

ĐIỀU KIỆN LY TÂM TỐI ƯU CHO QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT HUYẾT TƯƠNG GIÀU TIỂU CẦU

Phạm Thị Thanh Thảo¹, Trần Hồng Quân¹, Đào Thị Hương¹
Nguyễn Hồng Hà¹, Nguyễn Thị Hương Lan¹, Nguyễn Huy Bình^{1*}

TÓM TẮT:

Đặt vấn đề: Ly tâm là bước quan trọng khi sản xuất huyết tương giàu tiểu cầu (Plaletet rich plasma - PRP) trong điều trị bệnh nhân thoái hóa khớp, tuy nhiên vẫn còn nhiều tranh cãi về điều kiện ly tâm tối ưu cho người Việt Nam. Mục tiêu nghiên cứu: tìm ra điều kiện ly tâm tối ưu cho quá trình sản xuất PRP từ máu tĩnh mạch. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 15 mẫu máu chống đông bằng natri citrate ly tâm với tốc độ 16g, 44g, 87g, 177 g và thời gian 5 phút, 10 phút, 15 phút và 120 mẫu máu chống đông bằng natri citrate ly tâm ở 4 điều kiện (1) 16 x g và 15 phút, (2) 44 x g và 10 phút, (3) 87g và 10 phút, (4) 177 x g và 5 phút. **Kết quả:** Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có 4 điều kiện tốt nhất cho sản xuất huyết tương giàu tiểu cầu là (1) 16 x g và 15 phút, (2) 44 x g và 10 phút, (3) 87g và 10 phút, (4) 177 x g và 5 phút tương ứng với lượng tiểu cầu tuyệt đối thu được so với ban đầu lần lượt là 53,77%; 69,20%; 60,19% và 62,10% và các tế bào máu khác còn lại không đáng kể trong đó điều kiện 44 x g, 10 phút là tốt nhất. **Kết luận:** có thể sử dụng 4 điều kiện trên để sản xuất PRP sử dụng cho lâm sàng trong đó điều kiện 44 x g, 10 phút là tốt hơn cả.

Từ khóa: Dung dịch huyết tương giàu tiểu cầu (PRP), ly tâm, tốc độ, thời gian

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chức năng chính của tiểu cầu là đông máu, sửa chữa thành mạch và các mô xung quanh sau chấn thương [1] vì các chất tiết ra từ tiểu cầu có tác dụng thúc đẩy quá trình sinh sản tế bào, hình thành mạch, nhập cư tế bào và kết quả là tái tạo mô. Một số nghiên cứu cũng xác nhận về việc tiểu cầu sản xuất ra các peptid kháng khuẩn, có tác dụng như một chất kháng sinh, kháng viêm, giảm đau [2] [3].

Chính vì vậy, các sản phẩm từ tiểu cầu như huyết tương giàu tiểu cầu (Plaletet rich plasma - PRP) đã được nghiên cứu từ rất lâu. Từ đó, PRP đã được sản xuất với các phương pháp đơn giản như sử dụng các ống nghiệm thông

thường đến việc phát triển các kit thương mại. Bước quan trọng nhất trong quá trình sản xuất này là ly tâm máu toàn phần để thu được huyết tương với số lượng tiểu cầu nhiều nhất, và số lượng các tế bào máu khác ít nhất. Tuy nhiên, thời gian và số vòng ly tâm còn nhiều tranh cãi và có rất nhiều các quy trình với các thông số khác nhau.

Do đó, nghiên cứu của chúng tôi được tiến hành với mục đích tìm ra điều kiện ly tâm tối ưu cho quá trình sản xuất PRP từ máu tĩnh mạch.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

- Gồm 135 mẫu máu của các sinh viên năm thứ 2 Đại học Y Hà Nội có tiền sử khỏe mạnh đồng ý tự nguyện tham gia vào nghiên cứu.

* Tiêu chuẩn loại trừ:

- Mắc các bệnh mạn tính, các bệnh về máu và các bệnh nhiễm trùng cấp tính

2.2. Phương pháp nghiên cứu

¹Trường Đại học Y Hà Nội

* Tác giả chịu trách nhiệm chính:

Nguyễn Huy Bình

Email: binhcom2003@yahoo.com

Ngày nhận bài: 20/9/2016

Ngày nhận bài phản biện: 15/10/2016

Ngày chấp nhận đăng: 21/10/2016

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu: thực nghiệm theo 2 giai đoạn

Giai đoạn 1: Sử dụng 15 mẫu máu chống đông bằng natri citratly tâm ở 3 điều kiện: 5 phút (5 mẫu máu); 10 phút (5 mẫu máu); 15 phút (5 mẫu máu) ở các tốc độ 16g, 44g, 87g và 177 g để tìm ra xu hướng của mẫu tiểu cầu thu được.

Giai đoạn 2: Chọn 4 điều kiện tối ưu (mỗi điều kiện gồm 30 mẫu máu) để xác định chính xác điều kiện ly tâm tối ưu: (16 x g, 15 phút); (44 x g, 10 phút); (87 x g, 10 phút); (144 x g, 5 phút).

2.2.2. Quy trình nghiên cứu và các chỉ số nghiên cứu

Bước 1: Lấy 2 ml máu tĩnh mạch vào ống chứa 0,5 ml natri citrate. Lắc đều để máu được chống đông hoàn toàn.

Bước 2: Ly tâm ở các tốc độ và thời gian khác nhau với mục đích để thu được dung dịch huyết tương giàu tiểu cầu

Bước 3: Thu phần huyết tương ở phía

trên lớp buffy coat và dùng pipet đo thể tích của PRP thu được.

Bước 4: Xác định số lượng các tế bào máu bằng máy huyết học Sysmex CA-50 (Nhật Bản)

Bước 5: Tính số lượng tiểu cầu tuyệt đối theo công thức:

$TC = C_m \times V$

Trong đó

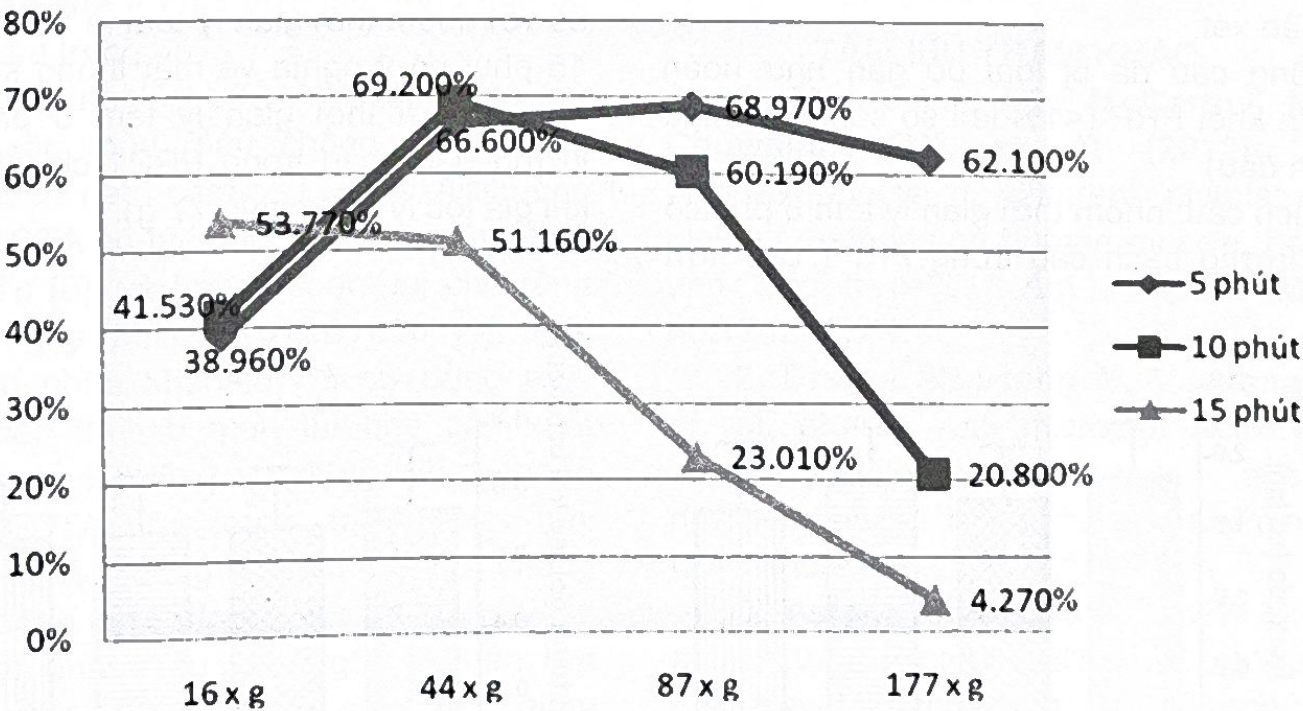
TC: số lượng tiểu cầu tuyệt đối(10^3); C_m : nồng độ tiểu cầu ($10^3/\mu l$); V: thể tích của mẫu (μl)

2.2.3. Đạo đức nghiên cứu và xử lý số liệu:

- Các sinh viên trước khi tham gia vào nghiên cứu đã được giải thích rõ ràng về ý nghĩa của nghiên cứu và đồng ý tự nguyện tham gia vào nghiên cứu.

- Xử lý số liệu theo phương pháp thống kê y sinh học bằng phần mềm Spss 11.0 và Excel.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU



Biểu đồ 3.1. Tỷ lệ tiểu cầu thu được trong PRP ở các tốc độ và thời gian ly tâm khác nhau

Nhận xét:

Với thời gian ly tâm là 15 phút thì số lượng tiểu cầu tuyệt đối thu được cao

nhất ở gia tốc 16 g là 53,77% và cao hơn số lượng tiểu cầu tuyệt đối thu được khi ly tâm ở gia tốc 16 g nhưng thời gian ngắn

hơn (5 phút và 10 phút). Khi gia tốc tăng thì số lượng tiểu cầu tuyệt đối có xu hướng giảm dần.

Với thời gian ly tâm là 10 phút thì số lượng tiểu cầu tuyệt đối tăng dần khi gia tốc tăng từ 16 g đến 44 g, và đạt giá trị cao nhất tại 44g là 69,20%. Sau đó khi gia

tốc tăng thì số lượng tiểu cầu tuyệt đối có xu hướng giảm dần.

Với thời gian 5 phút thì số lượng tiểu cầu tuyệt đối tăng dần khi gia tốc tăng từ 16 g đến 87g và đạt giá trị cao nhất tại 87g là 68,97%. Sau đó khi gia tốc tăng thì số lượng tiểu cầu tuyệt đối có xu hướng giảm dần.

Bảng 3.1. Số lượng bạch cầu và hồng cầu trong PRP

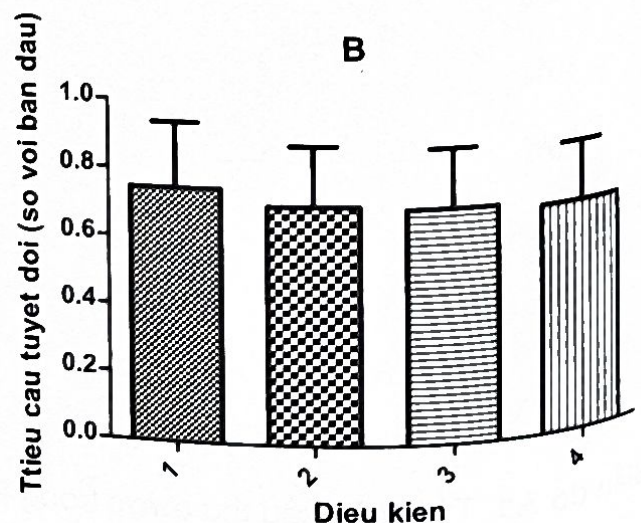
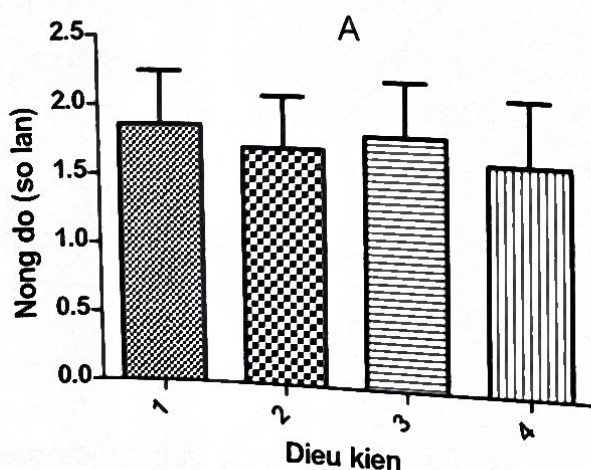
TG ly tâm	15 phút(1) (n=4)		10 phút(2) (n=4)		5 phút(3) (n=4)	
	Bạch cầu ($10^3/\mu\text{l}$)	Hồng cầu ($10^6/\mu\text{l}$)	Bạch cầu ($10^3/\mu\text{l}$)	Hồng cầu ($10^6/\mu\text{l}$)	Bạch cầu ($10^3/\mu\text{l}$)	Hồng cầu ($10^6/\mu\text{l}$)
16g	0,38 (1,3%)	0,026 (0,1%)	1,5 (5,6%)	0,042 (0,1%)	3,9 (11,7%)	0,06 (0,2%)
44g	0,12 (0,6%)	0,008 (0,4%)	0,44 (2,9%)	0,024 (0,1%)	2,72 (13,8%)	0,032 (0,2%)
87g	0,32 (1,7%)	0,01 (0,6%)	0,66 (5,3%)	0,012 (0,09%)	1,8 (10,1%)	0,038 (0,2%)
177g	0,56 (3,7%)	0,008 (0,4%)	0,4 (3,7%)	0,01 (0,08%)	0,42 (3%)	0,018 (0,15%)
p	$p_{2-1} > 0,05$; p_{3-1}^*					

Nhận xét:

-Hồng cầu đã bị loại bỏ gần như hoàn toàn khỏi PRP (<1% khi so sánh với mẫu ban đầu)

-Bạch cầu: nhóm thời gian ly tâm 5 phút có số lượng bạch cầu trong PRP1 cao hơn

so với nhóm thời gian ly tâm là 10 phút và 15 phút có ý nghĩa về mặt thống kê ($p_{3-1} > 0,05$). Với thời gian ly tâm 5 phút số lượng bạch cầu trong PRP1 chỉ giảm đi khi gia tốc ly tâm cao (177 g).



Biểu đồ 3.2. So sánh nồng độ tiểu cầu, số lượng tiểu cầu tuyệt đối thu được sau ly tâm
A: Nồng độ tiểu cầu, B: Số lượng tiểu cầu tuyệt đối. Cơ mẫu cho mỗi điều kiện là 30.
(1) 44 x g, 10 phút; (2) 87 x g, 10 phút; (3) 16 x g, 15 phút, (4) 177 x g, 5 phút

4. BÀN LUẬN

Nghiên cứu được tiến hành với mục tiêu tìm ra được điều kiện ly tâm thích hợp cho quá trình sản xuất dung dịch huyết tương giàu tiểu cầu (PRP) từ máu tĩnh mạch của người Việt Nam. Vì vậy, nghiên cứu đã tiến hành với các mẫu máu tĩnh mạch giống nhau ở các điều kiện ly tâm khác nhau về tốc độ vòng quay (16g, 44g, 87g và 177g) và thời gian quay (5 phút, 10 phút và 15 phút). Biểu đồ 3.1 cho thấy khi ly tâm với vòng quay nhỏ trong thời gian dài hoặc ly tâm với vòng quay lớn hơn trong thời gian ngắn sẽ thu được số lượng tiểu cầu nhiều nhất. Tuy nhiên, khi ly tâm với vòng quay lớn trong thời gian ngắn thì có thể thu được số lượng tiểu cầu lớn nhưng trong mẫu thu được lại vẫn chứa rất nhiều hồng cầu và bạch cầu (Bảng 3.1). Do đó, ly tâm với tốc độ vừa phải trong thời gian không quá dài sẽ thu được dung dịch huyết tương giàu tiểu cầu đạt yêu cầu về số lượng tiểu cầu cũng như hạn chế ít nhất việc lẫn hồng cầu và bạch cầu trong đó.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng các mẫu máu chống đông bằng dung dịch natri citrate. Tác giả Araki cho rằng EDTA có tác dụng tối đa hóa mật độ tiểu cầu [8], và Landersbers lại cho rằng EDTA gây phá hủy tiểu cầu [9]. Một nguyên nhân khác là khi sử dụng máy đếm các tế bào máu thì nhà sản xuất khuyến cáo không sử dụng bằng chống đông EDTA nên trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng máu tĩnh mạch chống đông bằng natri citrate.

Sản phẩm sau ly tâm gồm 3 phần: lớp thấp nhất chứa hồng cầu và chiếm khoảng $\frac{1}{2}$ thể tích máu toàn phần, một lớp mỏng trắng ở giữa chứa bạch cầu (buffy coat), và lớp trên cùng chứa tiểu cầu. Kết quả nghiên cứu gợi ý nếu cần rút ngắn thời gian tiến hành ly tâm, ta có thể cân nhắc lựa chọn thời gian 5 phút mà vẫn thu được số lượng tiểu cầu lớn. Tuy nhiên số

lượng bạch cầu khi ly tâm 5 phút còn cao khoảng 10% ở tất cả các tốc độ và tốt nhất khi ly tâm ở tốc độ 87 x g.

Ở giai đoạn 2, sau khi thảo luận chúng tôi đi đến thống nhất chọn ra 4 điều kiện tốt nhất cho quá trình sản xuất dung dịch huyết tương giàu tiểu cầu là (1) 44 x g, 10 phút; (2) 87 x g, 10 phút; (3) 16 x g, 15 phút, (4) 177 x g, 5 phút. Khi so sánh các điều kiện với nhau thì điều kiện 44 x g, 10 phút là tốt nhất về nồng độ và số lượng tiểu cầu tuyệt đối.

5. KẾT LUẬN, KIẾN NGHỊ

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có 4 điều kiện tốt nhất cho sản xuất huyết tương giàu tiểu cầu là 16 x g và 15 phút; 44 x g và 10 phút; 87 x g và 10 phút, 177 x g và 5 phút với lượng tiểu cầu tuyệt đối thu được so với ban đầu lần lượt là 53,77%; 69,20%; 60,19% và 62,10% và các tế bào máu khác còn lại không đáng kể, trong đó điều kiện 44 x g, 10 phút là tốt nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowaniec DM, et. Al. (2012). The positive effects of different platelet-rich plasma methods on human muscle, bone, and tendon cells. *Am J Sports Med*, 40:1742–1749.
2. DragoL ,Bortolin M, Vassena C, et. al. (2013). Anti microbial Activity of pure platelet-rich plasma against microorganisms isolated from oral cavity. *BMC Microbiol*, 13:47–51.
3. Asfaha S, Cenac N, Houle S, et. al. (2007). Protease-activated receptor-4: a Novel mechanism of inflammatory pain modulation. *Br J Pharmacol*, 150:176–185.
4. Lê Quang Nhật, Nguyễn Minh Đức, Cao Thanh Ngọc và cs (2013). Khảo sát thoái hóa khớp gối ở bệnh nhân cao tuổi tại khoa nội cơ xương khớp bệnh viện chợ Rẫy.

5. Bùi Hải Bình, Nguyễn Thị Ngọc Lan: hiệu quả bước đầu tiêm nội khớp huyết tương giàu tiểu cầu tự thân điều trị thoái hóa khớp gối

6. Kakudo N, Minakata T, Mitsui T, et.al. (2008). Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. *Plast Reconstr Surg*, 122:1352–1360.

7. Mc Carrel TM, Minas T, Fortier LA (2012). Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for

the treatment of tendinopathy. *J Bone Joint Surg Am*, 94:1–8.

8. Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, et. al. (2009). *Vox Sang*, 97:110–118.

9. Le G, Kaux JF, Seidel L, et. al. (2011). Étude Comparative de cinq techniques de préparation plaquettaire (platelet-rich plasma). *Pathol Biol*, 59:157–160.

SUMMARY

OPTIMAL CENTRIFUGAL CONDITIONS FOR PREPARING PLATELET RICH PLASMA

Pham Thi Thanh Thao¹, Tran Hong Quan¹, Dao Thi Huong¹
 Nguyen Hong Ha¹, Nguyen Thi Huong Lan¹, Nguyen Huy Binh¹
¹Ha Noi Medical University

Background: Platelet-rich plasma (PRP) is now applied efficiently in some clinical scenarios. Centrifugation is one of the most important steps in preparing platelet-rich plasma (PRP), but there remains arguments about the optimal centrifugal condition, which include the relative centrifugal force and time period of centrifugation. **Objectives:** This study aims to figure out the best conditions for preparing PRP from venous blood. **Subject and methods:** The collected samples of blood from healthy donors were centrifuged at different centrifugal forces (16×g, 44×g, 87×g and 177×g) in different time (5, 10, 15 minutes). The total blood cell count was determined in whole blood and PRP to evaluate the affection of different centrifugal conditions on blood samples. **Results:** Our method showed four optimal conditions for obtaining the highest platelet concentration are centrifugations of 16×g in 15 min, 44×g in 10 min, 87×g in 10 min and 177×g in 5 min, in which the centrifugation of 44×g in 10 min was determined to yield the maximum recovery of platelet. **Conclusion:** We can use one of the four conditions above to prepare PRP for osteoarthritis treatment, and the setting of 44×g for centrifugal acceleration and time of 10 min is the best condition.

Keywords: Platelet-rich plasma, centrifugation, centrifugal force, time period.