

PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG HÌNH THÁI ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ NHUỘM HÓA MÔ MIỄN DỊCH BỘC LỘ DẤU ẤN KHÁNG NGUYÊN CD31, CD34 TRÊN TẾ BÀO NỘI MÔ VI MẠCH MÔ DA SAU XẠ TRỊ

Hoàng Thanh Tuấn¹, Tường Phi Vương²,
Vũ Quang Vinh¹, Trịnh Tuấn Dũng³

¹Bệnh viện Bông Quốc gia Lê Hữu Trác

²Viện 69 Bộ tư lệnh Bảo vệ lăng

³Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

TÓM TẮT

Phương pháp định lượng hình thái cho phép đánh giá định lượng và định tính một cách khách quan biểu hiện của các quá trình sinh lý bệnh, giải phẫu bệnh. Với mục tiêu ứng dụng phương pháp định lượng hình thái trong đánh giá kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch chúng tôi tiến hành thực nghiệm đánh giá mức độ biểu lộ dấu ấn kháng nguyên CD31, CD34 trên tế bào nội mô vi mạch mô da sinh thiết từ 30 bệnh nhân sau xạ trị ở 3 vùng khác nhau: Trung tâm ổ loét, vùng thâm nhiễm và vùng rìa.

Kết quả đánh giá mức độ phản ứng hóa mô miễn dịch thông qua việc tính tỉ lệ diện tích tương đồng với kết quả tính tỉ lệ tạo mạch máu trong mẫu mô da sau xạ trị dương tính với CD31 và CD34, bảo đảm độ chính xác và độ tin cậy cao, phù hợp với các nghiên cứu trước đây đã được công bố, xạ trị làm tăng mức độ biểu hiện dấu ấn kháng nguyên CD31 và CD34. Thành công trong nghiên cứu áp dụng phương pháp định lượng hình thái đánh giá kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch bộc lộ dấu ấn kháng nguyên CD31, CD34 trên tế bào nội mô vi mạch mô da sau xạ trị cho thấy triển vọng tiếp tục ứng dụng phương pháp định lượng hình thái đối với các nghiên cứu tiếp theo về hóa mô miễn dịch.

Từ khóa: Định lượng hình thái (morphometry), quan trắc hệ thống (system stereology), hóa mô miễn dịch, xạ trị, tổn thương vi mạch, CD31, CD34.

SUMMARY

Skin damage is one of the most frequent side effects during radiotherapy in patients with cancer diseases. In this study, the quantitative morphological method was used to assess the level of CD31 and CD34 expression on the skin microvascular endothelial cells after radiotherapy.

Chịu trách nhiệm chính: Hoàng Thanh Tuấn, Bệnh viện Bông Quốc gia Lê Hữu Trác
Email: tuanht.vb@gmail.com

We collected thirty radiation-ulcer skin samples, each of which has three studied regions: the center (zone 1), the affected (zone 2), and the outside (zone 3) of the radiation-induced skin ulcer. We found that, the surface density (Sv) and length density (Lv) of a blood vessel with CD31 and CD34 positive decreased statistic significantly from center to outside of the ulcer. We conclude that our developed morphological quantitative method could be used to evaluate the results of CD31 and CD34 expression on skin microvascular endothelial cells after radiotherapy. Moreover, the success of our study may permit the following application of this morphological quantitative method for analysis of further immunohistochemistry studies.

Keywords: Radiation-induced ulcer, radiotherapy, morphometry, immunohistochemistry, CD31, CD34.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tổn thương mô khu trú sau xạ trị bao gồm hoại tử và những biến đổi hình thái cấu trúc khác của mô (*xơ hóa quanh mạch, giãn tĩnh mạch nhỏ, tắc mạch và xuất huyết*) gây ra do tác dụng phụ của quá trình xạ trị [4]. Trong đó, tổn thương mạch máu do tác dụng phụ của quá trình xạ trị là một trong những nhân tố quan trọng làm cho tổ chức bình thường của cơ thể bị teo đét, xơ hóa và hoại tử sau xạ trị [1,2,3,4].

Với mục tiêu đánh giá mức độ và vai trò của tổn thương vi mạch máu do xạ trị người ta thường sử dụng phương pháp hóa mô miễn dịch nhằm bộc lộ kháng nguyên CD31 và CD34 trên bề mặt tế bào nội mô thành vi mạch. Tuy nhiên, việc đánh giá mức độ phản ứng hóa mô miễn dịch mới chỉ mang tính định tính (âm tính - dương tính) hoặc bán định lượng với việc áp dụng phổ biến là phương pháp đánh giá theo thang điểm "+" dựa theo cường độ phản ứng và tỉ lệ tế bào hoặc số lượng mạch máu có phản ứng miễn dịch [1,2,3,4]. Do đó, kết quả đánh giá chưa thực sự khách quan. Sai số hệ thống và sai số thống kê của phương pháp cũng rất khó xác định.

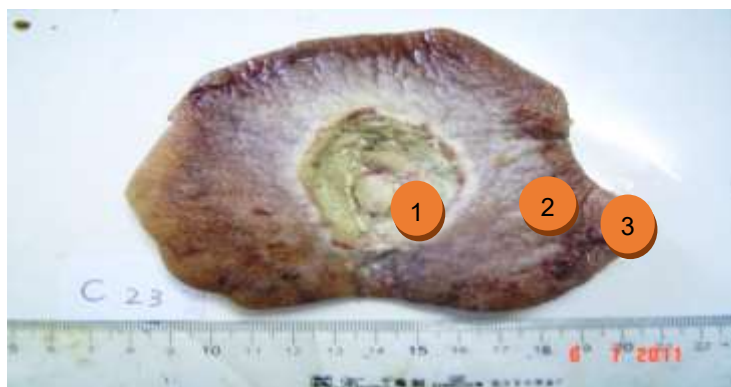
Phương pháp định lượng hình thái trên cơ sở quan trắc hệ thống (system stereology) không phải là mới đối với các nhà nghiên cứu hình thái. Nó cho phép sử dụng kết quả quan trắc trên mặt cắt (2D) của cấu trúc (tiêu bản mô) để suy ra các tính chất trong thể tích (3D) của cấu trúc đó. Từ đó đánh giá định lượng và định tính một cách khách quan biểu hiện của các quá trình bệnh học, các bệnh, sinh lý bệnh, giải phẫu bệnh..., đồng thời loại bỏ những sai số do đo đếm, cũng ảnh hưởng chủ quan của người nghiên cứu [1,2].

Do vậy, với mục tiêu ứng dụng phương pháp định lượng hình thái trong đánh giá kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch chúng tôi tiến hành thực nghiệm đánh giá mức độ biểu lộ dấu ấn kháng nguyên CD31,CD34 trên tế bào nội mô vi mạch mô da sau xạ trị.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Trên tổng số 30 bệnh nhân sau xạ trị, với mỗi bệnh nhân tiến hành phẫu thuật cắt bỏ tổn thương và lấy mẫu sinh thiết từ 3 vùng khác nhau: (1) Trung tâm ổ loét, (2) vùng thâm nhiễm, (3) vùng rìa (Hình 2.1).



Hình 2.1. Ba vị trí sinh thiết tổn thương
(1: Vùng trung tâm, 2: Vùng thâm nhiễm, 3: Vùng rìa)

Các mẫu sau khi đúc Paraphin được cắt với độ dày 4 μ m và lần lượt được nhuộm hóa mô miễn dịch để bộc lộ dấu ấn kháng nguyên CD31 và CD34. Ứng với từng vùng nghiên cứu, tổng số thu được:

- 30 tiêu bản vi thể, mỗi tiêu bản gồm 3 lát cắt từ 3 vị trí sinh thiết tương ứng, nhuộm hóa mô miễn dịch bộc lộ CD31.

- 30 tiêu bản vi thể, mỗi tiêu bản gồm 3 lát cắt từ 3 vị trí sinh thiết tương ứng, nhuộm hóa mô miễn dịch bộc lộ CD34.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chụp ảnh tiêu bản ở độ phóng đại 400 lần

- Chụp 5 ảnh/lát cắt (vi trường chọn ngẫu nhiên, 4 ảnh xung quanh và 1 ở giữa lát cắt).

- Trên mỗi tiêu bản có 3 lát cắt tương ứng với vị trí vùng ổ loét, vùng thâm nhiễm và vùng rìa (chứng).

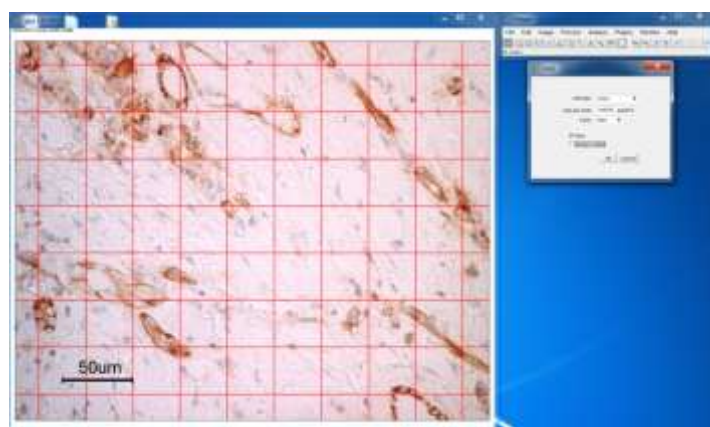
- Tiến hành định lượng hình thái trên từng lát cắt này và so sánh kết quả với nhau.

2.2.2. Tính tỉ lệ diện tích mạch máu (dương tính với CD31, CD34) trên một đơn vị thể tích (S_v)

Sử dụng phương pháp định lượng hình thái test đường (Test lines) [1,2]. Cụ thể như sau:

- Dùng phần mềm ImageJ (của Viện Y học quốc gia Mỹ) mở ảnh chụp tiêu bản.

- Chọn chế độ đặt lưới (Grid) ngẫu nhiên lên tiêu bản (Hình 2.2).



Hình 2.2: Chế độ đặt lưới ngẫu nhiên trên tiêu bản

- Tính tổng độ dài đường ngang (8 đường) và đường dọc (10 đường) (L).

- Tính số lượng các lần đường ngang và dọc cắt qua mạch máu dương tính với phản ứng hóa mô miễn dịch (Z).

- Tính tỉ lệ diện tích mạch máu trên một đơn vị thể tích (S_v) theo công thức

$$S_v = 2Z/L \quad [1,2]$$

- Tính sai số tương đối (E_{td})

$$E_{td} = K \cdot t / Z^{1/2} \cdot 100\% \quad [1,2]$$

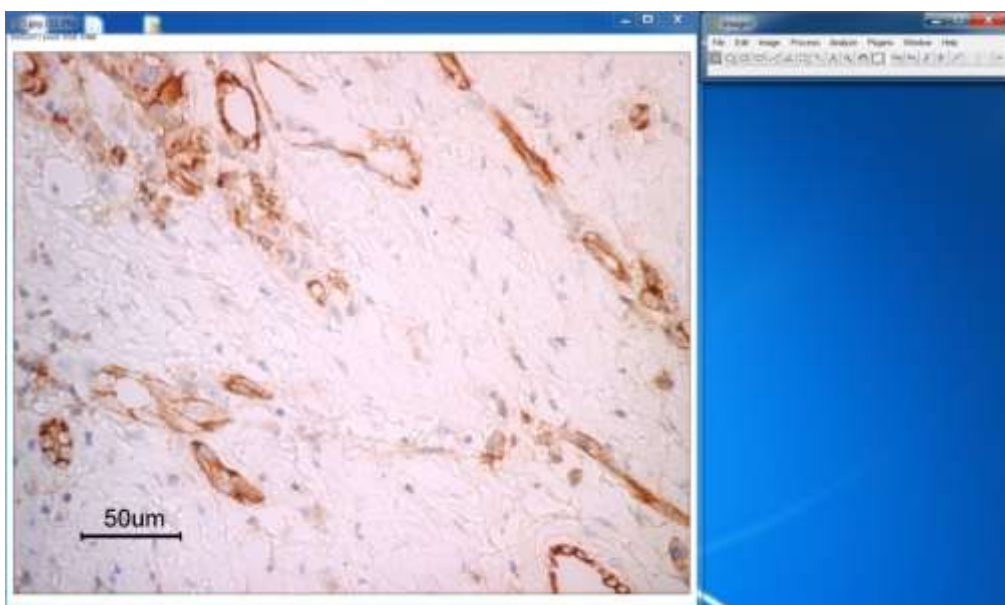
+ K là hệ số đẳng phương, trong trường hợp này $K = 0,45$ do mạch máu phân bố theo hướng không xác định.

+ $t = 1,96$ với $p < 0,05$

2.2.3. Tính tỉ lệ độ dài mạch máu (dương tính với CD31, CD 34) trên một đơn vị thể tích (L_v)

Sử dụng phương pháp định lượng hình thái test mặt (Test planes) [1,2]. Cụ thể như sau:

- Dùng phần mềm ImageJ (của Viện Y học quốc gia Mỹ) mở ảnh chụp tiêu bản (Hình 2.3).



Hình 2.3: Ảnh chụp tiêu bản

- Tính diện tích ảnh vi trường theo thước chuẩn trên ảnh (A).

- Tính số lượng mạch máu trong khuôn khổ vi trường (Q)

- Tính tỉ lệ độ dài mạch máu trên một đơn vị thể tích (L_v) theo công thức

$$L_v = 2 Q/A \quad [1,2]$$

- Tính sai số tương đối (E_{td})

$$E_{td} = K \cdot t / Q^{1/2} \cdot 100\% \quad [1,2]$$

+ K là hệ số đẳng phương, trong trường hợp này $K = 0,45$ do mạch máu phân bố theo hướng không xác định.

+ $t = 1,96$ với $p < 0,05$

3. KẾT QUẢ

3.1. Kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch với CD31

3.1.1. Kết quả tính tỉ lệ diện tích mạch máu dương tính với CD31 trên một đơn vị thể tích (S_{VCD31})

Bảng 1. Tổng hợp kết quả tính tỉ lệ diện tích mạch máu dương tính với CD31 trên một đơn vị thể tích (S_{VCD31})

Các vùng sinh thiết	Vùng ổ loét (1)	Vùng thâm nhiễm (2)	Vùng rìa (3)
S_v (mm^{-1})	5,3	2,9	1,7
Sai số tương đối với $p = 0,05$	1,97%	2,66%	3,43%
Giá trị p (T-test)	$p_{13} < 0,0001$	$p_{23} < 0,0001$	$p_{12} < 0,0001$

Ghi chú: p_{13} là giá trị của p khi kiểm chứng kết quả so sánh vùng ổ loét và vùng rìa

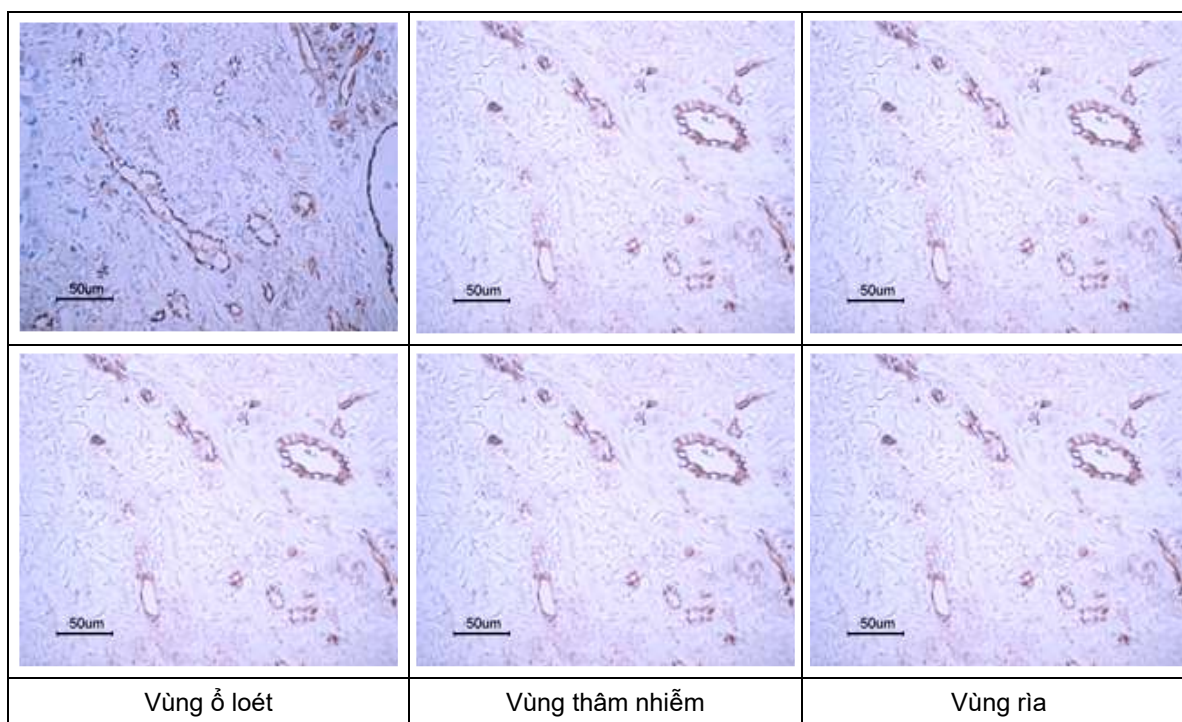
p_{23} là giá trị của p khi kiểm chứng kết quả so sánh vùng thâm nhiễm và vùng rìa

p_{12} là giá trị của p khi kiểm chứng kết quả so sánh vùng ổ loét và vùng thâm nhiễm

Nhận xét:

- Sai số tương đối của phương pháp định lượng giá trị S_v đều dưới 5%, giá trị này là có thể chấp nhận được trong nghiên cứu y học.

- Giá trị S_{VCD31} vùng ổ loét và vùng thâm nhiễm cao hơn so với vùng rìa. Các kết quả so sánh này đều có ý nghĩa thống kê với $p < 0,0001$ khi kiểm chứng bằng test T ghép cặp (Hình 3.1).



Hình 3.1. Hình ảnh bộc lộ dấu ấn kháng nguyên CD31 trong chân bì các mẫu da nghiên cứu. Mức độ biểu lộ dấu ấn kháng nguyên giảm dần từ vùng ổ loét đến vùng thâm nhiễm và vùng rìa. Nhuộm hóa mô miễn dịch với kháng thể kháng CD31. x 400.

3.1.2. Kết quả tính tỉ lệ độ dài mạch máu dương tính với CD31 trên một đơn vị thể tích (L_{VCD31})

Bảng 2. Tổng hợp kết quả tính tỉ lệ độ dài mạch máu dương tính với CD31 trên một đơn vị thể tích (L_{VCD31})

Các vùng sinh thiết	Vùng ổ loét (1)	Vùng thâm nhiễm (2)	Vùng rìa (3)
L_v (mm^{-2})	98,35	70,03	47,62
Sai số tương đối (%) với $p = 0,05$	3,51	4,16	5,04
Giá trị p (T-test)	$p_{13} < 0,0001$	$p_{23} = 0,0003$	$p_{12} = 0,0004$

Ghi chú: - p_{13} là giá trị của p khi kiểm chứng kết quả so sánh vùng ổ loét và vùng rìa
 - p_{23} là giá trị của p khi kiểm chứng kết quả so sánh vùng thâm nhiễm và vùng rìa
 - p_{12} là giá trị của p khi kiểm chứng kết quả so sánh vùng ổ loét và vùng thâm nhiễm

Nhận xét:

- Sai số tương đối của phương pháp định lượng giá trị L_{VCD31} đều dưới 5%, giá trị này là có thể chấp nhận được trong nghiên cứu y học.

- Giá trị L_{VCD31} vùng ổ loét và vùng thâm nhiễm cao hơn so với vùng rìa. Các kết quả so sánh này đều có ý nghĩa thống kê với $p < 0,0001$ khi kiểm chứng bằng test-T ghép cặp (Hình 3.1).

Như vậy, kết quả định lượng cả giá trị S_{VCD31} và L_{VCD31} đều cho thấy, các giá trị

này giảm dần từ vùng ổ loét đến vùng thâm nhiễm và vùng rìa. Do mức độ biểu hiện dấu ấn kháng nguyên CD31 tỉ lệ thuận với giá trị S_{VCD31} và L_{VCD31} . Vì vậy, từ kết quả định lượng hình thái này ta có thể kết luận: Mức độ biểu hiện dấu ấn kháng nguyên CD31 tăng dần từ vùng rìa đến vùng thâm nhiễm và vùng ổ loét. Nói cách khác, kết quả xạ trị làm tăng mức độ biểu hiện dấu ấn kháng nguyên CD31 tại vùng da bị tổn thương.

3.2. Kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch với CD34

4.2.1. Kết quả tính tỉ lệ diện tích mạch máu dương tính với CD34 trên một đơn vị thể tích (S_{VCD34})

Bảng 3. Tổng hợp kết quả tính tỉ lệ diện tích mạch máu dương tính với CD34 trên một đơn vị thể tích (S_{VCD34})

Các vùng sinh thiết	Vùng ổ loét (1)	Vùng thâm nhiễm (2)	Vùng rìa (3)
S_v (mm^{-1})	2,9	2,5	2,2
Sai số tương đối (%) với $p = 0,05$	2,57	2,79	2,93
Giá trị p (T-test)	$p_{13} = 0,00058$	$p_{23} = 0,07883$	$p_{12} = 0,27767$

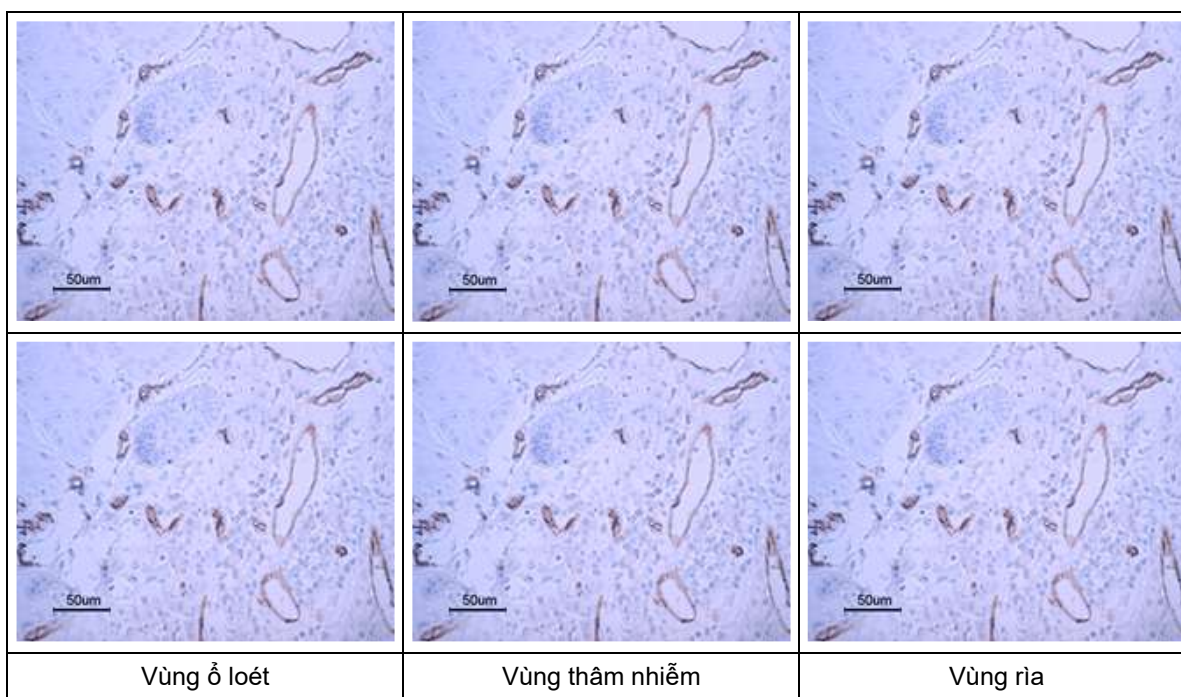
Ghi chú: - p_{13} là giá trị của p khi kiểm chứng kết quả so sánh vùng ổ loét và vùng rìa
 - p_{23} là giá trị của p khi kiểm chứng kết quả so sánh vùng thâm nhiễm và vùng rìa
 - p_{12} là giá trị của p khi kiểm chứng kết quả so sánh vùng ổ loét và vùng thâm nhiễm

Nhận xét:

- Sai số tương đối của phương pháp định lượng giá trị S_v đều dưới 5%, giá trị này là có thể chấp nhận được trong nghiên cứu y học.

- Giá trị S_{vCD34} vùng ổ loét cao hơn vùng rìa (có ý nghĩa thống kê với $p_{13} =$

0,00058). Giá trị S_{vCD34} vùng thâm nhiễm cao hơn vùng rìa và cũng ổ loét cao hơn vùng thâm nhiễm, nhưng không có ý nghĩa thống kê do $p > 0,05$. Mặc dù vậy, ta vẫn thấy được xu hướng giảm dần giá trị S_{vCD34} từ vùng ổ loét, qua vùng thâm nhiễm, đến vùng rìa (Hình 3.2).



Hình 3.2. Hình ảnh bộc lộ dấu ấn kháng nguyên CD34 trong chân bì các mẫu da nghiên cứu. Mức độ biểu lộ dấu ấn kháng nguyên giảm dần từ vùng ổ loét đến vùng thâm nhiễm và vùng rìa. Nhuộm hóa mô miễn dịch với kháng thể kháng CD34. x 400.

3.2.2. Kết quả tính tỉ lệ độ dài mạch máu dương tính với CD34 trên một đơn vị thể tích (L_{vCD34})

Bảng 4. Tổng hợp kết quả tính tỉ lệ độ dài mạch máu dương tính với CD34 trên một đơn vị thể tích (L_{vCD34})

Các vùng sinh thiết	Vùng ổ loét (1)	Vùng thâm nhiễm (2)	Vùng rìa (3)
L_v (mm^{-2})	107,92	85,40	76,11
Sai số tương đối (%) với $p = 0,05$	3,24	3,64	3,85
Giá trị p (T-test)	$p_{13} < 0,0001$	$p_{23} = 0,087$	$p_{12} = 0,00115$

Ghi chú: - p_{13} là giá trị của p khi kiểm chứng kết quả so sánh vùng ổ loét và vùng rìa

- p_{23} là giá trị của p khi kiểm chứng kết quả so sánh vùng thâm nhiễm và vùng rìa

- p_{12} là giá trị của p khi kiểm chứng kết quả so sánh vùng ổ loét và vùng thâm nhiễm

Nhận xét:

- Sai số tương đối của phương pháp định lượng giá trị L_{VCD34} đều dưới 5%, giá trị này là có thể chấp nhận được trong nghiên cứu y học.

- Giá trị S_{VCD34} vùng ổ loét cao hơn vùng rìa (có ý nghĩa thống kê với $p_{13} < 0,0001$), và cao hơn vùng thâm nhiễm (có ý nghĩa thống kê với $p_{12} = 0,00115$). Giá trị S_{VCD34} vùng thâm nhiễm cao hơn vùng rìa, nhưng không có ý nghĩa thống kê do $p > 0,05$. Mặc dù vậy, ta vẫn thấy được xu hướng giảm dần giá trị S_{VCD34} từ vùng ổ loét, qua vùng thâm nhiễm, đến vùng rìa (Hình 3.2).

Như vậy, tương tự như đối với CD31, kết quả định lượng cả giá trị S_{VCD34} và L_{VCD34} đều cho thấy, các giá trị này giảm dần từ vùng ổ loét đến vùng thâm nhiễm và vùng rìa. Do mức độ biểu hiện dấu ấn kháng nguyên CD34 tỉ lệ thuận với giá trị S_{VCD34} và L_{VCD34} nên có thể nói, kết quả xạ trị làm tăng mức độ biểu hiện dấu ấn kháng nguyên CD34 tại vùng da tương ứng.

4. BÀN LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, việc áp dụng phương pháp định lượng hình thái tính diện tích cũng như độ dài mạch máu dương tính với phản ứng hóa mô miễn dịch (qua đó đánh giá mức độ biểu lộ dấu ấn kháng nguyên của nghiên cứu) là hoàn toàn mới so với phương pháp đánh giá bán định lượng đang sử dụng phổ biến hiện nay.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn định lượng cả hai đại lượng diện tích và độ dài mạch máu để thử nghiệm độ chính xác của phương pháp đã áp dụng. Kết quả đánh giá mức độ phản ứng hóa mô

miễn dịch thông qua việc tính tỉ lệ diện tích tương đồng với kết quả tính tỉ lệ độ dài mạch máu trong mẫu mô da sau xạ trị dương tính với CD31 hay với CD34. Mức độ biểu hiện các dấu ấn kháng nguyên này đều tăng dần từ vùng rìa đến vùng thâm nhiễm và vùng ổ loét. Đồng thời, kết quả đánh giá mức độ biểu lộ dấu ấn kháng nguyên CD31 và CD34 thu được cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây đã được công bố [3,4,5,6].

Một trong những yêu cầu xuyên suốt khi áp dụng phương pháp định lượng hình thái là phải bảo đảm được tính hệ thống chặt chẽ, từ giai đoạn thiết kế nghiên cứu đến giai đoạn đo đếm, số lượng, giai đoạn tổng hợp, phân tích xử lý số liệu thu được bằng thống kê toán học và cuối cùng, trên cơ sở kết quả thu được đưa ra quy luật biến đổi của đối tượng nghiên cứu. Tất cả các giai đoạn này đều phải thực hiện một cách khoa học, chặt chẽ do sẽ ảnh hưởng trực tiếp đến tính chính xác của kết quả thu được.

Để đáp ứng yêu cầu này, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu với số lượng mẫu sinh thiết tương đối lớn (30 bệnh nhân) nhằm bảo đảm tính đại diện. Bên cạnh đó, ứng với mỗi bệnh nhân đều được sinh thiết 3 vùng tổn thương do xạ trị khác nhau cho phép so sánh đặc điểm tổn thương giữa các vùng tổn thương khác nhau trên cùng một bệnh nhân sử dụng test-T ghép cặp với $n = 30$ nhằm làm tăng độ tin cậy của kết quả.

Để bảo đảm tính khách quan, chúng tôi tiến hành thiết kế nghiên cứu dưới dạng mù đơn với quá trình chuẩn bị tiêu bản, soi chụp ảnh tiêu bản và tính toán định lượng trên ảnh thu được đều được thực hiện bởi các bác sĩ độc lập và không biết các thông

tin về nghiên cứu này. Đồng thời, quá trình chọn vi trường để tính toán cũng được tiến hành một cách ngẫu nhiên với 4 ảnh xung quanh và 1 ảnh ở giữa lát cắt. Nhờ có thiết kế nghiên cứu tương đối chặt chẽ và khoa học, tuân thủ các nguyên tắc của phương pháp định lượng hình thái nên kết quả chúng tôi thu được có độ chính xác và độ tin cậy đáp ứng được yêu cầu đề ra (sai số tương đối của tất cả các phép tính toán đều dưới 5%, đa số các giá trị p khi kiểm chứng bằng test-T đều rất nhỏ).

Một trong những ưu điểm của phương pháp định lượng hình thái không những đưa ra số liệu định lượng mà còn chỉ ra sai số của phương pháp (sai số tương đối trong nghiên cứu này). Thông tin về sai số phương pháp không những cho phép người nghiên cứu đánh giá mức độ chính xác của kết quả thu được mà còn là kim chỉ nam cho việc thiết kế nghiên cứu với các yêu cầu đặt ra về độ chính xác của kết quả dự kiến đạt được trên cơ sở tính toán ước lượng số mẫu theo các công thức toán học phù hợp [1].

Bên cạnh đó, kết quả định lượng thu được còn giúp các nhà nghiên cứu có thêm nhiều lựa chọn thuật toán thống kê (có thể dùng cả test với biến liên tục, biến thứ hạng và biến danh mục), bảo đảm tất cả kết quả nghiên cứu đều được xử lý thống kê toán học bằng các test phù hợp.

5. KẾT LUẬN

Như vậy, cùng với xu hướng số hóa trong phát triển của khoa học công nghệ nói chung và y học nói riêng đòi hỏi phải áp dụng các phương pháp định lượng trong đánh giá kết quả nghiên cứu khoa học. Định lượng hình thái đã từ lâu được cho là

hướng phát triển đầy triển vọng của chuyên ngành hình thái nhằm làm tăng tính khách quan, tính bao quát và độ tin cậy trong đánh giá hình thái cấu trúc mô sinh học. Kết quả định lượng là cơ sở để tiến tới tiếp tục áp dụng những tiến bộ của cuộc cách mạng khoa học và công nghệ 4.0 nhằm tiến tới “số hóa” và “tự động hóa” không những trong nghiên cứu mà cả trong chẩn đoán lâm sàng hình thái học.

Thành công trong nghiên cứu áp dụng phương pháp định lượng hình thái đánh giá kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch bộ lọc dấu ấn kháng nguyên CD31, CD34 trên tế bào nội mô vi mạch mô da sau xạ trị cho thấy triển vọng tiếp tục ứng dụng phương pháp định lượng hình thái đối với các nghiên cứu tiếp theo về hóa mô miễn dịch.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Avtandilov G., 1990.** Medical morphology. Moscow “Medicine”.
2. **Muhlfield et al, 2010.** Stereology for quantitative 3D morphology cardiac research. *Cardiovasc Path.*, Vol. 19, pp. 65-82.
3. **S. Quarmby, P. Kumar, J. Wang et al, 1999.** Irradiation Induces Upregulation of CD31 in Human Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol.19, pp. 588-597.
4. **S. Quarmby, P. Kumar, S. Kumar, 1999.** Radiation-induced normal tissue injury: Role of adhesion molecules in leucocyte-endothelial cell interactions. *Int. J. Cancer*, Vol. 82, pp.385-395.
5. **M. Chin, B. Freniere, L. Lancerotto et al, 2015.** Hyperspectral imaging as an early biomarker for radiation exposure and microcirculatory damage. *Frontiers in Oncology*, Vol. 5, Article 232.
6. **Nikitin K.V., 2010.** Local radiation injury of brain tissue after radiotherapy and radiosurgery for intracranial tumors. *Dissertation for Ph.D.*