

NGHIÊN CỨU TẠO GEL HUYẾT TƯƠNG GIÀU TIỂU CẦU
TỪ MÁU ĐỘNG MẠCH DÂY RÓN NGƯỜI

Đỗ Xuân Hai^{1*}

Tóm tắt

Mục tiêu: Nghiên cứu điều chế gel huyết tương giàu tiểu cầu (platelet-rich plasma - PRP) từ máu động mạch dây rốn người. **Phương pháp nghiên cứu:** PRP được thu nhận từ máu động mạch dây rốn và được kích hoạt bằng hỗn dịch kích hoạt tiểu cầu CaCl_2 (10%)/Thrombin tỷ lệ 1/2 (mL) với tỷ lệ thích hợp. Gel PRP sau điều chế được đánh giá chất lượng theo bảng phân loại DEPA của Magalon J. **Kết quả:** PRP thu được có số lượng tiểu cầu trung bình là $6,5 \pm 1,5 \times 10^9$ tiểu cầu/mL, cao gấp 8 lần so với máu toàn phần. Tỷ lệ thu hồi tiểu cầu và độ tinh khiết đạt mức chất lượng cao theo bảng phân loại DEPA. Quá trình hoạt hoá đạt chất lượng gần như lý tưởng. Tỷ lệ PRP/ CaCl_2 (10%)/Thrombin tối ưu là 1/2/5. **Kết luận:** Điều chế thành công gel PRP từ máu cuống rốn với nồng độ tiểu cầu cao gấp 8 lần máu toàn phần, màu vàng nhạt và có độ tinh khiết 3,9+.

Từ khóa: PRP; Máu dây rốn; Hỗn dịch kích hoạt tiểu cầu.

RESEARCH ON THE PRODUCTION OF HUMAN UMBILICAL CORD
PLATELET-RICH PLASMA GEL

Abstract

Objectives: This study aimed to prepare platelet-rich plasma (PRP) gel from human umbilical cord artery blood. **Methods:** PRP were obtained from umbilical cord artery blood and activated by CaCl_2 (10%)/Thrombin 2/5 (mL) solution in the appropriate ratio. Platelet ratio and purity of good quality according to DEPA classification of Magalon J. **Results:** The obtained PRP had an average platelet count of $6.5 \pm 1.5 \times 10^9$ platelets/mL, eight times higher than whole blood. According to the DEPA classification, platelet recovery rate and purity reached a high-quality level. The activation process is of near-ideal quality. The optimal PRP/ CaCl_2 (10%)/Thrombin ratio is 1/2/5. **Conclusion:** Successfully prepared PRP gel from cord blood with platelet concentration 8 times higher than whole blood, light yellow color and purity from 3.9+.

Keywords: Platelet-rich plasma (PRP); Umbilical cord blood; Platelet activation.

¹Học viện Quân y

* Tác giả liên hệ: Đỗ Xuân Hai (doxuanhai@vmmu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 09/5/2023

Ngày được chấp nhận đăng: 15/6/2023

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v48i5.369>

ĐẶT VẤN ĐỀ

Huyết tương giàu tiểu cầu là sản phẩm cô đặc tiểu cầu tự thân thu được từ máu toàn phần, chứa nồng độ tiểu cầu cao hơn bình thường và có chứa nhiều yếu tố tăng trưởng [1]. Các yếu tố tăng trưởng được dự trữ trong hạt alpha tiểu cầu, và được giải phóng khi tiểu cầu được hoạt hóa như: Yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch máu, yếu tố tăng trưởng từ tiểu cầu, yếu tố biệt hóa và tăng trưởng... [2]. Do vậy, PRP có ảnh hưởng đến quá trình viêm, nhiễm trùng, thoái hóa khớp và chữa lành các mô mềm [3, 4]. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cũng đưa ra kết luận rằng tiểu cầu cũng giải phóng nhiều protein có hoạt tính sinh học thu hút các đại thực bào, các tế bào gốc trung mô và tế bào tạo xương [5]. Bởi vậy, huyết tương giàu tiểu cầu không chỉ thúc đẩy loại trừ các mô bị thoái hóa và hoại tử mà còn tăng cường tái tạo mô và chữa lành vết thương.

Hiện nay, PRP thường được sử dụng ở dạng tiêm để tăng cường tái tạo mô, giúp tăng khả năng liền vết thương. Tuy nhiên, với những vết loét lâu liền thì cách thức tiêm PRP sẽ khó khăn và cần phải có loại gel PRP bôi sẽ phù hợp hơn. Một số trường hợp khác lại gặp khó khăn khi tạo PRP tự thân đòi hỏi phải tạo PRP từ đồng loài. Xuất phát từ những yếu tố trên chúng tôi tiến hành: *Nghiên cứu tạo gel PRP đồng loài, đánh giá chất lượng gel PRP ứng dụng trong điều trị vết thương lâu liền.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Gồm 80 mL máu động mạch dây rốn người tươi từ sản phụ khỏe mạnh (nhóm máu O, A, B, AB), vô khuẩn và hỗn dịch kích hoạt tiểu cầu CaCl_2 (10%)/Thrombin tỷ lệ 2:5 (mL). Được thí nghiệm tạo gel PRP tại Bộ môn Phẫu thuật thực hành, thực nghiệm - Học viện Quân y trong thời gian từ tháng 3 - 10/2022.

2. Phương pháp nghiên cứu

Tạo gel PRP từ máu dây rốn: Sử dụng bơm tiêm 10 mL lấy máu từ động mạch dây rốn bơm nhẹ vào 8 ống nghiệm đã chứa sẵn chất chống đông EDTA. Đặt 8 ống nghiệm này vào buồng ly tâm (Centrifuge) đối xứng nhau, quay tốc độ 3000 vòng/phút, trong 30 phút. Máu trong ống nghiệm sẽ tách ra thành 3 lớp: dưới cùng là hồng cầu, tiếp theo là lớp PRP và trên cùng là phần tiểu cầu lơ lửng trong huyết tương (PPP - huyết tương nghèo tiểu cầu). Dùng bơm tiêm vô khuẩn hút lấy PRP (thương 2 - 3 mL/10 mL máu toàn phần) bơm nhẹ vào ống nghiệm.

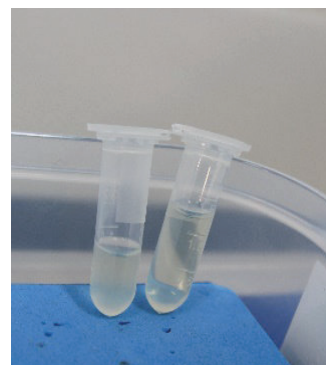
Trộn hỗn dịch CaCl_2 và Thrombin với PRP theo tỷ lệ 1:2:5 (mL) lắc đều và ủ ở nhiệt độ 4 - 6°C trong thời gian 10 phút, sau 30 phút sẽ thu được gel PRP.



Máu toàn phần



PRP



Gel PRP

Hình 1. Tạo gel PRP.

* Các chỉ tiêu nghiên cứu, đánh giá:

- Số mL PRP thu được so với máu toàn phần.
- Màu sắc gel PRP sau khi hoạt hóa: Vàng nhạt, trắng đục, trắng trong, trắng hồng.
- Số lượng tiểu cầu trong gel PRP: Số lượng tiểu cầu/mL gel PRP được đọc trên máy xét nghiệm huyết học Model Z3.
- Đánh giá chất lượng gel PRP: Bảng phân loại DEPA của Magalon J., và CS. (2016) [6]:

Bảng 1. Đánh giá chất lượng PRP.

Chỉ số	Điểm			
	1+	2+	3+	4+
Số lượng tiểu cầu (tỷ/mL)	< 1	1 - < 3	3 - < 5	≥ 5
Tỷ lệ (%) thu hồi tiểu cầu	< 30	30 - < 70	70 - < 90	≥ 90
Tỷ lệ (%) độ tinh khiết	< 30	30 - < 70	70 - < 90	≥ 90

+ Tỷ lệ hoạt hóa tiểu cầu và màu sắc gel PRP [2]: Hoạt hóa theo các tỷ lệ CaCl_2 và thrombin với PRP theo tổ hợp 3 chất từ 1 - 5 mL, xác định tỷ lệ tạo màu sắc trắng trong.

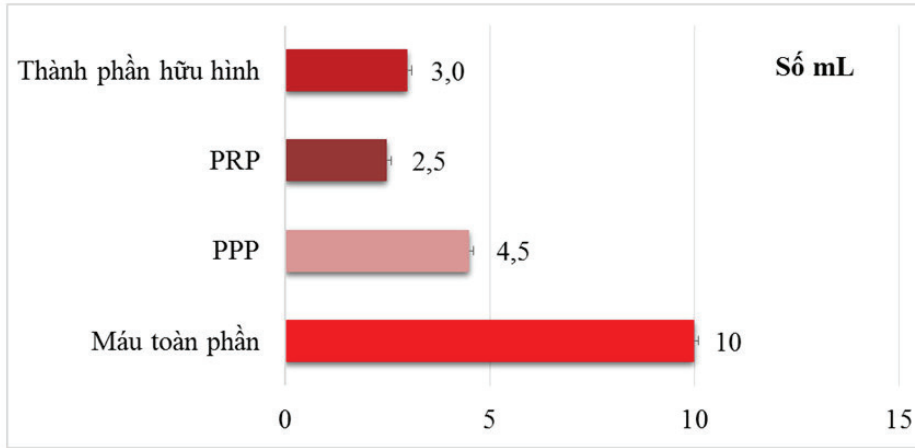
* Xử lý số liệu: Số liệu thu thập và các phân tích sẽ được thực hiện bằng phần mềm SPSS 20.0.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được sự chấp thuận của Hội đồng Đạo đức trong Nghiên cứu Y sinh học số 40/2020 QĐ-VMEC.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

* Số mL PRP thu được trong 10 mL máu toàn phần:



Biểu đồ 1. Số mL PRP thu được trong 10 mL máu toàn phần.

Trong 10 mL máu toàn phần sau ly tâm PRP thu được trung bình là $2,5 \pm 0,1$ mL và PPP trung bình thu được là $4,5 \pm 0,3$ mL.

* Số lượng tiểu cầu trung bình:

Bảng 2. Số lượng tiểu cầu trung bình trong gel PRP (n = 8).

Chỉ số	Tiểu cầu: $\bar{X} \pm SD$ (tiểu cầu/mL)
Máu toàn phần	$(0,8 \pm 0,05) \times 10^9$
Gel PRP	$(6,5 \pm 1,5) \times 10^9$

Số lượng tiểu cầu trung bình trong gel PRP là $(6,5 \pm 1,5) \times 10^9$ cao khoảng 8 lần so với tiểu cầu trong máu toàn phần.

Chất lượng gel PRP:

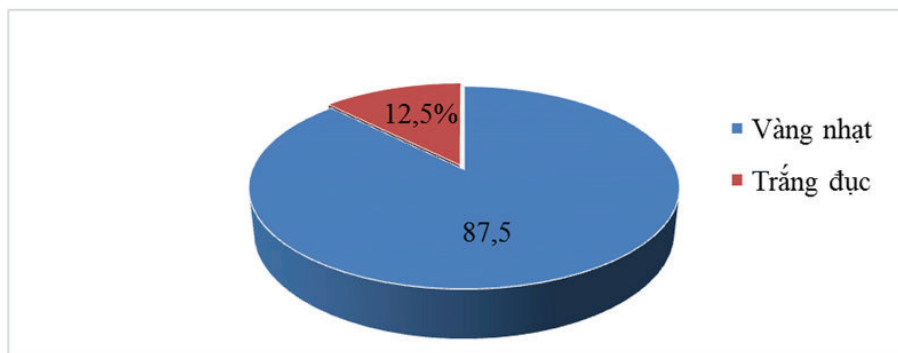
Bảng 3. Chất lượng PRP (n = 8).

Chỉ số	Kết quả
Số lượng tiểu cầu (10^9 /mL)	3,8+
Tỷ lệ (%) tiểu cầu thu được	3,9+
Tỷ lệ (%) độ tinh khiết	3,9+

Dựa theo phân loại DEPA của Magalon J., và CS (2016) [6], PRP thu được với chất lượng tốt và độ tinh khiết cao (điểm quy đổi từ 3,8+).

* Tỷ lệ hoạt hóa tiểu cầu và màu sắc gel PRP:

Tỷ lệ PRP/CaCl₂ (10%)/thrombin: Trong nghiên cứu này theo một số nghiên cứu trước chúng tôi tiến hành pha trộn các tỷ lệ khác nhau từ 1 - 5 mL của mỗi chất kết quả màu gel PRP trắng trong ở tỷ lệ 1:2:5 (mL).



Biểu đồ 2. Màu sắc của gel PRP (n = 8).

Sau khi kích hoạt bằng hỗn dịch CaCl₂ (10%)/thrombin, PRP chuyển từ lỏng sang dạng gel giống thạch và có dây tơ màu vàng nhạt, dung dịch còn lại là chất tăng trưởng sau khi tiểu cầu hoạt hóa dùng để trị liệu. Gel PRP sau hoạt hóa đạt tiêu chuẩn với màu vàng nhạt, kết quả cho thấy vàng nhạt chiếm chủ yếu là 87,5% và trắng đục chiếm tỷ lệ nhỏ là 12,5%.

BÀN LUẬN

Nồng độ tiểu cầu thu được ở bảng 2 cho thấy cao gấp 8 lần nồng độ tiểu cầu trung bình trong máu toàn phần. Kết quả này cao hơn nghiên cứu của Weiwei và CS (2012) với nồng độ tiểu cầu trung bình trong PRP gấp 5, 7 lần nồng độ tiểu cầu trung bình trong máu toàn phần [7] và nghiên cứu của Chai J. và CS (2019) với nồng độ tiểu cầu trung bình trong PRP gấp 6,2 lần nồng độ tiểu cầu trung bình trong máu toàn phần [8]. Kết quả cho thấy tạo PRP từ máu dây rốn có thể thu được tiểu cầu

cô đặc rất cao, phù hợp ứng dụng trong nghiên cứu và điều trị. Thông thường cứ khoảng 10 mL máu dây rốn sau ly tâm sẽ thu được từ 2 - 3 mL PRP, tác giả Hashemi S. và CS (2016) nghiên cứu trên máu dây rốn khi ly tâm lần 1 với 3000 vòng trong 20 phút thấy nồng độ tiểu cầu được làm giàu > 50%, loại bỏ được hơn 90% hồng cầu và bạch cầu [9]. Cũng trong nghiên cứu này PRP từ máu dây rốn của con người có chứa các yếu tố tăng trưởng (GF), bao gồm yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF), yếu tố tăng trưởng nguyên

bào sợi (FGF), yếu tố tăng trưởng giống như insulin-1 (IGF-1), interleukin và interferon... PRP được sử dụng như một hệ thống vận chuyển cho các vi hạt giúp kiểm soát giải phóng yếu tố tăng trưởng và tăng cường chữa lành và hình thành mạch [9]. Đây là những yếu tố có nhiều hoạt tính sinh học tốt mà đến nay ở nước ta chưa ứng dụng nhiều PRP từ máu dây rốn trong điều trị các bệnh.

Ở bảng 3 cho thấy tỷ lệ thu hồi tiểu cầu và tỷ lệ độ tinh khiết của PRP đều đạt mức cao. Theo kết quả, 100% số mẫu PRP thu được có tỷ lệ thu hồi tiểu cầu với hiệu suất khá tốt trở lên và 100% mẫu PRP thu được có độ tinh khiết rất cao. Như vậy, kết quả tách chiết huyết tương giàu tiểu cầu của nghiên cứu đạt chất lượng tốt, đảm bảo mẫu PRP có hoạt tính sinh học cao. Tác giả Hashemi và CS nghiên cứu với PRP từ máu dây rốn với các nồng độ khác nhau thấy: PRP kích thích sự tăng sinh và di chuyển của các nguyên bào sợi ở da và sự kích thích này phụ thuộc vào liều lượng của PRP [8], với kết quả thu được ở bảng 3 chúng tôi nhận thấy có thể được sử dụng để điều trị các tổn thương mạn tính ở da mà không gây ra phản ứng miễn dịch.

Theo y văn, tiểu cầu được kích hoạt bởi CaCl_2 và Thrombin, tuy nhiên theo tác giả Toshihisa T. và CS cho rằng chưa có bằng chứng nào cho thấy kích hoạt một phần hay toàn bộ là tốt hơn ở

PRP [9]. CaCl_2 làm tăng khả năng đông tụ của PRP đã được nhiều nghiên cứu chứng minh [1, 9]. Cũng theo tác giả Toshihisa T., CaCl_2 trực tiếp kích hoạt tiểu cầu, sau đó tạo điều kiện hình thành cục máu đông một cách độc lập và hợp tác với con đường đông máu thông qua chuyển đổi thrombin trong một chuỗi đông máu. Trong nghiên cứu của chúng tôi sử dụng tỷ lệ kích hoạt tiểu cầu 1:2:5 (mL) thấy sự đông tụ màu vàng nhạt, trên bề mặt xuất hiện lớp trắng đục có nhiều sợi tơ trắng, lớp này chứa nhiều yếu tố kích thích tăng trưởng. Các nghiên cứu khác cũng cho thấy kích hoạt PRP thấy các yếu tố tham gia vào quá trình chữa lành vết thương (TGF- β 1, PDGF-AB và VEGF) và 2 chất trung gian gây viêm (IL-1 β và TNF- α)... [9, 10]. Tác giả Carola C. và CS (2016) kích hoạt PRP được thực hiện bằng cách thêm 10% CaCl_2 (nồng độ 22,8 mM), 10% thrombin tự thân, 10% hỗn hợp CaCl_2 + thrombin và 10% collagen loại I (4 μg), hỗn dịch được ủ trong 15 và 30 phút và 1, 2 và 24 giờ ở 37°C. Sau đó, các mẫu được ly tâm ở 2800 vòng/phút trong 15 phút ở 20°C và phần nổi phía trên được thu thập và bảo quản ở -80°C cho đến khi sử dụng nhận thấy giải phóng các GF có nguồn gốc từ tiểu cầu [10]. Hiện nay hầu hết các tác giả kích hoạt PRP nhằm các mục đích khác nhau nhưng sử dụng CaCl_2 và thrombin kích hoạt được nhiều tác giả

sử dụng, đến nay chưa có công bố nào chứng minh tỷ lệ phù hợp nhất. Trong nghiên cứu này chúng tôi tổ hợp ba yếu tố trong pha chế gồm là PRP, CaCl₂ và thrombin với các tỷ lệ từ 1 - 5 mL, nhằm đạt được gel PRP với màu vàng nhạt và lớp dịch mỏng nhiều tơ trắng ở bề mặt.

KẾT LUẬN

Gel PRP từ máu dây rốn có nồng độ tiểu cầu cao gấp 8 lần so với máu toàn phần, tỷ lệ kích hoạt tối ưu CaCl₂/Thrombin/PRP là 1:2:5 (mL), gel màu vàng nhạt độ tinh khiết cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kellie K., Victor B., Bart M. Evaluation of the effects of platelet-rich plasma (PRP) therapy involved in the healing of sports-related soft tissue injuries. *The Iowa Orthopedic Journal*. 2012; 32:150-163.
2. Everts P., Onishi K., Jayaram P. Platelet-rich plasma: New performance understandings and therapeutic considerations in 2020. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(20):7794.
3. de Mos M., van der Windt A.E., Jahr H. Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *Am J Sports Med*. 2008; 36(6):1171-1178.
4. Marx R.E. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP?. *Implant Dent*. 2001; 10(4):225-228.
5. Magalon J., Chateau A.L., Bertrand B. DEPA classification: A proposal for standardising PRP use and a retrospective application of available devices. *BMJ Open Sport & Exercise Medicine*. 2016; 2(1): 000060.
6. Li W., Enomoto M., Ukegawa M. Subcutaneous injections of platelet-rich plasma into skin flaps modulate proangiogenic gene expression and improve survival rates. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2012; 129(4):858-866.
7. Chai J., Ge J., Zou J. Effect of autologous platelet-rich plasma gel on skin flap survival. *Medical science monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2019; 25:1611.
8. Hashemi S.S, Servatkah M., Rafati A.R. The in vitro effect of different cord blood platelet rich plasma concentrations on proliferation of dermal fibroblasts. *Biosci Biotech Res Asia*. 2016; 13(3).
9. Toshihisa T., Isobe K., Tsujino T. Direct activation of platelets by addition of CaCl₂ leads coagulation of platelet-rich plasma. *Int J Implant Dent*. 2018; 4:23.
10. Carola C., Alice R. Brunella grigolo platelet rich plasma: The choice of activation method affects the release of bioactive molecules. *Biomed Res Int*. 2016:6591717.