSDI đánh giá tổn thương bề mặt nhãn cầu giảm dần qua các lần khám lại sau điều trị 2 tuần và 1 tháng sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05, tỉ lệ điểm OSDI cao giảm

dần, tỉ lệ điểm OSDI thấp tăng dần, sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê với p<0,05.

Từ khóa: Khô mắt, Ocusoft, Demodex.

SUMMARY

EFFECTIVENESS OF IMPROVING CRUST EYE IN PATIENTS USING OCUSOFT TO TREATED DEMODEX BLEPHARITIS

Objectives: Effectiveness of improving crust eye in patients using Ocusoft to treated Demodex blepharitis. **Subjects and methods:** Prospective corelation study, 102 patient's crust eyes. test found 1 Demodex on eyelash follicles treated with Ocusoft, at Nghe An Eye Hospital from July 2021 to July 2022. **Results:** After 1 month of treatment, up to 92.2% of patients' symptoms improved well, and 7.8% of patients rated improvement with few symptoms, no patient rated no improvement or bad. than. The number of patients diagnosed with crust eye with Schimer I test result <10mm gradually decreased through follow-up visits, the number of normal patients with result >15mm gradually increased, the difference before treatment and 1 month after treatment is statistically significant with p<0.05. The number of crust eyes patients with BUT test time less than 10 seconds gradually decreased with follow-up visits, patients with BUT time more than 10 seconds gradually increased after 2 weeks and 1 month. The difference is statistically significant with p<0.05. OSDI score for assessing ocular surface damage gradually decreased through follow-up visits after 2 weeks and 1 month of treatment, the difference was statistically

¹Bệnh viện Mắt Nghệ An

Chịu trách nhiệm chính: Trần Tất Thắng

Email: thangmatna@gmail.com

Ngày nhận bài: 6.01.2023

Ngày phản biện khoa học: 17.3.2023

Ngày duyệt bài: 28.3.2023