

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

Nguyễn Thị Lê Na

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO HẠT MELANIN KÍCH THƯỚC  
NANO VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG BẢO VỆ TẾ BÀO TRONG  
ĐIỀU KIỆN CHIẾU XẠ

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội – 2023

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

Nguyễn Thị Lê Na

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO HẠT MELANIN KÍCH THƯỚC  
NANO VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG BẢO VỆ TẾ BÀO TRONG  
ĐIỀU KIỆN CHIẾU XẠ

Chuyên ngành: Hóa sinh học

Mã số: 9420101.16

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC  
PGS. TS. Nguyễn Đình Thắng

Hà Nội - 2023

## **LỜI CAM ĐOAN**

Đây là công trình nghiên cứu của tôi và một số kết quả cộng tác cùng các cộng sự khác. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận án là trung thực, một phần đã được công bố trên các tạp chí khoa học chuyên ngành với sự đồng ý và cho phép của các cộng sự là đồng tác giả. Các nội dung khác còn lại chưa được công bố công khai trên bất kỳ phương tiện nào khác.

Hà Nội, ngày.... tháng... năm 2023

Tác giả

Nguyễn Thị Lê Na

## LỜI CẢM ƠN

Luận án được thực hiện chính tại Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội, Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y, Hà Đông, Hà Nội.

Để hoàn thành luận án, tôi đã nhận được nhiều sự giúp đỡ quý báu và nhiệt tình của các cơ quan, đơn vị và cá nhân. Tôi xin gửi lời cảm ơn tới PGS.TS. Hồ Anh Sơn, PGS.TS. Nguyễn Đình Thắng, những người đã hướng dẫn tôi thực hiện nghiên cứu. Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới PGS.TS. Hoàng Thị Mỹ Nhung đã tạo mọi điều kiện thuận lợi, để tôi hoàn thành nhiều nội dung nghiên cứu quan trọng của luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới Ban lãnh đạo Khoa Sinh học, Phòng thí nghiệm trọng điểm Enzyme và Protein (Klept), Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội, Bộ môn Sinh lý bệnh, học viện Quân y, Viện nghiên cứu Y dược học Quân sự, Bệnh viện trung ương Quân đội 103, Trung tâm Ứng dụng Y học tái tạo và Công nghệ cao Vinmec và một số đơn vị khác đã tạo mọi điều kiện và sự hỗ trợ về cơ sở vật chất và trang thiết bị và những điều kiện cần thiết để tôi có thể triển khai nghiên cứu. Tôi xin chân thành cảm ơn các đồng nghiệp của tôi tại Bộ môn Sinh học tế bào, và Bộ môn Hóa Sinh và Sinh học phân tử, Khoa Sinh học trường Đại học Khoa học tự nhiên, và các em sinh viên, học viên cao học đã hỗ trợ và giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận án.

“Nguyễn Thị Lê Na (VINIF.2020.TS.116, VINIF.2019.TS.40 ) được tài trợ bởi Nhà tài trợ thuộc Tập đoàn Vingroup và hỗ trợ bởi chương trình học bổng đào tạo tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VinBigdata)”, Quỹ học bổng Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Quỹ học bổng Vallet. Luận án được thực hiện dưới sự tài trợ của kinh phí của đề tài Nafosted mã số 108.02-2017.07, đề tài cấp ĐHQGHN, mã số QG.20.14 và được hỗ trợ một phần (năm 2022) bởi dự án mã số: VINIF.2020.DA.07.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình, đã luôn động viên, khích lệ, giúp đỡ và ủng hộ tôi trong suốt quá trình hoàn thành luận án này.

## MỤC LỤC

MỞ ĐẦU .....	1
1. Mục tiêu của luận án.....	2
1.1. Mục tiêu tổng quát .....	2
1.2. Mục tiêu cụ thể.....	2
2. Nội dung nghiên cứu .....	2
3. Những đóng góp mới của luận án.....	3
4. Ý nghĩa khoa học của luận án .....	5
Chương 1. TỔNG QUAN CÁC VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU .....	6
1.1. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ UNG THƯ.....	6
1.1.1. Dấu hiệu đặc trưng của bệnh ung thư.....	6
1.1.2. Một số phương pháp điều trị bệnh ung thư.....	7
1.2. XẠ TRỊ UNG THƯ VÀ PHƯƠNG PHÁP XẠ TRỊ UNG THƯ .....	8
1.2.1. Phương pháp sử dụng tia xạ để điều trị ung thư và các loại tia xạ thường dùng trong điều trị ung thư .....	9
1.2.2. Những ưu điểm của phương pháp xạ trị.....	10
1.2.3. Cơ chế gây độc của tia xạ lên tế bào thường và mô lành và các tác dụng phụ do xạ trị ở bệnh nhân ung thư.....	11
1.2.4. Các hiệu ứng bức xạ lên tế bào và cơ thể.....	15
1.3. CÁC ĐẶC TÍNH CỦA CÁC HỢP CHẤT CÓ KHẢ NĂNG BẢO VỆ TRÁNH TÁC HẠI CỦA PHÓNG XẠ.....	17
1.3.1. Cơ chế phân tử, tế bào của các hợp chất có tác dụng bảo vệ khỏi tác hại của bức xạ.....	18
1.3.2. Các chỉ tiêu và đặc tính của các chất bảo vệ khỏi tác hại của bức xạ ..	19
1.3.3. Phân nhóm các hợp chất có khả năng bảo vệ khỏi tác hại của bức xạ ..	20
1.4. MELANIN VÀ TÁC DỤNG SINH DƯỢC HỌC .....	25
1.4.1. Cấu trúc, thành phần của melanin .....	26
1.4.2. Nguồn gốc và các con đường sinh tổng hợp melanin.....	27
1.4.3. Hoạt tính sinh học và dược học của melanin.....	30
1.4.3.1. Hoạt tính kháng oxy hóa của melanin.....	31

1.4.3.2. Khả năng điều hòa hệ thống miễn dịch của melanin .....	32
1.4.3.3. Tính chất bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ và kháng ung thư của melanin .....	34
Hoạt tính kháng sự tăng sinh tế bào ung thư .....	34
Khả năng hấp thụ bức xạ và bảo vệ tế bào sau xạ trị ung thư.....	35
<b>1.4.4. Các ứng dụng chính của NMPs.....</b>	<b>36</b>
1.4.4.1. Một vài đặc điểm của kỹ thuật chế tạo hạt nano trong nghiên cứu và phát triển dược phẩm .....	36
1.4.4.2. NMPs tổng hợp nhân tạo .....	39
1.4.4.3. Tính chất kháng viêm và hấp thụ bức xạ của NMPs trong xạ trị ung thư	39
1.4.4.4. NMPs là hệ thống vận chuyển thuốc hướng đích .....	40
<b>Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>44</b>
<b>2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>44</b>
<b>2.1.1. Tế bào .....</b>	<b>44</b>
<b>2.2.2. Động vật nghiên cứu .....</b>	<b>44</b>
<b>2.2. NGUYÊN LIỆU, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ.....</b>	<b>44</b>
<b>2.2.1. Hóa chất .....</b>	<b>44</b>
<b>2.2.2. Thiết bị nghiên cứu .....</b>	<b>45</b>
<b>2.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP, KỸ THUẬT ĐƯỢC SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>46</b>
<b>2.3.1. Nhóm phương pháp chế tạo hạt NMPs và xác định đặc tính của vật liệu .....</b>	<b>46</b>
2.3.1.1. Chế tạo hạt NMPs .....	46
2.3.1.2. Phương pháp xác định đặc tính của vật liệu.....	46
<b>2.3.2. Nhóm phương pháp nghiên cứu sử dụng trên mô hình <i>in vitro</i> .....</b>	<b>47</b>
2.3.2.1. Nuôi cấy tế bào.....	47
2.3.2.2. Phương pháp đánh giá độc tính của thuốc trên tế bào.....	47
2.3.2.3. Phương pháp chiếu xạ trên tế bào .....	48
2.3.2.4. Phương pháp đánh giá tế bào sống sót sau chiếu xạ.....	48

2.3.2.5. Phương pháp đánh giá sự tác động của NMPs lên quá trình di chuyển của tế bào (wound healing).....	49
2.3.2.6. Phương pháp đánh giá sự tác động của NMPs lên khả năng lão hóa tế bào (senescence cells) .....	49
2.3.2.7. Phương pháp đánh giá sự tác động của NMPs lên quá trình hình thành mạch máu .....	50
2.3.2.8. Phương pháp xác định tỷ lệ tế bào chết theo chương trình trên hệ thống phân tích tế bào theo dòng chảy .....	50
2.3.2.9. Phương pháp định lượng mức độ biểu hiện của các gen liên quan đến con đường apoptosis và chống oxy hóa của tế bào và đánh giá mức độ biểu hiện gen VEGF-A liên quan đến khả năng ức chế tạo mạch.....	51
<b>2.3.3. Nhóm phương pháp nghiên cứu sử dụng trên mô hình in vivo .....</b>	<b>51</b>
2.3.3.1. Phương pháp đánh giá độc tính cấp của NMPs trên chuột nghiên cứu. ..	52
2.3.3.2. Phương pháp tạo khối u rắn trên chuột thí nghiệm .....	53
2.3.3.3. Phương pháp xạ trị toàn thân điều trị chuột mang khối u.....	53
2.3.3.4. Phân tích mức độ biểu hiện gen trong mô khối u và mô lách bằng realtime pcr.....	53
2.3.3.5. Phân tích tế bào lách của chuột bằng kỹ thuật phân tích tế bào theo dòng chảy (flow cytometry) .....	55
2.3.2.6. Phương pháp phân tích mô học .....	55
2.3.2.7. Phân tích thành phần tế bào máu tổng số và thành phần sinh hóa của máu .....	56
<b>2.4. PHÂN TÍCH THỐNG KÊ VÀ GIẤY PHÉP THỰC HIỆN NGHIÊN CỨU TRÊN ĐỘNG VẬT.....</b>	<b>56</b>
<b>Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>57</b>
<b>3.1. TẠO HẠT NMPS .....</b>	<b>57</b>
<b>3.1.1. Đánh giá cấu trúc bề mặt và thành phần các nhóm chức hóa học của melanin .....</b>	<b>57</b>
<b>3.1.2. Khảo sát khả năng hòa tan của melanin trong một số dung môi .....</b>	<b>58</b>

<b>3.1.3. Khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ alkaline (NaOH và NH<sub>4</sub>OH) lên hàm lượng hạt NMPs trong dung dịch.....</b>	<b>60</b>
<b>3.1.4. Khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến mức độ tạo thành hạt NMPs</b>	<b>60</b>
<b>3.1.5. Khảo sát sự ảnh hưởng của tốc độ khuấy từ đối với khả năng hình thành hạt NMPs.....</b>	<b>62</b>
<b>3.1.6. Khảo sát kích thước hạt NMPs được tạo nên trong môi trường NaOH và NH<sub>4</sub>OH .....</b>	<b>63</b>
<b>3.1.7. Khảo sát những đặc điểm của hạt NMPs trong môi trường NaOH 0,5N .....</b>	<b>65</b>
<i>Các đặc trưng về hình thái và các nhóm chức hóa học trên bề mặt của NMPs. ...</i>	<i>65</i>
<b>3.2 KHẢO SÁT KHẢ NĂNG BẢO VỆ TẾ BÀO DƯỚI TÁC ĐỘNG CỦA TIA X67</b>	
<b>3.2.1. Sự tác động của NMPs lên chức năng sinh lý của tế bào .....</b>	<b>67</b>
<i>3.2.1. Độc tính của NMPs trên dòng tế bào NIH 3T3, HaCaT và hUVEC.....</i>	<i>67</i>
<i>3.2.1.3. Khảo sát sự ảnh hưởng của NMPs lên khả năng hình thành mạch ở tế bào nội mô.....</i>	<i>68</i>
<i>3.2.1.4. Sự tác động của NMPs lên mức độ biểu hiện của gen VEGF-A ở tế bào nội mô.....</i>	<i>70</i>
<i>3.2.1.5. Nghiên cứu khả năng tác động của NMPs lên sự di chuyển của tế bào (wound healing).....</i>	<i>71</i>
<i>3.2.1.6. Nghiên cứu khả năng ảnh hưởng của NMPs lên sự lão hóa của tế bào nội mô .....</i>	<i>72</i>
<b>3.2.2. Khảo sát hiệu quả bảo vệ tế bào trước sự ảnh hưởng bởi tia X của NMPs trên mô hình <i>in vitro</i>.....</b>	<b>73</b>
<i>3.2.2.1. Ảnh hưởng của liều chiếu xạ lên khả năng sống sót của các tế bào .....</i>	<i>73</i>
<i>3.2.2.2. Tác dụng bảo vệ tế bào của NMPs dưới điều kiện chiếu xạ .....</i>	<i>74</i>
<i>3.2.2.3. Phân tích sự thay đổi dấu ấn phân tử liên quan đến quá trình apoptosis và kháng oxy hóa của tế bào dưới tác dụng của NMPs trong điều kiện chiếu xạ.....</i>	<i>75</i>
<i>a. Phân tích sự thay đổi mức độ biểu hiện của gen BAX dưới tác dụng của tia xạ .....</i>	<i>76</i>



<i>b. Phân tích sự thay đổi mức độ biểu hiện của gen TNF-<math>\alpha</math> dưới sự tác động của chiếu xạ và NMPs</i> .....	77
<i>c. Phân tích sự thay đổi mức độ biểu hiện của gen Caspase-3 dưới sự tác động của chiếu xạ và NMPs</i> .....	77
<i>d. Phân tích sự thay đổi mức độ biểu hiện của gen SOD1 dưới sự tác động của chiếu xạ và NMPs</i> .....	78
<i>e. Sự tác động của NMPs với quá trình chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào HaCaT sau xạ trị</i> .....	79
<b>3.3. KHẢO SÁT KHẢ NĂNG BẢO VỆ CỦA NMPS ĐỐI VỚI CHUỘT MANG KHỐI UNG THƯ TRƯỚC TÁC ĐỘNG CỦA TIA X</b> .....	81
<b>3.3.1. Thử nghiệm độc tính cấp của hạt NMPs và khảo sát liều chiếu xạ gây chết trên chuột khỏe mạnh.</b> ....	81
<b>3.3.2. Tạo khối u ở chuột nhắt trắng bằng tế bào ung thư phổi chuột (3LL)</b> .	81
<b>3.3.3. Tình trạng sức khỏe toàn thân của chuột trong quá trình nghiên cứu</b> .	83
<b>3.3.4. Trọng lượng cơ thể của các nhóm chuột được nghiên cứu</b> .....	84
<b>3.3.5. Thể tích trung bình khối u ở các nhóm chuột được nghiên cứu</b> .....	85
<b>3.3.6. Phân tích các chỉ số huyết học ở các nhóm chuột nghiên cứu</b> .....	86
<b>3.3.7. Phân tích một số chỉ tiêu chức năng thận của các nhóm chuột nghiên cứu</b> .....	87
<b>3.3.8. Phân tích sự thay đổi khối lượng của lá lách và hạch bạch huyết ở các nhóm chuột nghiên cứu</b> .....	87
<b>3.3.9. Phân tích cấu trúc mô của một số mô ở các nhóm chuột nghiên cứu có khả năng chịu ảnh hưởng mạnh trong quá trình chiếu xạ</b> .....	89
<i>3.5.9.1. Phân tích mô lách của các nhóm chuột nghiên cứu</i> .....	90
<i>3.5.9.2. Phân tích mô hạch bạch huyết của các nhóm chuột</i> .....	91
<b>3.5.10. Phân tích dấu ấn phân tử của dưới tác dụng của NMPs trong quá trình xạ trị trên mô lách</b> .....	93
<i>3.5.10.1. Sự ảnh hưởng của NMPs lên mức độ biểu hiện của IL-2 và TNF-<math>\alpha</math> trong mô lách sau xạ trị.</i> ....	93

3.5.10.2. NMPs làm tăng tỷ lệ các tế bào miễn dịch ở mô lách chuột sau khi chiếu xạ tia X ở mức liều cao.....	94
3.5.10.3. NMPs gián tiếp kích hoạt tín hiệu apoptosis trong mô khối u của chuột .....	96
<b>Chương 4. BÀN LUẬN</b> .....	<b>98</b>
4.1. TẠO HẠT NMPS .....	98
4.2. KHẢO SÁT KHẢ NĂNG BẢO VỆ TẾ BÀO DƯỚI TÁC ĐỘNG CỦA TIA X	104
<b>4.2.1 Khảo sát một số tác động của NMPs lên chức năng sinh lý của tế bào trên mô hình <i>in vitro</i></b> .....	<b>104</b>
4.2.1.1. Độc tính của NMPs trên mô hình <i>in vitro</i> và khả năng gây lão hóa tế bào nội mô của NMPs. ....	104
4.2.1.2. Khả năng ức chế sự làm lành vết thương của tế bào nội mô và hình thành mạch ở nhóm tế bào được điều trị bởi NMPs .....	104
<b>4.2.2 Đánh giá khả năng bảo vệ tế bào của NMPs dưới tác động của tia X</b> .	<b>105</b>
4.2.2.1. Khả năng bảo vệ tế bào lành của NMPs sau chiếu xạ tia X.....	105
4.2.2.2. Những dấu ấn phân tử thay đổi của tế bào dưới tác động của tia xạ trên mô hình <i>in vitro</i> .....	106
4.3. KHẢ NĂNG BẢO VỆ CHUỘT MANG KHỐI UNG THƯ TRƯỚC TÁC ĐỘNG CỦA TIA X CỦA NMPS.....	108
<b>4.3.1. Sự ảnh hưởng của một số mô cơ quan dưới tác động của tia xạ.</b> .....	<b>108</b>
<b>4.3.2. Dấu ấn phân tử và miễn dịch ở mô lách của chuột thí nghiệm được điều trị bởi NMPs sau xạ trị.</b> .....	<b>109</b>
5.1. KẾT LUẬN.....	114
5.2. KIẾN NGHỊ.....	115
<b>DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN</b> .....	<b>116</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b> .....	<b>117</b>
<b>PHỤ LỤC</b> .....	<b>136</b>

## DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

<b>Từ viết tắt</b>	<b>Viết đầy đủ bằng tiếng Anh</b>	<b>Giải nghĩa Tiếng Việt</b>
APIs	Active pharmaceutical ingredients	Hoạt chất dược phẩm
BAX	B-cell lymphoma-2 Associated X-protein	Protein X liên kết với tế bào B lympho 2
ARN	Ribonucleic acid	Acid ribonucleic
Caspase	Cysteine–aspartic acid protease	Caspase
CAT	Catalase	Catalase
CT	Computed tomography	Chụp cắt lớp
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoxyribonucleic acid	acid deoxyribonucleic
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ĐCDM		Đôi chứng dung môi
ĐCSH		Đôi chứng sinh học
FBS	Fetal Bovine Serum	Huyết thanh thai bò
FDA	Food and Drug Administration	Cơ quan Quản lý thuốc và thực phẩm Hoa Kỳ
HaCaT	Keratinocyte	Tế bào sừng da người
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Vi rút gây suy giảm miễn dịch ở người
hUVEC	Human umbilical vein endothelial cells	Tế bào nội mô
INF- $\gamma$	Interferon gamma	Interferon gamma
IR	Irradiation	Chiếu xạ
IL-1,2,6	Interleukin-1,2,6	Interleukin-1,2,6
MRI	Magnetic Resonance Imaging	Cộng hưởng từ
NADPH oxidase	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase

NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B	Yếu tố hạt nhân tăng cường chuỗi nhẹ kappa của các tế bào B hoạt hóa
NIH 3T3	Mouse embryonic fibroblasts	Nguyên bào sợi da chuột
NMPs		Melanin có kích thước nano
UV	Ultraviolet	Tia cực tím
ROS	Reactive oxygen species	Các dạng oxy phản ứng
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi realtime PCR
SEM	Scanning electron microscope	Kính hiển vi điện tử quét
SOD	Superoxide dismutase	Superoxide dismutase
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta	Yếu tố tăng trưởng biến đổi beta
TLRs	Toll-like receptors	Thụ thể Toll-like
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factors	Yếu tố hoại tử khối u alpha
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế thế giới
3LL	Lewis lung carcinoma	Tế bào ung thư phổi chuột

## DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Các phản ứng hóa sinh chính xảy ra bên trong tế bào dưới tác động của tia xạ .....	13
Hình 1.2. Sơ đồ cơ chế bảo vệ tế bào của một số hợp chất có khả năng bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ .....	18
Hình 1.3. Mô hình đơn vị cấu trúc của eumelanin.....	26
Hình 1.4. Mô hình đơn vị cấu trúc của pheomelanin.....	27
Hình 1.5. Con đường sinh tổng hợp của eumelanin và pheomelanin.....	29
Hình 1.6. Các ứng dụng chính của melanin.....	31
Hình 2.1. Sơ đồ thử nghiệm trên mô hình <i>in vivo</i> .....	52
Hình 3.1. Bột melanin dưới độ phóng đại khác nhau dưới kính hiển vi điện tử SEM và các nhóm chức hóa học trên bề mặt của melanin được xác định bởi phép đo hồng ngoại xa FTIR.....	57
Hình 3.2. Sự ảnh hưởng của nồng độ alkaline tới khả năng tạo hàm lượng NMPs trong dung dịch .....	59
Hình 3.3. Sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến mức độ tạo hạt NMPs trong môi trường NH <sub>4</sub> OH 0,5N.....	60
Hình 3.4. Sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến mức độ tạo hạt NMPs trong môi trường NaOH 0,5N.....	61
Hình 3.5. Sự ảnh hưởng của tốc độ khuấy từ và khả năng tạo hạt NMPs trong các môi trường NaOH (0,5 N) (A) và NH <sub>4</sub> OH (0,5N) (B).....	61
Hình 3.6. Sự phân tán của các hạt NMPs trong dung dịch và kích thước của hạt NMPs trong dung dịch NH <sub>4</sub> OH và NaOH được xác định bởi máy đo tán xạ ánh sáng Zetasizer.....	63
Hình 3.7. NMPs dưới độ phóng đại 25.000 X (A); 50.000 X (B) của kính hiển vi điện tử quét SEM; hình ảnh phổ FTIR của NMPs (C).....	64
Hình 3.8. Sơ đồ tạo hạt melanin kích thước nano.....	65

Hình 3.9. Độc tính tế bào của NMPs đối với tế bào HaCaT, NIH 3T3 và hUVEC.....	66
Hình 3.10. Sự ảnh hưởng của NMPs lên hình thành mạch bởi tế bào nội mô (hUVEC) theo thời gian. ....	67
Hình 3.11. Sự ức chế quá trình hình thành mạch máu trên tế bào hUVEC của NMPs (E) ở nồng độ 25 và 50 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Hình ảnh mạch máu được nhuộm huỳnh quang (A, B,C,D).....	68
Hình 3.12. Mức độ biểu hiện gen <i>VEGF-A</i> sau 2 ngày chiếu xạ ở các mức liều 3 Gy và 5 Gy.....	69
Hình 3.13. Khả năng liền vết thương của NMPs trên dòng tế bào nội mô.....	70
Hình 3.14. Các tế bào có dấu hiệu lão hóa trong quần thể hUVECs.....	71
Hình 3.15. Tỷ lệ số tế bào sống sót sau chiếu xạ ở các mức liều chiếu xạ từ 0-10 Gy.....	73
Hình 3.16. Tỷ lệ tế bào tế bào HaCaT và NIH 3T3 và hUVEC sống sót dưới tác dụng của NMPs tron điều kiện chiếu xạ.....	74
Hình 3.17. Mức độ biểu hiện gen <i>BAX</i> sau 2 ngày chiếu xạ ở các mức liều 3 Gy và 5 Gy.....	75
Hình 3.18. Mức độ biểu hiện gen <i>TNF-<math>\alpha</math></i> sau 2 ngày chiếu xạ ở các mức liều 3 Gy và 5 Gy.....	76
Hình 3.19. Mức độ biểu hiện gen <i>Caspase-3</i> sau 2 ngày chiếu xạ ở các mức liều 3 Gy và 5 Gy.....	77
Hình 3.20. Mức độ biểu hiện gen <i>SOD1</i> sau 2 ngày chiếu xạ ở các mức liều 3 Gy và 5 Gy.....	78
Hình 3.21. Phân tích tế bào theo dòng chảy của tế bào HaCaT dưới tác động của X-ray và NMPs.....	79
Hình 3.22. Khối u ở lưng chuột sau khi ghép tế bào ung thư phổi (3LL).....	81
Hình 3.23. Giải phẫu bệnh mô học khối U bởi tế bào ung thư phổi 3LL dưới kính hiển vi 4X và 10X.....	82

Hình 3.24. Khối lượng các nhóm chuột nghiên cứu theo thời gian.....	84
Hình 3.25. Kích thước khối U chứa các nhóm chuột trong quá trình nghiên cứu...	85
Hình 3.26. Khối lượng lách của các nhóm chuột nghiên cứu (NIL, NC, IR, IR+Mel) sau 15 ngày chiếu xạ .....	88
Hình 3.27. Khối lượng của hạch bạch huyết ở các nhóm chuột nghiên cứu sau xạ trị.....	89
Hình 3.28. Hình ảnh mô lách ở các nhóm chuột nghiên cứu ở độ phóng đại 4X và 10X.....	90
Hình 3.29. Hình ảnh giải phẫu bệnh học mô hạch lympho của các nhóm chuột ở độ phóng đại 10X và 4X.....	92
Hình 3.30. Mức độ biểu hiện của <i>IL-2</i> và <i>TNF-<math>\alpha</math></i> trong mô lách sau xạ trị.....	93
Hình 3.31. Quần thể tế bào B trong lách ở các nhóm chuột.....	94
Hình 3.32. Quần thể tế bào T trong lách ở các nhóm chuột, NIL (F), NC (G), IR (H) và IR + Mel (I) được xác định bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy. Tỷ lệ% quần thể tế bào B trong mỗi nhóm chuột được thể hiện ở biểu đồ (E).....	95
Hình 3.33. Quần thể tế bào tua trong lách ở các nhóm chuột được xác định bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy.....	95
Hình 3.34. Mức độ biểu hiện của các gen <i>TNF-<math>\alpha</math></i> , <i>Bax</i> , <i>Caspase-3</i> trong mô khối u của các nhóm chuột.....	96

## DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Một số loại thuốc được FDA cho phép sử dụng ở mục đích như là chất bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ , chất giảm nhẹ và thuốc điều trị khi bị nhiễm xạ.....	24
Bảng 1.2. Nguồn gốc và đơn vị cấu trúc của melanin .....	28
Bảng 2.1. Trình tự của các cặp môi của các gen của người được sử dụng trong nghiên cứu.....	51
Bảng 2.2. Trình tự của các cặp môi của các gen của chuột được sử dụng trong nghiên cứu.....	54
Bảng 3.1. Khả năng tan của melanin trong một số dung môi thông thường.....	58
Bảng 3.2. Kích thước trung bình của các hạt nano melanin được tạo ra trong dung dịch.....	62
Bảng 3.3. Các chỉ số huyết học của các nhóm chuột ở thời điểm 15 ngày sau chiếu xạ.....	85
Bảng 3.4. Chỉ số chức năng thận của các nhóm chuột nghiên cứu.....	86



## MỞ ĐẦU

Ung thư là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây tử vong trên toàn thế giới. Có nhiều phương pháp để điều trị ung thư như phẫu thuật, xạ trị, điều trị bằng thuốc, liệu pháp kích thích phản ứng miễn dịch,.. Tùy từng loại ung thư và giai đoạn phát triển của nó, bác sĩ có thể sử dụng đơn lẻ hay kết hợp đồng thời nhiều phương pháp điều trị, trong đó xạ trị hầu hết được chỉ định đối với các bệnh nhân phát hiện ung thư ở giai đoạn muộn. Xạ trị là một trong các phương pháp trị liệu chính được sử dụng trong điều trị bệnh ung thư hiện nay. Tuy nhiên, phương pháp này có ảnh hưởng đến tế bào thường và tác dụng phụ của chúng lên sự chết của tế bào hay sự tăng sinh mô là những vấn đề khó khăn trong nhiều thập kỷ. Xạ trị có thể gây ra các phản ứng phụ cấp tính và mạn tính ảnh hưởng lớn tới chất lượng cuộc sống và thời gian sống của người bệnh.

Xạ trị thường gây ra sự phá hủy DNA và sinh ra các dạng oxy phản ứng (ROS). Nồng độ ROS ở mức thấp sẽ duy trì các hoạt động sinh lý bình thường của tế bào. Sự phát sinh đột ngột số lượng lớn các gốc ROS sau xạ trị dẫn đến sự phá hủy DNA, các đại phân tử và màng của tế bào. Hơn nữa, sự sinh ra ROS gây mất cân bằng nội mô, ảnh hưởng đến hoạt động trao đổi chất bình thường của tế bào và kích hoạt các con đường tín hiệu tế bào, thông qua sự hoạt hóa của các yếu tố phiên mã, cytokine viêm như nuclear factor kappa light chainenhancer of activated B (NF- $\kappa$ B), inteleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factors (TNF- $\alpha$ ) và một số enzyme chống oxy hóa bao gồm superoxide dismitase (SOD), catalase (CAT). Sự phát sinh các cytokine tiền viêm hay các nhân tố phiên mã quá mức sau xạ trị có thể tác động đến sự phát triển và di căn của tế bào ung thư.

Liệu pháp chiếu xạ sử dụng các tia xạ một cách trực tiếp trên cơ thể bệnh nhân và gây ra tác dụng phụ cấp tính và mạn tính. Vì vậy, làm thế nào để giảm thiểu các tác dụng phụ và nâng cao sức khỏe cho các bệnh nhân điều trị ung thư bằng phương pháp xạ trị là một vấn đề được ưu tiên nghiên cứu. Từ cơ sở sinh học của liệu pháp chiếu xạ, để tăng cường khả năng bảo vệ tế bào lành, có thể tác động bởi các hướng:

(1) giảm thiểu tác dụng trực tiếp của tia xạ đối với các tế bào lành; (2) tiêu thụ ROS được sinh ra trong quá trình xạ trị.

Melanin là sắc tố tự nhiên có độc tính thấp, được tìm thấy rộng rãi ở hầu hết sinh vật sống, có khả năng hấp thụ tia xạ. Vai trò bảo vệ cơ thể trước tia cực tím, ngăn ngừa ung thư da của melanin đã được biết đến từ trước đó, tuy nhiên, chưa có nhiều các nghiên cứu để ứng dụng tính chất đặc biệt này của melanin ở lĩnh vực y sinh. Một trong các nguyên nhân chính yếu là tính chất khó tan của melanin. Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu - **“Nghiên cứu chế tạo hạt melanin kích thước nano và đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào trong điều kiện chiếu xạ”** nhằm mục tiêu chế tạo hạt melanin có kích thước nhỏ hơn 1  $\mu\text{m}$  (viết tắt: NMPs) và thử nghiệm khả năng bảo vệ tế bào sau quá trình xạ trị của NMPs trên hai mô hình *in vitro* và *in vivo*.

## **1. Mục tiêu của luận án**

### **1.1. Mục tiêu tổng quát**

Nghiên cứu chế tạo được hạt melanin kích thước nano và đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào trong điều kiện chiếu xạ

### **1.2. Mục tiêu cụ thể**

- Nghiên cứu chế tạo được melanin kích thước nano
- Đánh giá khả năng bảo vệ tế bào lành của nano melanin trong điều kiện chiếu xạ ở mô hình *in vitro*
- Đánh giá khả năng bảo vệ tế bào lành và mô thường của nano melanin trong điều kiện chiếu xạ ở mô hình *in vivo*

## **2. Nội dung nghiên cứu**

2.1. Nghiên cứu tạo nano melanin ở kích thước phù hợp cho nghiên cứu

2.2. Thử nghiệm khả năng bảo vệ tế bào dưới sự tác động của tia X

2.2.1 Đánh giá sự tác động của hạt NMPs lên một số chức năng sinh lý của tế bào trên mô hình *in vitro*

- Đánh giá độc tính của hạt NMPs trên các dòng tế bào cần nghiên cứu. Xác định ngưỡng nồng độ không gây độc tế bào để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

- Đánh giá khả năng ức chế quá trình sinh mạch của NMPs

- Đánh giá sự tác động của NMPs lên sự di chuyển của tế bào trên mô hình *in vitro*

- Đánh giá khả năng gây lão hóa của hạt NMPs trên mô hình *in vitro*

#### 2.2.2. Đánh giá khả năng bảo vệ tế bào dưới tác động của tia X

- Đánh giá khả năng sống sót của các tế bào sau chiếu xạ

- Đánh giá khả năng sống của tế bào khi được điều trị bởi NMPs dưới tác dụng của tia xạ

- Phân tích sự thay đổi dấu ấn phân tử liên quan đến quá trình apoptosis và kháng oxy hóa của tế bào dưới tác dụng của NMPs trong điều kiện chiếu xạ

2.3. Thử nghiệm khả năng bảo vệ tế bào thường và mô lành dưới tác động của tia X trên mô hình chuột mang khối u được xạ trị

2.3.1. Đánh giá độc tính cấp của NMPs trên chuột thí nghiệm. Xác định ngưỡng nồng độ an toàn của NMPs để sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo

2.3.2. Gây khối u dưới da ở chuột bằng tế bào ung thư phổi (3LL)

2.3.3. Điều trị chuột mang khối u bằng phương pháp chiếu xạ tia X

2.3.4. Đánh giá khả năng bảo vệ của NMPs đối với tế bào thường và mô lành bằng phương pháp hóa sinh, sinh học phân tử, tế bào và mô học

### 3. Những đóng góp mới của luận án

Melanin được xem như là một hợp chất bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ tiềm năng và có khả năng hấp thụ các gốc tự do phát sinh trong quá trình xạ trị. Tuy vậy, hiện nay chưa có nhiều các nghiên cứu đánh giá vai trò của melanin trong xạ trị ung thư. Trên thế giới chưa có nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá vai trò của melanin cũng như cơ chế sinh học phân tử trong mối tương tác giữa melanin với các

phân tử khác trong các con đường tín hiệu tế bào nhằm ứng dụng vào trong thực tế điều trị ung thư.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đóng góp một số điểm mới như sau:

- Chế tạo melanin kích thước nano từ melanin có nguồn gốc từ tự nhiên và khảo sát sự ảnh hưởng của một số điều kiện tạo hạt bao gồm nhiệt độ, tốc độ khuấy từ, nồng độ kiềm ( $\text{NH}_4\text{OH}$  và  $\text{NaOH}$ ).

- Nghiên cứu đã cơ bản đánh giá được vai trò của NMPs tác động lên các quá trình sinh lý của tế bào bao gồm: độc tính tế bào, làm lành vết thương, sự sinh mạch và lão hóa tế bào trên mô hình *in vitro*. Giá trị  $\text{IC}_{50}$  của NMPs trên dòng tế bào NIH 3T3 và HaCaT lần lượt là 53 và 39 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Đối với dòng hUVEC, kết quả cho thấy không xác định được giá trị  $\text{IC}_{50}$  của NMPs trên dòng tế bào hUVEC ở dải nồng độ  $<100$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). NMPs có khuynh hướng làm chậm khả năng di chuyển tế bào trong quá trình làm lành vết thương. Ở thời điểm 72 h bổ sung NMPs ở các nồng độ khác nhau, khả năng làm lành vết thương ở các giếng đối chứng, giếng bổ sung NMPs 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  và 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  lần lượt 95%, 60%, 84%, và 89%. Ở mức liều độ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , NMPs làm ức chế quá trình tạo mạch, tuy nhiên không gây lão hóa tế bào nội mô so với đối chứng.

- Nghiên cứu đã đánh giá khả năng bảo vệ tế bào lành trên mô hình *in vitro* bằng xác định tỷ lệ sống sót của tế bào và dấu ấn phân tử liên quan dưới tác dụng của tia xạ của NMPs. NMPs làm tăng tỷ lệ sống sót của tế bào HaCaT (10%), giảm nhẹ tỷ lệ sống sót ở tế bào nội mô hUVEC và không có tác dụng bảo vệ trên dòng nguyên bào sợi da chuột.

- Nghiên cứu đã thử nghiệm vai trò của NMPs trong xạ trị ung thư trên mô hình chuột gây u được xạ trị bằng tia X. NMPs làm giảm tình trạng viêm và xơ hóa nặng ở mô lách của chuột gây ung thư được xạ trị. NMPs làm tăng mức độ biểu hiện IL-2 và TNF- $\alpha$  ở mô lách sau xạ trị tương ứng với 1,72 và 2,14 lần so với đối chứng. NMPs thúc đẩy sự sản sinh quần thể tế bào tua và tế bào T lần lượt 1,9 và 1,64 lần, tuy nhiên không làm thay đổi quần thể tế bào B trong mô lách của chuột gây u sau xạ trị.

#### **4. Ý nghĩa khoa học của luận án**

Xạ trị là liệu pháp điều trị ung thư có hiệu quả được sử dụng rộng rãi và phổ biến nhất. Tuy nhiên, các tác dụng phụ của xạ trị lên bệnh nhân ung thư là vấn đề khó giải quyết triệt để trong nhiều thập kỷ. Trên cơ sở những hiểu biết về cơ chế tác động của tia xạ, hạn chế được tác dụng phụ của liệu pháp xạ trị là mục tiêu của nhiều nghiên cứu. Sàng lọc, nghiên cứu các hợp chất có nguồn gốc từ tự nhiên hay tổng hợp có khả năng bảo vệ trước tác hại phóng xạ là vấn đề có ý nghĩa khoa học và thực tiễn. Luận án cung cấp những dữ liệu khoa học mới về cách chế tạo hạt NMPs. Các dữ liệu thực nghiệm về khả năng bảo vệ tế bào thường và mô lành trong xạ trị của NMPs nhằm cung cấp cơ sở khoa học về một giải pháp mới để hạn chế tác dụng phụ của liệu pháp xạ trị cho bệnh nhân ung thư.

## **Chương 1. TỔNG QUAN CÁC VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU**

### **1.1. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ UNG THƯ**

Ung thư là một trong các nguyên nhân hàng đầu gây tử vong trên toàn thế giới ngày nay. Trong năm 2012, có khoảng 14,1 triệu trường hợp ung thư được phát hiện mới và 8,2 triệu ca tử vong liên quan đến ung thư [Torre L.A, 2015], [DeSantis C.E, 2015]. Ung thư là một nhóm các bệnh liên quan đến việc phân chia tế bào một cách không kiểm soát và những tế bào đó có khả năng xâm lấn những mô khác bằng cách phát triển trực tiếp vào mô lân cận hoặc di chuyển đến các vị trí ở xa so với ban đầu (di căn).

#### **1.1.1. Dấu hiệu đặc trưng của bệnh ung thư**

Bên trong khối u bao gồm tập hợp nhiều tế bào với sự tăng sinh bất thường và có khả năng xâm lấn sang các mô xung quanh. Các tế bào bị phân chia liên tục, mất kiểm soát, và phát triển thành một khối ung biểu rõ ràng. Theo Douglas Hanahan, các tế bào khối u thường có các đặc điểm chung như sau [Hanahan D, 2000]:

- Tín hiệu tăng sinh tế bào được duy trì liên tục và không nhạy cảm với các tín hiệu ngừng tăng sinh từ các tế bào xung quanh
- Có khả năng tránh quá trình chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào
- Tế bào có khả năng phân chia bất tử
- Có khả năng kích thích sự hình thành mạch máu bao quanh khối u
- Có khả năng xâm lấn mô xung quanh và di căn

Nguyên nhân gây nên ung thư bao gồm nhiều yếu tố như các vi sinh vật gây bệnh, chất độc trong khói thuốc lá, môi trường bị ô nhiễm, nhiễm phóng xạ, chất độc hóa học, chế độ ăn uống không lành mạnh, hay do yếu tố di truyền. Các nhân tố này có thể cộng hưởng lẫn nhau hoặc là nguyên nhân trực tiếp gây bệnh. Các ước tính gần đây của tổ chức Y tế thế giới dự đoán tỷ lệ mắc bệnh ung thư toàn cầu sẽ tăng 65% từ 14 triệu người năm 2012 lên hơn 22 triệu người vào năm 2030, và trở thành một vấn đề sức khỏe cộng đồng lớn ở tất cả khu vực trên thế giới. Hơn 60% số các ca ung thư mới hàng năm được phát hiện ở Châu Phi, Châu Á, Trung và Nam Mỹ, và tỷ lệ các ca tử vong ở các khu vực này chiếm 70% trên toàn thế giới. Ung

thư phổi và ung thư vú là những căn bệnh ung thư phổ biến nhất và cũng là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu cho cả nam và nữ ở những nước đang phát triển. Ở những nước phát triển, ung thư tuyến tiền liệt là căn bệnh được chẩn đoán thường xuyên nhất ở nam giới. Ngoài ra, các bệnh về ung thư da, ung thư dạ dày hay đại trực tràng đều là những căn bệnh chiếm tỷ lệ tử vong cao ở cả nam và nữ [Torre L.A, 2015].

### **1.1.2. Một số phương pháp điều trị bệnh ung thư**

Cùng với sự phát triển của y học ngày nay, nhiều phương pháp được sử dụng để điều trị bệnh ung thư. Mỗi phương pháp điều trị đều có các ưu và nhược điểm riêng. Tuy nhiên, có 04 phương pháp điều trị chính được sử dụng rộng rãi là phẫu thuật, xạ trị, hóa trị, và liệu pháp miễn dịch.

#### *Phẫu thuật*

Là phương pháp điều trị ung thư chính lâu đời nhất và có hiệu quả rõ rệt đối với hầu hết các khối u rắn, nằm ở vị trí cô lập. Phẫu thuật còn có vai trò trong việc giảm nhẹ các triệu chứng và kéo dài thời gian sống cho bệnh nhân. Đây cũng là một phương pháp quan trọng được sử dụng để chẩn đoán chính xác tình trạng và giai đoạn bệnh thông qua các kết quả sinh thiết từ các phần mô và cơ quan được loại bỏ. Phẫu thuật được sử dụng để loại bỏ các khối u và tổn thương tổng thể. Tuy nhiên, điều này có thể dẫn đến tỷ lệ khối u tái phát cao và tỷ lệ bệnh nhân tử vong cao sau đó [Lind M.J, 2008].

#### *Xạ trị*

Xạ trị là phương pháp sử dụng năng lượng bức xạ chiếu trực tiếp vào khối u để tiêu diệt tế bào ung thư. Đây là một trong các phương pháp chính để điều trị ung thư hiện nay. Tuy nhiên, phương pháp này có thể tạo nên các tác dụng phụ cấp tính và mãn tính cho bệnh nhân [Zhang Z, 2022].

#### *Hóa trị liệu*

Là phương pháp sử dụng một số hợp chất hóa học theo liệu trình để tiêu diệt tế bào ung thư. Đây là phương pháp thường được sử dụng sớm hơn trong điều trị để bổ sung chất hỗ trợ cho các biện pháp phẫu thuật hoặc xạ trị nhằm kéo dài thời gian

sống cho bệnh nhân, đặc biệt ở những trường hợp ung thư có khả năng tái phát và di căn [Lind M.J, 2008].

### *Liệu pháp miễn dịch*

Là phương pháp tác động vào hệ thống miễn dịch để tiêu diệt tế bào ung thư. Hệ miễn dịch của động vật bậc cao bao gồm miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thích ứng. Ở phản ứng miễn dịch bẩm sinh, khi có các tác nhân kháng nguyên xâm nhập vào cơ thể, các tế bào bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, tế bào tua và tế bào chết tự nhiên được sản sinh và tồn tại trong thời gian ngắn để đáp ứng lại với sự xâm nhập của các tác nhân gây hại. Ở miễn dịch thích ứng, sự tác động giữa các tế bào trình diện kháng nguyên với tế bào T và B – lymphocytes được ghi nhận. Miễn dịch thích ứng tạo nên trí nhớ miễn dịch và điều hòa cân bằng nội mô miễn dịch của vật chủ [Bonilla F.A, 2010], [Akkın S, 2021]. Liệu pháp miễn dịch có thể tác động lên hệ thống miễn dịch của bệnh nhân để kích thích chúng tự sản sinh ra các tế bào miễn dịch thúc đẩy việc tiêu diệt tế bào ung thư. Ngoài ra, các tế bào miễn dịch có thể được tách và nuôi cấy trong môi trường chuyên biệt ở bên ngoài cơ thể và được truyền cho người bệnh để tăng cường các phản ứng kháng u. Liệu pháp miễn dịch đã làm thay đổi đáng kể khả năng sống sót và chất lượng cuộc sống của bệnh nhân. Tuy vậy, ứng dụng liệu pháp miễn dịch để điều trị ung thư vẫn còn có nhiều thách thức do các loại ung thư đều không giống nhau và phản ứng với các yếu tố miễn dịch rất khác nhau. Mặt khác, cho đến nay, có rất ít các nghiên cứu về độc tính cũng như các dữ liệu để dự báo về phản ứng của hệ miễn dịch của bệnh nhân khi có sự tác động can thiệp từ bên ngoài [Lind M.J, 2008], [Esfahani K, 2020].

### 1.2. XẠ TRỊ UNG THƯ VÀ PHƯƠNG PHÁP XẠ TRỊ UNG THƯ

Xạ trị là phương pháp điều trị ung thư được sử dụng phổ biến nhất hiện nay với giá thành rẻ. Phương pháp xạ trị sử dụng bức xạ ion hóa để tiêu diệt khối u nhằm chữa bệnh hoặc cải thiện triệu chứng. Trong các phương pháp chính để điều trị ung thư, phẫu thuật là phương pháp được sử dụng sớm nhất. Phương pháp xạ trị được ra đời vào đầu thế kỷ 20 và cùng với phương pháp hóa trị được sử dụng sau đó đã góp



phần không nhỏ vào việc tăng hiệu quả điều trị và cải thiện chất lượng cuộc sống của bệnh nhân ung thư trong nhiều thập kỷ qua.

### **1.2.1. Phương pháp sử dụng tia xạ để điều trị ung thư và các loại tia xạ thường dùng trong điều trị ung thư**

Xạ trị là phương pháp điều trị được sử dụng trong trường hợp thu nhỏ kích thước khối u, giảm thiểu khả năng di căn của khối u hoặc được sử dụng để dự phòng ở một số mô và cơ quan có nguy cơ cao bị ung thư di căn. Những năm qua, cùng với sự tiến bộ về kỹ thuật của các máy gia tốc cung cấp nguồn tia xạ và tối ưu phác đồ xạ trị đã mang đến lợi ích to lớn cho bệnh nhân, đặc biệt là tăng khả năng sống sót và kéo dài tuổi thọ cho các bệnh nhân bị ung thư ở giai đoạn muộn [Shinde A, 2018]. Trong phương pháp xạ trị cho bệnh nhân ung thư, các tia xạ thường được cấp từ nguồn phát xạ ở bên ngoài cơ thể bệnh nhân hoặc nguồn phóng xạ được đưa xuyên qua mô, đặt gần vị trí khối u. Các loại tia xạ thường được dùng trong điều trị ung thư bao gồm bức xạ photon, bức xạ hạt, bức xạ ion nặng.

Bức xạ photon bao gồm tia X và tia gamma, là hai loại tia xạ thường gặp phổ biến nhất hiện nay trong điều trị ung thư. Tia X được khuyến nghị sử dụng trong các trường hợp khối u ở vị trí bề mặt như ung thư da và các mô mềm. Tia X có bước sóng từ 100 pm - 10 nm, mức năng lượng của tia X dao động trong khoảng 200–500 Kev. Tia X được phát xạ bởi các nguồn Cobalt 60, sesium, radium. Tia gamma được tạo ra bởi sự phát xạ của hạt nhân nguyên tử và có bước sóng ngắn hơn tia X. Nguồn phát xạ tia gamma trong tự nhiên được ứng dụng thông thường là potassium - 40. Đây là loại tia xạ có bước sóng nhỏ hơn 100 pm mang mức năng lượng lớn. Nó được sử dụng để điều trị các khối ung thư nằm sâu hơn bên trong cơ thể [Baskar R, 2012].

Bức xạ hạt bao gồm chùm electron, neutron, proton. Chùm bức xạ được sử dụng trong xạ trị các khối u có vị trí gần bề mặt hay nằm sâu bên trong cơ thể. Đây là chùm tia có khả năng đâm xuyên tốt với gia tốc lớn và mức năng lượng cao hơn chùm bức xạ photon. Đồng thời, các bức xạ hạt cho phép phân bố liều chiếu tốt, khả năng tích lũy năng lượng ở vị trí khối u và hạn chế được tác hại lên các tế bào lành

và mô xung quanh. Tuy nhiên, nguồn phát xạ và thiết bị phát bức xạ hạt có giá thành cao, tốn kém. Do vậy, bức xạ photon vẫn được sử dụng phổ biến hiện nay và bức xạ hạt tiếp tục được nghiên cứu tối ưu để có thể thay thế bức xạ photon trong tương lai [Baskar R, 2012].

Các nghiên cứu về hiệu quả của các tia bức xạ truyền năng lượng tuyến tính thấp như tia X, tia gamma, tia electron và các tia bức xạ năng lượng cao như tia neutron, proton, ion nặng, hạt alpha, được xem xét ở nhiều khía cạnh. Tác dụng sinh học của chúng phụ thuộc vào tốc độ phát xạ, liều hấp thụ, phân đoạn liều hấp thụ, thể tích của mô được chiếu xạ. Ngoài ra, sự phản ứng của tế bào với tia xạ còn bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường xung quanh mà tế bào phụ thuộc. Bên cạnh đó, nền tảng di truyền và tốc độ tăng sinh tế bào là các yếu tố ảnh hưởng đến sự sống sót của tế bào sau xạ trị [Krishnan S, 2016], [Wang C.K, 2010].

### **1.2.2. Những ưu điểm của phương pháp xạ trị**

Xạ trị là phương pháp được chỉ định trong một số phác đồ điều trị bệnh ung thư. Nó có thể đứng độc lập hoặc kết hợp với một số phương pháp khác để tăng cường hiệu quả. Trong những năm gần đây, hơn một nửa bệnh nhân mắc bệnh ung thư ở các nước thu nhập thấp và trung bình đều sử dụng liệu pháp chiếu xạ để điều trị bệnh. Liệu pháp chiếu xạ thường được sử dụng ở ba mục tiêu chính với nhiều ưu điểm bao gồm xạ trị triệt căn, xạ trị giảm nhẹ triệu chứng và xạ trị hỗ trợ [Barton M.B, 2006].

Xạ trị triệt căn thường được dùng trong mục tiêu tiêu diệt hoàn toàn khối u để điều trị bệnh, được xem là một liệu pháp có chi phí thấp và hiệu quả về mặt kinh tế. Phương pháp này thường dùng cho các khối u mô đệm ở các vị trí cụ thể như tai, mũi, tứ chi, mí mắt, ung thư biểu mô, ung thư biểu mô tuyến hậu môn, ung thư nguyên bào tủy. Trong nhiều trường hợp, xạ trị có khả năng điều trị khỏi bệnh nhân ung thư ở giai đoạn sớm và ít gây ảnh hưởng tới các tổ chức lân cận [Kay Chul-Seung, 2013]. Xạ trị có khả năng cải thiện việc kiểm soát cục bộ khối u thông qua kiểm soát khả năng tăng sinh khối u, giảm tái phát và cải thiện tỷ lệ sống sót ở một số bệnh ung thư ở giai đoạn muộn [Barton M.B, 2006], [Baskar R, 2017].

Xạ trị làm giảm nhẹ triệu chứng, nâng cao chất lượng sống cho bệnh nhân ung thư. Ở mục tiêu này, xạ trị được chỉ định để giảm đau đớn cho bệnh nhân (đặc biệt là đau xương khớp), kiểm soát xuất huyết, nấm và loét da do hệ miễn dịch bị suy giảm, tắc nghẽn nội tạng do sự co lại hoặc tăng sinh của khối u tạo nên sự thay đổi về không gian trong các mô thường. Ngoài ra, nó cũng có thể làm giảm nhẹ triệu chứng nguy kịch của bệnh nhân ung thư như tắc tĩnh mạch chủ trên, chèn ép tủy sống, tăng áp lực bên trong sọ não do tình trạng ung thư di căn lên não [Rastogi M, 2012], [Ashby M, 1991].

Xạ trị bổ trợ được sử dụng để mô tả phương pháp điều trị ung thư bổ trợ sau các phác đồ điều trị chính. Ví dụ như sau phẫu thuật, khi các khối u được loại bỏ hoàn toàn, xạ trị bổ trợ được chỉ định để giảm nguy cơ về mặt xác suất khi vẫn còn lại những tế bào ung thư chưa được phát hiện và loại bỏ. Liệu pháp bổ trợ hỗ trợ cho phác đồ điều trị chính để tăng hiệu quả của điều trị. Xạ trị bổ trợ thường được sử dụng cho các bệnh nhân sau khi phẫu thuật ung thư vú hoặc ung thư hậu môn, ung thư tuyến tụy. Trong một vài trường hợp, xạ trị bổ trợ được thực hiện trước khi phẫu thuật để thu nhỏ khối u, giúp việc phẫu thuật diễn ra dễ dàng hơn và có thể bảo toàn được các mô lành xung quanh khối u tốt nhất [Viani G.A, 2019].

### **1.2.3. Cơ chế gây độc của tia xạ lên tế bào thường và mô lành và các tác dụng phụ do xạ trị ở bệnh nhân ung thư**

Xạ trị là phương pháp điều trị hiệu quả và ít tốn kém về kinh tế cho các bệnh nhân bị ung thư. Tuy nhiên, phương pháp này có nhiều tác dụng phụ, ảnh hưởng đến chất lượng cuộc sống của bệnh nhân. Sở dĩ như vậy vì cơ chế tác động của tia xạ lên tế bào ung thư cũng như tế bào thường đều có sự tương đồng. Vị trí các khối u ở xen kẽ trong các mô thường, và các tế bào ung thư còn nằm rải rác trong rất nhiều cơ quan khác nhau và có thể di căn. Khi chiếu xạ, tia xạ phá hủy tế bào theo một số cơ chế được mô tả ở hình 1.1. Xạ trị tác động lên tế bào thường và mô lành theo các hướng khác nhau. Năng lượng tia xạ phá hủy màng tế bào và các bào quan bên trong tế bào. Xạ trị có thể trực tiếp làm đứt gãy DNA dẫn đến chết tế bào hoặc gây đột biến và làm mất ổn định hệ gen. Chúng được tích lũy qua các lần phân chia

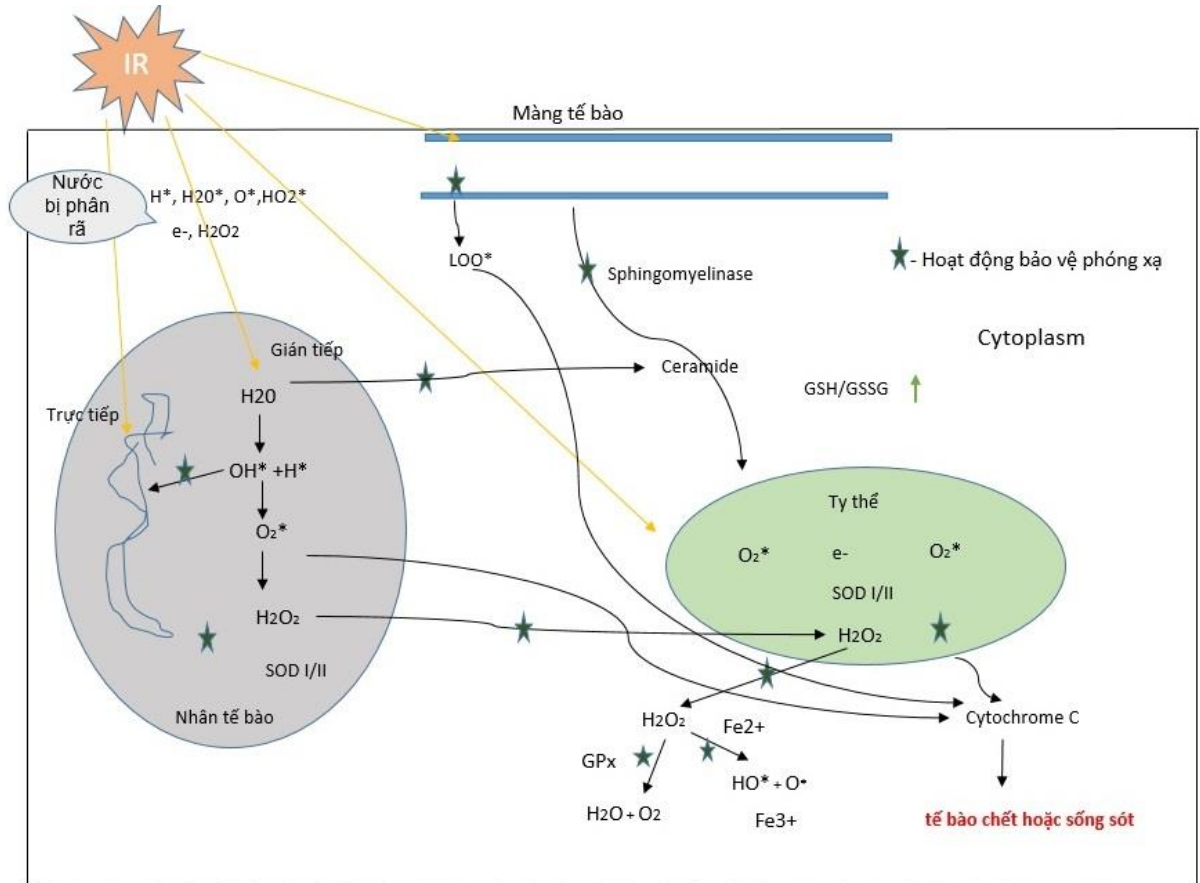
và có thể dẫn đến các tác dụng phụ mãn tính như xơ hóa các mô, cơ quan. Ngoài ra xạ trị làm phát sinh đột ngột số lượng lớn các gốc tự do tấn công và phá hủy các đại phân tử sinh học bên trong tế bào như đường, lipit, DNA..Xạ trị còn tác động lên các enzyme có vai trò giữ cân bằng nội mô làm rối loạn sự chuyển hóa bên trong tế bào.

Các tổn thương do tia xạ gây ra ở màng tế bào, màng nhân, lysosome, hay sự đứt gãy sợi đôi, sợi đơn DNA dẫn đến sự tiêu diệt tế bào ung thư bên trong khối u một cách nhanh chóng và hiệu quả. Các loại bức xạ khác nhau có cơ chế tác động lên tế bào là khác nhau. Bức xạ hạt và bức xạ ion nặng có mức năng lượng lớn hơn bức xạ photon. Chúng có khả năng trực tiếp phá hủy DNA trong khi cơ chế chủ yếu của bức xạ photon là gián tiếp thông qua sự phát sinh số lượng lớn ROS. Tế bào bị mất khả năng phân chia bình thường khi bị tổn thương bởi tia xạ. Tế bào có thể kích hoạt quá trình chết theo chương trình sau khi bị chiếu xạ, hoặc có thể phân chia vài lần trước khi chết và biến mất khỏi khối u [Hellman S, 1995].

Sự phát sinh ROS sau xạ trị là do sự phân giải phóng xạ của nước bên trong và bên ngoài tế bào. Quá trình này sản sinh ROS và diễn ra trong khoảng thời gian cực ngắn nano giây. Các ROS gần như ngay lập tức được tạo ra bao gồm superoxide, singlet oxygen, hydroxyl radical, hydrogen peroxide. Tốc độ tạo ra ROS sau quá trình xạ trị ở mức liều 2 Gy được Pollycove M cùng các cộng sự ước tính, có trung bình khoảng  $10^9$  ROS phát sinh, dẫn đến khoảng  $10^6$  vị trí tổn thương DNA oxy hóa,  $10^5$  vị trí đứt gãy sợi đơn DNA và 1 đứt gãy sợi kép DNA mỗi tế bào mỗi ngày [Pollycove M, 2003].

Tác động gây chết bởi sự phát sinh ROS sau quá trình chiếu xạ có thể theo cơ chế trực tiếp hoặc gián tiếp. Khi ROS trực tiếp tấn công làm đứt gãy DNA, có thể dẫn đến chết tế bào. Ngoài ra, ROS ở trạng thái không bền, dễ dàng liên kết với các đại phân tử sinh học bên trong tế bào làm thay đổi cấu trúc và chức năng của chúng. Điều này dẫn đến kích hoạt cơ chế tự sửa chữa của tế bào. Trong một số trường hợp, tế bào có thể tự phục hồi hoàn toàn khi sự tổn thương gây không quá lớn. Tuy

nhiên, phần lớn trong số đó là các tổn thương oxy hóa không thể phục hồi dẫn đến sự chết tế bào (hình 1.1).



Hình 1.1. Các phản ứng hóa sinh chính xảy ra bên trong tế bào dưới tác động của tia xạ. Hình ảnh được cải biên từ nguồn [Mishra K.N, 2018].

Những tổn thương ở giai đoạn sớm sau khi chiếu xạ vài giây đến vài giờ được ghi nhận như các hiệu ứng ngay lập tức tác động lên tế bào như sự đứt gãy của sợi đôi DNA, sợi đơn RNA, hiệu ứng tác động của các gốc ROS khi bị tăng số lượng một cách đột ngột do quá trình ion hóa phân tử nước. Sự phá hủy DNA và sự sinh ra ROS sẽ dẫn tới sự kích hoạt các yếu tố phiên mã, các cytokine viêm và tiền viêm như IL-6, IL-2, TNF $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, enzyme SOD, CAT thông qua các con đường liên vết thương (wound healing) và tăng cường apoptosis [Pico J.L, 1998]. Bên cạnh đó, các gốc tự do cũng có thể kích hoạt các con đường truyền tín hiệu tế bào sớm, dẫn đến sự đáp ứng sai lệch của tín hiệu và gây rối loạn trong quá trình trao đổi chất

bình thường của tế bào [Wei J, 2019], [Yahyapour R, 2018a], [Yahyapour, 2018b], [Pollycove M, 2003].

Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases hay NADPH oxidase là các enzyme liên kết với màng quay về hướng không gian bên ngoài tế bào. Chúng bao gồm NOX<sub>1</sub>, NOX<sub>2</sub>, NOX<sub>3</sub>, NOX<sub>4</sub> và LOX (Lysyl oxidase). Các enzyme này có vai trò quan trọng trong việc cân bằng nội mô. Xạ trị có thể tác động lên sự hoạt động ổn định của hệ thống enzyme này dẫn đến những rối loạn trong quá trình trao đổi chất của tế bào. Ngoài ra, năng lượng tia xạ tác động lên hệ thống oxy hóa/khử bên trong tế bào, gây căng thẳng oxy hóa, tạo oxit nitric gây độc cho tế bào [Wei J, 2019], [Yahyapour R, 2018b].

NADPH oxidase (NOXs) là một enzyme có chức năng vận chuyển electron từ NADPH tới các phân tử oxy hoặc H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sự chuyển hóa này được mô tả theo phương trình:  $NADPH + 2O_2 = NADP^+ + 2O_2^{*} + H^+$

Đây là nhóm enzyme nằm trong các cấu trúc màng như ty thể bao gồm NOX<sub>1</sub>, NOX<sub>2</sub>, NOX<sub>3</sub>, NOX<sub>4</sub> (NOXs) có vai trò quan trọng nhất. Chúng tham gia vào chuỗi hô hấp của tế bào sau chiếu xạ [Wei J, 2019], [Yahyapour R, 2018a]. Khi tia xạ tác động lên tế bào, các enzyme NOXs sẽ bị hoạt hóa theo các cách khác nhau. Đồng thời, các cytokin và chemokin gây viêm như TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta), TNF- $\alpha$ , IL-1, và IFN- $\gamma$  (interferon gamma) cũng tham gia vào quá trình hoạt hóa các NOXs. Các chức năng sinh lý của NADPH oxidase được biết đến liên quan đến việc bảo vệ tế bào, truyền tín hiệu tế bào, điều hòa biểu hiện gen và biệt hóa tế bào. Thời gian gần đây, việc nghiên cứu các NOXs được xem như là mục tiêu quan trọng trong việc tìm thuốc điều trị ung thư. Các nghiên cứu tập trung vào vai trò của các NOXs trong việc ức chế quá trình apoptosis của tế bào hay tăng sinh khối u, di căn [Gagnière J, 2017].

NOX<sub>1</sub> được biểu hiện bởi ở nhiều loại tế bào gồm tế bào nội mô trong tử cung, tuyến tiền liệt và nhau thai, biểu mô ruột kết, tế bào hủy xương. Nó cũng có thể được biểu hiện trong một số khối u ác tính bao gồm ung thư ruột kết và khối u ác tính [Fu X.J, 2014]. Nghiên cứu trước đó đã báo cáo việc ức chế NOX<sub>1</sub> làm giảm

quá trình tạo sợi xơ hóa ở phổi sau xạ trị trên mô hình chuột vì NOX<sub>1</sub> có thể hạn chế sự lắng đọng collagen do bức xạ gây nên. NOX<sub>2</sub> là một phân nhóm của NADPH oxidase. Nghiên cứu của Najafi M và cộng sự đã cho thấy có sự gia tăng mức độ biểu hiện của NOX<sub>2</sub> và NOX<sub>4</sub> sau chiếu xạ ở mô phổi chuột. Nghiên cứu trước đó cũng đã chỉ ra có mối liên hệ giữa tổn thương tuyến nước bọt và NOX<sub>2</sub> sau xạ trị [Choi S.H, 2016], [Najafi M, 2018].

Việc nghiên cứu vai trò của NOX<sub>3</sub> trong tổn thương do bức xạ còn nhiều hạn chế. Shin Y.S và các cộng sự có xác nhận sự thay đổi mức độ biểu hiện của NOX<sub>3</sub> ở các mô niêm mạc của chuột sau chiếu xạ. Sự biểu hiện của NOX<sub>3</sub> có liên hệ mật thiết với triệu chứng loét niêm mạc miệng sau chiếu xạ [Shin Y. S, 2013]. Trong bệnh ung thư đại trực tràng, NOX<sub>4</sub> tăng mức độ biểu hiện ở các mô ung thư. NOX<sub>4</sub> thúc đẩy quá trình chết của tế bào ung thư thông qua di cư và xâm lấn bằng cách điều chỉnh sự biểu hiện của các gen có liên quan [Lin X.L, 2017].

Lysyl oxidase (LOX) là một amine oxidase do tế bào tiết ra và có khả năng tạo liên kết với collagen và elastin trong không gian ngoại bào. LOX làm tăng độ bền và độ cứng của mô. Nó đóng vai trò quan trọng trong quá trình hình thành và sửa chữa các mô liên kết. Theo Shen C.J và các cộng sự, khi chiếu xạ không làm tăng mức độ dịch mã của LOX tuy nhiên làm tăng tiết LOX trên mô hình *in vivo* và *in vitro* [Shen C.J, 2014].

#### **1.2.4. Các hiệu ứng bức xạ lên tế bào và cơ thể**

Ảnh hưởng của bức xạ lên cơ thể được M. I. Koukourakis và các cộng sự có thể chia ra 05 cấp độ [Koukourakis M.I, 2012] bao gồm hiệu ứng bức xạ sớm cấp độ I, II, III, IV, V. Sự phân chia cấp độ này dựa trên sự tác động của tia xạ lên cơ thể từ mức độ phân tử đến tế bào, mô và cơ quan.

Hiệu ứng bức xạ sớm mức độ I được xem xét ở khả năng suy giảm tế bào dưới tác động của tia xạ. Hiệu ứng bức xạ sớm loại I ở mức độ gây chết của tế bào và sự suy giảm tế bào của một mô và tế bào gốc. Ở mức liều cao >80 Gy có thể tiêu diệt được hoàn toàn các tế bào thuộc cơ quan tạo máu. Trong lâm sàng, liều dùng trong xạ trị thường < 80 Gy [Koukourakis M.I, 2012].

Hiệu ứng bức xạ sớm mức độ II khi có sự đáp ứng kích hoạt một số gen sau xạ trị. Năng lượng tia xạ kích hoạt một số gen phản ứng, liên quan đến một số rối loạn chức năng tế bào và mô. Trong trường hợp này, bức xạ làm tăng tính thấm thành mạch, gây phù nề mô. Các yếu tố tăng trưởng và các cytokine viêm bị kích thích sản xuất trong các nguyên bào sợi và tế bào nội mô. Đồng thời, sự tăng số lượng đại thực bào gây nên tình trạng viêm sau xạ trị. Đây là tổn thương phóng xạ sớm diễn ra bên trong tế bào và nó là kết quả của việc kích hoạt chuỗi phản ứng của các gen liên quan đến viêm, tính thấm thành mạch, hình thành mạch máu, ức chế apoptosis và một số gen khác [Tsoutsou P.G, 2006], [Koukourakis M.I, 2012].

Hiệu ứng bức xạ muộn mức độ III khi có sự thay đổi chức năng và rối loạn trong tổ chức cơ quan. Năng lượng tia xạ gây rối loạn tổ chức ở mô. Ở hiệu ứng bức xạ sớm mức độ II, các nguyên bào sợi và thành mạch bị tổn thương. Những tổn thương này sẽ được tích lũy dần theo thời gian và tiến triển thành các rối loạn tổ chức mô và cơ quan vĩnh viễn, làm thay đổi chức năng của chúng. Các dấu hiệu như phù nề hay xơ hóa là các biểu hiện lâm sàng thường thấy ở những mô bị tác động bởi tia xạ có cường độ mạnh. Các tổn thương nặng có thể gây hoại tử. Những rối loạn chức năng này được biểu hiện ở giai đoạn muộn sau 6 tháng thậm chí là 2-3 năm sau khi chiếu xạ [Tsoutsou P.G, 2006].

Hiệu ứng bức xạ mức độ IV được thể hiện ở việc tổn thương do bức xạ không chỉ dừng lại ở mô, cơ quan của một cá thể bị chiếu xạ mà có sự đột biến ở vật chất di truyền. Những thay đổi này được di truyền sang thế hệ kế tiếp và gây bệnh như khối u máu ác tính (nếu đột biến ở tế bào máu), hay khối u rắn (nếu đột biến ở các tế bào biểu mô hoặc mô liên kết). Đột biến ở tế bào gốc có thể biểu hiện ra các tính trạng nhiều thế hệ khác nhau [Travis L.B, 2006].

Hiệu ứng bức xạ ở mức độ V có ảnh hưởng sinh học lên những tế bào không chịu tác động trực tiếp của tia xạ và ở xa vị trí được chiếu xạ. Những tác động này bao gồm tổn thương DNA, mất ổn định nhiễm sắc thể, đột biến và apoptosis. Ngoài ra, hiệu ứng bức xạ ở mức độ V là hiệu ứng bức xạ gây ra ở các tế bào, cơ quan, hoặc toàn bộ cơ thể, nơi không nhận sự chiếu xạ trực tiếp. Hiệu ứng này là kết quả



của sự truyền tín hiệu phân tử bằng phương thức cận tiết hoặc thông qua các phân tử được tiết ra và tuần hoàn trong máu, gây tổn thương các cơ quan ở nơi xa vị trí chiếu xạ. Trong trường hợp này, tế bào mặc dù không bị chiếu xạ trực tiếp nhưng vẫn xảy ra tổn thương DNA tương tự như ở những tế bào bị chiếu xạ bao gồm sự đứt gãy sợi đơn, sợi kép dẫn đến sự bất ổn định trong hệ gen gia tăng [Baskar R, 2010].

Để giảm thiểu các tác dụng phụ trong quá trình xạ trị, phát triển phương pháp chiếu xạ hay nghiên cứu các hợp chất có khả năng bảo vệ trước tác hại của phóng xạ là những mục tiêu nghiên cứu đáng chú ý.

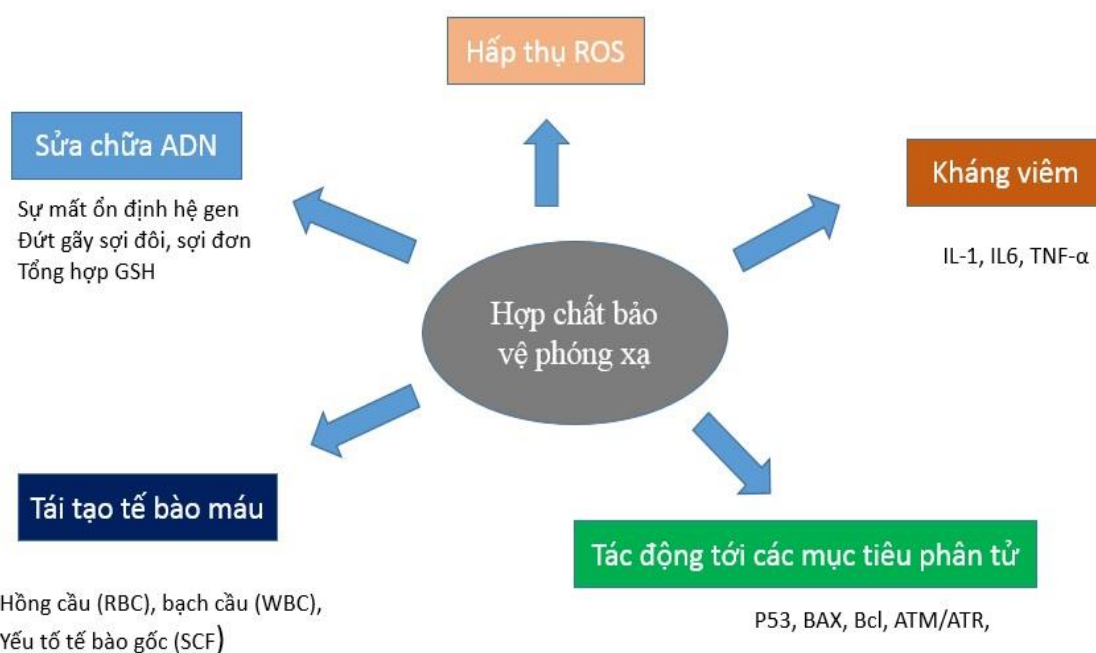
### 1.3. CÁC ĐẶC TÍNH CỦA CÁC HỢP CHẤT CÓ KHẢ NĂNG BẢO VỆ TRÁNH TÁC HẠI CỦA PHÓNG XẠ

Sự phát triển các phương pháp chiếu xạ bao gồm tối ưu liều chiếu xạ, tối ưu góc độ tiếp xúc giữa khối u với tia xạ, và phát triển hệ thống quan sát bằng hình ảnh theo thời gian thực của khối u đích trong suốt thời gian trị liệu hay tìm kiếm các nguồn phát xạ khác nhau. Điều này sẽ làm tăng tính hướng đích và định hướng năng lượng tia xạ trực tiếp lên khối u đồng thời giảm thiểu tác hại của việc chiếu xạ lên các mô thường. Tuy nhiên, hướng tiếp cận này gặp nhiều khó khăn khi vị trí khối u nằm sâu và lẫn vào trong các mô và cơ quan bình thường. Mặt khác, những tế bào mặc dù ở xa vị trí chiếu xạ, vẫn chịu ảnh hưởng lớn bởi năng lượng của tia xạ do hiệu ứng bức xạ. Vì vậy, việc tối ưu phương pháp chiếu xạ chưa đủ để loại bỏ tác hại của tia xạ lên tế bào thường và mô lành.

Một hướng tiếp cận khác là nghiên cứu phát triển các chất có khả năng bảo vệ trước tác động của tia xạ để phân bố thuốc vào vùng có các tế bào lành và mô thường nhằm hạn chế tác dụng phụ của tia xạ. Một số nghiên cứu theo hướng này đã phát triển, sàng lọc các chất gây nhạy cảm bức xạ và các chất bảo vệ bức xạ. Đây là các hóa chất có thể cải biến sự đáp ứng của tế bào đối với tia xạ. Các chất gây nhạy cảm bức xạ đã làm cho tế bào ung thư trở nên nhạy cảm hơn tới tác dụng của liệu pháp xạ trị. Nhiều chất đã được nghiên cứu và được ứng dụng trong lâm sàng như 5-fluorouracil và amifostine [Nguyen N.P, 2003], [Fernandes J.M, 2020].

### 1.3.1. Cơ chế phân tử, tế bào của các hợp chất có tác dụng bảo vệ khỏi tác hại của bức xạ

Tia xạ tác động lên tế bào theo nhiều hướng khác nhau. Các phản ứng để bảo vệ sự sống sót của tế bào cũng có thể được kích hoạt theo nhiều cơ chế. Hình 1.2 mô tả các mục tiêu phân tử và tế bào khác nhau của các hợp chất có tác dụng bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ.



Hình 1.2. Sơ đồ cơ chế bảo vệ tế bào của một số hợp chất có khả năng bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ. Hình ảnh được cải biên từ nguồn [Mun G-I, 2018].

Từ các thông tin về cơ chế tác động của tia xạ lên tế bào, trên cơ sở đó, các hợp chất có khả năng bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ được nghiên cứu và sàng lọc. Những hợp chất này có khả năng giảm thiểu tổn thương do tia xạ gây ra và các triệu chứng nhiễm độc phóng xạ bằng các nhóm cơ chế khác nhau. Các hợp chất này có khả năng hấp thụ ROS, kích hoạt các enzyme liên quan đến việc sửa chữa đứt gãy DNA, kích thích tạo máu và hệ thống miễn dịch hoặc tương tác với các protein trong các con đường truyền tín hiệu và apoptosis hoặc kháng viêm (hình 1.2). Các

hợp chất có khả năng bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ có thể có một hoặc một số cơ chế bảo vệ tế bào.

### **1.3.2. Các chỉ tiêu và đặc tính của các chất bảo vệ khỏi tác hại của bức xạ**

Một trong những nghiên cứu sớm nhất về chất bảo vệ bức xạ trên đối tượng động vật được dẫn đầu bởi Alexander Peter và được tài trợ bởi chính phủ Mỹ đã cung cấp những dữ liệu đầu tiên về tác động của bức xạ lên sự biểu hiện của các hội chứng liên quan đến tỷ lệ tử vong do sự ảnh hưởng phơi nhiễm bức xạ kéo dài. Đồng thời, nghiên cứu đã làm sáng tỏ một số cơ chế của quá trình tác động của tia xạ lên cơ thể sống [Peter Alexander, 1962].

Năm 1949, Path và cộng sự đã chứng minh rằng, khi tiêm cystein vào tĩnh mạch chuột trước khi chiếu xạ tia X khoảng 1h ở các liều lượng khác nhau có khả năng làm tăng mức độ sống sót của nhóm chuột sau 3 tuần lên 80%. Các kết quả này đã được chứng minh thêm sau đó bởi các công trình nghiên cứu các dẫn xuất của cystein như với các dẫn xuất cysteine là cysteamine (b-mercaptoethyl-amine) và glutathione (GSH) [Chapman W.H, 1950)], [Patt H.M,1949], [Bacq Z.M, 1951].

Trong chiến tranh thế giới lần thứ 2, hơn 4400 hợp chất được tổng hợp và thử nghiệm khả năng bảo vệ bức xạ của chúng. Kết quả sàng lọc ở trên quy mô lớn đã tìm ra amifostine có hiệu quả cao nhất trong số các hợp chất được tổng hợp đó có khả năng bảo vệ các cá thể bị ảnh hưởng bởi bức xạ. Đây là một aminothiol được phosphoryl hóa có tiềm năng chọn lọc bảo vệ các mô bình thường khỏi bị tổn thương bởi stress oxy hóa liên quan đến hóa trị và xạ trị ung thư. Amifostine là một hợp chất có công thức cấu tạo  $C_5H_{15}N_2O_3PS$ . Khả năng bảo vệ bức xạ của amifostine được chứng minh bởi nhóm hợp chất sulfhydryl có nhiều vai trò bao gồm sửa chữa các tổn thương DNA do bức xạ gây ra, khả năng quét gốc tự do, làm ổn định hệ gen, điều chỉnh sự trao đổi chất của tế bào, điều chỉnh sự tiến triển của chu kỳ tế bào, tăng cường các enzym sửa chữa DNA, và hấp phụ kim loại [Weiss J.F, 2009], [Vijay K, 2019].

Các hợp chất bảo vệ bức xạ là những hợp chất có khả năng bảo vệ tế bào thường tránh khỏi những tác dụng phá hủy của tia xạ. Các hợp chất này được phân loại dựa

vào đặc tính sinh học và chức năng bảo vệ tế bào trước tia xạ [Krishnan S, 2016], [Velpula N, 2013], [Mishra K, 2018]. Một số đặc tính sinh học của nhóm hợp chất bảo vệ bức xạ đã được nghiên cứu và xem xét như:

- Loại bỏ các gốc tự do
- Điều hòa các gen nhạy cảm với oxy hóa khử
- Điều chỉnh các yếu tố tăng trưởng và cytokine
- Ức chế quá trình apoptosis
- Khả năng chọn lọc trong việc bảo vệ các mô bình thường khỏi xạ trị mà

không bảo vệ khối u

- Có hiệu quả đối với nhiều loại bức xạ (tia X, tia gamma, tia neutron)

Những hợp chất này có khả năng giúp tế bào bảo vệ DNA trước tác động của tia xạ đồng thời thường nhanh chóng sửa chữa những hư hỏng của chúng khi tiếp xúc với tia xạ [Nguyen N.P, 2003].

### **1.3.3. Phân nhóm các hợp chất có khả năng bảo vệ khỏi tác hại của bức xạ**

Dựa trên cơ chế bảo vệ trước tia xạ của những chất này, có thể phân thành 03 nhóm chính: nhóm chất bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ, nhóm chất thích ứng và nhóm hấp thụ tia xạ. Ở nhóm chất đầu tiên thường là hợp chất sulfhydryl và các chất chống oxy hóa khác. Ở nhóm này có khả năng bảo vệ một số cơ quan quan trọng như não bộ, tủy xương, ruột. Nhóm chất thích nghi có vai trò giống như một yếu tố kích thích sự kháng lại tia xạ. Ở nhóm này thông thường là các thành phần được tách từ tế bào động thực vật với độc tính thấp. Chúng có khả năng kích thích các yếu tố nội sinh, điều hòa miễn dịch, tăng cường sức đề kháng không đặc hiệu của sinh vật. Nhóm chất hấp thụ tia xạ bảo vệ cơ thể từ các tia xạ. Các loại thuốc thuộc nhóm này có khả năng ngăn ngừa sự kết hợp của radioiodine giữa tuyến giáp và sự hấp thụ của các hạt nhân phóng xạ [Nair C.K, 2001].

Theo Velpula N và Nair C.K. cùng các cộng sự [Velpula N, 2013], [Nair C.K, 2001], các chất bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ còn được phân nhóm theo cơ chế tác động của chúng lên khả năng bảo vệ cơ thể trước tia xạ ở mức độ cụ thể hơn. Với cách phân nhóm này, các hợp chất bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ được chia

thành 09 nhóm chính bao gồm: nhóm chứa gốc sulhydryl, chất kháng oxy hóa, các hợp chất ức chế chuyển hóa enzyme angiotensin (ACE), điều hòa miễn dịch, dịch chiết thực vật, phối tử kết hợp với DNA, lipopolysaccharides và prostaglandins, nhóm cảm ứng metallothionin. Các nhóm hợp chất này với các cơ chế bảo vệ cơ thể khác nhau trước tia xạ được nghiên cứu và khảo sát ở nhiều vai trò cụ thể.

Nhóm sulhydryl với cơ chế chủ yếu dựa trên khả năng hấp thụ các gốc tự do và khả năng cho ion H<sup>+</sup>. Minh chứng cho nhóm hợp chất này là các cysteine, cysteamine, glutathione, amino-ethyl sothiourea (AET) đều tác động theo cơ chế này. Sự hình thành các disulfua hỗn hợp là một trong những yếu tố quan trọng để bảo vệ tế bào trước các tia bức xạ. Cơ chế này được tạo ra là do các hợp chất sulhydryl của các aminothiols hình thành cầu nối disulfua trong protein của tế bào. Khi disulfua bị tấn công bởi các gốc tự do, một nguyên tử lưu huỳnh bị khử và nguyên tử kia bị oxy hóa. Nếu lưu huỳnh nguyên tử của protein bị khử và nguyên tử lưu huỳnh của chất bảo vệ bị oxy hóa, protein không bị hư hỏng. Trên cơ sở này, liên kết của aminothiols và disulfua vào DNA đã được coi là một yếu tố quan trọng trong bảo vệ phóng xạ [Velpula N, 2013], [Capizzi R.L, 1999].

Nhóm hợp chất có khả năng kháng oxy hóa như vitamin A, C, E, tocopherol-monoglucoside (TMG), metolanin. Nhóm hợp chất này có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh [Velpula N, 2013]. Các nghiên cứu thực nghiệm trên mô hình *in vivo* của Kanter M et al và Seifter E et al đều chứng minh khả năng chống lại các tác động của tia xạ khi được bổ sung các loại vitamin tại thời điểm chiếu xạ và sau khi chiếu xạ [Seifter E, 1988], [Kanter M, 2008].

Nhóm hợp chất ức chế chuyển hóa enzyme angiotensin (ACE). Nhóm hợp chất này có khả năng kháng oxy hóa, ức chế tổng hợp collagen, kháng viêm, kháng sự xơ hóa và ức chế protease thông qua hệ thống reninangiotensin. Đại diện cho nhóm hợp chất này bao gồm captopril, enalapril, pencillamine, pentoxifylline [Velpula N, 2013], [Kharofa J, 2012]. Các bằng chứng tiền lâm sàng và lâm sàng cho thấy, nhóm chất ức chế chuyển hóa enzyme ACE có khả năng làm giảm tỷ lệ mắc bệnh viêm phổi do bức xạ ở những bệnh nhân được xạ trị lồng ngực vì ung thư phổi

[Kharofa J, 2012], [Van der Veen S.J, 2015]. Theo nghiên cứu của Van der Veen S.J, captopril có vai trò trong việc giảm tổn thương tim cấp tính, giảm yếu tố nguy cơ nhiễm độc tim phổi do bức xạ. Trong một nghiên cứu khác do Molteni A và các cộng sự đã chứng minh enalapril, pencillamine đều có khả năng bảo vệ phổi khỏi tình trạng viêm phổi trên hai mô hình gây tổn thương phổi ở chuột do chiếu xạ liều cao. Kết quả này là bằng chứng thực nghiệm quan trọng cho vai trò nhóm hợp chất ức chế chuyển hóa enzyme ACE có khả năng bảo vệ cơ thể trước tác động của tia xạ [Molteni A, 2000].

Nhóm hợp chất có khả năng điều hòa miễn dịch. Nhóm hợp chất này có khả năng điều chỉnh các phản ứng miễn dịch và tiết các cytokine của tế bào. Trong nghiên cứu của Pujol và các cộng sự trên thực nghiệm lâm sàng với 100 bệnh nhân xạ trị ung thư phổi được uống bổ sung hợp chất *gamma interferon*. Kết quả cho thấy trong sau quá trình điều trị được theo dõi ở 4, 8, 12 tuần, có sự kích thích miễn dịch, hoạt hóa tế bào đơn nhân ở bệnh nhân xạ trị ung thư phổi [Pujol J.L, 1993]. Trong một nghiên cứu khác năm 1992, Real và các cộng sự đã kiểm tra khả năng bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ qua sự kích thích tạo máu của polysaccharides AM5. Đây là một polysaccharide có khả năng liên kết với một protein. Trong nghiên cứu này, nhóm chuột được điều trị bởi polysaccharides AM5 giúp tăng cường khả năng sống sót của chuột từ 10% lên 90% sau khi chiếu xạ tia X với mức liều chiếu là 7 Gy [Real A, 1992]. Chiết xuất từ vi khuẩn Broncho-Vaxom không chứa nội độc tố cũng là một trong những hợp chất có khả năng tăng số lượng tế bào gốc tạo máu nội sinh (E-CFU). Thông qua đó, làm tăng khả năng sống sót của chuột dưới tác động của tia xạ [Fedorocko P, 1992]. Một nghiên cứu khác được tiến hành trên chuột B6D2F1 khi chuột được tiêm chất tổng hợp trehalose dicorynomycolate (S-TDCM). Kết quả nghiên cứu cho thấy S-TDCM có khả năng điều hòa miễn dịch và tăng cường khả năng sống sót của chuột sau khi chiếu xạ 30 ngày [Landauer M.R]. Một vài hợp chất khác cũng được báo cáo có khả năng điều hòa miễn dịch như nhóm hợp chất Ammonium trichloro-telluride (AS101). Đây là những hợp chất đã được thử nghiệm lâm sàng đối với các bệnh nhân ung thư được xạ trị. Nó được

chứng minh có vai trò trong việc kích thích tạo máu, tiết interleukin đóng vai trò trung gian quan trọng như *IL1*, *IL-6*, *TNF- $\alpha$*  [Kalechman Y, 1995].

Nhóm hợp chất tách chiết từ thực vật như curcumin có khả năng kháng oxy hóa, hấp thụ các gốc tự do, kháng viêm. Curcumin được chiết xuất từ phần rễ của *Curcuma lona* được chứng minh là có hiệu quả trong việc bảo vệ tế bào trước tác động của tia xạ và kháng khả năng tăng sinh của khối u. Một số nghiên cứu khác chứng minh tác dụng kép của việc bảo vệ tế bào thường của curcumin bằng cách tăng cường các con đường tín hiệu chống oxy hóa hay kháng viêm mạnh. Có nhiều nhóm thực vật chứa các hợp chất được tách chiết có hiệu quả trong việc bảo vệ tia xạ trên mô hình *in vivo* và *in vitro*. Tuy nhiên chưa thấy có các thử nghiệm lâm sàng của các nhóm chất này cho tới thời điểm hiện tại [Perrone D, 2015], [Verma V, 2016].

Nhóm các phối tử liên kết với DNA. Các hợp chất thuộc nhóm này có khả năng vận chuyển electron và quét gốc tự do. Những hợp chất có khả năng liên kết ở một số vị trí trong sợi DNA như ở rãnh nhỏ được nghiên cứu. Các liên kết này góp phần làm giảm khả năng bị đứt gãy DNA ở vị trí liên kết sau quá trình xạ trị. Đại diện cho nhóm hợp chất này là Hoechst 33342. Trong một nghiên cứu được báo cáo năm 1991 về cơ chế bảo vệ bức xạ của Hoechst 33342 được cải thiện nhờ bổ sung thêm nhóm cho điện tử electron vào các phối tử với DNA. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy khi Hoechst 33342 được thay thế nhóm etoxy bằng nhóm dimethylamino thì độc tính của thuốc giảm, đồng thời tăng khả năng sống sót trên mô hình *in vitro* với dòng nguyên bào sợi phổi chuột (V79) dưới tác động của tia xạ [Martin R.F, 1996]. Trong một nghiên cứu khác về khả năng methylproamine và Hoechst 33342 trong hệ thống phân giải phóng xạ. Kết quả cho thấy sự bảo vệ trước tia xạ bởi các phối tử liên kết với DNA được thực hiện qua sự vận chuyển điện tử trung gian [Martin R.F, 1998].

Hiện nay, một số hợp chất bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ được sàng lọc và được cục dược phẩm Hoa Kỳ FDA chấp nhận để sử dụng cho một số mục đích trong y học nhằm bảo vệ cơ thể trước tác dụng của phóng xạ (bảng 1.1).

Bảng 1.1: Một số loại thuốc được FDA cho phép sử dụng ở mục đích như là chất bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ , chất giảm nhẹ và thuốc điều trị khi bị nhiễm xạ [Mun G-I, 2018].

STT	Nhóm hóa chất	Tên thường gọi	Tác dụng
1	Nutraceuticals- Isoflavonoids	Genistein	Bảo vệ hệ thống cơ quan bên trong cơ thể (tủy xương, ruột, phổi)
2	Immunomodulator- TLR-5 agonist	CBLB502	Tăng cường khả năng sống sót; bảo vệ tủy xương và các tổn thương ruột ở các mô hình động vật chọn lọc
3	Cortical steroid metabolite	5-AED	Tăng cường khả năng sống sót; bảo vệ tủy xương
4	Free-radical quencher-Meso- prophyrin mimetic	AEOL 10150	Giảm thiểu tổn thương phổi, điều chỉnh hệ thống oxy hóa
5	Recombinant cytokines	Rhu IL-12	Tăng cường khả năng sống sót; bảo vệ tủy xương và các tổn thương ruột
6	Binding agents	Prussian Blue	Tác nhân hấp phụ của Cesium-137
7	Blocking agent	KI	Tác nhân hấp thụ hoặc ngăn chặn đối với iot phóng xạ (Iodine-131, Iodide-125)
8	5-hydroxy tryptamine antagonist	Granisetron	Giảm thiểu tác động gây nôn do phơi nhiễm bức xạ cấp tính
9	Chemical protectants	Amifostine	Bảo vệ sự sống sót của tế bào, bảo vệ toàn thân đặc biệt là cơ quan tủy xương và ruột
10	Cytokines and growth factor	Palifermin	Kích thích sự biệt hóa, tăng sinh, sửa chữa DNA và giải độc ROS



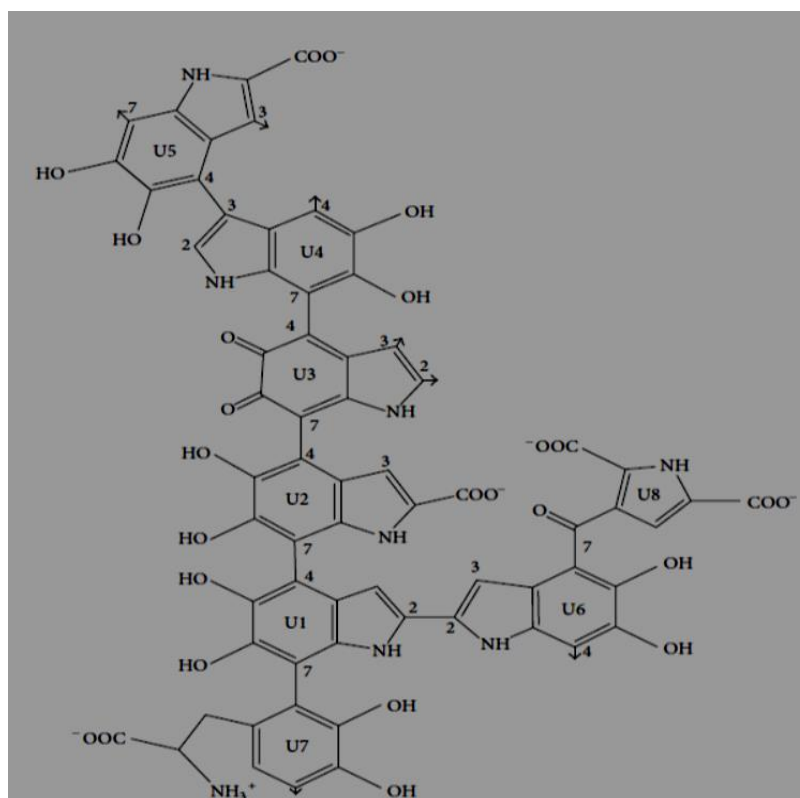
#### 1.4. MELANIN VÀ TÁC DỤNG SINH DƯỢC HỌC

Melanin là một nhóm sắc tố có bản chất là polymer tự nhiên và được tìm thấy rộng rãi ở hầu hết sinh vật sống. Các sắc tố melanin được phân loại dựa vào cấu trúc hóa học của chúng. Cho đến nay 04 nhóm melanin được thừa nhận rộng rãi là eumelanin, pheomelanin, neuromelanin và allomelanin. Các nhóm melanin này có nguồn gốc và thành phần hóa học khác nhau và có nhiều vai trò trong hoạt động sống của sinh vật. Theo các nghiên cứu trước, melanin tham gia vào cấu trúc trong hệ thống sinh học, có các chức năng như cảm biến sinh học, hấp phụ kim loại, bảo vệ cơ thể trước các tia xạ và sóng điện từ, kháng khuẩn và điều hòa thân nhiệt. Ngoài ra, melanin có mặt ở mọi cơ quan của cơ thể từ da, tóc, cho tới mạch máu hay hệ thần kinh, tuy nhiên vai trò của melanin trong các cơ quan này vẫn chưa được hiểu biết đầy đủ [Solano F, 2017].

Eumelanin là nhóm sắc tố màu đen chứa các gốc nito, còn pheomelanin là nhóm sắc tố màu vàng, đỏ nâu chứa lưu huỳnh. Đây là hai loại melanin thường được tìm thấy ở động vật. Chúng có chức năng chính bảo vệ cơ thể trước các tia xạ và tia cực tím. Liên quan đến chức năng ngăn ngừa tia UV, đã có một vài nghiên cứu, tập trung vào vai trò chính của melanin trong việc bảo vệ da khỏi sự phá hủy của tia UV bởi chúng có khả năng bảo vệ nhân tế bào tránh được sự phá hủy DNA [Solano F, 2017]. Nhóm neuromelanin có mặt trong các tế bào thần kinh. Cho đến nay, vai trò của neuromelanin vẫn chưa được làm rõ. Allomelanin được tổng hợp chủ yếu ở thực vật, vi khuẩn. Về mặt tính chất hóa học, melanin là nhóm hắc sắc tố đa dạng, tích điện âm, có khối lượng phân tử lớn được tổng hợp từ quá trình polymer hóa, oxy hóa các hợp chất phenol và indol [Manivasagan P, 2013], [Tarangini K, 2013]. Melanin hoàn toàn không tan trong nước, hay trong các dung môi hữu cơ, chịu được các loại axit mạnh, chỉ tan một ít trong dung môi kiềm. Melanin được ứng dụng rộng rãi ở các lĩnh vực như nông nghiệp, y học, dược phẩm, mỹ phẩm. Một số sản phẩm thương mại có chứa melanin được xem như là thành phần chính có thể ngăn ngừa tác hại của tia UV như là kem chống nắng, kính chống nắng [Solano F, 2017], [Brenner M, 2008].

### 1.4.1. Cấu trúc, thành phần của melanin

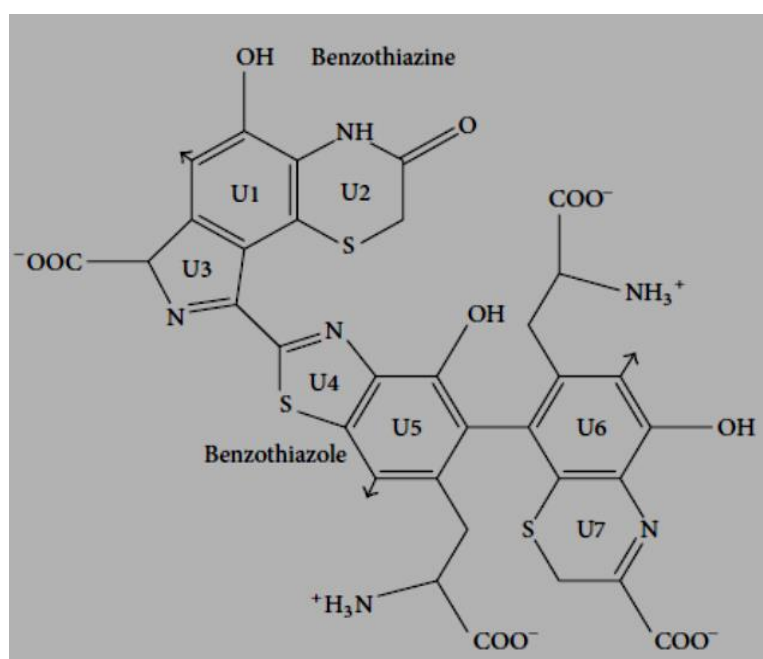
Cấu trúc của melanin vẫn chưa được xác định cụ thể bởi vì nó ít khả năng hòa tan và sự bền vững của polymer. Mặt khác, melanin không có khả năng tạo thành tinh thể nên khó xác định cấu trúc. Những thông tin về cấu trúc của melanin thu được bắt nguồn từ các sản phẩm phân giải và phân tích hiển vi [Manivasagan P, 2013], [Sajjan S, 2012]. Các nghiên cứu về thành phần, cấu trúc của melanin tập trung vào eumelanin và pheomelanin. Đây là hai nhóm melanin phổ biến nhất được tổng hợp bởi enzyme tyrosinase xúc tác quá trình chuyển đổi tyrosin thành dopaquinone. Các loại melanin từ các nguồn khác nhau không đồng nhất về kích thước và cấu trúc hóa học. Công thức phân tử thực nghiệm của eumelanin được thừa nhận rộng rãi là  $C_{18}H_{10}O_4N_2$ .



Hình 1.3. Mô hình đơn vị cấu trúc của eumelanin [Solano F, 2014].

Khối lượng trung bình là 318.3 g/M cho đơn vị tối thiểu là 3,8-dimetyl-2,7-dihydrobenzo [1,7] isoindole [6,5,4] indole-4,5,9,10-tetron. L-tyrosine được xem là tiền chất monophenol chính trong sự tạo thành melanin. Các đơn vị chính cấu thành melanin là hai đại phân tử 5,6-dihydroxyindole (DHI) và 5,6-dihydroxyindole-2-

carboxylic acid (DHICA) với các tỷ lệ khác nhau phụ thuộc vào loại eumelanin và các con đường sinh tổng hợp (hình 1.3). Pheomelanin dễ tan hơn eumelanin trong môi trường kiềm. Trong quá trình pheomelanesis, các acid amin L-cysteine tự do hoặc trong hợp chất glutathione, được kết hợp cùng L-dopaquinone, chất oxy hoá trung gian xúc tác bởi tyrosinase từ L-tyrosine. Do đó, pheomelanin được hình thành bởi các đơn vị chứa lưu huỳnh, chủ yếu là benzothiazin và benzothiazole thay vì các đơn vị indole [Solano F, 2014] như ở eumelanin. Mô hình đơn vị cấu trúc của pheomelanin được mô tả ở hình 1.4.



Hình 1.4. Mô hình đơn vị cấu trúc của pheomelanin [Solano F, 2014]

#### 1.4.2. Nguồn gốc và các con đường sinh tổng hợp melanin.

Melanin là tên gọi chung của một nhóm các loại sắc tố có nguồn gốc khác nhau. Ngày nay, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự có mặt của melanin ở hầu hết các sinh vật sống, từ vi khuẩn cho đến con người. Ở người và động vật, melanin là sắc tố quan trọng trong việc quyết định màu da và mắt, lông vũ. Melanin có mặt ở não bộ tham gia cấu trúc dây thần kinh và dẫn truyền các xung thần kinh và một số vai trò khác chưa được làm rõ. Ở động vật giáp xác, melanin tham gia vào cơ chế miễn dịch bẩm sinh của cơ thể. Quá trình melanization tạo ra melanin có khả năng tiêu diệt các vi khuẩn và vi sinh vật ngoại lai xâm nhập vào cơ thể.

Theo các nghiên cứu đã công bố trước đây, melanin có thể được phân thành các nhóm như eumelanin, pheumelanin, neuromelanin, catechol-melanin, DHN-melanin, pyomelanin và có các nguồn gốc khác nhau (bảng 1.2). Sự đa dạng về nguồn gốc cũng như đơn vị cấu trúc của melanin được quyết định bởi các con đường sinh tổng hợp khác nhau của melanin ở các loài sinh vật.

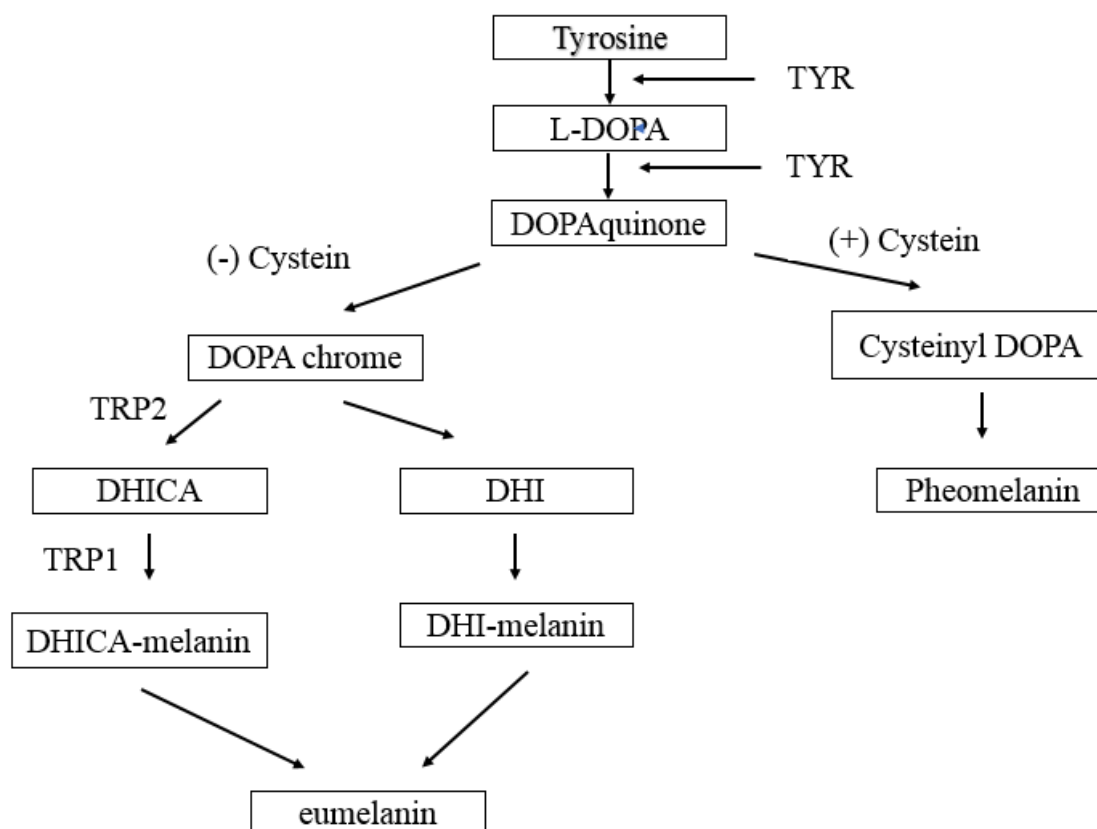
Bảng 1.2: Nguồn gốc và đơn vị cấu trúc của melanin [Tran-Ly A.N, 2020].

STT	Loại melanin	Nguồn gốc	Đơn vị cấu trúc
1	Eumelanin	Động vật, vi khuẩn, nấm	L-Dopa
2	Pheomelanin	Động vật	5-S-cys-Dopa
3	Neuromelanin	Não người	Dopamine và 5-S-cys-dopamine
4	Catechol-melanin	Thực vật	Catechol
5	DHN-melanin	Nấm, vi khuẩn	1,8-dihydroxynaphthalene (DHN)
6	Pyomelanin	Nấm, vi khuẩn	Homogentisic acid

Trong các con đường sinh tổng hợp melanin đều có điểm chung xuất phát từ tyrosine, được xúc tác bởi enzyme tyrosinase. Tuy nhiên, trong quá trình trùng hợp có sự kết hợp với một số thành phần khác đã tạo nên sự phong phú của các chủng loại melanin. Con đường sinh tổng hợp của eumelanin và pheomelanin ở động vật, vi khuẩn, nấm được mô tả ở hình 1.5.

Từ hình 1.5 có thể thấy, quá trình polymerization của pheomelanin có sự có mặt của cystein còn ở eumelanin thì không. Eumelanin là nhóm sắc tố màu đen chứa các gốc nito, còn pheomelanin là nhóm sắc tố màu vàng, đỏ nâu chứa lưu huỳnh. Sự khác nhau giữa eumelanin và pheomelanin là sự hiện diện của thành phần lưu huỳnh ở tiền chất tạo ra nó. Đây là hai nhóm sắc tố chính của melanin đều được tìm thấy ở da, mắt, tóc, lông vũ của các nhóm động vật và thậm chí là con người [Tran-Ly A.N, 2020]. Ở nấm và vi khuẩn, con đường sinh tổng hợp melanin đã tạo ra ba loại melanin khác nhau DHN-melanin, DOPA-melanin and pyomelanin [Berthelot C, 2020]. Pyromelanin được vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* sản xuất lần đầu tiên được công bố bởi nhóm tác giả Yabuuchi & Ohyama vào năm 1972. Từ đó đến nay,

một số loài vi khuẩn có khả năng tạo ra pyromelanin được sàng lọc và ghi nhận đặc biệt ở chi *proteobacteria* [Yabuuchi E, 1972].



Hình 1.5. Con đường sinh tổng hợp của eumelanin và pheomelanin. Hình ảnh cải biên từ nguồn [Schweitzer A.D, 2010]

Các đặc tính quan trọng của pyromelanin như khả năng tan, khả năng kháng oxy hóa và bảo vệ vi khuẩn trước năng lượng ánh sáng mặt trời được chúng sử dụng như là các cơ chế thích nghi với các tác động của môi trường bên ngoài [Turick C, 2010].

DHN-melanin được một số loài nấm tổng hợp nên như *B.cinerea* và *Leotiomycetes*. Con đường sinh tổng hợp DHN-melanin xuất phát từ 1,3,6,8 – tetrahydroxynaphtalene khác với các nhóm melanin còn lại là từ tyrosine. DHN-melanin là thành phần không thể thiếu tham gia vào sự phát triển sinh dưỡng, sự hình thành cấu trúc sinh sản và sự xâm nhập, lây nhiễm của *B. cinerea* vào các mô vật chủ [Schumacher J, 2016].

Neuromelanin có ở trong cơ quan não bộ của người, được tạo ra bởi phản ứng oxy hóa của dopamine và các tiền chất catecholamine. Vai trò của neuromelanin đã được Roberta L và các cộng sự tham gia dẫn truyền tín hiệu ở neuron đồng thời sự thoái hóa hoặc mất chức năng của neuromelanin có liên quan đến bệnh parkinson ở người [Roberta M.J, 2017], [Priyam A, 2018]. Neuromelanin còn được tìm thấy ở vùng chất đen của cuống não nhưng chưa rõ nó có tham gia vào hoạt động dẫn truyền tín hiệu của tế bào thần kinh hay không [Solano F, 2014].

Ở thực vật, các quá trình tổng hợp và trao đổi chất cần tuân theo qui luật tiết kiệm nito vì đây là yếu tố then chốt trong sự phát triển của cây trồng. Vì lẽ đó, việc tổng hợp melanin không sử dụng L-tyrosine ở thực vật để hạn chế sự mất mát nguyên tố nito. Thực vật sử dụng tiền chất catechol - là tiền chất có số lượng phong phú ở thực vật - được sử dụng thay thế cho L-tyrosine như ở động vật, nấm, vi khuẩn để tổng hợp nên catechol-melanin. Có rất ít thông tin nghiên cứu về thành phần catechol-melanin. Gần đây, có một vài nghiên cứu sử dụng phương pháp tái tổ hợp để tạo ra catechol-melanin từ vi khuẩn nhằm tăng hiệu quả sản xuất của thành phần này [Mejía-Caballero A, 2016].

Tóm lại melanin là nhóm sắc tố có mặt trong các dạng sinh vật sống. Các con đường sinh tổng hợp melanin ở các giới động, thực vật, vi khuẩn, nấm khác nhau là khác nhau và tạo nên sự đa dạng phong về chủng loại, cấu trúc, cũng như chức năng của nó trong các cơ thể sống. Cho đến nay, một số nhóm melanin vẫn chưa được nghiên cứu rõ ràng về vai trò và các đặc tính của nó, đặc biệt là ở nhóm neuromelanin.

#### **1.4.3. Hoạt tính sinh học và dược học của melanin**

Với sự đa dạng về mặt cấu trúc và có nhiều nhóm chức năng, melanin trong các cá thể sống có nhiều hoạt tính sinh dược học đa dạng. Nhìn chung, các tính chất và vai trò của từng loại melanin đã được khám phá. Một số hoạt tính sinh học của melanin thường được đánh giá như hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm, khả năng tăng cường và điều hòa hệ miễn dịch, khả năng hấp phụ các kim loại nặng, khả năng kháng ung thư và đặc biệt là khả năng hấp thụ tia uv và tia xạ ở

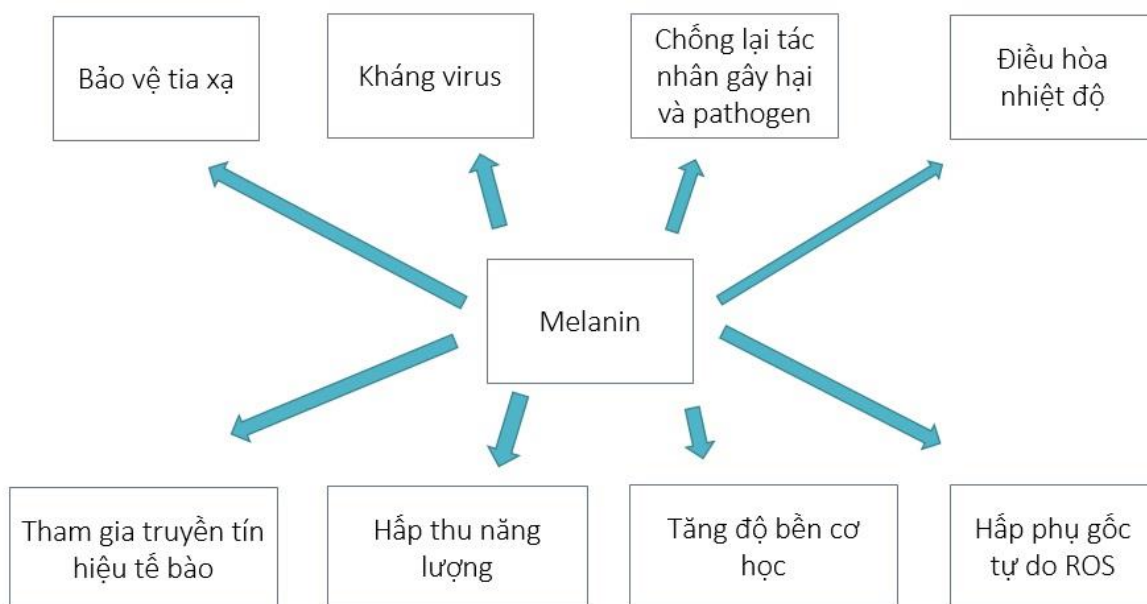
các nhóm melanin có nguồn gốc từ tự nhiên hay tổng hợp [Martínez L.M, 2019] (hình 1.6).

Melanin sử dụng trong các lĩnh vực khác nhau thường có nguồn gốc từ một số nguồn nguyên liệu sau:

a/ melanin được tách chiết từ các loài động vật, thực vật có khả năng tổng hợp melanin với số lượng lớn như trong túi mực của các loài mực ống hoặc từ sắc tố melanin của thực vật.

b/ melanin được tổng hợp nhân tạo bằng phương pháp tổng hợp hóa học.

c/ melanin được tổng hợp từ một số chủng vi sinh vật.



Hình 1.6. Các ứng dụng chính của melanin. Hình ảnh cải biên từ nguồn

[Martínez L.M, 2019]

#### 1.4.3.1. Hoạt tính kháng oxy hóa của melanin

Xạ trị phát sinh các dạng oxy phản ứng (ROS) bao gồm các gốc peroxides, superoxide, hydroxyl radical, oxy đơn nguyên tử [Hayyan M, 2016]. Ở trạng thái bình thường của cơ thể, nồng độ các gốc ROS ở mức thấp, và được giữ ở trạng thái cân bằng. Khi đó, các dạng oxy phản ứng này đóng vai trò quan trọng trong việc chuyển hóa các chất và xúc tác các phản ứng sinh hóa bên trong tế bào hay truyền

các tín hiệu tế bào. Tuy nhiên, khi nồng độ các ROS tăng lên quá mức do các yếu tố nội sinh hay ngoại sinh gây nên sự rối loạn quá trình trao đổi chất bình thường của tế bào, phá hủy cấu trúc các đại phân tử DNA, protein và sửa đổi một số thành phần cấu trúc bên trong tế bào và có thể dẫn đến chết tế bào [Larsson B.S, 1993].

Melanin từ các nguồn gốc khác nhau có hoạt tính kháng oxy hóa đáng kể. Vai trò kháng oxy hóa của melanin thường được đánh giá thông qua khả năng hấp thụ hay chuyển hóa các gốc tự do. Hoạt kháng oxy hóa của melanin được báo cáo ở hầu hết ở các nhóm melanin tách từ các nguồn tự nhiên như túi mực, động vật, thực vật hay melanin được tổng hợp bằng phương pháp hóa học [Yao Z.Y, 2016].

#### 1.4.3.2. Khả năng điều hòa hệ thống miễn dịch của melanin

Nhiều nghiên cứu chứng minh melanin có vai trò điều chỉnh hệ thống miễn dịch của cơ thể trên cả mô hình *in vitro* và *in vivo*. Trong đó, melanin được báo cáo là có vai trò trong việc tăng cường khả năng miễn dịch của cơ thể. Năm 2018, Mark H T Stappers cùng các cộng sự đã nghiên cứu về thụ thể Lectin C có khả năng cảm nhận melanin (Mellec) có vai trò thiết yếu trong khả năng miễn dịch kháng nấm thông qua nhận dạng đơn vị naphthalene-diol của 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin. Thụ thể MelLec nhận ra sắc tố melanin trong bào tử của nấm *Aspergillus fumigatus* cũng như ở các loại nấm tạo hắc tố DHN khác [Stappers M.H.T, 2018].

Sự sản xuất quá mức các cytokine tiền viêm trong các bệnh lý như viêm khớp dạng thấp hay hội chứng nhiễm trùng huyết làm tăng nặng tình trạng bệnh. Mohagheghpour và các cộng sự đã chứng minh melanin tổng hợp có vai trò điều hòa miễn dịch thông qua ức chế sản xuất các cytokine tiền viêm như TNF-alpha (TNF- $\alpha$ ) bởi các bạch cầu đơn nhân và ức chế Interleukin 1, 6, 10 (IL-1, IL-6, IL-11) và các đại thực bào [Mohagheghpou, 2000]. Một nghiên cứu khác của Pogh và cộng sự (2005) đã chứng minh melanin có tác dụng giúp các tế bào tua tăng sản xuất IgA và IL-1 trên mô hình chuột thí nghiệm. Ngoài ra, melanin được cho là yếu tố làm tăng hàm lượng (IFG -  $\gamma$ ) trong các tế bào mô lách do điều chỉnh sự cân bằng của lượng tế bào T-helper 1 và T-helper 2 [Pugh N.D, 2005].



Năm 2006, một loại melanin thực vật tách từ *Nigella sativa L.* được chứng minh có khả năng ảnh hưởng tới việc sản xuất 03 cytokine (yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6) và yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF), bởi bạch cầu đơn nhân, tổng số tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và trên dòng tế bào THP-1. Các tế bào được xử lý với nồng độ melanin khác nhau gây ra sự biểu hiện của các gen mã hóa các interleukin TNF-  $\alpha$ , IL-6 và VEGF trong dịch ly giải tế bào. Ở mức độ protein, melanin kích thích sản xuất protein TNF-  $\alpha$  và IL-6 và ức chế sản xuất VEGF bởi bạch cầu đơn nhân và PBMC. Trong dòng tế bào THP-1, melanin đã kích hoạt sản xuất cả ba loại protein cytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, VEGF [El-Obeid A, 2006].

Melanin được chiết xuất từ hạt họ cúc (*Echinacea*) có khả năng điều hòa miễn dịch được ghi nhận. Trong nghiên cứu này, melanin hoạt hóa NF- $\kappa$ B trong bạch cầu đơn nhân trên mô hình *in vitro* bằng liên kết với thụ thể TLR<sub>2</sub>. Melanin cũng được ghi nhận có tác dụng làm tăng sản xuất INF-  $\gamma$  trong các tế bào lá lách và IgA, IL-6 trên các tế bào lá lách. Trên mô hình *in vivo*, chuột được bổ sung melanin vào khẩu phần thức ăn trong bốn ngày làm tăng sản xuất INF-  $\gamma$  bởi các tế bào lá lách. Ngoài ra, melanin kích thích gia tăng sự tạo thành IgA và IL-6 ở các tế bào trong các cụm nang bạch huyết dưới biểu mô được tìm thấy trong ruột của chuột thí nghiệm [Pugh N.D, 2005].

Một nghiên cứu khác về melanin tách từ *Nigella sativa L* cũng được chứng minh có khả năng ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư đại trực tràng bởi tăng cường apoptosis và điều chỉnh con đường tín hiệu MAPK. Trong nghiên cứu này, melanin điều hòa thụ thể TLR<sub>4</sub> có vai trò tăng cường quá trình apoptosis và tăng khả năng hấp thụ các gốc ROS. TLRs là các thụ thể protein xuyên màng đóng vai trò quan trọng trong hệ thống miễn dịch. Tác nhân gây bệnh như vi khuẩn, nấm, vi rút được cơ thể nhận diện thông qua các thụ thể TLRs được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào bạch cầu, tế bào tua, Tế bào T, B, lymphocytes. Các phối tử kết hợp với TLRs thường là lipopolysaccharide (liên kết TLR<sub>4</sub>), peptidoglycans (liên kết TLR<sub>2</sub>), lipoprotein (liên kết với TLR<sub>2</sub>) [Poltorak A, 1998], [Takeuchi O, 1999].

Melanin tách từ hạt *Echinacea* và *Nigella sativa* được chứng minh có khả năng kích hoạt bạch cầu đơn nhân bằng liên kết với các thụ thể TLR<sub>2</sub>, và TLR<sub>4</sub> [El-Obeid A, 2006].

#### 1.4.3.3. Tính chất bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ và kháng ung thư của melanin

Có nhiều đặc tính quan trọng của melanin đã được nghiên cứu và thừa nhận như khả năng kháng oxy hóa, tính chất hấp thụ tia uv và tia xạ. Trong nhiều trường hợp, melanin được sử dụng như là một chất bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ [Dadachova E, 2008]. Để sử dụng những tính chất đặc biệt của melanin và tăng khả năng ứng dụng nó trong lĩnh vực y sinh, melanin thường được đưa về dạng hạt nano và được bọc polymer hoặc liposome. Khả năng kháng sự tăng sinh của tế bào ung thư và tiềm năng bảo vệ tế bào máu và mô lành sau quá trình xạ trị của melanin là một trong các hướng nghiên cứu gần đây được quan tâm rộng rãi.

##### *Hoạt tính kháng sự tăng sinh tế bào ung thư*

Melanin được tách và tổng hợp từ các nguồn khác nhau có các hoạt tính kháng ung thư đáng kể. Melanin được sản xuất từ *Streptomyces glaucescens* NEAE-H, được ghi nhận có khả năng gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư da HFB4 với IC<sub>50</sub> 16,34 ± 1,31 µg/mL [El-Naggar N.E, 2017]. Hoạt tính kháng lại sự tăng sinh của dòng tế bào ung thư tế bào biểu mô Hep-2 được báo cáo đặc biệt ở nồng độ cao từ 500-1000 µg/mL [Al-Tayib O, 2017].

Melanin tách từ hạt *Nigella sativa* L có khả năng ức chế sự tăng sinh ở dòng tế bào ung thư bạch cầu cấp (Th1). Trong nghiên cứu này đã chỉ ra ở nồng độ thấp (0-500 µg/mL), melanin không gây độc tế bào. Tuy nhiên ở nồng độ cao (62.5 - 500 µg/mL), melanin có khả năng ức chế tăng sinh ở pha G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> trong chu trình tế bào, đồng thời làm tăng nhẹ biểu hiện của thụ thể TLR<sub>4</sub> trên bề mặt tế bào Th1 và điều hòa mức độ biểu hiện gen và protein của TLR<sub>4</sub>. Ngoài ra, melanin kích hoạt cả hai con đường ngoại bào và nội bào gây ra quá trình apoptosis trên dòng tế bào Th1 [El-Obeid A, 2020]. Gần đây, có nghiên cứu đã thành công trong việc tách melanin có nguồn gốc từ vi khuẩn để thử nghiệm một số tính chất kháng ung thư. Tuy nhiên,

đây mới chỉ là những nghiên cứu thử nghiệm ban đầu, và chưa thực sự có nhiều kết quả ấn tượng [El-Naggar N.E, 2017].

*Khả năng hấp thụ bức xạ và bảo vệ tế bào sau xạ trị ung thư*

Cả hai loại eumelanin và pheomelanin đều có khả năng hấp thụ photon từ tia cực tím và các tia sáng nhìn thấy trong quang phổ mặt trời. Melanin có khả năng nhanh chóng chuyển đổi gần như hoàn toàn năng lượng hấp thụ photon thành nhiệt năng. Rất ít khi melanin ở trạng thái kích thích tham gia vào các phản ứng quang hóa. Melanin có dải hấp thụ các tia xạ rộng. Đặc tính này của melanin tương đồng với một số chất vô cơ hơn là một chất hữu cơ. Trên thực tế, melanin được cho là thích hợp để sử dụng trong mô hình chất bán dẫn [Liu H, 2020]. Tia UV ảnh hưởng trực tiếp đến chức năng và sự sinh tồn của nhiều loại tế bào, và là nguyên nhân chính gây ra các loại ung thư da bao gồm ung thư tế bào đáy BCC (basal cell carcinoma), ung thư tế bào vảy SCC (squamous cell carcinoma) và ung thư tế bào sắc tố melanoma [Gloster H.M.Jr, 2006]. Bởi vì tia UV có khả năng gây ra sự phân hủy và đột biến DNA. Các tia UV có bước sóng càng ngắn thì mang mức năng lượng càng cao và có khả năng tác động trực tiếp bẻ gãy các liên kết mạch đôi của DNA gây ra đột biến gen hoặc tác động gián tiếp thông qua sản sinh nhiều gốc tự do. Theo một số nghiên cứu đã được công bố trước đó, melanin được biết đến là sắc tố có khả năng bảo vệ da trước sự phá hủy của tia UV. Các nghiên cứu đã chỉ ra trên 50% các loại ung thư tế bào đáy, ung thư tế bào vảy và ung thư tế bào sắc tố melanoma là có liên quan đến những sự đột biến dưới tác động của UVB [Brash D.E, 1991]. Các nghiên cứu dịch tễ học đã cho thấy có mối quan hệ giữa hàm lượng sắc tố và sự phát sinh của các loại ung thư da. Tỷ lệ những người da trắng có nguy cơ bị ung thư da cao gấp 70 lần so với những người da đen. Sở dĩ như vậy vì nồng độ melanin dưới da của hai nhóm người này khác nhau được cho là đóng vai trò quyết định trong việc hấp thụ và phân tán năng lượng tia UV ở vị trí biểu bì tiếp xúc với tia xạ [Kollias N, 1991]. Theo nghiên cứu Brenner M và các cộng sự đã chỉ ra tỷ lệ tia UVA và UVB đi qua lớp biểu bì ở người da đen thấp hơn khoảng 3 lần so với người da trắng. Điều này được quyết định bởi số lượng, mật độ, kích thước của melanin

trong tế bào melanocyte và keratinocyte ở người da đen nhiều hơn, giúp tế bào tránh khỏi sự tấn công của tia UV so với ở người da trắng [Brenner M, 2008].

Trước đó, khả năng hấp thụ tia UV của melanin đã được biết đến và nó là đặc tính quan trọng nhất của melanin trong việc bảo vệ cơ thể trước tia bức xạ của mặt trời. Xạ trị cho bệnh nhân ung thư gây ra nhiều tác dụng phụ quan trọng phá hủy da, niêm mạc, ảnh hưởng lâu dài tới chất lượng sống của bệnh nhân ung thư [Pico J.L, 1998]. Melanin còn được sử dụng làm đích nhận diện của thuốc kết hợp hóa xạ trị để điều trị ung thư melanoma và có khả năng hạn chế được một số tác dụng phụ sau quá trình xạ trị [Hutchison S, 2014]. Một nghiên cứu trước đó đã thử nghiệm khả năng bảo vệ mô lách của melanin dưới tác dụng của tia gamma và các dấu ấn phân tử liên quan trên mô hình *in vivo* [Kunwar A, 2012].

Một nghiên cứu khác về melanin có nguồn gốc từ nấm đã khám phá vai trò chống lại các bức xạ ion hóa của nó thông qua khả năng loại bỏ gốc tự do và sắp xếp không gian theo hình cầu để hạn chế tác hại của tia xạ [Dadachova E, 2008]. Nghiên cứu trên mô hình chuột tiếp tục khẳng định vai trò bảo vệ toàn thân của melanin khi chuột bị chiếu xạ. Theo A Kunwar và các cộng sự, ở mức liều 50 mg/kg, melanin tách từ nấm có khả năng làm giảm nhẹ các triệu chứng tỷ lệ 100% ở nhóm chuột được tiêm melanin sau quá trình chiếu xạ [Kunwar A, 2012]. Đây là các cơ sở khoa học đáng chú ý cho thấy tiềm năng có thể bảo vệ các tế bào thường và mô lành sau quá trình xạ trị của melanin.

#### **1.4.4. Các ứng dụng chính của NMPs**

##### *1.4.4.1. Một vài đặc điểm của kỹ thuật chế tạo hạt nano trong nghiên cứu và phát triển dược phẩm*

Hạt nano (nanoparticles) và vật liệu có cấu trúc nano (nanostructured materials) là lĩnh vực nghiên cứu và ứng dụng mới được phát triển trong thời gian gần đây. Hiện tại, không tồn tại duy nhất một định nghĩa hạt nano được quốc tế chấp nhận chung cho vật liệu nano, tuy nhiên, chúng đều được phân loại dựa vào kích thước. Một trong số các khái niệm về vật liệu kích thước nano được chấp nhận rộng rãi là loại vật liệu có ít nhất một kích thước nằm trong khoảng 1-1000 nm. Hạt nano

thường có đường kính trong khoảng 1-100 nm [Jeevanandam J, 2018], [Dilnawaz F, 2018]. Trong quá trình nghiên cứu thuốc điều trị, có rất nhiều loại hoạt chất dược phẩm APIs (active pharmaceutical ingredients) có tính sinh khả dụng thấp vì có đặc tính khó tan. Các công nghệ nano dược sử dụng hiện nay cho phát triển dược phẩm góp phần tăng khả năng tan của chúng. Độ tan của một hợp chất phụ thuộc rất lớn vào kích thước của hạt. Các hạt có kích thước lớn có tổng diện tích bề mặt thấp dẫn đến diện tích bề mặt tiếp xúc của hạt và dung môi ít hơn dẫn đến độ phân tán và hòa tan kém hơn. Vì vậy một số kỹ thuật dược sử dụng trong chế tạo và sản xuất hạt nano được ứng dụng trong y sinh, dược học nhằm giảm kích thước của hạt vật liệu của chúng [Dilnawaz F, 2018], [Verma V, 2021].

Các phương pháp để thay đổi kích thước của hạt rất đa dạng và phong phú. Các đặc tính của vật liệu và hoạt chất dược phẩm là khác nhau. Vì vậy, các phương pháp sử dụng phụ thuộc vào đặc tính và tính chất của từng vật liệu. Đó có thể là những tác động vật lý hay tác động hóa học hoặc kết hợp đồng thời nhiều phương pháp để kiểm soát kích thước của hạt trong giới hạn cho phép.

Các phương pháp vật lý thường được sử dụng để đưa hạt về kích thước nano bao gồm mài, nghiền, ma sát, tăng áp suất, va đập hoặc cắt. Ngoài ra, có thể tăng độ hòa tan của hạt bằng tạo nano dưới dạng huyền phù. Đây là phương pháp phân tán dạng keo chứa các thành phần thuốc có kích thước nhỏ hơn micromet. Để tạo dạng huyền phù cho hạt nano, phương pháp nghiền ướt thường được sử dụng để tăng cường tính sinh khả dụng và hoạt tính sinh học của sản phẩm. Phương pháp kết tủa được sử dụng cho các hạt thuốc có độ hòa tan kém. Kỹ thuật này thường sử dụng bởi hai loại dung môi khác nhau. Dung môi đầu tiên có thể hòa tan các phân tử thuốc, sau đó dung dịch được trộn nhanh chóng vào một dung môi khác mà các phân tử thuốc không thể hòa tan được. Tốc độ khuấy trộn nhanh chóng giữa hai dung dịch dẫn đến sự siêu bão hòa của các phân tử thuốc và sự phát triển thuốc dưới dạng kết tinh siêu mịn hoặc vô định hình. Một kỹ thuật khác được sử dụng để tạo hạt nano là sử dụng đồng hóa áp lực cao nhằm tăng độ mịn cho sản phẩm. Trong kỹ thuật này, thuốc được phân tán dưới dạng huyền phù, sau đó dưới tác dụng của máy đồng hóa áp lực

cao để chuyển dung dịch huyền phù nano về kích thước mong muốn [Bhalani D. V, 2022].

Sự thay đổi về mặt hóa học có thể làm thay đổi kích thước của hạt. Những thay đổi được sử dụng trong công nghệ chế tạo hạt nano bao gồm sự thay đổi pH của dung dịch, hướng hydrat (hydrotropic), đồng kết tinh (co-crystallization), đồng dung môi (co-solvency), tạo muối (salt formation). Độ pH của dung dịch ảnh hưởng lớn đến khả năng hòa tan và kết tủa của một chất trong dung dịch. Trạng thái điện tích của các phân tử bị thay đổi khi pH môi trường thay đổi. Tại pH đẳng điện, lượng kết tủa được tạo ra nhiều nhất và phân tử không tích điện. Đồng kết tinh là phức hệ siêu cấu trúc vật liệu không ion được sử dụng cho hai hay nhiều phân tử khác nhau có các lực liên kết hydro và liên kết  $\pi-\pi$  trong phân tử. Trong quá trình đồng kết tinh sẽ làm thay đổi tương tác phân tử của các hợp chất được phẩm nhưng không làm thay đổi thành phần hóa học của hoạt chất được phẩm. Việc thay đổi này giúp được phẩm tăng khả năng hòa tan và tối ưu các đặc tính của thuốc [Sekhon B. S, 2012]. Đồng dung môi được sử dụng khi cấu trúc phân tử của thuốc phức tạp, độ hòa tan kém trong nước. Khi đó, có thể sử dụng thêm hỗn hợp dung môi để bổ sung thêm các nhóm chức hóa học không phân cực giúp các phân tử của thuốc dễ dàng hòa tan hơn trong nước [Millard J, 2002]. Tạo muối là một kỹ thuật để tăng độ hòa tan của thuốc. Các hoạt chất được phẩm có tính acid thường có độ hòa tan trong nước kém hơn so với dưới dạng muối của chúng. Do đó, việc chuyển đổi những hoạt chất được phẩm này dưới dạng muối góp phần tăng khả năng sinh khả dụng của chúng.

Đặc tính khó hòa tan và tính sinh khả dụng kém của nhiều APIs là vấn đề thách thức trong nghiên cứu và phát triển được phẩm ứng dụng cho điều trị, chẩn đoán. Các hoạt chất được phẩm rất đa dạng và có các đặc tính riêng biệt. Các phương pháp sử dụng bao gồm phương pháp vật lý, hóa học riêng rẽ hay kết hợp đồng thời các phương pháp khác nhau để nano hóa hoạt chất được phẩm lựa chọn phụ thuộc vào bản chất cấu trúc và đặc điểm của từng loại hợp chất.

Đặc tính đa chức năng và khả năng tương thích sinh học của melanin đã gợi ý đến việc phát triển vật liệu NMPs bằng phương pháp mô phỏng cấu trúc hóa học và

các đặc tính vật liệu của nó. Các nghiên cứu này phát triển vật liệu từ dopamine (DA) - tiền chất chính trong quá trình tổng hợp melanin *in vitro* kích thước nano. Bên cạnh các đặc tính giống melanin tự nhiên, các đặc tính kết dính linh hoạt của melanin có nguồn gốc là polydopamine đã mở rộng thêm khả năng ứng dụng trên lĩnh vực y sinh và môi trường [Park J, 2019].

#### 1.4.4.2. NMPs tổng hợp nhân tạo

Trong tự nhiên, melanin được tổng hợp bên trong các tế bào melanocytes và được bắt đầu bởi sự hoạt hóa enzyme tyrosinase, laccase và các polyphenol oxidase do các yếu tố kích thích ngoại sinh như nồng độ ROS tăng cao, stress hóa học. Các enzyme này chuyển đổi các tiền chất tyrosine, dopamin (DA) thành các chất trung gian DHI và axit 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic có thể được polymer hóa và tạo thành melanin. Trên mô hình *in vitro*, các nghiên cứu mô phỏng lại quá trình hình thành melanin trong tự nhiên, và tối ưu các điều kiện để tổng hợp hạt NMPs mang các đặc tính của melanin tự nhiên và một số đặc tính quan trọng khác để tăng khả năng ứng dụng của chúng. Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tạo hạt của NMPs như nhiệt độ, thành phần hệ đệm có thể làm tăng hoặc giảm kích thước của hạt. Trong hệ đệm phosphate hoặc bicarbonat, kích thước của hạt lớn hơn trong hệ đệm tris buffer.

Các ứng dụng của NMPs trong y sinh tập trung ở 03 mảng: điều trị, phân tích sinh học; thần kinh học; cảm biến sinh học. Các hạt NMPs được tổng hợp với kích thước có thể điều chỉnh từ vài chục đến hàng trăm nanomet khi điều chỉnh các giá trị pH khác nhau và bổ sung các thành phần NaOH và NH<sub>4</sub>OH vào các DA [Park J, 2019]. Ngoài ra, trong quá trình tổng hợp hạt NMPs bằng phương pháp hóa học, các nghiên cứu còn gắn thêm một số hợp chất khác nhau để tăng cường các chức năng của nó. Trong một số trường hợp, NMPs được sử dụng như là chất mang, đóng gói, vận chuyển thuốc biệt dược để nâng cao hiệu quả điều trị.

#### 1.4.4.3. Tính chất kháng viêm và hấp thụ bức xạ của NMPs trong xạ trị ung thư

NMPs và những hạt nano có cấu trúc giống melanin đã được chứng minh là có khả năng giảm thiểu tình trạng viêm ở mô hình *in vivo*. Các gốc tự do là một trong

những sản phẩm phát sinh trong quá trình viêm. Sự tăng nồng độ ROS khiến các đại phân tử như DNA, lipid, protein bị phá hủy và càng khiến tình trạng viêm tăng nặng. Khả năng quét gốc tự do của các hạt nano có cấu trúc giống melanin bởi các nhóm chức phenolic đóng vai trò quan trọng. Theo Zhao H và các cộng sự, các hạt nano có cấu trúc giống melanin đã làm giảm đáng kể mức ROS nội bào trong các đại thực bào của chuột. Khả năng chống viêm NMPs cũng được ghi nhận trên mô hình chuột bị viêm phúc mạc và tổn thương phổi cấp [Zhao H, 2018].

Giống như melanin có khả năng hấp thụ hiệu quả tia dải từ tia UV đến tia xạ mạnh, NMPs có khả năng hấp thụ tia xạ với các ưu điểm vượt trội. Các hạt NMPs được nghiên cứu khả năng bảo vệ tủy xương sau xạ trị. Trong nghiên cứu này, các hạt nano melanin được tạo ra kích thước 15 nm được tiêm vào tĩnh mạch và kiểm tra sự phân bố của NMPs trong tủy xương. Kết quả nghiên cứu cho thấy việc tiêm NMPs vào tủy xương làm giảm độc tính huyết học và không ghi nhận hiện tượng melanin có khả năng bảo vệ khối u trong quá trình xạ trị trên mô hình *in vivo* [Schweitzer A. D, 2010].

#### 1.4.4.4. NMPs là hệ thống vận chuyển thuốc hướng đích

Sự phát triển công nghệ nano đã hỗ trợ tích cực cho việc chẩn đoán và điều trị một số bệnh nan y đặc biệt là ung thư. Các hạt nano tăng khả năng vận chuyển, mang thuốc hướng đích để nâng cao hiệu quả điều trị và giảm tác dụng phụ. Có nhiều phức hệ nano vận chuyển thuốc đã được nghiên cứu và phát triển.

Hệ thống vận chuyển thuốc thường có kích thước nhỏ hơn 500 nm [Neubert R.H, 2011]. Nhìn chung, các phức hệ nano phân phối thuốc thường có một vài hoặc tất cả các yếu tố như: làm giảm độc tính, tăng độ hòa tan và độ ổn định của phức hệ, tính hướng đích, dễ dàng giải phóng thành phần thuốc ở các vị trí cụ thể. Những hệ thống phân phối mang những đặc điểm tối ưu dựa trên sự thay đổi các thành phần hóa học như thành phần hữu cơ, vô cơ hoặc hỗn hợp; kích thước thay đổi, hình dạng (hình cầu, hình que, hình khối); đặc tính bề mặt (diện tích bề mặt, nhóm chức); PEGyl hóa hoặc lớp phủ gắn các phân tử mục tiêu [Din F.U, 2017].



Melanin là một polymer sinh học với nhiều đặc tính đa chức năng có thể sử dụng để làm hệ thống vận chuyển phân phối thuốc. Các công trình nghiên cứu đã chỉ ra khả năng tương tác mạnh mẽ giữa melanin và các vòng thơm của thuốc cũng như khả năng tương thích sinh học và khả năng phân hủy của melanin [Park J, 2019], [Wang D, 2017]. Mặt khác, polydopamin được chứng minh có mức độ hòa tan cao trong nước, khả năng tương thích sinh học và trên bề mặt của melanin có các cấu trúc rỗng có khả năng chứa một lượng lớn thuốc biệt dược. Chúng được xem là chất vận chuyển tiện lợi và có giá thành rẻ trong hệ thống phân phối thuốc. Nhiều loại thuốc kháng ung thư có đặc điểm là kỵ nước. Chúng có thể được vận chuyển ở trong khoang rỗng, được bao bọc và chuyển đổi thành các dạng cấu trúc tương đồng để dễ dàng vận chuyển, trước khi chúng được giải phóng ở vị trí đích [Mousavi S.M, 2018]. Năm 2013, Chia-Che Ho cùng cộng sự đã tổng hợp các hạt NMPs để vận chuyển thuốc điều trị ung thư camptothecin. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các hạt NMPs không gây độc trên dòng A549 và Hela cells. Khi sử dụng NMPs làm chất mang thuốc điều trị ung thư như camptothecin, độc tính của nó trên các dòng A459 và Hela giảm đáng kể. Nghiên cứu đã chứng minh NMPs là chất vận chuyển thuốc tiềm năng trong việc điều trị ung thư [Ho C.C, 2013].

Về mặt cấu trúc hóa học, các hạt NMPs có nhiều liên kết  $\pi$  trên bề mặt. Vì vậy, các hạt nano melanin dễ dàng liên kết với các loại thuốc khác nhau có cấu trúc vòng thơm nhờ liên kết  $\pi$ - $\pi$ , liên kết hydro và lực tương tác Van der Waals. Thuốc cũng có thể được liên kết với NMPs thông qua tương tác hóa học hoặc bọc bên trong phức hợp polymer của chúng. Do vậy, NMPs được xem như một ứng cử viên tiềm năng để phát triển hệ thống phân phối thuốc với các thành phần đa dạng đã được thử nghiệm như doxorubicin (DOX), sorafenib, camptothecin, paclitaxel, cisplatin, chất cảm quang (chlorin e6), thuốc kháng sinh (rifampicin, tetracycline hydrochloride, ciprofloxacin), tác nhân tạo mạch (dimethylxalylglycine) và thuốc kháng viêm (aspirin) [Liu H, 2020].

NMPs cũng được nghiên cứu để sử dụng làm chất vận chuyển và đóng gói insulin, định hướng ứng dụng cho việc đưa insulin bằng đường uống cho các bệnh

nhân tiểu đường thay thế cho việc tiêm insulin vào tĩnh mạch để tăng sự thuận tiện và độ an toàn cho bệnh nhân khi sử dụng thuốc [Li H, 2017].

Trong nghiên cứu của Wen-Qing Li, và cộng sự năm 2017, NMPs được gắn thêm doxorubicin để tăng cường chức năng phân bố của thuốc tới nhân tế bào và ty thể [Li W.Q, 2017]. Doxorubicin là thuốc điều trị ung thư được sử dụng nhiều trong lâm sàng. Tuy nhiên tình trạng kháng thuốc là một thực tế khó khăn khiến hiệu quả điều trị của các bệnh nhân ung thư bị giảm theo thời gian. Trong nghiên cứu này, NMPs được cải biến chức năng mang thuốc tới ty thể, và nó được chứng minh là có tiềm năng làm giảm sự kháng thuốc so với việc sử dụng thuốc đơn lẻ. Nghiên cứu này hướng tới mục tiêu khắc phục tình trạng kháng thuốc trong điều trị ung thư [Wang D, 2017].

Camptothecin cũng là một thành phần khác được gắn vào phức hệ NMPs để thử nghiệm tiềm năng phát triển thuốc điều trị ung thư trên các dòng tế bào A549 và Hela. Ngoài ra trong thử nghiệm của Priyam A và cộng sự, polydopamin được gắn với nhóm polyethylenimine làm giảm thiểu nhược điểm có độc tính cao của polyethylenimine và được định hướng để trở thành một chất mang polymer phân phối thuốc hiệu quả [Priyam A, 2018].

Một nghiên cứu của Wang J.F và các cộng sự được thực hiện năm 2008 đã đưa ra bằng chứng melanin có khả năng tương tác với một số loại thuốc uống và được sử dụng như là nhân tố vận chuyển thuốc nhờ sự liên kết dễ dàng giữa một số nhóm chức trên bề mặt của melanin và kim loại nặng. Trong nghiên cứu này, Lei và các cộng sự là đã sử dụng melanin làm chất vận chuyển bổ sung sắt trên mô hình chuột bị bệnh thiếu máu do thiếu sắt. Hiệu quả của nghiên cứu đã được đánh giá thông qua việc điều trị nhóm chuột này bởi phức hệ melanin liên kết với sắt. Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở nhóm chuột bị bệnh thiếu máu đã phục hồi các chỉ số sinh hóa bình thường của cơ thể sau điều trị [Wang J.F, 2008].

**Tóm lại,** melanin với cấu trúc và nguồn gốc đa dạng cùng nhiều tính chất đặc biệt, đã và đang là đối tượng được nghiên cứu và ứng dụng ở nhiều lĩnh vực. Trong thời gian gần đây, có một số nghiên cứu cơ bản và nghiên cứu định hướng ứng dụng

đã chế tạo melanin về kích thước nano để tăng cường hoạt tính sinh học và mở ra các ứng dụng ở mảng y sinh với tiềm năng đặc biệt trong việc làm hệ thống vận chuyển thuốc biệt dược, kháng ung thư và bảo vệ tế bào lành sau xạ trị. Tuy nhiên, các nghiên cứu này chưa nhiều và đặc biệt chưa có nghiên cứu đánh giá về tác dụng bảo vệ các tế bào lành sau xạ trị ở vùng lân cận và xa vị trí khối ung thư của nano-melanin.

## **Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU**

#### **2.1.1. Tế bào**

Tế bào ung thư phổi Murine Lewis 3LL (ATCC CRL-1642). Nguyên bào sợi da chuột (NIH 3T3), dòng tế bào có nguồn gốc từ da người keratynocyte (HaCaT) từ Bộ môn Sinh học tế bào, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội và tế bào nội mô (hUVEC) được nhận từ Viện nghiên cứu Tế bào gốc và Công nghệ Gen Vinmec, Tập đoàn Vingroup.

#### **2.2.2. Động vật nghiên cứu**

Chuột thí nghiệm (Swiss trắng, 5 tuần tuổi), được cung cấp bởi Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương (NIHE; Hà Nội, Việt Nam). Chuột được nuôi trong lồng đặt trong hệ thống nuôi động vật (Viện nghiên cứu y dược học quân sự, Học viện Quân Y) ở nhiệt độ  $24 \pm 3$  °C, độ ẩm 55% và được cho ăn hai lần mỗi ngày và kiểm tra cân nặng 3-5 ngày/lần.

### **2.2. NGUYÊN LIỆU, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ**

#### **2.2.1. Hóa chất**

##### **Hóa chất**

Melanin (Số CAS: 8049-97-6; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) sử dụng cho nghiên cứu *in vivo*, melanin tách từ túi mực (*oligo chinensis Gray*) theo phương pháp được nghiên cứu trước đó [Cuong A.M, 2018] và sử dụng cho nghiên cứu *in vitro*, NaOH, NaCl, HCL, *n*-hexan, methanol, ethanol, diethyl ether, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>OH (Trung Quốc), DMSO (Gibco, USA), phosphate buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA), môi trường DMEM 4,5 g/L glucose (Pan, Đức), môi trường DMEM 1,0 g/L glucose, trypsin (Pan, Đức), RPMI (Pan, Đức), EBM-2 (Endothelial Basal Medium, Lonza, Switzerland), thuốc nhuộm trypan blue, penicillin/streptomycin (Gibco, USA), đệm ly giải erythrocyte (BD Biosciences, USA), trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich, USA), sunforhodamine B (Sigma-

Aldrich, USA), DAPI staining solution (Abcam, Cambridge, UK), paclitaxel (Trung Quốc), hematoxylin và Eosin (Leica, Đức).

Các kháng thể: anti-CD19-PE cho tế bào B, anti-CD11c-FITC cho tế bào tua, và anti-CD3-PE cho tế bào T (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

Kít apoptosis (Invitrogen), kit tách RNA (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Kít tổng hợp cDNA (Thermo Scientific, Singapore), kít Realtime PCR (Sensifast, India).

Kít đánh giá sự lão hóa tế bào (senescence cells histochemical staining kit) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

Kít đánh giá khả năng tạo mạch (angiogenesis assay kit) (Abcam, USA).

### **2.2.2. Thiết bị nghiên cứu**

- Hệ thống phòng nuôi cấy tế bào động vật (Khoa sinh học, Đại học Khoa học tự nhiên, đại học Quốc Gia Hà Nội).

- Hệ thống phòng nuôi động vật cho nghiên cứu (Viện nghiên cứu Y dược học, Học viện Quân Y).

- Hệ thống máy chiếu xạ precise digital accelerator 152377 (ELEKTA, Stockholm, Sweden) của Bệnh viện Quân y 103, Hà Đông, Hà Nội.

- Kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscope) NANOSEM 450 (SEM) (FEI, Hillsboro, OR, USA), máy đo phổ hồng ngoại FTIR (IRAffinity-1S, SHIMADZU, Kyoto, Nhật Bản). Thiết bị thuộc ĐHKHTN, ĐHQG Hà Nội.

- Hệ thống máy phân tích tế bào theo dòng chảy (Fact Canto II), thiết bị thuộc ĐHKHTN, ĐHQG Hà Nội và hệ thống máy phân tích tế bào theo dòng chảy (Fact lysic, BD Biosciences, USA), thiết bị thuộc Học viện Quân Y, Hà Đông, Hà Nội.

- Hệ thống máy Realtime PCR LightCycler® 96 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Đức), Hệ thống máy Realtime PCR 7500 (Applied Biosystems, USA), thiết bị thuộc ĐHKHTN, ĐHQG Hà Nội, Vinmec và Học viện Quân Y.

- Một số thiết bị khác: máy khuấy từ, máy siêu âm, máy đo pH (Hanna, Ý), máy ly tâm lạnh (Sigma, USA), hệ thống điện di ngang, điện di đứng (Thermo, USA), máy PCR (Thermo, USA), máy phân tích thành phần của máu (Synmex, Japan), máy đo quang phổ UV-vis (Thermo, USA), máy đo kích thước hạt và phân tán xạ nanosize (Malvern Instruments, UK), kính hiển vi điện tử phát huỳnh quang, kính hiển vi quang học (Olimpus, Trung Quốc), pipet man, pipet đa kênh (Eppendoft, Đức), máy soi gel (Trung Quốc).

## 2.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP, KỸ THUẬT ĐƯỢC SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU

### 2.3.1. Nhóm phương pháp chế tạo hạt NMPs và xác định đặc tính của vật liệu

#### 2.3.1.1. Chế tạo hạt NMPs

+ Bột melanin (Số CAS: 8049-97-6; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) và melanin tách từ mực được sử dụng để chế tạo melanin kích thước nano. Bột melanin được khảo sát khả năng tan trong một số dung môi như H<sub>2</sub>O, methanol, ethanol, HCl 3M, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M, *n*-hexan, ethyl acetate, DMSO, NaOH, NH<sub>4</sub>OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Lựa chọn môi trường alkaline có khả năng hòa tan melanin nhiều nhất là NH<sub>4</sub>OH và NaOH ở các nồng độ 0,1 N, 0,2 N, 0,5 N, 1 N và 3 N để chế tạo hạt melanin kích thước nano trong các điều kiện nhiệt độ (0 °C, 37 °C, 60 °C, 100 °C), tốc độ khuấy từ (0 rpm, 100 rpm, 200 rpm, 400 rpm) và thời gian (0 phút, 10 phút, 15 phút, 30 phút, 60 phút, 180 phút, 300 phút, 360 phút).

Sau đó, pH của dung dịch NMPs được điều chỉnh đến giá trị pH trong khoảng 7 - 7,2 bởi dung dịch axit hydrochloride (HCl). Hàm lượng melanin được xác định theo phương pháp được công bố trước đây với một vài sửa đổi [Hu D.N, 2008]. Hàm lượng của NMPs được xác định bằng máy quang phổ ở bước sóng 475 nm.

#### 2.3.1.2. Phương pháp xác định đặc tính của vật liệu

+ Phương pháp sử dụng kính hiển vi điện tử NANOSEM 450 (SEM) (FEI, Hillsboro, OR, USA) để xác định hình thái và kích thước của vật liệu. Kính hiển vi

điện tử quét NANOSEM sử dụng chùm điện tử electron hội tụ để quét trên bề mặt vật liệu để tạo nên hình ảnh bề mặt cấu trúc vi mô của vật liệu.

+ Phương pháp đo phổ hồng ngoại FTIR

Phổ hồng ngoại FTIR được sử dụng để xác định các nhóm chức năng hóa học của phân tử của một hợp chất thông qua tần số giao động đặc trưng trên phổ đồ. Các nhóm chức năng hóa học của melanin và NMPs được xác định bằng phương pháp đo quang phổ hồng ngoại Fourier-Transform (FTIR) (IRAffinity-1S, Shimadzu, Kyoto, Japan).

+ Phương pháp tán xạ laser động đã được áp dụng để đo kích thước và độ phân tán của hạt nano bằng Zetasizer (phần mềm v7.11, Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

Các phương pháp trên được thực hiện tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Hà Nội.

### **2.3.2. Nhóm phương pháp nghiên cứu sử dụng trên mô hình *in vitro***

#### **2.3.2.1. Nuôi cấy tế bào.**

Dòng tế bào nguyên bào sợi của da chuột NIH 3T3, tế bào có nguồn gốc từ da người HaCaT được hoạt hóa trong môi trường DMEM có bổ sung glucose ở mức 4,5 g/L và 1 (g/L). Tế bào nội mô hUVEC được nuôi trong môi trường EBM-2. Tế bào ung thư phổi chuột 3LL (ATCC) được nuôi trong môi trường RPMI. Các dòng tế bào phát triển trong các môi trường có bổ sung thêm 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% penicillin/streptomycin, và ủ ở nhiệt độ 37 °C trong tủ ổn nhiệt có cung cấp 5% CO<sub>2</sub>.

#### **2.3.2.2. Phương pháp đánh giá độc tính của thuốc trên tế bào**

Độc tính tế bào của NMPs trên tế bào được xác định bằng phương pháp SRB (Sigma-Aldrich) và đã được mô tả trước đây [Orellana E.A, 2016]. Tế bào HaCaT được gieo trên đĩa 96 giếng ở mật độ  $4 \times 10^3$  tế bào mỗi giếng (tế bào NIH 3T3 và hUVEC được gieo ở mật độ  $3 \times 10^3$  tế bào/giếng) và được ủ ở 37 °C trong 24 giờ với 5% CO<sub>2</sub>. Sau đó, các giếng tế bào được xử lý bằng NMPs ở các nồng độ khác

nhau 3, 6, 12, 25, 50, và 100 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) và được ủ liên tục trong 48 giờ. Paclitaxel được sử dụng làm đối chứng dương. Sau đó, TCA 10% được sử dụng để cố định tế bào trong 1 h trên đĩa giếng trước khi nhuộm với dung dịch SRB 0,04% trong 15 phút. Axit axetic (1%) được sử dụng để rửa các phần hóa chất, dung môi còn dư ở các đĩa tế bào. Cuối cùng, các tinh thể SRB được hòa tan trong 10% Tris-HCL và độ hấp thụ ở bước sóng 510 nm được tính toán bằng máy đo ELISA (BioTech Power Wave XS, Winooski, VT, USA).

#### 2.3.2.3. Phương pháp chiếu xạ trên tế bào

Phương pháp chiếu xạ trên tế bào được thực hiện theo phương pháp đã được mô tả trong nghiên cứu trước đây [Nikzad S, 2013].

Tế bào sau khi nuôi cấy được đếm và cấy chuyển sang các đĩa 96 giếng với mật độ 1000 tế bào/giếng hoặc đĩa 6 giếng với mật độ 30.000 tế bào/giếng. Một ngày sau khi cấy chuyển, tế bào sẽ được chia làm 04 nhóm thí nghiệm, bao gồm nhóm (I) đối chứng sinh học, không chiếu xạ (NIL); nhóm (II) - có bổ sung hạt nano (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) và không chiếu xạ (Mel); nhóm III - có bổ sung hạt nano cùng nồng độ và được chiếu xạ (IR+Mel); nhóm IV- không được bổ sung NMPs, chỉ chiếu xạ (IR). Sau khi tế bào đơn lớp đạt đến mật độ khoảng 60 – 70% sẽ được chiếu xạ tia X. Toàn bộ các giếng nuôi cấy sẽ được tiếp xúc tia xạ trong cùng điều kiện và cùng thời gian. Tia xạ được cung cấp dưới dạng liều đơn trong khoảng 0 - 10 Gy, tốc độ chiếu xạ là 0,6 Gy/min. Toàn bộ tia xạ được chiếu với khoảng cách 20 cm tới đĩa tế bào nuôi cấy. Sau đó, tế bào được thu và kiểm tra tỷ lệ tế bào sống và chết so với đối chứng ở thời điểm 2 ngày sau chiếu xạ.

#### 2.3.2.4. Phương pháp đánh giá tế bào sống sót sau chiếu xạ

Xác định tỷ lệ tế bào sống bằng phương pháp nhuộm tím tinh thể được mô tả theo nghiên cứu trước đây [Feoktistova M., 2016]. Tế bào được gieo trong đĩa 6 giếng và nuôi trong 24h. Tế bào được bổ sung NMPs hoặc không được bổ sung bởi NMPs và được nuôi cấy thêm 24h. Các tế bào sống có khả năng bám dính được cố định bằng formalin 10% và nhuộm bằng tím tinh thể nồng độ 0,1%. Hòa tan dung



dịch nhuộm với SDS 0,1% và đo độ hấp thụ ở bước sóng 595 nm bằng máy đo Elisa (BioTech Power Wave XS, Winooski, VT, USA).

#### *2.3.2.5. Phương pháp đánh giá sự tác động của NMPs lên quá trình di chuyển của tế bào (wound healing)*

Phương pháp đánh giá quá trình di chuyển của tế bào nội mô được thực hiện theo công bố trước đó [Martinotti S, 2019]. Tế bào nội mô được hoạt hóa trong môi trường EBM-2 (Endothelial Basal Medium) trên đĩa 24 giếng ở mật độ 8000 tế bào/cm<sup>2</sup>. Khi tế bào tăng sinh che phủ đĩa nuôi cấy ở mật độ >80%, tế bào được ức chế quá trình tăng sinh bởi bổ sung chất ức chế mitomixin (10 µg/mL). Ở thời điểm 0 h, các giếng được tạo vết thương bằng bộ dụng cụ tạo vết thương (SPL, Hàn Quốc). Sau đó, các giếng được bổ sung NMPs ở các nồng độ 0 (negative control), 25 và 50 (µg/mL). Sự di chuyển của tế bào ở các giếng được theo dõi và chụp ảnh bởi kính hiển vi quang học. Kết quả hình ảnh được phân tích bởi phần mềm Image J (phiên bản 1.46r).

#### *2.3.2.6. Phương pháp đánh giá sự tác động của NMPs lên khả năng lão hóa tế bào (senescence cells)*

Tỉ lệ tế bào lão hóa trong quần thể tế bào hUVECs ở được đánh giá theo chỉ dẫn của hãng sản xuất kit đánh giá tỷ lệ lão hóa tế bào Senescence Cells Histochemical Staining Kit (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Các bước tiến hành được thực hiện theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các tế bào được gieo lên đĩa 6 giếng với mật độ 20.000 tế bào/cm<sup>2</sup> và được ủ với hạt NMPs ở các nồng độ 50 µg/mL và 25 µg/mL trong điều kiện nhiệt độ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong 48 h. Sau đó, môi trường nuôi cấy được loại bỏ, tế bào được rửa 1 lần với PBS 1X trước khi cố định tế bào với 1X Fixation buffer trong 7 phút. Tế bào được rửa 2 lần với PBS 1X và ủ với Staining Mixture qua đêm trong điều kiện nhiệt độ 37°C có cung cấp 5% CO<sub>2</sub>. Tế bào được nhuộm với DAPI Staining solution (Abcam, Cambridge, UK) trong 15 phút sau khi loại bỏ dung dịch Staining Mixture và rửa 1 lần với PBS 1X. Tế bào được rửa 1 lần

với PBS và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang soi ngược (Olympus, Tokyo, Japan). Hình ảnh được phân tích với phần mềm Image J (bản 1.46r).

#### *2.3.2.7. Phương pháp đánh giá sự tác động của NMPs lên quá trình hình thành mạch máu*

Phương pháp đánh giá quá trình hình thành mạch được thực hiện theo công bố trước đó [Arnaoutova I, 2010]. Tế bào nội mô được nuôi cấy trong môi trường EBM-2, khi tế bào đạt 80% độ che phủ thì thu tế bào. Gieo tế bào lên đĩa 96 giếng ở mật độ  $1,5 \times 10^4$  tế bào/giếng, và các giếng đã được phủ bởi dung dịch Extracellular Matrix Solution. Bổ sung NMPs nồng độ 50  $\mu\text{g/mL}$  và 25  $\mu\text{g/mL}$  ở các giếng thử nghiệm. Ở giếng đối chứng âm, bổ sung suramin (50  $\mu\text{g/mL}$ ) có vai trò ức chế khả năng tạo mạch. Ủ tế bào ở điều kiện 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Theo dõi sự hình thành mạch ở các giếng bằng kính hiển vi điện tử. Nhuộm huỳnh quang và kiểm tra sự tạo mạch bằng kính hiển vi phát huỳnh quang ở kính lọc có biên độ bước sóng 490/540 nm. Xử lý kết quả thu được bằng phần mềm Image J (bản 1.46r).

#### *2.3.2.8. Phương pháp xác định tỷ lệ tế bào chết theo chương trình trên hệ thống phân tích tế bào theo dòng chảy*

Phương pháp xác định tỷ lệ tế bào chết theo chương trình được thực hiện theo phương pháp đã được mô tả trong nghiên cứu trước đây [Schutte B, 1998].

Tế bào HaCat được gieo vào đĩa 6 giếng với mật độ  $3 \times 10^4$ /giếng. Trước khi được chiếu xạ tia X ở các liều chiếu khác nhau (0 Gy, 3 Gy, 5 Gy). Các giếng được bổ sung NMPs với nồng độ 10  $\mu\text{g/mL}$  hoặc không được bổ sung thuốc. Sau đó, tế bào được thu và đánh giá tỷ lệ apoptosis bởi Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit (Invitrogen).  $10^6$  tế bào được ủ trong tối với 5  $\mu\text{L}$  V-FITC và 10  $\mu\text{L}$  PI trong 15 phút theo chỉ dẫn của hãng sản xuất. Tỷ lệ tế bào apoptosis được xác định bằng máy FACT Canto II. Dữ liệu được phân tích bởi phần mềm Flowjo.

2.3.2.9. Phương pháp định lượng mức độ biểu hiện của các gen liên quan đến con đường apoptosis và chống oxy hóa của tế bào và đánh giá mức độ biểu hiện gen VEGF-A liên quan đến khả năng ức chế tạo mạch

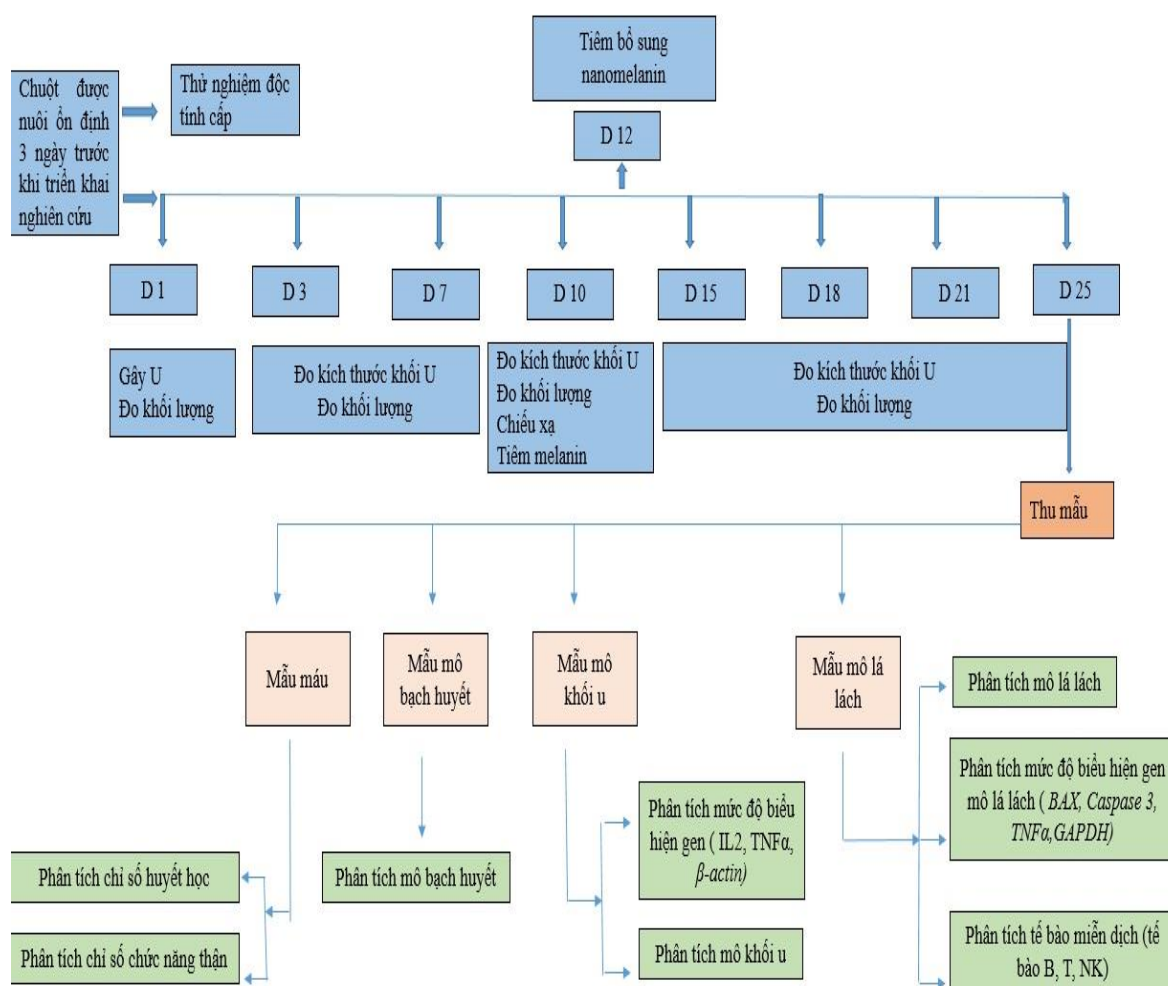
Tế bào sau khi chiếu xạ được thu mẫu và sử dụng kit tách RNA tổng số theo chỉ dẫn của hãng sản xuất (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Sau đó cDNA được tổng hợp từ RNA tổng số nhờ phản ứng phiên mã ngược theo phương pháp được cung cấp bởi kit tổng hợp cDNA của hãng Thermo Scientific, Singapore. Tiếp theo, số lượng bản sao của các gen liên quan đến các con đường apoptosis hay kháng oxy hóa của tế bào (*TNF- $\alpha$ /BAX/Caspase-3/SOD1/VEGF-A*) được định lượng tương đối bởi kỹ thuật Real-time PCR với gen nội chứng là  *$\beta$ -actin* và tính toán theo phương pháp Livak [Livak K.J]. Các trình tự cặp mồi của các gen ở bảng 2.1.

Bảng 2.1: Trình tự của các cặp mồi của các gen của người được sử dụng

Tên các cặp mồi	Trình tự (5' - 3')	Nguồn gốc
<i>Human-<math>\beta</math>-Actin (F)</i>	GAGTACAGAGCCTCGCCTAT	thiết kế
<i>Human-<math>\beta</math>-Actin (R)</i>	TTAAGCCGGCCTTGCACATG	thiết kế
<i>Human-BAX-F</i>	TTTGCTTCAGGGTTTCATCCA	[Di Meo F, 2019]
<i>Human-BAX-R</i>	CTCCATGTTACTGTCCAGTTCGT	[Di Meo F, 2019]
<i>Human-Caspase-3-F</i>	AGGCCGACTTCTTGTATGCA	[Valle-Casuso J.C, 2019]
<i>Human-Caspase-3-R</i>	TTCTGTTGCCACCTTTCGGT	Tự thiết kế
<i>Human-TNF-<math>\alpha</math>-F</i>	GCTGCACTTTGGAGTGATCG	[Wang J. W, 2020]
<i>Human-TNF-<math>\alpha</math>-R</i>	CCACCAGCTGGTTATCTCTC	Tự thiết kế
<i>Human-SOD1-F</i>	ACAAAG ATG GTGTGGCCGAT	[Toshikawa H, 2021]
<i>Human-SOD1-R</i>	AACGACTTCCAGCGTTTCCT	[Toshikawa H, 2021]
<i>Human-VEGF-A- F</i>	AGGAGGAGGGCAGAATCATCAC	[Schlegel C, 2012]
<i>Human- VEGF-A-R</i>	ATGTCCACCAGGGTCTCGATTG	[Schlegel C, 2012]

2.3.3. Nhóm phương pháp nghiên cứu sử dụng trên mô hình *in vivo*

Sơ đồ chung của thử nghiệm trên mô hình *in vivo* được mô tả dưới đây.



Hình 2.1. Sơ đồ thử nghiệm trên mô hình *in vivo*

D1, 3, 7, 10, 12, 15, 18, 21, 25 – ngày thử nghiệm thứ 1, 3, 7, 10, 12, 15, 18, 21, 25

### 2.3.3.1. Phương pháp đánh giá độc tính cấp của NMPs trên chuột nghiên cứu.

Độc tính cấp của NMPs trên chuột thí nghiệm được thực hiện theo hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu (ban hành kèm theo Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015), Bộ Y tế.

Chuột khỏe mạnh được cung cấp bởi viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương và được nuôi ổn định 03 ngày trong hệ thống phòng nuôi động vật (Viện nghiên cứu Y dược học Quân sự) trước khi triển khai các thí nghiệm. Dung dịch NMPs ở các mức liều khác nhau được tiêm theo đường phúc mạc để thử nghiệm độc tính cấp trên các nhóm chuột nghiên cứu. Mỗi nhóm chuột 3 con, được tiêm 02 liều NMPs cách nhau 2 ngày với dải nồng độ 5, 10, 20, 40, 60 và 80 mg/kg. Chuột được theo dõi tình trạng

sức khỏe toàn thân, khả năng vận động, chế độ ăn trong 1 tuần sau điều trị.

#### *2.3.3.2. Phương pháp tạo khối u rắn trên chuột thí nghiệm*

Tế bào ung thư phổi Murine lewis (3LL) được sử dụng ở nồng độ  $5 \times 10^5$  tế bào/200  $\mu$ L trong đệm photphat (PBS), và được tiêm dưới da lưng của chuột để tạo khối u. Khi các khối u đã hình thành, được quan sát và đo kích thước 3 ngày 1 lần. Kích thước khối u được xác định bởi công thức  $V=D \cdot R^2$  trong đó (D – chiều dài khối u rắn, R- chiều rộng khối u rắn). Mười ngày sau khi tiêm các tế bào ung thư dưới da, các khối u được hình thành đạt kích thước thích hợp khoảng 500 mm<sup>3</sup> (10  $\times$  10  $\times$  5 mm<sup>3</sup>). Tiếp theo, chuột được điều trị bằng NMPs và chiếu xạ bằng tia X.

#### *2.3.3.3. Phương pháp xạ trị toàn thân điều trị chuột mang khối u*

Phương pháp xạ trị toàn thân chuột thí nghiệm được thực hiện theo công bố trước đây với một vài sửa đổi nhỏ [Khayyal M.T, 2014]. Chuột được phân bổ thành bốn nhóm (n = 5, mỗi nhóm) như sau: nhóm 1 (NIL), là nhóm đối chứng sinh học, không gây khối u và không điều trị bằng NMPs hoặc bức xạ tia X; nhóm 2 (NC), nhóm chuột mang khối u không được điều trị bằng NMPs và bức xạ tia X; nhóm 3 (IR), Nhóm chuột mang khối u chỉ được điều trị bằng tia X; nhóm 4 (IR+Mel), nhóm chuột mang khối u được điều trị kết hợp giữa NMPs và tia X. Các nhóm chuột mang khối u được điều trị với một liều duy nhất 6,0 Gy với tốc độ phát xạ (HDR) 1,0 Gy/phút sử dụng máy phát xạ gia tốc 152377 (ELEKTA, Stockholm, Thụy Điển) tại Bệnh viện Quân y 103. Chuột được tiêm theo đường phúc mạc với nồng độ NMPs (40 mg/kg) 4 giờ trước khi chiếu tia X và 48 giờ sau chiếu xạ được tiêm bổ sung 01 liều NMPs. Chuột được thu mẫu sau 15 ngày chiếu xạ.

#### *2.3.3.4. Phân tích mức độ biểu hiện gen trong mô khối u và mô lách bằng realtime pcr*

RNA tổng số được tách từ các mô cơ quan của chuột bằng cách sử dụng kit tách RNA GeneJET RNA Purification (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó, cDNA được tổng hợp từ RNA tổng số bằng phản ứng sao chép ngược, theo quy trình được cung cấp với kit tổng hợp cDNA RevertAid First Strand (Thermo Scientific, Singapore). Phản ứng chuỗi polymerase

phiên mã ngược định lượng theo thời gian thực (RT-PCR) được thực hiện trên máy Realtime PCR LightCycler® 96 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Đức). Mức độ biểu hiện của bản sao *TNF- $\alpha$* , *IL-2*, *Bax* và *Caspase-3* của các mô được xác định thông qua mối tương quan với mức độ biểu hiện bản sao của các gen nội chứng  $\beta$ -actin (đối với các mẫu khối u) hoặc Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) (đối với mẫu lá lách) và tính toán theo phương pháp Livak [Livak K.J]. Các phản ứng realtime PCR được thực hiện bằng cách sử dụng hỗn hợp tổng thể tích 20  $\mu$ L chứa 10  $\mu$ L mastermix (bao gồm SYBR1 Green và các enzymes, dNTP cần thiết cho phản ứng tổng hợp chuỗi), 2  $\mu$ L các cặp mồi, 1  $\mu$ L cDNA và nước. Trình tự của các cặp mồi của các gen khảo sát được trình bày trong bảng 2.2.

Bảng 2.2 Trình tự của các cặp mồi của các gen của chuột nghiên cứu

Tên các cặp mồi	Trình tự (5' - 3')	Nguồn gốc
<i>mouse TNF-<math>\alpha</math> (F)</i>	ATGAGCACAGAAAGCATGA	[Liu T, 2016]
<i>mouse TNF-<math>\alpha</math> (R)</i>	AGTAGACAGAAGAGCGTGGT	[Liu T, 2016]
<i>mouse IL-2 (F)</i>	TTGTGCTCCTTGCAACAGC	[Gemechu Y, 2018]
<i>mouse IL-2 (R)</i>	CTGGGGAGTTTCAGGTTCCCT	[Gemechu Y, 2018]
<i>mouse Caspase-3 (F)</i>	CCTCAGAGAGACATTCATGG	[Mukhopadhyay R, 2018]
<i>mouse Caspase-3 (R)</i>	GCAGTAGTCGCCTCTGAAGA	[Mukhopadhyay R, 2018]
<i>mouse Bax (F)</i>	AGCAAACCTGGTGCTCAAGGC	[Mukhopadhyay R, 2018]
<i>mouse Bax (R)</i>	CCACAAAGATGGTCACTGTC	[Mukhopadhyay R, 2018]
<i>mouse GAPDH (F)</i>	CCCATCACCATCTTCCAGGAGC	[Guha P, 2018]
<i>mouse GAPDH (R)</i>	CCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC	[Guha P, 2018]

Tên các cặp mồi	Trình tự (5' - 3')	Nguồn gốc
<i>mouse <math>\beta</math>-actin (F)</i>	CGGTTCCGATGCCCTGAGGCTC TT	[Itou D, 2015]
<i>mouse <math>\beta</math>-actin (R)</i>	CGTCACACTTCATGATGGAATT GA	[Itou D, 2015]

#### 2.3.3.5. Phân tích tế bào lách của chuột bằng kỹ thuật phân tích tế bào theo dòng chảy (flow cytometry)

Các lá lách được thu thập ngay lập tức sau khi giết chuột và rửa bằng PBS 1X ba lần. Các mẫu lách (50 mg) được cho vào 2 mL PBS và dùng thìa thủy tinh nghiền nhẹ để tạo ra dung dịch đồng nhất, sau đó mẫu được lọc qua màng có kích thước lỗ 70  $\mu$ m. Dịch lọc sau đó được ly tâm ở 1500 vòng/phút trong 5 phút ở 4 °C. Tủa được thu lại và hòa lẫn trong 1,5 mL đệm ly giải Erythrocyte (ELB) (BD Biosciences, USA) và giữ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Hỗn dịch được ly tâm một lần nữa trong cùng điều kiện, và tế bào thu được được rửa bằng PBS ba lần. Sau đó, tế bào lách chuột được hòa lẫn trong 3 mL đệm FACS và giữ ở 4 °C. Sau đó, 10<sup>6</sup> tế bào trong dung dịch này được thêm vào 100  $\mu$ L kháng thể pha loãng trong dung dịch đệm FACS và ủ trong 1 giờ (anti-CD19-PE) cho tế bào B, anti-CD11c-FITC cho tế bào tua, và anti-CD3-PE cho tế bào T (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Tiếp theo, hỗn hợp được rửa nhẹ bằng đệm FACS ba lần trước khi đo trên máy đo tế bào theo dòng chảy FACS Lysis (BD). Dữ liệu phân tích bằng phần mềm flowjo.

#### 2.3.2.6. Phương pháp phân tích mô học

Phương pháp được thực hiện theo hướng dẫn cách nhuộm mẫu mô bằng hematoxylin and eosin của nhà sản xuất (Leica, Đức). Các mô lách, mô hạch và khối u được thu thập và giữ trong formalin (10%). Sau đó, phần mô ở vị trí trung tâm của mẫu được sử dụng để tiến hành phân tích. Các mô được loại bỏ canxi bằng cách sử dụng axit formic (5%) và cố định trong parafin. Tiếp theo, các mô nhúng parafin được cắt lát dày 4  $\mu$ m bằng máy cắt Leica microtome và cố định trên các

lam kính. Tiêu bản sau đó khử nước bằng cồn trước khi nhuộm bằng hematoxylin và eosin trong thời gian 6-15 phút. Ngâm lát cắt trong nước chứa amonia đến khi tiêu bản có màu xanh nhẹ. Rửa bằng nước trong vòng 10 phút, sau đó rửa qua cồn 70<sup>o</sup> trong 30 giây. Tiêu bản tiếp tục được nhuộm trong dung dịch eosin 1% trong 1-2 phút và loại nước bằng cồn 95<sup>o</sup> và xylene. Hình ảnh mô học được chụp và quan sát bằng kính hiển vi quang học.

#### 2.3.2.7. *Phân tích thành phần tế bào máu tổng số và thành phần sinh hóa của máu*

Được thực hiện bằng máy đo chỉ số máu tổng số và thành phần sinh hóa của máu của chuột (Sysmex, Japan) tại Trung tâm nghiên cứu động vật, Học viện Quân y.

### 2.4. PHÂN TÍCH THỐNG KÊ VÀ GIẤY PHÉP THỰC HIỆN NGHIÊN CỨU TRÊN ĐỘNG VẬT

Số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm Excel, Grap Path, các kết quả nghiên cứu được lặp lại 03 lần. Sự khác biệt giữa các nhóm nghiên cứu được xem xét có ý nghĩa thống kê khi giá trị  $p < 0,05$  được xác định bằng Student T-test và Anova. Tất cả các quy trình liên quan đến động vật được tiến hành theo Nguyên tắc Chăm sóc Động vật trong Phòng thí nghiệm (NIH). Các thí nghiệm trên động vật trong nghiên cứu này đã được hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh của Học viện Quân y phê duyệt cho Dự án có mã số 108.02-2017.07 do Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) tài trợ. Mã số phê duyệt: IACUC-025/18.

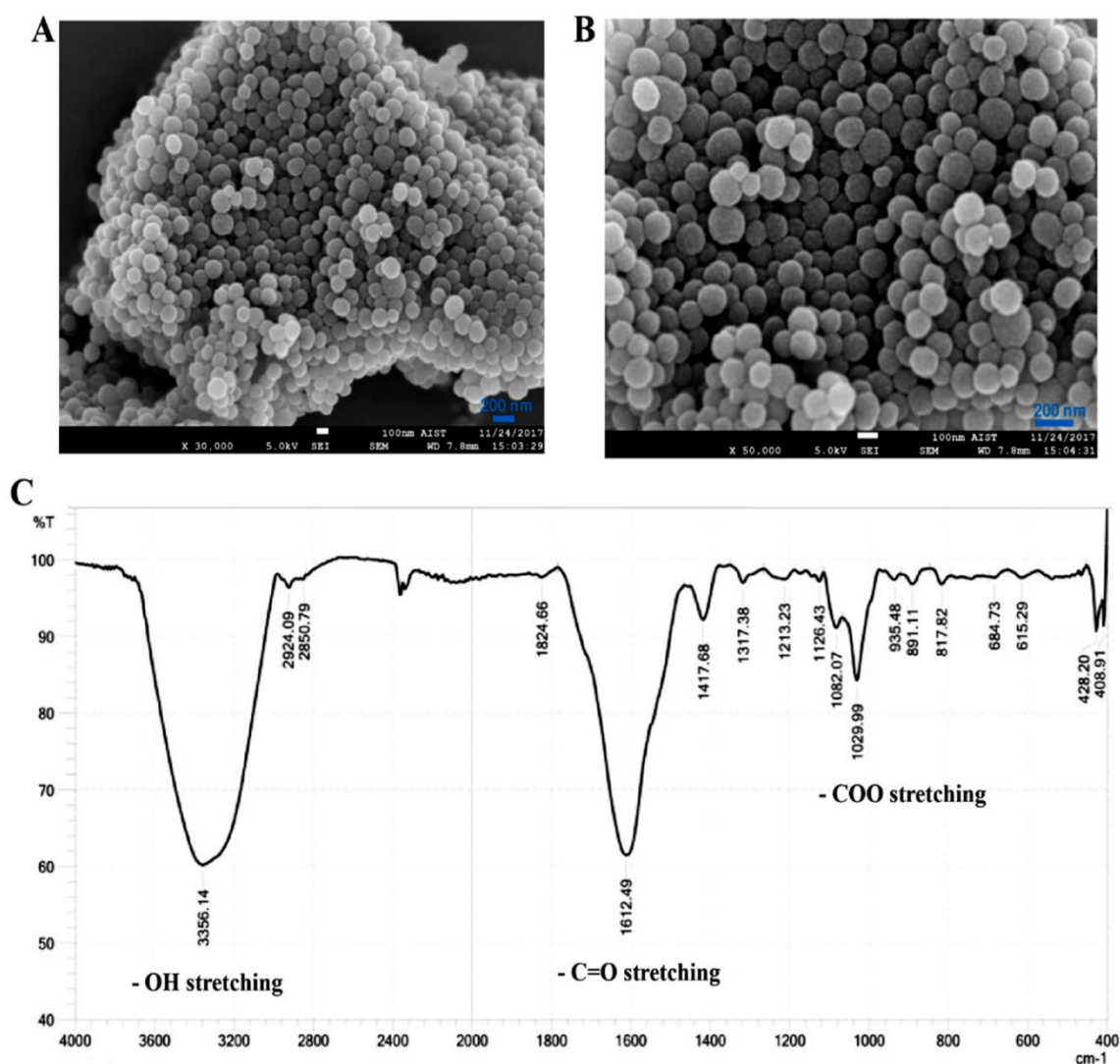


## Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. TẠO HẠT NMPS

#### 3.1.1. Đánh giá cấu trúc bề mặt và thành phần các nhóm chức hóa học của melanin

Melanin là nhóm sắc tố có cấu trúc phân tử dưới dạng polymer sinh học. Cấu trúc bề mặt của melanin được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét NanoSEM 450.



Hình 3.1. Bột melanin dưới độ phóng đại 30.000 lần (A) và 50.000 lần (B) dưới kính hiển vi điện tử SEM và các nhóm chức hóa học trên bề mặt của melanin được xác định bởi phép đo hồng ngoại xa FTIR (C).

Hình ảnh phóng đại 30.000 lần cho thấy, bề mặt của melanin được tạo thành từ tiểu cấu trúc nhỏ hình tròn, kích thước nano và gần như đồng nhất (hình 3.1A). Các tiểu cấu trúc hình cầu này tạo nên bề mặt melanin xù xì với các khoảng không gian được tạo thành bởi các tiểu cấu trúc nano trên bề mặt nằm xen kẽ nhau. Các cấu trúc rỗng bên trong bề mặt vật liệu là một trong các đặc tính quan trọng giúp chúng có thể thực hiện một số chức năng đặc biệt ví dụ như chứa đựng các hợp chất khác kích thước nano trong không gian rỗng của mình. Các tiểu cấu trúc nano này của melanin được quan sát rõ hơn ở độ phóng đại 50.000 lần (hình 3.1B).

Các nhóm chức năng hóa học của melanin được xác định bằng phương pháp đo phổ hồng ngoại xa FTIR. Với phương pháp này, phổ của các nhóm chức được xác định trong vùng dao động  $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ . Hình 3.1C, phổ FTIR của melanin xuất hiện các tần số dao động với đỉnh phổ rõ nét ở  $3356 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1612 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1029 \text{ cm}^{-1}$ , tương ứng với sự dao động của các liên kết  $-\text{OH}$ ,  $-\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{COO}$ . Từ đó có thể xác định được các nhóm chức năng hóa học như hydroxyl, cacbonyl, cacboxyl ( $-\text{OH}$ ,  $-\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{COO}$ ) ở bề mặt của melanin.

Melanin là vật liệu hoàn toàn không tan trong nước và có cấu trúc khá bền vững. Trước khi thực hiện các nghiên cứu tiếp theo, một số dung môi khác nhau được sử dụng để khảo sát khả năng hòa tan của melanin nhằm tìm kiếm môi trường phù hợp cho việc tạo hạt NMPs.

### **3.1.2. Khảo sát khả năng hòa tan của melanin trong một số dung môi**

Melanin được khảo sát khả năng hòa tan trong một số loại dung môi như nước, methanol, *n*-hexan,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  đặc, HCL đặc, DMSO, NaOH,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Kết quả bước đầu được thể hiện ở bảng 3.1. Melanin bột được bổ sung vào các dung môi và được lắc ở tốc độ 200 rpm/phút. Khả năng hòa tan của melanin được kiểm tra bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 475 nm. Giá trị OD càng lớn thì hàm lượng melanin càng cao.

Kết quả nghiên cứu chỉ ra melanin rất ít tan hoặc hoàn toàn không tan trong nhiều dung môi hữu cơ thông thường như methanol, ethanol, *n*-hexan, ethyl acetate, DMSO và cả acid đặc (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, chỉ tan một phần nhỏ trong môi trường kiềm và H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Bảng 3.1 Khả năng tan của melanin trong một số dung môi.

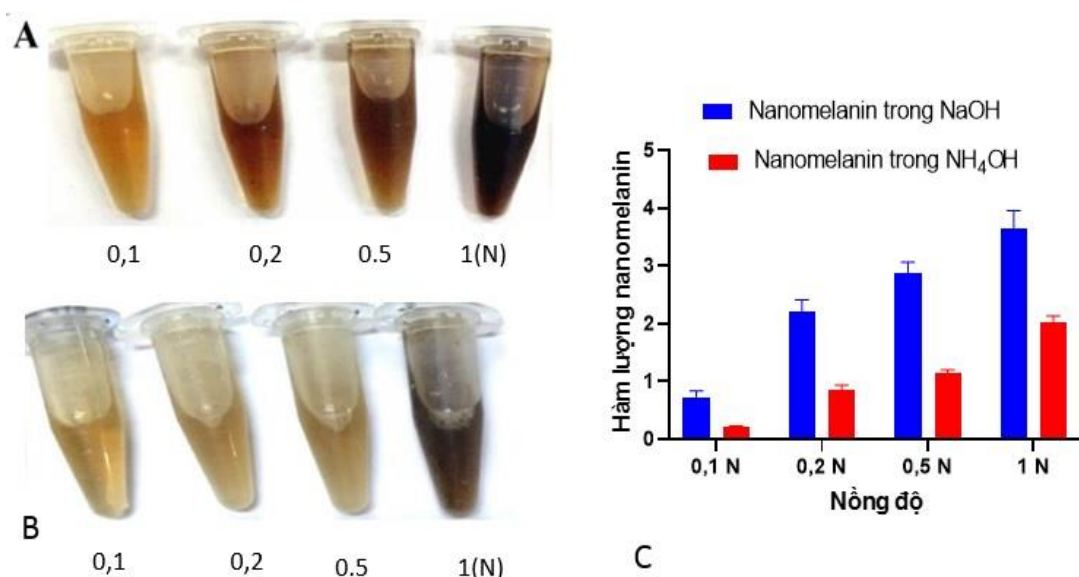
STT	Tên môi trường	Khả năng hòa tan
1	H <sub>2</sub> O	-
2	Methanol 99,9%	-
3	Ethanol 99,9%	-
4	HCl 3M	-
5	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3M	-
6	<i>n</i> -hexan	-
7	Ethyl acetate	-
8	DMSO 50%	-
9	NaOH 1N	++++
10	NH <sub>4</sub> OH 1N	++
11	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10%	+

(+): có khả năng hòa tan; (-): hoàn toàn không tan hoặc tan rất ít

Bảng 3.1 chỉ ra khả năng hòa tan của melanin trong NaOH và NH<sub>4</sub>OH là lớn nhất so với các dung môi được khảo sát. Nghiên cứu lựa chọn môi trường kiềm để tối ưu các điều kiện tạo hạt NMPs. Các yếu tố để khảo sát khả năng tạo hạt NMPs bao gồm: nhiệt độ, thời gian tạo hạt, tốc độ khuấy từ, nồng độ kiềm được sử dụng cho nghiên cứu.

### 3.1.3. Khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ alkaline (NaOH và NH<sub>4</sub>OH) lên hàm lượng hạt NMPs trong dung dịch

Nghiên cứu sử dụng NaOH và NH<sub>4</sub>OH ở dải các nồng độ khác nhau (0,1N - 1N) để tạo hạt NMPs. Hàm lượng NMPs trong các môi trường kiềm được thể hiện ở hình 3.2 A,B,C.



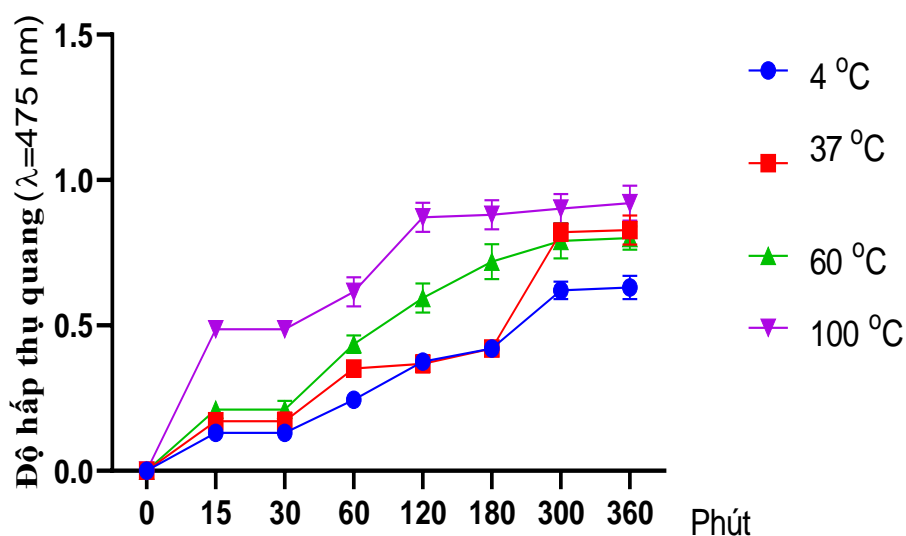
Hình 3.2. Sự ảnh hưởng của nồng độ kiềm tới khả năng tạo hàm lượng NMPs trong dung dịch. NMPs trong dung dịch NaOH ở các nồng độ 0,1; 0,2; 0,5; 1(N) (A). NMPs trong dung dịch NH<sub>4</sub>OH ở các nồng độ 0,1; 0,2; 0,5; 1(N) (B). Hàm lượng NMPs trong dung dịch NH<sub>4</sub>OH và NaOH (C).

Ở hình 3.2C, hàm lượng NMPs được tăng lên khi sử dụng nồng độ kiềm (NaOH, NH<sub>4</sub>OH) ở các nồng độ cao. Trong dung dịch NaOH, hàm lượng NMPs nhiều đang kể so với trong dung dịch NH<sub>4</sub>OH ở cùng một nồng độ. Hàm lượng NMPs ở trong dung dịch NaOH ở nồng độ 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 gấp 1,1; 2; 3; 5 lần tương ứng so với trong dung dịch NH<sub>4</sub>OH.

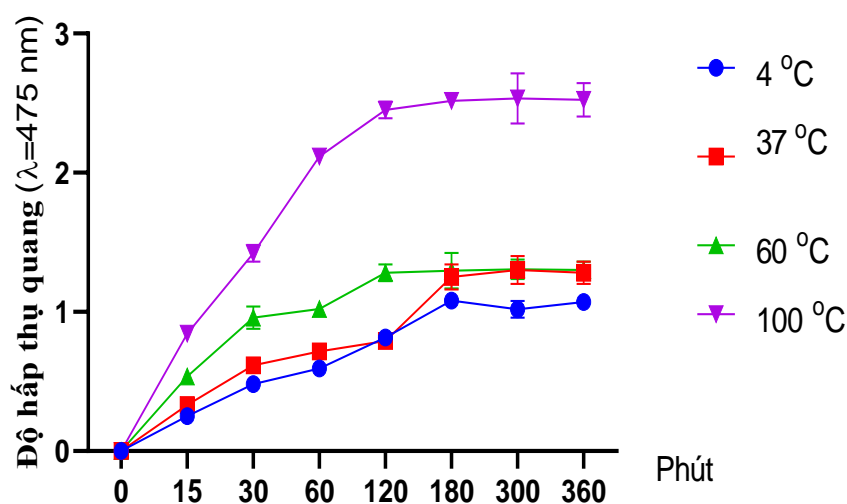
### 3.1.4. Khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến mức độ tạo thành hạt NMPs

Nhiệt độ là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tạo hạt của NMPs. Hình 3.3 chỉ ra sự phụ thuộc vào nhiệt độ đến khả năng tạo thành hạt NMPs khi sử dụng

dụng  $\text{NH}_4\text{OH}$  để phân cắt NMPs. Khảo sát khả năng tạo hạt NMPs ở nhiều mức nhiệt độ khác nhau bao gồm  $4^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ,  $60^\circ\text{C}$ ,  $100^\circ\text{C}$ .



Hình 3.3. Sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến mức độ tạo hạt NMPs trong môi trường  $\text{NH}_4\text{OH}$  0,5N.

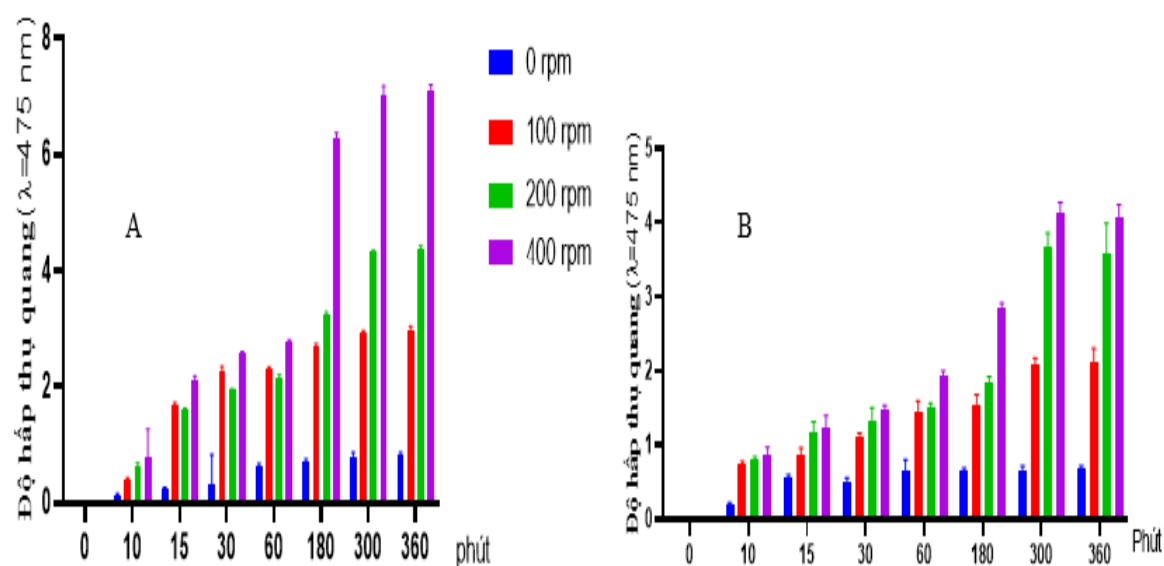


Hình 3.4. Sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến mức độ tạo hạt NMPs trong môi trường  $\text{NaOH}$  0,5N.

Trong cả hai môi trường  $\text{NH}_4\text{OH}$  và  $\text{NaOH}$  (0,5 N), hàm lượng hạt NMPs được tạo ra phụ thuộc vào nhiệt độ môi trường (hình 3.3 và 3.4). Khi nhiệt độ tăng lên, lượng hạt NMPs được tạo ra nhiều hơn và mức độ tạo hạt cực đại của NMPs phụ thuộc vào nhiệt độ. Số lượng hạt NMPs được tạo ra nhiều nhất ở  $100^\circ\text{C}$  và đạt mức cao nhất sau hai giờ. Ở các nhiệt độ còn lại, tỷ lệ NMPs được tạo thành đạt cực đại sau năm giờ (hình 3.3, 3.4).

### 3.1.5. Khảo sát sự ảnh hưởng của tốc độ khuấy từ đối với khả năng hình thành hạt NMPs

Tốc độ khuấy từ trong quá trình tạo hạt NMPs là một trong các điều kiện ảnh hưởng đến hàm lượng NMPs được tạo ra.



Hình 3.5. Sự ảnh hưởng của tốc độ khuấy từ và khả năng tạo hạt NMPs trong các môi trường  $\text{NaOH}$  (0,5N) (A) và  $\text{NH}_4\text{OH}$  (0,5N)(B).

Ở hai môi trường  $\text{NH}_4\text{OH}$  và  $\text{NaOH}$ , tốc độ khuấy từ có ảnh hưởng rõ rệt đến thời gian đạt hàm lượng cực đại và mức độ tạo hạt melanin. Khả năng tạo hạt NMPs được khảo sát ở 04 tốc độ khuấy từ khác nhau bao gồm 0, 100, 200, 400 (rpm/phút). Hình 3.5 cho thấy hàm lượng NMPs phụ thuộc vào tốc độ khuấy từ trong quá trình tạo hạt. Sau 3 giờ, hàm lượng NMPs được tạo ra ở tốc độ 400 rpm/phút đạt

cực đại gấp 7 lần so với đối chứng. Đồng thời, hàm lượng NMPs được tạo ra tăng lên theo thời gian. Hàm lượng NMPs được tạo ra đạt cực đại sau thời gian 5 giờ.

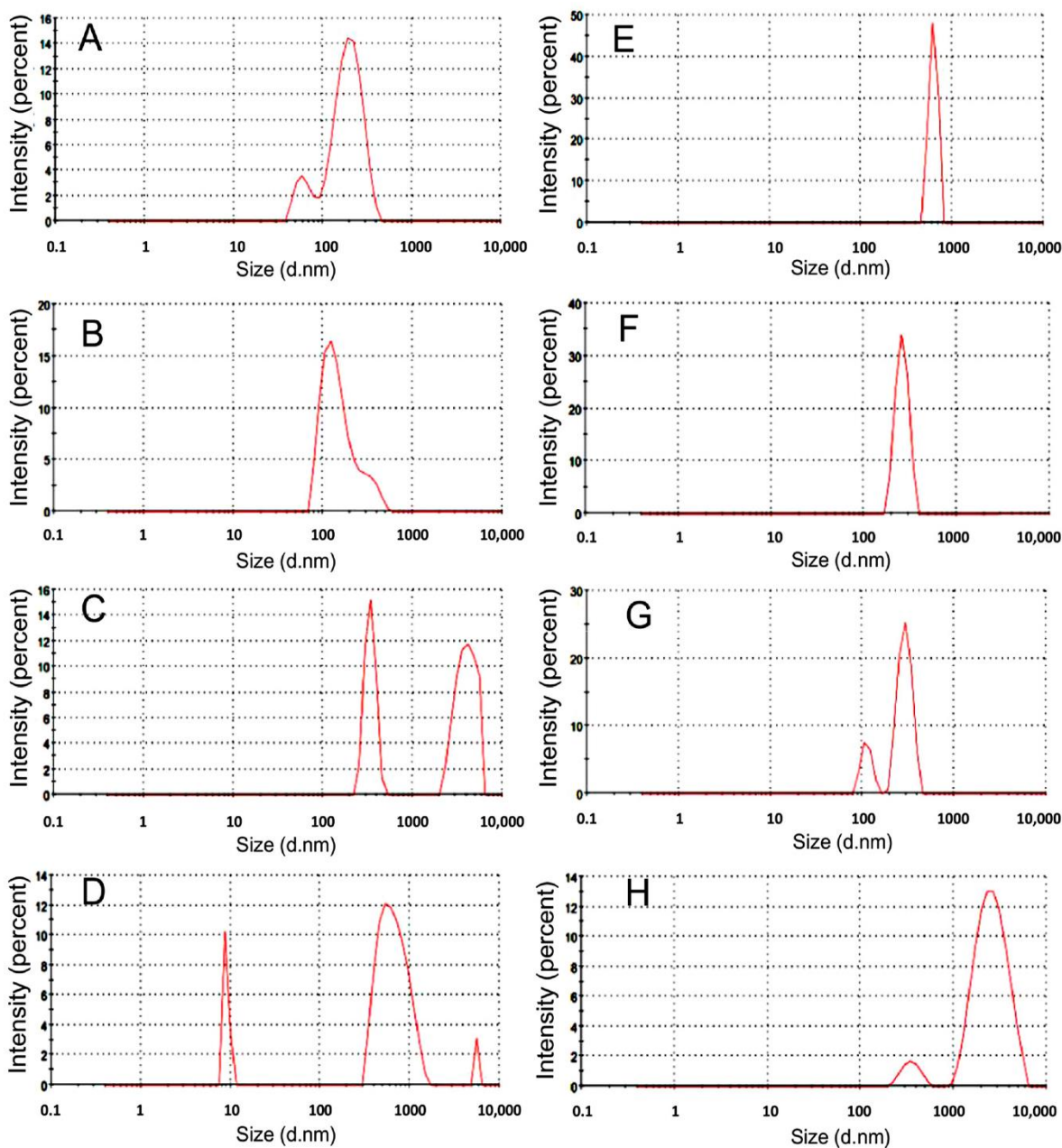
### 3.1.6. Khảo sát kích thước hạt NMPs được tạo nên trong môi trường NaOH và NH<sub>4</sub>OH

Ở tốc độ khuấy từ 400 rpm/phút và nhiệt độ 37°C, kích thước trung bình của hạt NMPs trong các môi trường NH<sub>4</sub>OH và NaOH với các nồng độ thử nghiệm khác nhau được xác định bằng máy đo kích thước hạt nanosize. Kích thước trung bình của hạt NMPs trong NH<sub>4</sub>OH và NaOH ở dải nồng độ 0,1 N; 0,5 N; 1 N và 3 N được thể hiện ở bảng 3.2 và hình 3.6. Độ phân tán của hạt và mức độ đồng đều của hạt trong dung dịch được mô tả bởi hình dạng phổ của đồ thị (hình 3.6).

Bảng 3.2 Kích thước trung bình của các hạt melanin được tạo ra trong dung dịch.

Nồng độ	NaOH	NH <sub>4</sub> OH
0.1 N	204 nm	625 nm
0.5 N	160 nm	260 nm
1 N	4006 và 340 nm	294 và 112 nm
3 N	681, 9073, và 5580 nm	2685 và 354 nm

Trong các môi trường khác nhau đã tạo ra các hạt NMPs ở các kích thước khác nhau. Khi nồng độ kiềm sử dụng có nồng độ lớn ( $\geq 1N$ ), melanin được phân cắt thành nhiều mảnh có kích thước ở nhiều phân đoạn khác nhau. Kích thước hạt nano là một trong những đặc trưng quan trọng để quyết định việc hạt nano có khả năng vận chuyển an toàn trong hệ thống tuần hoàn mà không gây tắc mạch và dễ dàng đi vào trong tế bào để thực hiện các chức năng dược lý của nó. Môi trường NaOH (0,5 N) tạo hạt nanomelanin có kích thước trung bình nhỏ nhất (160 nm) (bảng 3.2).



Hình 3.6. Sự phân tán của các hạt NMPs và kích thước của hạt NMPs trong dung dịch  $\text{NH}_4\text{OH}$  và  $\text{NaOH}$  được xác định bởi máy đo tán xạ ánh sáng Zetasizer.

- Sự phân bố của các hạt NMPs trong dung dịch  $\text{NaOH}$  ở nồng độ 0,1 N (A); 0,5 N (B); 1 N (C) và 3 N (D), tương ứng
- Sự phân bố của các hạt NMPs trong dung dịch  $\text{NH}_4\text{OH}$  ở nồng độ 0,1 N (E); 0,5 N (F); 1 N (G) và 3 N (H), tương ứng.

Do đó, một số đặc trưng của hạt NMPs trong môi trường  $\text{NaOH}$  tiếp tục được khảo sát.

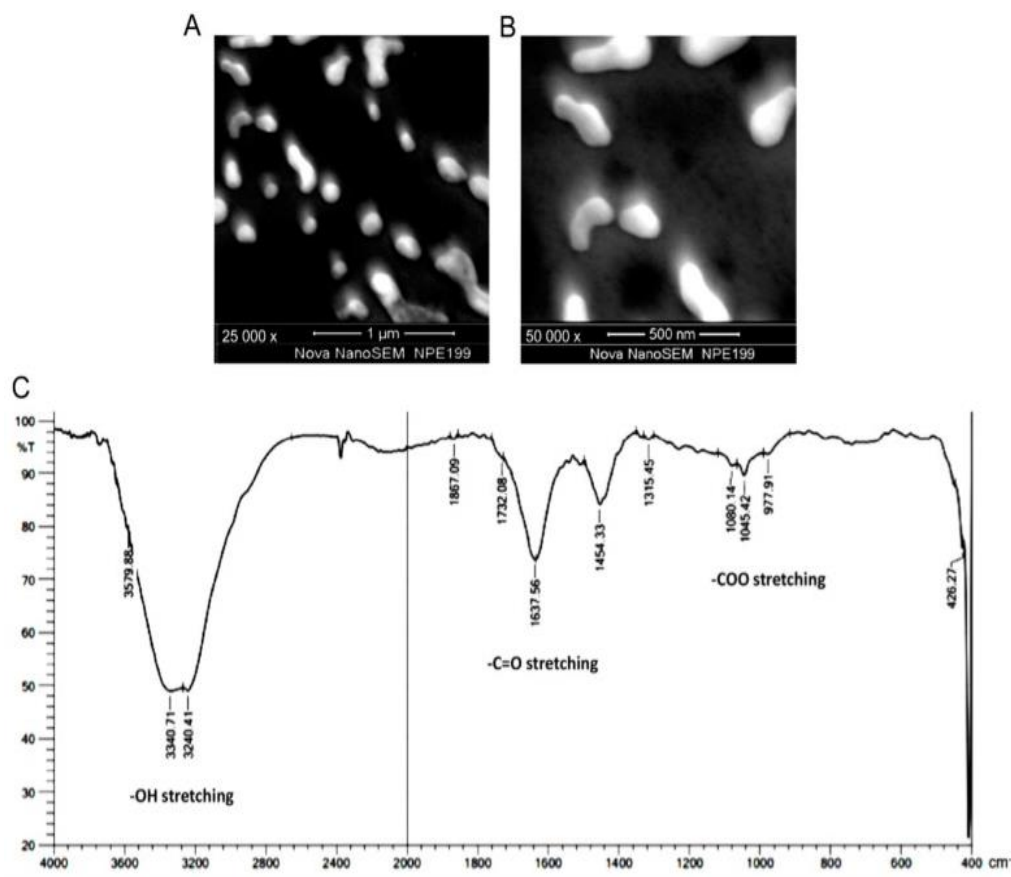


### 3.1.7. Khảo sát những đặc điểm của hạt NMPs trong môi trường NaOH 0,5N

Từ các khảo sát trước đó đã chỉ ra, trong môi trường NaOH, NMPs được tạo ra nhiều hơn về mặt hàm lượng và thời gian để đạt mức độ bão hòa so với trong môi trường NH<sub>4</sub>OH ngắn hơn. Do đó NaOH được lựa chọn làm môi trường phân cắt NMPs và tiếp tục khảo sát các đặc trưng của NMPs được tạo nên trong môi trường này. Các đặc điểm của NMPs được xác định bao gồm hình thái của hạt dưới quan sát của kính hiển vi điện tử quét, phổ các nhóm chức năng hóa học FTIR, phổ hấp thụ ánh sáng UV-vis.

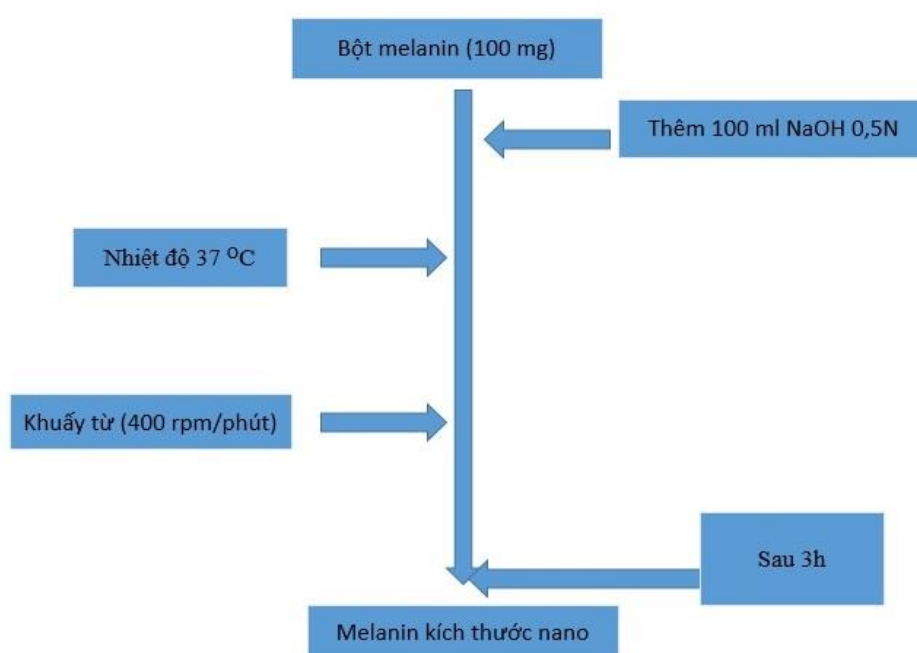
*Các đặc trưng về hình thái và các nhóm chức hóa học trên bề mặt của NMPs.*

Dung dịch NMPs được phân tích và đánh giá bởi phương pháp đo phổ hồng ngoại FTIR và quan sát hình thái của hạt bằng kính hiển vi điện tử SEM ở độ phóng đại 25.000 lần và 50.000 lần (hình 3.7 A,B). Đồng thời, các nhóm chức hóa học của dung dịch NMPs được xác định bởi phổ hồng ngoại xa FTIR (hình 3.7C).



Hình 3.7. NMPs dưới độ phóng đại 25.000X (A); 50.000X (B) của kính hiển vi điện tử quét SEM; phổ FTIR của NMPs (C).

Ở các độ phóng đại cực lớn 25.000 và 50.000 lần, hình ảnh SEM đã chỉ ra NMPs trong dung dịch tồn tại ở dạng hạt riêng biệt. Trong khi đó, hình ảnh ở độ phóng đại tương tự (hình 3.1 A,B) của kính hiển vi điện tử SEM cho thấy, melanin tự nhiên có bề mặt phức tạp với các cấu trúc dạng hình cầu tụ thành khối, xếp cạnh nhau với các khoảng rỗng xen kẽ. Hình 3.7C mô tả phổ FTIR của NMPs. Có thể nhận thấy, trên bề mặt NMPs, các dao động phổ nhóm chức năng được xác định trong khoảng  $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ . Các đỉnh phổ rõ nét của các nhóm chức năng hóa học bao gồm hydroxyl ( $3356 \text{ cm}^{-1}$ ), cacboxyl ( $1612 \text{ cm}^{-1}$ ), cabonyl ( $1029 \text{ cm}^{-1}$ ). Các nhóm chức năng hóa học trên bề mặt của NMPs được xác định bởi phổ FTIR có sự tương đồng với các nhóm chức trên bề mặt của melanin từ túi mực (hình 3.1C).



*Hình 3.8. Sơ đồ tạo hạt melanin kích thước nano*

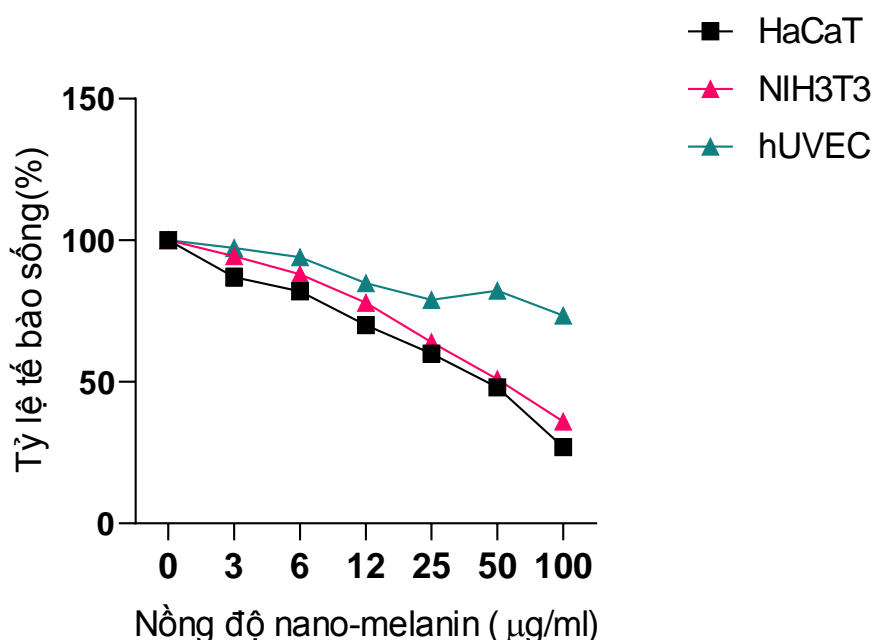
Từ các kết quả nghiên cứu ở trên, dung môi kiềm được sử dụng để tạo hạt NMPs. Hạt melanin được tạo ra trong môi trường NaOH 0,5 N, tốc độ khuấy từ 400 rpm/phút, ở  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (gần với nhiệt độ cơ thể) được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Hạt nano được tạo ra theo sơ đồ qui trình (hình 3.8) được sử dụng cho thử nghiệm trên mô hình tế bào và mô hình chuột thí nghiệm.

## 3.2 KHẢO SÁT KHẢ NĂNG BẢO VỆ TẾ BÀO DƯỚI TÁC ĐỘNG CỦA TIA X

### 3.2.1. Sự tác động của NMPs lên chức năng sinh lý của tế bào

#### 3.2.1.1. Độc tính của NMPs trên dòng tế bào NIH 3T3, HaCaT và hUVEC

Sau khi hoạt hóa thành công dòng tế bào NIH 3T3 và HaCaT, và hUVEC, các tế bào được gieo vào đĩa 96 giếng với mật độ lần lượt 3000, 4000, 3000 tế bào/giếng để tiến hành nghiên cứu thử nghiệm độc tính tế bào bởi NMPs. Tiến hành bổ sung NMPs ở các nồng độ khác nhau 0, 3, 6, 12, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  vào các giếng tế bào. Đối chứng dương được sử dụng là paclitaxel.



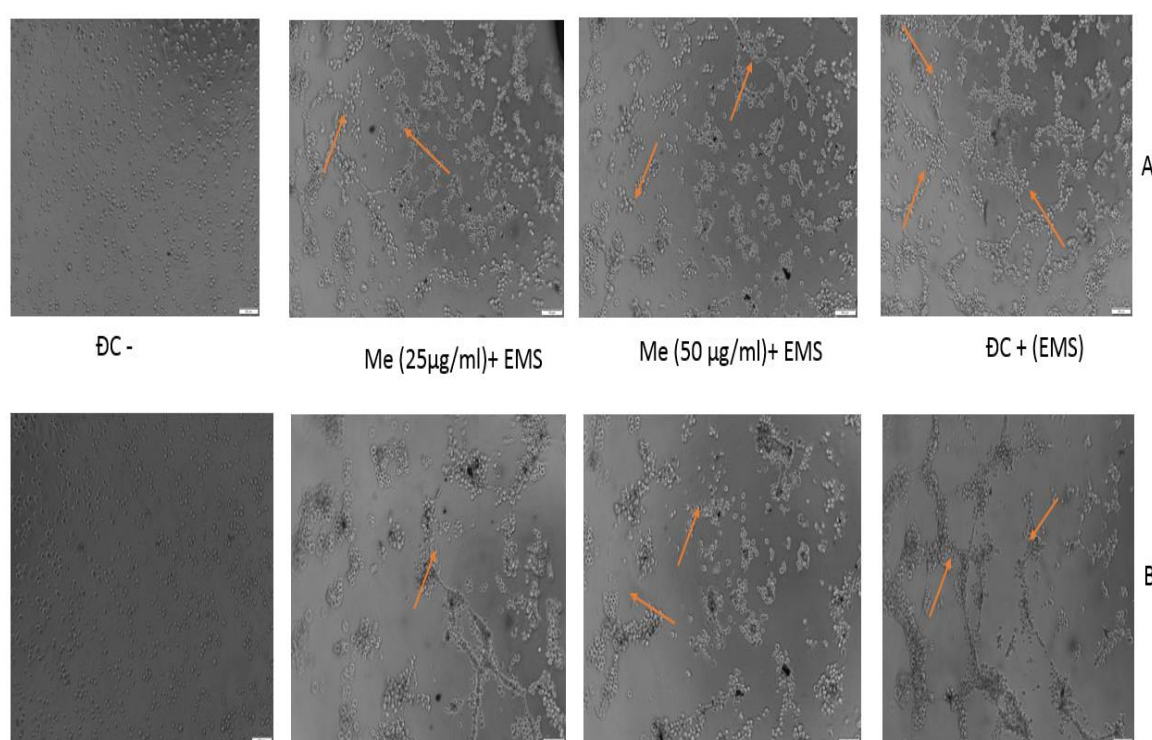
Hình 3.9. Độc tính tế bào của NMPs đối với tế bào HaCaT, NIH 3T3 và hUVEC

Kết quả nghiên cứu cho thấy sự phụ thuộc giữa tỷ lệ sống sót của tế bào với nồng độ thuốc thử (hình 3.9). Ở nồng độ thuốc thử 100  $\mu\text{g/mL}$ , số lượng lớn tế bào NIH 3T3 và HaCaT bị mất khả năng bám dính vào đáy đĩa và bị chết. Tỷ lệ tế bào sống sót của tế bào HaCaT và NIH 3T3 ở nồng độ thuốc thử 100  $\mu\text{g/mL}$  lần lượt là 36% và 27% so với đối chứng. Ở các nồng độ thuốc thử thấp từ 0 - 12  $\mu\text{g/mL}$ , chỉ có khoảng 10-12% tế bào bị chết so với đối chứng. Giá trị  $\text{IC}_{50}$  của NMPs trên dòng tế bào NIH 3T3 và HaCaT lần lượt là 53 và 39  $\mu\text{g/mL}$ .

Đối với dòng tế bào hUVEC, ở nồng độ thuốc 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  và 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , tỷ lệ tế bào sống sót lần lượt là 73% và 82% so với đối chứng. Do đó, không xác định được giá trị  $\text{IC}_{50}$  của NMPs trên dòng tế bào hUVEC ở dải nồng độ nhỏ hơn 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (hình 3.9).

### 3.2.1.3. Khảo sát sự ảnh hưởng của NMPs lên khả năng hình thành mạch ở tế bào nội mô

Tế bào nội mô được sử dụng làm mô hình để thử nghiệm sự ảnh hưởng của NMPs lên khả năng tạo mạch máu.



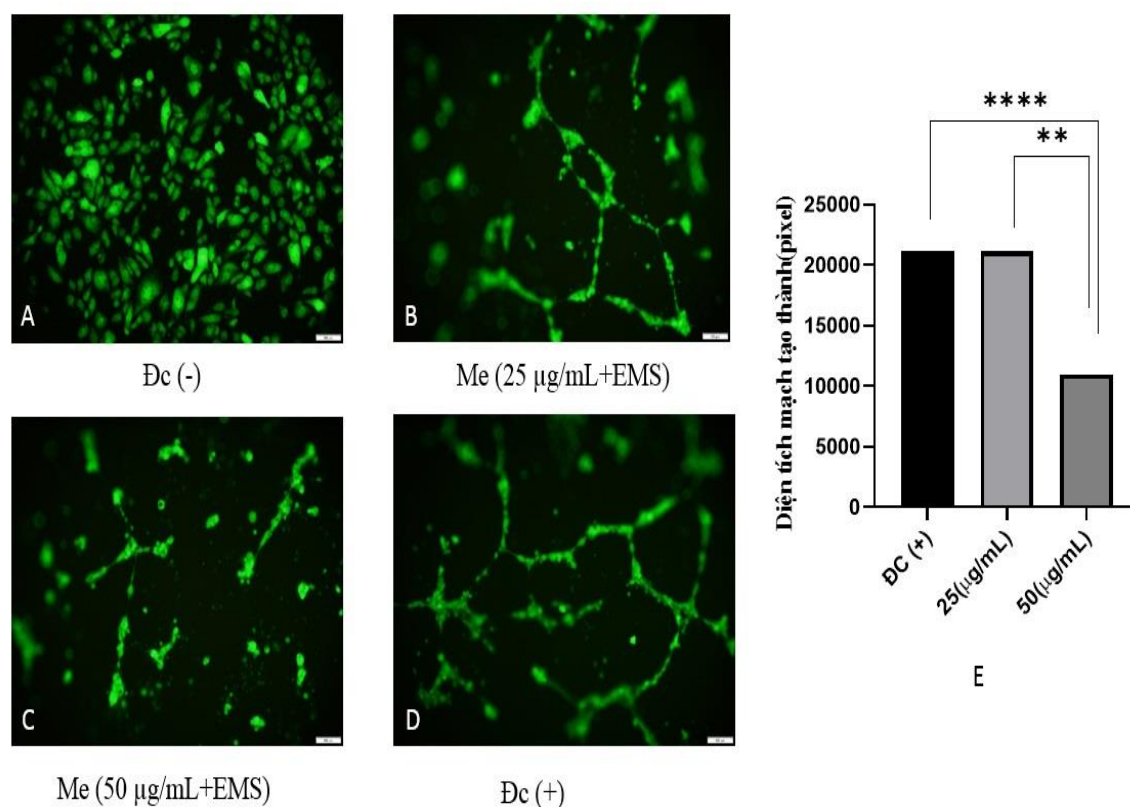
Hình 3.10. Sự ảnh hưởng của NMPs lên hình thành mạch bởi tế bào nội mô (hUVEC) theo thời gian.

- Sự hình thành mạch sau 6h (A). Sự hình thành mạch sau 10h (B).

Bar: 100 nm. Dấu mũi tên - Vị trí của mạch được tạo thành.

Khi tăng sinh tế bào đạt đến mật độ che phủ 80% đáy đĩa, thu tế bào để tiến hành các thử nghiệm tiếp theo. Các giếng thử nghiệm được bổ sung NMPs ở nồng độ 25 và 50 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) và đối chứng âm suramin nồng độ 10  $\mu\text{M}$  (negative control), đối chứng dương sử dụng Extracellular Matrix Solution để tạo thành mạch và để

quan sát khả năng hình thành mạch theo thời gian. Sau 6h, các tế bào nội mô di chuyển, kết dính và hình thành các sợi mạch trong môi trường nuôi cấy ở các giếng được bổ sung NMPs và đối chứng dương được quan sát dưới kính hiển vi (hình 3.10 A, B,C,D).



Hình 3.11. Sự ức chế quá trình hình thành mạch máu trên tế bào hUVEC của NMPs (E) ở nồng độ 25 và 50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) sau 10h.

Hình ảnh mạch được nhuộm huỳnh quang (A, B,C,D), bar = 100 nm. \*\*, \*\*\*\*, khác biệt có ý nghĩa thống kê (Student T-test) giữa các nhóm(  $p < 0,01$  và  $p < 0,0001$ ) tương ứng giữa nhóm được bổ sung NMPs 25 và 50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) và giữa nhóm ĐC và nhóm bổ sung 50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) NMPs.

Sau 10h, các mạch máu đã được hình thành rõ nét. Để đánh giá mức độ hình thành mạch dưới sự được điều trị và không được điều trị bởi NMPs, chúng tôi bổ sung thuốc nhuộm huỳnh quang DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) vào các giếng tế bào để quan sát bằng kính hiển vi điện tử (hình

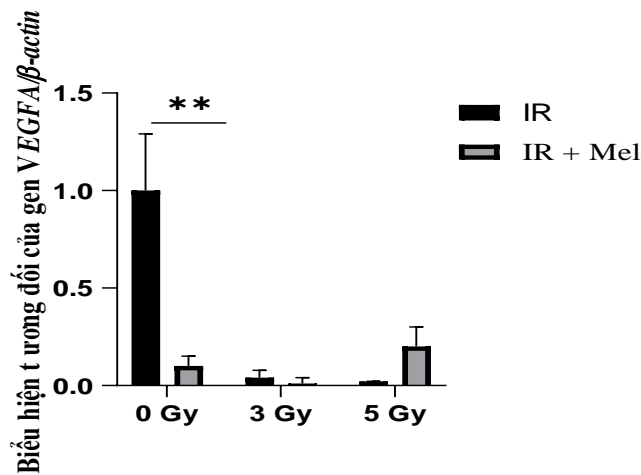
3.11). Các hình ảnh được chụp lại và đo chiều dài các mạch được hình thành bởi phần mềm xử lý hình ảnh Image J.

Hình 3.11A cho thấy không quan sát thấy sự hình thành mạch theo thời gian ở giếng đối chứng âm mặc dù tế bào vẫn phát triển bình thường. Ở các giếng được bổ sung bởi NMPs với các nồng độ khác nhau, và đối chứng dương, các mạch được hình thành và dễ dàng quan sát thấy dưới kính hiển vi điện tử quét phát huỳnh quang (hình 3.11 B,C,D). Ở giếng được bổ sung NMPs nồng độ 50 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), tổng chiều dài của mạch được tạo bằng 0,47 lần so với đối chứng ( $p < 0,001$ ) và bằng 0,52 lần so với tổng chiều dài của mạch được bổ sung NMPs với nồng độ 25 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $p < 0,01$ ) (hình 3.11 E).

Dữ liệu nghiên cứu đã chỉ ra khả năng ức chế quá trình tạo mạch trên dòng tế bào nội mô của NMPs khi được sử dụng ở nồng độ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### 3.2.1.4. Sự tác động của NMPs lên mức độ biểu hiện của gen VEGF-A ở tế bào nội mô

Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) là một protein được mã hóa bởi gen VEGF-A và có nhiều vai trò trong hoạt động sống của tế bào. Trong quá trình tạo mạch, VEGF-A là một protein đóng vai trò then chốt quyết định sự hình thành mạch.

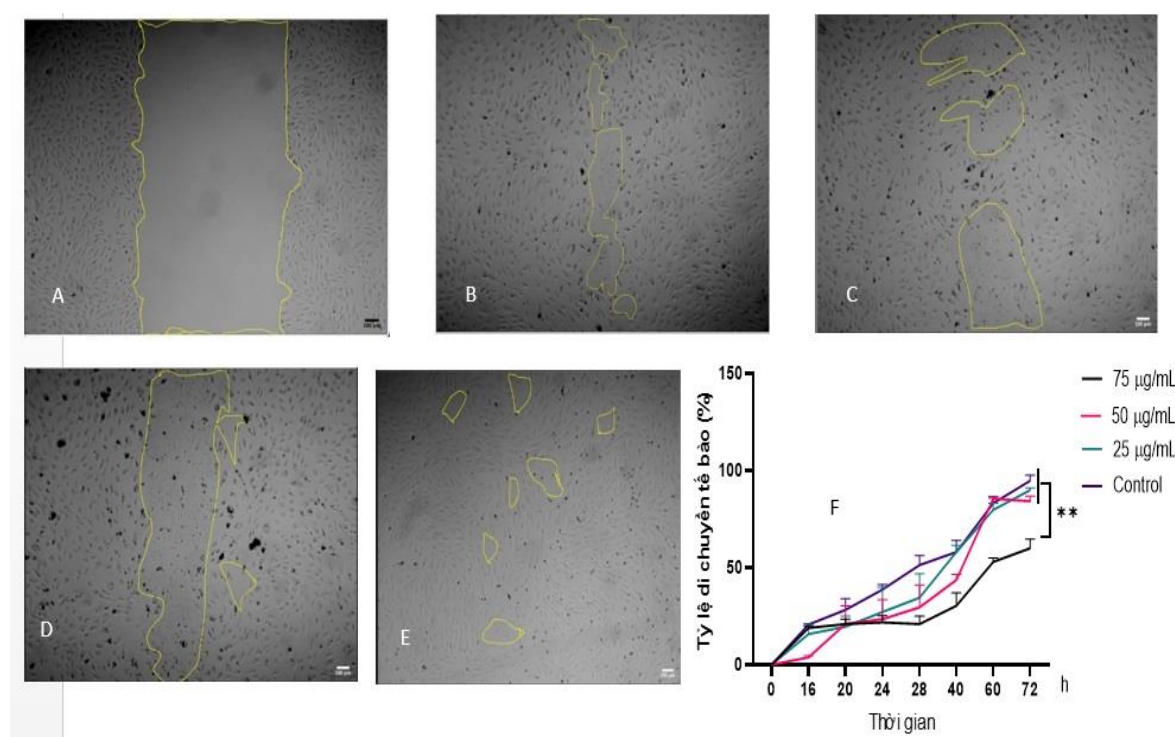


Hình 3.12. Mức độ biểu hiện gen VEGF-A sau 2 ngày chiếu xạ ở các mức liều 0 Gy, 3 Gy và 5 Gy. \*\*, khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$  giữa nhóm IR và IR+Mel khi không chiếu xạ.

Hình 3.12 cho thấy, khi không chiếu xạ, mức độ biểu hiện của gen mã hóa *VEGF-A* bị giảm xuống gần 3 lần so với đối chứng ( $p < 0,01$ ) ở giếng được bổ sung NMPs (25  $\mu\text{g/mL}$ ). Mặt khác, khi chiếu xạ ở liều cao (3 Gy, 5 Gy), mức độ biểu hiện của gen mã hóa *VEGF-A* ở các giếng được bổ sung NMPs và không được bổ sung NMPs đều rất thấp và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm này.

### 3.2.1.5. Nghiên cứu khả năng tác động của NMPs lên sự di chuyển của tế bào (wound healing)

Sự ảnh hưởng của NMPs lên khả năng di chuyển của tế bào lên sự di chuyển của tế bào nội mô được khảo sát. Tế bào hUVEC sau khi được tăng sinh trong môi trường EBM-2 và đạt đến độ che phủ 90% của đĩa nuôi cấy, vết thương được tạo ra ở thời điểm 0 h và bổ sung mitomixin 10  $\mu\text{g/ml}$  để ngừng quá trình phân chia tế bào. Sự liền thương diễn ra là do sự di chuyển của tế bào theo thời gian được quan sát thấy dưới độ phóng đại 10X của kính hiển vi (hình 13 A,B,C,D).



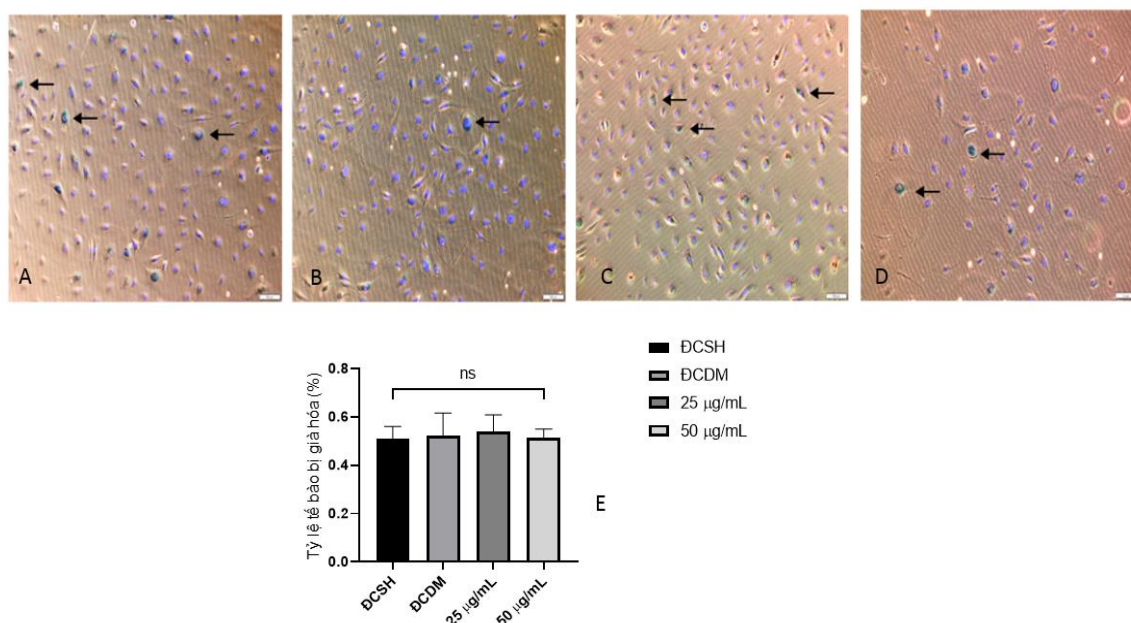
Hình 3.13. Khả năng làm lành vết thương trên dòng tế bào nội mô dưới tác động của NMPs. Hình ảnh vết thương được tạo nên ở thời điểm 0h (A). Hình ảnh về sự liền vết thương lần lượt ở các giếng đối chứng (E), các giếng bổ sung NMPs ở nồng

độ 75 ( $\mu\text{g/mL}$ ) (D), 50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) (C) và 25 ( $\mu\text{g/mL}$ ) (B) sau 72h. Biểu đồ sự liền vết thương ở các giếng được bổ sung NMPs ((75, 50 và 25 ( $\mu\text{g/mL}$ )) theo thời gian (F). Phần được khoanh vùng-khoảng không gian vết thương chưa lành. \*\*, khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,01$ ) giữa nhóm đối chứng và các nhóm được bổ sung NMPs.

Biểu đồ hình hình 3.13 F cho thấy khả năng ức chế sự di chuyển của các tế bào nội mô khi được bổ sung NMPs ở nồng độ cao trong quá trình làm lành vết thương. Sau 72h, hiệu quả làm lành vết thương ở các giếng đối chứng, và giếng bổ sung NMPs 75  $\mu\text{g/mL}$  và 50  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$  chiếm lần lượt 95%, 60%, 84%, và 89%. Sự khác biệt giữa khả năng di chuyển của tế bào ở giếng đối chứng và giếng được bổ sung NMPs có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,01$ ).

### 3.2.1.6. Nghiên cứu khả năng ảnh hưởng của NMPs lên sự lão hóa của tế bào nội mô

Khả năng gây lão hóa tế bào nội mô của NMPs được khảo sát. Các giếng tế bào được ủ với NMPs ở nồng độ 25 và 50 ( $\mu\text{g/mL}$ ).



Hình 3.14. Các tế bào có dấu hiệu lão hóa trong quần thể hUVECs, Đối chứng sinh học (ĐCSH) (A), Đối chứng dung môi (ĐCDM)(B), 25  $\mu\text{g/mL}$  (C) và 50  $\mu\text{g/mL}$  (D). Đồ thị biểu diễn tỉ lệ trung bình của tế bào thoái hóa trong quần thể hUVECs (E). Khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p = 0,2418 > 0,05$ ). bar = 100  $\mu\text{m}$ .



Dung dịch nhuộm DAPI được sử dụng để đánh dấu DNA của nhân tế bào. Hình 3.14 đã chỉ ra những tế bào biểu hiện bởi  $\beta$  - galactosidase được xác định thông qua nhuộm huỳnh quang màu xanh lá cây và được quan sát thấy dưới kính hiển vi điện tử (hình 3.14 A,B,C,D). Tỷ lệ tế bào bị lão hóa được thể hiện qua số lượng tế bào bị nhuộm màu xanh lá cây và nhân được nhuộm bởi DAPI màu xanh nước biển so sánh với số lượng tế bào ban đầu. Tỷ lệ trung bình của các tế bào thoái hóa trong quần thể tế bào hUVEC ở các giếng đối chứng sinh học, đối chứng dung môi, bổ sung NMPs ở nồng độ 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  và 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  lần lượt là  $0,510 \pm 0,051\%$ ,  $0,522 \pm 0,094\%$ ,  $0,541 \pm 0,068\%$ ,  $0,512 \pm 0,038\%$ . So sánh sự khác biệt giữa các nhóm ( $p=0,2418$ ) đã chỉ ra không có sự khác biệt về tỷ lệ tế bào bị lão hóa giữa nhóm được bổ sung NMPs và đối chứng. Dữ liệu nghiên cứu này đã cho thấy khi bổ sung NMPs ở mức liều  $\leq 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ , không gây lão hóa lên các tế bào nội mô.

### **3.2.2. Khảo sát hiệu quả bảo vệ tế bào trước sự ảnh hưởng bởi tia X của NMPs trên mô hình *in vitro***

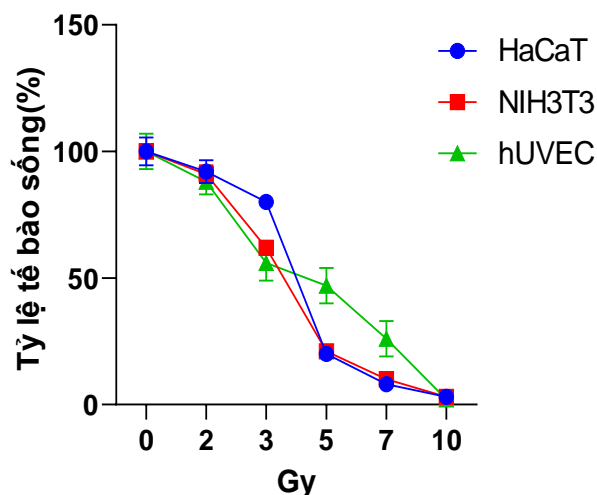
Tế bào keratinocytes (HaCaT), nguyên bào sợi da chuột (NIH 3T3) và nội mô (hUVEC) được hoạt hóa và sử dụng làm mô hình *in vitro* cho thí nghiệm khảo sát khả năng bảo vệ tia xạ (X-ray) của NMPs.

#### *3.2.2.1. Ảnh hưởng của liều chiếu xạ lên khả năng sống sót của các tế bào*

Tế bào NIH 3T3, HaCaT và hUVEC được gieo vào đĩa 6 giếng ở mật độ lần lượt là 30.000, 40.000, 30.000 (tế bào/1 giếng). Khi đĩa nuôi cấy đạt mật độ che phủ bởi tế bào ở mức 50 - 70% diện tích đáy đĩa, tiến hành chiếu xạ ở các liều chiếu xạ khác nhau 2, 3, 5, 7, 10 Gy. Quan sát sự thay đổi hình thái và sự phát triển của tế bào dưới tác động của tia xạ. Ở thời điểm 3 ngày sau khi chiếu xạ, tế bào được thu và xác định số lượng tỷ lệ tế bào còn sống.

Ở mức liều chiếu xạ nhỏ hơn 3 Gy, hình thái tế bào không có nhiều khác biệt với đối chứng. Mặt khác, không nhận thấy sự khác biệt rõ rệt về sự phát triển và sinh trưởng của NIH 3T3 ở mức liều chiếu này so với đối chứng bằng quan sát dưới kính hiển vi thông thường. Đồ thị hình 3.15 cho thấy, ở mức liều chiếu xạ  $\leq 2\text{Gy}$ , tỷ lệ tế bào còn sống sót chiếm khoảng 90%, và không có nhiều sự khác biệt so với đối

chúng. Tuy nhiên, khi tăng mức liều chiếu xạ, tỷ lệ tế bào sống giảm đi nhanh chóng và gần như chết hoàn toàn ở mức chiếu xạ 10 Gy. Ở mức liều chiếu xạ 3, 5, 7 (Gy), tỷ lệ tế bào sống sót so với đối chứng ở tế bào HaCaT lần lượt là 80, 20, 8 (%). Đối với tế bào NIH 3T3, tỷ lệ tế bào sống sót so với đối chứng tương ứng 62, 21, 10 (%) (hình 3.15).

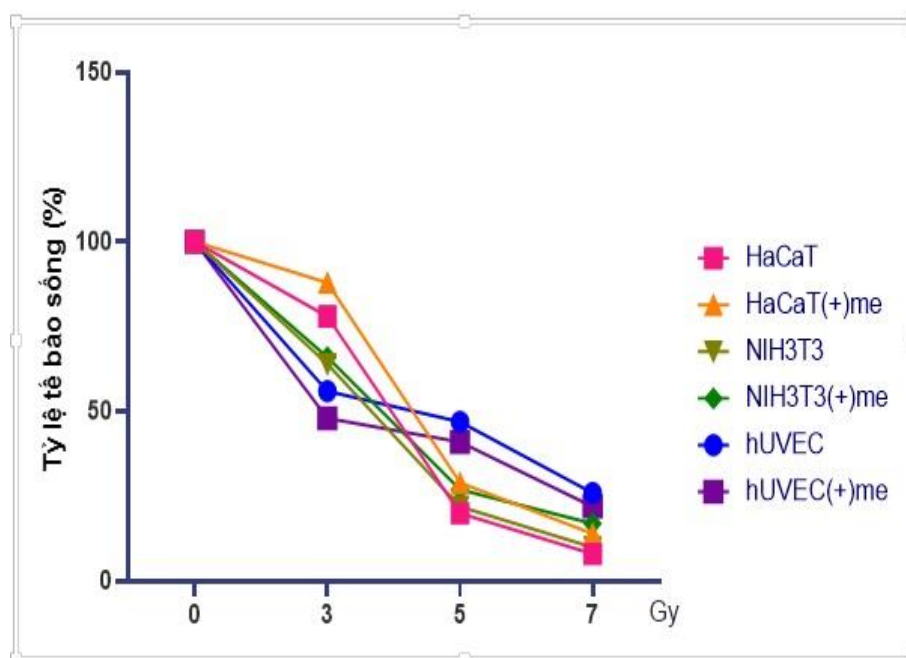


Hình 3.15. Tỷ lệ số tế bào sống sót sau chiếu xạ ở các mức liều chiếu xạ từ 0-10 Gy. Ở tế bào hUVEC, tỷ lệ này lần lượt là 88, 57, 46 (%). Khi tăng liều chiếu xạ lên 10 Gy, tỷ lệ tế bào sống sót ở cả 3 dòng tế bào là không đáng kể. Do vậy, chúng tôi tiếp tục khảo sát khả năng bảo vệ tế bào của NMPs ở dải liều chiếu xạ 0-7 Gy sau 02 ngày chiếu xạ.

### 3.2.2.2. Tác dụng bảo vệ tế bào của NMPs dưới điều kiện chiếu xạ

Khảo sát tỷ lệ sống sót của tế bào sau chiếu xạ dưới sự có bổ sung và không có bổ sung NMPs trước khi chiếu xạ. Hình 3.16 cho thấy, đối với tế bào NIH 3T3, khi bổ sung NMPs (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), tỷ lệ tế bào sống sót sau chiếu xạ không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê dưới tác dụng của NMPs ở tất cả liều chiếu xạ thử nghiệm. Ngược lại, ở dòng tế bào HaCaT, có sự khác biệt giữ tỷ lệ tế bào sống sót sau chiếu xạ khi được bổ sung melanin ở mức liều chiếu xạ không lớn hơn 5 Gy. NMPs (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) giúp tăng nhẹ tỷ lệ sống sót của tế bào sau chiếu xạ so với đối chứng ( $p < 0,05$ ) ở mức liều 3 Gy và 5 Gy lần lượt là 10% và 7%. Khi ở mức liều chiếu xạ cao hơn 5 Gy, không thấy sự khác biệt về tỷ lệ sống sót ở nhóm được bổ sung

NMPs so với đối chứng. Ở dòng tế bào hUVEC, có thể thấy sự giảm nhẹ tỷ lệ tế bào sống sót ở nhóm được bổ sung NMPs so với đối chứng.



Hình 3.16. Tỷ lệ tế bào tế bào HaCaT và NIH 3T3 và hUVEC sống sót dưới tác dụng của NMPs trong điều kiện chiếu xạ.

Từ hình 3.16 cho thấy, NMPs có khả năng tăng khả năng sống sót của tế bào HaCaT và giảm nhẹ tỷ lệ tế bào hUVEC sống sót sau chiếu xạ. Chúng tôi phân tích các dấu ấn phân tử của xác định được các dấu ấn phân tử liên quan đến tác dụng này của các hạt NMPs trên dòng tế bào HaCaT ở dải liều chiếu xạ 0-5 Gy.

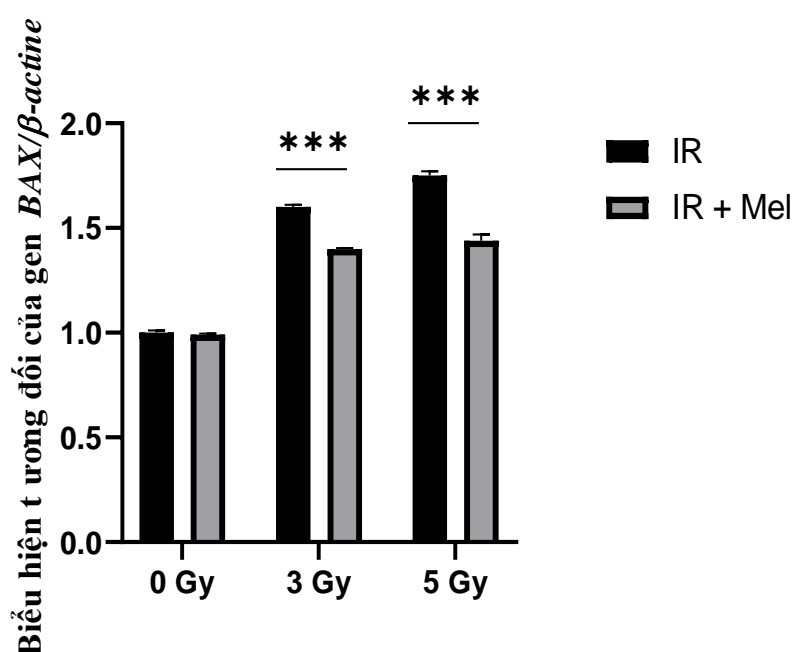
### 3.2.2.3. Phân tích sự thay đổi dấu ấn phân tử liên quan đến quá trình apoptosis và kháng oxy hóa của tế bào dưới tác dụng của NMPs trong điều kiện chiếu xạ

Năng lượng của tia xạ tác động lên tế bào và giết tế bào theo các cơ chế khác nhau. Khi chiếu xạ ở liều cao, quá trình chết tế bào diễn ra nhanh chóng. Trong trường hợp đó, tia xạ mang năng lượng lớn, tác động trực tiếp lên tế bào gây đứt gãy DNA và không thể phục hồi. Khi đó, các tế bào chết theo cơ chế chết hoại tử (necrosis). Ngoài ra, năng lượng tia xạ có khả năng kích hoạt chuỗi tín hiệu tế bào, khởi đầu từ thụ thể TNF- $\alpha$  trên bề mặt tế bào, kích hoạt các caspase và các yếu tố

khác bên trong nội bào như *BAX*, *TNF- $\alpha$* , *Caspase-3*. Ngoài ra, SOD1 là enzyme đóng vai trò quan trọng giúp tế bào chống lại stress oxy hóa khi xạ trị tạo ra số lượng lớn các dạng oxy phản ứng (ROS).

*a. Phân tích sự thay đổi mức độ biểu hiện của gen BAX dưới tác dụng của tia xạ*

Tia xạ gây chết tế bào bởi nhiều yếu tố. Trong nghiên cứu này, mức độ biểu hiện của gen mã hóa *BAX* ở các nhóm tế bào được chiếu xạ có bổ sung và không có bổ sung NMPs (10  $\mu\text{g/mL}$ ) được khảo sát.



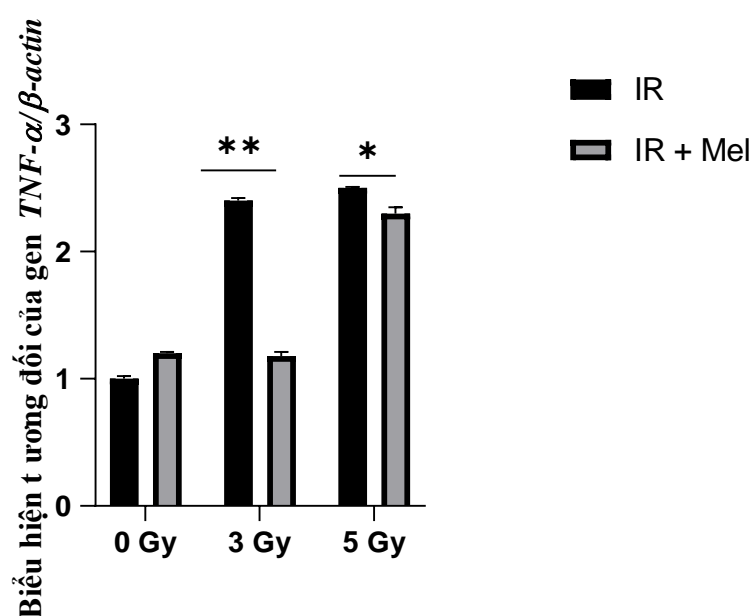
Hình 3.17. Mức độ biểu hiện gen *BAX* sau 2 ngày chiếu xạ ở các mức liều 0 Gy, 3 Gy và 5 Gy. \*\*\*, khác biệt có ý nghĩa thống kê (Student T-test) với  $p < 0,001$  tương ứng giữa nhóm IR và IR+Mel.

Hình 3.17 chỉ ra xu hướng tăng mức độ biểu hiện của gen *BAX* khi tăng mức độ chiếu xạ ở nhóm không được điều trị (IR) và cả ở nhóm được điều trị bởi NMPs (IR+Mel). Ở tế bào HaCaT, kết quả nghiên cứu cho thấy có sự giảm mức độ biểu hiện gen *BAX* ở nhóm IR+Mel bởi NMPs so với nhóm IR ở mức liều chiếu xạ 3 Gy và 5 Gy lần lượt là 1,1 và 1,2 lần ( $p < 0,001$ ).

*b. Phân tích sự thay đổi mức độ biểu hiện của gen TNF- $\alpha$  dưới sự tác động của chiếu xạ và NMPs*

Hình 3.18 cho thấy khuynh hướng tăng lên mức độ biểu hiện của gen mã hóa TNF- $\alpha$  dưới tác động của năng lượng xạ trị ở mức liều chiếu xạ khác nhau (3 Gy và 5 Gy). Ở nhóm IR, khi xạ trị mức liều chiếu xạ 3 Gy và 5 Gy, mức độ biểu hiện gen TNF- $\alpha$  lần lượt tăng lên 2,4 và 2,5 lần so với nhóm đối chứng ( $p < 0,01$ ).

Nhóm được điều trị bởi NMPs, mức độ biểu hiện của gen mã hóa TNF- $\alpha$  bị giảm rõ rệt ở mức liều chiếu xạ 3 Gy, 5 Gy lần lượt là 1,9 ( $p < 0,01$ ) và 1,1 ( $p < 0,05$ ) so với nhóm IR.

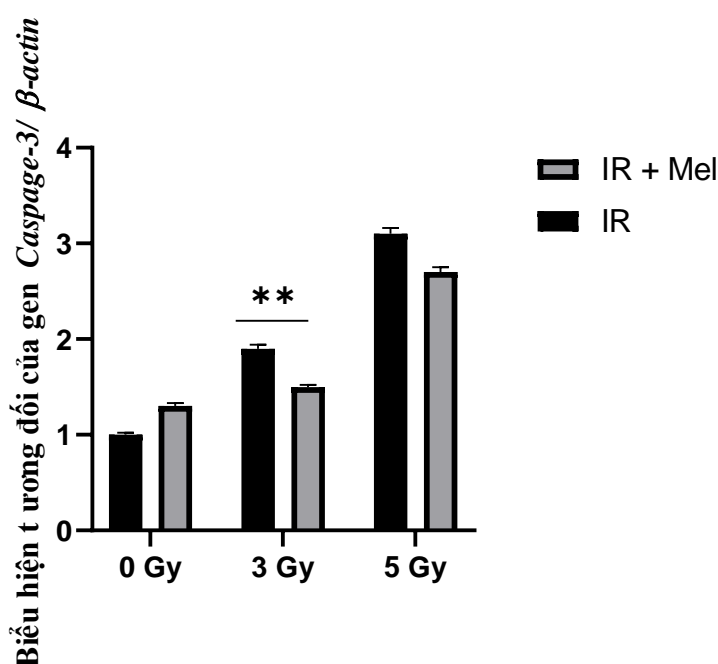


Hình 3.18. Mức độ biểu hiện gen TNF- $\alpha$  sau 2 ngày chiếu xạ ở các mức liều 0 Gy, 3 Gy và 5 Gy. \*, \*\*, khác biệt có ý nghĩa thống kê (Student T-test) với  $p < 0,05$  và  $p < 0,01$ , tương ứng, giữa nhóm IR và IR+Mel.

*c. Phân tích sự thay đổi mức độ biểu hiện của gen Caspase-3 dưới sự tác động của chiếu xạ và NMPs*

Chiếu xạ gây ra hoạt hóa gen mã hóa Caspase-3 và tăng mức độ biểu hiện khi tăng liều chiếu xạ. Mức độ biểu hiện Caspase-3 ở nhóm không bổ sung NMPs (IR) ở mức liều chiếu xạ 3 Gy là 1,9 lần và 5 Gy là 3,1 lần so với nhóm chứng ko chiếu xạ (hình 3.19). Khi được bổ sung NMPs (IR+Mel), mức độ biểu hiện tăng 1,05 ở 3 Gy

và 2,07 lần ở 5 Gy so với nhóm chứng không chiếu xạ. Đồng thời, ở nhóm không được bổ sung melanin và có chiếu xạ, mức độ biểu hiện gen *Caspase-3* có xu hướng tăng với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$  và  $p < 0,01$ ) so với nhóm được bổ sung NMPs.

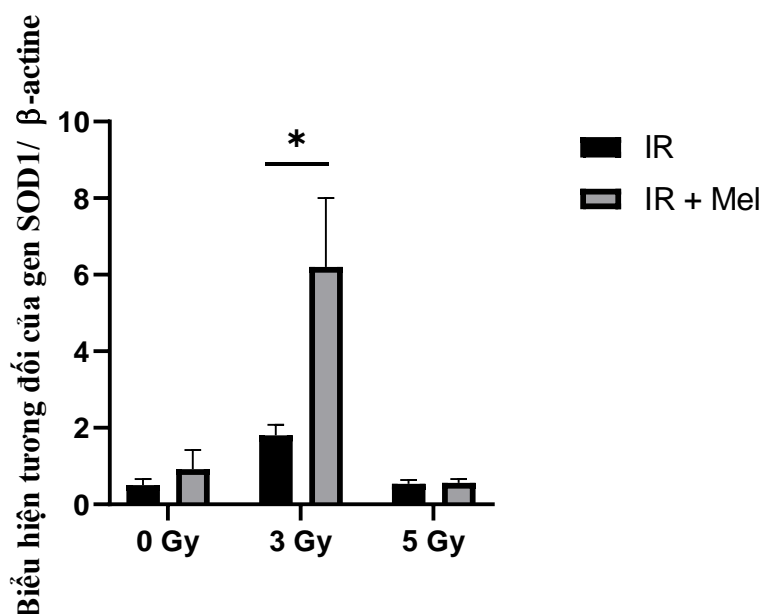


Hình 3.19. Mức độ biểu hiện gen *Caspase-3* sau 2 ngày chiếu xạ ở các mức liều 0 Gy, 3 Gy và 5 Gy. \*\*, khác biệt có ý nghĩa thống kê (Student T-test) với  $p < 0,01$  của nhóm IR+Mel và IR ở mức liều chiếu xạ 3 Gy.

d. Phân tích sự thay đổi mức độ biểu hiện của gen *SOD1* dưới sự tác động của chiếu xạ và NMPs

Quá trình chiếu xạ làm phát sinh số lượng đáng kể gốc tự do. Các gốc tự do này có mức năng lượng cao, kém bền, dễ dàng liên kết với các phần tử bên trong tế bào như DNA, các protein, chất béo, màng tế bào và các bào quan làm thay đổi cấu trúc, đứt gãy và thậm chí làm rối loạn quá trình chuyển hóa bình thường bên trong tế bào. Hình 3.20 chỉ ra năng lượng của tia xạ làm tăng mức độ biểu hiện gen mã hóa enzyme *SOD1* ở mức liều chiếu xạ 3 Gy. *SOD1* là enzyme có vai trò quan trọng trong quá trình kháng lại quá trình stress oxy hóa xảy ra bên trong tế bào. Ở nhóm

được điều trị bởi NMPs, mức độ tăng biểu hiện của gen mã hóa enzyme *SOD1* có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nhóm không được điều trị.



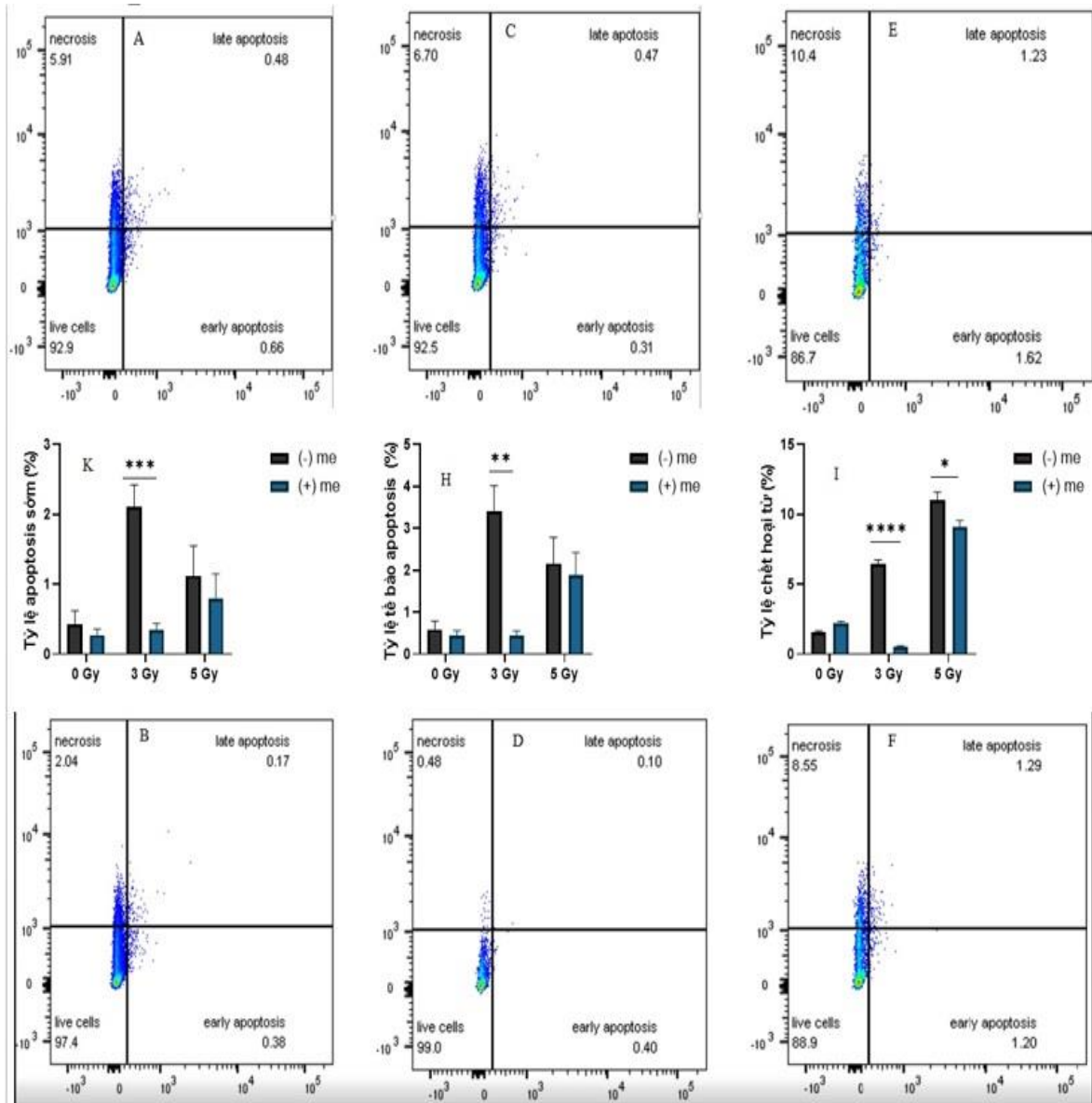
Hình 3.20. Mức độ biểu hiện gen *SOD1* sau 2 ngày chiếu xạ ở các mức liều 0 Gy, 3 Gy và 5 Gy. \*, khác biệt có ý nghĩa thống kê (Student T-test) với  $p < 0,05$  của nhóm IR + Mel so với nhóm IR.

Kết quả này có thể gợi ý đến việc NMPs có vai trò thúc đẩy mức độ biểu hiện gen mã hóa enzyme có chức năng làm hàng rào bảo vệ tế bào trước sự phát sinh số lượng lớn gốc tự do trong quá trình xạ trị.

*e. Sự tác động của NMPs với quá trình chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào HaCaT sau xạ trị*

Sau khi xạ trị, tế bào HaCaT được phân tích tỷ lệ tế bào chết apoptosis (hình 3.21). Kết quả phân tích tế bào dòng chảy (flow cytometry) của tế bào HaCaT sau 2 ngày chiếu xạ được thể hiện ở hình 3.21 trong đó, tỷ lệ tế bào chết hoại tử tăng đáng kể theo cường độ của liều chiếu xạ. Tỷ lệ tế bào chết hoại tử ở liều chiếu xạ 3 Gy và 5 Gy (hình 3.21.I) lần lượt là 6,42% và 11,03% và gấp 4.06 và 6.98 lần so với đối chứng ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ ). Ở nhóm được điều trị bởi NMPs, tỷ lệ tế bào chết giảm đi đáng kể so với nhóm không được điều trị. Đặc biệt ở liều chiếu xạ 3 Gy, tỷ lệ tế bào chết hoại tử đã giảm xuống 0,53% ( $p < 0,0001$ ) so với nhóm IR. Tương tự, tỷ lệ tế

bào chết theo chương trình (hình 3.21H) của nhóm được chiếu xạ ở 3 Gy ít hơn so với nhóm không được chiếu xạ với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê  $p < 0,01$ . Tuy nhiên, ở khi tế bào được chiếu xạ ở mức liều chiếu 5 Gy, tỷ lệ này không có sự khác biệt nào đáng kể.



Hình 3.21. Phân tích tế bào theo dòng chảy của tế bào HaCaT dưới tác động của X-ray và NMPs. \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*, sự khác biệt ( $p < 0,05$  và  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  tương ứng) giữa các nhóm IR và IR + Mel được xác định bởi Student T-test.

- Hình ảnh phân tích tế bào theo dòng chảy ở nhóm không bổ sung NMPs (10  $\mu\text{g/mL}$ ) tương ứng với các liều chiếu xạ 0 Gy (A), 3 Gy (C), 5 Gy (E) tương ứng.



- Hình ảnh phân tích tế bào theo dòng chảy ở nhóm không được bổ sung NMPs ở các liều chiếu xạ tương ứng với các liều chiếu xạ 0 Gy (B), 3 Gy (D), 5 Gy (F).

- Tỷ lệ tế bào chết apoptosis (%) (H), tỷ lệ tế bào chết sớm (%) (K), Tỷ lệ tế bào chết hoại tử (%) (I) sau hai ngày xạ trị.

Ở hình 3.21K, tỷ lệ tế bào apoptosis sớm giữa hai nhóm được bổ sung NMPs và không bổ sung NMPs chỉ có ý nghĩa thống kê ở mức liều chiếu xạ 3 Gy ( $p < 0,001$ ) với tỷ lệ tế bào apoptosis sớm khoảng 2% ở nhóm IR và 0,34% ở nhóm IR+Mel.

### 3.3. KHẢO SÁT KHẢ NĂNG BẢO VỆ CỦA NMPS ĐỐI VỚI CHUỘT MANG KHỐI UNG THƯ TRƯỚC TÁC ĐỘNG CỦA TIA X

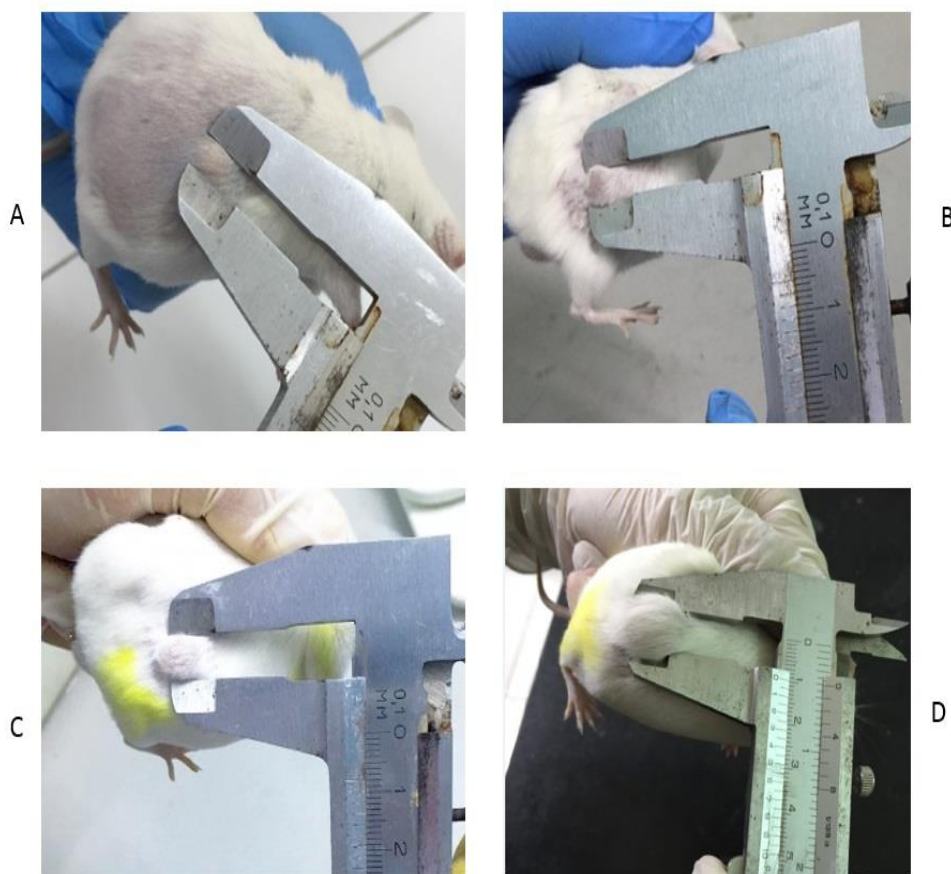
#### 3.3.1. Thử nghiệm độc tính cấp của hạt NMPs và khảo sát liều chiếu xạ gây chết trên chuột khỏe mạnh.

Độc tính cấp được thử nghiệm ở dải liều từ 5-80 mg/kg của NMPs. Kết quả nghiên cứu cho thấy ở mức liều  $\leq 60$  mg/kg không gây chết ở các nhóm chuột nghiên cứu. Ở mức liều 40 mg/kg, chuột vận động nhanh nhẹn, tình trạng sức khỏe bình thường trong suốt quá trình thử nghiệm. Ở mức liều cao hơn 80 mg/kg, nhóm chuột được tiêm có sự suy giảm về mức độ vận động. Chuột ăn uống kém. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn mức liều 40 mg/kg để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo. Chúng tôi cũng đồng thời khảo sát mức liều chiếu xạ gây chết trên chuột nhắt trắng. Các nhóm chuột được chiếu xạ tia X ở mức liều 4, 5, 6, 7 Gy với tốc độ phát xạ ở mức cao 1 Gy/phút. Các nhóm chuột được theo dõi 20 ngày sau khi chiếu liều duy nhất với dải liều trên. Ở mức 4, 5, 6 Gy không gây chết ở các nhóm chuột sau 20 ngày chiếu xạ. 7 ngày sau chiếu xạ ở mức liều cao nhất 7 Gy có khoảng 30% số chuột trong nhóm bị chết. Do đó, chúng tôi lựa chọn liều chiếu 6 Gy cho các nghiên cứu tiếp theo.

#### 3.3.2. Tạo khối u ở chuột nhắt trắng bằng tế bào ung thư phổi chuột (3LL)

Chuột được gây u ở vị trí lưng khi tiêm trực tiếp dung dịch tế bào ung thư phổi chuột với nồng độ  $10^6$  tế bào/1 mL. Sau 3 ngày xuất hiện khối u và kiểm tra kết quả số lượng chuột gây u thành công. Khối u dần phát triển theo thời gian và được xác

định kích thước bởi thước kẹp (hình 3.22). Sau chu kỳ từ 3 đến 5 ngày, kích thước khối u được kiểm tra lại. Sau 3 ngày, có 16/40 (chiếm tỷ lệ 40%) con chuột có xuất hiện khối u.



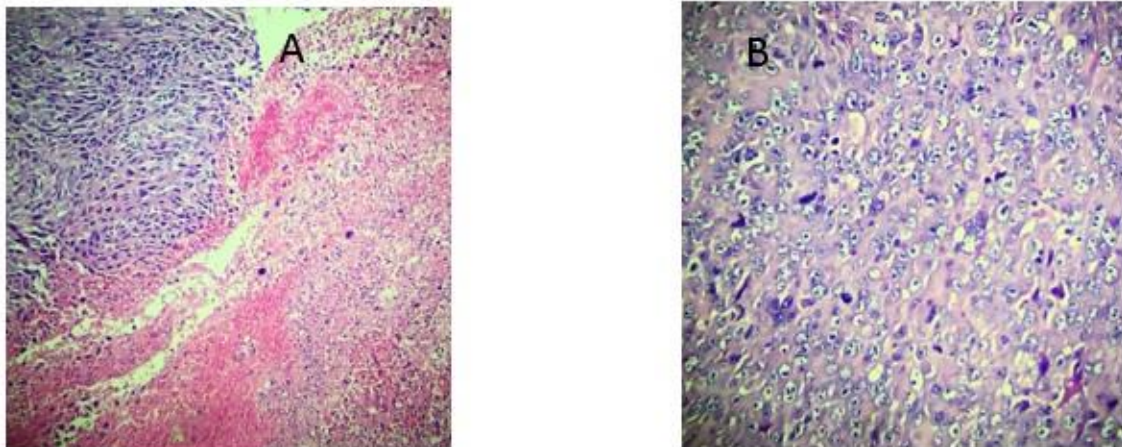
*Hình 3.22. Khối u ở lưng chuột sau khi ghép tế bào ung thư phổi (3LL).*

*Ngày thứ 3 sau khi tiêm tế bào 3LL (A); ngày thứ 5 sau khi tiêm tế bào 3LL (B);*

*ngày thứ 7 sau khi tiêm tế bào 3LL (C); ngày thứ 10 sau khi tiêm tế bào 3LL (D).*

Sau 7 ngày, có 36/40 (chiếm 90%) con chuột xuất hiện khối u (hình 3.22). Ở vị trí tiêm không xuất hiện vết loét hay hoại tử, sức khỏe và phản xạ của các nhóm chuột tốt. Chúng tôi lựa chọn 20 con chuột có kích thước khối u đạt khoảng 500 cm<sup>3</sup> để tiến hành thử nghiệm tiếp theo. Khi khối u đạt đến kích thước xác định, khối u được lấy ra để phân tích mô học để kiểm tra khả năng tạo khối u thành công ở các nhóm chuột. Khối u bao gồm các tế bào ung thư phổi biểu mô với các nhân không đều, tăng sắc tố và nhiều nhân. Có các hạch hoại tử nằm trong các khối u (hình 3.23).

Điều này chứng tỏ đã thành công trong việc gây u bằng tế bào ung thư phổi (3LL) trên mô hình chuột nhắt trắng.



Hình 3.23. Giải phẫu bệnh mô khối bởi tế bào ung thư phổi 3LL sau 10 ngày gây u dưới kính hiển vi 4X (A) và 10X (B).

### 3.3.3. Tình trạng sức khỏe toàn thân của chuột trong quá trình nghiên cứu

Chuột được theo dõi tình trạng sức khỏe toàn thân trong quá trình tiến hành thí nghiệm. Các tiêu chí được theo dõi bao gồm tình trạng sức khỏe tổng thể, chuột có thể ăn uống, tiêu hóa thức ăn, hậu môn khô, trọng lượng, phản xạ của các nhóm chuột làm thí nghiệm.

Kết quả theo dõi các nhóm chuột như sau:

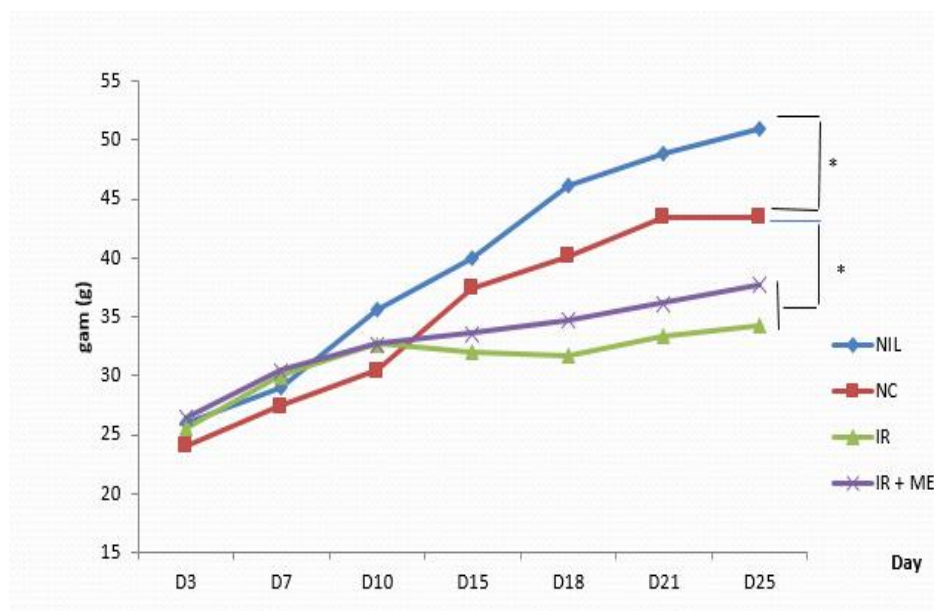
- Tiêu chí vận động: 100% chuột được chọn lựa làm nghiên cứu vận động nhanh nhẹn, bình thường, không có biểu hiện uể oải, liệt chi.
- Tiêu chí đáp ứng với kích thích: 100% chuột có phản xạ tốt khi đáp ứng lại với các yếu tố kích thích như ánh sáng, âm thanh, phản xạ với tác nhân gây nguy hiểm.
- Tiêu chí phân chuột: 100% chuột không đi lỏng, phân chuột khô có kích thước và màu sắc nâu đen đặc trưng.
- Tiêu chí da và lông chuột: 100% chuột có da không có màu bất thường, lông chuột mượt, không xù.

Chúng tôi lựa chọn 20 cá thể chuột trong đó có 15 con có kích thước khối u 500 cm<sup>3</sup> ở ngày thứ 10 và có tình trạng sức khỏe toàn thân tốt và 05 con chuột không được gây u để làm đối chứng sinh học cho các thí nghiệm tiếp theo.

### 3.3.4. Trọng lượng cơ thể của các nhóm chuột được nghiên cứu

Những cá thể chuột từ viện vệ sinh dịch tễ trung ương có khối lượng trung bình 20 g/con. Sau khi được chia thành các nhóm (NIL, NC, IR, IR+Mel), chuột tiếp tục được nuôi ở cùng một điều kiện thức ăn, nước uống, nhiệt độ và diễn biến trọng lượng trung bình của các cá thể chuột được theo dõi với chu kỳ 2-3 ngày một lần trong 25 ngày.

Ban đầu, khối lượng chuột giữa các nhóm tương đương nhau. Sự phát triển khối lượng trung bình của chuột theo thời gian trong quá trình triển khai nghiên cứu có sự khác biệt ( $p < 0,05$ ) ở các nhóm chuột được chiếu xạ và không được chiếu xạ. Hình 3.24 cho thấy, khối lượng chuột ở nhóm đối chứng sinh học (NIL) tăng nhanh nhất và đạt giá trị trung bình  $53 \pm 0,7$  (g). Ở nhóm chuột được gây u (NC), khối lượng trung bình của chuột đạt  $44 \pm 0,5$  (g) thấp hơn so với nhóm NIL ( $p < 0,05$ ) có ý nghĩa thống kê sau 25 ngày nuôi.

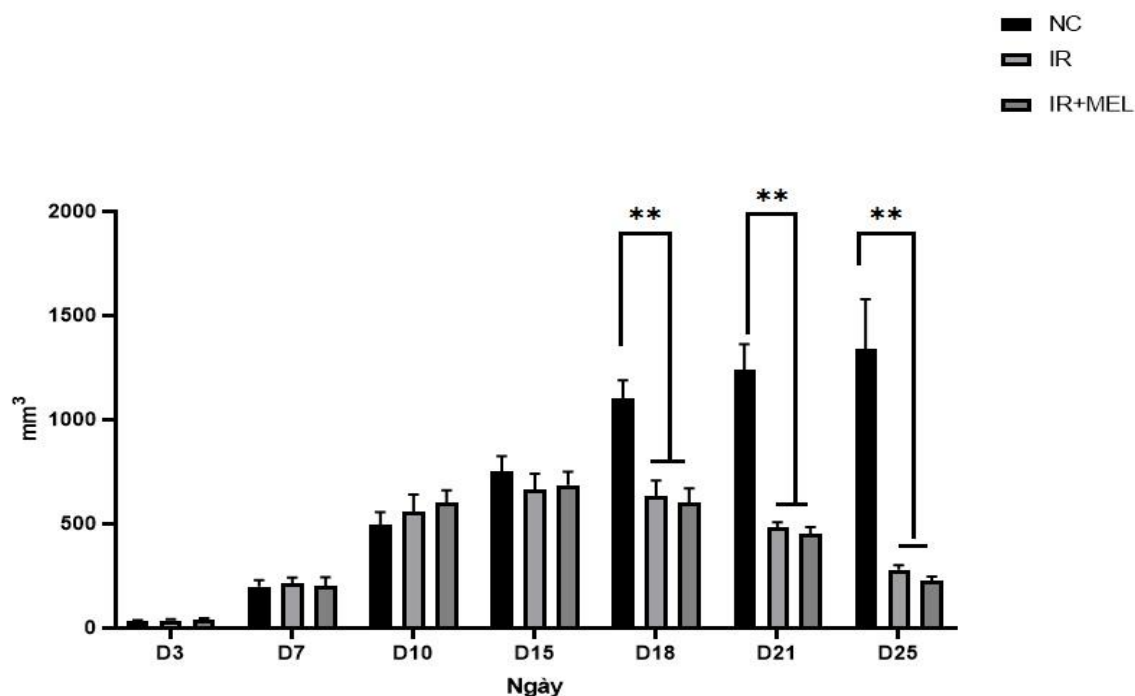


Hình 3.24. Khối lượng các nhóm chuột nghiên cứu theo thời gian. \*, khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  (Student T-test) giữa nhóm NC và NIL; NC và các nhóm được chiếu xạ (IR, IR+Mel).

Ở hai nhóm chuột còn lại, nhóm được gây u và chiếu xạ (IR), nhóm được gây u, chiếu xạ và được tiêm NMPs (IR+Mel) khối lượng trung bình của các nhóm chuột lần lượt là 37 g và 33 g thấp hơn hai nhóm NIL và NC có ý nghĩa thống kê. Sở dĩ như vậy vì ở hai nhóm này được chiếu xạ tia X ở liều cao (6 Gy). Đây là mức liều chiếu xạ không gây chết, tuy nhiên ảnh hưởng lớn đến quá trình sinh trưởng và phát triển của chuột. Trong đó, nhóm được điều trị bởi NMPs (IR+Mel) có sự phục hồi về mặt khối lượng có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nhóm không được điều trị bởi NMPs (IR).

### 3.3.5. Thể tích trung bình khối u ở các nhóm chuột được nghiên cứu

Chuột được tạo khối u rắn ở vị trí lưng chuột bởi tế bào ung thư phổi (3LL). Các nhóm chuột nghiên cứu được theo dõi kích thước khối u trong quá trình nghiên cứu. Kích thước khối u ở nhóm NC tăng lên theo thời gian và có sự giảm kích thước khối u ở các nhóm được điều trị bởi tia xạ và NMPs (hình 3.25). Sau 25 ngày thí nghiệm, kích thước khối u ở nhóm NC đạt  $1337 \text{ cm}^3$ .



Hình 3.25. Kích thước khối u của các nhóm chuột trong quá trình nghiên cứu. \*\*, khác biệt có ý nghĩa thống kê  $p < 0,01$  (Student T-test) giữa nhóm NC và các nhóm được chiếu xạ (IR, IR+Mel).

Ở hai nhóm chuột IR và IR+Mel, thể tích của khối u giảm so với nhóm NC sau khi chiếu xạ 5 ngày. Thể tích khối u đạt cực đại ở ngày 15, sau đó kích thước khối u ở các nhóm chuột IR và IR+Mel được thu nhỏ dần. Sau 25 ngày làm thí nghiệm với kích thước khối u trung bình đạt khoảng 200 cm<sup>3</sup> ở nhóm IR và IR+Mel giảm 6,7 lần so với nhóm NC không được điều trị. Điều này cho thấy, dưới tác dụng tác động cộng gộp giữa chiếu xạ liều cao và bổ sung NMPs làm giảm sự phát triển kích thước khối u một cách rõ rệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,01$ ). Mặc dù, khối lượng trung bình của nhóm chuột IR và IR+Mel trong quá trình nghiên cứu (hình 3.24) có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê  $p < 0,05$ , tuy nhiên không có nhiều sự khác biệt về kích thước khối u giữa hai nhóm chuột này sau 25 ngày điều trị (hình 3.25).

### 3.3.6. Phân tích các chỉ số huyết học ở các nhóm chuột nghiên cứu

Sau chiếu xạ 15 ngày, các nhóm chuột được thu mẫu để phân tích một số chỉ tiêu nghiên cứu. Chỉ tiêu huyết học của các nhóm chuột được nêu ở bảng 3.3.

Có thể thấy, 15 ngày sau chiếu xạ, các chỉ số huyết học như bạch cầu, hồng cầu, tiểu cầu, đều có sự thay đổi đáng kể giữa các nhóm (bảng 3.3). Quá trình xạ trị đã có sự tác động đáng kể lên các chỉ số huyết học giữa các nhóm chuột được chiếu xạ và không chiếu xạ. Trong đó, ở nhóm được chiếu xạ, các chỉ số bạch cầu (WBC), hồng cầu (RBC), tiểu cầu (PLT), hemoglobin, hemocrit, lym (%) đều có sự giảm đáng kể so với nhóm chứng đặc biệt là tỷ lệ tế bào bạch cầu sau xạ trị bị giảm khoảng 10 lần. Đây là một trong các thành phần tế bào máu nhạy cảm với tia xạ trong quá trình xạ trị khối u.

Bảng 3.3: Các chỉ tiêu huyết học của các nhóm chuột ở thời điểm 15 ngày sau chiếu xạ

STT	Thông số	Unit	NIL	NC	IR	IR+Mel
1	Bạch cầu (WBC)	[10 <sup>9</sup> /L]	4,15 ± 0,98	3,8 ± 0,94	0,45 ± 0,10	0,7 ± 0,22
2	Hồng cầu	[10 <sup>12</sup> /L]	7,7 ± 0,52	6,68 ± 0,19	5,48 ± 1,09	5,21 ± 0,68

	(RBC)					
3	Hemoglobin	[g/dL]	11 ± 0,61	10,63 ± 0,93	8,34 ± 0,65	7,77 ± 0,69
4	Hemocratit	[g/dL]	34,4 ± 2,69	33,1 ± 2,30	24,94 ± 2,05	23,1 ± 1,21
5	Tiểu cầu (PLT)	[pg]	763,5 ± 27,4	801,6 ± 52,8	178,14 ± 65	218,7 ± 23,0
6	Lym (%)	[%]	72,22 ± 1,52	37,83 ± 2,80	55,96 ± 3,82	60,9 ± 3,15

### 3.3.7. Phân tích một số chỉ tiêu chức năng thận của các nhóm chuột nghiên cứu

Kết quả ở bảng 3.4 chỉ ra, hai chỉ số này ở các nhóm chuột nghiên cứu, đều có xu hướng giảm ở các nhóm bị chiếu xạ (IR và IR+Mel) so với đối chứng với  $p < 0,05$ .

Bảng 3.4 Chỉ số chức năng thận của các nhóm chuột nghiên cứu

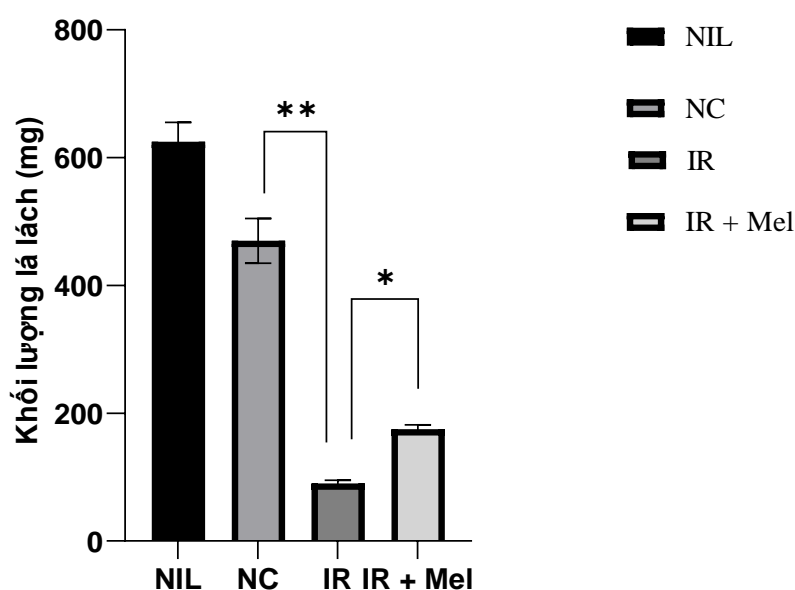
Chỉ số chức năng thận	Unit	NIL	NC	IR	IR+Mel
Ure	mmol/L	9,5 ± 1,3	7,9 ± 2,6	5,5 ± 0,5	5,5 ± 1,5
Creatinin	mmol/L	50,3 ± 1,6	43,5 ± 1,8	36 ± 4,5	50 ± 3,5

Ở nhóm được điều trị bởi NMPs, không có sự thay đổi về chỉ số ure, tuy nhiên có sự phục hồi mạnh mẽ chỉ số creatinin so với nhóm đối chứng (NIL) ( $p < 0,05$ ). Ure và creatinine đều được bài tiết qua thận. Chính vì vậy, đây cũng là các chỉ số thể hiện chức năng hoạt động của thận.

### 3.3.8. Phân tích sự thay đổi khối lượng của lá lách và hạch bạch huyết ở các nhóm chuột nghiên cứu

Trong quá trình chiếu xạ toàn thân ở các nhóm chuột được nghiên cứu, lá lách là một trong các cơ quan chịu tác động mạnh nhất của tia xạ. Trong nghiên cứu này, sự thay đổi khối lượng và hình thái của lá lách sau chiếu xạ được ghi nhận rõ nét. Lá lách ở các nhóm chuột bị chiếu xạ bị thu nhỏ đáng kể sau khi bị chiếu xạ (hình 3.26). Khối lượng lá lách ở nhóm bị chiếu xạ bị giảm từ 4-6 lần so với nhóm không chiếu xạ ( $p < 0,01$ ). Điều này được giải thích bởi năng lượng tia xạ đã tiêu diệt số

lượng lớn bạch cầu bạch cầu trong máu và tủy xương. Điều này được thể hiện ở tỷ lệ % tế bào lympho đều bị giảm mạnh gần 10 lần như kết quả đã phân tích ở bảng 3.3. Hình 3.26 cho thấy khối lượng lá lách ở nhóm IR+Mel gần gấp 2 lần khối lượng lá lách của nhóm chuột chỉ được chiếu xạ (IR) ( $p < 0,05$ ). Điều này chỉ ra NMPs đã có vai trò trong việc giúp lá lách được phục hồi phần nào, dưới sự tác động nghiêm trọng của việc chiếu xạ tia X liều cao.

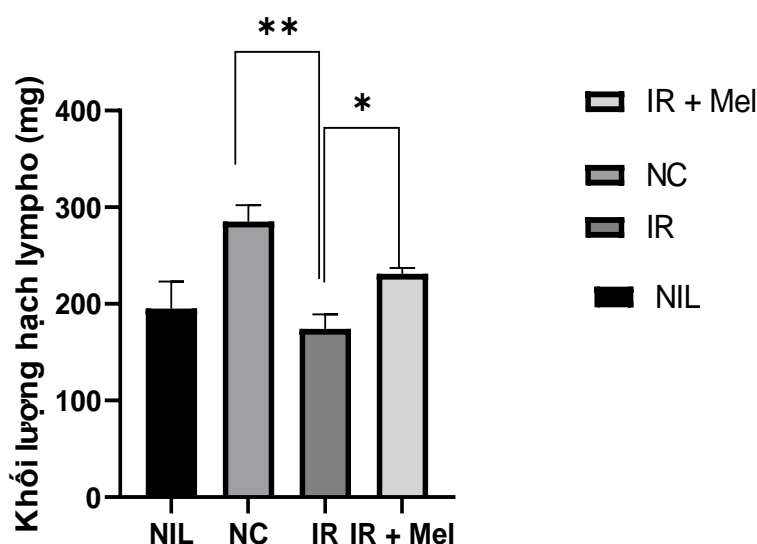


Hình 3.26. Khối lượng lách của các nhóm chuột nghiên cứu (NIL, NC, IR, IR+Mel) sau 15 ngày chiếu xạ. \*, \*\*, khác biệt có ý nghĩa thống kê (Student T-test) và ( $p < 0,05$  và  $p < 0,01$ ) tương ứng giữa nhóm IR và IR+Mel hay giữa nhóm NC và IR.

Hạch lympho là một cơ quan nằm trong hệ thống bạch huyết và miễn dịch thích ứng. Các tế bào lympho như tế bào T và tế bào B ở hạch bạch huyết có vai trò giúp cơ thể chống lại sự xâm nhập của các tác nhân gây bệnh bao gồm các tác nhân nội sinh hay ngoại sinh. Tương tự như lá lách, hạch lympho là một trong những cơ quan bị tác động trực tiếp do chiếu xạ liều cao. Khối lượng hạch bạch huyết ở nhóm chuột được chiếu xạ có sự giảm rõ nét so với nhóm NC có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$  (hình 3.27). Ở nhóm được điều trị bổ sung bởi NMPs có khối lượng hạch bạch huyết nhiều cao hơn so với nhóm IR ( $p < 0,05$ ). Kết quả này cũng phù hợp với



tỷ lệ % tế bào Lym bị giảm đáng kể sau khi chiếu xạ ở bảng 3.3. Ở nhóm NC, các cá thể chuột đều bị gây u mà không được điều trị, quan sát thấy tình trạng viêm tăng nặng theo thời gian ở nhóm này. Đồng thời, các hạch lympho xuất hiện nhiều và có khối lượng lớn hơn so với các nhóm còn lại.



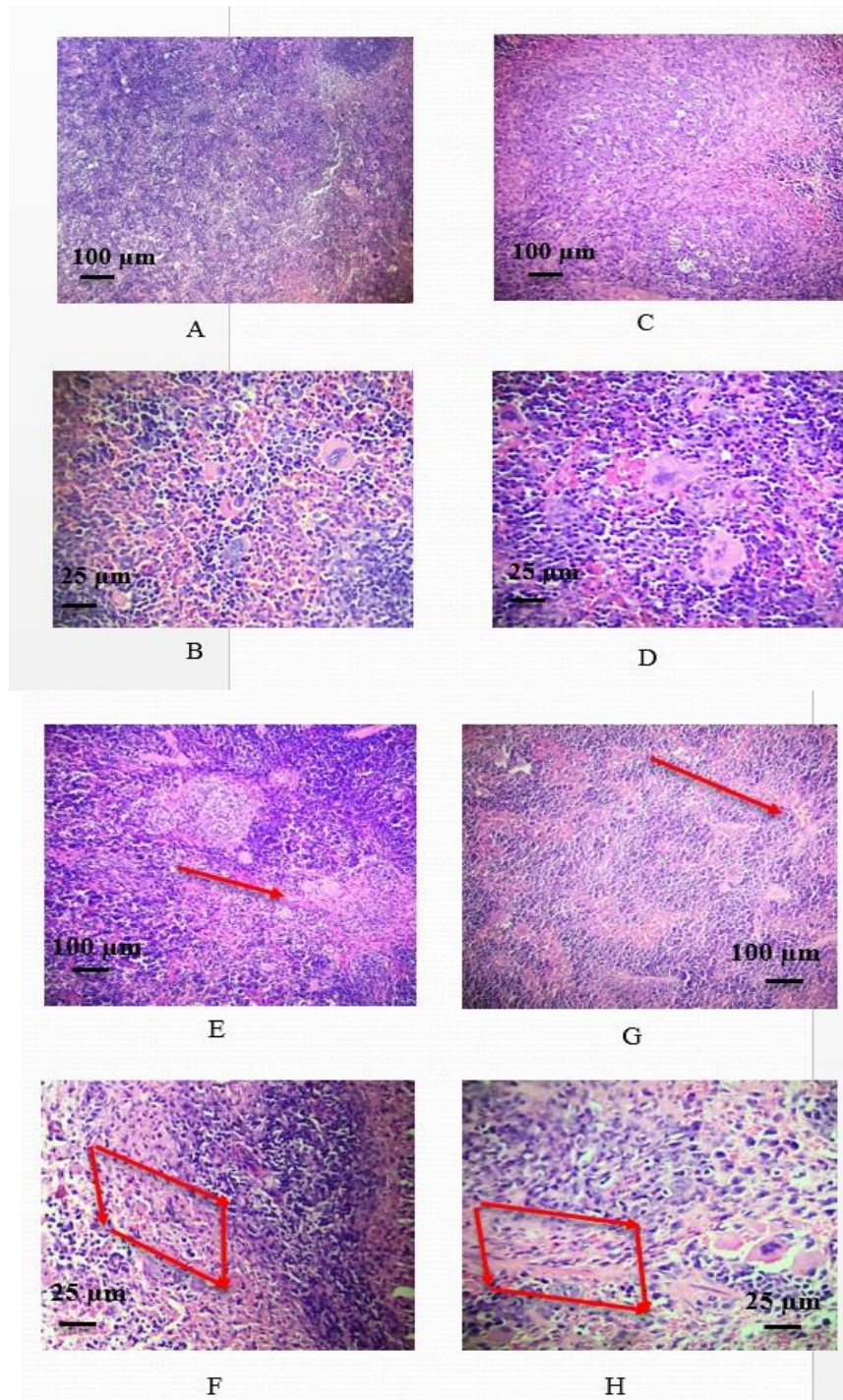
Hình 3.27. Khối lượng của hạch bạch huyết ở các nhóm chuột nghiên cứu sau xạ trị. NIL - nhóm đối chứng sinh học, NC - Đối chứng gây u, IR- chiếu xạ, không điều trị bởi NMPs, IR+Mel: Chiếu xạ, có điều trị NMPs ở mức liều 40 mg/kg. \*, \*\*, khác biệt có ý nghĩa thống kê (Student T-test) và ( $p < 0,05$  và  $p < 0,01$ ) tương ứng của nhóm IR và IR+Mel hay của các nhóm NC và IR.

### 3.3.9. Phân tích cấu trúc mô của một số mô ở các nhóm chuột nghiên cứu có khả năng chịu ảnh hưởng mạnh trong quá trình chiếu xạ

Kết quả giải bệnh mô cho thấy sự tác động mạnh mẽ của tia X lên cấu trúc mô lách của các nhóm chuột. Hình ảnh phân tích mô lách ở các nhóm chuột khác nhau có tình trạng viêm và xơ hóa mô lách ở mức độ khác nhau (hình 3.28). Ở nhóm chuột IR, 100% mẫu mô lách phân tích đều cho thấy tình trạng xơ hóa nặng (5/5 mẫu). Ở nhóm chuột bị chiếu xạ và được điều trị bởi NMPs (IR+Mel), tình trạng xơ hóa ở mô lách được giảm nhẹ ở một số cá thể. Ở nhóm IR+Mel, có 40%

(2/5) cá thể chuột bị xơ hóa nặng và 60% cá thể chuột có tình trạng xơ hóa mô lách ở mức độ vừa và nhẹ.

3.5.9.1. Phân tích mô lách của các nhóm chuột nghiên cứu



Hình 3.28. Hình ảnh mô lách ở các nhóm chuột nghiên cứu ở độ phóng đại 4X (A,C,E,G) và 10X (B,D,F,H).

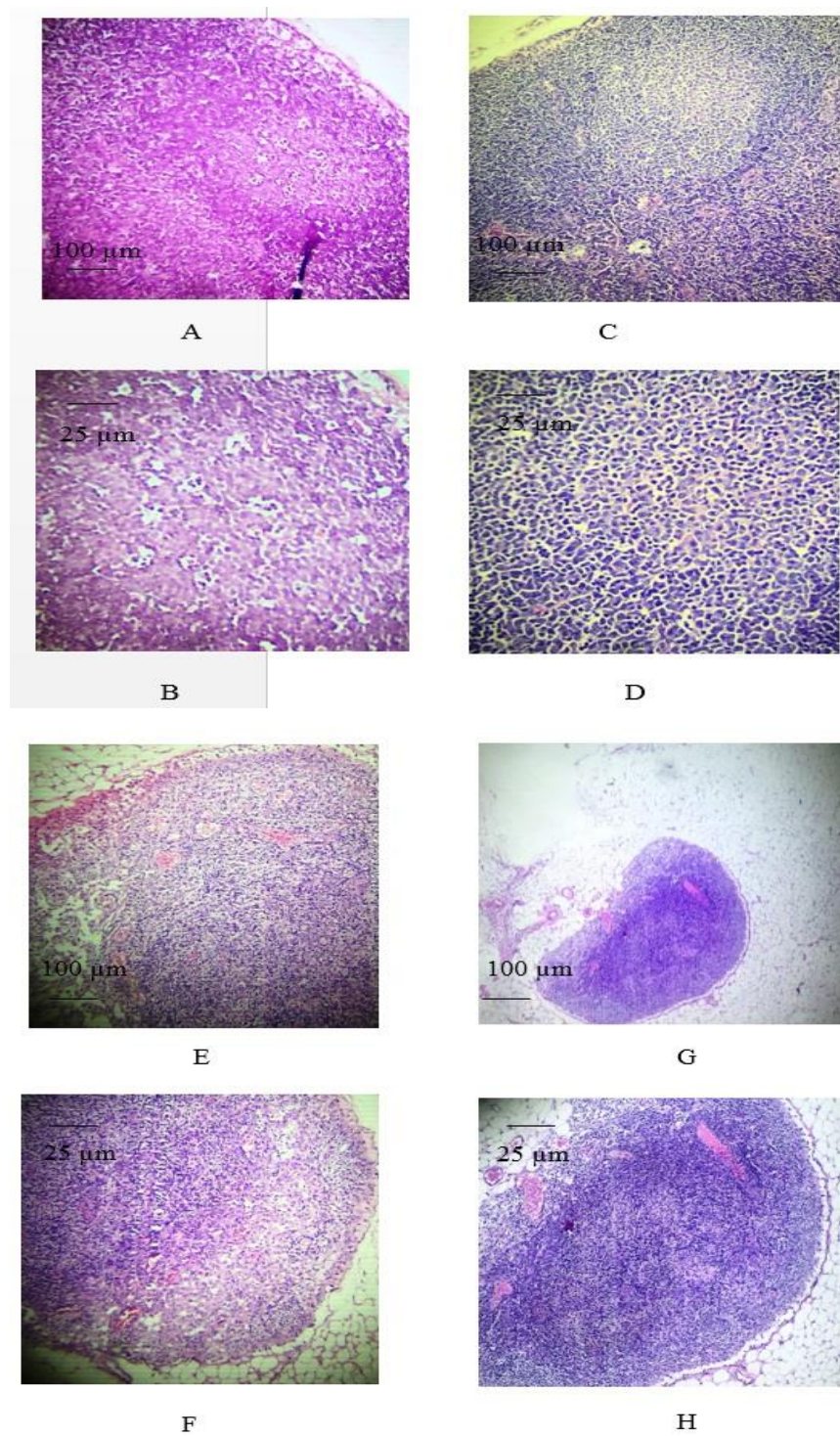
- Mẫu lá lách chuột nhóm NIL (A,B); mẫu lá lách chuột nhóm NC (C,D).
- Mẫu lá lách chuột nhóm IR (E,F); mẫu lá lách chuột nhóm IR+Mel (G,H).
- Đánh dấu bằng ô vuông và mũi tên màu đỏ - phần mô lách chuột bị xơ hóa.

### 3.5.9.2. Phân tích mô hạch bạch huyết của các nhóm chuột

Mỗi hạch bạch huyết được bao quanh bởi bao sợi. Trong đó bên trong mỗi hạch bạch huyết, các nhóm tế bào được chia thành 03 lớp vỏ ngoài và tủy trong. Các hạch bạch huyết bao gồm nhiều tiểu thùy bạch huyết. Các tiểu thùy có cấu trúc 3 chiều phức tạp. Trên bề mặt hạch bạch huyết có hệ thống mao mạch hướng tâm, chảy vào các xoang bạch huyết và hệ thống cấu trúc mao mạch bạch huyết để vận chuyển các tế bào lympho từ các hạch bạch huyết đi vào hệ thống tuần hoàn.

Dưới sự quan sát của kính hiển vi ở các độ phóng đại 4X và 10X, cho thấy, cấu trúc các tế bào lympho có kích thước nhỏ và phân bố đều. Các xoang nang lympho giãn rộng và chứa nhiều tế bào đại thực bào (hình 3.29). Do vậy, có thể thấy, các nhóm chuột gây u được điều trị chiếu xạ tia X ở mức liều chiếu 6 Gy và kết hợp cùng NMPs không quan sát thấy tác động đáng kể lên hình thái của các tế bào của hạch bạch huyết.

Mặc dù khối lượng của các hạch bạch huyết ở các nhóm chuột có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm chuột được nghiên cứu (hình 3.27), tuy nhiên hình ảnh giải phẫu bệnh mô ở các nhóm chuột không có sự khác biệt. Hình ảnh mô giữa các nhóm chuột được chiếu xạ và không chiếu xạ không xuất hiện tình trạng viêm hay có sự khác biệt rõ rệt về hình thái tế bào.



Hình 3.29. Hình ảnh giải phẫu bệnh của mô hạch lympho của các nhóm chuột ở độ phóng đại 10X (A,B,E,F) và 4X (C,D,G,H).

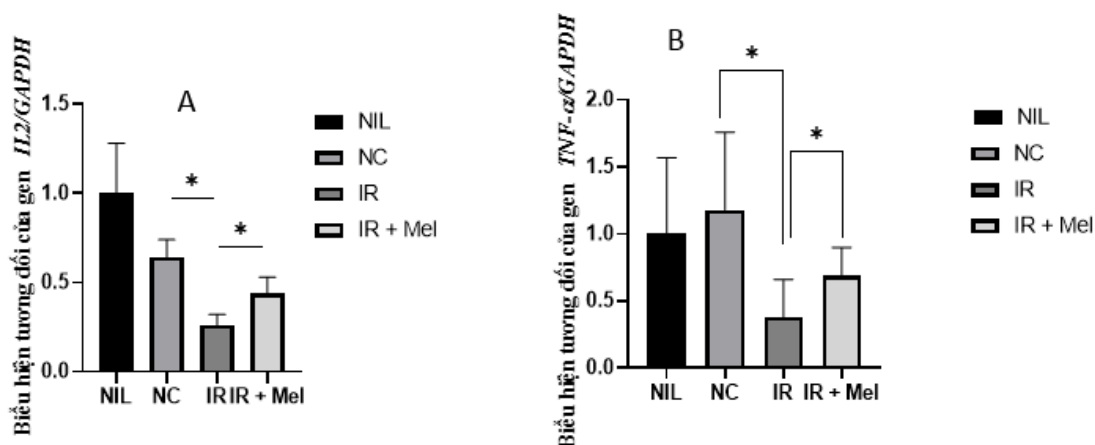
- Mẫu hạch lympho nhóm NIL (A,C); Mẫu hạch lympho nhóm NC (B,D).

- Mẫu hạch lympho nhóm IR (E,G); mẫu hạch lympho nhóm IR+Mel (F,H).

### 3.5.10. Phân tích dấu ấn phân tử của dưới tác dụng của NMPs trong quá trình xạ trị trên mô lách

#### 3.5.10.1. Sự ảnh hưởng của NMPs lên mức độ biểu hiện của *IL-2* và *TNF- $\alpha$* trong mô lách sau xạ trị.

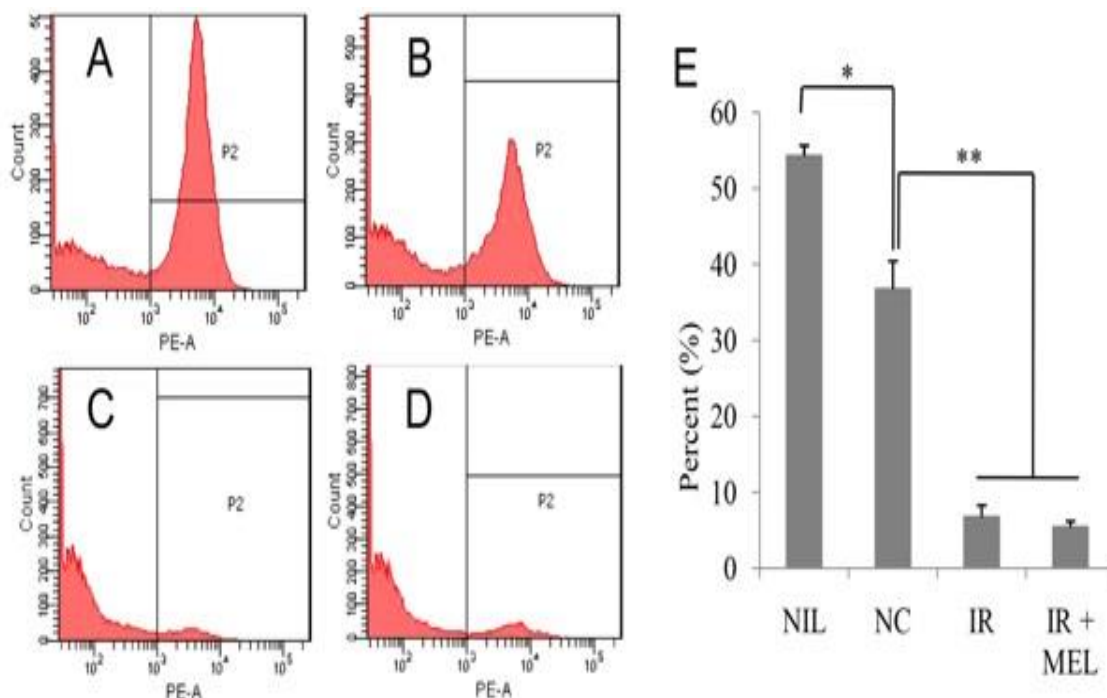
Các cytokine *IL-2* và *TNF- $\alpha$*  có liên quan đến một số quá trình sinh lý bên trong tế bào như apoptosis, quá trình viêm hay các phản ứng miễn dịch. Từ các kết quả phân tích giải phẫu bệnh của mô lách (hình 3.28), có thể nhận thấy, ở các nhóm chuột được chiếu xạ và được điều trị bởi NMPs, mức độ xơ hóa của lá lách được giảm nhẹ. Ở nhóm chuột chỉ được chiếu xạ, 100% các cá thể chuột trong nhóm đều bị tình trạng xơ hóa ở mức độ vừa và nặng. Mức độ xơ hóa mô lách được giảm rõ rệt ở nhóm IR+Mel so với nhóm IR như đã nêu trên.



Hình 3.30. Mức độ biểu hiện của *IL-2* (A) và *TNF- $\alpha$*  (B) trong mô lách sau xạ trị của các nhóm chuột. \*, khác biệt có ý nghĩa thống kê (Student T-test) với  $p < 0,05$  giữa nhóm IR và IR+Mel hay nhóm giữa các nhóm IR và NC.

Để kiểm tra sự thay đổi của các mục tiêu phân tử, mức độ biểu hiện của *IL-2* và *TNF- $\alpha$*  ở mô lách được tính toán bởi phương pháp real-time PCR. Hình 3.30 chỉ ra rằng, ở các nhóm chuột được chiếu xạ, mức độ biểu hiện của *IL-2* và *TNF- $\alpha$*  bị ức chế so với các nhóm không chiếu xạ. Tuy nhiên, ở nhóm chuột được điều trị bởi NMPs có sự phục hồi mức độ biểu hiện các gen *IL-2* và *TNF- $\alpha$*  tương ứng với 1,72 và 2,14 lần so với nhóm IR ( $p < 0,05$ ).

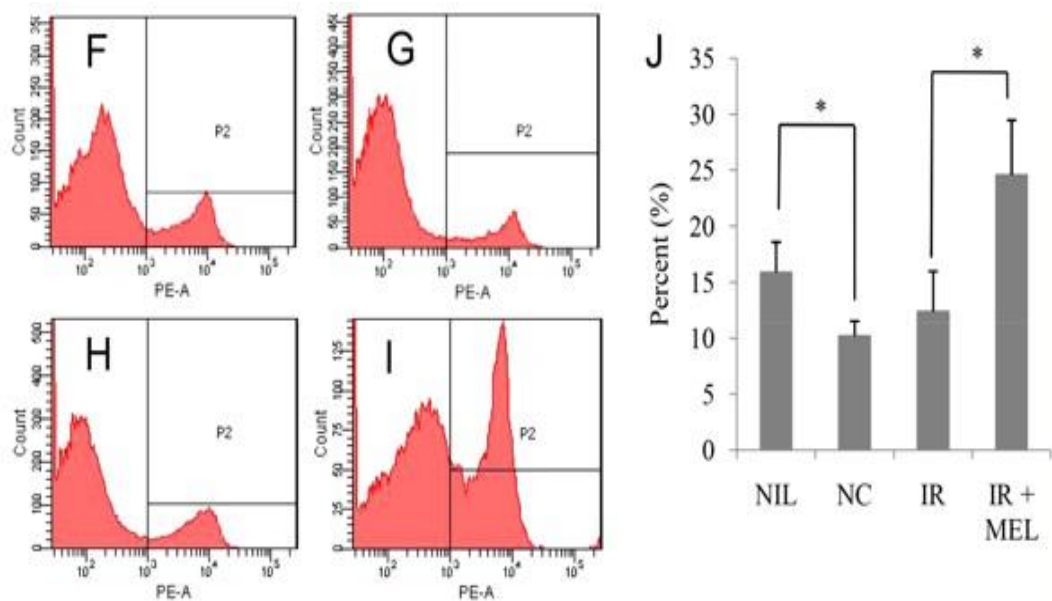
3.5.10.2. NMPs làm tăng tỷ lệ các tế bào miễn dịch ở mô lách chuột sau khi chiếu xạ tia X ở mức liều cao.



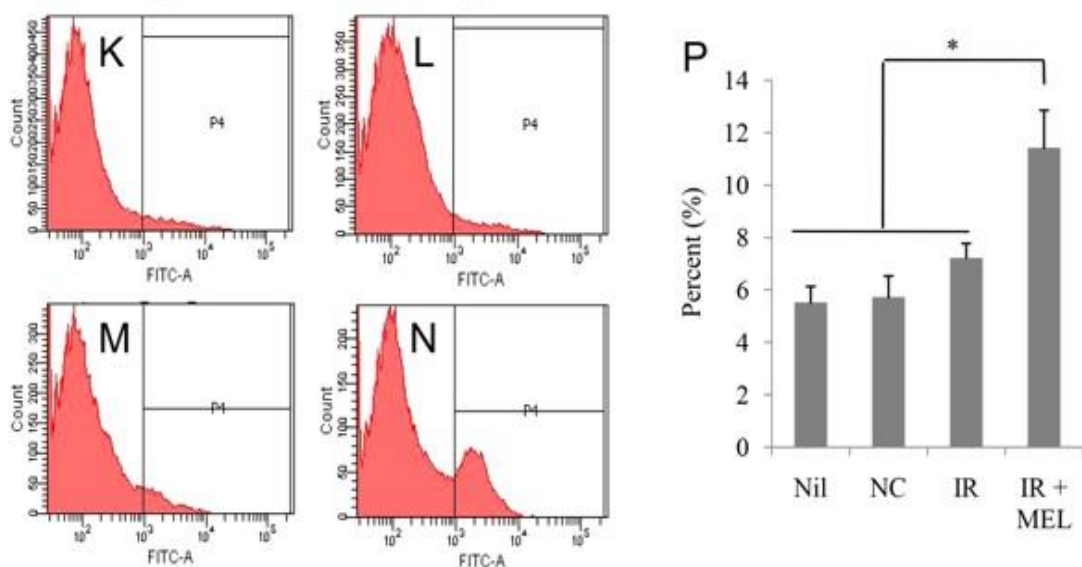
Hình 3.31. Quần thể tế bào B trong lá lách ở các nhóm chuột, NIL (A), NC (B), IR (C) và IR+Mel (D) được xác định bằng phương pháp đo tế bào dòng dòng chảy. Tỷ lệ % tế bào B trong mỗi nhóm chuột được thể hiện ở biểu đồ (E), \*, \*\*, Khác biệt có ý nghĩa thống kê (Student T-test) với  $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ , tương ứng giữa các nhóm NIL và NC hay giữa các nhóm NC và IR hoặc IR+Mel.

Có thể nhận thấy ở hình 3.31, chiếu xạ làm giảm mạnh số lượng tế bào B dưới 10%, trong khi đó, số lượng tế bào B ở nhóm NIL và NC lần lượt 35% và 53%.

Hình 3.31 cho thấy, tế bào B rất nhạy cảm với xạ trị liều cao, tuy nhiên, giữa hai nhóm IR và IR+Mel số lượng tế bào B không có nhiều sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Mặt khác, số lượng tế bào B ở nhóm chuột bị gây u nhưng không được điều trị (NC) thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm NIL ( $p < 0,05$ ). Tế bào T trong lá lách là một trong những quần thể tế bào miễn dịch có vai trò qua trọng trong lá lách. Từ hình 3.32, nhóm chuột NC có số lượng các tế bào T thấp nhất và thấp hơn khoảng 7% so với nhóm chứng ( $p < 0,05$ ).



Hình 3.32. Quần thể tế bào T trong lá lách ở các nhóm chuột NIL (F), NC (G), IR (H) và IR + Mel (I) được xác định bằng phương pháp đo tế bào dòng dòng chảy. Tỷ lệ % tế bào T trong mỗi nhóm chuột được thể hiện ở biểu đồ (E), \*, khác biệt có ý nghĩa thống kê (Student T-test) ( $p < 0,05$ ) giữa các nhóm NIL và NC hay giữa các nhóm IR và IR+Mel.



Hình 3.33. Quần thể tế bào tua trong lá lách ở các nhóm chuột, NIL (K), NC (L), IR (M) và IR + Mel (N) được xác định bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy. Tỷ lệ % tế bào tua trong mỗi nhóm chuột được thể hiện ở biểu đồ (E), \*, khác biệt có ý

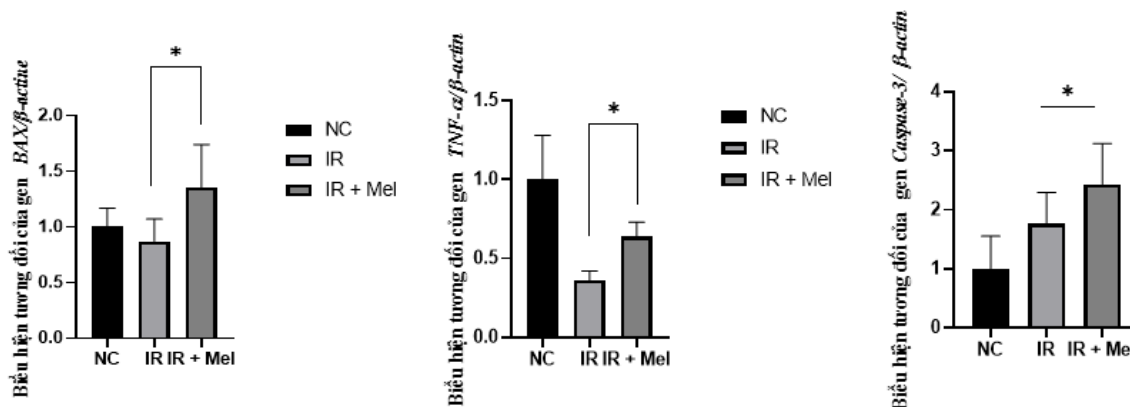
nghĩa thống kê (*Student T-test*) ( $p < 0,05$ ) giữa nhóm IR+Mel và các nhóm còn lại (NIL, NC, IR).

Đây là nhóm chuột bị ung thư nhưng không được điều trị. Ở hai nhóm chuột được chiếu xạ, số các tế bào T trong lách được phục hồi.

Đặc biệt ở nhóm được điều trị bởi NMPs (IR+Mel) có sự tăng số lượng tế bào T lớn nhất, gấp khoảng 1,91 lần so với số lượng tế bào T ở nhóm IR. Sự khác nhau ở hai nhóm này có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ . Tương tự, số lượng tế bào tua (DC) trong lá lách được xác định bằng phương pháp đếm tế bào dòng chảy. Trong lá lách, quần thể tế bào T ở nhóm NIL và nhóm NC có số lượng tương đương nhau và chiếm khoảng 5%.

Chiếu xạ tia X có làm tăng số lượng tế bào T ở nhóm IR, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng. Bên cạnh đó, ở nhóm vừa được điều trị đồng thời bằng tia xạ và NMPs, số lượng tế bào tua có sự tăng vượt trội gấp 1,86 lần so với nhóm IR. Sự khác nhau giữa hai nhóm có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

### 3.5.10.3. NMPs gián tiếp kích hoạt tín hiệu apoptosis trong mô khối u của chuột



Hình 3.34. Mức độ biểu hiện của các gen Bax (A), TNF-α (B), Caspase-3 (C) trong mô khối u của các nhóm chuột nghiên cứu. \*, khác biệt có ý nghĩa thống kê (*Student T-test*) ( $p < 0,05$ ) giữa nhóm IR và IR+Mel.

Mặc dù tác dụng giảm kích thước khối u của NMPs (hình 3.25) không thực sự ấn tượng so với nhóm chứng. Tuy nhiên, chúng tôi tiếp tục khảo sát mức độ biểu hiện một số gen đóng vai trò quan trọng trong việc truyền tín hiệu trong con đường apoptosis trong mô khối u như TNF-α, Bax, Caspase-3. Mức độ biểu hiện gen



*TNF- $\alpha$*  trong mô khối u được chiếu xạ bị ức chế đáng kể so với nhóm chứng không chiếu xạ. Việc giảm mức độ biểu hiện của nó có thể liên quan đến sự tổn thương lá lách sau xạ trị và đây cũng nơi *TNF- $\alpha$*  được sản xuất. Mặt khác, biểu hiện *TNF- $\alpha$*  ở nhóm IR+Mel cao hơn đáng kể (1,84 lần) so với ở nhóm IR ( $p < 0,05$ ). Tương tự, mức độ biểu hiện của *Bax* và *Caspase-3* ở nhóm chuột IR+Mel đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm IR ở trong mô khối u lần lượt là 1,62 và 1,41 lần ( $p < 0,05$ ) ở hình 3.34.

## Chương 4. BÀN LUẬN

### 4.1. TẠO HẠT NMPS

Melanin là nhóm sắc tố phổ biến trong giới động thực vật, qui định màu sắc của da, tóc, lông vũ, và cả màu mắt ở người với nhiều đặc tính sinh học đặc biệt. Ngày nay, melanin được biết đến là một nhóm sắc tố với cấu trúc đa dạng và vô định hình. Melanin là polymer không đồng nhất được tạo ra bởi quá trình oxy hóa các phenol và sự trùng hợp liên tiếp của các phenol trung gian và các quinon tạo nên [Solano F, 2014]. Melanin là một vật liệu đa tác dụng đã được ứng dụng rộng rãi ở nhiều lĩnh vực như y học, dược phẩm, làm đẹp..Tuy nhiên, đặc tính khó tan vẫn là một thách thức đáng kể để ứng dụng các hoạt tính sinh học của nó. Kết quả khảo sát ở bảng 3.1 đã chỉ ra melanin không tan trong rất nhiều dung môi thông thường (nước, methanol, ethanol, diethyl ether, *n*-hexan), acid đặc (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Kết quả này cũng phù hợp với khảo sát về khả năng tan của melanin được Xin Guo và các cộng sự được thực hiện năm 2014 [Guo X, 2014].

Theo các nghiên cứu trước đó, khả năng tan của một hợp chất là khả năng phân tán của chất đó trong dung môi để tạo thành một dung dịch đồng nhất. Tính tan là một trong những đặc tính quan trọng của một hợp chất có hoạt tính sinh dược để ứng dụng làm thuốc điều trị. Bởi vì chỉ khi ở trạng thái được hòa tan, thuốc mới được vận chuyển an toàn trong hệ thống tuần hoàn và đạt được nồng độ cho phép. Hơn nữa, chỉ khi ở trạng thái tan ở vị trí đích, thuốc mới được hấp thu và thể hiện các hoạt tính sinh dược của nó [Savjani K.T, 2012]. Hơn 40% các hợp chất hóa học trong dược phẩm đều không tan trong nước. Chính vì vậy, tăng cường khả năng hòa tan của hợp chất là một mục tiêu nhiều thách thức cho các nhà nghiên cứu để điều chế sản phẩm. Các qui trình công nghệ được nghiên cứu và phát triển nhằm tăng mức độ hòa tan của hợp chất. Đối với melanin, các nghiên cứu trước đó thường sử dụng lyzosome hoặc polymer để bao bọc, đóng gói melanin để tăng khả năng phân tán và tính tan trong dung dịch đậm [Rageh M.M, 2015], [Schweitzer A.D, 2010]. Cách bọc vật liệu trong lớp vỏ để vận chuyển an toàn trong hệ thống tuần hoàn có nhiều ưu điểm, tuy nhiên, nó có nhiều thách thức ở tính bền vững và độ an toàn của

lớp vỏ bọc, đồng thời tỷ lệ vật liệu được bao bọc và không được bao bọc khó kiểm soát dẫn đến có nhiều hạn chế.

Cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học, xu hướng tạo vật liệu kích thước nano là mục tiêu ưu tiên của các nhà nghiên cứu. Melanin ở kích thước rất nhỏ (nanomet) đã cho thấy ưu thế vượt trội trong việc tăng khả năng tan của sản phẩm. Cho đến nay, hầu hết NMPs được ứng dụng ở các lĩnh vực khác nhau đều được tạo nên bằng các con đường tổng hợp hóa học. Quá trình tổng hợp NMPs từ thành phần chính là pDA với enzyme tổng hợp tyrosinase tạo ra các hạt có kích thước nano và các tính chất và đặc tính tương tự như melanin tự nhiên. Tùy thuộc vào mục đích ứng dụng của NMPs, các hạt nano được chế tạo với sự kiểm soát chặt chẽ về mặt kích thước và hình dạng bao gồm các cấu trúc nang rỗng, cấu trúc lõi [Park J, 2019]. Bên cạnh sự tổng hợp các hạt NMPs đơn lẻ, các nghiên cứu còn kết hợp melanin và các phân tử mục tiêu để vận chuyển dễ dàng trong hệ thống tuần hoàn hoặc cải biến cấu trúc, tăng cường chức năng của chúng. Ví dụ như trong nghiên cứu trước đó của Abdelhalim M.A.K và cộng sự, được thực hiện năm 2018, melanin được kết hợp với hạt nano vàng để giảm thiểu quá trình viêm và bị tổn thương oxy hóa ở gan trên mô hình chuột thí nghiệm [Abdelhalim M.A.K, 2018]. Trong quá trình xạ trị ung thư, hạt nano vàng hấp thụ tia xạ cùng với melanin để chuyển hóa thành nguồn nhiệt năng lớn để tiêu diệt tế bào ung thư trong khối u.

Trong nghiên cứu này, các hạt NMPs được chế tạo ở kích thước 80-200 nm. Melanin được tách từ dịch mực của túi mực bị phá vỡ cấu trúc polymer bền vững của nó bằng các dung môi kiềm để chuyển về kích thước 80–200 nm, mà không cần sự hỗ trợ của vỏ bọc polymer và hoặc liposome (hình 3.6). Đây là kích thước hạt phù hợp cho mục tiêu ứng dụng tính chất hấp thụ quang nhiệt của NMPs, tương tự với các nghiên cứu báo cáo trước đó [Park J, 2019]. Hơn nữa, theo nghiên cứu trước đây, kích thước hạt NMPs nhỏ hơn 200 nm là phù hợp với các thí nghiệm trên mô hình tế bào và mô hình chuột thí nghiệm [Kiran G.S, 2017]. Vì vậy, sự hình thành các hạt NMPs có thể làm tăng các đặc tính có lợi bao gồm khả năng hòa tan, sự phân bố hiệu quả bên trong hệ thống tế bào và cơ thể để tăng hiệu quả trong việc

hấp thụ tia bức xạ. Mặc dù melanin có mặt hầu hết trong các sinh vật sống, tui mực là một trong những nguồn melanin tự nhiên cơ bản nhất được tìm thấy cho các mục tiêu nghiên cứu và ứng dụng. Tui mực là rác thải sinh học từ các nhà máy chế biến thủy hải sản. Trong dịch mực chứa khoảng 17-20% sắc tố melanin tùy thuộc vào phương pháp tách chiết hiện nay. Melanin được tách ra từ tui mực có thành phần chủ yếu eumelanin chiếm 98% ở *spea officinalis* [Guo X, 2014], [Magarelli M, 2010].

Phân tích hình thái bề mặt ở mức độ vi mô của melanin bằng kính hiển vi điện tử SEM ở độ phóng đại 25.000 lần và 50.000 lần (hình 3.1A, B) cho thấy, cấu trúc bề mặt phức tạp của melanin. Bề mặt melanin được cấu tạo từ những hình khối cầu, có kích thước khá tương đồng xếp gần nhau. Chúng tạo nên bề mặt có những khoảng trống về mặt không gian. Những khoảng không này có thể có vai trò trong việc tạo nên tính chất hấp thụ của melanin được nghiên cứu trước đó [Cuong A.M, 2018]. Đây là một trong những đặc trưng quan trọng của vật liệu. Melanin được tách từ các nguồn tự nhiên thường có cấu trúc hoàn chỉnh và hoạt tính sinh học cao. Tuy nhiên, melanin thường được hình thành trong các tế bào melanosome, bao quanh bởi các cấu trúc màng bền vững, các protein, chất béo và nhiều thành phần khác. Việc tách chiết, tinh sạch tương đối khó khăn và qua nhiều giai đoạn trung gian, dễ dẫn đến ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của sản phẩm cuối cùng.

Melanin được tổng hợp bằng phương pháp hóa học được sử dụng rộng rãi trong những năm gần đây. So sánh với việc tách chiết từ các nguồn tự nhiên có sẵn, tổng hợp melanin từ các hợp chất hóa học diễn ra dễ dàng, nhanh chóng hơn và có thể đáp ứng được số lượng lớn. Trong tổng hợp hóa học, thành phần chính của nó là polydopamine và được tổng hợp thông qua quá trình trùng hợp oxy hóa dopamine. Dopamine có chung một số đặc tính tương tự melanin tự nhiên do chúng có các nhóm chức năng tương đồng [Solano F, 2017]. Ba phương pháp thường dùng để tổng hợp polydopamine: sử dụng dung dịch oxy hóa, enzyme oxy hóa và trùng hợp điện. Quá trình sử dụng dung dịch oxy hóa thường được sử dụng trong điều kiện pH kiềm và tự trùng hợp các monomer thành polymer. Enzym xúc tác quá trình trùng

hợp tạo polydopamine là L-tyrosinase. Quá trình trùng hợp điện sử dụng dòng điện electron để tạo nên sự trùng hợp polymer từ các monomer trên điện cực. Mặc dù có sự nỗ lực để mô phỏng các cấu trúc tự nhiên của melanin, tuy nhiên, phương pháp tổng hợp hóa học thường tạo nên sự thay đổi cấu trúc và chức năng sinh học của melanin tổng hợp. Sự nghiên cứu các đặc tính sinh học của melanin có nguồn gốc từ vi sinh vật đã được công bố bởi nhiều nhà khoa học. Tuy nhiên, việc sử dụng các vi sinh vật để sản xuất melanin chỉ được chú ý trong thời gian gần đây. Đây là một trong những hướng nghiên cứu hứa hẹn nhiều tiềm năng với giá thành rẻ, thân thiện với môi trường và có thể tạo ra melanin số lượng lớn và giữ được những đặc tính sinh học của nó như là melanin tự nhiên [Tran-Ly A.N, 2020].

Hình 3.2, 3.3, 3.4 chỉ ra rằng, có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tạo hạt NMPs từ melanin, trong đó, các điều kiện như nồng độ alkaline, pH, nhiệt độ, tốc độ khuấy từ ảnh hưởng trực tiếp đến hàm lượng của NMPs được hòa tan. Kích thước của hạt, độ phân tán trong dung dịch và hàm lượng NMPs tạo ra còn phụ thuộc rất lớn vào nồng độ và bản chất của dung môi alkaline sử dụng (hình 3.2 A,B). Ở trong môi trường kiềm có nồng độ thấp ( $\leq 1N$ ), các hạt NMPs được tạo ra có kích thước nhỏ và độ phân tán tốt hơn so với trong môi trường kiềm ở nồng độ cao ( $> 1N$ ). Kết quả khảo sát đã chỉ ra trong dung dịch NaOH ở nồng độ 0,5N, lượng NMPs được tạo ra lớn nhất. Hơn nữa, kích thước và độ phân tán của NMPs trong môi trường NaOH ở các nồng độ 0,1N; 0,5N; 1N, 3N tốt hơn trong môi trường  $NH_4OH$  có cùng các nồng độ tương ứng (hình 3.2.B).

Phương pháp đo hồng ngoại xa FTIR là phương pháp để xác định đặc trưng liên kết vô cơ-hữu cơ của vật liệu. Hình ảnh phổ của các nhóm chức năng trên bề mặt của melanin được phân tích bởi phổ hồng ngoại xa FTIR, được mô tả ở hình 3.1C. Trong đó, phổ giao động của các vùng chứa các nhóm chức năng cacboxyl ( $COO^-$ ), hydroxyl (OH), cacbonyl ( $C=O$ ) được thể hiện rõ nét. Các kết quả này tương tự với nghiên cứu trước đó về đặc trưng của vật liệu eumelanin có nguồn gốc từ tảo mực [Liu H, 2020], [Solano F, 2014]. Phổ FTIR của NMPs (hình 3.7C) đã khẳng định sự có mặt của các nhóm chức năng tương tự như đối với melanin ở hình 3.1C. Sự có

mặt của các nhóm chức hóa học bao gồm cacboxyl (-COO-), hydroxyl (-OH), cacbonyl (-C=O), có khả năng cho electron là một trong các yếu tố quyết định hoạt tính kháng oxy hóa của melanin và NMPs như nhiều công bố đã khảo sát trước đó. Có thể nhận thấy, trên bề mặt của melanin và NMPs có nhiều liên kết  $\pi$ - $\pi$ . Đây là nhóm liên kết gợi ý đến khả năng của melanin có thể tương tác với nhiều loại thuốc và hợp chất hóa học có đặc tính khó tan để tạo thành phức hợp vận chuyển trong hệ thống tuần hoàn. Do vậy, NMPs còn được nghiên cứu để phát triển phức hệ vận chuyển một số thuốc điều trị ung thư hướng đích như camptothecin, doxorubicin, hydroxycamptothecin để tăng cường hiệu quả điều trị [Liu H, 2020].

Xạ trị được sử dụng rộng rãi cho các bệnh nhân ung thư, tuy nhiên các tác dụng phụ nghiêm trọng cấp tính và mãn tính là vấn đề khó giải quyết triệt để trong nhiều thập kỷ. Phát triển, nghiên cứu các hợp chất có khả năng bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ là một trong những mục tiêu nghiên cứu, nhằm bảo vệ các tế bào lành trước tác hại của xạ trị. Các loại thuốc bảo vệ bức xạ được phân thành 03 nhóm: nhóm chất bảo vệ bức xạ, nhóm chất giảm nhẹ bức xạ và nhóm chất điều trị. Chất bảo vệ bức xạ bảo vệ tế bào khỏi bị hư hại trong quá trình chiếu xạ bằng cách tăng cường hoạt động chống oxy hóa để loại bỏ các dạng oxy phản ứng được sinh ra sau xạ trị [Singh V.K, 2016]. Các chất giảm thiểu bức xạ thường được sử dụng sau khi chiếu xạ, nhưng trước khi xuất hiện các triệu chứng tác dụng phụ, để thúc đẩy quá trình sửa chữa DNA và kích hoạt các hệ thống oxy hóa khử. Thuốc điều trị bức xạ được sử dụng trong trường hợp sau khi xuất hiện các triệu chứng tác dụng phụ [Citrin. D, 2010]. Cho đến nay, một số hợp chất được FDA chấp thuận để sử dụng trong lâm sàng, như amifostine, filgrastim, pegfilgrastim và sargramostim [Mishra K.N, 2017] cho mục tiêu bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ .

Trong nghiên cứu được công bố trước đó của Rageh M.M và các cộng sự, đặc tính bảo vệ các tế bào máu sau chiếu xạ tia gamma của NMPs được thử nghiệm trên mô hình chuột. Ngoài ra, Schweitzer D.A cùng các cộng sự đã thử nghiệm khả năng bảo vệ tủy xương của NMPs sau xạ trị ung thư trên mô hình *in vivo*. NMPs được xem là một hợp chất có tiềm năng bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ được ghi

nhận bởi nhiều nghiên cứu. Hoạt tính chống oxy hóa của melanin và NMPs cũng được báo cáo ở nhiều nghiên cứu trước đó. Hoạt tính kháng oxy hóa của melanin được xác định bằng phương pháp sử dụng DPPH (1.1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu. Theo báo cáo Kumar C. G năm 2011, IC<sub>50</sub> của melanin được tách từ *Aspergillus bridgeri* ICTF-201 khoảng 54,12 µg/mL. Ngoài ra, một nghiên cứu khác đã tính toán giá trị IC<sub>50</sub> của melanin tách từ túi mực trong khoảng 60-80 µg/mL [Kumar C.G, 2011], [Rageh M.M, 2015], [Kunwar A, 2012], [Schweitzer D.A, 2010].

Như đã phân tích ở trên, melanin được nghiên cứu trên thực nghiệm về khả năng bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ cùng với hoạt tính chống oxy hóa của nó. Tuy nhiên, vai trò sinh học của melanin trong xạ trị ung thư chưa được công bố nhiều trong các nghiên cứu cơ bản và nghiên cứu định hướng ứng dụng. Đặc biệt là chưa có nghiên cứu nào về khả năng bảo vệ của melanin kích thước nano đối với tế bào thường và mô lành ở các vùng lân cận khối u cũng như các vùng khác xa hơn trong toàn bộ cơ thể trong quá trình xạ trị tia X. Khi chiếu xạ, khối u sẽ được nhận phần lớn năng lượng của tia xạ một cách trực tiếp, tuy nhiên những vùng mô lân cận mô khối u và những vùng khác xa hơn cũng sẽ bị ảnh hưởng vì các tế bào ung thư thường phát triển xâm lấn vào vào mô thường và di căn. Đồng thời, các hiệu ứng tác động gián tiếp của bức xạ (bystander effect) khiến cho các tế bào, cơ quan nằm ở vị trí xa mục tiêu chiếu xạ đều bị ảnh hưởng. Do đó việc tăng cường và phân bố các hạt NMPs ở các vùng lân cận mô khối u cũng như ở những vùng khác xa hơn trong cơ thể sẽ giúp bảo vệ tế bào thường và mô lành của cơ thể một cách hiệu quả thông qua khả năng hấp thụ tia xạ của nó và sẽ góp phần làm giảm tác dụng phụ của tia xạ trong quá trình xạ trị ung thư.

Trong nghiên cứu này, khả năng tác động lên chức năng sinh lý của tế bào của NMPs được xem xét. Các nghiên cứu về khả năng bảo vệ trước tia X đối với các tế bào thường và mô lành trên mô hình *in vitro* và *in vivo* khi được bổ sung NMPs được khảo sát.

## 4.2. KHẢO SÁT KHẢ NĂNG BẢO VỆ TẾ BÀO DƯỚI TÁC ĐỘNG CỦA TIA X

### 4.2.1 Khảo sát một số tác động của NMPs lên chức năng sinh lý của tế bào trên mô hình *in vitro*

#### 4.2.1.1. Độc tính của NMPs trên mô hình *in vitro* và khả năng gây lão hóa tế bào nội mô của NMPs.

Hạt NMPs được thử nghiệm khả năng bảo vệ tế bào thường trên mô hình *in vitro*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thử nghiệm độc tính trên 03 dòng tế bào thường HaCaT, NIH 3T3, hUVEC. Kết quả thử nghiệm cho thấy ở dải nồng độ NMPs  $\leq 100$   $\mu\text{g/mL}$ , giá trị  $\text{IC}_{50}$  của NMPs tế bào HaCaT và NIH 3T3 lần lượt là 53 và 39  $\mu\text{g/mL}$  (hình 3.9) và không xác định được giá trị  $\text{IC}_{50}$  trên dòng nội mô với dải liều  $\leq 100$   $\mu\text{g/mL}$ . Theo các báo cáo trước đó, một hợp chất có giá trị  $\text{IC}_{50}$  nằm trong khoảng 10 - 100  $\mu\text{g/mL}$  được đánh giá có mức độ độc tính ở mức trung bình [Phongpaichit S, 2007].

Sự lão hóa là một quá trình sinh lý bình thường xảy ra bên trong tế bào động vật. Có nhiều yếu tố tác động có thể thúc đẩy nhanh quá trình này bao gồm nồng độ các dạng oxy phản ứng (ROS), các tác nhân hóa học, vật lý. Khả năng gây lão hóa của tế bào là một trong các chỉ số để xác định sự tương tác và tác dụng phụ của một số loại dược phẩm. Trong nghiên cứu này, NMPs được sử dụng ở mức liều 25 và 50  $\mu\text{g/mL}$  để đánh giá khả năng gây lão hóa lên tế bào nội mô. Kết quả nghiên cứu cho thấy, NMPs không gây lão hóa tế bào ở các nồng độ thuốc thử nghiệm.

#### 4.2.1.2. Khả năng ức chế sự làm lành vết thương của tế bào nội mô và hình thành mạch ở nhóm tế bào được điều trị bởi NMPs

Sự làm lành vết thương là một quá trình sinh học phức tạp bao gồm nhiều nhân tố tham gia vào quá trình này như cầm máu, kháng viêm, tăng sinh và tái tạo [Guo. S, 2010]. Tế bào nội mô có nguồn gốc từ trung bì. Tế bào nội mô tham gia vào cấu trúc thành mạch máu và hình thành một lớp màng lót bên trong thành mạch. Tế bào nội mô có nhiều vai trò trong hệ thống tuần hoàn của cơ thể. Bên cạnh chức năng như là một màng bán thấm chọn lọc, tế bào nội mô còn tham gia vào các quá trình phản ứng miễn dịch, đông máu, điều hòa tăng trưởng, sản xuất các thành phần chất



nền ngoại bào, và điều chỉnh lưu lượng máu và trương lực mạch máu [Sumpio B.E]. Hơn nữa, tế bào nội mô còn là thành phần chính trong quá trình hình thành mạch máu. Ngoài ra, yếu tố tăng trưởng nội mô (*VEGF-A*) được xem là yếu tố quan trọng then chốt có vai trò điều hòa quá trình hình thành mạch máu.

Trong nghiên cứu này, ở hình 3.10 cho thấy, NMPs không có khả năng gây ức chế sự di chuyển của tế bào nội mô sau 72 h trong quá trình lành vết thương ở các mức liều 25 và 50  $\mu\text{g/mL}$ . Tuy nhiên NMPs có khả năng ức chế nhẹ quá trình liền thương ở tế bào nội mô ở mức liều cao là 75  $\mu\text{g/mL}$ . Bên cạnh đó, NMPs còn có vai trò làm giảm số lượng mạch máu được hình thành so với đối chứng (hình 3.11 E). Mặt khác, mức độ biểu hiện gen *VEGF-A* - một trong những nhân tố cảm ứng chính có vai trò điều hòa quá trình hình thành mạch máu - ở những giếng được bổ sung bởi NMPs được cho là có thể liên quan đến quá trình ức chế hình thành mạch máu (hình hình 3.13). Khối ung thư được hình thành và phát triển xâm lấn vào các mô lân cận cần có hệ thống mạch máu cung cấp chất dinh dưỡng nuôi khối u. Mặc dù, hoạt tính kháng ung thư của melanin được ghi nhận bởi một số nghiên cứu trước đó, tuy nhiên, mức độ độc tính của melanin tổng hợp và cả melanin tách từ thực vật đối với các tế bào ung thư là không đáng kể với giá trị  $\text{IC}_{50}$  thường lớn hơn 50  $\mu\text{g/mL}$  [Gabriele V.R, 2021], [El-Obeid A, 2020]. Trong nghiên cứu này, sự ức chế sự di chuyển của tế bào và hình thành mạch máu ở tế bào nội mô gợi ý đến khả năng của NMPs có thể ức chế sự phát triển khối u thông qua ngăn cản hình thành mạng lưới mạch máu nuôi khối u.

Ngoài ra, các tác động cộng gộp của của melanin và các bức xạ ở vùng ánh sáng khả kiến (visible light) làm tăng khả năng tiêu diệt tế bào ung thư được khảo sát trên các dòng tế bào như Hela cells, A375 đã được báo cáo bởi Gabriele V.R và các cộng sự [Gabriele V.R, 2021].

#### **4.2.2 Đánh giá khả năng bảo vệ tế bào của NMPs dưới tác động của tia X**

##### *4.2.2.1. Khả năng bảo vệ tế bào lành của NMPs sau chiếu xạ tia X*

Chúng tôi thử nghiệm khả năng bảo vệ tế bào của NMPs dưới tác dụng của tia xạ. Ở hình 3.15, các tế bào hUVEC, NIH 3T3, HaCaT đều nhạy cảm với tia X ở

cường độ chiếu xạ liều cao. Ở hình 3.16 cho thấy NMPs có khả năng bảo vệ tế bào chọn lọc đối với các tế bào khác nhau sau xạ trị. Khi chiếu xạ ở mức liều 5-10 Gy, tỷ lệ các tế bào bị chết sau 72h giao động trong khoảng 75-92%. Do đó chúng tôi lựa chọn dải nồng độ liều chiếu xạ từ 0-5 Gy để phân tích các dấu ấn phân tử của tế bào xảy ra sau quá trình xạ trị. Mặt khác, tế bào keratinocyte được phân lập từ da người, là dòng tế bào thường được sử dụng để làm mô hình *in vitro* để thử nghiệm một số loại dược liệu có tiềm năng bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ như fucoidan [Fernando I.P.S, 2020]. Bởi vì, da là cơ quan đầu tiên tiếp xúc với tia xạ và bị ảnh hưởng trực tiếp bởi quá trình chiếu xạ. Chúng tôi tiếp tục phân tích các dấu ấn sinh học phân tử, tế bào trên dòng tế bào HaCaT. Hơn nữa, NMPs ở mức liều 0-12  $\mu\text{g/mL}$  không gây chết tế bào trên dòng HaCaT, do đó, chúng tôi lựa chọn liều điều trị ở nồng độ 10  $\mu\text{g/mL}$  để phân tích những thay đổi của mức độ biểu hiện gen mã hóa một số protein quan trọng liên quan đến quá trình apoptosis và gen mã hóa enzyme có hoạt tính chống oxy hóa.

#### 4.2.2.2. Những dấu ấn phân tử thay đổi của tế bào dưới tác động của tia xạ trên mô hình *in vitro*

Mặc dù nhiều tính chất khác nhau của melanin đã được biết đến, tuy nhiên, tiềm năng bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ của melanin là một trong những đặc điểm chính đang được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm. Cho đến nay, hầu hết các ứng dụng của hạt NMPs ở các mảng điều trị, mô phỏng sinh học, thần kinh học và cảm biến sinh học đều được tổng hợp nhân tạo bằng enzyme tyrosinase. Trong nghiên cứu này, NMPs được tạo nên từ nguồn nguyên liệu có nguồn gốc từ túi mực và được đưa về kích thước hạt nano từ khoảng 80-200 nm (hình 3.7C). Melanin kích thước nano đã làm tăng mức độ tan và phân tán của hạt trong hệ đệm. Tế bào keratinocytes (HaCaT) được biệt hóa từ các tế bào da người thường được sử dụng làm mô hình nghiên cứu hiệu quả của các hợp chất có khả năng bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ. Bởi vì, da là cơ quan đầu tiên tiếp nhận và chịu ảnh hưởng trực tiếp trong quá trình xạ trị mà nguồn phát xạ được để ở bên ngoài cơ thể. Nghiên cứu này sử dụng tế bào HaCaT để khảo sát sự thay đổi của các dấu ấn phân tử dưới sự bổ

sung hoặc không bổ sung NMPs sau quá trình xạ trị bằng tia X. Năng lượng tia xạ phá hủy tế bào. Tuy nhiên trong trường hợp liều lượng được kiểm soát ở mức độ nhất định, xạ trị có khả năng thúc đẩy quá trình chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào [Li M.Y, 2017]. Apoptosis là một quá trình thiết yếu của tế bào trong cơ thể sống. Trong quá trình này, các tế bào già, rối loạn chức năng hay bị tổn thương sẽ được phân mảnh và tiêu hóa bởi quá trình thực bào để giảm thiểu tình trạng gây viêm cho các tế bào lân cận trước khi các thành phần bên trong tế bào bị vỡ tràn ra môi trường xung quanh. Do đó, quá trình chết rụng giúp cơ thể thay thế một tế bào hư hỏng bởi một tế bào khác khỏe mạnh mà không gây tổn thương cho các cấu trúc lân cận. Quá trình chết rụng này được kiểm soát bởi các con đường tín hiệu tế bào khác nhau và được điều hòa bởi các họ protein như Bcl-protein, Bax protein và các caspase. Theo các nghiên cứu trước đây đã báo cáo, xạ trị thúc đẩy quá trình chết rụng của tế bào tùy thuộc vào liều lượng và sự nhạy cảm của bức xạ đối với các loại tế bào. *TNF- $\alpha$*  khởi đầu kích hoạt con đường apoptosis ở thụ thể *TNF- $\alpha$* , sau đó hoạt hóa chuỗi các Caspase trung gian như *Caspase-7*, *Caspase-3* để kích hoạt quá trình apoptosis. Trong trường hợp này, các gen mã hóa các protein quan trọng đóng vai trò then chốt kích hoạt quá trình apoptosis của tế bào như *Bax*, *Caspase-3* sẽ tăng cường sao mã và dịch mã [Verheij, 2000].

Kết quả nghiên cứu ở hình 3.17, 3.19, 3.20 cho thấy, sau khi chiếu xạ, có sự tăng cường mức độ biểu hiện của các gen mã hóa protein *Bax*, *Caspase-3*, *TNF- $\alpha$*  khi tế bào tiếp xúc với tia X ở mức liều chiếu xạ 3 Gy và 5 Gy so với các đối chứng không chiếu xạ. Ở nhóm được điều trị bởi NMPs, mức độ phiên mã của các gen này thấp hơn so với nhóm không bổ sung thuốc (IR). Sự phiên mã thấp của các gen quan trọng có thể liên quan đến tỷ lệ tế bào chết apoptosis của nhóm được điều trị (IR+mel) so với đối chứng (IR). Sự khác biệt về mức độ biểu hiện của các gen này đều có ý nghĩa thống kê  $p < 0,01$ . Kết quả này phù hợp với kết quả phân tích tỷ lệ tế bào apoptosis bằng phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy. Trong đó, có thể nhận thấy tỷ lệ tế bào apoptosis ở nhóm IR+Mel ít hơn so với nhóm IR (hình 3.21H). Kết quả ở hình 3.21I cho thấy, một số lượng tế bào lớn đã bị chết hoại tử

(necrosis). Ở nhóm tế bào IR+Mel, tỷ lệ tế bào chết hoại tử có giảm đáng kể so với nhóm IR. Điều này cho thấy, NMPs đã có hiệu quả trong việc bảo vệ tế bào HaCaT sống sót dưới tác dụng chiếu xạ liều cao bởi tia X.

Ngoài ra, quá trình chiếu xạ sản sinh một số lượng lớn các dạng oxy phản ứng bên trong tế bào. ROS là những phân tử có trạng thái không ổn định gây ra stress oxy hóa và có khả năng tấn công các thành phần khác tế bào. Các ROS tấn công DNA, protein và làm rối loạn trong quá trình trao đổi chất của tế bào [Su L.J, 2019]. SOD1 là một enzyme có khả năng xúc tác chuyển hóa superoxide thành hydro peroxide và oxy phân tử. Đây là enzyme chống oxy hóa thiết yếu bên trong tế bào để giữ cân bằng nội mô [Bunton-Stasyshyn R.K, 2015] . Kết quả nghiên cứu ở hình 3.20 cho thấy, chiếu xạ ở mức liều 3 Gy có thể kích hoạt gen mã hóa cho các enzym *SOD1*, có vai trò quan trọng trong việc bảo vệ chống lại stress oxy hóa. Mức độ phiên mã của *SOD1* ở nhóm IR thấp hơn đáng kể so với nhóm IR+Mel, với sự khác biệt có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ). Mức độ biểu hiện cao hơn của các gen mã hóa enzym chống oxy hóa ở nhóm IR+Mel có thể liên quan đến hoạt tính kháng oxy hóa của NMPs. Hơn nữa, khả năng hấp thụ bức xạ và các đặc tính chống oxy hóa của NMPs giúp tăng cường khả năng sống sót của tế bào khi phơi nhiễm bức xạ ở liều 3 Gy và giảm tỷ lệ tế bào hoại tử, chết apoptosis đáng kể như kết quả ở hình 3.21 I,H,K.

#### 4.3. KHẢ NĂNG BẢO VỆ CHUỘT MANG KHÓI UNG THƯ TRƯỚC TÁC ĐỘNG CỦA TIA X CỦA NMPS

##### 4.3.1. Sự ảnh hưởng của một số mô cơ quan dưới tác động của tia xạ.

Lá lách là cơ quan của hệ thống miễn dịch đóng vai trò quan trọng trong phản ứng miễn dịch bẩm sinh và thích ứng của cơ thể. Lá lách được bao bọc trong nang mô liên kết dày. Phía trong lá lách gồm hai loại mô có màu trắng và màu đỏ, không phân tách thành từng vùng và nằm xen kẽ lẫn nhau và có chức năng riêng biệt. Phần mô trắng có liên quan đến quá trình trưởng thành của bạch cầu, đặc biệt là các tế bào lympho (B và T) và sản xuất kháng thể. Tủy đỏ chứa các mạch máu rộng và các sợi mô liên kết. Các mô ở tủy đỏ thực hiện các chức năng loại bỏ hồng cầu già hoặc mảnh vỡ tế bào. Bên trong tủy đỏ có chứa các đại thực bào để tiêu diệt vi khuẩn hay

vi rút xâm nhập vào cơ thể [Chaudhry S.R, 2021]. Trong xạ trị toàn thân trên chuột, tất cả các mô cơ quan của cơ thể chịu ảnh hưởng trực tiếp và gián tiếp của năng lượng tia xạ. Lá lách là một trong các cơ quan chịu tác động nặng nề nhất bởi tia xạ, dẫn đến sự giảm kích thước, khối lượng, cũng như số lượng các tế bào miễn dịch được tạo ra bởi mô lá lách [Zhao L, 2015], [Rageh M.M, 2015], [Kunwar A, 2012]. Trong thời gian gần đây, liệu pháp miễn dịch là một trong những phương pháp điều trị ung thư tiềm năng được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm. Trong đó, việc tăng cường các quần thể tế bào miễn dịch như tế bào lympho T và tế bào tua (DC) đóng vai trò quan trọng trong việc ức chế sự phát triển của tế bào ung thư [Shang N, 2017].

Bên cạnh lá lách, hạch bạch huyết cũng là cơ quan chịu ảnh hưởng trực tiếp của chiếu xạ. Trong nghiên cứu này, tuy số lượng hạch bạch huyết giảm ở các nhóm chuột sau xạ trị, tuy nhiên cấu trúc mô của hạch bạch huyết không có sự thay đổi giữa các nhóm chuột được chiếu xạ và không chiếu xạ.

Ure và creatinin là hai chỉ số thường được sử dụng để kiểm tra khả năng hoạt động bình thường của thận. Trong quá trình trao đổi chất ở cơ thể, ure và creatinin là các sản phẩm cuối cùng của quá trình trao đổi chất có nito. Ure là chất chuyển hóa chính xuất phát từ các protein có trong chế độ ăn và sự luân chuyển protein trong mô. Creatinin là sản phẩm dị hóa creatinine ở cơ. Hai phân tử ure và creatinin đều là những phân tử có kích thước nhỏ khoảng 60 và 113 dalton và phân bố trong toàn bộ lượng nước ở trong cơ thể [Cabaniss C.D, 1990]. Xu hướng giảm các chỉ số chức năng thận khi bị chiếu xạ (bảng 3.4) cho thấy sự ảnh hưởng mạnh mẽ của tia X tới hoạt động sống chung của toàn bộ cơ thể của các nhóm chuột được xạ trị.

#### **4.3.2. Dấu ấn phân tử và miễn dịch ở mô lách của chuột thí nghiệm được điều trị bởi NMPs sau xạ trị.**

Trong nghiên cứu này, NMPs được sử dụng trước khi chiếu xạ bởi tia X. Chuột được tiêm NMPs (40 mg/kg) vào trước thời điểm chiếu xạ và liều bổ sung cách nhau 2 ngày sau chiếu xạ để tăng cường khả năng bảo vệ tế bào bình thường và mô

lành. Đây là mức liều NMPs được sử dụng tương tự với các nghiên cứu của Rageh M.M và các cộng sự; Kunwar và các cộng sự, đã công bố trước đó đối với thử nghiệm bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ trên mô hình chuột nghiên cứu [Rageh M.M, 2015], [Kunwar, 2012]. Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy, melanin ở dạng hạt nano chứ không phải ở dạng hòa tan có hiệu quả cao trong việc bảo vệ DNA khỏi sự tấn công của bức xạ UV [Brenner. M, 2008]. Theo nghiên cứu của nhóm tác giả Rageh M. M và các cộng sự và Kunwar. A đã ghi nhận tác dụng bảo vệ tủy xương và mô lá lách chống lại tia gamma trong quá trình xạ trị trên mô hình chuột thí nghiệm của các hạt NMPs được bọc bởi liposome [Rageh M.M, 2015], [Kunwar A, 2012]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, các hạt NMPs được tạo nên bằng phương pháp mới với việc sử dụng alkaline để phân cắt cấu trúc polymer của melanin để tạo thành dạng hạt có kích thước từ 80-200 nm mà không được bao bọc trong lớp vỏ polymer hay lysosome (hình 3.6). Melanin kích thước nano đã làm tăng cường khả năng tan của melanin và dễ dàng phân bố hiệu quả hơn trong các mô và cơ quan, đưa đến hiệu quả tốt hơn khi hấp thụ các bức xạ trong quá trình xạ trị ở vị trí mô lành. ROS là một trong các tác nhân chính gây ảnh hưởng lên tế bào được tạo ra với số lượng lớn trong quá trình xạ trị. Khả năng loại bỏ ROS của NMPs được ghi nhận với sự có mặt của các nhóm chức năng hydroxyl, cacbonyl và cacboxyl ở hình 3.7C. Các đặc điểm trên đã góp phần hạn chế tác dụng phụ của tia xạ trên mô lành và bảo vệ lá lách sau xạ trị.

Mặt khác, các kết quả nghiên cứu ở mức độ tế bào và phân tử đã chỉ ra, NMPs đã bảo vệ lá lách, một cơ quan quan trọng trong cả hệ thống miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thích ứng tránh khỏi sự tấn công của tia xạ. Hình 3.26 cho thấy, nhóm được tiêm NMPs, có sự phục hồi đáng kể khối lượng lá lách và giảm thiểu tỷ lệ các con chuột bị xơ hóa của mô lách ở tình trạng nặng trong nhóm IR+Mel (hình 3.28). Ở nhóm chuột không được tiêm NMPs và xạ trị liều cao, 100% tỷ lệ cá thể chuột bị xơ hóa mô lách ở tình trạng nặng, trong khi đó, ở nhóm, tỷ lệ này chiếm 40%, còn lại ở mức độ vừa và nhẹ. Ở mức độ phân tử, nhóm chuột IR+Mel có sự thay đổi mức độ biểu hiện của các gen mã hóa *IL -2* và *TNF- $\alpha$*  (hình 3.30) trong tế bào lá

lách sau xạ trị. Tình trạng xơ hóa, giảm kích thước mô lách, và giảm cân cũng được ghi nhận ở các trường hợp chiếu xạ toàn thân trên mô hình chuột [Kunwar A., 2012].

Lá lách là một cơ quan có mặt ở các động vật có xương sống đóng vai trò quan trọng trong hệ thống miễn dịch ở cả hai quá trình miễn dịch thích ứng và miễn dịch bẩm sinh của cơ thể [Zhao L, 2015]. Một số chức năng của lá lách được biết đến như sản xuất tế bào lympho; tham gia loại bỏ các tế bào hồng cầu già, mảnh vụn tế bào cùng các tác nhân gây bệnh; giữ lại sắt cho sự tái tạo lại tế bào hồng cầu mới; dự trữ và điều hòa khối lượng máu cho cơ thể [Mebius R.E, 2005]. Sau khi chiếu xạ tia X liều cao, đã có những sự thay đổi đáng kể ở các chỉ tiêu của lá lách như khối lượng, cấu trúc mô học và dấu ấn phân tử trong lá lách ở các nhóm chuột IR và IR+Mel so với đối chứng (NIL, NC). Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng một số marker để xác định số lượng tế bào trong các quần thể tế bào B, tế bào T, tế bào tua ở lá lách của chuột. Các quần thể tế bào miễn dịch bao gồm tế bào B (CD19 marker); tế bào T (CD3 marker), tế bào tua (CD 11c marker), được khảo sát bằng phân tích tế bào theo dòng chảy FACS Lysis. Theo các nghiên cứu trước đó, các marker CD19, CD3 đặc hiệu cho các tế bào B và T. Thụ thể CD11 chủ yếu xuất hiện trên bề mặt tế bào tua, được xem xét là một marker tương đối đặc hiệu đối với loại tế bào này [Hey Y.Y, 2012]. Ở lá lách, ngoài các tế bào B, T, tế bào tua, còn có một số loại tế bào khác như bạch cầu đơn nhân, đại thực bào và bạch cầu trung tính - là các loại tế bào có phản ứng âm tính với CD11c [Hey Y.Y, 2012], [Griffiths K.L, 2014] ở trong điều kiện chuột khỏe mạnh. Tuy nhiên, một lượng nhỏ tế bào đơn nhân, đại thực bào, và tế bào lympho sẽ dương tính với CD11c [Mildner A, 2014], [Griffiths K.L, 2014], [Arnold I.C, 2016] khi lá lách nhiễm vi khuẩn. Trong thí nghiệm này, chuột được sử dụng không bị nhiễm khuẩn, do đó các tế bào dương tính với CD11c đều là tế bào tua trong lá lách.

Các tế bào miễn dịch được tạo ra ở mô lách như tế bào T, tế bào tua thường rất nhạy cảm với phóng xạ, và gần như bị triệt tiêu hoàn toàn khi xạ trị liều cao (bảng 3.3). Dữ liệu nghiên cứu của Pozniak M. A và các cộng sự chỉ ra sự phục hồi mức

độ biểu hiện của *IL-2* có thể có vai trò trong việc gia tăng khối lượng lá lách [Pozniak M. A, 1995]. Hơn nữa, có nhiều quá trình diễn ra trong tế bào như tăng sinh và biệt hóa tế bào, khởi động tín hiệu chết theo chương trình hay hoại tử và các phản ứng miễn dịch của tế bào có liên quan đến cytokine tiền viêm *TNF- $\alpha$*  [Van Horssen R, 2017]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, xạ trị đã có tác động ức chế đáng kể lên mức độ biểu hiện của *IL-2* và *TNF- $\alpha$*  lần lượt là 4 và 3 lần so với nhóm NC không được chiếu xạ. Ngoài ra, có sự gia tăng mức độ phiên mã *TNF- $\alpha$*  ở nhóm IR+Mel so với nhóm IR có thể có mối liên hệ với tỷ lệ tế bào lách được phục hồi nhanh hơn về mặt khối lượng ở nhóm này (hình 3.26). Tế bào B, T, và tế bào tua là một trong các yếu tố quan trọng của quá trình miễn dịch thích ứng của cơ thể. Thêm vào đó, kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng, khi chiếu xạ gây ra giảm đáng kể số lượng tế bào B (hình 3.31) và gia tăng nhẹ số lượng tế bào T (hình 3.32) và tế bào tua trong lá lách của chuột thí nghiệm (hình 3.33). Ở nhóm chuột được điều trị bởi NMPs (IR+Mel) đã cho thấy sự thúc đẩy sản sinh làm gia tăng quần thể tế bào T và tế bào tua trong lá lách của chuột được chiếu xạ. Kết quả này phù hợp với dữ liệu về nồng độ tế bào lympho trong máu (bảng 3.3). Theo nghiên cứu của Park B cùng cộng sự công bố năm 2014, trong điều kiện nhất định, chiếu xạ có thể làm tăng cường phản ứng miễn dịch ở sinh vật [Park B, 2014]. Các nghiên cứu khác báo cáo trong quá trình xạ trị ung thư, sự tiếp xúc với bức xạ có thể cung cấp một nguồn kháng nguyên thích hợp để tế bào tua và tế bào T trình diện chéo và kích hoạt sự tăng sinh của tế bào T bởi tế bào tua [Chang L, 2017]. Ngoài ra, vai trò *IL-2* trong việc thúc đẩy sự sản sinh quần thể tế bào T và tế bào NK (natural killer cell) đã được báo cáo bởi Jiang T và các cộng sự năm 2016 [Jiang T, 2016]. Ở nghiên cứu này, đã chỉ ra vai trò tương tác của của NMPs và tia X trong việc thúc đẩy sự gia tăng quần thể tế bào tua và tế bào T ở lá lách của chuột nghiên cứu.

Theo nghiên cứu trước đó, melanin thường được sử dụng như một phân tử đích để điều trị ung thư da bằng quang nhiệt hoặc liệu pháp đồng vị phóng xạ hơn là sử dụng cho mục đích điều trị cho các loại ung thư khác [Jiang Q, 2019]. Ở nghiên cứu này, các tế



bào ung thư phổi đã được sử dụng để gây u trên mô hình chuột thí nghiệm, do đó chưa thấy rõ tác dụng ấn tượng của NMPs như là một chất chống ung thư hiệu quả.

Ngoài ra, nghiên cứu cũng chỉ ra có sự gia tăng mức độ biểu hiện của một số gen đóng vai trò quan trọng (*TNF- $\alpha$* , *Bax*, *Caspase-3*) trong quá trình chết theo chương trình của tế bào ung thư ở các nhóm chuột IR+Mel so với nhóm IR (hình 3.34) ở mô khối u. Kết quả nghiên cứu phù hợp với báo cáo trước đó về việc thúc đẩy các tế bào miễn dịch tiêu diệt tế bào ung thư lưu thông trong máu thông qua quá trình chết theo chương trình hoặc hoại tử [Ewald J.A, 2010].

Tóm lại, các dữ liệu nghiên cứu thử nghiệm khả năng bảo vệ tế bào lách trên mô hình chuột thí nghiệm của NMPs ở mức độ tế bào và phân tử đã chỉ ra rằng NMPs có khả năng bảo vệ tế bào lách dưới tác động của tia xạ. Hơn nữa, việc điều trị bởi NMPs đã thúc đẩy mạnh mẽ sản sinh quần thể tế bào T và tế bào tua trong mô lách của chuột thí nghiệm sau xạ trị.

## Chương 5: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 5.1. KẾT LUẬN

Theo dữ liệu nghiên cứu, một số kết luận được đưa ra như sau:

1. Đã chế tạo được NMPs từ melanin ở kích thước 80-200 nm phù hợp cho nghiên cứu và khảo sát sự ảnh hưởng đến khả năng tạo hạt NMPs bởi các yếu tố nhiệt độ (37°C), thời gian, tốc độ khuấy từ (400 rpm/phút) và nồng độ alkaline (0,5N).
2. NMPs có độc tính ở mức trung bình trên dòng HaCaT và NIH 3T3 với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 53 và 39 µg/mL và không xác định được giá trị IC<sub>50</sub> trên dòng hUVEC ở dải nồng độ ≤100 µg/mL. NMPs ở mức liều 75 µg/mL có khả năng ức chế sự di chuyển của tế bào (p<0,01). NMPs ở mức liều 50 µg/mL ức chế sự hình thành mạch (p<0,01), đồng thời ức chế mức độ biểu hiện của gen mã hóa *VEGF-A*. NMPs không gây lão hóa tế bào nội mô (p>0,05) ở mức liều từ 25-50 µg/mL. NMPs có khả năng bảo vệ tế bào chọn lọc trong điều kiện chiếu xạ tia X trên mô hình *in vitro*. Sau xạ trị, NMPs có khả năng bảo vệ tế bào HaCaT lên đến 10% và giảm nhẹ tỷ lệ sống sót của tế bào hUVEC sau xạ trị, đồng thời không thấy rõ hiệu quả bảo vệ trên dòng tế bào NIH 3T3.
3. Ở mức liều 40 mg/kg, NMPs không gây độc lên chuột thí nghiệm. Trên mô hình *in vivo*, cho thấy NMPs góp phần phục hồi khối lượng chuột nghiên cứu (p<0,05), khối lượng mô lách, khối lượng mô hạch và giảm tình trạng viêm và xơ hóa nặng của mô lách ở chuột mang khối ung thư sau xạ trị tuy nhiên không có sự thay đổi về mặt mô học giữa nhóm chuột được điều trị và đối chứng ở mô hạch. NMPs có khả năng bảo vệ tế bào lách chuột thí nghiệm ở mức độ phân tử, tế bào dưới tác động của tia X, và tăng mức độ biểu hiện của *IL-2* và *TNF-α* trong mô lách sau xạ trị. Hơn nữa, việc điều trị bởi NMPs đã thúc đẩy mạnh mẽ sản sinh quần thể tế bào T và tế bào tua lần lượt là 1,91 và 1,64 lần trong mô lách so với đối chứng và phục hồi một phần chỉ số huyết học, hóa sinh của chuột mang khối u sau khi bị xạ trị tia X liều cao.

## 5.2. KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu khả năng bảo vệ tế bào thường và mô lành của NMPs ở các loại tế bào và mô khác nhau trước tác hại của tia xạ.
- Nghiên cứu khả năng kết hợp giữa NMPs và một số hoạt chất dược phẩm điều trị ung thư như paclitaxel, doxorubicin,.. để kiểm tra khả năng tương tác giữa hạt NMPs và những hoạt chất này.
- Kiểm tra khả năng đào thải của NMPs khỏi cơ thể.
- Thử nghiệm độc tính bán trường diễn của NMPs.

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

- 1. Nguyen Thi Le Na**, Sai Duc Loc, Nguyen Le Minh Tri, Nguyen Thi Bich Loan, Ho Anh Son, Nguyen Linh Toan, Ha Phuong Thu, Hoang Thi My Nhung, Nguyen Lai Thanh, Nguyen Thi Van Anh and Nguyen Dinh Thang\*. “Nanomelanin Potentially Protects the Spleen from Radiotherapy-Associated Damage and Enhances Immunoactivity in Tumor-Bearing Mice”. *Materials* 12(10), 2019 (**ISI, Q2, IF= 3**).
- 2. Nguyen Thi Le Na**, Bui Thi Van Khanh, Pham Xuan Huy, Hoang Thi My Nhung, Nguyen Thi Van Anh, Nguyen Dinh Thang\*. “Melanin biomaterial effectively eliminates bacteria from water and synergistically induces melanoma-cell death during X-ray irradiation”. *Materials technology* 36, pp. 261-269, 2020 (**ISI, Q2, IF= 3,8**).
- 3. Le Na Nguyen Thi\***, Son Le Duc, Van Khanh Bui Thi, Thanh Tam Dinh Thi, Hai Do Xuan, My Nhung Hoang Thi & Thang Nguyen Dinh. “Protective effect of melanin nanoparticles created from squid ink against irradiation on human keratinocytes”. *J Nanostruct Chem*, 2022 (**SCIE, Q1, IF = 8,0**).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abdelhalim M.A.K., Moussa S.A.A., Qaid H.A., Al-Ayed M.S. (2018), “Effect of melanin on gold nanoparticle-induced hepatotoxicity and lipid peroxidation in rats”, *International journal of nanomedicine* 13, pp. 5207-5213.
2. Akkın S., Varan G., Bilensoy E. (2021), “A Review on Cancer Immunotherapy and Applications of Nanotechnology to Chemoimmunotherapy of Different Cancers”, *Molecules* 26(11), pp. 1-24.
3. Al-Tayib O.A., Elbadwi S., Bakhiet A. (2017), “Cytotoxicity assay for herbal melanin derived from *Nigella sativa* seeds using in vitro cell lines”, *International Journal of Humanities and Social Science* 22(10), pp. 43-51.
4. Arnaoutova I., Kleinman H. (2010), “In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract”, *Nature Protocol* 5, pp. 628–635.
5. Arnold I.C., Mathisen S., Schulthess J., Danne C., Hegazy A.N., Powrie F. (2016), “CD11c+ monocyte/macrophages promote chronic *Helicobacter hepaticus*-induced intestinal inflammation through the production of IL-23”, *Mucosal Immunology* 9(2), pp. 352–363.
6. Ashby M. (1991), “The role of radiotherapy in palliative care”, *Journal of Pain and Symptom Management* 6(6), pp. 380-388.
7. Bacq Z.M., Herve A., Lecomte J., Fischer P., Blavier J. (1951), “Protection against x-rays and therapy of radiation sickness with beta-mercaptoethylamine”, *Science* 117(3049), pp. 633–636.
8. Barton M.B., Frommer M., Shafiq J. (2006), “Role of radiotherapy in cancer control in low-income and middle-income countries”, *Lancet Oncology* 7(7), pp. 584-595.
9. Baskar R. (2010) “Emerging role of radiation induced bystander effects: Cell communications and carcinogenesis”, *Genome integrity* 1(1), pp. 1-13.
10. Baskar R., Itahana K. (2017), “Radiation therapy and cancer control in developing countries: Can we save more lives?”, *International Journal of Medical Sciences* 14(1), pp. 13-17.

11. Baskar R., Lee K.A., Yeo R., Yeoh K.W. (2012), "Cancer and radiation therapy: current advances and future directions", *International Journal of Medical Sciences* 9(3), pp. 193-199.
12. Berthelot C., Zegeye A., Gaber D.A., Chalot M., Franken P., Kovács G.M., et al. (2020), "Unravelling the role of melanin in Cd and Zn tolerance and accumulation of three dark septate endophytic species", *Microorganisms* 8(4), pp. 1-17.
13. Bhalani D. V., Nutan B., Kumar A., and Singh Chandel A. K. (2022), "Bioavailability Enhancement Techniques for Poorly Aqueous Soluble Drugs and Therapeutics", *Biomedicines* 10(9), pp. 9-24.
14. Bonilla F.A., Oettgen H.C, (2010), "Adaptive immunity", *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125(2), pp. 33-40.
15. Brash D.E., Rudolph J.A., Simon J.A., Lin A., McKenna G.J., Baden H.P., et al. (1991), "A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(22), pp. 10124-10128.
16. Brenner M., Hearing V.J. (2008), "The protective role of melanin against UV damage in human skin", *Photochemistry and Photobiology* 84(3), pp. 539-549.
17. Bunton-Stasyshyn R.K., Saccon R.A., Fratta P., Fisher E.M. (2015), "SOD1 Function and Its Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathology: New and Renascent Themes", *Neuroscientist* 21(5), pp. 519-529.
18. Capizzi R.L. (1999), "The preclinical basis for broad-spectrum selective cytoprotection of normal tissues from cytotoxic therapies by amifostine", *Seminars in Oncology* 26(2), pp. 3-21.
19. Cabaniss C.D (1990), *Creatine Kinase. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*, Boston Butterworths, England.
20. Chang L., Zhang Z., Chen F., Zhang W., Song S. (2017), "Irradiation enhances dendritic cell potential antitumor activity by inducing tumor cell expressing TNF- $\alpha$ ", *Medical Oncology* 34(3), pp. 1-9.

21. Chapman W.H., Sipe C.R., Elitzholtz D.C., Cronkite E.P., Chambers F.W.Jr., (1950), "Sulfhydryl-containing agents and the effects of ionizing radiations. 1. Beneficial effect of glutathione injection on X-Ray induced mortality rate and weight loss in mice", *Radiology* 55(6), pp. 865-873.
22. Chaudhry S.R., Luskin V., Panuganti K.K. (2021), *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Spleen*, StatPearls Publishing, USA.
23. Choi S.H., Kim M., Lee H.J., Kim E.H., Kim C.H., Lee YJ. (2016), "Effects of NOX1 on fibroblastic changes of endothelial cells in radiation-induced pulmonary fibrosis", *Molecular medicine reports* 3(5), pp. 4135-4142.
24. Citrin D., Cotrim A.P., Hyodo F., Baum B.J., Krishna M.C., Mitchell J.B. (2010), "Radioprotectors and mitigators of radiation-induced normal tissue injury", *Oncologist* 15(4), pp. 360-371.
25. Cuong A.M., Le Na N.T., Thang P.N., Diep T.N., Thuy L.B., Thanh N.L., Thang N.D., "Melanin-embedded materials effectively remove hexavalent chromium (Cr(VI)) from aqueous solution", *Environmental Health and Preventive medicine* 23(1), pp. 9-24.
26. Dadachova E., Bryan R.A., Howell R.C., Schweitzer A.D., Aisen P., Nosanchuk J.D., (2008), "The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement", *Pigment Cell Melanoma Research* 21(2), pp. 192-199.
27. DeSantis C.E., DeSantis C. E., Fedewa S. A., Goding Sauer A., Kramer J. L., Smith R. A., Jemal A. (2016), "Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women", *A Cancer Journal for Clinicians* 66(1), pp. 31-42.
28. Dilnawaz F., Acharya S., and Sahoo S. K. (2018), "Recent trends of nanomedicinal approaches in clinics", *International Journal of Pharmaceutics* 538(1-2), pp. 263–278.
29. Di Meo F., Filosa S., Madonna M., Giello G., Di Pardo A., et al. (2019), "Curcumin C3 complex®/Bioperine® has antineoplastic activity in mesothelioma:

an in vitro and in vivo analysis”, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 38(1), pp. 1-11.

30. Din F.U., Aman W., Ullah I., Qureshi O.S., Mustapha O., Shafique S., et al. (2017), “Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors”, *International Journal of Nanomedicine* 12, pp. 7291-7309.

31. Edreva A. (2005), “Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts : a submolecular approach”, *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106, pp. 119-133.

32. El-Naggar N.E., El-Ewasy S.M. (2017), “Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H”, *Scientific Report* 7, pp. 1-19.

33. El-Obeid A.S, Alajmi H., Harbi M., Yahya W.B., Al-Eidi H., Alaujan M., et al. (2020), “Distinct anti-proliferative effects of herbal melanin on human acute monocytic leukemia THP-1 cells and embryonic kidney HEK293 cells”, *BMC complementary medicine and therapies*, 20(1), pp. 1-12.

34. El-Obeid A.S., Al-Harbi S., Al-Jomah N., Hassib A. (2006), “Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production”, *Phytomedicine* 13(5), pp. 324-33.

35. El-Obeid A.S., Hassib A., Pontén F., Westermarck B., (2006), “Effect of herbal melanin on IL-8: a possible role of Toll-like receptor 4 (TLR4)”, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 344(4), pp. 1200-1206.

36. El-Obeid A.S., Kamal-Eldin A., Abdelhalim M.A.K., Haseeb A.M. (2017), “Pharmacological Properties of Melanin and its Function in Health”, *Basic Clinical Pharmacology Toxicology* 120(6), pp. 515-522.

37. Esfahani K., Roudaia L., Buhlaiga N., Del Rincon S.V., Papneja N., Miller W.H.Jr. (2020), “A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future”, *Current Oncology* 27( 2), pp. 87-97.



38. Ewald J.A., Desotelle J.A., Wilding G., Jarrard D.F. (2010), "Therapy-induced senescence in cancer", *Journal of the National Cancer Institute* 102(20), pp.1536-1546.
39. Fedorocko P., Brezáni P., and Macková N.O. (1992), "Radioprotection of mice by the bacterial extract Broncho-Vaxom: haemopoietic stem cells and survival enhancement", *International Journal of Radiation Biology* 61(4), pp. 511-518.
40. Feoktistova M., Geserick P., Leverkus M. (2016), "Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells", *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), pp. 1-3.
41. Fernandes J.M., Jandrey E.H.F., Koyama F.C., Leite K.R.M., Camargo A.A., Costa É.T., et al. (2020), "Metformin as an Alternative Radiosensitizing Agent to 5-Fluorouracil During Neoadjuvant Treatment for Rectal Cancer", *Dis Colon Rectum* 63(7), pp. 918-926.
42. Fernando I.P.S., Dias M.K.H.M., Madusanka D.M.D., Han E.J., et al. (2020), "Human Keratinocyte UVB-Protective Effects of a Low Molecular Weight Fucoidan from *Sargassum horneri* Purified by Step Gradient Ethanol Precipitation", *Antioxidants* 21, 9(4), pp. 340-355
43. Fu X.J., Peng Y.B., Hu Y.P., Shi Y.Z., Yao M., Zhang X. (2014), "NADPH oxidase 1 and its derived reactive oxygen species mediated tissue injury and repair", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014, pp. 1-10.
44. Gabriele V. R., Mazhabi R. M., Alexander N., Mukherjee P., Seyfried T. N., Nwaji N., Akinoglu E. M., Mackiewicz A., Zhou, G., Giersig M., Naughton M. J., Kempa K. (2021), "Light- and Melanin Nanoparticle-Induced Cytotoxicity in Metastatic Cancer Cells", *Pharmaceutics* 13(7), pp. 1-13.
45. Gagnière J., Bonnet M. (2017), *Molecular Mechanism Underlying the Actions of Antioxidant Molecules in Digestive Disorders*, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, America.
46. Gemechu Y., Millrine D., Hashimoto S., Prakash J., Sanchenkova K., Metwally H., Gyanu P., Kang S., and Kishimoto T. (2018), "Humanized cereblon mice

revealed two distinct therapeutic pathways of immunomodulatory drugs”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(46), 11802–11807.

47. Gloster H.M.Jr., Neal K. (2006), “Skin cancer in skin of color” *Journal of the American Academy of Dermatology* 55(5), pp. 741-760.

48. Griffiths K.L., Tan J.K., O’Neill H.C. (2014), “Characterization of the effect of LPS on dendritic cell subset discrimination in spleen”, *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 18(9), pp.1908-1912.

49. Grubbe E.H. (1933), ”Priority in the Therapeutic Use of X-rays”, *Radiology* 21, pp. 156-162.

50. Guha P., Gardell J., Darpolor J., Cunetta M., Lima M., Miller G., Espat N. J., Junghans R. P., and Katz S. C. (2018) “STAT3 inhibition induces Bax-dependent apoptosis in liver tumor myeloid-derived suppressor cells”, *Oncogene* 38(4), 533–548.

51. Guo X., Chen S., Hu Y., Li G., Liao N., Ye X., Liu D., Xue C. (2014), “Preparation of water-soluble melanin from squid ink using ultrasound-assisted degradation and its anti-oxidant activity”, *Journal of Food Science and Technology* 51(12), pp. 3680-3690.

52. Hanahan D, Weinberg R.A. (2011), “Hallmarks of cancer: the next generation”, *Cell* 144(5), pp. 646-674.

53. Hayyan M., Hashim M. A., AlNashef I. M. (2016), “Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications”, *Chemical Reviews* 116(5), pp. 3029-3085.

54. Hellman S., Weichselbaum R.R. (1995), “Radiation oncology and the new biology”, *The cancer journal from Scientific American* 1(3), pp. 174-179.

55. Hey Y.Y., O’Neill H.C. (2012), “Murine spleen contains a diversity of myeloid and dendritic cells distinct in antigen presenting function”, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16, pp. 2611–2619.

56. Ho C.C., Ding S.J. (2013), “The pH-controlled nanoparticles size of polydopamine for anti-cancer drug delivery”, *Journal of Materials Science Materials in Medicine* 24(10), pp. 2381-2390.
57. Hu D. N. (2008), “Methodology for evaluation of melanin content and production of pigment cells in vitro”, *Photochemistry and Photobiology* 84(3), pp. 645-649.
58. Hutchison S., Rae C., Tesson M., Babich J., Boyd M., Mairs R. (2014), “Evaluation of Melanin-Targeted Radiotherapy in Combination with Radiosensitizing Drugs for the Treatment of Melanoma”, *Cancer and Oncology Research* 2(4), pp. 58-67.
59. Ito D., Shiromoto Y., Yukiho S. Y., Ishii C., Nishimura T., Ogonuki N., Ogura A., Hasuwa H., Fujihara Y., Kuramochi-Miyagawa S., and Nakano T. (2015), “Induction of DNA methylation by artificial piRNA production in male germ cells”, *Current Biology* 25(7), pp. 901–906.
60. Jeevanandam J., Barhoum A., Chan Y. S., Dufresne A., and Danquah M. K. (2018), “Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations”, *Beilstein Journal of Nanotechnology* 9, pp. 1050–1074.
61. Jiang Q., Liu Y., Guo R., Yao X., Sung S., Pang Z., Yang W. (2019), “Erythrocyte-cancer hybrid membrane-camouflaged melanin nanoparticles for enhancing photothermal therapy efficacy in tumors”, *Biomaterials* 192, pp. 292-308.
62. Jiang T, Zhou C, Ren S. (2016), “Role of IL-2 in cancer immunotherapy”, *Oncimmunology* 5(6), pp. 1-10.
63. Kalechman Y., Shani A., Albeck M., Sredni B. (1995), “Induction of Acute phase proteins in mice and Humans by treatment with AS101, an immunomodulator with radioprotective properties”, *Immunopharmacology* 29(2), pp. 149-158.
64. Kanter M., Akpolat M. (2008), “Vitamin C protects against ionizing radiation damage to goblet cells of the ileum in rats”, *Acta Histochemica* 110(6), pp. 481-90.

65. Kay Chul-Seung, Kang Y., ( 2013), *Curative Radiotherapy in Metastatic Disease: How to Develop the Role of Radiotherapy from Local to Metastases*, , Intechopen, United Kingdom.
66. Kharofa J., Cohen E.P., Tomic R., Xiang Q., Gore E. (2012), “Decreased risk of radiation pneumonitis with incidental concurrent use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and thoracic radiation therapy”, *International Journal of Radiation oncology, Biology, Physics* 84(1), pp. 238-243.
67. Khayyal M. T., Abdel-Naby D. H., Abdel-Aziz H., El-Ghazaly M. A. (2014), “A multi-component herbal preparation, STW 5, shows anti-apoptotic effects in radiation induced intestinal mucositis in rats”, *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 21(11), pp. 1390–1399.
68. Kiran G.S., Jackson S.A., Priyadharsini S., Dobson A.D.W., Selvin J. (2017), “Synthesis of Nm-PHB (NMPs-polyhydroxy butyrate) nanocomposite film and its protective effect against biofilm-forming multi drug resistant *Staphylococcus aureus*”, *Scientific Reports* 7(1), pp. 1-13.
69. Kollias N., Sayre R.M., Zeise L., Chedekel M.R. (1991), “Photoprotection by melanin”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 9(2), pp. 135-160.
70. Koukourakis M.I. (2012), “Radiation damage and radioprotectants: new concepts in the era of molecular medicine”, *The British Journal of Radiology* 85(1012), pp. 313-330.
71. Krishnan S., Chadha A.S., Suh Y., Chen H.C., Rao A., Das P., et al. (2016), “Focal Radiation Therapy Dose Escalation Improves Overall Survival in Locally Advanced Pancreatic Cancer Patients Receiving Induction Chemotherapy and Consolidative Chemoradiation”, *International Journal of Radiation oncology, Biology, Physics* 94(4), pp. 755-65.
72. Kunwar A., Adhikary B., Jayakumar S., Barik A., Chattopadhyay S., Raghukumar S., et al. (2012), “Melanin, a promising radioprotector: mechanisms of actions in a mice model”, *Toxicology and Applied Pharmacology* 264(2), pp. 202-211.

73. Kumar C.G., Mongolla, P., Pombala, S., Kamle, A. and Joseph, J. (2011), “Physicochemical characterization and antioxidant activity of melanin from a novel strain of *Aspergillus bridgeri* ICTF-201”, *Letters in Applied Microbiology* 53, pp. 350-358.
74. Landauer M.R., McChesney D.G., Ledney G. (1997), “Synthetic trehalose dicorynomycolate (S-TDCM): behavioral effects and radioprotection”, *Journal of Radiation Research* 38(1), pp. 45-54.
75. Larsson B.S. (1993), “Interaction between chemicals and melanin”, *Pigment Cell Research* 6(3), pp. 127-133.
76. Li H., Jia Y., Feng X., Li J. (2017), “Facile fabrication of robust polydopamine microcapsules for insulin delivery”, *Journal of Colloid and Interface Science* 487, pp. 12-19.
77. Li M. Y., Liu J. Q., Chen D. P., Li Z. Y., Qi B., et al, (2017), “Radiotherapy induces cell cycle arrest and cell apoptosis in nasopharyngeal carcinoma via the ATM and Smad pathways”, *Cancer Biology and Therapy* 18(9), pp. 681–693.
78. Li W.Q., Wang Z., Hao S., He H., Wan Y., Zhu C., et al. (2017), “Mitochondria-Targeting Polydopamine Nanoparticles To Deliver Doxorubicin for Overcoming Drug Resistance”, *ACS Applied Materials and Interfaces* 9(20), pp. 16793-16802.
79. Lin X.L., Yang L., Fu S.W., Lin W.F., Gao Y.J., Chen H.Y., et al (2017), “Overexpression of NOX4 predicts poor prognosis and promotes tumor progression in human colorectal cancer”, *Oncotarget* 8(20), pp. 33586-33600.
80. Lind M.J. (2008), “Principles of cytotoxic chemotherapy”, *Medicine* 36 (1), pp. 19-23.
81. Liu H., Yang Y., Liu Y., Pan J., Wang J., Man F., et al. (2020), “Melanin-Like Nanomaterials for Advanced Biomedical Applications: A Versatile Platform with Extraordinary Promise”, *Advanced Science* 7(7), pp. 1-33.
82. Liu T., Shi Y., Du J., Ge X., Teng X., Liu L., et al. (2016). “Vitamin D treatment attenuates 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced colitis but not oxazolone-induced colitis”, *Scientific Reports* 6, pp. 1-10.

83. Livak KJ, Schmittgen TD (2001), "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method", *Methods* 25(4), pp. 402-408.
84. Magarelli M., Passamonti P., Renieri C. (2010), "Purification, characterization and analysis of sepia melanin from commercial sepia ink (*Sepia officinalis*)", *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 5, pp. 18-28.
85. Manivasagan P., Venkatesan J., Senthilkumar K., Sivakumar K., Kim S.K. (2013), "Isolation and characterization of biologically active melanin from *Actinoalloteichus* sp. MA-32", *International Journal of Biological Macromolecules* 58, pp. 263-74.
86. Martin R.F., Anderson R.F. (1998), "Pulse radiolysis studies indicate that electron transfer is involved in radioprotection by Hoechst 33342 and methylproamine", *International Journal of Radiation oncology, Biology, Physics* 42(4), pp. 827-831.
87. Martin R.F., Broadhurst S., D'Abrew S., Budd R., Sephton R., Reum M., et al. (1996), "Radioprotection by DNA ligands", *The British Journal of Cancer Supplement* 27, pp. 99-101.
88. Martínez L.M., Martinez A., Gosset G. (2019), "Production of Melanins With Recombinant Microorganisms", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7, pp. 1-14.
89. Martinotti S., Ranzato E. (2019), *Scratch Wound Healing Assay*. In: Turksen, K. (eds) *Epidermal Cells, Methods in Molecular Biology*, vol 2109. Humana, New York.
90. Mebius R.E., Georg K. (2005), "Structure and function of the spleen", *Nature Reviews Immunology* 5, pp. 606-616.
91. Mejía-Caballero A., DeAnda R., Hernández-Chávez G., Rogg S., Martinez A., Bolívar F., et al. (2016), "Biosynthesis of catechol melanin from glycerol employing metabolically engineered *Escherichia coli*", *Microbial Cell Factories* 15(1), pp. 1-8.

92. Mildner A., Jung S. (2014), "Development and function of dendritic cell subsets", *Immunity* 40, pp. 642-656.
93. Millard J., Alvarez-Núñez F., and Yalkowsky S. (2002), "Solubilization by cosolvents. Establishing useful constants for the log-linear model", *International Journal of Pharmaceutics* 245(1-2), pp.153-166.
94. Mishra K., Alsbeih G. (2017), "Appraisal of biochemical classes of radioprotectors: evidence, current status and guidelines for future development", *Biotech* 7(5), pp. 1-16.
95. Mishra K.N., Moftah B.A., Alsbeih G.A. (2018), "Appraisal of mechanisms of radioprotection and therapeutic approaches of radiation countermeasures", *Biomedicine & Pharmacotherapy* 106, pp. 610-617.
96. Mohagheghpour N., Waleh N., Garger S.J., Dousman L., Grill L.K., Tusé D. (2000), "Synthetic melanin suppresses production of proinflammatory cytokines" *Cellular Immunology* 199(1), pp. 25-36.
97. Molteni A., Moulder J.E., Cohen E.F., Ward W.F., Fish B.L., Taylor J.M., et al. (2000), "Control of radiation-induced pneumopathy and lung fibrosis by angiotensin-converting enzyme inhibitors and an angiotensin II type 1 receptor blocker", *International Journal of Radiation Biology* 76(4), pp. 523-532.
98. Mousavi S.M., Zarei M., Hashemi S.A. (2018), "Polydopamine for Biomedical Application and Drug Delivery System", *Medicinal Chemistry* 8(8), pp. 218-229.
99. Mukhopadhyay R., Kazi J., and Debnath M. C. (2018), "Synthesis and characterization of copper nanoparticles stabilized with *Quisqualis indica* extract: Evaluation of its cytotoxicity and apoptosis in B16F10 melanoma cells", *Biomedicine & pharmacotherapy* 97, pp. 1373-1385.
100. Mun G-I., Kim S., Choi E., Kim C.S., Lee Y-S. (2019), "Pharmacology of natural radioprotectors", *Archives of Pharmacal Research* 41(11), pp. 1033-1050.
101. Najafi M., Shirazi A., Motevaseli E., Geraily G., Amini P., Tooli L.F., Shabeeb D. (2019), "Melatonin Modulates Regulation of NOX2 and NOX4

Following Irradiation in the Lung”, *Current Clinical Pharmacology* 14(3), pp. 224-231.

102. Nair C.K., Parida D.K., Nomura T. (2001), “Radioprotectors in radiotherapy”, *Journal of Radiation Research* 42(1), pp. 21-37.

103. Neubert R.H. (2011), “Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 77 (1), pp. 1-2.

104. Nguyen N.P., Levinson B., Dutta S., Karlsson U., Kelly K.C., Dowell J., et al. (2003), “Amifostine and curative intent chemoradiation for compromised cancer patients”, *Anticancer Research* 23(2), pp. 1649-1656.

105. Nigam Y., Knight J. (2020), ”The lymphatic system 3: its role in the immune system”, *Nursing Times* 116 (12), pp. 45-49.

106. Nikzad S., Hashemi B., Hassan Z. M., and Mozdarani, H. (2013), “The Cell Survival of F10B16 Melanoma and 4T1 Breast Adenocarcinoma Irradiated to Gamma Radiation Using the MTT Assay Based on Two Different Calculation Methods”, *Journal of Biomedical Physics and Engineering* 3(2), pp. 29–36.

107. Orellana E. A., and Kasinski A. L. (2016), “Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation”, *Bio-protocol* 6(21), pp. 1-9.

108. Park B., Yee C., Lee K.M. (2014), “The effect of radiation on the immune response to cancers”, *International Journal of Molecular Sciences* 15(1), pp. 927-943.

109. Park J., Moon H., Hong S. (2019), “Recent advances in melanin-like nanomaterials in biomedical applications: a mini review”, *Biomaterials Research* 23(24), pp. 1-10.

110. Patt H.M., Tyree E.B., Straube R.L., Smith D.E. (1949), “Cysteine Protection against X Irradiation”, *Science* 110(2852), pp. 213-214.

111. Perrone D., Ardito F., Giannatempo G., Dioguardi M., Troiano G., Lo Russo L., et al. (2015), “Biological and therapeutic activities, and anticancer properties of curcumin”, *Experimental and Therapeutic Medicine* 10(5), pp. 1615-1623.



112. Phongpaichit S., Nikom J., Rungjindamai N., Sakayaroj J., Hutadilok-Towatana N., Rukachaisirikul V., et al. (2007), "Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants", *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 51(3), pp. 517-25.
113. Pico J.L., Avila-Garavito A., Naccache P. (1998), "Mucositis: Its Occurrence, Consequences, and Treatment in the Oncology Setting", *The Oncologist* 3(6), pp. 446-451.
114. Pollycove M., Feinendegen L.E. (2003), "Radiation-induced versus endogenous DNA damage: possible effect of inducible protective responses in mitigating endogenous damage", *Human and Experimental Toxicology* 22(6), pp. 290-306.
115. Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X., et al. (1998), "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene", *Science* 282(5396), pp. 2085-2088.
116. Pozniak M.A., Christy P.S., Albertini M.R., Duffek S.M., Schiller J.H. (1995), "Interleukin-2-Induced splenic enlargement", *Cancer* 75(11), pp. 2737-2741.
117. Priyam A., Nagar P., Sharma A.K., Kumar P. (2018), "Mussel-inspired polydopamine-polyethylenimine conjugated nanoparticles as efficient gene delivery vectors for mammalian cells", *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces* 161, pp. 403-412.
118. Pugh N. D., Balachandran P., Lata H., Dayan F.E., Joshi V., Bedir E., et al. (2005), "Melanin: dietary mucosal immune modulator from *Echinacea* and other botanical supplements", *International Immunopharmacology* 5(4), pp. 637-647.
119. Pujol J.L., Gibney D.J., Su J.Q., Maksymiuk A.W., Jett J.R. (1993), "Immune response induced in small-cell lung cancer by maintenance therapy with interferon gamma", *Journal of the National Cancer Institute* 85(22), pp. 1844-1850.
120. Rageh M.M., El-Gebaly R.H., Abou-Shady H., Amin D.G. "Melanin Nanoparticles (MNPs) provide protection against whole-body  $\gamma$ -irradiation in mice

via restoration of hematopoietic tissues”, *Molecular and Cellular Biochemistry* 399(1), pp. 59-69.

121. Rastogi M., Revannasiddaiah S., Gupta M.K., Seam R.K., Thakur P., Gupta M. (2012), “When Palliative Treatment Achieves More Than Palliation: Instances of Long-term Survival after Palliative Radiotherapy”, *Indian Journal of Palliative Care* 18(2), pp. 117-121.

122. Real A., Güenechea G., Bueren J.A., Maganto G. (1992), “Radioprotection mediated by the haemopoietic stimulation conferred by AM5: a protein-associated polysaccharide”, *International Journal of Radiation biology* 62(1), pp. 65-72.

123. Roberta M.J., Jennifer A.S., Ron R.A. (2014), “Radioprotective agents for radiation therapy: future trends”, *Future Oncology* 10(15), pp. 2345-2357.

124. Savjani K.T., Gajjar A.K., Savjani J.K. (2012), “Drug solubility: importance and enhancement techniques”, *ISRN Pharmaceutics* 2012, pp. 1-10.

125. Schumacher J. (2016), “DHN melanin biosynthesis in the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea* is based on two developmentally regulated key enzyme (PKS)-encoding genes”, *Molecular Microbiology* 99(4), pp. 729-748.

126. Schlegel C., Paul P., Lee S., Kim K. W., Colon N., et al, (2012), “Protein kinase C regulates bombesin-induced rapid VEGF secretion in neuroblastoma cells”, *Anticancer Research* 32(11), pp. 4691–4696.

127. Schutte B., Nuydens R., Geerts H., and Ramaekers F, (1998), “Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells”. *Journal of neuroscience methods* 86(1), pp. 63–69.

128. Schweitzer A.D., Revskaya E., Chu P., Pazo V.C., Friedman M., Nosanchuk J.D., et al. (2010), “Melanin-covered nanoparticles for protection of bone marrow during radiation therapy of cancer”, *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 78 (5), pp. 1494-1502.

129. Seifter E., Mendecki J., Holtzman S., Kanofsky J.D., Friedenthal E., Davis L., et al.(1988), “Role of vitamin A and beta carotene in radiation protection:

relation to antioxidant properties”, *Pharmacology and Therapeutics* 39(1-3), pp. 357-365.

130. Sekhon B. S. (2012), “Drug-drug co-crystals”, *Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 20(1), pp. 1-2.

131. Shang N., Figini M., Shangguan J., Wang B., Sun C., Pan L., et al.(2017), “Dendritic cells based immunotherapy”, *American Journal of Cancer Research* 7(10), pp. 2091-2102.

132. Shen C.J., Sharma A., Vuong D.V., Erler J.T., Pruschy M., Broggin-Tenzer A. (2014), “Ionizing radiation induces tumor cell lysyl oxidase secretion”, *BMC Cancer* 14, pp. 1-10.

133. Shin Y.S., Shin H.A., Kang S.U., Kim J.H., Oh Y.T., Park K.H., et al. (2013), “Effect of epicatechin against radiation-induced oral mucositis: in vitro and in vivo study”, *PloS one* 8(7), pp. 1-12.

134. Shinde A., Richard L., Jae Kim, R.S., Arti H., Arya A. (2018), “Stereotactic body radiation therapy (SBRT) for early-stage lung cancer in the elderly”, *Seminars in Oncology* 45( 4), pp. 210-219.

135. Shi Z., Zhou Q., Gao S., Li W., Li X., et al. (2019), “Silibinin inhibits endometrial carcinoma via blocking pathways of STAT3 activation and SREBP1-mediated lipid accumulation”, *Life Sciences* 217, pp. 70–80.

136. Singh V.K., Hauer-Jensen M. (2016), “ $\gamma$ -Tocotrienol as a Promising Countermeasure for Acute Radiation Syndrome: Current Status”, *International Journal of Molecular Sciences* 17(5), pp. 1-20.

137. Solano F. (2014), “Melanins: Skin Pigments and Much More Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes”, *New Journal of Science* 2014(5), pp. 1-28.

138. Solano F. (2017), “Melanin and Melanin-Related Polymers as Materials with Biomedical and Biotechnological Applications-Cuttlefish Ink and Mussel Foot Proteins as Inspired Biomolecules”, *International Journal of Molecular Sciences* 18(7), pp. 1-18.

139. Stappers M.H.T., Clark A.E., Amanianda V., Bidula S., Reid D.M., Asamaphan P., et al.(2018), “Recognition of DHN-melanin by a C-type lectin receptor is required for immunity to *Aspergillus*” *Nature* 555(7696), pp. 382-386.
140. Sumpio B.E, Riley J.T, Dardik A. (2002). “Cells in focus: endothelial cell”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34(12), pp. 1508-1512.
141. Takeuchi O., et al., (1999), “Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components”, *Immunity* 11(4), pp. 443-451.
142. Tarangini K., Mishra S. (2013), “Production, Characterization and Analysis of Melanin from Isolated Marine *Pseudomonas* sp. using Vegetable waste”, *Research Journal of Engineering Sciences* 2(5), pp. 40-46.
143. Toshikawa H., Ikenaka A., Li L., Nishinaka-Arai Y., Niwa A., Ashida A., et al. (2021), “N-Acetylcysteine prevents amyloid- $\beta$  secretion in neurons derived from human pluripotent stem cells with trisomy 21”, *Scientific Reports* 11(1), pp. 1-10.
144. Torre L.A, Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. (2015), “Global cancer statistics 2012”, *A Cancer Journal for Clinicians* 65(2), pp. 87-108.
145. Tran-Ly A.N, Reyes C., Schwarze F., Ribera J. (2020), “Microbial production of melanin and its various applications”, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 36(11), pp. 1-9.
146. Travis L.B., Rabkin C.S., Brown L.M., Allan J.M., Alter B.P., Ambrosone C.B., et al. (2006), “Cancer survivorship-genetic susceptibility and second primary cancers: research strategies and recommendations”, *Journal of the National Cancer Institute* 98(1), pp. 15-25.
147. Tsoutsou P.G., Koukourakis M.I.(2006), “Radiation pneumonitis and fibrosis: mechanisms underlying its pathogenesis and implications for future research”, *International Journal of Radiation oncology, Biology, Physics* 66(5), pp. 1281-1293.

148. Turick C.E., Knox, A.S., Becnel, J., Ekechukwu, A.A., & Milliken, C.E. (2010). "Properties and Function of Pyomelanin", *Biopolymer* 23, pp. 450-472.
149. Valle-Casuso J.C, Angin M., Volant S., et al. (2019), "Cellular Metabolism Is a Major Determinant of HIV-1 Reservoir Seeding in CD4+ T Cells and Offers an Opportunity to Tackle Infection", *Cell Metabolism* 29(3), pp. 611-626.
150. Van der Veen S.J, Ghobadi G., de Boer R.A., Faber H., Cannon M.V., Nagle P.W., et al. (2015), "ACE inhibition attenuates radiation-induced cardiopulmonary damage", *Radiotherapy Oncology* 114(1), pp. 96-103.
151. Van Horssen R., ten Hagen T.L.M., Eggermont A. M. M. (2006), "TNF- $\alpha$  in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility", *The Oncologist* 11(4), pp. 397-408.
152. Velpula N., Ugrappa S., Kodangal S. (2013), "A role of radioprotective agents in cancer therapeutics: a review", *International Journal of Basic and Clinical Pharmacology* 2, pp. 677-682.
153. Verheij M., Bartelink H. (2000), "Radiation-induced apoptosis", *Cell and Tissue Research* 301(1), pp.133-142.
154. Verma V. (2016), "Relationship and interactions of curcumin with radiation therapy", *World Journal of Clinical Oncology* 7(3), pp. 275-283.
155. Verma V., Ryan K. M., and Padrela, L. (2021), "Production and isolation of pharmaceutical drug nanoparticles", *International Journal of Pharmaceutics* 603, pp. 1-2.
156. Viani G.A., Viana B.S. (2019), "Adjuvant radiotherapy after surgical resection for adrenocortical carcinoma: A systematic review of observational studies and meta-analysis", *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 159, pp. 20-26.
157. Vijay K.S.D., Thomas M. S. (2019), "The efficacy and safety of amifostine for the acute radiation syndrome", *Expert Opinion on Drug Safety* 18 (11), pp. 1077-1090.

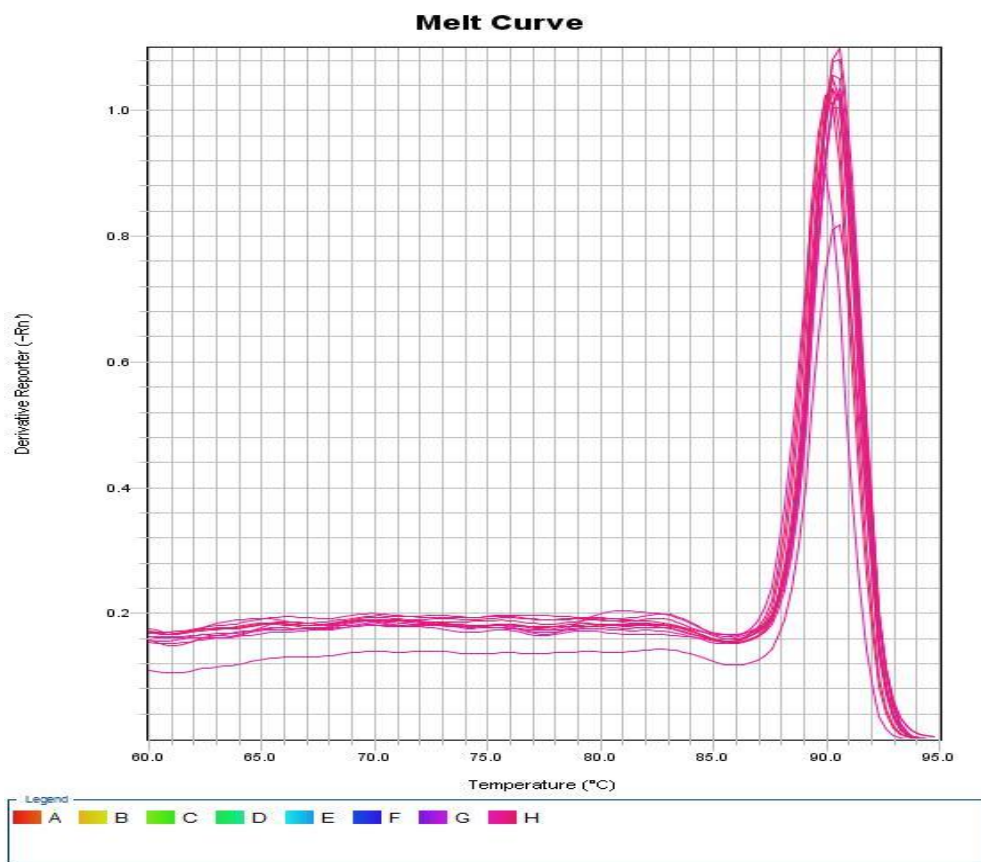
158. Wang C.K. (2010), “The progress of radiobiological models in modern radiotherapy with emphasis on the uncertainty issue”, *Mutation Research* 704(1-3), pp.175-181.
159. Wang D., Ren Y., Shao Y., Yu D., Meng L. (2017), “Facile Preparation of Doxorubicin-Loaded and Folic Acid-Conjugated Carbon Nanotubes@Poly(N-vinyl pyrrole) for Targeted Synergistic Chemo-Photothermal Cancer Treatment”, *Bioconjugate Chemistry* 28(11), pp. 2815-2822.
160. Wang J. W., Pan Y. B., Cao Y. Q., Wang C., Jiang W. D., et al. (2020), “Loganin alleviates LPS-activated intestinal epithelial inflammation by regulating TLR4/NF- $\kappa$ B and JAK/STAT3 signaling pathways”, *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 36(4), pp. 257–264.
161. Wei J., Wang B., Wang H., Meng L., Zhao Q., Li X., et al. (2019), “Radiation-Induced Normal Tissue Damage: Oxidative Stress and Epigenetic Mechanisms”, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019, pp. 1-11.
162. Weiss J.F, Landauer M.R. “History and development of radiation-protective agents”, *International journal of radiation biology* 85(7), pp. 539-573.
163. Yabuuchi E., Ohyama A. (1972), “Characterization of Pyomelanin - Producing Strains of *Pseudomonas aeruginosa*”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 22, pp. 53-64.
164. Yahyapour R., Motevaseli E., Rezaeyan A., Abdollahi H., Farhood B., Cheki (2018a). “Reduction-oxidation (redox) system in radiation-induced normal tissue injury: molecular mechanisms and implications in radiation therapeutics tissue injury: molecular mechanisms and implications in radiation therapeutics”, *Clinical and Translational Oncology* 20(8), pp. 975-988.
165. Yahyapour R., Shabeeb D., Cheki M., Musa A.E., Farhood B., Rezaeyan A., et al. (2018b), “Radiation Protection and Mitigation by Natural Antioxidants and Flavonoids: Implications to Radiotherapy and Radiation Disasters”, *Current Molecular Pharmacology* 11(4), pp. 285-304.

166. Yao Z.Y., Qi J. H. (2016), “Comparison of Antioxidant Activities of Melanin Fractions from Chestnut Shell”, *Molecules* 21(4), pp. 1-11.
167. Zaharah M., Rabeta. (2017), “Antioxidant and antimicrobial activities of squid ink powder”, *Journal of Food Science* 2, pp. 82-88.
168. Zhang Z., Liu X., Chen D., Yu J. (2022), “Radiotherapy combined with immunotherapy: the dawn of cancer treatment”, *Signal transduction and targeted therapy* 7(1), pp. 1-34.
169. Zhao H., Zeng Z., Liu L., Chen J., Zhou H., Huang L., et al. (2018), “Polydopamine nanoparticles for the treatment of acute inflammation-induced injury”, *Nanoscale* 10(15), pp. 6981-6991.
170. Zhao L., Liu L., Guo B., Zhu B. (2015), “Regulation of adaptive immune responses by guiding cell movements in the spleen”, *Frontiers in Microbiology* 2015(6), pp 1-6.

## PHỤ LỤC

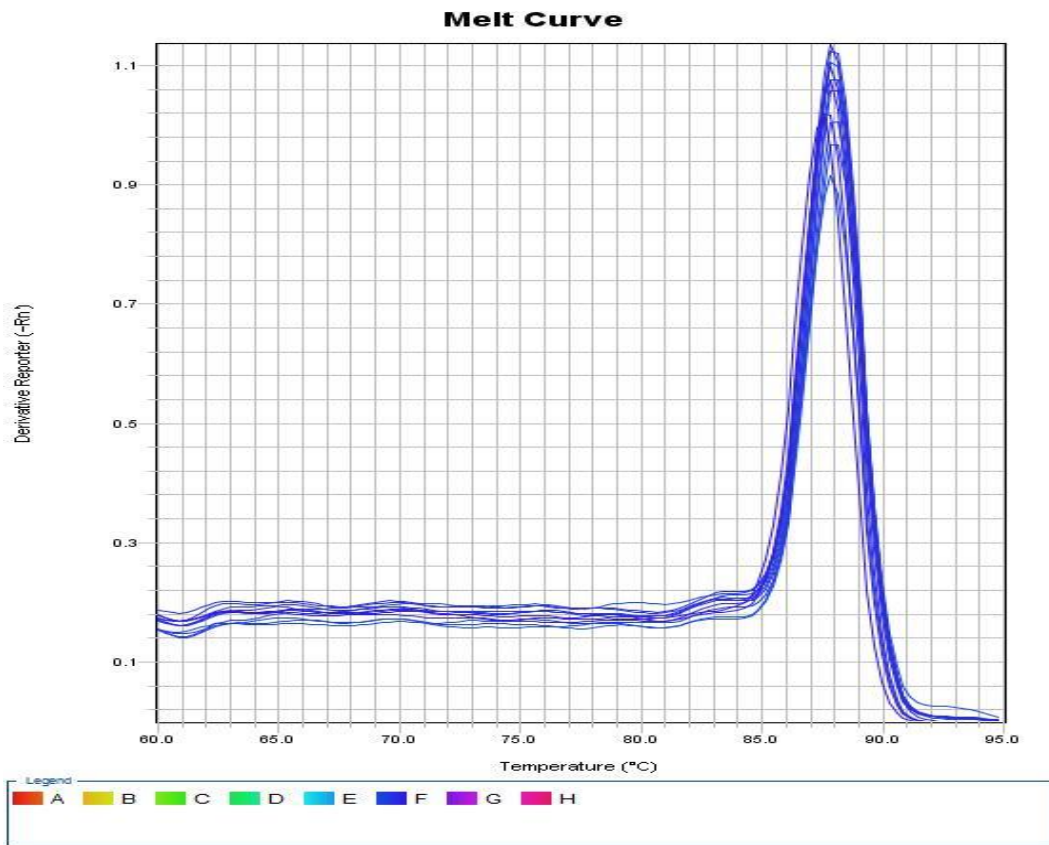
Bảng 1: Giá trị chu kỳ ngưỡng trung bình của các gen khảo sát trên mô hình *in vitro*

Genes			$\beta$ -actin (Ct)	H.Caspase 3 (Ct)	H.TNF- $\alpha$ (Ct)	H.BAX (Ct)	H.SOD1 (Ct)	H.VEGFA	
Các Nhóm thử nghiệm	Nhóm không chiếu xạ	NIL	TB	20.7	30.6	31.7	26.7	26.8	30.3
			SD	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	0.4
		Mel	TB	20.6	30.1	31.4	26.7	26.7	32.1
			SD	0.4	0.03	0.03	0.1	0.4	0.6
	Nhóm chiếu xạ	3Gy	TB	20.4	29.4	30.3	25.9	25.2	30.0
			SD	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5	0.5
		3GyM	TB	20.4	29.7	31.2	26.1	23.9	30.2
			SD	0.2	0.4	0.36	0.27	0.1	0.5
		5Gy	TB	22.1	30.3	31.7	27.4	25.9	28.5
			SD	0.1	0.04	0.1	0.2	0.6	0.1
		5GyM	TB	20.5	28.9	30.4	26.3	26.9	28.0
			SD	0.2	0.03	0.3	0.2	0.1	0.6

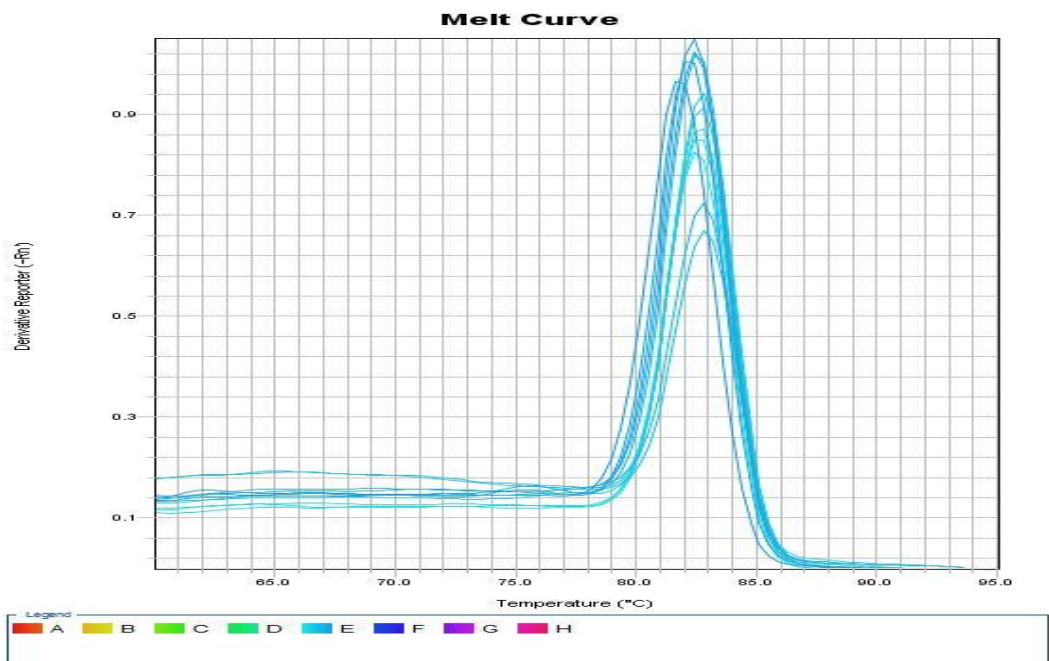


Hình 1: Biểu đồ đỉnh chảy của gene  $\beta$ -actin của các mẫu nghiên cứu.

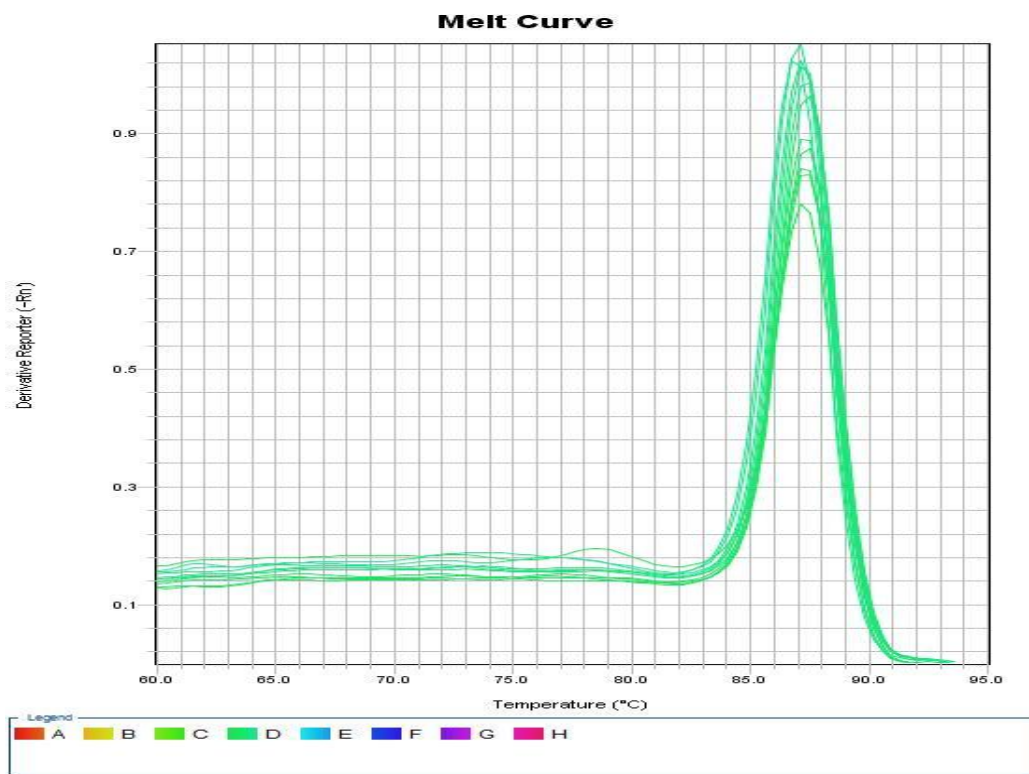




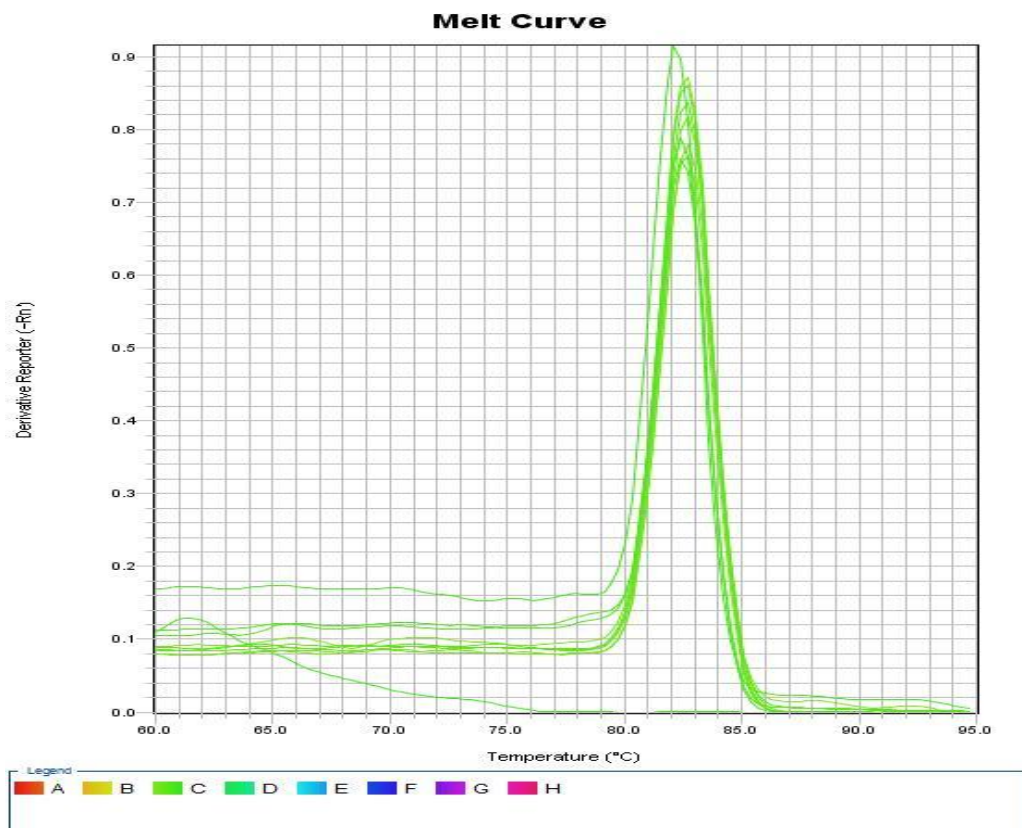
Hình 2: Biểu đồ đỉnh chảy của gene *BAX* của các mẫu nghiên cứu.



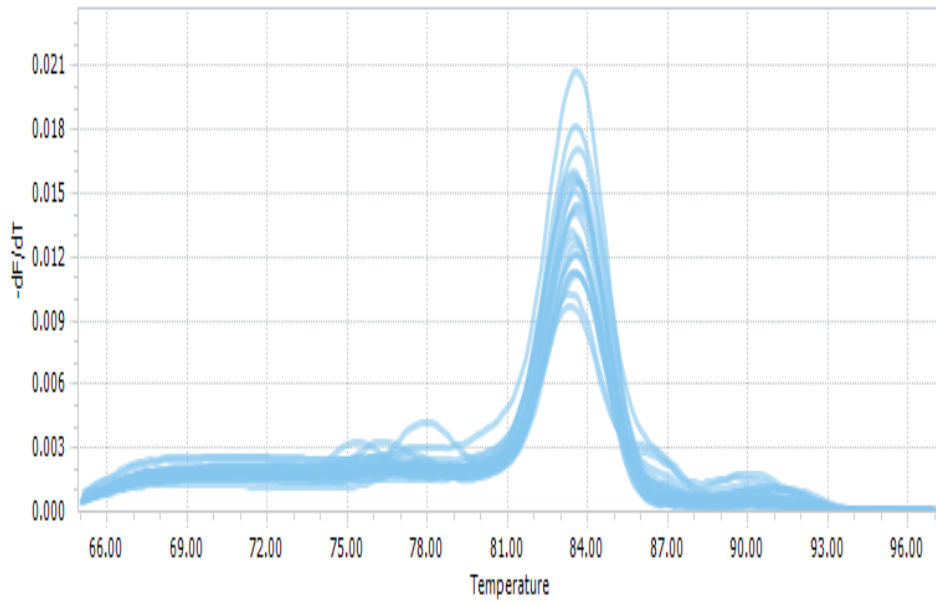
Hình 3: Biểu đồ đỉnh chảy của gene *Caspase 3* của các mẫu nghiên cứu.



Hình 4: Biểu đồ đỉnh chảy của gene *TNF-α* của các mẫu nghiên cứu.



Hình 5: Biểu đồ đỉnh chảy của gene SOD 1 của các mẫu nghiên cứu.

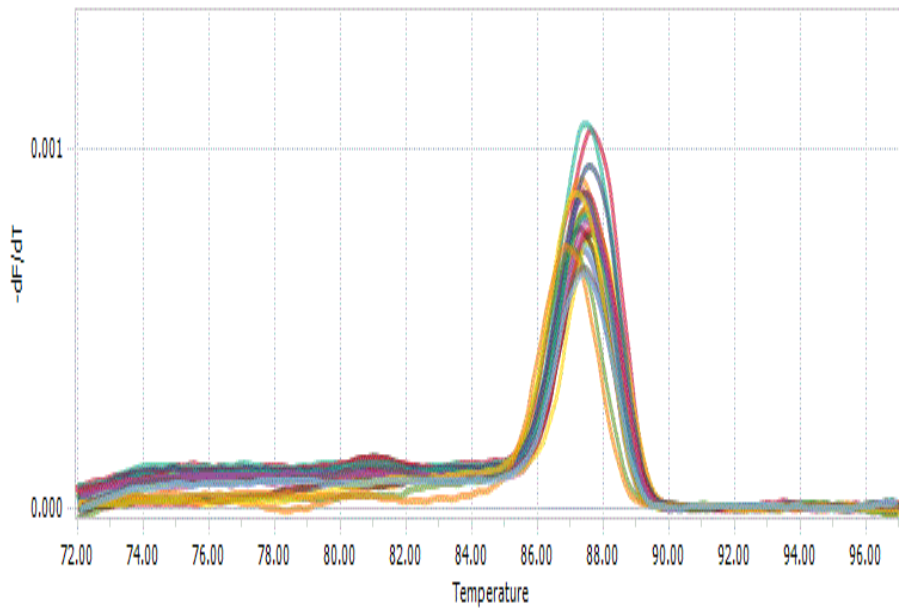


Hình 6: Biểu đồ đỉnh chảy của gene VEGFA của các mẫu nghiên cứu.

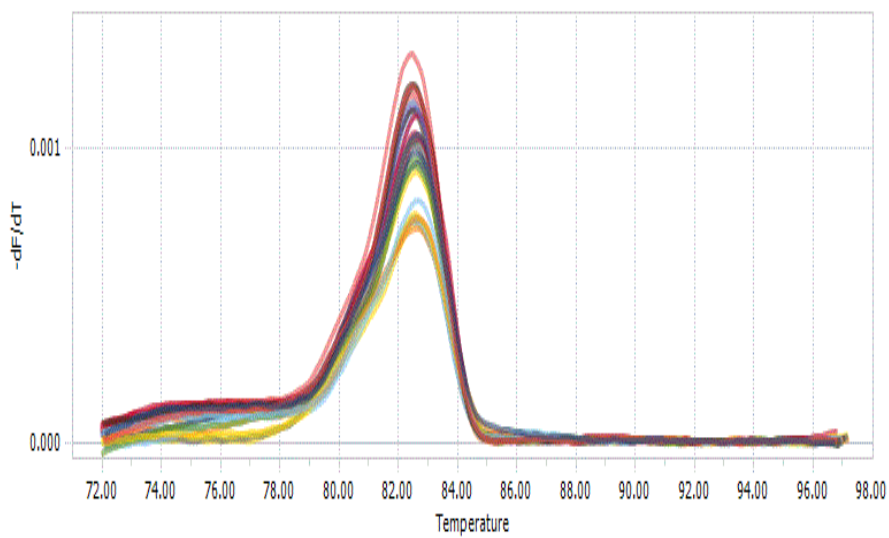
Bảng 2: Giá trị chu kỳ ngưỡng trung bình của các gen ở mô lách và mô khối u

Genes		GAPDH	TNF- $\alpha$	IL-2	Caspase3	$\beta$ -actin	TNF- $\alpha$	$\beta$ -actin	BAX	$\beta$ -actin
Nhóm chiếu xạ	IR1	19.2	30.8	28.8	35.3	25.7	25.4	20.5	26.2	21.2
	SD	0.06	0.5	0.03	0.3	0.2	0.1	0.2	2.7	3.0
	IR2	18.5	31.2	27.5	30.8	20.4	24.6	20.4	24.6	19.6
	SD	0.07	0.6	0.2	0.08	0.1	0.08	0.1	0.05	0.5
	IR3	19.83	31.2	28.8	30.5	22.6	24.7	20.2	24.7	20.2
	SD	0.02	0.5	0.03	0.4	0.3	0.03	0.06	0.03	0.03
	IR+Mel 1	19.6	30.3	28.3	31.8	21.4	24.6	20.2	28.7	24.2
	SD	0.2	0.2	0.2	0.05	0.2	0.1	0.04	0.1	0.04
	IR+Mel 2	18.91	29.8	27.5	30.7	20.9	24.2	20.5	26.8	21.7
	SD	0.01	0.3	0.06	0.3	0.03	0.1	0.08	1.5	2.1
	IR+Mel 3	18.1	28.5	26.2	30.8	23.3	25	21.3	27.3	22.05
	SD	0.2	0.4	0.1	0.1	0.4	0.3	0.2	2.4	2.5
Nhóm không chiếu xạ	NC1	18.6	29.2	26.4	36.1	22.9	29.1	24.8	30.2	25.4
	SD	0.1	0.1	0.2	0.2	0.03	0.1	0.03	0.1	0.1
	NC2	20.3	30.9	28.1	33.4	22.8	27.5	23.1	29.1	24.9
	SD	0.1	0.04	0.1	0.08	0.03	0.2	0.08	0.1	0.03
	NC3	20.0	30.0	27.9	32.6	22.4	27.5	23.3	27.8	23.7
	SD	0.2	0.3	0.2	0.2	0.06	0.2	0.03	1.1	0.9
	Nil 1	20.6	30.7	27.8	-	-	-	-	-	-
	SD	0.04	0.2	0.3	-	-	-	-	-	-
	Nil 2	20.3	30.1	27.5	-	-	-	-	-	-
	SD	0.1	0.2	0.3	-	-	-	-	-	-
	Nil 3	20.6	29.1	28.0	-	-	-	-	-	-
	SD	0.2	0.4	0.2	-	-	-	-	-	-

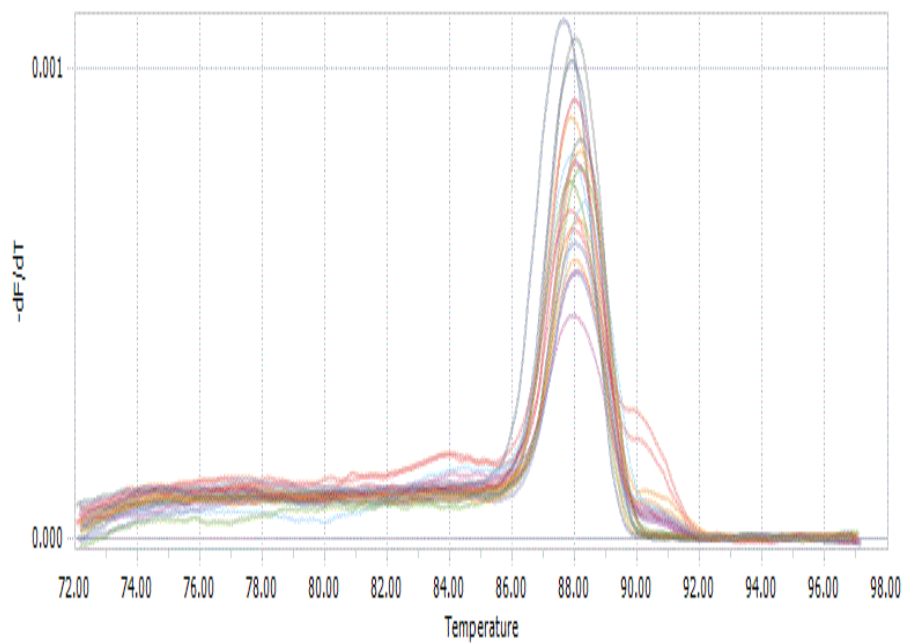
Ghi chú: “-“: Không thử nghiệm



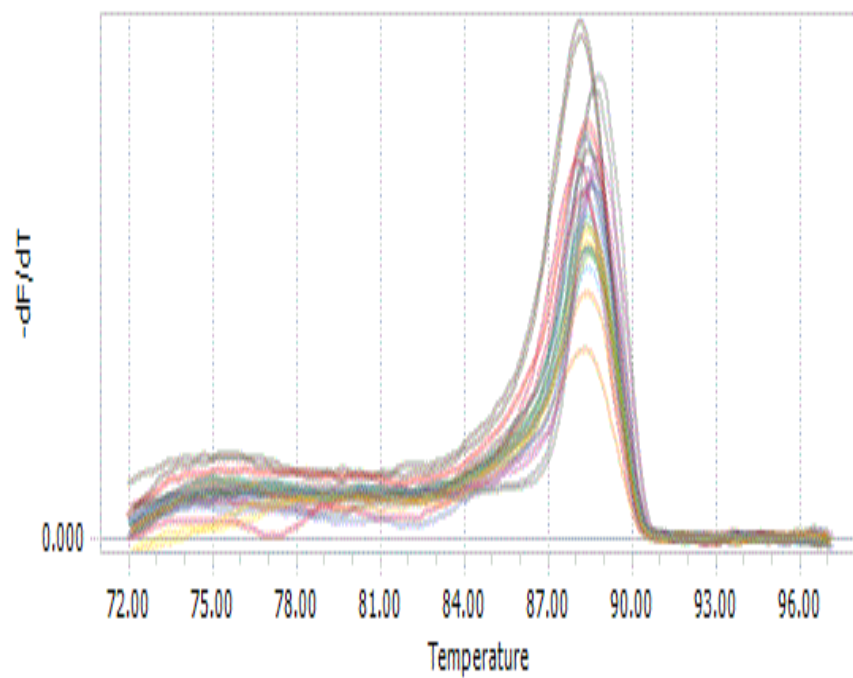
Hình 7: Biểu đồ đỉnh chảy của gen *TNF- $\alpha$*  ở mô khối u.



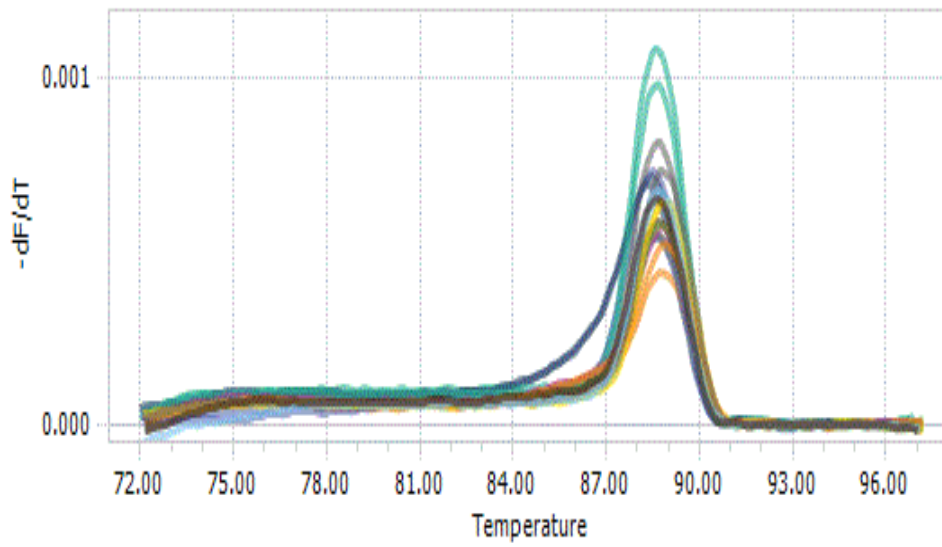
Hình 8: Biểu đồ đỉnh chảy của gen *Caspase 3* ở mô khối u.



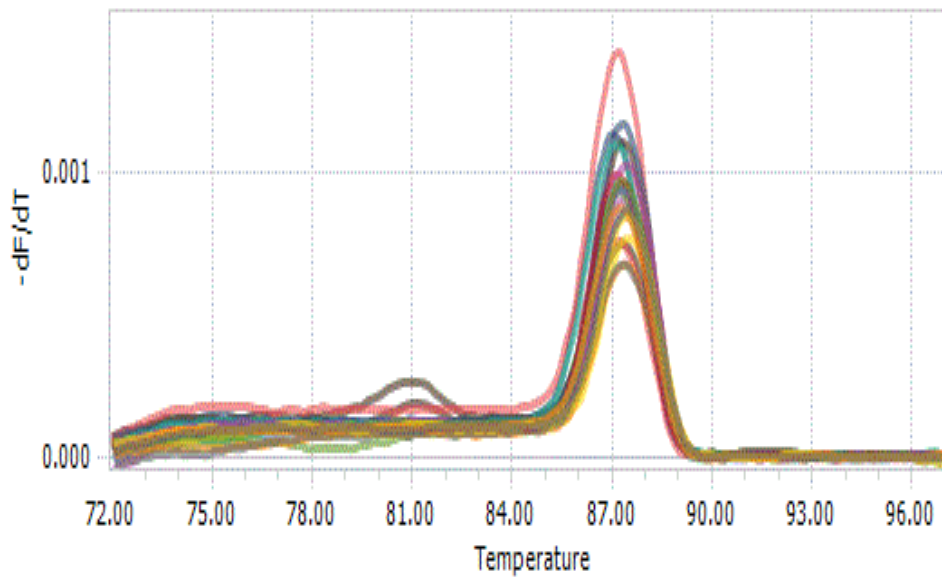
Hình 9: Biểu đồ đỉnh chảy của gene *Mouse.Bax* ở mô khối u.



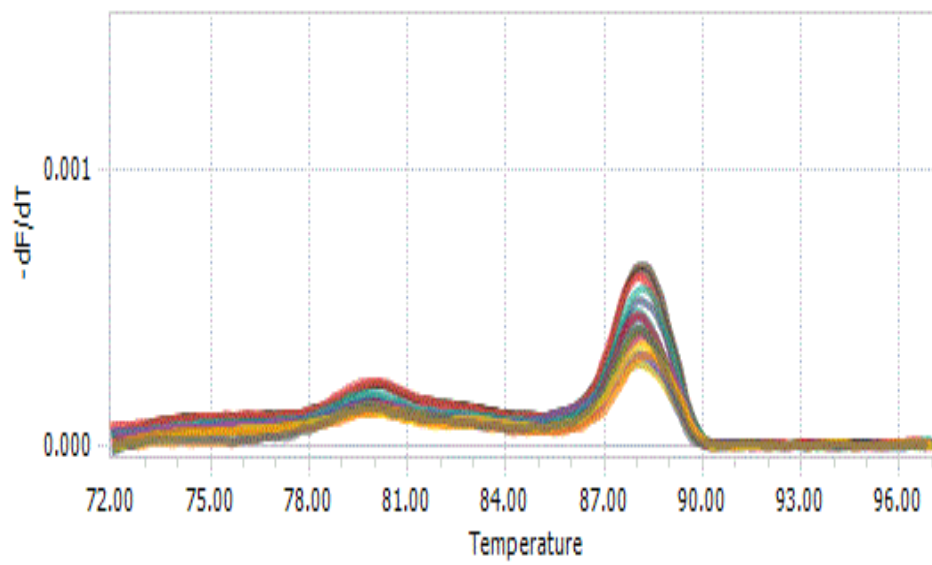
Hình 10: Biểu đồ đỉnh chảy của gene *Mouse.β-actin* ở mô khối u.



Hình 11: Biểu đồ đỉnh chảy của gene *GAPDH* ở mô khối lách.



Hình 12: Biểu đồ đỉnh chảy của gene *TNF-α* ở mô lách.



Hình 13: Biểu đồ đỉnh chảy của các gen *IL-2* ở mô lách.



**HỘI ĐỒNG (For committee only) ngày 14 tháng 3 năm 2018**

<b>HỘI ĐỒNG</b> (Committee column)	Đánh giá mức hoàn thành thông tin: ngày 14 tháng 3 năm 2018 (Review completion data)
	Tài liệu bổ sung: (Argument for amendment of document)
	Tài liệu kèm theo: animal experimental plan (project 108.02-2017.07) (Attach document)
	Đánh giá kết quả (Review result):  Đề cương sử dụng động vật phù hợp với qui định và nguyên tắc thí nghiệm trên động vật của Học viện Quân y (This animal experimental protocol complies with the rules and regulations of animal experiments in Vietnam Military Medical University)  Đề cương sử dụng động vật không phù hợp với qui định và nguyên tắc thí nghiệm trên động vật của Học viện Quân y (This animal experimental protocol does not comply with the rules and regulations of animal experiments in Vietnam Military Medical University)

**GIÁM ĐỐC VÀ CƠ QUAN CHỨC NĂNG (For President and administrative use only) ngày 19 tháng 3 năm 2018**

<b>CƠ QUAN CHỨC NĂNG (administrative use only)</b>		
Ngày đăng ký: 09/3/2018 (Registration date)	Người đăng ký: Hò Anh Sơn (Person in charge)	
Người tiếp nhận đăng ký: Nguyen Tuan Anh (Official who received an animal testing plan)	Người xử lý đăng ký: Nguyen Tuan Anh (Official who processed an animal testing plan)	
Đánh giá kết quả (Review result)	Chấp thuận (Approved)	Không chấp thuận (disapproved)
Chỉ điền khi được chấp thuận (Enter only when approved)	Ngày kết thúc đăng ký: 12/2019 (Registration completion date)	Số đăng ký: IACUC-025/18 (Registration number)
Chỉ điền khi không được chấp thuận (Enter only when disapproved)	Lý do: (Reason for disapproval)	

<b>GIÁM ĐỐC (President approved column)</b>	
<b>GIÁM ĐỐC</b> (President approved column)	Ngày 19 tháng 3 năm 2018  Chấp thuận đề cương sử dụng động vật (This animal experimental protocol has been approved) Số: IACUC-025/18 (Approval number)
	 Hoàng Văn Lương