

Tiềm năng ứng dụng keo fibrin tự thân trong y học

Nghiên cứu ứng dụng keo fibrin

Trên thế giới

Việc sử dụng keo fibrin trong lâm sàng để cải thiện lành vết thương lần đầu tiên được báo cáo vào năm 1909 bởi Bergel. Những nghiên cứu sau đó đã sử dụng gạc vải thấm với fibrin để cầm máu ở các mô mềm. Tuy nhiên, phải đến năm 1938, khi công nghệ tách protein đã được phát triển và thrombin tinh khiết được sản xuất và thương mại hóa thì lĩnh vực này mới bắt đầu phát triển. Sự kết hợp của thrombin và fibrinogen để tạo ra keo fibrin lần đầu tiên được sử dụng vào năm 1944 để hỗ trợ khả năng kết dính mảnh ghép da trên những người lính với vết thương bỏng nặng.

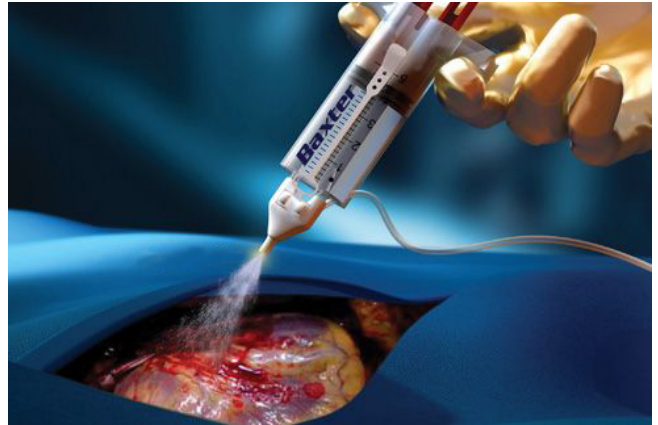
Tuy nhiên, sau đó có một số nguy cơ đối với việc sử dụng fibrinogen từ người vì có khả năng là một nguồn truyền bệnh (như viêm gan siêu vi, siêu vi B ...) và nhiều người trong số các bệnh nhân được điều trị bằng keo fibrin đã bị nhiễm bệnh. Ngoài ra, chất lượng gắn kết của các chế phẩm fibrin này tương đối kém, nguyên nhân là do nồng độ fibrinogen trong keo thấp. Do đó, trước khi các kỹ thuật dùng để bất hoạt hoặc loại bỏ virus có trong mẫu keo có hiệu quả, giới nghiên cứu chuyển sang sử dụng mẫu keo fibrin có nguồn gốc từ động vật, thrombin từ bò được sử dụng để làm giảm nguy cơ lây truyền bệnh từ người sang người.

Việc sử dụng thrombin có nguồn gốc từ động vật (bò) lại làm xuất hiện các mối nguy cơ mới, đó là các rủi ro như hiện tượng đông máu do sự gia tăng của thrombin và các nguy cơ về lây truyền bệnh có nguồn gốc từ động vật. Như vậy, trong giai đoạn đầu của sự phát triển, kết quả mà keo fibrin mang lại chưa xứng tầm mong đợi so với những nguy cơ và rủi ro mà chúng mang lại. Vì thế, ở giai đoạn này các nghiên cứu về keo fibrin trên thế giới (kể cả ở Mỹ) đã tiến triển rất chậm hoặc thậm chí là dừng lại.

Sau khi đã có những bước cải thiện đáng kể về các phương pháp thu nhận và sản xuất keo, loại keo fibrin thương mại đầu tiên đã được đưa ra thị trường tại châu Âu vào năm 1982. Kể từ thời điểm đó, các bác sĩ phẫu thuật ở châu Âu đã có nhiều kinh nghiệm trong việc sử dụng các loại keo fibrin trên một loạt các ứng dụng lâm sàng. Tuy nhiên, Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm (The Food and Drug Administration - FDA) của Hoa Kỳ đã không phê duyệt cấp phép cho các sản phẩm keo này vì có nguy cơ cao liên quan đến bệnh viêm gan lây lan qua huyết tương, do kỹ thuật thu nhận fibrinogen từ nhiều người để sử dụng trong sản xuất keo.

✧ HUỖNH DUY THẢO và cộng sự

Bộ môn Mô – Phôi, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch



Do nhu cầu cấp thiết tạo ra loại keo fibrin vượt qua được những rào cản trên, các bác sĩ phẫu thuật ở Mỹ đã tiến hành nghiên cứu và sản xuất các loại keo fibrin từ chính bệnh nhân của họ (keo fibrin tự thân) hoặc các loại keo được thu nhận từ máu có nguồn gốc từ các ngân hàng máu.

Theo số liệu năm 2013, trên thị trường xuất hiện một số loại keo được sử dụng khá phổ biến như: Tisseel (Human pooled plasma fibrinogen and thrombin) của Baxter Inc, Evicel (Human pooled plasma fibrinogen and thrombin) của Ethicon Inc. (Johnson & Johnson Co). Đây là hai loại keo thương mại được sản xuất từ nguồn huyết tương đồng loài từ nhiều nguồn mẫu khác nhau. Bên cạnh đó, các loại keo fibrin tự thân cũng có một số sản phẩm được sử dụng rộng rãi như: Vitagel (Autologous plasma fibrinogen and thrombin) của Orthovita Inc. và Cryoseal System (Autologous plasma fibrinogen and thrombin) của ThermoGenesis Corp.

Keo fibrin tự thân (như Vivostat® và CryoSea®) được tạo ra từ phương pháp tủa lạnh hiện tại được chấp nhận sử dụng rộng rãi tại Mỹ. Keo fibrin này được thu nhận từ chính máu của người bệnh thông qua một số phương pháp khác nhau như tủa lạnh sử dụng dung dịch ammonium sulfate, tủa lạnh bằng ethanol và tủa lạnh bằng ethylene glycol. Hiện tại phương pháp tủa lạnh được sử dụng rất phổ biến cho các loại keo tự thân.

Ưu điểm chính của keo tự thân được phát triển rộng rãi tại thị trường Mỹ là do giảm thiểu tối đa các nguy cơ truyền virus, các phản ứng dị ứng dẫn đến xuất huyết nghiêm trọng khi so sánh với các loại keo được sản xuất thương mại có nguồn gốc từ máu đồng loài hoặc liên quan đến các yếu tố có nguồn gốc từ động vật. Ngoài ra, keo tự thân còn được chứng minh có thể đáp ứng hiệu quả như các sản phẩm thương mại trong các ứng dụng lâm sàng

như các trường hợp dán mô trên thể tích nhỏ hoặc cầm máu với áp lực máu thấp.

Hiện tại, một số quy trình biến đổi đang được phát triển để cải thiện các tính chất cơ học của keo như độ đàn hồi, độ bền kéo của các chế phẩm keo tự thân thông qua một số phương pháp như kết hợp sử dụng các chất chống đông, kiểm soát tốt hơn các điều kiện bảo quản huyết tương, hoặc các phương pháp tủa và ly tâm thu nhận fibrinogen.

Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam

Mặc dù việc nghiên cứu và ứng dụng keo fibrin diễn ra trên thế giới từ rất sớm (1910) nhưng cho đến nay ở Việt Nam chưa có hoặc chưa thấy các công bố hoặc báo cáo nào có liên quan đến việc nghiên cứu và chế tạo các loại keo fibrin để ứng dụng trong y học.

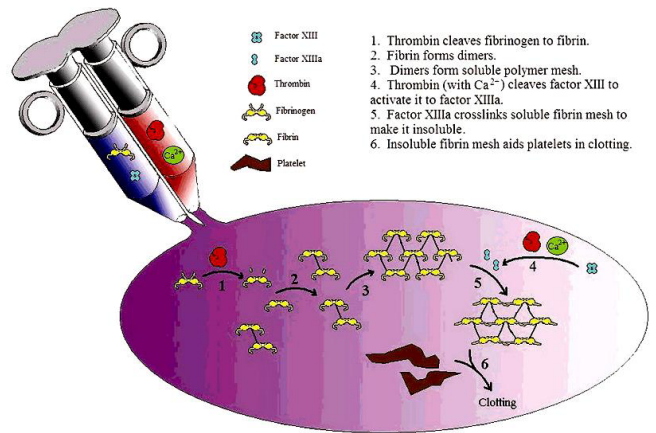
Năm 2012, trên Tạp chí Y học TP.HCM đăng tải kết quả nghiên cứu đánh giá hiệu quả của keo fibrin trong điều trị mổ nội tạng. Nghiên cứu thực hiện trên 60 bệnh nhân, trong đó có 30 bệnh nhân được sử dụng keo fibrin thương mại (Tisseel) để làm chất dán dính thay thế chỉ khâu. Kết quả nghiên cứu cho thấy keo fibrin được sử dụng trong phẫu thuật mổ nội tạng giúp cải thiện đáng kể cho người bệnh các triệu chứng khó chịu sau mổ, đồng thời làm giảm tình trạng viêm, một yếu tố được cho là nguyên nhân gây ra sự tái phát mổ nội tạng.

Trước đó, ở nước ta chưa sản xuất được keo fibrin có nguồn gốc tự thân hoặc có nguồn động loài cũng như từ nguồn dị loài, mặc dù tiềm năng ứng dụng và giá trị kinh tế mà keo fibrin mang lại là rất lớn. Do vậy, nghiên cứu "Thiết lập quy trình tạo keo fibrin từ huyết tương người" với mục đích thiết lập một quy trình hiệu quả, đơn giản để nhanh chóng tạo ra keo fibrin tự thân an toàn, hiệu quả, đáp ứng nhu cầu và giảm gánh nặng tài chính cho người bệnh là rất thiết thực.

Nguyên lý chế tạo keo fibrin tự thân

Cơ thể phản ứng lại với việc mất máu sau khi bị tổn thương bằng cách tạo ra một cục máu đông dùng để ngăn chặn việc mất máu, đó là một quá trình có sự tương tác của nhiều yếu tố, bao gồm tiểu cầu, huyết tương và các mô bị tổn thương. Sự tương tác này gây nên một loạt các phản ứng của các enzyme, kích hoạt một chuỗi các yếu tố đông máu gồm có các yếu tố từ I đến XIII. Giai đoạn cuối cùng của thác đông máu là sự hoạt động của các glycoprotein gọi là fibrinogen (yếu tố I) bởi các enzyme thrombin (yếu tố II). Sự hoạt động của các protein này sẽ dẫn đến sản phẩm cuối cùng là các cục máu đông (khối fibrin) để ngăn chặn sự mất máu.

Dựa trên sự mô phỏng lại cơ chế hình thành cục máu đông trong cơ thể, chúng ta có thể tạo ra được khối đông fibrin dùng để cầm máu hoặc chất kết dính để dán mô. Đây chính là cơ chế để tạo ra keo fibrin, đang được sử dụng hiện nay.



Hình 1: Sơ đồ mô tả sự hình thành keo fibrin, tạo ra bằng cách phối trộn các thành phần chính của keo [Theo Thomas H. Barker et al (2001), J Biomed Mater Res, 56:529-535].

Các thành phần chính tham gia cấu tạo keo fibrin

Fibrinogen

Fibrinogen ảnh hưởng trực tiếp đến mật độ và độ cứng của khối fibrin. Nếu bổ sung càng nhiều fibrinogen thì khối fibrin tạo thành có độ bền cao hơn nhưng độ xốp giảm và sự thấm thấu cũng giảm. Ngoài ra, nồng độ fibrinogen cũng xác định tính đồng nhất của khối fibrin. Cấu trúc của khối fibrin cũng có thể bị ảnh hưởng bởi các thành phần cấu tạo phân tử fibrinogen (gồm các chuỗi kép như A α , B β và γ).

Thrombin

Thrombin là một serine protease có hoạt tính xúc tác và chuyển đổi fibrinogen thành fibrin với số lượng gấp nhiều lần trọng lượng của thrombin. Tuy nhiên, giống như fibrinogen, nồng độ thrombin ảnh hưởng đến cấu trúc của khối fibrin trong một mối tương quan trực tiếp, làm gia tăng tính đồng nhất, giảm độ xốp của keo. Cơ chế hoạt động cũng đã được giải thích, là do hoạt động phân cắt fibrinogen của thrombin thành mạng lưới sợi fibrin.

Hầu hết các nghiên cứu tạo keo fibrin thường sử dụng các chất ở nồng độ thấp, dưới 5 mg/ml fibrinogen và 2 IU/ml thrombin. Khi sử dụng với nồng độ cao, như trong trường hợp của các loại keo thương mại có sẵn (2-250 IU thrombin và 50 mg fibrinogen), cho thấy kích thước lỗ xốp của khối fibrin giảm cùng với sự gia tăng nồng độ thrombin.

Muối NaCl

Khối keo fibrin cũng bị tác động bởi một số chất bổ sung khác, trong đó các chất này có thể xuất hiện tại thời điểm trùng hợp. Một trong những tác động lớn nhất là nồng độ muối (NaCl), ảnh hưởng đến màu sắc của khối keo (trong suốt hoặc mờ đục). Tác động này phụ thuộc vào độ pH, nhiệt độ và lực ion. Tuy nhiên, cơ chế gây ra sự khác biệt này được chứng minh là do một tác động đặc biệt bởi ion Cl $^-$. Sự thay đổi về cấu trúc của khối keo sẽ

dẫn đến các biến đổi về các tính chất cơ học. Làm mất đi tính mềm dẻo và độ bền kéo, các khối keo trở nên cứng nhắc giống như khối gelatine hoặc agarose cô đặc.

Yếu tố ức chế sự phân giải fibrin

Những tác động khác đến cấu trúc cũng như tính chất vật lý của khối keo fibrin cũng cần xem xét: các chất ức chế phân hủy fibrin được sử dụng để ngăn ngừa các khối keo sớm bị thủy phân bởi các enzyme bên trong cơ thể. Aprotinin và tranexamid acid là các chất chống phân hủy fibrin được sử dụng phổ biến nhất.

Các phương pháp tạo keo fibrin

Thu nhận fibrinogen

Fibrinogen cô đặc được thu nhận bằng cách ly tâm từ máu toàn phần, tiếp theo là tủa lạnh hoặc tủa lạnh bằng hóa chất như với ethanol, polyethylene glycol (PEG) hoặc ammonium sulfate.

Tủa lạnh là phương pháp phổ biến nhất để sản xuất keo fibrin và phương pháp này liên quan đến một số chu kỳ làm đông – rã đông. Fibrinogen được thu nhận bằng cách ly tâm phần huyết tương. Số lượng fibrinogen thu được khoảng từ 20-40 mg/ml.

Các phương pháp thu nhận fibrinogen bằng hóa chất thực hiện nhanh hơn (gồm một bước tủa lạnh duy nhất) và nồng độ fibrinogen thường cao hơn (30-50 mg/ml), nhưng nhược điểm của phương pháp này là độ tinh khiết của fibrinogen không cao, do còn lẫn hóa chất sử dụng. Trong đó, phương pháp thu nhận fibrinogen bằng ethanol và PEG kém hiệu quả hơn ammonium sulfate. Vì thế, ammonium sulfate được sử dụng phổ biến hơn so với các phương pháp khác.

Thu nhận thrombin

Thrombin được sản xuất riêng rẽ với fibrinogen. Có một số phương pháp khác nhau để thu nhận thrombin, phổ biến nhất là phương pháp sử dụng sắc ký. Ngoài ra, cũng có thể sử dụng các phương pháp tủa bằng hóa chất.

Một số phương pháp sử dụng keo fibrin

Keo fibrin có thể dùng để bịt kín vết thương khi tiến hành sinh thiết mô.

Keo fibrin thường được trải trên bề mặt sử dụng bằng một syringe kép với hai ống bơm tiêm có thể tách rời nhau, hoặc trộn hai thành phần này lại với nhau rồi mới trải trên bề mặt sử dụng.

Keo cũng có thể được chứa trong hai ống bơm tách rời nhau và được bơm một cách đồng thời để tạo thành một lớp màng để cầm máu ở dạng phun sương; keo cũng có thể sử dụng theo dạng "sandwich" bằng cách trải fibrinogen trên bề mặt cần thiết, sau đó từ từ trộn thrombin vào cùng với fibrinogen. Cách thức này tỏ ra khá hiệu quả trong việc kết dính mô như trong trường hợp ghép da.

Tiềm năng ứng dụng của keo fibrin

Với chức năng là một loại keo sinh học giúp cầm máu hoặc dùng như một loại keo dán để gắn kết mô, bịt kín vết thương, fibrin được ứng dụng rất nhiều trong lĩnh vực phẫu thuật như phẫu thuật tim mạch, niệu quản, tai mũi họng; phẫu thuật thần kinh, chỉnh hình, dạ dày-ruột, ...

Trong đó, phẫu thuật về tim mạch là lĩnh vực ứng dụng chủ yếu của keo fibrin, với vai trò để nối các ống dẫn mạch, nối mạch máu và những điểm đặt cannula. Trong lĩnh vực thần kinh, keo fibrin được dùng như chất phụ trợ đóng màng cứng, hạn chế rò rỉ dịch não tủy sau hậu phẫu. Ở lĩnh vực thẩm mỹ, fibrin đặc biệt có tác dụng kiểm soát chảy máu sau quá trình loại bỏ mô hoại tử do tổn thương của bỏng, hỗ trợ trong phẫu thuật hàm-mặt và đầu cổ. Ngoài ra, keo fibrin còn giúp cầm máu bề mặt gan và cầm máu trong phẫu thuật tái cấu trúc lách, đặc biệt sau chấn thương.

Các chỉ tiêu về an toàn của keo sinh học

Đối với các loại keo sinh học, việc thu nhận và sản xuất đều được đặt dưới sự kiểm soát nghiêm ngặt và có hệ thống đánh giá chất lượng sản phẩm. Theo đó, quy trình có thể chia ra làm 2 bước:

Bước 1: Sàng lọc người hiến và lưu giữ huyết thanh có kiểm kê.

Bước 2: Bất hoạt siêu vi. Phương pháp này làm giảm nguy cơ truyền bệnh tiềm ẩn xuống mức thấp nhất.

Ngoài các tiêu chí đảm bảo an toàn trong sản xuất như trên, để có thể ứng dụng được trên lâm sàng, keo phải không gây độc, không gây đột biến đối với tế bào, không gây ung thư cũng như không gây ra các phản ứng dị ứng,... Ngoài ra, còn cần phải đảm bảo sản xuất trong điều kiện vô trùng, đảm bảo vô khuẩn.

Quy trình sản xuất keo fibrin tự thân dùng để dán mô

Đây là một phương pháp đơn giản, hiệu quả để tạo ra keo fibrin tự thân dùng để dán mô trong các phẫu thuật như dán da ghép tự thân hoặc trong nhãn khoa như phẫu thuật mộng thịt,...

Keo fibrin có cấu tạo từ hai thành phần chính là fibrinogen và thrombin, nên quy trình tạo ra keo fibrin gồm hai nội dung: thu nhận fibrinogen và thu nhận thrombin.

Máu ngoại vi thu nhận từ chính người bệnh (khoảng 5ml máu), được chia vào 2 tube chứa máu (có sẵn natri citrate để chống đông). Mỗi tube sẽ được dùng để thu nhận fibrinogen và thrombin.

Quy trình thu nhận Fibrinogen

Fibrinogen được thu nhận theo phương pháp tủa lạnh, dựa trên chu trình làm đông và rã đông để lắng (hay tủa)

Chuyển giao công nghệ

└ Giới thiệu kết quả nghiên cứu

các phân tử fibrinogen. Đây là phương pháp khá an toàn vì không sử dụng hóa chất trong quá trình tiến hành thí nghiệm và thao tác vô trùng để đảm bảo tiêu chí an toàn về mặt vô khuẩn.

Các bước thực hiện

Toàn bộ quá trình được tiến hành trong điều kiện vô trùng.

1. Máu sau thu nhận được để yên ở 4°C để phân tách các thành phần của máu. Sau khoảng 3-4 giờ đem quay ly tâm trong 15 phút, ở tốc độ 3.000 vòng/phút, thu nhận huyết tương.

2. Phần huyết tương thu được đem đông lạnh ở -20°C trong 1 giờ. Sau đó để mẫu ở 4°C trong khoảng thời gian 24 giờ.

3. Sau thời gian trên, tiến hành rã đông mẫu ở 2 - 4°C. Ly tâm phần huyết tương đã rã đông trong 15 phút, ở tốc độ 3.000 vòng/phút.

4. Sau khi quay ly tâm, loại bỏ phần dịch nổi, chứa lại khoảng 0,5 ml dịch trong tube và bổ sung thêm 0,5 ml nước cất vào tube. Trộn đều phần dịch này với nhau.

5. Phần dung dịch này chứa fibrinogen đã kết tủa và bảo quản trong các tube bảo quản (1 ml/1 vial) ở nhiệt độ -20°C, thời gian sử dụng trong vòng 1 tháng.

Kết quả: Dung dịch fibrinogen (1ml/1 vial).

Quy trình thu nhận thrombin

Thu nhận thrombin theo nguyên tắc tủa lạnh, bổ sung một số chất hóa học để tủa lượng thrombin có trong phần huyết tương của máu ngoại vi. Đây là phương pháp phù hợp cho các loại keo được tạo ra theo kiểu

“homemade” để phục vụ cho nhu cầu tạo keo tự thân cho chính bệnh nhân.

Các bước thực hiện

Toàn bộ quá trình được tiến hành trong điều kiện vô trùng.

1. Máu thu nhận được để yên ở 4°C để phân tách các thành phần của máu. Sau khoảng 3-4 giờ, đem quay ly tâm trong 15 phút ở tốc độ 3.000 vòng/phút. Thu nhận khoảng 1 ml huyết tương, cho vào tube bảo quản qua đêm ở nhiệt độ -20°C.

2. Lấy 1 ml huyết tương đông lạnh rã đông ở 2-4°C và pha loãng với nước cất tạo thành 10 ml dung dịch.

3. Thêm dung dịch acid acetic 1% (tạo pH 5,3). Lắc đều, sau đó để yên để tạo kết tủa trong vòng 30 phút. Ly tâm ở tốc độ 3.000 vòng/phút trong 5 phút. Thu phần kết tủa lắng ở đáy tube, bổ sung thêm 2,0 ml dung dịch D-PBS vào và sử dụng dung dịch Na₂CO₃ 0,01M để điều chỉnh pH ở mức 7,0.

4. Đặt dung dịch trong môi trường có nhiệt độ 37°C trong 15 phút, sau đó bổ sung dung dịch CaCl₂ 0,1M để tạo khối đông. Khối đông sẽ xuất hiện trong vòng 1-2 phút, có màu trắng đục.

5. Dùng đũa thủy tinh để loại bỏ các khối đông này, phần dịch còn lại chính là thrombin (khoảng 1ml dịch thrombin). Rút dịch thrombin cho vào tube bảo quản (1ml dung dịch thrombin)

6. Các tube thrombin này được bảo quản ở nhiệt độ -20°C, có thể sử dụng trong vòng 1 tháng.

Kết quả: Dung dịch thrombin (1ml/1 vial).

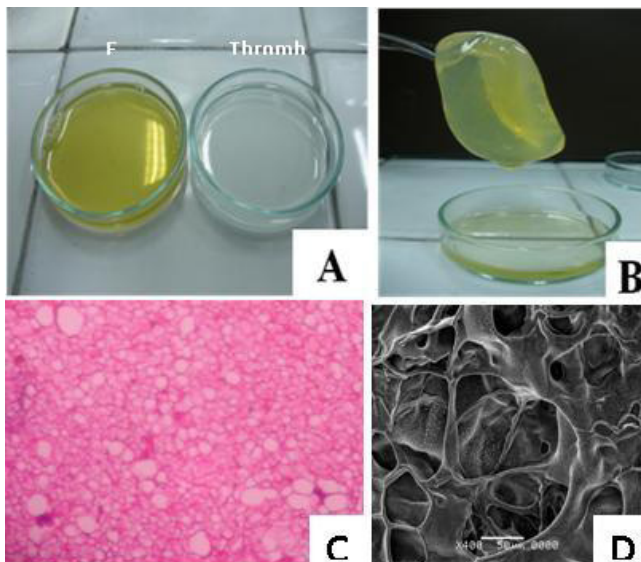
Phương thức sử dụng:

Trước khi sử dụng thì các tube chứa fibrinogen và thrombin phải được rã đông ở nhiệt độ phòng khoảng 5 phút. Khi trộn đều hai thành phần này lại với nhau sẽ xuất hiện khối keo. Thời gian tạo keo nằm trong khoảng từ 1-5 phút, khối keo tạo thành có màu vàng chanh, trong suốt.

Nên trải đều lớp fibrinogen trước trên bề mặt cần dán dính (bề mặt vết thương), sau đó mới trải đều lớp thrombin lên phía trên bề mặt lớp fibrinogen.

Thời gian cần thiết để tạo được keo fibrin (từ lúc thu nhận máu đến lúc tạo thành sản phẩm) trong khoảng thời gian là 72 giờ. Nếu không sử dụng ngay có thể bảo quản hai thành phần tạo keo là fibrinogen và thrombin riêng lẻ ở nhiệt độ -20°C, thời hạn sử dụng trong vòng 1 tháng.

Keo fibrin do nhóm tác giả nghiên cứu có thể tạo ra hoàn toàn từ chính nguồn máu của người bệnh (hướng đến phát triển nguồn keo fibrin tự thân), nên đảm bảo an toàn cho người bệnh trước các nguy cơ lây truyền bệnh. Quy trình tạo keo đơn giản, sẽ là một giải pháp thay thế hiệu quả cho các loại keo thương mại có giá rất đắt, giúp đáp ứng nhu cầu về keo fibrin cho người Việt. □



Hình 2: Đặc điểm của keo fibrin. (a) Hai thành phần tạo keo chính là fibrinogen và thrombin. (b) Keo fibrin sau khi hình thành. (c) Cấu trúc mô học (nhuộm H&E) của keo. (d) Cấu trúc bề mặt của keo fibrin quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét.