

Đánh giá độ nhạy cảm phóng xạ của tế bào lympho máu ngoại vi người bằng kỹ thuật phân tích sai hình nhiễm sắc thể do tổn thương phân tử DNA ở pha G2

Phạm Ngọc Duy*, Chế Quang Tuấn, Trần Thanh Mai, Lê Thị Thùy Linh,
Hán Huỳnh Điện, Lê Thị Bích Thy, Phạm Xuân Hải

Viện Nghiên cứu Hạt nhân, Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam

Ngày nhận bài 13/1/2020; ngày chuyển phản biện 16/1/2020; ngày nhận phản biện 12/3/2020; ngày chấp nhận đăng 18/3/2020

Tóm tắt:

Phương pháp xạ trị bên cạnh tác động tiêu diệt tế bào ung thư, còn ảnh hưởng không chọn lọc đến các tế bào thường xung quanh. Kỹ thuật phân tích sai hình nhiễm sắc thể do tổn thương phân tử DNA ở pha G2 của chu trình tế bào được kỳ vọng ứng dụng để đánh giá độ nhạy cảm phóng xạ nhằm nâng cao hiệu quả điều trị và an toàn bức xạ. Trong nghiên cứu này, các mẫu tế bào lympho máu ngoại vi người được nuôi cấy in vitro và chiếu xạ bằng nguồn phát tia X với các liều 0,5; 1,0; 2,0 và 4,0 Gy ở thời điểm 69 giờ sau nuôi cấy, khi tế bào đang ở pha G2. Mẫu tiếp tục được xử lý với caffeine nồng độ 4 mM, thu hoạch tế bào và tiêu bản hiển vi được phân tích để xác định tần số sai hình kiểu nhiễm sắc thể ở mẫu có và không xử lý caffeine. Độ nhạy cảm phóng xạ được đánh giá dựa trên chỉ số IRS = $(G2/G2_{\text{caffeine}}) \times 100\%$. Kết quả cho thấy phương pháp này có tiềm năng ứng dụng trong đánh giá độ nhạy cảm phóng xạ cá nhân và triển vọng đánh giá cho các bệnh nhân ung thư trước xạ trị.

Từ khóa: caffeine, chu trình tế bào, điểm kiểm soát G2, độ nhạy cảm phóng xạ cá nhân, sai hình nhiễm sắc thể, xạ trị.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Xạ trị là một trong những phương pháp phổ biến và hiệu quả để điều trị ung thư. Mục đích của xạ trị là loại bỏ toàn bộ tế bào ung thư trong khối u nguyên phát hoặc một số hạch di căn nhất định, đồng thời giảm thiểu tổn thương cho các tế bào hoặc mô lành xung quanh. Có 2 chiến lược được quan tâm nghiên cứu nhằm nâng cao hiệu quả xạ trị: phát triển các thiết bị xạ trị tiên tiến và nghiên cứu các hiệu ứng sinh học thích hợp có thể hỗ trợ cá nhân hóa điều trị (personalized treatment) [1]. Các kỹ thuật tiên tiến được sử dụng trong xạ trị chính xác bao gồm xạ trị điều biến liều (IMRT) dưới sự hỗ trợ của kỹ thuật hình ảnh và sử dụng các chùm hạt proton hoặc ion nặng như carbon (particle therapy) đã giúp nâng cao hiệu quả điều trị cho bệnh nhân. Ngoài ra, việc kết hợp giữa phương pháp xạ trị tiên tiến và đánh giá các hiệu ứng sinh học cũng được kỳ vọng mang lại kết quả tốt hơn trong điều trị ung thư. Có nhiều yếu tố sinh học có thể ảnh hưởng đến tính kháng xạ hay nhạy xạ của tế bào khối u, như độ nhạy cảm của tế bào, khả năng sửa sai tổn thương phân tử DNA; kích thước khối u, môi trường xung quanh khối u (nồng độ oxy, nhiệt độ...). Có đến 70%

trường hợp khác biệt về độ nhạy cảm phóng xạ lâm sàng là do yếu tố di truyền [2, 3]. Những yếu tố này đều liên quan đến cả tế bào khối u và tế bào bình thường [4]. Nghiên cứu hiệu ứng tác động in vitro của bức xạ ion hóa ở cấp độ tế bào nhằm đánh giá mức độ tổn thương và khả năng sửa sai phân tử DNA của tế bào được kỳ vọng sẽ mang lại một phương pháp tiên lượng tính nhạy cảm phóng xạ cho bệnh nhân trước xạ trị. Một trong các phương pháp phân tích được sử dụng phổ biến hiện nay là phân tích sai hình nhiễm sắc thể (NST) do tổn thương phân tử DNA ở pha G2 của chu trình tế bào (G2-assay). Phương pháp này được đánh giá là một phương pháp dự đoán đáng tin cậy về độ nhạy và có tương quan tốt khi dùng để nghiên cứu ở bệnh nhân ung thư [5].

Hầu hết các nghiên cứu độ nhạy cảm phóng xạ tế bào đều thực hiện trên tế bào lympho hoặc nguyên bào sợi, trong đó tế bào lympho có ưu thế hơn do quần thể tế bào này bình thường không phân chia và luôn đồng bộ ở pha G0 của chu trình tế bào. Chu trình phân chia của tế bào bình thường qua các pha G0-G1, S, G2 và M. Khi tế bào bị chiếu xạ ở pha G0, phân tử DNA có thể bị tổn thương dạng chuỗi đơn (single-strand break - SSB) hoặc chuỗi đôi (double-strand

*Tác giả liên hệ: Email: phamngocduynri@gmail.com

Assessing individual radiosensitivity in human peripheral blood lymphocytes by the method for analysing chromosome aberrations induced by DNA damage in G2 phase

Ngoc Duy Pham*, Quang Tuan Che, Thanh Mai Tran,
Thi Thuy Linh Le, Huynh Dien Han, Thi Bich Thy Le,
Xuan Hai Pham

Da Lat Nuclear Research Institute, Vietnam Atomic Energy Institute

Received 13 January 2020; accepted 18 March 2020

Abstract:

Radiotherapy not only kills the cancer cells but also non-selectively affects the surrounding normal cells. The method for analysing chromosome aberrations induced by DNA damage in G2 phase of the cell cycle is expected to be used to assess the radiosensitivity for improving treatment efficacy and radiation safety. In this study, the human peripheral blood lymphocytes samples were cultured in vitro and irradiated by X-ray sources with the doses of 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 Gy after 69 hours' cultivation, when most of the lymphocyte cells were in G2 phase. The samples were continued to be treated with 4 mM caffeine, cells harvesting and scoring of microscope slides for determining the chromatid break frequency in the samples with and without caffeine treatment. The radiosensitivity was evaluated by $IRS = (G2/G2_{\text{caffeine}}) \times 100\%$. The results exhibited that this method has greatly potential application in assessing individual radiosensitivity, especially for cancer patients before radiation therapy.

Keywords: caffeine, cell cycle, chromosome aberrations, G2 checkpoint, individual radiosensitivity, radiation therapy.

Classification number: 3.2

break - DSB). Trong đó, tổn thương SSB có thể được sửa sai dễ dàng nhờ cơ chế bắt cặp bổ sung; tổn thương DSB thì phức tạp hơn, nếu không được phục hồi hoặc phục hồi nhầm sẽ hình thành các sai hình kiểu NST (mảnh, đa tâm...) và có thể quan sát được khi tế bào ở pha M. Khi tế bào bị chiếu xạ ở pha G2, pha tế bào đã sinh tổng hợp và nhân đôi phân tử DNA nên ở pha này chủ yếu có tổn thương dạng DSB hình thành sai hình kiểu đứt gãy nhiễm sắc tử (NSTừ) có thể quan sát được khi tế bào ở pha M. Phân tích xác định tần số sai hình dạng đứt gãy NSTừ khi chiếu xạ ở pha G2 của chu trình tế bào (G2-assay) có thể đánh giá được độ nhạy cảm phóng xạ của tế bào. Kết quả nghiên cứu của Poggioli và cộng sự (2010) [6] cho thấy, nhóm bệnh nhân ung thư vú nhạy xạ hơn nhóm đối chứng và phương pháp phân tích G2-CA-assay phù hợp để phân tích độ nhạy cảm phóng xạ hơn G0-assay. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cũng chỉ ra sự khác biệt về độ nhạy cảm phóng xạ trong nhóm đối tượng mắc các bệnh ung thư và nhóm đối chứng khi nghiên cứu bằng kỹ thuật này. Điều đó theo những phát hiện của Pantelias và Terzoudi (2011) [7], phản ánh việc bệnh nhân có mang đột biến hoặc đa hình ở các gen điều hòa nhân tố cyclin-B/CDK1 và điểm kiểm soát G2 (G2-checkpoint) gây ảnh hưởng đến khả năng sửa sai phân tử DNA. Khi phân tử DNA bị tổn thương do chiếu xạ ở pha G2 thì tế bào hoạt hóa G2-checkpoint và tạm dừng chu trình để tế bào có thời gian huy động các nhân tố sửa sai DNA trước khi tế bào đến pha M. Như vậy, khi G2-checkpoint hoạt động bình thường thì hiệu quả sửa sai DNA cao nên sai hình NSTừ có thể quan sát được ở pha M sẽ giảm, do đó không phản ánh đúng hiệu quả tác động của bức xạ ion hóa. Trong khi đó, ở nhóm bệnh nhân ung thư có mang gen đột biến liên quan đến điều hòa chu trình tế bào nên biểu hiện của những gen này sẽ tác động đến G2-checkpoint ở các mức độ khác nhau làm cho sai hình NSTừ quan sát được ở pha M cũng sẽ khác biệt giữa các bệnh nhân. Để giải quyết vấn đề này, Pantelias và Terzoudi đã bổ sung caffeine (4 mM) khi nuôi cấy để tế bào không dừng ở G2-checkpoint, khi đó những tổn thương DNA do bức xạ ion hóa gây ra ở pha G2 sẽ không được sửa sai ở G2-checkpoint nên kết quả phân tích sai hình NSTừ ở pha M sẽ phản ánh đúng tác động của bức xạ ion hóa đối với từng đối tượng.

Bài báo này trình bày về quy trình kỹ thuật G2-assay và kết quả nghiên cứu thử nghiệm đánh giá độ nhạy cảm phóng xạ đối với nhóm người bình thường, làm tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo trên đối tượng bệnh nhân ung thư với kỳ vọng nâng cao hiệu quả của phương pháp xạ trị.

Đối tượng và phương pháp

10 mẫu tế bào lympho máu ngoại vi người bình thường (8 nữ, 2 nam từ 24-52 tuổi).

Phương pháp chiếu xạ in vitro: mẫu máu được đựng trong các lọ thủy tinh trung tính (thể tích 1 ml/lọ) để chiếu xạ. Chiếu xạ in vitro bằng nguồn phát tia X (200 kV) ở các liều 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 Gy tại vị trí có suất liều khoảng 0,5 Gy/phút và đối chứng không chiếu xạ.

Nuôi cấy tế bào lympho ngoại vi toàn phần: 0,6 ml máu toàn phần được nuôi cấy trong 5,4 ml môi trường RPMI-1640 (Sigma Aldrich) có bổ sung huyết thanh, Phytohemagglutinin (Invitrogen), Kanamycine sulfate, ủ tại điều kiện 37°C và 5% CO₂. Sau 69 giờ, tiến hành ly tâm, loại bỏ môi trường, chiếu xạ mẫu tế bào với các liều được thiết kế như trên. Thể tích mỗi mẫu tế bào sau chiếu xạ được chia đôi, bổ sung lại môi trường RPMI-1640 (Sigma Aldrich), 1 phần không xử lý caffeine, 1 phần xử lý caffeine nồng độ 4 mM, ủ tế bào ở 37°C/5% CO₂ trong 20 phút, sau đó xử lý Colcemid 1 giờ trước thu hoạch. Thu hoạch tế bào và làm tiêu bản hiển vi nhuộm Giemsa.

Phân tích tiêu bản hiển vi: sử dụng kính hiển vi AXIO Imager Z2 kết hợp phần mềm Metafer 4.0 để tự động quét và chụp ảnh metaphase, phân tích xác định tần số sai hình NST từ trên hình ảnh metaphase từ các mẫu nuôi cấy.

Tính chỉ số MI (Mitotic Index %):

$$MI (\%) = \frac{\text{Số tế bào nguyên phân}}{\text{Số tế bào nguyên phân} + \text{số nhân lympho}} \times 100$$

Đánh giá độ nhạy cảm phóng xạ (Individual radiosensitivity - IRS) thông qua chỉ số: $IRS = (G2/G2_{\text{caffeine}}) \times 100\%$. Nếu $IRS < 30\%$: kháng xạ; $30\% \leq IRS \leq 50\%$: bình thường; $IRS > 50\%$: nhạy xạ (Pantelias và Terzoudi, 2011).

Phương pháp xử lý số liệu: sử dụng phần mềm Excel phân tích thống kê và Sigmaplot 12.0 để vẽ đồ thị.

Kết quả

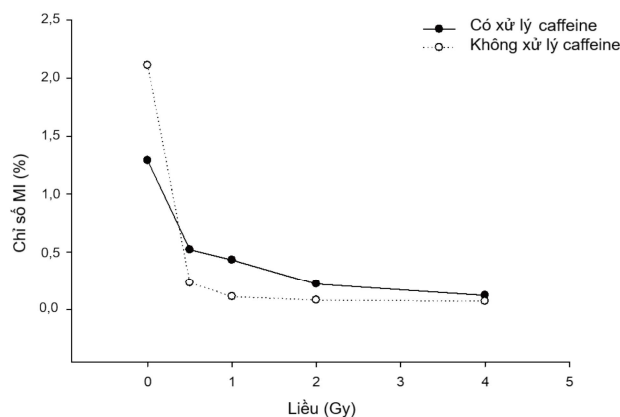
Chỉ số phân bào Mitotic Index (MI %) - Đánh giá khả năng sinh trưởng của tế bào

10 mẫu tế bào lympho máu ngoại vi toàn phần từ 10 người khỏe mạnh đã được thu thập để nuôi cấy in vitro và chiếu xạ các liều 0; 0,5; 1,0; 2,0 và 4,0 Gy, sau đó mỗi mẫu được chia làm 2 phần, 1 phần xử lý caffeine, 1 phần không xử lý caffeine. Chỉ số MI (%) ở mỗi mẫu tương ứng được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Chỉ số MI (%) của các mẫu tương ứng không và có xử lý caffeine.

Mẫu không caffeine	MI (%)					Mẫu có caffeine	MI (%)				
	0 Gy	0,5 Gy	1,0 Gy	2,0 Gy	4,0 Gy		0 Gy	0,5 Gy	1,0 Gy	2,0 Gy	4,0 Gy
W1	4,19	0,21	0,15	0,11	0,14	C1	2,40	1,28	1,30	0,43	0,25
W2	3,37	0,21	0,16	0,14	0,22	C2	2,63	1,19	0,88	0,68	0,42
W3	1,52	0,05	0,03	0,03	0,03	C3	1,20	0,26	0,20	0,07	0,07
W4	2,98	0,06	0,03	0,05	0,04	C4	1,32	0,26	0,16	0,09	0,06
W5	2,39	0,07	0,04	0,06	0,07	C5	1,62	0,30	0,42	0,10	0,12
W6	2,58	0,12	0,07	0,03	0,10	C6	1,06	0,51	0,37	0,12	0,10
W7	1,05	0,24	0,08	0,04	0,01	C7	0,36	0,16	0,11	0,03	0,02
W8	0,67	0,65	0,40	0,21	0,03	C8	0,44	0,23	0,19	0,35	0,03
W9	1,71	0,46	0,05	0,03	0,06	C9	1,53	0,74	0,51	0,30	0,11
W10	0,64	0,22	0,10	0,07	0,00	C10	0,37	0,29	0,16	0,04	0,01
Trung bình	2,11	0,23	0,11	0,08	0,07	Trung bình	1,29	0,52	0,43	0,22	0,12
SD	0,91	0,07	0,06	0,05	0,07	SD	0,66	0,48	0,45	0,25	0,14

Chỉ số MI trung bình khi không chiếu xạ ở các mẫu không xử lý caffeine là cao hơn ở các mẫu có xử lý caffeine ($p=0,09$). Còn đối với mẫu chiếu xạ thì ngược lại, khi chiếu xạ liều 0,5 và 1,0 Gy thì chỉ số MI trung bình ở các mẫu có xử lý caffeine là cao hơn ở các mẫu không xử lý caffeine (tương ứng $p=0,06$ và $p=0,03$). Khi chiếu xạ các liều 2,0 và 4,0 Gy thì chỉ số MI càng thấp và ở các mẫu có xử lý caffeine cũng có khuynh hướng cao hơn ở các mẫu không xử lý caffeine (hình 1).



Hình 1. Sự khác biệt chỉ số MI trung bình ở các mẫu có và không được xử lý caffeine khi chiếu xạ in vitro liều 0,5-4,0 Gy.

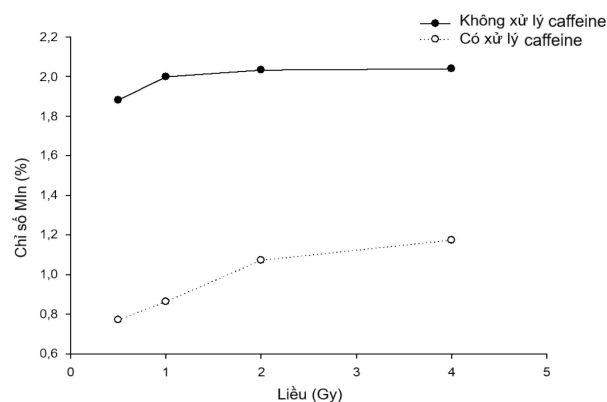
Chỉ số ức chế phân bào Mitotic Inhibition (MIn %) - Đánh giá mức độ đáp ứng của G2-checkpoint của chu trình tế bào với bức xạ ion hóa

Chỉ số MIn là hiệu số của chỉ số MI ở liều 0 Gy với chỉ số MI ở mỗi liều chiếu tương ứng, được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Chỉ số MIn (%) của các mẫu tương ứng không và có xử lý caffeine.

Mẫu không caffeine	MIn (%)				Mẫu có caffeine	MIn (%)			
	0,5 Gy	1,0 Gy	2,0 Gy	4,0 Gy		0,5 Gy	1,0 Gy	2,0 Gy	4,0 Gy
W1	3,98	4,04	4,08	4,05	C1	1,12	1,10	1,97	2,15
W2	3,16	3,21	3,23	3,15	C2	1,44	1,75	1,95	2,21
W3	1,47	1,49	1,49	1,49	C3	0,94	1,00	1,13	1,13
W4	2,92	2,95	2,93	2,94	C4	1,06	1,16	1,23	1,26
W5	2,32	2,35	2,33	2,32	C5	1,32	1,20	1,52	1,50
W6	2,46	2,51	2,55	2,48	C6	0,55	0,69	0,94	0,96
W7	0,81	0,97	1,01	1,04	C7	0,20	0,25	0,33	0,34
W8	0,02	0,27	0,46	0,64	C8	0,21	0,25	0,09	0,41
W9	1,25	1,66	1,68	1,65	C9	0,79	1,02	1,23	1,42
W10	0,42	0,54	0,57	0,64	C10	0,08	0,21	0,33	0,36
Trung bình	1,88	2,00	2,03	2,04	Trung bình	0,77	0,86	1,07	1,17
SD	1,29	1,22	1,20	1,14	SD	0,49	0,51	0,66	0,68

Chỉ số MIn trung bình ở các mẫu không xử lý caffeine cao hơn ở các mẫu có xử lý caffeine tương ứng ($p=0,0005$). Đối với mẫu không xử lý caffeine, chỉ số MIn trung bình không khác biệt khi so sánh giữa các liều chiếu xạ khác nhau. Đối với mẫu có xử lý caffeine, chỉ số MIn trung bình càng tăng khi tăng liều chiếu, chứng tỏ mức độ đáp ứng của G2-checkpoint càng tăng, làm cho tế bào càng bị ức chế (hình 2).

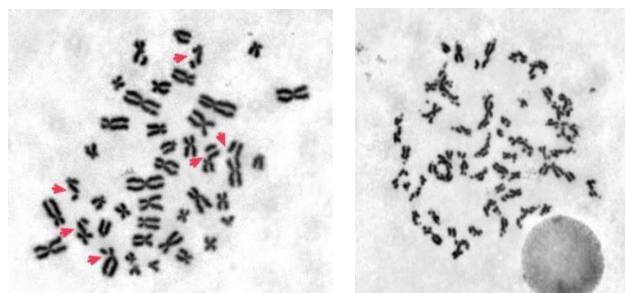


Hình 2. Khả năng đáp ứng của tế bào ở các mẫu có và không được xử lý caffeine khi chiếu xạ in vitro liều 0,5-4,0 Gy.

Sai hình dạng đứt gãy NSTừ do chiếu xạ ion hóa ở pha G2 của chu trình tế bào

Bức xạ ion hóa tác động vào tế bào đang ở pha G0 thì dạng tổn thương phân tử DNA chính được tạo ra là DSB, từ

đó hình thành các sai hình kiểu NST như mảnh NST, NST đa tâm, NST vòng..., có thể quan sát được khi tế bào ở pha M. Trong khi đó, nếu tế bào bị chiếu xạ ở pha G2, khi mà tế bào đã sinh tổng hợp và nhân đôi phân tử DNA, những tổn thương dạng DSB sẽ hình thành sai hình kiểu đứt gãy NSTừ khi quan sát tế bào ở pha M (hình 3A). Ngoài ra, khi chiếu xạ với liều cao (4,0 Gy) thì xuất hiện các tế bào có NST bị đứt gãy nghiêm trọng, có thể gọi là các “rough cell - tế bào hỗn loạn” (hình 3B).

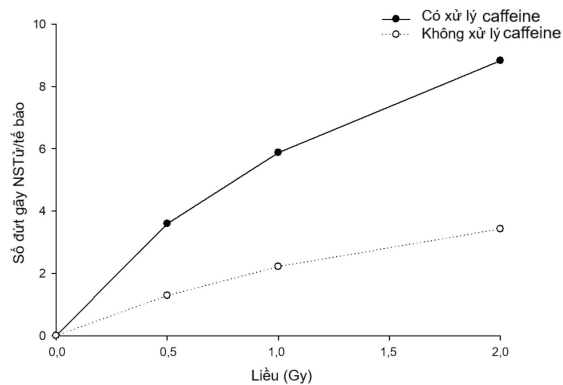


Hình 3A. Tế bào có đứt gãy NSTừ. **Hình 3B.** “Rough cell”.

Số đứt gãy NSTừ trung bình trong tế bào càng tăng khi tăng liều chiếu và ở mẫu có xử lý caffeine cao hơn mẫu không xử lý caffeine. Khi chiếu xạ liều 4,0 Gy thì rough cell chiếm tỷ lệ cao trong số tế bào phân tích được, số liệu và đồ thị được thể hiện ở bảng 3 và hình 4.

Bảng 3. Số đứt gãy NSTừ và rough cell (%) của các mẫu tương ứng không xử lý caffeine và có xử lý caffeine khi được chiếu xạ.

Mẫu không caffeine	Đứt gãy NSTừ/tế bào				Mẫu có caffeine	Đứt gãy NSTừ/tế bào			
	0,5 Gy	1,0 Gy	2,0 Gy	4,0 Gy		0,5 Gy	1,0 Gy	2,0 Gy	4,0 Gy
W1	1,35	1,91	5,39	80,00	C1	3,15	6,05	10,76	84,00
W2	1,30	1,72	2,68	62,00	C2	3,24	4,66	6,44	62,00
W3	1,10	2,58	1,94	57,69	C3	3,04	5,64	6,32	43,86
W4	1,62	2,42	2,55	74,00	C4	4,12	6,98	8,80	74,00
W5	1,26	2,50	2,41	67,31	C5	4,08	8,48	7,64	82,00
W6	1,54	3,14	5,72	86,00	C6	3,70	6,74	12,46	82,00
W7	1,16	3,03	4,58	66,67	C7	3,82	7,00	11,81	84,21
W8	0,98	2,18	4,11	62,50	C8	2,90	4,84	8,12	52,00
W9	1,10	1,44	2,70	70,00	C9	3,58	4,46	7,78	72,00
W10	1,45	1,24	2,16	76,00	C10	4,32	3,92	8,16	86,00
Trung bình	1,29	2,22	3,42	70,22	Trung bình	3,60	5,88	8,83	72,21
SD	0,21	0,64	1,40	8,80	SD	0,50	1,43	2,14	14,85

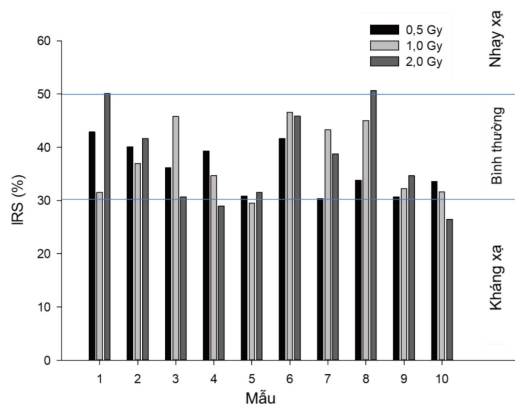


Hình 4. Biến động số đứt gãy NST/tế bào của các mẫu tương ứng không xử lý caffeine và có xử lý caffeine khi được chiếu xạ.

Chỉ số IRS (%) được xác định theo công thức $IRS = (G2/G2_{caffeine}) \times 100\%$, kết quả thể hiện trong bảng 4. Tất cả các mẫu được chiếu trong dải liều 0,5-2,0 Gy đa số có $30\% \leq IRS \leq 50\%$ (hình 5).

Bảng 4. Chỉ số IRS (%) các mẫu được chiếu trong dải liều 0,5-2,0 Gy.

Mẫu	IRS (%)		
	0,5 Gy	1,0 Gy	2,0 Gy
1	42,90	31,56	50,10
2	40,12	36,91	41,66
3	36,18	45,80	30,67
4	39,32	34,69	28,93
5	30,88	29,48	31,59
6	41,62	46,59	45,91
7	30,37	43,32	38,79
8	33,79	45,04	50,63
9	30,73	32,29	34,65
10	33,56	31,63	26,47



Hình 5. Biến động chỉ số IRS (%) các mẫu được chiếu trong dải liều 0,5-2,0 Gy.

Bàn luận

Chỉ số phân bào MI (%) phản ánh khả năng sinh trưởng và phân chia của tế bào lympho được nuôi cấy in vitro. Ở loạt mẫu không chiếu xạ, chỉ số MI (%) trung bình của các mẫu không xử lý caffeine (W) là cao hơn các mẫu có xử lý caffeine (C). Điều đó cho thấy caffeine là một yếu tố có thể ảnh hưởng đến quá trình tế bào đi vào pha M nên caffeine được thêm vào trong thời gian ngắn (20 phút). Còn ở loạt mẫu có chiếu xạ, chỉ số MI (%) trung bình của các mẫu C lại cao hơn ở các mẫu W và chỉ số này càng giảm khi tăng liều chiếu. Chỉ số MI (%) là số liệu để tính chỉ số MIn (%), qua đó đánh giá được khả năng đáp ứng của G2-checkpoint trong chu trình tế bào với bức xạ ion hóa. Trong nghiên cứu này, chỉ số MIn (%) trung bình ở các mẫu W là không khác nhau giữa các liều chiếu, còn ở các mẫu C thì chỉ số MIn (%) trung bình tăng khi tăng liều chiếu và chúng cũng thấp hơn ở các mẫu W. Qua đây cho thấy mức độ đáp ứng khác nhau của G2-checkpoint trong chu trình tế bào. Ở các mẫu W, khi được chiếu xạ ở pha G2, giá trị MIn (%) cao hơn ở các mẫu C là do ở tế bào người bình thường khi bị chiếu xạ sẽ hoạt hóa các điểm checkpoint trong chu trình tế bào, trong đó có điểm G2-checkpoint. Trong điều kiện bình thường, G2-checkpoint hoạt hóa CDC25 có chức năng ức chế CDC2 và cho phép chu trình tế bào diễn ra bình thường. Khi có tác nhân gây tổn thương phân tử DNA, để hoạt hóa CHK1 bằng ATM, Wee1 được phosphoryl hóa nhằm ức chế CDC25 làm cho không kết hợp được với CDC2, kết quả là chu trình tế bào bị dừng ở G2 [1]. Tế bào dừng ở pha G2 để thực hiện chức năng sửa sai các tổn thương ở phân tử DNA, chỉ khi phân tử DNA được phục hồi hoàn toàn thì tế bào mới tiếp tục đi vào pha M để tiếp tục được phân chia, nếu những tổn thương DNA nghiêm trọng không thể phục hồi được thì tế bào đi vào con đường chết theo chu trình (apoptosis - programmed cell death). Giá trị MIn (%) cao và giá trị MI (%) thấp ở các mẫu W khi chiếu xạ ở pha G2 cho thấy tế bào bình thường đáp ứng cao với tác động của bức xạ ion hóa, chúng hoạt hóa các cơ chế để bảo vệ tế bào, hạn chế gây tổn thương cho tế bào ở thế hệ sau. Còn ở các mẫu C, giá trị MIn (%) thấp hơn và có tăng khi tăng liều chiếu xạ, đồng thời giá trị MI (%) cũng cao hơn các mẫu W, điều này được giải thích là do caffeine là một yếu tố làm giảm khả năng hoạt động của G2-checkpoint, làm cho các tế bào bị tổn thương do bức xạ ở pha G2 tiếp tục đi vào pha M để phân chia. Do đó, việc sử dụng caffeine là một yếu tố để ức chế G2-checkpoint, giúp đánh giá được khả năng đáp ứng của tế bào khi chiếu xạ ở pha G2, đồng thời phân tích mức độ tổn thương của tế bào với chỉ thị sai hình NST/tế bào có thể đánh giá được độ nhạy cảm phóng xạ của tế bào [7].

Phân tích tối thiểu 100 metaphase đối với mỗi mẫu ở mỗi liều chiếu để xác định số lượng sai hình NST/tế bào. Đối với các mẫu không chiếu xạ, tần số sai hình NST/tế bào không

khác biệt so với kết quả nghiên cứu về sai hình NSTừ ngẫu nhiên trong dân chúng mà phòng thí nghiệm đã thực hiện trước đây [8]. Trong dải liều 0,5-2,0 Gy, số đứt gãy NSTừ trung bình trong tế bào càng tăng khi tăng liều chiếu cho thấy khả năng gây tổn thương DSB có tương quan với liều lượng bức xạ. Khi chiếu xạ liều 4,0 Gy là liều tương đối cao đã gây ra những tổn thương nghiêm trọng cho tế bào mà có thể quan sát được dưới dạng các “rough cell” nên rất khó để định lượng được số đứt gãy NSTừ, tỷ lệ “rough cell” ở các mẫu W và C phân tích được là tương đương nhau. Như vậy, để nghiên cứu độ nhạy cảm phóng xạ ở tế bào lympho máu ngoại vi thì dải liều thích hợp có thể sử dụng là $\leq 2,0$ Gy, trong đó có thể xem xét sử dụng liều 2,0 Gy vì mức liều này cũng phù hợp với liều SF_2 trong nghiên cứu tỷ lệ sống sót in vitro có thể dự đoán đáp ứng của khối u khi chiếu xạ in vivo [2]. Khi chiếu xạ các mẫu với liều 0,5; 1,0 và 2,0 Gy khi tế bào ở pha G2 ta thấy, số đứt gãy NSTừ trung bình trong tế bào ở nhóm mẫu C là cao hơn ở nhóm mẫu W, điều này cũng cho thấy khả năng đáp ứng của G2-checkpoint với bức xạ. Với nhóm mẫu W, vì không xử lý caffeine nên G2-checkpoint vẫn hoạt động với chức năng dừng chu trình để tế bào sửa chữa, giảm thiểu tổn thương DNA trước khi chuyển qua pha M nên số đứt gãy NSTừ trung bình trong tế bào ở nhóm này là thấp hơn. Với nhóm mẫu C, caffeine đã gây ức chế G2-checkpoint nên tế bào không dừng ở G2 để sửa sai trước khi đến pha M, do vậy số đứt gãy NSTừ trung bình trong tế bào ở nhóm này cao hơn. Để hạn chế khác biệt liên quan đến sự điều hòa chu trình tế bào ở G2-checkpoint, chỉ số IRS (%) đã được sử dụng [7]. 10 mẫu được chiếu trong dải liều 0,5-2,0 Gy thì đa số có $30\% \leq IRS \leq 50\%$, cho thấy độ nhạy cảm phóng xạ nằm trong khoảng bình thường. Để đánh giá độ nhạy cảm phóng xạ dựa vào chỉ số IRS (%), Pantelias và Terzoudi [7] đã nghiên cứu nhóm đối tượng gồm 78 người bình thường và 6 bệnh nhân AT (Ataxia Telangiectasia), trong đó bệnh nhân AT là đối tượng mất khả năng điều hòa dừng chu trình tế bào ở pha G2 khi có tác động của bức xạ ion hóa. Chỉ số IRS (%) của nhóm người bình thường tuân theo luật phân bố chuẩn với giá trị trung bình $MV=40,1\%$ và độ lệch chuẩn $SD=9,8\%$. Dựa trên các giá trị này, độ nhạy cảm phóng xạ cá nhân được phân loại gồm $IRS < MV - SD$ là kháng xạ, $IRS > MV + SD$ là nhạy xạ và $MV - SD \leq IRS \leq MV + SD$ là bình thường. Với cách phân loại như vậy, nghiên cứu đã chỉ ra trong nhóm người bình thường có 6/78 người nhạy xạ ($IRS > 50\%$), 8/78 người kháng xạ ($IRS < 30\%$) và 64/78 người bình thường ($30\% \leq IRS \leq 50\%$), trong khi đó tất cả 6 bệnh nhân AT đều có $IRS > 70\%$ thể hiện rất nhạy xạ. Trong nhóm người bình thường mà chúng tôi nghiên cứu thì kết quả cho thấy độ nhạy cảm phóng xạ cũng ở mức bình thường, phù hợp với sự phân loại như trên. Nghiên cứu tiếp theo sẽ thực hiện trên đối tượng bệnh nhân ung thư, điển hình là bệnh nhân ung thư vú trước xạ trị nhằm đánh giá độ nhạy cảm phóng xạ, giúp nâng cao hiệu quả điều trị cho bệnh nhân.

Kết luận

Kỹ thuật phân tích sai hình NST do bức xạ ion hóa làm tổn thương phân tử DNA ở pha G2 của chu trình tế bào kết hợp với xử lý caffeine là kỹ thuật tiềm năng sử dụng để đánh giá độ nhạy cảm phóng xạ nội tại của tế bào. Mở rộng ứng dụng kỹ thuật này nói riêng và các kỹ thuật phân tích tế bào nói chung là cần thiết để phát triển các công cụ thích hợp nhằm đánh giá, dự đoán độ nhạy cảm phóng xạ, qua đó nâng cao được hiệu quả trong chiến lược cá nhân hóa điều trị cho bệnh nhân.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của các đồng nghiệp trong quá trình thực hiện các thí nghiệm tại Viện Nghiên cứu Hạt nhân. Nghiên cứu này được thực hiện từ sự hỗ trợ kinh phí của Bộ Khoa học và Công nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.R. Cuddihy, M.J. O'Connell (2003), “Cell-cycle responses to DNA damage in G2”, *International Review of Cytology*, **222**, pp.99-140.
- [2] IAEA-TECDOC-1297 (2002), *Predictive assays and their role in selection of radiation as the therapeutic modality*, IAEA, VIENNA.
- [3] I. Turesson, J. Nyman, E. Holmberg, A. Odén (1996), “Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients”, *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, **36**, pp.1065-1075.
- [4] W. Dorr (1998), “Radiobiological models of normal tissue reactions”, *Strahlentherapie und Onkologie*, **174**, pp.4-7.
- [5] K. Baria, C. Warren, S. Roberts, C.M. West, D. Scott (2001), “Chromosomal radiosensitivity as a marker of predisposition to common cancers?”, *British Journal of Cancer*, **84**, pp.892-896.
- [6] T. Poggioli, S. Sterpone, S. Palma, R. Cozzi, A. Testa (2010), “G0 and G2 chromosomal assays in the evaluation of radiosensitivity in a cohort of Italian breast cancer patients”, *Journal of Radiation Research*, **51**, pp.615-619.
- [7] G.E. Pantelias, G.I. Terzoudi (2011), “A standardized G2-assay for the prediction of individual radiosensitivity”, *Radiotherapy and Oncology*, **101**, pp.28-34.
- [8] N.D. Pham, M.H. Nguyen, Q. Tran, Q.T. Che, V.H. Nguyen, V.T. Phan, V.D. Pham, S.E. Lee, T.L.T. Vo (2018), “Determination of spontaneous dicentric frequencies and establishment of dose-response curves after expose of human peripheral blood lymphocytes to low and high dose rate ^{60}Co gamma rays - The basis for cytogenetic biodosimetry in Vietnam”, *International Journal of Radiation Biology*, **95**, pp.307-313.