

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU HIỆU ỨNG LÀM LÀNH VẾT THƯƠNG CỦA HỖN HỢP CHITOSAN TAN TRONG NƯỚC - BACTERIAL CELLULOSE – NANO BẠC

Nguyễn Thị Mỹ Lan⁽¹⁾, Huỳnh Thị Phương Linh⁽¹⁾, Lê Thị Mỹ Phước⁽¹⁾
Nguyễn Quốc Hiến⁽²⁾

(1) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-Tp HCM

(2) Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ Tp HCM

(Bài nhận ngày 08 tháng 01 năm 2009, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 29 tháng 07 năm 2009)

TÓM TẮT: Với mong muốn góp phần trong việc điều trị cho các bệnh nhân bỏng, chúng tôi đã thử nghiệm hiệu ứng làm lành vết thương bỏng của hỗn hợp Chitosan tan trong nước (WSC)_ Bacterial cellulose (BC)_ Polyvinyl pyrrolidone (PVP) và có bổ sung thêm dung dịch Nano bạc nhằm tăng tính kháng khuẩn của hỗn hợp. Dịch paste từ sự kết hợp của BC, WSC, PVP và Nano bạc cho kết quả rất tốt khi thử nghiệm trên chuột bị bỏng da. Dịch paste ở các mẫu có chứa Nano bạc ở các nồng độ 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm có khả năng kháng được hai chủng *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* là hai chủng vi khuẩn phổ biến trên các vết bỏng. Khi bôi dịch paste lên vết bỏng có thể rút ngắn thời gian lành hóa, vùng da tổn thương phục hồi lại như bình thường.

Từ khóa: trị bỏng, chitosan tan trong nước (WSC), bacterial cellulose (BC), polyvinyl pyrrolidone (PVP), nano bạc

1. GIỚI THIỆU

Bỏng là một trong những tai nạn thương tâm nhất thường gặp trong đời sống hằng ngày và thường để lại những di chứng nặng nề về thẩm mỹ cũng như sức khỏe cho con người.

Theo thống kê, trung bình mỗi năm Viện bỏng quốc gia tiếp nhận trên 2000 trường hợp bỏng, trong đó chiếm hơn một nửa là trẻ em. Năm 2005 khoa Phòng- Chính hình Bệnh Viện Nhi Đồng 1 Tp.Hồ Chí Minh đã tiếp nhận gần 2000 trẻ em bị bỏng phải nhập viện, trong đó 79% trường hợp bỏng do nước sôi, 17% do lửa và 4% do hóa chất.

Hiện nay trên thế giới đã nghiên cứu sử dụng các màng da nhân tạo trong điều trị tổn thương bỏng và vết bỏng khi lành có tính thẩm mỹ như vùng da bình thường. Từ đó, nhiều loại màng da nhân tạo đã được thương mại hóa như: màng collagen, màng silicone, màng chitosan.... Ở Việt Nam màng da nhân tạo cũng đã được sử dụng để điều trị bỏng.

Trên cơ sở nghiên cứu các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên, chúng tôi quyết định thử nghiệm hiệu ứng làm lành vết thương bỏng của hỗn hợp *Chitosan_ Bacterial cellulose_ Polyvinyl pyrrolidone*. Và để ngăn ngừa các biến chứng nhiễm khuẩn trong quá trình điều trị chúng tôi đã bổ sung thêm dung dịch *Nano bạc* vì theo công bố của Bộ Y Tế Nano bạc là một dung dịch an toàn, đã được cấp giấy phép sử dụng trong y học và thực phẩm.

2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

- Ø Tạo màng cellulose từ *Acetobacter xylinum*.
- Ø Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của hỗn hợp BC, WSC với Nano bạc.
- Ø Khảo sát và đánh giá hiệu ứng làm lành vết thương trên chuột bị tổn thương bỏng.

3. THỰC NGHIỆM

3.1. Đối tượng nghiên cứu và nguyên liệu

Ø Chuột nhắt trắng (*Mus musculus* var. *Albino*) của Viện Pasteur Thành Phố Hồ Chí Minh.

Ø PVP (Polyvinyl Pyrolidone) (loại K_30, của Canada).

Ø Dung dịch Nano bạc (Silver Nano) 1000 ppm, kích thước hạt Nano bạc 1-10 nm do Trung Tâm Nghiên Cứu và Triển Khai Công Nghệ Bức Xạ cung cấp.

Ø Chitosan tan trong nước (Water Soluble Chitosan) độ deacetyl 55% (xác định bằng phương pháp phổ hồng ngoại), Mw = 80.000 (xác định bằng GPC) do Trung Tâm Nghiên Cứu và Triển Khai Công Nghệ Bức Xạ cung cấp.

Ø Giống *Acetobacter xylinum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* của phòng thí nghiệm Chuyên Hóa Sinh Học, Khoa Sinh Học, Trường Đại Học Khoa Học Tự Nhiên, ĐHQG Tp. Hồ Chí Minh.

3.2. Các phương pháp thực nghiệm

3.2.1. Tạo dịch paste

Mục tiêu: kết hợp các thành phần như BC, WSC, PVP, Nano bạc để tạo dịch paste dùng điều trị bỏng da.

Bảng 1. Tỷ lệ kết hợp giữa các thành phần để tạo dịch paste

Tên mẫu	Chitosan tan (WSC) (g)	Bacterial cellulose (BC) (g)	Nano bạc (ml)	PVP (g)	Nước cất (ml)
2	1	100	0	1,5	50
3a	1	100	1,4	1,5	50
3b	1	100	2,8	1,5	50
3c	1	100	4,2	1,5	50

- Tiến hành chiếu xạ dịch paste với liều xạ 18,3 kGy.

- Sau khi chiếu xạ ở liều 18,3 kGy chúng tôi đã tạo được các dịch paste với nồng độ Nano bạc là 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm và dịch paste không có Nano bạc (đối chứng).

3.2.2. Xác định độ nhiễm vi sinh vật ban đầu trong dịch paste

Mục tiêu: xác định tổng vi sinh vật hiếu khí, nấm men, nấm mốc của dịch paste ban đầu từ đó có biện pháp tiệt trùng thích hợp để nhằm bảo quản tốt dịch paste.

3.3.3. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của dịch paste

Mục tiêu: sau khi chiếu xạ dịch paste, tiến hành khảo sát hoạt tính kháng khuẩn trên 2 chủng: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Bảng 2. Môi trường khảo sát khả năng kháng khuẩn của dịch paste

STT	Lô thí nghiệm
1	Môi trường nuôi cấy vi sinh vật (đối chứng)
2	Môi trường nuôi cấy vi sinh vật bổ sung thêm 300 µl dầu mù u
3	Môi trường nuôi cấy vi sinh vật bổ sung thêm 0,5g mẫu 2 (M2)
4	Môi trường nuôi cấy vi sinh vật bổ sung thêm 0,5g mẫu 3a (M3a)
5	Môi trường nuôi cấy vi sinh vật bổ sung thêm 0,5g mẫu 3b (M3b)
6	Môi trường nuôi cấy vi sinh vật bổ sung thêm 0,5g mẫu 3c (M3c)

3.3.4. Phương pháp khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của dung dịch Nano bạc

Mục tiêu: Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của Nano bạc khi ở dạng dung dịch từ đó so sánh với khả năng kháng khuẩn của Nano bạc khi ở dạng paste với WSC và BC.

3.3.5. Khảo sát khả năng lành hóa vết thương bỏng của dịch paste

Mục tiêu: Xác định hiệu quả BC trong việc truyền tải thuốc đến nơi tổn thương bỏng (độ 3) trên cơ thể chuột. Từ đó, so sánh kết quả và đánh giá hiệu quả hàn gắn vết thương trong từng trường hợp của dịch paste.

Bảng 3. Các nhóm chuột thí nghiệm

STT	Nhóm thí nghiệm	Số lượng chuột	Số lần lặp lại
1	Đối chứng bôi dầu mù u	4	3
2	Bôi mẫu 2 sau khi KTBX 18,3 kGy	4	3
3	Bôi mẫu 3a sau khi KTBX 18,3 kGy	4	3
4	Bôi mẫu 3b sau khi KTBX 18,3 kGy	4	3
5	Bôi mẫu 3c sau khi KTBX 18,3 kGy	4	3

KTBX: khử trùng bức xạ

Chọn mốc thời gian khảo sát là 0 ngày (N0), 3 ngày (N3), 7 ngày (N7), 10 ngày (N10), 15 ngày (N15) để theo dõi tiến trình lành hóa vết thương.

Ở mỗi mốc thời gian ghi nhận các kết quả:

Ø Nhận xét các dấu hiệu lâm sàng.

Ø Tính diện tích vết bỏng ở các thời điểm.

Ø Chụp lại hình theo các thời điểm khảo sát.

4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

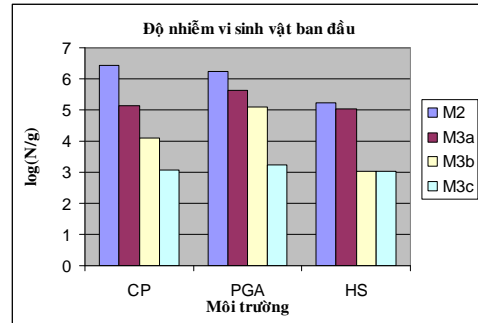
4.1. Khảo sát độ nhiễm vi sinh vật ban đầu trong dịch paste

Độ nhiễm vi sinh vật ban đầu trong dịch paste được đánh giá thông qua mật độ vi sinh vật trên các môi trường tương ứng.

CP: Mật độ vi sinh vật hiếu khí trong các dịch paste ban đầu trên môi trường cao thịt-pepton.

PGA: Mật độ nấm mốc trong các dịch paste ban đầu trên môi trường PGA.

HS: Mật độ nấm men trong các dịch paste ban đầu trên môi trường Hansen.



Đồ thị 1. Đồ thị biểu diễn độ nhiễm vi sinh vật ban đầu trong các dịch paste.

Vì mật độ vi sinh vật ban đầu trong các dịch paste khá cao và để bảo quản dịch paste tốt hơn chúng tôi tiến hành khử trùng bằng nhiệt. Tuy nhiên, sau khi khử trùng nhiệt dịch paste bị tách nước do đó chúng tôi tiến hành khử trùng bức xạ với liều xạ 18,3kGy. Phương pháp khử trùng bức xạ là phương pháp khử trùng hiệu quả vì được tiến hành ở nhiệt độ thường mà không cần gia nhiệt do đó không làm biến tính các thành phần của hỗn hợp, thân thiện với môi trường, sản phẩm có độ tinh khiết cao đồng thời có thể bảo quản lâu hơn trong các bao nhựa.

Sau khi chiếu xạ chúng tôi đã tiến hành kiểm tra độ nhiễm vi sinh vật.

Kết quả ghi nhận như sau:

Bảng 4. Mật độ vi sinh vật hiếu khí trong dịch paste sau khi chiếu xạ.

Tên mẫu	Mật độ vi sinh vật (CFU/g)		
	Lần 1	Lần 2	Trung bình
Mẫu 2	$3,4 \cdot 10^3$	$4,9 \cdot 10^3$	$4,2 \cdot 10^3$
Mẫu 3a	KHP	KHP	KHP
Mẫu 3b	KHP	KHP	KHP
Mẫu 3c	KHP	KHP	KHP

Bảng 5. Mật độ nấm mốc trong dịch paste sau khi chiếu xạ trên môi trường PGA.

Tên mẫu	Mật độ vi sinh vật (CFU/g)		
	Lần 1	Lần 2	Trung bình
Mẫu 2	$5,4 \cdot 10^3$	$7,2 \cdot 10^3$	$6,3 \cdot 10^3$
Mẫu 3a	KPH	KPH	KPH
Mẫu 3b	KPH	KPH	KPH
Mẫu 3c	KPH	KPH	KPH

Bảng 6. Mật độ nấm men trong dịch paste sau khi chiếu xạ trên môi trường Hansen

Tên mẫu	Mật độ vi sinh vật (CFU/g)		
	Lần 1	Lần 2	Trung bình
Mẫu 2	$0,30 \cdot 10^4$	$0,45 \cdot 10^4$	$0,38 \cdot 10^4$
Mẫu 3a	KPH	KPH	KPH
Mẫu 3b	KPH	KPH	KPH
Mẫu 3c	KPH	KPH	KPH

KPH: không phát hiện

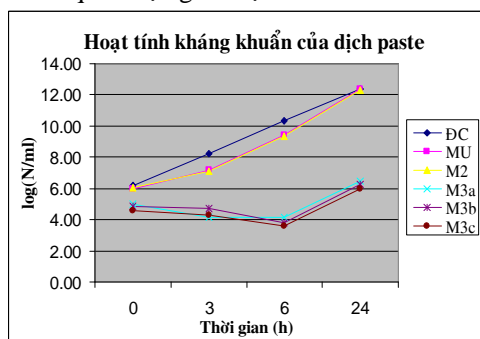
Kết quả ghi nhận ở các bảng 4, 5, 6 cho thấy các mẫu có chứa Nano bạc thì không còn nhiễm khuẩn nữa, trường hợp mẫu 2 mật độ vi sinh vật giảm đáng kể nhưng vẫn không tiêu diệt hoàn toàn có thể vì ban đầu trong thành phần của mẫu M2 không có Nano bạc để diệt khuẩn nên mật độ vi sinh vật ban đầu khá cao và có thể do liều chiếu xạ còn thấp không đủ để diệt khuẩn.

Vì trong thành phần tạo dịch paste chúng tôi có bổ sung PVP như là một chất làm tăng độ tương hợp sinh học, nếu chọn phương pháp khử trùng bằng nhiệt thì sản phẩm sẽ bị tách pha nước đồng thời nhiệt độ cao có thể làm biến tính Nano bạc. Ngoài ra, khử trùng bức xạ có thể tác động lên polyme tạo liên kết hoá học giữa các phân tử (khâu mạch) làm tăng tính đồng nhất cho sản phẩm.

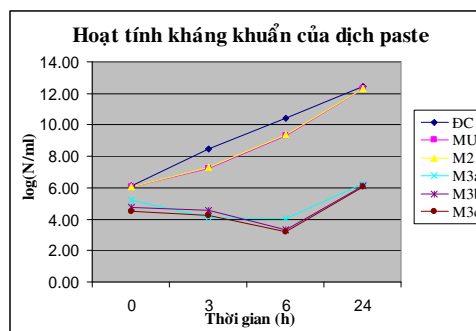
4.2. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của dịch paste

Hoạt tính kháng khuẩn của dịch paste chứa Nano bạc được đánh giá thông qua mật độ vi sinh vật (CFU/ml) trong môi trường nuôi cấy có bổ sung dịch paste qua các mốc thời gian khảo sát (0giờ, 3giờ, 6giờ, 24giờ).

Kết quả được ghi nhận như sau:



Đồ thị 2: Đồ thị biểu diễn mật độ *S.aureus* theo thời gian khi bổ sung dịch paste



Đồ thị 3: Đồ thị biểu diễn mật độ *P.aeruginosa* theo thời gian khi bổ sung dịch paste

Nhận xét:

Màng BC sau khi xay nhuyễn và kết hợp với WSC, Nano bạc để tạo dịch paste có khả năng kháng tốt với *S.aureus* và *P.aeruginosa*.

Ở thời điểm 0 giờ, khi bắt đầu khảo sát, do ta mới vừa bổ sung dịch paste vào nên thời gian tiếp xúc của các chất có hoạt tính kháng khuẩn với tế bào vi sinh vật chưa lâu nên hoạt tính kháng chưa biểu hiện rõ rệt. Mặc dù vậy dịch paste có chứa Nano bạc ở nồng độ 10 ppm,

20 ppm, 30 ppm đã có biểu hiện hoạt tính kháng, bằng chứng là mật độ tế bào giảm hẳn (10^4 - 10^5 CFU/ml) so với mẫu đối chứng (10^6 CFU/ml) và hiệu suất kháng khuẩn lên đến 97%.

4.3. Khảo sát khả năng lành hóa vết thương của dịch paste trên chuột nhắt trắng (*Mus musculus var.albino*)

Do không có điều kiện để tiến hành thu nhận mẫu mô nên chúng tôi chỉ tiến hành ghi nhận lại diện tích vết bỏng theo các mốc thời gian khảo sát, từ đó đánh giá hiệu quả lành vết thương theo thời gian như sau:

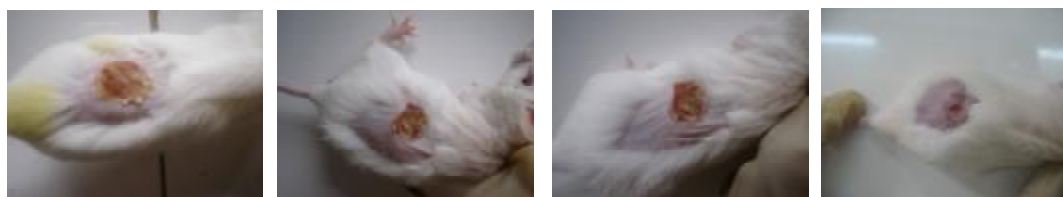
Bảng 7. Tỷ lệ % vết bỏng trên chuột còn lại so với ban đầu theo thời gian khảo sát

Tên mẫu	Tỷ lệ % vết bỏng còn lại so với ban đầu (S còn lại/S ban đầu)					
	0 ngày (N0)	3 ngày (N3)	7 ngày (N7)	10 ngày (N10)	12 ngày (N12)	15 ngày (N15)
Đối chứng (Dầu mù u)	100	100	95,24	81,82	73,81	54,55
Mẫu 2 (M2)	100	100	60,95	27,62	12,78	Lành hoàn toàn
Mẫu 3a (M3a)	100	100	43,64	18,18	Lành hoàn toàn	Lành hoàn toàn
Mẫu 3b (M3b)	100	100	40,00	17,50	Lành hoàn toàn	Lành hoàn toàn
Mẫu 3c (M3c)	100	100	40,83	17,50	Lành hoàn toàn	Lành hoàn toàn

Nhận xét:

Dựa vào kết quả bảng 7 ta thấy quá trình lành hoá vết thương trên chuột rất tốt. Khi chúng tôi tiến hành các lô thí nghiệm song song với nhau kết quả cho thấy các lô thí nghiệm bôi dịch paste có chitosan tan thì quá trình lành hoá vết thương nhanh hơn. Đối với trường hợp phỏng độ 3, ngày thứ 7 diện tích vết bỏng giảm rõ rệt $0,49\text{cm}^2$ (40,83%) so với ban đầu $1,2\text{cm}^2$ (100%), ngày thứ 12 vết bỏng lành hoàn toàn.

Một số hình ảnh minh họa



Bôi dầu mù u

Bôi M3c

Bôi dầu mù u

Bôi M3c

Hình 1. Vết bỏng ngày thứ 7

Hình 2. Vết bỏng ngày thứ 10

5. KẾT LUẬN

Từ những thực nghiệm trên, chúng tôi rút ra những kết luận sau: http://- Dịch paste kết hợp các thành phần như BC, WSC, PVP, Nano bạc có khả năng kháng vi khuẩn, nấm men, nấm mốc.

- Thử nghiệm trên chuột cho thấy quá trình lành hoá vết thương bỏng rất tốt.
- Có thể tạo kem điều trị bỏng từ hỗn hợp Chitosan tan trong nước - Bacterial cellulose - PVP - Nano bạc.

INITIAL EFFECTS ON HEALING BURNED WOUND BY THE MIXTURE OF WATER-SOLUBLE CHITOSAN - BACTERIAL CELLULOSE - SILVER NANOPARTICLES

Nguyen Thi My Lan⁽¹⁾, Huynh Thị Phương Linh⁽¹⁾, Le Thi My Phuoc⁽¹⁾
Nguyen Quoc Hien⁽²⁾

(1)University of Science, VNU-HCM

(2)Research and Development Center for Radiation Technology HCMC

ABSTRACT: *The paste of mixturing water-soluble chitosan (WSC) – Bacterial cellulose (BC) - Polyvinyl pyrrolidone (PVP) and anti-bacterial silver nanoparticles shows good results on burn wound of experimental mice. Paste of samples containing silver nanoparticles at concentration of 10, 20, and 30 ppm can also resist two harmful strains Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, which regularly appear on burn wound. The paste can used to reduce the length of treatment and help recovering wounds without causing convex scars.*

Keywords: *burn wound healing, water soluble chitosan (WSC), bacterial cellulose(BC), polyvinyl pyrrolidone (PVP), silver nanoparticles.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1].Bishara S.Atiyeh, Michel Costagliola, Shady N. Heyek, Saad A. Dibo, *Effect of silver on burn wound healing control and healing: Review of the literature*. Burn 33, pp.139-148, (2000).
- [2].Celso Vataru Nakanura, Tania Ueda Nakamura, *Antibacterial activity of ocimum gratissimum L. essential oil*, Mem Institute Oswaldocrz Rio DeJaneiro, Vol.95, pp.675-678, (1995).
- [3].D-K. Kweon et al, *Preparation of water-soluble-chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator*, pp.1595-1601, (2003).
- [4].H.Ueno et al, *Topical formulation and wound healing applications of chitosan*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp.105- 115, 2001.
- [5].Lian-Ying Zheng, Jiang-Feng Zhu, *Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights*, Carbohydrate Polymer 54, pp.527- 530, (2003).
- [6].J. Biosci. *Growth modulation of fibroblasts by chitosan –polyvinyl pyrrolidone hydrogel: Implication for wound manangement*, Vol 25, No.1, pp.25- 31, 3/(2000).