

ẢNH H- ỨNG CỦA TRỊ LIỆU OZONE ĐỐI VỚI NỒNG ĐỘ TNF- α HUYẾT T- ỜNG TRÊN THỎ BỊ BỎNG THỰC NGHIỆM

Vũ Quốc Bình*

TÓM TẮT

TNF- α là một cytokine tiền viêm có vai trò làm tăng phản ứng viêm tại vết thương. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá ảnh hưởng của phương pháp trị liệu bằng ozone đối với nồng độ TNF- α huyết tương của thỏ bị bỏng nhiệt thực nghiệm. Tổng số 24 thỏ bị bỏng, chia thành 4 nhóm (6 thỏ/nhóm): nhóm rửa tại chỗ bằng nước muối sinh lý, nhóm rửa nước ozone, nhóm rửa nước ozone kết hợp với sục ozone vào máu tự thân (OAHT) và nhóm điều trị bằng kem silvirin 1%. Đo nồng độ TNF- α huyết tương bằng phương pháp ELISA. Kết quả cho thấy: nồng độ TNF- α huyết tương trong máu ngoại vi tăng cao rõ rệt sau bỏng ở tất cả các nhóm ($p < 0,01$); tuy nhiên, ở nhóm thỏ bỏng điều trị tại chỗ bằng ozone kết hợp với OAHT, nồng độ TNF- α trong huyết tương thấp nhất so với các nhóm khác tại thời điểm sau 1 tuần điều trị ($p < 0,01$).

* Từ khóa: Bỏng thực nghiệm; Trị liệu ozone; Truyền máu tự thân đã tiếp xúc ozone.

INFLUENCE OF OZONE AUTOHEMOTHERAPY ON PLASMA TNF- α LEVEL IN EXPERIMENTALLY BURNED RABBIT

SUMMARY

TNF- α is an acute inflammatory cytokine which is believed to play a role on would to increase inflammation. This study was designed to evaluate the effectiveness of ozone therapy on plasma TNF- α level in the burn animal model. 24 burned rabbits were divided into 4 groups (6 rabbits in each group): local treatment with normal saline; local treatment with ozone; local treatment with ozone and ozone autohemotherapy (OAHT), and local treatment with silvirin 1%. The concentration of plasma TNF- α was examined by ELISA. The results showed that: the concentration of plasma TNF- α was significantly increased in all of the groups after burn periods ($p < 0.01$); however the plasma TNF- α level of the group treated with local ozone combined with OAHT was significantly lower in comparison with the other groups after one-week treatment ($p < 0.01$).

* Key words: Experimental burn; Ozone therapy; Ozone autohemotherapy.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bỏng là một tai nạn, cấp cứu thường gặp trong cuộc sống hàng ngày và trong lao động sản xuất. Bệnh sinh bỏng diễn biến tại chỗ cho thấy xuất hiện nhiều yếu tố như prostaglandin,

leucotrien, serotonin, histamine và các gốc oxy tự do [1, 2, 6], tại vùng bỏng sâu còn có đáp ứng của hệ đông máu. Đáp ứng của tế bào viêm nhằm tiêu diệt vi khuẩn góp phần làm sạch vết thương và kích hoạt quá trình tái tạo hàn gắn vết thương. Sự tập trung các

* Cục Quân y

Phản biện khoa học: PGS. TS. Lê Văn Sơn

PGS. TS. Nguyễn Gia Tiến

tế bào viêm này do ảnh hưởng của lực hoá ứng động của yếu tố C3a, C5a, leucotrien, kallikrein, fibrinopeptide. Đáp ứng tế bào phụ thuộc vào tính chất hoại tử bỏng và diện tích bỏng sâu [6].

Ozone đã được sử dụng điều trị vết thương bị nhiễm khuẩn hoại thư sinh hơi tại Chiến tranh Thế giới Thứ nhất, hiện nay, nó được biết đến như một chất có khả năng ứng dụng vào điều trị trong y học. Từ những cơ sở trị liệu đầu tiên sử dụng ozone để diệt khuẩn trên bề mặt vết thương, đến nay, ozone được sử dụng khá phổ biến trong y học tại nhiều nước với nhiều phương pháp trị liệu khác nhau, gồm truyền máu tự thân tiếp xúc ozone (OAHT), tắm nước ozone, súc ozone vào đại tràng, phúc mạc, rửa vết thương tại chỗ... Đến nay, tại Việt Nam, chúng ta chưa có phương án nào vừa giảm chi phí điều trị, vừa nâng cao sức đề kháng, vừa rút ngắn thời gian điều trị cho BN bỏng. Liệu pháp hỗ trợ điều trị bằng ozone hứa hẹn chi phí rẻ, tác dụng hiệu quả cả bằng con đường toàn thân làm tăng cường miễn dịch của cơ thể và tại chỗ có tác dụng ngăn ngừa tình trạng nhiễm khuẩn vết thương và làm vết thương nhanh liền [1, 3, 5, 6].

Bài viết này nhằm: *Đánh giá ảnh hưởng của liệu pháp ozone OAHT và điều trị tại chỗ bằng nước muối súc ozone đối với nồng độ của TNF- α trên thỏ bị bỏng nhiệt thực nghiệm.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

Động vật: 24 thỏ không phân biệt giới tính, khỏe mạnh, lông mượt, nhanh nhẹn, trọng lượng trung bình 2 kg/con. Nuôi thỏ thực nghiệm trong điều kiện đầy đủ thức ăn,

nước uống, chuồng trại bảo đảm vệ sinh trong thời gian nghiên cứu. Chia thỏ ngẫu nhiên thành 4 nhóm, 6 con/nhóm:

- Nhóm NaCl: thỏ bị gây bỏng và rửa vết thương bằng nước muối sinh lý.

- Nhóm NaCl + O₃: thỏ bị gây bỏng và rửa vết thương bằng nước muối sinh lý súc ozone với nồng độ giảm dần.

- Nhóm O₃ + O₃: thỏ bị gây bỏng và rửa vết thương bằng nước muối sinh lý súc ozone kết hợp tiến hành OAHT.

- Nhóm silvirin: thỏ bị gây bỏng, rửa vết thương bằng nước muối sinh lý và điều trị bằng silvirin.

Tiến hành thí nghiệm tại Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y.

2. Phương pháp nghiên cứu.

- Phương pháp trị liệu bằng OAHT: hút máu tĩnh mạch tai thỏ (tương ứng 5 ml/kg thể trọng) vào bình nhựa có chứa chất chống đông và hỗn hợp khí ozone-oxy, liều tương ứng với từng nhóm trị liệu. Cho máu tiếp xúc với hỗn hợp khí này trong 5 phút và truyền trả lại cho thỏ. Quá trình trị liệu bằng phương pháp OAHT tiến hành tổng số 6 lần, 3 lần/tuần, liều ozone khởi đầu 50 mcg/ml và tăng lên 50% sau mỗi 2 lần trị liệu (Bocci, 2005).

- Gây bỏng thỏ thực nghiệm: thỏ được cắt sạch lông vùng lưng, sau đó, cố định tư thế sấp trên bàn. Gây mê bằng thiophental, liều 50 mg/kg. Đổ đầy nước sôi vào ống gây bỏng, sau đó đặt ống gây bỏng vuông góc mặt da, tiếp theo, đặt quả cân nặng 1 kg lên ống trong vòng 30 giây. Gây bỏng cả 2 bên sống lưng với tổn thương độ III, diện tích khoảng 10% tổng diện tích bề mặt da thỏ.

- Súc ozone vào nước muối sinh lý để rửa vết thương: liều ozone súc nước muối để rửa

vết thương: bắt đầu từ 80 mcg/ml. Những ngày sau bỏng, giảm dần liều 10 mcg/ml/ngày. Khi liều giảm còn 10 mcg/ml, duy trì nồng độ này đến khi liền vết thương.

- Các chỉ tiêu nghiên cứu:

Máu tĩnh mạch tai thỏ được chống đông bằng EDTA, lấy vào ba thời điểm: trước khi tiến hành gây bỏng, sau khi gây bỏng và trị liệu 1 tuần + 2 tuần.

- Công thức máu: trong vòng 2 giờ, xác định số lượng tế bào máu bằng đếm tự động trên hệ thống xét nghiệm huyết học tự động Sysmex XE - 2100 (Khoa Cận Lâm sàng, Viện Bỏng Quốc gia) theo nguyên lý đếm dòng chảy, dựa vào điện trở kháng, kiểm soát liên tục độ mở của đường hút trong quá trình đếm và xác định phân loại kích cỡ tế bào.

- Định lượng TNF- α : sau khi được lấy ra

khởi tĩnh mạch, ly tâm máu 3.000 vòng/phút x 5 phút, huyết tương được tách riêng và bảo quản ở -80 độ cho đến thời điểm định lượng. Định lượng nồng độ TNF- α huyết tương trong máu thỏ bằng phương pháp ELISA, kit của hãng Orgenium. Các đáy giếng đã được gắn sẵn kháng thể đơn dòng tương ứng chống cytokine trên. Quy trình kỹ thuật tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đổi màu của cơ chất từ màu xanh sang màu vàng thể hiện cytokine có mặt trong các giếng. Đo mật độ quang học (OD) của các giếng bằng máy đọc ELISA (Beckman Coulter, Hoa Kỳ) ở bước sóng 450 nm. Giá trị OD của các giếng ELISA tỷ lệ thuận với lượng cytokine có trong mẫu.

* *Xử lý kết quả*: bằng thuật toán T-test, so sánh 2 số trung bình, sử dụng phần mềm tính toán chuyên dụng STAVIEW 6.0 và STATA 7.1.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Thay đổi một số chỉ số máu ngoại vi ở các nhóm thỏ bỏng.

Bảng 1: Số lượng hồng cầu máu ngoại vi ở các nhóm thỏ tại thời điểm nghiên cứu ($\bar{X} \pm SE$).

NHÓM (n = 6/nhóm)	SỐ LƯỢNG HỒNG CẦU (T/l)			p
	Trước bỏng (a)	Sau trị liệu tuần 1 (b)	Sau trị liệu tuần 2 (c)	
Nhóm NaCl (1)	4,62 $\pm$ 0,21	3,9 $\pm$ 0,14	4,38 $\pm$ 0,11	$p_{a,b,b,c} < 0,05$
Nhóm NaCl + O ₃ (2)	4,49 $\pm$ 0,09	4,15 $\pm$ 0,11	4,41 $\pm$ 0,06	$p_{a,b,b,c} < 0,05$
Nhóm O ₃ + O ₃ (3)	4,61 $\pm$ 0,24	3,85 $\pm$ 0,27	4,35 $\pm$ 0,17	$p_{a,b,b,c} < 0,05$
Nhóm silvirin (4)	4,88 $\pm$ 0,37	4,26 $\pm$ 0,23	4,42 $\pm$ 0,23	$p_{a,b,b,c} < 0,05$
p	$p_{1,2,3,4} > 0,05$			

Số lượng hồng cầu trong máu ngoại vi của thỏ trước thí nghiệm có giá trị trung bình 4,5 t/l. Ở các nhóm thỏ bị bỏng, sau trị liệu 1 tuần, số lượng hồng cầu giảm có ý nghĩa thống kê so với thời điểm trước thí nghiệm. Dù với 4 phương pháp trị liệu khác nhau, nhưng mức giảm số lượng hồng cầu sau 1 tuần trị liệu khá tương đồng với nhau. Số lượng hồng cầu tăng trở lại không khác biệt đáng kể sau 2 tuần trị liệu ở tất cả các nhóm ($p > 0,05$).

Bảng 2: Nồng độ hemoglobin máu ở nhóm thở tại thời điểm nghiên cứu ($\bar{X} \pm SE$).

NHÓM (n = 6/nhóm)	HEMOGLOBIN (g/l)			p
	Trước bông (a)	Sau trị liệu tuần 1 (b)	Sau trị liệu tuần 2 (c)	
Nhóm NaCl (1)	99,5 ± 4	82,2 ± 0,27	87,8 ± 2	$p_{a,b,c} < 0,05$
Nhóm NaCl + O ₃ (2)	96,8 ± 2,8	88 ± 3,1	92,3 ± 2,9	$p_{a,b,c} < 0,05$
Nhóm O ₃ + O ₃ (3)	100 ± 7,1	82 ± 6,9	89,6 ± 5,7	$p_{a,b,c} < 0,05$
Nhóm silvirin (4)	105 ± 6,3	88,8 ± 4,6	93,6 ± 4,9	$p_{a,b,c} < 0,05$
p	$p_{1,2,3,4} > 0,05$			

Nồng độ hemoglobin ở các nhóm thở bông trị liệu bằng những phương pháp khác nhau có mức giảm tương đương nhau ở tuần thứ nhất sau trị liệu. Mức giảm này có ý nghĩa thống kê so với thời điểm trước thí nghiệm và sau 2 tuần trị liệu ($p < 0,05$).

Bảng 3: Số lượng bạch cầu máu ngoại vi ở các nhóm thở tại thời điểm nghiên cứu ($\bar{X} \pm SE$).

NHÓM (n = 6/nhóm)	SỐ LƯỢNG BẠCH CẦU (G/L)			p
	Trước bông (a)	Sau trị liệu tuần 1 (b)	Sau trị liệu tuần 2 (c)	
Nhóm NaCl (1)	7,1 ± 0,58	9 ± 1,28	10,1 ± 2,09	$p_{a,b,a,c} < 0,05$
Nhóm NaCl + O ₃ (2)	7,38 ± 1,21	9,83 ± 0,77	9,48 ± 1,66	$p_{a,b,a,c} < 0,05$
Nhóm O ₃ + O ₃ (3)	6,82 ± 0,59	7,5 ± 1,33	8,84 ± 1,12	$p_{a,c} < 0,05$
Nhóm silvirin (4)	5,53 ± 0,96	7,2 ± 0,29	8,58 ± 0,78	$p_{a,b,a,c} < 0,05$
p	$P_{1,2,3,4} > 0,05$			

Số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi của thở dao động từ 4,6 - 12,1 G/l. Sau gây bông và trị liệu 1 tuần, ở nhóm NaCl, nhóm NaCl + O₃ và nhóm silvirin, số lượng bạch cầu tăng có ý nghĩa thống kê, mức tăng này vẫn được duy trì tới tuần thứ 2 của quá trình trị liệu. Mặt khác, nhóm O₃ + O₃ có số lượng bạch cầu tăng nhẹ không có ý nghĩa thống kê ở tuần thứ nhất sau trị liệu. Cuối tuần thứ 2, bạch cầu trong máu ngoại vi của nhóm này tăng rõ hơn, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

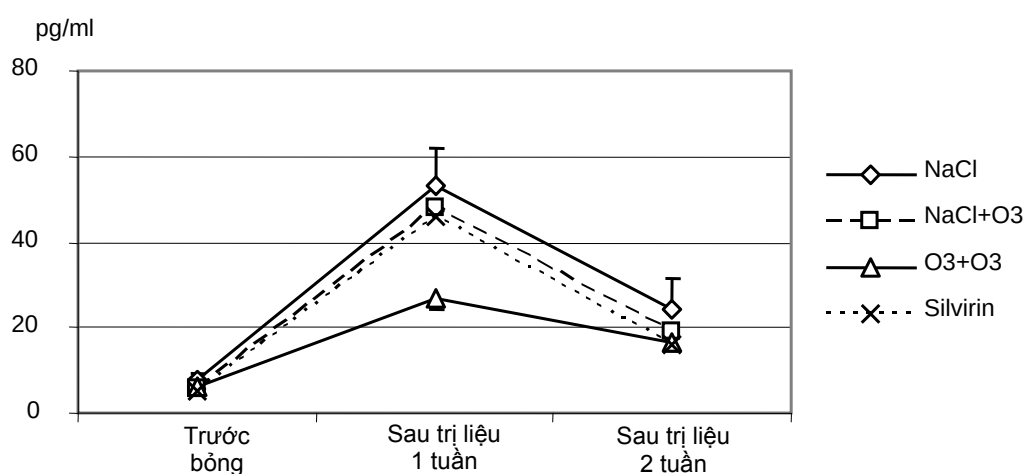
2. Biến đổi nồng độ TNF-α huyết tương ở các nhóm.

Bảng 4: Nồng độ TNF-α huyết tương ở các nhóm thở tại thời điểm nghiên cứu ($\bar{X} \pm SE$).

	NỒNG ĐỘ TNF-α (pg/ml)	
--	-----------------------	--

NHÓM (n = 6/nhóm)	Trước bỏng (a)	Sau trị liệu tuần 1 (b)	Sau trị liệu tuần 2 (c)	p
Nhóm NaCl (1)	7,95 ± 1,34	52,91 ± 6,72	24,42 ± 7,02	$p_{a,b,c} < 0,01$
Nhóm NaCl + O ₃ (2)	5,65 ± 4,31	47,8 ± 7,05	18,95 ± 3,93	$p_{a,b,c} < 0,01$
Nhóm O ₃ + O ₃ (3)	6,31 ± 0,44	27,05 ± 2,79	16,27 ± 1,99	$p_{a,b,c} < 0,01$
Nhóm silvirin (4)	4,92 ± 2,51	46,08 ± 8,15	16,25 ± 5,45	$p_{a,b,c} < 0,01$
p	$p_{1,2,3,4} > 0,05$	$p_{1,2,4} > 0,05$ $p_{3-1,3-2,3-4} < 0,01$	$p_{1,2,3,4} > 0,05$	

Nồng độ TNF- α huyết tương của các nhóm thử biến đổi mạnh theo thời gian sau gây bỏng. Sau 1 tuần trị liệu, nồng độ TNF- α tăng cao ở tất cả các nhóm so với thời điểm trước gây bỏng ($p < 0,01$) cũng như sau trị liệu 2 tuần ($p < 0,01$).



Biểu đồ 1: Biến đổi nồng độ TNF- α trong máu của các nhóm.

Sau 1 tuần trị liệu nồng độ TNF- α huyết tương tăng cao rõ rệt, giảm dần sau 2 tuần trị liệu, nhưng vẫn ở mức cao so với trước gây bỏng ($p < 0,01$).

BÀN LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy, số lượng hồng cầu và hemoglobin giảm nhẹ 1 tuần sau bỏng ở tất cả các nhóm trị liệu. Đây có thể do hậu quả của bỏng gây mất máu, tan máu. Trong quá trình điều trị từ ngày thứ 3 sau bỏng, chúng tôi tiến hành cắt lọc hoại tử tại vết bỏng, có chảy máu tại vết thương. Tuy nhiên, kết quả phân tích thấy không có sự khác biệt giữa các nhóm về số lượng hồng cầu và huyết sắc tố. Sau 2 tuần điều trị, các nhóm thử có số lượng hồng cầu và hemoglobin tương đương với thời điểm

trước thí nghiệm. Điều này chứng tỏ quá trình hồi phục của cơ thể thử. Số lượng bạch cầu của các nhóm thử đều tăng sau gây bỏng 1 tuần, nhưng mức tăng chỉ số này của nhóm OAHT thấp hơn so với các nhóm khác. Dưới tác dụng của OAHT, mức độ huy động bạch cầu làm nhiệm vụ chống viêm được giảm bớt. Có thể do tác dụng của cytokine viêm TNF- α tăng thấp nhất tại nhóm này. Nồng độ TNF- α huyết tương được định lượng trong máu thử tại 3 thời điểm: trước bỏng, sau điều trị 1 tuần cho thấy nhóm trị liệu OAHT thấp hơn các nhóm khác ($p < 0,01$). Các kết quả nghiên cứu

trước đây của chúng tôi được công bố trên thỏ khỏe mạnh, liệu pháp OAHT an toàn, không làm biến đổi nồng độ cytokine viêm, trong đó có TNF- α . Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, trị liệu ozone ảnh hưởng tới cytokine TNF- α viêm trên cơ thể bệnh lý [1]. Kết quả này tương tự của Souza (2010) tiến hành trị liệu nhiễm khuẩn phúc mạc chuột. Nhóm chuột được trị liệu bằng ozone có nồng độ IL-6, một cytokine viêm, thấp hơn có ý nghĩa so với các nhóm khác không điều trị hoặc được điều trị bằng các phương pháp khác. Chuột được điều trị ozone có tỷ lệ sống cao hơn các trị liệu khác [4]. Nghiên cứu khác tiến hành tiêm chất gây sốt (LPS) trên chuột nhắt cho thấy, nồng độ TNF- α trong máu chuột tăng ít hơn ở nhóm được trị liệu ozone so với nhóm không được điều trị (Zamora, 2005) [6].

KẾT LUẬN

Nghiên cứu 24 thỏ gây bỏng nhiệt cùng độ sâu và diện tích, chia thành 4 nhóm, được trị liệu bằng các phương pháp khác nhau gồm rửa nước muối sinh lý, rửa nước muối sinh lý sục ozone, rửa nước muối sinh lý sục ozone kết hợp với OAHT và trị liệu bằng silvirin, kết quả cho thấy, với quá trình trị liệu kéo dài 2 tuần, OAHT kết hợp rửa nước muối sinh lý sục ozone có tác dụng hạn chế rõ rệt mức độ tăng của TNF- α trong huyết tương máu thỏ bị bỏng so với các phương pháp trị liệu khác ($p < 0,05$).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Quốc Bình, Hồ Anh Sơn, Nguyễn Linh Toàn. Truyền máu tự thân đã tiếp xúc ozone không làm thay đổi hoạt độ SOD, nồng độ glucose, acide uric, IL1- α , TNF- α và IL10 huyết thanh ở thỏ khỏe mạnh. Tạp chí Y học lâm sàng 108. 2011, 6 (3), pp.24-29.

2. Bocci B, Valacchi G, Corradeschi F, Fanetti G. Studies on the biological effects of ozone: 8. Effects on the total antioxidant status and on interleukin-8 production. Med Infl. 1998, 7, pp.313-317.

3. Bocci V. Ozone - a new medical drug. Springer. 2005.

4. De Souza Y.M, Fontes B, Martins J.O, Sannomiya P, Brito G.S, Younes R.N, Rasslan S. Evaluation of the effects of ozone therapy in the treatment of intra-abdominal infection in rats. Clinics. 2010, 65, pp.195-202.

5. Giunta R, Coppola A, Luongo C, Sammartino A, Guastafierro S, Grassia A, Giunta L, Mascolo L, Tirelli A, Coppola A. Ozonized autohemotransfusion improves hemorheological parameters and oxygen delivery to tissues in patients with peripheral occlusive arterial disease. Ann Hematol. 2001, 80, pp.745-748.

6. Zamora ZB, Borrego A, López OY, Delgado R, González R, Menéndez S, Hernández F, Schulz S. Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF-alpha release and antioxidant-prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock. Mediators Inflamm. 2005, 24, pp.16-22.

Ngày nhận bài: 2/5/2012

Ngày giao phản biện: 1/6/2012

Ngày giao bản thảo in: 26/7/2012