

Tối ưu hoá quy trình đánh giá tổn thương sụn bằng mô bệnh học

Đặng Văn Huy^{1,2}, Nguyễn Thế Hoàng², Ngô Thị Minh Hạnh³, Nguyễn Thị Ngọc Ánh³, Phạm Công Nguyễn^{4,5}, Nguyễn Hải Anh^{4,5}, Lê Hữu Phương Anh^{4,5}, Nguyễn Đức Lương⁴, Nguyễn Kim Anh^{4,5}, Nguyễn Ngọc Mai^{4,5}, Đào Huy Hoàng⁴, Nguyễn Hữu Giáp⁶, Ngô Thu Hường⁷, Trương Văn Hà⁷, Trần Thị Huyền Trang^{4,5*}

¹Khoa Chấn thương Chỉnh hình, Bệnh viện Quân y 110, 7 Trần Lưu, phường Thị Cầu, TP Bắc Ninh, tỉnh Bắc Ninh, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Khoa học Y Dược Lâm sàng 108, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, 1 Trần Hưng Đạo, phường Bạch Đằng, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

³Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, 1 Trần Hưng Đạo, phường Bạch Đằng, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

⁴Trung tâm Nghiên cứu Ứng dụng Tế bào gốc, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, 1 Trần Hưng Đạo, phường Bạch Đằng, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

⁵Trung tâm Nghiên cứu Y học Việt Đức, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, 1 Trần Hưng Đạo, phường Bạch Đằng, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

⁶Khoa X-quang chẩn đoán, Trung tâm Chẩn đoán hình ảnh, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108,

1 Trần Hưng Đạo, phường Bạch Đằng, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

⁷Khoa Phẫu thuật khớp, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, 1 Trần Hưng Đạo, phường Bạch Đằng, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 24/10/2023; ngày chuyển phản biện 26/10/2023; ngày nhận phản biện 21/11/2023; ngày chấp nhận đăng 23/11/2023

Tóm tắt:

Tổn thương sụn khớp do thoái hóa hoặc chấn thương, nếu không được phát hiện sớm và điều trị kịp thời sẽ dẫn đến đẩy nhanh quá trình thoái hóa khớp, ảnh hưởng đến chức năng của khớp. Do tính chất vô mạch, thần kinh của mô sụn, việc sửa chữa hoàn toàn sụn hyaline vẫn đang là một thách thức lớn với các nhà nghiên cứu. Bên cạnh đó, việc đánh giá mức độ tổn thương cũng như hiệu quả của các phương pháp điều trị đối với tổn thương sụn cũng rất quan trọng. Mặc dù có nhiều phương pháp theo dõi dọc không xâm lấn như siêu âm và cộng hưởng từ nhưng mô bệnh học vẫn là “tiêu chuẩn vàng” để phân tích đánh giá chất lượng sụn khớp. Tuy nhiên cho đến nay, tại Việt Nam việc nghiên cứu mô bệnh sụn vẫn chưa được tiến hành thường quy. Nghiên cứu này nhằm xây dựng quy trình đánh giá mô bệnh tổn thương sụn khớp cả trên người và trên động vật thực nghiệm hiệu quả, dễ triển khai và đáng tin cậy.

Từ khóa: Safranin O, tái tạo sụn, tổn thương sụn.

Chỉ số phân loại: 3.2

An optimised procedure for histological assessment of cartilage damage

Van Huy Dang^{1,2}, The Hoang Nguyen², Thi Minh Hanh Ngo³, Thi Ngoc Anh Nguyen³, Cong Nguyen Pham^{4,5}, Hai Anh Nguyen^{4,5}, Huu Phuong Anh Le^{4,5}, Duc Luong Nguyen⁴, Kim Anh Nguyen^{4,5}, Ngoc Mai Nguyen^{4,5}, Huy Hoang Dao⁴, Huu Giap Nguyen⁶, Thu Huong Ngo⁷, Van Ha Truong⁷, Thi Huyen Trang Tran^{4,5*}

¹Department of Traumatology and Orthopaedics, 110 Military Hospital, 7 Tran Luu Street, Thi Cau Ward, Bac Ninh City, Bac Ninh Province, Vietnam

²108 Institute of Clinical Medicine and Pharmacy, 108 Military Central Hospital, 1 Tran Hung Dao Street, Bach Dang Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

³Department of Pathology, 108 Military Central Hospital, 1 Tran Hung Dao Street, Bach Dang Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

⁴Center of Stem Cell Research and Application, 108 Military Central Hospital, 1 Tran Hung Dao Street, Bach Dang Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

⁵The Vietnamese-German Center for Medical Research, 108 Military Central Hospital, 1 Tran Hung Dao Street, Bach Dang Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

⁶Department of Diagnostic X-Ray, Department of Diagnostic Imaging, 108 Military Central Hospital,

1 Tran Hung Dao Street, Bach Dang Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

⁷Department of Arthroplasty, 108 Military Central Hospital, 1 Tran Hung Dao Street, Bach Dang Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

Received 24 October 2023; revised 21 November 2023; accepted 23 November 2023

Abstract:

Cartilage damage caused by degeneration or injury can accelerate joint deterioration, leading to impaired joint function if it is not detected and treated in time. Due to the avascular and nerveless nature of cartilage tissue, fully repairing hyaline cartilage remains a challenge for researchers. Besides, assessing the severity of damage and the effectiveness of treatment for cartilage damage is very important. Although various non-invasive longitudinal monitoring methods, such as ultrasound and magnetic resonance imaging, histopathology remains the “gold standard” for assessing joint cartilage quality. However, research on cartilage histopathology in Vietnam is still not yet widely conducted. This research aims to establish an efficient, feasible, and reliable evaluation process for cartilage histopathology in humans and experimental animals.

Keywords: cartilage damage, repaired cartilage, Safranin O.

Classification number: 3.2

*Tác giả liên hệ: Email: vythutrang83@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Tổn thương sụn khớp sau chấn thương và thoái hóa khớp ảnh hưởng đến chất lượng cuộc sống của hơn 300 triệu người trên toàn thế giới, gây ra những gánh nặng đáng kể đối với cá nhân người bệnh và nền kinh tế xã hội [1]. Tổn thương sụn thường gặp ở người lớn tuổi do quá trình thoái hóa khớp gây ra. Tuy nhiên những báo cáo gần đây cho thấy tình trạng tổn thương sụn đang ngày càng trẻ hóa xuất phát từ các tổn thương cấp tính do chấn thương, nếu không được điều trị kịp thời sẽ đẩy nhanh quá trình thoái hóa khớp, gây mất sụn lan tỏa trên diện rộng [2]. Các biện pháp can thiệp sửa chữa sụn sau tổn thương ở giai đoạn sớm là vô cùng cần thiết tuy nhiên do tính vô mạch, thần kinh của mô sụn, cấu trúc nền ngoại bào phức tạp và sự sao chép tế bào chondrocyte hạn chế nên chưa có liệu pháp sửa chữa sụn nào thực sự có hiệu quả [3-5]. Tế bào gốc trung mô (Mesenchymal stem cell - MSC) với khả năng tự đổi mới, biệt hóa thành tế bào sụn, đồng thời có khả năng tiết ra các yếu tố điều hòa miễn dịch, chống viêm, tái tạo mạch máu, ngăn chặn sự chết tế bào. Do đó, liệu pháp MSC đang được đánh giá là một trong những liệu pháp tiềm năng đặc biệt trong điều trị tổn thương sụn. Hàng loạt nghiên cứu đã được tiến hành trên nhiều mô hình khác nhau, tuy nhiên kết quả đánh giá khả năng tái tạo sụn sau điều trị bằng liệu pháp MSC giữa các nghiên cứu còn chưa có tính thống nhất. Sự khác nhau trong lựa chọn phương pháp đánh giá khả năng tái tạo sụn là một trong những yếu tố dẫn đến sự thiếu thống nhất giữa các nghiên cứu. Có hai phương pháp đánh giá tình trạng tổn thương sụn cũng như khả năng tái tạo mô sụn đang được sử dụng hiện nay là xâm lấn và không xâm lấn.

Các phương pháp không xâm lấn như chụp X-quang thường quy, siêu âm, CT có giá trị trong chẩn đoán giai đoạn thoái hóa khớp, tuy vậy trong giai đoạn đầu của bệnh thì rất ít hoặc không có sự thay đổi rõ ràng tổn thương được ghi nhận trên X-quang. Chụp cộng từ rất có giá trị trong phân tích những tổn thương các thành phần của khớp như dây chằng, sụn chêm, bề mặt sụn khớp; tuy nhiên, quy trình phân tích đánh giá chất lượng sụn vẫn chưa thống nhất giữa các cơ sở chẩn đoán hình ảnh [6].

Phương pháp xâm lấn: Mở khớp quan sát đại thể hay qua nội soi khớp lấy mẫu sụn làm mô bệnh học vẫn được đánh giá là “tiêu chuẩn vàng” trong chẩn đoán tổn thương sụn khớp ngay từ giai đoạn sớm của bệnh. Là phương pháp hữu ích, dễ triển khai thực hiện ở các tuyến bệnh viện có khoa giải phẫu bệnh. Mặc dù vậy, việc chuẩn hóa quy trình mô học để phân tích tổn thương sụn khớp trên lâm sàng còn chưa được áp dụng thường quy tại Việt Nam. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mục đích thiết lập quy trình đánh giá mô bệnh học trong tổn thương sụn khớp trên người và động vật thực nghiệm.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

- Trên người, chúng tôi thu thập mẫu sụn lỗi cầu đùi cắt bỏ của bệnh nhân được thay khớp gối, bao gồm 2 khu vực trên quan sát đại thể: vùng sụn lành và vùng sụn thoái hóa.

- Trên động vật nghiên cứu là chó thực nghiệm, bao gồm mẫu sụn lỗi cầu đùi vùng chịu tải trọng của khớp gối trên chó khỏe mạnh bình thường và mẫu sụn thoái hóa 2-3 tháng sau khi tạo tổn thương khuyết sụn.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Quan sát đại thể mẫu sụn

Đánh dấu bằng mực đánh dấu mô (Tissue marking dye) trên bề mặt sụn nhằm đánh giá độ sâu mất sụn trong đánh giá đại thể. Mực đánh dấu bám dính vào sụn bị nứt, vỡ (các mảng đen) và do đó chúng ta có thể so sánh với sụn bình thường xung quanh. Đánh dấu bằng mực đánh dấu cũng giúp cho việc xác định mặt cắt đảm bảo lát cắt từ bề mặt sụn xuống xương dưới sụn. Bề mặt sụn được đánh dấu bằng mực trong tối thiểu 15 giây. Có thể dùng các màu mực khác nhau để đánh dấu các vùng khác nhau của mô sụn.

Phương pháp cố định và khử canxi mẫu sụn

Được sử dụng thường xuyên nhất để đánh giá mô học là cố định mẫu mô trong dung dịch formalin đậm trung tính 10%, khử canxi bằng các dung dịch khác nhau như axit ethylenediaminetetraacetic (EDTA) 10%, axit formic 5%, axit nitric 10-20%... sau đó chuyển vào quy trình vùi mô tẩm parafin thông thường. Để đẩy nhanh quá trình khử canxi ở các mẫu của các loài lớn hơn (chó, cừu, ngựa), có thể cắt/cưa mẫu thành các lát cắt dày 5 mm trước khi tiến hành khử canxi.

Mặc dù quá trình khử canxi bằng EDTA là tối ưu để bảo quản proteoglycan và được khuyến cáo dùng cho các mẫu cần thực hiện kỹ thuật lại tại chỗ, khử canxi bằng axit formic hoặc axit nitric có ưu điểm là rất nhanh. Có thể kiểm tra việc khử canxi đã hoàn thành hay chưa bằng cách nhiều cách như: thêm amoni oxalat vào một phần dung dịch khử canxi, nếu không còn tạo ra kết tủa canxi khi thêm thì đạt yêu cầu (phương pháp Rosen); dùng dao cắt qua được; dùng kim châm qua được; dùng tay kiểm tra thấy mẫu đã mềm... Sau khi xác nhận quá trình khử canxi đã hoàn tất, mô được rửa sạch axit dưới vòi nước chảy trong 5-10 phút, sau đó đưa lại vào dung dịch cố định NBF 10% chờ chuyển đúc mô bệnh học tẩm paraffin và tạo khối paraffin như thường quy.

Trong quy trình chúng tôi thực hiện, các mẫu mô sụn sau khi được lấy ra từ ổ khớp từ các vùng tổn thương khác nhau được cho ngay vào dung dịch NBF 10% để qua đêm. Ngày hôm sau, các mẫu được lấy ra và đánh dấu vùng lành, vùng tổn thương bằng mực đánh dấu mô. Vùng lành sẽ được đánh dấu màu vàng, vùng tổn thương được đánh dấu màu

đỏ. Tiếp đó, mẫu được chuyển vào cassette tương ứng đã có thông tin mã mẫu và tiến hành khử canxi bằng dung dịch axit nitric 10%. Sau 8 tiếng kiểm tra 1 lượt. Sau khi các vùng có xương đã được khử canxi hoàn toàn, mẫu được rửa sạch axit dưới vòi nước chảy 5 phút và chuyển lại vào dung dịch NBF 10% chờ xử lý tiếp như mẫu mô thường quy.

Phương pháp xử lý mô

Mẫu được xử lý bằng máy xử lý mô kín tự động VIP6 AI Sakura với chương trình chạy thường quy như ở bảng 1.

Bảng 1. Chương trình xử lý mô trên máy xử lý mô kín tự động VIP6 AI Sakura.

Chặng số	Tên hóa chất	Thời gian
1	NBF 10%	1 giờ 30 phút
2	NBF 10%	1 giờ 30 phút
3	Cồn 70°	1 giờ
4	Cồn 80°	1 giờ
5	Cồn 90°	1 giờ
6	Cồn tuyệt đối	1 giờ
7	Cồn tuyệt đối	1 giờ
8	Toluene 1	1 giờ 15 phút
9	Toluene 2	1 giờ 15 phút
10	Toluene 3	1 giờ 15 phút
11	Paraffin 1	1 giờ 15 phút
12	Paraffin 2	1 giờ
13	Paraffin 3	1 giờ
Tổng thời gian		15 giờ

Đúc khuôn và cắt mảnh mô

Sau khi quá trình xử lý mô trong máy xử lý mô kín tự động hoàn tất, lấy mẫu ra khỏi máy, tiến hành đúc tạo khối (block) paraffin. Trước khi đúc block, để phục vụ đánh giá tổn thương sụn cũng như sự phục hồi sụn sau điều trị, tiến hành cắt để có mặt cắt đứng dọc (sagittal) từ bề mặt sụn tới xương dưới sụn trong đó bề mặt đã được đánh dấu bằng mực đánh dấu mô. Các lát cắt được đặt vào khuôn đúng chiều sao cho khi cắt lấy được toàn bộ mặt cắt đứng dọc như trên.

Block paraffin được đem ra cắt mảnh bằng máy cắt dọc quay tay HMS325 - Microm với độ dày lát cắt 3 µm như nhau giữa các lát cắt.

Nhuộm Hematoxylin - Eosin (HE)

Hóa chất: Dung dịch Erythrosin B 1%: Erythrosin B (Sigma): 10 g, nước cất: 1000 ml. Dung dịch Hematoxylin Harris (Cancer Dianogtics).

Các bước tiến hành: Mẫu sau khi cắt và dần lam được đặt trong tủ ẩm 60°C trong vòng 1 giờ sau đó được tẩy paraffin trong 3 bể toluene, 5 phút/bể, sau đó loại toluene qua 3 bể cồn 100°; 90°; 70°, 3 phút/bể. Lam kính sau đó được rửa dưới vòi nước chảy 10 phút trước khi nhuộm nhân bằng dung dịch Hematoxylin 1-3 phút. Loại bỏ thuốc nhuộm còn

dư và làm xanh nhân bằng cách rửa dưới vòi nước ấm 35-40°C trong 5 phút. Kiểm tra màu của nhân qua kính hiển vi, nếu đậm có thể tẩy nhẹ bằng cồn - acid. Bào tương được nhuộm bằng dung dịch Erythrosin B 1% trong 2 phút, sau đó loại bỏ thuốc nhuộm thừa, tráng tiêu bản và loại nước trong mô bằng cách cho qua 3 bể cồn tuyệt đối. Kiểm tra lại màu bào tương qua kính hiển vi, nếu đậm có thể tráng thêm 2-3 lần, để lam khô tự nhiên và gắn lamên.

Nhận định kết quả: Toàn bộ chất nền sụn có màu hồng tím, phần xương dưới sụn có màu hồng đến đỏ, nhân màu xanh tím. Căn cứ vào ranh giới giữa các vùng để xác định độ dày của sụn.

Nhuộm hóa mô đánh giá hàm lượng proteoglycan

Safranin O: Safranin là thuốc nhuộm tích điện dương (cationic) được sử dụng khá phổ biến trong vi sinh giúp phân biệt các vi khuẩn Gram. Tính cationic của Safranin đã tạo ra liên kết với proteoglycan - một thành phần quan trọng của mô sụn có tính axit, nhờ đó có thể đánh giá được tính chất của mô sụn.

Chuẩn bị hóa chất: Hematoxylin Harris (Cancer Dianogtics); dung dịch Fast green (FCF) 0,001%; thuốc nhuộm phẩm Fast green, FCF: 0,01 g; nước cất: 1.000 ml; acid acetic 1%, glacial: 1 ml; nước cất: 99 ml; Safranin O 0,1%; Safranin O: 0,1 g; nước cất: 100 ml.

Các bước tiến hành: Tương tự như nhuộm HE, các mẫu sau khi cắt và dần lam được đặt sấy khô, tẩy paraffin bằng toluene, loại toluene bằng cồn như trên. Lam kính sau đó cũng được rửa dưới vòi nước chảy 10 phút trước khi nhuộm nhân bằng dung dịch Hematoxylin 1-2 phút. Loại bỏ thuốc nhuộm còn dư và làm xanh nhân bằng cách rửa nước chảy (nước ấm 35-40°C) 10 phút.

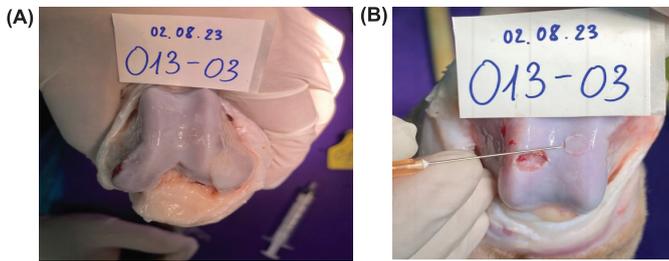
Tiếp tục nhuộm Light Green 5 phút sau đó lấy ra, thấm bớt dịch thừa và cho qua dung dịch axit acetic 1% trong 10 giây, lấy ra thấm bớt dịch thừa. Nhuộm bào tương bằng dung dịch Safranin O 0,1% trong 5 phút, thấm bớt dịch thừa và tráng qua bể cồn tuyệt đối. Kiểm tra lại màu bào tương qua kính hiển vi, nếu đậm có thể tráng thêm 2-3 lần, để lam khô tự nhiên và gắn lamên.

Nhận định kết quả: Toàn bộ chất nền sụn có màu cam đỏ chuyển dần sang màu xanh khi hàm lượng proteoglycan giảm dần, nhân tế bào màu xanh tím nhạt, bào tương có màu xanh xám, phần xương dưới sụn có màu hồng đến đỏ, nhân màu xanh lam. Căn cứ vào ranh giới giữa các vùng để xác định vùng tổn thương, vùng sụn lành vùng sụn tái tạo [7, 8].

3. Kết quả

3.1. Quan sát đại thể, lấy mẫu

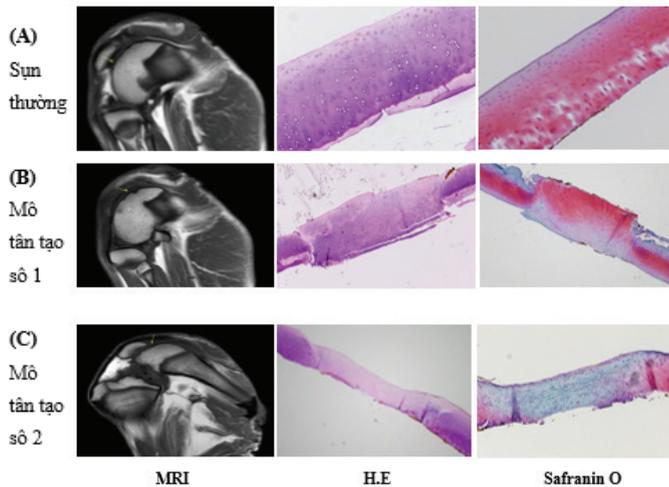
Các mẫu nghiên cứu được mở khớp quan sát đại thể và lấy mẫu sụn ở cả khu vực tổn thương, khu vực tân tạo và khu vực mô lành (hình 1).



Hình 1. Mở khớp quan sát đại thể (A), đánh giá vị trí tổn thương và lấy mẫu sụn làm mô bệnh học (B).

3.2. Kết quả đánh giá chất lượng sụn động vật thực nghiệm bằng nhuộm HE và Safranin O

Các cá thể thực nghiệm trước khi mở khớp lấy mẫu được chụp cộng hưởng từ 1.5T làm cơ sở hình ảnh tham chiếu với kết quả mô bệnh học. Dựa trên kết quả hình ảnh mô bệnh học, các cá thể nghiên cứu được chia làm 2 nhóm: sụn thường và có tổn thương khuyết sụn: mô tân tạo (hình 2).



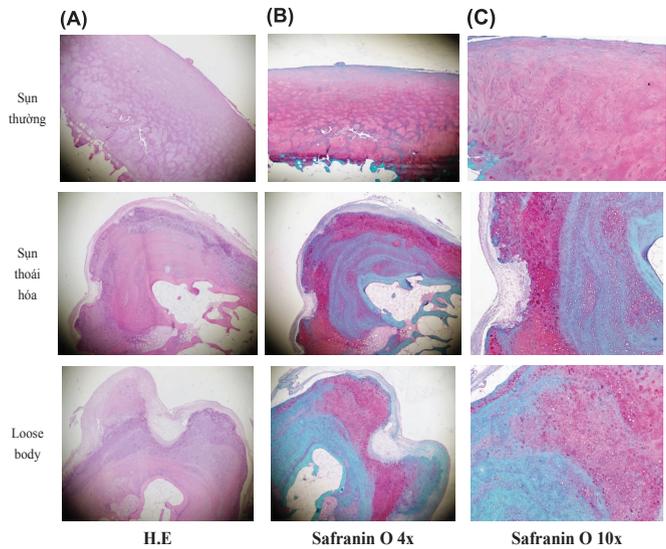
Hình 2. Hình ảnh cộng hưởng từ và kết quả nhuộm mô sụn lành và 2 mẫu mô tân tạo.

3.3. Kết quả phân tích mẫu sụn người bằng Safranin O

Mảnh sinh thiết sụn người được tiến hành nhuộm HE và Safranin O theo quy trình đã được tối ưu trên mẫu động vật. Các vùng lành, thoái hóa được ghi nhận đại thể trên phim chụp cộng hưởng từ. Hình ảnh được ghi nhận trên cả vùng lành (1), vùng thoái hóa (2) và thể loose body (3) (hình 3 và 4).



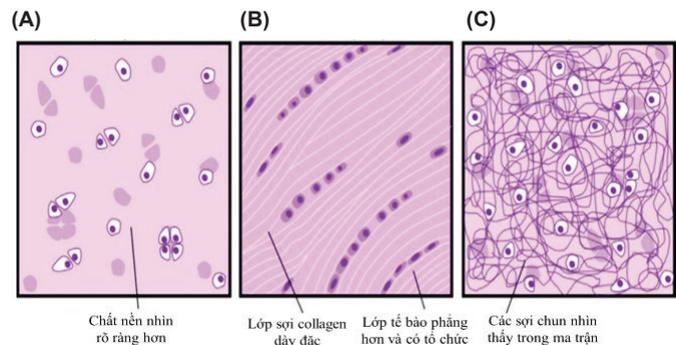
Hình 3. Chụp cộng hưởng từ khớp gối thoái hóa và các vị trí lấy mẫu sinh thiết.



Hình 4. Hình ảnh mô bệnh học trên mẫu sụn người lớn nhuộm HE/4x - nhuộm Safranin O/4x và 10x.

4. Bàn luận

Sụn là một loại mô liên kết, không có mạch máu và thần kinh, các tế bào sụn nằm rải rác và được cố định chắc chắn trong chất nền được tạo bởi các sợi collagen đàn hồi. Cấu trúc này khiến cho các tế bào sụn khó tiếp nhận nguồn dinh dưỡng dẫn đến khả năng tự sửa chữa tổn thương bị hạn chế. Proteoglycan là thành phần chính của chất nền sụn cùng với collagen và lipid. Tính chất của sụn được quyết định bởi sự có mặt cũng như mật độ của tế bào sụn cũng như các thành phần tham gia vào cấu trúc chất nền kể trên. Dựa vào đó mô sụn được phân làm ba loại: sụn hyaline, sụn sợi và sụn chun (elastic cartilage) (hình 5).



Hình 5. Cấu trúc các loại sụn. (A) Sụn hyaline, (B) Sụn sợi, (C) Sụn chun [9].

+ Sụn hyalin: là lớp sụn quan trọng và phổ biến nhất nằm trên bề mặt của mô sụn. Cấu trúc sụn hyaline tạo nên lớp bề mặt trơn nhẵn giúp giảm ma sát, hỗ trợ sự trơn trượt trong các chuyển động của khớp.

+ Sụn sợi là loại sụn cứng nhất, có nhiều sợi collagen, có tính bền và dẻo dai cao, được tìm thấy trong các đĩa đệm, sụn chêm khớp gối, khớp mu...

+ Sụn đàn hồi - sụn chun: có tính đàn hồi, màu vàng, được tìm thấy ở phần nâng đỡ bên trong của tai ngoài và trong nắp thanh quản.

Trong thực hành lâm sàng đối với tổn thương sụn khớp. Việc tái tạo hoàn toàn sụn hyaline đến nay vẫn là một thách thức. Do vậy, việc phân tích cấu trúc mô tái tạo là hết sức quan trọng đối với các nhà nghiên cứu. Tiêu chuẩn vàng cho việc đánh giá này là mô bệnh học. Phương pháp phân tích mô bệnh học bằng nhuộm HE được sử dụng rộng rãi hiện nay chỉ có thể cho phép phân tích cấu trúc phân bố của các lớp tế bào trong mô sụn mà không đánh giá được tính chất của các thành phần cấu tạo nên chất nền của mô sụn như collagen, proteoglycan.

Thuốc nhuộm safranin có liên kết ái lực với proteoglycan có tính axit và glycosaminoglycan trong chất nền mô sụn tạo thành màu hồng tím. Mật độ màu tương phản sự có mặt của proteoglycan trong chất nền mô sụn giúp đánh giá tính nguyên vẹn, bản chất của mô tái tạo tại các vị trí sau tổn thương là sụn hay tổ chức xơ sợi [10]. Như trong hình 2 trên mô hình động vật, hình ảnh mô tái tạo số 1 (hình 2B) cho thấy, mặc dù tại vị trí tổn thương đã có sự tân tạo mô mới nhưng hình ảnh nhuộm Safranin cho thấy, mức độ biểu hiện của proteoglycan trong lớp chất nền của mô tân tạo chưa được đồng đều như khu vực mô lành (hình 2A). Sự mất biểu hiện của proteoglycan trong lớp nền của mô sụn tái tạo được thể hiện rõ hơn trong hình 2C. Toàn bộ lớp mô tái tạo không bắt màu với Safranin cho thấy, mặc dù có sự lấp đầy tổ chức như hình ảnh nhuộm HE và quan sát trên MRI nhưng bản chất không có thành phần của proteoglycan nên đó chỉ là tổ chức xơ sợi.

Để thử nghiệm khả năng ứng dụng kỹ thuật đánh giá chất lượng sụn trên người bằng nhuộm Safranin, nhóm nghiên cứu tiến hành hành trên mẫu sụn phần khớp cắt bỏ của bệnh nhân thay khớp gối. Kết quả được thể hiện trên hình 3 cho thấy, chụp cộng hưởng từ cho phép quan sát các vị trí tổn thương; với kỹ thuật nhuộm HE mặc dù phân tích được cấu trúc các lớp, số lượng tế bào tại vị trí tổn thương (hình 4A), nhưng chỉ với nhuộm Safranin O (hình 4B, 4C), chúng ta mới có thể xác định được chính xác mức độ thoái hóa của sụn khớp dựa vào sự biểu hiện của thành phần proteoglycan

bắt màu đặc hiệu với thuốc nhuộm safranin, lớp bắt màu xanh thể hiện sự cốt hóa của mô sụn. Kết quả này cho thấy, kỹ thuật nhuộm Safranin O làm sáng tỏ hơn bản chất của các mô tại vị trí tổn thương, từ đó đánh giá chính xác hơn hiệu quả của các phương pháp can thiệp.

5. Kết luận

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, kỹ thuật đánh giá mô bằng nhuộm Safranin O là phương pháp có tính khả thi cao giúp việc đánh giá chất lượng sụn được toàn diện và chính xác hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Safiri, A.A. Kolahi, E. Smith, et al. (2020), "Global, regional and national burden of osteoarthritis 1990-2017: A systematic analysis of the global burden of disease study 2017", *Ann. Rheum. Dis.*, **79(6)**, pp.819-828, DOI: 10.1136/annrheumdis-2019-216515.
- [2] T.P. Liu, P. Ha, C.Y. Xiao, et al. (2022), "Updates on mesenchymal stem cell therapies for articular cartilage regeneration in large animal models", *Front Cell Dev. Biol.*, **10**, DOI: 10.3389/fcell.2022.982199.
- [3] W. Wei, H. Dai (2021), "Articular cartilage and osteochondral tissue engineering techniques: Recent advances and challenges", *Bioact. Mater.*, **6(12)**, pp.4830-4855, DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.05.011.
- [4] X. Yang, H. Li, Z. Yuan, et al. (2020), "Endogenous cell recruitment strategy for articular cartilage regeneration", *Acta Biomater.*, **114**, pp.31-52, DOI: 10.1016/j.actbio.2020.07.008.
- [5] E. Lee, I.E. Epanomeritakis, V. Lu, et al. (2023), "Bone marrow-derived mesenchymal stem cell implants for the treatment of focal chondral defects of the knee in animal models: A systematic review and meta-analysis", *Int. J. Mol. Sci.*, **24(4)**, DOI: 10.3390/ijms24043227.
- [6] A.J. Palmer, C.P. Brown, E.G. McNally, et al. (2013), "Non-invasive imaging of cartilage in early osteoarthritis", *Bone Joint J.*, **95-B(6)**, pp.738-746, DOI: 10.1302/0301-620X.95B6.31414.
- [7] N. Schmitz, S. Laverty, V.B. Kraus, et al. (2010), "Basic methods in histopathology of joint tissues", *Osteoarthritis Cartilage*, **18(3)**, pp.S113-S116, DOI: 10.1016/j.joca.2010.05.026.
- [8] C.D. Richardson, W.C. Bae, B. Fazeli, et al. (2001), "Quantitative characterization of osteoarthritis in the guinea pig", *47th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society*, <https://www.ors.org/transactions/47/0682.pdf>, accessed 20 August 2023.
- [9] M.A. Teixeira, M.T.P. Amorim, H.P. Felgueiras (2019), "Poly(vinyl alcohol)-based nanofibrous electrospun scaffolds for tissue engineering applications", *Polymers (Basel)*, **12(1)**, DOI: 10.3390/polym12010007.
- [10] G. Musumeci, P. Castrogiovanni, V. Mazzone, et al. (2014), "Histochemistry as a unique approach for investigating normal and osteoarthritic cartilage", *Eur. J. Histochem.*, **58(2)**, DOI: 10.4081/ejh.2014.2371.