

# Phân tích biểu hiện một số cytokine và yếu tố tăng trưởng tế bào trong dịch não tủy của bệnh nhân rối loạn cơ tròn, viêm tủy cắt ngang và liệt

Thân Thị Trang Uyên<sup>1\*</sup>, Trịnh Phương Đông<sup>1, 2</sup>, Nguyễn Thu Huyền<sup>1</sup>, Hoàng Hương Diễm<sup>1</sup>, Nguyễn Thanh Liêm<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Công nghệ cao, Công ty Cổ phần Bệnh viện Đa khoa Quốc tế Vinmec, 458 Minh Khai, phường Vĩnh Tuy, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

<sup>3</sup>Viện Nghiên cứu Tế bào gốc và Công nghệ gen Vinmec, Công ty Cổ phần Bệnh viện Đa khoa Quốc tế Vinmec, 458 Minh Khai, phường Vĩnh Tuy, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 10/5/2023; ngày chuyển phản biện 12/5/2023; ngày nhận phản biện 29/5/2023; ngày chấp nhận đăng 3/6/2023

## Tóm tắt:

Các nghiên cứu gần đây cho thấy có sự liên quan giữa mức độ biểu hiện của cytokine và yếu tố tăng trưởng với các bệnh lý khác nhau, trong đó có tổn thương thần kinh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thu thập dịch não tủy (DNT) của các bệnh nhân viêm/tổn thương thần kinh gồm rối loạn cơ tròn (RLCT), viêm tủy cắt ngang (VTCN) và liệt để phân tích sự biểu hiện của 22 cytokine và yếu tố tăng trưởng bằng phương pháp phân tích miễn dịch đa mục tiêu (Luminex). Kết quả cho thấy, trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt có sự biểu hiện của cả 22 yếu tố, gồm có 10 cytokine gây viêm, 6 cytokine chống viêm và 6 yếu tố tăng trưởng. Các cytokine gây viêm GM-CSF, IL-6 và TNF- $\alpha$ ; cytokine kháng viêm APRIL và ST2 (IL-33R); yếu tố tăng trưởng GDF-15 và G-CSF có mức độ biểu hiện cao hơn các yếu tố khác trong nhóm phân loại chức năng. Nhóm các yếu tố biểu hiện thấp hơn so với yếu tố khác trong nhóm phân loại chức năng gồm có cytokine gây viêm (IL-1 $\beta$  và IFN- $\gamma$ ), cytokine kháng viêm (IL-10 và BAFF) và yếu tố tăng trưởng (BMP-9, EGF, NGF- $\beta$ ). Đáng chú ý, 2 yếu tố IL-6 và GDF-15 biểu hiện cao hơn ở bệnh nhân liệt so với RLCT và VTCN, trong khi IL-17A và TNF- $\alpha$  chỉ biểu hiện cao hơn ở bệnh nhân liệt so với VTCN chứ không cao hơn bệnh nhân RLCT. 2 yếu tố IL-21 và TNF- $\alpha$  lại có biểu hiện cao hơn ở bệnh nhân RLCT so với VTCN. Đây là các kết quả mới, có ý nghĩa quan trọng đóng góp vào cơ sở dữ liệu về mức độ biểu hiện cytokine và yếu tố tăng trưởng trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt. Tuy nhiên, cần phải nghiên cứu thêm để có thể phát triển kết quả thành các chỉ thị cho từng loại bệnh.

**Từ khóa:** cytokine, liệt, rối loạn cơ tròn, viêm tủy cắt ngang, yếu tố tăng trưởng.

**Chỉ số phân loại:** 3.1

## 1. Đặt vấn đề

Trong 3 thập kỷ vừa qua, các bệnh thần kinh như RLCT do thoát vị màng não - tủy, VTCN và liệt đã gây ra những thách thức đối với người bệnh, gia đình và toàn xã hội. Trong đó, RLCT là bệnh lý gây ra do hậu quả của một dạng khuyết tật ống thần kinh khi gai xương bị hở hay cột sống bị nứt tạo khe hở trên đốt sống và có thể gây ra thoát vị màng não tủy [1]. Hậu quả nghiêm trọng nhất của RLCT do nứt đốt sống có thể bao gồm suy yếu cơ hoặc liệt ở phần do cột sống bị nứt điều khiển, có thể dẫn đến mất khả năng kiểm soát bàng quang và đại tràng. Một số nghiên cứu cho thấy, 42,2-71,2% các bệnh nhân mắc thoát vị màng não tủy sẽ dẫn đến rối loạn chức năng ruột (đại tiện, tiêu tiện không tự chủ hoặc táo bón) [2-5]. Hậu quả là có thể gây hại cho thận và ảnh hưởng rất nhiều đến chất lượng sống của người bệnh, gây cho họ cảm giác xấu hổ, trầm cảm và tự cách ly bản thân với xã hội.

VTCN là tình trạng viêm cả hai bên của một đoạn tủy sống, thường làm hỏng lớp vật liệu cách điện bao bọc các sợi tế bào thần kinh, hậu quả là làm gián đoạn các tín hiệu mà các dây thần kinh tủy sống gửi đi khắp cơ thể. Dấu hiệu của VTCN là sự xâm nhập của tập hợp các tế bào lympho và bạch cầu đơn nhân vào các đoạn của tủy sống với các mức độ khử myelin khác nhau, chiếm không gian quanh mạch, cũng như ảnh hưởng đến hoạt động của các tế bào thần kinh đệm [6, 7]. Ở những trường hợp bệnh nghiêm trọng,

có thể quan sát thấy các tổn thương viêm dây thần kinh thực vật có các lắng đọng của globulin miễn dịch và bổ thể xung quanh các mạch máu nhỏ và hoại tử [6, 8]. Điều này có thể gây đau, yếu cơ, tê liệt và rối loạn các vấn đề về cảm giác hoặc rối loạn chức năng bàng quang và ruột. Có khoảng 60% các trường hợp mắc viêm tủy cắt ngang vẫn chưa rõ nguyên nhân, 40% còn lại liên quan đến các rối loạn tự miễn như đa xơ cứng, viêm thần kinh tủy, lupus ban đỏ hệ thống, hội chứng Sjogren, bệnh Sarcoidosis và các bệnh khác. Mặc dù rối loạn có thể phát triển ở mọi lứa tuổi, nhưng tỷ lệ mắc bệnh đạt ngưỡng cao nhất ở hai mức tuổi là 10-19 và 30-39 [9].

Trong khi đó, liệt là tình trạng mất khả năng kiểm soát một cơ hoặc một nhóm cơ trong một bộ phận của cơ thể. Nguyên nhân dẫn đến liệt có thể do bất kỳ phần nào của hệ thống chuyển tiếp tín hiệu thần kinh hoặc bộ phận xử lý thông tin tín hiệu thần kinh - chẳng hạn như não, tủy sống, dây thần kinh hoặc điểm nối giữa dây thần kinh và cơ - bị hư hỏng, các tín hiệu di chuyển sẽ không đến được các cơ và dẫn đến tê liệt. Một trong số các nguyên nhân của liệt là do tổn thương dây thần kinh cấp điều khiển hoạt động. Ví dụ, hội chứng Guillain-Barre do những tổn thương ở các dây thần kinh gây ra trực tiếp bởi virus hoặc gián tiếp thông qua sự đáp ứng miễn dịch quá mức với các kháng nguyên virus [10], hoặc hội chứng liệt ở người Trung Quốc (thường gặp ở 88/90 bệnh nhân có biểu hiện liệt cấp tính tại phía bắc Trung Quốc). Dị tật bẩm sinh như tật nứt đốt sống xảy ra khi não, tủy sống và/hoặc lớp bao

\*Tác giả liên hệ: Email: v.yuentt@vinmec.com

## Analysis of expression level of several cytokines and growth factors in cerebrospinal fluids extracted from spina bifida, transverse myelitis, and paralysis

Thi Trang Uyen Than<sup>1\*</sup>, Phuong Dong Trinh<sup>1,2</sup>,  
Thu Huyen Nguyen<sup>1</sup>, Huong Diem Hoang<sup>1</sup>,  
Thanh Liem Nguyen<sup>3</sup>

<sup>1</sup>HiTech Center, Vinmec Healthcare System,

458 Minh Khai Street, Vinh Tuy Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi,

334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

<sup>3</sup>Vinmec Research Institute of Stem Cell and Gene Technology, Vinmec Healthcare System,

458 Minh Khai Street, Vinh Tuy Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

Received 10 May 2023; revised 29 May 2023; accepted 3 June 2023

### Abstract:

Recent studies have indicated that there is an association between expression levels of cytokines and growth factors with different pathologies, including neuron damage disease. In this study, we used Luminex assay to analyse expression levels of several cytokines and growth factors in cerebrospinal fluids (CSF) of patients with neuron inflammation or damage including spina bifida (SB), transverse myelitis (TM), and paralysis. Results showed that we had detected the expression of 22 factors, including ten inflammatory cytokines, six anti-inflammatory cytokines, and six growth factors, in the CSF isolated from patients. A group of factors expressed higher compared to others, including inflammatory cytokines (GM-CSF, IL-6, and TNF- $\alpha$ ); anti-inflammatory cytokines (APRIL and IL-33R); and growth factors (GDF-15 và G-CSF). A group of factors that expressed lower compared to other factors includes inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  và IFN- $\gamma$ ), anti-inflammatory cytokines (IL-10 and BAFF), and growth factors (BMP-9, EGF, and NGF- $\beta$ ). Interestingly, two factors of IL-6 and GDF-15 expressed higher in CSF originated from paralysis patients compared to SB and TM patients, while IL-17A and TNF- $\alpha$  expressed higher in paralysis patients compared to TM, but not SB. Two factors of IL-21 and TNF- $\alpha$  expressed higher in CSF from SB compared to TM. Results from this study are novel and significant to contribute to the knowledge of cytokine and growth factor profiles in the CSF of SB, TM, and paralysis patients. However, it requires more investigation to develop these results into markers for disease diagnosis.

**Keywords:** cytokines, growth factors, paralysis, spina bifida, transverse myelitis.

**Classification number:** 3.1

bọc bảo vệ chúng không hình thành đúng cách có thể dẫn đến liệt bẩm sinh. Một nghiên cứu tiến hành khảo sát dân số bại liệt do Quỹ Christopher và Dana Reeve tài trợ và Trung tâm Phát triển và Người khuyết tật của Đại học New Mexico triển khai cho thấy, có gần 1/50 người Mỹ đang sống chung với một dạng liệt - tương đương với khoảng 6 triệu người trên tổng dân số [11].

Gần đây, có nhiều nghiên cứu hướng đến tìm hiểu mối tương quan của hệ miễn dịch với bệnh tổn thương thần kinh. Nhiều bằng chứng cho rằng các cytokine viêm tăng cao có liên quan đến sự hiện diện của cơn đau sau tổn thương dây thần kinh, trong khi các cytokine chống viêm có liên quan đến việc điều hòa hệ thống miễn dịch và giảm đau thần kinh [4, 12]. Một số nghiên cứu với cytokine huyết thanh ở đối tượng bệnh nhân mắc VTCN cho thấy, IL-6 có thể đóng vai trò quan trọng do nó có liên quan đến sự tồn tại của các tế bào tạo ra kháng thể chống AQP4 trong tuần hoàn ngoại vi và tăng cường phản ứng viêm ở hệ thần kinh trung ương [13]. Bên cạnh đó, IL-6 tăng cao hơn trong dịch não tủy của bệnh nhân VTCN so với DNT của các bệnh lý thần kinh có nguyên nhân không phải viêm thần kinh [14, 15]. Ngoài ra trên đối tượng RLCT do viêm màng tủy, nồng độ IL-6 và TNF- $\alpha$  trong huyết thanh của trẻ mới sinh mắc bệnh tăng cao so với trẻ mới sinh bình thường, và do đó cho rằng có thể sử dụng IL-6 và TNF- $\alpha$  làm dấu ấn chỉ thị cho bệnh viêm màng não tủy [16]. Việc đánh giá mối tương quan giữa các cytokine và các bệnh tổn thương thần kinh là cần thiết để phát triển thành chất chỉ thị và tiên lượng bệnh, từ đó hướng đến những phương pháp điều trị phù hợp.

Mặc dù đã có một số nghiên cứu về biểu hiện cytokine trong huyết thanh của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt, tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào so sánh trực tiếp mức độ biểu hiện của cytokine và yếu tố tăng trưởng trong DNT của 3 loại bệnh này. Do vậy, chúng tôi tiến hành thu thập DNT và đánh giá biểu hiện của một số cytokine viêm, cytokine kháng viêm và yếu tố tăng trưởng của 3 loại bệnh nhân này nhằm tìm ra yếu tố khác biệt đặc trưng cho từng bệnh. Bên cạnh đó, trước đây việc tiến hành đo nồng độ các cytokine trong mẫu máu được thực hiện bằng phương pháp xét nghiệm miễn dịch hấp thụ liên kết với Enzyme (ELISA) [13, 16]. Tuy nhiên, ELISA chỉ có thể được sử dụng để phát hiện một cytokine trong một lần đo mẫu, trong khi đó Luminex có thể khắc phục được điểm yếu này và có thể phát hiện được nhiều cytokine trong cùng một lượng mẫu nhỏ. Do vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật Luminex để phát hiện và đánh giá biểu hiện của các cytokine và yếu tố tăng trưởng trong mẫu dịch não tủy của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Thu thập dịch não tủy

Bệnh nhân mắc RLCT do thoát vị màng não tủy, VTCN và liệt được tiến hành rút DNT trước khi truyền vào lượng dịch tế bào gốc tự thân tương ứng để duy trì áp lực nội sọ. Mẫu DNT là chất thải y tế và được thu lại. Bệnh nhân được thông báo và cho ký giấy đồng thuận trước khi tiến hành thu mẫu.

Quy trình lấy mẫu được bác sỹ thực hiện theo các bước: gây mê, rút DNT tại khe giữa đốt sống thắt lưng thứ 4 và 5 sử dụng kim tiêm 18 G, chuyển dịch sang ống ly tâm 15 ml và dán nhãn mã bệnh nhân. Sau đó, mẫu DNT sẽ được vận chuyển về phòng thí nghiệm để xử lý các bước tiếp theo.

**2.2. Xử lý dịch não tủy và bảo quản**

Mẫu DNT sau khi thu thập được chuyển về phòng thí nghiệm và xử lý theo quy trình gồm các bước: ly tâm 400 vòng/10 phút/4°C, thu dịch nổi là phần DNT sử dụng cho nghiên cứu và chia vào các ống bảo quản polypropylen 1 ml với thể tích 500 µl dịch nổi/ống. Tiếp đó tiến hành dán mã vạch thông tin mẫu và bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Cặn còn lại (sau khi đã thu dịch nổi) được hòa tan trong 100 µl dịch để đếm tế bào. Số lượng tế bào (đơn vị: tế bào) được tính toán theo công thức sau:

Số lượng tế bào = (Tổng số tế bào ở 4 buồng đếm/4) × 10.000 × 0,1 trong đó, 10.000 là thể tích buồng đếm (mm<sup>3</sup>); 0,1 là độ pha loãng (dung dịch ban đầu được cô lại).

**2.3. Định lượng nồng độ protein**

Nồng độ cytokine và các yếu tố tăng trưởng trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt được định lượng bằng bộ kit Human Custom Procartaplex Multiplex Panel 22-Plex (Thermo Fisher) trên thiết bị Luminex™200. Bộ kit được thiết kế để phân tích các cytokine gây viêm, chống viêm và yếu tố tăng trưởng, gồm có: GM-CSF, IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-21, IL-31, IL-33R, BAFF, APRIL, NGF-β, BMP-9, EGF, GDF-15, G-CSF, M-CSF.

Các hoá chất theo bộ kit được chuẩn bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nguyên lý hoạt động của bộ kit dựa trên sự bắt cặp protein của mẫu cần phân tích với hai lớp kháng thể là kháng thể bắt giữ được gắn trên các hạt từ và kháng thể phát hiện được gắn biotin. Các thao tác được thực hiện trên đĩa 96 giếng. Sau khi ủ mẫu và hạt từ, đặt đĩa 96 giếng lên bề mặt của đĩa nam châm để giữ lại hạt từ đã gắn kháng thể bắt giữ và tương tác với protein đích lại, rửa loại bỏ mẫu thừa và các protein không tương tác bám vào hạt từ. Tiếp theo, bổ sung kháng thể phát hiện có gắn biotin đặc hiệu với protein trong mẫu cần phân tích. Liên hợp Phycoerythrin (PE) Streptavidin hoạt động như phân tử phát huỳnh quang được bổ sung để bắt cặp với kháng thể phát hiện thông qua cầu nối Streptavidin - Biotin. Đo tín hiệu huỳnh quang trên hệ thống Luminex™200 để xác định sự có mặt và số lượng kháng nguyên. Kết quả thu được ở file Batch sẽ được đọc trên phần mềm ProCartaPlex Analyst 1.0. Kết quả định lượng sẽ được tính toán và kiểm định dựa vào đường chuẩn được dựng dựa trên chất chuẩn cung cấp cùng bộ kit.

**2.4. Phân tích thống kê và xử lý số liệu**

Hàm lượng protein phát hiện được trong DNT của bệnh nhân sẽ được phân tích và báo cáo dưới dạng giá trị số trung bình (TB) ±SD. Phân tích thống kê và vẽ hình trên phần mềm GraphPad Prism version 9 (Hoa Kỳ). Giá trị p<0,05 được xem là so sánh khác biệt có giá trị thống kê.

**3. Kết quả**

**3.1. Đặc điểm dịch não tủy thu được**

Mẫu DNT thu được là phần dịch hút ra trước khi tiêm tế bào gốc nên thể tích dịch sẽ phụ thuộc vào thể tích của dịch tế bào truyền vào. Mẫu thu được sẽ được xử lý để loại bỏ tế bào và bảo quản cho mục đích phân tích nồng độ protein (cytokine và chất tăng trưởng). Trước khi sử dụng DNT để phân tích cytokine, chúng tôi kiểm tra đặc điểm các mẫu DNT thu được sau ly tâm. Dữ liệu cho thấy, các mẫu DNT thu được không bị nhiễm tế bào máu đỏ nhưng có thấy xuất hiện tế bào đơn nhân. Điều này cho thấy rằng, trong quá trình hút DNT từ bệnh nhân, một phần tế bào trong dịch tủy có lẫn vào DNT trước khi xử lý. Việc xử lý loại bỏ tế bào lẫn vào nhằm đảm bảo cho chất lượng DNT đủ điều kiện để phân tích cytokine và yếu tố tăng trưởng bằng phương pháp Luminex (bảng 1).

**Bảng 1. Đặc điểm các mẫu dịch não tủy thu được từ bệnh nhân rối loạn cơ tròn, viêm tủy cắt ngang và liệt.**

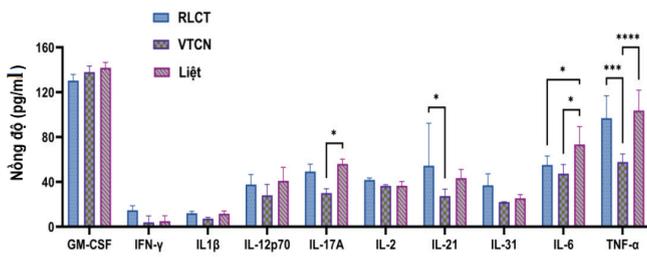
Mẫu DNT	RLCT	VTCN	Liệt
Số lượng mẫu (n)	5	2	5
Thể tích mẫu TB±SD (ml)	3,9±1,0	4,2±0,3	2,7±0,5
Tuổi bệnh nhân (TB (đái tuổi))	12,25 (6-20)	5,5 (5-6)	33,2 (18-45)
Nhiễm hồng cầu	Không	Không	Không
Nhiễm bạch cầu đơn nhân	Có	Có	Có

**3.2. Biểu hiện của cytokine gây viêm**

Để đánh giá biểu hiện của các cytokine gây viêm trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt, chúng tôi sử dụng kỹ thuật Luminex để đánh giá mức độ biểu hiện nồng độ của 10 cytokine gây viêm, gồm có: GM-CSF, TNF-α, IL-1β, IFN-γ, IL-12p70, IL-17A, IL-2, IL-6, IL-21 và IL-31. Trong đó, GM-CSF biểu hiện cao nhất ở cả 3 loại bệnh, tiếp đến cao thứ 2 là TNF-α và thứ 3 là IL-6. Nhóm biểu hiện thấp nhất là IFN-γ và IL-1β. Nhóm biểu hiện trung bình là IL-12p70, IL-17A, IL-2, IL-21 và IL-31 (bảng 2, hình 1).

**Bảng 2. Hàm lượng cytokine gây viêm trong dịch não tủy của bệnh nhân rối loạn cơ tròn, viêm tủy cắt ngang và liệt (pg/ml).**

Cytokine gây viêm	RLCT (TB±SD)	VTCN (TB±SD)	Liệt (TB±SD)
GM-CSF	130,3±5,569	137,95±5,473	141,778±4,779
IFN-γ	14,694±4,037	3,98±5,628	5,052±4,701
IL-1 β	12,074±1,768	7,31±1,131	11,66±2,364
IL-12p70	37,724±8,901	28,075±9,779	41,004±12,062
IL-17A	49,266±6,718	30,055±3,394	56,054±4,246
IL-2	41,814±1,679	36,485±1,053	36,62±3,869
IL-21	54,45±37,874	27,35±6,307	43,404±7,760
IL-31	37,032±10,203	22,08±0,212	25,406±3,316
IL-6	55,124±8,044	47,365±8,111	73,334±15,938
TNF-α	96,812±20,078	57,82±7,184	103,67±18,162



**Hình 1. Phân tích mức độ biểu hiện của các cytokine gây viêm sử dụng kỹ thuật Luminex.** Mức độ biểu hiện khác nhau của các cytokine gây viêm và giữa các nhóm bệnh. Chỉ có IL-17A, IL-6, IL-21 và TNF-α biểu hiện khác nhau ở các nhóm bệnh trong khi các yếu tố khác không có biểu hiện khác nhau. \*: chỉ  $p < 0,05$ ; \*\*\*: chỉ  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*: chỉ  $p < 0,0001$ .

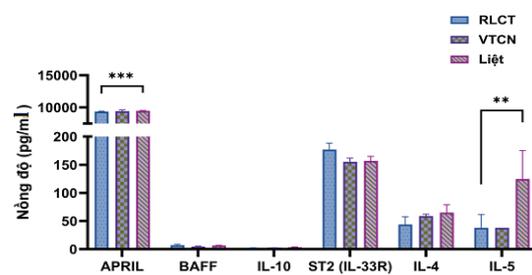
Khi đánh giá sự khác nhau của cytokine giữa 3 nhóm bệnh, hầu hết đều có biểu hiện không khác nhau trong DNT của bệnh nhân. Chỉ có 4 cytokine là IL-17A, IL-6, IL-21 và TNF-α là có sự khác biệt giữa các nhóm. Trong đó, 3 yếu tố là IL-17A, IL-6 và TNF-α biểu hiện cao hơn ở bệnh nhân liệt so với bệnh nhân VTCN. Bên cạnh đó, IL-6 biểu hiện cao hơn ở trong DNT của bệnh nhân liệt so với RLCT và TNF-α biểu hiện cao hơn trong DNT của bệnh nhân RLCT so với VTCN (hình 1).

### 3.3. Biểu hiện của cytokine chống viêm

Bên cạnh đánh giá hàm lượng cytokine gây viêm, chúng tôi cũng đánh giá mức độ biểu hiện của cytokine chống viêm trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt. Kết quả cho thấy, trong số 6 yếu tố chống viêm được phân tích gồm có APRIL, BAFF, IL-10, ST2 (IL-33R), IL-4 và IL-5; yếu tố APRIL có biểu hiện cao nhất, tiếp đến là ST2 (IL-33R), IL-4, IL-5 và thấp nhất là BAFF và IL-10 (bảng 3, hình 2). IL-10 cũng là yếu tố biểu hiện thấp nhất trong tổng số 22 cytokine gây viêm, cytokine kháng viêm và yếu tố tăng trưởng được phân tích trong nghiên cứu này (bảng 3). Tuy nhiên, 6 cytokine chống viêm này không có biểu hiện khác nhau giữa 3 nhóm bệnh ngoại trừ APRIL và IL-5 đều biểu hiện cao hơn ở DNT của bệnh nhân liệt so với RLCT (hình 2).

**Bảng 3. Hàm lượng cytokine chống viêm trong dịch não tủy của bệnh nhân rối loạn cơ tròn, viêm tủy cắt ngang và liệt (pg/ml).**

Cytokine chống viêm	RLCT (TB±SD)	VTCN (TB±SD)	Liệt (TB±SD)
APRIL	9352,618±75,112	9277,62±202,89	9464,726±74,632
BAFF	7,182±1,535	4,41±1,245	6,56±0,286
IL-10	2,338±0,33	2,63±0,127	3,578±0,658
ST2 (IL-33R)	176,948±11,516	155,3±6,477	156,826±8,077
IL-4	43,83±13,613	58,925±3,175	65,114±13,677
IL-5	37,986±23,681	38,05±0,000	124,594±50,457



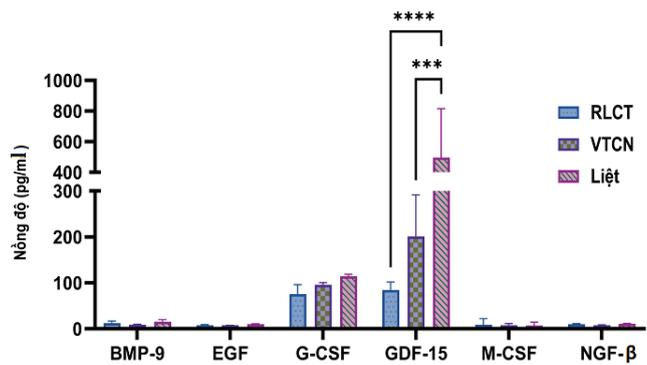
**Hình 2. Phân tích mức độ biểu hiện của các cytokine chống viêm sử dụng kỹ thuật Luminex.** Không có sự biểu hiện khác biệt về mức độ biểu hiện cytokine giữa các nhóm bệnh, ngoại trừ hai yếu tố APRIL và IL-5 có biểu hiện cao hơn ở trong DNT của bệnh nhân liệt so với RLCT. \*\*: chỉ  $p < 0,01$ ; \*\*\*: chỉ  $p < 0,001$ .

### 3.4. Biểu hiện của yếu tố tăng trưởng

Mức độ biểu hiện các yếu tố tăng trưởng cũng có thể phản ánh tình trạng bệnh lý của bệnh nhân. Do vậy, chúng tôi tiếp tục phân tích mức độ biểu hiện của 6 yếu tố tăng trưởng tế bào, gồm có: BMP-9, EGF, G-CSF, GDF-15, M-CSF và NGF-β. Kết quả cho thấy, GDF-15 biểu hiện cao nhất trong số các yếu tố được phân tích, tiếp theo là G-CSF, 2 yếu tố này biểu hiện cao hơn nhiều lần so với các yếu tố còn lại. Trong khi đó, các yếu tố BMP-9, EGF và NGF-β biểu hiện rất thấp và M-CSF biểu hiện thấp nhất. Khi phân tích về mức độ biểu hiện của yếu tố tăng trưởng giữa các nhóm bệnh, chỉ có GDF-15 biểu hiện khác biệt với nồng độ protein cao hơn được phát hiện ở DNT của bệnh nhân liệt so với trong DNT của bệnh nhân RLCT và VTCN (bảng 4, hình 3).

**Bảng 4. Hàm lượng yếu tố tăng trưởng trong dịch não tủy của bệnh nhân rối loạn cơ tròn, viêm tủy cắt ngang và liệt (pg/ml).**

Cytokine/GF	RLCT (TB±SD)	VTCN (TB±SD)	Liệt (TB±SD)
BMP-9	12,35±4,634	15,672±4,281	8,715±1,491
EGF	8,104±1,328	10,018±1,040	7,745±0,233
G-CSF	75,396±20,593	114,86±4,031	95,695±5,056
GDF-15	84,432±17,578	497,056±318,37	201,3±90,184
M-CSF	21,825±12,311	8,075±3,203	12,370±1,730
NGF-β	10,314±1,363	10,922±1,075	8,05±0,636



**Hình 3. Phân tích mức độ biểu hiện của các yếu tố tăng trưởng sử dụng kỹ thuật Luminex.** \*\*\*: chỉ  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*: chỉ  $p < 0,0001$ .

Mức độ biểu hiện khác nhau của 6 yếu tố tăng trưởng được phân tích, tuy nhiên chúng không biểu hiện khác nhau giữa các nhóm bệnh. Chỉ có một yếu tố là GDF-15 biểu hiện khác biệt giữa các nhóm bệnh.

#### 4. Bàn luận

Cytokine là nhóm polypeptide đa dạng, gồm có các interleukin, chemokine, các yếu tố hoại tử khối u, interferon, các yếu tố kích thích tế bào và tăng trưởng, và cả neurotrophin cũng đã được phân loại vào nhóm này. Cytokine có chức năng đa dạng đối với sự phát triển và biệt hóa tế bào, phản ứng miễn dịch, viêm nhiễm và trên một số hệ thống sinh lý/bệnh lý khác nhau. Các nghiên cứu trước đây cho rằng, nhiều cytokine đáp ứng biểu hiện với các tình trạng bệnh lý khác nhau. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá và phát hiện sự biểu hiện của 22 cytokine và yếu tố tăng trưởng trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt. Trong số đó, có 1 yếu tố kháng viêm APRIL biểu hiện rất cao với trên 9.000 pg/ml, 4 yếu tố biểu hiện lớn hơn 100 pg/ml (gồm có một yếu tố gây viêm GM-CSF, một yếu tố kháng viêm ST2 (IL-33R) và 2 yếu tố tăng trưởng là M-CSF và GDF-15). Các yếu tố biểu hiện thấp với hàm lượng nhỏ hơn 10 pg/ml gồm có IFN- $\gamma$  và IL-1 $\beta$  thuộc nhóm gây viêm, BAF và IL-10 thuộc nhóm kháng viêm và EGF thuộc nhóm yếu tố tăng trưởng. Cho tới nay, chỉ có một số báo cáo về mức độ cytokine trong DNT của bệnh nhân mắc đa xơ cứng, giang mai thần kinh, viêm màng não, tỵ kỷ... [17-20]. Tuy nhiên, có rất ít báo cáo về các thành phần này trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt. Trong một nghiên cứu trước đây về 3 bệnh nhân RLCT, hàm lượng cytokine viêm IL-4 trong huyết thanh bệnh nhân là 40-69 pg/ml [21]. Đặc biệt là hàm lượng IL-4 giảm đáng kể, thậm chí xuống mức không thể phát hiện được sau 2 tháng áp dụng biện pháp điều trị [21]. Ở một nghiên cứu khác về mức độ biểu hiện của IL-6 và IL-17 trong DNT của bệnh nhân VTCN, cả hai yếu tố này đều biểu hiện cao hơn so với nhóm đối chứng khỏe mạnh, bệnh nhân đa xơ cứng và bệnh thần kinh khác [22]. Cụ thể, IL-6 biểu hiện ở mức 12536 $\pm$ 2657 pg/ml, cao gấp 4,7 lần so với nhóm đối chứng khỏe mạnh và IL-17 biểu hiện ở mức 302,6 $\pm$ 152,5 pg/ml, cao gấp 8,4 lần so với nhóm đối chứng khỏe mạnh [22]. IL-6 cũng cho thấy biểu hiện cao hơn hẳn trong các bệnh nhân màng não cầu do vi khuẩn và virus so với người khỏe mạnh không mang các bệnh lý viêm thần kinh [17]. Với bệnh liệt, nghiên cứu của S. Basu và cs (2004) [23] cho thấy, hàm lượng IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  và TNF- $\alpha$  cao hơn trong tinh dịch của nam giới bị liệt so với nam giới khỏe mạnh, trong khi đó hàm lượng IL-4 và TGF- $\beta$ 1 lại thấp hơn trong tinh dịch của nam giới bị liệt so với người khỏe mạnh. Do các nghiên cứu sử dụng các loại mẫu khác nhau (ví dụ như huyết thanh, tinh dịch hay DNT) để phân tích cytokine nên rất khó để so sánh mức độ biểu hiện của các cytokine giữa các nghiên cứu khác nhau. Ngoài các báo cáo trên, không có báo cáo nào về mối liên hệ của các thành phần cytokine và yếu tố tăng trưởng trong nghiên cứu này của chúng tôi với các bệnh lý RLCT, VTCN và liệt do tổn thương thần kinh gây nên.

Trong mối tương quan về mức độ biểu hiện cytokine với các loại bệnh lý, một số yếu tố có xu hướng biểu hiện cao hơn trong DNT của bệnh nhân liệt, cụ thể là 6 yếu tố IL-17A, IL-6, TNF- $\alpha$ ,

IL-5, APRIL và GDF-15 (hình 1-3). Tuy nhiên, cho tới nay chưa thấy có báo cáo nào về các yếu tố này trong DNT hay huyết thanh của người bị liệt, ngoại trừ TNF- $\alpha$  đã được báo cáo biểu hiện cao ở tinh dịch của bệnh nhân liệt. Do vậy, cần phải có nghiên cứu sâu hơn về mức độ biểu hiện của các yếu tố này với bệnh liệt do viêm thần kinh gây ra.

Nghiên cứu của chúng tôi là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam và nghiên cứu tiên phong trên thế giới về mức độ biểu hiện cytokine và yếu tố tăng trưởng trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt. Tuy nhiên, nghiên cứu này có điểm hạn chế là cỡ mẫu còn nhỏ do số lượng bệnh nhân sử dụng liệu pháp ghép tế bào gốc không nhiều. Do vậy, cần phải tiến hành nghiên cứu trên cỡ mẫu lớn hơn để đánh giá và so sánh mức độ biểu hiện của cytokine và các yếu tố tăng trưởng trong DNT của các bệnh nhân RLCT, VTCN. Đồng thời có thể đánh giá được mối liên quan của cytokine với các loại bệnh lý khác nhau.

#### 5. Kết luận

Nghiên cứu này đã phát hiện sự có mặt của 22 yếu tố gồm có cytokine gây viêm, cytokine chống viêm và yếu tố tăng trưởng trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt. Sự biểu hiện của các yếu tố là khác nhau, tuy nhiên chỉ có IL-17A, IL-6, TNF- $\alpha$ , GDF-15, APRIL, IL-6 và IL-21 là có biểu hiện cao hơn ở bệnh nhân ở một nhóm bệnh này so với nhóm bệnh khác. Chúng tôi nhận thấy rằng, đây là các dữ liệu thăm dò mới, có ý nghĩa quan trọng trong lĩnh vực nghiên cứu thành phần và mức độ biểu hiện protein trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt. Đồng thời, đây là tiền đề để xây dựng và phát triển các nghiên cứu chất chỉ thị bệnh. Tuy nhiên, đây là nghiên cứu thăm dò thực hiện trên cỡ mẫu nhỏ, cần phải triển khai nghiên cứu trên cỡ mẫu lớn hơn để có thể phát triển thành chất chỉ thị phát hiện bệnh.

#### LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn đến bác sỹ Nguyễn Thị Phương Anh - Khoa Y học Tái tạo và Trị liệu Tế bào, Công ty Cổ phần Bệnh viện Đa khoa Quốc tế Vinmec đã thu thập dịch não tủy từ bệnh nhân giúp nhóm nghiên cứu.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.E.S. Hassan, Y.L. Du, S.Y. Lee, et al. (2022), "Spina bifida: A review of the genetics, pathophysiology and emerging cellular therapies", *Journal of Developmental Biology*, **10(2)**, DOI: 10.3390/jdb10020022.
- [2] P.T. Dorsher, P.M. McIntosh (2012), "Neurogenic bladder", *Advances in Urology*, **2012**, DOI: 10.1155/2012/816274.
- [3] G. Amarenco, S.S. Ismaël, C. Chesnel, et al. (2017), "Diagnosis and clinical evaluation of neurogenic bladder", *European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine*, **53(6)**, pp.975-980, DOI: 10.23736/S1973-9087.17.04992-9.
- [4] P.J. Austin, G.M. Taylor (2010), "The neuro-immune balance in neuropathic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines", *Journal of Neuroimmunology*, **229(1-2)**, pp.26-50, DOI: 10.1016/j.jneuroim.2010.08.013.

- [5] A. Ponticelli, B.D. Iacobelli, M. Silveri, et al. (1998), "Colorectal dysfunction and faecal incontinence in children with spina bifida", *British Journal of Urology*, **81**, Suppl. 3, pp.117-119, DOI: 10.1046/j.1464-410x.1998.00026.x.
- [6] A.I. Kaplin, C. Krishnan, D.M. Deshpande, et al. (2005), "Diagnosis and management of acute myelopathies", *The Neurologist*, **11(1)**, pp.2-18, DOI: 10.1097/01.nrl.0000149975.39201.0b.
- [7] C.G. Simone, P.D. Emmady (2022), "Transverse myelitis", *StatPearls [Internet]*, StatPearls Publishing, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559302/>, accessed 20 February 2023.
- [8] D.M. Wingerchuk (2003), "Postinfectious encephalomyelitis", *Current Neurology and Neuroscience Reports*, **3**, pp.256-264, DOI: 10.1007/s11910-003-0086-x.
- [9] A. Bhat, S. Naguwa, G. Cheema, et al. (2010), "The epidemiology of transverse myelitis", *Autoimmunity Reviews*, **9(5)**, pp.A395-A399, DOI: 10.1016/j.autrev.2009.12.007.
- [10] J.A. Goodfellow, H.J. Willison (2016), "Guillain-Barré syndrome: A century of progress", *Nature Reviews Neurology*, **12**, pp.723-731, DOI: 10.1038/nrneuro.2016.172.
- [11] Christopher and Dana Reeve Foundation (2013), "Paralysis in the U.S.", <https://www.christopherreeve.org/living-with-paralysis/statsabout-paralysis>, accessed 20 February 2023.
- [12] M.A. Thacker, A.K. Clark, F. Marchand, et al. (2007), "Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: Immune cells and molecules", *Anesthesia & Analgesia*, **105(3)**, pp.838-847, DOI: 10.1213/01.ane.0000275190.42912.37.
- [13] A. Uzawa, M. Mori, K. Arai, et al. (2010), "Cytokine and chemokine profiles in neuromyelitis optica: Significance of interleukin-6", *Multiple Sclerosis Journal*, **16(12)**, pp.1443-1452, DOI: 10.1177/1352458510379247.
- [14] A. Wullschleger, V. Kapina, N. Molnarfi, et al. (2013), "Cerebrospinal fluid interleukin-6 in central nervous system inflammatory diseases", *PLOS ONE*, **8(8)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0072399.
- [15] A.I. Kaplin, D.M. Deshpande, E. Scott, et al. (2005), "IL-6 induces regionally selective spinal cord injury in patients with the neuroinflammatory disorder transverse myelitis", *The Journal of Clinical Investigation*, **115(10)**, pp.2731-2741, DOI: 10.1172/JCI25141.
- [16] B. Mukhopadhyay, R. Gavel, A.N. Gongopadhyay, et al. (2016), "Correlation of oxidative damage with pro-inflammatory markers (IL-6, TNF- $\alpha$ ) in meningocele", *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, **10(2)**, pp.BC08-BC10, DOI: 10.7860/JCDR/2016/15872.7229.
- [17] G. Lepennetier, Z. Hracsko, M. Unger, et al. (2019), "Cytokine and immune cell profiling in the cerebrospinal fluid of patients with neuro-inflammatory diseases", *Journal of Neuroinflammation*, **16**, DOI: 10.1186/s12974-019-1601-6.
- [18] A.W. Zimmerman, H. Jyonouchi, A.M. Comi, et al. (2005), "Cerebrospinal fluid and serum markers of inflammation in autism", *Pediatr Neurol.*, **33(3)**, pp.195-201, DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2005.03.014.
- [19] S.Z. Lepej, T.V. Cavlek, M. Ilic, et al. (2022), "Quantification of antiviral cytokines in serum, cerebrospinal fluid and urine of patients with tick-borne encephalitis in Croatia", *Vaccines*, **10(11)**, DOI: 10.3390/vaccines10111825.
- [20] S.D. Lolansen, N. Rostgaard, E.K. Oernbo, et al. (2021), "Inflammatory markers in cerebrospinal fluid from patients with hydrocephalus: A systematic literature review", *Disease Markers*, **2021**, DOI: 10.1155/2021/8834822.
- [21] N.S. Kumar, V. Chavarria, M. Frieri (1995), "Cytokine detection in three children with spina bifida and health care workers with latex allergy", *Pediatric Asthma, Allergy & Immunology*, **9(2)**, pp.71-78, DOI: 10.1089/pai.1995.9.71.
- [22] J.J. Graber, S.R. Allie, K.M. Mullen, et al. (2018), "Interleukin-17 in transverse myelitis and multiple sclerosis", *Journal of Neuroimmunology*, **196(1-2)**, pp.124-132, DOI: 10.1016/j.jneuroim.2008.02.008.
- [23] S. Basu, T.C. Aballa, S.M. Ferrell, et al. (2004), "Inflammatory cytokine concentrations are elevated in seminal plasma of men with spinal cord injuries", *Journal of Andrology*, **25(2)**, pp.250-254, DOI: 10.1002/j.1939-4640.2004.tb02785.x.