

ĐIỀU TRỊ CHẤN THƯƠNG SỌ NÃO CẤP TÍNH BẰNG GHÉP TẾ BÀO GỐC TỰ THÂN TẠI BỆNH VIỆN TRUNG ƯƠNG HUẾ

Nguyễn Duy Thăng¹, Nguyễn Việt Quang¹,
Trần Ngọc Vũ¹, Hà Thị Phương Lan¹, Bùi Thị Diễm Thu¹

DOI: 10.38103/jcmhch.2020.59.3

TÓM TẮT

Số ca chấn thương sọ não cấp tính do tai nạn ngày càng tăng trong các năm trở lại đây, với mức độ nguy hiểm ngày càng cao, dễ dẫn đến tử vong hoặc biến chứng nặng nề trong việc cử động, nhận thức hành vi hay hoạt động xã hội. Một vài nghiên cứu lâm sàng và tiền lâm sàng trên thế giới cho thấy tế bào gốc có khả năng bảo vệ các tế bào thần kinh và giúp hỗ trợ quá trình hồi phục chấn thương sọ não. Vì vậy, chúng tôi thử nghiệm ghép tế bào gốc tự thân trên ba bệnh nhân chấn thương sọ não cấp tính để đánh giá bước đầu hiệu quả của liệu pháp này.

Phương pháp nghiên cứu: Bệnh nhân được thu dịch tủy xương ở vùng gai chậu trước trên, tách tế bào đơn nhân từ tủy xương với Ficoll-Paque và ghép tế bào bằng tiêm tĩnh mạch. Đồng thời tiến hành nuôi cấy sinh tế bào gốc trung mô từ tủy xương và ghép lần hai sau 7 -10 ngày. Đánh giá hiệu quả an toàn của phương pháp, các chỉ số gan, thận, huyết học, chỉ số BI và Glasgow được đánh giá trong vòng 4 tuần kể từ khi chấn thương.

Kết quả và kết luận: Không có sự thay đổi đáng kể về các chỉ số gan, thận và huyết học. Chỉ số BI và Glasgow tăng rõ rệt so với nhóm đối chứng, không có biến chứng bất thường trong vòng 4 - 6 tuần kể từ khi ghép tế bào. Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy liệu pháp ghép tế bào gốc tự thân an toàn và có hiệu quả tích cực đối với bệnh nhân chấn thương sọ não cấp tính.

Từ khóa: Tế bào đơn nhân; Tế bào gốc trung mô; Tủy xương; Chấn thương sọ não cấp tính.

ABSTRACT

TREATING ACUTE TRAUMATIC BRAIN INJURY BY USING AUTOLOGOUS BONE MARROW DERIVED STEM CELLS AT HUE CENTRAL HOSPITAL

Nguyen Duy Thang¹, Nguyen Viet Quang¹,
Tran Ngoc Vu¹, Ha Thi Phuong Lan¹, Bui Thi Diem Thu¹

The number of acute traumatic injuries caused by accidents has been increasing in recent years, leading to death or serious complications in cognitive behavior or social function. Few pre-clinical studies around the world have shown the ability of stem cells in neuroprotection. Therefore, we apply autologous stem cells transplants in two acute traumatic brain injury patients to evaluate the effectiveness of stem cell therapy.

Method: Three male patients aged 23 and 49 years with a postresuscitation Glasgow Coma Scale of 6 and 8 were treated with autologous mononuclear cells delivered intravenously within 2-3 hours after bone

1. BVTW Huế

- Ngày nhận bài (Received): 29/9/2019; Ngày phản biện (Revised): 27/01/2020;
- Ngày đăng bài (Accepted): 20/02/2020
- Người phản hồi (Corresponding author): Nguyễn Việt Quang
- Email: bsquang280@gmail.com; SĐT: 0914019662

Bệnh viện Trung ương Huế

marrow harvesting, mesenchymal stem cells were isolated and expanded in culture before the system administrating through vein after 7-10 days. To determine the safety of the procedure, systemic and cerebral hemodynamics were monitored during bone marrow harvest; infusion-related toxicity was determined by hepatic enzymes, and renal function.

Result and conclusion: *There were no significant changes in liver, kidney and hematological criteria. BI and Glasgow indexes increased significantly compared to the control group. There was no abnormal complication within 4-6 weeks after cell transplantation. Autologous stem cell therapy is safe and effective for patients with acute brain injury.*

Keywords: *Stem cells; Mesenchymal stem cell; Bone marrow; Acute traumatic brain injury.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tỷ lệ chấn thương sọ não ngày càng có xu hướng gia tăng. Mức độ bệnh có thể diễn biến nặng do tổn thương hộp sọ và các cấu trúc não bộ dễ dẫn đến tử vong hoặc các biến chứng khác. Tỷ lệ bệnh nhân tử vong chiếm hơn 1/3 và 2/3 tàn phế vĩnh viễn. Gần đây, các nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng trên thế giới đã cho thấy các kết quả tích cực của liệu pháp ghép tế bào gốc tự thân trong chấn thương sọ não nghiêm trọng [1], [2], [3]. Ghép tế bào gốc giúp cải thiện các chỉ số chức năng não bộ cũng như cho thấy tính an toàn của tế bào gốc tự thân. Kết quả cho thấy tế bào gốc có khả năng sửa chữa và thay thế các tế bào thần kinh bị tổn thương, đồng thời điều hòa giảm các đáp ứng viêm trong giai đoạn chấn thương cấp tính [4], [5], [6].

Vì vậy, chúng tôi tiến hành ghép tế bào gốc tự thân trên ba bệnh nhân chấn thương sọ não cấp tính nhằm đánh giá hiệu quả lâm sàng của liệu pháp này.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Ba bệnh nhân nam thử nghiệm ghép tế bào gốc, tuổi từ 23 - 49 tuổi, cân nặng 45-55kg, nhập viện trong tình trạng hôn mê.

- Nhóm đối chứng gồm 4 bệnh nhân nam, tuổi từ 16-60, cân nặng từ 45-55kg, nhập viện trong tình trạng hôn mê.

Các bệnh nhân được lựa chọn gồm những tiêu chí tương đồng: Chấn thương sọ não cấp tính, có máu tụ dưới màng não, xuất huyết não, chỉ số

Barthel (BI) nhỏ hơn 40, chỉ số Glasgow 6-8, được sự đồng thuận từ gia đình có nguyện vọng tham gia vào nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu tiền cứu có đối chứng

2.2.2. Quy trình nghiên cứu

- Thu nhận 200 - 250ml dịch tủy xương. Phân lập tế bào đơn nhân. Truyền tĩnh mạch 5-6 x 10⁶ tế bào đơn nhân.

- Nuôi tăng sinh tế bào gốc trung mô. Đánh giá chất lượng tế bào. Truyền tĩnh mạch 3-6 x 10⁶ tế bào gốc trung mô.

2.2.3. Phương pháp thực hiện

- *Thu nhận tủy xương:* Thu tủy xương được tiến hành trong điều kiện vô trùng. Tủy xương được chọc hút từ hai gai chậu trước trên, thể tích 200 - 250ml.

- *Phân lập tế bào đơn nhân*

+ Tế bào đơn nhân được thu nhận bằng phương pháp ly tâm theo gradient tỷ trọng với Ficoll-Paque Plus 1.077g/mL (Miltenyi Biotec Inc.).

+ Dịch tủy được pha loãng với PBS (Miltenyi Biotec Inc.) và lọc với màng lọc 100µm nhằm loại mảnh xương. Cho dịch tủy đã pha loãng lên trên lớp Ficoll-Paque, ly tâm tốc độ 400g trong 20 phút ở nhiệt độ phòng, thu vòng đơn nhân. Tế bào đơn nhân được rửa với PBS và ly tâm thu tế bào.

+ Pha loãng tế bào với dung dịch nước muối sinh lý, nhuộm đếm tế bào và kiểm tra chất lượng tế bào trước khi ghép.

- *Nuôi cấy tế bào gốc trung mô*

Tế bào thu được sau khi ly tâm với Ficoll-Paque

Điều trị chấn thương sọ não cấp tính bằng ghép tế bào gốc...

được nuôi tăng sinh trong chai T-flask với mật độ 5×10^4 tế bào/cm² ở điều kiện nhiệt độ 37°C, 5% CO₂, độ ẩm 95%. Sau 24-36 giờ đầu tiên, tế bào không bám dính được loại bỏ. Các tế bào bám dính phát triển thành các cụm tế bào trong 3-7 ngày. Khi mật độ tế bào đạt 80-90% diện tích, tế bào được tách với Trypsin/EDTA 0.25% (Miltenyi Biotec Inc.) và rửa sạch ba lần bằng PBS.

- *Tiêu chí đảm bảo cho tế bào ghép*

+ Nồng độ nội độc tố endotoxin < 5.0 EU/ml; âm tính với nhuộm Gram và các vi sinh vật khác; tỉ lệ tế bào sống > 85% khi nhuộm với Trypan Blue.

+ Đảm bảo một số kiểm tra chất lượng khác như: kiểm tra mycoplasma, khả năng tạo cụm CFU-F, phân tích dòng chảy tế bào.

* Nuôi cấy tạo cụm CFU-F:

Tế bào trước khi nuôi cấy tế bào gốc trung mô hoặc ghép được kiểm tra khả năng tạo cụm CFU-F bằng cách nuôi cấy trong chai T-flask 25 với mật độ 3×10^4 tế bào/cm² (nhiệt độ 37°C, 5% CO₂, độ ẩm 95%). Sau 10-14 ngày quan sát các cụm tế bào và nhuộm với Giemsa, cụm CFU-F được xác định là cụm có đường kính khoảng 1-8mm với hơn 30 tế bào.

* Xác định dấu ấn miễn dịch màng tế bào trên máy đếm Flow cytometry

Để đánh giá chất lượng tế bào, tiến hành kiểm tra các marker bề mặt bằng máy FACS Canto II. Tế bào đơn nhân được nhuộm với các kháng thể đơn dòng: CD34 và CD45. Tế bào gốc trung mô sau nuôi cấy được nhuộm với các kháng thể đơn dòng: CD45 (âm tính), CD73, CD90, và CD105 (dương tính).

- Quy trình ghép tế bào

Các tế bào đảm bảo sau khi kiểm tra chất lượng được ghép vào bệnh nhân bằng phương pháp tiêm tĩnh mạch. Tiến hành ghép tế bào đơn nhân lần 1 từ 2-3 giờ sau khi chọc tủy. Sau 9-10 ngày, ghép lần 2 với tế bào gốc trung mô. Trước khi ghép, dịch tế bào được heparin hóa để tránh các cục máu đông.

- Đánh giá chỉ số BI và Glasgow

Chỉ số Barthel (BI-Barthel Index) được sử dụng để đánh giá mức độ nghiêm trọng của thần kinh.

BI được sử dụng như một chỉ số độc lập đơn giản nhằm đánh giá chỉ số chức năng của bệnh nhân mắc chứng rối loạn thần kinh cơ hoặc cơ xương khớp từ đó đánh giá sự cải thiện của bệnh nhân. Chỉ số BI được xác định tại thời điểm bệnh nhân nhập viện và trong thời gian theo dõi 4 tuần sau ghép tế bào.

Thang điểm hôn mê Glasgow (Glasgow Coma Scale) là một phương pháp đánh giá tình trạng ý thức của người bệnh một cách lượng hóa. Được thiết lập để đánh giá độ hôn mê của nạn nhân bị chấn thương đầu. Thang điểm có 3 yếu tố, gồm các đáp ứng bằng mắt, lời nói và vận động. Điểm chi tiết cũng như tổng số điểm của ba loại đáp ứng đều được theo dõi. Tổng điểm GCS thấp nhất là 3 (hôn mê sâu hoặc chết), và cao nhất là 15 (người hoàn toàn tỉnh và đang thức).

Mức độ hôn mê được đánh giá là: Nặng khi GCS ≤ 8, trung bình với GCS từ 9 đến 12, nhẹ khi GCS ≥ 13.

- Đánh giá chỉ số huyết học, gan, thận

Theo dõi hàng ngày creatinine và urê máu để đánh giá chức năng thận, các men gan (AST và ALT) để đánh giá chỉ số tổn thương gan hoặc độc tính do tế bào.

Chỉ số huyết học (hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, nồng độ hemoglobin) cũng được theo dõi hàng ngày.

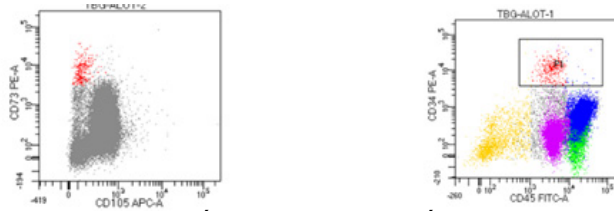
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Chất lượng và liệu tế bào ghép

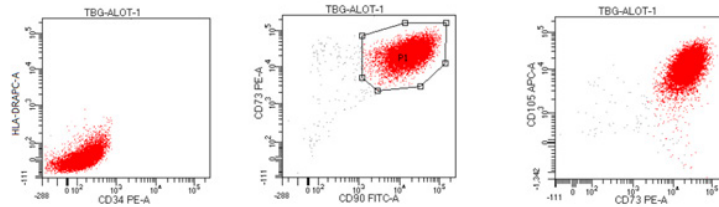
Do đòi hỏi tính khẩn trương kịp thời cấp tính trong thời gian 2-3 giờ sau chấn thương cấp tính nên bệnh nhân sẽ được ghép lần thứ nhất $5-6 \times 10^6$ tế bào đơn nhân/kg cân nặng. Sau đó, ghép $3-6 \times 10^6$ tế bào gốc trung mô lần thứ hai. Với một khoảng thời gian phục hồi tùy vào từng tình trạng mỗi bệnh nhân, sự mất cân bằng tế bào được cung cấp đầy đủ tới các vùng bị tổn thương, dần dần tái lập lại sự quân bình cho vi môi trường bị thương tổn.

Tế bào đơn nhân kiểm tra FACS cho kết quả dương tính với CD34. Tế bào gốc trung mô cho kết quả dương tính với CD73, CD90, CD105 (dương tính khoảng 98%).

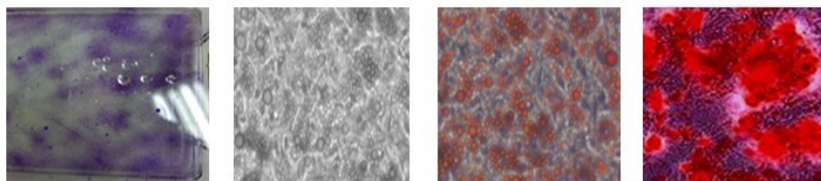
A. Hình ảnh kết quả chạy FACS tế bào đơn nhân thu từ tủy xương



B. Hình ảnh kết quả chạy FACS tế bào sau nuôi cấy



Hình 1. Kết quả chạy FACS tế bào: A. Tế bào đơn nhân thu từ tủy xương, B. Tế bào gốc trung mô.



Hình 2. Cụm CFU-F. Biệt hóa thành tế bào sụn, mỡ và xương

3.2. Chỉ số huyết học, gan và thận

Gan: Không có dấu hiệu tổn thương tế bào gan, các chỉ số men gan ổn định và không thay đổi đáng kể.

Thận: Không có bệnh nhân bị suy thận hoặc cần chạy thận. Nồng độ Creatinine trong huyết thanh không thay đổi đáng kể.

Huyết học: Không có sự thay đổi các chỉ số huyết học như hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, tỉ lệ

hemoglobin trong máu.

Không có hiện tượng sốc phản vệ hay các biến chứng bất thường trong quá trình thu nhận tủy xương cũng như theo dõi sau 4-6 tuần ghép tế bào.

Theo dõi bệnh nhân sau 2 tháng ghép tế bào, các kết quả xét nghiệm không thấy bất kỳ thay đổi nào về chỉ số men gan, thận.

3.3. Chỉ số BI và chỉ số Glasgow

Bảng 1. Chỉ số Barthel (BI) và chỉ số Glasgow của bệnh nhân ghép tế bào gốc trước và sau khi điều trị so với nhóm đối chứng

Giới tính	Tuổi	Ghép tế bào gốc	Chỉ số BI		Chỉ số Glasgow	
			Ban đầu	Sau 4 tuần	Ban đầu	Sau 4 tuần
Nam	23	Có	29	78	8	13
Nam	49	Có	25	80	6	14
Nam	27	Có	29	80	6	14
Nam	54	Không	27	43	6	9
Nam	16	Không	28	45	6	10
Nam	49	Không	22	45	8	10
Nam	60	Không	29	43	6	9

Chỉ số BI ban đầu của ba bệnh nhân ghép tế bào tương ứng là 29, 25 và 29, chỉ số Glasgow tương ứng 8, 6 và 6. Sau ghép tế bào 4 tuần cho thấy sự cải thiện về cả chỉ số BI cũng như chỉ số Glasgow. Chỉ số BI tăng lên 78, 80 và 80, chỉ số Glasgow tăng lên 13, 14 và 14. Kết quả thể hiện ở bảng 1 so với nhóm bệnh nhân đối chứng.

IV. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi kết hợp ghép tế bào đơn nhân và tế bào gốc trung mô bằng đường tĩnh mạch, kết quả cho thấy sự an toàn và hiệu quả tích cực sau 4 tuần ghép tế bào ở bệnh nhân chấn thương sọ não cấp tính. Bằng chứng là không có bất cứ dấu hiệu cho thấy tổn hại đến các cơ quan như gan, thận, hệ tuần hoàn, trong khi đó các chỉ số chức năng não bộ liên quan như BI và Glasgow đã được cải thiện rất đáng kể. Các bệnh nhân đều hồi phục các chức năng và xuất viện sau 4-6 tuần ghép tế bào gốc điều này có thể lý giải do sự phối hợp đồng bộ giữa các yếu tố tác động như thời điểm ghép phù hợp với hoạt động của từng loại tế bào, liều ghép và cách ghép tế bào.

Một vài nghiên cứu liên quan đến các đáp ứng viêm của bệnh nhân chấn thương sọ não cấp tính cho thấy rằng các phản ứng viêm ở vị trí vết thương liên quan đến sự tăng lên nhanh chóng các cytokine tiền viêm ở vùng thương tổn và các vùng xung quanh [7], [8]. Thông thường, việc đáp ứng tiết các cytokine sẽ giảm dần trong vòng 72 giờ sau chấn thương, nhưng đối với bệnh phù não hay chấn thương não thì lại đạt đỉnh trong quá trình viêm sớm. Do đó, cho thấy thời gian ghép tế bào, đồng thời vi môi trường của tế bào ghép có thể ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả của liệu pháp điều trị. Các yếu tố này cũng được đề cập đến trong các nghiên cứu của Cabonara về khả năng trị liệu của tế bào gốc trung mô trong việc bảo vệ neuron trong chấn thương sọ não cấp tính [9]. Vì vậy, chúng tôi đã hoàn tất quy trình nhanh nhất trong lần ghép tế bào 2-3 giờ ngay sau khi bệnh nhân chấn thương với một liều lượng vừa đủ nhằm đưa vào các tế bào

gốc có khả năng điều hòa giảm các lượng cytokine viêm và tăng các cytokine kháng viêm trong giai đoạn viêm của tế bào.

Một số nghiên cứu khác đã chứng minh rằng tế bào gốc có khả năng tiết ra các paracrine gồm các nhân tố tăng trưởng và các cytokine kháng viêm giúp bảo vệ các tế bào ở vùng tổn thương, ngoài ra việc tiêm tế bào theo đường tĩnh mạch cũng làm giảm các đáp ứng miễn dịch ở vị trí vết thương, từ đó các mô tổn thương có thể được bảo vệ và hồi phục chức năng nhanh chóng hơn [10], [11], [12].

Việc ghép tế bào gốc trung mô, chúng tôi sử dụng những tiềm năng của tế bào này như khả năng homing đến vị trí vết thương, khả năng điều hòa miễn dịch và khả năng chuyển biệt hóa thành tế bào thần kinh, chủ yếu bởi các yếu tố cận tiết [13]. Từ đó, cho thấy tác động đặc trưng của tế bào gốc trung mô vào việc di chuyển và homing tại vị trí tổn thương. Kết quả được chứng minh trên các bệnh nhân trong nghiên cứu này khi ghép tế bào gốc trung mô sau 7-10 ngày đã có những tiến triển tích cực. Có thể giải thích rằng việc ghép tế bào gốc trung mô đã làm giảm sự biểu hiện IFN- γ và TNF- α đồng thời hạn chế phù não, kích hoạt vi môi trường, nồng độ norepinephrine và tăng cường tái tạo neuron [13]. Các tế bào gốc trung mô dưới sự tác động của các yếu tố cytokine có khả năng homing đến các vị trí tổn thương ở não. Tại đây, tế bào tham gia điều hòa các đáp ứng miễn dịch, tăng khả năng chuyển biệt hóa từ tế bào gốc trung mô thành các tế bào đệm thần kinh hay các tế bào neuron dưới sự tác động của vi môi trường tại não giúp thay thế các tế bào đệm bị tổn thương, hỗ trợ hồi phục lại chức năng mô não.

V. KẾT LUẬN

- Liều ghép 5-6 x10⁶ tế bào đơn nhân/kg cân nặng và 3-6x10⁶ tế bào gốc trung mô/kg cân nặng là an toàn và có tác dụng tích cực trong điều trị chấn thương sọ não cấp tính.

- Không phát hiện các biến chứng bất thường trong vòng 4-6 tuần kể từ khi điều trị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Peng W, Sun J, Sheng C, Wang Z, Wang Y, Zhang C, et al. Systematic review and meta-analysis of efficacy of mesenchymal stem cells on locomotor recovery in animal models of traumatic brain injury. *Stem Cell Res Ther.* (2015) 6:47. doi: 10.1186/s13287-015-0034-0.
2. Hasan A, Deeb G, Rahal R, Atwi K, Mondello S, Marei HE, et al. Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic brain injury. *Front Neurol.* (2017) 8:28. doi: 10.3389/fneur.2017.00028
3. Dekmak A, Mantash S, Shaito A, Toutonji A, Ramadan N, Ghazale H, et al. Stem cells and combination therapy for the treatment of traumatic brain injury. *Behav Brain Res.* (2018) 340:49–62. doi: 10.1016/j.bbr.2016.12.039.
4. Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in adult rat with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* 2003;53:679-703.
5. Mahmood A, Lu D, Qu C et al. Human marrow stromal cell treatment provides long-lasting benefit after traumatic brain injury in rats. *Neurosurgery* 2005;57:102631.
6. Lu D, Mahmood A, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M. Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. *Neuroreport.* 2001;12(3):559-563.
7. Harting MT, Jimenez F, Adams SD, Mercer DW, Cox CS Jr. Acute, regional inflammatory response after traumatic brain injury: Implications for cellular therapy. *Surgery.* 2008;144(5):803-813.
8. Israelsson C, Bengtsson H, Kylberg A, et al. Distinct cellular patterns of upregulated chemokine expression supporting a prominent inflammatory role in traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2008;25(8):959-974.
9. Carbonara M, Fossi F, Zoerle T, et al. Neuroprotection in Traumatic Brain Injury: Mesenchymal Stromal Cells can Potentially Overcome Some Limitations of Previous Clinical Trials. *Front Neurol.* 2018;9:885. Published 2018 Oct 24. doi:10.3389/fneur.2018.00885.
10. Chopp M, Li Y, Zhang ZG. Mechanisms underlying improved recovery of neurological function after stroke in the rodent after treatment with neurorestorative cell-based therapies. *Stroke.* 2009;40(3 suppl):S143-S145.
11. Ohtaki H, Ylostalo JH, Foraker JE, et al. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses.
12. Lee ST, Chu K, Jung KH, et al. Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in haemorrhagic stroke. *Brain.* 2008;131(Pt 3): 616-629.
13. Soumya Pati, Sangu Muthuraju, Raisah Ab. Hadi, Tee Jong Huat, Shailja Singh, Mirjana Maletic-Savatic, Jafri Malin Abdullah and Hassan Jaafar, “Neurogenic plasticity of mesenchymal stem cell, an alluring cellular replacement for traumatic brain injury”, *Current Stem Cell Research & Therapy* (2016) 11: 149.
14. Li L, Jiang Q, Qu CS, Ding GL, Li QJ, Wang SY, et al. Transplantation of marrow stromal cells restores cerebral blood flow and reduces cerebral atrophy in rats with traumatic brain injury: in vivo MRI study. *J Neurotrauma* (2011) 28:535–45. doi: 10.1089/neu.2010.1619.