

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



DƯƠNG ĐÌNH TOÀN

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG PHẪU THUẬT NỘI SOI
TẠO TỔN THƯƠNG DƯỚI SỤN VÀ GHÉP KHỐI TẾ
BÀO GỐC TỬY XƯƠNG TỰ THÂN TRONG ĐIỀU TRỊ
THOÁI KHÓA KHỚP GỐI**

Chuyên ngành : CHẨN THƯƠNG CHỈNH HÌNH VÀ TẠO HÌNH

Mã số : 62720129

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI – 2015

Công trình được hoàn thành tại:

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. ĐÀO XUÂN TÍCH

PGS.TS. NGUYỄN THỊ THU HÀ

Phản biện 1: PGS.TS. Trần Đình Chiến

Phản biện 2: PGS.TS. Nguyễn Văn Thạch

Phản biện 3: GS.TS. Phạm Quang Vinh

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội Đồng chấm luận án cấp Trường
tại: Đại học Y Hà Nội

Vào lúc.....giờ.....ngày.....tháng.....năm

Có thể tìm hiểu tại:

- Thư viện Quốc Gia
- Thư viện Đại Học Y Hà Nội
- Thư viện Thông tin Y học Trung ương

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Đặt vấn đề

Thoái hóa khớp gối (THKG) là bệnh thường gặp ở người có tuổi, hiện nay đang có xu hướng tăng ở lứa tuổi trung niên. Tổn thương đặc trưng của THKG là sự bong gãy, mất dần sụn khớp do mất cân bằng giữa quá trình tổng hợp và hủy hoại mô sụn. Sụn khớp bị tổn thương không có khả năng tự phục hồi do không có mạch nuôi, vì vậy điều trị nội khoa giai đoạn đầu chỉ là điều trị triệu chứng. Khi THKG đã bước sang giai đoạn trung bình và muộn, chỉ định thay khớp vốn là sự lựa chọn hàng đầu. Tuy nhiên, thay khớp là một phẫu thuật lớn, chi phí cao, tỷ lệ biến chứng nhiều, không phải tất cả bệnh nhân THKG đều có điều kiện để thay khớp. Mặt khác, bệnh nhân sau thay khớp phải đối mặt với những lần phẫu thuật thay lại (Revision) do khớp hết thời gian sử dụng, đặc biệt đối với bệnh nhân ở tuổi trung niên. Đứng trước thực tế này, nghiên cứu một phương pháp điều trị giúp bảo tồn khớp hoặc đẩy lùi được thời gian thay khớp đã trở nên cấp thiết đối với các nhà lâm sàng, và liệu pháp tế bào gốc (TBG) đã được tiến hành nghiên cứu. Trên thế giới, đã có nhiều nghiên cứu tiền lâm sàng cũng như thử nghiệm lâm sàng, đã chứng minh khả năng biệt hóa thành tế bào sụn của TBG, từ đó có thể ứng dụng cho điều trị bệnh THKG. Tại Việt Nam, cho tới nay, chưa có một nghiên cứu nào đề cập về vấn đề này, vì vậy chúng tôi tiến hành đề tài **“nghiên cứu ứng dụng phẫu thuật nội soi tạo tổn thương dưới sụn và ghép khối tế bào gốc tủy xương tự thân trong điều trị thoái hóa khớp gối”** với hai mục tiêu:

- 1- *Nghiên cứu đặc điểm một số chỉ số tế bào tủy xương và khối tế bào gốc tách từ dịch tủy xương của bệnh nhân thoái hóa khớp gối.*
- 2- *Đánh giá kết quả điều trị thoái hóa khớp gối bằng nội soi tạo tổn thương dưới sụn và ghép khối tế bào gốc tủy xương tự thân.*

2. Tính cấp thiết của luận án

Tại Việt Nam, cùng với sự phát triển đi lên của kinh tế xã hội, tuổi thọ trung bình của con người ngày càng tăng, theo đó tỷ người có tuổi và bị THKG cũng tăng theo. Mặt khác, tỷ lệ thừa cân béo phì ở giới trẻ cũng đang đà tăng lên, là yếu tố nguy cơ thúc đẩy tình trạng THKG xuất hiện sớm. Tại Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào về ứng dụng TBG điều trị THKG, do đó, một nghiên cứu ứng dụng TBG điều trị THKG nhằm thay thế hoặc đẩy lùi thời gian thay khớp đã trở nên cấp thiết.

3. Những đóng góp mới của luận án

Là công trình nghiên cứu đầu tiên được tiến hành tại Việt Nam về phương pháp điều trị THKG bằng nội soi tạo tổn thương dưới sụn và ghép khối TBG tủy xương tự thân

4. Bố cục của luận án

Luận án gồm 132 trang, bao gồm các phần: đặt vấn đề (3 trang), tổng quan (44 trang), đối tượng và phương pháp nghiên cứu (21 trang), kết quả nghiên cứu (22 trang), bàn luận (39 trang), kết luận (2 trang), kiến nghị (1 trang). Luận án có 26 bảng, 33 hình ảnh, 13 biểu đồ, 153 tài liệu tham khảo (tiếng Anh và tiếng Việt)

Chương 1: TỔNG QUAN

1.1. CẤU TRÚC VÀ CHỨC NĂNG SỤN KHỚP

1.1.1. Thành phần của sụn khớp: sụn khớp gồm tế bào sụn và chất căn bản. Trong chất căn bản có 10-20% Collagen typ II, 4-7% Proteoglycan, 65-80% là nước. Ngoài ra các thành phần khác như aggrecan, collagen type (V, VI, IX, X, XI), protein, hyaluronate, fibronectin, và lipid, chiếm <5%. Tế bào sụn là tế bào trung mô chuyên biệt cao, có vai trò tổng hợp nên chất căn bản.

1.1.2. Cấu trúc của sụn khớp: các thành phần cấu tạo nên sụn khớp được sắp xếp theo 4 lớp (vùng) từ nông đến sâu, gồm: lớp nông (vùng I), lớp giữa (vùng II), lớp sâu (vùng III) và vùng

canxi hóa (vùng IV). Vùng IV có vai trò như “mỏ neo” giữ chặt sụn vào lớp xương dưới sụn.

1.1.3. Vai trò của sụn khớp

- + Sụn có vai trò như lớp đệm bao bọc đầu xương của khớp, giúp khớp tránh được tổn thương do các lực va đập, lực nén.
- + Giảm ma sát giữa các thành phần của khớp
- + Phân phối đều lực tác động lên đầu xương, giúp đầu xương dưới sụn giảm thiểu lực tác động do trọng lượng cơ thể.

1.2. ĐẠI CƯƠNG VỀ BỆNH THOÁI HÓA KHỚP (THK)

1.2.1. Định nghĩa: THK là tình trạng suy giảm chức năng của sụn khớp, biểu hiện là sự mòn và rách dần sụn khớp, do hậu quả của sự mất cân bằng giữa hai quá trình tổng hợp và hủy hoại sụn và xương dưới sụn.

1.2.2. Chẩn đoán THKG: chẩn đoán THKG theo tiêu chuẩn của hội khớp học Hòa Kỳ (ACR) 1991:

Theo tiêu chuẩn lâm sàng: 1) đau khớp; 2) Lao xạo khi cử động gối; 3) Cứng khớp buổi sáng dưới 30 phút; 4) Tuổi ≥ 40 ; 5) Sờ thấy phì đại xương. Chẩn đoán xác định khi có các yếu tố 1, 2, 3, 4 hoặc 1, 4, 5.

Theo tiêu chuẩn lâm sàng và cận lâm sàng: 1) Đau khớp; 2) Gai xương ở rìa khớp trên XQ; 3) Dịch khớp là dịch thoái hóa; 4) Tuổi ≥ 40 ; 5) Cứng khớp buổi sáng dưới 30 phút; 6) Lực cục khi cử động khớp. Chẩn đoán xác định khi có các yếu tố 1, 2 hoặc 1, 3, 5, 6 hoặc 1, 4, 5, 6

1.2.3. Phân loại THKG

THKG tiên phát: Sự lão hóa là nguyên nhân chính.

THKG thứ phát: Thường là hậu quả sau chấn thương; sau các bệnh lý xương sụn

1.2.4. Phân độ THKG

Dựa trên tổn thương giải phẫu (Theo Outerbridge):

Độ 0: sụn khớp bình thường; *Độ I:* sụn khớp trở nên mềm hơn, phù nề và có thể đổi màu vàng; *Độ II:* khuyết một phần bề dày của sụn hoặc xuất hiện các vết nứt trên bề mặt sụn khớp; *Độ*

III: vết nứt của sụn sâu hơn nhưng ngang mức dưới sụn; *Độ IV*: mất hoàn toàn bề dày của sụn, lộ xương dưới sụn.

Dựa trên phim XQ: *Độ I*: khe khớp gần như bình thường, có thể có gai xương nhỏ; *Độ II*: khe khớp hẹp nhẹ, có gai xương nhỏ; *Độ III*: khe khớp hẹp rõ, có nhiều gai xương kích thước vừa, vài chỗ đặc xương dưới sụn, có thể có biến dạng đầu xương; *Độ IV*: khe khớp hẹp nhiều, gai xương kích thước lớn, đặc xương dưới sụn, biến dạng rõ đầu xương

Dựa trên cộng hưởng từ (CHT) theo Noyes: *Độ 0*: bờ sụn khớp bình thường; *Độ 1*: đường viền của sụn bình thường nhưng sụn tổn thương tăng tín hiệu; *Độ 2*: mặt sụn mòn hoặc loét <50% bề dày sụn; *Độ 3*: tổn thương phần lớn bề dày sụn, >50% nhưng <100%; *Độ 4*: tổn thương toàn bộ bề dày sụn

1.2.5. Điều trị THKG

Không dùng thuốc: bao gồm tập luyện giảm cân, vật lý trị liệu, đeo nẹp chỉnh hình...

Nội khoa: bao gồm thuốc chống viêm không steroid, steroid. Các thực phẩm chức năng hỗ trợ như glucosamine, chondroitin, UC2... Tiêm Dung dịch HA (Hyaluronic acid) hay Huyết tương giàu tiểu cầu (Plate rich plasma-PRP) cũng làm giảm đáng kể các triệu chứng của THKG

Ngoại khoa: chỉ định điều trị phẫu thuật được đặt ra khi điều trị nội khoa kết hợp vật lý trị liệu không còn mang lại hiệu quả. Những phẫu thuật can thiệp tối thiểu được ưu tiên thực hiện khi có chỉ định, ở giai đoạn đầu như nội soi làm sạch; tạo tổn thương dưới sụn; ghép tế bào sụn tự thân... Các phẫu thuật xâm lấn bao gồm đục xương chỉnh trục, thay khớp gối bán phần, toàn phần.

Tế bào gốc (TBG): với khả năng tự tái tạo và biệt hóa thành những tế bào chuyên biệt, đa dòng, nhiều nghiên cứu cơ bản trên động vật thực nghiệm đã chứng minh TBG có khả năng biệt hóa thành tế bào sụn. Trên người, các nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng và ứng dụng TBG điều trị THKG đã mang lại kết quả khả quan.

1.3. SƠ LƯỢC VỀ TẾ BÀO GỐC (TBG)

1.3.1. Khái niệm chung về TBG: TBG là thuật ngữ dùng để chỉ một loại tế bào đặc biệt, duy nhất có khả năng tự tái tạo mới và biệt hoá thành những tế bào chuyên biệt trong những điều kiện nhất định. TBG với những đặc tính đặc trưng của nó có thể có nguồn gốc từ phôi, bào thai hoặc cá thể trưởng thành.

1.3.2. Nguồn TBG sử dụng trong điều trị tái tạo mô, tổ chức

Hiện nay, các nguồn TBG chủ yếu sử dụng trong cấy ghép điều trị tái tạo mô, tổ chức gồm tuỷ xương, máu ngoại vi, máu cuống rốn và mô mỡ.

1.4. TỤY XƯƠNG VÀ TBG CỦA TỤY XƯƠNG

Tuỷ xương là khoảng được lấp đầy bởi các ống tuỷ của xương dài và trong các hốc của xương dẹt. Tuỷ xương được xem như bể chứa TBG của cơ thể. Tuỷ xương có 3 loại TBG nhưng hiện nay có hai loại được nghiên cứu và ứng dụng trên lâm sàng nhiều nhất là TBG tạo máu (hematopoietic stem cells-**HSC**) và TBG trung mô (mesenchymal stem cells-**MSC**):

1.4.1. HSC: có khả năng biệt hoá thành các tế bào của hệ thống miễn dịch và tuần hoàn, đảm nhiệm quá trình duy trì tái tạo máu hằng định. HSC được sử dụng trong ghép TBG tạo máu để điều trị một số bệnh máu như: leukemia, thalassemia, hỗ trợ điều trị ung thư bằng hóa chất, xạ trị liều cao... Các nghiên cứu gần đây đã đưa ra một khái niệm mới là HSC trong những hoàn cảnh thích hợp có thể tham gia tái tạo hoặc sửa chữa các cơ quan tổ chức khác không thuộc cơ quan tạo máu, ví dụ như mô xương, mô sụn... gọi là tính mềm dẻo của HSC. Hiện nay, phân tử CD34 là marker chủ yếu để xác định HSC.

1.4.2. MSC: là những tế bào đệm của tuỷ xương, có đặc tính của những TBG vạn năng, chúng được tìm thấy trong chất đệm của tuỷ xương không tạo máu. Ngoài tuỷ xương, MSC còn thấy ở cơ, rau thai, máu ngoại vi, mỡ... MSC có thể biệt hoá thành nhiều loại tế bào như nguyên bào xương, nguyên bào sụn, tế bào cơ tim, tế bào thần kinh... MSC của người thường được phân lập từ lớp tế bào đơn nhân của tuỷ xương. Có 3 tiêu

chuẩn tối thiểu xác định MSC của người : 1) khả năng bám dính vào bề mặt nhựa khi nuôi cấy, 2) biểu hiện những kháng nguyên bề mặt đặc hiệu và 3) khả năng biệt hóa in vitro thành osteoblasts, adipocytes, và chondroblasts.

1.5. ỨNG DỤNG TBG TRONG ĐIỀU TRỊ BỆNH THKG

Bằng các nghiên cứu thực nghiệm và thử nghiệm lâm sàng, người ta đã chứng minh: Tiêm TBG tự thân vào khớp là an toàn; có thể làm giảm triệu chứng đau trong bệnh lý THKG; làm chậm quá trình THKG; có khả năng tái tạo sụn khớp

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn

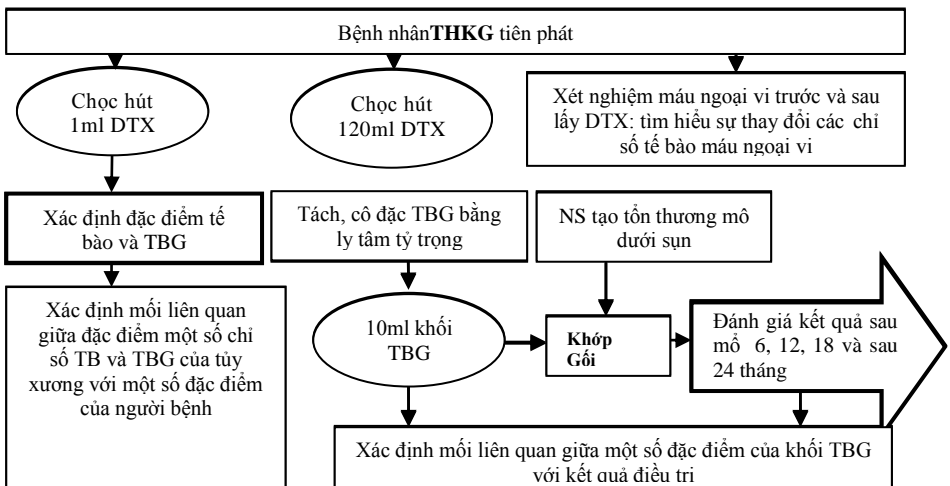
THKG tiên phát, được chẩn đoán theo tiêu chuẩn của ACR (1991), giai đoạn II và III (theo tiêu chuẩn của Kellgren-Lawrence). Tuổi từ 40-70. Không phân biệt nghề nghiệp, giới.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ: THKG thứ phát sau chấn thương; THKG tiên phát độ IV hoặc độ II và III nhưng kèm theo: Vẹo trục chi, mắc các bệnh viêm nhiễm, bệnh mạn tính khác

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu: mô tả tiến cứu, can thiệp lâm sàng, cắt ngang, có theo dõi dọc

Sơ đồ nghiên cứu:



2.2.2. Cỡ mẫu: cỡ mẫu thuận tiện, gồm 46 bệnh nhân

2.2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian nghiên cứu: từ tháng 11/2011-1/2015.

Địa điểm nghiên cứu: Viện Chấn thương Chính hình, Bệnh viện Việt Đức; khoa Huyết Học, khoa Chẩn đoán Hình ảnh, Bệnh viện Trung Ương Quân Đội 108.

2.2.4. Các chỉ tiêu nghiên cứu

- Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu
- Đặc điểm lâm sàng trước mổ
- Đặc điểm chẩn đoán hình ảnh trước mổ
- Đặc điểm tổn thương trong mổ
- Diễn biến trong mổ
- Đặc điểm số lượng tế bào gốc của tủy xương
- Đặc điểm khối tế bào gốc được tách từ dịch tủy xương
- Cải thiện lâm sàng (VAS, KOOS), phục hồi sụn trên CHT

2.2.5. Ý đức trong nghiên cứu: Tuân thủ đầy đủ các yêu cầu về đảm bảo đạo đức trong nghiên cứu

2.2.6. Các qui trình và kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

Chuẩn bị bệnh nhân

- Lựa chọn bệnh nhân theo tiêu chuẩn lựa chọn.
- Tất cả bệnh nhân đều được chụp phim CHT, chụp XQ khớp gối trước mổ và làm đầy đủ xét nghiệm thường qui.
- Đánh giá mức độ tổn thương sụn khớp dựa trên phim CHT 1.5 và 3.0 Testla theo Noyes
- Xác định thể tích sụn còn lại của một diện khớp có mức độ tổn thương sụn nặng nhất, bằng phần mềm Osiri, trên phim CHT 3.0Tesla Achieva của hãng Philips (Hà Lan). Diện khớp có tổn thương sụn nặng nhất được chọn để đo ở cả thời điểm trước và sau điều trị.

Qui trình kỹ thuật điều trị

Chọc hút dịch tủy xương và tách khối TBG:

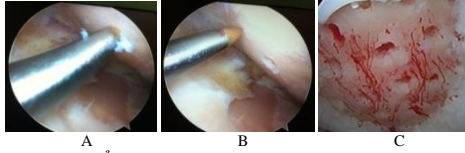
- Nơi thực hiện: chọc hút DTX được tiến hành tại phòng mổ Bệnh viện Việt Đức (do ê kíp bệnh viện Việt Đức phối hợp Bác sỹ, KTV khoa Huyết học bệnh viện TŨQĐ 108 thực hiện);

xử lý DTX, tách khối TBG được thực hiện tại khoa Huyết học Bệnh viện TWQĐ 108 (do ê kíp Bác sỹ, KTV khoa Huyết học bệnh viện TWQĐ 108 thực hiện). Quá trình thu gom được tiến hành trong điều kiện vô trùng tuyệt đối.

- Vị trí chọc hút DTX: mào chậu phía sau hai bên
- Thể tích DTX được thu gom: 120ml
- Tách khối TBG từ DTX theo phương pháp ly tâm gradient tỷ trọng, cô đặc trong 10ml.
- Bảo quản: khối TBG được bảo quản ở nhiệt độ phòng 20-22° trong 6 giờ đầu.
- Các xét nghiệm tế bào máu và tủy xương:
 - + *Huyết đồ và tủy đồ*: theo phương pháp tế bào học kinh điển kết hợp với phân tích tế bào bằng hệ thống phân tích huyết học tự động.
 - + *Xác định số lượng TBG tủy xương*:
 - *TBG tạo máu*: bằng phương pháp tế bào dòng chảy dựa vào các marker bề mặt đặc hiệu CD34(+) theo protocol của ISHAGE.
 - *TBG trung mô*: bằng kỹ thuật nuôi cấy tạo cụm CFU-F
 - + *Xác định tỷ lệ tế bào sống*: bằng phương pháp nhuộm xanh Trypan
 - Nuôi cấy khối TBG xác định nấm, vi khuẩn.

Nội soi tạo tổn thương dưới sụn:

- Tiến hành ngay sau khi chọc hút DTX, cùng một lần gây tê tủy sống.
- Thực hiện theo qui trình phẫu thuật nội soi khớp gối thông thường
- Làm sạch khớp, lấy bỏ các dị vật (mảnh sụn vỡ bong...)
- Xác định vị trí, kích thước (cm²), mức độ tổn thương sụn (theo Ourterbridge)
- Lấy bỏ phần sụn tổn thương mất vững, rửa khớp trước khi tạo tổn thương dưới sụn
- Dùng dùi tạo lỗ trên vùng khuyết sụn đã được xác định, các lỗ cách nhau 3-4mm, sâu 2-4mm (hình 2.1)



Hình 2.1. Tạo tổn thương dưới sụn khi đang ga rô (A,B);
sau tạo tổn thương dưới sụn và tháo ga-rô (C).

- Không đặt dẫn lưu sau mổ

Tiêm khối TBG vào khớp: Tiến hành tại phòng hồi tỉnh, bệnh viện Việt Đức, trong điều kiện vô trùng tuyệt đối

Điều trị và tập phục hồi chức năng sau mổ:

- Bệnh nhân về buồng điều trị, kê chân cao, chườm lạnh, kháng sinh, giảm phù nề trong 2-3 ngày đầu. Giảm đau trong tuần đầu

Chế độ tập luyện sau mổ: theo một protocol thống nhất

2.2.7. Đánh giá kết quả

Đánh giá kết quả gần: Trong thời gian nằm viện và từ khi ra viện đến lúc khám lại lần đầu (sau mổ 4 tuần), dựa theo: phản ứng toàn thân; diễn biến tại nơi lấy dịch tuỷ xương; diễn biến tại khớp gối; biên độ vận động chủ động của khớp gối. Mức độ đau gối sau mổ 4 tuần theo thang điểm VAS (Visual Analogue Scale)

Đánh giá kết quả xa: thời gian sau mổ 6, 12, 18 và sau 24 tháng: đánh giá tình trạng đau khớp gối theo VAS; đánh giá chức năng khớp gối sau mổ theo thang điểm KOOS (Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score); đánh giá phục hồi sụn khớp bằng phim chụp CHT (thay đổi điểm Noyes và thể tích sụn) trên máy CHT 1.5 và 3.0 Tesla.

2.2.8. Phương pháp thu thập thông tin, xử lý số liệu: Các kết quả nghiên cứu được phân tích và xử lý bằng thuật toán thống kê y học, sử dụng phần mềm Stata 12.0.

Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. ĐẶC ĐIỂM NHÓM ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Bảng 3.1. Phân bố bệnh theo tuổi, giới, nghề nghiệp

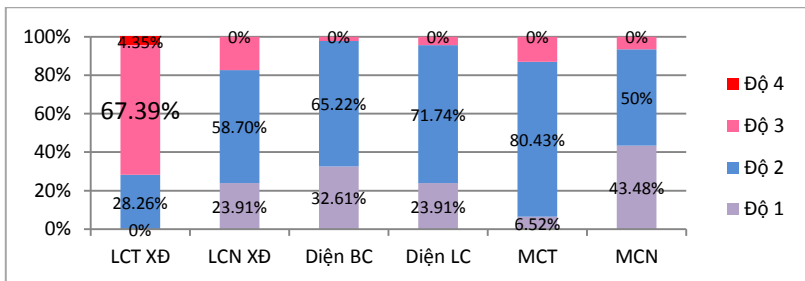
Đặc điểm đối tượng		n	%
Tuổi	40-49	8	17,4
	50-59	29	63,0
	60-70	9	19,6
Giới	Nam	15	32,6
	Nữ	31	67,4
Liên quan nghề nghiệp	Nông dân	25	54,3
	Công chức	21	45,7

Bảng 3.2. Phân bố bệnh nhân theo chỉ số BMI

Phân loại	BMI (kg/m ²)	n	%
Thiếu cân	<18.5	0	0
Bình thường	18.5 – 22.9	9	19,6
Thừa cân	23 – 24.9	21	45,7
Béo phì độ I	25 – 29.9	15	32,6
Béo phì độ II	≥30	1	2,2

Bảng 3.6. Phân bố bệnh nhân theo mức độ THKG

Mức độ THKG	n	%
Độ I	0	0,0
Độ II	9	19,6
Độ III	37	80,4
Độ IV	0	0,0



Biểu đồ 3.2. Phân bố mức độ tổn thương sụn trên CHT theo Noyes tại các diện khớp

Bảng 3.8. Mối liên quan giữa mức độ THKG với chỉ số BMI

Mức độ	BMI				Tổng		p
	< 25		≥ 25				
	n	%	n	%	n	%	
Độ II	7	23,33	2	12,50	9	19,57	>0,05
Độ III	23	76,67	14	87,50	37	80,43	
Tổng	30	100	16	100	46	100	

Bảng 3.10. Liên quan giữa mức độ THKG với nghề nghiệp

Mức độ THKG	Nghề nghiệp						p
	Công chức		Nông dân		Tổng		
	n	%	n	%	n	%	
Độ II	2	9,52	7	28,0	9	19,57	>0,05
Độ III	19	90,48	18	72,0	37	80,43	
Tổng	21	100	25	100	46	100	

Bảng 3.11. Liên quan giữa mức độ THKG với tuổi

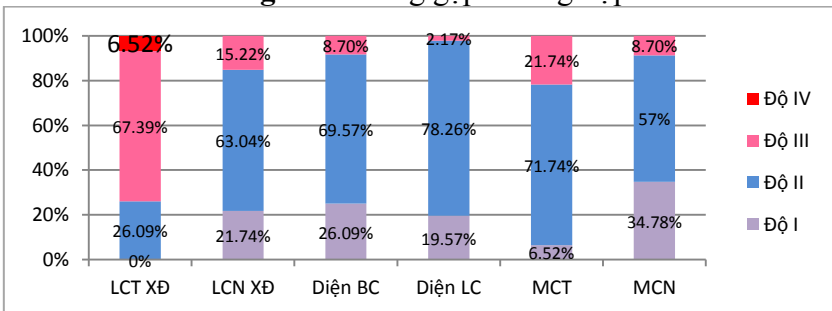
Mức độ THKG	Tuổi						p
	<55		≥55		Tổng		
	n	%	n	%	n	%	
Độ II	7	26,92	2	10,00	9	19,57	>0,05
Độ III	19	73,08	18	90,00	37	80,43	
Tổng	26	100	20	100	46	100	

3.2. DIỄN BIẾN TRONG MỖ

3.2.1. Thời gian lấy DTX: trung bình là: $11 \pm 1,66$ phút

3.2.2. Thời gian nội soi khớp: trung bình là: $44 \pm 3,09$ phút

3.2.3. Tai biến trong mổ: không gặp trường hợp nào



Biểu đồ 3.3. Phân bố tỷ lệ % về mức độ tổn thương sụn khớp trong mổ theo Outerbridge

Bảng 3.14. Các tổn thương phối hợp trong mô

		n	%
Sụn chêm	Bình thường	3	6,5
	Thoái hóa	40	87,0
	Rách	3	6,5
Dây chằng chéo	Bình thường	9	19,6
	Thoái hóa	37	80,4
Gai xương		28	60,9
Kén		4	8,7
Viêm bao hoạt dịch		23	50,0
Dị vật		39	84,8

3.2.4. Biến chứng trong mô: không gặp trường hợp nào có biến chứng trong mô.

3.3. ĐẶC ĐIỂM THÀNH PHẦN TẾ BÀO TỦY XƯƠNG

Bảng 3.16. Phân bố thành phần TB tuỷ xương (n=46)

Chỉ số TB	Đơn vị	Trung bình	Min	Max
SL TB có nhân	G/L	69,03 ± 49,86	20	255
SL TB CD34(+)	G/L	0,56 ± 0,93	0,07	5,73
Tỷ lệ TB CD34(+)	%	0,71 ± 0,78	0,24	5,07

Bảng 3.17. Phân bố TB tuỷ xương theo giới

Chỉ số TB	Đơn vị	Giới		p
		Nam (n=15)	Nữ (n=31)	
TB có nhân	G/L	71,68 ± 36,66	67,75 ± 55,64	>0,05
TB CD34(+)	G/L	0,50 ± 0,45	0,58 ± 0,11	>0,05
	%	0,64 ± 0,33	0,74 ± 0,92	>0,05

Bảng 3.18. Phân bố TB tuỷ xương theo tuổi

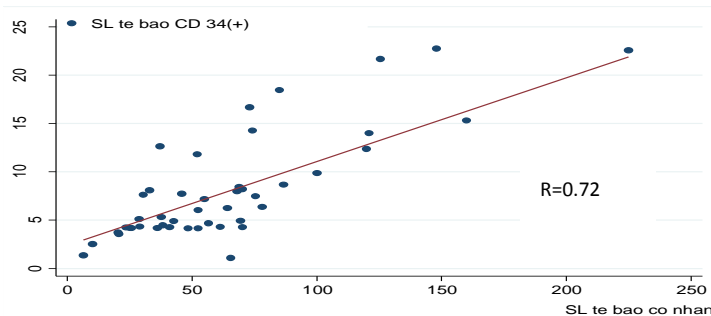
Chỉ số TB	Đơn vị	Nhóm tuổi		p
		≤ 55 (n=26)	>55(n=20)	
TB có nhân	G/L	77,28 ± 50,33	58,31 ± 48,37	>0,05
TB CD34(+)	G/L	0,52 ± 0,6	0,61 ± 0,13	>0,05
	%	0,61 ± 0,37	0,84 ± 1,1	>0,05

Bảng 3.19. Phân bố TB tủy xương theo bệnh lý phổi hợp

Chỉ số TB	Đơn vị	Bệnh lý phổi hợp		p
		Có (n=10)	Không (n=36)	
TB có nhân	G/L	62,24 ± 19,64	70,92 ± 55,50	>0,05
CD34(+)	G/L	34,38 ± 23,29	62,0 ± 104,18	>0,05
	%	0,55 ± 0,34	0,75 ± 0,86	>0,05

3.4. ĐẶC ĐIỂM KHỐI TBG TÁCH TỪ DỊCH TX**Bảng 3.20. Đặc điểm TB và TBG tạo máu (n=46)**

TB tủy xương	Đơn vị	Trung bình	Min	Max
SL TB có nhân	G/L	66,33 ± 46,12	6,4	225
SL TB đơn nhân	%	60,05 14,98	30,2	89,6
Tỷ lệ TB CD34(+)	%	1,44 ± 0,67	0,44	3,18
SL TB CD34(+)	10 ⁶	8,15 ± 5,5	1,1	22,78
SL tiểu cầu	G/L	468,26 ± 306,24	30	1300
Tỷ lệ TB sống	%	95,67 ± 1,33	93	99

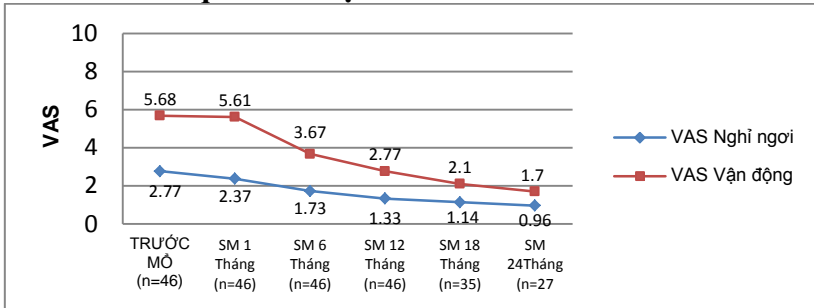
**Biểu đồ 3.6. Tương quan giữa số lượng tế bào CD34(+) với số lượng tế bào có nhân****Bảng 3.21. Số lượng TB tạo cụm CFU-F (n=41)**

	Trung bình	Min	Max
Cụm CFU-F/10 ⁶ TB	43,17 ± 25,23	7	140
Cụm CFU-F/ml	3336,83 ± 3996,59	283,9	22698
TB tạo cụm CFU-F được bơm vào khớp	33343,88 ± 39984,11	2838	226980

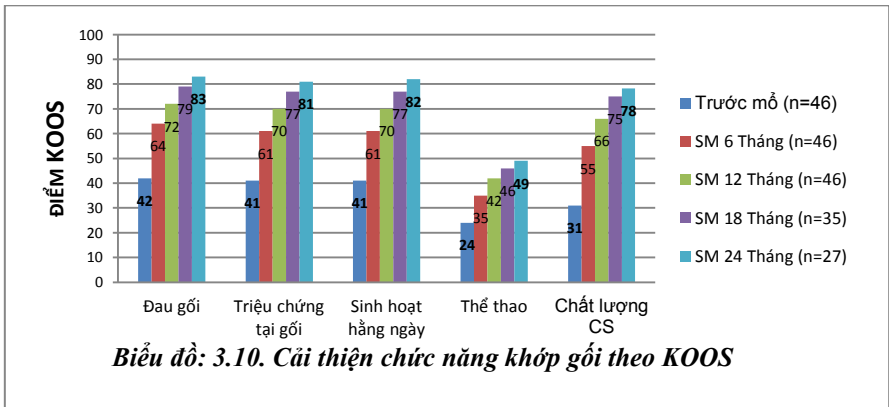
3.5. KẾT QUẢ ĐIỀU TRỊ

3.5.1. Biểu chứng: không có

3.5.2. Các kết quả điều trị:



Biểu đồ 3.9. Cải thiện tình trạng đau theo điểm VAS



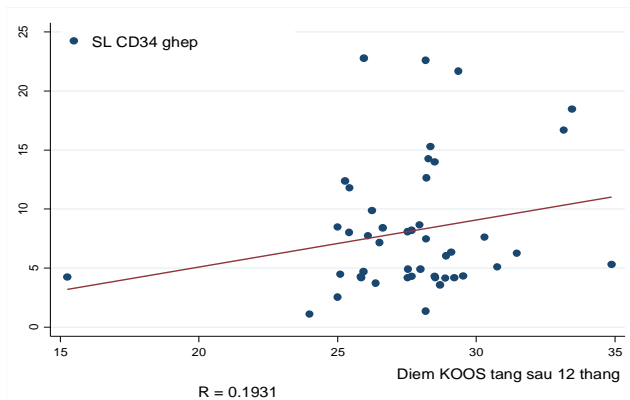
Biểu đồ: 3.10. Cải thiện chức năng khớp gối theo KOOS

Bảng 3.22. Điểm Noyes và thể tích sụn trước và sau mổ

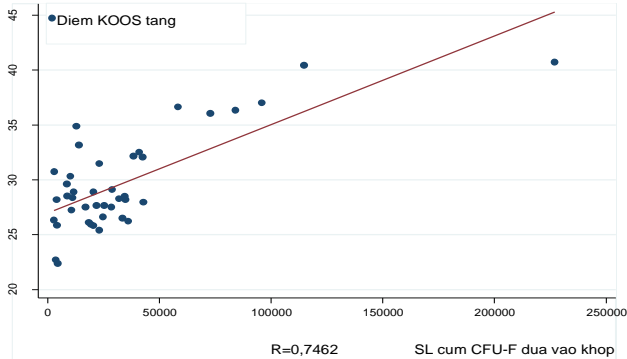
	Trước mổ	Sau mổ 12-24 tháng	P
Điểm Noyes trung bình	12 ± 1,46 (n = 46)	7 ± 1,50 (n = 36)	<0,001
Thể tích sụn TB (cm ³)	0,45 ± 0,2629 (n = 21)	0,55 ± 0,2901 (n = 21)	<0,001

Bảng 3.23. Liên quan giữa KOOS sau mổ 12 tháng với các đặc điểm giới, chỉ số BMI, mức độ thoái hóa khớp

Đặc điểm \ KOOS		Trước mổ (n=46)	Sau mổ 12 tháng (n=46)	Điểm KOOS tăng
Giới	Nữ	35 ± 2,97	63 ± 3,97	28 ± 2,25
	Nam	38 ± 2,68	65 ± 3,17	28 ± 2,41
	p	0,01	0,08	0,66
BMI	≤ 25	37 ± 3,01	64 ± 3,73	28 ± 2,46
	> 25	35 ± 2,94	63 ± 3,99	28 ± 1,94
	p	0,077	0,315	0,506
Mức độ	Độ II	39 ± 2,54	66 ± 2,82	28 ± 1,60
	Độ III	35 ± 2,88	63 ± 3,88	28 ± 2,43
	P	0,004	0,054	0,09



Biểu đồ 3.12. Biểu đồ tương quan giữa điểm KOOS tăng và số lượng tế bào CD34(+) được tìm vào khớp gối



Biểu đồ 3.13. Tương quan giữa điểm KOOS tăng và số lượng tế bào tạo cụm CFU-F được bơm vào khớp gối (n=41)

Chương 4: BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm một số chỉ số TB tủy xương và khối TBG tách từ DTX của bệnh nhân thoái hóa khớp gối

4.1.1. Đặc điểm số lượng TB của tủy xương

TBG là một loại tế bào duy nhất có cả hai khả năng đặc biệt: có thể tự tái tạo mới, sinh ra những tế bào giống hệt chúng và có thể biệt hoá thành các loại tế bào chuyên biệt trong những điều kiện nhất định. Tuy nhiên, TBG khá giống bạch cầu cả về hình dáng và một số tính chất khi nuôi cấy vì thế rất khó phân biệt và nhận ra chúng bằng hình thái học. Năm 1988, Weissman và cộng sự đã xác định được những marker bề mặt của TBG tạo máu ở chuột và năm 1992 đã phát hiện ra những marker tương tự của TBG tạo máu ở người. Hiện nay, phân tử CD34 trên bề mặt tế bào là một marker chủ yếu để xác định TBG tạo máu. Trong những tế bào CD34(+) này, người ta thấy có các tế bào gốc tạo sụn, tạo xương.

Bảng 3.16 cho thấy giá trị trung bình một số chỉ số tế bào của tủy xương đều nằm trong giới hạn bình thường của người Việt Nam trưởng thành. Khi so sánh kết quả nghiên cứu của chúng tôi với nghiên cứu của Nguyễn Mạnh Khánh, Nguyễn Thanh Bình và cộng sự thấy rằng, tỷ lệ và số lượng TBG tạo

máu trong tủy xương của chúng tôi có sự chênh lệch so với các tác giả (xem Bảng 4.1), điều này có thể được giải thích do sự khác nhau về một số đặc điểm đối tượng nghiên cứu như tuổi, mật bệnh, cỡ mẫu...

Bảng 4.1. So sánh kết quả nghiên cứu của chúng tôi với một số tác giả khác về số lượng, tỷ lệ tế bào CD34(+) của tủy xương

	Đơn vị	Nguyễn Mạnh Khánh (n=65)	Nguyễn Thanh Bình (n=112)	Chúng tôi (n=46)
Tế bào	G/L	$0,4 \pm 0,2$	$0,42 \pm 0,31$	$0,56 \pm 0,93$
CD34(+)	%	$0,6 \pm 0,2$	$0,66 \pm 0,27$	$0,71 \pm 0,78$

Nghiên cứu của Đỗ Trung Phần trên 79 người Việt nam trưởng thành cho thấy số lượng tế bào CD34(+) trung bình trong tủy xương là $1,22 \pm 0,79$ G/L. Tuy nhiên, phương pháp xác định tế bào CD34(+) của nghiên cứu này hoàn toàn khác với chúng tôi: sử dụng kỹ thuật huỳnh quang trực tiếp, đếm trên kính hiển vi huỳnh quang. Mặt khác, tỷ lệ và số lượng các tế bào tủy xương còn phụ thuộc và kỹ thuật chọc hút DTX.

Theo nhiều tác giả khi nghiên cứu về đặc điểm tế bào tủy xương, ngoài đếm trực tiếp số lượng tế bào CD34(+) trong tủy xương thì tế bào có nhân tủy xương cũng được xác định và phản ánh gián tiếp số lượng tế bào gốc tạo sụn. Theo Biểu đồ 3.6, số lượng tế bào CD34(+) tương quan tỷ lệ thuận với số lượng tế bào có nhân ($r = 0,72$, $P < 0,05$). Theo Đỗ Trung Phần, số lượng tế bào có nhân tủy xương của người Việt Nam trưởng thành trung bình $57,4 \pm 15,5$ G/L. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi (Bảng 3.16) phù hợp với các nghiên cứu khác.

4.1.2. Đặc điểm thành phần tế bào và chất lượng khối TBG tách từ DTX

Sau quy trình chiết tách cô đặc, khối tế bào đơn nhân giàu TBG (được gọi là khối TBG) của tủy xương được huyền dịch trong 10 ml huyết thanh mặn đẳng trương và được bơm vào khớp gối trong vòng 1-2 giờ. Trước khi ghép cho bệnh nhân, khối TBG được lấy mẫu để cấy khuẩn, cấy nấm. Kết quả 100%

các mẫu khối TBG đều âm tính, chứng tỏ các qui trình thu gom DTX, qui trình xử lý chiết tách cô đặc khối TBG được đảm bảo vô khuẩn tuyệt đối, và khối TBG được bơm vào khớp gối đảm bảo an toàn về mặt vi khuẩn học. Valérie Gangji và cộng sự (2004) báo cáo có 1/10 trường hợp khối TBGTX nuôi cấy vi khuẩn dương tính với coagulase-negative staphylococci. Các nghiên cứu của Nguyễn Mạnh Khánh, Nguyễn Thanh Bình, không có trường hợp nào nhiễm khuẩn tại vị trí ghép TBG được ghi nhận.

Thành phần TBG tạo máu và TBG trung mô trong khối TBG

Gần đây, người ta đã phát hiện ra khả năng biệt hóa “mềm dẻo” của TBG tạo máu, đó là khả năng chuyển biệt hóa (transdifferentiation), nhờ đó các nghiên cứu ứng dụng TBG tạo máu trong điều trị tái tạo các cơ quan tổ chức rắn bắt đầu được tiến hành. Khả năng chuyển biệt hóa của TBG tạo máu thành các tế bào có nguồn gốc khác nhau như tế bào thần kinh, cơ tim, xương, sụn khớp đã được chứng minh... Wakini và cộng sự đã chứng minh rằng trong quần thể tế bào chọn lọc CD34(+) từ tủy xương rất giàu các tế bào tiền thân chondroblast và những tế bào tiền thân này có thể biệt hóa trong môi trường nuôi cấy thành các chondroblast với đầy đủ chức năng của tiền thân tế bào sụn. Do đó, xác định số lượng TBG tạo máu trong khối TBG ghép vào vị trí tổn thương là cần thiết, góp phần chứng minh hiệu quả của phương pháp điều trị này. Để xác định số lượng các TBG tạo máu trong khối TBG chúng tôi sử dụng phương pháp đếm số lượng tế bào CD34(+).

TBG trung mô (MSC) dưới các tác động kích thích của các yếu tố tăng trưởng, có thể biệt hóa thành các tế bào có nguồn gốc trung mô, trong đó có tế bào sụn khớp. Thành phần TBG trung mô được chúng tôi xác định bằng nuôi cấy cụm, theo đó mỗi TBG trung mô sau nuôi cấy trong 2 tuần sẽ mọc một cụm CFU-F. Dựa vào số cụm CFU-F để xác định được số TBG trung mô được bơm vào khớp gối. Đối chiếu kết quả nghiên cứu của chúng tôi với các tác giả Nguyễn Mạnh Khánh,

Nguyễn Thái Bình và cộng sự thấy rằng tỷ lệ tế bào CD34(+), số cụm CFU-F/10⁶ tế bào của khối TBG là tương đương. Số cụm CFU-F/ml khối TBG của chúng tôi (xem Bảng 3.21) gấp gần 3 lần so với Nguyễn Thanh Bình và Nguyễn Mạnh Khánh, được lý giải vì thể tích cô đặc khối TBG của chúng tôi là 10ml, trong khi đó thể tích cô đặc khối TBG của Nguyễn Thanh Bình và Nguyễn Mạnh Khánh là 30ml. Liên quan giữa số lượng tế bào tạo cụm CFU-F và tuổi, cho thấy, số cụm CFU-F có xu hướng tương quan tỷ lệ nghịch với tuổi bệnh nhân, tuy nhiên mối tương quan này không chặt chẽ ($r = -0,06$), kết quả này phù hợp với các nghiên cứu khác.

4.2. Vai trò của phẫu thuật nội soi tạo tổn thương dưới sụn

Nghiên cứu về phương pháp ghép TBG để tái tạo sụn khớp, các tác giả nhận thấy rằng quá trình tăng sinh, biệt hóa và di chuyển của TBG phụ thuộc vào các cytokine, các yếu tố tăng trưởng (GF) và chất nền (chất đệm) mà TBG có thể gắn vào. Các chất đệm ở đây có thể là khối fibrin, hydrogen, chất đệm ngoại bào (ECM) hoặc giá đỡ sinh học (scaffold). Tiêu cầu chứa các protein là các các yếu tố tăng trưởng có vai trò hoạt hóa hoạt động của TBG, thúc đẩy quá trình liên kết thương, bao gồm VEGF (platelet derived growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor) và TGF (transforming growth factor). Trong nghiên cứu của chúng tôi, TBG được hoạt hóa bởi tiêu cầu tại chỗ (tạo tổn thương mới) và tiêu cầu có trong khối TBGTX, với số lượng trung bình $468,26 \pm 306,24$ G/L (Bảng 3.20). Nội soi tạo tổn thương dưới sụn là tạo một tổn thương mới tại vùng khuyết sụn, một mặt làm xuất hiện các yếu tố hoạt hóa, điều biến đối với hoạt động di chuyển, tăng sinh, biệt hóa của TBG, mặt khác tạo ra khối giá đỡ sinh học cho TBG bám dính, chính là mạng lưới fibrin được hình thành tại các vùng dưới sụn vừa tạo tổn thương sau khi cục huyết khối tan. Ngoài ra, nội soi khớp gối còn cho phép “làm sạch” khớp gối, lấy bỏ các dị vật khớp là các mảnh sụn khớp bong gãy rơi vào khớp gây phản ứng viêm, rửa sạch các

cytokine gây viêm. Những phần sụn khớp tổn thương mất vững được lấy bỏ. Quá trình này tạo hiệu quả cải thiện lâm sàng trong giai đoạn đầu.

4.3. Kết quả điều trị

Diễn biến sau mổ, không có trường hợp nào bị các biến chứng như tụ máu, chảy máu tại vị trí lấy DTX, hay nhiễm trùng tại khớp gối. Kết quả này tương tự các thông báo của các nghiên cứu khác. Mặc dù trong nghiên cứu của chúng tôi có 10 bệnh nhân (21,73%) có bệnh phối hợp, chủ yếu là bệnh tăng huyết áp (6 bệnh nhân) và đái tháo đường typ II (4 bệnh nhân), tuy nhiên những bệnh nhân này đã được điều trị nội khoa ổn định nên không ảnh hưởng đến kết quả điều trị. Mặt khác trong quá trình lựa chọn bệnh nhân, chúng tôi đã loại trừ những bệnh nhân có bệnh lý viêm nhiễm toàn thân hoặc tại chỗ, bệnh nhân có bệnh lý mạn tính làm suy giảm sức đề kháng. Đặc biệt trong tất cả các khâu của qui trình từ chọc hút lấy DTX, tách chiết khối TBG, nội soi khớp và tiêm TBG vào khớp gối đều đảm bảo vô trùng tuyệt đối. Khối TBG trước khi tiêm vào khớp chúng tôi đều cho cấy khuẩn, cấy nấm. Thời gian chọc hút DTX và nội soi khớp kéo dài đều là yếu tố nguy cơ nhiễm trùng. Trong nghiên cứu của chúng tôi, thời gian lấy DTX trung bình 11,17 phút, thời gian nội soi khớp gối trung bình 43,72 phút, so với các nghiên cứu khác, thời gian của chúng tôi đã rút ngắn hơn một phần vì thể tích DTX cần lấy của chúng tôi ít hơn. Diễn biến sau tiêm TBG vào khớp, chúng tôi không gặp trường hợp nào bị phản ứng toàn thân hoặc tại chỗ sau tiêm. Đây cũng là một ưu điểm của ghép khối TBGTX tự thân do tránh được các nguy cơ của phản ứng thải ghép. Mặt khác, tiêm khối TBGTX vào khớp phần nào an toàn hơn tiêm vào tổ chức trong cấy ghép ở các cơ quan khác của cơ thể.

Thời gian đánh giá kết quả xa sau mổ gần nhất là 12 tháng (100%), xa nhất là trên 24 tháng (58,7%), thấy rằng không có bệnh nhân nào có dấu hiệu đau hay bất kỳ một than phiền nào tại vị trí lấy DTX cũng như tại vết mổ nội soi khớp gối.

Nguyễn Mạnh Khánh, Nguyễn Thanh Bình ghi nhận kết quả tương tự sau khi lấy DTX trên 65 và 112 bệnh nhân. Cao Thi chỉ gặp 1/29 trường hợp đau tại chỗ lấy tủy, giảm dần và hết sau hai tuần. Các biểu hiện như nhiễm trùng, viêm rò, xơ dính hay u cục tại khớp gối, chúng tôi không ghi nhận trường hợp nào. Hai vết sẹo mô nhỏ vài milimet không ảnh hưởng đến chức năng và thẩm mỹ của khớp. Kết quả của chúng tôi tương tự các nghiên cứu của Kevin, Centeno, Davatchi. Như vậy, có thể khẳng định nội soi tạo tổn thương dưới sụn và ghép khối TBGTX điều trị THKG là phương pháp an toàn và ít xâm lấn.

Tình trạng đau gối ở trạng thái nghỉ ngơi được cải thiện sớm sau mổ 1 tháng, với điểm VAS trung bình từ 2,77 xuống 2,37 ($p < 0,05$). Ở trạng thái vận động, sau mổ 1 tháng, điểm VAS giảm không đáng kể, từ 5,68 xuống 5,61 ($p > 0,05$). Dấu hiệu đau gối ở trạng thái nghỉ ngơi được cải thiện sớm sau mổ có thể do vai trò của rửa khớp qua nội soi. Trong nghiên cứu của chúng tôi, bệnh nhân có dị vật khớp gối chiếm 84,8 %, gai xương chiếm 60,9% và viêm bao hoạt dịch chiếm 50%. Từ tháng thứ 6 sau mổ, tình trạng đau gối được cải thiện rõ rệt so với trước mổ ở cả hai trạng thái vận động và nghỉ ngơi. Tại các thời điểm đánh giá sau mổ 6, 12, 18 và sau 24 tháng, điểm VAS đều giảm có ý nghĩa ($p < 0,05$) (xem Biểu đồ 3.9). Theo nghiên cứu của Shapiro và cộng sự, nếu nội soi tạo tổn thương sụn đơn thuần, sau 12 tháng, sụn mới phục hồi (sụn xơ) bắt đầu thoái hóa và mất tính bền vững về cơ học, phù hợp với thực tế lâm sàng, ở thời điểm này, tình trạng đau gối đã xuất hiện trở lại. Trong nghiên cứu của chúng tôi, đau gối tiếp tục được cải thiện sau 12 tháng theo dõi cho thấy vai trò của TBG trong phục hồi sụn tổn thương bằng sụn bền vững.

Đánh giá chức năng khớp gối, chúng tôi sử dụng thang điểm KOOS, theo đó điểm KOOS càng tăng chức năng khớp gối càng được cải thiện. Điểm KOOS trung bình chung tăng theo thời gian, trong đó tăng mạnh nhất sau mổ 6 tháng ($p < 0,001$), các thời điểm sau mổ 12, 18 và sau 24 tháng điểm

KOOS tiếp tục tăng ($p < 0,01$). Khi xét riêng rẽ từng biểu hiện chức năng khớp gối, các điểm số đều tăng ở mức có ý nghĩa, trong đó mức độ cải thiện chậm nhất là khả năng chơi thể thao. Các biểu hiện khác, mức độ cải thiện khá dĩ hơn (xem Biểu đồ 3.10). Chất lượng cuộc sống (CLCS) được đánh giá trước mổ có điểm số trung bình khá thấp là $31 \pm 3,95$, điều này cho thấy bệnh THKG ở giai đoạn II và III đã ảnh hưởng lớn đến CLCS của người bệnh. Sau mổ 6 tháng điểm CLCS tăng lên $55 \pm 5,15$ sau đó tiếp tục tăng cùng với mức độ cải thiện tăng dần của chức năng khớp gối. Tuy vậy, đánh giá ở thời điểm sau mổ sau 24 tháng (27 bệnh nhân), điểm số về CLCS vẫn chỉ dừng ở mức $78 \pm 4,01 / 100$ điểm, có nghĩa sự hài lòng của người bệnh chưa đạt mức cao nhất. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các nghiên cứu của Emadedin (2012), Kevin (2012) và Emérito (2014). Liên quan giữa số lượng tế bào CD34(+) (tế bào gốc tạo máu) và số lượng tế bào tạo cụm CFU-F (tế bào gốc trung mô) tiêm vào khớp gối với kết quả cải thiện lâm sàng sau mổ 12 tháng thấy rằng, số lượng tế bào CD34(+) và số lượng cụm CFU-F có tương quan tỷ lệ thuận với số điểm KOOS tăng (Biểu đồ 3.12 và 3.13), nghĩa là số lượng TBG tạo máu và TBG trung mô càng tăng, mức độ cải thiện lâm sàng càng cao, trong đó mối tương quan giữa điểm KOOS với TBG trung mô là tương quan chặt chẽ, với $r = 0,75$, $p < 0,05$. Điều này cho thấy, TBG trung mô và TBG tạo máu có vai trò trong cải thiện chức năng khớp gối.

Đánh giá khả năng và mức độ phục hồi sụn khớp trên phim chụp CHT khớp gối, theo hệ thống phân độ và tính điểm của Noyes, và bằng phương pháp đo thể tích sụn trên phần mềm OsiriX, thấy rằng trước mổ điểm Noyes trung bình là $12 \pm 1,46$ điểm, thể tích sụn trung bình đo được tại một diện khớp có mức độ tổn thương sụn nặng nhất là $0,45 \pm 0,2629 \text{ cm}^3$. Sau mổ 12 - 24 tháng, điểm Noyes trung bình giảm xuống là $7 \pm 1,50$ điểm, thể tích sụn đo được trung bình là $0,55 \pm 0,2961 \text{ cm}^3$, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$ (xem

Bảng 3.22). Kết quả này cho thấy có sự phục hồi bề dày sụn khớp tại vị trí tổn thương sau điều trị. Tuy nhiên cách đánh giá trên phim CHT bằng thang điểm Noyes và đo thể tích sụn mới chỉ dừng lại ở đánh giá hình thái (thay đổi bề dày sụn khớp), mà chưa đánh giá được đầy đủ cấu trúc sinh học của sụn mới. Để đánh giá đầy đủ cấu trúc sinh học của sụn mới, bệnh nhân phải được chụp CHT có tiêm gadolinium trì hoãn (delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage (dGEMRIC)), với chuỗi xung T1 ρ sẽ nhận biết được độ tập trung của glycosaminoglycan, với chuỗi xung T2 sẽ nhận biết được thành phần collagen. Đây là 2 trong những thành phần chính cấu tạo nên sụn khớp do tế bào sụn tổng hợp nên. Trong nghiên cứu này chúng tôi không thể sử dụng dGEMRIC để đánh giá cấu trúc sụn mới vì thời gian khảo sát cho mỗi bệnh nhân kéo dài nhiều giờ, hơn nữa phương pháp chụp chưa được áp dụng phổ biến ở Việt Nam.

KẾT LUẬN

1. Đặc điểm một số chỉ số TB tủy xương và khối TBG tách từ DTX của 46 bệnh nhân thoái hóa khớp gối.

- Trong tủy xương: số lượng TB có nhân trung bình là $69,03 \pm 49,86$ G/L, số lượng TBG CD34(+) trung bình là $0,56 \pm 0,93$ G/L, tỷ lệ TBG CD34(+) trung bình chiếm $0,71 \pm 0,78\%$.

- Số lượng TB đơn nhân tương quan tỷ lệ nghịch với tuổi bệnh nhân. Số lượng và tỷ lệ TB CD34(+) không có sự khác biệt giữa hai nhóm trên và dưới 55 tuổi. Trong khối TBG tủy xương sau tách, tỷ lệ TBG CD34(+) tăng so với trước khi tách, chiếm $1,44 \pm 0,67\%$. Có mối tương quan tỷ lệ thuận giữa số lượng TB CD34(+) và số lượng TB có nhân ($r = 0,72, p < 0,05$).

- Số lượng cụm CFU-F thu được khi nuôi cấy từ 1×10^6 TB trong khối TBG tủy xương trung bình là $43,17 \pm 25,23$ cụm, số lượng TB tạo cụm CFU-F được tiêm vào khớp gối trung bình là 33343,88 (2838-226980) cụm.

2. Kết quả điều trị .

- Đây là một phương pháp điều trị ít xâm lấn, phục hồi sụn khớp, an toàn, không gặp các biến chứng.

- Tình trạng đau gối ở trạng thái nghỉ ngơi được cải thiện sớm sau mổ 1 tháng. Đánh giá tại các thời điểm sau mổ 6, 12, 18 và 24 tháng, mức độ đau gối đều giảm.

- Chức năng khớp gối được cải thiện rõ rệt sau mổ, thể hiện điểm KOOS trung bình chung từ 36,34 trước mổ, tăng lên 74,62 sau mổ sau 24 tháng.

- Mức độ cải thiện chức năng khớp gối tỷ lệ thuận với số lượng TBG trung mô tiêm vào khớp gối.

- Bề dày sụn khớp sau mổ được phục hồi, thể hiện trên phim CHT sau mổ 12-24 tháng, điểm Noyes trước mổ trung bình là $12 \pm 1,46$ điểm, sau mổ 12-24 tháng, điểm Noyes trung bình giảm còn $7 \pm 1,50$ điểm. Thể tích sụn tăng từ trung bình $0,45 \pm 0,2629 \text{ cm}^3$ trước mổ, lên trung bình $0,55 \pm 0,2901 \text{ cm}^3$ sau mổ 12-24 tháng.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Dương Đình Toàn, Đào Xuân Tích, Nguyễn Xuân Thùy (2013), “Kết quả bước đầu điều trị thoái hóa khớp gối bằng nội soi tạo tổn thương dưới sụn và ghép khối tế bào gốc tủy xương tự thân”, *Tạp chí Nghiên cứu Y Học*, 83 (3), tr. 122-129.
2. Tống Thị Thu Hằng, Lâm Khánh, Dương Đình Toàn, (2014), “Nghiên cứu đặc điểm hình ảnh cộng hưởng từ tổn thương sụn khớp trong thoái hóa khớp gối và dùng phần mềm OsiriX để lượng hóa tổn thương”, *Tạp chí Y Dược học lâm sàng 108*, số Đặc biệt, tr. 202-207.
3. Dương Đình Toàn, Đào Xuân Tích, Nguyễn Thị Thu Hà (2015), “Nghiên cứu hiệu quả sử dụng tế bào gốc tủy xương tự thân kết hợp nội soi tạo tổn thương dưới sụn điều trị thoái hóa khớp gối”, *Tạp chí Y Học*, số Đặc biệt, tr. 207-217.

MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING MINISTRY OF HEALTH

HANOI MEDICAL UNIVERSITY

DUONG DINH TOAN

**APPLIED RESEARCH ON USING ARTHROSCOPIC
MICROFRACTURE AND TRANSPLANTATION OF
AUTOLOGOUS BONE MARROW STEM CELL IN
TREATMENT OF KNEE OSTEOATHRITIS**

Field of study : ORTHOPAEDICS AND RECONSTRUCTION

Code : 62720129

SUMMARY OF MEDICINE DOCTORAL THESIS

HANOI – 2015

The work is completed at:

HANOI MEDICAL UNIVERSITY

Instructors:

Associate Professor.Dr. DAO XUAN TICH

Associate Professor.Dr. NGUYEN THI THU HA

Opponent 1: Associate Professor.Dr. Tran Dinh Chien

Opponent 2: Associate Professor.Dr. Nguyen Van Thach

Opponent 3: Professor.Dr. Pham Quang Vinh

The thesis shall be defended in front of the Grading Council at

University level at: Hanoi Medical University

On..../..../....

Can be found at:

- National Library
- The Library of Hanoi Medical University
- The Library of Central Medical Information

INTRODUCTION

1. Approach

Knee Osteoarthritis (KOA) is a common disease in elderly people, but it is increasingly occurring in people at middle age. The distinctive damage of KOA is the break, loss of cartilage caused by an imbalance between the synthesis and destruction of the cartilage cells. The damaged cartilage does not have ability to recover due to the lack of nutrient vessels, thus medical therapy at early stages is just symptom treatment. When KOA enters the medium and late stage, designation for joint replacement is the top choice. However, joint replacement is a big surgery with high cost and complications and not all patients of KOA have the conditions for replacement. In other words, after replacement, the patients have to face revisions since the joint is out of date, especially for patients at the middle age. Based on this reality, the treatment for joint preservation or extension of revision time which has become urgent for clinicians and stem cell therapy were studied. In the world, there have been pre-clinical studies as well as clinical trials which proved the ability to transdifferentiate into cartilage cells by the SCs, from which, it can be applied for treatment of knee osteoarthritis. In Vietnam, up to present, there has been no study on this issue, therefore we are conducting the thesis **“Applied research on using arthroscopic microfracture and transplantation of autologous bone marrow stem cell in treatment of knee osteoarthritis”** with the following objectives:

- 1- Research on some indicators of bone marrow cells and stem cell block derived from marrow cell fluid of patients with knee osteoarthritis*
- 2- Assessment of results on treatment of knee osteoarthritis by using arthroscopic microfracture and transplantation of autologous bone marrow stem cell*

2. The necessity of the thesis

In Vietnam, with the development of socio-economics, the average life expectancy of people increases, therefore the number of elderly with KOA also increases. On the other hand, the proportion of overweight and obesity among young people is also on the rise which is the risk factor promoting KOA conditions at early stages. In Vietnam, there has been no applied stem cell research on treatment of knee osteoarthritis, thus a research on application of stem cell on treatment of KOA by replacement or extension of time for joint replacement has become urgent.

3. New contributions of the thesis

The work is the first one conducted in Vietnam regarding treatment of KOA by endoscopy surgery for cartilage damage and autogenous transplantation of bone marrow stem cells.

4. Layout of the thesis

The thesis consists of 132 pages including: introduction (3 pages), overview (44 pages), research subjects and methods (21 pages), research results (22 pages), discussion (39 pages), conclusion (2 pages), recommendations (1 page). The thesis has 26 tables, 33 images, 13 figures, 153 reference documents (English and Vietnamese).

Chapter 1: OVERVIEW

1.1. STRUCTURE AND FUNCTIONS OF JOINT CARTILAGE

1.1.1. Composition of joint cartilage

1.1.2. Structure of joint cartilage

1.1.3. The role of joint cartilage

1.2. GENERAL INFORMATION ABOUT KNEE OSTEOARTHRITIS

1.2.1. Definition: KOA is the degeneration of the cartilage functions, manifested as the gradual wear and tear of articular cartilage, as a result of the imbalance between the synthesis and destruction of cartilage and bones under the cartilage.

1.2.2. Diagnosis of knee osteoarthritis: diagnosis of osteoarthritis is according to the standards of American College of Rheumatology (ACR) 1991:

According to clinical standards: 1) joint pain; 2) crepitus during joint motion; 3) joint stiffness in the morning less than 30 minutes; 4) Age ≥ 40 ; 5) Palpable bone hypertrophy. The diagnosis is identified when there are factors 1, 2, 3, 4 or 1, 4, 5.

According to clinical and subclinical standards: 1) Joint pain; 2) Osteophyte at the joint edges on X-ray; 3) joint fluid is the degenerative fluid; 4) Age ≥ 40 ; 5) joint stiffness in the morning less than 30 minutes; 6) crepitus during joint motion. The diagnosis is identified when there are factors 1, 2 or 1, 3, 5, 6 or 1, 4, 5, 6

1.2.3. Classification of knee osteoarthritis

Primary knee osteoarthritis: Aging is the main cause.

Secondary knee osteoarthritis: following cartilage disease.

1.2.4. Index of knee osteoarthritis

Based on anatomical injury (According to Outerbridge):

Grade 0: normal cartilage; *Grade 1:* cartilage becomes softer, swelling and can change its color into yellow; *Grade 2:* lack a part of cartilage thickness or appearance of cracks on the surface of cartilage; *Grade 3:* the cartilage cracks are deeper but equal to under cartilage level; *Grade 4:* complete disappearance of cartilage thickness, exposure of bones under cartilage.

Based on X-ray: Grade I: almost normal joint slit, there may be a small osteophyte; *Grade II:* joint slit is slightly narrow with small osteophytes; *Grade III:* clearly narrow joint with many medium-sized osteophytes, formative osteitis under cartilage with possible deformation of bone ends; *Grade IV:* considerably narrow joint slit with big-sized osteophytes formative osteitis under cartilage, clear deformation of bone ends.

Based on Magnetic Resonance Imaging (MRI) according to Noyes: *Grade 0:* cartilage edges are normal; *Grade 1:* contour of cartilage is normal but the cartilage injury is at high signal; *Grade 2:* cartilage surface is worn out or has ulceration under 50% of cartilage thickness; *Grade 3:* injury of most cartilage surface, over 50% but under 100%; *Grade 4:* injury on the total surface of cartilage.

1.2.5. Treatment of knee osteoarthritis

Non-drug

Internal medicine

Surgery: Indication for surgical treatment is stated when surgery which combines with physiotherapy is no longer useful. Minimum intervention surgery is given priority to perform with indication. Invasive surgery includes chiseling bone for axis adjustment; partial and total knee replacement.

Stem cells (SCs): with its reproducing capacity and transdifferentiation into specialized, polyclonal cells. Many studies on experimental animals proved that SCs are able to transdifferentiate into cartilage cells. In human, the clinical studies and application of SCs in treatment of osteoarthritis have brought about feasible results.

1.3. SUMMARY ABOUT STEM CELLS (SCs)

1.3.1. General definition of SCs: SCs is the term which indicates special and unique cells which are able to reproduce and transdifferentiate into specialized cells in certain conditions. The SCs with their own special characteristics may originate from embryo, fetus or mature individuals.

1.3.2. The source of SCs used in reproduction of cells and structure

At present, the source of SCs is used mainly in transplantation and reproduction of cells, structure of bone marrow, peripheral blood, cord blood and fat tissue.

1.4. BONE MARROW AND SCs OF BONE MARROW

Bone marrow is the space filled by the tubes of bone marrow of long bones and in the cavities of flat bones. Bone marrow is considered as a place which contains the SCs of the body. Bone marrow consists of three kinds of SCs but nowadays, there are two kinds which are studied and applied clinically the most are hematopoietic stem cells (HSC) and mesenchymal stem cells (MSC):

1.4.1. HSC: is able to transdifferentiate into cells of immune and circulatory system, is responsible for constant renewal and maintenance of blood. HSC is used in transplanting hematopoietic stem cells to treat some blood diseases such as: leukemia, thalassemia, supporting cancer treatment by chemicals and high-dose radiation therapy, etc... Recent studies introduced a new concept that HSC in some appropriate circumstances can participate in reproduction or repair of other organs which do not belong to blood-generating organs, such as bone cells, cartilage cells ... which is referred to as the plasticity of HSC. At present, particle CD34 is the major marker to identify HSC.

1.4.2. MSC: MSC is glial cells of bone marrow, with characteristics of pluripotent SCs, it is found in stroma of non-blood generating bone marrow. In addition to bone marrow, MSC is also found in muscle, placenta, peripheral blood, fat... MSC can transdifferentiate into many kinds of cell such as bone osteoblast, cartilage osteoblast, cells of cardiac muscle, nerve cells. Human MSC is usually isolated from mononuclear cell of bone marrow. There are 3 minimum criteria to identify human's MSC: 1) ability to stick to the plastic surface during transplantation, 2) expression of special surface antigen and 3) ability to transdifferentiate in vitro into osteoblasts, adipocytes, and chondroblasts.

1.5. APPLICATION OF STEM CELLS IN TREATMENT OF KNEE OSTEOARTHRITIS

Through experimental studies and clinical trials, it has been

proven that: injection of autologous SCs into joints is safe; it can reduce the symptoms of knee osteoarthritis, relieve pain in KOA and slow down the process of KOA; able to reproduce cartilage.

Chapter 2

SUBJECTS AND METHODS OF RESEARCH

2.1. SUBJECTS

2.1.1. Selection criteria

Primary KOA is diagnosed according to the criteria of ACR (1991), Stage II and III (According to the criteria by Kellgren-Lawrence). Age group: 40-70. Without discrimination of occupation and gender.

2.1.2. Exclusion criteria: Secondary KOA after injuries; Primary KOA at level IV or Level II and III but associated with: varus thrust, other inflammatory and chronic diseases.

2.2. METHODS

2.2.1. Research design, with vertical tracking

2.2.2. Sample size: convenient sample size, including 46 patients

2.2.3. Duration and location of research

Research duration: from November, 2011 to January, 2015.

Research location: Institute of Orthopaedics, Vietnam-Germany Hospital; Haematology Department, Department of Imaging Diagnostics, 108 Military Central Hospital.

2.2.4. Research criteria

- Common characteristics of research subjects
- Clinical characteristics before surgery
- Image diagnosis before surgery
- Characteristics of injury during surgery
- Process of surgery
- Number of bone marrow stem cells
- Characteristics of stem cell block derived from bone marrow fluid

- Clinical improvement (VAS, KOOS), recovery of cartilage on MRI

2.2.5. Ethics in research: Comply fully with the ethical requirements in research

2.2.6. The procedures and techniques used in research

Preparation

- Select patients according to selection criteria.
- All patients undertook MRI scan, X-ray scan for knee joints before surgery and are provided with adequate regular tests.
- Assess the level of injury on joint cartilage based on MRI film 3.0 Tesla according to Noyes.
- Determine the remaining volume of an area of joint cartilage with heaviest cartilage injury by Osiri software, on MRI film 3.0 Tesla Achieva Philips (Netherlands). Joint areas with the most severe cartilage injuries are selected to be measured at the time before and after treatment.

Technical treatment process

Bone marrow fluid aspiration and separation of SC block

- Place of implementation: Bone marrow fluid aspiration is implemented at surgery room of Vietnam-Germany Hospital (conducted by Vietnam German crew in coordination with doctors and technicians of Hematology Department of 108 Military Central Hospital); bone marrow fluid aspiration and separation of SC block is performed at Hematology Department - 108 Military Central Hospital (by crew of doctor and technicians of Hematology Department - 108 Military Central Hospital). Collection process was conducted in conditions of absolute sterility.
- Place of bone marrow fluid aspiration: iliac crest in the back at both sides.
- Volume of bone marrow fluid collected: 120ml.
- Separate SC block from bone marrow fluid according to gradient density centrifugation, condense in 10ml.

- Preservation: SC block is stored at room temperature of 20-22° in the first 6 hours.
- Blood cell and bone marrow tests:
 - + *Haemogram and myelogram*: according to classic cytology method combined with cell analysis through automated hematology analyzing system.
 - + *Determine the quantity of bone marrow SCs*:
 - *Hematopoietic SCs*: using flow cell method based on specific surface markers CD34 (+) according to protocol of ISHAGE.
 - *Mesenchymal SCs*: by CFU-F cluster-generating implanting technique
 - + *Determine the quantity of living cells*: Trypan blue dye method
 - Transplant SC block determining fungus, bacteria.

Endoscopy for regenerating injury under cartilage:

- Implement immediately after bone marrow fluid aspiration, at the same time with spinal anesthesia.
- Implement according to normal procedures of knee-joint endoscopy
- Clean the joints and remove arthrophyte (broken cartilage pieces ...)
- Identify the location and size (cm²), the injury level of cartilage (according to Ourterbridge)
- Remove the damaged instable, clean joints before regenerating injury under cartilage

Use a puncher to create holes on the identified cartilage defects, space between holes is 3-4mm, depth is 2-4 mm (Figure 2.1)

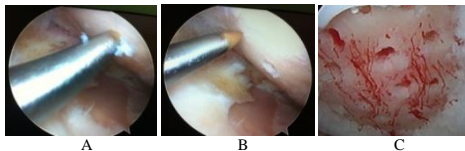


Figure 2.1. Regenerate injury under cartilage while applying tourniquet (A,B); after regenerating injury under cartilage and removing tourniquet (C).

- Do not place drainage after surgery

Inject SC block into the joints: Conducted in recovery room, Vietnam-Germany Hospital, in absolutely sterile conditions

Treatment and functions rehabilitation after surgery:

- The patients return to medical treatment room, place legs at high place, apply ice, taking anti-bodies and swelling relief medication in the first 2-3 days. Taking pain relievers in the first week.

Training regime after surgery: according to a consistent protocol.

2.2.7. Result assessment

Close result assessment: During the time in hospital and from the time being discharged until first re-check (4 weeks after surgery), based on: body reaction; developments at places where the bone marrow fluid is aspirated; development at knee joints; active movement range of knee joints. Grade of knee pain 4 weeks after surgery according to VAS (Visual Analogue Scale).

Distant result assessment 6, 12, 18 and 24 months after surgery: assessment of knee joint conditions according to VAS; assessment of knee functions after surgery according to KOOS (Knee Injury and KOA Outcome Score); assess recovery of joint cartilage by MRI film (change Noyes point and cartilage volume) on MRI machines 1.5 and 3.0 Tesla.

2.2.8. Information collection methods, data processing:

Research results are analyzed and processed by Medical Statistical Algorithms, using Stata 12.0 software.

Chapter 3: RESEARCH RESULTS

3.1. CHARACTERISTICS OF RESEARCH SUBJECTS

Table 3.1. Distribution of patients according to age, gender and occupation

Charateristics of subjects		n	%
Age	40-49	8	17,4
	50-59	29	63,0
	60-70	9	19,6
Gender	Male	15	32,6
	Female	31	67,4
Occupation relation	Farmer	25	54,3
	Official	21	45,7

Table 3.2. Distribution of patients according to BMI

Classification	BMI (kg/m2)	n	%
Underweight	<18.5	0	0
Normal	18.5 – 22.9	9	19,6
Overweight	23 – 24.9	21	45,7
Obese level I	25 – 29.9	15	32,6
Obese level II	≥30	1	2,2

Table 3.6. Distribution of patients according to KOA grade

Grade	n	%
Grade I	0	0,0
Grade II	9	19,6
Grade III	37	80,4
Grade IV	0	0,0

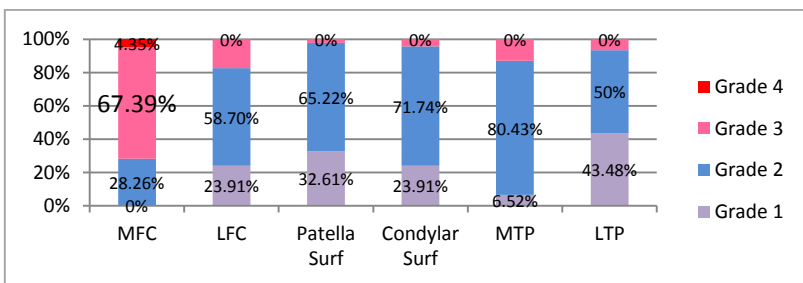
**Figure 3.2. Distribution of injury grade on MRI according to Noyes scores at joint areas**

Table 3.8. Relationship between KOA grade and BMI

Grade	BMI				Total		p
	< 25		≥ 25				
	n	%	n	%	n	%	
Grade II	7	23,33	2	12,50	9	19,57	>0,05
Grade III	23	76,67	14	87,50	37	80,43	
Total	30	100	16	100	46	100	

Table 3.10. Relationship between KOA grade and occupation

Grade	Occupation						p
	Official		Farmer		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Grade II	2	9,52	7	28,0	9	19,57	>0,05
Grade III	19	90,48	18	72,0	37	80,43	
Total	21	100	25	100	46	100	

Bảng 3.11. Relationship between KOA grade and age

Grade	Age						p
	<55		≥55		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Grade II	7	26,92	2	10,00	9	19,57	>0,05
Grade III	19	73,08	18	90,00	37	80,43	
Total	26	100	20	100	46	100	

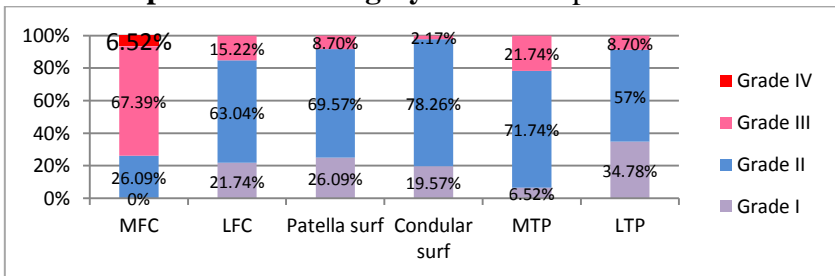
3.2. DEVELOPMENT DURING SURGERY**3.2.1. Time to take bone marrow:** average: 11 ± 1,66 minutes**3.2.2. Time for arthroscopy:** average: 44 ± 3.09 minutes**3.2.3. Complications in surgery:** no case reported**Figure 3.3. Distribution ratio of the levels of articular cartilage injury in surgery according to Outerbridge**

Table 3.14. Combined injury in surgery

		n	%
Meniscus	Normal	3	6,5
	Degenerative	40	87,0
	Torn	3	6,5
Cross ligament	Normal	9	19,6
	Degenerative	37	80,4
Osteophyte		28	60,9
Follicle		4	8,7
Bursitis		23	50,0
Arthrophyte		39	84,8

3.2.4. Complications of surgery: no case reported

3.3. QUANTITY OF BONE MARROW CELLS

Table 3.16. Distribution of bone marrow cells' composition

Cell indicator	Unit	Average	Min	Max
Quantity of nucleated cells	G/L	69,03 ± 49,86	20	255
Quantity of CD34(+) cells	G/L	0,56 ± 0,93	0,07	5,73
Rate of CD34(+) cells	%	0,71 ± 0,78	0,24	5,07

Table 3.17. Distribution of bone marrow cells according to gender

Cell indicator	Unit	Gender		p
		Male (n=15)	Female (n=31)	
Nucleated cells	G/L	71,68 ± 36,66	67,75 ± 55,64	>0,05
CD34(+) cells	G/L	0,50 ± 0,45	0,58 ± 0,11	>0,05
	%	0,64 ± 0,33	0,74 ± 0,92	>0,05

Bảng 3.18. Distribution of bone marrow cells according to age

Cell indicator	Unit	Age group		p
		≤ 55 (n=26)	>55(n=20)	
Nucleated cells	G/L	77,28 ± 50,33	58,31 ± 48,37	>0,05
CD34(+) cells	G/L	0,52 ± 0,6	0,61 ± 0,13	>0,05
	%	0,61 ± 0,37	0,84 ± 1,1	>0,05

Bảng 3.19. Distribution of bone marrow cells according to coordinated disease

Cell indicator	Unit	Coordinated disease		P
		Yes (n=10)	No (n=36)	
Nucleated cells	G/L	62,24 ± 19,64	70,92 ± 55,50	>0,05
CD34(+)	G/L	34,38 ± 23,29	62,0 ± 104,18	>0,05
	%	0,55 ± 0,34	0,75 ± 0,86	>0,05

3.4. CHARACTERISTICS OF SC BLOCK DERIVED FROM BONE MARROW FLUID

Table 3.20. Characteristics of cells and HSC (n=46)

Bone marrow cells	Unit	Average	Min	Max
Quantity of nucleated cells	G/L	66,33 ± 46,12	6,4	225
Rate of CD34(+) cells	%	1,44 ± 0,67	0,44	3,18
Quantity of CD34(+) cells	10 ⁶	8,15 ± 5,5	1,1	22,78
Quantity of platelets	G/L	468,26 ± 306,24	30	1300
Quantity of living cells	%	95,67 ± 1,33	93	99

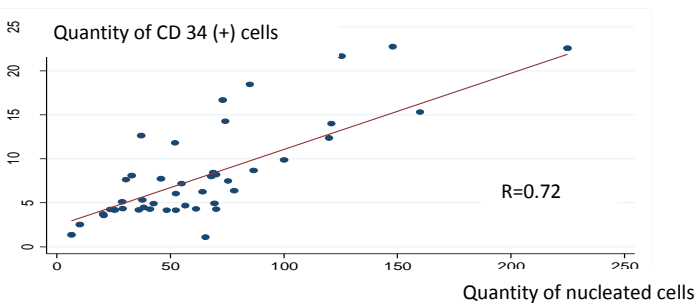


Figure 3.6. Correlation between quantity of CD34(+) cells and nucleated cells

Table 3.21. Quantity of CFU-F cluster-generating cells

	Average	Min	Max
CFU-F/10 ⁶ cell cluster	43,17 ± 25,23	7	140
CFU-F/ml Bone marrow SC block	3336,83 ± 3996,59	283,9	22698
CFU-F cluster-generating cells injected into knee joints	33343,88 ± 39984,11	2838	226980

3.5. TREATMENT RESULTS

3.5.1. Complications: none

3.5.2. Treatment results:

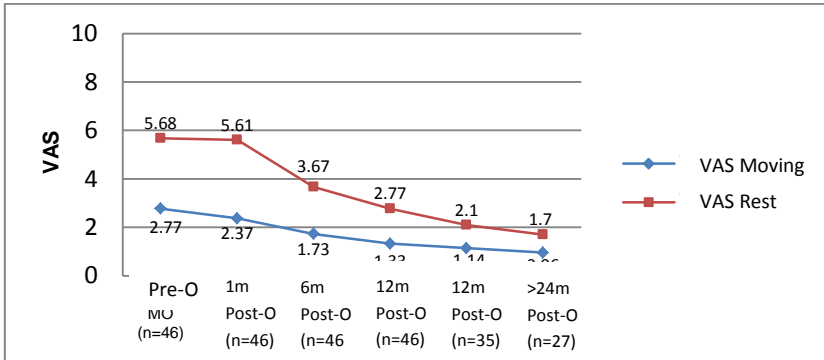


Figure 3.9. Ameliorate pain conditions according to VAS

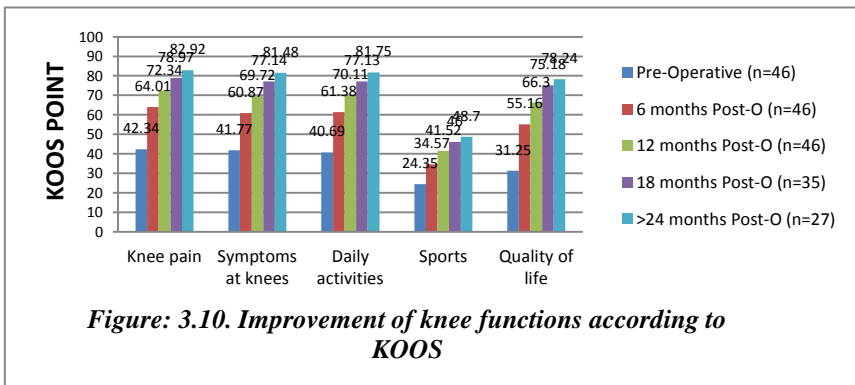


Figure: 3.10. Improvement of knee functions according to KOOS

Table 3.22. Noyes scores and cartilage volume before and after surgery

	Before surgery	After 12-24 months	P
Average Noyes scores	12 ± 1,46 (n = 46)	7 ± 1,50 (n = 36)	<0,001
Average cartilage volume (cm ³)	0,45 ± 0,2629 (n = 21)	0,55 ± 0,2901 (n = 21)	<0,001

Table 3.23. Relation between KOOS 12 months after surgery and characteristics of gender, BMI, grades of KOA

KOOS		Before surgery	After 12 months	Increasing KOOS point
Charateristics				
Gender	Female	35 ± 2,97	63 ± 3,97	28 ± 2,25
	Male	38 ± 2,68	65 ± 3,17	28 ± 2,41
	P	0,01	0,08	0,66
BMI	≤ 25	37 ± 3,01	64 ± 3,73	28 ± 2,46
	> 25	35 ± 2,94	63 ± 3,99	28 ± 1,94
	P	0,077	0,315	0,506
Level	Level II	39 ± 2,54	66 ± 2,82	28 ± 1,60
	Level III	35 ± 2,88	63 ± 3,88	28 ± 2,43
	P	0,004	0,054	0,09

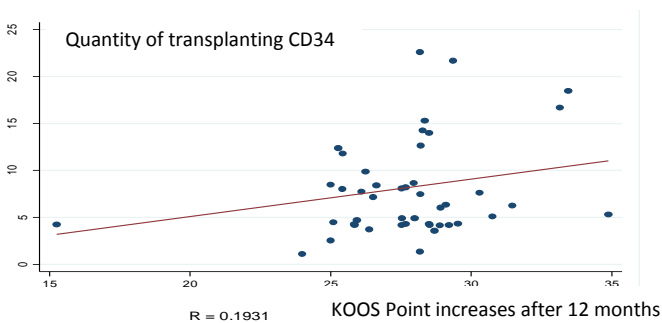


Figure 3.12. Correlation between increasing KOOS and quantity of CD34(+) cells injected into the knee joints

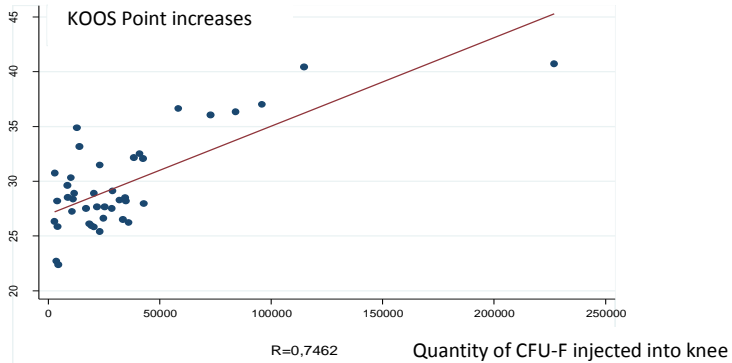


Figure 3.13. Correlation between increasing KOOS and CFU-F cluster-generating cells injected into knee joints (n=41)

Chapter 4: DISCUSSION

4.1. Quantitative characteristics of bone marrow cells and stem cell block derived from bone marrow fluid (BMF)

4.1.1. Quantitative characteristics of bone marrow cells

SCs are the only kind of cell which have two special abilities: reproduce identical cells and transdifferentiate into specialized in certain conditions. However, SCs are quite similar to leukocytes, both in form and some properties during transplatation, so it is very difficult to distinguish and recognize them by morphology. In 1988, Weissman and his colleagues identified surface markers of hematopoietic stem cells in mice and in 1992 they found similar markers of hematopoietic stem cells in humans. At present, CD34 molecules on the cell surface are major markers to identify hematopoietic stem cells. In CD34 (+) cells, people find stem cells which generate cartilage and bones. Table 3.16 indicates the average value of some cell indicators of bone marrow is within the normal limit of a Vietnamese adult. When

comparing our study results with that of Nguyen Manh Khanh, Nguyen Thanh Binh et al., I found that the proportion and quantity of our hematopoietic stem cells in bone marrow are different compared to the authors (see Table 4.1), this can be explained by differences in characteristics of research subjects such as age, disease, sample size...

Table 4.1. Comparison between our research results and other authors' in terms of quantity, proportion of CD34(+) cells of bone marrow

	Unit	Nguyen M.K (n=65)	Nguyen T.B (n=112)	Ours (n=46)
CD34(+) cells	G/L	0,4 ± 0,2	0,42 ± 0,31	0,56 ± 0,93
	%	0,6 ± 0,2	0,66 ± 0,27	0,71 ± 0,78

A study by Do Trung Phan carried out on 79 Vietnamese adult persons showed that the average quantity of CD34(+) cells in bone marrow is $1,22 \pm 0,79$ G/L. However, the method to determine CD34(+) cells of this study is completely different from ours: using direct fluorescent techniques, counting on fluorescent microscope. On the other hand, the rate and number of bone marrow cells and technique depends on bone marrow fluid aspiration. According to numerous authors when studying the characteristics of bone marrow cells, except for counting directly the number of CD34(+) cells in bone marrow, the cells which have bone marrow cores are also identified and reflect indirectly the quantity of cartilage-generating SCs. According to Figure 3.6, the number of CD34(+) cells correlate proportionally with number of nucleated cells ($r = 0,72$, $P < 0,05$). According to Do Trung Phan, the average quantity of cells with bone marrow cores of Vietnamese adult persons is $57,4 \pm 15,5$ G/L. Our study results (Table 3.16) are suitable with those from other studies.

4.1.2. Characteristics of cells and quality of SC block derived from bone marrow fluid

After the extraction and condensation process, rich mononuclear cell block of stem cells (called SC block) of bone marrow is condensed in 10 ml of isotonic saline serum injected into the knee joints within 1-2 hours. Before transplanting for patients, stem cell block was sampled to inoculate bacteria, fungi. 100% of the sample SC block is negative, indicating that the process of collecting bone marrow fluid and processing extraction and condensation of stem cell block are absolutely sterile, and SC block is injected into the knee joints with security of bacteriology. Valérie Gangji et al (2004) reported that 1/10 of the cases has inoculated bone marrow SCs positive with copagulse-negative staphylococci. In studies by Nguyen Manh Khanh and Nguyen Thanh Binh, there is no case reported of inflammation at SC transplanted locations.

Composition of blood stem cells and Mesenchymal Stem Cells in stem cell block

Recently, transdifferentiation or plasticity of blood stem cells has been discovered, whereby applied studies on blood stem cells in treatment and reshape of solid-tissue-based organs have been carried out. Transdifferentiation of blood stem cells into different types of stem cell such as neural stem cells, heart muscle cells, bone marrow stem cells, articular cartilage stem cell has been proved. Wakini et al. proved that there are many chondroblast progeneotor cells in the CD34(+) cell block in bone marrow, and such progeneotor cells is possible to transdifferentiate in a cell-culture environment into chondroblast with full functions of a precursor cartilage cell. Therefore, it is necessary to determine quantity of blood stem cells in the cell block that contributes to prove efficiency of this treatment method. We used CD34(+) cell counting method to determine quantity of blood stem cells in the cell block.

Mesenchymal stem cells (MSC) can transdifferentiate into mesenchymal cells, of which cartilage cells under the impact of

growth factors. Composition of MSC was defined by the method of cell aggregate culture, whereby each MSC grew a CFU-F cell aggregate after 2-week culture. It is possible to determine number of MSC pumped into knee joint based on number of CFU-F cell aggregates. According to the comparison of our research results to research results of Nguyen Manh Khanh, Nguyen Thai Binh et al., proportion of CD34(+) cells, number of CFU-F/ 10^6 cell aggregates of stem cell block are equivalent to each other. Number of CFU-F/ml stem cell aggregates in our research is threefold than that in the research of Nguyen Thanh Binh and Nguyen Manh Khanh because volume of concentrated stem cell block in our research is 10ml, while that in the research of Nguyen Thanh Binh and Nguyen Manh Khanh is 30ml. The relation of number of cell forming CFU-F cell aggregate and age shows that number of CFU-F cell aggregates correlates inversely with patient's age, nevertheless, this correlation is not too close ($r = -0,06$), this result is consistent with other studies..

4.2. Importance of microfractures

The research on method of stem cell transplantation for cartilage regeneration shows that proliferation, transdifferentiation and shift of a stem cell rely on cytokine, growth factors (GF) and matrix (buffer) in which the stem cell inserted. Buffer herein may be fibrin, hydrogen blockes, extracellular matrix (ECM) or scaffold. Platelet contains protein which is a GF whose role is activating activities of stem cells, speeding up of wound healing including VEGF (platelet derived growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor) and TGF (transforming growth factor). In this research, stem cells are activated by platelets in the new injury and platelets in bone marrow stem cells, with average density 468.26 ± 306.24 G/L (Table 3.20). Microfractures is creating a new injury in cartilage deletion area in order to appear activation factors, modulate shift, proliferation and

transdifferentiation activities of stem cells, and create a scaffold for adhesion of stem cells, the scaffold is fibrin network formed in the area under the new injured cartilage after solution of thrombosis. Additionally, knee arthroscopy allows to 'clean' the knee joint, to remove joint mouses which are knee fragments resulting in arthritis and to clean cytokine. Injured articular cartilage is removed. This process brings efficiency of clinical improvement in the beginning state.

4.3. Treatment results

After surgery, no patient was suffered from haematocele, bleeding in the site of bone marrow fluid separation or infected knee joint. Such results are similar to results of other studies. Although 10 patients (21.73%) who are suffered from many diseases, main ly hypertension (6 patients) and type II diabetes (4 patients), treatment results were not affected by such diseases because those patients were applied stable medical treatment methods. On the other hand, during selecting patients, we excluded patients who were suffered from systemic or local infection, patients who were suffered from chronic diseases impairing resistance. Especially, the sterility in every stages from separation of bone marrow fluid, separation of cell block, knee arthroscopy to injection of stem cells into knee joint were ensured absolutely. Stem cell block was cultured bacteria and fungi before injected into knee joint. Long time for aspiration of bone marrow fluid and for arthroscopy are factors for infection. In this research, average time for aspiration of bone marrow fluid was 11.17 minutes, for arthroscopy was 43.72 minutes, which are quicker than time for the same operations in other researches partly because of lower volume of bone marrow fluid in this research. After injection, no patient faced with systemic or local reactions which is also an advantage of transplantation of autologous bone marrow stem cells since riskses of Transplant rejection are prevented. On the other hand, injection of stem cell block in

bone marrow into knee joint is partly safer than injection into organs during transplantation of other organs.

According to time for result assessment after surgery at least 12 months (100%) and at most 24 months (58.7%), no patient had signs of pain or any complaint in the site of bone marrow fluid separation and in the site of incision for knee arthroscopy. The research results of Nguyen Manh Khanh and Nguyen Thanh Binh also were similar to our results after separating bone marrow fluid of 65 out of 112 patients. 1/29 patient was in pain in the site of bone marrow fluid separation, the pain reduced and resolved after two weeks. No patient was suffered from infection, inflammation, leakage, sticky fibers or lumps in the knee. Two few-millimeters long surgical scars are not affected functionality and aesthetics of the knee. Our results are similar to results of Kevin, Centeno, Davatchi. It is possible to say that endoscopy surgery for cartilage damage and transplantation of autobone marrow stem cells in treatment of osteoarthritis is the less trespassing, simple and high effective method. In resting state, knee pain is improved after 1 month of surgery, VAS point reduced from 2.77 to 2.37 ($p < 0,05$). In moving state, after 1 month of surgery, VAS point reduced from 5.68 to 5.61 ($p > 0,05$). Knee pain in resting state is early improved after 1 month of surgery maybe owing to knee-joint cleaning through endoscopy. In this research, quantity of patients with foreign object in their knees, ossicle and bursitis make up 84.8%, 60.9% and 50%, respectively. After 6 months of surgery, knee pain is remarkably reduced in both resting state and moving state. After 6, 12, 18 and 24 months of surgery, VAS point reduced significantly ($p < 0,05$) (see Chart 3.9). According to research of Shapiro et al., in case of single endoscopy for cartilage damage, after 12 months of surgery, cartilage was rehabilitated (fibrocartilage), begun degenerating and lost its mechanical sustainability, consistent with clinical reality, at this time, the knee pain reappeared. In this research,

continuous reduction of knee pain after 12 months shows the role of stem cells in rehabilitating injured cartilage by using sustainable cartilage. We used KOOS to assess knee functions, whereby the higher KOOS increases, the higher knee functions are. Average KOOS increases from time to time, and the highest increases after 6 months of surgery ($p < 0,001$), and continues increasing after 12, 18 and 24 months of surgery ($p < 0,01$). In the consideration of each expression of knee functions, score increases significantly, Capacity of sport playing has the lowest improvement. For other expressions, improvement levels are higher (see Chart 3.22). Life quality assessed before surgery has rather low score, 31.25 point, this shows that osteoarthritis in II and III stages significantly affects life quality of patients. After 6 months of surgery, the life quality score increases 55.16 points, and continues increasing with increasing improvement of knee functions. Therefore, after 24 months of surgery (27 patients), the life quality score is only 78.24/100 points, it means that satisfaction of the patients is not the highest. Our research results are similar to results of researches of (2012), Kevin (2012) and Emérito (2014). In the relation of quantity of CD34(+) cells (blood stem cells) and quantity of cells in CFU-F cell aggregate (Mesenchymal stem cells) injected into knee joint, according to assessment of clinical result after 12 months of surgery, quantity of CD34(+) cells and quantity of CFU-F cell aggregates correlate proportionally with increased KOOS (Chart 3.12 and 3.12), it means that the more quantity of blood stem cells and mesenchymal stem cells are, the higher clinical improvement is, and KOOS correlates closely with quantity of mesenchymal stem cells, $r = 0,75$, $p < 0,05$. This shows that mesenchymal stem cells and blood stem cells play important roles in rehabilitation of knee functions. According to assessing functions and rehabilitation of cartilage through the knee Magnetic Resonance Imaging (MRI), by Noyes scores and by

measurement of cartilage volume using OsiriX software, before surgery, average Noyes score is 12 ± 1.46 , average volume of cartilage in the area of the most serious injured knee is $0.45 \pm 0.2629 \text{ cm}^3$; after 12 – 24 months of surgery, average Noyes score is 7 ± 1.50 , average volume of cartilage is $0.55 \pm 0.2961 \text{ cm}^3$, $p < 0,001$ (see Chart 3.22). This result shows that thickness of injured articular cartilage increases after treatment. Nevertheless, the assessment through MRI film by using Noyes scale and measurement of cartilage volume are only carried out in term of appearance morphology (change of articular cartilage thickness), rather than biological structure of new cartilage, the patients should be applied delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage (dGEMRIC) with pulse string T1 ρ in order to determine concentration of glycosaminoglycan, and with pulse string T2 in order to determine composition of collagen. These are two components of main ones constituting articular cartilage from cartilage cells. In this research, we could not use dGEMRIC to assess the structure of new cartilage because survey for each patient took many hours and dGEMRIC was not used widely in Vietnam.

CONCLUSIONS

1. Some indicators of bone marrow cells and stem cell block derived from marrow cell fluid of patients with knee osteoarthritis

- In bone marrow: average quantity of nucleated cells is $69.03 \pm 49.86 \text{ G/L}$, average quantity of CD34(+) stem cells is $0.56 \pm 0.93 \text{ G/L}$, average proportion of CD34(+) stem cells is $0.71 \pm 0.78\%$.

- Quantity of single nucleated cells inversely correlated with patient age. There were no difference in quantity and proportion of CD34(+) cells between two above groups and

under-55-year-old patients. In the stem cell block from bone marrow after separation, proportion of CD34(+) stem cells is higher than that before separation, making up $1.44 \pm 0.67\%$. Quantity of CD34(+) cells is directly proportional to quantity of nucleated cells ($r = 0.72$, $p < 0.05$).

- Quantity of obtained CFU-F cell aggregates after culture of 1×10^6 cells in stem cell block in bone marrow in average is 43.17 ± 25.23 aggregates, quantity of cells creating CFU-F cell aggregates injected into knee in average is 33343.88 (2838-226980) aggregates.

2. Treatment results

- This treatment is a less trespassing, simple and high effective method without any complication.

- Knee pain in resting state reduced after 1 month of surgery. Knee pain also reduced after 6, 12, 18 and 24 months of surgery.

- Functions of knee were significantly rehabilitated after surgery, average KOOS before surgery and after 24 months of surgery was 36.34 and 74.62, respectively.

- Rehabilitation of function of knee is directly proportional to quantity of MSC injected into knee joint.

- Thickness of articular cartilage after surgery increased that was shown in MRI film after 12-24 months of surgery, Noyes scores before surgery in average was 12 ± 1.46 , and after surgery in average was 7 ± 1.50 . Volume of cartilage before surgery and after 12-24 months of surgery was 0.45cm^3 and 0.55cm^3 , respectively.

LIST OF SCIENTIFIC WORKS PUBLISHED RELATED TO THE THESIS

1. Duong Dinh Toan, Dao Xuan Tich, Nguyen Xuan Thuy (2013), “Results of initial treatment of osteoarthritis of the knee by arthroscopic subchondral drilling and autologous bone marrow stem cells injection”, *Journal of medical research*, 83 (3), p. 122-129.
2. Tong Thi Thu Hang, Lam Khanh, Duong Dinh Toan, (2014), “Research on articular cartilage damage in osteoarthritis through characteristic of MRI film and using OsiriX software for determination of damage”, *Journal of 108 - clinical medicine and pharmacy*, Special Vol, p. 202-207.
3. Duong Dinh Toan, Dao Xuan Tich, Nguyen Thi Thu Ha (2015), “Effective treatment of knee osteoarthritis by arthroscopic subchondral drilling and autologous bone marrow stem cells injection”, *Journal of medical research*, Special Vol, p. 207-217.

