

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN**

ĐỖ THỊ THANH HUYỀN

**NGHIÊN CỨU SÀNG LỌC CHẤT ỨC CHẾ NHÂN TỐ
PHIÊN MÃ NF- κ B *in silico* và *in vitro* ĐỊNH HƯỚNG
ỨNG DỤNG ĐIỀU TRỊ UNG THƯ**

Chuyên ngành: DI TRUYỀN HỌC

Mã số : 9420101.21

(DỰ THẢO) TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Hà Nội – 2022

;

Công trình được hoàn thành tại:

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên

Đại học Quốc gia Hà Nội

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS. TS. Nguyễn Thị Hồng Vân
2. PGS. TS. Nguyễn Quang Huy

Phản biện:

Phản biện:

Phản biện:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng cấp Đại học Quốc gia chấm
luận án tiến sĩ họp tại

.....

vào hồi giờ ngày tháng năm 20...

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam;
- Trung tâm Thư viện và Tri thức số, Đại học Quốc gia Hà Nội

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Phản ứng viêm là phản ứng quan trọng của hệ thống miễn dịch chống lại các tổn thương mô hoặc các kích thích có hại như các mầm bệnh, chất gây dị ứng, hóa chất độc hại hoặc chiếu xạ [1]. Tuy nhiên, những đáp ứng viêm không được kiểm soát có thể dẫn đến việc khởi phát và tiến triển hàng loạt các căn bệnh ở người như bệnh tim mạch, bệnh đường ruột, bệnh tiểu đường, bệnh hô hấp, bệnh thận, bệnh tự miễn và đặc biệt là nhiều loại bệnh ung thư [2-4]. Các loại thuốc kháng viêm được sử dụng rộng rãi hiện nay đều tiềm ẩn nguy cơ gây ra nhiều tác dụng phụ không mong muốn đối với dạ dày, thận, gan [5]. Vì vậy, việc nghiên cứu tìm kiếm và sàng lọc các loại thuốc kháng viêm mới và ngừa ung thư, đặc biệt là các thuốc có nguồn gốc từ thực vật, ít tác dụng phụ là nhu cầu cấp thiết.

Đích đến của các loại thuốc kháng viêm là các con đường truyền tin chính gây ra phản ứng viêm như NK- κ B, MAPK và axit arachidonic (AA). Trong các con đường truyền tin gây ra phản ứng viêm thì con đường truyền tin NF- κ B là con đường đóng vai trò quan trọng. Việc sàng lọc các chất có khả năng kháng viêm hướng đích vào NF- κ B là hết sức cần thiết và đang được thế giới quan tâm nghiên cứu.

Để tìm ra các thuốc kháng viêm tiềm năng cần có những mô hình kháng viêm thích hợp. Các hướng sàng lọc thuốc hiện nay tập trung vào 3 hướng chính là: (1) sàng lọc *in silico* bằng công cụ tin sinh, (2) sàng lọc *in vitro* trên mô hình tế bào và (3) sàng lọc *in vivo* dựa trên

mô hình động vật. Mỗi mô hình sàng lọc đều có ưu điểm và nhược điểm riêng. Việc kết hợp cả ba mô hình sàng lọc *in silico*, *in vitro*, *in vivo* sẽ tận dụng được tính ưu việt của các phương pháp này.

Xuất phát từ nhu cầu sàng lọc và tìm kiếm các chất có tiềm năng kháng viêm và ngừa ung thư hướng đích NF- κ B bằng việc kết hợp các mô hình sàng lọc *in silico*, *in vitro* và *in vivo*, chúng tôi tiến hành đề tài “ ***Nghiên cứu sàng lọc chất ức chế nhân tố phiên mã NF- κ B in silico và in vitro định hướng ứng dụng điều trị ung thư***”

2. Mục tiêu nghiên cứu:

1. Kết hợp hai hướng sàng lọc (1) sàng lọc *in silico* và (2) sàng lọc *in vitro* để sàng lọc được ít nhất hai chất ức chế protein NF- κ B p50 hoặc p65 từ thư viện 200000 hợp chất tự nhiên.

2. Đánh giá khả năng kháng viêm thông qua ức chế con đường NF- κ B của tinh dầu, dịch chiết cây xương sông, tinh dầu cây giổi mốc ở Việt Nam sử dụng phương pháp phân tích *in silico*, *in vitro* và *in vivo*.

3. Nội dung nghiên cứu:

1. Tạo thư viện cấu trúc 200000 hợp chất tự nhiên và từ đó sàng lọc *in silico* được ít nhất 6 chất tiềm năng có khả năng ức chế protein NF- κ B p50 hoặc p65.

2. Đánh giá khả năng ức chế protein NF- κ B p50 và p65 của 6 chất ức chế tiềm năng (thu được từ sàng lọc ảo) trong điều kiện *in vitro* sử dụng phương pháp EMSA và tìm ra được ít nhất hai chất có khả năng ức chế protein p50 hoặc p65.

3. Đánh giá khả năng kháng viêm thông qua ức chế con đường NF- κ B của tinh dầu cây xương sông ở Việt Nam sử dụng phương pháp phân tích *in silico*, *in vitro* và *in vivo*.

4. Đánh giá khả năng kháng viêm thông qua ức chế con đường NF- κ B của dịch chiết methanol cây xương sông ở Việt Nam sử dụng phương pháp phân tích *in silico*, *in vitro* và *in vivo*.

5. Đánh giá khả năng kháng viêm thông qua ức chế con đường NF- κ B của tinh dầu cây giổi móc sử dụng phương pháp phân tích *in silico*, *in vitro* và *in vivo*.

4. Đóng góp mới của luận án:

1. Sàng lọc được một số chất có tiềm năng ức chế nhân tố phiên mã NF- κ B p50 hoặc p65 từ thư viện 200000 hợp chất tự nhiên.

2. Đánh giá được khả năng kháng viêm thông qua ức chế con đường NF- κ B của tinh dầu cây xương sông ở Việt Nam sử dụng phương pháp phân tích *in silico*, *in vitro* và *in vivo*.

3. Đánh giá được khả năng kháng viêm thông qua ức chế con đường NF- κ B của dịch chiết methanol cây xương sông ở Việt Nam sử dụng phương pháp phân tích *in silico*, *in vitro* và *in vivo*.

4. Đánh giá được khả năng kháng viêm thông qua ức chế con đường NF- κ B của tinh dầu cây giổi móc ở Việt Nam sử dụng phương pháp phân tích *in silico*, *in vitro* và *in vivo*.

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Luận án đã sàng lọc được hai chất có tiềm năng kháng viêm thông qua việc ức chế protein NF- κ B p50 từ thư viện 200000 hợp chất tự nhiên. Các kết quả này là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo trong việc phát triển các loại thuốc kháng viêm mới.

Luận án đã đánh giá được khả năng kháng viêm của dịch chiết methanol cây xương sông, tinh dầu cây xương sông, tinh dầu cây giổi móc; đồng thời chỉ ra được đích kháng viêm của các chất có

trong dịch chiết và tinh dầu là các protein đích của con đường NF- κ B như TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2, p-I κ B α và p-p65. Các kết quả này cho thấy tiềm năng khai thác và ứng dụng tinh dầu, dịch chiết cây xương sông và tinh dầu cây giổi móc trong việc điều trị các bệnh liên quan đến phản ứng viêm.

6. Bố cục của luận án:

Luận án gồm 176 trang, 11 bảng và 52 hình bao gồm: Phần mở đầu (03 trang); Chương 1 Tổng quan tài liệu (32 trang); Chương 2 Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu (28 trang); Chương 3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận (80 trang); Kết luận (01 trang); Kiến nghị (01 trang); Các công trình khoa học của tác giả liên quan đến luận án (01 trang); Tài liệu tham khảo (8 trang) với 161 tài liệu; Phụ lục (22 trang).

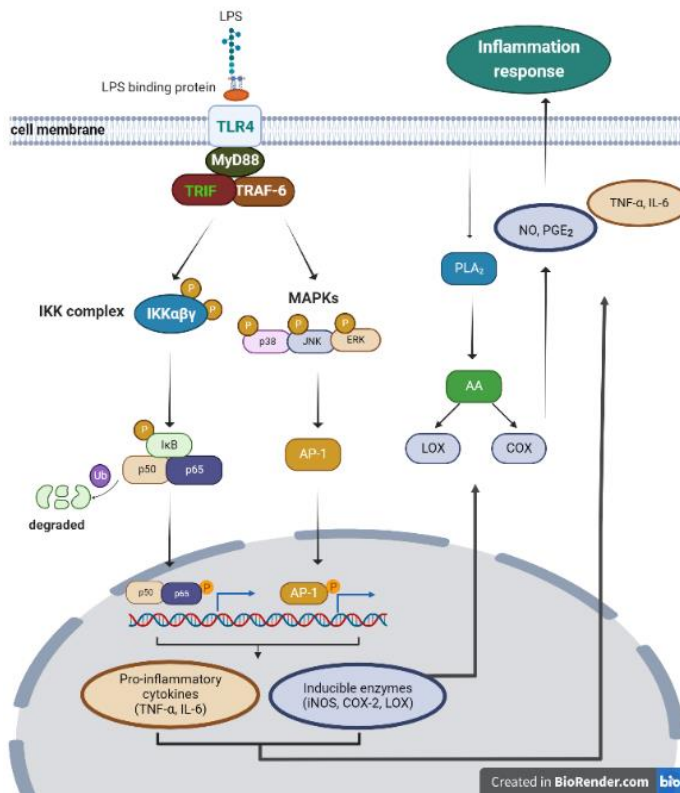
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Rối loạn phản ứng viêm và các bệnh liên quan

Viêm là phản ứng bảo vệ của hệ thống miễn dịch đối với các tổn thương mô hoặc các kích thích ngoại lai bao gồm các mầm bệnh ở người, chất gây dị ứng, hóa chất độc hại hoặc chiếu xạ. Tuy nhiên, những đáp ứng viêm không được kiểm soát có thể dẫn đến khởi phát và tiến triển thành nhiều bệnh ở người như bệnh tim mạch, bệnh đường ruột, bệnh tiểu đường, bệnh hô hấp, bệnh thận, bệnh tự miễn và đặc biệt là nhiều loại bệnh ung thư [2-4].

1.2. Các con đường truyền tin chính trong phản ứng viêm

Phản ứng viêm bao gồm nhiều con đường quan trọng, trong đó có 3 con đường chính: (1) con đường NF- κ B, (2) con đường MAPK và (3) con đường Arachidonic acid (AA) [30] như trên **Hình 1.3**.

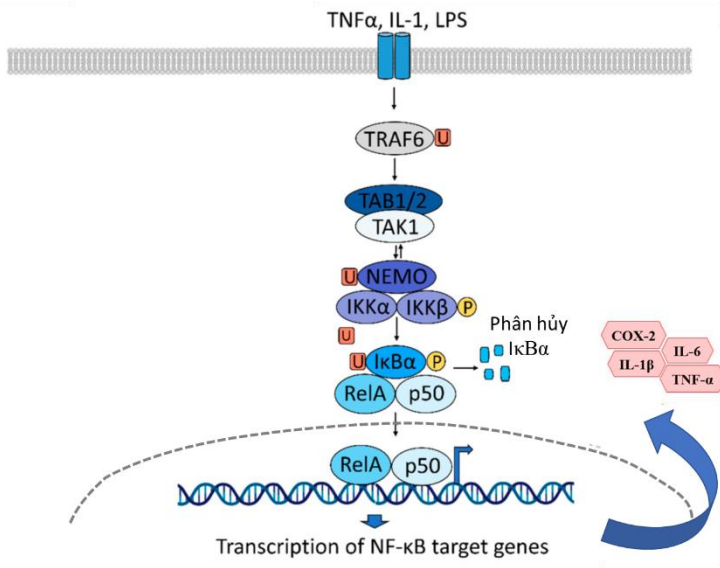


Hình 1.3. Sơ đồ minh họa các con đường chính trong phản ứng viêm

1.3. Con đường truyền tin NF-κB

Con đường truyền tin NF-κB

Con đường NF-κB là một trong những con đường truyền tin quan trọng nhất đối với phản ứng viêm. Con đường NF-κB đã được các nhà khoa học Bonizzi và Karin (2004) mô tả chi tiết (**Hình 1.7**) [39, 40].



Hình 1.7. Con đường truyền tin NF-κB [41, 42].

Vai trò của con đường NF-κB trong các bệnh liên quan đến phản ứng viêm và ung thư

NF-κB có mặt trong tất cả các tế bào động vật và đóng vai trò trung tâm trong việc điều khiển hệ thống miễn dịch của người [64]. Sự hoạt hóa quá mức NF-κB chính là một trong những nguyên nhân dẫn đến hàng loạt căn bệnh ung thư khác nhau như ung thư phổi, ung thư gan, ung thư thận, ung thư đại tràng, ung thư cổ tử cung, ung thư vòm họng, ung thư tiền liệt tuyến [67, 71-76].

Các đích tác dụng thuốc tiềm năng của con đường NF-κB

NF-κB điều khiển trên 500 gen liên quan đến rất nhiều bệnh khác nhau đặc biệt là bệnh ung thư. Những chất ức chế này tác dụng tới các giai đoạn khác nhau của con đường NF-κB bao gồm (1) giai

đoạn kích thích, (2) giai đoạn phosphoryl hóa I κ B α , (3) giai đoạn phân hủy I κ B α và (4) giai đoạn protein NF- κ B bám vào trình tự κ B DNA của gen đích và hoạt hóa gen đích.

1.4. Sàng lọc các chất ức chế NF- κ B định hướng ứng dụng kháng viêm và ngừa ung thư

Sàng lọc chất ức chế bằng công nghệ in silico

Phương pháp sàng lọc ảo trên máy tính (sàng lọc *in silico*) là phương pháp sử dụng cấu trúc không gian 3 chiều (3D) của các chất có hoạt tính sinh học để nghiên cứu mô phỏng sự tương tác của các chất với cấu trúc 3D của protein đích. Do vậy, công nghệ sàng lọc *in silico* đang là xu hướng lựa chọn của các nhà nghiên cứu, các tập đoàn dược phẩm trên thế giới.

Nghiên cứu khả năng ức chế protein NF- κ B p50 và p65 bằng EMSA

Phương pháp phân tích lệch điện di EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) là một trong những phương pháp có thể đánh giá khả năng ức chế trực tiếp protein NF- κ B. Phương pháp này sử dụng gel acrylamide không chứa chất biến tính để điện di protein p50, p65 và κ B-DNA.

Nghiên cứu khả năng ức chế con đường NF- κ B ở mô hình tế bào RAW264.7

Mô hình tế bào được sử dụng phổ biến trong sàng lọc thuốc kháng viêm là mô hình tế bào RAW264.7 được kích thích viêm bằng lipopolysaccharide (LPS).

Nghiên cứu khả năng kháng viêm in vivo sử dụng mô hình động vật

Trong các mô hình động vật, mô hình chuột gây viêm bằng carrageenan được sử dụng rộng rãi [9] vì phản ứng viêm do carrageenan gây ra là gây viêm cấp tính [10, 11].

1.5. Nguồn dược liệu kháng viêm tiềm năng tại Việt Nam

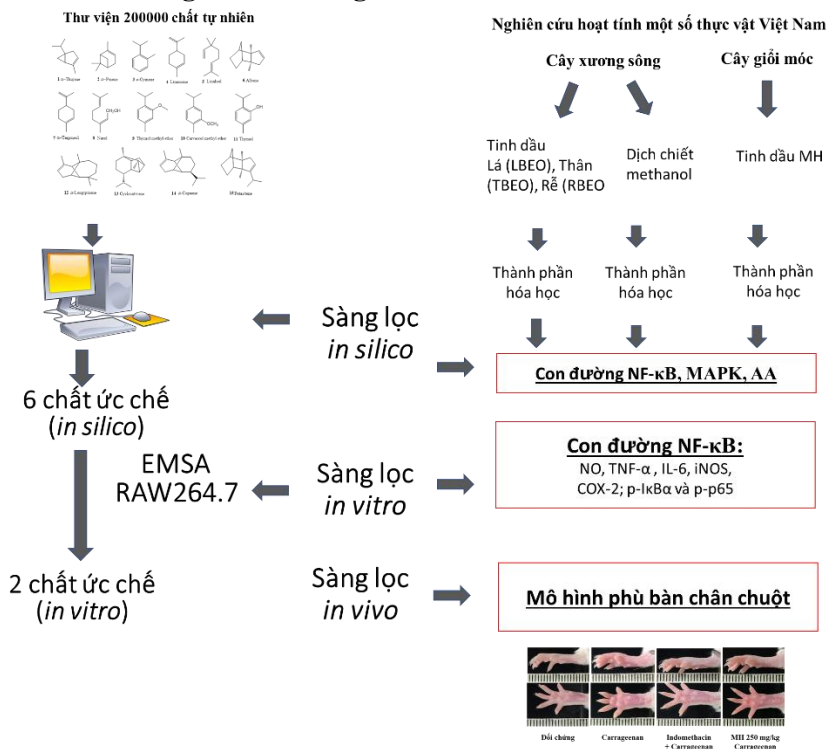
Ở Việt Nam, việc tìm kiếm các chất kháng viêm từ nguồn thảo dược là một hướng đi cần thiết nhằm tìm kiếm các ứng viên tiềm năng có khả năng kháng viêm nhưng ít gây ra tác dụng phụ. Trong nghiên cứu này, 2 loại cây được tập trung nghiên cứu là cây xương sông (*Blumea lanceolaria*) và cây giổi móc (*Magnolia hookeri*).

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này được mua từ các hãng hóa chất uy tín như Sigma, Fermentas, Qiagen, Merck. Tế bào RAW264.7 macrophage tại phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào động vật, trung tâm khoa học sự sống, khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội cung cấp. Chuột cái Swiss khối lượng từ 20-25 gram, 8-12 tuần tuổi, mua tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, Hà Nội, Việt Nam. Mẫu lá, thân và rễ cây xương sông (*Blumea lanceolaria*) và cây giổi móc (*Magnolia hookeri*) được thu hái từ một số tỉnh miền bắc Việt Nam, sau đó lưu trữ tại trung tâm khoa học sự sống, khoa Sinh học, trường đại học Khoa học tự nhiên.

2.2. Sơ đồ nghiên cứu tổng thể



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu tổng thể

2.3. Sàng lọc *in silico* bằng phương pháp docking

Sàng lọc *in silico* thông lượng cao

Phương pháp sàng lọc ảo sử dụng công cụ glide dock gồm các bước cơ bản như sau: (1) chuẩn bị protein đích, (2) chuẩn bị thư viện các hợp chất tiềm năng, (3) sàng lọc để thu được các chất có ái lực tương tác cao với các protein đích.

Sàng lọc và đánh giá tương tác phân tử sử dụng Autodock Vina

Trong nghiên cứu này, công cụ tin sinh Autodock Vina được sử dụng để đánh giá tương tác giữa các chất thu được trong sàng lọc ảo với protein p50 và p65. Phương pháp này cũng được ứng dụng để phân tích khả năng tương tác *in silico* của các thành phần hợp chất có trong dịch chiết của cây xương sông và cây giổi mốc với các protein đích.

2.4. Đánh giá khả năng ức chế tương tác NF- κ B với DNA

Nhân dòng, biểu hiện và tinh sạch NF- κ B p50 và p65

Đánh giá khả năng ức chế tương tác NF- κ B với κ B DNA bằng EMSA

2.5. Đánh giá khả năng kháng viêm *in vitro* sử dụng mô hình tế bào RAW264.7

Nuôi cấy tế bào

Đánh giá độc tính đối với tế bào

Đánh giá khả năng ức chế sản sinh nitric oxide (NO)

Đánh giá mức độ biểu hiện của một số protein bằng ELISA

Đánh giá mức độ biểu hiện của một số gen bằng Western blot

Phân tích định lượng mRNA của một số gen bằng RT-qPCR

2.6. Đánh giá khả năng kháng viêm *in vivo* sử dụng mô hình chuột Swiss

Mô hình đánh giá khả năng kháng viêm của các tinh dầu, dịch chiết *in vivo* trên chuột Swiss gây viêm bằng carrageenan.

2.7. Đánh giá khả năng kháng viêm thông qua ức chế con đường *NF-κB* của tinh dầu, dịch chiết cây xương sông và tinh dầu cây giổi mốc

Phân tích thành phần tinh dầu, dịch chiết bằng GC/MS

Để phân tích các thành phần hóa học của các loại tinh dầu, dịch chiết từ cây xương sông và cây giổi, GC-MS/GC-FID được sử dụng.

2.8. Phương pháp phân tích thống kê số liệu nghiên cứu

Số liệu được thể hiện dưới dạng mean ± SD. Các giá trị được so sánh sử dụng kiểm định ANOVA một yếu tố. Sự khác biệt giữa các số liệu được coi là có ý nghĩa đối với các giá trị *P* nhỏ hơn 0,05. Số liệu được lưu trữ và xử lý bằng phần mềm OriginPro, phiên bản 8.5.1.

2.9. Đạo đức trong nghiên cứu

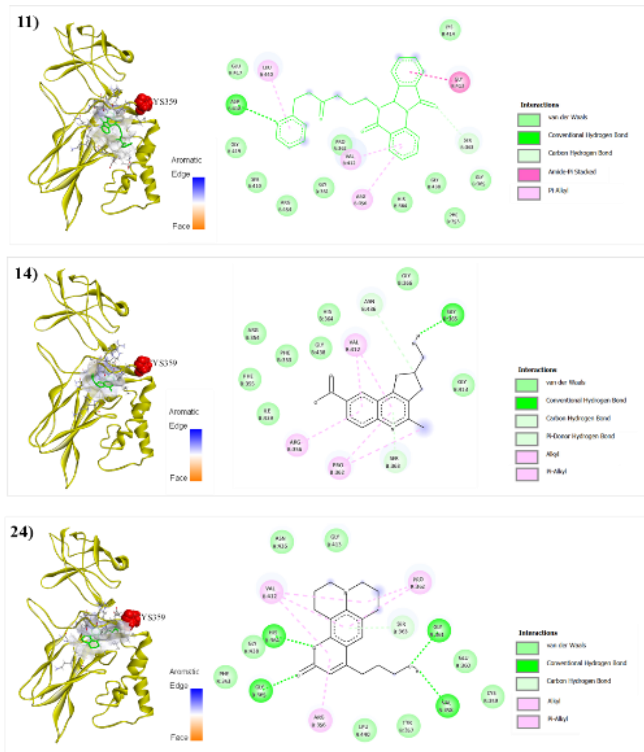
Giấy chứng nhận đạo đức trong nuôi và thử nghiệm trên động vật đã được cấp bởi Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y Sinh học, tại Viện Dược liệu Đinh Tiên Hoàng với số Giấy chứng nhận: IRB-A-2102 cho việc sử dụng động vật trong nghiên cứu này.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sàng lọc các chất ức chế *NF-κB* từ thư viện 200000 hợp chất tự nhiên

Sàng lọc in silico chất ức chế *NF-κB* p50

Thư viện 200000 hợp chất tự nhiên thu thập được từ cơ sở dữ liệu ZINC15, tiến hành sàng lọc ảo trên đối tượng protein đích là p53 sử dụng phần mềm Glide dock của Schrodinger. Kết quả chọn được 40 chất có điểm số docking tốt nhất để tiếp tục đánh giá tương tác bằng công cụ tính toán tương tác Autodock Vina, từ đó đánh giá tương tác của các chất và thu được 3 chất tiềm năng là **11-p50**, **14-p50** và **24-p50**.



Hình 3.1. Kết quả phân tích tương tác giữa 11-p50, 14-p50, 24-p50 với p50

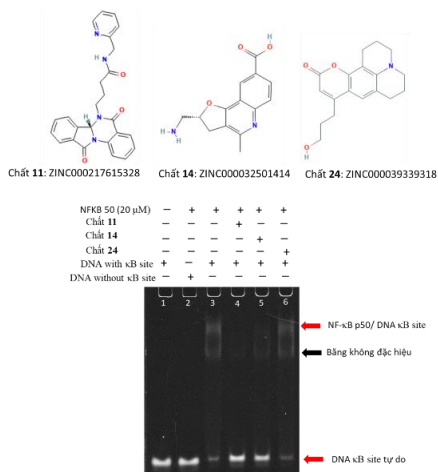
Sàng lọc *in silico* chất ức chế NF- κ B p65

Tương tự như phần sàng lọc ảo với protein p50, chúng tôi thu được 3 chất **22-p65**, **26-p65** và **31-p65** có tiềm năng tương tác với p65.

3.2. Đánh giá khả năng ức chế tương tác của protein NF- κ B với κ B DNA sử dụng phương pháp EMSA.

Đánh giá khả năng ức chế p50 liên kết với κ B DNA của các chất **11-p50**, **14-p50** và chất **24-p50**

Khả năng ức chế p50 liên kết với κ B DNA của các chất 11-p50, 14-p50 và chất 24-p50 được phân tích bằng phương pháp EMSA. Kết quả EMSA ở Hình 3.7 cho thấy chất 11-p50 và 14-p50 có khả năng ức chế tương tác giữa p50 và κ B DNA. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả phân tích tương tác *in silico*, trong đó chất 11_p50 và 14_p50 tương tác với p50 ở mức độ cao ($-8,7$ và $-7,6$ kcal/mol).



Hình 3.7. Đánh giá khả năng ức chế p50 liên kết với κ B DNA của các chất 11-p50, 14-p50, 24-p50.

Đánh giá khả năng ức chế p65 liên kết với κ B DNA của các chất **22-p65, 26-p65, 31-p65**. Kết quả phân tích cho thấy chất 22-p65, 26-p65, 31-p65 hầu như không có khả năng ức chế tương tác giữa p65 và κ B DNA. Kết quả này có thể giải thích một phần do kết quả sàng lọc ảo cho thấy ái lực liên kết của các chất này với p65 ở mức độ không cao (khoảng – 6 kcal/mol).

3.3. Đánh giá khả năng ức chế con đường NF- κ B của chất 11-p50 và chất 14-p50 trên mô hình tế bào RAW264.7.

Đánh giá độc tính tế bào của chất 11-p50 và 14-p50 đối với tế bào RAW264.7

Ảnh hưởng của chất 11-p50 và 14-p50 lên khả năng sống của tế bào RAW264.7 được đánh giá bằng kit CCK8. Kết quả này cho thấy cả 2 chất đều không độc đối với tế bào RAW264.7 ở nồng độ từ 0 đến 100 μ g/mL.

Khả năng ức chế sản sinh NO của chất 11-p50 và 14-p50 trong mô hình tế bào RAW264.7

Cả hai chất 11-p50 và 14-p50 đều có tác dụng ức chế sản sinh NO ở các nồng độ từ 0 – 100 μ g/ml trong mô hình tế bào RAW264.7.

Ảnh hưởng của các chất 11-p50 và 14-p50 lên các cytokine TNF- α và IL-6

Các chất 11-p50 và 14-p50 đều có khả năng ức chế sản sinh protein của TNF- α và IL-6 trong mô hình tế bào RAW264.7.

3.4. Đánh giá khả năng kháng viêm thông qua ức chế con đường NF- κ B của tinh dầu cây xương sông sử dụng phương pháp *in vitro*, *in vivo* và *in silico*

Thành phần hóa học của các tinh dầu xương sông (BEO)

Các thành phần hóa học và tỉ lệ phần trăm của mỗi thành phần của tinh dầu lá, thân và rễ cây xương sông được phân tích bằng phương pháp GC-MS có tổng số 30 hợp chất.

Đánh giá độc tính của BEO đối với tế bào RAW 264.7

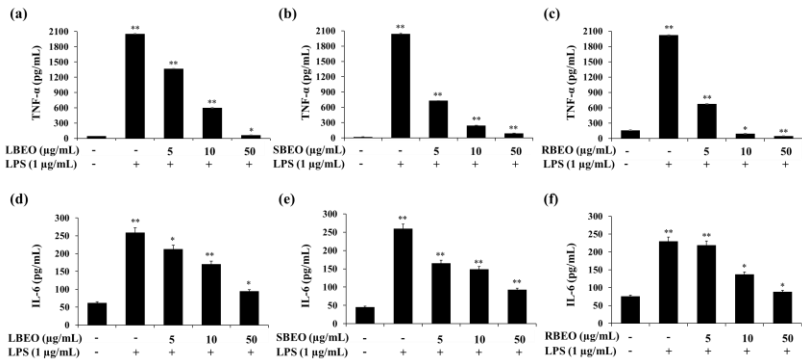
Kết quả đánh giá độc tính của BEO đối với tế bào RAW264.7 cho thấy ở các nồng độ từ 0 đến 50 $\mu\text{g/mL}$, cả tinh dầu lá (LBEO), thân (SBEO) và rễ (RBEO) đều không độc cho tế bào RAW264.7.

Khả năng ức chế sản sinh NO của BEO với tế bào RAW264.7

Cả ba tinh dầu đều có khả năng ức chế sản xuất NO trong mô hình tế bào RAW264.7.

Khả năng ức chế sự biểu hiện mRNA và protein TNF- α và IL-6 của BEO trong mô hình tế bào RAW264.7

Khả năng ức chế của BEO đối với sự sản sinh TNF- α và IL-6 trong các tế bào RAW264.7 kích thích bằng LPS được đánh giá bằng phương pháp ELISA. Những kết quả trên hình 3.15 cho thấy BEO có khả năng ức chế sản sinh TNF- α và IL-6.



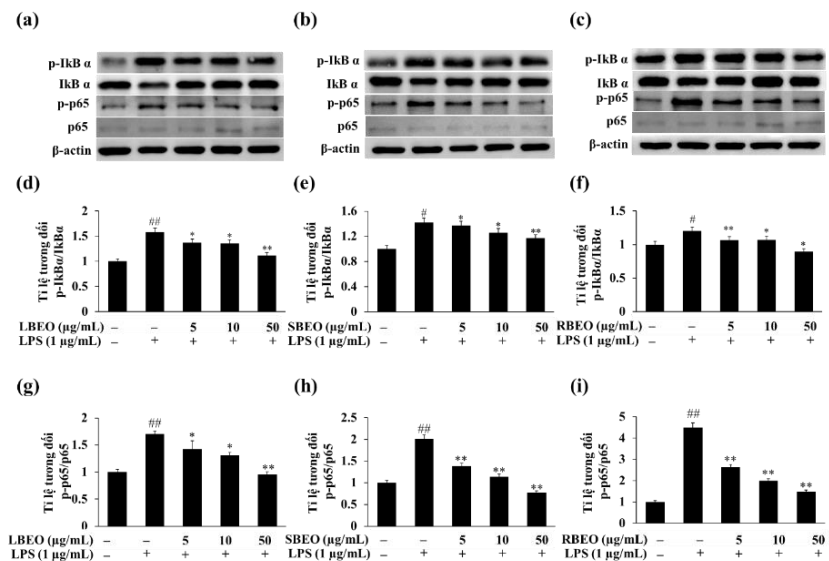
Hình 3.15. Ảnh hưởng của BEO lên sự biểu hiện của TNF- α và IL-6.

Khả năng ức chế sự biểu hiện gen iNOS và COX-2 của BEO trong mô hình tế bào RAW264.7

Phản ứng RT-qPCR và Western Blot được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế của BEO lên sự biểu hiện của iNOS và COX-2. Các kết quả chứng tỏ rằng, các mẫu BEO đều có khả năng ức chế mức độ biểu hiện của iNOS và COX-2

Khả năng ức chế con đường NF- κ B của BEO trong mô hình tế bào RAW264.7

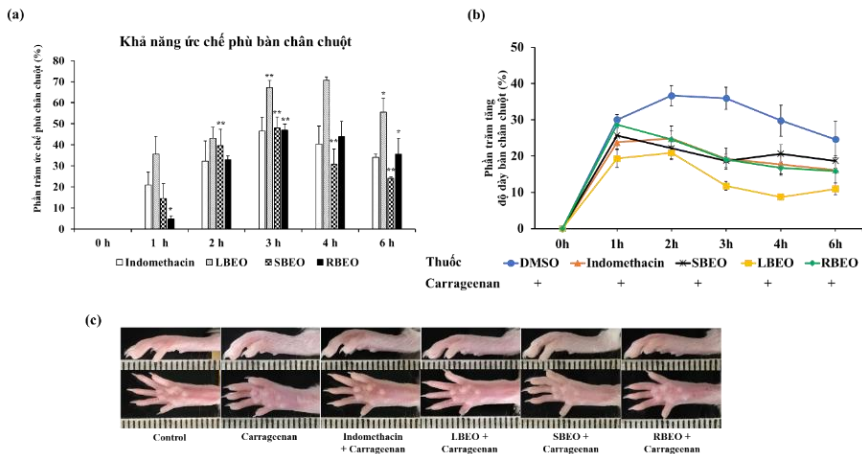
Ảnh hưởng của các loại tinh dầu xương sông (BEO) đến mức độ biểu hiện của I κ B α , phosphoryl hóa I κ B α (p-I κ B α), p65 và phosphoryl hóa p65 (p-p65) được đánh giá bằng Western blot. Kết quả trên hình 3.19 chỉ ra cả 3 loại tinh dầu đều có thể ức chế sự phosphoryl hóa I κ B α , do đó, ức chế sự kích hoạt con đường NF- κ B của tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS.



Hình 3.19. Ảnh hưởng của BEO lên mức độ biểu hiện của một số protein trong con đường NF- κ B.

Khả năng kháng viêm của BEO trên mô hình phù bàn chân chuột bằng carrageenan

Kết quả trên Hình 3.20 cho thấy cả 3 loại tinh dầu được sử dụng ở liều 50 mg/kg cân nặng chuột đều có hoạt tính kháng viêm tốt trong mô hình phù bàn chân chuột bằng carrageenan khi so sánh với nhóm thuốc đối chứng indomethacin 10 mg/kg cân nặng chuột.

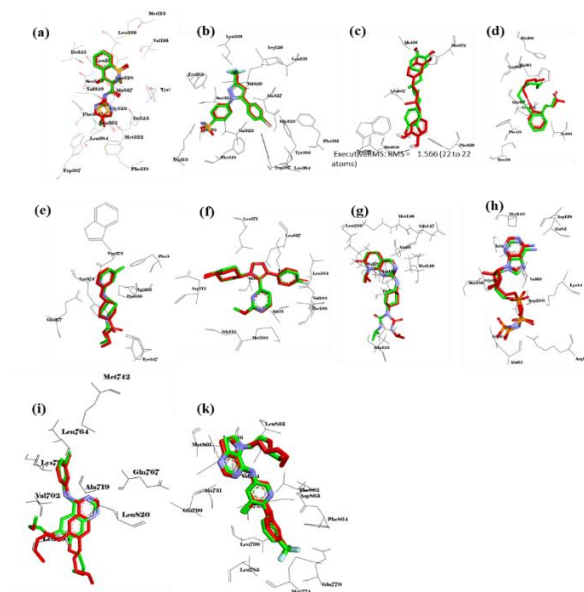


Hình 3.20. Khả năng ức chế phù bàn chân chuột của BEO.

Đánh giá in silico khả năng kháng viêm của 30 chất trong tinh dầu cây xương sông sử dụng phương pháp docking phân tử

Đánh giá độ tin cậy của phương pháp docking phân tử

Để xác định độ tin cậy của phương pháp docking, các nhà khoa học sẽ sử dụng các chất gắn đối chứng dương để docking với kết quả có độ tin cậy cao thể hiện ở Hình 3.21.



Hình 3.21. Đánh giá độ tin cậy của phương pháp docking

Đánh giá khả năng kháng viêm của 30 chất thông qua ức chế các con đường truyền tín hiệu (AA, NF- κ B, MAPK) bằng phương pháp sàng lọc *in silico*.

Trong mô hình *in silico*, mô phỏng ghép nối phân tử cho thấy rằng các thành phần hóa học trong các tinh dầu xương sông có liên kết tốt với nhiều protein trong cả ba con đường tín hiệu quan trọng trong phản ứng viêm, bao gồm cả con đường chuyển hóa axit arachidonic (COX-1, COX-2 và ALOX15), con đường NF- κ B (NF- κ B, TNF- α và iNOS) và con đường MAP (p38MAPK, JNK, ERK5, EGFR và ERBB2).

3.5. Đánh giá khả năng kháng viêm thông qua ức chế con đường NF- κ B của dịch chiết methanol cây xương sông sử dụng phương pháp *in vitro*, *in vivo* và *in silico*

Thành phần hóa học của dịch chiết methanol cây xương sông

Các thành phần hóa học của dịch chiết methanol từ *B. lanceolaria* (*Met_BL*) gồm 32 chất đã được xác định bằng phương pháp MS.

Đánh giá độc tính của dịch chiết Met_BL đối với tế bào

Kết quả đánh giá độc tính của dịch chiết *Met_BL* đối với tế bào RAW264.7 bằng kit CCK8 cho thấy dịch chiết *Met_BL* ở các nồng độ thử nghiệm (0, 20, 40 và 100 μ g/mL) đều không gây độc cho tế bào.

Khả năng ức chế sản sinh NO của dịch chiết Met_BL đối với tế bào RAW264.7

Dịch chiết *Met_BL* có khả năng kháng viêm thông qua ức chế sản sinh NO ở các nồng độ từ 0.8-100 μ g/mL gần tương đương với chất đối chứng L-NMMA là $90,63 \pm 3,18\%$.

Khả năng ức chế sự biểu hiện của mRNA, protein TNF- α và IL-6 của Met_BL trong mô hình tế bào RAW264.7

Kết quả ELISA và RT-qPCR cho thấy dịch chiết *Met_BL* có hoạt tính kháng viêm trong mô hình tế bào RAW264.7 kích thích bởi LPS thông qua việc ức chế sản sinh các cytokine tiền viêm TNF- α và IL-6 ở cả mức độ mRNA và protein.

Khả năng ức chế sự biểu hiện gen iNOS và COX-2 của Met_BL trong mô hình tế bào RAW264.7

Kết quả Western blot và RT-qPCR cho thấy mức độ biểu hiện của mRNA và protein iNOS và COX-2 đều bị ức chế đáng kể, phụ thuộc nồng độ dịch chiết *Met_BL*.

Khả năng ức chế con đường NF- κ B của Met_BL trong mô hình tế bào RAW264.7

Kết quả Western blot cho thấy dịch chiết Met_BL có khả năng ức chế con đường NF- κ B ở tế bào RAW264.7 thông qua khả năng ức chế các protein p-I κ B α và p-p65 và làm tăng I κ B α và p65.

Khả năng kháng viêm của Met_BL trên mô hình phù chân chuột bằng carrageenan

Dịch chiết Met_BL ở 2 nồng độ 250 mg/kg và 500 mg/kg đều có tác dụng ức chế phù chân chuột tại các thời điểm từ 1 đến 6 giờ sau gây viêm.

Đánh giá in silico khả năng kháng viêm của 32 chất trong dịch chiết Met_BL sử dụng phương pháp docking

Kết quả docking phân tử cho thấy rằng nhiều thành phần hóa học từ dịch chiết Met_BL có tương tác và liên kết rất mạnh với các protein của ba con đường truyền tin quan trọng trong phản ứng viêm. Có những tương tác có ái lực ái lực liên kết lên đến -10.2 kcal/mol.

3.6. Đánh giá khả năng kháng viêm thông qua ức chế con đường NF- κ B của tinh dầu cây giổi móc sử dụng phương pháp in vitro, in vivo và in silico

Thành phần hóa học của tinh dầu cây giổi móc

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục phân tích mối liên quan giữa thành phần hóa học và hoạt tính kháng viêm của 62 chất trong tinh dầu cây giổi móc (MH) dựa trên các thành phần hóa học của tinh dầu MH tại Việt Nam đã được Chu và cộng sự [157] công bố.

Đánh giá độc tính của tinh dầu MH đối với tế bào

Độc tính của tinh dầu MH lên khả năng sống của tế bào RAW264.7 được đánh giá bằng kit CCK8. Kết quả cho thấy, tinh

dầu MH không gây độc cho tế bào RAW264.7. Ở các nồng độ từ 0 – 100 $\mu\text{g/mL}$ MH tỉ lệ sống của tế bào trên 95%.

Khả năng ức chế sản sinh NO của tinh dầu MH đối với tế bào RAW264.7

Tinh dầu MH có tác dụng ức chế sản sinh NO ở các nồng độ từ 0 – 100 $\mu\text{g/mL}$. Đặc biệt, ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ khả năng ức chế sản sinh NO lên đến 89,84%.

Khả năng ức chế sự biểu hiện của protein iNOS và COX-2 của tinh dầu MH trong mô hình tế bào RAW264.7

Khả năng ức chế của tinh dầu MH lên mức độ biểu hiện của protein iNOS và COX-2 trong tế bào RAW264.7 được đánh giá sử dụng phương pháp Western blot. Kết quả cho thấy, mức độ biểu hiện của protein iNOS và COX-2 trong tế bào RAW264.7 được kích thích LPS cũng bị ức chế đáng kể, phụ thuộc nồng độ tinh dầu MH.

Khả năng ức chế con đường NF- κ B của tinh dầu MH trong mô hình tế bào RAW264.7

Kết quả cho thấy tinh dầu MH có khả năng ức chế con đường NF- κ B trong mô hình tế bào RAW264.7 thông qua khả năng ức chế phosphoryl hóa I κ B α và p65 và thông qua đó ức chế việc hoạt hóa con đường NF- κ B.

Khả năng kháng viêm của tinh dầu MH trên mô hình phù nề bàn chân chuột bằng carrageenan

Trên mô hình gây phù nề bàn chân chuột bằng carrageenan, tinh dầu MH cho thấy có khả năng kháng viêm tốt ở nồng độ 250 mg/kg qua các thời điểm khảo sát, tuy nhiên vẫn kém hơn so với thuốc đối chứng indomethacin.

Đánh giá in silico khả năng kháng viêm của 62 chất trong tinh dầu cây xương sông sử dụng phương pháp docking

Kết quả đánh giá *in silico* khả năng tương tác của các hợp chất chính trong tinh dầu giổi mốc với các protein gây viêm của con đường chuyển hóa axit arachidonic, con đường NF- κ B và con đường MAPK cho thấy nhiều hợp chất có ái lực cao với các protein đích trong các con đường này.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

A. KẾT LUẬN

1. Đã thiết lập được quy trình sàng lọc *in silico* để sàng lọc thư viện 200000 hợp chất tự nhiên với protein NF- κ B p50 và p65 và tìm ra được 6 chất tiềm năng ức chế NF- κ B *in silico* (3 chất ức chế p50 và 3 chất ức chế p65).

2. Đã đánh giá được ở mức độ *in vitro* khả năng ức chế NF- κ B p50 của 3 chất [11 (ZINC000217615328), 14 (ZINC000000517627), 24 (ZINC000002109393)] và khả năng ức chế NF- κ B p65 của 3 chất [22 (ZINC000002100012), 26 (ZINC000032501414), 31 (ZINC000039339318)] dựa trên phản ứng EMSA. Kết quả tìm ra được 2 chất có tiềm năng ức chế NF- κ B p50 là chất 11 (ZINC000217615328) và chất 14 (ZINC000000517627).

3. Đã đánh giá khả năng kháng viêm thông qua ức chế con đường NF- κ B của tinh dầu xương sông sử dụng phương pháp *in vitro*, *in vivo* và *in silico*. Kết quả cho thấy tinh dầu xương sông chứa 30 chất có khả năng ức chế nhiều đích của con đường NF- κ B gồm: (1) ức chế sản sinh NO, (2) ức chế sự biểu hiện của TNF- α , IL-6,

iNOS, COX-2 ở cả cấp độ mRNA và protein, (3) ức chế p-I κ B α và p-p65 trong con đường NF- κ B.

4. Đã đánh giá khả năng kháng viêm thông qua ức chế con đường NF- κ B của dịch chiết methanol của cây xương sông sử dụng phương pháp *in vitro*, *in vivo* và *in silico*. Kết quả cho thấy thành phần dịch chiết methanol cây xương sông có khả năng ức chế nhiều đích của con đường NF- κ B như: (1) ức chế sản sinh NO, (2) ức chế sự biểu hiện của TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2 ở cả cấp độ mRNA và protein, (3) ức chế p-I κ B α và p-p65 trong con đường NF- κ B.

5. Đã đánh giá khả năng kháng viêm thông qua ức chế con đường NF- κ B của tinh dầu giổi móc sử dụng phương pháp *in silico*, *in vitro* và *in vivo*. Kết quả cho thấy tinh dầu cây giổi móc cũng có khả năng ức chế nhiều đích quan trọng của con đường NF- κ B.

B. KIẾN NGHỊ

Từ kết quả nghiên cứu thu được, chúng tôi đưa ra một số kiến nghị như sau:

1. Mở rộng quy trình sàng lọc *in silico* với thư viện chất lớn hơn (có thể lên đến 1000000 chất) nhằm tìm kiếm các chất ức chế hướng đích NF- κ B p50, p65 và các protein đích kháng viêm quan trọng như COX-1, COX-2, p38MAPK.

2. Áp dụng quy trình sàng lọc *in silico* nhằm tiếp tục sàng lọc các chất tiềm năng từ nguồn thực vật Việt Nam có khả năng ức chế các protein đích quan trọng liên quan tới kháng viêm.

3. Áp dụng mô hình sàng lọc *in vitro* và *in vivo* trong đánh giá toàn diện khả năng kháng viêm của một số nguồn dược liệu bản địa Việt Nam.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Thị Thanh Huyền Do**, Thi Uyen Nguyen, Thi Thu Huyen Nguyen, Thi Yen Ho, Thi Luong Hang Pham, Tho Son Le, Thi Hong Van Nguyen, Phi-Hung Nguyen, Quang Huy Nguyen, and Van Sang Nguyen (2022), "Essential Oils from the Leaves, Stem, and Roots of *Blumea lanceolaria* (Roxb.) Druce in Vietnam: Determination of Chemical Composition, and *In Vitro*, *In Vivo*, and *In Silico* Studies on Anti-Inflammatory Activity" *Molecules* 27, no. 22: 7839. <https://doi.org/10.3390/molecules27227839>

2. **Thị Thanh Huyền Đỗ**, Thị Quyên Phạm, Thị Hồng Vân Nguyễn, Quang Huy Nguyễn (2021), “Biểu hiện và tinh sạch nhân tổ phiên mã NF- κ B p65 của người sử dụng tế bào vật chủ *E. coli* định hướng ứng dụng sàng lọc chất ức chế ung thư”, *Tạp Chí Y học Việt Nam*, 498(1). <https://doi.org/10.51298/vmj.v498i1.54>

3. **Đỗ Thị Thanh Huyền**, Trần Thị Thùy Anh, Nguyễn Thị Hồng Vân, Nguyễn Quang Huy, Nguyễn Văn Sáng (2017), “Tách dòng, biểu hiện và tinh sạch nhân tổ phiên mã NF- κ B p50 của người trong tế bào vật chủ *E. coli*”, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, Tập 33, Số 1S.