

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN THỊ MỸ THÀNH

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG KHÁNG UNG THƯ
PHỔI NGƯỜI CỦA VIRUS VACCINE SỞI
TRÊN THỰC NGHIỆM**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI, NĂM 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN THỊ MỸ THÀNH

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG KHÁNG UNG THƯ
PHỔI NGƯỜI CỦA VIRUS VACCINE SỞI
TRÊN THỰC NGHIỆM**

Chuyên ngành: Dị ứng và Miễn dịch

Mã số: 62720109

(Khoa học Y sinh Mã số: 9720101)

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- 1. GS.TS. NGUYỄN LĨNH TOÀN**
- 2. TS. NGUYỄN VĂN ĐÔ**

HÀ NỘI, NĂM 2023

LỜI CẢM ƠN

Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc!

Tôi xin chân thành cảm ơn Đảng ủy, Ban Giám Hiệu trường Đại học Y Khoa Vinh đã tạo mọi điều kiện cho tôi được học nghiên cứu sinh đúng chuyên ngành mình yêu thích.

Tôi xin chân thành cảm ơn Đảng ủy, Ban Giám Hiệu trường Đại học Y Hà Nội, Phòng Sau đại học, Bộ môn Sinh lý bệnh - Miễn dịch Trường Đại học Y Hà Nội; Bộ môn Sinh lý bệnh, Viện nghiên cứu Y-Dược học Quân sự, Khoa Giải phẫu bệnh - Bệnh viện 103 Học viện Quân Y đã tạo điều kiện, giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn Bộ môn Sinh học tế bào, khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội và Khoa Hình thái, Viện 69, Bộ tư lệnh Lãng Chủ Tịch Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện, giúp đỡ tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến GS.TS. Nguyễn Linh Toàn, TS Nguyễn Văn Đô là những người Thầy đã tận tình trực tiếp dạy dỗ, dìu dắt, hướng dẫn và tạo mọi điều kiện cho tôi trong suốt quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận án này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn và kính trọng đến các Quý Thầy, Cô trong hội đồng chấm luận án đã dành nhiều thời gian và công sức chỉ bảo, giúp đỡ tôi hoàn thành bản luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự động viên, giúp đỡ vô tư, tận tình của TS Lê Duy Cương, TS Ngô Thu Hằng và các anh chị đi trước, đồng nghiệp, và bạn bè trong quá trình học tập.

Cuối cùng, tôi xin tỏ lòng biết ơn tới công ơn nuôi dạy của Thầy mẹ tôi, sự quan tâm giúp đỡ, động viên của Thầy mẹ, chồng, con, hai anh trai và chị dâu và bạn bè thân thiết để tôi có được ngày hôm nay.

Hà Nội, ngày tháng năm 2022

Nguyễn Thị Mỹ Thành

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan số liệu trong luận án là kết quả của nhóm nghiên cứu chúng tôi. Kết quả đề tài này là thành quả nghiên cứu của tập thể mà tôi là một thành viên chính. Tôi đã được toàn bộ các thành viên trong nhóm nghiên cứu đồng ý cho phép sử dụng đề tài này vào trong luận án để bảo vệ lấy bằng tiến sĩ. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả luận án

Nguyễn Thị Mỹ Thành

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Ung thư phổi	3
1.1.1. Tình hình ung thư phổi trên thế giới.....	3
1.1.2. Tình hình ung thư phổi ở Việt Nam	4
1.1.3. Nguyên nhân và các yếu tố nguy cơ ung thư phổi	5
1.1.4. Phân loại ung thư phổi.....	9
1.1.5. Cơ chế bệnh sinh của ung thư phổi.....	10
1.1.6. Các phương pháp điều trị ung thư phổi hiện nay tại Việt Nam.....	17
1.2. Liệu pháp virus vaccine sởi điều trị ung thư phổi người	21
1.2.1. Sinh học virus sởi	21
1.2.2. Virus vaccine sởi lây nhiễm đặc hiệu tế bào ung thư phổi.....	22
1.2.3. Các cơ chế virus vaccine sởi ly giải tế bào ung thư phổi	24
1.2.4. Đáp ứng miễn dịch vật chủ kháng MeV	34
1.2.5. Các thử nghiệm lâm sàng sử dụng MeV điều trị ung thư.....	35
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	37
2.1. Đối tượng nghiên cứu	37
2.1.1. Động vật.....	37
2.1.2. Vật liệu nghiên cứu.....	37
2.1.3. Trang thiết bị sử dụng trong nghiên cứu	38
2.2. Phương pháp nghiên cứu	39
2.2.1. Nuôi cấy và tăng sinh các dòng tế bào	39
2.2.2. Tăng sinh và chuẩn độ virus vaccine sởi	41
2.2.3. Đánh giá virus vaccine sởi ly giải tế bào bằng thử nghiệm MTT.....	45
2.2.4. Chuẩn bị mẫu tế bào H460 và A549 nhiễm MeV đánh giá tế bào chết theo chương trình bằng phương pháp dòng chảy	47
2.2.5. Phương pháp phân tích tế bào dòng chảy đánh giá tỉ lệ tế bào H460 và A549 chết theo chương trình	50

2.2.6. Phương pháp nuôi chuột thiếu hụt miễn dịch (chuột nude)	52
2.2.7. Tạo khối u tế bào H460 trên đùi chuột nude và tính thể tích khối u	53
2.2.8. Phương pháp điều trị chuột nude bằng MeV	54
2.2.9. Phương pháp đánh giá hiệu quả điều trị khối u tế bào H460 của MeV	54
2.2.10. Phương pháp phẫu tích lấy mô u tế bào H460 ở chuột nude sau điều trị bằng MeV.....	55
2.2.11. Xử lý mô u tế bào H460 thành mẫu tế bào để đánh giá tỉ lệ các tế bào miễn dịch và tế bào chết theo chương trình bằng phương pháp tế bào dòng chảy	56
2.2.12. Đánh giá siêu cấu trúc mô u tế bào H460 trên chuột nude sau điều trị bằng MeV	58
2.2.13. Phân tích giải phẫu bệnh mô u tế bào H460 cấy ghép trên chuột nude	59
2.2.14. Phương pháp phân tích kết quả.....	61
2.2.15. Đạo đức trong nghiên cứu	61
2.2.16. Hạn chế của nghiên cứu.....	62
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	65
3.1. Nuôi cấy, tăng sinh dòng tế bào H460 A549, Vero và virus vaccine sởi	65
3.1.1. Nuôi cấy, tăng sinh các dòng tế bào H460, A549 và Vero	65
3.1.2. Tăng sinh virus vaccine sởi	66
3.2. Chuẩn độ TCID ₅₀ của virus vaccine sởi.....	67
3.3. Ly giải trực tiếp tế bào ung thư phổi người dòng H460 và A549 của Virus vaccine sởi in vitro	68
3.3.1. Tế bào H460 và A549 nhiễm virus vaccine sởi tạo hợp bào in vitro	68
3.3.2. Hiệu quả ly giải tế bào ung thư phổi người H460 và A549 bằng thử nghiệm MTT của virus vaccine sởi.....	69
3.3.3. Đánh giá tỉ lệ tế bào H460 và A549 chết theo chương trình sau nhiễm MeV in vitro bằng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy	75
3.4. Virus vaccine sởi kháng u tế bào ung thư phổi H460 cấy ghép trên chuột thiếu hụt miễn dịch.....	87
3.4.1. Kết quả ghép u dòng tế bào ung thư phổi người H460	87

3.4.2. Kết quả điều trị chuột nude mang khối u tế bào ung thư phổi người H460 bằng virus vaccine sởi	88
3.4.3. Tỷ lệ tế bào u H460 cấy ghép trên chuột nude chết theo chương trình sau điều trị bằng MeV.....	91
3.4.4. Hình ảnh siêu cấu trúc tế bào u phổi H460 và A549 sau điều trị bằng virus vaccine sởi	94
3.4.5. Kết quả giải phẫu bệnh u tế bào H460 cấy ghép trên chuột Nude sau điều trị bằng MeV	96
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN	97
4.1. Tăng sinh các dòng tế bào Vero và tế bào ung thư phổi người H460 và A549 in vitro	97
4.1.1. Tăng sinh dòng tế bào Vero.....	97
4.1.2. Nuôi cấy, tăng sinh dòng tế bào ung thư phổi người H460 và A549.....	98
4.2. Tăng sinh virus vaccine sởi và Chuẩn độ TCID ₅₀	99
4.3. Virus vaccine sởi ly giải tế bào H460 và A540 in vitro	102
4.3.1. Ly giải trực tiếp bằng cách tạo hợp bào in vitro.....	102
4.3.2. Đánh giá hiệu quả của virus vaccine sởi ly giải tế bào H460 và A549 bằng nghiệm pháp MTT	104
4.3.3. MeV gây chết tế bào apoptosis dòng tế bào ung thư phổi H460 và A549 invitro	105
4.4. Virus vaccine sởi kháng u tế bào ung thư phổi người H460 cấy ghép trên chuột thiếu hụt miễn dịch	108
4.4.1. Đánh giá độc tính của virus vaccine sởi điều trị chuột thiếu hụt miễn dịch mang khối u tế bào ung thư phổi người H460.....	108
4.4.2. Virus vaccine sởi kháng u tế bào ung thư phổi người H460 trên chuột thiếu hụt miễn dịch	109
4.4.3. Virus vaccine sởi kích thích miễn dịch đặc hiệu kháng u tế bào ung thư phổi người H460 trên chuột thiếu hụt miễn dịch.....	112
4.4.4. MeV kháng tế bào u H460 cấy ghép trên chuột nude qua con đường chết tế bào apoptosis	117

4.4.5. Kết quả siêu cấu trúc tế bào u phổi người H460 ghép trên chuột thiếu hụt miễn dịch sau điều trị bằng virus vaccine sởi	119
4.4.6. Kết quả giải phẫu bệnh tế bào u phổi người H460 ghép trên chuột thiếu hụt miễn dịch sau điều trị bằng virus vaccine sởi	123
KẾT LUẬN	128
KHUYẾN NGHỊ.....	130
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI, LUẬN ÁN TÀI LIỆU THAM KHẢO PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC CHỮ, KÝ HIỆU VIẾT TẮT

AAH	Atypical Adenomatous Hyperplasia
Apoptosis	Chết theo chương trình
ATP	Adenosine Triphosphate
CDX	Cell Line Derived Xenograft
CEA	Carcinoembryonic Antigen
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
DC	Dedritic Cell
DNA	Deoxyribonucleic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
F	Fusion (hòa màng)
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein isothiocyanate
H	Hemagglutinin
HLA	Human leukocyte antigen
HR/CI	Hazard Ratio/Confidence Intervals
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LUAD	Lung adenocarcinoma
LUSC	Lung squamous cell carcinoma
MeV	Mealse vaccine virus
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOI	Multiplicity of infection
MTT	3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MV	Mealse virus
MV-Edm	Measles virus strain Edmonston.
NIH-AARP	National Institutes of Health- American Association of Retired Persons

NIS	Sodium-Iodine Symporter
NK	Natural Killer
NSCLC	Non-small cell lung cancer
OV	Oncolytic Virus
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD1	Programmed Cell Death Protein 1
PDL1	Programmed Cell Death Ligand 1
PFU	Plaque forming units
PI	Propidium iodide
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive Oxygen Species
SCLC	Small cell lung cancer
TAA	Tumor-Associated Antigens
TCID	Tissue Culture Infectious Dose
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF	Tumor necrotic factor
UTP	Ung thư phổi
VATS	Video-assisted thoracoscopic surgery
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Wnt	Wingless-related integration

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng	Tên bảng	Trang
Bảng 1.1.	Các thử nghiệm lâm sàng của MeV	36
Bảng 3.1.	Tỉ lệ tế bào H460 và A549 sống ở ngày thứ 3 nhiễm MeV	69
Bảng 3.2.	Tỉ lệ tế bào H460 và A549 sống ở ngày thứ 4 nhiễm MeV	71
Bảng 3.3.	So sánh tỉ lệ tế bào H460 và A549 sống theo thời gian nhiễm MeV ..	73
Bảng 3.4.	Kết quả tạo khối u tế bào H460 trên đùi chuột nude	87
Bảng 3.5.	Kết quả theo dõi sức khỏe chuột trong điều trị MeV	88

DANH MỤC CÁC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ	Tên biểu đồ	Trang
Biểu đồ 3.1.	Kết quả MTT của tế bào H460 nhiễm MeV ngày thứ 3.....	69
Biểu đồ 3.2.	Kết quả MTT của tế bào A549 nhiễm MeV ngày thứ 3.....	70
Biểu đồ 3.3.	Kết quả MTT ở ngày thứ 4 nhiễm MeV	71
Biểu đồ 3.4.	Kết quả MTT ở ngày thứ 4 nhiễm MeV	72
Biểu đồ 3.5.	So sánh tỷ lệ tế bào H460 sống theo các thời điểm nhiễm MeV ..	73
Biểu đồ 3.6.	So sánh tỷ lệ tế bào A549 sống theo các thời điểm nhiễm MeV ..	74
Biểu đồ 3.7.	Tỉ lệ tế bào H460 nhiễm MeV ngày thứ 3 chết theo chương trình ...	76
Biểu đồ 3.8.	Tỉ lệ tế bào H460 nhiễm MeV ngày thứ 4 chết theo chương trình	77
Biểu đồ 3.9.	Tỉ lệ tế bào H460 nhiễm MeV ngày thứ 5 chết theo chương trình	79
Biểu đồ 3.10.	So sánh tế bào H460 chết theo chương trình theo ngày nhiễm MeV...	80
Biểu đồ 3.11.	Tỉ lệ tế bào A549 chết theo chương trình ở ngày thứ 3 nhiễm MeV ...	81
Biểu đồ 3.12.	Tỉ lệ tế bào A549 chết theo chương trình ở ngày thứ 4 nhiễm MeV ...	83
Biểu đồ 3.13.	Tỉ lệ tế bào A549 nhiễm MeV ngày thứ 5 chết theo chương trình ...	85
Biểu đồ 3.14.	So sánh tế bào A549 chết theo chương trình theo ngày nhiễm MeV...	86
Biểu đồ 3.15.	Thay đổi trọng lượng chuột sau điều trị bằng MeV.....	88
Biểu đồ 3.16.	Kết quả kích thước khối u sau điều trị bằng MeV	89
Biểu đồ 3.17.	So sánh thời gian sống và tỉ lệ sống-chết của chuột sau điều trị bằng MeV	90
Biểu đồ 3.18.	Tỉ lệ tế bào u H460 chết theo chương trình sau điều trị MeV	92
Biểu đồ 3.19.	Kết quả tỉ lệ các tế bào miễn dịch ở mô u tế bào H460 trên chuột nude sau điều trị bằng MeV.....	93

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
Hình 1.1.	Sơ đồ cấu trúc virus sởi.....	21
Hình 1.2.	MeV kích hoạt hệ miễn dịch kháng tế bào u.....	31
Hình 2.1.	Các máy sử dụng cho nghiên cứu	38
Hình 2.2.	Hình ảnh buồng đếm Neubauer.....	41
Hình 2.3.	Sơ đồ nhiễm MeV để chuẩn độ TCID ₅₀	43
Hình 2.4.	Pha loãng nồng độ MeV.....	44
Hình 2.5.	Sơ đồ nhiễm MeV theo các nhóm đánh giá tỉ lệ tế bào chết theo chương trình <i>in vitro</i>	48
Hình 2.6.	Mẫu xác định thông số chuẩn máy trên phần mềm BD FACS Diva đánh giá tỉ lệ tế bào chết apoptosis và tế bào hoại tử.....	52
Hình 2.7.	Buồng và lồng nuôi chuột nude	53
Hình 2.8.	Ghép u tế bào H460.....	53
Hình 2.9.	Xác định thông số chuẩn cho máy bằng phần mềm BD FACS Diva	57
Hình 3.1.	Tế bào ung thư phổi dòng H460 bám đáy và phát triển.....	65
Hình 3.2.	Tế bào ung thư phổi dòng A549 bám đáy và phát triển.....	65
Hình 3.3.	Tế bào Vero bám đáy và phát triển	65
Hình 3.4.	Tế bào Vero nhiễm MeV.....	66
Hình 3.5.	Kết quả chuẩn độ TCID ₅₀ sử dụng thuốc nhuộm xanh methylen.....	67
Hình 3.6.	Hình ảnh tế bào H460 và A549 nhiễm MeV tạo hợp bào <i>in vitro</i>	68
Hình 3.7.	Kết quả flow cytometry của tế bào H460 nhiễm MeV ngày thứ 3	75
Hình 3.8.	Kết quả flow cytometry của tế bào H460 nhiễm MeV ngày thứ 4	77
Hình 3.9.	Kết quả flow cytometry của tế bào H460 nhiễm MeV ngày thứ 5	78
Hình 3.10.	Kết quả flow cytometry của tế bào A549 nhiễm MeV ngày thứ 3	81
Hình 3.11.	Kết quả flow cytometry của tế bào A549 nhiễm MeV ngày thứ 4	82
Hình 3.12.	Kết quả flow cytometry tế bào A549 nhiễm MeV ngày thứ 5.....	84
Hình 3.13.	Kết quả ghép u tế bào H460 dưới da đùi chuột nude.....	87

Hình 3.14. Kết quả flow cytometry tế bào u H460 chết theo chương trình.....	91
Hình 3.15. Hình ảnh siêu cấu trúc tế bào u H460 không nhiễm virus	94
Hình 3.16. Hình ảnh siêu cấu trúc tế bào H460 hoại tử sau tiêm MeV	94
Hình 3.17. Siêu cấu trúc MeV xâm nhập vào tế bào u phổi H460	95
Hình 3.18. Hình ảnh siêu cấu trúc tế bào u H460 chết theo chương trình sau tiêm MeV.....	95
Hình 3.19. Hình ảnh giải phẫu bệnh tế bào u phổi bình thường	96
Hình 3.20. Hình ảnh giải phẫu bệnh tế bào u phổi hoại tử sau tiêm MeV	96

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư phổi (UTP) là loại ung thư phổ biến đứng thứ 2 trên toàn thế giới, sau ung thư vú. Theo thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), năm 2020 có khoảng 2,21 triệu ca UTP mới và 1,8 triệu ca tử vong do UTP trên thế giới.¹ UTP là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong do ung thư ở cả nam và nữ. Mặc dù đã có nhiều tiến bộ trong sàng lọc, phân loại, chẩn đoán, tiên lượng nhưng UTP vẫn là một thách thức đối với các nhà lâm sàng. Điều trị UTP hiện nay là điều trị đa phương thức bao gồm: phẫu thuật, xạ trị và/hoặc điều trị hệ thống (hóa chất, điều trị hormon, liệu pháp điều trị đích). Bệnh thường được phát hiện ở giai đoạn muộn, khối u lớn và di căn, tỷ lệ sống trên 5 năm thay đổi tùy giai đoạn của bệnh và loại mô bệnh học, tuy nhiên số lượng ước tính dưới 18% cho tất cả các giai đoạn của bệnh. Hơn 50% trường hợp tử vong trong vòng 1 năm sau khi được chẩn đoán UTP.¹

Trị liệu ung thư bằng virus ly giải tế bào u (Oncolytic virus-OV) đã có lịch sử gần 100 năm. Tuy nhiên, liệu pháp OV được mở ra bắt đầu từ những năm đầu thập kỷ 90 của thế kỷ 20. Nhiều thử nghiệm lâm sàng giai đoạn I-III, đã chứng minh liệu pháp OV dung nạp tốt, có nhiều hứa hẹn. Talimogene laherparepvec là OV đầu tiên được FDA đã phê duyệt cho điều trị u hắc tố trên lâm sàng năm 2015.² Liệu pháp OV có nhiều ưu thế hơn các liệu pháp cổ điển như: ít tác dụng phụ, có khả năng tự tăng cường các hoạt động kháng u thông qua quá trình xâm nhập đặc hiệu vào tế bào ung thư, virus tự sao chép nhân lên và ly giải tế bào ung thư. Quá trình ly giải tế bào ung thư của virus trong liệu pháp OV, dẫn tới hai hiệu ứng: một là, các virus vừa được giải phóng từ quá trình ly giải tế bào tiếp tục lây nhiễm lan rộng ra các tế bào u lân cận; mặt khác các sản phẩm protein, mảnh vỡ tế bào ung thư có tác dụng kích thích miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu chống lại mô ung thư, làm tăng cường hiệu quả kháng u. Chính vì vậy, liệu pháp OV có khả năng áp dụng

rộng rãi cho nhiều loại ung thư. Đến nay, nhiều OV được biến đổi bộ gen nhằm tăng khả năng lây nhiễm và ly giải tế bào ung thư đặc hiệu.

Trong các chủng OV, virus vaccine sởi sống, giảm độc lực (Live-attenuated measles virus: MeV) sử dụng trong điều trị một số ung thư người đã được chứng minh có hiệu quả. Nhiều thử nghiệm lâm sàng sử dụng MeV bằng các con đường khác nhau: tiêm nội u, tiêm tĩnh mạch, tiêm phúc mạc, tiêm màng phổi... điều trị các loại ung thư như: u lympho tế bào T ở da, ung thư đại trực tràng, ung thư buồng trứng, u nguyên bào đệm đa dạng, UTP... với kết quả nhiều hứa hẹn.

Ở Việt Nam, sử dụng MeV điều trị ung thư là liệu pháp có tiềm năng đang được quan tâm nghiên cứu. Nước ta đã làm chủ được công nghệ tiên tiến sản xuất vaccine sởi, tiêm chủng an toàn trên người. Gần đây, Học viện Quân y đã nghiên cứu tác dụng của virus vaccine sởi dùng đơn và phối hợp điều trị trên 10 dòng ung thư máu người khác nhau và các dòng tế bào tạo khối u rắn cho thấy, MeV có tác dụng kháng ung thư rõ rệt. Đến nay vẫn chưa có nghiên cứu nào đi sâu đánh giá hiệu quả MeV kháng UTP người trên thực nghiệm. Nghiên cứu hiệu quả MeV kháng UTP người sẽ mở đầu cho việc đi sâu nghiên cứu, áp dụng một phương pháp mới điều trị UTP trên lâm sàng. Trên cơ sở đó chúng tôi tiến hành đề tài: ***"Nghiên cứu tác dụng kháng ung thư phổi của virus vaccine Sởi trên thực nghiệm"*** với hai mục tiêu sau:

1. *Đánh tác dụng của virus vaccine Sởi trên tế bào ung thư phổi người (A549 và H460) in vitro.*
2. *Đánh giá hiệu quả kháng ung thư của virus vaccine Sởi trên mô hình chuột thiếu hụt miễn dịch mang khối ung thư phổi người dòng tế bào H460.*

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Ung thư phổi

1.1.1. Tình hình ung thư phổi trên thế giới

Ung thư phổi (UTP) là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong liên quan đến ung thư ở Hoa Kỳ cho cả nam và nữ. Trong năm 2018 có số lượng người Mỹ chết vì UTP vượt quá số lượng 3 loại ung thư phổ biến tiếp theo cộng lại (ung thư đại tràng, vú và tuyến tiền liệt). Tỷ lệ sống thêm chung trong 60 tháng đối với bệnh UTP không tế bào nhỏ (Non-small cell lung carcinoma - NSCLC) vẫn thấp, từ 68% ở bệnh nhân bệnh giai đoạn IB xuống 0% đến 10% ở bệnh nhân giai đoạn IVA-IVB.³

Ở Châu Âu, UTP là dạng ung thư được chẩn đoán phổ biến thứ hai sau ung thư tuyến tiền liệt ở nam giới và là loại ung thư phổ biến thứ ba sau ung thư vú và ung thư đại trực tràng ở nữ giới. Vào năm 2020, khoảng 320.000 người ở các nước Châu Âu được chẩn đoán mới mắc UTP, và bệnh này được dự đoán sẽ tiếp tục là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong do ung thư với hơn 257.000 trường hợp tử vong trên toàn Châu Âu.⁴ Các yếu tố nguy cơ chính của UTP là hút thuốc lá và yếu tố môi trường, đặc biệt là ô nhiễm không khí. Năm 2020, tỷ lệ mắc bệnh UTP ở nam giới nói chung ở Châu Âu là gần 100/100.000 người, cao hơn gấp đôi tỷ lệ ở nữ giới (45/100.000 người). Ở Đan Mạch và Thụy Điển, tỷ lệ mắc bệnh này gần như giống nhau ở nam và nữ, phản ánh khoảng cách giới về hút thuốc ngày càng thu hẹp trong những thập kỷ gần đây. Tỷ lệ tử vong do UTP vào năm 2020 là 54/100.000 dân ở Châu Âu nói chung. Sự khác biệt về tỷ lệ tử vong do bệnh này giữa các quốc gia là hơn 3 lần đối với nam giới và hơn 4 lần đối với nữ giới. Năm 2020, Hungary được dự đoán là quốc gia có tỷ lệ tử vong do UTP cao nhất đối với cả nam và nữ. Ở các nước Bắc Âu như Thụy Điển và Đan Mạch phản ánh sự

khác biệt về tỷ lệ mắc bệnh, khoảng cách về tỷ lệ tử vong theo giới tính là nhỏ, ở một số nước Nam và Đông Âu (ví dụ: Hy Lạp và Estonia) lại lớn.⁵ So với ung thư vú và ung thư đại trực tràng, UTP vẫn là ung thư có khả năng sống sau chẩn đoán tương đối thấp. Theo thống kê 2010-2014, đối với những bệnh nhân được chẩn đoán UTP trong các giai đoạn, xác suất tích lũy sống thêm sau ít nhất 5 năm (sau khi điều chỉnh các nguyên nhân tử vong khác) trung bình là 15% ở các nước Châu Âu. Xác suất này nằm trong khoảng từ 10% trở xuống ở Croatia, Lithuania và Bulgaria đến 20% ở Áo, Thụy Điển, Iceland và Thụy Sĩ. Điều này cho thấy sự khác biệt đáng kể trong việc chẩn đoán, tiếp cận kịp thời với thuốc và các phương pháp điều trị. Nhiều loại dược phẩm khác nhau đã được công nhận và được bảo hiểm chi trả cho điều trị UTP ở châu Âu rất khác nhau giữa các quốc gia.⁵ Trong khoảng thời gian từ 2000-2004 đến 2010-2014, thời gian sống thêm 5 năm sau khi chẩn đoán UTP đã tăng trung bình từ 11% lên 15% ở các nước Châu Âu.⁵

Nhìn chung, tỷ lệ tử vong do UTP đã theo xu hướng giảm, tỷ lệ mắc bệnh với thời gian chẩn đoán muộn thì xác suất sống thêm vẫn tương đối thấp ở tất cả các quốc gia. Điều này một phần là do chưa có các chương trình tầm soát UTP quy mô lớn nào ở các nước châu Âu, đặc biệt là đối với các nhóm dân số có nguy cơ cao, vì vậy làm hạn chế khả năng phát hiện và điều trị UTP ở giai đoạn đầu. Hiệu quả điều trị UTP vẫn còn nhiều khó khăn do bệnh thường được phát hiện ở giai đoạn muộn, bệnh nhân lớn tuổi, sự không đồng nhất về đột biến gen, typ mô bệnh học... Do đó, cách tiếp cận hứa hẹn nhất để giảm tỷ lệ tử vong do UTP là tăng cường phòng ngừa để giảm tỷ lệ mắc bệnh hơn nữa, đặc biệt là thông qua các chính sách kiểm soát thuốc lá và chính sách giảm ô nhiễm không khí.

1.1.2. Tình hình ung thư phổi ở Việt Nam

Năm 2019, GLOBOCAN cho thấy UTP là ung thư phổ biến và nguyên nhân thứ hai gây tử vong do ung thư ở người Việt Nam. Kể từ năm 2012,

người ta ước tính khoảng 26.262 trường hợp mắc và 25.272 trường hợp tử vong do ung thư vào năm 2020. Tỷ lệ tử vong do UTP được chuẩn hóa theo độ tuổi tăng đều đặn từ năm 1990 đến năm 2019, với ước tính 26,11/100.000 người vào năm 2019. Việt Nam ở vị trí thứ 37 về tỷ lệ tử vong do UTP trên toàn thế giới.⁶ Tại Việt nam, UTP là bệnh ung thư được chẩn đoán phổ biến nhất ở nam giới và là bệnh ung thư đứng hàng thứ tư ở phụ nữ. Trên cơ sở dữ liệu từ năm 2013 đến năm 2017 từ Hà Nội và Thành phố Hồ Chí Minh, tỷ lệ mắc chuẩn theo tuổi là 32,03 /100.000 dân đối với nam và 10,48/100.000 đối với nữ. Tỷ lệ mắc bệnh theo độ tuổi trong năm 2013 đến năm 2017, ở mức thấp đối với nhóm tuổi dưới 40 tuổi và tỷ lệ ung thư gia tăng theo tuổi, tỷ lệ cao nhất ở nhóm 65 đến 79 tuổi ở cả nam và nữ. Tuy nhiên, số ca UTP tuyệt đối được dự báo sẽ tiếp tục tăng ở cả hai thành phố, với dự báo 6.198 ca nam và 2.311 ca nữ vào năm 2025 do sự gia tăng dân số già hóa và tác động của thuốc lá và ô nhiễm môi trường. Tỷ lệ sống thêm sau 5 năm của bệnh UTP ở Việt Nam là 14,8%.⁷

1.1.3. Nguyên nhân và các yếu tố nguy cơ ung thư phổi

1.1.3.1. Hút thuốc lá

Hút thuốc lá là yếu tố nguy cơ quan trọng nhất đối với UTP. Hút thuốc lá chủ động hay thụ động (bao gồm hút thuốc lá, xì gà và thuốc lá) đều làm tăng nguy cơ UTP. Các nghiên cứu cũng cho thấy nguy cơ UTP do hút thuốc lá tăng theo số lượng thuốc lá hút mỗi ngày và số năm hút thuốc. Những người hút thuốc có nguy cơ mắc UTP cao gấp 20-50 lần so với những người không hút thuốc. Nguy cơ UTP gia tăng cũng đã được chứng minh tùy theo từng khu vực và tiêu thụ các sản phẩm thuốc lá địa phương.⁸ Tỷ lệ UTP cao hơn ở người Mỹ gốc Phi so với các nhóm dân tộc khác ở Hoa Kỳ có lẽ được giải thích là do họ tiêu thụ nhiều thuốc lá hơn. Mặc dù có sự khác biệt về thành phần, hàm lượng các chất trong mỗi điếu thuốc lá của các sản phẩm thuốc lá trên thị trường không được công bố rõ ràng để có thể so sánh với các

sản phẩm thuốc lá truyền thống (cigar, thuốc lá) về mức độ nguy cơ gây UTP. Bên cạnh đó tính nhạy cảm di truyền cũng có thể đóng vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh của UTP giữa các chủng tộc người khác nhau.⁹

1.1.3.2. Ô nhiễm không khí

Ô nhiễm không khí trong nhà được coi là một yếu tố nguy cơ chính gây UTP. Điều này bao gồm đốt than trong những ngôi nhà thông gió kém, đốt củi và các nhiên liệu rắn khác, cũng như khói từ quá trình nấu nướng ở nhiệt độ cao sử dụng dầu thực vật chưa tinh chế như dầu hạt cải. Các nghiên cứu dịch tễ học cũng chứng minh được mối liên hệ chặt chẽ giữa việc tiếp xúc với chất ô nhiễm không khí và bệnh UTP. Trong một số nghiên cứu thuần tập, các phép đo môi trường đối với các hạt mịn gợi ý về sự gia tăng nhẹ nguy cơ ở những người được xếp vào nhóm tiếp xúc nhiều nhất với ô nhiễm không khí. Cơ quan nghiên cứu ung thư quốc tế đã phân loại ô nhiễm không khí ngoài trời như một chất gây UTP ở người.^{10,11}

1.1.3.3. Chế độ ăn và uống rượu

Có bằng chứng từ các nghiên cứu bệnh chứng cho thấy chế độ ăn nhiều rau và trái cây, đặc biệt là các loại rau họ cải, có thể tạo ra một số tác dụng bảo vệ chống lại UTP. Isothiocyanates trong bắp cải là một nhóm hoạt chất có hoạt tính ngăn ngừa ung thư trong đó có UTP. Ăn nhiều thịt, đặc biệt là thịt đỏ rán hoặc rán kỹ, có thể làm tăng nguy cơ UTP và điều này có thể liên quan đến việc hình thành chất nitrosamine gây ung thư trong quá trình nấu ăn. Một phân tích tổng hợp của tám nghiên cứu thuần tập không cung cấp bằng chứng về việc tăng nguy cơ UTP khi ăn nhiều chất béo tổng hoặc chất béo bão hòa.¹² Nhiều nghiên cứu đã đề cập đến nguy cơ UTP theo lượng ước tính của β -carotene hoặc tổng số carotenoid (tương ứng với tổng của α - và β -carotene).¹³ Trong một báo cáo từ nghiên cứu NIH-AARP, uống cà phê có liên quan đến UTP (HR; 95% CI uống ≥ 6 cốc/ngày so với không uống: 4,56 (4,08–5,10)).¹⁴ Có một số bằng chứng về tác dụng ngăn ngừa UTP của trà ở những người hút

thuốc, đặc biệt là trà xanh.¹⁵ Do mối tương quan chặt chẽ giữa việc uống rượu và hút thuốc lá ở nhiều dân số, rất khó để làm sáng tỏ sự đóng góp của rượu vào quá trình bệnh sinh UTP trong khi kiểm soát đúng cách tác động gây nhiều tiềm ẩn của thuốc lá, vì không có mối liên quan nhất quán nào được quan sát thấy ở những người uống rượu mà không bao giờ hút thuốc.

1.1.3.4. Phơi nhiễm nghề nghiệp

Tiếp xúc nghề nghiệp đóng một vai trò quan trọng trong căn nguyên UTP, nguy cơ UTP tăng lên ở những người lao động làm việc trong một số ngành và nghề. Hai nghiên cứu đã báo cáo ước tính tỷ lệ các trường hợp UTP do tác nhân nghề nghiệp ở Anh là 14,5% nói chung¹⁶ và 12,5% ở nam giới ở Pháp¹⁷. Các chất gây UTP do ảnh hưởng của nghề nghiệp quan trọng nhất được báo cáo là: amiăng, silica (một oxit của silic), radon, các kim loại nặng và hydrocacbon thơm đa vòng... Các hợp chất crom làm tăng nguy cơ UTP ở những công nhân sản xuất cromat, nhà sản xuất sắc tố cromat, đĩa crom và nhà sản xuất ferrochromium. Không có nguy cơ nào như vậy được phát hiện ở những công nhân chỉ tiếp xúc với các hợp chất crom. Các nghiên cứu về thợ mỏ, lò luyện niken, công nhân điện phân và các nhà sản xuất hợp kim niken cao cho thấy nguy cơ UTP tăng lên. Các bằng chứng hiện chưa có không mối liên hệ rõ ràng giữa các loại muối niken khác nhau mà công nhân tiếp xúc với UTP. Hầu hết các nghiên cứu về mối liên quan giữa tiếp xúc với khí thải diesel và UTP cho thấy nguy cơ gia tăng ở mức khiêm tốn. Tiếp xúc với dầu diesel tích lũy có liên quan đến tăng nguy cơ UTP với tỷ lệ chênh lệch là 1,31 và mối quan hệ giữa phơi nhiễm và bệnh có ý nghĩa (giá trị $p < 0,01$).¹⁸

1.1.3.5. Nhiễm trùng mạn tính và các bệnh lý khác

Một số nghiên cứu đã gợi ý bệnh nhân mắc bệnh phổi phế quản tắc nghẽn mãn tính có nguy cơ bị UTP cao hơn, điều này không phụ thuộc vào việc hút thuốc lá. Tuy nhiên, một nghiên cứu đã không xác nhận điều này và kết luận rằng không thể loại trừ tác dụng còn lại của việc hút thuốc ở những người bệnh phổi phế quản tắc nghẽn mãn tính. Một phân tích tổng hợp các

nghiên cứu UTP và bệnh hen suyễn ở những người không bao giờ hút thuốc đã báo cáo nguy cơ tương đối là 1,8 (CI 95% 1,3–2,3).¹⁹ Bệnh nhân lao phổi có nguy cơ bị UTP cao hơn. Nguy cơ UTP trên những bệnh này được cho là liên quan đến tình trạng viêm mạn tính ở phổi.

1.1.3.6. Bức xạ ion hóa

Tiếp xúc với bức xạ ion hóa làm tăng nguy cơ UTP. Nguy cơ gia tăng UTP này đã được nghiên cứu ở những người sống sót sau bom nguyên tử, cũng như những bệnh nhân được điều trị bằng xạ trị (RR:1,5–2 đối với phơi nhiễm tích lũy vượt quá 100 cGy). Những người khai thác mỏ dưới lòng đất tiếp xúc với radon phóng xạ và các sản phẩm phân rã của nó, phát ra các hạt α , luôn có nguy cơ mắc UTP cao hơn. Một phân tích tổng hợp đã ước tính mức tăng nguy cơ tương quan tuyến tính, ~6% cho mỗi năm tiếp xúc ở mức độ làm việc (1 năm mức độ làm việc = 1 lần tiếp xúc ở mức độ làm việc $\times$ 170 giờ $\times$ 12 tháng).²⁰

1.1.3.7. Tiền sử gia đình và gen biến thể

Tiền sử gia đình có người thân bị UTP đã được xem là một yếu tố nguy cơ cao đối với UTP khởi phát sớm. Một phân tích mối liên quan các dòng họ có nguy cơ cao đã xác định được vị trí nhạy cảm chính là nhiễm sắc thể 6q23–25. Nguy cơ UTP cũng tăng lên khi có hội chứng Li-Fraumeni, đặc trưng bởi đột biến dòng mầm trong gen ức chế khối u *p53*.²¹

1.1.3.8. Đa hình gen

Các nghiên cứu liên quan bộ gen gần đây đã xác định nhiều đa hình gen tiềm ẩn nguy cơ gây UTP bằng cách sử dụng đến một triệu gán thể đa hình đơn nucleotide để xác định các biến thể di truyền phổ biến. Ba locus nhạy cảm chính được xác định là ở các vùng 15q25, 5p15 và 6p21, nhưng nhiều biến thể khác cũng đã được nói đến.²² Một vị trí nhạy cảm mới khác cũng được báo cáo là locus 9p21 ở người da trắng chỉ nhạy cảm với UTP tế bào vảy. Ngoài ra, một số locus mới cũng đã báo cáo ở người Châu Á có các locus

nhạy cảm với UTP bao gồm 3q28 và 22q12. Một phân tích khác trên 1000 bộ gen các đối tượng người châu Âu và xác định mối liên hệ các biến thể *BRCA2* p.Lys3326X (rs11571833) và *CHEK2* p.Ile157Thr (rs17879961) có liên quan nhiều với bệnh UTP tế bào vảy hiếm gặp.²³

1.1.4. Phân loại ung thư phổi

Có 2 dạng chính của UTP: UTP không tế bào nhỏ (Non-Small cell lung carcinoma-NSCLC) chiếm tỉ lệ đến 85% và UTP tế bào nhỏ (Small cell lung carcinoma-SCLC) chiếm tỉ lệ 15%. WHO phân NSCLC thành 3 loại chính: ung thư biểu mô tuyến, ung thư biểu mô tế bào vảy và ung thư tế bào lớn. Ngoài ra còn có một số biến thể khác và phân nhóm ung thư kết hợp trên lâm sàng.²⁴

1.1.4.1. Ung thư phổi tế bào nhỏ

Loại UTP tế bào nhỏ thường là do hút thuốc, là loại ung thư rất ác tính, có xu hướng lan rộng từ khá sớm. UTP tế bào nhỏ cũng được phân loại thành khối u thần kinh nội tiết ở phổi. Đây là những khối u hiếm gặp, chiếm 13% tổng số các loại UTP phát triển trong các tế bào của hệ thống nội tiết thần kinh ở phổi.²⁵

1.1.4.2. Ung thư phổi không tế bào nhỏ

Các loại NSCLC phổ biến nhất là ung thư biểu mô tế bào vảy, ung thư biểu mô tế bào lớn và ung thư biểu mô tuyến. Một số phân loại ít phổ biến hơn là u carcinoid màng phổi, ung thư biểu mô tuyến nước bọt và ung thư biểu mô không phân loại. Ung thư biểu mô tế bào không phải tế bào vảy gần như chiếm một nửa tổng số NSCLC.

- *Ung thư biểu mô tuyến*: hiện là loại UTP phổ biến nhất ở những người không bao giờ hút thuốc. Ung thư biểu mô tuyến chiếm khoảng 40% các trường hợp UTP ở người không hút thuốc.²⁶ Trong lịch sử, ung thư biểu mô tuyến thường được nhìn thấy ở ngoại vi ở phổi. Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây cho thấy rằng tỷ lệ tổn thương ở trung tâm và ngoại vi có sự thống nhất cho cả ung thư biểu mô tuyến và ung thư biểu mô tế bào vảy.

- *Ung thư biểu mô tế bào vảy*: là loại UTP hay gặp ở nam giới. Nó tương quan chặt chẽ với tiền sử hút thuốc lá, nhiều hơn so với hầu hết các loại UTP khác. Theo các nghiên cứu gần đây, nguy cơ tương đối của ung thư biểu mô phổi tế bào vảy là khoảng 5,5 ở những người có thời gian hút thuốc trước đó từ 1 đến 20 năm hoặc từ 20 đến 30 năm, so với những người "không bao giờ hút thuốc" (người không hút thuốc suốt đời). Nguy cơ tương đối tăng lên khoảng 16 với thời gian hút thuốc trước đó từ 30 đến 40 năm, và tăng lên khoảng 22 với hơn 40 năm hút thuốc.²⁷

- *Ung thư biểu mô phổi tế bào lớn*: Là một nhóm không đồng nhất của các khối u ác tính không biệt hóa có nguồn gốc từ các tế bào biểu mô đã biến đổi ở phổi.

1.1.4.3. Một số loại ung thư phổi khác

Những loại này ít phổ biến hơn nhiều so với UTP tế bào nhỏ và UTP không tế bào nhỏ, chúng chỉ chiếm 5% -10% các trường hợp UTP.²⁷

- *Carcinoid phế quản*: chiếm tới 5% các trường hợp UTP. Các khối u này thường nhỏ (3-4 cm hoặc nhỏ hơn) và xảy ra phổ biến nhất ở những người dưới 40 tuổi, không liên quan đến hút thuốc lá. Các khối u carcinoid có thể di căn và có một tỷ lệ nhỏ tiết ra các chất giống như hormone. Ung thư carcinoid thường phát triển chậm hơn so với ung thư khác.

- *Ung thư mô hỗ trợ ở phổi*: Thường rất hiếm, như ung thư cơ trơn, mạch máu hoặc các tế bào liên quan đến phản ứng miễn dịch ở phổi.

1.1.5. Cơ chế bệnh sinh của ung thư phổi

Người ta đã chứng minh sự hình thành khối u theo nhiều bước, trong đó các khối u phát triển thông qua một loạt các thay đổi tiến triển bệnh lý (tổn thương tiền ung thư) với các sai lệch gen và ngoại gen tương ứng, ở các cơ quan khác nhau, bao gồm da, phổi và đại tràng. Tăng sản, chuyển sản vảy, loạn sản vảy và ung thư biểu mô tại chỗ, bao gồm những thay đổi ở ống khí phế quản có trước hoặc kèm theo ung thư biểu mô tế bào vảy phổi (Lung

squamous cell carcinoma-LUSC) xâm lấn. Bản thân các tổn thương loạn sản vảy thường được phân loại theo mức độ khác nhau - nhẹ, vừa và nặng - dựa trên một loạt các thay đổi không điển hình về tế bào học và mô học. Các thay đổi bệnh lý và phân tử tiền ung thư liên quan đến LUSC chỉ ra nhiều giai đoạn trong sự phát triển của phân nhóm UTP này từ niêm mạc đường hô hấp. Mặt khác, các nghiên cứu đã gợi ý rằng sự tích tụ của các bất thường cấp độ phân tử vượt quá một ngưỡng nhất định, chứ không phải là thay đổi trình tự, là cơ sở cho sự phát triển của kiểu hình ác tính.²⁸ Ví dụ, các thay đổi tiền ác tính tuần tự đã được ghi nhận rất ít đối với ung thư biểu mô tuyến phổi (Lung adenocarcinoma - LUAD), khối u thần kinh nội tiết và SCLC. Tăng sản u tuyến không điển hình là chuỗi thay đổi hình thái duy nhất được xác định cho đến nay đối với sự phát triển của LUAD xâm lấn. Tăng sản tế bào thần kinh nội tiết phổi tự phát lan tỏa, một tổn thương hiếm gặp bao gồm tăng sinh cục bộ lòng ống đường hô hấp dưới dạng khối u nhỏ lành tính, được coi là tổn thương tiền thân của ung thư carcinoid nội tiết thần kinh ở phổi. Đáng chú ý, không có tổn thương tiền ung thư nào được biết đến đối với loại u phổi nội tiết thần kinh phổ biến nhất, SCLC. Sự phát triển của kiểu hình ác tính ở phổi dường như là do sinh bệnh học phân tử theo từng bước, đặc hiệu theo trình tự và đa tầng và do sự tích tụ và kết hợp của các bất thường gen và ngoại gen.²⁸

1.1.5.1. Cơ chế bệnh sinh ung thư biểu mô tuyến phổi

Rất nhiều bằng chứng cho thấy có ít nhất hai con đường phân tử có liên quan đến sự phát triển của LUAD, đó là *KRAS* và *EGFR* (thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì, EGFR) ở lần lượt bệnh nhân hút thuốc và không hút thuốc. Các đột biến gen *EGFR*, đặc biệt là đột biến mất đoạn ngắn của các biến thể *EGFR* ở trên exon 19, *L858R* và *L861Q* ở exon 21, có liên quan chặt chẽ đến bệnh sinh UTP ở những người không hút thuốc, giới tính nữ và chủng tộc Đông Á.²⁹ Mặt khác, các đột biến trên *KRAS* có liên quan chặt chẽ đến sự phát triển LUAD và liên quan đến những người hút thuốc.³⁰ Các đột biến

điểm khác thường xảy ra và thay đổi số lượng bản sao (Copy-number alterations - CNA) đã được mô tả trong LUAD và được xem xét ở những vùng khác của gen.

Tăng sản u tuyến không điển hình (Atypical adenomatous hyperplasia - AAH) là chuỗi thay đổi hình thái duy nhất được xác định cho đến nay đối với sự phát triển của LUAD và có sự đồng thuận quan điểm cơ chế bệnh sinh của nhiều ung thư biểu mô tuyến phần lớn chưa được biết rõ. Các nghiên cứu trước đó cho rằng cả tế bào Clara và tế bào phế nang loại II đều là tế bào tiền thân của LUAD.³¹ Tuy nhiên, rất nhiều bằng chứng cho đến nay đã cho thấy rõ ràng protein C có hoạt tính bề mặt biểu hiện trên tế bào tế bào phế nang loại II, chứ không phải tế bào Clara (tế bào nguồn gốc gây ra LUAD). Do khó phân biệt giữa AAH và ung thư biểu mô phế nang. Các tổ chức phân loại LUAD gần đây đã không còn sử dụng thuật ngữ ung thư biểu mô phế nang, mà được thay thế bằng ung thư biểu mô tuyến tại chỗ, hoặc ung thư biểu mô tuyến xâm lấn tối thiểu (u phát triển chủ yếu của lớp biểu bì với sự xâm lấn dưới 5 mm).

Nghiên cứu gần đây cho thấy AAH có liên quan đến sự tiến triển tuyến tính của các tế bào ở các phế nang (thành phần hô hấp tận cùng) thành ung thư biểu mô tuyến tại chỗ và sau đó là LUAD xâm lấn, do sự biểu hiện của các gen chung giữa các tế bào ở phế nang và AAH. Những nghiên cứu trên bệnh nhân LUAD ở Đông Á đã chứng minh hầu hết LUAD ngoại vi tiến triển từ các tế bào phế nang qua giai đoạn AAH, coi AAH như một tổn thương tiền ung thư. Mặt khác, các nghiên cứu khác cho rằng LUAD có thể phát sinh từ tế bào biểu mô tiểu phế quản và phế quản nhỏ dựa trên việc phát hiện ra các đột biến gen *EGFR* điều khiển (ví dụ, *EGFR p.L858R*) trong các tiểu phế quản lân cận với các LUAD đột biến *EGFR*.³² Có những thay đổi phân tử liên quan giữa LUAD và AAH, điều này đã cung cấp thêm bằng chứng AAH đại diện cho các tổn thương tiền ung thư trong quá trình bệnh sinh LUAD.

Các nghiên cứu trước đây cho thấy từ 30% đến 40% AAH mang đột biến *KRAS* (codon 12).³³ Ngoài ra, các đột biến gen *EGFR* gây ra tổn thương với tần số tương tự giữa AAH (ung thư biểu mô tuyến tại chỗ) và LUAD. Đặc biệt, người ta chú ý đến trình tự của các tổn thương trước khi phân nhóm ung thư phế nang phát triển thành các LUAD. Trong đó, đột biến gen *EGFR* được phát hiện từ tế bào biểu mô hô hấp ngoại vi liên kề, 43% LUAD có đột biến gen *EGFR*, mà không phải từ những bệnh nhân có các loại gen sinh ung thư.³⁴ Phát hiện này cho thấy, cơ chế bệnh sinh hình thành LUAD có thể từ các tế bào khác nhau về nguồn gốc (tế bào biểu mô tiểu phế quản và tế bào tế bào phế nang loại II), nhưng đều có đột biến gen *EGFR*. Người ta đã xác định được các sai lệch phân tử khác trong AAH, bao gồm biểu hiện quá mức của các Cyclin D1, Survivin và oncoprotein ERBB2, mất dị hợp tử (LOH) trong nhiễm sắc thể 3p (chiếm 18%), 9p (*CDKN2A*), 9q (phức hợp xơ cứng củ 1/*TSC1*), 17q và 17p (*TP53*) và giảm biểu hiện của chất ức chế khối u, serine threonine kinase 11 (*STK11* còn được gọi là *LKB1*).³⁵

Người ta cũng đã chứng minh các thay đổi ngoại gen bao gồm methyl hóa DNA các gen *CDKN2A* và *PTPRN2* cũng thấy ở AAH.³⁶ Các nghiên cứu nhằm đánh giá sự khác biệt và mức độ biểu hiện gen giữa các tổn thương ung thư sớm (AAH, ung thư biểu mô tại chỗ) và LUAD, kết quả cho thấy sự khuếch đại gen gây ung thư *EGFR* là đặc điểm phân tử khác biệt chủ yếu giữa các tổn thương sớm (AAH và ung thư biểu mô tại chỗ) và LUAD. Các nghiên cứu này cũng chỉ ra các tổn thương AAH và ung thư biểu mô tuyến tại chỗ đều có biểu hiện *NKX2-1* (còn được gọi là *TTF-1*) mức độ cao, đây là yếu tố phiên mã chứa homeodomain, chủ yếu biểu hiện ở các tiểu phế quản phổi tận cùng và vùng ngoại vi phổi. Ngoài ra, *NKX2-1* rất quan trọng đối với hình thành sự phân nhánh trong quá trình phát triển bình thường của phổi và biến đổi gen làm tăng biểu hiện các protein hoạt động bề mặt quan trọng đối với sự biệt hóa của tế bào phế nang loại II. Trong bệnh LUAD, gen *NKX2-1* thường bị tăng biểu hiện hoặc khuếch đại (vị trí 14q13.3), có vai trò gây ung thư đặc

hiệu của dòng tế bào phế nang loại II đối với yếu tố phiên mã *NKX2-1* trong LUAD. Các nghiên cứu khác nhau đã chỉ ra vai trò thúc đẩy tăng trưởng *NKX2-1* trong tế bào LUAD người, các nghiên cứu trên chuột (*Kras* (LSLG12D/p); *p53* (flox/flox)) đã chứng minh *NKX2-1* có vai trò ngăn chặn sự phát triển của khối u phổi ở chuột và ức chế khả năng di căn *in vivo*.³⁷

1.1.5.2. Cơ chế bệnh sinh ung thư ung thư biểu mô tế bào vảy phổi (LUSC)

Tiếp xúc lâu dài với khói thuốc có khả năng làm các tế bào vảy ở các đường hô hấp lớn chuyển sản hay loạn sản, các tế bào biến đổi này có vai trò như tiền thân của ung thư biểu mô tế bào vảy. Các nghiên cứu cơ chế bệnh sinh của LUSC đã chỉ ra các bất thường gen bắt đầu ở các tế bào biểu mô bình thường về mặt mô học và gia tăng với sự tiến triển của các thay đổi mô bệnh học. Các tế bào tế bào biểu mô mất alen tại nhiều vị trí trên nhiễm sắc thể 3p (*3p21*, *3p14*, *3p22-24* và *3p12*) và *9p21* (*CDKN2A*) trong biểu mô phế quản là những thay đổi được phát hiện sớm nhất trong quá trình bệnh sinh của LUSC.³⁸ Sự mất cân bằng alen ở *8p21-23*, *13q14* (*RB1*) và *17p13* (*TP53*) cũng được phát hiện trong các tổn thương tế bào vảy tiền xâm lấn.³⁸

Các nhà nghiên cứu cũng tìm thấy *CDKN2A* bị methyl hóa DNA trong các tổn thương vảy tiền ung thư với tần số tăng theo tiến triển mô bệnh học (24% ở tổn thương chuyển sản vảy và 50% ở ung thư biểu mô tại chỗ).³⁹ Các yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (Vascular endothelial growth factor-VEGF) và thụ thể VEGF tăng cường biểu hiện trong các tổn thương loạn sản vảy phế quản so với biểu mô phế quản bình thường, điều này chứng minh sự tăng sinh mạch phát triển sớm trong quá trình bệnh sinh UTP và những biểu hiện gen bất thường này là cơ sở cho việc phát triển dự phòng UTP bằng hóa chất kháng tăng sinh mạch. Hơn nữa, các tổn thương loạn sản vảy, tăng sinh mạch, biểu hiện sự tăng sinh mạch máu trong các mô dưới biểu mô với mật độ vi mạch tăng cao, cho thấy có sự sắp xếp lại cấu trúc của vi mao mạch tổ chức. Ngoài ra, sự hiện diện của tổn thương này ở những người có nguy cơ

cao do hút thuốc lá cho thấy rằng các mô hình vi mạch lạc chỗ có thể xảy ra ở giai đoạn đầu của quá trình hình thành ung thư phế quản.⁴⁰

Bên cạnh sự hình thành mạch, các con đường khác, bao gồm axit béo và axit retinoic, cũng liên quan giữa các tổn thương vảy tiền xâm lấn và LUSC. Người ta đã chứng minh trong LUSC, gen gây ung thư *SOX2* bị tăng cường khuếch đại ở vị trí 3q26.3. Bất thường này làm hình thành và phát triển các khối u. Ngoài ra, gen *SOX2* còn có vai trò thúc đẩy sự phát triển của các tế bào khối u phổi, đặc biệt là các tế bào biểu mô vảy và làm trung gian cho sự phát triển của tế bào gốc UTP. Người ta cũng thấy rõ ràng các thay đổi trong gen *SOX2* ở các giai đoạn tiền ung thư và phát triển thành LUSC như: Yuan và cộng sự đã chứng minh rằng biểu hiện protein *SOX2* hoàn toàn không có trong cơ chế bệnh sinh ung thư biểu mô tuyến ở phổi, nhưng tăng cường biểu hiện ở các tổn thương vảy tiền xâm lấn và trong LUSC.⁴¹ McCaughan và các đồng nghiệp đã cho thấy, bằng cách phân tích vùng nhiễm sắc thể 3q, loạn sản phế quản phần trên đường hô hấp có biểu hiện tăng cường khuếch đại gen *SOX2*.⁴²

Đáng chú ý, tăng biểu hiện gen *SOX2* có liên quan đến tiến triển lâm sàng của các tổn thương vảy có xâm lấn cao. Tương tự như gen *NKX2-1* trong LUAD. Người ta cho rằng, *SOX2* hoạt động như một gen gây ung thư trong cơ chế bệnh sinh ban đầu của LUSC. Trái ngược với các nghiên cứu về khối u ác tính khác, các phân tích trên toàn bộ bộ gen về tiền UTP là cực kỳ hiếm. Có thể nói việc lập hồ sơ phân tử của các tổn thương phổi tiền ác tính sẽ làm tăng đáng kể sự hiểu biết của chúng ta về các biến cố ban đầu trong cơ chế bệnh sinh UTP. Một bước quan trọng theo hướng này là nghiên cứu của Nakachi và đồng nghiệp đã chứng minh các thay đổi mới trên nhiễm sắc thể trong các tổn thương loạn sản tiền xâm lấn.⁴³ Nghiên cứu chứng minh được những thay đổi mới và những thay đổi đã biết trên nhiễm sắc thể trong các tổn thương loạn sản. Các vùng nhiễm sắc thể này bao gồm mất các gen ức chế

khối u giả định *RNF20*, *SSBP2* và sự khuếch đại gen ung thư *RASGRP3*.⁴³ Hơn nữa, một số thay đổi nhiễm sắc thể được tìm thấy trong nhiều tổn thương tiền ung thư, biểu hiện của hiệu ứng “lan rộng”. Trong một nghiên cứu khác của Ooi và cộng sự, các tổn thương tiền ác tính và LUSC được phân tích bằng giải trình tự RNA (RNA-seq). Nghiên cứu này đã xác định chính xác các kiểu hình biểu hiện gen bị điều chỉnh sớm giữa các tế bào bình thường và các tổn thương tiền ác tính cũng như các cấu hình thay đổi giữa các mô tiền ung thư và các LUSC.⁴⁴ Nhiều nghiên cứu sử dụng các con đường phân tử và phân tích nhiều gen (microarray) cho thấy, những thay đổi biểu hiện này là dấu hiệu của ức chế *TP53* và kích hoạt gen *MYC*.⁴⁴ Nghiên cứu này đã cung cấp những khía cạnh quan trọng về cơ chế bệnh sinh sớm của LUSC và các dấu ấn sinh học tiềm năng cho việc điều trị hóa chất. Tuy nhiên, các phát hiện này bị hạn chế bởi nghiên cứu tiến hành ở một số ít bệnh nhân LUSC, do đó, cần có các nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn để khẳng định. Ngoài ra, các nghiên cứu tương tự bao gồm các phân tích trực giao (giải trình tự DNA) sẽ cho phép xác định các tác nhân gây ra phát triển các tổn thương vảy tiền xâm lấn và sự tiến triển của chúng thành khối u phổi ác tính.

1.1.5.3. Cơ chế bệnh sinh ung thư biểu mô phổi tế bào nhỏ

Cho đến nay, người ta vẫn chưa xác định được tổn thương về mặt kiểu hình tiền ung thư đối với SCLC. So với NSCLC, rất ít thông tin về các sự kiện tiến triển ban đầu trong cơ chế bệnh sinh phân tử của SCLC. Một nghiên cứu đánh giá LOH tại một số vị trí nhiễm sắc thể, sự không ổn định của tế bào vi mô trong biểu mô phế quản bình thường về mặt mô học và tăng sản lân cận với các khối u phổi cho thấy tỷ lệ thay đổi biểu mô lân cận SCLC cao hơn đáng kể so với những biểu mô lân cận NSCLC. Những phát hiện trước đó chỉ ra tổn thương phân tử lan rộng và nhiều trong các mô bình thường xung quanh SCLC. Điều này gợi ý rằng SCLC có thể phát triển trực tiếp từ biểu mô bình thường hoặc bất thường nhẹ về mặt mô học mà không đi qua một trình tự mô học phức tạp. Đáng chú ý là các nghiên cứu sử dụng mô hình chuột

biến đổi gen *GEM* đã chứng minh sự phát triển SCLC được khởi động bởi sự bất hoạt của gen *TP53* và *RB1*, cũng như bằng cách kích hoạt con đường tín hiệu hedgehog.⁴⁵ Trong một nghiên cứu sử dụng phân tích bộ gen tích hợp, người ta phát hiện SCLC người biểu hiện những thay đổi cụ thể ở *TP53* và *RB1*, các đột biến lặp trong các bộ điều chỉnh histone CREBBP, EP300 và MLL cũng như sự khuếch đại trong gen ung thư *FGFR1*.⁴⁶ Gần đây hơn, các nghiên cứu về cấu hình protein đã xác định được những thay đổi trong SCLC bao gồm: bao gồm *PARP1* và các protein sửa chữa DNA. Ngoài ra, Mohammad và các đồng nghiệp đã mô tả histone demethylase lysine demethylase 1 (LMD1) như một mục tiêu điều trị cho SCLC. Tuy nhiên, vai trò của những thay đổi nói trên trong các giai đoạn bình thường và tiền ác tính của sự phát triển SCLC vẫn chưa được hiểu rõ.

1.1.6. Các phương pháp điều trị ung thư phổi hiện nay tại Việt Nam

1.1.6.1. Phẫu thuật

Phẫu thuật được coi là chỉ định rộng rãi cho bệnh nhân bị UTP giai đoạn đầu đủ sức khỏe phẫu thuật. Trong những năm gần đây, y học đã phát triển các kỹ thuật phẫu thuật hiện đại, bao gồm phẫu thuật nội soi lồng ngực cắt phổi có hỗ trợ video ít xâm lấn (Video assisted thoracic surgery- VATS). Bằng kỹ thuật hiện đại này, tỷ lệ tử vong sau phẫu thuật và thời gian sống thêm sau phẫu thuật VATS đã được chứng minh là tốt hơn so với phẫu thuật mở. Một nghiên cứu thuần tập hồi cứu lớn ở châu Âu cho thấy tỷ lệ tử vong trong bệnh viện sau khi phẫu thuật VATS là 1% so với 1,9% đối với phẫu thuật cắt thùy mở.⁴⁷ Tương tự, phân tích hệ thống cho thấy tỷ lệ sống sót sau 5 năm sau phẫu thuật cắt thùy VATS đối với UTP giai đoạn đầu là 80,1% so với 65,6% đối với phẫu thuật cắt thùy mở. Cắt thùy bằng phẫu thuật nội soi lồng ngực có hỗ trợ video cũng có nguy cơ biến chứng thấp hơn (29,1% VATS so với 31,7%) và thời gian nằm viện ngắn hơn (8,3 ngày VATS so với 13,3 ngày).

Trong 10 năm qua, tỷ lệ phẫu thuật cắt bỏ đã tăng từ 9% lên gần 17% và các chỉ định phẫu thuật đang mở rộng cho những người trên 70 tuổi. Việc sử dụng phương pháp phẫu thuật một phần cũng đã tăng lên làm cho tỷ lệ cắt bỏ phổi giảm xuống (phẫu thuật cắt bỏ phổi có nguy cơ tử vong khoảng 11% trong vòng 90 ngày). Phẫu thuật nội soi bằng robot đang được phát triển, nhưng nó hiện không được khuyến khích. Kiểm soát UTP quốc gia ở Anh năm 2016, đã báo cáo rằng phạm vi bệnh nhân bị UTP không phải tế bào nhỏ được điều trị phẫu thuật dao động từ 5% đến 36% ở các cơ sở khác nhau. Các nghiên cứu trước đây cũng đã chứng minh một người có khả năng được phẫu thuật điều trị UTP cao hơn tới 51% nếu họ được chẩn đoán lần đầu tiên tại một trung tâm phẫu thuật lồng ngực, hiệu quả này rõ rệt nhất ở các trung tâm phẫu thuật lớn nhất.⁴⁸

1.1.6.2. Chiếu xạ

- *Phương pháp xạ trị định vị không gian ba chiều (3D)*: Xạ trị tiếp tục phát triển và có nhiều kỹ thuật hiện đại đang được sử dụng để điều trị UTP. Phương pháp xạ trị định vị 3D, đã được phát triển điều trị cho bệnh UTP từ đầu những năm 2000. Phương pháp này có thể cung cấp liều lượng bức xạ lớn với độ chính xác cao (1–2 mm) đến các tổn thương nhỏ <1 cm³ bằng cách sử dụng phối hợp hệ thống 3D được liên kết bên ngoài với các chuyển động chu kỳ hô hấp. Nó chủ yếu chỉ định cho những người bị ung thư giai đoạn đầu không thể/không muốn phẫu thuật. Một phân tích tổng hợp các nghiên cứu đã chứng minh phương pháp xạ trị định vị 3D đã làm tăng thời gian sống thêm hơn so với xạ trị thông thường (tỷ lệ sống thêm trong 2 năm là 70% so với 53%). Một nghiên cứu thuần tập hồi cứu giai đoạn II cũng cho thấy tỷ lệ sống thêm sau 3 năm là 55,8% với UTP T1–2 N0 M0. Cùng với việc cải thiện thời gian sống thêm, phương pháp xạ trị định vị 3D cũng có tỷ lệ kiểm soát bệnh tại chỗ tốt hơn so với xạ trị thông thường sau 3 năm (87,2% so với 43% xạ trị thông thường). Với thành công trong việc điều trị những bệnh nhân không thể phẫu thuật, nghiên cứu hiện đang tập trung vào việc mở rộng sử dụng phương pháp xạ trị định vị 3D những bệnh nhân UTP. Tuy nhiên, cho đến nay, các

bằng chứng nghiên cứu việc ủng hộ phương pháp xạ trị định vị 3D cho điều trị UTP giai đoạn đầu còn ít.⁴⁸

- *Sóng cao tần/vi sóng*: Ban đầu phương pháp này được sử dụng để điều trị các khối u gan nguyên phát hoặc thứ phát, cắt bỏ u bằng sóng cao tần qua da dùng cho các khối u phổi lần đầu tiên được mô tả vào năm 2000 bởi Dupuy và cộng sự. Cắt bỏ u bằng sóng cao tần qua da được sử dụng cho các khối u phổi ở ngoại vi giai đoạn đầu hoặc di căn ở những bệnh nhân không chỉ định phẫu thuật. Dưới hướng dẫn của chụp cắt lớp vi tính, dùng một kim chứa nhiều điện cực, có thể mở rộng được đưa qua da vào tổn thương phổi. Sau đó, dùng một dòng điện hình sin đi qua các điện cực gây phá hủy nhiệt và hoại tử đông máu các tế bào u. Ngoài ra, có thể sử dụng đầu dò vi sóng để bóc tách khối u hiệu quả. Biến chứng phổ biến nhất được báo cáo là tràn khí màng phổi; tuy nhiên, chỉ 4-16% bệnh nhân bị biến chứng tràn khí màng phổi phải xử lý. Nhiều nghiên cứu đã báo cáo tỷ lệ sống thêm tổng thể là 75% đối với bệnh nhân ở giai đoạn I UTP không có chỉ định phẫu thuật.⁴⁸

1.1.6.3. Liệu pháp điều trị đích và ức chế điểm kiểm soát miễn dịch

Những tiến bộ về hiểu biết các con đường phát sinh ung thư, công nghệ gen đã hỗ trợ phát triển các loại thuốc điều trị đích và thuốc miễn dịch mới, ngăn chặn hoạt động của các con đường hình thành ung thư. Trong UTP, một số con đường chính, như con đường EGFR, PI3K/AKT/mTOR, RAS - MAPK và NTRK/ROS1. Phương pháp điều trị đích đầu tiên, erlotinib là chất ức chế EGFR, gefitinib là chất ức chế PI3K/AKT/mTOR everolimus và entrectinib là chất ức chế NTRK/ROS1. Hiện nay, người ta đã xác định được các cơ chế kháng thuốc trong UTP, như đột biến miền TK (*T790M*), khuếch đại *MET*, đột biến *RAS*. Liệu pháp điều trị đích với các loại thuốc mới đang trong quá trình phát triển lâm sàng và cho kết quả lâm sàng đầy hứa hẹn đối với tình trạng UTP kháng thuốc, như EGFR-TKIs thế hệ thứ ba (Osimertinib) có thể hoạt động và nhắm đích cả đột biến nhạy cảm với EGFR và kháng thuốc *T790M*.

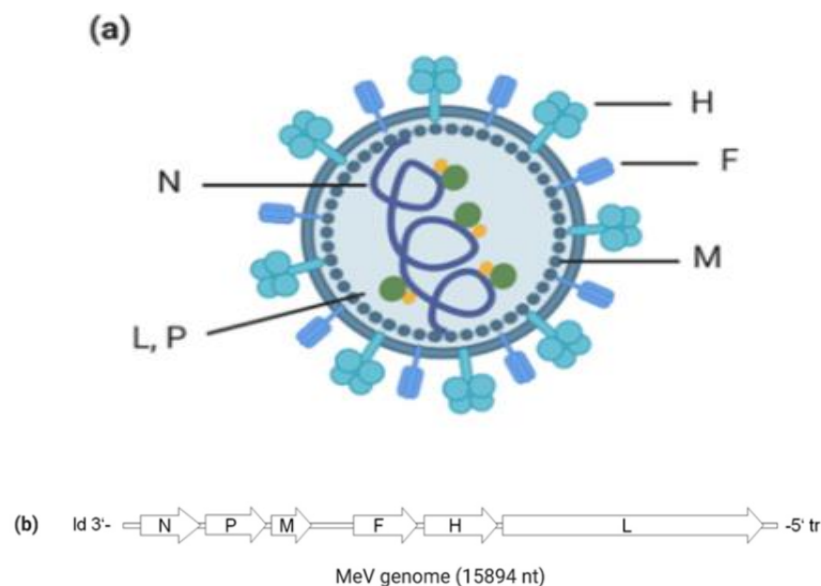
Bên cạnh đó, với sự xuất hiện của các chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch, nhiều bệnh nhân UTP đáp ứng tốt với các kháng thể ức chế điểm kiểm soát miễn dịch (như nivolumab và pembrolizumab) kháng thể kháng PD1. Ngoài ra, một số nghiên cứu cũng đã báo cáo một số liệu pháp nhắm đích và liệu pháp miễn dịch có hiệu quả hứa hẹn trong điều trị UTP.⁴⁸

Phương pháp điều trị hệ thống mới nhất là các chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch: pembrolizumab, nivolumab và atezolizumab. Chúng hoạt động thông qua con đường thụ thể chết tế bào theo chương trình 1/2 (PD-L1 và PD-L2). PD-L1 và PD-L2 là những protein được cho là ngăn chặn hệ thống miễn dịch bằng cách liên kết với thụ thể PD-1 trên các tế bào T đã được kích hoạt (gây ra cái chết bằng gây độc tế bào các tế bào ung thư khi được kích hoạt bởi các kháng nguyên khối u). Một số tế bào ung thư biểu hiện PD-L1 và PD-L2 trên màng tế bào của chúng, cung cấp một lớp áo bảo vệ khỏi hệ thống miễn dịch một cách hiệu quả. Các liệu pháp miễn dịch này ngăn chặn con đường thụ thể PD-L1/2 và PD-1, do đó, hệ thống miễn dịch nhận diện các tế bào ung thư và tế bào ung thư trải qua quá trình chết qua trung gian tế bào T gây độc tế bào. Thử nghiệm KEYNOTE-010 đã chứng minh với hai liều khác nhau của pembrolizumab đã cải thiện đáng kể khả năng sống thêm tổng thể so với hóa trị liệu tiêu chuẩn (docetaxel) ở những người bị NSCLC có > 1% biểu hiện của tế bào khối u PD-L1. Những phát hiện tương tự cũng được tìm thấy với nivolumab so với docetaxel ở những bệnh nhân có biểu hiện PD-L1 > 1%. CTLA-4 (protein 4 liên quan với tế bào lympho T gây độc tế bào) là một phân tử khác biểu hiện trên tế bào lympho có chức năng điều chỉnh giảm hệ thống miễn dịch. Ipilimumab, một chất ức chế CTLA-4, đã cho thấy kết quả đầy hứa hẹn ở thử nghiệm giai đoạn III của thuốc này kết hợp với các liệu pháp chống ung thư toàn thân khác để điều trị NSCLC, như thử nghiệm checkmate 227, hiện đang được tiến hành.⁴⁸

1.2. Liệu pháp virus vaccine sởi điều trị ung thư phổi người

1.2.1. Sinh học virus sởi

Virus sởi là một virus RNA sợi đơn, âm, có vỏ bọc thuộc loài Morbillivirus và họ Paramyxovirus. Bộ gen dài 16 kilobase, gồm 15.894 nucleotit, bao gồm 6 gen mã hóa 8 protein của virus. Bộ gen của virus được bao bọc bởi nucleoprotein (N), phosphoprotein (P) và protein lớn (L) tạo thành phức hợp ribonucleoprotein (RNP), được bao quanh bởi matrix (M) protein. Hai trong số các protein là protein không cấu trúc V và C, được biểu hiện từ một bản phiên mã RNA thay thế của gen P. Vai trò của chúng chủ yếu liên quan đến việc ngăn chặn các phản ứng miễn dịch do interferon (IFN) loại 1 gây ra. Các glycoprotein vỏ MV, hemagglutinin (H) và protein dung hợp (F) làm trung gian cho sự gắn kết và hòa hợp virus với màng tế bào (Hình 1).⁴⁹



Hình 1.1 Sơ đồ cấu trúc virus sởi

Nguồn: Engeland C.E và cộng sự (2021)⁴⁹

(a) Virus sởi; (b) bộ gen của virus sởi nucleoprotein (N), Protein lớn (L), Phosphoprotein (P), Matrix (M), protein Haemagglutinin (H), protein Fusion (F), protein phi cấu trúc V và C.

1.2.2. Virus vaccine sởi lây nhiễm đặc hiệu tế bào ung thư phổi

1.2.2.1. Tế bào UTP có các thụ thể đặc hiệu với virus sởi

Ba thụ thể chính, CD150, CD46 và Nectin-4, được virus sởi sử dụng để xâm nhập vào tế bào đích. CD150 hay phân tử hoạt hóa tế bào lympho (SLAM) là thụ thể chính đối với các chủng virus sởi hoang dã. Thụ thể này được biểu hiện chủ yếu trên tế bào lympho B và T đã hoạt hóa, tế bào tuyến giáp chưa trưởng thành, bạch cầu đơn nhân và tế bào đuôi gai (DC). Ngược lại, các chủng virus giảm độc lực thuộc dòng MV-Edm, lây nhiễm tế bào ung thư có chọn lọc sử dụng thụ thể CD46 thông qua sự thay thế axit amin duy nhất ở vị trí 481 trong protein virus sởi-H (asparagin thành tyrosine). Glycoprotein xuyên màng loại I, CD46 hoạt động như một chất điều hòa âm của quá trình ly giải qua trung gian bổ thể và được biểu hiện phổ biến trong tất cả các tế bào có nhân. Một thụ thể biểu mô mới được xác định mới gần đây, tên gọi là Nectin-4, cả chủng virus hoang dại và chủng virus đều sử dụng thụ thể này để tăng cường cho việc xâm nhập vào tế bào đích.^{44,47} Nectin-4 là một protein bám dính, một thành viên các thụ cảm thể bám dính của liên họ globulin miễn dịch nằm ở vị trí mà các tế bào biểu mô dính với nhau, trong đó có cả tế bào UTP. Ban đầu, chúng được mô tả là poliovirus-giống thụ thể-4 (PVRL-4), đóng một vai trò quan trọng trong quá trình sinh bệnh, giúp virus sởi bám dính vào biểu mô đường hô hấp gây nhiễm trùng.⁴⁹

Nhiều dữ liệu đã chứng minh rằng MeV như là một tác nhân điều trị có tiềm năng cho bệnh nhân UTP NSCLC. Do các dòng tế bào NSCLC được thử nghiệm đều biểu hiện mạnh mẽ thụ thể đặc hiệu CD46 của MeV, có nhiều bằng chứng hóa mô miễn dịch cho thấy có tới 40% mẫu tế bào NSCLC ở người biểu hiện mạnh mẽ thụ thể CD46.⁵⁰ Thụ thể CD46 là rất cần thiết cho sự xâm nhập của MeV, ngăn chặn biểu hiện phân tử CD46 dẫn đến việc ức chế gần như hoàn toàn sự lây nhiễm MeV-GFP trong các tế bào UTP.⁵¹ Gần

đây, người ta đã báo cáo rằng Nectin-4 biểu hiện cao, có chọn lọc trong nhiều loại tế bào ung thư bao gồm cả UTP.^{52,53} Do đó, Nectin-4 là mục tiêu tốt đối với loại khối u này, do đó, MeV có thể là một công cụ và ứng cử viên tốt để điều trị các tế bào khối u này một cách có chọn lọc.

1.2.2.2. Cơ chế lây nhiễm đặc hiệu tế bào ung thư

** Mọi quan hệ giữa biểu hiện thụ thể đặc hiệu với ly giải tế bào ung thư*

- Hầu hết các tế bào ung thư kể cả UTP thường biểu hiện quá mức thụ thể CD46 để thoát khỏi sự gây độc tế bào. Đây chính là cơ chế MeV lây nhiễm chọn lọc tế bào ung thư biểu hiện quá mức thụ thể CD46. Người ta đã chứng minh hiệu quả kháng tế bào UTP của MeV tương quan với mức độ biểu hiện thụ thể đặc hiệu với MeV (CD46 và Nectin-4).⁵¹ Hơn nữa, các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng các chủng MV-Edm có khả năng sử dụng phân tử SLAM như một thụ thể đặc hiệu. Sự ly giải tế bào ung thư lympho trên mô hình động vật của MeV cho thấy MeV lây nhiễm qua thụ thể SLAM độc lập với mức độ biểu hiện CD46.⁵⁴

Ngoài ra, thụ thể Nectin-4 cũng được chứng minh là một thụ thể đặc hiệu của MeV được biểu hiện ở mức độ thấp đến trung bình trong các tế bào biểu mô đường hô hấp, nhưng một số nghiên cứu đã cho thấy sự biểu hiện phong phú của nó trong ung thư biểu mô tuyến phổi, đại tràng, buồng trứng và vú, làm cho Nectin-4 trở thành một thụ thể khối u đặc hiệu tiềm năng với MeV.⁵⁵ Hoạt động kháng u của MeV trong các tế bào ung thư biểu mô tuyến người tăng lên theo mức độ biểu hiện của Nectin-4, điều này cho thấy rằng sự biểu hiện của Nectin-4 có tương quan với mức độ sự ly giải tế bào ung thư của MeV.⁵⁶

** Tế bào ung thư khiếm khuyết đáp ứng với interferon*

Ngoài ái lực của MeV với các thụ thể tế bào đặc hiệu, có các cơ chế tiềm năng khác cũng góp phần vào khả năng ly giải chọn lọc tế bào u của MeV. Các khiếm khuyết trong con đường đáp ứng interferon (IFN) kháng

virus thường gặp ở các tế bào khối u, khiến các tế bào ung thư dễ lây nhiễm virus hơn so với các tế bào bình thường.⁴⁹ Ở các tế bào bình thường, nhận diện RNA của virus bằng các thụ thể PRR, RIG-I và MDA-5 sẽ kích hoạt một loạt các con đường miễn dịch bẩm sinh, kích hoạt sản xuất interferon loại 1 (IFN α/β). IFN sau đó gắn với thụ thể đặc hiệu trên tế bào, kích hoạt con đường tín hiệu JAK/STAT, dẫn đến hoạt hóa ISG liên quan đến việc bảo vệ chống virus và tín hiệu chết tế bào theo chương trình (apoptosis). Trong tế bào ung thư, con đường này thường bị ức chế hoạt động, dẫn đến tế bào ung thư thoát khỏi hệ thống miễn dịch của cơ thể. Một nghiên cứu chứng minh vai trò của interferon loại 1 với khả năng MeV lây nhiễm vào tế bào ung thư bằng cách điều trị các dòng tế bào ung thư với IFN- β trước khi nhiễm MeV, kết quả cho thấy IFN- β làm giảm khả năng MeV nhiễm và ly giải tế bào ung thư; điều này chứng minh MeV có khả năng lây nhiễm các loại tế bào ung thư ở mức độ khác nhau phụ thuộc vào phản ứng miễn dịch bẩm sinh của cơ thể.⁵⁷

1.2.3. Các cơ chế virus vaccine sôi ly giải tế bào ung thư phổ

1.2.3.1. Hình thành hợp bào (tế bào khổng lồ nhiều nhân)

MeV có các protein F và protein H gắn vào thụ thể tham gia quá trình hợp màng. Khi gắn vào thụ thể, protein H thay đổi cấu hình, sự thay đổi này kích hoạt protein hợp màng gây ra quá trình thay đổi trong protein F. Sự thay đổi này làm cho màng virus và tế bào sát lại rồi hợp nhất với nhau. Cơ chế chính xác mà protein H kích hoạt protein F là chưa rõ ràng. Các protein F của MeV còn tham gia quá trình hợp nhất màng tế bào nhiễm virus với màng tế bào bình thường xung quanh, giống như sự hợp nhất giữa màng virus và tế bào (quá trình nhiễm trùng MeV). Sự hợp nhất giữa tế bào nhiễm virus và tế bào bình thường lân cận tạo thành hợp bào (một khối tế bào khổng lồ có nhiều nhân). Một tế bào bị nhiễm virus có thể hợp nhất 50-100 tế bào lân cận với nhau tạo thành một hợp bào.⁵⁸ Đây là một cơ chế lây lan virus mà không cần giải phóng các hạt virus trưởng thành ra khỏi tế bào ung thư. Quá trình hợp

nhất tế bào làm cho virus giảm tiếp xúc với kháng thể trung hòa của cơ thể vật chủ, chúng lẫn tránh được sự kiểm soát của hệ miễn dịch dễ dàng lây lan và phát triển. Thông thường, các hợp bào tồn tại không quá 4-5 ngày. Hợp bào chết là do hợp nhất hạt nhân, ngưng tụ nhiễm sắc thể sớm, thoái hóa autophagy, kèm theo giải phóng các túi syncytiosome giống như exosome nhưng biểu hiện kháng nguyên tế bào u cao. Hợp bào chết tạo ra syncytiosome nhiều hơn so với các tế bào chết do các nguyên nhân khác. Syncytiosome là yếu tố làm cho các tế bào DC trưởng thành và trình diện kháng nguyên hiệu quả hơn so với các exosome từ tế bào chết do các nguyên nhân khác.⁵⁹

MeV sử dụng protein hợp màng để hình thành hợp bào góp phần tăng hiệu quả ly giải tế bào u. Vì vậy, MeV có khả năng giết chết trực tiếp các tế bào ung thư thông qua hình thành các hợp bào, đây là một thuộc tính ly giải tế bào u quan trọng, khả năng MeV tạo hợp tương quan với tiềm năng ly giải tế bào ung thư của chúng.

1.2.3.2. Tạo ra miễn dịch đặc hiệu kháng tế bào u

** Tế bào khối u chết do nguyên nhân miễn dịch*

- Mặc dù, sự thiếu hụt cảm ứng IFN có thể thúc đẩy sự nhân lên của MeV trong các tế bào ác tính, Nhiễm MeV kích hoạt hệ miễn dịch bẩm sinh ly giải tế bào ung thư qua trung gian MeV đã được xác nhận trong nhiều nghiên cứu. Việc cảm nhận MeV bằng các thụ thể nhận dạng mô hình, đặc biệt là RIG-I, MDA-5 và TLR7, thúc đẩy trạng thái tiền viêm và kháng virus. Tuy nhiên, nhiễm MeV gây ra phản ứng IFN loại I đã được ghi nhận trong liệu pháp virus gây ly giải tế bào ung thư đối với các chủng MeV giảm độc lực. Rajaraman và cộng sự gần đây đã báo cáo các tế bào u nguyên bào thần kinh đệm người bị nhiễm MeV-Edm làm tăng phiên mã của *DDX58* cảm biến RNA bẩm sinh, cũng như *IFN- β* , *STAT1* và các gen được kích thích bởi interferon có chức năng chống virus, bao gồm *ISG15*, *MX1*, *MX2*, *OAS1* và *OAS2*.⁶⁰ Ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy nhiễm MeV sẽ kích hoạt hệ

miễn dịch gây ly giải tế bào ung thư qua trung gian MeV. Ngoài các kháng nguyên liên quan đến khối u (TAA), chết tế bào khối u bị nhiễm MeV hoặc phá vỡ hợp bào còn giải phóng các mô hình phân tử nguy hiểm có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh (Pathogen-associated molecular pattern-PAMP) và mô hình phân tử nguy hiểm có nguồn gốc từ tổ chức bị tổn thương (Danger-associated molecular pattern-DAMP), chúng kích hoạt phản ứng miễn dịch. Nghiên cứu của A. Chen và cộng sự (2017) cho thấy các tế bào ung thư biểu mô tế bào gan người chết sau khi nhiễm MeV-Edm đã thúc đẩy sự chuyển vị qua màng của calreticulin cũng như giải phóng năng lượng từ phân tử Adenosine triphosphate (ATP) và HMGB1.⁶¹

HMGB1 là một tín hiệu nguy hiểm tác động mạnh lên các tế bào đuôi gai (DC) thông qua TLR4, đây là yếu tố được giải phóng bởi các tế bào u ác tính người bị nhiễm MeV-Edm. Các tế bào ung thư trung biểu mô màng phổi người bị nhiễm chủng MeV-Schwarz tạo ra biểu hiện HSP70 mức độ cao, một phân tử có vai trò tăng cường khả năng tế bào DC trình diện chéo kháng nguyên. Ngoài ra, việc nhận diện các phân tử PAMP sau nhiễm MeV, chẳng hạn như dsRNA, kích hoạt thay đổi các mức IFN- α , IFN- β và IFN- λ , dẫn đến sản xuất các cytokine gây viêm, gồm IL-6 và IL-8, cũng như chemokine RANTES. Đáng chú ý, các phân tử này cũng có thể tạo ra trạng thái cơ thể kháng virus, cản trở sự ly giải tế bào ung thư trực tiếp hay qua trung gian MeV.⁶²

** Vai trò tế bào trình diện kháng nguyên và khởi động tế bào T*

Ngoài vai trò chống virus, IFN- α còn thúc đẩy sự biểu hiện của TRAIL, được mã hóa bởi một gen kích thích interferon trên các tế bào DC. Trong một nghiên cứu *in vitro*, Achard et al. đã chứng minh điều chỉnh TRAIL trên DC cần phải có sự hiện diện của virus (trong nghiên cứu này tác giả dùng chủng MeV-Schwarz) hoặc các tế bào khối u bị nhiễm virus, quá trình điều hòa TRAIL không xảy ra khi nuôi cấy tế bào DC với các tế bào khối u được chiếu

xạ UV (tạo ra tế bào u chết apoptosis).⁶³ Nhiều tác giả khác cũng đã chứng minh điều hòa TRAIL qua trung gian MeV kích hoạt tế bào DC, dẫn đến giết chết các tế bào lympho của người biểu hiện các thụ thể TRAIL bởi các tế bào bạch cầu lympho T. Bên cạnh hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc vào TRAIL, các tế bào DC dòng máu và dòng tủy có thể thực bào toàn bộ các tế bào nhiễm MeV chết theo chương trình.⁶² Chuỗi RNA của MeV được nhận diện bởi TLR7 trong các phasome của tế bào DC dòng máu cũng như các chất trung gian sao chép MeV bao gồm dsRNA được phát hiện bởi các thụ thể tế bào RIG-I và MDA-5 ở cả DC dòng máu và CD1c + DCs dòng tủy.⁶² MeV kích hoạt TLR7, RIG-I và MDA-5 gây ra một dòng tín hiệu lên đến đỉnh điểm trong quá trình tế bào DC trưởng thành, được đặc trưng bởi điều hòa các dấu hiệu kích thích CD40, CD80, CD83, CD86 và HLA-DR, cũng như tiết ra các tiền viêm và Th1 và các cytokine phân cực, chẳng hạn như IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- α và IL-12p70 ở mức độ thấp hơn.⁶² Tế bào DC trưởng thành thúc đẩy trình diện hiệu quả các kháng nguyên từ các tế bào bị nhiễm MeV bị thực bào, bao gồm cả kháng nguyên khối u, được trình diện chéo trên các phân tử MHC lớp I đến các tế bào T CD8+ đặc hiệu với khối u.⁶² Việc kích hoạt chéo các tế bào T CD8+ thúc đẩy sự tăng sinh và hoạt hóa của chúng, dẫn đến giải phóng IFN- γ . Đáng chú ý, trong môi trường *in vitro* với tế bào u ác tính ở người NY-ESO-1 + M18, Guillerme và cộng sự đã báo cáo cần phải có sự lây nhiễm virus để kích hoạt tế bào T đặc hiệu NY-ESO-1, vì các tế bào DC dòng máu tiếp xúc với các tế bào khối u được chiếu tia UV không thể tạo ra các tế bào T đặc hiệu cho khối u.⁶⁴ Như vậy, nhiễm MeV thúc đẩy chức năng tế bào trình diện kháng nguyên và khởi động tế bào T kháng khối u hiệu quả. Do đó, liệu pháp virus ly giải tế bào ung thư có thể cung cấp kháng nguyên khối u, các phân tử kích thích và các cytokine gây viêm, tức là các tín hiệu 1, 2 và 3 cần thiết để kích hoạt tế bào T.⁶²

* *Hoạt hóa tế bào lympho T*

Các nghiên cứu *in vivo* về nhiễm MeV hoạt hóa hệ miễn dịch kháng u đầu tiên đã được tiến hành trên mô hình chuột thiếu hụt miễn dịch mang khối ung thư người. Mặc dù các mô hình này đã ghi nhận tác dụng ly giải trực tiếp tế bào u của MeV và kích hoạt các phản ứng miễn dịch bẩm sinh kháng u. Đánh giá vai trò MeV hoạt hóa miễn dịch thích ứng kháng u chỉ có thể được giải quyết sau khi phát triển các mô hình chuột có hệ miễn dịch bình thường. Grossardt và cộng sự (2013) lần đầu tiên báo cáo sự xâm nhập của tế bào T đặc hiệu ở rìa ngoài khối u sau 7 ngày điều trị bằng virus sởi trên mô hình chuột bị ung thư đại trực tràng MC38cea.⁶⁵ Một nghiên cứu trên chuột có hệ miễn dịch bình thường mang ung thư biểu mô phổi dưới da cũng cho thấy có thâm nhiễm tế bào lympho CD4⁺ và CD8⁺ nội u sau khi điều trị MeV.⁶⁶ Hơn nữa, một số nghiên cứu cho thấy tăng tế bào T CD8⁺ IFN- γ + nội u và các yếu tố tăng tỷ lệ tế bào T (CD8⁺/FoxP3⁺) trên mô hình chuột mang u ác tính B16 sau khi điều trị bằng MeV. Các nghiên cứu khác cũng cho thấy MeV gia tăng thâm nhập tế bào T vào khối u.

Điều trị OV đã là tăng thâm nhập tế bào T vào khối u thông qua cơ chế cơ bản bao gồm OV làm tăng của các yếu tố hoạt hóa tế bào lympho thâm nhập vào khối u, cụ thể là CCL3, CCL4, CCL5 và CXCL10. Các chemokine này tăng lên trong các mô hình động vật cấy ghép ung thư biểu mô tế bào gan người được điều trị bằng MeV-Edm so với các khối u không được điều trị.⁶¹ Một số nghiên cứu cho thấy các tế bào u nguyên bào thần kinh đệm người tiết ra CCL5 và CXCL10 cao hơn sau khi nhiễm trùng MeV-Edm *in vitro*.⁶⁰ Do đó, có thể khẳng định điều trị bằng MeV gây ra tăng biểu hiện của một số yếu tố kích thích tăng tỉ lệ tế bào lympho T và di chuyển chúng đến vị trí khối u.

* *Đáp ứng tế bào lympho T*

Khi đến khối u, các tế bào T CD8⁺ đặc hiệu với khối u trình diện kháng nguyên khối u trên phân tử MHC lớp I, làm trung gian gây độc tế bào khối u. Đáng chú ý, nhiễm MeV vào tế bào u nguyên bào thần kinh đệm người trong

ống nghiệm làm tăng mức mRNA của TAP, HLA-A và HLA-B, cũng như nhiều phối tử HLA, do đó tăng cường khả năng tế bào khối u trình diện kháng nguyên khối u và tế bào u trở thành mục tiêu của tế bào T đặc hiệu khối u. Hiệu lực kháng u có thể được tăng cường hơn nữa bằng cách chuyển kháng nguyên khối u vào nội bào khối u trong quá trình ly giải tế bào u qua trung gian MeV. Delaunay và cộng sự (2017) đã nhiễm MeV ở các mô hình *in vitro* dòng tế bào u ác tính kháng nguyên NY-ESO-1⁺ và NY-ESO-1⁻ tự thân và cùng loài có nguồn gốc từ bệnh nhân để chứng minh hiện tượng này.⁶⁷ Họ phát hiện ra rằng NY-ESO-1 được giải phóng ra từ các tế bào u bị ly giải do nhiễm MeV đã được các tế bào khối u khác thu nhận trên HLA lớp II, xử lý và trình diện cho các tế bào T CD4⁺. Điều này chỉ ra rằng kháng nguyên khối u được biểu hiện không đồng nhất, có thể lan truyền khắp khối u khi tế bào u bị ly giải qua trung gian MeV, làm cho nhiều tế bào khối u dễ bị tế bào T nhận diện hơn. Tuy nhiên, hiện tượng này vẫn chưa được xác nhận trên cơ thể người. Hai nghiên cứu sử dụng mô hình MC38cea đã báo cáo 40% sự thuyên giảm khối u hoàn toàn và khả năng sống sót lâu dài sau liệu pháp OV sử dụng chủng MeV Schwarz biểu hiện IgG1-Fc. Đáng chú ý, 75% - 100% chuột khỏi hoàn toàn không thấy tái phát khối u ở một vị trí xa sau điều trị 4 và 6 tháng điều trị.^{68,69}

** MeV kích hoạt các thành phần khác của hệ miễn dịch*

Sự tác động lẫn nhau giữa virus gây ly giải tế bào ung thư và hệ thống miễn dịch không chỉ giới hạn ở các tế bào DC và tế bào T, mà bao gồm các quần thể tế bào miễn dịch khác nhau (Hình 1.2). Trong số này, bạch cầu trung tính đã được nghiên cứu trong liệu pháp MeV. Chúng nhạy cảm với nhiễm trùng MeV, điều này thúc đẩy quá trình hoạt hóa tế bào bạch cầu trung tính.⁶² Khi nhiễm MeV, bạch cầu trung tính được kích hoạt, chúng tiết ra IL-8, chiêu mộ thêm nhiều bạch cầu trung tính vào vị trí khối u. Bạch cầu trung tính có tác dụng kháng u trực tiếp bằng cách giải phóng các phân tử gây độc tế bào như TNF- α hoặc TRAIL. Chúng còn kháng khối u gián tiếp bằng cách tiết ra MCP-1, chất này thu hút bạch cầu đơn nhân và tế bào lympho T. Tuy nhiên,

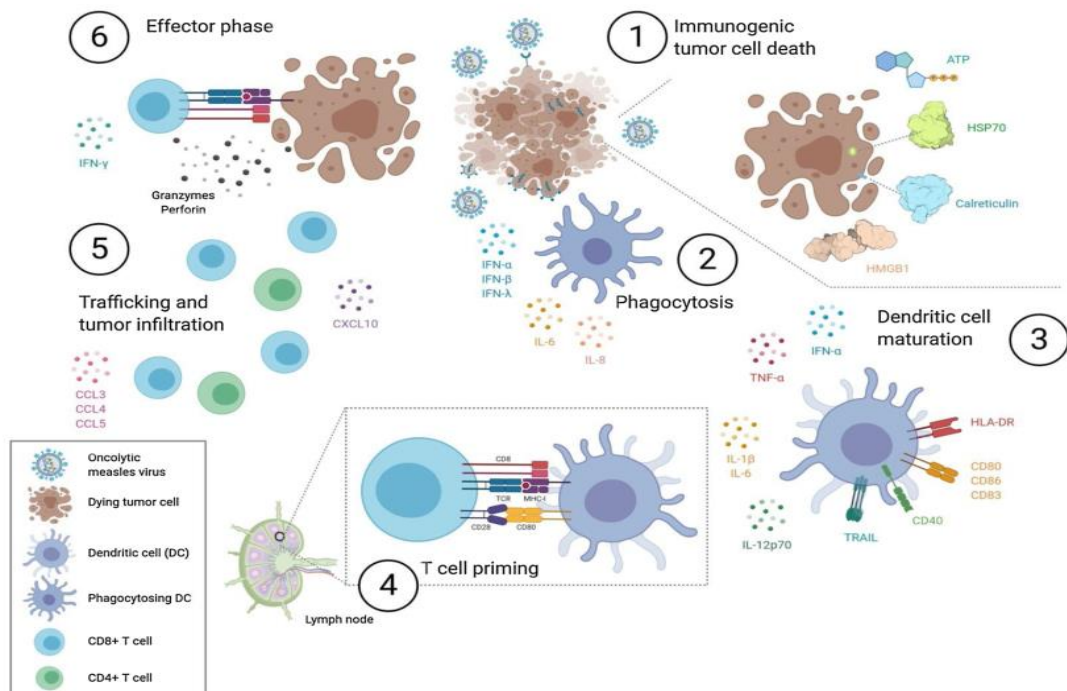
bạch cầu trung tính tiết ra IFN- α lại góp phần vào các đáp ứng miễn dịch chống virus. Hầu hết những thay đổi này chỉ thấy ở bạch cầu trung tính bị nhiễm các chủng MeV và không xảy ra đối với chủng virus sởi hoang dã. Tuy nhiên, vai trò của bạch cầu trung tính trong các khối u ác tính tế bào B dường như thay đổi, tùy thuộc vào mức độ của ly giải tế bào ung thư trực tiếp, bạch cầu trung tính có vai trò hơn nữa trong các khối u ác tính có khả năng kháng với ly giải tế bào u qua trung gian MeV so với những tế bào u nhạy cảm với ly giải tế bào u qua trung gian MeV. Do đó, điều quan trọng là phải khảo sát vai trò của bạch cầu trung tính trong liệu pháp ly giải tế bào u qua trung gian MeV trên các mô hình cấy ghép u có hệ miễn dịch bình thường.

Các đại thực bào liên quan đến khối u thường có kiểu hình M2 và do đó, thúc đẩy hình thành khối u.⁶² Tuy nhiên, việc tiếp xúc với virus có thể kích hoạt sự tái phân cực của chúng. Về vấn đề này, Tan và cộng sự (2016) đã chứng minh quá trình chuyển đại thực bào người M0 và M2 sang M1 khi tiếp xúc với các tế bào khối u nhiễm MeV. Sự tái phân cực này được chứng minh bằng một số dấu ấn của kiểu hình M1, bao gồm tăng các phân tử đồng kích thích như CD80, giải phóng cytokine tiền viêm (IL-1 β , TNF- α , IL-6) và tiết ra các chất hóa ứng động tế bào T là CXCL9 và CXCL10.⁷⁰ Theo một số nhà khoa học, tác dụng kháng khối u của đại thực bào trong liệu pháp MeV ly giải tế bào u mới chỉ được biết *in vitro*. Cần có các nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng sâu hơn để làm sáng tỏ vấn đề này.

Rất ít nghiên cứu *in vitro* đánh giá vai trò của tế bào giết tự nhiên (NK) trong liệu pháp MeV ly giải tế bào ung thư. Nhiều tác giả đã quan sát thấy, mặc dù điều trị MeV không dẫn đến tăng các phối tử tế bào NK như MICA/B, ULBP1, ULBP 2, ULBP 3, CD112, hoặc CD155, nhưng tăng khả năng giết chết tế bào khối u trong đồng nuôi cấy tế bào bị nhiễm MeV và tế bào NK cùng với giải phóng granzyme, perforin và granulysin.⁷¹ Trong đồng nuôi cấy tế bào u hắc tố nhiễm MeV với tế bào NK, người ta cũng thấy tăng các dấu ấn hoạt hóa CD69 và dấu ấn phân hủy CD107, trong khi mức độ biểu hiện của CD16, CCR7, DNAM1 và NKG2D không thay đổi. Một nghiên cứu gần đây

cho thấy kích hoạt tế bào DC là rất quan trọng đối với chức năng của tế bào NK trong điều trị MeV. Điều này làm nổi bật các tương tác phức tạp xảy ra trong vi môi trường khối u, khi điều trị liệu pháp virus ly giải tế bào ung thư.

Dữ liệu về vai trò đóng góp của các tế bào miễn dịch khác, đặc biệt là vai trò của tế bào B trong liệu pháp MeV ly giải tế bào ung thư vẫn còn khan hiếm và chưa được nghiên cứu đầy đủ. Một nghiên cứu gần đây đã phân tích hiệu quả của tế bào T CD8⁺ NKG2D⁺ giết tế bào ung thư biểu mô tế bào gan người dưới hỗ trợ của cytokine (tế bào CIK) được điều trị bằng MeV-Edm.⁶¹ Trong *in vitro*, tế bào CIK tăng phối tử Fas và các tế bào u bị nhiễm MeV tăng phối tử NKG2D MICA/B, sau đó các tế bào CIK tăng cường bài tiết IFN- γ và do đó, tăng hoạt động kháng khối u của chúng. Trong một mô hình chuột thiếu hụt miễn dịch, các tác giả đã chứng minh sự tăng cường hoạt hóa tế bào CIK ở lách và khối u của những con chuột được điều trị bằng MeV so với những con không được điều trị. Ngoài ra, điều trị MeV tương quan với tăng cường thâm nhập tế bào CIK, tăng một số chemokine liên quan đến sự di chuyển của tế bào lympho như CCL3, CCL4, CCL5 và CXCL10 nội u.



Hình 1.2. MeV kích hoạt hệ miễn dịch kháng tế bào u

* Nguồn: G. Pidelaserra-Martí and C.E. Engeland (2020)⁶²

1.2.3.3. Biến đổi virus tăng cường liệu pháp miễn dịch kháng tế bào ung thư

Các đặc tính nội tại của MeV trong việc điều chỉnh lại vi môi trường khối u có thể được tăng cường bằng cách gắn các gen mã hóa điều hòa miễn dịch vào bộ gen virus.⁶² Các chất điều hòa miễn dịch được mã hóa bởi các gen điều hòa miễn dịch trong bộ gen virus sau đó được biểu hiện tại vị trí nhân lên của virus trong khối u. Trong một số nghiên cứu, các nhà nghiên cứu đã tích hợp các gen mã hóa các chất kích thích khả năng miễn dịch bẩm sinh vào bộ gen MeV. Các nghiên cứu *in vivo* trên chuột thiếu hụt miễn dịch mang khối u người đã chỉ ra, trang bị cho MeV gen mã hóa IFN- β của chuột, gen *GM-CSF* chuột, hoặc gen *G-CSF* người giúp tăng cường tác dụng kháng khối u của MeV. Hơn nữa, một gen mã hóa phân tử sinh miễn dịch của vi khuẩn *Helicobacter pylori*, là protein kích hoạt bạch cầu trung tính (NAP), đã được chuyển vào bộ gen MeV để kích thích thêm phản ứng viêm và thúc đẩy giải phóng các cytokine phân cực Th1.⁷² Một nghiên cứu điều tra MeV biến đổi mang gen mã hóa *GM-CSF* trên mô hình động vật có hệ miễn dịch bình thường mang u tế bào MC38cea cho thấy khối u tiến triển chậm và kéo dài thời gian sống so với chuột ở nhóm chứng. Đáp ứng IFN- γ đặc hiệu MC38 và gây độc tế bào được tăng cường đáng kể trong tế bào lách của chuột được điều trị bằng MeV có gen *GM-CSF*. Điều này cho thấy sự tăng đáp ứng của tế bào T đặc hiệu với khối u. Khả năng miễn dịch đặc hiệu với khối u được duy trì 6 tháng sau khi cấy ghép khối u và không thấy khối u tái phát. Với mục đích tăng cường phản ứng của tế bào T, Veinalde và cộng sự đã gắn gen mã hóa một protein hợp bào IL-12 (*FmIL-12*) vào bộ gen MeV (chủng Schwarz). Điều trị bằng MeV mang gen *FmIL-12* giúp loại bỏ hoàn toàn, lâu dài 90% khối u MC38cea trên mô hình chuột, có khả năng bảo vệ tái phát khối u. Điều trị MeV mang gen *FmIL-12* có liên quan đến cấu hình cytokine Th1 ở nội u và tăng tế bào T CD8 + nội u. Các nghiên cứu khác đã chứng minh hiệu quả ly giải tế bào u của MeV mang gen *FmIL-12* phụ thuộc vào tế bào T gây độc

tế bào CD8⁺.⁶⁸ Tuy nhiên, điều trị bằng MeV mang gen *FmIL-12* đã làm giảm nồng độ tế bào NK nội u. Các tế bào NK cho thấy tăng dấu ấn hoạt hóa CD69. Do đó kích hoạt ly giải tế bào u qua trung gian FmIL-12 đã được công nhận. Điều này đã thúc đẩy việc thiết kế một MeV tái tổ hợp mã hóa protein hợp bào IL-15/IL-15R α chuột (MeV FmIL-15), tương đương với hiệu quả của MeV mang gen *FmIL-12* trên các mô hình động vật mang khối u MC38cea và B16-CD46.⁶⁸ Thật vậy, điều trị bằng MeV mang gen *FmIL-15* có hiệu quả làm tăng tế bào NK nội u so với MeV mang gen *FmIL-12*. Tuy nhiên, hiệu quả điều trị của MeV mang gen *FmIL-15* không vượt trội trong cả hai mô hình thực nghiệm. Điều này cho thấy rằng, mặc dù giảm tế bào NK nội u, nhưng MeV *FmIL-12* là tác nhân trị liệu tiềm năng hơn trong các mô hình đó. Trong khi MeV mang gen FmIL-12 và FmIL-15 kích hoạt các chức năng tạo hiệu ứng tế bào T, nhưng các chức năng này có thể không hiệu quả đối với các khối u thiếu khả năng thâm nhập miễn dịch trước đó. Với mục đích tăng thâm nhập tế bào T vào các khối u, MeV mang gen mã hóa chất dính tế bào T đặc hiệu kép (BiTEs) với tính đặc hiệu kép đối với CD3 và phát triển các kháng nguyên bề mặt khối u. Các thí nghiệm tiền lâm sàng trên mô hình khối u ác tính B16 đã chứng minh điều trị MeV mang gen *BiTE* đã tăng cường chiêu mộ tế bào lympho T, kích hoạt tế bào lympho T và hoạt động kháng u khi. MeV mang gen *BiTE* cũng cho thấy hiệu quả kháng khối u đáng kể trong các mô hình khối u nguồn gốc từ bệnh nhân bằng cách chuyển tế bào miễn dịch vào chuột thiếu hụt miễn dịch. Trong khi các cytokine và BiTE có thể hoạt động trên tất cả các tế bào T không kể đến tính đặc hiệu của chúng, những nỗ lực gần đây nhằm hướng đến điều trị MeV tạo ra các phản ứng tế bào T với các kháng nguyên khối u đặc hiệu. Cách tiếp cận dùng MeV dị loài đã được áp dụng rộng rãi để điều trị khối u. Theo đó, MeV mang gen mã hóa lần lượt kháng nguyên ovalbumin và kháng nguyên khối u tương ứng là claudin-6 và TRP-2 đã được nghiên cứu. MeV - Schwarz mang gen mã hóa

các chuỗi TRP-2 có chiều dài đầy đủ hoặc chuỗi ovalbumin hoặc các chuỗi quyết định kháng nguyên ovalbumin, lây nhiễm các tế bào khối u và tế bào DC chuột, gây ra biểu hiện các phân tử MHC lớp I trên cả hai loại tế bào, đặc biệt là rõ ràng hơn khi nhiễm các virus mang gen mã hóa chuỗi quyết định kháng nguyên ovalbumin. Sự trình diện kháng nguyên trên các tế bào bị nhiễm MeV đã thúc đẩy sự hoạt hóa CTL đặc hiệu ovalbumin và khởi động các tế bào OT-I đặc hiệu ovalbumin. Hutzler và cộng sự (2017) đã chứng minh sự cảm ứng tế bào T CD8+ đặc hiệu ovalbumin và claudin-6 chuột C57BL/6 IFNAR^{-/-} CD46Ge được tiêm MeV mang gen mã hóa ovalbumin và claudin-6.⁷³ Ngoài ra, chuột được tiêm chủng MeV mang gen mã hóa claudin-6 đã phát triển miễn dịch dịch thể đặc hiệu với kháng nguyên, làm trung gian gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể kháng các tế bào khối u biểu hiện claudin-6. Những nghiên cứu đã đề cập ở trên chỉ ra có thể biến đổi MeV tăng cường cảm ứng các phản ứng tế bào T kháng tế bào khối u hiệu quả.

1.2.4. Đáp ứng miễn dịch vật chủ kháng MeV

Ngoài việc tăng cường đáp ứng miễn dịch kháng tế bào khối u, một số chất điều hòa miễn dịch cũng tăng cường đáp ứng miễn dịch kháng virus. Nghiên cứu sau khi điều trị MeV mang gen *GM-CSF* thì đáp ứng IFN- γ đặc hiệu với MeV đã tăng lên so với điều trị MeV đối chứng ở mô hình chuột mang khối u MC38cea, mặc dù không đáng kể.⁶⁵ Trong dân số nói chung, miễn dịch kháng MeV phổ biến là đã có từ trước, do đã từng bị nhiễm trùng virus sởi và tiêm chủng. Các kháng thể kháng virus sởi đã được chứng minh là ngăn cản quá trình ly giải tế bào u qua trung gian MeV, kể cả tiêm MeV tại chỗ hay toàn thân. Ngược lại, hiệu quả của MeV mang gen *BiTE* được tiêm nội u dường như cao hơn một chút ở chuột đã được chủng ngừa trước MeV trong mô hình chuột có miễn dịch bình thường mang khối u tế bào B16. Hơn nữa, như đã thảo luận ở trên, các tín hiệu chống virus bẩm sinh có thể là điều kiện tiên quyết để khởi phát các đáp ứng miễn dịch thích ứng kháng lại liệu

pháp OV. Các phản ứng kháng virus tự nhiên và thích ứng có thể hạn chế hoạt động gây phân giải trực tiếp tế vào ung thư của virus. Các phản ứng miễn dịch này lại cung cấp bổ sung về độ an toàn của phương pháp điều trị bằng OV, do cách hạn chế sự nhân lên và ngăn chặn sự lây lan không kiểm soát được của virus. Hơn nữa, trong một số trường hợp, các đáp ứng kháng virus thích ứng thậm chí có thể có lợi cho liệu pháp OV. Trong một nghiên cứu gần đây, Rajaraman và cộng sự (2018) đã xác định được một peptide virus mới, được xử lý từ protein MeV L, trình diện trên các phân tử HLA-A*24 bởi các tế bào u nguyên bào thần kinh đệm nhiễm MeV. Chúng có khả năng kích hoạt các tế bào T phù hợp với HLA, giải phóng IFN- γ ⁶⁰. Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy tế bào T kháng virus có thể được hoán đổi để trở thành tác nhân kháng tế bào khối u.⁶⁰ Các kháng thể chống vi-rút cũng có thể làm tăng hiệu quả của thuốc phân giải. Hiện tượng này đã được nghiên cứu chi tiết đối với reovirus. Tương tự, người ta cũng đã báo cáo sự tăng cường thực bào MeV qua trung gian kháng thể của đại thực bào, mặc dù không phải trong môi trường tế bào ung thư. Tóm lại, có một sự cân bằng phức tạp giữa khả năng miễn dịch kháng virus và kháng khối u. tuy nhiên, cần có nhiều thử nghiệm sâu rộng hơn đánh giá vấn đề này.

1.2.5. Các thử nghiệm lâm sàng sử dụng MeV điều trị ung thư

Sau đây là tóm tắt các thử nghiệm lâm sàng sử dụng liệu pháp MeV điều trị ung thư. Các thử nghiệm lâm sàng sử dụng liệu pháp MeV đã hoàn thành cho đến nay mới là giai đoạn đầu với các tiêu chí chính về tính an toàn và tính khả thi của điều trị bằng MeV ly giải tế bào ung thư. Do đó, bằng chứng liên quan đến các tiêu chí miễn dịch học từ các thử nghiệm lâm sàng còn hạn chế. Tuy nhiên, trong các thử nghiệm lâm sàng ban đầu này cũng đã cho thấy tiềm năng đầy hứa hẹn liệu pháp MeV điều trị ung thư (Bảng 1.1).

Bảng 1.1. Các thử nghiệm lâm sàng của MeV

Chủng virus	Cách điều trị	Liều, thời gian điều trị	Bệnh	N.C lâm sàng, bệnh nhân (n)	Kết quả lâm sàng	Tác giả, năm hoàn thành
MeV-EZ	Tiêm nội u	10^2 – 10^3 TCID ₅₀	U lympho T dưới da	Giai đoạn 1 (n = 5)	1/5 bệnh nhân thoái triển hoàn toàn u bị tiêm, 3/5 bệnh nhân thoái triển một phần ở u tiêm và 2/3 bệnh nhân này có thoái triển một phần các u ở xa.	Heinzerling L và cộng sự (2005)
MeV-CEA	Tiêm màng bụng	10^3 – 10^9 TCID ₅₀ (4 tuần/lần, 6 tháng)	Ung thư buồng trứng	Giai đoạn 1 (n = 21)	14/21 bệnh nhân có đáp ứng: thời gian sống trung bình là 1 năm; 1 bệnh nhân có thời gian sống 3,2 năm.	Galanis E và cộng sự (2010)
MeV-NIS	Truyền tĩnh mạch		Đa u tủy	Giai đoạn 1 (n=2)	Sau truyền virus, quan sát thấy MV-NIS nhân lên có chọn lọc ở khối u, thoái triển hoàn toàn u ác tính đã di căn ở 1/2 số bệnh nhân.	Russell SJ và cộng sự (2014)
MeV-NIS	Tiêm màng bụng	10^8 – 10^9 TCID ₅₀ (4tuần/lần, 6 tháng)	Ung thư buồng trứng	Giai đoạn 1 (n=16)	Thời gian sống trung bình của bệnh nhân là 26,5 tháng	Galanis E và cộng sự (2015)
MeV-NIS	Tiêm tĩnh mạch	10^6 – 10^9 TCID ₅₀	Đa u tủy	Giai đoạn 1	Không có giới hạn liều độc tính. Báo cáo ở 2 bệnh nhân: Giảm protein M và phân giải tương bào tủy xương ở cả hai bệnh nhân. Độ phân giải hoàn toàn × 9 tháng ở tất cả các vị trí bệnh của 1 bệnh nhân.	Russell SJ và cộng sự (2014)
MeV-NIS	Tiêm tĩnh mạch	10^9 TCID ₅₀	Đa u tủy	Giai đoạn 1 (n=12)	Đang thực hiện	
MeV-NIS	Tiêm màng phổi	10^8 – 3×10^9 TCID ₅₀	U thần kinh ngoại biên	Giai đoạn 1 (n=30)	Đang thực hiện	
MeV-NIS	Tiêm nội u		U nguyên bào đa dạng tái phát	Giai đoạn 2 (n=16)	Đang thực hiện	
MeV-NIS	Tiêm màng bụng	10^9 TCID ₅₀ , 28 ngày/lần, 6 tháng	U biểu mô buồng trứng hay màng bụng	Giai đoạn 2	Đang thực hiện	
MeV-NIS	Tiêm màng bụng	10^9 TCID ₅₀ ,	U biểu mô buồng trứng	Giai đoạn 1 (n=54)	Đang thực hiện	
MeV-NIS	Tiêm nội u	10^8 – 10^9 TCID ₅₀	Ung thư tế bào vảy đầu và cổ hay ung thư vú	Giai đoạn 2	Đang thực hiện	
MeV-NIS	Tiêm nội u	10^8 – 10^9 TCID ₅₀	Ung thư thần kinh ngoại vi	Giai đoạn 1	Đang thực hiện	

* Nguồn: Theo Pavlos Msaouel và cộng sự (2018)⁷⁴

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Động vật

Chuột thiếu hụt miễn dịch chủng BALB/c (nude mice, Foxn1^{nu}, chuột nude). Chuột nude đột biến trên gen Foxn1, không có tuyến ức, không có tế bào lympho T, chuột nude 6 - 8 tuần tuổi, trọng lượng từ 18-22g, đủ tiêu chuẩn thí nghiệm, được nhập khẩu từ Công ty Charlie-River (Hoa Kỳ).

Số lượng 20 chuột nude được nuôi trong phòng sạch. Nuôi dưỡng và chăm sóc theo quy trình hướng dẫn nuôi chuột nude tại Viện nghiên cứu Y-Dược học Quân sự, Học viện Quân y.

2.1.2. Vật liệu nghiên cứu

2.1.2.1. Virus vaccine sởi

Virus vaccine sởi chủng Edmonton có nguồn gốc từ vaccine Priorix (GlaxosmithKline, Anh).⁷⁵ Chủng virus vaccine này được hoạt hóa, tăng sinh, bảo quản và duy trì ở phòng thí nghiệm nghiên cứu ung thư của Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y.

2.1.2.2. Dòng tế bào ung thư phổi người H460, A549 và tế bào Verro

Dòng tế bào UTP người H460 (HTB-177TM -ATCC), A549 (CCL-185TM -ATCC) và Vero (CCL-81TM -ATCC, tế bào thận khỉ xanh Châu Phi) và có nguồn gốc từ trung tâm nuôi cấy các dòng tế bào Mỹ (American Type Culture Collection, Mỹ). Chúng tôi nuôi cấy, tăng sinh các dòng tế bào này trong môi trường nuôi cấy đúng theo quy trình, sau đó, bảo quản và duy trì ở môi trường âm sâu (-80⁰C) tại phòng thí nghiệm nghiên cứu ung thư của Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y.

2.1.3. Trang thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

2.1.3.1. Trang thiết bị

Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu bao gồm thước kẹp đo u, máy camera, máy đo quang OD, kính hiển vi quang học đảo ngược truyền qua, kính hiển vi điện tử truyền qua, hệ thống phân tích tế bào theo dòng chảy, máy ly tâm lạnh, tủ ấm CO₂ (37°C và 5% CO₂) (hình 2.1). Các máy đo phục vụ cho nghiên cứu đều được chuẩn hóa.



Hình 2.1. Các máy sử dụng cho nghiên cứu

(1) kính hiển vi điện tử truyền qua; (2) Hệ thống phân tích tế bào theo dòng chảy; (3) máy ly tâm; (4) kính hiển vi; (5) tủ nuôi cấy tế bào (37°C, 5% CO₂); (6) máy đo quang MTT

2.1.3.2. Dụng cụ nghiên cứu tiêu hao

Vật tư tiêu hao gồm đĩa nuôi cấy tế bào đa giếng các kích cỡ khác nhau: 6, 12, 24, 96 giếng; pipet các kích cỡ; ống falcon 15ml và 50 ml; ống effendort 1,5ml và 2ml; các dụng cụ tiêu hao khác...

2.1.3.3. Hóa chất nghiên cứu

Môi trường nuôi cấy tế bào DMEM có thêm 10% FBS (Foetal Bovine Serum) và 1% kháng sinh (gồm penicillin và streptomycin) đã được lọc qua màng lọc vô trùng.

Dung dịch đệm PBS, cồn 90 độ, Trypsin-EDTA 1X, dung dịch cố định tế bào, dung dịch dimethyl sulphoxide (DMSO)....

Bộ kit MTT đánh giá tỉ lệ tế bào sống; kit FITC Annexin V Apoptosis Detection kit (BD) đánh giá tỉ lệ tế bào chết apoptosis; các kháng thể gắn chất phát huỳnh quang phát hiện các tế bào miễn dịch ở mô u chuột: kháng thể Mouse CD11b-FITC, kháng thể Mouse CD49b/Pan-NK Cells FITC DX5, kháng thể Mouse CD11c APC HL3, Kháng thể Ms CD197 (CCR7) PerCP-Cy5.5 4B12.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nuôi cấy và tăng sinh các dòng tế bào

2.2.1.1. Nội dung chuẩn bị

- Tế bào dòng tế bào UTP người H460, A549 và Vero lấy từ tế bào dòng được bảo quản ở môi trường âm sâu (-80°C).

- Dung dịch PBS 1X vô trùng, dung dịch môi trường nuôi cấy tế bào DMEM bổ sung 10% FBS, 1% kháng sinh (penicillin + streptomycin) và được lọc qua màng lọc vô trùng đường kính lỗ $0,45\mu\text{m}$. Dung dịch trypsin-EDTA 1X.

- Tủ ấm nuôi cấy tế bào (37°C , 5% CO_2).

- Pipet, ống nghiệm vô trùng, đĩa nuôi cấy tế bào đường kính 10 cm, máy ly tâm, buồng đếm tế bào, kính hiển vi quang học...

2.2.1.2. Nuôi cấy dòng tế bào ung thư phổi người H460, A549 và Vero

Từ tủ âm sâu (-80°C) lưu trữ tế bào, lấy ra mỗi loại một ống falcon chứa tế bào H460, A549 và Vero và rã đông nhanh trong bể ổn nhiệt (37°C x 1 phút). Hút 200 μl dung dịch tế bào có trong mỗi ống trên cho vào từng

falcon loại 15ml chứa 10 ml môi trường nuôi cấy tế bào rồi trộn đều. Hút dung dịch tế bào vừa trộn vào đĩa nuôi cấy đường kính 10 cm. Kiểm tra tế bào trên kính hiển vi, đánh giá đặc điểm hình thái và mật độ tế bào vừa gieo. Chuyển các đĩa nuôi tế bào vào tủ ấm nuôi cấy tế bào (37 °C và 5% CO₂).

Sau 24 giờ, lấy các đĩa nuôi cấy tế bào ra, tiến hành kiểm tra tế bào bằng kính hiển vi quang học, tế bào sống và bám đáy đĩa nuôi cấy, rửa tế bào bằng PBS 1X và thay môi trường nuôi cấy tế bào. Duy trì đĩa nuôi cấy tế bào trong tủ nuôi cấy (37°C, 5% CO₂). Hàng ngày, dùng kính hiển vi quang học kiểm tra tế bào cũng như tình trạng nhiễm các vi sinh vật vào môi trường nuôi cấy. Thay môi trường nuôi cấy tế bào 2-3 ngày/lần^{76,77}.

2.2.1.3. Tăng sinh dòng tế bào ung thư phổi người H460, A549 và Vero

Gieo các tế bào sau 6-7 ngày, kiểm tra dưới kính hiển vi quang học thấy tế bào phát triển khoảng 80% đáy đĩa nuôi cấy, tiến hành tăng sinh tế bào bằng cách tách và gieo tế bào vào nhiều đĩa nuôi cấy theo các bước sau:

- Hút hết dịch môi trường cũ ở các đĩa nuôi cấy tế bào, sau đó, rửa sạch tế bào ở các đĩa nuôi cấy bằng dung dịch PBS 1X (lặp lại khoảng 2lần).

- Cho 3 ml dung dịch trypsin-EDTA 1X vào các đĩa nuôi cấy tế bào, lắc đều rồi lưu tủ ấm 37°C, CO₂ khoảng 2-3 phút.

- Lấy các đĩa nuôi cấy tế bào ra khỏi tủ ấm, kiểm tra mức độ tế bào bong khỏi đáy dưới kính hiển vi quang học. Khi tế bào bong khỏi đáy đĩa nuôi cấy, tách rời nhau, lơ lửng trong môi trường nuôi cấy, thực hiện các bước sau:

- + Cho thêm 20 ml dung dịch môi trường nuôi cấy vào mỗi đĩa nuôi cấy tế bào (đã bong hết), trộn đều dung dịch môi trường nuôi cấy và tế bào bằng pipet, dùng pipet hút toàn bộ dịch môi trường có chứa tế bào cho vào ống fancel 50 ml.

- + Đếm tế bào ở buồng đếm Neubauer (Hình 2.2), chuẩn nồng độ dịch tế bào là 10⁴ tế bào/ml.

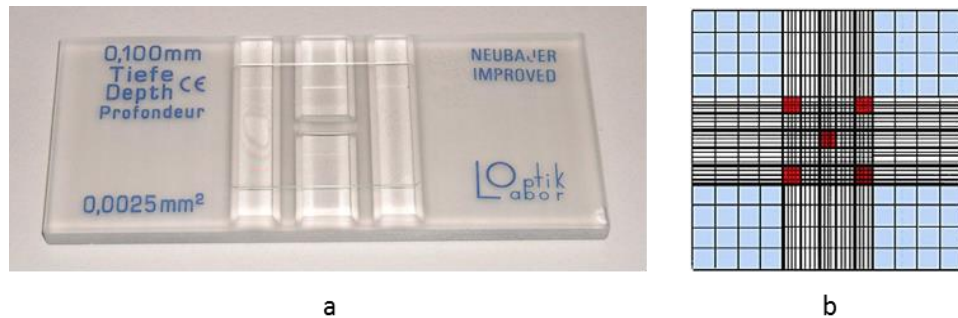
+ Cho 10 ml dung dịch tế bào đã chuẩn nồng độ ở trên vào các đĩa nuôi cấy 20x100 mm mới (đã chuẩn bị sẵn).

+ Lưu các đĩa nuôi cấy tế bào mới gieo ở tủ ấm nuôi cấy tế bào (37 °C, 5% CO₂). Theo dõi tế bào bám đáy và phát triển hàng ngày, loại bỏ ngay đĩa nuôi cấy bị nhiễm nấm hay vi sinh vật khác trong quá trình theo dõi.

Khi tế bào phát triển tốt gần kín đáy đĩa nuôi cấy, thu tế bào làm thí nghiệm hay làm nguồn tế bào bảo quản ở môi trường -80°C.

2.2.1.4. Phương pháp chuẩn nồng độ tế bào

- Nồng độ tế bào sau thu hoạch được chuẩn bằng cách sử dụng buồng đếm Neubauer (Hình 2.2) và kính hiển vi quang học.



Hình 2.2. Hình ảnh buồng đếm Neubauer

(a). Buồng đếm nhìn bằng mắt thường; (b). Buồng đếm nhìn trên kính hiển vi

- Công thức tính mật độ tế bào trong môi trường bằng buồng đếm Neubauer:

+ Gọi A là số lượng tế bào đếm được trong 80 ô nhỏ.

+ Công thức tính: Số tế bào trong 1mm³ = $\frac{A \times 4000 \times \text{Độ Pha Loãng}}{5 \times 16}$

2.2.2. Tăng sinh và chuẩn độ virus vaccine sởi

2.2.2.1. Tăng sinh virus vaccine sởi

- Nhiễm MeV vào tế bào Vero:

Gieo tế bào Vero vào các đĩa nuôi cấy 20x100 mm với nồng độ 10⁵ tế bào/ml theo kỹ thuật nuôi cấy tế bào (đã đề cập ở tiểu mục 2.2.1.2), lưu ở tủ nuôi cấy tế bào (37°C, 5% CO₂).

Sau 24 giờ, kiểm tra tế bào trên đĩa nuôi cấy bằng kính hiển vi quang học, tế bào Vero bám đáy tốt, thay môi trường nuôi cấy. Theo dõi tế bào Vero phát triển hàng ngày, thay môi trường nuôi cấy 2-3 ngày/1 lần. Khi tế bào Vero phát triển gần kín đáy đĩa nuôi cấy (thường vào ngày thứ 5-6), thay môi trường nuôi cấy đồng thời tiến hành nhiễm MeV với nồng độ 1-2 ml dịch stock virus/đĩa nuôi cấy, lưu vào tủ nuôi cấy tế bào (37 °C, 5% CO₂).

- *Thu dung dịch chứa MeV:*

Kiểm tra tế bào Vero nhiễm MeV ở các đĩa nuôi cấy hàng ngày dưới kính hiển vi quang học. Sau 7-8 ngày nhiễm virus, quan sát dưới kính hiển vi thường, tế bào Vero nhiễm MeV ở các đĩa nuôi cấy có hình ảnh: tế bào hòa màng tạo hợp bào, hợp bào chết vỡ ra tạo thành mảnh vỡ tế bào. Hút toàn bộ dịch chứa tế bào nhiễm MeV chết ở các đĩa nuôi cấy vào ống falcon 50 ml, ly tâm 5000 vòng/phút, trong 5 phút. Sau đó, lấy phần dịch nổi, bỏ phần cặn bên dưới, tiếp tục lọc phần dịch nổi này bằng màng lọc vi sinh đường kính lỗ 0,45µm, ta thu được dịch chứa virus. Bảo quản trong môi trường -80°C.

2.2.2.2. *Chuẩn độ virus vaccine sởi bằng phương pháp TCID₅₀*

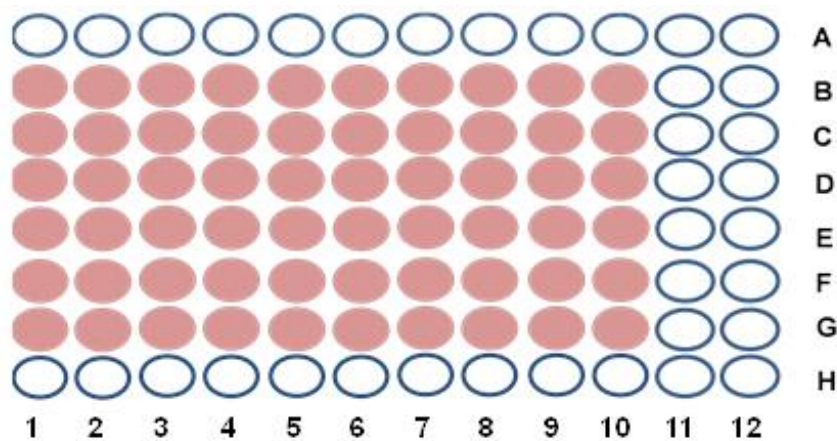
Chuẩn độ virus bằng TCID₅₀ là phương pháp xác định liều nhiễm 50% nuôi cấy mô. Đây là phương pháp thường sử dụng để chuẩn độ các virus gây ra hiệu ứng bệnh lý tế bào đặc trưng *in vitro*. Chúng tôi lựa chọn phương pháp chuẩn độ TCID₅₀ sử dụng tế bào Vero và dung dịch xanh methylen làm chất biểu hiện màu và đánh giá hiệu ứng bệnh lý tế bào nhiễm MeV ở các giếng.

Tiến hành theo các bước như sau:

- Chuẩn bị 1 đĩa 96 giếng
- Gieo tế bào Vero vào các giếng trên đĩa 96 giếng theo các bước sau:
 - + Tăng sinh tế bào Vero đủ số lượng theo kỹ thuật tăng sinh tế bào đã nêu ở trên và thu đủ số lượng tế bào Vero.
 - + Đếm tế bào Vero ở buồng đếm Neubauer, chuẩn bị dung dịch tế bào Vero nồng độ 5×10^4 tế bào/ml.

+ Cho 200 μ l dung dịch tế bào Vero đã chuẩn nồng độ trên vào các giếng trên đĩa 96 giếng, ta có các giếng có nồng độ 10^4 tế bào/200 μ l/1 giếng, duy trì tế bào trên đĩa 96 giếng ở tủ nuôi cấy tế bào (37 °C, 5% CO₂).

- Nhiễm MeV vào các giếng trên đĩa 96 giếng với các nồng độ pha loãng từ 10^{-3} đến 10^{-8} theo các bước: Sau 24 giờ kiểm tra tế bào trên đĩa 96 giếng dưới kính hiển vi quang học, tế bào Vero bám đáy và phát triển. Tiến hành thay môi trường nuôi cấy và nhiễm MeV vào các giếng trên đĩa 96 giếng theo hàng ngang B, C, D, E, F, G, tương ứng với nồng độ pha loãng stock virus từ 10^{-3} đến 10^{-8} , hàng A, hàng H, cột 11 và 12 là các giếng chứng (không nhiễm virus) (Hình 2.3).



Hình 2.3. Sơ đồ nhiễm MeV để chuẩn độ TCID₅₀

● Giếng nhiễm MeV; ○ Giếng không nhiễm MeV

- Pha loãng nồng độ virus theo các bước sau⁷⁸:

+ Chuẩn bị 9 ống nghiệm (5ml) vô trùng, đánh số ống nghiệm từ 1 đến 9, mỗi ống có 2,25ml môi trường nuôi cấy tế bào.

+ Cho 250 μ l stock virus vào ống nghiệm 1, trộn đều được 2,5ml dung dịch stock virus đã pha loãng 10^{-1} (Hình 2.4).

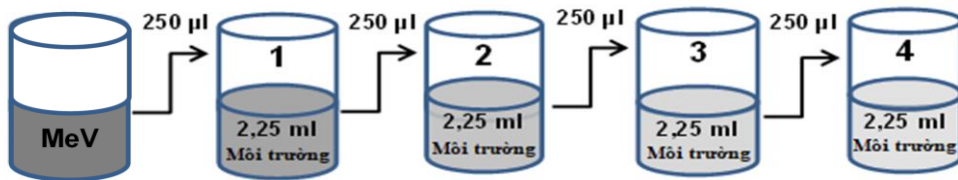
+ Lấy 250 μ l dung dịch ở ống nghiệm 1 cho vào ống nghiệm 2, trộn đều ta được 2,5ml dung dịch virus pha loãng 10^{-2} (Hình 2.4).

+ Lấy 250 μl dung dịch ở ống nghiệm 2 cho vào ống nghiệm 3, trộn đều ta được 2,5ml dung dịch virus pha loãng 10^{-3} (Hình 2.4).

+ Lấy 250 μl dịch virus ở ống nghiệm 3 cho vào ống nghiệm 4, trộn đều ta được 2,5ml dung dịch virus pha loãng 10^{-4} (Hình 2.4).

+ Cứ như vậy, lặp lại các thao tác trên cho đến ống nghiệm 9, ta được 9 ống nghiệm chứa 2,5 ml dung dịch có nồng độ virus từ 10^{-1} đến 10^{-9} .

Sử dụng các ống chứa dung dịch virus từ 2 đến 9 tương ứng với nồng độ pha loãng virus từ 10^{-2} đến 10^{-9} cho thử nghiệm này.



Hình 2.4. Pha loãng nồng độ MeV

** Nguồn: Lê Duy Cương (2019)⁷⁸*

Kiểm tra tế bào Vero nhiễm virus ở các giếng trên đĩa 96 giếng hàng ngày dưới kính hiển vi quang học.

- Nhuộm xanh methylen: Sau 4-5 ngày nhiễm MeV, quan sát dưới kính hiển vi thấy các giếng có hình ảnh nhiễm virus rõ. Cho thêm 50 μl xanh methylen 15% vào từng giếng trên đĩa 96 giếng. Sau đó, cho đĩa 96 giếng vào trong 1 túi nilon sạch rồi để ở nhiệt độ phòng 1-2 giờ. Lấy đĩa 96 giếng ra rửa nhẹ nhàng bằng nước sạch. So sánh màu ở giếng chứng và giếng nhiễm virus đánh giá kết quả và tính TCID₅₀.

- Đọc kết quả sau nhuộm xanh methylen: Các tế bào còn sống bám đáy và bắt màu xanh của chất nhuộm xanh methylen, các tế bào chết do nhiễm virus bong ra và bị rửa trôi đi sau khi rửa nhẹ nhàng đĩa 96 giếng bằng nước sạch. Do vậy, giếng có màu xanh đậm hơn là giếng có số tế bào sống cao hơn, độ nhạt của màu xanh tỉ lệ thuận với số tế bào chết. So sánh mức độ màu giữa giếng chứng và giếng nhiễm virus xác định giếng có tế bào nhiễm MeV.

- Công thức tính $TCID_{50}$ ^{77,78}:

I: Tính khoảng tỉ lệ (PD):

$$\frac{(\% \text{ CPE ở nồng độ pha loãng có } \% \text{ CPE trên } 50\%) - (50\%)}{(\% \text{ CPE ở nồng độ pha loãng có } \% \text{ CPE} > 50\%) - (\% \text{ CPE ở nồng độ pha loãng có } \% \text{ CPE} < 50\%)}$$

II: Tính (-Log) nồng độ pha loãng có %CPE trên 50% (ví dụ 10^{-3} sẽ là 3)

$$TCID_{50}/ml = 10^{I+II}/ml \quad (CPE: \text{Hiệu ứng gây độc tế bào})$$

2.2.3. **Đánh giá virus vaccine sởi ly giải tế bào bằng thử nghiệm MTT**

MTT [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5 diphenyl tetrazolium bromide] có màu vàng, trong ti thể của tế bào sống, chất này được khử thành các tinh thể formazan có màu tím. Dùng máy quang phổ đo độ hấp thụ quang phổ của dung dịch MTT màu tím tại một bước sóng cụ thể (thường 490-570nm). Trong nghiên cứu này chúng tôi đo quang ở bước sóng 570nm. Độ hấp thụ quang phổ giảm chứng tỏ các enzym ti thể (reductase) ít hoạt động, tỉ lệ tế bào sống ít. Sự thay đổi này cho chúng ta thấy độ hấp thụ quang phổ liên quan trực tiếp đến số lượng tế bào sống *in vitro*. Quy ước độ hấp thụ quang phổ của nhóm chứng (không nhiễm MeV) là 100% tế bào sống. Khi đó, lấy độ hấp thụ quang phổ ở từng giếng của nhóm nhiễm MeV chia cho nhóm chứng ta được tỉ lệ tế bào sống ở từng giếng, đánh giá hiệu quả gây chết tế bào theo nồng độ nhiễm MeV *in vitro*.

2.2.3.1. Chuẩn bị dòng tế bào H460 và A549

- Tế bào dòng UTP người H460, A549 được lấy từ nguồn bảo quản trong môi trường -80°C , gieo mỗi loại vào 2 đĩa nuôi cấy kích thước 20x100 mm. Thay môi trường nuôi cấy 2-3 ngày/lần.

- Sau 6-7 ngày gieo, tế bào H460, A549 bám đáy và phát triển kín đáy đĩa nuôi cấy. Tách tế bào này theo kỹ thuật tách tế bào (mục 2.2.1.3).

- Cho 10 ml dung dịch môi trường nuôi cấy mới vào đĩa nuôi cấy các tế bào này (đã bong hết), trộn đều để các tế bào lơ lửng trong môi trường. Dùng pipet hút toàn bộ dịch tế bào từ 4 đĩa nuôi cấy trên vào 1 ống falcon 50 ml.

- Chuẩn nồng độ tế bào A549, H460 ở buồng đếm Neubauer để có dịch tế bào với nồng độ 2×10^3 tế bào/ml. Cho 200 μ l dịch từng loại tế bào này vào từng giếng trên 2 đĩa 96 giếng (1 đĩa cho mỗi thời điểm đánh giá). Như vậy mỗi giếng trên đĩa 96 giếng có 10^4 tế bào H460/200 μ l hoặc A549/200 μ l. Trên cùng một đĩa 96 giếng thì 6 cột là tế bào H460 và 6 cột là tế bào A549. Đánh ký hiệu thời gian đánh giá gồm: đĩa I, đánh giá tỉ lệ tế bào sống sau nhiễm virus ngày thứ 3; đĩa II, đánh giá tỉ lệ tế bào sống nhiễm virus ngày thứ 4.

- Để 2 đĩa 96 giếng đã gieo tế bào H460 và A549 vào tủ nuôi cấy tế bào (37°C, 5% CO₂).

2.2.3.2. Nhiễm virus vaccine sởi vào tế bào H460 và A549 trên đĩa 96 giếng

- Sau 24 giờ gieo tế bào vào đĩa 96 giếng, kiểm tra các giếng trên đĩa 96 giếng đã gieo tế bào H460 và A549 dưới kính hiển vi quang học, đánh giá tế bào bám và phát triển.

- Chuẩn bị MeV với nồng độ 1 MOI và 1/10 MOI. Tiến hành thay môi trường ở các giếng trên từng đĩa 96 giếng. Nhiễm virus theo 2 nhóm (nhóm nhiễm MeV và nhóm chứng) như sau:

- + Hàng đầu tiên và cuối cùng là nhóm chứng (không nhiễm MeV),
- + Hàng thứ 2, 3 nhiễm MeV với nồng độ 1 MOI; Hàng thứ 3, 4 nhiễm MeV với nồng độ 0,1 MOI.

- Hàng ngày, kiểm tra tế bào H460 và A549 nhiễm MeV ở các giếng trên đĩa 96 giếng (nếu đĩa nuôi cấy có giếng bị nhiễm nấm hay vi sinh vật khác trong quá trình tiến hành thì làm lại). Đến ngày thứ 3 và 4 sau nhiễm MeV, tiến hành làm nghiệm pháp MTT và tính kết quả tỉ lệ tế bào sống ở các nhóm nghiên cứu.

2.2.3.3. Các bước tiến hành nghiệm pháp MTT

- Chuẩn bị dung dịch MTT 10% gồm các bước sau:
 - + Cho 3ml PBS 1.M vào lọ chứa MTT, lắc đều để hòa tan hết các thành phần của hoạt chất MTT.

+ Cho 2 ml MTT và 18 ml dịch nuôi cấy tế bào vào ống falcon để được 20 ml dung dịch nuôi cấy 10% MTT.

- Tiến hành nghiệm pháp MTT theo các bước:

+ Lấy nhẹ nhàng các đĩa 96 giếng chứa tế bào H460 và A549 đã nhiễm MeV ngày thứ 3 và 4 ra khỏi tủ ẩm (37°C , 5% CO_2). Kiểm tra các giếng trên đĩa 96 giếng bằng kính hiển vi quang học để loại bỏ đĩa nuôi cấy có giếng bị nhiễm nấm hay vi sinh vật khác trong quá trình tiến hành.

+ Hút nhẹ nhàng loại bỏ hết dịch nuôi cấy tế bào ở các giếng trên đĩa 96 giếng bằng pipet.

+ Cho vào mỗi giếng 100 μl dung dịch nuôi cấy tế bào có 10% MTT.

+ Lưu đĩa 96 giếng ở tủ nuôi cấy tế bào (37°C , 5% CO_2) thời gian 4 giờ.

+ Sau khi lưu đủ thời gian, lấy đĩa 96 giếng ra, hút nhẹ nhàng loại bỏ toàn bộ dịch nổi ở mỗi giếng (tránh hút cả tinh thể formazan màu tím), cho 100 μl dung dịch hòa tan tinh thể formazan vào các giếng trên đĩa 96 giếng.

+ Lắc nhẹ nhàng để hòa tan hết các tinh thể màu tím formazan.

+ Đo mật độ quang ở bước sóng 570 nm rồi tính kết quả.

2.2.4. Chuẩn bị mẫu tế bào H460 và A549 nhiễm MeV đánh giá tế bào chết theo chương trình bằng phương pháp dòng chảy

2.2.4.1. Chuẩn bị dòng tế bào ung thư phổi người H460 và A549

Tăng sinh tế bào H460 và A549 (theo các bước ở mục 2.2.1), gieo mỗi loại tế bào vào 3 đĩa 6 giếng theo các bước sau:

- Cho vào các đĩa nuôi cấy tế bào H460 và A549 đã bong hết 15 ml dung dịch môi trường nuôi cấy, trộn đều để các tế bào lơ lửng trong môi trường. Hút toàn bộ dịch tế bào này vào ống fancel 50 ml.

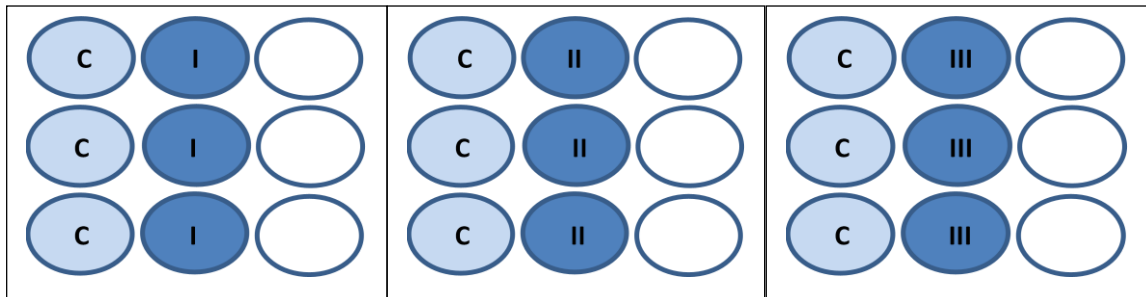
- Chuẩn nồng độ tế bào H460 và A549 nồng độ 10^5 tế bào/ml. Cho 2ml dịch 2 dòng tế bào trên vào từng giếng trên đĩa 6 giếng. Như vậy tổng số có 36 giếng mỗi giếng có 2×10^5 tế bào.

- Lưu 6 đĩa 6 giếng chứa tế bào H460 và A549 trên vào tủ nuôi cấy tế bào (37°C , 5% CO_2).

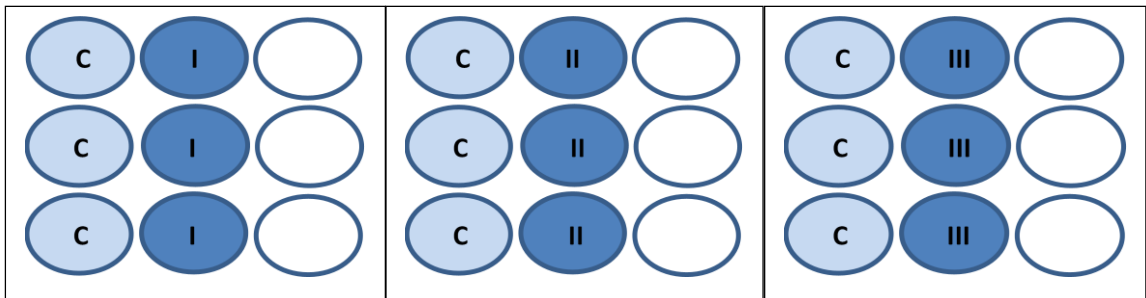
2.2.4.2. Lây nhiễm tế bào H460 và A549 bằng MeV

Sau 24 giờ, kiểm tra 6 đĩa 6 giếng đã gieo tế bào H460 và A549 dưới kính hiển vi quang học, tế bào bám đáy và phát triển và không bị nhiễm vi sinh vật khác. Thay môi trường nuôi cấy tế bào.

- Chia các giếng thành 3 thời điểm nghiên cứu và đánh số I, II, III tương ứng với thời điểm nhiễm MeV ngày thứ 3, 4 và 5. Mỗi thời điểm có 2 nhóm gồm: nhóm nhiễm MeV với nồng độ 1.MOI và nhóm chứng. Mỗi nhóm có 3 giếng (Hình 2.5). Như vậy, có 6 đĩa 6 giếng được đánh số theo từng nhóm nghiên cứu (Hình 2.5).



A. Nhóm tế bào H460



A. Nhóm tế bào A549

Hình 2.5. Sơ đồ nhiễm MeV theo các nhóm đánh giá tỉ lệ tế bào chết theo chương trình *in vitro*

(I). tế bào nhiễm virus ngày thứ 3; (II). tế bào nhiễm virus ngày thứ 4;
(III). tế bào nhiễm virus ngày thứ 5; (C). nhóm chứng

Công thức tính liều nhiễm virus theo PFU.⁷⁹

$$MOI = \frac{PFU/ml \times V}{N}$$

V: thể tích dung dịch virus (ml)
N: số tế bào trong giếng

Lưu các đĩa 6 giếng trên ở tủ nuôi cấy tế bào (37 °C, 5% CO₂), kiểm tra tế bào hàng ngày.

2.2.4.3. Thu mẫu tế bào H460 và A549

Ở ngày thứ 3, thứ 4, thứ 5 nhiễm MeV, tiến hành thu mẫu tế bào để đánh giá tỉ lệ tế bào chết theo chương trình bằng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy (flow cytometry) theo các bước sau:

- Chuẩn bị 12 ống fancel 15 ml vô trùng cho mỗi thời điểm (6 ống cho mỗi loại tế bào), đánh số các ống nhiễm virus ngày thứ 3, thứ 4 và thứ 5.

- Lấy các đĩa 6 giếng tế bào H460 và A549 của ngày thứ 3, thứ 4 và thứ 5 nhiễm virus ra khỏi tủ ấm (37°C, 5% CO₂), kiểm tra tế bào nhiễm MeV dưới kính hiển vi quang học, chụp ảnh lưu trong máy vi tính.

- Hút hết phần dịch nổi cùng các tế bào đã bong khỏi đáy (lơ lửng trong dịch nuôi tế bào) ở từng giếng cho vào các ống fancel vô trùng đã chuẩn bị ở trên. Sau đó, cho vào mỗi giếng 1 ml dung dịch Trypsin-EDTA 1X để làm bong tế bào, lắc nhẹ rồi đưa các đĩa 6 giếng vào tủ nuôi cấy tế bào (37 °C, 5% CO₂), duy trì khoảng 2-3 phút.

- Kiểm tra tế bào bong khỏi đáy dưới kính hiển vi, khi tế bào bong đáy hết, tiến hành thêm vào mỗi giếng 3ml dung dịch môi trường nuôi cấy tế bào, trộn đều rồi hút dịch tế bào này vào các ống falcon đã đánh số tương ứng, ta thu được toàn bộ phần dịch tế bào ở các giếng nhiễm virus ngày thứ 3, ngày thứ 4 và thứ 5.

- Ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 5 phút, hút bỏ dịch nổi thay bằng 1ml dung dịch PBS, thu được mẫu tế bào H460 và A549 nhiễm virus ngày thứ 3, thứ 4 và thứ 5.

2.2.5. Phương pháp phân tích tế bào dòng chảy đánh giá tỉ lệ tế bào H460 và A549 chết theo chương trình

2.2.5.1. Nguyên lý

Sử dụng kháng thể anti-annexin V gắn chất phát huỳnh quang là Fluorescein isothiocyanate (FITC) và chất nhuộm nhân tế bào phát huỳnh quang là Propidium iodide (PI) để kiểm tra tỉ lệ tế bào chết apoptosis.

- Phosphatidyl serine là một thành phần lipit tham gia cấu trúc lớp phospholipid kép của màng tế bào. Phosphatidyl serine có vai trò quan trọng trong duy trì sinh lý màng tế bào. Ở các tế bào sống, chất này nằm trên mặt trong màng tế bào phía tế bào chất. Khi tế bào đi vào quá trình apoptosis thì phosphatidyl serine chuyển từ mặt trong ra mặt ngoài của màng tế bào, tiếp xúc trực tiếp với môi trường bên ngoài. Annexin V là một protein có khả năng phản ứng với phosphatidyl serine dưới chất xúc tác ion Ca^{2+} . Khi đó, phosphatidyl serine sẽ kết hợp với Annexin V. Chúng ta dễ dàng nhận biết tế bào này bằng sử dụng kháng thể kháng Annexin V có gắn chất phát huỳnh quang FITC.

- PI là loại thuốc nhuộm nhân phát huỳnh quang, chúng có khả năng liên kết rất mạnh với DNA của nhân tế bào. Khi tế bào ở trạng thái bình thường, chất này không thể xâm nhập vào trong để gắn với DNA ở nhân tế bào sống. Khi màng tế bào bị tổn thương, PI đi vào trong tế bào và liên kết với DNA ở nhân tế bào. Như vậy, sử dụng chất PI phát huỳnh quang để phát hiện màng tế bào bị tổn thương.

Kết hợp chất nhuộm nhân PI với kháng thể kháng Annexin V có gắn chất phát huỳnh quang FITC, chúng ta dễ dàng phát hiện tế bào ở các giai đoạn apoptosis sớm, apoptosis muộn và hoại tử. Nếu tế bào trong giai đoạn apoptosis sớm chỉ có Annexin V liên kết với phosphatidyl serine trên bề mặt ngoài màng tế bào nên hiển thị tín hiệu huỳnh quang của FITC. Tế bào ở giai

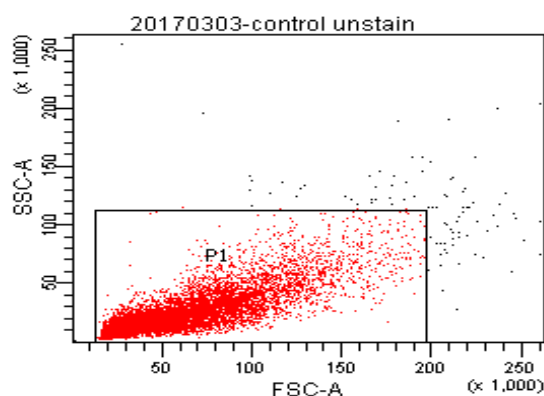
đoạn apoptosis muộn, mất tính toàn vẹn của màng tế bào, có cả 2 tín hiệu huỳnh quang là tín hiệu huỳnh quang của FITC và PI. Tế bào chết theo kiểu hoại tử sẽ chỉ biểu hiện tín hiệu huỳnh quang của PI.

2.2.5.2. Phương pháp phân tích tế bào dòng chảy đánh giá tỉ lệ tế bào chết apoptosis

Tế bào được xử lý và nhuộm theo hướng dẫn thực hiện quy trình kèm theo bộ kit FITC, Annexin V Apoptosis Detection kit (BD) gồm các bước sau:

- Hòa loãng 3 ml dung dịch Binding buffer 10X bằng nước cất tỉ lệ 1:10 để được dung dịch 1X.
- Rửa sạch mẫu tế bào bằng dung dịch PBS 1X rồi bỏ hết dung dịch PBS.
- Rửa sạch mẫu tế bào một lần nữa bằng dung dịch Binding buffer 1X, ly tâm ở 300 G trong 10 phút, hút hết phần dung dịch Binding buffer ở trên.
- Hòa tan khối tế bào sau ly tâm trong dung dịch Binding buffer 1X thành dung dịch có nồng độ 10^6 tế bào/mL.
- Cho 100 μ L tế bào trên (nồng độ 10^5 tế bào) vào các ống nghiệm vô trùng đã chuẩn bị trước. Thêm 5 μ L Annexin V-FITC vào mỗi ống nghiệm chứa dịch tế bào ở trên. Trộn đều, nhẹ nhàng từng ống nghiệm và ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng, để trong buồng tối.
- Thêm 5 μ L dung dịch PI và ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng trong buồng tối, sau đó ly tâm ở 300 G trong 10 phút, loại bỏ phần dịch nổi phía trên.
- Rửa sạch tế bào và hòa tan tế bào bằng dùng dịch PBS.
- Chạy flow cytometry trong 1 giờ (sau khi chuẩn bị tế bào) đánh giá tỉ lệ tế bào chết apoptosis.

Đánh giá tỉ lệ tế bào apoptosis trên hệ thống FACS CANTO II (BD) gồm: xác định quần thể tế bào cần đánh giá, xác định vùng giá trị huỳnh quang FITC và propidium iodide (PI).



Hình 2.6. Mẫu xác định thông số chuẩn máy trên phần mềm BD FACS

Diva đánh giá tỉ tế bào chết apoptosis và tế bào hoại tử.

Trước tiên, chúng tôi tiến hành chạy mẫu đối chứng không nhuộm để xác định các thông số chuẩn cho máy trên phần mềm BD FACS Diva. Các tế bào được phân loại theo kích thước (đo độ tán xạ thẳng của chùm ánh sáng: FSC) và độ phức tạp (đo độ tán xạ bên của chùm ánh sáng: SSC). Kết quả là xác định vùng tế bào cần đánh giá. Ở đây, chúng tôi xác định được vị trí phân bố của các tế bào đơn độc là vùng P1 (Hình 2.8). Các vùng nằm ngoài khoảng này sẽ không được tiếp tục khảo sát. Đồng thời, tín hiệu huỳnh quang ở mẫu đối chứng cũng sẽ được khoanh vùng. Ở đây, chúng tôi xác định là giá trị nhỏ hơn 10^3 đối với PI và nhỏ hơn 2.10^3 đối với FITC ở mẫu đối chứng. Như vậy có nghĩa là sau khi ủ với kháng thể, các tế bào có giá trị huỳnh quang PI lớn hơn 10^3 và FITC lớn hơn 2.10^3 sẽ được coi là có biểu hiện huỳnh quang, căn cứ vào tín hiệu huỳnh quang để xác định loại tế bào ở các giai đoạn apoptosis.

Thực hiện quá trình thí nghiệm tại Bộ môn Sinh học tế bào, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

2.2.6. Phương pháp nuôi chuột thiếu hụt miễn dịch (chuột nude)

Chuột thiếu hụt miễn dịch 20 con, được nuôi trong phòng sạch. Phân nhóm, mỗi nhóm 10 chuột được nhốt chung trong 2 lồng, mỗi lồng 5 chuột và đánh số theo dõi. Mỗi lồng chuột có lỗ cấp và thoát khí qua màng lọc HEPA riêng (Hình 2.7). Ánh sáng được duy trì theo chu kỳ tự nhiên, bật lúc 7 giờ và tắt lúc 19 giờ bằng công tắc điều khiển tự động. Thay lồng và chất lót, đồng

thời kiểm tra tình trạng toàn thân, phân, tiêu thụ thức ăn, nước uống của chuột 2 lần/tuần. Chế biến thức ăn sạch và hấp tiệt trùng nước uống tinh khiết. Nhiệt độ phòng được duy trì $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, duy trì độ ẩm của phòng khoảng $60 \pm 2\%$ bằng dùng máy hút ẩm không khí. Môi trường nuôi chuột được cấy khuẩn để kiểm tra và vệ sinh vô khuẩn hàng tuần.



Buồng nuôi chuột nude



Lồng chia nhóm chuột nud

Hình 2.7. Buồng và lồng nuôi chuột nude

2.2.7. Tạo khối u tế bào H460 trên đuôi chuột nude và tính thể tích khối u

2.2.7.1. Phương pháp tạo khối u

- Tăng sinh tế bào H460 (kỹ thuật tăng sinh tế bào ở mục 2.2.1).
- Chuẩn nồng độ tế bào H460 là 10^7 tế bào/ml ở buồng đếm Neubauer.
- Chuẩn bị chuột thiếu hụt miễn dịch khỏe mạnh, 6-8 tuần tuổi.
- Tiêm 0,1ml dịch tế bào H460 trên (nồng độ 10^6 tế bào) vào dưới da đuôi chuột nude (Hình 2.8). Theo dõi u tế bào H460 phát triển hàng ngày.



Hình 2.8. Ghép u tế bào H460

2.2.7.2. Phương pháp đo và tính thể tích khối u

Khoảng 10 ngày sau tiêm, u đã phát triển rõ, đo thước khối u bằng thước kẹp, đo 2 chiều, chiều dài và chiều rộng khối u (Hình 2.10)

Công thức tính kích thước khối u: $V = D \times R^2 \times 0,5 \text{ (mm}^3\text{)}$.^{78,80}

V: thể tích khối u D: chiều dài khối u R: chiều rộng khối u

2.2.8. Phương pháp điều trị chuột nude bằng MeV

- 20 chuột nude mang khối u tế bào UTP người H460 được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm (10 con/1 nhóm), đánh ký hiệu từng nhóm: nhóm điều trị MeV; nhóm chứng tiêm dung dịch PBS 1X.

- Chuẩn bị dung dịch chứa MeV đã chuẩn độ TCID₅₀, tính liều điều trị theo công thức:

$$\text{TCID}_{50} = 0,7 \times \text{PFU (ml)}^{79}$$

- Sát trùng da đùi mặt trên khối u, tiêm MeV trực tiếp vào khối u bằng bơm tiêm nhựa 1 ml với liều 10^7 PFU/lần/con, 2 lần/tuần, đến khi kết thúc điều trị (có chuột chết), nhóm chứng tiêm dung dịch PBS 1X^{81,78}.

2.2.9. Phương pháp đánh giá hiệu quả điều trị khối u tế bào H460 của MeV

2.2.9.1. Đánh giá tình trạng sức khỏe chuột trong khi điều trị bằng MeV

Theo dõi tình trạng sức khỏe của chuột nude mang khối u tế bào H460 được điều trị bằng MeV ở các nhóm nghiên cứu theo các tiêu chí: cân nặng, vận động, đáp ứng kích thích, màu sắc da của chuột, phân chuột. Từ đó, đánh giá độc tính của MeV lên chuột nude, cũng như các nguyên nhân khác gây chết chuột nude.

2.2.9.2. Đánh giá kích thước u theo thời gian điều trị

Theo thời gian điều trị, đánh giá tương quan kích thước trung bình khối u giữa nhóm điều trị MeV với nhóm chứng. Thời gian đánh giá tính từ khi bắt đầu điều trị cho đến khi có chuột chết.

2.2.9.3. *Đánh giá tỉ lệ sống, chết của chuột*

Thời gian sống, chết của từng con chuột; thời gian sống trung bình; tỉ lệ sống, chết của nhóm chuột mang khối u tế bào H460 sau điều trị bằng MeV được đánh giá ngay sau khi kết thúc thí nghiệm (thời điểm các nhóm nghiên cứu đều chết hết chuột).

2.2.10. *Phương pháp phẫu tích lấy mô u tế bào H460 ở chuột nude sau điều trị bằng MeV.*

Tất cả các quy trình nghiên cứu trên động vật thí nghiệm, chúng tôi tuân thủ các tiêu chuẩn hiện hành của nhà sản xuất về hướng dẫn chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm.

- *Chuẩn bị:*

+ Dụng cụ: một tấm phẳng cứng, sạch; kéo nhỏ có đầu nhọn; nĩa có máu, nĩa không máu, ống eppendorf 2 ml.

+ Hóa chất: cồn 70⁰, dung dịch PBS.

+ Chuột mang u tế bào H460 ở 2 nhóm nghiên cứu sau khi kết thúc điều trị bằng MeV.

- *Tiến hành:*

+ Làm chết chuột bằng kéo giãn cột sống chuột, sau đó để chuột trên tấm phẳng đã chuẩn bị.

+ Sát trùng vùng da bề mặt u ở đuôi chuột.

+ Bóc tách da phía trên u bằng nĩa có máu và kéo nhỏ đầu nhọn. Cắt một miếng mô u ở phía ngoài u kích thước khoảng 2-3 mm (tránh phần u hoại tử ở giữa). Dùng dung dịch PBS 1X rửa sạch miếng mô u 3 lần.

+ Cho miếng mô u vào ống eppendorf 2 ml, bổ xung dung dịch glutaraldehyde 2% trong đệm cacodylate có pH=7,3 để cố định tế bào, với tỉ lệ thể tích mẫu u/dung dịch là 1:10. Để hỗn hợp trên ở môi trường 4⁰C, duy trì tối đa 2-3 ngày.

Phân tích siêu hình ảnh cấu trúc tế bào tại Viện 69, Bộ Tư Lệnh Lãng.

2.2.11. Xử lý mô u tế bào H460 thành mẫu tế bào để đánh giá tỉ lệ các tế bào miễn dịch và tế bào chết theo chương trình bằng phương pháp tế bào dòng chảy

2.2.11.1. Xử lý mô u tế bào H460 thành mẫu tế bào

- Nghiền nát miếng mô u bằng panh có đầu nhám. Sau đó, thêm dung dịch PBS 1X thu được dịch chứa tế bào H460 từ mô u tế bào.

- Ủ dịch tế bào thu được với dung dịch Trypsin-EDTA 1X ở nhiệt độ phòng trong 20-30 phút. Tiếp theo, trộn đều, ly tâm ở tốc độ 5000 vòng, trong 5 phút. Sau đó, thu được khối tế bào bằng cách dùng pipet loại bỏ dịch nổi phía trên. Rửa sạch khối tế bào này (lặp lại 2 lần) bằng dung dịch PBS 1X.

- Cho dung dịch PBS 1X vào khối tế bào mô u, trộn đều rồi lọc qua màng lọc kích thước 70 μ m, ta thu được dịch tế bào H460 của mô u.

- Cho dung dịch trypan blue rồi trộn đều, sử dụng buồng đếm Neubauer kiểm tra tỉ lệ tế bào sống, dịch tế bào phải đạt tỉ lệ tế bào sống >95%. Tiếp theo, chuẩn nồng độ dịch tế bào 10⁶ tế bào.

Ly tâm dịch tế bào này ở 5000 vòng/phút trong 5 phút, hút bỏ dịch nổi thay bằng 1ml dung dịch PBS, ta thu được mẫu tế bào H460 của mô u.

Đánh giá được thực hiện tại Bộ môn Sinh học tế bào, khoa Sinh học Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

2.2.11.2. Dùng kháng thể đặc hiệu đánh giá tỉ lệ tế bào miễn dịch ở mô u

Chuẩn bị 4 ống chứa 10⁶ tế bào mô u, mỗi ống được ủ riêng với từng loại kháng thể dưới đây:

- Đánh giá tỉ lệ đại thực bào chuột bằng kháng thể kháng CD11b có gắn huỳnh quang Fluorescein isothiocyanate (FITC).

- Đánh giá tỉ lệ tế bào NK chuột bằng kháng thể kháng CD49b có gắn huỳnh quang fluorescein isothiocyanate (FITC).

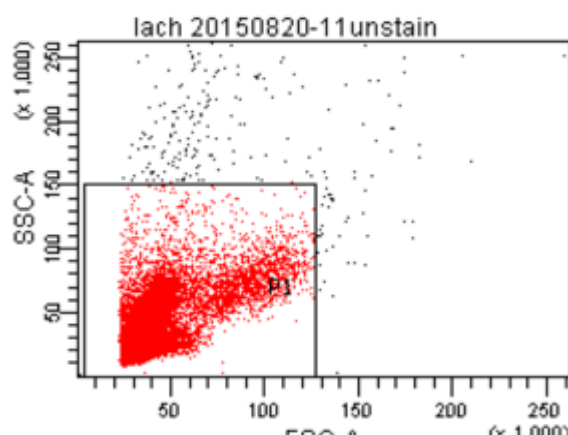
- Đánh giá tỉ lệ tế bào DC chuột bằng kháng thể kháng CD11c có gắn huỳnh quang Allophycocyanin (APC).

- Đánh giá tỉ lệ tế bào DC trưởng thành chuột bằng kháng thể kháng CD11c gắn huỳnh quang Allophycocyanin (APC) kết hợp với kháng thể kháng CD197 (CCR7) gắn huỳnh quang PerCP-Cy5-5.

- Sử dụng máy FACS Canto II (BD) để đánh giá tỉ lệ các tế bào sau khi ủ với các loại kháng thể.

- Phân loại tế bào theo các tín hiệu huỳnh quang qua các bước sau:

+ Đầu tiên, chúng tôi chuẩn các thông số cho máy trên phần mềm BD FACS Diva bằng cách chạy mẫu đối chứng để xác định các thông số. Xác định vùng P1 là vị trí phân bố của các tế bào đơn độc (màu đỏ) có tín hiệu huỳnh quang là vùng tế bào cần khảo sát (Hình 2.9). Các đối tượng có tín hiệu huỳnh quang không nằm trong vùng này sẽ không được khảo sát tiếp. Do đó, tất cả các tín hiệu huỳnh quang (FITC, APC, PerCP-Cy5-5) được khảo sát đều nằm ở vùng này. Như vậy, sau khi ủ với kháng thể, tín hiệu huỳnh quang FITC ở vùng này sẽ xác định các tế bào có biểu hiện CD11b hoặc CD49b, tín hiệu huỳnh quang APC ở vùng này sẽ xác định các tế bào có biểu hiện CD11c, có cả tín hiệu huỳnh quang APC và PerCP-Cy5-5 ở vùng này sẽ xác định các tế bào có biểu hiện CD197 (CCR7).



Hình 2.9. Xác định thông số chuẩn cho máy bằng phần mềm BD FACS Diva

+ Tiếp theo, chúng ta chạy mẫu tế bào đã ủ với các kháng thể kháng CD11b, CD49b, CD11c, CD197(CCR7) của chuột. Kết quả cho thấy xuất hiện các tế bào có giá trị huỳnh quang xuất hiện ở vùng dương tính với các kháng thể CD nêu trên. Tỷ lệ tế bào dương tính với các kháng thể CD đại diện cho số lượng các tế bào miễn dịch tương ứng có trong quần thể tế bào được phân tích.

2.2.11.3. Chuẩn bị mẫu tế bào mô u tế bào H460 cho đánh giá chết tế bào theo chương trình

Chuẩn bị dung dịch tế bào mô u tế bào H460 (theo quy trình ở mục 2.2.11.1). Sau đó, chuyển dung dịch tế bào này vào 12 ống ependorft 2ml vô trùng (đã chuẩn bị), trong đó có 6 ống nhóm chứng và 6 ống nhóm điều trị bằng MeV, các nhóm đánh ký hiệu theo nhóm để nhận biết. Ly tâm ở 5000 vòng/phút, trong 5 phút, hút bỏ dịch nổi thay bằng 1ml dung dịch PBS 1X, thu được mẫu tế bào H460 của mô u để đánh giá tỷ lệ tế bào chết apoptosis.

2.2.12. Đánh giá siêu cấu trúc mô u tế bào H460 trên chuột nude sau điều trị bằng MeV

Phẫu tích 6 mẫu ung thư từ mô khối u tế bào H460 trên chuột nude ở nhóm điều trị MeV và nhóm chứng. Tiến hành làm tiêu bản siêu cấu trúc theo các bước sau:

- Mẫu ung thư được rửa 2 lần bằng dung dịch đệm cacodylate với pH = 7,3.
- Cố định mẫu ung thư bằng dung dịch glutaraldehyde 2% trong đệm cacodylate (pH = 7,3) với tỷ lệ thể tích là 1mẫu/10 dung dịch, duy trì 2-3 ngày.
- Pha mẫu thành mảnh nhỏ kích thước khoảng 1x1x2 mm.
- Các mảnh nhỏ này được rửa 2-3 lần, trong 1 giờ bằng dung dịch đệm cacodylate.
- Cố định các mảnh nhỏ lại bằng acid osmic 1% trong đệm cacodylate (pH = 7,3) trong 1 giờ. Sau đó, rửa 2-3 lần bằng đệm cacodylate (pH = 7,3).
- Khử nước của các mảnh nhỏ này bằng chuyển liên tục qua các dung dịch cồn 50⁰, 60⁰, 70⁰, 80⁰, 90⁰, 100⁰, duy trì thời gian ở mỗi dung dịch là 15 phút.

- Sau khi khử nước, mẫu được chuyển qua dung dịch cồn propylene + ethylene với tỉ lệ 1:1, trong 10 phút, chuyển qua propylene trong 10 phút.

- Tiếp tục chuyển mẫu qua hỗn hợp propylene + epon 812 với tỷ lệ thể tích là 1:1, trong 15 phút, hỗn hợp propylene + epon 812 tỉ lệ 1:2 trong 30 phút. Cuối cùng cho mẫu vào epon 812, trong 30 phút.

- Đúc block bằng khuôn.

- Lưu hóa ở nhiệt độ 37⁰C trong 24 giờ.

- Polyme hóa ở nhiệt độ 60⁰C trong 48 giờ.

- Sau khi đã hóa cứng hoàn toàn các block, gọt mẫu, cắt lát mỏng, nhuộm bằng xanh toluidine, xác định vị trí đánh giá, gọt mẫu và cắt bằng máy siêu cắt (sản xuất tại Đức) độ dày lát cắt: 50 nm.

- Vớt lát cắt lên lưới đồng 200 lỗ.

- Nhuộm các lát cắt này bằng uranyl acetate 2% trong 5 phút, rồi rửa 2 lần bằng nước cất.

- Nhuộm bằng chì citrate 5% trong 5 phút, dùng nước cất rửa 2 lần.

- Đánh giá cấu trúc mô, tế bào ung thư trên kính hiển vi điện tử truyền qua JEM 1400, JEOL, Nhật Bản (Khoa Hình thái - Viện 69, Bộ tư lệnh Lãng Chủ tịch Hồ Chí Minh).

2.2.13. Phân tích giải phẫu bệnh mô u tế bào H460 cấy ghép trên chuột nude

Phẫu tích 3 mẫu u từ mô UTP dòng tế bào H460 ghép trên chuột nude ở nhóm điều trị MeV và nhóm chứng. Cố định mẫu mô ung thư ngay sau khi lấy ra khỏi cơ thể chuột nude trong formol trung tính 10% với tỉ lệ thể tích 1 bệnh phẩm/20 - 30 dung dịch. Sau đó bệnh phẩm được gửi tới khoa giải phẫu bệnh, Bệnh viện Quân y 103 để phân tích theo các bước sau:

** Đưa bệnh phẩm qua các hóa chất khác nhau:*

- Nguyên lý: Đưa bệnh phẩm qua các hóa chất khác nhau để có thể cắt bệnh phẩm bằng máy dễ dàng mà không làm biến dạng cấu trúc của chúng và có thể bảo quản bệnh phẩm được lâu dài.

- Tiến hành kỹ thuật:

+ Bệnh phẩm được đưa qua ba bình formol 10% với thời gian 4 giờ.

+ Tiếp theo, bệnh phẩm lần lượt được đưa qua các bình đựng cồn ở các nồng độ khác nhau từ cồn 80⁰ đến cồn 100⁰ trong thời gian 2,5 giờ.

+ Sau đó, bệnh phẩm được đưa qua 3 bình Xylen với thời gian 1,5 giờ.

+ Tiếp theo, bệnh phẩm được đưa qua 2 bình paraffin 60⁰ trong thời gian 3,5 giờ.

** Đúc bệnh phẩm trong paraffin:*

- Nguyên lý: Qui trình đúc khối parafin là làm cho parafin ở xung quanh cũng như ở bên trong bệnh phẩm đặc lại thành một khối thuần nhất và nhằm giữ miếng bệnh phẩm trong lòng cassette.

- Tiến hành kỹ thuật:

+ Tháo bỏ nắp cassette chứa bệnh phẩm sau quá trình chuyển mẫu ra, gấp bệnh phẩm vào khuôn đúc bằng kim loại có kích thước phù hợp với kích thước của mảnh bệnh phẩm. Đặt bệnh phẩm vào vị trí giữa khuôn, nằm sát mặt đáy, đúng chiều và đúng mặt phẳng bệnh phẩm sao cho lấy được đủ diện cắt cần để chẩn đoán.

+ Đặt khuôn trên mặt phẳng ngang ngay dưới vòi rót parafin, bơm parafin nóng chảy vào khuôn đúc đến khoảng 1/2 thể tích khuôn. Gắn, giữ khuôn nhựa của cassette vào khuôn đúc kim loại rồi bơm tiếp parafin cho đầy khuôn đúc.

+ Để khuôn ra bàn làm lạnh cho đến khi phần đáy khuôn rắn lại dần có màu trắng đục giúp giữ được chiều và vị trí ở giữa của bệnh phẩm.

Cắt nhuộm Hematoxylin – Eosin:

- Nguyên lý: Bệnh phẩm sau khi chuyển đúc xong được cắt mỏng thành lát (có độ dày từ 1µm đến vài chục µm) bằng những máy cắt mỏng (microtome) khác nhau để ánh sáng có thể đi qua được, kết hợp nhuộm màu nên quan sát được hình dạng cấu trúc của tế bào hoặc mô dưới kính hiển vi.

- Tiến hành kỹ thuật:

+ Bệnh phẩm đúc trong khối paraffin được cắt thành các lát mỏng từ 3-5 μm , sau đó được cố định trên lam kính.

+ Lam kính được đưa qua các bể nhuộm chứa các hóa chất khác nhau để nhuộm màu nhân và bào tương cùng các thành phần khác ngoài tế bào.

+ Nhuộm nhân với Hematoxylin và nhuộm bào tương với Eosin.

+ Sau khi nhuộm xong soi trên kính hiển vi quang học nhân tế bào bắt màu xanh, bào tương bắt màu hồng đỏ là đạt yêu cầu.

2.2.14. Phương pháp phân tích kết quả

Chúng tôi dùng các thuật toán thống kê ở phần mềm SPSS.20 và vẽ đồ thị bằng phần mềm GraphPad Prism.

Các số liệu được trình bày bằng giá trị trung bình ($\bar{X}$), độ lệch chuẩn (SD) và trung vị (Me). Sử dụng phép kiểm định T. Test để so sánh giá trị trung bình giữa 2 nhóm, phép kiểm định One-Way ANOVA để kiểm định sự khác nhau của giá trị trung bình khi so sánh nhiều hơn 2 nhóm, phép kiểm định trung vị independent-samples median test sử dụng kiểm định Mann-Whitney U test giá trị trung vị giữa các nhóm.

Sử dụng phương pháp Kaplan-Meier để phân tích thời gian sống, tỉ lệ chuột chết sau điều trị bằng MeV ở các nhóm nghiên cứu.

Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi giá trị $p < 0,05$.

2.2.15. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu được thông qua bởi Hội đồng khoa học chăm đề cương nghiên cứu sinh của Trường đại học Y Hà Nội. Nghiên cứu tuân thủ các nguyên tắc đối xử nhân đạo đối với động vật. Đảm bảo hạn chế đến mức tối thiểu việc gây tổn thương, đau đớn cả về thể xác lẫn tinh thần cho các động vật thí nghiệm.

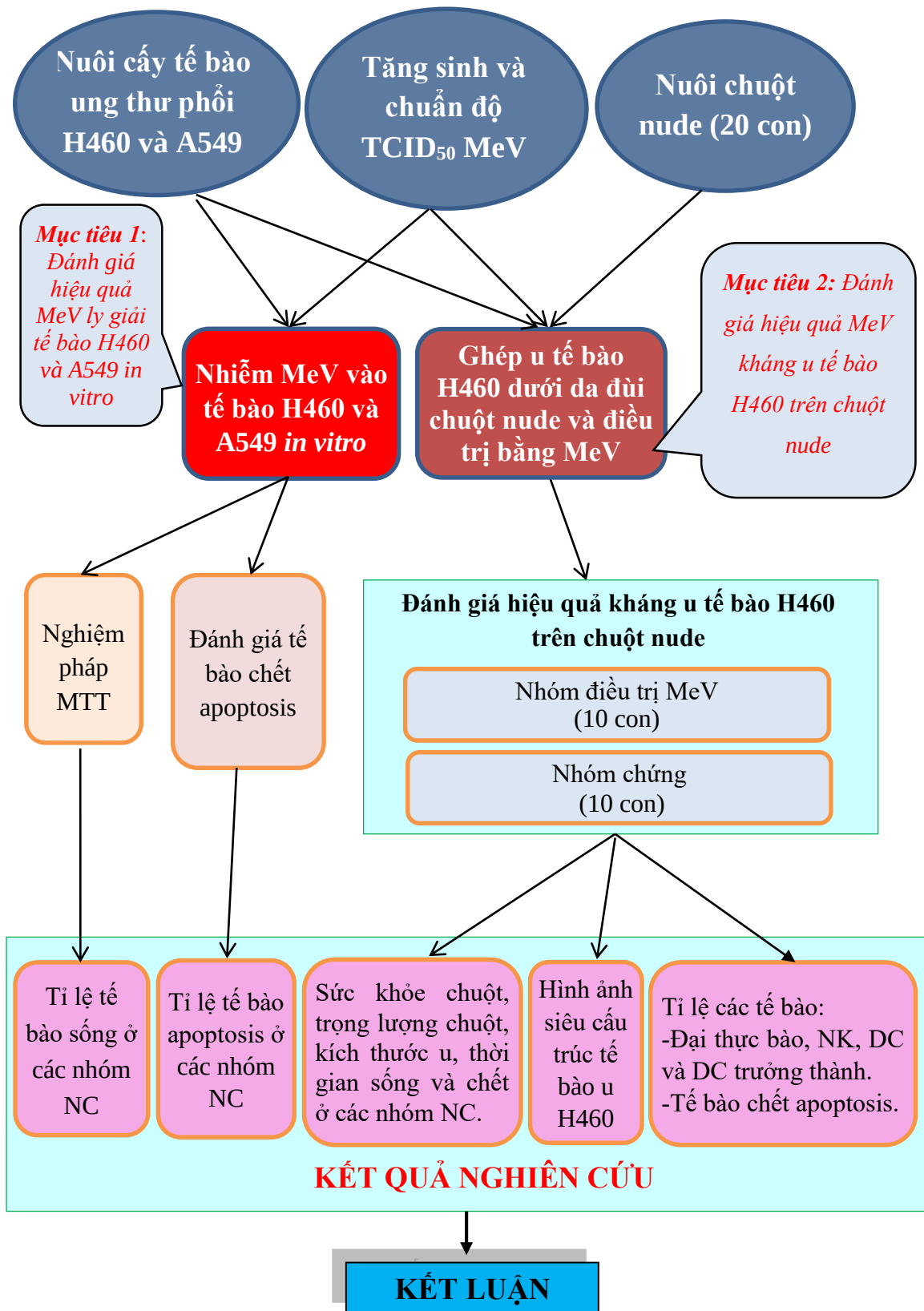
2.2.16. Hạn chế của nghiên cứu

Mặc dù các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rõ ràng tiềm năng kháng tế bào ung thư của OV nói chung và MeV nói riêng. Tuy nhiên, vẫn còn nhiều hạn chế cần được giải quyết để cải thiện hiệu quả của liệu pháp OV. Những yếu tố này bao gồm: tình trạng nhiễm virus, khả năng đưa virus vượt qua các rào cản của cơ thể đến tổ chức ung thư, phân bố virus trong tổ chức ung thư, chiến lược dùng thuốc hỗ trợ, khả năng miễn dịch của cơ thể kháng virus, và khả năng virus ly giải tế bào ung thư.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá hiệu quả kháng UTP người của MeV trên dòng tế bào UTP người H460, A549 nuôi cấy trong phòng thí nghiệm và mô hình cấy ghép khối u tế bào H460 trên chuột thiếu hụt miễn dịch. Chúng tôi dùng phương pháp tiêm trực tiếp MeV vào khối u, nhằm tăng khả năng virus tập trung vào khối u, hạn chế các rào cản của cơ thể đối với virus. Do đó, Nghiên cứu chưa đánh giá được đầy đủ ảnh hưởng của một loạt các rào cản trên cơ thể sống hoàn chỉnh mà OV phải vượt qua để có được hiệu quả ly giải tế bào ung thư như: (1) mạng lưới bạch huyết bất thường và sự tăng cường mạch máu bên trong khối u và chất nền ngoại bào dày đặc (ECM) của khối u dẫn đến tăng huyết áp mô kẽ có thể làm giảm sự xâm nhập của virus; (2) Hơn nữa, nghiên cứu trên chuột thiếu hụt miễn dịch nên chưa đánh giá hết được mức độ đáp ứng miễn dịch kháng MeV mạnh mẽ của cơ thể, MeV có khả năng bị hệ thống miễn dịch của vật chủ loại bỏ và rất khó đảm bảo đủ số lượng gây ly giải tế bào khối u hiệu quả, do sự tương tác giữa chúng với các tế bào trình diện kháng nguyên, các kháng thể sẵn có lưu hành trong máu và các yếu tố như yếu tố đông máu FIX, FX và protein bổ thể C4BP⁸².... (3) Tiếp đó, là số lượng lớn các rào cản riêng lẻ trong vi môi trường ức chế miễn dịch của các khối u rắn. Nhờ có biến đổi vi môi trường ức chế miễn dịch ở khối u, tế bào khối u có thể thoát khỏi sự giám sát miễn dịch, tăng sinh nhanh chóng và di căn. Các khối u rắn có thể tiết ra chemokine và

cytokine như interleukin (IL) -10, tố tăng trưởng chuyển dạng β (TGF- β) và arginase-1,⁸³ ngăn cản quần thể tế bào miễn dịch và chiêu mộ các tế bào ức chế miễn dịch bao gồm: tế bào điều hòa T, tế bào ức chế dòng tủy, đại thực bào liên quan khối u, nguyên bào sợi liên quan khối u và bạch cầu trung tính. Những yếu tố này có thể bảo vệ khối u khỏi các phản ứng miễn dịch kháng u. Do đó, các tín hiệu ức chế và các thụ thể điểm kiểm soát miễn dịch, chẳng hạn như: PD-1, CTLA-4, TIM-3 và LAG-3, được điều chỉnh theo tế bào lympho xâm nhập khối u, góp phần tạo ra môi trường khối u ức chế miễn dịch. Ngoài ra, tổ chức và cấu trúc bất thường của mạch máu khối u có thể làm giảm nguồn cung cấp máu.⁸⁴ Tình trạng thiếu oxy cục bộ và vi môi trường pH thấp có thể ức chế quá trình chết theo chương trình của tế bào khối u, thúc đẩy hình thành mạch, điều chỉnh các yếu tố phát triển khối u và làm cho tế bào khối u kháng thuốc hơn với các phương pháp điều trị chuẩn như xạ trị, thuốc độc tế bào và liệu pháp miễn dịch. Như vậy, một khi MeV đến vị trí khối u, điều quan trọng là chúng phải duy trì các chức năng của mình trong vi môi trường khối u ức chế miễn dịch. Hơn nữa, nghiên cứu mới chỉ đánh giá hiệu quả của MeV kháng dòng tế bào UTP người trên thực nghiệm mà chưa đánh giá được độc tính liều MeV trên cơ thể hoàn chỉnh.

SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU

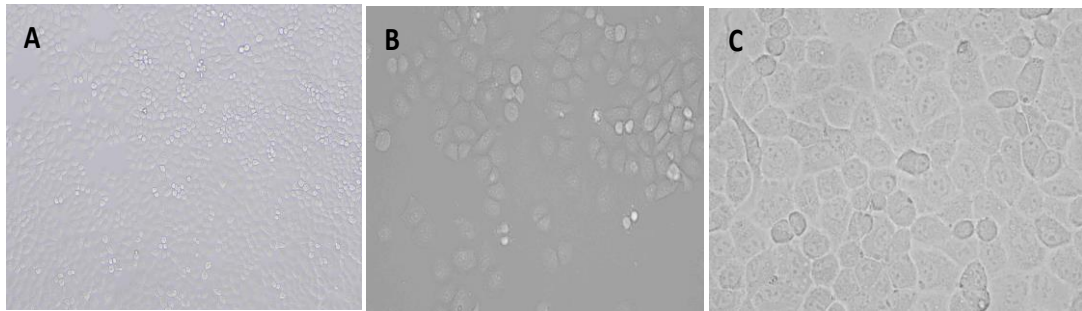


Chương 3

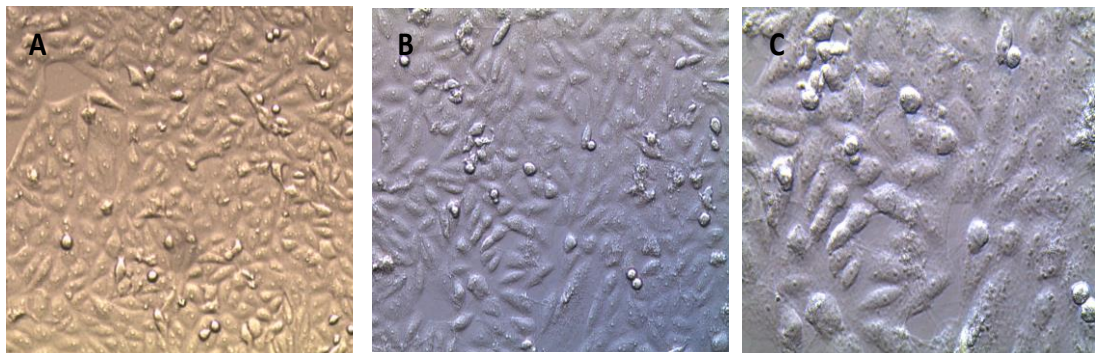
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Nuôi cấy, tăng sinh dòng tế bào H460 A549, Vero và virus vaccine sởi

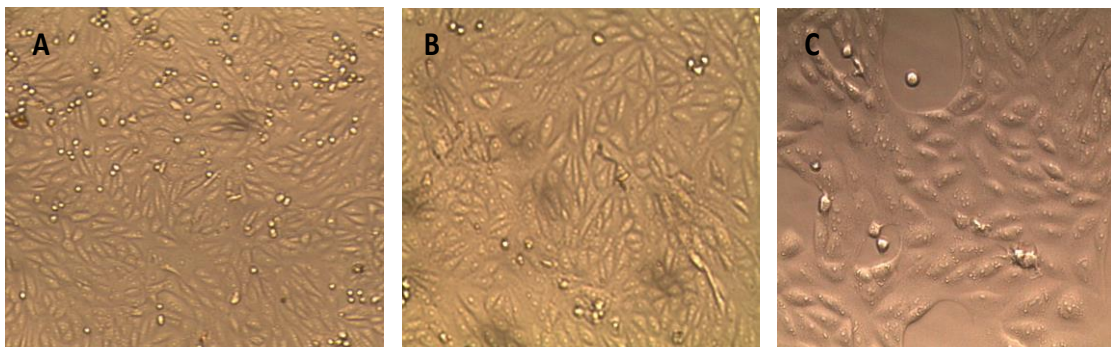
3.1.1. Nuôi cấy, tăng sinh các dòng tế bào H460, A549 và Vero



Hình 3.1. Tế bào ung thư phổi dòng H460 bám đáy và phát triển
(A) Ở Vật kính 10X; (B) ở vật kính 20X; (C) ở vật kính 40X



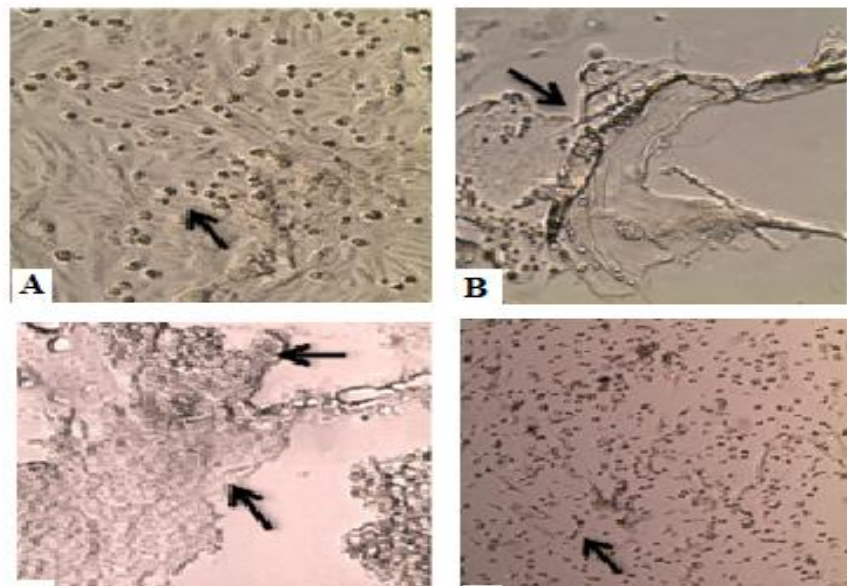
Hình 3.2. Tế bào ung thư phổi dòng A549 bám đáy và phát triển
(A) ở vật kính 10X; (B) ở vật kính 20X; (C) ở vật kính 40X



Hình 3.3. Tế bào Vero bám đáy và phát triển
(A) ở vật kính 10X; (B) ở vật kính 20X; (C) ở vật kính 40X

Nhận xét: Quan sát dưới kính hiển vi quang học, tế bào ung thư phổi dòng H460 và A549 là các loại tế bào bám đáy, phát triển đơn lớp, có nhiều hình dạng khác nhau từ hình bầu dục cho đến hình đa giác, đường kính khoảng 20-40 μ m, có nhân tế bào to chiếm gần hết phần tế bào chất, hình ảnh nhân quai, nhân chia (Hình 3.1; 3.2). Tế bào Vero là tế bào dạng bám đáy phát triển đơn lớp, đường kính khoảng 17 μ m (Hình 3.3).

3.1.2. Tăng sinh virus vaccine sởi



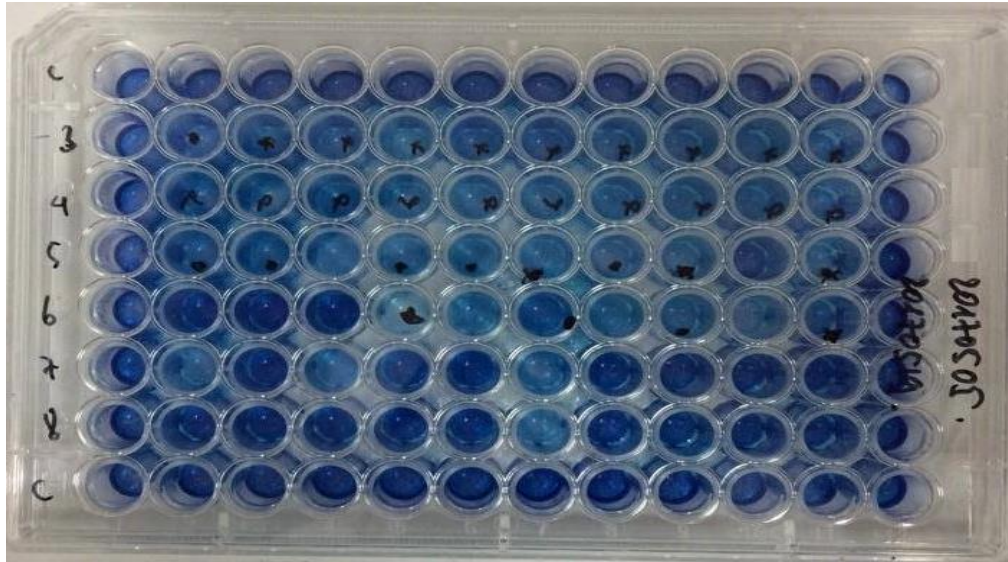
Hình 3.4. Tế bào Vero nhiễm MeV

(A), Nhiễm MeV ngày thứ 3; (B) nhiễm MeV ngày thứ 4; (C), nhiễm virus ngày thứ 5-6; (D) nhiễm MeV ngày thứ 7

Nhận xét: Tế bào Vero nhiễm MeV ở ngày thứ 3, các tế bào nhiễm virus co tròn lại bong khỏi đáy; ở ngày nhiễm thứ 4, tế bào Vero nhiễm virus hòa màng tạo hợp bào; ở ngày nhiễm thứ 5-6, tế bào Vero nhiễm virus tạo hợp bào lan rộng; ở ngày thứ 7 nhiễm virus, tế bào nhiễm virus hoại tử vỡ ra tạo ra xác tế bào (Hình 3.4).

3.2. Chuẩn độ TCID₅₀ của virus vaccine sởi

Nhiễm MeV ngày thứ 5, tiến hành nhuộm xanh methylene các giếng tế bào Vero nhiễm MeV trên đĩa 96 giếng. Kết quả thu được như hình 3.5.



Hình 3.5. Kết quả chuẩn độ TCID₅₀ sử dụng thuốc nhuộm xanh methylen

- TCID₅₀ của MeV: hàng tương ứng với nồng độ pha loãng virus là 10⁻⁶ có 7 giếng nhạt màu hơn (giếng có tế bào nhiễm virus) so với nhóm chứng chiếm tỉ lệ 7/10 > 50%. Ở hàng tương ứng với nồng độ pha loãng 10⁻⁷ của virus có 3 giếng nhạt màu, tỉ lệ là 3/10 < 50%, như vậy ta có:

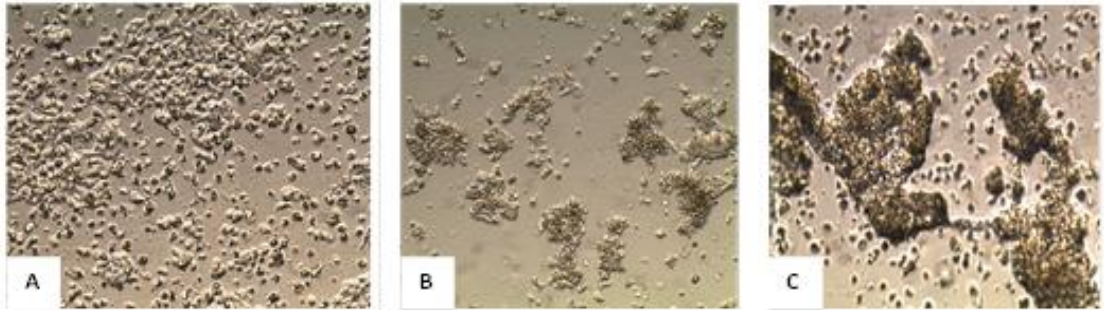
$$\text{Khoảng tỉ lệ (PD)} = (7/10 - 5/10) : (7/10 - 3/10) = 0,5$$

$$\text{Log của nồng độ pha loãng có CPE trên 50\%: } -\log(10^{-6}) = 6$$

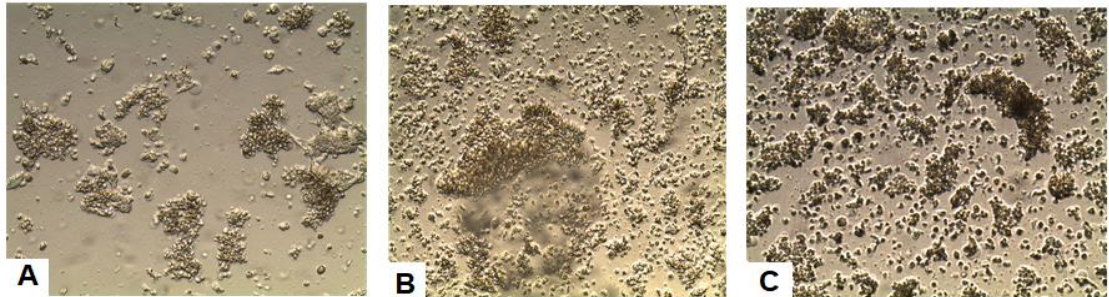
$$\text{TCID}_{50} \text{ của MeV} = 10^{6+0,5} / 0,2 \text{ ml} = 5 \times 10^{6,5} / \text{ml}$$

3.3. Ly giải trực tiếp tế bào ung thư phổi người dòng H460 và A549 của Virus vaccine sởi *in vitro*

3.3.1. Tế bào H460 và A549 nhiễm virus vaccine sởi tạo hợp bào *in vitro*



Tế bào H460 tạo hợp bào *in vitro*



Tế bào A549 tạo hợp bào *in vitro*

Hình 3.6. Hình ảnh tế bào H460 và A549 nhiễm MeV tạo hợp bào *in vitro*

(A) Nhiễm MeV ngày thứ 3; (B) Nhiễm MeV ngày thứ 4;
(C) Nhiễm MeV ngày thứ 5.

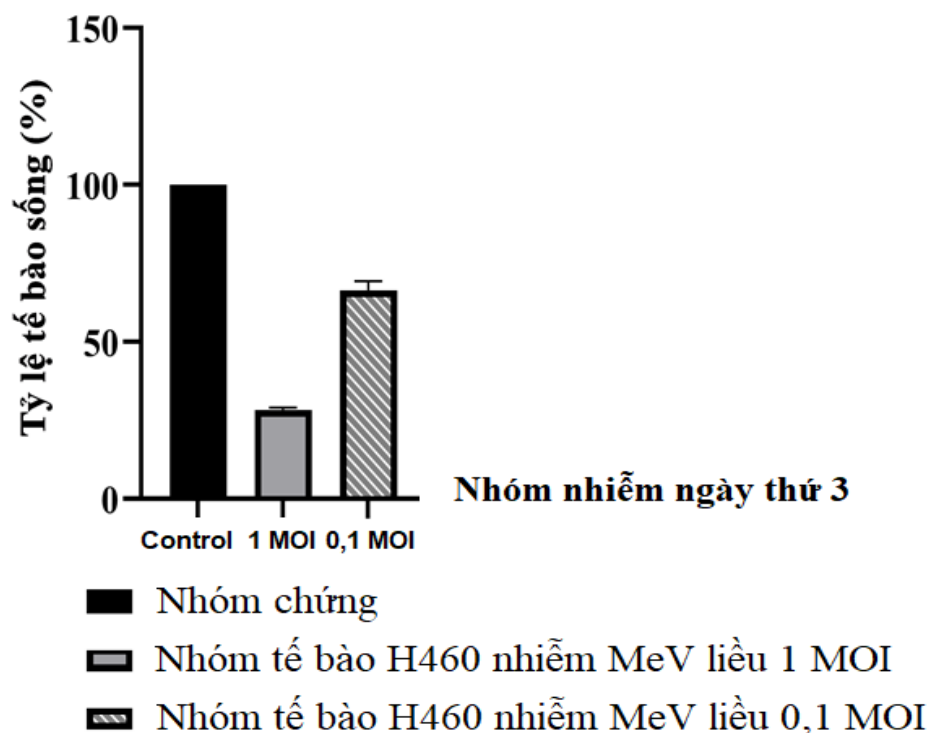
Nhận xét: Từ ngày thứ 3 nhiễm MeV, hình ảnh tế bào H460 và A549 nhiễm virus thay đổi về hình thái dưới kính hiển vi thường, nhiều tế bào co tròn, nhỏ lại, bong ra khỏi đáy đĩa nuôi cấy, lơ lửng (hình 3.6A). Đến ngày thứ 4 nhiễm MeV, tế bào H460 và A549 nhiễm virus hòa màng với nhau tạo hình ảnh hợp bào (tế bào không lồ có nhiều nhân, nổi lên trên) (hình 3.6B). Ngày thứ 5 nhiễm MeV, các tế bào nhiễm virus hình ảnh hợp bào nhiều và to hơn nổi lên trên, các hợp bào có xu thế phân hủy để lại hình ảnh tế bào chết và các mảnh vỡ tế bào (Hình 3.6 C, D và E).

3.3.2. Hiệu quả ly giải tế bào ung thư phổi người H460 và A549 bằng thử nghiệm MTT của virus vaccine sởi

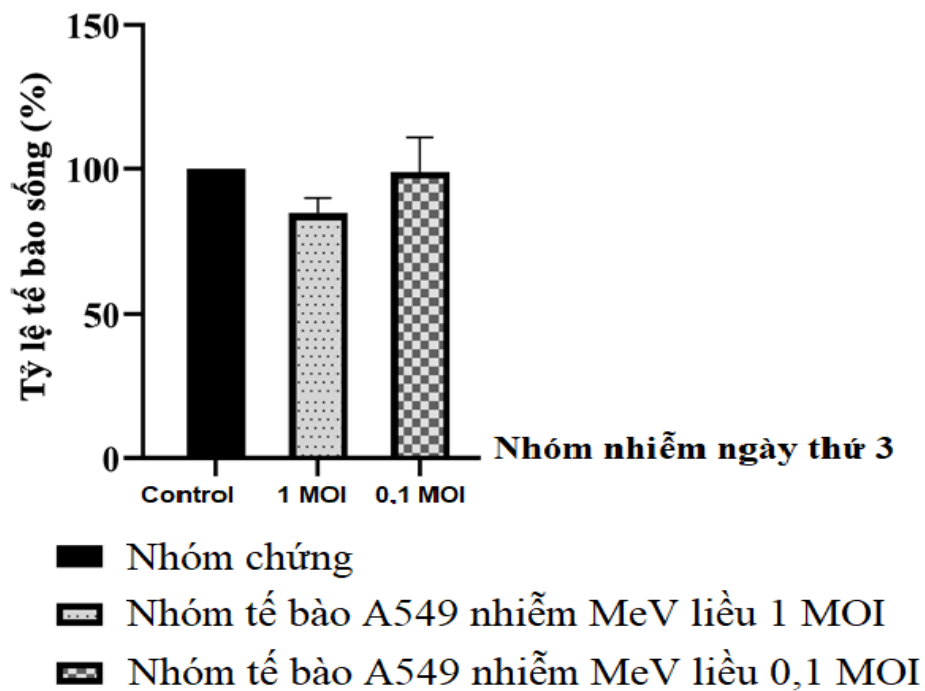
3.3.2.1. Kết quả ở thời điểm nhiễm MeV ngày thứ 3

Bảng 3.1. Tỷ lệ tế bào H460 và A549 sống ở ngày thứ 3 nhiễm MeV

Tế bào	Nhóm	n	Tỷ lệ tế bào sống (%)	
			Mean $\pm$ SD	p
H460	Control (1)	12	100	p2-1 < 0.05 P3-1 < 0.05 P2-3 < 0.05
	MeV 1MOI (2)	12	49,09 $\pm$ 5,63	
	MeV 0,1 MOI (3)	12	68,08 $\pm$ 8,968	
A549	Control (1)	12	100	p2-1 < 0.05 P2-3 < 0,05 P3-1 > 0,05
	MeV 1MOI (2)	12	85,26 $\pm$ 3,34	
	MeV 0,1 MOI (3)	12	98,3 $\pm$ 18,34	



Biểu đồ 3.1. Kết quả MTT của tế bào H460 nhiễm MeV ngày thứ 3.



Biểu đồ 3.2. Kết quả MTT của tế bào A549 nhiễm MeV ngày thứ 3.

Nhận xét:

- Tỷ lệ tế bào H460 sống ở hai nhóm nhiễm MeV (nhóm nhiễm MeV liều 1 MOI và 0.1 MOI) đều thấp hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nhóm chứng (Biểu đồ 3.1, Bảng 3.1).

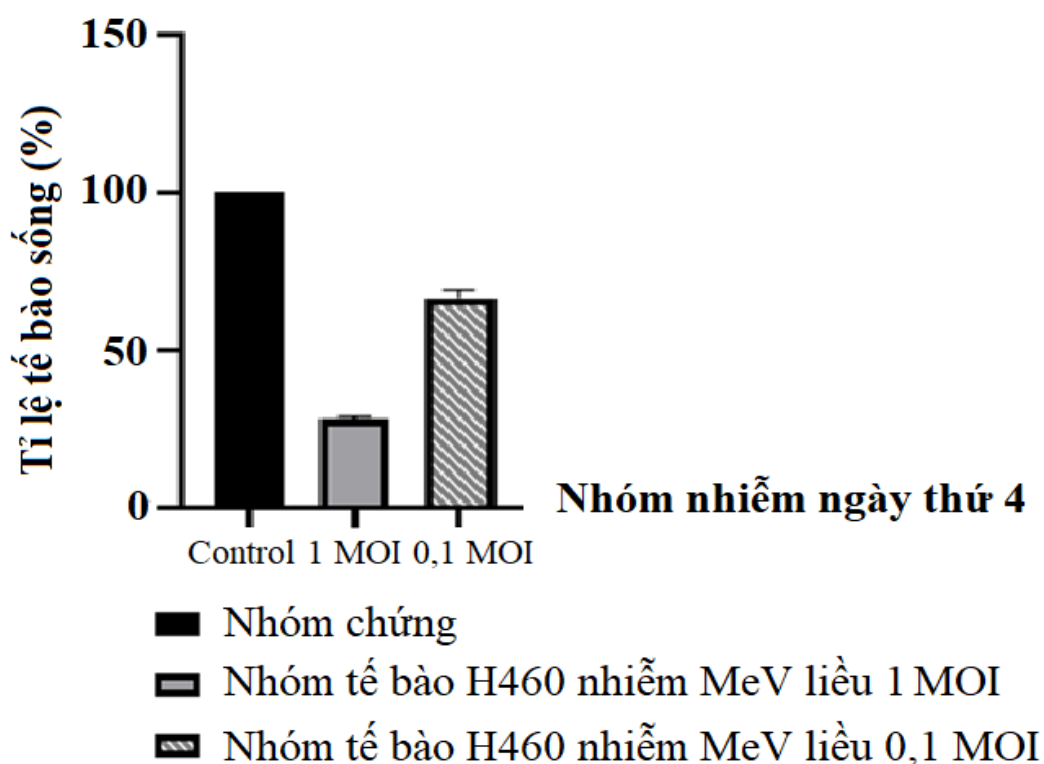
- Tỷ lệ tế bào A549 sống ở hai nhóm điều trị (nhóm nhiễm MeV liều 1 MOI và 0.1 MOI) đều thấp hơn so với nhóm chứng. Nhưng chỉ có khác biệt ở nhóm điều trị MeV liều 1 MOI so với nhóm chứng là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) (Biểu đồ 3.2, Bảng 3.1).

- Ở hai nồng độ pha loãng của MeV, tỷ lệ tế bào sống của nhóm nhiễm MeV liều 1 MOI thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm điều trị MeV liều 0,1 MOI ở cả hai dòng tế bào UTP người H460 và A549 ($p_{H460} < 0,0001$; $p_{A549} < 0,05$) (Biểu đồ 3.1, Biểu đồ 3.2, Bảng 3.1).

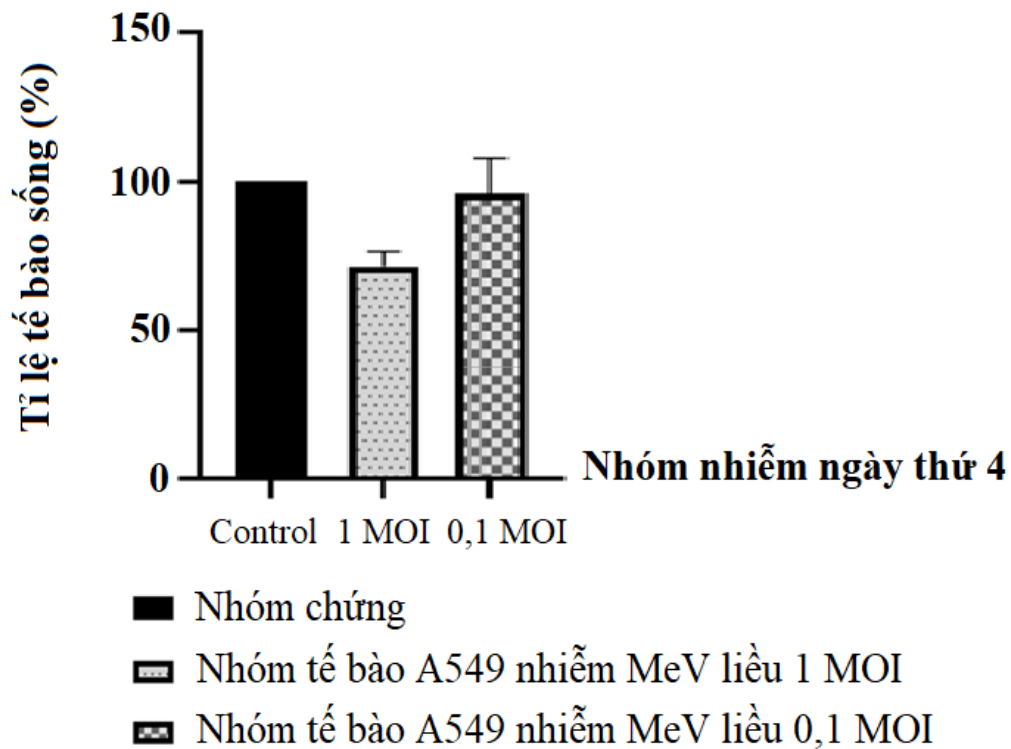
3.3.2.2. Kết quả ở thời điểm Nhiễm MeV ngày thứ 4

Bảng 3.2. Tỷ lệ tế bào H460 và A549 sống ở ngày thứ 4 nhiễm MeV

Tế bào	Nhóm	n	Tỷ lệ tế bào sống (%)	
			Mean $\pm$ SD	p
H460	Control (1)	12	100	p₂₋₁ < 0.05
	MeV 1 MOI (2)	12	28,25 $\pm$ 1,9	P₃₋₁ < 0.05
	MeV 0,1 MOI (3)	12	66,43 $\pm$ 7,12	P₂₋₃ < 0,05
A549	Control (1)	12	100	p₂₋₁ < 0.05
	MeV 1 MOI (2)	12	71,48 $\pm$ 12,37	P₂₋₃ < 0,05
	MeV 0,1 MOI (3)	12	96,93 $\pm$ 29,53	P₃₋₁ > 0,05



Biểu đồ 3.3. Kết quả MTT ở ngày thứ 4 nhiễm MeV



Biểu đồ 3.4. Kết quả MTT ở ngày thứ 4 nhiễm MeV

Nhận xét:

- Tỷ lệ tế bào sống của dòng tế bào H460 ở 2 nhóm nhiễm MeV (liều 1 MOI và liều 0,1 MOI) thấp hơn so với nhóm chứng, khác biệt là có ý nghĩa thống kê ở ($p < 0,05$) (Biểu đồ 3.3, Bảng 3.2).

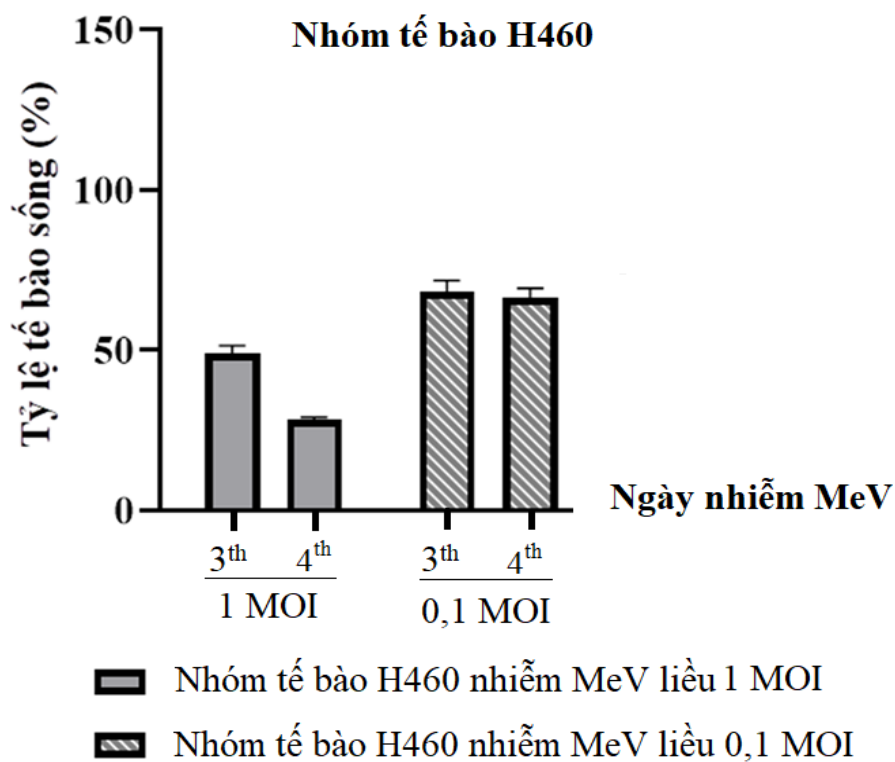
- Tỷ lệ tế bào sống của dòng tế bào A549 ở 2 nhóm nhiễm MeV (liều 1 MOI và liều 0,1 MOI) thấp hơn so với nhóm chứng. Nhưng, chỉ có khác biệt giữa nhóm nhiễm MeV liều 1 MOI so với nhóm chứng là có ý nghĩa thống kê ở ($p < 0,05$) (Biểu đồ 3.4, Bảng 3.2).

- Ở cả hai dòng tế bào A549 và H460 nhiễm MeV đều cho thấy, tỷ lệ tế bào sống của nhóm nhiễm MeV liều 1 MOI thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm nhiễm MeV liều 0,1 MOI ($p_{2-3H460} < 0,05$; $p_{A549} < 0,05$) (Biểu đồ 3.3, 3.4 và Bảng 3.2).

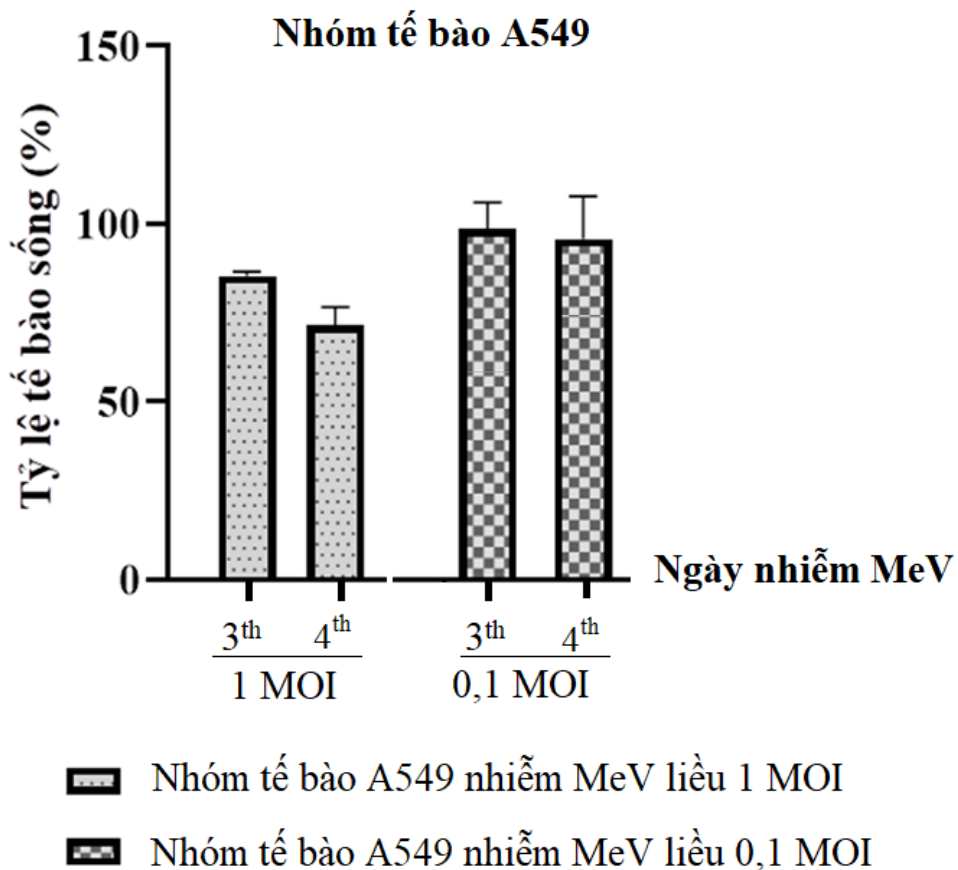
3.3.2.3. So sánh tỉ lệ tế bào H460 và A549 sống theo thời gian nhiễm MeV

Bảng 3.3. So sánh tỉ lệ tế bào H460 và A549 sống theo thời gian nhiễm MeV

Tế bào	Ngày nhiễm MeV	Liều nhiễm	Tỷ lệ tế bào sống (%)	
			Mean $\pm$ SD	p
H460	Ngày thứ 3	1 MOI	49,09 $\pm$ 5,63	p < 0,05
	Ngày thứ 4	1 MOI	28,25 $\pm$ 1,9	
	Ngày thứ 3	0,1 MOI	68,08 $\pm$ 8,97	p > 0,05
	Ngày thứ 4	0,1 MOI	66,426 $\pm$ 7,12	
A549	Ngày thứ 3	1 MOI	85,26 $\pm$ 3,34	p > 0,05
	Ngày thứ 4	1 MOI	71,48 $\pm$ 12,37	
	Ngày thứ 3	0,1 MOI	98,3 $\pm$ 18,34	p > 0,05
	Ngày thứ 4	0,1 MOI	96,93 $\pm$ 29,53	



Biểu đồ 3.5. So sánh tỷ lệ tế bào H460 sống theo các thời điểm nhiễm MeV

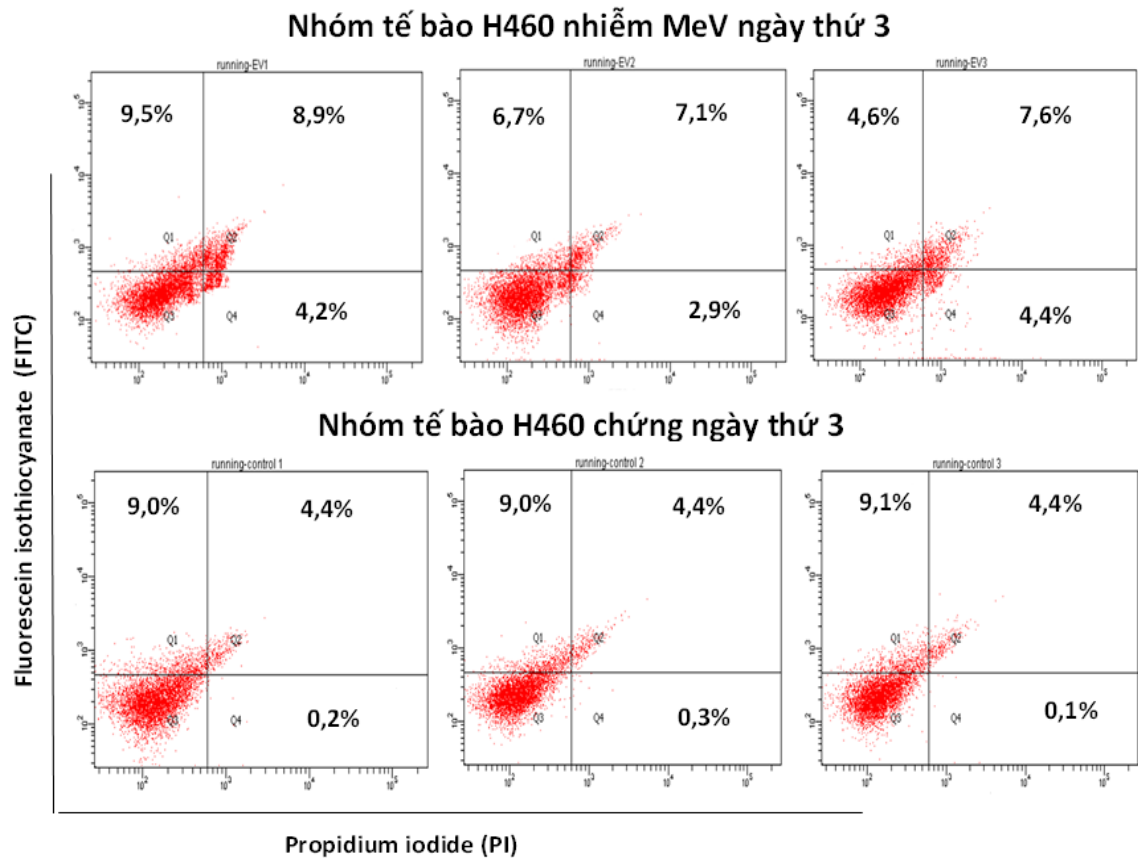


Biểu đồ 3.6. So sánh tỷ lệ tế bào A549 sống theo các thời điểm nhiễm MeV

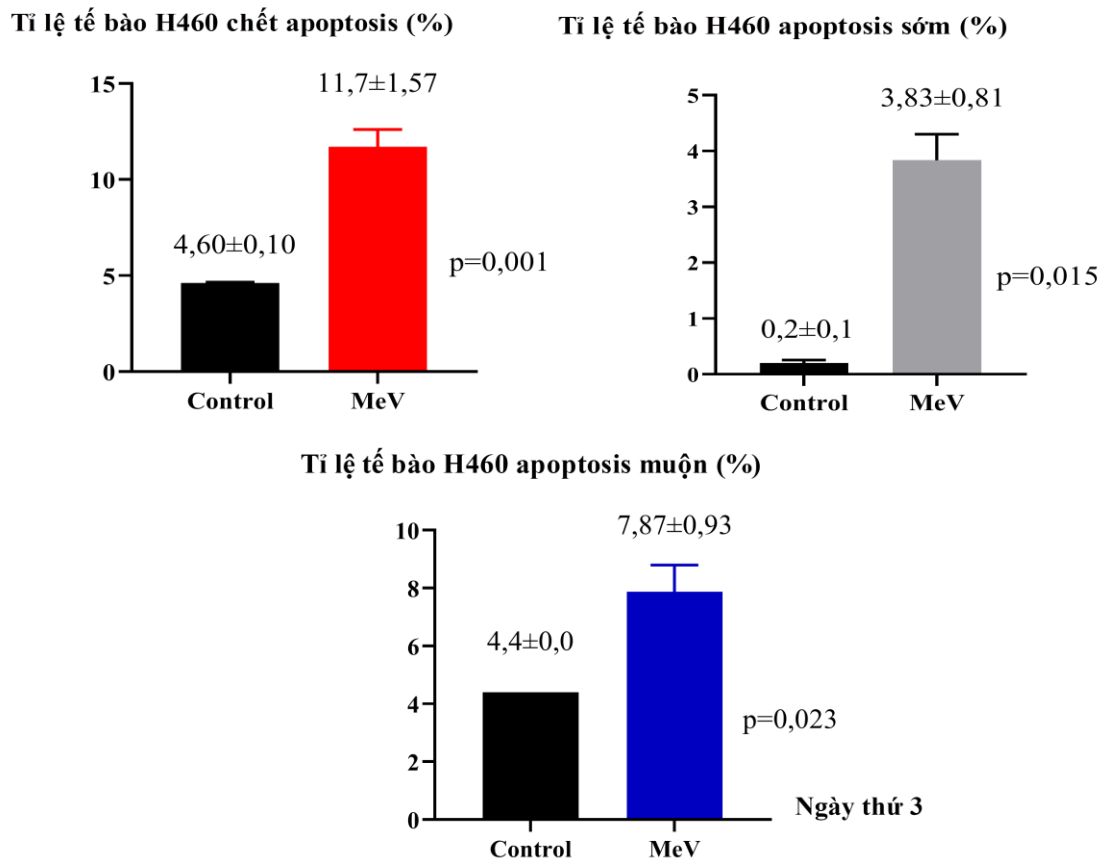
Nhận xét: Tỷ lệ tế bào sống của cả 2 dòng tế bào A549 và H460 giảm theo thời gian nhiễm MeV. Tỷ lệ tế bào sống của cả 2 dòng tế bào UTP nhiễm MeV ở thời điểm ngày thứ 4 đều thấp hơn thời điểm ngày thứ 3 ở cả hai nồng độ (1 MOI và 0,1 MOI), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ ở nhóm tế bào H460 nhiễm MeV nồng độ 1 MOI (Biểu đồ 3.5, bảng 3.3). Nồng độ nhiễm MeV càng cao sự khác biệt về tỷ lệ tế bào sống càng rõ rệt (Biểu đồ 3.5, 3.6 và Bảng 3.3).

3.3.3. Đánh giá tỉ lệ tế bào H460 và A549 chết theo chương trình sau nhiễm MeV *in vitro* bằng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy

3.3.3.1. Tỉ lệ tế bào H460 chết theo chương trình

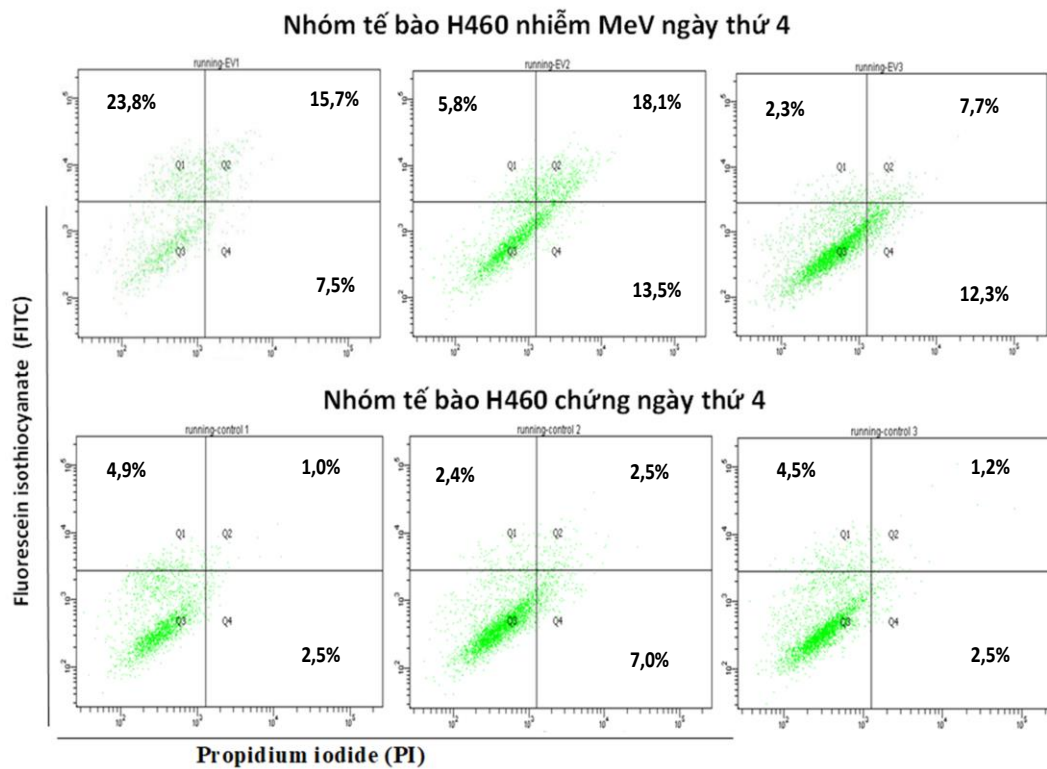


Hình 3.7. Kết quả flow cytometry của tế bào H460 nhiễm MeV ngày thứ 3
(Q4) vùng apoptosis sớm; (Q2) vùng apoptosis muộn; (Q1) vùng tế bào hoại tử

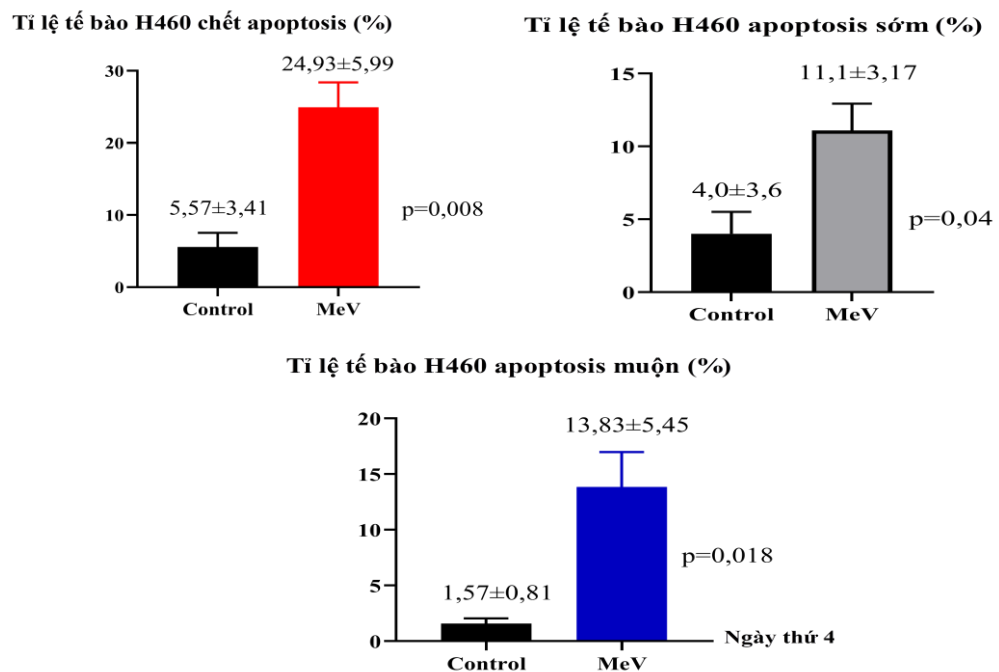


Biểu đồ 3.7. Tỉ lệ tế bào H460 nhiễm MeV ngày thứ 3 chết theo chương trình

Nhận xét: Tỉ lệ tế bào chết theo chương trình của nhóm tế bào H460 nhiễm MeV ở ngày thứ 3 cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nhóm chứng (nhóm nhiễm MeV lần lượt là: $11,7 \pm 1,57$; $3,83 \pm 0,81\%$; $7,87 \pm 0,93$; so với nhóm chứng lần lượt là: $4,6 \pm 0,10\%$; $0,2 \pm 0,1\%$; $4,4 \pm 0,0\%$ với $p_{(\text{Apoptosis sớm-Control})} = 0,015$; $p_{(\text{Apoptosis muộn-Control})} = 0,023$; $p_{(\text{Apoptosis-Control})} = 0,001$) (Biểu đồ 3.7 và Hình 3.7).

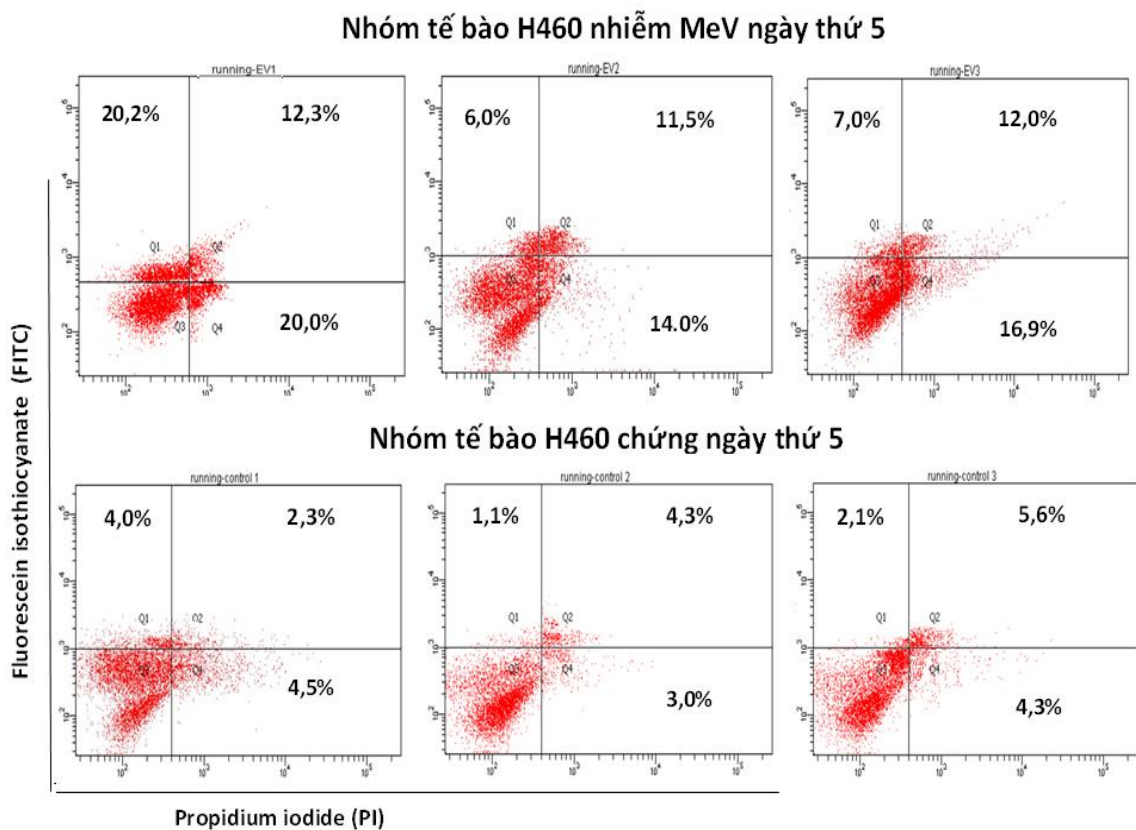


Hình 3.8. Kết quả flow cytometry của tế bào H460 nhiễm MeV ngày thứ 4
(Q4) vùng apoptosis sớm; (Q2) vùng apoptosis muộn; (Q1) vùng tế bào hoại tử

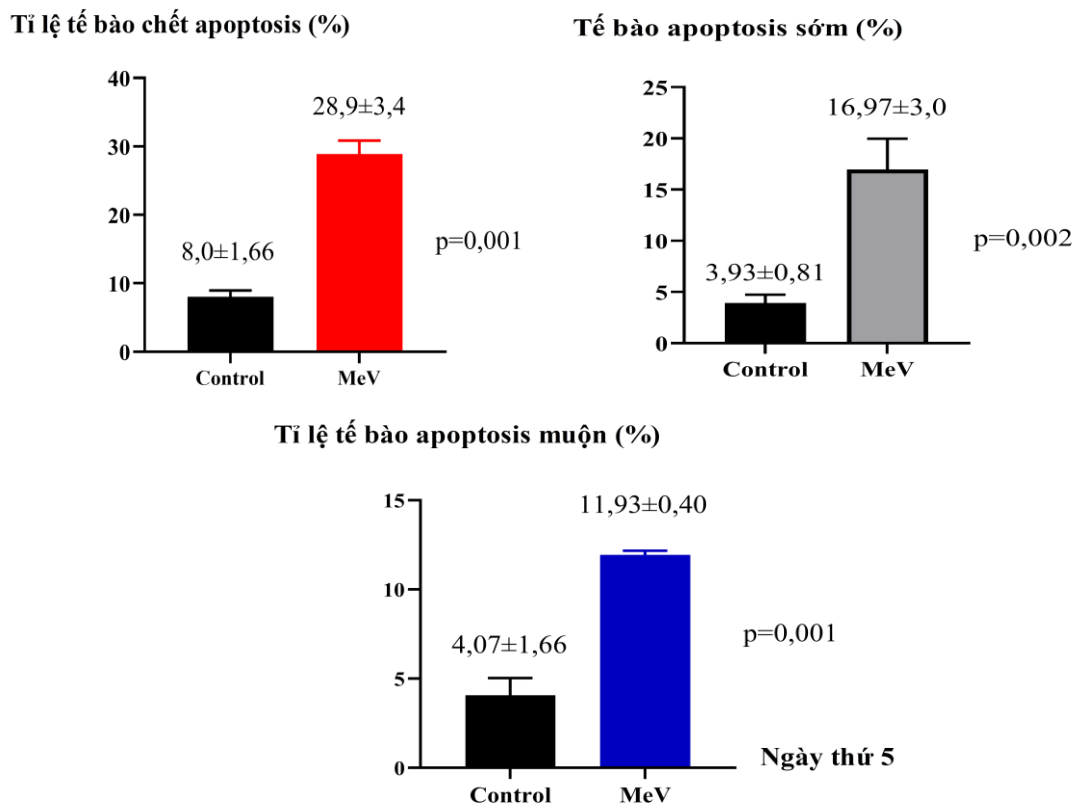


Biểu đồ 3.8. Tỉ lệ tế bào H460 nhiễm MeV ngày thứ 4 chết theo chương trình

Nhận xét: Tỷ lệ tế bào chết theo chương trình của nhóm tế bào H460 nhiễm MeV ở ngày thứ 4 cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nhóm chứng (nhóm MeV lần lượt là: $24,93 \pm 5,99\%$; $11,1 \pm 3,17\%$; $13,83 \pm 5,45\%$ so với nhóm chứng lần lượt là: $5,57 \pm 3,41\%$; $4,0 \pm 3,6\%$; $1,57 \pm 0,81\%$ với $P(\text{Apoptosis-Control})=0,008$; $P(\text{Apoptosis sớm-Control})=0,04$; $P(\text{Apoptosis muộn-Control})=0,018$) (Biểu đồ 3.8, Hình 3.8).



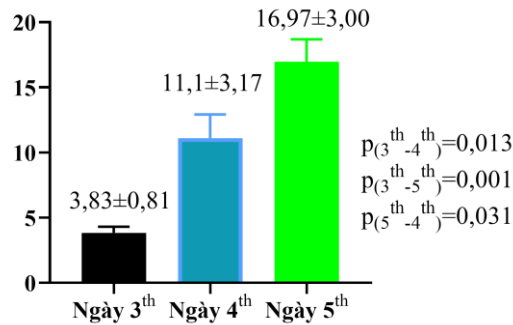
Hình 3.9. Kết quả flow cytometry của tế bào H460 nhiễm MeV ngày thứ 5
(Q4) vùng apoptosis sớm; (Q2) vùng apoptosis muộn; (Q1) vùng tế bào hoại tử



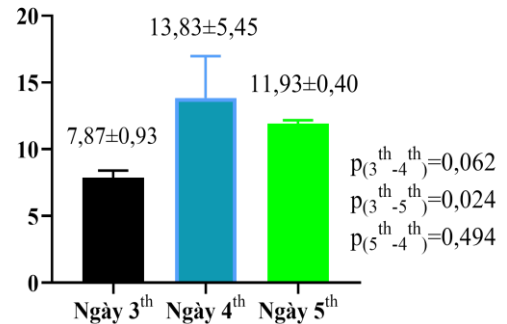
Biểu đồ 3.9. Tỉ lệ tế bào H460 nhiễm MeV ngày thứ 5 chết theo chương trình

Nhận xét: Tỉ lệ tế bào chết theo chương trình của nhóm tế bào H460 nhiễm MeV ở ngày thứ 5 cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nhóm chứng so với nhóm chứng (nhóm MeV lần lượt là: $28,9 \pm 3,4\%$; $16,97 \pm 3,0\%$; $11,93 \pm 0,40$ so với nhóm chứng lần lượt là $8,0 \pm 1,66\%$; $3,93 \pm 0,81\%$; $4,07 \pm 1,66\%$ với $p_{(\text{Apoptosis-Control})} = 0,001$; $p_{(\text{Apoptosis sớm-Control})} = 0,002$; $p_{(\text{Apoptosis muộn-Control})} = 0,001$) (Biểu đồ 3.9 và Hình 3.9).

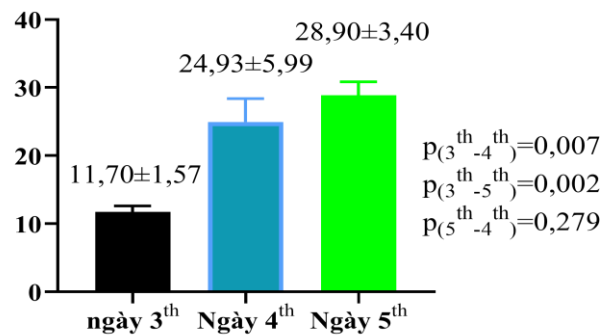
Tỉ lệ tế bào H460 apoptosis sớm (%)



Tỉ lệ tế bào H460 apoptosis muộn (%)



Tỉ lệ tế bào H460 chết apoptosis (%)



Biểu đồ 3.10. So sánh tế bào H460 chết theo chương trình theo ngày nhiễm MeV

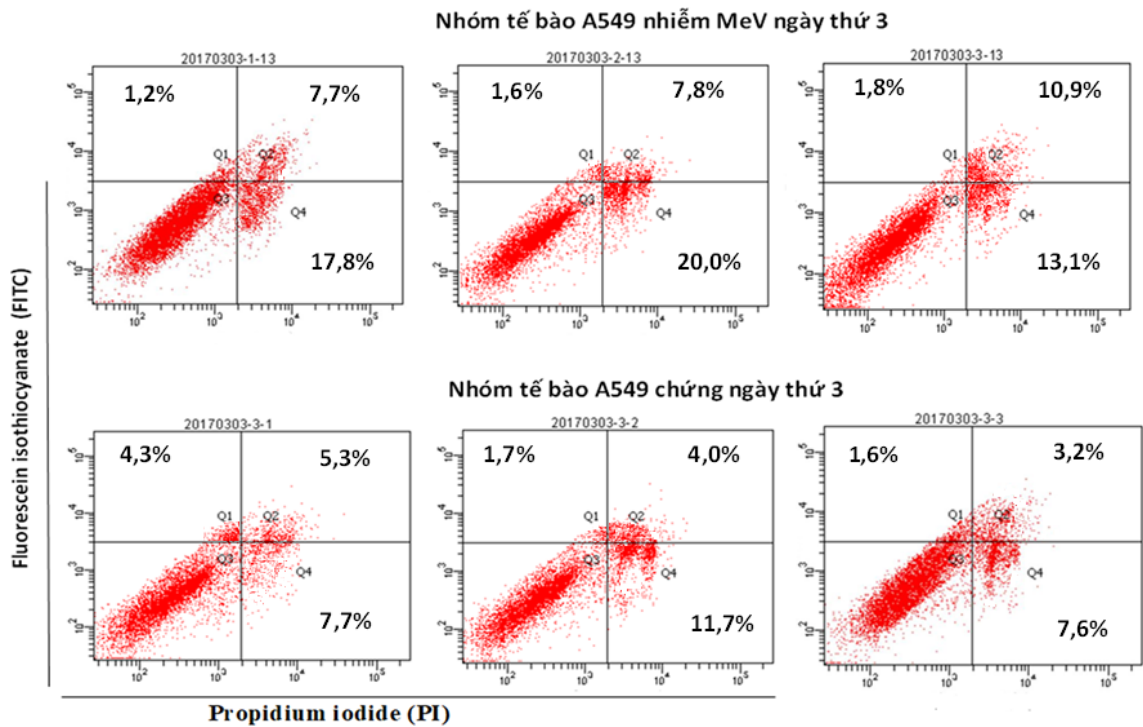
Nhận xét: Kết quả ở Biểu đồ 3.10 cho thấy

- Tỉ lệ tế bào chết apoptosis sớm cao nhất ngày ở thứ 5, thấp nhất ở ngày thứ 3, sự khác biệt giữa các ngày có ý nghĩa thống kê ($p_{(\text{ngày } 3^{\text{th}}-\text{ngày } 4^{\text{th}})} = 0,013$; $p_{(\text{ngày } 3^{\text{th}}-\text{ngày } 5^{\text{th}})} = 0,001$; $p_{(\text{ngày } 4^{\text{th}}-\text{ngày } 5^{\text{th}})} = 0,031$).

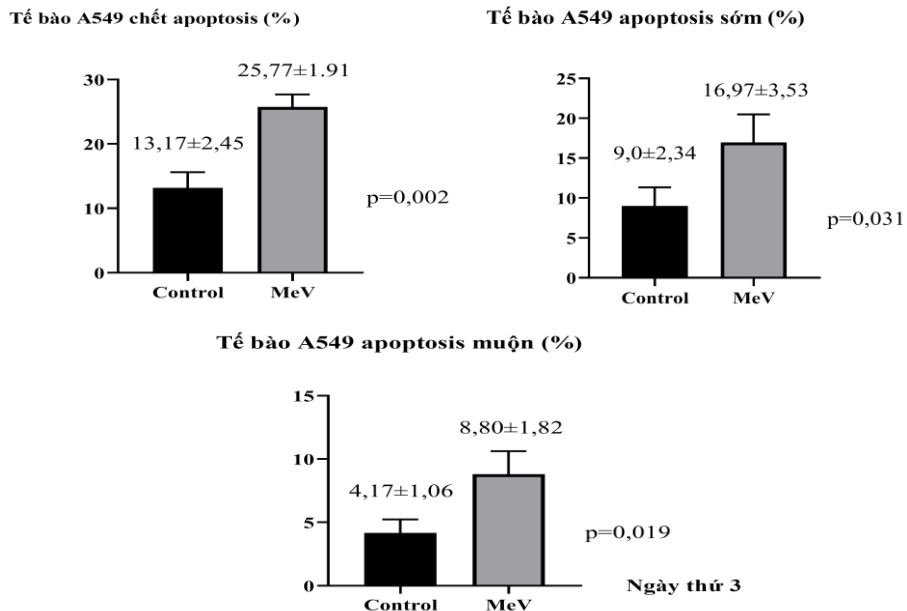
- Tỉ lệ tế bào chết apoptosis muộn cao nhất ngày thứ 4, thấp nhất ở ngày thứ 3, sự khác biệt giữa ngày thứ 3 với 5 có ý nghĩa thống kê ($p_{(\text{ngày } 3^{\text{th}}-\text{ngày } 5^{\text{th}})} = 0,024$; $p_{(\text{ngày } 3^{\text{th}}-\text{ngày } 4^{\text{th}})} = 0,062$; $p_{(\text{ngày } 4^{\text{th}}-\text{ngày } 5^{\text{th}})} = 0,494$).

- Tỉ lệ tế bào H460 chết apoptosis cao nhất ở ngày thứ 5 và thấp nhất ở ngày thứ 3, sự khác biệt giữa ngày thứ 3 với 4 và 5 có ý nghĩa thống kê ($p_{\text{ngày } 3^{\text{th}}-\text{ngày } 4^{\text{th}}} = 0,007$; $p_{\text{ngày } 3^{\text{th}}-\text{ngày } 5^{\text{th}}} = 0,002$). Sự khác biệt giữa ngày thứ 4 và 5 không có ý nghĩa thống kê ($p=0,279$).

3.3.3.2. Đánh giá tỉ lệ tế bào A549 chết theo chương trình bằng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy

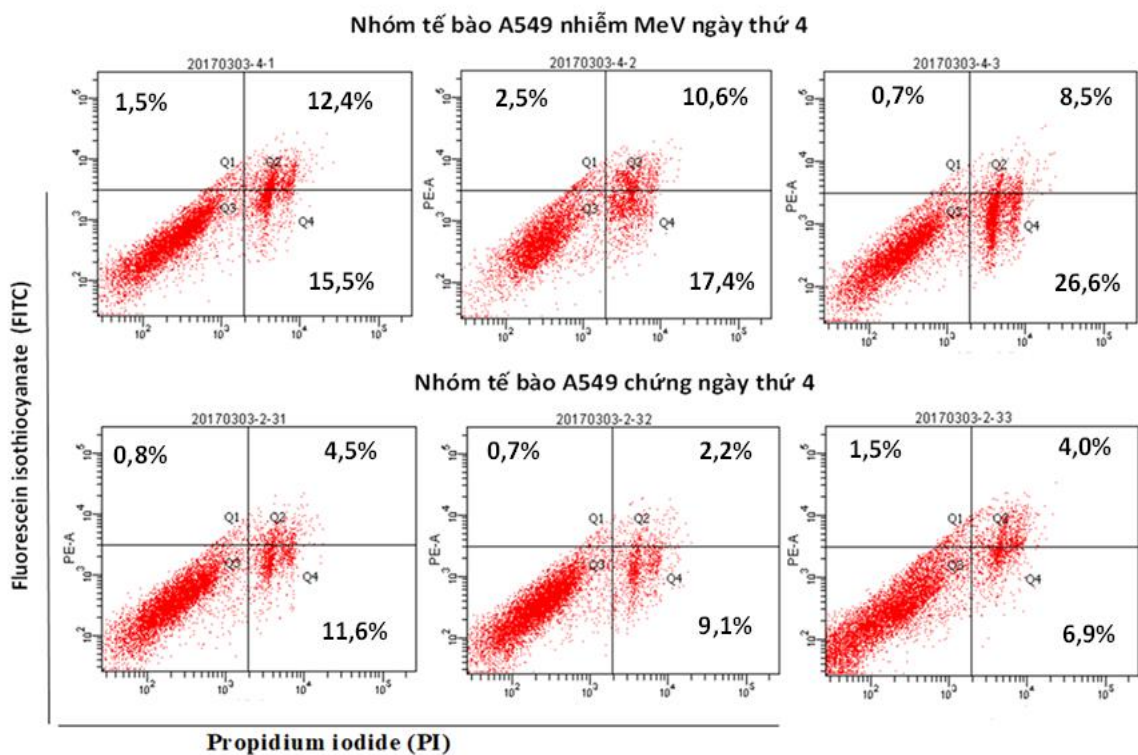


Hình 3.10. Kết quả flow cytometry của tế bào A549 nhiễm MeV ngày thứ 3
(Q4) vùng apoptosis sớm; (Q2) vùng apoptosis muộn; (Q1) vùng tế bào hoại tử

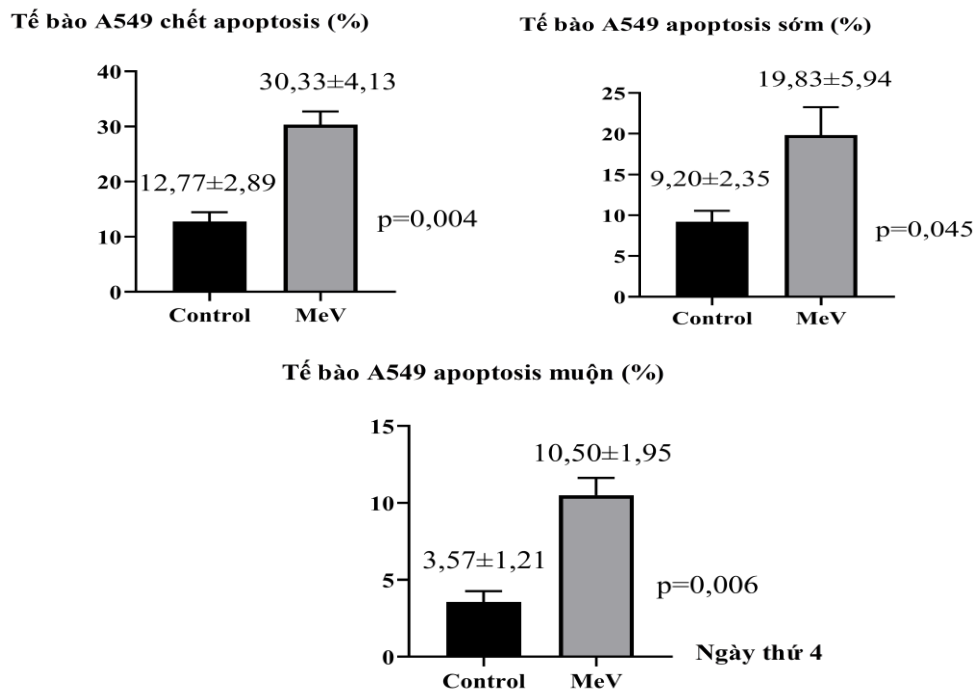


Biểu đồ 3.11. Tỉ lệ tế bào A549 chết theo chương trình ở ngày thứ 3 nhiễm MeV

Nhận xét: Tỷ lệ tế bào chết theo chương trình của nhóm tế bào A549 nhiễm MeV ở ngày thứ 3 cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nhóm chứng (nhóm MeV lần lượt là: $25,77 \pm 1,91\%$; $16,97 \pm 3,53\%$; $8,80 \pm 1,82\%$; so với nhóm chứng lần lượt là: $13,17 \pm 2,45\%$; $9,0 \pm 2,34\%$; $4,17 \pm 1,06\%$ với $P(\text{Apoptosis sớm-Control}) = 0,031$; $P(\text{Apoptosis muộn-Control}) = 0,019$; $P(\text{Apoptosis-Control}) = 0,002$) (Biểu đồ 3.11; Hình 3.10).

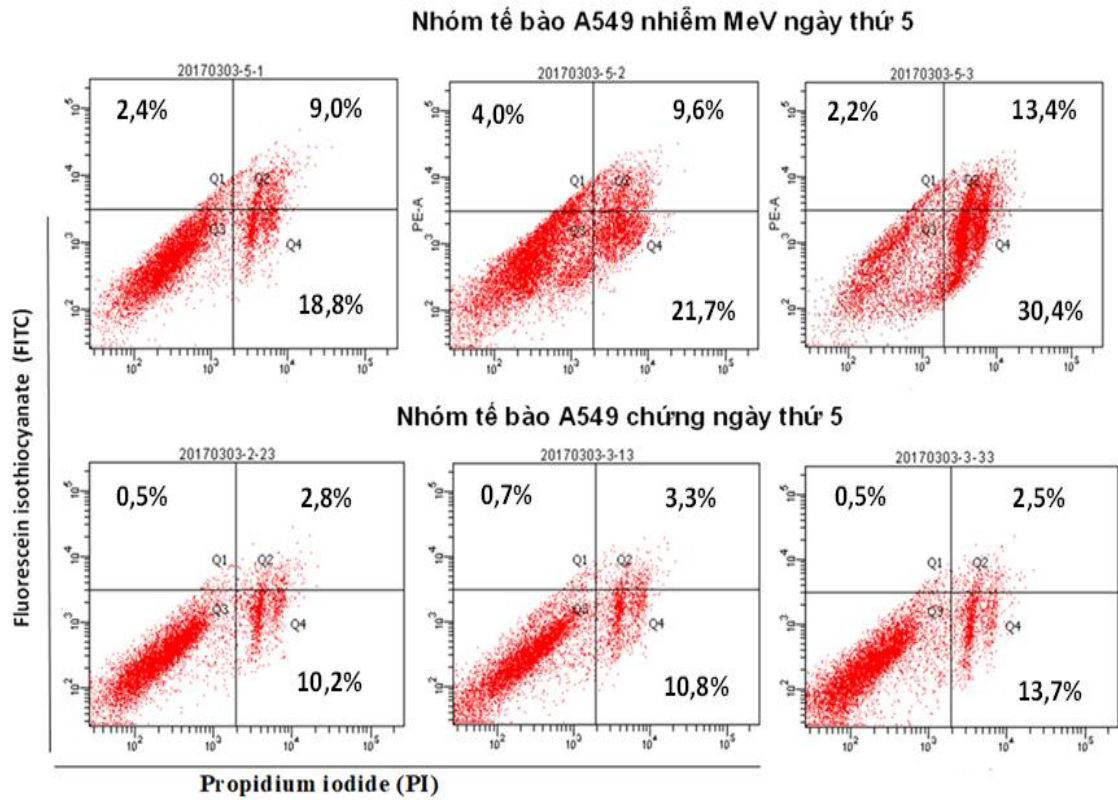


Hình 3.11. Kết quả flow cytometry của tế bào A549 nhiễm MeV ngày thứ 4
(Q4) vùng apoptosis sớm; (Q2) vùng apoptosis muộn; (Q1) vùng tế bào hoại tử

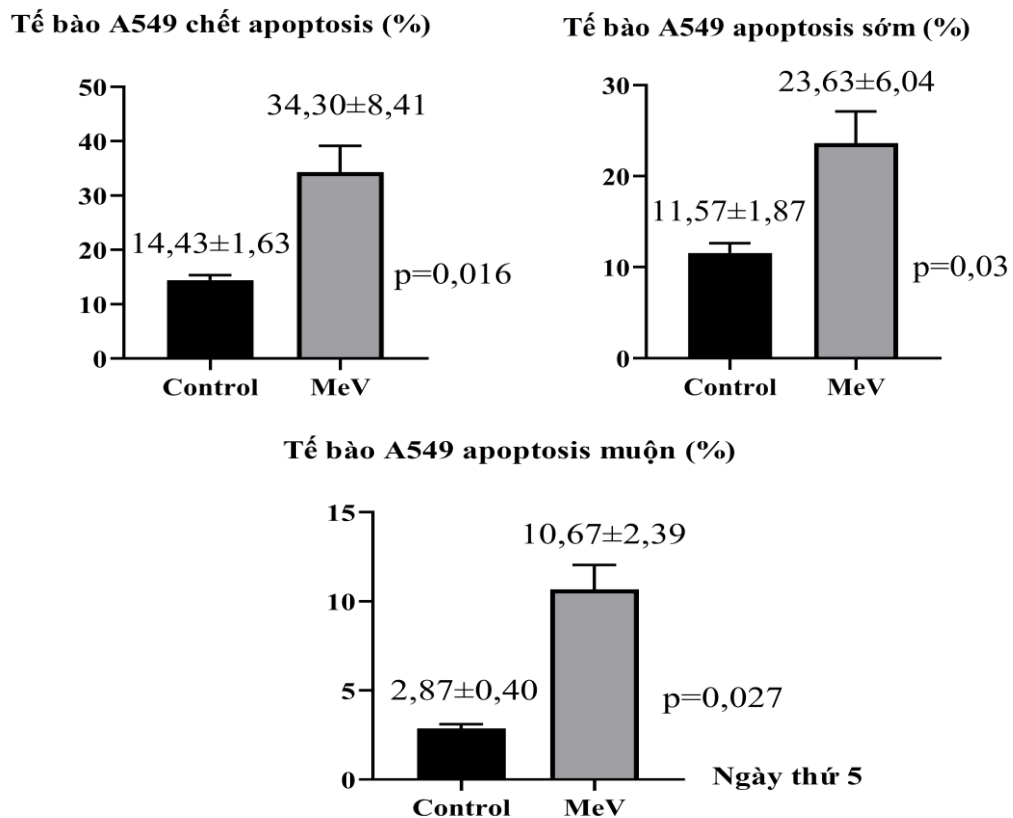


Biểu đồ 3.12. Tỷ lệ tế bào A549 chết theo chương trình ở ngày thứ 4 nhiễm MeV

Nhận xét: Tỷ lệ tế bào chết theo chương trình của nhóm tế bào A549 nhiễm MeV ở ngày thứ 4 cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nhóm chứng (nhóm MeV lần lượt là: 30,33±4,13%; 19,83±5,94%; 10,50±1,95% so với nhóm chứng lần lượt là: 12,77± 2,89%; 9,20±2,35%; 3,57±1,21%; với $P_{(\text{Apoptosis-Control})} = 0,004$; $p_{(\text{Apoptosis sớm-Control})} = 0,045$; $p_{(\text{Apoptosis muộn-Control})} = 0,006$) (Biểu đồ 3.12; Hình 3.11).

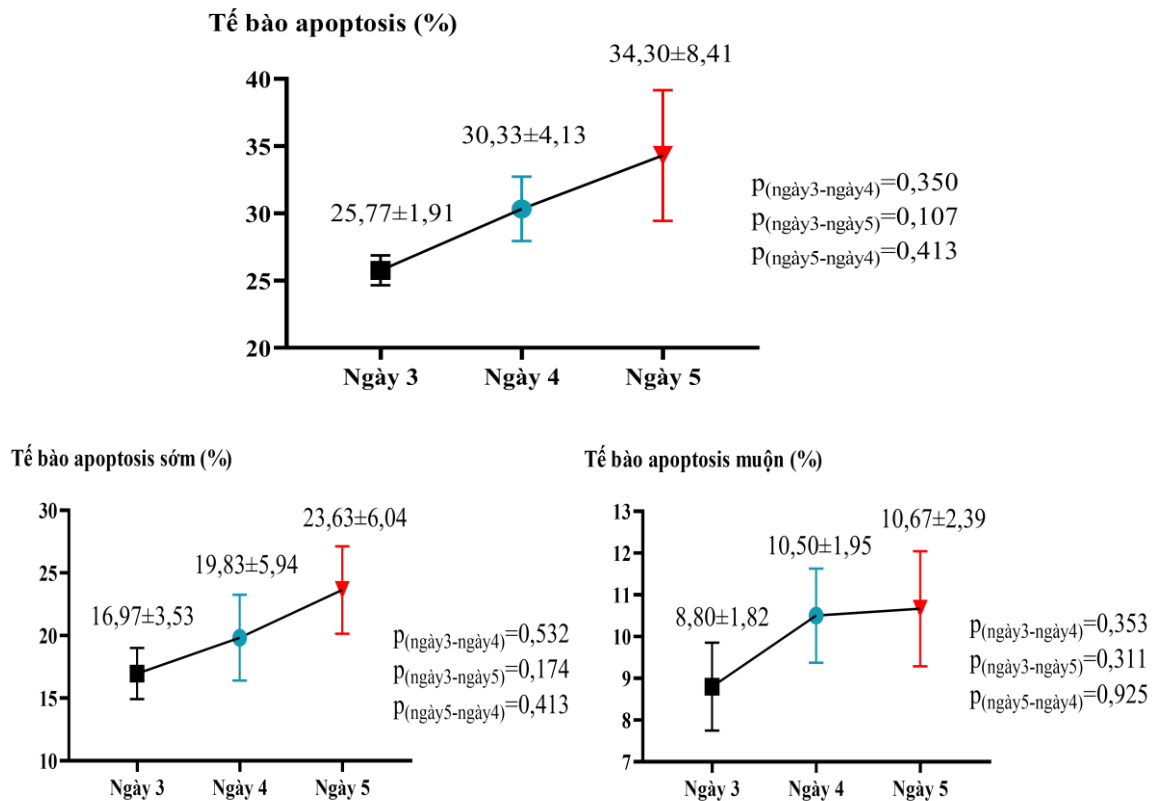


Hình 3.12. Kết quả flow cytometry tế bào A549 nhiễm MeV ngày thứ 5
 (Q4) vùng apoptosis sớm; (Q2) vùng apoptosis muộn; (Q1) vùng tế bào hoại tử



Biểu đồ 3.13. Tỷ lệ tế bào A549 nhiễm MeV ngày thứ 5 chết theo chương trình

Nhận xét: Tỷ lệ tế bào chết theo chương trình của nhóm tế bào A549 nhiễm MeV ở ngày thứ 5 cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nhóm chứng (nhóm MeV lần lượt là: 34,30 ± 8,41%; 23,63 ± 6,04%; 10,67 ± 2,39%; so với nhóm chứng lần lượt là: 14,43 ± 1,63%; 11,57 ± 1,87%; 2,87 ± 0,40% với $p_{(\text{Apoptosis-Control})} = 0,016$; $p_{(\text{Apoptosis sớm-Control})} = 0,003$; $p_{(\text{Apoptosis muộn-Control})} = 0,027$) (Biểu đồ 3.13, Hình 3.12).



Biểu đồ 3.14. So sánh tế bào A549 chết theo chương trình theo ngày nhiễm MeV

Nhận xét: Biểu đồ 3.14 cho thấy

- Tỷ lệ tế bào A549 chết theo chương trình cao nhất ở ngày thứ 5 và thấp nhất ở ngày thứ 3, sự khác biệt giữa các ngày thứ 3 với 4 và 5 có không ý nghĩa thống kê ($p_{\text{ngày } 3^{\text{th}}-\text{ngày } 4^{\text{th}}}=0,350$; $p_{\text{ngày } 3^{\text{th}}-\text{ngày } 5^{\text{th}}}=0,107$; $p_{\text{ngày } 4^{\text{th}}-\text{ngày } 5^{\text{th}}}=0,413$).

- Tỷ lệ tế bào A549 apoptosis sớm cao nhất ngày ở thứ 5, thấp nhất ở ngày thứ 3, sự khác biệt giữa các ngày không có ý nghĩa thống kê ($p_{(\text{ngày } 3^{\text{th}}-\text{ngày } 4^{\text{th}})}=0,532$; $p_{(\text{ngày } 3^{\text{th}}-\text{ngày } 5^{\text{th}})}=0,174$; $p_{(\text{ngày } 4^{\text{th}}-\text{ngày } 5^{\text{th}})}=0,413$).

Tỷ lệ tế bào A549 apoptosis muộn cao nhất ngày thứ 5, thấp nhất ở ngày thứ 3, sự khác biệt giữa các ngày không có ý nghĩa thống kê ($p_{(\text{ngày } 3^{\text{th}}-\text{ngày } 4^{\text{th}})}=0,353$; $p_{(\text{ngày } 3^{\text{th}}-\text{ngày } 5^{\text{th}})}=0,311$; $p_{(\text{ngày } 4^{\text{th}}-\text{ngày } 5^{\text{th}})}=0,925$).

3.4. Virus vaccine sởi kháng u tế bào ung thư phổi H460 cấy ghép trên chuột thiếu hụt miễn dịch

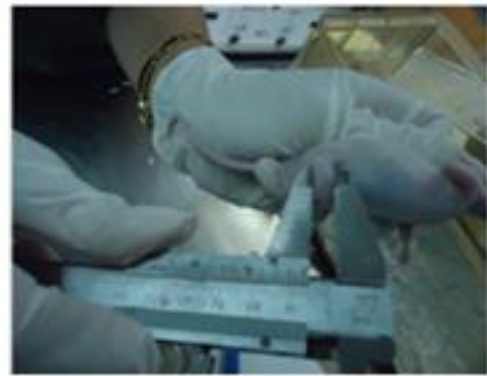
3.4.1. Kết quả ghép u dòng tế bào ung thư phổi người H460

Bảng 3.4. Kết quả tạo khối u tế bào H460 trên đuôi chuột nude

Số ngày tiêm tế bào H460 Các chỉ số theo dõi	Ngày 1 st (n = 20)	Ngày 4 th (n=20)	Ngày 7 th (n=20)	Ngày 10 th (n=20)	Ngày 12 th (n=20)
Số chuột có u (con)	0	12	20	20	20
Tỷ lệ có u (%)	0	60	100	100	100



(B)



(C)

Hình 3.13. Kết quả ghép u tế bào H460 dưới da đuôi chuột nude

(A) Hình ảnh tiêm tế bào H460 tạo khối UTP người trên chuột nude; (B, C) đo kích thước khối ung thư trên chuột nude bằng thước kẹp SNK.

Nhận xét: Kết quả cho thấy u xuất hiện bắt đầu vào ngày thứ 4 sau tiêm, đến ngày thứ 7 thì có 20/20 (100%) chuột nude ghép phát triển có khối u (Bảng 3.4, Hình 3.13). Vùng da tại chỗ tiêm bình thường, không có biểu hiện viêm loét hay hoại tử.

3.4.2. Kết quả điều trị chuột nude mang khối u tế bào ung thư phổi người H460 bằng virus vaccine sởi

3.4.2.1. Tình trạng sức khỏe của chuột sau điều trị

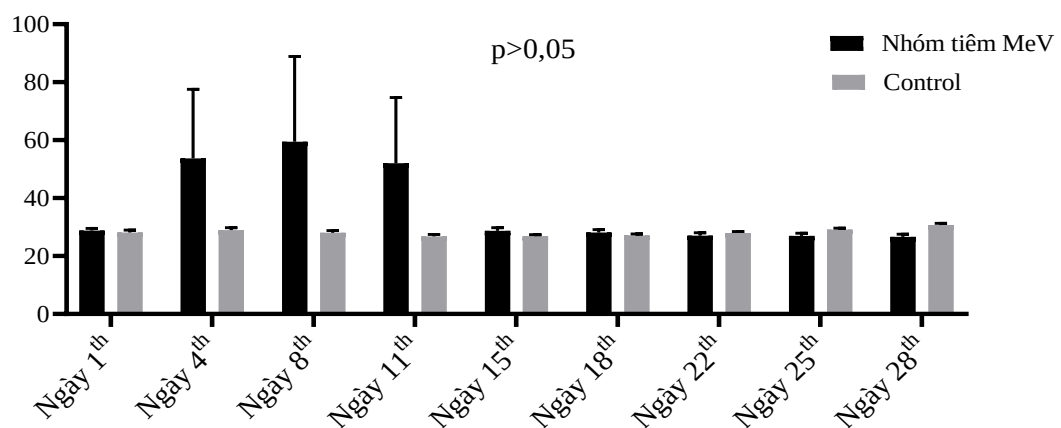
Bảng 3.5. Kết quả theo dõi sức khỏe chuột trong điều trị MeV

Số TT	Tiêu chí theo dõi	Trước điều trị		Sau điều trị (ngày 27 th)	
		Mức độ đánh giá		Mức độ đánh giá	
		Bình thường	Kém	Bình thường	Kém
1	Vận động	20 Con	0	20 Con	0
2	Đáp ứng với kích thích	20 Con	0	20 Con	0
3	Phân chuột	20 Con	0	20 Con	0
4	Da chuột	20 Con	0	20 Con	0

Nhận xét: Sau khi tiêm 12 ngày, u phát triển tại vị trí dưới da đùi của 20 chuột nude, chúng tôi tiến hành điều trị bằng MeV theo phác đồ và liều lượng (đã nói ở mục 2.2.8). Bên cạnh đó, chúng tôi theo dõi sức khỏe chuột trong suốt quá trình điều trị. Kết quả cho thấy các chuột sau ghép u tế bào H460 và trong quá trình điều trị bằng MeV đều có các chỉ số đánh giá sức khỏe bình thường (Bảng 3.5).

3.4.2.2. Trọng lượng chuột ở các nhóm nghiên cứu sau điều trị

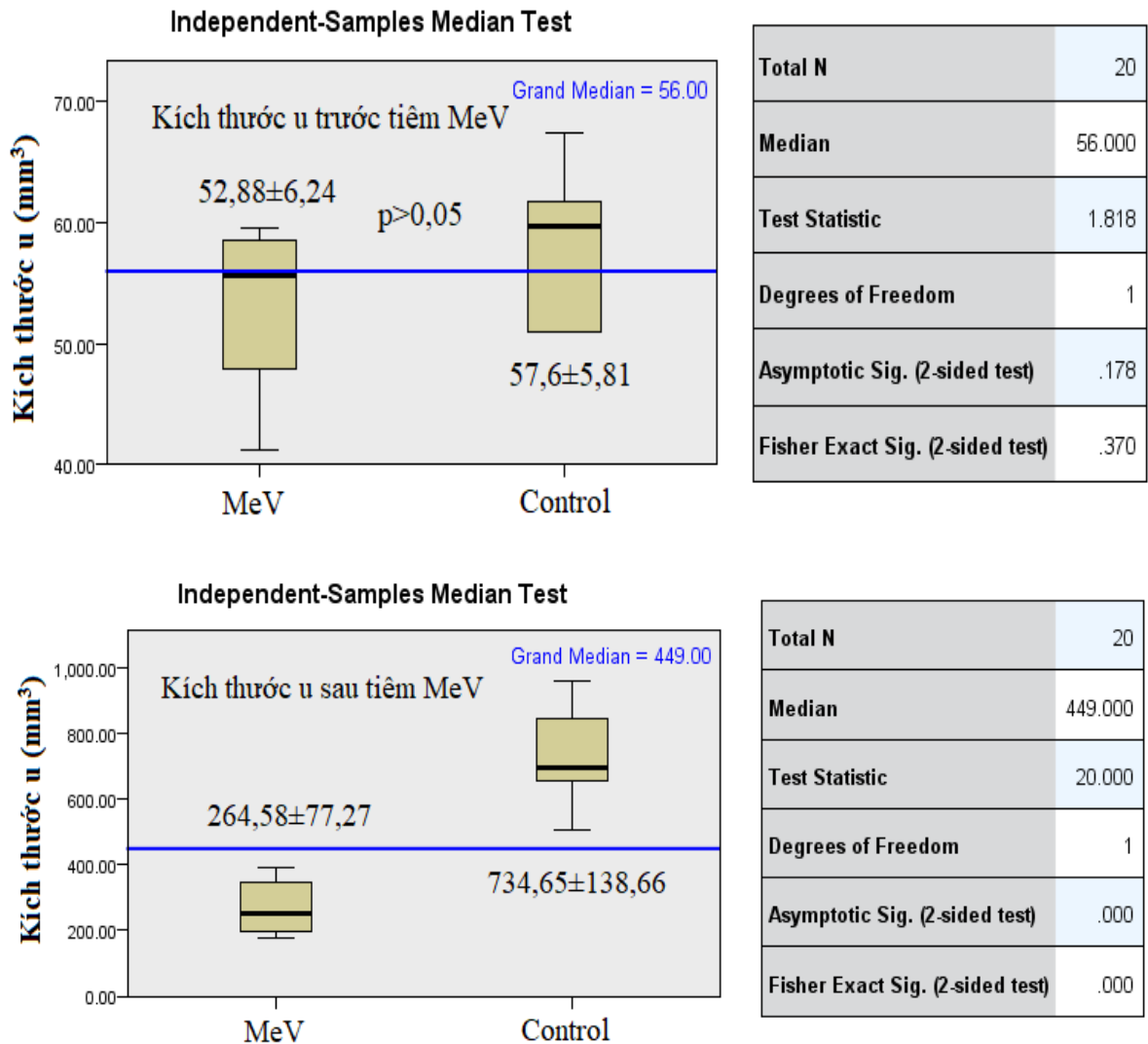
Trọng lượng (gam)



Biểu đồ 3.15. Thay đổi trọng lượng chuột sau điều trị bằng MeV

Các nhóm chuột có trọng lượng tương đồng nhau (khác biệt không có nghĩa thống kê $p > 0,05$) (Biểu đồ 3.15).

3.4.2.3. Kích thước u trước và sau điều trị bằng virus sởi



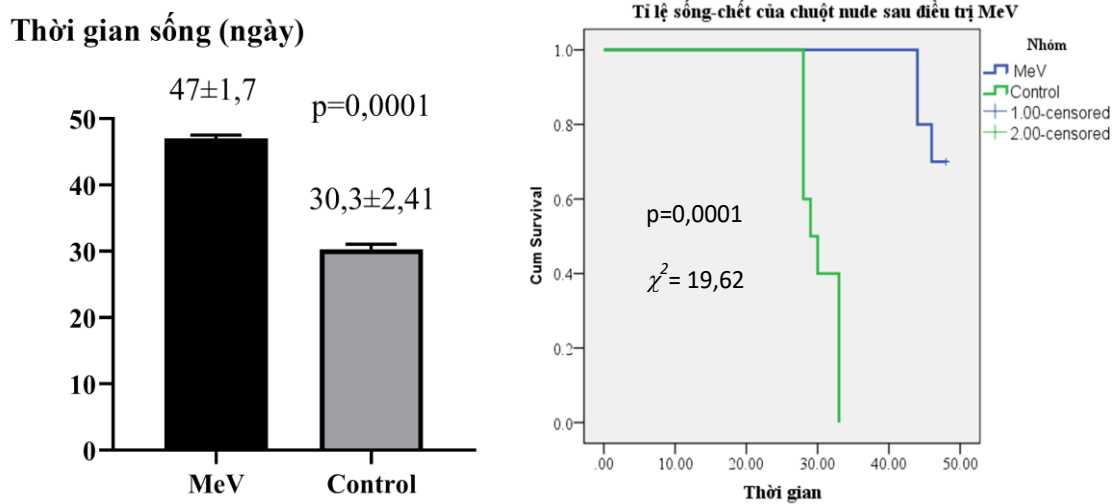
Biểu đồ 3.16. Kết quả kích thước khối u sau điều trị bằng MeV

(A) So sánh ở ngày điều trị thứ 1; (B) So sánh ở ngày điều trị thứ 28

Ngày điều trị đầu tiên, khác biệt về kích thước u giữa nhóm chứng và nhóm điều trị MeV không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$) (Biểu đồ 3.16A).

Sau thời gian điều trị, ở ngày thứ 28, kích thước khối u ở điều trị MeV tăng chậm có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) so với nhóm chứng (biểu đồ 3.16B).

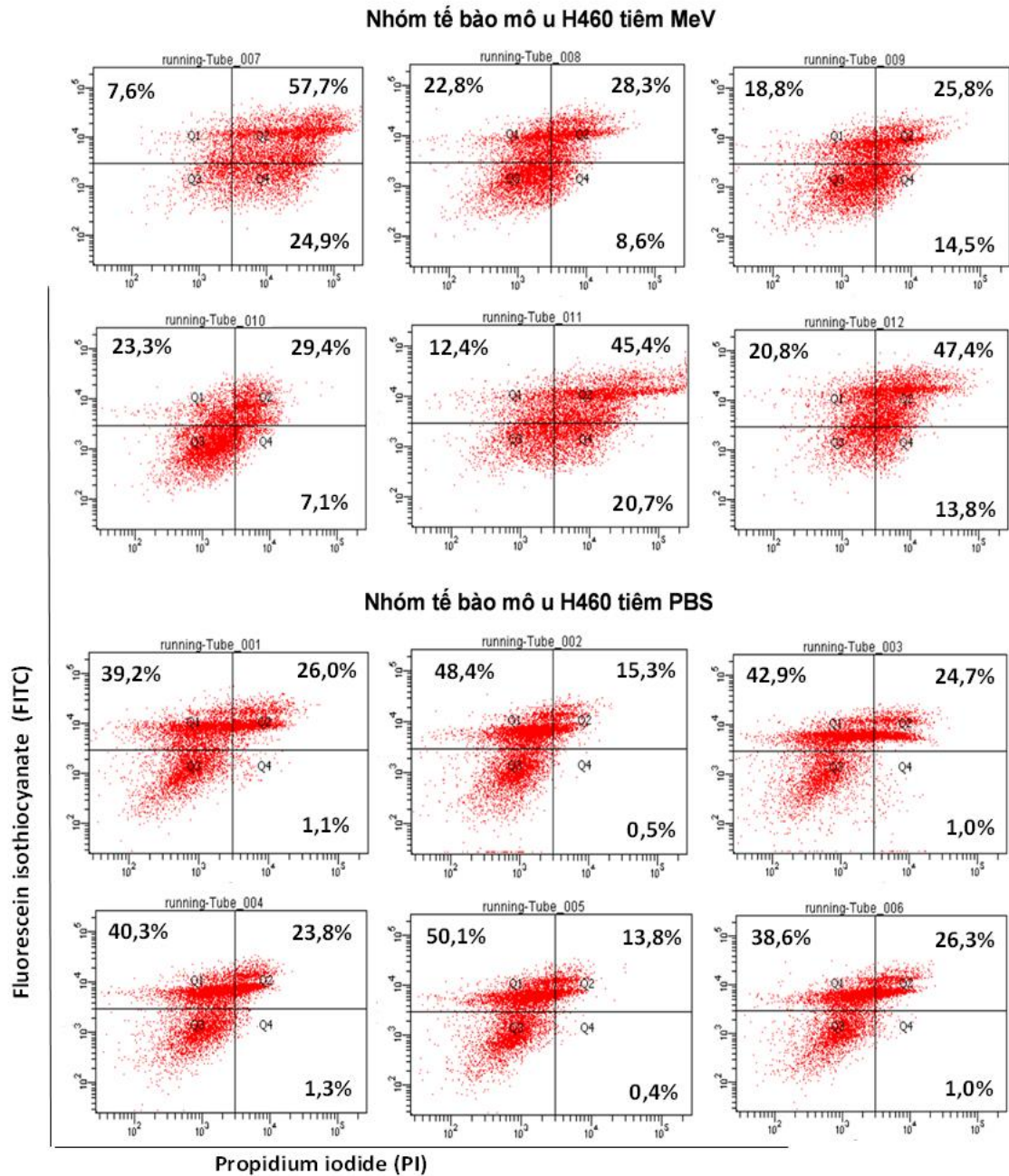
3.4.2.4. Thời gian sống trung bình và tỉ lệ chuột còn sống của các nhóm nghiên cứu sau điều trị bằng virus vaccine sởi



Biểu đồ 3.17. So sánh thời gian sống và tỉ lệ sống-chết của chuột sau điều trị bằng MeV

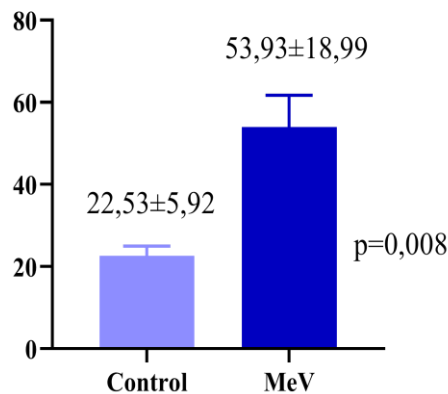
Nhận xét: Sau thời gian điều trị, thời gian sống trung bình của chuột nude ở nhóm tiêm virus MeV ($47 \pm 1,7$ ngày) dài hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$) so với nhóm chứng ($30,3 \pm 2,41$) (Biểu đồ 3.17). Tỉ lệ chuột còn sống (sau 48 ngày theo dõi) ở nhóm tiêm MeV (70%) cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$, $\chi^2 = 19,62$) so với nhóm chứng (10%) (Biểu đồ 3.17).

3.4.3. Tỷ lệ tế bào u H460 cấy ghép trên chuột nude chết theo chương trình sau điều trị bằng MeV

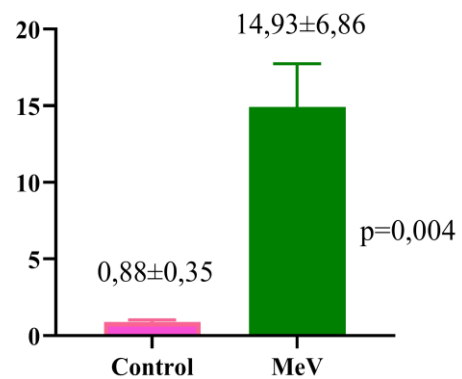


Hình 3.14. Kết quả flow cytometry tế bào u H460 chết theo chương trình

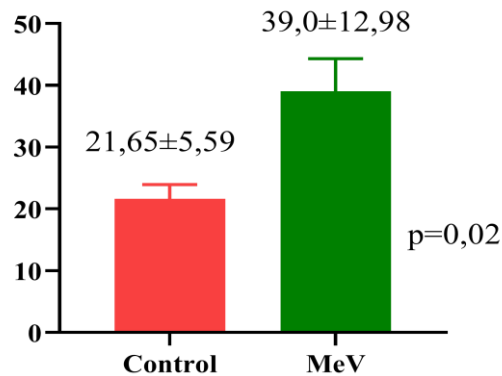
Tỉ lệ tế bào u H460 chết apoptosis (%)



Tỉ lệ tế bào u H460 apoptosis sớm (%)



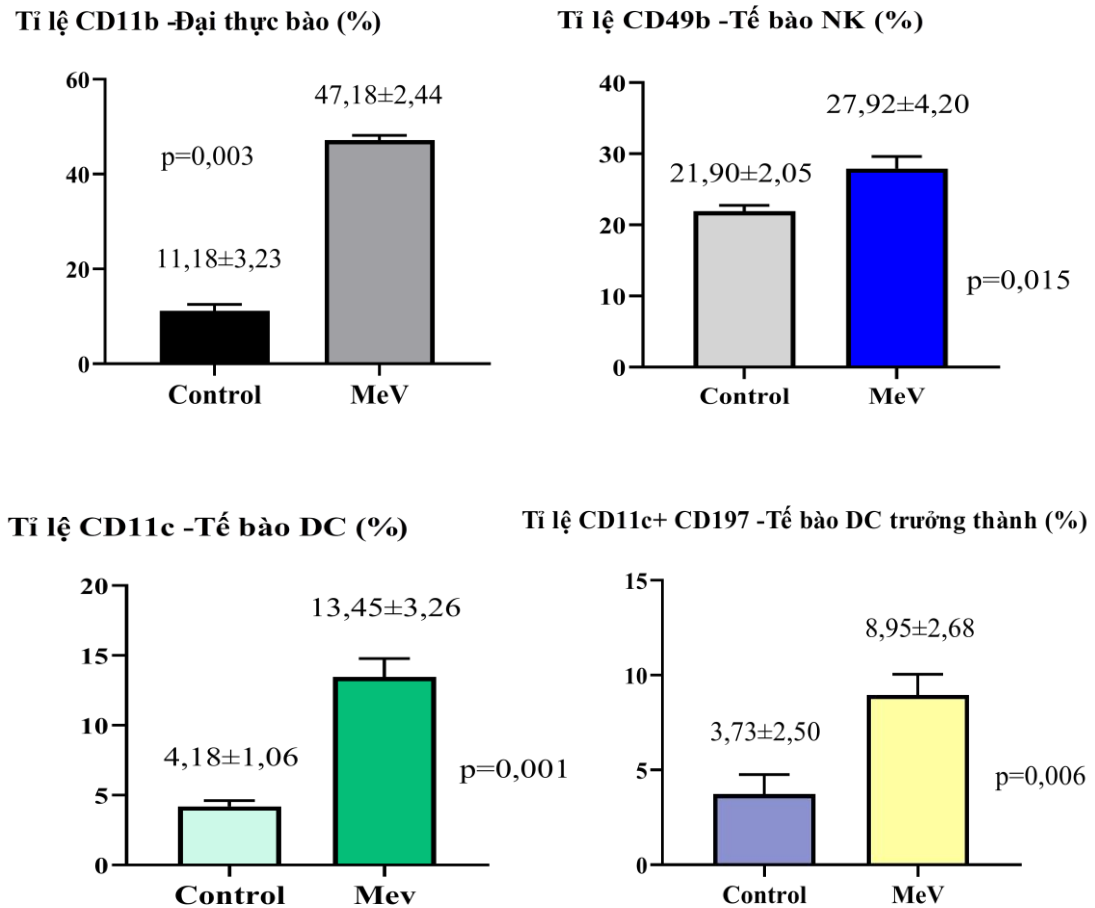
Tỉ lệ tế bào u H460 apoptosis muộn (%)

**Biểu đồ 3.18. Tỉ lệ tế bào u H460 chết theo chương trình sau điều trị MeV**

Nhận xét: Hình 3.14 và biểu đồ 3.18 cho thấy

- Tỉ lệ tế bào chết theo chương trình ở u tiêm MeV nhiều hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng (53,93±18,99% so với 22,53±5,92% với p=0,008).
- Tỉ lệ tế bào apoptosis sớm ở u tiêm MeV nhiều hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng (14,93±6,86% so với 0,88±0,35% với p=0,004).
- Tỉ lệ tế bào apoptosis muộn ở u tiêm MeV nhiều hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng (39,0±12,98% so với 21,65±5,59% với p=0,02).

3.4.3.2. Kết quả tỉ lệ các tế bào miễn dịch bằng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy



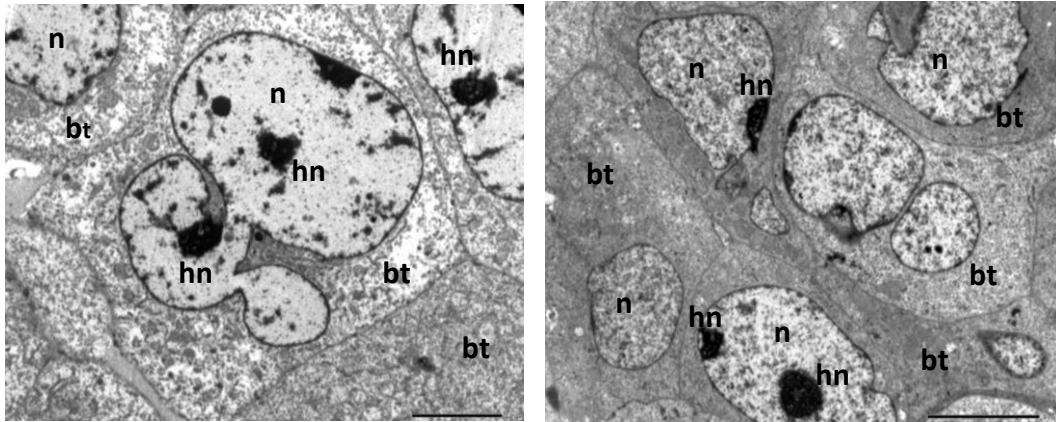
Biểu đồ 3.19. Kết quả tỉ lệ các tế bào miễn dịch ở mô u tế bào H460 trên chuột nude sau điều trị bằng MeV.

(A) Tỉ lệ Đại thực bào; (B) Tỉ lệ tế bào NK

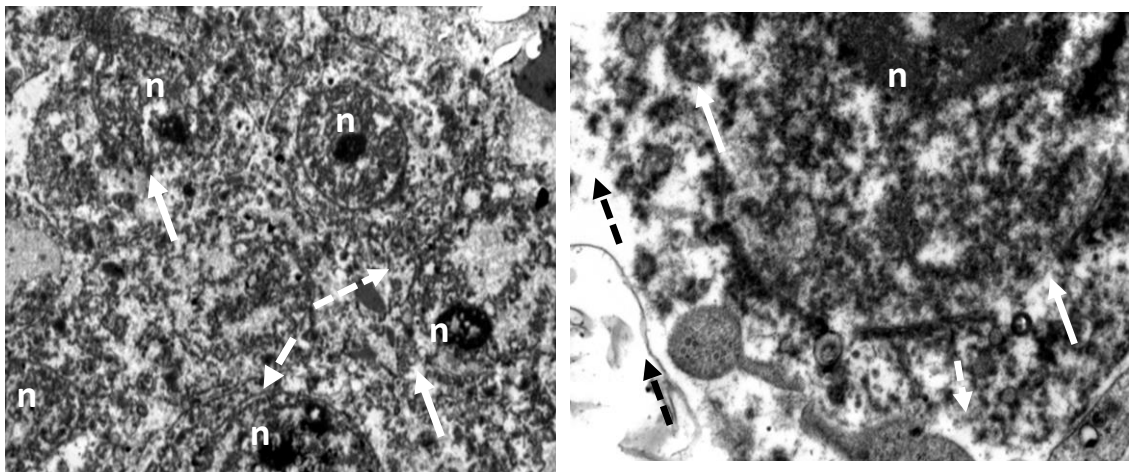
(C) Tỉ lệ tế bào DC; (D) Tỉ lệ tế bào DC trưởng thành

Nhận xét: Kết quả đánh giá quần thể tế bào mô u chuột cho thấy tỉ lệ tế bào bạch cầu dòng tủy, tế bào NK, tế bào DC và tế bào DC trưởng thành ở nhóm điều trị MeV (lần lượt là 47,18±2,44%; 27,92±4,20%; 13,45±3,26%; 8,95±2,68%) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng (lần lượt là 11,18±3,23%; 21,9±2,05%; 4,18±1,06%; 3,73±2,50%) với $p_{(CD11b-control)} = 0,003$; $p_{(CD49b-control)} = 0,015$; $p_{(CD11c-control)} = 0,001$; $p_{(CD11c-197-control)} = 0,006$ (Biểu đồ 3.19).

3.4.4. Hình ảnh siêu cấu trúc tế bào u phổi H460 và A549 sau điều trị bằng virus vaccine sởi

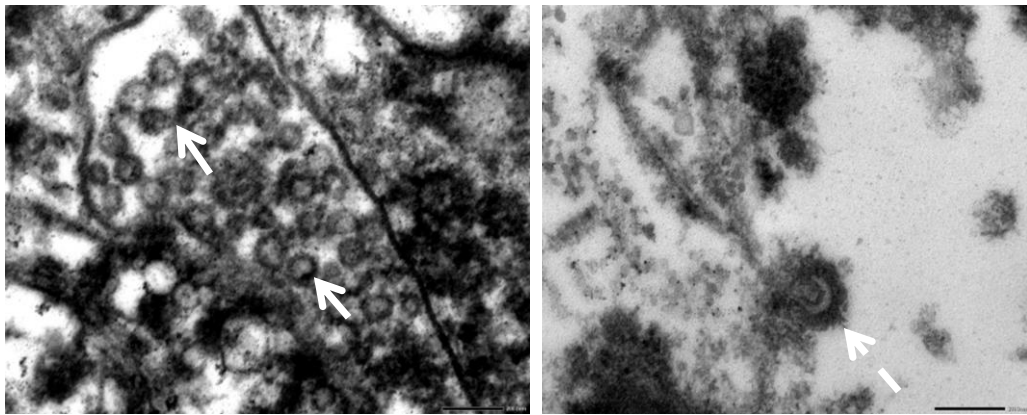


Hình 3.15. Hình ảnh siêu cấu trúc tế bào u H460 không nhiễm virus
n (đen)– nhân; hn (vàng) – hạt nhân; bt (vàng)– bào tương.



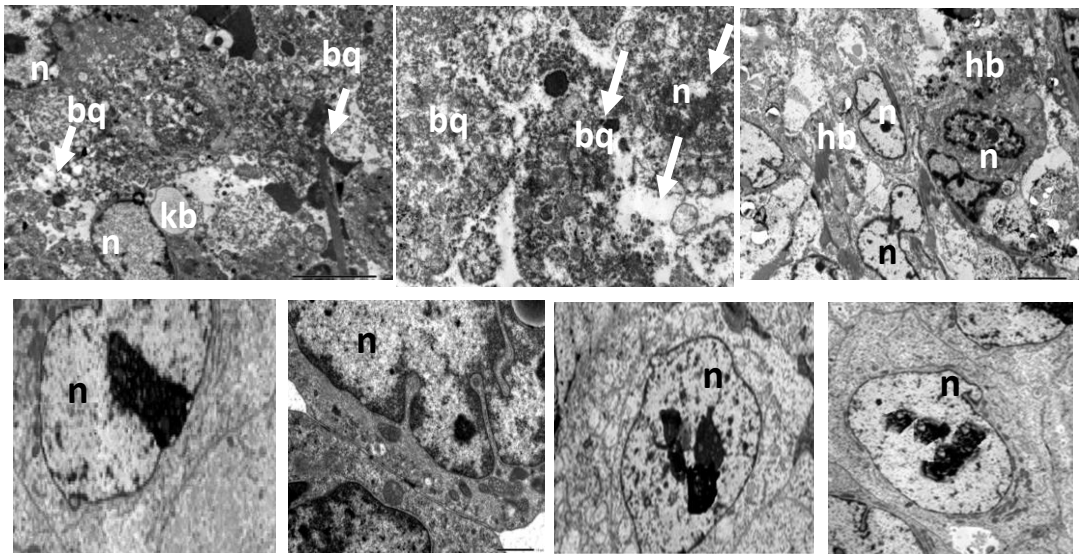
Hình 3.16. Hình ảnh siêu cấu trúc tế bào H460 hoại tử sau tiêm MeV

Nhận xét: Tế bào H460 nhiễm MeV có hình ảnh phá hủy, mất cấu trúc tế bào, màng tế bào đứt đoạn mất ranh giới (mũi tên đứt đoạn); Nhân mất màng nhân, chất nhân thoát ra ngoài (mũi tên liền) (Hình 3.16).



Hình 3.17. Siêu cấu trúc MeV xâm nhập vào tế bào u phổi H460

Nhận xét: Tế bào H460 nhiễm MeV có cấu trúc dạng tiểu thể hình cầu của virus trên bề mặt tế bào (mũi tên). Phóng to hơn thì thấy tiểu thể hình cầu – virus đang hình thành trên màng tế bào (mũi tên đứt đoạn) (Hình 3.17).

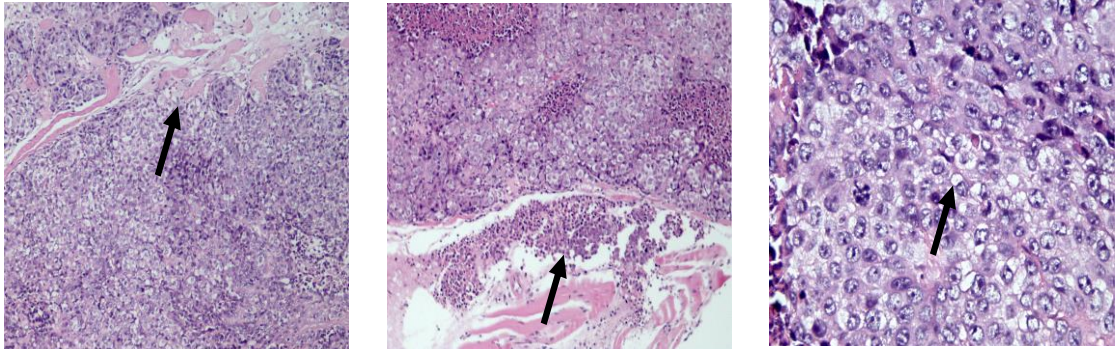


Hình 3.18. Hình ảnh siêu cấu trúc tế bào u H460 chết theo chương trình sau tiêm MeV

(kb): không bào; **(bq):** bào quan; **(n):** nhân

Nhận xét: Tế bào H460 nhiễm MeV có hình ảnh các bào quan trương phồng và mất cấu trúc, hình thành khoảng sáng trong bào tương (mũi tên) và hình thành không bào. Nhân tế bào H460 ngưng tụ nhiễm sắc thể, hạt nhân phân mảnh. Hình ảnh tạo hợp bào là tế bào nhiều nhân (Hình 3.18).

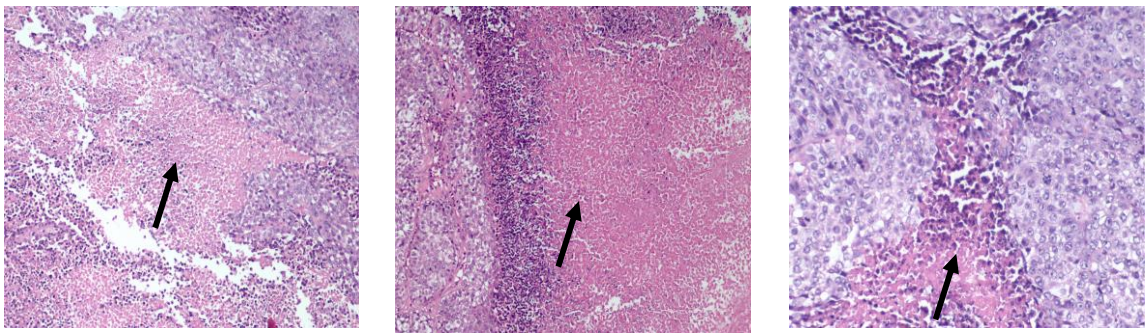
3.4.5. Kết quả giải phẫu bệnh u tế bào H460 cấy ghép trên chuột Nude sau điều trị bằng MeV



Hình 3.19. Hình ảnh giải phẫu bệnh tế bào u phổi bình thường

Nhận xét: các tế bào u phát triển mạnh mẽ xâm lấn vào mô cơ vân (mũi tên), bóc tách các bó cơ ra và các tế bào u nằm giữa các bó cơ đó.

Ở độ phóng đại lớn hơn, nhìn rõ tính chất của nhân. Các tế bào u sắp xếp sát nhau, bào tương hẹp, nhân tế bào không đều, tăng sắc mạnh, có hình nhân chia bất thường (mũi tên) (Hình 3.19).



Hình 3.20. Hình ảnh giải phẫu bệnh tế bào u phổi hoại tử sau tiêm MeV

Nhận xét: U có các ổ hoại tử nhỏ nằm giữa các đám tế bào u và ổ hoại tử lớn ở trung tâm. Ở độ phóng đại cao hơn thấy rõ vùng hoại tử với mảnh vụn tế bào và các nhân đông (mũi tên) (Hình 3.20).

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. Tăng sinh các dòng tế bào Vero và tế bào ung thư phổi người H460 và A549 *in vitro*

Trong quá trình nuôi cấy và tăng sinh tế bào *in vitro*, môi trường luôn phải được đảm bảo vô trùng. Đây là vấn đề quan trọng nhất khi nuôi cấy bất kỳ dòng tế bào nào trong phòng thí nghiệm. Để giảm nguy cơ nhiễm, chúng tôi luôn làm việc trong tủ cấy (Box) hút vô trùng, đảm bảo tất cả các trang thiết bị và dung dịch tiếp xúc với tế bào đều vô trùng. Bổ sung 1% kháng sinh (streptomycin và penicillin) vào môi trường nuôi cấy, kiểm tra tế bào thường xuyên (1-2 ngày/lần) đánh giá quá trình phát triển của tế bào và kịp thời phát hiện tế bào bị nhiễm vi sinh vật, một trong những nguồn lây nhiễm phổ biến nhất là Mycoplasma. Việc nuôi cấy và duy trì tế bào trong môi trường có một lượng kháng sinh thấp là cần thiết, giúp làm giảm nhiễm vi sinh vật, nhất là mycoplasma. Duy trì công tác khử trùng trước khi bắt đầu nuôi cấy tế bào mới từ nguồn tế bào lưu ở tủ âm sâu để tránh bị nhiễm các vi sinh vật.

DMEM là một môi trường nuôi cấy rất phổ biến, một môi trường được sử dụng thành công nuôi cấy tế bào Vero, H460 và A549^{76,85}.

4.1.1. Tăng sinh dòng tế bào Vero

Trong nghiên cứu, chúng tôi sử dụng dòng tế bào Vero để tăng sinh và chuẩn độ virus. Tế bào Vero được nuôi cấy và duy trì trong môi trường DMEM có thêm 10% FBS và 1% kháng sinh (penicillin và streptomycin), lưu trong tủ nuôi cấy tế bào (37°C, 5% CO₂) (Hình 3.3).

Tế bào Vero có nguồn gốc từ loài thỏ nhĩ xanh Châu phi (tên khoa học là *Cercopithecus Aethiops*), được 2 nhà khoa học Yasumura Y và Kawakita Y (Đại học Chiba ở Chiba, Nhật Bản) tìm thấy tế bào Vero năm 1962. Tế bào Vero được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu về virus. Ngoài ra, ở nhiều

nước trên thế giới, tế bào Vero đã được cấp phép dùng để sản xuất các e virus sống như: rotavirus, đậu mùa sởi, quai bị..., Có một số dòng tế bào Vero đều xuất phát từ cùng một nguồn gốc như: Vero, Vero 76, Vero E6.⁸⁵ Để lưu trữ lâu dài, các tế bào Vero được giữ trong nitơ lỏng hoặc ở môi trường -80°C . Sau khi gieo tế bào vào đĩa nuôi cấy từ nguồn lưu trữ, thường lặp lại 2-3 lần gieo thì tế bào mới đạt được tốc độ tăng trưởng bình thường. Đây là vấn đề rất quan trọng cho việc lập kế hoạch sử dụng tế bào trong quá trình nghiên cứu. Cần lưu ý, tế bào Vero là tế bào bám đáy phát triển, không thể nuôi cấy và duy trì được trong hệ thống treo.⁸⁵

4.1.2. Nuôi cấy, tăng sinh dòng tế bào ung thư phổi người H460 và A549

Để đánh giá khả năng MeV kháng tế bào UTP người *in vitro* và khối u phổi người cấy ghép trên chuột nude, chúng tôi sử dụng dòng tế bào UTP người H460 và A549. Các dòng tế bào này được nuôi cấy và duy trì trong môi trường DMEM có thêm 10% FBS và 1% kháng sinh (penicillin và streptomycin), lưu trong tủ ấm 37°C và 5% CO_2 , thay môi trường nuôi cấy mỗi 2 ngày 1 lần, kiểm tra tế bào phát triển thường xuyên 1-2 ngày/lần, khoảng 6-7 ngày thu hoạch tế bào (nếu tế bào phát triển tốt) (hình 3.1 và hình 3.2). Các bước gieo, duy trì và thu hoạch tế bào chúng tôi làm đúng quy trình.⁷⁶

D.J. Giard, và các cộng sự được thiết lập dòng tế bào A549 vào năm 1972, từ mẫu nuôi cấy mô u phổi của một người đàn ông da trắng 58 tuổi. Tế bào A549 là tế bào biểu mô đáy phế nang. Dòng tế bào A549 được phân loại là ung thư biểu mô phổi không phải tế bào nhỏ (NSCLC), có xu hướng ít ác tính hơn và ít lây lan hơn so với ung thư biểu mô phổi tế bào nhỏ (SCLC), nhưng lại là phổ biến hơn. Dòng tế bào A549 được sử dụng rộng rãi làm mô hình ung thư biểu mô tuyến phổi, mô hình A549 CDX là một trong những mô hình UTP cấy ghép trên động vật thí nghiệm được các nhà nghiên cứu sử dụng nhiều nhất, cũng như mô hình *in vitro* cho các nghiên cứu UTP thực

nghiệm. Tế bào này là tế bào gắn kết đơn lớp trong ống nghiệm. Tế bào H460 (NCI-H460) được phân lập vào năm 1982 từ dịch màng phổi của một bệnh nhân nam bị UTP tế bào lớn. Ngày nay, một số lượng lớn các dòng tế bào UTP NSCLC người đang được sử dụng cho cả nghiên cứu cơ bản và nghiên cứu thử nghiệm thuốc. Tuy nhiên, dòng tế bào này đã đáp ứng được đầy đủ các đặc tính của tế bào UTP người, do đó, nó được lựa chọn cho các nghiên cứu đánh giá về UTP người cả *in vitro* và *in vivo*. Hiện nay, tế bào H460 đang được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu đánh giá hiệu quả kháng ung thư của nhiều thuốc khác nhau.

Liên quan đến sự biểu hiện của các thụ thể bề mặt tế bào, tế bào H460 và A549 đã được chứng minh là vẫn giữ nguyên các thụ cảm thể bề mặt như các tế bào ở phổi bình thường. Tế bào H460 và A549 biểu hiện các thụ cảm thể CD46 và Nectin-4 cao. Đây là một đặc trưng của các tế bào này, rất quan trọng cho việc đánh giá hiệu quả ly giải của MeV đối với UTP người, một yếu tố quan trọng nhất để các virus lây nhiễm đặc hiệu.

4.2. Tăng sinh virus vaccine sởi và Chuẩn độ TCID₅₀

MeV được tăng sinh từ nguồn virus vaccine sởi. Đầu tiên, chúng tôi tăng sinh số lượng tế bào Vero. Sau đó, nhiễm virus vaccine sởi vào tế bào Vero để tăng sinh virus. Các tác giả Enders J.F và cộng sự (1949) đã chứng minh rất nhiều virus bao gồm cả virus sởi có thể phát triển ở tế bào Vero nuôi cấy, phương pháp này được thực hiện rộng rãi để tăng sinh các virus.⁸⁶ Nhiều virus vaccine đã được tăng sinh và chọn lọc clone theo phương pháp này như: virus sởi, dại, rubella, quai bị... Vấn đề nhiễm virus ở tế bào nuôi cấy *in vitro* là cách hợp lý để tạo ra các virus. Môi trường thích hợp để duy trì chủng virus là ở 37⁰ C (nhiệt độ bình thường trong tế bào người). Có nhiều dòng tế bào dùng để tạo ra các chủng virus. Tuy nhiên, tế bào Vero là một trong những dòng tế bào được sử dụng nhiều nhất cho sản xuất các virus vaccine sởi.⁸⁷

Chuẩn độ virus là một bước quan trọng trong nghiên cứu virus, tăng sinh số lượng và chuẩn độ virus hay đánh giá một loại thuốc kháng virus. Cách định lượng virus phổ biến nhất là phương pháp chuẩn độ điểm kết thúc 50%, là điểm mà 50% tế bào hoặc động vật thí nghiệm bị nhiễm bệnh chết, hay còn gọi là liều nhiễm 50% mô nuôi cấy (TCID₅₀). Ngoài ra, còn có các phương pháp chuẩn độ virus khác: trực tiếp đếm các mảng tế bào tổn thương nhiễm virus, sử dụng phản ứng PCR, hoặc (RT)–PCR...

Reed L.J và cộng sự (1938) mô tả đầu tiên nghiệm pháp chuẩn độ virus TCID₅₀.⁸⁸ Đến năm 2001, LaBarre D.D và cộng sự đã đưa ra công thức tính TCID₅₀ hoàn chỉnh theo nồng độ pha loãng.⁸⁹ Kết quả của chuẩn độ TCID₅₀ thường dựa trên hiệu ứng bệnh lý tế bào quan sát dưới kính hiển vi thường, nên có độ chính xác không cao, nhiều lỗi chủ quan bao gồm xác định sai hiệu ứng bệnh lý tế bào trong một nồng độ pha loãng và /hoặc giữa các nồng độ pha loãng khác nhau. Ngoài ra, nghiệm pháp TCID₅₀ thông thường không thể sử dụng hiệu ứng bệnh lý tế bào như là một yếu tố định lượng virus và tỷ lệ thuận với độ pha loãng virus. Hơn nữa, có một số tế bào nhiễm virus không hiển thị rõ ràng hiệu ứng bệnh lý tế bào, sẽ bị hạn chế nếu dựa trên quan sát thông thường để đánh giá kết quả chuẩn độ TCID₅₀. Nhiều tác giả đã đề xuất một số giải pháp để cải thiện đánh giá kết quả phương pháp chuẩn độ TCID₅₀ truyền thống, bao gồm việc sử dụng các chất hiển thị màu để dễ dàng phát hiện hiệu ứng bệnh lý tế bào, giảm lỗi chủ quan.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật chuẩn độ virus bằng nghiệm pháp TCID₅₀ có sử dụng xanh methylen là chất hiển màu để đánh giá hiệu ứng bệnh lý tế bào của virus. Việc sử dụng xanh methylen để nhuộm và phát hiện hiệu ứng bệnh lý tế bào của virus trong chuẩn độ TCID₅₀ đã được một số tác giả khác đã sử dụng phương pháp này để chuẩn độ virus có hiệu quả trong nghiên cứu của mình.^{78,90} Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng xanh methylen. Mục đích của việc sử dụng thêm chất hiển màu xanh

methylen là thiết lập một kỹ thuật phát hiện chính xác hơn hiệu ứng bệnh lý tế bào xác định chuẩn độ. Sau thời gian nhiễm virus (4-5 ngày) vào tế bào Vero ở các giếng trên đĩa 96 giếng, chúng tôi cho xanh methylen vào các giếng với nồng độ 1%, để trong tủ ấm 30 phút, tế bào sống (không nhiễm virus) vẫn bám đáy sẽ bắt màu xanh của xanh methylen, các tế bào nhiễm virus bị bong khỏi đáy và nổi lên trên không bắt màu xanh. Sau đó, chúng tôi rửa nhẹ nhàng các giếng trên đĩa 96 giếng bằng nước sạch, tế bào nhiễm virus không bám đáy bị rửa trôi đi (Hình 3.5). Như vậy, sau khi rửa, giếng có màu xanh đậm hơn là giếng có tỉ lệ tế bào sống nhiều hơn. Điều này đã làm cho việc đọc kết quả rõ ràng và khách quan hơn. Tuy nhiên phương pháp này cũng có nhược điểm là quá trình nhuộm xanh methylen nếu để quá lâu, tế bào cũng sẽ bị chết do dung dịch xanh methylen gây độc tế bào, ảnh hưởng đến độ chuẩn xác của nghiệm pháp. Một điểm chú ý nữa là, khi rửa các giếng tế bào đã nhuộm xanh methylen bằng nước sạch, động tác phải nhẹ nhàng không để tế bào sống bong khỏi đáy và phải đọc kết quả ngay.

Cùng như một số tác giả đã nghiên cứu trước đây, để chuẩn độ TCID₅₀ chính xác hơn, trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng lặp lại 10 giếng ở mỗi nồng độ pha loãng của virus, nhóm chứng chúng tôi tăng số giếng lên đến 24 giếng.^{78,90} Thực tế, nghiệm pháp chuẩn độ TCID₅₀ thông thường có tổng sai số chủ quan do đánh giá sai hiệu ứng bệnh lý tế bào tăng lên theo cùng với số lượng giếng thí nghiệm ở mỗi nồng độ pha loãng virus. Một vấn đề nữa, tế bào ở giai đoạn đầu của nhiễm MeV, các tế bào mới chỉ co tròn lại, tách rời nhau và bong khỏi đáy đĩa nuôi cấy rất khó quan sát bằng kính hiển vi thường, dẫn đến kết quả âm tính giả. Việc rửa nhẹ nhàng bằng nước sạch trong nghiệm pháp nhuộm xanh methylen có thể loại bỏ các tế bào nhiễm virus khó quan sát dưới kính hiển vi quang học. Hơn nữa, chúng tôi thực hiện việc so sánh màu giữa giếng nhiễm virus và các giếng chứng sẽ khách quan

hơn, kết quả có độ chính xác hơn, cho thông tin chính xác số lượng virus cần sử dụng trong quá trình thực hiện đề tài nghiên cứu.

4.3. Virus vaccine sợi ly giải tế bào H460 và A540 *in vitro*

4.3.1. Ly giải trực tiếp bằng cách tạo hợp bào *in vitro*

MeV lây nhiễm đặc hiệu tế bào UTP người *in vitro*, do các thụ cảm thể đặc hiệu CD46, Nectin-4 của MeV biểu hiện cao ở tế bào UTP người. Bên cạnh đó chu trình nhân lên của virus có vỏ bọc như MeV đòi hỏi phải có các protease phân cắt glycoprotein của virus tạo điều kiện để virus xâm nhập vào tế bào có hiệu quả. Các protease thích hợp với virus được biểu hiện nhiều ở các tế bào H460 và A549. Số lượng thụ cảm thể đã được chứng minh là yếu tố quan trọng quyết định đến tính lây nhiễm hay hiệu quả lan truyền của virus vào các tế bào u đích. Sử dụng nhiều loại tế bào biểu hiện từ thấp đến cao mức thụ cảm thể CD46, người ta đã xác định khả năng lây nhiễm MeV tăng lên theo số lượng thụ cảm thể. Hợp bào xảy ra ít ở các tế bào biểu hiện mức thụ cảm thể thấp, cần có mức tới hạn thụ cảm thể CD46 để tạo hợp bào và gây ly giải trực tiếp tế bào ung thư nhiều hơn.⁵⁸ Thụ thể CD46, Nectin-4 là các thụ thể đặc hiệu của MeV, các thụ thể này biểu hiện cao trên bề mặt nhiều loại tế bào ung thư bao gồm cả UTP, ung thư đại trực tràng, ung thư đầu mặt cổ... Ngoài ra, acid sialic có nhiều ở bề mặt tế bào ung thư cũng làm cho các OV này lây nhiễm tế bào ung thư có tính chọn lọc cao hơn. Mức độ phong phú của thụ cảm thể xác định tính đặc hiệu và hiệu quả lây nhiễm của virus vào tế bào ung thư. Tính đặc hiệu của OV đối với tế bào ung thư còn xảy ra ở mức nội bào sau khi virus xâm nhập vào tế bào, các virus có thể tận dụng được các yếu tố do khiếm khuyết gen như: giảm cảm ứng interferon, kích hoạt Ras, p53, Rb..., các yếu tố này chỉ có duy nhất ở các tế bào ung thư, làm cho OV tăng tính chọn lọc các tế bào khối u mà hầu như không xảy ra ở các tế bào bình thường. Trong khi đó, nhiều tài liệu cho thấy virus ly giải tế bào ung thư còn có khả năng tận dụng được những khiếm khuyết gen trong tế bào u để

khuyết đại bộ gen của chúng và tăng biểu hiện bộ gen đó. Phạm vi và mức độ mà MeV tận dụng con đường khiếm khuyết gen để ly giải tế bào ung thư vẫn chưa rõ ràng. Vấn đề này cần có nhiều nghiên cứu đánh giá sâu rộng hơn nữa. Tuy nhiên, đã có nhiều nghiên cứu chứng minh MeV có hiệu quả kháng ung thư *in vivo* và cả trên lâm sàng.^{78,80,91}

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã cho thấy chủng virus vaccine sởi (MeV) gây độc tế bào H460 và A549 có hiệu quả và gây ra một hiệu ứng bệnh lý tế bào rõ ràng ở thời điểm nhiễm virus 3-6 ngày *in vitro*, rõ nhất là ở thời điểm ngày thứ 4-6 sau nhiễm, các tế bào nhiễm MeV tạo hợp bào lan rộng (hình 3.6). Hiệu ứng gây độc tế bào của MeV bắt đầu sau khi protein bám dính H tương tác với thụ cảm thể của nó trên các tế bào đích. Sự tương tác này thúc đẩy thay đổi hình dạng trong protein hợp bào của virus, điều này dẫn đến hợp nhất màng tế bào và màng virus, làm cho virus đi vào trong tế bào. Protein H và của virus tương tác với các thụ cảm thể trên màng các tế bào lân cận và kích hoạt quá trình hợp màng giữa tế bào nhiễm virus và các tế bào xung quanh. Sự lan truyền hợp màng giữa các tế bào nhiễm virus và tế bào u lân cận không nhiễm virus hình thành một tế bào khổng lồ gọi là hợp bào, hợp bào thường chết sau vài ngày.^{58,92}

E-H Lin và cộng sự (2009) cũng đã chứng minh protein hợp màng F của virus tạo ra hợp vào và ly giải tế bào UTP người *in vitro*.⁹³ Patel M.R. và cộng sự (2014) cũng đã chứng minh chủng virus vaccine sởi ly giải tế bào UTP người *in vitro*, tác giả sử dụng kính hiển vi huỳnh quang quan sát thấy MeV trực tiếp ly giải tế bào UTP qua hình thành hợp bào.⁵¹ Xia, Mao và cộng sự (2020), cũng chứng minh MeV ly giải trực tiếp tế bào UTP người *in vitro* bằng cách hình thành hợp bào *in vitro*.⁹⁴ Nghiên cứu của Lê Duy Cương (2019) cho thấy MeV ly giải trực tiếp tế bào ung thư đại tràng người HT-29 bằng cách tạo hợp bào quan sát rất rõ trên kính hiển vi quang học thông thường, ở ngày thứ 3-5 nhiễm MeV.⁷⁸ Nghiên cứu của Ngô Thu Hằng (2020)

cũng cho thấy MeV ly giải tế bào ung thư đầu mặt cổ qua con đường tạo hợp bào.⁹⁰ Điều này khẳng định MeV lây nhiễm đặc hiệu các tế bào biểu hiện quá mức thụ thể CD46 và Nectin-4 và ly giải trực tiếp chúng bằng cách tạo hợp bào.

Sự nhân lên của virus MeV và sự biểu hiện protein F hợp bào gây ly giải tế bào u thông qua hình thành hợp bào, sự ly giải này đã được quan sát thấy *in vivo* ở một số tế bào ung thư người, bao gồm các khối u ác tính về huyết học như ung thư hạch, u tủy, cũng như các khối u rắn, như ung thư buồng trứng, u nguyên bào thần kinh đệm, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư vú, ung thư cổ tử cung và ung thư dạ dày.⁶²

4.3.2. Đánh giá hiệu quả của virus vaccine sởi ly giải tế bào H460 và A549 bằng nghiệm pháp MTT

Đến nay, nhiều nghiên cứu đã sử dụng nghiệm pháp MTT để đánh giá hiệu quả của virus gây ly giải tế bào ung thư *in vitro*. Với đề tài này, chúng tôi cũng sử dụng nghiệm pháp MTT đánh giá tỉ lệ tế bào H460 và A549 chết *in vitro* sau nhiễm virus vaccine sởi ở các thời điểm ngày thứ 3 và 4. Để tăng thêm độ chính xác nghiệm pháp, chúng tôi pha loãng nồng độ của virus thành 1 MOI và 0,1 MOI. Kết quả cho thấy, tỉ lệ tế bào H460 và A549 sống ở hai nhóm nhiễm MeV (nhóm nhiễm MeV liều 1 MOI và 0.1 MOI) đều thấp hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nhóm chứng. Ở cả hai dòng tế bào A549 và H460 nhiễm MeV cho đều thấy tỉ lệ tế bào sống của nhóm nhiễm MeV liều cao hơn (1 MOI) thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm nhiễm MeV liều thấp hơn (0,1 MOI). Kết quả còn cho thấy tỉ lệ tế bào sống giảm theo thời gian nhiễm MeV, tỷ lệ tế bào sống ở thời điểm nhiễm 4 ngày đều thấp hơn đáng kể so với thời điểm 3 ngày ở cả hai nồng độ 1 MOI và 0,1 MOI. Nồng độ nhiễm MeV càng cao thì tỷ lệ tế bào sống càng giảm rõ rệt.

Nhiều tác giả cũng đã sử dụng nghiệm pháp MTT trong nghiên cứu đánh giá khả năng ly giải tế bào ung thư của virus e, kết quả của Zhao D và

cộng sự (2013), nghiên cứu virus vaccine sởi kháng tế bào UTP *in vitro*, nghiệm pháp MTT đã chứng minh MeV gây chết tế bào A549 và LLC lần lượt là 60% và 62%, trong khi đó MeV gây chết tế bào 293T chỉ là 31%.⁶⁶ Kết quả của Yan Y và cộng sự (2015), sử dụng nghiệm pháp MTT đánh giá khả năng gây chết tế bào A549 của virus NDV tái tổ hợp rL-RVG và hoang dại, kết quả cho thấy tỉ lệ tế bào sống ở nhóm nhiễm rL-RVG thấp hơn đáng kể so với nhóm nhiễm NDV hoang dại và tỷ lệ ức chế tế bào sống tăng theo thời gian nhiễm 24, 48, 72 giờ (nồng độ virus từ 10^{-3} - 10^{-6}).⁹⁵ Nghiên cứu của Lê Duy cương và cộng sự (2019), sử dụng nghiệm pháp MTT cũng cho thấy MeV gây chết tế bào ung thư đại tràng người HT-29 theo cả nồng độ virus (10^{-2} đến 10^{-8}) và thời gian nhiễm (ngày thứ 3,4 và 5).⁷⁸

Như vậy, nghiệm pháp MTT có thể coi đó là một trong những cách tiếp cận có giá trị trong nghiên cứu virus ly giải tế bào ung thư *in vitro*. Kết quả tỉ lệ tế bào UTP A549 và H460 sống sau nhiễm MeV bằng nghiệm pháp MTT của chúng tôi đã khẳng định thêm hiệu quả kháng tế bào UTP người *in vitro* của MeV.

4.3.3. MeV gây chết tế bào apoptosis dòng tế bào ung thư phổi H460 và A549 invitro

Apoptosis là một quá trình sinh lý quan trọng để bảo vệ cơ thể chống nhiễm trùng, các cytokine và interferon được tế bào sản xuất ra chống lại quá trình nhiễm virus, các chất này có thể kích hoạt con đường dẫn đến apoptosis. Apoptosis cung làm cho các sinh vật có khả năng đào thải virus bằng cách loại bỏ các tế bào đã bị nhiễm. Tuy nhiên, mỗi loại virus khác nhau lại có các chiến lược khác nhau, chúng có thể chống lại con đường apoptosis để kéo dài sự nhiễm trùng ở tế bào vật chủ hay kích thích con đường apoptosis để tăng khả năng lây lan giữa các tế bào. Nhiều thành viên virus của Paramyxoviridae đã được chứng minh gây ra apoptosis ở các tế bào ung thư. MeV kích thích con đường apoptosis trong các tế bào nó lây nhiễm, apoptosis tạo điều kiện

giải phóng các hạt virus từ các tế bào bị nhiễm bệnh làm tăng khả năng lây lan sang các tế bào lân cận. Người ta cũng chưa biết rõ ràng cơ chế kích hoạt con đường tế bào chết theo chương trình của MeV. Bhaskar A và cộng sự (2011) đã chứng minh rằng nucleoprotein của virus sởi gây chết tế bào apoptosis phụ thuộc vào các gốc oxy hóa và kích hoạt caspase-3. Nucleoprotein của virus sởi biểu hiện nhiều trong quá trình virus xâm nhập vào trong tế bào và chúng mang theo cả virion của virus. Trong quá trình nhân lên của virus sởi, chất này tiếp xúc và tương tác với nhiều protein nội bào, ảnh hưởng chức năng nội bào và tạo ra quá trình apoptosis và trực tiếp tối ưu hóa sự lây lan của virus. Sự thay đổi về mức độ biểu hiện của nhiều protein liên quan đến điều chỉnh các gốc oxy hóa và quá trình apoptosis bao gồm Cofilin, eIF5A, GST, GAPDH, PRDXs, Hsp70, PARK7, PHB và PA2G4... Các protein này điều chỉnh gen Beta actin (Beta actin còn được xem như là control house keeping gene) ở nội bào và kích hoạt quá trình apoptosis.⁹⁶

Chúng tôi đã sử dụng phương pháp đếm tế bào qua dòng chảy (flow cytometry) để đánh giá tỉ lệ tế bào H460 và A549 chết theo chương trình *in vitro*. Kết quả đã chứng minh MeV có khả năng ly giải tế bào H460 và A549 *in vitro* qua trung gian kích hoạt con đường tế bào chết theo chương trình ở tất cả các thời điểm nghiên cứu, từ ngày thứ 3 tăng dần đến ngày thứ 4, 5. Tỉ lệ tế bào chết theo chương trình, chết theo chương trình giai đoạn sớm, muộn sau nhiễm MeV của tế bào H460 và A549 tăng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nhóm chứng.

Đã có nhiều nghiên cứu trước đây chứng minh MeV gây ra tế bào chết theo chương trình ở nhiều loại tế bào ung thư khác nhau như: MeV có thể tạo ra apoptosis trong các tế bào ung thư đại trực tràng,⁷⁸ MeV đã được chứng minh là làm tăng tế bào chết theo chương trình ở tế bào ung thư buồng trứng,⁹⁷ ung thư thanh quản.⁹⁰ Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với kết quả của nghiên cứu của Zhao D và cộng sự (2013) cũng đã nghiên cứu

và chứng minh virus sởi sống, giảm độc lực có khả năng kháng tế bào UTP bằng cách kích hoạt con đường apoptosis trong tế bào ung thư.⁶⁶ Các tác giả cho rằng, cơ chế mà MeV gây ra quá trình apoptosis của tế bào ung thư có thể liên quan đến sự nhân lên của virus. Đây tính năng sao chép của virus cung cấp sự khuếch đại liên tục hiệu quả ly giải tế bào ung thư. Tuy nhiên, nghiên cứu này khác nghiên cứu của chúng tôi về thời điểm đánh giá kết quả (ngày thứ 2, 3 và 4 sau nhiễm virus). Điều này càng chứng minh vấn đề là tác dụng ly giải dòng tế bào H460 và A549 của MeV bắt đầu vào ngày thứ 2 tăng dần đến ngày thứ 5 nhiễm virus, phù hợp với kết quả quan sát tế bào H460 và A549 nhiễm virus *in vitro* của chúng tôi (đã đề cập ở mục 3.3.1 phần kết quả nghiên cứu). Nghiên cứu của Patel M.R và cộng sự (2014) về liệu pháp chủng virus vaccine sởi điều trị UTP không tế bào nhỏ, cũng đã chứng minh MeV ly giải tế bào UTP không tế bào nhỏ bằng cách tạo ra chết tế bào apoptosis từ ngày thứ 2-4 nhiễm virus.⁵¹

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng đồng nhất với một số nghiên cứu khác về quá trình apoptosis được quan sát thấy ở giai đoạn tương đối muộn sau khi nhiễm OV (ở ngày thứ 3, 4 và 5 nhiễm OV).⁷⁸ Một nghiên cứu sử dụng phương pháp phát hiện đoạn gãy của chuỗi DNA kép trong quá trình apoptosis bằng cách đánh dấu đầu 3'-hydroxyl tận của đoạn DNA kép bị gãy, (phương pháp TUNEL), đã cho thấy hơn 70% các tế bào u thần kinh đệm từ ngày thứ 4 sau nhiễm OV, ngày thứ 3 chúng bắt đầu hình thành hợp bào nhưng chưa phát hiện thấy tế bào chết apoptosis.⁹⁸ Đến ngày thứ 4 nhiễm virus, tác giả mới phát hiện tế bào chết apoptosis. Ngày thứ 6 nhiễm virus, kết quả cho thấy tế bào chết theo chương trình rõ nhất Liu C và cộng sự (2007) cũng nghiên cứu sử dụng phương pháp TUNEL, phát hiện mảnh vỡ DNA trong quá trình apoptossis và xét nghiệm Western plot để đánh giá hoạt động của caspase-8, caspase-9, caspase-3 ở các ngày 2, 4, 6 sau nhiễm virus, tác giả đã thấy có một lượng lớn tế bào chết do cơ chế khác trước khi con đường tế

bào chết theo chương trình được kích hoạt, hoạt hóa caspase và chất nền apoptosis bị phân cắt vào ngày thứ 4 và thứ 6 sau khi nhiễm OV.⁹⁹ Do đó, cần có nhiều nghiên cứu sâu và rộng hơn đánh giá tế bào chết apoptosis ở thời điểm muộn hơn ngày thứ 2 nhiễm virus, cũng như các cơ chế giết chết tế bào ung thư ngoài con đường kích hoạt tế bào chết apoptosis.

4.4. Virus vaccine sởi kháng u tế bào ung thư phổi người H460 cấy ghép trên chuột thiếu hụt miễn dịch

4.4.1. Đánh giá độc tính của virus vaccine sởi điều trị chuột thiếu hụt miễn dịch mang khối u tế bào ung thư phổi người H460

Chúng tôi theo dõi độc tính của MeV trên chuột nude mang khối u từ ngay sau khi tiêm. Độc tính được đánh giá bằng những thay đổi về trọng lượng cơ thể và các chỉ số theo dõi ở Bảng 3.5. Trọng lượng của chuột nude ở các nhóm nghiên cứu trong quá trình điều trị MeV hầu như không thay đổi, trọng lượng giảm nhẹ sau 2-3 tuần tiêm, biến đổi nhiều hơn cả là ở nhóm chứng (không có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$). Cùng với đó là các chỉ số đánh giá sức khỏe của chuột đồng đều nhau giữa nhóm điều trị MeV và nhóm chứng (Bảng 3.5). Điều này cho thấy, MeV không gây độc toàn thân ở chuột nude mang khối u tế bào H460. Nghiên cứu của chúng tôi đã sử dụng MeV với liều 10^7 PFU để điều trị cho chuột nude mang khối u tế bào H460, liều này cao gấp 10^3 lần so với liều thông thường (10^3 đến 10^4 PFU) được sử dụng để tiêm chủng. Ngoài ra, theo dõi sức khỏe chuột trong quá trình điều trị, chúng tôi đã loại trừ được các nguyên nhân bệnh lý khác mà không phải do u to gây chết chuột. Điều này làm kết quả tính toán, đánh giá hiệu quả điều trị MuV thông qua chỉ số tỉ lệ chuột sống, chết và số ngày sống của chuột ở các nhóm có độ tin cậy và khách quan hơn.

Các chương trình tiêm chủng với quy mô lớn bằng vaccine virus sởi sống, giảm độc lực đã rất thành công, với hồ sơ sử dụng an toàn rộng khắp thế giới với hàng triệu trẻ em trong nhiều thập kỷ qua. Bên cạnh đó, hầu hết các

nguyên cứu lâm sàng và tiền lâm sàng trước đây sử dụng MeV chủng Edmonston, điều trị ung thư đã chứng minh là rất an toàn về độc tính. Hơn nữa, chưa bao giờ có báo cáo là sự đảo ngược của các chủng virus sởi thành virus có khả năng gây bệnh.⁷⁴ Các thử nghiệm lâm sàng sử dụng virus này bằng cách tiêm nội u hay tiêm tĩnh mạch điều trị cho những bệnh nhân bị u lympho tế bào T dưới da,¹⁰⁰ ung thư buồng trứng,⁹⁷ hoặc các loại ung thư khác, đã báo cáo với liều tới 10^7 - 10^9 PFU, nhưng vẫn không có độc tính đáng kể. Các chủng Edmonston của MeV rất khó gây bệnh trở lại vì hầu hết mọi người đều đã được chủng ngừa. Chúng ta đã có rất nhiều kinh nghiệm sử dụng đơn hoặc phối hợp virus vaccine trong chương trình chủng ngừa bệnh sởi với hồ sơ an toàn rất cao của loại virus này trên hàng triệu trẻ em. Tuy nhiên, cần có những nghiên cứu lớn hơn đánh giá tác dụng phụ và độc tính của các virus này khi dùng liều cao điều trị ung thư ở người.

4.4.2. Virus vaccine Sởi kháng u tế bào ung thư phổi người H460 trên chuột thiếu hụt miễn dịch

Trong nghiên cứu này, để đánh giá hiệu quả MeV ly giải tế bào UTP người dòng H460 trên chuột nude, chúng tôi đã ghép u tế bào H460 ngay dưới da đùi chuột nude, phù hợp cho liệu pháp điều trị tiêm MeV nội u, tăng cường khả năng virus tiếp xúc và xâm nhập trực tiếp vào khối u. Kết quả cho thấy u xuất hiện bắt đầu vào ngày thứ 4 sau tiêm (12/20), đến ngày thứ 7 thì có 20/20 con chuột đều có u (Bảng 3.4), (Hình 3.13). Vùng da tại chỗ tiêm bình thường, không có biểu hiện viêm loét hay hoại tử. Sau khi tiêm 12 ngày, u phát triển tại vị trí dưới da đùi của 20 chuột nude, chúng tôi tiến hành điều trị bằng MeV theo phác đồ và liều lượng (nhóm MeV: 10^7 CFU/lần/con x 2 lần/1tuần và nhóm control tiêm PBS 1X/1 lần/ con x 2 lần/tuần; cho đến kết thúc thí nghiệm 3 tuần). Bên cạnh đó, chúng tôi theo dõi sức khỏe chuột trong suốt quá trình điều trị. Kết quả cho thấy các chuột sau ghép u tế bào H460 và trong quá trình điều trị bằng MeV đều có các chỉ số đánh giá sức khỏe bình

thường (Bảng 3.4). Các nhóm chuột có trọng lượng tương đồng nhau (khác biệt không có nghĩa thống kê $p > 0,05$). Theo dõi trong quá trình điều trị: chúng tôi thấy trước khi điều trị sự khác biệt về kích thước u giữa nhóm chứng và nhóm điều trị MeV không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) (Biểu đồ 3.12A). Một số nghiên cứu khác như nghiên cứu của Lê Duy Cương (2019), nghiên cứu liệu pháp OV sử dụng MeV phối hợp với virus vaccine quai bị kháng tế bào ung thư đại trực tràng người trên thực nghiệm cho thấy trọng lượng chuột cũng không thay đổi trong quá trình điều trị.⁷⁸ Nghiên cứu của Ngô Thu Hằng và cộng sự (2020), đánh giá hiệu quả kháng u tế bào thanh quản người của MeV phối hợp với nimotuzumab trên thực nghiệm cũng cho thấy trọng lượng chuột mang khối ung thư không thay đổi trong quá trình điều trị.⁹⁰

Nghiên cứu của chúng tôi đã chứng minh MeV có tác dụng làm chậm phát triển khối u tế bào H460 ghép trên đùi chuột nude có ý nghĩa thống kê so với nhóm không điều trị MeV ($p < 0,05$). Hiệu quả là chậm phát triển khối u bắt đầu vào ngày thứ 4 sau tiêm. Thời gian sống trung bình của nhóm điều trị MeV dài hơn và số chuột còn sống nhiều hơn có nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nhóm chứng (Biểu đồ 3.12B). Khả năng virus lây lan tạo ra hoạt động kháng u là do virus xâm nhập trực tiếp và nhân lên trong tế bào u đích. Thực tế, hầu hết các khối u được điều trị bằng MeV đã cho thấy giảm sự phát triển kích thước.

Kết quả của chúng tôi phù hợp với các kết quả nghiên cứu của Patel M.R và cộng sự (2014), nghiên cứu hiệu quả kháng UTP tế bào nhỏ của virus vaccine sởi trên thực nghiệm, kết quả cho thấy MeV với liều $84, \times 10^5$ MeV-VEA 2lần/tuần, trong 3 tuần, có tác dụng kháng u tế bào UTP không tế bào nhỏ người cấy ghép trên mô hình chuột nude.⁵¹ Fujiyuki T và cộng sự (2015) nghiên cứu MeV hoạt hóa phân tử kích hoạt tế bào lympho kháng u phối hợp người, kết quả chứng minh MeV với liều 10^6 TCID₅₀, rất có hiệu quả kháng tế

bào UTP người trên chuột nude.⁵³ Bên cạnh đó, việc phân chia liều lượng, với liều 10^7 PFU và liệu trình điều trị như vậy là cần thiết để tăng khả năng ly giải tế bào u của virus, nhiều tác giả cũng đã sử dụng liều lượng và liệu trình điều trị này của MeV điều trị ung thư có hiệu quả^{78,90,92}. Chúng tôi cũng đã quan sát thấy tiêm nội u tạo ra lây nhiễm sớm virus vào các tế bào khối u và lây lan virus chỉ giới hạn trong khối u, điều này đã làm tăng khả năng ly giải tế bào khối u. Kết quả của chúng tôi cũng cố thêm tiêm virus nội u nhiều lần hiệu quả hơn so với tiêm tổng liều duy nhất.^{78,90} Kết quả này rất có giá trị làm nền tảng cho sử dụng MeV tiêm nội u điều trị ung thư cho thử nghiệm lâm sàng trong tương lai. Tuy nhiên, cần có các nghiên cứu quy mô lớn đánh giá liệu điều trị MeV thích hợp, tiến tới phát triển các thử nghiệm lâm sàng trong tương lai.

Nhiều thử nghiệm đánh giá khả năng MeV kháng ung thư người trên lâm sàng như: thử nghiệm lâm sàng giai đoạn I của Heinzerling L và cộng sự (2005) nghiên cứu MeV chủng Edmonston-Zagreb kháng ung thư trên những bệnh nhân bị u tế bào lympho T ở da.¹⁰⁰ Nghiên cứu này cho thấy tiêm MeV vào nội u sau khi điều trị hệ thống bằng IFN-a (để tránh nhiễm trùng MeV trong các tế bào khỏe mạnh miễn cảm với IFN-a) gây ra nhiễm trùng tại chỗ, một hiệu ứng ly giải tế bào đặc trưng của MeV trên các tế bào khối u và MeV không bị loại bỏ bởi sự hiện diện của các kháng thể kháng MeV có từ trước. Kết quả nghiên cứu cho thấy MeV làm thoái triển các khối u. Trong nghiên cứu lâm sàng giai đoạn I, tác giả Galanis E và cộng sự (2013) sử dụng chủng virus sởi là MeV-CEA điều trị bệnh nhân ung thư buồng trứng tái phát, MeV chủng Edmonston biến đổi gen sản xuất kháng nguyên tiền ung thư (CEA), một marker hòa tan để nhận biết, theo dõi sự nhân lên của MeV qua liều lượng kháng nguyên CEA đo được trong huyết thanh. Tác giả đã tăng liều điều trị cho bệnh nhân đã được chủng ngừa bệnh sởi trước đó nhưng vẫn đảm bảo sự an toàn cho cuộc thử nghiệm. Liều dao động 10^3 - 10^9 TCID₅₀,

vẫn chưa thấy giới hạn liều độc tính. Kết quả cho thấy có đáp ứng lâm sàng trong 14/21 bệnh nhân với bệnh ổn định trong thời gian trung bình 92,5 ngày. Sự ổn định của bệnh có liên quan đến sự suy giảm của các marker đặc hiệu khối u CEA ở bệnh nhân. Thời gian sống trung bình của các bệnh nhân được điều trị bằng MeV-CEA là 12,15 tháng gấp đôi so với thời gian sống trung bình của bệnh nhân ở nhóm chứng (6 tháng).⁹¹ Những kết quả này đã làm nổi bật tiềm năng đầy hứa hẹn của liệu pháp OV sử dụng MeV biến đổi gen ở bệnh nhân ung thư.

Mô hình khối u, chủng virus và liều lượng cũng như thời gian phân tích có thể tạo ra sự khác biệt giữa các nghiên cứu. Về vấn đề này, một nghiên cứu có hệ thống so sánh một số mô hình khối u trong các điều kiện tương tự có thể làm sáng tỏ các cơ chế điều chỉnh sự chết của tế bào khối u sau khi nhiễm các chủng MeV. Một số nghiên cứu tiền lâm sàng đã đề cập đến các yếu tố tế bào liên quan đến hiệu quả của sự chết tế bào khối u qua trung gian bệnh sỏi.

4.4.3. Virus vaccine sỏi kích thích miễn dịch đặc hiệu kháng u tế bào ung thư phổi người H460 trên chuột thiếu hụt miễn dịch

Các chủng MeV rất nhạy cảm với IFN, tuy nhiên, các protein P, V và C phi cấu trúc của các MeV gây bệnh là các chất đối kháng IFN mạnh. Các chủng vắc xin MeV khác nhau, bao gồm Moraten/Schwarz, Edmonston-Zagreb, Hu191 và Edmonston B (Edm) khác nhau về trình tự P, V và C của chúng. Cho đến nay, chưa có bằng chứng nghiên cứu về cách những khác biệt này ảnh hưởng đến liệu pháp OV của MeV. MeV làm trung gian các hiệu ứng kháng khối u không chỉ ở cấp độ tế bào do nhiễm virus ly giải của các tế bào khối u, mà còn ở cấp độ hệ thống bằng cách tạo ra các phản ứng miễn dịch chống khối u.

MeV có khả năng kích thích tăng sinh đáp ứng miễn dịch đặc hiệu kháng tế bào ung thư, tăng cường khả năng ly giải tế bào u qua trung gian miễn dịch, 1 đặc tính quan trọng của MeV tăng cường hiệu quả kháng ung

thư. Nghiên cứu của chúng tôi tập trung vào đánh giá khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch của MeV trên chuột nude bằng cách tiêm trực tiếp MeV theo một liệu trình điều trị với liều 10^7 CFU/lần, 2lần/tuần, 3 tuần vào khối u trên đuôi chuột nude, đánh giá tỉ lệ các tế bào đại thực bào, tế bào NK, tế bào DC và tế bào DC trưởng thành ở khối u chuột, đây là những tế bào có vai trò rất quan trọng trong đáp ứng miễn dịch cả tự nhiên và thích ứng chống lại tế bào u. Kết quả đánh giá quần thể tế bào miễn dịch tách từ mô chuột cho thấy tỉ lệ tế bào bạch cầu dòng tủy, tế bào NK, tế bào DC và tế bào DC trưởng thành ở nhóm điều trị MeV (lần lượt là $47,18 \pm 2,44\%$; $27,92 \pm 4,20\%$; $13,45 \pm 3,26\%$; $8,95 \pm 2,68\%$) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng (lần lượt là $11,18 \pm 3,23\%$; $21,9 \pm 2,05\%$; $4,18 \pm 1,06\%$; $3,73 \pm 2,50\%$).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kháng thể kháng CD11b, CD11c, CD49b và CD197 (CCR7) để phát hiện lần lượt các tế bào miễn dịch của chuột là: tế bào bạch cầu dòng tủy, tế bào DC, tế bào NK và tế bào DC trưởng thành. Đây là các tế bào hệ miễn dịch bẩm sinh, chúng có vai trò rất quan trọng trong quá trình đáp ứng miễn dịch chống ung thư. Có thể nói CD11b, CD11c, CD49b và CD197 (CCR7) là kháng nguyên đặc hiệu lần lượt cho các tế bào bạch cầu dòng tủy bao gồm cả đại thực bào, tế bào DC, tế bào NK ở chuột. Ohtsui M và cộng sự (2018) đã sử dụng chất kháng kháng nguyên CD11b ở tế bào dòng tủy của chuột, kết quả cho thấy các chất này đã làm giảm tỉ lệ tế bào bạch cầu dòng tủy ở máu ngoại vi, giảm di cư tế bào bạch cầu dòng tủy có kháng nguyên CD11b vào tổ chức viêm.¹⁰¹ Ahn J.O và cộng sự (2008) đã sử dụng kháng thể kháng CD11b có gắn huỳnh quang phát hiện các tế bào bạch cầu dòng tủy chuột như: tế bào bạch cầu đơn nhân, đại thực bào; kháng thể kháng CD11c phát hiện tế bào DC và kháng thể kháng CD49b phát hiện tế bào NK của chuột.¹⁰² Stenström M và cộng sự (2004) đã sử dụng kháng thể kháng CD49b để phát hiện tế bào NK xâm nhập vào khối u trong nghiên cứu đánh giá đáp ứng miễn dịch kháng u cấy ghép trên chuột thiếu hụt

miễn dịch.¹⁰³ Nhóm nghiên cứu của Holst K và cộng sự (2015) cũng đã sử dụng kháng thể kháng CD11c và CD197 (CCR7) để phát hiện tế bào DC và DC trưởng thành của chuột trong nghiên cứu đánh giá thụ cảm thể serotonin 5-HT7R điều hòa các đặc tính hình thái và di cư của tế bào DC.¹⁰⁴

Một số nghiên cứu cho thấy DC có thể trở thành chất gây độc tế bào sau khi bị kích thích bởi virus, đặc biệt là virus RNA, hoặc bởi các chất chủ vận TLR khác nhau.¹⁰⁵ Hiện tượng này đã được mô tả rõ ràng hơn đối với tập con tế bào pDC. Trong nghiên cứu của Achard C và cộng sự (2017) đã chỉ ra rằng MeV gây ra biểu hiện protein liên quan đến phân tử Tumor necrofactor (TNF-related apoptosis-inducing ligand:TRAIL), thúc đẩy quá trình apoptosis. TRAIL pro-apoptotic trên các tế bào DC tủy và pDC CD11c dòng máu người. Tác giả cũng xác định rằng MeV kích hoạt pDC bài tiết ra một lượng lớn IFN- α , còn các DC CD11c bị kích hoạt tiết ra cytokine này với số lượng nhỏ hơn. Sau đó, bằng cách sử dụng chất ức chế tín hiệu JAK 1 và 2 Ruxolitinib, các tác giả đã chứng minh IFN- α được tiết ra bởi DC để phản ứng với MeV có liên quan đến TRAIL.⁶³ Cuối cùng, tác giả đã chỉ ra rằng tế bào DC tiết IFN- α và biểu hiện TRAIL tiếp theo được kích hoạt bởi sự nhận diện MeV của các RLR trong các DC CD11c, ở các tế bào pDC thì nhận diện MeV bằng cả hai đường dẫn tín hiệu RLR và TLR7. Tác giả kết luận rằng DC được kích hoạt bởi nhiễm MeV để thành DC trưởng thành có vai trò quan trọng trong kích thích hệ miễn dịch ly giải tế bào u. Một số nghiên cứu đã được thực hiện để xác định những PRR nào liên quan đến việc nhận diện virus RNA và Các con đường tín hiệu sau đó được kích hoạt trong các DC dòng máu và dòng tủy. Các thử nghiệm đã thực hiện bằng cách sử dụng DC từ những con chuột thiếu các thành phần khác nhau của con đường RLR như RIG-I, TBK-1 và IKK-e hoặc MAVS, và từ những con chuột thiếu TLR7 hoặc MyD88, có liên quan đến con đường tín hiệu TLR7. Nhìn chung, các

ngiên cứu này đều cho rằng tế bào DC sử dụng con đường RLR để nhận diện và phản ứng với virus RNA.

Trong nghiên cứu của Guillerme J.B và cộng sự (2013) đã mô tả, liệu pháp điều trị MeV kháng khối u dựa trên các chức năng pDC người. tác giả cũng chứng minh các tế bào pDC có thể phát hiện MeV bằng cách sản xuất IFN-a chẳng hạn như IL-3.⁶⁴ Tác giả cũng chỉ ra rằng, khi pDC được nuôi cấy chung với các tế bào khối u bị nhiễm MeV, chúng trải qua quá trình trưởng thành được đặc trưng bởi sự cảm ứng của biểu hiện CD83 và sản xuất mạnh mẽ IFN-a, với sự biểu hiện tăng nhẹ của các phân tử đồng kích thích. Ngược lại, pDC được nuôi cấy với các tế bào khối u bị chiếu xạ UV thì vẫn giữ kiểu hình chưa trưởng thành tương tự như kiểu hình quan sát được khi chúng được nuôi cấy với IL-3 một mình. Sau đó, chúng tôi xác định TLR7 là thụ thể pDC chịu trách nhiệm kích hoạt chúng, có thể do sự hiện diện của RNA virus sợi đơn trong ngăn nội bào của pDC sau khi nội bào hóa của các mảnh tế bào khối u bị nhiễm MeV. Như vậy, kết quả này cho thấy liệu pháp điều trị MeV kháng khối u ngoài MeV ly giải trực tiếp các tế bào khối u bị nhiễm virus, MeV có thể hoạt hóa tế bào pDC trong phản ứng miễn dịch kháng khối u.

Thực tế, các nghiên cứu trước đây đã chứng minh nhiễm MeV làm tăng tỉ lệ tế bào bạch cầu dòng tủy và tăng hiệu quả ly giải tế bào ung thư thông qua cơ chế tăng cường đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào.¹⁰⁶ Donnelly O.G và cộng sự (2013) cũng đã chứng minh các tế bào u hắc tố da bị nhiễm MeV thúc đẩy tế bào DC trưởng thành và tăng đáp ứng ly giải tế bào ung thư.¹⁰⁷ Hơn nữa, các nhà nghiên cứu cũng đã xác định các yếu tố kích thích miễn dịch được hoạt hóa trong quá trình ly giải tế bào ung thư qua trung gian miễn dịch. Một nghiên cứu đã tiến hành nuôi cấy tế bào DC cùng với các tế bào u hắc tố da nhiễm MeV, kết quả cho thấy tế bào DC kích hoạt tế bào lympho T gây độc và tiêu diệt tế bào u hắc tố. Các nhà khoa học cũng đã chứng minh các tế bào nhiễm MeV giải phóng protein HMGB1 và nhiều

cytokine viêm như: IFN loại I (IFN- α và IFN- β), IL-6, IL-8, RANTES, IL-28. Tế bào DC dòng máu là một dạng khác của tế bào DC, một dòng tế bào chuyên về đáp ứng miễn dịch kháng virus. Nhiều bằng chứng đã cho thấy kích thích tăng sinh dòng tế bào DC này sẽ tăng hiệu quả ly giải tế bào ung thư, vì các tế bào DC này có thể gây ra phản ứng miễn dịch thông qua sản xuất IFN loại I và trình diện kháng nguyên cho các tế bào lympho T trực tiếp tham gia hoạt động ly giải tế bào ung thư.^{108,109}

Kết quả nghiên cứu *in vitro* của Guillerme J.B và cộng sự (2013) cũng đã chứng minh nhiễm MeV với liều 1.MOI và không có IL-3, gây ly giải tế bào DC dòng máu tới 100% sau 72 giờ *in vitro*, trong khi đó nhiễm MeV liều 50.MOI cộng thêm với IL-3 mới tạo ra DC trưởng thành.⁶⁴ Kết quả này cũng đã ủng hộ cho giả thuyết là ở liều nhiễm virus rất cao có thể mới tạo ra tín hiệu kích thích tế bào DC trưởng thành trước khi đáp ứng tế bào chết theo chương trình (apoptosis). Do đó, từ các kết quả nghiên cứu, chúng tôi đề nghị với liều tiêm virus là 10^7 PFU/chuột nude, đã đủ để kích thích tế bào DC trưởng thành.

Nhiều nghiên cứu cũng đã chứng minh vấn đề này MeV có khả năng kích thích tế bào lympho T đặc hiệu kháng tế bào ung thư. Nghiên cứu của C. Grossardt và cộng sự (2013) cho thấy các khối u bào MC38cea được điều trị bằng MeV-EGFP-antiCEA và MeV-GMCSF-antiCEA có số lượng tế bào lympho T CD3+ thâm nhập vào khối u tăng lên so với nhóm chứng. Mật độ tế bào T ở rìa các u tế bào MC38CEA được điều trị MeV tăng lên đáng kể so với nhóm chứng.⁶⁵ Galanis E và cộng sự (2015) đã báo cáo tiêm Edmonston MV vào khoang phúc mạc điều trị bệnh nhân ung thư buồng trứng đã cảm ứng phản ứng tế bào T chống lại các kháng nguyên khối u buồng trứng.¹¹⁰ Nghiên cứu của Delaunay T và cộng sự (2018) cũng đã chứng minh MeV kích thích tế bào lympho T tham gia kháng nhiều dòng tế bào u người.⁶⁷ Nghiên cứu của Tan D.Q và cộng sự (2016) cho thấy tác dụng trị liệu kháng

ung thư của MeV được tăng cường liên quan đến kích thích đại thực bào và có liên quan đến việc điều chỉnh đại thực bào liên quan khối u theo kiểu hình chống khối u.⁷⁰ Tác giả đã đưa ra một quan điểm khác về vai trò của đại thực bào liên quan khối u trong liệu pháp OV, làm nổi bật tiềm năng điều trị miễn dịch của paramyxovirus ly giải tế bào u; có thể góp phần vào hiệu quả tổng thể của liệu pháp OV. Nghiên cứu của Klose C và cộng sự (2019) cho thấy MeV ly giải trực tiếp tế bào u và kích hoạt tế bào NK tăng cường sự phân giải tế bào A673 và HT1080.⁷¹ Bên cạnh đó, tác giả còn quan sát thấy sự gia tăng giải phóng các dấu hiệu kích hoạt tế bào NK khi đồng nuôi cấy với các tế bào sarcoma A673 ở người nhiễm MeV. Những kết quả này cho thấy liệu pháp OV sử dụng MeV kích hoạt miễn dịch dựa trên tế bào NK để kháng tế bào trên mô hình cấy ghép u thực nghiệm. Grote D và cộng sự (2003) đã chứng minh MeV kích thích phản ứng của bạch cầu trung tính mạnh kháng khối u.¹⁰⁶ Ianko D Iankov và cộng sự (2012) cũng chứng minh điều trị bằng MeV kích thích phản ứng tế bào bạch cầu vật chủ tham gia kháng u mạnh mẽ.⁷²

4.4.4. MeV kháng tế bào u H460 cấy ghép trên chuột nude qua con đường chết tế bào apoptosis

Virus sởi đã được sử dụng thành công để điều trị nhiều khối u, bao gồm u tủy, ung thư buồng trứng và u thần kinh đệm sau khi tiêm trong miệng, trong phúc mạc hoặc tiêm tĩnh mạch. Ung thư biểu mô phổi là một khối u ác tính có khả năng kháng lại các phương pháp điều trị hiện tại, chẳng hạn như hóa trị hoặc xạ trị. Dữ liệu gần đây đã chứng minh rằng MeV có tiềm năng như một tác nhân điều trị cho bệnh nhân UTP NSCLC. Trong khi các dòng tế bào NSCLC được thử nghiệm đều biểu hiện mạnh mẽ thụ thể MV, CD46, cũng có bằng chứng trong tài liệu cho thấy có tới 40% mẫu NSCLC ở người biểu hiện mạnh mẽ CD46 bằng hóa mô miễn dịch.⁶⁶ Việc ngăn chặn CD46 dẫn đến việc ức chế gần như hoàn toàn sự lây nhiễm MV-GFP trong các tế bào UTP. Mặc dù MeV của chủng Edmonston đã được chứng minh là sử

dụng Nectin-4 như một thụ thể đặc hiệu để xâm nhập vào tế bào ung thư, nhiều dữ liệu cho thấy MeV xâm nhập vào tế bào ung thư phụ thuộc vào sự biểu hiện của phân tử Nectin-4 trong các tế bào NSCLC này.

MeV ly giải tế bào u biểu hiện quá mức CD46 và Nectin-4 trên bề mặt bằng cách gây chết tế bào u apoptosis cũng đã được chứng minh ở nhiều nghiên cứu trước đây.^{111,112} Chúng tôi phân tích kết quả tế bào chết theo chương trình của tế bào u phổi không tế bào nhỏ H460 cấy ghép trên chuột nude sau điều trị bằng MeV càng khẳng định vấn đề MeV ly giải tế bào u H460 qua con đường chết tế bào apoptosis, kết quả cho thấy, tỉ lệ tế bào chết apoptosis, apoptosis sớm và apoptosis muộn ở tế bào u phổi người H460 tiêm được điều trị MeV nhiều hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nhóm chứng lần lượt là ($53,93 \pm 18,99$ so với $22,53 \pm 5,92$), ($14,93 \pm 6,86$ so với $0,88 \pm 0,35$), ($39,0 \pm 12,98$ so với $21,65 \pm 5,59$).

Apoptosis phụ thuộc vào caspase là con đường chết tế bào theo chương trình cổ điển. Các caspase-8, caspase-9, caspase-12, caspase-7, caspase-3 thường tham gia vào loại apoptosis này¹¹³, có các thụ thể tham gia vào loại con đường apoptosis này như: thụ thể TNF-alpha, thụ thể FasL, thụ thể TLR, thụ thể chết.... Một số kênh ion cũng có thể tham gia vào quá trình apoptosis này, điển hình là kênh canxi, vì nồng độ canxi trong tế bào chất đóng một vai trò quan trọng trong điều chỉnh truyền tín hiệu và tham gia vào sự phát triển tế bào và chết tế bào. Số phận tế bào có thể được kiểm soát bằng cách mở hoặc đóng kênh canxi. TNF-alpha tạo ra con đường apoptosis phụ thuộc caspase-8, nhờ có thụ thể TNF-alpha caspase-8 được kích hoạt, sau đó kích hoạt protein Bcl-2. Kích hoạt gia đình protein Bcl-2 có thể tạo ra thay đổi màng ty thể và kích thích giải phóng cytochrome C. Cytochrome C là phân tử tín hiệu tiền apoptosis, chúng có thể kích hoạt phản ứng của một loạt caspase và gây ra apoptosis. Một số tia cực tím hoặc tia X có thể làm cho quá trình khử cực ty thể và tính thấm màng tế bào thay đổi, sau đó, giải phóng cytochrome C, kích hoạt caspase-9, caspase-3, Cuối cùng các caspase phân cắt các chất nền và tế

bào đi vào con đường apoptosis. Boisgerault N và cộng sự (2013) cũng đã chứng minh MeV kháng khối u tế bào UTP và đại tràng người trên mô hình chuột nude bằng con đường chết tế bào apoptosis, họ đã phân tích hóa mô miễn dịch tế bào u trên chuột nude sau điều trị MeV, caspase-3 là một chất kích hoạt con đường chết tế bào apoptosis tăng lên trong tế bào u đã được điều trị bằng MeV.¹¹⁴ Zhao D và cộng sự (2013) nghiên cứu MeV tạo ra chết tế bào apoptosis kháng lại u tế bào UTP người trên thực nghiệm.⁶⁶ Nghiên cứu này cũng đã phân tích tế bào u đã được điều trị bằng MeV đánh giá tế bào chết theo chương trình bằng nghiệm pháp phân tích tế bào dòng chảy và phân tích phân tử liên quan đến quá trình chết tế bào apoptosis (nghiệm pháp TUNEL), chứng minh MeV kháng khối u tế bào UTP người trên mô hình cấy ghép bằng con đường tạo ra chết tế bào theo chương trình (apoptosis).

4.4.5. Kết quả siêu cấu trúc tế bào u phổi người H460 ghép trên chuột thiếu hụt miễn dịch sau điều trị bằng virus vaccine sởi

Apoptosis đã được nghiên cứu kỹ lưỡng trong ba thập kỷ qua và được coi là cơ chế chính của sự phát triển và chết tế bào theo chương trình. Năm 1972, Kerr và cộng sự lần đầu tiên sử dụng thuật ngữ “apoptosis” để mô tả một hình thái tế bào chết riêng biệt.¹¹⁵ Apoptosis được điều chỉnh bởi các tín hiệu nội bào và/hoặc ngoại bào và được đặc trưng bởi những thay đổi hình thái của tế bào trong quá trình chết, bao gồm sự phân mảnh và ngưng tụ nhân, tăng tính thấm màng ngoài ty thể, co rút tế bào và hình thành thể apoptotic. Các nghiên cứu trong các hệ thống mô hình khác nhau đã phát hiện quá trình apoptosis vai trò thiết yếu của đối với sự phát triển bình thường và cân bằng nội môi.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kính hiển vi điện tử truyền qua đánh giá những thay đổi siêu cấu trúc tế bào u H460 cấy ghép trên chuột nude sau đợt điều trị bằng MeV. Kết quả cho thấy có hình ảnh tế bào HT460 đang trong quá trình chết theo chương trình bao gồm: Các tế bào nằm sát

nhau, không có khoảng không bào, chất nền ngoại bào. Xuất hiện các hợp bào, kích thước lớn. Sự xuất hiện của hạt nhân kết đặc lại (ngưng tụ chromatin ở ngoại vi nhân tế bào), phân mảnh nhân và hình thành vật thể apoptosis (Hình 3.16; 3.17; 3.18). Tế bào chất của các tế bào H460 trong quá trình apoptosis xuất hiện khá đặc biệt: Các tế bào bị phá hủy, mất cấu trúc, màng tế bào và các bào quan, màng nhân mất tính liên tục, một số nhân tế bào mất chất nhân, xuất hiện các thể có cấu trúc dạng hình ảnh xương cá. Các không bào được bao xung quanh bởi một màng kép, có thể do tàn dư của màng ti thể. Như vậy, kết quả chỉ ra điều trị bằng MeV có hiệu quả kháng khối u tế bào H460 trên chuột nude qua trung gian chết tế bào apoptosis. Tế bào H460 nhiễm MeV có hình ảnh phá hủy, mất cấu trúc tế bào, màng tế bào đứt đoạn mất ranh giới, nhân mất màng nhân, chất nhân thoát ra ngoài. Tế bào H460 nhiễm MeV có cấu trúc dạng tiểu thể hình cầu của virus trên bề mặt tế bào, thấy tiểu thể hình cầu - virus đang hình thành trên màng tế bào (Hình 3.17). Ngoài ra, còn có hình ảnh hợp bào là những tế bào nhiều nhân (Hình 3.18).

Hình ảnh siêu cấu trúc tế bào u H460 nhiễm MeV trong nghiên cứu này khẳng định thêm MeV đã lây nhiễm và ly giải tế bào u H460 một cách hiệu quả, đặc biệt là sự hiện diện của hình ảnh hợp bào. Giống như các paramyxovirus khác, nhiễm MeV được thành lập bởi sự kết dính của MeV với tế bào u tại thụ thể (CD46). MeV sử dụng protein haemagglutinin (H) xâm nhập vào tế bào đích qua trung gian tương tác giữa protein hợp màng (F) và màng tế bào. Các glycoprotein mới được tổng hợp chất đóng ở màng tế bào bị nhiễm, kích hoạt quá trình hợp bào với các tế bào lân cận hình thành hợp bào. Trong các giai đoạn tiếp theo, hợp bào thường được phân ly sau một vài ngày nhiễm bệnh. Do đó, vi rút có thể lây lan từ tế bào này sang tế bào khác mà không cần sản xuất ra virus hoàn chỉnh. Các tế bào u bị hợp bào mất khả năng tái tạo, do đó không tham gia vào sự phát triển của các tế bào ung thư tiếp theo.

Như chúng ta đã biết, hình thái của nhân tế bào trong quá trình apoptosis là sự ngưng tụ chất nhiễm sắc và phân mảnh hạt nhân. Sự ngưng tụ bắt đầu từ dọc bên ngoài theo màng nhân, tạo thành một cấu trúc lưới liềm hoặc dạng vòng. Trong giai đoạn sau của quá trình apoptosis hạt nhân tiếp tục ngưng tụ, và cuối cùng nó bị vỡ bên trong tế bào với màng tế bào còn nguyên vẹn, một tính năng được mô tả như vỡ nhân. Sử dụng kính hiển vi điện tử quan sát thấy sự ngưng tụ và phân mảnh của hạt nhân. Những đặc điểm biến đổi hình thái này bắt đầu do các caspase được kích hoạt (caspases-3 và -6) phân tách các protein khác nhau có vai trò duy trì tính toàn vẹn cấu trúc của hạt nhân. Một số caspase có liên quan đến việc sửa chữa và sao chép DNA chịu trách nhiệm cho sự phân mảnh DNA từ sợi kép thành các đoạn có chiều dài từ 180 đến 200 bp, đáng chú ý là caspase thuộc nhóm Dnase có thể phân cắt DNA, chúng là các yếu tố phân mảnh DNA.¹¹⁶ Ngoài ra, có một số lượng lớn các endonuclease khác cũng tham gia vào quá trình phân cắt DNA trong quá trình apoptosis. Các protein là sản phẩm từ quá trình apoptosis cũng có vai trò trong quá trình phân mảnh DNA, chúng gây bất hoạt polymerase (ADP-ribose) và protein DNA kinase, đây là hai protein tham gia vào các cơ chế sửa chữa DNA.¹¹⁷

Các tế bào trong quá trình chết theo chương trình luôn có thay đổi cấu trúc khung tế bào, với sự phân mảnh của các bó vi sợi, đây là yếu tố tạo ra độ dẻo cho toàn bộ tế bào và làm cho tế bào giảm khối lượng cũng như có thể co rút lại.¹¹⁸ Thực tế, nhiều nghiên cứu đã dùng hóa mô miễn dịch để chứng minh những biến đổi cấu trúc phân tử actin và tubulin dẫn đến việc chuyển đổi các sợi khung tế bào, các tubulin khung tế bào tổ chức lại thành các bó dày; các vi sợi actin cũng tạo thành các bó dày hơn, đặc biệt là ở vùng ngoại vi tế bào khi dùng các chất gây chết tế bào theo con đường apoptosis.¹¹⁹ Một trong những bào quan cũng thay đổi nhiều về hình thái khi tế bào trong quá trình chết apoptosis, đó là bộ máy golgi. Bào quan này chủ yếu tham gia vào

quá trình đóng gói protein, đưa chúng đến các khoang nhỏ khác nhau, phối hợp với các bào quan khác bài tiết sản phẩm protein ra ngoài tế bào. Bộ máy Golgi có vai trò rất quan trọng khi tế bào bị các tác động có hại của stress, oxy hóa... Chúng được coi là bộ “cảm biến stress”, khi tế bào trong quá trình apoptosis, bộ máy Golgi có những thay đổi hình thái và chức năng, bao gồm phân mảnh, căng phồng lên, có thể nhìn thấy trong quá trình apoptosis muộn. Bộ máy Golgi trải qua sự phân mảnh và phân bố lại trong tế bào chết, đôi khi hình thành các khối dày đặc.^{119,120}

Kết quả hình ảnh tế bào u H460 cấy ghép trên chuột nude sau điều trị MeV tương đồng với kết quả của Toan N.L và cộng sự (2019), tác giả đã phân tích cấu trúc tế bào khối u thành quần cấy ghép trên chuột nude sau điều trị MeV phối hợp với Nimotuzumab bằng kính hiển vi điện tử, kết quả cho thấy tế bào u thành quần nhiễm MeV chết theo chương trình có hình ảnh nhân phân mảnh, ngưng tụ nhiễm sắc thể, bào tương có nhiều giọt lipid và sự xuất hiện không bào trong tế bào chết, cũng như các tế bào u thành quần bị hoại tử.⁸⁰ Kết quả nghiên cứu hình ảnh siêu cấu trúc của tác giả Lê Duy Cường (2019) tiến hành trên khối u đại tràng dòng tế bào HT-29, cấy ghép trên chuột nude sau điều trị phối hợp virus vaccine sởi và quai bị cũng cho thấy hình ảnh tế bào u nhiễm virus chết theo chương trình có hình ảnh hạt nhân kết đặc lại (ngưng tụ chromatin ở ngoại vi nhân tế bào), phân mảnh nhân và hình thành vật thể apoptosis.⁷⁸ Tế bào co tròn lại và bề mặt trở nên nhăn. Tế bào chết của các tế bào HT-29 trong quá trình apoptosis xuất hiện có mặt nhiều không bào, hình thành các tế bào bọt. Nghiên cứu của Xia M và cộng sự (2014) cũng chứng minh MeV gây chết tế bào UTP nhỏ qua con đường apoptosis *invitro*.¹²¹

Như vậy, sử dụng kính hiển vi điện tử truyền qua đánh giá thay đổi hình thái siêu cấu trúc tế bào u H460 sau điều trị bằng MeV, một lần nữa, chúng tôi khẳng định vai trò MeV ly giải tế bào u H460 thông qua kích hoạt

con đường chết tế bào apoptosis, một cơ chế ly giải tế bào ung thư rất quan trọng đang được quan tâm nghiên cứu điều trị ung thư hiện nay.

4.4.6. Kết quả giải phẫu bệnh tế bào u phổi người H460 ghép trên chuột thiếu hụt miễn dịch sau điều trị bằng virus vaccine sởi

Như chúng ta đã biết, apoptosis được coi là cơ chế chính gây ly giải tế bào u của các virus này. Tuy nhiên, ngoài cơ chế kích hoạt con đường tế bào chết apoptosis, MeV còn giết chết tế bào u phổi người H460 bằng nhiều cơ chế khác, một trong những cơ chế đó là gây hoại tử tế bào.

Nghiên cứu hình ảnh giải phẫu bệnh khối u sau điều trị bằng MeV, kết quả cho thấy. U có các ổ hoại tử nhỏ nằm giữa các đám tế bào u và ổ hoại tử lớn ở trung tâm. Ở độ phóng đại cao hơn thấy rõ vùng hoại tử với mảnh vụn tế bào và các nhân đông (Hình 3.20).

Nhiều nghiên cứu đã nhận thấy rằng MV-Edm đã ly giải 50 - 70% tế bào NSCLC trong tình trạng không apoptosis do không hoạt hóa caspase-3 và sau đó là không có sự phân cắt poly(ADP-ribose) glycohydrolase. Những quan sát này cho thấy rằng tác dụng ly giải tế bào ung thư của MV-Edm đối với NSCLC có thể không chỉ dựa vào quá trình apoptosis.¹²² Do đó, các cơ chế khác ngoài quá trình apoptosis có thể tồn tại trong quá trình ly giải tế bào ung thư qua trung gian MV-Edm.

Sự tương tác chéo giữa autophagy và apoptosis đã được nghiên cứu kỹ lưỡng trong những năm gần đây. Các nhiều bằng chứng cho thấy rằng autophagy có khả năng bảo vệ các tế bào bị stress và làm giảm xu hướng của các tế bào trải qua quá trình apoptosis.¹²³ Một nghiên cứu gần đây cũng cho thấy rằng autophagy do MV-Edmind gây ra ở HeLa đã ngăn chặn quá trình apoptosis, tuy nhiên, vẫn chưa rõ ràng cách autophagy chống lại quá trình apoptosis và cách autophagy góp phần vào việc gây ung thư do MV-Edmind.¹²⁴ Chúng tôi phát hiện ra rằng MV-Edm gây ra quá trình mitophagy qua trung gian SQSTM1, rất quan trọng để giải phóng các ty thể bị hỏng

trước khi cytochrome c được giải phóng. Do đó, kết quả của chúng tôi cho thấy MV-Edm sử dụng mitophagy để kiểm soát sự giải phóng cytochrome c và sau đó ngăn chặn sự kích hoạt caspase. Tuy nhiên, kết quả của chúng tôi không loại trừ rằng MV-Edm sử dụng autophagy để ngăn chặn apoptosis bằng các cơ chế khác. Điều này cho thấy rằng quá trình autophagy bền vững sẽ làm cạn kiệt protein nội bào cần thiết cho quá trình autophagy. Chúng tôi giả định rằng sự cạn kiệt SQSTM1 có thể thúc đẩy tín hiệu tiền apoptosis và thực sự, việc loại bỏ biểu hiện SQSTM1 dẫn đến sự gia tăng đáng kể quá trình apoptosis ngay cả ở giai đoạn đầu (2 ngày) sau khi nhiễm MV-Edm. Những kết quả này có thể giải thích những quan sát trong các nghiên cứu trước đây rằng các đặc điểm apoptotic xảy ra ở giai đoạn tương đối muộn sau khi nhiễm MV-Edm. Apoptosis được coi là một trong những cơ chế cơ bản mà vật chủ tự bảo vệ chống lại sự lây nhiễm của virus.¹²² Vì quá trình tự hủy có thể hạn chế sự nhân lên và lây lan của virus, nên việc MV-Edm sử dụng mitophagy để chống lại quá trình apoptosis và do đó, có lợi cho sự nhân lên của nó. Giả thiết này đã được xác nhận bởi thực tế là trong các NSCLC bị suy giảm khả năng tự chết, sự ức chế quá trình chết rụng bằng cách tăng cường sự lan truyền của vi rút z-VAD-fmk. Đáng chú ý, sự suy thoái ty thể do mitophagy cũng làm giảm mức độ của cảm biến kháng vi rút liên quan đến ty thể (MAVS), làm giảm các phản ứng miễn dịch bẩm sinh kháng vi rút dẫn đến tăng cường sự nhân lên của virus.⁹⁴

Đáng ngạc nhiên, mặc dù chống lại quá trình chết tế bào apoptosis nhưng quá trình tự chết autophagy lại xảy ra ở tế bào nhiễm MV-Edm. Oncolysis đã bị hạn chế lây lan ở các NSCLC bị suy giảm autophagy, cho thấy rằng autophagy tham gia vào quá trình chết tế bào do MV-Edm gây ra. Hơn nữa, chúng tôi nhận thấy rằng sự nhân lên của virus MV-Edm có tương quan với sự cạn kiệt ATP và với sự giải phóng HMGB1, cho thấy rằng nhiễm MV-Edm dai dẳng dẫn đến hoại tử tế bào. Chúng tôi đã loại trừ các khả năng

của cả hoại tử tế bào theo chương trình qua trung gian RIP1 và hoại tử qua trung gian ROS. Điều này và cho rằng autophagy thúc đẩy khả năng lây nhiễm MV-Edm, như được thể hiện trong nghiên cứu này và các nghiên cứu trước đây, chúng ta có thể kết luận rằng autophagy góp phần vào quá trình phân giải bằng cách duy trì sự lan truyền của virus dẫn đến hoại tử vì cạn kiệt ATP.¹²⁴ Người ta vẫn chưa chứng minh được liệu cơ chế này có hoạt động trong các tế bào ung thư là NSCLC hay không. Những phát hiện này rất quan trọng để cải thiện liệu pháp OV bằng cách sử dụng MV-Edm. Hơn nữa, hiểu biết này cũng có lợi cho việc thiết kế các chiến lược điều trị hợp lý kháng virus gây bệnh, chẳng hạn như sử dụng các chất ức chế autophagy.

Ngoài ra các thuyết hoại tử do thiếu nuôi dưỡng (thiếu dưỡng) do tăng sinh quá mức của tế bào u cũng làm cho chúng bị hoại tử, nhất là vùng trung tâm. Trong những năm gần đây, khái niệm về chết của tế bào đã phát triển đáng kể nhờ những nghiên cứu sâu rộng về vai trò của nó trong cân bằng nội môi mô bình thường và trong một loạt các bệnh bao gồm bệnh tự miễn dịch, bệnh thoái hóa thần kinh và ung thư.¹²⁵ Hiện nay người ta đã đưa ra những dạng chết tế bào theo chương trình khác khác với apoptosis như: chết tế bào theo chương trình tiền viêm (pyroptosis) và chết tế bào theo chương trình phụ thuộc vào sắt (ferroptosis).¹²⁵ Quan trọng hơn, các nhà nghiên cứu đã phát hiện ra hoại tử cũng có thể xảy ra theo cách được lập trình, điều chỉnh tinh vi trong một số điều kiện nhất định. Khi quá trình apoptosis bị chặn lại, yếu tố hoại tử khối u (TNF) kích hoạt một số loại tế bào nhất định trải qua quá trình chết tế bào hoại tử có điều chỉnh. Hoại tử được điều chỉnh này được gọi là hoại tử theo chương trình.^{125,126}

Chết tế bào u thường quan sát thấy ở các vùng lõi của các khối u rắn do kết quả của mạch máu nuôi dưỡng không đầy đủ, gây ra các stress chuyển hóa như thiếu oxy và thiếu chất dinh dưỡng.¹²⁷ Do hình thái của các tế bào khối u chết như bị hoại tử, các ổ tế bào chết này được gọi là hoại tử khối u.¹²⁸ Một số

nghiên cứu gần đây đã bắt đầu làm sáng tỏ vai trò tích cực của hoại tử khối u trong quá trình hình thành khối u. Không giống như quá trình apoptosis trong đó các tế bào có màng nguyên vẹn và bị đại thực bào vật chủ loại bỏ nhanh chóng, người ta đã chỉ ra rằng hoại tử khối u dẫn đến giải phóng các thành phần nội bào vào vi môi trường khối u. Một nghiên cứu gần đây cho thấy rằng một lượng lớn kali được giải phóng từ các tế bào khối u hoại tử. Điều quan trọng là nghiên cứu này cho thấy rằng kali ngoại bào được giải phóng từ hoại tử khối u ức chế cả hoạt động của tế bào T CD4 và CD8, những yếu tố quan trọng đối với khả năng miễn dịch chống khối u.¹²⁹

Để khám phá cơ chế phân tử của hoại tử khối u, gần đây nhiều nghiên cứu đã thử nghiệm xem con đường hoại tử theo chương trình có liên quan đến hoại tử khối u hay không. Các nghiên cứu nhận thấy rằng quá trình phosphoryl hóa gen *MLKL* xảy ra trong các tế bào đang chết ở các vùng hoại tử của khối u và chứng minh rằng hiện tượng hoại tử theo chương trình thực sự tham gia trong quá trình hoại tử khối u.¹³⁰ Quan trọng hơn, hoại tử khối u bị triệt tiêu phần lớn khi tắc nghẽn con đường hoại tử theo chương trình bằng cách xóa gen *MLKL* và đáng chú ý là tế bào khối u chết còn lại trong các khối u bất hoạt gen *MLKL* là dẫn đến tế bào chết theo chương trình.¹³⁰ Những phát hiện này cho thấy sự hoại tử theo chương trình của các tế bào khối u rất có thể là nguyên nhân chính gây ra hoại tử khối u và cung cấp một công cụ khả thi để đánh giá vai trò của hoại tử khối u trong quá trình hình thành khối u.¹³⁰ Sự hình thành mạch rất quan trọng đối với sự phát triển của khối u. Tuy nhiên, khi các khối u rắn đạt đến một kích thước nhất định, hiện tượng mạch máu ở vùng lõi của các khối u tiến triển nhỏ lại và dẫn đến hoại tử khối u.¹²⁷ Ở những khu vực khối u có hệ thống mạch máu không đầy đủ, các tế bào khối u gặp phải những stress về chuyển hóa như thiếu oxy và thiếu chất dinh dưỡng.¹²⁷ Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra stress về chuyển hóa như thiếu oxy, thiếu hụt glutamine hoặc glucose có thể gây ra chết tế bào apoptosis, phụ

thuộc vào autophagy hoặc hoại tử ở các tế bào ung thư.¹³¹ Tuy nhiên, liệu những stress chuyển hóa này có kích hoạt quá trình hoại tử theo chương trình trong tế bào ung thư hay không vẫn còn chưa được nghiên cứu rõ ràng. Một nghiên cứu gần đây cho rằng GD (thiếu glucose) Gây ra cái chết của tế bào hoại tử không theo chương trình, phụ thuộc RIPK1.¹³² Do đó, mặc dù stress chuyển hóa này được cho là nguyên nhân gây ra hoại tử khối u, người ta vẫn chưa biết liệu những tình trạng này có thực sự gây ra hiện tượng hoại tử theo chương trình ở các khối u rắn hay không.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu hiệu quả kháng dòng tế bào UTP người H460 và A549 *in vitro* và u tế bào H460 cấy ghép trên chuột nude của virus vaccine sởi với kết quả như sau:

1. Virus vaccine sởi có hiệu quả kháng dòng tế bào ung thư phổi người H460 và A549 trực tiếp và qua kích hoạt con đường apoptosis *in vitro*

Virus vaccine sởi ly giải trực tiếp tế bào UTP người dòng H460 và A549 bằng tạo hợp bào cũng như kháng tế bào H460 và A549 thông qua kích hoạt con đường chết tế bào theo chương trình *in vitro* với kết quả:

- Hình ảnh tế bào H460 và A549 chết qua tạo hợp bào *in vitro* dưới kính hiển vi quang học bắt đầu từ ngày thứ 3, cao nhất vào ngày thứ 4 và 5 sau nhiễm virus vaccine sởi.

- Tỷ lệ tế bào sống *in vitro* của tế bào UTP người A549 và H460 nhiễm MeV ở ngày thứ 3 và 4 với nồng độ pha loãng virus 1 MOI và 0,1 MOI thấp hơn đáng kể so với nhóm chứng. Tỷ lệ tế bào sống tỷ lệ nghịch với nồng độ và thời gian nhiễm virus vaccine sởi.

- Tỷ lệ tế bào chết theo chương trình *in vitro* ở các nhóm nhiễm MeV cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nhóm chứng ở cả 3 thời điểm nghiên cứu (ngày thứ 4 và 5 nhiễm virus vaccine sởi).

2. Virus vaccine sởi có hiệu quả kháng u dòng tế bào ung thư phổi người H460 cấy ghép trên chuột nude

Virus vaccine sởi có hiệu quả kháng u tế bào UTP người H460 cấy ghép trên mô hình chuột nude cả theo con đường trực tiếp, hoạt hóa con đường chết tế bào apoptosis cũng như kích hoạt hệ miễn dịch kháng tế bào u H460, với kết quả:

- Kích thước khối u trung bình ở các nhóm điều trị bằng virus vaccine sởi nhỏ hơn so với nhóm chứng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Thời gian sống

trung bình và tỉ lệ chuột sống của các nhóm tiêm virus vaccine sởi cao hơn nhóm chứng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

- Tỉ lệ các tế bào miễn dịch (đại thực bào, tế bào NK, tế bào DC và tế bào DC trưởng thành) ở mô u tế bào H460 được tiêm virus vaccine sởi cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nhóm chứng không tiêm virus vaccine sởi.

- Tỉ lệ tế bào u phổi người H460 tách từ mô u, chết theo chương trình ở nhóm chuột nude được tiêm virus vaccine sởi cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nhóm không được tiêm virus vaccine sởi.

- Hình ảnh siêu cấu trúc cho thấy tế bào u H460 sau điều trị bằng virus vaccine sởi chết theo con đường apoptosis.

- Hình ảnh giải phẫu bệnh mô u tế bào H460 sau tiêm virus vaccine sởi cho thấy nhiều tế bào chết hoại tử.

KHUYẾN NGHỊ

Qua kết quả nghiên cứu, chúng tôi có một số khuyến nghị sau:

1. Virus vaccine sởi có hiệu quả tiềm năng kháng UTP người cả *in vitro* và u cấy ghép trên mô hình chuột nude. Do đó, cần có các nghiên cứu quy mô lớn hơn đánh giá tính an toàn, hiệu quả của virus vaccine sởi kháng tế bào UTP người.
2. Tiến tới các thử nghiệm lâm sàng ở các giai đoạn khác nhau sử dụng virus vaccine sởi điều trị bệnh nhân UTP trên lâm sàng ở Việt Nam.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI, LUẬN ÁN

1. Tạo khối ung thư phổi không tế bào nhỏ của người trên thực nghiệm. Tạp chí nghiên cứu Y học Số 2. 2022 Trang (182-188).
<https://doi.org/10.52852/tcncyh.v150i2.737>
2. Hiệu quả kháng ung thư của virus sởi trên mô hình chuột thiếu hụt miễn dịch mang khối ung thư phổi người. Tạp chí nghiên cứu Y học Số 8 tháng 8 năm 2022. Trang (317 -323).
(<https://doi.org/10.52852/tcncyh.v156i8.1083>)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. World Health Organization. (2022). Cancer, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Pol J, Kroemer G, Galluzzi L. (2016). First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy, *Oncoimmunology*. 5(1):e1115641. doi:10.1080/2162402x.2015.1115641
3. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, et al. (2016). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer, *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 11(1):39-51. doi:10.1016/j.jtho.2015.09.009
4. JRC. (2020). ECIS–European Cancer Information System, <https://ecisjrce.europa.eu>.
5. OECD. (2020). Addressing Challenges in Access to Oncology Medicines, OECD, Paris., <https://www.oecd.org/health/health-systems/addressing-challenges-in-access-to-oncology-medicines.htm>.
6. GLOBOCAN. (2020). Cancer in Vietnam, <https://gcoiarcfr/today/data/factsheets/populations/704-viet-nam-fact-sheets.pdf>.
7. Nguyen SM, Deppen S, Nguyen GH, Pham DX, Bui TD, Tran TV. (2019). Projecting Cancer Incidence for 2025 in the 2 Largest Populated Cities in Vietnam, *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*. 26(1):1073274819865274. doi:10.1177/1073274819865274.
8. Rusmaully J, Tvardik N, Martin D, et al. (2021). Risk of lung cancer among women in relation to lifetime history of tobacco smoking: a population-based case-control study in France (the WELCA study), *BMC cancer*. 21(1):711. doi:10.1186/s12885-021-08433-z

9. O'Keeffe LM, Taylor G. (2018). Smoking as a risk factor for lung cancer in women and men: a systematic review and meta-analysis, 8(10):e021611. doi:10.1136/bmjopen-2018-021611
10. Loomis D, Huang W, Chen G. (2014). The International Agency for Research on Cancer (IARC) evaluation of the carcinogenicity of outdoor air pollution: focus on China, *Chinese journal of cancer*. 33(4):189-96. doi:10.5732/cjc.014.10028
11. Turner MC, Andersen ZJ, Baccarelli A, et al. (2020). Outdoor air pollution and cancer: An overview of the current evidence and public health recommendations, *CA: a cancer journal for clinicians*. doi:10.3322/caac.21632
12. Wei X, Zhu C, Ji M, et al. (2021). Diet and Risk of Incident Lung Cancer: A Large Prospective Cohort Study in UK Biobank, 114(6):2043-2051. doi:10.1093/ajcn/nqab298
13. Kordiak J, Bielec F. (2022). Role of Beta-Carotene in Lung Cancer Primary Chemoprevention: A Systematic Review with Meta-Analysis and Meta-Regression, 14(7)doi:10.3390/nu14071361
14. Guertin KA, Freedman ND, Loftfield E, Graubard BI, Caporaso NE, Sinha R. (2016). Coffee consumption and incidence of lung cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study, *International journal of epidemiology*. 45(3):929-39. doi:10.1093/ije/dyv104
15. Farooq S, Sehgal A. (2021). Chemopreventive Efficacy of Green Tea, *Ocimum gratissimum* and their Combination Against Benzo[a]pyrene Induced Preneoplastic Lung Lesions in Murine Model, *Journal of Biologically Active Products from Nature*. 11(1):22-31. doi:10.1080/22311866.2021.1894236

16. Kocarnik JM, Compton K, Dean FE, et al. (2022). Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life Years for 29 Cancer Groups From 2010 to 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019, *JAMA oncology*. 8(3):420-444.
doi:10.1001/ jamaoncol.2021.6987
17. Boffetta P, Autier P, Boniol M, et al. (2010). An estimate of cancers attributable to occupational exposures in France, *Journal of occupational and environmental medicine*. 52(4):399-406.
doi:10.1097/JOM.0b013e3181d5e355
18. Ilar A, Plato N, Lewné M, Pershagen G, Gustavsson P. (2017). Occupational exposure to diesel motor exhaust and risk of lung cancer by histological subtype: a population-based case-control study in Swedish men, *European journal of epidemiology*. 32(8):711-719.
doi:10.1007/s10654-017-0268-5
19. Santillan AA, Camargo CA, Jr., Colditz GA. (2003). A meta-analysis of asthma and risk of lung cancer (United States), *Cancer causes & control : CCC*. 14(4):327-34. doi:10.1023/a:1023982402137
20. Lubin JH, Boice JD, Jr., Edling C, et al. (1995). Lung cancer in radon-exposed miners and estimation of risk from indoor exposure, *Journal of the National Cancer Institute*. 87(11):817-27.
doi:10.1093/ jnci/87.11.817
21. Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms, *Science (New York, NY)*. 250(4985):1233-8.
doi:10.1126/ science.1978757.
22. Truong T, Hung RJ, Amos CI, et al. (2010). Replication of lung cancer susceptibility loci at chromosomes 15q25, 5p15, and 6p21: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium, *Journal of the National Cancer Institute*. 102(13):959-71. doi:10.1093/jnci/djq178.

23. Wang Y, McKay J, Rafnar T, et al. (2017). Rare variants of large effect in BRCA2 and CHEK2 affect risk of lung cancer (vol 46, pg 736, 2014), *Nature Genetics*. 49:651-651.
24. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. (2019). Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment, *Mayo Clinic proceedings*. 94(8):1623-1640.
doi:10.1016/j.mayocp. 2019.01.013.
25. Raso MG, Bota-Rabassedas N, Wistuba, II. (2021). Pathology and Classification of SCLC, *Cancers*. 13(4)doi:10.3390/cancers13040820
26. Pharmacist US. (2021). Lung Cancer Overview,
<https://www.uspharmacist.com/article/lung-cancer-overview>.
27. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification, *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 10(9):1243-1260.
doi:10.1097/jto.0000000000000630
28. Kadara H, Wistuba, II. (2012). Field cancerization in non-small cell lung cancer: implications in disease pathogenesis, *Proceedings of the American Thoracic Society*. 9(2):38-42. doi:10.1513/pats.201201-004MS.
29. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. (2007). Lung cancer in never smokers--a different disease, *Nature reviews Cancer*. 7(10):778-90.
doi:10.1038/nrc2190.
30. Xie M, Xu X, Fan Y. (2021). KRAS-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: An Emerging Promisingly Treatable Subgroup, *Frontiers in oncology*. 11:672612. doi:10.3389/fonc.2021.672612.

31. Jones-Freeman B, Starkey MR. (2020). Bronchioalveolar stem cells in lung repair, regeneration and disease, 252(3):219-226.
doi:10.1002/path.5527.
32. Tang X, Varella-Garcia M, Xavier AC, et al. (2008). Epidermal growth factor receptor abnormalities in the pathogenesis and progression of lung adenocarcinomas, *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)*. 1(3):192-200. doi:10.1158/1940-6207.capr-08-0032.
33. Westra WH, Baas IO, Hruban RH, et al. (1996). K-ras oncogene activation in atypical alveolar hyperplasias of the human lung, *Cancer research*. 56(9):2224-8.
34. Tang X, Shigematsu H, Bekele BN, et al. (2005). EGFR tyrosine kinase domain mutations are detected in histologically normal respiratory epithelium in lung cancer patients, *Cancer research*. 65(17):7568-72. doi:10.1158/0008-5472.can-05-1705.
35. Ghaffar H, Sahin F, Sanchez-Cepedes M, et al. (2003). LKB1 protein expression in the evolution of glandular neoplasia of the lung, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 9(8):2998-3003.
36. Selamat SA, Galler JS, Joshi AD, et al. (2011). DNA methylation changes in atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma in situ, and lung adenocarcinoma, *PloS one*. 6(6):e21443. doi:10.1371/journal.pone.0021443.
37. Winslow MM, Dayton TL, Verhaak RG, et al. (2011). Suppression of lung adenocarcinoma progression by Nkx2-1, *Nature*. 473(7345):101-4. doi:10.1038/nature09881.
38. Wistuba, II, Behrens C, Virmani AK, et al. (2000). High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints, *Cancer research*. 60(7):1949-60.

39. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, et al. (1998). Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(20):11891-6. doi:10.1073/pnas.95.20.11891.
40. Hirsch FR, Prindiville SA, Miller YE, et al. (2001). Fluorescence versus white-light bronchoscopy for detection of preneoplastic lesions: a randomized study, *Journal of the National Cancer Institute*. 93(18):1385-91. doi:10.1093/jnci/93.18.1385.
41. Yuan P, Kadara H, Behrens C, et al. (2010). Sex determining region Y-Box 2 (SOX2) is a potential cell-lineage gene highly expressed in the pathogenesis of squamous cell carcinomas of the lung, *PloS one*. 5(2): e9112. doi: 10.1371/journal.pone.0009112.
42. McCaughan F, Pole JC, Bankier AT, et al. (2010). Progressive 3q amplification consistently targets SOX2 in preinvasive squamous lung cancer, *American journal of respiratory and critical care medicine*. 182(1):83-91. doi:10.1164/rccm.201001-0005OC.
43. Nakachi I, Rice JL, Coldren CD, et al. (2014). Application of SNP microarrays to the genome-wide analysis of chromosomal instability in premalignant airway lesions, *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)*. 7(2): 255-65. doi:10.1158/1940-6207.capr-12-0485
44. Ooi AT, Gower AC, Zhang KX, et al. (2014). Molecular profiling of premalignant lesions in lung squamous cell carcinomas identifies mechanisms involved in stepwise carcinogenesis, *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)*. 7(5):487-95. doi:10.1158/1940-6207.capr-13-0372.
45. Meuwissen R, Linn SC, Linnoila RI, Zevenhoven J, Mooi WJ, Berns A. (2003). Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model, *Cancer cell*. 4(3):181-9. doi:10.1016/s1535-6108(03)00220-4.

46. Peifer M, Fernández-Cuesta L, Sos ML, et al. (2012). Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer, *Nat Genet.* 44(10):1104-10. doi:10.1038/ng.2396.
47. Falcoz PE, Puyraveau M, Thomas PA, et al. (2016). Video-assisted thoracoscopic surgery versus open lobectomy for primary non-small-cell lung cancer: a propensity-matched analysis of outcome from the European Society of Thoracic Surgeon database, *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery.* 49(2):602-9. doi:10.1093/ejcts/ezv154
48. Jones GS, Baldwin DR. (2018). Recent advances in the management of lung cancer, *Clinical medicine (London, England).* 18(Suppl 2):s41-s46. doi:10.7861/clinmedicine.18-2-s41.
49. Engeland CE, Ungerechts G. (2021). Measles Virus as an Oncolytic Immunotherapy, *Cancers.* 13(3)doi:10.3390/cancers13030544
50. Niehans GA, Cherwitz DL, Staley NA, Knapp DJ, Dalmasso AP. (1996). Human carcinomas variably express the complement inhibitory proteins CD46 (membrane cofactor protein), CD55 (decay-accelerating factor), and CD59 (protectin), *The American journal of pathology.* 149(1):129-42.
51. Patel MR, Jacobson BA, Belgum H, et al. (2014). Measles vaccine strains for virotherapy of non-small-cell lung carcinoma, *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer.* 9(8):1101-10. doi:10.1097/jto.0000000000000214.
52. Takano A, Ishikawa N, Nishino R, et al. (2009). Identification of nectin-4 oncoprotein as a diagnostic and therapeutic target for lung cancer, *Cancer research.* 69(16):6694-703. doi:10.1158/0008-5472.can-09-0016.

53. Fujiyuki T, Yoneda M, Amagai Y, et al. (2015). A measles virus selectively blind to signaling lymphocytic activation molecule shows anti-tumor activity against lung cancer cells, *Oncotarget*. 6(28):24895-903. doi:10.18632/oncotarget.4366.
54. Miest TS, Frenzke M, Cattaneo R. (2013). Measles virus entry through the signaling lymphocyte activation molecule governs efficacy of mantle cell lymphoma radiovirotherapy, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 21(11):2019-31. doi:10.1038/mt.2013.171.
55. Derycke MS, Pambuccian SE, Gilks CB, et al. (2010). Nectin 4 overexpression in ovarian cancer tissues and serum: potential role as a serum biomarker, *American journal of clinical pathology*. 134(5):835-45. doi:10.1309/ajcpgxk0fr4mhihb.
56. Bouleftour W, Guillot A. (2022). The Anti-Nectin 4: A Promising Tumor Cells Target. A Systematic Review, 21(4):493-501. doi:10.1158/1535-7163.mct-21-0846.
57. Berchtold S, Lampe J, Weiland T, et al. (2013). Innate immune defense defines susceptibility of sarcoma cells to measles vaccine virus-based oncolysis, *Journal of virology*. 87(6):3484-501. doi:10.1128/jvi.02106-12.
58. Matveeva OV, Guo ZS, Shabalina SA, Chumakov PM. (2015). Oncolysis by paramyxoviruses: multiple mechanisms contribute to therapeutic efficiency, *Molecular therapy oncolytics*. 2:15011-. doi:10.1038/mto.2015.11
59. Bateman AR, Harrington KJ, Kottke T, et al. (2002). Viral fusogenic membrane glycoproteins kill solid tumor cells by nonapoptotic mechanisms that promote cross presentation of tumor antigens by dendritic cells, *Cancer research*. 62(22):6566-78.

60. Rajaraman S, Canjuga D, Ghosh M, et al. (2019). Measles Virus-Based Treatments Trigger a Pro-inflammatory Cascade and a Distinctive Immunoepitidome in Glioblastoma, *Molecular therapy oncolytics*. 12:147-161. doi:10.1016/j.omto.2018.12.010
61. Chen A, Zhang Y, Meng G, et al. (2017). Oncolytic measles virus enhances antitumour responses of adoptive CD8(+)NKG2D(+) cells in hepatocellular carcinoma treatment, *Scientific reports*. 7(1):5170. doi:10.1038/s41598-017-05500-z
62. Pidelaserra-Martí G, Engeland CE. (2020). Mechanisms of measles virus oncolytic immunotherapy, *Cytokine & growth factor reviews*. 56:28-38. doi:10.1016/j.cytogfr.2020.07.009
63. Achard C, Guillerme JB, Bruni D, et al. (2017). Oncolytic measles virus induces tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated cytotoxicity by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells, *Oncoimmunology*. 6(1):e1261240. doi:10.1080/2162402x.2016.1261240
64. Guillerme JB, Boisgerault N, Roulois D, et al. (2013). Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 19(5):1147-58. doi:10.1158/1078-0432.ccr-12-2733
65. Grossardt C, Engeland CE, Bossow S, et al. (2013). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-armed oncolytic measles virus is an effective therapeutic cancer vaccine, *Human gene therapy*. 24(7):644-54. doi:10.1089/hum.2012.205
66. Zhao D, Chen P, Yang H, et al. (2013). Live attenuated measles virus vaccine induces apoptosis and promotes tumor regression in lung cancer, *Oncology reports*. 29(1):199-204. doi:10.3892/or.2012.2109

67. Delaunay T, Violland M, Boisgerault N, et al. (2018). Oncolytic viruses sensitize human tumor cells for NY-ESO-1 tumor antigen recognition by CD4⁺ effector T cells, *Oncoimmunology*. 7(3):e1407897. doi:10.1080/2162402x.2017.1407897
68. Veinalde R, Grossardt C, Hartmann L, et al. (2017). Oncolytic measles virus encoding interleukin-12 mediates potent antitumor effects through T cell activation, *Oncoimmunology*. 6(4):e1285992. doi:10.1080/2162402x.2017.1285992
69. Backhaus PS, Veinalde R, Hartmann L, et al. (2019). Immunological Effects and Viral Gene Expression Determine the Efficacy of Oncolytic Measles Vaccines Encoding IL-12 or IL-15 Agonists, *Viruses*. 11(10)doi:10.3390/v11100914
70. Tan DQ, Zhang L, Ohba K, Ye M, Ichiyama K, Yamamoto N. (2016). Macrophage response to oncolytic paramyxoviruses potentiates virus-mediated tumor cell killing, *European journal of immunology*. 46(4):919-28. doi:10.1002/eji.201545915
71. Klose C, Berchtold S, Schmidt M, et al. (2019). Biological treatment of pediatric sarcomas by combined virotherapy and NK cell therapy, *BMC cancer*. 19(1):1172. doi:10.1186/s12885-019-6387-5
72. Iankov ID, Allen C, Federspiel MJ, et al. (2012). Expression of immunomodulatory neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* enhances the antitumor activity of oncolytic measles virus, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 20(6):1139-47. doi:10.1038/mt.2012.4
73. Hutzler S, Erbar S, Jabulowsky RA, et al. (2017). Antigen-specific oncolytic MV-based tumor vaccines through presentation of selected tumor-associated antigens on infected cells or virus-like particles, *Scientific reports*. 7(1):16892. doi:10.1038/s41598-017-16928-8

74. Msaouel P, Opyrchal M, Dispenzieri A, et al. (2018). Clinical Trials with Oncolytic Measles Virus: Current Status and Future Prospects, *Current cancer drug targets*. 18(2):177-187.
doi: 10.2174/1568009617666170222125035
75. Wellington K, Goa KL. (2003). Measles, mumps, rubella vaccine (Priorix; GSK-MMR): a review of its use in the prevention of measles, mumps and rubella, *Drugs*. 63(19):2107-26. doi:10.2165/00003495-200363190-00012
76. Daniel Martínez-Maqueda, Beatriz Miralles, Isidra Recio. (2015). The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models [Internet], Chapter 11HT29 Cell Line, *InfoGest FA1005 COST Action*.112-124. doi:10.1007/978-3-319-16104-4
77. Grigorov B, Rabilloud J, Lawrence P, Gerlier D. (2011). Rapid titration of measles and other viruses: optimization with determination of replication cycle length, *PloS one*. 6(9):e24135.
doi:10.1371/ journal.pone.0024135
78. Cương L.D. *Nghiên cứu tác dụng kháng ung thư đại tràng người của virus sởi và quai bị trên thực nghiệm*. Luận án tiến sỹ y học. Học viện Quân y; 2019.
79. Pourianfar HR, Javadi A, Grollo L. (2012). A colorimetric-based accurate method for the determination of enterovirus 71 titer, *Indian journal of virology : an official organ of Indian Virological Society*. 23(3):303-10. doi:10.1007/s13337-012-0105-0
80. Toan NL, Hang NT, Luu NK, et al. (2019). Combination of Vaccine Strain Measles Virus and Nimotuzumab in the Treatment of Laryngeal Cancer, *Anticancer research*. 39(7):3727-3737.
doi:10.21873/anticanres.13521.

81. Zhang LF, Tan DQ, Jeyasekharan AD, et al. (2014). Combination of vaccine-strain measles and mumps virus synergistically kills a wide range of human hematological cancer cells: Special focus on acute myeloid leukemia, *Cancer letters*. 354(2):272-80. doi:10.1016/j.canlet.2014.08.034
82. Jain RK, Stylianopoulos T. (2010). Delivering nanomedicine to solid tumors, *Nature reviews Clinical oncology*. 7(11):653-64. doi:10.1038/nrclinonc.2010.139
83. Guedan S, Alemany R. (2018). CAR-T Cells and Oncolytic Viruses: Joining Forces to Overcome the Solid Tumor Challenge, *Frontiers in immunology*. 9:2460. doi:10.3389/fimmu.2018.02460
84. Kuczynski EA, Vermeulen PB, Pezzella F, Kerbel RS, Reynolds AR. (2019). Vessel co-option in cancer, *Nature reviews Clinical oncology*. 16(8):469-493. doi:10.1038/s41571-019-0181-9
85. Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. (2008). Growth and maintenance of Vero cell lines, *Current protocols in microbiology*. Appendix 4:Appendix 4E. doi:10.1002/9780471729259.mca04es11
86. Enders JF, Weller TH, Robbins FC. (1949). Cultivation of the Lansing Strain of Poliomyelitis Virus in Cultures of Various Human Embryonic Tissues, *Science (New York, NY)*. 109(2822):85-7. doi:10.1126/science.109.2822.85
87. Barrett PN, Mundt W, Kistner O, Howard MK. (2009). Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines, *Expert Review of Vaccines*. 8(5):607-618. doi:10.1586/erv.09.19
88. Reed Lj, Muench H. (1938). A Simple Method Of Estimating Fifty Per Cent Endpoints¹², *American Journal of Epidemiology*. 27(3):493-497. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.

89. LaBarre DD, Lowy RJ. (2001). Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID50 and plaque assays, *Journal of virological methods*. 96(2):107-26. doi:10.1016/s0166-0934(01)00316-0.
90. Hằng NT. (2020). Nghiên cứu tác dụng kháng ung thư đầu cổ của virus vaccine sởi phối hợp với Nimotuzumab trên thực nghiệm, luận án tiến sĩ y học. *Học Viện Quân y*.
91. Galanis E, Hartmann LC, Cliby WA, et al. (2010). Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer, *Cancer research*. 70(3):875-82. doi:10.1158/0008-5472.can-09-2762
92. Peng KW, TenEyck CJ, Galanis E, Kalli KR, Hartmann LC, Russell SJ. (2002). Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus, *Cancer research*. 62(16):4656-62.
93. Lin EH, Salon C, Brambilla E, et al. (2010). Fusogenic membrane glycoproteins induce syncytia formation and death in vitro and in vivo: a potential therapy agent for lung cancer, *Cancer Gene Therapy*. 17(4):256-265. doi:10.1038/cgt.2009.74
94. Xia M, Xia Y, Xu X, Meng G, Yan H, Shen H. Forskolin enhances the antitumor effect of oncolytic measles virus by promoting Rab27a dependent vesicular transport system in the lung cancer A549 cells in vitro. Research Square; 2020.
95. Yan Y, Liang B, Zhang J, Liu Y, Bu X. (2015). Apoptotic induction of lung adenocarcinoma A549 cells infected by recombinant RVG Newcastle disease virus (rL-RVG) in vitro, *Molecular medicine reports*. 11(1):317-26. doi:10.3892/mmr.2014.2657.

96. Bhaskar A, Bala J, Varshney A, Yadava P. (2011). Expression of measles virus nucleoprotein induces apoptosis and modulates diverse functional proteins in cultured mammalian cells, *PloS one*. 6(4):e18765. doi:10.1371/journal.pone.0018765.
97. Zhou S, Li Y, Huang F, et al. (2012). Live-attenuated measles virus vaccine confers cell contact loss and apoptosis of ovarian cancer cells via ROS-induced silencing of E-cadherin by methylation, *Cancer letters*. 318(1):14-25. doi:10.1016/j.canlet.2011.10.038.
98. Phuong LK, Allen C, Peng KW, et al. (2003). Use of a vaccine strain of measles virus genetically engineered to produce carcinoembryonic antigen as a novel therapeutic agent against glioblastoma multiforme, *Cancer research*. 63(10):2462-9.
99. Liu C, Sarkaria JN, Petell CA, et al. (2007). Combination of measles virus virotherapy and radiation therapy has synergistic activity in the treatment of glioblastoma multiforme, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 13(23):7155-65. doi:10.1158/1078-0432.ccr-07-1306.
100. Heinzerling L, Künzi V, Oberholzer PA, Kündig T, Naim H, Dummer R. (2005). Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses in vivo and targets interferon-resistant tumor cells, *Blood*. 106(7):2287-94. doi:10.1182/blood-2004-11-4558.
101. Ohtsuji M, Lin Q, Okazaki H, et al. (2018). Anti-CD11b antibody treatment suppresses the osteoclast generation, inflammatory cell infiltration, and autoantibody production in arthritis-prone FcγRIIB-deficient mice, *Arthritis research & therapy*. 20(1):25. doi:10.1186/s13075-018-1523-1.

102. Ahn GO, Brown JM. (2008). Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: role of bone marrow-derived myelomonocytic cells, *Cancer cell*. 13(3):193-205. doi: 10.1016/j.ccr.2007.11.032.
103. Stenström M, Sköld M, Ericsson A, et al. (2004). Surface receptors identify mouse NK1.1+ T cell subsets distinguished by function and T cell receptor type, *European journal of immunology*. 34(1):56-65. doi: 10.1002/eji.200323963.
104. Holst K, Guseva D, Schindler S, et al. (2015). The serotonin receptor 5-HT₇R regulates the morphology and migratory properties of dendritic cells, *Journal of cell science*. 128(15):2866-80. doi:10.1242/jcs.167999
105. Tel J, Anguille S, Waterborg CE, Smits EL, Figdor CG, de Vries IJ. (2014). Tumoricidal activity of human dendritic cells, *Trends in immunology*. 35(1):38-46. doi:10.1016/j.it.2013.10.007.
106. Grote D, Cattaneo R, Fielding AK. (2003). Neutrophils contribute to the measles virus-induced antitumor effect: enhancement by granulocyte macrophage colony-stimulating factor expression, *Cancer research*. 63(19):6463-8.
107. Donnelly OG, Errington-Mais F, Steele L, et al. (2013). Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma, *Gene therapy*. 20(1):7-15. doi:10.1038/gt.2011.205.
108. Nava S, Lisini D. (2021). Dendritic Cells and Cancer Immunotherapy: The Adjuvant Effect, 22(22)doi:10.3390/ijms222212339.
109. Guo ZS, Lu B, Guo Z, et al. (2019). Vaccinia virus-mediated cancer immunotherapy: cancer vaccines and oncolytics, *Journal for immunotherapy of cancer*. 7(1):6. doi:10.1186/s40425-018-0495-7.
110. Galanis E, Atherton PJ, Maurer MJ, et al. (2015). Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer, *Cancer research*. 75(1):22-30. doi:10.1158/0008-5472.can-14-2533

111. Abdullah SA, Al-Shammari AM, Lateef SA. (2020). Attenuated measles vaccine strain have potent oncolytic activity against Iraqi patient derived breast cancer cell line, *Saudi journal of biological sciences*. 27(3):865-872. doi:10.1016/j.sjbs.2019.12.015.
112. Muñoz-Alía M, Nace RA, Tischer A. (2021). MeV-Stealth: A CD46-specific oncolytic measles virus resistant to neutralization by measles-immune human serum, 17(2):e1009283. doi:10.1371/ journal.ppat.1009283.
113. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis, *BMC cell biology*. 14:32. doi:10.1186/1471-2121-14-32.
114. Boisgerault N, Guillerme JB, Pouliquen D, et al. (2013). Natural oncolytic activity of live-attenuated measles virus against human lung and colorectal adenocarcinomas, *BioMed research international*. 2013:387362. doi:10.1155/2013/387362.
115. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British journal of cancer*. 26(4):239-57. doi:10.1038/bjc.1972.33.
116. Liu X, Li P, Widlak P, et al. (1998). The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(15):8461-6. doi:10.1073/pnas.95.15.8461.
117. Errami Y, Naura AS, Kim H, et al. (2013). Apoptotic DNA fragmentation may be a cooperative activity between caspase-activated deoxyribonuclease and the poly(ADP-ribose) polymerase-regulated DNAS1L3, an endoplasmic reticulum-localized endonuclease that translocates to the nucleus during apoptosis, *The Journal of biological chemistry*. 288(5):3460-8. doi:10.1074/jbc.M112.423061

118. Núñez R, Sancho-Martínez SM, Novoa JM, López-Hernández FJ. (2010). Apoptotic volume decrease as a geometric determinant for cell dismantling into apoptotic bodies, *Cell death and differentiation*. 17(11):1665-71. doi:10.1038/cdd.2010.96
119. Soldani C, Croce AC, Bottone MG, et al. (2007). Apoptosis in tumour cells photosensitized with Rose Bengal acetate is induced by multiple organelle photodamage, *Histochemistry and cell biology*. 128(5):485-95. doi:10.1007/s00418-007-0333-3.
120. Bottone MG, Santin G, Aredia F, Bernocchi G, Pellicciari C, Scovassi AI. (2013). Morphological Features of Organelles during Apoptosis: An Overview, *Cells*. 2(2):294-305. doi:10.3390/cells2020294
121. Xia M, Gonzalez P, Li C, et al. (2014). Mitophagy enhances oncolytic measles virus replication by mitigating DDX58/RIG-I-like receptor signaling, *Journal of virology*. 88(9):5152-64. doi:10.1128/jvi.03851-13
122. Everett H, McFadden G. (1999). Apoptosis: an innate immune response to virus infection, *Trends in microbiology*. 7(4):160-5. doi:10.1016/s0966-842x(99)01487-0
123. Moreau K, Luo S, Rubinsztein DC. (2010). Cytoprotective roles for autophagy, *Current opinion in cell biology*. 22(2):206-11. doi:10.1016/j.ceb.2009.12.002
124. Richetta C, Grégoire IP, Verlhac P, et al. (2013). Sustained autophagy contributes to measles virus infectivity, *PLoS pathogens*. 9(9): e1003599. doi:10.1371/journal.ppat.1003599
125. Green DR. (2019). The Coming Decade of Cell Death Research: Five Riddles, *Cell*. 177(5):1094-1107. doi:10.1016/j.cell.2019.04.024
126. Wallach D, Kang TB, Dillon CP, Green DR. (2016). Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules, *Science (New York, NY)*. 352(6281):aaf2154. doi:10.1126/science.aaf2154

127. Gatenby RA, Gillies RJ. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis?, *Nature reviews Cancer*. 4(11):891-9. doi:10.1038/nrc1478
128. Makki J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance, *Clinical medicine insights Pathology*. 8:23-31. doi:10.4137/CPath.S31563.
129. Eil R, Vodnala SK, Clever D, et al. (2016). Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function, *Nature*. 537(7621):539-543. doi:10.1038/nature19364.
130. Jiao D, Cai Z. (2018). Necroptosis of tumor cells leads to tumor necrosis and promotes tumor metastasis, 28(8):868-870. doi:10.1038/s41422-018-0058-y.
131. Altman BJ, Rathmell JC. (2012). Metabolic stress in autophagy and cell death pathways, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 4(9):a008763. doi:10.1101/cshperspect.a008763.
132. Lee HY, Itahana Y. (2018). Ca(2+)-dependent demethylation of phosphatase PP2Ac promotes glucose deprivation-induced cell death independently of inhibiting glycolysis, 11(512) doi:10.1126/scisignal.aam7893.