BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO **BỘ Y TẾ**

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

PHẠM HOÀI THU

NGHI£N CøU KÕT QU¶ §IÒU TRÞ BÖNH THO¸I HãA KHíP GèI NGUY£N PH¸T B»NG LIÖU PH¸P TÕ BµO GèC M¤ Mì Tù TH¢N

Chuyên ngành : NỘI XƯƠNG KHỚP

Mã số : 62720142

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI - 2017

CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. Nguyễn Thị Ngọc Lan

Phản biện 1: PGS.TS. Lê Thu Hà

Phản biện 2: PGS.TS. Nguyễn Mai Hồng

Phản biện 3: PGS.TS. Bùi Văn Lệnh

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án Tiến sỹ cấp Trường họp tại Trường Đại học Y Hà Nội.

Vào hồi giờ ngày tháng năm 2017.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội
- Thư viện Thông tin Y học Trung ương

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Bước đầu đánh giá kết quả của liệu pháp tế bào gốc mô mỡ tự thân điều trị bệnh nhân thoái hóa khớp gối nguyên phát (2013). *Tạp chí nội khoa Việt Nam*, số đặc biệt, trang 199 - 205.
2. Initial evaluation of clinical results of intra-articular injection of autologous adipose tissue - derived stem cell therapy in primary knee osteoarthritis treatment (2014). *Journal of Military Pharmaco - medicine*, Vol 39, No 7, 83-88.
3. Đánh giá kết quả phục hồi sụn khớp và cải thiện triệu chứng trên 48 khớp gối thoái hóa nguyên phát điều trị bằng liệu pháp tế bào gốc mô mỡ tự thân sau 06 tháng (2015). *Tạp chí y học Việt Nam*, tập 429, số đặc biệt, trang 218 - 224.
4. Đánh giá quy trình kỹ thuật sản xuất tế bào gốc mô mỡ tự thân theo công nghệ Adistem tại bệnh viện Bạch Mai (2015). *Tạp chí y học Việt Nam*, tập 429, số đặc biệt, trang 308-313.

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết của đề tài

Thoái hóa khớp gối là bệnh lý tổn thương của toàn bộ các thành phần của một khớp như sụn, xương dưới sụn, dây chằng, màng hoạt dịch, cơ cạnh khớp, trong đó tổn thương sụn là chủ yếu. Tổ chức y tế thế giới ước tính khoảng 25% người già trên 65 tuổi bị đau khớp và tàn phế do mắc bệnh thoái hóa khớp gối. Với tuổi thọ trung bình ngày càng cao và sự gia tăng béo phì trong dân số nói chung, tỷ lệ mắc thoái hóa khớp gối ngày càng tăng ảnh hưởng đáng kể đến chất lượng sống và nền kinh tế xã hội. Cho đến nay, việc điều trị bệnh rất tốn kém cho cá nhân người bệnh và cả xã hội trong khi hiệu quả điều trị nhiều khi chưa đạt được mong muốn. Các biện pháp nội khoa và ngoại khoa điều trị thoái hóa khớp gối chủ yếu nhằm điều trị triệu chứng bệnh và chưa đạt được tới đích cải thiện được chất lượng sụn khớp, thậm chí chưa thể làm ngừng quá trình thoái hóa. Một số các biện pháp mới trong điều trị thoái hóa khớp đã ra đời trong đó liệu pháp tế bào gốc tự thân tiêm nội khớp đã mở ra một hướng đi mới: điều trị nhắm đích, nhằm đem lại hiệu quả tối ưu trong điều trị thoái hóa khớp gối. Kết quả của một số nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng trên thế giới cho thấy liệu pháp tế bào gốc mô mỡ tự thân tiêm nội khớp trong điều trị thoái hóa khớp gối cải thiện đáng kể thang điểm đau (VAS), biên độ vận động và tổn thương sụn khớp gối. Ở Việt Nam, cho đến nay chưa có nghiên cứu nào đánh giá một cách hệ thống hiệu quả điều trị thoái hóa khớp gối nguyên phát giai đoạn II - III bằng liệu pháp tế bào gốc mô mỡ tự thân tiêm nội khớp được công bố. Chính vì vậy, nghiên cứu đã được tiến hành và đánh giá là phương pháp có hiệu quả khả quan do tác động đến bảo tồn sụn khớp một cách tự nhiên và sinh lý, đã mang lại hy vọng mới trong việc điều trị bệnh thoái hóa khớp khớp gối nguyên phát.

2. Những đóng góp mới của luận án

Luận án đã mô tả chi tiết đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của thoái hóa khớp gối nguyên phát giai đoạn II-III. Kết quả nghiên cứu cho thấy liệu pháp tế bào gốc mô mỡ tự thân cải thiện các triệu chứng đau và

hạn chế vận động khớp gối thoái hóa giai đoạn II-III trên lâm sàng ở cả 2 thời điểm sau 6 và 12 tháng điều trị. Ngoài ra, còn có sự cải thiện một phần bề dày sụn khớp trên siêu âm và cộng hưởng từ. Qua khảo sát tính an toàn bước đầu của liệu pháp điều trị, nghiên cứu không nhận thấy có bất kỳ tác dụng không mong muốn tại chỗ cũng như toàn thân nghiêm trọng.

3. Mục tiêu nghiên cứu

- Mô tả đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của bệnh thoái hóa khớp gối nguyên phát giai đoạn II-III
- Đánh giá kết quả và tính an toàn bước đầu của liệu pháp tế bào gốc mô mỡ tự thân trong điều trị bệnh thoái hóa khớp gối nguyên phát giai đoạn II-III sau 12 tháng theo dõi.

4. Cấu trúc luận án

Luận án có 134 trang, với 4 chương chính: Đặt vấn đề (2 trang), chương 1: Tổng quan (36 trang), chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu (22 trang), chương 3: Kết quả nghiên cứu (34 trang), chương 4: Bàn luận (37 trang), Kết luận (2 trang), Kiến nghị (1 trang). Trong luận án có 35 bảng, 10 biểu đồ, 1 sơ đồ, 23 hình. Luận án có 183 tài liệu tham khảo, trong đó có 21 tài liệu tiếng Việt, 162 tiếng Anh.

CHƯƠNG 1
TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Chẩn đoán thoái hóa khớp gối

Thoái hóa khớp gối là bệnh tiến triển chậm, triệu chứng lâm sàng không đặc hiệu. Do đó, để chẩn đoán xác định thoái hóa khớp gối phải kết hợp các yếu tố nguy cơ, triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng và các phương pháp chẩn đoán hình ảnh. Tuy nhiên, chẩn đoán thoái hoá khớp là chẩn đoán loại trừ vì hình ảnh X quang thoái hoá khớp luôn tồn tại ở người lớn tuổi song triệu chứng đau lại có thể do nguyên nhân khác. Hội thấp khớp học Mỹ (ACR) 1991 đã đề ra tiêu chuẩn chẩn đoán thoái hóa khớp gối với độ nhậy 94%, độ đặc hiệu 88%.

1.2. Điều trị thoái hóa khớp gối

1.2.1. Điều trị nội khoa và ngoại khoa

Điều trị thoái hóa khớp gối bao gồm: điều trị không dùng thuốc, điều trị nội khoa và điều trị ngoại khoa. Các phương pháp điều trị hiện tại chưa giải quyết được tận gốc, bản chất của bệnh là tổn thương mất sụn khớp. Hơn nữa, thoái hóa khớp gối hay gặp ở người cao tuổi nên thường có nhiều bệnh kèm theo dẫn đến việc chỉ định thuốc điều trị gặp nhiều khó khăn và nhiều các tác dụng không mong muốn có thể xảy ra.

1.2.2. Liệu pháp tế bào gốc mô mỡ trong điều trị thoái hóa khớp gối

Tế bào gốc mô mỡ có hiệu quả trong sửa chữa tổn thương sụn khớp do có khả năng biệt hóa thành tế bào sụn và giải phóng các yếu tố hoạt hóa tạo sụn một cách sinh học như yếu tố tăng trưởng chuyển dạng (TGF- β), protein tạo xương (BMPs), yếu tố tăng trưởng kháng lại tình trạng chết theo chương trình và tạo xơ. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu đã đưa ra bằng chứng cho thấy vai trò của tế bào gốc mô mỡ trong việc ức chế phản ứng miễn dịch biểu hiện bằng giảm phản ứng viêm tại chỗ.

Ở một số nước trên thế giới như Úc, Canada, Hàn Quốc đều cho phép tiến hành cấy ghép tế bào (hoặc mô) tự thân (trên cùng một bệnh nhân) trong cùng một thì, đảm bảo yếu tố vô trùng. Với việc ứng dụng tế bào gốc mô mỡ trong điều trị thoái hóa khớp, đã có nhiều công trình đánh giá tính an toàn và hiệu quả của phương pháp điều trị này. Các kết quả nghiên cứu đã khẳng định khả năng biệt hóa thành sụn của tế bào gốc mô mỡ cả trong môi trường nuôi cấy ngoài cơ thể cũng như trong cơ thể.

CHƯƠNG 2
ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân nghiên cứu:

Được chẩn đoán thoái hóa khớp gối theo ACR 1991 giai đoạn II - III theo phân loại của Kellgren và Lawrence; Đáp ứng kém với các phương pháp điều trị thoái hóa khớp theo quy trình thông thường; Điểm đau VAS > 5/10.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

Thoái hóa khớp gối nhẹ (giai đoạn I) và nặng (giai đoạn IV); Thoái hóa khớp gối thứ phát; Có chống chỉ định với các quy trình điều trị (hút mỡ bụng, tiêm nội khớp); Đã được tiêm acid hyaluronic (Hyalgan, Go-on,…) hoặc nội soi khớp gối tổn thương trong vòng 6 tháng trước đó.

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Địa điểm nghiên cứu: Khoa Cơ xương khớp và Đơn vị gen trị liệu – Trung tâm y học hạt nhân và u bướu, bệnh viện Bạch Mai, từ tháng 4/2012 đến tháng 8/2016

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thiết kế nghiên cứu: Can thiệp theo dõi dọc

2.3.2. Cỡ mẫu: Mẫu thuận tiện n= 36 BN với tổng số khớp gối nghiên cứu: 72 khớp.

2.3.3. Nội dung nghiên cứu

2.3.3.1. Khai thác các triệu chứng lâm sàng:

- Đặc điểm chung: tên, tuổi, giới, nghề nghiệp
- Khai thác các triệu chứng cơ năng và thực thể: Đau khớp gối; dấu hiệu "phá rỉ khớp"; tiếng động bất thường tại khớp; hạn chế vận động khớp; biến dạng; tràn dịch khớp; dấu hiệu bào gỗ; teo cơ tùy hành.

+ Xác định mức độ đau theo VAS: 3 mức độ: từ 1 đến 3: đau nhẹ, từ 4 đến 6: đau vừa, từ 7 đến 10: đau nặng

+ Đánh giá mức độ hạn chế vận động khớp gối theo các thang điểm WOMAC LEQUESNE.

- Tiền sử: Các bệnh nội khoa, chấn thương, điều trị thoái hóa khớp gối

2.3.3.2. Cận lâm sàng

a) Xét nghiệm

Các xét nghiệm để chẩn đoán và đánh giá các rối loạn kèm theo được thực hiện tại các khoa chuyên trách tại Bệnh viện Bạch Mai với các thông số tham chiếu

- Xét nghiệm đánh giá tình trạng viêm: bạch cầu, tốc độ máu lắng, CRP
- Các xét nghiệm sinh hóa khác: Urê, Creatinin; GOT, GPT; Glucose máu; Lipid máu; RF.

b) Chẩn đoán hình ảnh

- **Chụp X quang khớp gối 2 bên**: nhằm chẩn đoán xác định và giai đoạn bệnh

Tất cả các bệnh nhân nghiên cứu đều được chụp X quang khớp gối 2 bên thẳng và nghiêng, tư thế đứng

+ Thực hiện tại khoa Chẩn đoán hình ảnh bệnh viện Bạch Mai.

+ Kết quả do bác sĩ khoa Chẩn đoán hình ảnh bệnh viện Bạch Mai đọc.

+ Tất cả các phim X quang đều được đọc theo một qui trình thống nhất: trục khớp, khe khớp hẹp, gai xương, đặc xương dưới sụn, khuyết xương, u xương sụn màng hoạt dịch, giai đoạn theo Kellgren và Lawrence.

- **Siêu âm khớp gối 2 bên**: để đánh giá trước điều trị và theo dõi kết quả điều trị

+ Dụng cụ: Máy siêu âm Medison Accuvix 10.0 của Mỹ, đầu dò Linear tần số cao 5-13 MHz

+ Thực hiện tại phòng Siêu âm của khoa Khớp bệnh viện Bạch Mai, do 2 bác sỹ chuyên khoa Cơ xương khớp tiến hành. Bác sỹ siêu âm không biết về tình trạng lâm sàng cũng như thời điểm đến khám của bệnh nhân.

+ Các thông số đánh giá: Dịch khớp gối, màng hoạt dịch, kén khoeo, gai xương, cấu trúc âm của sụn, bề mặt sụn khớp,bề dày sụn.

- **Chụp cộng hưởng từ khớp gối:** để đánh giá trước điều trị và theo dõi kết quả điều trị

+ Thực hiện tại khoa Chẩn đoán hình ảnh bệnh viện Bạch Mai.

+ Sử dụng máy Cộng hưởng từ 1.5 Tesla của hãng Siemens, CHLB Đức, do hai bác sỹ chuyên khoa Chẩn đoán hình ảnh bệnh viện Bạch Mai thực hiện và đọc. Bác sỹ chẩn đoán hình ảnh không biết về tình trạng lâm sàng cũng như lần tái khám của bệnh nhân.

+ Tất cả các phim MRI đều được đọc theo một qui trình thống nhất gồm các thông số sau: tổn thương xương (độ sâu, độ rộng), gai xương, phù tủy xương, tổn thương sụn (độ sâu, độ rộng), kén dưới sụn, đo bề dày sụn khớp, sụn chêm, dịch khớp, màng hoạt dịch, dây chằng chéo, dị vật, kén Baker,... Các mức độ tổn thương được đánh giá theo thang điểm KOSS (Knee Osteoarthritis Scoring System). Đo bề dày sụn khớp tại 7 vị trí.

c) Các thăm dò khác:

- ***Xét nghiệm sàng lọc ung thư trước điều trị***:

+ Các chất chỉ điểm khối u: CEA, CA19-9, CA72-4, CA125, alpha FP, NSE, PSA toàn phần, tự do (đối với bệnh nhân nam giới), ALP; FT4, TSH.

+ Chụp X quang tim phổi, chụp Mammography và siêu âm tuyến vú 2 bên, siêu âm tuyến giáp, siêu âm ổ bụng. Soi dạ dày, soi đại tràng (nếu cần)

- ***Xét nghiệm trước phẫu thuật*** : Đông máu cơ bản; định nhóm máu; HIV, HBsAg; tổng phân tích nước tiểu; điện tâm đồ, siêu âm tim

- Đo mật độ xương toàn thân

2.3.4. Quy trình điều trị thoái hóa khớp gối bằng liệu pháp tế bào gốc mô mỡ tự thân

Quy trình phân tách tế bào gốc mô mỡ và quy trình kỹ thuật điều trị thoái hóa khớp gối bằng tế bào gốc mô mỡ tự thân đã được Bộ y tế và Hội đồng khoa học của Bệnh viện Bạch Mai thông qua ngày 11/01/2012.

2.3.4.1. Phân lập tế vào gốc mô mỡ

Các mẫu mô mỡ bụng được lấy bằng phương pháp chọc hút áp lực âm qua kim đầu tù có lỗ chuyên dụng. Ngay sau khi thu nhận mẫu mô mỡ của bệnh nhân thoái hóa khớp gối tại phòng mổ, các mẫu mô mỡ được xử lý làm sạch bằng nước muối sinh lý (NaCl 0,9%). Phân đoạn tế bào nền mạch máu mô mỡ được phân lập bằng bộ kít tách chiết tế bào của Adistem (Úc). Quy trình được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất để phân lập phân đoạn tế bào nền mạch máu. Tế bào sau khi phân lập được kiểm tra số lượng và trộn với huyết tương giàu tiểu cầu và kích hoạt bằng ánh sáng đơn sắc bằng máy AdiLight trước khi sử dụng cho điều trị.

2.3.4.2. Kiểm tra chất lượng tế bào sau khi phân lập

Toàn bộ các nghiên cứu về nuôi cấy, bảo quản và đánh giá tế bào được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Tế bào gốc, Trung tâm Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y.

- Xác định mật độ và tỷ lệ sống tế bào
- Nuôi cấy tăng sinh tế bào: đánh giá hình thái tế bào, khả năng bám dính và tăng sinh của tế bào
- Xác định các dấu ấn của tế bào bằng kỹ thuật flowcytometry
- Xác định độ vô khuẩn

2.3.4.3. Ghép tế bào gốc vào khớp gối

- Vị trí tiêm: 1,5 cm dưới ngoài xương bánh chè
- Tiêm khớp gối:

+ Tiêm 2ml Hyalgan (có hoạt chất là Sodium hyaluronate trọng lượng phân tử thấp 500-730 kDalton, hàm lượng 20mg/2ml của hãng Fidia, Ý) vào khớp gối với mục đích làm giá đỡ.

+ Tiêm 3ml dung dịch chứa huyết tương giàu tiểu cầu và phân đoạn tế bào nền mạch máu đã được kích hoạt cho khớp gối tổn thương

2.3.5. Theo dõi, đánh giá kết quả điều trị và tính an toàn thông qua các chỉ số lâm sàng, hình ảnh:

Tất cả bệnh nhân đều được đánh giá các thông số lâm sàng tại các thời điểm sau: T0 (Trước tiêm TBG); T1 (1 tuần sau tiêm TBG); T4 (1 tháng sau tiêm TBG); T13 (3 tháng sau tiêm TBG); T26 (6 tháng sau tiêm TBG) ; T52 (1 năm sau tiêm TBG).

Đánh giá sự thay đổi các thông số lâm sàng tại các thời điểm từ T0 đến T52

- Tình trạng đau khớp, hạn chế vận động khớp gối, dấu hiệu phá rỉ khớp

- Mức độ đau theo thang điểm VAS, cải thiện 30% điểm VAS, 50% điểm WOMAC đau theo nhóm tuổi, chỉ số khối cơ thể và giai đoạn XQ.

- Mức độ đau, cứng khớp, hạn chế vận động khớp gối theo thang điểm LEQUESNE, WOMAC.

Đánh giá sự thay đổi các thông số cận lâm sàng tại các thời điểm

- T0, T26, T52: Siêu âm đánh giá dịch, cấu trúc âm của sụn, bề dày sụn khớp đầu dưới xương đùi; MRI đo độ dày sụn khớp tại 7 vị trí.

Đánh giá tác dụng không mong muốn của liệu pháp

- Các tác dụng không mong muốn của liệu pháp được ghi nhận và xử trí tai biến (nếu xảy ra) tại các thời điểm T0 đến T52 và ở bất kỳ thời điểm nào trong khoảng 52 tuần theo dõi.

- Khảo sát sự xuất hiện khối u ở vị trí ghép tế bào gốc sau 12 tháng theo dõi.

2.4. Xử lý số liệu: Phần mềm SPSS 16.0.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng và đặc điểm phân đoạn tế bào nền mạch máu thu được

3.1.1. Triệu chứng lâm sàng

3.1.1.1. Triệu chứng cơ năng

Bảng 3.4. Triệu chứng cơ năng (n=72 khớp)

Đặc điểm	n	Tỷ lệ%
Đau kiểu cơ học	64	88,9
Đau kiểu viêm	8	11,1
Đau khi ngủ		
Không phải thức giấc	58	80,5
Thức giấc vì đau	14	19,5
Đau khi đứng lâu trên 30 phút	60	83,3
Đau khi đi bộ		
Không đau	0	0,0
Đau khi đi một đoạn (100m)	48	66,7
Đau ngay khi đi	24	33,3
Đau khi đi cầu thang	72	100,0
Lên cầu thang	72	100,0
Xuống cầu thang	65	90,3
Phá gỉ khớp:		
Không	10	13,9
Dưới 15 phút	38	52,8
15 - 30 phút	24	33,3

Nhận xét: Đa số khớp gối đau kiểu cơ học (chiếm 88,9%). Tỷ lệ bệnh nhân phải thức giấc khi ngủ vì đau là 7/36 bệnh nhân (chiếm 19,4%). 100% khớp gối đều có biểu hiện đau khi đi bộ và khi leo cầu thang. Dấu hiệu phá gỉ khớp gặp ở 86,1% khớp gối.

3.1.1.2. Triệu chứng thực thể

Bảng 3.6. Triệu chứng thực thể tại khớp gối (n=72 khớp)

Đặc điểm	n	Tỷ lệ %
Lạo xạo xương khi khám	67	93,1
Dấu hiệu bào gỗ	57	79,2
Tăng nhiệt độ tại khớp (Nóng)	4	5,6
Dấu hiệu bập bềnh xương bánh chè	16	22,2
Kén Baker (Kén khoeo)	5	6,9%
Biên độ gấp khớp gối ($\overline{X}$ ± SD)	$101,39^o \pm 11,42$ (90^o - 130^o)	

Nhận xét: Tỷ lệ khớp gối khám thấy có dấu hiệu bào gỗ là 79,2% trong khi dấu hiệu lạo xạo xương là 93,1%. Tỷ lệ tràn dịch phát hiện được trên lâm sàng là 22,2%.

3.1.2. Triệu chứng cận lâm sàng

3.1.2.1. Đặc điểm X quang khớp gối

Bảng 3.7. Đặc điểm XQ khớp gối (n=72 khớp)

Đặc điểm XQ	Vị trí	n	%
Trục chi	Bình thường	18	50,0
	Vẹo ngoài	2	5,6
	Vẹo trong	16	44,4
Hẹp khe khớp	***Chung***	62	86,1
	Đùi- Chày trong	59	81,9
	Đùi- Chày ngoài	37	51,4
	Đùi- Chè	55	76,3
Gai xương	***Chung***	64	88,9
	Đùi- Chày trong	63	87,5
	Đùi- Chày ngoài	52	72,2
	Đùi- Chè	59	81,9
Giai đoạn theo Kellgren Lawrene	Giai đoạn 2	11	15,3
	Giai đoạn 3	61	84,7

Ghi chú: 1 khớp có thể có nhiều tổn thương

Nhận xét: Biến dạng trục chi chiếm 50% trong đó phần lớn là lệch trục chi vẹo trong (chiếm 44,4%). Tỷ lệ hẹp khe khớp và gai xương trên XQ là 86,1% và 88,9% trong đó hay gặp tổn thương ở khe đùi chày

trong. Đa số khớp gối thoái hóa ở giai đoạn 3 theo Kellgrene và Lawrence (chiếm 84,7%).

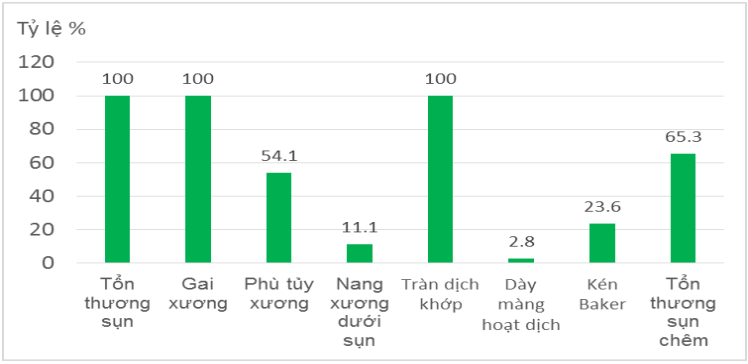
3.1.2.2. Đặc điểm siêu âm khớp gối

Bảng 3.8. Đặc điểm siêu âm khớp gối (n=72 khớp)

Đặc điểm tổn thương trên siêu âm		n	Tỷ lệ%
Dịch khớp	Không có dịch	31	43,0
	Ít	30	41,7
	Trung bình	11	15,3
	Nhiều	0	0,0
Dày màng hoạt dịch		2	2,8
Kén khoeo		17	23,6
Nốt Canxi hóa màng hoạt dịch		5	6,9
Gai xương	Chung	66	91,7
	Khe đùi chày trong	65	90,3
	Khe đùi chày ngoài	62	86,1

Nhận xét: Tỷ lệ tràn dịch khớp gối trên siêu âm là 57%, trong đó phần lớn là tràn dịch khớp mức độ ít (41,7%). Tỷ lệ gai xương trên siêu âm là 91,7%. Tỷ lệ gai xương ở vị trí khe đùi chày trong là 90,3% cao hơn so với ở vị trí khe đùi chày ngoài (86,1%)

3.1.2.3. Đặc điểm tổn thương trên MRI



Biểu đồ 3.2: Đặc điểm tổn thương trên MRI (n=72 khớp)

Nhận xét: 100% khớp gối có tổn thương cả 3 thành phần trong ổ khớp: sụn khớp, gai xương và tràn dịch khớp. Tỷ lệ phù tủy xương, nang

xương, kén Baker lần lượt là 54,1%; 11,1% và 23,6%. Có 65,3% trường hợp có tổn thương sụn chêm.

Bảng 3.11. Đặc điểm vị trí và mức độ tổn thương bề rộng sụn khớp trên MRI (n=72 khớp)

Tổn thương bề rộng sụn khớp	Mức độ							
	Độ 0		Độ 1		Độ 2		Độ 3	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Mào bánh chè	46	63,9	16	22,2	10	13,9	0	0,0
Mặt trong bánh chè	52	72,2	10	13,9	7	9,7	3	4,2
Mặt ngoài bánh chè	43	59,7	7	9,7	8	11,1	***14***	***19,4***
Mặt trong ròng rọc	44	61,1	2	2,8	7	9,7	***19***	***26,4***
Mặt ngoài ròng rọc	59	81,9	4	5,6	5	6,9	4	5,6
Lồi cầu trong	39	54,2	2	2,8	12	16,7	***19***	***26,4***
Lồi cầu ngoài	61	84,7	4	5,6	6	8,3	1	1,4
Mâm chày trong	43	59,7	5	6,9	9	12,5	***15***	***20,8***
Mâm chày ngoài	59	81,9	3	4,2	8	11,1	2	2,8

Nhận xét: Tổn thương bề rộng sụn khớp nặng nhất >10mm (độ 3) hay gặp ở vị trí mặt trong ròng rọc, lồi cầu trong xương đùi, mâm chày trong và mặt ngoài bánh chè với tỷ lệ lần lượt là 26,4%; 26,4%, 20,8% và 19,4%.

3.1.3. Đặc điểm phân đoạn tế bào nền mạch máu (SVF) thu được

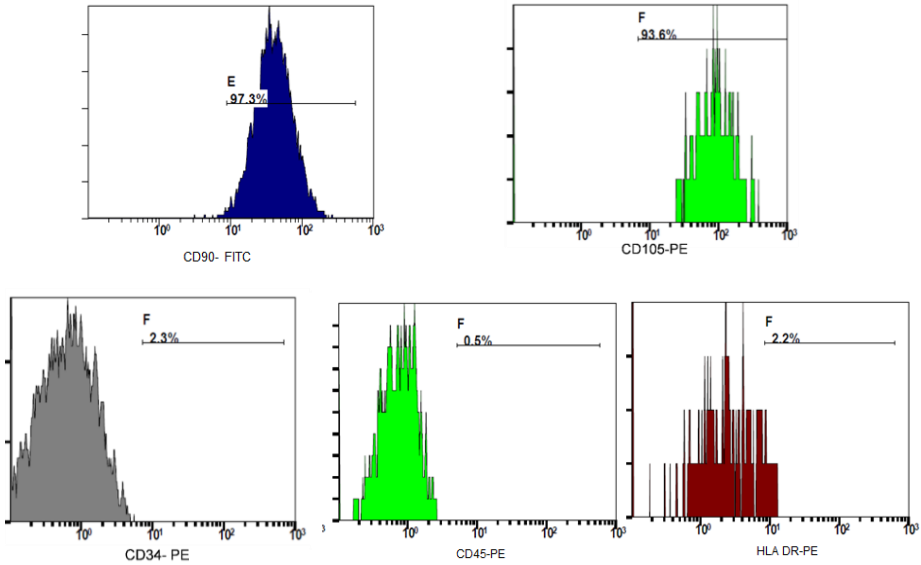
Bảng 3.20. Đặc điểm phân đoạn tế bào nền mạch máu (SVF) (n=36 mẫu TB)

Đặc điểm	$\overline{X}$ **± SD**
Thể tích khối tế bào có nhân thu được (ml)	5,24 ± 1,43
Số lượng tế bào có nhân /ml	(3,1 ± 0,62) x 10^8
Tổng tế bào có nhân tiêm 1 gối	(5,38 ± 0,13) x 10^8
Tỷ lệ sống (%)	96,91 ± 1,19
Tỷ lệ cấy khuẩn âm tính	100,0%
Thể tích mỡ thu được (ml)	122,64 ± 19,36

Nhận xét: Tổng số tế bào có nhân tiêm một khớp gối là (5,38 ± 0,13) x 10^8 tế bào. 100% các trường hợp đều có tỷ lệ tế bào sống > 95%. Không có trường hợp nào bị nhiễm khuẩn.

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy ngẫu nhiên 3 mẫu tế bào để đánh giá chất lượng tế bào. Tế bào SVF phối trộn với sản phẩm huyết tương giàu tiểu cầu kích hoạt bằng canxi clorua và ánh sáng đơn

sắc sau khi nuôi cấy xuất hiện các tế bào bám dính vào bề mặt đĩa nuôi cấy, có dạng hình thoi giống nguyên bào sợi, đặc trưng của TBG trung mô. Với 3 mẫu tễ bào được nuôi cấy, trong quần thể tế bào SVF, tỷ lệ các tế bào mang dấu ấn CD90 của tế bào gốc trung mô lần lượt là 2,9%; 2,7% và 3,7%. Sau khi nuôi cấy tăng sinh tế bào đến thế hệ thứ 3, các tế bào được tiến hành thu hoạch và được phân tích các dấu ấn bề mặt. Kết quả được thể hiện ở hình 3.3.



Hình 3.3: Kết quả biểu hiện một số dấu ấn bề mặt của TBG mô mỡ ở lần cấy chuyển thứ 3 của một mẫu tế bào

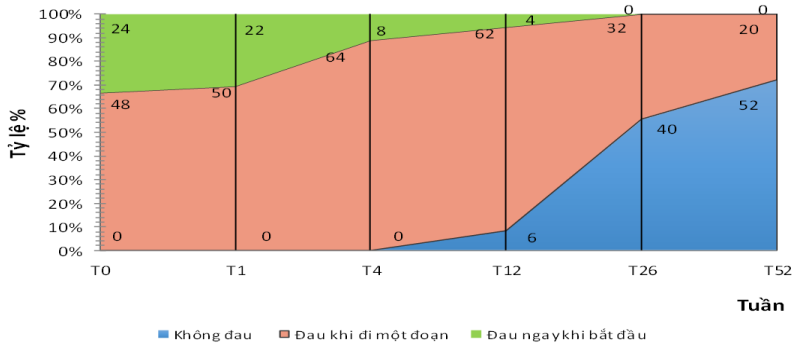
Dấu ấn	CD90	CD105	CD34	CD45	HLA DR
Tỷ lệ dương tính	94,6 ± 3,7	97,9 ± 3,7	1,6 ± 0,6	1,4 ± 1,7	1,03 ± 1,1

Nhận xét: Kết quả trên cho thấy các mẫu tế bào đều dương tính với dấu ấn CD90 (94,6%), CD 105 (97,9%) và âm tính với CD34 (1,6%), CD45 (1,4%) và HLA DR (1,03%).

3.2. Đánh giá kết quả điều trị và tính an toàn của liệu pháp

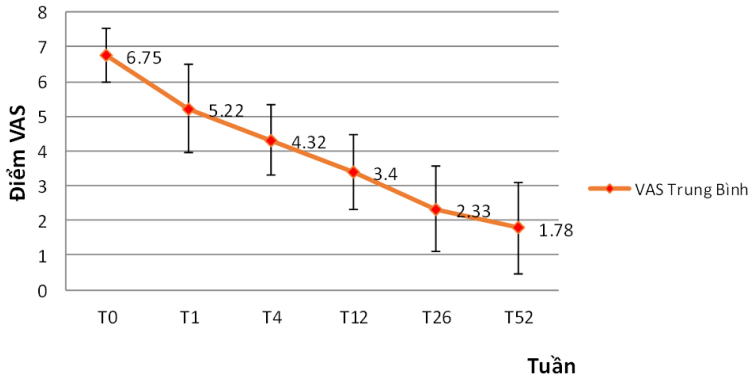
3.2.1. Đánh giá kết quả điều trị của liệu pháp

3.2.1.1. Đánh giá kết quả điều trị trên lâm sàng



Biểu đồ 3.4. Tỷ lệ thay đổi triệu chứng đau khi đi bộ tại các thời điểm

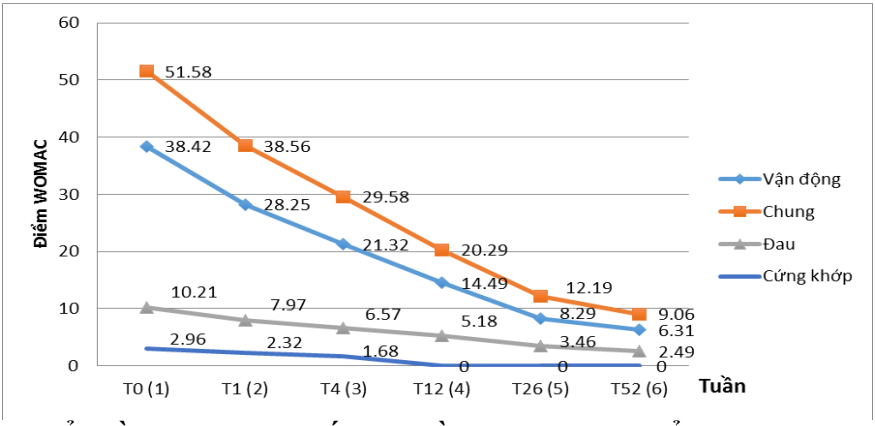
Nhận xét: Trước điều trị, 100% bệnh nhân có biểu hiện đau khi đi bộ, trong đó 66,7% khớp gối đau khi đi một đoạn và 33,3% khớp gối đau ngay khi bắt đầu đi. Từ sau 6 tháng điều trị, không có trường hợp nào đau ngay sau khi bắt đầu đi. Ngoài ra, trước điều trị 100% bệnh nhân đau khi đi cầu thang. Sau 6 tháng điều trị, tỷ lệ khớp gối đau khi đi cầu thang là 69,4%, giảm xuống còn 48,6% sau 1 năm điều trị.



Biểu đồ 3.5. Đánh giá kết quả điều trị qua thang điểm VAS

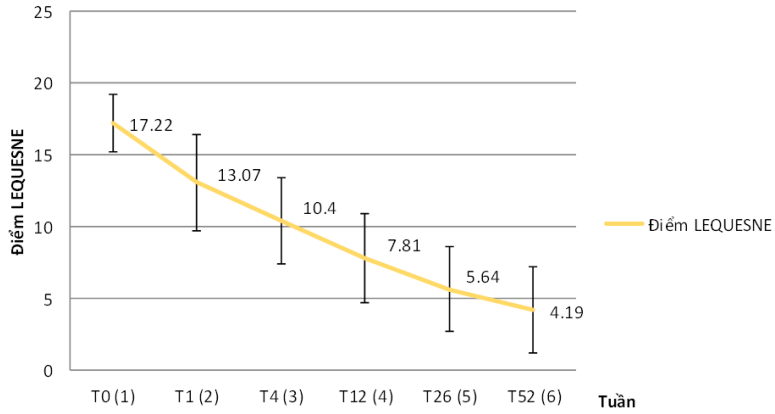
Nhận xét: Điểm đau VAS trung bình trước điều trị là 6,75 ± 0,78, giảm xuống còn 2,33 ± 1,22 sau 6 tháng điều trị và sau 1 năm điều trị là 1,78 ± 1,32. Sự cải thiện này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

Ngoài ra, thời gian phá rỉ khớp giảm từ 10,07±6,52 (phút) trước điều trị xuống 0,22±0,95 (phút) sau1 năm điều trị với p< 0,001. Biên độ vận động gấp khớp gối tăng từ 101,39°±11,42 lên 127,50°±4,36 sau 1 năm điều trị có ý nghĩa thống kê (p < 0,001).



Biểu đồ 3.8. Đánh giá kết quả điều trị qua thang điểm WOMAC

Nhận xét: Điểm WOMAC trung bình giảm từ 51,58±7,40 trước điều trị xuống còn 9,06±8,8 sau 1 năm điều trị. Trong đó, đều có sự cải thiện có ý nghĩa thống kê về các điểm WOMAC đau, WOMAC cứng khớp và WOMAC vận động với p < 0,001.



Biểu đồ 3.9. Đánh giá kết quả điều trị qua thang điểm LEQUESNE

Nhận xét: Sau 1 năm điều trị, điểm LEQUESNE trung bình có sự cải thiện, giảm từ 17,22±1,99 xuống còn 4,19±3,00 có ý nghĩa thống kê với p< 0,001.

Bảng 3.22: Thay đổi thang điểm VAS, WOMAC, LEQUESNE theo giai đoạn XQ (n=72 khớp)

VAS	**T0**	**T1**	**T4**	**T12**	**T26**	**T52**
Giai đoạn 2	6,6±0,8	4,9±1,3	3,6±1,1	2,9±1,0	1,5±1,0	0,6±0,7
Giai đoạn 3	6,8±0,8	5,3±1,3	4,4±1,0	3,5±1,1	2,5±1,2	2,0±1,3
P	***> 0,05***	***> 0,05***	***<0,05***	***>0,05***	***<0,01***	***<0,01***
WOMAC	**T0**	**T1**	**T4**	**T12**	**T26**	**T52**
Giai đoạn 2	51,3±7,3	35,2±11,7	22,6±11,4	15,6±8,3	6,2±4,8	2,6±2,7
Giai đoạn 3	51,6±7,5	39,2±11,8	30,8±10,7	21,1±10,8	13,3±9,5	10,2±9,0
P	***>0,05***	***>0,05***	***<0,05***	***>0,05***	***<0,05***	***< 0,01***
LEQUESNE	**T0**	**T1**	**T4**	**T12**	**T26**	**T52**
Giai đoạn 2	17,0±2,2	12,2±3,5	8,7±3,3	6,5±2,5	3,4±2,3	1,5±1,5
Giai đoạn 3	17,2±1,9	13,2±3,3	10,7±2,9	8,1±3,2	6,0±2,9	4,7±2,9
P	***>0,05***	***>0,05***	***<0,05***	***>0,05***	***<0,01***	***<0,01***

Nhận xét: Có sự cải thiện về thang điểm VAS, WOMAC, LEQUESNE ở cả 2 giai đoạn. Tuy nhiên, ở thời điểm sau 6 tháng và 1 năm, các khớp gối tổn thương ở giai đoạn 2 có sự thiện tốt hơn giai đoạn 3 có ý nghĩa thống kê với p< 0,05 (sau 6 tháng) và p< 0,01 (sau 1 năm).

3.2.1.2. Đánh giá kết quả điều trị trên cận lâm sàng

Đánh giá kết quả điều trị trên siêu âm

Bảng 3.27. Đánh giá kết quả điều trị qua bề dày sụn khớp trên siêu âm (n=72 khớp)

Bề dày sụn khớp	Trước ĐT (T0)	Sau 6 tháng (T26)	Sau 1 năm (T52)	P
Liên lồi cầu (mm)	2,33±0,56	2,62±0,51	2,71±0,46	< 0,01
Lồi cầu trong (mm)	1,89±0,45	2,25±0,57	2,31±0,53	< 0,001
Lồi cầu ngoài(mm)	2,01±0,51	2,33±0,51	2,40±0,46	< 0,001
Chung (mm)	2,08±0,36	2,40±0,42	2,48±0,36	< 0,001

Nhận xét: Bề dày sụn khớp trung bình trên siêu âm sau 6 tháng tăng từ 2,08±0,36 mm lên 2,40±0,42 mm và sau 1 năm là 2,48±0,36 mm với p< 0,001.

Ngoài ra, tỷ lệ bệnh nhân có tràn dịch khớp gối giảm từ 56,9% xuống 34,7% sau 6 tháng điều trị và sau 1 năm điều trị là 23,6%.

Đánh giá kết quả điều trị trên cộng hưởng từ

Bảng 3.31. Đánh giá kết quả điều trị qua bề dày sụn trên MRI (n=72 khớp)

Bề dày sụn khớp trên MRI	Trước ĐT (T0)	Sau 6 tháng (T26)	Sau 1 năm (T52)	P
Lồi cầu xương đùi	1,52 ± 0,57	1,61 ± 0,59	1,65 ± 0,56	< 0,001
Mâm chày	1,59 ± 0,59	1,68 ± 0,59	1,75 ± 0,57	<0,001
Khớp đùi chè	1,75±0,50	1,80±0,52	1,83±0,53	<0,05

Nhận xét: Bề mặt sụn khớp trên cộng hưởng từ ở cả 7 vị trí trên đều có sự cải thiện có ý nghĩa thống kê với p< 0,01.

Ngoài ra, có sự cải thiện về tình trạng phù tủy xương ở cả 3 vị trí xương bánh chè, xương đùi và xương chày sau 6 tháng và 1 năm theo dõi. Tuy nhiên sự cải thiện này không có ý nghĩa thống kê với p > 0,05

3.2.2. Tính an toàn của liệu pháp

Bảng 3.33. Các tai biến tại khớp gối của liệu pháp (n=72 khớp)

Đặc điểm	**n**	**Tỷ lệ %**
Đau khớp gối sau tiêm tế bào gốc	5	6,95
Tràn dịch khớp	4	5,56
Nhiễm khuẩn khớp	0	0,0
Nhiễm khuẩn phần mềm quanh khớp	0	0,0

Nhận xét: Tỷ lệ khớp gối đau sau tiêm là chiếm 6,95%. Trong đó chỉ có 2 trường hợp đau kéo dài trên 24 giờ. Có 5,56% khớp gối tràn dịch sau tiêm. Không gặp trường hợp nào có biểu hiện nhiễm khuẩn khớp hay phần mềm quanh khớp sau tiêm.

Bảng 3.34. Các tai biến tại vị trí lấy mỡ bụng của liệu pháp (n=36 BN)

Đặc điểm		n	%
Đau tại vị trí lấy mỡ bụng	Không	26	72,2
	Có	10	27,8
	Điểm đau VAS trung bình	1,1 ± 1,9 (0-5 điểm)	
Xuất huyết dưới da bụng	Không	26	72,2
	Có	10	27,8
	Thời gian trung bình (ngày)	1,8±3,3 (0 - 10 ngày)	

Nhận xét: Tỷ lệ đau vùng bụng sau lấy mỡ là 27,8%, trong đó đa số bệnh nhân đau trong vòng 1 ngày, VAS cao nhất là 5 điểm. Chỉ có 1 bệnh nhân đau kéo dài trên 24 giờ. Có 27,8% bệnh nhân bị xuất huyết ở vùng bụng sau lấy mỡ. Thời gian xuất huyết dài nhất là 10 ngày.

Ngoài ra, nghiên cứu của chúng tôi không gặp bất kỳ tác dụng không mong muốn toàn thân nào như nhức đầu, chóng mặt, mẩn ngứa, chảy máu cũng như tình trạng sốc. Cộng hưởng từ tại khớp gối sau 12 tháng điều trị không thấy xuất hiện các khối u bất thường.

Bảng 3.35. Đánh giá mức độ hài lòng sau điều trị (n=36BN)

Mức độ hài lòng	Sau 6 tháng		Sau 12 tháng		p
	n	Tỷ lệ %	n	Tỷ lệ %	
Không hài lòng	8	22,2	3	8,3	< 0,05
Hài lòng	21	58,3	9	25,0	
Rất hài lòng	7	19,4	24	66,7	

Nhận xét: Tỷ lệ bệnh nhân hài lòng với liệu pháp điều trị tăng dần theo thời gian theo dõi. Sau 6 tháng điều trị, tỷ lệ bệnh nhân hài lòng là 58,3% và rất hài lòng là 19,4%. Sau 1 năm điều trị, tỷ lệ này lần lượt là 25% và 66,7% (p<0,05).

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. Triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng và đặc điểm phân đoạn tế bào nền mạch máu

4.1.1. Triệu chứng lâm sàng

4.1.1.1. Triệu chứng cơ năng

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy 100% bệnh nhân đều có biểu hiện đau khớp gối. Trong đó, đa số khớp gối đau kiểu cơ học (chiếm 88,9%), chỉ có 11,1% khớp gối đau kiểu viêm do tình trạng viêm màng

hoạt dịch kèm theo (Bảng 3.4). Kết quả này tương tự so với kết quả nghiên cứu của Bùi Hải Bình cho thấy đau kiểu cơ học chiếm 97,5% và Đặng Hồng Hoa là 95,2%. Dấu hiệu "phá rỉ khớp" là dấu hiệu cứng khớp buổi sáng kéo dài từ 15-30 phút. Tỷ lệ khớp gối có biểu hiện cứng khớp trong nghiên cứu của chúng tôi là 86,1%. Thời gian phá gỉ khớp dài nhất là 30 phút (Bảng 3.4). Kết quả này tương tự so với kết quả nghiên cứu của Bùi Hải Bình nhận thấy tỷ lệ khớp gối có dấu hiệu phá gỉ khớp là 75,4%.

4.1.1.2. Triệu chứng thực thể

Trong nghiên cứu của chúng tôi, các triệu chứng thường gặp khi thăm khám khớp gối là lạo xạo xương khi khám 93,1%, dấu hiệu bào gỗ dương tính 79,2% (bảng 3.6). Tỷ lệ lạo xạo xương trong nghiên cứu của chúng tôi, tương tự so với nghiên cứu của Bùi Hải Bình là 90,2% và Nguyễn Thị Thanh Phượng là 96,7%. Đây là dấu hiệu quan trọng phản ánh trung thành tình trạng thoái hoá khớp gối mà trong các tiêu chuẩn chẩn đoán THK của Hiệp hội thấp khớp học Hoa Kỳ ACR 1986 và ACR 1991 đều có mặt. Gây cọ sát các diện sụn với nhau có thể nhận biết được tiếng lắc rắc được gọi là "dấu hiệu bào gỗ", chứng tỏ có tổn thương khớp đùi chè. Tỷ lệ dấu hiệu bào gỗ dương tính trong nghiên cứu của chúng tôi tương tự với nghiên cứu của Đặng Hồng Hoa là 78,6%. Trong thoái hóa khớp gối, khớp tổn thương sẽ bị hạn chế chức năng vận động. Tỷ lệ khớp gối có hạn chế động tác gấp khớp gối trong nghiên cứu của chúng tôi là 93,05%. Không có trường hợp nào hạn chế vận động động tác duỗi khớp gối (Bảng 3.6).

4.1.2. Triệu chứng cận lâm sàng

4.1.2.1. Đặc điểm X quang khớp gối

Qua khảo sát 36 bệnh nhân thoái hóa khớp, chúng tôi nhận thấy tỷ lệ bệnh nhân có biến dạng lệch trục cẳng chân vẹo vào trong là 44,4% và cẳng chân vẹo ngoài là 5,6% (Bảng 3.7). Các thông số trên cho thấy tỷ lệ lệch trục chi vẹo trong gặp khá cao ở người Việt Nam. Hunter và cộng sự (2009) đã đưa ra bằng chứng cho thấy ở những bệnh nhân thoái hóa khớp gối, trục giải phẫu có liên quan với tình trạng tiến triển của thoái hóa khớp cũng với các yếu tố nguy cơ khác như béo phì, sức mạnh của cơ tứ đầu đùi, tình trạng lỏng lẻo khớp và mức độ nặng của bệnh. Kết quả nghiên

cứu của chúng tôi cho thấy 86,1% bệnh nhân có hẹp khe khớp trên XQ trong đó hẹp khe đùi chày trong chiếm 81,9%, hẹp khe đùi chày ngoài chiếm 51,4% và hẹp khe đùi chè là 76,3% (Bảng 3.7). Các nghiên cứu cả trong và ngoài nước đều cho thấy hẹp khe khớp đùi chày trong hay gặp hơn hẹp khe đùi chày ngoài. Điều này có thể giải thích do trục khớp góp phần quan trọng vào việc phân bố trọng lượng cơ thể lên bề mặt khớp giữa khe đùi chày trong và khe đùi chày ngoài. Khi khớp ở tư thế đứng thẳng, phần đùi chày trong phải chịu sức nặng của 60-70% trọng lượng cơ thể trong các hoạt động chịu lực. Tỷ lệ khớp gối có gai xương trong nghiên cứu của chúng tôi là 88,9%, trong đó gai xương khe đùi chày trong, khe đùi chày ngoài và khớp đùi chè theo thứ tự lần lượt là 87,5%, 72,2% và 81,9% (Bảng 3.7). Kết quả của các nghiên cứu lâm sàng và dịch tễ học đều cho rằng gai xương là dấu hiệu đặc trưng thường gặp nhất ở bệnh nhân thoái hóa khớp gối.

4.1.2.2. Đặc điểm siêu âm khớp gối

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ khớp gối có biểu hiện tràn dịch khớp trên siêu âm là 57%, trong đó chủ yếu là tràn dịch khớp mức độ ít chiếm 41,7%. Không gặp trường hợp nào tràn dịch khớp gối nhiều. Nghiên cứu của Iagnocco trên 82 bệnh nhân thoái hóa khớp gối ở Ý cho thấy tỷ lệ tràn dịch khớp trên siêu âm là 43% và có mối tương quan chặt chẽ giữa hình ảnh tổn thương trên siêu âm và điểm Lequesne (thang điểm đánh giá mức độ nặng của thoái hóa khớp gối) cũng như tình trạng đau trên lâm sàng của bệnh nhân. Tỷ lệ gai xương trên siêu âm là 91,7%, khe đùi chày trong là 90,3% cao hơn so với khe đùi chày ngoài (chiếm 86,1%) (Bảng 3.8); cao hơn so với tỷ lệ các triệu chứng phát hiện được trên XQ.

4.1.2.3. Đặc điểm tổn thương trên MRI

Trong nghiên cứu của chúng tôi, 100% khớp gối thoái hóa có biểu hiện tổn thương sụn, gai xương và tràn dịch khớp trên cộng hưởng từ. Tỷ lệ dày màng hoạt dịch và kén Baker được phát hiện với tỷ lệ 2,8% và 23,6%, tương tự so với tỷ lệ phát hiện được trên siêu âm (Bảng 3.8). Tỷ lệ phù tủy xương và tổn thương sụn chêm phát hiện được trên cộng hưởng từ khá cao 54,1% và 65,3% (Biểu đồ 3.2). Theo tác giả Bùi Hải Bình, tỷ lệ gặp các thành phần tổn thương trong thoái hóa bao gồm: 99,1% tràn dịch khớp, 98,2% có tổn thương sụn, 97,3% có gai xương, 76,6% phù tủy xương,

19,8% có kén Baker khoeo chân, 10,9% nang xương dưới sụn, 1,8% viêm màng hoạt dịch khớp và 70,3% có tổn thương sụn chêm. Tổn thương bề rộng và bề sâu sụn khớp mức độ nặng (> 10mm) thường gặp ở vị trí mâm chày trong (20,8% - 13,9%), lồi cầu trong (26,4% - 8,3%), mặt trong ròng rọc (26,4% - 8,3%) (Bảng 3.11, 3.12). Ngoài ra, chúng tôi cũng gặp tổn thương sụn khớp ở vị trí mặt ngoài xương bánh chè với tỷ lệ 19,4%. Trong nghiên cứu của chúng tôi, 100% khớp gối có gai xương trong đó tỷ lệ gai xương ở xương bánh chè cao nhất (100%), sau đó đến lồi cầu (95,8%), mâm chày (75%). Gai xương lớn > 5mm hay gặp ở vùng rìa lồi cầu trong (63,9%), mâm chày trong (41,7%), khớp ròng rọc (mặt trong: 45,8% và mặt ngoài: 37,5%) (Bảng 3.14). Kết quả này tương tự so với nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Phượng cho thấy gai xương thường gặp ở xương bánh chè chiếm 90,6%, tiếp theo là vùng lồi cầu trong 66,4% và mâm chày trong 56,1%. Gai xương lớn tập trung chủ yếu ở vùng lồi cầu trong xương đùi, tỷ lệ gai xương độ II 28,2% và độ III 8,7%. Phù tủy xương là tổn thương thoái hóa bao gồm các hiện tượng: phù, hoại tử tủy xương và xơ hóa. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy phù tủy xương hay gặp nhất ở xương chày và xương đùi với tỷ lệ như nhau là 54,1%, trong đó chủ yếu là phủ tủy xương ở vị trí lồi cầu trong (30,6%) và mâm chày trong (40,3%).

4.1.3. Đặc điểm phân đoạn tế bào nền mạch máu (SVF) thu được

Theo quy trình của Adistem thì số lượng tế bào thu được tối thiểu đảm bảo cho quá trình tiêm vào khớp cho bệnh nhân là 10^7/ml. Trong nghiên cứu này của chúng tôi, 100% mẫu xử lý tế bào có nồng độ tế bào cao hơn gấp 10 lần tiêu chuẩn (>10^8 tế bào/ml). Kết quả này cho thấy quy trình kỹ thuật của Adistem tách được số lượng tế bào gấp hàng chục lần phương pháp truyền thống và tỷ lệ sống cao. Để đánh giá chất lượng tế bào gốc thu được, chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy 3 mẫu tế bào ngẫu nhiên. Các tế bào phân lập được sau khi nuôi cấy có dạng hình thoi đặc trưng và tiếp tục tăng sinh và hợp dòng và trải đều trên bề mặt đĩa nuôi cấy. Đây là các tế bào có hình dạng giống như nguyên bào sợi là hình thái đặc trưng của TBG trung mô, giống với các TBG trung mô thu được từ các mô khác và có khả năng bám dính. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành phân tích dấu ấn CD90 và CD105 cho tỷ lệ dương tính cao

(≥95%) và âm tính với CD34, CD45 và HLA-DR (Hình 3.4). Kết quả này cũng phù hợp với một số kết quả nghiên cứu của các tác giả khác đã công bố về đặc điểm tế bào gốc phân lập từ mô mỡ. Như vậy bước đầu đánh giá tế bào thu nhận và nuôi cấy được có đặc điểm của TBG trung mô từ mô mỡ. Ở Việt Nam cho đến nay đã có rất nhiều nghiên cứu phân lập tế bào gốc theo quy trình của Adistem và thu được số lượng tế bào lớn, tỷ lệ sống cao, kích hoạt hiệu quả mang lại tiềm năng ứng dụng tốt trên lâm sàng.

4.2. Đánh giá kết quả điều trị và tính an toàn của liệu pháp

4.2.1. Đánh giá kết quả điều trị

4.2.1.1. Đánh giá kết quả điều trị trên lâm sàng

Trong nghiên cứu của chúng tôi, sau 1 năm theo dõi, các bệnh nhân nghiên cứu đều có cải thiện về các triệu chứng lâm sàng như: Tình trạng đau khi ngủ, đau khi đi bộ, đau khi nghỉ ngơi, đau khi leo cầu thang, đau khi đứng và khi thay đổi tư thế không vịn ghế, đặc biệt các triệu chứng này cải thiện rõ rệt sau 6 tháng điều trị. Tương tự như vậy, điểm VAS, WOMAC và LEQUESNE đều cho thấy có sự cải thiện có ý nghĩa thống kê sau 1 năm theo dõi với $p<0,01$. Thời gian phá gỉ khớp giảm từ 10,07±6,52 (phút) trước điều trị xuống 0,22±0,95 (phút) sau 1 năm điều trị ($p< 0,001$). Sau điều trị 6 tháng, chức năng khớp gối được cải thiện rõ rệt nhất so với trước điều trị vì trong thời điểm này tình trạng đau gối được cải thiện do tác động của phục hồi sụn khớp. Sau điều trị 12 tháng, tình trạng đau khớp gối tiếp tục được cải thiện chứng tỏ có vai trò của sụn khớp mới phục hồi. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cho thấy tế bào gốc trung mô có tác dụng chống viêm và ức chế miễn dịch thông qua điều biến tế bào B và T, kích thích giải phóng các yếu tố chống viêm như Interleukin 10 (IL-10), tác nhân chống lại receptor của IL-1 (IL-1 RA) hoặc prostaglandin E2 (PGE2) giúp cải thiện tình trạng đau khớp, đặc biệt là đau kiểu viêm (đau về đêm, đau khi nghỉ ngơi) và cứng khớp, hạn chế vận động khớp. Đồng thời với cải thiện triệu chứng đau do hiệu quả phục hồi sụn khớp, sự tăng cường tập luyện, vận động gối của người bệnh giúp chức năng khớp gối của bệnh nhân ngày càng được cải thiện. Trong nghiên cứu của chúng tôi, biên độ vận động gấp khớp gối tăng từ $101,39^o$±11,42 lên $127,50^o$±4,36 sau 1 năm điều trị có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$) (Biểu đồ 3.7). Điểm WOMAC vận động trung bình giảm từ

38,42±5,19 trước điều trị xuống còn 8,29±6,86 sau 6 tháng điều trị và sau 1 năm là 6,31±6,36 với p < 0,001 (Biểu đồ 3.8). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự so với kết quả nghiên cứu của một số tác giả trong nước và trên thế giới.

Sau điều trị, chúng tôi nhận thấy có sự cải thiện về thang điểm VAS, WOMAC, LEQUESNE ở cả 2 giai đoạn II và III. Tuy nhiên, ở thời điểm sau 6 tháng và 1 năm, các khớp gối tổn thương ở giai đoạn II có sự thiện tốt hơn giai đoạn III có ý nghĩa thống kê với p< 0,05 (sau 6 tháng) và p< 0,01 (sau 1 năm) (Bảng 3.22). Kết quả nghiên cứu trên cho thấy, bệnh nhân có mức độ tổn thương khớp gối trước điều trị càng thấp thì hiệu quả điều trị càng cao. Nghiên cứu của tác giả Michalek trên 1114 bệnh nhân thoái hóa điều trị bằng liệu pháp tế bào gốc mô mỡ tự thân cho thấy béo phì và mức độ thoái hóa có liên quan đến quá trình phục hồi sụn khớp.

4.2.1.2. Đánh giá kết quả điều trị trên cận lâm sàng

Đánh giá kết quả điều trị trên siêu âm

Kết quả nghiên cứu cho thấy có sự cải thiện bề dày sụn khớp có ý nghĩa thống kê ở cả 3 vị trí lồi cầu ngoài, lồi cầu trong và liên lồi cầu (p< 0,001). Bề dày sụn khớp trung bình trên siêu âm sau 6 tháng tăng từ 2,08±0,36 mm lên 2,40±0,42 mm và sau 1 năm là 2,48±0,36 mm với p< 0,001 (Bảng 3.27). Như vậy, có sự cải thiện bề dày sụn khớp rõ ràng sau 6 tháng điều trị. Kết quả này cũng phù hợp với những cải thiện về các triệu chứng lâm sàng sau 6 tháng điều trị. Điều này cho thấy, liệu pháp tế bào gốc mô mỡ theo công nghệ Adistem đã phục hồi được sụn khớp bị tổn thương, tái tạo sụn mới trong khi tất cả các phương pháp điều trị trước đây chỉ dừng ở mức độ sụn khớp ngừng hủy hoại. Tỷ lệ bệnh nhân có tràn dịch khớp gối giảm từ 56,9% xuống 23,6% sau 1 năm điều trị. Tràn dịch khớp mức độ trung bình trên siêu âm có sự cải thiện có ý nghĩa thống kê: giảm từ 15,2% trước điều trị xuống còn 0% sau 1 năm điều trị. (Biểu đồ 3.12). Điều này cho thấy tình trạng viêm màng hoạt dịch phản ứng được cải thiện song song với sự phục hồi của sụn khớp - vốn là tổn thương chính và khởi nguồn của bệnh. Tình trạng viêm, tràn dịch thuyên giảm phù hợp với sự cải thiện triệu chứng đau, hạn chế vận động trên lâm sàng.

Đánh giá kết quả điều trị trên cộng hưởng từ

Trong nghiên cứu của chúng tôi bề mặt sụn khớp trên cộng hưởng từ ở cả 7 vị trí: lồi cầu ngoài, lồi cầu trong, liên lồi cầu, mâm chày trong, mâm

chày ngoài, giữa mâm chày và xương bánh chè đều có sự cải thiện có ý nghĩa thống kê với p< 0,01. Kết quả này tương tự so với kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả trong nước và trên thế giới. Nghiên cứu của tác giả Liang-jing Lu năm 2016 trên 18 bệnh nhân thoái hóa khớp gối cho thấy thể tích sụn khớp xương đùi, xương chày và xương bánh chè tăng ổn định trong toàn bộ thời gian theo dõi, có ý nghĩa thống kê ở thời điểm sau 6 tháng, 12 tháng và 18 tháng. Ngoài ra, nghiên cứu của chúng tôi còn cho thấy có sự cải thiện về tình trạng phù tủy xương ở cả 3 vị trí xương bánh chè, xương đùi và xương chày sau 6 tháng và 1 năm theo dõi. Tuy nhiên sự cải thiện này không có ý nghĩa thống kê với p > 0,05 (Bảng 3.32). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của tác giả Liang -jing Lu (2016) cho thấy có sự cải thiện tình trạng phù tủy xương trên cộng hưởng từ sau 2 năm theo dõi. Tương tự như vậy, nghiên cứu của tác giả Jaewoo Pak (2016) cũng nhận thấy có sự giảm tình trạng phù tủy xương trên cộng hưởng từ sau 22 tuần điều trị.

4.2.2. Tính an toàn của liệu pháp

Để đánh giá hiệu quả của một biện pháp điều trị không thể không đánh giá tính an toàn của biện pháp đó. Tế bào gốc từ người trưởng thành là những tế bào gốc có trong các tổ chức của cơ thể sau khi sinh, phát triển và biệt hóa ở tổ chức đó mặc dù với số lượng ít. Tuy nhiên, việc sử dụng các tế bào gốc đã trưởng thành có ưu điểm là có thể lấy tế bào gốc này từ một bệnh nhân, đem nuôi cấy (hoặc không) rồi ghép trở lại (ghép tự thân) cho cùng bệnh nhân đó mà không sợ hệ miễn dịch của cơ thể tấn công. Hơn nữa sử dụng tế bào gốc nguồn gốc từ người trưởng thành ít bị ung thư hóa hoặc vượt sự kiểm soát về số lượng như dùng tế bào gốc nguồn gốc phôi, thai.

Trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi không gặp bất kỳ tác dụng không mong muốn tại chỗ cũng như toàn thân nghiêm trọng nào (Bảng 3.33, 3.34). Kết quả chụp cộng hưởng từ khớp gối tại vị trí ghép tế bào gốc sau 12 tháng theo dõi không thấy xuất hiện khối u bất thường. Để đánh giá tính an toàn của liệu pháp ghép tế bào gốc mô mỡ tự thân, năm 2013 tác giả Jaewoo Pak và cộng sự đã tiến hành khảo sát trên 91 bệnh nhân với 100 khớp (74 khớp gối và 2 khớp cổ chân thoái hóa, 22 khớp háng trong đó có 15 khớp là hoại tử vô mạch chỏm xương đùi và 7 khớp thoái hóa, 2 trường hợp thoát vị đĩa đệm cột sống thắt lưng) được tiêm hỗn hợp tế bào gốc mô mỡ và huyết tương giàu tiểu cầu. Thời gian theo dõi trung bình là

26,62±0,32 tháng (dài nhất là 36 tháng). Kết quả nghiên cứu cho thấy cộng hưởng từ tại vị trí ghép tế bào gốc mô mỡ không thấy có biểu hiện của sự hình thành khối u sau 3 tháng và sau 3 năm điều trị. Tuy nhiên, hay gặp biểu hiện đau và sưng khớp có thể là do hiện tượng chết tế bào. Tác giả đưa ra kết luận liệu pháp TBG mô mỡ tự thân không nuôi cấy kết hợp với PRP là phương pháp điều trị an toàn khi sử dụng tiêm tại chỗ Nghiên cứu của tác giả Centeno tiến hành trong 2 năm điều trị cho 339 bệnh nhân thoái hóa khớp và Wakitani tiến hành trong 11 năm điều trị thoái hóa khớp ở 41 bệnh nhân có sử dụng tế bào gốc trung mô cho thấy đây là liệu pháp an toàn. Chưa phát hiện thấy trường hợp nào bị nhiễm khuẩn hay ung thư sau điều trị.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy tỷ lệ bệnh nhân hài lòng với liệu pháp điều trị tăng dần theo thời gian theo dõi. Sau 6 tháng điều trị, tỷ lệ bệnh nhân hài lòng là 58,3% và rất hài lòng là 19,4%. Sau 1 năm điều trị, tỷ lệ này lần lượt là 25% và 66,7% (Bảng 3.35). Điều này cho thấy liệu pháp tế bào gốc mô mỡ đã giúp cải thiện các triệu chứng cho bệnh nhân, bệnh nhân có thể đi lại bình thường và thực hiện các hoạt động sinh hoạt hàng ngày.

KẾT LUẬN

1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của thoái hóa khớp gối nguyên phát giai đoạn II - III và phân đoạn tế bào nền mạch máu thu được:

- Các triệu chứng thường gặp: Đau kiểu cơ học (88,9%); 100% khớp gối đều có biểu hiện đau khi đi bộ và khi leo cầu thang. Dấu hiệu phá gỉ khớp chiếm 86,1%. Lạo xạo xương 93,1%; dấu hiệu bào gỗ 79,2%.

- Đặc điểm tổn thương trên Xquang: lệch trục chi chiếm 50%; 86,1% khớp gối có hẹp khe khớp; gai xương chiếm 88,9%; đặc xương dưới sụn chiếm 65,3%.

- Đặc điểm tổn thương trên siêu âm: tràn dịch khớp chiếm 57%; gai xương chiếm 91,7%. Bề dày sụn khớp ở vị trí lồi cầu trong, lồi cầu ngoài, liên lồi cầu lần lượt là 1,89 ± 0,45 mm, 2,01 ± 0,51mm, 2,33 ± 0,56 mm

- Đặc điểm tổn thương trên cộng hưởng từ: 100% khớp gối có tổn thương sụn, gai xương và tràn dịch khớp; phù tủy xương và tổn thương sụn chêm là 54,1% và 65,3%. Tổn thương sụn nặng hay gặp ở khớp đùi chày

trong. Bề dày sụn khớp trung bình đầu dưới xương đùi là 1,52 ± 0,57 mm và đầu trên xương chày là 1,59 ± 0,59 mm.

- *Đặc điểm phân đoạn tế bào nền mách máu thu được*

+ Tổng số tế bào có nhân: (1,87 ± 0,24) x 10^9 tế bào, tổng số tế bào có nhân tiêm 1 khớp gối: (5,38 ± 0,13) x 10^8 tế bào. Tỉ lệ các tế bào sống: 97%.

+ Phân đoạn tế bào nền mạch máu thu được từ mô mỡ mang đặc điểm của tế bào gốc trung mô: tế bào sau khi nuôi cấy có dạng hình thoi đặc trưng; có khả năng bám dính; biểu hiện các dấu ấn marker bề mặt: dương tính với CD90, CD105 và âm tính CD34, CD45 và HLA-DR

2. Kết quả điều trị và tính an toàn ban đầu của liệu pháp tế bào gốc mô mỡ tự thân

2.1. Kết quả điều trị

- Sau 1 năm theo dõi, các bệnh nhân nghiên cứu đều có cải thiện về tình trạng đau, mức độ hạn chế vận động có ý nghĩa thống kê. Đặc biệt, các triệu chứng này cải thiện rõ rệt sau 6 tháng điều trị ($p<0,05$).

- Điểm VAS, WOMAC, LEQUESNE trung bình đều có sự cải thiện có ý nghĩa thống kê với $p< 0,001$.

- Ở nhóm bệnh nhân thoái hóa khớp gối giai đoạn II đáp ứng với điều trị tốt hơn so với giai đoạn III ($p< 0,05$).

- Có sự cải thiện bề dày sụn khớp có ý nghĩa thống kê trên siêu âm và cộng hưởng từ ($p< 0,01$).

2.2. Tính an toàn

Liệu pháp an toàn: Không gặp các tác dụng không mong muốn tại chỗ cũng như toàn thân nghiêm trọng.Tỷ lệ bệnh nhân hài lòng với liệu pháp điều trị tăng dần theo thời gian theo dõi.

KIẾN NGHỊ

Nên tiến hành điều trị thoái hóa khớp gối nguyên phát giai đoạn II và III bằng liệu pháp tế bào gốc mô mỡ tự thân, đặc biệt là giai đoạn II để đạt hiệu quả tốt hơn.

MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING MINISTRY OF HEALTH

HANOI MEDICAL UNIVERSITY

PHAM HOAI THU

STUDY OF EFFICACY OF AUTOLOGOUS ADIPOSE TISSUE - DERIVED STEM CELL THERAPY IN TREATMENT OF PRIMARY KNEE OSTEOARTHRITIS

Major : Internal-Rheumatology
Code : 62720142

MEDICAL DOCTOR DISSERTATION SUMMARY

HA NOI – 2017

THESIS RESEARCH IS ACCOMPLISHED
AT HANOI MEDICAL UNIVERSITY

Instructor: Assoc Prof. PhD. Nguyen Thi Ngoc Lan

Reviewer 1: Assoc.Prof. PhD. Le Thu Ha

Reviewer 2: Assoc.Prof. PhD. Nguyen Mai Hong

Reviewer 3: Assoc.Prof. PhD. Bui Van Lenh

The thesis will be defended from the university level council marking doctoral thesis at Hanoi Medical University.

At On ,2017.

The thesis can be found in:

- National library of Vietnam
- Library of Hanoi Medical University
- Library of Central Medical Information

LIST OF RESEARCH WORKS PUBLISHED

RELATED TO THE THESIS

1. Initial evaluation efficacy of adipose tissue -derived stem cell therapy in treatment of primary knee osteoarthritis (2013). *Journal of Internal Medicine*, special number, page 199-205.
2. Initial evaluation of clinical results of intra-articular injection of autologous adipose tissue - derived stem cell therapy in primary knee osteoarthritis treatment (2014). *Journal of Military Pharmaco - medicine*, Vol 39, No 7, 83-88.
3. Evaluation of cartilage and symptom improvements on 48 osteoarthritis knee joints treated by autologous adipose tissue - derived stem cell therapy after 6 months (2015). *Journal of Medicine,* Vol 427, special number, page 218-224.
4. Evaluation of production protocol of autologous adipose tissue-derived stem cells according to Adistem technology at Bachmai hospital (2015). *Journal of Medicine*, Vol 427, special number, page 308-313.

THESIS INTRODUCTION

1. The topicality of thesis

Knee osteoarthritis is a disease injuring all components of a joint including cartilage, subchondral bone, ligament, synovial membrane and muscles beside the joint, in which the cartilage injury is major. This disease is very common in old people all over the world. The WHO estimates around 25% of elderly pepple over 65 years old had painful joints and disability due to osteoarthritis. With increasing average life expectancy and an increase in obesity in the general population, the increasing incidence of knee degeneration has a significant impact on quality of life and socioeconomic status. So far, treatment of the disease is very costly to both patients and the whole society while the effectiveness of treatment is often not achieved. Internal medicine and surgical therapies for knee osteoarthritis are mainly aimed at treating the symptoms of the disease and have not yet reached its goal, improving cartilage quality and can not even stop degradation. Some new approaches in the treatment of osteoarthritis have emerged including intra-articular injection of autologous stem cells opening a new direction: targeted therapy to achieve optimal therapeutic efficacy. The results of some pre-clinical and clinical studies in the world show that intra-articular injection of autologuous adipose tissue-derived stem cell for knee osteoarthritis patients significantly improved pain threshold (VAS), mobility capacity and joint cartilage injury. In Vietnam, no studies have systematically evaluated the efficacy of intra-articular injection of autologuous adipose tissue-derived stem cell in the treatment of primary knee osteoarthritis stage II-III. Therefore, this research has been conducted and revealed the therapy has positive effects by preseverving cartilage naturally and physiologically, which brings new hope in the treatment of primary knee osteoarthritis.

2. Scientific contributions of thesis

The thesis describes in detail the clinical and subclinical characteristics of primary knee osteoarthritis stage II-III. The results of the study showed that autologous adipose tissue-derived stem cells therapy improved pain symptoms and mobility capacity in clinical for knee osteoarthritis patients stage II-III after both 6 and 12 months of treatment. In addition, there is a partial improvement in joint cartilage thickness on ultrasonography and magnetic resonance. By investigating the initial safety of therapy, the study did not find any local or serious systemic adverse effects.

3. Study aims

- To describe clinical and sub-clinical characteristics of primary knee osteoarthritis patients stage II-III
- To evaluate efficacy and initial saftety of autologuous adipose tissue-derived stem cell in the treatment of primary knee osteoarthritis stage II-III after 12 months of follow-up.

4. Thesis structure

The thesis has 134 pages including: Background (2 pages), Literature Review (36 pages), Subjects and Methods of study (22 pages), Results (34 pages), Discussion (37 pages), Conclusion (2 pages), and Recommendation (1 page). There are 35 tables, 10 figures, 1 diagram and 23 images. The thesis has 183 references in which 21 in Vietnamese and 162 in English.

CHAPTER 1: LITERATURE REVIEW

1.1. Knee osteoarthritis diagnosis

Knee osteoarthritis is a progressive, nonspecific clinical disease. Therefore, to determine the diagnosis of knee osteoarthritis, it requires to combine the risk factors, clinical symptoms, subclinical and imaging methods. However, the diagnosis of osteoarthritis is a diagnosis of exclusion because radiographic osteoarthritis images often appear in the elderly but the pain may be due to another cause. The American College of Rheumatology (ACR) set the standard for knee osteoarthritis diagnosis in 1991 with a sensitivity of 94% and a specificity of 88%.

1.2. Knee osteoarthritis treatment

1.2.1. Internal and surgical treatment

Treatment for knee osteoarthritis includes: non-drug treatment, internal medical treatment and surgical treatment. Current treatment methods have not resolved the etiology and nature of the disease which is the loss of joint cartilage. In addition, knee osteoarthritis is more common in the elderly with many co-morbid diseases which lead to difficulties in medication indications and many of the undesirable effects may occur..

1.2.2. Adipose tissue - derived stem cells therapy in treatment of knee osteoarthritis

Adipose tissue-derived stem cells are effective in repairing cartilage injury due to its ability to differentiate into cartilage cells and release biologically activated factors such as transforming growth factor (TGF- β), bone morphogenetic proteins (BMPs), growth factors resisting

to apoptosis and fibrosis. In addition, many studies have shown evidence that the role of adipose tissue-derived stem cells in inhibiting immune responses is demonstrated by reduced local inflammatory responses.

In some countries in the world such as Australia, Canada and Korea, they allow the transplantation of autologous cells (or tissues) (on the same patient) in one phase to ensure sterilization. With the application of adipose tissue-derived stem cells in the treatment of osteoarthritis, many studies have evaluated the safety and efficacy of this therapy. The study results confirmed the ability to differentiate into cartilage of adipose tissue-derived stem cells both ex vivo and in vivo.

CHAPTER 2: SUBJECTS AND METHODOLOGY

2.1. Study subjects

2.1.1. Inclusion criteria

Our study recruited patients diagnosed as primary osteoarthritis according to ACR diagnostic criteria 1991, stage II – III according to Kellgren and Lawrence; these patients responded poorly to normal therapies of osteoarthritis and VAS score > 5/10.

2.1.2. Exclusion criteria

Mild knee osteoarthritis (stage I) or severe knee osteoarthritis (stage IV), secondary knee osteoarthritis, contraindications of protocol (adipose tissue deriving, intra-articular injection procedures), previous acid hyaluronic (Hyalgan, Go-on...) injection or injured joint endoscopy within 6 months.

2.2. Study location and duration

Study location: Rheumatology department, Therapeutic Gene Unit – Nuclear Medicine and Oncology Centre, Bach Mai hospital.

Study duration: April/2012 – August/2016

2.3. Study methods

2.3.1. Study design: Interventional, follow-up study

2.3.2. Study sample: Convenient sample n= 36 with the number of knee joints being 72.

2.3.3. Study protocol

2.3.3.1. To investigate clinical symptoms:

- General characteristics: name, age, gender, job
- To investigate symptoms and signs: knee joint pain, morning stiffness, abnormal sound in the joint, limited range of motion of the joint, deformity, synovial fluid, crepitus.

+ To identify severity of pain by VAS score: 3 levels, from 1 – 3: mild, from 4 – 6: medium, from 7 – 10: severe.

+ To evaluate limitation of motion range of knee joint by WOMAC LEQUESNE score.

- Past history: co-morbid diseases, trauma, knee osteoarthritis treatment

2.3.3.2. Sub-clinical tests

a) Lab tests

Tests for the diagnosis and assessment of accompanying disorders are conducted at specialized departments at Bach Mai Hospital with reference parameters.

- Tests to evaluate inflammation: white blood cells (WBC), blood sedimentation rate, CRP
- Other biochemistry tests: Ure, Creatinin; GOT, GPT; Glucose; Lipid; RF.

b) Images

- **X-ray images of bilateral knees**: to have confirmed diagnosis and evaluate stages.

All patients in the study recieved both anteroposterior X ray, standing position.

+ Performed at the Department of Diagnostic Imaging at Bach Mai Hospital.

+ Results were read by radiologists of Bach Mai Hospital.

All x-rays are read in a unified process: joint axis, narrow joint space, osteophytes, subchondral sclerosis, loose bodies, stages classified according to Kellgren and Lawrence.

- **Ultrasound of bilateral knees:** to evaluate before and monitor treatment results

+ Tools**:** Ultrasound Machine Medison Accuvix 10.0 from America, Linear transducer with high frequency of 5-13 MHz

+ Performed in Ultrasound Room of Rheumatology department of Bach Mai hospital by two rheumatologists. The doctors did not know clincial characteristics as well as the admitting time of patients.

+ Evaluated parameters: synovial fluid, synovial membranes, popliteal cysts, osteophytes, cartilage echo structure, articular cartilage surface, cartilage thickness.

- **MRI images of knee joint:** to evaluate before and monitor treatment results

+ Performed in Diagnostic Imaging department of Bach Mai hospital.

+ Machine: MRI 1.5 Tesla machine from Siemens, German, performed and evaluated by two radiologists of Diagnostic Imaging department of Bach Mai hospital. The radiologists did not know clincial characteristics as well as the follow-up time of patients.

+ All MRI films are evaluated in a unified process including following parameters: bone lesion (depth, width), osteophytes, bone marrow edema, cartilage lesion (depth, width), subchondral cysts, cartilage thickness, meniscus, synovial fluid, synovial membrane, joint ligament, loose bodies, Baker's cyst ... The severity of injury was assessed by KOSS (Knee Osteoarthritis Scoring System). Cartilage thickness was measured at 7 positions.

c) Other investigations:

- ***Tests to screen malignancy before treatment***:

+ Tumor markers: CEA, CA19-9, CA72-4, CA125, alpha FP, NSE, total and free PSA (for male patients), ALP; FT4, TSH.

+ X-ray, Mammography and breast ultrasound for female patients, thyroid ultrasound, abdominal ultrasound. EGD and colonoscopy is required if necessary.

- ***Tests before operation:*** Coagulation, blood group test, HIV, HBsAg; urine test; ECG, cardiac ultrasound

- Measure the bone density

2.3.4. Protocol of autologous adipose tissue-derived stem cells therapy in the treatment of knee osteoarthritis

Protocol of seperating adipose tissue-derived stem cells and protocol of autologous adipose tissue-derived stem cells therapy in the treatment of knee osteoarthritis was approved by Ministry of Health and Scientific Council of Bach Mai hospital on11/01/2012.

2.3.4.1. Seperating adipose stem cells

Samples of abdominal fat tissue were collected by the method of negative pressure puncture with a specific needle with tip. Right after fat tissue samples from patients with osteoarthritis were collected from the operating room, fat tissue samples were cleaned with physiological saline (NaCl 0.9%). The stromal vascular fraction is separated by the cellular seperation kit Adistem (Australia). The procedure is performed according to the manufacturer's instructions to isolate the stromal vascular fraction. After isolation, the cells were tested the quantity and mixed with platelet-rich plasma and activated by monochromator using AdiLight prior to administration.

2.3.4.2. Test the quality of cells after seperating

All the studies on cell culture, preservation and evaluation were conducted at the Stem Cell Laboratory, Military Medicine Research Center, Military Medical Academy.

- To determine cell density and survival rate
- To culture cells: to evaluate cell morphology, adhesion and proliferation capacity of cells
- To identify the markers of the cell by flowcytometry technique
- To determine sterility

2.3.4.3. Stem cell transplantation into knee joint

- Injection site: 1.5 cm lower and outer position of patella.
- Intra-articular injection:

+ Inject 2ml Hyalgan (Sodium hyaluronate with low molecular weight of 500-730 kDalton, the content of 20mg/2ml, produced by Fidia company, Italy) in the knee joint for the purpose of supporting.

+ Inject 3ml of platelet-enriched plasma and activated stromal vascular fraction into injured knee joint.

2.3.5. Monitor and evaluate treatment efficacy and safety through clincal and imaging parameters:

All patients were evaluated clinical parameters in the following moments: T0 (Before treatment), T1 (1 week after treatment); T4 (1 month after treatment; T13 (3 months after treatment); T26 (6 months after treatment) ; T52 (1 year after treatment).

Evaluate the change of clinical parameters in different times from T0 to T52

- Knee pain, limit of motion, crepitus
- Pain severity according to VAS score, improvement of 30% of VAS score, 50% of WOMAC score according to age group, BMI and X-ray stage.
- Pain severity, joint stiffness, limit of motion according to LEQUESNE, WOMAC scores.

Evaluate the change of subclinical parameters in different times

- T0, T26, T52: Ultrasound to evaluate fluid, echo of cartilage, thickness of cartilage under the femur; MRI to measure cartilage thickness in 7 sites.

Evaluate side effects of therapy

- All side effects of the therapy were recorded and managed if happened in the follow-up time from T0 to T52.
- Evaluate the appearance of tumor in the location of stem cell transplantation after 12 months of follow-up.

2.4. Data analysis: SPSS 16.0 was used.

CHAPTER 3: RESULTS

3.1. Clinical, subclinical and stromal vascular fraction characteristics

3.1.1. Clinical characteristics

3.1.1.1. Symptoms

Table 3.4. Clinical symptoms (n=72 joints)

Characteristics	n	%
Mechanical pain	64	88.9
Inflammatory-like pain	8	11.1
Pain during sleep		
No wake up	58	80.5
Wake up due to pain	14	19.5
Pain when standing more than 30 mins	60	83.3
Pain when walking		
No pain	0	0.0
Pain when walking for a distance (100m)	48	66.7
Pain right after walking	24	33.3
Pain when climbing stairs	72	100.0
Upstair	72	100.0
Downstair	65	90.3
Morning stiffness:		
No	10	13.9
Less than 15 mins	38	52.8
15 - 30 mins	24	33.3

Comment: Most knee pain is mechanical (88.9%). The proportion of patients waking up during sleep due to pain is 7/36 (19.4%). 100% of knee joints had signs of pain when walking and climbing upstairs. Sign of morning stiffness was seen in 86.1% of knee joints.

3.1.1.2. Clinical signs

Table 3.6. Clinical signs in the knee (n=72 joints)

Characteristics	n	%
Crepitus in examination	67	93.1
Sign of patellofemoral leision	57	79.2
Increased temperature in the joint (Warm)	4	5.6
Patellar tap sign	16	22.2
Baker's cyst	5	6.9
Amplitude of knee joint ($\overline{X}$ ± SD)	$101,39^o$ ± 11,42 (90^o - 130^o)	

Comment: The proportion of sign of patellofemoral leision in examination was 79.2% while crepitus was 93.1%. The proportion of detection synovial fluid in clinics was 22.2%..

3.1.2. Subclinical characteristics

3.1.2.1. X-ray images of knee joints

Table 3.7. X-ray characteristics of knee joints(n=72 joints)

X-ray characteristics	Location	n	%
Axis	Normal	18	50.0
	Valgus	2	5.6
	Varus	16	44.4
Narrow joint space	***General***	62	86.1
	Medial tibiofemoral	59	81.9
	Lateral tibiofemoral	37	51.4
	Patellofemoral	55	76.3
Osteophytes	***General***	64	88.9
	Medial tibiofemoral	63	87.5
	Lateral tibiofemoral	52	72.2
	Patellofemoral	59	81.9
Stage of Kellgren Lawrene	Stage 2	11	15.3
	Stage 3	61	84.7

Note: 1 joint could have multiple injuries

Comments: The axial deformity was 50%, most of which was varus (44.4%). The proportion of narrow joint space and osteophytes was 86.1% and 88.9%, respectively, in which the most common site was medial tibiofemoral space. Most knee osteoarthritis was in stage 3 of Kellgrene and Lawrence (accounting for 84.7%).

3.1.2.2. Ultrasound characteristics

Table 3.8. Ultrasound characteristics of knee joints (n=72 joints)

Ultrasound images of injuries		n	%
Synovial fluid	No fluid	31	43.0
	Little	30	41.7
	Intermediate	11	15.3
	Much	0	0.0
Synovial membrane thickness		2	2.8
Popliteal cyst		17	23.6
Calcification in synovial membrane		5	6.9
Osteophytes	General	66	91.7
	Medial tibiofemoral	65	90.3
	Lateral tibiofemoral	62	86.1

Comment: The proportion of synovial fluid under ultrasound was 57%, with the majority of cases had little volume (41.7%). The percentage of osteophytes on ultrasound was 91.7%. The proportion of osteophyte in medial tibiofemoral joint (90.3%) was higher than in lateral tibiofemoral joint (86.1%).

3.1.2.3. MRI characteristics

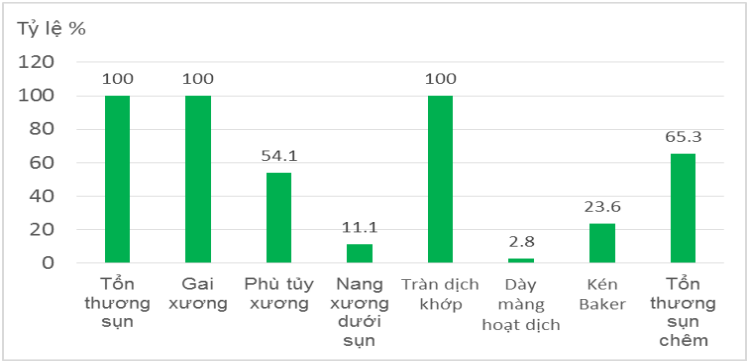


Figure 3.2: MRI images of injuries (n=72 joints)

Comments: 100% of knee joints had injuries in all three components of articular cartilage including joint cartilage, osteophytes and articular fluid. The proportion of bone marrow edema, subchondral cyst and Baker's cysts was 54.1%; 11.1% and 23.6%, respectively. There were 65.3% of cases having meniscus lesions.

Table 3.11. Features of location and extent of cartilage lesion width on MRI (n=72 joints)

Exent of cartilage lesion width	Severity stage							
	Stage 0		Stage 1		Stage 2		Stage 3	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Patellar crest	46	63.9	16	22.2	10	13.9	0	0.0
Medial patellar facet	52	72.2	10	13.9	7	9.7	3	4.2
Lateral patellar facet	43	59.7	7	9.7	8	11.1	***14***	***19.4***
Medial trochlear articular facet	44	61.1	2	2.8	7	9.7	***19***	***26.4***
Lateral trochlear articular facet	59	81.9	4	5.6	5	6.9	4	5.6
Medial condyle of femur	39	54.2	2	2.8	12	16.7	***19***	***26.4***
Lateral condyle of femur	61	84.7	4	5.6	6	8.3	1	1.4
Medial tibial plateau	43	59.7	5	6.9	9	12.5	***15***	***20.8***
Lateral tibial plateau	59	81.9	3	4.2	8	11.1	2	2.8

Comment: The most severe cartilage width lesion >10mm (stage 3) often seen in medial trochlear articular facet, medial condyle of femur, medial tibial plateau and lateral patellar facet were 26.4%; 26.4%, 20.8% and 19.4%, respectively

3.1.3. Characteristics of stromal vascular fraction (SVF)

Table 3.20. Characteristics of stromal vascular fraction (SVF) (n=36 samples)

Characteristics	$\overline{X}$ **± SD**
Volume of nuclei cell mass collected (ml)	5.24 ± 1,43
Quantity of nuclei cells /ml	$(3.1 \pm 0.62) \times 10^8$
Quantity of nulei cells injected in 1 knee joint	$(5.38 \pm 0.13) \times 10^8$
Survival rate (%)	96.91 ± 1.19
Negative culture	100,0%
Volume of fat collected (ml)	122.64 ± 19.36

Comments: The quantity of nuclei cells injected in 1 knee joint was (5.38 ± 0.13) x 10^8 cells. 100% of cases having cell survival rate > 95%. No case had infection.

In this study, we cultured 3 cell samples randomly to assess the quality of the cells. SVF cells are mixed with platelet rich plasma activated by calcium chloride and monochromatic light. After culture, there was the appearance of cells adherent to the surface of the culture disk with similar shape to fibroblasts, which is typical of mesenchymal stem cells. With three cultured tissue samples, in the SVF cell population, the proportion of cells having CD90 markers of the mesenchymal stem cells was 2.9%; 2.7% and 3.7% respectively. After culturing the cells to the third generation, the cells were harvested and analyzed for surface markers. The results are shown in Figure 3.3.

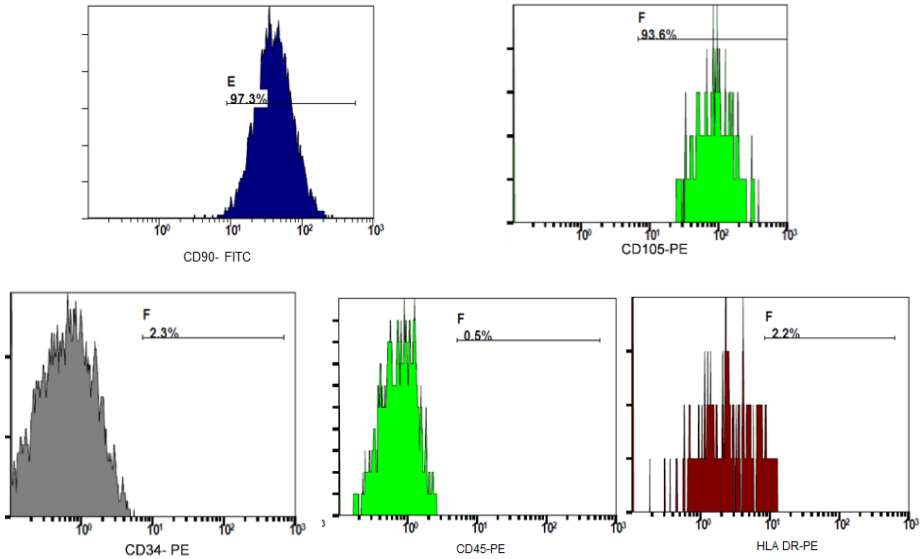


Figure 3.3: Surface markers of stem cells in the third culture

Markers	CD90	CD105	CD34	CD45	HLA DR
Positive rate	94.6 ± 3.7	97.9 ± 3.7	1.6 ± 0.6	1.4 ± 1.7	1.03 ± 1.1

Comments: The results showed that the cell samples were all positive with CD90 (94.6%), CD 105 (97.9%) and negative with CD34 (1.6%), CD45 (1.4%) and HLA DR (1.03%).

3.2. Evaluation the efficacy and safety of the therapy

3.2.1. Efficacy of the therapy

3.2.1.1. Evaluation of clinical treatment outcomes

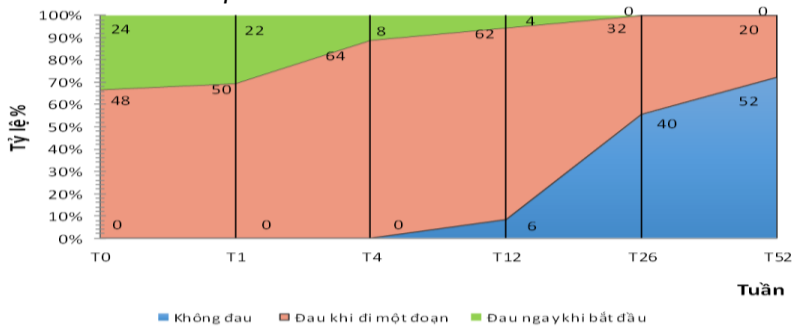


Figure 3.4. The proportion of pain change when walking in different time

Comment: Prior to treatment, 100% of patients had pain while walking, in which 66.7% had knee pain after walking for a distance and 33.3% had immediate pain. Since after 6 months of treatment, there is no case having pain right after getting started to walk. In addition, before treatment, 100% of patients had pain when climbing upstairs. After 6 months of treatment, the proportion of knee pain when climbing upstairs was 69.4% and reduced to 48.6% after 1 year of treatment.

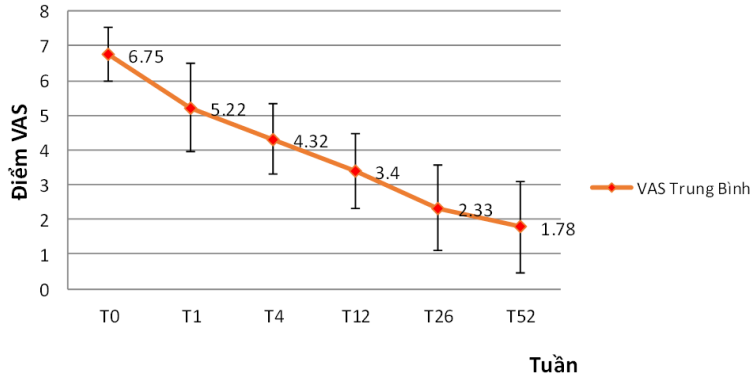


Figure 3.5. Efficacy of therapy on improvement of VAS score

Comment: Before treatment, the mean VAS score was 6.75 ± 0.78, reduced to 2.33 ± 1.22 after 6 months of treatment and to 1.78 ± 1.32 after 1 year of treatment. This improvement was statistically significant with $p < 0.001$.

In addition, the duration of morning stiffness reduced from 10.07 ± 6.52 minutes before treatment to 0.22 ± 0.95 minutes after 1 year of

treatment with p <0.001. The range of knee motion increased from 101.39 ^{o} ± 11.42 to 127.50^{o} ± 4.36 after 1 year, the difference was statistically significant (p <0.001).

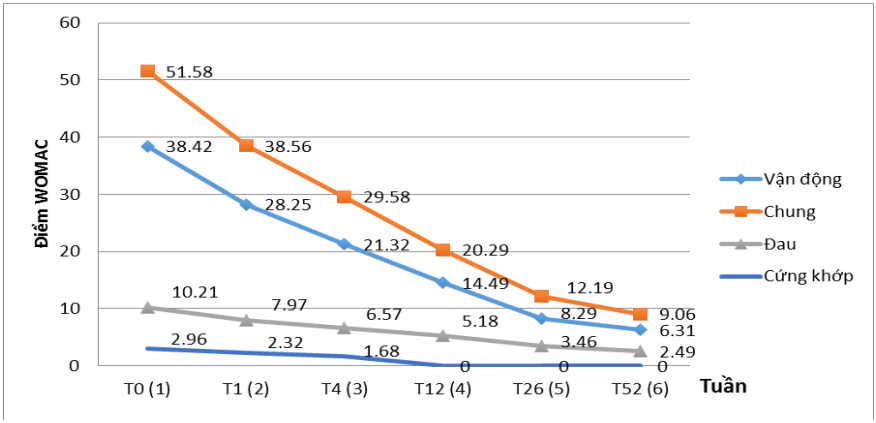


Figure 3.8. Efficacy of therapy on WOMAC score

Comment: The mean WOMAC score decreased from 51.58 ± 7.40 before treatment to 9.06 ± 8.8 after 1 year of treatment. In particular, there was statistically significant improvement in WOMAC pain scores, WOMAC stiffness scores and WOMAC mobility scores with p <0.001.

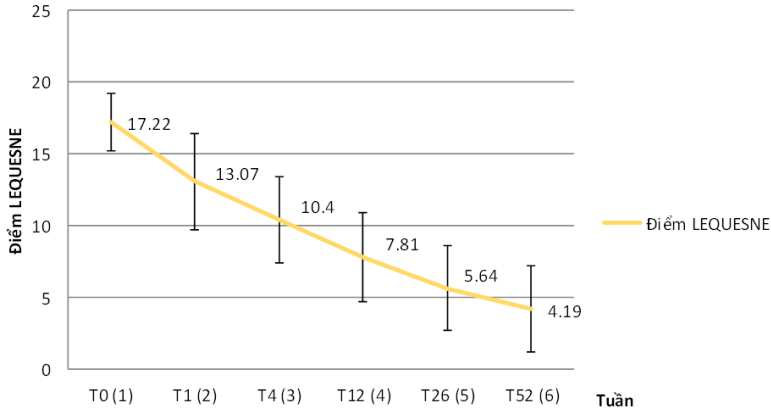


Figure 3.9. Efficacy of therapy on LEQUESNE

Comments: After 1 year of treatment, the mean LEQUESNE score improved with the decrease from 17.22 ± 1.99 to 4.19 ± 3.00, which was statistically significant, p <0.001.

Table 3.22: The change of VAS, WOMAC, LEQUESNE scores according to stages on X-ray (n=72 joints)

VAS	**T0**	**T1**	**T4**	**T12**	**T26**	**T52**
Stage 2	6.6±0.8	4.9±1.3	3.6±1.1	2.9±1.0	1.5±1.0	0.6±0.7
Stage 3	6.8±0.8	5.3±1.3	4.4±1.0	3.5±1.1	2.5±1.2	2.0±1.3
P	***> 0.05***	***> 0.05***	***<0.05***	***>0.05***	***<0.01***	***<0.01***
WOMAC	**T0**	**T1**	**T4**	**T12**	**T26**	**T52**
Stage 2	51.3±7.3	35.2±11.7	22.6±11.4	15.6±8.3	6.2±4.8	2.6±2.7
Stage 3	51.6±7.5	39.2±11.8	30.8±10.7	21.1±10.8	13.3±9.5	10.2±9.0
P	***>0.05***	***>0.05***	***<0.05***	***>0.05***	***<0.05***	***< 0.01***
LEQUESNE	**T0**	**T1**	**T4**	**T12**	**T26**	**T52**
Stage 2	17.0±2.2	12.2±3.5	8.7±3.3	6.5±2.5	3.4±2.3	1.5±1.5
Stage 3	17.2±1.9	13.2±3.3	10.7±2.9	8.1±3.2	6.0±2.9	4.7±2.9
P	***>0.05***	***>0.05***	***<0.05***	***>0.05***	***<0.01***	***<0.01***

Comments: There was improvement in VAS, WOMAC, LEQUESNE scores in both stages. However, after 6 months and 1 year, the injured knees in stage 2 had better improvement than stage 3 with statistically significant difference ($p < 0.05$ after 6 months and $p < 0.01$ after 1 year).

3.2.1.2. Evaluation subclinical treatment outcome

Evaluation efficacy of treatment on ultrasound

Table 3.27. Evaluation efficacy of treatment by cartilage thickness on ultrasound (n=72 joints)

Cartilage thickness	Before treatment (T0)	After 6 months (T26)	After 1 year (T52)	P
Trochlear groove (mm)	2.33±0.56	2.62±0.51	2.71±046	< 0.01
Medial condyle of femur (mm)	1.89±0.45	2.25±0.57	2.31±0.53	< 0.001
Lateral condyle of femur (mm)	2.01±0.51	2.33±0.51	2.40±0.46	< 0.001
General (mm)	2.08±0.36	2.40±0.42	2.48±0.36	< 0.001

Comment: The mean cartilage thickness on ultrasound after 6 months increased from 2.08 ± 0.36 mm to 2.40 ± 0.42 mm and after 1 year was 2.48 ± 0.36 mm with p <0.001.

In addition, the proportion of patients with synovial fluid decreased from 56.9% to 34.7% after 6 months of treatment and to 23.6% after 1 year of treatment.

Evaluation efficacy of treatment on MRI

Table 3.31. Evaluation efficacy of treatment by cartilage thickness on MRI (n=72 joints)

Cartilage thickness on MRI	Before treatment (T0)	After 6 months (T26)	After 1 year (T52)	P
Femoral condyle	1.52 ± 0.57	1.61 ± 0.59	1.65 ± 0.56	< 0.001
Tibial plateau	1.59 ± 0.59	1.68 ± 0.59	1.75 ± 0.57	<0.001
Patellofemoral joint	1.75±0.50	1.80±0.52	1.83±0.53	<0.05

Comments: Cartilage thickness in 7 locations on MRI all had statiscally significant improvement with p< 0.01.

In addition, there was improvement in bone marrow edema at all three sites of the knee, thigh and tibia after 6 months and 1 year of follow-up. However, this improvement was not statistically significant with p> 0.05.

3.2.2. Safety of the therapy

Table 3.33. Complications of local site of the therapy (n=72 joints)

Findings	**n**	**%**
Knee joint pain after stem cell injection	5	6.95
Synovial fluid	4	5.56
Joint infection	0	0.0
Infection of soft tissue around the joint	0	0.0

Comment: The proportion of pain after injection was 6.95%, of which, only 2 cases had pain lasting more than 24 hours. There was 5.56% of knee joints had synovial fluid after injection. No case had joint or soft tissue around the joint infection after injection.

Table 3.34. Complications of abdominal fat collecting site (n=36 patients)

Findings		n	%
Local pain at the site	No	26	72.2
	Yes	10	27.8
	Mean VAS scores	1.1 ± 1.9 (0-5 points)	
Abdominal purpura	No	26	72.2
	Yes	10	27.8
	The mean duration (days)	1.8±3.3 (0 - 10 days)	

Comment: The abdominal pain proportion after fat removal was 27.8%, in which most patients had pain within one day, the highest VAS score was 5 points. Only 1 patient had pain lasting more than 24 hours. There were 27.8% of patients with abdominal purpura after fat removal. The longest duration was 10 days.

In addition, our study did not record any systemic side effects such as headache, dizziness, rash, bleeding, or shock. MRI images of knees after 12 months of treatment did not show abnormal tumors.

Table 3.35. Evaluation of satisfaction after treatment (n=36 patients)

Satisfaction	After 6 months		After 12 months		p
Not satisfied	8	22.2	3	8.3	< 0.05
Satisfied	21	58.3	9	25.0	
Very satisfied	7	19.4	24	66.7	

Comment: The proportion of patients satisfied with the therapy increased gradually over time. After 6 months of treatment, the proportion of satisfied patients was 58.3% and very satisfied was 19.4%. After 1 year of treatment, these rates were 25% and 66.7%, respectively ($p < 0.05$).

CHAPTER 4: DISCUSSION

4.1. Clinical, subclinical and stromal vascular fraction characteristics

4.1.1. Clinical characteristics

4.1.1.1. Clinical symptoms

Our study found that 100% of patients had knee pain in which, the majority of patients had mechanical pain type (88.9%), only 11.1% had inflammation type pain due to accompanying synovial membrane inflammation (Table 3.4). This result is similar to the study of Bui Hai Binh showing that mechanical pain accounted for 97.5% and the study of Dang Hong Hoa with the percentage of 95.2%. The proportion of knee stiffness in our study was 86.1%. The longest duration of morning stiffness was 30 minutes (Table 3.4). This finding is similar to Bui Hai Binh's study with the proportion of joints having morning stiffness sign being 75.4%.

4.1.1.2. Clincal signs

In our study, the common signs were crepitus in examination and sign of patellofemoral leision with the proportion of 93.1%, 79.2%, respectively (Table 3.6). The sign of crepitus in examination in our study was similar to that of Bui Hai Binh's study (90.2%) and Nguyen Thi Thanh Phuong's study (96.7%). This is an important sign reflecting knee osteoarthritis which were included in the diagnostic criteria of American College of Rheumatology (ACR) in 1986 and 1991. Rubbing the cartilage surfaces can create the sound which indicates that the patellofemoral joint is damaged. The percentage of this sign in our study was similar to that of Dang Hong Hoa's study with 78.6%. In knee osteoarthritis, injured joints will have limited mobility. The proportion of knee flexion limit in our study was 93.05%. There are no cases of knee extention limit (Table 3.6).

4.1.2. Subclinical characteristics

4.1.2.1. X-ray features

Through evaluation of 36 patients with osteoarthritis, we found that the proportion of patients with axial deformities with internal direction being 44.4% and the external direction being 5.6% (Table 3.7). The above results indicated that the varus axis rate is quite high among Vietnamese people. Hunter et al (2009) have provided evidence that in patients with

knee osteoarthritis, the anatomical axis is associated with the progression of osteoarthritis with other risk factors such as obesity, the strength of the quadriceps muscle, loose joints condition and severity of the disease. Our results show that 86.1% of patients had narrow joint space on X-ray with 81.9% of tibiofemoral joint, 51.4% of lateral tibiofemoral joint and 76.3% of patellofemoral joint (Table 3.7). Both domestic and foreign studies showed that narrow joint space appeared in medial tibiofemoral space more commonly than in lateral tibiofemoral joint. This can be explained by the difference in distribution of body weight to the joint surfaces of two locations. When the joint is in an upright position, the medial tibiofemoral portion carries 60-70% of the body weight during the load-bearing activities. The proportion of knee osteophytes in our study was 88.9%, of which, osteophytes in medial tibiofemoral, lateral tibiofemoral and patellofemoral were 87.5%, 72.2% and 81.9%, respectively (Table 3.7). The results of clinical and epidemiological studies suggested that osteophytes are the most common sign in patients with knee osteoarthritis.

4.1.2.2. Ultrasound features

In our study, synovial fluid under ultrasound was 57%, in which mostly had little volume of fluid, accounting for 41.7%. No case of severe synovial fluid was recorded. Iagnocco's study on 82 patients with knee osteoarthritis in Italy showed that the incidence of synovial fluid on ultrasound was 43% and that there was a strong correlation between ultrasound features and Lequesne scores (a score to evaluate the severity of knee osteoarthritis) as well as the pain status of the patient. The proportion of osteophytes on ultrasound was 91.7%, in which in medial tibiofemoral joint was 90.3%, higher than in lateral tibiofemoral joint (86.1%) (Table 3.8). The proportions of lesions under ultrasound was higher than on XQ.

4.1.2.3. MRI features

In our study, 100% of knee osteoarthritis patients had cartilage lesions, osteophytes, and synovial fluid on MRI. The proportion of synovial membrane thickness and Baker’s cyst was 2.8% and 23.6%, respectively, similar to the detection rate on ultrasound (Table 3.8). The proportion of bone marrow edema and meniscus lesions were found to be quite high at 54.1% and 65.3%, respectively (Figure 3.2). According to Bui Hai Binh, the

percentages of lesions in osteoarthritis were: 99.1% - synovial fluid, 98.2% - cartilage lesions, 97.3% - osteophytes, 76.6% - bone marrow edema, 19.8% - Baker's cyst, 10.9% - subchondral follicle, 1.8% - synovial membrane inflammation and 70.3% - meniscus damage. Severe cartilage lesions with the width and the depth > 10 mm are common in medial tibial plateau (20.8% - 13.9%), medial condyle of femur (26.4% - 8.3%), medial trochlear articular facet (26.4% - 8.3%) (Table 3.11, 3.12). In addition, we also had cartilage lesions at the later facet of the patella with the percentage of 19.4%. In our study, 100% of the knee joints had osteophytes in which the percentage in the patella was highest (100%), then in the femoral condyle (95.8%), and the tibial plateau (75%). Osteophytes greater than 5 mm were found in the margin of medial condyle of femur (63.9%), medial tibial plateau (41.7%), trochlear joint (inner surface: 45.8% and outter surface: 37.5%) (Table 3.14). This result is similar to the study of Nguyen Thi Thanh Phuong, showing that the osteophyte found in the patella was 90.6%, followed by the medial condyle of femur of 66.4% and the medial tibial plateau of 56.1%. Big osteophytes are mainly concentrated in the medial condyle of femur, with osteophytes degree II being 28.2% and degree III being 8.7%. Bone marrow edema is degenerative lesion including swelling, bone marrow necrosis and fibrosis. Our results show that bone marrow edema was common in the tibia and femur with similar percentages of 54.1%, in which mainly located at the medial condyle of femur (30.6%) and the medial tibial plateau (40.3%).

4.1.3. Characteristics of SVF collected

According to the Adistem protocol, the minimum number of cells obtained to ensure the injection procedure for the patient must be 10^7 / ml. In our study, 100% of the cell sample had 10 times higher than the standard (> 10^8 cells / ml). This result shows that Adistem's technical process separated dozens of times the number of cells comparing to traditional methods and had high survival rates. To evaluate the quality of stem cells, we randomly cultured three samples of cells. Isolated cells after culture are typically rhombus and continue to proliferate, merge and spread over the surface of the culture plate. These are fibroblast-shaped cells that are typical of the mesenchymal cells, similar to mesenchymal cells derived from other tissues. The cell sample contains a stem cell

population capable of adhering. In this study, CD90 and CD105 markers had high positive rates (≥ 95%) while CD34, CD45, and HLA-DR were negative (Figure 3.4). This finding is consistent with the findings of other published authors on stem cell characteristics isolated from adipose tissue. Thus, in initial evaluation step, culture cells had characteristics of mesenchymal stem cells from adipose tissue. In Vietnam up to now there have been many studies of stem cell seperating according to Adistem procedure and obtained high quantity of cells, high survival rate, effective activation which is potential for clinical applications.

4.2. Evaluation of efficacy and safety of the therapy

4.2.1. Evaluation of treatment outcomes

4.2.1.1. Clinical evaluation of treatment outcomes

In our study, after one year of follow-up, the patients had improved clinical symptoms such as: pain in sleep, pain in walking, pain in rest, pain in climbing stairs, pain when standing and when changing position without touching chair, especially these symptoms significantly improved after 6 months of treatment. Similarly, VAS, WOMAC, and LEQUESNE scores showed statistically significant improvement after one year of follow-up with $p < 0.01$. The duration of morning stiffness decreased from 10.07 ± 6.52 minutes before treatment to 0.22 ± 0.95 minutes after 1 year of treatment ($p < 0.001$). After 6 months of treatment, the knee function was most markedly improved compared to before treatment because at this time knee pain was improved due to the effects of cartilage recovery. After 12 months of treatment, the condition of the knee pain continues to improve, showing the role of the cartilage to recover. In addition, many studies have shown that mesenchymal stem cells have anti-inflammatory and immunosuppressive effects through B and T cell modulation, stimulating the release of anti-inflammatory factors such as Interleukin 10 (IL-10) , IL-1 receptor antagonist (IL-1 RA) or prostaglandin E2 (PGE2) which help to improve arthralgia, especially inflammation-like pain (pain at night, pain at rest), stiffness and limited joint mobility. Simultaneously with improvement of pain symptoms due to arthritis joint recovery, exercise enhancement, knee mobilization of the patient helped to improve the knee functions. In our study, the amplitude of knee arthroplasty increased from $101.39^{o} \pm 11.42$

to 127.50 ^{o} ± 4.36 after one year of treatment, which was statistically significant (p <0.001) (Figure 3.7). The mean WOMAC score decreased from 38.42 ± 5.19 before treatment to 8.29 ± 6.86 after 6 months of treatment and to 6.31 ± 6.36 after 1 year of treatment with p <0.(Figure 3.8). The results of our research are similar to the results of some authors in the country and in the world.

After treatment, we observed an improvement in the VAS, WOMAC, and LEQUESNE scores in both grade II and grade III patients. However, at 6 months and 1 year, the injured knee in grade II had better improvement than grade III, with p <0.05 (after 6 months) and p <0 1 (after 1 year) (Table 3.22). The results showed that the less severe of knee osteoarthritis before treatment was, the better efficacy could be achieved. Michalek's study of 1114 osteoarthritis patients treated with adipose tissue-derived stem cell therapy showed that obesity and degeneration severity were associated with joint cartilage recovery.

4.2.1.2. Subclinical evalution of treatment outcomes

Evaluation of efficacy under ultrasound

The results showed that the cartilage thickness improvement was statistically significant at all three sites lateral condyle of femur, medial condyle of femur và trochlear groove (p <0.001). The mean cartilage thickness on ultrasound after 6 months increased from 2.08 ± 0.36 mm to 2.40 ± 0.42 mm and after 1 year was 2.48 ± 0.36 mm with p <0.001 (Table 3.27). Thus, there is a remarkable improvement in cartilage thickness after 6 months of treatment. This result is also consistent with improvement in clinical symptoms after 6 months of treatment. This shows Adistem's adipose-derived-tissue stem cell therapy has recovered damaged cartilage joints, regenerating new cartilage while all previous treatments could only stop cartilage destruction. The proportion of patients with synovial fluid decreased from 56.9% to 23.6% after one year of treatment. Medium synovial fluid was significantly improved: from 15.2% pretreatment to 0% after 1 year of treatment. (Figure 3.12). This suggests that synovial membrane inflammation was improved with the recovery of cartilage - which is the primary lesion and the origin of the disease. Reduction of inflammation and synovial fluid is consistent with improvement of pain symptoms and limitation of mobility.

Evaluation of efficacy on MRI

In our study, the surface of cartilage in all 7 positions on MRI had statistically significant improvement: lateral condyle of femur, medial condyle of femur, trochlear groove, medial tibial plateau, lateral tibial plateau, centered plateau and patellar with $p< 0.01$. This result is similar to the results of many domestic and foreign authors. The study by Liang-jing Lu in 2016 on 18 patients with knee osteoarthritis revealed that the volume of cartilage of thigh bone, tibia and patellar increased stably over the entire follow-up period with statistical significance at 6 months, 12 months and 18 months after treatment. In addition, our study showed an improvement in bone marrow edema at all three sites of the thigh, tibia and patella after 6 months and 1 year of treatment. However, this improvement was not statistically significant with $p > 0.05$ (Table 3.32). This result is similar to the study of Liang-jing Lu (2016) also showing the improvement of bone marrow edema on MRI after 2 years of follow-up. Similarly, the study of Jaewoo Pak (2016) also recorded the reduction of bone marrow edema on MRI after 22 weeks of treatment.

4.2.2. The safety of the therapy

To assess the efficacy of a therapy, it is vital to evaluate its safety. Adult stem cells are stem cells found in the body's organs after birth, developed and differentiated in that organ despite in small numbers. However, the use of adult stem cells has the advantage of being able to take stem cells from one patient, culture (or not) and then transplant (autologous transplantation) to the same patient without fearing the body's immune system attacks. Furthermore, using adult stem cells is less likely to be cancerous or beyond quantitative control comparing to embryonic stem cells.

In the course of the study, we did not record any serious local or systemic side effects (Table 3.33, 3.34). MRI images at stem cell transplantation site after 12 months of follow-up did not show any abnormal tumor. To assess the safety of autologous adipose tissue-deriving stem cells, in 2013, Jaewoo Pak and colleagues conducted a study of 91 patients with 100 joints (74 knee joints, 2 ankle joints, 22 hip joints in which 15 joints were noninfectious necrosis of the femoral head, 7 degenerative joints, 2 cases of lumbar disc herniation) were injected with the mixture of adipose

tissue-deriving stem cells and platelet-rich plasma. The average follow-up time was 26.62 ± 0.32 months (the longest time was 36 months). The results showed that on MRI at the grafted stem cell site, there was no sign of tumor formation after 3 months and after 3 years of treatment. However, symptoms of joint pain and swelling may be due to cell death. The author concludes that autologous adipose tissue-deriving stem cells with PRP is a safe method of treatment for on-site injection. The studies by Centeno conducted over 2 years on 339 patients with osteoarthritis and Wakitani conducted in 11 years of treatment of 41 patients with osteoarthritis using mesenchymal stem cells showed that this was a safe therapy. There have been no cases of infection or cancer after treatment.

In this study, we found that the proportion of patients satisfied with the therapy increased gradually over time. After 6 months of treatment, the proportion of satisfied patients was 58.3% and very satisfied was 19.4%. After one year of treatment, these rates were 25% and 66.7%, respectively (Table 3.35). This shows that adipose tissue-derived stem cell therapy improves symptoms for patients, enables them to walk normally and perform daily activities.

CONCLUSION

1. Clinical, subclinical characteristics of osteoarthritis stage II-III and features of stromal vascular fraction collected:

- Common symptoms: mechanical pain 88.9%; 100% knee joints had pain when walking or climbing stairs. Morning stiffness sign accounted for 86.1%. Crepitus in examination 93.1%; sign of patellofemoral leision 79.2%.

- X-ray findings: axial deformity accounting for 50%; 86.1% joints had narrow joint space; osteophytes 88.9%; subchondral sclerosis 65.3%.

- Ultrasound findings: synovial fluid 57%; osteophytes 91.7%. Cartilage thickness in the position of medial condyle of femur, lateral condyle of femur, trochlear groove was 1.89 ± 0.45 mm, 2.01 ± 0.51mm and 2.33 ± 0.56 mm, respectively.

- MRI findings: 100% knee joints had cartilage injuries, osteophytes and synovial fluid; bone marrow edema and meniscus injuries were 54.1% and 65.3%. Severe cartilage injuries occurred commonly in medial

tibiofemoral joint. The mean thickness of cartilage in the lower extremity of the femur was 1.52 ± 0.57 mm and in the upper extremity of the tibia was 1.59 ± 0.59 mm.

- *Features of stromal vascular fraction collected*

+ Quantity of nuclei cells: (1.87 ± 0.24) x 10^9 cells, quantity of nuclei cells injected into 1 knee joint: (5.38 ± 0.13) x 10^8 cells. The rate of cell survival: 97%.

+ Stromal vascular fraction derived from adipose tissue carries the characteristics of mesenchymal stem cells: cultured cells are typically rhombus; capable of adhering; expressing surface markers: positive for CD90, CD105 and negative for CD34, CD45 and HLA-DR.

2. Initial efficacy and safety of autogous adipose tissue-deriving stem cell therapy

2.1. Treatment outcome

- After 1 year of follow-up, the patients had statistically significant improvement in pain status and the level of exercise restriction. In particular, these symptoms improved significantly after 6 months of treatment ($p < 0.05$).

- The mean VAS, WOMAC, LEQUESNE scores had statistically significant improvement with $p < 0.001$.

- Patients with knee osteoarthritis in stage II responded to therapy better than in stage III ($p < 0.05$).

- There was a statistically significant improvement of cartilage thickness on ultrasound and MRI ($p < 0.01$).

2.2. Safety

The study proved this therapy safe: No serious local or systemic adverse effects occured. The proportion of patients satisfied with the therapy increased gradually over time.

RECOMMENDATIONS

Primary knee osteoarthritis stage II and III should be treated with autologous adipose tisse-derived stem cell therapy, especially stage II to have better efficacy.