

Khảo sát tế bào lympho T CD3, CD4, CD8 trong máu ngoại vi của bệnh nhân ghép thận

Survey of peripheral blood lymphocyte subtype in kidney transplant recipients

Đỗ Thị Mai Dung*, Hà Phan Hải An*,
Lê Văn Đông**

*Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức,
**Học viện Quân y

Tóm tắt

Mục tiêu: Trong việc lựa chọn để đánh giá tác động của micophenolic acid (MPA), chúng tôi xác định sự thay đổi của tế bào lympho T trong máu ngoại vi trên bệnh nhân ghép thận. **Đối tượng và phương pháp:** Chúng tôi đếm số lượng tế bào lympho T CD3, CD4, CD8 trong máu ngoại vi của nhóm 30 người khỏe mạnh và 35 bệnh nhân ghép thận tại thời điểm trước ghép 1 ngày và sau ghép 10 ngày; bằng kit miễn dịch huỳnh quang trực tiếp của Becton Dickinson. **Kết quả:** Số lượng tế bào lympho T CD3, CD4, CD8 trong máu ngoại vi của bệnh nhân trước ghép thấp hơn so với nhóm chứng (TCD3 là $1690,31 \pm 503,45$ so với $2280,73 \pm 522,48$; TCD4 là $549,51 \pm 211,72$ so với $766,37 \pm 341,72$ và CD8 là $1134,37 \pm 431,07$ so với $1523,4 \pm 349,23$ với $p=0,000, 0,001, 0,0002$), sau ghép 10/35 bệnh nhân giảm và 22/35 bệnh nhân tăng số lượng tế bào TCD4 với $p=0,036$. **Kết luận:** Đếm số lượng tế bào lympho T CD3, CD4, CD8 trong máu ngoại vi nên được thực hiện ở nhiều thời điểm sau ghép để đưa ra các dự đoán sớm trong quá trình theo dõi điều trị sau ghép.

Từ khóa: Lympho T, ghép thận.

Summary

Objective: Our goal was to determine whether micophenolic acid (MPA) modulates peripheral blood lymphocyte T in kidney patients. **Subject and method:** We assessed CD3, CD4, CD8 peripheral blood lymphocytes in 30 donors; 35 kidney patients on 1 day before and 10 days after transplantation. By fluorescent light to identify and count the lymphocytes and CD4 T lymphocytes. **Result:** Comparisons showed in CD3+, CD4+, CD8+ peripheral blood lymphocytes in before kidney transplant recipients were lower than donor group (TCD3 was 1690.31 ± 503.45 vs 2280.73 ± 522.48 ; TCD4 was 549.51 ± 211.72 vs 766.37 ± 341.72 and CD8 was 1134.37 ± 431.07 vs 1523.4 ± 349.23 and $p=0.000, 0.001, 0.0002$), posttransplantation there were 10/35 patients reduction; 22/35 patients increation $p=0.036$. **Conclusion.** The need to reduce situations of risk to recipients by lymphocytes T monitoring more time points.

Keywords: Lymphocyte T, kidney transplant.

1. Đặt vấn đề

Tác dụng hai mặt của thuốc ức chế miễn dịch trên những bệnh nhân ghép tạng nói chung và trên bệnh nhân ghép thận nói riêng cần được kiểm soát

chặt chẽ. Hiện nay, việc định lượng nồng độ đối với thuốc ức chế calcineurin đã được thường xuyên và MPA đã được tiến hành tại các trung tâm ghép lớn trên thế giới để đưa ra mối tương quan giữa được

Ngày nhận bài: 28/10/2020, ngày chấp nhận đăng: 30/10/2020

Người phản hồi: Đỗ Thị Mai Dung, Email: domaidung70@gmail.com - Bệnh viện Việt Đức

động học và liều lượng thuốc trên lâm sàng [5]. Mặc dù sinh thiết đưa ra chẩn đoán xác định [10] nhưng phương pháp ít can thiệp lại đưa ra chẩn đoán sớm thải ghép sẽ có lợi hơn cho bệnh nhân ghép thận. Hơn thế nữa, các kiểm soát miễn dịch nên được thực hiện trước khi có các dấu hiệu lâm sàng là rất cần thiết. Việc thực hiện đánh giá tế bào lympho T trong máu ngoại vi cũng góp phần đưa ra các đánh giá nguy cơ [4], [12]. Weimer và cộng sự đã đề cập đến tế bào lympho T CD4 của người nhận liên quan đến thải ghép cấp [14] và sự tăng tế bào lympho T trong 1 tháng sau ghép của bệnh nhân dự báo cho thải ghép cấp [11].

Trên lâm sàng, bệnh nhân sau ghép thận có sử dụng MMF hoặc MPS, khi vào cơ thể sẽ được este hóa thành mycophenolic acid (MPA), chúng sẽ tham gia vào quá trình ức chế inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) từ đó ức chế sinh tổng hợp guanine nucleotide cho tái tổ hợp AND và phân bào. Do vậy, quá trình sinh sản của các tế bào lympho bị ức chế, trong đó có lympho T CD3, TCD4, TCD8 là những tế bào tham gia vào quá trình thải ghép. Nghiên cứu nhằm mục tiêu: *Khảo sát số lượng tế bào lympho T CD3, TCD4, TCD8 trong máu ngoại vi trên bệnh nhân ghép thận trước và sau ghép có sử dụng MPA.*

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Gồm hai nhóm:

Nhóm chứng: 30 người khỏe mạnh đã được sàng lọc trong đó có 20 người đủ tiêu chuẩn để hiến máu và 10 người đủ tiêu chuẩn để hiến tạng.

Nhóm nghiên cứu: 35 bệnh nhân ghép thận tại Bệnh viện Việt Đức trong thời gian từ tháng 2/2014 đến tháng 11/2015 được kiểm tra tại thời điểm trước ghép 1 ngày và sau ghép 10 ngày.

2.2. Phương pháp

Nghiên cứu tiến cứu, mô tả cắt ngang có theo dõi dọc được thực hiện tại Bệnh viện Việt Đức trên các bệnh nhân ghép thận vào thời điểm trước ghép và sau ghép 10 ngày.

Lấy mẫu và thực hiện xét nghiệm:

Lấy 2ml máu ngoại vi chống đông bằng EDTA. Đếm tế bào lympho T trong máu ngoại vi trên máy FACSCount, có sử dụng kit miễn dịch huỳnh quang trực tiếp của Becton Dickinson (Mỹ) xác định số lượng tế bào lympho T CD3, CD4, CD8.

2.3. Xử lý số liệu

Xử lý số liệu bằng chương trình Stata.

Các số liệu được tính ra trị số trung bình hay tỷ lệ %. So sánh số liệu từng cặp theo thuật toán t-test với $p < 0,05$.

3. Kết quả

Bảng 1. Đặc điểm của bệnh nhân ghép thận

Đặc điểm	Số lượng
Số lượng bệnh nhân (nam/nữ)	35 (22/13)
Tuổi	19 - 61
Cân nặng (kg)	38 - 69
Thời gian phát hiện bệnh thận (tháng)	12 - 200
Tạng hiến (người cho sống/người cho chết não)	29/6
Sử dụng MPA (Celcept/ Myfortic)	24/11

35 bệnh nhân ghép thận (22 nam và 13 nữ) được lấy máu kiểm tra trước ghép 1 ngày và ngày thứ 10 sau ghép. Bệnh nhân được sử dụng thuốc chống thải ghép theo phác đồ gồm: Ức chế calcineurin (cyclosporin hoặc tacrolimus) + MPA (cellcept hoặc Myfortic) + corticoid.

Bảng 2. So sánh số lượng tế bào lympho T trên bệnh nhân trước ghép với người khỏe mạnh

Tế bào lympho	Nhóm ghép (n = 35)	Nhóm chứng (n = 30)	p-values
TCD3 (tế bào/ μ l)	1690,31 $\pm$ 503,45	2280,73 $\pm$ 522,48	0,000 ^c
TCD4 (tế bào/ μ l)	549,51 $\pm$ 211,72	766,37 $\pm$ 341,72	0,001 ^g

Tỷ lệ TCD4/TCD3 (%)	33,36 ± 9,83	32,09 ± 6,96	0,557 ^c
TCD8 (tế bào/ μ l)	1134,37 ± 431,07	1523,4 ± 349,23	0,0002 ^g

c. *T-student test*g. *Willcoxon signrank test.*

Nhóm bệnh nhân trước ghép có số lượng tế bào lympho T CD3 dao động từ 1187 - 2193 và T CD4 từ 338 - 760; nhóm chứng có số lượng tế bào lympho T CD3 dao động từ 1758 - 2802 và T CD4 từ 425 - 1107. Sự khác biệt giữa hai nhóm về số lượng tế bào CD3, CD4, CD8 có ý nghĩa thống kê ($p=0,000$, $0,001$, $0,0002$). Tuy nhiên, tỷ lệ CD4/CD3 khác nhau không có ý nghĩa thống kê với $p=0,557$.

Bảng 3. So sánh số lượng tế bào lympho T trên bệnh nhân trước ghép và sau ghép 10 ngày

Tế bào lympho	Trước ghép	Sau ghép	p-values
TCD3 (tế bào/ μ l)	1690,31 ± 503,45	2069,14 ± 1374,4	0,222 ^g
TCD4 (tế bào/ μ l)	549,51 ± 211,72	729,46 ± 515,69	0,036 ^g
Tỷ lệ TCD4/TCD3 (%)	33,36 ± 9,83	35,49 ± 13,77	0,413 ^g
TCD8 (tế bào/ μ l)	1134,37 ± 431,07	1373,03 ± 1004,71	0,368 ^g

g. *Willcoxon signrank test*

Nhóm bệnh nhân sau ghép 10 ngày có số lượng tế bào lympho T CD4 từ 214 - 1244 và 10/35 bệnh nhân giảm và 22/35 bệnh nhân tăng số lượng tế bào T CD4. Sự khác biệt của nhóm bệnh nhân trước và sau ghép về số lượng tế bào T CD4 có ý nghĩa thống kê ($p=0,036$). Tuy nhiên, các thông số còn lại khác nhau không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 4. Nồng độ MPA của bệnh nhân sau ghép thận 10 ngày

C ₀ (mg/ L)	AUC ₀₋₁₂ (mg.h/L)						Tổng	
	< 30		30 - 60		> 60			
	n	%	n	%	n	%	n	%
< 1,5	7	20,0	12	34,3	1	2,9	20	57,1
1,5 - 2,5	2	5,7	10	28,6	2	5,7	14	40,0
> 2,5	0	0,0	1	2,9	0	0,0	1	2,9
Tổng	9	25,7	23	65,7	3	8,6	35	100,0
p-values	p=0,574							

Có 23/35 bệnh nhân có AUC 30 - 60mg.h/L và 3/35 bệnh nhân có AUC > 60mg.h/L. Sự khác nhau giữa nồng độ C_0 và AUC tại thời điểm 10 ngày khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p=0,574$).

4. Bàn luận

MPA ức chế enzym inosin monophosphate dehydrogenase (IMPDH), là enzym tổng hợp purin và catalyzes để tạo thành guanosin nucleotid từ inosin. Giảm guanosin nucleotid dẫn tới kháng chọn

lọc quá trình tăng sinh tế bào lympho, ngăn chặn sự tăng sinh của tế bào lympho. Do đó, việc đánh giá số lượng tế bào lympho cũng góp phần đánh giá đáp ứng miễn dịch trong cơ thể người nhận cũng như hiệu quả của liệu pháp ức chế miễn dịch.

Bảng 2 cho thấy nhóm chứng có số lượng tế bào lympho T CD3, T CD4, T CD8 tương đối phù hợp với các nghiên cứu của tác giả Phan Bích Liên [2] và Nguyễn Thị Thảo [1]. Bệnh nhân mắc bệnh thận mạn

tính thường có thêm các bệnh đái tháo đường, rối loạn điện giải, tăng huyết áp, thiếu máu... ngoài ra còn xuất hiện những thay đổi về các thông số miễn dịch, trong đó có các tế bào lympho T và đã được nhắc đến trên bệnh nhân chạy thận nhân tạo. Đó là do trong quá trình chạy thận nhân tạo có sự không phù hợp màng tế bào của màng lọc và nhiễm khuẩn gây phản ứng viêm trên bệnh nhân. Sự tiếp xúc của các tế bào đơn nhân gây hiện tượng apoptosis (chết tế bào) của các tế bào lympho [3], [13]. Kết quả từ Bảng 2 cho thấy bệnh nhân trước ghép có số lượng tế bào lympho TCD3, CD4, CD8 giảm đáng kể so với nhóm chứng và sự khác biệt giữa hai nhóm về số lượng tế bào CD3, CD4, CD8 có ý nghĩa thống kê ($p=0,000$, $0,001$, $0,0002$). Kết quả của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Katarzyna A [6]. Nghiên cứu của tác giả Mahboob còn cho thấy, trong nhóm bệnh nhân trước ghép mà có CD4 cao (41,3% so với 35%) thì sau ghép thường có dấu hiệu thải ghép cấp tính [7]. Khoảng 90% thải ghép cấp là qua trung gian tế bào, những trường hợp này điều trị chống thải ghép cho kết quả thường tốt hơn là các trường hợp thải ghép qua trung gian kháng thể. Tế bào lympho T-CD4 là tế bào khởi phát quá trình thải ghép, tế bào lympho T-CD8 có vai trò muộn hơn.

Chúng tôi nghiên cứu sự thay đổi của tế bào lympho T trong máu ngoại vi trên bệnh nhân ghép thận có sử dụng MPA, đã có 10/35 (28,6%) bệnh nhân giảm số lượng tế bào lympho TCD4 (Bảng 3) trong khi có 26/35 (73,3%) bệnh nhân đạt và cao hơn nồng độ MPA AUC điều trị. Nghiên cứu của Bravo Soto [5] cũng cho thấy, nhóm bệnh nhân có sử dụng MPA có tế bào lympho T CD4, CD8 trong máu ngoại vi giảm và đây là hiệu quả tích lũy, vì thế số lượng tế bào lympho T nên được kiểm tra tại nhiều thời điểm khác nhau và kéo dài sau ghép. Ngoài ra, hiệu quả điều trị của thuốc không chỉ phụ thuộc vào liều lượng thuốc mà còn tùy thuộc vào sự phối hợp của nhóm thuốc ức chế miễn dịch cũng như tùy từng cá thể. Nghiên cứu của Mathieu [8] đã cho thấy hiệu quả của MPA trên tế bào lympho T CD4, CD8 của máu ngoại vi vào tháng thứ nhất sau ghép tim, và cũng không có sự khác biệt giữa các tế bào dưới nhóm này.

Thời điểm 10 ngày là thời điểm chuyển từ giai đoạn miễn dịch dịch thể sang miễn dịch qua trung gian tế bào nên có sự tăng các tế bào lympho T. Nhiều nghiên cứu trên thế giới chỉ ra cũng có sự tăng của các dòng tế bào lympho T đặc biệt các tế bào mang trí nhớ miễn dịch như CD4 trong giai đoạn này. Vì vậy, hiệu quả điều trị của các thuốc ức chế miễn dịch trong giai đoạn này cần được đánh giá rõ ràng. Trong nghiên cứu của chúng tôi (Bảng 4) đã có 23/35 bệnh nhân đạt AUC 30 - 60mg.h/L; mặc dù không thấy sự khác biệt về AUC₀₋₁₂ ở ba nhóm có nồng độ thuốc khác nhau tại thời điểm C₀ nhưng đã có sự tăng rõ rệt tỷ lệ bệnh nhân đạt AUC₀₋₁₂ đích.

5. Kết luận

Bên cạnh việc định lượng nồng độ thuốc chống thải ghép, kiểm soát miễn dịch trên bệnh nhân ghép thận bao gồm cả số lượng tế bào lympho T nên được thực hiện ở nhiều thời điểm sau ghép để đưa ra các dự đoán sớm nhằm hạn chế thải ghép.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Thị Thảo (2016) *Nghiên cứu sự biến đổi nồng độ của một số cytokine và tiểu quần thể tế bào lympho trước, sau điều trị bệnh lupus ban đỏ hệ thống*. Luận án Tiến sĩ Y học Miễn dịch dị ứng, Đại Học Y Hà Nội.
2. Phan Thị Bích Liên (2005) *Nghiên cứu số lượng lympho T: CD4, CD8, CD3 ở người bình thường và sự biến đổi của chúng ở bệnh nhân nhiễm HIV/AIDS*. Luận án Tiến sĩ Y học Miễn dịch, Học viện Quân y.
3. Borges A et al (2011) *Apoptosis of peripheral CD4 T-lymphocytes in end-stage renal disease patients under hemodialysis and rhEPO therapies*. PubMed 33: 138-143.
4. Flechner SM, Modlin CS, Serrano DP et al (1996) *Determinants of chronic renal allograft rejection in cyclosporine-treated recipients*. Transplantation 62: 1235-1241.
5. Bravo Soto JA et al (2003) *Effect of Mycophenolate Mofetil regimen on peripheral blood lymphocyte subsets in kidney transplant recipients*. Transplantation proc 35: 1355-1359.

6. Katarzyna A et al (2011) *Hemodialysis affects phenotype and proliferation of CD4- positive lymphocytes*. Journal of clinical immunology 32: 189-200.
7. Mahboob Lessan-Pezeshki et al (2005) *Prediction of rejection in renal transplantation by immune parameters*. Iranian journal of immunology 2 87-90.
8. Mathieu P et al (2000) *Effect of mycophenolate mofetil in heart transplantation*. Canadian journal surgery 43: 202-206.
9. Pawinski T, Durlik M, Szlaska I (2006) *Comparison of mycophenolic acid pharmacokinetic parameters in kidney transplant patients within the first 3 months post-transplant*. J Clin Pharm Ther 31(1): 27-34.
10. Ron Shapiro et al (2001) *An analysis of early renal transplant protocol biopsies - the high incidence of subclinical tubulitis*. American journal of transplantation 1: 47-50.
11. Sadeghi M, Daniel V, Weimer R et al (2003) *Pre-transplant Th2 cytokine patterns are associated with early acute rejection in renal transplant recipients*. Clinical Transplant 17: 151-157.
12. Tejani A, Sullivan EK (2000). *The impact of acute rejection: A report of the north american pediatric renal transplant cooperative study*. Pediatr Transplant 4: 107-111.
13. Tetta C et al (1990) *Production of cytokines in hemodialysis*. PubMed 8: 337-346.
14. Weimer R, Zipperle S, Daniel V et al (1996) *Pretransplant CD4 helper function and interleukin 10 response predict risk of acute kidney graft rejection*. Transplantation 62: 1606-1614.