

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bề mặt nhãn cầu (BMNC) được duy trì sự ổn định nhờ sự toàn vẹn của các yếu tố cấu thành bao gồm biểu mô của giác mạc, kết mạc và biểu mô vùng rìa cùng với phim nước mắt. BMNC đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ nhãn cầu chống lại các tác nhân gây bệnh, đảm bảo cho giác mạc trong suốt và duy trì chức năng thị giác.

Rối loạn BMNC biểu hiện tùy theo mức độ tổn hại tế bào gốc của biểu mô giác mạc ở vùng rìa. Khi có suy giảm trầm trọng tế bào gốc, nghĩa là không còn nguồn cung cấp biểu mô cho giác mạc, sẽ xuất hiện rối loạn nặng BMNC. Hậu quả của bệnh lý này là làm mất độ trong của giác mạc do biểu mô kết mạc, tổ chức xơ và tân mạch xâm lấn vào giác mạc, làm giảm thị lực ở nhiều mức độ, có thể dẫn tới mù lòa. Suy giảm tế bào gốc cũng có thể gây trợt biểu mô tái phát, loét giác mạc khó hàn gắn, thậm chí gây thủng giác mạc, ảnh hưởng tới sự toàn vẹn của nhãn cầu.

Ở những bệnh nhân có tổn hại tế bào gốc ở một mắt, phẫu thuật ghép tế bào gốc tự thân từ vùng rìa của mắt lành là phương pháp tối ưu để kiến tạo bề mặt nhãn cầu, phương pháp này đã được thực hiện thành công ở nhiều nước trên thế giới cũng như ở Việt nam. Đối với những bệnh nhân có rối loạn nặng BMNC do suy giảm tế bào gốc ở cả hai mắt, có thể thực hiện ghép tế bào gốc vùng rìa đồng loài từ mắt người thân trong gia đình hoặc từ vùng rìa giác mạc của người hiến. Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi sự phối hợp với liệu trình điều trị bằng các thuốc ức chế miễn dịch toàn thân kéo dài để chống thải ghép. Các thuốc ức chế miễn dịch toàn thân dùng kéo dài gây tác dụng phụ ảnh hưởng đến toàn thân, nguy cơ nhiễm trùng và tổn hại chức năng gan,

thận, đồng thời còn làm nặng thêm những tổn thương sẵn có tại mắt như tăng tình trạng khô mắt và kéo dài quá trình viêm của bề mặt nhãn cầu.

Để khắc phục những vấn đề trên, các nhà nghiên cứu đã tìm các nguồn nguyên liệu tế bào biểu mô tự thân để thay thế biểu mô giác mạc trong điều trị các bệnh nhân rối loạn BMNC hai mắt. Trong cơ thể người, biểu mô giác mạc và biểu mô niêm mạc miệng đều là những biểu mô lát tầng không sừng hóa, có cùng nguồn gốc phôi thai từ ngoại bì da và có hình thái tế bào lớp đáy giống nhau. Các nghiên cứu về mô học cho thấy tế bào biểu mô niêm mạc miệng sau khi nuôi cấy có hình thái và cấu trúc tương đồng với biểu mô giác mạc bình thường, đó là biểu mô lát tầng không sừng hóa, có vi nhung mao bề mặt và có thể liên kết ở khớp nối giữa các tế bào. Cùng với sự phát triển của công nghệ nuôi cấy tế bào, việc sử dụng tế bào biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy làm nguồn cung cấp biểu mô cho việc kiến tạo bề mặt nhãn cầu là giải pháp mới cho điều trị rối loạn BMNC hai mắt, đã được áp dụng thành công ở nhiều nước phát triển [1], [2], [3], [4].

Với mong muốn áp dụng phương pháp ghép tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy điều trị cho các bệnh nhân bị rối loạn bề mặt nhãn cầu ở 2 mắt ở Việt nam, chúng tôi tiến hành đề tài “**Nghiên cứu phẫu thuật ghép tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy điều trị rối loạn nặng bề mặt nhãn cầu hai mắt**” với mục tiêu:

- 1. Nghiên cứu phẫu thuật ghép tự thân tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trên thử nghiệm.*
- 2. Đánh giá kết quả bước đầu của phẫu thuật ghép tự thân tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trên bệnh nhân rối loạn nặng bề mặt nhãn cầu hai mắt.*

Chương 1

TỔNG QUAN

1.1. Cấu tạo và chức năng của bề mặt nhãn cầu và các yếu tố liên quan

Bề mặt nhãn cầu là toàn bộ lớp biểu mô được giới hạn bởi đường xám của mi trên và mi dưới, bao gồm biểu mô kết mạc, giác mạc và biểu mô vùng rìa. BMNC được duy trì sự ổn định nhờ sự toàn vẹn về giải phẫu và chức năng sinh lý của các yếu tố có liên quan bao gồm mi mắt, phim nước mắt, biểu mô của kết mạc, giác mạc và vùng rìa.

1.1.1. Mi mắt

Mi mắt có vai trò quan trọng trong việc dàn đều phim nước mắt, bôi trơn BMNC và bảo vệ mắt thông qua hoạt động nhắm và chớp mắt [5]. Sụn mi chứa tuyến Meibomius có vai trò trong việc chế tiết thành phần lipid của phim nước mắt. Kết mạc mi chứa các tế bào đại thực bào có khả năng chế tiết chất nhầy tham gia hình thành lớp mucin của phim nước mắt. Trong kết mạc còn có các tuyến lệ phụ cung cấp nước cho phim nước mắt.

1.1.2. Cấu tạo và chức năng của phim nước mắt

Nước mắt bao gồm: Nước mắt cơ bản không do phản xạ (chiếm 99%) được chế tiết từ các tuyến lệ phụ, nước mắt phản xạ (đáp ứng khi có kích thích) được cung cấp từ tuyến lệ chính. Trong tổn thương thần kinh nhận cảm như việc vô cảm tại chỗ hay toàn thân, hoặc sợi thần kinh cảm giác của giác mạc bị cắt đứt sau phẫu thuật lasik, hoặc trong bệnh nhiễm trùng tác động đến thần kinh (Herpes, Zona) thì chế tiết nước mắt giảm rõ rệt. Các sợi vận động của thần kinh mặt chi phối cơ vòng mi và kích thích phản xạ chớp mắt góp phần dàn đều nước mắt trên BMNC [6].

Nước mắt có tác dụng bảo vệ bề mặt nhãn cầu, ổn định khúc xạ bề mặt, đảm bảo chức năng thị giác. Phim nước mắt bao gồm 3 lớp:

Lipid: tiết ra từ tuyến Meibomius, có khả năng dàn trải đều trên BMNC, góp phần ổn định khúc xạ và ngăn cản nước bốc hơi.

Nước: chứa các thành phần kháng khuẩn (peroxidase, lactoferin, IgA...), chống oxy hóa thu dọn gốc tự do, giảm tổn thương tế bào (vitamin C, glutathion...), yếu tố phát triển, chất ức chế protease, neuropeptidase làm liền vết thương, glucose và điện giải (calcium, bicarbonat, phosphate, ...) cung cấp các chất dinh dưỡng thẩm thấu cho giác mạc.

Nồng độ điện giải của lớp này tương tự như huyết thanh, tạo áp suất thẩm thấu 300 mOsmol/l. Áp suất thẩm thấu có tác dụng giữ ổn định kích thước tế bào, cân bằng hoạt động của các enzym và giữ hằng định nội môi của tế bào. Tăng áp suất thẩm thấu gây ra sức ép cho tế bào biểu mô (cytokine, chemokine) dẫn tới tăng giải phóng các chất trung gian gây viêm, đặc biệt là MMP-9 và đáp ứng miễn dịch ở kết mạc, kéo theo phản ứng viêm ở kết mạc [7].

Mucin: là các glycoprotein gắn kết chặt chẽ với lớp vi nhung mao của biểu mô kết giác mạc. Có hai loại mucin: mucin được chế tiết và mucin gắn kết tế bào. Mucin được chế tiết gồm loại hòa tan (nằm ở cực gần với lớp lipid của nước mắt) và loại tạo keo (nằm ở cực tiếp giáp với biểu mô kết giác mạc). Mucin chế tiết có vai trò làm sạch các dị nguyên, các cặn bã tế bào và làm sạch vi khuẩn. Mucin gắn tế bào (hay còn gọi là màng gắn mucin) tạo nên glycocalyx, phối hợp với mucin loại keo để tạo nên lớp áo bảo vệ tối đa cho biểu mô, ngăn chặn quá trình khô [8].

1.1.3. Cấu trúc và chức năng của kết mạc

Kết mạc tạo bởi biểu mô không sừng hóa, gắn với màng đáy và ở dưới là mô đệm chắc, tạo nên lớp áo che phủ nhãn cầu. Các khớp nối giữa các đỉnh tế bào, khoảng gian bào và thể liên kết tạo nên tính thấm chọn lọc của biểu mô. Các vi nhung mao của biểu mô liên kết với phức hợp glycocalyx giúp cho

phim nước mắt được dính kết. Tế bào dài chiếm 5-10% trong các tế bào lớp đáy của biểu mô kết mạc, nhiều nhất ở kết mạc nhãn cầu phía mũi dưới và kết mạc sụn mi. Tế bào dài có vai trò chế tiết mucin, thành phần quan trọng của phim nước mắt. Lớp dưới biểu mô chứa tuyến lệ phụ Krause và Wolfring cung cấp nước cho phim nước mắt. Chất đệm dưới biểu mô là mô liên kết thưa chứa lympho bào có vai trò trong đáp ứng miễn dịch của kết mạc.

1.1.4. Biểu mô giác mạc và vùng rìa

1.1.4.1. Biểu mô vùng rìa

Biểu mô vùng rìa là vùng chuyển tiếp giữa biểu mô giác mạc và kết mạc nhãn cầu, khoảng 1,5 đến 2 mm tính từ bờ trong vùng rìa, là biểu mô lát tầng không sừng hóa, phân biệt với kết mạc vì không chứa tế bào dài, lớp đáy của biểu mô vùng rìa chứa các tế bào có khả năng tăng sinh mạnh mẽ nhưng lại ít biệt hóa nhất của biểu mô BMNC, đây là các tế bào gốc của biểu mô giác mạc [9]. Tế bào gốc tập trung ở hốc của vùng rìa, có cấu trúc giống như nhú được gọi là hàng rào Vogt nhìn thấy trên lâm sàng. Hàng rào Vogt được nhận biết như những nếp hình nan hoa tỏa ra ở khoảng 1mm chiều rộng quan sát thấy trên sinh hiển vi đèn khe và hiển vi đồng tiêu cự [10].

1.1.4.2. Biểu mô giác mạc

Là lớp biểu mô lát tầng không sừng hóa dày khoảng 50 μ m, gồm 5-7 hàng tế bào.

Tế bào biểu mô bề mặt: Gồm 2-4 lớp tế bào đa giác dẹt dày 50 μ m, có nhiều vi nhung mao làm tăng diện tích bề mặt của tế bào, tăng khả năng hấp thu oxy và các chất dinh dưỡng từ phim nước mắt. Ngoài ra, liên kết chặt chẽ giữa các tế bào tạo ra hàng rào bảo vệ của biểu mô. Các tế bào biểu mô bề mặt là các tế bào biệt hóa cao nhất do đó không có khả năng phân chia. Đặc trưng duy nhất của tế bào biểu mô bề mặt là sự xuất hiện của rất nhiều các phân tử glycolipid và glycoprotein bám quanh màng tế bào, tạo nên lớp

glycocalyx gắn kết với mucin (MUCs) của lớp phim nước mắt, giúp ổn định phim nước mắt. Có 3 loại mucin chủ yếu được gắn trên BMNC là MUCs 1 có vai trò kết dính, báo hiệu, ngăn chặn tác nhân bệnh lý, MUCs 4 có chức năng duy trì ổn định nước mắt, MUCs 16 có vai trò cùng với khung tế bào tạo hàng rào trước tác nhân bệnh lý.

Tế bào biểu mô dạng cánh trước lớp đáy: Gồm 2-3 lớp tế bào dày $15\mu\text{m}$ đan xen nhau thành dạng cánh, các tế bào này ở giai đoạn biệt hóa trung gian giữa tế bào bề mặt và tế bào đáy, hiếm khi phân chia.

Tế bào biểu mô đáy: Là lớp tế bào trụ đơn cao $8-10\mu\text{m}$ nằm trên màng đáy. Chỉ có các tế bào này của biểu mô giác mạc là có hoạt động phân chia, do đó có chứa nhiều bào quan hơn các tế bào khác. Các tế bào này liên kết với nhau bằng dải bịt, thể liên kết, và liên kết khe. Các tế bào đáy còn chứa thể bán liên kết và các phức hợp gắn kết với màng đáy ở dưới. Chúng tổng hợp một phần màng đáy và có các tấm neo chứa các collagen type 1 xuyên tới nhu mô, các tấm này đóng vai trò quan trọng cho sự dính kết của biểu mô vào màng đáy.

Màng đáy: dày $0,11-0,55\mu\text{m}$, cấu tạo bởi collagen type 4 và laminin. Màng đáy có chức năng trong việc phân cực và di cư của các tế bào biểu mô tăng sinh, là tổ chức quan trọng cho cấu trúc phân tầng của biểu mô được đảm bảo trật tự và liên tục.

Quá trình tự đổi mới của biểu mô giác mạc diễn ra trong 5-7 ngày, các tế bào đáy phân bào, tăng sinh, các tế bào con sinh ra được di chuyển hướng tâm về phía bề mặt giác mạc, khi tới bề mặt giác mạc, chúng được biệt hóa thành các tế bào trước lớp đáy, tế bào cánh, rồi tế bào biểu mô bề mặt. Các tế bào biệt hóa cuối cùng thành tế bào vảy rồi tróc ra khỏi BMNC. Giả thiết X,Y,Z về sự duy trì của biểu mô giác mạc được đưa ra bởi Thoft và Friend: Tổng số

tế bào tăng sinh từ lớp đáy (X) và tế bào di cư hướng tâm vào giác mạc (Y) bằng với số tế bào bề mặt bị tróc (Z), $X+Y=Z$ [11].

Hoạt động chức năng của tế bào gốc vùng rìa, ổ vùng rìa và biểu mô giác mạc đóng vai trò quan trọng cho việc duy trì giác mạc được trong suốt. Các tổn thương hoặc thiếu hụt tế bào gốc vùng rìa gây ra tổn hại biểu mô dai dẳng, tân mạch giác mạc, tình trạng khó chịu về cơ năng mãn tính, giảm thị lực.

1.2. Rối loạn bề mặt nhãn cầu

BMNC có chức năng duy trì độ trong suốt của giác mạc, cung cấp bề mặt khúc xạ tương thích cho mắt, bảo vệ mắt trước các tác nhân bên ngoài. Sự mất ổn định của BMNC gây ra bởi chấn thương và các bệnh lý khác sẽ dẫn đến các rối loạn ở kết mạc, giác mạc ở nhiều mức độ, từ tróc nhẹ biểu mô tới suy giảm nặng tế bào gốc vùng rìa của giác mạc, làm giảm thị lực trầm trọng, có thể dẫn tới mù lòa.

Rối loạn bề mặt nhãn cầu biểu hiện tùy theo mức tổn hại tế bào gốc của biểu mô giác mạc ở vùng rìa. Trong trường hợp tổn hại một phần, những vùng có biểu mô kết mạc che phủ lên vùng tổn thương giác mạc nằm xen lẫn với vùng còn giác mạc lành, do đó BMNC còn giữ được một phần vai trò nhất định trong việc duy trì chức năng thị giác. Khi toàn bộ tế bào gốc vùng rìa bị tổn thương trầm trọng, sẽ xuất hiện rối loạn nặng BMNC.

1.2.1. Chẩn đoán lâm sàng: Bệnh nhân có thể xuất hiện một hoặc nhiều các dấu hiệu như sau

1.2.1.1. Triệu chứng cơ năng: giảm thị lực, sợ ánh sáng, chảy nước mắt, co quắp mi, cảm giác bỏng rát hoặc đau nhức cùng với tiền sử viêm mạn tính.

1.2.1.2. Triệu chứng thực thể

- Tình trạng mi, tuyến Meibomius có thể bị rối loạn, phát hiện bằng máy sinh hiển vi đèn khe.

- Rối loạn lớp phim nước mắt thể hiện qua các test BUT, Schirmer, bộ câu hỏi cho bệnh nhân khô mắt.

- Các tổn thương biểu mô kết mạc biểu hiện qua các test nhuộm bề mặt nhãn cầu bằng Fluorescein, hồng Bengal, xanh Lissamin.

- Biểu mô giác mạc mỏng, gồ ghề, tróc biểu mô tái phát, khuyết biểu mô dai dẳng dẫn đến loét, nhuyễn hoại tử hoặc thủng giác mạc.

- Sự xâm lấn của biểu mô kết mạc mang theo mạch máu vào giác mạc, còn gọi là “kết mạc hóa giác mạc”, mất cấu trúc giải phẫu của hàng rào Vogt ở vùng rìa.

- Tân mạch nông và sâu xâm lấn vào trung tâm giác mạc, mang theo xơ và sẹo đục giác mạc, có thể xuất hiện vôi hóa.

- Giai đoạn cuối trầm trọng dẫn tới sùng hóa của BMNC.

1.2.2. Chẩn đoán về cận lâm sàng

Một số xét nghiệm hỗ trợ chẩn đoán và xác định mức độ nặng của bệnh *Test áp tế bào (Impression cytology) [12]*: phát hiện sự xuất hiện của tế bào dài trên giác mạc hoặc bất thường biểu mô của BMNC.

Sinh thiết biểu mô kết mạc (Biopsy): phát hiện một số bệnh dị ứng, tăng sản, các bệnh miễn dịch... bằng các kỹ thuật hiển vi điện tử, hóa mô miễn dịch, test sinh học phân tử.

Xét nghiệm chất nạo biểu mô BMNC (Ocular surface scraping): cho hình ảnh tế bào học của BMNC.

Đo liềm nước mắt (Tear meniscus) [13], *đo áp suất thẩm thấu của nước mắt (Osmolarity) [14]*, *đánh giá độ dày lớp nước mắt bằng máy giao thoa (Tear film interferometry) [15]*, *chụp tuyến Meibomius (Meibography)*: đánh giá mức độ khô mắt.

Đo cảm giác giác mạc (Esthesiometry) [16]: phát hiện giảm cảm giác giác mạc ở một số bệnh lý rối loạn BMNC.

Soi hiển vi đồng tiêu cự (Confocal microscopy)[17],[18]: Quan sát hình thái tế bào của BMNC trong bệnh lý khô mắt hoặc viêm, chẩn đoán rối loạn tuyến Meibomius.

Test nhanh xác định dấu ấn của phản ứng viêm [19]: Test xác định MMP-9 tăng trong nước mắt góp phần quan trọng xác định tồn tại phản ứng viêm của BMNC.

1.2.3. Các nguyên nhân gây rối loạn bề mặt nhãn cầu

Viêm bờ mi

Có thể viêm bờ mi trước do tụ cầu hoặc tăng tiết bã, hoặc viêm bờ mi sau do rối loạn chức năng tuyến Meibomius [20],[21],[22]. Viêm bờ mi gây rối loạn thành phần lipid, làm mất ổn định phim nước mắt dẫn tới các bệnh lý của biểu mô và BMNC. Các độc tố trung gian tiết ra do phản ứng viêm làm tổn thương màng tế bào, mất ổn định BMNC. Viêm bờ mi mạn tính gây tổn thương vùng rìa giác mạc, suy giảm tế bào gốc, tân mạch giác mạc.

Khô mắt

Khô mắt là bệnh lý đa nhân tố của nước mắt và BMNC mà hậu quả là các triệu chứng khó chịu, rối loạn thị giác và mất ổn định của phim nước mắt, có khả năng làm tổn hại cho BMNC. Bệnh lý này kèm theo sự tăng áp lực thẩm thấu của phim nước mắt và phản ứng viêm của BMNC [23].

Phim nước mắt có vai trò quan trọng duy trì cho sự toàn vẹn và ổn định của BMNC. Ở trường hợp khô mắt nặng, độ thanh thải của phim nước mắt giảm, ứ đọng cytokin IL-1 hay enzym MMP-9 trên BMNC, gây ra phản ứng viêm và giải phóng ra độc tố làm biến đổi biểu mô BMNC, gây ra các biệt hóa bất thường, giảm chế tiết mucin, làm rối loạn BMNC.

Viêm kết mạc dị ứng: 2 thể viêm dị ứng nặng gây rối loạn BMNC

Viêm kết mạc dị ứng mạn tính (Atopic keratoconjunctivitis): Thể viêm kết mạc dị ứng nặng nhất, gặp ở các cơ địa quá mẫn, cơ chế liên quan đến đáp

ứng miễn dịch. Bệnh biểu hiện mạn tính ở người lớn tuổi, gây rối loạn BMNC kèm theo tổn thương da mi.

Viêm kết mạc mùa xuân (Vernal keratoconjunctivitis) [24]: Trên BMNC của các bệnh nhân này có tăng mật độ của các giác mạc bào hoạt hóa và tế bào viêm, tăng kích thước biểu mô, tăng cytokin và các tế bào miễn dịch... Các thành phần này hoạt hóa phản ứng viêm BMNC, kích thích tăng sinh xơ, khi kéo dài mạn tính sẽ dẫn tới biến đổi cấu trúc mô và sẹo hóa BMNC.

Mộng

Mộng là tổn thương hay gặp của BMNC, do sự xâm lấn vào giác mạc của một phần kết mạc nhãn cầu bị biến đổi. Hậu quả là suy giảm một phần của tế bào gốc của biểu mô giác mạc, dẫn tới xơ mạch xâm nhập vào giác mạc, phối hợp phản ứng viêm, giải phóng cytokin, men tiêu phức hợp ngoại bào, ... đặc biệt trong mộng tái phát [25].

Tân sản BMNC

Tổn thương nhiều mức độ, từ loạn sản lành tính kết giác mạc đến tân sản ở mức tiền xâm lấn, ví dụ tân sản nội biểu mô (CIN- conjunctival and corneal intra epithelial neoplasia) nhẹ, vừa hay nặng toàn bộ chiều dày biểu mô (CIS- carcinoma in situ), đến mức độ nặng, xâm lấn xuống màng đáy, ví dụ ung thư tế bào vảy (squamous cell carcinoma). Tổn thương lâm sàng chủ yếu là quanh rìa vùng khe mi (95%), phá hủy cấu trúc bình thường của BMNC, làm tổn hại tế bào gốc. Sau khi điều trị tùy mức độ có thể để lại di chứng suy giảm tế bào gốc và rối loạn BMNC [26].

Chùng nhão kết mạc (conjunctival chalasis)

Chùng nhão kết mạc là hiện tượng thừa kết mạc nhưng không phù, liên kết kém với tổ chức Tenon và thượng củng mạc nên gây ra cọ sát về cơ học trên BMNC khi nhắm mắt và vận động nhãn cầu. Hậu quả là kích thích BMNC, kích hoạt phản ứng viêm, khô mắt, gián tiếp làm rối loạn BMNC.

Bệnh viêm kết giác mạc rìa trên (Super limbal keratitis-SLK)

Là bệnh lý hiếm gặp của kết giác mạc vùng rìa trên, gồm các dấu hiệu chính: phản ứng viêm của kết mạc sụn mi trên và viêm kết mạc nhãn cầu phía trên, tổn thương nông ở kết giác mạc vùng rìa trên. Các tổn thương này dẫn đến các dấu hiệu kích thích dai dẳng của BMNC.

Bệnh lý ở da kèm theo tổn thương BMNC

Bệnh trứng cá đỏ

Tổn thương da điển hình là nốt sần đỏ, giãn mao mạch, mụn mủ và phì đại tuyến bã khu trú ở trán, cằm, mũi, má. Tổn thương mắt gồm rối loạn chức năng tuyến Meibomius, tân mạch vùng rìa giác mạc, thâm nhiễm dưới biểu mô ở chu biên gây ra kích thích BMNC. Có sự xuất hiện của phản ứng viêm với sự tăng nồng độ của MMP-9 và IL-1 trong nước mắt [27].

Bệnh xơ sẹo nhãn cầu pemphigoid

Bệnh màng nhầy pemphigoid trong đó 60-77% có tổn thương BMNC mạn tính dẫn tới sẹo xơ co kết mạc tiến triển (OCP-ocular cicatricial pemphigoid). Biểu hiện kích thích, tiến triển thành sẹo xơ co kết mạc, cạn cùng đồ, dính mi cầu, khô mắt nặng, tổn thương kết giác mạc, thậm chí gây loét/thủng, sẹo đục, tân mạch giác mạc, sừng hóa BMNC [28].

Hội chứng Stevens-Johnson (SJS) và hoại tử thượng bì nhiễm độc cấp tính (TEN-toxic epidermal necrolysis)

Là nhóm bệnh lý do phản ứng miễn dịch cấp tính với thuốc, gây tổn thương nặng ở hệ thống da và niêm mạc và thường để lại di chứng nặng nề cho mắt, có thể dẫn đến mù lòa. Khi tổn thương tróc thượng bì dưới 20% diện tích cơ thể thì xếp vào nhóm Stevens-Johnson, trên 20% được xếp vào nhóm hoại tử thượng bì cấp (TEN) [29].

Biểu hiện mắt: Giai đoạn cấp trong 2 tuần đầu với phù mi, phản ứng viêm và hoại tử kết mạc, 50-70% có màng, tổn thương biểu mô giác mạc, có

thể thâm lậu nhu mô. Mặc dù được điều trị, phản ứng viêm mạn tính vẫn xuất hiện từng đợt tái phát ở kết mạc và mi, gây ra quặm, lông xiêu, tắc điễm lệ. Tổn thương nặng nề kết mạc làm xơ co kết mạc, cạn cùng đồ, dính mi cầu, tổn hại tế bào đài tiết mucin gây khô mắt nặng, thậm chí sừng hóa bờ mi và BMNC. Tổn thương giác mạc từ khô, viêm biểu mô mạn tính, tới loét biểu mô dai dẳng, xơ mạch giác mạc, sẹo nhu mô, tân mạch giác mạc, hiện tượng kết mạc hóa giác mạc do suy giảm tế bào gốc, cuối cùng là sừng hóa BMNC.

Bệnh loạn sản ngoại bì: Nhóm bệnh di truyền rối loạn sự phát triển các cấu trúc có nguồn gốc ngoại bì: tóc, răng, móng, tuyến mồ hôi. Các rối loạn mắt đi kèm: thiếu hụt hoặc rối loạn tuyến Meibomius, đục và tân mạch giác mạc, suy giảm tế bào gốc, dính mi cầu, viêm giác mạc...[30].

Bệnh lý mô ghép chống vật chủ (*Graft Versus Host Disease*): Khi ghép tế bào gốc tủy tạo máu điều trị các bệnh lý về máu, miễn dịch chuyển hóa, xảy ra phản ứng miễn dịch giữa tế bào của người cho với tổ chức của người nhận. Biến chứng mắt thường xảy ra ở giai đoạn mãn tính sau ghép trên 100 ngày với các biểu hiện khô mắt, viêm kết giác mạc do khô, rối loạn chức năng tuyến Meibomius, rối loạn BMNC [31].

Bệnh viêm kết mạc dạng gỗ (*Ligneous conjunctivitis*): thể viêm kết mạc mạn hiếm gặp, đặc trưng bởi sự xuất hiện màng fibrin dạng gỗ tái phát ở kết mạc sụn mi, gặp ở tuổi thiếu nhi ở trẻ bị thiếu hụt plasminogen toàn thân, nếu nặng có thể lan tới bờ mi, đôi khi có ở kết mạc nhãn cầu và vùng rìa, gây tân mạch và sẹo giác mạc [32].

Viêm kết giác mạc do nhiễm độc thuốc do tiếp xúc: Là biến chứng nhiễm độc BMNC do các thuốc tra tại mắt. Các thành phần của thuốc hoặc các chất bảo quản có thể làm phá vỡ cấu trúc và rối loạn chức năng của biểu mô BMNC. Chế phẩm gây độc thường gặp: chất bảo quản (BAK, thimerosal),

kháng sinh (aminoglycosid, ciprofloxacin, sulfonamide), kháng nấm, kháng virus (IDU), thuốc tê, thuốc hạ nhãn áp... [33].

Rối loạn dính kết biểu mô giác mạc: Hội chứng tróc biểu mô giác mạc tái diễn (RCE- recurrent corneal erosion) do bất thường dính kết của biểu mô, tái phát nhiều lần gây ra sẹo đục và tân mạch giác mạc. Nguyên nhân nguyên phát do rối loạn gen (loạn dưỡng biểu mô giác mạc, màng đáy biểu mô, nhu mô trước), hoặc thứ phát sau vi chấn thương ở giác mạc, thoái hóa Salzmann, loạn năng tuyến Meibomius [34].

Bệnh giác mạc do liệt thân kinh dinh dưỡng: giác mạc bị giảm hoặc mất cảm giác do tổn thương thân kinh nên dễ bị tổn thương và khó hàn gắn biểu mô. Nguyên nhân gồm liệt dây V, một số bệnh toàn thân (đái tháo đường, thiếu vitamin A, phong), bệnh mắt do herpes, zona [35].

Suy giảm tế bào gốc vùng rìa giác mạc

Bỏng BMNC do hóa chất hoặc nhiệt

Là bệnh lý cấp cứu trong nhãn khoa do hậu quả nặng nề tới BMNC, giác mạc và bán phần trước. Các tác nhân gây bỏng hóa chất và sản phẩm giáng hóa của các chất hoại tử sau bỏng ngấm vào tổ chức làm phá vỡ cấu trúc, rối loạn chức năng của tế bào. Các tổn thương gồm tổn hại biểu mô BMNC, suy giảm tế bào gốc vùng rìa gây khó hàn gắn biểu mô, tân mạch giác mạc, bỏng sâu có thể phá hủy nhu mô gây phù đục hoặc tiêu nhuyễn giác mạc. Phản ứng viêm diễn ra mạnh nhất ở thời điểm sau bỏng 24h và tuần thứ 2-3, đôi khi kéo dài dai dẳng trong trường hợp nặng [36],[37].

Bệnh lý tổn hại tế bào gốc bẩm sinh

- ***Di tật không có móng mắt:*** thiếu hụt móng mắt, có thể kèm nhiều bất thường bẩm sinh khác, liên quan đến đột biến gen PAX6, gen biểu hiện ở tế bào gốc vùng rìa, điều hòa các protein gắn kết biểu mô và kiểm soát sự sản sinh MMP-9. Hậu quả là tổn hại tế bào gốc vùng rìa, kết mạc hóa giác mạc [38].

- *Loạn dưỡng giác mạc dạng giọt gelatin nguyên phát*: bẩm sinh, di truyền lặn do đột biến gen TACSTD2, lắng đọng chất bất thường dạng tinh bột, biểu hiện như những giọt màu xám ở dưới biểu mô giác mạc, gây đục nhu mô nông xung quanh, kéo theo tân mạch vào trung tâm giác mạc và dấu hiệu viêm BMNC ở hai mắt.

- *Bệnh viêm giác mạc mạn phối hợp với thiếu năng nội tiết*: bệnh tự miễn, viêm giác mạc xuất hiện sớm, đặc trưng bởi kết mạc hóa giác mạc, phối hợp thiếu năng các tuyến cận giáp, vỏ thượng thận, giáp, tụy beta, bệnh nấm da mạn tính, loạn dưỡng răng và móng, rụng lông, bạch biến.

- *Cứng mạc hóa giác mạc*: giác mạc thường phẳng, đục toàn bộ hoặc chu biên, không thấy sự có mặt của vùng rìa, bẩm sinh và 2 mắt.

Suy giảm tế bào gốc có liên quan đến điều trị

Phẫu thuật nhiều lần tại vị trí vùng rìa cứng giác mạc, đặc biệt là phẫu thuật glaucoma hoặc cắt u BMNC có sử dụng thuốc chống chuyển hóa.

Dùng các thuốc tra chứa chất bảo quản gây độc cho BMNC, hoặc dùng kính tiếp xúc (KTX) trong thời gian dài.

Tia xạ điều trị 1 số u nội nhãn hoặc 1 số bệnh lý vùng đầu mắt, hóa chất điều trị toàn thân, tia cực tím [39].

1.2.4. Các mức độ tổn thương bề mặt nhãn cầu

Mức độ suy giảm tế bào gốc vùng rìa giác mạc và tình trạng viêm của kết mạc đóng vai trò quan trọng nhất trong việc xác định mức độ tổn thương BMNC, từ đó quyết định chiến lược điều trị và tiên lượng bệnh (bảng 1.1). Các yếu tố khác như tình trạng khô mắt, bất thường của mi mắt, số bên mắc bệnh, tình trạng toàn thân của người bệnh, tuổi bệnh nhân cũng có ảnh hưởng đến khả năng thành công của điều trị và kết quả phục hồi thị giác [40].

Bảng 1.1. Phân loại các mức độ tổn thương BMNC

(theo E. Holland và M. Mannis - 2002)[41]

	<i>KM bình thường (mức “a”)</i>	<i>KM viêm cũ đã hết (mức “b”)</i>	<i>KM đang viêm (mức “c”)</i>
<i>Thiếu hụt 1 phần TBG (mức I-nhẹ)</i>	Bệnh GM do KTX, suy giảm TBG có liên quan điều trị, tăng sản nội BM (Ia)	Bong cũ (Ib)	Dị ứng thuốc hoặc pemphigoid nhẹ, bong mới (Ic)
<i>Thiếu hụt toàn bộ TBG (mức II-nặng)</i>	Dị tật không có MM, bệnh GM do KTX nặng, suy giảm TBG có liên quan điều trị (IIa)	Bong cũ nặng (IIb)	Dị ứng thuốc hoặc pemphigoid nặng, bong mới nặng (IIc)

1.3. Điều trị rối loạn bề mặt nhãn cầu

1.3.1. Điều trị nội khoa

Trong xử trí rối loạn BMNC, điều trị nội khoa là bước quan trọng đầu tiên, khi cần thiết có thể phối hợp phẫu thuật. Điều trị nội khoa đòi hỏi kiểm soát tình trạng viêm, điều hòa phim nước mắt để thúc đẩy quá trình hàn gắn biểu mô BMNC. Điều trị nội khoa tốt có thể cải thiện tình trạng BMNC làm nâng cao hiệu quả phẫu thuật hoặc tránh được phẫu thuật không cần thiết.

1.3.1.1. Các thuốc tra mắt

Thuốc chống viêm

- Corticosteroid: kiểm soát tình trạng viêm của BMNC dựa trên cơ chế ức chế phospholipase A2, kiểm soát sinh tổng hợp hóa chất trung gian của phản ứng viêm. Dexamethasone có hiệu lực mạnh hơn prednisolone nhưng khả năng thấm vào nhãn cầu kém hơn. Flumetholone và loteprednol có hiệu

lực yếu nhưng an toàn, ít gây biến chứng tăng nhãn áp [42]. Thận trọng khi dùng corticosteroid tra kéo dài vì có thể gặp các tác dụng phụ.

- Cyclosporine A (CsA) ngăn ngừa sản xuất cytokine gây viêm và hoạt hóa tế bào T, phá vỡ quá trình sản xuất Interleukin -2 từ lympho T hỗ trợ. CsA tra tại chỗ có hiệu quả trong điều trị viêm giác mạc nhu mô Herpes, bệnh mắt rosacea, bệnh thải loại mảnh ghép-vật chủ, viêm kết mạc mùa xuân, viêm kết mạc dị ứng atopy, khô mắt nặng...[43],[44].

- Tacrolimus: ức chế miễn dịch phong tỏa sao chép IL-2, ức chế kháng nguyên trình diện tế bào Langerhans, giảm hoạt hóa lympho T [45].

- Azithromycin: có đặc tính chống viêm qua khả năng ức chế sản xuất các tiền tố viêm cytokin và phức hợp tiêu protein ngoại bào (MMP) [46].

Dinh dưỡng giác mạc

- Nước mắt nhân tạo có tác dụng giữ ẩm, tăng độ nhớt, dính kết biểu mô, bổ sung lipid, có ion bicarbonat thúc đẩy hàn gắn biểu mô, ưu tiên lựa chọn sản phẩm không có chất bảo quản để tránh gây độc BMNC [47],[48].

- Vitamin A là yếu tố cần thiết duy trì biểu mô, hiệu quả trong điều trị khô mắt, sừng hóa kết giác mạc.

- Huyết thanh tự thân: chứa nhiều yếu tố sinh học tương đồng với nước mắt tự nhiên như pH, áp suất thẩm thấu, EGF, vitamin A, yếu tố tăng trưởng β , IgA, lysozym, fibronectin, đem lại hiệu quả tốt trong việc hàn gắn tổn thương BMNC [49].

Điều trị các nhiễm khuẩn thứ phát trong trường hợp loét giác mạc bằng kháng sinh phổ rộng tra mắt.

1.3.1.2. Các thuốc dùng toàn thân

Chống viêm: Corticosteroid hoặc thuốc ức chế miễn dịch trong một số bệnh lý toàn thân có liên quan đến viêm và miễn dịch, dùng liều tấn công sau đó giảm liều và duy trì với sự theo dõi chặt chẽ.

Cycline uống: Cycline liều thấp có đặc tính kháng viêm, ức chế MMP, giảm sự hình thành tân mạch [50].

Chất dinh dưỡng bổ sung: Vitamin A, omega 3 liều thấp có tác dụng cải thiện tình trạng BMNC, tăng chế tiết nước mắt [51].

1.3.2. Kính tiếp xúc trong điều trị rối loạn bề mặt nhãn cầu

Kính tiếp xúc điều trị (contact lens for therapeutic use) phù hợp có thể bảo vệ giác mạc trước các tác nhân cơ học, làm giảm khô mắt, giảm đau và kích thích của BMNC, kích hoạt liên biểu mô giác mạc.

Chỉ định đặt kính tiếp xúc trong một số bệnh BMNC: Tróc biểu mô giác mạc tái diễn, tổn thương biểu mô dai dẳng, hội chứng Stevens-Johnson và bệnh pemphigoid, bệnh giác mạc do liệt thân kinh dinh dưỡng, sau các phẫu thuật kiến tạo BMNC.

Kính được lựa chọn dựa vào chỉ số thấm khí cao giúp cho khả năng vận chuyển oxy qua kính vào giác mạc tốt hơn, độ cong tương xứng với giác mạc tránh cản trở lưu thông của các chất dinh dưỡng và oxy vào giác mạc. Có các loại kính đường kính lớn (16-24mm), kính cứng mạc, PROSE (thiết bị nhân tạo thay thế BMNC): loại kính cứng mạc đặc biệt được thiết kế với độ bám cứng mạc tốt nhờ phần mềm tính toán chính xác cho độ cong nền.

Cần phát hiện và xử trí sớm các biến chứng do kính tiếp xúc gây ra: nhiễm khuẩn, tiêu nhuyễn giác mạc vô khuẩn, tân mạch giác mạc.

1.3.3. Các phẫu thuật bảo vệ bề mặt nhãn cầu

Chích nhu mô nông hoặc nạo biểu mô giác mạc: làm tăng độ bám dính giữa nhu mô và biểu mô trong điều trị bệnh tróc biểu mô tái phát [52].

Đóng điểm lệ: giữ nước mắt lưu lại trên BMNC, giảm tình trạng khô, kích thích và viêm. Mức độ vừa có thể đóng tạm thời bằng nút collagen hoặc silicon, mức độ nặng cần đóng vĩnh viễn bằng phẫu thuật [53],[54].

Gọt giác mạc lớp nông: trong một số tổn thương nông của giác mạc như thoái hóa Salzmann, tróc biểu mô tái phát, thoái hóa dải băng.

Tạo hình mi hoặc khâu cò mi tạm thời: giúp mắt nhắm kín hơn, giảm diện tiếp xúc của giác mạc và BMNC với môi trường, giảm sự bốc hơi của phim nước mắt, do đó giúp bảo tồn và hàn gắn tổn thương BMNC dai dẳng[55]. Ngoài ra có thể thu hẹp diện tiếp xúc của nhãn cầu với môi trường bằng cách tiêm botox để gây sụp mi tạm thời [56].

Phủ kết mạc: dùng kết mạc lân cận che phủ vùng tổn thương khó hàn gắn của giác mạc, làm giảm đau nhức do kích thích từ vết loét khó hàn gắn, giảm viêm, đưa xơ mạch từ kết mạc vào để hàn gắn tổn thương giác mạc. Nhược điểm là làm cận cùng độ, giảm thị lực, khó theo dõi nhãn áp, khó quan sát các lớp sâu, kéo xơ mạch vào giác mạc gây suy giảm tế bào gốc và làm khó khăn cho các bước kiến tạo BMNC về sau.

1.3.4. Các phẫu thuật kiến tạo bề mặt nhãn cầu

Các yếu tố liên quan đến mức độ tổn thương BMNC trước mổ

Các yếu tố thuộc nhãn cầu

Số mắt tổn thương, mức độ tổn hại của tế bào gốc vùng rìa, mức độ tổn thương kết mạc, tổn hại phim nước mắt, tổn thương nhu mô giác mạc, các rối loạn về cơ học của mi mắt, các bệnh lý phối hợp như glaucoma hoặc bệnh dịch kính – võng mạc.

Các yếu tố ngoài nhãn cầu

Tuổi, tình trạng bệnh toàn thân (dung nạp thuốc ức chế miễn dịch), khả năng tuân thủ điều trị sau phẫu thuật.

Các bệnh nhân có suy giảm tế bào gốc một phần thì có thể không cần can thiệp phẫu thuật. Trong trường hợp giác mạc bị che phủ một phần bởi biểu mô kết mạc, việc cắt bỏ phần biểu mô này là đủ cho các tế bào biểu mô vùng rìa còn lại phát triển tái tạo lại một bề mặt giác mạc hoàn thiện.

Các bệnh nhân có tổn hại trầm trọng tế bào gốc khi đã điều trị nội khoa qua giai đoạn viêm cấp, chưa khô mắt tới mức sừng hóa BMNC, mi nhắm tốt, tùy theo mức độ tổn thương để lựa chọn loại phẫu thuật kiến tạo BMNC phù hợp.

Ghép màng ối đơn thuần (Amniotic membrane transplantation- AMT)

Ứng dụng màng ối trong kiến tạo BMNC được áp dụng rộng rãi từ sau nghiên cứu của Kim và Tseng năm 1995 với nhiều kết quả khả quan[57]. Quy trình thu nhận, bảo quản và phân phối màng ối được FDA công nhận năm 1997, phẫu thuật này được tổng kết bởi Dua năm 1999 [58].

Phẫu thuật ghép màng ối được áp dụng cho các trường hợp [59],[60]:

- Bệnh lý kết mạc: thay thế kết mạc sau tổn thương kết mạc rộng, dính mi cầu, chùng kết mạc, sửa sẹo bong glaucoma.

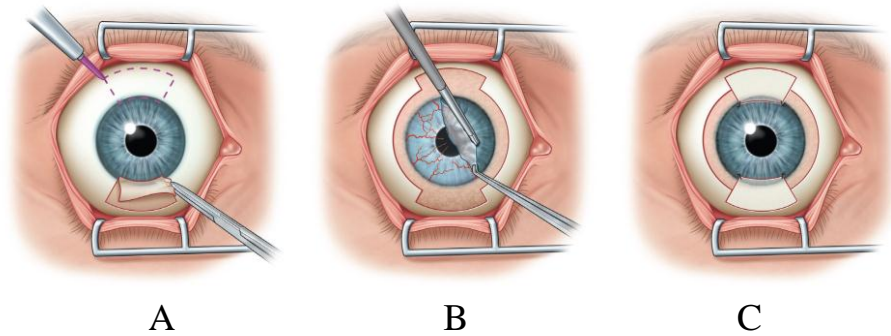
- Bệnh lý giác mạc: loét giác mạc khó hàn gắn, di chứng bong, Stevens-Johnson, bệnh giác mạc bong tróc biểu mô đau nhức.

- Sử dụng như lớp băng che phủ BMNC: bong cấp, Stevens-Johnson, hoại tử thượng bì cấp.

Nhược điểm: màng ối chỉ có vai trò là chất nền chứ không thay thế được biểu mô do đó khi suy giảm toàn bộ tế bào gốc thì quá trình biểu mô hóa vẫn khó khăn và sẽ bị tân mạch xâm nhập từ kết mạc vào giác mạc sau ghép màng ối đơn thuần.

Ghép kết mạc rìa tự thân (Conjunctival limbal autograft- CLAU)

Ghép kết mạc rìa tự thân từ mắt lành sang mắt bệnh được áp dụng cho các bệnh nhân bị suy giảm tế bào gốc ở một bên mắt, thực hiện từ năm 1989 bởi Kenyon và Tseng[61], được xếp trong bảng phân loại ghép biểu mô của Holland và Schwartz năm 1996[62]. Từ đó rất nhiều báo cáo về hiệu quả của phương pháp này được công bố[63],[64].



Hình 1.1. Ghép kết mạc rìa tự thân

A. Lấy KM mắt lành; B. Gọt xơ mạch mắt bệnh; C. Ghép KM rìa tự thân[65]

Kỹ thuật: gọt bỏ tổ chức xơ và tân mạch trên bề mặt giác mạc bệnh lý, lấy 2 mảnh kết mạc rìa (dài khoảng 90 cung giờ, rộng 2-3mm) trên và dưới từ mắt lành ghép sang vùng rìa của mắt bệnh (hình 1.1.). Ưu và nhược điểm: Kết mạc rìa mang theo tế bào gốc từ mắt lành có tác dụng tái tạo biểu mô giác mạc, duy trì sự ổn định BMNC của mắt bệnh. Sử dụng nguyên liệu tự thân nên không gặp nguy cơ thải loại, không phải dùng thuốc ức chế miễn dịch. Phẫu thuật đơn giản và hiệu quả, tuy nhiên chỉ áp dụng được với người bị bệnh ở 1 mắt. Ngoài ra, do lấy một diện tích khá lớn kết mạc rìa nên có nguy cơ gây ra suy giảm tế bào gốc ở mắt lành.

Ghép kết mạc rìa đồng loài từ người cùng huyết thống (Living-related conjunctival limbal allograft: Lr-CLAL)

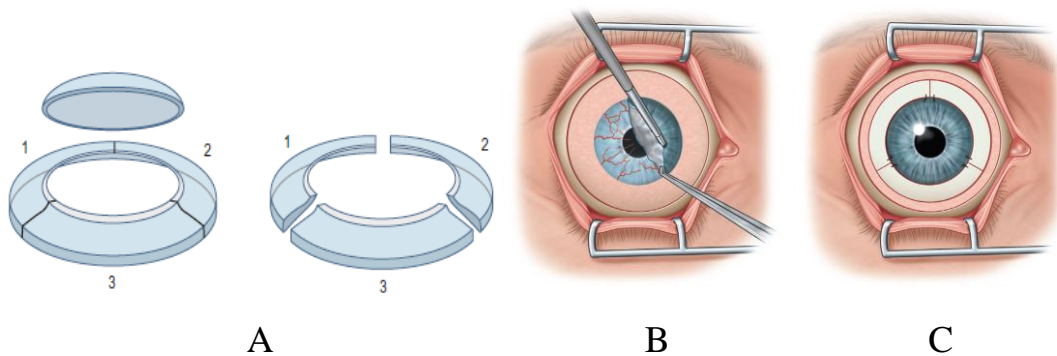
Ghép kết mạc rìa đồng loài từ người đồng huyết thống là giải pháp cho các bệnh nhân rối loạn BMNC ở cả 2 mắt, tuy có sự lựa chọn về tương hợp miễn dịch, nhưng vẫn gặp phản ứng thải loại mảnh ghép, khi xuất hiện thải ghép cần tăng liều thuốc ức chế miễn dịch và theo dõi nghiêm ngặt[66].

Kỹ thuật: lựa chọn người cùng huyết thống có BMNC lành lặn. Người cho được xét nghiệm viêm gan B, C, giang mai, HIV, nhóm máu ABO, kháng nguyên trình diện bạch cầu (HLA I và II) và chọn người tương hợp cao nhất

với người nhận. Phẫu thuật thực hiện giống ghép kết mạc rìa tự thân. Sau mổ dùng thuốc chống viêm và ức chế miễn dịch toàn thân, giảm liều từ từ với sự kiểm soát chặt chẽ.

Ghép giác mạc rìa đồng loài (Keratolimbal Allograft - KLAL)

Áp dụng trong trường hợp suy giảm tế bào gốc cả 2 mắt nhưng không lấy được kết mạc rìa đồng huyết thống tương hợp, nguồn tế bào gốc dùng để ghép được lấy từ vành rìa giác mạc hiến (hình 1.2.). Phẫu thuật có tác dụng làm tái tạo lại BMNC bằng lớp biểu mô là biểu mô giác mạc, tuy nhiên người bệnh phải dùng thuốc ức chế miễn dịch toàn thân và tại chỗ kéo dài sau mổ[67],[68],[69].



Hình 1.2. Ghép giác mạc rìa đồng loài.

A. Lấy vành GM rìa; B. Gọt xơ mạch GM bệnh; C. Ghép GM rìa[65]

Phương pháp này đòi hỏi thời gian hòa nhập của mảnh ghép với tổ chức khá dài, nguy cơ thải loại mảnh ghép do miễn dịch, nguy cơ tổn thương toàn thân do việc dùng thuốc ức chế miễn dịch kéo dài.

Trong trường hợp suy giảm tế bào gốc kèm theo tổn thương nặng ở kết mạc (bỏng hoặc dị ứng thuốc nặng), có thể phối hợp ghép giác mạc rìa đồng loài (KLAL) và ghép kết mạc rìa đồng loài từ người đồng huyết thống (Lr-CLAL) với tổn thương 2 mắt (phẫu thuật Cincinnati)[70], hoặc ghép kết mạc rìa tự thân (CLAU) với tổn thương 1 mắt (Cincinnati cải biên)[71].

Điều trị ức chế miễn dịch trong ghép tế bào gốc đồng loài

Mô vùng rìa chứa các tế bào Langerhans mang số lượng lớn kháng nguyên so với vùng giác mạc trong vô mạch. Trong các phẫu thuật ghép tế bào gốc đồng loài Lr-CLAL, KLAL, Allo-CLET, Lr-CLET, kháng nguyên lạ được ghép vào tổ chức kết mạc của người nhận là vùng giàu mạch máu sẽ gây ra phản ứng miễn dịch mạnh mẽ, vì vậy các bệnh nhân cần được sử dụng thuốc ức chế miễn dịch tại chỗ và toàn thân, phối hợp với corticosteroid giảm liều dần. Các thuốc kháng sinh, kháng virus cần được dùng kéo dài để phòng bội nhiễm. Đồng thời cần tiến hành các khám nghiệm toàn thân định kỳ chặt chẽ để kiểm soát tác dụng phụ của thuốc [68].

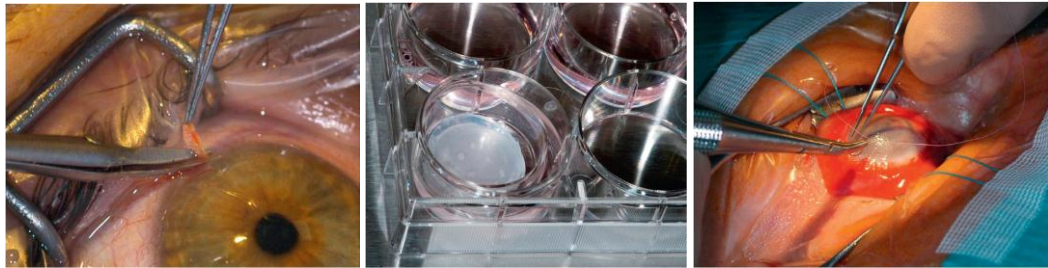
Việc điều trị ức chế miễn dịch phức tạp, tốn kém và cần theo dõi nghiêm ngặt, kéo dài, bệnh nhân luôn đứng trước các nguy cơ thải loại ghép và nguy cơ do dùng thuốc, do đó trong các phương pháp điều trị, ghép tự thân luôn là giải pháp an toàn và được ưu tiên lựa chọn của các nhà nhãn khoa.

Ghép tự thân tẩm biểu mô giác mạc vùng rìa nuôi cấy (Autologous Cultured Limbal Epithelial Transplantation: Auto-CLET)

Với sự phát triển mạnh mẽ của công nghệ nuôi cấy tế bào, trong những năm gần đây, phương pháp ghép tự thân tẩm biểu mô giác mạc vùng rìa nuôi cấy được thực hiện cho các trường hợp rối loạn BMNC nặng có tổn hại tế bào gốc toàn bộ ở 1 mắt hoặc ở 2 mắt nhưng có 1 mắt chỉ suy giảm tế bào gốc 1 phần.

Phương pháp ghép tẩm biểu mô giác mạc nuôi cấy được Pellegrini và cộng sự mô tả đầu tiên vào năm 1997 [72], cho tới nay đã có nhiều báo cáo về sự thành công của phương pháp này trên thực nghiệm và trên người, mở ra hướng đi mới cho điều trị rối loạn BMNC nặng ở 1 mắt [73],[74],[75]. Phương pháp này sử dụng nguyên liệu ghép tự thân nên không gặp vấn đề thải loại miễn dịch cũng như nguy cơ do thuốc ức chế miễn dịch, đồng thời tiết kiệm tổ chức lành của bệnh nhân nên có thể điều trị lần tiếp theo nếu lần đầu chưa thành công. Ở Việt nam đã áp dụng phương pháp này trên thực nghiệm và trên bệnh nhân bỏng 1 mắt cho hiệu quả tốt [76], [77].

Kỹ thuật: sinh thiết 1 mảnh mô vùng rìa 2×2 mm từ mắt lành, lấy hết lớp biểu mô đến tận màng đáy, nuôi cấy trong khoảng 2-3 tuần tạo tấm biểu mô. Tấm biểu mô sau khi nuôi cấy được ghép lên trên BMNC của mắt bệnh sau khi đã gọt bỏ tổ chức xơ mạch (hình 1.3).



A

B

C

Hình 1.3. Ghép tấm biểu mô tế bào gốc vùng rìa nuôi cấy

A. Sinh thiết mảnh mô GM vùng rìa từ mắt lành. B. Nuôi cấy tạo tấm biểu mô.

C. Ghép tự thân tấm biểu mô GM vùng rìa cho mắt bệnh[65]

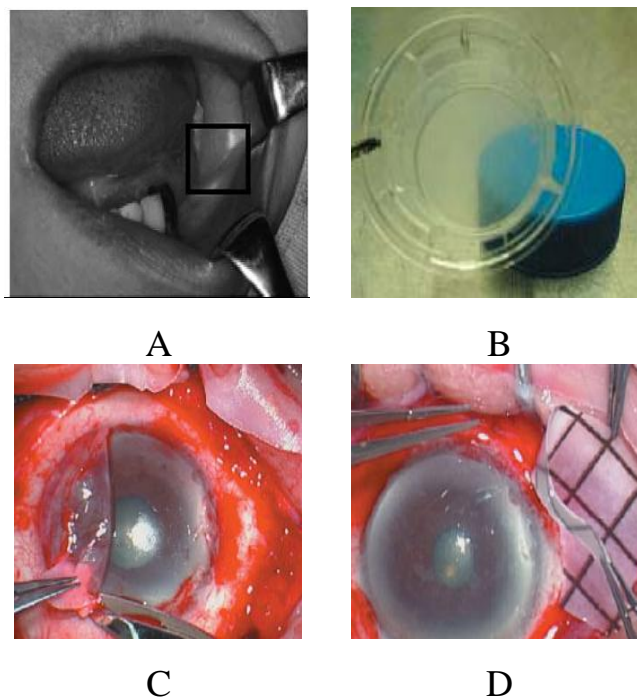
Tuy nhiên với những bệnh nhân bị suy giảm trầm trọng tế bào gốc ở cả 2 mắt, giải pháp đưa ra là có thể ghép đồng loài tấm biểu mô giác mạc vùng rìa nuôi cấy, lấy nguyên liệu mảnh mô giác mạc vùng rìa từ giác mạc của người hiến (Allo-CLET) hoặc từ người thân cùng huyết thống (Lr-CLET), phối hợp với thuốc ức chế miễn dịch kéo dài. Để tránh nguy cơ thải ghép và tránh nguy cơ do thuốc ức chế miễn dịch, gần đây các nhà khoa học tiếp tục tìm và phát hiện các nguồn nguyên liệu tự thân có thể thay thế biểu mô giác mạc trong kiến tạo BMNC.

Ghép tự thân tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy (Autologous Cultured oral mucosal epithelial transplantation – COMET)

Từ nhu cầu cần tìm 1 nguồn nguyên liệu tự thân thay thế biểu mô giác mạc, qua nhiều nghiên cứu trên thực nghiệm cũng như trên người, các nhà khoa học đã phát hiện biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy có nhiều đặc tính

tương đồng về hình thái và sinh lý với biểu mô giác mạc. Đã có rất nhiều nghiên cứu ghép tằm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy thành công trên thực nghiệm, sau đó áp dụng thành công trên các bệnh nhân bị suy giảm toàn bộ tế bào gốc ở cả 2 mắt. Các nghiên cứu cho thấy tằm biểu mô vẫn tồn tại và giúp duy trì sự ổn định của BMNC sau thời gian theo dõi tương đối dài [2],[4], [78], [79].

Kỹ thuật: Sinh thiết 1 mảnh niêm mạc miệng đường kính 3mm, nuôi cấy tạo tằm biểu mô trong thời gian 2-3 tuần. Ghép tự thân tằm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trên BMNC của mắt bệnh nhân sau khi đã gọt bỏ tổ chức xơ mạch (hình 1.4.).



Hình 1.4. Ghép tằm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy

A. Sinh thiết niêm mạc miệng. B. Nuôi cấy tạo tằm biểu mô. C. Gọt bỏ tổ chức xơ mạch. D. Ghép tự thân tằm biểu mô trên BMNC[80],[81]

Ưu điểm: Phương pháp đạt hiệu quả tốt trong việc ổn định BMNC ở những bệnh nhân có rối loạn BMNC 2 mắt. Đây là phương pháp ghép tự thân nên không cần sử dụng thuốc ức chế miễn dịch, do đó không có nguy cơ đối với toàn thân do tác dụng phụ của thuốc. Đồng thời bệnh nhân không có phản ứng thải loại mảnh ghép do miễn dịch, tăng khả năng thành công trong điều trị. Phương pháp này an toàn do chỉ lấy 1 mảnh nhỏ niêm mạc miệng để làm nguyên liệu cấy ghép, và vì vậy có thể thực hiện nhiều lần nếu cần mà không làm ảnh hưởng đến tình trạng toàn thân của người bệnh.

1.3.5. Ghép giác mạc trong bệnh lý rối loạn bề mặt nhãn cầu

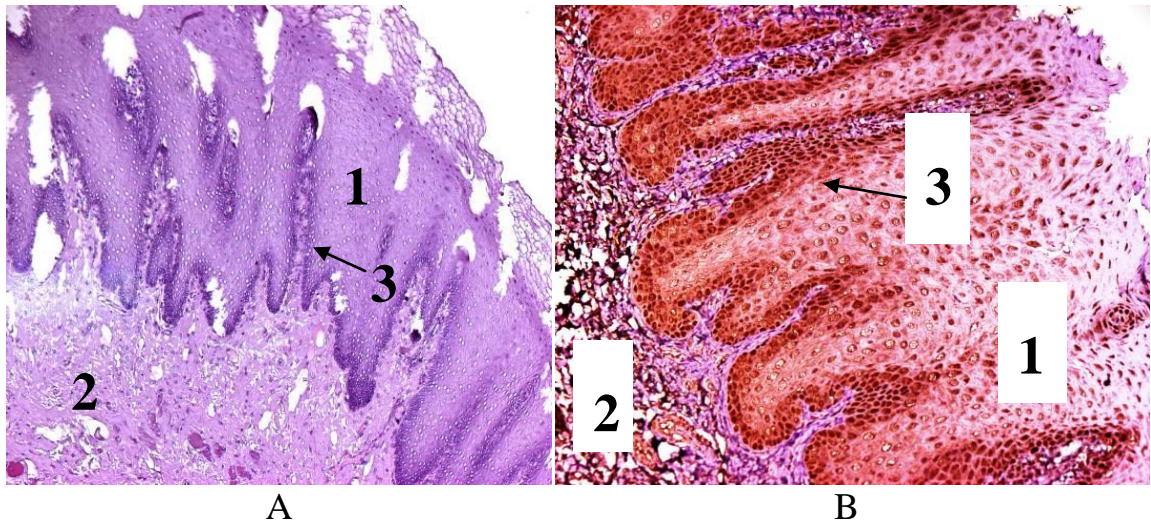
Đối với những bệnh nhân bị rối loạn BMNC và đục nhu mô giác mạc, phẫu thuật ghép giác mạc sẽ được tiến hành sau khi phẫu thuật kiến tạo BMNC, nhằm tăng thị lực cuối cùng cho bệnh nhân[82],[83]. Tiên lượng và chỉ định của phẫu thuật ghép tùy thuộc vào mức độ ổn định của BMNC sau điều trị. Tùy theo mức độ đục của giác mạc là một phần hay toàn bộ chiều dày mà có thể ghép xuyên hay ghép lớp trước. Trong trường hợp tổn thương BMNC quá nặng, các phẫu thuật kiến tạo BMNC thất bại, tình trạng liên biểu mô kém, nguy cơ thải ghép cao, có thể cân nhắc việc ghép giác mạc nhân tạo. Điều trị nội khoa sau phẫu thuật cũng đòi hỏi liệu trình chống viêm, chống thải ghép ở mức cao hơn ghép giác mạc hoặc ghép biểu mô BMNC đơn thuần.

1.4. Tắm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy và ứng dụng trong điều trị rối loạn bề mặt nhãn cầu

1.4.1. Cấu trúc biểu mô niêm mạc miệng

Biểu mô niêm mạc miệng và biểu mô giác mạc có cùng nguồn gốc phôi thai từ ngoại bì da, đều là biểu mô lát tầng không sừng hóa, dày, gồm nhiều hàng tế bào và có hình thái tế bào lớp đáy giống nhau. Tế bào ở lớp đáy có

hình trụ hoặc hình khối, bào tương có đầy đủ các bào quan, có khả năng phân chia để duy trì quần thể tế bào biểu mô ổn định. Các tế bào có khả năng phân chia tập trung thành từng cụm nằm ở 2-3 lớp sát màng đáy, nhân bắt màu đậm khi nhuộm p63 nhìn thấy nhiều hơn ở chỗ sâu nhất của lõm biểu mô, hay còn gọi là nhú chân bì [84]. Khi nuôi cấy in vitro các tế bào biểu mô hình thành một loạt các cụm tế bào khác nhau. Nghiệm pháp đánh dấu cho thấy sự có mặt của các tế bào gốc ở niêm mạc miệng của thỏ nằm ở đỉnh của các nhú chân bì (Hình 1.5.). Cho tới nay, chưa có nhiều nghiên cứu nhận dạng tế bào gốc hoặc tế bào tăng sinh chuyển tiếp ở niêm mạc miệng. Đối với niêm mạc miệng, tế bào gốc biểu mô được cho rằng nằm ở lớp đáy. Do vấn đề đạo đức mà người ta không thể làm các nghiệm pháp để chứng minh điều này ở người trên in vivo mà chỉ có thể minh chứng trong phòng thí nghiệm.



Hình 1.5. Niêm mạc vùng giữa má.

A. Nhuộm HE; B. Nhuộm hóa mô miễn dịch p63

1. Biểu mô 2. Mô đệm 3. Nhân tế bào biểu mô

1.4.2. Các nghiên cứu về kỹ thuật nuôi cấy

Nuôi cấy tế bào là một quá trình phức tạp mà nhờ đó các tế bào được phát triển trong các môi trường nuôi cấy thông thường ở ngoài cơ thể để hồi phục, thay thế hoặc tái tạo tổn thương. Các tế bào, giá đỡ và các yếu tố phát triển được đề cập tới là bộ ba trong công nghệ mô.

1.4.2.1. Giá đỡ dùng trong nuôi cấy

Giá đỡ cung cấp khung chống đỡ cho sự kết dính tế bào và phát triển mô.

Màng ối: sử dụng rộng rãi nhất trong các nghiên cứu và ứng dụng nuôi cấy tấm biểu mô [85],[86],[87]. Do cấu trúc màng ối gần giống màng đáy của biểu mô kết giác mạc vì có chứa collagen typ IV, V, fibronectin, laminin-1, laminin-5, các thành phần này đóng vai trò quan trọng trong sự biệt hoá và sự tăng sinh của các tế bào biểu mô, nhờ đó tế bào biểu mô nuôi cấy có khả năng bám dính, phát triển, tăng sinh và di cư trên mặt màng ối [88]. Ngoài ra, màng ối có tác dụng chống viêm và kháng khuẩn nhờ sự có mặt của các loại cytokin chống viêm như IL-1 α và IL-1 β . Màng ối không biểu lộ kháng nguyên HLA-A,B hoặc DR của β 2 microglobulin trên bề mặt, nên không có hiện tượng thải loại miễn dịch sau khi ghép. Mặt khác, màng ối có chứa các yếu tố tăng trưởng, yếu tố phát triển biểu bì (EGF), yếu tố phát triển giác mạc bào (KGF), yếu tố phát triển thần kinh (NGF), tạo điều kiện cho tế bào biểu mô phát triển và phân chia [89]. Màng ối là nguyên liệu dễ thu nhận và xử lý, bảo quản ở -80°C có thể để được nhiều tháng. Màng ối dai, đàn hồi và chun giãn dễ dàng tạo thuận lợi cho các thao tác dàn trải khi phẫu thuật, tấm biểu mô sau khi phát triển trên nền màng ối dễ dàng thu hoạch để cấy ghép.

Giá fibrin [86]: hình thành bởi sự kết hợp fibrinogen và thrombin pha trong muối 1,1%, được phủ đều lên đáy giếng nuôi cấy để làm giá đỡ cho các tế bào, ưu điểm là trong suốt, nhanh chóng tạo ra sự dính kết mạnh mẽ với mô đệm bên dưới trong phẫu thuật nhờ sự có mặt của các phân tử kết dính

integrin $\beta 1$, sử dụng giá đỡ fibrin khá tiện lợi và dễ thu hoạch tấm biểu mô nuôi cấy, tuy nhiên so với màng ôi thì chi phí cao hơn và không tận dụng được các lợi thế như đặc tính chống viêm, tăng trưởng, phát triển.

Nền polymer nhạy cảm nhiệt: là phương pháp nuôi cấy không sử dụng giá đỡ để tạo tấm biểu mô. Ở 37°C , các tế bào biểu mô dễ dàng bám dính và tăng sinh trên bề mặt màng polymer, nhưng ở nhiệt độ thấp hơn (32°C) tấm biểu mô bắt đầu tách rời ra, do đó không cần enzyme để giải phóng tấm biểu mô ra khỏi màng nuôi cấy [90].

1.4.2.2. Các loại tế bào sử dụng trong nuôi cấy

Tế bào biểu mô: mảnh mô được lấy từ niêm mạc má ở vị trí chính giữa (điểm giữa tính từ mép vào đến vùng tương ứng tuyến nước bọt ở răng hàm số 6), nơi mà các tác giả cho rằng cấu trúc biểu mô dày và nhú chân bì rõ, khả năng mọc của tấm biểu mô khi nuôi cấy cao hơn vì có chứa nhiều tế bào gốc hơn [91]. Kích thước mảnh mô tùy từng tác giả và từng phương pháp nuôi cấy. *Nguyên bào sợi (3T3):* lớp tế bào hỗ trợ cho sự tăng sinh và biệt hóa tế bào biểu mô. Nguyên bào sợi dùng trong nuôi cấy có thể từ các nguồn khác nhau, lý tưởng nhất là nguyên bào sợi tự thân ở đúng vùng mô liên kết tương ứng với biểu mô muốn nuôi cấy để đảm bảo việc tương tác biểu mô-trung mô cho tế bào biểu mô phát triển, song điều này rất khó thực hiện, nguyên bào sợi chuột bất hoạt là một giải pháp. Nguyên bào sợi chuột bất hoạt bằng Mitomycin C có khả năng sản xuất ra các yếu tố tăng trưởng, loại bỏ các độc chất có trong môi trường nuôi cấy, hạn chế sự biệt hóa của các tế bào biểu mô, tạo điều kiện cho các tế bào biểu mô phát triển phủ kín đáy giếng nuôi cấy. Tuy nhiên có không ít lo ngại do đây là sản phẩm có nguồn gốc động vật. Nhiều nghiên cứu gần đây đã xác nhận hiệu quả nuôi cấy tốt mặc dù không sử dụng 3T3, Oie và cộng sự (2010) dùng nguyên bào sợi da hậu gián phân để nuôi cấy thu được tấm biểu mô đạt chất lượng tốt [92], Sen và cộng sự (2011)

nuôi cấy không dùng 3T3 cũng thu được tấm biểu mô đẹp, các tế bào có sự hiện diện của nhiều loại mucin [93].

1.4.2.3. Phương pháp nuôi cấy

- *Phương pháp nuôi cấy bằng mảnh mô*: sau khi sinh thiết, phẫu tích mảnh mô bỏ bớt mô liên kết ở phía dưới lớp biểu mô, xử lý enzym 10 phút, dùng dung dịch PBS có kháng sinh, kháng nấm để rửa sạch enzym, sau đó xử lý qua EDTA rồi đặt lên giá đỡ được chuẩn bị trước. Sau khi mảnh mô bám dính vào giá đỡ, bổ sung môi trường nuôi cấy liên tục để kích thích các tế bào tăng sinh và lan rộng che phủ toàn bộ mặt giếng nuôi cấy tới khi thu hoạch. Đây là phương pháp đơn giản, nhưng nhược điểm là tấm biểu mô không phẳng và thường lẫn nguyên bào sợi.

- *Phương pháp nuôi cấy bằng dịch treo*: dùng enzyme dispase làm tan rã màng đáy biểu mô để tách các tế bào biểu mô khỏi mô đệm và enzyme trypsin để ly giải những đám tế bào biểu mô thành dạng dịch treo chứa các tế bào riêng rẽ. Dịch treo này được xác định mật độ rồi cấy lên bề mặt giá đỡ đã chuẩn bị trước, rồi bổ sung môi trường nuôi cấy đến khi thu hoạch. Phương pháp này cho tấm biểu mô phẳng nhưng tiến hành phức tạp, đòi hỏi kích thước mảnh mô lớn, cần sử dụng nguyên bào sợi dị loài [94].

- *Phương pháp nuôi cấy mảnh biểu mô*: Tiến hành các bước như kỹ thuật nuôi cấy bằng dịch treo đến khi bóc tách lớp biểu mô ra khỏi mô nền, cắt các mảnh mô thành miếng $0,5 \times 0,5$ mm, sau đó ủ lớp biểu mô với trypsin EDTA trong 1-2 phút. Rửa mảnh biểu mô 3 lần bằng môi trường nuôi cấy. Nuôi trên màng ôi trong môi trường nuôi cấy ở 37°C 5% CO_2 có lớp tế bào nuôi tạo bởi các nguyên bào sợi tự thân. Đây là phương pháp đơn giản, cho tấm biểu mô phẳng, tránh được việc sử dụng nguyên bào sợi dị loài [95].

Quá trình nuôi cấy diễn ra trong khoảng 14-21 ngày. Khi biểu mô đạt được một hàng tế bào, một thao tác bổ sung gọi là *airlifting* để tạo tầng bằng

cách cho lớp tế bào đang nuôi cấy lên cao hơn bề mặt môi trường, vì khi tiếp xúc với không khí, oxy không bị hạn chế khuếch tán bởi môi trường, là yếu tố phù hợp cho việc kích thích biểu mô tạo tầng và biệt hóa [96].

1.4.2.4. Môi trường nuôi cấy

Đảm bảo nồng độ vitamin và amino acid cao, đáp ứng các đặc tính lý hóa như pH, áp suất thẩm thấu, nhiệt độ. Môi trường nuôi cấy tế bào biểu mô niêm mạc miệng thông thường là sự kết hợp của Ham's F12 và DMEM với tỷ lệ 1:1, nhiệt độ phù hợp nhất là 37°C, áp suất thẩm thấu hợp lý là 290 mosmol/kg. Ngoài ra cần các yếu tố bổ sung: Insulin kích thích thu nạp gluco và acid amin, kích thích phân chia tế bào, hormon tăng trưởng trong huyết thanh, đặc biệt huyết thanh bào thai với nồng độ 50ng/ml, hydrocortison có tác động lên sự liên kết và nhân lên của các tế bào, khi mật độ tế bào cao nó có thể gây biệt hóa tế bào, chất này cũng có trong huyết thanh, đặc biệt trong huyết thanh bào thai bò. Để tránh sử dụng huyết thanh do vấn đề nguy cơ lây nhiễm và tránh yếu tố dị loài, cần có fibronectin hoặc polylysin thay thế để đảm bảo độ dính kết của tấm biểu mô nuôi cấy. Ilmarinen và cộng sự (2013) đã sử dụng môi trường không huyết thanh để nuôi cấy thành công tấm biểu mô niêm mạc miệng [97].

1.4.2.5. Các phương pháp định danh tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy

Phương pháp hình thái học

- Quan sát hình thái tấm biểu mô sống: quan sát tấm biểu mô qua quá trình nuôi cấy bằng kính hiển vi soi nổi và soi ngược [98].

- Nhuộm Trypan blue: xác định tỷ lệ sống và chết của tế bào ở mảnh mô nuôi cấy.

- Nhuộm Giemsa: quan sát hình thái bề mặt của tấm biểu mô nuôi cấy: hình dạng, kích thước tế bào và khoảng gian bào.

- Nhuộm Hematoxylin-Eosin: đánh giá cấu trúc vi thể của tấm biểu mô theo chiều dọc: độ phẳng của tấm biểu mô, số lớp tế bào, hình dạng và kích thước các tế bào và khoảng gian bào.

Phương pháp hiển vi điện tử: tấm biểu mô được kiểm tra bằng hiển vi điện tử quét (Scanning electron microscopy - SEM) và xuyên (Transmission electron microscopy - TEM). Quan sát cấu trúc siêu vi của tấm biểu mô, liên kết giữa các tế bào biểu mô với nhau và giữa tế bào biểu mô với giá đỡ, bằng SEM có thể xác định sự hiện diện của tế bào gốc [87], [93], [99].

Kỹ thuật hóa mô miễn dịch: nhuộm hóa mô miễn dịch bằng cách dùng các marker K3, K12, connexin-43, p63, p75, MCSP để nhận diện các loại tế bào và đánh giá các đặc tính và độ biệt hóa của chúng. K3 là dấu ấn của các tế bào đã biệt hóa của giác mạc và không hiện diện ở tế bào gốc, K12 tạo cặp với K3 và không hiện diện ở kết mạc nên K12 là dấu ấn tốt để phát hiện tế bào biểu mô giác mạc [100]. Đơn vị kết nối (connexin- 43) thể hiện dấu ấn của tế bào biểu mô giác mạc đã biệt hóa cao, p63 là marker thể hiện tế bào gốc, đặc biệt là dạng đồng phân ΔN của p63, hoặc p75 là marker cho tế bào gốc niêm mạc miệng. Ngoài ra còn có Occludin, Desmoplakin là một loại protein tham gia liên kết các tế bào, K4 đặc trưng cho keratin của các tế bào biểu mô niêm mạc, K4/K13 đặc trưng cho tế bào biểu mô không sừng hóa. Kỹ thuật hóa mô miễn dịch sử dụng trong nhiều nghiên cứu khi đánh giá đặc điểm của tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy [87], [93], [98], [101], [102].

Kỹ thuật sinh học phân tử (phản ứng khuếch đại chuỗi gen có sao chép ngược Reverse transcription Polymerase chain reaction RT-PCR): xác định các marker p63, $\Delta Np63$, p75, các mucin liên kết màng tế bào MUC 1,4,16. Ngoài ra một số marker khác cũng được phát hiện như intergrin, ABCG2 (ATP binding cassette sub family G member 2: marker quần thể ranh giới của tế bào gốc), pax6 là marker cho nhãn cầu.

Các mucin liên kết màng tế bào (MUC) là những protein trên bề mặt biểu mô BMNC, khớp với các đỉnh vi nhung mao của tế bào biểu mô tạo thành phức hợp có khả năng giữ nước, góp phần quan trọng vào việc ổn định và duy trì phim nước mắt. Trong nghiên cứu của Hori và cộng sự, kỹ thuật PCR đã xác định sự có mặt của MUC 1,4,16 ở tằm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy [103],[104]; Sen và cộng sự khẳng định sự hiện diện của MUC 1, 5B, 6, 13, 15, 16 [93]. Krishnan và cộng sự cũng cho thấy MUC 1, 4, 16 ở tằm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy [98].

Test lưu giữ BrdU: Đánh giá sự tăng sinh của tế bào, dựa vào sự phát hiện tế bào gắn BrdU (5-Brommo-2-deoxyuridine) trong khi tổng hợp DNA của tế bào nuôi cấy tăng sinh[98],[101].

Test tạo cụm: Khi tách và phát triển ngoài cơ thể, các cụm tế bào hình thành từ tế bào biểu mô được chia làm 3 loại: (1) Clone toàn phần (holoclone): chứa toàn bộ là tế bào gốc, tạo ra các clone toàn phần khi cấy chuyển. (2) Clone bán phần (paraclone): được coi là tế bào tăng sinh chuyển tiếp muộn, ít có tiềm năng phát triển hơn, chỉ có thể tạo ra các clone bán phần khi chuyển. (3) Clone một phần (meroclone): có thuộc tính trung bình, chứa chủ yếu các tế bào tăng sinh chuyển tiếp sớm. Hiệu quả tạo cụm là số lượng cụm tế bào sinh ra từ từng phần tế bào biểu mô/tổng số tế bào gieo \times 100, các cụm đánh giá dựa vào loại tế bào trong từng cụm. Trong nghiên cứu của Priya và cộng sự năm 2011, sau 3 tuần nuôi cấy các tế bào biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy đã hình thành 2-3 hàng tế bào, test tạo cụm với tế bào biểu mô niêm mạc miệng bình thường là $0,22\pm 0,02\%$, của tế bào niêm mạc miệng nuôi cấy là $0,199\pm 0,04\%$, cả hai loại tế bào biểu mô đều có khả năng hình thành clone toàn phần [91].

1.4.3. Ứng dụng của tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trong điều trị rối loạn bề mặt nhãn cầu

1.4.3.1. Nghiên cứu trên thực nghiệm

Nakamura và cộng sự (2003) đã nuôi cấy thành công tấm biểu mô niêm mạc miệng trên nền nuôi cấy là màng ối và ghép tự thân cho thỏ bị bỏng giác mạc. Sau nuôi cấy, tấm biểu mô niêm mạc miệng có hình dạng, cấu trúc siêu vi rất giống biểu mô giác mạc bình thường. Sau khi ghép tự thân tấm biểu mô nuôi cấy cho thỏ bị bỏng giác mạc 10 ngày, giác mạc duy trì độ trong suốt, hạn chế tân mạch. Mô học giác mạc thỏ sau ghép cho thấy tấm biểu mô gắn chặt với mô nền giác mạc, lớp tế bào trên cùng vẫn còn nhân và không có hiện tượng sừng hoá[78].

Tiếp theo đó, Hayashida và cộng sự (2005) cũng tiến hành nuôi cấy tấm biểu mô niêm mạc miệng và ghép tự thân cho thỏ thực nghiệm bị tổn thương tế bào gốc, tác giả sử dụng màng polymer nhạy cảm nhiệt, không cần giá đỡ màng ối và không cần khâu. Tấm biểu mô thu được gồm 3-5 hàng tế bào lát tầng biệt hóa cao, hình thái giống biểu mô giác mạc bình thường. Định danh tấm biểu mô nuôi cấy có chứa dấu ấn của p63, β 1-intergrin ở lớp đáy, connexin 43 ở khớp nối giữa các tế bào lớp đáy, K3 xuất hiện ở tất cả các lớp tế bào. Sau ghép 4 tuần, bề mặt nhãn cầu của thỏ ổn định và trong suốt, mô bệnh học cho thấy tấm biểu mô vẫn tồn tại nguyên vẹn ở giác mạc thỏ, không thấy sự xâm nhập của tân mạch và tế bào đày[105].

1.4.3.2. Nghiên cứu trên bệnh nhân tổn thương bề mặt nhãn cầu hai mắt

Nishida và cộng sự (2004) lần đầu tiên áp dụng phương pháp này cho 4 bệnh nhân rối loạn nặng bề mặt nhãn cầu hai mắt. Sau thời gian theo dõi trung bình 14 tháng, không có tân mạch xâm lấn vào giác mạc, bề mặt nhãn cầu ổn định, duy trì độ trong suốt, không xuất hiện biến chứng[106].

Inatomi và cộng sự (2006) cũng thông báo kết quả ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy cho 15 mắt của 12 bệnh nhân Steven – Johnson, bỏng, pemphigoid với thời gian theo dõi dài hơn, trung bình 20 tháng, trường hợp dài nhất là 34 tháng. Kết quả bề mặt nhãn cầu duy trì sự ổn định và tương đối trong, không có biến chứng, thị lực được cải thiện. Qua thời gian theo dõi, các tác giả nhận thấy có xuất hiện tân mạch giác mạc nông ở chu vi nhưng không xâm lấn vào trung tâm, thoái triển dần sau 3-6 tháng và ổn định sau 1 năm. Tân mạch giác mạc xuất hiện ở lớp nông được giả thiết là do sự xuất hiện của yếu tố phát triển nội mạch (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF) và các yếu tố phát triển nguyên bào sợi (Fibroblast Growth Factor - FGF) ở tấm biểu mô nuôi cấy. Đây là một nhược điểm của biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy so với biểu mô nuôi cấy từ tế bào gốc vùng rìa[107].

Tình trạng của tấm biểu mô niêm mạc miệng sau ghép qua thời gian theo dõi là vấn đề mà nhiều nhà khoa học quan tâm. Để chứng minh sự tồn tại lâu dài trên giác mạc của biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy sau ghép, Chen và cộng sự (2009) đã ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy cho 4 trường hợp bị bỏng, sau 10-22 tháng các bệnh nhân này được ghép giác mạc xuyên hoặc ghép kết mạc rìa tự thân. Bệnh phẩm giác mạc được dùng các kỹ thuật định danh để xác định sự tồn tại của tấm biểu mô và sự hiện diện của các dấu ấn tế bào gốc và tế bào biệt hóa. Kết quả khẳng định tấm biểu mô vẫn tồn tại nguyên vẹn, có sự hiện diện của K3, 4, 13, không có K8, MUC5AC, chứng tỏ lớp biểu mô trên giác mạc có nguồn gốc từ niêm mạc miệng. Một trường hợp có hiện diện K12, thể hiện đặc tính hỗn hợp của biểu mô giác mạc và niêm mạc miệng trong trường hợp này. Đặc biệt là có hiện diện p75 ở lớp đáy, pan-p63 và ABCG2 ở lớp đáy và trước lớp đáy ở tất cả các bệnh nhân, chứng tỏ sự tồn tại của các tế bào gốc hoặc mang đặc tính của tế bào gốc. Điều này

đảm bảo cho sự tái sinh, biệt hóa đều đặn của biểu mô nuôi cấy sau ghép, giúp cho sự tồn tại bền vững của tấm biểu mô nuôi cấy qua thời gian[101].

Hiệu quả và độ an toàn của tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trong các bệnh lý rối loạn bề mặt nhãn cầu nặng tiếp tục được khẳng định trong các nghiên cứu gần đây, với quy mô lớn hơn và thời gian theo dõi tương đối dài. Nakamura và cộng sự (2011) ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy, sử dụng màng ối làm giá đỡ cho 19 mắt ở 17 bệnh nhân với thời gian theo dõi trung bình là 55 tháng (ngắn nhất là 36 tháng, dài nhất là 90 tháng). Kết quả thị lực cải thiện ở 18 mắt (95%), không có biến chứng, giảm tân mạch giác mạc, ức chế dính mi cầu và kết mạc hóa giác mạc sau mổ[108].

Kết quả tương tự được công bố từ nghiên cứu của Satake và cộng sự (2011) tiến hành trên 40 mắt của 36 bệnh nhân, theo dõi 25,5 tháng (ngắn nhất 6 tháng, dài nhất 54,9 tháng). Cải thiện thị lực đạt được ở 59% số bệnh nhân, tỷ lệ ổn định bề mặt nhãn cầu sau theo dõi 1 năm là 64,8%, sau 2 năm là 59%, sau 3 năm là 53,1%[3].

Một nghiên cứu khác do Burillon và cộng sự (2012) tiến hành ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trên 26 mắt của 25 bệnh nhân suy giảm tế bào gốc do các nguyên nhân khác nhau, sử dụng giá đỡ là màng polymer nhạy cảm nhiệt và không khô. Sau thời gian theo dõi 360 ngày, tỷ lệ thành công là 64%, có hiện diện của p63, β 1-integrin, test tạo cụm $3,4\% \pm 2,06\%$ và chứa các clon toàn phần, thể hiện đặc tính của tế bào gốc có trong tấm biểu mô nuôi cấy, đảm bảo sự tái sinh của tế bào biểu mô, giúp cho tấm biểu mô được tồn tại bền vững sau mổ[109].

Gần đây nhất, Kocaba và cộng sự (2014) công bố kết quả ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy cho 26 mắt của 23 bệnh nhân suy giảm tế bào gốc cả 2 mắt [4]. Sau thời gian trung bình là 28 tháng (ngắn nhất 18 tháng, dài nhất 48 tháng), thị lực cải thiện ở 74% số ca, cải thiện chất lượng cuộc sống ở

95,6%, cải thiện tình trạng biểu mô giác mạc ở 62% các bệnh nhân. Quá trình theo dõi thời gian dài khẳng định sự hiện diện của p63 ở biểu mô giác mạc sau ghép, thể hiện khả năng tái sinh lâu dài của biểu mô, giảm tân mạch và giảm kết mạc hóa chứng tỏ khả năng hồi phục chức năng của biểu mô sau mổ. Tắm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy có vai trò làm tăng thị lực đối với các bệnh nhân chưa có tổn thương đục nhu mô, còn với các bệnh nhân đục nhu mô có nhu cầu ghép giác mạc, tắm biểu mô nuôi cấy cũng giúp cải thiện tình trạng bề mặt nhãn cầu, do đó giảm nguy cơ thải ghép giác mạc, nâng cao hiệu quả điều trị.

Như vậy các nghiên cứu trên thực nghiệm và trên bệnh nhân của các tác giả trên thế giới đều khẳng định rằng ghép tắm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy là phương pháp hiệu quả và an toàn để điều trị bệnh lý rối loạn BMNC nặng 2 mắt. Tuy còn một vài hạn chế như sự xuất hiện của tân mạch giác mạc quanh rìa và chu biên trong thời gian đầu sau mổ, biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy mờ dày và bề mặt kém đồng nhất hơn so với biểu mô giác mạc nên cho thị lực thấp hơn, phẫu thuật đã làm cải thiện và ổn định BMNC, giảm viêm, giảm tân mạch giác mạc.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Nghiên cứu thực nghiệm

15 thỏ chủng *Oryzagalus Cuniculus*, trọng lượng trung bình $2 \pm 0,2$ kg, được nuôi trong cùng điều kiện phòng thí nghiệm tại Bộ môn Mô – Phôi, Đại học Y Hà nội 5 ngày trước khi làm thí nghiệm và suốt thời gian nghiên cứu.

2.1.2. Nghiên cứu trên bệnh nhân

Nghiên cứu được thực hiện trên 12 bệnh nhân rối loạn nặng bề mặt nhãn cầu ở 2 mắt được điều trị và theo dõi tại khoa Kết – giác mạc, Bệnh viện Mắt Trung Ương từ tháng 1/2009 đến tháng 6/2014.

2.1.2.1. Tiêu chuẩn lựa chọn

- Tổn thương suy giảm toàn bộ tế bào gốc: có xâm nhập của tổ chức xơ và tân mạch qua rìa vào giác mạc ở toàn bộ chu vi, có thể tổn hại biểu mô dai dẳng khó hàn gắn.

- Bệnh nhân đã được điều trị nội khoa qua giai đoạn viêm cấp, mắt bớt kích thích, không có dấu hiệu nhiễm trùng.

2.1.2.2. Tiêu chuẩn loại trừ

- Bất thường mi như quặm, hở mi

- Xuất hiện sừng hóa bề mặt nhãn cầu

- Bệnh nhân không hợp tác nghiên cứu, không thu thập được các thông tin điều trị trước đây hoặc không theo dõi được sau điều trị.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu thực nghiệm

2.2.1.1. *Thiết kế nghiên cứu:* Nghiên cứu thực nghiệm, tiến hành tại Bộ môn Mô – Phôi, trường Đại học Y Hà nội từ tháng 1 đến tháng 9/2012. Mẫu

nghiên cứu gồm 15 thỏ, chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 3 thỏ. Mỗi lô tương ứng với thời điểm tiến hành nghiên cứu đánh giá đặc điểm lâm sàng và cấu trúc vi thể của GM thỏ sau ghép 7 ngày, 15 ngày, 30 ngày, 60 ngày, 180 ngày.

2.2.1.2. Phương tiện nghiên cứu: Máy hiển vi phẫu thuật và bộ dụng cụ vi phẫu, các thiết bị và hóa chất cần thiết cho nuôi cấy tế bào.

2.2.1.3. Các bước tiến hành nghiên cứu

Gây bông thực nghiệm cho thỏ: Gây mê tĩnh mạch tai thỏ bằng Thiopental 10mg/kg, gây bông bằng phương pháp “in dầu” dung dịch NaOH 3% trên bề mặt giác mạc và vùng rìa trong 7 giây. Rửa mắt bằng nước muối sinh lý sau khi gây bông 1 phút.

Sinh thiết lấy mẫu biểu mô niêm mạc miệng:

- Thực hiện sau khi gây bông 2 tuần.
- Cố định thỏ trên giá, gây mê Thiopental đường tĩnh mạch rìa tai trong suốt quá trình sinh thiết. Khử trùng vùng miệng thỏ bằng Polydone-iodine 10%. Sinh thiết mảnh niêm mạc mặt trong vùng giữa má thỏ có đường kính 3 mm. Vùng niêm mạc miệng thỏ sau khi sinh thiết được khâu đóng bằng 1 mũi chỉ 6/0 Vicryl, sát trùng bằng dung dịch Polydone-iodine 10%.

- Rửa mảnh mô bằng PBS pha kháng sinh, kháng nấm, ngâm trong môi trường SHEM rồi được chuyển ngay tới phòng nuôi cấy tế bào xử lý tiếp.

Nuôi cấy tạo tấm biểu mô niêm mạc miệng: Nuôi cấy bằng phương pháp mảnh biểu mô, giá đỡ là màng ôi đã nạo bỏ biểu mô, sử dụng lớp tế bào nuôi là nguyên bào sợi tự thân, theo quy trình nuôi cấy của labo nuôi cấy Mô – Bộ môn Mô phôi, Đại học Y Hà nội.

Sau khi nuôi tạo được 2 tấm biểu mô, sử dụng 1 tấm để định danh, 1 tấm để ghép tự thân cho thỏ

Đánh giá chất lượng tấm biểu mô sau khi nuôi cấy:

- + Các tiêu chí đánh giá về đại thể:

- Tốt: Tắm biểu mô trong, dai, độ dày đồng nhất ở các vị trí, trượt dễ dàng khỏi đáy giếng nuôi cấy khi phẫu thuật.

- Trung bình: Tắm biểu mô dày mỏng không đều, dính và khó tách khỏi đáy giếng nuôi cấy khi phẫu thuật nhưng còn nguyên vẹn sau khi tách.

- Xấu: Tắm biểu mô khuyết ở một số vị trí hoặc dính và rách khi tách khỏi đáy giếng nuôi cấy khi phẫu thuật.

+ Các tiêu chí đánh giá về cấu trúc vi thể và siêu vi:

- Vi thể: tắm biểu mô gồm 4-5 hàng tế bào, bám chặt vào màng ối, không có tế bào chế nhày.

- Siêu vi: có vi nhung mao bề mặt, thể liên kết giữa các tế bào và thể bán liên kết giữa lớp đáy và màng ối.

- Hóa mô miễn dịch (+) với K3

Ghép tự thân tắm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy cho thử thực nghiệm:

- Sau bồng 30 ngày, đánh giá tổn thương bề mặt nhãn cầu của thỏ và tiến hành phẫu thuật ghép tắm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy.

- Gây mê qua đường tĩnh mạch tai thỏ bằng Thiopental. Sát trùng mắt bằng betadine 5%.

- Mở kết mạc rìa 360°. Phẫu tích tổ chức màng xơ mạch trên giác mạc và củng mạc. Chuẩn bị diện ghép bao gồm bề mặt giác mạc, vùng rìa và củng mạc quanh rìa, qua rìa giác-củng mạc khoảng 5 mm.

- Trải tắm biểu mô nuôi cấy trên bề mặt nhãn cầu. Dùng chỉ 10/0 khâu cố định tắm biểu mô trên bề mặt nhãn cầu bằng các mũi chỉ rời.

- Kiểm tra độ nguyên vẹn của tắm biểu mô bằng test nhuộm Fluorescein. Tra nhỏ thuốc tại mắt phẫu thuật hàng ngày bằng dung dịch kháng sinh (ofloxacin 0.5% 4 lần/ngày), chống viêm (prednisolon acetat 1% 4 lần/ngày).

Đánh giá sau phẫu thuật: các thời điểm theo dõi là sau ghép 7 ngày, 15 ngày, 30 ngày, 60 ngày, 180 ngày.

Đánh giá tình trạng mắt thỏ sau ghép bằng sinh hiển vi cầm tay và đèn pin khám mắt, đánh giá các biểu hiện mắt đỏ, sưng nề, tiết tố dính ở bờ mi, tổn thương biểu mô bằng test nhuộm màu Fluorescein. Kết quả phẫu thuật được đánh giá như sau:

- Kết quả tốt: Tắm biểu mô áp tốt, trong, không phù, bề mặt nhãn bóng, không bắt màu Fluorescein, không có tân mạch.

- Kết quả khá: Tắm biểu mô áp tốt, không phù, bề mặt không bắt màu Fluorescein hoặc bắt màu ít dạng chấm, tân mạch có thể xuất hiện nhưng chỉ dừng ở vùng rìa.

- Kết quả trung bình: Tắm biểu mô mờ, không nhãn bóng, có tổn thương biểu mô thành đám, tăng sinh xơ mạch qua rìa vào chu biên nhưng chưa vào trung tâm giác mạc.

- Kết quả xấu: Tắm biểu mô phù đục, không nhãn bóng, loét biểu mô khó hàn gắn, tăng sinh xơ mạch vào trung tâm giác mạc.

Tiến hành giết thỏ theo từng lô ở các thời điểm theo dõi để kiểm tra cấu trúc vi thể và siêu vi của giác mạc thỏ đã được ghép tắm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy.

2.2.2. Nghiên cứu trên bệnh nhân

2.2.2.1. Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng, tiến cứu, thực hiện trên 12 bệnh nhân rối loạn bề mặt nhãn cầu 2 mắt được điều trị tại khoa Két giác mạc, Bệnh viện Mắt Trung Ương trong thời gian từ tháng 1 năm 2009 đến tháng 6 năm 2014.

2.2.2.2. Phương tiện nghiên cứu: Máy sinh hiển vi khám bệnh có gắn máy chụp ảnh, hiển vi phẫu thuật và bộ dụng cụ vi phẫu, các thiết bị và hóa chất cần thiết cho nuôi cấy tế bào.

2.2.2.3. Các bước tiến hành nghiên cứu

Đánh giá bệnh nhân trước phẫu thuật:

Khai thác tiền sử và bệnh sử

Đánh giá triệu chứng cơ năng: mức độ nhìn mờ, mức độ cộm chói mắt, đau nhức, đỏ, chảy nước mắt. Sử dụng bảng định lượng mức độ kích thích về cơ năng, dựa trên 3 triệu chứng chính là: sợ ánh sáng, cảm giác khô mắt, cảm giác đau (bảng 2.1).

Bảng 2.1. Mức độ kích thích về triệu chứng cơ năng

Mức độ	Chói, sợ ánh sáng	Cảm giác khô mắt	Cảm giác đau
–	Không phàn nàn	Không phàn nàn	Không phàn nàn
+	Phải đeo kính râm	Có cảm giác khô	Thỉnh thoảng
++	Phải nheo mắt liên tục	Cảm giác rất khô	Thường xuyên
+++	Không mở được mắt	Không mở được mắt	Đau liên tục

Đánh giá tình trạng bề mặt nhãn cầu trước phẫu thuật: đo thị lực (sử dụng bảng Snellen, quy đổi ra LogMAR), đo nhãn áp (nếu được), test Schirmer đánh giá màng phim nước mắt, áp té bào bề mặt giác mạc trước phẫu thuật, đánh giá mức độ viêm của bề mặt nhãn cầu: mức độ chảy nước mắt, co quắp mi, cương tụ kết mạc, đánh giá tổn thương biểu mô trên lâm sàng (test nhuộm Fluorescein).

Khám và loại trừ bệnh nhân có sùng hóa bề mặt nhãn cầu

Điều trị bệnh nhân trước phẫu thuật

Điều trị viêm bề mặt nhãn cầu bằng thuốc tra corticosteroid (prednisolon acetat 1%), liều lượng và thời gian tùy theo mức độ viêm.

Tăng cường dinh dưỡng bề mặt nhãn cầu, củng cố chất lượng và số lượng màng phim nước mắt: Tra nước mắt nhân tạo dạng dung dịch và dạng keo.

Điều trị viêm hoặc các tổn thương khác của bờ mi: tra mỡ tetracycline, chườm ấm và mát xa bờ mi.

Xử trí các bất thường bờ mi như hở, trễ mi, quặm, lông xiêu bằng phẫu thuật tạo hình bờ mi, xử lý dính mi cầu bằng phẫu thuật tách dính.

Tiêu chí lựa chọn bệnh nhân sau khi điều trị nội khoa: đã qua giai đoạn viêm cấp, hết đau nhức, tân mạch giác mạc không cương tụ, không có sừng hóa bề mặt nhãn cầu.

Sinh thiết lấy mẫu biểu mô niêm mạc miệng

- Trước mổ bệnh nhân được điều trị các bệnh răng miệng nếu có, đánh răng đều đặn, không hút thuốc lá.

- Bệnh nhân nằm trên bàn mổ, sát trùng niêm mạc miệng bằng Polydone-iodine 10%. Gây tê tại chỗ bằng tiêm 1ml Lidocain 2% dưới niêm mạc má.

- Sinh thiết một mảnh niêm mạc đường kính 3 mm ở mặt trong ở vùng giữa má (điểm giữa tính từ góc miệng đến lỗ đổ ra của ống Stenon, tương đương răng hàm số 6). Vùng niêm mạc má sau khi sinh thiết được khâu bằng chỉ 6/0 Vicryl, sát trùng bằng dung dịch Polydone-iodine 10%.

- Rửa mảnh mô bằng PBS pha kháng sinh rồi ngâm trong môi trường DMEM, chuyển ngay tới phòng nuôi cấy tế bào xử lý tiếp.

- Sau sinh thiết niêm mạc miệng, bệnh nhân súc miệng hàng ngày bằng nước muối sinh lý.

Nuôi cấy tạo tấm biểu mô niêm mạc miệng: Nuôi cấy bằng phương pháp mảnh biểu mô, giá đỡ là màng ôi đã nạo bỏ biểu mô, sử dụng lớp tế bào nuôi là nguyên bào sợi tự thân, theo quy trình nuôi cấy của labo nuôi cấy Mô – Bộ môn Mô phôi, Đại học Y Hà nội.

Sau khi nuôi tạo được 2 tấm biểu mô, sử dụng 1 tấm để định danh, 1 tấm để ghép tự thân cho bệnh nhân

Đánh giá chất lượng tấm biểu mô sau khi nuôi cấy

+ Các tiêu chí đánh giá về đại thể:

- Tốt: Tấm biểu mô trong, dai, độ dày đồng nhất ở các vị trí, trượt dễ dàng khỏi đáy giếng nuôi cấy khi phẫu thuật

- Trung bình: Tấm biểu mô dày mỏng không đều, dính và khó tách khỏi đáy giếng nuôi cấy khi phẫu thuật nhưng còn nguyên vẹn sau khi tách

- Xấu: Tấm biểu mô khuyết ở một số vị trí hoặc dính và rách khi tách khỏi đáy giếng nuôi cấy khi phẫu thuật

+ Các tiêu chí đánh giá về cấu trúc vi thể và siêu vi:

- Vi thể: tấm biểu mô gồm 4-5 hàng tế bào, bám chặt vào màng ối, không có tế bào chế nhày

- Siêu vi: có vi nhung mao bề mặt, thể liên kết giữa các tế bào và thể bán liên kết giữa lớp đáy và màng ối

- Hóa mô miễn dịch (+) với K3

Ghép tự thân tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trên bệnh nhân

- Gây tê cạnh nhãn cầu lidocain 2% 6ml, sát trùng mắt bằng betadine 5% (với bệnh nhân dưới 15 tuổi phải gây mê toàn thân).

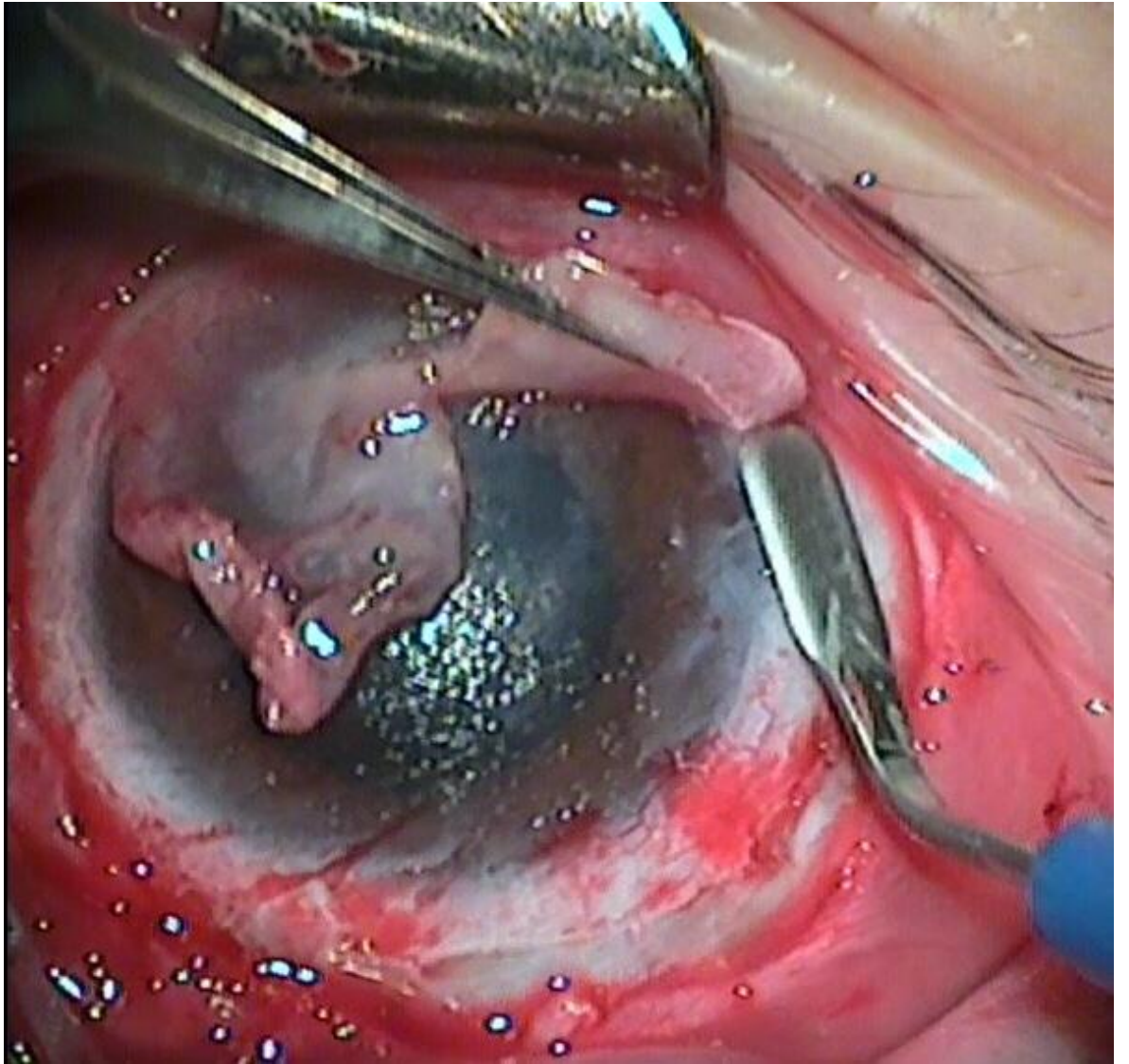
- Mở kết mạc rìa 360°. Phẫu tích tổ chức xơ dưới kết mạc, giữ tối đa tổ chức kết mạc lành.

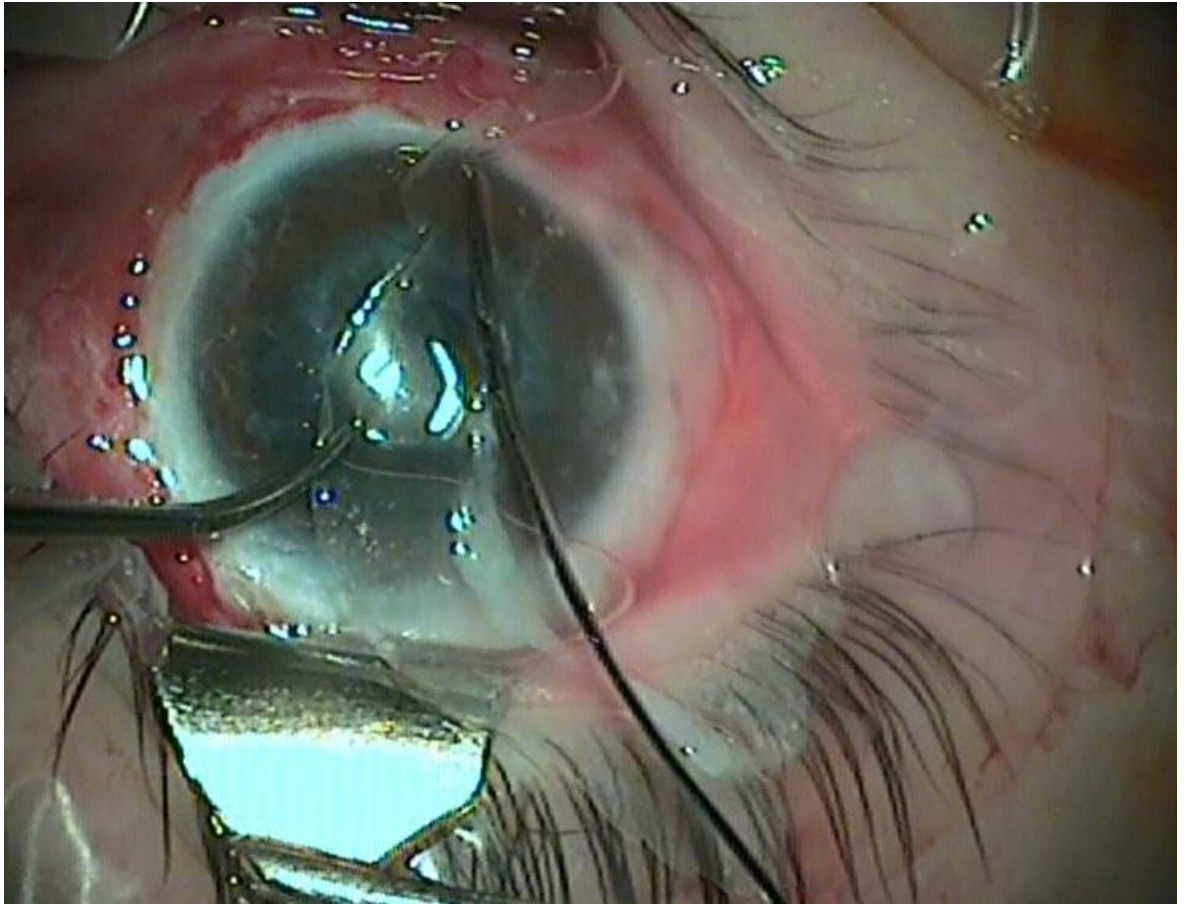
- Phẫu tích tổ chức màng xơ mạch trên giác mạc và củng mạc, đốt cầm máu củng mạc quanh rìa. Chuẩn bị diện ghép gồm bề mặt giác mạc, vùng rìa và củng mạc quanh rìa, cách rìa giác củng mạc khoảng 5 mm.

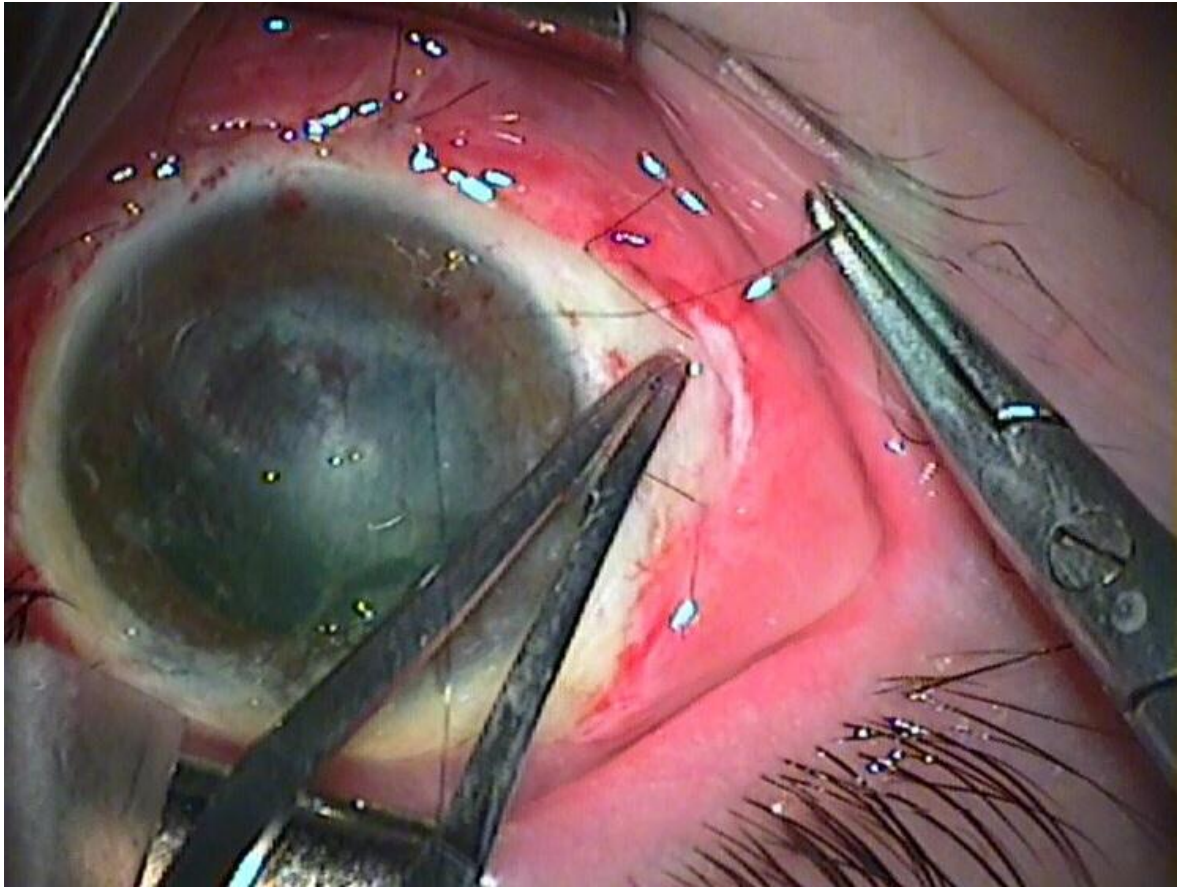
- Trải tấm biểu mô nuôi cấy trên bề mặt nhãn cầu. Dùng chỉ 10/0 để khâu cố định tấm biểu mô nuôi cấy trên bề mặt nhãn cầu bằng các mũi chỉ rời.

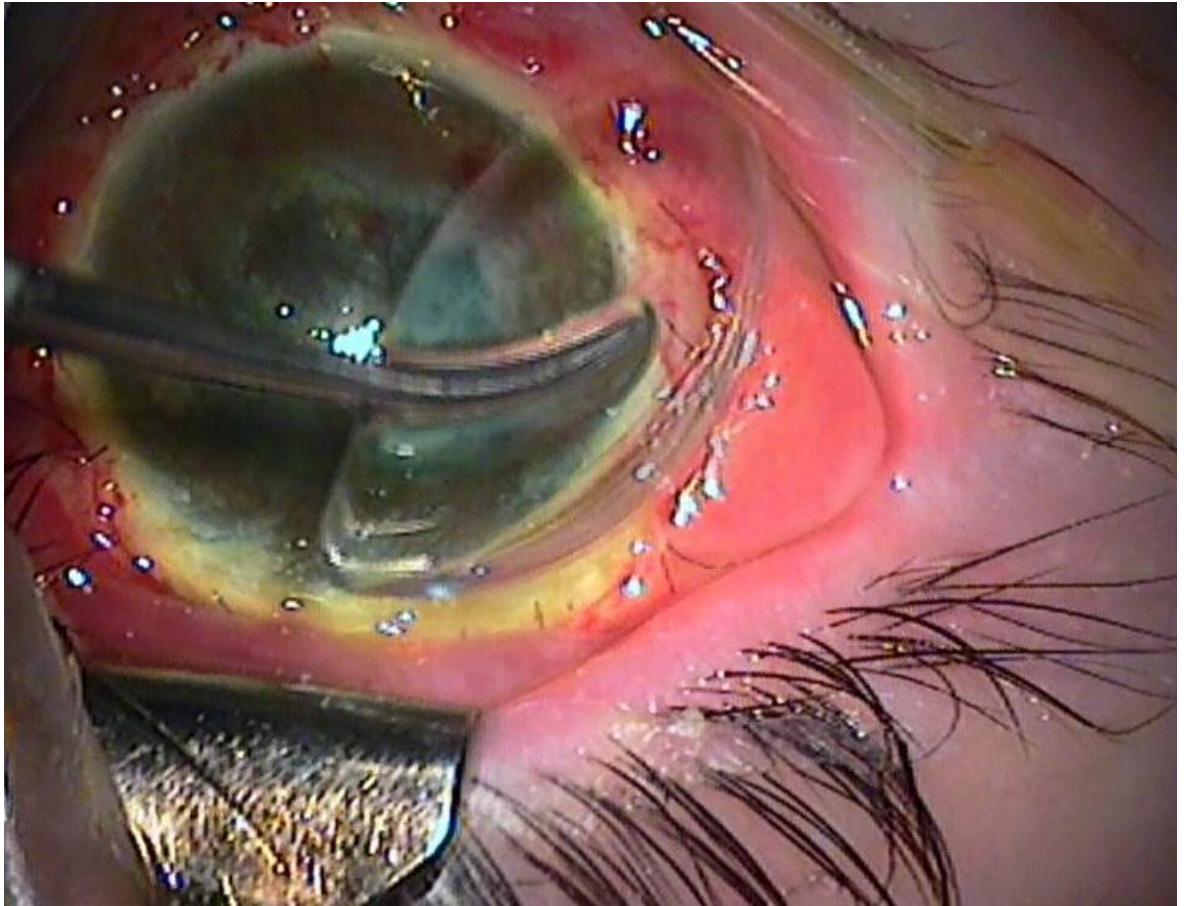
- Kiểm tra độ nguyên vẹn của tấm biểu mô bằng test nhuộm Fluorescein. Đặt kính tiếp xúc.

- Mảnh tổ chức màng xơ mạch phẫu tích từ bề mặt nhãn cầu gửi giải phẫu bệnh để phân tích cấu trúc mô học.









Chăm sóc sau mổ: thay băng hàng ngày, thuốc tra kháng sinh (ofloxacin 0.3%) 4 lần/ngày trong 2 tuần, chống viêm có corticoid (prednisolon acetat 1%) 6 lần/ ngày giảm liều dần, dinh dưỡng bề mặt nhãn cầu (nước mắt nhân tạo, các thuốc giữ ẩm và tăng liền biểu mô) dùng liên tục 1h/ lần và tra kéo dài. Cắt chỉ sau 2 tuần khi tám biểu mô đã bám tốt. Thay kính tiếp xúc 2 tuần/ lần và duy trì 3-4 tháng sau mổ.

Theo dõi và đánh giá tình trạng mắt sau phẫu thuật

Đánh giá 2 ngày/lần trong 2 tuần đầu, sau đó hàng tuần trong 1 tháng, 2 tuần/lần trong 2 tháng, 1 tháng/lần trong thời gian tiếp theo.

Phát hiện các biến chứng có thể xảy ra sau mổ (nhiễm trùng, bong mảnh ghép do cố định không tốt).

Đánh giá mức cải thiện các triệu chứng cơ năng sau mổ (sử dụng bảng 2.1), đánh giá số dấu hiệu cơ năng cải thiện so với trước mổ.

Đánh giá mức cải thiện thị lực sau mổ

Về thực thể, đánh giá kết quả phẫu thuật dựa trên 3 yếu tố: độ trong và áp của tấm biểu mô, tình trạng biểu mô bề mặt nhãn cầu, tăng sinh tân mạch nông, sâu hoặc tổ chức xơ trên giác mạc.

+ Kết quả tốt: Tấm biểu mô áp tốt, trong, không phù, bề mặt nhẵn bóng, không bắt màu Fluorescein, không có tân mạch.

+ Kết quả khá: Tấm biểu mô áp tốt, không phù, bề mặt không bắt màu Fluorescein hoặc bắt màu ít dạng chấm, tân mạch có thể xuất hiện nhưng chỉ dừng ở vùng rìa.

+ Kết quả trung bình: Tấm biểu mô mờ, không nhẵn bóng, có tổn thương biểu mô thành đám, tăng sinh xơ mạch qua rìa vào chu biên nhưng chưa vào trung tâm giác mạc.

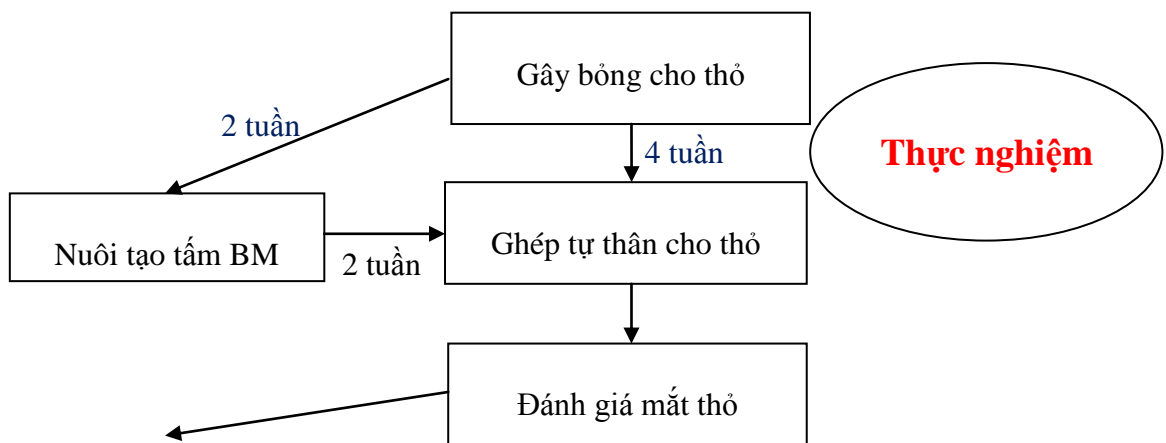
+ Kết quả xấu: Tấm biểu mô phù đục, không nhẵn bóng, loét biểu mô khó hàn gắn, tăng sinh xơ mạch vào trung tâm giác mạc.

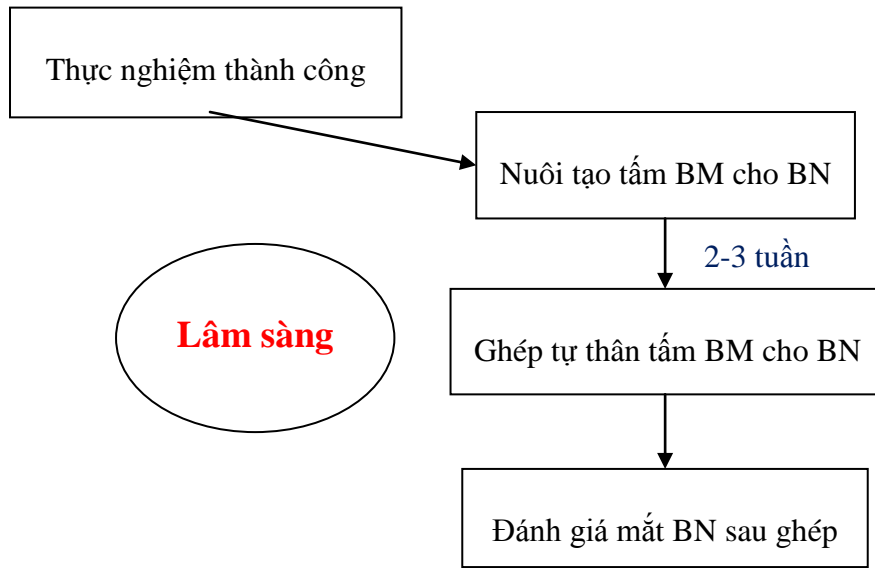
Kết quả chung:

+ Biểu hiện của ghép thành công: sau thời gian 6 tuần triệu chứng cơ năng của bệnh nhân được cải thiện, ổn định bề mặt nhãn cầu, biểu mô liền tốt.

+ Biểu hiện của thất bại ghép: tổn thương biểu mô dai dẳng, tấm biểu mô bị bong hoặc tiêu hủy, thâm nhiễm tế bào viêm, có tăng sinh xơ và tân mạch từ vùng rìa vào bề mặt giác mạc.

2.3. Mô hình nghiên cứu





2.4. Thu thập và phân tích số liệu

Thu thập số liệu bằng mẫu bệnh án nghiên cứu, có ảnh chụp tổn thương giác mạc và bề mặt nhãn cầu.

Lưu giữ hình ảnh lâm sàng và hình ảnh mô học, lưu giữ video phẫu thuật.

2.5. Đạo đức nghiên cứu

Đề tài là một phần nội dung của đề tài độc lập cấp nhà nước “Nghiên cứu quy trình sử dụng tế bào gốc để điều trị một số bệnh của bề mặt nhãn cầu” thuộc Bộ môn Mô - phôi, trường Đại học Y Hà nội, mã số ĐTĐL.2010T/15, đã được Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học của trường Đại học Y Hà nội chấp thuận (Chứng nhận chấp thuận số 77/HĐĐĐ – YHN ngày 16/07/2010).

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nghiên cứu trên thực nghiệm

3.1.1. Đặc điểm thử thực nghiệm

Trong suốt quá trình tiến hành nghiên cứu thực nghiệm, từ khi gây bông, sinh thiết niêm mạc miệng, ghép tự thân tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy, theo dõi sau mổ, cả 15 thử thực nghiệm đều sống cho tới khi kết thúc quá trình nghiên cứu.

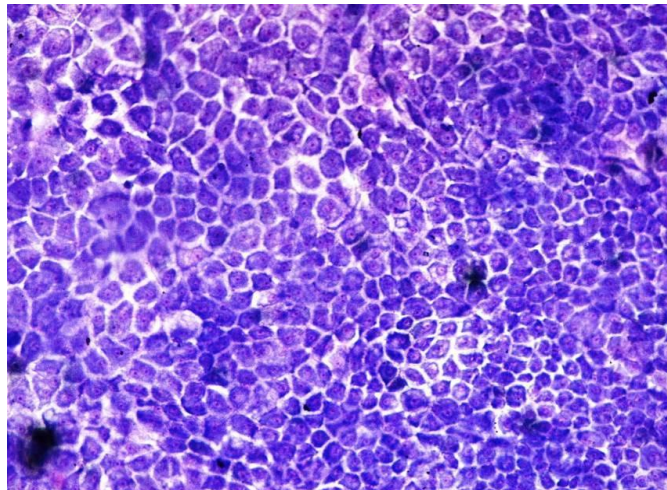
3.1.2. Đặc điểm tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy

3.1.2.1. Về đại thể

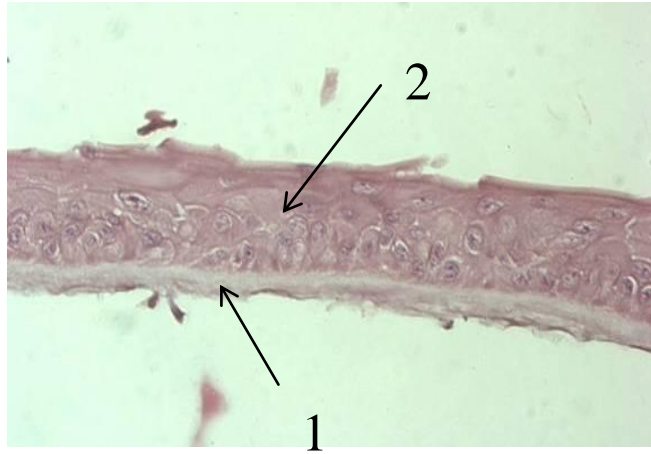
Sau khi nuôi cấy theo phương pháp mảnh biểu mô, có sự hỗ trợ của lớp tế bào nuôi là nguyên bào sợi tự thân, từ mỗi thử nghiệm chúng tôi đã tạo được 2 tấm biểu mô niêm mạc miệng. Sau 2 tuần nuôi cấy, các tấm biểu mô đều phẳng, phủ kín đáy lồng nuôi cấy trên nền chất mang là màng ối. Tấm biểu mô có màu trắng mờ, có tính chất đàn hồi, tách được dễ dàng và nguyên vẹn khỏi đáy giếng nuôi cấy trong thì phẫu thuật.

3.1.2.2. Về vi thể

Quan sát bề mặt tấm biểu mô bằng phương pháp nhuộm Giemsa, các tế bào có hình đa diện phủ kín đáy giếng nuôi cấy, khoảng gian bào hẹp và đều nhau. Quan sát mặt cắt dọc tấm biểu mô bằng phương pháp nhuộm HE thấy tấm biểu mô phẳng, có 5-7 hàng tế bào, các lớp tế bào trên có xu hướng dẹt dần, khoảng gian bào hẹp, không thấy các tế bào thoi xen lẫn (hình 3.1).



A



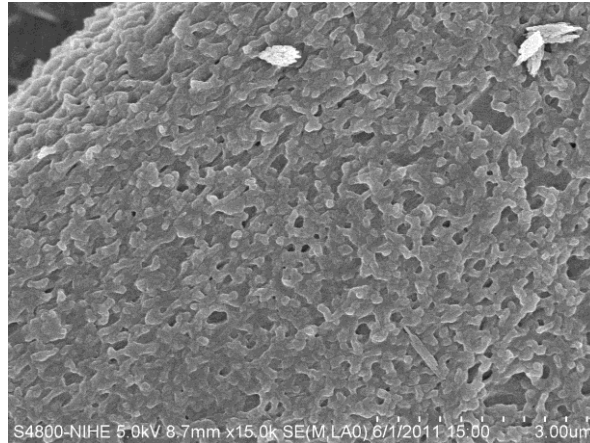
B

Hình 3.1. A. Hình ảnh nhuộm Giemsa của tằm biểu mô nuôi cấy

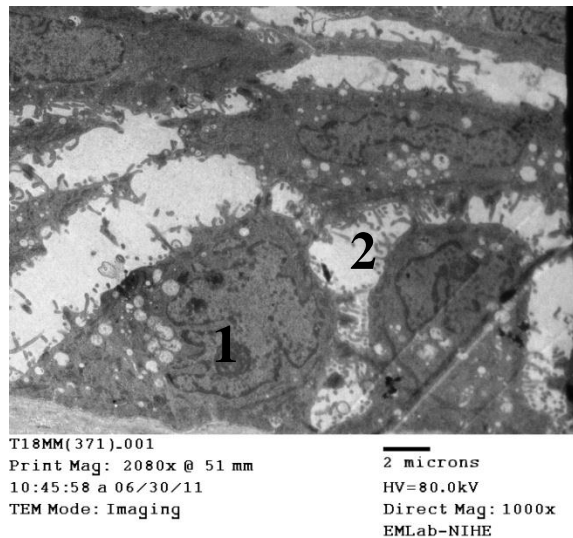
B. Hình ảnh nhuộm H.E. lát cắt đứng dọc của tằm biểu mô nuôi cấy

1. Màng ối; 2. Tằm biểu mô

Dưới kính hiển vi điện tử quét, bề mặt hàng tế bào trên cùng của tấm biểu mô có nhiều vi nhung mao ngắn chia nhánh (hình 3.2). Dưới hiển vi điện tử xuyên, các tế bào của tấm biểu mô liên kết với nhau bằng các cầu bào tương dài, khoảng gian bào rộng (hình 3.3).



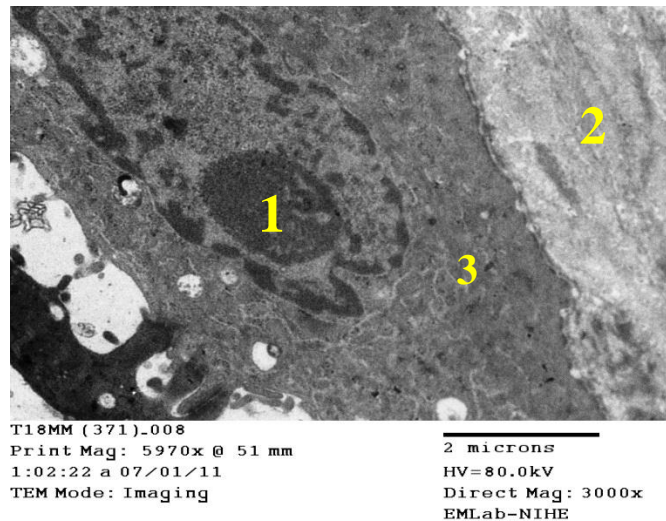
Hình 3.2. Bề mặt tấm biểu mô nuôi cấy dưới hiển vi điện tử quét



Hình 3.3. Liên kết giữa các tế bào của tấm biểu mô nuôi cấy dưới hiển vi điện tử xuyên

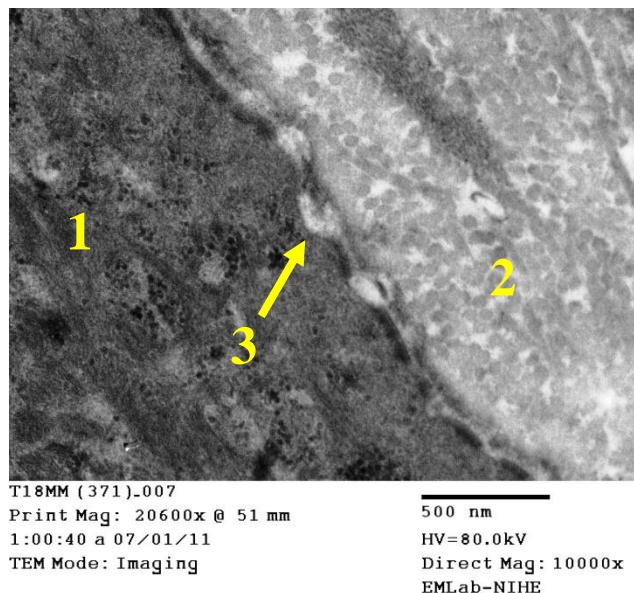
1. Tế bào biểu mô; 2. Khoảng gian bào

Các tế bào lớp đáy có nhân lớn, màng nhân có những lõm nông, hạt nhân lớn, bào tương có lưới nội bào có hạt và ti thể phong phú, nhiều đám hạt glycogen. Các tế bào lớp đáy gắn chặt với màng ôi bằng các thể bán liên kết (hình 3.4, 3.5).



Hình 3.4. Tế bào lớp đáy của tấm biểu mô dưới hiển vi điện tử xuyên

1. Nhân tế bào; 2. Màng ôi; 3. Ti thể

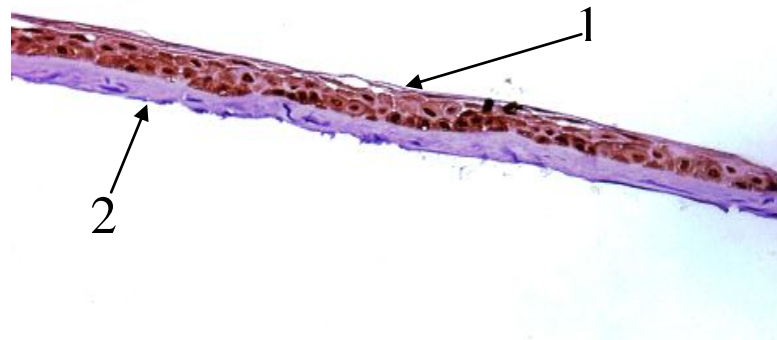


Hình 3.5. Liên kết giữa tấm biểu mô và màng ôi dưới hiển vi điện tử xuyên

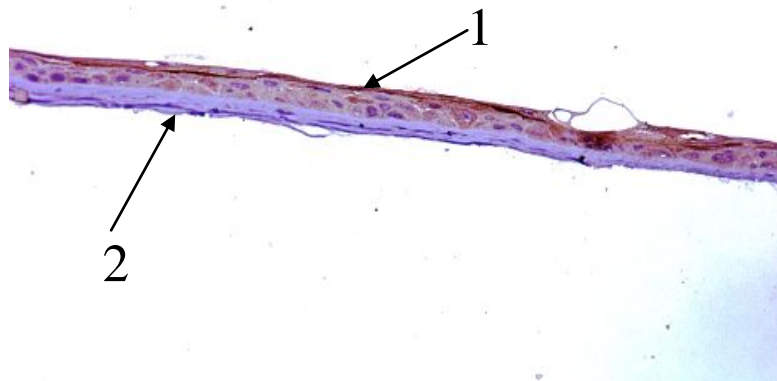
1. Tế bào biểu mô; 2. Màng ôi; 3. Thể bán liên kết

Định danh tằm biểu mô nuôi cấy bằng phương pháp hóa mô miễn dịch:

Trên các tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch phát hiện p63, nhân các tế bào của tằm biểu mô bắt màu nâu sẫm, đặc biệt là nhân các tế bào ở lớp đáy (hình 3.6.A.). Nhuộm phát hiện K3 và K12: K3 và K12 thể hiện yếu ở các tế bào lớp trên đáy (hình 3.6.B.). Nhuộm PAS để phát hiện glycogen và chất nhầy cho thấy: trong bào tương các tế bào lớp dưới có ít glycogen, không thấy tế bào tiết nhầy trong tằm biểu mô nuôi cấy (hình 3.7.).



A

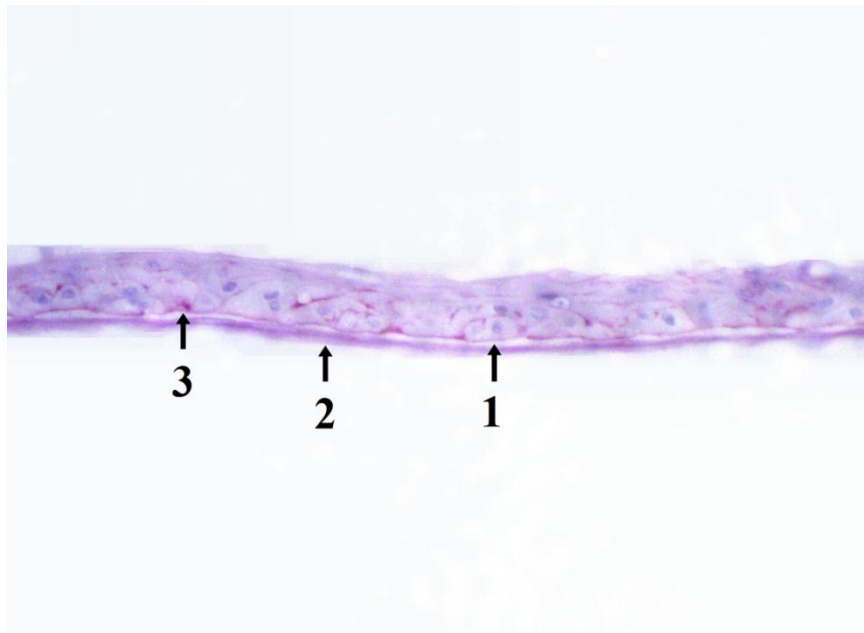


B

Hình 3.6. A. Hình ảnh nhuộm hóa mô miễn dịch p63 của tằm biểu mô.

B. Hình ảnh nhuộm hóa mô miễn dịch K3 của tằm biểu mô

1. Tằm biểu mô; 2. Màng ối



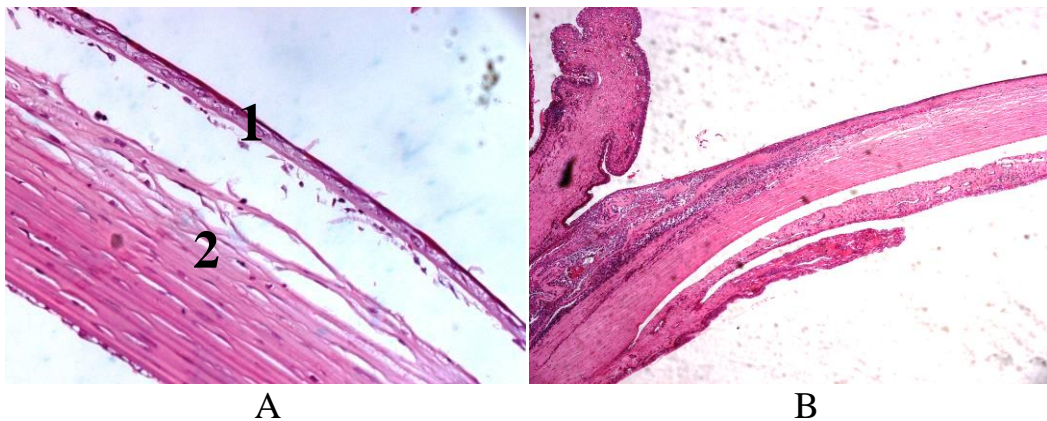
Hình 3.7. Hình ảnh nhuộm P.A.S. tấm BM nuôi cấy

1. Biểu mô; 2. Màng ối; 3. Glycogen

3.1.3. Kết quả ghép tự thân tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy cho thử nghiệm

Ở mức độ đại thể, tất cả các tấm biểu mô đều trong và áp tốt trên bề mặt nhãn cầu của thỏ qua các thời điểm theo dõi. Trong 7 ngày đầu khi làm test nhuộm fluorescein, có 2 thỏ giác mạc còn bắt màu thuốc nhuộm ở trung tâm khoảng 4 mm và xuất hiện tân mạch ở chu biên. Tuy nhiên sau 15 ngày, diện bắt màu đã thu gọn còn 2 mm, tân mạch chu biên rút bớt chỉ còn ở vùng rìa. Sau ghép 30 ngày, biểu mô hóa hoàn toàn ở tất cả các thỏ, không còn bắt màu fluorescein, chỉ có 1 thỏ có tân mạch quanh rìa. Sau ghép 60 ngày, có 1 thỏ còn tân mạch qua rìa vào chu biên nhưng không vào trung tâm giác mạc, cho kết quả khá, tất cả các thỏ còn lại đều có kết quả tốt, tấm biểu mô trong, áp tốt, nhẵn bóng và không có tân mạch giác mạc.

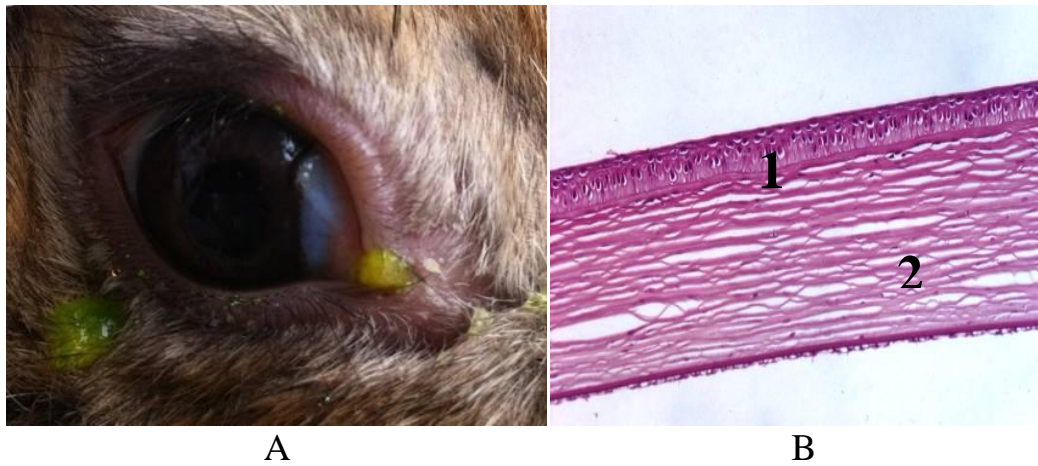
Ở mức độ vi thể, khi quan sát mẫu sinh thiết là giác mạc thỏ sau ghép ở các thời điểm, chúng tôi thấy: sau ghép 7 ngày, tấm biểu mô áp sát nhu mô nhưng chưa dán chặt nên khi làm tiêu bản dễ bị bong, lớp nhu mô trương phù, các lá collagen tách xa nhau (hình 3.8.A). Từ giai đoạn sau ghép 15 ngày, tấm biểu mô áp và dán chặt hơn vào lớp nhu mô (hình 3.8.B), hiện tượng trương phù giảm rõ rệt và hết hẳn sau ghép 30 ngày (hình 3.9). Ở các thời điểm lâu hơn, tấm biểu mô áp chặt vào nhu mô, giác mạc hết phù, các tế bào sắp xếp rất đều đặn. Lớp tế bào trên cùng vẫn còn nhân và không có hiện tượng sừng hóa (hình 3.10, 3.11). Ở mắt thỏ có kết quả trung bình có thể thấy hình ảnh tân mạch ở lớp dưới biểu mô giác mạc (hình 3.12).



Hình 3.8. A. Hình ảnh nhuộm H.E. giác mạc thỏ sau ghép 7 ngày

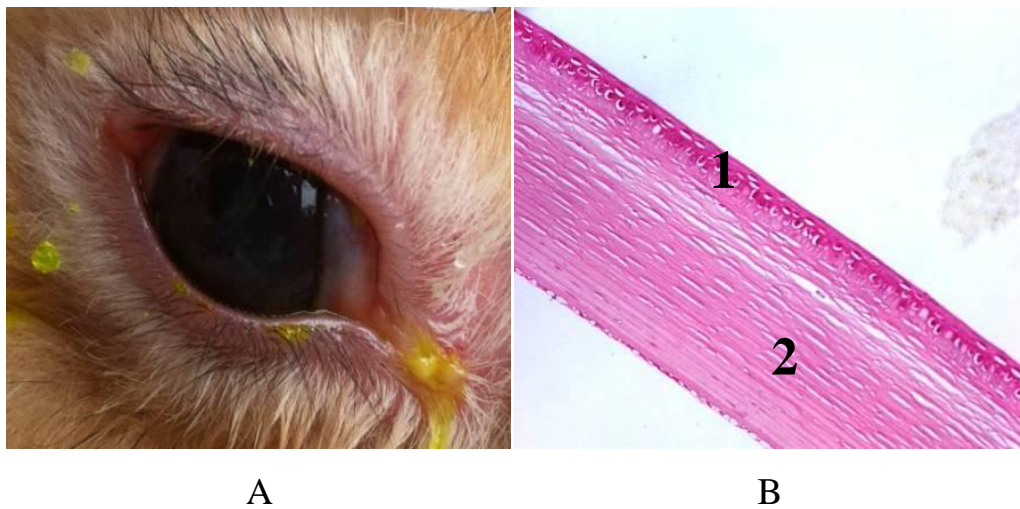
B.Hình ảnh nhuộm H.E. giác mạc thỏ sau ghép 15 ngày

1. Tấm biểu mô; 2. Nhu mô giác mạc



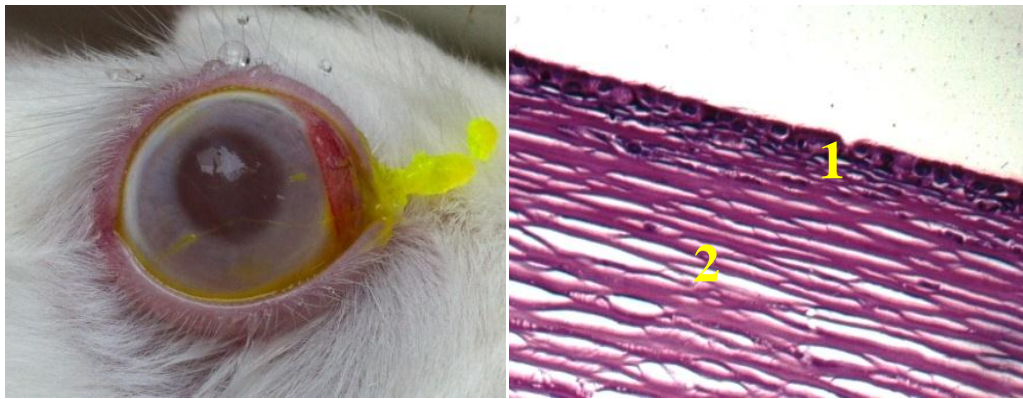
Hình 3.9. A. Mắt thỏ sau ghép 30 ngày, kết quả tốt
B. Hình ảnh nhuộm H.E. giác mạc thỏ sau ghép

1. Tầm biểu mô; 2. Nhu mô giác mạc



Hình 3.10. A. Mắt thỏ sau ghép 60 ngày, kết quả tốt
B. Hình ảnh nhuộm H.E. giác mạc thỏ sau ghép

1. Tầm biểu mô; 2. Nhu mô giác mạc



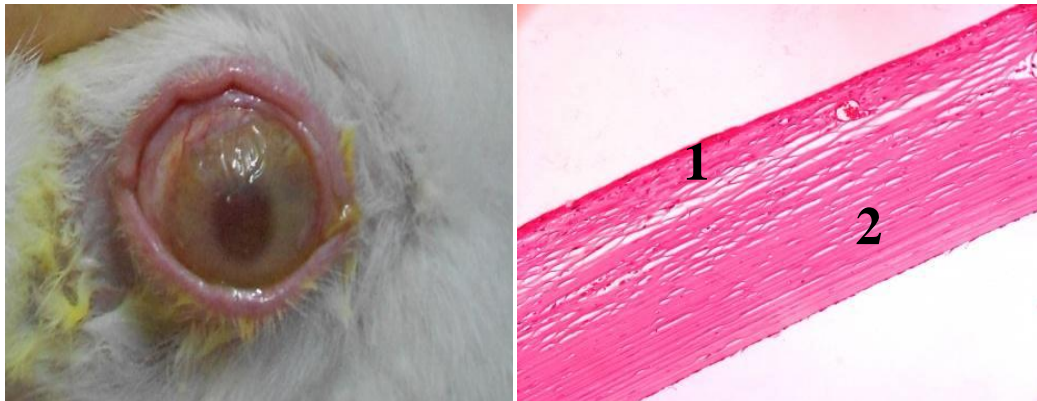
A

B

Hình 3.11. A. Mắt thỏ sau ghép 180 ngày, kết quả tốt

B. Hình ảnh nhuộm H.E. giác mạc thỏ

1. Tắm biểu mô; 2. Nhu mô giác mạc



A

B

Hình 3.12. A. Mắt thỏ sau ghép 60 ngày, kết quả khá

B. Hình ảnh nhuộm H.E. giác mạc thỏ

1. Tắm biểu mô; 2. Nhu mô giác mạc

3.2. Kết quả nghiên cứu trên bệnh nhân

3.2.1. Đặc điểm bệnh nhân

Tuổi trung bình của bệnh nhân khi tiến hành phẫu thuật là 26,2 tuổi (nhỏ nhất là 12 tuổi, lớn nhất là 57 tuổi). Sau khi nuôi tạo được tâm biểu mô niêm mạc miệng, chúng tôi đã ghép tự thân cho 17 mắt của 12 bệnh nhân được chẩn đoán là rối loạn nặng của bề mặt nhãn cầu cả 2 mắt, tổng số phẫu thuật được thực hiện là 20 ca, bao gồm:

- 3 bệnh nhân loạn dưỡng giác mạc bẩm sinh di truyền dạng giọt gelatin được phẫu thuật ghép cả 2 mắt (được tính là 6 trường hợp).

- 9 bệnh nhân di chứng sau bỏng 2 mắt do hóa chất, trong đó:

✓ 5 bệnh nhân được phẫu thuật ghép 1 lần ở 1 bên mắt (được tính là 5 trường hợp)

✓ 2 bệnh nhân được phẫu thuật ghép 2 lần ở 1 bên mắt (được tính là 4 trường hợp).

✓ 1 bệnh nhân được phẫu thuật ghép 1 lần ở 2 bên mắt (được tính là 2 trường hợp).

✓ 1 bệnh nhân được phẫu thuật ghép 2 bên mắt, nhưng có 1 bên mắt được ghép 2 lần (được tính là 3 trường hợp).

Do mỗi lần sinh thiết niêm mạc miệng và ghép tự thân cho bệnh nhân là hoàn toàn độc lập nên cho dù tiến hành phương pháp này trên 2 mắt của 1 bệnh nhân hoặc tiến hành nhiều lần trên cùng 1 mắt chúng tôi vẫn tính là các trường hợp riêng rẽ.

Thời gian theo dõi trung bình là 18,95 tháng, ngắn nhất là 12 tháng, dài nhất là 62 tháng.

Tất cả các bệnh nhân trước phẫu thuật đều có thị lực rất thấp: chỉ 1 trường hợp thị lực dưới đếm ngón tay 3 m (tương đương LogMAR trên + 1,30), còn lại đều dưới đếm ngón tay 1 m (tương đương LogMAR trên + 1,70). Tất cả các trường hợp đều không còn thị lực nhìn gần.

Tất cả các bệnh nhân trước khi phẫu thuật ghép tấm biểu mô đều có tổn thương tân mạch và xơ xâm nhập toàn bộ giác mạc ở toàn bộ chu vi và che phủ vào vùng trung tâm giác mạc.

Không có trường hợp nào bị tăng nhãn áp trước khi phẫu thuật.

Trong 6 trường hợp loạn dưỡng giác mạc dạng giọt gelatin, chỉ có 1 mắt chưa từng được phẫu thuật, còn lại 5 trường hợp đều đã được mổ gọt giác mạc, ghép màng ối trước đó.

Tất cả 14 trường hợp di chứng bong hóa chất đều đã được điều trị nhiều đợt trước đó, và đã trải qua các phẫu thuật khác như ghép màng ối, tách dính, tạo hình mi, có 1 ca đã ghép giác mạc xoay, 2 ca đã mổ lấy thể thủy tinh, đặt thủy tinh thể nhân tạo.

Về các tổn thương phối hợp sâu hơn so với tổn thương rối loạn nặng của bề mặt nhãn cầu: có 3 trường hợp, đều nằm trong nhóm nguyên nhân di chứng bong. Có 1 ca giác mạc đã thủng bít kèm theo đục thể thủy tinh trong phòng do bong, 1 ca giác mạc mỏng dọa thủng do loét khó hàn gắn trước đó, đồng thời trước đó cũng đã phải mổ thay thể thủy tinh, 1 ca do chất gây bong đã ngấm vào tiền phòng gây đục thể thủy tinh nên đã được mổ thay thể thủy tinh nhân tạo.

3.2.2. Kết quả định danh tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy

Thời gian nuôi cấy của các tế bào biểu mô là 16-28 ngày. Trên kính hiển vi soi ngược ở thời điểm thu hoạch, tấm biểu mô chứa các tế bào đa diện đều

nhau, khá đồng nhất (hình 3.13). Trên tiêu bản nhuộm H.E., tấm biểu mô nuôi cấy có khoảng 4-5 hàng tế bào, hàng trên cùng dẹt, tấm biểu mô khá phẳng, gắn trên nền màng ối (hình 3.14.).



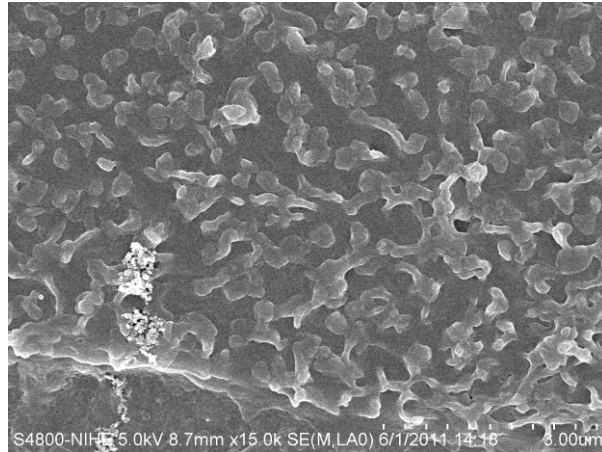
Hình 3.13. Hình ảnh hiển vi soi ngược tấm biểu mô niêm mạc miệng



Hình 3.14. Hình ảnh nhuộm H.E. tấm biểu mô niêm mạc miệng

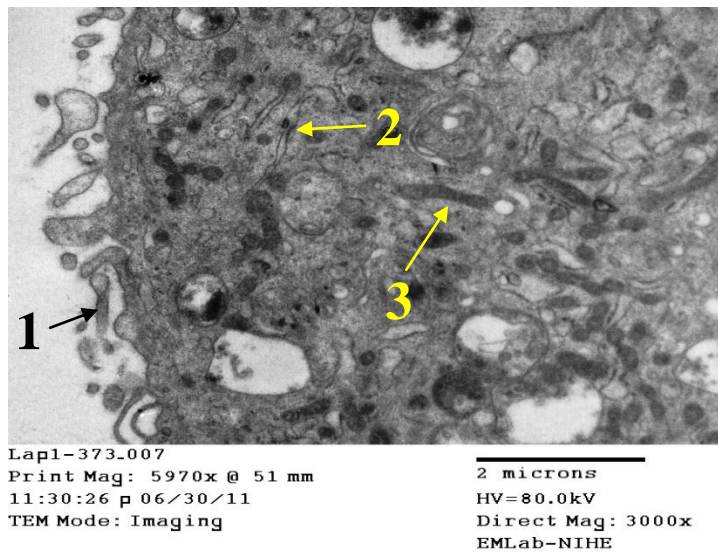
1. Tấm biểu mô; 2. Màng ối

Khi kiểm tra dưới kính hiển vi điện tử quét, bề mặt tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy có nhiều vi nhung mao giống như trên biểu mô giác mạc, tuy nhiên số lượng dường như ít hơn và kích thước vi nhung mao lớn hơn so với ở thỏ (hình 3.15).



Hình 3.15. Hình ảnh hiển vi điện tử quét tấm biểu mô niêm mạc miệng

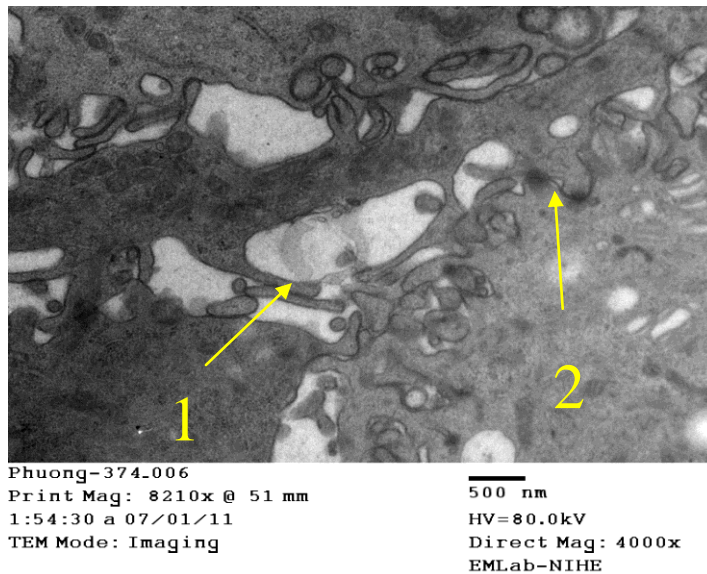
Khi soi bằng hiển vi điện tử xuyên, ở bề mặt các tế bào lớp trên cùng thấy rõ các vi nhung mao ngắn, bào tương chứa ty thể dài, mào rõ, chất nền sẫm màu, lưới nội bào hạt phát triển (hình 3.16).



Hình 3.16. Hình ảnh hiển vi điện tử xuyên cấu trúc tế bào bề mặt của tấm biểu mô nuôi cấy

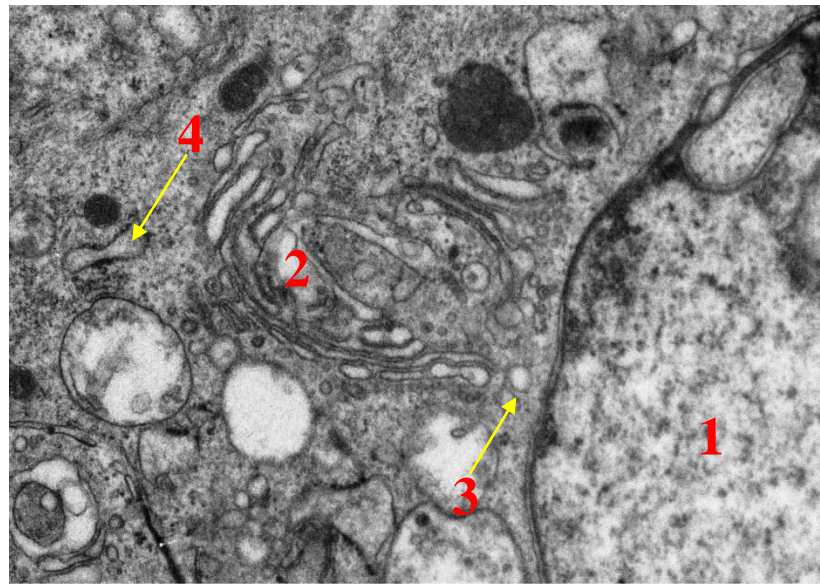
1. Vi nhung mao; 2. Lưới nội bào; 3. Ty thể

Giữa các tế bào ở lớp trên của tấm biểu mô, có thể quan sát thấy các thể liên kết và các cầu bào tương dài hơn so với tấm biểu mô ở thử nghiệm (hình 3.17). Trong bào tương của lớp đáy, các bào quan rất phát triển gồm lưới nội bào có hạt, ty thể, bộ Golgi nằm gần nhân với túi dẹt và không bào (hình 3.18).



Hình 3.17. Hình ảnh hiển vi điện tử xuyên khoảng gian bào ở lớp trên của tấm biểu mô

1. Cầu bào tương; 2. Thể liên kết



Lap1-373.004

Print Mag: 12600x @ 51 mm

12:19:21 p 06/30/11

TEM Mode: Imaging

500 nm

HV=80.0kV

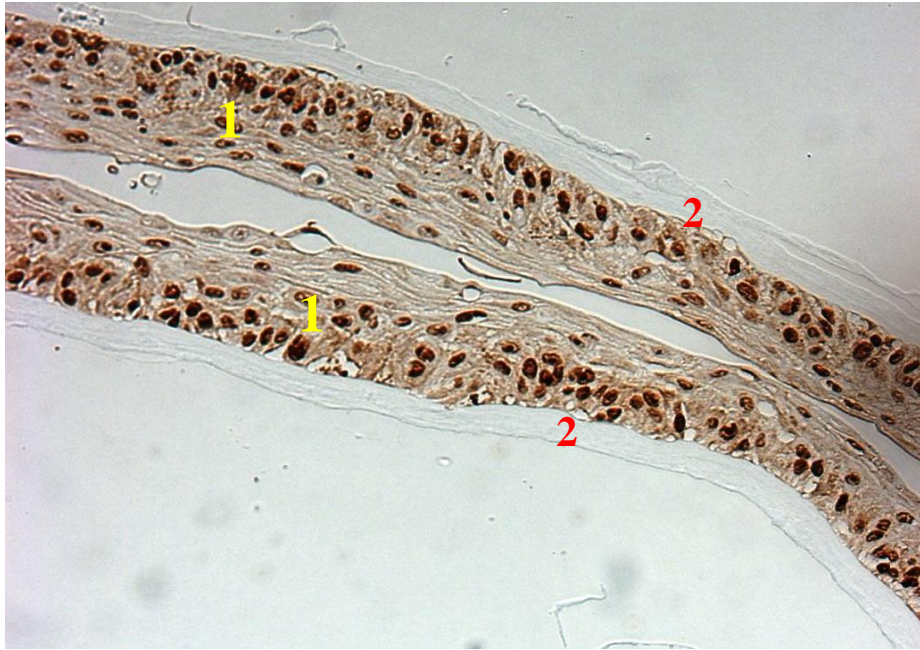
Direct Mag: 6000x

EMLab-NIHE

Hình 3.18. Hình ảnh hiển vi điện tử xuyên tế bào lớp đáy của tằm biểu mô

1. Nhân tế bào; 2. Bộ Golgi; 3. Không bào; 4. Lưới nội bào

Khi nhuộm hóa mô miễn dịch để phát hiện p63, chúng tôi thấy nhân các tế bào của biểu mô bắt màu nâu sẫm, đặc biệt là nhân của các tế bào lớp đáy (hình 3.19). Trên các tiêu bản nhuộm phát hiện K3 thì thấy K3 thể hiện yếu ở các tế bào lớp trên đáy (hình 3.20).



**Hình 3.19. Hình ảnh nhuộm hóa mô miễn dịch p63
tắm biểu mô niêm mạc miệng**

1. Tắm biểu mô; 2. Màng ối



**Hình 3.20. Hình ảnh nhuộm hóa mô miễn dịch K3
tắm biểu mô niêm mạc miệng**

1. Tắm biểu mô; 2. Màng ối

3.2.3. Kết quả ghép tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trên bệnh nhân

3.2.3.1. Kết quả chung

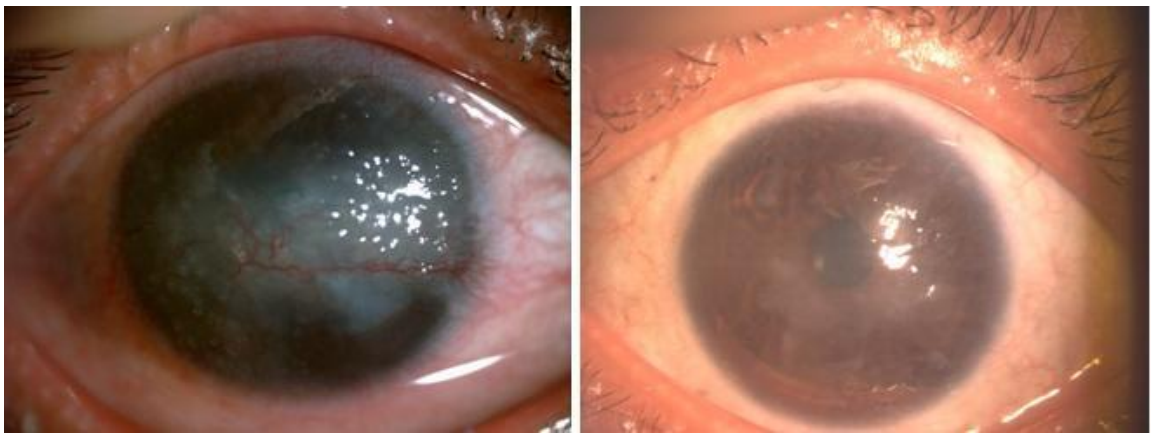
Chúng tôi đã tiến hành sinh thiết niêm mạc miệng 20 trường hợp, mỗi lần sinh thiết đều nuôi tạo được 2 tẩm biểu mô phẳng, phủ kín đáy giếng nuôi cấy. Tuy nhiên trong thì phẫu thuật thì có 4 trường hợp tẩm biểu mô bị dính chặt, rất khó tách khỏi đáy giếng nuôi cấy và bị rách trong quá trình phẫu tích.

Phẫu thuật thành công ở 14/20 trường hợp (70%), với 6 trường hợp (30%) cho kết quả tốt (giác mạc trong, biểu mô nhẵn, không còn tân mạch giác mạc), 4 trường hợp (20%) cho kết quả khá (tân mạch chỉ ở vùng rìa giác mạc), 4 trường hợp (20%) cho kết quả trung bình (tân mạch dừng ở chu biên, chưa vào trung tâm giác mạc). Như vậy, tẩm biểu mô có tác dụng làm ổn định và cải thiện tình trạng bề mặt nhãn cầu, giảm tình trạng tân mạch giác mạc tới 70% số ca. Những trường hợp này đều được theo dõi với thời gian tương đối dài (từ 12 – 62 tháng). Kết quả cụ thể được trình bày trong bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả phẫu thuật và tình trạng tân mạch giác mạc ở thời điểm theo dõi cuối cùng

BN số	Nguyên nhân	Tân mạch giác mạc	Kết quả phẫu thuật
1	Bỏng	Trung tâm	Xấu
2	Bỏng	Chu biên	Trung bình
3	Bỏng	Chu biên	Trung bình
4	Loạn dưỡng	Không có	Tốt
5	Loạn dưỡng	Không có	Tốt
6	Bỏng	Trung tâm	Xấu
7	Bỏng	Rìa	Khá
8	Loạn dưỡng	Không có	Tốt
9	Loạn dưỡng	Không có	Tốt
10	Bỏng	Rìa	Khá
11	Bỏng	Trung tâm	Xấu
12	Bỏng	Trung tâm	Xấu
13	Bỏng	Trung tâm	Xấu
14	Bỏng	Chu biên	Trung bình
15	Bỏng	Rìa	Khá
16	Loạn dưỡng	Không có	Tốt
17	Loạn dưỡng	Không có	Tốt
18	Bỏng	Trung tâm	Xấu
19	Bỏng	Chu biên	Trung bình
20	Bỏng	Rìa	Khá

Xét theo nguyên nhân gây bệnh: 6 trường hợp bệnh lý loạn dưỡng giác mạc dạng giọt gelatin sau mổ cho kết quả tốt là 100%, trong khi nhóm nguyên nhân do di chứng bỏng có 4/14 trường hợp (28,57%) cho kết quả khá, 4/14 trường hợp (28,57%) cho kết quả trung bình, 6/14 trường hợp (42,86%) cho kết quả xấu. Chúng tôi thấy rằng tất cả các trường hợp đạt kết quả tốt sau mổ đều là bệnh nhân loạn dưỡng giác mạc gelatin, tất cả các ca bị thất bại đều nằm ở nhóm di chứng bỏng. Như vậy nhóm loạn dưỡng giác mạc gelatin cho kết quả thành công cao hơn so với nhóm di chứng bỏng.

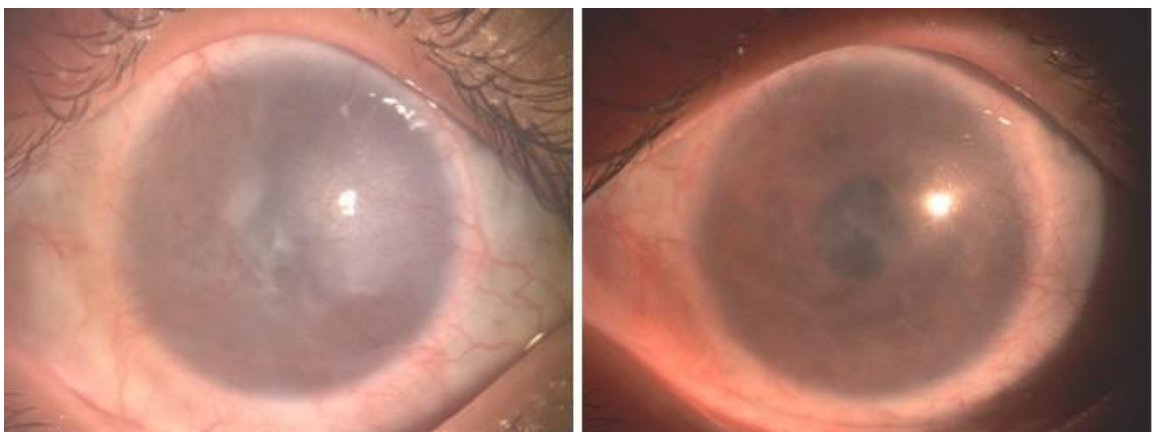


A

B

Hình 3.21. Hình ảnh kết quả tốt sau phẫu thuật 3 năm

A. Trước mổ; B. Sau mổ



A

B

Hình 3.22. Hình ảnh kết quả trung bình sau mổ 1 năm

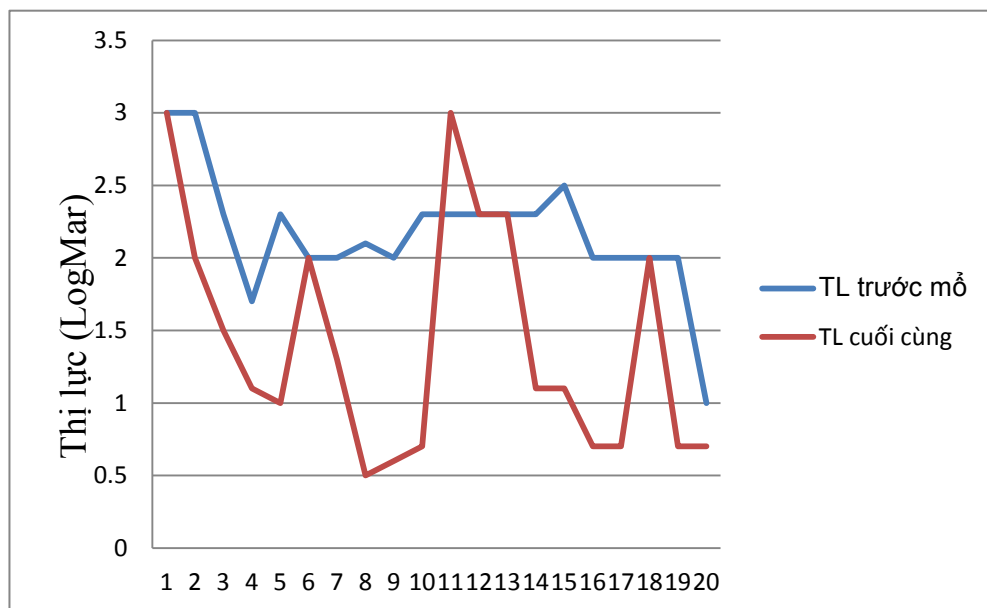
A. Trước mổ; B. Sau mổ

3.2.3.2. Kết quả về triệu chứng cơ năng

Có 12 trường hợp (60%) cải thiện cả 3 triệu chứng cơ năng sau phẫu thuật, bệnh nhân đã giảm và hết các hiện tượng chói, sợ ánh sáng, cảm giác khô rát, đau trong mắt. Có 1 trường hợp cải thiện 2 triệu chứng (sợ ánh sáng, kích thích, cảm giác khô mắt), 2 trường hợp cải thiện 1 triệu chứng, không có trường hợp nào thấy triệu chứng cơ năng nặng hơn (bảng 3.2).

3.2.3.3. Kết quả về thị lực

Thị lực nhìn xa (quy đổi theo LogMAR) trung bình trước mổ của tất cả các bệnh nhân là + 2,17, kết quả thị lực nhìn xa trung bình ở thời điểm theo dõi cuối cùng là + 1,415. Mức cải thiện thị lực trung bình của tất cả các bệnh nhân là - 0,755. Mức độ cải thiện thị lực của từng trường hợp được thể hiện ở biểu đồ 3.1.



Biểu đồ 3.1. Kết quả thị lực nhìn xa

Về mức độ cải thiện thị lực: trong 14 trường hợp thành công thì có 13 trường hợp có cải thiện rõ rệt thị lực nhìn xa (65%), 1 trường hợp do sẹo đục nhu mô giác mạc nhiều nên thị lực cải thiện ít, cần chờ để ghép giác mạc

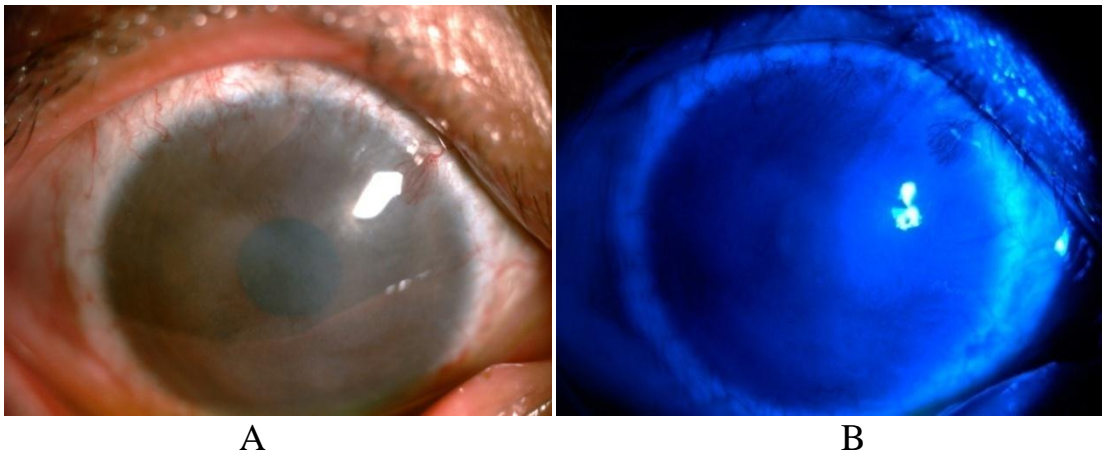
quang học thì 2. Trong số này có 7 trường hợp có thị lực tăng trên 2 hàng. Đặc biệt có tới 9 trường hợp có cải thiện rõ rệt thị lực nhìn gần (10-30cm). Có 2 bệnh nhân loạn đường giác mạc và 1 bệnh nhân bong có thể đọc sách và soạn tin nhắn ở cỡ chữ bình thường (bảng 3.2).

Bảng 3.2. Kết quả cải thiện về các triệu chứng cơ năng và thị lực ở thời điểm theo dõi cuối cùng

BN số	Cải thiện cơ năng (số triệu chứng được cải thiện)				Cải thiện thị lực	
	0	1	2	3	Nhìn xa	Nhìn gần
1	+				-	-
2	+				+	-
3				+	+	-
4				+	+	-
5				+	+	-
6		+			-	-
7			+		+	+
8				+	+	+
9				+	+	+
10				+	+	-
11	+				-	-
12	+				-	-
13	+				-	-
14				+	+	+
15				+	+	+
16				+	+	+
17				+	+	+
18		+			-	-
19				+	+	+
20				+	+	+

3.2.3.4. Diễn biến tình trạng bề mặt nhãn cầu

Ngay sau phẫu thuật và diễn biến trong 1 tháng đầu theo dõi, tân mạch giác mạc xuất hiện ở tất cả các bệnh nhân, tuy nhiên ở những trường hợp thành công thì tân mạch chỉ dừng ở lớp nông quanh rìa và chu biên giác mạc, sau đó thoái triển và rút dần sau mổ 3-6 tháng. Quan sát trên lâm sàng chúng tôi thấy rằng đây là các tân mạch nhỏ ở chu vi, nằm ở giữa lớp nhu mô giác mạc với lớp biểu mô, khi nhuộm fluorescein biểu mô bề mặt nhãn cầu vẫn trơn nhẵn, không bắt màu (hình 3.23).



Hình 3.23. Hình ảnh tân mạch giác mạc rìa sau mổ 1 tháng

A. Trước nhuộm fluorescein; B. Sau nhuộm fluorescein

3.2.3.5. Biến chứng của phẫu thuật

Không có biến chứng xảy ra trong quá trình sinh thiết niêm mạc miệng. Sau khi sinh thiết, niêm mạc miệng của bệnh nhân liền tốt, để lại sẹo rất nhỏ và mịn, không gặp biến chứng loét hay nhiễm khuẩn.

Tất cả các phẫu thuật đều diễn ra an toàn, không xảy ra biến chứng. Trong suốt thời gian theo dõi, không xuất hiện các biến chứng như nhiễm trùng, tăng nhãn áp.

Trong quá trình theo dõi không gặp vấn đề về miễn dịch và thuốc ức chế miễn dịch. Thời gian dùng steroid ngắn, không gặp biến chứng do steroid (tăng nhãn áp, bội nhiễm).

Phương pháp được thực hiện lần 2 ở một số bệnh nhân khi lần đầu thất bại, và đều diễn ra an toàn, không có biến chứng.

3.2.3.6. Các trường hợp thất bại ghép

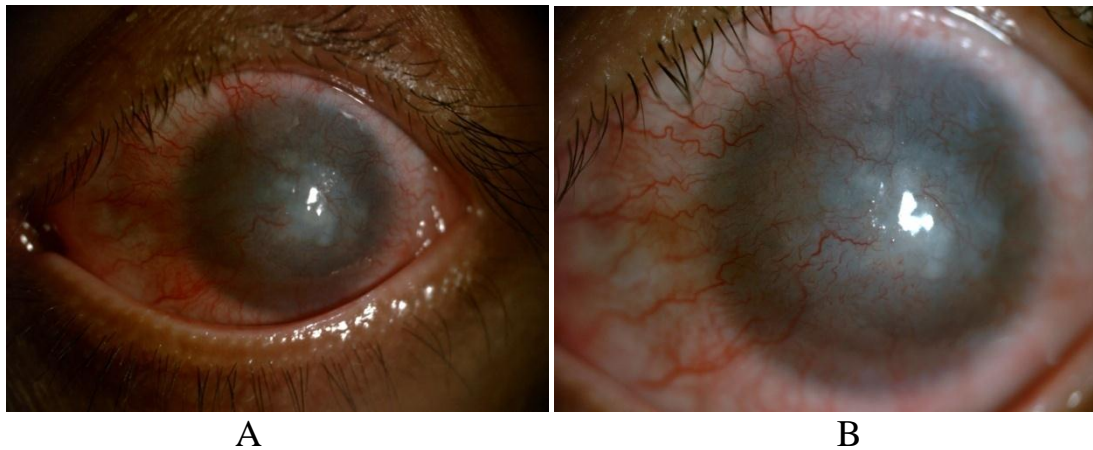
Kết quả xấu (thất bại ghép) gặp ở 6 trường hợp (30%), cụ thể như sau:

Trường hợp số 1: tổn thương trước mổ là giác mạc thủng bít, tân mạch che phủ toàn bộ, kèm theo đục thể thủy tinh trong phòng do bong, chúng tôi đã tiến hành phẫu thuật phối hợp ghép giác mạc xuyên với thay thể thủy tinh và ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy. Kết quả tạm ổn định trong tháng đầu, song trong thời gian tiếp theo mảnh ghép đục, tấm biểu mô bị tiêu hủy, loét mảnh ghép khó hàn gắn, giác mạc tiêu nhuyễn và thủng bít sau 3 tháng phẫu thuật.

Trường hợp số 11: tổn thương trước mổ là giác mạc mỏng dọa thủng do loét khó hàn gắn trước đó, đồng thời trước đó cũng đã phải phẫu thuật thay thể thủy tinh do bong, với trường hợp này chúng tôi đã phối hợp ghép giác mạc xuyên và ghép tấm biểu mô nuôi cấy. Tuy nhiên sau phẫu thuật có hiện tượng loét biểu mô khó hàn gắn, sau 3 tháng mặc dù đã biểu mô hóa hoàn toàn nhưng là xâm nhập của kết mạc vào giác mạc, tân mạch che phủ toàn bộ trung tâm giác mạc.

Còn 4 trường hợp còn lại (số 6, 12, 13, 18) có tấm biểu mô niêm mạc miệng bị dính chặt vào đáy giếng nuôi cấy, và bị rách trong quá trình phẫu tích khi phẫu thuật. Sau mổ, mặc dù đã điều trị dinh dưỡng giác mạc tích cực, bề mặt nhãn cầu đã biểu mô hóa hoàn toàn nhưng tân mạch xâm nhập vào trung tâm giác mạc. Chúng tôi đã tiến hành sinh thiết niêm mạc miệng, nuôi

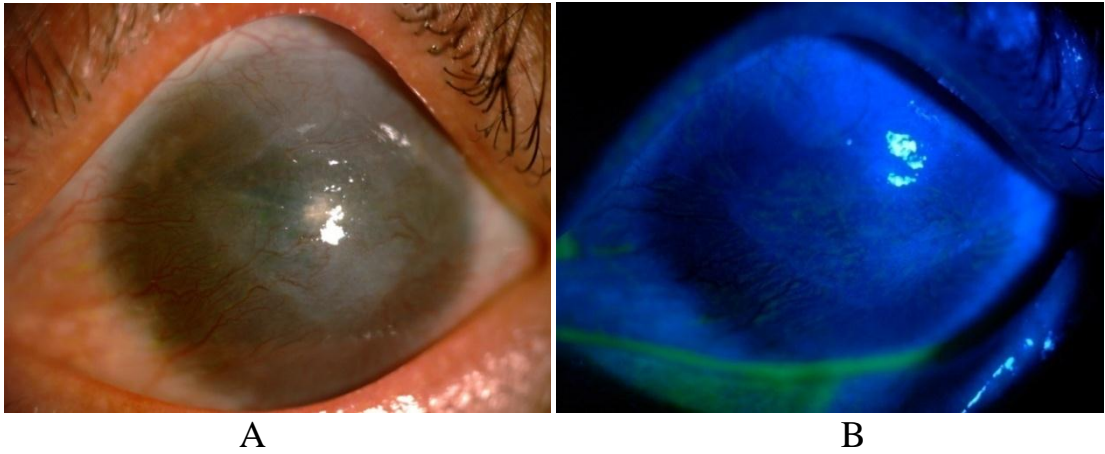
cấy và ghép lại lần 2 cho trường hợp số 6 và 18, kết quả tương ứng thu được là khá (trường hợp số 7), và trung bình (trường hợp số 19 – hình 3.22). Riêng trường hợp số 12, sau khi làm lại lần 2 (trường hợp số 13) tiếp tục thất bại, cho kết quả xấu (hình 3.24).



Hình 3.24. Hình ảnh kết quả xấu sau mổ 3 tháng

A. Trước mổ; B. Sau mổ

Quan sát trên lâm sàng những trường hợp kết quả xấu, chúng tôi nhận thấy tân mạch xâm nhập vào bề mặt giác mạc với nhiều kích thước khác nhau, tân mạch thường nằm ở ngay lớp biểu mô, khiến cho bề mặt giác mạc trở nên gồ ghề, không đều, khi nhuộm fluorescein thấy ngấm thuốc không đều, giống như kiểu ngấm thuốc của kết mạc (hình 3.25).



Hình 3.25. Hình ảnh tân mạch vào trung tâm giác mạc

A. Trước nhuộm fluorescein; B. Sau nhuộm fluorescein

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. Ghép tấm biểu mô trên thỏ thực nghiệm

Trong khoa học, vai trò của nghiên cứu thực nghiệm đã được khẳng định. Nó giúp các nhà khoa học tìm hiểu được nhiều vấn đề mà không thể thực hiện được trên con người. Mặc dù việc sử dụng tấm biểu mô niêm mạc miệng đã được nhiều nhà khoa học trên thế giới nghiên cứu và áp dụng thành công, tuy nhiên do điều kiện nghiên cứu của Việt nam có thể khác các nước trên thế giới nên chúng tôi vẫn tiến hành nghiên cứu thực nghiệm cùng với nghiên cứu ứng dụng trên bệnh nhân. Nghiên cứu thực nghiệm giúp chúng tôi xác định được vị trí và kích thước thích hợp cho việc sinh thiết mảnh mô dùng để nuôi cấy. Qua nghiên cứu thực nghiệm chúng tôi có thời gian để rút kinh nghiệm và rút ra quy trình hoàn chỉnh để nuôi tạo thành công tấm biểu mô niêm mạc miệng. Nghiên cứu thực nghiệm cũng tạo điều kiện để hoàn thiện kỹ năng phẫu thuật sau quá trình mổ thực nghiệm, giúp loại bỏ tối đa các yếu tố ảnh hưởng tới sự thành công của phẫu thuật. Bằng nghiên cứu thực nghiệm, chúng tôi có thể quan sát được hình ảnh vi cấu trúc của giác mạc sau khi ghép tấm biểu mô, từ đó tìm hiểu được sự tồn tại và tình trạng của tấm biểu mô sau ghép qua thời gian.

4.1.1. Đặc tính của tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trên thỏ

Trên các tiêu bản nhuộm Giemsa và H.E. của tấm biểu mô niêm mạc miệng mà chúng tôi thu được sau khi nuôi cấy cho hình ảnh các tế bào đa diện đều nhau, tương đối đồng nhất, gồm các hàng tế bào với hình thái chuyển dần từ dưới lên trên là lớp đáy có hình trụ, các lớp ở trên dẹt dần, đặc biệt lớp trên cùng vẫn còn nhân, điều này thể hiện đặc tính không sừng hóa của tấm biểu

mô. Hình ảnh mô học này cho thấy tâm biểu mô có hình thái khá tương đồng với biểu mô của giác mạc.

Về cấu trúc siêu vi, qua hình ảnh qua hiển vi điện tử chúng tôi thấy rằng các tế bào liên kết chặt chẽ với nhau bằng các thể liên kết và các cầu bào tương dài. Liên kết chặt chẽ giữa các tế bào bề mặt tạo nên hàng rào bảo vệ của biểu mô, đây là yếu tố quan trọng đảm bảo cho hoạt động chức năng của biểu mô. Ngoài ra, hình ảnh về sự hiện diện của thể bán liên kết thể hiện sự gắn kết chặt chẽ của lớp đáy với nền giá đỡ màng ối. Hoạt động của hàng rào chức năng và sự gắn kết chặt chẽ của lớp đáy lên giá đỡ là các mấu chốt cần thiết cho thành công của phẫu thuật ghép tâm biểu mô.

Qua hiển vi điện tử xuyên, có thể thấy được cấu trúc của các tế bào trụ ở lớp đáy với nhân lớn, khả năng tăng sinh mạnh, các bào quan rất phát triển. Đồng thời, lớp trên cùng của tâm biểu mô có rất nhiều vi nhung mao, có tác dụng làm tăng diện tích tiếp xúc bề mặt với các chất dinh dưỡng, giúp tăng khả năng lưu giữ, ổn định lớp phim nước mắt trên bề mặt nhãn cầu.

Khi định danh tâm biểu mô nuôi cấy bằng hóa mô miễn dịch chúng tôi thấy có sự hiện diện của p63 rõ rệt ở nhân tế bào lớp đáy, điều này thể hiện đặc tính tế bào gốc có trong lớp đáy của tâm biểu mô, đảm bảo cho khả năng tái sinh của tế bào biểu mô sau khi ghép. Có sự hiện diện của K3 (dấu ấn thể hiện biểu mô giác mạc biệt hóa) ở các lớp trên đáy qua hóa mô miễn dịch, đồng thời nhuộm PAS thấy sự vắng mặt của tế bào đài (tế bào đài là dấu hiệu đặc trưng của biểu mô kết mạc), các kết quả này của chúng tôi chứng tỏ tâm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy có đặc tính giống như biểu mô giác mạc.

Trên thế giới, nghiên cứu thực nghiệm về nuôi cấy tâm biểu mô niêm mạc miệng được thực hiện đầu tiên bởi Nakamura năm 2003[78]. Tác giả đã nuôi cấy thành công tâm biểu mô niêm mạc miệng của thỏ gây bỏng thực nghiệm trên nền giá đỡ là màng ối. Khi quan sát tâm biểu mô bằng kính hiển

vi diện tử quét và xuyên, kết quả cho thấy tế bào niêm mạc miệng nuôi cấy có hình dạng, kích thước và cấu trúc siêu vi rất giống tế bào biểu mô giác mạc bình thường. Nghiên cứu hóa mô miễn dịch cho thấy K3 có mặt ở tất cả các lớp của tấm biểu mô nuôi cấy. Sau nghiên cứu này, Hayashida và cộng sự (2005) cũng đã tiến hành nuôi cấy tấm biểu mô niêm mạc miệng ở thỏ thực nghiệm, sử dụng giá đỡ là màng polymer nhạy cảm nhiệt[105]. Các tác giả cũng nuôi cấy thành công tấm biểu mô gồm 3-5 hàng tế bào lát tầng biệt hóa cao, có hình thái rất giống với biểu mô giác mạc bình thường. Tuy nhiên lớp đáy của tấm biểu mô có hình khối vuông và chiều dày của tấm biểu mô lớn hơn và không đều so với biểu mô giác mạc, chứng tỏ nguồn gốc niêm mạc miệng của tấm biểu mô nuôi cấy. Định danh tấm biểu mô nuôi cấy có sự hiện diện của dấu ấn p63, β 1-integrin ở nhân tế bào lớp đáy, connexin 43 ở khớp nối giữa các tế bào lớp đáy, test tạo cụm dương tính, thể hiện đặc tính tế bào gốc của tấm biểu mô.

Từ các đặc điểm về hình thái, cấu trúc và đặc tính tương tự như biểu mô giác mạc, tạo cơ sở cho việc sử dụng tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy như một nguyên liệu thay thế cho biểu mô giác mạc trong điều trị kiến tạo bề mặt nhãn cầu.

4.1.2. Kết quả ghép tự thân tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy cho thỏ thực nghiệm

Qua thời gian theo dõi lâm sàng, tất cả thỏ thực nghiệm trong nghiên cứu của chúng tôi đều có tấm biểu mô áp tốt và trong, bề mặt nhãn cầu nhẵn. Để xác định tình trạng của tấm biểu mô nuôi cấy sau khi ghép, chúng tôi đã tiến hành sinh thiết giác mạc thỏ ở từng thời điểm theo dõi. Kết quả cho thấy tấm biểu mô vẫn giữ được hình thái tương đồng như biểu mô giác mạc, có khả năng bám dính và tồn tại khá bền vững trên mắt thỏ sau ghép, thể hiện ở hình ảnh mô học của giác mạc thỏ qua các thời điểm theo dõi. Ở thỏ có tân mạch

vào chu biên giác mạc sau mổ 2 tháng, trong thì cuối của phẫu thuật do thoát mê sớm nên những mũi khâu cuối cùng chưa được cố định tốt, do đó tấm biểu mô có 1 vùng ở chu biên không bám dính tốt sau mổ gây ra hiện tượng xâm nhập của tân mạch vào dưới tấm biểu mô ở vị trí tương ứng, giác mạc vùng chu biên ở vị trí này cũng bị mờ đục hơn, điều này thể hiện rõ ở tiêu bản sinh thiết giác mạc thỏ (hình 3.12). Tất cả các thỏ còn lại, khi làm sinh thiết giác mạc chúng tôi đều thấy kể từ sau thời điểm theo dõi 30 ngày, tấm biểu mô áp chặt vào nhu mô, giác mạc hết phù, các tế bào sắp xếp rất đều đặn, lớp trên cũng vẫn còn nhân, không có hiện tượng sừng hóa. Sự tồn tại bền vững của tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy có thể được giải thích là nhờ đặc tính tế bào gốc được khẳng định qua sự hiện diện của dấu ấn p63 có trong tế bào đáy của tấm biểu mô nuôi cấy.

Trong nghiên cứu của Nakamura năm 2003 tiến hành trên thỏ gây bỏng thực nghiệm, 10 ngày sau khi ghép tự thân tấm biểu mô nuôi cấy, khi làm sinh thiết giác mạc thỏ các tác giả quan sát thấy tấm biểu mô vẫn tồn tại nguyên vẹn, được gắn chặt với mô nền của giác mạc. Về lâm sàng, giác mạc sau ghép duy trì được độ trong suốt, hạn chế tân mạch từ ngoài vào giác mạc[78]. Tiếp sau đó, trong nghiên cứu của Hayashida và cộng sự, sau ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy, bề mặt nhãn cầu của thỏ ổn định và trơn nhẵn sau 1 tuần, giác mạc trở nên trong suốt như giác mạc bình thường sau 4 tuần. Kết quả mô học sau ghép 4 tuần cho thấy tấm biểu mô vẫn tồn tại nguyên vẹn, do sử dụng màng polymer nhạy cảm nhiệt làm giá đỡ nên vẫn còn quan sát thấy khớp nối giữa tấm biểu mô với nhu mô, không thấy sự xâm nhập của tân mạch và tế bào đài. Trong nghiên cứu này, các tác giả còn làm các xét nghiệm hóa mô miễn dịch để tìm sự hiện diện của một số dấu ấn đặc hiệu của biểu mô và phát hiện ra một đặc tính khá lý thú. Các tác giả thấy sự hiện diện của K3 ở tất cả các lớp của biểu mô sau ghép, điều này thể hiện đặc

tính của biểu mô giác mạc biệt hóa của tấm biểu mô. Đặc biệt, K13 là dấu ấn xuất hiện ở các lớp trên đáy của biểu mô niêm mạc miệng nhưng không bao giờ xuất hiện trong biểu mô giác mạc. Trong nghiên cứu, có sự hiện diện của K13 ở các tế bào lớp trên của tấm biểu mô nuôi cấy chưa ghép, nhưng không thấy xuất hiện trong biểu mô sinh thiết sau ghép 4 tuần. Điều này chứng tỏ tấm biểu mô nuôi cấy có khả năng biến đổi kiểu hình sau khi ghép[105]. Các tác giả giải thích hiện tượng này là do cấy ghép trên mô nền là nhu mô giác mạc nên qua thời gian tấm biểu mô nuôi cấy đã biến đổi để có cấu trúc tương thích với mô nền, nghĩa là chuyển từ đặc tính của biểu mô niêm mạc miệng thành đặc tính của biểu mô giác mạc. Điều này giúp khẳng định cơ sở của việc sử dụng biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy để thay thế biểu mô giác mạc trong kiến tạo bề mặt nhãn cầu.

4.1.3. Một số kinh nghiệm thu hoạch từ nghiên cứu thực nghiệm

Quá trình tiến hành nghiên cứu thực nghiệm trên thỏ đã giúp chúng tôi rút ra một số kinh nghiệm. Quá trình gây bỏng cho thỏ là chủ động với mức độ vừa phải, đủ để gây rối loạn bề mặt nhãn cầu ở lớp nông, không gây ra tổn thương sâu, không đọng chất gây bỏng nằm sâu trong tổ chức, do đó không có phản ứng viêm dai dẳng sau phẫu thuật, vì vậy việc dùng thuốc chống viêm sau mổ cho thỏ không cần kéo dài và không quá phức tạp. Tuy nhiên trên bệnh nhân cơ chế gây bệnh thường phức tạp và phong phú nên cần chú ý hơn để có phác đồ điều trị chống viêm phù hợp. Đồng thời, lớp kết mạc của thỏ, đặc biệt là kết mạc mi và kết mạc ở lớp mí phụ còn nguyên vẹn, không bị tổn thương sau khi gây bỏng, nên không ảnh hưởng đến việc chế tiết nước mắt sau bỏng, đây là lợi thế lớn giúp cho tấm biểu mô nuôi cấy của thỏ bám dính và được nuôi dưỡng tốt trên bề mặt nhãn cầu. Ngược lại trên bệnh nhân, đa số các nguyên nhân gây bệnh đều có thể gây ra tổn hại nặng trên kết mạc, làm

thiếu hụt nước mắt, gây cản trở cho việc hàn gắn và duy trì sự bền vững của biểu mô, vì vậy cần lưu ý để phối hợp thuốc tăng cường dinh dưỡng giác mạc. Hơn nữa, mắt thỏ luôn có một nếp mí phụ có tác dụng che phủ và nuôi dưỡng rất tốt cho bề mặt nhãn cầu, khi áp dụng trên bệnh nhân cần thay thế bằng việc đặt kính tiếp xúc kéo dài trong thời gian đầu sau mổ để bảo vệ sự toàn vẹn của tấm biểu mô trước tác động của môi trường. Ngoài ra, việc gây mê cho thỏ là yếu tố có ảnh hưởng đến quá trình nghiên cứu. Vì thỏ nhạy cảm với thuốc mê, rất dễ chết do gây mê, nên việc điều chỉnh liều thuốc mê cần rất thận trọng, tuy nhiên nếu gây mê quá ngắn sẽ làm thỏ tỉnh sớm khi chưa kết thúc phẫu thuật và gây ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu. Nên dùng bơm tiêm nhỏ để điều chỉnh lượng thuốc mê, liên tục theo dõi nhịp tim và mức độ giãn đồng tử trong khi phẫu thuật.

Kết quả nghiên cứu trên thực nghiệm của chúng tôi cũng tương tự như các công bố của các tác giả nước ngoài. Việc nghiên cứu thành công trên thỏ thực nghiệm là minh chứng khoa học cho phẫu thuật ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy, tạo cơ sở cho việc ứng dụng phương pháp này trên bệnh nhân.

4.2. Ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trên bệnh nhân

4.2.1. Tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy

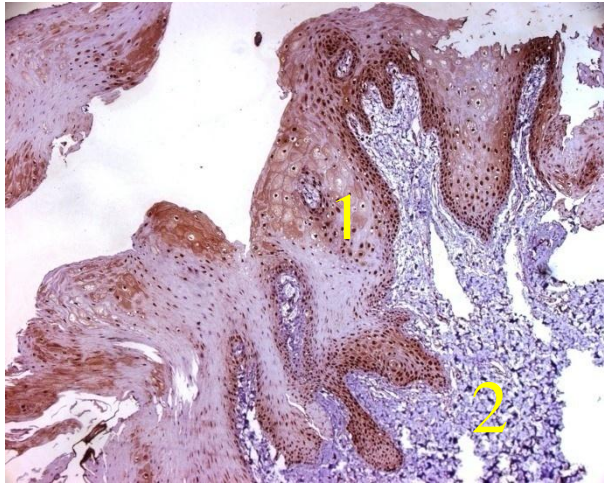
4.2.1.1. Vị trí mảnh mô được sinh thiết

Biểu mô niêm mạc miệng và biểu mô giác mạc có cùng nguồn gốc phôi thai từ ngoại bì da, đều là lớp biểu mô lát tầng không sừng hóa, dày, có nhiều hàng tế bào, có hình thái tế bào lớp đáy giống nhau. Trong các nguồn vật liệu là niêm mạc thường được sử dụng cho ghép tự thân, biểu mô niêm mạc miệng có nhiều điểm thuận lợi cho việc ứng dụng để điều trị bệnh lý bề mặt nhãn cầu bởi vì biểu mô niêm mạc miệng biệt hóa ở giai đoạn thấp hơn so với biểu

mô sừng của da, có chu kỳ tế bào ngắn, do đó yêu cầu thời gian cho nuôi cấy ngắn và có thể được lưu giữ ở điều kiện môi trường nuôi cấy trong thời gian dài mà không bị sừng hóa[99]. Ngoài ra, vùng niêm mạc miệng là vị trí khá lý tưởng cho việc sinh thiết do để lại sẹo rất kín đáo. Các đặc tính này gợi ý cho việc sử dụng biểu mô niêm mạc miệng làm nguồn nguyên liệu có thể thay thế cho biểu mô giác mạc trong điều trị bệnh bề mặt nhãn cầu.

Đối với niêm mạc miệng, tế bào có khả năng phân chia tập trung thành từng cụm nằm ở lớp đáy, nhân bắt màu đậm khi nhuộm p63, nhìn thấy nhiều hơn ở các nhú chân bì [84]. Đỗ Thùy Hương và cộng sự khi nghiên cứu so sánh cấu trúc vi thể các vị trí sinh thiết khác nhau trong khoang miệng thấy rằng trong khi lớp biểu mô niêm mạc vùng dưới lưỡi và vùng môi mỏng, vùng niêm mạc má có cấu trúc biểu mô khá dày với nhú chân bì rõ, 2-3 hàng tế bào sát đáy có kích thước nhỏ, nhân lớn, biểu hiện dương tính mức độ cao với marker p63. Như vậy niêm mạc vùng má có những đặc điểm thích hợp để nuôi cấy, vì khả năng thu được tế bào gốc ở vùng này cao hơn [95].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng lựa chọn vị trí sinh thiết là vùng trung tâm niêm mạc má. Kết quả mảnh mô sinh thiết là lớp biểu mô không sừng hóa gồm 10-15 hàng tế bào, lớp đáy dày gồm 3-4 lớp gồm các tế bào có kích thước nhỏ, bào tương bắt màu base đậm, lớp Malpighi gồm 7-10 hàng, gồm các tế bào hình đa diện, nhân hình cầu, ranh giới giữa các tế bào khá rõ. Trên cùng là 2-3 hàng tế bào dẹt, chứa nhân dẹt. Trên tiêu bản nhuộm p63, nhân tế bào đặc biệt là ở lớp đáy bắt màu đậm. Các nhú chân bì cũng có kích thước lớn, chia nhánh rõ. Mô đệm lỏng lẻo, ít tế bào (hình 4.1). Cấu trúc niêm mạc miệng vùng giữa má ở nam và nữ đều giống nhau.



Hình 4.1. Hình ảnh nhuộm hóa mô miễn dịch p63 niêm mạc vùng giữa má

1. Biểu mô 2. Mô đệm

4.2.1.2. Kích thước mảnh mô sinh thiết

Do yêu cầu kỹ thuật khi nuôi cấy, phương pháp nuôi bằng dịch treo cần có một số lượng lớn tế bào biểu mô nên mẫu mô dùng để nuôi phải có kích thước lớn (đường kính 8 mm), còn phương pháp nuôi bằng mảnh mô, kể cả khi để nguyên cả mô đệm hay bóc đi chỉ còn mảnh biểu mô, kích thước mảnh mô nuôi cấy chỉ cần đường kính 3 mm. Chúng tôi đã sử dụng phương pháp nuôi cấy bằng mảnh biểu mô nên chỉ cần lấy kích thước là 3 mm. Nhờ giảm kích thước mảnh mô, việc sinh thiết sẽ làm giảm đau đớn cho bệnh nhân, đồng thời vết thương sau khi sinh thiết sẽ nhanh lành hơn. Ngoài ra, do lấy mảnh mô nhỏ nên có thể lặp lại sinh thiết nhiều lần nếu cần mà không ảnh hưởng đến tình trạng niêm mạc miệng của người bệnh.

4.2.1.3. Chất lượng của tấm biểu mô nuôi cấy

Cũng tương tự như trong nghiên cứu ở thử nghiệm, từ biểu mô niêm mạc miệng chúng tôi đã nuôi tạo được tấm biểu mô có đặc điểm hình thái giống như biểu mô giác mạc với 4-5 hàng tế bào, hàng trên cùng dẹt dần và vẫn còn nhân chứng tỏ là biểu mô không sừng hóa. Vi cấu trúc của tế bào

được thể hiện qua hình ảnh hiển vi điện tử cũng cho thấy liên kết chặt chẽ giữa các tế bào với nhau, tạo nên hàng rào chức năng cho biểu mô. Cấu tạo các tế bào lớp đáy thể hiện khả năng phát triển và phân chia cao với hệ thống bào quan phong phú. Lớp đáy được gắn vào lớp màng ôi bằng thể bán liên kết, giúp cho biểu mô nuôi cấy được bám dính ổn định trên giá đỡ. Kết quả định danh hóa mô miễn dịch cho thấy có sự hiện diện của p63 tập trung ở các tế bào lớp đáy, thể hiện đặc tính tế bào gốc của tằm biểu mô, và có sự hiện diện yếu của K3 của các tế bào ở lớp trên, thể hiện đặc tính của biểu mô giác mạc biệt hóa. Như vậy, tằm biểu mô nuôi cấy có chứa cả tế bào gốc lẫn tế bào trưởng thành. Điều này giúp cho tằm biểu mô sau khi ghép vẫn đảm bảo được chức năng giữ ổn định bề mặt nhãn cầu, đồng thời vẫn có thể tái sinh để tiếp tục tồn tại bền vững qua thời gian.

Kết quả của chúng tôi tương tự với kết quả nghiên cứu của Madhira và cộng sự năm 2008, các tác giả cũng thu được tằm biểu mô niêm mạc miệng sau nuôi cấy 3-4 tuần, sử dụng giá đỡ là màng ôi, với các đặc tính về hình thái và kiểu hình tương tự với biểu mô vùng rìa nuôi cấy[87]. Tằm biểu mô có 2-3 hàng tế bào không sừng hóa, không có tế bào dài, có thể quan sát được các thể liên kết, bán liên kết. Để nhận diện các dấu ấn thể hiện tế bào gốc cũng như tế bào biệt hóa, các tác giả đã định danh bằng phương pháp sinh học phân tử, phân tích chuỗi gen sao chép ngược (RT-PCR), và phương pháp hóa mô miễn dịch, đã khẳng định sự hiện diện của p63 trong lớp đáy, và hiện diện của K3 ở các lớp trên. Hơn nữa, theo nghiên cứu của Sen và cộng sự năm 2011, các tác giả khẳng định tằm biểu mô nuôi cấy từ niêm mạc miệng còn có lợi thế đặc biệt là khả năng cải thiện tình trạng khô mắt do thiếu hụt mucin thường đi kèm ở bệnh lý rối loạn bề mặt nhãn cầu nặng [93]. Bằng phương pháp nuôi cấy mảnh mô với giá đỡ là màng ôi, các tác giả đã nuôi tạo được tằm biểu mô lát tầng không sừng hóa. Các phân tích siêu vi cho thấy hình ảnh

của các thể liên kết gắn các tế bào biểu mô với nhau và thể bán liên kết gắn biểu mô với màng ôi, có hiện diện các hạt mucin nằm trong tế bào, lớp đáy có chứa một số nhân đang phân chia chứa chất nhiễm sắc, thể hiện đặc tính tăng sinh của biểu mô đáy. Kết quả định danh hóa mô miễn dịch và sinh học phân tử thấy có hiện diện của p63, β 1-integrin, p75 (các dấu ấn tế bào gốc), K3, connexin 43 (dấu ấn tế bào biệt hóa), và đặc biệt là sự hiện diện của 1 số mucin gắn màng MUC1,13,15,16 và mucin tạo keo MUC 5B và 6. Các kết quả này cho phép kết luận rằng tâm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy có cấu trúc và chức năng tương tự như biểu mô giác mạc, có thể thay thế biểu mô giác mạc để tái thiết bề mặt nhãn cầu, đặc biệt là tác dụng làm cải thiện tình trạng khô mắt.

Khi áp dụng liệu pháp tế bào, ngoài việc tìm ra quy trình nuôi cấy để tạo ra các tế bào với số lượng và chất lượng cao nhất đáp ứng với nhu cầu điều trị và đảm bảo sự sống của chúng, vấn đề kiểm soát điều kiện nuôi cấy để không gây ra đột biến gen - nguy cơ gây ung thư tế bào, đảm bảo cho liệu pháp điều trị được an toàn cũng là mục tiêu quan trọng. Vì vậy các nhà khoa học luôn tìm giải pháp để tránh các nguyên liệu dị loài trong quá trình nuôi cấy. Trong nghiên cứu, chúng tôi sử dụng lớp tế bào nuôi là lớp nguyên bào sợi tự thân từ chính mẫu mô sinh thiết, điều này tạo ra điều kiện nuôi cấy gần giống điều kiện sinh lý, các tế bào biểu mô có thể nhận được các tín hiệu từ mô đệm ban đầu, đồng thời có thể tránh được việc sử dụng lớp tế bào nuôi là nguyên bào sợi 3T3 (bất hoạt bởi MMC) từ chuột, tránh được sự tích hợp của protein từ chuột vào các tế bào nuôi cấy. Như vậy phương pháp nuôi cấy của chúng tôi đảm bảo được độ an toàn, không có các yếu tố dị loài nên tránh được các biến chứng về bệnh truyền nhiễm, phản ứng miễn dịch thải ghép, hay nguy cơ tích hợp protein có nguồn gốc động vật. Cùng ý tưởng này, Oie và cộng sự (2010)

cũng đã cải biên phương pháp nuôi cấy dùng lớp tế bào nuôi là nguyên bào sợi hậu gián phân của da người cũng cho kết quả tốt [92].

Mặt khác, tác giả Klingbeil và cộng sự cũng đã thực hiện nghiên cứu để chứng tỏ quá trình nuôi cấy biểu mô niêm mạc miệng là an toàn và không làm xuất hiện tế bào đột biến[110]. Các tác giả dùng hóa mô miễn dịch và sinh học phân tử (Western-Blot) để xác định sự hiện diện ở tấm biểu mô nuôi cấy của các protein có khả năng gây ung thư biểu mô (p53 và MDM2-Murine double minute gene 2 – các protein này có thể xuất hiện khi có sự đột biến trong quá trình phân chia tế bào), và các protein có khả năng chống ung thư (pAkt và PTEN – các protein này điều hòa các yếu tố tăng sinh, dính kết, di cư tế bào, chống lại sự chết theo chương trình của tế bào). Kết quả nghiên cứu cho thấy trong tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy có sự hiện diện của pAkt và PTEN, nhưng không thấy sự hiện diện của p53 và MDM2. Điều này cho phép khẳng định sự an toàn của tấm biểu mô nuôi cấy.

4.2.2. Kết quả thu được khi ghép trên bệnh nhân

4.2.2.1. Đặc điểm bệnh nhân

Độ tuổi trung bình của các bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi là 26,2 tuổi, thị lực trước mổ của các bệnh nhân đều rất thấp, hầu hết là dưới đếm ngón tay 1m. Như vậy với đối tượng bệnh nhân còn trẻ tuổi, có nhu cầu học tập và lao động cao, lại có cả 2 mắt cùng bị bệnh và thị lực rất thấp, gần như mù lòa thì việc tìm giải pháp điều trị để nâng cao thị lực cho bệnh nhân là rất cần thiết.

Nguyên nhân gây bệnh chính trong nhóm nghiên cứu của chúng tôi là bệnh lý loạn dưỡng giác mạc dạng giọt gelatin và bóng kết giác mạc do hóa chất. Bệnh lý loạn dưỡng giác mạc dạng giọt gelatin thường biểu hiện các dấu hiệu kích thích cơ năng và giảm thị lực khá sớm, từ tuổi thiếu niên, và tiến triển nặng ở những năm tiếp theo, từ sau 20 tuổi, với các lắng đọng bất

thường dưới biểu mô ở trung tâm giác mạc, kéo theo tân mạch xâm nhập từ kết mạc vào giác mạc, nếu không được điều trị sẽ làm xuất hiện xơ đục xuống các lớp nhu mô giác mạc phía dưới. Trong nghiên cứu chúng tôi có 3 bệnh nhân bị bệnh này và đều được điều trị cả 2 mắt. Như vậy đặc điểm bệnh lý phù hợp với tuổi và tình trạng thị lực trước mổ của các bệnh nhân.

Tương tự như vậy, nguyên nhân bỏng thường gặp ở người trẻ do tai nạn lao động hoặc sinh hoạt, với những người bị tổn thương nặng có suy giảm toàn bộ tế bào gốc ở 2 mắt thì bệnh cảnh rất nặng nề và thị lực rất thấp.

Trước bệnh cảnh rối loạn bề mặt nhãn cầu nặng, để tạo điều kiện cho phẫu thuật kiến tạo bề mặt nhãn cầu được thuận lợi, việc cần thiết là phải sửa soạn được nền ghép lành và môi trường xung quanh tốt. Vì vậy, đối với các bệnh nhân bỏng trong nghiên cứu, chúng tôi đã điều trị tích cực từ giai đoạn cấp để loại bỏ các tác nhân gây bỏng đọng trong tổ chức nhãn cầu, tránh để các tác nhân đó ngấm sâu thêm, đồng thời chống viêm tích cực. Tất cả các bệnh nhân bỏng trong nghiên cứu đều đã được mổ cắt lọc tổ chức hoại tử, tách dính mi cầu, ghép màng ối. Ngoài ra các bất thường mi mắt cũng đã được sửa chữa để đảm bảo cho mắt luôn được nhắm kín, bổ sung liên tục chất dinh dưỡng bề mặt nhãn cầu để tạo môi trường nuôi dưỡng đảm bảo cho sự sống của vật liệu ghép. Tuy nhiên vẫn còn 3 trường hợp do tác nhân gây bỏng đã ngấm sâu vào nội nhãn nên ngoài tổn thương rối loạn bề mặt nhãn cầu nặng, xơ và tân mạch che phủ toàn bộ giác mạc, còn có tổn thương phối hợp: 1 ca thủng bít giác mạc kèm đục thể thủy tinh, 1 ca bị ngấm chất gây bỏng làm đục trương thể thủy tinh và đã phải mổ thay thể thủy tinh, đồng thời giác mạc dọa thủng do khó hàn gắn biểu mô trước đó, ca còn lại cũng đã phải mổ thay thể thủy tinh. Do có nhiều tổn thương sâu phối hợp nên phải điều trị chống viêm với liều cao và kéo dài, đồng thời tiên lượng sau mổ của các trường hợp này cũng khó khăn hơn.

4.2.2.2. Hiệu quả của phẫu thuật ghép tự thân tâm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy

Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp cho tỷ lệ thành công ở 14/20 trường hợp với thời gian theo dõi trung bình là 18,95 tháng (12-62 tháng), cho tỷ lệ 70%. Ở các trường hợp này, giác mạc trong hơn và trơn nhẵn, giảm tân mạch, bề mặt nhãn cầu ổn định. Kết quả của chúng tôi tương đối khả quan so với một số nghiên cứu khác trên thế giới với số lượng đủ lớn và thời gian theo dõi tương đối dài (bảng 4.1).

Bảng 4.1. Tỷ lệ thành công của các nghiên cứu ghép tâm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy

Nghiên cứu	Tỷ lệ thành công	Thời gian theo dõi	Cỡ mẫu
Inatomi (2006)[107]	67%	20 tháng	15
Nakamura (2011)[108]	79%	55 tháng	19
Satake (2011)[3]	64,8% sau 1 năm 59% sau 2 năm	25,5 tháng	40
Burillon (2012)[109]	64%	360 ngày	26
Sotozono (2013)[111]	48%	28,7 tháng	46
Kocaba (2014)[4]	62,5%	28 tháng	26
N T T Thủy (2016)	70%	18,95 tháng	20

Các biểu hiện về triệu chứng cơ năng như chói sợ ánh sáng, cảm giác khô mắt, cảm giác đau là lý do chủ yếu đưa bệnh nhân đến điều trị. Sự xuất hiện của các triệu chứng này cũng là tiêu chuẩn giúp cho thầy thuốc đánh giá được mức độ viêm trên bề mặt nhãn cầu của bệnh nhân. Việc điều trị làm

giảm bớt các kích thích cơ năng giúp cho bệnh nhân có thể cải thiện chất lượng cuộc sống, cũng đồng thời làm giảm phản ứng viêm bề mặt, tạo sự ổn định cho bề mặt nhãn cầu. Trong nghiên cứu, qua theo dõi chúng tôi thấy có 12 trường hợp cải thiện rõ rệt về tình trạng cơ năng ở cả 3 triệu chứng, 1 trường hợp có cải thiện 2 triệu chứng và 2 trường hợp cải thiện 1 triệu chứng, đặc biệt không có trường hợp nào có biểu hiện xấu hơn so với trước khi mổ. Kết quả này tương tự với kết quả từ nghiên cứu của Burillon (2012) khi điều trị cho 26 mắt, có cải thiện cả 3 triệu chứng cơ năng ở 7 ca, cải thiện ít nhất 1 triệu chứng ở 22 ca [109]. Đặc biệt tác giả Kocaba và cộng sự (năm 2014) còn công bố kết quả đạt mức cải thiện về các triệu chứng cơ năng tới 95,6% trong số bệnh nhân nghiên cứu [4]. Như vậy phương pháp ghép biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy có vai trò đáng kể trong việc nâng cao chất lượng cuộc sống của người bệnh.

Trong điều trị các bệnh lý rối loạn bề mặt nhãn cầu nặng, tẩm biểu mô nuôi cấy đóng vai trò thay thế cho biểu mô giác mạc trong việc kiến tạo bề mặt nhãn cầu, do đó cải thiện thị lực không phải là mục tiêu chính. Tuy vậy, phẫu thuật có khả năng làm tăng thị lực trong trường hợp bệnh lý tổn thương ở lớp biểu mô và nhu mô nông, còn với các trường hợp có đục nhu mô sâu, tẩm biểu mô có vai trò kiến tạo bề mặt ổn định, giảm tân mạch để tạo thuận lợi cho ghép quang học thì 2 nhằm tăng thị lực. Ở nhóm nghiên cứu của chúng tôi, thị lực nhìn xa được tăng đáng kể, trước khi mổ hầu hết các bệnh nhân đều chỉ ở mức dưới đếm ngón tay 1m, sau mổ có tới 13 trường hợp tăng rõ rệt và 1 ca tăng ít do sẹo nhu mô sâu (đạt tỷ lệ 70%). Có 7 trường hợp tăng trên 2 hàng, thị lực cao nhất là 20/60. Tính theo LogMAR, chúng tôi đã đưa thị lực trung bình từ +2,17 về +1,415, mức cải thiện đạt được là -0,755. Đặc biệt có tới 9 trường hợp có cải thiện rõ rệt thị lực nhìn gần, có 2 bệnh nhân loạn dưỡng và 1 bệnh nhân bong có thể đọc sách và soạn tin nhắn ở cỡ chữ

bình thường. Điều này đem lại ý nghĩa vô cùng quan trọng vì đa số bệnh nhân còn trẻ và có nhu cầu học tập, lao động cao. Quá trình điều trị đưa bệnh nhân từ tình trạng gần như mù lòa do thị lực quá thấp ở cả 2 mắt tới một mức thị lực nhất định cho dù ít ỏi cũng có thể làm tăng đáng kể chất lượng cuộc sống và tinh thần của người bệnh.

Theo tổng kết của Sotozono năm 2013, trong nhóm 46 mắt được điều trị ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy, với thị lực trước mổ LogMAR $> + 2.40$, sau điều trị có 15 mắt (tỷ lệ 48%) đưa về thị lực LogMAR $< + 2$, thị lực đạt được ổn định với thời gian theo dõi khá dài 28,7 tháng[111]. Trong một nghiên cứu khác của Kocaba và cộng sự năm 2014, thị lực của nhóm nghiên cứu gồm 26 mắt cũng được cải thiện từ +1,67 về +1,44 (LogMAR) ở 74% sau 28 tháng [4]. Các tác giả cũng đưa ra nhận xét rằng tấm biểu mô niêm mạc miệng có vai trò cải thiện và ổn định bề mặt nhãn cầu, làm tăng thị lực ngay ở những ca không có tổn thương nhu mô, với những trường hợp đục nhu mô cần ghép quang học thì việc ghép tấm biểu mô trước đó cũng giúp giảm nguy cơ thái ghép.

4.2.2.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả phẫu thuật

Nguyên nhân gây bệnh:

Trong 2 nhóm nguyên nhân gây bệnh, chúng tôi thấy nhóm loạn dưỡng giác mạc dạng giọt gelatin cho kết quả sau mổ tốt hơn nhóm di chứng bỏng hóa chất, cho thị lực cao hơn, giảm tân mạch giác mạc tốt hơn. Chúng tôi cho rằng tổn thương loạn dưỡng giác mạc chỉ nằm ở lớp nông của bề mặt nhãn cầu, nên sau khi được thay thế bởi tấm biểu mô, tình trạng bệnh được cải thiện hoàn toàn. Còn với bệnh lý bỏng, tổn thương có thể nằm ở các lớp sâu hơn, đôi khi vẫn còn tác nhân gây bỏng ngấm sâu vào tổ chức gây phản ứng viêm dai dẳng làm ảnh hưởng xấu đến kết quả phẫu thuật. Đồng thời tổn hại nặng của tế bào đại ở kết mạc do bỏng làm giảm chế tiết nước mắt, giảm khả

năng dinh dưỡng và bảo vệ của bề mặt nhãn cầu, là yếu tố ảnh hưởng đến kết quả điều trị.

Các tổn thương phối hợp ở mắt

Các tổn thương biểu mô dai dẳng trước phẫu thuật cũng như các tổn hại sâu trong nhãn cầu có tiên lượng xấu đến kết quả điều trị. Trong nghiên cứu chúng tôi có 1 trường hợp giác mạc thủng kèm đục thể thủy tinh trong phòng sau bỏng, và 1 trường hợp có loét giác mạc dai dẳng trước đó, mặc dù ổ loét đã liền sau khi được ghép màng ối song giác mạc mỏng dọa thủng với nhiều tân mạch xâm nhập trung tâm, ca này cũng đã được mổ thay thể thủy tinh. Như vậy cả 2 ca này đều có tổn thương bỏng sâu ở nhu mô giác mạc và trong nhãn cầu, gây phản ứng viêm kéo dài, chúng tôi đã buộc phải phối hợp ghép tấm biểu mô với ghép giác mạc điều trị. Sau phẫu thuật mảnh ghép giác mạc bị nhuyễn hồng và tân mạch sâu xâm nhập toàn bộ giác mạc.

Theo công bố của Satake và cộng sự (2011) về kết quả lâu dài của ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy cho các bệnh lý tổn hại toàn bộ tế bào gốc, trên quy mô khá lớn 40 mắt sau 25,5 tháng (lâu nhất là 54,9 tháng), bên cạnh hiệu quả kiến tạo bề mặt nhãn cầu trên 64,8% sau 1 năm, 59% sau 2 năm, 53,1% sau 3 năm, các tác giả cũng nhận thấy tổn thương khuyết biểu mô dai dẳng trước phẫu thuật là tiên lượng xấu cho kết quả điều trị. Mặc dù đã phối hợp tất cả các biện pháp nhằm cải thiện tình trạng dinh dưỡng cho bề mặt nhãn cầu, vẫn không đủ để duy trì được sự nguyên vẹn của biểu mô trong một số trường hợp [3].

Ngoài ra các tổn thương phối hợp của mi mắt như biến dạng bờ mi, rối loạn chức năng tuyến bờ mi gây ảnh hưởng đến sự bền vững của lớp phim nước mắt, gây nên hiện tượng viêm và chậm hàn gắn biểu mô bề mặt nhãn cầu. Tất cả các bệnh nhân trong nhóm nguyên nhân bỏng của chúng tôi đều có viêm tắc tuyến Meibomius, có 7 trường hợp đã phẫu thuật tạo hình mi bằng ghép niêm mạc môi, mặc dù mi nhắm tốt nhưng tuyến Meibomius bị viêm tắc làm ảnh hưởng đến dinh dưỡng giác mạc, phải điều trị tích cực bằng các

thuốc tra huyết thanh tự thân và nước mắt nhân tạo, chườm ấm mi, uống Doxycycline.

Cách thức phẫu thuật và chăm sóc sau mổ

Quy trình phẫu thuật được chia làm 2 bước: Bước chuẩn bị nền ghép và bước cố định tấm biểu mô lên bề mặt nhãn cầu. Bước chuẩn bị nền ghép cần gọt bỏ tổ chức biểu mô bệnh lý, tạo nền ghép phẳng nhẵn để tạo điều kiện cho tấm biểu mô nhanh chóng hòa nhập với lớp nhu mô. Cần cầm máu kỹ để giảm bớt hiện tượng đọng máu dưới tấm biểu mô. Bước trải tấm biểu mô trên bề mặt nhãn cầu cần tránh gây sang chấn cho bề mặt tấm biểu mô, có thể làm mất đi các tế bào biểu mô nuôi cấy. Dùng dụng cụ kẹp ở bờ tấm biểu mô để kéo trượt tấm biểu mô ra khỏi đáy lòng nuôi cấy, trải lên bề mặt nhãn cầu. Khi khâu cố định cũng lưu ý tránh để cọ sát giữa chỉ khâu với bề mặt tấm biểu mô vì có thể gây ra bong tế bào biểu mô. Cố định bằng các mũi chỉ rời sẽ có tác dụng cố định tốt hơn so với mũi chỉ liên tục. Các mũi khâu cần đảm bảo để tấm biểu mô được áp sát và phẳng, không được chùng và nhăn vì có thể kéo dài thời gian hòa nhập của màng ối với lớp nhu mô và tạo điều kiện cho tân mạch xâm nhập vào dưới tấm biểu mô. Cần nhắc người phụ lưu ý động tác tưới nước giác mạc, cần tưới nhẹ nhàng từng giọt, tránh xối trực tiếp thành tia vì có thể gây bong tế bào biểu mô.

Trong quá trình hậu phẫu, cần đặt kính tiếp xúc liên tục ít nhất là trong vài tháng đầu sau mổ, đủ thời gian để tấm biểu mô gắn kết chắc chắn trên bề mặt nhãn cầu, kính tiếp xúc có tác dụng bảo vệ tấm biểu mô khỏi các cọ sát cơ học. Kính tiếp xúc được dùng là loại kính có độ thấm khí cao để tránh tình trạng thiếu oxy của biểu mô khi đặt kính kéo dài.

Để nuôi tạo được tấm biểu mô niêm mạc miệng, yêu cầu kỹ thuật đòi hỏi phải liên tục bổ sung vào môi trường nuôi cấy các chất dinh dưỡng, phát triển. Khi chuyển từ môi trường nuôi cấy sang mắt người bệnh và tiếp xúc với

không khí bên ngoài, cần phải tiếp tục bổ sung nguồn dinh dưỡng để duy trì sự sống cho các tế bào biểu mô. Các thuốc dinh dưỡng giác mạc cần được bổ sung liên tục 15 phút/ lần trong tuần đầu và duy trì trong thời gian tiếp theo, vì khô mắt sẽ làm bong biểu mô.

Qua nhiều năm nghiên cứu ghép tấm biểu mô nuôi cấy cho các bệnh nhân rối loạn nặng bề mặt nhãn cầu, từ 1999 với ghép tấm biểu mô giác mạc vùng rìa nuôi cấy và từ 2002 với ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy, Nakamura và cộng sự cũng đã rút ra kinh nghiệm lâm sàng như sau: dùng kính tiếp xúc loại thấm khí cao ngay trong thời gian hậu phẫu sớm, dùng nước mắt nhân tạo 15 phút/ lần trong tuần đầu sau mổ để duy trì sự sống của tấm biểu mô [108].

Chất lượng của tấm biểu mô nuôi cấy

Khi quá trình nuôi tạo tấm biểu mô đảm bảo đủ lượng tế bào đầu dòng (progenitor cell) trên tấm biểu mô nuôi cấy thì sự phát triển và tồn tại của lớp biểu mô trên bề mặt giác mạc sau ghép được duy trì hằng định, sẽ có vai trò ngăn cản sự xâm lấn của tổ chức xơ mạch từ kết mạc vào giác mạc.

Mức độ dai và đàn hồi của màng ối đã nạo biểu mô được sử dụng làm giá đỡ cho nuôi cấy cũng có vai trò quan trọng trong phẫu thuật. Khi màng ối quá mỏng, tấm biểu mô sẽ dễ bị rách trong thì phẫu thuật. Khi màng ối quá dày, độ đàn hồi sẽ kém hơn, khi cố định tấm biểu mô lên bề mặt nhãn cầu, do giác mạc hình chòm cầu nên dễ tạo thành các nếp gấp theo hướng nan hoa từ trung tâm ra chu vi. Hiện tượng này làm cho tấm biểu mô không áp chặt được vào nhu mô và gây ra tân mạch xâm nhập vào dưới tấm biểu mô.

Khả năng tách rời của tấm biểu mô khỏi đáy giếng nuôi cấy sau khi lấy ra khỏi môi trường nuôi cấy để ghép lên mắt bệnh nhân cũng là yếu tố quan trọng có ảnh hưởng đến kết quả phẫu thuật. Tấm biểu mô bị dính chặt vào đáy giếng nuôi cấy dễ bị rách trong khi tách ở thì phẫu thuật, gây bong hoặc tróc

tế bào, tẩm biểu mô không được cố định chặt vào nền giác mạc, do đó dễ bị tổ chức xơ mạch xâm lấn sau phẫu thuật. Trong nghiên cứu của chúng tôi có 4 trường hợp tẩm biểu mô bị dính chặt vào đáy giếng nuôi cấy, và kết quả điều trị bị thất bại. Khi tiến hành phẫu thuật lần 2 cho bệnh nhân, chúng tôi đã làm mô bệnh học mảnh gọt giác mạc và thấy tổ chức xơ mạch xuất hiện ở giữa tẩm biểu mô và nhu mô giác mạc. Điều này có thể do kỹ thuật viên đã nạo biểu mô màng ôi và kéo giãn quá nhiều ở thì chuẩn bị màng ôi và khi căng trên đáy giếng nuôi cấy, hoặc do kỹ thuật chuẩn bị lớp nguyên bào sợi tự thân trong quá trình nuôi cấy. Cho tới nay chưa có nghiên cứu nào của các tác giả trên thế giới đề cập đến hiện tượng này. Về vấn đề này chúng tôi thấy rằng cần trao đổi với các nhà nuôi cấy để tìm cách khắc phục và hoàn thiện quy trình nuôi cấy.

4.2.2.4. Độ an toàn của phương pháp

Để điều trị bệnh lý rối loạn nặng của bề mặt nhãn cầu do suy giảm toàn bộ tế bào gốc thì lý tưởng nhất là phương pháp ghép tế bào gốc của biểu mô giác mạc ở vùng rìa. Tuy nhiên trong tình huống không còn nguồn tế bào gốc tự thân của giác mạc khi bị bệnh ở cả 2 mắt thì có thể dùng phương pháp ghép tế bào gốc từ người hiến hoặc người đồng huyết thống. Phương pháp này giúp kiến tạo bề mặt nhãn cầu với lớp biểu mô là biểu mô giác mạc, song lại gặp trở ngại lớn về vấn đề miễn dịch thải ghép, đặc biệt khi đa số bệnh nhân là đối tượng trẻ tuổi, có đáp ứng miễn dịch cao. Việc sử dụng thuốc ức chế miễn dịch toàn thân kéo dài chống thải ghép đem đến nguy cơ cao đối với chức năng gan, thận, nguy cơ nhiễm trùng toàn thân, tại chỗ. Phương pháp ghép tự thân tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy đã khắc phục được vấn đề này. Nhờ ghép tẩm biểu mô tự thân, đạt được hiệu quả kiến tạo bề mặt nhãn cầu mà không gặp phải nguy cơ thải loại miễn dịch. Bệnh nhân không cần sử dụng thuốc ức chế miễn dịch toàn thân nên không gặp các nguy cơ do dùng thuốc này. Đồng thời do sử dụng nguồn nguyên liệu tự thân nên không cần

phải dùng thuốc chống viêm corticosteroid kéo dài sau mổ, vì vậy cũng giảm bớt các biến chứng do dùng corticosteroid gây ra như tăng nhãn áp, bội nhiễm. Trong nghiên cứu của chúng tôi không gặp trường hợp nào có biến chứng nhiễm trùng và tăng nhãn áp, trong khi ở các báo cáo của 1 số tác giả khác có gặp các hiện tượng này (Satake năm 2011, Burillon 2012, Kocaba 2014), có thể là do các bệnh nhân trong đối tượng nghiên cứu của các tác giả này có tăng nhãn áp kèm theo từ trước khi mổ, và có bệnh mang tính miễn dịch toàn thân như dị ứng thuốc, pemphigoid nên phải dùng thuốc corticosteroid kéo dài[3], [109], [4].

Với phương pháp ghép tự thân tẩm biểu mô niêm mạc miệng, chỉ cần sinh thiết một mảnh rất nhỏ niêm mạc má 3 mm, vì vậy sẹo để lại rất nhỏ và không gây đau. Phẫu thuật ghép thực hiện trên mắt cũng chỉ đơn thuần ở bề mặt, gọt bỏ lớp biểu mô bệnh lý rồi cố định tẩm biểu mô trên bề mặt nhãn cầu, không làm tổn hại gì cho tổ chức nhu mô ở phía dưới. Tất cả các thao tác trên đều ít xâm lấn và dễ thực hiện, thể hiện độ an toàn cao, vì vậy có thể dễ dàng thực hiện lặp lại việc sinh thiết và ghép lại lần sau nếu lần đầu không thành công.

4.2.3. Khả năng tồn tại của tẩm biểu mô sau ghép

Trong cơ chế hàn gắn tổn thương của biểu mô giác mạc, khi có xảy ra tổn hại biểu mô thì các tế bào gốc vùng rìa (Stem Cells - SC) sẽ tự thay mới, tiến vào trung tâm và biệt hóa thành các tế bào phân chia tạm thời (Transient Amplifying Cells – TAC) nằm ở màng đáy của biểu mô giác mạc. Các tế bào TAC khi đó sẽ ngừng gián phân và biệt hóa thành các tế bào hậu gián phân nằm ở màng đáy (Post Mitotic Cells – PMC), rồi biệt hóa thành tế bào biệt hóa cuối cùng nằm ở các lớp trên của biểu mô (Terminally Differentiate Cells – TDC). Cần lưu ý rằng các tế bào phân chia tạm thời (TAC) có vòng đời ngắn, thường chỉ dưới 1 năm.

Trong nghiên cứu chúng tôi thấy có 14 trường hợp bề mặt nhẵn cầu vẫn ổn định, không bị tân mạch và kết mạc xâm nhập vào giác mạc tính đến thời điểm theo dõi cuối cùng, trường hợp ngắn nhất là 12 tháng, dài nhất là 62 tháng. Vì vòng đời của các tế bào phân chia tạm thời chỉ tồn tại dưới 1 năm, điều này chứng tỏ có sự hiện diện của tế bào gốc trong biểu mô giác mạc sau khi ghép, do đó biểu mô được tiếp tục tự đổi mới một cách hằng định qua thời gian dài, tránh được hiện tượng kết mạc hóa và tân mạch hóa.

Ở nghiên cứu thực nghiệm, chúng tôi đã tiến hành làm mô bệnh học toàn bộ giác mạc thỏ sau khi ghép để tìm bằng chứng về sự tồn tại lâu dài của tấm biểu mô. Mặc dù không làm được điều này trên tất cả các bệnh nhân, nhưng khi tiến hành mổ lần 2 cho bệnh nhân Võ Nữ Ngọc Y., chúng tôi đã làm mô bệnh học mảnh gọt giác mạc sau khi ghép tấm biểu mô lần 1 trước đó 12 tháng. Hình ảnh cho thấy tấm biểu mô vẫn tồn tại nguyên vẹn trên bề mặt nhẵn cầu và có sự xâm nhập của tân mạch vào giác mạc ở dưới tấm biểu mô, điều này đã chứng tỏ khả năng tồn tại lâu dài của tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy sau khi ghép qua thời gian (hình 4.2).



Hình 4.2. Hình ảnh nhuộm H.E. mảnh gọt giác mạc sau ghép 12 tháng

** Tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy*

Mặt khác, sau khi nuôi tạo tấm biểu mô niêm mạc miệng, 1 tấm dùng để ghép trên bệnh nhân, tấm còn lại chúng tôi dùng để định danh. Kết quả định danh bằng hóa mô miễn dịch cho thấy có sự hiện diện của p63 ở lớp đáy của tấm biểu mô. Mặc dù không có marker đặc hiệu để định lượng tế bào gốc, nhưng sự hiện diện của p63 thể hiện đặc tính tế bào gốc có trong tấm biểu mô, đồng thời với quan sát tình trạng lâm sàng ổn định của giác mạc sau ghép qua thời gian dài, chúng tôi cho rằng tấm biểu mô nuôi cấy có đủ số lượng tế bào gốc để tiếp tục tái tạo, duy trì sự ổn định bề mặt nhãn cầu qua thời gian.

Có nhiều nghiên cứu trên thế giới cũng đã chứng minh sự tồn tại lâu dài trên bề mặt nhãn cầu của biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy sau ghép. Chen và cộng sự (2009) đã ghép giác mạc quang học và ghép kết mạc tự thân 10 – 22 tháng sau khi ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng, định danh mẫu bệnh phẩm giác mạc thu được thấy tấm biểu mô vẫn tồn tại nguyên vẹn, có hiện diện của p63, ABCG2 ở lớp đáy[101]. Burillon và cộng sự (2012) ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy cho 26 mắt, sau 360 ngày thành công 64%, tấm biểu mô có sự hiện diện của p63, β 1-integrin, test tạo cụm $3,4\% \pm 2,06\%$ và chứa các clon toàn phần[109]. Tương tự như vậy, Kocaba và cộng sự (2014) cũng công bố kết quả theo dõi sau 28 tháng ghép tấm biểu mô nuôi cấy từ niêm mạc miệng và thu được 62% bệnh nhân có bề mặt nhãn cầu ổn định, sau mổ 1 năm các tác giả đã tiến hành ghép giác mạc quang học cho 9 ca có sẹo nhu mô, kết quả mô bệnh học các mảnh giác mạc thu được thấy hình ảnh biểu mô rất giống biểu mô giác mạc bình thường, có sự biểu hiện của p63 ở tất cả các tế bào lớp đáy [4]. Tóm lại, các nghiên cứu đều khẳng định sự tồn tại của dấu ấn tế bào gốc ở biểu mô giác mạc sau ghép. Điều này đảm bảo cho sự tái sinh, biệt hóa đều đặn của biểu mô, giúp cho bề mặt nhãn cầu được duy trì sự ổn định qua thời gian dài.

4.2.4. Một số nhược điểm của phẫu thuật ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy

Hàng rào chức năng của biểu mô:

Vai trò quan trọng của biểu mô giác mạc là tạo ra khúc xạ bề mặt góp phần vào chức năng thị giác và vai trò hàng rào chức năng chống lại sự xâm nhập từ các tác nhân gây bệnh bên ngoài. Sau phẫu thuật ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng, trên lâm sàng chúng tôi quan sát thấy đa số biểu mô bắt màu với thuốc nhuộm Fluorescein dạng chấm nông nhỏ và tồn tại khá lâu, giống như mô tả trong nghiên cứu của Inatomi [107] và Shimazaki [102]. Điều này chứng tỏ biểu mô sau ghép có hiện tượng tăng tính thấm với Fluorescein, là biểu hiện giảm hàng rào chức năng của biểu mô so với giác mạc bình thường. Trong nghiên cứu so sánh hàng rào chức năng của tấm biểu mô niêm mạc miệng với tấm biểu mô vùng rìa nuôi cấy, Shimazaki đã đưa ra nhận xét tấm biểu mô niêm mạc miệng dày hơn và kém đều hơn, có một số vùng giảm sự hiện diện của dải bọt trên hóa mô miễn dịch, điều này có thể có liên quan đến giảm liên kết giữa các tế bào, gây ra hiện tượng giảm hàng rào chức năng của biểu mô, biểu hiện bằng tăng tính thấm với Fluorescein. Trong một nghiên cứu khác, Satake cũng thấy biểu mô sau ghép có tăng tính thấm rõ rệt với Fluorescein so với trước khi ghép, tuy nhiên lại không cho các phân tử Horseradish peroxidase – HPR (có trọng lượng phân tử lớn là 40 kDa) thấm qua [112]. Điều này thể hiện sự giảm hàng rào chức năng của biểu mô sau ghép với các chất có phân tử lượng nhỏ. Tuy nhiên đặc tính này có ưu điểm là hàng rào chức năng thấp sẽ tạo thuận lợi cho các thuốc tra mắt (phân tử lượng nhỏ) dễ thấm qua. Đồng thời việc không cho các chất có phân tử lượng lớn (trên 40 kDa) thấm qua giúp cho biểu mô tạo được hàng rào chức năng đủ độ an toàn đối với các tác nhân gây độc từ môi trường.

Sự xuất hiện của tân mạch sau ghép

Ở các mắt thành công trong thời gian đầu sau mổ chúng tôi vẫn nhận thấy có sự xuất hiện của tân mạch giác mạc quanh rìa và chu biên, tuy nhiên các tân mạch này thoái triển và rút dần sau mổ 3 – 6 tháng. Hiện tượng này tương tự với kết quả trong nghiên cứu của Inatomi (2006)[107], Satake (2011)[3], Nakamura (2011)[108]. Các tân mạch này khác với tân mạch xâm nhập từ kết mạc vào giác mạc ở chỗ nó nằm ở dưới biểu mô, ở trước nhu mô và biểu mô vẫn trơn nhẵn, không bắt màu fluorescein, còn các tân mạch do kết mạc xâm nhập gây ra biểu mô gồ ghề không đều, ngấm fluorescein không đồng nhất, vị trí tân mạch nằm ngay ở lớp biểu mô, xâm lấn thay thế biểu mô. Hiện tượng này có thể là do biểu mô giác mạc của bệnh nhân sau mổ có nguồn gốc từ niêm mạc miệng (niêm mạc miệng ở vị trí phía trên của lớp mô liên kết đệm giàu mạch máu) nên có thể chứa các chất phát triển nội mạch.

Giác mạc được đảm bảo tính vô mạch nhờ sự cân bằng của các yếu tố tăng sinh mạch với các yếu tố chống tăng sinh mạch máu. Các yếu tố chống lại sự sinh mạch máu bao gồm: Thrombospondin – 1 (TSP-1), endostatin, tissue inhibitor of metalloproteinase – 3 (TIMP-3), đặc biệt là thụ thể hòa tan 1 của yếu tố phát triển nội mạch (Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 – VEGFr-1). Hoạt động của VEGFr-1 hòa tan là bất giữ và làm bất hoạt màng bao quanh các phân tử VEGF. Để xác định yếu tố chính là thủ phạm gây ra sự xuất hiện tân mạch giác mạc trên mắt đã ghép tằm biểu mô, một số nhà nghiên cứu đã phân tích các yếu tố có liên quan đến việc tăng sinh mạch máu có trong tằm biểu mô nuôi cấy. Kanayama và cộng sự (2009) bằng phương pháp định lượng ELISA đã phát hiện tằm biểu mô niêm mạc miệng và tằm biểu mô giác mạc rìa tiết ra lượng VEGF như nhau, nhưng khối lượng VEGFr-1 hòa tan trong tằm biểu mô niêm mạc miệng thấp hơn rõ rệt so với tằm biểu mô vùng rìa[113]. Chen và cộng sự (2012) cũng sử dụng hiển vi

miễn dịch huỳnh quang đồng tiêu cự để phân tích và thấy rằng có sự vắng mặt của các yếu tố TSP-1, thụ thể kháng VEGF - 1 hòa tan, TIMP - 3 trong biểu mô giác mạc sau ghép. Sự thiếu hụt các yếu tố ức chế sinh tân mạch này góp phần tạo ra tân mạch giác mạc sau mổ[114]. Các tác giả đã đưa ra giải pháp khắc phục hiện tượng này bằng cách sử dụng phối hợp thuốc ức chế phát triển nội mạch (anti-VEGF) như Bevacizumab (Avastin) với phẫu thuật ghép tằm biểu mô để làm tăng hiệu quả điều trị.

Độ trong của tằm biểu mô nuôi cấy

So với tằm biểu mô giác mạc vùng rìa nuôi cấy thì tằm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy mờ hơn, hơi dày hơn và bề mặt kém đồng nhất hơn, có lẽ là do nguồn gốc từ tế bào biểu mô của niêm mạc miệng nên các tế bào nuôi cấy có kích thước lớn hơn biểu mô giác mạc và sắp xếp kém đồng nhất hơn, gây ra hiện tượng tán xạ ánh sáng, do đó làm thị lực bị ảnh hưởng. Trong các nghiên cứu của các tác giả khác, chúng tôi cũng thấy đề cập đến vấn đề này (Nakamura 2011, Ma 2009, Inatomi 2006)[107], [115], [108].

Ngoài ra việc sử dụng màng ối làm chất liệu giá đỡ cũng góp phần làm cho tằm biểu mô kém trong suốt hơn so với các vật liệu khác như fibrin hay màng polymer nhạy cảm nhiệt và sử dụng màng ối thì tằm biểu mô không dính ngay vào nền ghép mà phải khâu cố định nên có thể có tân mạch xâm nhập vào khoảng giữa màng ối với nhu mô giác mạc. Tuy nhiên chúng tôi vẫn lựa chọn màng ối làm giá đỡ trong nghiên cứu vì rất nhiều lợi thế: Màng ối là nguyên liệu sẵn có, dễ thu nhận, bảo quản và xử lý, màng ối có chứa các thành phần quan trọng trong sự biệt hóa, tăng sinh của biểu mô, các yếu tố tăng trưởng, phát triển biểu mô, màng ối có tác dụng chống viêm, kháng khuẩn, không biểu lộ kháng nguyên nên không gây phản ứng miễn dịch. Ngoài ra màng ối giúp cho tằm biểu mô dai, đàn hồi và chun giãn nên thuận tiện cho thao tác dàn trải khi phẫu thuật.

Phân tích các trường hợp cho kết quả xấu

Trong nghiên cứu chúng tôi gặp 6 trường hợp có kết quả xấu, tấm biểu mô bị tiêu hủy hoặc bị tân mạch xâm nhập toàn bộ vào vùng trung tâm giác mạc, tất cả đều trong nhóm nguyên nhân bỏng. Trong đó 2 trường hợp là 2 bệnh nhân có tổn thương toàn bộ chiều dày giác mạc và thủy tinh thể (trường hợp số 1 và 11), 4 trường hợp còn lại là do tấm biểu mô bị dính chặt vào đáy giếng nuôi cấy và rách khi phẫu thuật (trường hợp số 6, 12, 13, 18).

Về trường hợp số 1 và 11, do tác nhân gây bỏng đã ngấm sâu vào trong nhãn cầu gây tổn hại thủy tinh thể phối hợp với tổn thương toàn bộ chiều dày giác mạc (1 ca thủng, 1 ca dọa thủng do loét khó hàn gắn trước đó), chúng tôi phải tiến hành phẫu thuật mổ ghép giác mạc, thay thủy tinh thể và ghép tấm biểu mô. Do phản ứng viêm sau mổ kéo dài dai dẳng đã làm thải loại mảnh ghép giác mạc, tấm biểu mô đã bị tiêu hủy và bị tân mạch từ kết mạc xâm nhập vào giác mạc. Với các trường hợp này, chúng tôi thấy rằng tổn thương xâm lấn quá sâu nên không còn chỉ định cho các phẫu thuật kiến tạo bề mặt nhãn cầu. Vì tình trạng nước mắt chưa nặng tới mức sừng hóa, để cải thiện thị lực, có thể áp dụng phẫu thuật ghép giác mạc nhân tạo loại Kpro Boston type 1, tuy nhiên phải chấp nhận các nguy cơ biến chứng nặng như nhiễm trùng, tăng sinh màng xuất tiết sau vật liệu nhân tạo do phản ứng viêm, tăng nhãn áp do bít vùng bè do viêm, tiêu mô do miễn dịch ở bờ ghép. Bệnh nhân phải theo dõi và dùng thuốc kháng sinh, kháng nấm phòng bội nhiễm suốt đời. Do mắt còn lại của 2 bệnh nhân này tuy cũng bị tổn hại tế bào gốc vùng rìa nhưng giác mạc trung tâm còn trong và thị lực chưa quá kém nên chúng tôi quyết định điều trị bảo tồn, duy trì tình trạng hiện có.

Về 4 trường hợp có tấm biểu mô bị dính khi phẫu thuật cho kết quả xấu, có 2 ca chúng tôi đã tiến hành sinh thiết niêm mạc miệng và phẫu thuật ghép tự thân thành công ở lần thứ 2. Trường hợp số 6 khi làm lần 2 đã cho kết quả

khá, trường hợp số 18 khi làm lần 2 cho kết quả trung bình. Còn lại trường hợp số 12 và 13 chính là tiến hành ghép tấm biểu mô trên cùng 1 mắt của 1 bệnh nhân ở 2 lần khác nhau, cách nhau 2 năm. Ở lần 2, chúng tôi vẫn gặp hiện tượng tấm biểu mô dính chặt vào đáy giếng nuôi cấy và rách khi phẫu thuật. Có thể do niêm mạc miệng của bệnh nhân không đủ chất lượng cho việc nuôi tạo tấm biểu mô. Ngoài ra, bệnh nhân này khô mắt rất nặng, do đó tiên lượng điều trị rất khó khăn cho dù áp dụng bất kỳ phương pháp nào. Để cải thiện thị lực, chỉ còn chỉ định phẫu thuật ghép giác mạc nhân tạo loại Kpro Boston type 2 hoặc ghép giác mạc dùng xương mâm răng (Modified Osteo Odonto Keratoprothesis: MOOKP), tuy nhiên đây là phương pháp can thiệp rất nặng nề, xâm lấn nhiều, có nhiều nguy cơ biến chứng, nếu thất bại sẽ không còn khả năng bảo tồn. Mắt còn lại của bệnh nhân thị lực cũng rất kém, tân mạch giác mạc sâu sau bóng, tổn hại toàn bộ lớp giác mạc, nhưng phim nước mắt tốt hơn, và còn 1 chút ít thị lực, có thể có chỉ định ghép giác mạc nhân tạo loại Kerato Boston type 1. Với bệnh nhân này hiện nay chúng tôi đang cân nhắc và nghĩ tới việc ghép giác mạc nhân tạo ở mắt còn lại của bệnh nhân, với mắt đã mổ ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng chúng tôi quyết định bảo tồn ở tình trạng hiện tại.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trên 15 thỏ thực nghiệm và 20 lượt phẫu thuật cho 12 bệnh nhân rối loạn nặng bề mặt nhãn cầu hai mắt, chúng tôi nhận thấy:

1. Kết quả ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trên mắt thỏ thực nghiệm

Đã góp phần nuôi tạo thành công tấm biểu mô niêm mạc miệng thỏ thực nghiệm, tấm biểu mô thu được có đặc điểm hình thái và cấu trúc mô học tương tự biểu mô giác mạc thỏ bình thường.

Phẫu thuật ghép tự thân tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy thành công cho 15 thỏ. Theo dõi đến 6 tháng, có 14 thỏ đạt kết quả tốt, 1 thỏ đạt kết quả khá. Bề mặt giác mạc trong và ổn định, tấm biểu mô vẫn tồn tại nguyên vẹn và gắn chặt với mô nền của giác mạc qua các thời điểm theo dõi.

2. Kết quả ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trên bệnh nhân

Tấm biểu mô niêm mạc miệng được nuôi cấy thành công trên bệnh nhân với hình thái và cấu trúc siêu vi giống như biểu mô giác mạc bình thường.

Phẫu thuật ghép tự thân tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy thành công ở 14/20 trường hợp (tỷ lệ 70%), trong đó 6/14 ca tốt, 4/14 ca khá, 4/14 ca trung bình. Việc ghép tự thân tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy có tác dụng kiến tạo bề mặt nhãn cầu ổn định cho các bệnh nhân suy giảm tế bào gốc cả 2 mắt, làm giảm viêm và giảm tân mạch giác mạc.

Ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy đã cải thiện cả 3 dấu hiệu cơ năng ở 12/20 trường hợp (60%), cải thiện thị lực nhìn xa cho 13/20 trường hợp (65%), trong đó 9/20 trường hợp (45%) có cải thiện rõ rệt thị lực nhìn gần.

Trong các nhóm nguyên nhân gây bệnh, nhóm bỏng hóa chất cho kết quả kém hơn so với nhóm loạn dưỡng giác mạc dạng giọt gelatin. Ngoài ra các tổn thương biểu mô dai dẳng trước mô và các tổn thương sâu trong nhãn cầu là yếu tố tiên lượng xấu đến kết quả điều trị.

Chất lượng của tâm biểu mô (mức độ dai, khả năng bóc tách khỏi đáy giềng nuôi cấy) cũng có ảnh hưởng đến kết quả phẫu thuật.

Sử dụng kính tiếp xúc và thuốc dinh dưỡng giác mạc liên tục trong thời gian đầu sau mổ có tác dụng giúp cho tâm biểu mô nuôi cấy bám dính và ổn định tốt trên bề mặt giác mạc.

HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP VÀ KIẾN NGHỊ

Tiếp tục nghiên cứu với số lượng bệnh nhân lớn hơn và thời gian theo dõi dài hơn để đánh giá chính xác hơn hiệu quả của phương pháp.

Phối hợp với labo nuôi cấy để tiếp tục nghiên cứu hoàn thiện quy trình nuôi cấy và xây dựng tiêu chuẩn của tấm biểu mô tốt nhất, phù hợp với điều kiện Việt Nam.

Nghiên cứu phối hợp ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy với sử dụng thuốc ức chế phát triển nội mạch (anti-VEGF) với các đối tượng nguy cơ cao và đánh giá kết quả.

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
Chương 1:TỔNG QUAN.....	3
1.1. Cấu tạo và chức năng của bề mặt nhãn cầu và các yếu tố liên quan	3
1.1.1. Mi mắt.....	3
1.1.2. Cấu tạo và chức năng của phim nước mắt.....	3
1.1.3. Cấu trúc và chức năng của kết mạc	4
1.1.4. Biểu mô giác mạc và vùng rìa	5
1.2. Rối loạn bề mặt nhãn cầu.....	7
1.2.1. Chẩn đoán lâm sàng.....	7
1.2.2. Chẩn đoán về cận lâm sàng.....	8
1.2.3. Các nguyên nhân gây rối loạn bề mặt nhãn cầu	9
1.2.4. Các mức độ tổn thương bề mặt nhãn cầu	14
1.3. Điều trị rối loạn bề mặt nhãn cầu.....	15
1.3.1. Điều trị nội khoa	15
1.3.2. Kính tiếp xúc trong điều trị rối loạn bề mặt nhãn cầu	17
1.3.3. Các phẫu thuật bảo vệ bề mặt nhãn cầu.....	17
1.3.4. Các phẫu thuật kiến tạo bề mặt nhãn cầu	18
1.3.5. Ghép giác mạc trong bệnh lý rối loạn bề mặt nhãn cầu	25
1.4. Tắm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy và ứng dụng trong điều trị rối loạn bề mặt nhãn cầu.....	25
1.4.1. Cấu trúc biểu mô niêm mạc miệng.....	25
1.4.2. Các nghiên cứu về kỹ thuật nuôi cấy	27
1.4.3. Ứng dụng của tắm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trong điều trị rối loạn bề mặt nhãn cầu	33
Chương 2:ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	37
2.1. Đối tượng nghiên cứu	37
2.1.1. Nghiên cứu thực nghiệm.....	37
2.1.2. Nghiên cứu trên bệnh nhân.....	37
2.2. Phương pháp nghiên cứu	37
2.2.1. Nghiên cứu thực nghiệm.....	37
2.2.2. Nghiên cứu trên bệnh nhân.....	40

2.3. Mô hình nghiên cứu	48
2.4. Thu thập và phân tích số liệu	49
2.5. Đạo đức nghiên cứu	49
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	50
3.1. Kết quả nghiên cứu trên thực nghiệm.....	50
3.1.1. Đặc điểm thử thực nghiệm.....	50
3.1.2. Đặc điểm tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy	50
3.1.3. Kết quả ghép tự thân tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy cho thử thực nghiệm	56
3.2. Kết quả nghiên cứu trên bệnh nhân	60
3.2.1. Đặc điểm bệnh nhân	60
3.2.2. Kết quả định danh tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy	61
3.2.3. Kết quả ghép tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trên bệnh nhân..	67
Chương 4: BÀN LUẬN.....	76
4.1. Ghép tẩm biểu mô trên thử thực nghiệm	76
4.1.1. Đặc tính của tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trên thử	76
4.1.2. Kết quả ghép tự thân tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy cho thử thực nghiệm	78
4.1.3. Một số kinh nghiệm thu hoạch từ nghiên cứu thực nghiệm.....	80
4.2. Ghép tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trên bệnh nhân	81
4.2.1. Tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy.....	81
4.2.2. Kết quả thu được khi ghép trên bệnh nhân.....	86
4.2.3. Khả năng tồn tại của tẩm biểu mô sau ghép	95
4.2.4. Một số nhược điểm của phẫu thuật ghép tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy	98
KẾT LUẬN	103
HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP VÀ KIẾN NGHỊ.....	105
DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Phân loại các mức độ tổn thương BMNC.....	15
Bảng 2.1. Mức độ kích thích về triệu chứng cơ năng	41
Bảng 3.1. Kết quả phẫu thuật và tình trạng tân mạch giác mạc ở thời điểm theo dõi cuối cùng.....	68
Bảng 3.2. Kết quả cải thiện về các triệu chứng cơ năng và thị lực ở thời điểm theo dõi cuối cùng.....	71
Bảng 4.1. Tỷ lệ thành công của các nghiên cứu ghép tằm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy.....	88

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1. Kết quả thị lực nhìn xa	70
--	----

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Ghép kết mạc rìa tự thân	20
Hình 1.2.	Ghép giác mạc rìa đồng loài.....	21
Hình 1.3.	Ghép tấm biểu mô tế bào gốc vùng rìa nuôi cấy	23
Hình 1.4.	Ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy	24
Hình 1.5.	Niêm mạc vùng giữa má.	26
Hình 3.1.	A. Hình ảnh nhuộm Giemsa của tấm biểu mô nuôi cấy B. Hình ảnh nhuộm H.E. lát cắt đứng dọc của tấm biểu mô nuôi cấy.....	52
Hình 3.2.	Bề mặt tấm biểu mô nuôi cấy dưới hiển vi điện tử quét	53
Hình 3.3.	Liên kết giữa các tế bào của tấm biểu mô nuôi cấy dưới hiển vi điện tử xuyên	53
Hình 3.4.	Tế bào lớp đáy của tấm biểu mô dưới hiển vi điện tử xuyên.....	54
Hình 3.5.	Liên kết giữa tấm biểu mô và màng ối dưới hiển vi điện tử xuyên...	54
Hình 3.6.	A. Hình ảnh nhuộm hóa mô miễn dịch p63 của tấm biểu mô. B. Hình ảnh nhuộm hóa mô miễn dịch K3 của tấm biểu mô.....	55
Hình 3.7.	Hình ảnh nhuộm P.A.S. tấm BM nuôi cấy.....	56
Hình 3.8.	A. Hình ảnh nhuộm H.E. giác mạc thỏ sau ghép 7 ngày B. Hình ảnh nhuộm H.E. giác mạc thỏ sau ghép 15 ngày	57
Hình 3.9.	A. Mắt thỏ sau ghép 30 ngày, kết quả tốt B. Hình ảnh nhuộm H.E. giác mạc thỏ sau ghép	58
Hình 3.10.	A. Mắt thỏ sau ghép 60 ngày, kết quả tốt B. Hình ảnh nhuộm H.E. giác mạc thỏ sau ghép.....	58
Hình 3.11.	A. Mắt thỏ sau ghép 180 ngày, kết quả tốt B. Hình ảnh nhuộm H.E. giác mạc thỏ	59
Hình 3.12.	A. Mắt thỏ sau ghép 60 ngày, kết quả khá B. Hình ảnh nhuộm H.E. giác mạc thỏ	59

Hình 3.13. Hình ảnh hiển vi soi ngược tấm biểu mô niêm mạc miệng.....	62
Hình 3.14. Hình ảnh nhuộm H.E. tấm biểu mô niêm mạc miệng.....	62
Hình 3.15. Hình ảnh hiển vi điện tử quét tấm biểu mô niêm mạc miệng	63
Hình 3.16. Hình ảnh hiển vi điện tử xuyên cấu trúc tế bào bề mặt của tấm biểu mô nuôi cấy	63
Hình 3.17. Hình ảnh hiển vi điện tử xuyên khoảng gian bào ở lớp trên của tấm biểu mô	64
Hình 3.18. Hình ảnh hiển vi điện tử xuyên tế bào lớp đáy của tấm biểu mô	65
Hình 3.19. Hình ảnh nhuộm hóa mô miễn dịch p63 tấm biểu mô niêm mạc miệng	66
Hình 3.20. Hình ảnh nhuộm hóa mô miễn dịch K3 tấm biểu mô niêm mạc miệng	66
Hình 3.21. Hình ảnh kết quả tốt sau phẫu thuật 3 năm	69
Hình 3.22. Hình ảnh kết quả trung bình sau mổ 1 năm.....	69
Hình 3.23. Hình ảnh tân mạch giác mạc rìa sau mổ 1 tháng.....	72
Hình 3.24. Hình ảnh kết quả xấu sau mổ 3 tháng	74
Hình 3.25. Hình ảnh tân mạch vào trung tâm giác mạc	75
Hình 4.1. Hình ảnh nhuộm hóa mô miễn dịch p63 niêm mạc vùng giữa má ...	83
Hình 4.2. Hình ảnh nhuộm H.E. mảnh gọt giác mạc sau ghép 12 tháng	96

20,21,23,24,26,45,48,49,50,51-55,58-62,65,66,68,70,71,79,92

1-19,22,25,27-44,46,47,56,57,63,64,67,69,72-78,80-91,93-106