

PHÂN TÍCH DẤU ẤN MIỄN DỊCH TẾ BÀO TRONG DỊCH NÃO TỦY BỆNH NHÂN U LYMPHO TẠI TRUNG TÂM HUYẾT HỌC- BỆNH VIỆN BẠCH MAI

Nguyễn Tuấn Tùng
Đỗ Thị Vinh An
Lê Lan Anh
Phạm Thị Thu Hằng
Tôn Ái Thực

Trung tâm Huyết học và Truyền máu,
Bệnh viện Bạch Mai

Tác giả chịu trách nhiệm
Nguyễn Tuấn Tùng
Bệnh viện Bạch Mai
Email: tungghbm@gmail.com

Ngày nhận bài: 06/09/2024
Ngày phản biện: 02/10/2024
Ngày đồng ý đăng: 08/10/2024
DOI: 10.52322/jocmbmh.143.0205

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xác định giá trị chẩn đoán u lympho xâm lấn thần kinh trung ương và u lympho nguyên phát hệ thần kinh bằng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Mô tả cắt ngang trên 33 bệnh nhân u lympho và 6 bệnh nhân nghi ngờ u lympho có biểu hiện thần kinh được xét nghiệm đếm tế bào dòng chảy dịch não tủy (flow cytometry) tại Bệnh viện Bạch Mai từ tháng 1/2022 đến tháng 12/2023.

Kết quả: Các dấu ấn lympho bất thường của u lympho được phát hiện trong mẫu dịch não tủy gồm 23/33 mẫu bằng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy trong đó chỉ có 10 mẫu bằng xét nghiệm hình thái. Trong 6 bệnh nhân nghi ngờ u lympho có 3 bệnh nhân chẩn đoán mới bằng phương pháp phân tích dấu ấn miễn dịch, giúp tăng tỷ lệ phát hiện lên rất nhiều so với chỉ xét nghiệm hình thái trong các mẫu dịch não tủy.

Kết luận: Nghiên cứu này cho thấy xét nghiệm hình thái kết hợp với phân tích dấu ấn tế bào giúp tăng tỷ lệ phát hiện lên rất nhiều so với chỉ xét nghiệm hình thái trong các mẫu dịch não tủy.

Từ khóa: dịch não tủy, dấu ấn miễn dịch, u lympho.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) hiện nay phân loại các bệnh lý huyết học ác tính dựa vào các đặc điểm hình thái, kiểu hình miễn dịch (dấu ấn miễn dịch) trên bề mặt tế bào và di truyền. U lympho là bệnh lý gây nên bởi sự gia tăng ác tính các tế bào của hệ thống lưới lympho tại chỗ hoặc lan tràn, chủ yếu liên quan đến các tế bào hạch bạch huyết, lá lách, gan và tủy xương. Triệu chứng thường gặp là nổi hạch không đau, đôi khi có sốt, đổ mồ hôi ban đêm, sụt cân không

chú ý, ngứa, lách to và gan to. Bệnh được ghi nhận có xâm nhiễm thần kinh trung ương, với sự có mặt các tế bào ác tính trong dịch não tủy. Đánh giá chẩn đoán tình trạng này dựa vào việc sử dụng phương pháp chẩn đoán thần kinh, tế bào học và phương pháp đo tế bào dòng chảy (flow cytometry - FCM). Kỹ thuật FCM này đã được thực hiện tại dịch não tủy vào đầu những năm 1990 [1], cho thấy độ nhạy vượt trội so với các phương pháp khác khi các tế bào thâm nhiễm thần kinh trung ương ở mức độ thấp.

U lympho nguyên phát của hệ thần kinh (Primary central nervous system lymphoma -PCNSL) là khối u ác tính đại diện cho một phân nhóm không phổ biến của u lympho không Hodgkin ngoài hạch (NHL). PCNSL liên quan đến não, màng não, mắt và tủy sống và thường không kèm theo bất kỳ bệnh lý toàn thân nào tại thời điểm chẩn đoán. Các triệu chứng, dấu hiệu lâm sàng của u lympho nguyên phát hệ thần kinh không đặc hiệu và khó phân tách với một số bệnh lý thần kinh khác, chẳng hạn như u thần kinh đệm hoặc các bệnh viêm hệ thần kinh. Các triệu chứng của u lympho nguyên phát hệ thần kinh bao gồm chậm vận động tâm thần, rối loạn chức năng nhận thức và thay đổi tính cách. Ngoài ra, tăng áp lực nội sọ và các triệu chứng khu trú cũng được quan sát thấy ở phần lớn bệnh nhân PCNSL. Tuy nhiên, đầu đầu, các triệu chứng thần não, các triệu chứng tiểu não, rối loạn chức năng thần kinh sọ và co giật chỉ xuất hiện ở một số ít bệnh nhân [2]. Để xác minh chẩn đoán nghi ngờ, các xét nghiệm chẩn đoán hình ảnh và phẫu thuật thần kinh là không thể thiếu và đại diện cho tiêu chuẩn chẩn đoán hiện tại. Mặc dù sinh thiết bằng kim có định vị của các khối u hệ thần kinh có tỷ lệ tai biến và tử vong thấp, nhưng thủ thuật này là xâm lấn, với độ nhạy chẩn đoán dao động từ 20 đến 65% [3-5]. Vì vậy việc chẩn đoán u lympho nguyên phát hệ thần kinh vẫn còn nhiều thách thức.

Việc ứng dụng FCM trong dịch não tủy giúp giảm thiểu biến chứng gây ra bởi sinh thiết não, đồng thời giúp các bác sĩ lâm sàng sẽ xác định được chính xác tình trạng cũng như giai đoạn bệnh, từ đó đưa ra phác đồ điều trị và tiên lượng phù hợp với bệnh nhân; đặc biệt với một số trường hợp u lympho nằm tại não ở vị trí khó không thể sinh thiết.

Do đó, mục tiêu nghiên cứu hiện nay là xác định giá trị chẩn đoán của phương pháp phân tích tế bào dòng chảy so với phương pháp tế

bào học, nhằm xác định các dấu hiệu u lympho trong dịch não tủy, có thể tạo điều kiện cho việc chẩn đoán u lympho tại hệ thần kinh trung ương và u lympho xâm lấn hệ thần kinh trung ương.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Gồm 39 bệnh nhân u lympho có biểu hiện thần kinh được xét nghiệm đếm tế bào dòng chảy dịch não tủy (flow cytometry) tại Trung tâm Huyết học-Truyền máu, Bệnh viện Bạch Mai từ tháng 1/2022 đến tháng 12/2023.

2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn

- Bệnh nhân u lympho có các triệu chứng thâm nhiễm TKTW hoặc u tại não, khó chẩn đoán ban đầu tại bệnh viện Bạch mai và bệnh viện K Tân triều

- Bệnh nhân đồng ý chọc dịch não tủy và thực hiện kỹ thuật FCM dịch não tủy.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

- Bệnh nhân không đồng ý chọc dịch não tủy và thực hiện kỹ thuật FCM dịch não tủy.

2.1.3. Tiêu chuẩn chẩn đoán

- Không có tế bào trong dịch não tủy (DNT): chưa thâm nhiễm TKTW

- Có tế bào u lympho và số lượng tế bào trong DNT > 5 tế bào/ μ L: thâm nhiễm TKTW

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu: Mô tả cắt ngang

2.2.2. Cỡ mẫu: Cỡ mẫu thuận tiện bao gồm các bệnh nhân đủ tiêu chuẩn lựa chọn trong thời gian nghiên cứu.

2.2.3. Các bước tiến hành nghiên cứu

Mẫu sử dụng: Dịch não tủy được thu thập với thể tích từ 1,5-2ml, được chuyển ngay đến

phòng xét nghiệm huyết học trong khoảng 30-45 phút. Dịch não tủy được làm tiêu bản phân tích hình thái tế bào; đếm số lượng bạch cầu, và phân tích dấu ấn miễn dịch.

Các thiết bị sử dụng: Máy phân tích thành phần huyết học; máy tế bào dòng chảy miễn dịch (Flow cytometry).

Các dấu ấn miễn dịch được sử dụng gồm:

	Blue laser					Red laser			Violet laser	
	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC-A700 ⁽¹⁾	APC-A750 ⁽²⁾	PB ⁽³⁾	KRo ⁽⁴⁾
B Cell Tube Part# B96805	Kappa	Lambda	CD10	CD5	CD200	CD34	CD38	CD20	CD19	CD45
T Cell Tube Part# B96806	TCR $\gamma\delta$	CD4	CD2	CD56	CD5	CD34	CD7	CD8	CD3	CD45
M1 Cell Tube Part# B96807	CD16	CD7	CD10	CD13	CD64	CD34	CD14	HLA-DR	CD11b	CD45
M2 Cell Tube Part# B96808	CD15	CD123	CD117	CD13	CD33	CD34	CD38	HLA-DR	CD19	CD45

(1) APC-A700: APC-Alexa Fluor* 700
(2) APC-A750: APC-Alexa Fluor* 750
(3) PB: Pacific Blue*
(4) KRo: Krome Orange

Hình 1. Bảng dấu ấn miễn dịch được sử dụng phân tích dịch não tủy

2.3. Phương pháp xử lý và phân tích số liệu

Sử dụng phần mềm SPSS 26.0 để xử lý và phân tích số liệu. Sự khác biệt giữa 2 nhóm nghiên cứu có ý nghĩa thống kê nếu $p < 0,05$.

2.4. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu tuân thủ theo quy tắc về đạo

đức trong nghiên cứu y sinh. Tất cả các đối tượng đều tự nguyện đồng ý tham gia nghiên cứu và các thông tin do đối tượng nghiên cứu cung cấp được giữ bí mật.

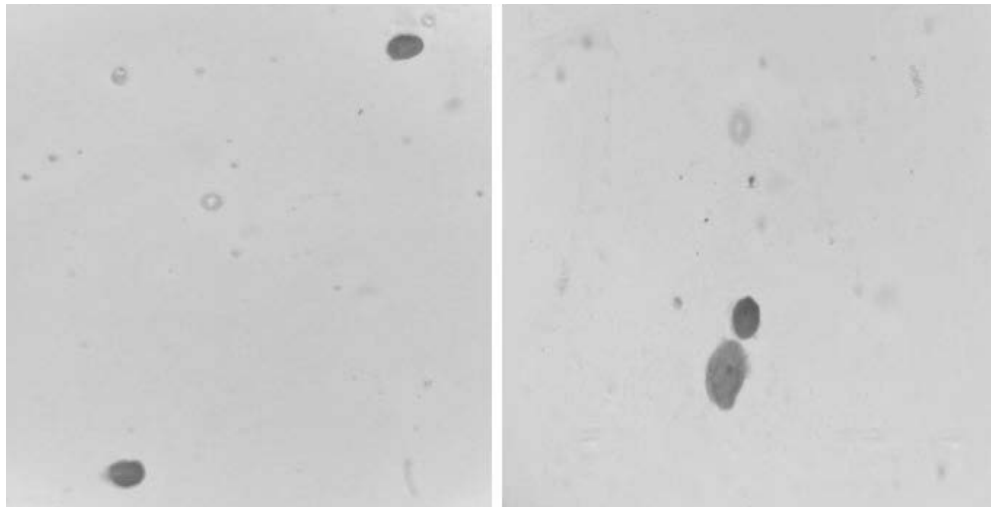
3. KẾT QUẢ

Phân tích dấu ấn miễn dịch mẫu được lấy từ 39 bệnh nhân; chúng tôi đã thu được kết quả như sau:

Dạng bệnh	Số lượng	Thâm nhiễm TKTW		Nhiễm trùng	
		Hình thái	FCM	Hình thái	FCM
U lympho đã chẩn đoán	33	10	23	6	10
TD u lympho	6	2	3	1	2

U lympho xâm nhiễm thần kinh trung ương được phát hiện trong 23/33 bệnh nhân U lympho đã điều trị ở các giai đoạn II,III, IV, trong

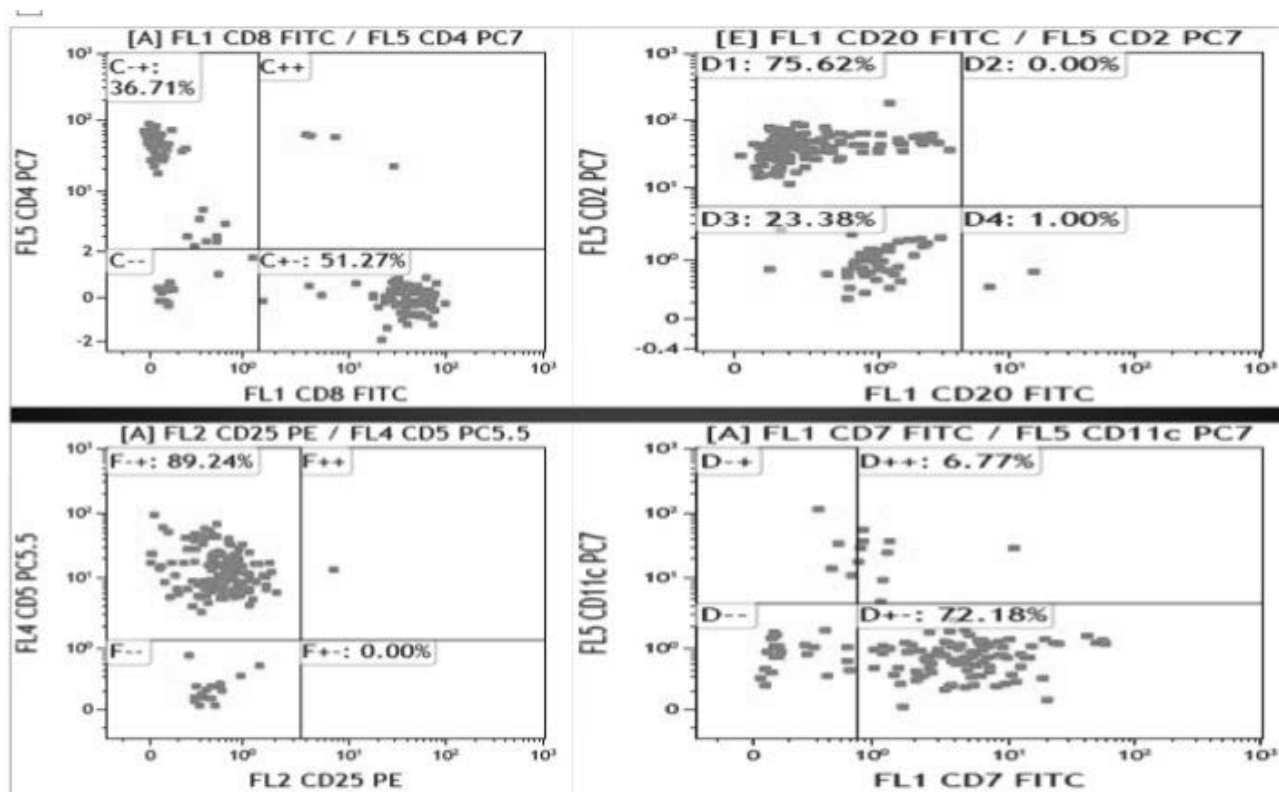
đó chỉ có 10 ca có thể có các hình ảnh nghi ngờ trên tiêu bản hình thái học dịch não tủy dựa trên các tế bào lympho có kích thước lớn (Hình 2).



Hình 2. Hình ảnh tế bào lympho có kích thước lớn nghi tới u lympho xâm lấn thần kinh ở bệnh nhân U lympho đã được chẩn đoán và điều trị

Trong 06 bệnh nhân có các biểu hiện lâm sàng, khối u tại não được xác nhận bằng hình ảnh MRI, có trường hợp phân tích dịch não tủy có hình ảnh các dấu ấn tăng lympho bất thường, kết hợp với đặc điểm lâm sàng, sinh hoá khác,

được chẩn đoán U lympho gồm 02 bệnh nhân ATLL, 01 bệnh nhân DLBC – CNS. Các bệnh nhân này đã được khẳng định lại bằng phương pháp hóa mô miễn dịch màng sinh thiết não.



Hình 3. Hình ảnh các dấu ấn lympho T thể hiện trong dịch não tủy bệnh nhân ATLL

4. BÀN LUẬN

Xét nghiệm tế bào bệnh học của dịch não tủy vẫn được coi là “tiêu chuẩn vàng” để chẩn đoán bệnh ác tính màng não [6], các đặc điểm tế bào học của tế bào u lympho là kích thước tế bào to, hình dạng không đều và tế bào chất nham nhỡ, cũng như các khía, rãnh trong nhân [6]. Trong phần lớn các trường hợp, cần phải có thêm xét nghiệm miễn dịch tế bào để chứng minh tính ác tính. Trong bốn nghiên cứu lớn nhất bao gồm hơn 150 bệnh nhân mắc PCNCL, sự liên quan của màng não được phát hiện bằng xét nghiệm hình thái tế bào ở 16% bệnh nhân [7,8]. Có thể thấy, tế bào bệnh học dựa trên các phương pháp nhuộm thông thường chỉ dẫn đến độ nhạy thấp trong việc phát hiện sự liên quan đến u lympho màng não. Do đó, cần có các phương pháp miễn dịch tế bào bổ sung. Phân tích tế bào dòng chảy dễ dàng tái tạo để phát hiện tế bào lympho ác tính, có thể tách ra khỏi nhiều tế bào phản ứng dựa trên kích thước, độ hạt và hồ sơ biểu hiện kháng nguyên [9,10]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, u lympho xâm nhiễm thần kinh trung ương được phát hiện trong 23/33 bệnh nhân U lympho đã điều trị ở các giai đoạn II,III, IV, trong đó chỉ có 10 ca có thể có các hình ảnh nghi ngờ trên tiêu bản hình thái học dịch não tủy dựa trên các tế bào lympho có kích thước lớn. French và cộng sự đã báo cáo tỷ lệ phát hiện tăng 50% trong dịch não tủy bằng cách kết hợp phân tích tế bào dòng chảy và tế bào bệnh học, so với chỉ phân tích tế bào bệnh học, trong một nghiên cứu hồi cứu trên 32 bệnh nhân mắc các rối loạn tăng sinh lympho liên quan đến CNS [9]. Trong một nghiên cứu khác do Finn và cộng sự công bố, tỷ lệ phát hiện u lympho ác tính trong dịch não tủy tăng 43% tương tự bằng phân tích tế bào dòng chảy đa thông số đã được báo cáo [10].

Trong một nghiên cứu khác, Quijano và cộng sự đã báo cáo về một loạt 123 bệnh nhân mới được chẩn đoán mắc u lympho tế bào

B xâm lấn có nguy cơ liên quan đến CNS [11]. Tương ứng với kết quả của Hegde và cộng sự, độ nhạy tăng từ 6 lên 22% khi xác định bằng phương pháp tế bào bệnh học đã được quan sát thấy [12]. Trong hai nghiên cứu được công bố gần đây, Stacchini và cộng sự đã báo cáo sự liên quan đến CNS ở 24% trong số 62 mẫu được phân tích bằng phương pháp đo lưu lượng tế bào, trong khi phương pháp tế bào bệnh học chỉ tìm thấy kết quả dương tính ở 16% [13]. Benevolo và cộng sự phát hiện quần thể mới của tế bào B-NHL trong dịch não tủy của 18 trong số 174 (10%) bệnh nhân, trong khi tế bào bệnh học chỉ phát hiện tế bào bất thường ở bảy trường hợp (4%) [14].

Các nghiên cứu mới về phát hiện ra các trường hợp u lympho tế bào lympho T trong dịch não tủy như của Tatsuro (2019) cũng đã được công bố [15], trong nghiên cứu này, dịch não tủy được coi như phương pháp tốt để chẩn đoán u lympho tại não, đặc biệt là ở vị trí không thể sinh thiết.

5. KẾT LUẬN

Các dấu ấn lympho bất thường của u lympho được phát hiện trong mẫu dịch não tủy gồm 23 mẫu bằng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy trong đó chỉ có 10 mẫu bằng xét nghiệm hình thái. Trong 6 bệnh nhân nghi ngờ u lympho có 3 bệnh nhân chẩn đoán mới bằng phương pháp phân tích dấu ấn miễn dịch, giúp tăng tỷ lệ phát hiện lên rất nhiều so với chỉ xét nghiệm hình thái trong các mẫu dịch não tủy. Phân tích dịch não tủy bằng dấu ấn miễn dịch đã được coi là một phần trong chẩn đoán ở bệnh nhân u lympho tại não, hoặc các u lympho tái phát có thâm nhiễm thần kinh trung ương. Phương pháp dấu ấn miễn dịch có giá trị cao hơn trong các trường hợp nghi ngờ u lympho tại não không có khả năng sinh thiết.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Correale J, Mix E, Olsson T, et al. CD5+ B cells and CD4-8-T cells in neuroimmunological diseases. *J Neuroimmunol.* 1991;32(2):123-132.
2. Korfel A, Schlegel U. Diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(6):317-327.
3. Javedan SP, Tamargo RJ. Diagnostic yield of brain biopsy in neurodegenerative disorders. *Neurosurgery.* 1997;41(4):823-828.
4. Josephson SA, Papanastassiou AM, Berger MS, et al. The diagnostic utility of brain biopsy procedures in patients with rapidly deteriorating neurological conditions or dementia. *J Neurosurg.* 2007;106(1):72-75.
5. Hall WA. The safety and efficacy of stereotactic biopsy for intracranial lesions. *Cancer.* 1998;82(9):1749-1755.
6. Perske C, Nagel I, Nagel H, Strik H. CSF cytology-the ongoing dilemma to distinguish neoplastic and inflammatory lymphocytes. *Diagn Cytopathol.* 2011;39(8):621-626.
7. Korfel A, Weller M, Martus P, et al. Prognostic impact of meningeal dissemination in primary CNS lymphoma (PCNSL): experience from the G-PCNSL-SG1 trial. *Ann Oncol.* 2012;23(9):2374-2380.
8. Ferreri AJ, Blay JY, Reni M, et al. Prognostic scoring system for primary CNS lymphomas: the International Extranodal Lymphoma Study Group experience. *J Clin Oncol.* 2003;21(2):266-272.
9. French CA, Dorfman DM, Shaheen G, Cibas ES. Diagnosing lymphoproliferative disorders involving the cerebrospinal fluid: increased sensitivity using flow cytometric analysis. *Diagn Cytopathol.* 2000;23(6):369-374.
10. Finn WG, Peterson LC, James C, Goolsby CL. Enhanced detection of malignant lymphoma in cerebrospinal fluid by multiparameter flow cytometry. *Am J Clin Pathol.* 1998;110(3):341-346.
11. Quijano S, Lopez A, Manuel SJ, et al. Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry. *J Clin Oncol.* 2009;27(9):1462-1469.
12. Hegde U, Filie A, Little RF, et al. High incidence of occult leptomeningeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement: the role of flow cytometry versus cytology. *Blood.* 2005;105(2):496-502.
13. Stacchini A, Aliberti S, Demurtas A, Benevolo G, Godio L. Ten antibodies, six colors, twelve parameters: a multiparameter flow cytometric approach to evaluate leptomeningeal disease in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012;82(3):139-144.
14. Benevolo G, Stacchini A, Spina M, et al. Final results of a multicenter trial addressing role of CSF flow cytometric analysis in NHL patients at high risk for CNS dissemination. *Blood.* 2012;120(16):3222-3228.
15. Jo T, Horio K, Shishido T, Shimizu S, Kato T, Hata T. Brain tissue selectively attacked by adult T-cell leukemia/lymphoma cells: a case report. *Clinic in Oncology.* 2019;4:1675-1677.

ABSTRACT

ANALYSIS OF CELLULAR IMMUNE MARKERS IN CEREBROSPINAL FLUID OF LYMPHOMA PATIENTS AT THE HEMATOLOGY CENTER - BACH MAI HOSPITAL

Objectives: Determination of the diagnostic value of central nervous system invasive lymphoma by flow cytometry compared with cytogenetic methods.

Participants and Methods: Cross-sectional description of 33 patients with lymphoma or 6 suspected lymphoma patients with neurological manifestations who underwent cerebrospinal fluid flow cytometry at Bach Mai Hospital from January 2022 to December 2023.

Results: Abnormal lymphoid markers of lymphoma were detected in 23/33 cerebrospinal fluid samples by flow cytometry and 10 samples by morphological examination. Of the 6 patients with suspected lymphoma, 3 were newly diagnosed by immunomarker analysis, which significantly increased the detection rate compared to morphological testing in cerebrospinal fluid samples alone.

Conclusion: This study showed that morphological testing combined with flow cytometry significantly increased the detection rate compared to morphology alone in cerebrospinal fluid samples.

Keywords: *cerebrospinal fluid, immunomarkers, lymphoma*