

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



VŨ NGUYỆT MINH

**NGHIÊN CỨU SỰ BIẾN ĐỔI MỘT SỐ CYTOKIN  
Ở BỆNH NHÂN XƠ CỨNG BÌ HỆ THỐNG**

**Chuyên ngành : Da liễu**

**Mã số : 62 7201 52**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC**

**Hà Nội – 2018**

**CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

Người hướng dẫn khoa học:

**GS. TS. Trần Hậu Khang**

**Phản biện 1:**

**Phản biện 2:**

**Phản biện 3:**

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án Tiến sỹ cấp Trường họp tại Trường Đại học Y Hà Nội.

*Vào hồi giờ ngày tháng năm 2018*

*Có thể tìm luận án tại thư viện:*

Thư viện Quốc gia

Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Xơ cứng bì hệ thống (Systemic scleroderma -SSc, XCBHT) là một bệnh tự miễn của tổ chức liên kết, đặc trưng bởi bệnh lý mạch máu và viêm mức độ thấp, kéo dài gây hậu quả cuối cùng là lắng đọng collagen tại các tổ chức. Một trong những vấn đề cần làm rõ trong cơ chế bệnh sinh của XCBHT là mối liên quan giữa biểu hiện viêm, rối loạn vi mạch và yếu tố phát triển xơ. Từ khi bệnh nhân viêm khớp dạng thấp được điều trị thành công bởi kháng thể đơn dòng ức chế TNF- $\alpha$  và gần đây, thuốc sinh học kháng cytokin BAFF được FDA chấp thuận cho điều trị lupus ban đỏ hệ thống thì các nghiên cứu đã tập trung nhiều hơn vào mạng lưới cytokin trong cơ chế bệnh sinh của bệnh XCBHT. Cytokin là yếu tố chính gây viêm cấp tính và mãn tính. Tuy nhiên, mỗi loại cytokin do nhiều tế bào tiết ra, không hoạt động riêng lẻ mà tương tác với nhau thành một mạng lưới phức tạp. Sự sản xuất và giải phóng nhiều loại cytokin tham gia vào quá trình kích hoạt lympho T và B dẫn đến phản ứng viêm, sản xuất tự kháng thể, thương tổn vi mạch và xơ hoá là những diễn biến phức tạp trong cơ chế bệnh sinh của XCBHT. Như vậy, cân bằng giữa lympho Th1/ Th2/ Th17/ Treg, lympho B đại thực bào và các nguyên bào sợi trong bệnh XCBHT cần được nghiên cứu cùng lúc với mối tương tác của cả mạng lưới nhằm phát triển các liệu pháp điều trị kết hợp, điều chỉnh nhiều con đường dẫn tới phản ứng viêm - xơ hoá trong cơ chế bệnh sinh phức tạp của bệnh tự miễn mạn tính này.

Trong nhiều thập kỷ qua, do bệnh XCBHT biểu hiện rất khác nhau về lâm sàng, cận lâm sàng ở giai đoạn khởi phát và tiến triển nên các tác giả gặp nhiều khó khăn trong việc xác định bệnh nhân thuộc giai đoạn nào. Đây cũng là nguyên nhân dẫn đến các nghiên cứu lâm sàng, cận lâm sàng, cytokin trên bệnh nhân XCBHT cho các kết quả rất khác nhau, gây khó khăn cho việc xác định phác đồ điều trị. Trong trường hợp biểu hiện lâm sàng và cận lâm sàng về các thương tổn cơ quan chưa rõ ràng, đặc điểm mạng lưới cytokin là số liệu tốt giúp nhận dạng các thể lâm sàng không đồng nhất này.

Tuy nhiên, nghiên cứu trên bệnh nhân XCBHT giai đoạn sớm rất ít. Hơn nữa sự thay đổi nồng độ các cytokin cũng có liên quan đến hình ảnh, triệu chứng lâm sàng của một số cơ quan. Ngoài ra nhiều nhà khoa học cũng cho rằng sự xuất hiện một số cytokin liên quan tới biểu hiện lâm sàng và tiên lượng bệnh.

Trên thế giới, các nhà khoa học vẫn tiếp tục tiến hành thêm nhiều nghiên cứu trên các nhóm bệnh nhân, có theo dõi dọc theo thời gian để đánh giá một cách toàn diện vai trò của các cytokin trong bệnh XCBHT. Số lượng nghiên cứu trên cả mạng lưới cytokin và có theo dõi dọc trên các nhóm bệnh nhân cùng giai đoạn bệnh, đặc biệt trong giai đoạn sớm là không nhiều. Một số nghiên cứu cho kết quả khả quan về việc sử dụng cytokin và các dấu ấn sinh học như các công cụ dự đoán mức độ bệnh, đáp ứng điều trị và tiên lượng bệnh. Tại Việt Nam, chưa có một nghiên cứu nào theo hướng miễn dịch học mức độ phân tử liên quan đến mạng lưới cytokin ở bệnh nhân XCBHT. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài “**Nghiên cứu sự biến đổi một số cytokin ở bệnh nhân xơ cứng bì hệ thống**” nhằm các mục tiêu sau:

1. *Khảo sát sự thay đổi nồng độ các cytokin trong máu bệnh nhân xơ cứng bì hệ thống trước và sau điều trị tại Bệnh viện Da liễu Trung ương.*
2. *Xác định mối tương quan giữa sự thay đổi của các cytokin với thương tổn da và nội tạng của bệnh nhân xơ cứng bì hệ thống.*

## NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam đánh giá sự thay đổi nồng độ 10 cytokin (TGF- $\beta$ 1, BAFF, MCP-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  và IL-17A) trong máu của bệnh nhân XCBHT chẩn đoán sớm và chưa điều trị, đồng thời xác định mối liên quan giữa sự thay đổi của các cytokin với thương tổn da và nội tạng. Nghiên cứu phối hợp với Khoa da bệnh viện Kanazawa Nhật Bản, sử dụng kỹ thuật đếm tế bào

dòng chảy (BD flow cytometric) là một kỹ thuật cao, chưa được sử dụng tại Việt Nam với mục tiêu này. Bệnh nhân được theo dõi bằng các phương pháp tối ưu để quản lý bệnh XCBHT (thang điểm mRSS, chỉ số xơ phổi trên phim chụp cắt lớp vùng ngực độ phân giải cao, siêu âm tim, điện cơ kim). Số liệu được phân tích đa biến bằng phương pháp tin cậy (hồi quy logistic). Kết quả của luận án đã đem lại thông tin quan trọng về mạng lưới cytokin liên quan đến cơ chế bệnh sinh của bệnh XCBHT. Các thông tin này rất có ý nghĩa trong việc tìm ra các phương pháp điều trị mới trúng đích hơn cho bệnh XCBHT.

## CẤU TRÚC LUẬN ÁN

Luận án dày 125 trang không kể phụ lục và tài liệu tham khảo, gồm 4 chương, 27 bảng, 4 biểu đồ, 6 hình ảnh minh họa, 3 sơ đồ, 170 tài liệu tham khảo (tiếng Việt 4, tiếng Anh 166) và phụ lục. Bộ cục luận án gồm: đặt vấn đề 2 trang, tổng quan 40 trang, đối tượng và phương pháp nghiên cứu 16 trang, kết quả 32 trang, bàn luận 32 trang, kết luận 2 trang, 4 bài báo có nội dung liên quan với luận án đã được công bố.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. Đại cương bệnh XCBHT

#### 1.1.1. Dịch tễ

XCBHT (XCBHT, SSs) là một bệnh tự miễn hệ thống hiếm gặp, được mô tả gần 3000 năm trước đây. Bệnh phân bố rộng rãi khắp thế giới, có thể xuất hiện ở mọi chủng tộc, tỷ lệ lưu hành khoảng 31-88 trường hợp/ 1 triệu người, hay gặp ở độ tuổi 40-50.

#### 1.1.2. Phân loại

- XCBHT thể lan toả (diffuse cutaneous systemic sclerosis - dcSSc): được đặc trưng bởi thương tổn dày da lan đến trên khuỷu tay và đầu gối.

- XCBHT thể giới hạn (limited cutaneous systemic sclerosis - lcSSc): được đặc trưng bởi thương tổn dày da bị giới hạn ở đầu ngón lan đến gần khuỷu tay và gần đầu gối.

Diễn biến tự nhiên hay gặp của XCBHT được chia làm 3 dưới nhóm: giai đoạn sớm, giai đoạn trung gian và giai đoạn muộn. Nhiều nghiên cứu lấy mốc giai đoạn sớm của bệnh là trong vòng 3 năm từ khi bệnh khởi phát.

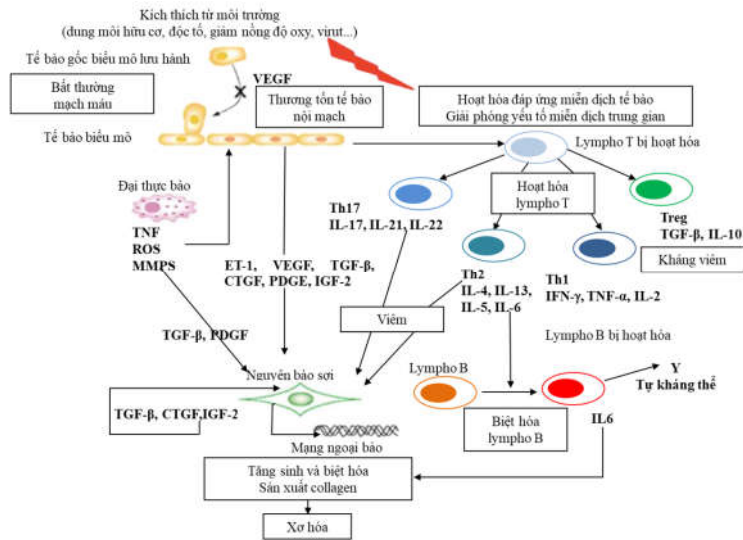
#### 1.1.3. Tiêu chuẩn chẩn đoán

Bảng 1.1: Tiêu chuẩn chẩn đoán XCBHT ACR và EULAR 2013

Tiêu chuẩn	Tiêu chí	Điểm
<b>Thương tổn dày da vùng ngón tay của cả hai tay, lan đến gần khớp đốt bàn (tiêu chuẩn đầy đủ để chẩn đoán)</b>		<b>9</b>
- Dày da ngón tay (chỉ tính điểm cao nhất)	+ Phù nề đầu ngón	2
	+ Xơ cứng da đầu ngón (chưa đến khớp đốt bàn nhưng gần đến vùng khớp ngón)	4
- Thương tổn đầu ngón (chỉ tính điểm cao nhất)	+ Loét đầu ngón	2
	+ Sẹo rỗ đầu ngón	3
- Giãn mạch		2
- Bất thường mao mạch nền móng		2
- PAH và/ hoặc ILD (điểm tối đa là 2)		2
	+ PAH	2
- Hiện tượng Raynaud		2
	+ ILD	2
- Các tự kháng thể liên quan đến XCBHT (điểm tối đa là 3)		1
	+ ACAs	1
	+ ATAs	1
	+ RNAP	1

Bệnh nhân có từ 9 điểm trở lên là đủ tiêu chuẩn chẩn đoán XCBHT.

## 1.2. VAI TRÒ CỦA CÁC CYTOKIN TRONG CÁC RỐI LOẠN CỦA BỆNH XCBHT



Sơ đồ 1.1: Cơ chế bệnh sinh của bệnh XCBHT

### 1.2.1. Tổn thương mạch máu

Tổn thương mạch máu là đặc điểm quan trọng đầu tiên trong sinh bệnh học của XCBHT. Nguyên nhân gây tổn thương nội mô có thể xuất phát từ rối loạn do gen bị kích thích bởi một số yếu tố khởi phát của môi trường. Mô thiếu máu phản ứng bằng cách giải phóng các yếu tố tăng sinh mạch máu và các chất trung gian phản ứng viêm có tác dụng hoạt hóa nguyên bào sợi, tăng sản xuất lắng đọng sợi xơ, đồng thời tạo vòng xoắn bệnh lý. Quá trình này gây kích thích hệ thống miễn dịch bẩm sinh, kích hoạt lympho B, lympho T, làm xuất hiện các cytokin và sản xuất nhiều loại tự kháng thể. Vì vậy, cytokin và các tự kháng thể là các chất trung gian hoá học chính liên quan đến thương tổn cơ bản của bệnh và cũng là đích điều trị bệnh.

### 1.2.2. Phản ứng viêm cấp, vai trò của đại thực bào và các cytokin có nguồn gốc đại thực bào

Đại thực bào có nguồn gốc từ tế bào đơn nhân, là chìa khoá điều hoà và cảm ứng tế bào miễn dịch. Nghiên cứu đầu tiên tập trung vào tế bào đơn nhân/đại thực bào hoạt hoá trên bệnh nhân XCBHT là của York và cộng sự năm 2007. Sau đó, nhiều nghiên cứu đã chứng minh đại thực bào trong máu bệnh nhân XCBHT hoạt động trong giai đoạn sớm của bệnh theo mô hình M2, tiết IL-4, sản xuất ra IL-10, chữa lành vết thương, gây xơ hoá.

- TNF (Tumor necrosis factor - yếu tố hoại tử u): TNF là một cytokin có khả năng điều chỉnh sự tăng sinh, sống sót, biệt hoá và chết theo chương trình nhiều tế bào miễn dịch quan trọng, đặc biệt là đại thực bào. TNF được biết với chức năng chính là tiền viêm và là yếu tố quan trọng nhất trong các bệnh viêm.

- MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1- Protein hoá hướng động bạch cầu đơn nhân: MCP-1) hay còn gọi là CCL2 (CC chemokine ligand 2). Trên bệnh nhân XCBHT, giai đoạn viêm sớm, MCP-1 được sản xuất chủ yếu từ các tế bào đơn nhân/ đại thực bào thâm nhiễm.

### 1.2.3. Rối loạn sản xuất collagen và vai trò của nguyên bào sợi (Fibroblast)

Sự tích tụ collagen tại da và các tổ chức khác là đặc trưng cơ bản của bệnh lý XCBHT. Nguồn gốc của các sợi collagen này là nguyên bào sợi cơ (myofibroblast). Nhiều loại tế bào có thể chuyển đổi thành nguyên bào sợi cơ bao gồm: nguyên bào sợi tại tổ chức, tế bào xơ nguồn gốc tuỷ xương, tế bào quanh mạch... dưới tác dụng của TGF-β (Transforming growth factor).

### 1.2.4. Rối loạn miễn dịch, vai trò của lympho B và các cytokin nguồn gốc lympho B

Lympho B có khả năng đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng điều hoà miễn dịch của bệnh XCBHT.

- Vai trò của các tự kháng thể: Tự kháng thể là các dấu ấn sinh học đáng tin cậy nhất hiện nay giúp chẩn đoán, phân loại và dự đoán biểu hiện lâm sàng đặc hiệu của bệnh XCBHT.

- BAFF (B cell-activating factor family) còn được gọi là yếu tố kích thích lympho B (B lymphocyte stimulator - BlyS), đóng vai trò quan trọng nhất trong sự sống sót và trưởng thành của lympho B.

- IL-6 là một interleukin hoạt động như là một cytokin tiền viêm đa chức năng. Chức năng chính của IL-6 bao gồm kích thích sự trưởng thành của lympho B thành tế bào sản xuất kháng thể và biệt hoá tế bào, kích hoạt lympho T, khởi đầu phản ứng viêm cấp, ... Điều trị kháng thể kháng IL-6 (tocilizumab) đã hạn chế một phần trong cơ chế bệnh sinh của XCBHT.

### ***1.2.5. Rối loạn miễn dịch, vai trò của lympho T và các cytokin nguồn gốc lympho T***

Lympho T có vai trò quan trọng trong thương tổn cơ quan nội tạng trên bệnh nhân XCBHT thông qua các cytokin gây viêm và các chất trung gian gây xơ hoá. IL-2 ban đầu được biết là một yếu tố tăng trưởng lympho T trong ống nghiệm.

- Th1: Đánh giá nồng độ IFN- $\gamma$  trong mạng lưới cytokin rất quan trọng để hiểu rõ hoạt động của Th1 trên XCBHT.

- Th2: IL-4 là một cytokin đại diện cho Th2 làm tăng cường tổng hợp collagen từ nguyên bào sợi.

- Th17: Nghiên cứu về IL-17 là một hướng tốt để hiểu rõ hơn về cơ chế bệnh sinh của XCBHT.

- Treg (T regulation - Lympho T điều hòa): T điều hoà tiết ra IL-10 còn được gọi là yếu tố ức chế tổng hợp cytokin ở người (Human cytokin synthesis inhibitory factor - CSIF), là một cytokin chống viêm quan trọng. IL-10 điều chỉnh sự tổng hợp và phân hủy mạng lưới ngoại bào trong tổ chức liên kết làm nó có khả năng là một ứng cử viên điều trị bệnh xơ hoá.

## **Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**2.1. Đối tượng nghiên cứu:** 32 bệnh nhân bị XCBHT (Tiêu chuẩn của ACR và EULAR 2013) bị bệnh  $\leq 36$  tháng, chưa điều trị gì hoặc đã ngừng điều trị các thuốc ức chế miễn dịch, thuốc chống xơ hóa từ 2 tháng trở lên, được điều trị tại Bệnh viện Da liễu Trung ương.

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

**2.2.1. Thiết kế nghiên cứu:** Mô tả cắt ngang

**2.2.2. Cỡ mẫu:** cỡ mẫu thuận tiện

#### **2.2.3. Các bước tiến hành**

- Xác định các đặc điểm về lâm sàng, cận lâm sàng vào thời điểm T0 theo các chỉ tiêu nghiên cứu trong mục 2.2.4 (bao gồm cả chỉ tiêu về tự kháng thể ANA, ACA, ATA nhằm chẩn đoán xác định bệnh).

- Lưu mẫu huyết thanh thời điểm T0: theo quy trình chuẩn tại Bệnh viện Da liễu Trung ương.

- Tiến hành điều trị: dựa vào triệu chứng lâm sàng và tiến triển của bệnh, do các bác sỹ thuộc Phòng khám chuyên đề Bệnh tổ chức liên kết tự miễn Bệnh viện Da liễu Trung ương theo dõi.

+ Methyprednisolone liều thấp (tương đương  $< 20$  mg/ngày liều prednisolon) và chỉnh liều theo đáp ứng; methotrexate liều tăng dần bắt đầu từ liều 7,5 mg/ tuần theo đáp ứng của bệnh (nếu không có chống chỉ định).

+ Nifedipin và/hoặc bosentan nếu có triệu chứng thương tổn mạch ngoại vi và/hoặc PAH.

+ Azathioprin trong trường hợp thương tổnILD tiến triển nặng, không đáp ứng với 2 ức chế miễn dịch trên.

- Xác định các đặc điểm về lâm sàng, cận lâm sàng vào thời điểm T12 theo các chỉ tiêu nghiên cứu trong mục 2.2.4.

- Lưu mẫu huyết thanh thời điểm T12 theo quy trình 2.2.3.2.

- Vận chuyển mẫu huyết thanh đến Khoa da Bệnh viện Kanazawa Nhật Bản để tiến hành xét nghiệm tự kháng thể và cytokin: Mẫu

huyết thanh lưu được vận chuyển bằng thùng xốp kín chứa đá khô. Các mẫu huyết thanh được kiểm tra đảm bảo không rã đông trong suốt thời gian vận chuyển cho đến khi được bảo quản trở lại ở -20 độ trước khi tiến hành xét nghiệm.

#### **2.2.4. Các chỉ tiêu nghiên cứu**

- Tuổi khởi phát (năm), giới (nam, nữ)
- Thời gian bị bệnh: Thời gian xuất hiện triệu chứng đầu tiên của bệnh đến khi vào nghiên cứu (tháng), tính cả triệu chứng Raynaud.
- Đánh giá thương tổn loét đầu ngón: đánh giá có/không ở thời điểm T0 và đánh giá giữ nguyên, nhẹ đi hoặc nặng lên (theo triệu chứng khám) ở thời điểm T12.
- Đánh giá thương tổn dày da: Độ dày da theo thang điểm mRSS ở thời điểm T0 và T12. Đánh giá cải thiện hay nặng lên của thương tổn da vào thời điểm T12 dựa vào thay đổi mRSS giảm hay tăng  $\geq 2$  điểm.
- Đánh giá thương tổn bệnh phổi kẽ (ILD): chụp phim HRCT vùng ngực T0 và T12 tại khoa chẩn đoán hình ảnh Bệnh viện Bạch Mai. Đánh giá chỉ số HRCT theo 5 lớp cắt. Bệnh nhân có ILD nếu chỉ số HRCT  $> 0$ . Cải thiện hay nặng lên ILD T12 dựa vào thay đổi chỉ số HRCT giảm hay tăng  $\geq 2$  điểm.
- Đánh giá thương tổn tăng áp lực động mạch phổi (PAH): siêu âm tim qua thành ngực: đánh giá chỉ số PAPs (áp lực động mạch phổi thì tâm thu) T0 và T12 tại Bệnh viện Bạch Mai. Chẩn đoán PAH khi PAPs  $\geq 35$  mmHg. Cải thiện hay nặng lên PAH T12 dựa vào thay đổi chẩn đoán có hay không có PAH trên PAPs và mức độ tăng PAPs. Ngưỡng cutoff là  $\geq 35$  mmHg.
- Đánh giá bất thường tổng phân tích nước tiểu nếu có một trong các biểu hiện protein niệu, hồng cầu niệu, bạch cầu niệu, trụ niệu,... ít nhất 2 lần. Cải thiện hay nặng lên phụ thuộc vào sự mất đi hoặc xuất hiện thêm bất thường tổng phân tích nước tiểu.
- Đánh giá triệu chứng nuốt nghẹn T0, T12 và hàng tháng. Nhận định bệnh nhân có/không nuốt nghẹn. Đánh giá sau 1 năm bằng hỏi bệnh nhân: giữ nguyên, nhẹ đi hay nặng lên.

- Đánh giá thương tổn cơ: Bệnh nhân sẽ được ghi nhận có thương tổn cơ nếu có 2 trong các biểu hiện trên phổi hợp: 1. Đau cơ/yếu cơ + men CK cùng thời điểm tăng trên ngưỡng bình thường; 2. Men CK tăng + điện cơ kim có thương tổn nguồn gốc cơ; 3. Đau cơ/ yếu cơ + điện cơ kim có thương tổn nguồn gốc cơ. Không nhận định bệnh nhân có thương tổn cơ nếu chỉ có 1 triệu chứng hoặc xét nghiệm bất thường.
  - Đánh giá thương tổn đau khớp: đau khớp có/ không theo hỏi bệnh và khám sưng nóng đỏ đau tại thời điểm T0, T12. Đánh giá sau 1 năm bằng hỏi bệnh: giữ nguyên, nhẹ đi hay nặng lên.
  - Các chỉ số tự kháng thể và cytokin
    - + Tự kháng thể ANA sử dụng kỹ thuật nhuộm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp trên tế bào Hep-2: đánh giá theo mức độ từ 0 đến 4+. Tự kháng thể ACA được đánh giá dương tính/âm tính nếu có hay không dạng lắng đọng discrete.
    - + Nồng độ tự kháng thể ATA và RNAP: dương tính/ âm tính theo giá trị ngưỡng của bộ kit và có ghi nhận nồng độ tự kháng thể tính theo đơn vị  $\mu\text{mol/l}$
    - + Nồng độ TGF- $\beta$ 1, BAFF/BLyS/TNFSF13B, CCL2/MCP-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  và IL-17A được tính theo đơn vị pg/ml. Các trường hợp nồng độ cytokin đo được bằng 0 được đánh giá là “Dưới ngưỡng phát hiện” hay “Không phát hiện”. Các trường hợp nồng độ cytokin đo được  $> 0$  được đánh giá là “Trên ngưỡng phát hiện” hoặc “Phát hiện”. Ngưỡng cutoff của các cytokin trong mô hình đa biến dựa vào giá trị bách phân vị.
- #### **2.2.5. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu và đánh giá kết quả**
- ##### **2.2.5.1. Các xét nghiệm tiến hành tại Việt Nam: tại Khoa xét nghiệm Bệnh viện Da Liễu Trung ương**
- Xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp trên tế bào Hep-2 xác định ANA và ACA: Kháng thể (nếu có) trong huyết thanh bệnh nhân kết hợp với kháng nguyên nhân (nhân tế bào HEP-2) và được phát hiện bằng kính hiển vi huỳnh quang nhờ kết hợp với kháng thể kháng

IgG của người đã gắn huỳnh quang (anti IgG-FITC). Bộ kit FLUORO HEPANA của hãng MBL - Nhật Bản.

- Xét nghiệm ELISA định lượng ATA: dựa trên sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể, trong đó kháng thể được gắn với một men. Khi cho thêm cơ chất thích hợp vào phản ứng, men sẽ thủy phân cơ chất thành một chất có màu. Thông qua cường độ màu mà biết được nồng độ kháng nguyên hay kháng thể cần phát hiện. Bộ kit Medical & Biological Laboratories, Naka-ku, Nagoya, Nhật Bản.

2.2.5.2. Các xét nghiệm tiến hành tại Nhật Bản: nghiên cứu sinh và nhân viên của Khoa da Bệnh viện Kanazawa Nhật Bản tiến hành

- Xét nghiệm ELISA định lượng RNAP, TGF- $\beta$ 1, BAFF/BLyS/TNFSF13B và CCL2/MCP-1: Bộ kit Mesacup anti-RNA của Nhật Bản, Quantikines ELISA Human TGF- $\beta$ 1 Immunoassay, Quantikines ELISA Human BAFF/BLyS/TNFSF13B Immunoassay và Quantikines ELISA Human CCL2/MCP-1 Immunoassay của hãng R&D Systems China Company

- Kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy (BD flow cytometric) định lượng cytokin IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  và IL-17A: là phương pháp bắt giữ các chất hoà tan cần phân tích, mỗi chất gắn đặc hiệu lên một loại hạt có kích thước và phát màu huỳnh quang khác nhau. Tín hiệu huỳnh quang của từng loại hạt tỷ lệ với số lượng chất hoà tan cần phân tích bị bắt giữ, được phát hiện bằng cách cho chảy qua một máy đếm tế bào. Nhờ đó đo được nồng độ của nhiều loại chất hoà tan có nồng độ rất thấp trong 1 lần làm xét nghiệm một cách chính xác, tiết kiệm mẫu và thời gian. Bộ kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit của hãng Becton, Dickinson and Company.

#### 2.2.6. Phương pháp phân tích và xử lý kết quả

Xử lý số liệu theo chương trình SPSS, có ý nghĩa thống kê nếu  $p < 0,05$ . Tương quan đơn biến giữa hai biến định lượng được thể hiện bằng hệ số tương quan r (biến chuẩn dùng test pearson, biến không chuẩn dùng test spearman). Tương quan đa biến sử dụng mô hình hồi quy logistic, hệ số tương quan OR với độ tin cậy CI 95%.

2.2.7. **Hạn chế của đề tài:** Thời gian nghiên cứu trong vòng 3 năm nên cỡ mẫu chưa đủ lớn. Cần theo dõi tiếp nhóm bệnh nhân nghiên cứu và đánh giá lại các bệnh nhân.

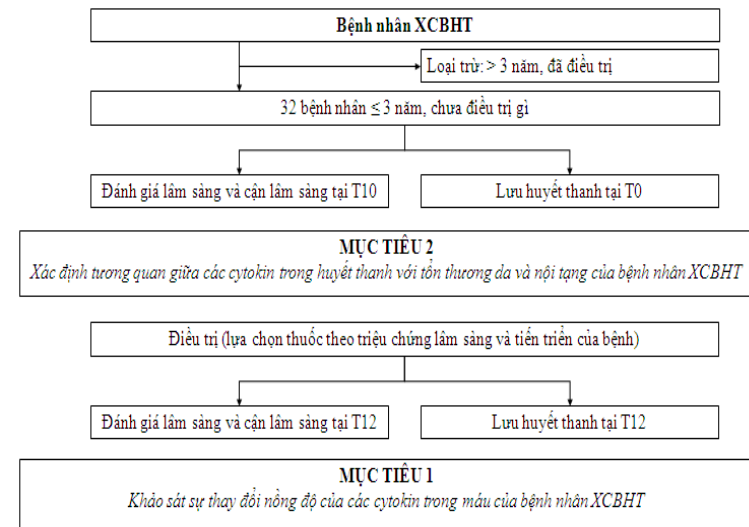
#### 2.3. ĐỊA ĐIỂM VÀ THỜI GIAN NGHIÊN CỨU

Bệnh viện Da liễu Trung ương và Khoa da Bệnh viện Kanazawa Nhật Bản từ 12/2014 -12/2017.

#### 2.4. ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu được sự đồng ý của hội đồng Trường Đại học Y Hà Nội và Bộ môn Da liễu Trường Đại học Y Hà Nội trong việc phối hợp tiến hành quản lý bệnh nhân tại Bệnh viện Da liễu Trung ương. Bệnh nhân được chẩn đoán XCBHT tự nguyện đến khám và điều trị, đồng ý làm xét nghiệm tại Bệnh viện Da liễu Trung ương. Lợi ích cho bệnh nhân: Bệnh nhân được làm xét nghiệm cytokin miễn phí. Các thông tin thu nhận được từ người bệnh được giữ bí mật.

#### Sơ đồ nghiên cứu



### Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. ĐẶC ĐIỂM NHÓM NGHIÊN CỨU

##### 3.1.1. Đặc điểm chung

**Bảng 3.1: Đặc điểm chung của bệnh nhân nghiên cứu**

Đặc điểm	Tổng	XCBHT thể	XCBHT	P
	XCBHT n = 32	lan toả n = 21	thể giới hạn n = 11	
<b>N (%)</b>	32	21 (65,6%)	11 (34,4%)	
<b>Tuổi khởi phát (trung bình ± SD)</b>	49,6 ± 12,0	47,5 ± 11,9	53,5 ± 11,6	0,2**
<b>Nam:Nữ</b>	2:5	2:5	3:8	0,9*
<b>Thời gian bị bệnh (tháng)</b>	10,8 ± 8,1	10,2 ± 7,3	12,0 ± 9,8	0,6**
<b>ANA</b>	32 (100%)	21/21 (100%)	11/11 (100%)	
<b>ATA</b>	26 (81,3%)	19/21 (90,5%)	7/11 (63,6%)	0,09*
<b>ACA</b>	2 (6,3%)	1/21 (4,8%)	1/11 (9,1%)	0,58*
<b>RNAP</b>	1 (3,1%)	1/21 (4,8%)	0/11 (0,0%)	0,66*

\* Kiểm định khi bình phương với biến định tính, \*\* Kiểm định t test với biến định lượng.

**Nhận xét:** Có 21 bệnh nhân XCBHT thể lan toả (65,6%) và 11 bệnh nhân XCBHT thể giới hạn (34,4%). Thời gian bị bệnh trung bình của các bệnh nhân XCBHT là 10,8 ± 8,1 tháng. Tất cả các bệnh nhân XCBHT trong nghiên cứu đều có tự kháng thể kháng nhân dương tính. Trước điều trị, 81,3% bệnh nhân XCBHT có tự kháng thể ATA, 6,3% có ACA dương tính, 3,1% có RNAP dương tính. Không có sự khác biệt về tự kháng thể giữa thể giới hạn và thể lan toả.

#### 3.1.2. Thay đổi thương tổn cơ quan sau 1 năm

**Bảng 3.2: Sự thay đổi thương tổn cơ quan sau 1 năm điều trị**

Đặc điểm	Thể lan toả (n = 21)		Thể giới hạn (n = 11)	
	Trước điều trị	Sau 1 năm	Trước điều trị	Sau 1 năm
<b>Loét đầu chi</b>	4/21 (19,0%)	6/21 (28,6%)	2/11 (18,2%)	2/11 (18,2%)
<b>mRSS</b>	17,7 ± 8,1	13,2 ± 7,7***	6,6 ± 3,7	5,4 ± 2,9***
<b>ILD</b>	16/21 (76,2%)	17/21 (81,0%)	9/11 (81,8%)	9/11 (81,8%)
<b>PAH</b>	7/21 (33,3%)	11/21 (52,4%)	6/11 (54,5%)	5/11 (45,5%)
<b>Nuốt nghẹn</b>	4/21 (19,0%)	5/21 (23,8%)	1/11 (9,1%)	2/11 (18,2%)
<b>Rối loạn tổng phân tích nước tiểu</b>	5/21 (23,8%)	8/21 (38,1%)	2/11 (18,2%)	3/11 (27,3%)
<b>Thương tổn cơ</b>	5/21 (23,8%)	6/21 (28,6%)	3/11 (27,3%)	2/11 (18,2%)
<b>Đau khớp</b>	13/21 (61,9%)	14/21 (66,7%)	5/11 (45,5%)	6/11 (54,5%)

\*\*\* p = 0,001. Kiểm định t test với biến định lượng, kiểm định khi bình phương với biến định tính. Những phần in đậm là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

**Nhận xét:** Trước điều trị, mRSS trung bình là 13,9 ± 8,7. Trong đó, nhóm XCBHT thể lan toả có mRSS trung bình là 17,7 ± 8,1, nhóm XCBHT thể giới hạn có mRSS trung bình 6,6 ± 3,7 (p < 0,001). 25 bệnh nhân có ILD (78,1%), 13 bệnh nhân có PAH (40,6%), 6 bệnh nhân loét đầu chi (18,8%), 5 bệnh nhân nuốt nghẹn (15,6%), 18 bệnh nhân đau khớp (56,3%) và 8 bệnh nhân có thương tổn cơ (25%). Sau 1 năm, XCBHT thể lan toả có thêm 2 bệnh nhân loét đầu chi, 4 bệnh nhân PAH, 3 bệnh nhân bất thường tổng phân tích nước tiểu.



### 3.2. THAY ĐỔI NỒNG ĐỘ CÁC CYTOKIN

#### 3.2.1. Thay đổi cytokin trước và sau 1 năm điều trị

**Bảng 3.3: Thay đổi nồng độ của các cytokin trước và sau 1 năm điều trị**

Cytokin (pg/ml)	Trước điều trị		Sau điều trị		P
	N (%)	$\bar{X} \pm SD$	N (%)	$\bar{X} \pm SD$	
<b>TNF</b>	13 (40,6)	8,1 ± 17,9	8 (25)	4,7 ± 13,7	0,16
<b>MCP-1</b>	31 (96,9)	673,6 ± 702,7	30 (93,8)	793,6 ± 1094,5	0,54
<b>TGF-β1</b>	30 (93,8)	28367,0 ±18037,7	31 (96,9)	34562,8 ± 20256,8	0,18
<b>IL-6</b>	32 (100)	301,1 ± 950,5	32 (100)	482,7 ± 2537,5	0,91
<b>BAFF</b>	<b>32 (100)</b>	<b>2148,1 ± 979,4</b>	<b>32 (100)</b>	<b>1683,7 ± 919,1</b>	<b>0,007*</b>
<b>IL-10</b>	10 (31,3)	3,1 ± 14,9	8 (25)	5,2 ± 21,9	0,62
<b>IL-4</b>	8 (25)	2,9 ± 13,1	9 (28,1)	1,4 ± 4,6	0,68
<b>IFN-γ</b>	4 (12,5)	0,1 ± 0,2	1 (3,1)	0,01 ± 0,1	0,13
<b>IL-17A</b>	8 (25)	19,4 ± 92,1	2 (6,3)	1,4 ± 7,7	0,09
<b>IL-2</b>	12 (37,5)	3,1 ± 9,9	13 (40,6)	2,7 ± 6,8	0,73

\* p = 0,007 (Kiểm định Wilcoxon Signed Ranks). Những phần in đậm là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

**Nhận xét:** Trong 10 cytokin khảo sát, MCP-1, TGF-β1, IL-6 và BAFF là các cytokin phát hiện dễ dàng trong máu bệnh nhân XCBHT. Trong 4 cytokin này, chỉ có BAFF giảm có ý nghĩa thống kê sau 1 năm điều trị. Các cytokin còn lại có tỷ lệ phát hiện dưới 50% số bệnh nhân trong nghiên cứu. Số bệnh nhân phát hiện được TNF trong huyết thanh giảm từ 13 xuống 8, IFN-γ giảm từ 4 xuống 1 và IL-17A giảm từ 8 xuống 2 bệnh nhân sau điều trị. IL-10 và IL-4 khác biệt không rõ ràng trước - sau điều trị.

#### 3.2.2. Liên quan giữa nồng độ cytokin và yếu tố khác

**Bảng 3.4: Mối liên quan giữa nồng độ cytokin trước điều trị với các yếu tố khác**

Cytokin (pg/ml)		MCP-1	TGF-β1	IL-6	BAFF
<b>Giới tính*</b>	<b>Nam (n=9)</b>	782,6 ± 564,9	31862,8 ± 21181,9	171,4 ± 314,5	<b>2921,4 ± 1093,0</b>
	<b>Nữ (n=23)</b>	630,9 ± 756,9	26999,1 ± 16980,9	351,8 ± 1107,9	<b>1845,4 ± 759,4</b>
<b>ANA*</b>	<b>3+ (n = 12)</b>	489,6 ± 587,9	30849,2 ± 19802,2	<b>47,1 ± 130,9</b>	2251,4 ± 1170,0
	<b>4+ (n = 20)</b>	783,9 ± 755,9	26877,7 ± 17251,2	<b>453,5 ± 1182,7</b>	2086,1 ± 872,7
<b>ATA*</b>	<b>Âm tính (n=6)</b>	737,0 ± 1005,9	20396,9 ± 15622,4	544,9 ± 1219,5	<b>1421,2 ± 840,1</b>
	<b>Dương tính (n=26)</b>	658,9 ± 639,4	30206,3 ± 18326,8	244,8 ± 897,3	<b>2315,8 ± 944,5</b>
<b>Thời gian bị bệnh (R)**</b>		- 0,14	0,26	-0,02	<b>-0,36</b>

\* Kiểm định Mann-Whitney U. \*\* Hồi quy tuyến tính đơn biến. Chỉ đưa vào phân tích tương quan giữa 4 cytokin có tỷ lệ phát hiện trên 90% trong máu là MCP-1, TGF-β1, IL-6 và BAFF. Những phần in đậm là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

**Nhận xét:** Tại thời điểm trước điều trị, nồng độ BAFF của nam cao hơn nữ, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p = 0,01. Nồng độ IL-6 của nhóm ANA 4+ cao hơn nhóm 3+, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với p = 0,05. Nồng độ BAFF của nhóm ATA dương tính cao hơn nhóm âm tính, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với p = 0,04. Có tương quan tuyến tính nghịch biến giữa nồng độ BAFF trước điều trị với thời gian bị bệnh (r = - 0,36; p = 0,04).

### 3.3. LIÊN QUAN GIỮA CYTOKIN VỚI THƯƠNG TỔN DA VÀ NỘI TẠNG

**Bảng 3.5. Tương quan của nồng độ cytokin với biểu hiện lâm sàng bằng hồi quy logistic đa biến.**

Cytokin	Loét đầu chi	Bệnh phổi kẽ nặng	Đau khớp	≥ 4 thương tổn phối hợp
<b>Giới nam</b>			<b>0,04</b> <b>(0,002-0,9)</b>	0,5 (0,04-5,2)
<b>Thể lan tỏa</b>	1,9 (0,1-64,7)	17,9 (0,7-494,2)	14,7 (0,9-243,6)	0,1 (0,01-2,0)
<b>Thời gian bị bệnh (&lt; 12 tháng)</b>	0,4 (0,01-12,7)	0,2 (0,01-4,7)	0,3 (0,02-3,4)	1,9 (0,1-26,3)
<b>TNF (trên ngưỡng phát hiện)</b>	0,1 (0,004-5,9)	1,9 (0,1-40,0)	2,2 (0,2-25,2)	1,0 (0,1-8,2)
<b>MCP-1 (≥ 389,2 pg/ml)</b>	8,5 (0,2-365,9)	<b>42,1</b> <b>(1,1-1643,1)</b>	<b>30,8</b> <b>(1,4-673,1)</b>	0,3 (0,03-4,2)
<b>TGF-β1 (≥ 46404 pg/ml)</b>	10,1 (0,2-424,2)	0,03 (0-3,7)	2,5 (0,1-53,3)	1,4 (0,1-23,3)
<b>IL-6 (≥ 9,06 pg/ml)</b>	1,0 (0,03-37,5)	0,02 (0-1,1)	0,8 (0,1-7,5)	1,1 (0,1-10,5)
<b>BAFF (≥ 1997,1 pg/mL)</b>	4,7 (0,1-197,1)	0,1 (0,01-1,7)	2,5 (0,3-23,5)	<b>10,1</b> <b>(1,0-98,3)</b>
<b>IL-10 (trên ngưỡng phát hiện)</b>	<b>76,9</b> <b>(1,2-4911,6)</b>	<b>236,2</b> <b>(1,4-38664,9)</b>	<b>23,2</b> <b>(1,0-514,8)</b>	0,1 (0,01-1,8)
<b>IL-2 (trên ngưỡng phát hiện)</b>	2,4 (0,04-126,6)	0,1 (0,01-2,4)	0,9 (0,1-7,3)	1,5 (0,1-20,3)

Chỉ phân tích các cytokin có tỷ lệ phát hiện trong máu > 30%. Giá trị trong bảng: tỉ số chênh OR (khoảng tin cậy 95%). Giá trị in đậm là có ý nghĩa thống kê.

**Nhận xét:** Mô hình đa biến cho thấy: IL-10 trên ngưỡng phát hiện làm tăng loét đầu chi lên 76,9 lần (95% CI: 1,2-4911,6). Sự xuất hiện của MCP-1 với nồng độ ≥ 389,2 pg/ml làm tăng nguy cơ gặp ILD nặng lên 42,1 lần (95% CI: 1,1 – 1643,1). Nồng độ IL-10 trên ngưỡng phát hiện làm tăng nguy cơ gặp ILD nặng lên 236,2 lần (95% CI: 1,4 – 38664,9). Sự xuất hiện của MCP-1 với nồng độ ≥ 389,2 pg/ml làm tăng nguy cơ gặp đau khớp lên 30,8 lần (95% CI: 1,4 – 673,1). IL-10 trên ngưỡng phát hiện làm tăng nguy cơ gặp đau khớp lên 23,2 lần (95% CI: 1,0 – 514,8). Ngoài ra, sự xuất hiện của BAFF với nồng độ < 1977,1 pg/ml làm tăng nguy cơ gặp ≥ 4 thương tổn phối hợp lên 10,1 lần (95% CI: 1,0 – 98,3).

## Chương 4: BÀN LUẬN

### 4.1. ĐẶC ĐIỂM NHÓM NGHIÊN CỨU

#### 4.1.1. Đặc điểm chung của nhóm bệnh nhân XCBHT

Chúng tôi lựa chọn các bệnh nhân XCBHT giai đoạn sớm, chưa được điều trị gì nhằm, mục đích đánh giá đặc điểm lâm sàng và biến đổi cytokin trong giai đoạn đầu của bệnh. Thời gian bị bệnh trung bình của bệnh nhân trong nghiên cứu là  $10,8 \pm 8,1$  tháng, sớm hơn so với các nghiên cứu khác cùng giai đoạn.

#### 4.1.2. Đặc điểm tự kháng thể

Tất cả các bệnh nhân XCBHT trong nghiên cứu đều có tự kháng thể kháng nhân (Anti nuclear antibody - ANA) dương tính. Trước điều trị, 26 bệnh nhân XCBHT trong nghiên cứu (81,3%) có ATA

ương tính, 2 bệnh nhân có ACA dương tính (6,3%), 1 bệnh nhân có RNAP dương tính (3,1%). Trong đó, 19/21 (90,5%) bệnh nhân thể lan toả có ATA và chỉ có 7/11 (63,6%) bệnh nhân thể giới hạn có tự kháng thể này. Theo nghiên cứu của Hamaguchi và cộng sự trên 203 bệnh nhân người Nhật, mỗi bệnh nhân XCBHT thường chỉ gặp một loại tự kháng thể.

## 4.2. NỒNG ĐỘ CÁC CYTOKIN VÀ MỐI LIÊN QUAN VỚI CÁC YẾU TỐ KHÁC

### 4.2.1. TNF

TNF được biết với chức năng chính là tiền viêm và là yếu tố quan trọng nhất trong các bệnh viêm, tự miễn, tăng cao trong các bệnh lý như viêm khớp dạng thấp, vẩy nến...XCBHT là bệnh lý viêm nhưng không theo mô hình phản ứng viêm mạnh kiểu TNF.

### 4.2.2. MCP-1

MCP-1 rất dễ phát hiện trong huyết thanh bệnh nhân XCBHT, có thể do tế bào đơn nhân bị IL-6 kích thích tiết ra. Trong giai đoạn muộn, IL-6 có xu hướng tăng lên làm tăng nồng độ MCP-1 và duy trì ổn định ở ngưỡng cao kéo dài.

### 4.2.3. TGF- $\beta$ 1

Nồng độ TGF- $\beta$ 1 trong huyết thanh bệnh nhân XCBHT rất dễ phát hiện. Sau điều trị, BAFF đóng vai trò làm giảm nồng độ TGF- $\beta$ 1; TGF- $\beta$ 1 và IL-6 tăng lên đồng biến với nhau có thể liên quan đến cơ chế bệnh sinh của bệnh.

### 4.2.4. IL-6

IL-6 là cytokine tham gia vào nhiều khâu nhất trong cơ chế bệnh sinh của bệnh XCBHT. Nồng độ IL-6 thay đổi nhiều, phụ thuộc vào giai đoạn bệnh. Ở giai đoạn sớm, IL-6 do lympho B tiết ra một lượng nhỏ và liên quan với quá trình sản xuất tự kháng thể đặc hiệu cho

bệnh. Ở giai đoạn sau, IL-6 do nguyên bào sợi tiết ra một lượng lớn cùng với TGF- $\beta$ 1 duy trì quá trình xơ hoá da và nội tạng.

### 4.2.5. BAFF

Trong 10 loại cytokin được phân tích, BAFF là cytokin có sự thay đổi rõ rệt nhất. Trước điều trị, BAFF tăng cao trên bệnh nhân XCBHT có thời gian bị bệnh ngắn và nhóm có tự kháng thể ATA dương tính nhưng không liên quan đến nồng độ ATA. Sau 1 năm điều trị, nồng độ BAFF giảm so với trước điều trị, tương quan với nồng độ TGF- $\beta$ 1 trong máu.

### 4.2.6. IL-10

IL-10 được nhắc đến từ năm 1989 trong nghiên cứu của Fiorentino và cộng sự như một cytokin nguồn gốc Th2 có khả năng ức chế sản xuất cytokin của lympho Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 và TNF- $\alpha$ ). Như vậy, IL-10 có khả năng làm suy yếu một loạt các phản ứng miễn dịch và phản ứng viêm. IL-10 trên bệnh nhân XCBHT giai đoạn sớm trước điều trị có nồng độ rất thấp, tỷ lệ phát hiện trong huyết thanh là 31,3%. Sau 1 năm, nồng độ IL-10 tăng nhẹ. Các nghiên cứu cho rằng hiệu lực của phương pháp điều trị IL-10 chống viêm tương đối thấp. Do đó, trên bệnh nhân XCBHT, IL-10 không phải là "đột phá" chính trong điều trị chống viêm mà có thể giúp điều hòa miễn dịch lâu dài.

### 4.2.7. IL-2

IL-2 đã được chứng minh là một yếu tố điều tiết chính của sự di cư lympho trong cơ thể. IL-2 là cytokine đại diện cho sự biệt hoá lympho T, tăng nhẹ trên bệnh nhân XCBHT. Sau 1 năm điều trị, IL-2 có xu hướng giảm, cùng với sự giảm nồng độ của IFN- $\gamma$ , IL-4.

### 4.3. MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA CÁC CYTOKIN VỚI THƯƠNG TỔN DA VÀ NỘI TẠNG

#### 4.3.1. Thương tổn loét đầu chi

Trong mô hình phân tích đa biến, chỉ có IL-10 trên ngưỡng phát hiện tương quan với tăng tỷ lệ loét đầu chi lên 76,9 lần với  $p = 0,04$ . IL-10 được chứng minh là một cytokin chống viêm, tăng lên trong trường hợp tổ chức bị viêm và/ hoặc thiếu máu cục bộ giúp ổn định phản ứng viêm. Sau 1 năm điều trị, 5 bệnh nhân loét đầu chi nặng lên có BAFF cao hơn nhóm loét đầu chi cải thiện. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, tuy nhiên, số lượng bệnh nhân khá ít để đưa ra các nhận định sâu hơn.

#### 4.3.2. Thương tổn dày da

Các nghiên cứu trước đây so sánh nồng độ cytokin với chỉ số mRSS cho kết quả rất khác biệt. Hai cytokin IL-6 và TGF- $\beta$ 1 đã được khẳng định trong nhiều nghiên cứu trước đây về ảnh hưởng kích thích sản xuất collagen từ nguyên bào sợi gây xơ hoá. Mô hình phân tích đa biến của chúng tôi không phát hiện mối liên quan giữa IL-6 và thương tổn da trong giai đoạn sớm của bệnh. Sau 1 năm điều trị, 16 bệnh nhân thương tổn da cải thiện có TGF- $\beta$ 1 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với 4 bệnh nhân thương tổn da nặng lên. Qua nghiên cứu của chúng tôi và nghiên cứu thử nghiệm anti-TGF- $\beta$ 1, chúng ta cần xem xét lại ảnh hưởng của TGF- $\beta$ 1 và cân nhắc sử dụng thuốc kháng TGF- $\beta$ 1 trên bệnh nhân XCBHT.

#### 4.3.3. Thương tổn ILD

Trên mô hình đa biến, MCP-1 tăng  $\geq 389,2$  pg/ml và IL-10 trên ngưỡng phát hiện làm tăng nguy cơ gặp ILD nặng có ý nghĩa thống kê. MCP-1 đóng vai trò trung tâm trong quá trình viêm cấp và mãn

tính bằng cách kiểm soát dòng đại thực bào đi vào tổ chức. Với phân tích mô hình hồi quy đa biến, chúng tôi đã bộc lộ được rõ hơn nguy cơ của MCP-1 lên thương tổn ILD so với nghiên cứu của Antonelli và cộng sự. Theo kết quả của Scala và cộng sự, xơ hoá phổi được đánh giá dựa trên điểm HRCT có liên quan giữa tăng nồng độ IL-10 với sự xuất hiện thương tổn phổi. Tuy nhiên, nghiên cứu này tiến hành trên nhóm bệnh nhân XCBHT giai đoạn muộn (11,1 năm). Nhiều nghiên cứu khác cho thấy sự tiết IL-10 của các tế bào B ngoại vi bị suy yếu làm bệnh nặng lên và hoạt động tăng tiết IL-10 từ các lympho điều hoà làm giảm ILD, protein C phản ứng và tự kháng thể. Vai trò của IL-10 trong xơ hoá phổi cần được đánh giá sâu hơn dựa trên các mô hình thực nghiệm.

#### 4.3.4. Thương tổn đau khớp

Theo phân tích mô hình đa biến, chúng tôi không phát hiện được mối tương quan giữa TNF và IL-6 với thương tổn khớp nhưng lại ghi nhận MCP-1  $\geq 389,2$  pg/ml làm tăng tỷ lệ đau khớp lên 33,9 lần; IL-10 tăng trên ngưỡng phát hiện làm tăng tỷ lệ đau khớp lên 36,9 lần, các số liệu có ý nghĩa thống kê. MCP-1 đã được chứng minh là một dấu ấn sinh học liên quan đến mức độ nặng của bệnh viêm khớp dạng thấp trong nhiều nghiên cứu trước đây. Nguyên bào sợi trong tổ chức hoạt dịch của bệnh nhân viêm khớp có biểu hiện tăng tổng hợp MCP-1 cao hơn so với ở người khoẻ mạnh. Ngược lại, chính MCP-1 được tạo ra kích thích quá trình tuyển dụng tế bào đơn nhân/đại thực bào vào khớp viêm để duy trì phản ứng viêm khớp.

#### 4.3.5. Thương tổn cơ quan phổi hợp

Khi phân tích mô hình đa biến, BAFF  $< 1977,1$  pg/ml làm tăng nguy cơ gặp  $\geq 4$  thương tổn cơ quan lên 10,1 lần, có ý nghĩa thống kê. BAFF tăng lên trong huyết thanh bệnh nhân XCBHT thể hiện sự

kích hoạt lympho B. Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây cho thấy lympho B là một quần thể không đồng nhất với các tập con khác nhau, được phân biệt bởi kiểu hình và sự sản xuất cytokin của chúng. Kết quả của chúng tôi có thể một phần lý giải sự thất bại của liệu pháp ức chế lympho B trong điều trị XCBHT.

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu trên 32 bệnh nhân XCBHT chẩn đoán sớm, chưa điều trị gì, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

### 1. Thay đổi nồng độ các cytokin trong huyết thanh của bệnh nhân xơ cứng bì hệ thống và các yếu tố liên quan

- Trước điều trị, trong giai đoạn sớm của bệnh XCBHT, có 4 cytokin tỷ lệ phát hiện trên 90% trong huyết thanh: MCP-1 ( $673,6 \pm 702,7$  pg/ml), TGF- $\beta$ 1 ( $28\ 367,0 \pm 18\ 037,7$  pg/ml), IL-6 ( $301,1 \pm 950,5$  pg/ml) và BAFF ( $2148,1 \pm 979,4$  pg/ml). 3 cytokin tỷ lệ phát hiện 30-40% bao gồm TNF ( $8,1 \pm 17,9$  pg/ml), IL-10 ( $3,1 \pm 14,9$  pg/ml) và IL-2 ( $3,1 \pm 9,9$  pg/ml). 3 cytokin tỷ lệ phát hiện rất thấp là IL-4 (25%), IFN- $\gamma$  (12,5%) và IL-17A (25%).

- Nồng độ BAFF tăng cao ở nam giới, bệnh nhân có ATA dương tính và trên bệnh nhân có thời gian bị bệnh ngắn. IL-6 tăng cao ở nhóm ANA dương tính 4+.

- Trong phân tích tương quan đơn biến trước điều trị, nồng độ MCP-1 cao đồng biến với IL-6 với  $r = 0,42$ ;  $p = 0,02$ .

- Sau điều trị, chỉ có BAFF giảm có ý nghĩa thống kê so với thời điểm trước điều trị ( $1683,7 \pm 919,1$  pg/ml). Các cytokin nguồn gốc lympho T đều xu hướng giảm (TNF, IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-2). Trong khi đó, các cytokin: IL-6, TGF- $\beta$ 1, MCP-1 và IL-10 có xu hướng tăng lên cho thấy đây là các cytokin quan trọng, duy trì phản ứng viêm và xơ hoá kéo dài trên bệnh nhân XCBHT.

### 2. Tương quan của các cytokin với thương tổn da và nội tạng

- Loét đầu chi gặp trong 18,8% bệnh nhân, nguy cơ tăng 76,9% trên bệnh nhân có IL-10 trên ngưỡng phát hiện. Sau 1 năm, loét đầu chi tăng lên 25%. Nhóm nặng lên có BAFF cao hơn nhóm cải thiện.

- Thương tổn dày da: mRSS trước điều trị là  $13,9 \pm 8,7$ ; giảm có ý nghĩa thống kê sau 1 năm điều trị ( $10,6 \pm 7,4$ ). Nhóm thương tổn da nặng lên có TGF- $\beta$ 1 thấp hơn nhóm cải thiện.

- Các thương tổn nội tạng đều tăng nhẹ sau điều trị

+ ILD gặp trong 78,1% bệnh nhân trước điều trị, nguy cơ tăng 42,1 lần với MCP-1  $\geq 389,2$  pg/ml; 236,2 lần nếu IL-10 trên ngưỡng phát hiện. Sau 1 năm, tỷ lệ ILD tăng lên 81,3%. Nhóm nặng lên có BAFF thấp hơn nhóm cải thiện.

+ Đau khớp gặp trong 56,3% bệnh nhân trước điều trị; nguy cơ tăng 30,8 lần với MCP-1  $\geq 389,2$  pg/ml; 23,2 lần nếu IL-10 trên ngưỡng phát hiện. Sau 1 năm, tỷ lệ đau khớp tăng lên 62,5%.

+ PAH gặp trong 40,6% bệnh nhân trước điều trị; nuốt nghẹn gặp trong 15,6%, rối loạn tổng phân tích nước tiểu gặp trong 21,9% và thương tổn cơ gặp trong 25% bệnh nhân trước điều trị; tăng lên sau 1 năm. Không tìm được tương quan giữa nồng độ cytokin và các thương tổn nội tạng này.

- Có 59,3% bệnh nhân gặp  $\geq 4$  thương tổn cơ quan, nguy cơ tăng lên 10,1 lần nếu BAFF  $< 1977,1$  pg/ml.

**CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ  
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Thương tổn phổi trên các bệnh nhân xơ cứng bì hệ thống giai đoạn sớm - *Tạp chí Da liễu học Việt Nam*. Số 20 (12/2015).
2. Đánh giá mức độ nặng của bệnh xơ cứng bì hệ thống giai đoạn sớm sử dụng thang điểm medsker - *Tạp chí Da liễu học Việt Nam*. Số 22 (07/2016).
3. Vai trò của BAFF trên bệnh nhân xơ cứng bì hệ thống – *Tạp chí y học thực hành*. Số 3 (1068) 2018.
4. Định lượng nồng độ huyết thanh 07 cytokin ở bệnh nhân xơ cứng bì hệ thống giai đoạn sớm – *Tạp chí Y dược lâm sàng 108*. Số 8 (12/2018).

VIETNAM'S MINISTRY OF  
EDUCATION AND TRAINING

VIETNAM'S MINISTRY  
OF HEALTH

**HANOI MEDICAL UNIVERSITY**



**VŨ NGUYỆT MINH**

**CHANGES OF CYTOKINE LEVELS IN SYSTEMIC  
SCLEROSIS**

**Specialty : Dermatology**  
**Number : 62 7201 52**

**SUMMARY OF PH.D. THESIS**

**Hanoi - 2018**

THE THESIS IS COMPLETED AT  
THE HANOI MEDICAL UNIVERSITY

*The thesis can be found at:*

The Vietnam's National Library

The Library of Hanoi Medical University

Supervisor:

**Prof. Trần Hậu Khang MD, PhD**

Opponent 1:

Opponent 2:

Opponent 3:

The thesis will be defended before the  
institutional PhD Thesis Board at the Hanoi Medical  
University.

*At ... on ...*

## INTRODUCTION

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune connective tissue disease characterized by chronic vascular diseases and low-grade inflammation, leading to collagen deposition at tissues. It is important to elucidate the association between inflammation, microvascular disorder, and fibrosis growth factor in the pathogenesis of SSc [1]. After the first anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody was successful in the treatment of rheumatoid arthritis and anti-BAFF was approved by the FDA for the treatment of systemic lupus erythematosus, more research has been focused on the network of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diseases. Cytokines are the main factor causing acute and chronic inflammation. However, each cytokine is produced by different cells and does not work independently but interact with others, forming a complicated network. Production and release of many cytokines stimulate T lymphocytes and B lymphocytes, leading to inflammatory reaction, autoantibody production, microvascular damage and fibrosis, all of which are complicated processes in the mechanism of SSc. Therefore, the balance between Th1/Th2/Th17/Treg cells, B cells, macrophages, and fibroblasts needs to be researched simultaneously in the interaction of the entire network to develop combined therapies that control different pathways resulting in inflammatory and fibrotic reactions in SSc.

For a few decades, researchers have met difficulties in SSc staging because of the differences in the clinical and laboratory manifestations between the early and late stages. These differences also explain the variety in the results of clinical and laboratory

studies on SSc patients, leading to difficulties in determining definitive management. In asymptomatic and mildly symptomatic patients, characteristics of the cytokine network can inform staging and phenotypes. Changes in cytokine levels are associated with organ damage and predict patient outcomes. However, there are very few studies on early stage SSc.

Some longitudinal studies have been conducted on different patient groups, especially at the early stage, to systematically evaluate the roles of cytokines in SSc, but only a few have been completed. Some have suggested cytokines and biomarkers can be predictive of severity, treatment response and prognosis. In Vietnam, there are no immunologic molecular studies about the cytokine network in SSc. Therefore, we conducted the study “**Changes of cytokine levels in systemic sclerosis**” with the following objectives:

1. *To determine the changes of serum cytokine levels in patients with systemic sclerosis before and after treatment at the National Hospital of Dermatology and Venereology.*
2. *To determine the correlation between changes of cytokine levels and skin and organ damage in patients with systemic sclerosis.*

## CONTRIBUTION OF THE THESIS

This is the first study in Vietnam evaluating changes in the serum concentration of 10 cytokines (TGF- $\beta$ 1, BAFF, MCP-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$ , and IL-17A) in early-stage naïve-to-treatment patients with systemic sclerosis and determining the correlation between their changes and skin and visceral lesions. This study was conducted in collaboration with the Dermatology Department, Kanazawa hospital, Japan. The study used a new



method, the BD flow cytometry, which has never been utilized in Vietnam for this purpose. Patients were managed with optimal follow-up, using the mRSS, the lung fibrosis index (evaluating high-resolution CT images of the chest), echocardiography, and electromyography. The data was analyzed using reliable multivariate methods (logistic regression). The results have provided information relating to how the cytokine network is associated with the pathogenesis of systemic sclerosis. The information is valuable for seeking new target therapies for systemic sclerosis.

## THESIS STRUCTURE

The thesis has 125 pages, excluding appendices and references. The thesis includes 4 chapters, 27 tables, 4 charts, 6 figures, 3 diagrams, 170 references (Vietnamese 4, English 166), and appendices. The structure of the thesis: introduction 2 pages, overview 40 pages, subjects and method 16 pages, results 32 pages, discussion 32 pages, and conclusion 2 pages. Four articles relating to the thesis have been published.

## CHAPTER 1. OVERVIEW

### 1.1. Systemic sclerosis

#### 1.1.1. Epidemiology

Systemic sclerosis (SSc) is a rare autoimmune disease described about 3000 years ago. The disease is worldwide prevalent, occurs in all races with a prevalence of 31-88 affected people in one million populations. The condition mainly affects people between 40 and 50 years of age.

#### 1.1.2. Classification

- *Diffuse cutaneous systemic sclerosis* (dcSSc) is characterized by skin thickening extending to proximal to elbows and knees.
- *Limited cutaneous systemic sclerosis* (lcSSc): is characterized by skin thickening limited to distal to elbows and knees.
- SSc can also be classified by its natural course: early, intermediate, and late stage. Many studies defined early SSc as having an onset of less than three years.

#### 1.1.3. Diagnostic criteria

**Table 1.1: The 2013 ACR/EULAR Classification Criteria for Systemic Sclerosis**

Criteria	Sub-item	Weight
Skin thickening of the fingers of both hands extending proximal to the MCPs (sufficient criteria)		<b>9</b>
Skin thickening of the fingers (only count the highest score)	+ <i>Puffy fingers</i>	<b>2</b>
	+ <i>Sclerodactyly of the fingers (distal to MCP but proximal to the PIPs)</i>	<b>4</b>
Fingertip lesions	+ <i>Digital tip ulcers</i>	<b>2</b>
	+ <i>Fingertip pitting scars</i>	<b>3</b>
Telangiectasia		<b>2</b>
Abnormal nailfold capillaries		<b>2</b>
PAH and/or ILD (maximum 2 points)	+ <i>PAH</i>	<b>2</b>
	+ <i>ILD</i>	<b>2</b>
Raynaud's phenomenon		<b>2</b>

SSc-related autoantibodies (maximum 3 points)	+ <i>ACAs</i>	1
	+ <i>ATAs</i>	1
	+ <i>RNAP</i>	1

A patient with a total score of 9 points or more can be diagnosed with SSc.

*Notes:* MCP: metacarpophalangeal joints; PIP: proximal interphalangeal joints; PAH: pulmonary arterial hypertension; ILD: interstitial lung disease; ACA: anti-centromere antibody; ATA: anti-topoisomerase I antibody; RNAP: anti-RNA polymerase III antibody.

## 1.2. The role of cytokines in systemic sclerosis

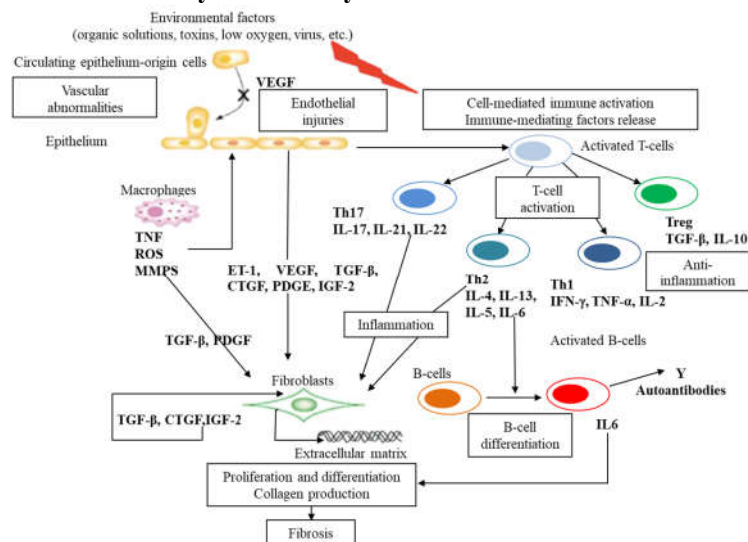


Figure 1.1: Pathogenesis of SSc

### 1.2.1. Vascular injury

Vascular injury is the first important feature in the pathogenesis of SSc. Endothelial injuries might result from genetic regulations which are triggered by environmental factors. Ischemic tissues react by releasing vascular proliferating factor and inflammatory mediators that activate fibroblasts, increase accumulation of fibrotic tissues, and create a vicious cycle. This process stimulates the innate immune system, activates B and T cells, releases cytokines, and produces autoantibodies. Therefore, cytokines and autoantibodies are shown to be the main substances associated with the lesions of the disease and also targets of therapy.

### 1.2.2. Macrophage and its cytokines

Macrophages are differentiated from monocytes and are the key cells that mediate and induce immune cells. The first study on activated monocytes/macrophages in SSc patients is York et al. (2007). After that, other studies have shown that, in the serum of SSc patients, macrophages proliferate in the M2 model, release IL-4, produce high IL-10, and promote wound healing and fibrosis. - *TNF* (*Tumor necrosis factor*) is a cytokine mediating proliferation, survival, differentiation, and apoptosis of multiple important immune cells, especially macrophage. TNF is known for its important pro-inflammatory activity and is the most important factor in inflammatory diseases.

- *MCP-1* (*Monocyte chemoattractant protein-1*) or *CCL2* (*CC chemokine ligand 2*) is mainly produced from monocytes and infiltrative macrophages at the early stage of SSc.

### 1.2.3. Collagen production disorder and the role of fibroblast

Collagen accumulation in the skin and organs is the main feature of SSc. These collagen fibers are produced by myofibroblast.

Different cells can transform into myofibroblast, including tissue fibroblast, bone marrow-derived fibrocyte, perivascular cell, etc. in the effect of TGF- $\beta$  (transforming growth factor).

#### **1.2.4. Immune disturbance and the role of B lymphocyte and its cytokines**

B cells are likely to play an important role in immune-mediated response of SSc.

- *Autoantibodies* are the most reliable biomarkers for diagnosis, classification, and prediction of specific clinical signs and SSc.

- *BAFF (B cell-activating factor family) or B lymphocyte stimulator (BlyS)* plays an important role in the survival and proliferation of B cells.

- *IL-6* is an interleukin acting as a multi-functional pro-inflammatory cytokine. Its functions include stimulating B cells to differentiate into plasma cells, stimulating T cells, and initiates acute inflammatory reactions. Anti-IL-6 (tocilizumab) has provided disease limitation for SSc.

#### **1.2.5. Immune disturbance and the role of T lymphocyte and its cytokines**

T cells play an important role in organ damage in SSc, through the inflammatory cytokines and fibrotic mediators. IL-2 was initially known as an *in vitro* T lymphocyte growth factor.

- *Th1*: Evaluation of the level of IFN- $\gamma$  in the cytokine networks is very important to understand the activity of Th1 in SSc.

- *Th2*: IL-4 represents Th2 and increases collagen synthesis of fibroblast.

- *Th17*: Research on IL-17 is a new direction to understand the pathogenesis of SSc.

- *Treg (T regulation)*: Treg produces IL-10 or the human cytokine synthesis inhibitory factor – CSIF, one of the important anti-inflammatory cytokines. IL-10 regulates synthesis and lysis of the extracellular matrix in the connective tissue, making it one of the potential candidates for treating fibrotic diseases.

## **CHAPTER 2: SUBJECTS AND METHODS**

**2.1. Subjects:** 32 patients diagnosed with SSc (based on the 2013 ACR/EULAR Classification Criteria for Systemic Sclerosis) that had an onset of  $\leq 36$  months, were naïve to treatment or had stopped immunosuppressive or antifibrotic therapy for more than 2 months, and were treated at the National Hospital of Dermatology and Venereology (NHDV).

### **2.2. Methods**

**2.2.1. Study design:** Cross-sectional study.

**2.2.2. Sample size:** Convenience sampling.

#### **2.2.3. Study procedures**

Determine clinical and laboratory features at T0 (see Section 2.2.4 for list of features, including ANA, ACA, and ATA for definitive diagnosis).

- Store serum sample at T0: according the NHDV's standard operating procedure (SOP).
- Treatment: based on clinical features and disease progress, done by doctors at the Connective Tissue Disease Unit of NHDV.
  - o Low-dose methylprednisolone (equivalent to  $<20$  mg/day of prednisolone) and tapered based on response.

- Methotrexate, starting from 7.5 mg/week and increased based on response (if not contraindicated).
- Nifedipine and/or bosentan if peripheral vascular lesions and/or PAH were present.
- Azathioprine if severe ILD developed or patients did not respond to the regimen of two immunosuppressive agents above.
- Store serum sample at T12: according the SOP in the Section 2.2.5.2.
- Transfer samples to the Dermatology Department, Kanazawa Hospital, Japan to test autoantibodies and cytokines: Serum samples were transferred in a foam-box containing dry ice. Samples were checked to make sure that they were not unfrozen during transfer and until they were put into a -20°C freezer in Japan again before testing.

#### 2.2.4. Study variables

- Age of onset (year), sex (male/female)
- Onset (month): time from the first symptom (including Raynaud's phenomenon) to recruitment.
- The presence of digital tip ulcers was checked at baseline and their change (improved, not changed, or worsened) was clinically evaluated after 12 months.
- Skin thickening was assessed by the modified Rodnan Skin Scale (mRSS). A skin lesion is considered improved if 12-month mRSS decreases by  $\geq 2$  points and worsened if 12-month mRSS increases by  $\geq 2$  points.
- Interstitial lung disease (ILD) was evaluated on high-resolution computed tomography (HRCT) of the chest at T0 and T12 at the Imaging Department of Bach Mai Hospital. HRCT images were scored at five levels. ILD is present if HRCT score is greater than 0. ILD is considered improved if 12-month HRCT score

- decreases by  $\geq 2$  points and worsened if 12-month HRCT score increases by  $\geq 2$  points.
- Pulmonary arterial hypertension (PAH) was assessed by transthoracic echocardiography (TTE). The systolic pulmonary arterial pressure (PAPs, normal range  $28 \pm 5$  mmHg) was evaluated at T0 and T12. PAH was diagnosed when PAPs was  $\geq 35$  mmHg. TTE was done at Bach Mai hospital. PAH is considered improved if 12-month PAPs decreases by  $\geq 5$  mmHg and worsened if 12-month PAPs increases by  $\geq 5$  mmHg.
- Renal injuries were evaluated by abnormal urinalysis at T0 and T12 (if needed). Urinalysis abnormalities included the presence of proteinuria, hematuria, leukocyturia, or urine casts in at least two urine specimens taken at two different time points. Improvement or worsening was determined by disappearance of present abnormalities or appearance of new abnormalities, respectively.
- The presence of difficulty swallowing was assessed at T0 and T12. Clinical change (improved, not changed, or worsened) was evaluated after 12 months.
- Muscular involvement was considered present if the patient had at least 2 out of 3 signs: (1) Muscle pain/ weakness, (2) Elevated creatine kinase (CK) at the time the symptoms were present, and (3) needle electromyography (EMG) showing myopathy lesions.
- Joint involvement was determined by the presence of joint pain, redness, heat, and swelling at T0 and T12. Clinical change (improved, not changed, or worsened) was evaluated after 12 months.
- Autoantibodies and cytokines:
  - ANA was measured by indirect immunofluorescence (IF) on Hep-2 cells (from 0 to 4+). The presence of ACA was assessed by the presence of discrete aggregation.

- ATA and RNAP were measured by corresponding testing kits (both positive/negative and concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )).
- The concentration of TGF- $\beta$ 1, BAFF/BLyS/TNFSF13B, CCL2/MCP-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$ , and IL-17A was measured in pg/ml. A concentration of 0 was called “below detection threshold”. A concentration of  $> 0$  was called “above detection threshold”. Cutoffs for the logistic models were chosen by the quantile values from previous studies.

### **2.2.5. Laboratory techniques**

#### *2.2.5.1. Laboratory tests performed in Vietnam*

The following tests were performed at the NHDV.

- ANA and ACA were tested by indirect immunofluorescence on Hep-2 cells: Autoantibodies in patient serum is combined with nuclear antigen (Hep-2 cells) and detected under IF microscope by anti-human IgG antibody (anti IgG-FITC), using the Fluoro Hepana kit (MBL, Japan).
- ATA ELISA: based on the specific antigen-antibody combination, an enzyme is attached to the antibody. When the corresponding substrate is added, the enzyme will catalyze, producing a color. Concentration of the antigen/antibody is measured by the intensity of the color. For ATA ELIS, we used the Medical & Biological Laboratories kit (Naka-ku, Nagoya, Japan).

#### *2.2.3.5. Laboratory tests performed in Japan*

The following tests were performed by the PhD student and staff at the Dermatology Department, Kanazawa hospital, Japan.

- RNAP, TGF- $\beta$ 1, BAFF/BLyS/TNFSF13B, and CCL2/MCP-1 were measured by the Mesacup anti-RNA kit (Japan), Quantikines ELISA Human TGF- $\beta$ 1 Immunoassay, Quantikines

ELISA Human BAFF/BLyS/TNFSF13B Immunoassay and Quantikines ELISA Human CCL2/MCP-1 Immunoassay, respectively (R&D Systems China Company).

- The IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  and IL-17A concentrations were measured by BD flow cytometry (unit: pg/ml) using the BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (Becton, Dickinson and Company). The principle is to capture soluble molecules of interest, each molecule is attached to a bead with a particular size and fluorescent color. The strength of fluorescent signal is proportional to the number of captured soluble molecules of interest and is analyzed by having the solution flow through a cytometer. In this way, different soluble molecules (even at very low concentrations) can be measured simultaneously; therefore, the test is accurate and sample and time-saving.

### **2.2.4. Data analysis**

Data was analyzed using SPSS 20 (IBM Corporation). Significance was defined as a p-value of  $< 0.05$ . Univariate correlation between two quantitative variables was described by the correlation coefficient Pearson’s  $r$  (for normally distributed variables) or Spearman’s  $r$  (for not normally distributed variables). Multivariate correlation for binary outcomes was examined by the multiple logistic regression, described by the odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95%CI).

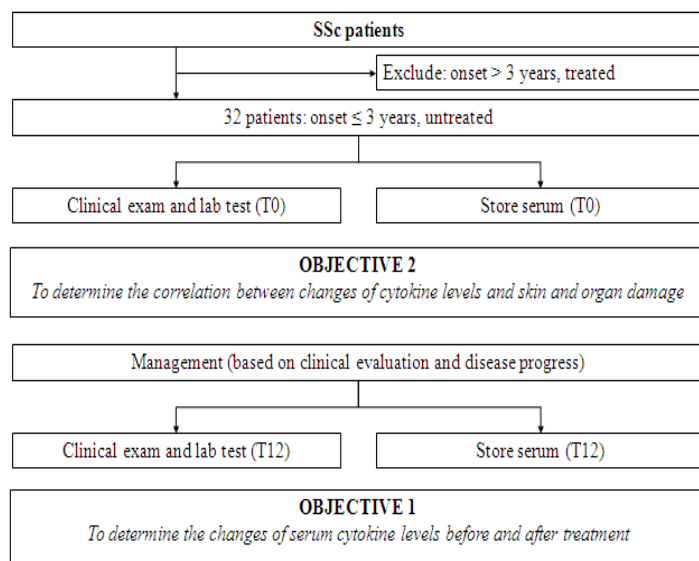
**2.2.5. Limitations:** Study duration was three years, which did not allow a large sample size. Study patients should be followed up.

### **2.3. Study sites and duration**

Patients were recruited at the NHDV and samples were analyzed at the Dermatology Department, Kanazawa Hospital, Japan from December 2014 to December 2017.

## 2.4. Ethics

The study was approved by the committee for PhD students and the Dermatology Department of the Hanoi Medical University for the collaboration with the NHDV in patient management. SSc patients agreed to participate in the patient management program at the NDV. Samples were collected and stored routinely. Patients were tested for cytokines for free. All patient information was kept confidential.



**Figure 1.2: Study flow diagram**  
**CHAPTER 3: RESULTS**

### 3.1. Patient characteristics

#### 3.1.1. General characteristics

**Table 3.1: General characteristics**

Characteristic	Diffuse SSc (n = 21)	Limited SSc (n = 11)	Total (n = 32)	p
<b>N (%)</b>	21 (65.6%)	11 (34.4%)	32	
<b>Age of onset (mean ± SD)</b>	47.5 ± 11.9	53.5 ± 11.6	49.6 ± 12.0	0.2**
<b>Male : female</b>	6:15	3:08	9:23	0.9*
<b>Disease duration (month)</b>	10.2 ± 7.3	12.0 ± 9.8	10.8 ± 8.1	0.6**
<b>ANA</b>	21/21 (100%)	11/11 (100%)	32 (100%)	
<b>ATA</b>	19/21 (90.5%)	7/11 (63.6%)	26 (81.3%)	0.09*
<b>ACA</b>	1/21 (4.8%)	1/11 (9.1%)	2 (6.3%)	0.58*
<b>RNAP</b>	1/21 (4.8%)	0/11 (0.0%)	1 (3.1%)	0.66*

\*: chi-square test; \*\*: t-test.

*Comment:* 21 (65.6%) and 11 (34.4%) patients had diffuse and limited SSc, respectively. The mean disease duration was  $10.8 \pm 8.1$  months. All patients had positive ANA. Before treatment, 81.3%, 6.3%, and 3.1% of the patients had positive ATA, ACA, and RNAP, respectively. There was no difference regarding the proportion of positive autoantibodies between two clinical types.

#### 3.1.2. Changes of organ damage after one year

**Table 3.2: Changes of organ damage after one year**

Characteristic	Diffuse (n = 21)		Limited (n = 11)	
	Before treatment	After one year	Before treatment	After one year
Digital tip ulcer	4/21 (19.0%)	6/21 (28.6%)	2/11 (18.2%)	2/11 (18.2%)
mRSS	17.7 ± 8.1	13.2 ± 7.7 ***	6.6 ± 3.7	5.4 ± 2.9 ***
ILD	16/21 (76.2%)	17/21 (81.0%)	9/11 (81.8%)	9/11 (81.8%)
PAH	7/21 (33.3%)	11/21 (52.4%)	6/11 (54.5%)	5/11 (45.5%)
Dysphagia	4/21 (19.0%)	5/21 (23.8%)	1/11 (9.1%)	2/11 (18.2%)
Urine abnormalities	5/21 (23.8%)	8/21 (38.1%)	2/11 (18.2%)	3/11 (27.3%)
Muscle damage	5/21 (23.8%)	6/21 (28.6%)	3/11 (27.3%)	2/11 (18.2%)
Joint pain	13/21 (61.9%)	14/21 (66.7%)	5/11 (45.5%)	6/11 (54.5%)

\*\*\*:  $p < 0.001$  (Wilcoxon signed ranks test).

*Comment:* Before treatment, the mean mRSS of all, diffuse SSc, and limited SSc patients was  $13.9 \pm 8.7$ ,  $17.7 \pm 8.1$ , and  $6.6 \pm 3.7$ , respectively (the difference between two clinical types was significant,  $p < 0.001$ ). 25 (78.1%), 13 (40.6%), 6 (18.8%), 5 (15.6%), 18 (56.3%), and 8 (25%) of the patients had ILD, PAH, digital tip ulcer, difficulty swallowing, joint pain, and muscular involvement. After one year, an addition of 2, 4, and 3 diffuse SSc patients had digital tip ulcer, PAH, and abnormal urinalysis, respectively.

### 3.2. Changes in cytokine levels

#### 3.2.1. Changes between before treatment and after one year

**Table 3.3: Cytokine level changes between before treatment and after one year**

Cytokine	Before treatment	After treatment	P
----------	------------------	-----------------	---

(pg/ml)	N (%)	$\bar{X} \pm SD$	N (%)	$\bar{X} \pm SD$	
TNF	13 (40.6)	$8.1 \pm 17.9$	8 (25)	$4.7 \pm 13.7$	0.16
MCP-1	31 (96.9)	$673.6 \pm 702.7$	30 (93.8)	$793.6 \pm 1094.5$	0.54
TGF- $\beta$ 1	30 (93.8)	$28367.0 \pm 18037.7$	31 (96.9)	$34562.8 \pm 20256.8$	0.18
IL-6	32 (100)	$301.1 \pm 950.5$	32 (100)	$482.7 \pm 2537.5$	0.91
BAFF	32 (100)	$2148.1 \pm 979.4$	32 (100)	$1683.7 \pm 919.1$	<b>0.007*</b>
IL-10	10 (31.3)	$3.1 \pm 14.9$	8 (25)	$5.2 \pm 21.9$	0.62
IL-4	8 (25)	$2.9 \pm 13.1$	9 (28.1)	$1.4 \pm 4.6$	0.68
IFN- $\gamma$	4 (12.5)	$0.1 \pm 0.2$	1 (3.1)	$0.01 \pm 0.1$	0.13
IL-17A	8 (25)	$19.4 \pm 92.1$	2 (6.3)	$1.4 \pm 7.7$	0.09
IL-2	12 (37.5)	$3.1 \pm 9.9$	13 (40.6)	$2.7 \pm 6.8$	0.73

\*: Wilcoxon signed ranks test.

*Comment:* Of 10 tested cytokines, MCP-1, TGF- $\beta$ 1, IL-6, and BAFF were easily detected in the serum. Only BAFF had significant decrease after one year. Other cytokines were only detected in less than 50% of the patients. After one year, there was a decrease in the number of patients with TNF (13 to 8), IFN- $\gamma$  (4 to 1), and IL-17A (8 to 2) detected in the serum. No difference was observed regarding IL-10 and IL-4.

#### 3.2.2. Correlation of cytokine levels with other factors

**Table 3.4: Correlation of cytokine levels with other factors**

Cytokine (pg/ml)	MCP-1	TGF- $\beta$ 1	IL-6	BAFF
Sex*				
Male (n=9)	$782,6 \pm 564,9$	$31862,8 \pm 21181,9$	$171,4 \pm 314,5$	<b><math>2921,4 \pm 1093,0</math></b>
Female (n=23)	$630,9 \pm 756,9$	$26999,1 \pm 16980,9$	$351,8 \pm 1107,9$	<b><math>1845,4 \pm 759,4</math></b>

ANA*	3+ (n = 12)	489,6 ± 587,9	30849,2 ± 19802,2	<b>47,1 ± 130,9</b>	2251,4 ± 1170,0
	4+ (n = 20)	783,9 ± 755,9	26877,7 ± 17251,2	<b>453,5 ± 1182,7</b>	2086,1 ± 872,7
ATA*	Negative (n=6)	737,0 ± 1005,9	20396,9 ± 15622,4	544,9 ± 1219,5	<b>1421,2 ± 840,1</b>
	Positive (n=26)	658,9 ± 639,4	30206,3 ± 18326,8	244,8 ± 897,3	<b>2315,8 ± 944,5</b>
Disease duration (R)**		- 0,14	0,26	-0,02	<b>-0,36</b>

\*: Mann-Whitney U test; \*\*: Linear regression. Only 4 cytokines detected in >90% of the patients were analyzed. Values in bold were significantly different.

*Comment:* Before treatment, the BAFF level was higher in male than in female ( $p = 0.01$ ). The IL-6 level was higher in patients with ANA 4+ than ANA 3+ ( $p = 0.05$ ). The BAFF level in ATA-positive patients was higher in ATA-negative ( $p = 0.04$ ). The pretreatment BAFF level was inversely correlated with disease duration ( $r = -0.36$ ;  $p = 0.04$ ).

### 3.3. Relationship between cytokines and organ damage

**Table 3.5: Correlation of cytokine levels with clinical features (multiple logistic regression)**

Cytokine	Digital tip ulcer	Severe ILD	Joint pain	≥4 organs involved
Sex, male			<b>0.04 (0.002–0.9)</b>	0.5 (0.04–5.2)
Diffuse type	1.9 (0.1–64.7)	17.9 (0.7–494.2)	14.7 (0.9–243.6)	0.1 (0.01–2.0)

Disease duration (< 12 months)	0.4 (0.01–12.7)	0.2 (0.01–4.7)	0.3 (0.02–3.4)	1.9 (0.1–26.3)
TNF (above detection threshold)	0.1 (0.004–5.9)	1.9 (0.1–40.0)	2.2 (0.2–25.2)	1.0 (0.1–8.2)
MCP-1 (≥ 389.2 pg/ml)	8.5 (0.2–365.9)	<b>42.1 (1.1–1643.1)</b>	<b>30.8 (1.4–673.1)</b>	0.3 (0.03–4.2)
TGF-β1 (≥ 46404 pg/ml)	10.1 (0.2–424.2)	0.03 (0–3.7)	2.5 (0.1–53.3)	1.4 (0.1–23.3)
IL-6 (≥ 9.06 pg/ml)	1.0 (0.03–37.5)	0.02 (0–1.1)	0.8 (0.1–7.5)	1.1 (0.1–10.5)
BAFF (≥ 1997.1 pg/mL)	4.7 (0.1–197.1)	0.1 (0.01–1.7)	2.5 (0.3–23.5)	<b>10.1 (1.0–98.3)</b>
IL-10 (above detection threshold)	<b>76.9 (1.2–4911.6)</b>	<b>236.2 (1.4–38664.9)</b>	<b>23.2 (1.0–514.8)</b>	0.1 (0.01–1.8)
IL-2 (above detection threshold)	2.4 (0.04–126.6)	0.1 (0.01–2.4)	0.9 (0.1–7.3)	1.5 (0.1–20.3)

Only cytokines detected in >30% of the patients were analyzed.

Values were described as OR (95%CI). Values in bold were significantly different.

*Comment:* Detectable IL-10 was associated with digital tip ulcer (OR 76.9; 1.2–4911.6). MCP-1 of ≥ 389.2 pg/ml (OR 42.1; 1.1–1643.1) and detectable IL-10 (OR 236.2; 1.4–38664.9) were associated with severe ILD. MCP-1 of ≥ 389.2 pg/ml (OR 30.8; 1.4–673.1) and detectable IL-10 (OR 23.2; 1.0–514.8) were associated with joint



pain. BAFF of  $\geq 1997.1$  pg/ml was associated with  $\geq 4$  organ involved (OR 10.1; 1.0–98.3).

## CHAPTER 4: DISCUSSION

### 4.1. Patient characteristics

#### 4.1.1. General characteristics

We selected early untreated SSc patients to determine clinical manifestations and cytokine changes at the early stage of the disease. Patients' duration were  $10.8 \pm 8.1$  months, shorter than other studies on the same population (patients at early stage).

#### 4.1.2. Autoantibodies

Anti-nuclear antibody (ANA) was found in the serum of all patients. ATA, ACA, and RNAP were positive in 26 (81.3%), 2 (6.3%), and 1 (3.1%) patients, respectively. 19 out of 21 (90.5%) patients with diffuse SSc and 7 out of 11 (63.6%) patients with limited SSc had ATA. Hamaguchi et al conducted a study in 203 Japanese SSc patients and found that all patients had only one positive autoantibody.

### 4.2. Levels of cytokines and their correlation with other factors

#### 4.2.1. TNF

TNF is known for its proinflammatory activity and the most important factor in autoimmune inflammatory diseases. Its level is high in rheumatoid arthritis and psoriasis. Despite being an inflammatory disease, SSc does not have a strong inflammatory profile of TNF.

#### 4.2.2. MCP-1

MCP-1 can be easily detected in the serum of SSc patients. It can be produced by monocytes induced by IL-6. At the late stage, IL-6 tends to increase, leading to an increase in MCP-1, and maintains at a high level for a long time.

#### 4.2.3. TGF- $\beta$ 1

TGF- $\beta$ 1 can be easily detected in the serum of SSc patients. After treatment, BAFF decreases the level of TGF- $\beta$ 1; the concomitant increase of TGF- $\beta$ 1 and IL-6 might relate to the pathogenesis of SSc.

#### 4.2.4. IL-6

IL-6 participates in many steps in the pathogenesis. Its level in SSc patients changes drastically, depending on the stage of the disease. At the early stage, a small amount of IL-6 is produced by B cells and relates to the production of autoantibodies specific for SSc. At the late stage, a large amount of IL-6 is produced by fibroblasts, together with TGF- $\beta$ 1, maintaining skin and organ fibrosis.

#### 4.2.5. BAFF

Among the 10 cytokines analyzed, BAFF is the cytokine with the most significant change in the level. Before treatment, the level of BAFF increased in patients with short duration and in the ATA-positive group (but did not correlate to the level of ATA). After one year, the level of BAFF decreased compared to that before treatment and was correlated with the serum level of TGF- $\beta$ 1.

#### 4.2.6. IL-10

IL-10 has been mentioned since 1989 in the study of Fiorentino et al as a Th2-derived cytokine that could inhibit Th1's cytokine production (IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$ ). Thus, IL-10

could weaken a series of immune and inflammatory reaction. The level of IL-10 in pretreatment early SSc patients was low, only found in 31.3% of the patients. After one year, the level of IL-10 was mildly increased. Studies suggested low effectiveness of anti-inflammatory IL-10 therapy. Therefore, in SSc patients, IL-10 is not the mainstay of anti-inflammatory therapy that can provide long-term immune regulation.

#### **4.2.7. IL-2**

IL-2 has been proven to be a major mediator of lymphocyte movement in the body. IL-2 represents the differentiation of T lymphocytes and mildly increases in SSc patients. After one year, the level of IL-2 tends to decrease together the decrease of IFN- $\gamma$  and IL-4.

### **4.3. Relationship of cytokines and skin and organ involvement**

#### **4.3.1. Digital tip ulcer**

Our multivariate model showed that only IL-10 above detection threshold was associated with digital tip ulcer. IL-10 has been proven to be an anti-inflammatory cytokine, its level increases in inflammation and/or ischemia to regulate the inflammatory reaction. After one year, the level of BAFF in 5 patients with worsened digital tip ulcer was higher than in patients with improvement. The difference was significant, but the small number of patients did not allow us to provide further insight.

#### **4.3.2. Skin thickening**

Previous studies, which compared cytokine levels with the mRSS, showed significant difference. IL-6 and TGF- $\beta$ 1 have been shown in many studies to stimulate collagen production from fibroblasts, resulting in fibrosis. Our multivariate regression did not

show relationship between IL-6 and skin thickening at early stage. After one year, 16 patients with improved skin thickening had significantly higher TGF- $\beta$ 1 level compared with 4 worsened patients. This finding, together with evidence from anti-TGF- $\beta$ 1 trials, prompts the consideration of the role of TGF- $\beta$ 1 and use of anti-TGF- $\beta$ 1 therapy in SSc patients.

#### **4.3.3. ILD**

In our study, MCP-1 and IL-10 were associated with ILD. MCP-1 plays a central role in the acute and chronic phase of inflammation by controlling the tissue influx of macrophage. In the multivariate model, we were able to elucidate the risk of MCP-1 to ILD, compared to the study of Antonelli et al. Scala et al showed that the severity of ILD (assessed by the HRCT score) was associated with increased IL-10; however, this study was done on late-stage patients (mean disease duration 11.1 years). Other studies showed that the weakened release of IL-10 from peripheral B cells associated with increase in disease severity and increased IL-10 production from Treg reduced ILD, C-reactive protein and autoantibodies. The role of IL-10 in ILD needs to be further evaluated by experimental models.

#### 4.3.7. Joint pain

No correlation was detected between TNF and IL-6 and joint involvement but MCP-1 of  $\geq 389.2$  pg/ml and IL-10 above detection threshold significantly increased the odds of joint pain. MCP-1 has been proved to be a biomarker relating to the severity of rheumatoid arthritis in recent studies. Fibroblasts in the synovial tissue of arthritis patients were shown to have higher MCP-10 synthesis compared to healthy controls. On the contrary, MCP-1 stimulates the recruitment of monocytes/macrophages into inflamed joints to maintain the inflammatory reaction.

#### 4.3.8. Multiple organ involvement

In multivariate analysis, BAFF of  $< 1977.1$  pg/ml significantly increased the risk of more than four organ involvements. Increased BAFF represents B cell activation. However, recent studies have shown that B cells are composed of different subpopulations, differentiated by their phenotypes and cytokines that they produce. Our result could explain the failure of anti-B lymphocyte therapy in the treatment of SSc.

### CONCLUSION

This is a study on 32 untreated early SSc patients. Below are the findings:

#### 1. Changes of the serum levels of cytokines in SSc patients and associated factors

- Before treatment, at the early stage, 4 cytokines were detected in the serum of  $>90\%$  of the patients: MCP-1 ( $673.6 \pm 702.7$  pg/ml). TGF- $\beta$ 1 ( $28\ 367.0 \pm 18\ 037.7$  pg/ml). IL-6 ( $301.1 \pm 950.5$  pg/ml). and BAFF ( $2148.1 \pm 979.4$  pg/ml). Three cytokines

were detected in the serum of 30%–40% of the patients: TNF ( $8.1 \pm 17.9$  pg/ml), IL-10 ( $3.1 \pm 14.9$  pg/ml), and IL-2 ( $3.1 \pm 9.9$  pg/ml). Three cytokines were detected in only a small number of patients: IL-4 (25%), IFN- $\gamma$  (12,5%), and IL-17A (25%).

- The BAFF level was higher in male patients, ATA-positive patients, and patients with shorter disease duration. IL-6 was higher in patients with ANA 4+.
- The MCP-1 level was correlated with the IL-6 ( $r = 0.42$ ;  $p = 0.02$ ).
- After treatment, only BAFF was significantly decreased. Cytokines from T lymphocyte (TNF, IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-2) tended to decrease. Increased levels of IL-6, TGF- $\beta$ 1, MCP-1, and IL-10 suggest these are important cytokines which maintain and prolong inflammatory and fibrotic reactions in SSc patients.

#### 2. Relationship of cytokines and skin and organ involvement

- Digital pit ulcer was seen in 18.8% of the patients and was associated with IL-10 above threshold detection. After one year, the number of patients increased by 25%. Worsening patients had higher BAFF compared with improving patients.
- Skin thickening: the mean pretreatment mRSS was  $13.9 \pm 8.7$  and significantly decreased after treatment ( $10.6 \pm 7.4$ ). Worsening patients had lower TGF- $\beta$ 1 than improving patients.
- Organ involvements were worsened after treatment:
  - o ILD was seen in 78.1% of the patients before treatment and was associated with MCP-1  $\geq 389,2$  pg/ml (OR 42.1) and IL-10 above threshold detection (OR 236.2). After one

year, ILD was seen in 81.3%. Worsening patients had lower BAFF level.

- Joint pain was seen in 56.3% of the patients before treatment and was associated with MCP-1  $\geq$  389,2 pg/ml (OR 30.8) and IL-10 above threshold detection (OR 23.2). After one year, joint pain was seen in 62.5%.
- PAH, difficulty swallowing, abnormal urinalysis, and muscular involvement were seen in 40.6%, 15.6%, 21.9%, and 25% of the patients before treatment; the proportions increased after one year. No correlation was found between cytokine levels and these involvements. 59.% of the patients had  $\geq$  4 involvements; it was associated with BAFF  $<$  1977,1 pg/ml (OR 10.1).

## RELEVANT PUBLICATIONS

5. Thương tổn phổi trên các bệnh nhân xơ cứng bì hệ thống giai đoạn sớm - *Tạp chí Da liễu học Việt Nam*. Số 20 (12/2015).
6. Đánh giá mức độ nặng của bệnh xơ cứng bì hệ thống giai đoạn sớm sử dụng thang điểm medsker - *Tạp chí Da liễu học Việt Nam*. Số 22 (07/2016).
7. Vai trò của BAFF trên bệnh nhân xơ cứng bì hệ thống – *Tạp chí y học thực hành*. Số 3 (1068) 2018.
8. Định lượng nồng độ huyết thanh 07 cytokin ở bệnh nhân xơ cứng bì hệ thống giai đoạn sớm – *Tạp chí Y dược lâm sàng 108*. Số 8 (12/2018).