

Nghiên cứu chế tạo sợi huyết giàu tiểu cầu đông khô

Thái Hoàng Phước Thảo^{1*}, Đoàn Ngọc Hoan²,

Lê Minh Khôi³ và Nguyễn Thị Hiệp²

¹Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

²Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia TP.HCM

³Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

TÓM TẮT

Sợi huyết giàu tiểu cầu (PRF) là sản phẩm tự thân chiết xuất từ máu toàn phần đã được sử dụng như vật liệu tái tạo tự thân. Việc sử dụng PRF còn hạn chế do thời gian phân huỷ nhanh và tính ổn định cơ học thấp. Mục tiêu của nghiên cứu này là chế tạo sợi huyết giàu tiểu cầu dạng đông khô và xác định tính chất hóa học của chúng sau khi chế tạo. Một tình nguyện viên, khoẻ mạnh, không ghi nhận bệnh lý toàn thân hay lây nhiễm được lấy máu toàn phần A-PRF và S-PRF. 10mL máu toàn phần được quay ly tâm lần lượt với lực quay 250g trong 14 phút và 200g trong 14 phút. Lớp PRF được thu về và được đông khô bằng cách lưu trữ ở nhiệt độ -80°C qua đêm và sấy khô bằng máy đông khô Labconco ở -51°C trong 12 giờ. Các mẫu PRF đông khô (Ly-APRF và Ly-SPRF) được kiểm tra lần lượt bằng kính hiển vi điện tử quét và phương pháp phổ hồng ngoại biến đổi Fourier. Hình ảnh SEM thể hiện cấu trúc sợi huyết còn lưu giữ sau quá trình đông khô. FTIR cho thấy các nhóm amide I, II, III tương đồng giữa Ly-APRF và Ly-SPRF. Việc đông khô PRF là phương pháp tiềm năng để cải thiện tính chất và lưu trữ vật liệu tự thân này.

Từ khóa: sợi huyết giàu tiểu cầu, đông khô, Ly-PRF

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sợi huyết giàu tiểu cầu (platelet-rich fibrin – PRF) là nguồn dồi dào của các yếu tố tăng trưởng (Growth Factors - GFs), cytokines và chemokines như protein tạo hình xương (Bone Morphogenetic Proteins - BMPs), yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (Platelet-Derived Growth Factor - PDGF), yếu tố tăng trưởng giống insulin-1 (Insuline-like Growth Factor-1 - IGF-1), yếu tố tăng trưởng chuyển đổi (Transforming Growth Factors - TGF-1), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF). Các sản phẩm cô đặc tiểu cầu là sản phẩm sinh học tự thân thu được sau khi ly tâm máu ngoại vi với tốc độ chậm. Đến nay, hai thế hệ cô đặc tiểu cầu đã được phát triển huyết tương giàu tiểu cầu (PRP) và sợi huyết giàu tiểu cầu (PRF), chúng đều dựa trên tốc độ ly tâm và chất bổ sung khác nhau. Sợi huyết giàu tiểu cầu cho thấy khả năng tồn tại và tương thích sinh học tốt hơn PRP, cũng như PRF tuy có hàm lượng yếu tố

tăng trưởng ít hơn PRP nhưng có khả năng lưu trữ và giải phóng yếu tố tăng trưởng chậm hơn. Điều này do khả năng giữ protein trong khung fibrin của PRF cũng như các tế bào có khả năng giải phóng các yếu tố tăng trưởng [1]. Cho tới nay, rất nhiều loại PRF đã được phát triển và áp dụng thành công như một loại vật liệu sinh học tự thân có khả năng thúc đẩy quá trình lành thương và tái sinh mô. Các loại sản phẩm PRF phụ thuộc vào kỹ thuật ly tâm và ống nghiệm có hoặc không có các chất phụ khác. Trong các sản phẩm PRF, L-PRF (sợi huyết giàu tiểu cầu và bạch cầu) là sản phẩm đầu tiên. L-PRF chứa nhiều tế bào thường được sử dụng để che phủ vết thương trực tiếp, hỗ trợ ghép xương và đóng vai trò là khung cho các vật liệu ghép. Cũng cùng thế hệ với L-PRF, S-PRF (sợi huyết giàu tiểu cầu tiêu chuẩn) được phát triển vào năm 2001 bằng việc ly tâm ống nghiệm bằng nhựa, không có chất

Tác giả liên hệ: ThS. Thái Hoàng Phước Thảo

Email: thaohp@hiu.vn

chống đông. S-PRF thường ở dạng lỏng và được kết hợp với các vật liệu tái tạo khác[2]. Sau đó, A-PRF (sợi huyết giàu tiểu cầu cải tiến) được phát triển ứng nghiệm thủy tinh, không có chất đông máu. A-PRF được ly tâm với tốc độ thấp hơn L-PRF và có dạng gel. A-PRF giải quyết được hạn chế của sự hiện diện tế bào bạch cầu và chứa nhiều yếu tố tăng trưởng hơn các sản phẩm thể hệ thứ nhất [3].

Sợi huyết giàu tiểu cầu (PRF) đã nổi lên như một phương pháp điều trị đầy hứa hẹn trong lĩnh vực y học tái tạo, đặc biệt là trong nha khoa. Với khả năng cung cấp một nguồn dồi dào các yếu tố tăng trưởng ngay trong giai đoạn đầu của quá trình sửa chữa và tái tạo mô, PRF được xem là một công cụ đắc lực để thúc đẩy quá trình lành thương và tái tạo xương [4]. Ứng dụng của PRF tươi đã được chứng minh hiệu quả trong nhiều lĩnh vực nha khoa, từ việc tăng cường khả năng lành thương, hỗ trợ di chuyển răng chỉnh nha, đến tái tạo các mô quan trọng như xương, nha chu, tủy và khớp [5]. Tuy nhiên, PRF tươi cũng tồn tại một hạn chế đáng kể, đó là thời gian phân hủy nhanh chóng. Nghiên cứu cho thấy A-PRF, một dạng PRF phổ biến, có thể bị phân hủy tới 60% chỉ trong vòng 60 phút đầu tiên và hoàn toàn biến mất sau 120 phút [3]. Điều này đồng nghĩa với việc PRF tươi chỉ có thể được sử dụng ngay lập tức sau khi điều chế, gây khó khăn cho việc lưu trữ, vận chuyển và ứng dụng trong thực tế lâm sàng. Hạn chế này đã thúc đẩy các nhà nghiên cứu tìm kiếm giải pháp để kéo dài thời gian sử dụng và mở rộng khả năng ứng dụng của PRF.

Một trong những hướng đi đầy triển vọng là phát triển PRF dạng đông khô (Ly-PRF). Kỹ thuật đông khô, hay còn gọi là sấy lạnh, là một phương pháp bảo quản vật liệu sinh học bằng cách loại bỏ nước thông qua quá trình thăng hoa. PRF sau khi được đông khô sẽ có dạng bột hoặc miếng xốp, có thể bảo quản trong thời gian dài mà không làm mất đi hoạt tính sinh học. Khi cần sử dụng, Ly-PRF có thể được hoàn nguyên bằng cách thêm nước hoặc dung dịch sinh lý, tạo thành dạng gel hoặc màng tương tự như PRF tươi. Ly-PRF mang lại nhiều lợi ích vượt trội

so với PRF tươi. Đầu tiên, Ly-PRF có thể được bảo quản trong thời gian dài ở nhiệt độ phòng, giúp đơn giản hóa quy trình lưu trữ và vận chuyển. Thứ hai, Ly-PRF có thể được sử dụng theo nhu cầu, cho phép các bác sĩ linh hoạt trong việc điều chỉnh liều lượng và phương pháp điều trị. Cuối cùng, Ly-PRF vẫn giữ được khả năng giải phóng các yếu tố tăng trưởng một cách từ từ và kéo dài, tối ưu hóa hiệu quả điều trị [3, 4]. Các nghiên cứu về Ly-PRF đã cho thấy những kết quả khả quan trong việc tái tạo xương, lành thương mô mềm, và điều trị các bệnh lý nha khoa. Ly-PRF được kỳ vọng sẽ trở thành một công cụ hữu hiệu trong y học tái tạo, mang lại nhiều lợi ích cho bệnh nhân và mở ra những hướng đi mới cho việc điều trị các bệnh lý và tổn thương khác nhau.

Phương pháp sấy đông khô được phát triển để cải thiện độ ổn định của vật liệu sinh học và khả năng lưu trữ của chúng. Trong đó, PRF đông khô (Ly-PRF) được chế tạo từ PRF tức thì đã được chứng minh có khả năng tái tạo và có thể được áp dụng cho nhiều lần điều trị ở những thời điểm khác nhau. Việc đông khô PRF đã được báo cáo là không chỉ làm gia tăng khả năng lưu trữ, thời gian bán hủy tốt mà còn cải thiện sự ổn định của các yếu tố tăng trưởng [4], [5]. Ly-PRF đã được báo cáo có khả năng tái tạo xương trong vùng sọ mặt [4], thúc đẩy quá trình lành thương mô mềm như một loại băng gạc [6]. Do đó, chúng tôi muốn thực hiện nghiên cứu này nhằm thực hiện quy trình đông khô cho sản phẩm sợi huyết giàu tiểu cầu và khả năng lưu trữ hoá tính của sản phẩm Ly-PRF.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là sợi huyết giàu tiểu cầu đông khô. Sợi huyết giàu tiểu cầu được chiết xuất từ máu toàn phần của tình nguyện viên.

10mL máu toàn phần được lấy từ một tình nguyện viên với các tiêu chí được liệt kê sau. Việc lựa chọn một tình nguyện viên sẽ cho kết quả thử nghiệm đồng nhất giữa các lần nghiên cứu và đảm bảo được tính ổn định của vật liệu.

Một tình nguyện viên trong độ tuổi 18-30 tuổi có

sức khỏe tốt tự nguyện đồng ý hiến máu phục vụ cho mục đích nghiên cứu (xác nhận bằng mẫu đồng ý tham gia nghiên cứu). Tiêu chuẩn chọn mẫu: Đối tượng tham gia nên có mức BMI trong khoảng bình thường, khỏe mạnh, không mang thai. Tiêu chuẩn loại trừ: người tham gia có nền tiểu đường hoặc nồng độ đường cao trong máu; bệnh nhân vừa bị đột quỵ hoặc tai biến mạch máu não trong vòng 6 tháng trước; hoặc những người tham gia mà cần có thêm sự theo dõi của các bác sĩ/điều dưỡng. Ngoài ra, người thực hiện đề tài cần loại trừ các đối tượng có các bệnh lây truyền qua đường máu như là, HIV, viêm gan siêu vi B, viêm gan siêu vi C, sốt rét, sốt xuất huyết,... hoặc các đối tượng có nguy cơ phơi nhiễm nghề nghiệp cao.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chế tạo sợi huyết giàu tiểu cầu

Để thực hiện các thí nghiệm trên máu, máu được sử dụng phải được lấy đúng kỹ thuật theo hướng dẫn của Bộ Y tế. Lượng máu được lấy không quá 20 mL/người cho mỗi lần lấy máu. Nghiên cứu được chấp thuận của Hội đồng Đạo đức trong Nghiên cứu Y sinh học của Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng theo mã số 31/PCR-HĐĐĐ-ĐT. Cho tới hiện nay, có rất nhiều quy trình lấy PRF tùy theo ứng dụng. Nghiên cứu này sử dụng quy trình A-PRF theo tác giả Choukroun [7].

- Bước 1: Máu tĩnh mạch được lấy trong ống thủy tinh 10mL, không có chất chống đông máu A-PRF (Bio-PRF, FL, USA) và ống nhựa 10mL

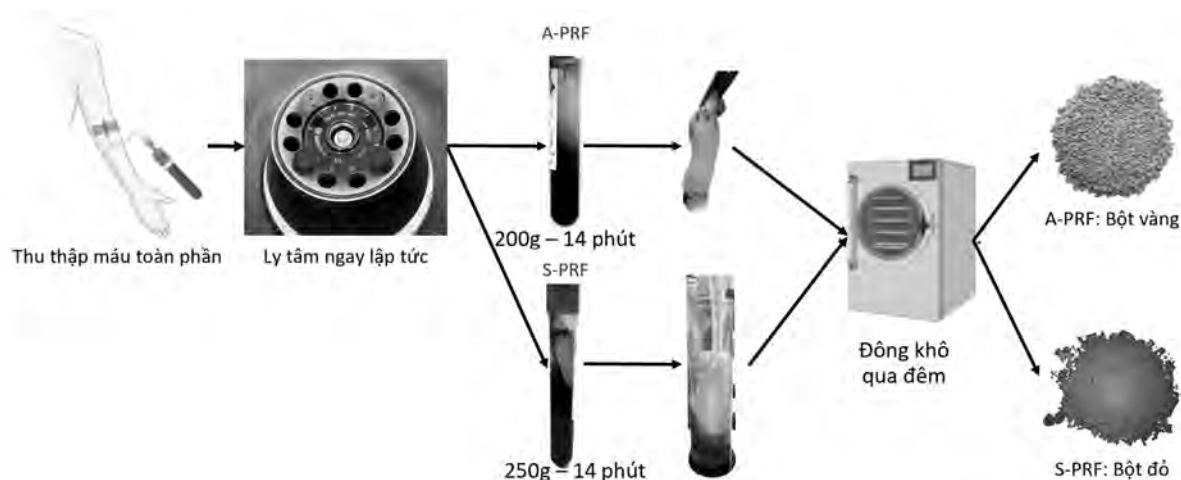
không có chất chống đông máu, không có gel và chất phụ gia S-PRF (Bio-PRF, FL, USA).

- Bước 2: Ống thủy tinh được lập tức ly tâm theo quy trình Choukroun [7], cụ thể là quy trình A-PRF với lực quay ly tâm là 250g trong 14 phút và S-PRF với lực quay ly tâm là 200g trong 14 phút.

- Bước 3: Đối với A-PRF: Sau khi ly tâm, máu được tách làm ba lớp: (1) lớp trong suốt, không có tế bào, (2) lớp giữa là lớp PRF, (3) lớp tế bào hồng cầu. Lớp giữa được lấy ra bằng kẹp vô trùng. Sử dụng kéo để tách chiết lớp hồng cầu ra khỏi PRF. Chuyển PRF vào ống Falcon vô trùng. Đối với S-PRF: Sau khi ly tâm, máu được tách thành hai lớp: (1) lớp huyết tương giàu tiểu cầu, (2) lớp hồng cầu. Lớp huyết tương giàu tiểu cầu gần lớp hồng cầu được lấy ra bằng pipette và chuyển vào ống Falcon vô trùng.

2.2.2. Phương pháp chế tạo sợi huyết giàu tiểu cầu đông khô

Phương pháp sấy đông khô là phương pháp loại bỏ nước trong vật liệu để bảo quản tính chất, kéo dài thời gian tuổi thọ và thời gian bảo quản. Phương pháp này là một quá trình trong đó nước được để ở dạng băng dưới áp suất thấp được loại bỏ khỏi vật liệu bằng cách thăng hoa. Phương pháp sấy đông khô được thực hiện bằng cách PRF được đông khô bằng cách trữ trong tủ đông -80°C qua đêm và đông khô bằng máy đông khô Labconca tại -51°C (Free Zone, Labconco, Kansas City, MO, USA) [8].



Hình 1. Quy trình chế tạo sợi huyết giàu tiểu cầu cải tiến đông khô (Ly-APRF) và sợi huyết giàu tiểu cầu chuẩn đông khô (Ly-SPRF)

2.2.3. Quan sát hình thái bề mặt cắt của cấu trúc Ly-PRF qua hình ảnh kính hiển vi điện tử quét

Kính hiển vi điện tử quét (SEM) được sử dụng để quan sát hình thái bề mặt cắt của cấu trúc Ly-APRF và Ly-SPRF. Mỗi mẫu được cắt ra để lộ diện cắt, sau đó, được phủ một lớp vàng mỏng bằng máy Smart Coater (JEOL, Nhật Bản) và quan sát bằng kính hiển vi JSMIT100 (JEOL, Nhật Bản) ở điện áp 15kV. Hình ảnh sau khi quét được phân tích bằng phần mềm ImageJ.

2.2.4. Xác định sự hiện diện của các nhóm chức Amide của Ly-APRF và Ly-SPRF bằng phương pháp phổ hồng ngoại biến đổi Fourier

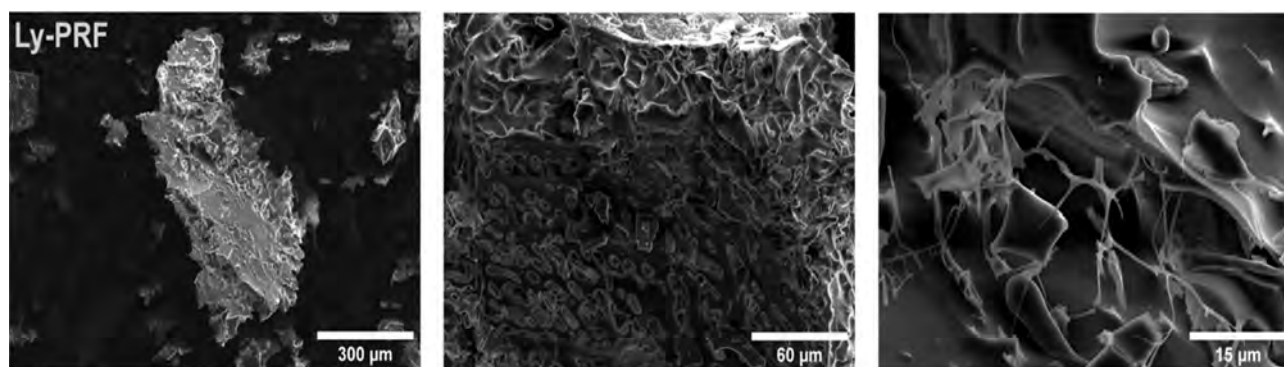
Kỹ thuật phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) được sử dụng để xác định sự hiện diện của các nhóm chức Amide và so sánh giữa các sản phẩm Ly-APRF và Ly-SPRF; Ly-APRF được lưu trữ ở nhiệt độ -20°C sau 1, 7 và 30 ngày. Các kết quả thu được qua máy quang phổ FTIR Vertex 70v (Bruker, USA) tại Trung tâm Nghiên cứu Vật liệu cấu trúc Nano và Phân tử (INOMAR, Việt Nam). Phép đo được thực hiện trên các mẫu đã được đông khô trong khoảng sóng từ $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$.

Kết quả FTIR được phân tích bằng phần mềm OriginPro (Originlab, Massachusetts, USA).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Sản phẩm sợi huyết giàu tiểu cầu đông khô được thu được dạng bột sau khi được đông khô. Bột Ly-APRF có màu vàng nhạt, Ly-SPRF có màu đỏ. Khối lượng PRF còn 20-30% sau khi đông khô so với khối lượng PRF tươi.

Hình ảnh SEM cho thấy cấu trúc vi mô và cấu trúc bề mặt của sản phẩm Ly-PRF. Ở độ phóng đại $\times 100$, cấu trúc Ly-PRF tồn tại ở những hạt tinh thể có kích thước từ $200\text{--}300\mu\text{m}$. Ly-PRF thể hiện cấu trúc xốp với các khoảng liên kết có kích thước khác nhau. Ngoài ra, các cấu trúc sợi tồn tại trên bề mặt thể hiện sự hiện diện của sợi huyết sau quy trình đông khô. Hình ảnh ở độ phóng đại $\times 500$ cho thấy tính không đồng nhất ở cấu trúc bề mặt Ly-PRF, có những vùng có mạng lưới sợi dày đặc và khoảng trống lớn hơn các vùng khác. Hình ảnh ở độ phóng đại $\times 1000$ xác nhận sự hiện diện của sợi huyết đan xen trong mạng lưới tinh thể trên bề mặt vật liệu



Hình 2. Hình ảnh SEM của Ly-PRF cho thấy cấu trúc sợi xen kẽ trong cấu trúc xốp liên kết. (SEM: độ phóng đại từ trái qua phải: $\times 100$, $\times 500$, $\times 1000$; hình ảnh từ Ly-SPRF)

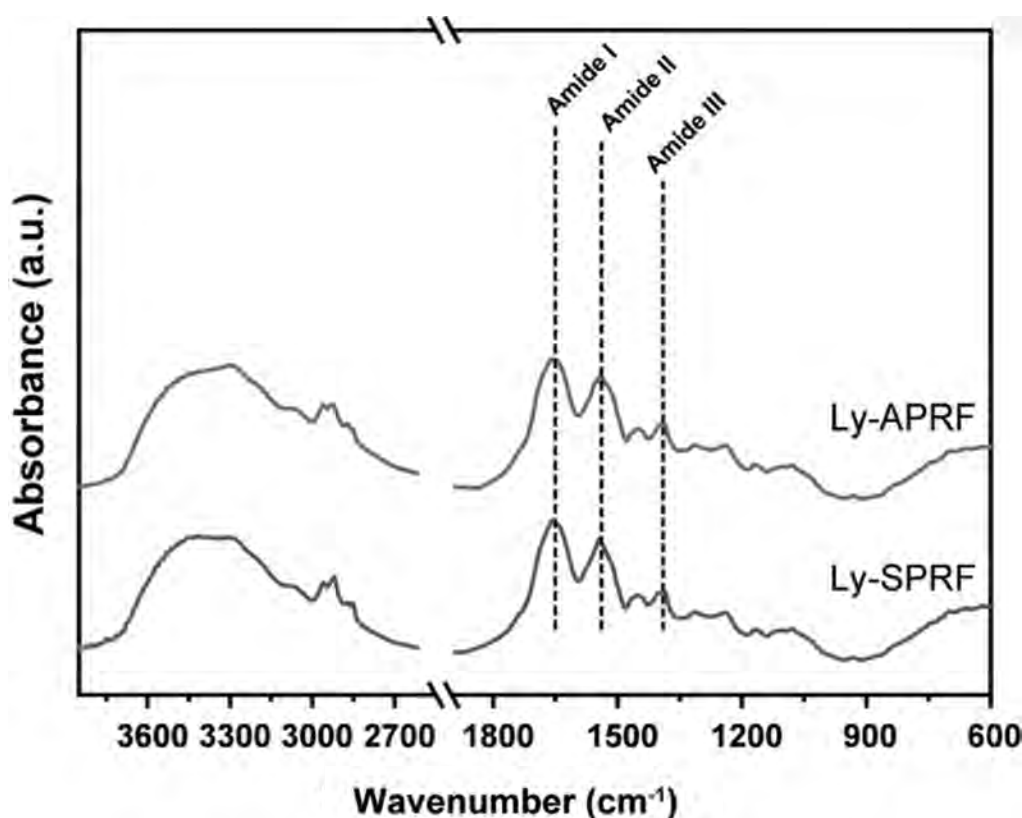
Phổ FTIR so sánh hai loại vật liệu là sợi huyết giàu tiểu cầu đông khô cải tiến (Ly-APRF) và sợi huyết giàu tiểu cầu đông khô chuẩn (Ly-SPRF). Phân tích cho thấy sự khác biệt nhỏ về cấu trúc hóa học giữa hai loại vật liệu. Dải Amide I, II và II đại diện cho các dao động trong protein từ đó gợi ý về sự khác biệt về hình dạng, vị trí và các biến đổi trong cấu trúc protein. Vùng phổ $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ cho thấy Ly-APRF có hàm lượng nước cao hơn Ly-

SPRF. Dải Amide I (khoảng 1650 cm^{-1}) thể hiện nhóm carbonyl (C=O) trong liên kết peptide, xuất hiện rõ ràng và gần như đồng nhất ở cả hai mẫu Ly-APRF và Ly-SPRF, cho thấy rằng hai loại vật liệu đều chứa hàm lượng protein đáng kể. Sự khác biệt của nhóm Amide I giữa hai mẫu không đáng kể. Dải Amide II (khoảng 1550 cm^{-1}) thể hiện dao động uốn của nhóm N-H và dao động kéo giãn của liên kết C-N trong liên kết peptide, và thể

hiện cấu trúc bậc hai của protein. Dải Amide II cũng xuất hiện rõ ràng ở cả hai mẫu phản ánh sự tương đồng về cường độ và thành phần cấu trúc. Dải Amide II (khoảng 1300cm^{-1}) là dải phổ phức tạp và là sự kết hợp của nhiều dao động khác nhau bao gồm dao động kéo giãn C-N và dao động uốn N-H. Tuy dải Amide III, thể hiện sự dao động kéo giãn của O-H và N-H, khó phân tích và phức tạp hơn dải Amide I và II, hai mẫu Ly-APRF và Ly-SPRF đều thể hiện đỉnh Amide III gần như tương đồng.

4. BÀN LUẬN

nguồn yếu tố tăng trưởng dồi dào như protein tạo hình xương (BMP), yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (PDGF), yếu tố tăng trưởng giống insulin-1 (IGF-1), yếu tố tăng trưởng chuyển đổi-1 (TGF-1), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) khiến sợi huyết giàu tiểu cầu PRF là một vật liệu tái tạo tiềm năng. Các yếu tố tăng trưởng này không những thúc đẩy quá trình lành thương mô mềm mà còn yếu tố quan trọng trong quá trình tái tạo xương.



Hình 3. Kết quả FTIR cho thấy ba nhóm Amide I, II và III khá tương đồng giữa hai mẫu Ly-APRF và Ly-SPRF

BMPs đóng vai trò then chốt trong quá trình biệt hóa tế bào gốc trung mô thành tế bào tạo xương, thúc đẩy quá trình hình thành xương mới và kích thích lành thương xương. PDGF kích thích sự tăng sinh và di chuyển của nguyên bào sợi, tế bào nội mô, và tế bào cơ trơn, góp phần hình thành mạch máu mới và tái tạo mô liên kết. IGF-1 thúc đẩy sự tăng trưởng và phát triển của tế bào, đồng thời tăng cường tổng hợp protein và DNA. TGF-1 điều hòa sự tăng sinh, biệt hóa và chức năng của nhiều loại tế bào, bao gồm tế bào miễn dịch,

nguyên bào sợi và tế bào tạo xương. VEGF kích thích hình thành mạch máu mới, cung cấp oxy và dưỡng chất cho mô đang tái tạo [2], [9]. Sự kết hợp hài hòa giữa các yếu tố tăng trưởng trong PRF khiến PRF là môi trường vi mô lý tưởng cho quá trình lành thương và tái tạo mô. PRF không chỉ cung cấp cấu tạo khung vững chắc cho sự phát triển của tế bào mà còn có khả năng giải phóng chậm các yếu tố tăng trưởng và duy trì trong thời gian nhất định. Tuy nhiên, PRF cũng có hạn chế như thời gian bán hủy ngắn [3] và khó

kiểm soát liều lượng các yếu tố tăng trưởng do sản phẩm PRF tươi là một thể hợp nhất. Do đó, kỹ thuật đông khô PRF được áp dụng để giải quyết các hạn chế này.

Phương pháp chế tạo PRF đã được nghiên cứu và bàn luận qua nhiều bài báo. Trong đó, theo Thanasrisuebwong và c.s[10], lớp PRF đỏ, gần với lớp hồng cầu, lưu giữ nhiều yếu tố tăng trưởng hơn lớp trên cùng. Điều này có thể được giải thích bởi trọng lượng tế bào và các yếu tố tăng trưởng lắng đọng trong quá trình ly tâm. Các tế bào tiểu cầu, vốn là nguồn dự trữ các yếu tố tăng trưởng có xu hướng tập trung ở giữa, trên lớp tế bào hồng cầu (nặng hơn tiểu cầu) và dưới lớp huyết thanh không tế bào (nhẹ hơn lớp tiểu cầu). Vì vậy, để tận dụng tối đa tiềm năng của các yếu tố tăng trưởng trong PRF, nghiên cứu này thực hiện lấy lớp giữa bao gồm một ít tế bào hồng cầu trong sản phẩm S-PRF. Mặc khác, A-PRF dễ thu thập hơn vì ở dạng gel mềm, có thể dễ dàng lấy ra bằng kẹp gấp và loại bỏ lớp hồng cầu bằng kéo. Tốc độ ly tâm, thời gian ly tâm cũng ảnh hưởng rất nhiều đến tính chất cơ học và hóa học của sản phẩm. Tuy nhiên, nghiên cứu này chỉ tập trung chế tạo dạng đông khô của hai sản phẩm PRF tươi nên sử dụng lực ly tâm và thời gian ly tâm theo quy trình Choukroun [2]. Lực ly tâm được sử dụng thay vì tốc độ ly tâm vì điều chỉnh phù hợp với máy ly tâm hiện có.

Đông khô, hay còn được gọi là sấy lạnh, là khử nước trong vật liệu thường được sử dụng để bảo quản các vật liệu có tính chất cơ học thấp, hoặc là phương pháp để vận chuyển vật liệu. Quá trình đông khô bao gồm đóng băng vật liệu, giảm áp suất và gia nhiệt để vật liệu thăng hoa. Quy trình đông khô đã được sử dụng rộng rãi trong ngành dược phẩm và công nghệ sinh học để bảo quản vắc-xin, dược phẩm, sản phẩm máu và mô [11]. Tuy nhiên, việc áp dụng và tối ưu hóa quy trình đông khô, đặc biệt cho sản phẩm PRF còn hạn chế. Quy trình đông khô được áp dụng trong nghiên cứu này tương đồng với quy trình Ly-PRF từ chó[12], chuột[13] và các nghiên cứu từ người đã thành công khác[4].

Kết quả thu được cho thấy các mẫu sợi huyết giàu tiểu cầu (PRF) sau quá trình đông khô đã chuyển

sang dạng bột mịn, có màu trắng ngà và cấu trúc đồng nhất. Quá trình đông khô đã loại bỏ hoàn toàn nước từ mẫu PRF, cho phép sản phẩm thu được có độ ổn định cao và dễ dàng bảo quản trong thời gian dài [4]. Bột PRF này có tính chất vật lý mịn, nhẹ, và không vón cục, dễ dàng xử lý trong các ứng dụng tiếp theo. Một điểm đáng chú ý là PRF dạng bột có khả năng hòa tan và tái phân tán nhanh chóng khi được ngâm vào dung dịch nước hoặc dung dịch muối sinh lý, cho phép nó dễ dàng được sử dụng trong các quy trình lâm sàng, đặc biệt là trong lĩnh vực tái tạo mô và lành vết thương[12], [13].

Cấu trúc vi thể của Ly-PRF dạng xốp qua hình ảnh SEM đóng vai trò then chốt của tính hiệu quả của vật liệu tái tạo. Tính xốp của cấu trúc làm tăng đáng kể diện tích bề mặt của vật liệu, tạo điều kiện cho sự bám dính và phát triển của tế bào, đặc biệt là nguyên bào sợi và nguyên bào xương [4]. Các lỗ xốp trong PRF cũng đóng vai trò tiềm năng để phát triển mạch máu mới, cung cấp oxy, nhất là với sự hiện diện của VEGF. Ngoài ra, cấu trúc xốp có khả năng giải phóng các yếu tố tăng trưởng có kiểm soát, đóng vai trò trong việc điều hòa sự tăng sinh, biệt hóa và di chuyển của tế bào [14]. Do đó, nghiên cứu này cho thấy quy trình đông khô PRF phù hợp để lưu giữ cấu trúc xốp của PRF, từ đó, lưu giữ được các ưu điểm của một vật liệu tái tạo tối ưu.

Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier là công cụ mạnh mẽ để phân tích và so sánh hai loại Ly-PRF là Ly-APRF và Ly-SPRF. FTIR cho kết quả các nhóm chức hóa học và phân tử đặc trưng của vật liệu. Nghiên cứu này cho thấy các nhóm chức xuất hiện mạnh mẽ trong cả hai vật liệu cho thấy sự tồn tại của cấu trúc protein sau khi đông khô. Sự biến đổi trong các dải Amide I, II và III cho thấy Ly-APRF và Ly-SPRF có cấu trúc bậc hai hơi khác nhau. Dải rộng hơn trong vùng $3000-3600\text{cm}^{-1}$ ở Ly-APRF cho thấy hàm lượng nước được giữ lại cao hơn. Điều này có thể giải thích do A-PRF tươi ở dạng gel với cấu trúc fibrin dày đặc, khác với tính chất dạng lỏng của S-PRF. Do đó, sự thăng hoa, hay quá trình đông khô loại bỏ nước ra khỏi một chất ở S-PRF đạt được dễ dàng hơn A-PRF. FTIR được sử dụng như phương pháp kiểm tra tính chất hóa học của

vật liệu. Kết quả FTIR của nghiên cứu tương đồng với kết quả của Anthraper và c.s [15]. Tuy nhiên, hạn chế của nghiên cứu này là chưa tìm ra được cách xác định tính chất hóa học của PRF tươi.

Việc chế tạo sản phẩm PRF dạng bột này cũng có tiềm năng ứng dụng rộng rãi nhờ tính linh hoạt trong việc kết hợp với các vật liệu sinh học khác để tạo ra các hệ thống giải phóng yếu tố tăng trưởng, nâng cao hiệu quả trong việc tái tạo mô và xương. Ly-PRF đã được nghiên cứu kết hợp với alginate và HA trong tái tạo mô tim [6], polydopamine và SiO₂ trong lành thương xương, alginate và chitosan trong lành thương mô mềm. Nghiên cứu về sự kết hợp Ly-PRF với các vật liệu khác có triển vọng lớn trong việc điều trị tái tạo ở các bệnh lý khác nhau và vùng khác nhau trên cơ thể.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này thành công trong việc chế tạo

PRF dạng đông khô (Ly-PRF) từ hai loại PRF tươi là A-PRF và S-PRF, mở ra hướng đi mới cho việc bảo quản, lưu trữ các thành phần yếu tố tăng trưởng của PRF, cũng như phát triển ứng dụng tiềm năng của Ly-PRF trong y học tái tạo. Ly-PRF dạng bột có độ ổn định cao, dễ bảo quản và sử dụng, đồng thời vẫn giữ được cấu trúc xốp và các protein quan trọng. Việc kết hợp Ly-PRF với các vật liệu sinh học khác hứa hẹn các giải pháp điều trị tiên tiến và hiệu quả cho các bệnh lý và các tổn thương mất chất khác nhau như xương, mô mềm, khớp, vết thương mạn tính,... Tuy nhiên, các nghiên cứu sâu hơn cần được thực hiện để đánh giá toàn diện về mặt phân tử tác động của Ly-PRF đến tế bào, động vật, và lâm sàng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng cấp kinh phí thực hiện dưới mã số đề tài GVTC17.57.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R. J. Miron *et al.*, "Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry?," *Clin. Oral Investig.*, vol. 21, no. 8, pp. 2619–2627, Nov. 2017, doi: 10.1007/s00784-017-2063-9.
- [2] D. M. Dohan *et al.*, "Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features," *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology*, vol. 101, no. 3, pp. e45–e50, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.tripleo.2005.07.009.
- [3] K. Isobe *et al.*, "Mechanical and degradation properties of advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), concentrated growth factors (CGF), and platelet-poor plasma-derived fibrin (PPTF)," *Int. J. Implant Dent.*, vol. 3, no. 1, p. 17, Dec. 2017, doi: 10.1186/s40729-017-0081-7.
- [4] Q. Li *et al.*, "Lyophilized Platelet-Rich Fibrin (PRF) Promotes Craniofacial Bone Regeneration through Runx2," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 5, pp. 8509–8525, May 2014, doi: 10.3390/ijms15058509.
- [5] R. Warin, P. Vongchan, W. Suriyasathaporn, R. Boripun, and W. Suriyasathaporn, "In Vitro Assessment of Lyophilized Advanced Platelet-Rich Fibrin from Dogs in Promotion of Growth Factor Release and Wound Healing," *Vet. Sci.*, vol. 9, no. 10, p. 566, Oct. 2022, doi: 10.3390/vetsci9100566.
- [6] F. Xu *et al.*, "Effects of incorporation of granule-lyophilized platelet-rich fibrin into polyvinyl alcohol hydrogel on wound healing," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 14042, Sep. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-32208-5.
- [7] D. M. Dohan *et al.*, "Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution," *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology*, vol. 101, no. 3, pp. e37–e44, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.tripleo.2005.07.008.
- [8] I. Andia, A. Perez-Valle, C. Del Amo, and N. Maffulli, "Freeze-Drying of Platelet-Rich Plasma: The Quest for Standardization," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 18, p. 6904, Sep. 2020, doi: 10.3390/ijms21186904.
- [9] S. Werner and R. Grose, "Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines," *Physiol. Rev.*, vol. 83, no. 3, pp. 835–870, Jul. 2003, doi: 10.1152/physrev.2003.83.3.835.

- [10] P. Thanasrisuebwong, S. Kiattavorncharoen, R. Surarit, C. Phruksaniyom, and N. Ruangsawasdi, "Red and Yellow Injectable Platelet-Rich Fibrin Demonstrated Differential Effects on Periodontal Ligament Stem Cell Proliferation, Migration, and Osteogenic Differentiation," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 14, p. 5153, Jul. 2020, doi: 10.3390/ijms21145153.
- [11] D. Nowak and E. Jakubczyk, "The Freeze-Drying of Foods—The Characteristic of the Process Course and the Effect of Its Parameters on the Physical Properties of Food Materials," *Foods*, vol. 9, no. 10, p. 1488, Oct. 2020, doi: 10.3390/foods9101488.
- [12] H. A. Shekho, I. A. Zedan, S. K. AL-Tae, and M. T. Annaz, "Evaluation the Effect and Efficacy of Autologous Lyophilized Advanced Platelet- Rich Fibrin on Full Thickness Wound Healing in Dogs," *Egypt. J. Vet. Sci.*, vol. 56, no. 6, pp. 1213–1223, Jun. 2025, doi: 10.21608/ejvs.2024.272361.1873.
- [13] M. H. Khanbazi, A. Bigham-Sadegh, A. Oryan, A. Meimandi-Parizi, and A. M. Jannesar, "The effects of allogeneic and xenogeneic lyophilized leukocyte-and platelet-rich fibrin on bone healing in rat," *Injury*, vol. 55, no. 3, p. 111396, Mar. 2024, doi: 10.1016/j.injury.2024.111396.
- [14] M. C. Socci *et al.*, "Polymeric Materials, Advances and Applications in Tissue Engineering: A Review," *Bioengineering*, vol. 10, no. 2, p. 218, Feb. 2023, doi: 10.3390/bioengineering10020218.
- [15] M. S. J. Anthraper, A. Chandramouli, S. Srinivasan, and J. Rangasamy, "Lyophilized platelet rich fibrin and gelatin incorporated bioadhesive bone cement composite for repair of mandibular continuity defects," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 258, Feb. 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.129086.

Fabrication of lyophilized platelet-rich fibrin

Thai Hoang Phuoc Thao, Doan Ngoc Hoan,
Le Minh Khoi and Nguyen Thi Hiep

ABSTRACT

Platelet-rich fibrin (PRF) is an autologous product extracted from whole blood and has been used as a regenerative material. The use of PRF is limited due to its rapid degradation and low mechanical stability. The objective of this study was to prepare lyophilized platelet-rich fibrin and determine its chemical properties after fabrication. Blood was drawn from a healthy volunteer with no history of systemic or infectious diseases for the preparation of A-PRF and S-PRF. 10 ml of whole blood was centrifuged at 250g for 14 minutes and 200g for 14 minutes, respectively. The PRF layer was collected and lyophilized by storing it at -80°C overnight and freeze-dried using a Labconco lyophilizer at -51°C for 12 hours. The lyophilized PRF samples (Ly-APRF and Ly-SPRF) were examined using scanning electron microscopy (SEM) and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). SEM images showed that the fibrin structure was preserved after the lyophilization process. FTIR revealed similar amide I, II, and III groups between PRF, Ly-APRF, and Ly-SPRF; and Ly-APRF after being stored for 1, 7, and 30 days. Lyophilization of PRF is a potential method to improve the properties and storage of this autologous material.

Keywords: platelet-rich fibrin, lyophilization, Ly-PRF

Received: 22/10/2024

Revised: 22/11/2024

Accepted for publication: 22/11/2024