

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



VI QUỲNH HOA

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM VÀ HIỆU QUẢ  
CỦA KHỐI TẾ BÀO GỐC TỰ THÂN TỪ TỦY XƯƠNG  
TRONG ĐIỀU TRỊ CHẤN THƯƠNG CỘT SỐNG  
CÓ LIỆT TỬ HOÀN TOÀN**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

VI QUỲNH HOA

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM VÀ HIỆU QUẢ  
CỦA KHỐI TẾ BÀO GỐC TỰ THÂN TỪ TỦY XƯƠNG  
TRONG ĐIỀU TRỊ CHẤN THƯƠNG CỘT SỐNG  
CÓ LIỆT TỦY HOÀN TOÀN**

Chuyên ngành : Huyết học Truyền máu

Mã số : 62720151

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Hà
2. PGS.TS. Nguyễn Mạnh Khánh

HÀ NỘI - 2020

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi là Vi Quỳnh Hoa, nghiên cứu sinh khoá 33 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Huyết học - Truyền máu, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS Nguyễn Thị Thu Hà và PGS.TS Nguyễn Mạnh Khánh.
2. Công trình này không trùng lặp với bất cứ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

*Hà Nội, ngày      tháng      năm*

Tác giả luận án

**Vi Quỳnh Hoa**

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

ADSC (Adipose Derived Stem Cell)	Tế bào gốc mô mỡ
AIS (American Spinal Injury Association Impairment Scale)	Thang đo chấn thương cột sống của Hiệp hội chấn thương cột sống Hoa Kỳ
ASIA (American Spinal Injury Association)	Hiệp hội chấn thương cột sống Hoa Kỳ
BC	Bạch cầu
BCH	Bạch cầu hạt
BDNF (Brain-derived Neurotrophic factor)	Yếu tố dinh dưỡng thần kinh nguồn gốc não
BMP (Bone morphogenetic protein)	Protein tạo hình thể xương
CD (Cluster of Differentiation)	Cụm kháng nguyên biệt hóa
CHT	Cộng hưởng từ
CNS (Central Nervous System)	Hệ thần kinh trung ương
CT (Computed Tomography)	Cắt lớp vi tính
CTCS	Chấn thương cột sống
CFU-F (Colony Forming Unit – Fibroblast)	Đơn vị tạo cụm nguyên bào sợi
CXCR4	C-X-C chemokine Receptor 4
DMSO	Dimethyl sulfoxid
DTX	Dịch tuỷ xương
ECM (Extracellular matrix)	Chất đệm ngoại bào
EPC (Epithelial – Progenitor cells)	Tế bào gốc tiền thân nội mạc
ES (Embryonic stem cells)	Tế bào gốc phôi
FC (Flow Cytometry)	Phương pháp đếm tế bào dòng chảy
FDA (Food and Drug Administration)	Cục Quản lý dược thực phẩm Mỹ
FSC (Fetal stem cells)	Tế bào gốc bào thai
G-CSF (Granulocyte-colony stimulating factor)	Yếu tố kích thích tạo cụm dòng bạch cầu hạt
GM-CSF (Granulocyte, Monocyte-colony	Yếu tố kích thích tạo cụm dòng bạch

stimulating factor)	cầu hạt và bạch cầu mono
GMP (Good Manufacturing Practice)	Thực hành sản xuất tốt
HC	Hồng cầu
HCT	Hematocrit
HGF (Hepatocyte growth factor)	Yếu tố tăng trưởng tế bào gan
HSC (Hemopoietic stem cells)	Tế bào gốc tạo máu
HST	Huyết sắc tố
IGF (Insulin-like growth factor)	Yếu tố tăng trưởng giống Insulin
IL	Interleukin
ISCT (International Society for Cellular Therapy)	Hiệp hội quốc tế về liệu pháp tế bào
L (Length)	Chiều dài
LIF (Leukemia-Inhibitory Factor)	Yếu tố ức chế bạch cầu
LTHT	Liệt tuỷ hoàn toàn
MCC (Maximum Canal Compromise)	Độ tổn thương ống sống tối đa
M-CSF (Macrophage- colony stimulating factor)	Yếu tố kích thích tạo cụm đại thực bào
MHC (Major histocompatibility complex)	Phức hợp hòa hợp mô chủ yếu
MRI (Magnetic resonance imaging)	Chụp cộng hưởng từ
MSC (Mesenchymal stem cells)	Tế bào gốc trung mô
MSCC (Maximum Spinal Cord Compression)	Độ chèn ép tuỷ tối đa
NGF (Nerve growth factor)	Yếu tố tăng trưởng thần kinh
PSC (Pluripotent stem cells)	Tế bào gốc vạn năng
SCF (Stem cell factor)	Yếu tố tế bào gốc
SDF-1 (Stroma derived factor – 1)	Yếu tố - 1 của tổ chức đệm
SF36 (36-Item Short Form Health Survey)	Bộ 36 câu hỏi khảo sát sức khoẻ
SP (Side population)	Quần thể phụ
TB	Tế bào

TBCN	Tế bào có nhân
TBDN	Tế bào đơn nhân
TBG	Tế bào gốc
TC	Tiểu cầu
TGF- $\beta$ (Transforming growth-factor-beta)	Yếu tố chuyển dạng $\beta$
TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )	Yếu tố hoại tử khối u alpha
USC (Unipotent stem cells)	Tế bào gốc đơn năng
VEGF (Vascular endothelial growth factor)	Yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch máu
W (Width)	Chiều rộng
WHO (World Health Organization)	Tổ chức Y tế thế giới

## MỤC LỤC

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN</b>	<b>3</b>
<b>1.1. SƠ LƯỢC VỀ TẾ BÀO GỐC TUYẾN XƯƠNG</b>	<b>3</b>
<b>1.2. TẾ BÀO GỐC TẠO MÁU</b>	<b>3</b>
1.2.1. Khái niệm, phân loại tế bào gốc tạo máu (HSC)	3
1.2.2. Đặc điểm HSC	4
1.2.3. Dấu ấn bề mặt của HSC	6
<b>1.3. TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ</b>	<b>6</b>
1.3.1. Khái niệm, phân loại MSC	6
1.3.2. Đặc điểm MSC	7
1.3.3. Dấu ấn bề mặt của MSC	12
<b>1.4. ỨNG DỤNG CỦA HSC VÀ MSC</b>	<b>13</b>
1.4.1. Ứng dụng của HSC	13
1.4.2. Ứng dụng của MSC	13
<b>1.5. CHẤN THƯƠNG CỘT SỐNG LIỆT TUYẾN HOÀN TOÀN</b>	<b>14</b>
1.5.1. Phân loại CTCS	14
1.5.2. Sinh lý bệnh chấn thương cột sống	15
1.5.3. Các phương pháp điều trị CTCS	17
<b>1.6. SỬ DỤNG TẾ BÀO GỐC TUYẾN XƯƠNG TRONG ĐIỀU TRỊ CHẤN THƯƠNG CỘT SỐNG</b>	<b>27</b>
1.6.1. Nghiên cứu tiền lâm sàng trên động vật	27
1.6.2. Sử dụng TBG tủy xương điều trị CTCS LTHT trên lâm sàng	29
<b>CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b>	<b>36</b>
<b>2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU</b>	<b>36</b>
2.1.1. Cỡ mẫu	36
2.1.2. Tiêu chuẩn lựa chọn	37

2.1.3. Tiêu chuẩn loại trừ	37
<b>2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b>	<b>38</b>
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu	38
Mô tả tiền cứu, can thiệp lâm sàng theo dõi dọc có nhóm chứng	38
2.2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu	38
2.2.3. Chọn mẫu	38
2.2.4. Sơ đồ nghiên cứu	39
2.2.5. Các chỉ tiêu nghiên cứu	40
2.2.6. Phương tiện nghiên cứu	41
2.2.7. Các quy trình và kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu	42
2.2.8. Các phương pháp đánh giá hiệu quả điều trị	60
2.2.9. Phương pháp thu thập thông tin và xử lý số liệu	61
2.2.10. Y đức trong nghiên cứu	61
<b>CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU</b>	<b>62</b>
<b>3.1. ĐẶC ĐIỂM NHÓM ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU</b>	<b>62</b>
3.1.1. Đặc điểm tuổi, giới	62
3.1.2. Đặc điểm nghề nghiệp và nguyên nhân chấn thương	63
3.1.3. Vị trí tổn thương dựa trên phim X-QUANG và CT	63
3.1.4. Mức độ tổn thương dựa trên phim CHT	64
3.1.5. Thời gian được ghép TBG	64
3.1.6. Đặc điểm máu ngoại vi của đối tượng nghiên cứu	65
3.1.7. Đặc điểm tế bào tuỷ xương của đối tượng nghiên cứu	66
<b>3.2. HIỆU QUẢ CHIẾT TÁCH VÀ CHẤT LƯỢNG KHỐI TBG TỬY XƯƠNG ....</b>	<b>66</b>
3.2.1. Hiệu quả chiết tách khối TBG bằng máy Sepax II	66
3.2.2. Thông số đánh giá chất lượng khối TBG	70
<b>3.3. ĐÁNH GIÁ TÍNH AN TOÀN VÀ HIỆU QUẢ SỬ DỤNG KHỐI TBG TỰ THÂN TỪ TỬY XƯƠNG TRONG ĐIỀU TRỊ CTCS CÓ LTHT</b>	<b>76</b>
3.3.1. Các tai biến, tác dụng không mong muốn của liệu pháp	76



3.3.2. Liều ghép	77
3.3.3. Phục hồi thần kinh sau ghép	78
3.3.4. Đánh giá kết quả trên cộng hưởng từ	79
<b>CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN</b>	<b>84</b>
<b>4.1. ĐẶC ĐIỂM CHUNG CỦA NHÓM NGHIÊN CỨU</b>	<b>84</b>
4.1.1. Đặc điểm tuổi, giới, nghề nghiệp	84
4.1.2. Đặc điểm lâm sàng và chẩn đoán hình ảnh	85
4.1.3. Thời gian được ghép TBG	87
4.1.4. Đặc điểm tế bào ngoại vi và tuỷ xương của đối tượng nghiên cứu	88
<b>4.2. HIỆU QUẢ CHIẾT TÁCH VÀ CHẤT LƯỢNG KHỐI TẾ BÀO GỐC TUỖ XƯƠNG</b>	<b>89</b>
4.2.1. Kỹ thuật chọc hút dịch tuỷ xương	90
4.2.2. Hiệu suất tách TBG tuỷ xương của máy Sepax II	92
4.2.3. Tế bào gốc tạo máu trong khối TBG tuỷ xương	95
4.2.4. Tế bào gốc trung mô trong khối TBG tuỷ xương	101
<b>4.3. ĐÁNH GIÁ TÍNH AN TOÀN VÀ HIỆU QUẢ SỬ DỤNG KHỐI TBG TỰ THÂN TỪ TUỖ XƯƠNG TRONG ĐIỀU TRỊ CTCS CÓ LTHT</b>	<b>108</b>
4.3.1. Các tai biến, tác dụng không mong muốn	108
4.3.2. Liều ghép	110
4.3.3. Kết quả điều trị	114
<b>KẾT LUẬN</b>	<b>122</b>
<b>KIẾN NGHỊ</b>	<b>123</b>
<b>MỘT SỐ CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN</b>	
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>PHỤ LỤC</b>	

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1: Thang điểm AIS (The ASIA Impairment Scale).....	15
Bảng 1.2: Sử dụng MSC trong điều trị tổn thương tuỷ sống trên mô hình động vật .....	28
Bảng 1.3: Tóm tắt một số thí nghiệm lâm sàng ghép tế bào gốc tuỷ xương cho bệnh nhân bị tổn thương tuỷ sống.....	32
Bảng 2.1: Thang điểm phân loại và đánh giá mức độ tổn thương tuỷ sống theo Hiệp hội chấn thương cột sống Hoa Kỳ.....	43
Bảng 2.2: Đánh giá chất lượng cuộc sống theo thang điểm SF36.....	45
Bảng 2.3: Trả lời câu hỏi và tính điểm số thang điểm SF36 .....	45
Bảng 2.4: Tính điểm trung bình của 8 lĩnh vực đánh giá thang điểm SF36... ..	46
Bảng 2.5: Đánh giá chất lượng sản phẩm khối tế bào gốc .....	57
Bảng 2.6: Các phương pháp đánh giá hiệu quả điều trị.....	60
Bảng 3.1: Phân bố bệnh theo tuổi, giới.....	62
Bảng 3.2. Nghề nghiệp và nguyên nhân chấn thương .....	63
Bảng 3.3: Phân bố bệnh nhân theo vị trí tổn thương .....	63
Bảng 3.4: Mức độ tổn thương dựa trên phim CHT.....	64
Bảng 3.5. Thời gian được ghép TBG sau khi bị chấn thương .....	64
Bảng 3.6. Một số chỉ số máu ngoại vi trước và sau lấy dịch tuỷ xương.....	65
của 42 BN ở nhóm ghép TBG (n=126).....	65
Bảng 3.7. Một số chỉ số tế bào tuỷ xương của nhóm ghép TBG trước chọc DTX lần 1, lần 2, lần 3 .....	66
Bảng 3.8. Thành phần TB máu và TBG tạo máu trong 120ml DTX .....	66
trước tách (n=126).....	66
Bảng 3.9. Đánh giá số lượng TBĐN và TBG tạo máu trong 120ml DTX trước tách ở 3 lần chọc hút DTX (so sánh cặp giữa các lần chọc, T-test).....	67

Bảng 3.10. Thành phần tế bào trong DTX trước tách và khối TBG thu được sau tách bằng máy Sepax II (n=126).....	67
Bảng 3.11. Hiệu quả loại bỏ và thu hồi TB máu và TBG tạo máu bằng máy Sepax II để tạo khối TBG (n=126).....	69
Bảng 3.12. Đặc điểm TBG tạo máu (CD34+) trong khối TBGTX (n=126) ..	70
Bảng 3.13. Kết quả nuôi cấy cụm CFU-F (n=126).....	71
Bảng 3.14. Số lượng, nồng độ TB CD73+/CD90+/CD105+ trong khối TBG (n=126).....	73
Bảng 3.15. Đánh giá số lượng TBG tạo máu và TBG trung mô của khối TBG (so sánh cặp giữa các lần tách chiết, T-test) .....	74
Bảng 3.16. Kết quả xét nghiệm cấy khuẩn, nấm và endotoxin (n=126).....	76
Bảng 3.17. Các tai biến, tác dụng không mong muốn .....	76
trong ghép TBG tuỷ xương .....	76
Bảng 3.18: Số lượng tế bào gốc ghép cho bệnh nhân (n=42).....	77
Bảng 3.19. Đánh giá phục hồi thần kinh theo thang điểm AIS .....	78
Bảng 3.20. Liều ghép TBCD34+, TBCD73+/CD 90+/CD105+ theo nhóm cải thiện AIS (AIS-A lên B, C, D) và không cải thiện AIS.....	79
Bảng 3.21: So sánh kết quả MRI ở nhóm chứng và nhóm can thiệp tại thời điểm trước ghép TBG.....	79
Bảng 3.22. So sánh kết quả MRI ở nhóm chứng và nhóm can thiệp tại thời điểm sau 12 tháng.....	80
Bảng 4.1: Tổng hợp kết quả điều trị ở giai đoạn cấp và bán cấp của một số tác giả trên thế giới.....	88
Bảng 4.2. So sánh hiệu quả tạo khối TBG.....	95
Bảng 4.3 Chất lượng khối TBG từ dịch tuỷ xương .....	106
Bảng 4.4: Bảng đánh giá các tác dụng phụ của một số nghiên cứu trên thế giới .....	110

## DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1:	Tương quan TB CD34+ và TBCN _____	70
Biểu đồ 3.2:	Tương quan tổng số lượng TB CD34+ và tuổi BN _____	71
Biểu đồ 3.3:	Tương quan giữa số cụm CFU-F với TB CD34+ _____	72
Biểu đồ 3.4:	Tương quan giữa số cụm CFU-F với tuổi _____	72
Biểu đồ 3.5:	Tương quan số lượng TB CD73+/CD90+/ CD105+ và tuổi BN _____	74
Biểu đồ 3.6:	Tương quan giữa TBCD73+/CD90+/CD105+ với TB CD34+ _____	75
Biểu đồ 3.7:	Tương quan giữa MSC (tế bào CD73+/CD 90+/CD105+) và tế bào tạo cụm CFU-F _____	75
Biểu đồ 3.8:	Đánh giá thay đổi chất lượng cuộc sống bằng thang điểm SF36 theo thời gian _____	81
Biểu đồ 3.9:	Chỉ tiêu trung bình chung của SF36 trước và sau ghép _____	82
Biểu đồ 3.10:	Biểu đồ tương quan giữa điểm SF36 sau 12 tháng và tổng lượng TB CD34+ được ghép _____	82
Biểu đồ 3.11:	Biểu đồ tương quan giữa điểm SF36 sau 12 tháng và tổng lượng TB MSC được ghép _____	83

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1: Khả năng tái tạo và biệt hoá đa dòng của HSC	5
Hình 1.2: Khả năng điều biến miễn dịch của MSC	8
Hình 1.3: Cơ chế Homing của MSC	9
Hình 1.4: Khả năng biệt hoá của MSC	11
Hình 1.5: Các giai đoạn sinh lý bệnh của chấn thương cột sống	16
Hình 1.6: Liệu pháp sử dụng MSC trong điều trị tổn thương hệ thần kinh trung ương	25
Hình 2.1: Phân loại thần kinh và phân loại AIS	44
Hình 2.2: Ảnh minh họa phương pháp đo trên kết quả CHT	47
Hình 2.3: Kỹ thuật chọc hút dịch tuỷ xương	49
Hình 2.4: Máy Sepax 2 thực hiện tách tế bào gốc tuỷ xương	51
Hình 2.5: Sơ đồ kit CS900.2 tách chiết dịch tuỷ xương bằng máy Sepax 2	52
Hình 2.6: Hình ảnh nuôi cấy tạo cụm CFU-F	55
Hình 2.7: Các tế bào dạng fibroblast trong cụm CFU-F	55
Hình 2.8: Hình ảnh nuôi cấy vi khuẩn, nấm.	56
Hình 2.9: Hình ảnh đông gel xác định Endotoxin	57
Hình 2.10: Ghép tế bào gốc lần 1	59
Hình 2.11: Ghép tế bào gốc lần 2, lần 3	60
Hình 4.1: Biểu hiện của các dấu ấn đặc hiệu của HSC 5 tuần sau ghép	97
Hình 4.2: Xác định tế bào CD34+, tỷ lệ TB sống chết bằng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy trên máy FACS-Calibur	100
Hình 4.3: Hình ảnh MSC biệt hoá thành tế bào thần kinh	102
Hình 4.4: Xác định tế bào MSC bằng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy trên máy FACS-Calibur	105
Hình 4.5: Cố định cột sống và giải ép thần kinh	115
Hình 4.6: Hình ảnh CHT trước và sau ghép của bệnh nhân Tran Quang H.	119

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo thống kê của tổ chức Y tế thế giới (WHO) mỗi năm có khoảng 250.000 – 500.000 người bị chấn thương cột sống (CTCS) [1]. Tại Mỹ, mỗi năm có thêm khoảng 17.000 bệnh nhân mới bị CTCS, tương đương 54 ca CTCS trên một triệu dân; trong đó nam giới chiếm đa số với khoảng 80% và tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân là 42 tuổi [2]. Tại Việt Nam, các tai nạn gây ra CTCS gồm có tai nạn lao động, giao thông, sinh hoạt, thể thao...gặp chủ yếu trong độ tuổi lao động từ 35 đến 40 tuổi chiếm 80% [3]. CTCS thường để lại hậu quả rất nặng nề về mặt tâm lý, kinh tế,... cho bệnh nhân, gia đình và xã hội.

Hiện nay, ngành Phẫu thuật cột sống có nhiều phát triển vượt bậc nhờ vào sự tiến bộ của kỹ thuật, công nghệ hiện đại và sự hiểu biết về cơ thể học và sinh học cột sống. Nhiều công trình có giá trị trên Thế giới và Việt Nam đã được công bố. Các phương pháp điều trị nhóm bệnh nhân CTCS có liệt tủy hoàn toàn hiện nay có chung nguyên lý là cố định cột sống, giải phóng chèn ép, tuy nhiên hiệu quả điều trị không như mong muốn, tỷ lệ phục hồi chức năng gần như rất thấp. Trước thực tế này, nghiên cứu một phương pháp điều trị kết hợp đã trở nên cấp thiết đối với các nhà lâm sàng và liệu pháp tế bào gốc đã được tiến hành nghiên cứu.

Từ cuối thế kỷ XX đến nay, công nghệ tế bào gốc đã và đang được nghiên cứu ứng dụng trong y sinh học và đã đạt được những thành tựu đáng được kỳ vọng. Một trong các ứng dụng được coi là có giá trị nhất là điều trị dựa trên tế bào, có thể gọi đó là y học tái tạo (Regenerative medicine). Ứng dụng của y học tái tạo được thể hiện ở nhiều mức độ và đem lại những hiệu quả khả quan và bất ngờ cho người bệnh. Qua các bằng chứng được mô tả trong các nghiên cứu *in vitro* về khả năng biệt hóa thành tế bào thần kinh của

tế bào gốc tủy xương, cho thấy tiềm năng của chúng trong chữa trị bệnh lý có thương tổn tế bào thần kinh [4] [5]. Trong thực tế, các thử nghiệm lâm sàng cũng cho thấy khả năng điều trị CTCS bằng liệu pháp tế bào gốc cho kết quả rất đáng khích lệ [6] [7] [8].

Trên thế giới, ứng dụng tế bào gốc tủy xương trong điều trị bệnh lý CTCS có liệt tủy hoàn toàn đang được quan tâm nghiên cứu tại một số nước như Mỹ, Hàn Quốc, Nhật Bản, Trung Quốc,... Nghiên cứu Zurab Kakabadze – Mỹ (2016) nghiên cứu trên 18 bệnh nhân chấn thương cột sống liệt tủy hoàn toàn có 50% bệnh nhân được cải thiện chức năng thần kinh, cảm giác, vận động [9]. Pu Cha Jiang – Trung Quốc (2013) nghiên cứu trên 20 bệnh nhân CTCS có liệt tủy hoàn toàn được điều trị bằng ghép tế bào gốc tự thân từ tủy xương, 75% bệnh nhân có tiến triển tốt [10]. Tại Việt Nam, Nguyễn Đình Hòa (2013) đã báo cáo “ Nghiên cứu ứng dụng ghép tế bào gốc mô mỡ tự thân điều trị chấn thương cột sống ngực – thắt lưng liệt tủy hoàn toàn” kết quả sau 6 tháng có 48% bệnh nhân có phục hồi về thần kinh [11]. Các nghiên cứu đều cho thấy kết quả tương đối khả quan trong việc cải thiện cả chức năng sinh lý và chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân. Tuy nhiên, chưa có tác giả nào nghiên cứu ứng dụng ghép TBG tủy xương điều trị CTCS có liệt tủy hoàn toàn. Vì vậy, đây là một hướng nghiên cứu mới cần được tiến hành trong giai đoạn hiện nay. Xuất phát từ thực tế trên, chúng tôi tiến hành đề tài **“Nghiên cứu đặc điểm và hiệu quả của khối tế bào gốc tự thân từ tủy xương trong điều trị chấn thương cột sống có liệt tủy hoàn toàn”**

Mục tiêu của đề tài:

1. *Đánh giá hiệu quả chiết tách và chất lượng khối tế bào gốc tự thân từ tủy xương được sử dụng trong điều trị CTCS có liệt tủy hoàn toàn.*
2. *Đánh giá tính an toàn và hiệu quả sử dụng của khối tế bào gốc tự thân từ tủy xương trong điều trị CTCS có liệt tủy hoàn toàn.*

# Chương 1

## TỔNG QUAN

### 1.1. SƠ LƯỢC VỀ TẾ BÀO GỐC TUYẾN XƯƠNG

Tế bào gốc (TBG) là loại tế bào có khả năng sinh sản, tự tái sinh và biệt hóa thành những loại tế bào chuyên biệt trong điều kiện nhất định

TBG có thể có nguồn gốc từ phôi, bào thai hoặc từ những cá thể trưởng thành có các đặc tính, đặc trưng chung nhưng khác nhau về khả năng tăng sinh và biệt hóa.

Ở người trưởng thành, TBG có thể thu được từ các nguồn khác nhau như máu cuống rốn, thành dây rốn, mô mỡ, tủy xương... trong đó nguồn tủy xương có ưu điểm là lấy tương đối dễ dàng và có thể được một lượng lớn TBG.

Trong tủy xương có nhiều loại TBG khác nhau về mức độ chín, về hình thái và chủng loại, tuy nhiên có thể xếp thành 2 nhóm lớn:

- + Nhóm TBG tạo máu (HSC – Haematopoietic Stem Cell): là các tế bào đầu dòng tạo máu.

- + Nhóm TBG không tạo máu (non – HSC): gồm có các tế bào trung mô và các tế bào tiền thân nội mạc.

Trong số các TBG tủy xương thì TBG tạo máu (HSC) và TBG trung mô (MSC – Mesenchymal Stem Cell) có nhiều ứng dụng nhất, còn các TBG khác như tế bào tiền thân nội mạc (EPC – Endothelial Progenitor Cell), quần thể tế bào phụ hiếm gặp và ít ứng dụng hơn [12].

### 1.2. TẾ BÀO GỐC TẠO MÁU

#### 1.2.1. Khái niệm, phân loại tế bào gốc tạo máu (HSC)

HSC là các tế bào có nguồn gốc từ TBG toàn năng của cơ thể, và nó là TBG vạn năng của cơ quan tạo máu. Chúng có khả năng tự tái tạo và biệt hóa thành các dòng tế bào máu và các tế bào miễn dịch, thay thế các tế bào máu

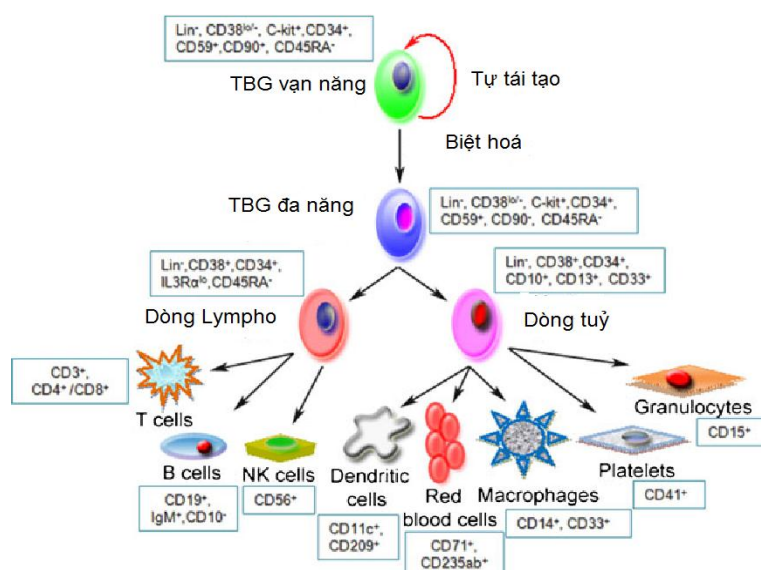


già chết đi sau khi thực hiện hết chức năng, đảm bảo duy trì sự hằng định của hệ thống huyết học – miễn dịch của cơ thể. HSC được tìm thấy trong môi trường thích hợp của tủy xương gắn liền endosteum và trong điều kiện thiếu oxy tương đối, trong đó vai trò cytokine thrombopoietin và megakaryocytes là quan trọng [13]. Tủy xương, máu dây rốn và máu ngoại vi là những nguồn HSC phổ biến. Tỷ lệ HSC trong tủy xương là 0,01 – 0,015%, ở máu ngoại vi là 0,001% và hầu hết ở trạng thái nghỉ, không phân bào. Khi cơ thể bị nhiễm khuẩn, chảy máu cấp tính hoặc điều trị hóa chất,... các HSC sẽ nhanh chóng tăng sinh. Tình trạng rối loạn quá trình tạo máu cũng có thể gặp trong các bệnh lý như loxêmi, bệnh tăng sinh tủy hoặc giảm sinh tủy. Như vậy, HSC được định nghĩa dựa trên ba đặc trưng cơ bản: khả năng tự tái tạo, khả năng biệt hóa đa dòng và khả năng thay thế [14]. Ngoài ra còn một số đặc điểm khác như khả năng di chuyển từ tủy ra máu, tính mềm dẻo trong biệt hóa và chết theo chương trình.

## **1.2.2. Đặc điểm HSC**

### ***1.2.2.1. Khả năng tự tái tạo và biệt hoá đa dòng***

TBG tạo máu có khả năng tự tái tạo và biệt hoá thành tất cả các dòng tế bào máu, được điều chỉnh bởi các yếu tố nội sinh và ngoại sinh (vi môi trường). Tuy nhiên quá trình tự tái tạo và biệt hoá của HSC vẫn chưa được biết rõ ràng. Nghiên cứu mới đây của Jingyao Zhao và cộng sự, cho thấy gen Uhrf1 kiểm soát sự tự tái tạo và biệt hoá thông qua việc điều chỉnh quá trình phân chia tế bào. Những yếu tố cơ bản làm cho các tế bào tiền thân biệt hoá thành những dòng tế bào máu khác nhau là: yếu tố tăng trưởng (growth factor), và các cytokin, chemokine... Những yếu tố này tương tác với nhau hết sức phức tạp, tạo nên một hệ thống kiểm soát về di truyền và điều phối tạo máu hoàn hảo [15],[16].



**Hình 1.1. Khả năng tái tạo và biệt hoá đa dòng của HSC**

Nguồn: Vira D, Basak SK (2012) [17]

### 1.2.2.2. Khả năng trở lại tủy, phục hồi mô tạo máu và huy động vào máu tuần hoàn

Khả năng trở lại tủy và khả năng huy động vào máu tuần hoàn là hai quá trình đối ngược nhau, tùy thuộc vào sự tương tác giữa các chemokine, các thụ thể chemokine, tín hiệu nội bào, các phân tử bám dính và protease. Sự tương tác giữa SDF-1/ CXCL12 và receptor CXCR4 là rất quan trọng để giữ lại HSC trong tủy xương. Các phương pháp huy động HSC vào máu tuần hoàn hiện tại được sử dụng chủ yếu là: Hóa chất đơn thuần (thường sử dụng Cyclophosphamide), các cytokine kích thích phát triển (G-CSF, GM-CSF, IL3), sử dụng phối hợp hóa chất và cytokine (Cyclophosphamide và G-CSF), sử dụng chất đối vận CXCR4 (Plexirafor) [18].

### 1.2.2.3. Chết theo chương trình (apoptosis):

Số lượng HSC trong tủy xương được điều chỉnh bởi một sự cân bằng giữa mất tế bào (chết theo chương trình và sự biệt hoá) và tăng tế bào (tự tăng sinh và phân bào). Trong sinh máu bình thường, những yếu tố này được kiểm soát để bảo tồn trạng thái ổn định. [19]

#### **1.2.2.4. Tính mềm dẻo của HSC**

Nhiều nghiên cứu đang tiến hành đã đưa ra một khái niệm mới là HSC và các loại TBG khác có khả năng biệt hóa thành tế bào của nhiều loại mô khác rộng hơn là khả năng đã được biết đến trước đây. Tế bào tủy xương, sau khi khôi phục lại, có thể biệt hóa thành không chỉ thành các tế bào máu mà cả các tế bào cơ (gồm cả tế bào cơ xương và tế bào cơ tim), tế bào não, tế bào gan, tế bào da, tế bào phổi, tế bào thận, tế bào ruột và tế bào tụy [20].

#### **1.2.3. Dấu ấn bề mặt của HSC**

Các dấu ấn bề mặt của HSC người đã được xác định: CD34<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>, CD90<sup>-</sup>, CD38(±)..., kháng nguyên bạch cầu người-DR và một panel các marker của các dòng tế bào gốc tạo máu trưởng thành. TBG tạo máu CD34<sup>+</sup> có khả năng biệt hoá thành tất cả các dòng tế bào máu và có khả năng tăng sinh cao.[21]

Tuy nhiên, CD34 có thể không được biểu hiện trên tất cả các tế bào tiền thân. Bên cạnh CD34, một marker khác là prominin-1 (CD133) được biểu hiện trên cả tế bào tiền thân CD34<sup>+</sup>, và CD34<sup>-</sup>. [22]

### **1.3. TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ**

#### **1.3.1. Khái niệm, phân loại MSC**

Tế bào gốc trung mô (Mesenchymal stem cell - MSC) là TBG trưởng thành, đa năng được thu nhận từ những mô có nguồn gốc từ lớp trung bì. Ủy ban TBG mô và trung mô của hiệp hội trị liệu tế bào quốc tế (the Mesenchymal and Tissue Stem cells Committee of the International Society for Cellular Therapy – ISCT) đã đưa ra ba tiêu chuẩn tối thiểu nhằm xác định một quần thể MSC sau phân lập, nuôi cấy [23], theo đó:

- MSC phải bám dính vào bề mặt nhựa nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tiêu chuẩn;

- MSC biểu hiện dương tính với CD73, CD90 và CD105; biểu hiện âm tính với CD45, CD34, CD14 hoặc CD11b, CD79 hoặc CD19 và HLA-DR;

- MSC có khả năng biệt hóa in vitro thành tạo cốt bào, tế bào mỡ, tế bào sụn.

Mặc dù nguồn gốc của MSC được thu nhận từ những mô có nguồn gốc từ lớp trung bì như tủy xương nhưng gần đây MSC còn được tìm thấy ở cơ, màng hoạt dịch, dịch ối, rau thai, da, màng xương, máu ngoại vi và mô mỡ[24].

### **1.3.2. Đặc điểm MSC**

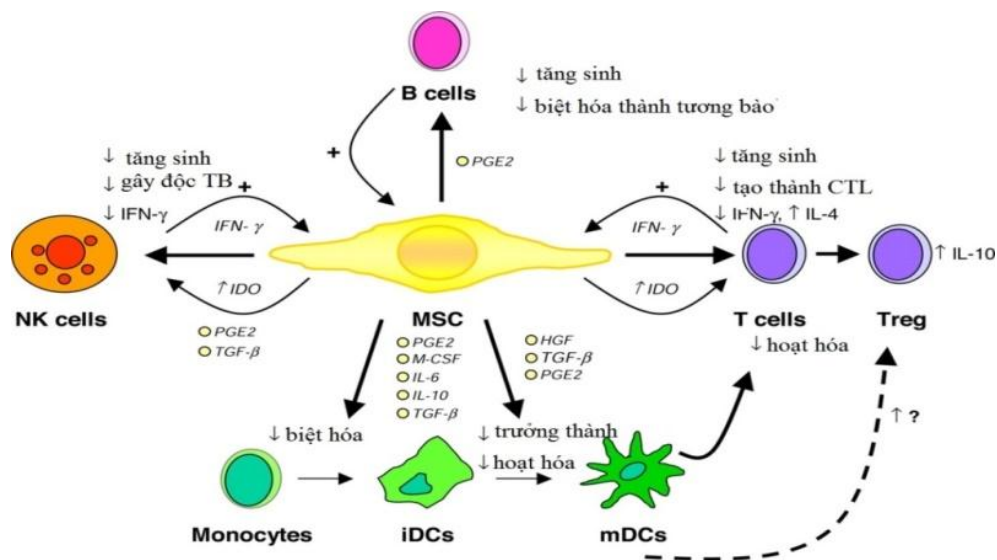
#### ***1.3.2.1. Hỗ trợ tạo máu***

Trong tủy xương, MSC giữ vai trò quan trọng trong việc hình thành vi môi trường cho quá trình tăng sinh và biệt hóa của HSC. Những tế bào này sản xuất protein ngoại bào như fibronectin, laminin, collagen và proteoglycan. In vitro, MSC tổng hợp và tiết ra các cytokin, chemokin và các yếu tố tăng trưởng, như: IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-14, IL-15, yếu tố kích thích tạo cụm đại thực bào (M-CSF), yếu tố kích thích tạo cụm bạch cầu hạt (G-CSF), yếu tố kích thích tạo cụm đại thực bào – bạch cầu hạt (GM-CSF), yếu tố ức chế bạch cầu (LIF), yếu tố TBG (SCF), tyrosine kinase-3 gan thai nhi, thrombopoietin, yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) [25]. Dưới tác động của hydrocortisone, MSC biệt hóa mô đệm có khả năng hỗ trợ sinh máu, biểu hiện bởi sự sinh trưởng các dòng tế bào tạo máu (Kỹ thuật tạo cụm CFC).

#### ***1.3.2.2. Điều biến miễn dịch***

Trong vài năm gần đây, MSC đã được chứng minh có hiệu quả trong điều trị rối loạn miễn dịch. MSC tiết ra một số cytokine và các thụ thể miễn dịch để thay đổi môi trường miễn dịch của vật chủ. MSC ức chế phản ứng miễn dịch quá mức của tế bào T, tế bào B, tế bào đuôi gai, đại thực bào và NK. Cơ chế cơ bản được cho là do tác dụng kết hợp của nhiều chất trung gian ức chế miễn dịch. Phần lớn các chất trung gian đều có thể được kích thích bởi các tác nhân kích thích viêm như: nitric oxide (NO), indoleamine 2,3, dioxygenase (IDO),

prostaglandin E2 (PGE2), tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein (TSG6), CCL-2, and programmed death ligand 1 (PD-L1). Những yếu tố này được biểu hiện tối thiểu trong các MSC bất hoạt, trừ khi chúng được kích thích bởi một số cytokin gây viêm như:  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , and IL-1 [26],[27].



**Hình 1.2: Khả năng điều biến miễn dịch của MSC**

Nguồn: Alma J. Nauta và W. E. Fibbe (2007) [28]

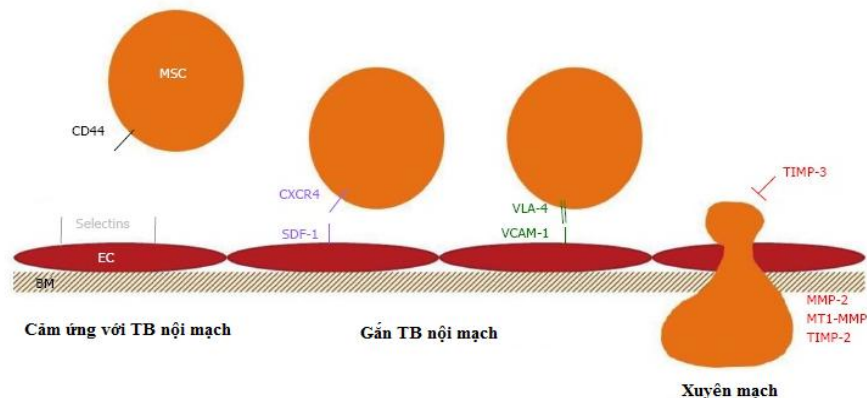
### 1.3.2.3. Khả năng di chuyển và định cư ngoài tủy xương (Homing)

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh MSC có thể tồn tại định cư ở ngoài tủy xương và di chuyển đến các mô tổn thương, nhờ đó có khả năng tăng cường quá trình liền vết thương, hỗ trợ sự tái tạo mô và có thể khôi phục vi môi trường của tủy xương in vitro [29]. Cơ chế di chuyển của MSC đã được nghiên cứu trong nhiều năm. Các nghiên cứu chỉ ra rằng MSC có phản ứng mạnh mẽ với các kích thích viêm hoặc hoá chất tiết ra từ mô tổn thương như các chemokine và yếu tố tăng trưởng: CCR1(CC1receptor), CCR4 (CC4 receptor), CCR7 (CC7 receptor), CXCR5 (CXC5 receptor), CCR10 (CC10 receptor), VEGF, HGF, SDF-1 $\alpha$ /CXCR4. MSC có khả năng tăng cường di chuyển đến các vùng thương tổn sau chấn thương cột sống nhờ sự tăng cường

biểu hiện của SDF-1 $\alpha$ /CXCR4[30],[31], [32]. Những thụ thể có thể có vai trò đối với khả năng di chuyển đặc hiệu trên.

Cũng như các loại TBG khác, MSC chịu sự điều hòa của vi môi trường nơi chúng tồn tại. Sau khi bị kích thích bởi các tổn thương cơ học, quá trình viêm, nhiễm trùng và ung thư, MSC di cư khỏi nơi trú ngụ của chúng và thâm nhập vào các vùng tổn thương, dẫn đến quá trình tái tạo mô. Các tín hiệu cụ thể trong quá trình tác động của MSC nhằm sửa chữa các tổn thương cho tới nay vẫn cần được nghiên cứu thêm. Đặc điểm này của MSC nếu được áp dụng sẽ hình thành một liệu pháp điều trị tạo điều kiện sửa chữa các mô bị tổn thương [33].

Quá trình Homing trải qua 3 giai đoạn: 1. Hoá hướng động/ Di chuyển, 2. Cuộn lại và di chuyển nội mô, 3. Hội nhập vào nhu mô. [34]



**Hình 1.3: Cơ chế Homing của MSC**

Nguồn: Ann De Becker và I. V. Riet (2016) [35]

#### 1.3.2.4. Khả năng biệt hóa của MSC

MSC có khả năng biệt hoá thành nhiều dòng tế bào khác nhau như: nguyên bào xương, tế bào sụn, tế bào cơ, tế bào mỡ...trong in vitro. Do vậy, các tế bào MSC được sử dụng nhiều nhất trong các nghiên cứu như một cách chứng minh về tiềm năng biệt hoá của TBG nói chung. Khả năng biệt hóa in vitro thành tạo cốt bào (osteoblast), tế bào mỡ (adipocytes), nguyên bào sụn (chondroblast) là một trong ba tiêu chuẩn tối thiểu được Ủy ban TBG mô và

trung mô của hiệp hội trị liệu tế bào quốc tế chọn để định nghĩa MSC của người [23]. Nghiên cứu khả năng biệt hóa in vitro của MSC được tiến hành từ rất sớm.

*- Biệt hóa tạo tạo cốt bào*

Các nghiên cứu cho thấy khả năng biệt hoá MSC thành tạo cốt bào dựa vào hoạt tính Alkaline phosphatase sau 7-14 ngày tác động với Dexamethasone, L. ascorbic acid 2-phosphate, glycerolphosphate. Sự tương tác lâu dài của MSC với các chất trên tạo sự tích tụ canxi trong chất nền. Ngoài ra, vai trò của protein tạo hình thể xương (BMP) cũng tác động để MSC tạo thành xương như: BMP-2, BMP-6, BMP-9.[36]

Một giả thuyết được đưa ra là quá trình tạo mỡ và xương của MSC có mối liên quan thuận nghịch, do các tác nhân sử dụng trong quá trình biệt hóa tạo tế bào mỡ cũng được sử dụng trong quá trình biệt hóa tạo xương và ngược lại [37].

*- Biệt hóa tạo tế bào mỡ*

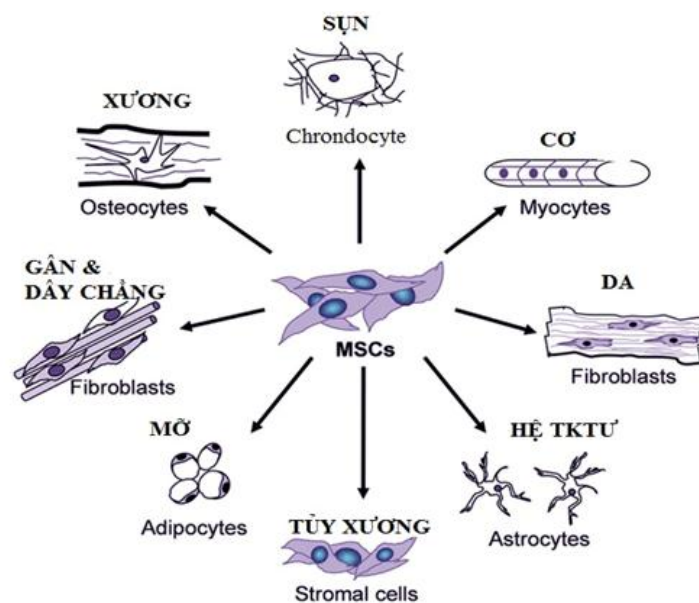
Sự biệt hoá MSC thành tế bào mỡ gây ra bởi việc kích hoạt các gen chịu trách nhiệm tạo mỡ. Trong nghiên cứu, MSC được nuôi cấy trong môi trường tăng trưởng được bổ sung dexamethasone, indomethacine, insulin and isobutyl methyl xanthine trong 3 tuần. Các tế bào được phân tích có sự tích tụ các giọt lipid và biểu hiện các gen đặc hiệu tế bào mỡ peroxisome proliferatoractivated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), adipocyte protein 2 (ap2) and lipoprotein lipase (LPL) [26].

*- Biệt hóa tạo nguyên bào sụn*

Sự biệt hoá của MSC thành sụn là một dấu hiệu quan trọng trong sự tái sinh sụn. Sụn có khả năng tái sinh thấp bởi sự khan hiếm các tế bào tiền thân tạo sụn trong cơ thể người trưởng thành. Các yếu tố phát triển chuyển dạng như TGF- $\beta$ 1, TGF-  $\beta$ 2, TGF-  $\beta$ 3 được mô tả kích thích sự tạo sụn của MSC. Sự kết hợp của TGF-3 và protein-6 tạo hình thể xương (BMP-6), gia tăng sự

tích tụ của chất nền sụn. Sự tiếp xúc có tính chu kỳ với TGF- $\beta$  sẽ cảm ứng mạnh các tích tụ chất nền, so với sự tiếp xúc liên tục của một mình TGF-3, hay một mình BMP-6 hoặc kết hợp [36].

MSC có thể biệt hoá thành tế bào sụn trong giàn khung 3D. Các giàn polymere hoá: alginate, agarose, chitosan, polyethylene glycol diacrylate (PEGDA) hydrogel cũng được sử dụng để cung cấp môi trường 3D cho sự biệt hoá các tế bào MSC thành sụn [36].



**Hình 1.4: Khả năng biệt hoá của MSC**

Nguồn: RoosterBio (February 15, 2014) [38]

### 1.3.2.5. Tính mềm dẻo của MSC

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, MSC có tiềm năng biệt hóa đa dòng. Ngoài khả năng biệt hóa thành các tế bào, mô thuộc trung bì như tạo cốt bào, tế bào mỡ, nguyên bào sụn, MSC còn có khả năng biệt hóa thành các tế bào có đặc điểm của tế bào lớp nội bì, tế bào thần kinh, tế bào cơ trơn, cơ vân và cơ tim [39] bằng cách sản xuất các yếu tố tăng trưởng, cảm ứng hóa học và tạo một vi môi trường thuận lợi cho quá trình tăng sinh, biệt hóa.

*In vitro*, MSC có thể biệt hóa thành tế bào thần kinh nhờ các tác nhân: DMSO, butylated hydroxyanisole [31],  $\beta$ -mercaptoethanol, KCL, forskolin và



hydrocortisone[40] hay Notch-1 và protein kinase A (PKA) [41]. Một báo cáo khác về khả năng MSC biệt hóa thành các tế bào tương tự neuron có các dấu ấn đặc trưng của neuron trưởng thành cũng được công bố. Tuy nhiên, các tế bào giống neuron này thiếu các kênh ion cần thiết cho việc tạo ra khả năng dẫn truyền thần kinh; vì thế, các tế bào này có thể không được phân loại là tế bào thần kinh thật sự [42].

K.D.Lee và cộng sự sử dụng các yếu tố tăng trưởng gan và oncostatin M để biệt hóa MSC thành những tế bào mang các dấu ấn của tế bào gan ( $\alpha$ -fetoprotein, glucose 6-phosphatase, tyrosine aminotransferase và CK-18) và sản xuất được albumin in vitro [43].

Tuy MSC có khả năng biệt hóa thành một số mô in vitro, nhưng những tế bào, mô này không mang đầy đủ đặc điểm và cơ chế sinh học của mô, tế bào đích.

### **1.3.3. Dấu ấn bề mặt của MSC**

Nhiều nghiên cứu về đặc điểm kiểu hình của MSC đã được tiến hành, tuy bộc lộ nhiều dấu ấn nhưng trong số đó lại không có dấu ấn nào đặc hiệu cho MSC. Điều này gây khó khăn cho việc phân lập, chọn lọc cũng như đánh giá quần thể MSC một cách chính xác. Theo ISCT, một trong ba tiêu chuẩn tối thiểu để xác định một quần thể MSC sau phân lập, nuôi cấy là: biểu hiện dương tính với CD73, CD90 và CD105; biểu hiện âm tính với CD45, CD34, CD14, hoặc CD11b, CD79 hoặc CD19 và HLA-DR [23]. Tiêu chuẩn này nhằm thống nhất các kết quả nghiên cứu của nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới. Các công bố nghiên cứu về việc phân lập MSC từ các mô trưởng thành, về đặc điểm cũng như khả năng ứng dụng của MSC cần tuân thủ những tiêu chuẩn tối thiểu nêu trên của ISCT.

## 1.4. ỨNG DỤNG CỦA HSC VÀ MSC

### 1.4.1. Ứng dụng của HSC

Các ứng dụng chủ yếu có thể chia thành 4 loại chính:

- Ghép HSC để điều trị bệnh lý cơ quan tạo máu: Loxêmi, lymphoma, bệnh lý di truyền,...

- Ghép HSC tự thân như một biện pháp giải cứu, điều trị hỗ trợ cho bệnh nhân ung thư để có thể dùng hóa trị liệu hoặc xạ trị liều cao.

- Ghép HSC đồng loại trong điều trị nhiều bệnh khối u của các tổ chức rắn như ung thư phổi, tiền liệt tuyến, vú, buồng trứng, đại tràng, ung thư đường mũi họng... Trong trường hợp ghép đồng loại ngoài tác dụng thay thế những HSC đã bị tổn thương còn có tác dụng diệt các tế bào ác tính của hội chứng mảnh ghép chống chủ (nhờ sự khác biệt về phức hệ hòa hợp tổ chức giữa người cho và người nhận) [44].

- Sử dụng HSC trong điều trị những bệnh lý khác:

- + Tự miễn: dùng TBG trong những trường hợp này với hy vọng thiết lập và chương trình hoá lại hệ thống miễn dịch.

- + Dùng HSC như một phương tiện chuyển gen. Dùng HSC trong điều trị hàn gắn, sửa chữa những tổn thương của tế bào, cơ quan, tổ chức dựa vào tính linh hoạt mềm dẻo của HSC [45], [46].

### 1.4.2. Ứng dụng của MSC

Các bằng chứng in vitro và in vivo cho thấy MSC có nhiều đặc điểm nổi trội với vai trò ứng viên cho liệu pháp cấy ghép tế bào, bao gồm: dễ dàng thao tác, phân lập; thời gian mọc ghép tương đối ngắn; giữ nguyên đặc điểm sinh học sau cấy chuyển; không gây phản ứng phụ khi ghép tự thân hay đồng loài; MSC sau nuôi cấy không biểu hiện dấu ấn MHC lớp II [47].

- Với các đặc điểm trên, MSC và các tế bào tương tự MSC trở thành nguồn TBG đầy hứa hẹn trong điều trị. Các lĩnh vực đã được nghiên cứu ứng

dụng MSC bao gồm: Nuôi cấy tăng sinh MSC và truyền trở lại bệnh nhân nhằm thúc đẩy nhanh sự tái tạo vi môi trường và cung cấp điều kiện tối ưu hỗ trợ quá trình tạo máu, sử dụng MSC để sửa chữa tái tạo mô cơ tim trong điều trị các bệnh tim mạch nói chung và nhồi máu cơ tim nói riêng [48], sử dụng MSC để ghép thay thế và tái tạo lại các tế bào thần kinh dùng trong trường hợp bệnh Parkinson, teo cơ xơ cứng bên, bệnh Huntington, Alzheimer [49],[50],[51], tái tạo các tổ chức có nguồn gốc trung mô như mô xương, sụn, dây chằng...[52], sử dụng TB đệm trung mô để hỗ trợ sự tăng sinh của các HSC khi nuôi cấy[53], biệt hóa TBG trung mô thành tế bào tiết insulin trong điều trị đái tháo đường [54], sử dụng MSC trong điều trị bệnh mảnh ghép chống chủ (Graft versus host disease – GVHD) [55].

### **1.5. CHẤN THƯƠNG CỘT SỐNG LIỆT TUYỆT HOÀN TOÀN**

CTCS là những thương tổn của xương, dây chằng, đĩa đệm cột sống có thể gây nên tình trạng tổn thương thần kinh tạm thời hoặc vĩnh viễn cho bệnh nhân.

Liệt tủy hoàn toàn thường xảy ra khi tổn thương nằm trên nón tủy, trên lâm sàng được biểu hiện mất hoàn toàn vận động và cảm giác dưới khu vực chi phối bởi tủy tổn thương bao gồm cả cảm giác quanh hậu môn, vẫn còn phản xạ hành hang. Nếu phản xạ này mất tức là có choáng tủy và phải đợi hết giai đoạn này (khi có phản xạ hành hang trở lại) thì mới xác định được thương tổn tủy biểu hiện trên lâm sàng. Thường sóc tủy hết sau 24-48 giờ và bệnh nhân có phản xạ trở lại (các biểu hiện rối loạn cơ tròn, rối loạn dinh dưỡng, dương vật cương cứng).

#### **1.5.1. Phân loại CTCS**

Dựa vào lâm sàng tổn thương tủy sống hoàn toàn khi bệnh nhân mất hoàn toàn chức năng vận động, cảm giác và phản xạ dưới tổn thương sau khi chấm dứt giai đoạn choáng tủy.

Đánh giá dựa trên thang điểm AIS (The AISA Impairment Scale, 2011)

**Bảng 1.1: Thang điểm AIS (The ASIA Impairment Scale)**

*Nguồn: Steven C. Kirshblum (2011) và Jenna L. Robbins (2015) [56] [57]*

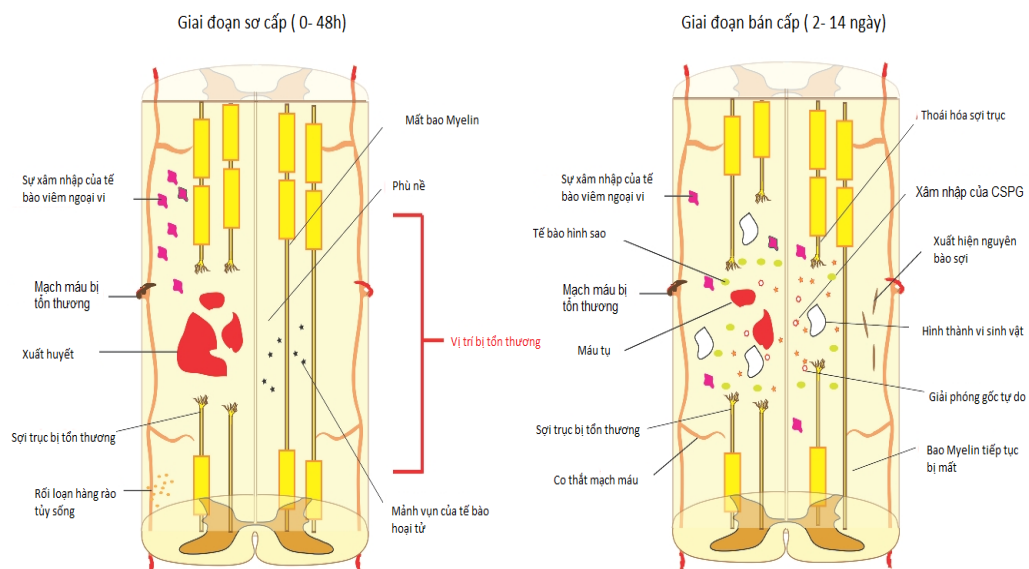
<b>Loại</b>	<b>Mô tả</b>
A	Hoàn toàn: mất hoàn toàn cảm giác hay vận động (VĐ) ở đoạn S4-S5.
B	Không hoàn toàn: còn cảm giác, không có VĐ dưới tổn thương (TT) (S4-S5)
C	Không hoàn toàn: còn VĐ dưới nơi TT (trên 50% các cơ chính dưới TT <3).
D	Không hoàn toàn: còn VĐ dưới TT (trên 50% các cơ chính có sức cơ $\geq 3$ ).
E	Bình thường: cảm giác và VĐ bình thường.

**1.5.2. Sinh lý bệnh chấn thương cột sống**

Quá trình bệnh lý sau chấn thương cột sống được chia làm hai giai đoạn nguyên phát và thứ phát. Thương tổn nguyên phát theo cơ chế vật lý do lực kéo, lực nén tác động trực tiếp làm dập nát các tổ chức thần kinh, đồng thời mạch máu bị tổn thương với sự xuất huyết vùng xám trung tâm của tủy, làm tổn thương màng tế bào và phù nề tạo ra hàng rào máu tủy, gây thiếu máu cục bộ, giải phóng các độc chất, làm thay đổi các chất điện giải. Thương tổn thứ phát xảy ra sau chấn thương cơ học sẽ dẫn đến hoại tử và chết tế bào, giảm chức năng các tế bào thần kinh lân cận. Diễn biến sinh lý bệnh trong giai đoạn tổn thương thứ cấp làm trầm trọng hơn tổn thương ban đầu và tạo ra môi trường nội sinh ức chế quá trình sửa chữa, tái tạo, tái sinh tế bào. Sự mất cân bằng nội môi làm tăng calci huyết, kích hoạt các protease, gây rối loạn chức năng ty thể dẫn đến các tế bào bị chết. Phản ứng viêm đóng một vai trò quan trọng trong giai đoạn thứ phát sau chấn thương cột sống thông qua hàng loạt các tương tác tế bào và phân tử phức tạp[2]. Các tế bào viêm như đại thực

bào, tế bào lympho T, bạch cầu trung tính... xâm nhập phá vỡ hàng rào máu tủy, giải phóng các cytokine gây viêm như TNF  $-\alpha$ , interlekin (IL)  $-1\alpha$ , IL- $1\beta$ , IL- 6 từ 6 đến 12 giờ sau chấn thương và tiếp tục tăng lên sau 4 ngày [3]. Giai đoạn cuối của sự biến đổi sau chấn thương cột sống được xác định là biến đổi về sinh lý bệnh với sự hình thành sẹo lồi, syrinx, và chết theo chu trình [1]. Các giai đoạn chấn thương cột sống được chia thành giai đoạn cấp tính (từ 0 giờ đến 48 giờ), giai đoạn bán cấp (từ 2 đến 14 ngày) và giai đoạn trung gian (từ 2 tuần đến 6 tháng), mãn tính ( $>6$  tháng) [2].

Áp dụng cơ chế sửa chữa, tái tạo nội sinh xảy ra trong giai đoạn thứ cấp của chấn thương là để giảm thiểu mức độ tổn thương, tái cung cấp sự lưu thông máu trong các mạch máu, sửa chữa các tổ chức thần kinh bị phá hủy với nhiều biện pháp điều trị được đưa ra nghiên cứu, nhưng trong đó liệu pháp tế bào gốc là phương pháp có nhiều hứa hẹn nhất.



**Hình 1.5: Các giai đoạn sinh lý bệnh của chấn thương cột sống**

*Nguồn: Christopher S. Ahuja (2017) [58]*

### 1.5.3. Các phương pháp điều trị CTCS

#### 1.5.3.1. Phương pháp nội khoa

##### •Thuốc chống phù nề tủy

Ngoài việc bất động, việc chống phù nề tủy còn được thực hiện nhờ thuốc: Methyl prednisolone đường tĩnh mạch 30mg/kg trước 8 giờ tiếp theo bởi 5mg/kg/giờ, trong 23 giờ. Tuy nhiên, hiện nay, việc sử dụng phác đồ này còn nhiều tranh cãi, chưa thống nhất có áp dụng thường quy hay không.

*Nhược điểm:* tỷ lệ nhiễm trùng hậu phẫu cao và biến chứng xuất huyết dạ dày. Mặt khác, chỉ có những tủy sống bị phù nhẹ mới phục hồi tốt với corticoid, còn những tủy sống bị xuất huyết thì không thể phục hồi.

##### •Điều trị bảo tồn

Phương pháp bảo tồn chủ yếu dành cho những trường hợp gãy không kèm liệt hoặc những bệnh nhân quá yếu không chịu nổi phẫu thuật. Được thực hiện chủ yếu bằng 2 cách:

- Nằm nghỉ trên giường 8 – 10 tuần, kết hợp với tập luyện cơ năng;
- Bệnh nhân sau CTCS có thể bất động bằng bó bột[59] hoặc nằm bất động trong những ngày đầu [60] và đều được tập vận động sớm.

#### 1.5.3.2. Phương pháp phẫu thuật

##### •Giải ép tủy sống

Phẫu thuật giải ép được chỉ định khi thân đốt sống vỡ mà tổn thương thần kinh, đặc biệt là khi có sự liên quan giữa tổn thương trên lâm sàng và hình ảnh chèn ép tủy trên phim cộng hưởng từ và CT. Có hai phương thức giải ép là giải ép trực tiếp và giải ép gián tiếp.

##### - Giải ép gián tiếp

Kỹ thuật sử dụng nắn chỉnh mảnh xương trong ống tủy mà không can thiệp vào mảnh xương đó. Theo Edwards giải ép gián tiếp nhằm các mục đích: Đem lại trục giải phẫu, giãn nẹp phía sau làm căng dây chằng dọc sau,

sẽ đẩy miếng xương vỡ ra phía trước, uốn tối đa cột sống để tăng cường đẩy miếng xương ra trước.

- *Giải ép trực tiếp*

Gồm hai hình thức:

+ Giải ép trực tiếp qua đường mổ phía sau: được thực hiện bởi thủ thuật mở cung sau phối hợp với lấy một phần thân đốt sống, đẩy mảnh xương chèn ép ra phía trước.

+ Giải ép trực tiếp qua đường mổ phía trước: có nhiều tác giả cho rằng việc lấy mảnh xương chèn ép ở phía trước là an toàn và triệt để hơn. Với những tổn thương vỡ nát thân đốt sống nếu chỉ định cố định và giải ép lõi sau mà không tạo dựng lại được cột trụ giữa và trước thì sẽ gây ra gù cột sống.

#### • **Cố định, kết hợp xương**

- Phẫu thuật đã được áp dụng rộng rãi nhất là phẫu thuật Harrington vì có thể tạo sự căng dây dọc sau để nắn xương tạo sự uốn và nắn giữ xương bằng 3 điểm. Tuy nhiên áp dụng cho gãy cả 3 cột hoặc có đứt dây dọc sau có thể đưa tới căng giãn tủy sống quá mức; người ra phương pháp này không chống lại được lực xoay và rất hay bị biến chứng tuột móc.

- Nẹp Roy Camille: Nẹp được bắt vào cuống cung sau khi nắn cột sống bằng cách cho uốn tối đa trên bàn mổ và nẹp chỉ giữ một cách thụ động. Khuyết điểm chính là nẹp và vít chống lại lực làm gập cột sống rất kém: các vít xa hay tuột ra hoặc gãy, vì vậy sau mổ bệnh nhân vẫn phải mang áo nẹp phụ trợ bên ngoài.

- Khung Hartchill: Dùng chỉ thép luồn dưới bản sống và ngoài màng cứng để buộc ép khung Hartchill là phương pháp rẻ tiền, nắn được cột sống bằng nhiều điểm. Khuyết điểm chính là không chống lại lực dồn nén dọc trục khi bệnh nhân ngồi vì các mối chỉ có thể trượt theo hai thanh dọc của khung một cách dễ dàng.

- Phẫu thuật kết hợp cả bản sống lẫn cuống cung: với ưu điểm như rất vững nên chỉ cần cố định một đoạn ngắn của cột sống; không cần mang nẹp bên ngoài và bệnh nhân có thể ngồi dậy ngay; dụng cụ có thể thích ứng với mọi tình huống, chống đỡ tốt lực gập, lực căng giãn hay lực xoay.

*Ưu điểm của phương pháp phẫu thuật:* Làm vững lại cột sống, giải phóng chèn ép, giúp tập vận động sớm, giảm đau, thuận lợi chăm sóc, sớm trở lại công việc, tránh được các biến chứng muộn.

*Nhược điểm của phương pháp phẫu thuật:* Tỷ lệ phục hồi tổn thương tủy thấp.

### **1.5.3.3. Liệu pháp TBG trong điều trị CTCS có liệt tủy hoàn toàn.**

Tế bào gốc tủy xương có hai loại tế bào chính bao gồm tế bào gốc tạo máu (HSC) và tế bào gốc trung mô (MSC). Nhưng vai trò riêng biệt hay phối hợp của HSC và MSC trong tủy xương còn đang là vấn đề được quan tâm. Nghiên cứu cho thấy HSC và MSC thúc đẩy quá trình tái tạo bao myelin, kết nối sợi trục và phục hồi chức năng thần kinh. Nhiều nghiên cứu đã ghi nhận thành công khi ghép HSC và MSC trong điều trị chấn thương tủy sống [61], [62]. HSC và MSC có khả năng hình thành tế bào đệm và tế bào thần kinh để đáp ứng với sự đa dạng của hình thái gen, hóa học, sinh lý [62]. Phần lớn các ca thực nghiệm ghép HSC và MSC trên động vật CTCS diễn ra ở giai đoạn cấp tính và bán cấp. Ghép HSC và MSC có những ảnh hưởng khác nhau ở từng giai đoạn của bệnh, trong đó ghép ở giai đoạn cấp tính mục đích chống viêm, còn trong giai đoạn bán cấp và mãn tính thúc đẩy hình thành tế bào đệm và tế bào thần kinh [62].

Các thử nghiệm điều trị tổn thương hệ thống thần kinh trung ương có thể nhóm thành 2 chiến lược điều trị riêng biệt nhưng có liên quan nhau là bảo vệ thần kinh (*neuroprotection*) và sửa chữa/ tái sinh thần kinh (*neurorepair/ neuroregeneration*). Bảo vệ thần kinh đề cập đến tác động ức chế sự chết đi của các tế bào nhu mô của hệ thần kinh trung ương sau tổn thương. Sửa chữa



thần kinh đề cập đến việc tái sinh các sợi trục thần kinh bị đứt hoặc làm phát triển các sợi trục nguyên vẹn nhằm phân bố lại các dây thần kinh bị đứt. MSC đã được sử dụng trong cả 2 chiến lược này. [63]

- *Điều biến miễn dịch và chống viêm*

Tế bào MSC có đồng thời khả năng tăng cường và ức chế miễn dịch [64]. Phản ứng miễn dịch và viêm đóng vai trò quan trọng trong việc lan truyền và làm tăng mức độ nghiêm trọng của tổn thương tủy sống, cũng như phản tác dụng điều trị. Trong cấy ghép đồng loài, các tế bào cấy ghép cân trộn hệ miễn dịch của người nhận một phần nào đó và chủ động điều hòa khu vực vết thương bị viêm. MSC và HSC đã được chứng minh có khả năng điều biến miễn dịch và chống viêm trong các nghiên cứu *in vivo* và *in vitro* [65]

MSC tích cực tham gia vào quá trình cân bằng nội mô của tủy xương được coi như hàng rào đầu tiên của hệ thống miễn dịch. Bên cạnh đó, để nhanh chóng chữa lành tổn thương tủy sống bằng các tác nhân gây nhiễm mà không gây ra phản ứng viêm quá mức, tế bào MSC có thể chuyển từ kích thích miễn dịch sang ức chế miễn dịch tùy theo hoàn cảnh [66].

Tính ức chế miễn dịch này, khi kết hợp cùng chức năng phục hồi của MSC sẽ làm giảm đáp ứng viêm cấp tính tới chấn thương cột sống, giảm thiểu sự hình thành nang, cũng như làm giảm phản ứng của các tế bào tiêu thần kinh đệm, đại thực bào [67].

Một số kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng các MSC không ức chế miễn dịch tự phát mà chúng cần được kích hoạt để biểu hiện các đặc tính điều hoà miễn dịch của chúng thông qua các yếu tố IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ . Một trong những yếu tố tạo ra đầu tiên sau khi kích hoạt tế bào T là IFN- $\gamma$ . Cytokine này thường sẽ cung cấp tín hiệu kích hoạt tế bào T, nhưng với sự có mặt của MSC sẽ làm ức chế sự tăng sinh tế bào T. Các yếu tố TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$  có khả năng kích hoạt điều biến miễn dịch nhưng chúng lại không thể ức chế tăng sinh tế bào T qua MSC.

Sau tác động TNF –  $\alpha$ , IL - 1 $\beta$  là có sự thay đổi kiểu hình của MSC, gồm biểu hiện MHC lớp 1, ICAM -1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule – 1), VCAM -1 (Vascular Cell Adhesion Molecule – 2). Ngoài ra cũng có biểu hiện MHC lớp II có thể hỗ trợ chức năng trình diện kháng nguyên của MSC. Sự kích hoạt MSC còn do kích thích của yếu tố tiền viêm, thông qua sự cảm ứng COX- 2 làm giảm hoạt động heme oxygenase – 1 (HO – 1). Đồng thời MSC tương tác với IFN -  $\gamma$ , TNF-  $\alpha$  dẫn đến sự hoạt hóa của superoxide dismutase 3, một enzyme chống viêm có liên quan đến quá trình dị hóa. Kích hoạt MSC do IFN -  $\gamma$ , TNF-  $\alpha$  đã tạo ra các chemokine receptor như CC-chemokine Receptor 5 (CCR5), CC-chemokine Receptor 10 (CCR10), CXC-chemokine Receptor 3 (CXCR3), C-X-C motif chemokine Receptor 9 (CXCL9), và C-X-C motif chemokine Receptor 10 (CXCL10) có thể ức chế sự tăng sinh của các tế bào phản ứng của hệ thống miễn dịch [68].

*- Di chuyển và định cư tại vị trí tổn thương (Homing)*

Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra MSC có khả năng di chuyển đến các vị trí tổn thương sau khi bị gãy xương, nhồi máu cơ tim, thiếu máu cục bộ, chấn thương não và cột sống....[69]

Nhờ đặc tính homing của MSC, nó có thể về đúng mô tổn thương, tích hợp và cung cấp hiệu ứng điều hòa miễn dịch. Quá trình homing trải qua 3 giai đoạn: Hóa hướng động/ di chuyển, cuộn lại và di chuyển nội mô, thâm nhập vào nhu mô. Khả năng di chuyển và định cư tại vị trí tổn thương, hoặc gần vùng tổn thương của MSC sau ghép đóng vai trò quan trọng, liên quan mật thiết đến khả năng tái sinh của chúng. Các cơ chế di chuyển và định cư của MSC vẫn đang được nghiên cứu rộng rãi. Các nghiên cứu đã chứng minh rằng MSC phản ứng mạnh mẽ với các kích thích viêm giải phóng từ các mô bị thương bao gồm chemokines và các yếu tố tăng trưởng khác nhau như yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF), yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) và

trục SDF-1  $\alpha$  / CXCR4 [70] [68]. Bên cạnh đó, chất P hoạt động như một chất dẫn truyền thần kinh có thể huy động MSC từ tủy xương và sau đó thâm nhập vào các mô bị suy yếu [71]. Yếu tố kích thích tăng bạch cầu hạt (G-CSF) cũng được biết là thúc đẩy huy động MSC cho mô bị thương [72]. Nghiên cứu gần đây cũng cho thấy rằng peptit liên quan đến gen calcitonin (CGRP- Calcitonin gene-related peptide) là một trong những yếu tố then chốt điều chỉnh quá trình homing của các MSC được cấy ghép đến các vị trí tổn thương tủy [73] [32]

*- Sửa chữa và thay thế tế bào thần kinh tổn thương*

Đã có những báo cáo cho rằng, khi các MSC nguồn gốc tủy xương được nuôi cấy trong các điều kiện cụ thể như sự có mặt của yếu tố tăng trưởng biểu bì hoặc BDNF, chúng phát triển các hình thái thần kinh và bắt đầu biểu hiện các dấu ấn thần kinh. Một số nhà nghiên cứu khác đã sử dụng DMSO 2% để làm cho các MSC biểu hiện các dấu hiệu thần kinh. Những phát hiện này chứng tỏ khả năng biệt hoá của MSCs thành tế bào thần kinh, từ đó cho thấy một tiềm năng cho việc sử dụng MSC trong việc thay thế tế bào thần kinh tổn thương sau chấn thương tủy và bệnh của hệ thống thần kinh [63].

Theo một số nghiên cứu hình thái học, các dấu ấn protein của tế bào thần kinh và tế bào thần kinh đệm được biểu hiện trên các MSC cấy ghép sau tổn thương tủy sống. Ví dụ, một lượng nhỏ MSC gắn huỳnh quang có thể được tìm thấy trong các mạch máu ở vùng tổn thương, nơi chúng có thể biệt hoá thành các tế bào thần kinh, MSC có thể di chuyển vào vùng bị thương và biệt hoá thành các tế bào giống tế bào thần kinh. Trong một nghiên cứu khác, biểu hiện của  $\beta$  III-tubulin tại vị trí chấn thương đã được xác minh cho thấy khả năng tái sinh chức năng [32].

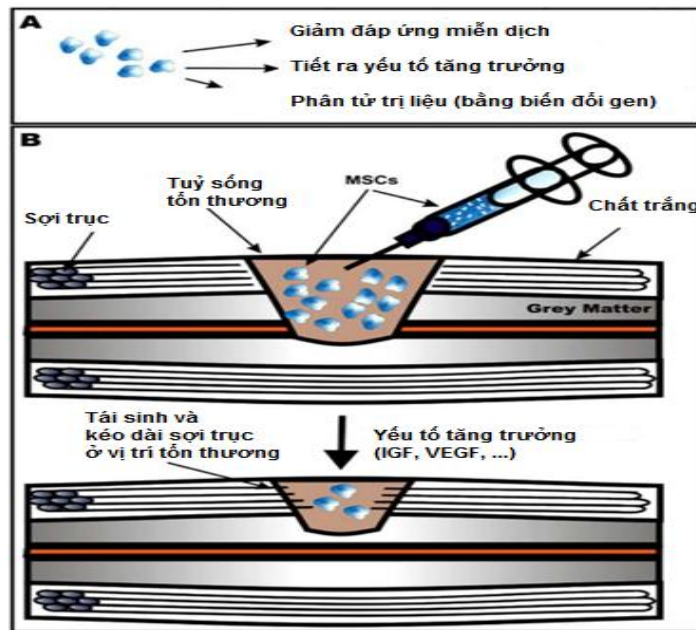
Tuy nhiên, theo một số báo cáo, có sự biệt hoá thành tế bào thần kinh của MSCs in vivo nhưng số lượng sống sót của các neuron ghép và biệt hoá là quá nhỏ để được xem là đóng vai trò phục hồi chức năng sau chấn thương tuỷ sống [74] [75]. Hơn nữa, các tế bào này, đôi khi, không cho thấy đặc tính điện sinh lý thần kinh cụ thể [76]. Hiện vẫn còn nhiều ý kiến gây tranh cãi về khả năng biệt hoá thần kinh của các MSCs in vivo. Một số dữ liệu thực nghiệm ủng hộ quan điểm khác, cho rằng MSC có khả năng tiết ra các yếu tố hòa tan hạn chế tế bào chết trong hệ thần kinh trung ương hoặc thúc đẩy sự phát triển của tế bào tiền thân nội sinh đóng vai trò quan trọng trong việc sửa chữa tổn thương tuỷ sống [32].

- *Giảm sẹo*

Các sẹo hình thành do quá trình tăng sinh quá mức của các tế bào thần kinh đệm và các phản ứng của tế bào này sau chấn thương cột sống đã giới hạn sự lan rộng tổn thương sang các mô lân cận. Tuy nhiên đặc biệt sau chấn thương cột sống, vết sẹo do tế bào thần kinh đệm có thể phát triển và thâm nhập vào phần trên và dưới vết thương, tiếp tục ảnh hưởng đến chức năng vận động và cảm giác. MSC với khả năng giảm đáp ứng viêm cấp tính sau chấn thương cột sống giúp giảm sự hình thành khoang và hạn chế hoạt động của các tế bào đệm hình sao, tiểu tế bào thần kinh đệm, đại thực bào, giúp hạn chế vùng tổn thương, nhờ đó làm giảm sự hình thành mô sẹo. Nghiên cứu khác cho thấy nhờ cấy ghép MSC sau chấn thương giúp thay đổi môi trường viêm bằng cách chuyển đổi kiểu hình đại thực bào từ dạng M1 sang M2. Các đại thực bào kiểu hình M2 thể hiện khả năng thực bào cao do sự hiện diện của endosomes/ lysosomes và cấu trúc ảm bào với enzyme tiêu hóa để loại bỏ mô sẹo và các chất ức chế tăng trưởng có trong các mảnh vỡ myelin, nhờ đó cho phép tái tạo các sợi trục thần kinh [77].

- Kỹ thuật di truyền trước khi cấy ghép MSC

Một chiến lược khả thi khác là làm tăng cường việc sản xuất các yếu tố hòa tan (soluble factor) bằng cách biến đổi di truyền các MSC. MSC đã được biến đổi gen để sản xuất một loạt các yếu tố dinh dưỡng thần kinh bao gồm neurotrophin-3, BDNF, NGF sau đó được cấy ghép vào vị trí tổn thương tủy sống. Các MSC được biến đổi di truyền tăng cường biểu hiện của neurotrophin-3 có thể kích thích sự phát triển của sợi trục thần kinh ở ống thần kinh vô-tủy (*corticospinal tract*) trong tổn thương tủy sống [78]. Tác dụng thúc đẩy sự tái sinh các sợi trục thần kinh ở các đường thần kinh vận động như đường rubrospinal từ nhân đỏ (màu đỏ), đường vestibulospinal (màu lục), đường reticulospinal trong tủy sống bị tổn thương của BDNF được tiết ra từ MSC cấy ghép 4 tuần sau khi xảy ra chấn thương [79]. Khi các MSC tiết ra BDNF được cấy ghép vào vị trí bị đứt của đường thần kinh rubrospinal [80] hay tổn thương bó bên (*lateral funiculus*) [79] trong tủy sống của chuột trưởng thành, nó không chỉ làm giảm việc mất đi các tế bào thần kinh trong nhân đỏ mà còn kích thích sự tái phát triển của các sợi trục thần kinh đưa đến sự phục hồi vận động. Hơn nữa, khi MSC của người được biến đổi để biểu hiện BDNF bằng cách chuyển với vector adenovirus [81], [82] được cấy ghép vào chuột bị chứng tắc động mạch não giữa tạm thời (*middle cerebral artery occlusion* \_MCAO), có thể làm phục hồi tình trạng thiếu máu cục bộ sau 7-14 ngày và giảm sự apoptotic của một số tế bào trong vùng Penumbra. Ngoài ra MSC có biểu hiện BDNF và neurotrophin-3 ở mức cao không chỉ kích thích phục hồi cử động chân sau mà còn phục hồi chức năng của bàng quang trong tổn thương tủy sống vùng ngực.



**Hình 1.6: Liệu pháp sử dụng MSC trong điều trị tổn thương hệ thần kinh trung ương.** Nguồn: Michael F Azari (2010) [63]

(A) MSC có một vài tính chất có thể sử dụng trong các liệu pháp tái sinh (*regenerative medical approach*) như khả năng làm giảm các đáp ứng của hệ thống miễn dịch và tiết ra các yếu tố tăng trưởng (*growth factors*), và có thể được sử dụng như các vector tế bào (*cellular vector*) nhằm phân phối các phân tử trị liệu (*therapeutic molecule*) như các peptide có khả năng ức chế những yếu tố ức chế tăng trưởng tiết ra do lớp vỏ myelin (*myelin derived inhibitory factors* \_*MAIFs*) ngăn chặn sự tái sinh của sợi trục thần kinh. (B) Việc cấy ghép MSC, đặc biệt là những MSC được biến đổi di truyền để tiết ra các yếu tố dinh dưỡng thần kinh (*neurotrophic factor*) như BDNF, làm tái sinh các sợi trục thần kinh bị tổn thương và sự kéo dài của chúng ở vị trí tổn thương, làm giảm kích thước của vị trí tổn thương tuỷ sống [63].

Tuy nhiên, các quần thể tế bào thần kinh khác nhau có các đáp ứng khác nhau với các neurotrophin được tiết ra bởi tế bào gốc. Vì vậy nhu cầu của các mô trong hệ thần kinh trung ương đối với các yếu tố dinh dưỡng thần kinh là rất phức tạp và mang tính chuyên biệt cho từng loại tế bào. Chính vì vậy, đòi

hỏi phải có sự tinh tế hơn trong việc thiết kế các chiến lược điều trị nhằm kết hợp một cách chính xác các yếu tố dinh dưỡng thần kinh và cách thức phân phối chuyên biệt để kích thích sự tái sinh của các tế bào thần kinh mong muốn [63].

**• Vai trò của HSC trong quá trình phục hồi tổn thương tủy sống**

Kháng nguyên CD34 là một marker của HSC, có mặt trên tất cả các HSC nguyên thủy, tất cả các tế bào tạo cụm và các tế bào tiền thân của hai dòng T và B lympho. Hiện nay phân tử CD34 trên bề mặt tế bào là một marker chủ yếu để xác định HSC [12]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh HSC ngoài khả năng biệt hóa thành các dòng tế bào máu còn có thể chuyên biệt hóa thành các tế bào thần kinh trung ương, các neuron và tế bào đệm thần kinh [83], [84], [85]. Barbara và cộng sự (2005) đã báo cáo các trường hợp bệnh nhân có tổn thương não được ghép TBG tủy xương đã chọn lọc CD34+. Kết quả cho thấy, các neuron và tế bào hình sao được phát hiện bằng mô học và hóa mô miễn dịch ở vùng vỏ não, hồi hải mã, thể vân và tiểu não. Tuy nhiên, ở những vùng chất xám và chất trắng chỉ tìm thấy các tế bào đệm thần kinh [85].

Tác giả Simmon và Torok [86] báo cáo khi nuôi cấy các tế bào tủy xương người đã chọn lọc CD34+ có hình thành các cụm nguyên bào sợi (CFU-F), chứng minh rằng có thể tồn tại sự giao thoa các tế bào tiền thân tạo máu và MSC. Khi nuôi cấy các tế bào tủy xương đã được chọn lọc CD34+ trong hệ thống nuôi cấy tủy xương dài hạn, một quần thể tế bào không đồng nhất bao gồm cả nguyên bào sợi, tế bào mỡ, tế bào cơ trơn và đại thực bào được tạo ra.

Tác giả Liu Lin Xiong (2017) cấy ghép HSC trên chuột cho thấy có sự giảm thể tích tủy sống, bảo vệ thần kinh chuột sau chấn thương cột sống, cải thiện các thiếu hụt liên quan đến tái tạo thần kinh và Oligogenesis, ức chế các Astrogliosis vì sự giảm vừa phải Astrogliosis tạo cơ hội cho sự tái tạo thần kinh, sự tăng của Oligogenesis có vai trò quan trọng trong hình thành bao

myelin. Như vậy HSC có vai trò quan trọng như một nguồn tế bào thần kinh tiềm năng để sửa chữa các tổn thương tuỷ sống.

## **1.6. SỬ DỤNG TẾ BÀO GỐC TUỶ XƯƠNG TRONG ĐIỀU TRỊ CHẤN THƯƠNG CỘT SỐNG**

### **1.6.1. Nghiên cứu tiền lâm sàng trên động vật**

Với khả năng tìm đến vị trí tổn thương và biệt hóa thành nhiều loại tế bào trong cơ thể để phục hồi các thương tổn, MSC đã thu hút được nhiều nghiên cứu tiền lâm sàng trên CTCS [87] [88]. Với kiểu hình dị gene (*heterogeneity*) và khả năng tổng hợp ra nhiều loại protein điều hòa phân bào giải thích được đặc tính và khả năng của MSC trong đáp ứng các loại thương tổn khác nhau [89]. Các mô hình nghiên cứu cũng như các thử nghiệm tiền lâm sàng của MSC trên CTCS đã đưa ra các kết quả khả quan về việc cải thiện chức năng ở những động vật thử nghiệm. Tế bào MSC được kỳ vọng là có khả năng cung cấp các chất nền trong quá trình tái sinh sợi trục (*axonal regeneration*) và cũng được ví von như “một ống bơm dinh dưỡng” cung cấp cho chất trắng và quá trình tái sinh sợi trục [90]. Lợi ích của việc cấy ghép MSC trong điều trị tổn thương hệ thần kinh trung ương còn có thể được lý giải bởi khả năng cung cấp các yếu tố sinh trưởng hay điều hòa hệ thống miễn dịch. Một trong những mục tiêu chính trong liệu pháp tế bào gốc là ngăn chặn quá trình apoptosis [91] thay thế các tế bào chết, cụ thể ở đây là thay thế các tế bào thần kinh ít nhánh (*oligodendrocyte*) – tế bào tạo ra bao myelin bao bọc các dây thần kinh.

Bảng 1.2 sau đây trình bày những nghiên cứu sử dụng MSC trong điều trị tổn thương tuỷ sống trên mô hình động vật.



**Bảng 1.2: Sử dụng MSC trong điều trị tổn thương tủy sống trên mô hình động vật**

<b>Nguồn tài liệu</b>	<b>Nguồn/ Loại TBG</b>	<b>Vị trí ghép và liều ghép</b>	<b>Kết quả điều trị</b>
Gu và cs, 2010 [92]	Tủy xương chuột/ MSC	Cách 1 mm trung tâm vị trí tổn thương về phía đuôi Liều ghép: $3 \times 10^5$	Giảm lượng tổn thương; tái phát triển sợi trục của tủy sống bị thương
Jung Hwa Seo và cs, 2011 [90]	Máu cuống rốn chuột/ MSC	Tiêm tĩnh mạch Liều ghép: $1 \times 10^6$	Thúc đẩy việc phục hồi chức năng
Tan và cs, 2013 [93]	Tủy xương chuột/ MSC	Tiêm trực tiếp vùng tổn thương Liều ghép: $1 \times 10^5$	Điều biến miễn dịch, giảm apoptosis, cải thiện phục hồi chức năng.
Nakano và cs, 2013 [94]	Tủy xương chuột/ MSC	Tiêm vào khoang dưới nhện Liều ghép: $5 \times 10^6$	Cải thiện chức năng vận động
Mitsuhara và cs, 2013 [95]	Tủy xương chuột/ MSC	Tiêm tĩnh mạch Liều ghép: $3 \times 10^5$	Cải thiện chức năng vận động
Ding và cs, 2014 [96]	Tủy xương chuột/ MSC	Tiêm trực tiếp vùng tổn thương Liều ghép: $5 \times 10^5$	Hỗ trợ tái tạo sợi trục và bao myelin sau chấn thương tủy sống.
Chen và cs, 2014 [97]	Tủy xương chuột/ MSC	Tiêm trực tiếp vùng tổn thương Liều ghép: $5 \times 10^5$	Giảm apoptosis do đó bảo vệ mô, cải thiện phục hồi chức năng.
Ukegawa và cs, 2015 [98]	Tủy xương chuột/ MSC	Tiêm trực tiếp vùng tổn thương Liều ghép: $3 \times 10^4$	Thúc đẩy tái tạo thần kinh cảm giác, dẫn đến phục hồi chức năng.
Kim và cs, 2015 [99]	Mô mỡ chó/ MSC	Tiêm tĩnh mạch Liều ghép: $1 \times 10^7$	Phục hồi vận động
Ramalho và cs, 2018 [100]	Tủy xương chuột/ MSC	Tiêm tĩnh mạch/ trong phúc mạc Liều ghép: $8 \times 10^5$	Phục hồi vận động

## **1.6.2. Sử dụng TBG tủy xương điều trị CTCS LTHT trên lâm sàng**

### ***1.6.2.1. Trên thế giới***

Thomas E Ichim và cộng sự [101] đã báo cáo tiêm hỗn hợp MSC đồng loài thu từ dây rốn và tế bào CD34 thu từ máu cuống rốn vào tủy sống của một bệnh nhân nam 29 tuổi bị tai nạn máy bay. Bệnh nhân bị gãy nát phần xương sống L1, tủy sống bị tổn thương không liền mạch tại vị trí T12-L1, mất cảm giác và mất chức năng nửa dưới cơ thể, chấn thương được xếp vào cấp độ A theo tiêu chuẩn của Hiệp hội Tổn thương Cột sống Hoa Kỳ (ASIA). Việc tiêm hỗn hợp tế bào gốc vào vị trí tủy sống ở thắt lưng bệnh nhân được thực hiện 3 lần: 5 tháng, 8 tháng và 14 tháng kể từ sau khi tai nạn xảy ra. Trong quá trình tiêm, theo dõi không thấy có phản ứng phụ nào xảy ra cũng như không có các phản ứng miễn dịch hay kí chủ chống mảnh ghép được ghi nhận. Cơn đau thần kinh trong tuần giảm từ 10/10 (phải sử dụng thuốc Lyrica liên tục 300 mg/ngày) xuống 3/10 (không phải sử dụng Lyrica liên tục) (theo thang đánh giá trực quan). Các chức năng cơ, ruột, niệu đạo và sinh dục được hồi phục. Tình trạng chấn thương đã được giảm xuống mức độ D.

Từ nghiên cứu trên, Ichim và cộng sự đã chứng minh tính hiệu quả của MSC trong việc kháng viêm và sản xuất các nhân tố tăng trưởng cũng như khả năng tạo ra các nhân tố tạo mạch mới của tế bào CD34. Tuy nhiên, việc phục hồi các chức năng ruột và sinh dục của các bệnh nhân chấn thương mức độ A theo tiêu chuẩn AIS là rất hiếm. Vì vậy, tính khả thi của hướng nghiên cứu tiêm kết hợp tế bào gốc vào tủy sống, mà không gây đau đớn thần kinh hay hình thành mô lạc vị cần được tập trung nghiên cứu sâu hơn nữa.

Tế bào gốc có nguồn gốc từ tủy xương có khả năng kích thích sự hồi phục về cấu trúc giải phẫu và chức năng tủy sống trên mô hình động vật bị tổn thương tủy sống bằng cách thúc đẩy duy trì các mô, tái tạo sợi trục, tái tạo

bao myelin. Dựa trên những kết quả hồi phục khả quan trên, Yashbir Dewan và cộng sự [69] đã báo cáo kết quả thử nghiệm lâm sàng phase I và phase II phẫu thuật cấy ghép tế bào gốc thu từ tủy xương tự thân vào các bệnh nhân bị tổn thương tủy sống. Các bệnh nhân cả nam và nữ, ở độ tuổi từ 18 – 60 tuổi, bị tổn thương tủy sống nghiêm trọng từ vị trí C5 trở xuống. Chấn thương của các bệnh nhân đã kéo dài từ 6 tháng đến 8 năm trước khi điều trị, tình trạng bệnh nhân lúc bắt đầu thử nghiệm là mất cảm giác và mất chức năng vận động kéo dài một phần hoặc toàn bộ phần cơ thể phía dưới vị trí tổn thương, theo tiêu chuẩn AIS thì chấn thương ở cấp độ A,B,C. Các bệnh nhân được tiêm tế bào gốc tủy xương (*Bone Marrow Stem Cells-BMSC*) (hay còn gọi là tế bào đơn nhân tủy xương (*Bone Marrow mononuclear cells-BMMNCs*) vào tủy sống với một liều có thể bằng hoặc nhiều hơn 100 triệu tế bào. Kết quả thử nghiệm phase I cho thấy đây là một hướng nghiên cứu an toàn và cơ thể có thể dung nạp được. Kết quả thử nghiệm phase II cho thấy sự cải thiện đáng kể về vận động, cảm giác và chức năng cơ thắt cơ; cải thiện sự độc lập về chức năng của tủy sống; cải thiện về mức độ nhạy cảm đau.

Trên tạp chí *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, tháng 7/2010, Sang Ryong Jeon và cộng sự đã công bố kết quả nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng hiệu quả của liệu pháp MSC tự thân cho chấn thương cột sống ở người [102]. Trong nghiên cứu này, Sang Ryong Jeon phân tích những thay đổi trong điện sinh học và hình ảnh cộng hưởng từ (MRI) để định lượng đánh giá kết quả. Tổng cộng có  $8 \times 10^6$  MSC tự thân được tiêm vào khoang tủy sống của 10 bệnh nhân bị chấn thương cột, và  $40 \times 10^6$  tế bào được tiêm vào khoang màng cứng. Sau phẫu thuật đầu tiên 4 và 8 tuần,  $50 \times 10^6$  MSC được tiêm tiếp tục bằng cách chọc thắt lưng. Kết quả được đánh giá trước khi phẫu thuật, sau phẫu thuật ba tháng và sáu tháng bằng cách đánh giá bằng thang điểm Frankel/AIS vận động, đo các thông số về điện sinh học (điện cơ đồ, tốc

độ dẫn truyền thần kinh, kích thích tiềm năng hệ thần kinh giao cảm, tiềm năng kích thích vận động), và MRI. Trong quá trình điều trị mười bệnh nhân đều không có bất kỳ biến chứng nghiêm trọng hoặc tác dụng phụ nào. Một bệnh nhân bị dị cảm vừa phải trong 10 tháng đầu tiên, sau đó giảm xuống một cách tự nhiên. Sáu bệnh nhân biểu hiện thay đổi sức vận động, ba trong số này có cải thiện trong các hoạt động hàng ngày. Có sự thay đổi điện sinh học và MRI lần lượt trong 5 và 6 bệnh nhân. Sang Ryong Jeon kết luận rằng việc tiêm trực tiếp MSC tự thân tiêm vào tủy sống an toàn và không gây thêm tổn thương thần kinh nào. Hơn nữa, liệu pháp MSC tự thân cho kết quả cải thiện hệ thần kinh, thay đổi điện sinh học, và/hoặc thay đổi MRI trong một số bệnh nhân bị chấn thương cột sống cổ.

Năm 2016, Zurab và cộng sự báo cáo kết quả nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng phase 1 ghép TBG tự thân tủy xương vào bệnh nhân chấn thương cột sống 18 bệnh nhân gồm cả nam và nữ, có độ tuổi 22 – 65 tuổi; bị chấn thương cột sống ngực, thất lưng nghiêm trọng từ đoạn C5 đến T11 và đã được phẫu thuật giải ép trên 6 tháng. Bệnh nhân được chọc hút 100 – 120ml dịch tủy xương từ mào chấu trước trên. Thực hiện ly tâm theo gradient tỷ trọng thu 2ml huyền dịch tế bào đơn nhân trong dung dịch đệm PBS. Tổng cộng  $750 \times 10^6$  tế bào đơn nhân được tiêm vào nội tủy mạc của bệnh nhân. Theo dõi sau 3, 6, 12 tháng cho kết quả 9 bệnh nhân (50%) có cải thiện chức năng vận động, cảm giác; trong đó, 7 bệnh nhân (78%) có AIS giảm một bậc và 2 bệnh nhân (22%) giảm hai bậc, không có bệnh nhân giảm ba bậc. Tỷ lệ bệnh nhân có cải thiện chức năng bàng quang và ruột lần lượt là 42% và 78%. Nghiên cứu cũng kết luận rằng việc tiêm trực tiếp tế bào gốc tự thân vào tủy sống là khả thi và an toàn [9]. Bảng 1.3 sau đây trình bày tóm tắt một số thí nghiệm lâm sàng cấy ghép tế bào gốc ở các bệnh nhân bị tổn thương tủy sống.

**Bảng 1.3: Tóm tắt một số thí nghiệm lâm sàng ghép tế bào gốc tủy xương cho bệnh nhân bị tổn thương tủy sống**

Nghiên cứu	Đặc điểm bệnh nhân/ Vị trí ghép /Liều ghép	Kết quả điều trị
Yoon và cs, 2007 [103]	<p>48 BN CTCS liệt tủy hoàn toàn với 30 BN cột sống cổ và 18 BN cột sống ngực.</p> <p>Tiêm trực tiếp vào vùng tổn thương.</p> <p>Liều ghép: <math>2 \times 10^8</math></p>	<p>Theo dõi sau 10 tháng, 29,5% BN cấp, 33,3% BN bán cấp, 0% BN mạn và 7,7% trong nhóm chứng cho thấy phục hồi thần kinh sau điều trị. Không có biến chứng nguy hiểm, nhiễm trùng sâu hoặc nhiễm trùng vết mổ. GM-CSF có thể gây sốt, nổi ban và đau đầu. Một số BN của cả hai nhóm có đau thần kinh (neuropathic pain) sau mổ.</p>
Deda và cs, 2008 [104]	<p>9 BN liệt tủy hoàn toàn bao gồm 6 cột sống cổ và 3 cột sống ngực.</p> <p>Tiêm trực tiếp vào vùng tổn thương.</p> <p>Liều ghép: <math>(20-67) \times 10^6</math></p>	<p>Theo dõi một năm sau ghép. Có sự phục hồi thần kinh ở tất cả các BN, 1 BN từ AIS_A lên AIS_B, 8 BN từ AIS_A lên AIS_C. Không có biến chứng nguy hiểm.</p>
Cristante và cs, 2009 [105]	<p>39 bệnh nhân liệt 2 chân và liệt cả 2 chân, 2 tay.</p> <p>Tiêm động mạch.</p> <p>Liều ghép: <math>2,5 \times 10^6</math></p>	<p>Theo dõi sau 30 tháng, 66,7% BN có cải thiện khả năng đánh thức cảm giác của cơ thể. Không ghi nhận biến chứng.</p>
Pal và cs, 2009 [106]	<p>25 BN trong đó có 3 cột sống cổ và 2 cột sống ngực, 20 BN liệt hoàn toàn và 3 BN liệt không hoàn toàn AIS_C.</p> <p>Liều ghép: <math>1 \times 10^6</math></p>	<p>Theo dõi từ 1 đến 3 năm. Không thấy sự phục hồi về thần kinh. Một số BN CTCS ngực cấp tính có cải thiện phần nào chất lượng cuộc sống. Không thấy biến chứng nguy hiểm trong nghiên cứu.</p>

Nghiên cứu	Đặc điểm bệnh nhân/ Vị trí ghép /Liều ghép	Kết quả điều trị
Kumar và cs, 2009 [107]	215 bệnh nhân liệt 2 chân; 49 bệnh nhân liệt 2 chân và 2 tay; 33 bệnh nhân tổn thương tủy sống do bệnh có thang ASI A_D.  Tiêm tuỷ sống. Liều ghép: $4 \times 10^8$	Theo dõi sau 3 tháng, 32,6% BN cải thiện thần kinh. BN bị sốt (32%), đau đầu (23%), đau nhói dây thần kinh cảm giác (23%).
Ricardo và cs, 2014 [108]	14 BN CTCS ASI-A.  Tiêm trực tiếp vào vị trí tổn thương.	Theo dõi sau 6 tháng, BN có cải thiện chức năng tiêu tiện, vận động, cảm giác.  Cải thiện khả năng đánh thức cảm giác của cơ thể.  6 bệnh nhân giảm về AIS-B, 1 bệnh nhân về AIS-C  Không ghi nhận biến chứng.
Suzuki và cộng sự, 2014 [109]	10 BN CTCS cùng thắt lưng có ASI-A, B.  Tiêm vào nội tủy mạc vùng tổn thương.	Theo dõi sau 6 tháng, 1/5 bệnh nhân có AIS-A giảm về AIS-B 2/5 bệnh nhân có AIS-B giảm về AIS-C 1/5 bệnh nhân có AIS-B giảm về AIS-D.  Không ghi nhận biến chứng trầm trọng, 2 BN thiếu máu nhẹ.
Chhabra và cộng sự, 2016 [110]	21 BN CTCS T1-T12 cấp tính có ASI-A.  Tiêm vào vùng L3-4.  Liều ghép: $2 \times 10^8$	Theo dõi sau 6 và 12 tháng, không có cải thiện về thần kinh, điện sinh học, niệu động học. Không ghi nhận biến chứng.

### ***1.6.2.2. Tại Việt Nam***

Ca ghép tế bào gốc tuỷ xương đầu tiên tại Việt Nam, được thực hiện vào năm 1995 do PGS. Trần Văn Bé thực hiện. Từ đó cho đến nay, nhiều bệnh lý về cơ quan tạo máu như: bệnh bạch cầu cấp, lơ xê mi, đa u tuỷ... đã được tiến hành ghép và thu được những thành công nhất định. Đồng thời, các bệnh tự miễn: nhồi máu cơ tim, COPD,... đã được nghiên cứu và tiến hành ghép tại nhiều bệnh viện trong cả nước.

Các nghiên cứu ghép TBG tuỷ xương trong điều trị CTCS ở nước ta mới chỉ dừng ở giai đoạn thử nghiệm ban đầu và hầu như chưa được ứng dụng rộng rãi với một số ít báo cáo.

Nguyễn Đình Hòa (2015) ghép tế bào gốc mô mỡ (ADSC) tự thân vào vị trí tổn thương cho 20 bệnh nhân CTCS ngực – thất lưng liệt tuỷ hoàn toàn được phẫu thuật cố định cột sống giải ép [11]. Mô mỡ được hút từ vùng dưới da bụng, tách bằng phương pháp ly tâm tỷ trọng để thu được lớp phân đoạn mạch nền (Stromal Vascular Fraction – SVF). SVF chứa các loại tế bào như bạch cầu, tế bào máu, tế bào tiền thân nội mô và TBG trung mô. Một nửa hỗn hợp TBG gồm  $1.5 \times 10^6$  -  $4 \times 10^6$  ADSC này được bơm trực tiếp vào vùng tổn thương hoặc bơm vào khoang dưới nhện sau khi mở màng cứng. Một nửa được nuôi cấy tăng sinh và tiêm trả lại cho bệnh nhân sau 30 ngày (lần 2), 45 ngày (lần 3) và 60 ngày (lần 4). Lần ghép thứ 2 và thứ 3, bệnh nhân được tiêm số lượng  $20-30 \times 10^6$  TBG mô mỡ (ADSC)/8ml vào khoang dưới nhện vùng L2. Lần ghép thứ 4, bệnh nhân được tiêm qua đường tĩnh mạch, số lượng  $1 \times 10^8$  ADSC/100ml. Bệnh nhân được theo dõi dọc sau 4 tháng, 6 tháng, 12 tháng, 18 tháng, 24 tháng. Kết quả điều trị được đánh giá lâm sàng qua độ liệt AIS, chức năng đại tiểu tiện qua thang điểm Bathrex, mức độ mất khả năng vận động lưng dưới qua thang điểm OSWESTRY, đánh giá chất lượng cuộc sống qua thang điểm SF36. Đánh giá cận lâm sàng gồm: XQ cột sống thẳng

ngiên, chụp CT cột sống, chụp MRI cột sống để đo mức độ dẹt tủy, đo niệ động học bàng quang và điệ chân thần kinh.

Kết quả hồi phục thần kinh khám lại sau 6 tháng là 48,15% (13/27 trường hợp chuyển từ AIS\_A sang AIS\_B) và sau 9 tháng sau ghép là 7,4% (2 trường hợp) chuyển từ AIS\_B sang AIS\_C), và 12 tháng sau ghép 7,4% (2 trường hợp) chuyển AIS\_C sang AIS\_D.

Thang điể vận động sau điệ trị 12 tháng tăng (69,38 điể) so với trước điệ trị (50 điể). Thang điể cảm giác sâu và cảm giác nông cũng tăng lên nhiều tại thời điể 12 tháng sau điệ trị (87,69; 82,46 điể) so với trước điệ trị (70,62; 70,62 điể).

Chiều dài tổn thương thấp hơn, chiều rộng ống sống lớn hơn và tỷ lệ đáp ứng dẫn truyền cao hơn so với nhóm chứng. Các bệnh nhân có sự cải thiện về chức năng bàng quang và các thang điể đánh giá chất lượng cuộc sống SF36, Oswestry, Barthex thời điể 3 tháng, 6 tháng, 12 tháng.

Các biến chứng do ghép không đáng kể, chỉ có 3,7% bệnh nhân đau đầu, không ghi nhận biến chứng viêm não.

Hiện nay, một nghiên cứu sử dụng TBG tủy xương tự thân trong điệ trị bệnh nhân CTCS cũng đang được thực hiện tại bệnh viện đa khoa Đà Nẵng do Nguyễn Ngọc Bá chủ nhiệm đề tài. Hiện nghiên cứu vẫn đang tiếp tục nên chưa có báo cáo chính thức.



## Chương 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu của chúng tôi gồm 84 bệnh nhân được chẩn đoán xác định là CTCS ngực – thắt lưng liệt tủy hoàn toàn được chia thành 2 nhóm:

- Nhóm 1 (nhóm chứng) gồm 42 bệnh nhân được mổ cố định cột sống, giải ép thần kinh, không ghép tế bào gốc.
- Nhóm 2 (nhóm can thiệp) gồm 42 bệnh nhân được mổ cố định cột sống, giải ép thần kinh, và ghép tế bào gốc.

##### 2.1.1. Cỡ mẫu

Công thức tính cỡ mẫu [111]

$$n1 = n2 = Z_{(\alpha\beta)}^2 \frac{2pq}{(p_1 - p_2)^2}$$

Trong đó:

- n1: số bệnh nhân không can thiệp tế bào gốc
- n2: số bệnh nhân can thiệp tế bào gốc
- $\alpha$ : sai lầm loại 1, tính bằng 5%
- $\beta$ : sai lầm loại 2, tính bằng 10%
- Ta được  $Z_{(\alpha,\beta)}^2 = 10,5$
- p1: tỷ lệ phục hồi thần kinh sau 6 tháng điều trị ở nhóm không can thiệp tế bào gốc, theo nghiên cứu của Nguyễn Đình Hòa [11] là 7,4%
- p2: tỷ lệ phục hồi thần kinh sau 6 tháng điều trị ở nhóm can thiệp tế bào gốc, theo nghiên cứu của Nguyễn Đình Hòa [11] là 37%
- $q = 1 - p$

$$p = \frac{(p_1 + p_2)^2}{2}$$

Áp dụng công thức trên, cỡ mẫu được tính  $n = 21$  (cần ít nhất 21 bệnh nhân thuộc nhóm chứng và 21 bệnh nhân thuộc nhóm can thiệp). Nghiên cứu của chúng tôi chọn được 42 bệnh nhân nhóm chứng và 42 bệnh nhân nhóm can thiệp.

### 2.1.2. Tiêu chuẩn lựa chọn

- Tuổi:  $\geq 16$
- Thời gian tổn thương:  $\leq 14$  ngày
- Được chẩn đoán là CTCS ngực – thất lưng liệt tủy hoàn toàn (AIS-A trên thang điểm AIS gồm 5 mức độ A, B, C, D, E), theo tiêu chuẩn của ASIA (2011) [56] gồm mất hoàn toàn cảm giác hay vận động ở đoạn S4-S5:
  - + Chụp phim X quang và cộng hưởng từ có CTCS vùng ngực – thất lưng.
  - + Khám cảm giác một điểm chính trong mỗi 28 khoanh da bên trái và bên phải cơ thể  $\rightarrow$  tổng điểm = 0.
  - + Khám vận động 10 cơ chính 2 bên (5 cơ ở chi trên 2 bên, 5 cơ ở chi dưới 2 bên)  $\rightarrow$  bậc 0.
- Đối tượng được tư vấn, chấp nhận tham gia nghiên cứu.

### 2.1.3. Tiêu chuẩn loại trừ

- CTCS ngực – thất lưng liệt tủy hoàn toàn:
  - + Giai đoạn mãn tính.
  - + Thở máy hoặc tổn thương phối hợp ở các cơ quan khác.
  - + Có viêm nhiễm vùng xương chậu ở vị trí lấy dịch tủy xương.
  - + Cộng hưởng từ xác định hình ảnh đứt tủy (Tủy bị đứt sẽ tạo khoảng trống tủy cản trở TBG bám vào để liên kết và hồi phục tổn thương tủy nên chỉ áp dụng cho trường hợp đứt dập tủy).
- Có thai hoặc đang cho con bú.

- Có khối u ác tính.
- Có các bệnh lý kèm theo: nội khoa mãn tính, bệnh liên quan đến chống chỉ định gây tê, gây mê, dị ứng kháng sinh, thuốc mê...
- Có bệnh lý cơ quan tạo máu.
- Nồng độ Hemoglobin máu dưới 120g/l.
- Bệnh nhân không đồng ý tham gia vào nhóm nghiên cứu.

## **2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.2.1. Thiết kế nghiên cứu**

Mô tả tiến cứu, can thiệp lâm sàng theo dõi dọc có nhóm chứng.

### **2.2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu**

- Thời gian nghiên cứu: Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 9 năm 2014 đến tháng 9 năm 2018.

- Địa điểm nghiên cứu: Viện Chấn thương chỉnh hình, Trung tâm Truyền máu (Bệnh viện HN Việt Đức), Khoa Huyết học (Bệnh viện Trung ương Quân đội 108).

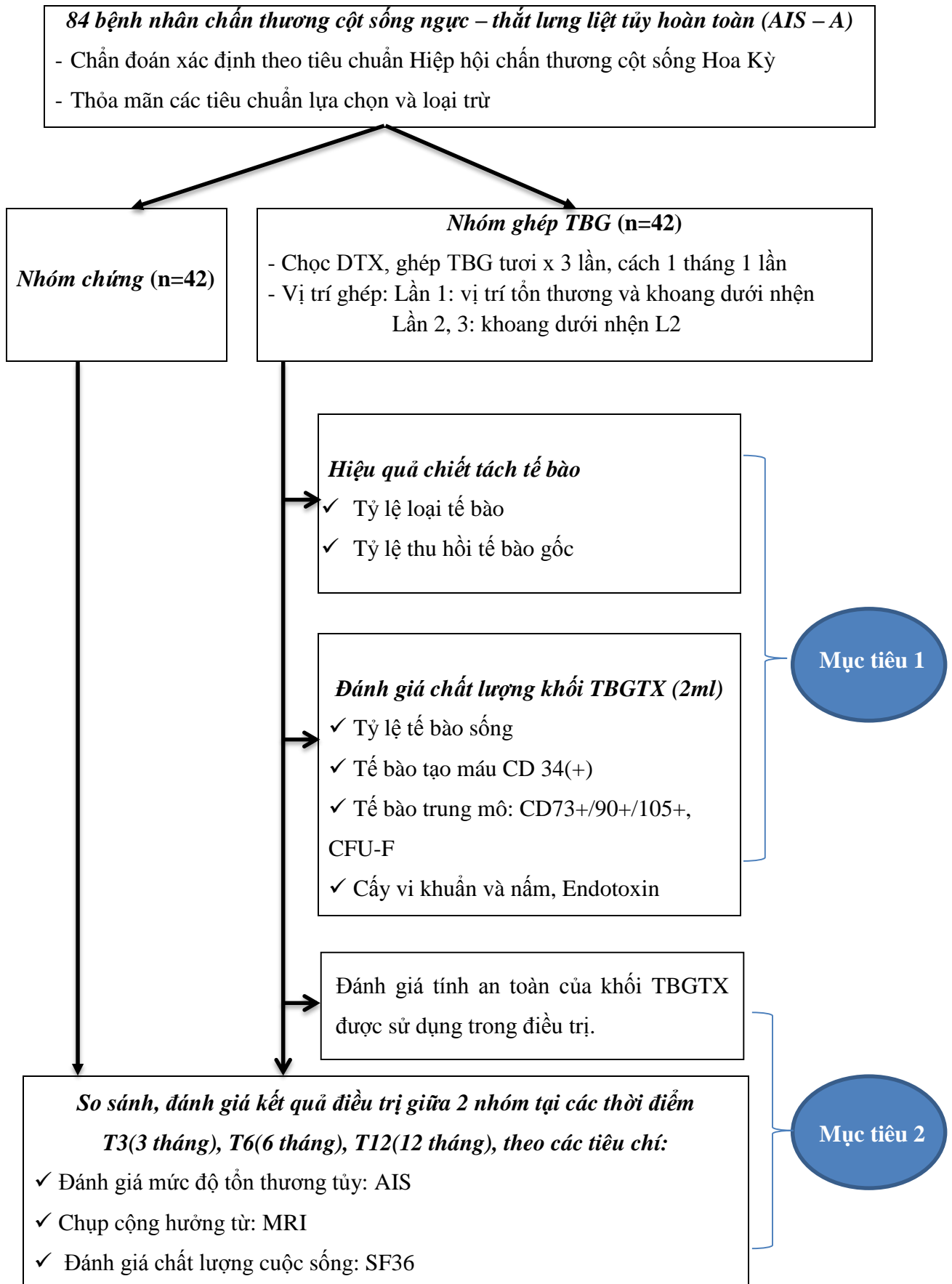
### **2.2.3. Chọn mẫu**

Lựa chọn bệnh nhân đủ tiêu chuẩn ở phần đối tượng nghiên cứu, chia làm 2 nhóm. Các bệnh nhân này sẽ được tư vấn về liệu pháp ghép tế bào gốc tự thân, nếu bệnh nhân đồng ý điều trị theo tư vấn ghép tế bào gốc thì chọn vào nhóm can thiệp. Nếu bệnh nhân không đồng ý điều trị liệu pháp ghép tế bào gốc thì được đánh số và chọn ngẫu nhiên vào nhóm chứng theo tỉ lệ cứ 5 bệnh nhân thì chọn lấy 1.

- Nhóm ghép TBG: Ghép tế bào gốc tủy xương tự thân gồm 42 bệnh nhân đáp ứng tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ, được phẫu thuật cố định và giải ép cột sống và điều trị ghép tế bào gốc theo liệu trình 3 lần, cách 1 tháng 1 lần.

- Nhóm chứng: Có cùng đặc điểm như nhóm can thiệp, đáp ứng tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ, cũng được phẫu thuật cố định và giải ép cột sống. Nhưng không ghép tế bào gốc.

### 2.2.4. Sơ đồ nghiên cứu



## 2.2.5. Các chỉ tiêu nghiên cứu

### 2.2.5.1. Chỉ tiêu đánh giá hiệu quả chiết tách khối TBG tự thân từ tủy xương

- Tỷ lệ loại các TB trưởng thành (HC, BCH, TC) được tính theo công thức:  $(\text{Tổng số lượng các TB trưởng thành trong khối DTX trước tách} - \text{Tổng số lượng các TB trưởng thành trong khối TBG sau tách}) / (\text{Tổng số lượng các TB trưởng thành trong khối DTX trước tách}) \times 100$ .
- Tỷ lệ thu hồi các TBĐN được tính theo công thức:  $(\text{Tổng số lượng TBĐN trong khối TBG sau tách} / \text{Tổng số lượng TBĐN trong khối DTX trước tách}) \times 100$ .
- Hiệu quả làm tăng nồng độ TB CD34+ được tính theo công thức:  $(\text{Nồng độ TB CD34+ trong khối TBG sau tách} / \text{Nồng độ TB CD34+ trong khối DTX trước tách})$

### 2.2.5.2. Chỉ tiêu đánh giá thành phần và chất lượng khối TBG tự thân từ tủy xương

- Số lượng TB có nhân, tỷ lệ TB đơn nhân, số lượng BCH, HC và TC còn lại.
- Thành phần TBG tạo máu: Tỷ lệ TB CD34+, tổng số lượng TB CD34+ trong khối TBG.
- Thành phần TBG trung mô:
  - + Tỷ lệ TB CD73+/CD90+/ CD105+, nồng độ TB CD73+/CD90+/ CD105+/ml, tổng số lượng TB CD73+/CD90+/ CD105+ trong khối TBG.
  - + Hiệu quả tạo cụm CFU-F trên  $10^6$  TB nuôi cấy, nồng độ CFU-F/ml, và số lượng CFU-F trong khối TBG.
- Tỷ lệ TB sống.
- Nuôi cấy vi khuẩn, nấm, Endotoxin

### **2.2.5.3. Chỉ tiêu đánh giá tính an toàn của khối TBG**

Các biến chứng sớm và muộn trong ghép TBG

### **2.2.5.4. Chỉ tiêu đánh giá hiệu quả sử dụng của khối TBG tự thân từ tuỷ xương trong điều trị CTCS có liệt tuỷ hoàn toàn.**

- AIS sau ghép TBG 3 tháng, 6 tháng, 12 tháng.
- SF36 sau ghép 3 tháng, 6 tháng, 12 tháng.
- MRI sau ghép TBG 6 tháng, 12 tháng.
- Tương quan giữa số lượng TB CD34+, TB CD73+/CD90+/ CD105+ trong khối TBG và SF36.

### **2.2.6. Phương tiện nghiên cứu**

#### **2.2.6.1. Dụng cụ, trang thiết bị**

- Tủ An toàn sinh học cấp 2 (Streamline Esco, Singapore)
- Máy tách tế bào tự động Sepax 2 (Biosafe – Thụy Sĩ)
- Máy đếm tế bào máu tự động Cell-Dyn 1800 (ABBOTT – Mỹ)
- Hệ thống Flow cytometry FACS – Callibur (BD – Mỹ)
- Tủ nuôi cấy tế bào (Herius – CHLB Đức)
- Máy hàn dây Sealmatic M (GmbH – CHLB Đức)
- Máy ly tâm lạnh (Herius – CHLB Đức)
- Tủ lạnh 4-6<sup>0</sup>C
- Bộ dụng cụ gây tê tuỷ sống
- Kim lấy tuỷ xương RCP-100 (Biosafe – Thụy Sĩ)
- Túi máu đơn không chất chống đông (Terumo – Mỹ)
- Bộ tách chiết CS900.2 (Biosafe – Thụy Sĩ)
- Kính hiển vi đảo ngược (Carl-Zeiss – CHLB Đức)
- Kính hiển vi quang học (Olympus – Nhật Bản)
- Bộ Micropipet có điều chỉnh thể tích (Eppendorf – CHLB Đức)

- Chai nhựa nuôi cấy tế bào T=25cm<sup>3</sup> (BD – Mỹ)
- Các loại ống nghiệm Falcon 5ml, 10ml, 50ml (BD – Mỹ)
- Piper pasteur
- Buồng đếm Neubauer

#### **2.2.6.2. Hoá chất, sinh phẩm**

- Dung dịch NaCl 0,9%
- Dung dịch chống đông ACD (Terumo – Mỹ)
- Dung dịch Ficoll-Paque Premium vô khuẩn tỷ trọng 1,077 g/cm<sup>3</sup> (GE Healthcare Bio-Science AB SE-75184 Uppsala, Thụy Điển)
- Heparin 5000 UI/ml (GmbH – CHLB Đức)
- Albumin người 20% (GmbH – CHLB Đức)
- Bộ thuốc thử 7-AAD CD34+ PE/CD45+ FITC/ Mouse-IgG PE (BD – Hoa Kỳ)
- Bộ thuốc thử CD73+/CD90+/CD105+ (BD – Hoa Kỳ)
- Môi trường nuôi cấy cụm nguyên bào sợi MesenCult® basal và MesenCult® Stimulatory supplements (STEMCELL technologies, Inc – Canada).
- Môi trường nuôi cấy vi khuẩn, nấm: thạch máu, thạch Macconkey và thạch Sabouraud.
- Pyrosate và LAL (Associates of Cape Cod, Inc)

#### **2.2.7. Các quy trình và kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu**

##### **2.2.7.1. Chuẩn bị bệnh nhân**

- Chọn bệnh nhân theo tiêu chuẩn lựa chọn, loại trừ bệnh nhân không nằm trong tiêu chuẩn lựa chọn.
- Bệnh nhân và gia đình được giải thích chi tiết về tình trạng bệnh, những lợi ích mang lại cho người bệnh, những tai biến, biến chứng có thể xảy ra của phương pháp điều trị và đồng ý tự nguyện tiến hành nghiên cứu theo mẫu cam kết.

- Tất cả các bệnh nhân được đánh giá AIS, SF36, chụp XQ, CT và cộng hưởng từ.

• *AIS (The AISA Impairment Scale)*: Thang điểm phân loại và đánh giá mức độ tổn thương tuỷ sống theo Hiệp hội chấn thương cột sống Hoa Kỳ (ASIA, 2011).

#### *Các bước đánh giá AIS*

- Khám 10 cơ chính hai bên
- Khám 28 khoanh da cảm giác bằng cảm giác đau và sờ.
- Khám trực tràng để đánh giá phản xạ cơ thắt và phản xạ hành hang.
- Xác định mức vận động bên trái và phải.
- Xác định mức cảm giác bên trái và phải.
- Đánh giá mức vận động và mức cảm giác cuối cùng.
- Xác định mức tổn thương thần kinh.
- Phân loại tổn thương hoàn toàn hay không hoàn toàn bằng thang điểm AIS (A, B, C, D, E).
- Tính điểm vận động và điểm cảm giác.
- Xác định vùng bảo tồn nếu là tổn thương hoàn toàn (A).

**Bảng 2.1: Thang điểm phân loại và đánh giá mức độ tổn thương tuỷ sống theo Hiệp hội chấn thương cột sống Hoa Kỳ**

*Nguồn: Steven C. Kirshblum (2011) [56]*

<b>Loại</b>	<b>Mô tả</b>
A	Hoàn toàn: mất hoàn toàn cảm giác hay vận động (VD) ở đoạn S4-S5.
B	Không hoàn toàn: còn cảm giác, không có VD dưới TT (S4-S5)
C	Không hoàn toàn: còn VD dưới nơi TT (trên 50% các cơ chính dưới TT có sức cơ <3).



D	Không hoàn toàn: còn VĐ dưới TT (trên 50% các cơ chính dưới TT có sức cơ $\geq 3$ ).
E	Bình thường: cảm giác và VĐ bình thường

Patient Name \_\_\_\_\_

Examiner Name \_\_\_\_\_ Date/Time of Exam \_\_\_\_\_



**STANDARD NEUROLOGICAL CLASSIFICATION OF SPINAL CORD INJURY**



**MOTOR**  
KEY MUSCLES  
(scoring on reverse side)

R	L	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Elbow flexors
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Wrist extensors
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Elbow extensors
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Finger flexors (distal phalanx of middle finger)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Finger abductors (little finger)

UPPER LIMB TOTAL (MAXIMUM)  +  =   
(25) (25) (50)

Comments:

L2	<input type="checkbox"/>	Hip flexors
L3	<input type="checkbox"/>	Knee extensors
L4	<input type="checkbox"/>	Ankle dorsiflexors
L5	<input type="checkbox"/>	Long toe extensors
S1	<input type="checkbox"/>	Ankle plantar flexors

Voluntary anal contraction (Yes/No)

LOWER LIMB TOTAL (MAXIMUM)  +  =   
(25) (25) (50)

**SENSORY**  
KEY SENSORY POINTS

	LIGHT TOUCH	PIN PRICK
	R	L
C2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C7	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
T1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
T2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
T3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
T4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
T5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
T6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
T7	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
T8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
T9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
T10	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
T11	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
T12	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
L1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
L2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
L3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
L4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
L5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
S1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
S2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
S3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
S4-5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

TOTALS  +  =   
(MAXIMUM) (56) (56) (56) (56)

Any anal sensation (Yes/No)

PIN PRICK SCORE (max: 112)

LIGHT TOUCH SCORE (max: 112)

Key Sensory Points

<p><b>NEUROLOGICAL LEVEL</b> <small>The most caudal segment with normal function</small></p> <p>SENSORY <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> L</p> <p>MOTOR <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> L</p>	<p><b>COMPLETE OR INCOMPLETE?</b> <input type="checkbox"/></p> <p><small>Incomplete = Any sensory or motor function in S4-S5</small></p> <p><b>ASIA IMPAIRMENT SCALE</b> <input type="checkbox"/></p>	<p><b>ZONE OF PARTIAL PRESERVATION</b> <input type="checkbox"/></p> <p><small>Caudal extent of partially innervated segments</small></p> <p>SENSORY <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> L</p> <p>MOTOR <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> L</p>
--	---	--

This form may be copied freely but should not be altered without permission from the American Spinal Injury Association.

REV 03/06

**Hình 2.1: Phân loại thân kinh và phân loại AIS**

Nguồn: Steven C. Kirshblum (2011) [56]

SF36: Thang điểm đánh giá chất lượng cuộc sống (SF36 - The Short Form 36, National Committee for Quality Assurance. HEDIS 2016), đánh giá những dấu hiệu thay đổi về hình thức và sức khỏe dựa trên 36 câu hỏi được cung cấp bởi Ware và Sherbourn với các nhóm khái niệm về: Chức năng thể chất, đau toàn thân, những vấn đề về sức khỏe làm hạn chế vai trò

của cơ thể, chức năng xã hội, năng lượng cơ thể/ sự mệt mỏi, nhận thức về sức khỏe tổng quát. [112]

**Bảng 2.2: Đánh giá chất lượng cuộc sống theo thang điểm SF36**

<b>Điểm</b>	<b>Chất lượng cuộc sống (CLCS)</b>
0-25	Kém
26-50	Trung bình kém
51-75	Trung bình khá
76-100	Khá, tốt

### **Phương pháp đánh giá**

- *Đánh giá thay đổi chất lượng cuộc sống ở các thời điểm 3, 6, 12 tháng.*
- *Cách cho điểm bảng câu hỏi SF-36 (bộ câu hỏi xem ở phụ lục)*
- Chúng tôi thực hiện theo trình tự các bước như sau:
  - + Bước 1: Trả lời và cho điểm các câu hỏi, chuyển đổi điểm số của các câu trả lời theo bảng dưới đây. Trong bảng chuyển đổi thì mỗi câu trả lời đều có điểm số thay đổi từ 0 đến 100.
  - + Bước 2: Tính điểm trung bình của nhóm câu hỏi thuộc 8 lĩnh vực.
  - + Bước 3: Tính điểm trung bình chung của SF36.

1. Trả lời câu hỏi và tính điểm số [112]:

**Bảng 2.3: Trả lời câu hỏi và tính điểm số thang điểm SF36**

<b>Câu hỏi số</b>	<b>Trả lời ban đầu</b>	<b>Tính điểm số</b>
1, 2, 20, 22, 34, 36	1	100
	2	75
	3	50
	4	25
	5	0
3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12	1	0
	2	50
	3	100
13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	1	0
	2	100
21, 23, 26, 27, 30	1	100
	2	80
	3	60

Câu hỏi số	Trả lời ban đầu	Tính điểm số
	4	40
	5	20
	6	0
24, 25, 28, 29, 31	1	0
	2	20
	3	40
	4	60
	5	80
	6	100
32, 33, 35	1	0
	2	25
	3	50
	4	75
	5	100

2. Tính điểm trung bình của 8 lĩnh vực đánh giá [112]:

**Bảng 2.4: Tính điểm trung bình của 8 lĩnh vực đánh giá thang điểm SF36**

Lĩnh vực	Số lượng câu hỏi đánh giá	Tính điểm trung bình các câu hỏi
Hoạt động thể lực	10	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12
Các hạn chế do sức khoẻ thể chất	4	13, 14, 15, 16
Các hạn chế do vấn đề tinh thần	3	17, 18, 19
Sinh lực/ Mệt mỏi	4	23, 27, 29, 31
Sức khoẻ tinh thần	5	24, 25, 26, 28, 30
Hoạt động xã hội	2	20, 32
Cảm giác đau	2	21, 22
Sức khoẻ chung	5	1, 33, 34, 35, 36

• *X - Quang và CT* (Đánh giá về độ vững của cột sống sau chấn thương):

*Chụp X – Quang quy ước:* Dựa vào thăm khám lâm sàng (khu trú điểm đau và ranh giới rối loạn cảm giác) để khu trú vùng tổn thương và chụp X-Quang vùng nghi ngờ. Chụp 2 tư thế thẳng và nghiêng quy ước.

Bệnh nhân ở tư thế nghiêng: Là tư thế cần quan sát trước tiên, trên phim đánh giá được tình trạng gãy xương, xếp thân đốt sống, hẹp khe khớp, trượt đốt sống, gấp góc cột sống.

Bệnh nhân ở tư thế thẳng: đánh giá độ mở rộng của ống sống (nhất là vùng ngực), mở rộng khe liên gai và lệch trục các mỏm gai, hẹp khe liên đốt.

*Chụp CT:* Đánh giá tốt nhất sự toàn vẹn của xương, di lệch của diện khớp và dự đoán tổn thương thần kinh. 2 tư thế chụp CT thẳng và nghiêng xác định vị trí tổn thương hay mất vững.

• *Cộng hưởng từ:* Đánh giá các dạng tổn thương tuỷ sống và phần mềm xung quanh, khả năng hồi phục tuỷ và mức độ cải thiện sau điều trị: tổn thương về xương, thoát vị đĩa đệm, tổn thương dây chằng, máu tụ ngoài màng tuỷ, phù tuỷ, đưng dập tuỷ, đứt tuỷ...



**Hình 2.2: Ảnh minh họa phương pháp đo trên kết quả CHT.**

Nguồn: Sarita Magu (2015) [113]

Chỉ số	Mô tả
L	Chiều dài tổn thương
W	Chiều rộng tổn thương
MCC	Độ tổn thương ống sống tối đa
MSCC	Độ chèn ép tủy tối đa

$$MCC = \left[ 1 - \frac{D_i}{(D_a + D_b)/2} \right] \times 100\%$$

Với: -  $D_i$ : Đường kính ống sống tại vị trí tổn thương tối đa.

-  $D_a$ : Đường kính ống sống tại vị trí gần như bình thường trên vị trí tổn thương.

-  $D_b$ : Đường kính ống sống tại vị trí gần như bình thường dưới vị trí tổn thương.

$$MSCC = \left[ 1 - \frac{d_i}{(d_a + d_b)/2} \right] \times 100\%$$

Với:

-  $d_i$ : Đường kính tủy sống tại vị trí tổn thương tối đa.

-  $d_a$ : Đường kính tủy sống tại vị trí gần như bình thường trên vị trí tổn thương.

-  $d_b$ : Đường kính tủy sống tại vị trí gần như bình thường dưới vị trí tổn thương.

#### 2.2.7.2. Kỹ thuật thu nhận khối dịch tủy xương

Mỗi bệnh nhân được chọc hút DTX 3 lần tương ứng với 3 lần ghép TBG, mỗi lần cách nhau 1 tháng, giống nhau về kỹ thuật chọc và thu nhận DTX. Lần 1, thủ thuật được tiến hành tại phòng mổ trong điều kiện vô khuẩn (kết hợp cùng với phẫu thuật cố định và giải ép cột sống). Lần 2, lần 3 được tiến hành tại phòng tiểu phẫu trong điều kiện vô khuẩn.

Theo thông tư 26 - Hướng dẫn hoạt động truyền máu, một bệnh nhân được hiến máu không quá 9ml/kg và không quá 500ml, có thể nhắc lại sau 84 ngày [114]. Theo Hiệp hội ghép tủy châu Âu, trong một lần lấy tủy để ghép cho những bệnh nhân điều trị bệnh máu, có thể lấy với lượng 20ml DTX cho

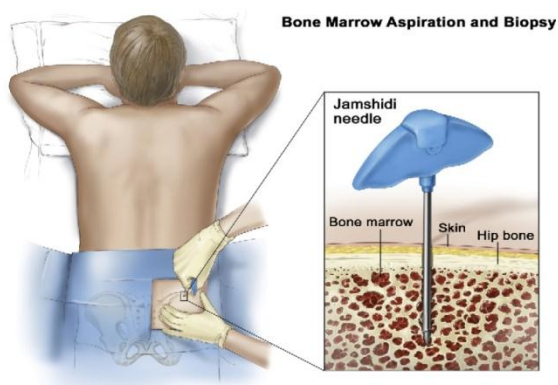
1kg trọng lượng cơ thể. Vì vậy, chúng tôi thu nhận dịch tủy xương cho mỗi lần lấy là 120ml và tổng thể tích dịch tủy xương chọc hút cho ba lần ghép trong 3 tháng (mỗi lần cách nhau một tháng) là 360ml. Lượng thể tích này vừa đảm bảo an toàn, vừa phải, thời gian hút ngắn nên không bị pha loãng nhiều với máu ngoại vi.

Kỹ thuật chọc hút dịch tủy xương được thu nhận bằng phương pháp chọc hút qua da theo QT 122, QĐ 2017/QĐ-BYT [115] và Philippe Hernigou (2011) [116] [117].

- Phương pháp vô cảm: Bệnh nhân được gây tê tủy sống bằng thuốc Marcain 0,5% - 7 mg và Fentanyl 0,05 mg

- Tư thế bệnh nhân: Nằm sấp trên bàn mổ.

- Vị trí chọc kim tại gai chậu sau trên hai bên: mốc để xác định vị trí chọc khi bệnh nhân nằm sấp là ngang mức đốt sống thắt lưng thứ 5, phía dưới điểm cao nhất của mào chậu 1-2 cm, phía ngoài khớp cùng chậu hai bên, cách đường giữa sau cột sống 5-6 cm.



**Hình 2.3: Kỹ thuật chọc hút dịch tủy xương**

*Nguồn: Mayo F.Friedlis, Christopher J.Centeno (2016) [118]*

- Quá trình thu thập dịch tủy xương được thực hiện đồng thời bởi một phẫu thuật viên và một bác sỹ huyết học đứng ở hai bên bệnh nhân, mỗi người chọc hút một bên mào chậu của bệnh nhân và cùng lấy dịch tủy xương:

+ Kim chọc hút tủy có chiều dài 6 – 8 cm và đường kính bên trong là 1,5 mm, đầu kim vát 45°. Kim lấy tủy được tráng chống đông bằng Heparin trước khi chọc tủy (lượng Heparin pha 20 đơn vị/ml huyết thanh mặn 0,9%).

+ Sau khi đã xác định đúng vị trí chọc kim tại gai chậu sau trên hai bên, kim được chọc thẳng theo hướng vuông góc. Khi đưa kim vào phải luôn có nòng bên trong để tránh các mảnh xương nhỏ hoặc phần mềm kẹt vào gây tắc kim trong khi hút.

+ Sau khi chọc qua da (thông thường độ sâu của kim từ 2- 6 cm tùy thuộc vào thể trạng bệnh nhân và chiều dày phần mềm, tổ chức dưới da), kim được chọc qua phần vỏ để tới phần xốp của xương chậu. Cần kiểm soát độ sâu của kim để không chọc qua phần vỏ bên kia, tránh làm tổn thương các tạng trong tiểu khung. Khi tới phần xốp của xương chậu, nòng của kim lấy tủy được rút ra, lắp bơm tiêm 10 ml vào đốc kim để bắt đầu hút dịch tủy xương. Khi chọc đúng vị trí khoang tủy xương chậu, áp lực tại đây khá lớn nên dịch tủy xương có thể tự đẩy vào bơm tiêm. Nếu dịch tủy xương hút không ra có thể do chưa vào đúng khoang tủy hoặc phần xốp của xương chậu quá mỏng cần phải thay đổi hướng kim và hút lại.

+ Dịch tủy xương được hút ra với từng lượng nhỏ (2- 4 ml/lần hút) để giảm mức độ hoà loãng bởi máu ngoại vi. Xoay kim từng góc 45° sau mỗi lần hút để thay đổi hướng đầu vát của kim nhằm tăng tối đa thể tích tủy xương được hút ra. Sau khi quay đủ một vòng, rút kim ra khoảng 1cm về phía mặt da, tiếp tục hút dịch tủy xương như trên. Quá trình chọc hút được thực hiện đến khi thu đủ số lượng cần thiết, do đó có thể phải chọc từ 3-5 vị trí trên cánh chậu nhưng không thay đổi vị trí chọc từ da vào để giảm đau cho bệnh nhân và giảm nguy cơ nhiễm trùng từ ngoài vào. Khoảng cách giữa các vị trí chọc ít nhất là 2 cm để dịch tủy xương không bị hoà loãng bởi máu ngoại vi đã tràn vào các vị trí chọc trước. Dịch tủy xương hút ra được thu gom vào túi lấy máu

(Túi lấy máu đơn không có chất chống đông của Terumo được bổ sung 12 ml dung dịch chống đông ACD có pha thêm 10.000 đ.v Heparin).

+ Sau khi lấy xong dịch tủy xương, băng ép lại tại vị trí chọc kim.

+ Thẻ tích dịch tủy xương lấy: thẻ tích dịch tủy xương được hút là 120 ml với thời gian 15 – 20 phút để thực hiện.

### **2.2.7.3. Kỹ thuật tách chiết, cô đặc khối tế bào gốc tủy xương**

#### **•Lọc dịch tủy xương bằng màng lọc (loại bỏ xương vụn và tế bào mỡ)**

Dịch tủy xương được đưa qua màng lọc có đường kính lỗ 100  $\mu\text{m}$  (màng lọc được thiết kế kèm theo bộ kit tách chiết CS900.2 của máy) để loại bỏ mảnh xương vụn, cục máu đông và mô mỡ trước khi được tách chiết, cô đặc.

#### **•Tách chiết, cô đặc dịch tủy xương bằng máy tách tế bào**

Dịch tủy xương được tách chiết và cô đặc dựa trên nguyên tắc ly tâm gradient tỷ trọng với quy trình khép kín sử dụng máy Sepax 2 (Biosafe – Thụy Sĩ).



**Hình 2.4: Máy Sepax 2 thực hiện tách tế bào gốc tủy xương**

#### *Nguyên lý*

Sử dụng chương trình tách bạch cầu đơn nhân theo phương pháp của Bøyum có dung dịch Ficoll tỷ trọng 1,077 g/ml (cao hơn tỷ trọng của bạch cầu đơn nhân: lympho, mono... nhưng lại thấp hơn tỷ trọng hồng cầu và bạch cầu



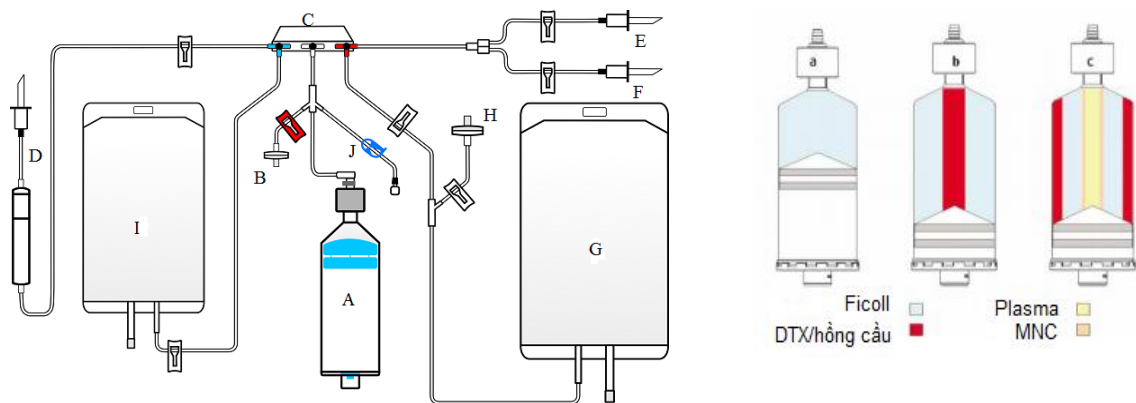
hạt), với bộ kit chiết tách CS 900.2 của phần mềm cài trong máy và các bước lắp đặt kit và cài đặt các thông số theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các tế bào có tỷ trọng khác nhau sẽ phân thành từng lớp riêng rẽ khi có lực ly tâm tác dụng. Lực ly tâm này đẩy các tế bào hồng cầu ở ngoài cùng (vì có tỷ trọng lớn nhất), sau đó là lớp bạch cầu đa nhân, lớp buffycoat (chứa chủ yếu là các tế bào đơn nhân) và lớp tiểu cầu ở trong cùng. Lớp buffycoat sẽ được tách riêng khỏi các thành phần còn lại và là sản phẩm cuối cùng thu được của quá trình tách. [119]

Do các tế bào gốc có tỷ trọng tương đương với thành phần tế bào đơn nhân nên quá trình xử lý này giúp tập trung các tế bào gốc với đậm độ cần thiết trong một thể tích nhỏ phù hợp để ghép vào vùng tổn thương.

#### *Sản phẩm thu được*

- Các tế bào đơn nhân (MNC) được tinh sạch và cô đặc.
- Hồng cầu được loại bỏ tới > 99%.
- Thể tích sản phẩm: lựa chọn được 8 - 20ml hoặc tùy theo chỉ định lâm sàng.

#### *Bộ kit sử dụng: CS 900.2*



**Hình 2.5: Sơ đồ kit CS900.2 tách chiết dịch tuỷ xương bằng máy Sepax 2**

*Nguồn: Biosafe SA (2017) [58]*

#### *Ưu điểm của máy Sepax 2*

- Thời gian xử lý nhanh (Tổng thời gian cho một quy trình: khoảng 1 giờ 15 phút);

- Quy trình khép kín và hoàn toàn tự động;
- Quy trình tách tế bào đơn nhân (MNC), tỷ lệ loại hồng cầu, tỷ lệ thu hồi tế bào đơn nhân, tỷ lệ tế bào sống cao.
- Thiết kế nhỏ gọn, vận hành đơn giản.

#### **2.2.7.4. Các kỹ thuật xét nghiệm sử dụng trong nghiên cứu**

- *Đếm số lượng tế bào và các thành phần tế bào*

(Xét nghiệm được thực hiện tại khoa Huyết học – Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.)

*Huyết đồ:* tiến hành trước chọc DTX.

- Mỗi bệnh nhân được lấy 2ml máu ngoại vi chống đông EDTA (1mg EDTA/1ml máu) để làm huyết đồ trước khi lấy dịch tủy xương.

- Xác định các chỉ số tế bào máu trên máy Cell-Dyn 1800 (ABBOTT-Hoa Kỳ). Công thức bạch cầu được xác định trên tiêu bản máu dàn nhuộm Giemsa.

*Chỉ số tế bào tủy xương:* tiến hành trên 1ml dịch tủy đầu tiên.

- Xác định số lượng tế bào có nhân bằng máy huyết học tự động Cell-Dyn 1800 (ABBOTT-Hoa Kỳ).

- Phân loại tỷ lệ % các loại tế bào tủy và xem xét hình thái tế bào trên tiêu bản máu dàn nhuộm Giemsa.

- *Xác định tỷ lệ tế bào sống chết*

(Xét nghiệm được thực hiện tại khoa Huyết học – Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.)

*Nguyên lý*

Xác định số lượng tế bào sống nhờ 7-AAD(7-amino- actinomycin) và các kháng thể đơn dòng gắn huỳnh quang CD45- FITC/CD34- PE. 7 AAD là chất nhuộm màu nhân, nó xen giữa Cytosine và guanine của chuỗi ADN. Nó chỉ nhuộm được nhân trong trường hợp màng tế bào không còn nguyên vẹn hay là những các tế bào chết.

Tiến hành phân tích trên hệ thống máy BD FASC – Calibur.

Kết quả sẽ đánh giá được tỷ lệ tế sống chết của tế bào gốc với độ nhạy độ chính xác cao.

• *Xác định TBG tạo máu CD34+:*

(Xét nghiệm được thực hiện tại khoa Huyết học – Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.)

- Tiến hành phân tích trên máy FASC - Calibur, sử dụng phần mềm CELLQUEST 3.1 (BD - Hoa Kỳ). Các tế bào CD34+ được xác định dựa trên các tham số của kỹ thuật tế bào dòng chảy gồm CD34bright/ CD45dim/SSClow.

- Kết quả được xác định bằng tỷ lệ phần trăm tế bào CD34+, số lượng tuyệt đối tế bào CD34+ được tính bằng cách nhân tỷ lệ phần trăm này với số lượng tế bào có nhân trong mẫu xét nghiệm (được xác định bằng máy phân tích huyết học tự động).

• *Xác định tế bào gốc trung mô bằng 2 kỹ thuật:*

(Xét nghiệm được thực hiện tại khoa Huyết học – Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.)

*Kỹ thuật đếm số lượng tế bào CD73+, 90+, 105+:*

- Phân tích trên máy FACS Calibur 4 màu, sử dụng phần mềm CELLQUEST Pro với template dựng sẵn cho MSC.

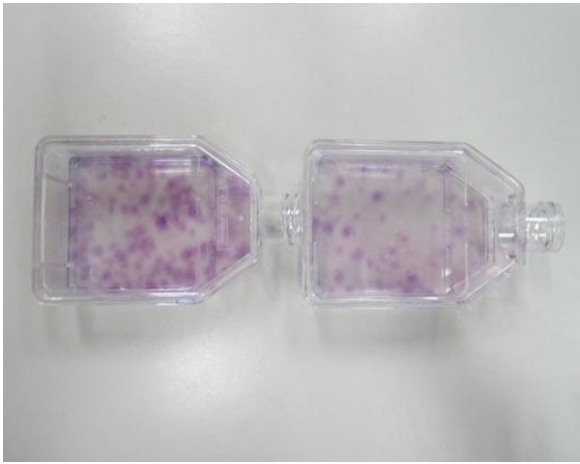
- Kết quả sẽ xác định được số lượng MSC trong 100000 tế bào có nhân của mẫu. Từ số lượng tế bào có nhân trong mẫu xét nghiệm (được xác định bằng máy phân tích huyết học tự động) và thể tích khối TBG ghép cho bệnh nhân, có thể tính được liều ghép MSC.

*Nuôi cấy tạo cụm nguyên bào sợi (Colony forming units – Fibroblast – CFU-F)*

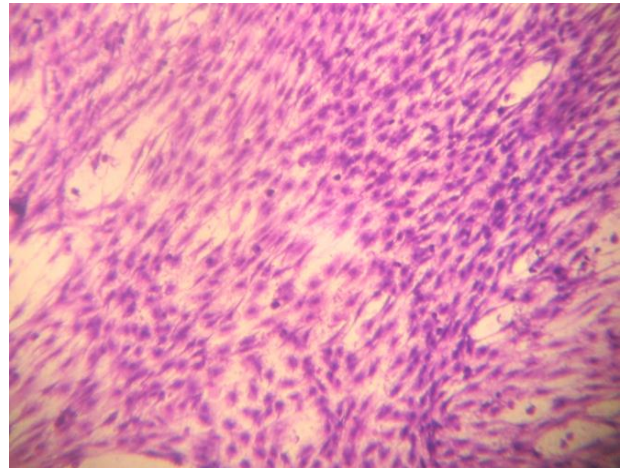
Nguyên lý: Các tế bào gốc được nuôi cấy trong điều kiện có đủ các chất dinh dưỡng và chất kích thích, chúng sẽ tăng sinh và biệt hoá thành các đơn vị tế bào trưởng thành.

Sử dụng tủ nuôi cấy tế bào Cytoperm (Herius - Đức) với các môi trường nuôi cấy MesenCult® basal và MesenCult® Stimulatory supplement (STEMCELL technologies, Inc – Canada), điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, độ ẩm >95%, trong thời gian 14-16 ngày.

Nhuộm Giemsa và đọc kết quả: Các cụm CFU-F có đường kính 1-8 mm (thường chứa > 50 tế bào) và có thể quan sát được bằng mắt thường. Kết quả được xác định bằng số lượng CFU-F mọc trên 10<sup>6</sup> tế bào nuôi cấy (còn gọi là hiệu quả mọc cụm (CFE)).



**Hình 2.6: Hình ảnh nuôi cấy tạo cụm CFU-F**



**Hình 2.7: Các tế bào dạng fibroblast trong cụm CFU-F (nhuộm Giemsa, x400)**

• *Nuôi cấy vi khuẩn, nấm*

(Xét nghiệm được thực hiện tại khoa Vi sinh – Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức.)

*Nguyên lý:* Nuôi cấy vi khuẩn, nấm đánh giá mức độ đảm bảo vô khuẩn của sản phẩm TBG sau xử lý. Cây khuẩn, cây nấm dung dịch treo TBG trước khi ghép cho bệnh nhân được thực hiện thường qui để đảm bảo quá trình thu thập, xử lý dịch tủy xương không bị lây nhiễm vi sinh vật có hại.

Môi trường nuôi cấy: thạch máu, thạch Macconkey và thạch Sabouraud.

Thực hiện kiểm tra nhiễm bằng cách rìa cấy huyền dịch khối TBG sản phẩm trên môi trường nuôi cấy vi khuẩn, nấm và đặt ở khí trường 5% CO<sub>2</sub>/37°C trong 72 giờ, đánh giá có hay không sự nhiễm vi khuẩn hoặc nấm.



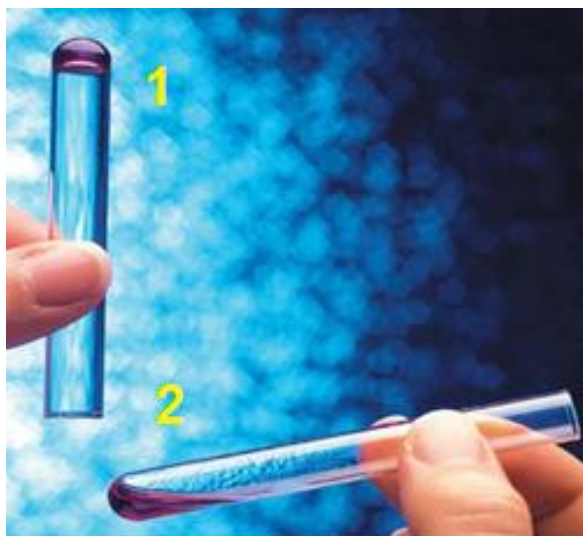
**Hình 2.8: Hình ảnh nuôi cấy vi khuẩn, nấm.**

• *Xét nghiệm Endotoxin*

*Nguyên lý:* Endotoxin là lipopolysaccharide có nguồn gốc từ vách TB của vi khuẩn Gram (-), có tính chất đặc trưng là ly giải tế bào amebocytes tuần hoàn trong máu con sam (horseshoes = *Limulus polyphemus*). Dịch ly giải amebocytes sẽ bị đục đi và đông lại thành gel tùy thuộc vào lượng Endotoxin có trong mẫu thử. Phương pháp thử Gel Clot là phương pháp dựa trên việc hình thành gel clot, do phản ứng giữa Endotoxin và LAL (*limulus amebocytes lysate*) xác định sự có mặt của Endotoxin trong mẫu. Độ nhạy tối đa là 0.03 EU/ml.

Hoá chất: Pyrotell và LAL của Associates of Cape Cod, Inc.

Đánh giá kết quả: Dựa trên việc hình thành đông gel, xác định sự có mặt của Endotoxin có trong mẫu (dương tính khi mẫu thử có sự đông gel và âm tính khi không hình thành cục đông).



**Hình 2.9: Hình ảnh đông gel xác định Endotoxin (1: dương tính, 2: âm tính)**

Nguồn: Associates of Cape Cod, Inc. (2016)[61]

**Bảng 2.5: Đánh giá chất lượng sản phẩm khối tế bào gốc [120], [23], [121]**

Tiêu chuẩn	Đánh giá
Định danh	<b>HSC:</b> số lượng và tỷ lệ tế bào CD34+ <b>MSC:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Số lượng và tỷ lệ tế bào CD73, CD90, CD105 (+)</li> <li>• Số lượng và tỷ lệ cụm CFU-F</li> </ul>
Tỷ lệ tế bào sống	>70%
Vô khuẩn	Nuôi cấy vi khuẩn, nấm âm tính.
An toàn	Xét nghiệm Endotoxin <0.2 EU/kg cân nặng/ liều ghép.

#### 2.2.7.5. Quy trình ghép tế bào gốc tủy xương

**Chuẩn bị bệnh nhân trước ghép:** Bệnh nhân được làm đầy đủ xét nghiệm thường quy, xem xét tình trạng toàn thân và tại chỗ trước ghép. Bệnh nhân và gia đình được giải thích về tình trạng bệnh, khả năng hồi phục, lợi ích, tai biến và biến chứng có thể xảy ra.

#### **Chuẩn bị dụng cụ phẫu thuật:**

- Bộ phẫu thuật thông thường hộp tuỷ.
- Kim chọc hút tuỷ có chiều dài 6 – 8 cm và đường kính bên trong là 1,5mm, đầu kim vát 45°.
- Bơm tiêm 12 ml, đốc kim 18G.

**Ghép lần 1:** Được thực hiện tại phòng mổ cột sống – BV HN Việt Đức.

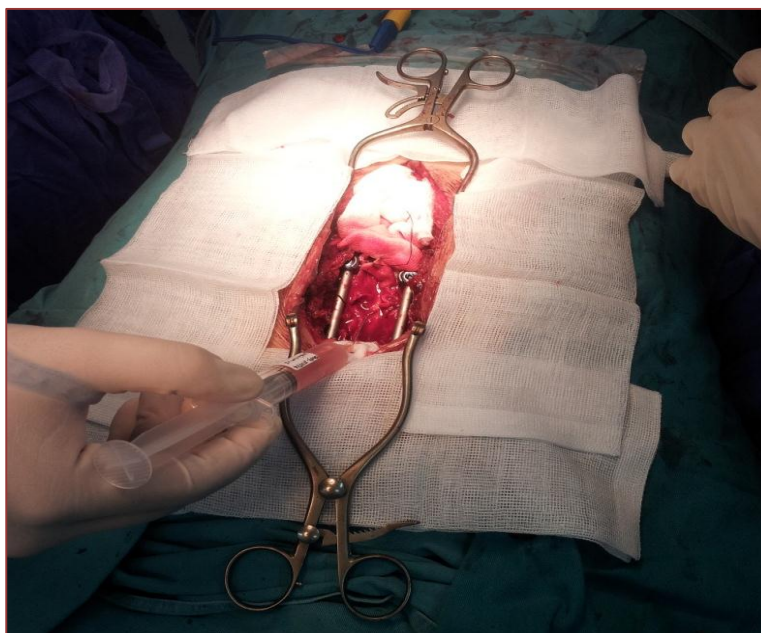
***Bước 1: Phẫu thuật mở cung sau giải ép và cố định cột sống***

- Bệnh nhân nằm sấp, kê gối độn ở vai và hông.
- Bệnh nhân được thực hiện gây mê toàn thân với ống nội khí quản.
- Đặt ống thông dạ dày tránh trào ngược.
- Tiến hành mở cung sau giải ép.
- Cố định cột sống.

***Bước 2: Ghép TBG bằng hai đường trực tiếp và gián tiếp***

- Sử dụng máy Xquang tăng sáng để xác định vị trí tổn thương và vùng tiêm truyền ghép TBG.
- Nối bơm tiêm chứa 12ml khối TBG vào đốc kim 18G, từ từ tiêm với tốc độ 2ml/phút.
- Trực tiếp: Ghép vào 3 vị trí trên, giữa, dưới vị trí tổn thương, mỗi vị trí 3ml.
- Gián tiếp: Ghép 1ml vào khoang dưới nhện trước khi đóng màng cứng.





**Hình 2.10: Ghép tế bào gốc lần 1**

**Ghép lần 2, lần 3:** Được thực hiện tại phòng tiểu phẫu trong điều kiện vô khuẩn.

- Bệnh nhân nằm tư thế nghiêng bên, giữ mặt phẳng lưng vuông góc với giường, cúi gập đầu về phía ngực, co hai đùi và gối gập về phía ngực. Trong một số trường hợp khác, có thể để bệnh nhân ở tư thế ngồi; lưng thẳng, hướng ra ngoài, cầm gập sâu xuống ngực.

- Bệnh nhân được thực hiện gây tê tại chỗ.

- Xác định vị trí và ghép vào khoang dưới nhện vùng L2.

+ Sát khuẩn và gây tê vị trí ghép.

+ Sử dụng găng vô khuẩn và đặt ga vô khuẩn ở vị trí ghép.

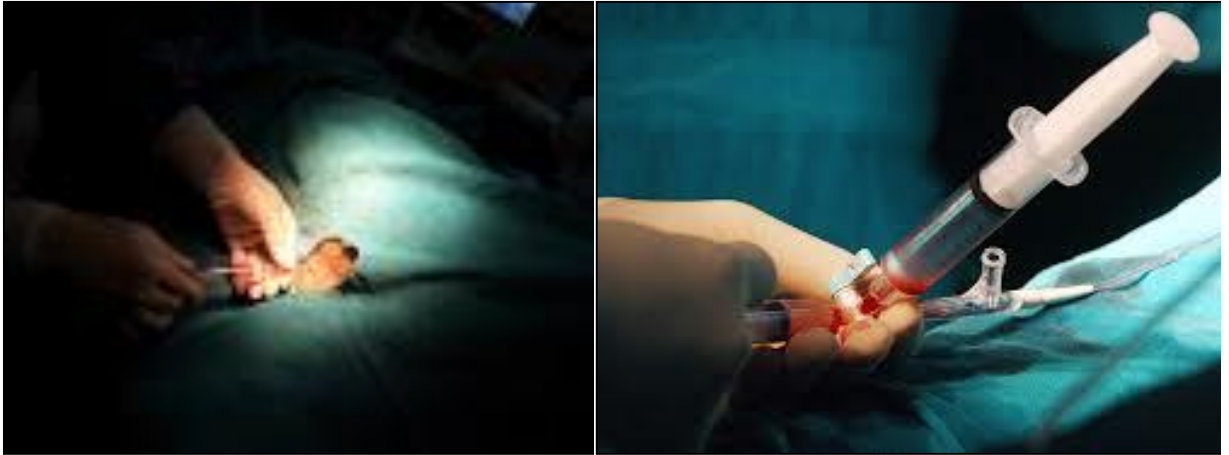
+ Xác định vị trí, chọc kim qua da (góc giữa kim và mặt da khoảng  $45^\circ$ )

+ Đưa kim vào khoang dưới nhện, mũi kim hơi chệch hướng lên, thân kim tạo đường giữa cột sống một góc  $15^\circ$ . Trước khi đưa được kim vào khoang dưới nhện phải chọc kim qua hệ thống dây chằng và qua màng cứng.

+ Khi đưa kim sâu khoảng 3-4cm hoặc thấy hẫng tay, rút nòng thông xem dịch não tủy có chảy qua kim không.

+ Nối bơm tiêm chứa 10ml khối TBG vào đốc kim 18G, tiêm từ từ vào khoang dưới nhện.





*Hình 2.11: Ghép tế bào gốc lần 2, lần 3*

### 2.2.8. Các phương pháp đánh giá hiệu quả điều trị

**Bảng 2.6: Các phương pháp đánh giá hiệu quả điều trị**

Công cụ		Thời điểm	Cách đánh giá
<b>Lâm sàng</b>	Dấu hiệu toàn thân	Trước ghép, sau 1, 2, 4, 6, 24 giờ sau ghép	Đo nhiệt độ, huyết áp và mạch của bệnh nhân. Ghi nhận các dấu hiệu xuất hiện, buồn nôn, tiêu chảy định kỳ. Ghi vào bảng theo dõi nhiệt độ, mạch và bệnh án.
	AIS (Phân loại và đánh giá mức độ tổn thương tuỷ sống)	Trước điều trị, 3 tháng, 6 tháng, 12 tháng	Thực hiện theo phân loại mức độ thần kinh và AIS tiêu chuẩn như trình bày ở mục 2.2.4.1
	SF-36 (Thang điểm đánh giá chất lượng cuộc sống)	Trước điều trị, 3 tháng, 6 tháng, 12 tháng	Đánh giá chất lượng cuộc sống bệnh nhân theo mức điểm tương ứng trình bày ở mục 2.2.4.1
<b>Cận lâm sàng</b>	MRI (Cộng hưởng từ)	Trước ghép, 3 tháng, 6 tháng, 12 tháng	Bệnh nhân được chụp MRI tại vị trí tổn thương. Đánh giá 2 chỉ số MCC và MSCC.

### **2.2.9. Phương pháp thu thập thông tin và xử lý số liệu**

Các chỉ số nghiên cứu được thu thập theo các biểu mẫu thiết kế sẵn, tại các thời điểm: trước mổ, trong và sau mổ, tái khám định kỳ.

Công cụ thu thập bao gồm:

- Phiếu thu thập thông tin từ bệnh án nghiên cứu.
- Kết quả phân tích chỉ số tế bào tuỷ xương, huyết đồ, công thức tế bào TBG từ DTX và khối TBG.
- Phân tích và xử lý kết quả bằng phần mềm Excel và SPSS 16.0.

### **2.2.10. Y đức trong nghiên cứu**

Khi thực hiện đề tài này, chúng tôi tuân thủ đầy đủ các yêu cầu về đảm bảo đạo đức trong nghiên cứu sau đây:

- Thông qua hội đồng khoa học trước khi làm nghiên cứu.
- Lựa chọn bệnh nhân là những đối tượng hoàn toàn tỉnh táo về tinh thần, nhận thức được ý nghĩa của phương pháp điều trị, cũng như chấp nhận những rủi ro có thể xảy ra.
- Bệnh nhân được giải thích rõ về mục đích nghiên cứu, những lợi ích, rủi ro có thể có và những đóng góp cho khoa học của phương pháp điều trị.
- Bệnh nhân hoàn toàn tình nguyện tham gia nghiên cứu và có ký giấy cam kết tình nguyện tham gia nghiên cứu.
- Bệnh nhân có quyền rút khỏi nghiên cứu bất cứ lúc nào.
- Bệnh nhân được đảm bảo bí mật tuyệt đối nếu có yêu cầu.
- Bệnh nhân được hưởng một số quyền lợi khi tham gia nghiên cứu.
- Bệnh nhân được thông báo về cam kết hợp tác nghiên cứu.
- Có cam kết rõ ràng đối với bệnh nhân về mục đích, quy trình, nội dung, lợi ích, và trách nhiệm trong nghiên cứu.

## Chương 3

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. ĐẶC ĐIỂM NHÓM ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

##### 3.1.1. Đặc điểm tuổi, giới

**Bảng 3.1: Phân bố bệnh theo tuổi, giới**

Nhóm BN		Nhóm chứng (n=42)	Nhóm ghép TBG (n=42)
<b>Tuổi</b> n (%)	18 – 30	19 (45%)	17 (40%)
	31 – 40	13 (31%)	15 (36%)
	41 – 50	5 (12%)	6 (14%)
	51 – 60	5 (12%)	4 (10%)
	<b>Tổng</b>	<b>42 (100%)</b>	<b>42 (100%)</b>
<b>Giới</b> n (%)	Nam	37 (88%)	38 (90%)
	Nữ	5 (12%)	4 (10%)
	<b>Tổng</b>	<b>42 (100%)</b>	<b>42 (100%)</b>

**Nhận xét:**

Không có sự khác biệt về tuổi, giới giữa hai nhóm chứng và nhóm ghép TBG ( $p > 0.05$ ). Nam giới chiếm chủ yếu. Nhóm tuổi từ 18-30 chiếm tỷ lệ cao nhất, nhóm tuổi từ 51-60 chiếm tỷ lệ thấp nhất.

### 3.1.2. Đặc điểm nghề nghiệp và nguyên nhân chấn thương

**Bảng 3.2. Nghề nghiệp và nguyên nhân chấn thương**

Nhóm BN		Nhóm chứng (n=42)	Nhóm ghép TBG (n=42)
<b>Nghề nghiệp</b>	Nghề có nguy cơ cao	34	37
	Nghề có nguy cơ thấp	8	5
	<b>Tổng</b>	<b>42 (100%)</b>	<b>42 (100%)</b>
<b>Nguyên nhân chấn thương</b>	Tai nạn lao động	17	15
	Tai nạn sinh hoạt	5	8
	Tai nạn giao thông	20	19
	<b>Tổng</b>	<b>42 (100%)</b>	<b>42 (100%)</b>

**Nhận xét:**

Nghề nghiệp có nguy cơ cao chiếm tỷ lệ cao hơn nhóm nguy cơ thấp chiếm. Nguyên nhân chấn thương cột sống do tai nạn giao thông chiếm tỷ lệ cao nhất, tiếp đến là tai nạn lao động và sinh hoạt, không có sự khác biệt giữa 2 nhóm ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.3. Vị trí tổn thương dựa trên phim X-QUANG và CT

**Bảng 3.3: Phân bố bệnh nhân theo vị trí tổn thương**

Vị trí tổn thương	n	Tỷ lệ %
T1-T5	15	17,5
T6-T9	30	35,6
T10-L1	39	46,9
<b>Tổng</b>	<b>84</b>	<b>100</b>

**Nhận xét:**

Vị trí tổn thương cột sống vùng ngực thấp T10 – L1 chiếm tỷ lệ cao nhất 46,9%. Tổn thương vùng ngực cao T1- T5 chiếm tỷ lệ thấp 17,5%.

### 3.1.4. Mức độ tổn thương dựa trên phim CHT

**Bảng 3.4: Mức độ tổn thương dựa trên phim CHT**

Mức độ thương tổn	n	Tỷ lệ (%)
Phù tủy	47	56,2
Đụng dập	32	37,5
Máu tụ	5	6,25
<b>Tổng</b>	<b>84</b>	<b>100</b>

**Nhận xét:**

Trong giai đoạn cấp tính và bán cấp của chấn thương cột sống tỷ lệ phù tủy chiếm cao nhất là 56,2%, đụng dập là 37,5%, tụ máu tủy là 6,25%.

### 3.1.5. Thời gian được ghép TBG

**Bảng 3.5. Thời gian được ghép TBG sau khi bị chấn thương**

Thời điểm	n	Tỷ lệ (%)
< 2 ngày (cấp tính)	5	12,5
2-14 ngày (bán cấp)	37	87,5
<b>Tổng</b>	<b>42</b>	<b>100</b>

**Nhận xét:**

Tỷ lệ bệnh nhân được ghép tế bào gốc ở giai đoạn bán cấp chiếm 87,5%, còn giai đoạn cấp tính chỉ có 12,5%.

### 3.1.6. Đặc điểm máu ngoại vi của đối tượng nghiên cứu

**Bảng 3.6. Một số chỉ số máu ngoại vi trước và sau lấy dịch tủy xương của 42 BN ở nhóm ghép TBG (n=126)**

Chỉ số	Lần 1 (1)		Lần 2 (2)		Lần 3 (3)		p
	Trước	Sau	Trước	Sau	Trước	Sau	
<b>BC (G/L)</b>	11,61 ± 4,50	11,24 ± 3,15	10,95 ± 4,12	10,42 ± 3,67	11,06 ± 4,78	10,75 ± 3,09	p1>0,05 p2>0,05 p3>0,05
<b>HC (T/L)</b>	4,58 ± 0,52	4,01 ± 0,23	4,24 ± 0,12	3,85 ± 0,37	4,43 ± 0,21	4,03 ± 0,31	p1<0,01 p2<0,01 p3<0,01
<b>HST (g/L)</b>	138 ± 12,23	121 ± 13,14	136 ± 11,38	123 ± 12,43	135 ± 10,26	120 ± 10,42	p1<0,01 p2<0,01 p3<0,01
<b>HCT (L/L)</b>	0,41 ± 0,75	0,38 ± 0,53	0,42 ± 0,51	0,39 ± 0,21	0,39 ± 0,47	0,37 ± 0,62	p1<0,01 p2<0,01 p3<0,01
<b>TC (G/L)</b>	234 ± 59,85	230 ± 57,53	212 ± 62,54	201 ± 55,33	250 ± 49,62	241 ± 37,37	p1>0,05 p2>0,05 p3>0,05
<b>HCL (%)</b>	0,95 ± 0,21	0,83 ± 0,29	0,93 ± 0,16	0,87 ± 0,41	0,92 ± 0,31	0,89 ± 0,72	p1<0,01 p2<0,01 p3<0,01

#### **Nhận xét:**

Ở 3 lần lấy DTX, số lượng hồng cầu, huyết sắc tố, Hematocrit sau khi lấy dịch tủy xương giảm có ý nghĩa thống kê so với trước khi lấy dịch tủy xương ( $p<0,01$ ).

### 3.1.7. Đặc điểm tế bào tuỷ xương của đối tượng nghiên cứu

**Bảng 3.7. Một số chỉ số tế bào tuỷ xương của nhóm ghép TBG trước chọc DTX lần 1, lần 2, lần 3**

Chỉ số		Giá trị trung bình $\pm$ SD			p
		Lần 1 (n=42)	Lần 2 (n=42)	Lần 3 (n=42)	
TBCN (G/L)	TB $\pm$ SD	59,97 $\pm$ 16,53	60,31 $\pm$ 23,18	58,16 $\pm$ 31,61	>0,05
	Min-Max	20,3 - 65,82	21,2 - 62,78	19,4 - 60,36	
HCL (%)	TB $\pm$ SD	1,5 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,3	>0,05
	Min-Max	1,51 - 1,70	1,46 - 1,62	1,37 - 1,51	
TBCD34+(G/L)	TB $\pm$ SD	0,64 $\pm$ 0,15	0,62 $\pm$ 0,26	0,63 $\pm$ 0,55	>0,05
	Min-Max	0,37 - 0,85	0,45 - 0,71	0,35 - 0,65	

**Nhận xét:** Số lượng TBCN của nhóm ghép TBG trước chọc DTX lần 1, lần 2, lần 3 lần lượt là: 59,97  $\pm$  16,53 (G/L), 60,31  $\pm$  23,18 (G/L), 58,16  $\pm$  31,61 (G/L). Số lượng TBCD34+ trước chọc DTX lần 1, lần 2, lần 3 lần lượt là: 0,64  $\pm$  0,15 (G/L), 0,62  $\pm$  0,26 (G/L), 0,63  $\pm$  0,55 (G/L).

## 3.2. HIỆU QUẢ CHIẾT TÁCH VÀ CHẤT LƯỢNG KHỐI TBG TỦY XƯƠNG.

### 3.2.1. Hiệu quả chiết tách khối TBG bằng máy Sepax II

**Bảng 3.8. Thành phần TB máu và TBG tạo máu trong 120ml DTX trước tách (n=126)**

Chỉ số	Đơn vị	Giá trị	Giá trị	Trung bình $\pm$ SD
--------	--------	---------	---------	---------------------

		<b>nhỏ nhất</b>	<b>lớn nhất</b>	
TBCN	G/L	15,56 ± 4,23	30,12 ± 6,12	25,49 ± 8,96
TBDN	G/L	7,24 ± 2,31	12,43 ± 3,67	9,17 ± 2,86
BCH	%	50,12 ± 3,64	80,34 ± 5,31	63,28 ± 5,41
HC	T/L	3,2 ± 1,03	4,02 ± 1,56	3,7 ± 1,17
HST	g/L	95,32 ± 31,54	125,47 ± 41,68	106,6 ± 35,6
TC	G/L	120,12 ± 45,78	210,36 ± 67,14	167,7 ± 71,83
Tỷ lệ TB CD34+	%	0,51 ± 0,12	1,22 ± 0,51	0,85 ± 0,52

**Nhận xét:** Số lượng TBCN, TBDN, HC, TC, HST, tỷ lệ TB CD34+ của dịch tuỷ xương trước tách lần lượt là: 25,49 ± 8,96 G/L; 9,17 ± 2,86 G/L; 3,7 ± 1,17 T/L; 167,7 ± 71,83 G/L; 106,6 ± 35,6 g/L; 0,85 ± 0,52%.

**Bảng 3.9. Đánh giá số lượng TBDN và TBG tạo máu trong 120ml DTX trước tách ở 3 lần chọc hút DTX (so sánh cặp giữa các lần chọc, T-test)**

Chỉ số	Lần 1 - 2 (n=42)	Lần 2 - 3 (n=42)	Lần 1 - 3 (n=42)	p1-2	p2-3	p1-3
Số lượng TBDN (10 <sup>6</sup> )	-0,98±0,54	0,14±0,48	0,04±0,32	0,24	0,075	0,46
Số lượng TBCD34+ (10 <sup>6</sup> )	1,15±13,5	1,27±11,31	2,43±8,73	0,584	0,46	0,079

**Nhận xét:** Số lượng TBDN và TBCD34+ trong 120ml DTX trước tách ở 3 lần chọc hút DTX không có sự khác biệt giữa các lần chọc (p>0,05).

**Bảng 3.10. Thành phần tế bào trong DTX trước tách và khối TBG thu được sau tách bằng máy Sepax II (n=126)**

Chỉ số	Đơn vị	Giá trị trung bình ± SD		p
		Khối DTX	Khối TBG	



		(120 ml)	(12ml)	
TBCN	G/L	25,49 ± 8,96	59,42 ± 34,12	<0,01
TBĐN	G/L	9,17 ± 2,86	30,61 ± 18,6	<0,01
BCH	%	63,28 ± 5,41	45,8 ± 9,76	<0,01
HC	T/L	3,7 ± 1,17	0,18 ± 0,13	<0,01
HST	g/L	106,6 ± 35,6	10,02 ± 5,02	<0,01
TC	G/L	167,7 ± 71,83	175 ± 123	>0,05
Tỷ lệ CD34+	%	0,85 ± 0,52	1,54 ± 0,78	<0,01

***Nhận xét:***

Thể tích khối dịch tủy xương thu gom được dùng trên máy tách tự động là 120ml, với số lượng TBCN là 25,49 ± 8,96 G/L, tỷ lệ TBCD34+ chiếm 0,85 ± 0,52. Khối TBG thu được có thể tích là 12ml, lượng HC, HST giảm đi đáng kể, số lượng TBCN là 59,42 ± 34,12, tỷ lệ CD34+ là 1,54 ± 0,78%.

**Bảng 3.11. Hiệu quả loại bỏ và thu hồi TB máu và TBG tạo máu bằng máy Sepax II để tạo khối TBG (n=126)**

Chỉ số	Đơn vị	Giá trị thấp nhất	Giá trị cao nhất	Trung bình $\pm$ SD
Tỷ lệ loại BCH	%	75,67	95,43	80,15 $\pm$ 15,6
Tỷ lệ loại HC	%	96,81	99,98	97,44 $\pm$ 0,51
Tỷ lệ loại HST	%	96,67	99,84	98,93 $\pm$ 0,68
Tỷ lệ loại TC	%	85,09	99,32	93,39 $\pm$ 2,79
Tỷ lệ thu hồi TBĐN	%	29,35	57,26	36,4 $\pm$ 19,57
Tỷ lệ thu hồi TBCD34+	%	73	92,36	78,27 $\pm$ 55,43
Mức độ tăng đậm độ TBCD34+	Lần	5,2	12,66	7,83 $\pm$ 5,55

**Nhận xét:**

Khối TBG thu được có tỷ lệ loại BCH, HC, HST tương ứng là 80,15  $\pm$  15,6 %; 97,44  $\pm$  0,51 %; 98,93  $\pm$  0,68 % và tỷ lệ thu hồi TBĐN, TBCD34+ lần lượt là 36,4  $\pm$  19,57 %; 78,27  $\pm$  55,43 %; đậm độ TBCD34+ tăng 7,83  $\pm$  5,55 lần so với trước tách.

### 3.2.2. Thông số đánh giá chất lượng khối TBG

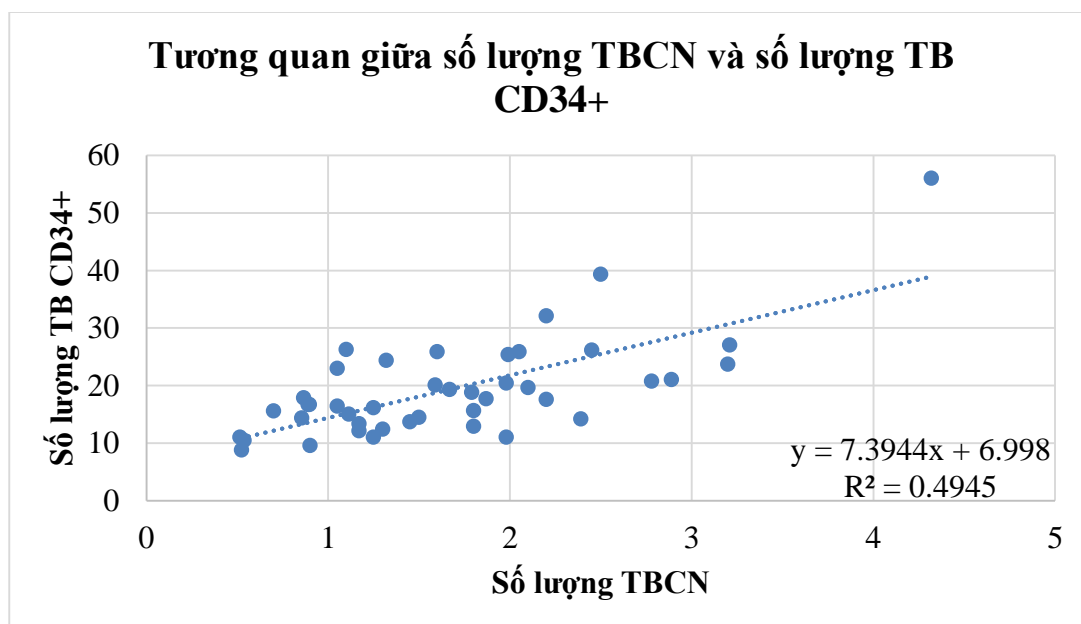
#### 3.2.2.1. Đặc điểm thành phần tế bào gốc tạo máu trong khối TBG tuỷ xương

**Bảng 3.12. Đặc điểm TBG tạo máu (CD34+) trong khối TBGTX (n=126)**

Chỉ số	Đơn vị	Giá trị nhỏ nhất	Giá trị lớn nhất	Trung bình $\pm$ SD
Tỷ lệ TB CD34+	%	0,8	5,85	2,88 $\pm$ 2,04
Tổng SL TBCD34+	10 <sup>6</sup>	8,84	64,43	19,35 $\pm$ 15,82
Tỷ lệ CD 34+ sống	%	73,03	98,38	82,73 $\pm$ 12,09

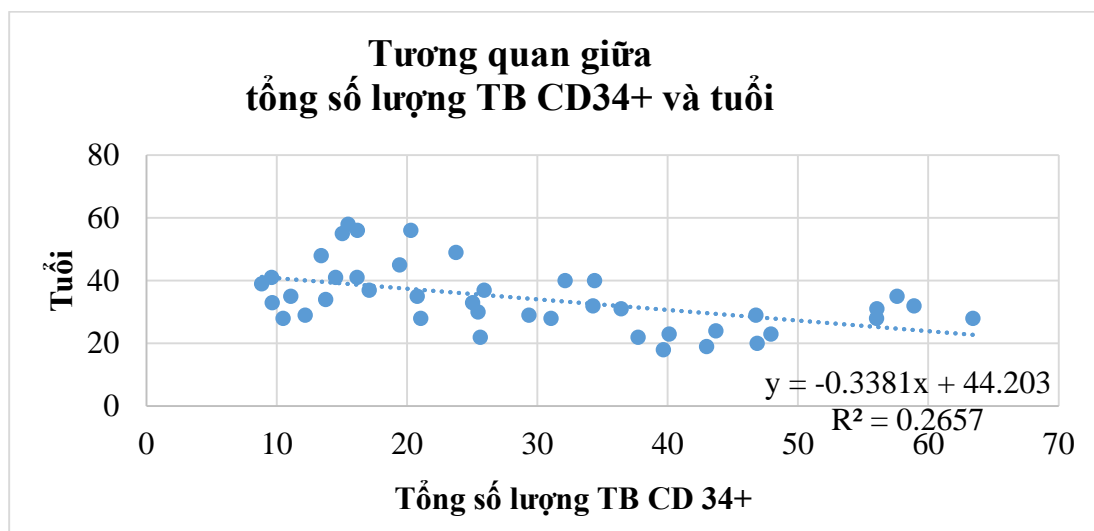
#### Nhận xét:

- Tỷ lệ TB CD34+ trong khối TBG trung bình là 2,88  $\pm$  2,04%
- Tổng số lượng TB CD34+ trong khối TBG là 19,35  $\pm$  15,82 (x 10<sup>6</sup>)
- Tỷ lệ TB CD34+ sống trung bình là 82,73  $\pm$  12,09 %



**Biểu đồ 3.1: Tương quan TB CD34+ và TBCN**

**Nhận xét:** Số lượng TB CD34+ trong khối TBG có tương quan thuận với số lượng TBCN ( $r = 0,705$ ;  $p < 0,05$ )



**Biểu đồ 3.2: Tương quan tổng số lượng TB CD34+ và tuổi BN**

**Nhận xét:** Số lượng TB CD34+ tương quan tỷ lệ nghịch với tuổi BN với  $r = -0,52$ ,  $p < 0.05$ .

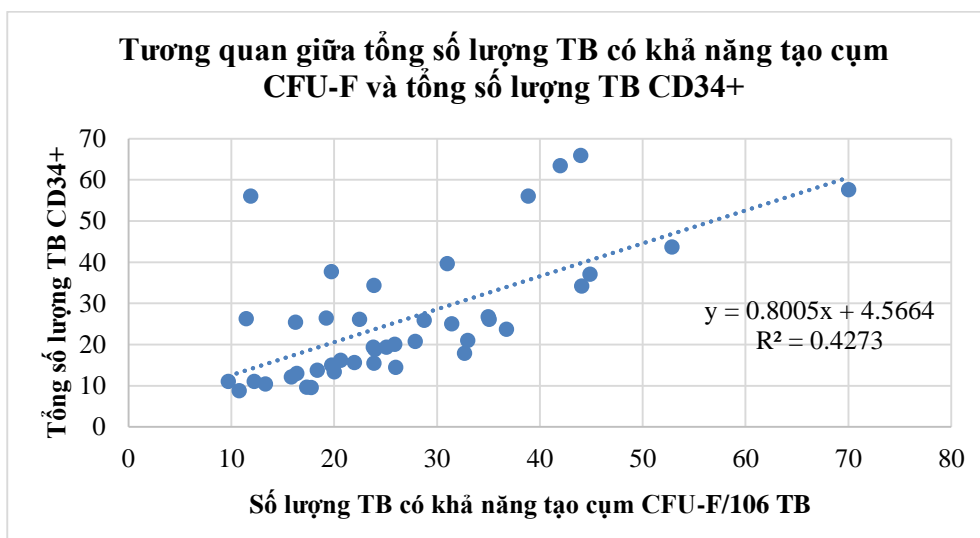
### 3.2.2.2. Đặc điểm thành phần tế bào gốc trung mô trong khối TBG

**Bảng 3.13. Kết quả nuôi cấy cụm CFU-F (n=126)**

Chỉ số	Giá trị thấp nhất	Giá trị cao nhất	TB $\pm$ SD
SL CFU-F/ $10^6$ TB	9,28	70,05	$32,39 \pm 27,03$
Nồng độ TB tạo cụm (CFU-F/ ml)	316,90	2638,0	$2121,2 \pm 2540,5$
SLTB tạo cụm CFU-F trong khối TBG ( $\times 10^3$ )	6,62	196,56	$25,46 \pm 30,49$
SLTB tạo cụm trong liều ghép 10ml ( $\times 10^3$ )	5,52	163,8	$21,21 \pm 25,41$

**Nhận xét:**

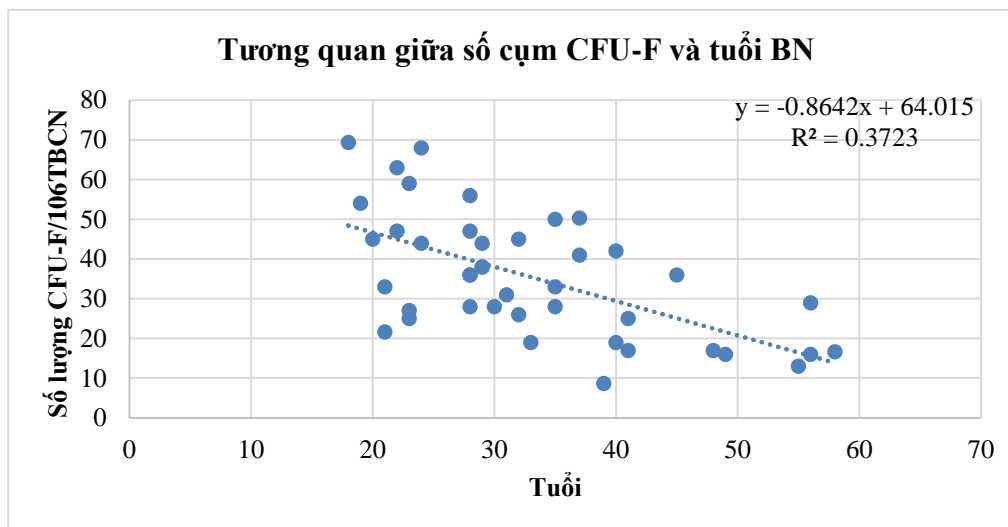
Hiệu quả mọc cụm CFU-F trung bình của khối TBG là  $(32,39 \pm 27,03)/10^6$  TB, nồng độ TB tạo cụm CFU-F trung bình trong khối TBG là  $2121,2 \pm 2540,5$  CFU-F/ ml. Số lượng TB tạo cụm CFU-F trung bình trong khối TBG thu được là  $(25,46 \pm 30,49) \times 10^3$ . Số lượng TB tạo cụm CFU-F trong 1 liều ghép 10ml là  $(21,21 \pm 25,41) \times 10^3$ .



**Biểu đồ 3.3: Tương quan giữa số cụm CFU-F với TB CD34+**

**Nhận xét:**

Số lượng tế bào có khả năng tạo cụm CFU-F/10<sup>6</sup> TB có tương quan tỷ lệ thuận với số lượng TB CD34+ với  $r = 0,654$ ,  $p < 0,05$ .



**Biểu đồ 3.4: Tương quan giữa số cụm CFU-F với tuổi**

**Nhận xét:**

Số lượng CFU-F/10<sup>6</sup> TBCN có tương quan nghịch với tuổi của bệnh nhân ( $r = -0,610$ ),  $p < 0,05$ .

**Bảng 3.14. Số lượng, nồng độ TB CD73+/CD90+/CD105+ trong khối TBG  
(n=126)**

<b>Chỉ số</b>	<b>Giá trị thấp nhất</b>	<b>Giá trị cao nhất</b>	<b>TB ± SD</b>
Số lượng TBCD73+/ CD90+/CD105+ /10 <sup>5</sup> TB	2,08	14,95	9,96 ± 8,39
Nồng độ TBCD73+/CD90+/CD105+(TB/ml)	3660,1	6755,6	5832,2±2038,4
Số lượng TBCD73+/CD90+/CD105+ trong khối TBG (x 10 <sup>3</sup> )	43,24	87,67	72,59 ± 34,46

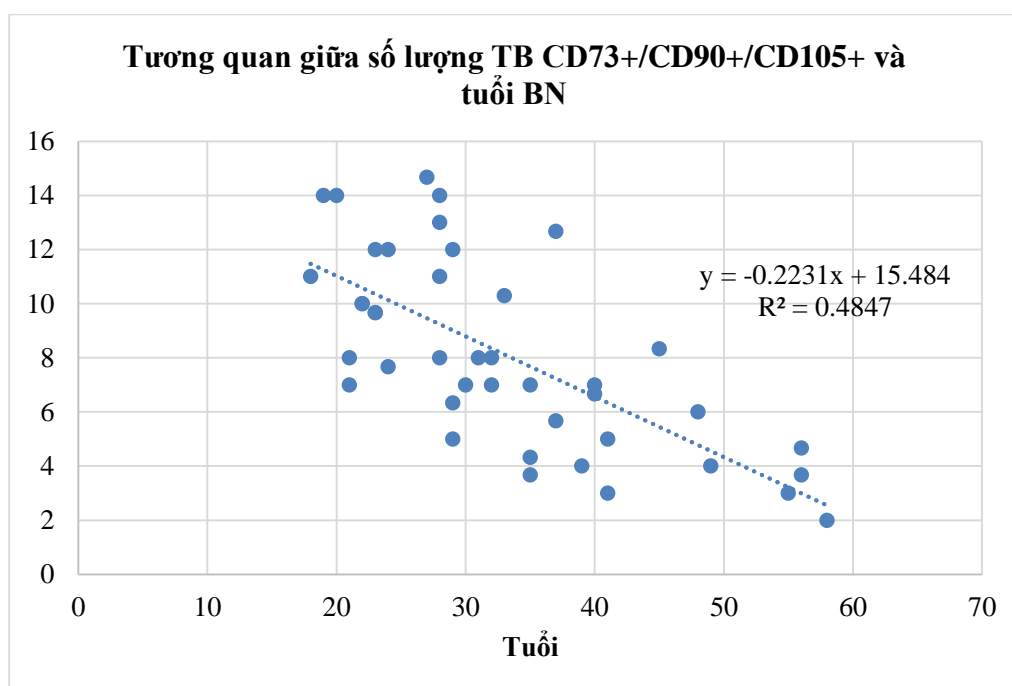
***Nhận xét:***

Số lượng TB CD73+/CD90+/CD105+ /10<sup>5</sup>TB của khối TBG là 9,96 ± 8,39; nồng độ TBCD73+/CD90+/CD105+ trong khối TBG là 5832,2 ± 2038,4 TB/ml; tổng số lượng TBCD73+/CD90+/CD105+ trong khối TBG là (72,59±34,46) x10<sup>3</sup> TB.

**Bảng 3.15. Đánh giá số lượng TBG tạo máu và TBG trung mô của khối TBG (so sánh cặp giữa các lần tách chiết, T-test)**

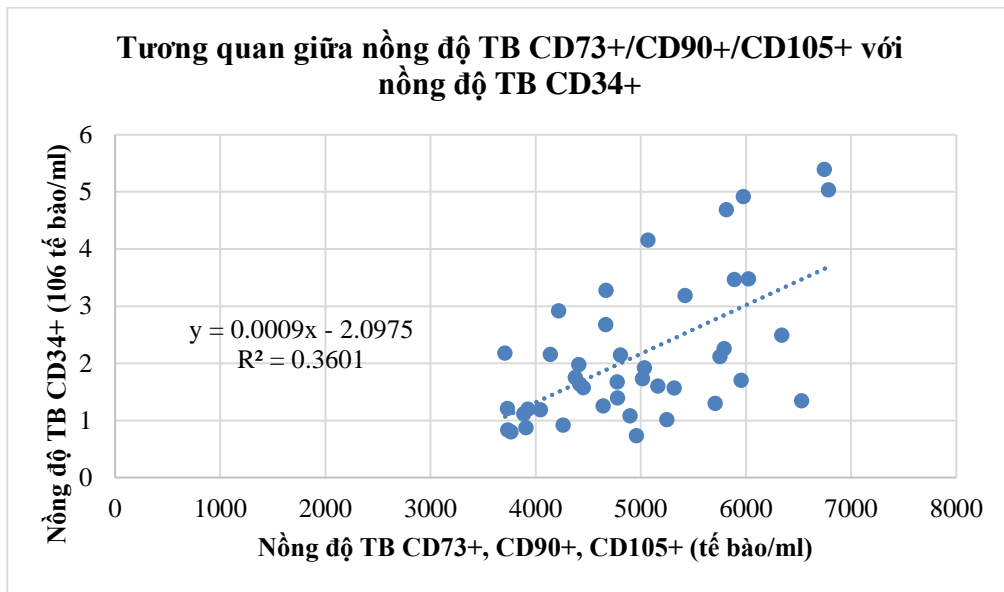
Chỉ số	Lần 1 - 2 (n=42)	Lần 2 - 3 (n=42)	Lần 1 - 3 (n=42)	p1-2	p2-3	p1-3
Số lượng TBCD34+ ( $10^6$ )	4,86±24,56	0,61±17,02	5,47±23,32	0,21	0,82	0,136
Số lượng TBCD73+/ CD90+/ CD105+ ( $10^3$ )	4,86±24,56	0,61±17,02	5,47±23,32	0,21	0,81	0,136
Số lượng CFU-F ( $10^3$ )	2,83±16,25	1,02±12,58	3,85±15,19	0,265	0,601	0,108

**Nhận xét:** Số lượng TBCD34+, số lượng TBCD73+/CD90+/CD105+, số lượng CFU-F của khối TBG không có sự khác biệt giữa các lần tách chiết ( $p > 0,05$ )



**Biểu đồ 3.5: Tương quan số lượng TB CD73+/CD90+/ CD105+ và tuổi BN**

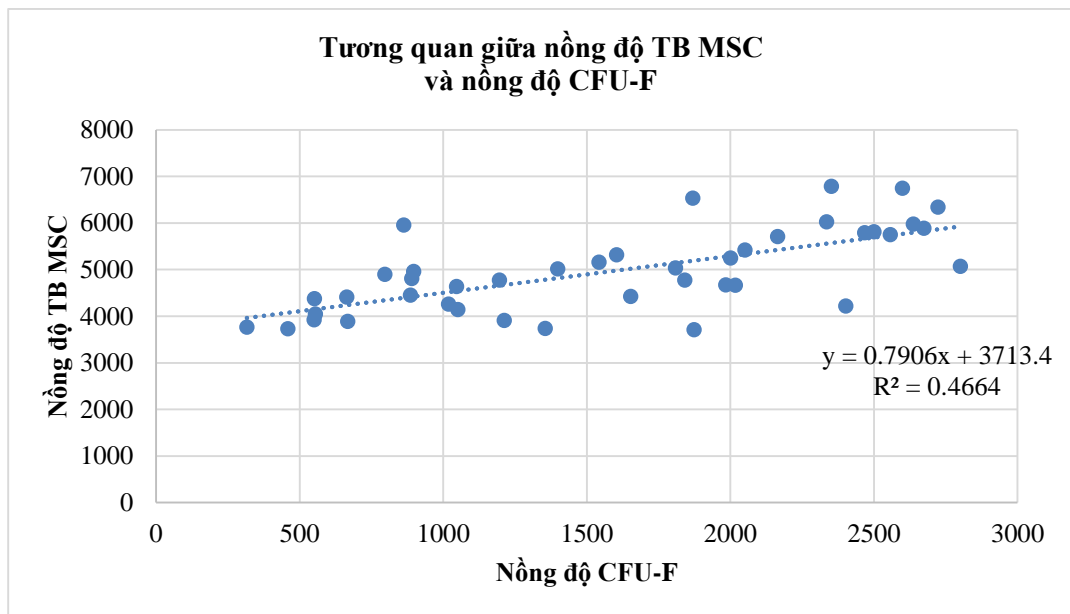
**Nhận xét:** Số lượng TBCD73+/CD90+/CD105+ / $10^5$  TB có tương quan nghịch với tuổi của người bệnh với  $r = -0,696$ ,  $p < 0,05$ .



**Biểu đồ 3.6: Tương quan giữa TBCD73+/CD90+/CD105+ với TB CD34+**

**Nhận xét:**

Nồng độ TB CD73+/CD90+/CD105+ và TB CD34+ có tương quan thuận,  $r = 0,60$ ;  $p < 0,05$ .



**Biểu đồ 3.7: Tương quan giữa MSC (tế bào CD73+/CD 90+/CD105+) và tế bào tạo cụm CFU-F**

**Nhận xét:** Tế bào CD73+/CD90+/CD105+ có tương quan thuận với tế bào tạo cụm CFU-F,  $r=0,683$ ,  $p<0.05$ .



**Bảng 3.16. Kết quả xét nghiệm cấy khuẩn, nấm và endotoxin (n=126)**

Xét nghiệm	n	Tỷ lệ âm tính (%)	Tỷ lệ dương tính (%)
Cấy khuẩn	126	100	0
Nấm	126	100	0
Endotoxin	126	100	0

**Nhận xét:**

Tất cả các mẫu đều âm tính với xét nghiệm cấy khuẩn, nấm và Endotoxin.

### 3.3. ĐÁNH GIÁ TÍNH AN TOÀN VÀ HIỆU QUẢ SỬ DỤNG KHỐI TBG TỰ THÂN TỪ TUỖ XƯƠNG TRONG ĐIỀU TRỊ CTCS CÓ LTHT

#### 3.3.1. Các tai biến, tác dụng không mong muốn của liệu pháp

**Bảng 3.17. Các tai biến, tác dụng không mong muốn trong ghép TBG tuỷ xương**

Tai biến, tác dụng không mong muốn	n = 42	(%)
Sốt	0	0
Phát ban	0	0
Co thắt phế quản	0	0
Tăng nhịp tim	0	0
Đau đầu	3	7
Buồn nôn	2	5
Nhiễm khuẩn	0	0
Chảy máu tại chỗ ghép	0	0
Tụ máu dưới màng cứng	0	0
Tai biến muện trong 12 tháng	0	0

**Nhận xét:**

Trong số 42 bệnh nhân can thiệp TBG qua 3 lần ghép, có tỷ lệ các trường hợp có tác dụng phụ là: 3 BN (7%) đau đầu, 2 BN (5%) buồn nôn, số còn lại không có biểu hiện gì.

- *Tai biến muện*: trong thời gian theo dõi 12 tháng, không có trường hợp nào được xác định là có biến chứng muện.

### 3.3.2. Liều ghép

**Bảng 3.18: Số lượng tế bào gốc ghép cho bệnh nhân (n=42)**

	<b>Ghép lần 1</b> (Ngày 0)	<b>Ghép lần 2</b> (Sau lần 1 một tháng)	<b>Ghép lần 3</b> (Sau lần 2 một tháng)	<b>Tổng liều TB ghép</b>
<b>Số lượng TB CD34+ (x10<sup>6</sup>)</b>	18,12 ± 6,56	20,15 ± 7,52	19,48 ± 10,23	58,75 ± 16,27
<b>Số lượng TB CD73+/CD90+/ CD105+ (x10<sup>3</sup>)</b>	62,17 ± 28,42	64,44 ± 65,69	63,45 ± 88,74	190,07 ± 113,28
<b>Số lượng TB tạo cụm CFU-F (x10<sup>3</sup>)</b>	21,49 ± 11,04	22,17 ± 23,57	19,97 ± 24,45	63,64 ± 74,05

**Nhận xét:**

Tổng liều ghép TB CD34+, TB CD73+/CD90+/  
CD105+, TB tạo cụm CFU-F lần lượt là: (39,75 ± 16,27)x10<sup>6</sup>, (150,07 ± 113,28)x10<sup>3</sup>, (63,64 ± 74,05)x10<sup>3</sup> TB.

### 3.3.3. Phục hồi thần kinh sau ghép

**Bảng 3.19. Đánh giá phục hồi thần kinh theo thang điểm AIS**

Nhóm	Thời gian	n	Mức A	Mức B	Mức C	Mức D	Mức E
Nhóm chứng	Ban đầu	42	42 (100%)	0	0	0	0
	3 tháng	42	40 (95%)	2 (5%)	0	0	0
	6 tháng	42	40 (95%)	2(5%)	0	0	0
	12 tháng	42	40 (95%)	2 (5%)	0	0	0
Nhóm can thiệp	Trước tiêm	42	42 (100%)	0	0	0	0
	3 tháng	42	28 (67%)	14 (33%)	0	0	0
	6 tháng	42	26 (62%)	13 (31%)	3 (7%)	0	0
	12 tháng	42	26 (62%)	12 (29%)	3 (7%)	1 (2%)	0

Nhóm chứng: ghi nhận 2 bệnh nhân chiếm (5%) hồi phục tủy từ AIS (A-B).

Nhóm can thiệp:

+ Sau 3 tháng: 33% trường hợp chuyển từ A-B

+ Sau 6 tháng: 31% trường hợp chuyển từ A-B, 7% chuyển từ A-B sang C.

+ Sau 12 tháng: 29% trường hợp chuyển từ A-B, 7% chuyển từ A-B sang C và 2% chuyển sang D.

**Bảng 3.20. Liều ghép TBCD34+, TBCD73+/CD 90+/CD105+ theo nhóm cải thiện AIS (AIS-A lên B, C, D) và không cải thiện AIS.**

Nhóm		Cải thiện AIS (n=16)	Không cải thiện AIS (n=26)	p
TBG				
Số lượng TB CD34+ (x10 <sup>6</sup> )	TB ± SD	22,15±16,47	17,69±7,76	p>0,05
Số lượng TB CD73+/CD90+/CD105+ (x10 <sup>3</sup> )	TB ± SD	66,25±11.31	56,31±10,61	P<0,05

**Nhận xét:**

Số lượng TBCD34+ ở nhóm cải thiện AIS cao hơn ở nhóm không cải thiện AIS, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p>0,05).

Số lượng TB CD73+/CD90+/ CD105+ ở nhóm cải thiện AIS cao hơn ở nhóm không cải thiện AIS có ý nghĩa thống kê (p<0,05).

**3.3.4. Đánh giá kết quả trên cộng hưởng từ**

**Bảng 3.21: So sánh kết quả MRI ở nhóm chứng và nhóm can thiệp tại thời điểm trước ghép TBG**

Nhóm	L (mm)	R (mm)	MCC (%)	MSCC (%)
<b>Nhóm chứng</b> (n = 42)	60,32 ± 7,85	5,67 ± 1,86	29,15 ± 3,87	30,18 ± 3,45
<b>Nhóm can thiệp</b> (n = 42)	66,02 ± 22,58	6,07 ± 2,29	34,23 ± 14,77	37,89 ± 16,87
<b>p</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

**Nhận xét:**

Chỉ số L, R, MCC và MSCC ở hai nhóm chứng và nhóm can thiệp không có sự khác biệt (p >0,05).

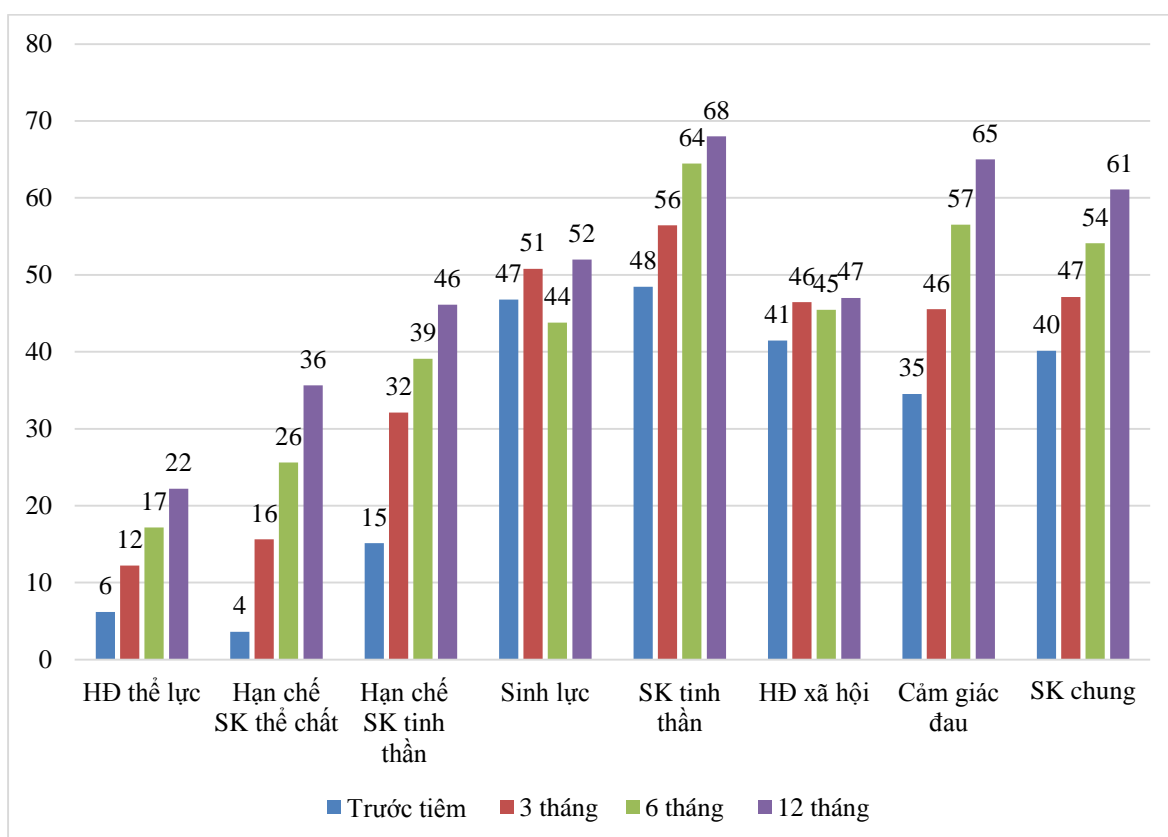
**Bảng 3.22. So sánh kết quả MRI ở nhóm chứng và nhóm can thiệp tại thời điểm sau 12 tháng**

Nhóm	L (mm)	R (mm)	MCC (%)	MSCC (%)
<b>Nhóm chứng (n = 42)</b>	57,75 ± 7,45	6,56 ± 2,95	25,15 ± 1,96	27,01 ± 2,03
<b>Nhóm can thiệp (n = 42)</b>	38,45 ± 13,40	8,19 ± 1,97	13,00 ± 5,67	14,97 ± 6,80
<b>p</b>	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

***Nhận xét:***

- Sau 12 tháng, chiều dài tổn thương ống sống (L) là 38,45 ± 13,40mm, MCC (độ tổn thương ống sống tối đa) là 13,00 ± 5,67% và MSCC (độ chèn ép tủy tối đa) là 14,97 ± 6,80% ở nhóm can thiệp thấp hơn so với nhóm chứng có ý nghĩa thống kê với p<0,05.

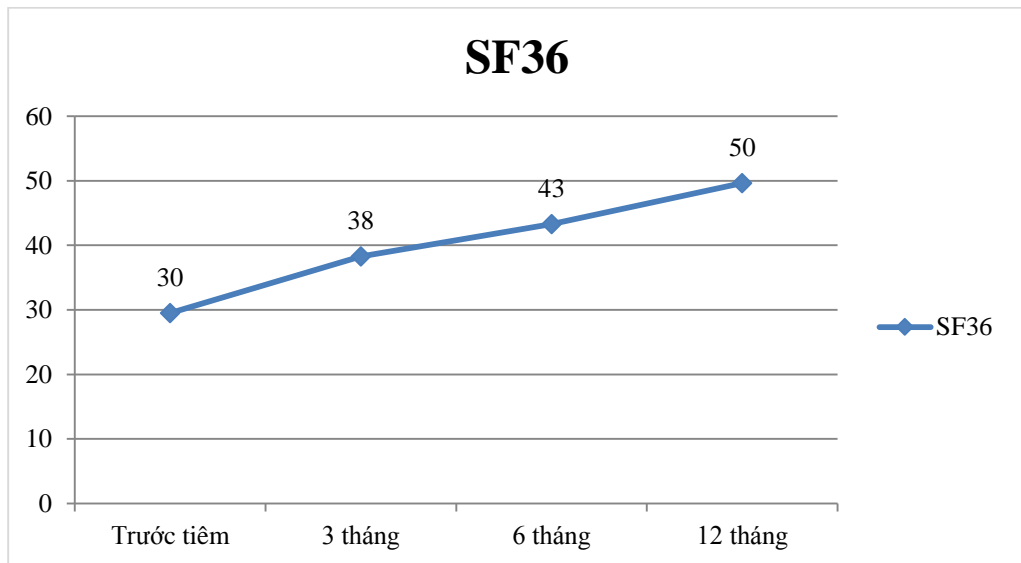
- Sau 12 tháng, chiều rộng tổn thương ống sống (R) là 8,19 ± 1,97mm ở nhóm can thiệp lớn hơn so với nhóm chứng có ý nghĩa thống kê với p<0,05.



**Biểu đồ 3.8: Đánh giá thay đổi chất lượng cuộc sống bằng thang điểm SF36 theo thời gian**

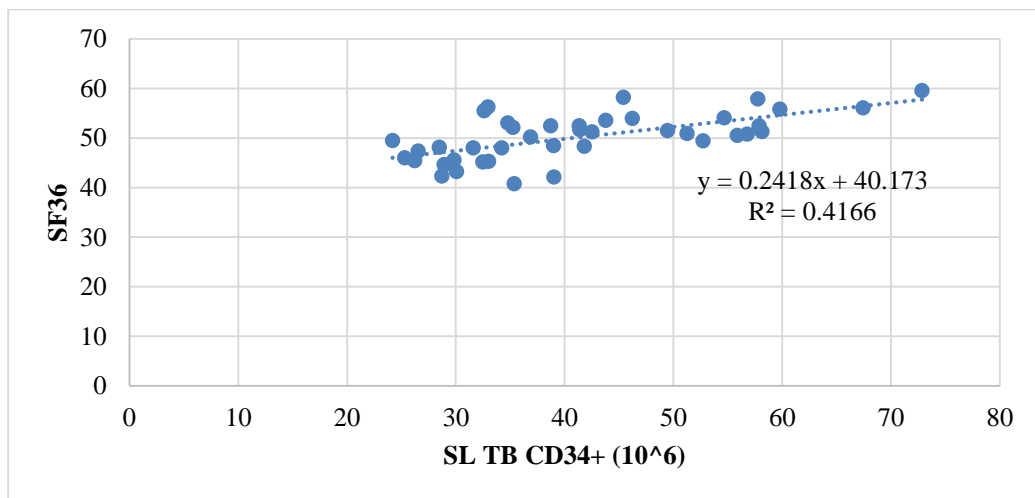
**Nhận xét:**

Các chỉ tiêu đánh giá Hoạt động thể lực, Hạn chế sửa khỏe thể chất, Hạn chế sức khỏe tinh thần, Sức khỏe tinh thần, Cảm giác đau, Sức khỏe chung đều tăng lên rõ rệt ở các thời điểm khác nhau 3 tháng, 6 tháng, 12 tháng sau điều trị. Hai chỉ tiêu Sinh lực và Hoạt động xã hội thay đổi không có ý nghĩa thống kê.



**Biểu đồ 3.9: Chỉ tiêu trung bình chung của SF36 trước và sau ghép**

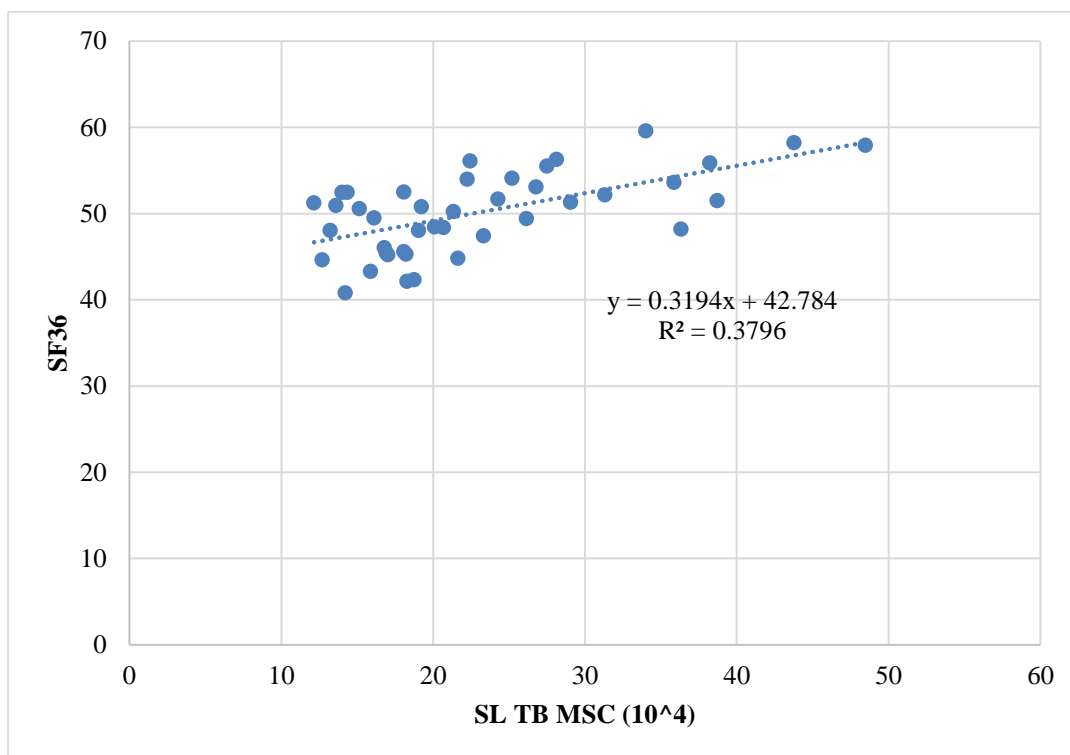
**Nhận xét:** Chỉ tiêu trung bình chung của SF36 tăng dần sau ghép ( $p < 0,001$ )



**Biểu đồ 3.10: Biểu đồ tương quan giữa điểm SF36 sau 12 tháng và tổng lượng TB CD34+ được ghép**

**Nhận xét:**

Từ biểu đồ 3.10 cho thấy điểm SF36 tăng tỷ lệ thuận với số lượng tế bào CD34+, nghĩa là tình trạng cải thiện lâm sàng tăng lên khi số lượng tế bào CD34+ tăng lên,  $r = 0,65$ ;  $p < 0,001$ .



***Biểu đồ 3.11: Biểu đồ tương quan giữa điểm SF36 sau 12 tháng và tổng lượng TB MSC được ghép***

***Nhận xét:***

Từ biểu đồ 3.11 cho thấy điểm SF36 tăng tỷ lệ thuận với số lượng tế bào MSC, nghĩa là tình trạng cải thiện lâm sàng tăng lên khi số lượng tế bào MSC tăng lên,  $r = 0,62$ ;  $p < 0,001$ .



## **Chương 4**

### **BÀN LUẬN**

#### **4.1. ĐẶC ĐIỂM CHUNG CỦA NHÓM NGHIÊN CỨU**

##### **4.1.1. Đặc điểm tuổi, giới, nghề nghiệp**

Chúng tôi tiến hành nghiên cứu 84 bệnh nhân chấn thương cột sống ngực – thắt lưng liệt tủy hoàn toàn, phù hợp với các tiêu chuẩn chẩn đoán và loại trừ. Nghiên cứu được tiến hành tại Khoa Phẫu thuật cột sống và Trung tâm Truyền máu – Bệnh viện Việt Đức, được chia làm 2 nhóm:

- Nhóm I: Gồm 42 bệnh nhân được ghép tế bào gốc (nhóm ghép TBG)
- Nhóm II: Gồm 42 bệnh nhân không ghép tế bào gốc (nhóm chứng)

Nghiên cứu được chia làm 4 nhóm tuổi: nhóm tuổi chủ yếu từ 18 đến 30 tuổi chiếm tỷ lệ cao nhất (40% ở nhóm chứng, 45% ở nhóm ghép TBG), đây là độ tuổi lao động chính, hay gặp các tai nạn do tham gia giao thông và lao động (Bảng 3.1). Theo nghiên cứu Sun Kyu Oh và CS (2016) tại Hàn Quốc thì CTCS cũng gặp từ 20 đến 29 tuổi [122], nên gây thiệt hại nặng nề về kinh tế cho bản thân, gia đình và xã hội. Số liệu tại Mỹ đã cho thấy những thiệt hại về kinh tế với chi phí trung bình của một bệnh nhân bị CTCS năm 2018 là 76.327 \$/ 1năm [2]. Do vậy mà nhiều quốc gia đã đưa ra những chiến lược phòng ngừa các tai nạn gây chấn thương cột sống.

Liên quan giữa CTCS với giới, một nghiên cứu của Yi Kang và cs, cũng như nhiều nghiên cứu khác đều cho thấy rằng, tỷ lệ CTCS ở nam giới cao hơn nữ giới. Tỷ lệ nam/ nữ dao động từ 1,1/1 đến 6,69/1 ở các nước phát triển, còn các nước kém phát triển là từ 1,00/1 đến 7,59/1 [123]. Nam giới vừa tham gia lao động nặng và lao động chính trong xã hội. Mặt khác số liệu cũng cho thấy

tỷ lệ CTCS cũng khác nhau ở các quốc gia tùy thuộc điều kiện giao thông, cơ cấu việc làm ở mỗi nước. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ nam chiếm chủ yếu (tỷ lệ ở nhóm ghép TBG là 9.5/1), tương đối cao so với các nghiên cứu khác, có lẽ do cỡ mẫu của chúng tôi còn ít (Bảng 3.1).

Nghề nghiệp ảnh hưởng không nhỏ đến các tai nạn gây CTCS. Nhiều ngành nghề ở nhóm nguy cơ cao như công nhân xây dựng, lái xe ...thường dễ xảy ra tai nạn hơn nhóm nguy cơ thấp như công chức, giáo viên... Theo số liệu của chúng tôi thì nhóm nguy cơ cao chiếm tỉ lệ cao hơn nhóm nguy cơ thấp, không có sự khác biệt giữa nhóm chứng và nhóm ghép TBG ( $p > 0,05$ ) (Bảng 3.2). Kết quả này cho thấy tại Việt Nam với nền kinh tế thấp, hệ thống giao thông chưa tốt, điều kiện bảo hiểm lao động cho công nhân chưa được quan tâm một cách đầy đủ dẫn đến hiện tượng trên. Thống kê tại các nước Châu Phi thì tai nạn giao thông chiếm 70%, khu vực Đông Nam Á là 40% và Tây Thái Bình Dương là 55% [124], tại Mỹ là 38,3% [125], đó là một trong những nguyên nhân đứng đầu gây CTCS, tiếp theo đến các nguyên nhân do tai nạn lao động và sinh hoạt [124]. Tại Việt nam CTCS do tai nạn giao thông chiếm tỷ lệ cao nhất và thường liên quan tới việc sử dụng rượu bia đi xe máy ở tốc độ cao màt kiểm soát phương tiện và gây ra tai nạn. Một nghiên cứu ở Mỹ cho rằng việc sử dụng mũ bảo hiểm không đạt tiêu chuẩn có thể gây ra nhiều thiệt hại hơn là không có mũ bảo hiểm [126]. Theo Jatinder Singh thấy rằng các nước khu vực Đông Nam Á hàng năm mất gần 3% GDP cho chấn thương về giao thông đường bộ [62].

#### **4.1.2. Đặc điểm lâm sàng và chẩn đoán hình ảnh**

Các bệnh nhân bị CTCS khi vào cấp cứu tại bệnh viện đều phải làm các xét nghiệm cơ bản để đánh giá tổn thương và các chức năng sống của cơ thể.

Như chụp X – Quang, CT là phương pháp chẩn đoán hình ảnh trong cấp cứu, qua đó các bác sỹ lâm sàng xác định được vị trí tổn thương đốt sống, xương và phần mềm... Trong nghiên cứu của chúng tôi, CTCS ngực - lưng được chia làm 3 vùng, T1-T5: vùng ngực cao (17,5%), T6-T9: vùng ngực giữa (35,6%) và T10-L1: vùng ngực thấp (46,9%) (Bảng 3.3). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi vùng T10- L1 chiếm tỷ lệ cao nhất là 46,9% cũng tương tự như nghiên cứu của tác giả Nguyễn Đình Hòa (2016) là 53,7% [11]. Theo tác giả Tulika Chandra và Cs (2016) nghiên cứu trên 44 bệnh nhân chấn thương cột sống, có 18 (41%) trường hợp bị chấn thương tại vị trí L1 [127]. Điều này được lý giải là do đặc điểm giải phẫu vùng T10-L1 ở vùng bản lề cột sống ngực thắt lưng, nơi chuyển hướng cong của cột sống và cũng là chỗ giáp ranh giữa vùng cột sống cố định và cột sống di động nên dễ xảy ra chấn thương hơn các vùng khác.

Để đánh giá tổn thương chính xác hơn, chúng tôi tiến hành chụp cộng hưởng từ cho 84 bệnh nhân nghiên cứu thì tỷ lệ phù tủy và đọng dập tủy chiếm tỷ lệ 56,2% và 37,5%, tuy nhiên chỉ có 6,25% là máu tủy (Bảng 3.4). Kết quả này cũng tương tự kết quả của tác giả Nguyễn Đình Hòa (2016), có tỷ lệ phù tủy và đọng dập tủy chiếm tỷ lệ cao [11]. Điều này cũng phù hợp với cơ chế CTCS ở giai đoạn cấp và bán cấp như theo nghiên cứu của tác giả Vidyasagar (2012) cho rằng trong chấn thương tủy sống, ở giai đoạn nguyên phát do lực nén và lực kéo gây tổn thương trực tiếp đến các hệ thống thần kinh. Nguyên nhân chủ yếu là do các mảnh xương, dây chằng, đĩa đệm bị dịch chuyển dẫn đến tổn thương sợi trục, tế bào thần kinh và mạch máu. Tiếp đó, tủy sống bị phù nề chiếm toàn bộ đường kính của ống sống gây thiếu máu cục bộ, làm giải phóng độc tố dẫn đến một loạt các tổn thương thứ cấp và cuối cùng ảnh hưởng đến các tế bào thần kinh ở vùng lân cận [128]. Nghiên cứu Venkata Ramesh

Dasari và Cs (2014) đã chứng minh ở giai đoạn cấp tính có hiện tượng dập nát tế bào thần kinh, chảy máu và hoại tử trong chất xám của tủy, tiếp theo là phù nề và chảy máu trong chất trắng của tủy [67]. Nhìn chung ở giai đoạn cấp và bán cấp theo các tác giả đều có chung nhận xét trên lâm sàng có các biểu hiện phù tủy, đưng dập, máu tụ...

#### **4.1.3. Thời gian được ghép TBG**

Để có được thành công trong quá trình ghép TBG, đa số các tác giả phải lựa chọn thời gian tiến hành ghép, chủ yếu phải dựa vào sự phân chia giai đoạn sinh lý của bệnh. Ở giai đoạn cấp tính của chấn thương cột sống, các phản ứng oxy hóa gốc tự do, các kích thích dẫn truyền và yếu tố gây viêm tạo ra môi trường gây độc cho việc cấy ghép tế bào gốc, còn trong giai đoạn mãn tính mô sẹo thần kinh hình thành tạo ra rào cản vật lý cản trở quá trình tái sinh sợi trục. Vì vậy giai đoạn mãn tính rất khó khăn cho việc ghép tế bào gốc [122]. Nghiên cứu Bhanot Y và cộng sự (2011) thấy rằng ở giai đoạn mãn tính của CTCS các tín hiệu chemokin rất yếu để hướng tế bào gốc về phía tổn thương [129]. Yoon và cộng sự (2007) nghiên cứu trên các bệnh nhân ở giai đoạn mãn tính (> 8 tuần) thấy hoàn toàn không có sự cải thiện khi đánh giá dựa trên thang điểm AIS [103]. Ngược lại, giai đoạn bán cấp cho thấy sự giảm phản ứng viêm và chưa hình thành sẹo thần kinh, các tế bào gốc ở giai đoạn này tồn tại tốt hơn so với giai đoạn cấp và mãn tính [122]. Do đó, giai đoạn bán cấp dường như là giai đoạn tối ưu cho quá trình cấy ghép tế bào. Trong nghiên cứu của chúng tôi, 87.5% các trường hợp được ghép ở giai đoạn bán cấp (Bảng 3.5). Một số tác giả trên thế giới đã lựa chọn giai đoạn cấp và bán cấp để ghép và cũng thu được kết quả nhất định.

**Bảng 4.1: Tổng hợp kết quả điều trị ở giai đoạn cấp và bán cấp của một số tác giả trên thế giới**

<b>Nghiên cứu</b>	<b>Giai đoạn</b>	<b>Số lượng bệnh nhân</b>	<b>Kết quả điều trị</b>
Seung Hwan Yoon (2007) [6]	Cấp tính và bán cấp	35	30,4% bệnh nhân cải thiện từ ASI- A lên (B-C)
Arachimani và cộng sự (2009) [107]	Cấp tính và mãn tính	297	30,5 % bệnh nhân cải thiện từ ASI- A lên (B-C)
Pu – Cha Jiang (2013) [10]	Cấp tính và bán cấp	20	75% cải thiện trong đó 50% cải thiện từ ASI- A lên (B-C)
Zurab và cộng sự (2016) [9]	Cấp tính và bán cấp	18	Mức độ cải thiện ASI-A tăng lên từ 30-33%

#### **4.1.4. Đặc điểm tế bào ngoại vi và tuỷ xương của đối tượng nghiên cứu**

##### ***Đặc điểm tế bào máu ngoại vi:***

Xét nghiệm tế bào máu ngoại vi là xét nghiệm cơ bản bắt buộc cho bệnh nhân phẫu thuật, kết quả cho thấy: ở 3 lần chọc DTX, một số chỉ số máu ngoại vi trước khi chọc tủy như số lượng BC, HC, HST, HCT; TC (Bảng 3.6) đều nằm trong giới hạn bình thường của người Việt Nam trưởng thành [130]. Sau khi đã chọc dịch tủy xương, kiểm tra lại công thức máu thấy hiện tượng giảm nhẹ HC, HST, HCT ( $p < 0,01$ ) so với trước khi lấy; sự thay đổi các chỉ số sau chọc dịch vẫn nằm trong khoảng giới hạn bình thường. Điều đó cho thấy với thể tích lấy dịch tủy xương 120 ml là thể tích an toàn, không ảnh hưởng đến

sức khỏe bệnh nhân. So sánh với nghiên cứu của tác giả Dương Đình Toàn (2015), nghiên cứu ghép khối TBG tủy xương tự thân điều trị cho 46 bệnh nhân thoái hoá khớp khối sử dụng thể tích dịch tủy xương là 120ml và cũng cho kết quả tương tự với kết quả của chúng tôi [131].

#### ***Đặc điểm tế bào tủy xương:***

Trong nghiên cứu này, chúng tôi lấy 2ml dịch tủy xương ban đầu để làm xét nghiệm tủy đồ, được thực hiện trên hệ thống máy Cell-Dyn 1800, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 đã đạt chứng chỉ ISO 15189, đảm bảo kết quả chính xác. Kết quả số lượng TBCN, HCL, TBCD34+, số lượng TBCD34+ ở 3 lần lấy có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p>0,05$ ). Chứng tỏ, khoảng cách lấy DTX 1 tháng/ lần, mỗi lần 120ml không ảnh hưởng đến sức khoẻ BN (Bảng 3.7). Kết quả số lượng TBCN nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của tác giả Đỗ Trung Phần, số lượng tế bào có nhân tủy xương của người Việt Nam trưởng thành trung bình  $57,4 \pm 15,5$  G/L [130]. Tác giả Dương Đình Toàn, Nguyễn Thanh Bình cũng cho kết quả tương tự lần lượt là  $69,03 \pm 49,86$  G/L,  $61,54 \pm 33,06$  [131],[132]. Trong số 42 bệnh nhân nghiên cứu, chúng tôi thấy tủy đồ các bệnh nhân này hoàn toàn bình thường. Tuy nhiên, theo nhận xét của tác giả Kostovski E (2010), các bệnh nhân CTCS nếu nằm lâu sẽ chuyển thành mãn tính, rối loạn chức năng các cơ quan trong cơ thể, do đó kết quả các chỉ số tế bào của dịch tủy xương khác so với người khỏe mạnh [133].

## **4.2. HIỆU QUẢ CHIẾT TÁCH VÀ CHẤT LƯỢNG KHỐI TẾ BÀO GỐC TỦY XƯƠNG**

Sự thành bại của các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng liệu pháp tế bào gốc đều phụ thuộc vào nguồn tế bào, trong đó nguồn tế bào gốc lấy từ tủy xương

ứng dụng cho điều trị chấn thương cột sống có một số ưu điểm và nhược điểm sau [7],[67],[6]:

*Ưu điểm:*

- Dễ dàng phân lập và bảo quản lạnh.
- Sau khi bảo quản lạnh  $-80^{\circ}\text{C}$  tế bào có khả năng sống sót và tái sinh cao.
- Có khả năng tăng sinh và biệt hoá đa dòng.
- Hạn chế các vấn đề liên quan đến miễn dịch hoặc phản ứng ghép chống chủ.
- Không tạo thành u ác tính.
- Nghiên cứu rộng rãi, kho dữ liệu khoa học lớn trong ứng dụng tế bào gốc tuỷ xương đối với bệnh lý huyết học.

*Nhược điểm:*

- Phân lập TBG được tiến hành trong phòng thí nghiệm do vậy có khả năng bị nhiễm khuẩn.
- Xử lý TBG từ tuỷ xương không đảm bảo sẽ ảnh hưởng xấu đến kết quả ghép.

#### **4.2.1. Kỹ thuật chọc hút dịch tuỷ xương**

Chúng tôi tiến hành thu nhận 120ml dịch tuỷ xương của 42 bệnh nhân nghiên cứu bằng cách chọc hút tuỷ xương theo quy trình chuẩn, trước khi tiến hành chiết tách dịch tuỷ xương bằng máy Sepax II.

Có ba tư thế chuẩn bị bệnh nhân để chọc hút dịch tuỷ xương. Tư thế nằm ngửa, tư thế nằm sấp và tư thế nằm nghiêng  $90^{\circ}$ . Connolly (1991), Howard R. Bierman (1952) đã mô tả quy trình lấy dịch tuỷ xương ở bệnh nhân theo tư thế nằm sấp, được lấy ở vị trí mào chậu sau hai bên [134],[135]. Hernigou (2006)

lấy dịch tuỷ xương ở gai chậu trước trên hai bên, bệnh nhân được gây mê toàn thân và ở tư thế nằm ngửa [116]. Hernigou (2012) mô tả quy trình lấy dịch tuỷ xương từ mào chậu sau hai bên, bệnh nhân nằm ở tư thế nghiêng, chân gấp  $45^{\circ}$  [136]. Có thể thu nhận dịch tuỷ xương từ mào chậu trước hoặc mào chậu sau. Việc thu nhận dịch tuỷ xương từ mào chậu sau an toàn hơn và chất lượng dịch tuỷ xương tốt hơn; bởi bề mặt của mào chậu sau rộng, dễ dàng thao tác, hạn chế được chảy máu, khối lượng tuỷ xương ở đây tương đối lớn và nằm xa các cấu trúc quan trọng. Tư thế bệnh nhân nằm sấp là tư thế thuận lợi nhất để thu nhận dịch tuỷ xương từ mào chậu sau.

Trong nghiên cứu của chúng tôi lựa chọn phương pháp thu nhận an toàn nhất và hạn chế chảy máu. Do đó, 42 bệnh nhân đều được nằm sấp và lấy dịch tuỷ xương ở gai chậu sau trên.

Việc sử dụng kim lấy dịch tuỷ xương có đường kính 2,4mm giúp giảm đau đớn cho bệnh nhân và giảm thiểu nguy cơ nhiễm trùng.

Chúng tôi thực hiện kỹ thuật lấy tuỷ xương theo quy trình đã được nhiều tác giả có uy tín trên thế giới áp dụng. Theo đó, thể tích mỗi lần hút không quá 4ml, với lượng hút như vậy có thể lấy được ít nhất 85% tế bào tuỷ xương tại mỗi vị trí chọc hút và hạn chế pha loãng với máu ngoại vi [136].

Kết quả thu được của chúng tôi thể hiện trong bảng 3.6 và bảng 3.7 cũng cho thấy không có sự khác biệt của TB máu và tuỷ xương qua 3 lần lấy 120ml DTX và cách nhau 1 tháng. Tuy nhiên để đánh giá sự khác biệt giữa tổng thể tích tuỷ xương và thể tích mỗi lần hút ảnh hưởng như nào đến số lượng và đậm độ tế bào gốc trên bệnh nhân nói chung, cần phải tiếp tục nghiên cứu và theo dõi thêm.



#### 4.2.2. Hiệu suất tách TBG tủy xương của máy Sepax II

Các bệnh nhân được phẫu thuật cố định cột sống và giải phóng chèn ép trước khi tiến hành lấy dịch tủy xương ở gai chậu sau trên hai bên, bệnh nhân được đặt ở tư thế nằm sấp theo phương pháp của Connolly (1991). Đây là tư thế thuận lợi nhất so với các tư thế nằm ngửa và nằm nghiêng vì phải kết hợp với các phẫu thuật khác. Bệnh nhân được gây tê tủy sống nên không gặp khó khăn khi đặt bệnh nhân ở tư thế nằm sấp, gây tê tủy sống là phương pháp có nhiều ưu điểm như: thời gian thực hiện thủ thuật nhanh, chuyển tư thế bệnh nhân dễ dàng, thời gian giảm đau có thể kéo dài tới 2-3 giờ. Trong quá trình thực hiện chúng tôi không gặp biến chứng nào trong quá trình lấy dịch tủy xương và gây tê tủy sống cho bệnh nhân trong tư thế nằm sấp.

Theo nghiên cứu của tác giả Philippe Hernigou (2013) với số lượng hút dịch tủy xương nhỏ thì thu được nhiều tế bào gốc trung mô hơn so với việc hút nhiều dịch tủy xương cùng một lúc, nhưng có nhược điểm là thời gian kéo dài hơn do đó chúng tôi cũng áp dụng phương pháp hút dịch tủy xương của tác giả Philippe Hernigou để đảm bảo có được tế bào gốc trung mô nhiều nhất [137]. Nhưng cũng để hạn chế thời gian kéo dài chúng tôi đã đồng thời phối hợp một bác sĩ huyết học và một bác sĩ ngoại khoa cùng tiến hành chọc hút tủy ở hai bên gai chậu sau trên của bệnh nhân, sử dụng kim lấy tủy đường kính 2,4mm và thể tích mỗi lần lấy là 2-4 ml. Kim được xoay theo các hướng khác nhau để đảm bảo dịch tủy xương không bị hòa loãng bởi máu ngoại vi, tổng thể tích dịch tủy xương chúng tôi thu thập là 120ml. Thời gian lấy trung bình là  $12 \pm 4.05$  (phút) và thể tích trung bình ở các lần lấy  $123 \pm 6,12$  (ml). Nghiên cứu này cũng tương tự như nghiên cứu của tác giả Dương Đình Toàn (2015) [131]

11 ± 1,66 (phút), tác giả Nguyễn Thanh Bình (2012) [132] là 15 – 30 (phút). Với thể tích và thời gian mà chúng tôi lấy dịch tủy xương đảm bảo thu được nhiều TBG, không có sự pha loãng của dịch tủy xương với máu ngoại vi, hạn chế phải thay đổi vị trí trục kim trên xương cánh chậu.

Có nhiều phương pháp xử lý dịch tủy xương để lấy các tế bào đơn nhân như sử dụng phương pháp tách tay, tách qua hệ thống Comtec, Harvest... Tuy nhiên chúng tôi lựa chọn hệ thống Sepax vì là hệ thống kín và hoàn toàn tự động của Thuy Sĩ dựa trên phương pháp tách thành phần tế bào đơn nhân bằng cách sử dụng dung dịch Ficoll tỷ trọng 1,077 g/ml (cao hơn tỷ trọng của bạch cầu lympho nhưng lại thấp hơn tỷ trọng hồng cầu và bạch cầu hạt), thời gian xử lý toàn bộ quy trình là khoảng 1 giờ 15 phút, sản phẩm cuối cùng đạt được thể tích nhỏ theo mong muốn là 12ml khối tế bào gốc tủy xương. Như vậy với phương pháp tách và thời gian thực hiện hoàn toàn phù hợp để phẫu thuật và ghép tế bào gốc cho bệnh nhân.

Để đánh giá hiệu quả của máy, chúng tôi tiến hành so sánh kết quả của dịch tủy xương và khối tế bào gốc thu được. Bảng 3.8 cho thấy các thành phần TB của dịch tủy xương trước tách như TBĐN, HC, TC, HST, tỷ lệ TB CD34+ của dịch tủy xương lần lượt là: 9,17 ± 2,86 G/L; 3,7 ± 1,17 T/L; 167,7 ± 71,83 G/L; 106,6 ± 35,6 g/L; 0,85 ± 0,52%. Kết quả này tương tự nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thanh Bình (2012) [132]. Bảng 3.9 so sánh cặp giữa các lần chọc, thấy số lượng TBĐN lần 2 thấp hơn lần 1, lần 3 thấp hơn lần 1 và 2, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Số lượng TB CD34+ lần 1 lớn hơn lần 2, lần 2 lớn hơn lần 3, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Kết quả ở bảng 3.10 cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê

( $p < 0,01$ ) với các chỉ số TBCN tăng từ  $25,49 \pm 8,96$  đến  $59,42 \pm 34,12$  (G/L), tỷ lệ TBĐN tăng từ  $9,17 \pm 2,86$  đến  $30,61 \pm 18,6$  (G/L), tỷ lệ tế bào CD34+ tăng từ  $0,85 \pm 0,52$  đến  $1,54 \pm 0,78$  sau tách. Tỷ lệ tế bào CD34+ trong tủy xương và khối TBG thu được của bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với nghiên cứu của Nguyễn Thanh Bình (2012) [132]. Để tính hiệu suất của máy tách tế bào tự động Sepax II, chúng tôi tính tỷ lệ thu hồi và loại của các tế bào khác nhau. Kết quả cho thấy tỷ lệ HC, HST, TC, BCH được loại bỏ khá cao lần lượt là 97,44%; 98,93%; 93,39%; 80,15%. Lượng hồng cầu, huyết sắc tố được loại bỏ gần hết (Bảng 3.11). Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng máy Sepax II để chiết tách 12ml khối TBG từ 120 ml. So sánh với nghiên cứu của tác giả Kiều Thị Vân Oanh (2019), sử dụng máy Sepax II để chiết tách 80ml khối tế bào gốc từ 414ml dịch tủy xương cho kết quả hiệu suất loại bỏ HC thấp hơn (69,45%) nhưng hiệu suất thu hồi TBĐN cao hơn (71,08%). So sánh với hệ thống máy Comtec trong nghiên cứu của Nguyễn Thanh Bình (2012) thấy hiệu suất loại bỏ HC, HST, TC, BCH của máy Sepax II cao hơn máy nhưng tỷ lệ thu hồi TBĐN và TBCD34+ lại thấp hơn.

**Bảng 4.2. So sánh hiệu quả tạo khối TBG**

<b>Phương pháp tách</b>	<b>Hiệu quả thu hồi TBDN (%)</b>	<b>Hiệu quả thu hồi TBCD34+ (%)</b>	<b>Tỷ lệ loại HC (%)</b>	<b>Tỷ lệ loại BCH (%)</b>
<b>Máy Comtec BV108 (n=31) [132]</b>	34,19	52,44	98,11	80,59
<b>Máy Sepax BVBM (n=17) [138]</b>	71,08	N/A	69,45	N/A
<b>Tách tay BV108 (n=81) [132]</b>	35,5	56,86	99,63	85,94
<b>Tách tay Vinmec (n=26) [139]</b>	66,15	N/A	N/A	N/A
<b>Nghiên cứu của chúng tôi Sepax (n=126)</b>	36,4	78,27	97,44	80,15

Vấn đề đặt ra là liệu phần mềm Sepax II cài đặt rửa loại bỏ triệt để nên một phần TBDN đã bị rửa trôi và tỷ lệ cô đặc thể tích chiết tách có ảnh hưởng đến hiệu suất chiết tách của máy. Tuy nhiên, kết quả này cho thấy mục tiêu chính của quá trình xử lý chiết tách và cô đặc dịch tủy xương đã đạt được qua hệ thống tách máy tự động Sepax II.

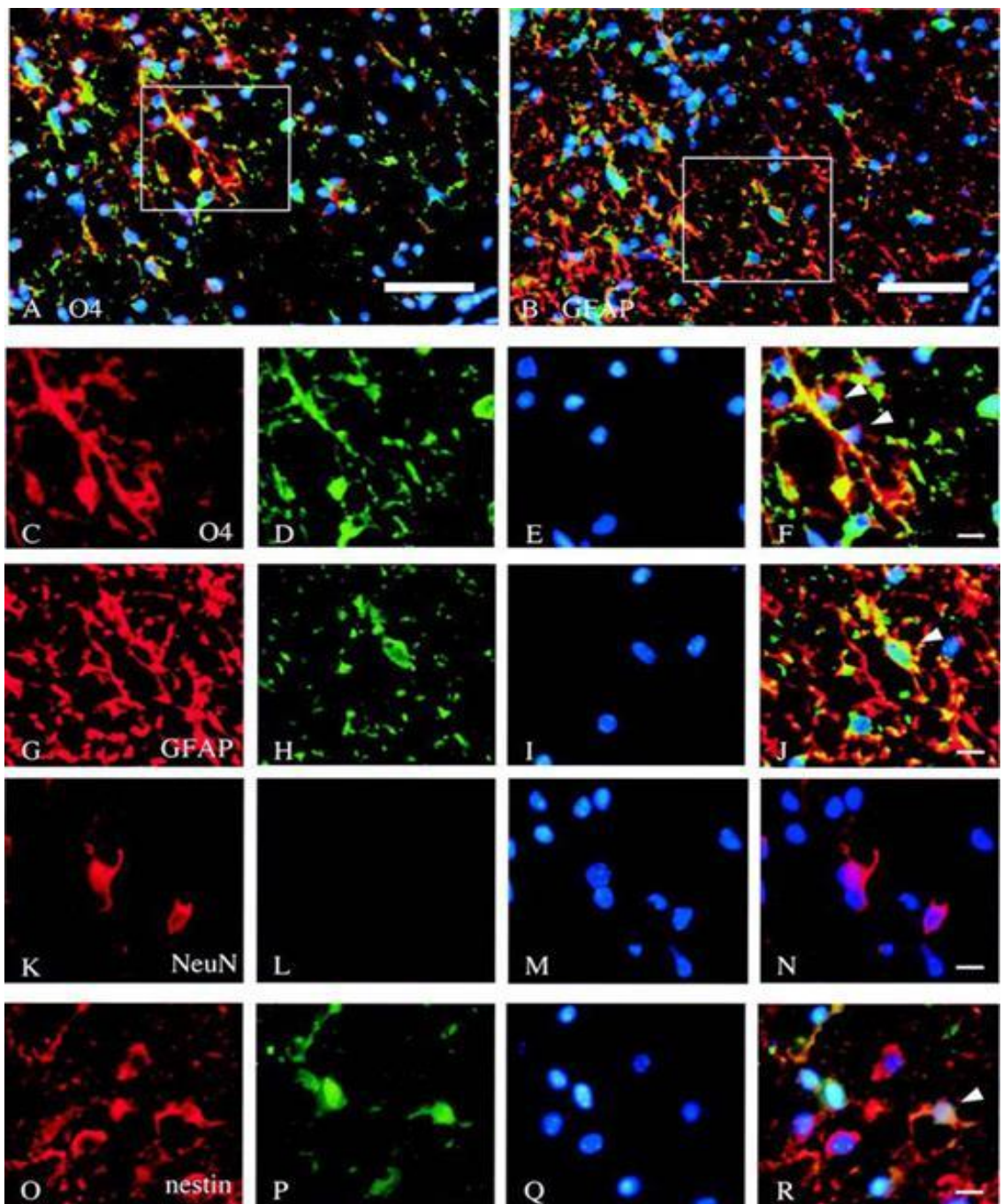
#### **4.2.3. Tế bào gốc tạo máu trong khối TBG tủy xương**

Tế bào gốc tạo máu (HSC) là loại tế bào gốc của tủy xương được nghiên cứu ứng dụng từ khá lâu trong điều trị các bệnh lý của cơ quan tạo máu và hỗ trợ điều trị số bệnh lý khác. Gần đây người ta đã phát hiện ra khả năng biệt hoá mềm dẻo của tế bào gốc tạo máu, đó là khả năng chuyển biệt hoá

(transdifferentiation) nhờ đó các nghiên cứu ứng dụng tế bào gốc tạo máu trong điều trị tái tạo.

Nghiên cứu của Suman Kanji và cộng sự (2011) cho rằng, tế bào gốc tạo máu phụ thuộc vào sự cân bằng giữa quá trình tái tạo và biệt hoá HSC nhờ các tín hiệu nội bộ (quá trình phiên mã) và các tín hiệu bên ngoài. Sự phát triển của các tế bào HSC là một quá trình phức tạp liên quan đến sự di chuyển của chúng đến các vị trí giải phẫu. HSC là các tế bào đa năng và có khả năng biệt hoá thành các tế bào tiền thân của tất cả các tế bào máu như: hồng cầu, bạch cầu hạt, bạch cầu đơn nhân, tiểu cầu, lympho. Điều này đã được thể hiện ở sự phục hồi tạo máu ở các bệnh nhân sau khi ghép tế bào gốc tạo máu thành công. Gần đây, nhiều bài báo đã chứng minh khả năng biệt hoá và chuyên biệt hoá thành các loại tế bào ngoài dòng tạo máu của các mô khác trong cơ thể. HSC biệt hoá thành các tế bào cơ khi các tế bào máu và tế bào cơ thuộc cùng một lớp mầm và lớp trung bì. Ngược lại, HSC biệt hoá thành các tế bào thần kinh khi vượt qua hàng rào lớp mầm phôi, do đó gọi là sự chuyên biệt hoá [20].

Nghiên cứu của Shuhei Koshizuka và cộng sự (2004) nghiên cứu trên chuột bị chấn thương tuỷ sống và cấy trực tiếp HSC vào tuỷ sống một tuần sau chấn thương tuỷ. Sử dụng thang điểm đánh giá phục hồi chức năng vận động chân sau, hàng tuần trong 5 tuần sau ghép. Kết quả chứng minh sự cải thiện đáng kể ở những con chuột được cấy tế bào gốc tạo máu so với những con chuột nhóm chứng. Sử dụng lai tại chỗ huỳnh quang cho nhiễm sắc thể Y và hóa mô miễn dịch cho thấy các tế bào được ghép tồn tại 5 tuần sau ghép và biểu hiện các dấu ấn đặc hiệu cho tế bào hình sao, oligodendrocytes và tiền chất thần kinh như O4, GFAP, NeuN, Nestin, LacZ, DAPI... Những kết quả này cho thấy rằng cấy ghép HSC từ tuỷ xương là một chiến lược hiệu quả để điều trị chấn thương cột sống [140].



**Hình 4.1: Biểu hiện của các dấu ấn đặc hiệu của HSC 5 tuần sau ghép [140].**

Tế bào gốc tạo máu bài tiết nhiều loại cytokin, bao gồm trombopoietin và interleukin-11. Những cytokine này được biết đến như là thiết yếu các yếu tố cho sự tồn tại và biệt hóa của tế bào tiền thân thần kinh. Yếu tố kích thích cụm 1 (CSFs) là một trong các cytokine tạo máu quan trọng cũng có vai trò như một

yếu tố tăng trưởng đối với hệ thần kinh trung ương [141],[142],[143]. Theo nghiên cứu của tác giả H Deda và cộng sự, sử dụng các tế bào gốc tạo máu tự thân có thể tránh các vấn đề liên quan đến phản ứng miễn dịch và thải ghép chống chủ (GvH), thường được gây ra bởi ghép đồng loài. Lợi thế khác là loại trị liệu tế bào này không liên quan đến sinh ung thư, đôi khi xảy ra trong liệu pháp tế bào gốc phôi [144].

Năm 1992, Weissman và cộng sự đã xác định được những dấu ấn bề mặt của HSC ở người như sau: CD34<sup>+</sup>, CD59<sup>+</sup>, CD90<sup>-</sup>, CD38<sup>±</sup>, C-kit<sup>±</sup>. Hiện nay phân tử CD34 trên bề mặt tế bào là một dấu ấn chủ yếu để xác định HSC. CD34 được biểu hiện từ 1 – 4% tế bào có nhân trong tủy xương người bình thường và nhỏ hơn 0,1% ở các tế bào có nhân trong máu ngoại vi [145].

Nghiên cứu của Shinji Yasuhara và cộng sự (2010) chỉ ra rằng hiệu quả điều trị của liệu pháp ghép tế bào gốc tủy xương là do quá trình tân mạch được tăng cường bởi các tế bào CD34<sup>+</sup>, do đó chỉ số tế bào CD34<sup>+</sup> là một chỉ số rất quan trọng [146].

Chúng tôi xác định tế bào CD34<sup>+</sup> trong khối TBG bằng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy trên máy FACS-Calibur (BD- Hoa Kỳ) với phần mềm CELLQUEST 3.1 theo quy trình của ISHAGE (International Society of Haematotherapy and Graft Engineering), đây là quy trình chuẩn được nhiều trung tâm ghép tế bào gốc tạo máu trên thế giới áp dụng. Phương pháp này cho phép xác định chính xác tế bào CD34<sup>+</sup> dựa trên bốn tham số của kỹ thuật tế bào dòng chảy (nhuộm với các kháng thể CD45-PerCP/CD34-PE, SSC và FSC). Điều quan trọng là phương pháp tiếp cận này có thể phân biệt TBG tạo máu (có bộc lộ CD45 trên bề mặt với mức độ thấp) với lymphocytes và monocytes, và do đó cho phép xác định các tế bào CD34<sup>+</sup> thực sự là các tế bào

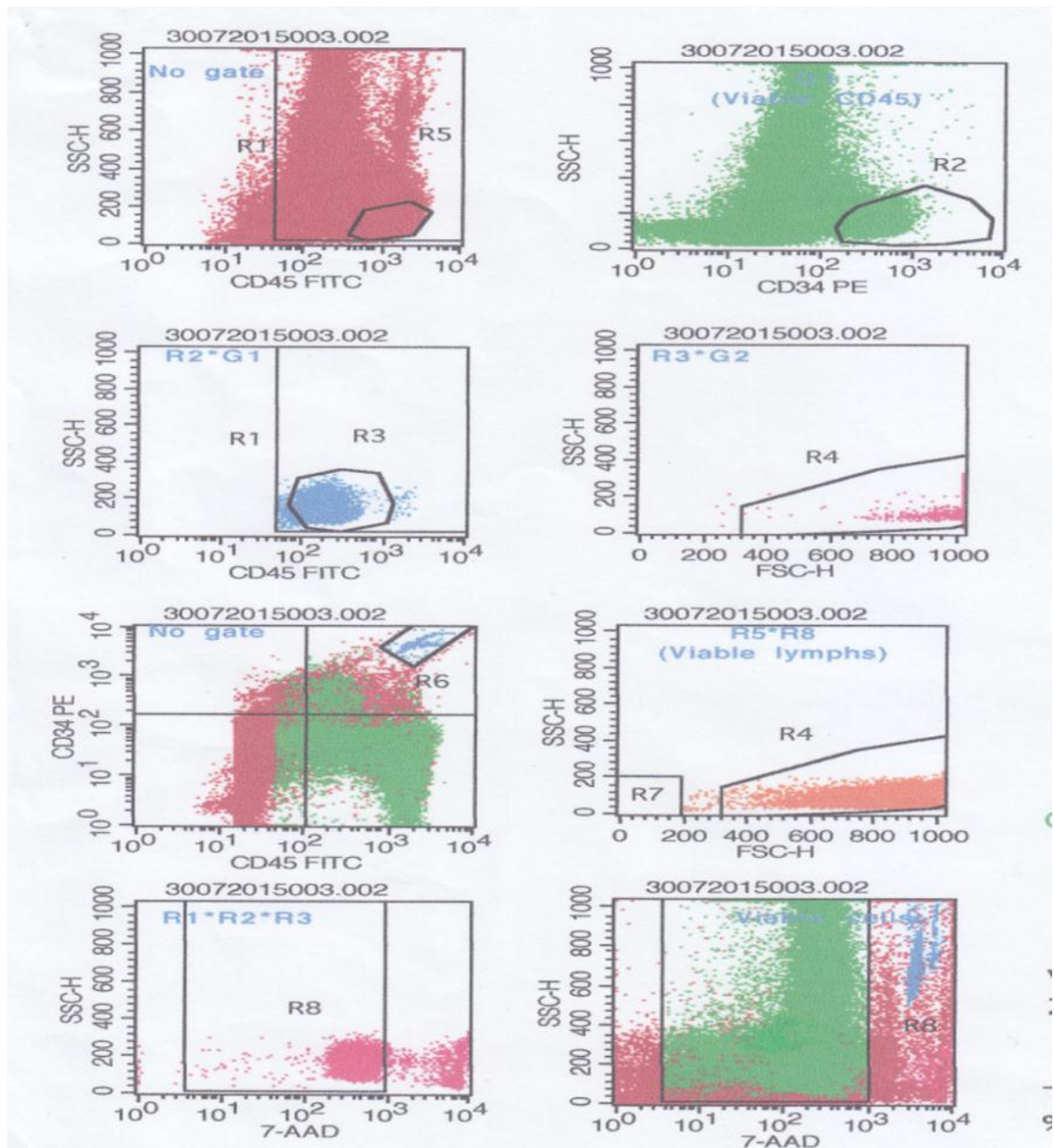
có mức độ phát huỳnh quang CD45 thấp và sự tán xạ ánh sáng thấp (CD45<sup>dim</sup>, SSC<sup>low</sup>). Kết quả ở bảng 3.12 cho thấy tỷ lệ tế bào CD34<sup>+</sup> trong khối TBG là  $2,88 \pm 2,04\%$ , và tổng số lượng tế bào CD34<sup>+</sup> trong khối TBG ghép cho các bệnh nhân là  $(19,35 \pm 15,82) \times 10^6$ .

Kết quả tỷ lệ TB CD34 trong khối TBG trong nghiên cứu của chúng tôi tương đương với kết quả nghiên cứu của tác giả Dương Đình Toàn ( $1,44 \pm 0,67\%$ ) [131], Nguyễn Mạnh Khánh ( $1,3 \pm 0,5\%$ ) [147] và Nguyễn Thanh Bình ( $1,23 \pm 0,69\%$ ) [132].

Tương quan giữa số lượng TB CD34<sup>+</sup> tỷ lệ thuận với số lượng TBCN với ( $r = 0,705$ ;  $p < 0,05$ ) (Biểu 3.1). Kết quả phù hợp với nghiên cứu của tác giả Dương Đình Toàn [131].

Tỷ lệ tế bào sống trong khối TBG được ghép cho bệnh nhân là một chỉ tiêu quan trọng đánh giá chất lượng của khối TBG. Tất cả các bước trong khi tiến hành thu nhận dịch tuỷ xương, tách chiết, xử lý tế bào đều có thể ảnh hưởng đến tế bào và làm cho các tế bào bị chết. Do đó, chúng tôi tiến hành xác định tỷ lệ tế bào sống, chết dựa trên nguyên lý 7AAD (7-amino-actinomycin) và các kháng thể đơn dòng gắn huỳnh quang CD45-FITC/CD34-PE. 7AAD là chất nhuộm màu nhân, nó xen giữa Cytosine và guanine của chuỗi ADN. Nó chỉ nhuộm được nhân trong trường hợp màng tế bào không còn nguyên vẹn hay là những các tế bào chết thực hiện trên hệ thống máy FASC – Calibur. Kết quả cho thấy tỷ lệ sống 82,73% (Bảng 3.12) thấp hơn kết quả nghiên cứu của Dương Đình Toàn (95,67%), Kiều Thị Vân Oanh (95,19%), Bùi Việt Anh (97,79%) [131] [138] [139]. Tuy kết quả này thấp hơn nghiên cứu của các tác giả khác, nhưng vẫn đạt chỉ tiêu đánh giá tế bào sống, đảm bảo được sự toàn vẹn tế bào trong khối TBG.





**Hình 4.2: Xác định tế bào CD34+, tỷ lệ TB sống chết bằng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy trên máy FACS-Calibur (BD- Hoa Kỳ)**

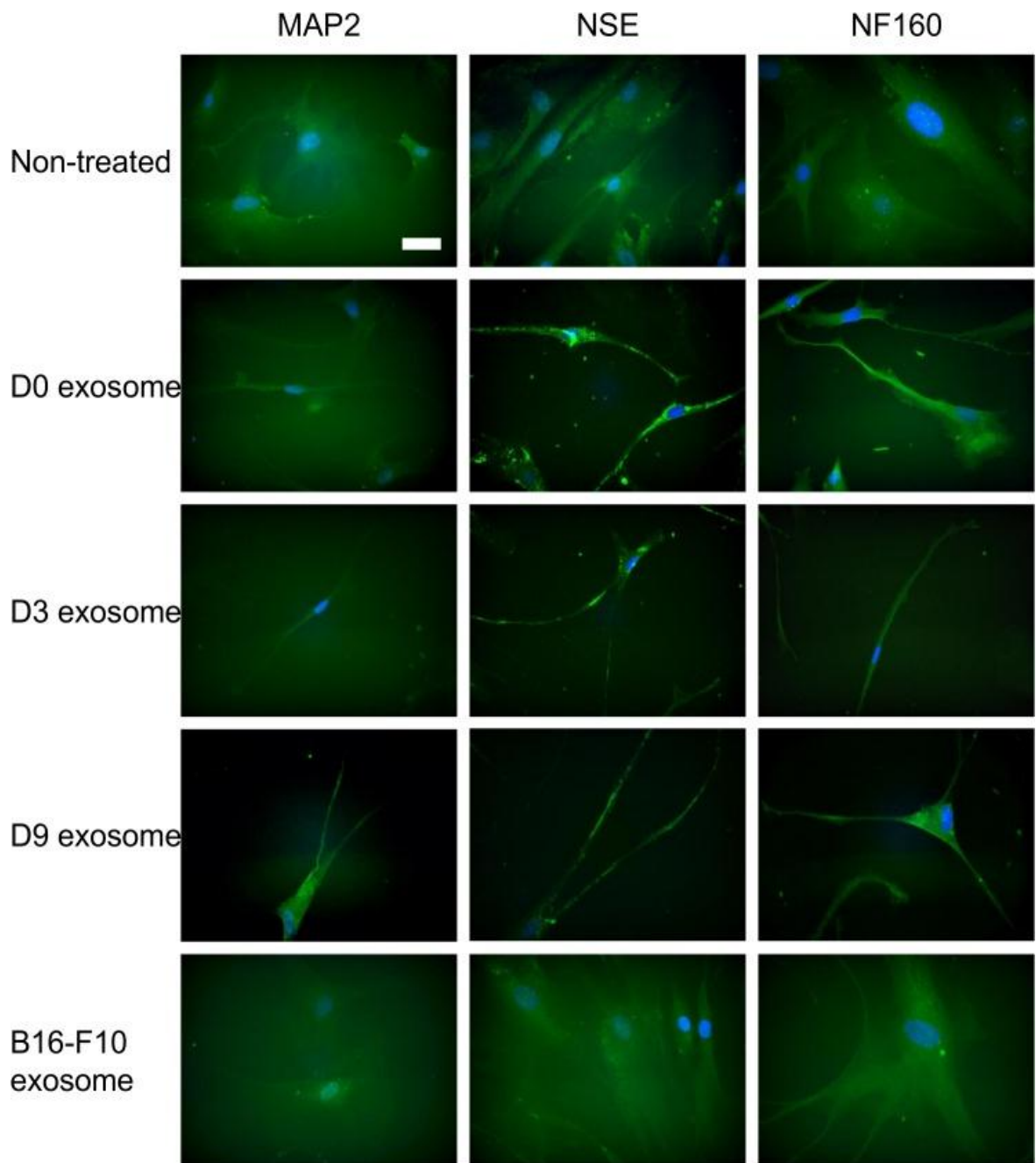
Biểu đồ 3.2 cho thấy số lượng TB CD34+ có tương quan nghịch với tuổi BN ( $r=-0.52$ ,  $p<0.05$ ). Kết quả này cũng tương tự kết quả nghiên cứu của Schündeln MM và cs [148]. So sánh với nghiên cứu của tác giả Dedeepiya VD (2012), khi tác giả nghiên cứu trên 332 bệnh nhân CTCS được chia theo các

nhóm tuổi khác nhau, cũng cho kết quả tỷ lệ CD34+ cao hơn ở nhóm bệnh nhân ít tuổi hơn [128].

#### **4.2.4. Tế bào gốc trung mô trong khối TBG tuỷ xương**

Tế bào gốc trung mô (MSC) là những tế bào đệm của tuỷ xương, dưới các tác động kích thích của các yếu tố phát triển, tế bào gốc trung mô có thể biệt hoá thành các tế bào có nguồn gốc trung mô trong đó có tế bào thần kinh [149].

Tác giả Yuji S. Takeda (2015) nghiên cứu sự biệt hoá thần kinh in vitro của các tế bào MSC nguồn gốc tuỷ xương, sử dụng các túi ngoại bào (exosomes), chứa protein chức năng và vật liệu di truyền như mRNA và micro RNA, nguồn gốc từ các tế bào thần kinh biệt hoá. Các tế bào MSC được nuôi cấy trong môi trường thích hợp và xử lý với các túi ngoại bào nguồn gốc từ tế bào PC12 (một tế bào thuộc dòng thần kinh) hàng ngày và trong một tuần. Kết quả cho thấy MSC đã phát triển hình thái giống tế bào thần kinh, biểu hiện gen và protein của các chất chỉ điểm thần kinh. miR-125b có vai trò trong sự biệt hóa tế bào thần kinh của tế bào gốc biểu hiện cao hơn nhiều trong các exosome có nguồn gốc PC12 so với exosome từ các tế bào u ác tính B16-F10. Những kết quả này cho thấy rằng việc cung cấp miRNA có trong các exosome có nguồn gốc từ PC12 là một cơ chế có thể giải thích sự biệt hoá thành tế bào thần kinh của MSC. [150].



**Hình 4.3: Hình ảnh MSC biệt hoá thành tế bào thần kinh [150]**

Nhiều nghiên cứu ghép tế bào gốc MSC trên bệnh nhân CTCS cho thấy các tế bào MSC có thể có khả năng ức chế miễn dịch. Các đặc tính ức chế miễn dịch này có thể kết hợp làm giảm phản ứng viêm cấp tính trong chấn thương cột sống, do đó làm giảm sự hình thành khoang cũng như giảm phản ứng của các tế bào hình sao và đại thực bào. Ghép MSC đã được chứng minh không chỉ

giúp tăng cường sự bảo tồn mô mà còn giảm tác động cơ học đối với chấn thương cột sống. Các tế bào MSC được cấy ghép có thể mang lại sự phục hồi chức năng bởi sự thay đổi trực tiếp môi trường tổn thương cột sống. MSC có thể thúc đẩy tái tạo sợi trục bằng cách thiết lập môi trường hỗ trợ cho sự phát triển của sợi trục. MSC tổng hợp một số cytokin kích thích sự phát triển thần kinh bao gồm yếu tố thần kinh nguồn gốc từ não, yếu tố tăng trưởng nội mô thành mạch [151].

Để đánh giá số lượng TBG trung mô trong khối TBG ghép cho bệnh nhân, chúng tôi sử dụng kỹ thuật nuôi cấy tạo cụm nguyên bào sợi (CFU-F), mỗi cụm CFU-F phát triển từ một TBG trung mô trong điều kiện nuôi cấy thích hợp. Kết quả ở bảng 3.13 cho thấy hiệu quả mọc cụm CFU-F trên  $10^6$  TB của khối TBG là  $32,39 \pm 27,03$  cụm. Kết quả của chúng tôi tương đương với hiệu quả tạo cụm CFU-F theo nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thanh Bình (2012) [132], và nghiên cứu trên người khỏe mạnh của Ph. Hernigou (2005) [116], Bernardo ME (2007) [152]. Tuy nhiên, kết quả này chênh lệch nhiều so với kết quả nghiên cứu của Sergei A.Kuznetsov (2008) là  $323 \pm 30$  cụm CFU-F/ $10^6$ TB [153] và nghiên cứu của Gangji (2004) là  $920 \pm 90$  cụm CFU-F/ $10^6$ TB [154]. Như vậy, có thể thấy kết quả nuôi cấy cụm CFU-F của các tác giả là rất khác nhau. Theo chúng tôi là do kỹ thuật nuôi cấy chưa được chuẩn hóa giữa các trung tâm, sử dụng môi trường nuôi cấy khác nhau, mẫu nuôi cấy và thời gian nuôi cấy không thống nhất. Điều đó cho thấy, tuy xét nghiệm nuôi cấy CFU-F được coi là một xét nghiệm tiêu chuẩn trong đánh giá TBG trung mô, nhưng cần có sự chuẩn hóa giữa các trung tâm để có các chỉ số tham chiếu thống nhất có thể so sánh được.

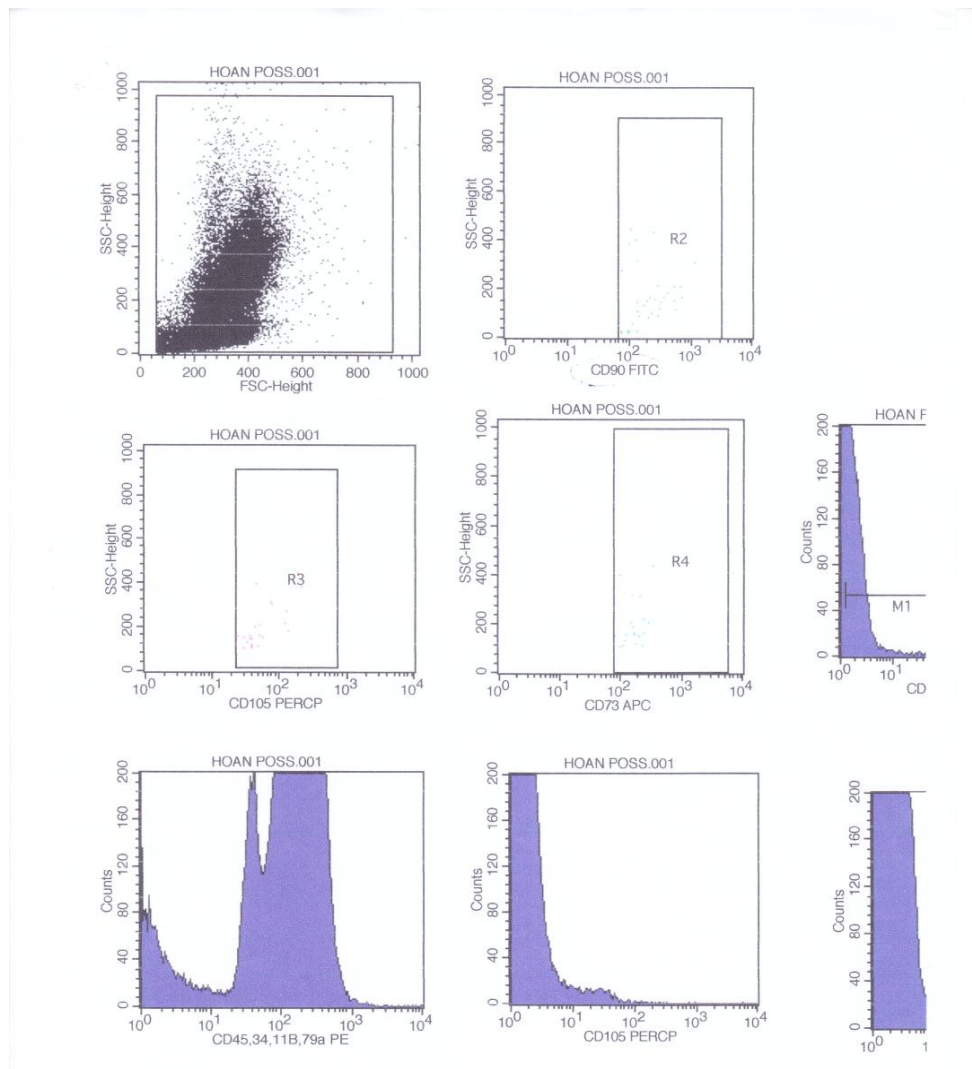
Tìm hiểu về mối tương quan giữa CFU-F với TB CD34+ cho thấy cụm CFU-F (phản ánh số lượng TBG trung mô) có mối tương quan thuận ( $r= 0,654$ ,  $p<0,05$ ) (Biểu 3.3). Xét nghiệm nuôi cấy cụm CFU-F, cũng giống như xét

nghiệm nuôi cấy cụm tế bào tạo máu (CFC) cần thời gian 14 ngày mới có thể cho kết quả. Mặt khác, nguy cơ không mọc được cụm rất dễ xảy ra do nhiều nguyên nhân mà nguyên nhân nhiễm khuẩn và nhiễm nấm là hay gặp nhất nhưng để lặp lại xét nghiệm là rất khó. Vì vậy, nhờ có mối tương quan này mà chúng ta có thể dự đoán được số lượng tế bào gốc trung mô có mặt trong khối TBG sẽ được ghép cho bệnh nhân qua tổng số lượng tế bào CD34+ trong khối TBG. Xét nghiệm TBCD34+ hiện nay được thực hiện khá nhanh chóng, chính xác và có thể lặp lại nhiều lần khi cần thiết. Nghiên cứu về mối tương quan giữa CFU-F với tuổi của bệnh nhân, kết quả của chúng tôi cho thấy có mối tương quan tỷ lệ nghịch với  $r = -0,610$ ;  $p < 0,05$  (Biểu 3.4). Tương tự như kết quả nghiên cứu của tác giả Christopher D. Chaput (2018) [155].

Số lượng tế bào gốc trung mô ước tính chiếm khoảng 0,001% tới 0,01% tế bào có nhân của tủy xương và thường được phân lập từ lớp tế bào đơn nhân của tủy xương sau khi tách bằng phương pháp ly tâm gradient tỷ trọng [156]. Về kiểu hình, TBG trung mô được xác định bằng kỹ thuật tế bào dòng chảy trên hệ thống Flow Cytometry. Ủy ban tế bào gốc mô và trung mô của hiệp hội trị liệu tế bào (the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy - ISCT) đã đưa ra một trong ba tiêu chuẩn tối thiểu định nghĩa MSC của người, đó là biểu hiện các kháng nguyên bề mặt đặc hiệu. Sử dụng một panel các kháng thể đơn dòng tương ứng với các phân tử có trên bề mặt của TBG trung mô là CD90+/CD73+/CD105+ và những phân tử không có trên bề mặt TBG trung mô là CD45-/CD34-. Khối TBG trong nghiên cứu của chúng tôi được phân lập trên hệ thống tự động Sepax II, kết quả số lượng TBCD73+/CD90+/CD105+ / $10^5$  TB là  $9,96 \pm 8,39$ , nồng độ TBCD73+/CD90+/CD105+ /ml là  $5832,2 \pm 2038,4$  và tổng số lượng TBCD73+/CD90+/CD105+ trong khối TBG là  $72,59 \times 10^3 \pm 34,46 \times 10^3$  (Bảng 3.14). Kết quả nồng độ TBCD73+/CD90+/CD105+ /ml của chúng tôi cao hơn

so với nghiên cứu của của tác giả P.Kasten (2008) [157], kết quả số lượng TBCD73+/CD90+/CD105+ / $10^5$  TBCN cao hơn nghiên cứu của Kiều Thị Vân Oanh (6,49 TBCD73+/CD90+/CD105+ / $10^5$  TBCN) [138], kết quả số lượng TBCD73+/CD90+/CD105+ trong khối TBG thấp hơn so với nghiên cứu của Bùi Việt Anh (  $154,3 \times 10^3$ ) [139].

Bảng 3.15 cho thấy số lượng TBCD34+, số lượng TBCD73+/CD90+/CD105+, số lượng CFU-F giảm nhẹ qua từng lần chọn, tuy nhiên kết quả không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).



**Hình 4.4: Xác định tế bào MSC bằng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy trên máy FACS-Calibur (BD- Hoa Kỳ)**

Một số yếu tố có thể ảnh hưởng đến số lượng MSC trong khối TBG sau phân lập gồm [158]:

- Đặc điểm tuổi, giới và tình trạng bệnh của bệnh nhân
- Kỹ thuật chọc hút dịch tủy xương: vị trí chọc, loại kim chọc, thời gian chọc, góc xoay kim, các lần chọc khác nhau.
- Quy trình phân lập MSC.

Về mối tương quan giữa số lượng TBG trung mô với một số yếu tố khác, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy số lượng TBCD73+/CD90+/CD105+ /10<sup>5</sup> TB có tương quan nghịch với tuổi của người bệnh với  $r = - 0,69$ ,  $p < 0,05$  (Biểu đồ 3.5); tương tự với số lượng CFU-F/10<sup>6</sup> TB và tuổi của người bệnh ( $r = - 0,69$ ,  $p > 0,05$ ) ở biểu đồ 3.4. Kết quả này tương tự nhận xét của A.Stolzing (2008) [159]. Điều đó có nghĩa là tuổi càng cao thì số lượng TBG trung mô trong tủy xương càng giảm, do phần tủy đỏ ở tủy xương của người trưởng thành dần giảm thể tích và bị thay thế bởi tủy vàng gồm tế bào mỡ và các tổ chức xơ. Ngoài ra, số lượng TBCD73+/CD90+/CD105+ có tương quan thuận với TB CD34+ với  $r=0,60$ ,  $p<0.05$  (Biểu đồ 3.6) và cũng tương quan thuận với TB tạo cụm CFU-F với  $r=0,683$ ,  $p<0,05$  (Biểu đồ 3.7)

**Bảng 4.3 Chất lượng khối TBG từ dịch tủy xương**

Tác giả	Phương pháp tách	Tỷ lệ TBCD34+ (%)	Tỷ lệ TBCD34+ sống (%)	Số lượng CFU-F/ml	Số lượng TBCD73+/CD90+/CD105+ (TB/ml)
Dương Đình Toàn [131]	Tách tay	1,44 ± 0,67	95,67 ± 1,33	3336 ± 3996	
Nguyễn Thanh Bình [132]	Tách máy	0,98 ± 0,21	94,57 ± 2,24	1747 ± 1303	
Nguyễn Mạnh Khánh [147]	Tách tay	1,3 ± 0,5		1026 (364 – 1996)	
Nghiên cứu của chúng tôi	Sepax	2,88 ± 2,04	82,73 ± 12,09	2121 ± 2540	5832 ± 2038



Nghiên cứu của chúng tôi, từ 120ml DTX sau chiết tách thu được khối TBG có tỷ lệ TBCD34+ là 2,88 %, tỷ lệ TBCD34+ sống là 82,73%, số lượng CFU-F là 2121 TB/ml, số lượng TBCD73+/CD90+/CD105+ là 5832 TB/ml. So sánh với các nghiên cứu khác ứng dụng TBG tuỷ xương trong điều trị bệnh chấn thương (bảng 4.3), các nghiên cứu có kết quả lượng TBG khác nhau đều cho thấy hiệu quả điều trị. Nghiên cứu của Nguyễn Mạnh Khánh có tỷ lệ liền xương đạt 91,5% với khối TBG có tỷ lệ TBCD34+ là 1,3 %, số lượng CFU-F/ml là 1026 TB/ml; nghiên cứu của Dương Đình Toàn cho thấy chức năng khớp gối được cải thiện rõ ràng sau mổ ghép TBG với khối TBG có tỷ lệ TBCD34+ là 1,44%, tỷ lệ TBCD34+ sống là 95,67 %, số lượng CFU-F/ml là 3336 TB/ml; nghiên cứu của Nguyễn Thanh Bình có 86,5% bệnh nhân khớp giả có liền xương và 80% bệnh nhân nhóm hoại tử vô khuẩn chỏm xương đùi đạt kết quả điều trị từ khá đến tốt với khối TBG có tỷ lệ TBCD34+ là 0,98%, tỷ lệ TBCD34+ sống là 94,57 %, số lượng CFU-F/ml là 1747 TB/ml.

Quy trình sản xuất khối TBG sử dụng trong điều trị luôn tiềm ẩn các nguy cơ to lớn về sự biến đổi và mất ổn định từ các bước thu thập, phân lập, bảo quản, [120]. Vì vậy, quy trình sản xuất TBG cần phải được kiểm soát chặt chẽ theo tiêu chuẩn GMP (Good Manufacturing Practice); đồng thời các sản phẩm TBG được sản xuất cho ứng dụng lâm sàng đảm bảo an toàn. Chúng tôi tiến hành cấy khuẩn, nấm và xét nghiệm Endotoxin cho các sản phẩm sau xử lý, kết quả là 100% các mẫu âm tính không bị nhiễm khuẩn với bất kì loại vi khuẩn nào (Bảng 3.16).



### 4.3. ĐÁNH GIÁ TÍNH AN TOÀN VÀ HIỆU QUẢ SỬ DỤNG KHỐI TBG TỰ THÂN TỪ TUY XƯƠNG TRONG ĐIỀU TRỊ CTCS CÓ LTHT

#### 4.3.1. Các tai biến, tác dụng không mong muốn

Theo tác giả Panfeng Xu (2019) tổng hợp 11 nghiên cứu với 499 bệnh nhân và Xiao Fan (2017) phân tích số liệu dựa trên 10 báo cáo ở 377 bệnh nhân đưa ra kết luận [160], [161]:

- Hiệu quả và an toàn trong cải thiện về thân kinh cảm giác bao gồm cảm giác nông và sâu.
- Chức năng bàng quang được cải thiện: sức chứa bàng quang tăng tối đa (VH20max), tốc độ dòng nước tiểu tối đa tăng, lượng nước tiểu còn lại giảm.
- Có hiệu quả và tiến triển tốt ở nhóm AIS-A.
- Chưa có kết quả rõ ràng về chức năng vận động trong thời gian ngắn và lâu dài.
- Chỉ xuất hiện một số tác dụng phụ tạm thời và nhẹ như: sốt, đau đầu, tê và trướng bụng; không có tác dụng phụ nào nghiêm trọng và lâu dài như nhiễm trùng vết thương, rò rỉ dịch não tủy từ vết mổ cho thấy sự an toàn của cấy ghép TBG.

*Tế bào gốc nuôi cấy hay không nuôi cấy:*

Mật độ MSC trong tủy xương và các mô trưởng thành là rất thấp nên để đánh giá các nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng, các tác giả cần phải cân nhắc, lựa chọn sử dụng MSC nuôi cấy tăng sinh hay không tăng sinh. Cụ thể:

- Nuôi cấy tăng sinh

- Ưu điểm: số lượng tế bào sau khi nuôi cấy lớn có thể đạt được liều theo mong muốn.

- Nhược điểm: khả năng có thể biến đổi thành tế bào ác tính.
- Có khả năng nhiễm khuẩn hoặc nhiễm nấm (ở Việt Nam nằm ở khu vực nhiệt đới gió mùa môi trường không khí thuận lợi cho vi nấm phát triển. Đây là 1 thách thức gặp phải trong nuôi cấy ở hầu hết các phòng thí nghiệm ở Việt Nam)
- Không nuôi cấy: lấy trực tiếp từ dịch tuỷ xương
- Ưu điểm: dễ áp dụng, chi phí thấp, đảm bảo tính an toàn tế bào.
- Nhược điểm: số lượng tế bào gốc còn ít, phải chọc nhiều lần.

*Tai biến và tác dụng không mong muốn của ghép TBGTX tự thân*

Chúng tôi tiến hành ghép TBG áp dụng theo phương pháp Park (2011) [162]. Tai biến và tác dụng không mong muốn của ghép TBGTX tự gồm các biến chứng sớm (như biến chứng tại chỗ và các biến chứng toàn thân liên quan đến tuỷ sống khi ghép TBG vào khoang dưới nhện) và các biến chứng muộn (như ung thư, phản ứng miễn dịch). Trong tổng số 42 ca ghép, chúng tôi gặp một số trường hợp có biến chứng sớm như bệnh nhân đau đầu (7%), buồn nôn (5%); không bệnh nhân nào có những triệu chứng: sốt, phát ban, co thắt phế quản, tăng nhịp tim hoặc những biến chứng tại chỗ như: nhiễm trùng, chảy máu tại chỗ ghép, tụ máu dưới màng cứng (Bảng 3.17). Theo dõi diễn biến ghép trong vòng 12 tháng, không có trường hợp nào xảy ra biến chứng muộn. Tác giả Panfeng Xu và cộng sự (2019) tổng hợp các kết quả nghiên cứu của các tác giả trên thế giới đã cho thấy một số tác dụng phụ ở mức độ nhẹ và thoáng qua, bao gồm sốt, nhức đầu, đau lưng, tê và chướng bụng,... Không gặp trường hợp nào có tác dụng phụ xảy ra ở mức độ nghiêm trọng và phần lớn các tác dụng phụ tự biến mất trong vòng 24-48h không cần phải điều trị.

**Bảng 4.4: Bảng đánh giá các tác dụng phụ của một số nghiên cứu trên thể giới [160]**

Tên tác giả	SL Nghiên cứu	Nguồn tế bào	Liều ghép	Đường vào	Tác dụng phụ
Dai và cộng sự (2013)	20	TBGTX	$2 \times 10^7$	Khoang dưới nhện	Sốt (2); đau đầu (1); đau và tê (1)
Guo và cộng sự (2014)	40	TBGTX	$1,5 \times 10^4$	Chưa rõ	Sốt (1)
Karamouzian và cộng sự (2012)	11	TBGTX	$7 \times 10^5 - 1,2 \times 10^6$	Khoang dưới nhện	Không có tác dụng phụ nào
Xiao và cộng sự (2012)	70	TBGTX	$1,4 \times 10^7$	Khoang dưới nhện/ tĩnh mạch	Sốt (5)
Fang và cộng sự (2011)	14	TBGTX		Khoang dưới nhện	Sốt (2)
Zurab (2014)	18	TBGTX	$491 \times 10^3$	Khoang dưới nhện, tĩnh mạch,	Đau đầu 9%, sốt 6%

Cả hai cách tiếp cận TBG trực tiếp và gián tiếp cho bệnh nhận CTCS đều cho thấy an toàn và mang lại những kết quả hồi phục nhất định. Tuy nhiên, hiệu quả riêng biệt hay phối hợp của đường ghép trong các nghiên cứu thì chưa thể khẳng định một cách chắc chắn.

#### 4.3.2. Liều ghép

Trong nghiên cứu chúng tôi sử dụng 10ml khối TBG cô đặc được chia ra và tiêm vào 4 vị trí trong đó 3 mũi vào vùng tổn thương và 1 mũi vào khoang dưới nhện tại thời điểm  $T_0$ . Sau đó ghép nhắc lại vào thời điểm  $T_1$ ,  $T_2$  ở khoang dưới nhện. Với thể tích tiêm là 2 - 2,5ml không tạo áp lực quá lớn đối với vùng tổn thương. Ghép nhắc lại có ưu điểm tăng số lượng TBG được tiêm vào vùng tổn thương; nhưng nhược điểm là tăng số lần can thiệp, tăng thời gian. Để có được nguồn TBG ghép nhắc lại hoặc là phải chọc hút DTX nhiều lần khi ghép

trực tiếp hoặc là phải bảo quản TBG trong thời gian dài ở trạng thái không hoạt động hoặc phải nuôi cấy tăng sinh trong môi trường và điều kiện phức tạp. Với những TBG đã qua bảo quản, khi sử dụng phải hoạt hoá bằng các yếu tố vật lý thì TBG mới có khả năng sống, hoạt động, tăng sinh, biệt hoá. Với những TBG qua nuôi cấy tăng sinh hiện nay tại Việt Nam chưa được khuyến khích ứng dụng, điều trị bệnh trên người vì tính an toàn.

Để đảm bảo tính an toàn, cũng như tiết kiệm chi phí cho đối tượng nghiên cứu, chính vì vậy nghiên cứu đã tiến hành ghép trực tiếp khối TBG sau xử lý mỗi tháng 1 lần không qua nuôi cấy trong 3 tháng liên tiếp. Tìm hiểu về số lượng CD34+, tế bào CD73+/CD90+/CD105+ ở 3 lần ghép có được lần lượt là  $12,12 \times 10^6$ ,  $13,15 \times 10^6$ ,  $14,48 \times 10^6$  và  $49,19 \times 10^3$ ,  $49,44 \times 10^3$ ,  $51,45 \times 10^3$  (Bảng 3.18). Số lượng tế bào ở các lần ghép có sự khác biệt, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ . Số lượng tế bào qua 3 lần ghép không thay đổi nhiều có thể là do tế bào được lấy từ tuỷ xương không qua nuôi cấy, kỹ thuật chọc hút và chiết tách ổn định, sức khoẻ bệnh nhân không biến đổi nhiều.

Như vậy chúng tôi có được 3 lần ghép cho bệnh nhân đáp ứng tổng liều số lượng tế bào CD34+  $39,75 \times 10^6$ ; TB CD73, CD90, CD105 là  $1,5 \times 10^5$  (Bảng 3.18). Tương tự nghiên cứu của tác giả Zurab Kakabadze (2016) lượng tế bào CD34+ là  $12,2 \times 10^6$  TB, MSC là  $2,2 \times 10^5$  TB [9].

### ***Kỹ thuật ghép khối TBGTX tự thân cho BN CTCS liệt tuỷ hoàn toàn***

#### ***Ghép trực tiếp hay ghép gián tiếp:***

Để đưa tế bào gốc vào đối tượng nghiên cứu cần phải áp dụng theo phương pháp trực tiếp, gián tiếp hoặc phối hợp đồng thời cả hai phương pháp:

- Ghép trực tiếp TBG (tiền thân tế bào thần kinh hoặc nguyên bào sợi thần kinh biệt hoá từ TBG). TBG hoạt động theo hướng tái tạo, thay thế, biệt hoá

thành tế bào thần kinh mới hoặc tế bào thần kinh đệm. Với cơ chế viêm cơ thể sẽ đưa đại thực bào tới ổ tổn thương để dọn dẹp các tế bào chết. Khi đó sẽ tiết ra các cytokine và yếu tố tăng trưởng VEGF (nội mô mạch máu), HGF (tế bào gan), trục SDF-1 $\alpha$ /CXCR4. Các TBG khi được ghép đã chứng minh trên thực nghiệm có khả năng biệt hoá thành tế bào thần kinh hoặc thần kinh đệm. Ngoài ra, các TBG còn cung cấp cho việc tái tạo lại sợi trục hoặc phân myelin đã mất [149].

Một số nghiên cứu đã cho thấy khi ghép trực tiếp TBG vào vị trí tổn thương, các tế bào sẽ tồn tại tốt hơn. Tuy nhiên cũng có một số hạn chế như nếu ghép đủ liều thích hợp sẽ tạo ra áp lực cao và gây tổn thương tủy [122], hoặc có khi do đầu kim tiếp xúc trực tiếp với vị trí tổn thương làm cho các tế bào MSC có xu hướng rò rỉ ra ngoài [163]. Jing Q khi nghiên cứu về sự di cư TBG thấy rằng các tế bào MSC vẫn di chuyển mặc dù đã có mặt ở vị trí tổn thương, quan sát thấy sau 1 giờ MSC di chuyển khỏi vị trí, sau 7 ngày di chuyển tạo thành giá đỡ sinh học (Scallfold) hướng đến vị trí tổn thương. Sau khi cấy ghép tế bào, xác định thấy các tế bào ở mô tổn thương và vị trí xung quanh có biểu hiện dấu ấn thần kinh, tuy nhiên số lượng rất nhỏ.

- Ghép gián tiếp bằng cách truyền tĩnh mạch hoặc tiêm vào khoang dưới nhện. Khả năng di cư và trở về của MSC đóng vai trò quan trọng liên quan mật thiết đến khả năng cấy ghép và tái tạo tế bào. Có nhiều yếu tố tác động đến sự di cư của MSC như là trục SDF-1 $\alpha$ /CXCR4, chất P hoạt động như chất dẫn truyền thần kinh, G-CSF (granulocyte- colony- stimulating factor) thúc đẩy huy động MSC cho mô tổn thương, CGRP (calcitonin gene- related peptide) yếu tố điều chỉnh MSC đến vị trí tổn thương trong chấn thương cột sống.

Nhiều nghiên cứu của các tác giả trên thế giới chỉ ra rằng phương pháp ghép gián tiếp là liệu pháp an toàn và dễ dàng. Tuy nhiên họ cũng nhấn mạnh những hạn chế của nó như các tế bào có thể bị mắc vào các cơ quan trong quá

trình di chuyển, kẹt tại phổi và khoang dưới nhện, môi trường tổn thương bất lợi do thiếu sự cung cấp máu ... dẫn đến số lượng tế bào đến khu vực đích bị giảm nhiều. Do vậy mà liệu ghép cho phương pháp gián tiếp thường phải sử dụng số lượng lớn [163], [164], [162].

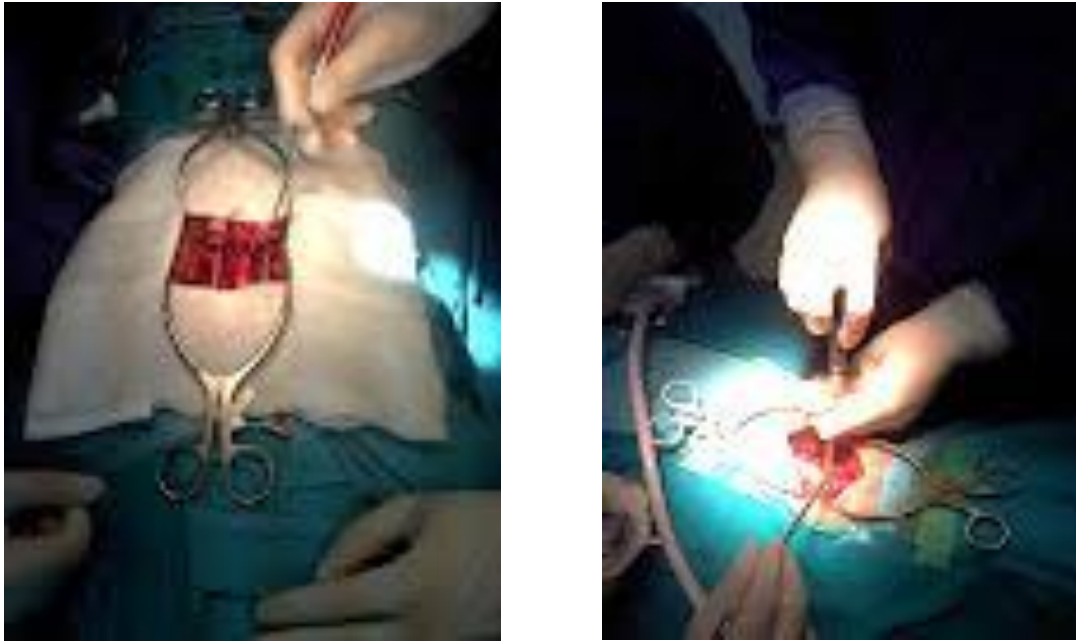
Mỗi phương pháp ghép đều có những ưu nhược điểm riêng, một số tác giả đã đưa ra kết quả của việc nghiên cứu ghép TBG đồng thời bằng cả hai phương pháp: con đường trực tiếp và gián tiếp đều mang lại hiệu quả và tính an toàn. Theo nghiên cứu của Park JH (2011) cho rằng ghép MSC bằng con đường tĩnh mạch, khoang dưới nhện có sự cải thiện đáng kể với tỉ lệ 3/10 bệnh nhân [165]. Nghiên cứu khác trên 63 bệnh nhân bị CTCS trong đó có 40 bệnh nhân chấn thương ở mức độ A, 12/40 bệnh nhân này (chiếm 30%) có mức độ cải thiện từ A sang B và C. Nghiên cứu của Deda và cộng sự (2008) nghiên cứu trên 9 bệnh nhân liệt tuỷ hoàn toàn ghép TBG tuỷ xương tự thân trực tiếp vào vùng tổn thương và ghép vào khoang tĩnh mạch theo dõi 1 năm có sự phục hồi ở tất cả bệnh nhân trong đó 1 bệnh nhân từ AIS - A lên AIS - B, 8 bệnh nhân từ AIS - A lên AIS - C.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, ghép khối tế bào gốc tự thân từ tuỷ xương ngay sau khi tách bằng cả 2 phương pháp ghép trực tiếp và ghép gián tiếp có ưu điểm: hạn chế phản ứng miễn dịch; việc ghép tươi tránh được nguy cơ tế bào bị biến đổi do nuôi cấy; kỹ thuật thu nhận, tách chiết, ghép tế bào gốc được thực hiện trong điều kiện vô trùng. Các xét nghiệm cấy khuẩn cấy nấm, Endotoxin được thực hiện, có kết quả sớm để hồi cứu.

### 4.3.3. Kết quả điều trị

#### *Phẫu thuật cố định và giải ép*

Sau CTCS, chèn ép cơ học tuỷ sống có thể làm giảm lưu lượng máu gây thiếu máu cục bộ và tổn thương tế bào thần kinh. Mục tiêu của việc phẫu thuật sớm sau SCI là làm giảm chèn ép, từ đó cải thiện việc cung cấp máu cho vùng bị tổn thương và hạn chế tổn thương thứ phát. Liên quan đến bằng chứng lâm sàng về phẫu thuật sau CTCS, người ta đã tiến hành thực hiện phẫu thuật ở một số mốc thời gian. Để điều tra hiệu quả của việc phẫu thuật sớm trước 24h, người ta tiến hành nghiên cứu trên 313 bệnh nhân bị CTCS, kết quả cho thấy 38 bệnh nhân được điều trị sớm (trong vòng 24h sau CTCS) có tỉ lệ hồi phục cao gấp 2,8 lần so với bệnh nhân điều trị muộn (24h sau CTCS) và 38 bệnh nhân này mức độ cải thiện tăng ít nhất 2 cấp sau 6 tháng tính theo thang ASI. Cũng theo một nghiên cứu Canada cho rằng bệnh nhân được điều trị sớm có thời gian nằm viện ngắn hơn. Những bệnh nhân bị chấn thương không hoàn toàn ở mức độ B, C, D nếu được điều trị trong thời gian đầu đã tăng thêm 6,3 điểm trong phục hồi vận động so với người điều trị muộn. Nhìn chung những nghiên cứu cho thấy tầm quan trọng của chẩn đoán và can thiệp sớm của phẫu thuật nhằm nâng cao tình trạng sức khoẻ của bệnh nhân [58]. Trong nghiên cứu của chúng tôi 42 bệnh nhân được phẫu thuật cố định cột sống, giải ép sớm ngay sau khi bị chấn thương và được ghép TBG. Nhóm chúng 42 bệnh nhân được điều trị phẫu thuật cố định cột sống, giải ép và không ứng dụng ghép TBG nhằm nhận biết khả năng phục hồi tự nhiên. Ở cả hai nhóm chúng và nhóm điều trị bệnh nhân không dùng thuốc gì đặc biệt, chỉ sử dụng kháng sinh và giảm đau sau mổ.



**Hình 4.5: Cố định cột sống và giải ép thần kinh**

#### ***Kết quả lâm sàng và MRI***

Chấn thương cột sống gây ra bởi sự tổn thương trực tiếp tuỷ sống, dẫn đến mất chức năng thần kinh (như chức năng vận động và chức năng cảm giác) hoàn toàn hoặc không hoàn toàn. Cho đến nay, chưa có phương pháp điều trị phục hồi hoàn toàn cho bệnh nhân CTCS [165]. Mặc dù, cơ chế sửa chữa nội bào được hoạt hoá sau CTCS thông qua việc gia tăng số lượng tế bào nội mô, tuy nhiên hoạt động này không có nhiều ý nghĩa lâm sàng. Ứng dụng ghép tế bào gốc trung mô là một liệu pháp có ý nghĩa thông qua việc: sản xuất yếu tố dinh dưỡng bằng cách ức chế phản ứng viêm và tạo các tín hiệu thần kinh nội sinh [166], biệt hoá hoặc kích thích các tế bào nội sinh biệt hoá thành các tế bào hình thành bao myelin [167], ức chế sự xơ hoá tạo môi trường thích hợp cho sự tái tạo axon và kích thích sự hình thành mạch [165].

Để đánh giá mức độ hồi phục thần kinh, nghiên cứu dựa vào thang điểm AIS (A- E). Theo dõi 42 bệnh nhân nhóm chứng (AIS- A) ở các thời điểm 3 tháng, 6 tháng, 12 tháng chỉ có 5% cải thiện thang điểm AIS từ A lên B (Bảng 3.19).



Để làm rõ thêm vai trò của TBG, nhiều tác giả đã đưa ra nghiên cứu sử dụng các nhóm chứng khác nhau để chứng minh. Nghiên cứu Panfeng Xu (2019) và Xiao Fan (2017) đã sử dụng nhóm chứng là các bệnh nhân CTCS có điều trị phục hồi chức năng so với nhóm điều trị TBG, kết quả nhóm điều trị TBG đã cải thiện đáng kể khi so sánh với liệu pháp phục hồi chức năng [160],[161]. Một nghiên cứu khác của tác giả Jenna L. Robbins và cộng sự (2015) cho thấy ở nhóm chứng không có sự cải thiện AIS trong khi ở nhóm can thiệp có tỉ lệ 19/40 bệnh nhân có sự cải thiện [57].

Kirshblum và cộng sự (2004) đánh giá sự phục hồi tự nhiên trên 987 bệnh nhân ở 16 trung tâm thu được kết quả: 94,4% AIS-A không phục hồi, chỉ có khoảng 3,5% AIS-A sang AIS-B và 1,05% AIS-A sang AIS-C hoặc D [168].

S Oraee-Yazdani (2016) nghiên cứu đánh giá trước – sau trên 6 bệnh nhân được điều trị phục hồi chức năng trong thời gian 6 tháng trước khi ghép TBG, kết quả cho thấy không có sự cải thiện khi dựa trên hệ thống đánh giá ISNCSCI (International Standard of Neurological Classification for Spinal Cord Injury) và SCIM (Spinal Cord Independence Measure). Tuy nhiên, khi ghép TBG sau 4 tháng bệnh nhân có cải thiện về cảm giác, sau 1 năm điểm PP (pinprick) và LT (light-touch) là 79 điểm [169].

Nhóm bệnh nhân ghép TBG được theo dõi ở các thời điểm sau 03 tháng, 06 tháng và 12 tháng. Sau 03 tháng có 33% cải thiện từ AIS-A lên AIS-B, sau 06 tháng có thêm 7% cải thiện được lên AIS-C, sau 12 tháng có thêm 2% cải thiện lên mức AIS-D (Bảng 3.19). Kết quả này có sự tương đồng với một số nghiên cứu của tác giả của Seung Hwan Yoon và cộng sự (2007) 30,4% bệnh nhân ở giai đoạn cấp và bán cấp cải thiện từ AIS - A lên B hoặc C [6]. Zurab

(2016) đưa ra nhận xét thời gian 03 tháng là thời gian bệnh nhân có sự tiến triển tốt nhất [9].

Tuy nhiên cũng có những nghiên cứu, kết quả thu được rất khác nhau như Junseok W. Hur và cs (2016) trên 14 bệnh nhân CTCS cho kết quả có 5 bệnh nhân cải thiện AIS sau 8 tháng [170]. So sánh với nghiên cứu của tác giả Pu-Cha Jiang và cộng sự (2013), 15 bệnh nhân (75%) cải thiện từ AIS- A lên B hoặc C, trong đó có 14 bệnh nhân (93,3%) cải thiện AIS (A – B), 1 (6,7%) bệnh nhân cải thiện AIS (A – C) [10], hay theo nghiên cứu của Dai và cộng sự (2013) nghiên cứu trên 40 bệnh nhân trong khoảng thời gian 6 tháng nhận thấy 50% bệnh nhân có cải thiện lâm sàng [171]. Đó là một số kết quả nghiên cứu đạt được tương đối tốt, tuy nhiên cũng có nghiên cứu kết quả thu được không như mong đợi, Sun Kyu Oh và cs (2016) nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ở pha II và III nhưng chỉ đạt 2/16 bệnh nhân có cải thiện AIS.

Bảng 3.20, số lượng TBCD34+ ở nhóm cải thiện AIS ( $22,15 \times 10^6$  TB) cao hơn ở nhóm không cải thiện AIS ( $17,69 \times 10^6$  TB), sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Số lượng TB CD73+/CD90+/ CD105+ ở nhóm cải thiện AIS ( $66,25 \times 10^3$  TB) cao hơn ở nhóm không cải thiện AIS ( $56,31 \times 10^3$  TB) có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Điều đó có thể cho thấy vai trò tế bào gốc trung mô trong việc phục hồi tổn thương tuỷ sống. Tuy nhiên, có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến khả năng cải thiện của bệnh nhân như: đặc điểm bệnh nhân, vị trí và mức độ tổn thương, thời gian tiến hành ghép, liều ghép, chăm sóc bệnh nhân, điều trị sau ghép....

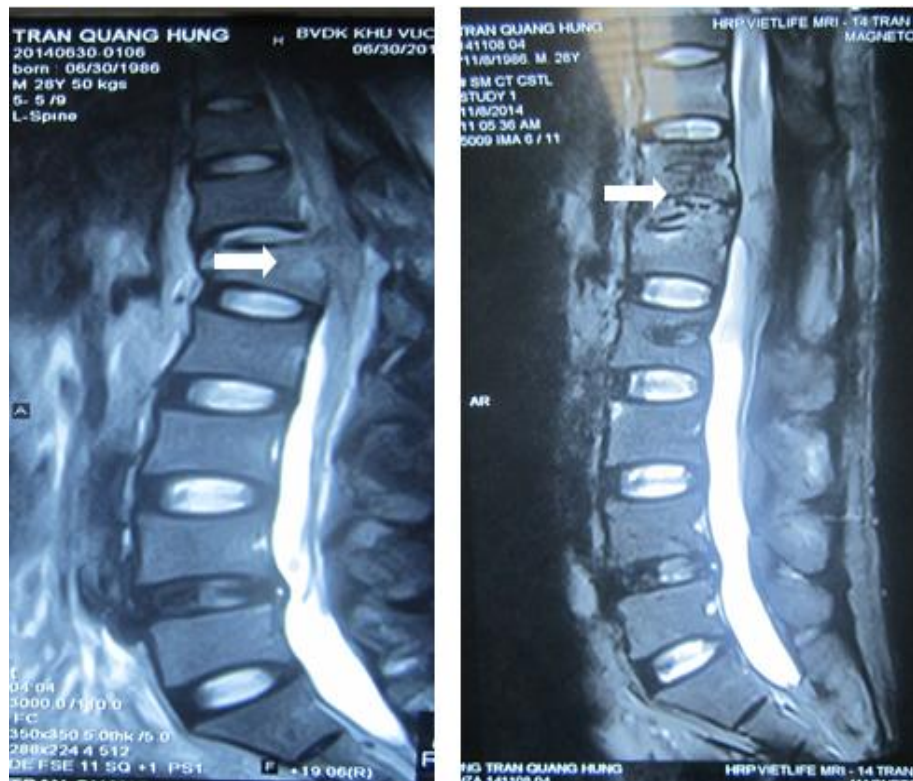
Để đánh giá giá khả năng phục hồi tuỷ sống, người ta có thể sử dụng phương pháp chụp cắt lớp vi tính, mổ mở,...trong đó chụp cộng hưởng từ (CHT) là một phương pháp đánh giá không xâm lấn, an toàn, có hiệu quả cho

đến bây giờ vẫn được ứng dụng rộng rãi trên thế giới. CHT đánh giá các tổn thương: máu tụ, phù tủy, chèn ép tủy, cắt ngang tủy,... và đánh giá khả năng hồi phục và cải thiện sau điều trị. Trong nghiên cứu của chúng tôi mức độ chèn ép, đưng dập tổn thương của tủy sống được đánh giá qua 4 chỉ số đo lường trên hình ảnh MRI như chiều dài tủy sống bị tổn thương (L), độ rộng tủy sống tại vị trí tổn thương (R), độ tổn thương ống sống tối đa (MCC), độ chèn ép tủy sống tối đa (MSCC).

Quan sát, đo lường trên hình ảnh MRI của bệnh nhân chấn thương cột sống trong cả hai nhóm trước khi điều trị cho thấy chiều dài tủy sống tổn thương của nhóm chứng và nhóm can thiệp là 60,32 mm và 66,02 mm, độ rộng tủy sống là 5,67 mm và 6,07 mm. Giá trị L và R của nhóm chứng và nhóm can thiệp cho thấy có sự chênh lệch nhỏ giữa mức độ tổn thương của hai nhóm. Chỉ số MCC, MSCC ở nhóm chứng lần lượt là 29,15%, 30,18% thấp hơn ở nhóm can thiệp lần lượt là 34,23%, 37,89% (Bảng 3.21). Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa ( $p > 0,05$ ). Điều này cho thấy nghiên cứu đã lựa chọn hai nhóm bệnh nhân có sự tương đồng nhất định về mức độ chấn thương trước khi điều trị. Việc đưa ra các so sánh với nhóm chứng tương đồng đã loại bỏ được các yếu tố nhiễu như: trình độ phẫu thuật, phục hồi tự nhiên.

Tuy nhiên, khi so sánh kết quả MRI của 2 nhóm chứng và nhóm can thiệp cùng thời điểm quan sát 12 tháng sau ghép, kết quả cho thấy chiều dài tổn thương nhóm can thiệp  $38,45 \pm 13,40$  thấp hơn nhiều so với nhóm chứng  $57,75 \pm 7,45$ , chiều rộng của tủy sống rộng hơn nhiều ở nhóm can thiệp  $8,19 \pm 1,97$  so với nhóm chứng  $6,56 \pm 2,95$  (Bảng 3.22). Thêm vào đó, MCC và MSCC nhóm can thiệp cũng đồng thời thấp hơn so với nhóm chứng. Sự khác biệt của các biến tương ứng ở hai nhóm có ý nghĩa thống kê. Điều này có thể khẳng

định sự phục hồi về cấu trúc cột sống, tuỷ sống liên quan đến yếu tố TBG cấy ghép. Như vậy không thể phủ nhận vai trò TBG, sự tham gia của TBG trong môi trường tổn thương tuỷ sống không những chỉ chống viêm, điều hoà miễn dịch mà còn đóng vai trò tái tạo, phục hồi phần tuỷ sống bị tổn thương với sự cải thiện về chiều dài tổn thương, giảm đường kính của nang mô sẹo. Park và cs (2011) đã ghi nhận sự mất đi nang mô sẹo và tăng chiều rộng tuỷ sống trên phim MRI [162].



**Hình 4.6:** Hình ảnh CHT trước và sau ghép của bệnh nhân Tran Quang H.

#### SF36:

Để đánh giá sự cải thiện chất lượng cuộc sống nghiên cứu dựa trên thang điểm SF 36 [172], SF 36 được xây dựng bởi nhóm nghiên cứu y tế (Medical Outcomes Study – MOS) thuộc tập đoàn RAND. Bộ câu hỏi bao gồm 8 tiêu chí đánh giá về tình trạng sức khoẻ và tâm sinh lý, cụ thể: (1) hoạt động thể lực,

(2) các hạn chế do sức khoẻ thể chất, (3) các hạn chế do vấn đề tinh thần, (4) sinh lực, (5) sức khoẻ tinh thần, (6) hoạt động xã hội, (7) cảm giác đau, (8) sức khoẻ chung. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy ở các thời điểm 3 tháng, 6 tháng và 12 tháng đều có sự cải thiện rõ rệt đặc biệt là tiêu chí (8) đánh giá tình trạng sức khoẻ chung (Biểu đồ 3.8). Nghiên cứu ở 3 tiêu chí chính: hoạt động thể chất, hoạt động tinh thần và sức khoẻ chung nhận thấy. Với hạn chế sức khoẻ thể chất chỉ số trước ghép là  $4 \pm 1,42$  theo dõi sau 12 tháng tăng lên là  $36 \pm 4,37$ ; hoạt động tinh thần trước ghép là  $15 \pm 3,78$  sau 12 tháng là  $46 \pm 6,89$ ; tình trạng sức khoẻ chung trước ghép là  $40 \pm 8,12$  sau 12 tháng tăng lên là  $61 \pm 11,97$ . Biểu đồ 3.9 cho thấy điểm SF 36 trung bình chung tăng theo thời gian, tăng mạnh nhất sau ghép 03 tháng ( $p < 0,001$ ), các thời điểm sau ghép 06 tháng và 12 tháng điểm SF 36 tiếp tục tăng ( $p < 0,01$ ). Điều đó cho thấy rằng vai trò của TBG trong việc sửa chữa, thay thế các tế bào thần kinh bị tổn thương như việc tái tạo sợi trục, hình thành bao myelin...

### ***Tương quan giữa số lượng TBG và kết quả điều trị***

Tìm hiểu mối liên quan giữa số lượng tế bào CD34+ (tế bào gốc tạo máu) và số lượng TBG trung mô được tiêm vào vị trí tổn thương và khoang dưới nhện của cột sống. Với kết quả cải thiện lâm sàng sau mổ 12 tháng thấy rằng số lượng tế bào CD34+ và số lượng TBG trung mô có tương quan tỷ lệ thuận với điểm SF36 tăng (Biểu đồ 3.10 và 3.11). Nghĩa là số lượng TBG tạo máu và TBG trung mô càng tăng mức độ cải thiện lâm sàng càng cao, mối tương quan giữa điểm SF36 và số lượng TBG tạo máu, trung mô ở mức tương quan trung bình với  $r=0,65$  và  $r= 0,62$ . Điều này cho thấy TBG tạo máu và TBG trung mô có vai trò trong việc cải thiện chức năng tế bào thần kinh.

Một số nghiên cứu khác ứng dụng tế bào gốc tủy xương trong bệnh lý xương khớp cũng cho thấy mối tương quan giữa số lượng TBG và kết quả điều

trị. Tác giả Nguyễn Thanh Bình (2012) nghiên cứu ứng dụng ghép tế bào gốc tuỷ xương trên bệnh nhân khớp giả thân xương dài, kết quả đánh giá vai trò của TBG trung mô đối với hiệu quả liền xương cho thấy số lượng TBG trung mô trong nhóm liền xương cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm không liền xương [132]. Nghiên cứu của Dương Đình Toàn (2015) ứng dụng tế bào gốc tự thân từ tuỷ xương trong điều trị bệnh nhân thoái hoá khớp gối. Kết quả cho thấy, số lượng tế bào gốc tạo máu và tế bào gốc trung mô có mối tương quan chặt chẽ ( $r=0,75$ ,  $p<0,5$ ) với mức độ cải thiện lâm sàng [131].

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu về đặc điểm và hiệu quả của khối tế bào gốc tự thân từ tủy xương trên 84 bệnh nhân CTCS liệt tủy hoàn toàn được chia làm 2 nhóm:

- Nhóm can thiệp: 42 BN được điều trị phẫu thuật cố định cột sống, giải ép và ghép TBG.

- Nhóm chứng: 42 BN được điều trị phẫu thuật cố định cột sống, giải ép.

Nghiên cứu được thực hiện tại Bệnh viện Việt Đức với sự phối hợp Khoa Huyết học của Bệnh viện Trung ương Quân Đội 108, chúng tôi đưa ra một số kết luận sau:

### **1. Hiệu quả chiết tách và chất lượng khối TBG tự thân từ tủy xương được sử dụng trong điều trị CTCS liệt tủy hoàn toàn**

Quy trình phân lập và xử lý đã loại bỏ được 97,44% HC, 80,15% BCH, 93,39% TC. Hiệu suất thu hồi TBĐN đạt 36,4%, CD34+ là 78,27%.

Chất lượng khối TBG (12ml) có tỷ lệ TB sống đạt 82,73%, số lượng TBCD34+ là  $(19,35 \pm 15,82) \times 10^6$  TB, TBG trung mô CD73+/CD90+/CD105+ là  $(72,59 \pm 34,46) \times 10^3$  TB.

### **2. Tính an toàn và hiệu quả sử dụng của khối tế bào gốc tự thân từ tủy xương trong điều trị CTCS có liệt tủy hoàn toàn.**

- **Tai biến và tác dụng không mong muốn:** Không có trường hợp nào xảy ra biến chứng nghiêm trọng, 7% bệnh nhân đau đầu, 5% bệnh nhân buồn nôn.

- **Kết quả điều trị:**

- Sau ghép 12 tháng, nhóm ghép TBG có 38% bệnh nhân có cải thiện thang điểm AIS từ AIS-A lên B, C hoặc D so với nhóm chứng chỉ có 5% BN được cải thiện.

- Kết quả MRI chiều dài tổn thương tủy sống (L), độ tổn thương ống sống tối đa (MCC), Độ chèn ép tủy tối đa (MSCC) của nhóm ghép TBG thấp hơn so với nhóm chứng; chiều rộng tổn thương tủy sống (R) lớn hơn so với nhóm chứng.

- Chỉ tiêu trung bình chung thang điểm SF36 đánh giá chất lượng cuộc sống của bệnh nhân tăng theo thời gian sau ghép TBG.

## **KIẾN NGHỊ**

Dựa trên các kết quả thu được từ nghiên cứu này, chúng tôi có một số kiến nghị:

- Tiếp tục nghiên cứu với số lượng bệnh nhân lớn hơn, thời gian theo dõi dài hơn.
- Áp dụng các kỹ thuật và xét nghiệm làm rõ vai trò tế bào gốc tủy xương trong quá trình tái tạo tế bào thần kinh.



## MỘT SỐ CÔNG TRÌNH KHOA HỌC LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Vi Quỳnh Hoa**, Quách Chính Nghĩa, Nguyễn Đình Hòa, Đặng Hồng Dung (2015), Thông báo một trường hợp chấn thương cột sống có liệt tủy hoàn toàn. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, tập 19/số 4, 243-247.
2. **Vi Quỳnh Hoa**, Nguyễn Thị Thu Hà, Quách Chính Nghĩa, Nguyễn Hồng Dung, Đỗ Thanh Hòa, Lương Tuấn Anh, Nguyễn Thanh Hà (2016), Chỉ số tế bào của khối tế bào gốc tủy xương ở những bệnh nhân chấn thương cột sống LTHT được tách bằng máy Sepax II tại Bệnh viện Việt Đức, *Tạp chí Y học Việt Nam*, tập 446/số đặc biệt, 535-540.
3. **Vi Quỳnh Hoa**, Nguyễn Mạnh Khánh, Quách Chính Nghĩa, Lương Tuấn Anh, Dương Thị Huyền, Đỗ Thanh Hòa, Nguyễn Thị Thu Hà (2018), Kết quả bước đầu điều trị ghép tế bào gốc tủy xương tự thân cho bệnh nhân chấn thương cột sống liệt tủy hoàn toàn tại BV Việt Đức, *Tạp chí Y học Việt Nam*, tập 466/số đặc biệt, 873-879.
4. **Vi Quỳnh Hoa**, Nguyễn Hồng Dung, Quách Chính Nghĩa, Nguyễn Thị Thu Hà, Lương Tuấn Anh, Lê Đức Hà (2019), Một số chỉ số của tế bào gốc trung mô trong khối tế bào gốc tách từ tủy xương trên bệnh nhân CTCS tại Bệnh viện HN Việt Đức, *Tạp chí Y học Việt Nam*, tập 477/số đặc biệt, 125-129.
5. **Vi Quỳnh Hoa**, Đỗ Thanh Hòa, Nguyễn Mạnh Khánh, Nguyễn Đình Hòa, Nguyễn Thị Hương, Nguyễn Thị Thu Hà (2020). Đánh giá kết quả điều trị ghép tế bào gốc tủy xương tự thân cho bệnh nhân chấn thương cột sống liệt tủy hoàn toàn tại Bệnh viện HN Việt Đức, *Tạp chí Y học Việt Nam* tập 487/số 1&2, 214-217.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WHO, International Spinal Cord Society (2013). *International perspectives on spinal cord injury*.
2. National Spinal Cord Injury Statistical Center (2019). *Facts and Figures at a Glance*. Birmingham.
3. Nguyễn Văn Thạch (2007). *Nghiên cứu điều trị phẫu thuật gãy cột sống ngực - thắt lưng không vững, không liệt và liệt tủy không hoàn toàn bằng dụng cụ Moss Miami*, Tiến sĩ Y học, Học viện Quân y.
4. Ying Ye, Yi-ran Peng, Shu-qun Hu et al. (2016). In Vitro Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Neuron-Like Cells by Cerebrospinal Fluid Improves Motor Function of Middle Cerebral Artery Occlusion Rats. *Front Neurol*, 7 (183).
5. Mu T, Qin Y, Liu B et al. (2018). In Vitro Neural Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Carrying the FTH1 Reporter Gene and Detection with MRI. *BioMed Research International*, 2018:1978602,
6. Yoon Seung Hwan, Shim Yu Shik, Park Yong Hoon et al. (2007). Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: phase I/II clinical trial. *Stem cells*, 25 (8), 2066-2073.
7. Park Hyung Chun, Shim Yoo Shik, Ha Yoon et al. (2005). Treatment of complete spinal cord injury patients by autologous bone marrow cell transplantation and administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Tissue Engineering*, 11 (5-6), 913-922.
8. Kakabadze Z, Kipshidze N, C. G. Mardaleishvili K (2016). Phase 1 trial of autologous bone marrow stem cell transplantation in patients with spinal cord injury. *Stem cells international*, 2016 (6768274).
9. Zurab Kakabadze, Nickolas Kipshidze, Konstantine Mardaleishvili et al. (2016). Phase 1 Trial of Autologous Bone Marrow Stem Cell Transplantation in Patients with Spinal Cord Injury. *Stem cells international*, 2016 (6768274)
10. Jiang Pu-Cha, Xiong Wen-Ping, Wang Ge et al. (2013). A clinical trial report of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in patients with spinal cord injury. *Experimental and therapeutic medicine*, 6 (1), 140-146.

11. Nguyễn Đình Hoà (2016). *Nghiên cứu ứng dụng ghép tế bào gốc mô mỡ tự thân điều trị chấn thương cột sống ngực - thất lưng liệt tuỷ hoàn toàn*, Tiến sĩ Y học, Đại học Y Hà Nội.
12. Nguyễn Thị Thu Hà (2004). Tế bào gốc và ứng dụng trong y sinh học. *Tạp chí nghiên cứu Y học, phụ bản*, 32 (6), 13-26.
13. Ashley P Ng, Warren S Alexander (2017). Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discovery*, 3 (2), 17002.
14. Schoemans H, Verfaillie C (2009). Cellular biology of hematopoiesis. *In the Hematology: Basic principles and Practice, 5th*, 200-212.
15. Arai F (2016). Self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells. [*Rinsho ketsueki*] *The Japanese journal of clinical hematology*, 57 (10), 1845-1851.
16. Jingyao Zhao, Xufeng Chen, Guangrong Song et al. (2017 Jan 10). Uhrf1 controls the self-renewal versus differentiation of hematopoietic stem cells by epigenetically regulating the cell-division modes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114 ((2): E142–E151.
17. Vira D, Basak SK, Veena MS (2012). Cancer stem cells, microRNAs, and therapeutic strategies including natural products. *Cancer Metastasis Rev*, 31 (3-4), 733-751.
18. Suárez-Álvarez B, López-Vázquez A, López-Larrea C (2012). Mobilization and homing of hematopoietic stem cells. *Advances in experimental medicine and biology*, 741, 152-170.
19. Faris Q. Alenzi, Badi Q. Alenazi, Shamweel Y. Ahmad et al. (2009 Mar). The Haemopoietic Stem Cell: Between Apoptosis and Self Renewal. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 82(1), 7–18.
20. Suman Kanji, Vincent J. Pompili, Hiranmoy Das et al. (2011). Plasticity and Maintenance of Hematopoietic Stem Cells During Development. *NIH Public Access. Recent Pat Biotechnol*, 5 (1), 40-53.
21. Laura E Sidney, Matthew J Branch, Siobhán E Dunphy et al. (2014). Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 32 (6), 1380–1389.
22. Handgretinger R, Kuçi S (2013). CD133-Positive Hematopoietic Stem Cells: From Biology to Medicine. *Advances in experimental medicine and biology*, 777 (Prominin-1 (CD133): New Insights on Stem & Cancer Stem Cell Biology ), 99-111.

23. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8 (4), 315-317.
24. Tuan RS, Boland G, Piacibello W et al. (2003). Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*, 5 (1), 32-45.
25. Kim DH, Yoo KH, Choi KS et al. (2005). Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cell. *Cytokine*, 31, 119-126.
26. Imran Ullah, S. Raghavendra Baregundi, Gyu Jin Rho (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, 35 (2).
27. Xin WEI, Xue YANG, Zhi-peng HAN et al. (2013 Jun). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34 (6), 747-754.
28. Alma J Nauta, Willem E Fibbe (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, (110), 3499-3506.
29. Ries C, Egea V, Karow M et al. (2007). MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood*, 109 (4055-63).
30. Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M et al. (2006). Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem cells*, 24, 1030-1041.
31. Huang JI, Kazmi N, Durbhakula MM (2005). Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *J Orthop Res*, 23, 1383-1389.
32. Jing Qu, Huanxiang Zhang (2017). Roles of Mesenchymal Stem Cells in Spinal Cord Injury. *Stem cells international*, 2017: 5251313.,
33. Chamberlain G, Fox J, Ashton B et al. (2007). Concise review: Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells*, 25, 2739-2749.
34. Fernando E. Ezquer, Marcelo E. Ezquer, Jose M. Vicencio et al. (2017). Two complementary strategies to improve cell engraftment in mesenchymal stem cell-based therapy: Increasing transplanted cell resistance and increasing tissue receptivity. *Cell Adhesion & Migration*, 11 (1), 110–119.

35. Ann De Becker, Ivan Van Riet (2016). Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World J Stem Cells*, 8 (3), 73-87.
36. Phan Kim Ngọc, Phạm Văn Phúc, Trương Định (2009). *Công nghệ Tế bào gốc*, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.
37. Gimble JM, Nuttall ME (2004). Bone and fat: old questions, new insights. *Endocrine*, 23, 183-188.
38. RoosterBio (February 15, 2014). What are MSCs? *Democratizing Cell Technologies*.
39. Pittenger MF, Martin BJ (2004). Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res.*, 95 (1), 9-20.
40. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.*, 20 (1), 5-14.
41. J Yanjie, S Jiping, Z Yan et al. (2007). Effects of Notch-1 signalling pathway on differentiation of marrow mesenchymal stem cells into neurons in vitro. *NeuroReport*, 18 (14), 1443-1447.
42. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ et al. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.*, 61 (4), 364-370.
43. Kuan-Der Lee, Tom Kwang-Chun Kuo, Jacqueline Whang-Peng et al. (2004). In Vitro Hepatic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Hepatology*, 40 (6), 1275-1284.
44. Grant MB, May WS, Caballero S et al. (2002). Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med*, 8, 607-612.
45. Krause DS, Theise ND, Collector MI et al. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105, 369-377.
46. Joanna E Grove, Emanuela Bruscia, Diane S Krause (2004). Plasticity of Bone Marrow-Derived Stem Cells. *Stem cells*, 22, 487-500.
47. Asdrubal Falavigna, Jaderson Costa da Costa (2015). Mesenchymal Autologous Stem Cells. *World Neurosurgery*, 83 (2), 236-250.
48. V Ramakrishna, P B Janardhan, L Sudarsanareddy (2011). Stem Cells and Regenerative Medicine – A Review . *Annual Review & Research in Biology*, 1 (4), 79-110.

49. José-Manuel Baizaba, Mayra Furlan-Magaril, Jesús Santa-Olalla et al. (2003). Neural stem cells in development and regenerative medicine. *Archives of Medical Research*, 34 (6), 572-588.
50. Minyue Ma, Jiahao Sha, Qi Zhou et al. (2008). Generation of patient-specific pluripotent stem cells and directed differentiation of embryonic stem cells for regenerative medicine. *Journal of Nanjing Medical University Volume*, 22 (3), 135-142.
51. Dong-an Wang, Ram I. Mahato (2010). Therapeutic cell delivery for in situ regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62 (7-8), 669-670.
52. Frédéric Deschaseaux, Charalampos Pontikoglou, Luc Sensébéa (2010). Bone regeneration: the stem/progenitor cells point of view. *J Cell Mol Med*, 14 (1-2), 103-115.
53. McNiece IK, Harrington J, Turney J et al. (2004). Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 6 (4), 311-317.
54. Trần Đăng Xuân Tùng, Đặng Vạn Phước, Lê Thị Bích Phượng et al. (2014). Biệt hóa tế bào gốc trung mô từ mô mỡ thành tế bào tiết insulin để ứng dụng điều trị đái tháo đường type 2. *Y Học TP. Hồ Chí Minh*, 18 (2), 50-54.
55. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, 363 (9419), 1439-1441.
56. Steven C. Kirshblum, Stephen P. Burns, Fin Biering-Sorensen et al. (2011). International standards for neurological classification of spinal cord injury (Revised 2011). *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 34 (6), 535-546.
57. Jenna L Robbins, BA, Priyanka R Kumar et al. (2015). Clinical Utility of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Spinal Cord Injury. *Contemporary Spine Surgery*, 16 (6).
58. Ahuja CS, Nori S, Tetreault L et al. (2017). Traumatic spinal cord injury—repair and regeneration. *Neurosurgery*, 80 (3S), S9-S22.
59. Mirella Meregalli, Andrea Farini, Yvan Torrente (2011). Stem Cell Therapy for Neuromuscular diseases, DOI: 10.5772/24013, 437-468.
60. Gomillion Cheryl T, KJL Burg (2006). Stem cell and Adipose tissue engineer. *Biomaterial*, 27, 6052-6063.

61. Associates of Cape Cod Inc (2016). Gel-Clot Method, The Industry Standard. 2.10.
62. Singh Jatinder, Sahni Manjote Kour, Bilquees Safoora et al. (2016). Reasons for road traffic accidents-victims' perspective. *International Journal of Medical Science and Public Health*, 5 (04), 814.
63. Michael F Azari, Louisa Mathias, Ezgi Ozturk et al. (2010). Mesenchymal Stem Cells for Treatment of CNS Injury. *Current Neuropharmacology*, 8 (4), 316–323.
64. Farbod Rastegar, Deana Shenaq, Jiayi Huang et al. (2010). Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World J Stem Cells.*, 2(4), 67-80.
65. Reaz Vawda, Michael G. Fehlings (2013). Mesenchymal Cells in the Treatment of Spinal Cord Injury: Current & Future Perspectives. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 8, 25-38.
66. Hiroshi Yagi, Alejandro Soto-Gutierrez, Biju Parekkadan et al. (2010). Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Immunomodulation and Homing. *Cell Transplantation.*, 19, 667-679.
67. Venkata Ramesh Dasari, Krishna Kumar Veeravalli, Dzung H Dinh (2014). Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injuries: A review. *World J Stem Cells.*, 6(2), 120-133.
68. L Zachar, D Bacenkova, J Rosocha (2016). Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *Journal of Inflammation Research*, 9, 231–240.
69. Cízková D, Rosocha J, Vanický I et al. (2006). Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 26 (7-8), 1167-1180.
70. P. Dmitriev, E. Kiseleva, O. Kharchenko et al. (2016.). Dux4 controls migration of mesenchymal stem cells through the Cxcr4-Sdf1 axis. *Oncotarget*, 7 (40), 65090–65108.
71. Hong HS, Lee J, Lee E et al. (2009. ). A new role of substance P as an injury-inducible messenger for mobilization of CD29(+) stromal-like cells. *Nature Medicine*, 15 (4), 425–435.
72. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A et al. (2002). G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nature Immunology*, 3 (7), 687–694.

73. J Li, W. Guo, M. Xiong et al. (2015). Effect of SDF-1/CXCR4 axis on the migration of transplanted bone mesenchymal stem cells mobilized by erythropoietin toward lesion sites following spinal cord injury. *Journal of Molecular Medicine*, vol. 36, no. 5, pp. 1205–1214, 2015. *International Journal of Molecular Medicine*, 36 (5), 1205–1214.
74. K Zhang, Z Liu, G Li et al. (2014). Electro-acupuncture promotes the survival and differentiation of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells pre-induced with neurotrophin-3 and retinoic acid in gelatin sponge scaffold after rat spinal cord transection. *Stem Cell Reviews*, 10 (4), 612–625.
75. C. Wang, D. Shi, X. Song et al. (2016). Calpain inhibitor attenuates ER stress-induced apoptosis in injured spinal cord after bone mesenchymal stem cells transplantation. *Neurochemistry International*, 97, 15–25.
76. D. Arboleda, S. Forostyak, P. Jendelova et al. (2011). Transplantation of predifferentiated adipose-derived stromal cells for the treatment of spinal cord injury. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 31 (7), 1113–1122.
77. Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR et al. (2012). Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, 29 (8), 1614-1625.
78. Liu Y, Himes BT, Murray M et al. (2002). Grafts of BDNF-producing fibroblasts rescue axotomized rubrospinal neurons and prevent their atrophy. *Exp. Neurol.*, 178 (2), 150-164.
79. Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T et al. (2004). BDNF genemodified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol. Ther.*, 9 (2), 189-197.
80. Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T et al. (2005). Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol. Ther.*, 11 (1), 96-104.
81. Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A et al. (2011). Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol*, 24, 59-64.
82. Phinney DG, Baddoo M, Dutreil M et al. (2006). Murine mesenchymal stem cells transplanted to the central nervous system of neonatal versus adult mice exhibit distinct engraftment kinetics and express receptors that guide neuronal cell migration. *Stem Cells Dev*, 15, 437-447.



83. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI et al. (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, 290 (5497), 1775-1779.
84. Priller J, Persons DA, Klett FF et al. (2001). Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *The Journal of Cell Biology*, 155 (5), 733-738.
85. Barbara J Craina, Simon D Tranb, Eva Mezeyc (2005). Transplanted human bone marrow cells generate new brain cells. *Journal of the Neurological Sciences* 233(1-2), pp. 121-3, 233 (1-2), 121-123.
86. Simmons P.J, Torok-Storb B (1989). Stromal cell precursors express the CD34 antigen and the receptor for soybean agglutinin. *Blood*, 151a.
87. Enzmann GU, Benton RL, Talbott JF et al. (2006). Functional considerations of stem cell transplantation therapy for spinal cord repair. *J Neurotrauma*, 23, 479-495.
88. Gaby Ritfeld, Martin Oudega (2014). Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell Transplant Survival in the Injured Rodent Spinal Cord. *Journal of Bone Marrow Research*, 2 (146).
89. Garbuzova-Davis S, Willing AE, Saporta S et al. (2006). Novel cell therapy approaches for brain repair. *Prog Brain Res*, 157, 207-222.
90. Seo JH, Jang IK, Kim H et al. (2011). Early Immunomodulation by Intravenously Transplanted Mesenchymal Stem Cells Promotes Functional Recovery in Spinal Cord Injured Rats. *Cell Med*, 2 (2), 55-67.
91. Dasari VR, Spomar DG, Cady C et al. (2007). Mesenchymal stem cells from rat bone marrow downregulate caspase-3-mediated apoptotic pathway after spinal cord injury in rats. *Neurochem. Res.*, 32 (12), 2080-2093.
92. W. Gu, F. Zhang, Q. Xue et al. (2010). Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells reduces lesion volume and induces axonal regrowth of injured spinal cord. *Neuropathology*, 30 (3), 205-217.
93. Ying Tan, Kenzo Uchida, Hideaki Nakajima et al. (2013). Blockade of Interleukin 6 Signaling Improves the Survival Rate of Transplanted Bone Marrow Stromal Cells and Increases Locomotor Function in Mice With Spinal Cord Injury *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 72 (10), 980–993.
94. Nakano N1, Nakai Y, Seo TB et al. (2013). Effects of bone marrow stromal cell transplantation through CSF on the subacute and chronic spinal cord injury in rats. *PLoS One*, 8 (9), e73494.

95. Mitsuhashi T, Takeda M, Yamaguchi S et al. (2013 ). Simulated microgravity facilitates cell migration and neuroprotection after bone marrow stromal cell transplantation in spinal cord injury. *Stem Cell Res Ther*, 4 (2), 35.
96. Peng Ding, Zhiyong Yang, Weimin Wang et al. (2014). Transplantation of bone marrow stromal cells enhances infiltration and survival of CNP and Schwann cells to promote axonal sprouting following complete transection of spinal cord in adult rats. *Am J Transl Res*, 6 (3), 224–235.
97. Chen J, Zhang Z, Liu J et al. (2014 Mar). Acellular spinal cord scaffold seeded with bone marrow stromal cells protects tissue and promotes functional recovery in spinal cord-injured rats. *J Neurosci Res*, 92 (3), 307-317.
98. Onuma-Ukegawa M, Bhatt K, Hirai T et al. (2015). Bone Marrow Stromal Cells Combined With a Honeycomb Collagen Sponge Facilitate Neurite Elongation In Vitro and Neural Restoration in the Hemisected Rat Spinal Cord. *Cell Transplant*, 24 (7), 1283-1297.
99. Kim Y, Jo SH, Kim WH et al. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory effects of intravenously injected adipose derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury. *Stem Cell Research & Therapy*, 6 (229).
100. Bruna dos Santos Ramalho, Fernanda Martins de Almeida, Conrado Mendonça Sales et al. ( 2018 Jun). Injection of bone marrow mesenchymal stem cells by intravenous or intraperitoneal routes is a viable alternative to spinal cord injury treatment in mice. *Neural Regen Res*, 13 (6), 1046–1053.
101. Thomas E Ichim, Fabio Solano, Neil H Riordan (2010). Feasibility of combination allogeneic stem cell therapy for spinal cord injury: a case report. *Int Arch Med.*, 3 (30).
102. Sang Ryong Jeon, Jin Hoon Park, Jung Hwan Lee et al. (2010). Treatment of Spinal Cord Injury with Bone Marrow-Derived, Cultured Autologous Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7 (3), 316-322.
103. Yoon SH, Shim YS, Park YH et al. (2007). Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: phase I/II clinical trial. *Stem cells*, 2066-2073.
104. Deda H, Inci MC, Kürekçi AE et al. (2008). Treatment of chronic spinal cord injured patients with autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell transplantation: 1-year follow-up. *Cytotherapy*, 10 (6), 565-575.

105. Cristante AF, Barros-Filho TE, Tatsui N et al. (2009). Stem cells in the treatment of chronic spinal cord injury: evaluation of somatosensitive evoked potentials in 39 patients. *Spinal Cord*, 47 (10), 733-738.
106. Pal R, Venkataramana NK, Bansal A et al. (2009). Ex vivo-expanded autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in human spinal cord injury/ paraplegia: A pilot clinical study. *Cytotherapy*, 897-911.
107. Arachimani Anand Kumar, Sankaran Raj Kumar, Raghavachary Narayanan et al. (2009). Autologous Bone Marrow Derived Mononuclear Cell Therapy for Spinal Cord Injury: A Phase I/II Clinical Safety and Primary Efficacy Data. *Experimental and Clinical Transplantation*, 4, 241-248.
108. Ricardo dos Santos, Ticiana Larocca, Bruno Souza et al. (2014). Transplantation of autologous bone marrow stem cells in patients with chronic spinal cord injury. *BMC Proceedings*, 8 (4).
109. Suzuki Y, Ishikawa N, Omae K et al. (2014). Bone marrow-derived mononuclear cell transplantation in spinal cord injury patients by lumbar puncture. *Restor Neurol Neurosci.*, 32 (4), 473-482.
110. Chhabra HS, Sarda K, Arora M et al. (2016). Autologous bone marrow cell transplantation in acute spinal cord injury--an Indian pilot study. *Spinal Cord*, 54 (1), 57-64.
111. Nhà xuất bản y học (2006). *Phương pháp nghiên cứu khoa học trong y học và sức khỏe cộng đồng*, Nhà xuất bản y học.
112. Hays RD, Sherbourne CD, Mazel RM (1993). The RAND 36-Item Health Survey 1.0. *Health Econ*, 2 (3), 217-227.
113. Sarita Magu, Deepak Singh (2015 ). Evaluation of Traumatic Spine by Magnetic Resonance Imaging and Correlation with Neurological Recovery. *Asian Spine Journal*, 9 (5), 748–756.
114. Bộ Y tế (2013). Thông tư số 26/2013/TT-BYT ngày 16/09/2013 Hướng dẫn hoạt động truyền máu.
115. Bộ Y tế (2014). Quyết định 2017/QĐ-BYT năm 2014 về việc ban hành tài liệu "Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Huyết học - Truyền máu - Miễn dịch di truyền - Sinh học phân tử".
116. Philippe Hernigou, G Mathieu, A Poignard et al. (2006). Percutaneous Autologous Bone-Marrow Grafting for Nonunions. Surgical Technique. *J. Bone Joint Surg. Am*, 88, 322-327.
117. P. Hernigou and F. Beaujean (2002). "Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting", *Clin Orthop Relat Res*, 405: p.14-23.

118. Mayo F Friedlis, Christopher J Centeno (2016). Performing a Better Bone Marrow Aspiration. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 27 (4), 919-939.
119. M Aktas, TF Radke, BE Strauer et al. (2008). Separation of adult bone marrow mononuclear cells using the automated closed separation system Sepax. *Cytotherapy*, 10 (2), 203-211.
120. Yen-Shun Chen, Yi-An Chen, Pei-Hsun Tsai (2016). Mesenchymal Stem Cell: Considerations for Manufacturing and Clinical Trials on Cell Therapy Product. *International Journal of stem cell research and therapy*, 3 (1).
121. Nguyễn Thị Thu Hà (2006). Tế bào gốc tạo máu. *Tạp chí y dược lâm sàng 108*, 1(1), 13-17.
122. Oh Sun Kyu, Jeon Sang Ryong (2016). Current concept of stem cell therapy for spinal cord injury: A review. *Korean journal of neurotrauma*, 12 (2), 40-46.
123. Kang Yi, Ding Han, Zhou Hengxing et al. (2017). Epidemiology of worldwide spinal cord injury: a literature review. *J. Neurorestoratol*, 6, 1-9.
124. WHO (2013). Road safety status in the WHO South-East Asia Region, 2013.
125. (2012). Spinal cord injury facts and figures at a glance. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, Vol.35, 480-481.
126. Peek-Asa C, McArthur DL, Kraus JF (1999). The prevalence of non-standard helmet use and head injuries among motorcycle riders. 31 (3), 229-233.
127. Tulika Chandra , R N Srivastava, Saroj Chooramani Gopal Mch et al. (2016). Processing of bone marrow mononuclear stem cells in acute spinal cord injury. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 3 (1), 226-232.
128. Dedeepiya VD, Rao YY, Jayakrishnan GA et al. (2012). Index of CD34+ cells and mononuclear cells in the bone marrow of spinal cord injury patients of different age groups: a comparative analysis. *Bone marrow research*, 2012.
129. Bhanot Yanish, Rao Sujay, Ghosh Debapriya et al. (2011). Autologous mesenchymal stem cells in chronic spinal cord injury. 25 (4), 516-522.
130. Đỗ Trung Phần (2014). Các giá trị sinh học về huyết học và miễn dịch huyết học (Giai đoạn 1995-2005). *Kỹ thuật xét nghiệm huyết học và truyền máu ứng dụng lâm sàng 2009, Truyền máu hiện đại ứng dụng trong điều trị bệnh*, Nhà xuất bản giáo dục Việt Nam.

131. Dương Đình Toàn (2015). *Nghiên cứu ứng dụng phẫu thuật nội soi tạo tổn thương dưới sụn và ghép khối TBG tủy xương tự thân trong điều trị thoái hóa khớp gối*, Tiến sĩ Y học, Đại học Y Hà Nội.
132. Nguyễn Thanh Bình (2012). *Nghiên cứu đặc tính và hiệu quả của khối tế bào gốc tự thân từ tủy xương trong điều trị một số tổn thương xương, khớp*, Đại học Y Hà Nội.
133. Kostovski E, Iversen PO, Hjeltnes N (2010). Complications of chronic spinal cord injury. *Tidsskrift for den Norske laegeforening: tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*, 130 (12), 1242-1245.
134. Connolly JF, Guse R, Tiedeman J (1991 ). Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 266, 259-270.
135. Howard R Bierman (1952). Bone marrow aspiration: The Posterior Iliac Crest, an Additional Safe Site. *California Medicine*, 77 (2), 138–139.
136. Philippe Hernigou (2012). Procedure for Bone Marrow Aspiration from the Posterior Iliac Crest. *Celling Biosciences*.
137. Hernigou P, Homma Y, P. A. Flouzat Lachaniette CH et al. (2013). Benefits of small volume and small syringe for bone marrow aspirations of mesenchymal stem cells. *International orthopaedics*, 37 (11), 2279-2287.
138. Kiều Thị Vân Oanh (2019). Bước đầu đánh giá hiệu quả chiết tách khối TBG tủy xương bằng máy tự động Sepax II ở bệnh nhân bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính giai đoạn gold C, D tại bệnh viện Bạch Mai. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 477, 146-152.
139. Bùi Việt Anh (2017). Nghiên cứu đặc điểm chất lượng khối tế bào gốc phân lập từ tủy xương trong điều trị bại não ở trẻ em tại bệnh viện đa khoa quốc tế Vinmec. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 453, 289-297.
140. Koshizuka S, Okada S, Okawa A et al. (2004). Transplanted Hematopoietic Stem Cells from Bone Marrow Differentiate into Neural Lineage Cells and Promote Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Mice. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 63 (1), 64–72.
141. Mehler MH, Rozental R, Dougherty M (1993). Cytokine regulation of neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *Nature*, 362 (62), 65.
142. Ryan JM (2005). Ryan JM. Mesenchymal stem cells avoid allogenic rejection. *Journal of Inflammation*, 26 (2), 8.

143. Storch A, Paul G, Csete M et al. (2001). Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Experimental Neurology*, 170 (317), 325.
144. H Deda, MC İnci, AE Kuşrekc (2008). Treatment of chronic spinal cord injured patients with autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell transplantation: 1-year follow-up. *Cytotherapy*, 10 (6), 565-574.
145. Sutherland DR, Anderson L, N. R. Keeney M et al. (1996). The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *Journal of hematotherapy*, 5 (3), 213-226.
146. Shinji Yasuhara, Yuji Yasunaga, Takashi Hisatome (2010). Efficacy of Bone Marrow Mononuclear Cells to Promote Bone Regeneration Compared With Isolated CD34+ Cells From the Same Volume of Aspirate. *Artificial Organs*, 34 (7), 594–599.
147. Nguyễn Mạnh Khánh (2011). *Nghiên cứu ứng dụng ghép tế bào gốc tủy xương tự thân điều trị chậm liền xương, khớp giả thân xương chày*, Luận án Tiến sỹ Y học Học viện Quân Y.
148. Schündeln MM, Walde G, Basu O et al. (2014 ). Quantification of nucleated cells, CD34-positive cells and CFU-GM colonies in single bone marrow samples and bone marrow harvests derived from healthy children. *Pediatric Hematology and Oncology*, 31 (4), 340-348.
149. Qu Jing, Zhang Huanxiang (2017). Roles of mesenchymal stem cells in spinal cord injury. *Stem cells international*, 2017.
150. Yuji S Takeda, Qiaobing Xu (2015). Neuronal Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Using Exosomes Derived from Differentiating Neuronal Cells. *PLoS One*, 10 (8), e0135111.
151. Wright Karina T, El Masri Wagih, Osman Aheed et al. (2011). Concise review: Bone marrow for the treatment of spinal cord injury: mechanisms and clinical applications. *Stem cells*, 29 (2), 169-178.
152. Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C et al. (2007). Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *Journal of cellular physiology*, 211 (1), 121-130.
153. Kuznetsov Sergei A, Mankani Mahesh H, Bianco Paolo et al. (2009). Enumeration of the colony-forming units–fibroblast from mouse and human bone marrow in normal and pathological conditions. *Stem cell research*, 2 (1), 83-94.

154. Gangji V, Hauzeur JP, Matos C et al. (2005). Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. *JBJS*, 87 (1), 106-112.
155. Christopher D Chaput, Adam Shar, Daniel Jupiter et al. (2018). How stem cell composition in bone marrow aspirate relates to clinical outcomes when used for cervical spine fusion. *PLoS One*, 13 (9), e0203714.
156. David C. Colter, Reiner Class, Carla M. DiGirolamo (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *PNAS*, 97 (7).
157. P. Kasten, I. Beyen, M. Egermann (2008). Instant stem cell therapy: characterization and concentration of human mesenchymal stem cells in vitro. *European Cells and Materials*, 16, 47-55.
158. Jing Li, Wilfred Hing-Sang Wong, Shing Chan (2011). Factors Affecting Mesenchymal Stromal Cells Yield from Bone Marrow Aspiration. *Chin J Cancer Res*, 23 (1), 43-48.
159. Stolzing, E. Jones, D. McGonagle (2008). Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128, 163-173.
160. Xu Panfeng, Yang Xianliang (2019). The efficacy and safety of mesenchymal stem cell transplantation for spinal cord injury patients: a meta-analysis and systematic review. *Cell transplantation*, 28 (1), 36-46.
161. Fan X, Wang JZ, Lin XM et al. (2017). Stem cell transplantation for spinal cord injury: a meta-analysis of treatment effectiveness and safety. 12 (5), 815.
162. Park Jin Hoon, Kim Dae Yul, Sung Inn Young et al. (2011). Long-term results of spinal cord injury therapy using mesenchymal stem cells derived from bone marrow in humans. *Neurosurgery*, 70 (5), 1238-1247.
163. Kim Yoon-Chung, Kim Young-Hoon, Kim Jang-Woon et al. (2016). Transplantation of mesenchymal stem cells for acute spinal cord injury in rats: comparative study between intralesional injection and scaffold based transplantation. *Journal of Korean medical science*, 31 (9), 1373-1382.
164. Vaquero J, Zurita M, Rico MA et al. (2018). Intrathecal administration of autologous mesenchymal stromal cells for spinal cord injury: Safety and efficacy of the 100/3 guideline. *Cytotherapy*, 20 (6), 806-819.

165. Neil H Riordan, Thomas Ichim, Neil Riordan (2017). *MSC (Mesenchymal Stem Cells): Clinical Evidence Leading Medicine's Next Frontier*.
166. Kantarcıoğlu M, Demirci H, Avcu F (2015). Efficacy of autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with liver cirrhosis. *Turk J Gastroenterol*, 26, 244-250.
167. Salama H, Zekri AR, Medhat E et al. (2014). Peripheral vein infusion of autologous mesenchymal stem cells in Egyptian HCV-positive patients with end-stage liver disease. *Stem Cell Res Ther*, 5 (3), 70.
168. Kirshblum S, Millis S, McKinley W et al. (2004). Late neurologic recovery after traumatic spinal cord injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 85 (11), 1811-1817.
169. Oraee-Yazdani S, Hafizi M, Atashi A et al. (2016). Co-transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells and Schwann cells through cerebral spinal fluid for the treatment of patients with chronic spinal cord injury: safety and possible outcome. *Nature research*, 54 (2), 102.
170. Hur Junseok W, Cho Tai-Hyoung, Park Dong-Hyuk et al. (2016). Intrathecal transplantation of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells for treating spinal cord injury: A human trial. 39 (6), 655-664.
171. Dai G, Liu X, Zhang Z et al. (2013). Transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of complete and chronic cervical spinal cord injury. *Brain research*, 1533, 73-79.
172. National Committee for Quality Assurance (HEDIS 2016). Specification for the medicare health outcomes survey. *National Committee for Quality Assurance*, 6.



## PHỤ LỤC 1

### BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU

Số NC

Mã số B.A

#### I. HÀNH CHÍNH

- 1.1. Họ tên: .....
- 1.2. Tuổi: .....
- 1.3. Giới:..... (1. Nam, 2. Nữ)
- 1.4. Nghề nghiệp:.....
- 1.5. Địa chỉ:
- Xóm, số nhà:..... Thôn, phố:.....
- Xã, phường:..... Huyện, quận:.....
- Tỉnh, thành phố:.....Điện thoại cố định:.....
- ĐD.....Email:.....
- Địa chỉ người thân:.....
- ĐT cố định:..... ĐD:..... Email:.....
- 1.6. Lý do vào viện:.....
- 1.7. Nguyên nhân chấn thương:.....
- 1.8. Chẩn đoán sơ bộ:.....
- 1.9. Ngày vào viện: .....
- 1.10. Ngày ra viện:.....

#### II. LÂM SÀNG

##### 1. Triệu chứng lâm sàng trước ghép

- Đánh giá mức độ tổn thương tuỷ theo thang điểm AIS:.....
- Đánh giá chất lượng cuộc sống SF36: 8 lĩnh vực dựa trên bộ 36 câu hỏi
  - + Hoạt động thể lực:.....

- + Các hạn chế do sức khoẻ thể chất:.....
- + Các hạn chế do vấn đề tinh thần:.....
- + Sinh lực/ Mệt mỏi:.....
- + Sức khoẻ tinh thần:.....
- + Hoạt động xã hội:.....
- + Cảm giác đau:.....
- + Sức khoẻ chung:.....

## 2. Chẩn đoán hình ảnh

### - Chụp XQ và CT:

#### + Vị trí tổn thương:

- |        |                          |
|--------|--------------------------|
| T1-T5  | <input type="checkbox"/> |
| T6-T9  | <input type="checkbox"/> |
| T10-L1 | <input type="checkbox"/> |

#### + Mức độ tổn thương:

- |               |                          |
|---------------|--------------------------|
| Phù tủy       | <input type="checkbox"/> |
| Đụng dập      | <input type="checkbox"/> |
| Máu tụ        | <input type="checkbox"/> |
| Đứt hoàn toàn | <input type="checkbox"/> |

### - Chụp MRI

- |      |       |
|------|-------|
| L    | ..... |
| R    | ..... |
| MCC  | ..... |
| MSCC | ..... |

### 3. Kết quả xét nghiệm

- Chỉ số TB máu ngoại vi

SLBC (G/L) .....

SLHC (T/L) .....

HST (g/L) .....

HCT (L/L) .....

SLTC (G/L) .....

HCL (%) .....

- Chỉ số TB tuỷ xương

SL TBCN (G/L) .....

SL TBĐN (G/L) .....

SLHC (T/L) .....

SLTC (G/L) .....

HST (g/L) .....

HCL (%) .....

### III. CHẤT LƯỢNG KHỐI TẾ BÀO GỐC

#### 1. Số lượng TBTX trước tách

TBCN (G/L) .....

TBĐN (G/L) .....

BCH (%) .....

HC (T/L) .....

HST (g/L) .....

TC (G/L) .....

Tỷ lệ TB CD34+ (%) .....

## 2. Số lượng TBTX sau tách

TBCN (G/L) .....

TBDN (G/L) .....

BCH (%) .....

HC (T/L) .....

HST (g/L) .....

TC (G/L) .....

Tỷ lệ TB CD34+ (%) .....

## 3. Số lượng TBG tạo máu TB CD34+:

Tỷ lệ TB CD34+ sống:.....

## 4. Số lượng TB tạo cụm CFU-F/ $10^6$ TBCN:

## 5. Số lượng TB trung mô CD73+/CD90+/CD105+/ $10^5$ TBCN:

## 6. Cấy khuẩn, nấm, Endotoxin:

Cấy khuẩn .....

Nấm .....

Endotoxin .....

## IV. KẾT QUẢ ĐIỀU TRỊ

### 1. Kết quả cải thiện AIS:

	Tháng thứ 3	Tháng thứ 6	Tháng thứ 12
Điểm AIS			

### 2. Cải thiện CLCS (SF36):

Tiêu chí	Tháng thứ 3	Tháng thứ 6	Tháng thứ 12
Hoạt động thể lực			
Các hạn chế do sức khoẻ thể chất			
Các hạn chế do vấn đề tinh thần			
Sinh lực/ Mệt mỏi			
Sức khoẻ tinh thần			
Hoạt động xã hội			
Cảm giác đau			
Sức khoẻ chung			

**3. KQ chụp MRI kiểm tra sau ghép 12 tháng:**

L .....

R .....

MCC .....

MSCC .....

**V. BIẾN CHỨNG SAU GHÉP**

**- Biến chứng sớm**

Sốt	<input type="checkbox"/>
Phát ban	<input type="checkbox"/>
Co thắt phế quản	<input type="checkbox"/>
Tăng nhịp tim	<input type="checkbox"/>
Đau đầu	<input type="checkbox"/>
Buồn nôn	<input type="checkbox"/>
Nhiễm trùng	<input type="checkbox"/>
Chảy máu tại vị trí ghép	<input type="checkbox"/>
Tụ máu dưới màng cứng	<input type="checkbox"/>
Khác	.....

**- Biến chứng muộn:**

.....  
.....

## PHỤ LỤC 2

### BỘ CÂU HỎI ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG CUỘC SỐNG (SF36)

*Nguồn: The RAND 36 – Item Health Survey, Ver 1.0 (1993) [112]*

Họ tên bệnh nhân:.....

1. Nhìn chung, bạn thấy sức khoẻ của mình thế nào?	1. Tuyệt vời 2. Rất tốt 3. Tốt 4. Khá tốt 5. Tồi tệ
2. So với 1 năm trước, bạn đánh giá sức khoẻ chung <b>hiện tại</b> của mình thế nào?	1. Tốt hơn nhiều 2. Phần nào tốt hơn 3. Giống như năm trước 4. Phần nào kém hơn 5. Kém hơn nhiều

Sức khoẻ hiện tại của bạn có <b>hạn chế</b> bạn làm những hoạt động dưới đây không, mức độ hạn chế như thế nào?	<b>Có, Hạn chế rất nhiều</b>	<b>Có, Hạn chế 1 chút</b>	<b>Không</b>
3. <b>Hoạt động mạnh</b> như: chạy, nâng vật nặng, chơi môn thể thao mạnh...	1	2	3
4. <b>Hoạt động vừa phải</b> : dịch chuyển bàn, đẩy vật nhẹ, chơi bowling hay golf...	1	2	3
5. Nâng hoặc mang hàng tạp hoá	1	2	3
6. Leo <b>nhiều</b> tầng bậc thang	1	2	3
7. Leo <b>một</b> tầng bậc thang	1	2	3
8. Uốn lưng, quỳ gối, khom lưng	1	2	3
9. Đi bộ <b>nhiều hơn 1km</b>	1	2	3
10. Đi bộ <b>nhiều</b> chặng	1	2	3
11. Đi bộ <b>một</b> chặng	1	2	3
12. Tự tắm rửa hoặc mặc quần áo	1	2	3

Trong 4 tuần vừa qua, <b>sức khỏe thể chất</b> của bạn có ảnh hưởng đến công việc hoặc các hoạt động thường ngày?	<b>Có</b>	<b>Không</b>
13. Giảm thời gian dành cho công việc và các hoạt động khác	1	2
14. Thực hiện được ít hơn bạn mong muốn	1	2
15. Giới hạn loại công việc hoặc hoạt động thực hiện được	1	2
16. Khó khăn hơn trong công việc hoặc các hoạt động khác (như phải nỗ lực rất nhiều...)	1	2

Trong <b>4 tuần vừa qua</b> , <b>trạng thái cảm xúc</b> (chán nản, lo lắng...) của bạn có ảnh hưởng đến công việc hoặc các hoạt động thường ngày?	<b>Có</b>	<b>Không</b>
17. Giảm thời gian dành cho công việc và các hoạt động khác	1	2
18. Thực hiện được ít hơn bạn mong muốn	1	2
19. Không làm chu đáo như thường lệ	1	2

20. Trong <b>4 tuần vừa qua</b> , mức độ cảm xúc của bạn với gia đình, bạn bè, hàng xóm, nhóm đoàn thể như thế nào?	1. Thờ ơ
	2. 1 chút
	3. Vừa phải
	4. Khá hơn chút
	5. Tốt

21. Trong <b>4 tuần vừa qua</b> , cơ thể bạn có đau đớn gì không?	1. Không đau
	2. Đau rất nhẹ
	3. Đau nhẹ
	4. Đau
	5. Đau nhiều
	6. Đau dữ dội

22. Trong <b>4 tuần vừa qua</b> , mức độ đau ảnh hưởng thế nào đến công việc của bạn?	1. Không ảnh hưởng
	2. Ảnh hưởng 1 chút
	3. Ảnh hưởng vừa
	4. Ảnh hưởng khá nhiều
	5. Ảnh hưởng rất nhiều

Những câu hỏi dưới đây nói về cảm giác của bạn <b>trong 4 tuần vừa qua</b> :	Mọi lúc	Hầu hết thời gian	Nhiều thời gian	Một số thời gian	Ít thời gian	Không có thời gian
23. Bạn cảm thấy rất hăng hái.	1	2	3	4	5	6
24. Bạn cảm thấy lo lắng.	1	2	3	4	5	6
25. Bạn cảm thấy buồn chán và không có gì khiến bạn vui.	1	2	3	4	5	6
26. Bạn cảm thấy bình tĩnh và thư thái.	1	2	3	4	5	6
27. Bạn cảm thấy nhiều năng lượng.	1	2	3	4	5	6
28. Bạn cảm thấy chán nản và thất vọng.	1	2	3	4	5	6
29. Bạn cảm thấy kiệt sức.	1	2	3	4	5	6
30. Bạn cảm thấy hạnh phúc.	1	2	3	4	5	6
31. Bạn cảm thấy mệt mỏi.	1	2	3	4	5	6

32. Trong <b>4 tuần vừa qua</b> , các <b>vấn đề về sức khỏe thể chất và tinh thần</b> có ảnh hưởng đến các hoạt động xã hội của bạn (như thăm hỏi người thân, bạn bè...)?	1. Mọi lúc
	2. Hầu hết thời gian
	3. Một số thời gian
	4. Một ít thời gian
	5. Không



Những trạng thái dưới đây có đúng với bạn không?	<b>Hoàn toàn đúng</b>	<b>Gần như đúng</b>	<b>Không rõ</b>	<b>Hầu như sai</b>	<b>Hoàn toàn sai</b>
33. Bạn có vẻ dễ ốm hơn người khác.	1	2	3	4	5
34. Bạn cảm thấy khoẻ như mọi người.	1	2	3	4	5
35. Bạn nghĩ rằng sức khoẻ của bạn đang trở nên tệ hơn.	1	2	3	4	5
36. Bạn cảm thấy sức khoẻ của bạn rất tốt.	1	2	3	4	5

**Ghi chú:**

.....  
.....

**Ngày:**..... **Bệnh nhân (Ký tên):**.....

### PHỤ LỤC 3

#### PHIẾU ĐỒNG Ý THAM GIA NGHIÊN CỨU

Họ và tên đối tượng tham gia nghiên cứu (hoặc người đại diện):

.....

Tuổi:.....

Địa chỉ: .....

Điện thoại (nếu có): .....

Sau khi được Cán bộ nghiên cứu thông báo về mục đích, quyền lợi, nghĩa vụ, những nguy cơ tiềm tàng và các thông tin chi tiết của nghiên cứu liên quan đến đối tượng tham gia vào nghiên cứu, tôi (hoặc người đại diện trong gia đình) đồng ý tình nguyện tham gia vào nghiên cứu này.

Tôi xin tuân thủ các quy định của nghiên cứu.

*Hà Nội, ngày      tháng      năm*

Họ tên của đối tượng (hoặc người đại diện)

(Ký và ghi rõ họ, tên)