ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CỦA DỊ NGUYÊN D. PTERONYSSINUS ĐIỀU CHẾ QUA PHẢN ỨNG PHÂN HUỶ TẾ BÀO MASTOCYTE

HUỲNH QUANG THUẬN - *Học viện Quân y*
LƯƠNG HỒNG CHÂU - *Bệnh viện Tai Mũi Họng Trung ương*

TÓM TẮT

Các chế phẩm dị nguyên D.pteronyssinus do khoa Miễn dịch – Dị nguyên, Bệnh viện Tai Mũi Họng Trung ương sản xuất có hoạt tính miễn dịch cao, Tỉ lệ phân hủy trung bình của tế bào mast với dị nguyên mạt toàn phần cao hơn so với 2 phân đoạn và đạt 28,4 ± 11,8%, mức độ (+) chiếm 45,5%; mức độ (++)42,2%. Mức độ (+++) của dị nguyên toàn phần là 3%, của phân đoạn F1 3%, của phân đoạn F2 0%. Chế phẩm dị nguyên toàn phần có hoạt tính cao hơn các phân đoạn. Nghiên cứu này tương đương với các tác giả trong và ngoài nước.

Từ khoá: dị nguyên D.pteronyssinus.

SUMMARY

D. pteronyssinus allergen extracts producted by Department of Allergy and Allergen, National ENT Hospital have high allergic activity, average rate of degranulation of Mast cells was higher than that of the 2 Fractions and was 28,4 ± 11,8%, (+) level was 45,5%; (++) level was 42,2%. (+++) level of our total allergen, of Fraction F1 and Fraction F1 were respectively 3%, 3% and 0%. The total allergen extract has higher allergic activity than the Fractions. The results of present study was equivalent with some study from Vietnam and abroad.

Keywords: D. pteronyssinus.

MỞ ĐẦU

Ngày nay chúng ta đang chứng kiến sự phát triển nhanh chóng của dị ứng học. Dị ứng học hiện đại - là một khoa học tổng hợp, sử dụng những thành tựu của miễn dịch học phân tử, hóa miễn dịch, dược học, những kết quả của y học lâm sàng. Tất cả những điều đó được phản ánh trong các phương pháp điều chế, chuẩn hóa và sơ đồ ứng dụng DN. Đồng thời thông tin khoa học thực nghiệm đã giúp cho việc điều chế các dạng chế phẩm DN thương mại hết sức nhanh chóng để đáp ứng nhu cầu của một số lớn bệnh nhân rất cần chẩn đoán và điều trị bằng các DN.

Tế bào Mastocyte được phát hiện bởi Paul Ehrlich (1878), là tế bào có ở vài mô và tổ chức, chứa nhiều histamin và serotonin. Mastocyte có vai trò quan trọng trong dị ứng typ I (Theo Coombs và Gell), Tế bào Mast gắn IgE thông qua thụ thể Fc của nó, khi bắt gặp dị nguyên, các phân tử IgE này tạo lên liên kết chéo, làm vỡ hạt và giải phóng các chất trung gian gây các triệu chứng dị ứng cấp, mạn.

Hiểu rõ về các đặc tính của tế bào Mast và tính đáp ứng dị nguyên của nó, có vai trò quan trọng trong công tác chẩn đoán và điều trị bệnh dị ứng.

Xuất phát từ những vấn đề trên chúng tôi tiến hành nghiên cứu đánh giá khả năng phân huỷ tế bào Mast của dị nguyên D.pteronyssinus do khoa miễn dịch dị nguyên, Bệnh viện Tai Mũi Họng Trung ương điều chế, nhằm đi tới sản xuất dị nguyên phục vụ công tác chẩn đoán và điều trị bệnh dị ứng.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

Các chế phẩm dị nguyên *Dermatophagoides pteronyssinus* do khoa Miễn dịch Dị nguyên bệnh viện Tai Mũi Họng Trung ương sản xuất.

Người:

+ *Nhóm người tình nguyện*:

Những người khỏe mạnh, lứa tuổi từ 18 – 55, không có tiền sử dị ứng

+ *Nhóm bệnh nhân*:

Những bệnh nhân VMDƯ được thăm khám lâm sàng theo mẫu 25B của Tổ chức Y tế thế giới, Prick – Test dương tính với DN D.pteronyssinus.

2. Phương pháp nghiên cứu.

Xác định hoạt tính kháng nguyên của *DN D.pteronyssinus* bằng phản ứng phân hủy mastocyte.

Phản ứng phân hủy tế bào mast

* *Nguyên lý*: Dựa vào sự biến đổi hình thái của tế bào mast dưới tác dụng của DN và KT IgE trong huyết thanh bệnh nhân. Sau khi đã mẫn cảm, nếu DN lại xâm nhập vào cơ thể thì sẽ có sự kết hợp DN với

KT đặc hiệu gắn trên màng tế bào mast. Phức hợp này làm tế bào mast bị phân hủy.

Phản ứng nhằm mục đích phát hiện KT dị ứng kháng D.pteronyssinus trong huyết thanh bệnh nhân VMDƯ hoặc huyết thanh động vật được gây mẫn cảm bằng DN D.pteronyssinus.

** Tiến hành*:

- Gây mê chuột bằng ether, vệ sinh vùng bụng chuột.
- Cắt động mạch cho chảy hết máu.
- Tiêm 10 ml dung dịch NaCl 0,9% (37^0 C) vào ổ bụng chuột, day ổ bụng 3-5 phút.
- Mổ bụng chuột, hút hết dịch đã bơm vào ổ bụng chuột cho vào ống nghiệm đáy tròn.
- Li tâm 1000 v/p trong 5 phút.
- Bỏ phần dịch nổi, lấy tủa. Bổ sung vào dịch treo 1 ml NaCl 0,9%.

Lấy 3 ống nghiệm đánh số 1,2,3. Nhỏ vào mỗi ống 50 µl các dung dịch sau:

Dịch thí nghiệm	ống 1 (ống TN)	ống 2 (chứng DN)	ống 3 (chứng HT)
Dịch treo tế bào	50 µl	50 µl	50 µl
Dị nguyên	50 µl	50 µl	
Huyết thanh bệnh nhân	50 µl		50 µl

Ủ các ống nghiệm ở 37^0 C trong 15 phút. Nhuộm tế bào bằng xanh toludin và đọc kết quả.

Đọc kết quả phản ứng phân hủy tế bào mast theo các mức độ sau:

Mức độ	Ký hiệu	Biểu hiện
Âm tính	-	Tỉ lệ tế bào vỡ ≤ 10%
Dương tính nhẹ	+	Tỉ lệ tế bào vỡ 11-20%
Dương tính vừa	++	Tỉ lệ tế bào vỡ 21-30%
Dương tính mạnh	+++	Tỉ lệ tế bào vỡ 31-40%
Dương tính rất mạnh	++++	Tỉ lệ tế bào vỡ > 40%

3. Phương pháp xử lý số liệu.

Xử lý thống kê tiến hành theo chương trình Stata.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Phản ứng phân hủy tế bào mast

Phản ứng được tiến hành trên 33 mẫu huyết thanh của bệnh nhân VMDƯ và nhóm kiểm tra được tiến hành trên 30 mẫu huyết thanh người khỏe. Kết quả được trình bày trên bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phản ứng phân hủy tế bào mast với các chế phẩm dị nguyên *D. Pteronyssinus:*

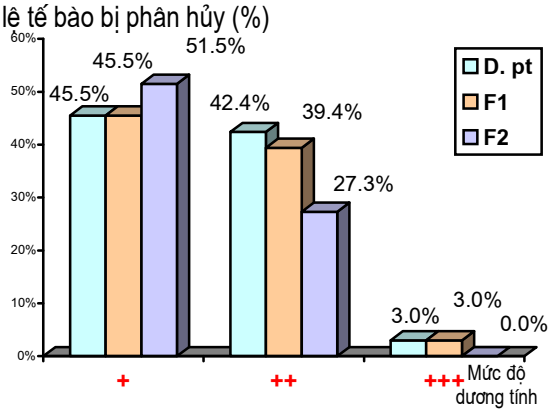
Đối tượng	Dị nguyên	Dương tính	Âm tính	Tỉ lệ tế bào bị phân hủy (%)		
				Nhỏ nhất	Lớn nhất	Trung bình
Nhóm chứng (n=30)	D. pt (F1; F2)	4/30 (13,3%)	26/30 (86,7%)	5	19	11,8 ± 4,1
Nhóm bệnh nhân (n=60)	D. pt Toàn phần	30/33 (90,9%)	3/33 (9,1%)	6	71	28,4 ± 11,8
	Phân đoạn F1	29/33 (87,9%)	4/33 (12,1%)	6	70	26,3 ± 11,5
	Phân đoạn F2	26/33 (78,8%)	7/33 (21,2%)	6	59	19,9 ± 7,8

Kết quả ở bảng cho thấy tỉ lệ phản ứng dương tính ở nhóm chứng và nhóm bệnh nhân khác nhau rõ rệt. Ở nhóm bệnh nhân, tỉ lệ phản ứng dương tính của 3 mẫu dị nguyên mạt lần lượt là 90,9%; 87,9% và 78,8% so với nhóm chứng 13,3%.

Tỉ lệ tế bào mast bị phân hủy ở nhóm bệnh nhân cao hơn so với nhóm chứng: 28,4 ± 11,8%; 26,3 ± 11,5% và 19,9 ± 7,8% ở nhóm bệnh nhân so với 11,8 ± 4,1% ở nhóm chứng. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$). Điều đó chứng tỏ các mẫu dị nguyên mạt có hoạt tính kháng nguyên đã phản ứng với các kháng thể dị ứng đặc hiệu IgE trong huyết thanh bệnh nhân làm phân hủy tế bào mast.

So sánh 3 mẫu dị nguyên mạt về tỉ lệ phản ứng dương tính và tỉ lệ tế bào mast bị phân hủy, chúng tôi có nhận xét hoạt tính miễn dịch của dị nguyên *D. pteronyssinus* toàn phần mạnh hơn cả, chế phẩm F2 yếu hơn.

Về mức độ dương tính của phản ứng phân hủy tế bào mast với các chế phẩm dị nguyên được trình bày hình 1.



Hình 1. Biểu đồ so sánh các mức độ dương tính của phản ứng phân hủy tế bào mast với các mẫu dị nguyên

Kết quả cho thấy trong nhóm bệnh nhân, mức độ phản ứng dương tính tập trung chủ yếu ở mức (+) và (++):

- Chế phẩm *D. pteronyssinus* toàn phần: (+) 45,5% và (++) 42,4%
- Phân đoạn F1: (+) 45,5% và (++) 39,4%
- Phân đoạn F2: (+) 51,5% và (++) 27,3%

Tỉ lệ bệnh nhân có mức độ phản ứng dương tính (+++)thấp, nhất là với phân đoạn F2 không có trường hợp nào (+++). Có nhận xét rằng về mức độ dương tính của phản ứng phân hủy tế bào mast, chế phẩm dị nguyên *D. pteronyssinus* toàn phần và phân đoạn F1 là tương đương, phân đoạn dị nguyên F2 yếu hơn.

BÀN LUẬN

Mạt bụi nhà là kháng nguyên chủ yếu của DNBN - một trong những nguyên nhân chính gây ra các bệnh dị ứng đường hô hấp như HPQ, VMDƯ... ở nước ta, số người HPQ chiếm 4-5% dân số, ở các thành phố lớn như Hà Nội, thành phố Hồ Chí Minh, Hải Phòng tỉ lệ này còn cao hơn. Để chẩn đoán và điều trị cho bệnh nhân, các cơ sở y tế thường dùng dị nguyên nhập ngoại của Pháp và CHLB Đức. Trong những năm qua,

chúng ta đã nghiên cứu tách chiết, tiêu chuẩn hóa và đưa vào ứng dụng một số dị nguyên như DNBN của Nguyễn Văn Hướng và cộng sự (1993), DNBN và DNBB của Nguyễn Năng An và cộng sự (1996), DNBN của Vũ Minh Thục (1987), DNBB của Vũ Minh Thục và cộng sự (2003). Hiện nay, số bệnh nhân đến khám và điều trị về dị ứng đường hô hấp ngày một tăng nên việc nuôi cấy, tách chiết và nghiên cứu các đặc tính hóa sinh, miễn dịch của dị nguyên MBN *D. pteronyssinus* là cần thiết để tiến tới sản xuất thuốc dùng, đồng thời góp phần làm phong phú bộ dị nguyên, nâng cao hiệu quả chẩn đoán và điều trị các bệnh dị ứng, góp phần tiết kiệm ngoại tệ nhập thuốc của nước ngoài.

Phát hiện kháng thể dị ứng kháng DN D.pteronyssinus trong huyết thanh người bệnh dị ứng (phản ứng phân hủy tế bào mastocyte)

Việc đánh giá về miễn dịch học hoạt tính của DN ngoài cơ thể như phản ứng phân hủy mastocyte là rất quan trọng và cần thiết. Mục đích của các phản ứng này là gián tiếp phát hiện kháng thể dị ứng kháng dị nguyên mạt trong huyết thanh người bệnh. Phản ứng tiến hành đơn giản, ít tốn kém, nhiều tác giả coi là có độ tin cậy cao trong việc chẩn đoán bệnh dị ứng do dị nguyên, mặt khác là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá hoạt tính của dị nguyên.

Kết quả cho thấy tỷ lệ phân hủy mastocyte ở nhóm VMDƯ do DN D.pteronysinus chiếm tỉ lệ 90,9%.

Kết quả của phản ứng phân huỷ tế bào mast được đánh giá theo tỉ lệ phần trăm và phân ra 4 mức độ dương tính.

Theo cách đánh giá đó, kết quả của Petrova (1987) là 63,7 $\pm$ 2,79% số mẫu có phản ứng dương tính, trong đó mức độ (+) là chủ yếu (46,8%).

Theo Poriadin (1999), khi nghiên cứu một số chỉ số hóa học, sinh học của dị nguyên toàn phần, 4 phân đoạn thu được bằng lọc gel trên sephdex G-15, G-25, gel Toyopearl HW-60 (hãng Toyocoda San, Japan) và dị nguyên được tinh chế bằng thấm tách, tác giả nhận thấy rằng số phản ứng dương tính trong phản ứng phân hủy tế bào mast là 67,1 $\pm$ 2,31%, mức độ phân hủy nằm trong giới hạn kiểm tra của thí nghiệm (tỉ lệ phân hủy tế bào mast của dị nguyên toàn phần và dị nguyên được thấm tách 26,06 $\pm$ 0,71% và 26,52 $\pm$ 1,93%, của 4 phân đoạn còn lại từ 19,57 $\pm$ 1,32% đến 5,64 $\pm$ 1,44%).

Nghiên cứu của Trịnh Mạnh Hùng (2002) cho thấy tỉ lệ phản ứng phân hủy tế bào mast dương tính đối với dị nguyên *D. pteronyssinus* là 66,67%. Phần lớn các trường hợp cho phản ứng dương tính với mức độ từ (+) đến (+++).

Trong nghiên cứu của chúng tôi, số phản ứng dương tính đối với dị nguyên *D. pteronyssinus* toàn phần cao hơn so với 2 phân đoạn F1 và F2 và đạt 90,9%. Tỉ lệ phân hủy trung bình của tế bào mast đối với dị nguyên mạt toàn phần cũng cao hơn so với 2 phân đoạn còn lại và đạt 28,4 $\pm$ 11,8%, trong đó mức độ (+) chiếm 45,5%; mức độ (++)42,2% trên tổng số bệnh nhân xét nghiệm. Mức độ (+++) của dị nguyên toàn phần là 3%, của phân đoạn F1 3%, của phân đoạn F2 0%. So sánh 3 chế phẩm dị nguyên của chúng tôi về tỉ lệ tế bào mast bị phân hủy và mức độ dương tính thấy rằng chế phẩm dị nguyên toàn phần có hoạt tính cao hơn các phân đoạn.

Kết quả của chúng tôi về tỉ lệ dương tính trong phản ứng này gần tương đương với kết quả của Petrova (1987) và phù hợp với kết quả của Trịnh Mạnh Hùng (2002), Nguyễn Thị Vân (1996). Nguyễn Thị Vân cũng cho thấy tỉ lệ dương tính của người bệnh HPQ với DNBN và bọ nhà (MBN) *D. pteronyssinus* trong phản ứng này khá cao, từ 86,94% - 86,99%, mức độ dương tính thường ở mức (++) và (+++). Về mức độ phân hủy của tế bào mast, kết quả của chúng tôi tương đương với kết quả của Poriadin đối với dị nguyên toàn phần và dị nguyên được thấm tách và kết quả của các tác giả trên.

KẾT LUẬN

Các chế phẩm dị nguyên D.pteronyssinus do khoa Miễn dịch – Dị nguyên, Bệnh viện Tai Mũi Họng Trung ương sản xuất có hoạt tính miễn dịch cao, Tỉ lệ phân hủy trung bình của tế bào mast đối với dị nguyên mạt toàn phần cao hơn so với 2 phân đoạn và đạt 28,4 $\pm$ 11,8%, trong đó mức độ (+) chiếm 45,5%; mức độ (++)42,2% trên tổng số bệnh nhân xét nghiệm. Mức độ (+++) của dị nguyên toàn phần là 3%, của phân đoạn F1 3%, của phân đoạn F2 0%. So sánh 3 chế phẩm dị nguyên của chúng tôi về tỉ lệ tế bào mast bị phân hủy và mức độ dương tính thấy rằng chế phẩm dị nguyên toàn phần có hoạt tính cao hơn các phân đoạn. Nghiên cứu này tương đương với các nghiên cứu trong và ngoài nước.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ađo AĐ (1986), *Dị ứng học đại cương*, Người dịch: TSKH Nguyễn Năng An, TS Trương Đình Kiệt, NXB Mir, Matxcơva, tr. 74-85.

2. *Dược điển Việt Nam* (1992), Toàn tập, NXB Y học, Hà Nội.

3. Vũ Minh Thục (1997) "Một số đặc điểm của dị nguyên bụi nhà" *Yhọc thực hành*, N4, (19 – 21).

4. Vũ Minh Thục, Phạm Văn Thức, Vũ Văn Sản, Trương Thị An (1999), "Những kết quả bước đầu của phương pháp giảm mẫn cảm đặc hiệu trong VMDƯ do bụi nhà và bụi lông vũ", *Báo cáo khoa học, Hội nghị giảng dạy và nghiên cứu miễn dịch học hàng năm lần IX*, tháng 3/1999.

5. Đoàn Thị Thanh Hà (2002), *Nghiên cứu chẩn đoán và điều trị miễn dịch viêm mũi dị ứng do dị nguyên bụi nhà*, Luận án Tiến sĩ Y học, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, Hà Nội.

6. Fain A., Guerin B., and Hart B.J. (1990), "Mites and allergic diseases", *J. Allergy*, 23, pp. 427- 35.

7. Fleming Carswell (1999), "House dust allergy", *J. Allergy Clin. Immu-nol*., 11(2), pp. 43-48.

8. Riley JF, West GB: The presence of histamine in tissue mast cells, *J Physiol* 120: 528, 1953.

9. Ishizaka K, Tomioka K, Ishizaka T: Mechanisms of passive sensitization. I. Presence of IgE and IgG molecules on human leukocytes, *j Immunol* 105: 1459, 1970.

10. Ohashi Y, Nakai Y, Nakagama T (1987), "House dust mite specific IgE, IgG_4 antibodies in patiens with perennial rhinitis", *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol*., Jul-Aug. (4): 434-37.