

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN THỊ THẢO

**NGHIÊN CỨU SỰ THAY ĐỔI NỒNG ĐỘ CỦA
MỘT SỐ CYTOKIN VÀ TIÊU QUẢN THỂ TẾ BÀO
LYMPHO TRƯỚC, SAU ĐIỀU TRỊ
BỆNH LUPUT BAN ĐỎ HỆ THỐNG**

Chuyên ngành: Da liễu

Mã số: 62 72 01 52

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HA NOI – 2016

Công trình được hoàn thành tại

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

Người hướng dẫn khoa học:

GS.TS. TRẦN HẬU KHANG

GS. TS. VĂN ĐÌNH HOA

Phản biện 1: GS. TS. Phạm Văn Thúc

Phản biện 2: PGS. TS. Trần Đăng Quyết

Phản biện 3: PGS. TS. Nguyễn Văn Thường

Luận án được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án tiến sĩ y học cấp trường tại trường Đại học Y Hà Nội vào hồi:..... giờ, ngày tháng..... năm

Luận án có thể được tìm thấy tại:

- Thư viện Quốc gia
- Thư viện Thông tin y học trung ương
- Thư viện trường Đại học Y Hà Nội
- Thư viện Viện Da liễu trung ương

ĐẶT VẤN ĐỀ

Luput ban đỏ hệ thống (Systemic Lupus Erythematosus-SLE) là một bệnh tự miễn rất hay gặp ở Việt Nam cũng như các nước trên thế giới. Đặc trưng cơ bản của bệnh là những tổn thương tái diễn ở nhiều cơ quan, tổ chức, đặc biệt ở da, khớp, máu, thận... Bệnh tiến triển dai dẳng, tái đi tái lại nhiều lần. Bệnh sinh của SLE rất phức tạp và có nhiều vấn đề còn chưa hoàn toàn sáng tỏ. Tuy nhiên, người ta đã biết chắc chắn rằng cơ chế nhận biết kháng nguyên của hệ thống miễn dịch ở người bệnh trở nên bất thường, nhiều kháng thể đã được sản xuất để chống lại một số thành phần tổ chức của chính mình. Rối loạn điều hoà miễn dịch đóng vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh.

Các biểu hiện lâm sàng khác nhau cũng như tiến triển khác nhau trên từng bệnh nhân liệu có liên quan với mức độ rối loạn miễn dịch, trong đó có thay đổi nồng độ các cytokin hay không vẫn là vấn đề đang được nghiên cứu. Phương pháp điều trị SLE chủ yếu sử dụng liệu pháp ức chế miễn dịch, với các thuốc như corticoid, cyclophosphamide, azathioprine,... Tuy nhiên, diễn biến lâm sàng và đáp ứng điều trị giữa các bệnh nhân không đồng nhất, thậm chí một số bệnh nhân đáp ứng rất kém với điều trị.

Trên thế giới, nhiều hướng nghiên cứu đã được tiến hành để tìm kiếm biện pháp giải quyết những trường hợp này, trong đó vai trò chi phối của các cytokin trong quá trình đáp ứng miễn dịch ở người bệnh đang được tập trung nghiên cứu.

Ở Việt Nam, đã có một số nghiên cứu về đặc điểm lâm sàng, điều trị và một số khía cạnh sinh học của SLE. Tuy nhiên, rất ít tác giả nghiên cứu về rối loạn miễn dịch, nhất là về thay đổi nồng độ các cytokin và thay đổi số lượng tế bào miễn dịch ở bệnh nhân SLE trước điều trị cũng như trong quá trình điều trị.

Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm hai mục tiêu:

1. *Đánh giá sự thay đổi nồng độ các cytokin (IL-2, IL-4, TNF- α , IFN- γ) và số lượng tế bào lympho T-CD3, T-CD4, T-CD8, B-CD19, NK-CD56 trước và sau điều trị ở bệnh nhân luput ban đỏ hệ thống.*

2. Xác định mối liên quan giữa thay đổi nồng độ của một số cytokin và số lượng tiểu quần thể tế bào lympho với chỉ số hoạt động bệnh trên lâm sàng.

1. Tính thời sự của luận án

SLE là một bệnh khá phổ biến, chưa có khả năng điều trị khỏi hoàn toàn. Vì vậy, mục tiêu tổng quát là kéo dài thời gian sống không bệnh, kéo dài thời gian sống toàn bộ và đảm bảo chất lượng cuộc sống tốt nhất có thể cho người bệnh. Để giải quyết mục tiêu tổng quát cần tiến hành đồng bộ nhiều biện pháp: chế độ sinh hoạt, đặc biệt là ăn uống, nghỉ ngơi, tránh ánh nắng; chế độ điều trị hợp lý nhằm duy trì tình trạng lui bệnh ổn định; phát hiện sớm cơn vượng bệnh để điều trị tăng cường sớm, nhanh chóng đưa bệnh nhân trở lại tình trạng lui bệnh, hạn chế tác dụng phụ của thuốc. Bình thường hóa các biến đổi sinh học được coi là yếu tố then chốt chi phối kết quả điều trị SLE. Từ những năm 1970 đến nay, trên thế giới, nhất là ở các nước có nền Y học phát triển, đã và đang tập trung nghiên cứu vai trò miễn dịch ở bệnh nhân SLE. Ở Việt Nam, cho đến nay, vẫn còn ít nghiên cứu theo hướng thời sự của thể giới.

Chính vì vậy, chúng tôi nghiên cứu sự biến đổi một số thông số miễn dịch: nồng độ IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ ; số lượng tế bào lympho mang dấu ấn CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 ở bệnh nhân SLE Việt Nam, hy vọng đóng góp các dữ liệu mới, cập nhật, góp phần điều trị tốt hơn bệnh nhân SLE.

2. Những đóng góp khoa học trong luận án

- Ở bệnh nhân SLE hoạt động, giảm nồng độ IL-2; tăng nồng độ IL-4, TNF- α , IFN- γ ; số lượng lympho T-CD4, NK-CD56 thấp hơn so với người khỏe mạnh ($p < 0,001$). Sau điều trị ức chế miễn dịch 1 tháng, có sự điều chỉnh theo hướng bình thường hóa các thông số miễn dịch nghiên cứu đến bằng hoặc gần bằng ở người khỏe mạnh. Dữ liệu này cho thấy tác dụng của điều trị ức chế miễn dịch, nhưng thời gian 1 tháng điều trị chưa đủ đối với một số bệnh nhân trong nghiên cứu này.

- Sự bình thường hóa các thông số miễn dịch nghiên cứu có tương quan tuyến tính với chỉ số hoạt động (điểm SLEDAI) của bệnh nhân trên lâm sàng: Chưa thấy tương quan chặt giữa điểm SLEDAI với từng thông

số miễn dịch nghiên cứu (IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ ; T-CD3, T-CD4, T-CD8, B-CD19, NK-CD56), nhưng có tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa điểm SLEDAI với sự thay đổi số lượng các tiểu quần thể lympho (T-CD3, T-CD4, T-CD8, B-CD19, NK-CD56), $r=0,45$, $p<0,001$.

4. Bố cục của luận án

Luận án có 116 trang chưa kể phụ lục và tài liệu tham khảo. Ngoài phần đặt vấn đề: 2 trang; kết luận: 2 trang, kiến nghị: 1 trang, luận án có 4 chương: Chương 1: tổng quan tài liệu: 38 trang; Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: 12 trang; Chương 3: Kết quả nghiên cứu: 31 trang; Chương 4: Bàn luận: 30 trang. Luận án có 41 bảng, 11 biểu đồ, 6 hình và 154 tài liệu tham khảo.

Chương 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. NHỮNG VẤN ĐỀ CHUNG VỀ BỆNH SLE

1.1.1. Sơ lược lịch sử phát hiện bệnh

Năm 1904, William Osler đã mô tả những biến chứng nội tạng của nhiều dạng Luput đỏ, các biểu hiện lâm sàng của bệnh cũng như cơ chế gây viêm mạch máu, đề xuất khái niệm một bệnh luput đỏ hệ thống, không chỉ có thương tổn ngoài da và không nhất thiết phải có thương tổn ngoài da. Từ đây, một số tác giả đã đi sâu nghiên cứu cơ chế bệnh sinh của bệnh SLE.

Trong những năm gần đây, nhờ những tiến bộ trong kỹ thuật sinh học phân tử, nghiên cứu về bệnh sinh của SLE được tập trung phân tích vai trò của các cơ chế kiểm soát chu trình sống của tế bào như hiện tượng tự tiêu, cơ chế cận tiết và tự tiết với vai trò của các cytokin, cũng như vai trò của rối loạn cân bằng miễn dịch. Những quá trình này chịu trách nhiệm chính trong bệnh sinh của SLE và khả năng đáp ứng điều trị của bệnh nhân. Các yếu tố di truyền, nội tiết và môi trường sống... là cầu nối giữa tính dễ phát sinh bệnh và con đường tác động gây hậu quả bệnh lý rối loạn miễn dịch. Vì vậy, bệnh sinh và tiến triển bệnh học của SLE nên được nhìn nhận trong một tương tác phức tạp của các yếu tố nêu trên.

1.1.2. Các yếu tố liên quan đến bệnh sinh

Yếu tố gia đình và di truyền, môi trường sống và nội tiết có vai trò quan trọng trong việc xuất hiện và duy trì tình trạng bệnh. Kết quả nghiên cứu cho thấy các gen của Fc γ RIIA liên quan đến nguy cơ viêm thận ở người Mỹ gốc Phi và người Hàn Quốc; gen Fc γ RIIIA liên quan đến nguy cơ SLE ở người gốc Tây Ban Nha và người da trắng; phụ nữ, nhất là trong độ tuổi sinh đẻ mắc SLE nhiều nhất; một số thuốc, chế độ ăn uống, phơi nắng làm tăng tỷ lệ mắc SLE.

1.1.3. Cơ chế bệnh sinh

Rối loạn miễn dịch bao trùm ở bệnh nhân SLE là đáp ứng tự miễn dịch có tính đặc hiệu cao, chống lại các tự kháng nguyên của cơ thể. Các tự kháng nguyên này có trong nhân, trong bào tương, trên màng tế bào và ngay cả một số protein trong huyết thanh như các yếu tố đông máu và thậm chí chính các kháng thể cũng trở thành các tự kháng nguyên. Các tự kháng thể được sản xuất do lympho T hoạt hóa. Các đợt tiến triển lâm sàng của bệnh là do tự kháng thể tiếp xúc với tự kháng nguyên.

1.1.4. Đánh giá hoạt tính bệnh

Một số thang điểm đang được dùng rộng rãi trong điều trị bệnh SLE, như thang điểm ECLAM (European Consensus Lupus Activity Measure), thang điểm BILAG (British ISLEs Lupus Assesment Group Scale), thang điểm SLAM Systemic Lupus Activity Measure), thang điểm SLEDAI (SLE Disease Activity Index)... Các thang điểm này là những chỉ điểm quan trọng về mức độ tổn thương và nguy cơ tử vong, cũng như hoạt tính của bệnh. Mỗi thang điểm có những giá trị nhất định, trong đó thang điểm SLEDAI được sử dụng thông dụng nhất trên lâm sàng.

1.2. RỐI LOẠN TỰ MIỄN Ở BỆNH NHÂN SLE

1.2.1. Các yếu tố sinh học

Các tự kháng thể đóng vai trò quan trọng trong bệnh sinh của SLE. Trên lâm sàng, xét nghiệm phát hiện tự kháng thể kháng nhân là bắt buộc trong chẩn đoán bệnh này. Nếu bệnh nhân thể bất hoạt mà nồng độ kháng thể kháng ds-DNA tăng lên thì nguy cơ tái phát khá cao, khoảng 40- 80%.

1.2.2. Biểu hiện lâm sàng của SLE

Khoảng 75% bệnh nhân có triệu chứng lâm sàng trong tiến triển của bệnh, và là dấu hiệu đầu tiên trong 25% số bệnh nhân. Biểu hiện lâm sàng chủ yếu liên quan đến lắng đọng phức hợp miễn dịch tại các tổ chức và cơ quan, cố định bổ thể và hoạt hóa phản ứng viêm, do vậy biểu hiện bệnh trên lâm sàng có thể thấy ở nhiều cơ quan, bộ phận..

1.2.3. Mối liên quan giữa nồng độ cytokin với hoạt tính bệnh

Kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả (Davas E. M. (1999), Grondal G. (2000), Bengtsson A. A. (2000), Chan R. W. (2004),...) khẳng định vai trò quan trọng của các cytokin IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ ,... trong mối liên quan với hoạt tính của bệnh. Tuy nhiên, vai trò cụ thể của mỗi cytokin, mức độ chặt chẽ trong mối liên quan cụ thể thì không đồng nhất giữa các nghiên cứu. Đây là vấn đề vẫn đang được quan tâm nghiên cứu trên thế giới.

1.2.4. Điều trị SLE bằng ức chế miễn dịch

1.2.4.1. Sử dụng các thuốc ức chế miễn dịch

Các thuốc ức chế miễn dịch, độc tế bào như corticoid, cyclophosphamid,... có tác dụng tốt và được sử dụng phổ biến trong điều trị SLE. Gần đây, MMF đang được coi là một lựa chọn thích hợp cả trong điều trị SLE và cả trong duy trì sau khi dùng cyclophosphamid..

1.2.4.2. Sử dụng các phương pháp sinh học

Anolik J.H. (2002), Leandro M.J. (2002), Anolik J.H. (2003),... đã nghiên cứu điều trị SLE bằng rituximab là kháng thể đơn dòng chống CD20; Kalled S.L. (1998), điều trị bằng anti-CD40L; (Aringer M. (2004) sử dụng kháng thể chống TNF- α để điều trị bệnh nhân SLE,... Kết quả nghiên cứu cho thấy đây là hướng đi mới đầy hứa hẹn, cần tiếp tục nghiên cứu sâu hơn.

Ghép tế bào gốc tự thân được chỉ định cho bệnh nhân SLE đầu tiên vào năm 1997. Nói chung, tỷ lệ lui bệnh sau ghép từ 50% đến 66%, tái phát muộn 33% và tỷ lệ chết 12%. Biến chứng của ghép tự thân cũng rất nặng nề và là nguyên nhân chính gây tử vong. Vì thế, ghép tế bào gốc máu tự thân không phải là phương pháp điều trị phổ biến cho người bệnh SLE.

1.3. NGHIÊN CỨU BỆNH SLE TẠI VIỆT NAM

SLE bắt đầu được nghiên cứu từ những năm 1970. Mặc dù còn nhiều hạn chế, các tác giả đã cố gắng tiếp cận các hướng nghiên cứu chính và có tính cơ bản của bệnh như đặc điểm lâm sàng và diễn biến điều trị, rối loạn miễn dịch và sinh học. Tuy nhiên, chưa có điều kiện nghiên cứu sâu về vai trò của cytokin và các dưới nhóm lympho trong tiến trình bệnh. Đây là những vấn đề cần được giải quyết trong thời gian tới để góp phần điều trị hiệu quả hơn đối với căn bệnh phức tạp này.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Nhóm nghiên cứu

Bệnh nhân SLE từ 15 tuổi trở lên điều trị tại Bệnh viện Da liễu trung ương và khoa Thận-Tiết niệu, Bệnh viện Bạch Mai. Số lượng 90 người.

Chọn mẫu thuận tiện. Lựa chọn bệnh nhân đáp ứng yêu cầu đối tượng nghiên cứu theo thứ tự bệnh nhân nhập viện cho đến đủ 30.

2.1.1.1. Phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu 1, bao gồm hai nhóm:

- *Nhóm bệnh nhân SLE không viêm thận (nhóm 1):* Gồm 30 bệnh nhân SLE, không có biểu hiện viêm thận theo tiêu chuẩn của ACR, được điều trị tại Bệnh viện Da liễu trung ương năm 2005.

- *Nhóm bệnh nhân SLE có viêm thận (nhóm 2):* Gồm 30 bệnh nhân SLE có biểu hiện viêm thận theo tiêu chuẩn của ACR, được điều trị tại khoa Thận-Tiết niệu, Bệnh viện Bạch Mai năm 2005.

2.1.1.2. Phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu 2:

Nhóm bệnh nhân SLE không viêm thận (nhóm 3): Gồm 30 bệnh nhân SLE, không có biểu hiện viêm thận theo tiêu chuẩn của ACR, được điều trị tại Bệnh viện Da liễu trung ương năm 2011.

2.1.1.3. Các tiêu chuẩn chẩn đoán

+ *Chẩn đoán xác định*

Chẩn đoán xác định SLE theo tiêu chuẩn của hội Bệnh thấp Hoa Kỳ (ARA-1982) sửa đổi năm 1997.

+ *Chẩn đoán bệnh nhân SLE có viêm thận*

Theo tiêu chuẩn của ACR

+ *Tiêu chuẩn loại trừ:*

- Bệnh nhân SLE có tổn thương nặng cần hồi sức chuyên khoa đặc biệt: thở máy, chạy thận nhân tạo, hồi sức tim mạch, hồi sức tích cực.

- Bệnh nhân SLE không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.1.2. Nhóm chứng

Người khỏe mạnh (cả nam và nữ) đang sống và làm việc bình thường, từ 15 tuổi trở lên (năm 2005). Khám nội khoa hệ thống để loại trừ các bệnh lý cấp tính và mãn tính. Số lượng nhóm chứng 30 người.

2.2. VẬT LIỆU

2.2.1. Mẫu bệnh phẩm bệnh nhân SLE

2.2.1.1. Đếm lympho T-CD3, T-CD4, T-CD8, B-CD19, NK-CD56: Máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA K₃, lấy máu khi bệnh nhân chưa ăn sáng, xét nghiệm trong vòng 4 giờ kể từ khi lấy máu.

2.2.1.2. Định lượng các cytokin (IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ):

Lấy máu tĩnh mạch khi bệnh nhân chưa ăn sáng, máu không chống đông, để 30 phút trong tủ ấm 37⁰ C vô trùng, ly tâm 3000 g/phút trong 15 phút, tách huyết thanh, bảo quản ngay ở -80⁰C. Xét nghiệm được tiến hành ngay sau khi làm tan đông mẫu huyết thanh.

- Xét nghiệm IL-2, TNF- α năm 2005 được tiến hành tại Trung tâm nghiên cứu y học và bảo vệ phóng xạ Quân đội. Ngay sau khi tách, huyết thanh được bảo quản ở -80⁰C. Xét nghiệm được tiến hành < 2 tháng kể từ khi lấy mẫu.

- Xét nghiệm IL-4, IFN- γ năm 2005 được tiến hành tại khoa Hóa sinh Bệnh viện Chợ Rẫy, thành phố Hồ Chí Minh. Ngay sau khi tách, huyết thanh được bảo quản ở -80⁰C tại Viện Huyết học-Truyền máu trung ương. Xét nghiệm được tiến hành < 2 tháng kể từ khi lấy mẫu.

- Xét nghiệm IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ năm 2011 được tiến hành tại khoa Miễn dịch Bệnh viện trung ương Quân đội 108. Ngay sau khi lấy máu, mẫu máu được chuyển đến khoa Miễn dịch Bệnh viện trung ương Quân đội 108. Mẫu máu được bảo quản trong hộp bảo ôn chuyên

dụng có đá cacbon lạnh đảm bảo nhiệt độ 20-25⁰C. Huyết thanh được tách và bảo quản ở -80⁰C tại khoa Miễn dịch Bệnh viện trung ương Quân đội 108. Xét nghiệm được tiến hành < 2 tháng kể từ khi lấy mẫu.

2.2.2. Mẫu bệnh phẩm người khỏe mạnh

Người khỏe mạnh được lấy máu trong khoảng thời gian thu thập mẫu máu ở bệnh nhân SLE năm 2005. Quy trình lấy máu, tách huyết thanh, bảo quản mẫu, gửi mẫu và xét nghiệm giống như các mẫu bệnh phẩm bệnh nhân SLE năm 2005.

2.2.3. Sinh phẩm

2.2.3.1. Sinh phẩm sử dụng cho mục tiêu nghiên cứu 1

+ Kít IMK-480 của Viện năng lượng nguyên tử quốc gia Trung Quốc (CIAE) dùng định lượng cytokin IL-2 và TNF- α .

+ Kit cytokin panel Cat.No. EV 3544 của Randox (Anh) định lượng cytokin IL-4 và IFN- γ .

+ Kít miễn dịch huỳnh quang trực tiếp (Simultest) của Becton-Dickinson (Mỹ) dùng xác định các lympho T-CD3, T-CD4, T-CD8, B-CD19, NK-CD56.

2.2.3.2. Sinh phẩm sử dụng cho mục tiêu nghiên cứu 2

+ Bộ kít ELISA của DRG (Đức) sử dụng định lượng các cytokin.

+ Kít miễn dịch huỳnh quang trực tiếp (Simultest) của Becton-Dickinson (Mỹ) dùng xác định các lympho T-CD3, T-CD4, T-CD8, B-CD19, NK-CD56.

2.2.4. Thiết bị

2.2.4.1. Thiết bị sử dụng cho mục tiêu nghiên cứu 1

+ Máy đếm tế bào tự động Sysmex KX21, Nhật Bản.

+ Máy đếm γ Counter Willzar 1470, phần mềm RIACAL, Hà Lan.

+ Kính hiển vi quang học và huỳnh quang Nikon, Nhật.

+ Máy Evidence[®] biochip array technology của Randox, Anh.

2.2.4.2. Thiết bị sử dụng cho mục tiêu nghiên cứu 2

+ Máy xét nghiệm ELISA Biotek (Mỹ) sử dụng định lượng các cytokin.

+ Máy xét nghiệm FASC-Calibur (BD-CHLB Đức) sử dụng đếm tế bào T-CD3, T-CD4, T-CD8, B-CD19, NK-CD56.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sử dụng phương pháp nghiên cứu tiền cứu, mô tả cắt ngang, can thiệp có so sánh trước và sau điều trị.

2.3.1. Phác đồ điều trị

- Bệnh nhân SLE không viêm thận: Prednisolone 2 mg/kg/24 giờ trong giai đoạn bệnh hoạt tính, sau đó giảm liều đến 0,5-1 mg/kg/24 giờ.

- Bệnh nhân SLE có viêm thận: Cyclophosphamide 2mg/kg/24 giờ + Prednisolon 60 mg/ 24 giờ trong giai đoạn bệnh hoạt tính, sau đó Cyclophosphamide 1mg/kg/24 giờ + Prednisolon 30 mg/ 24 giờ trong nhiều tháng tiếp theo.

2.3.2. Các kỹ thuật xét nghiệm dùng trong nghiên cứu

+ Đếm tế bào máu bằng máy xét nghiệm KX21.

+ Xác định các dưới nhóm lympho T-CD3, T-CD4, T-CD8, CD19, CD56 bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang trực tiếp tại viện Huyết học-Truyền máu Trung ương (mục tiêu 1) và khoa Huyết học-Truyền máu bệnh viện Trung ương quân đội 108 (mục tiêu 2). Đọc kết quả trên kính hiển vi huỳnh quang ở bước sóng 490 nm (mục tiêu 1), trên máy FACS (mục tiêu 2). Các bước tiến hành theo "Kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang trực tiếp với kit simultest", 1994, và hướng dẫn sử dụng kit (Cat. 349211, 349212, 349213, 349221), 1995, hãng Becton-Dickinson.

+ Định lượng cytokin IL-2 và TNF- α bằng kỹ thuật định lượng kháng nguyên theo phương pháp miễn dịch phóng xạ (RIA) tuân theo luật cạnh tranh IL-2, TNF- α tại Trung tâm nghiên cứu y học và bảo vệ phóng xạ Quân đội (mục tiêu 1).

+ Định lượng cytokin IL-4 và IFN- γ bằng phương pháp hoá miễn dịch phát quang Biochip tại khoa Hoá sinh bệnh viện Chợ Rẫy thành phố Hồ Chí Minh (mục tiêu 1).

+ Định lượng cytokin IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ và bổ thể bằng phương pháp miễn dịch ELISA tại khoa Miễn dịch bệnh viện Trung ương

quân đội 108 (mục tiêu 2).

2.3.3. Theo dõi tiến triển của bệnh về lâm sàng, xét nghiệm

Đánh giá hoạt tính của bệnh theo thang điểm SLEDAI, sự thay đổi nồng độ các cytokin, bổ thể và các dưới nhóm lympho trước điều trị, sau một tháng điều trị bằng thuốc ức chế miễn dịch:

- Điểm SLEDAI <3: Lui bệnh; đáp ứng tốt.
- Điểm $3 \leq$ SLEDAI <10: Bệnh hoạt tính nhẹ; đáp ứng chưa tốt.

2.3.4. Xử lý kết quả

Tính tỷ lệ phần trăm, số trung bình, độ lệch chuẩn, so sánh thống kê, tính hệ số tương quan sử dụng chương trình SPSS 15.0; EPINFO 6.

2.4. ĐẠO ĐỨC NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu được tiến hành trong khuôn khổ đề tài nghiên cứu sinh của Trường Đại học Y Hà Nội, đảm bảo tính hợp pháp, tính hợp lý và tính nhân đạo.

Chương 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. ĐẶC ĐIỂM ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Bảng 3.1. Tuổi và giới đối tượng nghiên cứu

Đối tượng	Thời gian	Mục tiêu nghiên cứu	Tuổi	Giới (Nữ/Nam)
Nhóm 1	2005	1	15-49 25,83±8,49	29/1
Nhóm 2	2005	1	17-55 32,43±10,87	30/0
Nhóm chứng	2005	1	23-46 31,33±7,83	29/1
Nhóm 3	2011	2	15-53 29,87±10,99	30/1

F test (nhóm 1; nhóm 2) = 0,6100 ; (nhóm 1; chứng) = 0,8511 ; (nhóm 2; chứng) = 0,5192; $\alpha=0,05$: 1,8620.

Nhận xét : Bệnh chủ yếu gặp ở nữ, tuổi trẻ.

3.2. THAY ĐỔI NỒNG ĐỘ CYTOKIN VÀ TIỂU QUẢN THỂ LYMPHO Ở BỆNH NHÂN SLE

3.2.1. Thay đổi nồng độ cytokin ở bệnh nhân SLE

Bảng 3.2. So sánh nồng độ IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α giữa bệnh nhân nhóm 1 trước điều trị với người trưởng thành khỏe mạnh

Cytokin	Nhóm 1 (n=30)	Chúng (n=30)	p
IL-2 (ng/ml)	3,59 \pm 2,36	9,07 \pm 4,47	<0,001
IL-4 (pg/ml)	1,32 \pm 1,96	0,30 \pm 0,10	<0,05
TNF- α (ng/ml)	0,72 \pm 1,23	0,20 \pm 0,14	<0,05
IFN- γ (pg/ml)	10,33 \pm 12,86	0,63 \pm 0,14	<0,001

Nhận xét : Trước điều trị, nồng độ IL-2 thấp hơn có ý nghĩa so với người khỏe mạnh ($p < 0,001$); Nồng độ IL-4, TNF- α và IFN- γ cao hơn có ý nghĩa so với người khỏe mạnh ($p < 0,05 - 0,01$);

Bảng 3.3. So sánh nồng độ IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α giữa bệnh nhân nhóm 2 trước điều trị với người trưởng thành khỏe mạnh

Cytokin	Nhóm 2 (n=30)	Chúng (n=30)	p
IL-2 (ng/ml)	5,19 \pm 2,34	9,07 \pm 4,47	<0,001
IL-4 (pg/ml)	2,09 \pm 2,94	0,30 \pm 0,10	<0,05
TNF- α (ng/ml)	0,59 \pm 0,30	0,20 \pm 0,14	<0,001
IFN- γ (pg/ml)	4,13 \pm 6,04	0,63 \pm 0,14	<0,001

Nhận xét : Trước điều trị, nồng độ IL-2 thấp hơn có ý nghĩa so với người khỏe mạnh ($p < 0,001$); Nồng độ IL-4, TNF- α và IFN- γ cao hơn có ý nghĩa so với người khỏe mạnh ($p < 0,05 - 0,001$);

Bảng 3.5. So sánh thay đổi nồng độ các cytokin ở bệnh nhân nhóm 1 sau điều trị so với trước điều trị

Cytokin	Trước ĐT (n=30)	Sau ĐT (n=30)	p
IL-2 (ng/ml)	3,59 \pm 2,36	5,76 \pm 2,08	<0,001
IL-4 (pg/ml)	1,32 \pm 1,96	1,15 \pm 1,61	>0,05
TNF- α (ng/ml)	0,72 \pm 1,23	0,39 \pm 0,32	>0,05
IFN- γ (pg/ml)	10,33 \pm 12,86	3,20 \pm 4,11	<0,05

Nhận xét: Sau điều trị, nồng độ IL-2 tăng, cao hơn có ý nghĩa so với trước điều trị ($p < 0,001$); Nồng độ IFN- γ sau điều trị giảm có ý nghĩa so với trước điều trị ($p < 0,05$);

Bảng 3.6. So sánh thay đổi nồng độ các cytokin ở bệnh nhân nhóm 2 sau điều trị so với trước điều trị

Cytokin	Trước ĐT (n=30)	Sau ĐT (n=30)	p
IL-2 (ng/ml)	5,19 ±2,34	6,78±3,00	<0,05
IL-4 (pg/ml)	2,09 ±2,94	0,59 ±1,38	<0,05
TNF-α (ng/ml)	0,59 ±0,30	0,32 ±0,19	<0,001
IFN-γ (pg/ml)	4,13 ±6,04	1,45 ±2,94	<0,05

Nhận xét: Sau điều trị, nồng độ IL-2 tăng cao hơn có ý nghĩa so với trước điều trị ($p<0,05$); Nồng độ IL-4, TNF-α và IFN-γ giảm có ý nghĩa so với trước điều trị ($p<0,05-0,001$);

Bảng 3.7. Thay đổi nồng độ các cytokin ở bệnh nhân nhóm 1 sau điều trị so với người khỏe mạnh

Cytokin	Nhóm 1 (n=30)	Chứng (n=30)	p
IL-2 (ng/ml)	5,76 ± 2,08	9,07 ± 4,47	<0,001
IL-4 (pg/ml)	1,15 ± 1,61	0,30 ± 0,10	<0,01
TNF-α (ng/ml)	0,39 ± 0,32	0,20 ± 0,14	<0,01
IFN-γ (pg/ml)	3,20 ± 4,11	0,63 ± 0,14	<0,001

Nhận xét: Sau điều trị, nồng độ IL-2 đã phục hồi, nhưng vẫn thấp hơn có ý nghĩa so với người khỏe mạnh ($p<0,001$); Nồng độ các cytokin khác vẫn cao hơn có ý nghĩa so với người khỏe mạnh ($p<0,01-0,001$);

Bảng 3.8. Thay đổi nồng độ các cytokin ở bệnh nhân nhóm 2 sau điều trị so với người khỏe mạnh

Cytokin	Nhóm 2 (n=30)	Chứng (n=30)	p
IL-2 (ng/ml)	6,78±3,00	9,07 ± 4,47	<0,05
IL-4 (pg/ml)	0,59 ±1,38	0,30 ± 0,10	>0,05
TNF-α (ng/ml)	0,32 ±0,19	0,20 ± 0,14	<0,001
IFN-γ (pg/ml)	1,45±2,94	0,63 ± 0,14	<0,001

Nhận xét: Sau điều trị, nồng độ IL-2 tăng nhưng vẫn thấp hơn có ý nghĩa so với người khỏe mạnh ($p<0,05$); Nồng độ TNF-α và IFN-γ giảm nhưng vẫn cao hơn có ý nghĩa so với người khỏe mạnh ($p<0,001$); Nồng độ IL-4 giảm và không khác biệt có ý nghĩa so với người khỏe mạnh ($p>0,05$);

3.2.2. Thay đổi số lượng tiểu quần thể lympho ở bệnh nhân SLE

Bảng 3.11. So sánh số lượng tiểu quần thể tế bào lympho giữa bệnh nhân nhóm 1 trước điều trị với người khỏe mạnh

Tế bào(x10 ⁶ /l)	Nhóm 1 (n=30)	Chứng (n=30)	p
T-CD3	1397 ± 673	1622 ± 223	>0,05
T-CD4	565 ± 378	874 ± 134	<0,001
T-CD8	737 ± 331	684 ± 103	>0,05
B-CD19	277 ± 202	387 ± 121	>0,05
NK-CD56	94 ± 70	236 ± 56	<0,001

Nhận xét: Trước điều trị, số lượng lympho T-CD4 và NK-CD56 thấp hơn có ý nghĩa so với người khỏe mạnh (p<0,001) ;

Bảng 3.12. So sánh số lượng tiểu quần thể tế bào lympho giữa bệnh nhân nhóm 2 trước điều trị với người khỏe mạnh

Tế bào (x10 ⁶ /l)	Nhóm 2 (n=30)	Chứng (n=30)	p
T-CD3	994 ± 341	1622 ± 223	<0,001
T-CD4	483 ± 160	874 ± 134	<0,001
T-CD8	484 ± 215	684 ± 103	<0,001
B-CD19	177 ± 86	387 ± 121	<0,001
NK-CD56	128 ± 61	236 ± 56	<0,001

Nhận xét: Trước điều trị, số lượng tế bào lympho T-CD3, T-CD4, T-CD8, B-CD19 và NK-CD56 đều thấp hơn có ý nghĩa so với người khỏe mạnh (p<0,001) ;

Bảng 3.14. Thay đổi số lượng tiểu quần thể tế bào lympho ở bệnh nhân nhóm 1 sau điều trị so với trước điều trị

Tế bào (x10 ⁶ /l)	Trước ĐT (n=30)	Sau ĐT (n=30)	p
T-CD3	1397 ± 673	2014 ± 1.122	<0,05
T-CD4	565 ± 378	898 ± 532	<0,001
T-CD8	737 ± 331	983 ± 556	<0,05
B-CD19	277 ± 202	464 ± 262	<0,01
NK-CD56	94 ± 70	182 ± 85	<0,001

Nhận xét: Sau điều trị, số lượng tế bào lympho T-CD3, T-CD4, T-CD8, B CD19 và NK CD56 đều cao hơn có ý nghĩa so với trước điều trị ;

Bảng 3.15. So sánh thay đổi số lượng tiểu quần thể tế bào lympho ở bệnh nhân nhóm 2 sau điều trị so với trước điều trị

Tế bào ($\times 10^6/l$)	Trước ĐT (n=30)	Sau ĐT (n=30)	p
T-CD3	994±341	1449±308	<0,001
T-CD4	483±160	696±161	<0,001
T-CD8	484±215	714±163	<0,001
B-CD19	177±86	305±112	<0,001
NK-CD56	128±61	239±95	<0,001

Nhận xét : Số lượng tế bào lympho T-CD3, T-CD4, T-CD8, B-CD19 và NK-CD56 đều cao hơn có ý nghĩa so với trước điều trị ($p<0,001$);

Bảng 3.16. Thay đổi số lượng tiểu quần thể tế bào lympho ở bệnh nhân nhóm 1 sau điều trị so với người khỏe mạnh

Tế bào ($\times 10^6/l$)	Nhóm 1(n=30)	Chúng (n=30)	p
T-CD3	2014 ± 1122	1622 ± 223	>0,05
T-CD4	898 ± 532	874 ± 134	>0,05
T-CD8	983 ± 556	684 ± 103	<0,05
B-CD19	464 ± 262	387 ± 121	>0,05
NK-CD56	182 ± 85	236 ± 56	<0,05

Nhận xét :Số lượng tiểu quần thể tế bào lympho ở bệnh nhân nhóm 1 đã phục hồi gần với trị số người khỏe mạnh; tuy nhiên, số lượng lympho T-CD8 và NK-CD56 vẫn thấp hơn so với người khỏe mạnh ($p<0,05$);

Bảng 3.17. Thay đổi số lượng tiểu quần thể tế bào lympho ở bệnh nhân nhóm 2 sau điều trị so với người khỏe mạnh

Tế bào ($\times 10^6/l$)	Nhóm 2(n=30)	Chúng (n=30)	p
T-CD3	1449 ± 308	1622 ± 223	<0,05
T-CD4	696 ± 161	874 ± 134	<0,001
T-CD8	714 ± 163	684 ± 103	>0,05
B-CD19	305 ± 112	387 ± 121	<0,01
NK-CD56	239 ± 95	236 ± 56	>0,05

Nhận xét: Sau điều trị, số lượng tế bào lympho T-CD3, T-CD4 và B-CD19 đã phục hồi dần, nhưng vẫn thấp hơn có ý nghĩa so với người khỏe mạnh ($p<0,05-0,001$);

3.3. MỐI LIÊN QUAN GIỮA THAY ĐỔI NỒNG ĐỘ CYTOKIN VÀ SỐ LƯỢNG TIÊU QUẢN THỂ TẾ BÀO LYMPHO VỚI CHỈ SỐ HOẠT ĐỘNG BỆNH TRÊN LÂM SÀNG

Bảng 3.19. Cải thiện về triệu chứng lâm sàng (n=30)

Triệu chứng	Trước ĐT (%)	Sau ĐT (%)	p
Dát đỏ mới	96,7	63,3	< 0,001
Viêm khớp	73,3	0	< 0,001
Mệt lả	70	0	< 0,001
Rụng tóc	50	43,3	> 0,05
Viêm mạch máu	46,7	0	< 0,001
Protein niệu	46,7	10	< 0,001
Đái máu	23,3	0	< 0,001
Loét niêm mạc	23,3	6,7	< 0,05
Sốt	10	0	< 0,05
Viêm màng phổi	6,7	0	> 0,05
Cặn nước tiểu	3,3	0	> 0,05
Viêm ngoại tâm mạc	3,3	0	> 0,05

Nhận xét: Phần lớn các triệu chứng lâm sàng giảm có ý nghĩa hoặc mất hẳn sau 1 tháng điều trị ức chế miễn dịch (p < 0,05 - 0,001); Riêng rụng tóc có thuyên giảm nhưng chưa có ý nghĩa thống kê (p > 0,05).

Bảng 3.20. Đáp ứng lâm sàng ở bệnh nhân nhóm 3 theo điểm SLEDAI

Nhóm bệnh nhân	Trước điều trị	Sau điều trị	p
Đáp ứng tốt (n=16)	19,06 ± 7,55	0,88 ± 1,02	< 0,001
Đáp ứng chưa tốt (n=14)	21,07 ± 5,68	5,0 ± 1,88	< 0,001
Chung	100% > 3	10 > 46,7% > 3	< 0,001

Nhận xét: Sau điều trị, 100% bệnh nhân nhóm 3 có chỉ số SLEDAI giảm có ý nghĩa thống kê (p < 0,001); trong đó 16/30 (53,3%) bệnh nhân có SLEDAI < 3 (lui bệnh hoàn toàn) và không có bệnh nhân nào có chỉ số SLEDAI ≥ 10.

Bảng 3.21. Cải thiện về huyết học ở bệnh nhân nhóm 3 (n = 30)

Triệu chứng	Trước điều trị	Sau điều trị	p
Thiếu máu (%)	63,3	36,7	< 0,01
Giảm bạch cầu (%)	16,7	6,7	> 0,05
Giảm tiểu cầu (%)	13,3	0	< 0,001

Nhận xét: Tình trạng thiếu máu và giảm tiểu cầu cải thiện có ý nghĩa sau 1 tháng điều trị ức chế miễn dịch ($p < 0,001$).

Bảng 3.25. Thay đổi nồng độ cytokin ở bệnh nhân đáp ứng tốt (n=16)

Cytokin	Trước điều trị	Sau điều trị	p
IL-2 (ng/ml)	2,64 ± 2,61	4,02 ± 2,59	< 0,01
IL-4 (pg/ml)	1,24 ± 1,59	0,53 ± 0,75	< 0,05
IL-6 (pg/ml)	20,99 ± 7,71	10,91 ± 6,31	< 0,001
TNF- α (ng/ml)	1,87 ± 0,67	0,45 ± 0,35	< 0,01
IFN- γ (pg/ml)	22,64 ± 5,79	3,90 ± 1,79	< 0,01

Nhận xét: Trước điều trị, IL-2 giảm, sau điều trị, nồng độ IL-2 tăng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$); Trước điều trị, nồng độ IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ tăng, sau điều trị, các cytokin này đều giảm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05 - 0,001$);

Bảng 3.26. Thay đổi số lượng tiểu quản thể tế bào lympho ở bệnh nhân đáp ứng điều trị tốt (n=16)

Tế bào ($\times 10^6/l$)	Trước điều trị	Sau điều trị	p
T-CD3	1319 ± 619	1747 ± 471	< 0,01
T-CD4	510 ± 188	822 ± 267	< 0,001
T-CD8	669 ± 398	758 ± 286	> 0,05
B-CD19	305 ± 125	368 ± 130	> 0,05
NK-CD56	59 ± 46	176 ± 121	< 0,01

Nhận xét: Sau điều trị, số lượng lympho T-CD3, T-CD4, CD56 tăng có ý nghĩa ($p < 0,01 - 0,001$).

Bảng 3.27. Thay đổi nồng độ cytokin ở bệnh nhân đáp ứng chưa tốt (n=14)

Cytokin	Trước điều trị	Sau điều trị	p
IL-2 (ng/ml)	3,71 ±6,11	5,20±5,61	< 0,01
IL-4 (pg/ml)	1,28 ±1,24	0,34 ±0,23	< 0,01
IL-6 (pg/ml)	23,12±11,77	11,83 ±7,38	<0,001
TNF-α (ng/ml)	0,93 ±0,42	0,55 ±0,33	< 0,001
IFN-γ (pg/ml)	9,54 ±6,41	4,89 ±3,57	< 0,001

Nhận xét: Sau điều trị, nồng độ IL-2 tăng; nồng độ IL-4, IL-6, TNF-α, IFN-γ giảm có ý nghĩa (p < 0,01-0,001).

Bảng 3.28. Thay đổi số lượng tiểu quần thể tế bào lympho ở bệnh nhân đáp ứng chưa tốt (n=14)

Tế bào(x10 ⁶ /l)	Trước điều trị	Sau điều trị	p
T-CD3	1718±544	2095±560	<0,05
T-CD4	732±259	930±244	<0,05
T-CD8	892±313	862±307	>0,05
B-CD19	279±130	342±106	<0,01
NK-CD56	117±111	214±107	<0,01

Nhận xét: Sau điều trị, số lượng lympho T-CD3, T-CD4, NK-CD56 và B-CD19 tăng có ý nghĩa (p < 0,05 - 0,01).

Bảng 3.34. Tương quan đa biến giữa điểm số SLEDAI với số lượng tiểu quần thể tế bào lympho (n=30)

Thông số	r	p
Trước điều trị	0,37	<0,001
Sau điều trị	0,26	> 0,05
Trước-Sau điều trị	0,45	<0,001

Nhận xét: Có tương quan thuận, chặt chẽ giữa điểm số SLEDAI với số lượng tiểu quần thể tế bào lympho trước điều trị, r = 0,37; với sự thay đổi số lượng tiểu quần thể tế bào lympho sau điều trị, r = 0,45 (p < 0,001).

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. ĐẶC ĐIỂM ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

4.1.1. Đối tượng nghiên cứu mục tiêu 1

Định lượng nồng độ cytokin không phải là kỹ thuật khó, nhưng nồng độ cytokin có thể khác nhau ngay cả khi cùng kỹ thuật xét nghiệm ở các labo khác nhau. Kết quả IL-6 ($21,15 \pm 10,99$ so với $7,11 \pm 3,23$ pg/ml, $p < 0,05$) và TNF- α ($172,7 \pm 39,19$ so với $7,87 \pm 3,49$, $p < 0,05$) trong nhóm chứng là người khỏe mạnh của Alaa A. Sabry (2005, n=20) và Carmen Avrămescu (2010, n=35) cùng sử dụng kỹ thuật ELISA là một minh chứng. Vì thế, chúng tôi chọn nhóm đối chứng là 30 người khỏe mạnh để đảm bảo độ tin cậy khi xem xét biến đổi nồng độ các cytokin ở đối tượng nghiên cứu.

4.1.2. Đối tượng nghiên cứu mục tiêu 2

Để đáp ứng mục tiêu nghiên cứu 2, chúng tôi chọn được 30 bệnh nhân SLE không có biểu hiện viêm thận, điều trị tại Bệnh viện Da liễu trung ương năm 2011. Nhóm bệnh nhân này được nghiên cứu mối liên quan giữa hoạt tính bệnh trước và sau điều trị với sự biến đổi nồng độ các cytokin và số lượng tiểu quần thể tế bào lympho, không liên quan tới 2 nhóm bệnh nhân SLE (nhóm 1 và nhóm 2) và nhóm đối chứng năm 2005. Chính vì thế chúng tôi không chọn nhóm chứng cho mục tiêu nghiên cứu này.

4.2. THAY ĐỔI NỒNG ĐỘ CYTOKIN VÀ SỐ LƯỢNG TIỂU QUẦN THỂ TẾ BÀO LYMPHO Ở BỆNH NHÂN SLE

4.2.1. Thay đổi nồng độ cytokin ở bệnh nhân SLE

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, nồng độ IL-2 ở bệnh nhân trước điều trị giảm rõ rệt so với người khỏe mạnh. Nồng độ IL-2 ở bệnh nhân nhóm 1 giảm thấp hơn so với bệnh nhân nhóm 2. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với Mok C.C., Lau C.S. (2003), Huang Y. P. (1988). Sau 1 tháng điều trị bằng thuốc ức chế miễn dịch, nồng độ IL-2 ở bệnh nhân đã tăng lên đáng kể so với trước điều trị, tuy

nhiên, nồng độ này vẫn chưa trở lại bình thường như người khỏe mạnh ($p < 0,05 - 0,01$). Như vậy, 1 tháng điều trị bằng thuốc ức chế miễn dịch đã có tác dụng điều chỉnh nồng độ IL-2, nhưng thời gian điều trị như vậy là chưa đủ để nồng độ IL-2 phục hồi về mức bình thường. Kết quả này phù hợp với Sima Sedighi (2011-2012), Mok C.C. (2003), Kyttaris V.C. (2004).

Khác với IL-2, nồng độ IL-4 ở bệnh nhân tăng cao hơn so với IL-4 ở người khỏe mạnh. Kết quả này phù hợp với Nakajima A., Hirose S. (1997), Viallard J.F (1999), Nagy G. Y. (2000), Csiszar A. (2000), Robak E. Sau 1 tháng điều trị, những bệnh nhân có nồng độ IL-4 cao trước đó có xu hướng giảm về gần mức bình thường. Còn những bệnh nhân có nồng độ IL-4 giảm trước điều trị chưa thấy tăng lên rõ rệt. Có lẽ, hiệu quả điều trị sẽ giúp “bình thường hóa” nồng độ IL-4, chứ không phải là giúp làm IL-4 “tăng lên” hay “giảm xuống” theo một chiều đơn thuần, Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với Enass A. Elewa (2014). Các số liệu nghiên cứu trên cho thấy có sự biến đổi nồng độ IL-4 ở bệnh nhân với tần suất cao, do đó có thể coi IL-4 như một chỉ điểm tăng hoạt tính của bệnh.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, 70% bệnh nhân nhóm 1 và trên 50% bệnh nhân nhóm 2 có tăng nồng độ TNF- α , cao hơn so với người khỏe mạnh. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với Bengtsson A.A. (2004), Carmen Avrănescu (2010). Sau 1 tháng điều trị ức chế miễn dịch, nồng độ TNF- α ở bệnh nhân nhóm 1 chưa giảm có ý nghĩa, trong khi nồng độ TNF- α ở bệnh nhân nhóm 2 đã giảm có ý nghĩa so với trước điều trị ($p < 0,01$). Tuy nhiên, nồng độ TNF- α ở cả hai nhóm bệnh nhân vẫn cao hơn so với người khỏe mạnh ($p < 0,01$). Nguyên nhân nồng độ TNF- α ở bệnh nhân nhóm 1 giảm chậm hơn bệnh nhân nhóm 2 có lẽ liên quan đến hiệu quả ức chế miễn dịch của phác đồ điều trị: bệnh nhân nhóm 2 được điều trị ức chế miễn dịch mạnh hơn.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy trước điều trị, nồng độ IFN- γ ở bệnh nhân nhóm 1 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nồng độ IFN- γ ở bệnh nhân nhóm 2. Nồng độ IFN- γ ở cả hai nhóm bệnh nhân đều cao hơn nhiều so với người trưởng thành. Kết quả nghiên cứu của

chúng tôi phù hợp với Kono D. H.(2001), Noreldin N. (2014), Csiszar A. (2000), Enass A. Elewa (2014). Sau 1 tháng điều trị ức chế miễn dịch, nồng độ IFN- γ ở cả hai nhóm bệnh nhân đã giảm đáng kể so với trước điều trị ($p<0,05$); nhưng vẫn còn cao hơn so với người khỏe mạnh ($p<0,001$)

4.2.2. Thay đổi số lượng tiểu quần thể lympho ở bệnh nhân SLE

Trong số 60 bệnh nhân trước điều trị trong nghiên cứu của chúng tôi, 48/60 (80%) bệnh nhân giảm số lượng T-CD3. Số lượng tuyệt đối của T-CD3 ở các bệnh nhân rất không đồng đều. Bên cạnh những bệnh nhân giảm T-CD3, vẫn có 10/60 (16,67%) bệnh nhân tăng T-CD3 so với chúng. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với Bengtsson A.A. (2004), Papadaki H.A. (Hylạp), Phạm Thị Huệ (1985), Neidhart (1996), Wenzel J.

Nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy, số lượng T-CD4 ở bệnh nhân trước điều trị giảm rất thấp so với người khỏe mạnh, $p<0,001$. Phần lớn bệnh nhân có giảm số lượng lympho T-CD4 với những mức độ khác nhau. Sau 1 tháng điều trị, số lượng lympho T-CD4 được cải thiện khá rõ, cao hơn rõ rệt so với trước điều trị ($p<0,001$). Đặc biệt, số lượng lympho T-CD4 ở bệnh nhân nhóm 1 đã tăng tới giới hạn của người khỏe mạnh ($p>0,05$). Như vậy, hiệu quả điều trị ức chế miễn dịch đã giúp phục hồi số lượng lympho T-CD4 ở bệnh nhân nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với Reininger (1996), Stassi G. (1997), Nobutoh (1994), Hahn B.H. (2005).

Trong nghiên cứu của chúng tôi, trước điều trị, số lượng T-CD8 ở bệnh nhân nhóm 1 chưa thay đổi rõ rệt so với người khỏe mạnh ($p>0,05$); trong khi số lượng tế bào này ở bệnh nhân nhóm 2 đã giảm rõ rệt so với người khỏe mạnh, $p<0,001$). Sau 1 tháng điều trị ức chế miễn dịch, số lượng T-CD8 ở bệnh nhân nhóm 1 có tăng nhẹ, làm cho số lượng tế bào này cao hơn so với người khỏe mạnh ($p<0,05$). Ở bệnh nhân nhóm 2, hiệu quả của điều trị thấy rõ trên tất cả các bệnh nhân nghiên cứu: 100% bệnh nhân có tăng số lượng T-CD8. Số lượng T-CD8 tăng cao hơn rõ rệt so với trước điều trị ($p<0,001$). Kết quả nghiên cứu của

chúng tôi phù hợp với Viillard J.F. (2001), Hahn B.H. (2005), George Bertias (2012).

Trước điều trị, số lượng B-CD19 ở bệnh nhân nhóm 1 chưa giảm rõ so với người khỏe mạnh, $p > 0,05$, trong khi số lượng B CD19 ở bệnh nhân nhóm 2 đã giảm nặng, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với người khỏe mạnh ($p < 0,001$). Sau 1 tháng điều trị ức chế miễn dịch, số lượng B-CD19 ở bệnh nhân được phục hồi khá tốt ở cả hai nhóm, cao hơn đáng kể so với trước điều trị ($p < 0,01 - 0,001$). Như vậy, điều trị ức chế miễn dịch 1 tháng đã giúp làm tăng số lượng lympho B-CD19 ở bệnh nhân SLE. Kết quả này phù hợp với Demaison (1996), Phạm Thị Huệ (1985), Wenzel J. (2004).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy trước điều trị ức chế miễn dịch, số lượng tế bào NK-CD56 ở cả bệnh nhân rất thấp so với người khỏe mạnh, $p < 0,001$). Sau 1 tháng điều trị ức chế miễn dịch, số lượng tế bào NK-CD56 ở cả hai nhóm bệnh nhân đều đã tăng lên đáng kể so với trước điều trị ($p < 0,05$). Kết quả này phù hợp với Hahn B.H. (2005), Wenzel J. (2004).

4.3. MỐI LIÊN QUAN GIỮA SỰ BIẾN ĐỔI NỒNG ĐỘ CYTOKIN VÀ SỐ LƯỢNG TIÊU QUẢN THỂ TẾ BÀO LYMPHO VỚI CHỈ SỐ HOẠT ĐỘNG BỆNH TRÊN LÂM SÀNG

4.3.1. Biểu hiện lâm sàng

Sau 1 tháng điều trị ức chế miễn dịch, các triệu chứng như viêm khớp, mệt lã, viêm mạch máu, đái máu,... biến mất. Triệu chứng dát đỏ môi tuy còn tỷ lệ khá cao (63,3%), nhưng đã giảm rõ rệt so với trước điều trị ($p < 0,001$). Chỉ còn rụng tóc là chưa cải thiện rõ. Các rối loạn huyết học phổ biến nhất trong nghiên cứu này là tình trạng thiếu máu (63,3%). Ngoài ra, còn gặp giảm bạch cầu (16,7%) và giảm tiểu cầu (13,3%). Các triệu chứng thiếu máu và giảm tiểu cầu đã được cải thiện rõ sau 1 tháng điều trị ức chế miễn dịch ($p < 0,05 - 0,001$). Riêng tình trạng giảm bạch cầu vẫn chưa hồi phục rõ. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với Enass A. Elewa (2014) nghiên cứu 40 bệnh nhân tuổi 17-50.

4.3.2. Đo hoạt tính bệnh bằng điểm số SLEDAI

Đối với thực tế Việt Nam, thang điểm SLEDAI bao gồm 24 thông số, đều thực hiện được ở Việt Nam hiện nay, do đó dễ áp dụng nhất trong các thang điểm kể trên. Chính vì lý do đó, chúng tôi chọn thang điểm SLEDAI để đánh giá mức độ hoạt động bệnh trên lâm sàng. Chúng tôi áp dụng điểm SLEDAI theo Gladman D. D. (2000). Nghiên cứu của chúng tôi cho kết quả phù hợp với tác giả Formiga F. (1999).

4.3.3. Nồng độ cytokin

Phân tích mối liên quan giữa điểm SLEDAI với biến đổi nồng độ các cytokin riêng lẻ, chúng tôi thấy có tương quan thuận nhưng không chặt chẽ ($p > 0,05$); Phân tích gộp sự biến đổi của 5 cytokin nghiên cứu với điểm SLEDAI cho thấy hệ số tương quan khá lớn, $r = 0,345 - 0,493$ nhưng không có ý nghĩa, $p > 0,05$. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với Sima Sedigh (2014), Enass A. Elewa (2014), Davas E. M. (1999). Một số tác giả cho thấy có mối tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa điểm số SLEDAI với TNF- α , IFN- γ . Có thể do cỡ mẫu nghiên cứu hạn chế ($n=30$), thời gian nghiên cứu ngắn (chỉ 1 tháng), khi phân tích mối tương quan đơn lẻ với từng cytokin (đơn biến), chúng tôi không thấy mối tương quan chặt chẽ.

4.3.4. Số lượng tiểu quần thể tế bào lympho

Phân tích mối liên quan (đơn biến) giữa điểm SLEDAI với mỗi tiểu quần thể tế bào lympho, chúng tôi chưa thấy mối tương quan chặt chẽ giữa chỉ số SLEDAI với số lượng tiểu quần thể tế bào lympho. Tuy nhiên, phân tích gộp tương quan giữa chỉ số SLEDAI với số lượng các tiểu quần thể tế bào lympho; với sự thay đổi số lượng các tiểu quần thể tế bào lympho giữa trước và sau điều trị (đa biến) cho thấy có tương quan thuận, tương đối chặt chẽ giữa điểm số SLEDAI với các tiểu quần thể tế bào lympho trước điều trị ($r=0,37$, $p < 0,001$) và với sự thay đổi số lượng các tiểu quần thể tế bào lympho giữa trước và sau điều trị ($r=0,45$, $p < 0,001$). Kết quả này phù hợp với các luận điểm trong nghiên cứu của Formiga F. (1999), Cook R. J. (2000), Toubi E. (2006).

KẾT LUẬN

1. Sự thay đổi nồng độ các cytokin (IL-2, IL-4, TNF- α , IFN- γ) và số lượng tế bào lympho T-CD3, T-CD4, T-CD8, B-CD19, NK-CD56 trước và sau điều trị ở bệnh nhân luput ban đỏ hệ thống

1.1. Nồng độ các cytokin

+ Trước điều trị, nồng độ IL-2 ở bệnh nhân thấp hơn, trong khi nồng độ IL-4, TNF- α và IFN- γ cao hơn so với người khỏe mạnh ($p < 0,05-0,001$); Nồng độ IL-2 ở bệnh nhân nhóm 1 thấp hơn ở bệnh nhân nhóm 2, ngược lại với nồng độ IFN- γ ($p < 0,05-0,1$);

+ Sau 1 tháng điều trị ức chế miễn dịch, nồng độ IL-2 ở bệnh nhân tăng lên ($p < 0,001$), trong đó 96,66% bệnh nhân nhóm 1 và 73,33% bệnh nhân nhóm 2 tăng IL-2, nhưng vẫn thấp hơn so với người khỏe mạnh ($p < 0,001$); Nồng độ IFN- γ ở bệnh nhân nhóm 1 giảm ($p < 0,05$) nhưng vẫn cao hơn so với bệnh nhân nhóm 2 ($p < 0,05$); nồng độ IL-4, TNF- α và IFN- γ ở bệnh nhân nhóm 2 giảm ($p < 0,05-0,001$), nhưng vẫn cao hơn với người khỏe mạnh ($p < 0,01-0,001$);

1.2. Số lượng tiểu quần thể tế bào lympho

+ Trước điều trị, số lượng lympho T-CD4 và tế bào NK-CD56 ở cả 2 nhóm bệnh nhân đều thấp hơn so với người khỏe mạnh ($p < 0,001$). Số lượng lympho T-CD3, lympho T-CD8 và lympho B-CD19 ở bệnh nhân nhóm 2 thấp hơn so với người khỏe mạnh ($p < 0,001$). Số lượng lympho T-CD3, lympho T-CD8 và lympho B-CD19 ở bệnh nhân nhóm 2 thấp hơn so với bệnh nhân nhóm 1 ($p < 0,05-0,001$);

+ Sau 1 tháng điều trị ức chế miễn dịch, số lượng lympho T-CD3, lympho T-CD4, lympho T-CD8, lympho B-CD19 và tế bào NK-CD56 ở bệnh nhân tăng ($p < 0,01-0,001$); trong đó 90% bệnh nhân nhóm 1 tăng lympho T-CD4, 100% bệnh nhân SLE nhóm 2 tăng lympho T-CD4 và lympho T-CD8.

2. Mối liên quan giữa biến đổi nồng độ của một số cytokin và số lượng tiểu quần thể lympho với chỉ số hoạt động bệnh trên lâm

2.1. Hoạt tính bệnh

+ Sau 1 tháng điều trị ức chế miễn dịch, phần lớn các triệu chứng lâm sàng và huyết học tăng có ý nghĩa so với trước điều trị hoặc đạt mức bình thường ($p < 0,05 - 0,001$);

+ 100% bệnh nhân nhóm 3 có chỉ số SLEDAI giảm sau 1 tháng điều trị ức chế miễn dịch, chỉ số SLEDAI < 10 ; trong đó 53,3% có SLEDAI < 3 .

2.2. Liên quan giữa thay đổi miễn dịch với chỉ số hoạt động bệnh trên lâm sàng

+ Ở cả bệnh nhân đáp ứng tốt và đáp ứng chưa tốt, đều thấy nồng độ IL-2 tăng, trong khi nồng độ các cytokin IL-4, IL-6, TNF- α , và IFN- γ giảm có ý nghĩa ($p < 0,05 - 0,001$); số lượng lympho T-CD3, lympho T-CD4 và tế bào NK-CD56 tăng có ý nghĩa sau điều trị ($p < 0,01 - 0,001$);

+ Ở bệnh nhân đáp ứng chưa tốt, số lượng lympho B-CD19 tăng có ý nghĩa sau điều trị ($p < 0,01 - 0,001$).

+ Chưa thấy tương quan chặt chẽ giữa điểm số SLEDAI với nồng độ các cytokin, bộ thể và số lượng dưới nhóm lympho; nhưng đã thấy tương quan thuận, chặt chẽ giữa chỉ số SLEDAI với sự thay đổi số lượng các tiểu quần thể lympho sau điều trị ($r=0,45, p < 0,001$).

KIẾN NGHỊ

Kết quả nghiên cứu cho thấy những thay đổi nồng độ các cytokin và số lượng tiểu quần thể tế bào lympho sau 1 tháng điều trị ức chế miễn dịch, có liên quan với tiến triển bệnh. Cần có các nghiên cứu lớn hơn với thời gian dài hơn để thấy được rõ hơn liên quan giữa các thông số miễn dịch với tiến triển lâm sàng của bệnh nhân SLE, góp phần hướng dẫn theo dõi và điều trị có hiệu quả.

**DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ LIÊN
QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

- 1 Nguyễn Thị Thảo, Trần Hậu Khang, Văn Đình Hoa (2012),**
Nghiên cứu sự thay đổi số lượng các tế bào miễn dịch ở bệnh nhân luput ban đỏ hệ thống biểu hiện chủ yếu ở da, YHTH, 848(11) tr. 48-52.
- 2 Nguyễn Thị Thảo, Trần Hậu Khang, Văn Đình Hoa (2012),**
Nghiên cứu sự thay đổi hàm lượng cytokin IL-2 và IL-4 ở bệnh nhân luput ban đỏ hệ thống, YHTH, 855(12) tr. 138-142.

Ministry of Education and Training

Ministry of Public Health

Hanoi Medical University



NGUYEN THI THAO

**STUDY ON THE CHANGE OF
CYTOKINE'S CONCENTRATION AND LYMPHOCYTIC
SUBSETS BEFORE AND AFTER TREATMENT OF
PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS**

Subject: Dermatology

Code No: 62 72 01 52

**Summary of Thesis
of Philosophy Doctor in Medicine**

HA NOI – 2016

Research completed in

Hanoi Medical University

Scientific supervisors: **Professor TRAN HAU KHANG, MD., PhD**

Professor VAN DINH HOA, MD., PhD

Scientific Reviewer No.1:

Prof. PHAM VAN THUC, MD., PhD

Scientific Reviewer No.2:

Associate Prof. TRAN DANG QUYET, MD., PhD.

Scientific Reviewer No.3:

Associate Prof. NGUYEN VAN THUONG, MD., PhD

The thesis was defended in front of The Council for Philosophy
Doctor in Medicine, at Hanoi Medical University

At: hour, .../..... 2016

The thesis can be found at:

- *The National Library*
- *Central Medical Information Library*
- *Hanoi Medical University Library*
- *Central Dermatology Hospital Library*

Introduction

Systemic Lupus Erythematosus-SLE is a common autoimmune disease in Vietnam as well as around the world. The onset of SLE expresses symptoms in different organs, especially skin, joints, blood, and kidney. The disease progresses along the life and relapses time to time. The pathology of SLE is extremely complex and still un-known well. However, it is clearly that the mechanism of antigen determinant recognition of immune system in SLE patients becomes abnormal and many antibodies are produced to attack their own antigens. The disorders of immune regulation play an important role in its pathology.

SLE treatment mostly utilized immunosuppressive drugs such as corticosteroid, cyclophosphamide, azathioprine,... However, clinical progression and treatment response are not consistent among patients. Whether or not the cytokine concentration related to treatment results is still undergoing study. Many approaches are being in application to utilize anti-cytokine in the treatment of SLE patient.

In Vietnam, there are many studies on clinic, laboratory and therapeutic aspects of SLE. But up to now, it is only some authors have first looked into immune disorders, especially the changes in cytokine concentration and lymphocytic subsets of SLE patient during treatment.

Therefore, this thesis is run to focus on two main objectives:

1. To assess the change of IL-2, IL-4, TNF- α and IFN- γ concentration and lymphocytic subsets of T-CD3, T-CD4, T-CD8, B-CD19, NK-CD56 before and after treatment of systemic lupus erythematosus patient.

2. To investigate the correlation between changes in above immune parameters and clinical activity indices of the patients with SLE.

The reality of the dissertation

SLE is a common disease that is still not available complete treatment. Main objectives of treatment is to prolong the remission and the life, and to ensure the best quality for patient life. The normalization of biological abnormality is considered to factorsthat affect to treatment result. Since the 1970s, they have looked closed consideration to the role of immunity in SLE patients that is still little in Vietnam now.

Our research focusesinthe changes of IL-2, IL-4, IL-6,TNF- α , IFN- γ concentrationsand lymphocytic subsets in SLE patients before and after treatment, to contribute new insight in the treatment of this disease.

Scientific contribution of the dissertation

(1) In active phase of SLE, we detected lowered IL-2, increased IL-4, TNF- α , IFN- γ concentration;lower cell counts of lympho T-CD4 and NK-CD56than healthy people ($p < 0.001$). After 1 month of immunosuppression, there are adjustments of immune parameters towards normalization.But 1 month treatment was not enough effective for some patients.

(2) The normalization of observed immunity parameters has a linear correlation to clinical activity as SLEDAI. No closed correlation between SLEDAI and separate immune parameters likes IL-2, IL-4, IL-6,TNF- α , IFN- γ ; T-CD3, T-CD4, T-CD8, B-CD19, NK-CD56 was observed. But, there is a strong linear correlation between SLEDAI and changes in lymphocytic subsets, $r = 0.45$; $p < 0.001$.

The dissertation layout:

The dissertation takes 116 pages excluding appendixes and references. Aside 2 pages of Introduction, 2 pages of Conclusion and 1 pages of recommendation, the main content of thesis consists of 4

chapters as follows: chapter 1 - The overview 38 pages; chapter 2 - Patients and method 12 pages; chapter 3 - Data analysis 31 pages and chapter 4 – Discussion 30 pages. This dissertation has 41 tables and 11 graphs.

Chapter 1. THE OVERVIEW

1.1. The SLE

In 1904, Willian Osler described various lesions of internal organs and tissues, that suggested to the concept of systemic lupus erythematosus other than the only skin lesion.

The advances in molecular biology in recent years found out the roles of cellular cycles, cytokines and immune disorder in pathology of SLE and patient's treatment response.

The autoimmune response is highly specific to auto-antigen that reside in nucleus, cytoplasm, cell membrane and blood proteins, etc. The clinical progress of disease is due to the reaction between auto-antibodies and auto-antigens. Depend on the sites where the reaction occurs, clinical symptoms are present.

1.2. Autoimmune disorders

Auto-antibodies play an important role in the pathology of SLE. Laboratory detection of nuclear antibodies is mandatory in diagnosis of SLE. If the patient is found to increase anti-ds-DNA antibody concentration, the risk of recurrence are high, about 40-80%.

About 75% of patients are present clinical symptoms during disease progression, and 25% exhibit clinical symptoms as first sign. These clinical symptoms are most commonly related to immune complex deposition to tissues and organs with complement fixation and inflammatory activation, where clinical symptoms occurred.

Many studies confirmed the significance of cytokines such as IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ in disease activity. However, the exact role of each cytokine, and its correlation to disease activity are not clear. There is great interest in this issue and various ongoing studies.

Immunosuppressive drugs with cellular toxicity effect such as corticoid, cyclophosphamide,... are used effectively in SLE treatment. Recently, MMF has been proven a suitable choice for both SLE treatment and post cyclophosphamide maintenance.

Anolik J.H. (2002), Leandro M.J. (2002), Anolik J.H. (2003),... looked into SLE treatment with rituximab as monoclonal antibody anti-CD20; Kalled S.L. (1998), with anti-CD40L; Aringer M. (2004) utilizing anti-TNF- α antibody in SLE treatment,... The results showed that, these are promising new approaches, and deeper researches are required.

Autologous stem cell transplant was first prescribed for SLE patient in 1997. In general, the efficacy of disease suppression ranges from 50 - 66% with late recurrence 33% and fatality 12%. Complication from autologous transplant is severe, and is leading cause of death. Hence, autologous stem cell transplant is not a common treatment for SLE patients.

1.3. SLE researches in Vietnam

In Vietnam, SLE researches started from the 1970s. The authors have attempted to approach major directions such as clinical features, treatment progress, immunity and biological disorders. However, there is few researches of cytokine concentration and lymphocytic subsets during disease progress. This situation needs to be resolved in the future to make better treatment result for this complex disease.

Chapter 2. PATIENTS AND METHODS

2.1. Patients

90 SLE adult patients underwent treatment at National Institute of Dermatology and Department of Reno-urology, Bach Mai Hospital.

SLE diagnosis is according to ARA standards-1982, amended in 1997 and nephritis diagnosis is according to ACR standard.

- For first objective:
 - + 30 SLE patients without nephritis (group 1)
 - + 30 SLE patients with nephritis (group 2)
- For second objective: 30 SLE patients without nephritis (group 3)
- Control group: 30 healthy peoples.

2.2. Materials

- SLE patient and control blood samples for lymphocytic subsets, cytokine quantitation.

- Test kits and equipments consist of Sysmex KX21 analyzer, Counter Willzar 1470, Nikon microscope, Evidence biochip array, Randox, ELISA Biotek, FASC-Calibur system...

2.3. Methods

Prospective study in cross-sectional and longitudinal during intervention analysis.

2.3.1. Testing techniques

- Blood cell analysis in KX21 machine and microscope.
- Urine protein testing by dry bio-chemistry in Clinitex 100.
- Lymphocytic subsets counting of T-CD3, T-CD4, T-CD8, B-CD19 and NK-CD56 by FACS system.
- Quantitation of IL-2 and TNF- α by RIA and ELISA technique.
- Quantitation of IL-4 and IFN- γ by fluorescent immuno-chemistry and ELISA technique.

2.3.2. Treatment protocol

- Non-nephritis SLE patients: Prednisolone 2mg/kg/24 hour in active phase and to reduce the dose to 0,5-1 mg/kg/24 hour thereafter.

- Nephritis SLE patients: Cyclophosphamide 2mg/kg/24 hour + prednisolon 60mg/24 hour during active phase and then cyclophosphamide 1mg/kg/24 hour + prednisolon 30 mg/ 24 hour for several following months.

2.3.3. Supervising disease progression on clinical and testing aspects

Assessing disease activeness according to the SLEDAI, changes in cytokin concentrations and lymphocytic subsets before treatment, and after 1 month of immunity suppression treatment:

* SLEDAI <3: disease suppression; good response.

* $3 \leq$ SLEDAI <10: mild disease activeness; not good response.

2.4. Data analysis

By SPSS 15.0; EPINFO 6.0.

2.5. Ethic in medical research

This research was carried out legality, sensibility and ethic regulation for fellows of medical doctor, Hanoi Medical University.

Chapter 3. DATA ANALYSIS

3.1. Age and gender of research groups

Table 3.1. Target subject age and gender

Target	Time period	Objective	Age	Female/Male
Group 1	2005	1	15-49 25,83±8,49	29/1
Group 2	2005	1	17-55 32,43±10,87	30/0
Control	2005	1	23-46 31,33±7,83	29/1
Group 3	2011	2	15-53 29,87±10,99	30/1

*SLE is commonly found in young female. F tets ($\alpha=0,05$)=0,6100; 0,8511; 0,5192 < 1,8620;

3.2. Cytokine concentration and lymphocytic subsets in SLE patient

Table 3.2. Comparison of IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α concentration between group 1 before treatment and control

Cytokine	Group 1 (n=30)	Control (n=30)	p
IL-2 (ng/ml)	3,59 \pm 2,36	9,07 \pm 4,47	<0,001
IL-4 (pg/ml)	1,32 \pm 1,96	0,30 \pm 0,10	<0,05
TNF- α (ng/ml)	0,72 \pm 1,23	0,20 \pm 0,14	<0,05
IFN- γ (pg/ml)	10,33 \pm 12,86	0,63 \pm 0,14	<0,001

*Prior to treatment, lowered IL-2 concentrations are significant against control (p<0,001); higher IL-4, TNF- α and IFN- γ concentrations are significant against control (p< 0,05- 0,01);

Table 3.3. Comparison of IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α concentration between group 2 before treatment and control

Cytokine	Group 2 (n=30)	Control (n=30)	p
IL-2 (ng/ml)	5,19 \pm 2,34	9,07 \pm 4,47	<0,001
IL-4 (pg/ml)	2,09 \pm 2,94	0,30 \pm 0,10	<0,05
TNF- α (ng/ml)	0,59 \pm 0,30	0,20 \pm 0,14	<0,001
IFN- γ (pg/ml)	4,13 \pm 6,04	0,63 \pm 0,14	<0,001

* Prior to treatment, lowered IL-2 concentrations are significant against control (p<0,001); higher IL-4, TNF- α and IFN- γ concentrations are significant against control (p< 0,05- 0,01);

Table 3.5. Comparison of cytokine concentrations between group 1 pre-treatment and post-treatment

Cytokine	Pre-treatment(n=30)	Post-treatment (n=30)	P
IL-2 (ng/ml)	3,59 ± 2,36	5,76 ± 2,08	<0,001
IL-4 (pg/ml)	1,32 ± 1,96	1,15 ± 1,61	>0,05
TNF-α (ng/ml)	0,72 ± 1,23	0,39 ± 0,32	>0,05
IFN-γ (pg/ml)	10,33 ± 12,86	3,20 ± 4,11	<0,05

* Post-treatment, increased, higher IL-2 concentrations are significant against pre-treatment ($p < 0,001$); Decreased IFN-γ concentrations post-treatment are significant against pre-treatment ($p < 0,05$);

Table 3.6. Comparison of cytokine concentrations between group 2 pre-treatment and post-treatment

Cytokine	Pre-treatment (n=30)	Post-treatment (n=30)	P
IL-2 (ng/ml)	5,19 ± 2,34	6,78 ± 3,00	<0,05
IL-4 (pg/ml)	2,09 ± 2,94	0,59 ± 1,38	<0,05
TNF-α (ng/ml)	0,59 ± 0,30	0,32 ± 0,19	<0,001
IFN-γ (pg/ml)	4,13 ± 6,04	1,45 ± 2,94	<0,05

* Post-treatment, increased, higher IL-2 concentrations are significant against pre-treatment ($p < 0,05$); decreased IL-4, TNF-α and IFN-γ concentrations are significant against pre-treatment ($p < 0,05-0,001$);

Table 3.7. Changes in cytokine concentrations in group 1 post-treatment in comparison to control

Cytokine	Group 1 (n=30)	Control (n=30)	P
IL-2 (ng/ml)	5,76 ± 2,08	9,07 ± 4,47	<0,001
IL-4 (pg/ml)	1,15 ± 1,61	0,30 ± 0,10	<0,01
TNF- α (ng/ml)	0,39 ± 0,32	0,20 ± 0,14	<0,01
IFN- γ (pg/ml)	3,20 ± 4,11	0,63 ± 0,14	<0,001

* Post-treatment, IL-2 concentrations recovered, but is still significantly lower than control subjects ($p < 0,001$); other cytokine concentrations are still significantly higher than control subjects ($p < 0,01 - 0,001$);

Table 3.8. Changes in cytokine concentrations in group 2 post-treatment compared to control

Cytokine	Group 2 (n=30)	Control (n=30)	P
IL-2 (ng/ml)	6,78±3,00	9,07 ± 4,47	<0,05
IL-4 (pg/ml)	0,59 ± 1,38	0,30 ± 0,10	>0,05
TNF- α (ng/ml)	0,32 ± 0,19	0,20 ± 0,14	<0,001
IFN- γ (pg/ml)	1,45±2,94	0,63 ± 0,14	<0,001

* Post-treatment, IL-2 concentrations increased but were still lower and are significant against control ($p < 0,05$); TNF- α and IFN- γ concentrations decreased but were still higher and are significant against control ($p < 0,001$);

Table 3.11. Comparison of lymphocytic subsets between pre-treatment group 1 and control

Cell($\times 10^6/l$)	Group 1 (n=30)	Control (n=30)	P
T-CD3	1397 \pm 673	1622 \pm 223	>0,05
T-CD4	565 \pm 378	874 \pm 134	<0,001
T-CD8	737 \pm 331	684 \pm 103	>0,05
B-CD19	277 \pm 202	387 \pm 121	>0,05
NK-CD56	94 \pm 70	236 \pm 56	<0,001

* Pre-treatment, number of lympho T-CD4 and NK-CD56 were significantly lower than control ($p < 0,001$);

Table 3.12. Comparison of lymphocytic subsets between pre-treatment group 2 and control

Cell ($\times 10^6/l$)	Group 2 (n=30)	Control (n=30)	P
T-CD3	994 \pm 341	1622 \pm 223	<0,001
T-CD4	483 \pm 160	874 \pm 134	<0,001
T-CD8	484 \pm 215	684 \pm 103	<0,001
B-CD19	177 \pm 86	387 \pm 121	<0,001
NK-CD56	128 \pm 61	236 \pm 56	<0,001

* Pre-treatment, number of T-CD3, T-CD4, T-CD8, B-CD19 and NK-CD56 lympho cells were all significantly lower than control ($p < 0,001$);

Table 3.14. Changes in lymphocytic subsets in group 1 post-treatment and pre-treatment

Cell ($\times 10^6/l$)	Pre-treatment (n=30)	Post-treatment (n=30)	P
T-CD3	1397 \pm 673	2014 \pm 1.122	<0,05
T-CD4	565 \pm 378	898 \pm 532	<0,001
T-CD8	737 \pm 331	983 \pm 556	<0,05
B-CD19	277 \pm 202	464 \pm 262	<0,01
NK-CD56	94 \pm 70	182 \pm 85	<0,001

*Post-treatment, number of T-CD3, T-CD4, T-CD8, B-CD19 and NK-CD56 lympho cells are all significantly higher than pre-treatment;

Table 3.15. Changes in lymphocytic subsets in group 2 post-treatment and pre-treatment

Cell ($\times 10^6/l$)	Pre-treatment (n=30)	Post-treatment (n=30)	p
T-CD3	994 \pm 341	1449 \pm 308	<0,001
T-CD4	483 \pm 160	696 \pm 161	<0,001
T-CD8	484 \pm 215	714 \pm 163	<0,001
B-CD19	177 \pm 86	305 \pm 112	<0,001
NK-CD56	128 \pm 61	239 \pm 95	<0,001

*Post-treatment, number of T-CD3, T-CD4, T-CD8, B-CD19 and NK-CD56 lympho cells are all significantly higher than pre-treatment (p<0,001);

Table 3.16. Changes in lymphocytic subsets in group 1 post-treatment compares to control

Cell ($\times 10^6/l$)	Group 1(n=30)	Control (n=30)	P
T-CD3	2014 \pm 1122	1622 \pm 223	>0,05
T-CD4	898 \pm 532	874 \pm 134	>0,05
T-CD8	983 \pm 556	684 \pm 103	<0,05
B-CD19	464 \pm 262	387 \pm 121	>0,05
NK-CD56	182 \pm 85	236 \pm 56	<0,05

* Lymphocytic subsets in group 1 have recovered to almost that of control; however, number of T-CD8 and NK-CD56 are still lower than control ($p < 0,05$);

Table 3.17. Changes in lymphocytic subsets in group 2 post-treatment compares to control

Cell ($\times 10^6/l$)	Group 2(n=30)	Control (n=30)	P
T-CD3	1449 \pm 308	1622 \pm 223	<0,05
T-CD4	696 \pm 161	874 \pm 134	<0,001
T-CD8	714 \pm 163	684 \pm 103	>0,05
B-CD19	305 \pm 112	387 \pm 121	<0,01
NK-CD56	239 \pm 95	236 \pm 56	>0,05

*Post-treatment, number of lympho T-CD3, T-CD4 and B-CD19 are gradually recovered, but still lower than control ($p < 0,05-0,001$);

3.3. The correlation between changes in cytokine's concentration and lymphocytic subsets and disease activity

Table 3.19. Improvement in clinical symptoms(n=30)

Symptoms	Pre-treatment (%)	Post-treatment (%)	P
Rashes	96,7	63,3	< 0,001
Arthritis	73,3	0	< 0,001
Fatigue	70	0	< 0,001
Hair loss	50	43,3	> 0,05
Vasculitis	46,7	0	< 0,001
Urine protein	46,7	10	< 0,001
Urine bleeding	23,3	0	< 0,001
Mucosaulceration	23,3	6,7	< 0,05
Fever	10	0	< 0,05
Fleuritis	6,7	0	> 0,05
Urine residue	3,3	0	> 0,05
Pericarditis	3,3	0	> 0,05

*Almost of clinical symptoms decreased significantly, or completely absent after 1 month of immunosuppression treatment (p <0,05 - 0,001).

Table 3.20. Clinical respond in group 3 subjects according to SLEDAI

Patient response	Pre-treatment	Post-treatment	P
Favorable (n=16)	19,06 ± 7,55	0,88 ± 1,02	<0,001
Non favorable (n=14)	21,07 ± 5,68	5,0 ± 1,88	<0,001
Total	100% > 3	10> 46,7% > 3	< 0,001

* Post-treatment, 100% group 3 subjects has lowered SLEDAI with statistical significance ($p < 0,001$); in which 16/30 (53,3%) subjects has SLEDAI < 3 (complete suppression) and no subjects has SLEDAI ≥ 10 .

Table 3.21. Hematology improvement in group 3 subjects (n = 30)

Symptom	Pre-treatment	Post-treatment	P
Anemia (%)	63,3	36,7	< 0,01
Leukocyte deficiency (%)	16,7	6,7	> 0,05
Platelet deficiency (%)	13,3	0	< 0,001

* Anemia and thrombocytopenia are improved significantly after 1 month of immunosuppression treatment ($p < 0,001$).

Table 3.25. Changes in cytokine concentration in subjects with good response (n=16)

Cytokine	Pre-treatment	Post-treatment	P
IL-2 (ng/ml)	2,64 ±2,61	4,02 ±2,59	< 0,01
IL-4 (pg/ml)	1,24 ±1,59	0,53 ± 0,75	< 0,05
IL-6 (pg/ml)	20,99±7,71	10,91 ±6,31	< 0,001
TNF- α (ng/ml)	1,87 ±0,67	0,45 ±0,35	< 0,01
IFN- γ (pg/ml)	22,64 ±5,79	3,90 ±1,79	< 0,01

* Pre-treatment, IL-2 decreased, post-treatment, IL-2 concentration increased with statistical significance ($p < 0,01$); Pre-treatment, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ concentration increased, post-treatment, these cytokines concentration decreased with statistical significance ($p < 0,05 - 0,001$);

Table 3.26. Changes in lymphocytic subset in patients with good treatment response (n=16)

Cell ($\times 10^6/l$)	Pre-treatment	Post-treatment	P
T-CD3	1319±619	1747±471	< 0,01
T-CD4	510±188	822±267	<0,001
T-CD8	669±398	758±286	> 0,05
B-CD19	305±125	368±130	>0,05
NK-CD56	59±46	176±121	<0,01

*Post-treatment, number of T-CD3, T-CD4, NK-CD56 lympho increased with statistical significance ($p < 0,01 - 0,001$).

Table 3.27. Changes in cytokine concentrations in subjects with not good treatment respond (n=14)

Cytokine	Pre-treatment	Post-treatment	p
IL-2 (ng/ml)	3,71 ±6,11	5,20±5,61	< 0,01
IL-4 (pg/ml)	1,28 ±1,24	0,34 ±0,23	< 0,01
IL-6 (pg/ml)	23,12±11,77	11,83 ±7,38	<0,001
TNF-α (ng/ml)	0,93 ±0,42	0,55 ±0,33	< 0,001
IFN-γ (pg/ml)	9,54 ±6,41	4,89 ±3,57	< 0,001

* Post-treatment, IL-2 concentration increased, IL-4, IL-6, TNF-α, IFN-γ decreased with significance (p < 0,01-0,001).

Table 3.28. Changes in lymphocytic subsets in patients with not good treatment response (n=14)

Cell (x10 ⁶ /l)	Pre-treatment	Post-treatment	P
T-CD3	1718±544	2095±560	<0,05
T-CD4	732±259	930±244	<0,05
T-CD8	892±313	862±307	>0,05
B-CD19	279±130	342±106	<0,01
NK-CD56	117±111	214±107	<0,01

*Post-treatment, number of T-CD3, T-CD4, NK- CD56 and B-CD19 lympho increased significantly (p <0,05 - 0,01).

Table 3.34. Multiple variable correlation between SLEDAI and lymphocytic subsets (n=30)

Parameter	R	P
Pre-treatment	0,37	<0,001
Post-treatment	0,26	> 0,05
Pre-Post treatment	0,45	<0,001

* There is a strict and proportional correlation between SLEDAI and lymphocytic subsets pre-treatment, $r = 0,37$; and with changes in lymphocytic subsets post-treatment, $r = 0,45$ ($p < 0,001$).

Chapter 4. DISCUSSION

4.1. Patients and control group

The quantitation of cytokine concentration is not a difficult technique, but the results can vary from laboratory to laboratory, even with same technique. Results for IL-6 ($21,15 \pm 10,99$ compared to $7,11 \pm 3,23$ pg/ml, $p < 0,05$) and TNF- α ($172,7 \pm 39,19$ compared to $7,87 \pm 3,49$, $p < 0,05$) in control groups by Alaa A. Sabry (2005, n=20) and Carmen Avrămescu (2010, n=35) using the same ELISA technique are examples. Therefore, we chose control group as 30 healthy people to ensure reliability to investigate the changes in cytokine concentrations in research groups.

To meet the second objective, we chose 30 SLE patients without nephritis, undergoing treatment at Central Dermatology Hospital in 2011. This group was studied for the correlation of pre and post treatment disease activity versus changes in cytokine concentrations and lymphocytic subsets.

4.2. The change in cytokine concentration and lymphocytic subsets in SLE patients

4.2.1. Changes in cytokine concentration

Our research results show that, IL-2 concentration in patients pre-treatment are considerably lower than in healthy people. IL-2 concentration in group 1 decreased to lower than group 2. This result aligns with Mok C.C., Lau C.S. (2003), Huang Y. P. (1988). After 1 month of immunosuppression treatment, IL-2 concentration increased significantly compared to pre-treatment, but still lower than that of healthy people ($p < 0,05 - 0,01$). Thus, 1 month immunosuppression treatment takes re-adjusting effect on IL-2

concentration, but not enough to re-adjust IL-2 concentration. This result aligns with Sima Sedighi (2011-2012), Mok C.C. (2003), Kyttaris V.C. (2004).

Other than IL-2, IL-4 concentration in patients increased compared to IL-4 in healthy people. This result aligns with Nakajima A., Hirose S. (1997), Viillard J.F (1999), Nagy G. Y. (2000), Csiszar A. (2000), Robak E. After 1 month of treatment, patients with IL-4 concentration higher than normal showed re-adjustable tendency to normal, whereas patients with lower IL-4 concentration showed no significant increase. Perhaps, treatment has an effect of 'normalization' of IL-4 concentration instead of re-adjusting IL-4 upwards or downwards in a single direction. Our results align with Enass A. Elewa (2014). The abovementioned data shows that, IL-4 can be used as an index for disease activity.

In our research, 70% patients in group 1 and more than 50% patients in group 2 increased TNF- α concentration higher than level in healthy people. Our result aligns with Bengtsson A.A. (2004), Carmen Avrănescu (2010). After 1 month of immunosuppression treatment, TNF- α concentration in group 1 patients displayed no significant decrease, while group 2 patients was decreased significantly in comparison to pre-treatment ($p < 0,01$). However, TNF- α concentration in both groups are still higher than healthy people ($p < 0,01$). The reason for lower concentration of TNF- α in group 1 compared to group 2 may be related to the treatment protocol.

Our research study shows that pre-treatment, IFN- γ concentration in group 1 were significantly higher than group 2. IFN- γ concentration in both groups were higher than healthy adults. This result aligns with Kono D. H.(2001), Noreldin N. (2014),

Csiszar A. (2000), Enass A. Elewa (2014). After 1 month of immunosuppression treatment, IFN- γ concentration in both groups decreased significantly in comparison to pre-treatment ($p < 0,05$); but still higher than healthy group ($p < 0,001$).

4.2.2. *Changes in lymphocytic subsets*

Among 60 pre-treatment patients, 48/60 (80%) had lowered lympho T-CD3 count. But 16,67% patients had higher lympho T-CD3 count than control. Our result aligns with Bengtsson A.A. (2004), Papadaki H.A. (Greece), Phạm Thị Hue (1985), Neidhart (1996)...

Our research also showed that lympho T-CD4 count in pre-treatment patients were lower than healthy people, $p < 0,001$. After 1 month of treatment, lympho T-CD4 count is recovery noticeably than pre-treatment ($p < 0,001$). Especially, lympho T-CD4 count in group 1 returned to normal ($p > 0,05$). Thus, immunosuppression treatment helped to recover lympho T-CD4. Our result aligns with Reininger (1996), Stassi G. (1997), Nobutoh (1994), Hahn B.H. (2005).

Before treatment, lympho T-CD8 in group 1 is not different to healthy people ($p > 0,05$); while this cell in group 2 is lower than significantly ($p < 0,001$). After 1 month of immunosuppression treatment, lympho T-CD8 count in group 1 increased to higher than healthy people ($p < 0,05$). In group 2, 100% of patients increased lympho T-CD8 count than pre-treatment ($p < 0,001$). Viillard J.F. (2001), Hahn B.H. (2005), George Bertias (2012) also showed that.

Before treatment, lympho B-CD19 count in group 1 was normal, but lympho B in group 2 decreased severely ($p < 0,001$). After 1 month of immunosuppression, lympho B-CD19 count recovered in both

patient groups, significantly higher than pre-treatment ($p < 0,01 - 0,001$). Thus, 1 month of immunosuppression treatment helped to increase lympho B-CD19 count in SLE patients. This result aligns with Demaison (1996), Pham Thi Hue (1985) and Wenzel J. (2004).

NK cell count in SLE patients were extremely lower than healthy people ($p < 0,001$). After 1 month of treatment, NK-CD56 cell count increased significantly ($p < 0,05$). This result aligns with Hahn B.H. (2005), Wenzel J. (2004).

4.3. The correlation between change in cytokine concentration and lymphocytic subsets to disease activity

4.3.1. Clinical representation

After 1 month of treatment, almost of symptoms such as arthritis, fatigue, blood vessel inflammation, urine blood disappeared. Novel rashis still in 63,3% patients. Hairloss is not recovery. Anemia and thrombocytopenia are improved well after one month immunosuppression ($p < 0,05 - 0,001$). Contrary, leukopenia had not improved. Enass A. Elewa (2014) was also showed that.

4.3.2. Disease activity in SLEDAI

Almost of SLEDAI parameters are currently applicable in Vietnam. Our research result align with Formiga F. (1999).

4.3.3. Cytokine concentration

The correlation between SLEDAI and changes in cytokine concentration showed that, there is a proportional but not strict correlation. Compound analysis of all 5 cytokines and SLEDAI showed a rather large relation coefficient, $r = 0,34 - 0,49$ but not significant, $p > 0,05$. Our research result aligns with Sima Sedigh (2014), Enass A. Elewa (2014), Davas E. M. (1999). Some studies

showed linear correlation between SLEDAI to TNF- α and IFN- γ .

4.3.4. Lymphocytic subsets

Compound analysis of SLEDAI and lymphocytic subsets pre and post-treatment showed relatively strict proportional correlation ($r=0,37$, $p<0,001$) and changes of lymphocytic subsets between pre-treatment and post-treatment ($r=0,45$, $p<0,001$).

This result is same as Formiga F. (1999), Cook R. J. (2000), Toubi E.(2006).

CONCLUSION

1.The changes in cytokine's concentration and lymphocytic subsets in SLE patients:

1.1. Changes in cytokine's concentrations

- Before treatment, patient's IL-2 concentrations were lower, while IL-4, TNF- α and IFN- γ concentrations were higher than those of healthy people ($p< 0,05- 0,001$); IL-2 concentrations in group 1 patients were lower than group 2, while IFN- γ were higher ($p<0,05- 0,1$);
- After 1 month of immunosuppression treatment, patient's IL-2 concentration increased ($p<0,001$) (96,66% group 1 patients and 73,33% group 2 patients increased) but still lower than healthy people ($p<0,001$); IFN- γ concentrations in group 1 patients decreased, but still higher than group 2 ($p<0,05$); IL-4, TNF- α and IFN- γ concentrations in group 2 patients decreased, but still higher than healthy people ($p<0,01- 0,001$);

1.2. Changes in lymphocytic subsets

- Before treatment, lympho T-CD3, T-CD4, T-CD8, lympho B-CD19 and NK-CD56 cells in SLE patient were lower than healthy people ($p < 0,001$). Lympho T-CD3, T-CD8 and lympho B-CD19 in group 2 patients were lower than group 1 ($p < 0,05 - 0,001$);
- After 1 month of immunosuppressive treatment, lymphocytic subsets of T-CD4, T-CD8, B-CD19 and NK-CD56 increased ($p < 0,01 - 0,001$); of which 90% of group 1 increased lympho T-CD4, 100% group 2 increased lympho T-CD4 and T-CD8;

2. The correlation between changes in cytokine concentrations and lymphocytic subsets to disease activity:

2.1. Disease activity

- After 1 month of immunosuppression, almost of clinical symptoms and hematologic signs were normalized ($p < 0,05 - 0,001$); 100% patients decreased SLEDAI to 10, and 53,3% had SLEDAI < 3 .

2.2. Correlation between immune changes and disease activity

- In patients without good response, lympho B-CD19 increased significantly ($p < 0,01 - 0,001$).
- There was still not strict correlations of SLEDAI to cytokines, complement concentrations and lymphocytic subsets. But, there were strict and directly proportional correlation of SLEDAI to changes in lymphocytic subsets post-treatment ($r = 0,45$, $p < 0,001$).

RECOMMENDATIONS

Research results show changes in cytokin concentrations and lymphocytic subsets after 1 month of immunosuppressive treatment, with some correlation to disease progression. Longer researches are required to find out the real relations between immunity parameters and clinical progression in SLE patients, to give more effective treatment to this disease.

**LIST OF PUBLISHED PAPERS RELATIVE TO THIS
DISSERTATION**

- 1 Nguyen Thi Thao, Tran Hau Khang, Van Dinh Hoa** (2012), *Changes in number of leukocytes in systemic lupus erythematosus patients who primarily exhibit on skin. Journal of practical medicine*, 848 (11), p.48-52.
- 2 Nguyen Thi Thao, Tran Hau Khang, Van Dinh Hoa** (2012), *Changes in concentrations of IL-2 and IL-4 cytokins in systemic lupus erythematosus patients, Journal of practical medicin*, 855 (12), p.138 - 142.