



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0002657

(51)⁷ **C12Q 1/68; G01N 33/53**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00472

(22) 29/10/2019

(45) 25/07/2021 400

(43) 25/12/2019 381A

(73) Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

Nhà 1H, 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Đỗ Hữu Nghị (VN); Lê Mai Hương (VN); Nguyễn Hồng Nhung (VN); Đỗ Hữu Chí (VN); Vũ Đình Giáp (VN).

(54) QUY TRÌNH SÀNG LỌC HOẠT CHẤT KHÁNG PHÂN BÀO VÀ HƯỚNG ĐÍCH NF- κ B TRÊN DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sàng lọc hoạt chất kháng phân bào hướng đích NF- κ B trên dòng tế bào ung thư. Quy trình theo giải pháp hữu ích nhằm sàng lọc hoạt chất kháng phân bào hướng đích NF- κ B trên dòng tế bào ung thư trên cơ sở đánh giá cả hình thái tế bào, diện tích và cường độ phát huỳnh quang trên cơ sở miễn dịch đặc hiệu protein và nhân tế bào. Quy trình theo giải pháp hữu ích cung cấp một phương pháp hiệu quả để sàng lọc các hợp chất thiên nhiên và (bán) tổng hợp có hoạt tính kháng viêm và chống ung thư *in vitro* trong nghiên cứu hóa-dược và phát triển thuốc.

Lĩnh vực kỹ thuật đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực sinh học phân tử ứng dụng trong phân tích miễn dịch huỳnh quang. Cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sàng lọc hoạt chất sinh học kháng phân bào hướng đích NF- κ B trên dòng tế bào ung thư trên cơ sở miễn dịch huỳnh quang bằng cách phân tích hình ảnh phát quang đặc trưng, trên cơ sở đó có thể đánh giá mức độ liên kết sinh học của hợp chất thử nghiệm đối với tế bào đích. Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép sàng lọc các hợp chất thiên nhiên, chất tổng hợp và bán tổng hợp có hoạt tính kháng viêm và ức chế tế bào ung thư dựa trên đích NF- κ B.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Hiện có một số phương pháp phổ biến trong sàng lọc hoạt chất có hoạt tính sinh học là phương pháp MTT (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) hay một số phương pháp tương tự dựa trên sự khử tetrazolium (ví dụ, MTS, XTT) nhờ hoạt tính chuyển hóa MTT/XTT/MTS thành dạng tinh thể formazan bởi enzym dehydrogenaza của ty thể ở các tế bào sống. Tuy nhiên phân tử chất này có thể tương tác với một số cơ chế hoạt động khác của tế bào dẫn đến khả năng sai lệch kết quả. Điều này đã được báo cáo trước đó đối với các hợp chất và thuốc như Imatinib, rottlerin, axit ursolic, verapamil, resveratrol, genistein và một số polypeptit có ảnh hưởng khi thực nghiệm bằng phương pháp MTT. Tương tự khi xử lý các tế bào u nguyên bào thần kinh đệm (U251, T98G) với temsirolimus (chất ức chế mTOR kinase), U0126 (chất ức chế MEK1/2 kinases) và temozolomit (alkyl hóa ADN) hay xử lý dòng tế bào MCF-7, MCF-12A với các chất 3-bromopyruvat, lonidamine và 2-deoxyglucoza cho thấy những kết quả sai lệch khi sử dụng phương pháp MTT đánh giá hoạt tính gây độc tế bào (Stepanenko & Dmitrenko, 2015; Kumar et al., 2018; van Tonder et al., 2015). Để khắc phục nhược điểm này, phương pháp sử dụng các chất nhuộm huỳnh quang là giải pháp thay thế hữu hiệu, có độ chính xác cao và đang ngày

càng được ứng dụng nhiều trong đánh giá tác động của thuốc hay chất thử có hoạt tính chống ung thư trên mức độ tế bào.

Kỹ thuật nhuộm huỳnh quang kết hợp kỹ thuật ghi hình ảnh tế bào sử dụng kính hiển vi huỳnh quang tự động đã được phát triển nhằm truy xuất được các kết quả phân tích kiểu hình cho các mục đích khác nhau và có thể phát triển quy mô sàng lọc trong khi giảm thiểu được các bước thực nghiệm. Vấn đề then chốt của kỹ thuật này là cần tối ưu các điều kiện đối với một số chất đánh dấu huỳnh quang gắn kết với phân tử đích cũng như khả năng thu nhận được hình ảnh rõ nét với các bước sóng kích thích/phát xạ rõ ràng để có thể thu được hình ảnh có màu sắc khác nhau để có khả năng phân tích bằng các phần mềm hỗ trợ phân tích. Quá trình phát triển thông qua chu trình tế bào là một trong những chức năng cơ bản nhất của tế bào. Các phương pháp nghiên cứu chu trình tế bào cổ điển thường dựa vào phân tích tập hợp tế bào và đòi hỏi phải có các chỉ thị cụ thể hoặc sử dụng các hệ thống biến đổi di truyền, gây khó khăn cho việc xác định giai đoạn chu trình của từng tế bào riêng lẻ và không bị tác động. Chúng tôi đưa ra quy trình phù hợp để ứng dụng trong các phương pháp ghi hình ảnh có độ phân giải cao, để xác định giai đoạn chu trình của từng tế bào bằng cách đo hàm lượng ADN của chúng bằng kính hiển vi huỳnh quang. Phương pháp này dựa trên việc định lượng chính xác bằng phân tích hình ảnh về cường độ hạt nhân tích hợp của các tế bào được nhuộm bằng thuốc nhuộm ADN và nó có thể được sử dụng kết hợp với thử tác động của các hợp chất hóa học đến tế bào.

Trạng thái và hoạt động của chu trình tế bào thường được theo dõi bằng các phương pháp dựa trên tập hợp như dòng chảy tế bào (flow cytometry), không phù hợp với các kỹ thuật sinh học tế bào có độ phân giải cao cũng như không cho phép theo dõi từng tế bào theo thời gian. Các hướng nghiên cứu hiện nay đã dẫn đến sự phát triển các phương pháp nhằm mục đích xác định và theo dõi chính xác giai đoạn của chu trình tế bào của từng tế bào và kết hợp thông tin này với các đặc điểm tế bào khác được đánh giá bằng hình ảnh, ví dụ protein hoặc sự thay đổi hình thái của các bào quan và tế bào. Hầu hết các phương pháp này đòi hỏi sự đánh dấu có chọn lọc các tế bào nhân bản (Jackson & Cook, 2008; Sterzel et al., 1985), nhuộm màu các chất đánh dấu đặc trưng trong chu trình tế bào cụ thể (Easwaran et al., 2005), hoặc biểu hiện của các chỉ thị (reporter) cụ thể của các giai đoạn trong chu kỳ tế bào (Hesse et al. 2012).

Mặc dù các phương pháp này đã được chứng minh là hữu ích cho nghiên cứu các khía cạnh chính của điều hòa chu trình tế bào và phối hợp với các chức năng khác như chỉnh sửa ADN, lão hóa hoặc quá trình chết theo chương trình (apoptosis) (Campisi & Adda di Fagagna, 2007; Evan & Vousden, 2001), nhưng chúng chỉ có thể thăm dò các giai đoạn cụ thể của chu trình tế bào và do đó cần thiết phải sử dụng nhiều phương pháp kết hợp để nghiên cứu một quá trình một cách toàn diện trong toàn bộ chu trình tế bào. Ngoài ra, các phương pháp này thường khó kết hợp với nhau, vì chúng đòi hỏi các chất nhuộm huỳnh quang chồng chéo hoặc bộ lọc phức tạp. Tương tự như vậy, việc sử dụng nhiều chỉ thị rất khó khăn, có nguy cơ sai số do các quy trình kỹ thuật và lựa chọn cài đặt, và làm giảm tính khả dụng của các vùng không bao trùm của phổ có thể được sử dụng để hiển thị đồng thời các khoang tế bào khác nhau bằng cách dựa trên kỹ thuật ghi hình ảnh.

Quy trình này xác định các giai đoạn chu trình tế bào của từng tế bào riêng lẻ trong tập hợp tế bào trên cơ sở đo hàm lượng ADN của chúng bằng kính hiển vi huỳnh quang trên cơ sở tham khảo theo quy trình của Roukos et al. (2015), Viện Nghiên cứu ung thư Mỹ NCI. Cách tiếp cận dựa trên định lượng bằng cách phân tích hình ảnh về cường độ huỳnh quang của nhân tế bào được nhuộm bằng thuốc nhuộm gắn ADN là DAPI và Hoechst, và không yêu cầu kỹ thuật di truyền tạo chất đánh dấu hoặc các chỉ thị đặc hiệu của chu kỳ tế bào. Quy trình mô tả chi tiết việc đưa tế bào lên giếng và cố định và nhuộm các giếng bằng DAPI hoặc Hoechst. Tập hợp các tế bào trong mỗi giai đoạn chu kỳ tế bào (G_1 , S, G_2/M) có thể được xác định bằng cách áp dụng các ngưỡng trên cường độ DAPI, Hoechst tích hợp hoặc bằng cách mô hình hóa biểu đồ được xuất bằng phần mềm phân tích chu kỳ tế bào của hệ thống.

Đánh giá trạng thái chu trình tế bào của các tế bào riêng lẻ là cơ sở để đánh giá biến đổi của chu trình tế bào đáp ứng lại các tín hiệu nội và ngoại bào. Ví dụ, đánh giá số lượng tế bào trong chu trình và tỉ lệ tế bào trong các giai đoạn phân bào cung cấp các chỉ số quan trọng về sự phát triển của tế bào và tình trạng phát triển khối u (Hanahan & Weinberg, 2011; Jackson & Cook, 2008). Hơn nữa, nhiều chức năng cơ bản của tế bào, như tái bản ADN, phân ly nhiễm sắc thể hay sửa chữa ADN, xảy ra hoặc được điều chỉnh theo cách thức cụ thể trong chu trình tế bào. Trong bốn thập kỷ qua, kỹ thuật trích ly tế bào theo dòng chảy (flow cytometry) kết hợp với phương

pháp phân tích đa thông số đã được sử dụng như một công cụ vàng để phân tích chu kỳ tế bào nhờ ưu điểm cho kết quả nhanh chóng và chính xác để đánh giá trạng thái chu trình của các tế bào riêng lẻ giúp chúng ta hiểu được các tác động của chu trình tế bào. Phương pháp này dựa trên nguyên lý các tế bào được dán nhãn bởi một chất nhuộm ADN huỳnh quang giúp xác định chính xác hàm lượng phân tử này. Các thiết bị quét laze tế bào phát triển mạnh mẽ vào giữa những năm 1990 đã cải tiến độ phân giải hơn nhiều so với phương pháp dòng chảy và cho phép các nghiên cứu phân tích đa thông số về mức bội thể ADN tiến hành kết hợp với di truyền học tế bào và đã được dụng rộng rãi trong chẩn đoán bệnh học tế bào (Darzynkiewicz et al., 2004; Pozarowski et al., 2013). Mặc dù có các thế mạnh được chứng minh, nhưng các phương pháp này đòi hỏi phải có máy móc chuyên dụng và bị hạn chế về khả năng kết hợp trạng thái chu trình tế bào của các tế bào riêng lẻ với các đặc điểm hình thái dưới tế bào chỉ phát hiện được bằng phương pháp hình ảnh có độ phân giải cao.

Trong quy trình giới thiệu ở đây, các tế bào được nhuộm bằng thuốc nhuộm gắn ADN là bisbenzimit (Hoechst). Các hình ảnh thu được được định lượng bằng phân tích hình ảnh tự động để tính cường độ nhân tích hợp của từng tế bào để thu được biểu đồ hàm lượng ADN. Tuy nhiên, quy trình có thể được điều chỉnh phù hợp với bất kỳ thuốc nhuộm gắn ADN khác để định lượng ADN, như thuốc nhuộm DAPI hoặc DRAQ5. Nhiều chất nhuộm có khả năng thẩm thấu qua tế bào thì không cần bước bán thấm. Hơn nữa, một số chất nhuộm có khả năng tương thích với các tế bào sống như DRAQ5, cho thấy các thuốc nhuộm này phù hợp để sử dụng trong các phương pháp thí nghiệm với tế bào sống (Martin et al. 2005). Tuy nhiên, khi ủ thời gian dài với DRAQ5 đã được chứng minh là có ảnh hưởng đến tiến triển của chu trình tế bào và can thiệp vào một số quá trình liên quan đến nhiễm sắc thể, do đó thuốc nhuộm này chỉ nên sử dụng cho các thí nghiệm tế bào sống và trong thời gian ngắn (Mari et al., 2010). Quy trình chuẩn theo kỹ thuật sàng lọc nội hàm cao được xây dựng đối với dòng tế bào ung thư gan Hep-G2 và có thể áp dụng đối với các dòng tế bào khác như MCF-7, Jurkat, HeLa tùy theo mục đích sàng lọc và biểu hiện hoạt tính của thuốc hay chất thử.

Một số phương pháp khác cũng dựa trên hình ảnh để đánh giá trạng thái chu trình tế bào của từng tế bào riêng lẻ bao gồm ghi nhãn quá trình chuyển hóa ở tế bào

pha S (Diermeier-Daucher 2009), phương pháp nhuộm các đích đặc hiệu của chu trình tế bào như xyclin A, kháng nguyên nhân tế bào tăng sinh (PCNA) hay Cdt1 (Essers et al. 2005; Roukos et al. 2011), hoặc kỹ thuật liên quan đến sản sinh một số hệ thống tế bào biểu hiện ổn định như các chỉ thị khác nhau cho từng pha trong chu trình tế bào (Hesse et al., 2012). Tuy nhiên, khác với quy trình được đưa ra ở đây, các phương pháp này chỉ có thể thăm dò riêng từng giai đoạn hay pha cụ thể của chu trình tế bào. Lấy ví dụ, đánh dấu miễn dịch gắn với các tiền ADN đã biến đổi như sử dụng 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), 5-chloro-2'-deoxyuridine (CldU) hoặc iododeoxyuridine (IdU), hay phương pháp phát hiện qua liên kết 5-ethynyl-2'-deoxyurine qua phản ứng Click mà không cần bước cố định hoặc biến tính (Cappella et al., 2008; Diermeier-Daucher et al., 2009; Yokochi & Gilbert, 2007), thì đều chỉ cho phép phát hiện chính xác các tế bào ở pha S. Tương tự, có thể theo dõi chu trình tế bào bằng phương pháp huỳnh quang miễn dịch với cyclin A hoặc protein geminin của chu trình tế bào, trong khi đó miễn dịch huỳnh quang của yếu tố kiểm soát Cdt1 có thể được sử dụng để đánh dấu các tế bào trong pha G₁ (McGarry & Kirschner, 1998; Nishitani et al., 2001; Pines & Hunter et al., 1990; Stathopoulou et al., 2012). Chỉ thị chu trình tế bào ở các pha S, G₂ và M có thể được tích hợp với các tín hiệu huỳnh quang đặc trưng (marker) được tạo ra từ các dòng tế bào ổn định hoặc động vật chuyển gen. Hệ thống huỳnh quang chỉ thị ubiquitin trong chu trình trình tế bào (FUCCI) được sử dụng rộng rãi, dựa trên sự biểu hiện dao động của Cdt1 và geminin trong chu trình tế bào được gắn nhãn bằng các protein huỳnh quang khác nhau, đánh dấu tế bào trong các pha G₁ hoặc S, G₂/M, tương ứng, sự phân chia tế bào có thể phát hiện theo những thay đổi về hình thái tế bào hay trong quá trình phân vùng của protein anillin (Hesse et al., 2012; Ridenour et al., 2012). Tuy nhiên, không có phương pháp nhuộm miễn dịch hay thử nghiệm reporter đủ để xác định các giai đoạn (pha) chu trình tế bào của tất cả từng tế bào riêng lẻ trong một tập hợp và do đó cần phải sử dụng kết hợp các công cụ này. Đây là vấn đề phức tạp về mặt kỹ thuật và đòi hỏi phải sử dụng nhiều kênh lọc phổ khác nhau, làm giảm khả năng hiển thị đồng thời các đặc tính của tế bào (Roukos et al., 2015). Ngược lại, phương pháp được đưa ra ở đây chỉ sử dụng một chất nhuộm huỳnh quang với giá thành thấp và thông dụng như DAPI hoặc Hoechst để định lượng hàm lượng ADN nhân tế bào bằng phương pháp

ghi và phân tích hình ảnh, từ đó cho phép xác định chu trình tế bào của từng tế bào trong tập hợp cũng như có thể kết hợp với các phương pháp sinh học tế bào khác như miễn dịch huỳnh quang, kỹ thuật FISH hoặc ghi ảnh tế bào thời gian thực.

NF- κ B (Nuclear factor-kappa B) lúc đầu được xem như là yếu tố nhân (yếu tố phiên mã) của riêng tế bào B (tế bào lympho B có chức năng sản xuất kháng thể liên kết tác nhân gây bệnh), sau này chúng không chỉ được tìm thấy trong tế bào B mà còn trong rất nhiều loại tế bào khác nhau. Hiện nay đã có 5 thành viên của họ NF- κ B được xác định: p105/p50 (*nfkb1*), p100/p52 (*nfkb2*), p65 (*RelA*), RelB và c-Rel.

Yếu tố nhân kappa B, NF- κ B, là một yếu tố sao mã thiết yếu kiểm soát quá trình biểu hiện gen mã hóa của các cytokin tiền viêm trong quá trình sinh lý bệnh viêm và ung thư. Khi tế bào ở trạng thái nghỉ, NF- κ B tồn tại trong bào tương ở dạng tương tác không đồng hóa trị với các protein I κ B (I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , I κ B- ϵ , Bcl-3, p100 và p105). Tất cả các I κ B này đều chứa các đoạn lặp lại là ankyrin. Các ankyrin này điều hòa quá trình gắn kết giữa I κ B - NF- κ B và tương tác với một vùng trên RHD của NF- κ B do đó che mất phần NLS (nuclear localization sequence) nên phân tử NF- κ B không thể di chuyển từ bào tương vào nhân được. Những tác nhân hoạt hóa NF- κ B gây nên quá trình phosphoryl hóa các I κ B. Kết quả là I κ B bị giáng hóa bởi quá trình thủy phân protein hoặc bị phân hủy do các proteasom hay các proteaza khác. Khi đó các NF- κ B sẽ được giải phóng, đi vào nhân tế bào và kích hoạt quá trình sao mã tại đây. Sự kích hoạt sai lệch tín hiệu NF- κ B có liên quan đến các bệnh viêm như viêm khớp dạng thấp và hen suyễn và một số bệnh chuyển hóa. Mặt khác, khi viêm không lành dễ chuyển sang giai đoạn viêm mạn tính và nhiều nghiên cứu đã chứng minh có mối liên hệ giữa viêm mạn tính và nguy cơ ung thư cao thông qua yếu tố NF- κ B. Liên quan tới bệnh ung thư, NF- κ B có vai trò là yếu tố điều hòa biểu hiện của những gen kiểm soát sự tăng sinh và sống sót của tế bào. Như vậy, nhiều loại khối u khác nhau của con người do sự kiểm soát sai NF- κ B: NF- κ B hoạt động giúp biểu hiện của các gen giữ cho tế bào tăng sinh và bảo vệ tế bào khỏi các điều kiện kích ứng quá trình chết theo chương trình apoptosis. Trong ung thư, các protein kiểm soát tín hiệu NF- κ B bị đột biến hoặc biểu hiện bất thường dẫn đến sự phối hợp không hoàn thiện giữa các tế bào ác tính và phần còn lại của cơ thể sinh vật. Điều này dẫn tới việc hệ thống miễn dịch loại bỏ không hiệu quả khối u và những tế bào ung thư ác tính. Trong TB

khối u, NF- κ B hoạt động (ví dụ, trong 41% ung thư biểu mô vòm họng) do đột biến gen mã hóa các yếu tố phiên mã NF- κ B hoặc trong các gen kiểm soát hoạt động NF- κ B (như gen I κ B ức chế yếu tố NF- κ B); ngoài ra, một số tế bào khối u tiết ra các yếu tố dẫn tới NF- κ B trở nên hoạt động. Việc ức chế yếu tố NF- κ B có thể làm cho các tế bào khối u ngừng tăng sinh, chết hoặc trở nên nhạy cảm hơn với tác dụng của những tác nhân chống khối u. Vì vậy, NF- κ B được coi là một đích của liệu pháp kháng viêm và ung thư.

Do vậy, việc phát triển được kỹ thuật dựa trên kỹ phân tích hình ảnh miễn dịch huỳnh quang với đích NF- κ B có khả năng đánh giá được quá trình di chuyển của NF- κ B vào nhân hay ức chế quá trình này thông qua cảm ứng kích hoạt I κ B ứng dụng trong sàng lọc các hợp chất kháng viêm và ung thư là một hướng cho phép giảm bớt được nhiều kỹ thuật sàng lọc trên quy mô tế bào, cho phép đánh giá và đưa ra được các hoạt chất tiềm năng để làm cơ sở phát triển thuốc điều trị bệnh viêm và bệnh ung thư.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sàng lọc hoạt chất kháng phân bào hướng đích NF- κ B trên dòng tế bào ung thư, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) hoạt hóa dòng tế bào ung thư bằng cách nuôi cấy dòng tế bào ung thư ở 37°C, 5% CO₂ trong môi trường bổ sung kháng sinh penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL và từ 5-10% huyết thanh thai bò (thể tích/thể tích) đến khi phát triển đạt trên 70%, rửa thu tế bào bằng dung dịch đệm PBS 0,1M bổ sung trypsin EDTA 0,05%, sau khi ly tâm, chuẩn độ đến khoảng 3x10⁵ tế bào/mL thu dịch tế bào hoạt hóa;

b) xác định khoảng nồng độ thử nghiệm của hoạt chất thử nghiệm bằng cách chuyển khoảng 500µL dịch tế bào hoạt hóa vào các vi giếng trên đĩa nuôi cấy, tiếp đó nuôi cấy tế bào ung thư trong 24 giờ trong điều kiện bổ sung hoạt chất thử nghiệm với dải nồng độ từ 1-100 µg/mL trong dimethyl sulfoxit (DMSO 100%) và đối chứng là palitaxel hoặc elliptixin, sau khi nuôi cấy 24 giờ, tiến hành đo mật độ quang để xác định giá trị IC₅₀ mà tại đó hoạt chất thử nghiệm ức chế 50% sự tăng sinh tế bào so với đối chứng;

c) xử lý và cố định tế bào bằng cách bổ sung 500 μ L dịch tế bào hoạt hóa vào vi giếng có bổ sung hoạt chất thử nghiệm có nồng độ pha loãng nhỏ hơn nồng độ IC₅₀ trong khoảng thời gian từ 24 đến 48 giờ, sau khi bổ sung vào mỗi giếng 100 μ L paraformaldehyt 8% (thể tích/thể tích) và ủ trong khoảng từ 10-12 phút, sau đó mỗi giếng được bổ sung 100 μ L Triton X100 nồng độ từ 0,1 đến 0,3% trong PBS và ủ trong khoảng 5 đến 10 phút để cố định tế bào;

d) nhuộm huỳnh quang và gắn kháng thể bằng cách bổ sung 100 μ L thuốc nhuộm bisbenzimit hoặc khoảng từ 300 đến 500 nM thuốc nhuộm 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) và ủ trong 25 phút, tiếp đó bổ sung vào mỗi giếng 10 μ L sữa bột tách béo 5% trong đệm PBS 0,1M, pH=7,8 trong 20 phút rồi ủ với một lượng tương ứng kháng thể kháng p65 NF- κ B gắn huỳnh quang; và

e) đánh giá khả năng kháng phân bào bằng cách thu nhận hình ảnh huỳnh quang tế bào trên kính hiển vi quang học với mức phóng đại x20 hoặc x40 với độ phân giải hình ảnh ở các mức $\geq 4,0$ megapixel, tốc độ quét ≥ 100 hình/giây, thời gian phơi sáng 200ms, mỗi lần quét và xử lý ít nhất 9-16 vị trí/giếng, với các bước sóng kích thích lần lượt là $\lambda=488\text{nm}$ (GPF) và $\lambda=405\text{nm}$ (DAPI) tương ứng với hình ảnh liên kết protein tế bào và nhân, trên cơ sở so sánh cường độ và mật độ quang theo hình ảnh tương ứng với bước sóng phát huỳnh quang, đưa ra kết luận về khả năng kháng phân bào hướng đích NF- κ B đối với các giai đoạn phát triển của tế bào của hoạt chất thử nghiệm.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó hoạt chất kháng phân bào cần sàng lọc có biểu hiện ức chế sự phát triển của tế bào trên 85% trong khoảng nồng độ từ 5 đến 100 $\mu\text{g/mL}$ đối với dạng căn chiết các hoạt chất thiên nhiên hoặc từ 1 đến 50 $\mu\text{g/mL}$ đối với dạng hợp chất tổng hợp hoặc bán tổng hợp tinh khiết.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó thuốc nhuộm là bisbenzimit với nồng độ 350nM và hình ảnh huỳnh quang được thu nhận với bước sóng $\lambda=488\text{nm}$ để xác định protein liên kết màng tế bào.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó thuốc nhuộm là 4',6-diamidino-2-phenylindole với nồng độ 350nM và hình ảnh huỳnh quang được thu nhận với bước sóng kích thích $\lambda=405\text{nm}$ để xác định protein liên kết nhân tế bào.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó việc đánh giá hình thái, diện tích phát huỳnh quang và cường độ phát huỳnh quang trung bình được thực hiện cho ít nhất là 1000 tế bào.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó dòng tế bào ung thư được chọn từ nhóm bao gồm dòng tế bào ung thư gan, tế bào ung thư máu và tế bào ung thư cổ tử cung.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó kháng thể kháng p65 NF- κ B được gắn huỳnh quang GFP với bước sóng phát quang $\lambda=488$ nm kích thích chuyển vị bởi lipopolysaccharit (LPS) hoặc interleukin-1 (IL-1) với nồng độ tối thiểu 10 ng/mL trong 1 giờ.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó kháng thể kháng p65 NF- κ B còn được gắn huỳnh quang FITC để thu hình ảnh phát huỳnh quang với bước sóng phát xạ $\lambda=518$ nm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh chụp với độ phóng đại 20x trên thiết bị hiển vi huỳnh quang Olympus scan[^]R đối với tín hiệu protein huỳnh quang (A) hình ảnh huỳnh quang gắn với tiểu đơn vị NF- κ B p65 (GFP-p65), (B) ảnh chụp tín hiệu huỳnh quang ADN nhân tế bào (DAPI) và (C) là hình ảnh chồng hình ảnh huỳnh quang.

Hình 2 là ảnh chụp thể hiện thông số xác định viền và kích thước hình ảnh của đối tượng phân tích nhằm xác định diện tích huỳnh quang thông qua việc xử lý bằng phần mềm Olympus scan[^]R Analysis ver.2.7.2.

Hình 3 là hình ảnh thể hiện mức độ ảnh hưởng của nồng độ bisbenzimit (Hoechst 33342) tới tín hiệu huỳnh quang và chất lượng hình ảnh trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 ($2,4 \times 10^4$ tế bào/giếng), tế bào được nhuộm bisbenzimit sau 24 giờ và ghi hình ảnh ở VK x20, thời gian phơi sáng 200 ms.

Hình 4 là biểu đồ phân tích thể hiện phân vùng tế bào sống-chết thông qua mối tương quan giữa hình dạng - kích thước của 6 mẫu hoạt chất chiết từ sinh vật biển cần phân tích. Tế bào Hep-G2 được ủ với các mẫu thử ($25\div 50$ μ M) trong 24 giờ với bisbenzimit (Hoechst 33342), thu hình ảnh ở kênh DAPI, VK x20 và phân tích bằng phần mềm scan[^]R Analysis.

Hình 5 là biểu đồ phân tích thể hiện tế bào ung thư gan Hep-G2 sau 24 giờ ủ với chất thử ở kỳ trung gian (các pha G₁, S và G₂) và phân tích định lượng. Tế bào thể đa bội được xác định qua tổng cường độ tín hiệu bisbenzimidide (Hoechst 33342) cao nhất.

Hình 6 là ảnh chụp phân tích hình ảnh tế bào sau khi xử lý với mẫu thử cho thấy hầu hết nhân tế bào có hình dạng đồng nhất khi quan sát qua tín hiệu huỳnh quang Hoechst 33342 (A). Hình ảnh nhân tế bào đang trong giai đoạn phân chia (mitosis) cho thấy tín hiệu huỳnh quang cao, hình dạng nhỏ và dài (B). Tế bào trong giai đoạn chết bởi quá trình apoptosis có nhân hình dạng không đồng nhất (C).

Hình 7 là đồ thị thể hiện mối tương quan giữa diện tích vùng biên và cường độ huỳnh quang của tế bào Hep-G2 trên kênh DAPI/Cy3 bởi phần mềm scan[^]R Analysis ver.2.7.2.

Hình 8 là đồ thị thể hiện hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào bằng phương pháp MTT các mẫu tiềm năng trên dòng tế bào ung thư gan (Hep-G2) và ung thư cổ tử cung (HeLa).

Hình 9 là hình ảnh nhân tế bào trên kênh DAPI cho thấy vùng “cloud” màu xanh lục là vùng các tế bào với cường độ tín hiệu thấp (tế bào ở pha G₁) (A) và vùng màu xanh sẫm thể hiện vùng với cường độ mạnh là các tế bào ở pha G₂/M (B).

Hình 10 thể hiện ví dụ đánh giá mẫu ký hiệu Zer4 (11,5 µg/mL) biểu hiện hoạt tính kháng phân bào ở pha G₂/M trên dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa sau khi ủ 48 giờ với mẫu thử sử dụng phần mềm phân tích scan[^]R Analysis ver.2.7.2.

Hình 11 là thông số xác định đường viền đối với đối tượng phân tích chính Main Object (kênh DAPI) và phần Sub-Object (tương ứng vùng tế bào chất “CytoI”, kênh GFP).

Hình 12 là mô hình định lượng chuyển vị NF-κB từ tế bào chất (Cyto) vào nhân (Nuc) và phân tích hình ảnh thực trên phần mềm Olympus scan[^]R Analysis ver.2.7.2. Tế bào HeLa kích hoạt NF-κB bởi IL-1 10 ng/mL trong 1 giờ.

Hình 13 ví dụ đánh giá hoạt tính ức chế chuyển vị yếu tố kappa B (NF-κB) của tế bào ung thư cổ tử cung HeLa qua phân tích tiểu đơn vị NF-κB p65 gắn protein

huỳnh quang xanh GFP, kích thích ở $\lambda=488$ nm. Nhân được xác định đồng thời với nhuộm DAPI, kích thích ở $\lambda=405$ nm.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên các phương án này chỉ nhằm mục đích minh họa bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Thuật ngữ "chất thử" hoặc "hoạt chất thử nghiệm" chỉ các hợp chất thiên nhiên hoặc chất tổng hợp, bán tổng hợp đã được chiết tách và tinh sạch được sử dụng nhằm đánh giá, sàng lọc hoạt tính sinh học, cụ thể là khả năng tương tác của hợp chất này đối với tế bào, thụ thể hoặc các yếu tố mô, protein có nguồn gốc từ tế bào khác. Chất thử ưu tiên được sử dụng là các hợp chất dự kiến hoặc có tiềm năng sinh học cần xác định khả năng tương tác sinh học với đích phân tử, tốt nhất đã được xác định đối với khả năng ức chế sự sống sót của tế bào đích ở mức khoảng 50%, tốt hơn là trên 85%.

Theo giải pháp hữu ích, thuật ngữ "đích phân tử" chỉ phân tử sinh học bao gồm các bào quan có vai trò trong các hoạt động sống của tế bào (ty thể, yếu tố nhân) hay các quá trình chức năng của tế bào (chu kỳ tế bào, quá trình chết theo chương trình).

Các chất phát huỳnh quang được sử dụng theo giải pháp hữu ích là các chất có khả năng nhuộm ADN nhân tế bào nhằm đánh giá tương quan về số lượng tế bào và các đối tượng phân tích hoặc là đối tượng chính trong phân tích hoạt tính kháng phân bào. Nhuộm liên kết ADN có thể sử dụng propidium iodide (PI), 7-aminoactinomycin-D (7-AAD), bisbenzimidazolyl (Hoechst 33342), TO-PRO-3, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) và anthraquinon (DRAQ5™, DRAQ7™). Theo giải pháp hữu ích, đối với các đích phân tử ưu tiên sử dụng DAPI hoặc Hoechst 33342. DAPI và Hoechst đều được kích thích bởi nguồn sáng xenon, ánh sáng hồ quang thủy ngân hoặc tia UV tại $\lambda = 360$ nm và phát xạ huỳnh quang màu xanh lam ở vùng 460 nm. Do có sự khác biệt giữa hai loại thuốc nhuộm này là Hoechst có nhóm etyl bổ sung nên chúng ưa lipid hơn và do đó dễ dàng qua màng tế bào sống hơn DAPI nên nhuộm ADN dễ dàng hơn. DAPI ít thấm thấu màng tế bào hơn Hoechst và phải được sử dụng ở nồng độ cao hơn (thường là 10 $\mu\text{g/mL}$) nên thích hợp để nhuộm tế bào sống.

“Hoạt tính cảm ứng chết theo chương trình của tế bào” chỉ khả năng của thuốc hay một chất thử tại nồng độ thử nghiệm cảm ứng làm tăng số lượng tế bào ở giai đoạn apoptosis tăng so với mẫu đối chứng (không xử lý) phát hiện bằng thuốc nhuộm huỳnh quang đặc hiệu và phân tích hình ảnh đặc trưng của tế bào chết theo chương trình. Để xác định tế bào chết theo chương trình, một chất đánh dấu huỳnh quang annexin V-FITC mà có khả năng liên kết với phospholipit khi có xúc tác của canxi mà không cần cố định tế bào được sử dụng để xác định sự thay đổi về hình thái tế bào do mất tính không đối xứng của phospholipit trong giai đoạn sớm của quá trình chết theo chương trình của tế bào. Trong các tế bào sống, phosphatidylserine được vận chuyển vào bên trong của lớp lipid kép nhờ enzym aminophospholipit translocaza phụ thuộc Mg-ATP. Tại thời điểm khởi đầu quá trình chết theo chương trình, phosphatidylserin thường thấy ở phần bên trong của màng plasma sẽ được chuyển qua phần bên ngoài của màng. Phosphatidylserin sẽ liên kết annexin V-FITC với sự có mặt của canxi. Annexin V-FITC được phát hiện dưới dạng huỳnh quang xanh và PI được phát hiện dưới dạng huỳnh quang màu đỏ. Các tế bào đang ở giai đoạn sớm của quá trình chết theo chương trình sẽ chỉ bắt màu của Annexin V-FITC. Các tế bào còn sống sẽ không bắt màu cả Annexin V-FITC và dung dịch PI. Các tế bào đã chết sẽ bắt màu cả hai. Tế bào chết theo chương trình được tính qua tỷ lệ cường độ huỳnh quang FITC và Cy3.

Các hóa chất, tế bào ung thư có thể sử dụng theo giải pháp hữu ích là các tế bào, hóa chất có thể thu được trên thị trường và có thể mua được từ các nhà cung cấp. Các dòng tế bào ung thư được sử dụng để đánh giá khả năng hướng đích của hoạt chất thử nghiệm có thể được phân lập từ bệnh nhân, nuôi cấy theo quy trình chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sàng lọc hoạt chất kháng phân bào hướng đích NF- κ B trên dòng tế bào ung thư, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) hoạt hóa dòng tế bào ung thư; b) xác định khoảng nồng độ thử nghiệm của hoạt chất; c) xử lý và cố định tế bào; d) nhuộm huỳnh quang và gắn kháng thể; và e) đánh giá khả năng kháng phân bào.

Trong bước hoạt hóa dòng tế bào ung thư, dòng tế bào ung thư thử nghiệm được sử dụng có thể được phân lập từ mẫu sinh thiết tế bào ung thư hoặc sử dụng dòng tế bào thương mại được phân lập và nuôi cấy để thử nghiệm. Theo các phương án ưu tiên, dòng tế bào ung thư được chọn từ nhóm bao gồm dòng tế bào ung thư gan, tế bào ung thư máu và tế bào ung thư cổ tử cung. Theo các phương án ưu tiên cụ thể, dòng tế bào ung thư được lựa chọn là dòng tế bào ung thư gan, ví dụ tế bào ung thư gan Hep-G2, tế bào ung thư máu, ví dụ tế bào ung thư máu Jukat, tế bào ung thư cổ tử cung, ví dụ tế bào ung thư cổ tử cung HeLa được phân lập.

Dòng tế bào ung thư được nuôi cấy ở 37°C, 5% CO₂ trong môi trường bổ sung kháng sinh penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL và từ 5-10% huyết thanh thai bò (thể tích/thể tích). Quá trình nuôi được thực hiện cho đến khi tế bào phát triển đạt trên 70%. Sau đó, rửa thu tế bào bằng dung dịch đệm PBS 0,1M bổ sung trypsin EDTA 0,05% để thu dịch. Cuối cùng ly tâm và chuẩn độ bằng dung dịch đệm PBS đến khoảng 3x10⁵ tế bào/mL thu dịch tế bào hoạt hóa. Dịch tế bào hoạt hóa này được sử dụng để nuôi cấy để làm đích thử nghiệm để xác định khả năng hướng đích của hợp chất thử nghiệm. Việc chuẩn hóa nồng độ tế bào giúp định lượng tế bào trong quá trình nuôi một cách chính xác để có thể thu được hình ảnh cho từng tế bào một cách rõ nét.

Trong bước xác định khoảng nồng độ thử nghiệm của hoạt chất thử nghiệm, tiến hành bằng cách chuyển khoảng 500µL dịch tế bào hoạt hóa ở trên vào các vi giếng trên đĩa nuôi cấy. Các đĩa nuôi cấy thường sử dụng là đĩa 96 giếng, quá trình nuôi cấy tế bào ung thư trong mỗi giếng trong khoảng 24 giờ trong điều kiện bổ sung hoạt chất thử nghiệm với dải nồng độ từ 1-100 µg/mL trong dimethyl sulfoxit (DMSO 100%).

Khả năng gây chết tế bào của hợp chất thử nghiệm là một yếu tố quyết định đến việc tiến hành nghiên cứu tương tác, vận chuyển, xâm nhập của hoạt chất vào tế bào cũng như xác định cơ chế gây chết tế bào. Theo cách khác, để thử nghiệm thì hợp chất đó có biểu hiện gây chết tốt nhất là trên 85% tế bào trong khoảng nồng độ từ 1 đến 100µg/mL. Hoạt tính gây chết tế bào ở hợp chất thử nghiệm có biểu hiện ức chế sự phát triển của tế bào trên 85% trong khoảng nồng độ từ 5 đến 100µg/mL đối với dạng cặn chiết các hoạt chất thiên nhiên hoặc từ 1 đến 50µg/mL đối với dạng hợp chất

tổng hợp hoặc bán tổng hợp tinh khiết. Ellipticine hoặc paclitaxel (Taxol) trong dimethyl sulfoxit (DMSO) với nồng độ tương ứng được dùng làm chất đối chứng dương. Sản phẩm chuyển hóa dạng tinh thể formazan được hòa tan trong DMSO và đo mật độ quang ở $\lambda = 540/720$ nm.

Khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư ở nồng độ nhất định của chất thử tính theo % so với đối chứng theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ ức chế tế bào (\%)} = [1 - (\text{OD}_{[\text{mẫu}]} / \text{OD}_{[\text{đối chứng (-)}])] \times 100\%$$

“Giá trị IC_{50} ” ($\mu\text{g/mL}$ hoặc μM) hay “ IC_{25} ”, “ IC_{75} ” là nồng độ của mẫu thử mà tại đó ức chế lần lượt 50, 25 hay 75 % sự sống sót của tế bào. Theo quy trình của giải pháp hữu ích các mẫu được sàng lọc trước phải ức chế ≥ 50 % sự sống sót của tế bào và các giá trị IC_{25} , IC_{50} và IC_{75} được xác định, ví dụ bằng cách sử dụng phần mềm TableCurve AISN (Jandel Scientific, San Rafael, CA). Giá trị IC_{50} , mà tại đó hoạt chất thử nghiệm ức chế 50% sự tăng sinh tế bào so với đối chứng được sử dụng làm giá trị ngưỡng thử nghiệm. Khả năng gây chết tế bào ở nồng độ lớn hơn về bản chất không có nhiều ý nghĩa trong việc sàng lọc các hợp chất có thể phát triển làm dược phẩm, ngược lại, nếu nồng độ thấp hơn, khả năng gây độc của hoạt chất quá mạnh, khi đó khó đánh giá được khả năng ức chế tế bào thông qua việc nuôi cấy và phát hiện dựa trên hình ảnh huỳnh quang.

Trong bước xử lý và cố định tế bào, đây là bước quyết định đến chất lượng hình ảnh huỳnh quang thu được. Trong bước này, tiến hành bổ sung 500 μL dịch tế bào hoạt hóa vào vi giếng có bổ sung hoạt chất thử nghiệm có nồng độ pha loãng nhỏ hơn nồng độ IC_{50} trong khoảng thời gian từ 24 đến 48 giờ. Môi trường nuôi cấy được sử dụng là môi trường chuẩn theo hướng dẫn của nhà cung cấp hoặc môi trường nuôi cấy tế bào động vật thông dụng, ví dụ, môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose; Sigma, USA) có bổ sung kháng sinh (penicillin + streptomycin sulfate) và FBS 10 %. Để cố định được tế bào, tránh việc bong tróc, tiến hành bổ sung vào mỗi giếng 100 μL paraformaldehyt 8% (thể tích/thể tích). Theo tỷ lệ này, nồng độ cuối đạt 4% và ủ trong khoảng từ 10-12 phút. Tiếp đó, mỗi giếng được bổ sung 100 μL Triton X100 nồng độ từ 0,1 đến 0,3% trong PBS và ủ trong khoảng 5 đến 10 phút để cố định tế bào.

Trong bước nhuộm huỳnh quang và gắn kháng thể, tiến hành bổ sung 100 μ L thuốc nhuộm bisbenzimit hoặc khoảng từ 300 đến 500 nM thuốc nhuộm 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Theo một phương án ưu tiên, thuốc nhuộm được sử dụng là bisbenzimit với nồng độ 350nM.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó thuốc nhuộm huỳnh quang là 4',6-diamidino-2-phenylindole với nồng độ 350nM. Theo một phương án ưu tiên nữa, thuốc nhuộm huỳnh quang được sử dụng lần lượt là bisbenzimit với nồng độ 350nM và 4',6-diamidino-2-phenylindole với nồng độ 350nM và ngược lại. Nồng độ và loại thuốc nhuộm ảnh hưởng lớn đến chất lượng hình ảnh huỳnh quang thu được. Các tác giả đã tối ưu và nhận thấy rằng, với nồng độ nêu trên, chất lượng hình ảnh thu được là rõ nét, có khả năng sử dụng được để đánh giá sàng lọc hoạt chất hướng đích NF- κ B trên tế bào ung thư.

Sau khi bổ sung thuốc nhuộm huỳnh quang, ủ trong 25 phút và bổ sung vào mỗi giếng 10 μ L sữa bột tách béo 5% trong đệm PBS 0,1M, pH=7,8 trong 20 phút rồi ủ với một lượng tương ứng kháng thể kháng p65 NF- κ B gắn huỳnh quang.

Kháng thể kháng p65 NF- κ B gắn huỳnh quang cho phép định được khả năng gắn kết hướng đích của kháng thể đối với p65 NF- κ B, các kháng thể này được gắn huỳnh quang có khả năng phát quang khi chiếu ánh sáng kích thích với bước sóng xác định. Các chất huỳnh quang này cần có bước sóng khác với bước sóng phát xạ đối với thuốc nhuộm nêu trên.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó kháng thể kháng p65 NF- κ B được gắn huỳnh quang GFP với bước sóng phát quang $\lambda=488$ nm kích thích chuyển vị bởi lipopolysaccharit (LPS) hoặc interleukin-1 (IL-1) với nồng độ tối thiểu 10 ng/mL trong 1 giờ.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó kháng thể kháng p65 NF- κ B còn được gắn huỳnh quang FITC để thu hình ảnh phát huỳnh quang với bước sóng phát xạ $\lambda=518$ nm.

Như vậy, đối với thuốc nhuộm bisbenzimit, sau khi nhuộm sẽ cho hình ảnh huỳnh quang được thu nhận với bước sóng $\lambda=488$ nm, trên cơ sở đó có thể xác định được protein liên kết màng tế bào. Thuốc nhuộm là 4',6-diamidino-2-phenylindole có

hình ảnh huỳnh quang thu nhận với bước sóng kích thích $\lambda=405\text{nm}$ để xác định protein liên kết nhân tế bào.

Như vậy, tùy theo mục đích, có thể xác định được vị trí của từng hình ảnh huỳnh quang trên các giếng. Khi chiếu ánh sáng kích thích với các bước sóng khác nhau vào các giếng sẽ thu được các hình ảnh huỳnh quang khác nhau. Trên cơ sở các hình ảnh này, dựa vào diện tích và vị trí có thể xác định được hình thái tế bào, các đường viền nhân và vị trí gắn kết nhân, vị trí gắn kết màng của hợp chất thử nghiệm đối với tế bào ung thư thông qua kháng thể kháng p65 NF- κ B.

Trong bước đánh giá khả năng kháng phân bào, tiến hành kích thích các giếng bởi các tia sáng kích thích và chụp hình ảnh phát huỳnh quang từ mẫu sau khi được kích thích bởi các đoạn dò gắn huỳnh quang. Bằng cách thu nhận hình ảnh huỳnh quang tế bào trên kính hiển vi quang học với mức phóng đại x20 hoặc x40 với độ phân giải hình ảnh ở các mức $\geq 4,0$ megapixel, tốc độ quét ≥ 100 hình/giây cho phép lập được bản đồ hình ảnh phát quang với màu sắc khác nhau.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó kháng thể kháng p65 NF- κ B được gắn huỳnh quang GFP với bước sóng phát quang $\lambda=488\text{ nm}$ kích thích chuyển vị bởi lipopolysaccharit (LPS) hoặc interleukin-1 (IL-1) với nồng độ tối thiểu 10 ng/mL trong 1 giờ.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó kháng thể kháng p65 NF- κ B còn được gắn huỳnh quang FITC để thu hình ảnh phát huỳnh quang với bước sóng phát xạ $\lambda=518\text{ nm}$.

Để thu nhận hình ảnh phát quang, ánh sáng kích thích được chiếu trong khoảng thời gian phơi sáng 200ms, mỗi lần quét và xử lý ít nhất từ 9 đến 16 vị trí/giếng, thời gian phơi sáng 200 ms, với các bước sóng kích thích lần lượt là $\lambda=488\text{nm}$ (GPF) và $\lambda=405\text{nm}$ (DAPI) tương ứng với hình ảnh liên kết protein tế bào và nhân. Trên cơ sở so sánh cường độ và mật độ quang theo hình ảnh tương ứng với bước sóng phát huỳnh quang, đưa ra kết luận về khả năng kháng phân bào hướng đích NF- κ B đối với các giai đoạn phát triển của tế bào của hoạt chất thử nghiệm.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó việc đánh giá hình thái, diện tích phát huỳnh quang và cường độ phát huỳnh quang trung bình được thực hiện cho ít nhất là 1000 tế bào.

Hình ảnh tế bào và các đích phân tử huỳnh quang được thu nhận bằng hệ thiết bị kính hiển vi tự động và phần mềm ghi/phân tích hình ảnh nội hàm cao. Theo một phương án cụ thể, quy trình giải pháp hữu ích được thực hiện sử dụng hệ thống Olympus scan[^]R (EMBL, Heidelberg, CHLB Đức) ở các vật kính x20 (Plan Semi-Apochromat 20xPH/0.45) hoặc x40 (Semi-Apochromat 40x PH/0.60) với 4 bộ lọc tiêu chuẩn cho các kênh DAPI/FITC/TRICT/CY5 tương ứng.

Phần mềm dựa trên gradient tự động lấy nét có thể điều chỉnh thô và chỉnh tinh được sử dụng để xác định mặt phẳng lấy nét theo kênh DAPI, GFP, FITC và Cy3. Hình ảnh được thu nhận cần sử dụng camera lạnh (CCD camera) để đảm bảo thu được hình ảnh không bị nhiễu ở điều kiện nhiệt cao hoặc tốt nhất là camera cảm biến CMOS hoặc sCMOS, như được sử dụng trong quy trình giải pháp hữu ích camera cảm biến sCMOS (Hamamatsu ORCA-flash 4.0, Nhật Bản), độ phân giải ≥ 4.0 megapixel, tốc độ quét ≥ 100 hình/giây, mỗi lần quét và xử lý ít nhất 9-16 vị trí/giếng.

Sau khi thu nhận được hình ảnh huỳnh quang, kết quả được phân tích off-line, theo quy trình giải pháp hữu ích sử dụng phần mềm scan[^]R Analysis ver.2.7.2. Phần mềm này cho phép phân tích tự động dựa trên các thông số thiết lập cho các đối tượng phân tử đích cần đánh giá. Để xác định và phân tích hình ảnh huỳnh quang, đối tượng được định dạng dựa trên công thức đẳng chu:

$$f_{circ} = \frac{4\pi A}{P^2}$$

Trong đó, f_{circ} : hệ số định dạng đối tượng phân tích (dạng cầu hoặc hình sao); A : diện tích; P : chu vi.

Thiết lập thông số lựa chọn viền hình ảnh (Selectivity) theo hình ảnh thực từ tín hiệu huỳnh quang thu được. Đồng thời xác định kích thước tối đa khung đối tượng phân tích (Max. object size) sao cho xác định tối đa các đối tượng, mặt khác loại bỏ các nhiễu tín hiệu không đủ chất lượng phân tích.

Để phân tích hoạt tính kháng phân bào, các điểm kiểm soát của chu kỳ tế bào được xác định (G_1 , S và G_2/M). Các tế bào apoptosis được xác định qua tỷ lệ tín hiệu Annexin V-FITC và PI đồng thời với phân tích hình dạng tế bào đặc trưng ở giai đoạn apoptosis.

Mỗi tế bào trong trường phân tích được xác định số lượng và phân định bởi đường viền quanh nhân. Để giảm tín hiệu nhiễu vùng tế bào chất, vòng đường viền thứ hai phía trong được tạo khi phân tích định lượng. Lượng protein xác định ở vùng tế bào chất và trong nhân là kết quả trung bình tín hiệu huỳnh quang đo được theo diện tích của mỗi vùng phân định. Khi kích thích chuyển vị protein bởi cytokine hay LPS, tín hiệu huỳnh quang vùng tế bào chất giảm và tăng lên trong nhân do có sự di chuyển của protein từ vùng tế bào chất dẫn tới thay đổi tỷ lệ protein trong nhân/protein tế bào chất (Nuc/Cyto). Việc phân tích có thể thực hiện bởi sự trợ giúp của phần mềm cho phép thiết lập định rõ vùng nhân và đường viền bằng phương pháp giới hạn theo động học (dynamic threshold) qua sự thay đổi tín hiệu huỳnh quang so với tín hiệu nền.

Dựa trên kết quả phân tích tín hiệu huỳnh quang thu được, tiến hành lập biểu đồ, đánh giá và đưa ra kết quả đối với khả năng gắn kết đặc hiệu của tế bào đối với tế bào ung thư theo mức độ gắn kết đặc hiệu kháng thể kháng p65 NF- κ B.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Hoạt hóa tế bào ung thư và xử lý với chất thử nghiệm

Tế bào ung thư Hep-G2 và HeLa từ nhà cung cấp được nuôi cấy ở 37°C trong tủ cấp CO₂ 5 % trên môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) bổ sung kháng sinh 100 U/mL penicillin + 100 μ g/mL streptomycin và FBS 10 %. Sau khi tế bào phát triển đạt trên 70 %, loại bỏ môi trường cũ và rửa với dung dịch đệm phosphat PBS 0,1 M; bổ sung trypsin-EDTA 0,05 % để tách tế bào bám dính khỏi đáy đĩa nuôi cấy. Dịch tế bào được chuyển sang ống falcon 15 mL có chứa 4-5 mL dịch môi trường mới và ly tâm 300 vòng/phút. Sau khi loại bỏ phần dịch, phần cặn tế bào được trộn với môi trường và được chuyển sang bình nuôi cấy mới để sẵn sàng cho các thử nghiệm hoạt tính.

Xác định nồng độ thử nghiệm

Các mẫu thử nghiệm bao gồm M11-7cc, Indox, MurA và Zer4 cần đánh giá hoạt tính tiềm năng ức chế tế bào ung thư được xác định giá trị IC₂₅, IC₅₀ và IC₇₅ (µg/mL) để làm căn cứ cho nồng độ sử dụng trong đánh giá hoạt tính đích phân tử. Theo đó, tế bào được nuôi cấy trên các tấm vi giếng 96 giếng và ủ với các mẫu thử được pha loãng theo dải nồng độ từ 100 µg/mL đến 1 µg/mL, mỗi nồng độ lặp lại 3 lần với bước pha loãng 1µg/mL. Paclitaxel (Taxol) được pha trong dung dịch dimethyl sulfoxit (DMSO) với tỷ lệ tương ứng được dùng làm đối chứng. Sản phẩm chuyển hóa dạng tinh thể formazan được hòa tan trong DMSO và đo mật độ quang ở $\lambda = 540/720$ nm.

Khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư ở nồng độ nhất định của chất thử tính theo % so với đối chứng theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ ức chế tế bào (\%)} = [1 - (\text{OD}_{[\text{mẫu}]} / \text{OD}_{[\text{đối chứng (-)}]})] \times 100\%$$

Kết quả xác định giá trị IC được xác định bằng cách sử dụng phần mềm TableCurve AISN Software (Jandel Scientific, San Rafael, CA), kết quả được thể hiện trên bảng sau:

Mẫu thử	IC ₇₅ (µg/mL)		IC ₅₀ (µg/mL)		IC ₂₅ (µg/mL)	
	HeLa	Hep-G2	HeLa	Hep-G2	HeLa	Hep-G2
Paclitaxel	31,58	36,96	6,57	9,95	3,13	3,43
M11-7cc	-	>50	-	35,55	-	5,60
Indox	>50	>50	38,09	35,17	12,23	9,99
MurA	45,89	46,10	21,30	21,50	10,76	7,81
Zer4	27,11	41,57	9,07	17,10	3,15	4,11

Theo đó, nồng độ thử nghiệm đối với Indox, M11-7cc, MurA và Zer4 được xác định theo từng dòng tế bào và tốt nhất được lựa chọn để đánh giá ở mức nồng độ IC₅₀ tương ứng.

Cố định tế bào và gắn huỳnh quang

Để đánh giá khả năng tương tác với tế bào của mẫu thử nghiệm, tế bào được nuôi cấy trên đĩa vi giếng gồm 96 giếng trên môi trường DMEM như nêu trên có bổ sung 100 µL dung dịch PFA 8% vào các giếng (để nồng độ cuối PFA là 4 %) ủ trong

10 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp đó bổ sung vào mỗi giếng 10 μ L sữa bột tách béo 5% trong đệm PBS 0,1M, pH=7,8 trong 20 phút rồi ủ với một lượng tương ứng kháng thể kháng p65 NF- κ B gắn huỳnh quang.

Tế bào sau khi cố định có thể giữ trong PBS 1x ở 4 °C trong vòng 1 tuần. Bọc miệng giếng bằng parafilm và bổ sung thêm PBS nếu thấy dung dịch bay hơi.

Thẩm thấu tế bào bằng cách bổ sung 100 μ L PBST 0,3% (Triton X-100- 0,3% trong PBS) vào mỗi giếng, ủ 8 phút ở nhiệt độ phòng.

Bổ sung 100 μ L dung dịch nhuộm Hoechst (DAPI) 300nM (có thể tăng lên 350-400 nm) vào mỗi giếng và ủ trong 25 phút.

Để phát hiện chuyên vị nội bào NF- κ B được kích thích bởi cytokin tiền viêm, quy trình giải pháp hữu ích sử dụng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang với kháng thể sơ cấp anti-p65 NF- κ B và liên kết huỳnh quang xanh phát hiện trên kênh GFP, kích thích ở λ =488 nm. Đồng thời, nhân tế bào được nhuộm với huỳnh quang Hoechst (DAPI), kích thích ở λ =405 nm. Kết quả hình ảnh huỳnh quang được chụp với độ phóng đại 20x như được thể hiện trên Hình 1, trong đó (A) hình ảnh huỳnh quang gắn với tiểu đơn vị NF- κ B p65 (GFP-p65) cho hình ảnh màu xanh lá, (B) ảnh chụp tín hiệu huỳnh quang ADN nhân tế bào (DAPI) cho hình ảnh màu xanh thẫm và (C) là hình ảnh chụp chồng hình ảnh huỳnh quang.

Ví dụ 2: Thử nghiệm hoạt tính cảm ứng gây chết tế bào

Mẫu tế bào ung thư hoạt hóa thu được từ Ví dụ 1 được sử dụng trong thử nghiệm hoạt tính cảm ứng gây chết tế bào. Môi trường nuôi cấy được loại bỏ và rửa tế bào với 5 mL dung dịch PBS. Làm bong tế bào khỏi bề mặt bám dính bằng cách bổ sung 0,7 mL trypsin 0,25% vào đĩa petri hoặc bình nuôi cấy và ủ trong khoảng 8 phút.

Tiếp đó, bổ xung 1,5 mL môi trường vào đĩa nuôi cấy đã được xử lý với trypsin, sau đó dùng pipet hút dung dịch chứa tế bào vào 2 ống eppendorf 15 mL mới, ly tâm 1000 vòng/phút trong 2 phút. Loại bỏ môi trường phía trên, bổ sung 900 μ L môi trường vào mỗi ống, 1 ống đem ngủ đông bằng cách bổ sung 100 μ L DMSO và 1 ống để làm thí nghiệm. Tiến hành đếm tế bào trên buồng đếm hồng cầu để chuẩn hóa nồng độ tế bào đến $3,5 \times 10^5$ tế bào/mL.

Sử dụng pipet hút 500 μL vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng. Chuyển đĩa tế bào vào tủ ấm 37 °C và ủ trong 24 giờ.

Sau thời gian ủ để tế bào loại bỏ môi trường cũ từ tất cả các giếng, bổ sung 450 μL môi trường vào mỗi giếng. Hút 50 μL các mẫu vào các giếng trên đĩa 96 giếng. Ủ đĩa tế bào đã được bổ sung mẫu được pha với nồng độ IC_{50} trong tủ ấm trong 24 - 48 giờ theo chu trình phát triển của mỗi loại tế bào.

Chuyển môi trường từ các giếng thử vào các ống Eppendorf, bổ sung 200 μL trypsin vào các mẫu và ủ trong khoảng 10 phút đến khi các tế bào được tách hoàn toàn khỏi giếng và thu dịch vào các ống chứa dịch môi trường tương ứng đã hút.

Li tâm 1.500 vòng/phút trong 5 phút đổ dịch (giữ lại dịch để kiểm tra). Rửa bằng PBS ly tâm 1500 vòng/phút trong 5 phút (giữ lại cặn để kiểm tra).

Bổ sung 25 μL dung dịch nhuộm vào các ống và trộn đều, hút 50 μL mẫu đưa vào mỗi giếng trên phiên vi lượng, mỗi mẫu lên 5 giếng để phân tích. Ủ 10-15 phút ở 37°C.

Thu hình ảnh và phân tích ở kênh FITC với Annexin V và Cy3 với PI ở các bước sóng kích thích/phát xạ tương ứng cho các mẫu huỳnh quang chỉ thị.

Tế bào xử lý với mẫu thử nghiệm được nhuộm huỳnh quang. Sau khi thu nhận được hình ảnh huỳnh quang, kết quả được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm phân tích nội hàm cao, theo quy trình giải pháp hữu ích sử dụng phần mềm scan[^]R Analysis ver.2.7.2. Phần mềm này cho phép phân tích tự động dựa trên các thông số thiết lập cho các đối tượng phân tử đích cần đánh giá. Để xác định và phân tích hình ảnh huỳnh quang, đối tượng được định dạng dựa trên công thức đẳng chu:

$$f_{circ} = \frac{4\pi A}{P^2}$$

Trong đó, f_{circ} : hệ số định dạng đối tượng phân tích (dạng cầu hoặc hình sao); A : diện tích; P : chu vi.

Thiết thông số lựa chọn viền hình ảnh (Selectivity) theo hình ảnh thực từ tín hiệu huỳnh quang thu được đồng thời xác định kích thước tối đa khung đối tượng phân tích (Max. object size) sao cho xác định tối đa các đối tượng, mặt khác loại bỏ các

nhiều tín hiệu không đủ chất lượng phân tích. Như thể hiện trên Hình 2, nếu thông số viên phù hợp (Selectivity: 0,45) nhưng kích thước tối đa nhỏ hơn rất nhiều kích thước hình ảnh thực (Max. object size: 50) dẫn tới vùng phân tích của đối tượng bị hạn chế (sẽ dẫn đến sai số lớn khi phân tích kết quả) Hình 2A. Ngược lại, nếu hệ số viên không phù hợp (ví dụ, Selectivity: 0.20) sẽ xuất hiện nhiều vùng tín hiệu nhiễu (hình 2B). Trong thử nghiệm này, các thông số phù hợp được xác định với Selectivity: 0.45 và Max. object size: 100 (Hình 2C).

Bảng 1. Các thông số tín hiệu huỳnh quang theo nồng độ bisbenzimit (Hoechst 33342) đối với dòng tế bào ung thư vú MCF-7.

Nồng độ bisbenzimidide (nM)	Hệ số định dạng đối tượng phân tích (f_{circ})	Cường độ huỳnh quang tổng (a.u.)*	Cường độ h. quan trung bình (a.u.)*
200	1,0671875	39046	80,08243
300	1,0307914	47921	102,17697
350	1,0382137	101637	216,77879
400	1,0205070	137002	272,36978
500	1,0247661	146876	290,99258
800	1,0357433	218056	388,69162
1000	1,0157869	237014	465,64636
1500	1,0464288	558937	716,58588
2000	1,0448981	731946	1209,8281
3000	1,0558139	748090	1605,3434

* Đơn vị cường độ huỳnh quang (arbitrary unit)

Nồng độ chất nhuộm huỳnh quang có liên quan trực tiếp đến chất lượng hình ảnh thu được (và do vậy ảnh hưởng đến kết quả phân tích đầu ra). Ở đây bisbenzimit được thử nghiệm ở dải nồng độ từ 200 ÷ 3000 nM, quan sát hình ảnh sau 48 giờ với điều kiện thời gian phơi sáng 200 ms trên hệ thiết bị hiển vi tự động Olympus scan[^]R (Bảng 1 & Hình 3). Ở nồng độ 200 nM chỉ các tế bào có tín hiệu mạnh (ví dụ, đang trong giai đoạn phân bào) có thể hiện rõ trong khi phần lớn tín hiệu thu được yếu. Tín hiệu thu được cho hình ảnh tốt khi sử dụng nồng độ bisbenzimit từ 350 nm. Ở các nồng độ 350 đến 500 nM chất lượng hình ảnh thu được tốt và không có sự khác biệt

đáng kể, do vậy nồng độ 350 là tốt nhất để có thể thu được hình ảnh rõ nét. Ở các nồng độ từ 800 và 1000 nM có sự thay đổi mạnh về cường độ tín hiệu huỳnh quang khi phân tích ở kênh DAPI và hình ảnh vẫn phân tách rõ, có thể phân tích được khi nồng độ đến 1000 nM. Tuy nhiên ở nồng độ bisbenzimidazole cao hơn tín hiệu huỳnh quang không đều và xuất hiện các vùng nhòe trên hình ảnh. Bisbenzimidazole (Hoechst 33342) không gây độc tế bào ở nồng độ nghiên cứu đến 3000 nM (không có ý nghĩa thống kê).

Ví dụ 4: Xác định tế bào thể đa bội, phân tích dữ liệu thử nghiệm hoạt tính kháng phân bào và gây chết tế bào

Để đánh giá tế bào đa bội, thử nghiệm được thực hiện như trên Ví dụ 2, bên cạnh xác định các tế bào thể đa bội, kích thước và hình dạng tế bào cũng có thể được phân tích cho các đánh giá tiếp theo về các giai đoạn phát triển của tế bào. Hệ số định dạng đối tượng phân tích f_{circ} (theo như Ví dụ 3), trong một số trường hợp, cho phép xác định được trạng thái của tế bào nếu đặc tính liên quan đến hình dạng chung của tế bào.

Dựa trên kết quả hình ảnh scan[^]R Analysis cho phép phân tích và trích xuất kết quả trên từng giếng của mẫu phân tích hoặc tập hợp của nhiều giếng tương ứng với các mẫu thử khác nhau phân tích theo trục XY. Điều này có ý nghĩa khi phân tích sự tương quan và/hoặc hoạt tính hiệp đồng của nhóm các hợp chất. Hình 4 là trên biểu đồ phân bố vùng tế bào sống-chết qua tương quan giữa hình dạng - kích thước đối tượng phân tích của tất cả các (6) mẫu thử và được liên kết cho các phân tích hoạt tính kháng phân bào (cell-cycle arrest) của từng mẫu thử riêng biệt (Hình 5).

Như ở phương pháp flow cytometry, các tế bào ở giai đoạn sub-G₁ có thể được sử dụng cho định lượng apoptosis. Ngoài ra, một căn cứ khác để định lượng apoptosis là sự phân hủy hay các phân mảnh ADN trong nhân. Không giống như hầu hết các tế bào ở giai đoạn G₁ và G₂ của chu kỳ tế bào thể hiện sự đồng nhất của ADN trong nhân với hình ảnh dạng tròn, các tế bào đang trong giai đoạn phân chia (mitosis) và tế bào chết theo chương trình (apoptosis) cho thấy sự thay đổi khác nhau về hình dạng và cường độ tín hiệu đối với bisbenzimidazole Hoechst 33342 (Hình 6). Trong quy trình giải pháp hữu ích, việc xác định các tế bào thể tứ bội 4n và đối tượng có hình dạng dài

dựa trên hình dạng biến đổi hình ảnh để định lượng các tế bào trong giai đoạn phân bào phân bào. Tương tự, bằng việc tính toán độ lệch chuẩn (SD) cường độ tín hiệu bisbenzimit Hoechst 33342 của đối tượng phân tích, sự thay đổi tín hiệu lớn này có thể dùng cho định lượng khả năng gây chết tế bào. Theo kết quả xử lý cho thấy các tế bào apoptosis trong mẫu được xác định tương đương 1,6 % tổng tế bào. Như vậy, phân tích apoptosis dựa trên đồng thời cường độ tín hiệu huỳnh quang và phân tích hình ảnh rõ ràng cho thấy độ chính xác cao hơn và tính ưu việt so với các phương pháp khác (chỉ dựa trên cường độ tín hiệu huỳnh quang).

Phân tích vùng tế bào các pha G_1 và G_2

Để xác định các pha tế bào, tiến hành phân tích các tập hợp đối tượng/sự kiện sử dụng kênh lọc DAPI (cho ADN) và Cy3 (cho protein) khi phân tích trên thiết bị Olympus scan[^]R nhằm xác định được % số tế bào ở pha G_1 và G_2 từ đó đánh giá khả năng cảm ứng điều hòa chu kỳ tế bào bởi thuốc hoặc chất thử.

Ở thời gian phơi sáng 200 ms và ngưỡng phân tích Threshold = 900, đối tượng phân tích chính Main object được xác định đối với bisbenzimit Hoechst 33342 với khoảng kích thước $100 \div 10.000$ pixel. Trong đó mỗi pixel tương đương $0,1 \mu m^2$ khi thu hình ảnh ở vật kính (VK) x20 (đường kính tế bào trung bình $\sim 20 \mu M$).

Các điều kiện phân tích được tối ưu: chế độ hiệu chỉnh nền Background cho kênh DAPI với giá trị kích thước lựa chọn là khoảng 100 (%) trên cho số lượng tế bào xác định cho phân tích là ít nhất 1.000 tế bào. Modul cho đối tượng chính trên kênh DAPI sử dụng chế độ dò tính theo đường viền (Edge detection). Đồ thị tương quan Area và Mean Intensity DAPI cho kết quả thu được hai vùng. Vùng phía dưới được xác định là vùng tế bào ở pha G_1 , trong khi đó vùng phía trên có cường độ tín hiệu bisbenzimit Hoechst 33342 mạnh thể hiện tế bào ở pha G_2 .

Ví dụ 5: Đánh giá hoạt tính kháng phân bào của thuốc và mẫu thử

Để đánh giá cơ chế tác động của chất thử lên các đích phân tử, mẫu hoạt tính tiềm năng được sàng lọc trước hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào ung thư theo phương pháp MTT, đồng thời qua đó xác định giá trị IC_{25} , IC_{50} và IC_{75} làm căn cứ sử dụng nồng độ chất cho các test thử tiếp theo. Ví dụ 5 mô tả quy trình sàng lọc và đánh giá hoạt tính kháng phân bào của một số mẫu thuốc và mẫu hợp chất thiên nhiên tiềm

năng. Từ kết quả sàng lọc hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào bằng phương pháp MTT (Hình 8 & Bảng 2), ở đây hợp chất zerumbon (ký hiệu Zer4) được lựa chọn cho nghiên cứu đánh giá hoạt tính kháng phân bào trên dòng HeLa. Hợp chất Zer4 là một sesquiterpene cấu trúc đơn vòng được phân lập từ tinh dầu cây gừng *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. Hợp chất Zer4 đã được chứng minh là có nhiều tác dụng dược lý bao gồm hoạt tính kháng khuẩn, hạ sốt, chống co thắt, chống co giật, chống oxy hóa, chống ung thư, kháng viêm, giảm đau, chống dị ứng, kháng angiogen, chống kết tập tiểu cầu, chống đông máu và hoạt tính bảo vệ gan.

Bảng 2: Giá trị IC₂₅, IC₅₀ và IC₇₅ (µg/mL) của các mẫu hoạt tính tiềm năng trên dòng tế bào ung thư gan (Hep-G2) và ung thư cổ tử cung (HeLa).

Mẫu thử	IC ₇₅ (µg/mL)		IC ₅₀ (µg/mL)		IC ₂₅ (µg/mL)	
	HeLa	Hep-G2	HeLa	Hep-G2	HeLa	Hep-G2
Paclitaxel	31,58	36,96	6,57	9,95	3,13	3,43
M11-7cc	-	>50	-	35,00	-	5,60
Indox	>50	>50	38,09	35,18	12,23	9,99
MurA	45,89	46,10	21,30	21,50	10,76	7,81
Zer4	27,11	41,57	9,07	17,10	3,15	4,11

(-): không xác định

Theo Ví dụ thực hiện, hoạt tính kháng phân bào trên dòng tế bào HeLa của chất thử Zer4 (9,07 µg/mL) được đánh giá sử dụng quy trình kỹ thuật phân tích hình ảnh HCS trên thiết bị ghi ảnh tự động hiển vi huỳnh quang Olympus scan^R. Tế bào được ủ 24 giờ với chất thử, nhuộm bisbenzimidazole Hoechst 33342 (350 nM) và ghi hình ảnh ở VK x20 trên kênh DAPI. Phân tích vùng tế bào các pha G₁ và G₂ được thực hiện như mô tả ở Ví dụ 4. Kết quả phân tích hình ảnh nhuộm ADN nhân tế bào cho thấy vùng “cloud” phía dưới (màu xanh lục) là vùng các tế bào với cường độ huỳnh quang thấp (tế bào ở pha G₁) và vùng trên (màu xanh thẫm) thể hiện vùng với cường độ DAPI mạnh là các tế bào ở pha G₂/M (Hình 9).

Mẫu Zer4 biểu hiện hoạt tính kháng phân bào (cell-cycle arrest) ở pha G₂/M trên dòng tế bào HeLa thể hiện qua lượng tế bào tại pha này tăng lên đáng kể khi xử lý với

hợp chất Zer4, trong khi pha G₁ thay đổi theo hướng giảm. Cụ thể lượng tế bào ở mẫu có xử lý 48 giờ với Zer4 là 47,21 % ở pha G₁ và 36,93 % ở pha G₂/M so với mẫu đối chứng (tế bào không xử lý với chất thử) lần lượt là G₁: 52,15 % và G₂/M: 23,31 % (Hình 10). Các kết quả nghiên cứu công bố trên đây chủ yếu được phân tích bằng kỹ thuật flow cytometry, do vậy kết quả đánh giá hoạt tính kháng phân bào của Zer4 dựa trên phân tích hình ảnh huỳnh quang HCS trong nghiên cứu này cho thấy sự phù hợp của phương pháp HCS trong đánh giá hoạt tính có liên quan, đồng thời cho thấy hoạt tính hướng đích đa dạng của hợp chất sesquiterpene Zer4.

Ví dụ 6: Phân tích hình ảnh chuyển vị NF-κB

Để phát hiện NF-κB kích hoạt bởi IL-1, quy giải pháp hữu ích sử dụng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang với kháng thể sơ cấp anti-p65 NF-κB và liên kết huỳnh quang xanh phát hiện trên kênh GFP như được mô tả ở Ví dụ 1.

Trước hết, vùng tín hiệu nhân tế bào được khur trú sử dụng mrur trong các thuốc nhuộm huỳnh quang đặc hiệu Hoechst, DAPI hoặc DRAQ5. Nhân tế bào được xác định theo phân vùng hình ảnh phân tích (mask), sau đó kỹ thuật chồng hình ảnh thứ hai (mask overlay/merge) được tạo từ viền bao quanh toàn bộ tế bào hoặc vùng giới hạn nằm trong tế bào chất. Nhờ đó NF-κB gắn huỳnh quang có thể được định lượng qua phân vùng thứ hai này (nhân hoặc/và tế bào chất). Trong sàng lọc các chất có hoạt tính, sử dụng cường độ tín hiệu vùng nhân và tế bào chất cũng có thể phát hiện đồng thời các hợp chất có huỳnh quang trùng hoặc gần với phổ của chất dò (kit nhuộm) tương ứng sử dụng khi phát triển phương pháp thực nghiệm. Khi đó những hợp chất này được đưa vào nhóm mẫu "dương tính giả" (false positive) và cần xác định mức tín hiệu "tự phát huỳnh quang" trong tế bào khi có và không có mặt của chất dò.

Mỗi tế bào trong trường phân tích được xác định số lượng và phân định bởi đường viền quanh nhân. Để giảm tín hiệu nhiễu vùng tế bào chất, vòng đường viền thứ hai phía trong được tạo khi phân tích định lượng. Lượng protein xác định ở vùng tế bào chất và trong nhân là kết quả trung bình tín hiệu huỳnh quang đo được theo diện tích của mỗi vùng phân định. Như vậy trước khi kích thích tế bào, vùng tế bào chất sẽ có tín hiệu huỳnh quang xanh mạnh (GFP) so với ở vùng nhân. Khi kích thích

chuyển vị protein bởi cytokine, tín hiệu huỳnh quang vùng tế bào chỉ giảm và tăng lên trong nhân do có sự di chuyển của protein từ vùng tế bào chất, đồng nghĩa với tỷ lệ Nuc/Cyto tăng. Cần lưu ý rằng, việc đo/quan sát từ hướng trên hoặc dưới phiên tế bào có thể có hiện tượng chồng lấn do các vùng nhân trùng nhau ở các tế bào khác phía trên hay dưới nó, do vậy phân tích yêu cầu kỹ thuật quét lớp và quan sát theo hướng cạnh tế bào.

Để xác định sự chuyển vị NF- κ B, đối tượng phân tích chính (Main Object) được lựa chọn là vùng ADN nhân tương ứng với kênh tín hiệu DAPI; đối tượng phụ (Sub-Object) là phức p65-GFP phát hiện trên kênh GFP ở tín hiệu hiệu tế bào chất được đặt là “CytoI” và Sub-Object thứ hai được lựa chọn là vùng nhân “NucCore”. Tối ưu các thông số trên phần mềm phân tích scan^R Analysis, đường viền giữa Sub-Object và Main Object với khoảng cách là -1 và độ rộng = 1 cho hình ảnh phân tách giữa các đối tượng tốt nhất (Hình 3). Sub-Object thứ hai (“NucCore”, kênh GFP) là phần bên trong đối tượng Main Object với khoảng cách mặc định -100, độ rộng = 98 (Hình 11).

Các tế bào không chỉ được nhuộm với kháng thể đặc hiệu p65 để xác định NF- κ B ở mỗi tế bào riêng biệt mà còn được nhuộm với kit đặc hiệu để xác định nhân của tất cả tế bào trong giếng hay vùng phân tích. Một phần mềm phân tích nội hàm cao (vd. Olympus scan^R Analysis) cho phép định rõ vùng nhân và đường viền bằng phương pháp giới hạn theo động học (dynamic threshold) qua sự thay đổi tín hiệu huỳnh quang so với tín hiệu nền. Theo đó khi kích thích tế bào HeLa với IL-1 10 ng/mL và có sự chuyển vị của protein tiểu đơn vị p65, vùng xanh đậm được xác định trong nhân với vùng giới hạn là đường màu xanh và vùng tế bào chất nằm giữa đường phân định của nhân và đường viền màu đỏ như ở Hình 12 A&B.

Ví dụ 7: Thử nghiệm hoạt tính ức chế chuyển vị NF- κ B trên tế bào HeLa

Hợp chất ký hiệu SHTN-4 được đánh giá khả năng điều hòa/ức chế yếu tố kappa B (NF- κ B) trên TB ung thư cổ tử cung HeLa dựa trên sự chuyển vị NF- κ B (p65 gắn với protein huỳnh quang xanh GFP) từ bào tương (trạng thái không hoạt động) vào trong nhân (trạng thái hoạt động) bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang và thu nhận, phân tích hình ảnh nội hàm cao như mô tả ở Ví dụ 1 và 6. Kết quả phân tích cho thấy 2 vùng “clouds” tương ứng với nồng độ p65 trong bào tương cao so với trong nhân

TB (“negative”), trong khi ở mẫu đối chứng tín hiệu huỳnh quang vùng tế bào chất thấp do lượng lớn p65 di chuyển vào nhân (“positive”) sau khi kích hoạt với IL-1. Theo đó nồng độ NF- κ B trong bào tương cao (82 %) sau khi xử lý tế bào HeLa với SHTN-4 (25 μ g/mL) so với mẫu không xử lý (19,4 %). Kết quả logic là nồng độ NF- κ B trong nhân được xác định đối với mẫu xử lý SHTN-4 chỉ ở mức 8,2 % so với 70 % ở mẫu đối chứng (Hình 13).

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đưa ra một quy trình sàng lọc hoạt chất kháng phân bào hướng đích NF- κ B để làm cơ sở trong việc sàng lọc các hoạt chất tiềm năng sử dụng để phát triển thuốc chống ung thư và/hoặc chống viêm trên cơ sở phân tích tính đặc hiệu đích NF- κ B trên tế bào ung thư. Quy trình này dựa trên miễn dịch huỳnh quang sử dụng trong phân tích đánh giá đa thông số với các tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu và chuẩn hóa được tín hiệu phân tích cho phép thu được kết quả tin cậy, ít nhiễu.

Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép rút ngắn thời gian thử nghiệm cũng như chi phí trong việc nghiên cứu, sàng lọc các hoạt chất tiềm năng ứng dụng trong dược phẩm. Bằng cách kết hợp với kỹ thuật phân tích hình ảnh, giải pháp cho phép xác định được chính xác vị trí liên kết của hoạt chất thử nghiệm lên tế bào, từ đó xây dựng được chiến lược phát triển dược phẩm đối với hoạt chất tiềm năng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sàng lọc hoạt chất kháng phân bào hướng đích NF- κ B trên dòng tế bào ung thư, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) hoạt hóa dòng tế bào ung thư bằng cách nuôi cấy dòng tế bào ung thư ở 37°C, 5% CO₂ trong môi trường bổ sung kháng sinh penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL và từ 5-10% huyết thanh thai bò (thể tích/thể tích) đến khi phát triển đạt trên 70%, rửa thu tế bào bằng dung dịch đệm PBS 0,1M bổ sung trypsin EDTA 0,05%, sau khi ly tâm, chuẩn độ đến khoảng 3×10^5 tế bào/mL thu dịch tế bào hoạt hóa;

b) xác định khoảng nồng độ thử nghiệm của hoạt chất thử nghiệm bằng cách chuyển khoảng 500µL dịch tế bào hoạt hóa vào các vi giếng trên đĩa nuôi cấy, tiếp đó nuôi cấy tế bào ung thư trong 24 giờ trong điều kiện bổ sung hoạt chất thử nghiệm với dải nồng độ từ 1-100 µg/mL trong dimethyl sulfoxit (DMSO 100%) và đối chứng là palitaxel hoặc elliptixin, sau khi nuôi cấy 24 giờ, tiến hành đo mật độ quang để xác định giá trị IC₅₀ mà tại đó hoạt chất thử nghiệm ức chế 50% sự tăng sinh tế bào so với đối chứng;

c) xử lý và cố định tế bào bằng cách bổ sung 500µL dịch tế bào hoạt hóa vào vi giếng có bổ sung hoạt chất thử nghiệm có nồng độ pha loãng nhỏ hơn nồng độ IC₅₀ trong khoảng thời gian từ 24 đến 48 giờ, sau khi bổ sung vào mỗi giếng 100µL paraformaldehyt 8% (thể tích/thể tích) và ủ trong khoảng từ 10-12 phút, sau đó mỗi giếng được bổ sung 100µL Triton X100 nồng độ từ 0,1 đến 0,3% trong PBS và ủ trong khoảng 5 đến 10 phút để cố định tế bào;

d) nhuộm huỳnh quang và gắn kháng thể bằng cách bổ sung 100µL thuốc nhuộm bisbenzimidazol hoặc khoảng từ 300 đến 500 nM thuốc nhuộm 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) và ủ trong 25 phút, tiếp đó bổ sung vào mỗi giếng 10µL sữa bột tách béo 5% trong đệm PBS 0,1M, pH=7,8 trong 20 phút rồi ủ với một lượng tương ứng kháng thể kháng p65 NF- κ B gắn huỳnh quang; và

e) đánh giá khả năng kháng phân bào bằng cách thu nhận hình ảnh huỳnh quang tế bào trên kính hiển vi quang học với mức phóng đại x20 hoặc x40 với độ phân giải hình ảnh ở các mức $\geq 4,0$ megapixel, tốc độ quét ≥ 100 hình/giây, thời gian phơi sáng

200ms, mỗi lần quét và xử lý ít nhất 9-16 vị trí/giếng với các bước sóng kích thích lần lượt là $\lambda=488\text{nm}$ (GPF) và $\lambda=405\text{nm}$ (DAPI) tương ứng với hình ảnh liên kết protein tế bào và nhân, trên cơ sở so sánh cường độ và mật độ quang theo hình ảnh tương ứng với bước sóng phát huỳnh quang, đưa ra kết luận về khả năng kháng phân bào hướng đích NF- κ B đối với các giai đoạn phát triển của tế bào của hoạt chất thử nghiệm.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó hoạt chất kháng phân bào cần sàng lọc có biểu hiện ức chế sự phát triển của tế bào trên 85% trong khoảng nồng độ từ 5 đến $100\mu\text{g/mL}$ đối với dạng cặn chiết các hoạt chất thiên nhiên hoặc từ 1 đến $50\mu\text{g/mL}$ đối với dạng hợp chất tổng hợp hoặc bán tổng hợp tinh khiết.

3. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, trong đó thuốc nhuộm là bisbenzimit với nồng độ 350nM và hình ảnh huỳnh quang được thu nhận với bước sóng kích thích $\lambda=488\text{nm}$ để xác định protein liên kết màng tế bào.

4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó thuốc nhuộm là 4',6-diamidino-2-phenylindole với nồng độ 350nM và hình ảnh huỳnh quang được thu nhận với bước sóng kích thích $\lambda=405\text{nm}$ để xác định protein liên kết nhân tế bào.

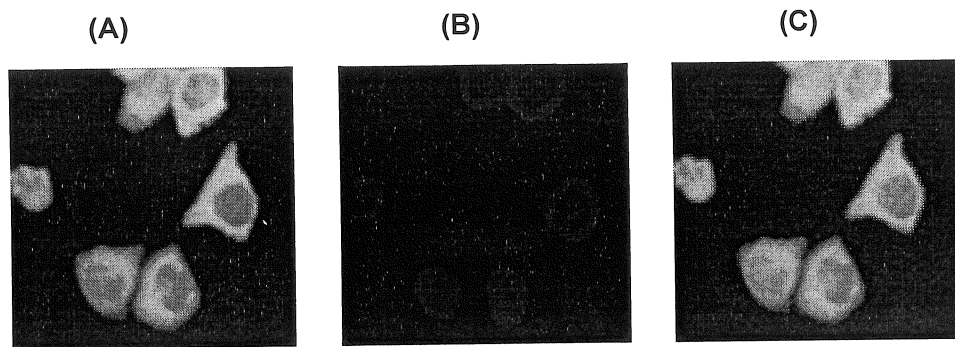
5. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó việc đánh giá hình thái, diện tích phát huỳnh quang và cường độ phát huỳnh quang trung bình được thực hiện cho ít nhất là 1000 tế bào.

6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó dòng tế bào ung thư được chọn từ nhóm bao gồm dòng tế bào ung thư gan, tế bào ung thư máu và tế bào ung thư cổ tử cung.

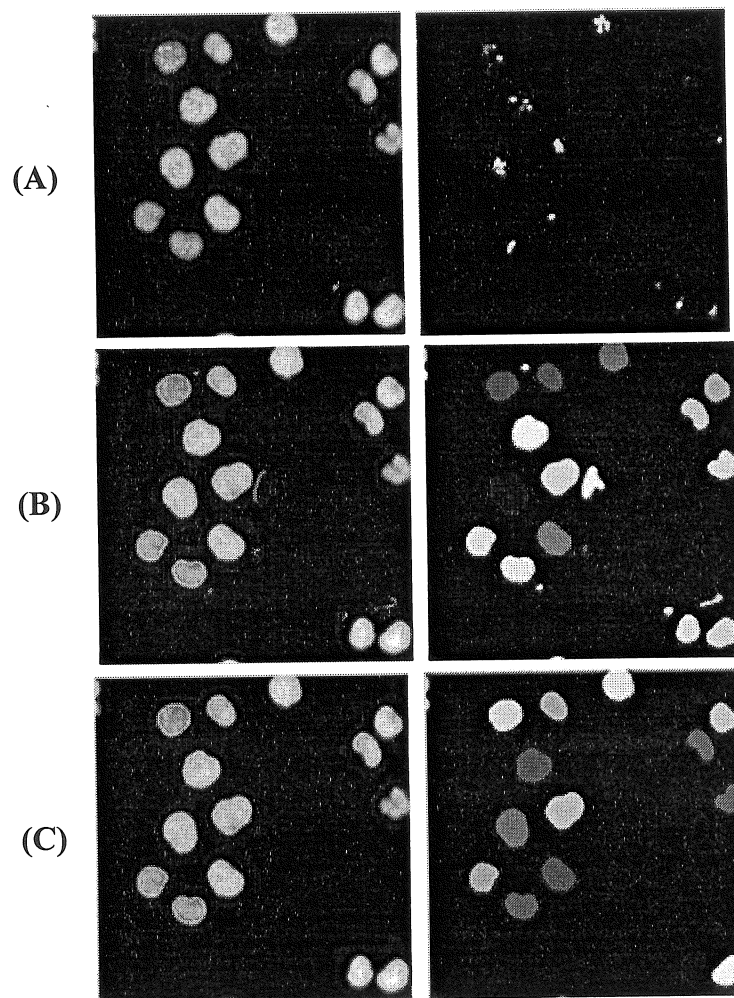
7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể kháng p65 NF- κ B được gắn huỳnh quang GFP với bước sóng kích thích $\lambda=488\text{ nm}$ kích thích chuyển vị bởi lipopolysaccharit (LPS) hoặc interleukin-1 (IL-1) với nồng độ tối thiểu 10 ng/mL trong 1 giờ.

8. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể kháng p65 NF- κ B còn được gắn huỳnh quang FITC để thu hình ảnh phát huỳnh quang với bước sóng phát xạ $\lambda=518\text{ nm}$.

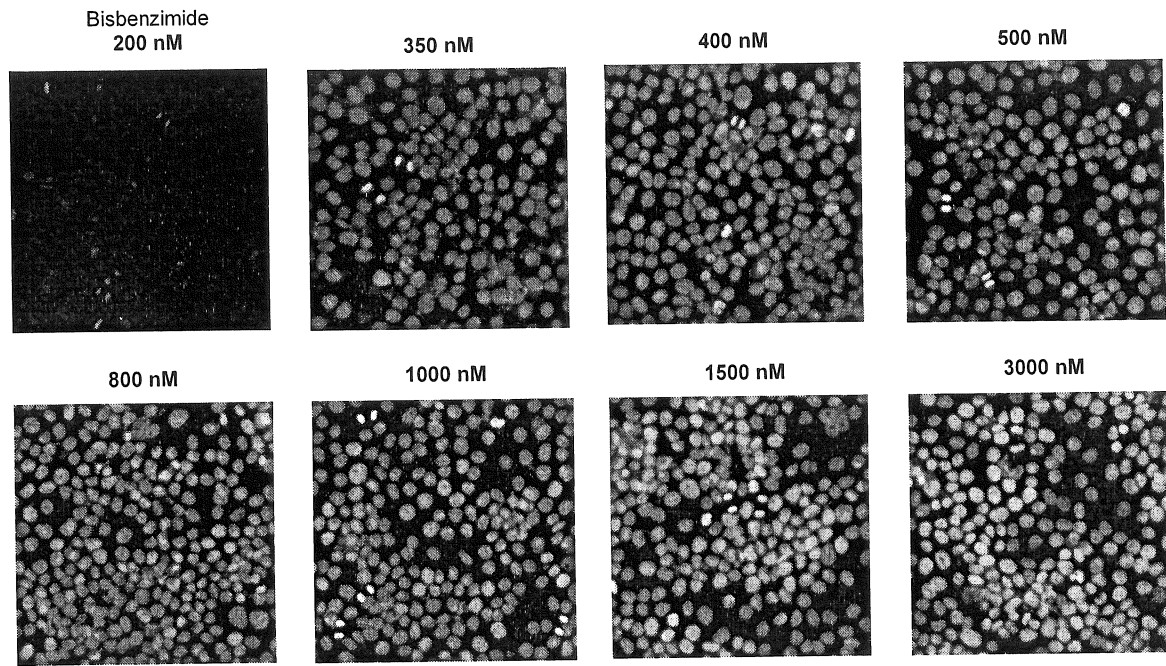
HÌNH 1



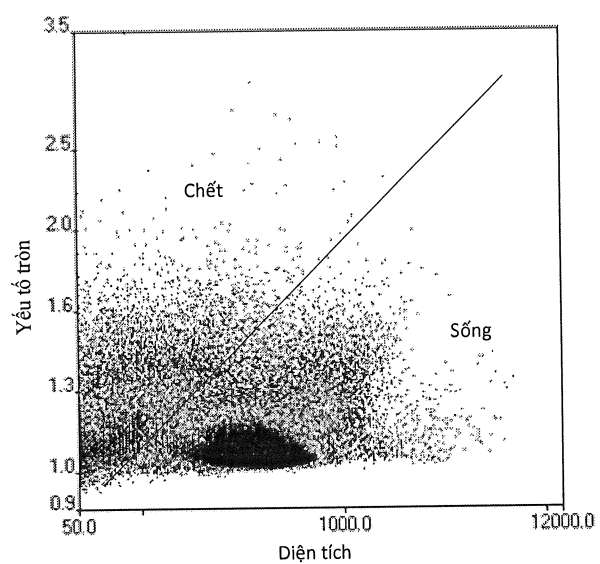
HÌNH 2



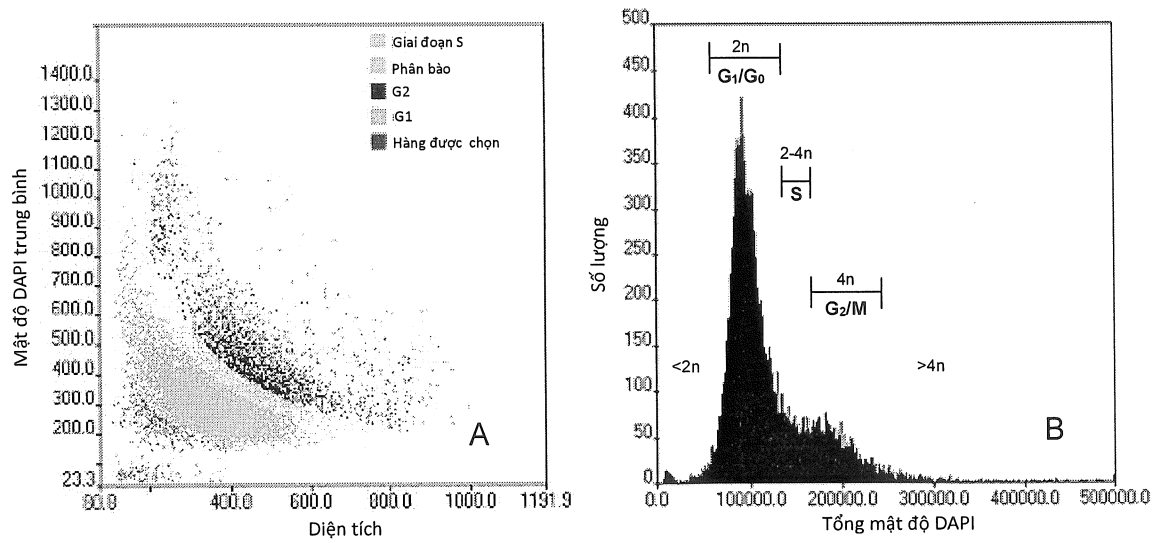
HÌNH 3



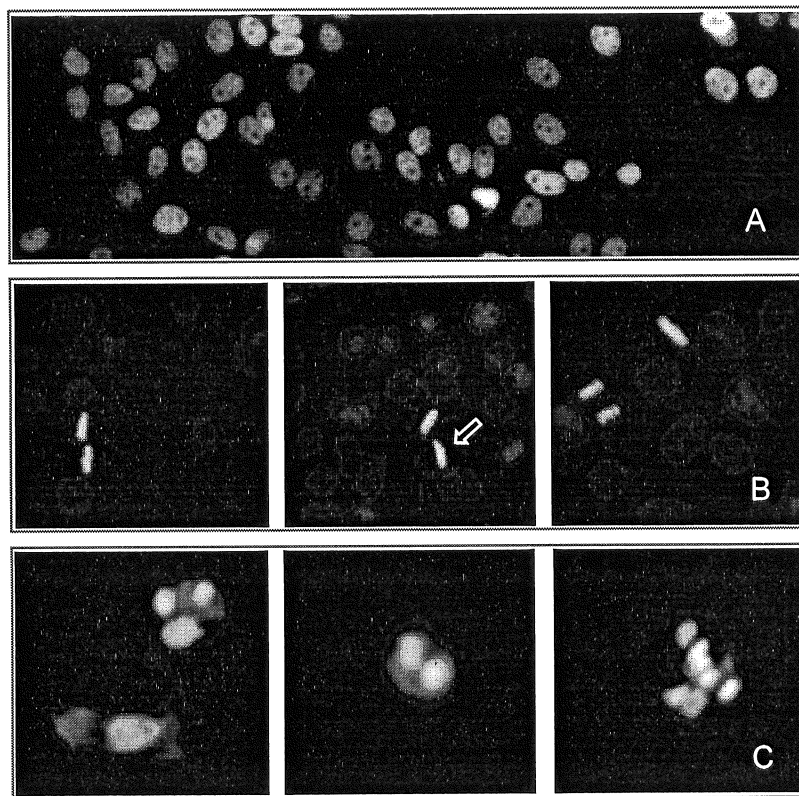
HÌNH 4



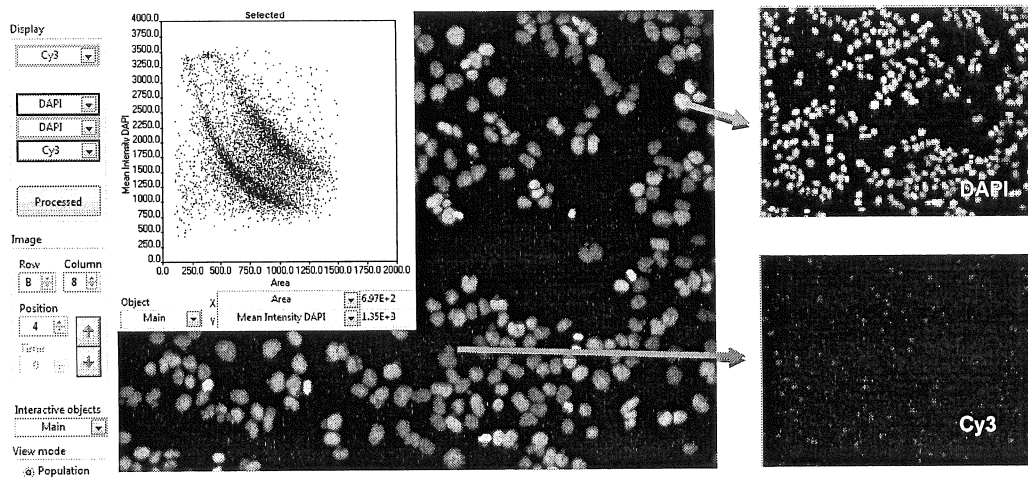
HÌNH 5



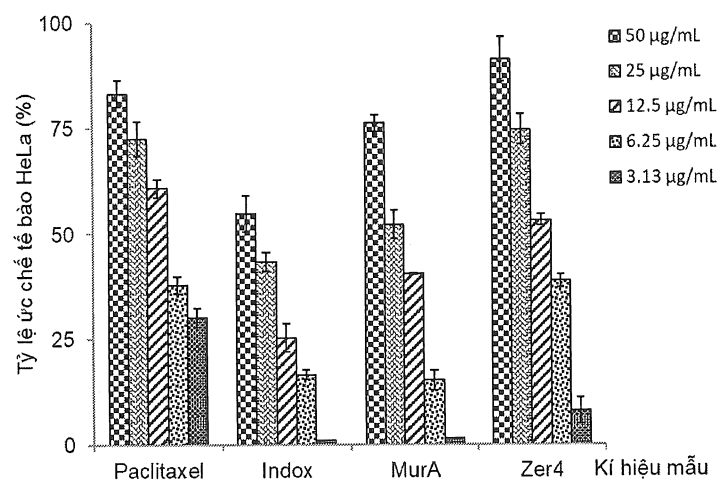
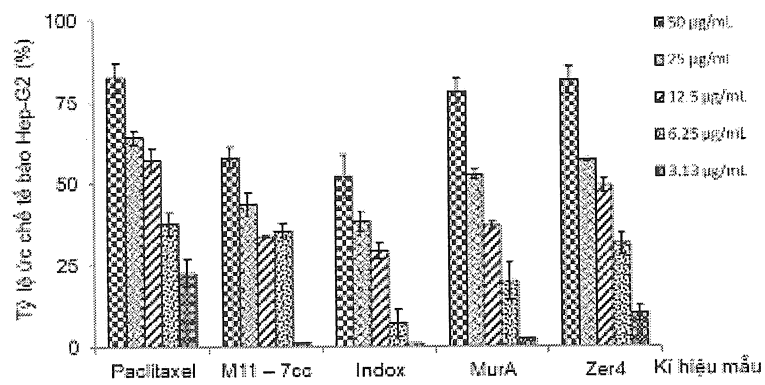
HÌNH 6



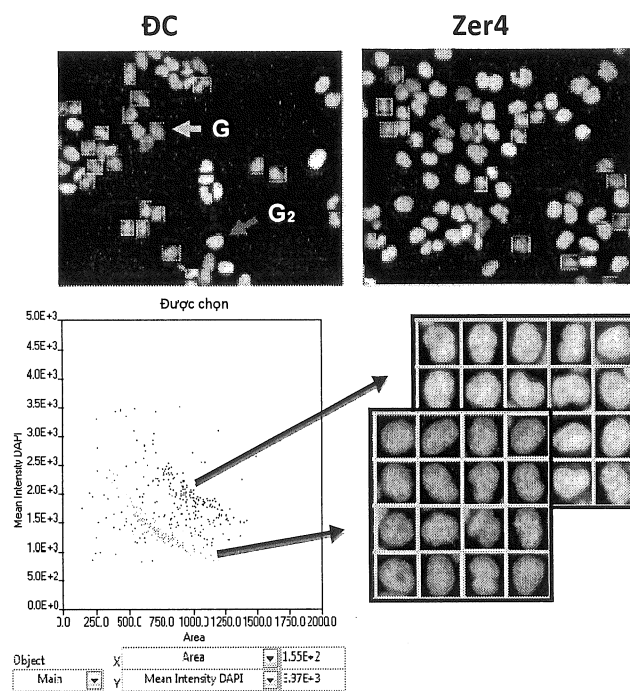
HÌNH 7



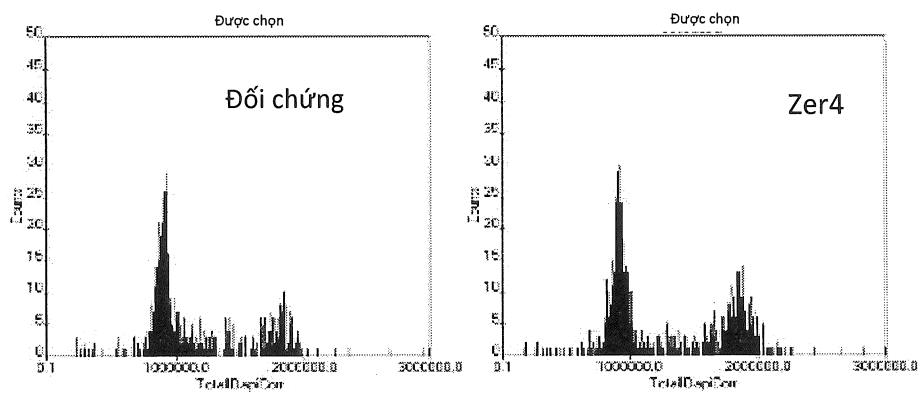
HÌNH 8



HÌNH 9



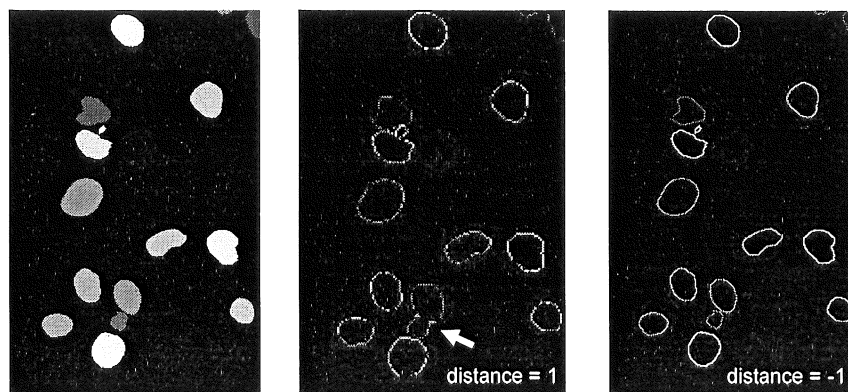
HÌNH 10



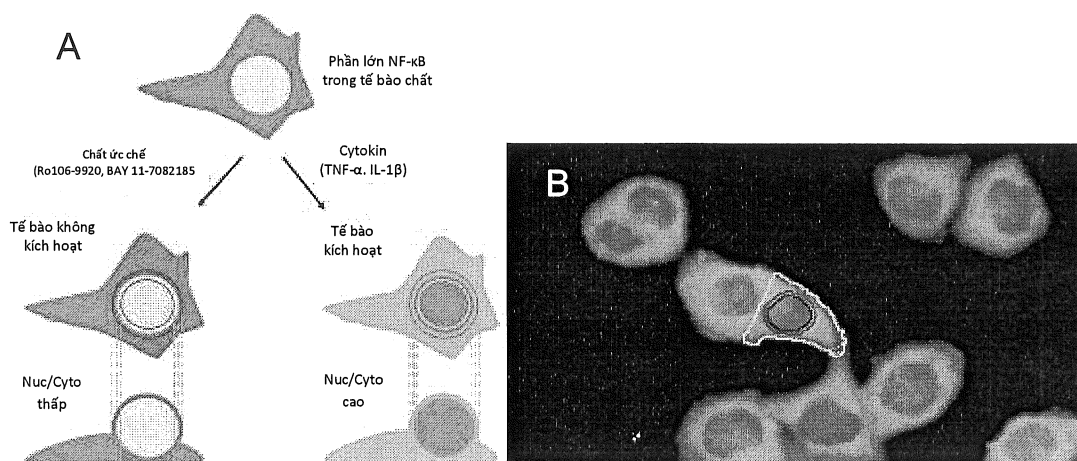
Đối chứng		
	Số đếm	%
Tổng	1209	
Được chọn	652	100,0
G ₁	340	52,15
S	92	14,11
G ₂ /M	152	23,31

Zer4		
	Số đếm	%
	1425	
	788	100.0
	372	47,21
	97	12,31
	291	36,93

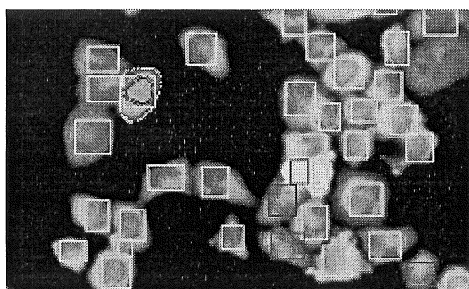
HÌNH 11



HÌNH 12



HÌNH 13



	Đối chứng		SHTN-4	
	Số đếm	%	Số đếm	%
Tổng tế bào	732,0	100,0	720,0	100,0
Tế bào "dương"	600,0	82,0	140,0	19,4
Tế bào "âm"	60,0	8,2	504,0	70,0