

CHỤP ẢNH ĐỒNG TIÊU VÀ PHÂN TÍCH HÌNH ẢNH 3D:

Phương pháp hữu hiệu để đánh giá độc tính tế bào gan có nguồn gốc từ iPSC

Bài viết đề cập đến phương pháp chụp ảnh đồng tiêu và phân tích hình ảnh 3D để đánh giá độc tính tế bào gan có nguồn gốc từ tế bào gốc vạn năng (iPSC). Đây là phương pháp do GS Oksana Sirenko (Hoa Kỳ) và cộng sự thực hiện năm 2017. Phương pháp này không chỉ góp phần khắc phục những hạn chế trong nghiên cứu đánh giá tác động của các độc tính lên gan - một vấn đề đang thu hút sự quan tâm của giới khoa học hiện nay mà còn mở ra những hướng nghiên cứu mới trong thời gian tới.

Những tổn thương trong gan gây ra bởi độc tính của thuốc và hóa chất môi trường là một vấn đề đáng lo ngại hiện nay. Vì vậy, việc phát triển các hệ thống mới cho phép đánh giá tác động của các hợp chất gây độc lên gan là một lĩnh vực nghiên cứu đang nhận được nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học.

Phần lớn các nghiên cứu về độc tính của gan đã được công bố trong thời gian qua đều sử dụng các dòng tế bào gan đã bị biến đổi (HepG2, HepaRG) hoặc các tế bào gan sơ cấp (primary hepatocytes) để sàng lọc độc tính, trong khi các tế bào gan được tạo thành từ iPSC cũng thể hiện là một mô hình có giá trị với chức năng và hình thái gần giống với các tế bào sơ cấp nhưng giảm thiểu được sự biến đổi và những hạn chế của tế bào sơ cấp. Tế bào gan có nguồn gốc từ iPSC còn cho thấy những triển vọng tuyệt vời trong việc tạo ra một mô sơ cấp (primary tissue) với đặc điểm hình thái, tính đồng nhất và sự sẵn có không giới hạn cũng như tiềm năng để tạo ra những tế bào với kiểu gen đặc biệt từ các cá thể khác nhau. Gần đây, việc tạo ra các khối tế bào hình cầu trong các

đĩa đáy tròn có độ bám dính thấp để đánh giá tác động của các độc tính lên gan đã trở nên phổ biến, vì quy trình thực hiện đơn giản và tương thích với kỹ thuật chụp ảnh chất lượng cao. Các phương pháp phân tích phổ biến sử dụng máy đọc đĩa trước đây phải phá vỡ cấu trúc của các khối tế bào trong dịch huyền phù hoặc ly giải tế bào để phân tích ATP và các chất chuyển hóa, trong khi phương pháp chụp ảnh chất lượng cao vẫn có thể mô tả được sự ảnh hưởng của các hợp chất hóa học mà không làm thay đổi hình thái và khả năng sống sót của tế bào.

Ưu điểm nổi bật của phương pháp này là có thể sử dụng kết hợp với nhiều loại chất nhuộm phát huỳnh quang khác nhau như các chất nhuộm đánh giá khả năng sống của tế bào, chất nhuộm nhân (ADN), marker cho quá trình apoptosis hay marker cho ty thể. Phương pháp này cũng có thể được mở rộng với các mô hình đa bào phức tạp biểu hiện nhiều marker huỳnh quang. Đặc biệt, với việc sử dụng độ phóng đại lớn hơn, phương pháp này cho phép cung cấp độ phân giải về từng tế bào, đặc điểm hình thái và nội dung của mỗi tế bào trong khối 3D, đồng thời còn cho ra

nhiều thông số về hình thái phức tạp của khối tế bào khi bị tác động bởi các hợp chất.

Trong nghiên cứu của mình, GS Oksana Sirenko (Hoa Kỳ) và cộng sự đã sử dụng phương pháp chụp ảnh đồng tiêu và phân tích hình ảnh 3D. Nghiên cứu này đã được công bố trên Tạp chí ASSAY and Drug Development Technologies năm 2017 với các bước thực hiện như sau: Đầu tiên các khối tế bào gan người dòng iCell Hepatocytes 2.0 và tế bào ung thư HepG2 được nuôi cấy để hình thành các khối tế bào 3D. Sau đó để đánh giá sự ảnh hưởng của độc tính trên tế bào, các khối tế bào được nuôi cấy và xử lý với hóa chất phù hợp trong 72 giờ. Tiếp đến các khối tế bào được nhuộm với hỗn hợp 3 thuốc nhuộm gồm Calcein AM, EthD-1 và Hoechst. Với những thí nghiệm đánh giá khả năng kích hoạt các tín hiệu apoptosis của hợp chất, CelleEvent Caspase 3/7 được bổ sung vào cùng với thuốc nhuộm nhân Hoechst trong dung dịch Hank's Balanced Salt. Để đánh giá khả năng gây độc đối với ty thể, các nhà khoa học đã sử dụng thuốc nhuộm ty thể Mito Tracker Orange kết hợp với thuốc nhuộm nhân Hoechst (dung dịch thuốc nhuộm được thêm trực tiếp



Đánh giá tác động của các độc tính lên gan dễ dàng hơn với phương pháp chụp ảnh đồng tiêu và phân tích hình ảnh 3D

vào môi trường). Các khối tế bào 3D được ủ với thuốc nhuộm trong 2 giờ trước khi chụp ảnh. Hình ảnh tế bào được chụp bởi hệ thống ImageXpress® Micro Confocal High-Content Imaging System và được phân tích bởi phần mềm MetaXpress®.

Kết quả ứng dụng phương pháp chụp ảnh đồng tiêu và phân tích hình ảnh 3D trong nghiên cứu đánh giá tác động của các độc tính lên gan cho thấy, với một quy trình đơn giản phương pháp này có thể cung cấp một số thông tin quan trọng cho phép đánh giá ảnh hưởng của các hợp chất thử nghiệm lên hình thái và khả năng sống của tế bào. Bằng cách sử dụng kết hợp các hợp chất gây độc cho gan, các nhà khoa học đã đánh giá được tác động gây độc của hỗn hợp thuốc thông qua nhiều dữ liệu khác nhau thu được như hình thái khối tế bào (sự thay đổi trong thể tích và kích thước), tính toàn vẹn (sự thay đổi về khoảng cách giữa các tế bào), khả năng sống (đếm số tế bào sống/ chết) và các thông số khác như

cường độ huỳnh quang trung bình. Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% đối tượng thử) từ các dữ liệu khác nhau cho thấy, việc đếm số lượng tế bào dương tính với calcein AM (tế bào có hoạt động trao đổi chất) là cách nhạy cảm nhất để đánh giá tác động của hóa chất và đưa ra đường cong độc tính phù hợp nhất. Các thông số khác sẽ cung cấp những thông tin về hình thái khối tế bào gây ra bởi thuốc, ví dụ như kích thước khối cầu, tính toàn vẹn hoặc đặc điểm của các tế bào chết. GS Oksana Sirenko và các đồng nghiệp của bà cũng lưu ý rằng, ánh sáng dễ dàng truyền qua các khối tế bào không còn nguyên vẹn nên số lượng tế bào sống đếm được cao hơn, dẫn đến sự sai lệch về giá trị IC_{50} thu được. Tuy nhiên, các khối tế bào không còn nguyên vẹn thường dự kiến chứa ít các tế bào sống nên sẽ hạn chế việc đếm thừa số tế bào sống trong giá trị IC_{50} .

Ngoài những kết quả nhận được ở trên, phương pháp chụp ảnh đồng tiêu và phân tích hình ảnh 3D còn cho phép xác định

đặc tính của các hợp chất độc tố thông qua hình dạng và kích thước (thể tích) khối cầu, số lượng tế bào và phân bố không gian, đặc điểm của nhân, số lượng và sự phân bố của các loại tế bào sống, tế bào chết theo chu trình (apoptosis), điện thế ty thể và cường độ biểu hiện marker cho tế bào sống. Kết quả này chỉ ra rằng, nghiên cứu đặc điểm hình thái sử dụng mô hình tế bào gan 3D có nguồn gốc iPSC phù hợp với việc sàng lọc thông lượng lớn và có thể sử dụng để đánh giá độc tính của tế bào gan trong điều kiện *in vitro*.

Tóm lại, mô hình khối tế bào 3D kết hợp với phương pháp phân tích 3D chất lượng cao hứa hẹn là một công cụ sàng lọc nhạy cảm có độ lặp cao để đánh giá độc tính tế bào gan. Với những kết quả đã đạt được, nhóm nghiên cứu của GS Oksana Sirenko cho biết sẽ ứng dụng những thành công trong phương pháp này để tiếp tục nghiên cứu với các loại tế bào khác, bổ sung thêm các marker để đọc các thông số như hypoxia (tình trạng thiếu oxy của tế bào), cytoskeleton (khung xương tế bào) và các quá trình kích hoạt kinase. Hướng nghiên cứu này cũng có thể được mở rộng với nhiều hệ thống 3D phức tạp hơn như nuôi cấy nhiều loại tế bào cùng lúc (ví dụ như tế bào Kupffer, nguyên bào sợi, tế bào nội mô) để nghiên cứu đặc tính của các quần thể tế bào khác nhau và vai trò của chúng trong quá trình gây độc và tổn thương gan.

Trần Thị Loan

(Lược dịch theo *ASSAY and Drug Development Technologies*)