

NỒNG ĐỘ 9 CYTOKIN TRONG DỊCH MÀNG PHỔI VÀ HUYẾT THANH BỆNH NHÂN LAO VÀ UNG THƯ

NGUYỄN THỊ BÍCH NGỌC, TRẦN THỊ DUNG,
Bệnh viện Lao và Bệnh phổi Trung ương
NGUYỄN XUÂN TRIỀU - Học viện Quân y

TÓM TẮT:

Trần dịch màng phổi do lao và ung thư đều được xếp vào nhóm TDMP tiết với đậm độ lymphocyte cao. 38 BN TDMP do lao dựa trên các kết quả mô học và VK và 26 BN TDMP do ung thư điều trị tại BV lao và BPTW từ 01/2007-8/2008 được đưa vào nghiên cứu. Tất cả DMP được định lượng nồng độ 9 cytokin. Kết quả nồng độ IFN γ tăng ở nhóm TDMP do lao và IL10 tăng trong DMP BN K. Nồng độ các cytokin trong DMP cao hơn trong huyết thanh. Các chỉ số Th1/Th2 lớn hơn ở DMP BN lao

Từ khóa: Trần dịch màng phổi

SUMMARY

We studied 64 patients with lymphocytic exudative pleural effusion between January 2007 and August 2008. 38 patients had tuberculous pleurisy, 26 patients had malignant pleuritis. Pleural fluid concentrations were measured 9 cytokines. The level of IFN γ in pleural fluid were significantly higher for tuberculous pleuritis than malignant pleuritis. The level of IL10 in pleural fluid were significantly higher for malignant pleuritis than tuberculous pleuritis. The level of 9 cytokines in TB pleural fluid were higher than serum. Ratio Th1/Th2 were large in TB pleuritis than malignant pleuritis.

Keywords: Pleural fluid

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cytokine là các protein có trong lượng phân tử thấp được bài tiết bởi các tế bào khi đáp ứng lại các tác nhân kích thích khác nhau. Cytokine đóng vai trò quan trọng của cơ thể trong việc đáp ứng lại nhiễm trùng, viêm, bệnh lý miễn dịch. Các tế bào tiết cytokine và cytokine được thấy trong DMP do K, lao, mũ màng phổi... TDMP do lao được xếp vào nhóm TDMP lymphocyte. Các tác giả cho rằng MD tại chỗ với sự tham gia chủ yếu của các cytokin, các tế bào tiết cytokin đã đóng vai trò hiệu quả trong việc bảo vệ và chiến đấu lại với VK lao. Nhiều nghiên cứu về thăng bằng Th1/Th2 nhận định rằng miễn dịch trong bệnh lao nghiêng về hướng Th1

Chúng tôi tiến hành nghiên cứu đánh giá nồng độ các cytokin trong DMP, huyết thanh bệnh nhân lao và ung thư. Bước đầu nhận định cân bằng Th1/Th2 ở BN TDMP do lao.

ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- 38 bệnh nhân TDMP do lao có bằng chứng về

mô bệnh, vi khuẩn học (MGIT, PCR dương tính), tuổi từ 20-80

- 26 bệnh nhân TDMP do ung thư có bằng chứng mô bệnh, tế bào

Qui trình xét nghiệm TNF α và IFN γ trong dịch màng phổi

Tất cả các bệnh nhân khi có đủ bằng chứng vi khuẩn hoặc mô bệnh, tế bào được chọc hút dịch. Lấy 4ml, quay li tâm, loại bỏ cặn tế bào. Các mẫu bệnh phẩm dịch màng phổi được bảo quản ở nhiệt độ -70oC cho đến khi xét nghiệm.

Xét nghiệm cytokin dịch màng phổi được chạy trên dây chuyền Bio-Plex do hãng Bio-Rad cung cấp. Các hoá chất và sinh phẩm là đồng bộ do hãng cung cấp.

Nguyên lý phản ứng phát hiện cytokin

Cytokine được phát hiện bằng phản ứng miễn dịch huỳnh quang kiểu "Sandwich" trên bề mặt các vi hạt nhựa. Các phân tử kháng thể đơn clon đặc hiệu với một quyết định kháng nguyên của phân tử cytokine được gắn sẵn trên bề mặt của các vi hạt nhựa. Khi ủ mẫu xét nghiệm với hạt vi nhựa đã gắn kháng thể, các phân tử cytokine sẽ bị kháng thể đặc hiệu bắt giữ và bám vào bề mặt hạt. Sau đó đưa thêm một kháng thể đơn clon thứ hai đặc hiệu với một quyết định kháng nguyên khác của cytokine đã gắn biotin thêm vào. Phản ứng kháng nguyên kháng thể tạo thành phức hợp miễn dịch gồm phân tử cytokine kẹp giữa hai kháng thể đơn clon "Sandwich". Cuối cùng đưa thêm phức hợp streptavidin-PE, phức hợp này sẽ gắn vào phân tử biotin. Dưới tác động của tia laser bước sóng tử ngoại PE sẽ phát ra ánh sáng huỳnh quang chứng tỏ sự có mặt của cytokine trong mẫu xét nghiệm. Lượng PE gắn vào tỷ lệ thuận với lượng kháng thể thứ hai hay lượng cytokine có trên bề mặt hạt nhựa. Dựa vào mật độ huỳnh quang phát ra từ các hạt được ủ với những nồng độ cytokine đã biết cho phép định lượng được cytokine. Kỹ thuật này gọi là kỹ thuật định lượng flow cytometry-assisted immunoassay.

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu thập được mã hoá và nhập bằng phần mềm EPI6.04. Sử dụng phần mềm STATA 7 phân tích số liệu dựa trên các nguyên lý thống kê y học.

Địa điểm nghiên cứu: tiến hành tại bệnh viện lao và bệnh phổi trung ương và bệnh viện 103 từ 1/2007-8/2008.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Bảng 1: Nồng độ các cytokine trong dịch màng phổi ở BN lao và ung thư

	DMP lao		DMP K		P
	X	SD	X	SD	
IL2	16,97	70,55	0,86	2,97	>0,05
IL4	0,76	3,72	0,12	0,58	>0,05
IL5	33,74	132,38	97,14	312,01	>0,05
IL10	7,41	8,69	18,36	26,37	<0,05
IL12	0,63	1,87	0,11	0,01	>0,05
IL13	14,43	24,49	11,08	40,97	>0,05
GM-CSF	32,83	156,38	0,86	3,08	>0,05
IFN γ	1060,61	1216,04	26,89	98,52	<0,001
TNF α	135,28	568,78	12,54	38,70	>0,05

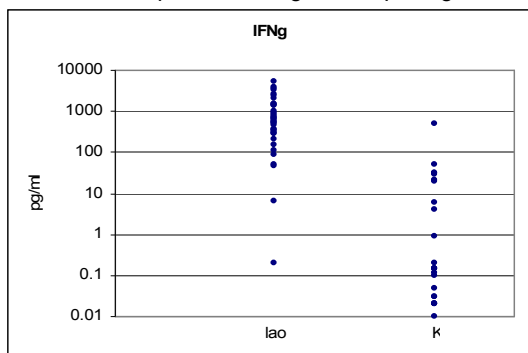
Nồng độ IFN γ trong dịch màng phổi BN lao cao hơn hẳn các cytokine khác và cao hơn rất nhiều so với DMP BN ung thư. Các cytokine nhóm Th1 khác IL2, IL12 cao hơn ở nhóm lao so với nhóm ung thư, nhưng sự khác biệt là không có ý nghĩa. Nồng độ TNF α trong DMP bệnh nhân lao cao hơn bệnh nhân ung thư, nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Nồng độ trung bình các cytokin thuộc nhóm Th1: IL2, IL12, IFN γ , TNF α cao hơn ở DMP bệnh nhân lao. Ngược lại IL5, IL10 thuộc nhóm Th2 có nồng độ trung bình cao hơn trong DMP bệnh nhân ung thư.

Bảng 2: So sánh nồng độ các cytokin trong DMP và huyết thanh

	DMP lao		HT lao		P
	X	SD	X	SD	
IL2	16,97	70,55	3,51	11,77	>0,05
IL4	0,76	3,72	0,58	1,94	>0,05
IL5	33,74	132,38	2,86	8,40	>0,05
IL10	7,41	8,69	1,57	2,24	<0,001
IL12	0,63	1,87	0,84	2,78	>0,05
IL13	14,43	24,49	2,44	8,06	<0,01
GM-CSF	32,83	156,38	13,85	42,50	>0,05
IFN γ	1060,61	1216,04	167,77	659,76	<0,001
TNF α	135,28	568,78	23,22	62,42	>0,05

Nồng độ cytokine trong dịch và máu cơ thể thấp. Khoảng nồng độ phân tán rộng, ít tập trung, thể hiện sự phản ứng khác nhau của các cá thể. Nồng độ cytokin trong DMP cao hơn trong huyết thanh. Sự khác biệt có ý nghĩa gặp ở IL10, IL13, IFN γ .

Hình 1: Sự phân bố nồng độ IFN γ trong DMP



Hình 1 thể hiện sự tập trung về hai cực ở hai nhóm. Hầu hết các BN TDMP do lao đạt giá trị từ 100pg/ml, số liệu tập trung chủ yếu khoảng 1000pg/ml. Trong khi đó nhóm TDMP do ung thư chỉ có 1 BN vượt ngưỡng 100pg/ml. Các bệnh nhân ung thư nồng độ IFN γ thấp, chủ yếu tập trung ở mức xấp xỉ 0.1pg/ml hoặc thấp hơn. Qua biểu đồ thấy rõ sự phân cực về nồng độ giữa hai nhóm.

Bảng 3: Tỷ số Th1/Th

Chỉ số	DMP lao		DMP K		P
	X	SD	X	SD	
IL2/IL4	457,51	2644,82	349,71	1672,59	>0,05
IL12/IL4	162,31	464,52	76,22	40,67	>0,05
IFN γ /IL4	284031,00	262685,70	2651,69	6069,42	<0,001
IL2/IL10	39,31	194,35	0,61	1,88	>0,05
IL12/IL10	0,74	2,31	0,85	2,71	>0,05
IFN γ /IL10	5578,49	22858,15	78,83	371,60	>0,05

Chỉ số Th1/Th2 đều cao hơn ở nhóm TDMP do lao. Đặc biệt chỉ số IFN γ /IL4 rất cao ở nhóm TDMP do lao với mức P<0,001.

BÀN LUẬN

TDMP do lao được cho là kết quả của phản ứng quá miễn muộn khi kháng nguyên lao xâm nhập vào khoang màng phổi với sự tham gia chủ yếu là các tế bào TCD4 và đại thực bào.

Từ những năm 80, đã có rất nhiều nghiên cứu về MD tại chỗ và MD toàn thân ở BN TDMP do lao. Các nghiên cứu đều nhận thấy rằng: Có sự khác biệt giữa các tế bào máu ngoại vi và các tế bào tại vị trí tổn thương. Tỷ lệ tế bào Th1 chiếm ưu thế trong DMP, trong khi đó tế bào máu chủ yếu là Tc và Ts. IFN γ được bài tiết bởi T4 lymphocytes hoạt hoá dưới sự kích thích của kháng nguyên đặc hiệu và không đặc hiệu. Do vậy, nồng độ cao IFN γ trong dịch màng phổi có thể là kết quả tế bào lymphocyte bị kích thích do các kháng nguyên lao. Điều này lý giải vì sao nồng độ IFN γ trong DMP rất cao.

Kaoru (1991), nghiên cứu nồng độ IFN γ và IL2 trong DMP BN lao và ung thư nhận thấy, nồng độ IFN γ ở nhóm BN lao cao hơn có ý nghĩa so với nhóm K. Có sự tương quan giữa IFN γ và IL2.

Somkiat Wongtim 1999, nghiên cứu trên 39 bệnh nhân lao và 27 trường hợp TDMP khác cho thấy nồng độ IFN γ cao hơn rất nhiều ở nhóm lao màng phổi so với nhóm không lao. Với điểm cắt là 240 pg/ml, độ nhạy đạt 95%, độ đặc hiệu đạt 96%.

TNF α là một cytokine tiền viêm, được tiết bởi đại thực bào, monocyte, các lymphocyte B và T, tế bào xơ. Tăng nồng độ TNF α được thấy trong cả TDMP do lao và ung thư. Người ta cho rằng đó là do các đại thực bào, monocyte trong DMP tiết ra khi tiếp xúc với KN lao hoặc tế bào u. TNF α là một cytokine cần thiết để hình thành tổ chức hạt, hạn chế sự phát triển của VK, tăng khả năng diệt khuẩn của đại thực bào tại vị trí tổn thương.

Zahra (2005) đánh giá nồng độ TNF α trong máu BN lao phổi và lao ngoài phổi nhận thấy nồng độ

TNF α trong máu tăng cao ở nhóm BN lao phổi và lao ngoài phổi so với nhóm chứng.

IL2 đóng vai trò chủ chốt trong đáp ứng miễn dịch. IL2 do lymphocyte hoạt hoá tiết ra. Chúng tác động và hoạt hoá một loạt các tế bào lympho Th, TDTH, Tc..., đại thực bào, tế bào diệt tự nhiên. Chúng khuếch đại phản ứng miễn dịch tại chỗ và gây độc tế bào. IL2 là một cytokin rất quan trọng phát triển dòng lymphocyte trong đáp ứng CMI. Mức độ phát triển dòng T lymphocyte phụ thuộc số lượng của IL1 và IL2.

Kaoru (1991) nghiên cứu nồng độ IL2, IFN γ trong DMP ở 20 BN lao và 20 BN TDMP do K nhận thấy nồng độ IL2 ở nhóm TDMP do lao cao hơn có ý nghĩa so với nhóm TDMP do K ($p < 0,01$). 25% BN TDMP do lao có mức IL2 rất thấp, thấp hơn giới hạn dưới. Có sự liên quan ý nghĩa giữa IL2 và IFN γ trong DMP BN lao.

Thực tế là IL2 kích thích các lymphocyte tiết IFN γ , bên cạnh việc các tế bào này tiết dưới kích thích của KN do vậy làm nồng độ IFN γ rất cao trong DMP. Ngược lại IFN γ kích thích hoạt hoá đại thực bào thực bào VK lao và như vậy cơ chế đáp ứng MD tại chỗ hoạt động hiệu quả tại vùng tổn thương.

Chen YM nghiên cứu IFN γ và IL10 trên 26 bệnh nhân lao và 202 ca ung thư phổi nhận thấy: nồng độ IFN γ , IL10 trong dịch màng phổi cao hơn trong máu. Nồng độ IFN γ trong dịch và máu ở bệnh nhân lao màng phổi cao hơn có ý nghĩa so với nhóm K phổi. Các chỉ số IFN γ dịch màng phổi/ IFN γ máu, IFN γ dịch màng phổi/IL10 dịch màng phổi, và IL10 dịch màng phổi/IL10 máu cao hơn có ý nghĩa ở nhóm bn lao. Tác giả cho rằng đáp ứng miễn dịch ở bệnh nhân lao nghiêng về nhóm Th1 và ngược lại nhóm ung thư đáp ứng của Th2 trội hơn.

Li YH nghiên cứu về các cytokine Th1 (IFN γ , IL2)/Th2 (IL4, IL10) trong dịch và máu lao màng phổi, trong máu BN lao phổi và người bình thường có test PPD (+) nhận thấy đáp ứng với vi khuẩn lao là Th1. Nồng độ các cytokin Th1 và Th2 trong dịch màng phổi cao hơn có ý nghĩa trong máu, tác giả kết luận rằng cả Th1 và Th2 đều đóng vai trò quan trọng trong bệnh sinh tràn dịch màng phổi do lao.

Barbosa định lượng IL10, TNF α , IFN γ trong dịch màng phổi ở BN lao nhận thấy IL10 có liên quan với IFN γ , TNF α . IFN γ và TNF α giảm đi khi bệnh hồi phục. Nghiên cứu cho rằng đáp ứng Th1 ưu tiên ở pha sớm của lao, và IL10 có liên quan đến giai đoạn lui bệnh.

Masakazu Okamoto nghiên cứu trên 7 BN lao và 19 BN ung thư màng phổi nhận thấy: nồng độ IFN γ và IL12 ở nhóm BN lao cao hơn có ý nghĩa so với nhóm ung thư phổi. Nồng độ IL4 không có khác biệt giữa hai nhóm. Chỉ số IFN γ và IL12/Th2 cao có ý nghĩa ở nhóm lao màng phổi. Kết quả cho thấy, tràn dịch màng phổi do ung thư đáp ứng miễn dịch theo hướng Th2. Đáp ứng miễn dịch trong lao màng phổi rất rõ ràng theo hướng Th1.

Nghiên cứu của chúng tôi cũng đạt nồng độ IFN γ cao trong DMP ở bệnh nhân lao và khác biệt có ý

nghĩa so với nhóm TDMP do K. IL10 tăng cao có ý nghĩa trong DMP BN K. Chỉ số Th1/Th2 cao hơn ở nhóm BN TDMP do lao, và đạt sự khác biệt rất lớn ở chỉ số IFN/IL4. Điều này gợi ý đến có thể đáp ứng MD trong TDMP do lao nghiêng về hướng Th1.

KẾT LUẬN

Nồng độ các cytokin trong dịch màng phổi và huyết thanh thấp. Nồng độ các cytokin Th1 tăng cao trong DMP BN lao, Th2 tăng DMP BN K. IFN γ tăng cao có ý nghĩa trong DMP BN lao so với BN K, ngược lại IL10 tăng trong DMP BN K. Chỉ số IFN γ /Th2 tăng cao ở nhóm TDMP do lao đặc biệt IFN γ /IL4.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Barbosa T, Arruda S, Chalhoub M, et al (2006), "Correlation between interleukin-10 and in situ necrosis and fibrosis suggests a role for interleukin-10 in the resolution of the granulomatous response of tuberculous pleurisy patients", *Microbes & Infection*. Mar 8(3):889-97
2. Chen, Y.M.; Yang, W.K.; Whang-Peng, J.; Tsai, C.M.; Perng, R.P. (2001) "An analysis of cytokine status in the serum and effusions of patients with tuberculous and lung cancer", *Lung Cancer*, 31, 25-30
3. Jing Jiang; Huan-Zhong Shi, Qiu-Li Liang; Shou-Ming Qin and Xue-Jun Qin 2007, Diagnostic Value of Interferon- γ in Tuberculous Pleurisy A Metaanalysis, *Chest*. 131:1133-1141
4. Masakazu Okamoto; Yoshinori Hasegawa; Toru Hara, et al (2005), "T-Helper Type 1/T-Helper Type 2 Balance in Malignant Pleural Effusions Compared to Tuberculous Pleural Effusions", *Chest*; 128:4030-4035
5. Li, Yan-hong, Xie, Can-mao (2004), "A study on the Th1/Th2 cytokines in the pathogenesis of human tuberculous pleuritis", *Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases*, 27(5):324-7
6. Nektaria Xirouchaki, Nikolaos Tzanakis, (2002); Diagnostic Value of Interleukin-10, Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor in Pleural Effusions, *Chest*. 121:815-820
7. Peter F. Barber, Sue-Jane Fong et al 1990, Local production of tumor necrosis factor and IFN γ in tuberculous pleuritis, *The journal of Immunology*, Vol 145, 149-154
8. Sharma, SK, Banga, 2004, A Diagnostic utility of pleural fluid IFN γ -in tuberculosis pleural effusion. *J Interferon Cytokine Res*; 24, 213-217
9. Shimokata Kaoru, Saka H, Murate T, Hasegawa Y, Hasegawa T. 1991, Cytokine content in pleural effusion. Comparison between tuberculous and carcinomatous pleurisy. *Chest*. May; 99(5):1103-7.
10. Somkiat Wongtim, Udomsak Silachamroon, Kiat Ruxrungham, Visit Udompanich, Sakchai Limthongkul, Pradit Charoenlap, Chaivej Nuchprayoon 1999; Interferon gamma for diagnosing tuberculous pleural effusions, *Thorax*; 54:921-924