

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Tô Minh Quân

**ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CHỐNG LÃO HÓA
DA CỦA ASTAXANTHIN CHIẾT XUẤT TỪ
TẢO *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* TRÊN
MÔ HÌNH CHUỘT**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Tp. Hồ Chí Minh – Năm 2023

Công trình được hoàn thành tại: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. HCM và Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Người hướng dẫn khoa học 1: PGS. TS. BS. Trần Công Toại
Người hướng dẫn khoa học 2: TS. Nguyễn Hoàng Dũng

Phản biện 1: PGS. TS. Hoàng Kim Anh

Phản biện 2: PGS. TS. Trương Hải Nhung

Phản biện 3: TS. Phạm Ngọc Khôi

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện, họp tại Viện Sinh học Nhiệt đới vào hồi 8 giờ 30, ngày 14 tháng 06 năm 2023.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
- Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của luận án

Astaxanthin (AST) là một chất thuộc nhóm carotenoid với công thức hóa học là 3,3'-dihydroxy- β -carotene-4,4'-dione. AST có hoạt tính chống oxy hóa hàng đầu hiện nay (gấp 100 lần so với α -tocopherol và gấp 10 lần so với các hợp chất zeaxanthin, lutein, canthaxanthin, β -carotene). Do đó, AST được ứng dụng rất nhiều trong y học để chữa trị các bệnh có nguyên nhân là gốc oxy hóa hoạt động (ROS) : tim mạch, khớp, tiểu đường, ...

Các gốc oxy hóa hoạt động (ROS) là một trong những nguyên nhân chính gây ra quá trình lão hóa da. Lượng ROS có khả năng da tăng theo sự quá trình lão hóa sinh lý cũng như bị tác động bởi các tác nhân bên ngoài như tia cực tím (tia UV), khói bụi. Những ROS này phá vỡ tế bào da (nguyên bào sợi, tế bào sừng) và những phân tử trong chất nền da như collagen, elastin, đồng thời ngăn cản sự tổng hợp mới những phân tử trên. AST là chất chống oxi hóa mạnh có khả năng hấp thu những gốc tự do này nên sẽ ức chế quá trình lão hóa da và phục hồi da lão hóa.

Trong lĩnh vực thẩm mỹ, AST được sử dụng ở hai dạng: dạng thoa và dạng uống. Mặc dù nhiều sản phẩm thương mại nhưng các nghiên cứu về ứng dụng AST trong lĩnh vực thẩm mỹ còn rất hạn chế. Các nghiên cứu rất rời rạc, chưa có sự thống nhất và chỉ tiến hành ở quy mô nhỏ. Do đó, khuyến cáo sử dụng AST một cách hiệu quả nhất trong lĩnh vực thẩm mỹ vẫn chưa có.

Hiện nay, ở Việt Nam, các nghiên cứu AST đã được tiến hành nhưng kết quả thu nhận vẫn còn nhiều hạn chế, đặc biệt là những nghiên cứu ứng dụng.

Mục tiêu tổng quát: Đánh giá hiệu quả chống lão hóa của dịch chiết tảo *Haematococcus pluvialis* giàu astaxanthin trên mô hình tế bào và chuột.

Mục tiêu cụ thể

- Cảm ứng thành công tổng hợp AST từ *Haematococcus pluvialis*
- Đánh giá được hiệu quả bảo vệ tế bào của dịch chiết giàu AST khỏi tác nhân gây oxy hóa trong điều kiện *in vitro*.
- Đánh giá được hiệu quả bảo vệ da của dịch chiết giàu AST khỏi tia UV.

1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về vi tảo tảo *H. pluvialis*

Giới thiệu về đặc điểm hình thái và vòng đời của tảo *H. pluvialis* và giới thiệu những điều kiện chuyển đổi giữa vòng đời vi tảo.

1.2. Giới thiệu về ASX

Phần này giới thiệu về ASX: cấu trúc, con đường tổng hợp, tính chất của ASX

1.3. Nguồn thu nhận ASX

Phần này giới thiệu về các nguồn thu nhận hiện nay ASX như: tảo *H. pluvialis*, cá hồi, vi nấm

1.4. Cơ chế chống lão hóa của ASX

Phần này giới thiệu về đặc tính chống lão hóa của ASX, những ứng dụng của ASX như chống viêm, sửa chữa DNA, bảo vệ tế bào.

1.5. Cấu trúc da

Phần này giới thiệu về cấu trúc và thành phần da: cấu trúc 3 lớp, bao gồm các tế bào nguyên bào sợi, tế bào biểu bì, tế bào sừng

1.6. Lão hóa da

Phần này giới thiệu về sự lão hóa da do tia UV, các tác động của tia UV đối với tế bào da và cấu trúc da và giới thiệu về lão hóa tế bào

1.7. Lão hoá tế bào

2. VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thiết kế thí nghiệm: phương pháp thực nghiệm mô tả.

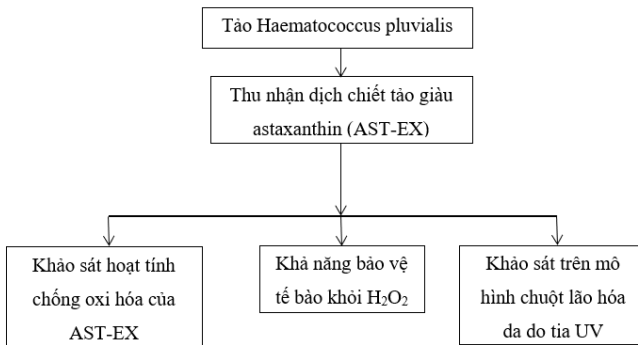
2.2. Mẫu vật tươi

- Tảo *H. pluvialis*: chủng LC (HP-C), Viện Công nghệ Sinh học, trực thuộc Viện Hàn Lâm Khoa học Việt Nam.
- Tế bào nguyên bào sợi người (hF): tế bào hF thế hệ P8 đông lạnh.
- Chuột nhắt trắng (*Mus musculus var. Albino*): giới tính cái, cân nặng từ 20-25 g, khoảng 4-6 tuần tuổi, được cung cấp bởi viện Pasteur Tp. HCM.

2.3. Hóa chất

- Môi trường nuôi tảo: BG-11, môi trường nuôi tế bào: DMEM/F12 bổ sung 10% FBS, môi trường gây lão hóa: DMEM/F12 bổ sung H_2O_2 150 μ M, bổ sung 3% FBS.

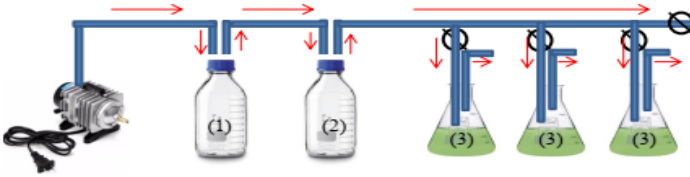
2.4. Sơ đồ thí nghiệm tổng quát



Hình 2. 1. Sơ đồ thí nghiệm tổng quát

2.5. Phương pháp nghiên cứu

2.5.1. Thiết kế hệ thống nuôi tảo



Hướng di chuyển dòng khí: \longrightarrow Van điều tiết:
 (1): Chai đựng bông gòn lọc bụi, (2): chai đựng nước, (3): chai nuôi tảo

Hình 2. 2. Sơ đồ hệ thống nuôi tảo

Hệ thống nuôi tảo được lắp đặt theo sơ đồ hình 2.2 với nhiệt độ phòng ở 25°C, ánh sáng đèn LED bóng dài

2.5.2. Phương pháp nuôi tảo trong chai nuôi 1000 ml

Tảo HP-C được cấy vào chai nuôi 1000 ml chứa sẵn 500 ml môi trường BG-11 với mật độ ban đầu 10×10^4 tế bào/ml và nuôi trong ở nhiệt độ 25°C, điều kiện ánh sáng 3000 lux (3 klux), chu kỳ sáng:tối 12h:12h, điều kiện sục khí nhẹ 2L/phút, lắc nhẹ 3 lần/ngày, nuôi trong 15 ngày.

2.5.3. Phương pháp cảm ứng tảo HP-C tổng hợp AST bằng cường độ ánh sáng mạnh

Tảo được cấy vào chai nuôi với mật độ ban đầu 50×10^4 tế bào/ml. Tảo được chiếu sáng 10 klux với chu kỳ sáng:tối 24:0 giờ. Sau 24 ngày, tiến hành thu tảo và đánh giá nồng độ và AST tổng.

2.5.4. Phương pháp thu nhận dịch chiết AST

Bảng 2. 1. Bố trí thí nghiệm tách chiết AST-EX từ tảo HP-C

	TN 1	TN 2	TN 3
B1: Đông khô	không	có	có
B2: Xử lý HCl 2N	không	không	có
B3: Đồng hóa trong dung môi chloroform/methanol	có	có	có

Thu nhận sinh khối nang tảo và làm khô theo từng nhóm thí nghiệm.

Bước xử lý HCl: 50 mg sinh khối được để trong 5 ml dung dịch HCl 2N trong 1 phút, ly tâm 3 lần để loại HCl, sau đó sinh khối được làm khô lạnh ở 4°C trong 1 ngày.

Bước đồng hóa trong dung môi: Cân 50 mg sinh khối tảo trong mỗi nhóm cho vào 10 ml dung dịch dichlormethane/methanol, tiến hành đồng hóa cơ học ở vận tốc quay 10000 vòng/phút trong 10 phút để thu dịch, cặn được tách tiếp và ly tâm đến dịch chiết trong suốt.

2.5.5. Phương pháp định lượng AST

Bột tảo khô được hòa với methanol và xà phòng hóa bằng NaOH 0.107 M trong methanol tuyệt đối với tỉ lệ thể tích 1 ml NaOH: 5 ml dịch, sục khí về 5 ml, ủ trong tối ở 4°C, trong 6 giờ. Sau đó, AST được đánh giá bằng HPLC.

2.5.6. Phương pháp thu nhận dịch chiết tảo *H. pluvialis* giàu AST (AST-EX)

Mục đích: thu nhận dịch chiết tảo *H. pluvialis*

Nguyên tắc: quy trình thu nhận dịch chiết được xác định theo quy trình tối ưu được đánh giá ở mục 2.5.7

Dịch chiết tảo *H. pluvialis* giàu AST được ký hiệu là ASX-EX và đi kèm với nồng độ AST tổng. Ví dụ: ASX-EX 5 µg/ml là dịch chiết tảo *H. pluvialis* có nồng độ AST tổng là 5 µg/ml.

2.5.7. Phương pháp FRAP

Chuẩn bị dung dịch FRAP: đệm acetate 300 mmol/l, pH 3.6. TPTZ 10 mmol/l pha trong HCl 40 mmol/l. FeCl₃ 20 mmol/l. Hút 190 µl dung dịch FRAP cho vào giếng đĩa 96, thêm 10 µl dịch chiết ASX hoặc Trolox. Hỗn hợp được ủ tránh sáng trong 2 giờ, và độ hấp thụ được đo ở bước sóng 593 nm. Khả năng oxi hóa của AST sẽ được tính toán theo giá trị FRAP: Giá trị FRAP = $A_0/A_1 \times N$, trong đó A₀, A₁: giá trị OD của mẫu, FeSO₄ ở bước sóng 593 nm.

2.5.8. Phương pháp ABTS

Chuẩn bị dung dịch ABTS⁺• có giá trị OD₇₅₃ là $0,7 \pm 0,02$.

Chuẩn bị dung dịch ASX các nồng độ 12,5; 25; 50; 100 và 150 µg/ml. Chuẩn bị trolox 1 mM thành dãy nồng độ 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 và 0,3 mM. Công thức tính: % Ức chế = $[(A_0 - A_m)/A_0] \times 100\%$ và IC₅₀ = $(50 - b)/a$, trong đó, A₀ là giá trị OD₇₅₃ của ethanol và dịch ABTS⁺•. TEAC (mmol/g) = $(IC_{50}Trolox / IC_{50}ASX)$.

2.5.9. Phương pháp đánh giá độc tính của AST-EX trên nguyên bào sợi

Tế bào hF được cấy lên đĩa 96 giếng với mật độ ban đầu 8×10^3 tế bào/giếng. Sau 1 ngày, thay môi trường nuôi cấy bằng môi trường theo như các nhóm thí nghiệm. Sau 1 hoặc 2 ngày nuôi cấy, quan sát hình dạng tế bào bằng kính hiển vi và tiến hành phương pháp MTT để đánh giá độc tính tế bào. Tỷ lệ tế bào sống được đánh giá theo công thức sau: % tế bào sống = $OD_{590TN} / OD_{590DC\text{ âm}} \times 100$

Các nhóm thí nghiệm: 6 nhóm và 2 biến bao gồm nồng độ AST-EX và thời gian ủ theo các mục dưới đây:

- Nồng độ AST-EX 0,5, 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ và AST thương mại TM 10 $\mu\text{g/ml}$
- Thời gian ủ AST-EX: 1 ngày hoặc 2 ngày

2.5.10. Phương pháp đánh giá sự tăng sinh của nguyên bào sợi trong môi trường AST-EX

Tế bào hF được cấy lên đĩa 96 giếng với mật độ ban đầu 1×10^3 tế bào/giếng và được nuôi trong môi trường có nồng độ AST-EX 05-10 $\mu\text{g/ml}$. Tiến hành phương pháp MTT để đánh giá sự tăng sinh tế bào sau 11 ngày.

2.5.11. Phương pháp đánh giá sự di cư tế bào theo phương pháp Scratch-wound assay

Tế bào hF được cấy lên đĩa 96 giếng với mật độ ban đầu 10×10^3 tế bào/giếng. Sau 1 ngày, sử dụng đầu tip vàng để tạo vết rạch giữa lớp tế bào và thay môi trường theo thiết kế thí nghiệm Nồng độ AST-EX:

0.5, 1, 1.5, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$. Đối chứng âm: Môi trường nuôi chứa 0.2% DMSO. Ghi nhận hình ảnh tế bào di chuyển sau 3 giờ, 12 giờ và 24 giờ, xử lý hình ảnh bằng phần mềm ImageJ.

2.5.12. Phương pháp MTT để đánh giá sức sống tế bào

Tế bào hF được cấy vào đĩa 96 với mật độ phù hợp cho thí nghiệm và ủ trong điều kiện 37°C , 5% CO_2 . Hút bỏ môi trường cũ, bổ sung 50 μl MTT Reagent và 50 μl môi trường nuôi cấy vào mỗi giếng, ủ ở 37°C trong 3 giờ. Sau đó, hòa tan tinh thể bằng 50 μl MTT Solvent, lắc đều đĩa trong 15 phút ở điều kiện tránh sáng. Đo mật độ quang ở bước sóng 590 nm

2.5.13. Phương pháp tạo mô hình lão hoá bằng hydrogen peroxide (H_2O_2)

Tế bào được đĩa 24 giếng với mật độ 3×10^4 tế bào/giếng và nuôi 1 ngày. Sau 1 ngày, loại bỏ môi trường, rửa bằng PBS, xử lý các giếng tế bào nồng độ 100, 150, 175, 200 μM trong các khoảng thời gian 90 phút, 120 phút tùy theo thí nghiệm. Sau đó cấy tế bào và đánh giá biểu hiện marker lão hóa để xác định quy trình tối ưu.

2.5.14. Phương pháp nhuộm senescence-associated β -galactosidase (bộ kit ab102534, Abcam, US).

2.5.15. Phương pháp đánh giá khả năng của AST-EX trong việc bảo vệ tế bào trước yếu tố gây lão hoá H_2O_2

Thí nghiệm được chia thành tổng cộng 8 nhóm dựa vào nồng độ AST-EX. Nhóm xử lý với AST-EX nồng độ 0.5, 1, 1.5, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$, trước khi xử lý với H_2O_2 150 μM trong 90 phút (ký hiệu lần lượt là AST-

EX0.5, AST-EX1, AST-EX1.5, AST-EX5, AST-EX10) và nhóm xử lý với AST thương mại nồng độ 10 µg/ml (ký hiệu TM10)

2.5.16. Phương pháp nhuộm Hoestch và phalloidin để đánh giá hình dạng tế bào

Tế bào được cố định bằng paraformaldehyde và nhuộm với Hoestch, phalloidin theo hướng dẫn của nhà sản xuất

2.5.17. Phương pháp đánh giá sự biểu hiện mRNA tế bào bằng phương pháp realtime PCR

Tên	Trình tự primer	Sản phẩm
MMP1-F	CAGAGATGAAGTCCGGTTTTTC	76
MMP1-R	GGGGTATCCGTGTAGCACAT	
MMP3-F	CAAAACATATTTCTTTGTAGAGGACAA	91
MMP3-R	TTCAGCTATTTGCTTGGGAA	
p16 ^{INK4a} -F	TGAGCACTCACGCCCTAAGC	144
p16 ^{INK4a} -R	TAGCAGTGTGACTCAAGAGAAGCC	
p53-F	GAGCACTGCCCAACAACAC	224
p53-R	ATGGCGGGAGGTAGACTGA	
p21-F	TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA	65
p21-R	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAATC	
COL1A1-F	AGCAGGCAAACCTGGTGAAC	80
COL1A1-R	AACCTCTCTCGCCTCTTGCT	
Elastin-F	TGTCCATCTCCACCCCTCT	64
Elastin-R	CCAGGAACTCCACCAGGAAT	
GAPDH-F	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	172
GAPDH-R	GAAGATGGTGATGGGATTTC	

Thu nhận RNA tổng bằng bộ kit Total RNA PurificAST-EXion Kit

Thực hiện phản ứng qPCR theo bộ SyGreen 1-Step Lo-ROX kit

Đánh giá sự biểu hiện bằng công thức $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Bảng 2.4. Trình tự primer

2.5.18. Phương pháp WESTERN BLOT đánh giá sự biểu hiện CDK4, CDK6 và cyclin D1

Thu protein tổng bằng cách ly giải tế bào trong Optiblot LDS Sample Buffer. Sau đó, protein được điện di bằng Precast Gel SDS-PAGE 4-12% trong 2 giờ tại 50V, lai màng PVDF và ủ kháng thể anti-CDK4, anti-CDK6, anti-cyclin D1, anti-actin. Sau đó nhuộm kháng thể thứ cấp và nhận biết bằng film X-ray

2.5.19. Phương pháp tạo mô hình chuột lão hóa da (In vivo)

Chuột được cung cấp bởi viện Pasteur TP. HCM, cạo lông và chiếu UV theo quy trình tăng dần cường độ 1-6 MED trong 8 tuần. Sự thay đổi về mặt hình thái trên da chuột được ghi nhận hàng tuần và ghi nhận bằng bình ảnh, cắt lát mô học HE vào ngày cuối thí nghiệm.

2.5.20. Phương pháp đánh giá khả năng bảo vệ da chuột khỏi tia UVB

Bảng 2. 2. Bố trí thí nghiệm tác động của AST lên da chuột

Ký hiệu lô	Số lượng và giới tính	Phương pháp xử lý	Thời gian
ĐC	4 con	Chiếu UV theo quy trình lão hóa 2.5.10.	8 tuần
Sacha	4 con	Bôi dầu sacha inchi trước khi chiếu UVB theo quy trình	8 tuần
AST-EX5	4 con	Bôi AST-EX 5 µg.ml (dịch chiết tảo có nồng độ AST tổng là 5 ug/ml) trước khi chiếu UVB theo quy trình	8 tuần
AST-EX10	4 con	Bôi AST-EX 10 µg.ml (dịch chiết tảo có nồng độ AST tổng là 10 ug/ml) trước khi chiếu UVB theo quy trình	8 tuần
AST-EX20	4 con	Bôi AST-EX 20 µg.ml (dịch chiết tảo có nồng độ AST tổng là 20 ug/ml) trước khi chiếu UVB theo quy trình	8 tuần
AST-EX200	4 con	Bôi AST-EX 200 µg.ml (dịch chiết tảo có nồng độ AST tổng là 200 ug/ml) trước khi chiếu UVB theo quy trình	8 tuần

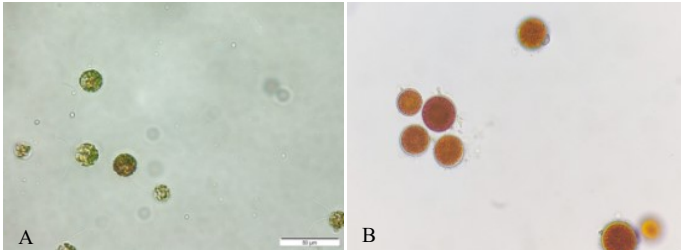
Bố trí thí nghiệm: chuột được chia thành 6 nhóm như trong bảng 2.5. Mỗi thí nghiệm được tiến hành với 4 con chuột. Các chỉ tiêu đánh giá trên đối tượng nghiên cứu: quan sát bề mặt, nhuộm mô học

AST dạng bột được hòa vào dầu sacha inchi hữu cơ dùng trong thẩm mỹ. AST thu nhận được bôi trực tiếp vào vùng da chuột theo bố trí thí nghiệm.

3. KẾT QUẢ BIỆN LUẬN

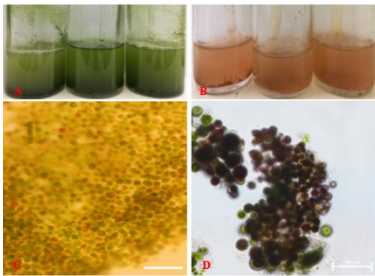
3.1. Nuôi cấy tăng sinh *H. pluvialis* và cảm ứng AST

Giai đoạn sinh trưởng: tảo HP-C có màu lục, $20 \pm 3 \mu\text{m}$. Nang trưởng thành chuyển sang màu đỏ hoàn toàn, $32.61 \pm 4.57 \mu\text{m}$ và nồng độ AST tối đa là 3.09% sinh khối khô.



Hình 3. 1. Chu kỳ vòng đời tảo HP-C sử dụng trong nghiên cứu (x40).

A: sinh trưởng, B: nang trưởng thành. Scale bar: 50 μm .



Hình 3. 2. A: nuôi cấy tăng sinh trong môi trường BG-11 sau 26 ngày. B: cảm ứng tổng hợp AST trong điều kiện ánh sáng mạnh 10 klux. C: tảo HP-C trong điều kiện nuôi cấy tăng sinh, D: tảo HP-C trong điều kiện cảm ứng tổng hợp AST

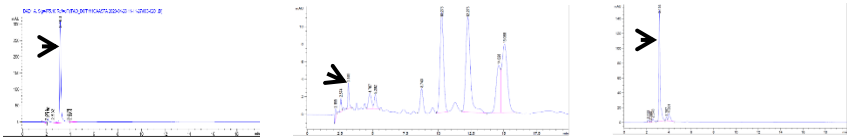
3.2. Tách chiết AST trong dung môi

So sánh giữa TN3 và TN1 cho thấy phương pháp đông khô có hiệu quả tốt trong hỗ trợ tách chiết AST từ tảo.

	TN 1	TN 2	TN 3
Nồng độ tổng AST thu được (% SKK tảo)	1.73 ± 0.13 ^a	3.09 ± 0.19 ^b	3.01 ± 0.25 ^b
Tỉ lệ AST tự do (% trên AST tổng)	4.5 ± 0.27 ^a	4.43 ± 0.4 ^a	4.37 ± 0.5 ^a

Bảng 3. 1. Kết quả tóm tắt chiết xuất AST theo quy trình TN1, TN2, TN3.

(^{a, b}: sự khác biệt về thống kê trong cùng hàng ($p < 0.05$))

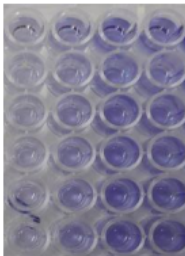


Hình 3. 3. Kết quả chạy HPLC mẫu AST

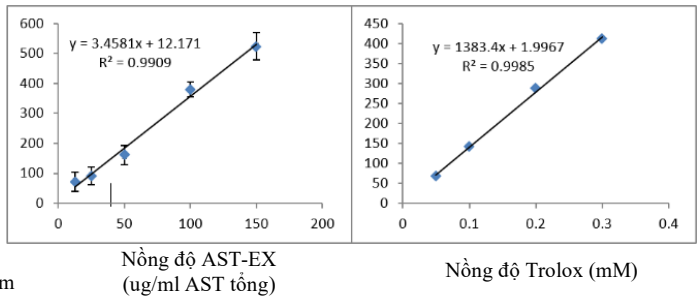
A: AST thương mại, B: dịch chiết tảo HP-C trước khi xử lý và phòng hóa, C: sau khi xử lý phòng hóa. Mùi tên: AST tự do.

Quy trình tách chiết bằng cách kết hợp đông khô và đông hóa trong dung môi được sử dụng cho tất cả các thí nghiệm sau.

3.3. Chống oxi hóa FRAP

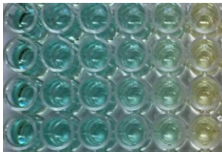


Hình 3. 5. Kết quả thử nghiệm FRAP

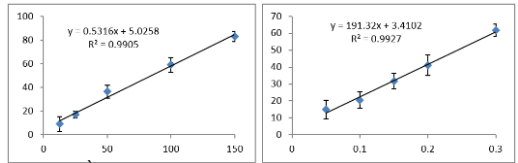


Hình 3. 6. Biểu đồ biểu thị giá trị FRAP

3.4. Chống oxy hóa ABTS

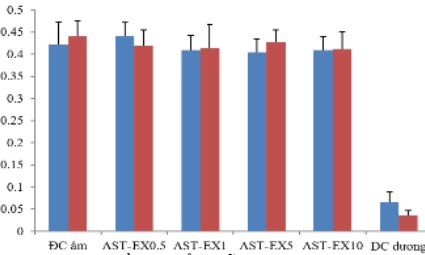


Hình 3. 7. Kết quả thử nghiệm ABTS



Hình 3. 8. Biểu đồ biểu thị kết quả thử nghiệm ABTS

3.5. Độc tính *in vitro*



Hình 3. 9. Đồ thị biểu diễn giá trị OD₄₉₅ thu được từ thí nghiệm đánh giá độc tính của AST-EX

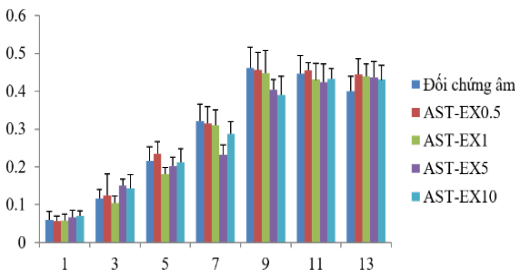
Bảng 3. 2. Tỷ lệ RBG của AST-EX ở các nồng độ khác nhau

	Ngày 1	Ngày 2
ĐC âm	100%	100%
AST-EX		
0.5	104.27 ± 7.64% ^a	95.45 ± 7.87% ^a
AST-EX 1	97.16 ± 7.49% ^a	94.09 ± 11.91% ^a
AST-EX 5	95.73 ± 7.12% ^a	97.27 ± 6.00% ^a
AST-EX 10	97.16 ± 6.87% ^a	93.64 ± 8.79% ^a
ĐC dương	15.64 ± 5.73% ^b	8.53 ± 2.42% ^b

Dựa theo tiêu chuẩn ISO 10993-5, AST-EX nồng độ 0.5-10 µg/ml không gây độc cho tế bào.

3.6. Tăng sinh

Kết quả này khẳng định AST-EX 05-1.5 µg/ml không gây tác động bất lợi lên sự tăng sinh tế bào hF.

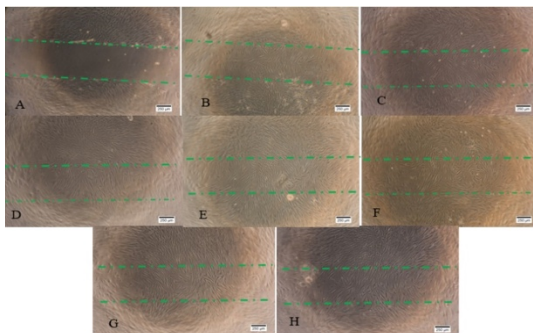


Hình 3. 10. Biểu đồ biểu thị sự tăng trưởng tế bào hF trong môi trường bổ sung AST-EX sau 13 giờ nuôi cấy

	DT (giờ)
Đối chứng âm	49.3 ± 3.1 ^a
AST-EX0.5	47.8 ± 2.5 ^a
AST-EX1	49.2 ± 3.2 ^a
AST-EX1.5	50.2 ± 3.3 ^a
AST-EX5	55.2 ± 2.1 ^{ab}

Bảng 3. 3. Thời gian tăng sinh thể hệ tế bào hF trong các nhóm thí nghiệm

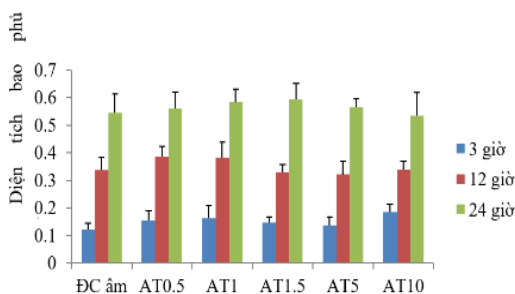
3.7. Di cư



Hình 3. 11. Kết quả thử nghiệm di cư của hF dưới tác động của AST-EX 0.5-10 µg/ml.

A: vết rạch tế bào ban đầu, B: tế bào di cư sau 12 giờ mẫu AST-EX1, C, D, E, F, G, H: sự di cư tế bào sau 24 giờ ở các nhóm đối chứng và AST-EX0,5, 1, 1,5, 5, 10. Nét đứt màu xanh lá: vị trí vết rạch tế bào ban đầu.

Kết quả xử lý thống kê cho thấy không có sự khác biệt giữa các nhóm trong cùng thời điểm 3 giờ, 12 giờ hoặc 24 giờ. Kết quả trên cho thấy AST-EX 0.5-10 µg/ml không ảnh hưởng tới quá trình di cư tế bào.



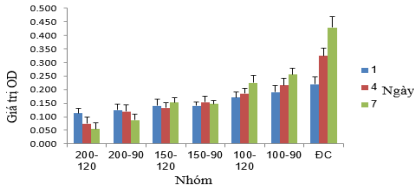
Hình 3. 12. Biểu đồ biểu thị diện tích bao phủ bởi tế bào trong thí nghiệm scratch-wound assay

Bảng 3. 4. Kết quả đánh giá hiệu quả hỗ trợ hF di cư bằng Scratch-wound assay sau 24 giờ (% diện tích so với diện tích vùng rạch)

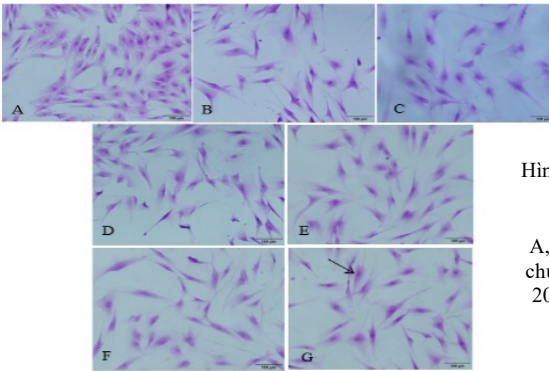
	3 giờ	12 giờ	24 giờ
ĐC âm	16.3 ± 3.1 ^a	44.9 ± 6 ^a	72.3 ± 8.9 ^a
AST-EX0.5	20.8 ± 4.5 ^a	51.5 ± 5.1 ^a	74.8 ± 7.9 ^a
AST-EX1	21.9 ± 5.9 ^a	51.1 ± 7.3 ^a	77.9 ± 6.4 ^a
AST-EX1.5	19.7 ± 3.5 ^a	44.1 ± 3.5 ^a	79.2 ± 7.6 ^a
AST-EX5	18.4 ± 6.5 ^a	42.8 ± 6.5 ^a	75.2 ± 4.3 ^a
AST-EX10	24.8 ± 4.1 ^a	45.2 ± 4.1 ^a	71.2 ± 11.2 ^a

3.8. Khảo sát quy trình gây lão hóa tế bào bằng H₂O₂

3.8.1. Kết quả khảo sát sự tăng trưởng tế bào



Hình 3. 13. Biểu đồ biểu thị sự gia tăng giá trị OD ở các nhóm thí nghiệm sau 7 ngày



Hình 3. 14. Sự biến đổi hình dạng tế bào hF khi xử lý với H₂O₂. (x50).

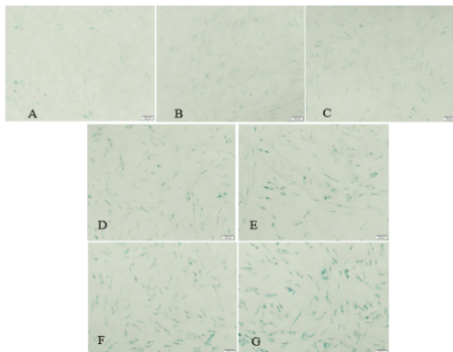
A, B, C, D, E, F, G: tế bào các nhóm: Đối chứng, 100-90, 100-120, 150-90, 150-120, 200-90, 200-120. Scale bar: 100 μm, mũi tên: tế bào phình to

3.8.2. Kết quả khảo sát sự biểu hiện SA-gal

Bảng 3. 5. Tỷ lệ tế bào dương tính với SA-gal khi xử lý với H₂O₂

(a, b, c: sự khác biệt về mặt thống kê, p<0.05)

Nhóm	ĐC	100-90	100-120	150-90	150-120	200-90	200-120
Tỷ lệ dương tính SA-gal	4.60 ± 47.14	51.44 ± 51.44	65.25 ± 65.25	70.73 ± 70.73	72.03 ± 72.03	74.99 ± 74.99	74.99 ± 74.99
	1.52 ^a	8.48 ^b	11.79 ^b	8.97 ^c	8.31 ^c	6.73 ^c	7.29 ^c



Hình 3. 15. Kết quả nhuộm SA-gal tế bào hF xử lý với H_2O_2 ở các nồng độ khác nhau. (x100).

A, B, C, D, E, F, G: tế bào các nhóm: Đối chứng, 100-90, 100-120, 150-90, 150-120, 200-90, 200-120. Scale bar: 100 μm

Do đó, nồng độ 150 μM , thời gian xử lý 90 phút và 120 phút đều phù hợp với tiêu chí đề ra.

3.9. Khảo sát khả năng bảo vệ tế bào nguyên bào sợi của AST-EX khỏi tác động của H_2O_2

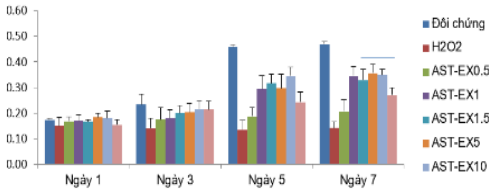
3.9.1. Kết quả đánh giá diện tích tế bào

Kết quả này cho thấy H_2O_2 làm biến đổi hình dạng tế bào: tế bào đẹp, phình to tế bào chất và nhân, trong khi đó AST-EX 1-10 $\mu g/ml$ hạn chế được hiện tượng này (Hình 3.26 và Bảng 3.10).

Bảng 3. 6. Diện tích tế bào và diện tích nhân trong nhóm xử lý với AST-EX và H_2O_2 (a, b, c d: sự khác biệt về mặt thống kê trong cùng 1 hàng, $p < 0.05$)

	ĐC	H_2O_2	AST EX0.5	AST EX1	AST EX1.5	AST EX5	AST EX10	TMI10
Diện tích tế bào	2,430.9 ± 212.6 ^a	10527.25 ± 1798.1 ^b	3,919.2 ± 1172.2 ^c	± 3,102.7 ± 1172.2 ^d	± 3,065.8 ± 393.8 ^d	± 3,193.2 ± 393.8 ^d	± 3,153.1 ± 393.8 ^d	3,868.9 ± 345.8 ^{cd}
Diện tích nhân	224.8 ± 21.4 ^a	± 383.3 ± 93.7 ^b	± 293.9 ± 27.1 ^c	± 255.4 ± 42.0 ^d	± 216.3 ± 43.5 ^d	± 246.2 ± 41.6 ^d	± 251.1 ± 38.4 ^d	± 285.2 ± 24.5 ^{cd}
Tỉ lệ tế bào/nhân	11.8 ± 2.1	± 17.1 ± .16	13.2 ± 4.0	12.3 ± 2.6	14.9 ± 4.3	13.2 ± 2.0	12.8 ± 1.9	± 13.6 ± 4.4

3.9.2. Kết quả đánh giá sự tăng sinh tế bào



Hình 3. 1. Biểu đồ biểu thị sự tăng sinh tế bào xử lý với AST-EX và H₂O₂.

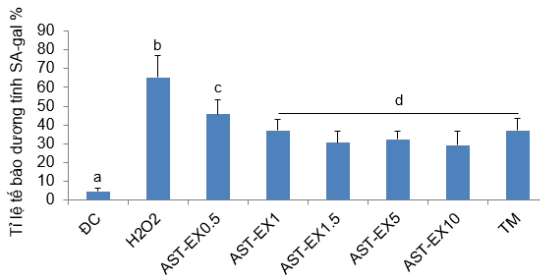
(a, b, c: sự khác biệt về mặt thống kê giữa các nhóm trong cùng 1 ngày)

Điều này cho thấy H₂O₂ đã ức chế sự tăng sinh tế bào, tế bào trong nhóm TM vẫn duy trì được khả năng tăng sinh mặc dù thấp hơn so với nhóm AST-EX

Bảng 3.7. Thời gian nhân đôi của tế bào xử lý AST-EX và H₂O₂

	Doubling time
ĐC âm	83.63 ± 3.08 ^a
H₂O₂	Không tăng trưởng
A0.5	572.51 ± 258.18 ^b
A1.0	198.57 ± 46.68 ^c
A1.5	199.88 ± 64.36 ^c
A5	215,09 ± 57.29 ^c
A10	213.23 ± 50.01 ^c
TM 10	269.53 ± 102.78 ^c

3.9.3. Kết quả đánh giá sự biểu hiện SA-gal



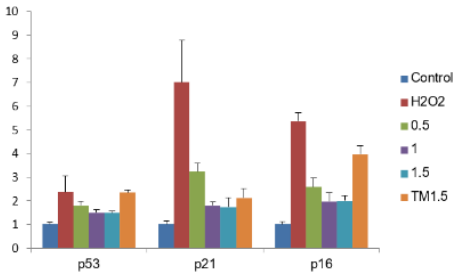
Hình 3.18. Biểu đồ biểu thị tỉ lệ tế bào dương tính với SA-gal

Kết quả này phần nào cho thấy khả năng của AST-EX trong việc bảo vệ tế bào khỏi tác nhân gây stress oxy hóa H₂O₂

3.9.4. Kết quả đánh giá sự biểu hiện marker lão hóa p53, p21, p16

bằng phương pháp realtime-PCR

Kết quả cho thấy AST-EX nồng độ 1, 1.5 µg/ml làm giảm sự biểu hiện marker lão hóa p53, p21, p16 (Hình 3.23)

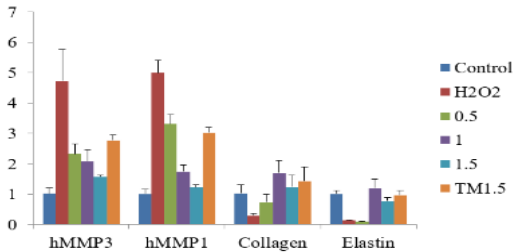


Hình 3. 20. Biểu đồ biểu thị sự biểu hiện của marker lão hóa p53, p16, p21 ở các nhóm tế bào xử lý với AST-EX và H₂O₂

Bảng 3. 9. Biểu hiện tương đối mRNA của các gen p53, p21, p16 trong thí nghiệm bảo vệ tế bào của AST-EX (a, b, c, d: là sự khác biệt về mặt thống kê trong cùng 1 dòng, p<0.05)

	Đối chứng	H ₂ O ₂	AST-EX0.5	AST-EX1	AST-EX1.5	TM1.5
p53	1.0 ± 0.1 ^a	2.4 ± 0.6 ^b	1.8 ± 0.2 ^b	1.6 ± 0.2 ^b	1.5 ± 0.1 ^b	2.4 ± 0.1 ^b
p21	1.0 ± 0.2 ^a	7.0 ± 1.8 ^b	3.2 ± 0.3 ^c	1.8 ± 0.2 ^c	1.8 ± 0.3 ^c	2.1 ± 0.4 ^c
p16	1.0 ± 0.1 ^a	5.4 ± 0.4 ^b	2.6 ± 0.4 ^c	1.9 ± 0.3 ^c	2.1 ± 0.1 ^c	4.0 ± 0.4 ^d

3.9.5. Kết quả đánh giá sự biểu hiện chức năng tế bào ở mức độ phiên mã



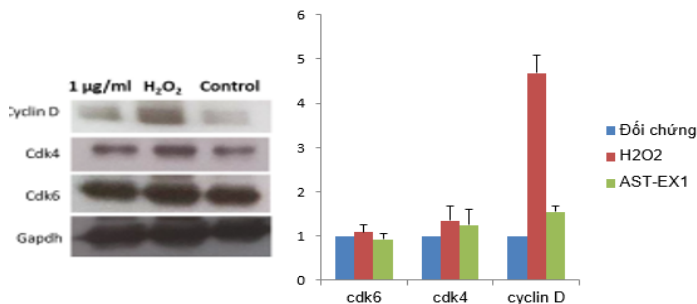
Hình 3. 2. Biểu đồ biểu thị sự biểu hiện hMMP3, hMMP1, collagen, elastin tế bào xử lý với AST-EX

(^{a,b,c,d}: sự khác biệt về mặt thống kê trong cùng 1 gene đánh giá)

Trong khi đó, tế bào thuộc nhóm AST-EX có sự gia tăng 2 mRNA MMP3, MMP1 so với tế bào nhóm đối chứng nhưng giảm so với nhóm H₂O₂ (Hình 3.24). Đối với collagen và elastin, tế bào nhóm H₂O₂ giảm sự biểu hiện so với nhóm đối chứng (giảm còn 29% và 13% so với tế bào nhóm đối chứng).

3.9.6. Kết quả đánh giá sự biểu hiện chức năng tế bào ở mức độ protein

Tế bào trong nhóm AST-EX1 biểu hiện gia tăng cyclin D1 (gấp 1.5 lần so với đối chứng) và giảm so với nhóm tế bào trong H₂O₂.



Hình 3. 22. Biểu đồ biểu thị sự biểu hiện CDK4,CDK6, cyclin D1 của tế bào hF

(a, b, c: sự khác biệt về mặt thống kê trong cùng 1 thí nghiệm)

Bảng 3. 10. Kết quả biểu hiện tương đối protein CDK4, CDK6 và cyclin D

(a,b: sự khác biệt về mặt thống kê trong cùng 1 cột, p<0.005)

	CDK6	CDK4	cyclin D
Đối chứng	1 ± 0.2 ^a	1 ± 0.1 ^a	1 ± 0.1 ^a
H₂O₂	1.1 ± 0.2 ^a	1.3 ± 0.2 ^a	4.7 ± 0.4 ^b
AST-EX1	0.9 ± 0.2 ^a	1.2 ± 0.2 ^a	1.5 ± 0.3 ^a

Kết quả cho thấy AST-EX giảm tác hại của H₂O₂ tác động lên tế bào nguyên bào sợi, nồng độ 1 µg/ml là nồng độ tối thiểu thể hiện được hiệu quả bảo vệ tế bào.

3.10. Kết quả đánh giá khả năng bảo vệ da chuột lão hóa do tia UV

3.10.1 Mô hình lão hóa da do tia UV

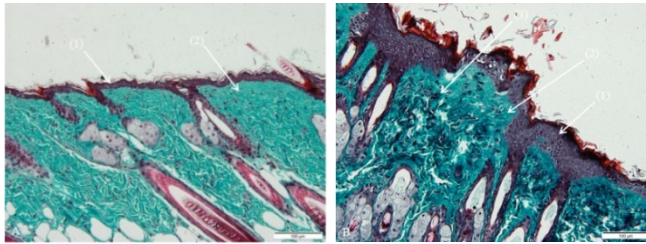
Ở tuần thứ 6, xuất hiện các vết nhăn ngang lưng chuột, những vết này rõ hơn khi chuột di chuyển. Tuần thứ 7-8, da chuột có hiện tượng giãn ra, da kém đàn hồi, do đó vết nứt trở nên không rõ ràng.



Hình 3.24. Kết quả soi da chuột sau khi chiếu uv

A: nhóm đối chứng, B: sau khi chiếu UVB 8 tuần

Kết quả nhuộm Trichrome cho thấy độ dày biểu bì của nhóm thoa AST-EX giảm so với nhóm chiếu UV hoặc nhóm bôi dầu.



Hình 3.25. Kết quả nhuộm trichrome mẫu da chuột

A: Mẫu da chuột đối chứng, B: mẫu da chuột chiếu UV 8 tuần. (1): lớp biểu bì, (2): lớp trung bì, (3): cấu trúc collagen bất thường

Bảng 3. 11. Bảng tổng kết kết quả tạo mô hình chuột lão hóa da do tia UVB. ^(a,b): sự khác biệt về mặt thống kê, $p < 0.05$

	Nhóm đối chứng	Nhóm chiếu tia UVB
Điểm nhân da	0.5 ± 0.5^a	4.67 ± 0.47^b
Điểm nhão da	0.25 ± 0.43^a	2.5 ± 0.5^b
Độ dày biểu bì (μm)	21.3 ± 0.8^a	65.8 ± 2.7^b
Sự xâm nhập tế bào viêm	Không phát hiện	Có
Sự xuất hiện các cấu trúc collagen bất thường	Không phát hiện	Có

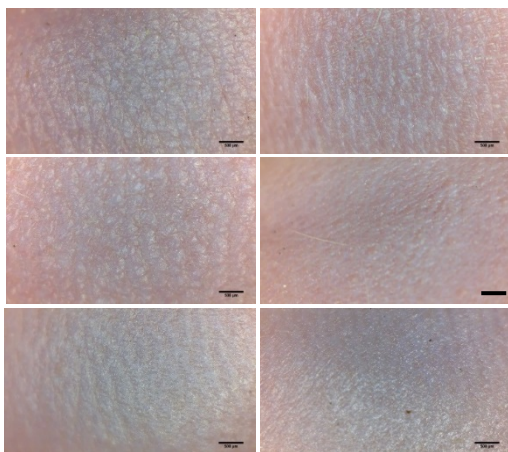
3.01.2 Kết quả khả năng bảo vệ da của AST-EX khỏi tác hại tia UV

Bảng 3. 2. Tóm tắt kết quả mức độ nhăn da và độ dày biểu bì.

(a,b,c,d,e,f: sự khác biệt về mặt thống kê trong cùng 1 dòng, $p < 0.05$)

	ĐC	UVB	Sacha	AST-EX5	AST-EX10	AST-EX20	AST-EX200
Mức độ nhăn da	0.5 ± 0.5	4.5 ± 0.5	3.5 ± 0.5	3.25 ± 0.43	3.0 ± 0.7	2.5 ± 0.5	2.25 ± 0.43
Mức độ nhăn da	0.25 ± 0.43	2.5 ± 0.5	2.25 ± 0.43	1.75 ± 0.42	1.5 ± 0.5	1.0 ± 0.7	0.75 ± 0.43
Độ dày biểu bì (μm)	21.4 ± 6.7^a	58.9 ± 20.9^b	54.7 ± 12.9^b	47.3 ± 10.0^c	41.7 ± 9.8^d	33.5 ± 9.6^e	28.9 ± 7.3^e
Sự xâm nhập tế bào viêm	*	*****	****	**	**	*	*
Sự hình thành các cấu trúc collagen bất thường	*	*****	****	***	***	**	**

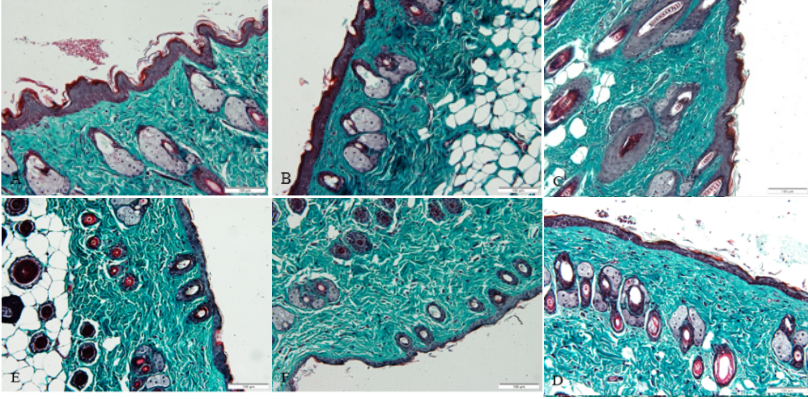
Kết quả soi da cho thấy AST-EX 10, 20, 20 có hiệu quả tốt trong việc bảo vệ bề mặt da chuột.



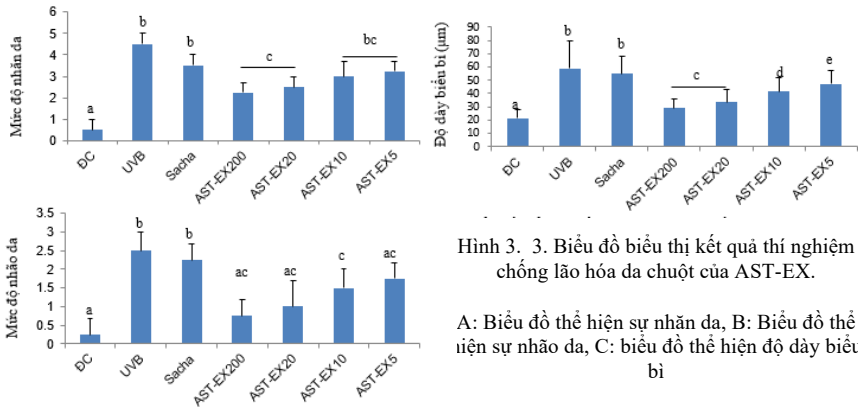
Hình 3. 3. Kết quả soi da chuột sau 8 tuần chiếu UVB

A: chuột nhóm chiếu UVB, B: chuột thuộc thoa dầu Sacha inchi, C, D, E, F: chuột thoa AST-EX 5, 10, 20, 200 $\mu\text{g/ml}$

Kết quả nhuộm Trichrome cho thấy, da chuột sau 8 tuần chiếu UV có sự gia tăng về độ dày lớp biểu bì, sự xâm nhập của tế bào viêm, sự hình thành những cấu trúc collagen bất thường (hình 3.28, 3.29).



Hình 3. 28. Kết quả nhuộm trichrome mẫu da chuột sau khi chiếu UVB 8 tuần.
A: chuột nhóm chiếu UVB, B: chuột thuộc nhóm thoa dầu Sacha inchi, C, D, E, F: chuột thoa AST-EX 5, 10, 20, 200 µg/ml



Hình 3. 3. Biểu đồ biểu thị kết quả thí nghiệm chống lão hóa da chuột của AST-EX.

A: Biểu đồ thể hiện sự nhăn da, B: Biểu đồ thể hiện sự nhão da, C: biểu đồ thể hiện độ dày biểu bì

4. KẾT LUẬN

Từ những kết quả thu được từ nghiên cứu, chúng tôi xin kết luận như sau

- Cảm ứng thành công AST từ giống tảo HP-C với nồng độ cao nhất 3.1% khối lượng khô.
- Dịch chiết giàu AST có khả năng bảo vệ tế bào khỏi tác nhân H₂O₂ và nồng độ 1 µg/ml là nồng độ tối thiểu có chức năng
- Dịch chiết giàu AST khi sử dụng ở dạng thoa đã bảo vệ da chuột khỏi tác động của tia UV, nồng độ 20 µg/ml cho hiệu quả tốt nhất.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Những tính mới trong nghiên cứu:

- Khảo sát được một số tính chất của chủng tảo địa phương *H. pluvialis* được phân lập tại Việt Nam, trong đó nồng độ AST là 3,09% khối lượng khô.
- Nghiên cứu cho thấy dịch chiết giàu astaxanthin từ vi tảo có khả năng bảo vệ tế bào khỏi các tác nhân gây oxy hóa mạnh H₂O₂ trong điều kiện *in vitro* (nồng độ 1 µg/ml tối ưu trong mô hình tế bào) và khả năng này cao hơn so với AST tinh khiết trong cùng nồng độ.
- Đối với mô hình chuột lão hoá do tia UVB, nồng độ AST tối ưu bảo vệ da chuột khi sử dụng dạng thoa là 20 µg/ml.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

Quan Minh To, Nhan Dinh Tran, Truc Thi Thanh Vo, Thao Thu Huynh, Dieu Quang Tran, Trinh Nguyen Ai Ta1, Bien Dinh Lai, Dung Hoang Nguyen, Long Thanh Le, Determining the ability of AST from *H.*

pluvialis on the protection of skin in the mouse model, Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol. 9(04), pp. 85-92

Quan Minh To, Dieu Quang Tran, Tuyet Thi Vy Le, Ha Le Bao Tran, Long Thanh Le, The ability of AST-rich *H. pluvialis* algal extract on preventing harmful effects of H₂O₂ on human fibroblast cells *in vitro*, European Journal of Molecular & Clinical Medicine, Volume 08, Issue 03, 2021, 1809-1919.