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

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội – 2023

Công trình được hoàn thành tại: Khoa sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội.

Người hướng dẫn khoa học: PGS. TS. Nguyễn Đình Thắng

Phản biện: PGS.TS. Lê Quang Huấn

Phản biện: PGS.TS. Nguyễn Hải Hà

Phản biện: PGS.TS. Vũ Thị Thơm

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ họp tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.
Vào hồi giờ ngày tháng năm 2023

Có thể tìm hiểu luận án tại:
- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Trung tâm Thư viện và Tri thức số - Đại học Quốc gia Hà Nội

MỞ ĐẦU

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, bệnh nhân được chỉ định 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 phương pháp điều trị ung thư hiệu quả, tuy vậy, các tác dụng phụ của tia xạ lên sự chết và phát triển của tế bào khỏe mạnh ở xung quanh và xa khối u là những vấn đề khó khăn trong nhiều thập kỷ.

Liệu pháp chiếu xạ sử dụng các tia xạ một cách trực tiếp trên cơ thể bệnh nhân và có thể gây ra tác dụng phụ cấp tính và mãn 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 quan tâm 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 các gốc tự do 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 phụ tia UV. 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 làm hạn chế khả năng ứng dụng của melanin trong lĩnh vực y sinh nói chung 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 1μm (melanin có kích thước nano) và thử nghiệm khả năng bảo vệ tế bào sau quá trình xạ trị của melanin có kích thước nano 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 lành 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 melanin có kích thước nano 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 chế tạo melanin có kích thước nano 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 melanin có kích thước nano lên một số chức năng sinh lý của tế bào trên mô hình *in vitro*

- Đánh giá độc tính của hạt melanin có kích thước nano 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 melanin có kích thước nano

- Đánh giá sự tác động của melanin có kích thước nano lên quá trình liền vết thương trên mô hình *in vitro*

- Đánh giá khả năng gây lão hóa của hạt melanin có kích thước nano 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 melanin có kích thước nano dưới tác dụng của tia xạ

- Phân tích sự thay đổi dấu ấn phân tử liên quan đến quá trình apoptosis và kháng oxi hóa của tế bào dưới tác dụng của melanin có kích thước nano 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 melanin có kích thước nano trên chuột thí nghiệm. Xác định ngưỡng nồng độ an toàn của melanin có kích thước nano 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 phương pháp chiếu xạ tia X

2.3.4. Đánh giá khả năng bảo vệ của melanin có kích thước nano đối với tế bào thường và mô lành bằng phương pháp phân tích 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 chất bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ tiềm năng và có khả năng hấp phụ 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 bất kì một nghiên cứu nào được thực hiện một cách đầy đủ nhằm đánh giá vài 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 (NH_4OH và NaOH).

- Nghiên cứu đã cơ bản đánh giá được vai trò của melanin có kích thước nano tác động lên các quá trình sinh lý của tế bào bao gồm: độc tính tế bào, liền vết thương, sự sinh mạch máu và lão hóa tế bào trên mô hình *in vitro.* Giá trị IC_{50} của melanin có kích thước nano trên dòng tế bào NIH 3T3 và HaCaT lần lượt là 53 và 39 (µg/mL). Đối với dòng hUVEC, kết quả cho thấy không xác định được giá trị IC_{50} của melanin có kích thước nano trên dòng tế bào hUVEC ở dải nồng độ <100 (µg/mL). Melanin có kích thước nano có khuynh hướng làm chậm khả năng di chuyển tế bào trong quá trình lành thương. Ở thời điểm 72 h bổ sung melanin có kích thước nano ở các nồng độ khác nhau, khả năng làm lành vết thương ở các giếng đối chứng, giếng bổ sung melanin có kích thước nano 75 µg/mL và 50 µg/mL, 25 µg/mL lần

lượt 95%, 60%, 84%, và 89%. Ở mức liều độ 50 µg/mL, melanin có kích thước nano 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 melanin có kích thước nano. Melanin có kích thước nano làm tăng tỷ lệ sống sót của tế bào HaCaT (đến 10%), giảm nhẹ tỷ lệ sống sót của tế bào hUVEC sau xạ trị và không có tác dụng bảo vệ trên dòng nguyên bào sợi chuột.

- Nghiên cứu đã thử nghiệm vai trò của melanin có kích thước nano trong xạ trị ung thư trên mô hình chuột gây u xạ được xạ trị bằng tia X. Melanin có kích thước nano làm giảm tình trạng viêm và xơ hóa nặng ở mô lách của chuột gây ung thư được xạ trị. Melanin có kích thước nano làm tăng mức độ biểu hiện *IL-2* và *TNF-α* ở mô lách sau xạ trị tương ứng với 1,72 và 2,14 lần so với đối chứng. Melanin có kích thước nano 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 tránh tác hại của phóng xạ là vấn đề có ý nghĩa khoa học và thực tiễn nhằm tìm kiếm giải pháp nâng cao chất lượng cuộc sống và kéo dài tuổi thọ cho các bệnh nhân ung thư. Luận án cung cấp những dữ liệu khoa học mới về cách chế tạo hạt melanin có kích thước nano. Các dữ liệu thực nghiệm về khả năng bảo vệ tế bào thường và mô lành trong xạ trị của melanin có kích thước nano 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

1.1. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ UNG THƯ

Ung thư là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây tử vong trên toàn thế giới. Xạ trị là phương pháp điều trị ung thư chính được sử dụng rộng rãi. Tuy nhiên, đây là phương pháp điều trị có khả năng gây ra nhiều tác dụng phụ cấp tính và mãn tính cho bệnh nhân ung thư.

1.1.1 Dấu hiệu đặc trưng của bệnh ung thư

Sự tăng sinh bất thường của tế bào với khả năng xâm lấn hoặc lan sang các bộ phận khác của cơ thể tạo nên tập hợp khối u. Các tế bào ung thư mang một số đặc điểm chung bao gồm khả năng tăng sinh mất kiểm soát, có khả năng phân chia vô thời hạn, có khả năng tránh quá trình chết theo chương trình, hình thành mạch máu bao quanh khối u, có khả năng xâm lấn và di căn.

1.1.2 Một số phương pháp điều trị bệnh ung thư

Một số phương pháp điều trị bệnh ung thư được sử dụng chính hiện nay bao gồm: hóa trị liệu, phẫu thuật, liệu pháp miễn dịch, xạ trị.

1.2. XẠ TRỊ UNG THƯ VÀ LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN PHƯƠNG PHÁP XẠ TRỊ UNG THƯ

Ngay sau khi nhà vật lý người Đức Wilhelm Röntgen, năm 1895 phát minh ra tia X, nó đã được sử dụng để điều trị bệnh ung thư. Tuy nhiên, sự thiếu hụt nguồn phát xạ và những hiểu biết chưa đầy đủ về

những nguy hại của tia xạ đã khiến cho bệnh nhân và các nhà khoa học trực tiếp sử dụng chúng bị ảnh hưởng trực tiếp bởi tác dụng phụ của tia xạ. Cùng với thời gian, phương pháp xạ trị được nghiên cứu và tối ưu dần để tận dụng khả năng tiêu diệt tế bào ung thư và hạn chế phần nào tác hại của năng lượng bức xạ lên tế bào thường và cơ thể bệnh nhân.

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 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 [Gillette E. L, 1987].

Các loai tia xạ thường được dùng trong điều trị ung thư: bức xạ photon, bức xạ hạt, bức xạ ion nặng.

1.2.2. Những ưu điểm của phương pháp xạ trị

Xạ trị triệt căn thường được dùng trong mục tiêu tiêu diệt hoàn toàn khối u để điều trị bệnh và là một liệu pháp có chi phí thấp [Barton M.B, 2006].

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.

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. Sau phẫu thuật cắt bỏ khối u, phương pháp xạ trị bổ trợ được chỉ định để giảm nguy cơ về mặt xác suất trong trường hợp có thể còn sót những tế bào ung thư chưa được phát hiện và loại bỏ.

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 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. Số lượng tế bào đột biến 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 có khả năng tấn công và phá hủy các đại phân tử sinh học bên trong tế bào bao gồm các phân tử đường, lipit, và axit nucleic. Xạ trị còn tác động lên các enzyme có vai trò giữ cân bằng nội mô dẫn đến rối loạn sự chuyển hóa bên trong tế bào. Các tổn thương gây ra bởi xạ trị có thể xuất hiện sau vài tháng hoặc vài năm. Xạ trị có thể ảnh hưởng đến tình trạng tim, phổi, da, thận, đường tiêu hóa, thậm chí là cả hệ thần kinh và hình thành ung thư thứ cấp. Ở giai đoạn muộn, một số hiện tượng được quan sát thấy như sự hình thành xơ hóa khu trú ở mạng lưới fibrin sau một thời gian dài tiếp xúc với tia xạ. Sự tổn thương mạch máu, sự co thắt động mạch, bệnh viêm mạch máu, teo cơ, thiếu máu do thiếu oxi cục bộ thường xuất hiện sau thời gian bệnh nhân tiếp xúc với tia xạ.

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.

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

Hiện nay để tăng hiệu quả của xạ trị và giảm tác dụng phụ trong điều trị ung thư là một trong những vấn đề được quan tâm nghiên cứu. Hướng khắc phục đầu tiên đó là phát triển các phương pháp chiếu xạ để tối ưu liều chiếu xạ, góc độ tiếp xúc 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.

Một hướng tiếp cận khác là nghiên cứu phát triển các hợp 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 đối với tế bào ung thư và các chất bảo vệ bức xạ đối với tế bào lành. Đây là các hóa chất có thể cải biến sự đáp ứng của tế bào đối với tia xạ. Nhiều chất đã được nghiên cứu và được ứng dụng trong lâm sàng như 5-fluorouracil và amifostine, [Fernandes J.M, 2020].

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

Tia xạ tác động lên tế bào theo nhiều hướng khác nhau. Cùng với nó là các phản ứng để bảo vệ sự sống sót của tế bào cũng có thể được kích hoạt theo nhiều cơ chế. Các chất bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ có thể tác động lên tế bào thường bao gồm hấp thụ ROS, kháng viêm, sửa chữa DNA, tái tạo tế bào máu, và kích hoạt các con đường tín hiệu tế bào để tạo ra các phản ứng có lợi cho cơ thể chống lại tác dụng phụ của xạ trị.

1.3.2. Các chỉ tiêu và đặc tính của các chất bảo vệ tia xạ

Các hợp chất có khả năng bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ thường có một số tính chất như:

- Khả năng loại bỏ gốc tự do của hợp chất
- 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)
- Có khả năng điều hòa miễn dịch, điều chỉnh mức độ biểu hiện của các gen nhạy cảm với oxy hóa-khử

1.3.3. Phân nhóm các hợp chất có khả năng bảo vệ bức xạ

Các hợp chất có khả năng bảo vệ bức xạ có thể phân thành 03 nhóm chính: (1) nhóm hợp chất bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ, (2) nhóm hợp chất thích ứng và (3) nhóm hợp chất hấp phụ tia xạ. Ở nhóm hợp chất bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ thường là hợp chất có nhóm chức năng sulfhydryl và các chất chống oxi hóa khác. Chúng có khả năng làm bền vững cấu trúc DNA và khả năng làm giảm tác hại của các ROS bên trong tế bào trước sự phá hủy của tia xạ. Ở nhóm này có khả năng bảo vệ một số cơ quan quan trọng như não bộ, tủy xương, ruột. Nhóm hợp chất thích ứng 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 hợp chất hấp phụ tia xạ bảo vệ cơ thể từ các tia xạ. Các loại thuốc ở nhóm này có khả năng ngăn ngừa sự kết hợp của radioiodine giữa tuyến giáp và sự hấp phụ của các hạt nhân phóng xạ [Cherupally K], [Livesey J, 1987].

1.4. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ MELANIN

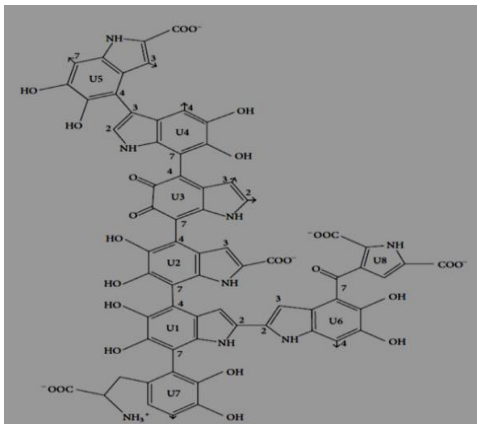
Melanin là một nhóm sắc tố có bản chất là polymer tự nhiên và được tìm thấy rộng rãi ở hầu hết sinh vật sống. Các sắc tố melanin được phân loại dựa vào cấu trúc hóa học của chúng. Cho đến nay nhiều nhóm melanin được được tách từ các nguồn tự nhiên như eumelanin, pheomelanin, neuromelanin và allomelanin. 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 oxi hóa, kháng khuẩn và điều hòa thân nhiệt.

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 $C_{18}H_{10}O_4N_2$.

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

Theo các nghiên cứu đã công bố trước đây, melanin có thể được phân thành các nhóm như eumelanin (hình 1.3), pheumelanin, neuromelanin, catechol-melanin, DHN-melanin, pyomelanin và có các nguồn gốc khác nhau. 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. 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.



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

1.4.3. Hoạt tính sinh 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 học đa dạng. Một số hoạt tính sinh học của melanin đã được nghiên cứu trước đó như hoạt tính kháng oxi hóa, kháng khuẩn, 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 phụ tia uv và tia xạ ở các nhóm melanin có nguồn gốc từ tự nhiên hay tổng hợp.

1.4.3.1. Hoạt tính kháng oxi hóa của melanin.

Melanin từ các nguồn gốc khác nhau có hoạt tính kháng oxi hóa đáng kể. Vai trò kháng oxi hóa của melanin thường được đánh giá thông qua khả năng hấp thụ các electron, oxi đơn phân tử hay gốc supeoxide. Hoạt kháng oxi 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].

1.4.3.3. Khả năng điều hòa hệ thống miễn dịch của melanin

Có nhiều nghiên cứu chứng minh melanin có vai trò điều hòa 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. Có nhiều nghiên cứu cho thấy khả năng điều hòa miễn dịch của melanin thông qua ức chế hay kích thích các cytokine tiền viêm (IL-1, IL-6, IL-11) hay các cytokine (yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF-α), interleukin 6 (IL-6), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF-A), bạch cầu đơn nhân, tổng số tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và trên dòng tế bào THP-1.

1.4.3.4. Tính chất bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ và kháng sự tăng sinh khối u của melanin

Melanin có khả năng bảo vệ tránh tác hại của phóng xạ, kháng sự tăng sinh khối u. Có nhiều nghiên cứu chứng minh khả năng hấp phụ tia UV của melanin, và bảo vệ tủy xương trong quá trình xạ trị trên mô hình chuột thí nghiệm.

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

Cả hai loại eumelanin và pheomelanin đều có khả năng hấp phụ photon từ tia cực tím và các tia sáng nhìn thấy trong quang phổ mặt trời. Melanin có khả năng bảo vệ da khỏi sự tấn công của tia cực tím. Ngoài ra, melanin còn có khả năng bảo vệ tế bào tủy xương sau xạ trị bằng tia gamma trên mô hình chuột thí nghiệm.

Hoạt tính kháng sự tăng sinh tế bào ung thư

Một số melanin tách chiết từ các nguồn tự nhiên hay tổng hợp có khả năng kháng lại sự phát triển của các tế bào ung thư buồng trứng (Hela), ung thư da (Skmel-28), ung thư bạch cầu cấp (Th1).

1.4.4. Các ứng dụng chính của melanin có kích thước nano

Trong thời gian gần đây, melanin được biết đến là một polymer sinh học có nhiều hoạt tính sinh học đa dạng. Đặc tính đa chức năng và khả năng tương thích sinh học của melanin đã khiến cho nhiều nhà khoa học phát triển vật liệu ở kích thước nano bằng cách mô phỏng cấu trúc hóa học và 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* ở kích thước nano. Bên cạnh các đặc tính giống melanin, các đặc tính kết dính linh loạt của melanin có nguồn gốc là polydopamine đã mở rộng thêm khả năng ứng dụng trên lĩnh vực y sinh và môi trường [Lee H, 2007], [Jihyo Park, 2019].

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

Công nghệ nano đã được ứng dụng rộng rãi trong vài thập kỷ qua đặc biệt trong lĩnh vực y sinh, dược học và đóng góp chính cho doanh thu của các hệ thống phân phối thuốc. Các hạt nano được tạo ra bằng nhiều phương pháp khác nhau. Các hệ nano đã được sử dụng trong vận chuyển, phân phối thuốc, điều trị

ung thư cũng như trong điều trị các loại bệnh khác. Hệ thống phân phối thuốc có thể được sử dụng để vận chuyển nhiều loại thuốc biệt dược như kháng sinh, vacxin, vận chuyển protein trong hệ thống tuần hoàn và giải phóng ở vị trí đích. Các phương pháp để nano hóa của hạt vật liệu rất đa dạng và phong phú. Các đặc tính của vật liệu và hoạt chất dược phẩm là khác nhau, do đó, các phương pháp nano hóa được sử dụng phụ thuộc rất lớn vào đặc tính và tính chất của chúng. 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 hạt nano dưới dạng huyền phù. Những thay đổi được sử dụng trong công nghệ chế tạo hạt nano bao gồm sự thay đổi pH của dung dịch, hướng hydrat (hydotropic), đồng kết tinh (co-crystallization), đồng dung môi (co-solvency), tạo muối (salt formation). Các phương pháp này nhằm góp phần giải quyết vấn đề thách thức trong nghiên cứu và phát triển thuốc là đặc tính khó hòa tan và tính sinh khả dụng kém của nhiều hoạt chất dược phẩm.

1.4.3.2. Melanin có kích thước nano tổng hợp nhân tạo

Melanin có kích thước nano thương được tổng hợp nhân tạo bằng phương pháp hóa học và sử dụng tyrosinase làm xúc tác. Các enzyme này chuyển hóa 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 và các hợp chất có cấu trúc tương tự với melanin.

1.4.3.3. Tính chất kháng viêm và hấp phụ bức xạ của melanin có kích thước nano trong xạ trị ung thư

Có một vài nghiên cứu về khả năng kháng viêm và hấp phụ bức xạ của melanin có kích thước nano trên mô hình chuột. Trong các 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 melanin có kích thước nano trong tủy xương. Kết quả nghiên cứu cho thấy việc tiêm melanin có kích thước nano 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].

1.4.3.4. Melanin có kích thước nano là hệ thống vận chuyển thuốc hướng đích

Trong thời gian gần đây, melanin đã được đưa về dạng kích thước nano để tăng cường hoạt tính sinh học của nó và mở ra các ứng dụng ở mảng y sinh trong việc làm phức hợp vận chuyển thuốc biệt dược, kháng ung thư và bảo vệ tế bào lành sau xạ trị.

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 ± 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

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_2SO_4, NH_4OH (Trung Quốc), DMSO (Gibco, USA). Đệm phosphate (PBS), huyết thanh thai bò (FBS, Gibco, USA), các loại môi trường nuôi cấy bao gồm môi trường DMEM 4,5 g/L glucose (Pan, Đức), môi trường DMEM 1,0 g/L glucose (Pan, Đức), RPMI (Pan, Đức) và EBM-2 (Endothelial Basal Medium, Lonza, Switzerland). Thuốc nhộm trypan blue, penicillin/streptomycin (Gibco, USA), đệm ly giải hồng cầu (ELB) (BD Biosciences, US), trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich, USA), sunforhodamine B (Sigma-Aldrich, USA), DAPI Staining solution (Abcam, Cambridge, UK).

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 ARN (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

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

Kít đánh giá sự già hóa tế bào (Senescence Cells Histochemical Staining Kit) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

EGM-2 SingleQuot Kit (Endothelial cell growth medium-2), Sigma, 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, ĐHQG 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 trung ương quân đội 103.

- 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).

- Hệ thống máy phân tích tế bào theo dòng chảy Fact Canto II và hệ thống máy phân tích tế bào theo dòng chảy Fact lysic (BD Biosciences, USA).

- Hệ thống máy Realtime PCR LightCycler® 96 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Đức), Hệ thống máy Realtime PCR 7500 (Applied Biosystems, USA).

- 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, Nhật Bản), 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, KĨ THUẬT ĐƯỢC SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU

2.3.1. Nhóm phương pháp chế tạo hạt nano melanin và xác định đặc tính của hạt

2.3.1.1. Phương pháp chế tạo hạt nano melanin

Sử dụng alkaline để phân cắt melanin về kích thước nano và xác định hàm lượng melanin có kích thước nano bằng phương pháp đo quang phổ ở bước sóng 475 nm theo nghiên cứu đã công bố trước đó [Hu D.N, 2008].

2.3.1.2. Các phương pháp xác định đặc tính của vật liệu

Phương pháp chụp ảnh bằng kính hiển vi điện tử (Nano-SEM) để xác định hình thái và kích thước của vật liệu

Phương pháp đo phổ hồng ngoại FTIR xác định các nhóm chức năng hóa học của vật liệu

Phương pháp tán xạ laser được áp dụng để đo kích thước và độ phân tán của vật liệu

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 da thường HaCaT được hoạt hóa trong môi trường DMEM high và low glucose. 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_2.

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

Độc tính tế bào của melanin có kích thước nano trên tế bào được xác định bằng phương pháp nhuộm Sulforhodamine B (SRB) (Sigma-Aldrich) và đã được mô tả trước đây [Orellana E.A, 2016].

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 bài báo trước đây [Nikzad S, 2013].

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].

2.3.2.5. Phương pháp đánh giá quá trình lành thương (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].

2.3.2.6. Phương pháp đánh giá khả năng già 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 kít đánh giá tỷ lệ già hóa tế bào Senescence Cells Histochemical Staining Kit (Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

2.3.2.7. Phương pháp đánh giá sự tác động lên quá trình hình thành mạch máu của melanin có kích thước nano

Phương pháp đánh giá quá trình hình thành mạch được thực hiện theo công bố trước đó [Arnaoutova I, 2010].

2.3.2.8. Phân tích apoptosis trên hệ thống FACS Canto II

Kháng thể kháng Annexin V gắn với tác nhân phát huỳnh quang FITC và chất nhuộm nhân tế bào PI được sử dụng để kiểm tra tỉ lệ tế bào chết theo chương trình trong quần thể tế bào. 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].

2.3.2.9. Phương pháp định lượng mức độ biểu hiện của các gen liên quan đến con đường appotosis và kháng oxi 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 do hãng Thermor Scientific, Waltham, MA, USA cung cấp. Sau đó, cDNA được tổng hợp từ ARN 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 oxi hóa của tế bào (*TNF-α, Bax, caspase -3/SOD1/VEGFA)* được định lượng bởi kỹ thuật Realtime-PCR với gen nội chứng là *β-actin*.

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
Human-β-Actin (F)	GAGTACAGAGCCTCGCCTAT	Tự thiết kế
Human-β-Actin (R)	TTAAGCCGGCCTTGCACATG	Tự thiết kế
Human-BAX-F	TTTGCTTCAGGGTTTCATCCA	[Di Meo F, 2019]
Human-BAX-R	CTCCATGTTACTGTCCAGTTCGT	[Di Meo F, 2019]
Human-Caspase 3-F	AGGCCGACTTCTTGTATGCA	[Valle-Casuso J.C, 2019]
Human-Caspase 3-R	TTCTGTTGCCACCTTTCGGT	Tự thiết kế
Human-TNF-α-F	GCTGCACTTTGGAGTGATCG	[Wang J. W, 2020]
Human-TNF-α-R	CCACCAGCTGGTTATCTCTC	Tự thiết kế
Human-SOD1-F	ACAAAG ATG GTGTGGCCGAT	[Toshikawa H, 2021]
Human-SOD1-R	AACGACTTCCAGCGTTTCCT	[Toshikawa H, 2021]
Human-VEGF-A- R	AGGAGGAGGGCAGAATCATCAC	[Schlegel C, 2012]
Human- VEGF-A-R	ATGTCCACCAGGGTCTCGATTG	[Schlegel C, 2012]

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

2.3.3.1. Phương pháp đánh giá độc tính cấp của hạt melanin có kích thước nano trên chuột thí nghiệm

Độc tính cấp của melanin có kích thước nano 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.

2.3.3.2. Phương pháp tạo khối U rắn trên chuột thí nghiệm

Tế bào ung thư phổi Murine lewis 3LL, ở nồng độ 5 × 106 tế bào/150 µL trong đệm photphat (PBS), được tiêm dưới da lưng của chuột để tạo khối u. Khi các khối u đã hình thành, quan sát và đo kích thước 3 ngày 1 lần. 10 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^3 (10 × 10 × 5 mm^3), chuột được điều trị bằng melanin có kích thước nano và chiếu xạ bằng tia X.

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

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 melanin có kích thước nano hoặc bức xạ tia X; nhóm 2 (NC), nhóm chuột mang khối u không được điều trị bằng melanin có kích thước nano và bức xạ tia X; nhóm 3 (IR), nhóm chuột mang khối u chỉ được điều trị bằng bức xạ tia X; và nhóm 4 (IR + Mel), nhóm chuột mang khối u được điều trị kết hợp giữa melanin có kích thước nano 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 liều cao (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 melanin có kích thước nano (40 mg/kg) 4 giờ trước thời điểm chiếu xạ tia X. 48 giờ sau chiếu xạ, chuột được tiêm bổ sung 01 liều melanin có kích thước nano. 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 kít tách ARN 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 enzyme phiên mã ngược, theo quy trình được cung cấp với Bộ tổng hợp cDNA RevertAid First Strand (Thermo Scientific, Singapore). Phản ứng Realtime (RT-PCR) được thực hiện trên máy Realtime PCR LightCycler® 96 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Đức). Mức độ biểu hiện của bản sao *TNF-α, IL-2, Bax* và *Caspase-3 ở* các mô được xác định thông qua mối tương quan với mức độ biểu hiện bản sao của các gen nội chứng *β-actin* (đối với các mẫu khối u) hoặc *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase* (*GAPDH*) cho mẫu lách.

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**
mouse TNF-α (F)	ATGAGCACAGAAAGCATGA	[Liu T, 2016]
mouse TNF-α (R)	AGTAGACAGAAGAGCGTGGT	[Liu T, 2016]
mouse IL-2 (F)	TTGTGCTCCTTGTCAACAGC	[Gemechu Y, 2018]
mouse IL-2 (R)	CTGGGGAGTTTCAGGTTCCT	[Gemechu Y, 2018]
mouse Caspase-3 (F)	CCTCAGAGAGACATTCATGG	[Mukhopadhyay R, 2018]
mouse Caspase-3 (R)	GCAGTAGTCGCCTCTGAAGA	[Mukhopadhyay R, 2018]

Tên các cặp mồi	Trình tự (5′ - 3′)	Nguồn gốc
mouse Bax (F)	AGCAAACTGGTGCTCAAGGC	[Mukhopadhyay R, 2018]
mouse Bax (R)	CCACAAAGATGGTCACTGTC	[Mukhopadhyay R, 2018]
mouse GAPDH (F)	CCCATCACCATCTTCCAGGAGC	[Guha P, 2018]
mouse GAPDH (R)	CCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC	[Guha P, 2018]
mouse β-actin (F)	CGGTTCCGATGCCCTGAGGCTCTT	[Itou D, 2015]
mouse β-actin (R)	CGTCACACTTCATGATGGAATTGA	[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) trên hệ thống FASC Lysis

Các lá lách được thu thập ngay sau khi giết chuột và rửa bằng PBS ba lần. Các mẫu lách (50 mg) được cho vào 2 mL PBS và dùng đũa thủy tinh nghiền nhẹ để tạo ra dung dịch đồng nhất, sau đó mẫu được lọc qua màng có kích thước lỗ 70 µm. Dịch lọc sau đó được ly tâm ở 1500 vòng/phút trong 5 phút ở 4 °C. Sử dụng các maker anti-CD19-PE, anti-CD11c-FITC và anti-CD3-PE để xác định các quần thể tế bào B, T, tế bào tua trong lá lách theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) và được đo bằng hệ thống FACS lysis.

2.3.3.6. 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).

2.3.3.7. Phân tích thành phần tế bào máu tổng số và thành phần hóa sinh của máu

Được thực hiện bằng máy đo chỉ số máu tổng số và thành phần hóa sinh của máu của chuột (Sysmex, Nhật Bản) 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 MELANIN CÓ KÍCH THƯỚC NANO

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

Melanin là nhóm sắc tố màu đen có cấu tạo phân tử dưới dạng polymer sinh học. Với sự hỗ trợ của kính hiển vi điện tử quét NanoSEM 450 đã quan sát thấy cấu trúc bề mặt của melanin với các tiểu cấu trúc nano trên bề mặt nằm xen kẽ nhau. Phổ hồng ngoại xa FTIR của melanin đã xác định thành phần

các nhóm chức hóa học trên bề mặt của vật liệu bao gồm nhóm hydroxyl (-OH), cacbonyl (-CO-), cacboxyl (-COO-).

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, H_2SO_4 đặc, HCL đặc, DMSO, NaOH, NH_4OH, H_2O_2. Kết quả nghiên cứu cho thấy melanin hầu như không tan ở phần lớn các dung môi trên và chỉ tan được một phần nhỏ trong môi trường kiềm là NaOH, NH_4OH.

3.1.3. Khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ alkaline lên hàm lượng hạt melanin có kích thước nano trong dung dịch

Hàm lượng melanin có kích thước nano được tạo ra phụ thuộc vào nồng độ kiềm (NaOH, NH_4OH) sử dụng. Khi tăng nồng độ kiềm, hàm lượng melanin có kích thước nano được tạo ra cũng tăng lên. Trong dung dịch NaOH, hàm lượng melanin có kích thước nano nhiều đang kể so với trong dung dịch NH_4OH ở cùng một nồng độ. Hàm lượng melanin có kích thước nano 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_4OH.

3.1.4. Khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến mức độ tạo thành hạt melanin có kích thước nano

Nhiệt độ là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tạo hạt của melanin có kích thước nano. Khảo sát khả năng tạo hạt melanin có kích thước nano ở nhiều mức nhiệt độ khác nhau bao gồm 4 ^{O}C, 37 ^{O}C, 60 ^{O}C, 100 ^{O}C. Kết quả nghiên cứu chỉ ra sự phụ thuộc vào nhiệt độ đến khả năng tạo thành hạt melanin có kích thước nano trong môi trường NH_4OH. Đối với môi trường NaOH, kết quả khảo sát cũng tương tự như ở môi trường NH_4OH.

3.1.5. Khảo sát sự ảnh hưởng của tốc độ khuấy từ đối với khả năng hình thành hạt melanin có kích thước nano

Tốc độ khuấy từ trong quá trình tạo hạt melanin có kích thước nano là một trong các điều kiện ảnh hưởng đến hàm lượng melanin có kích thước nano được tạo ra. Ở hai môi trường NH_4OH và NaOH, tốc độ khấy từ có ảnh hưởng rõ rệt đến thời gian đạt hàm lượng cực đại và mức độ tạo hạt melanin có kích thước nano. Khả năng tạo hạt melanin có kích thước nano được khảo sát ở 4 tốc độ khuấy từ khác nhau bao gồm 0, 100, 200, 400 (rpm/phút).

3.1.6. Khảo sát kích thước hạt melanin có kích thước nano được tạo nên trong môi trường NaOH

Ở tốc độ khuấy từ 200 rpm/phút và nhiệt độ 37^{o}C, kích thước trung bình của hạt melanin có kích thước nano được khảo sát trong các môi trường NH_4OH và NaOH ở các nồng độ thử nghiệm khác nhau được bằng máy đo nanosize. Kích thước trung bình của hạt melanin có kích thước nano trong NH_4OH và NaOH với nồng độ 0,1 N; 0,5 N; 1 N và 3 N như bảng 3.2.

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

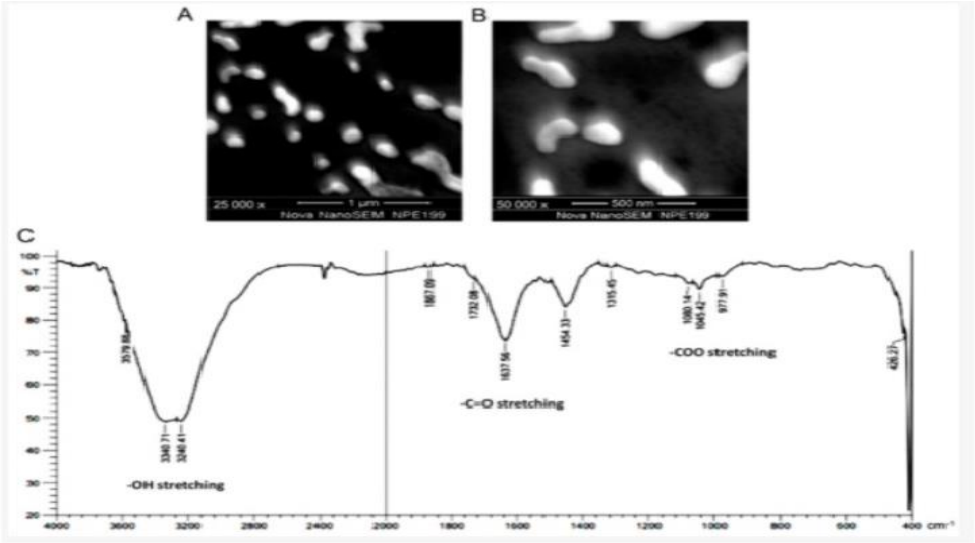
Nồng độ	NaOH	NH_4OH
0.1 N	204 nm	625 nm
0.5 N	160 nm	260 nm
1 N	4006 và 340 nm	294 và 112 nm
3 N	681, 9073, và 5580 nm	2685 và 354 nm

3.1.7. Khảo sát những đặc điểm của hạt melanin có kích thước nano trong môi trường NaOH

Từ các nghiên cứu trước đó cho thấy, NaOH là môi trường có khả năng tạo hạt melanin có kích thước nano nhiều hơn về mặt hàm lượng trong cùng một thời gian thử nghiệm và cùng nồng độ so với môi trường NH_4OH. Do đó, NaOH được sử dụng làm môi trường để phân cắt melanin và tiếp tục khảo sát những đặc trưng của melanin có kích thước nano trong môi trường này bao gồm hình thái, phổ FTIR của vật liệu.

Các đặc trưng về hình thái và các nhóm chức hóa học trên bề mặt của melanin có kích thước nano được xác định bởi kính hiển vi điện tử SEM và đo phổ hồng ngoại FTIR.

Ở hình 3.7 với độ phóng đại 25.000 lần và 50.000 lần cho thấy hình ảnh vi mô của melanin có kích thước nano bao gồm các cấu trúc hạt, rời rạc. Phổ hồng ngoại của melanin có kích thước nano có các nhóm chức bề mặt bao gồm nhóm OH, COOH, CO, tương đồng với cấu trúc phổ FTIR melanin.



Hình 3.7 Melanin có kích thước nano dưới độ phóng đại 25.000X (A); 50.000X (B) của kính hiển vi điện tử quét SEM; Phổ FTIR của melanin có kích thước nano (C).

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

3.2.1. Sự tác động của melanin có kích thước nano lên chức năng sinh lý của tế bào

3.2.1.1. Hoạt hóa các dòng tế bào nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng dòng tế bào nguyên bào sợi (NIH 3T3), dòng tế bào keratinocyte (HaCaT), dòng tế bào nội mô (hUVEC), và dòng tế bào ung thư phổi (3LL). Các dòng tế bào được bảo quản trong nito lỏng ở nhiệt độ -196 ^{0}C. Sau đó, tế bào được hoạt hóa và tăng sinh trong các môi trường nuôi cấy phù hợp trước khi tiến hành các thử nghiệm.

3.2.1.2. Độc tính của melanin có kích thước nano trên dòng tế bào NIH 3T3 và 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 tế bào/giếng, và 3000 tế bào/giếng để tiến hành nghiên cứu thử nghiệm độc tính tế bào bởi melanin có kích thước nano. Tiến hành bổ sung melanin có kích thước nano ở các nồng độ khác nhau 0, 3, 6, 12, 25, 50, 100 (µg/mL) vào các giếng. Đối chứng dương được sử

dụng là palitacel. Giá trị IC_{50} của melanin có kích thước nano trên dòng tế bào NIH 3T3 và HaCaT lần lượt là 53 và 39 (µg/mL). Ở tế bào hUVEC, kết quả cho thấy không xác định được giá trị IC 50 của melanin có kích thước nano ở dải nồng độ <100 (µg/mL).

3.2.1.3. Khảo sát sự ảnh hưởng của melanin có kích thước nano lên khả năng hình thành mạch máu ở tế bào nội mô

Tế bào nội mô được nuôi cấy có bổ sung hoạt chất tạo mạch (Extracellular Matrix Solution) được sử dụng làm mô hình để thử nghiệm sự ảnh hưởng của melanin có kích thước nano lên khả năng tạo mạch. Bổ sung melanin có kích thước nano ở các nồng độ 25, 50 (µg/mL) vào các giếng và quan sát sự ảnh hưởng của melanin có kích thước nano lên quá trình tạo mạch. Ở giếng được bổ sung melanin có kích thước nano ở nồng độ 50 (µg/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 melanin có kích thước nano với nồng độ 25 (µg/mL) ($p<0,01$).

3.2.1.4. Sự tác động của melanin có kích thước nano 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. Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi không chiếu xạ, ở giếng được bổ sung melanin có kích thước nano (25 µg/mL), mức độ biểu hiện của gen mã hóa *VEGF-A* bị giảm xuống gần 3 lần so với đối chứng ($p<0,01$). Mặt khác, khi chiếu xạ ở liều cao (3 Gy, 5 Gy), ở tế bào hUVEC, mức độ biểu hiện của gen mã hóa *VEGF-A* rất thấp. Khi đó, mức độ biểu hiện gen *VEGF-A* ở các giếng được bổ sung melanin có kích thước nano và không được bổ sung melanin có kích thước nano, đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

3.2.1.5. Nghiên cứu khả năng tác động của melanin có kích thước nano lên sự di chuyển của tế bào (wound healing)

Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của melanin có kích thước nano lên khả năng di chuyển của tế bào trong quá trình liền vết thương trên dòng tế bào nội mô. Melanin có kích thước nano ở nồng độ cao ức chế sự di chuyển của các tế bào nội mô. Sau 72 h, hiệu quả liền vết thương ở các giếng đối chứng, giếng bổ sung melanin có kích thước nano 75 µg/mL và 50 µg/mL, 25 µg/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 melanin có kích thước nano (75 µg/mL) có ý nghĩa thống kê ($p<0,01$).

3.2.1.6. Nghiên cứu khả năng ảnh hưởng của melanin có kích thước nano lên sự lão hóa của tế bào nội mô

Khả năng gây lão hóa tế bào nội mô của melanin có kích thước nano được thử nghiệm. Các giếng tế bào được ủ với melanin có kích thước nano ở mức liều 25 và 50 (µg/mL).

Tỷ lệ trung bình các của các tế bào thoái hóa trong quần thể tế bào hUVEC ở các giếng đối chứng sinh học, đối chứng dung môi và ở các giếng được bổ sung melanin có kích thước nano ở nồng độ 25 µg/mLvà 50 µg/mL lần lượt là 0,510 ± 0,051; 0,522 ± 0,094; 0,541 ± 0,068; 0,512 ± 0,038 (%). Thống kê sự khác biệt giữa các nhóm nghiên cứu cho thấy giá trị $p=0,2418 > 0,05$. Do đó không có sự khác biệt giữa các

nhóm được bổ sung melanin có kích thước nano và đối chứng. Do vậy, melanin có kích thước nano ở mức liều ≤ 50 μg/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 melanin có kích thước nano 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 melanin có kích thước nano.

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

Ở mức liều chiếu xạ ≤ 2Gy, tỷ lệ tế bào còn sống sót chiếm khoảng 90%, không có nhiều sự khác biệt so với đối chứng. 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 10 Gy. Ở mức liều chiếu xạ 3 Gy, 5 Gy, 7 Gy, tỷ lệ tế bào sống sót so với đối chứng ở dòng tế bào HaCaT lần lượt là 80, 20, 8 (%). Đối với dòng tế bào NIH 3T3, tỷ lệ tế bào sống sót so với đối chứng tương ứng 62, 21,10 (%). Trên dòng 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.

3.2.2.2. Tác dụng bảo vệ tế bào của melanin có kích thước nano dưới điều kiện chiếu xạ

Khảo sát tỷ lệ sống sót của tế bào sau chiếu xạ dưới sự có mặt có và không có bổ sung melanin có kích thước nano trước khi chiếu xạ. Khi được bổ sung melanin có kích thước nano (10 μg/mL) ở dòng tế bào HaCaT, thấy có sự tăng nhẹ tỷ lệ tế bào sống khoảng 10% sau khi chiếu xạ và không có sự thay đổi tỷ lệ này ở dòng tế bào NIH 3T3. Ở dòng tế bào nội mô, melanin có kích thước nano làm giảm nhẹ tỷ lệ sống sót của tế bào nội mô.

3.2.2.3 Phân tích sự thay đổi dấu ấn phân tử liên quan đến quá trình apoptosis và kháng oxi hóa của tế bào dưới tác dụng của melanin có kích thước nano 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 không thể phục hồi và chết tế bào.

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

Kết quả nghiên cứu 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 melanin có kích thước nano (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 melanin có kích thước nano 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-α dưới sự tác động của chiếu xạ và melanin có kích thước nano

Kết quả nghiên cứu cho thấy khuynh hướng tăng lên mức độ biểu hiện của gen mã hóa *TNF-α* dưới tác động của năng lượng xạ trị ở mức liều chiếu xạ khác nhau là 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-α* tăng lên 2,4 và 2,5 lần so với nhóm đối chứng ($p<0,01$). Ở nhóm được điều trị bởi melanin có kích thước nano, mức độ biểu hiện của gen mã hóa *TNF-α* 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.

c. Phân tích sự thay đổi mức độ biểu hiện của gen Caspase-3 dưới sự tác động của chiếu xạ và melanin có kích thước nano

Chiếu xạ gây ra hoạt hóa gen mã hóa *Caspase-3* và tăng mức độ biểu hiện khi tăng liều chiếu xạ. Kết quả cho thấy mức độ biểu hiện *Caspase-3* ở nhóm không bổ sung melanin có kích thước nano ở mức liều chiếu xạ 3 Gy là 1.9 lần và 5 Gy là 3,1 lần so với nhóm chứng. Khi được bổ sung melanin có kích thước nano, mức độ biểu hiện tăng 1,15 ở 3 Gy và 2,07 lần ở 5 Gy so với nhóm chứng.

d. Phân tích sự thay đổi mức độ biểu hiện của gen SOD1 dưới sự tác động của chiếu xạ và melanin có kích thước nano

Kết quả nghiên cứu 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 oxi hóa xảy ra bên trong tế bào. Ở nhóm được điều trị bởi melanin có kích thước nano, 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.

e. Sự tác động của melanin có kích thước nano với quá trình chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào keratinocytes sau xạ trị

Kết quả phân tích tế bào dòng chảy (flow cytometry) của tế bào HaCat sau 2 ngày chiếu xạ chỉ ra 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 3 Gy và 5 Gy 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 melanin có kích thước nano, 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 hoạt tử đã giảm xuống 0,53% ($p<0,0001$) so với nhóm IR.

Tương tự, tỷ lệ tế bào chết theo chương trình của nhóm được điều trị ở 3 Gy ít hơn so với nhóm không được điều trị với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $p<0,01$. Tuy nhiên, ở 5 Gy, tỷ lệ này không có sự khác biệt nào đáng kể. Tỷ lệ tế bào apoptosis sớm giữa hai nhóm được bổ sung melanin có kích thước nano và không bổ sung melanin có kích thước nano chỉ có ý nghĩa thống kê ở mức liều chiếu xạ 3 Gy ($p<0,001$) với tỷ lệ tế bào khoảng 2% ở nhóm (IR) và 0,34% ở nhóm IR +Mel.

3.3. KHẢO SÁT KHẢ NĂNG BẢO VỆ CỦA MELANIN CÓ KÍCH THƯỚC NANO ĐỐI VỚI CHUỘT MANG KHỐI UNG THƯ TRƯỚC TÁC ĐỘNG CỦA TIA X.

3.3.1. Thử nghiệm độc tính cấp của hạt melanin có kích thước nano và khảo sát liều chiếu xạ gây chết trên chuột.

Kết quả cho thấy ở mức liều ≤ 60 mg/kg không gây có hiện tượng bất thường sau được tiêm melanin có kích thước nano. Chuột vận động nhanh nhẹn, tình trạng sức khỏe bình thường. Ở mức liều cao hơn 80mg/kg, nhóm chuột được tiêm melanin có kích thước nano có sự suy giảm về mức độ vận động. Chuột ăn uống kém.

Kết hợp với kết quả thử nghiệm độc tính ở ở dải liều từ 5-80 mg/kg của melanin có kích thước nano, chúng tôi lựa chon 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. Kết quả cho thấy ở

mức 4, 5, 6 Gy không gây chết ở các nhóm chuột sau 20 ngày chiếu xạ. ở mức liều cao nhất 7 Gy, 7 ngày sau chiếu xạ 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 0,2 mL 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 số lượng chuột gây u thành công. Khối u dần phát triển theo thời gian và được đo kích thước với chu kỳ từ 3 đến 5 ngày. Sau 3 ngày, có 16/40 (chiếm tỷ lệ 40%) con chuột có xuất hiện khồi U. Sau 7 ngày, có 36/ 40 (chiếm 90%) con chuột xuất hiện khối u.

3.3.3. Tình trạng toàn thân các nhóm chuột trong quá trình làm thí nghiệm

Tình trạng sức khỏe toàn thân của chuột bao gồm khả năng vận động, đáp ứng với tác nhân kích thích, khả năng tiêu hóa thức ăn được theo dõi trong quá trình nghiên cứu.

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

Ở thời điểm ban đầu, khối lượng chuột giữa các nhóm tương đương nhau. Sự khác biệt giữa các nhóm không có ý nghĩa thống kê $p>0,05$.Sau 25 ngày, sự phát triển khối lượng trung bình của chuột 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. Kết quả nghiên cứu cho thấy, khối lượng chuột ở nhóm NIL, NC, IR, IR+Mel đạt giá trị trung bình lần lượt là 53 ± 0,7, 44 ± 0,5, 37 và 33 (g) sau 25 ngày triển khai nghiên cứu.

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

Thể tích khối u của chuột được theo dõi sau 3-5 ngày/1 lần để kiểm tra quá trong toàn bộ quá trình nghiên cứu

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

Các chỉ số hóa sinh của các nhóm chuột sau xạ trị như chỉ số hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, hemoglobin, hemocratit, tiểu cầu, lympho được khảo sát. Kết quả cho thấy ở các nhóm được chiếu xạ có hầu như các chỉ số bạch cầu (WBC), hồng cầu (RBC), tiểu cầu (PLT), hemoglobin, hemocratit, 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.

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

Ở hai chỉ số chức năng của thận là ure và creatinin được khảo sát ở các nhóm chuột nghiên cứu, đều cho thấy xu hướng giảm ở các nhóm bị chiếu xạ so với đối chứng với $p<0,05$. Tuy nhiên ở nhóm được điều trị bởi melanin có kích thước nano, không có sự thay đổi về chỉ số ure, tuy nhiên có sự tăng khả năng phục hồi mạnh mẽ chỉ số creatinin so với nhóm chứng (NIL) ($p<0,05$).

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

Cơ quan hạch bạch huyết và lá lách là nơi bị ảnh hưởng mạnh khi xạ trị. Khối lượng của lá lách và hạch bạch huyết được theo dõi trong quá trình làm thí nghiệm.

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

Mô của lá lách và hạch bạch huyết được nhuộm hematoxyline và eosin và phân tích mức độ của tình trạng viêm và tổn thương mô, sự xơ hóa mô ở các nhóm chuột nghiên cứu.

3.3.9.1. Phân tích mô lách của các nhóm chuột

Kết quả phân tích mô lá lách ở các nhóm chuột khác nhau có sự khác nhau. 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 bổ sung melanin có kích thước nano (IR+Mel), tình trạng xơ hóa ở mô lách được giảm nhẹ ở một số cá thể. Có 40% (2/5) cá thể chuột ở nhóm IR+Mel bị xơ hóa nặng. 60% cá thể, các mô lá lách đều ở tình trạng xơ hóa vừa và nhẹ và tình trạng sung huyết nhẹ và không rõ sự xơ hóa.

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

Kết quả phân tích mô học của hạch bạch huyết nhận thấy không có sự thay đổi tình trạng viêm và xơ hóa giữa các nhóm chuột được điều trị bởi melanin có kích thước nano và không được điều trị.

3.3.10. Phân tích dấu ấn phân tử dưới tác dụng của melanin có kích thước nano trong quá trình xạ trị ở mô lách

3.3.10.1. Sự ảnh hưởng của melanin có kích thước nano lên mức độ biểu hiện của IL-2 và TNF-α trong mô lách sau xạ trị.

Phân tích mức độ biểu hiện của *IL-2* và *TNF-α* trong mô lách sau xạ trị ở các nhóm chuột cho thấy, xạ trị ức chế mức độ biểu hiện *IL-2* và *TNF-α* và phục hồi một phần mức độ biểu hiện của chúng ở nhóm được tiêm melanin có kích thước nano.

3.3.10.2. Melanin có kích thước nano làm tăng tỷ lệ các tế bào miễn dịch ở mô lách chuột sau khi chiếu xạ tia X ở mức liều cao.

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 ượt 35% và 53%. Kết quả 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.

Tế bào T trong lá lách là một trong những quần thể tế bào miễn dịch có vai trò qua trọng trong lá lách. Kết quả cho thấy, ở nhóm chuột đối chứng gây u (NC) có số lượng các tế bào T thấp nhất và thấp hơn khoảng 7% so với nhóm chứng ($p<0,05$). Đây là nhóm chuột bị ung thư nhưng không được điều trị. Ở hai nhóm chuột được chiều xạ, số các tế bào T trong lách được phục hồi. Đặc biệt ở nhóm được điều trị bởi melanin có kích thước nano (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 (dendritic cells) 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 đối so với nhóm chứng. Bên cạnh đó, ở nhóm vừa được điều trị đồng thời bằng tia xạ và melanin có kích thước nano, 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 ($p<0,05$).

3.3.10.3. Melanin có kích thước nano gián tiếp kích hoạt tín hiệu apoptosis trong mô khối u của chuột

Đóng vai trò quan trọng trong việc truyền tín hiệu apoptosis trong mô khối u như *TNF-α, Bax, caspase-3*. Mức độ biểu hiệ gen *TNF-α* trong mô khối u được chiếu xạ bị ức chế đáng kể so với nhóm chứng không chiếu xạ. Giảm mức độ biểu hiện TNF-α có thể liên quan đến sự tổn thương lá lách sau xạ

trị dẫn đến sự giảm đáng kể số lượng đại thực bào và đây cũng nơi *TNF-α* được sản xuất. Mặt khác, biểu hiện *TNF-α* 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 *Caspage-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 ($p<0,05$).

Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

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

1. Đã chế tạo được melanin có kích thước nano từ melanin ở kích thước 80-200 nm phù hợp cho nghiên cứu và khảo sát sự ảnh hưởng đến khả năng tạo hạt melanin có kích thước nano bởi các yếu tố nhiệt độ (37^oC), thời gian, tốc độ khấy từ (400 rpm/phút) và nồng độ alkaline (0,5N).

2. Melanin có kích thước nano có độc tính ở mức trung bình trên dòng HaCaT và NIH 3T3 với giá trị IC_{50} lần lượt là 53 và 39 μg/mL và không xác định được giá trị IC_{50} trên dòng hUVEC ở dải nồi độ ≤100 μg/mL. Melanin có kích thước nano ở mức liều 75 μg/mL có khả năng ức chế quá trình liền thương ($p<0,01$). Melanin có kích thước nano 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*. Melanin có kích thước nano không gây già hóa tế bào nội mô ($p>0,05$) ở mức liều từ 25-50 μg/mL. Melanin có kích thước nano có khả năng bảo vệ tế bào chọn lọc trong điều kiện chiếu xạ tia X trên mô hình *in vitro*. Sau xạ trị, melanin có kích thước nano 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, melanin có kích thước nano không gây độc lên chuột thí nghiệm. Trên mô hình *in vivo*, cho thấy melanin có kích thước nano 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. Melanin có kích thước nano có khả năng bảo vệ tế bào lách chuột thí nghiệm ở mức độ phân tử, tế bào dưới tác động của tia X, thông qua tăng mức độ biểu hiện của *IL-2* và *TNF-α* trong mô lách sau xạ trị. Hơn nữa, việc điều trị bởi melanin có kích thước nano 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.

KIẾN NGHỊ

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

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 **(SCIE, 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).**