



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003308

(51) **A61B 17/04; A61L 17/00**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00540

(22) 08/08/2019

(67) 1-2019-04342

(45) 25/08/2023 425

(43) 25/02/2021 395

(73) **CÔNG TY CỔ PHẦN NHÀ MÁY THIẾT BỊ Y HỌC VÀ VẬT LIỆU SINH HỌC
(VN)**

I-4B-2.1, đường N3, khu Công nghệ cao, phường Long Thạnh Mỹ, quận 9, thành phố
Hồ Chí Minh

(72) Cao Thị Vân Diễm (VN).

(54) **CHỈ KHÂU PHẪU THUẬT ĐƯỢC PHỦ NANO BẠC VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHỈ
KHÂU NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chỉ khâu phẫu thuật, cụ thể là chỉ khâu phẫu thuật tự
tiêu, được phủ nano bạc để nhằm mục đích kháng khuẩn trong quá trình phẫu thuật khâu
vết thương cũng như hạn chế sự lưu trú của vi khuẩn trên sợi chỉ khâu, nhờ đó làm giảm
rủi ro gây nhiễm trùng trên vết thương được khâu bằng chỉ khâu phẫu thuật. Giải pháp hữu
ích còn đề cập đến quy trình sản xuất chỉ khâu phẫu thuật được phủ nano bạc này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến chỉ khâu phẫu thuật, cụ thể là chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu, được phủ nano bạc để nhằm mục đích kháng khuẩn trong quá trình phẫu thuật khâu vết thương cũng như hạn chế sự lưu trú của vi khuẩn trên sợi chỉ khâu, nhờ đó làm giảm rủi ro gây nhiễm trùng trên vết thương được khâu bằng chỉ khâu phẫu thuật. Giải pháp hữu ích còn đề cập đến quy trình sản xuất chỉ khâu phẫu thuật được phủ nano bạc này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Nhiễm trùng nguyên phát sau phẫu thuật cũng như nhiễm trùng thứ phát là một trong những biến chứng thường gặp nhất trong quá trình phẫu thuật. Nhiễm trùng sau phẫu thuật thường gặp phải sau vài tuần hoặc thậm chí vài tháng từ thời điểm phẫu thuật và dẫn đến nhiều hệ lụy cho bệnh nhân cũng như bác sỹ phẫu thuật. Có nhiều nguyên nhân gây ra sự nhiễm trùng này, một số nguyên nhân đã được xác định bao gồm sự nhiễm khuẩn trên chỉ khâu phẫu thuật và nhiễm khuẩn vết thương sau phẫu thuật.

Chỉ khâu phẫu thuật thường được sử dụng để khâu các mô và thường là nguồn lây nhiễm vi sinh vật. Mặc dù chỉ khâu phẫu thuật có thể được làm vô trùng trước khi sử dụng bằng tia gamma hoặc khí etylen oxide, chỉ khâu sau khi sử dụng trên vết thương vẫn là nơi hoạt động mạnh của vi sinh vật. Gần đây, nhằm mục đích ngăn ngừa nhiễm khuẩn sau phẫu thuật, đã có những báo cáo sử dụng các loại kháng sinh cũng như các chất chống vi sinh vật khác nhau trên chỉ khâu phẫu thuật. Các kết quả thu được đều cho thấy việc sử dụng các chất này trực tiếp trên sợi chỉ khâu phẫu thuật làm giảm đáng kể tỷ lệ nhiễm trùng trên vết mổ sau phẫu thuật và tạo ra xu hướng hứa hẹn cho việc phát triển chỉ khâu phẫu thuật với các chất chống vi sinh vật trên đó.

Đối với việc sử dụng nano bạc (silver nanoparticles - Ag NPs), trong những năm gần đây, nano bạc đã được áp dụng làm chất kháng khuẩn trong nhiều sản phẩm y tế,

chẳng hạn như băng gạc kháng khuẩn, răng giả, thiết bị dùng trong phẫu thuật, bao gồm cả chỉ khâu phẫu thuật mà chủ yếu là chỉ khâu phẫu thuật không tự tiêu.

Các thực nghiệm của W. Enab và cộng sự trên chỉ khâu phẫu thuật polyester không tự tiêu đa sợi cho thấy với hàm lượng Ag rất thấp trên chỉ khâu phẫu thuật (0,0014% trọng lượng và 0,0061% trọng lượng) và ghi nhận khả năng kháng khuẩn tốt trên 2 loại vi khuẩn *E. coli* và *S. aureus* của chỉ khâu phẫu thuật có mang Ag NPs này.

Đối với việc sử dụng nano bạc trên chỉ khâu phẫu thuật, vấn đề nảy sinh là hàm lượng tích lũy của nano bạc trên sợi chỉ có thể quá mức và có thể dẫn đến sự giải phóng liều cao vào các mô sinh học khi khâu. Điều này có thể dẫn đến sự thay đổi cho mô sinh học từ viêm đến hoại tử.

Một nhược điểm nữa đối với việc phủ nano bạc trên chỉ khâu, đặc biệt là chỉ khâu tự tiêu, là việc tạo ra các điểm yếu tiềm ẩn trong quá trình phủ, phủ nano bạc trên sợi chỉ khâu do sự kết hợp của các hạt kim loại với kích cỡ nhất định và dẫn đến làm giảm độ bền cơ học của chỉ khâu phẫu thuật. Điều này sẽ ảnh hưởng lớn đến bệnh nhân cũng như bác sĩ phẫu thuật trong quá trình phẫu thuật.

Do đó, ứng dụng đưa Ag NPs lên chỉ khâu còn tồn tại nhiều vấn đề và cần được tiếp tục nghiên cứu sâu rộng để khắc phục các nhược điểm nêu trên trong khi đó vẫn cải thiện hơn nữa về khả năng kháng khuẩn.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu được phủ nano bạc để tạo sự kháng khuẩn cho sợi chỉ khâu cũng như hạn chế sự lưu trú của vi khuẩn trên sợi chỉ khâu, nhờ đó làm giảm rủi ro gây nhiễm trùng trên vết thương được khâu bằng chỉ khâu phẫu thuật.

Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu với lượng nano bạc tích lũy trên sợi chỉ nằm trong khoảng từ 2 đến 4% trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 3,3 đến 3,8% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3,65 đến 3,75% trọng lượng. Chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu đa sợi phủ nano bạc theo giải pháp hữu ích có

tác dụng kháng khuẩn tốt đối với các vi khuẩn gây nhiễm trùng da và mô mềm thường gặp trong khi đó vẫn giữ được hoặc thậm chí cải thiện các tính chất khác như độ bền cơ học và thời gian tiêu chỉ.

Mục đích khác của giải pháp hữu ích là đề xuất quy trình phủ nano bạc lên chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh SEM của chỉ khâu phẫu thuật polyglycolic acid (PGA) mẫu trắng (A), mẫu phủ 1 lần (B), mẫu phủ 2 lần (C) và mẫu phủ 3 lần (D).

Hình 2 là hình ảnh tế bào HEK293 sau 48 giờ phơi nhiễm với vật liệu chỉ tự tiêu PGA ở các dải nồng độ khác nhau.

Hình 3 là hình ảnh tế bào HEK293 sau 24 giờ phơi nhiễm với vật liệu chỉ nhân tạo mẫu PG910 ở các dải nồng độ khác nhau.

Hình 4 là hình ảnh chụp vùng vô khuẩn của các mẫu chỉ thử nghiệm và chỉ đối chứng trong thử nghiệm với chủng *E.coli*.

Hình 5 là hình ảnh chụp vùng vô khuẩn của các mẫu chỉ thử nghiệm và chỉ đối chứng trong thử nghiệm với chủng *P.aeruginosa*

Hình 6 là hình ảnh chụp vùng vô khuẩn của các mẫu chỉ thử nghiệm và chỉ đối chứng trong thử nghiệm với chủng *S.aureus*

Hình 7 là hình ảnh vi thể vùng chỉ đang tiêu trong mô cơ sau 8 tuần thử nghiệm. hình 6A là chỉ PGA, hình 6B là chỉ PG910. Các lỗ rỗng là hình ảnh còn lại của các tơ chỉ. Mô xung quanh không có tế bào viêm, mô liên kết xâm nhập vào vùng đã tiêu của chỉ. Không thấy sự khác biệt giữa hai loại chỉ.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Chỉ khâu là vật liệu dạng sợi dùng để buộc mạch máu hoặc khâu mô lại với nhau và giữ chúng cho đến khi vết thương lành hẳn. Lựa chọn chỉ khâu trong phẫu thuật phải dựa trên các đặc tính vật lý và sinh học của vật liệu làm chỉ và đặc điểm của tổ chức được

khâu, các mối chỉ khâu cũng là các dị vật có khả năng gây viêm do nhiễm khuẩn khi phẫu thuật. Khi phẫu thuật, các bác sĩ sẽ chọn loại chỉ khâu nhỏ nhất, có độ bền thích hợp với tổ chức cần khâu.

Hiện nay, trong phẫu thuật có hai loại chỉ khâu thường được sử dụng là chỉ tự tiêu và chỉ không tiêu. Chỉ tự tiêu là loại chỉ có khả năng tự tiêu, không lưu lại vật lạ, thời gian tự tiêu của chỉ phụ thuộc vào vật liệu chế tạo sợi chỉ và vị trí nơi đặt mối khâu. Có năm loại chỉ khâu tự tiêu phổ biến bao gồm: chỉ catgut, chỉ trên cơ sở axit polyglycolic, chỉ trên cơ sở polyglyconat, chỉ trên cơ sở polydioxanon và chỉ trên cơ sở axit polyglactic.

Chỉ catgut được làm bằng ruột mèo cũng như ruột của gia súc có sừng hoặc cừu, thời gian tự tiêu khoảng 10 ngày. Tuy nhiên, chỉ này dễ gây phản ứng trong tổ chức do chứa collagen và kháng nguyên.

Chỉ trên cơ sở axit polyglycolic là loại chỉ bền tự tiêu tổng hợp. Thời gian tự tiêu sau mổ nằm trong khoảng từ 60 đến 90 ngày. Nó thường được dùng để khâu các tổ chức cơ, cân, gân và đóng da dưới biểu bì. So với catgut thì chỉ này có độ dai cao hơn và ít gây phản ứng trong tổ chức hơn vì không chứa collagen, không có kháng nguyên và không có chí nhiệt tố.

Chỉ polyglyconat là loại chỉ tự tiêu đơn sợi, có độ an toàn và độ dai của mối buộc tốt nhất so với các loại chỉ tự tiêu tổng hợp khác. Nó thường được dùng để khâu các tổ chức phân mềm, thực quản, ruột, khí quản.

Chỉ trên cơ sở axit polyglactic là loại chỉ bền tổng hợp tương tự chỉ trên cơ sở axit polyglycolic nhưng độ dai hơi kém hơn. Thời gian tự tiêu sau mổ của chỉ này là khoảng 60 ngày.

Chỉ trên cơ sở polydioxanon là loại chỉ đơn sợi tự tiêu tổng hợp có độ dai rất cao, thời gian tự tiêu lâu, ít gây phản ứng tổ chức. Tuy nhiên, nó lại cứng và khó điều khiển do được làm từ rong biển.

Những tính chất quan trọng của chỉ tiêu tự tiêu dùng trong phẫu thuật cho người bao gồm các tính chất như không gây độc cho tế bào, không gây nhiễm độc cấp, không gây nhiễm độc bán cấp, không gây kích ứng tại chỗ, không gây độc tính gen, có khả năng phù hợp mô, và đặc biệt là có khả năng tự tiêu và khả năng liền vết thương tốt.

Theo một phương án, giải pháp hữu ích đề cập đến chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu được phủ nano bạc để tạo sự kháng khuẩn cho sợi chỉ khâu cũng như hạn chế sự lưu trú của vi khuẩn trên sợi chỉ khâu, nhờ đó làm giảm rủi ro gây nhiễm trùng trên vết thương được khâu bằng chỉ khâu phẫu thuật phủ nano bạc theo giải pháp hữu ích. Chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu theo giải pháp hữu ích có khả năng kháng nhiều chủng vi khuẩn thường thấy trong khi đó vẫn giữ được các tính chất của chỉ tự tiêu thông thường như không gây độc cho tế bào, không gây nhiễm độc cấp, không gây nhiễm độc bán cấp, không gây kích ứng tại chỗ, không gây độc tính gen, có khả năng phù hợp mô, và đặc biệt là có khả năng tự tiêu và khả năng liền vết thương tốt cũng như giữ được độ bền cơ học của chỉ khâu tự tiêu.

Ứng dụng nano bạc trong các sản phẩm phục vụ đời sống đã và đang được phát triển. Ở kích thước nano, bạc được cho là không gây tác động xấu đến con người và môi trường, chính vì vậy, các ứng dụng của việc sử dụng nano bạc cho các sản phẩm phục vụ đời sống con người và đặc biệt là trong lĩnh vực y học ngày càng được quan tâm.

Các đặc tính kháng khuẩn của bạc có thể bắt nguồn từ tính chất hóa học của ion Ag^+ . Ion này có khả năng liên kết mạnh với petidoglycan – thành phần cấu tạo lên thành tế bào của vi khuẩn và ức chế khả năng vận chuyển oxy vào trong tế bào dẫn đến làm tê liệt vi khuẩn. Ngoài ra, ion bạc có thể liên kết với các base của ADN và trung hòa điện tích của gốc phosphat, nhờ đó ngăn chặn quá trình sao chép ADN.

Tác giả giải pháp hữu ích đã tiến hành các nghiên cứu sâu rộng và thấy rằng kích cỡ hạt nano bạc có ảnh hưởng đến tính chất kháng khuẩn của sợi chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu được phủ nano bạc. Kích cỡ hạt nano bạc càng nhỏ thì tính kháng khuẩn của chỉ khâu được phủ nano bạc càng cao. Điều này cũng phù hợp với lý thuyết khi hạt càng nhỏ

thì diện tích bề mặt càng lớn và do đó giải phóng càng nhiều ion Ag^+ hơn, dẫn đến tính kháng khuẩn mạnh hơn.

Tuy nhiên, như đã được đề cập ở trên, việc phủ nano bạc lên chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu cần phải đảm bảo các yếu tố trong đó bao gồm các tính chất như không gây độc tế bào, khả năng tự tiêu và độ bền cơ học. Tác giả giải pháp hữu ích nhận thấy rằng, khi kích cỡ hạt nano bạc quá nhỏ, các hạt này sẽ thấm sâu vào trong sợi chỉ khâu và dẫn đến độ bền cơ học của sợi chỉ khâu giảm đi đáng kể. Kích cỡ hạt nano bạc tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10nm đến 30nm, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 17nm đến 25 nm, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 19nm đến 22nm.

Do đó, theo một phương án, giải pháp hữu ích đề xuất chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu được phủ nano bạc trong đó kích cỡ của hạt nano bạc là nằm trong khoảng từ 10nm đến 30nm, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 17nm đến 25 nm, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 19nm đến 22nm.

Tác giả giải pháp hữu ích cũng nhận ra rằng hàm lượng của nano bạc tích lũy trên chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu cũng ảnh hưởng tới các tính chất kháng khuẩn và độ bền cơ học của chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu được phủ nano bạc.

Hàm lượng nano bạc cao có thể dẫn đến khả năng kháng khuẩn cao nhưng lại làm giảm độ bền cơ học của chỉ tự tiêu và ngược lại. Hàm lượng nano bạc tích lũy trên chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu theo giải pháp hữu ích tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 4% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3,3 đến 3,8% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3,65 đến 3,75%.

Theo một phương án cụ thể khác, giải pháp hữu ích đề cập đến chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu đa sợi trên cơ sở axit polyglycolic (PGA) hoặc polyglactin 910 (PG910) được phủ nano bạc với lượng nano bạc tích lũy trên sợi chỉ nằm trong khoảng từ 2 đến 4% trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 3,3 đến 3,8% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3,65 đến 3,75% trọng lượng.

Điều chế keo nano bạc

Keo nano bạc theo giải pháp hữu ích được điều chế dựa trên phương pháp hóa học để khử ion kim loại thành kim loại. Để các hạt phân tán tốt trong dung môi mà không bị kết tụ thành đám, có thể sử dụng phương pháp tĩnh điện để làm cho bề mặt các hạt nano có cùng điện tích và đẩy nhau hoặc dùng phương pháp bao bọc bằng chất hoạt hóa bề mặt. Các hạt nano tạo thành bằng phương pháp này có kích thước từ 10 nm đến 100 nm.

Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng, phương pháp điều chế nano bạc có ảnh hưởng mạnh đến khả năng kháng vi sinh vật của vật liệu nano bạc thu được.

Nguồn bạc được sử dụng là muối bạc nitrat (AgNO_3). Nồng độ của dung dịch bạc nitrat là nằm trong khoảng từ 0,01M đến 0,2M, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,01-0,1M, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,02 đến 0,05M, tốt nhất là 0,03M.

Keo nano bạc theo giải pháp hữu ích được điều chế sử dụng muối natri alginate ($\text{C}_6\text{H}_9\text{NaO}_7$), trong đó dung dịch bạc nitrat được nhỏ giọt vào bình cầu chứa sẵn thể tích định trước của dung dịch natri alginate đang được khuấy từ (tỷ lệ thể tích dung dịch bạc nitrat: thể tích dung dịch natri alginate xấp xỉ 1:3). Nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng 80 từ 90°C và duy trì trong thời gian khoảng 120 phút. Dung dịch sẽ chuyển từ không màu sang màu vàng rom chứng tỏ nano bạc đã được hình thành.

Dung dịch sau phản ứng được mang đi phân tích các đặc trưng hóa lý bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis để xác định sự hình thành của nano bạc. Phủ nano bạc lên chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu

Việc phủ nano bạc lên chỉ tự tiêu được tiến hành theo phương pháp nhúng ngâm sợi chỉ trong dung dịch keo nano bạc. Tùy ý, chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu có thể được xử lý bằng UV để làm sạch bề mặt cũng như để tạo điều kiện thuận lợi cho nano bạc bám vào bề mặt của chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu.

Chỉ nguyên liệu được nhúng ngâm vào bề dung dịch nano bạc đã chuẩn bị trước trong thời gian 30 phút, tiếp đó được lấy ra và làm khô ở nhiệt độ khoảng 70°C trong thời gian 30 phút. Quy trình nhúng ngâm này có thể được lặp lại 1, 2, 3 hoặc nhiều lần. Sau

lần phủ cuối cùng, chỉ khâu được rửa với nước cất trước khi cho vào tủ sấy ở khoảng 70°C trong thời gian 60 phút.

Sau đây, giải pháp hữu ích sẽ được minh họa rõ hơn với các ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích nhưng cần phải hiểu rằng các ví dụ này không giới hạn phạm vi của giải pháp hữu ích.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Điều chế keo nano bạc

Hòa tan 0,51g muối bạc nitrat (AgNO_3) trong 100ml nước khử ion, thu được dung dịch bạc nitrate (Ag^+) có nồng độ 0,03M.

Hoàn tan 0,684g muối natri alginat ($\text{C}_6\text{H}_9\text{NaO}_7$) vào trong 100ml nước khử ion, thu được dung dịch natri alginat có nồng độ 0,007 %w/v.

Nhỏ giọt 30ml dung dịch bạc nitrat vào bình cầu chứa sẵn 100ml dung dịch natri alginat đang khuấy từ với tốc độ 400-600 vòng/phút (tỷ lệ thể tích dung dịch bạc nitrat: thể tích dung dịch natri alginat = 1:3). Tiến hành gia nhiệt phản ứng đến nhiệt độ nằm trong khoảng 80 từ 90°C. Khi hệ phản ứng đạt nhiệt độ yêu cầu, giữ nhiệt độ phản ứng trong khoảng 120 phút. Dung dịch sẽ chuyển từ không màu sang màu vàng rơm chứng tỏ nano bạc đã được hình thành. Nồng độ dung dịch nano bạc thu được là 1180ppm.

Dung dịch sau phản ứng được mang đi phân tích các đặc trưng hóa lý bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis. Kết quả cho thấy các nano bạc hấp thụ plasmon bề mặt tại bước sóng cực đại khoảng 420nm.

Tiến hành các bước tương tự với các nồng độ khác nhau, tỷ lệ bạc nitrat và natri alginate và tốc độ khuấy khác nhau để thu được dung dịch keo nano bạc với nồng độ khác nhau cũng như kích cỡ hạt khác nhau.

Ví dụ 2: Phủ nano bạc lên chỉ khâu phẫu thuật

Chỉ nguyên liệu được nhúng ngâm vào bể dung dịch nano bạc đã chuẩn bị trước trong thời gian 30 phút, tiếp đó được lấy ra và làm khô ở nhiệt độ khoảng 70°C trong thời

gian 30 phút. Quy trình nhúng ngâm này có thể được lặp lại 1, 2, 3 hoặc nhiều lần. Sau lần phủ cuối cùng, chỉ khâu được rửa với nước cất trước khi cho vào tủ sấy ở khoảng 70°C trong thời gian 60 phút.

Kết quả ICP-MS cho thấy hàm lượng bạc bám lên sợi chỉ sau một lần phủ là khoảng 1,9%, sau hai lần phủ là khoảng 3% và sau 3 lần phủ là khoảng 3,7%.

Ví dụ 3: Thử nghiệm kéo đứt

Kết quả đo lực kéo đứt của 2 loại chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu phủ nano bạc PG910 và PGA có đường kính khác nhau được liệt kê trong Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả đo lực kéo đứt của các loại chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu được phủ nano bạc (theo Dược điển Mỹ USP NF-881, *Độ bền kéo đứt*)

Loại chỉ đa sợi	Số lần phủ	Lực kéo đứt (N)	Biến đổi
PG910 (2/0)	3	67,49	-2,75
PG910 (3/0)	3	33,46	+1,09
PGA (2/0)	3	57,21	+1,73
PGA (3/0)	3	37,77	-2,33

Lực kéo đứt của sợi cả 2 loại chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu vẫn bảo đảm sau quá trình phủ dung dịch Ag NPs.

Ví dụ 4. Thử nghiệm gây độc tế bào đối với chỉ khâu phẫu thuật được phủ nano bạc

Đối tượng

Dòng tế bào HEK293 - là dòng tế bào thận phôi người (Human Embryonic Kidney).

Vật liệu

Bảng 2: Các vật liệu được sử dụng để đánh giá độc tính tế bào

Vật liệu	Mã số
Chỉ PGA phủ nano bạc	PGA
Chỉ PG 910 phủ nano bạc	PG910

Phương pháp và quy trình thực hiện

Chuẩn bị tế bào HEK293

- Dụng cụ và thiết bị nuôi cấy: Chai nuôi cấy T25, pipet và tip 1000 μ l, tip 200 μ l, tip 10 μ l, buồng đếm tế bào, tủ ấm nuôi tế bào (37°C, 5%CO₂), máy ly tâm Hettich EBA 270.

- Một số hóa chất khác: PBS, Trypsin 0,25%/EDTA 0,02%

Bảng 3: Thành phần môi trường nuôi cấy tế bào

Thành phần	Nồng độ
Huyết thanh thai bò (FBS - Fetal Bovine Serum)	10%v/v
Penixilin	100 μ g/mL
Streptomycin	100U/mL
DMEM High Glucose	Bổ sung tới đủ lượng cần pha

- Dòng tế bào HEK293 là dòng tế bào thận phôi người (Human Embryonic Kidney), là một dòng tế bào thương mại được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu trên tế bào, đặc biệt là chuyển nạp gen, biểu hiện protein và đánh giá độc tính của hóa chất-vật liệu. Tế bào được dùng thử nghiệm có nguồn gốc từ ATCC và lưu giữ trong ngân hàng tế

bào, bộ môn Sinh học Tế bào, khoa Sinh học, trường ĐHKHTN. Tế bào HEK293 có hình dạng đa giác, khả năng phân chia mạnh và sức sống ổn định qua nhiều lần cấy chuyển. Môi trường nuôi cấy được chuẩn bị như trong Bảng 3.

- Hoạt hóa và nuôi cấy tế bào HEK293 trong 1-2 tuần với 3 lần cấy chuyển để ổn định dòng tế bào trước khi tiến hành kiểm tra tác động của vật liệu (Hình 2 và 3).

Chuẩn bị mẫu vật liệu

- Dụng cụ nghiền mẫu gồm: Cắt nhỏ và nghiền nhỏ bằng kim loại cứng, panh gấp mẫu, đĩa petri đựng mẫu và ống eppendorf (chứa mẫu sau khi nghiền). Tất cả các dụng cụ đều phải được khử trùng ướt (121°C, 20 phút) và sấy khô trước khi sử dụng.

Các vật liệu thử nghiệm được cắt nhỏ bằng cơ học. Sau khi nghiền nhỏ, các mẫu được đựng trong ống Eppendorf 1,5mL, khử trùng trước khi pha vào trong môi trường nuôi tế bào để phòng tránh trường hợp bị nhiễm vi khuẩn khi xử lý nghiền mẫu.

Đánh giá tác động lên sức sống tế bào bằng MTT Assay Kit

Nguyên lý: Phương pháp MTT dựa trên chuyển đổi hợp chất MTT hòa tan trong nước (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) màu vàng được chuyển hóa trong ti thể của tế bào sống tạo thành sản phẩm formazan không hòa tan. Các tế bào khả thi với sự trao đổi chất hoạt động chuyển đổi MTT thành formazan. Các tế bào chết thì mất khả năng này và do đó không có tín hiệu. Do đó, sự hình thành màu sắc là chỉ thị của phương pháp cho những tế bào sống, tạo ra tỉ lệ thuận giữa quá trình chuyển hóa tế bào và số lượng tế bào đang hoạt động. Độ hấp thụ đo được ở OD 590nm.

Quy trình

- Cấy chuyển tế bào lên đĩa 96 giếng với mật độ tế bào 3000 tế bào/giếng
- Pha vật liệu vào trong môi trường nuôi cấy theo một dải nồng độ giảm dần.

Bảng 3. Dải nồng độ các vật liệu:

Tên vật liệu	Dải nồng độ (mg/mL)				
PGA - Phủ 3 lần	1,2	2,2	3,1	5,2	8,4
PG910 - Phủ 3 lần	1,7	3,2	4,6	6,3	10,4

Sau 24h cấy chuyển tế bào, hút bỏ môi trường cũ, bổ sung môi trường chứa vật liệu vào giếng. Mỗi nồng độ vật liệu được tra vào 3 giếng để đảm bảo dữ liệu thu được đạt độ lặp lại có tính thống kê. Đối chứng âm là 3 giếng chứa tế bào chỉ nuôi môi trường bình thường không chứa vật liệu.

- Ủ đĩa vào tủ nuôi cấy trong 24 tiếng.
- Bổ sung 0,1mg (50 μ L dung dịch 2mg/mL) MTT vào mỗi giếng
- Tiếp tục ủ trong tủ 370 C trong 4h.
- Sau đó hút bỏ một cách nhẹ nhàng cẩn thận môi trường trong giếng
- Bổ sung 150 μ L dimetylsunfoxit vào mỗi giếng để hòa tan các tinh thể formazan.
- Đo ở bước sóng 540nm

Thu thập dữ liệu và phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism5. Từ hình ảnh chụp tế bào và so sánh với giếng đối chứng, có thể thấy rằng không có sự tác động của vật liệu chỉ nhân tạo mẫu PGA lên sức sống của tế bào HEK293.

Tế bào ở tất cả các giếng đều có hình thái tế bào và mức độ tăng sinh bình thường. Quan sát trong ảnh có thể thấy được các mảnh sợi vật liệu nhỏ không tan trong môi trường nuôi cấy vì tính chất vật lý của bản thân vật liệu. Sức sống của tế bào không bị ảnh hưởng sau khi phơi nhiễm với vật liệu chỉ nhân tạo mẫu PGA kể cả ở những giếng có nồng độ vật liệu rất cao là 8,4mg/mL.

Đánh giá tương tự về ảnh hưởng của mẫu PG910 thông qua hình thái tế bào, có thể thấy không có sự ảnh hưởng đáng kể của vật liệu lên sức sống tế bào.

Kết luận

Kết quả thử nghiệm cả 2 mẫu vật liệu chỉ nhân tạo PGA, PG910 – Phủ Nano bạc 3 lần, sử dụng trong y tế đều chưa thấy có tác động gây chết đối với tế bào HEK293 ở mức độ quan sát hình thái đối với các nồng độ đã thử nghiệm.

Ví dụ 5. Đánh giá khả năng kháng khuẩn có so sánh với chỉ đối chứng là VPC317 ETHICON trên một số vi khuẩn gây nhiễm trùng da và mô mềm thường gặp.

Chủng vi khuẩn:

- + *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (chủng chuẩn quốc tế)
- + *Staphylococcus aureus* đề kháng Methicillin (MRSA) (chủng bệnh nhân)
- + *Staphylococcus aureus* nhạy cảm Methicillin (MSSA) (chủng bệnh nhân)
- + *Escherichia coli* ATCC 25922 (chủng chuẩn quốc tế)
- + *Escherichia coli* sinh ESBL (chủng bệnh nhân)
- + *Escherichia coli* chủng bệnh nhân
- + *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (chủng chuẩn quốc tế)
- + *Pseudomonas aeruginosa* đa kháng kháng sinh (chủng bệnh nhân)
- + *Pseudomonas aeruginosa* chủng bệnh nhân

Môi trường, hóa chất

- + Thạch Mueller-Hinton (MH)
- + Thạch thường
- + Canh thang BHI
- + Nước muối sinh lý

Dụng cụ

- + Đĩa petri
- + Tấm bông
- + Tube 20ml

Phương pháp tiến hành

Chuẩn bị vi khuẩn thử nghiệm:

- Các vi khuẩn cần thử nghiệm được nuôi cấy trên thạch đĩa khoảng 18-24 giờ.
- Pha canh khuẩn trong nước muối 0,9% để có độ đục tương ứng với Mc Farland 0,5.

Chỉ phẫu thuật tự tiêu được thử nghiệm:

- 4 loại chỉ dùng trong thử nghiệm bao gồm chỉ khâu phẫu thuật PGA không được phủ nano bạc (mẫu 1), chỉ khâu phẫu thuật PGA được phủ nhúng 1 lần trong dung dịch keo nano bạc (mẫu 2), chỉ khâu phẫu thuật PGA được phủ nhúng 2 lần trong dung dịch keo nano bạc (mẫu 3), chỉ khâu phẫu thuật PGA được phủ nhúng 3 lần trong dung dịch keo nano bạc (mẫu 4) và chỉ đối chứng VPC317 ETHICON.
- Cắt chỉ thành những đoạn dài 4cm.
- Bảo quản trong túi kín, vô trùng.

Tiến hành thử nghiệm:

- Tấm bông thấm canh khuẩn được dàn đều lên trên mặt thạch đĩa MuellerHinton.
- Đặt đoạn chỉ thử nghiệm vào giữa đĩa đã có vi khuẩn.
- Ủ đĩa thạch ở 35°C trong 24h.
- Kiểm tra vùng ức chế xung quanh sợi chỉ.
- Bộ thử gồm 03 đĩa lặp lại: 01 loại chỉ + 01 loại vi khuẩn không đề kháng kháng sinh (chủng bệnh nhân).

- Bộ thử gồm 01 đĩa: 01 loại chỉ + 01 loại vi khuẩn ATCC hoặc loại vi khuẩn đề kháng kháng sinh (chủng bệnh nhân).

- Cả 4 loại chỉ thử nghiệm và chỉ đối chứng được tiến hành làm đồng thời.

Đánh giá kết quả

- Vùng ức chế là vùng xung quanh sợi chỉ không có vi khuẩn phát triển.

- Đường kính vùng ức chế được đo vuông góc với sợi chỉ.

- Đường kính vùng ức chế là trung bình cộng của bộ thử.

Bảng 4. Kết quả thử nghiệm kháng khuẩn

Chủng vi khuẩn thử nghiệm	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 4	Mẫu đối chứng
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	NZ	0,5mm	2mm	4mm	1,6mm
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) đề kháng Methicillin (chủng bệnh nhân)	NZ	0,5mm	2mm	3mm	1,6mm
<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) nhạy cảm Methicillin (chủng bệnh nhân)	NZ	NZ	1,7mm	2,7mm	1,6mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	NZ	NZ	1,5mm	3mm	2mm
<i>Escherichia coli</i> (ESBL) đề kháng sinh nhóm betalactam mở rộng (chủng bệnh nhân)	NZ	0,2mm	1,5mm	3mm	1,5mm
<i>Escherichia coli</i> chủng bệnh nhân	NZ	0,5mm	2mm	3mm	2mm

Chủng vi khuẩn thử nghiệm	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 4	Mẫu đối chứng
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	NZ	0,5mm	1,5mm	2,5mm	NZ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> đa đề kháng kháng sinh (chủng bệnh nhân)	NZ	NZ	1mm	1,5mm	NZ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> chủng bệnh nhân	NZ	0,3mm	2,3mm	4,3mm	NZ

Ghi chú: NZ: không có vùng ức chế.

Mẫu chỉ khâu phẫu thuật PGA được phủ nhúng 3 lần trong dung dịch keo nano bạc (mẫu 4) có tính kháng khuẩn mạnh nhất, trong khi đó chỉ khâu phẫu thuật PGA được phủ nhúng 2 lần trong dung dịch keo nano bạc (mẫu 3) cũng có tính kháng khuẩn đáng kể và cả hai mẫu này đều kháng khuẩn tốt hơn chỉ đối chứng đồng thời kháng nhiều chủng vi khuẩn hơn chỉ đối chứng.

Ví dụ 6. Thử nghiệm khả năng tự tiêu của chỉ được phủ nano bạc theo giải pháp hữu ích

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

- Thỏ ta, 3 tháng tuổi, trọng lượng 2,0kg do Trung tâm giống dê, thỏ Sơn Tây cung cấp.

- Vật liệu là 2 loại chỉ khâu phẫu thuật PGA và PG 910.

Các bước tiến hành:

Bước 1: Chuẩn bị vật liệu và phân nhóm: Hai loại vật liệu được rửa siêu âm, đóng gói, tiệt trùng bằng tia gamma.

- Phân nhóm, lô: Hai loại chỉ khâu chia làm 2 nhóm: Nhóm 1: 20 thỏ cấy chỉ loại 1, chia 2 lô, mỗi lô 10 thỏ. Nhóm 2: 20 thỏ cấy chỉ loại 2 chia 2 lô, mỗi lô 10 thỏ. Thời gian theo dõi lô 1: 4 tuần và 8 tuần. Tổng số mẫu 40 mẫu (n=40).

Bước 2: Phẫu thuật cấy ghép vật liệu vào mô dưới da và mô cơ vùng mông thỏ.

- Thỏ đã được làm sạch lông bộc lộ vùng mông.
- Gây mê thỏ bằng ketamin 4mg/kg cân nặng.
- Làm sạch, sát trùng vùng mông thỏ.
- Rạch da, bóc tách mô liên kết, bộc lộ vùng cơ mông trái. Tách các lớp cơ mông, rạch dọc cơ, dùng hai loại chỉ khâu vết thương.
- Chỉ được xuyên qua cơ mông sau khi cạo lông, sát trùng, gây tê tại chỗ, rạch da và tổ chức dưới da.
- Đánh dấu vùng phẫu thuật.
- Theo dõi tình trạng toàn thân và tại vị trí cấy ghép vật liệu của thỏ sau phẫu thuật trong thời gian nghiên cứu.
- Đánh giá khả năng tự tiêu của chỉ ở các thời điểm khác nhau qua tiêu bản vi thể, mỗi mẫu cắt 5 lát. Tổng số tiêu bản 600 tiêu bản.

Bước 3: Đánh giá sau ghép ở các thời điểm khác nhau

- Phẫu thuật bộc lộ vùng mô thỏ có cấy chỉ.
- Đánh giá tình trạng đại thể, lấy khối cơ chứa vật liệu làm tiêu bản vi thể.

Chỉ tiêu đánh giá

- Màu sắc, cấu trúc, độ đàn hồi của mô.
- Sự phát triển tổ chức xơ.
- Khả năng tự tiêu

- Sự tập trung của các tế bào viêm: Bạch cầu đa nhân trung tính, đại thực bào, Tương bào, Lympho bào, đánh giá sự xuất hiện các nguyên bào sợi.

- Tình trạng phát triển của mô xơ.

Chú ý: ISO 10993-6: 2016 quy định cụ thể các phương pháp thử để đánh giá tác động cục bộ sau khi cấy ghép các vật liệu sinh học dùng cho các thiết bị y tế áp dụng cho các vật liệu rắn và không hấp thụ được, các vật liệu không rắn chẳng hạn như vật liệu xốp, chất lỏng, gel, bột nhão, và các hạt.

Mẫu thử nghiệm được cấy vào một địa điểm các loài động vật phù hợp để đánh giá sự an toàn sinh học của vật liệu. Kết quả kiểm tra sau cấy ghép này không nhằm đánh giá hoặc xác định hiệu suất của mẫu thử đối với tải cơ học hoặc chức năng. Phần ISO 10993 này cũng có thể được áp dụng cho các thiết bị y tế được sử dụng trong các chỉ dẫn lâm sàng khi bề mặt hoặc lớp lót có thể bị phá vỡ, để đánh giá phản ứng mô tại chỗ.

ISO 10993-6: 2016 không xử lý độc tính hệ thống, khả năng gây ung thư, gây quái thai hay gây đột biến. Tuy nhiên, các nghiên cứu cấy ghép lâu dài nhằm đánh giá hiệu quả sinh học tại chỗ có thể cung cấp cái nhìn sâu sắc về một số trong những đặc tính này.

Kỹ thuật sử dụng

Kỹ thuật làm tiêu bản mô học sử dụng trong nghiên cứu

Mục đích: đánh giá hình ảnh vi thể của mô sau ghép vật liệu.

- Lấy bệnh phẩm: lấy vùng mô cơ xung quanh vị trí ghép vật liệu với bán kính 1-1,5 cm.

- Cố định: bằng dung dịch Bouin nhằm làm chết tế bào nhưng vẫn giữ được chúng trong tình trạng giống như khi sống.

- Vùi mô: gắn miếng mô và một khối nền để tạo khối mô cố định.

- Cắt thiết đồ: cắt miếng mô thành những lát mỏng 3 – 5 μm để ánh sáng có thể xuyên qua được, mỗi mảnh mô cắt từ 3 – 5 lát, mỗi lát cách nhau từ 25 – 30 μm .

- Nhuộm tiêu bản bằng phương pháp nhuộm HE.

- Đậy lamên lên mảnh mô sau khi nhuộm, dán bằng dung dịch Bom Canada.
- Soi tiêu bản dưới kính hiển vi quang học để đánh giá hình ảnh vi thể của mô.

Phần mềm định lượng mô, tế bào KS400

Phần mềm định lượng KS400 của hãng Carl Zeiss hoạt động theo nguyên lý ứng dụng phép đo cường độ màu trên các ảnh màu kỹ thuật số được ghi lại qua kính hiển vi từ các tiêu bản vi thể, dựa trên cơ sở chế độ màu RGB (đỏ, xanh lá cây, xanh dương).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phần mềm KS400 để đếm tất cả tế bào viêm có trong các tiêu bản của mỗi mẫu bệnh phẩm, đo độ dày màng xơ bao quanh vật liệu nghiên cứu.

Kết quả

Tình trạng toàn thân và tại chỗ của động vật sau cấy ghép

Tình trạng toàn thân: Ăn uống, hoạt động của động vật bình thường.

Tình trạng tại vị trí cấy ghép: không viêm, rò rỉ dịch, đùn đẩy chỉ ra ngoài.

Tình trạng ại thể vùng mô sau thử nghiệm

- Có sự tập trung một mô xơ sợi quanh vật liệu. Mô xơ này xâm nhập vào vùng chỉ sau khi tự tiêu. Sự tiêu của chỉ hoàn toàn sinh lý, sau khi tiêu, mô sợi thay thế, không thấy tế bào viêm. Thời gian càng dài, phần chỉ còn lại càng ít. Sau 8 tuần, lượng chỉ còn lại khoảng $\frac{1}{4}$.

Không có sự khác biệt về sự tự tiêu, liền vết thương, phù hợp mô giữa hai loại chỉ PGA và PG 910 được phủ nano bạc.

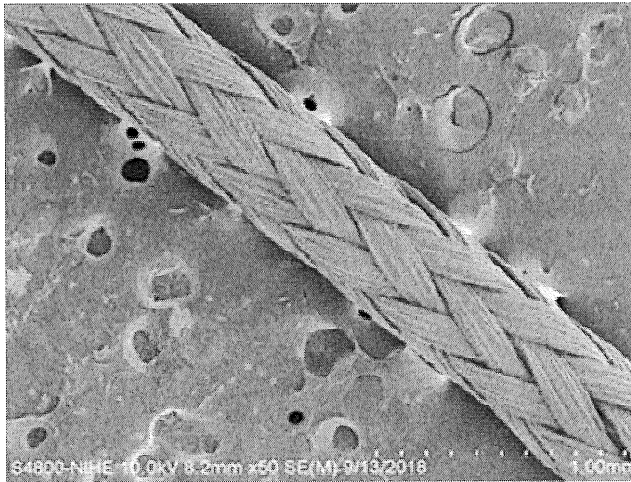
Trung bình, thời gian tiêu hết khoảng trên 7 – 8 tuần. Chỉ có kích thước trung bình thời gian tiêu hết khoảng 5 tuần. So với chỉ làm chứng, chỉ được phủ nano bạc theo giải pháp hữu ích tiêu nhanh hơn khoảng 1 tuần.

Yêu cầu bảo hộ

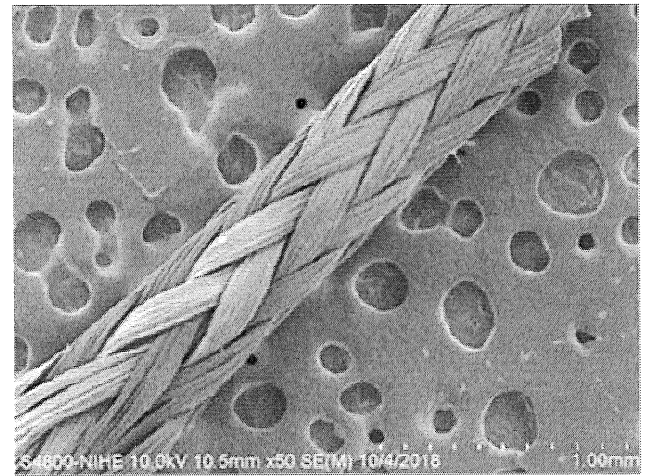
1. Chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu được phủ nano bạc, trong đó hàm lượng nano bạc được phủ lên sợi chỉ là nằm trong khoảng từ 2% đến 4% trọng lượng.
2. Chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu theo điểm 1, trong đó kích cỡ hạt nano bạc là nằm trong khoảng từ 10nm đến 30nm.
3. Chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu này có thể là chỉ đơn sợi hoặc chỉ đa sợi.
4. Chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu là chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu trên cơ sở axit polyglycolic, chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu trên cơ sở polyglyconat, chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu trên cơ sở polydioxanon và chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu trên cơ sở axit polyglactic.
5. Chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu là chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu trên cơ sở axit polyglycolic và chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu trên cơ sở axit polyglactic.
6. Quy trình phủ nano bạc lên chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu bao gồm các bước:
 - i) Điều chế dung dịch keo nano bạc bằng cách sử dụng dung dịch bạc nitrat và dung dịch muối natri alginat, trong đó dung dịch bạc nitrat được nhỏ giọt vào dung dịch natri alginat đang được khuấy từ với tỷ lệ thể tích dung dịch bạc nitrat : thể tích dung dịch natri alginat = 1:3 và trong đó nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng 80 từ 90°C và trong thời gian phản ứng là khoảng 120 phút;
 - ii) nhúng ngâm chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu vào bể dung dịch nano bạc đã chuẩn bị trước ở bước (i) trong thời gian 30 phút, sau đó được lấy ra và làm khô ở nhiệt độ khoảng 70°C trong thời gian 30 phút;
 - iii) lặp lại bước (ii) 1, 2, 3 hoặc nhiều lần;
 - iv) rửa chỉ khâu phẫu thuật tự tiêu tu được sau bước (iii) với nước cất và sấy ở khoảng 70°C trong thời gian 60 phút.

1/7

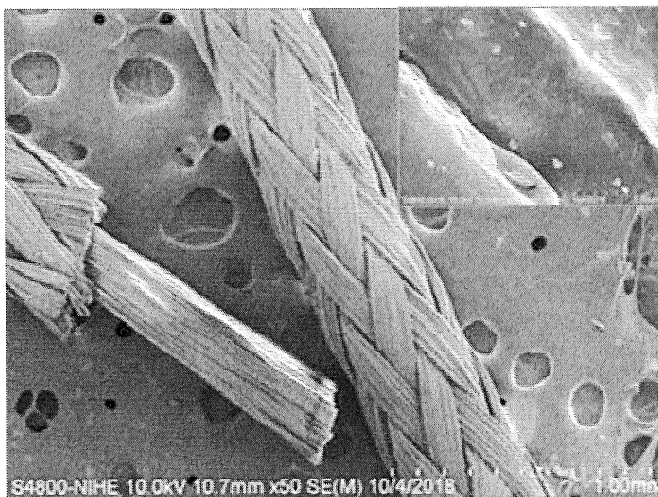
Hình 1



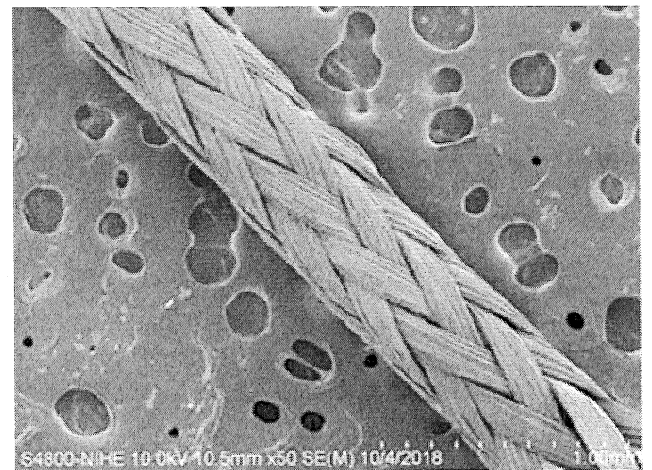
A



B



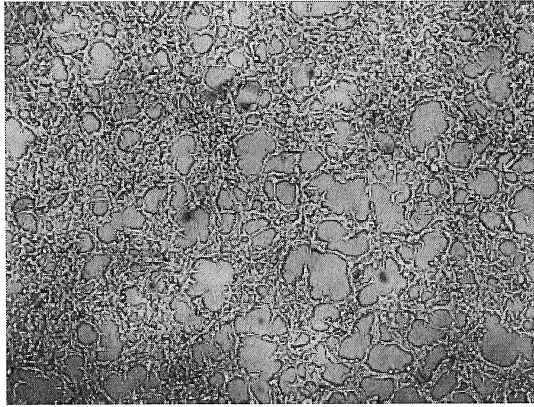
C



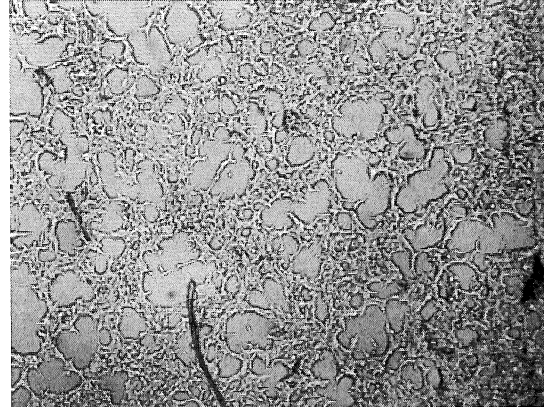
D

2/7

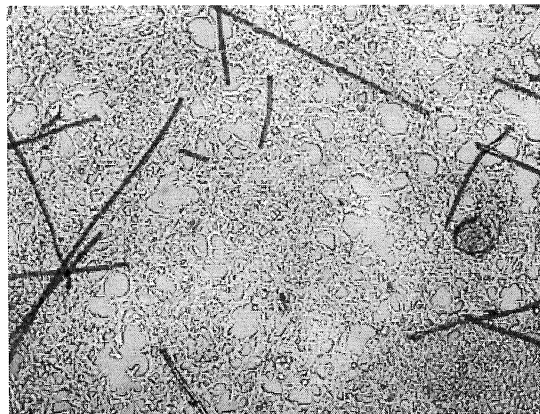
Hình 2



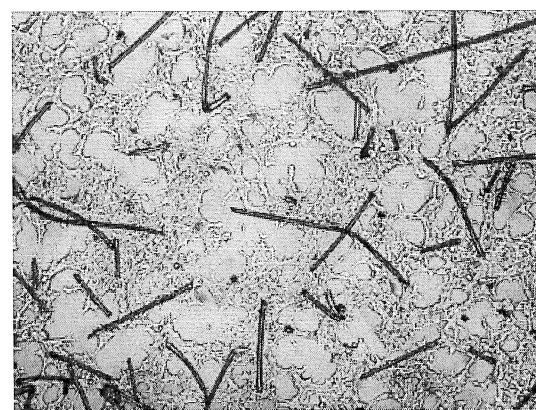
ĐC



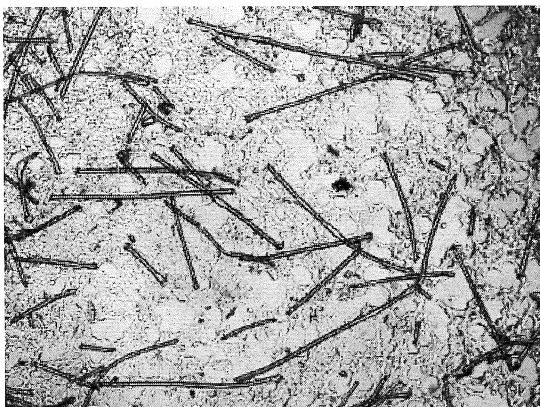
1,2



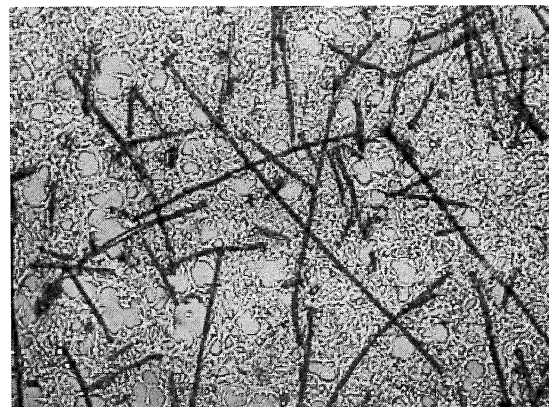
2,2



3,1



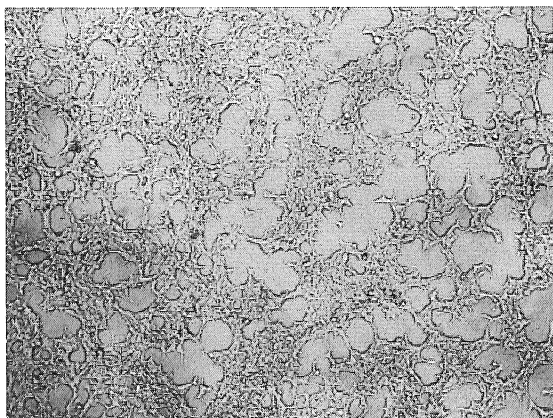
5,2



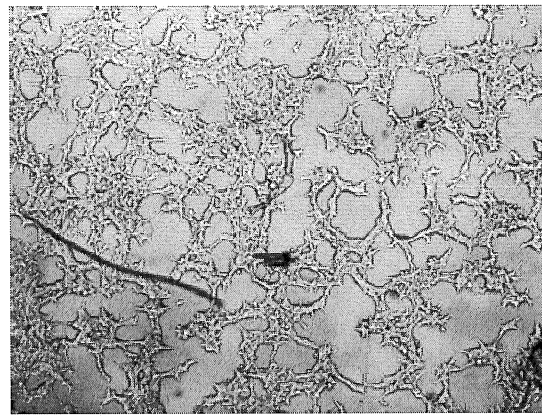
8,4

3/7

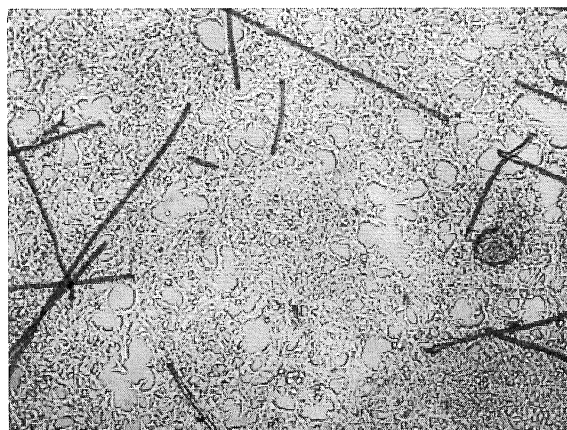
Hình 3



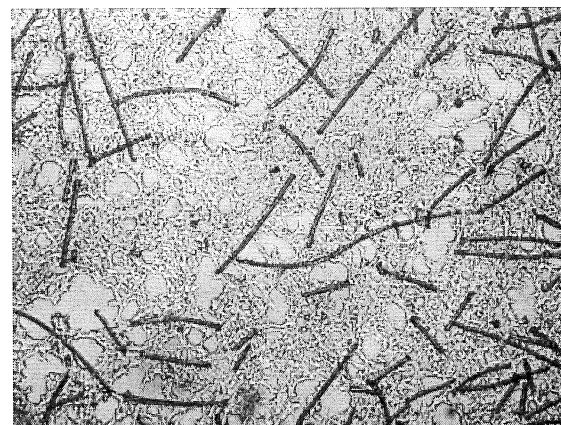
ĐC



1,7



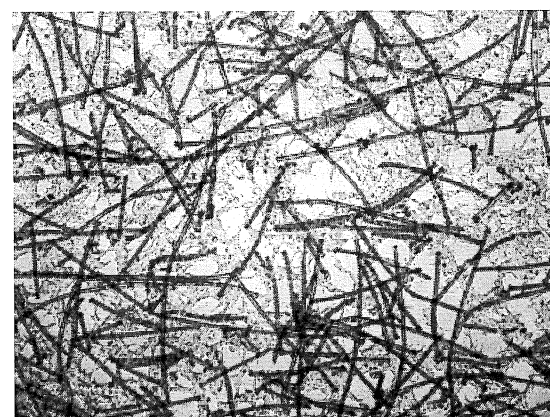
3,2



4,6



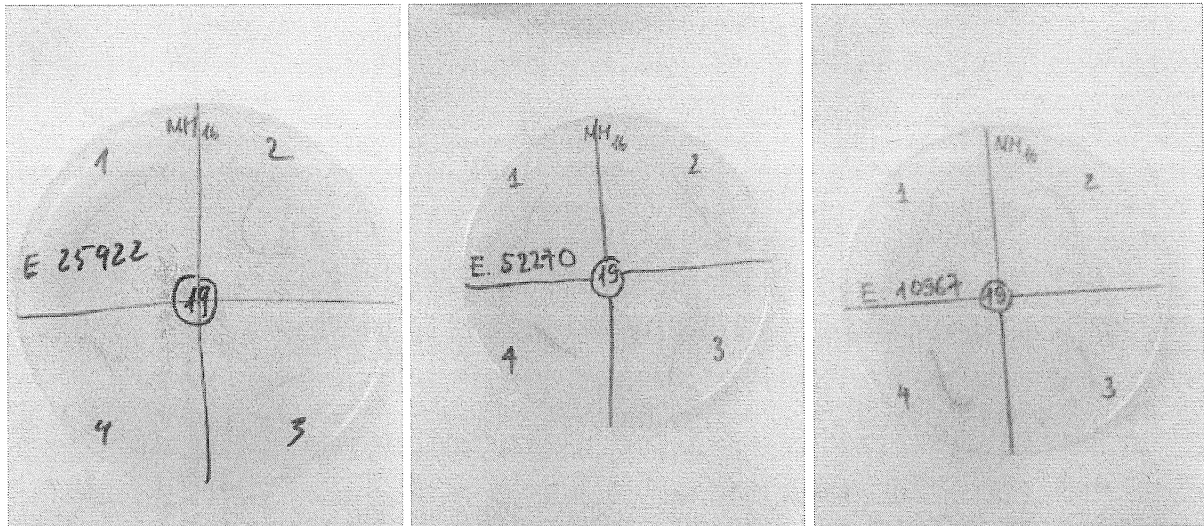
6,3



10,4

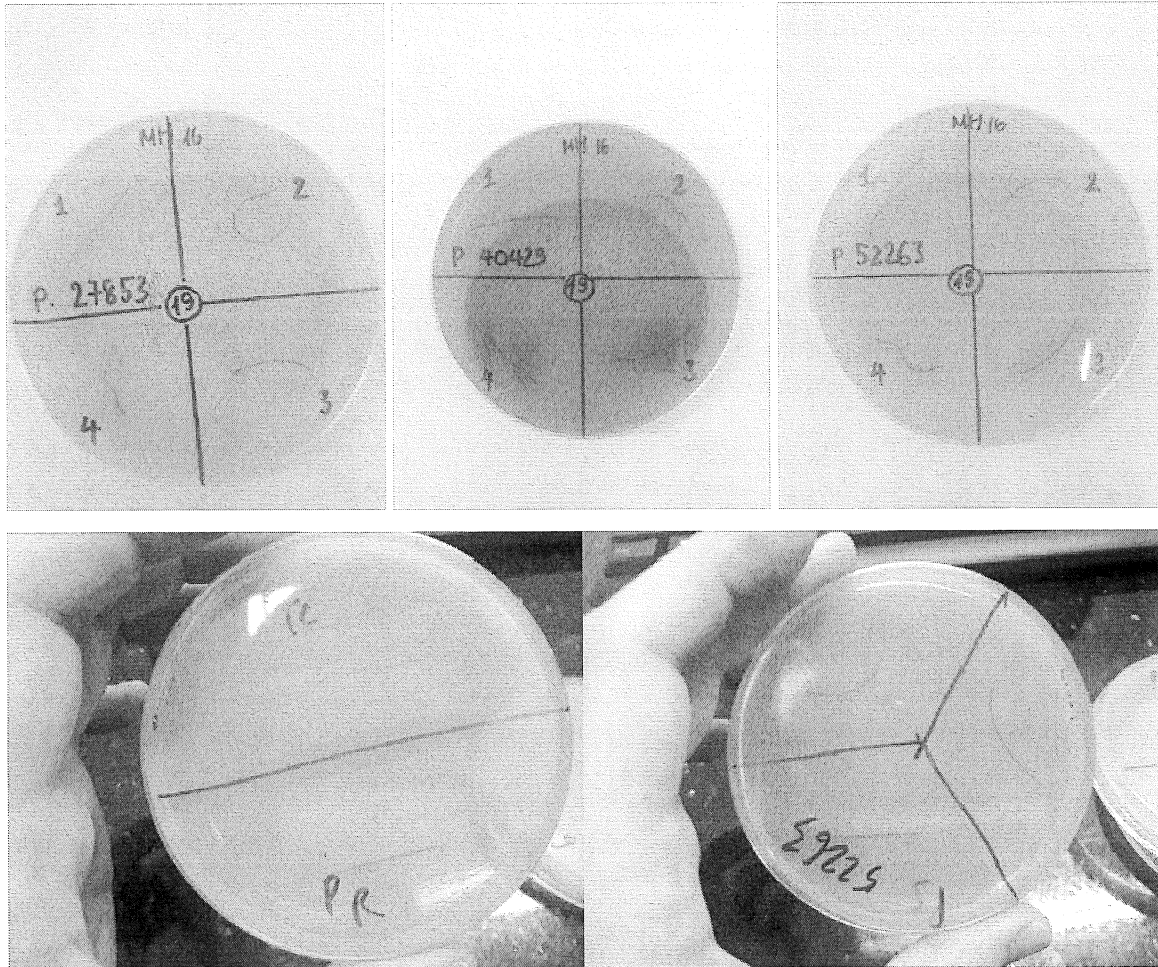
4/7

Hình 4



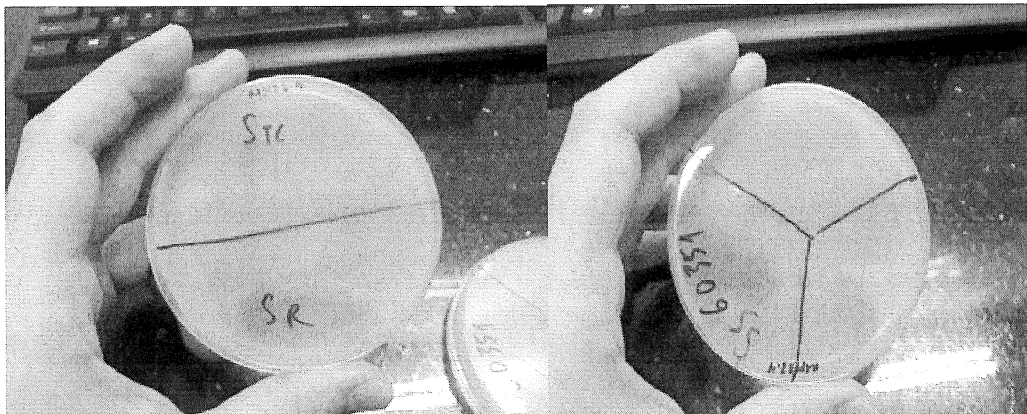
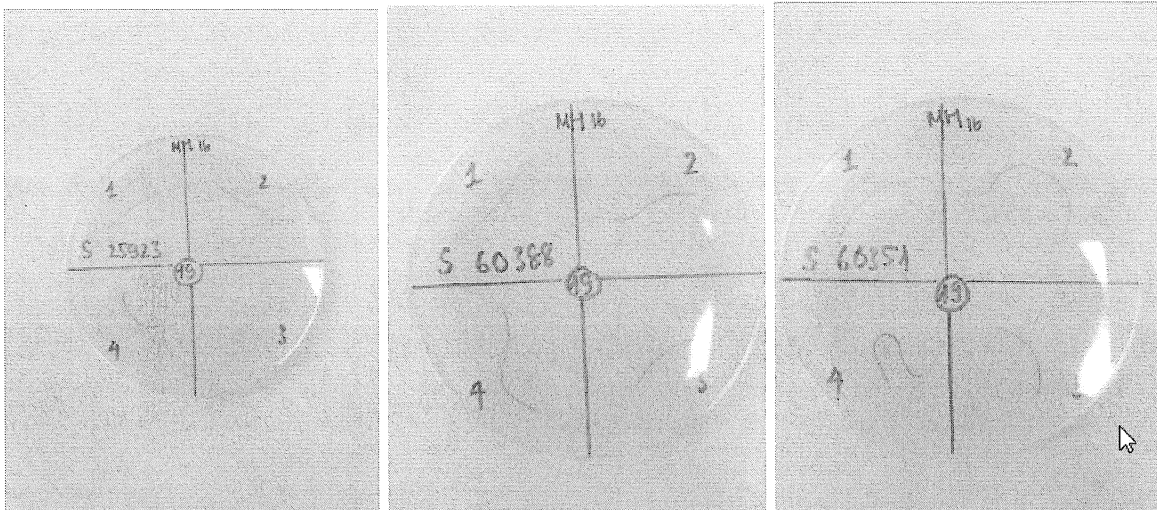
5/7

Hình 5



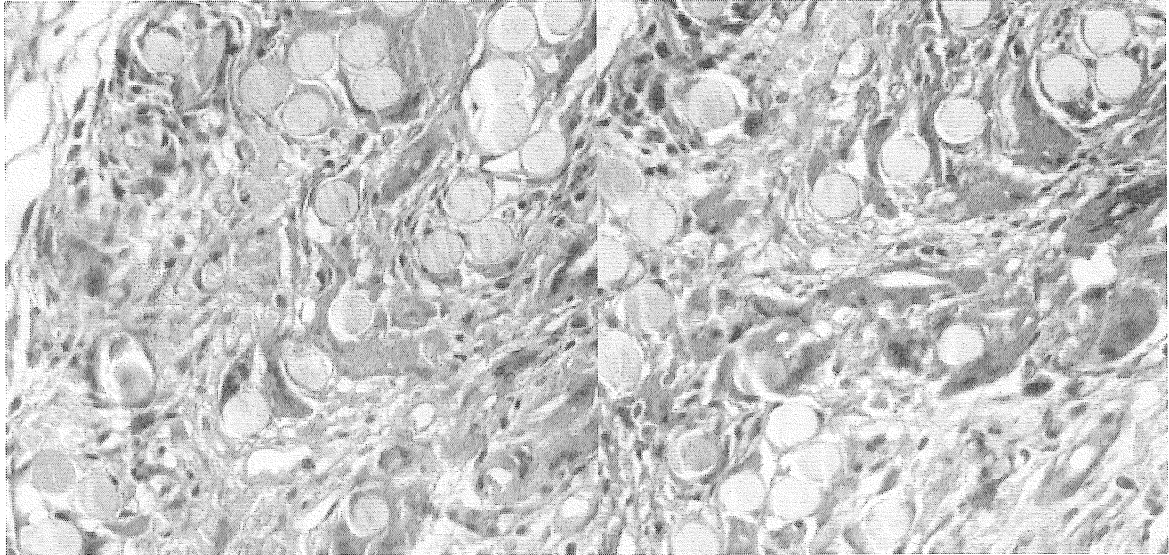
6/7

Hình 6



7/7

Hình 7



A

B