

THIẾT KẾ MÀNG GELATIN – ALGINAT CÓ CỐ ĐỊNH THUỐC NAM ỨNG DỤNG TRONG ĐIỀU TRỊ TỖN THƯƠNG BỎNG

Nguyễn Thị Lệ Thủy, Võ Thị Bích Phượng, Nguyễn Huỳnh Trang Thi,
Vũ Tuấn Trung, Trần Lê Bảo Hà, Võ Huy Dân, Phan Kim Ngọc

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 11 tháng 04 năm 2006, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 27 tháng 07 năm 2006)

TÓM TẮT: *Màng được tạo thành từ gelatin (sản phẩm thu từ sự thủy phân giới hạn sợi collagen) và alginat (một loại polysaccharide từ tảo nâu), sử dụng EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) làm tác nhân khâu mạch. Sau đó, kết hợp màng với một số loại thuốc truyền thống dùng để trị bỏng là dầu mù u, tinh dầu tràm, hợp chất madecassol chiết xuất từ rau má, nghệ, mỡ trăn. Màng tẩm thuốc được dùng để điều trị bỏng cho chuột có hiệu quả trong việc ngăn chặn sự nhiễm trùng và thúc đẩy quá trình làm lành vết thương tốt hơn so với chuột đối chứng. Trong đó, màng kết hợp với tinh dầu tràm và madecassol đạt hiệu quả cao nhất.*

1. MỞ ĐẦU

Các ca điều trị bỏng ở Việt nam cũng như trên thế giới lên đến hàng triệu mỗi năm. Chấn thương bỏng không chỉ gây đau đớn, mất mát một phần cơ thể, để lại di tật xấu mà còn gây ra tỉ lệ tử vong cao cho người bệnh. Phác đồ điều trị bỏng phải được tiến hành ở nhiều mặt, dài ngày và chi phí rất tốn kém. Nội dung của phòng và trị bỏng còn bao gồm cả việc cấy ghép da, phẫu thuật, tạo một số màng trị bỏng như màng ổi, trung bì da lợn, màng chitosan, sử dụng các thuốc có nguồn gốc tự nhiên để điều trị bỏng...[1]. Trên cơ sở đánh giá kết quả tốt của màng gelatin – alginat (màng GA) thử nghiệm, công trình này có ý định kết hợp màng với một số thuốc nam thường được dân gian sử dụng trong điều trị bỏng là dầu mù u, tinh dầu tràm, hợp chất Madecassol chiết xuất từ rau má, nghệ, mỡ trăn để làm tăng khả năng lành hóa vết thương, hạn chế nhiễm trùng, tạo ra một màng sinh học có tác dụng tốt trong điều trị bỏng và các tổn thương về da, có giá trị về mặt kinh tế.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Tạo màng gelatin – alginat

Pha dung dịch gelatin (Merck)1% và alginat (Kanto, Nhật) 1%: cân và khuấy gelatin (ở 50⁰C), alginat (ở nhiệt độ phòng) với nước cất hai lần trong 3 giờ. Trộn và khuấy dung dịch gelatin 1% và alginat 1% để thu được hỗn hợp gelatin – alginat (G:A) theo tỉ lệ (w/w) 8G:2A trong 30 phút. Rót 10 g hỗn hợp vào đĩa petri nhựa (5cm x 1,2cm), để lạnh ở -70⁰C trong 40 giờ. Lắc chậm (100 vòng/phút) với từng màng GA trong 20ml hỗn hợp acetone:nước cất (tỉ lệ 9:1) có chứa 60mg EDC (Sigma)(0,3% EDC) trong 24 giờ. Sau đó lấy màng ra và làm khô lạnh (-70⁰C).

2.2. Đánh giá khả năng kháng khuẩn của màng gelatin – alginat ngâm với thuốc nam

2.2.1. Chuẩn bị 3 loại thuốc để ngâm màng

- Hỗn hợp dầu mù u và tinh dầu tràm (Viện Y - Dược học Dân tộc Tp.HCM): dầu mù u có tác dụng tái sinh mô tốt nhưng khả năng kháng khuẩn hạn chế (tác động mạnh trên vi khuẩn Gram dương và yếu trên vi khuẩn Gram âm) [4] do vậy, cần phối hợp với tinh dầu tràm là một chất sát trùng mạnh, có phổ kháng khuẩn rộng (tác động mạnh lên cả vi khuẩn Gram âm, Gram dương, nấm mốc và virus) theo tỉ lệ 1:1 (v/v) [6].

- Hỗn hợp tinh dầu tràm và hợp chất madecassol (Delpharm, Pháp) chiết xuất từ rau má: Madecassol với thành phần chính là asiaticoside, asiatic acid và madecassic acid, chúng là các

saponin triterpenoid có tác dụng chính kích thích sinh tổng hợp collagen, làm tăng khả năng lành hóa vết thương, tuy nhiên lại không có tính kháng khuẩn nên được sử dụng kết hợp với tinh dầu trầm để được hỗn hợp tinh dầu chứa 1% madecassol [5].

- Dầu trị bỏng Trancumin (Công ty cổ phần Dược phẩm OPC): thành phần chính gồm mỡ trăn, nghệ, tinh dầu trầm.

Bổ sung Tween 20 tỉ lệ 0,5% vào cả 3 loại thuốc để nhũ tương hóa tinh dầu.

2.2.2. Màng ngâm thuốc

Sau khi được làm khô lạnh, cắt màng thành từng miếng kích thước 1cm x 1cm và ngâm trong 2ml dung dịch từng loại thuốc trong 24 giờ. Sau đó lấy miếng màng ra và tiếp tục ngâm trong PBS theo các nghiệm thức N₀, N₁, N₂, N₃, N₄ (N₀: không ngâm trong PBS; N₁: ngâm trong PBS 1 ngày; N₂, N₃, N₄: ngâm trong PBS 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày, thay PBS mỗi ngày).

Cấy các chủng vi sinh vật *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* có mật độ 10⁶ tế bào/ml (đo ở bước sóng 610nm) lên các đĩa Petri chứa môi trường Nutrient Agar (NA). Sau đó đặt các miếng màng theo các nghiệm thức ngâm PBS lên các đĩa môi trường đã có cấy vi khuẩn. Theo dõi và đo đường kính vòng kháng khuẩn sau 24 giờ.

2.3. Bảo quản vô trùng màng gelatin – alginat ngâm thuốc

Màng GA sau khi làm khô lạnh được ngâm trong 5ml thuốc trong 24 giờ sau đó được đóng gói và chiếu tia gamma liều 25 Kgy bằng nguồn cobalt 60 tại Trung tâm Công nghệ Bức xạ Tp.HCM. sau đó bảo quản màng ở 0°C. Kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của màng sau 7 ngày bảo quản.

2.4. Thử nghiệm màng gelatin – alginat ngâm thuốc trên chuột nhắt trắng được gây bỏng nhân tạo

Chuột nhắt trắng (*Mus musculus* Var. *albino*) có trọng lượng 28 – 30g, cung cấp từ Viện Y học Dân tộc Tp.HCM, được nuôi ổn định trong 1 tuần. Cạo sạch lông chuột ở vùng lưng và gây mê bằng ête rồi gây bỏng nhiệt khô (độ 3, 4) bằng thanh kim loại (1,6cm x 1,6cm) nung nóng. Sau 48 giờ gây bỏng, cắt lọc hoại tử ở vết thương bỏng. Tiến hành thí nghiệm với 5 nhóm nghiệm thức: (i) đối chứng (để lạnh tự nhiên); (ii) đắp gạc sulfadiazin bạc; (iii) đắp màng GA ngâm hỗn hợp dầu mù u và tinh dầu trầm (màng UT); (iv) đắp màng GA ngâm dầu trị bỏng Trancumin (màng TR); (v) đắp màng GA ngâm hỗn hợp tinh dầu trầm và hợp chất madecassol (màng MT). Theo dõi tiến trình lành hóa, đánh giá mô học vết thương bỏng ở chuột sau 4 ngày, 7 ngày, 10 ngày khảo sát tại Khoa Giải phẫu bệnh - Bệnh viện Chợ Rẫy Tp.HCM với các bước chính như sau: thu nhận mô da vùng tổn thương bỏng, cố định trong formol 10%, cắt mẫu thành lát mỏng, nhuộm tiêu bản với HE (Hematoxylin & Eosin).

2.5. Xử lý số liệu

Số liệu thu nhận được xử lý bằng chương trình Excel, tính toán thống kê với độ khác biệt có ý nghĩa nhỏ nhất (Least Significant Different – LSD) ở mức xác suất p = 95% bằng phương pháp phân tích phương sai ANOVA theo chương trình Statgraphic 7.0 (của Đại học Michigan - Mỹ).

3. KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

3.1. Tạo màng gelatin – alginat

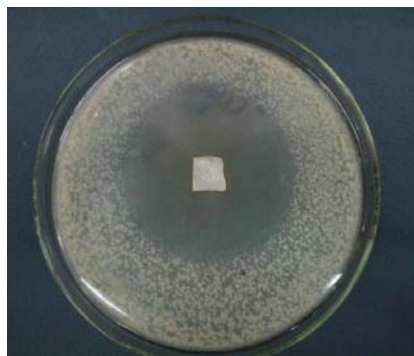
Màng GA được tạo ra từ 2 thành phần chính là gelatin và alginat với tác nhân khâu mạch là EDC. EDC hoạt động thông qua sự tạo thành liên kết amide giữa nhóm carboxyl và nhóm amin hiện diện trong thành phần của alginat và gelatin. EDC không có độc tính và có tính tương hợp sinh học, dễ bị mất hoạt tính trong nước nên thường sử dụng dung môi hữu cơ để hoà tan [7].

Màng GA có đặc điểm: (i) cấu trúc lỗ xốp (kích thước lỗ 10 – 100 μm); (ii) khả năng hấp thu nước tốt (gấp 3 lần trọng lượng khô của màng) nhờ sự có mặt của các nhóm chức ưa nước (-OH, -COOH, -COONH₂) có trong gelatin và alginat; (iii) khả năng tự phân hủy sinh học [3].

3.2. Đánh giá khả năng kháng khuẩn của màng gelatin – alginat ngâm với thuốc nam

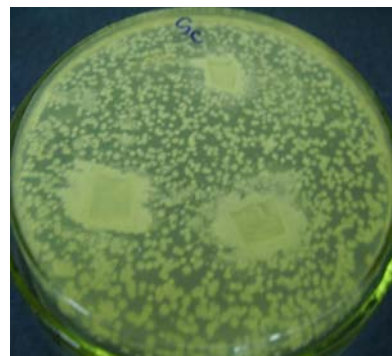
Bảng 1. Đường kính vòng kháng khuẩn của các màng GA ngâm thuốc																
Màng	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)															
	<i>P. aeruginosa</i>					<i>S. aureus</i>					<i>E. coli</i>					
	N ₀	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄	N ₀	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄	N ₀	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄	
Màng UT	36.3	13.5	0.0	0.0	0.0	36.3	20.2	15.3	0.0	0.0	48.0	26.5	22.0	15.0	0.0	
Màng TR	27.2	0.0	0.0	0.0	0.0	32.7	0.0	0.0	0.0	0.0	33.3	15.7	0.0	0.0	0.0	
Màng MT	45.7	25.8	16.8	13.7	0.0	72.5	43.2	41.5	19.8	0.0	80.3	41.7	31.7	26.3	29.0	
LSD(p=95%)	6.62	5.14	8.23	7.25	NS	10.58	8.89	9.13	8.76	NS	9.86	10.46	4.80	4.98	8.56	

NS: không khác biệt (Non – Significant)



Hình 1

Hình 1. Vòng kháng *S.aureus* của màng MT ở 0 ngày



Hình 2

Hình 2. Khả năng kháng *S.aureus* của màng GA không ngâm thuốc

Kết quả cho thấy tất cả các màng GA ngâm thuốc ở ngày đầu (không ngâm PBS) đều có khả năng kháng tốt với cả 3 chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* là những chủng vi khuẩn thường hiện diện nhất tại vết thương bỏng. Màng GA ngâm hỗn hợp tinh dầu trầm và Madecassol có khả năng ức chế rất mạnh với 2 chủng *S. aureus* và *E. coli*. Tuy nhiên khả năng kháng khuẩn của các màng giảm đáng kể sau các ngày ngâm trong PBS, đường kính vòng kháng khuẩn giảm tỉ lệ với thời gian ngâm PBS. Màng GA ngâm hỗn hợp dầu mù u và tinh dầu trầm không còn khả năng kháng *E. coli* sau 4 ngày ngâm PBS; không kháng được *S. aureus* sau 3 ngày ngâm PBS và kháng yếu với *P. aeruginosa* chỉ sau 1 ngày ngâm PBS. Màng GA ngâm dầu Trancumin hầu như không còn khả năng kháng với cả 3 chủng vi khuẩn sau khi ngâm PBS. Màng GA ngâm hỗn hợp tinh dầu trầm và madecassol duy trì được tính kháng sau khi ngâm PBS 3 ngày (đối với *P. aeruginosa* và *S.aureus*) và 4 ngày (đối với *E.coli*). Khả năng kháng khuẩn của các màng giảm mạnh khi ngâm trong PBS có thể do đặc điểm của các loại thuốc đều ở dạng dầu nên có thể bị rửa trôi ra khỏi màng. Màng GA

ngâm hỗn hợp tinh dầu trầm và madecassol có khả năng kháng khuẩn mạnh nhất và duy trì được tính kháng tốt.

3.3. Kiểm tra tính kháng khuẩn của màng GA ngâm thuốc sau chiếu xạ và bảo quản

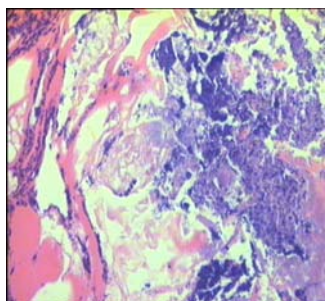
Một trong những chỉ tiêu quan trọng của vật liệu sinh học dùng trong điều trị bỏng là có thể tiết trùng được để không mang nguồn bệnh đến cho vết thương và bảo quản được lâu [1]. Màng GA mang thuốc được chiếu xạ ở liều 25 K Gy là liều phổ biến để diệt khuẩn [2]. Kết quả kiểm tra tính kháng khuẩn của màng ngâm thuốc sau khi chiếu xạ và bảo quản được thể hiện ở bảng 2

Bảng 2. Đường kính vòng kháng khuẩn của màng GA ngâm thuốc sau khi chiếu xạ và bảo quản 7 ngày			
Màng	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Màng UT	40.0	37.5	40.0
Màng TR	48.0	32.0	24.5
Màng MT	53.5	32.0	57.0
LSD (p=95%)	3.90	1.30	3.90

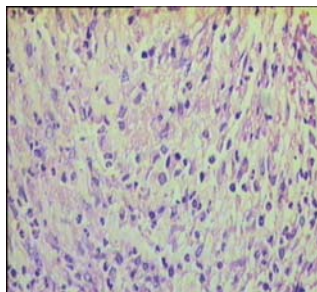
Kết quả cho thấy màng sau khi chiếu xạ và bảo quản 7 ngày vẫn duy trì được khả năng kháng tốt với cả 3 chủng vi khuẩn. Màng GA ngâm hỗn hợp tinh dầu trầm và madecassol có khả năng kháng mạnh nhất. Như vậy tia phóng xạ không làm ảnh hưởng đến tính chất của các thuốc trong màng.

3.4. Thử nghiệm màng gelatin – alginat ngâm thuốc trên chuột nhắt trắng được gây bỏng nhân tạo

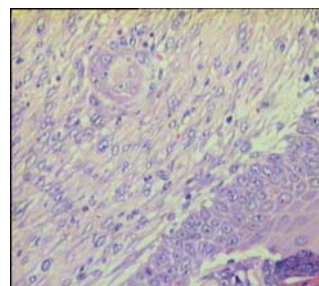
Kết quả đánh giá mô học và sự lành hóa vết thương ở chuột thí nghiệm cho thấy: ở tất cả các nhóm chuột thí nghiệm trong những ngày đầu sau bỏng đều có sự huy động của bạch cầu đa nhân trung tính, đại thực bào đến vùng vết thương để ngăn chặn sự xâm nhiễm, làm sạch vết thương, kích thích cho quá trình lành hóa. Điều này cho thấy màng sinh học không gây dị ứng, không làm ngăn cản quá trình đáp ứng bình thường của cơ thể. Màng sinh học ngăn chặn được sự nhiễm trùng, có tác dụng đẩy nhanh quá trình tái tạo và lành hóa vết thương bỏng. Màng GA tẩm hỗn hợp tinh dầu trầm và hợp chất madecassol chiết xuất từ rau má có tác động tốt nhất cho quá trình điều trị, quá trình lành hóa nhanh hơn so với các nhóm khác.



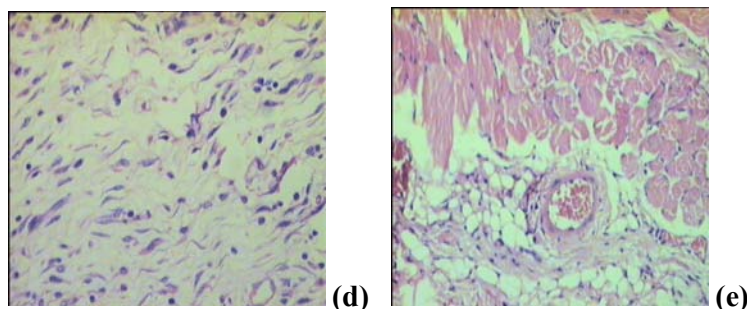
(a)



(b)



(c)



Hình 3. Kết quả mô học da chuột sau 10 ngày điều trị (x 100)

- (a) Đối chứng: có sự tái tạo mô hạt, nhiễm trùng loét sâu đến lớp cơ, vết thương còn loét rộng.
 (b) Đắp gạc sulfadiazin bạc: có sự tăng sinh nguyên bào sợi, mô hạt viêm.
 (c) Đắp màng UT: vết thương sạch, không có nhiễm trùng, tái tạo thượng bì, hình thành mạch máu, còn viêm.
 (d) Đắp màng TR: tế bào sợi tăng sinh nhiều, vết thương sạch, còn viêm nhẹ.
 (e) Đắp màng MT: tái tạo mô xơ và mạch máu tốt, vết thương giai đoạn hàn gắn.

4. KẾT LUẬN

- Phối hợp được các thuốc nam thường dùng trong điều trị bỏng lên màng gelatin– alginat. Màng GA có khả năng nẹp và thải thuốc.
- Màng gelatin–alginat mang thuốc có tác dụng tốt trong điều trị bỏng trên chuột thí nghiệm: ngăn cản sự xâm nhiễm (đặc biệt vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli*), giảm viêm, đẩy nhanh quá trình lành hóa vết thương.
- Màng GA phối hợp với hỗn hợp tinh dầu trầm và hợp chất madecassol chiết xuất từ rau má có tác dụng tốt nhất trong các nhóm điều trị.
- Màng gelatin – alginat mang thuốc có thể được sản xuất công nghiệp ứng dụng điều trị tổn thương bỏng, đặc biệt có hiệu quả ở dạng bông khô.

COMBINING SOME NATURAL SUBSTANCES WITH GELATIN – ALGINAT SPONGES FOR TREATMENT BURN WOUNDS

Nguyen Thi Le Thuy, Vo Thi Bich Phuong, Nguyen Huynh Trang Thi, Vu Tuan Trung,
 Tran Le Bao Ha, Vo Huy Dang, Phan Kim Ngoc

University of Natural Science, VNU- HCM

ABSTRACT: The sponges consisting of gelatin from hydrolysis of collagen and alginat – a polysaccharide from Phaeophyta were established by using EDC as a crosslinking agent. The sponges were combined with some natural substances traditional used for burn treatment such as tamanu oil (from nuts of *Calophyllum inophyllum*); cajeputi oil (from leaves of *Meulaleuca leucadendron*); madecassol (from extract of *Centella asiatica*); turmeric and python fat. Data obtained from testing on mice showed that the coordinated sponges have rather good ability on preventing infection and promoting wound healing compared with control. The sponges combined with mixture of cajeputi oil and madecassol have the best potential for burn treatment.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Lê Thế Trung, *Bỏng - những kiến thức chuyên ngành*, NXB Y học Hà Nội, 453– 482, 579 – 580., 2003.
- [2]. Phan Văn Duyệt, *Phương pháp vật lý và lý sinh phóng xạ dùng trong nông nghiệp sinh học và y học*, NXB KH&KT Hà Nội: 58 – 70., 1998.
- [3]. Trần Lê Bảo Hà, Vũ Quốc Hùng, Đinh Hoàng Đăng Khoa, Võ Huy Dân, *Thiết kế màng gelatin – alginat trong ứng dụng điều trị tổn thương bỏng*, Báo cáo Khoa học hội nghị toàn quốc, Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống: 397– 401., 2004.
- [4]. Trần Ngọc Tiếng, *Sử dụng tinh dầu trà trà cừ và Ramasol để làm lành nhanh vết thương*.
- [5]. [http: www.ykhoanet/NCKH/duoc06.htm](http://www.ykhoanet/NCKH/duoc06.htm)
- [6]. Maquart, Chastang et al, *Triterpens from Centella asiatica stimulate extracellular matrix accumulation in rat experimental wounds*, European Journal of Dermatology, Vol.9, Issue 4, 289-96., 1999.
- [7]. Robert R.S.Nelson, *Selection of resistance to the essential oil of Melaleuca alternifolia in Staphylococcus aureus*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy 45, 547 - 551., 2000.
- [8]. Young Seon Choi, Sung Ran Hong, Young Moo Lea et al, *Study on gelatin – containing artificial skin: I.Preparation and characteristics of novel gelatin – alginat sponge*, Biomaterials 20:409 – 417., 1998.