

## GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

### **Đặt vấn đề**

Bề mặt nhãn cầu (BMNC) đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ nhãn cầu chống lại các tác nhân gây bệnh, đảm bảo cho giác mạc (GM) trong suốt và duy trì chức năng thị giác. Rối loạn BMNC nặng do suy giảm toàn bộ tế bào gốc vùng rìa là một trong những thách thức đối với các nhà nhãn khoa bởi mức độ khó khăn trong điều trị và tiên lượng. Biểu hiện rối loạn BMNC là xâm lấn biểu mô kết mạc, tổ chức xơ và tân mạch vào GM gây giảm thị lực trầm trọng, thường kèm theo các dấu hiệu kích thích cơ năng ảnh hưởng lớn đến chất lượng sống của người bệnh.

Phẫu thuật ghép tế bào gốc tự thân từ tế bào gốc vùng rìa của mắt lành để điều trị cho bệnh nhân có rối loạn BMNC ở 1 mắt là phương pháp tối ưu đã được áp dụng thành công trên thế giới cũng như ở Việt nam. Tuy nhiên không thể áp dụng được phương pháp này với các bệnh nhân bị bệnh ở cả 2 mắt do không còn tế bào gốc. Mặt khác, phương pháp ghép tế bào gốc dị thân đòi hỏi phối hợp thuốc ức chế miễn dịch toàn thân kéo dài để chống thải ghép, nguy cơ tổn hại chức năng gan thận, nhiễm trùng toàn thân và tại chỗ, do đó còn hạn chế trong việc áp dụng.

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 BMNC là giải pháp mới cho điều trị bệnh nhân có rối loạn BMNC ở cả 2 mắt, phương pháp này đã được áp dụng thành công ở nhiều nước phát triển.

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 BMNC ở 2 mắt ở Việt Nam, chúng tôi tiến hành đề tài này với mục tiêu:

- 1. Nghiên cứu phẫu thuật ghép tự thân tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trên thỏ thực 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.***

## **Tính cấp thiết của đề tài**

Rối loạn nặng BMNC do suy giảm toàn bộ tế bào gốc vùng rìa cho tới nay vẫn là thách thức trong nhãn khoa do điều trị và tiên lượng còn rất khó khăn. Các bệnh nhân bị suy giảm toàn bộ tế bào gốc ở 2 mắt nằm trong tình trạng gần như mù lòa do thị lực rất thấp, điều trị ghép tế bào gốc dị thân còn nhiều hạn chế do thải loại miễn dịch và nguy cơ do dùng thuốc ức chế miễn dịch kéo dài. Do đó việc nghiên cứu phương pháp mới để điều trị hiệu quả bệnh lý này là rất cần thiết. Nhờ sự phát triển của công nghệ tế bào gốc, việc sử dụng biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy làm nguồn cung cấp biểu mô cho việc kiến tạo BMNC là giải pháp mới cho điều trị bệnh nhân có rối loạn BMNC ở cả 2 mắt.

## **Những đóng góp mới của luận án**

Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam về ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy điều trị rối loạn nặng BMNC 2 mắt, nghiên cứu trên thực nghiệm và ứng dụng trên bệnh nhân. Với thời gian theo dõi dài nhất sau phẫu thuật đến 62 tháng, nghiên cứu đã chứng minh hiệu quả và độ an toàn của phương pháp trong việc kiến tạo BMNC ổn định, giảm viêm, giảm tân mạch GM, chứng minh tấm biểu mô tồn tại lâu dài và gắn với mô nền GM sau khi ghép.

Nghiên cứu đã cho thấy ưu việt của việc kết hợp nghiên cứu thực nghiệm và lâm sàng. Thành công từ nghiên cứu thực nghiệm là cơ sở khoa học của việc ứng dụng phẫu thuật này trong việc điều trị cho bệnh nhân. Đồng thời nghiên cứu thực nghiệm giúp định hướng, rút kinh nghiệm và hoàn thiện các bước nghiên cứu khi áp dụng trên lâm sàng

## **Bố cục luận án**

Luận án gồm 101 trang: Đặt vấn đề (2 trang), Tổng quan (34 trang), Đối tượng và phương pháp nghiên cứu (10 trang), Kết quả (25 trang), Bàn luận (27 trang), và Kết luận (2 trang), Kiến nghị (1 trang).

Trong luận án có 5 bảng, 1 biểu đồ, 32 hình, phụ lục. Có 115 tài liệu tham khảo, trong đó 3 tiếng Việt, 112 tiếng Anh.

## Chương 1. TỔNG QUAN

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

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.

- *Mi mắt*: có vai trò bảo vệ nhãn cầu, dàn đều phim nước mắt
- *Phim nước mắt*: từ ngoài vào gồm 3 lớp lipid, nước, mucin.

Phim nước mắt có tác dụng bôi trơn, cung cấp chất dinh dưỡng, duy trì áp suất thẩm thấu, ổn định khúc xạ bề mặt của giác mạc

- *Biểu mô kết mạc (KM)*: chứa các vi nhung mao giúp gắn kết glycocalyx, tế bào đài chế tiết mucin, tuyến lệ phụ tiết nước, lớp đệm chứa lympho bào.

- *Biểu mô vùng rìa*: chứa tế bào gốc là thành phần quan trọng có vai trò tăng sinh và biệt hóa biểu mô, ngăn chặn kết mạc xâm nhập vào giác mạc

- *Biểu mô giác mạc (GM)*: gồm 5-7 hàng tế bào lát tầng không sừng hóa, trong suốt. Trong đó: lớp tế bào bề mặt biệt hóa cao, chứa nhiều vi nhung mao gắn mucin, lớp đáy hình trụ đơn có khả năng phân chia, màng đáy giúp biểu mô di cư, phân tầng trật tự và liên tục

### 1.2. Rối loạn bề mặt nhãn cầu

#### 1.2.1. Chẩn đoán lâm sàng rối loạn BMNC

Mất ổn định BMNC biểu hiện tùy theo mức độ tổn hại tế bào gốc. Khi toàn bộ tế bào gốc tổn thương sẽ xuất hiện rối loạn nặng BMNC.

✓ **Cơ năng:** giảm thị lực, sợ ánh sáng, chảy nước mắt, co quắp mi và tiền sử viêm mạn tính ở mắt

✓ **Thực thể**

- Rối loạn mi, tuyến Meibomius, khô mắt  
- Hiện tượng “kết mạc hóa giác mạc”, mất cấu trúc giải phẫu của vùng rìa

- Biểu mô GM không đều, có thể xuất hiện tróc biểu mô tái phát, hoặc khuyết biểu mô dai dẳng, đôi khi nhuyễn hoại tử GM

- Tân mạch và sẹo đục GM

- Giai đoạn muộn có thể xuất hiện sùng hóa BMNC

### 1.2.2. Chẩn đoán cận lâm sàng

Có vai trò hỗ trợ chẩn đoán và xác định các mức độ tổn thương của bệnh

- Test áp tế bào, sinh thiết KM, chất nạo BMNC

- Đo liềm nước mắt, đo áp suất thẩm thấu của phim nước mắt bằng máy giao thoa

- Chụp Meibography, soi hiển vi đồng tiêu cự

- Test nhanh xác định dấu ấn của phản ứng viêm

- Máy đo cảm giác GM

### 1.2.3. Các nguyên nhân gây rối loạn BMNC

- Viêm bờ mi kéo dài

- Khô mắt nặng

- Viêm kết mạc dị ứng

- Mộng và tân sản biểu mô BMNC

- Rối loạn dinh dưỡng biểu mô

- Bỏng hóa chất hoặc bỏng nhiệt

- Tổn hại tế bào gốc bẩm sinh: dị tật không có móng mắt, loạn dưỡng GM dạng giọt gelatin, viêm GM kèm thiếu năng nội tiết, cứng mạc hóa GM

- Rối loạn BMNC do các bệnh tự miễn: pemphigoid, dị ứng thuốc, viêm khớp dạng thấp

- Tổn hại tế bào gốc do liên quan đến điều trị (do 1 số thuốc hoặc phẫu thuật nhiều lần ở vùng rìa).

#### 1.2.4. Phân loại các mức độ tổn thương BMNC

**Bảng 1.1. Phân loại các mức độ tổn thương BMNC**

	<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 tế bào gốc (mức I-nhẹ)</i>	Bệnh GM do KTX, suy giảm tế bào gốc có liên quan điều trị, tăng sản nội BM (Ia)	Bông cũ (Ib)	Dị ứng thuốc hoặc pemphigoid nhẹ, bông mới (Ic)
<i>Thiếu hụt toàn bộ tế bào gốc (mức II-nặng)</i>	Dị tật không có MM, bệnh GM do KTX nặng, suy giảm tế bào gốc có liên quan điều trị (IIa)	Bông cũ nặng (IIb)	Dị ứng thuốc hoặc pemphigoid nặng, bông mới nặng (IIc)

Mức độ suy giảm tế bào gốc vùng rìa và tình trạng viêm KM 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.

### **1.3. Điều trị rối loạn BMNC**

**1.3.1. Nội khoa:** điều trị tại mắt và toàn thân, bao gồm kiểm soát tình trạng viêm, tăng cường dinh dưỡng thúc đẩy hàn gắn biểu mô. Điều trị nội khoa làm cải thiện tình trạng BMNC, duy trì, tăng hiệu quả phẫu thuật, tránh phẫu thuật không cần thiết

**1.3.2. Kính tiếp xúc (KTX):** có tác dụng giảm đau, tăng liền biểu mô trong 1 số trường hợp tróc biểu mô tái phát, loét biểu mô dai dẳng.

**1.3.3. Phẫu thuật bảo vệ BMNC:** nạo biểu mô, gọt GM, đóng điểm lệ, cò mi áp dụng trong 1 số trường hợp

**1.3.4. Phẫu thuật kiến tạo BMNC:** Các bệnh nhân có tổn hại trầm trọng tế bào gốc khi đã điều trị nội khoa qua giai đoạn viêm cấp, tùy mức độ tổn thương có thể lựa chọn loại phẫu thuật kiến tạo BMNC phù hợp.

- Ghép màng ối áp dụng trong trường hợp cần che phủ hoặc hàn gắn bề mặt như tách dính mi cầu, loét khó hàn gắn, bong cấp, dị ứng thuốc cấp. Nhược điểm là do chỉ là chất nền ko thay thế được biểu mô, vì vậy quá trình biểu mô hóa khó khăn, dễ bị xâm nhập xơ mạch vào GM.

- Ghép tự thân KM rìa (CLAU) hoặc tấm biểu mô GM vùng rìa nuôi cấy từ mắt lành (Auto-CLET) là phương pháp cho hiệu quả cao và an toàn nhưng chỉ áp dụng được cho những bệnh nhân bị rối loạn BMNC ở 1 mắt

- Với bệnh nhân bị rối loạn BMNC nặng do suy giảm tế bào gốc ở 2 mắt, có thể ghép KM rìa(Lr-CLAL)/ tấm biểu mô vùng rìa nuôi cấy đồng loài (Lr-CLET) từ người đồng huyết thống hoặc từ vành GM hiến

(KLAL), phương pháp này còn nhiều khó khăn do vấn đề thải loại miễn dịch và nguy cơ do dùng thuốc ức chế miễn dịch toàn thân kéo dài

#### **1.4. Tắm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy và ứng dụng trong điều trị rối loạn BMNC**

**1.4.1. Cấu trúc biểu mô niêm mạc miệng:** các nghiên cứu mô học chỉ ra rằng niêm mạc miệng có nguồn gốc từ ngoại bì, lát tầng không sừng hóa, lớp đáy có khả năng phân chia, tế bào gốc nằm ở lớp đáy (đỉnh như chân bì).

##### **1.4.2. Các nghiên cứu về kỹ thuật nuôi cấy**

Sự phát triển mạnh mẽ của công nghệ nuôi cấy tế bào và ứng dụng thành tựu của y học tái tạo cho phép nuôi tạo tắm biểu mô từ biểu mô niêm mạc miệng. Tắm biểu mô nuôi cấy có cấu trúc mô học, chức năng tương đồng với biểu mô GM.

**1.4.3. Ứng dụng của tắm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trong điều trị rối loạn BMNC:** Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu trên thực nghiệm cũng như trên bệnh nhân về ghép tắm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy để điều trị rối loạn BMNC hai mắt (COMET).

- Nakamura (2003), Hayashida (2005) thành công trên thỏ gây bông.

- Nishida (2004), Inatomi (2006), Chen (2009), Nakamura (2011), Satake (2011), Kocaba (2014) đã thực hiện thành công trên bệnh nhân, thời gian theo dõi 14 đến 55 tháng, với cỡ mẫu 4 – 40 ca.

- Kết quả chung: Tắm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy có khả năng tồn tại và giúp duy trì ổn định BMNC sau thời gian khá dài, là giải pháp an toàn, hiệu quả cho điều trị bệnh lý rối loạn BMNC nặng ở 2 mắt.

## Chương 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. *Nghiên cứu thực nghiệm*: 15 thỏ khỏe,  $2 \pm 0.2$  kg, nuôi cùng điều kiện phòng thí nghiệm tại Bộ môn Mô – phôi, Đại học Y Hà Nội

2.1.2. *Nghiên cứu trên bệnh nhân*: 12 bệnh nhân rối loạn BMNC nặng 2 mắt điều trị tại khoa Kết giác mạc – Bệnh viện Mắt Trung Ương 1/2009 - 6/2014.

○ *Tiêu chuẩn lựa chọn*: suy giảm toàn bộ tế bào gốc 2 mắt, xơ mạch GM toàn bộ, không nhiễm trùng, đã qua giai đoạn viêm cấp.

○ *Tiêu chuẩn loại trừ*: Bất thường mi, khô mắt nặng đến mức sàng hóa BMNC, không hợp tác nghiên cứu.

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. *Nghiên cứu thực nghiệm*: 15 thỏ chia 5 lô ngẫu nhiên

○ *Thiết kế*: Nghiên cứu thực nghiệm, thực hiện tại Bộ môn Mô phôi - ĐHYHN.

○ *Các bước*:

– Gây bỏng mắt thỏ

– Sau 2 tuần sinh thiết niêm mạc miệng thỏ (đường kính 3mm), nuôi tạo 2 tấm biểu mô

– 1 tấm định danh, 1 tấm ghép tự thân cho thỏ

– Đánh giá đại thể, vi thể GM thỏ sau mổ: 7, 15, 30, 60, 180 ngày

2.2.2. *Nghiên cứu trên bệnh nhân*:

○ *Thiết kế*: thử nghiệm lâm sàng, tiến cứu, thực hiện tại Bệnh viện Mắt TW

○ *Các bước*:

– Đánh giá bệnh nhân trước mổ: mức độ kích thích cơ năng, thị lực, nhãn áp, tình trạng BMNC. Điều trị trước mổ: chống viêm, dinh dưỡng, điều trị mi, phẫu thuật tách dính



- Sinh thiết niêm mạc miệng (3mm), nuôi tạo 2 tấm biểu mô
- 1 tấm định danh, 1 tấm ghép tự thân cho bệnh nhân
- Đánh giá tình trạng mắt sau phẫu thuật: 2 ngày/lần trong 2 tuần đầu, hàng tuần trong 1 tháng, 2 tuần/ lần trong 2 tháng, sau đó 1 tháng/lần.

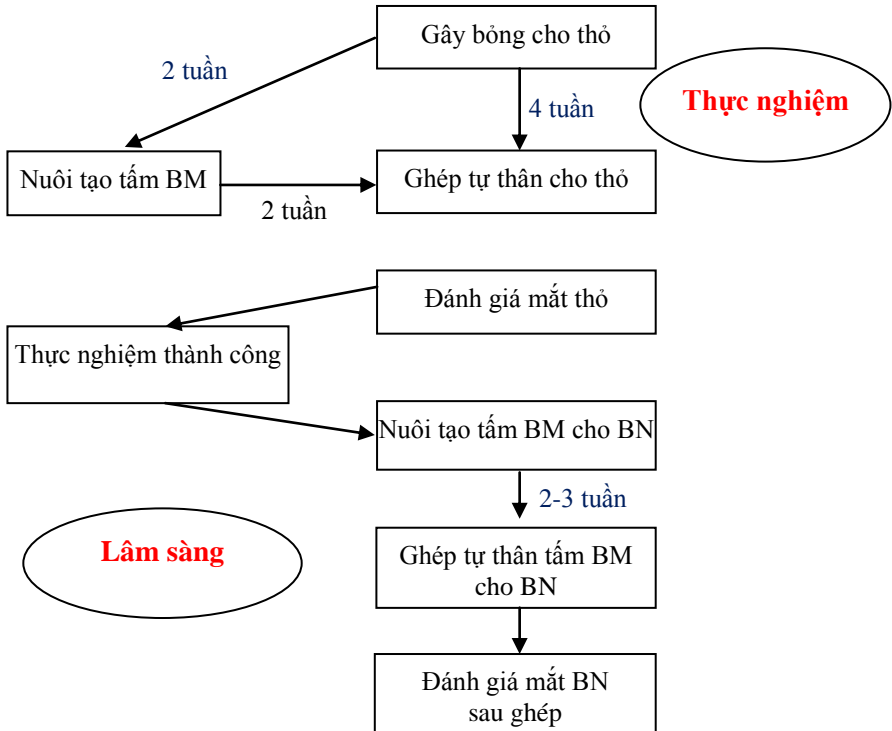
*Tiêu chí đánh giá chất lượng tấm biểu mô nuôi cấy:* Các tiêu chí về đại thể, cấu trúc vi thể và siêu vi của tấm biểu mô

*Tiêu chí đánh giá kết quả phẫu thuật:* Cải thiện triệu chứng cơ năng, thị lực, tình trạng biểu mô BMNC

### 2.3. Thu thập và phân tích số liệu

Mẫu bệnh án, ảnh chụp tổn thương GM và BMNC, hình ảnh lâm sàng và mô học, video phẫu thuật.

### 2.4. Mô hình nghiên cứu



## 2.5. Đạo đức nghiên cứu

Là 1 phần nội dung Đề tài cấp Nhà nước “Nghiên cứu quy trình sử dụng tế bào gốc để điều trị một số bệnh của bề mặt nhãn cầu”, mã số ĐTĐL.2010T/15 thuộc Bộ môn Mô-phôi ĐHYHN, đã được Hội đồng đạo đức của trường ĐHYHN chấp thuận (số 77/HĐĐĐ – YHN).

## Chương 3. KẾT QUẢ

### 3.1. Kết quả trên thỏ thực nghiệm

**3.1.1. Đặc điểm thỏ thực nghiệm:** cả 15 thỏ đều sống trong suốt quá trình nghiên cứu.

#### 3.1.2. Kết quả định danh tấm biểu mô nuôi cấy

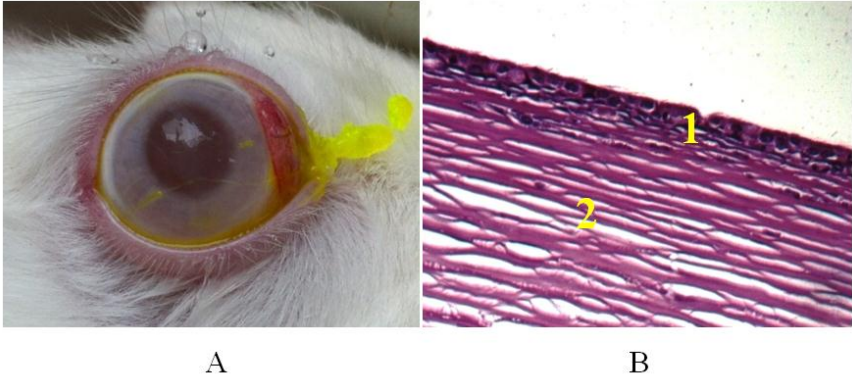
✓ *Hình ảnh mô học:* Tấm biểu mô phẳng, có 4-5 hàng tế bào đa diện đều nhau, lớp đáy hình trụ nhân lớn, bào quan phát triển, các lớp trên dẹt dần, lớp trên cùng vẫn còn nhân, bề mặt chứa nhiều vi nhung mao. Các tế bào liên kết với nhau bằng thể liên kết, liên kết với màng ôi bằng thể bán liên kết.

✓ *Hóa mô miễn dịch:* hiện diện p63 ở nhân lớp đáy, K3 ở lớp trên, không có tế bào đài.

#### 3.1.3. Kết quả ghép tấm biểu mô trên thỏ thực nghiệm

✓ *Lâm sàng:* 14/15 thỏ có tấm biểu mô áp tốt, trong, BMNC nhãn, không có tân mạch GM; 1 thỏ có tân mạch vào 1 phần chu biên GM.

✓ *Mô học GM thỏ:* Sau 6 tháng, tấm biểu mô tồn tại nguyên vẹn, áp chặt nhu mô, tế bào sắp xếp đều đặn, lớp trên cùng còn nhân, không sừng hóa.



**Hình 3.11. Mắt thỏ có kết quả phẫu thuật tốt sau 180 ngày**

A. Hình đại thể của mắt thỏ: GM trong, Fluorescein (-)

B. Cấu trúc vi thể của GM thỏ (nhuộm H.E.): 1. Lớp biểu mô lát tầng gồm 4-5 hàng tế bào, áp chặt vào nhu mô; 2. Lớp nhu mô không có thâm nhiễm tế bào viêm.

### 3.2. Kết quả trên bệnh nhân

#### 3.2.1. Đặc điểm bệnh nhân nghiên cứu

○ Tuổi trung bình: 26,2 tuổi (12 – 57 tuổi)

○ Thị lực xa: 95% < ĐNT 1m; thị lực gần (-)

○ Nguyên nhân bệnh: 3 bệnh nhân loạn dưỡng GM giọt gelatin và 9 bệnh nhân bong hóa chất 2 mắt.

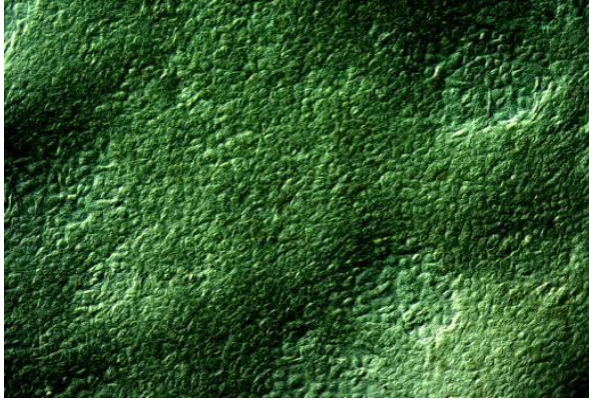
○ Tổng số 20 lượt phẫu thuật, thực hiện ở 17 mắt của 12 bệnh nhân (10 nam, 2 nữ), trong đó 5 bệnh nhân được mổ 2 mắt, 3 mắt được mổ 2 lần.

○ Thời gian theo dõi trung bình: 18,95 tháng (12 – 62 tháng)

### 3.2.2. Kết quả định danh tằm biểu mô nuôi cấy

○ *Mô học*: 4-5 hàng tế bào đa diện lát tầng. Lớp đáy nhân lớn, bào quan phát triển, lớp trên dẹt dần, lớp trên cùng vẫn còn nhân, nhiều vi nhung mao ngắn bề mặt. Có thể liên kết giữa các tế bào, thể bán liên kết giữa tế bào và giá đỡ.

○ *Hóa mô miễn dịch*: hiện diện p63 ở nhân lớp đáy, K3 ở lớp trên



**Hình 3.13. Tằm biểu mô niêm mạc miệng BN Nguyễn Hữu C.**  
(KHV soi ngược x 250)



**Hình 3.14. Tằm biểu mô niêm mạc miệng BN Phạm Ngọc T.**  
(HE x 500)

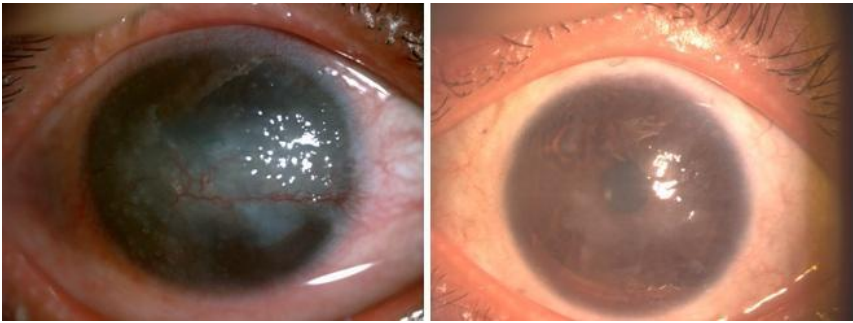
1. Biểu mô      2. Màng ối

### 3.2.3. *Kết quả ghép tâm biểu mô trên bệnh nhân*

✓ Sau sinh thiết, niêm mạc miệng liền tốt, sẹo nhỏ và mịn. Không có biến chứng trong và sau quá trình sinh thiết.

✓ Không có biến chứng trong và sau phẫu thuật ghép tâm biểu mô.

✓ Tỷ lệ thành công là 14/20 (70%): Kết quả tốt 6/20 (30%), khá 4/20 (20%), trung bình 4/20 (20%). Tỷ lệ thất bại cho kết quả xấu là 6/20 (30%).



**A**

**B**

**Hình 3.21. Mắt bệnh nhân có kết quả tốt sau phẫu thuật 3 năm**

A. Trước mổ: biểu mô GM gồ ghề, màng xơ và tân mạch xâm lấn toàn bộ vùng rìa 360 vào đến trung tâm GM.

B. Sau mổ 3 năm: GM trong, biểu mô nhẵn, không có tân mạch.

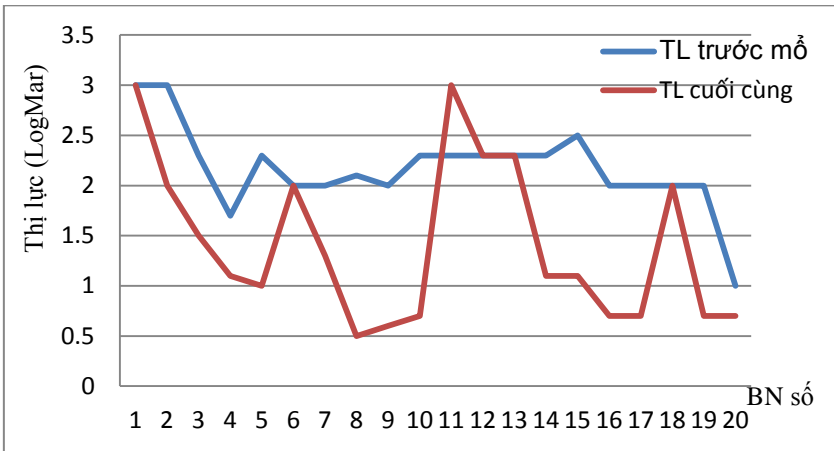
✓ *Kết quả cải thiện các triệu chứng cơ năng*

Có 12 trường hợp (60%) cải thiện cả 3 triệu chứng cơ năng sau phẫu thuật, bệnh nhân giảm và hết các triệu chứng chói sợ ánh sáng, cảm giác khô mắt, cảm giác đau. Có 1 trường hợp cải thiện 2 triệu chứng, 2 trường hợp cải thiện 1 triệu chứng. Không có trường hợp nào thấy triệu chứng cơ năng nặng hơn.

✓ *Kết quả thị lực*

- *Nhìn xa*: 14/20 ca (70%) thị lực tăng, trong đó 13 ca tăng rõ rệt.
- 7/20 ca thị lực tăng trên 2 hàng, thị lực cao nhất là 20/60
- Thị lực trước mổ + 2,17, sau mổ +1,415 (logMAR): mức cải thiện - 0,755

- 9/20 trường hợp *cải thiện thị lực gần*



**Biểu đồ 3.1. Kết quả thị lực nhìn xa**

✓ *Diễn biến tình trạng bề mặt nhãn cầu sau phẫu thuật*

Ở các mắt thành công: trong 1 tháng đầu đều có tân mạch nhỏ nằm ở lớp nông dưới biểu mô, chỉ dừng ở quanh rìa hoặc chu biên, thoái triển và rút dần sau 3-6 tháng.

✓ *Kết quả chung của nghiên cứu*: 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

✓ *Biến chứng của phẫu thuật:*

- Không có biến chứng xảy ra trong suốt quá trình nghiên cứu
- 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

✓ *Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả phẫu thuật*

- Nguyên nhân bệnh: nhóm loạn dưỡng cho kết quả tốt hơn nhóm bong.

- Tổn thương phối hợp: các trường hợp có tổn thương biểu mô dai dẳng, tổn thương phối hợp trong nhãn cầu cho kết quả kém.

- Quy trình phẫu thuật và chăm sóc sau mổ có ảnh hưởng đến kết quả phẫu thuật.

- Chất lượng tẩm biểu mô nuôi cấy: các trường hợp tẩm biểu mô bị dính chặt vào đáy giếng nuôi cấy và rách khi phẫu thuật cho kết quả xấu.

## **Chương 4. BÀN LUẬN**

### **4.1. Ghép tự thân tẩm biểu mô trên thỏ thực nghiệm**

#### **4.1.1. Đặc điểm tẩm biểu mô nuôi cấy**

- Mô học: tẩm biểu mô có hình thái tương đồng với biểu mô GM, lớp trên cùng vẫn còn nhân, thể hiện đặc tính không sừng hóa. Lớp tế bào đáy hình trụ có nhân lớn, bào quan phát triển. Các vi nhung mao

giúp tăng diện tích tiếp xúc bề mặt, tăng lưu giữ nước mắt. Thê liên kết gắn kết chặt chẽ giữa các tế bào với nhau tạo nên hàng rào bảo vệ của biểu mô, thê bán liên kết gắn chặt tế bào với giá đỡ giúp tấm biểu mô bám dính tốt.

○ Hóa mô miễn dịch: Hiện diện p63 ở lớp đáy thê hiện đặc tính tế bào gốc, đảm bảo khả năng tái sinh của biểu mô sau ghép

#### ***4.1.2. Kết quả ghép tự thân tấm biểu mô trên thỏ thực nghiệm***

Về lâm sàng, tất cả các thỏ đều có GM trong và ổn định sau mổ. Kết quả sinh thiết GM thỏ ở các thời điểm đã xác định tình trạng tấm biểu mô nuôi cấy sau ghép: Sau 6 tháng, tấm biểu mô vẫn tồn tại nguyên vẹn, áp chặt nhu mô, tế bào sắp xếp đều đặn, lớp trên cùng còn nhân, không sừng hóa. Kết quả của chúng tôi tương tự với nghiên cứu của Nakamura (2003) và Hayashida (2005)

#### ***4.1.3. Kinh nghiệm thu hoạch từ nghiên cứu thực nghiệm***

○ Hoàn thiện kỹ năng phẫu thuật, loại bỏ tối đa các yếu tố ảnh hưởng tới sự thành công của phẫu thuật.

○ Kinh nghiệm khi áp dụng trên lâm sàng: Nghiên cứu trên thỏ thuận lợi hơn do gây bông cho thỏ chủ động ở bề mặt: phản ứng viêm ít, không tổn hại phim nước mắt, vì vậy khi áp dụng trên bệnh nhân cần lưu ý bổ sung thuốc dinh dưỡng và chống viêm. Ngoài ra thỏ có mí phụ có tác dụng bảo vệ rất tốt cho BMNC, khi tiến hành phẫu thuật trên bệnh nhân cần sử dụng kính tiếp xúc lâu dài.

○ Hình ảnh mô học GM thỏ chứng tỏ sự tồn tại của tấm biểu mô sau ghép qua thời gian.



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

## **4.2. Kết quả trên bệnh nhân**

**4.2.1. Vị trí và kích thước vùng sinh thiết:** trung tâm niêm mạc má: niêm mạc dày, nhú chân bì rõ, nhân tế bào đáy có độ hiện diện p63 cao. 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. Đường kính sinh thiết 3 mm: Sinh thiết không đau, nhanh liền, lấy được nhiều lần.

### **4.2.2. Đặc điểm của tấm biểu mô nuôi cấy**

○ *Mô học* tương đồng với biểu mô GM, lớp trên cùng vẫn còn nhân, thể hiện đặc tính không sừng hóa. Các vi nhung mao giúp tăng diện tích tiếp xúc bề mặt, làm tăng lưu giữ nước mắt. Thể bán liên kết gắn kết chặt chẽ giữa các tế bào với nhau tạo hàng rào bảo vệ biểu mô, thể bán liên kết gắn chặt tế bào với giá đỡ giúp tấm biểu mô bám dính tốt. *Hóa mô miễn dịch:* có hiện diện p63 ở nhân lớp đáy thể hiện đặc tính gốc, K3 ở lớp trên thể hiện đặc tính của biểu mô GM biệt hóa. Như vậy tấm biểu mô chứa cả tế bào gốc lẫn tế bào trưởng thành, đảm bảo chức năng giữ ổn định BMNC và khả năng tái sinh bền vững của biểu mô sau ghép qua thời gian. Kết quả này tương tự với:

- Madhira (2008): 2-3 hàng tế bào ko sừng hóa, chứa thể liên kết, bán liên kết, có hiện diện p63 ở lớp đáy, K3 ở các lớp trên.
- Sen (2011): Tấm biểu mô lát tầng ko sừng hóa, chứa thể liên kết, bán liên kết. Có hiện diện p63, K3, đặc biệt là các hạt mucin trong

tế bào: MUC gắn màng 1,13,15,16, MUC tạo keo 5B,6, làm cải thiện tình trạng khô mắt.

- Klingbeli (2010): có hiện diện pAkt và PTEN (protein chống ung thư), ko có p53 và MDM2 (protein gây ung thư). Điều này thể hiện độ an toàn và không làm xuất hiện tế bào đột biến khi nuôi cấy.

#### **4.2.3. Đặc điểm bệnh nhân nghiên cứu**

- Đối tượng bệnh nhân còn trẻ, tuổi trung bình: 26,2 (12 – 57 tuổi), nhu cầu học tập và lao động cao, có cả 2 mắt cùng bị bệnh, lại có thị lực rất thấp, gần như mù lòa: thị lực xa: 95% < ĐNT 1m; thị lực gần (-) thì việc tìm giải pháp để nâng cao thị lực cho bệnh nhân là rất cần thiết.

- 2 nhóm nguyên nhân bệnh chính là loạn dưỡng GM giọt gelatin (3 bệnh nhân) và bông hóa chất (9 bệnh nhân): phù hợp với đặc điểm về tuổi bệnh nhân.

#### **4.2.4. Hiệu quả của phẫu thuật ghép tấm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy**

- ✓ Cải thiện các triệu chứng cơ năng: 12/20 ca cải thiện cả 3 triệu chứng, 1 ca cải thiện 2 triệu chứng, 2 ca cải thiện 1 triệu chứng. Kết quả tương tự với Burillon (2012) và Kocaba (2014). Giảm kích thích cơ năng giúp cải thiện chất lượng cuộc sống, giảm phản ứng viêm bề mặt, làm ổn định BMNC.

- ✓ Thị lực: tuy không phải là mục tiêu chính trong điều trị rối loạn BMNC nặng, phẫu thuật vẫn có khả năng làm tăng thị lực trong trường hợp bệnh lý tổn thương ở lớp biểu mô và nhu mô nông. Với các trường hợp đục nhu mô sâu, tấm biểu mô có vai trò kiến tạo bề mặt ổn

định, giảm tân mạch để tạo thuận lợi cho ghép quang học thị 2 nhằm tăng thị lực. Ở nhóm nghiên cứu của chúng tôi, thị lực nhìn xa được tăng đáng kể, sau mổ có 14 ca tăng thị lực, trong đó 13 ca tăng rõ rệt (đạt tỷ lệ 70%). Có 7 ca 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. Nghiên cứu của Sotozono (2013) và Kocaba (2014) cũng cho kết quả tương tự.

✓ Đặc biệt, có 9 ca cải thiện rõ rệt thị lực nhìn gần. Điều này có ý nghĩa hết sức quan trọng vì đa số bệnh nhân trẻ và nhu cầu học tập lao động cao, quá trình điều trị đưa từ trạng thái gần như mù lòa tới 1 mức thị lực nhất định cho dù ít ỏi cũng làm tăng đáng kể chất lượng cuộc sống của người bệnh.

✓ Diễn biến tình trạng bề mặt nhãn cầu sau phẫu thuật: Ở các mắt thành công: trong 1 tháng đầu đều có tân mạch nhỏ nằm ở lớp nông dưới biểu mô, chỉ dừng ở quanh rìa hoặc chu biên, thoái triển và rút dần sau 3-6 tháng. Kết quả này tương tự với Inatomi (2006), Satake (2011), Nakamura (2011), điều này có thể được giải thích là do biểu mô giác mạc của bệnh nhân sau mổ có nguồn gốc từ niêm mạc miệng nên có thể chứa các yếu tố phát triển nội mạch.

✓ Tổng hợp và so sánh, kết quả chung của chúng tôi tương đối khả quan so với các tác giả khác trên thế giới với số lượng đủ lớn và thời gian theo dõi tương đối dài.

**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
<i>Inatomi (2006)</i>	67%	20 tháng	15
<i>Nakamura (2011)</i>	79%	55 tháng	19
<i>Satake (2011)</i>	64,8% sau 1 năm 59% sau 2 năm	25,5 tháng	40
<i>Burillon (2012)</i>	64%	360 ngày	26
<i>Sotozono (2013)</i>	48%	28,7 tháng	46
<i>Kocaba (2014)</i>	62,5%	28 tháng	26
<i>N T T Thủy (2016)</i>	70%	18,95 tháng	20

✓ *Ưu điểm của phương pháp:*

○ *Độ an toàn*

- Ghép tự thân: không gặp vấn đề về miễn dịch, không cần dùng thuốc ức chế miễn dịch. Thời gian dùng corticoid ngắn hơn, giảm biến chứng (tăng nhãn áp, bội nhiễm)

- Nguồn nguyên liệu dồi dào, diện tích thiết nhỏ, phẫu thuật thực hiện đơn thuần ở lớp bề mặt: ít xâm lấn và dễ thực hiện. Như vậy đây là phương pháp an toàn, có thể nhắc lại

✓ *Khả năng tồn tại của tằm biểu mô sau ghép*

Trong nghiên cứu có 14 trường hợp BMNC vẫn ổn định, ko bị tân mạch và KM xâm nhập đến thời điểm cuối cùng 12-62 tháng. điều này chứng tỏ sự hiện diện của tế bào gốc trong biểu mô GM sau ghép, do đó biểu mô GM được tiếp tục tự đổi mới 1 cách hằng định qua thời gian dài, tránh được KM hoá, điều này cũng phù hợp với kết quả định danh tằm biểu mô bằng hóa mô miễn dịch thấy có sự hiện diện của p63, thể hiện đặc tính của tế bào gốc trong tằm biểu mô. Các nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh sự tồn tại lâu dài của biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy sau ghép: Chen (2009) sau 10-22 tháng, Kocaba (2014) sau 28 tháng: định danh mảnh GM sau phẫu thuật khi ghép GM quang học thì 2: tằm biểu mô vẫn tồn tại nguyên vẹn, có hiện diện p63

✓ *Nhược điểm của phương pháp:*

○ Tân mạch rìa GM sau ghép: do hoạt động của yếu tố phát triển nội mạch tồn tại trong tằm biểu mô, do vậy ý tưởng phối hợp anti-VEGF với phẫu thuật được một số tác giả đề xuất

○ So với tằm biểu mô vùng rìa nuôi cấy thì tằm biểu mô niêm mạc miệng mờ, dày và kém đồng nhất hơn, có thể là do giá đỡ màng ôi và nguồn gốc từ niêm mạc miệng nên các tế bào nuôi cấy có kích thước lớn hơn, sắp xếp kém đồng nhất hơn, gây ra hiện tượng tán xạ ánh sáng, ảnh hưởng đến thị lực. Trong nghiên cứu của Nakamura (2011), Ma (2009), Inatomi (2006), chúng tôi cũng thấy đề cập đến vấn đề này

✓ *Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả phẫu thuật*

○ *Nguyên nhân bệnh:* kết quả nhóm loạn dưỡng tốt hơn nhóm bông (do mức độ sâu của tổn thương, tình trạng tổn hại phim nước mắt khác nhau)

○ *Tổn thương phối hợp*: tổn thương biểu mô dai dẳng, tổn thương phối hợp trong nhãn cầu có kết quả kém – Satake (2011) cũng cho kết quả tương tự

○ *Quy trình phẫu thuật* (gọt nền ghép nhãn, tránh tổn thương tẩm biểu mô trong phẫu thuật) và *chăm sóc sau mổ* (tra thuốc dinh dưỡng liên tục, kính tiếp xúc kéo dài) giúp tẩm biểu mô ổn định tốt.

○ *Chất lượng tẩm biểu mô nuôi cấy*: mức độ dai và đàn hồi của lớp giá đỡ, khả năng tách rời khỏi đáy giếng khi phẫu thuật đem lại thành công cao hơn

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu ghép tẩm 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 tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trên mắt thỏ thực nghiệm**

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

Đã ghép tự thân tẩm 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, tẩm 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 tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy trên bệnh nhân**

Đã góp phần nuôi tạo thành công tẩm biểu mô niêm mạc miệng trên bệnh nhân, tẩm biểu mô thu được có hình thái và cấu trúc siêu vi giống như biểu mô giác mạc bình thường.

Phẫu thuật ghép tự thân tẩm biểu mô niêm mạc miệng nuôi cấy đạt tỷ lệ 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 tẩm 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 tẩm 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 bong 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 mổ và các tổn thương sâu trong nhãn cầu là yếu tố tiên lượng xấu đến kết quả điều trị.

Chất lượng của tẩm biểu mô (mức độ dai, khả năng bóc tách khỏi đáy giếng 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 tẩm biểu mô nuôi cấy bám dính và ổn định tốt trên bề mặt giác mạc.

## **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.



## ABOUT THE THESIS

### Introduction

Ocular surface (OS) plays an important role in protecting against ocular pathogens, ensuring the transparency of the cornea and maintain visual function. Severe ocular surface disorder (OSD) due to total limbal stem cell deficiency is one of the challenges for an ophthalmologist by the difficulty in treatment and prognosis. OSD manifestation is invasion of conjunctival epithelium, fibrosis and neovascularization over cornea cause severe vision loss, often accompanied by signs of discomfort and significant impact on patient's quality of life.

Autologous limbal stem cell transplantation from the healthy eye to the opposite eye affected to treat unilaterally OSD patients has been applied successfully in the world as well as in Vietnam. But it could not be applied to the bilateral OSD patients with no stem cells. On the other hand, allograft stem cell transplantation method itself requires long term systemic immunosuppressive therapy, and take the risk of kidney damage, decrease liver function, risk of systemic infection.

Along with the development of cell culture technology, the use of cultured oral mucosa epithelial cells as new source supplies of epithelial for the treatment of patients OSD in both eyes, this method has been successfully applied in many developed countries.

Wishing to apply grafting cultured oral mucosal epithelial sheets to treat patients with bilateral OSD in Vietnam, we conducted this research with the aim of:

1. *Research autologous cultured oral mucosal epithelial transplantation in experimental rabbits.*
2. *Evaluation initial results of autologous cultured oral mucosal epithelial transplantation in patients with bilateral severe ocular surface disorders.*

## **The necessary of research**

Severe ocular surface disorder due to total limbal stem cell deficiency so far remains a challenge in ophthalmology because the treatment and prognosis are still very difficult. Patients with total stem cells damage are in a blind state due to low vision. Allograft stem cell transplantation is limited by immune rejection and the risk due to the use long term immunosuppressive drugs. Thus the study of new methods to effectively treat this disease are essential. With the development of stem cell technology, cultured oral mucosal epithelial sheets supplies epithelial sources for the treatment of patients with bilateral ocular surface disorders.

## **New contributions of the thesis**

This is the first study in Vietnam on cultured oral mucosa epithelial transplantation for treatment bilateral severe ocular surface disorders on experimental and clinical application. With the longest follow-up period to 62 months after surgery, the study has demonstrated the efficacy and safety of the method in creating ocular surface stability, reducing inflammation and corneal neovascularization. The results showed the long term survival and closed attach of epithelial layer with stromal bed after transplantation.

Research has showed the benefit of combining experimental and clinical researchs. Success from experimental research is the scientific basis of the clinical application in patients. On the other hand, experimental research helps to guide and complete perfectly clinical research.

## **Thesis structure**

The thesis consists of 101 pages: Introduction (2 pages), Overview (34 page), subjects and methods (10 pages), Results (25 page), discussion (27 pages), and Conclusion (2 pages), Recommendation (1 page).

In the thesis there are 5 tables,1 charts, 32 shapes, annex. There are 115 references, including 3 Vietnamese, 112 English.

## Chapter 1. OVERVIEW

### 1.1. Structure and function of ocular surface and related factors

Ocular surface stability is maintained by the integrity of the anatomy and physiology of the related factors including eyelids, tear film, the epithelium of the conjunctiva, cornea and limbal area.

*Eyelids:* protect the eye, spread the tear film on ocular surface

*Tear film:* consists of 3 layers: lipids, water and mucin. Tear film have lubrication effect, provide nutrients, maintain osmotic pressure and stability of corneal surface refraction

*Conjunctival epithelium:* contains goblet cells that secrete mucin, accessory lacrimal glands produce the aqueous portion of tears, additional cells include melanocytes, T and B cell lymphocytes that contributes to immune surveillance.

*Corneal limbus:* contains radially oriented fibrovascular ridges known as the palisades of Vogt that may harbour a stem cells population. Limbal stem cells have high proliferative potential, ability to regenerate the entire corneal epithelium, prevent the conjunctival epithelial cells from migrating onto surface of the cornea.

*Corneal epithelium:* is a stratified squamous nonkeratinised epithelium. The surface corneal epithelial cells has numerous microvilli that secrete glycocalyx which helps in adhesion and stability of the tear film. Epithelium can be divided into superficial squamous cell layer, the middle wing cell layer, and the inner basal cell layer. Among these three, the basal cell are only capable of mitosis.

## **1.2. Ocular surface disorders**

### ***1.2.1. Clinical diagnosis of ocular surface diseases***

Depending on the extent of damage, partial or total limbal stem cell deficiency (LSCD) may result. In total LSCD, there is 360° conjunctival ingrowth. LSCD may present with irritation, blepharospasm, photophobia, recurrent episodes of pain (due to epithelial breakdown), and decreased vision. Clinical findings of LSCD include a loss of the palisades of Vogt, epithelial defects, late fluorescein staining, superficial and deep corneal neovascularization, and fibrovascular pannus. The persistence of epithelial defects may lead to ulceration, scarring, and corneal perforation.

***1.2.2. Paraclinical diagnosis of ocular surface diseases:*** help improve our ability to accurately diagnose ocular surface disease

- Impression cytology, conjunctival biopsy, ocular surface scraping
- Tear meniscus measurement, osmolarity, tear film interferometry, Meibography shooting, confocal microscopy.
- Rapid testing for inflammatory markers.
- Esthesiometry.

### ***1.2.3. Etiology of ocular surface diseases***

- Blepharitis
- Severe dry eyes
- Allergic conjunctivitis
- Ocular surface squamous neoplasia (OSSN)
- Epithelial adhesion dysfunction
- Chemical burns or thermal burns
- Congenital stem cells deficiency: aniridia, drop-like gelatinous corneal dystrophy, keratitis associated endocrine insufficiency, ectodermal dysplasia, sclerocornea

- Ocular surface disorder caused by autoimmune diseases: pemphigoid, drug allergy, rheumatoid arthritis
- Iatrogenic causes of limbal stem cell deficiency

**1.2.4. Staging of ocular surface diseases severity :** the condition of the stem cells and conjunctiva is a better indicator of treatment choice and prognosis

**Table 1.1. Staging of ocular surface diseases severity**

<i>Limbal stem cells lost</i>	<i>Normal conjunctiva (stage “a”)</i>	<i>Previously inflamed conjunctiva (stage “b”)</i>	<i>Inflamed conjunctiva (stage “c”)</i>
<i>Lost 1 part (stage I-mild)</i>	Iatrogenic, CIN, contact lens (stage Ia)	History of chemical or thermal injury (stage Ib)	Mild SJS, OCP, recent chemical injury ( stage Ic)
<i>Lost totally (mức II-nặng)</i>	Aniridia, severe contact lens and iatrogenic (stage IIa)	History of severe chemical or thermal injury ( stage IIb)	Severe SJS, OCP, recent chemical or thermal injury (stage IIc)

### 1.3. Ocular surface disorder management

**1.3.1. Medical treatment:** The medical management of OSD including topical and systemic regimens, is required prior to surgical intervention. The medical management of OSD compose controlling the inflammation and restoring the normal anatomy and tear film to promote healing of the ocular surface. Careful attention to the medical management of the ocular surface is paramount to the

outcomes of any surgical intervention and may indeed preclude its necessity.

**1.3.2. *Therapeutic contact lens*** in some cases can promote corneal healing, provide mechanical protection and support, reduce desiccation, relieve pain.

**1.3.3. *Protective surgery*** such as epithelial scraping, superficial keratectomy, punctal occlusion, temporary suture tarsography applied in some cases.

**1.3.4. *Surgical techniques for ocular surface reconstruction:*** medical treatment in the acute phase, then select surgery according classification of OSD

- Amniotic membrane transplantation (AMT): promote epithelial healing and reduce ocular surface inflammation in the cases of acute ocular burns, persistent epithelial damage. But amniotic membrane does not contain stem cells, therefore AMT alone is not a treatment for stem cell failure.

- Conjunctival limbal Autograft (CLAU) or Cultured limbal epithelial transplantation (Auto-CLET) from the limbus of the patient's contralateral healthy eye is a method for high efficiency and safety, but only applicable to unilaterally affected patients.

- For patients with bilateral severe ocular surface disorders, can apply Living-related conjunctival limbal allograft (Lr-CLAL) / Living-related cultured limbal epithelial transplantation (Lr-CLET) from normal limbal of patient's living relative or from harvested donor tissue (Kerato Limbal Allograft - KLAL), this method is more difficult due to immune rejection problems and risks of long term immunosuppressive systemic drugs.

#### **1.4. Cultured oral mucosa epithelium sheet and application in the treatment of ocular surface disorders**

##### ***1.4.1. Histological structure of oral mucosal epithelium:***

Histological studies indicate that oral mucosal epithelium is derived from ectoderm, is squamous non-keratinised epithelium, the basal layer has the ability to mitosis, the stem cells were located in the basal layer (at apical of papillary derm)

##### ***1.4.2. Cultured oral mucosa epithelial sheet***

The rapidly development regenerative medicine allows produce cultured epithelial sheet from the oral mucosa epithelium. Cultured oral mucosal epithelial sheet have histological structure and functional similar with normal corneal epithelium.

##### ***1.4.3. Application of cultured oral mucosal epithelial sheet in treatment OSD:***

There are many research in the world in experimental as well as in clinical on the application of cultured oral mucosal epithelial transplantation (COMET) in the treatment of bilateral OSD.

- Nakamura (2003), Hayashida (2005) has success in experimental rabbits.

- Nishida (2004), Inatomi (2006), Chen (2009), Nakamura (2011), Satake (2011), Kocaba (2014): carried out successfully on patients with follow-up period of 14-55 months.

All research confirmed that cultured oral mucosal epithelial sheet was survive and help maintain ocular surface stability for long time. This method is the safe and effective solution for the treatment of bilateral severe OSD.

## Chapter 2. SUBJECTS AND METHODS

### 2.1. Subjects

**2.1.1. Experimental study** was realized on 15 healthy rabbits,  $2 \pm 0.2$  kg of weight, nourished at the same conditions of the laboratory at the Department of Histology and Embryology, Hanoi Medical University.

**2.1.2. Clinical study** was performed on 12 patients with severe bilateral OSD were treated at the Corneal Department - VNIO 1/2009 - 6/2014.

*Selection criteria:* total bilateral stem cells loss, conjunctivalization of cornea, non-infectious, uninflamed state

*Exclusion criteria:* pathology of eyelid, keratinized ocular surface, don't cooperate for research .

### 2.2. Methods

**2.2.1. Experimental study:** 15 rabbits randomly divided into 5 groups

Design: Experimental study, performed at the Department of Histology and Embryology – Hanoi Medical University.

Realization steps:

- All rabbit eyes were burned by NaOH 3% application. (After 4 weeks, clinical signs of total LSCD were evident: corneal haze, vascularization, and epithelial irregularity)

- After 2 weeks of eye burning, taked the rabbit oral mucosa biopsy specimen (3 mm in diameter) and culturing: obtained 2 cultured epithelial sheets after 2 weeks of culturing

- 1 sheet using for histological identification, 1 sheet using for autologous transplantation to rabbit

Evaluation rabbit'eye and rabbit's corneal histology 7, 15, 30, 60, 180 days after surgery

**2.2.2. Clinical study:** in patient bilateral OSD

*Design:* clinical trials, prospective, conducted at Vietnam National Institute of Ophthalmology



*Realization steps:*

- Patient evaluation before surgery: irritation severity (based on 3 functional signs: photophobia, dry eye sensation, pain), visual acuity, intraocular pressure, tear film and ocular surface condition

- Preoperative treatment: Anti-inflammatory, nutrition, management of eyelid problem, management of symblepharon

- Harvested specimens (3 mm in diameter) of oral mucosal tissue from patients with bilateral OSD. Two tissue-engineered epithelial cell sheets were fabricated ex vivo by culturing harvested oral mucosal epithelium on amniotic membrane

- 1 sheet using for histological identification, 1 sheet using for autologous transplantation to patient

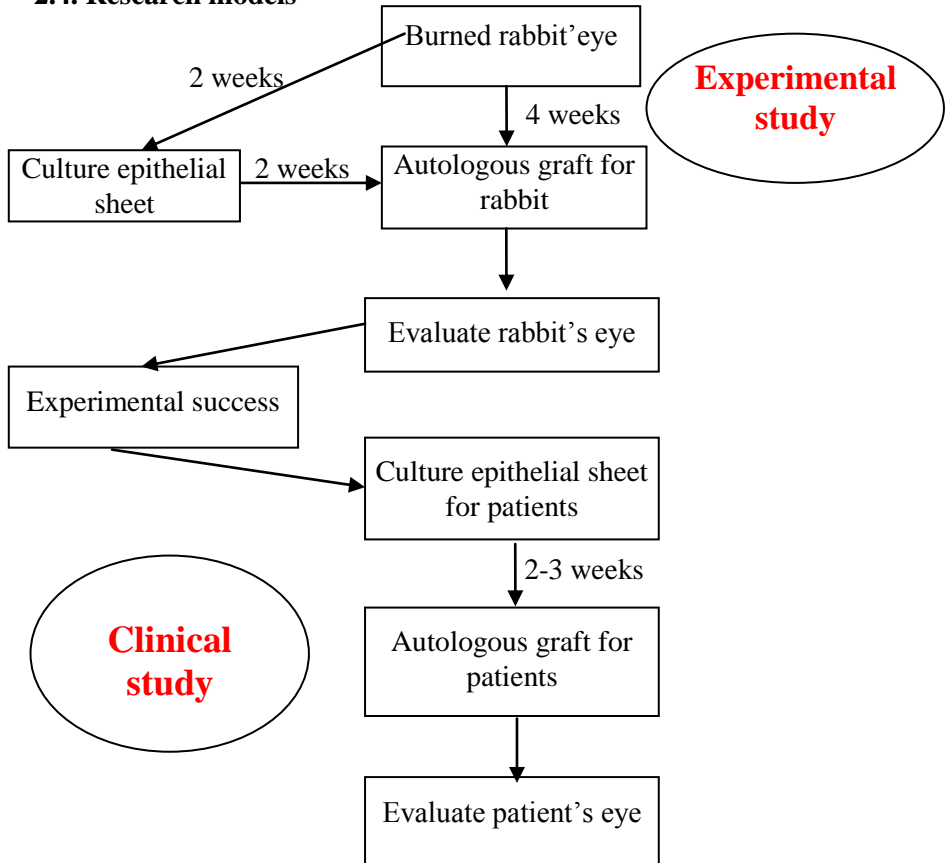
*Evaluate the quality of cultured epithelial sheets*

*Evaluate the results of the surgery:* improvement of functional signs, VA, ocular surface state

**Table 2.2. Criteria for evaluating the results of the surgery**

<i>Criteria Results</i>	<i>Epithelial sheet</i>	<i>Ocular surface</i>	<i>Corneal neovascular</i>
<i>Excellent</i>	Attached, clear, not edema	Smooth, no epithelial defect	Absence
<i>Good</i>	Attached, not edema	Mild PEK (punctate epithelial keratopathy)	At the limbus
<i>Moderate</i>	Blurred	Rough, epithelial defect less than 5mm	At the peripherique
<i>Bad</i>	Edema/ detached	Persistence epithelial defect	In the center

## 2.4. Research models



## 2.3. Data analysis

Medical documentation, clinical photographs and histological, surgical video.

## 2.5. Research ethics

This study was 1 part of National project "Research on the use of stem cells to treat ocular surface diseases", code DTDL.2010T / 15 at the Department of Histology and Embryology- Hanoi Medical

University, was approved by Ethical Board of Hanoi Medical University, (ethical approval No. 77 / HDDD - YHN).

## Chapter 3. RESULTS

### 3.1. Experimental results on rabbits

**3.1.1. *Experimental rabbits features:*** All 15 rabbits survived during the study.

#### **3.1.2. *Characteristics of cultured epithelial sheets***

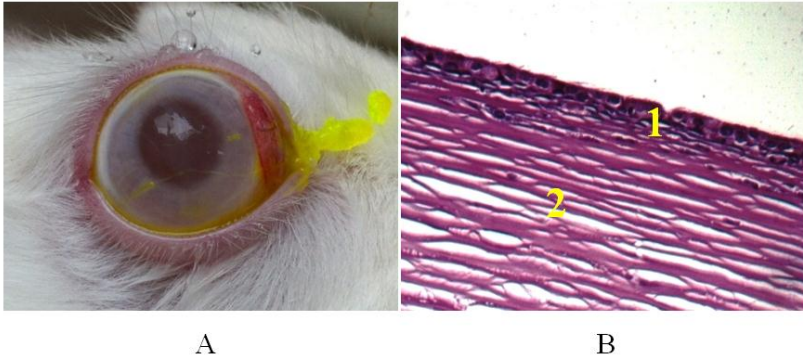
Image histology: cultivated oral mucosal epithelium consisted of five to six cell layers, a well-conserved basal layer formed by cuboidal cells, several suprabasal cell layers, and flat apical cell layers. Ultrastructural examination revealed an architecture of well-structured cell sheets with the microvilli, tight junctions, desmosomes, and basement membrane. Such morphologic characteristics are similar to those of corneal epithelium in vivo.

Immunohistochemistry: expression of p63 in the basal layer, K3 in the superficial layer, absence of goblet cell.

#### **3.1.3. *Results of cultured epithelial sheet transplantation on experimental rabbits***

*In clinical:* The epithelial sheets were well attached, ocular surface was smooth, no corneal neovascular in 14 of 15 rabbits. There was neovascular at peripheral cornea in 1 rabbit.

*Corneal rabbit histology:* After 6 months, the epithelial sheets were survived, closed attach with stroma, contained regular cell and non-keratinized.



**Figure 3.11. Rabbit's eye with good outcome after 180 days**

- A. Rabbit's eye: clear cornea, no epithelial defect  
 B. Rabbit's cornea (with H.E. stain). 1. Epithelial 4-5 layers stratified attached well with stroma; 2. Intact stroma, no infiltrate cell.

### 3.2. Results in patients

#### 3.2.1. Characteristics of patients studied

The mean age was 26.2 years old (12-57 years old)

Far vision: 95% < CF 1m; near vision (-)

Initial diseases: drop-like gelatinous corneal dystrophy in 3 patients, chemical burns the both eyes in 9 patients.

There are 20 surgeries were performed in 17 eyes of 12 patients (10 male, 2 female), of which 5 patients underwent surgery in both eyes, 3 eye underwent surgery 2 times.

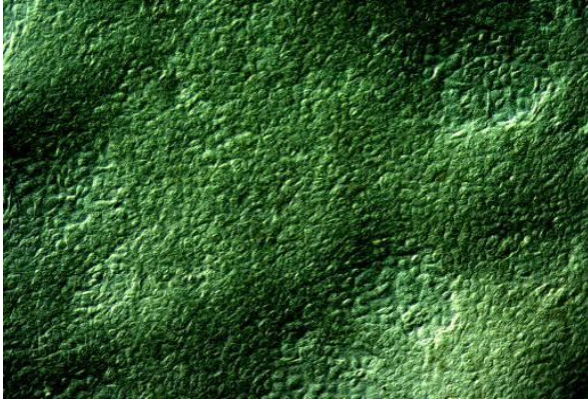
The mean of follow-up was 18.95 months (12-62 months)

#### 3.2.2. Characteristics of cultured epithelial sheets

*Histology:* 4-5 layer squamous stratified cells. They were consisted of cuboidal basal cells, several polygonal cells in intermediate layer, and flat apical cell surface layer. The apical

surface of the cells showed prominent small microvillus. Well-defined desmosomes were formed among the adjacent cells

*Immunohistochemistry:* expression of p63 in the basal layer, K3 in the superficial layer.



**Figure 3.13. Cultured epithelial sheet (Microscopy inverse x 250)**



**Figure 3.14. Cultured epithelial sheet (HE x 500)**

### **3.2.3. The surgical outcomes**

- After the biopsy, the oral mucosa healed quickly, the scars was small and smooth. No complications during and after the biopsy.

- No complications during and after cultured oral mucosal epithelial transplantation.

- The success rate was 14/20 (70%): Excellent 6/20 (30%), good 4/20 (20%), moderate 4/20 (20%). The failure rate is 6/20 (30%).



**Figure 3.21. Eye with excellent results 3 years after surgery**  
**A. Before B. After**

✓ *Improvement in functional signs:* there are 12/20 cases (60%) improved in 3 functional signs (phtophobia, dry eye sensation, pain), 1 case improved in 1 sign, 2 cases improved in 2 signs

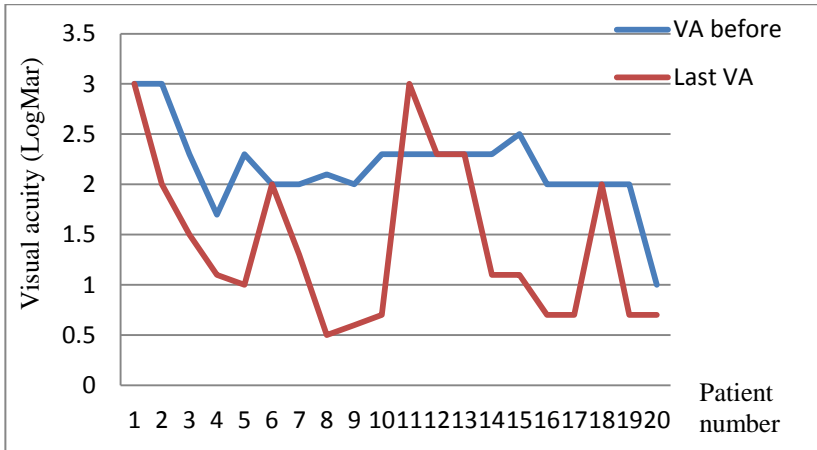
✓ *Visual acuity*

- Far vision: 14/20 cases (70%) increased, including 13 cases clearly increased.

- 7/20 cases improved of VA more than 2 lines, the highest visual acuity was 20/60

- The VA before surgery was + 2.17, after surgery was +1.415 (in logMAR): the gain in the VA was - 0.755

- 9/20 cases improve near vision



**Chart 3.1. Results of far vision**

✓ *Ocular surface condition after surgery*

In all eyes, vascularization gradually recurred in the peripheral cornea but not in the central zone at the first month but was stable after 3-6 months in success cases. This vascularization was unlike subepithelial vascularization accompanied by conjunctival ingrowth, since it was localized to the deeper stroma and did not show the abnormally high fluorescein permeability characteristic of conjunctival epithelium

✓ *The final outcomes:* the success rate was 14/20 (70%) cases with mean follow-up time was 18.95 months (12-62 months). In these success cases, cornea was smooth and clear, reduced neovascularization, ocular surface was stable

✓ *The safety of the method*

- No complication during the time of study
- No rejection and no complications associated with immunosuppressive treatments; no complications due to steroids (high IOP, infections)

- Can be repeated many times
- ✓ *Factors affecting the surgical results*
  - Etiology: the dystrophy group have better results than the burns group
    - The combination lesions: persistent epithelial defects and deep injury intraocular have bad results
    - Surgical process and postoperative care have an impact on surgical outcomes
    - The quality of cultured epithelial sheets: resilience and persistence of carrier layer, capable separated from well-plate intraoperative also affects the results

## **Chapter 4. DISCUSSION**

### **4.1. Autologous transplantation epithelial sheet on experimental rabbits**

#### ***4.1.1. Characteristics of cultured epithelial sheets***

*Histology:* epithelial sheets morphologically is similar to corneal epithelium, the top layer is still have nuclear, shown nonkeratinized characteristic. The microvilli increase surface contact with tears film, helping tears retention. Closely linked between the cells by desmosomal junctions to create protective barriers of the epithelium, the basal cells adhered well to amniotic membrane carrier by hemidesmosomes help well adhesion of epithelial sheet on ocular surface.

*Immunohistochemistry:* p63 expression in basal layer presented stem cell characteristics, ensure the regeneration of the epithelium after transplantation



#### ***4.1.2. Results of autologous cultured epithelial transplanattion on experimental rabbits***

In clinical, all the rabbits have stable and clear cornea after surgery. Corneal rabbit biopsy results determined cultured epithelial sheets condition after transplant: After 6 months, the epithelial sheet remains intact, closed attach with stroma, contained regular cell and non-keratinized. Our results are similar to studies by Nakamura (2003) and Hayashida (2005)

#### ***4.1.3. The experience obtained from experimental studies***

- Improving surgical skills, removal of factors affecting the success of the surgery.

- Experience in clinical applying: surgery outcomes in burns eye rabbits more favorable than in human eye because rabbit eyes injury was more superficial, less inflammatory reaction, no tear film damage → note in nutritional supplements and anti-inflammatory drugs in clinical apply. On the other hand, rabbits have sub eyelid therefore rabbit eye was protected better than human eye → long-term contact lens was needed in patient.

- Histological images of corneal rabbit proved the epithelial sheets were survived over time after transplantation.

The results of our study similar to those published by foreign authors. Cultured oral mucosal epithelial transplantation was successfully in experimental, is the scientific basis for the application in human.

## **4.2. Results in patients with bilateral severe ocular surface disorders**

### ***4.2.1. Location and size of the biopsy:*** center cheek mucosa have thick mucosa, high concentration of p63 at basal cell layer. Thus

mucosa cheek area has the characteristics appropriate to the culture, because the possibility of obtaining stem cells higher in this region. With 3 mm of diameter, the biopsy is painless, quick healing, can repeatedly perform

#### **4.2.2. Characteristics of cultured epithelial sheets**

*Histology* of epithelial sheets were similar to corneal epithelium, the top layer is still have nuclear, shown nonkeratinized characteristic. The microvilli increase surface contact with tears film, helping tears retention. Closely linked between the cells by desmosomal junctions to create protective barriers of the epithelium, the basal cells adhered well to amniotic membrane carrier by hemidesmosomes help well adhesion of epithelial sheet on ocular surface.

*Immunohistochemistry*: p63 expression in basal layer presented stem cell characteristics, ensure the regeneration of the epithelium after transplantation over time. This result is similar to:

Madhira (2008): 2-3 rows nonkeratinized cell, may contain desmosome, hemidesmosome, p63 expression in the basal layer, K3 in the top layer

Sen (2011): stratified nonkeratinized epithelial sheet, may contain desmosome, hemidesmosome. Expression of p63, K3, especially mucin granules in the cell: membrane-associated mucin MUC 1,13,15,16, mucin gel MUC 5B, 6 → improve dry eye condition

Klingbeli (2010): presence of PAKT and PTEN (anti-cancer protein), absence of p53 and mdm2 (cancer protein) → proven the safety and do not appear mutation when culturing

#### **4.2.3. Characteristics of patients in the study**

Mainly are young patients, mean age was 26.2 (12-57 years), high requirement on learning and working, affected in both eyes, very low visual acuity, almost blind: distant vision: 95% <CF of 1m; no near vision, therefore finding solutions to improve vision for patients is necessary

2 groups of etiology are gelatinous drop-like dystrophy (3 patients) & chemical burns (9 patients): correspond with characteristics of patient's age

#### **4.2.4. Surgical outcomes**

*Improve the functional signs:* 12/20 cases improved 3 signs, 1 case improved 2 signs, 2 cases improved 1 sign. These results were similar to results of Burillon (2012) and Kocaba (2014). Reduced irritation signs helps improve quality of life, reduced surface inflammation, stabilize ocular surface

*Vision:* Although not the primary goal in the treatment of severe ocular surface disorders, surgery still has the ability to increase visual acuity in some cases with superficial stromal damages. For patients whose stroma is severely deteriorated, by reducing neovascularisation and making the epithelium functional, cultured oral mucosal epithelial sheet allows a secondary corneal transplantation without acute rejection, and improved visual acuity can be achieved.

In our study, the far vision increased significantly postoperative in 14 cases, in which 13 cases were markedly increased

(70%). There are 7 cases improved more than 2 rows, the highest acuity was 20/60. According to logMAR, we have taken the average visual acuity of +2.17 to +1.415, the improvement achieved is -0.755. Sotozono study (2013) and Kocaba (2014) also gives similar results

In particular, there are 9 cases evidently improved near vision. This is extremely significant because most young patients have high requirement on learning and working, treatment pushed patients's vision from almost blind to one higher level despite modest also increases significantly the life's quality of patients.

#### *Evolution ocular surface condition after surgery*

In the successful cases: In the first 1 month there were some small neovasculars under epithelium layer, but it located just at peripheral cornea, and regressed after 3-6 months. This result is similar to Inatomi (2006), Satake (2011), Nakamura (2011), this can be explained by the corneal epithelium of patients after surgery are derived from the oral mucosa can be contained intravascular growth factors

In summary and comparison, our overall results relatively positive compared with other authors in the world with a large enough quantity and time tracking relatively long

**Table 4.1. Success rate of COMET's studies**

Research	Success rate (%)	Follow-up (months)	Sample size
<i>Inatomi (2006)</i>	67	20	15
<i>Nakamura (2011)</i>	79	55	19
<i>Satake (2011)</i>	64,8% after 1 year 59 % after 2 years	25.5	40
<i>Burillon (2012)</i>	64	360 days	26
<i>Sotozono (2013)</i>	48	28.7	46
<i>Kocaba (2014)</i>	62.5	28	26
<b><i>N T T Thuy (2016)</i></b>	<b>70</b>	<b>18.95</b>	<b>20</b>

*The advantage of the method:*

✓ Safety

- Autologous transplantation: no immune problems, without using immunosuppressive drugs. Corticosteroid shorter time, reduce complications due to steroids (glaucoma, infections)

- Abundant mucosal stem cells , small biopsy, surgery done only at the ocular surface: minimally invasive and easy to carry → safety, may be repeated

✓ The ability to survive after transplantation of epithelial sheets

In the study, 14 cases remained stable ocular surface, and no conjunctivalisation until the last visit at 12-62 months. This proves the presence of stem cells in corneal epithelium after transplantation, so corneal epithelium continued to renewal constant over time, avoiding conjunctival colonization. This results is consistent with immunohistochemistry feature of epithelial sheets: the expression of p63, demonstrating characteristics of the stem cell in the epithelial

sheet. Others studies have demonstrated the long-term existence of the oral mucosa epithelium after transplantation: Chen (2009) after 10-22 months, Kocaba (2014) after 28 months: Histopathology of cornea after optical secondary keratoplasty: epithelial sheet remains intact, there is expression of p63

*The limits of the method*

✓ Limbal neovascularisation after transplantation: due to action of intravascular growth factors in cultured epithelial sheets → idea to coordinate anti-VEGF with surgery are proposed by some authors

✓ Compared to the cultured limbal epithelial sheet, the oral mucosal epithelial sheets were thicker, more opaque and less homogeneous, the cultured cells were larger, less homogenous arrangement, cause light scattering phenomenon, affecting vision. In the reports of Nakamura (2011), MA (2009), Inatomi (2006), we also find the same problem

*Factors affecting the surgical results*

✓ The aetiology: results better in dystrophy group compare with burns group (different deep injury, different tear film disorder)

✓ Combination injury: the persistent epithelial defect, deep damages intraocular give poor results. Satake (2011) has similar outcomes

✓ Process surgery (smooth stromal base after keratectomy, maintain intact epithelial sheet during surgery) and postoperative care (prolonged lubricant and bandage contact lens) help to good stability of epithelial sheet on ocular surface.

✓ Quality of cultured epithelial sheets: resilience and persistence of carrier layer, capable separated from well-plate intraoperative gives greater success

## CONCLUSION

Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial sheets in 15 rabbits and 12 patients (20 surgeries performed) with bilateral severe ocular surface disorders, we founded:

### **1. Results of cultivated oral mucosa epithelial transplantation on experimental rabbit eyes**

Cultured successfully oral mucosal epithelial sheets on experimental rabbits, epithelial sheets obtained have morphological and histological structure similar to normal rabbit corneal epithelium.

Cultured oral mucosal epithelial transplantation has been successful in 15 experiment rabbits. After 6 months postoperatively, 1 rabbit eye has moderate result with neovascularisation at peripheral cornea, 14 rabbit eyes have good results: the epithelial sheets survive, intact and clear, no neovascularisation.

### **2. Results of cultivated oral mucosa epithelial transplantation on patients**

Cultured successfully oral mucosal epithelial sheets on patients, the epithelial sheet obtained have morphological and histological structural like normal corneal epithelium.

The success rate of autologous cultured oral mucosal epithelial transplantation was 14/20 cases (70%), in which the excellent was 6/14, good was 4/14, moderate was 4/14. The surgery was safe and effective in the reconstruction of a stable ocular surface, reduce inflammation and reduce corneal neovascularization.

There were 12/20 cases (60%) improved 3 functional signs. The far vision was increased in 14/20 cases (70%), including 13 cases (65%) clearly increased. There were 9/20 cases (45%) improve significant the near vision

The results was better in dystrophy group compare with burns group. The previous persistent epithelial defect and deep damages intraocular gived poor prognostic

The quality of the epithelial sheets: resilience and persistence of carrier layer, capable separated from well-plate intraoperative also affect the results of surgery.

Using the contact lens and lubricants continuously for the first time after surgery help the cultured epithelial sheet well adhere with stromal bed and be good stability on the surface of the cornea

## **RECOMMENDATIONS**

Continue studies with larger numbers of patients and longer follow-up period to assess more precisely the effectiveness of methods.

Coordinate with laboratory to continue research to improve the process of culture and development of standards of best epithelial sheet, in accordance with the conditions of Vietnam.

Research cultured oral mucosa epithelial transplantation combine with using anti-VEGF with high-risk subjects and evaluate results.