

NGHIÊN CỨU KỸ THUẬT NHUỘM HÓA MÔ MIỄN DỊCH TRÊN MẪU MÔ DỊCH LIQUID BIOPSY TẠI BỆNH VIỆN TRUNG ƯƠNG HUẾ: NHÂN MỘT TRƯỜNG HỢP UNG THƯ BUỒNG TRỨNG

Phạm Nguyên Cường¹, Nguyễn Thanh Xuân¹, Phạm Như Huy¹

TÓM TẮT

Chúng tôi báo cáo một trường hợp sử dụng kỹ thuật hóa mô miễn dịch để nhuộm mẫu mô dịch trong ung thư buồng trứng. Chúng tôi so sánh kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch trên mẫu mô dịch với nhuộm hóa mô miễn dịch trên mẫu mô u. Kết quả: sự bộc lộ các dấu ấn hóa mô miễn dịch trên mẫu mô dịch có kết quả tương tự với kết quả hóa mô miễn dịch trên mẫu mô u và đưa ra chẩn đoán tương đồng với kết quả sau mổ. Kết luận: việc nhuộm hóa mô miễn dịch trên mẫu mô dịch có ý nghĩa trong việc đưa ra chẩn đoán chính xác mà không cần mổ bóc u. Việc thực hiện kỹ thuật đơn giản, nhanh chóng.

ABSTRACT

STUDY ON THE TECHNIQUE OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY STAINING ON LIQUID BIOPSY SAMPLES IN HUE CENTRAL HOSPITAL: CASE STUDY OF OVARY CANCER

Pham Nguyen Cuong, Nguyen Thanh Xuan, Pham Nhu Huy

We report a case of using the technique of immunohistochemistry for staining the liquid biopsy in ovarian cancer. We compared the technique of immunohistochemistry on both of liquid biopsy samples and tumor tissue samples. Results: No differences in revealing the immunohistochemical markers on both of liquid biopsy samples and tumor tissue samples. Conclusion: Immunohistochemical staining of this sample of liquid biopsy has a significance in diagnosis accurately without operating the tumor. This technical of immunohistochemistry staining the liquid biopsy is simple and fast.

Key words: immunohistochemistry, liquid biopsy, ovary cancer.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Xét nghiệm tế bào học bằng kỹ thuật “khối tế bào dịch” (cell-block) dựa trên các tiêu bản làm từ khối cận tế bào thu được qua ly tâm các dịch hút từ các khoang cơ thể đã được áp dụng từ khá lâu trên thế giới, với giá trị chẩn đoán cao hơn so với kỹ thuật “tế bào phết lam” (cell-smear) kinh điển dựa trên các

phiến đồ tế bào dàn từ cặn lắng hoặc ly tâm dịch.

Kỹ thuật này làm tăng độ tập trung các tế bào đơn lẻ, rải rác trong dịch hút ở vùng tổn thương và dịch khoang cơ thể thành một khối có thể đưa vào chuyển, đúc, cắt nhuộm giống quy trình mô học thường quy, nhằm nâng cao giá trị chẩn đoán các bệnh phẩm là dịch của tổn thương khối u – ung thư.

1. BVTW Huế cơ sở 2

- Ngày nhận bài (Received): 31/5/2018; Ngày phản biện (Revised): 11/6/2018;
- Ngày đăng bài (Accepted): 25/6/2018
- Người phản hồi (Corresponding author): Phạm Nguyên Cường
- Email: bscuonggb@gmail.com, ĐT: 0914.006.781

Bệnh viện Trung ương Huế

Trong một số trường hợp phát hiện tế bào ung thư trên mẫu dịch, yêu cầu tiếp theo của bác sĩ điều trị là xác định xuất nguồn của tế bào cũng như chẩn đoán phân biệt một số bệnh. Để giải quyết vấn đề này, phải nhuộm hóa mô miễn dịch trên khối dịch. Việc nhuộm hóa mô miễn dịch trên khối dịch khác rất nhiều so với nhuộm hóa mô miễn dịch cho khối u. Do đó, việc cải tiến kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch trên khối dịch được đặt ra để thực hiện sao cho các tế bào bộc lộ dấu ấn hóa mô miễn dịch tốt nhất, nhằm đưa ra một chẩn đoán tối ưu cho bệnh nhân. Đây là kỹ thuật chưa được áp dụng rộng rãi tại các cơ sở y tế ở miền Trung cũng như tại Bệnh viện Trung ương Huế, do đó chúng tôi thực hiện đề tài này với hai mục tiêu:

1. So sánh kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch khối u và kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch khối dịch trên một bệnh lý điển hình.

2. Áp dụng kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch khối dịch một cách thường quy tại Bệnh viện Trung ương Huế.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu: Các kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch trên khối u và trên khối dịch.

2.2. Phương pháp nghiên cứu: Phương pháp thực nghiệm, so sánh.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu: Các thông tin xử lý số liệu theo dạng thức thông tin định tính (so sánh đặc điểm, tính chất của hai loại kỹ thuật nhuộm).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm chung của kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch

3.1.1. Đặc điểm của kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch khối u

Các bước tiến hành nhuộm hóa mô miễn dịch trên khối u như sau:

3.1.1.1. Lấy bệnh phẩm và xử lý bệnh phẩm

Bệnh phẩm u được lấy ra khỏi cơ thể được cố định ngay trong dung dịch formol đậm trung tính 10% với tỷ lệ thể tích dung dịch cố định nhiều gấp 20 -30 lần thể tích bệnh phẩm. Thời gian cố định thông thường từ 2-24 giờ tùy theo mảnh bệnh phẩm to hay nhỏ. Sau khi bệnh phẩm được cố định, xử lý, vùi trong nền paraffin, và đúc khối paraffin, các mảnh cắt được máy cắt vi thể có độ dày 3-4 μ m, dán lên phiến kính đã được tráng Silan (3-aminopropyltriethoxy-silane).

3.1.1.2. Nhuộm hóa mô miễn dịch theo các bước như sau:

+ Sấy khô các phiến kính có lát cắt ở tủ ấm 37°C: 12 giờ (qua đêm)

+ Khử parafin: 10 phút

+ Nhúng nước cất: 5 phút

+ Khử peroxidaza nội sinh bằng dung dịch H₂O₂ 3%: 5 phút

+ Rửa các phiến kính có lát cắt bằng nước cất: 5 phút

+ Bộc lộ kháng nguyên: bằng đun cách thủy trong nồi áp suất hoặc trong lò vi sóng hoặc sử dụng proteinaza K*.

+ Rửa nước cất: 5 phút

+ Rửa các mảnh cắt bằng dung dịch TBS: 6 phút (Qua 2 bể, mỗi bể 3 phút)

+ Ủ với kháng thể thứ nhất (primary antibody): 60 phút

+ Rửa bằng dung dịch TBS: 6 phút (Qua 2 bể, mỗi bể 3 phút)

+ Ủ với kháng thể thứ hai có gắn với biotin: 30 phút (Biotinylated secondary antibody)

+ Rửa bằng dung dịch TBS: 6 phút (Qua 2 bể, mỗi bể 3 phút)

+ Ủ với phức hợp ABC hoặc streptavidin peroxidaza: 30 phút

+ Rửa phiến kính có lát cắt bằng dung dịch TBS: 6 phút (Qua 2 bể, mỗi bể 3 phút)

+ Phủ dung dịch tạo màu DAB (Diamino benzidin) hoặc EAC (3-amino-9-ethylcarbazole): 10 phút

+ Rửa phiến kính có lát cắt bằng dung dịch TBS: 6 phút

(Qua 2 bể, mỗi bể 3 phút)

+ Nhuộm nhân: bằng Hematoxylin : 1 phút

+ Rửa nước chảy:

* Nếu dùng DAB thì tiếp tục khử nước.

+ Khử nước bằng cồn, rồi qua xylene

+ Gắn lá kính bằng Resin nếu dùng DAB hoặc Geltol nếu dùng EAC.

3.1.2. Đặc điểm của kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch khối dịch

3.1.2.1. Lấy bệnh phẩm và xử lý bệnh phẩm

+ Dịch được hút từ khoang cơ thể được cho vào lọ thủy tinh. Số lượng dịch từ 50 đến 250 ml.

+ Nếu dịch có nhiều máu thì cho 1ml Cytosol red/ 50ml dịch, nếu dịch có nhiều chất nhầy thì cho 1ml Mucolux/50ml dịch, lắc đều rồi để khoảng 5 phút cho tan bớt nhầy.

+ Đưa vào máy ly tâm ống lớn 50 ml và tiến hành các bước:

+ Bước 1: Cho các ống nghiệm chứa dịch vào máy ly tâm trong 10 phút với tốc độ 2000 vòng/phút.

+ Bước 2: Loại bỏ lớp dịch trong phía trên để lấy lắng cặn tế bào rồi cố định cặn tế bào trong formol đậm trung tính 10% trong tủ ấm 60°C khoảng 2 giờ.

+ Bước 3: Ly tâm bệnh phẩm lần nữa với tốc độ 2000 vòng/phút trong 10 phút nếu cần (nếu bệnh phẩm đã hình thành khối chắc thì qui trình có thể chuyển trực tiếp từ bước 2 sang bước 4).

+ Bước 4: Loại bỏ formol trong ống vào lọ đựng nước thải. Dùng que gỗ nhỏ để lấy khối tế bào ở đáy ống ra khỏi ống và đặt lên một tờ giấy (loại giấy không dính có trong phòng xét nghiệm mô học). Gói khối tế bào trong giấy này và đặt vào trong khuôn nhựa đã được dán nhãn với tên và mã số bệnh nhân.

+ Bước 5: Dùng que gỗ nhỏ để lấy khối tế bào ra khỏi ống và đặt lên một tờ giấy (loại giấy không dính có trong phòng xét nghiệm mô bệnh học). Gói khối tế bào trong giấy này và đặt vào trong khuôn nhựa đã được dán nhãn với tên và mã số bệnh nhân.

+ Bước 6: Cho khuôn nhựa có chứa khối tế bào

tiếp tục được thực hiện các bước như vào quy trình mô học thường quy.

+ Bước 7: Các mảnh cắt từ khối tế bào có độ dày từ 3 - 5 μ m.

3.1.2.2. Nhuộm hóa mô miễn dịch: theo các bước như quy trình nhuộm hóa mô miễn dịch thường quy.

3.2. Những đặc điểm khác nhau cơ bản của hai kỹ thuật

3.2.1. Đặc điểm khối u và đặc điểm khối tế bào:

Khối u được trích ra từ mẫu mô u nên giữ được cấu trúc mô học của nó, và đây là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán mô bệnh học ung thư. Trong khi đó, khối dịch được hút từ khoang cơ thể bao gồm các tế bào rời rạc và gồm nhiều loại tế bào khác nhau, do áp lực hút của ống hút, và sự rơi rớt cơ học của các tế bào vốn có khuynh hướng lỏng lẻo mất cực tính trong ung thư, rơi vào khoang cơ thể. Cho dù được lắng đọng do sự ly tâm, nhưng các tế bào trong dịch khoang cơ thể không đại diện cho tổn thương u. Vậy nên, sự bộc lộ hóa mô miễn dịch ở các tế bào trong khối dịch chỉ định hướng xuất nguồn tế bào, chứ không chẩn đoán xác định bản chất u, cũng như vị trí u.

3.2.2. Đặc điểm tế bào và cấu trúc tế bào trong khối:

Các tế bào trong mẫu mô khối u được sắp xếp theo cấu trúc nhất định và đồng nhất, theo cấu trúc mô học của cơ quan mà trên đó khối u phát triển (ví dụ khối ung thư vú chỉ gồm các tế bào biểu mô tuyến vú, khối ung thư gan chỉ gồm các tế bào biểu mô gan...), nên việc nhuộm hóa mô miễn dịch thông thường sẽ chỉ có đồng nhất cho một loại tế bào, và bác sĩ giải phẫu bệnh chỉ cần định hướng dấu ấn miễn dịch tùy tính chất miễn dịch của loại tế bào đó.

Các tế bào trong mẫu mô khối dịch sẽ khác. Vì mẫu dịch được hút bằng kim từ khoang cơ thể nên trong dịch hút sẽ có nhiều loại tế bào. Ví dụ trong dịch hút của tràn dịch màng phổi do u, sẽ có nhiều loại tế bào như tế bào ung thư biểu mô phổi, tế bào thành màng phổi, kể cả tế bào viêm, mô bào... được hòa trong dịch màng phổi. Do đó, việc nhuộm hóa mô miễn dịch của khối dịch sẽ có nhiều thành phần

Bệnh viện Trung ương Huế

bộc lộ miễn dịch. Trên tiêu bản hóa mô miễn dịch, bác sĩ giải phẫu bệnh sẽ loại trừ các tế bào bộc lộ các dấu ấn không mong muốn, trước khi khảo sát sự bộc lộ của dấu ấn miễn dịch của loại tế bào cần tìm.

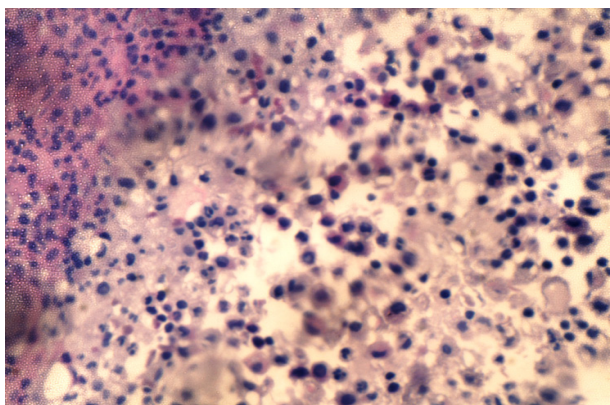
3.3. Nhuộm hóa mô miễn dịch trên khối u dịch khoang bụng trên một bệnh nhân ung thư buồng trứng

3.3.1. Giới thiệu trường hợp:

Bệnh nhân Phạm Thị Cẩm H. 64 tuổi, nhập viện

tại Bệnh viện Trung ương Huế cơ sở 2 với số vào viện: 180005270, với chẩn đoán TD U buồng trứng, có kèm tràn dịch màng bụng. Bệnh nhân được hút dịch màng bụng để tìm tế bào lạ.

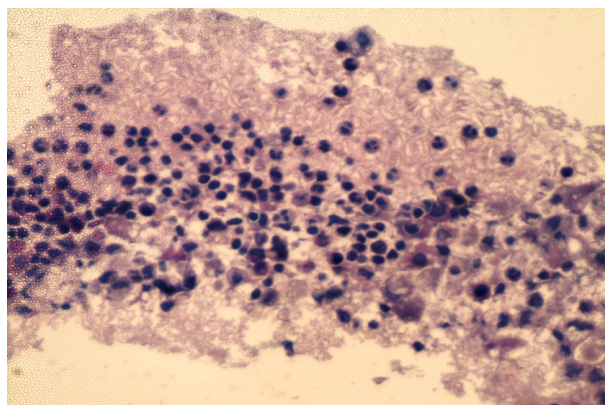
Chúng tôi lấy khoảng 200cc dịch, quay ly tâm 2000 lần/1 phút, sau đó theo quy trình xử lý bệnh phẩm, vùi dịch sau khi cô đặc vào nền paraffin, cắt ra tiêu bản nhuộm Hematoxylin- Eosin. Hình ảnh nhuộm được thể hiện như hình sau:



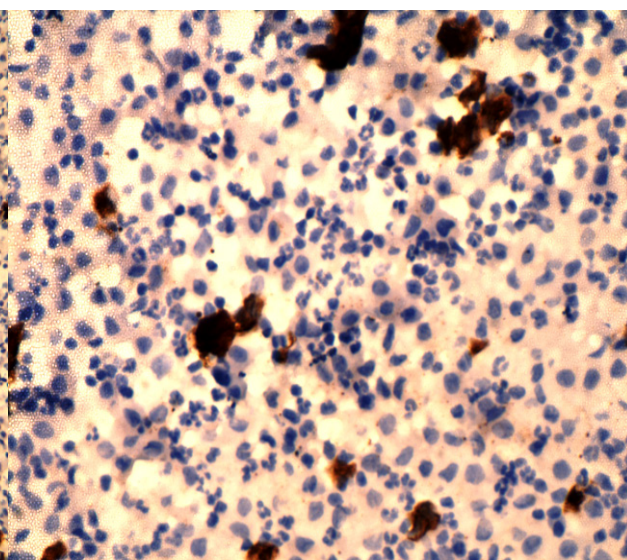
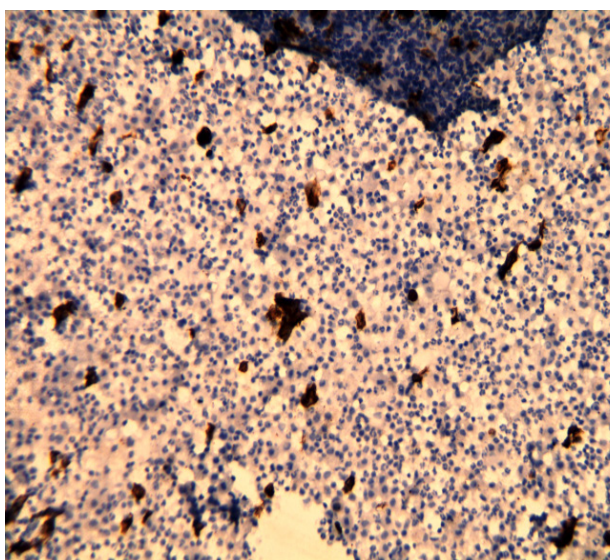
Nhuộm Hematoxylin – Eosin, x100.

Hình ảnh nhuộm Hematoxylin – Eosin cho thấy các tế bào viêm dạng bạch cầu đa nhân trung tính và mô bào nằm rải rác khắp mẫu mô.

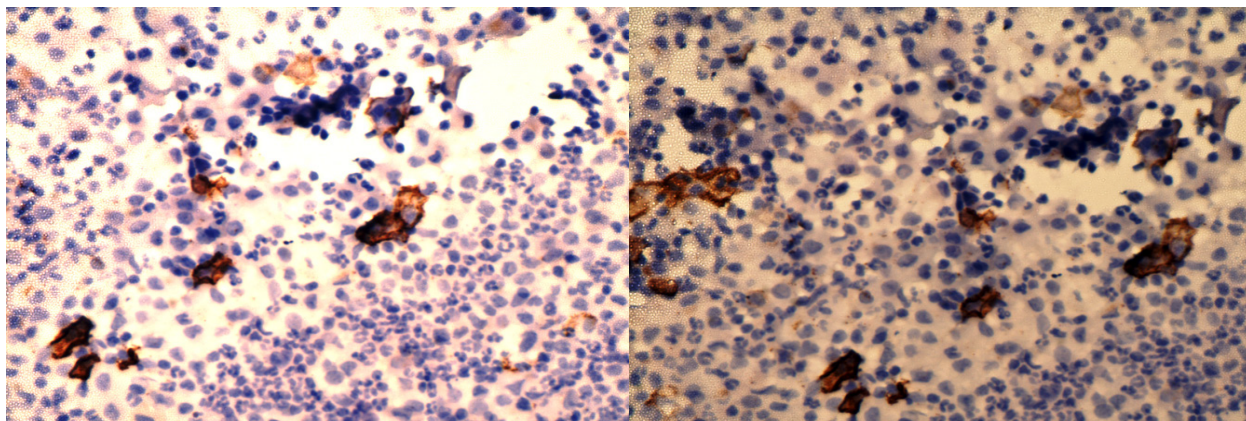
Khối sáp nền này được tiếp tục nhuộm hóa mô miễn dịch với các dấu ấn: CKAE1/3, CA125, và Vimentin. Hình ảnh nhuộm được thể hiện như hình sau:



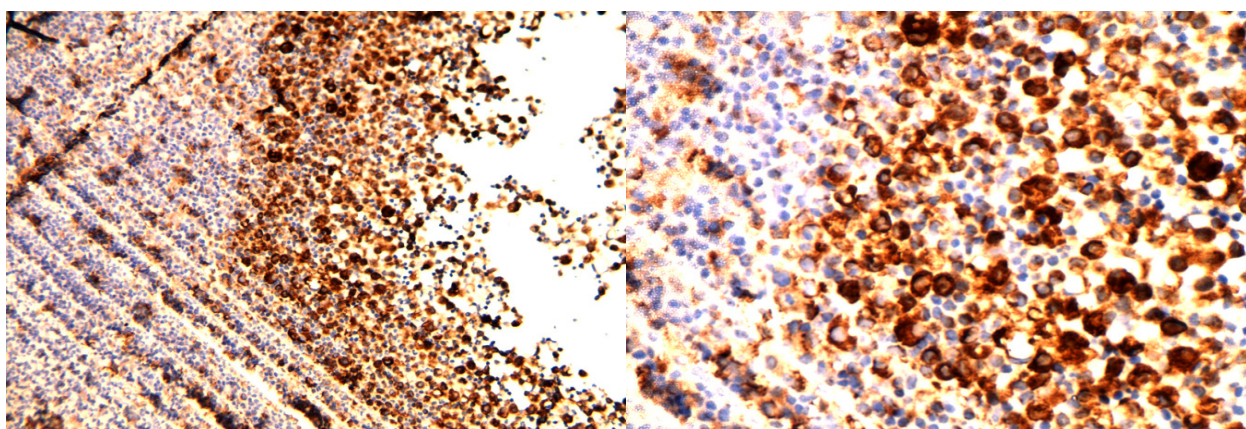
Khi phóng đại vật kính lên 400 lần, thấy các tế bào tập trung lại thành đám. Trong vùng này có một số tế bào biểu mô tuyến có nhân lớn, không điển hình, nhưng chưa rõ bản chất và xuất nguồn của tế bào.



Khi nhuộm dấu ấn CKAE1/3, thấy các tế bào biểu mô bắt màu nâu (dương tính). Số lượng tế bào này không nhiều, nhưng dương tính mạnh. Có thể thấy rõ các tế bào viêm dạng bạch cầu đa nhân không bắt màu miễn dịch như trong hình.



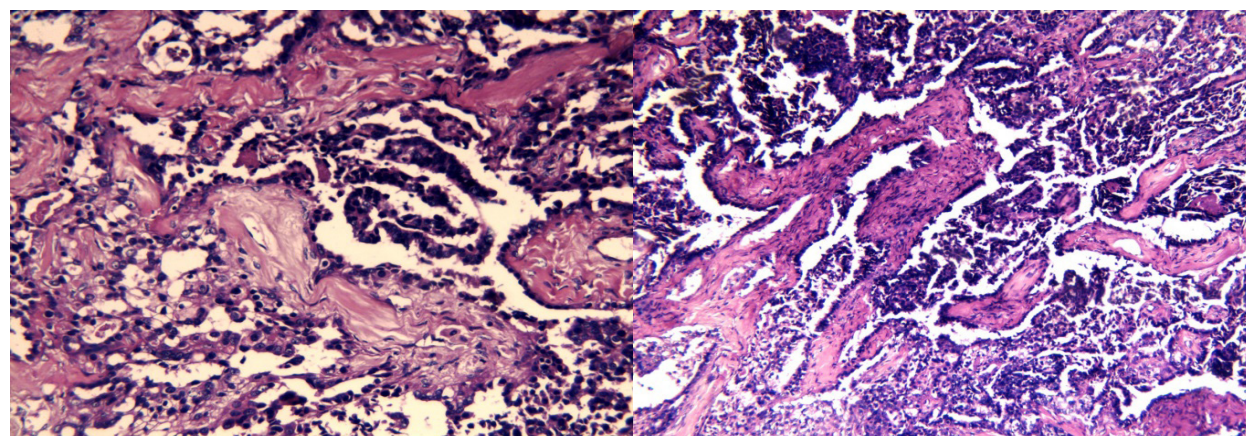
Hình ảnh trên là sự bộc lộ dấu ấn miễn dịch CA125 đặc hiệu cho ung thư buồng trứng. Thấy rõ các tế bào biểu mô tuyến bắt màu dương tính mạnh.



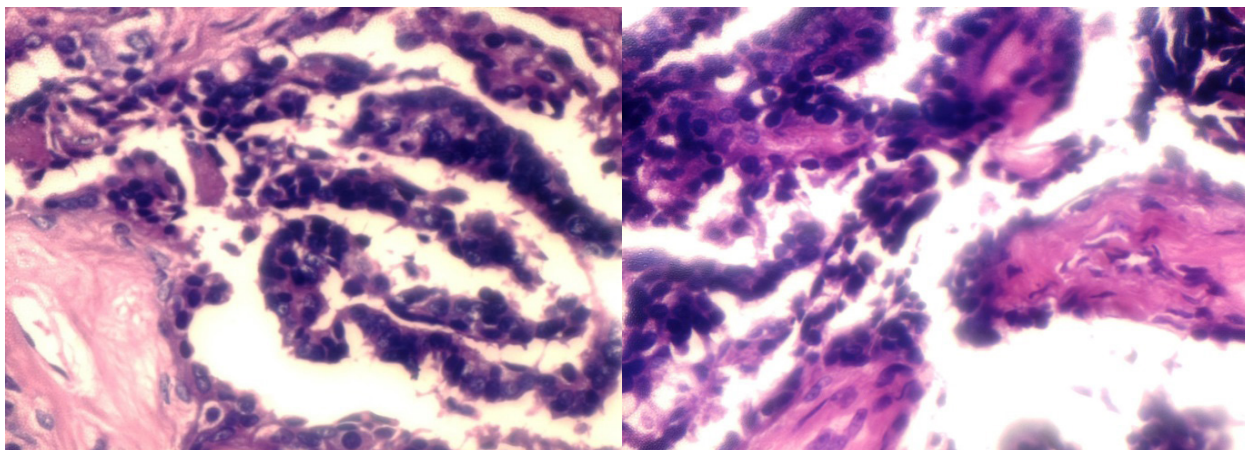
Khi cho dấu ấn Vimentin nhuộm các tế bào trong khối dịch, thấy rất nhiều tế bào dương tính, đây là các tế bào có nguồn gốc từ trung mô như tế bào xơ, mô bào, là các tế bào khoang thành bụng.

Từ các hình ảnh mô bệnh học nhuộm H.E thông thường đến các hình ảnh nhuộm hóa mô miễn dịch với các dấu ấn CKAE1/3, CA125, Vimentin, Khoa Giải phẫu bệnh BVTW Huế cơ sở 2 đưa ra chẩn đoán là: ung thư biểu mô tuyến của buồng trứng, kèm viêm bán cấp.

Sau đó bệnh nhân được phẫu thuật mổ cắt buồng trứng làm sinh thiết giải phẫu bệnh. Sau đây là các hình ảnh vi thể sau mổ:



Hình ảnh vi thể GPB sau mổ, độ phóng đại 100 lần



Hình ảnh vi thể GPB sau mổ, phóng đại 400 lần.

Trên hình ảnh độ phóng đại 100 lần và 400 lần, thấy có các tế bào biểu mô tuyến biến đổi ác tính, tế bào có nhân lớn, màng nhân dày, có hạt nhân rõ. Các tế bào biểu mô tuyến sắp xếp thành hình nhú, xâm lấn, phá hủy mô đệm.

Chẩn đoán giải phẫu bệnh sau mổ là ung thư biểu mô buồng trứng, tuyến thanh dịch, typ tuyến nhú, phù hợp với chẩn đoán khối dịch trước mổ. Số tiêu bản: B18.181.

3.2. Kết luận rút ra sau chẩn đoán giải phẫu bệnh

- Hóa mô miễn dịch các khối dịch có thể chẩn đoán xác định ung thư, và có thể định hướng vị trí ung thư.

- Sử dụng khối dịch để thực hiện nhuộm hóa mô miễn dịch có thể tránh một cuộc mổ sinh thiết thăm dò, và dễ thực hiện.

IV. KẾT LUẬN

4.1. Ý nghĩa của nhuộm hóa mô miễn dịch khối dịch

Đối với ngành ung thư, việc điều trị rất cần có kết quả giải phẫu bệnh chính xác. Quyết định điều trị ung thư phụ thuộc vào loại ung thư của từng loại tế bào, vì mỗi loại ung thư sẽ đáp ứng với điều trị khác nhau, như có loại đáp ứng với phẫu trị, có loại đáp ứng với hóa trị hoặc xạ trị và có loại đáp ứng với điều trị đa mô thức phối hợp giữa phẫu - hóa - xạ trị. Việc xác định loại

tế bào dựa vào đặc tính miễn dịch của tế bào đó. Hóa mô miễn dịch là phương pháp xác định những kháng nguyên đặc hiệu có trong mô hoặc tế bào, dựa trên sự kết hợp kháng nguyên - kháng thể. Do đó việc áp dụng phương pháp hóa mô miễn dịch rất cần thiết cho việc xác định chính xác các loại ung thư, xác định nguồn gốc tế bào của những khối u kém biệt hóa, không biệt hóa bằng những kháng thể đặc hiệu của dòng tế bào như: tế bào biểu mô, tế bào trung mô, tế bào lymphô, tế bào sắc tố, tế bào thần kinh nội tiết. Nếu thực hiện việc nhuộm hóa mô miễn dịch trên các khối dịch được hút ra từ khoang cơ thể sẽ giúp thêm một phương pháp chẩn đoán nhanh chóng, tiện lợi, đem lại kết quả chẩn đoán chính xác cho bệnh nhân.

4.2. Ý nghĩa của đề tài

Đề tài được thực hiện chính là giải pháp thay thế một phần các chỉ định mổ sinh thiết chẩn đoán, vì tính đơn giản, nhanh chóng, hiệu quả và dễ sử dụng trên thực tế.

4.3. Kiến nghị, đề xuất

- Cần thực hiện nhiều hơn chỉ định hút dịch làm sinh thiết dịch, có thể làm thường quy trong chẩn đoán các bệnh tràn dịch khoang cơ thể trên các bệnh nhân có bệnh lý khối u - ung thư, nhằm tăng thêm số liệu nghiên cứu, cũng như tiếp cận thêm một phương pháp chẩn đoán bệnh lý đối với loại bệnh này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh, tế bào học (Ban hành kèm theo Quyết định số 5199/QĐ-BYT ngày 25 tháng 12 năm 2013 của Bộ trưởng Bộ Y tế), 2013.
2. Diaz Jr LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Jlin Oncol.* 2014;32(6):579–86.
3. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(6):426–37.
4. Alix-Panabieres C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discov.* 2016;6(5):479–91.
5. Heitzer E, Auer M, Ulz P, Geigl JB, Speicher MR. Circulating tumor cells and DNA as liquid biopsies. *Genome Med.* 2013;5(8):73.
6. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem.* 2015;61(1):112–23.