

NGHIÊN CỨU SỰ BIẾN ĐỔI MỘT SỐ CYTOKINE Ở BỆNH NHÂN MẮC BỆNH PHỔI TẮC NGHẼN MẠN TÍNH

TỔNG QUAN

1. Ngoài nước (phân tích, đánh giá tình hình nghiên cứu thuộc lĩnh vực của đề tài trên thế giới, liệt kê danh mục các công trình nghiên cứu, tài liệu có liên quan đến đề tài được trích dẫn khi đánh giá tổng quan)

Bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính hiện nay có xu hướng phát triển ngày càng tăng và là nguyên nhân chính gây tử vong, chỉ đứng sau nhóm nguyên nhân bệnh lý tim mạch và ung thư. Tình trạng viêm mạn tính đường thở đã được công nhận là thủ phạm trong cơ chế bệnh sinh, tuy nhiên hoạt động của hệ thống viêm như thế nào- hiện nay là vấn đề cần tìm lời giải với hy vọng đưa ra được biện pháp để kiểm soát quá trình viêm.

Nghiên cứu sự biến đổi các marker viêm trong ở bệnh nhân mắc bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (BPTNMT) được nhiều nhà khoa học quan tâm. Một số nghiên cứu thực nghiệm trên chuột, có một số nghiên cứu với bệnh phẩm là huyết tương, dịch rửa phế quản, nhu mô phổi, hạch bạch huyết với nhiều phương pháp nghiên cứu mô tả có so sánh, tiến cứu, nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng nhằm tìm hiểu sự hoạt động của một số marker viêm như tế bào lympho T và các cytokine ở các giai đoạn BPTNMT, trong đợt bùng phát của BPTNMT, liên quan với thông khí phổi, tình trạng khí phế thũng và tình trạng hút thuốc lá. Hầu hết các tác giả thấy sự biến đổi hoạt động của lympho T, đặc biệt là CD4, TCD8 và các cytokine như TNF Alpha, INF Gamma, và một số cytokine đóng vai trò quan trọng trong quá trình viêm mạn tính đã gây các tổn thương giải phẫu bệnh ở BPTNMT như phá hủy thành phế nang và các đường thở nhỏ gây với bệnh cảnh lâm sàng ở các mức độ và thể bệnh khác nhau.

Finkelstein R (1995) Nghiên cứu trên bệnh nhân BPTNMT hút thuốc lá có tình trạng khí phế thũng, các tác giả đã thấy có mối liên quan giữa số lượng tế bào lympho T với mức độ khí phế thũng .

O'Shaughnessy TC(1997) nghiên cứu các tế bào viêm đường thở qua dịch rửa phế quản trên 3 nhóm: người bình thường, hen phế quản và BPTNMT thấy rằng trong COPD, có tăng đáng kể số lượng CD3+lyphoT và CD8+ và có mối liên quan giữa CD8+T lympho, Neutrophils và Eosinophils với tỷ lệ FEV1.

Majiori M (1999) nghiên cứu đáp ứng miễn dịch ở BPTNMT qua các cytokine theo phương pháp mô tả có đối chứng, tác giả đã thấy tăng tỷ lệ tế bào sản xuất INF-g và giảm tỷ lệ tế bào sản xuất IL-4, qua đó tác giả đã cho rằng ở BPTMNR đáp ứng viêm của Th1 đóng vai trò chủ yếu.

Wedzicha JA (2000) với phương pháp nghiên cứu tiến cứu, đo hàm lượng IL-6 trong huyết thanh ở bệnh nhân BPTNMT trong mỗi đợt bùng phát cho thấy có sự tăng đáng kể IL-6 và có mối tương quan giữa mức độ tăng IL- 6 với mức độ nặng của đợt bùng phát.

Turato G (2002) nghiên cứu sự biến đổi cấu trúc, các tế bào viêm và tình trạng khí phế thũng ở bệnh nhân hút thuốc lá bị BPTNMT nặng (FEV1=29%) có so sánh với nhóm hút thuốc lá nhưng không bị BPTNMT hoặc chỉ giảm nhẹ lưu thông khí thở, tác giả thấy rằng có sự tăng đáng kể số lượng tế bào lympho trong đường thở và tương quan với mức độ khí phế thũng (đánh giá trên Xquang), mức độ giảm lưu lượng khí thở. Trong đó quá trình viêm được đặc trưng bởi sự tăng tế bào TCD8, TCD4 và đại thực bào.

Saetta M (2003) nghiên cứu tỷ lệ CD4/CD8 tại tổ chức hạch thấy tỷ lệ này giảm ở bệnh nhân BPTNMT có hút thuốc lá.

Profita M.(2003) và một số tác giả khác đã nghiên cứu định lượng TNF-a trong huyết tương, trong

dịch phế quản, có nhận xét TNF- α là yếu tố quan trọng thúc đẩy quá trình viêm ở bệnh nhân BPTNMT, đặc biệt là ở bệnh nhân không được kiểm soát, bệnh nhân BPTNMT trong đợt bùng phát. Qua đó các nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng có đối chứng trong việc sử dụng thuốc ức chế sản xuất cytokine này đã được nghiên cứu.

Tetley TD (2005) phân tích các tế bào bạch cầu trung tính, đại thực bào và lympho T trong dịch phế quản, tác giả cho thấy có sự gia tăng đáng kể các bạch cầu trung tính ở các phế quản lớn, phế quản nhỏ và cả nhu mô phổi, chỉ có một số lượng rất ít tế bào lympho T. Trong đó đại thực bào là một tế bào nằm ở các phế quản nhỏ và nhu mô phổi được cho là tác nhân gây tình trạng khí phế thũng, ngoài ra tế bào T cytotoxic cũng là tác nhân gây chết và độc tế bào - một cơ chế của tình trạng khí phế thũng, sự hoạt động của tế bào T cytotoxic này chịu sự chi phối của tế bào T hỗ trợ (Th) và tác giả cho rằng trong BPTNMT có sự khác biệt trong bộ nhớ của tế bào TCD4 và TCD8. Tác giả đã thấy có tăng số lượng TCD8 và/hoặc tăng tỷ lệ các tế bào TCD8/CD4 trong BPTNMT, mức độ gia tăng này có liên quan với tình trạng hút thuốc lá, mức độ tắc nghẽn phế quản và tình trạng khí phế thũng.

Jack Elias G cho rằng Lympho Th2 cùng với các cytokine của nó như IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 có vai trò chủ đạo trong đáp ứng viêm ở bệnh hen, ngược lại sự đáp ứng của Th1 cùng với việc tăng cường sản xuất cytokine của nó như TNF-g là yếu tố thúc đẩy cơ chế bệnh sinh ở bệnh nhân BPTNMT. Tuy nhiên, trong một nghiên cứu khác tác giả lại cho thấy có hiện tượng gia tăng TNF gamma ở một số bệnh nhân hen phế quản, và ở bệnh nhân BPTNMT có tăng đáng kể các cytokine IL-4, IL-5, IL-13.

Nghiên cứu mô tả tiến cứu của Victor.M (2007) trên 22 bệnh nhân BPTNMT đợt bùng phát, cho thấy IL-6, IL-8, leucotrien B4 và TNF- tăng cao rõ rệt và mức độ tăng của các cytokine này cũng liên quan với mức độ nặng của bệnh trong đợt cấp.

Peter J. Barnes (2004) sau khi tổng hợp một số kết quả về nghiên cứu đáp ứng miễn dịch ở BPTNMT, tác giả cho rằng sau khi được tiếp xúc với kháng nguyên, tế bào Th1 hoạt động, tăng sản xuất các cytokine và INF-g, gây kích hoạt các tế bào biểu mô phế quản sản xuất IL-12 và kích hoạt các yếu tố thúc đẩy hoạt động tế bào T phản ứng, đại thực bào, bạch cầu trung tính, thu hút các tế bào Th1 và Tc1 vào phổi gây nên quá trình phản ứng tự miễn tại phổi. Sự hoạt hóa này có lẽ khởi phát của đáp ứng miễn dịch đặc thù tăng đại thực bào và bạch cầu trung tính, cũng có thể do sự di chuyển của tế bào có tua từ biểu mô di chuyển vào hạch lympho và trình diện kháng nguyên cho tế bào T, từ đó kích thích tăng CD4 và CD8 mạnh hơn, chúng phản ứng theo phương thức độc tế bào.

2. Trong nước (phân tích, đánh giá tình hình nghiên cứu thuộc lĩnh vực của đề tài ở Việt Nam, liệt kê danh mục các công trình nghiên cứu, tài liệu có liên quan đến đề tài được trích dẫn khi đánh giá tổng quan)

- Lê Thắng Đức (2001), Nghiên cứu sự biến đổi thông khí phổi và khí máu trước và sau can thiệp Salbutamol để phân biệt COPD typ B với hen phế quản, Luận án tiến sĩ y học, Trường Đại học Y Hà Nội, Hà Nội 2001.

- Ngô Quý Châu (2002), "Tình hình chẩn đoán và điều trị bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính tại khoa hô hấp bệnh viện Bạch Mai trong 5 năm (1996-2000)", Thông tin y học lâm sàng, Nxb Y học, Hà Nội, 7/2000, Tr 50-58

- Nguyễn Huy Lực, Bùi Xuân Tám, Trần Thị Dung, Lê Bá Thúc (2002), "Biến đổi một số chỉ tiêu thông khí phổi ở 50 bệnh nhân bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính", Nội san Lao và bệnh phổi, Tổng hội y dược học Việt Nam, tập 34, tr 71-76

- Mai Xuân Khấn (2005), Nghiên cứu lâm sàng, thể tích cận, khả năng khuếch tán CO, nội soi và biến đổi tế bào dịch rửa phế quản của bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, luận án tiến sỹ y học, Học viện quân y, 2005.

10.3. Danh mục các công trình đã công bố thuộc lĩnh vực của đề tài của chủ nhiệm và những thành viên tham gia nghiên cứu (họ và tên tác giả; bài báo; ấn phẩm; các yếu tố về xuất bản)

- Phạm Kim Liên, Dương Hồng Thái, Đỗ Quyết, 2007 “Đặc điểm lâm sàng, Xquang và đáp ứng điều trị của viêm phổi cộng đồng nhập viện tại Bệnh viện đa khoa Trung Ương Thái Nguyên” Tạp chí thông tin y dược số 10/ 2007, tr 21-24.

- Phạm Kim Liên, Dương Hồng Thái, Nguyễn Trọng Hiếu, 2009 “Đặc điểm lâm sàng và lưu lượng đỉnh ở bệnh nhân mắc bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính điều trị tại khoa nội tiết- hô hấp Bệnh viện Đa khoa trung ương Thái Nguyên”, tạp chí nội khoa, số 1/2009, tr 28- 32.

MỤC TIÊU

1. Phân tích sự biến đổi của các cytokine huyết thanh: IL-2, TNF- α , INF- γ và T CD4, TCD8 trong và ngoài đợt bùng phát.

2. Đánh giá mối liên quan của các cytokine, TCD4, TDC8 với một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng trong và ngoài đợt bùng của bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính

NỘI DUNG

* Các chỉ tiêu nghiên cứu

- Lâm sàng:

+ Tuổi, giới, tiền sử hút thuốc lá, khoảng thời gian biểu hiện bệnh

+ Chỉ số khối cơ thể

+ Triệu chứng cơ năng, toàn thân, thực thể trong và ngoài đợt bùng phát

+ Thể lâm sàng

+ Mức độ nặng của đợt bùng phát

+ Giai đoạn BPTNMT

- Cận lâm sàng

+ Số lượng, công thức bạch cầu trong và ngoài đợt bùng phát

+ Đặc điểm điện tim.

+ Đặc điểm thông khí phổi ngoài đợt bùng phát

+ Đặc điểm hình ảnh Xquang và chụp cắt lớp vi tính độ phân giải cao.

- Hàm lượng các cytokine, số lượng CD4, CD8

+ Hàm lượng trung bình các cytokine, số lượng và tỷ lệ T CD4/CD8 của nhóm bệnh

+ Hàm lượng trung bình các cytokine, số lượng và tỷ lệ T CD4/CD8 trong và ngoài đợt bùng phát.

- Mối liên quan sự biến đổi cytokine, tỷ lệ T CD4/CD8 với đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng

+ Trong đợt bùng phát: Tìm hiểu mối liên quan giữa các đặc điểm lâm sàng, mức độ nặng của đợt bùng phát, công thức máu với sự biến đổi hàm lượng các cytokine và CD4, CD8

+ Ngoài đợt bùng phát: Tìm hiểu mối liên quan giữa thể bệnh, giai đoạn bệnh, chỉ số thông khí phổi, các hội chứng rối loạn thông khí phổi, đặc điểm hình ảnh chụp cắt lớp với hàm lượng các cytokine và CD4, CD8.

* Kỹ thuật thu thập số liệu

- Lâm sàng

Bệnh nhân được phỏng vấn và thăm khám phát hiện các triệu chứng và ghi chép theo mẫu đăng ký nghiên cứu.

Tuổi, giới.

Tiền sử: Hút thuốc lá (bao/năm), tiếp xúc thường xuyên với khói than, bụi, lông súc vật, nhiễm khuẩn đường hô hấp nhiều lần khi còn nhỏ Đo chiều cao, cân nặng tính chỉ số BMI

Thân nhiệt

Tần số thở

Màu sắc da niêm mạc: tím- hồng

Đặc điểm lồng ngực: hình thùng, co kéo cơ hô hấp.

Rì rào phế nang

Các tiếng bất thường ở phổi

Phù, gan to, tĩnh mạch cổ nổi.

- Đo thông khí phổi

Đo thông khí phổi bằng máy Chestgraphy HI- 101 do Nhật Bản sản xuất, đo tại khoa Lao và bệnh phổi Bệnh viện 103, do học viên cùng kỹ thuật viên thực hiện.

Các chỉ số thông khí được xác định: FVC (lít); FEV1 (lít), FEV1/FVC (%), FEV1/FCV, FEF25-75%, FEF50% được in trên giấy nhiệt của máy

- Công thức máu

Đánh giá sự biến đổi công thức bạch cầu trong 24 giờ đầu nhập viện và khi bệnh nhân ổn định ra viện

Lấy 2ml máu vào tuyp có chống đông, xét nghiệm trên máy tổng phân tích tế bào máu của Khoa huyết học Bệnh viện 103.

- Chụp xquang tim phổi: chụp thường quy.

- Chụp cắt lớp vi tính độ phân giải cao.

Độ dày lớp cắt 1-2mm, bước chuyển bàn 10-20mm

Thực hiện kỹ thuật chụp bằng máy chụp cắt lớp Philips Mx 8000D, tại khoa chẩn đoán hình ảnh, Viện 103, Học viện quân y

Đọc phim: theo phương pháp 2 người đọc: Thầy hướng dẫn và học viên.

- Điện tim

Ghi trong đợt bùng phát, xác định các biến đổi liên quan tăng áp động mạch phổi: Trục phải, dây nhĩ phải, dây thất phải.

Ghi 12 chuyển đạo thường quy: DI, DII, DIII, aVR, aVL, aVF, V1, V2, V3, V4, V5, V6.. Thực hiện trên máy điện tim 3 cần của khoa A3, viện 103

- Định lượng cytokine

Các bệnh nhân thuộc đối tượng nghiên cứu được lấy máu 2 lần: Trong và ngoài đợt bùng phát để định lượng cytokine huyết thanh

Lấy 2,5 ml máu tĩnh mạch cho vào ống nghiệm, chuyển ngay đến labo miễn dịch của Trung tâm nghiên cứu ứng dụng sinh y dược học - Học viện Quân y, ly tâm chất lấy huyết thanh và bảo quản ở -800 . Sau khi đủ bệnh phẩm tiến hành định lượng các cytokine theo nguyên lý kỹ thuật Flowcytometry- Assisted - Imunoassay do hãng Bio- Rad (Mỹ) cung cấp

Cytokine được phát hiện bằng phản ứng miễn dịch huỳnh quang kiểu sandwich trên bề mặt của vi hạt nhựa. Bề mặt của vi hạt nhựa được gắn sẵn các phân tử kháng thể đơn clon đặc hiệu với một quyết định kháng nguyên trên phân tử cytokine. Khi ủ mẫu xét nghiệm với hạt phủ kháng thể, các phân tử cytokine sẽ bị kháng thể đặc hiệu bắt giữ và bám vào bề mặt hạt. Sau đó kháng thể đơn clon thứ hai đặc hiệu với một quyết định kháng nguyên khác của cytokine đã gắn biotin được thêm vào, tạo thành phức hợp miễn dịch gồm phân tử cytokine kẹp giữa 2 kháng thể đơn clon. Cuối

cùng phức hợp streptavidin - PE được thêm vào sẽ gắn vào kháng thể đơn clon qua tương tác streptavidin - 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 cho phép định lượng được cytokine bằng cách so sánh với tín hiệu từ các mẫu chuẩn phát ra. Đường chuẩn cho mỗi cytokine được xây dựng độc lập dựa vào dựa vào nồng độ đã biết của cytokine đó trong mẫu cytokine chuẩn

- Đếm tế bào CD4, CD8:

Phương pháp đếm tế bào CD4, CD8 trên hệ thống Flow cytometry FC 500 của hãng Beckman Coulter.

Lấy 2,5ml máu tĩnh mạch có chống đông bằng EDTA, thực hiện đếm số lượng tế bào trong 6h sau khi lấy máu.

Lấy 100ml mẫu ủ với 20 ml antiCD4-FITC và 20 ml anti CD8-PE và 20 ml antiCD45-ECD ủ 30 phút trong tối nhiệt độ phòng

Thêm vào 2ml dung dịch lysing để 10 phút

Thêm 100ml hạt counter sphere lắc đều đem phân tích trên máy FC500, dùng chương trình đếm CD4, CD8 trên máy

Kết quả: Số lượng tế bào/ml

*Xử lý số liệu: Theo phương pháp thống kê y học SPSS 16.0

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mô tả tiến cứu

HIỆU QUẢ KTXH

ĐƠN VỊ SỬ DỤNG