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

LUẬN ÁN TIẾN SỸ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Tp. Hồ Chí Minh – Năm 2023

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

LUẬN ÁN TIẾN SỸ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học

Mã số chuyên ngành: 9 42 02 01

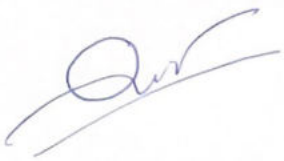
Xác nhận của Học viện Khoa học và Công nghệ	Thầy hướng dẫn 1	Thầy hướng dẫn 2
KT. GIÁM ĐỐC PHÓ GIÁM ĐỐC Nguyễn Thị Trung	PGS.TS.BS. Trần Công Toại	TS. Nguyễn Hoàng Dũng

Tp. Hồ Chí Minh – Năm 2023

LỜI CAM ĐOAN

Luận án này được hoàn thành bởi NCS. Tô Minh Quân và cộng sự. Tôi xin cam đoan kết quả luận án được trình bày trung thực và những kết quả đã công bố được sự đồng ý của cộng sự và cán bộ hướng dẫn.

Người cam đoan



NCS. Tô Minh Quân

LỜI CẢM ƠN

Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi học nghiên cứu sinh tại Viện Sinh học Nhiệt đới, Học viện Khoa học Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Luận án được hoàn thành không chỉ là công sức cá nhân mà còn có sự hỗ trợ từ rất nhiều cá nhân, đơn vị. Tôi xin gửi lời cảm ơn của mình tới:

- Thầy hướng dẫn PGS. TS. BS. Trần Công Toại. Cám ơn thầy vì luôn quan tâm, hướng dẫn, đốc thúc em hoàn thành công việc và cám ơn những lời dạy của thầy trong công việc lẫn trong cuộc sống.
- Thầy hướng dẫn TS. Nguyễn Hoàng Dũng. Cám ơn thầy vì đã hướng dẫn em rất nhiệt tình và góp ý về mặt khoa học để em chỉnh sửa đề tài theo hướng càng hoàn thiện hơn.
- TS. Lê Thành Long. Cám ơn anh vì đã hỗ trợ em về khoa học, vật chất, tinh thần để em có thể hoàn thành luận án. Cám ơn những lời động viên kịp thời của anh.
- Cám ơn những em, bạn trong nhóm đã hỗ trợ tôi hoàn thành đề tài: Uyên, Khải, Loan, Trâm, Trinh, Nhân, Diệu.
- Cám ơn các thầy cô đồng nghiệp trong bộ môn Sinh lý học và Công nghệ Sinh học Động vật, trường Đại học Khoa học Tự nhiên đã tạo điều kiện để tôi thực hiện đề tài này.
- Cám ơn viện Sinh học Nhiệt đới, Học viện Khoa học Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã đào tạo tôi trong thời gian qua và đã tạo điều kiện cho tôi hoàn thành luận án. Kiến thức từ các thầy cô của viện Sinh học Nhiệt đới, của Học viện Khoa học Công nghệ đã hỗ trợ rất lớn cho tôi trong quá trình thực hiện luận án.
- Ba, mẹ và em trai. Cám ơn gia đình vì luôn là người đứng sau âm thầm hỗ trợ tôi suốt thời gian qua.

MỤC LỤC

MỤC LỤC I

TÓM TẮT V

ABSTRACT VI

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT VII

DANH MỤC HÌNH IX

DANH MỤC BẢNG XI

MỞ ĐẦU 1

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU 3

1.1. Tổng quan về vi tảo *Haematococcus pluvialis* 3

1.1.1. Đặc điểm hình thái 3

1.2. Giới thiệu về astaxanthin 5

1.3. Nguồn thu nhận AST 7

1.3.1. Quá trình hình thành astaxanthin ở *Haematococcus pluvialis* 8

1.3.2. Điều kiện nuôi cấy và cảm ứng AST ở *Haematococcus pluvialis* 9

1.4. Cơ chế chống lão hóa của AST 10

1.4.1. Hoạt tính chống oxy hóa 10

1.4.2. Hoạt tính kháng viêm 12

1.4.3. Hoạt tính tăng cường miễn dịch 12

1.4.4. Hoạt tính điều hòa sửa chữa tổn thương tế bào và DNA 12

1.5. Cấu trúc da 13

1.6. Lão hóa da 15

1.7. Lão hóa tế bào 16

1.8. Lão hóa do ROS 21

1.8.1. Chức năng của ROS 21

1.8.2. ROS trong lão hóa và các bệnh liên quan đến tuổi tác 22

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP 25

2.1. Phương pháp nghiên cứu: 25

2.2. Đối tượng nghiên cứu 25
2.3. Hóa chất 25
2.3.1. Môi trường nuôi tảo 25
2.3.2. Hóa chất, thiết bị trong đánh giá tế bào 26
2.4. Sơ đồ thí nghiệm tổng quát 28
2.5. Phương pháp nghiên cứu 28
2.5.1. Thiết kế hệ thống nuôi tảo 28
2.5.2. Phương pháp nuôi tảo trong chai nuôi 1000 ml 29
2.5.3. Phương pháp cảm ứng tảo HP-C tổng hợp AST bằng cường độ ánh sáng mạnh. 30
2.5.4. Đánh giá phương pháp thu nhận dịch chiết AST. 31
2.5.5. Phương pháp định lượng AST. 32
2.5.6. Phương pháp thu nhận dịch chiết tảo *Haematococcus pluvialis* giàu AST (AST-EX) được sử dụng trong nghiên cứu 33
2.5.7. Phương pháp FRAP 33
2.5.8. Phương pháp ABTS 34
2.5.9. Phương pháp đánh giá độc tính của AST-EX trên nguyên bào sợi36
2.5.10. Phương pháp đánh giá sự tăng sinh của nguyên bào sợi trong môi trường AST-EX 36
2.5.11. Phương pháp đánh giá sự di cư tế bào theo phương pháp Scratch-wound assay 37
2.5.12. Phương pháp MTT để đánh giá sức sống tế bào 38
2.5.13. Phương pháp tạo mô hình lão hóa bằng hydrogen peroxide (H_2O_2) 38
2.5.14. Phương pháp nhuộm senescence –associated β-galactosidase .40
2.5.15. Phương pháp đánh giá khả năng của AST-EX trong việc bảo vệ tế bào trước yếu tố gây lão hóa H_2O_2 41
2.5.16. Phương pháp nhuộm Hoestch và phalloidin để đánh giá hình dạng tế bào 42

2.5.17. Phương pháp đánh giá sự biểu hiện mRNA tế bào bằng phương pháp realtime PCR 43

2.5.18. Phương pháp WESTERN BLOT đánh giá sự biểu hiện CDK4, CDK6 và cyclin D1 44

2.5.19. Phương pháp tạo mô mình chuột lão hóa da 45

2.5.20. Phương pháp đánh giá khả năng bảo vệ da chuột khỏi tia UVB 46

2.5.21. Phương pháp xử lý thống kê 49

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ - BIỆN LUẬN 50

3.1. Nuôi cấy tăng sinh HP-C và cảm ứng AST 50

3.2. Tách chiết AST 51

3.3. Chống oxy hóa FRAP 55

3.4. Chống oxy hóa ABTS 56

3.5. Độc tính *in vitro* 57

3.6. Tăng sinh 59

3.7. Di cư 60

3.8. Khảo sát quy trình gây lão hóa tế bào bằng H_2O_2 62

3.8.1. Kết quả khảo sát sự tăng trưởng tế bào 63

3.8.2. Kết quả khảo sát sự biểu hiện SA-gal 65

3.9. Khảo sát khả năng bảo vệ tế bào nguyên bào sợi của AST-EX khỏi tác động của H_2O_2 67

3.9.1. Kết quả đánh giá diện tích tế bào 68

3.9.2. Kết quả đánh giá sự tăng sinh tế bào 70

3.9.3. Kết quả đánh giá sự biểu hiện SA-gal 71

3.9.4. Kết quả đánh giá sự biểu hiện marker lão hóa p53, p21, p16 bằng phương pháp realtime PCR 73

3.9.5. Kết quả đánh giá sự biểu hiện MMP3, MMP1, collagen, elastin [129] 75

3.9.6. Kết quả đánh giá sự biểu hiện CDK4, CDK6, cyclin D1 77

3.10. Kết quả đánh giá khả năng bảo vệ da chuột lão hóa do tia UV 80

3.10.1. Mô hình lão hóa da do tia UV..... 80

3.10.2. Kết quả khả năng bảo vệ da của AST-EX khỏi tác hại tia UV. 85

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN- KIẾN NGHỊ 93

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÓM TẮT

Astaxanthin (AST) là một chất thuộc nhóm carotenoid với công thức hóa học là 3,3'-dihydroxy-β-carotene-4,4'-dione có hoạt tính chống oxy hóa hàng đầu. Nguồn AST tự nhiên tốt nhất hiện nay là từ tảo *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*). Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng nguồn *H. pluvialis* phân lập trong nước (chủng LC, HP-C) để thu nhận dịch chiết tảo *H. pluvialis* giàu AST (AST-EX) và đánh giá hiệu quả của AST-EX trong việc bảo vệ tế bào nguyên bào sợi (hF) khỏi hydrogen peroxide (H_2O_2) *in vitro* và bảo vệ da chuột khỏi tia UVB. Tế bào hF được xử lý trước với AST-EX 0.5-10 µg/ml, sau đó xử lý với 150 µM H_2O_2 trong 90 phút. AST-EX 1 µg/ml là nồng độ tối ưu hạn chế tác hại của H_2O_2 đối với hF: giúp tế bào duy trì sự tăng sinh (thời gian nhân đôi thế hệ 198,57 ± 46,68 giờ), giảm sự gia tăng kích thước tế bào (3102,7 ± 1172,2, 255,4 ± 42,0 µm^2), giảm sự biểu hiện của β-galactosidase lão hóa (37,19 ± 5,67%), giảm sự biểu hiện các marker lão hóa p21, p16 (gấp 1,8 ± 0,2, 1,9 ± 0,3 so với đối chứng), giảm sự biểu hiện các enzyme phân hủy protein MMP1, MMP3 (gấp 1,7 ± 0,2, 2,1 ± 0,4 so với đối chứng), giảm sự biểu hiện cyclin D1 (gấp 1,5 ± 0,3 so với đối chứng) so với tế bào xử lý H_2O_2 và phục hồi sự biểu hiện collagen, elastin (gấp 1,7 ± 0,4, 1,2 ± 0,3 so với đối chứng). Da chuột được thoa với AST-EX 5-200 µg/ml 4 giờ trước khi chiếu UVB theo quy trình gây lão hóa. AST-EX 20 µg/ml hạn chế sự biểu hiện của các dấu hiệu lão hóa: giảm mức độ nhăn da và nhão da (2,5 ± 0,5, 1,0 ± 0,7), giảm độ dày biểu bì (33,5 ± 9,6 µm), giảm biểu hiện collagen bất thường. Kết luận: AST-EX hạn chế tác hại của các tác nhân H_2O_2, tia UV trên mô hình tế bào và da chuột.

ABSTRACT

Astaxanthin (AST) is a highly antioxidant carotenoid with the formulation of 3,3'-dihydroxy-β-carotene-4,4'-dione. *Haematococcus pluvialis* algae (*H. pluvialis*) is the best natural source of AST. In this research, the ability of AST-rich extract from a Vietnamese *H. pluvialis* strain (AST-EX) to alleviate danger effects of H_2O_2 on human fibroblast (hF) and ultraviolet radiation (UV) on mouse skin. The hF was pretreated with AST-EX 0.5-10 µg/ml and then treated with 150 µM H_2O_2 for 90 minutes. The results showed that AST-EX 1 µg/ml was the optimal concentration for relieving H_2O_2-induced damage: maintaining cell proliferation (doubling time 198.57 ± 46.68 hours), reducing senescence-associated β-galactosidase (37.19 ± 5.67%), reducing the expression of mRNA of p21, p16, MMP1, MMP3 (1.8 ± 0.2, 1.9 ± 0.3, 1.7 ± 0.2, 2.1 ± 0.4), reducing the expression of protein cyclin D1 and restoring the expression of mRNA of collagen, elastin (1.7 ± 0.4, 1.2 ± 0.3). The mouse skin was topically applied with AST-EX 5-200 µg/ml 4 hours before UVB radiation. AST-EX 20 µg/ml relieved skin senescence: decreasing wrinkle score (2.5 ± 0.5, 1.0 ± 0.7), epidermal layer (33.5 ± 9.6 µm) and abnormal collagen fibers. Conclusion: AST-EX alleviated the harmful effects of H_2O_2 and UVB radiation.

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Thuật ngữ	Giải thích thuật ngữ
hF	Human fibroblast	Nguyên bào sợi người
AST	Astaxanthin	Chất astaxanthin nguyên chất
AST-EX	Astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* extract	Dịch chiết tảo *Haematococcus pluvialis* giàu astaxanthin.
AST-EX 0,5 µg/ml, AST-EX 1 µg/ml, AST-EX 5 µg/ml, AST-EX 10 µg/ml		Dịch chiết giàu astaxanthin từ tảo *Haematococcus pluvialis* có nồng độ AST tổng là 0,5 µg/ml. Tương tự các thuật ngữ còn lại là nồng độ AST tổng là 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml
AST-EX0,5, AST-EX1, AST-EX5, AST-EX10		Nhóm tế bào hoặc chuột xử lý với AST-EX 0,5 µg/ml, AST-EX 1 µg/ml, AST-EX 5 µg/ml, AST-EX 10 µg/ml
MMP	Matrix metallproteinases	Enzyme matrix metallproteinase
Nrf-2 factor	Nuclear factor erythroid 2-related factor	
DT	Doubling time	Thời gian nhân đôi thế hệ
qPCR (realtime-PCR)	Quantitative polymerase chain reaction	PCR định lượng
SA-gal	Senescence-associated β-galactosidase	Marker đặc trưng cho sự lão hóa tế bào enescence-associated b-galactosidase
	Cell cycle arrest	Sự dừng chu kỳ tế bào
HP-C		Tảo *Haematococcus pluvialis* chủng LC

dichlo/met		Dichloromethane/methanol (tỉ lệ 1:3 v/v)
UVB	Ultraviolet B radiation	Tia UVB
H. pluvialis	*Haematococus pluvialis*	Tảo *Haematococcus pluvialis*
CDK		Cyclin-dependent kinase
ATM	Ataxia telangiectasia mutated	
MTCB		Môi trường nuôi cấy cơ bản: 89% DMEM/F12, 10%FBS, 1% penicillin/streptomycin
ROS	Reactive Oxygen Species	Gốc oxy hoạt động
Tế bào dạng cyst		Nang bào tử trưởng thành tổng hợp lượng lớn AST khi gặp điều kiện bất lợi kéo dài
Tế bào pamelloid		Tảo ở trạng thái hình cầu sinh dưỡng bất động
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
MTT	3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide	Hoá chất MTT
KHV		Kính hiển vi
ABTS assay	2,2′-azino-bis (3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid	Phương pháp ABTS
FRAP assay	Ferric Reducing Antioxidant Power	Phương pháp đánh giá khả năng khử Fe^{3+}

DANH MỤC HÌNH

Hình 1. 1. Tế bào vi tảo *Haematococcus pluvialis* [11]. 3
Hình 1. 2. Các chu kỳ tế bào của *H. pluvialis* trong chu kỳ sống [12]. 4
Hình 1. 3. Vòng đời tự nhiên của vi tảo [12]. 5
Hình 1. 4. Cấu trúc astaxanthin [17]. 6
Hình 1. 5. Vị trí chống oxy hóa của AST [17]. 6
Hình 1. 6. AST và các dẫn xuất ester từ nhiều nguồn khác nhau [20, 21]. 8
Hình 1. 7. Quá trình tổng hợp AST từ β-carotene [23]. 9
Hình 1. 8. Sự biến đổi gốc oxy hóa trong cơ thể [38]. 11
Hình 1. 9. Sự hình thành ROS trong tế bào [39]. 11
Hình 1. 10. Các cơ chế chống oxy hóa của AST trong tế bào [7]. 12
Hình 1. 11. Sự tương tác DNA và AST [42]. 13
Hình 1. 12. Cấu trúc da [43]. 14
Hình 1. 13. Cơ chế gây lão hóa da do tia ánh sáng mặt trời [46]. 16
Hình 1. 14. Con đường tín hiệu liên quan tới quá trình lão hóa tế bào [49]. 21
Hình 2. 1. Sơ đồ thí nghiệm tổng quát. 28
Hình 2. 2. Sơ đồ hệ thống nuôi tảo. 29
Hình 2. 3. Sự chuyển hóa MTT thành tinh thể formazan. 38
Hình 2. 4. Sơ đồ thí nghiệm tạo mô hình lão hoá. 39
Hình 2. 5. Enzyme SA-gal xúc tác phản ứng với X-Gal. 40
Hình 2. 6. Sơ đồ thí nghiệm khả năng bảo vệ tế bào của astaxanthin 41
Hình 2. 7. Sơ đồ thí nghiệm bảo vệ da chuột của AST. 46
Hình 3. 1. Chu kỳ vòng đời tảo HP-C sử dụng trong nghiên cứu (x40). 50
Hình 3. 2. Kết quả nuôi cấy HP-C. 51
Hình 3. 3. Kết quả chạy HPLC mẫu dịch chiết tảo *H. pluviais*. 52
Hình 3. 4. Kết quả tách chiết AST từ vi tảo. 53
Hình 3. 5. Kết quả thử nghiệm FRAP của AST-EX. 55
Hình 3. 6. Biểu đồ biểu thị giá trị FRAP. 56
Hình 3. 7. Kết quả thử nghiệm ABTS của AST-EX. 56
Hình 3. 8. Biểu đồ biểu thị kết quả thử nghiệm $ABTS^{+\bullet}$. 57
Hình 3. 9. Đồ thị biểu diễn giá trị OD_{590} thu được từ thí nghiệm đánh giá độc tính của AST-EX. 58

Hình 3. 10. Biểu đồ biểu thị sự tăng trưởng tế bào hF trong môi trường bổ sung AST-EX sau 13 ngày nuôi cấy. 60

Hình 3. 11. Kết quả thử nghiệm di cư của hF dưới tác động của AST-EX 0,5-10 µg/ml. 61

Hình 3. 12. Biểu đồ biểu thị diện tích bao phủ bởi tế bào trong thí nghiệm di cư. 62

Hình 3. 13. Biểu đồ biểu thị sự gia tăng giá trị OD ở các nhóm thí nghiệm sau 7 ngày. 63

Hình 3. 14. Sự biến đổi hình dạng tế bào hF khi xử lý với H_2O_2 ngày 4 (x50). 64

Hình 3. 15. Kết quả nhuộm SA-gal tế bào hF xử lý với H_2O_2 ở các nồng độ khác nhau. (x100). 66

Hình 3. 16. Kết quả nhuộm Hoechst/phaloidin tế bào xử lý với AST-EX và H_2O_2. 69

Hình 3. 17. Biểu đồ biểu thị sự tăng sinh tế bào xử lý với AST-EX và H_2O_2... 71

Hình 3. 18. Biểu đồ biểu thị tỉ lệ tế bào dương tính với SA-gal 72

Hình 3. 19. Kết quả biểu hiện SA-gal tế bào trong nhóm thí nghiệm (x25)..... 72

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 H_2O_2 74

Hình 3. 21. Biểu đồ biểu thị sự biểu hiện hMMP3, hMMP1, collagen, elastin tế bào xử lý với AST-EX 76

Hình 3. 22. Biểu đồ biểu thị sự biểu hiện CDK4, CDK6, cyclin D1 của tế bào hF 78

Hình 3. 23. Hình chụp bên ngoài chuột sau khi chiếu UV. 80

Hình 3. 24. Kết quả soi da chuột sau khi chiếu UVB. 81

Hình 3. 25. Kết quả nhuộm Trichrome mẫu da chuột. 84

Hình 3. 26. Kết quả quan sát da chuột ở các nhóm thoa AST-EX. 86

Hình 3. 27. Kết quả soi da chuột sau 8 tuần chiếu UVB. 87

Hình 3. 28. Kết quả nhuộm Trichrome mẫu da chuột sau khi chiếu UVB 8 tuần. 88

Hình 3. 29. Biểu đồ biểu thị kết quả thí nghiệm chống lão hóa da chuột của AST-EX. 89

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1. 1. Hàm lượng AST từ các nguồn khác nhau [1, 3]..... 8
Bảng 2. 1. Thành phần môi trường nuôi tảo BG-11 (đơn vị mg/L) [82]..... 25
Bảng 2. 2. Bố trí thí nghiệm tách chiết AST từ tảo HP-C 31
Bảng 2. 3. Bảng bố trí thí nghiệm khả năng bảo vệ tế bào trước yếu tố gây lão hóa H_2O_2 của AST 42
Bảng 2. 4. Trình tự primer 44
Bảng 2. 5. Bố trí thí nghiệm tác động của AST lên da chuột 47
Bảng 2. 6. Mức độ nhăn da theo tiêu chuẩn Agrawal [88] 48
Bảng 2. 7. Mức độ nhão da theo tiêu chuẩn Bisset [89] 48
Bảng 3. 1. Kết quả tóm tắt chiết xuất AST theo quy trình TN1, TN2, TN3..... 54
Bảng 3. 2. Tỉ lệ RBG của AST-EX ở các nồng độ khác nhau..... 58
Bảng 3. 3. Thời gian tăng sinh thế hệ tế bào hF trong các nhóm thí nghiệm 60
Bảng 3. 4. Kết quả đánh giá hiệu quả hỗ trợ hF di cư sau 24 giờ (% diện tích so với diện tích vùng rạch) 62
Bảng 3. 5. Tỉ lệ tế bào dương tính với SA-gal khi xử lý với H_2O_2..... 66
Bảng 3. 6. Diện tích tế bào và diện tích nhân trong nhóm xử lý với AST-EX và H_2O_2 70
Bảng 3. 7. Thời gian nhân đôi của tế bào xử lý AST-EX và H_2O_2..... 71
Bảng 3. 8. Tóm tắt sự biểu hiện tương đối mRNA của các gene p53, p21, p16 trong thí nghiệm bảo vệ tế bào của AST-EX..... 74
Bảng 3. 9. Sự biểu hiện tương đối mRNA MMP3, MMP1, collagen I, elastin trong thí nghiệm bảo vệ tế bào..... 76
Bảng 3. 10. Kết quả biểu hiện tương đối protein CDK4, CDK6 và cyclin D1 . 78
Bảng 3. 11. Bảng tổng kết kết quả tạo mô hình chuột lão hóa da do tia UVB.. 85
Bảng 3. 12. Tóm tắt kết quả mức độ nhăn da và độ dày biểu bì..... 90

MỞ ĐẦU

Astaxanthin (AST) là một chất thuộc nhóm carotenoid với công thức hóa học 3,3'-dihydroxy-β-carotene-4,4'-dione. AST có hoạt tính chống oxy hóa hàng đầu hiện nay và được ứng dụng rất nhiều trong y học để chữa trị các bệnh có nguyên nhân là các gốc oxy hoạt động (ROS): tim mạch, khớp, tiểu đường, … Hiện nay, AST được thu nhận từ nhiều nguồn khác nhau như thịt cá hồi, vỏ tôm, cua, vi nấm (*Phaffia rhodozyma*) [1, 2]. Trong những nguồn AST tự nhiên, tảo *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) được xem là nguồn AST tốt nhất hiện nay. Nồng độ AST cao nhất trong tảo *H. pluvialis* có thể có thể đạt đến là 5% khối lượng khô, cao gấp 33 lần so với AST từ tôm, gần 1000 lần so với thịt cá hồi [3]. Đồng thời, AST từ tảo *H. pluvialis* tồn tại ở dạng đồng phân có hoạt tính cao, tốt cho sức khỏe (3S,3’S) [4].

Đối với lĩnh vực thẩm mỹ, AST thường được sử dụng để chống lại lão hóa da. Hiện tượng lão hóa da có nguyên nhân từ bên trong và bên ngoài cơ thể. Các gốc oxy hóa hoạt động (ROS) là một trong những nguyên nhân chính gây ra quá trình lão hóa da [5]. ROS được sinh ra liên tục trong quá trình sinh lý bình thường trong suốt chu kỳ sống của tế bào như ROS được sinh ra trong chuỗi truyền điện tử trong ty thể. Khi được sinh ra, ROS có khả năng phá hủy các phân tử DNA, protein, lipid mà ROS tiếp xúc. Lượng ROS có khả năng gia tăng theo 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, ô nhiễm [6]. Tia UV trong ánh sáng mặt trời không chỉ phá hủy tế bào da mà còn sinh ra lượng lớn ROS gây tổn hại lên tế bào da (nguyên bào sợi, tế bào sừng) và những protein chính trong chất nền da như collagen, elastin, đồng thời ngăn cản sự tổng hợp mới những protein nói trên [6]. Do đó, khi tiếp xúc với tia UV trong thời gian dài, da sẽ xuất hiện những dấu hiệu lão hóa: xuất hiện vết nhăn, da trở nên nhão, kém đàn hồi... AST là chất chống oxy hóa mạnh có khả năng hấp thu những gốc tự do này nên có khả năng ức chế quá trình lão hóa da do ROS sinh ra trong quá trình sinh lý hoặc do tia UV [7].

Hiện nay các nghiên cứu ứng dụng AST trong thẩm mỹ trên đối tượng động vật và những thử nghiệm lâm sàng trên người tập trung vào AST dạng uống [8, 9]. Giá thành hiện nay của AST vẫn còn cao (giá thành bột tảo giàu AST được bán khoảng 400 USD/kg trên các trang mạng online, giá AST dạng bột có thể lên tới 10.000 USD/kg), việc sử dụng AST dạng thoa có thể làm tăng hiệu quả chống lão hóa và giảm giá thành sử dụng, điều này giúp nhiều người có điều kiện tiếp cận được với sản phẩm có chất

lượng tốt. Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa có nghiên cứu đánh giá hiệu quả của AST trong việc bảo vệ nguyên bào sợi chống lại tác hại các ROS trực tiếp ở cấp độ tế bào, nội phân tử cũng như chưa có nghiên cứu xác định nồng độ hiệu quả của AST dạng thoa. Đồng thời nguồn tảo *Haematococcus pluvialis* trong nước rất ít (hiện chỉ có chủng HB và chủng LC của viện Công nghệ Sinh học được công bố rộng rãi) và những khảo sát tiến hành tập trung vào quá trình nuôi cấy tảo để thu AST, chưa tập trung vào ứng dụng của AST [10]. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành đánh giá hiệu quả cảm ứng AST trên một chủng tảo trong nước (chủng LC) để cung cấp thêm thông tin về khả năng thương mại hoá nguồn tảo địa phương.

Nghiên cứu được tiến hành với mục đích đánh giá hiệu quả của dịch chiết tảo *H. pluvialis* giàu AST trong bảo vệ nguyên bào sợi khỏi tác nhân ROS trực tiếp *in vitro* và bảo vệ da khi sử dụng dạng thoa trên mô hình động vật bị lão hóa do tia UVB.

Mục tiêu tổng quát:

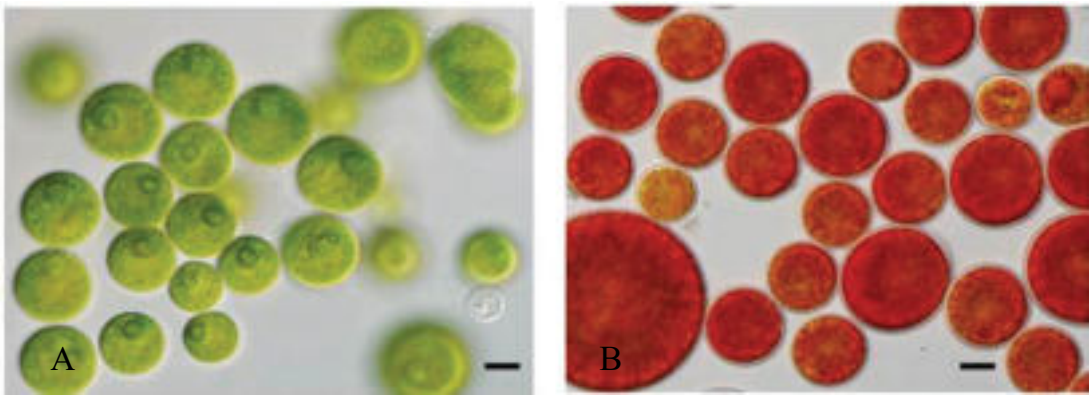
- Đánh giá hiệu quả chống lão hóa của dịch chiết tảo *Haematococcus pluvialis* giàu astaxanthin trên mô hình tế bào và chuột.

Mục tiêu cụ thể:

- Cảm ứng thành công AST từ vi tảo *Haematococcus pluvialis*
- Đánh giá được hiệu quả của dịch chiết tảo *Haematococcus pluvialis* giàu astaxanthin trong việc bảo vệ nguyên bào sợi khỏi tác nhân hydrogen peroxide trong điều kiện *in vitro*.
- Đánh giá được hiệu quả bảo vệ da chuột của dịch chiết tảo giàu AST khỏi tia UVB.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về vi tảo *Haematococcus pluvialis*



Hình 1. 1. Tế bào vi tảo *Haematococcus pluvialis* [11].

A: Nang bào tử sinh dưỡng, B: Nang bào tử cảm ứng trưởng thành

Tên khoa học: *Haematococcus pluvialis.*

Phân loại khoa học:

Giới Eukaryote

Ngành Chlorophyta

Lớp Chlorophyceae

Bộ Volvocales

Họ Haematococcaceae

Chi *Haematococcus*

H. pluvialis là một loài vi tảo lục đơn bào có roi, có vùng phân bố rộng ở các vùng ôn đới và đã được phân lập từ Châu Âu, Châu Phi, Bắc Mỹ và Himachal Pradeslv Ấn Độ [12].

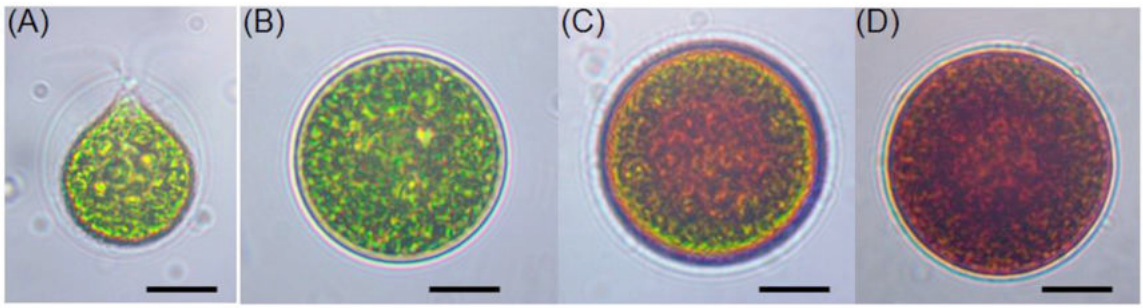
1.1.1. Đặc điểm hình thái

Hình thái tế bào của *H. pluvialis* có sự biến đổi khác nhau trong chu trình sống của chúng. Tế bào có 2 dạng, tương ứng với đặc điểm sinh trưởng: tế bào sinh dưỡng và nang bào tử (cyst). Trong đó:

- Tế bào sinh dưỡng: màu xanh, dạng cầu hoặc elip với đường kính khoảng 10 – 20 µm, có thể chuyển động nhanh nhờ 2 roi. Trong điều kiện thuận lợi, phần lớn các tế bào tảo tồn tại ở dạng sinh dưỡng, có hàm lượng chlorophyll a, b và tiền chất

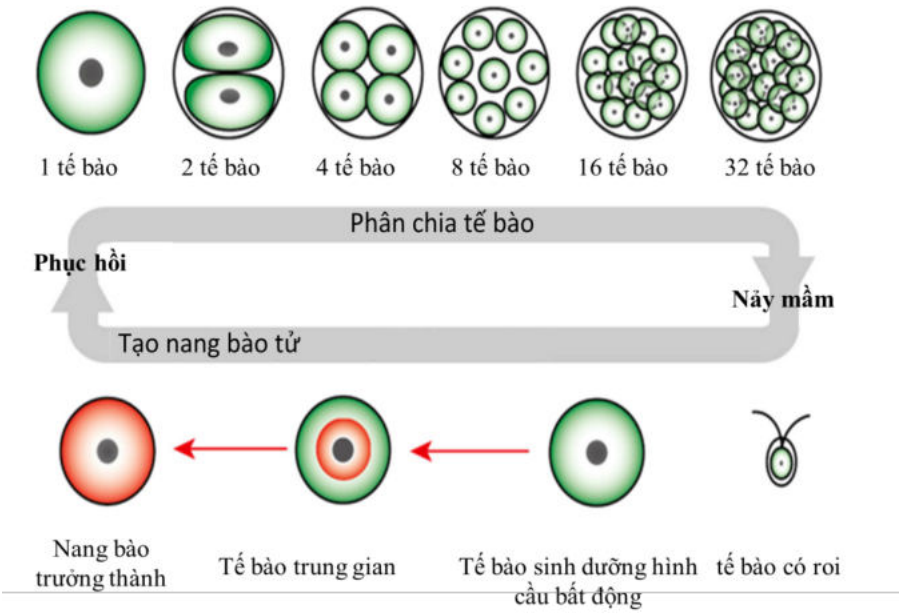
carotenoid cao, nhân nằm ở trung tâm tế bào với diệp lục vây quanh, có rất ít hạt chứa AST nằm xung quanh nhân. Các tế bào sinh dưỡng có thể phân chia tạo thành 2-32 tế bào con. Khi điều kiện trở nên bất lợi (cạn kiệt dinh dưỡng, cường độ ánh sáng cao, nhiệt độ cao, stress muối, …), các tế bào sinh dưỡng bắt đầu mất roi, phình to. Trong giai đoạn này, tảo ở trạng thái tế bào sinh dưỡng hình cầu bất động (pamelloid).

- Nang bào tử: Khi điều kiện bất lợi tiếp tục diễn ra, tế bào sinh dưỡng sẽ bắt đầu tích lũy AST để hình thành nang bào tử. Trong suốt quá trình hình thành nang bào tử, *H. pluvialis* chuyển từ màu xanh lục sang tế bào có màu xanh lẫn cam, đây là giai đoạn trung gian của giai đoạn sinh dưỡng và nang bào tử trưởng thành. Một số tác giả gọi giai đoạn này là giai đoạn nang bào tử non hoặc tế bào trung gian. Trong giai đoạn này các túi tinh bột có thể thấy rõ cùng với những hạt dầu với nhiều kích thước chứa AST nằm xung quanh nhân. Đi cùng với sự tích lũy AST, diệp lục giảm về thể tích nhưng quá trình quang hợp vẫn còn xảy ra cho đến khi giai đoạn bào nang bắt đầu. Lúc này diệp lục bị phân hủy hoàn toàn và thay thế bởi những hạt dầu chứa AST. Khi điều kiện bất lợi tiếp tục diễn ra, tế bào tổng tích lũy lượng lớn AST và chuyển thành nang bào tử trưởng thành (giai đoạn cyst hoặc còn gọi là aplanopspore). Tế bào có hình cầu, không còn khả năng di động màu đỏ sậm. Thành tế bào dày lên, đường kính tăng 40 – 50 µm. Tốc độ sinh trưởng của tế bào giảm và tế bào tích luỹ một lượng lớn astaxanthin [13, 14], [15].



Hình 1. 2. Các chu kỳ tế bào của *H. pluvialis* trong chu kỳ sống [12].

(A): Tế bào sinh dưỡng thể di động; (B): Tế bào sinh dưỡng hình cầu bất động; (C): AST bắt đầu được tích lũy trong tế bào sinh dưỡng hình cầu, (D): Nang bào tử trưởng thành tích lũy đầy đủ AST.



Hình 1. 3. Vòng đời tự nhiên của vi tảo [12].

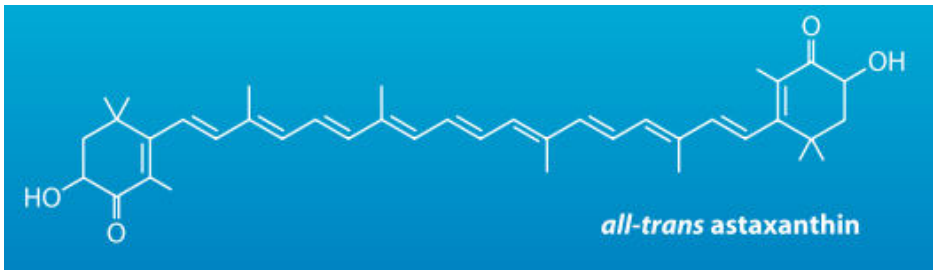
- Giai đoạn nảy mầm: Khi điều kiện trở nên thuận lợi, nang bào tử trưởng thành nảy mầm thành tế bào sinh dưỡng có roi di động để bắt đầu chu kỳ phát triển tiếp theo. Trong giai đoạn này, một tế bào cyst có khả năng tạo thành 64 tế bào con với kích thước nhỏ (<10 µm).

1.2. Giới thiệu về astaxanthin

Astaxanthin là một xanthophyll carotenoid có tên công thức khoa học là 3,3'-dihydroxy-ß-carotene-4,4'-dione. AST có cấu trúc mạch thẳng với 2 đầu là 2 vòng ionone có nhóm liên kết hydroxyl và keto. Hai đầu được nối với nhau bằng một chuỗi polyene bao gồm các liên kết C-C với các liên kết đôi và đơn xen kẽ lẫn nhau (Hình 1.5) [16].

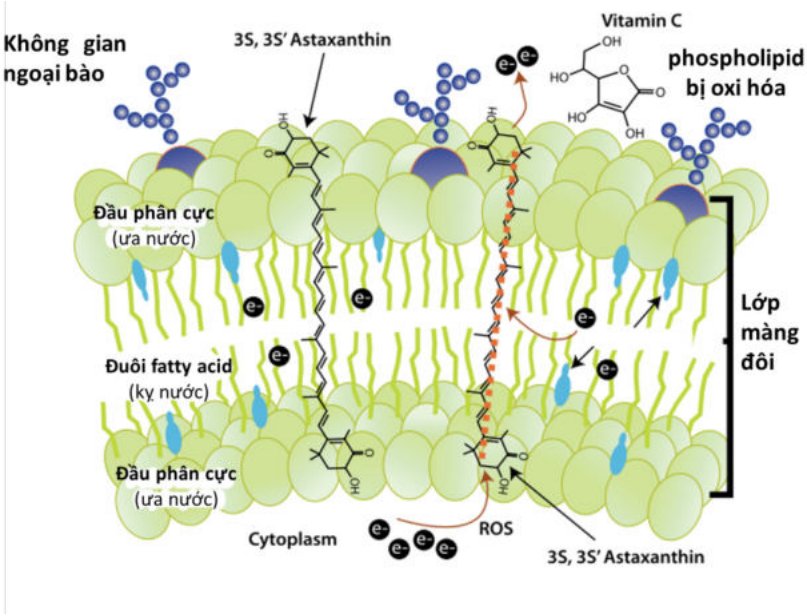
Do cấu trúc đặc trưng: dạng thẳng, gồm 3 phần phân cực – không cực – phân cực nên đã giúp cho astaxanthin có tính chất độc đáo là xen giữa màng tế bào (Hình 2). Điều này tạo nên tính chất chống oxy hóa độc đáo của astaxanthin:

- Vòng ionone ở hai đầu giúp chống oxy hóa trong và ngoài màng sinh học (màng tế bào, màng nhân, màng ty thể…)
- Chuỗi C-C giúp chống oxy giữa màng sinh học (màng tế bào, màng nhân, màng ty thể…)



Hình 1. 4. Cấu trúc astaxanthin [17].

Ngoài ra, một tính chất quan trọng khác của astaxanthin là astaxanthin không bị biến đổi thành chất pro-oxidant (chất gây oxy hóa) khi bị kích thích như các chất β-carotene, vitamin C. Đây cũng chính là một trong những nguyên nhân tạo nên tính an toàn cao của astaxanthin. Thực tế, astaxanthin có khả năng kháng oxy hóa cao hơn α-tocopherol 100 lần và cao hơn các hợp chất zeaxanthin, lutein, canthaxanthin, β-carotene 10 lần [3].



Hình 1. 5. Vị trí chống oxy hóa của AST [17]

Với khả năng chống oxy hóa hiệu quả như trên, hiện nay AST được sử dụng trên toàn thế giới để chống lại các căn bệnh có liên quan đến các gốc oxy hóa như bệnh tim mạch, viêm khớp, tiểu đường, ung thư … đặc biệt là dùng để chống lão hóa.

AST có tính an toàn cao, một số nghiên cứu ghi nhận liều dùng AST có thể lên tới 40 mg/ngày [3]. Do đó, AST được sử dụng trên thế giới như 1 loại thực phẩm chức năng hằng ngày để chống lại các gốc oxy hóa hoặc chống lão hóa nhưng các nghiên cứu lâm sàng trên AST vẫn chưa được tiến hành ở quy mô lớn mà chỉ ở những quy mô

nhỏ (khoảng 50 người) [18]. Đa phần người sử dụng đều cảm nhận rõ ràng sự phục hồi sức khỏe.

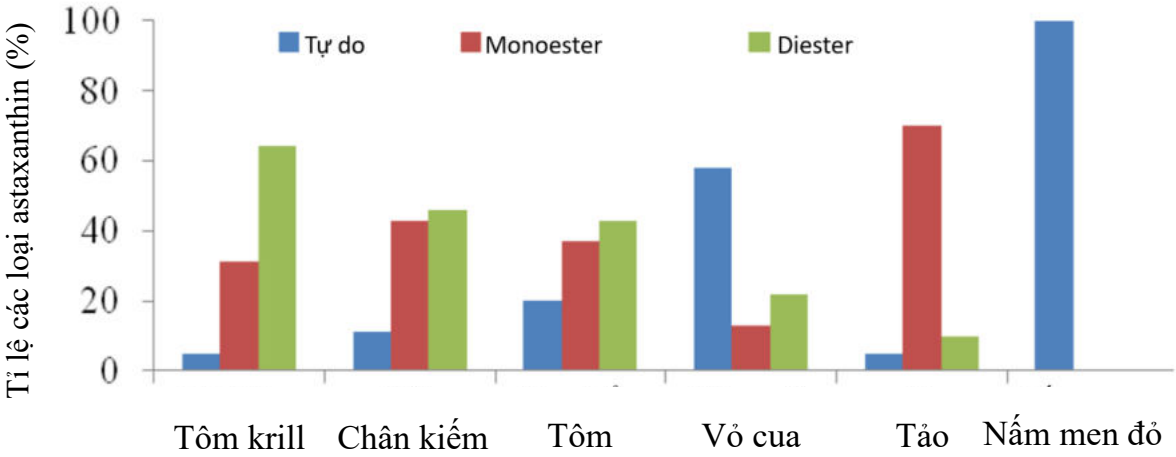
1.3. Nguồn thu nhận AST

Hiện nay trên thị trường có 2 loại AST đang lưu hành: AST tự nhiên và AST tổng hợp. AST tự nhiên là AST được chiết xuất từ những nguồn tự nhiên như tảo, nấm, thịt cá hồi, tôm cua. AST tổng hợp là AST được tổng hợp bằng những phản ứng hóa học từ dầu mỏ. Tuy nhiên, dạng AST tổng hợp không có nhiều đồng phân 3S, 3'S như AST tự nhiên và chỉ được dùng trong nuôi trồng thủy sản để tạo màu cho vật nuôi. Duy nhất AST tự nhiên được cấp phép sử dụng cho người [17], [19]. Hiện nay, giá thành 1 kg AST tự nhiên chiết xuất từ tảo *H. pluvialis* là 10.000 USD, trong khi giá thành 1 kg AST tổng hợp là 2.000 USD.

AST là chất tạo màu đỏ trong thịt cá, vỏ cua, vỏ tôm. Giai đoạn đầu, AST được chiết xuất từ vỏ tôm, cua, hoặc thịt cá hồi. Sau đó, một số nghiên cứu cho thấy AST xuất hiện ở một số loài vi nấm (*Phaffia rhodozyma*), vi tảo. Những nghiên cứu hiện nay đều chứng tỏ rằng nguồn AST có chất lượng tốt nhất và nhiều nhất là vi tảo *Haematococcus pluvialis (H. pluvialis)*. Nguồn AST từ tảo *H. pluvialis* (38 g/kg) cao gấp 1000 lần so với thịt cá hồi (38 mg/kg) [3]. *H. pluvialis* là một họ vi tảo lục, nước ngọt, đơn bào, hình elip đường kính khoảng 10-20 µm, sinh sản vô tính bằng cách nhân đôi, có thể di chuyển bằng hai roi, phân bố chủ yếu ở vùng ôn đới. Khi bị kích thích bởi môi trường, tảo *H. pluvialis* tổng hợp AST để chống lại sự thay đổi từ môi trường bên ngoài (Hình 3) [3, 12].

Bảng 1. 1. Hàm lượng AST từ các nguồn khác nhau [1, 3].

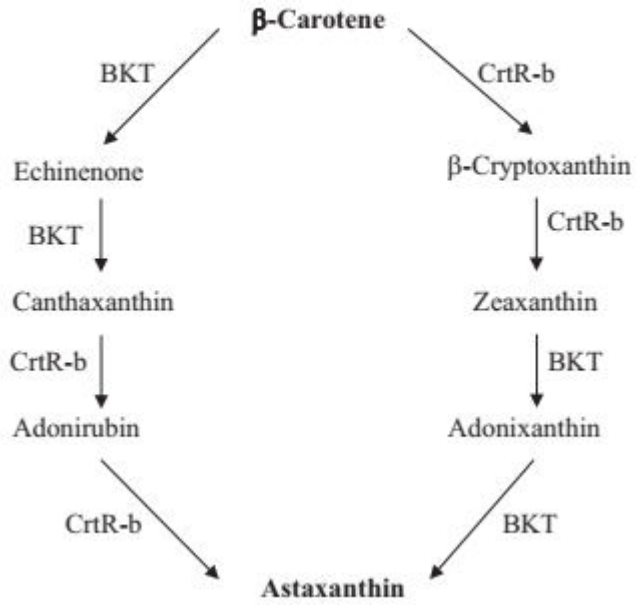
Nguồn AST	**Lượng AST**
Cá hồi Coho	26-38 mg/kg
Tôm *(P. borealis*)	150 mg/kg
Nấm men	1700 mg/kg
H. pluvialis	36000-38000 mg/kg



Hình 1. 6. AST và các dẫn xuất ester từ nhiều nguồn khác nhau [20, 21].

1.3.1. Quá trình hình thành astaxanthin ở *Haematococcus pluvialis*

AST được chứa trong các giọt lipid nằm quanh nhân. Trong giai đoạn sinh dưỡng, tế bào tảo rất ít tổng hợp AST. Khi điều kiện môi trường trở nên không thuận lợi, (bao gồm những yếu tố ánh sáng, nhiệt độ, pH, chất dinh dưỡng) tảo chuyển sang giai đoạn nang bào. Trong giai đoạn này, nhiều hạt dầu với nhiều kích thước khác nhau dùng để chứa AST xuất hiện xung quanh nhân. Diệp lục tố bị thay thế dần dần bằng AST [22]. Quá trình tổng hợp AST trong tảo *H. pluvialis* được bắt đầu từ β-carotene. Sự oxy hóa β-carotene tại 4 vị trí bởi carotence ketolase (BKT). Khi tảo gặp điều kiện môi trường bất lợi, mRNA của ketolase được tổng hợp vượt ngưỡng và tảo bắt đầu tổng hợp AST. β-carotene sau đó được chuyển thành echinenone và thành canthaxanthin nhờ tác dụng của enzyme BKT. Canthaxanthin tiếp đến được gắn thêm gốc -OH để tạo thành AST nhờ enzyme CrtR-b [23].



Hình 1. 7. Quá trình tổng hợp AST từ β-carotene [23]

1.3.2. Điều kiện nuôi cấy và cảm ứng AST ở *Haematococcus pluvialis*

Điều kiện nuôi cấy AST bao gồm 2 giai đoạn: nuôi cấy tích lũy sinh khối và nuôi cấy tích lũy astaxantin. Những yếu tố như thành phần môi trường, pH, nhiệt độ, ánh sáng, đều ảnh hưởng tới quá trình nuôi cấy và không giống nhau giữa các chủng và các giai đoạn mong muốn. Giai đoạn tích lũy sinh khối cần tạo điều kiện môi trường thuận lợi. Nhiều loại môi trường nuôi cấy được dùng trong nuôi cấy *H. pluvialis* như BG-11, BBM, OHM, KM1, RM và những biến thể của chúng. Đối với giai đoạn cảm ứng sinh tổng hợp AST, tảo được nuôi trong môi trường gây stress. Một số yếu tố ảnh hưởng tới quá trình tổng hợp AST.

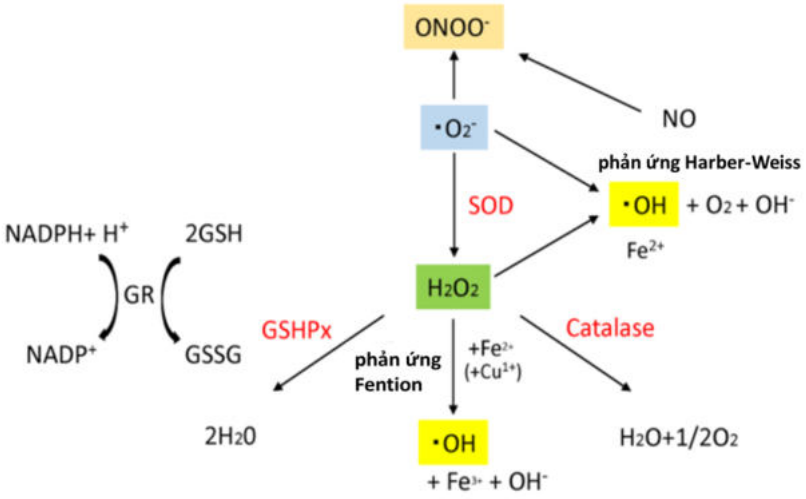
- Muối natri nitrate: Muối nitrate là nguồn dinh dưỡng vô cơ cho tảo. Khi thiếu nitrate dẫn tới thiếu nguồn nitrogen cho các hoạt động của tảo, có thể dẫn tới thoái hóa diệp lục tố. Do đó, thiếu nitrogen dẫn tới hình thành AST. Tác giả Boussiba cho rằng thiếu hụt nguồn nitrogen và phospho dẫn tới tổng hợp AST [24, 25].
- Nồng độ muối cao (0.25-0.5%), nhiệt độ cao (trên 30^{o}C), pH thấp cũng có ảnh hưởng đến tổng hợp carotenoid. Điều kiện tối ưu cho sự tăng trưởng là nhiệt độ 25-28^{o}C, pH 7-7.85.
- Ánh sáng: cường độ ánh sáng cao 70-177 µmol photons/m^2/s kích thích sự hình thành AST và cường độ ánh sáng rất khác nhau ở các giống tảo khác nhau. Thời

gian chiếu sáng được áp dụng khi nuôi sinh khối là 12:12 hoặc 16:8, thời gian cảm ứng sinh tổng hợp AST thường là chiếu sáng liên tục. Về nguồn sáng, đèn LED đỏ thích hợp cho tăng sinh khối trong khi LED trắng xanh thích hợp cho tổng hợp AST. Cường độ chiếu sáng nên tăng dần để tảo có thời gian thích nghi để tạo nang bào tử [26].

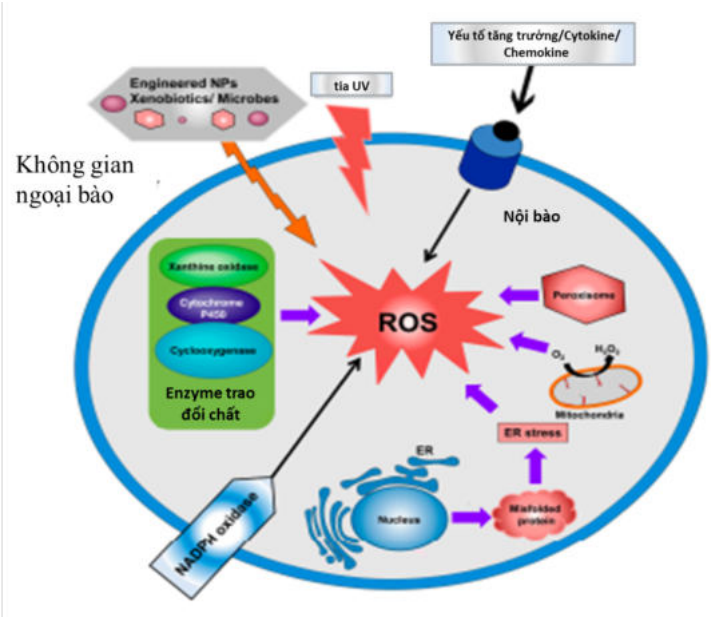
1.4. Cơ chế chống lão hóa của AST

1.4.1. Hoạt tính chống oxy hóa

ROS là một nhóm các gốc oxy hóa hoạt động, ROS bao gồm các gốc oxy tự do, như superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$), gốc hydroxyl ($HO^{\cdot}$) và một số phân tử không phải gốc oxy tự do như hydrogen peroxide (H_2O_2). Các gốc superoxide phản ứng để tạo thành các ROS khác, cụ thể là các gốc H_2O_2 và hydroxyl, đồng thời chuyển đổi xen kẽ với các gốc chứa nitrogen hoạt tính (RNS), tạo ra các hiệu ứng tương tự như ROS [27]. Sự chuyển điện tử không hiệu quả trong chuỗi hô hấp của ty thể được cho là nguồn ROS chính, trong số các nguồn enzyme và không enzyme khác nhau [28]. Sự biểu hiện gia tăng của các phân tử catalase và peroxiredoxin-1 được coi là các marker stress oxy hoá. Họ này bao gồm bảy thành viên protein xuyên màng, cụ thể là Nox1–5 và Duox1-2 [29-31], [32]. ROS được tạo ra bởi quá trình chuyển hóa oxy trong quá trình hô hấp tế bào ở sinh vật hiếu khí và có thể bắt nguồn từ nguyên nhân bên ngoài như các hợp chất oxy hóa khử, bức xạ, tác nhân hóa trị liệu, chất gây ung thư (phân tử oncogen), chế độ ăn hay từ tia UV [33]. Sự cân bằng giữa các cơ chế oxy hóa-chống oxy hóa dẫn đến sự điều biến liên tục của quá trình sản xuất, vị trí và bất hoạt ROS, trong cả điều kiện sinh lý và bệnh lý. Các chất chống oxy hóa nội sinh, như các enzyme thuộc họ catalase, nhóm glutathione, nhóm liên quan đến thioredoxin và superoxide dismutase [34], chất chống oxy hóa ngoại sinh như glutathione, carotenoid, vitamin C và E, tạo thành hệ thống chống lại các ROS [35]. Tuy nhiên, sự mất cân bằng cân bằng oxy hóa khử luôn có thể xảy ra và thường theo hướng có gia tăng các ROS, do đó ROS chuyển từ mức sinh lý sang mức có hại, điều này dẫn tới hiện tượng stress oxy hóa và nitro hóa (OS/NS). Sự biểu hiện gia tăng của các phân tử catalase và peroxiredoxin-1 được coi là marker stress oxy hoá [36, 37].



Hình 1. 8. Sự biến đổi gốc oxy hóa trong cơ thể [38].



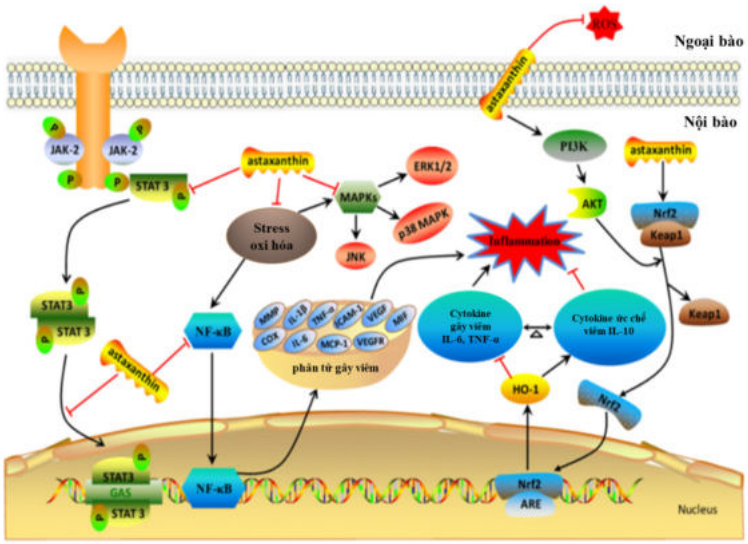
Hình 1. 9. Sự hình thành ROS trong tế bào [39].

AST có nhiều đặc tính tốt trong chống oxy hóa bảo vệ tế bào. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh AST có tác dụng tốt trong phòng chống oxy hóa.

- AST ức chế sự hình thành ROS và kích hoạt con đường chống oxy hóa Nrf2/HO-1 [7].
- AST kích thích tổng hợp các yếu tố chống oxy hóa nội bào như superoxide dismutase 2 (SOD2), catalase (CAT) và glutathione peroxidase 1 (GPX1) [40]. Do đó, AST có tác dụng chống oxy hóa không chỉ thông qua việc trực tiếp hấp thụ ROS mà còn kích hoạt hệ thống chống oxy hóa nội bào thông qua việc điều hòa con đường Nrf2.

1.4.2. Hoạt tính kháng viêm

Các yếu tố stress oxy hóa như các gốc tự do dẫn tới sự viêm nhiễm mãn tính. Đối với da, tế bào sừng có khả năng cảm ứng tổng hợp những tác nhân gây viêm liên quan tới enzyme tổng hợp nitric oxide cảm ứng (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2. AST giúp hấp thụ các gốc tự do nên giảm tác hại của tia UV [20]. Đồng thời, AST ức chế sự biểu hiện của các phân tử gây viêm như interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6)



Hình 1. 10. Các cơ chế chống oxy hóa của AST trong tế bào [7].

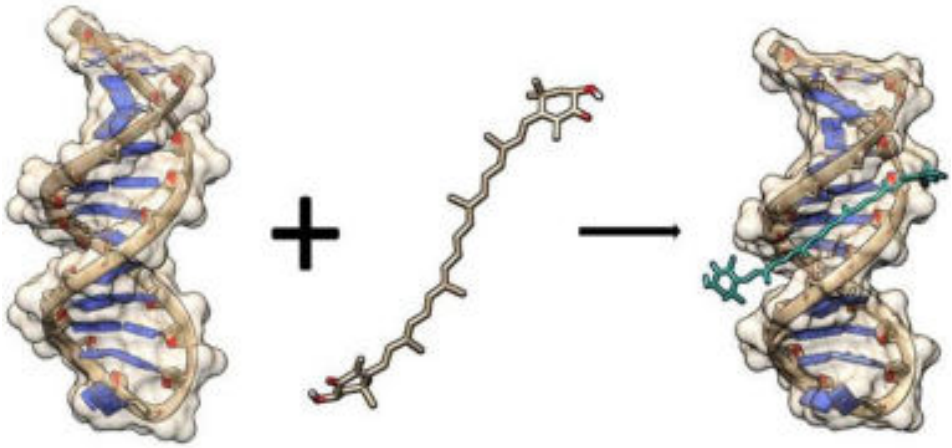
1.4.3. Hoạt tính tăng cường miễn dịch

Hệ miễn dịch đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ cơ thể chống lại các nguyên nhân gây bệnh từ bên ngoài, chống ung thư và lão hóa. AST kích thích sự sản xuất immunoglobulin trên tế bào lympho. Đồng thời, AST tăng cường hoạt tính của tế bào giết tự nhiên (NK) [41].

1.4.4. Hoạt tính điều hòa sửa chữa tổn thương tế bào và DNA

Collagen, elastin, glycosaminoglycan là những phân tử cấu trúc quan trọng trong chất nền ngoại bào da. Đối với cả hai loại lão hóa nội sinh và lão hóa ngoại sinh đều cho thấy có sự thay đổi tiêu cực ở các cấu trúc này. Những hệ quả của sự thay đổi cấu trúc trên bao gồm sự mất đi độ căng, độ đàn hồi, khả năng giữ nước và sửa chữa tổn thương của da dẫn đến tăng sự hình thành nếp nhăn. Thêm vào đó các gốc tự do kích thích sự sinh tổng hợp enzyme MMP-1 chịu trách nhiệm cho việc phân hủy chất nền ngoại bào, cụ thể là gây tiêu hủy collagen. Trong *in vitro*, AST ức chế các tổn thương tế bào gây ra bởi các gốc tự do dẫn đến làm giảm sự sản xuất MMP-1 ở da.

Nhờ sự ức chế sự biểu hiện MMP mà AST làm tăng lượng collagen tổng hợp bởi nguyên bào sợi của da. Ngoài ra, sự hủy hoại chất nền ngoại bào còn gây ảnh hưởng xấu tới chức năng của tế bào như sự bám dính, tăng sinh và khả năng biệt hóa. Tuy vậy, MMP cũng đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì tính ổn định và chức năng của chất nền ngoại bào do sự phân hủy các cấu trúc collagen bị hư hỏng tạo điều kiện cho sự tái tạo collagen mới. Trong suốt quá trình hồi phục vết thương, chất nền ngoại bào trải qua sự tái cấu trúc mạnh, sự phân hủy và tái tạo chất nền ngoại bào đều diễn ra đồng thời. Khi da bị tổn thương, AST thúc đẩy quá trình lành vết thương ở da thông qua việc làm tăng biểu hiện collagen loại I và các yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (bFGF) thể hiện trên mô hình chuột [20].



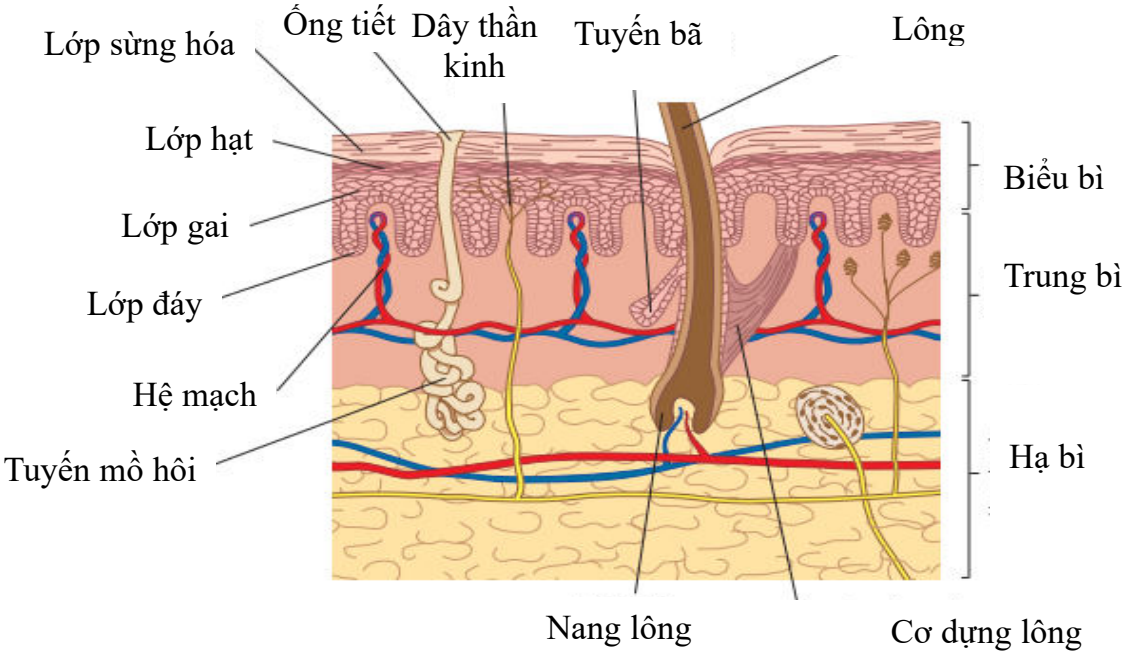
Hình 1. 11. Sự tương tác DNA và AST [42].

Tổn thương DNA da có thể đến từ tia UV hoặc gốc oxy hóa. Các tác nhân này có thể tổn thương DNA và dẫn tới lỗi trong quá trình sao chép. Điều này dẫn tới hàng loạt con đường truyền tín hiệu để sửa chữa DNA. Nucleotide excision repair (NER) là cơ chế chính sửa chữa DNA ở động vật có vú. AST có khả năng tăng cường chức năng sửa chữa DNA của tế bào sau tiếp xúc với tia UV. Ngoài ra, AST có khả năng làm giảm tổn thương DNA do cyclophosphamide. Đồng thời, AST có thể đã tham gia vào việc điều hòa con đường AKT gây ra tác động cộng hợp với các con đường sửa chữa DNA khác và giúp duy trì tính ổn định của bộ gene và chống lại sự tổn thương DNA [42].

1.5. Cấu trúc da

Da là cơ quan quan trọng đối với cơ thể con người và động vật, chiếm khoảng 15% trọng lượng cơ thể. Chức năng chính của da là bao bọc toàn bộ cơ thể và là lớp

ngoài bảo vệ chống lại các tác nhân gây hại bên ngoài, ngăn ngừa mất độ ẩm từ bên trong cơ thể thoát ra ngoài môi trường và điều tiết nhiệt độ cơ thể [5].



Hình 1. 12. Cấu trúc da [43].

Da bao gồm 3 lớp: lớp biểu bì, trung bì và hạ bì

- Biểu bì: là lớp trên cùng của da, là lớp biểu mô lát tầng sừng hóa chứa các tế bào biểu bì. Ngoài ra, biểu bì còn chứa các tế bào: tế bào tạo sắc tố, tế bào trình diện kháng nguyên Langerhans, tế bào biểu mô xúc giác Merkel. Biểu bì được chia thành các lớp: lớp đáy, lớp gai, lớp hạt và lớp sừng.
    - Lớp đáy: là lớp dưới cùng của biểu bì, nằm trên màng đáy, bao gồm những tế bào hình trụ hay vuông. Các tế bào lớp đáy có khả năng nguyên phân và tạo ra toàn bộ tế bào biểu bì bên trên.
    - Lớp gai: nằm trên lớp đáy, là lớp dày nhất của biểu bì, bao gồm những tế bào đa diện với nhân trung tâm. Trong lớp gai vẫn có một ít tế bào có khả năng nguyên phân.
    - Lớp hạt: khoảng 3-5 lớp tế bào đa diện dẹt, bào tương chứa đầy các hạt keratohyalin bắt màu kiềm.
    - Lớp sừng hóa: chứa 15-20 lớp tế bào sừng dẹt, mất nhân, bào tương chứa các sợi keratin
- Trung bì: mô liên kết nâng đỡ biểu bì và liên kết với hạ bì. Trung bì tiếp xúc

với biểu bì thông qua lớp màng đáy và có nhiều nhú trung bì đan xen với gờ biểu bì. Thành phần khuôn nền ngoại bào chính của trung bì là collagen, elastin và các glycosaminoglycan như hyaluronic acid, proteoglycan, glycoprotein. Nguyên bào sợi là thành phần tế bào chính trong trung bì, vai trò của nguyên bào sợi là tổng hợp các sợi collagen, sợi đàn hồi để duy trì chức năng của trung bì. Ngoài ra, trong da còn bao gồm một ít đại thực bào, tế bào mast và tế bào mỡ để duy trì chức năng trung bì.

– Hạ bì: nằm dưới lớp trung bì, là lớp mô liên kết lỏng lẻo kết hợp da với các cơ quan bên dưới.

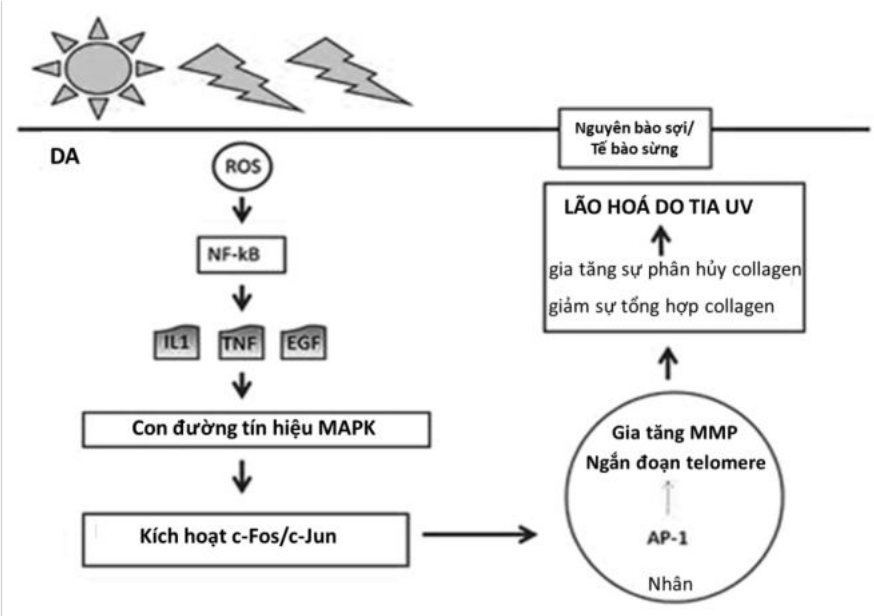
1.6. Lão hóa da

Lão hóa da là quá trình sinh học phức tạp chịu ảnh hưởng bởi sự kết hợp của các nhân tố nội sinh (di truyền, quá trình trao đổi chất, hormone) và ngoại sinh (tiếp xúc với ánh nắng trong thời gian dài, ô nhiễm, hóa chất). Những nhân tố này dẫn đến việc tích luỹ những tổn thương đối với cấu trúc và sinh lý cũng như hình thái của da. Trái ngược với các vùng da lão hóa do tuổi tác với các biểu hiện teo lại, xuất hiện các nếp nhăn nông kèm theo hiện tượng da khô thì lão hóa sớm ở các vùng da tiếp xúc với ánh sáng với dấu hiệu là tầng biểu bì dày lên, xuất hiện các đốm nâu đen, các nếp nhăn sâu, da nhão, trùng xuống và trở nên thô ráp. Tính đàn hồi của da mất dần theo thời gian dẫn tới hiện tượng bị trùng xuống. Tốc độ tái sinh của tầng biểu bì chậm lại xảy ra đồng thời với sự lành vết thương chậm dần cùng với sự tẩy da chết không hiệu quả ở người già [5].

Làn da lão hóa do tiếp xúc với ánh nắng đặc trưng bởi sự thoái hóa mô đàn hồi. Đối với quang lão hóa, sự xuất hiện của nhiều loại enzyme phân hủy chất nền làm giảm bớt lượng collagen. Sợi collagen có cấu trúc bất thường và liên kết bất thường và suy giảm hàm lượng collagen tổng đáng kể. Trong đó tỉ lệ Col-3 tăng lên so với Col-1. Nhìn chung hàm lượng collagen trên một đơn vị diện tích bề mặt da giảm 1% mỗi năm. Glycosaminoglycan (GAG) một trong những thành phần cấu thành nên chất nền trung bì giúp giữ nước cho da. Ở làn da lão hóa, GAG có liên quan tới sự bất thường của các chất đàn hồi trong da, do đó không thực hiện chức năng hiệu quả. Axit hyaluronic trong trung bì tuy được duy trì mức ổn định ở da lão hóa nhưng lại giảm rõ rệt ở tầng biểu bì [7].

Ba thành phần cấu trúc chính của khuôn nền ngoại bào lớp trung bì là collagen, elastin và GAG. Đây cũng là đối tượng chính của các nghiên cứu chống lão hóa và cải thiện ngoại hình của da bị lão hóa bằng các loại kem chống lão hóa và chất làm đầy [44].

Tia UV phá hủy các sợi collagen trong lớp trung bì và dẫn đến hình thành nếp nhăn. Ngoài ra, tia UV còn góp phần hình thành nếp nhăn thông qua việc kích thích sự tạo ra các enzyme phân hủy protein ngoại bào ở nguyên bào sợi do tín hiệu cytokine gây viêm được giải phóng bởi các tế bào keratinocyte tiếp xúc với UV như: IL-1α, IL-6 và TFN- α. Tiến trình này làm hình thành nếp gấp trên bề mặt của da, đó là kết quả của việc tế bào bị tổn thương và các sợi liên kết bị hư hại. Một số tác nhân đẩy nhanh quá trình lão hóa da đó là: không khí ô nhiễm, khói thuốc và sự căng thẳng [9], [45] .



Hình 1. 13. Cơ chế gây lão hóa da do tia ánh sáng mặt trời [46].

1.7. Lão hóa tế bào

Năm 1961, Hayflick và các đồng nghiệp đã mô tả nguyên bào sợi có khả năng tăng sinh trong môi trường nuôi cấy nhưng chỉ trong một khoảng thời gian hữu hạn, thường là sau khoảng 40-60 lần phân chia. Nuôi cấy nguyên bào sợi của con người trong thời gian dài khiến các tế bào ngừng tăng sinh. Tuy nhiên, các tế bào này vẫn thực hiện hoạt động trao đổi chất và trở thành tế bào lão hóa. Lão hóa sớm có thể có lợi cho việc ức chế việc hình thành khối u, nhưng điều này làm mất khả năng tái sinh tế bào, từ đó dẫn tới sự lão hóa ở cấp độ mô và cơ thể. Các tế bào lão hóa đã được chứng minh tích lũy trong các mô khi con người lớn lên và liên quan đến một số quá

trình sinh học, bao gồm phát triển phôi, chữa lành vết thương, sửa chữa mô và viêm nhiễm do tuổi tác [47].

Sự cấy chuyền liên tục của các tế bào trong nuôi cấy gây ra sự lão hóa sao chép, có liên quan đến sự ngắn dần của telomere và sự mất ổn định gene. Các yếu tố gây stress bao gồm những chất gây tổn thương DNA và chất gây ung thư, cũng có thể gây ra lão hóa. Các yếu tố này thường không liên quan tới telomere mà chúng thường phụ thuộc vào con đường $p16^{INK4A}$/Rb5. Trong khi các tế bào vẫn còn khả năng tăng sinh, có dạng hình thoi thì các tế bào lão hóa có thể được xác định ở một số đặc điểm nhất định như tế bào trải rộng, diện tích tế bào chất tăng cùng với hoạt động của galactosidase liên quan tới lão hóa (SA-gal). Tế bào lão hóa cũng tích lũy các dấu hiệu hư hại DNA bao gồm H2AX, foci nhiễm sắc thể do lão hóa (SAHF). Tế bào lão hóa cũng biểu hiện mức protein điều hòa chu kỳ tế bào cao hơn, như p16 ($p16^{INK4A}$) và/hoặc p21 và p53. Hơn nữa, các tế bào lão hóa còn gây ảnh hưởng đến các tế bào xung quanh bằng cách tiết ra một số cytokine và chemokine gây viêm được gọi là kiểu hình tiết liên quan tới lão hóa (SASP). Mặc dù hiện tượng SASP này có thể khác nhau ở mỗi loại tế bào nhưng hầu hết đều có sự gia tăng interleukin-6 (IL-6), IL-8, yếu tố kích thích nhóm bạch cầu hạt (GM-CSF), yếu tố điều hòa tăng trưởng liên quan tới gene ung thư α (GRO-α) và GRO-β [48, 49].

Hiện nay, hiện tượng lão hóa được xem như là quá trình dừng tăng sinh vĩnh viễn khi tế bào đáp ứng với nhiều tác nhân kích thích tế bào, bao gồm những chất kích thích ung thư, cytokine, ROS, chất gây tổn thương DNA hoặc mất nucleotide. Dạng lão hóa này được gọi là lão hóa cảm ứng bởi stress (SIPS) và gây nhiều tác hại lên sức khỏe [50].

Con đường tín hiệu p53/p21

Nhiều nghiên cứu tập trung vào vai trò của p53 trong việc điều hòa hoạt động tế bào bị tác động bởi các tín hiệu gây ung thư và stress do tăng sinh. Khi bị kích thích, p53 điều hòa hoạt động của lượng lớn gene liên quan tới việc dừng chu kỳ tế bào, sửa chữa DNA, lão hóa tế bào và apoptosis. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng p53 đóng vai trò duy trì sự toàn vẹn của bộ gene khi đáp ứng với tổn thương DNA [51].

Lão hóa tế bào được định nghĩa là tình trạng tế bào có chu kỳ kéo dài vĩnh viễn, điều này kèm theo nhiều sự biến đổi như biến đổi hình dạng tế bào, tái cấu trúc nhiễm

sắc thể, tái chương trình quá trình trao đổi chất và tiết những nhân tố gây viêm liên quan tới quá trình lão hóa. Những hiện tượng này thường biểu hiện trong tế bào lão hoá và tổn thương. Trong điều kiện sinh lý bình thường, tế bào tăng sinh nằm trong chu kỳ tế bào. Hiện tượng đoạn telomere giảm dần và stress mãn tính gây mất ổn định cấu trúc và sự toàn vẹn bộ gene đều có thể dẫn tới hoạt hóa con đường lão hóa tế bào. Do đó, lão hóa là đáp ứng thích nghi của tế bào khi tiếp xúc với điều kiện môi trường bất lợi. Những tác nhân gây stress bao gồm tác nhân nội sinh và ngoại sinh như sự tăng sinh quá mức, chất hoạt hóa ung thư, tia UV, tia gamma, thuốc… Những tác nhân này kích thích tổn thương DNA, điều này dẫn tới nhiều hậu quả khác nhau tùy thuộc cường độ, thời gian tiếp xúc. Tổn thương trung tính thường gây dừng chu kỳ tế bào tạm thời trong khi những tổn thương lớn có thể hoạt hóa quá trình lão hóa hoặc gây chết tế bào thông qua cơ chế apoptosis, hoại tử [52].

p53 đóng vai trò quan trọng trong xác định số phận tế bào, đối với hiện tượng lão hóa tế bào, p53 có thể được hoạt hóa thông qua con đường DDR hoặc không thông qua con đường trên. Trong trường hợp thông qua con đường DDR, hiện tượng mất telomere, tổn thương DNA, sự tăng sinh quá mức hoặc bất hoạt các chất ức chế ung thư dẫn tới tổn thương DNA, điều này dẫn tới hoạt hóa đáp ứng sửa chữa DNA (DDR). DDR hoạt hóa thụ thể nhận biết telangiectasia-muted (ATM) hoặc ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) kinase. ATM/ATR hoạt hóa p53/p21 bằng cách phospho hóa p53 và ligase Mdm2, điều này dẫn tới ổn định mức độ p53. Sau đó p53 được phospho hóa tại vị trí Ser-15 và Ser-20 thông qua Chk1/2 [53]. Con đường thứ 2 để hoạt hóa p53 là thông qua NOREA1 kích thích sự acetyl hóa p53 để tạo con đường lão hóa và ức chế sự hoạt hóa p53 theo con đường apoptosis.

Con đường lão hóa tế bào được nghiên cứu nhiều nhất là con đường p53/p21 và con đường $p16^{INK4A}$/Rb. Tổn thương DNA và đáp ứng DDR là những kiểm soát quan trọng đối với cả 2 con đường trên. Những nhân tố dẫn tới tổn thương DNA và đáp ứng DDR đều có thể khởi động sự lão hóa tế bào [54].

p53 là nhân tố phiên mã, điều hòa tăng hoặc giảm sự biểu hiện của gene mục tiêu bằng cách liên kết vào vùng promoter hoặc tương tác với đồng phiên mã như protein liên kết TATA. Fisher và đồng nghiệp đã cho rằng p53 có 3661 sản phẩm đích. Nhiều gene trong đó liên quan tới các hiện tượng trao đổi chất, tự thực bào, sửa chữa DNA, dừng chu kỳ tế bào. Đối với quá trình lão hóa tế bào, các yếu tố kích thích quan

trọng là cường độ và thời gian. Kích thích bền vững mới có thể tạo ra lão hóa tế bào trong khi kích thích ngắn hạn có thể dẫn tới dừng chu kỳ tạm thời, sau một thời gian, tế bào sẽ quay lại chu kỳ tế bào. Kích thích quá mạnh sẽ dẫn tới apoptosis [55].

Chen và Liu đã xử lý tế bào nguyên bào sợi với nồng độ H_2O_2 tăng dần và họ xác định nồng độ H_2O_2 thấp hơn cường độ gây chết có thể cảm ứng cho sự dừng chu kỳ tế bào. Trong tình trạng apoptosis, mức độ p53 của tế bào biểu hiện gấp đôi so với p53 trong tế bào bị dừng chu kỳ tăng sinh. Ngưỡng nồng độ chất gây stress tế bào giữa apoptosis và lão hóa thì khác nhau giữa các dạng tế bào, đồng thời, nhiều dòng tế bào có thiên hướng cảm ứng lão hóa với một chất gây stress nhất định. Một số chất như busulfan và nhóm alkyl có xu hướng cảm ứng lão hóa thay vì apoptosis đối với tế bào nguyên bào sợi WI38. Nồng độ của p53 không phải là yếu tố quyết định hoạt tính mà còn quá trình biến đổi sau dịch mã. Acetyl hóa là biến đổi sau dịch mã được nghiên cứu kỹ càng nhất. Sự acetyl hóa ở một số vị trí nhất định ngăn chặn sự phospho hóa ở một vài serin trong vùng tận cùng -NH2, cho phép hoạt hóa những gene có ái lực cao với p53 như CDKN1A, gene này có chức năng mã hóa p21 có vai trò tiếp tục con đường lão hóa tế bào. Acetyl hóa xảy ra ở những vị trí khác có thể dẫn tới sự phospho hóa quá mức, điều này làm cho p53 tương tác với các gene có ái lực yếu, dẫn tới hiện tượng apoptosis [56].

Một số yếu tố từ môi trường kích thích con đường lão hóa tế bào như IL-6. IL-6 cần thiết cho sự bắt đầu và duy trì con đường lão hóa trong nguyên bào sợi trung bì da người.

p53 điều hòa nhiều nhân tố khác để khởi đầu dòng thác lão hóa và ức chế apoptosis và im lặng tế bào. Trong những nhân tố được điều hòa bởi p53 thì p21 là yếu tố quan trọng để hình thành quá trình lão hóa tế bào. p21 là một thành viên của họ các chất ức chế CDK, vì vậy nó cần thiết cho sự bắt tế bào tại bước chuyển tiếp G1/S hoặc G2/M. Một khi được hoạt hóa, p21 tạo thành nhiều chức năng bao gồm vai trò biến đổi biểu hiện gene của nhiều gene đích như CDC25C, CDC25B, and survivin. Tuy nhiên, vai trò quan trọng của p21 là kích thích lão hóa tế bào thông qua ức chế hiện tượng apoptosis. p21 có khả năng bám vào các tác nhân gây apoptosis như là các enzyme caspases. Sự bất hoạt p21 trên tế bào sẽ dẫn tới kích thích apoptosis thông qua con đường caspases. Tế bào ung thư tuyến tiền liệt khi xử lý với adenovirus có trình tự anti p21 dẫn tới hiện tượng apoptosis khi xử lý thuốc liều thấp. Ngoài ra, p21 cũng có khả

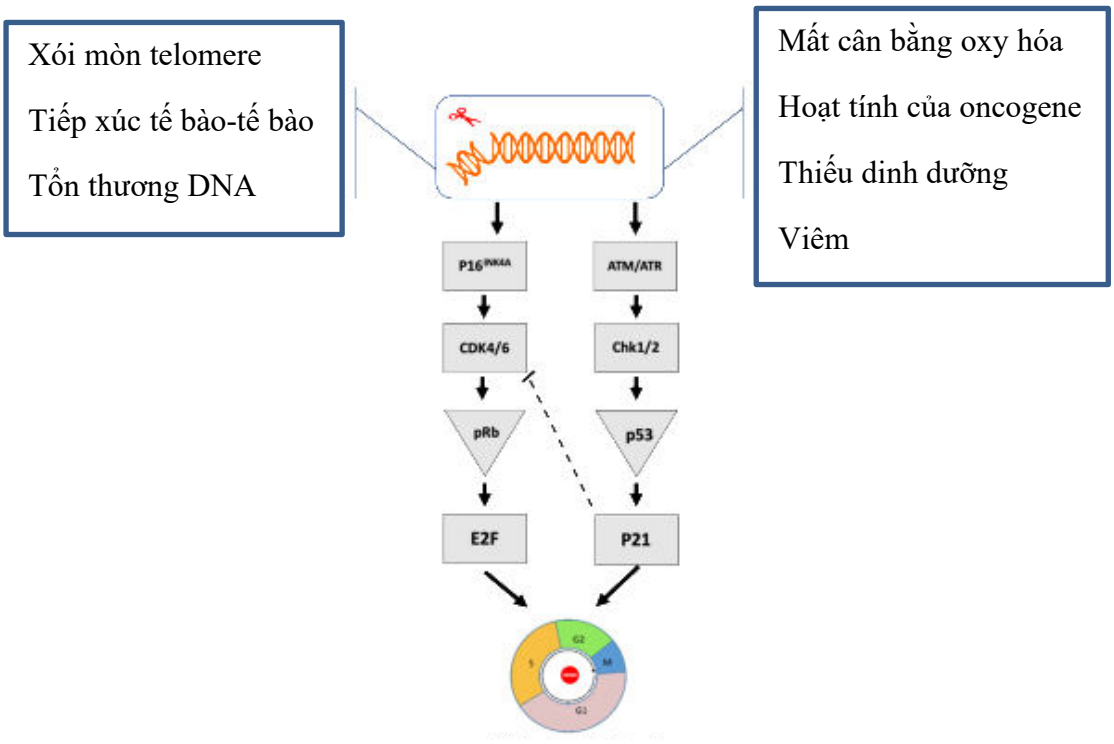
năng được cảm ứng không cần qua p53. Hiện tượng này phát hiện khi Chk2 có khả năng cảm ứng sự biểu hiện p21 trong dòng tế bào đột biến không có p53 [57].

Con đường tín hiệu p16/retinoblastoma

Trong khi con đường p53/p21 đóng vai trò quan trọng trong khởi đầu quá trình lão hóa tế bào thì con đường p16 và retinoblastoma (họ Rb) đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì quá trình lão hóa tế bào. Sau giai đoạn đầu, mức độ p53 giảm xuống trong khi p16 vẫn duy trì ở mức cao. Trong tế bào biểu hiện thấp p16, tế bào thành công quay lại quá trình tăng sinh nhưng ở điều kiện mức độ p16 cao thì hiện tượng này không diễn ra. Do đó, sự hình thành p16 chính là ranh giới giữa 2 giai đoạn quá trình lão hóa là giai đoạn sớm được khởi đầu bởi p53 (chu kỳ tế bào có thể phục hồi) và giai đoạn chu kỳ tế bào không thể phục hồi, khởi đầu bởi p16. Con đường p16 liên quan tới họ protein Rb như 105, p107, p130 [58].

Con đường p53/p21 và con đường p16/Rb có sự tương tác và ảnh hưởng qua lại. Sự lão hóa có thể chấm dứt khi bất hoạt p53 ở giai đoạn p16 chưa được bất hoạt. Tuy nhiên khi p16 đã được hoạt hóa thì bất hoạt p53 cũng không còn tác dụng ức chế lão hóa. Hiện nay, quá trình lão hóa tế bào được xem là quá trình chuyển đổi nhiều bước. Trong giai đoạn đầu, quá trình lão hóa được gọi là lão hóa sơ cấp, những tế bào bị stress vẫn có khả năng phục hồi và tiếp tục chu kỳ tế bào khi tác nhân gây stress bị loại bỏ. Khi ức chế p53, một số lượng nhỏ tế bào có thể phục hồi chu kỳ tế bào. Những kết quả quan sát cho thấy những tế bào phục hồi ban đầu là những tế bào lão hóa. Tuy nhiên hiện tượng này chỉ xảy ra ở giai đoạn đầu, khi tác nhân kích thích kéo dài, tế bào chuyển sang giai đoạn lão hóa phát triển [59].

Nếu điều kiện gây lão hóa tiếp tục kéo dài, tế bào tiến vào giai đoạn thứ 3: lão hóa muộn, tế bào biểu hiện đầy đủ các tính chất của lão hóa. Những biến đổi về tính chất tế bào thường thấy như tế bào lớn hơn, dẹp hơn, liposome nhiều, gia tăng trao đổi chất, sản xuất ROS, … Trong nhiều nghiên cứu, p53 biểu hiện ở giai đoạn sớm và giảm dần theo thời gian, do đó, p53 được xem là yếu tố quan trọng khởi đầu cho quá trình lão hóa và trong giai đoạn này, quá trình lão hóa còn có khả năng đảo ngược. p16 hoạt hóa sự lão hóa hoàn toàn và quy trình lão hóa lúc này không thể đảo ngược [60].



Hình 1. 14. Con đường tín hiệu liên quan tới quá trình lão hóa tế bào [49].

1.8. Lão hóa do ROS

1.8.1. Chức năng của ROS.

Những nghiên cứu gần đây xác định ROS không chỉ là sản phẩm phụ của quá trình trao đổi chất mà còn đóng vai trò phân tử tín hiệu. ROS tham gia nhiều con đường truyền tín hiệu trong cơ thể và được vận chuyển trung gian bởi các hormone, ví dụ như từ quá trình phospho hóa protein đến các hệ thống vận chuyển trong tế bào. Tùy thuộc vào nồng độ ROS, loại phân tử và vị trí xuất hiện của ROS, các thành phần tế bào và đường truyền tín hiệu bị ảnh hưởng tích cực hoặc tiêu cực. Mức ROS được cho là một "yếu tố oxy hóa khử sinh học" điều chỉnh các chức năng sinh lý, bao gồm truyền tín hiệu, biểu hiện gene và tăng sinh [61]. Protein là mục tiêu chính của tín hiệu ROS/RNS. Những tổn thương do ROS gây ra có thể được phục hồi hoặc không thể phục hồi chức năng của chúng, điều này dẫn tới tế bào tổn thương, ngừng tăng trưởng, lão hóa hoặc chết. Việc điều chỉnh quá trình oxy hóa thuận nghịch của các protein nhạy cảm với oxy hóa khử đóng vai trò cơ bản trong việc thu nhận và truyền tín hiệu.

ROS được kích thích tăng sinh trong điều kiện *in vitro* khi tế bào tiếp xúc với các tác nhân bên trong và ngoài tế bào như các yếu tố tăng trưởng, cytokine, sự thiếu

hụt chất dinh dưỡng và tình trạng thiếu oxy. Từ đó, ROS điều chỉnh sự tăng sinh, biệt hóa và chết theo chương trình của tế bào cùng với các dấu hiệu quan trọng ban đầu của ung thư [62]. Các yếu tố bên trong và bên ngoài kiểm soát vai trò của ROS đối với quá trình tự đổi mới, ngừng hoạt động, lão hóa và chết theo chương trình của tế bào, trong quá trình sửa chữa và cân bằng nội môi của mô *in vivo* [63]. ROS hoạt động như một bộ biến trở, cảm biến và dịch các dấu hiệu môi trường trong phản ứng của tế bào gốc, do đó cân bằng chức năng của tế bào với chất dinh dưỡng, cytokine. Các tế bào gốc có thể cạn kiệt tùy thuộc vào mức độ ROS [64].

ROS của ty thể có thể kích hoạt phản ứng thích ứng của tế bào nhằm phòng ngừa và trì hoãn bệnh tật, đây là như một cơ chế tăng cường sức khỏe để kéo dài tuổi thọ [65, 66]. ROS không thể thiếu trong quá trình phát triển các sự kiện sinh lý bệnh như báo hiệu cái chết của ty thể và tự thực bào, tình trạng viêm và nhiễm trùng [67-69]. Mức ROS cao được tạo ra bởi các tế bào miễn dịch (tế bào lympho, bạch cầu hạt và thực bào) để chống lại vi khuẩn [70, 71]. Mặt khác, bất kỳ sự kiện nào góp phần gây ra ROS hoặc RNS mãn tính sẽ làm rối loạn hệ thống dẫn truyền tín hiệu, làm thay đổi cấu trúc lipid, protein và nucleic acid, đồng thời kích hoạt các phản ứng phục hồi đối với những thay đổi. Ngoài ra, việc sản xuất quá mức ROS cản trở quá trình sửa chữa DNA trong nhân và ty thể bị hư hỏng, điều này góp phần làm mất ổn định bộ gene của tế bào [72]. ROS đóng vai trò quan trọng trong điều biến các quá trình tích tụ các phân tử bị oxy hóa trong thời gian dài trong bệnh tiểu đường, bệnh tim mạch, xơ vữa động mạch, tăng huyết áp, thiếu máu cục bộ, tổn thương tái tưới máu, thoái hóa thần kinh và thấp khớp [33]. Ngoài ra, ROS tham gia vào quá trình phát triển ung thư thông qua tác động của chúng đối với sự tăng sinh tế bào, gây đột biến và ức chế quá trình chết theo chương trình [73]. Tương tác giữa ROS, p53 và NF-κB đóng vai trò quan trọng trong quá trình hình thành khối u [74-76]. Con đường tạo thành ROS bị loại bỏ trong các tế bào ung thư và từ đó stress oxy hoá có thể gây ra kiểu hình xâm lấn tế bào [77]. Mặc dù các chức năng của ROS vẫn khó điều tra, nhưng nhiều nghiên cứu dược lý đang được tiến hành để duy trì cân bằng nội môi của ROS [78, 79].

1.8.2. ROS trong lão hóa và các bệnh liên quan đến tuổi tác

Hiểu biết về quá trình lão hóa vẫn chưa được rõ ràng, điều này cản trở các biện pháp can thiệp để ngăn ngừa hoặc trì hoãn các bệnh lý liên quan đến tuổi tác, như bệnh tiểu đường, rối loạn tim mạch, rối loạn thoái hóa thần kinh và ung thư, do đó ảnh

hưởng đến sức khỏe con người và xuất hiện bệnh tật [80-82]. Gần đây, sự quan tâm đã tập trung vào các tế bào gốc, bởi vì sự suy giảm của chúng làm suy yếu khả năng duy trì cân bằng nội môi của mô, dẫn đến sự suy yếu của cơ thể và các bệnh liên quan đến tuổi tác [64]. Cơ chế lão hóa đã được thu thập thành hai loại. Loại thứ nhất là quá trình lão hóa như được lập trình bởi các quá trình phát triển như sự già đi của tế bào, những thay đổi về thần kinh nội tiết và những thay đổi về miễn dịch. Loại thứ hai thể hiện sự lão hóa do sự tích lũy các tổn thương ngẫu nhiên, nghĩa là tích lũy các đột biến và stress oxy hoá. Sự tách biệt giữa các loại không còn được coi là rõ ràng, bởi vì các con đường liên quan đến lão hóa thường liên quan đến cả 2 con đường và từng bệnh cụ thể đối với từng cơ quan [83]. Di truyền đóng góp không quá 3% vào quá trình lão hóa và tốc độ lão hóa khác nhau đáng kể giữa các cá thể trong quần thể cũng như giữa các mô, cơ quan của một cá thể. Khi bắt đầu lão hóa, hiện tượng xói mòn các đoạn telomere, stress oxy hoá và lão hóa tế bào là những sự kiện quan trọng bắt nguồn từ sự mất cân bằng nội môi của quá trình chuyển hóa của tế bào. Ví dụ, sự tương tác giữa ty thể với nhân và sự thay đổi cân bằng nội môi của ty thể dẫn đến những thay đổi liên quan tới tuổi tác [84-86]. Việc kiểm soát ROS không hiệu quả đối với các phức hợp ty thể gây ra sự thay đổi tín hiệu ROS, do đó làm trung gian cho các phản ứng stress của tế bào đối với tổn thương liên quan đến tuổi tác [87]. Đồng thời, tất cả các phương pháp được đề xuất để kéo dài tuổi thọ, như hạn chế lượng calo và tăng hoạt động của SIRT1, đều có tác dụng giảm stress oxy hoá [88]. Các nghiên cứu cho rằng việc tập luyện cơ bắp trong thời gian dài bảo vệ người lớn tuổi khỏi tác hại do stress oxy hoá gây ra và củng cố khả năng phòng vệ của họ chống lại ROS. ROS ty thể cao góp phần làm cho động vật biến đổi gene bị lão hóa. Động vật thiếu superoxide dismutase, động vật thiếu SOD-1 [89] và SOD-3 [90], và động vật thiếu p66SHC biểu hiện rối loạn chức năng ty thể tạo ra tổn thương oxy hóa và các kiểu hình liên quan, giống như các đặc điểm lão hóa sớm. Tương tự như vậy, những con chuột biểu hiện quá mức catalase ty thể sẽ chống lại quá trình stress oxy hóa và sống lâu hơn. Tỉ lệ mắc các bệnh và bệnh lý liên quan đến tuổi tác trong các mô hình động vật, sau khi chúng được gửi đến các mẫu khác nhau, cho thấy stress oxy hoá ảnh hưởng đáng kể đến các khía cạnh của tuổi già [91].

Tóm lại, ROS có liên quan đến các tổn thương ở người cao tuổi liên quan đến (I) tổn thương DNA, nguyên nhân một phần dẫn đến lão hóa sớm và chết theo chương

trình [92]; (ii) RNA liên quan đến sự khởi đầu của các bệnh thoái hóa mãn tính [93]; (iii) các lamin nhân tham gia vào quá trình tăng sinh và kéo dài tuổi thọ của tế bào [94]. Sự thay đổi về tốc độ và chất lượng trong quá trình lão hóa của từng sinh vật có thể phản ánh những thay đổi đặc biệt đã được tích lũy trong DNA, protein và lipid [95], sau khi sinh vật tiếp xúc với các tác nhân gây stress mãn tính. Mức ROS thấp cải thiện các cơ chế bảo vệ bằng cách tạo ra các phản ứng thích ứng, góp phần chống lại căng thẳng và kéo dài tuổi thọ, trong khi mức ROS cao gây ra các phản ứng thích ứng không đủ, có thể góp phần khởi phát và tiến triển lão hóa [96].

Do đó, các đột biến tích lũy, giảm chuyển hóa năng lượng của ty thể và tăng stress oxy hoá có thể góp phần đáng kể vào quá trình lão hóa của con người và các bệnh liên quan.

Chương 2. VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

2.1. Phương pháp nghiên cứu:

- Phương pháp nghiên cứu: phương pháp thực nghiệm mô tả với thí nghiệm lặp lại tối thiểu 3 lần.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

- Tảo *Haematococcus pluvialis* chủng LC (HP-C) được cung cấp bởi Viện Công nghệ Sinh học, trực thuộc Viện Hàn Lâm Khoa học Việt Nam. Chủng HP-C được phân lập tại tỉnh Lào Cai, Việt Nam.
- Tế bào nguyên bào sợi người (hF): tế bào hF được phân lập từ da người, được đông lạnh ở thế hệ P8 trong nitrogen lỏng ở -196^{o}C. Trước khi sử dụng, tế bào được rã đông trong môi trường DMEM/F12 chứa 20% huyết thanh bò (FBS), 1% penicillin và streptomycin và được nuôi ở 37^{o}C, 5%CO_2 trong cho tới khi đầy chai nuôi.
- Chuột nhắt trắng (*Mus musculus var. Albino*): cùng giới tính cái, khỏe mạnh, cân nặng từ 20-25 g, khoảng 4-6 tuần tuổi, được cung cấp bởi viện Pasteur TP. HCM. Chuột được nuôi ổn định tại phòng thí nghiệm trường Đại học Khoa học Tự nhiên trong vòng 1 tuần trước khi tiến hành thí nghiệm. Chuột được nuôi trong điều kiện mở, thoáng gió, trung bình 28^{o}C, thức ăn được cung cấp bởi viện Pasteur (5 g/thức ăn/ngày/con).

2.3. Hóa chất

2.3.1. Môi trường nuôi tảo

Bảng 2. 1. Thành phần môi trường nuôi tảo BG-11 (đơn vị mg/L) [97]

Thành phần	BG-11	Nguồn gốc
$MgSO_4.7H_2O$	75	Merck
EDTA-Na_2	1	Merck
H_3BO_3	2.86	Merck
$MnCl_2$	1.15	Merck
$ZnSO_4.7H_2O$	0.222	Merck
$CoCl_2.6H_2O$	50	Merck
B12	0.015	Merck
Biotin	0.025	Merck
$K_2HPO_4.3H_2O$	40	Merck
$CaCl_2$	27.18	Merck

MoO_3	0.08	Merck
$CuSO_4.5H_2O$	0.05	Merck
Ferric aminium citrate	6	Merck
Acid citric	6	Merck
$NaMoO_4.2H_2O$	0.39	Merck
Na_2CO_3	20	Merck
$NaNO_3$	1500	Merck

2.3.2. Hóa chất, thiết bị trong đánh giá tế bào

- **Dung dịch muối sinh lý PBS 1X rửa mẫu**

  Pha PBS 1X 1000ml, pH 7,4

  NaCl (Sigma) 8 g

  KCl (Sigma) 0,2 g

  $Na_2HPO_4.12H_2O$ (Sigma) 2,9384 g

  KH_2PO_4 (Sigma) 0,2 g

  Hòa tan trong 1 lít nước cất vô trùng

  Hấp vô trùng ở 121°C

  Bảo quản trong tủ lạnh 4°C**.**

- **Dung dịch PBS 1X sử dụng cho nuôi cấy tế bào (Sigma)**
- **Môi trường nuôi tế bào cơ bản (MTCB)**

  Môi trường DMEM/F12 (Sigma): 89%

  Huyết thanh (FBS) (Sigma): 10%

  Penicillin/streptomycin (Sigma): 1%
- **Môi trường nuôi tế bào cơ bản bổ sung 0.2% DMSO**

  Môi trường DMEM/F-12 (Sigma): 89%

  Huyết thanh (FBS) (Sigma): 10%

  Penicillin/streptomycin (Sigma): 1%

  DMSO (99,5%, Sigma) 0.2%
- **Môi trường nuôi bổ sung AST-EX**

  Môi trường DMEM/F-12 (Sigma): 89%

  Huyết thanh (FBS) (Sigma): 10%

  Penicillin/streptomycin (Sigma): 1%

  DMSO (99.5%, Sigma) 0.2%

  AST-EX tùy theo nồng độ

- **Môi trường gây lão hóa tế bào**

  Môi trường DMEM/F-12 (Sigma): 96%

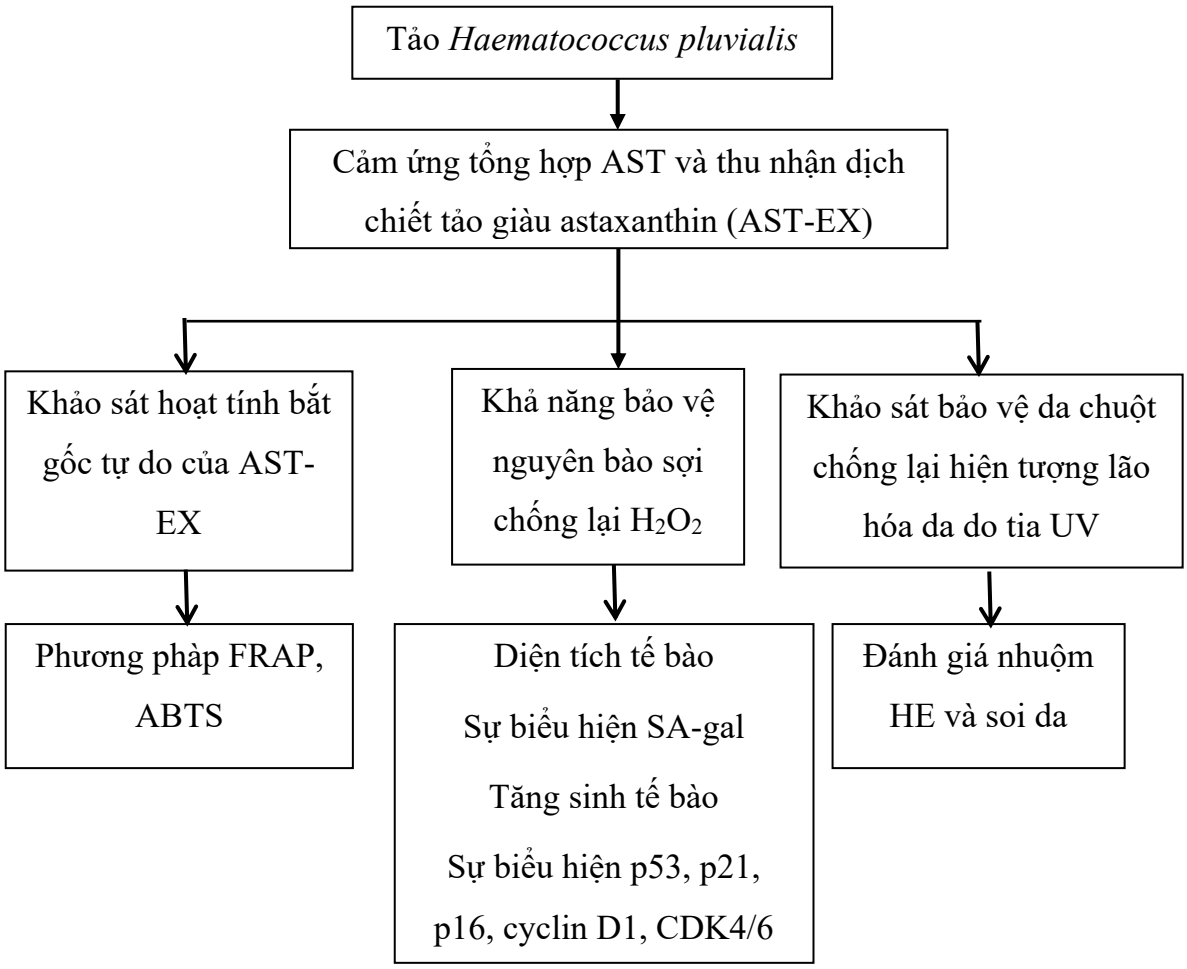
  Huyết thanh (FBS) (Sigma): 3%

  Penicillin/streptomycin (Sigma): 1%

  H_2O_2 (30%) (Merck): tùy theo nồng độ mong muốn

- **Thuốc nhuộm Giemsa nhuộm tế bào (Merck)**
- **Bộ kit nhuộm senescence-associate β-galactosidase (Abcam)**
- **Thuốc nhuộm Hoechst staining (Abcam)**
- **Thuốc nhuộm phalloidine (Abcam)**
- **Dầu Sacha Inchi hữu cơ ép lạnh nguyên chất (Mekong Megumi)**
- **Bộ kit thực hiện phản ứng realtime-PCR**
  - Tách chiết RNA: Total RNA Purification Kit
  - Phản ứng realtime PCR: SyGreen 1-Step Lo-ROX kit
- **Hệ thống realtime-PCR**: Thermo Scientific™ PikoReal™ Real-Time PCR System
- **Bộ kit thực hiện WESTERN BLOT**
  - Optiblot LDS Sample Buffer (Abcam, USA).
  - Gel điện di: Precast Gel SDS-PAGE 4–12% (Abcam, USA)
  - Màng PVDF (Abcam, USA)
  - Kháng thể bắt Cdk4, Cdk6, GAPDH (Abcam, USA)
- **Thiết bị đánh giá tế bào:** Cytell™ Cell Image System (GE Healthcare, Life Sciences)

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

Mục đích: Tạo điều kiện cho tảo HP-C phát triển

Nguyên tắc: Tảo HP-C phát triển được trong môi trường nhiệt độ 25^{o}C, điều kiện ánh sáng thấp và sục khí nhẹ

Thao tác:

Hướng di chuyển dòng khí: ⟶ Van điều tiết: ⊘

(1): Chai đựng bông gòn lọc bụi, (2): Chai đựng $KMnO_4$, (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. Dòng khí từ máy bơm sẽ đi ngay bộ lọc bụi, sau đó đi vào bộ lọc dung dịch trước khi đi tới từng chai nuôi tảo. Sau khi vào chai nuôi thì khí sẽ đi ra ngoài không khí. Hệ thống khí được điều tiết bằng van cho từng bình. Vận tốc sục khí được đo bằng máy đếm giọt để ước tính tốc độ dòng khí. Thời gian sục khí tương ứng với thời gian chiếu sáng. Mỗi ngày lắc bình nuôi tảo 3 lần: 9 giờ sáng, 12 giờ trưa và 4 giờ chiều, mỗi lần 5 phút.
- Nhiệt độ phòng được duy trì ở 25°C bằng máy lạnh được mở 24/24 giờ. Nhiệt độ nước đo được thường dao động giữa 23-24°C.
- Ánh sáng sử dụng là ánh sáng đèn LED bóng dài ánh sáng trắng, cường độ ánh sáng ở bề mặt chai nuôi tảo được đo bằng thiết bị đo cường độ và điều chỉnh cường độ bằng cách điều chỉnh khoảng cách giữa bóng đèn và bề mặt chai nuôi. Thời gian chiếu sáng được kiểm soát bằng thiết bị hẹn giờ điện tử. Chu kỳ ánh sáng được điều chỉnh sáng:tối 12h:12h cho giai đoạn tăng sinh tảo và 24/0 cho giai đoạn cảm ứng tổng hợp AST.

2.5.2. Phương pháp nuôi tảo trong chai nuôi 1000 ml

Mục đích: tăng sinh khối tảo để phục vụ thí nghiệm.

Nguyên tắc: Tảo HP-C có khả năng tăng sinh được trong môi trường BG11 trong điều kiện nuôi cấy thích hợp.

Thao tác: Quy trình được tiến hành dựa theo quy trình của Đặng Diễm Hồng và cộng sự [10, 98]

- Tảo HP-C giống được cung cấp trong chai 500ml. Sau khi nuôi ổn định 2-3 ngày trong hệ thống đã thiết kế, tảo được thu nhận từ bình tảo giống, đếm mật độ tế bào bằng buồng đếm hồng cầu.
- Sau đó, tảo được cấy vào chai thủy tinh 1000 ml chứa sẵn 500 ml môi trường BG-11 với mật độ ban đầu $5x10^4$ tế bào/ml.
- Tảo được nuôi ở nhiệt độ 25^oC, 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 như trong phần thiết kế.
- Sau 15 ngày nuôi cấy, sử dụng tảo trong erlen để thực hiện những nghiên cứu sau

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

Mục đích: Kích thích tảo tổng hợp astxanthin bằng ánh sáng cường độ cao.

Nguyên tắc: Tảo HP-C có khả năng tổng hợp AST khi được chiếu sáng cường độ cao

Thao tác: Thí nghiệm được tiến hành dựa theo quy trình của Lưu Thị Tâm và cộng sự [99]

- Tảo được cấy vào chai nuôi 500 ml có chứa 250 ml môi trường BG-11 với mật độ ban đầu $50x10^4$ tế bào/ml.
- Chai nuôi được nuôi trong hệ thống tương tự như hệ thống tăng sinh nhưng điều chỉnh về cường độ ánh sáng 10 klux, chu kỳ sáng/tối là 24/0 giờ.
- Sau 24 ngày, tiến hành thu tảo và đánh giá nồng độ carotenoid tổng và AST tổng. Toàn bộ tảo trong mỗi chai nuôi được chia vào các ống ly tâm 50 ml, ly tâm vận tốc 6000 vòng/phút trong 10 phút để thu cặn. Lặp lại bước ly tâm 3 lần để thu cặn và rửa sạch cặn. Tiếp theo, đông khô và tách tảo bằng máy đồng hóa khuấy cơ học tốc độ cao 10000 rpm trong dung môi dichloromethane/methanol (1:3 về thể tích) trong 10 phút. Sau đó, ly tâm thu dịch tảo và tiếp tục tách cặn bằng máy đồng hóa và ly tâm thu cặn, lặp lại bước này 3 lần. Nồng độ AST

được đánh giá bằng phương pháp HPLC sau khi đã xà phòng hóa (phương pháp 2.5.5.).

2.5.4. Đánh giá phương pháp thu nhận dịch chiết AST.

Mục đích: Xác định quy trình hiệu quả trong việc thu nhận AST từ tảo HP-C

Nguyên tắc: AST là thành phần chính trong tảo HP-C trong giai đoạn nang bào tử, AST tan tốt trong dung môi hữu cơ do đó AST được tách chiết trong dung môi hữu cơ dichloromethane/methanol tỉ lệ 1:3 v/v (dichlo/met). Do vỏ tảo trong giai đoạn nang bào tử tương đối dày nên quá trình phá vỏ tế bào cần được hỗ trợ bằng lực cơ học (máy đồng hóa, quá trình đông khô) hoặc hóa chất (HCl).

Bố trí thí nghiệm:

- Thí nghiệm được chia thành 3 nhóm như bảng bên dưới với các biến khảo sát: Đông khô, xử lý HCl 2N, đồng hóa trong dung môi dichlo/met

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

	TN 1	**TN 2**	**TN 3**
Bước 1	Sấy lạnh	Đông khô	Đông khô
Bước 2	không	không	HCl 2N
B3: Đồng hóa trong dung môi dichlo/met	có	có	có

- Đánh giá: dựa vào nồng độ AST thu được và quan sát sinh khối tảo sau mỗi chu kỳ tách chiết

Thao tác:

- Đối với phương pháp đông khô, tảo được đông khô qua đêm theo quy trình như sau: làm lạnh -50°C trong 2 giờ, -40°C trong 1 giờ, -30°C trong 1 giờ, -20°C trong 1 giờ, -10°C trong 1 giờ, 0°C trong 1 giờ, 10°C trong 1 giờ, 20°C trong 2 giờ, 30°C trong 3 giờ, 40°C trong 9 giờ.
- Đối với quy trình sấy khô, tảo được làm sấy lạnh ở 4°C trong 1 ngày.
- Bước xử lý HCl 2N: 50 mg sinh khối được để trong 5 ml dung dịch HCl 2N trong 10 phút ở 70°C. Tiếp theo, tiến hành ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút

để thu cặn. Bổ sung nước cất và lặp lại bước ly tâm thu cặn 3 lần để loại bỏ hoàn toàn HCl. Sau đó sinh khối được làm khô lạnh ở 4^{o}C trong 1 ngày [100].

- Bước tiếp theo, cân 50 mg sinh khối tảo trong mỗi nhóm cho vào 10 ml dung dịch dichlo/met trong chai đựng 40 ml, tiến hành đồng hóa bằng máy đồng hóa cơ học ở vận tốc quay 10000 vòng/phút trong 10 phút. Sau 10 phút, ly tâm để thu dịch, cặn tảo tiếp tục được đồng hóa trong dichlo/met và ly tâm để thu cặn. Bước đồng hóa, ly tâm thu cặn được tiến hành lặp lại liên tục cho đến khi dịch chiết trong suốt.
- Nồng độ AST được đánh giá bằng phương pháp HPLC theo quy trình 2.5.5.

2.5.5. Phương pháp định lượng AST.

Mục đích: Định lượng AST bằng phương pháp HPLC

Nguyên tắc: AST trong tảo tồn tại chủ yếu ở dạng ester. Trước khi định lượng, AST được xà phòng hóa bằng NaOH trong methanol để trở về dạng tự do (được gọi là AST tổng). AST tổng được định lượng bằng phương pháp High-performance Liquid Chromatography (HPLC). Phương pháp HPLC là phương pháp phân tách các hợp chất dựa trên ái lực của các chất đối với cột. AST thương mại (Sigma) được sử dụng làm chuẩn để đo thời gian lưu và dựng đường tuyến tính liên quan giữa nồng độ và giá trị OD bước sóng 480 nm. Dựa trên đường chuẩn và giá trị OD thu được, tính nồng độ AST tổng có trong mẫu.

Thao tác:

- Quy trình xà phòng hóa Yuan và cộng sự [101]:
    - Dịch chiết tảo được làm khô bằng phương pháp coway chân không. Sau đó bổ sung methanol để hòa tan bột AST.
    - Pha dung dịch NaOH 0,107 M trong methanol tuyệt đối, bổ sung dung dịch này với tỉ lệ thể tích 1 ml NaOH: 5 ml dịch chiết tảo HP-C.
    - Tiến hành đậy nắp, sục khí nitrogen để bay hơi dung dịch để dung dịch trở về thể tích ban đầu (5 ml).
    - Ủ trong tối, ở 4^{o}C, trong 6 giờ để quá trình xà phòng hóa diễn ra hoàn toàn.
- Quy trình HPLC:

- HPLC được tiến hành theo phương pháp của Yuan và cộng sự [101], sử dụng AST tinh chất (Sigma) làm chuẩn.

2.5.6. Phương pháp thu nhận dịch chiết tảo *Haematococcus pluvialis* giàu AST (AST-EX) được sử dụng trong nghiên cứu

Mục đích: Thu nhận dịch chiết tảo HP-C

Nguyên tắc: Quy trình thu nhận dịch chiết được xác định theo quy trình tối ưu được đánh giá ở mục 2.5.4.

Dịch chiết tảo *Haematococcus 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 *Haematococcus pluvialis* có nồng độ AST tổng là 5 µg/ml.

Thao tác:

- Thu nhận sinh khối nang tảo và đông khô: làm lạnh -40^{o}C và thăng hoa hơi nước qua đêm cho tới khi khô hoàn toàn.
- Bước tiếp theo, cân 50 mg sinh khối tảo cho vào 10 ml dung dịch dichlo/met trong chai đựng 40 ml, tiến hành đồng hóa bằng máy đồng hóa cơ học ở vận tốc quay 10000 vòng/phút trong 10 phút.
- Sau 10 phút, ly tâm để thu dịch, cặn tảo tiếp tục được đồng hóa trong dichlo/met và ly tâm để thu cặn. Bước đồng hóa, ly tâm thu cặn được tiến hành lặp lại liên tục thêm 3 lần.
- Nồng độ AST tổng bằng phương pháp xà phòng hóa và HPLC trước khi sử dụng (phương pháp 2.5.5).

2.5.7. Phương pháp FRAP

Mục đích: Đánh giá khả năng khử ion Fe^{3+} của AST thông qua phản ứng oxy hóa/khử.

Nguyên tắc: Phương pháp FRAP dựa trên sự khử phức hợp Fe^{3+}-TPTZ bởi các chất chống oxy hóa ở điều kiện pH thấp để tạo thành phức hợp Fe^{2+}-TPTZ có màu xanh. Sự thay đổi về màu sắc có thể đo quang phổ ở bước sóng 593 nm. Kết quả tính toán dựa trên dung dịch chuẩn là $FeSO_4$. So sánh khả năng chống oxy hóa bằng Trolox, được sử dụng để làm chất chuẩn để so sánh khả năng chống oxy hóa của các hợp chất.

Thiết kế thí nghiệm:

- AST-EX được pha loãng với ethanol ở các nồng độ khác nhau: 0; 12,5; 25; 50; 100; 150 (µg/ml).
- Trolox sẽ được pha loãng thành các nồng độ 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 0,15; 0,2 µM. Đem các dung dịch và dịch chiết pha loãng ủ tối với dung dịch FRAP trong 2 giờ. Sau đó đo mật độ quang với bước sóng 593 nm.

Thao tác: Phương pháp FRAP được thực hiện dựa trên quy trình của Benzie và Strain có chỉnh sửa [2].

- Chuẩn bị dung dịch FRAP: đệm acetate 300 mmol/l, pH bằng 3,6. TPTZ 10 mmol/l pha trong HCl 40 mmol/l. $FeCl_3$ 20 mmol/l. Dung dịch FRAP được pha bằng cách cho 10ml đệm acetate 300 mmol vào 1ml TPTZ 10 mmol/l và 1 ml $FeCl_3$ 20 mmol/l (tỉ lệ 10:1:1).
- Đối với AST-EX: 190 µl dung dịch FRAP cho vào giếng đĩa 96, thêm 10 µl dịch chiết AST-EX ở các nồng độ (0 – 150 µg/ml), mỗi nồng độ được lặp lại 8 lần. Hỗn hợp được ủ tránh sáng trong 2 giờ, và độ hấp thụ được đo ở bước sóng 593 nm.
- Đối với trolox, trolox ở các nồng độ (0 – 0,2 mM) được dùng để so sánh khả năng oxy hóa – khử với AST-EX.
- Sử dụng $FeSO_4$ 1000 µmol/l làm dung dịch chuẩn. Khả năng oxy hóa của AST sẽ được tính toán theo giá trị FRAP:

$$Giá\ trị\ FRAP = A0/A1 \times N$$

Trong đó:

A0: giá trị OD của mẫu ở bước sóng 593 nm.

A1: giá trị OD của $FeSO_4$ ở bước sóng 593 nm.

N: nồng độ của dung dịch chuẩn $FeSO_4$

2.5.8. Phương pháp ABTS

Mục tiêu: Đánh giá khả năng chống oxy hóa của AST.

Nguyên tắc: $ABTS^{+\bullet}$ là một gốc tự do màu xanh lam, có bước sóng hấp thụ cực đại là 753 nm trong dung môi ethanol và được tạo ra khi ABTS tác dụng với chất oxy hóa mạnh, điển hình là kali persulfate ($K_2S_2O_8$). Khi phản ứng với chất chống oxy hóa, $ABTS^{+\bullet}$ sẽ bị khử về dạng không màu, dẫn đến độ hấp thu OD bước sóng 753 nm

giảm. Dịch chiết AST-EX được sử dụng làm mẫu thí nghiệm và Trolox 0,05-0,3 mM được dùng làm đối chứng.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm chia thành 3 nhóm, mỗi nhóm lặp lại 8 lần:

- Nhóm đối chứng: ethanol
- Nhóm thí nghiệm AST-EX: AST-EX các nồng độ 12,5; 25, 50, 100 và 150 µg/ml.

  Nhóm thí nghiệm trolox: trolox các nồng độ 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 và 0,3 mM

Thao tác: Quy trình dựa trên nghiên cứu của Jianwei Dong và cộng sự (2014) với một số sửa đổi [11]:

- Chuẩn bị dung dịch $ABTS^{+\bullet}$: trộn dung dịch ABTS 7 mM và dung dịch $K_2S_2O_8$ 2,45 mM (tỉ lệ 1:1). Sau đó, dung dịch được ủ tối khoảng 16 – 18 giờ ở nhiệt độ phòng.
- Pha loãng dung dịch đã ủ bằng ethanol 30 – 50 lần sao cho OD_{753} có mật độ quang là 0,70 ± 0,02.
- Chuẩn bị dung dịch mẫu: pha loãng dịch chiết AST-EX bằng ethanol thành các nồng độ 12,5; 25; 50; 100 và 150 µg/ml. Tương tự, pha loãng trolox 1 mM thành dãy nồng độ 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 và 0,3 mM.
- Trộn hỗn hợp mẫu và dung dịch $ABTS^{+\bullet}$ theo tỉ lệ 1:24. Ủ tránh sáng 60 phút và đo OD bước sóng 753 nm.
- Khả năng chống oxy hóa được tính toán dựa trên phần trăm ức chế ABTS theo công thức sau [18]:

$$\% \text{ Ức chế} = [(A0 - Am)/A0] \times 100\%$$

$$IC50 = (50 - b)/a$$

  Trong đó,

  A0 là giá trị OD_{753} của dịch $ABTS^{+\bullet}$

  Am là giá trị OD753 của AST-EX

- Năng lực chống oxy hóa tương đương trolox (TEAC) được xác định theo công thức sau:

$$TEAC\ (mmol/g) = (IC50_{Trolox}/\ IC50_{AST})$$

  Trong đó:

  $IC50_{Trolox}$ (mM) và $IC50_{AST}$ (µg/ml) lần lượt là hàm lượng ức chế 50% ABTS của trolox và dịch chiết AST.

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

Nguyên tắc:

AST-EX từ tảo sẽ được cho tiếp xúc với tế bào với các nồng độ được khảo sát 0 µg/ml - 10 µg/ml. Độc tính (nếu có) làm tế bào giảm sức sống, thậm chí chết, bong ra khỏi chai nuôi. Sau 1, 2 ngày quan sát hình dạng tế bào và đánh giá sức sống tế bào bằng MTT.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được chia thành 6 nhóm với 2 biến: nồng độ AST-EX và thời gian ủ.

- Nồng độ
  - Nồng độ AST-EX 0,5, 1, 5, 10 µg/ml và AST thương mại TM 10 µg/ml
  - Đối chứng âm: Môi trường nuôi cơ bản (MTCB) chứa 0.2% DMSO
  - Đối chứng dương: Môi trường nuôi cơ bản (MTCB) chứa 10% DMSO
- Thời gian ủ AST-EX: 1 ngày hoặc 2 ngày

Thao tác:

- Tế bào hF được cấy lên đĩa 96 giếng với mật độ ban đầu $10x10^3$ tế bào/giếng.
- Sau 1 ngày, thay môi trường nuôi cấy bằng môi trường theo như các nhóm thí nghiệm. Mỗi nồng độ tiến hành với 5 giếng.
- Ủ 1 hoặc 2 ngày tùy theo nhóm thí nghiệm.
- Sau thời gian ủ, quan sát hình dạng tế bào bằng kính hiển vi và tiến hành phương pháp MTT để đánh giá độc tính tế bào.
- Tỉ lệ tế bào sống được đánh giá theo công thức sau:

$$\% \text{ tế bào sống} = OD_{590}TN/OD_{590}ĐC \text{ âm} \times 100$$

Trong đó:

$OD_{590}TN$, $OD_{590}ĐC$ âm: Giá trị OD đo được ở bước sóng 590 nm trong phương pháp MTT.

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

Nguyên tắc:

Đánh giá sự tăng mật độ tế bào trong môi trường có AST-EX ở các nồng độ khác nhau qua các mốc thời gian để đánh giá tác động của AST-EX lên sự tăng sinh tế bào

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được chia thành 6 nhóm liên quan tới nồng dộ AST-EX trong môi trường.

- Nồng độ AST-EX
    - Nồng độ AST-EX: 0,5, 1, 1.5, 5, 10 µg/ml
    - Đối chứng âm: Môi trường nuôi chứa 0.2% DMSO
- Thời gian thí nghiệm 1 tới 13 ngày. Sau các mốc thời gian đánh giá MTT.

Thao tác:

- Tế bào hF được cấy lên đĩa 96 giếng với mật độ ban đầu $1x10^3$ tế bào/giếng.
- Sau 1 ngày, thay môi trường nuôi cấy bằng môi trường theo như các nhóm thí nghiệm. Mỗi nồng độ tiến hành với 5 giếng.
- Sau khi nuôi 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 ngày, tiến hành phương pháp MTT để đánh giá sự gia tăng giá trị OD bước sóng 590 nm.

Công thức tính thời gian nhân đôi thế hệ (DT) = $(T_2 - T_1)$. $[\ln(2)/\ln(Q_2/Q_1)]$. Trong đó, Q_2 là giá trị OD_{590} ở ngày đạt đỉnh T2, Q2 là giá trị OD_{590} ở ngày bắt đầu tăng sinh T1

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

Nguyên tắc: Tạo vết rạch giữa lớp tế bào hợp dòng. Sau đó quan sát sự di cư của tế bào vào vết rạch.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được chia thành 6 nhóm liên quan tới nồng dộ AST-EX trong môi trường.

- Nồng độ AST-EX
    - Nồng độ AST-EX: 0,5, 1, 1.5, 5, 10 µg/ml
    - Đối chứng âm: Môi trường nuôi chứa 0.2% DMSO
- Thời gian thí nghiệm: 3, 12, 24 giờ sau khi rạch. Diện tích bao phủ được xác định bằng phần mềm ImageJ.

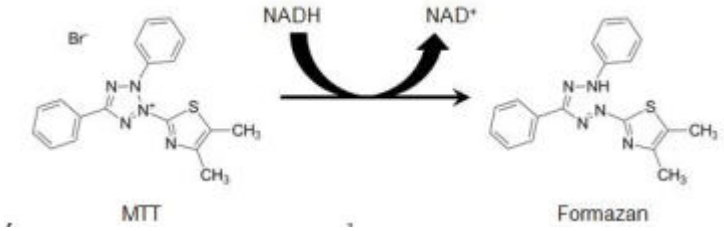
Thao tác:

- Tế bào hF được cấy lên đĩa 96 giếng với mật độ ban đầu $10x10^3$ tế bào/giếng.
- Sau 1 ngày, sử dụng đầu tip trắng để tạo vết rạch giữa lớp tế bào và thay môi trường theo thiết kế thí nghiệm
- Ghi nhận hình ảnh tế bào di chuyển sau 3 giờ, 12 giờ và 24 giờ, xử lý hình ảnh bằng phần mềm Image J.

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

Mục tiêu: Xác định tỉ lệ tế bào sống trong thí nghiệm độc tính và tăng sinh.

Nguyên tắc: Thử nghiệm MTT dựa trên sự khử muối tetrazolium màu vàng thành tinh thể formazan màu tím. Các tế bào sống chứa enzyme oxidoreductase phản ứng với MTT tạo thành formazan, dạng kết tủa không hòa tan bên trong tế bào. Các tinh thể formazan được hòa tan bằng cách sử dụng dung dịch hòa tan (MTT Solvent) và dung dịch được định lượng dựa vào giá trị OD_{590}. Dung dịch càng sẫm màu cho thấy số lượng tế bào còn sống và hoạt động trao đổi chất càng lớn.



Hình 2. 3. Sự chuyển hóa MTT thành tinh thể formazan.

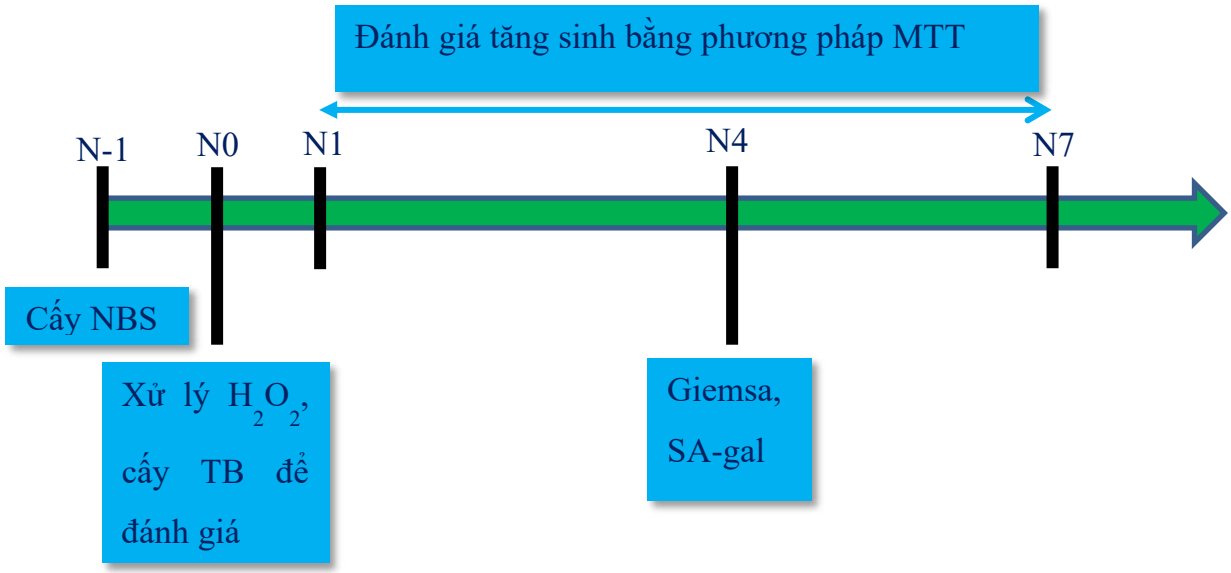
Thao tác

- Quy trình được thực hiện trong đĩa 96 giếng theo quy trình của bộ kit MTT (SigmaAlrich, Mỹ).
- 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 [50]

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

Nguyên tắc:

Hydrogen peroxide (H_2O_2) là một chất gây oxy hóa mạnh, có khả năng gây tổn thương nhân và tế bào chất của tế bào. Trong thí nghiệm này, nguyên bào sợi sẽ được gây lão hóa bằng H_2O_2 100-200 µM trong thời gian 60-120 phút nhằm tạo ra mô hình gây lão hóa hiệu quả với tỉ lệ tế bào lão hóa nhiều nhưng ít gây nên sự chết tế bào nhất.



Hình 2. 4. Sơ đồ thí nghiệm tạo mô hình lão hoá.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí để khảo sát 2 biến: nồng độ H_2O_2 và thời gian xử lý H_2O_2, tổng cộng 6 nhóm:

- Nồng độ H_2O_2: 100, 150, 200 µM.
- Thời gian xử lý: 90, 120 phút.

  Ngoài ra, nhóm đối chứng là nhóm tế bào nuôi trong môi trường

- Sau đó đánh giá hiệu quả lão hóa bằng MTT và nhuộm SA-gal

Thao tác gây lão hóa tế bào bằng H_2O_2:

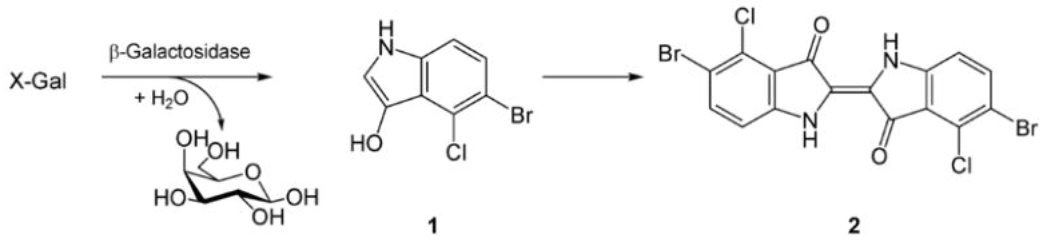
- Tách tế bào từ bình nuôi bằng Trypsin, sau đó thu cụm tế bào nhờ ly tâm.
- Tái huyền phù viên tế bào bằng môi trường mới và trải lên đĩa 24 giếng với mật độ $4x10^4$ tế bào/giếng và được ủ với môi trường nuôi bổ sung 0,2% DMSO trong 24 giờ. Sau 24 giờ, tế bào có thể đạt đến độ phủ khoảng 80-90%.
- Tiếp theo, loại bỏ môi trường, rửa bằng PBS, xử lý các giếng tế bào với môi trường nuôi bổ sung H_2O_2 nồng độ 100, 150, 200 µM trong các khoảng thời gian 90 phút, 120 phút tùy theo thí nghiệm. Tế bào nhóm đối chứng tiếp tục được nuôi trong môi trường nuôi cơ bản.
- Sau thời gian xử lý với H_2O_2, tiến hành loại bỏ H_2O_2 và tiến hành cấy chuyền tế bào. Tế bào sau đó được tiếp tục nuôi trong môi trường cơ bản.

- Sự tăng trưởng tế bào từ ngày 1 tới ngày 7 bằng phương pháp MTT (mật độ tế bào ban đầu 10^3 tế bào/giếng).
- Nhuộm Giemsa đánh giá hình dạng tế bào sau 4 ngày cấy (mật độ 10^4 tế bào/giếng).
- Sự biểu hiện senescence-asociated β-galatosidase (SA-gal) sau 4 ngày cấy (mật độ 10^4 tế bào/giếng).

2.5.14. Phương pháp nhuộm senescence –associated β-galactosidase

Nguyên tắc:

Một trong số những dấu ấn sinh học của tế bào lão hóa là sự tích lũy lượng lớn enzyme SA-gal. Bằng việc sử dụng dung dịch X-Gal, ta có thể nhận diện tế bào bị lão hóa bằng sự tạo tủa xanh lam do sự phân cắt cơ chất X-Gal bởi galactosidase [26].



Hình 2. 5. Enzyme SA-gal xúc tác phản ứng với X-Gal.

Thao tác:

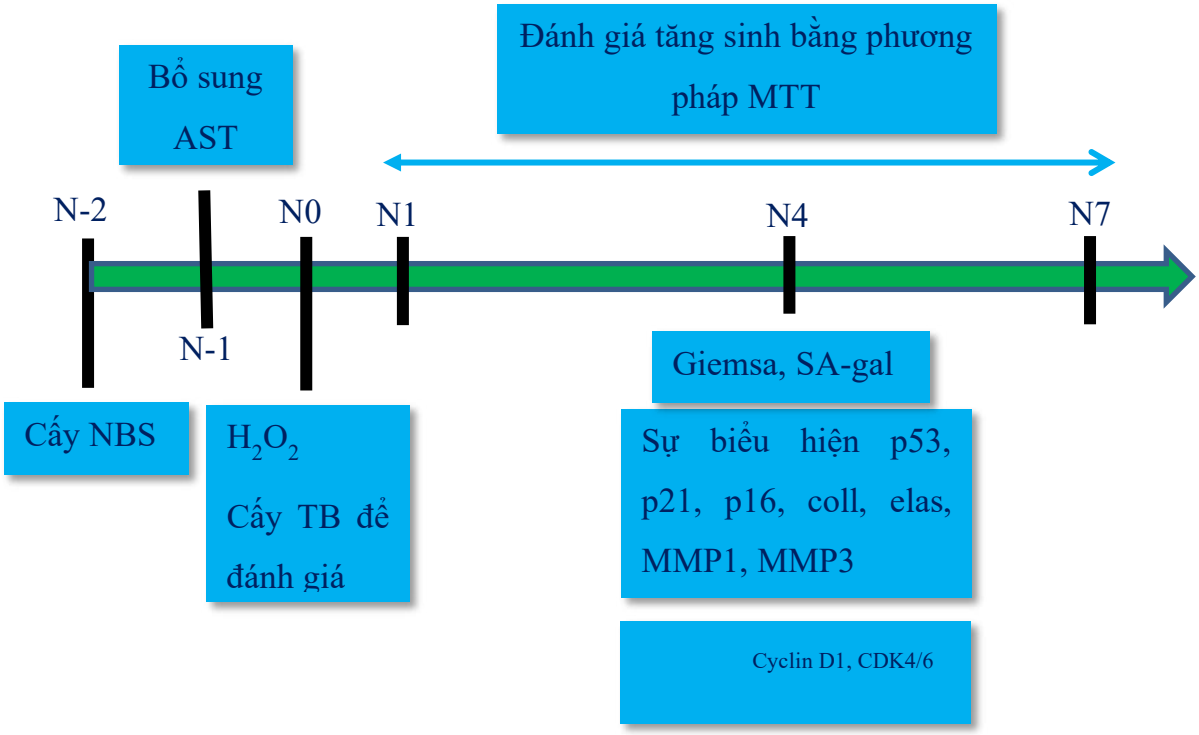
Hoạt động của SA-gal sẽ được phát hiện bằng bộ kit nhuộm (ab102534, Abcam, US).

- Loại bỏ môi trường tăng trưởng.
- Rửa tế bào với PBS 2 lần.
- Thêm 0,5 ml dung dịch cố định 1x mỗi đĩa. Cho tế bào cố định 10-15 phút ở nhiệt độ phòng.
- Rửa tế bào với PBS 2 lần.
- Thêm 1 ml dung dịch nhuộm β-Gal mỗi giếng. Lưu ý: Bịt kín đĩa lại bằng parafin để ngăn sự bay hơi vì sự bay hơi sẽ dẫn tới sự hình thành tinh thể.
- Ủ đĩa ở 37°C qua đêm trong tủ ủ nhiệt không chứa CO_2
- Sau đó, kiểm tra tế bào dưới kính hiển vi để xác định sự hình thành màu xanh ở tế bào lão hóa.

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

Nguyên tắc:

AST có khả năng xâm nhập và duy trì trong màng tế bào, màng các loại bào quan trong tế bào, màng nhân nên việc xử lý trước tế bào đối với AST-EX có thể hạn chế tác động của H_2O_2 lên tế bào. Trước khi tiến hành gây lão hóa tế bào, nuôi tế bào trong môi trường chứa AST ở các nồng độ khác nhau trong 24 giờ. Sau đó tế bào được gây lão hóa bằng H_2O_2 theo như quy trình đã xác định.



Hình 2. 6. Sơ đồ thí nghiệm khả năng bảo vệ tế bào của astaxanthin

Bố trí thí nghiệm:

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 µg/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-EX 10) và nhóm xử lý với AST thương mại nồng độ 10 µg/ml (ký hiệu TM10).
- Nhóm đối chứng (ĐC): tế bào được nuôi trong môi trường bổ sung DMSO 0.2% và không xử lý với H_2O_2
- Nhóm xử lý H_2O_2, tế bào được nuôi trong môi trường bổ sung DMSO 0.2% và xử lý với H_2O_2 150 µM trong 90 phút.

Bảng 2. 3. Bảng bố trí thí nghiệm khả năng bảo vệ tế bào trước yếu tố gây lão hóa H_2O_2 của AST

Nhóm	**ĐC**	**H_2O_2**	**AST-EX0,5**	**AST-EX1**	**AST-EX 1.5**	**AST-EX 5**	**AST-EX 10**	**TM10**
Xử lý với AST-EX (µg/ml)	không	không	0,5	1	1,5	5	10	10 (thương mại)
Xử lý H_2O_2	không	có	có	có	có	có	có	có

Thao tác:

- Tế bào hF được cấy lên đĩa 24 giếng với mật độ $4x10^4$ tế bào/giếng
- Sau 1 ngày, thay môi trường nuôi bằng môi trường có AST-EX hoặc môi trường bổ sung 0.2% DMSO tùy theo thí nghiệm.
- Sau 1 ngày, rửa sạch môi trường, rửa bằng PBS 2 lần, bổ sung môi trường gây lão hóa (H_2O_2 150 µg/ml) trong 90 phút.
- Sau 90 phút, cấy tế bào ra đĩa nuôi mới để tiến hành đánh giá hiệu quả bảo vệ của AST-EX
- Những chỉ tiêu đánh giá:
    - Hình dạng và diện tích tế bào.
    - Sự tăng sinh tế bào bằng phương pháp MTT.
    - Sự biểu hiện SA-gal.
    - Sụ biểu hiện marker p53, p21, 16.
    - Sự biểu hiện enzyme MMP1, MMP3, collagen, elastin.
    - Sự biểu hiện cyclin D1, CDK4, CDK6.

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

Mục đích: Xác định sự biến đổi hình dạng tế bào trong các nhóm nghiên cứu

Nguyên lý: Thuốc nhuộm Hoechst và phalloidin là 2 thuốc nhuộm huỳnh quang để nhuộm lần lượt nhân tế bào và tế bào chất. Hoechst là một chất nhuộm DNA dạng huỳnh quang có thể thấm vào trong tế bào. Hoestch có ái lực cao với phân tử DNA trên vùng trình tự giàu A-T. Khi Hoechst thẩm thấu vào tế bào và liên kết với DNA

trong các tế bào sống hoặc các tế bào đã được cố định, phức hợp này có thể được kích thích bởi nguồn ánh sáng cực tím và phát ra ánh sáng huỳnh quang màu xanh. Cường độ cao nhất của ánh sáng huỳnh quang có thể được thu nhận ở bước sáng 461 nm. Hoechst có tính thấm tốt nên có thể thấm vào và nhuộm nhân giai đoạn đầu của appotosis [25].

Thao tác:

- Tế bào được cố định bằng paraformaldehyde và nhuộm với Hoestch, phalloidin theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Hình dạng nhân và diện tích nhân sẽ được xử lý bằng máy Cytel. Sau khi xử lý, hình dạng nhân, diện tích nhân được xác định bằng phần mềm của máy
- Hình dạng tế bào thì được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang và xử lý bằng phần mềm ImageJ

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

Mục đích: Đánh giá sự biểu hiện mRNA các marker tế bào p53, p21, p16, MMP1, MMP3, collagen, elastin.

Nguyên tắc: mRNA được reverse và khếch đại trong phản ứng qPCR, dựa trên giá trị Ct, tính được biểu hiện tương đôi so với gene chứng, từ đó so sánh mức độ biểu hiện của các gene.

Thao tác:

Lượng RNA tổng được chiết xuất bằng bộ kit Total RNA Purification Kit. Phản ứng PCR được tiến hành bởi bộ kit SyGreen 1-Step Lo-ROX kit bằng hệ thống máy PikoReal 96 Real-Time PCR System.

- Phản ứng PCR bao gồm 20 ul cho mỗi phản ứng:
    - 1 ul RNA
    - 2 ul primer (forward và reverse)
    - 10 ul 2X Mix Ro-Lox
    - 1 ul RTase
    - 6 ul dH2O.
- Chu trình realtime PCR tiến hành như sau:
    - 1 chu kỳ 45°C trong 15 phút
    - 1 chu kỳ 95°C trong 2 phút

- 40 chu kỳ: 95°C trong 10 giây, 60°C trong 15 giây
- 71 chu kỳ 60°C trong 15 giây

- Áp dụng phương thức $2^{-\Delta\Delta Ct}$ để tính sự biểu hiện tương đối của các gene mục tiêu

Bảng 2. 4. Trình tự primer

Tên	Trình tự primer	Sản phẩm khếch đại	TLTK
MMP1-F	CAGAGATGAAGTCCGGTTTTTC	76	[102]
MMP1-R	GGGGTATCCGTGTAGCACAT		
MMP3-F	CAAAACATATTTCTTTGTAGAGGACAA	91	[103]
MMP3-R	TTCAGCTATTTGCTTGGGAA		
$p16^{INK4a}$ -F	TGAGCACTCACGCCCTAAGC	144	[104]
$p16^{INK4a}$-R	TAGCAGTGTGACTCAAGAGAAGCC		
p53-F	GAGCACTGCCCAACAACAC	224	[105]
p53-R	ATGGCGGGAGGTAGACTGA		
p21-F	TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA	65	
p21-R	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAATC		[106]
COL1A1-F	AGCAGGCAAACCTGGTGAAC	80	
COL1A1-R	AACCTCTCTCGCCTCTTGCT		[107]
Elastin-F	TGTCCATCCTCCACCCCTCT	64	
Elastin-R	CCAGGAACTCCACCAGGAAT		
GAPDH-F	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	172	
GAPDH-R	GAAGATGGTGATGGGATTTC		

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

Mục đích: Kiểm tra biểu hiện mức protein của CDK4, CDK6 và cyclin D1

Nguyên tắc: Thành phần protein trong tế bào được thu nhận, điện di, lai màng và nhuộm với kháng thể đặc trưng cho từng loại protein, dựa trên cường độ biểu hiện hình ảnh tính được sự biểu hiện tương đối của protein đối chứng nội. Từ đó đánh giá được mức độ biểu hiện tương đối protein mục tiêu giữa các tế bào.

Thao tác:

- Tế bào đã trải qua thí nghiệm bảo vệ tế bào bởi AST được thu nhận từ chai nuôi T25 và ly giải trong Optiblot LDS Sample Buffer.
- Lượng tương đương 10 µg/ml được đưa vào giếng được đổ bằng Precast Gel SDS-PAGE 4-12%.
- Gel được chạy trong buffer Optiblot SDS Run Buffer trong 2 giờ tại 50V. Sau 2 giờ, protein được chuyển qua màng PVDF và màng được block qua đêm ở 4^{o}C trong blocking buffer.
- Màng được ủ với những kháng thể sơ cấp qua đêm ở 4^{o}C. Kháng thể được sử dụng bao gồm anti-CDK4, anti-CDK6, anti-cyclin D1, anti-actin. Màng được rửa với TBST 3 lần trong 10 phút mỗi lần. Màng được ủ với kháng thể thứ cấp tại nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Kháng thể của dê kháng IgG chuột và kháng thể của dê kháng IgG thỏ được sử dụng để nhận diện kháng thể sơ cấp. Những band được nhận diện bằng bộ kit ECL Western Blotting Substrate Kit. Hình ảnh được chụp bằng film X-ray.

2.5.19. Phương pháp tạo mô mình chuột lão hóa da

Mục đích: Đánh giá hiệu quả bảo vệ da của dịch chiết giàu AST-EX khỏi tác hại của tia UV.

Nguyên tắc: AST có khả năng thấm vào lớp da chuột và chống loại các tác hại do ROS sinh ra bởi tia UV.

Đối tượng: Chuột được cung cấp bởi viện Pasteur TP. HCM. Chuột được nuôi ổn định trong 3 ngày trước khi tiến hành thí nghiệm.

Thao tác:

- Hệ thống chiếu chuột bao gồm: Đèn UVB, lồng chiếu chuột và lồng chắn sáng.
- Chuột được cạo vùng da giữa lưng kích thước 2x2 cm^2.
- Chuột được cạo lông hàng tuần (2 lần/tuần) và tiến hành chiếu dưới đèn UV. Liều chiếu UV được tiến hành như sau:

  Tuần 1-2: 100 mJ/cm^2/lần, tuần chiếu 3 lần

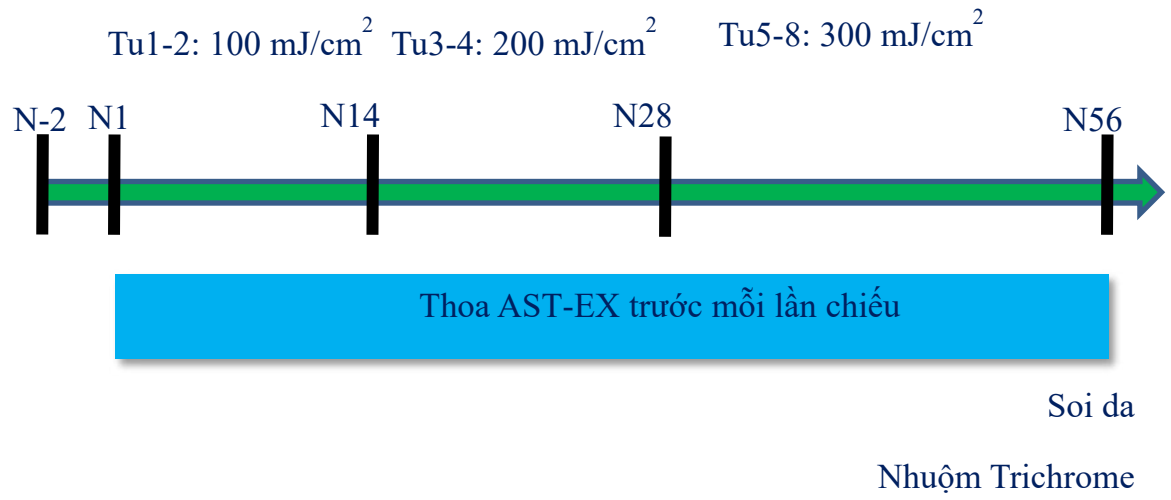
  Tuần 3-4: 200 mJ/cm^2/lần, tuần chiếu 3 lần

  Tuần 5-8: 300 mJ/cm^2/lần, tuần chiếu 3 lần
- Đánh giá

- Sự thay đổi về mặt hình thái trên da chuột được ghi nhận hàng tuần và ghi nhận bằng bình ảnh.
- Sự thay đổi cấu trúc mô học được đánh giá dựa trên phương pháp nhuộm Masson's Trichrome.

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

Nguyên tắc: AST có khả năng thấm vào da và hấp thụ gốc oxy hóa do tia UV tạo ra.



Hình 2. 7. Sơ đồ thí nghiệm bảo vệ da chuột của AST

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

- Đối chứng: Chuột chiếu UVB theo quy trình 2.5.20 trong 8 tuần
- Bôi dầu Sacha Inchi (ký hiệu Sacha): Chuột được thoa dầu Sacha Inchi 4 giờ trước mỗi lần UVB, quy trình chiếu tương tự như nhóm đối chứng.
- Bôi AST-EX 5 µm/ml (ký thiệu là AST-EX5), bôi AST-EX 10 µm/ml (ký hiệu là AST-EX 10), bôi AST-EX 20 µm/ml (ký hiệu là AST-EX20), bôi AST-EX 200 µm/ml (ký hiệu là AST-EX200). Tất cả AST được hòa trong dung môi là dầu Sacha Inchi.

Thao tác:

- Chuột thí nghiệm được cạo lông trên lưng với vùng diện tích tối thiểu 4cm², trung bình cạo lông 2 lần/ tuần.
- AST thu nhận được bôi trực tiếp vào vùng da lưng chuột đã cạo sạch lông lượng 50 µl/lần/con/lần chiếu UVB.

Các chỉ tiêu đánh giá trên đối tượng nghiên cứu:

- Dựa trên đánh giá mô học, đánh giá độ dày lớp biểu bì, cấu trúc da
- Đánh giá cảm quan bên ngoài bề mặt da bằng mắt thường và máy soi da:
    - Vết nứt lớn hoặc da bị chảy xệ được quan sát bằng mắt thường theo tiêu chuẩn Agrawal và Bisset (Bảng 2.6 và 2.7)
    - Vết nứt nhỏ trên da

Bảng 2. 5. Bố trí thí nghiệm tác động của AST lên da chuột

Ký hiệu lô	**Số lượng**	**Phương pháp xử lý**	**Thời gian**
ĐC	4	Chiếu UV theo quy trình lão hóa 2.5.19	8 tuần
Sacha	4	Bôi dầu sacha inchi trước mỗi lần chiếu UVB theo quy trình 2.5.19	8 tuần
AST-EX5	4	Bôi AST-EX 5 µg/ml (dịch chiết tảo có nồng độ AST tổng là 5 µg/ml) trước mỗi lần chiếu UVB theo quy trình 2.5.19	8 tuần
AST-EX10	4	Bôi AST-EX 10 µg/ml (dịch chiết tảo có nồng độ AST tổng là 10 µg/ml) trước mỗi lần chiếu UVB theo quy trình 2.5.19	8 tuần
AST-EX20	4	Bôi AST-EX 20 µg/ml (dịch chiết tảo có nồng độ AST tổng là 20 µg/ml) trước mỗi lần chiếu UVB theo quy trình 2.5.19	8 tuần
AST-EX200	4	Bôi AST-EX 200 µg/ml (dịch chiết tảo có nồng độ AST tổng là 200 µg/ml) trước mỗi lần chiếu UVB theo quy trình 2.5.19	8 tuần

Bảng 2. 6. Mức độ nhăn da theo tiêu chuẩn Agrawal [108]

Điểm	Giải thích
0	Không có vết nhăn hoặc nhão, những vết nứt nhỏ chạy dọc theo xương sống.
1	Xuất hiện những nếp nhăn nhỏ theo trục vuông góc với cơ thể
2	Biến mất của những nếp nhăn nhỏ
3	Xuất hiện nếp nhăn nông trên lưng theo trục vuông góc với cơ thể.
4	Xuất hiện một ít nếp nhăn nông và bắt đầu có dấu hiện nhão da
5	Nhiều vết nhăn sâu vĩnh viễn
6	Nhiều vết nhăn sâu, phát triển khối u/tổn thương da

Bảng 2. 7. Mức độ nhão da theo tiêu chuẩn Bisset [109]

Điểm	Giải thích
0	Xuất hiện những vết nứt nhỏ trên cơ thể, những vết nứt nhỏ dọc theo trục sống lưng và biến mất khi di chuyển
1	Tất cả những vết nứt dọc theo cơ thể biến mất, xuất hiện những nếp nhăn nông vuông góc với trục cơ thể, những nếp nhăn này có thể xuất hiện hoặc biến mất khi di chuyển.
2	Tất cả vết nứt biến mất, những nếp nhăn trở thành vĩnh viễn.
3	Nhiều nếp nhăn sâu xuất hiện vĩnh viễn trên da

2.5.21. Phương pháp xử lý thống kê

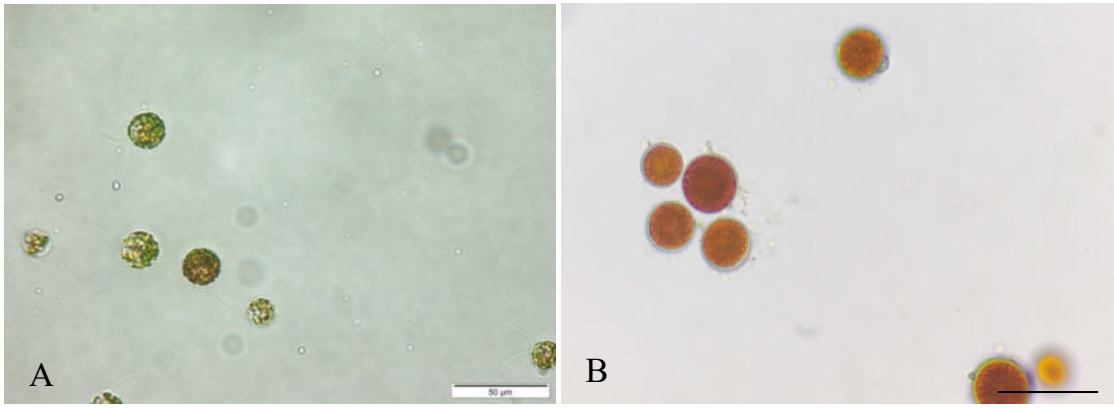
Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SigmaPlot với độ tin cậy 95%.

Số liệu được trình bày dưới dạng: A ± SD, trong đó A là giá trị trung bình, SD là độ lệch chuẩn.

Chương 3. KẾT QUẢ - BIỆN LUẬN

3.1. Nuôi cấy tăng sinh HP-C và cảm ứng AST

Hình dạng tế bào chủng tảo HP-C được ghi nhận qua thời gian thí nghiệm như sau (Hình 3.1). Giai đoạn sinh trưởng: trong điều kiện môi trường thuận lợi, tảo HP-C có màu lục, thân hình cầu hoặc elip, đường kính trung bình 20 ± 3 µm và di chuyển trong dung dịch bằng 2 roi. Giai đoạn nang trưởng thành: khi điều kiện bất lợi được kéo dài (trong nghiên cứu là 30 ngày) tảo bắt đầu tổng hợp AST và các loại carotenoid khác. Vị trí xuất hiện đầu tiên là vùng trung tâm nang và khếch đại toàn bộ tế bào tảo, khi đó, tảo chuyển sang màu đỏ hoàn toàn. Đường kính trung bình trong giai đoạn này là 32,61 ± 14,57 µm và nồng độ AST tối đa thu nhận được trong nghiên cứu là 3,09% sinh khối khô (Hình 3. 1).



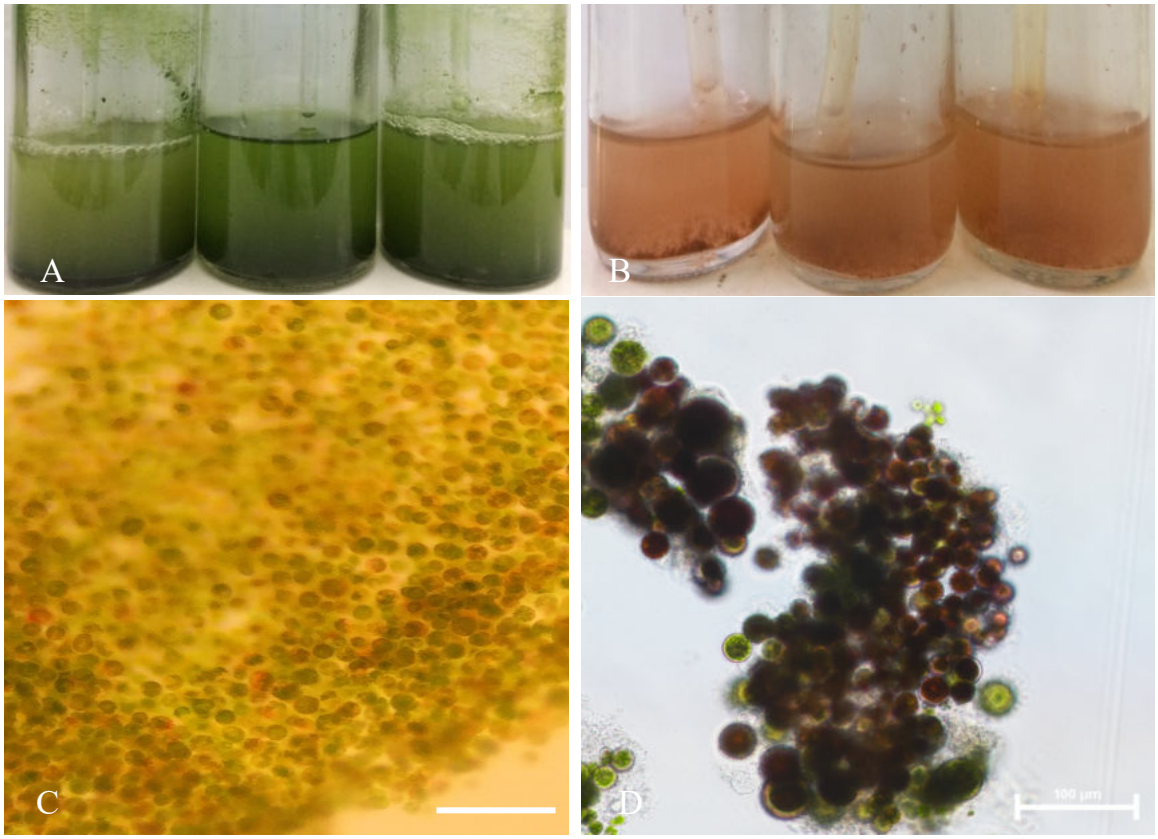
Hình 3. 1. Chu kỳ vòng đời tảo HP-C sử dụng trong nghiên cứu (x40).

A: Giai đoạn sinh trưởng, B: Nang trưởng thành. Scale bar: 50 µm.

Trong điều kiện nuôi cấy tăng sinh, mật độ tế bào tảo cao nhất đạt được trong môi trường BG-11 là 63,9 ± 5,8 (x10^4) tế bào/ml sau 26 ngày nuôi cấy và thời gian tăng sinh thế hệ là 6,28 ± 0,23 ngày. Kết quả tăng sinh tảo trong môi trường BG-11 tương tự với kết quả của Imamoglu và cộng sự. Imamoglu và cộng sự đã xác định thời gian nhân đôi thế hệ trong nghiên cứu trên trong môi trường BG-11 là 144 giờ [98].

AST được cảm ứng tổng hợp trong điều kiện ánh sáng mạnh 10 klux theo quy trình của tác giả Đặng Thị Diễm Hồng [10]. Môi trường nuôi cấy xuất hiện màu đỏ từ ngày thứ 8-10 sau khi nuôi cấy. Sau 24 ngày, dịch nuôi cấy hoàn toàn chuyển thành màu đỏ, các cụm tảo màu đỏ có xu hướng liên kết với nhau và lắng xuống đáy chai nuôi. Quan sát hình dạng tảo trong chai nuôi ngày 24 cho thấy tế bào nang trưởng

thành chiếm tỉ lệ lớn trong chai nuôi 89,86 ± 10,07% số lượng tế bào quan sát. Nồng độ AST tổng đánh giá ngày 24 là 3,09 ± 0,19% (hình 3. 2).



Hình 3. 2. Kết quả nuôi cấy HP-C.

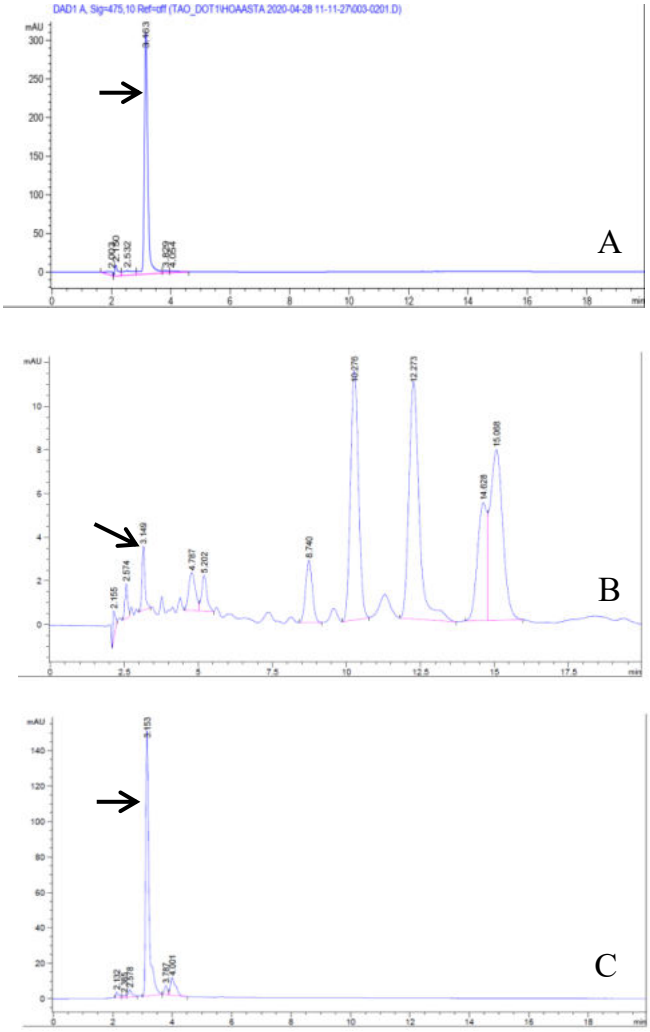
A: Nuôi cấy tăng sinh trong môi trường BG-11 sau 26 ngày, B: Cảm ứng tổng hợp AST trong điều kiện ánh sáng mạnh 10 klux, C: Tảo HP-C trong điều kiện nuôi cấy tăng sinh, D: Tảo HP-C trong điều kiện cảm ứng tổng hợp AST

3.2. Tách chiết AST

Trong nghiên cứu này, AST được tách chiết trong dung môi dichlo/met (tỉ lệ 1:3). Quy trình tách chiết được chia thành 3 nhóm:

- TN1: Tảo được làm khô bằng nhiệt, sau đó tách trong dung môi bằng máy đồng hóa tốc độ cao để phá vỡ vách tảo.
- TN2: Tảo được làm khô bằng phương pháp đông khô, tách trong dung môi bằng máy đồng hóa
- TN3: Tảo được làm khô bằng phương pháp đông khô, xử lý trước bằng HCl, tách trong dung môi bằng máy đồng hóa.

Dung môi sau đó được ly tâm để thu nhận dịch, cặn tiếp tục được tách trong dung môi mới bằng máy đồng hóa. Lặp lại các bước tới khi nào dung môi trắng hoàn toàn.



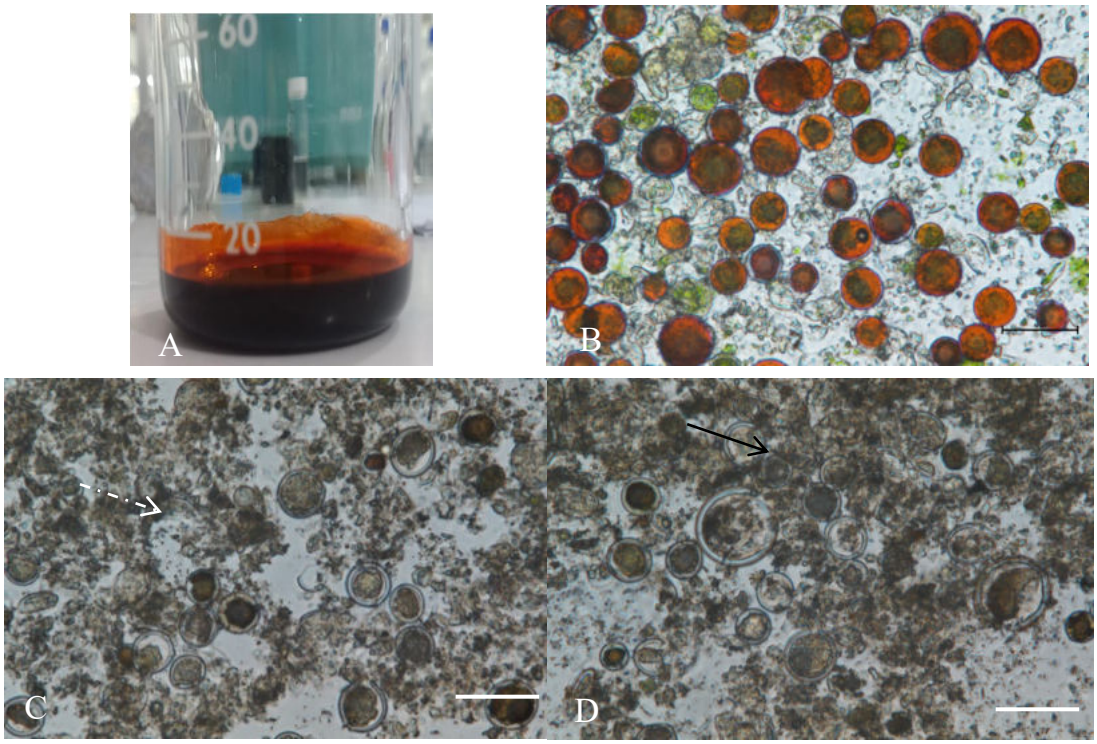
Hình 3. 3. Kết quả chạy HPLC mẫu dịch chiết tảo *H. pluviais*.

A: AST thương mại, B: Dịch chiết tảo HP-C trước khi xà phòng hóa, C: sau khi xà phòng hóa. Mũi tên: AST tự do.

Nồng độ AST được định lượng bằng phương pháp HPLC theo quy trình của tác giả Yuan và cộng sự, bước sóng hấp thụ được sử dụng là 480 nm [110]. AST trong tảo tồn tại dạng AST tự do (0.7-5%) và phần lớn là dạng ester (95-99.3%) [111, 112]. Trước khi định lượng bằng HPLC, dịch tảo được tiến hành xà phòng hóa để tách các phân tử AST dạng ester thành dạng tự do. Quy trình xà phòng hóa được thực hiện theo tác giả [110]. Đối chứng trong thí nghiệm này là AST dạng tự do thương mại (độ tinh khiết 98,5%) để ghi nhận thời gian lưu của AST tự do và dựng đường thẳng tuyến tính tương quan giữa mAU và nồng độ AST tự do. Dựa vào đường thẳng trên để tính nồng độ AST tự do trong mẫu nghiên cứu (hình 3. 3).

Kết quả cho thấy thời gian lưu trung bình của AST tự do theo quy trình là 3,14 ± 0,03 phút. Đối với mẫu AST chiết xuất trực tiếp từ tảo, biểu đồ HPLC xuất hiện

nhiều đỉnh, trong đó có đỉnh tương ứng với AST tự do, những đỉnh còn lại không được xác định trong nghiên cứu. Tuy nhiên, dựa vào biểu đồ HPLC của các nghiên cứu khác, những đỉnh này tương đương với đỉnh của AST dạng ester [110, 113]. Sau khi xà phòng hóa, tất cả các đỉnh nghi ngờ là AST dạng ester biến mất và đỉnh tương ứng với AST tự do tăng cao (Hình 3.3). Lúc này biểu đồ thu nhận được giống với biểu đồ sau khi xà phòng hóa của tác giả Yuan và cộng sự [101, 110]. Dựa trên kết quả HPLC mẫu trước và sau khi xà phòng hóa, nồng độ AST tự do (đo trong mẫu trước xà phòng hóa) và AST tổng (đo trong mẫu sau xà phòng hóa) được ghi nhận.



Hình 3. 4. Kết quả tách chiết AST từ vi tảo.

A: Dịch nổi, B: TN 1, C: TN 2, D: TN 3. Scale bar: 50 µm. Mũi tên đen: xác tảo còn AST, mũi tên trắng: xác tảo đã chiết hoàn toàn.

Kết quả quan sát cho thấy khi tiếp xúc với tảo, dung môi chuyển từ màu trắng sang màu đỏ đậm. Sau mỗi chu kỳ đồng hóa trong dichlo/met và ly tâm, dịch nổi trở nên trắng hơn. Kết quả quan sát bằng KHV xác tảo cho thấy xác tảo vỡ thành nhiều mảnh nhỏ trong quá trình tách chiết. Tuy nhiên, trong đó vẫn tồn tại nang trưởng thành nguyên vẹn. Sau mỗi chu kỳ đồng hóa trong dichlo/met và ly tâm, tỉ lệ nang tảo đỏ giảm dần và không phát hiện ở chu kỳ thứ 5 trong TN2, TN3. Đối với TN1, chu kỳ thứ 8 vẫn phát hiện nang tảo trưởng thành mặc dù dịch ly tâm đã trong suốt. Kết quả này cho thấy TN2, TN3 tách chiết AST hiệu quả hơn TN1 (hình 3. 4, bảng 3. 1).

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 ($p<0.05$)

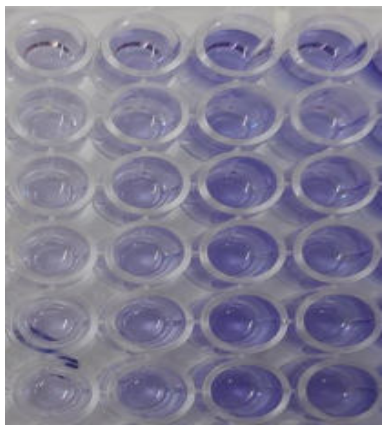
	TN 1	TN 2	TN 3
Nồng độ tổng AST thu được (% SKK tảo)	$1,73 \pm 0,13^{a}$	$3,09 \pm 0,19^{b}$	$3,01 \pm 0,25^{b}$
Tỉ lệ AST tự do (% trên AST tổng)	$4,50 \pm 0,27^{a}$	$4,43 \pm 0,40^{a}$	$4,37 \pm 0,50^{a}$

Kết quả định lượng AST bằng HPLC thể hiện trên Bảng 3.1. Dựa trên kết quả này, quá trình chiết xuất AST TN2 và TN3 cao hơn TN1 ($p<0.05$). So sánh giữa TN3 và TN1 cho thấy phương pháp đông khô có hiệu quả tốt trong hỗ trợ tách chiết AST từ tảo. Khi so sánh giữa TN2 và TN3, kết quả cho thấy hiệu quả giữa 2 phương pháp tương tự nhau. Kết quả này cho thấy HCl 2N không hiệu quả trong hỗ trợ tách chiết AST.

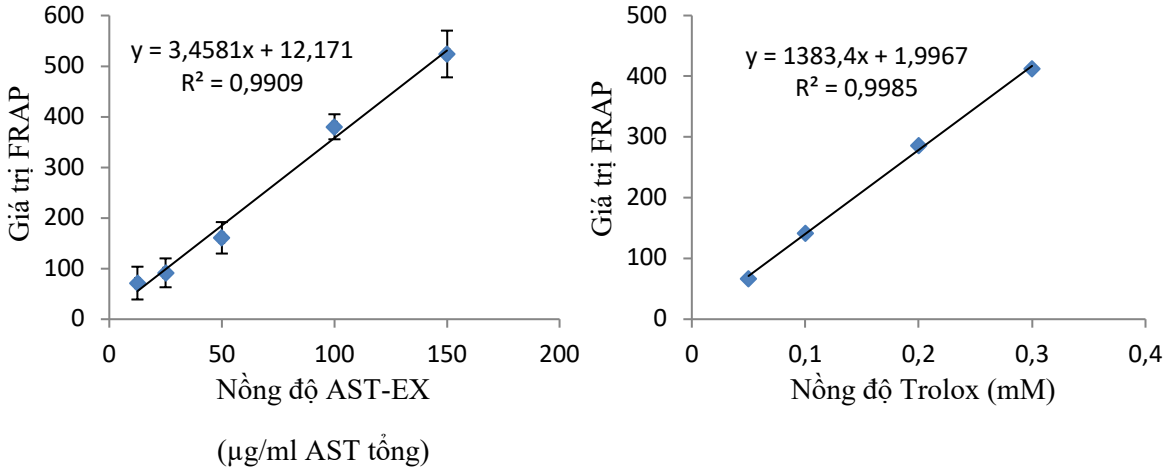
Một trong những khó khăn chính trong quá trình tách chiết hợp chất từ tảo là quá trình phá vách tế bào. Điều này đặc biệt quan trọng đối với tảo *H. pluvialis* bởi vì khi chuyển thành dạng nang trưởng thành, vách tế bào sẽ trở nên dày hơn, cứng hơn (khoảng 2 µm) [114]. Quá trình này nhằm bảo vệ tảo khỏi các tác nhân bất lợi từ môi trường. Do đó hỗ trợ phá vách tế bào là bước quan trọng trong tách chiết AST từ vi tảo [115]. Phương pháp đồng hóa cơ học trong dung môi sử dụng lực khuấy của thiết bị đồng hóa để hỗ trợ sự xâm nhập của dung môi vào trong nang tảo và phá vỡ vách nang tảo. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành đánh giá ảnh hưởng của 2 phương pháp xử lý: đông khô và HCl 2N lên hiệu quả tách chiết AST từ vi tảo. Phương pháp đông khô là một trong những phương pháp thường được sử dụng nhằm bảo quản tảo [116]. Phương pháp này rút toàn bộ nước khỏi vi tảo bằng các bước: đông lạnh dung dịch, thăng hoa nước. Do đó, đây là phương pháp làm khô có hiệu quả cao, bảo quản được hoạt chất tốt nên thường được sử dụng trong bảo quản nhiều loại sản phẩm có giá trị cao. Đối với tách chiết AST, quá trình làm lạnh trong đông khô có thể hỗ trợ hiệu quả tách chiết AST. Các phân tử nước liên kết với nhau tạo thành tinh thể trong quá làm lạnh ở nhiệt độ âm (-50^{o}C). Những tinh thể này có khả năng phá vỡ cấu trúc vách nang. Phương pháp sử dụng tinh thể nước được sử dụng để tách chiết các thành phần

nội bào như phycocyanin trong tảo Spirulina [117]. Kết quả đánh giá cho thấy phương pháp đông khô có hiệu quả hỗ trợ tách chiết AST từ vi tảo. Phương pháp thứ 2 được sử dụng là HCl 2N. HCl là một acid mạnh, có khả năng làm mềm vỏ vi tảo. Tác giả Sarada đã đánh giá hiệu quả xử lý vi tảo với HCl ở các nồng độ 1-10 N và thời gian khác nhau 5-10 phút. Kết quả cho thấy HCl 1-2N hiệu quả trong việc hỗ trợ tách chiết AST, thời gian tối ưu là 5-10 phút [100]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi, quy trình HCl 2N không hỗ trợ tốt quá trình tách chiết AST. Điều này có thể giải thích là khi đã trải qua quá trình đông khô, vách nang tảo đã trở nên mềm, dễ vỡ nên khi xử lý tiếp bằng HCl 2N thì hiệu quả HCl 2N không được thể hiện rõ ràng. Ngoài ra, HCl là một acid mạnh, có khả năng gây nguy hiểm trong quá trình thao tác và có thể gây tác động không tốt lên hoạt chất. Do đó, trong những thí nghiệm sau, HCl không sử dụng trong quá trình tách chiết. Đông khô mặc dù là quy trình thường quy sử dụng để bảo quản tảo tuy nhiên quy trình đông khô sử dụng nhiều năng lượng và thời gian xử lý lâu dài (khoảng 22 giờ) nên chi phí cho quá trình đông khô tương đối lớn. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, chúng tôi đưa ra thêm 1 lý do để sử dụng quá trình đông khô để bảo quản vi tảo HP-C là quá trình đông khô hỗ trợ tốt quá trình tách chiết AST. Quy trình tách chiết bằng cách kết hợp đông khô và đồng hóa trong dung môi dichlo/met được sử dụng cho tất cả các thí nghiệm sau.

3.3. Chống oxy hóa FRAP



Hình 3. 5. Kết quả thử nghiệm FRAP của AST-EX.

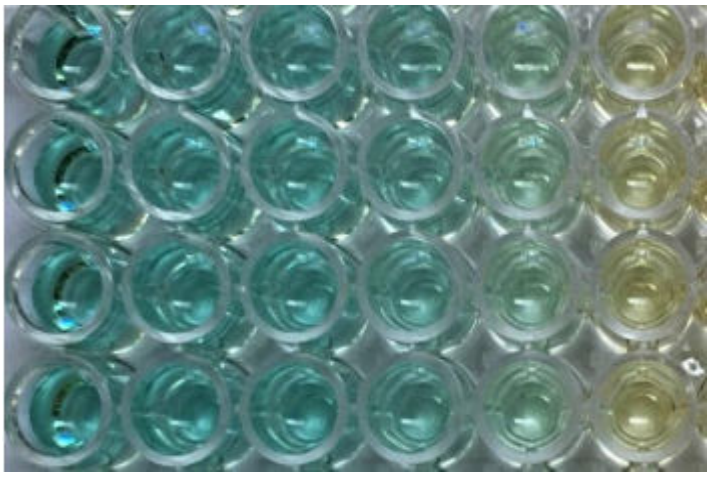


Hình 3. 6. Biểu đồ biểu thị giá trị FRAP.

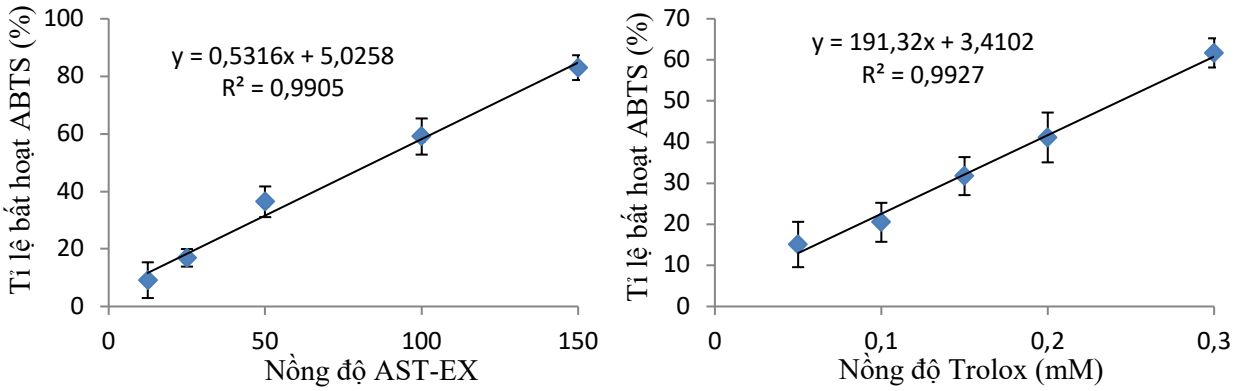
Đồ thị bên trái: Giá trị FRAP của AST-EX. Đồ thị bên phải: Giá trị FRAP của Trolox

Kết quả cho thấy có sự chuyển màu xanh trong đĩa thí nghiệm với AST-EX và đĩa đối chứng Trolox. Điều này chứng tỏ AST-EX có khả năng khử Fe^{3+}-TPTZ thành Fe^{2+}-TPTZ. Kết quả thu được là công thức hấp thụ electron tính được trong trường hợp AST-EX là y = 3,4581x + 12,171 và Trolox là y = 1383,4x + 1,9957. Dựa trên kết quả trên, giá trị TEAC là 2,76 mmol TE/g AST-EX (hình 3. 5, 3. 6).

3.4. Chống oxy hóa ABTS



Hình 3. 7. Kết quả thử nghiệm ABTS của AST-EX.



Hình 3. 8. Biểu đồ biểu thị kết quả thử nghiệm $ABTS^{+\bullet}$.

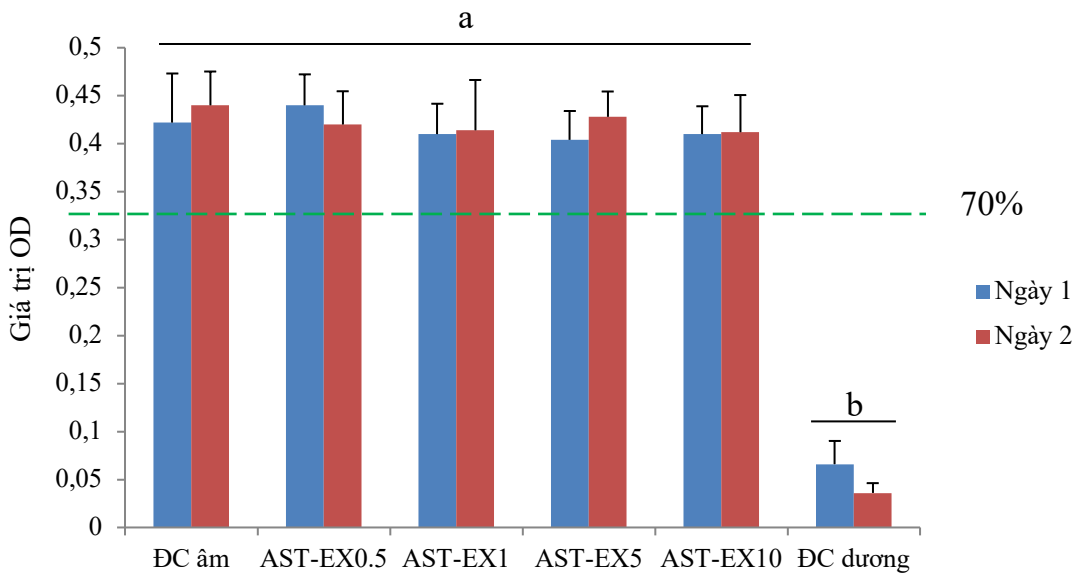
Đồ thị bên trái: tỉ lệ ức chế $ABTS^{+\bullet}$ của AST-EX, đồ thị bên phải: tỉ lệ ức chế $ABTS^{+\bullet}$ của của Trolox

Kết quả thí nghiệm cho thấy dung dịch $ABTS^{+\bullet}$ mất dần màu xanh cùng với sự gia tăng nồng độ AST-EX và Trolox. Kết quả này cho thấy AST-EX có khả năng hấp thụ electron tự do. Đường hấp thụ ABTS của AST-EX có công thức là y=0,5316x + 5,0258 với IC_{50} là 84,6 µg/ml, đường hấp thụ ABTS của Trolox có công thức là y=191,32 x + 3,4102 với IC_{50} là 0,24 mM (hình 3. 7, 3. 8).

Dựa trên kết quả này, TEAC của AST-EX là 0.38 mmol TE/g bột chiết tảo. Kết quả này tương tự với kết quả của Jaime khi tiến hành với giống tảo BN 10/024, giá trị TEAC trong nghiên cứu trên từ 0,19-0,42 mmol/g AST-EX [118].

3.5. Độc tính *in vitro*

Độc tính *in vitro* của AST-EX được đánh giá theo tiêu chuẩn ISO 10993-5. Tế bào nguyên bào sợi được nuôi trong môi trường bổ sung AST-EX theo các nồng độ 0,5 - 10 µg/ml. Thời gian ủ tế bào trong AST-EX là 1 hoặc 2 ngày. Sau đó đánh giá tỉ lệ sống của tế bào trong từng nồng độ bằng phương pháp MTT. Trong nghiên cứu này, đối chứng âm sử dụng là môi trường nuôi bổ sung 0,2% DMSO bởi vì AST-EX được hòa tan trong môi trường nuôi bổ sung 0,2% DMSO. Dãy nồng độ sử dụng trong thí nghiệm độc tính từ 0,5-10 µg/ml bởi vì dãy nồng độ này bao gồm dãy nồng độ cần sử dụng trong nghiên cứu. Đối chứng dương sử dụng là DMSO 10%, đây là đối chứng dương theo tiêu chuẩn ISO 10993-5.



Hình 3. 9. Đồ thị biểu diễn giá trị OD_{590} thu được từ thí nghiệm đánh giá độc tính của AST-EX.

(^{a,b}: sự khác biệt về mặt thống kê giá trị OD_{590} giữa các nhóm và các ngày)

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

(^{a,b}: sự khác biệt về mặt thống kê trong giữa các nhóm thí nghệm và giữa các ngày đánh giá, $p<0.05$)

	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}

Đối với tế bào trong nhóm đối chứng âm, tế bào hF có dạng thon dài, không có hiện tượng bong tróc tế bào khỏi bề mặt nuôi cấy. Đối với tế bào trong nhóm đối chứng dương, phần lớn tế bào co tròn và bong ra khỏi bề mặt nuôi cấy, những tế bào bám trên bề mặt nuôi thì có sự biến đổi về hình dạng tế bào như tế bào bị thu nhỏ. Đối với tế bào trong các nhóm AST-EX 0,5-10 µg/ml, tế bào vẫn duy trì hình dạng thon dài đặc trưng, không có dấu hiệu tế bào bong tróc khỏi bề mặt nuôi.

Kết quả đánh giá bằng MTT cho thấy tỉ lệ tế bào sống trong các nhóm AST-EX 0,5-10 µg/ml dao động trong khoảng 93,64 ± 8,79% tới 104,27 ± 7,64% và không có sự khác biệt tỉ lệ tế bào sống giữa các nhóm thí nghiệm và giữa ủ AST-EX 1 ngày hoặc 2 ngày. Kết quả này phù hợp với kết quả quan sát bằng kính hiển vi. Dựa theo tiêu chuẩn ISO 10993-5, tỉ lệ RBG lớn hơn 70% là dung dịch không gây độc với tế bào (hình 3. 9, bảng 3. 2). Do đó, AST-EX nồng độ 0,5-10 µg/ml không gây độc cho tế bào. Kết quả này tương tự như kết quả của Chintong và cộng sự. Chintong và cộng sự đã xác định AST nồng độ dưới 160 µg/ml không gây độc cho tế bào [119].

3.6. Tăng sinh

Tế bào nguyên bào sợi người (hF) được nuôi trong môi trường bổ sung AST-EX 0,5-10 µg/ml để đánh giá tác động của hF lên sự tăng trưởng tế bào. Đối chứng âm sử dụng là môi trường cơ bản bổ sung 0,2% DMSO.

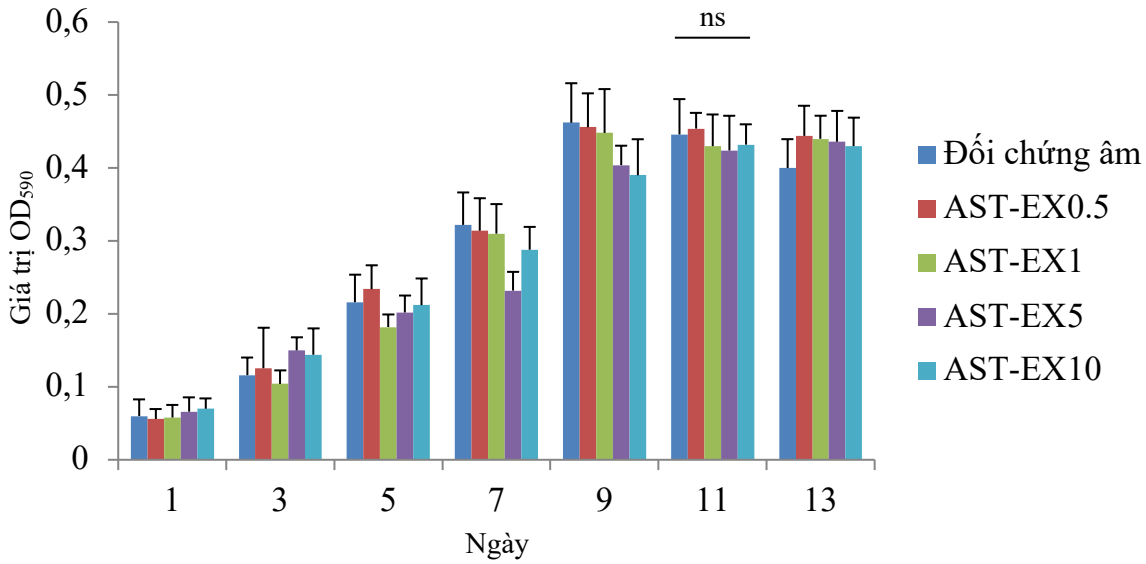
Kết quả đo OD_{590} cho thấy tế bào trong nhóm đối chứng âm tăng sinh mạnh trong giai đoạn từ ngày 1 tới ngày 9, đạt đỉnh trong ngày 9 và duy trì tới ngày 11, sau đó suy giảm ở ngày 13. Thời gian tăng sinh thế hệ (doubling time, DT) là 49,3 ± 3,1 giờ. Kết quả này tương tự với kết quả của Moulin và cộng sự, thời gian tăng sinh thế hệ nguyên bào sợi người từ 32-68 giờ, trung bình là 47 giờ và thay đổi tùy theo người hiến [120].

Tế bào trong nhóm xử lý AST-EX 0.5-10 µg/ml đều đạt mật độ đỉnh vào ngày 11, tuy nhiên, có sự khác biệt về thời gian tăng sinh thế hệ giữa tế bào nuôi trong nồng độ 0,5, 1, 1,5, 5 µg/ml so với nồng độ 10 µg/ml (hình 3.10). Tế bào trong nhóm xử lý AST-EX 0,5, 1, 1,5, 5 µg/ml có mật độ tối đa và thời gian tăng sinh thế hệ tương tự như tế bào trong môi trường đối chứng. Trong khi đó, tế bào trong nhóm xử lý với AST-EX 10 µg/ml có thời gian tăng sinh chậm hơn (bảng 3.3).

Khi so sánh giữa tế bào trong nhóm AST-EX0,5, AST-EX1, AST-EX1,5, AST-EX5 và nhóm ĐC âm thì thấy rằng tế bào trong những nhóm này tương tự nhau về mật độ tối đa, tốc độ tăng sinh. Tuy nhiên, tế bào nguyên bào sợi người hF trong nhóm ĐC âm có xu hướng giảm dần sau ngày 13. Trong giếng nuôi tế bào, những tế bào bắt đầu bong lên khỏi bề mặt nuôi cấy ở ngày này. Điều này có thể là do hiện tượng apoptosis xảy ra trong nuôi cấy tế bào khi mật độ tế bào đạt đỉnh tăng trưởng. Đối với tế bào trong nhóm AST-EX0,5, AST-EX1, AST-EX1,5 và AST-EX5 thì hiện tượng này

không được phát hiện. Giá trị OD_{590} giữa các nhóm trên trong ngày 9, 11, 13 không có sự khác biệt về mặt thống kê. Điều này có thể giải thích là hiện tượng apoptosis được tiến hành theo nhiều cơ chế, trong đó có con đường theo gốc oxy hóa và AST-EX có khả năng hấp thụ các gốc oxy hóa này nên thời gian tồn tại khi mật độ 100% dài hơn so với nhóm đối chứng.

Kết quả này khẳng định AST-EX 0,5-5 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 ngày nuôi cấy.

(ns: Giá trị OD590 giữa các nhóm trong ngày 11 là không khác biệt về thống kê (p>0.05))

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

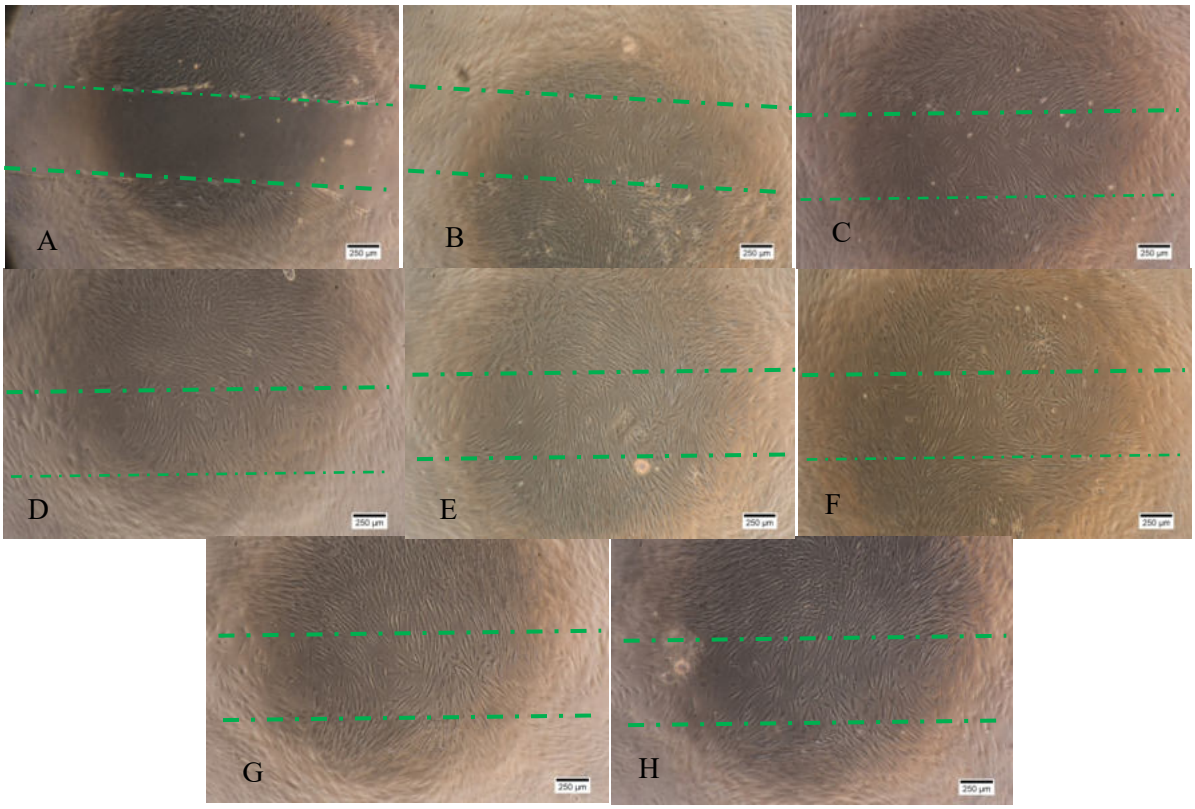
(a, b: sự khác biệt về mặt thống kê, p<0.05)

	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]
AST-EX10	58,8 ± 4,7[b]

3.7. Di cư

Tác động của AST-EX lên sự di cư của nguyên bào sợi được đánh giá dựa trên mô hình Wound-Scratch Assay. Tế bào nguyên bào sợi người hF được nuôi đạt mật độ

100% diện tích bề mặt nuôi cấy, sau đó tạo vết rạch trên bề mặt đĩa nuôi để tế bào di chuyển vào vết rạch. Xác định tỉ lệ diện tích bao phủ của tế bào sẽ đánh giá được hiệu quả của AST-EX trong việc hỗ trợ tế bào di chuyển.

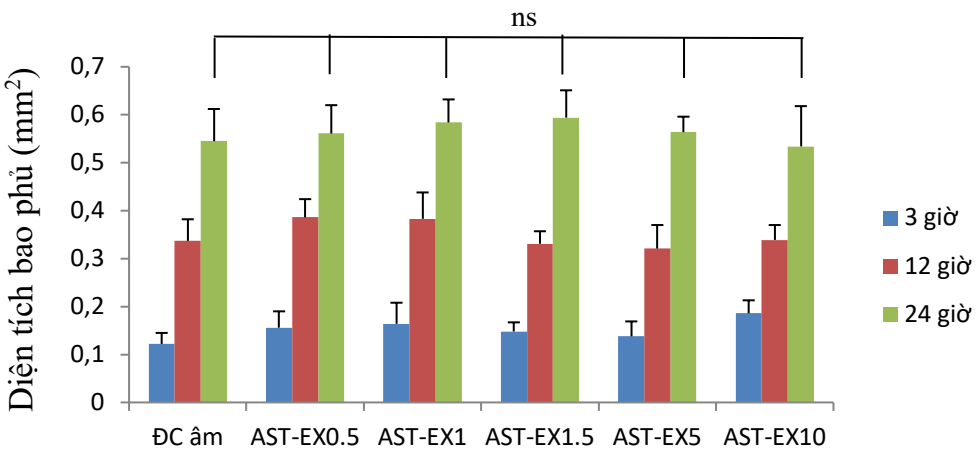


Hình 3. 11. Kết quả thử nghiệm di cư của hF dưới tác động của AST-EX 0,5-10 µg/ml.

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 quan sát di cư tế bào cho thấy tế bào bắt đầu di chuyển vào bên trong vết rạch sau 3 giờ nuôi cấy. Hiện tượng này xuất hiện trong tất cả các nhóm bao gồm nhóm đối chứng âm và nhóm thí nghiệm AST-EX0,5-AST-EX10. Sau 12 giờ, tế bào xâm nhập nhiều hơn và sâu hơn vào vị trí vết rạch và chiếm khoảng 40-50% diện tích vết rạch. Sau 24 giờ, tế bào tiếp tục di chuyển vào vị trí vết rạch, diện tích bao phủ tăng lên khoảng 71-79% diện tích vết rạch (hình 3. 11, 3. 12 và bảng 3. 4).

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 µm/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 di cư.

(ns: diện tích bao phủ các nhóm sau 24 giờ không khác biệt về mặt thống kê (p>0.05))

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

(ns: sự khác biệt về mặt thống kê trong cùng 1 cột, (p<0.05))

	3 giờ	12 giờ	24 giờ
ĐC âm	16,3 ± 3,1^{ns}	44,9 ± 6,0^{ns}	72,3 ± 8,9^{ns}
AST-EX0,5	20,8 ± 4,5^{ns}	51.5 ± 5,1^{ns}	74,8 ± 7,9^{ns}
AST-EX1	21,9 ± 5,9^{ns}	51,1 ± 7,3^{ns}	77,9 ± 6,4^{ns}
AST-EX1,5	19,7 ± 3,5^{ns}	44,1 ± 3,5^{ns}	79,2 ± 7,6^{ns}
AST-EX5	18,4 ± 6,5^{ns}	42,8 ± 6,5^{ns}	75,2 ± 4,3^{ns}
AST-EX10	24,8 ± 4,1^{ns}	45,2 ± 4,1^{ns}	71,2 ± 11,2^{ns}

3.8. Khảo sát quy trình gây lão hóa tế bào bằng H_2O_2

Hydrogen peroxide là chất có khả năng gây oxy hóa mạnh thường được sử dụng để tạo mô hình lão hóa tế bào. Mặc dù nồng độ 200 µM, thời gian xử lý 120 phút thường được sử dụng để tạo mô hình lão hóa trên tế bào nhưng quy trình gây lão hóa tế bào bằng H_2O_2 cũng biến đổi tùy theo dòng tế bào nguyên bào sợi [121, 122]. Do đó

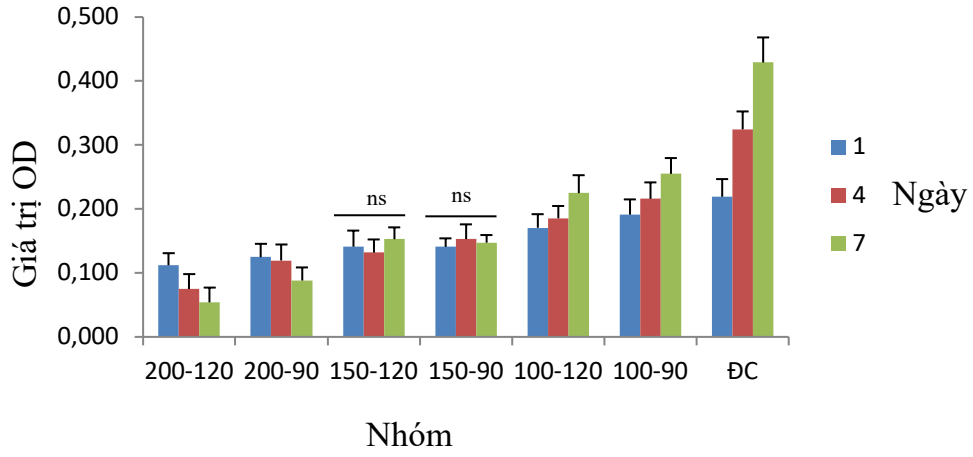
bước này được tiến hành nhằm tìm quy trình gây lão hóa phù hợp với tế bào hiện đang sử dụng bằng cách biến đổi quy trình thường sử dụng.

Tế bào được cấy vào đĩa nuôi cấy đạt mật độ bao phủ 80-85%. Sau 24 giờ, chuyển thành môi trường nuôi cấy bổ sung 0,2% DMSO. Sau 24 giờ, thay môi trường bổ sung DMSO bằng môi trường có bổ sung H_2O_2 ở các nồng độ 100, 150, 200 hoặc 250 µM, mỗi nồng độ chia thành 2 khoảng thời gian xử lý là 90 phút và 120 phút. Sau thời gian xử lý, cấy tế bào vào đĩa 96 giếng để tiến hành những đánh giá tiếp theo để xác định quy trình xử lý tối ưu. Những đánh giá này bao gồm:

- Sự tăng trưởng tế bào trong đĩa 96 giếng (bằng phương pháp MTT)
- Biểu hiện marker lão hóa tế bào senescence-associated β-galactosidase (SA-gal)

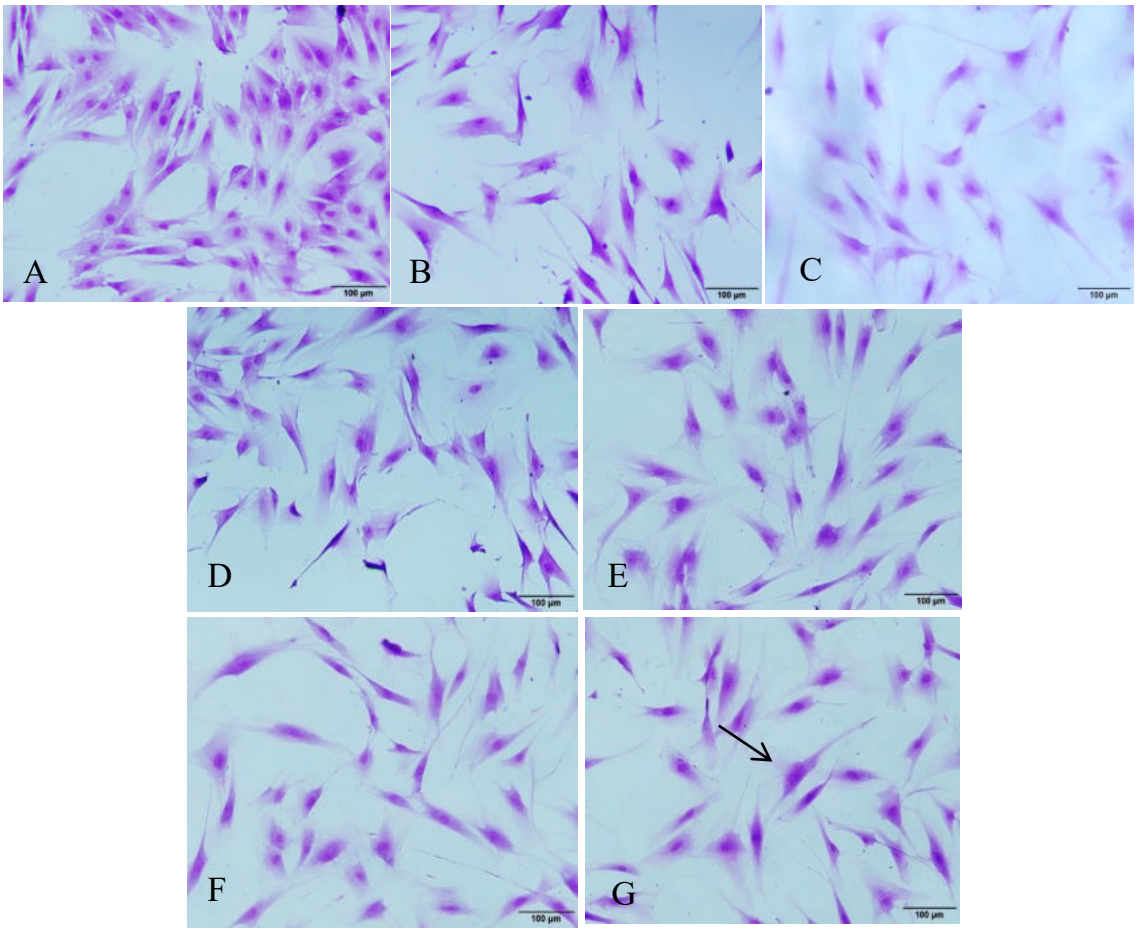
3.8.1. Kết quả khảo sát sự tăng trưởng tế bào

Để đánh giá sự tăng trưởng tế bào, tế bào sau khi xử lý với H_2O_2 được cấy vào đĩa nuôi mới với mật độ tế bào sống chiếm 50% diện tích bề mặt nuôi cấy. Sau đó, sự tăng sinh tế bào được đánh giá bằng phương pháp MTT ở ngày 1, 4, 7 sau khi cấy. Đồng thời, hình dạng tế bào được ghi nhận bằng phương pháp nhuộm Giemsa.



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

(**ns**: không khác biệt về mặt thống kê giá trị OD_{590} giữa ngày 1, 4, 7 trong cùng 1 nghiệm thức và giữanồng độ H_2O_2, $p>0.05$)



Hình 3. 14. Sự biến đổi hình dạng tế bào hF khi xử lý với H_2O_2 ngày 4 (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

Kết quả cho thấy sau khi cấy tế bào vào đĩa nuôi mới, tế bào hF trong nhóm đối chứng bám tốt vào bề mặt nuôi cấy, tế bào trải trong vòng 12 giờ sau khi cấy và tăng trưởng. Trong khi đó, tế bào xử lý với H_2O_2 có tỉ lệ lớn tế bào không bám vào bề mặt nuôi cấy. Sau 1 ngày nuôi cấy, nhiều tế bào không trải trên bề mặt nuôi cấy. Giá trị OD_{590} ngày 1 khác nhau giữa các nhóm mặc dù mật độ tế bào sống ban đầu đưa lên là như nhau. Điều này cho thấy một lượng lớn tế bào không bám trải được trên bề mặt nuôi cấy. Sau 4 ngày, nhiều tế bào hình dạng bất thường xuất hiện trong chai nuôi: nhân và tế bào chất phình to, nhiều tế bào phình theo chiều dọc hoặc chiều ngang hoặc cả hai hướng. Đồng thời, một số tế bào xuất hiện nhiều nhánh, hình dạng như tế bào hình sao (hình 3.14). Trong tất cả các giếng tế bào thuộc nhóm xử lý với H_2O_2 đều xuất hiện những tế bào hình dạng như trên. Từ ngày 4 tới ngày 7, tế bào trong nhóm H_2O_2 nồng độ 200 µM giảm dần đối với thời gian xử lý 120 phút và 90 phút, phần lớn tế bào dạng bất thường về hình dạng, phần còn lại là dạng co tròn. Tế bào trong nhóm H_2O_2 nồng độ 150 µM duy trì ổn định trong cả 2 nhóm thời gian xử lý 120 phút và 90

phút. Trong khi đó, tế bào trong nhóm xử lý H_2O_2 nồng độ 100 µM có sự tăng sinh chậm, trong đó tế bào trong nhóm xử lý 90 phút có giá trị OD_{590} ngày 7 cao hơn so với nhóm xử lý 120 phút (hình 3. 13).

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

Senescence associated β-galactosidase (SA-gal) là marker đặc trưng cho sự biểu hiện của sự lão hóa tế bào. SA-gal biểu hiện ổn định ở pH=6 trong tế bào lão hóa. Enzyme SA-gal sẽ biến đổi X-gal (dung dịch màu vàng) thành 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo – 2 dạng không tan màu xanh dương. Do đó, tế bào biểu hiện SA-gal sẽ có màu xanh, trong khi tế bào âm tính SA-gal sẽ trong suốt không màu.

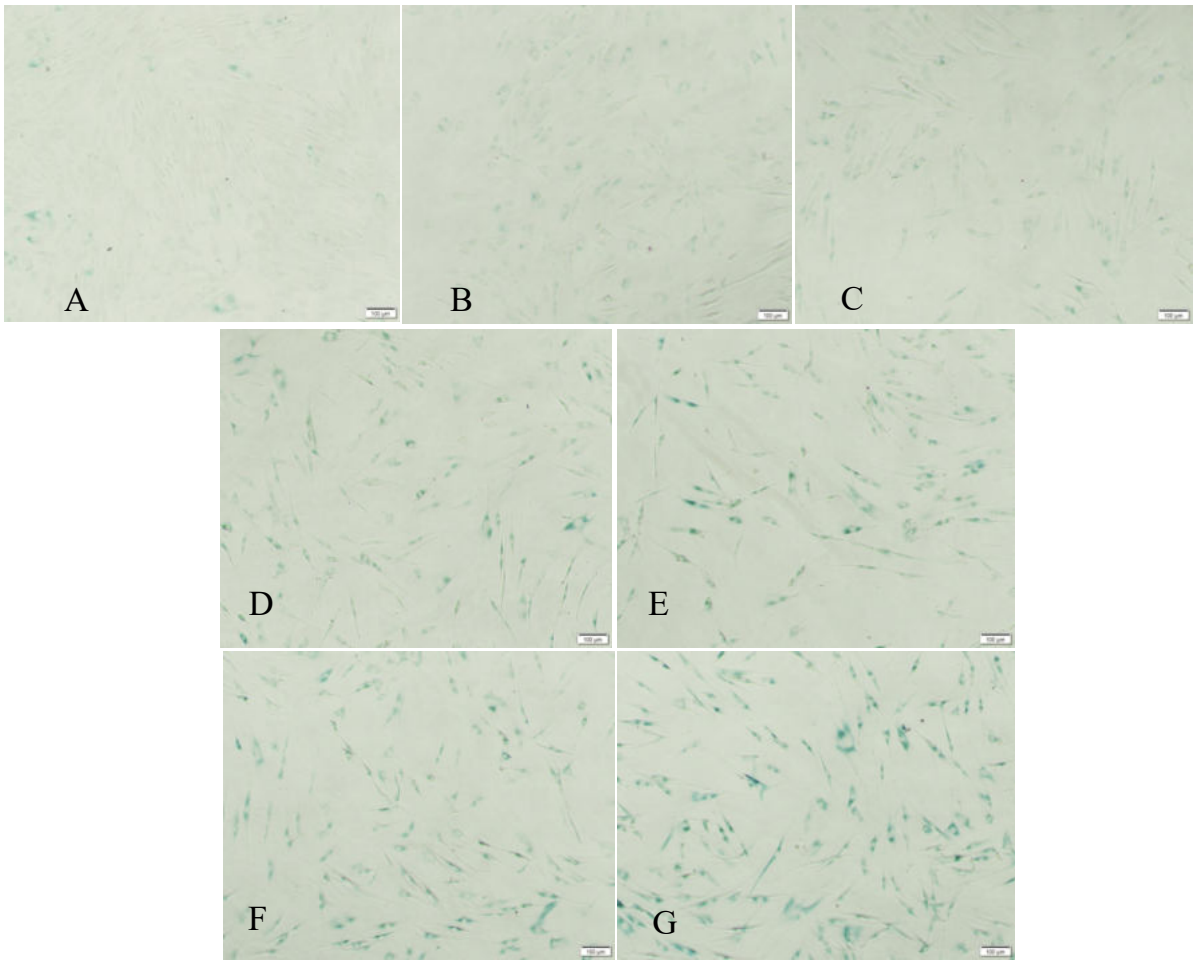
Kết quả đánh giá cho thấy tế bào biểu hiện SA-gal nhiều trong nhóm tế bào xử lý với H_2O_2 ở các nồng độ khác nhau. Đối với tế bào dương tính với SA-gal, vùng tế bào chất xung quanh nhân được nhuộm xanh, màu xanh này không phát hiện trong nhân và vùng không gian giữa các tế bào. Điều này phù hợp với tính chất SA-gal có hoạt tính trong tế bào chất của tế bào lão hóa. Để đánh giá tác động của H_2O_2 lên sự biểu hiện SA-gal trong tế bào, số lượng tế bào dương tính với SA-gal được đếm ngẫu nhiên trên các vùng trong giếng nuôi cấy. Kết quả cho thấy tế bào trong nhóm xử lý H_2O_2 200 µM biểu hiện SA-gal cao nhất: 72,03 ± 6,73%, 74,99 ± 7,29% tương ứng với thời gian xử lý 90 phút và 120 phút. Tế bào trong nhóm xử lý H_2O_2 150 µM biểu hiện SA-gal tương đương với nhóm 200 µM ($p>0.05$), tỉ lệ 65,25 ± 8,97%, 70,73 ± 8,31% tương ứng với thời gian xử lý 90 phút và 120 phút. Nhóm biểu hiện thấp nhất là nhóm xử lý H_2O_2 100 µM là 47,14 ± 8,48%, 51,44 ± 11,79% tương ứng với thời gian xử lý 90 phút và 120 phút. Trong khi nhóm đối chứng: tế bào được nuôi trong môi trường nuôi cấy biểu hiện SA-gal chỉ 4,60 ± 1,52%.

Kết quả này cho thấy H_2O_2 làm gia tăng sự biểu hiện marker đặc trưng cho sự lão hóa tế bào ở nguyên bào sợi và hiệu quả phụ thuộc vào nồng độ sử dụng (bảng 3.5, hình 3.15).

Bảng 3. 5. Tỉ lệ tế bào dương tính với SA-gal khi xử lý với H_2O_2

($^{a, b, c}$: Sự khác biệt về mặt thống kê, $p<0.05$)

Nhóm	ĐC	100-90	100-120	150-90	150-120	200-90	200-120
Tỉ lệ dương tính SA-gal	4,60 ± 1,52^a	47,14 ± 8,48^b	51,44 ± 11,79^b	65,25 ± 8,97^c	70,73 ± 8,31^c	72,03 ± 6,73^c	74,99 ± 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

Hydroxy peroxide (H_2O_2) là chất gây oxy hóa mạnh, nó có thể gây biến tính các thành phần tế bào mà nó tiếp xúc như protein, phospholipid. Khi tiếp xúc với nhân tế bào, H_2O_2 phá hủy những cấu trúc DNA, gây đột biến tế bào. Đồng thời, H_2O_2 tác động lên tế bào làm gia tăng nồng độ các gốc oxy hóa nội bào, làm gia tăng tác hại của

H_2O_2[123]. Khi bị tác động bởi các gốc oxy hóa, tế bào sẽ tiến hành cơ chế sửa sai nhằm phục hồi lại chức năng tế bào. Tuy nhiên, khi tổn thương lớn có thể dẫn tới hiện tượng lão hóa tế bào hoặc apoptosis. Hiện tượng lão hóa trong trường hợp này là 1 phản ứng của tế bào nhằm ngăn chặn tác hại của H_2O_2, hạn chế hình thành tế bào ung thư [124]. Tác động của H_2O_2 tùy thuộc vào nồng độ, thời gian và khả năng chống chọi của tế bào. Khi xử lý với H_2O_2, dòng nguyên bào sợi phổi MRC-5 và nguyên bào sợi da tai H8F2p25LM có giá trị IC_{50} rất khác nhau, lần lượt là 528 và 33,5 µM [125]. Đối với nguyên bào sợi, quy trình thường được sử dụng là 200 µM [126]. Tuy nhiên, để tối ưu cho nghiên cứu, chúng tôi tiến hành gia giảm thời gian xử lý để tạo quy trình tối ưu đối với dòng nguyên bào sợi đang sử dụng.

Dựa trên lý thuyết trên, tiêu chí để chọn lựa quy trình xử lý H_2O_2 tối ưu là: tế bào không tăng sinh sau khi xử lý và tỉ lệ tế bào biểu hiện SA-gal cao.

Trong nghiên cứu ban đầu có tiến hành xử lý hF với nồng độ 250 µM, tỉ lệ tế bào bám ngày 1 rất ít, sau đó tế bào không tăng sinh, nhiều tế bào trở nên co tròn tróc khỏi bề mặt nuôi cấy. Do đó, thí nghiệm này bị loại ngay từ những khảo sát ban đầu, không tiến hành MTT để đánh giá sự tăng sinh tế bào. Đối với nồng độ 200 µM, sau 7 ngày nuôi cấy tế bào chết dần. Điều này dẫn tới giả thuyết là nồng độ 250 và 200 µM cao vượt ngưỡng chịu đựng của tế bào, biểu hiện là tế bào chết ngay sau khi xử lý hoặc chết từ từ trong quá trình nuôi cấy sau đó. Đối với nhóm tế bào xử lý 100 µM, tế bào sau đó vẫn tiếp tục tăng trưởng nhưng với tốc độ chậm, sự biểu hiện SA-gal thấp hơn so với các nhóm còn lại. Điều này cho thấy nồng độ 100 µM chưa phải là nồng độ tối ưu trong nghiên cứu này. Do đó, nồng độ 150 µM, thời gian xử lý 90 phút và 120 phút đều phù hợp với tiêu chí đề ra. Trong đó, thời gian xử lý 90 phút cho kết quả tương tự như thời gian xử lý 120 phút nên nồng độ H_2O_2 150 µM và thời gian xử lý 90 phút được chọn làm quy trình gây lão hóa cho các thí nghiệm sau.

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

Để đánh giá hiệu quả của AST-EX trong việc bảo vệ tế bào hF khỏi tác động của H_2O_2, tế bào hF được nuôi trong môi trường bổ sung AST-EX ở nhiều nồng độ 24 giờ trước khi xử lý với H_2O_2 150 µM trong 90 phút. Sau khi xử lý với H_2O_2, tế bào hF được cấy ra giếng nuôi tế bào để tiến hành đánh giá quá trình lão hóa ở từng nhóm thí nghiệm. Các đánh giá được tiến hành:

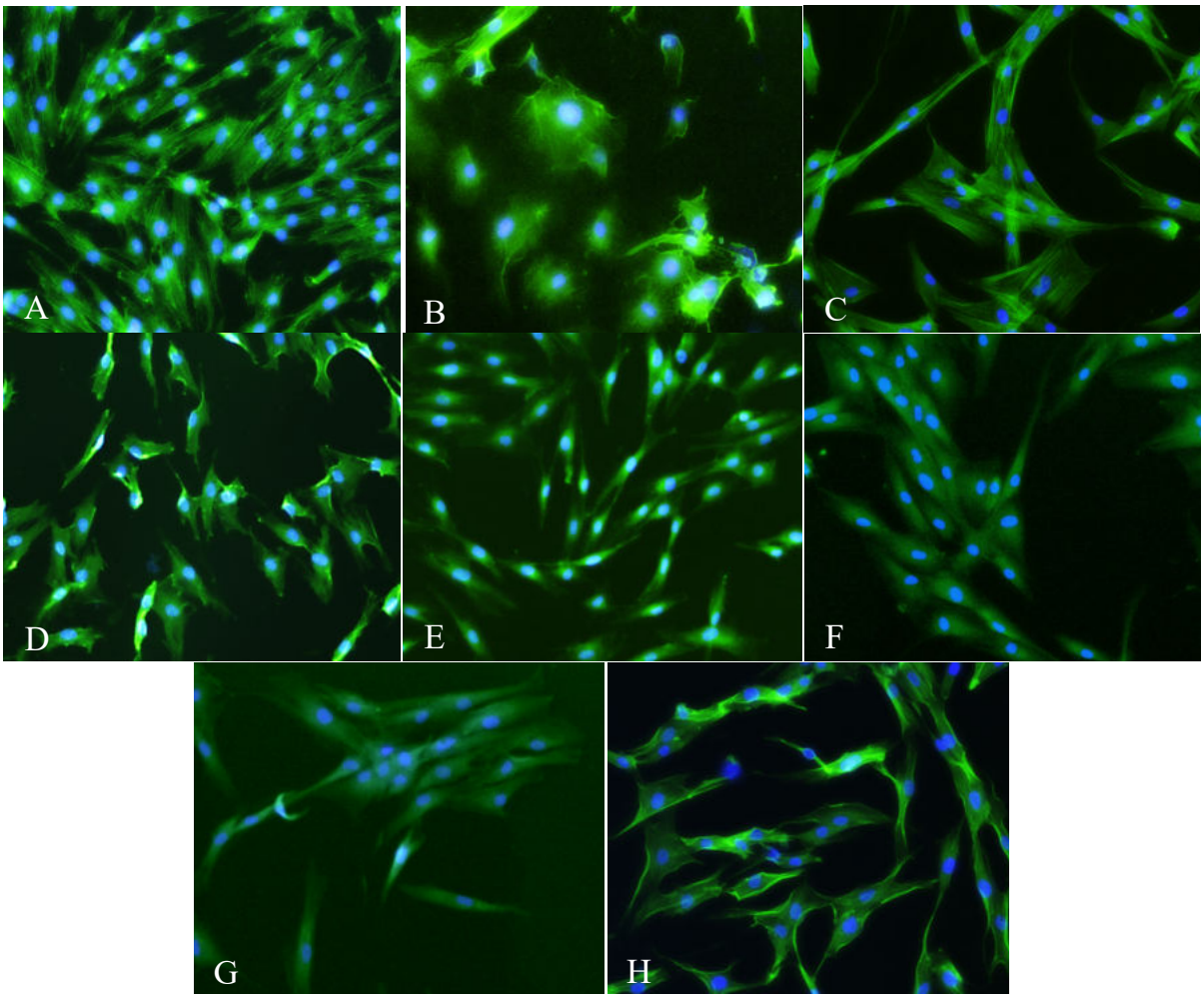
- Diện tích tế bào: đối với nồng độ AST-EX 0,5, 1, 1,5, 5, 10 và TM10
- Sự biểu hiện SA-gal: đối với nồng độ AST-EX 0,5, 1, 1,5, 5, 10 và TM10
- Sự tăng sinh tế bào: đối với nồng độ AST-EX 0,5, 1, 1,5, 5, 10 và TM10
- Sự biểu hiện mức độ phiên mã p53, p16, p21, MMP1, MMP3, collagen, elastin: đối với nồng độ AST-EX 0,5, 1, 1,5 và TM1.5
- Sự biểu hiện mức độ phiên mã collagen, elastin: đối với nồng độ AST-EX 0,5, 1, 1,5 và TM1,5

Sự biểu hiện mức độ protein CDK, cyclin D1: đối với nồng độ AST-EX 1

3.9.1. Kết quả đánh giá diện tích tế bào

Khi bị tác động bởi H_2O_2, tế bào lão hóa có xu hướng gia tăng diện tích nhân và tế bào chất. Do đó, diện tích tế bào là một trong những yếu tố cần khảo sát để đánh giá hiệu quả bảo vệ tế bào. Diện tích tế bào được đánh giá bằng phương pháp nhuộm kép Hoechst/phalloidin. Hoechst là thuốc nhuộm nhân phát huỳnh quang màu xanh. Phalloidin là peptide vòng đôi có khả năng liên kết với sợi protein actin trong khung tế bào động vật. Phalloidin được cố định với chất phát quanh màu xanh lá Alexa Flour^{TM} 488. Diện tích nhân được xác định bằng thiết bị Cytell, diện tích tế bào chất được xác định bằng phần mềm ImageJ.

Kết quả cho thấy tế bào nguyên bào sợi dưới tác động của H_2O_2 trở nên dẹp hơn, phình to ra theo 2 chiều: chiều dọc, chiều ngang. Sự phình to này không chỉ diễn ra ở vùng tế bào chất mà còn xuất hiện trong vùng nhân tế bào, tuy nhiên tỉ lệ gia tăng diện tích tế bào chất cao hơn tỉ lệ gia tăng diện tích nhân, điều này dẫn tới tỉ lệ diện tích tế bào chất/nhân tăng cao đối với tế bào bị tác động bởi H_2O_2. Hiện tượng gia tăng diện tích tế bào thấy rõ nhất sau khi xử lý H_2O_2 4 ngày. Diện tích tế bào nhóm H_2O_2 trở nên gấp gần 4 lần so với nhóm đối chứng. Hiện tượng này diễn ra là do khi bị H_2O_2 tổn thương tới DNA, tế bào dừng phân chia nhưng vẫn tiếp tục trao đổi chất, điều này dẫn tới tế bào phình to về diện tích [127].



Hình 3. 16. Kết quả nhuộm Hoechst/phaloidin tế bào xử lý với AST-EX và H_2O_2.

A, B, C, D, E, F, G, H: Lần lượt là các nhóm Đối chứng, H_2O_2, AST-EX0,5, 1, 1,5, 5, 10 và TM10

Đối với tế bào trong nhóm AST-EX, diện tích tế bào tăng lên so với nhóm đối chứng, tuy nhiên diện tích tế bào vẫn thấp hơn so với nhóm xử lý H_2O_2 ($p<0.05$). Đồng thời, tế bào xử lý AST thương mại (nhóm TM) có sự suy giảm diện tích tế bào chất, diện tích nhân so với nhóm H_2O_2, tuy nhiên, vẫn cao hơn so với nhóm AST-EX cùng nồng độ 10 µg/ml (hình 3.16, bảng 3.6).

Kết quả này cho thấy H_2O_2 làm biến đổi hình dạng tế bào: tế bào dẹp, phình to tế bào chất và nhân, trong khi đó AST-EX 1-10 µg/ml hạn chế được hiện tượng này.

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 với $p<0.05$)

	ĐC	H_2O_2	AST-EX0,5	AST-EX1	AST-EX1,5	AST-EX5	AST-EX10	TM10
Diện tích tế bào (μm^2)	2430,9 ± 212,6^a	10527,25 ± 3798,1^b	3919,2 ± 1172,2^c	3102,7 ± 1172,2^d	3065,8 ± 393,8^d	3193,2 ± 393,8^d	3153,1 ± 393,8^d	3868,9 ± 345,8^{cd}
Diện tích nhân (μm^2)	224,8 ± 21.4^a	383,3 ± 93,7^b	293,9 ± 27,1^c	255,4 ± 42,0^a	216,3 ± 43,5^a	246,2 ± 41,6^a	251,1 ± 38,4^a	285,2 ± 24,5^c
Tỉ lệ tế bào/nhân	11,8 ± 2.1	17,1 ± 1,6	13,2 ± 4,0	12,3 ± 2,6	14,9 ± 4,3	13,2 ± 2,0	12,8 ± 1,9	13,6 ± 4,4

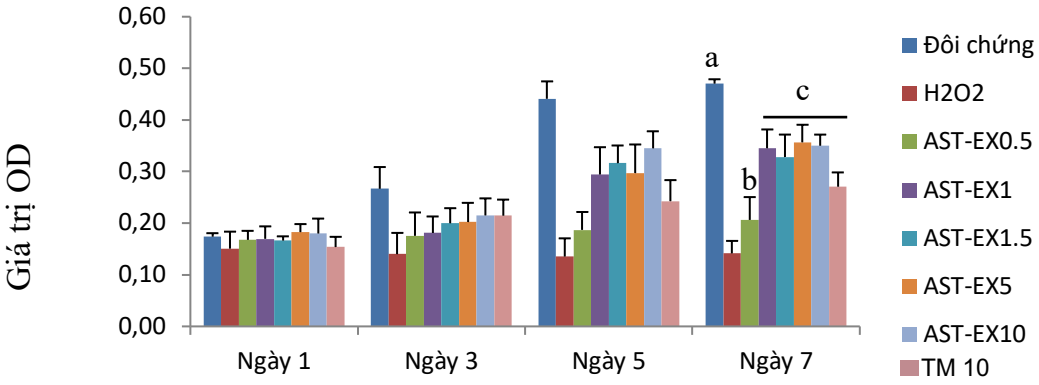
3.9.2. Kết quả đánh giá sự tăng sinh tế bào

Tế bào lão hóa bởi H_2O_2 sẽ bị dừng chu kỳ tế bào, tế bào không tăng sinh. Do đó, khả năng tăng sinh chính là một trong những tiêu chí đánh giá khả năng bảo vệ tế bào khỏi tác nhân gây oxy hóa (hình 3.17 và bảng 3.7).

Kết quả thử nghiệm quy trình lão hóa H_2O_2 cho thấy tế bào không tăng sinh sau 7 ngày. Trong nghiên cứu này, tế bào được nuôi trong môi trường bổ sung AST-EX nồng độ 0,5-10 µg/ml trong 1 ngày trước khi xử lý H_2O_2. Sự tăng sinh tế bào được đánh giá bằng phương pháp MTT.

Kết quả cho thấy tế bào hF vẫn tăng sinh tốt trong môi trường đối chứng và đạt đỉnh ở ngày 5. Đối với tế bào trong nhóm chỉ xử lý H_2O_2, tế bào dường như không tăng trưởng. Đối với tế bào được xử lý với AST-EX nồng độ 0,5-10 µg/ml, kết quả cho thấy có sự tăng trưởng mật độ tế bào, đặc biệt vào ngày cuối của đợt đánh giá là ngày 7. Tuy nhiên, giá trị OD của tất cả các nhóm vẫn thấp hơn so với nhóm tế bào đối chứng và thời gian nhân đôi cũng dài hơn ($p<0.05$). Đồng thời, so sánh giữa các nhóm xử lý với AST-EX và nhóm TM cho thấy thời gian nhân đôi của nhóm AST-EX 1, 1,5, 5, 10 và TM bằng nhau, đều thấp hơn AST-EX0,5 ($p<0.05$).

Điều này cho thấy H_2O_2 đã ức chế sự tăng sinh tế bào, việc xử lý tế bào với AST-EX trước khi xử lý với H_2O_2 đã phần nào giúp tế bào duy trì khả năng tăng sinh mặc dù không đạt được mức ban đầu. Tế bào trong nhóm TM vẫn duy trì được khả năng tăng sinh mặc dù thấp hơn so với nhóm AST-EX



Hình 3. 17. Biểu đồ biểu thị sự tăng sinh tế bào xử lý với AST-EX và H_2O_2.

($^{a, b, c}$: Sự khác biệt về mặt thống kê giữa các nhóm trong cùng một ngày với $p<0.05$)

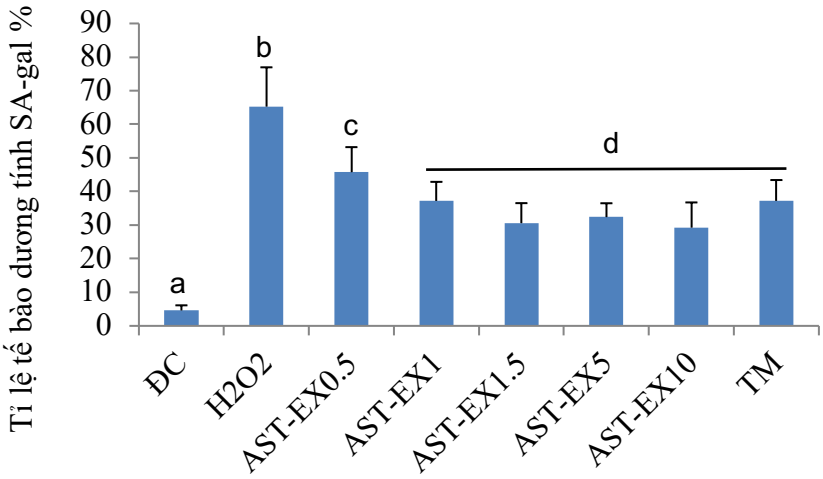
Bảng 3. 7. Thời gian nhân đôi của tế bào xử lý AST-EX và H_2O_2

($^{a, b, c}$: Sự khác biệt về mặt thống kê trong cùng 1 cột với $p<0.05$)

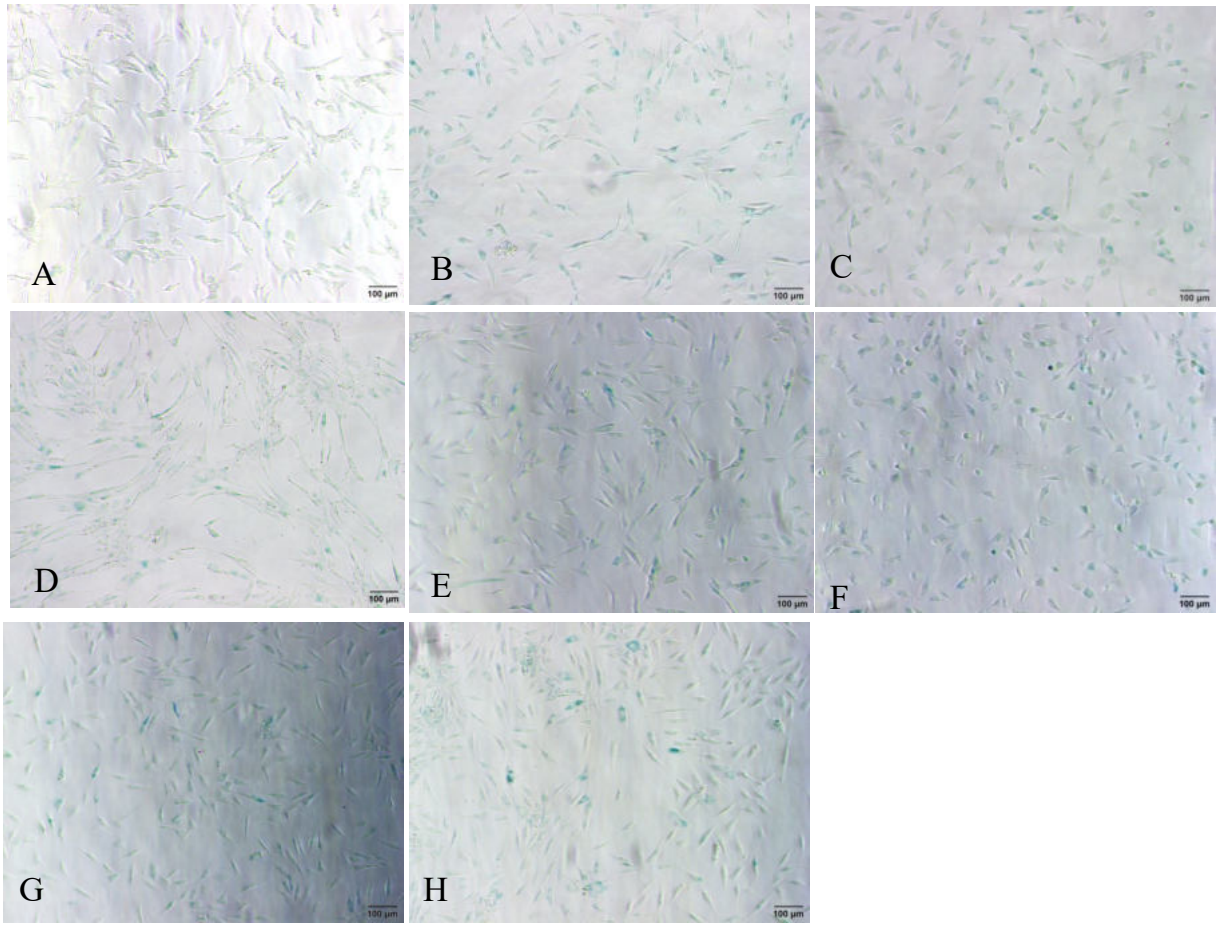
	Doubling time
ĐC âm	68,08 ± 2,06^{a}
H_2O_2	Không tăng trưởng
AST-EX0,5	572,51 ± 258,18^{b}
AST-EX1.0	198,57 ± 46,68^{c}
AST-EX1,5	199,88 ± 64,36^{c}
AST-EX5	215,09 ± 57,29^{c}
AST-EX10	213,23 ± 50,01^{c}
TM10	269,53 ± 102,78^{c}

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

Kết quả cho thấy nhóm tế bào trong nhóm đối chứng biểu hiện tỉ lệ dương tính thấp nhất (4,60 ± 1,52%), tế bào trong nhóm xử lý với H_2O_2 biểu hiện tỉ lệ tế bào dương tính cao nhất (65,25 ± 11,70%), kết quả này gần với kết quả của Varma và cộng sự. Ông đã tiến hành gây lão hóa bằng H_2O_2 10 µM trong 1 giờ, sau 24 giờ 80% tế bào biểu hiện dương tính với SA-gal [128].



Hình 3. 18. Biểu đồ biểu thị tỉ lệ tế bào dương tính với SA-gal



Hình 3. 19. Kết quả biểu hiện SA-gal tế bào trong nhóm thí nghiệm (x25).

A, B, C, D, E, F, G, H: lần lượt là các nhóm đối chứng, H_2O_2, AST-EX0,5, 1, 1,5, 5, 10 và TM10, scale bar = 100 µm

Kết quả này tương tự với kết quả thu được trong thí nghiệm đánh giá hiệu quả H_2O_2 tối ưu. Đối với tế bào được ủ trước với AST-EX 0,5-10 µg/ml và TM10, tỉ lệ tế bào dương tính các nhóm này lần lượt là 45,76 ± 7,4%, 37,19 ± 5,67%, 30,59 ± 5,94%,

32,39 ± 4,1%, 29,35 ± 7,50%, 37,2 ± 6,2%, các tỉ lệ này bằng nhau và thấp hơn so với nhóm H_2O_2 ($p<0.05$) (hình 3.18, 3.19).

Kết quả này cho thấy xử lý với AST-EX đã làm giảm sự biểu hiện của SA-gal đối với tế bào nguyên bào sợi. 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 H_2O_2

3.9.4. Kết quả đánh giá sự biểu hiện marker lão hóa p53, p21, p16 bằng phương pháp realtime PCR

Tổng kết các kết quả đánh giá tăng sinh, diện tích tế bào và biểu hiện SA-gal cho thấy AST-EX có hiệu quả trong việc giảm biểu hiện những dấu hiệu lão hóa đối với nguyên bào sợi. Tuy nhiên, trong các nồng độ được sử dụng trong nghiên cứu, AST-EX 0,5 µg/ml chưa thể hiện rõ ràng hiệu quả chống H_2O_2, trong khi đó nồng độ AST-EX 1 µg/ml tới 10 µg/ml có hiệu quả tương đương nhau trong các thí nghiệm đã được tiến hành. Ngoài ra, khi so sánh giữa nhóm AST-EX 10 µg/ml và nhóm TM 10 µg/ml cho thấy mặc dù hiệu quả AST-EX 10 µg/ml tốt hơn, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê. Do đó, chúng tôi tiếp tục tiến hành đánh giá hiệu quả bảo vệ tế bào của AST-EX nồng độ 0,5, 1, 1,5 µg/ml và so sánh với TM 1,5 µg/ml.

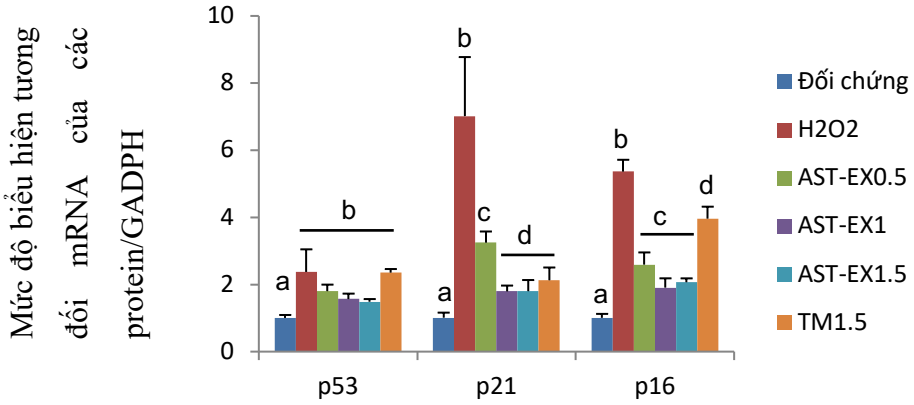
Marker lão hóa tế bào được đánh giá bao gồm: p53, p21, p16. Sự đồng biểu hiện p53/p21 là dấu hiệu cho thấy sự khởi đầu của lão hóa tế bào, sự biểu hiện của p16 là dấu hiệu cho thấy sự lão hóa vĩnh viễn. Những marker này được đánh giá bằng phương pháp realtime PCR. Kết quả định lượng mRNA bằng realtime PCR cho thấy sự gia tăng lượng mRNA của p53, p16 và p21 ở tế bào trong nhóm H_2O_2 (hình 3. 20).

Đối với p53, tế bào trong nhóm H_2O_2 (tăng 2,4 ± 0,6 lần) và tế bào nhóm AST-EX0,5, 1, 1,5 (tăng 1,8 ± 0,2, 1,6 ± 0,2, 1,5 ± 0,1 lần) và nhóm TM1,5 (tăng 2,4 ± 0,1 lần) đều có sự gia tăng biểu hiện so với nhóm đối chứng. Mặc dù biểu hiện tương đối của nhóm H_2O_2 cao hơn những nhóm còn lại nhưng lại không có sự khác biệt về mặt thống kê giữa các nhóm đối chứng và xử lý AST-EX, TM ($p>0.05$) (bảng 3. 8).

Đối với p21, tế bào trong nhóm H_2O_2 biểu hiện cao nhất (7,0 ± 1,8 lần so với tế bào trong nhóm đối chứng) và khác biệt đối với các nhóm còn lại, mức độ biểu hiện tiếp theo lần lượt AST-EX0,5 (tăng 3,2 ± 0,3 lần), TM1,5 (tăng 2,1 ± 0,4 lần), AST-EX

1 (tăng 1,8 ± 0,2 lần), AST-EX 1,5 (tăng 1,8 ± 0,3 lần). Tuy nhiên sự biểu hiện của 4 nhóm này không có sự khác biệt về mặt thống kê (p>0.05).

Đối với p16, sự biểu hiện tế bào trong nhóm H_2O_2 vẫn là cao nhất (5,4 ± 0,4 lần) và khác biệt thống kê với các nhóm còn lại. Mức biểu hiện tiếp theo là TM1,5 (4,0 ± 0,4 lần), cao hơn so với AST-EX0,5, 1, 1,5 (2,6 ± 0,4, 1,9 ± 0,3, 2,1 ± 0,1 lần) (p<0.05) và cả 3 đều cao hơn so với tế bào đối chứng (p<0.05).



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 H_2O_2

Kết quả nay cho thấy có sự gia tăng biểu hiện p53, p21, p16 ở tế bào xử lý với H_2O_2, tất cả các maker này đều biểu hiện mạnh và cao hơn so với đối chứng. Trong khi đó, nhóm tế bào xử lý với AST-EX và TM có sự gia tăng p53 tương đồng với H_2O_2 và giảm biểu hiện marker p21, p16. Trong đó, các tế bào trong nhóm AST-EX0,5, 1, 1.5 đều biểu hiện mRNA như nhau, tế bào nhóm TM biểu hiện p16 mạnh hơn các nhóm còn lại.

Bảng 3. 8. Tóm tắt sự biểu hiện tương đối mRNA của các gene 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_2O_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

p53 là nhân tố phiên mã, điều hòa tăng hoặc giảm sự biểu hiện của gene mục tiêu bằng cách liên kết vào vùng promoter hoặc tương tác với các nhân tố phiên mã khác như protein liên kết TATA. Fisher và đồng nghiệp đã cho rằng p53 có tới 3661

gene đích. Nhiều gene trong đó liên quan tới các hiện tượng trao đổi chất, tự thực bào, sửa chữa DNA, dừng chu kỳ tế bào. p53 điều hòa nhiều nhân tố khác để khởi đầu dòng thác tín hiệu lão hóa và ức chế chương trình apoptosis. Trong những nhân tố được điều hòa bởi p53 thì p21 là yếu tố quan trọng để hình thành quá trình lão hóa tế bào. Nhân tố phiên mã p21 là một thành viên của họ các chất ức chế CDK, vì vậy nó cần thiết cho sự dừng chu kỳ tế bào. Một khi được hoạt hóa, p21 tạo thành nhiều chức năng bao gồm vai trò biến đổi biểu hiện gene của nhiều gene đích như CDC25C, CDC25B. Tuy nhiên, vai trò quan trọng của p21 là kích thích lão hóa tế bào thông qua ức chế hiện tượng apoptosis. p21 có khả năng bám vào các tác nhân gây apoptosis như là các enzyme caspases. Những tế bào bất hoạt p21 dẫn tới kích thích apoptosis thông qua con đường caspases.

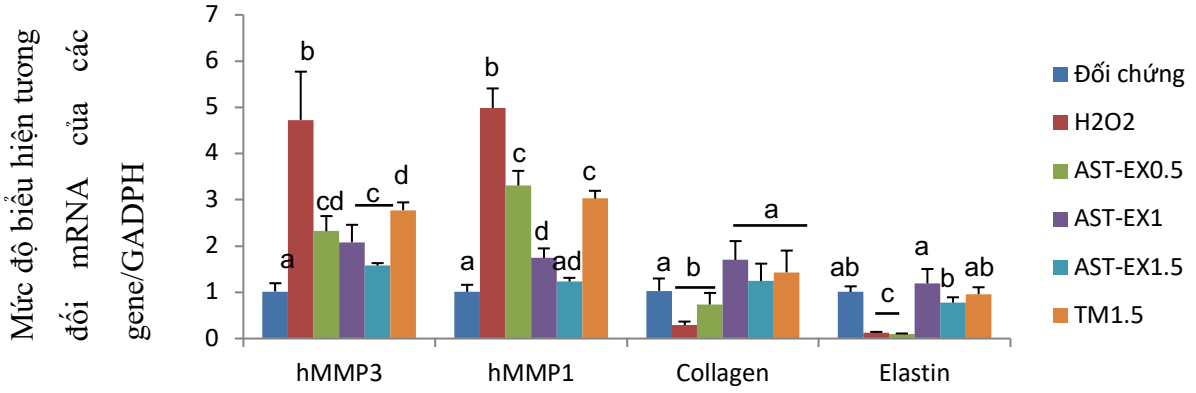
Trong khi con đường p53/p21 đóng vai trò quan trọng trong khởi đầu quá trình lão hóa tế bào thì con đường p16 và retinoblastoma (họ Rb) đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì quá trình lão hóa tế bào. Sau giai đoạn đầu, mức độ p53 giảm xuống trong khi p16 vẫn duy trì ở mức cao. Trong tế bào biểu hiện thấp p16, tế bào có thể quay lại quá trình tăng sinh, nhưng ở điều kiện mức độ p16 cao thì hiện tượng này không xảy ra. Do đó, sự hình thành p16 chính là ranh giới giữa 2 giai đoạn quá trình lão hóa là giai đoạn sớm được khởi đầu bởi p53 (chu kỳ tế bào có thể phục hồi) và giai đoạn chu kỳ tế bào không thể phục hồi, khởi đầu bởi p16.

Mặc dù phương pháp realtime-PCR chỉ đánh giá biểu hiện ở mức độ mRNA, tuy nhiên, đây là những marker điều hòa các con đường tín hiệu của tế bào nên sự biểu hiện của marker này phần nào cho thấy được tế bào biểu hiện những marker này cấp độ protein và 3 marker cũng biểu hiện cho thấy có sự lão hóa tế bào vĩnh viễn trong chai nuôi.

3.9.5. Kết quả đánh giá sự biểu hiện MMP3, MMP1, collagen, elastin [129]

Đối với MMP3, tế bào trong nhóm H_2O_2 biểu hiện mạnh mRNA so với đối chứng và cao hơn tất cả các nhóm còn lại ($p<0.05$). Mức độ biểu hiện lần lượt là TM1.5, tiếp theo là nhóm AST-EX0,5, AST-EX1, AST-EX1,5 ($p<0.05$).

Đối với MMP1, tế bào trong nhóm H_2O_2 biểu hiện mức độ cao mRNA so với nhóm đối chứng (gấp 5,0 lần) và cao hơn tất cả các nhóm còn lại ($p<0.05$). Mức độ biểu hiện ở nhóm AST-EX0,5 và TM1,5 cao hơn so với nhóm AST-EX1, AST-EX1,5.



Hình 3. 21. 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)

Bảng 3. 9. Sự biểu hiện tương đối mRNA MMP3, MMP1, collagen I, elastin trong thí nghiệm bảo vệ tế bào.

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

	Đối chứng	**H_2O_2**	**AST-EX0,5**	**AST-EX1**	**AST-EX1,5**	**TM1.5**
MMP3	$1,0 \pm 0,2^{a}$	$4,7 \pm 1,0^{b}$	$2,3 \pm 0,3^{cd}$	$2,1 \pm 0,4^{c}$	$1,6 \pm 0,1^{c}$	$2,8 \pm 0,2^{d}$
MMP1	$1,0 \pm 0,2^{a}$	$5,0 \pm 0,4^{b}$	$3,3 \pm 0,3^{c}$	$1,7 \pm 0,2^{d}$	$1,2 \pm 0,1^{ad}$	$3,0 \pm 0,2^{c}$
COL1A1	$1,0 \pm 0,3^{a}$	$0,3 \pm 0,1^{b}$	$0,7 \pm 0,3^{b}$	$1,7 \pm 0,4^{a}$	$1,2 \pm 0,4^{a}$	$1,4 \pm 0,5^{a}$
Elastin	$1,0 \pm 0,1^{ab}$	$0,1 \pm 0,0^{c}$	$0,1 \pm 0,0^{c}$	$1,2 \pm 0,3^{a}$	$0,8 \pm 0,1^{b}$	$1,0 \pm 0,1^{ab}$

Đối với collagen type 1A1, mức độ biểu hiện cao nhất là ở các nhóm AST-EX1, AST-EX1,5, TM1.5. Sự biểu hiện ở các nhóm này tương tự như với nhóm đối chứng ($p>0.05$). Hai nhóm có biểu hiện giống nhau và thấp là nhóm H_2O_2 và AST-EX0,5.

Đối với elastin, mức độ biểu hiện cao nhất ở nhóm AST-EX1, giảm dần ở nhóm TM, đối chứng và AST-EX1,5 trong đó AST-EX1 khác biệt về mặt thống kê so với AST-EX1,5. Tế bào 2 nhóm H_2O_2 và AST-EX0,5 biểu hiện thấp nhất, bằng 1/10 so với đối chứng ($p<0.05$) (hình 3. 21, bảng 3. 9).

Enzyme MMP-3 có tên khác stromelysin-1. Chức năng của MMP3 là phân hủy protein khuôn nền trong quá trình sinh lý bình thường như elastin, collagen II, proteoglycan, fibronectin, laminin. Enzme MMP-1 hay còn được gọi là fibroblast collagenase. Cả 2 đều được tổng hợp bởi nguyên bào sợi và tham gia quá trình tái cấu trúc mô. MMP3, MMP1 tổng hợp tăng cường bởi nguyên bào sợi da bị chiếu tia UV hoặc gặp trường hợp gốc oxy hóa. Năm 1997, Brenneisen và cộng sự đã chứng minh

H_2O_2 từ 25 µM – 500 µM cảm ứng sự tổng hợp mRNA MMP-1 sau 1 giờ tiếp xúc, và sự tổng hợp này vẫn còn được phát hiện sau đó 1 ngày, cao nhất là gấp 2,6 lần so với đối chứng [130]. Thí nghiệm với các chất gây stress oxy hóa khác trên nguyên bào sợi cũng phát hiện hiện tượng này. Claudila và cộng sự đã chứng H_2O_2 tác động lên tế bào biểu bì và làm gia tăng tổng hợp mRNA MMP3, MMP1 [131]. Trong nghiên cứu này, mức độ biểu hiện mRNA MMP1 cao hơn so với kết quả của Brenneisen, sự khác biệt có thể nằm ở chỗ là thời gian xử lý là 2 giờ so với Brenneisen và Brenneisen chỉ kiểm tra sự biểu hiện sau 1 ngày. Kết quả cho thấy nhóm AST-EX làm giảm sự biểu hiện mức mRNA ở trong tất cả các nhóm, trong đó AST-EX1 và 1,5 cho kết quả tốt nhất.

Collagen type 1A1 và elastin là những protein chính trong khuôn nền ngoại bào của da. Ngược với sự biểu hiện ổn định của MMP1, MMP3 trong tế bào xử lý với H_2O_2, sự biểu hiện collagen và elastin biến đổi theo thí nghiệm. Galicka năm 2014 đã chứng minh xử lý nguyên bào sợi bằng 300 µM sẽ làm giảm tổng hợp collagen 56% [132]. Kết quả cho thấy xử lý H_2O_2 làm tế bào giảm tổng hợp mRNA của collagen và elastin, đặc biệt là mRNA elastin giảm gần 10 lần. Kết quả tế bào được xử lý trước với AST-EX sau đó mới tiếp xúc với H_2O_2 có khả năng duy trì sự biểu hiện mRNA của cả 2 loại protein trên và nồng độ 1 µg/ml cho kết quả tốt nhất.

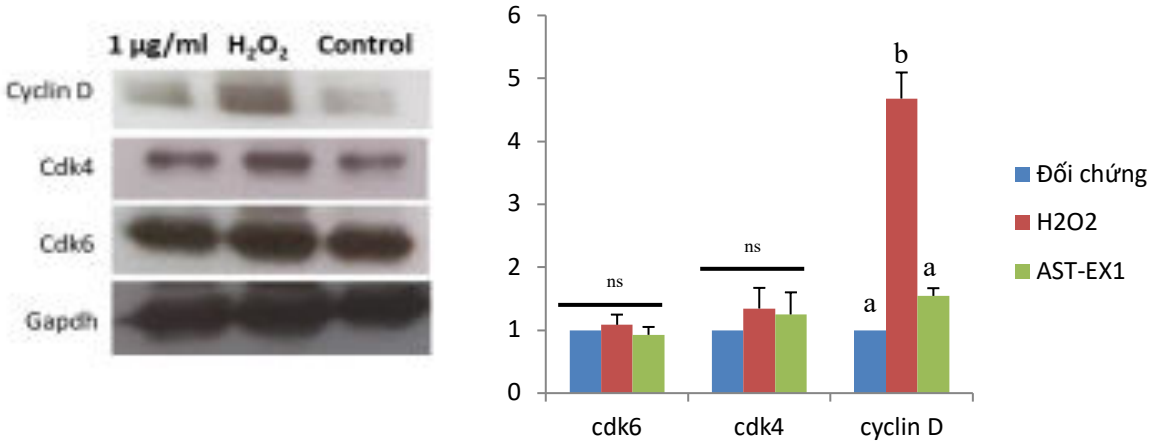
3.9.6. Kết quả đánh giá sự biểu hiện CDK4, CDK6, cyclin D1

Tổng kết kết quả biểu hiện MMP3, MMP1, collagen và elastin trong tế bào xử lý với AST-EX và H_2O_2 cho thấy H_2O_2 làm gia tăng sự biểu hiện MMP1, MMP3 và giảm sự biểu hiện collagen, elastin. AST-EX làm giảm sự biểu hiện MMP1, MMP3 và phục hồi sự biểu hiện collagen, elastin. Tuy nhiên, AST-EX 1 và 1,5 µg/ml là nồng độ tốt nhất trong thí nghiệm này. Để tiếp tục đánh giá sự biểu hiện của cyclin D1, CDK4, CDK6, AST-EX 1 µg/ml được sử dụng làm nồng độ nghiên cứu.

Kết quả WESTERN BLOT cho thấy sự biểu hiện CDK4, CDK6 trong giữa các nhóm bằng nhau ($p>0.05$). Riêng đối với sự biểu hiện cyclin D1, cylin D1 trong tế bào xử lý H_2O_2 gia tăng mạnh (gấp 4,7 lần so với đối chứng) và trong tế bào xử lý trước với AST-EX1, sự biểu hiện cyclin D1 vẫn cao nhưng không khác biệt về mặt thống kê.

Sự biểu hiện của cyclin D1 được đánh giá bằng phương pháp WESTERN BLOT. Kết quả cho thấy tế bào xử lý với H_2O_2 gia tăng sự biểu hiện của cyclin D1 (gia tăng 4,76 lần so với tế bào trong nhóm đối chứng). Trong khi đó, tế bào trong

nhóm AST-EX1 biểu hiện gia tăng cylin D1 (gấp 1,5 lần so với đối chứng) và giảm so với nhóm tế bào trong H_2O_2 (hình 3. 22, bảng 3. 10).



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

([a, b]: sự khác biệt về mặt thống kê nồng độ cyclin D1 giữa các nhóm thí nghiệm ($p<0,05$), ns: không khác biệt về mặt thống kê nồng độ CDK4, CDK6 giữa các nhóm thí nghiệm ($p>0,05$))

Cylin D1 và CDK4/6 tạo thành phức hợp protein có chức năng giúp tế bào vượt qua chu kỳ G1 để tiến vào chu kỳ S. Trong tế bào lão hóa do tăng sinh, cyclin D1 là marker đặc trưng cho sự hoạt động quá mức của tế bào, cyclin D1 biểu hiện vượt trội trong tế bào lão hóa do tăng sinh. Kết quả cho thấy AST-EX 1 µg/ml đã hạn chế sự biểu hiện cyclin D1 trong tế bào.

Bảng 3. 10. Kết quả biểu hiện tương đối protein CDK4, CDK6 và cyclin D1

([a,b]: sự khác biệt về mặt thống kê trong cùng 1 cột, $p<0.05$)

	CDK6	**CDK4**	**cyclin D**
Đối chứng	$1\pm 0,2^a$	$1 \pm 0,1^a$	$1 \pm 0,1^a$
H_2O_2	$1,1 \pm 02^a$	$1,3 \pm 0,2^a$	$4,7 \pm 0,4^b$
AST-EX1	$0,9 \pm 0,2^a$	$1,2 \pm 0,2^a$	$1,5 \pm 0,3^a$

Lão hóa tế bào là quá trình không thể đảo ngược bị tác động bởi các nhân tố bên trong và bên ngoài tế bào. Khi vào quá trình lão hóa, tế bào không tăng sinh, không thực hiện chức năng. Đây là phản ứng bảo vệ của cơ thể nhằm mục đích hạn chế hiện tượng ung thư trong tế bào. Hiện tượng lão hóa do tác nhân tác động lên

DNA tế bào, điều này dẫn tới cơ chế bảo vệ của cơ thể là kích hoạt lão hóa. Hydrogen peroxide là tác nhân thường được sử dụng để gây lão hóa tế bào. Đặc điểm tế bào bị lão hóa: sự gia tăng diện tích tế bào, sự biểu hiện SA-gal, tế bào dừng tăng sinh, biểu hiện những marker đặc trưng như p53, p21, p16 và sự gia tăng cyclin D1. Đồng thời, tế bào suy giảm các chức năng, đối với nguyên bào sợi, tế bào gia tăng sự biểu hiện MMP1, MMP2 và suy giảm sự biểu hiện collagen và elastin

Kết quả cho thấy H_2O_2 nồng độ 150 µg/ml thời gian xử lý 90 phút đã gây lão hóa tế bào: tế bào dừng tăng sinh, biểu hiện nồng độ cao SA-gal, tế bào phình to, biểu hiện suy chức năng: tổng hợp nhiều MMP1, MMP3 và giảm tổng hợp collagen, elastin, đồng thời tế bào biểu hiện mạnh cyclin D1.

AST là chất chống oxy hóa mạnh hiện nay, AST có khả năng xâm nhập vào bên trong màng tế bào và bảo vệ tế bào khỏi các tác nhân gây oxy hóa. Với những tính chất trên, cách sử dụng AST tốt nhất là ủ tế bào với AST trước khi xử lý với H_2O_2 vì AST có thể được lưu trữ trong các loại màng trong tế bào, bao gồm màng tế bào, màng nhân, màng ty thể… và bảo vệ các bào quan này khỏi tác hại của gốc oxy hóa xâm nhập vào tế bào hoặc mới hình thành do bị H_2O_2 kích thích. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng AST từ tảo *Haematococcus pluvialis* bởi vì đây là nguồn giàu AST và đồng thời AST tồn tại chủ yếu là dạng ester, giá thành tương đối rẻ hơn so với AST tinh khiết. Do vậy trong nghiên cứu này chúng tôi so sánh khả năng bảo vệ tế bào của AST tinh khiết và dịch chiết giàu AST (AST-EX), từ đó, cung cấp thêm căn cứ để sử dụng AST-EX thay thế AST trong các ứng dụng như mỹ phẩm bởi vì AST-EX có giá thành rẻ hơn và có hoạt tính chống lão hóa tốt hơn AST.

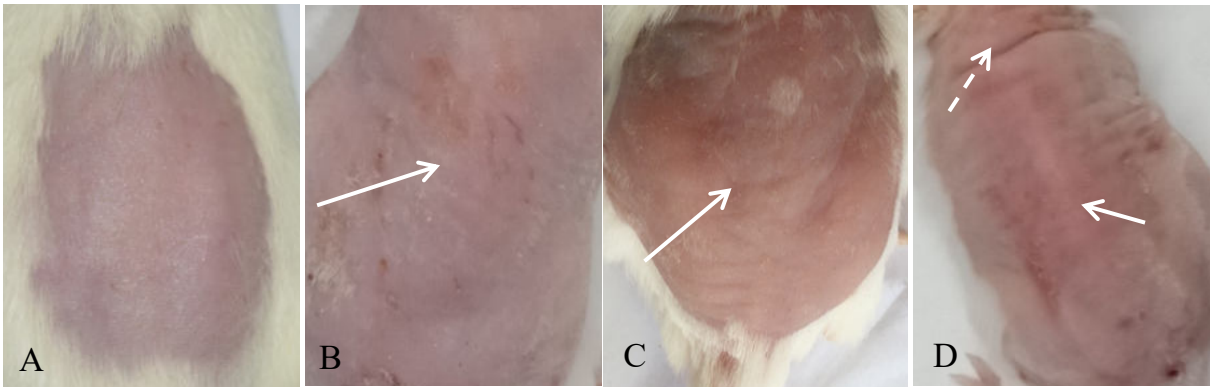
AST-EX và AST được sử dụng để tiền xử lý tế bào trước khi tế bào xử lý với H_2O_2. Kết quả cho thấy so với tế bào xử lý H_2O_2, tế bào tiền xử lý với AST-EX vẫn bị sự tác động của H_2O_2, tuy nhiên có sự cải thiện tính chất tế bào: tế bào vẫn duy trì sự tăng sinh nhưng với tốc độ chậm, tế bào vẫn phình to, biểu hiện SA-gal với mức thấp, biểu hiện có chức năng: tổng hợp mRNA collagen, elastin và giảm sự biểu hiện của MMP1, MMP3.

Kết quả cho thấy AST-EX giảm tác hại của H_2O_2 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. So với AST tinh khiết ở cùng nồng độ, AST-EX dịch chiết từ tảo cho hiệu quả tác động

ngang bằng (cùng nồng độ AST 10 µg/ml) hoặc tốt hơn (cùng nồng độ AST 1,5 µg/ml).

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

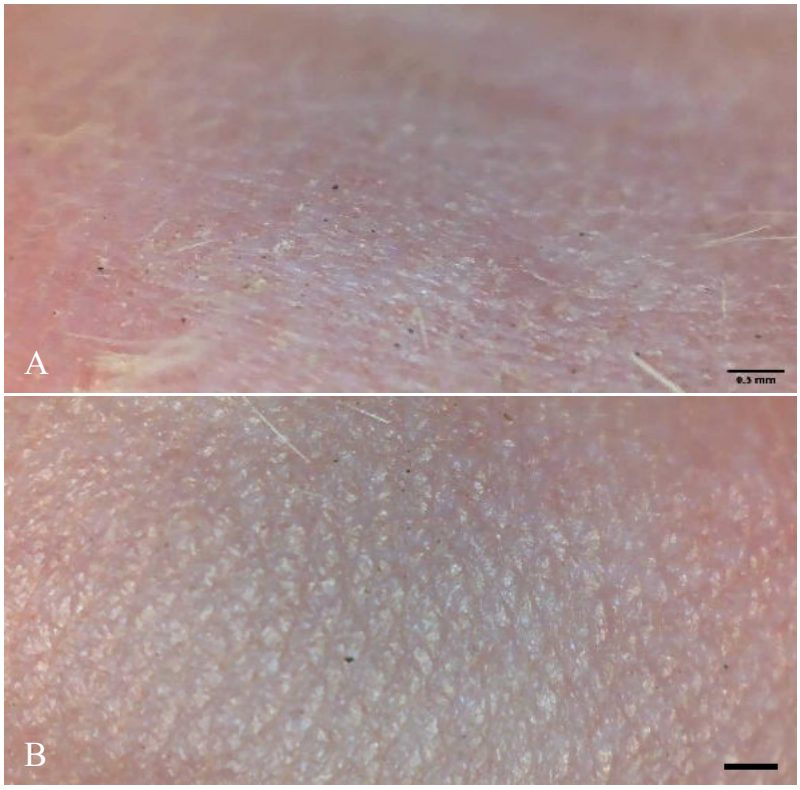
3.10.1. Mô hình lão hóa da do tia UV



Hình 3. 23. Hình chụp bên ngoài chuột sau khi chiếu UV.

A: Chuột nhóm đối chứng, B: Sau khi chiếu UV 3 tuần, C: Chiếu UV 5 tuần, D: Chiếu UV 8 tuần. Mũi tên: Vết nứt trên lưng, mũi tên đứt quãng: Vùng da nhão.

Trong nghiên cứu này, tia UVB được sử dụng làm tác nhân gây lão hóa da chuột. UVB là một trong những tia UV có trong ánh sáng mặt trời có khả năng xuyên qua tầng ozone tiếp xúc với mặt đất. Bước sóng tia UVB nằm trong khoảng 280-320 nm. Trong nghiên cứu này tia UVB được phát từ đèn chỉ có bước sóng tia UVB và bước sóng đỉnh là 311 nm. Cường độ chiếu sáng được đo bằng máy đo UV meter và khoảng cách được điều chỉnh để có liều lượng phù hợp (35 cm từ đèn tới lưng chuột). Chuột được cạo lông trước khi chiếu UVB và di chuyển tự do trong lồng chiếu trong thời gian chiếu. Liều chiếu UVB được tăng lên theo tuần để đạt được mô hình lão hóa. Tiêu chuẩn đánh trong trường hợp này là hiện tượng nhăn và nhão da, sự dày lên lớp biểu bì. Đây là những dấu hiệu rõ ràng của hiện tượng lão hóa da do tia UVB [109].



Hình 3. 24. Kết quả soi da chuột sau khi chiếu UVB.

A: Nhóm đối chứng, B: Sau khi chiếu UVB 8 tuần

Kết quả quan sát được cho thấy tia UV ảnh hưởng tới cấu trúc bề mặt da chuột: làm da trở nên trắng hơn, sần sùi, kết vảy, xuất hiện nhiều nếp nhăn lớn và nhão da trong giai đoạn sau của quá trình chiếu UVB. Sau khi chiếu chuột 1 tuần, da chuột trở nên khô, thô ráp khi cảm nhận bằng tay trong quá trình thao tác. Sau 2-3 tuần, da chuột bắt đầu xuất hiện nếp nhăn nông trên bề mặt da, những vết nhăn này tương đối nhỏ, mịn. Sau đó, những vết nứt sâu dần và liên kết với nhau hình thành mạng lưới chằng chịt. Tuần thứ 5, những vết nứt lớn xuất hiện, vị trí thường xuất hiện đầu tiên là vùng da lưng 2 bên sườn. Tiếp theo, vết nứt trở nên nhiều hơn và xuất hiện ở vị trí khác như vùng da lưng gần với mông chuột, vùng cổ. Tuần thứ 6 trở đi, vết nứt lan tới vùng giữa lưng. Tuần 7-8, hiện tượng nhão da chuột trở nên rõ ràng hơn, đặc biệt khu vực vùng mông, cổ và vùng 2 bên của lưng tiếp xúc với bụng. Trong giai đoạn này, da trở nên lỏng lẻo khi tiếp xúc bằng tay (hình 3. 23, 3. 24). Dựa theo thang đo độ nhăn da của Agrawal thì độ nhăn da của nhóm đối chứng và chiếu tia UVB lần lượt như sau: 0,5 ± 0,5, 4,67 ± 0,47 ($p<0.05$), mức độ lão hóa da của 2 nhóm trên lần lượt là 0,25 ± 0,43, 2,5 ± 0,5 ($p<0.05$).

Kết quả nhuộm Trichrome cho thấy da có sự biến đổi cấu trúc sau 8 tuần chiếu bởi tia UVB. Đầu tiên, lớp tế bào biểu bì trở nên dày hơn, xuất hiện thêm nhiều lớp tế bào và nhiều khuôn nền trở nên dày hơn. Kết quả nhuộm Trichrome mẫu đối chứng cho thấy rằng lớp tế bào biểu bì chuột chứa khoảng 3-5 lớp tế bào biểu bì, độ dày trung bình 21,3 ± 0,8 μm. Trong đó lớp tế bào đáy có nhân đậm màu, vùng tiếp xúc giữa lớp trung bì và biểu bì theo hình lượn sóng. Đối với da chuột chiếu UV, lớp biểu bì dày hơn, độ dày trung bình 65,8 ± 2,7 μm ($p<0.05$), chứa khoảng 4-6 lớp tế bào biểu bì, trong đó nhiều tế bào có nhân phình to, vùng tiếp xúc giữa biểu bì và trung bì thường là đường nằm ngang (hình 3. 25).

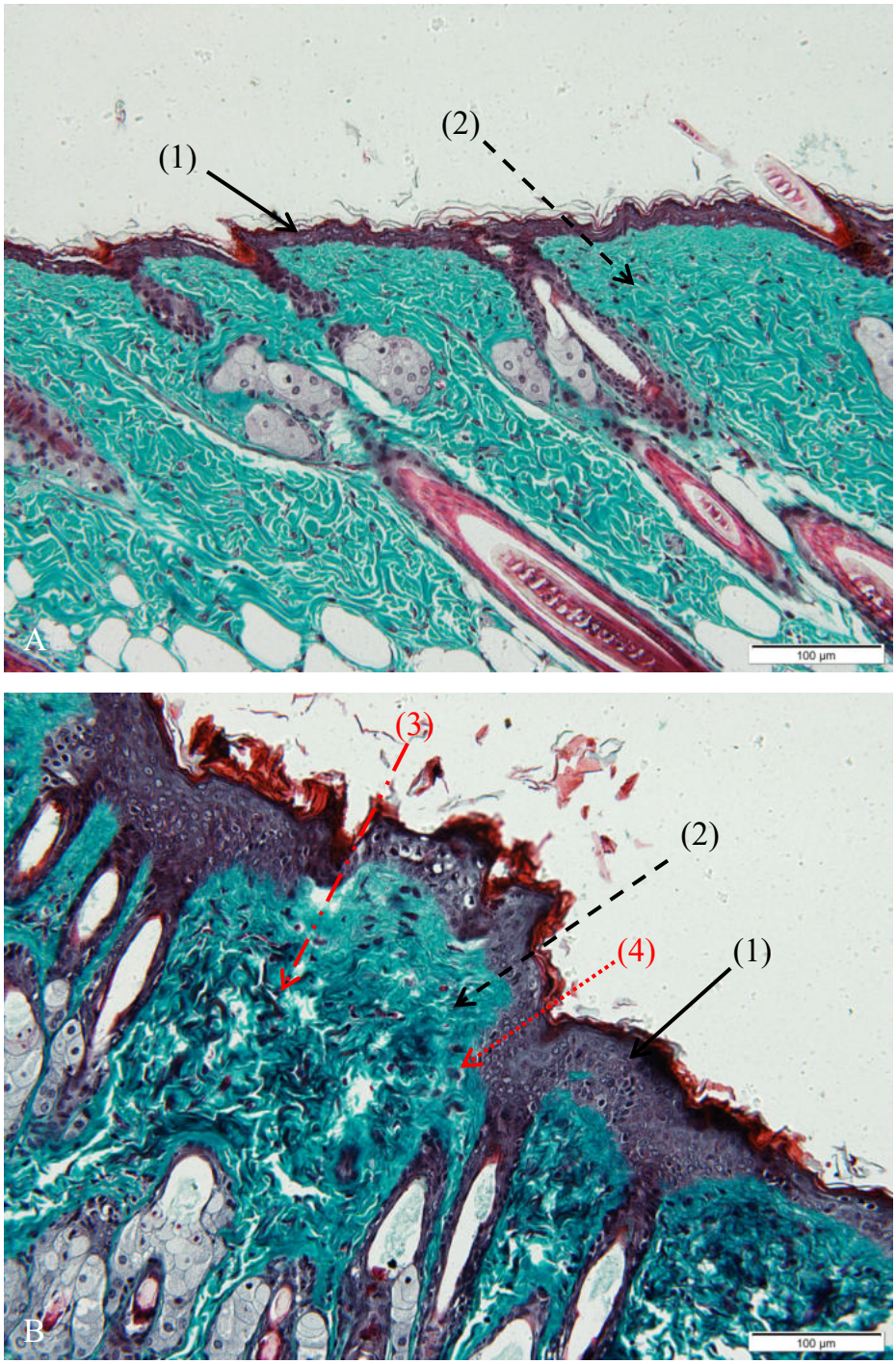
Đối với lớp trung bì, kết quả Trichrome da chuột đối chứng cho thấy trung bì da chuột chia thành 2 lớp: lớp mô liên kết thưa và lớp mô liên kết đặc. Trong lớp trung bì có nhiều tế bào nguyên bào sợi phân bố thưa và đồng đều. Sợi collagen bắt màu xanh dương hiện rõ và là thành phần chính của lớp protein trung bì. Trong lớp lưới, các sợi collagen mảnh, ngắn đan xen lẫn nhau, trong lớp đáy, các sợi collagen bện thành từng nhiều bó lớn. Ngoài ra, trong lớp trung bì xuất hiện những phần phụ như tuyến bã, tuyến mồ hôi, lông.

Đối với da chiếu UV, ngoài tế bào nguyên bào sợi, lớp trung bì xuất hiện nhiều tế bào viêm và xuất hiện những cấu trúc collagen bất thường sậm màu. Hiện tượng này là do tia tác động lên các bó sợi collagen làm xuất hiện những liên kết mới giữa các bó sợi và tạo thành những cấu trúc collagen bất thường. Điều này giải thích cho sự hình thành nếp nhăn và da trở nên lỏng lẻo hơn.

Nguyên nhân chính của hiện tượng lão hóa da do ánh sáng là do tia UV có trong ánh sáng mặt trời. Trong ánh sáng mặt trời có tia UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm), UVC (250-280 nm), trong đó tia UVA và UVB có khả năng xâm nhập qua tầng khí quyển và tiếp xúc trực tiếp lên da, tia UVB mang năng lượng cao nên dễ gây ra các hậu quả lão hóa da. Nhiều tác giả đã thành công trong việc gây mô hình lão hóa da bằng tia UVB như Hwang, Sung H. Lim, Ha Nui Kim với các liều lượng khác nhau [133-135]. So với tia UVA, tia UVB thường được sử dụng trong việc tạo mô hình lão hóa da chuột. Liều tia UVB thường được sử dụng trong lão hóa da không đồng nhất giữa các nhóm tác giả. Liều lượng được sử dụng thường 90 mJ/cm^2 – 180 mJ/cm^2 trong 1 tuần, thời gian xử lý 8 – 20 tuần. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành chiếu tia UVB theo quy trình của Ha Nui Kim năm 2016 có điều chỉnh [135].

Quy trình Ha Nui Kim sử dụng tia UVB: tuần 1-2: 100 mJ/cm^2 (3 lần 1 tuần), tuần 3-4: 200 mJ/cm^2 (3 lần 1 tuần), tuần 5-6: 300 mJ/cm^2 (2 lần/1 tuần), tuần 7-8: 400 mJ/cm^2 (2 lần 1 tuần). Tuy nhiên, trong quá trình khảo sát ban đầu, kết quả thu được chưa đạt như mong muốn, điều này có thể giải thích là do đối tượng nghiên cứu trong nghiên cứu này là chuột *Mus musculus* var. *Albino*, chuột có khả năng mọc lông liên tục, khác với đối tượng nghiên cứu của Ha là chuột HR-1 không có lông. Do đó, để tạo được mô hình chuột bị lão hóa do tia UVB, liều lượng chiếu được gia tăng từ tuần thứ 5 trở đi, kết hợp với quan sát hình dạng ngoài da chuột để đưa ra quy trình hiệu quả.

Biểu hiện lâm sàng của hiện tượng này là xuất hiện các viết nhăn da, da sần sùi, giãn mạch,… [6]. Do đó, da chuột được đánh giá theo các tiêu chí lão hóa da là sự xuất hiện nếp nhăn và nhão da. Hiện nay các tiêu chí về nhăn da và nhão da thường được đánh giá dựa trên quan sát bên ngoài. Để kết quả đánh giá rõ ràng và dễ so sánh hơn, mức độ nhăn và nhão da được đưa ra dựa theo tiêu chuẩn của Bisset và Agrawal [108, 109]. Tiêu chuẩn về đánh giá da chuột đề ra là của Bisset năm 1987, hiện nay tiêu chuẩn này và những biến thể của nó vẫn được sử dụng nhiều trong nghiên cứu. Tiêu chuẩn của Bisset chia thành 2 yếu tố riêng biệt là hiện tượng nhăn và nhão da, mỗi yếu tố có 4 mức độ từ 0 tới 3 với mức độ lão hóa nghiêm trọng tăng dần. Tiêu chuẩn của Agrawal xuất hiện sau (năm 2010) cũng tương tự như của Bisset nhưng tập trung vào yếu tố nhăn da và tiến hành chia nhỏ thêm thang điểm để gia tăng mức độ phân biệt bữa (7 mức độ từ 0 tới 6). Đồng thời, mức chia điểm được tiến hành dựa trên chuột *Mus musculus* tương tự như trong thí nghiệm đang được tiến hành. Do đó, mức độ nhăn da được đánh giá theo tiêu chí của Agrawal và mức độ nhão da được đánh giá theo tiêu chuẩn Bisset. Kết quả cho thấy tia UVB là gia tăng mức độ nhăn da từ 0,5 ± 0,5 tới 4,67 ± 0,47 và gia tăng mức độ lão hóa da từ 0,25 ± 0,43 tới 2,5 ± 0,5 (bảng 3. 11).



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, (4): tế bào viêm.

Sau đó, cấu trúc mô học của da được xác định bằng phương pháp nhuộm Trichrome. Cấu trúc mô học của da chuột lão hóa do tia UV được đánh giá bởi nhiều tác giả, đặc điểm chung của da chuột lão hóa do tia UVB là lớp biểu bì dày lên, sự xâm nhập tế bào viêm, sự gia tăng mật độ tế bào, xuất hiện những bó sợi collagen có cấu trúc bất thường. Kết quả nhuộm mô học da chuột cho sau khi chiếu UVB 8 tuần, độ

dày biểu bì tăng cao 65,8 ± 2,7 µm, đồng thời có sự xuất hiện các tế bào viêm và xuất hiện nhiều cấu trúc collagen bắt màu bất thường với thuốc nhuộm Trichrome. Kết quả này tương tự với kết quả của những tác giả Kang [136], Bisset [109].

Tổng hợp những kết quả trên cho thấy rằng sau 8 tuần chiếu UVB, da chuột đã xuất hiện những dấu hiệu của lão hóa da do ánh sáng: da xuất hiện nhiều nếp nhăn, da kém đàn hồi, lớp biểu bì dày, thành phần collagen giảm đi và xuất hiện cấu trúc collagen bất thường. Những kết quả này cho thấy quy trình chiếu UVB 8 tuần đã tạo thành công mô hình lão hóa ở chuột.

Bảng 3. 11. Bảng tổng kết kết quả tạo mô hình chuột lão hóa da do tia UVB.

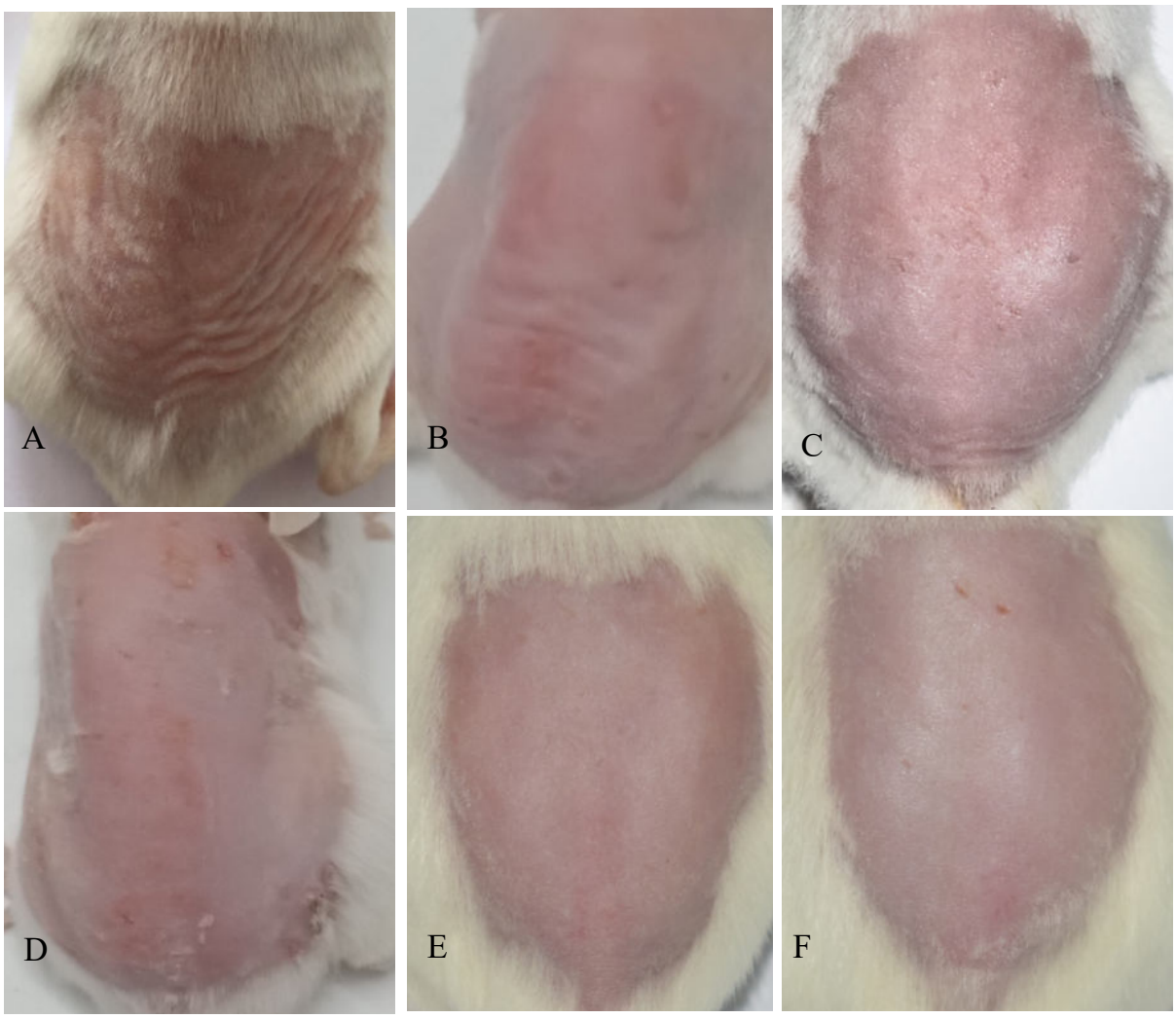
(^{a,b}: sự khác biệt về mặt thống kê giá trị trong cùng 1 hàng, $p<0.05$)

	Nhóm đối chứng	**Nhóm chiếu tia UVB**
Điểm nhăn da	$0,5 \pm 0,5^{a}$	$4,67 \pm 0,47^{b}$
Điểm nhão da	$0,25 \pm 0,43^{a}$	$2,5 \pm 0,5^{b}$
Độ dày biểu bì (µm)	$21,3 \pm 0,8^{a}$	$65,8 \pm 2,7^{b}$
Sự xâm nhập tế bào viêm	Không phát hiện	Có
Sự xuất hiện các cấu trúc collagen bất thường	Không phát hiện	Có

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

Thí nghiệm được tiến hành bằng cách thoa AST-EX 5-200 µg/ml 4 giờ trước mỗi lần chiếu UVB, quy trình chiếu UVB tương tự như trong quy trình gây lão hóa. Kết quả quan sát bên ngoài cho thấy có hiện tượng nhăn da trên các nhóm thí nghiệm và nhóm chiếu tia UV ở những mức độ khác nhau. Đối với nhóm chiếu tia UVB, mức độ nhăn da và nhão da tương tự như khi trong thí nghiệm đánh giá lão hóa. Đối với nhóm thoa dầu Sacha Inchi, mức độ nhăn da và nhão da giảm so với nhóm chiếu tia UVB, một ít nếp nhăn sâu xuất hiện vùng da lưng và mông chuột, những nếp nhăn này có thể quan sát bằng mắt thường, da vẫn còn cảm giác thô ráp khi chạm bằng tay. Đối với da thoa với AST-EX nồng độ 5-200 ug/ml, mức độ thô ráp và nhăn da giảm dần. Các vết nhăn trở nên mờ hơn khi quan sát bằng mắt và thường xuất hiện trên vùng da lưng gần sát vùng mông, da chuột trong nhóm này mềm, mịn, tuy nhiên vẫn xuất hiện một ít vết

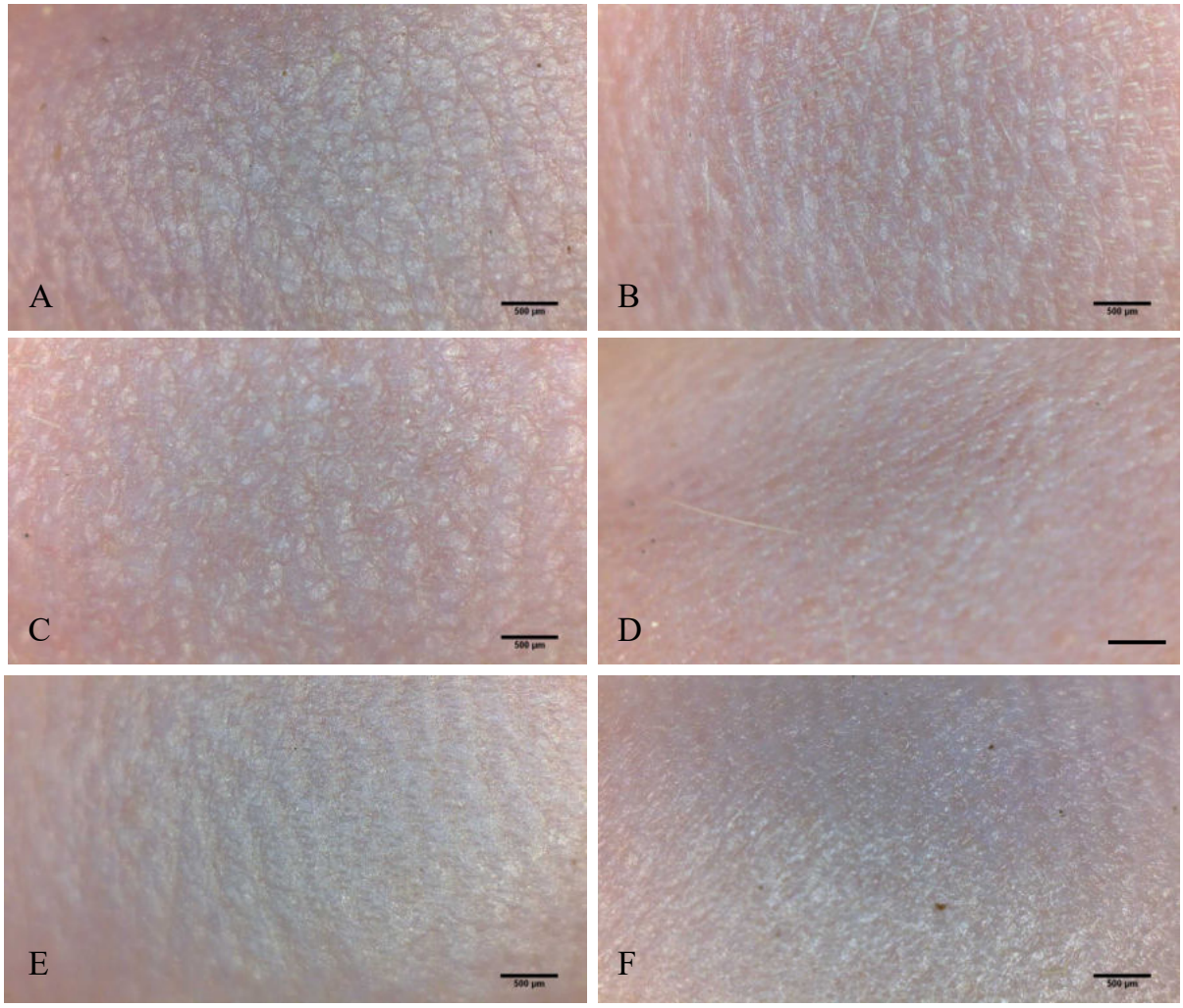
sừng trên da lưng. Đối với chuột trong nhóm thoa 20-200 µg/ml, da vẫn có những nếp nhăn nông, xuất hiện khi chuột di chuyển, tuy nhiên bề mặt da mềm, mịn khi tiếp xúc bằng tay (hình 3.26, bảng 3.12).



Hình 3. 26. Kết quả quan sát da chuột ở các nhóm thoa AST-EX.

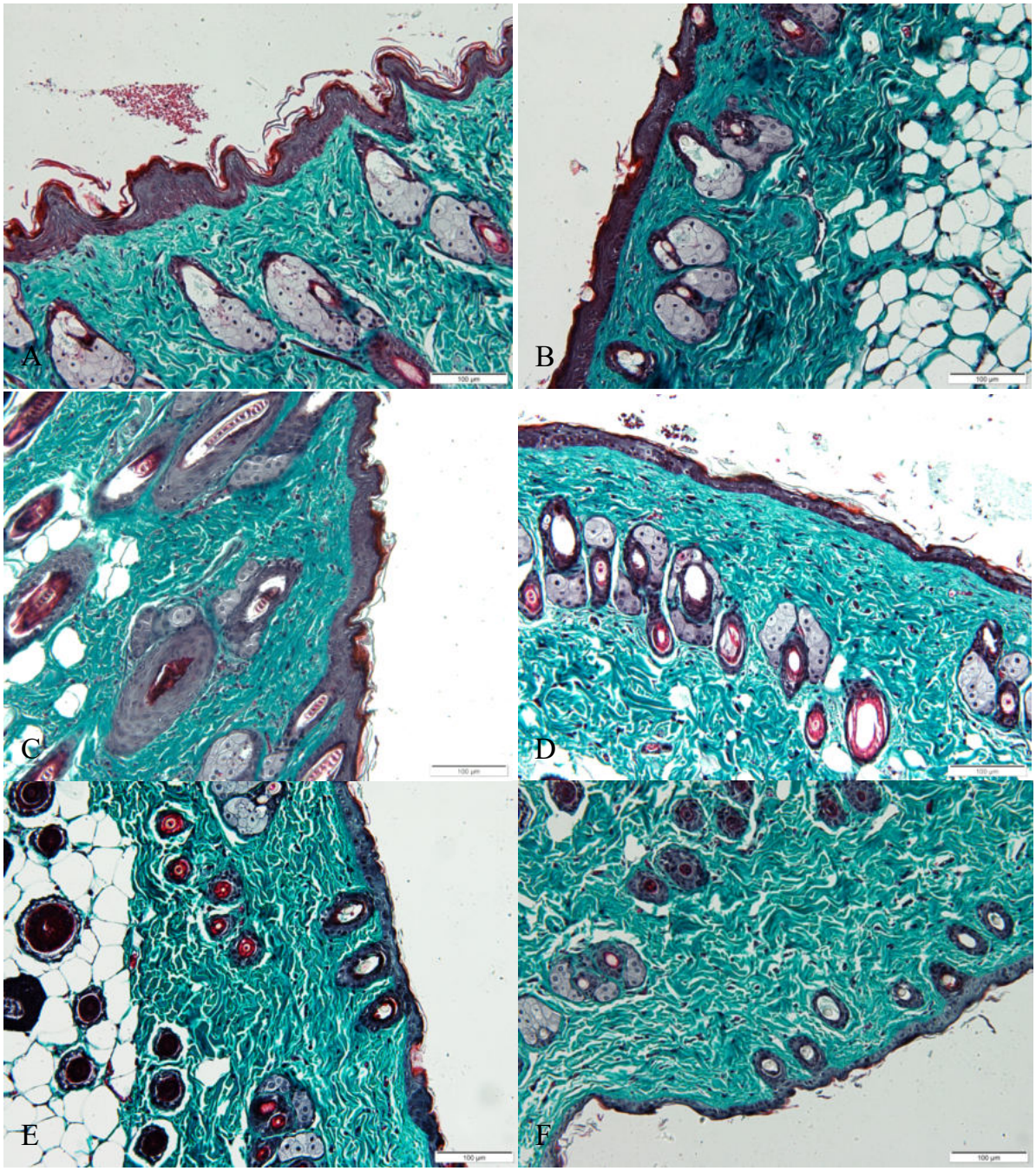
A: Chuột nhóm chiếu UVB, B: Chuột thuộc nhóm thoa dầu Sacha Inchi, C, D, E, F: Chuột thoa AST-EX 5, 10, 20, 200 µg/ml

Kết quả soi da cho thấy, da chuột trong nhóm chiếu tia UV bao gồm nhiều vết lõm sâu đan xen và liên kết với nhau. Da chuột trong nhóm thoa dầu Sacha Inchi có nhiều nếp nhăn sâu giống như chuột nhóm chiếu tia UV. Đối với chuột thoa AST-EX 5-200 µg/ml, mức độ nhăn da giảm dần, nhóm xử lý AST-EX 0,5 bề mặt da chuột có vết nứt mịn liên kết với nhau, trong nhóm xử lý AST-EX 10, 20, 200, bề mặt da láng, xuất hiện vết nhăn nông sắp xếp theo cùng 1 hướng. 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. 27. Kết quả soi da chuột sau 8 tuần chiếu UVB.

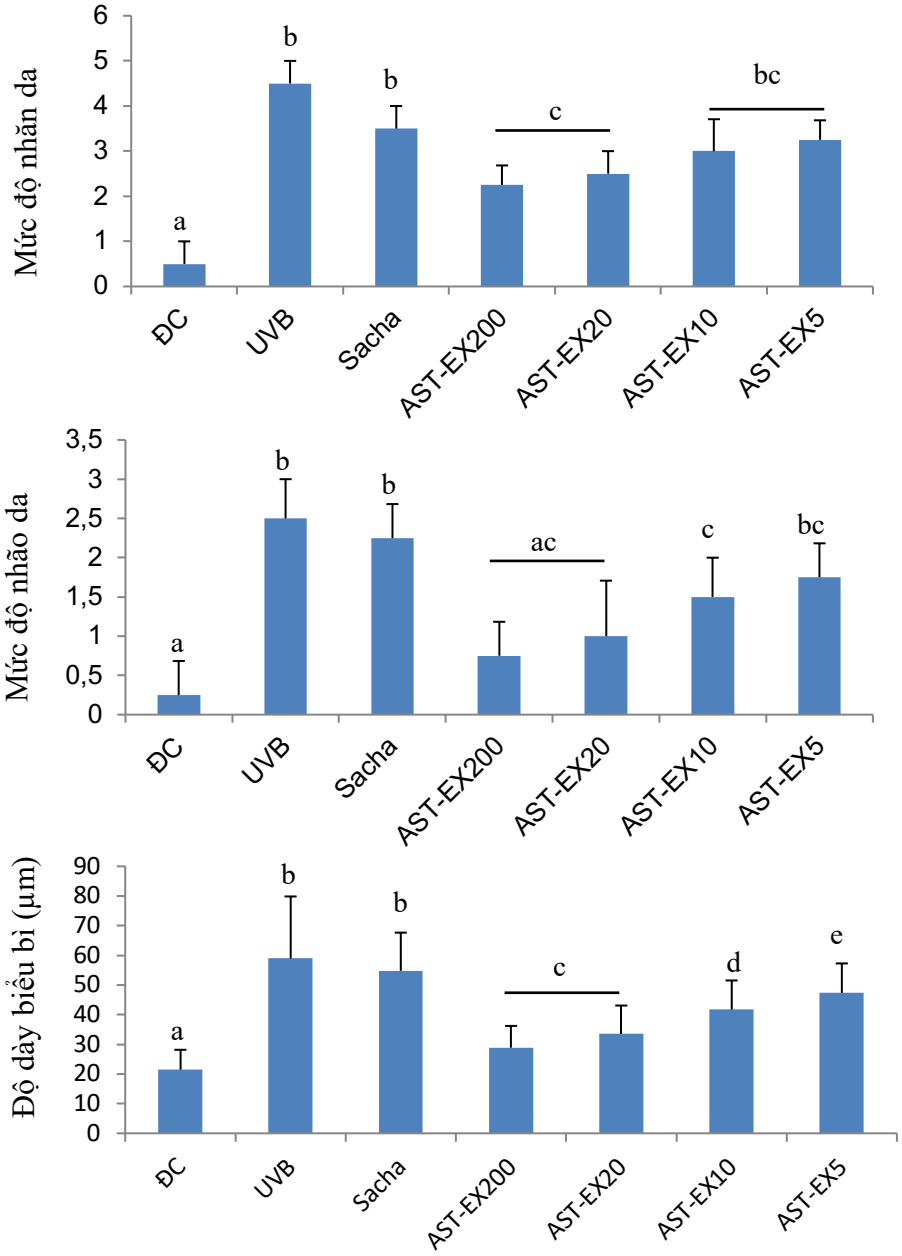
A: Chuột nhóm chiếu UVB, B: Chuột thuộc thoa dầu Sacha Inchi, C, D, E, F: Chuột thoa AST-EX 5, 10, 20, 200 µg/ml



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

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. 29. 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

Da chuột trong nhóm xử lý với dầu Sacha Inchi cho thấy có sự suy giảm về độ dày biểu bì so với nhóm chuột chiếu tia UVB (58,9 ± 20,9 µm). Trong mẫu mô học ít nhận thấy tế bào viêm, tuy nhiên trong mẫu vẫn xuất hiện những cấu trúc collagen bất thường. Đối với chuột trong nhóm xử lý dầu Sacha Inchi và AST-EX 5, 10, 20, 200 µg/ml, độ dày biểu bì giảm khi nồng độ AST-EX gia tăng, độ dày biểu bì trong các nhóm lần lượt là: 54,7 ± 12,9 µm, 47,3 ± 10,0 µm, 41,7 ± 9,8 µm, 33,5 ± 9,6 µm, 28,9 ± 7,3 µm. Khi quan sát lớp trung bì cho thấy mẫu da trong nhóm xử lý AST-EX ít có sự xâm nhập tế bào viêm và ít nhận thấy cấu trúc collagen bất thường. Mẫu da nhóm

xử lý AST-EX 20 và 200 µg/ml gần như tương tự so với mẫu đối chứng mặc dù lớp biểu bì vẫn dày hơn so với mẫu đối chứng.

Bảng 3. 12. 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 một dòng với $p < 0.05$)

	ĐC	UVB	Sacha Inchi	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 nhão 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	+	+++++	++++	+++	+++	++	++

(+: ước tính bằng mắt trên vùng thị trường quan sát, mặc định đối chứng là: +, chiếu UVB là: +++++, những thí nghiệm thì dựa trên quy ước này để ước tính)

Bàn luận:

Tổng kết các kết quả thu được từ thí nghiệm đánh giá cho thấy thoa AST-EX trước khi xử lý tế bào với H_2O_2 đã hạn chế được tác hại do tia UVB gây ra trên da chuột ở mức độ quan sát bằng mắt thường, soi da và cấu trúc mô học. Da chuột bị lão hóa bởi tia UV có những đặc điểm sau:

- Quan sát đại thể: da nhăn, nhão vị trí vùng da lưng và vùng da xung quanh
- Soi da: trên da có nhiều vết nứt sâu, liên kết với nhau
- Cấu trúc: da tăng độ dày biểu bì, sự xâm nhập tế bào viêm, hình thành những cấu trúc collagen bất thường trên da.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành hòa dịch chiết giàu AST trong dung môi là dầu của hạt Sacha Inchi. Sacha Inchi (*Plukenetia voubilis*) của họ Euphorbiaceae. Sacha Inchi bắt nguồn từ khu vực Amazon của Nam Mỹ. Bộ phận được khai thác của cây chủ yếu là hạt. Tùy theo giống và địa điểm trồng, hạt chứa 35-60% chất béo, 25-30% protein, vitamin E, polyphenols, khoáng chất và các thành phần khác. Dầu Sacha Inchi chứa chất béo trung tính (97,2%), axit béo tự do (1,2%), và phospholipid (0,8%). Chất béo không bão hòa chiếm tỉ lệ cao với chỉ 6,8 - 9,1% acid béo bão hòa. Tổng lượng tocolpherol trong dầu Sacha Inchi từ 2,39-3 g/kg dầu tùy vào phương pháp tách chiết [137]. Các thành phần khác chứa trong dầu bao gồm phytosterol, carotenoid và nhiều loại polyphenol như phennyl alcohol, flavonoid, secoridoid, lignan. Trong lĩnh vực chăm sóc da, dầu Sachi Inchi khá thông dụng nhờ khả năng làm mềm da, điều trị vết thương nhiễm trùng, làm săn da và chống lão hóa. Những thử nghiệm sử dụng dầu Sacha Inchi trong thẩm mỹ vẫn chưa nhiều. Ở đây, chúng tôi kết hợp nghiên cứu với dầu Sacha Inchi để đưa ra thêm thông số về hiệu quả của dầu hạt. Kết quả cho thấy dầu Sacha Inchi có tác dụng hạn chế trong việc bảo vệ da khỏi tia UVB.

Đối với da xử lý AST-EX, những dấu hiệu lão hóa tuy vẫn tồn tại nhưng giảm thiểu về mức độ và biểu hiện tùy thuộc vào nồng độ AST-EX. Nồng độ AST-EX 5 µg/ml bắt đầu thấy có sự thay đổi so với mẫu thoa dầu Sacha Inchi, tuy nhiên sự khác biệt chưa rõ ràng. Thoa AST-EX 20 µg/ml làm da chuột có sự khác biệt rõ ràng so với nhóm thoa dầu Sacha Inchi và kết quả tương đồng với nhóm thoa AST-EX 200 µg/ml. Da chuột trong 2 nhóm này đều mềm mịn với ít vết sừng trên da mặc dù vẫn còn những nếp nhăn nhỏ xuất hiện khi chuột di chuyển (mức độ nhăn da 2,25-2,5) và có hiện tượng nhão. Về kết quả soi da, trên da lưng chỉ tồn tại những vết nứt nhẹ. Cấu trúc mô học cho thấy cấu trúc da thoa với AST-EX 20 và 200 µg/ml mặc dù vẫn tồn tại cấu trúc collagen bất thường nhưng nhìn chung vẫn tương tự với cấu trúc da ban đầu. Sự khác biệt 2 nhóm AST-EX20 và AST-EX200 nằm ở độ dày biểu bì, độ dày biểu bì của nhóm thoa AST-EX20 dày hơn so với AST-EX200, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0.05$). Đồng thời nồng độ AST-EX20 chỉ bằng 1/10 so với nồng độ AST-EX200, do đó về mặt ứng dụng AST-EX20 tốt hơn so với AST-EX200. Kết quả này có được là do AST có khả năng chống oxy hóa mạnh và có hoạt tính kháng viêm. Một trong những tác hại chính của tia UVB là tạo ra các gốc oxy hóa,

các gốc này phá hủy, gây biến tính cấu trúc tế bào và những protein trong da, trong đó collagen là thành phần chiếm đa số. Hậu quả của quá trình này dẫn phản ứng viêm ở da. AST được thoa trước khi chiếu UVB nên AST có khả năng hấp thụ các gốc oxy hóa tự do mới được hình thành, do đó AST hạn chế được tác hại của tia UVB. Ngoài ra, AST có khả năng kháng viêm tốt, điều này góp phần vào hạn chế đáp ứng viêm của cơ thể. Hiện nay, chỉ có thí nghiệm trên người của Tominaga có sử dụng AST dạng thoa [9]. Năm 2012, Tominaga và cộng sự đã tiến hành đánh giá tác dụng của AST dạng vừa uống vừa thoa và dạng uống. Ba mươi người phụ nữ khỏe mạnh uống 6 mg AST mỗi ngày và thoa 2 ml dịch tảo giàu AST nồng độ AST là 78,9 µM (47,34 µg/ml AST tổng). Sau 8 tuần thì nhận thấy hiện tượng cải thiện nếp nhăn, đồi mồi, da trở nên đàn hồi hơn. So sánh thí nghiệm vừa uống (6 mg) vừa thoa (78,9 µM) và thí nghiệm chỉ uống dịch chiết giàu AST cùng nồng độ uống là 6 mg thì thấy cả 2 thí nghiệm đều có sự cải thiện, tuy nhiên do sự khác biệt về thiết kế thí nghiệm nên không so sánh được nhóm nào tốt hơn. Đồng thời, tác giả không giải thích tại sao sử dụng nồng độ 47,34 µg/ml AST tổng để tiến hành trong thí nghiệm. Sau đó năm 2017, tác giả Tominaga tiến hành tiếp thí nghiệm dạng uống mỗi ngày 6 mg và 12 mg, tác giả khẳng định liều 12 mg AST mỗi ngày không gây độc trong thời gian dài và có tác dụng cải thiện chất lượng da [18].

Kết quả thử nghiệm của chúng tôi cho thấy nồng độ khi thoa chỉ cần 20 µg/ml AST tổng là đạt được hiệu quả mong đợi. Mặc dù những dịch chiết tảo giàu AST có nồng độ 5, 10 µg/ml AST tổng cũng thể hiện được hiệu quả hạn chế tác hại của tia UVB nhưng nồng độ phù hợp nhất để hạn chế tác hại tia UV là 20 µg/ml AST tổng. Đây là một kết quả đáng khích lệ vì đây là nghiên cứu đầu tiên khảo sát các dãy nồng độ dịch chiết tảo giàu AST dạng thoa và nồng độ thu nhận được chưa bằng ½ so với nghiên cứu khác và bằng 1/600 so với dạng uống 12 mg mỗi ngày.

Chương 4. KẾT LUẬN- KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

- Cảm ứng thành công AST từ giống tảo HP-C với nồng độ cao nhất 3,09% khối lượng khô trong điều kiện chiếu sáng liên tục 10 klux trong 24 ngày.
- Dịch chiết tảo *Haematococcus pluvialis* giàu AST hạn chế được tác hại của gốc oxy hóa hoạt động H_2O_2 lên nguyên bào sợi và nồng độ AST-EX 1 µg/ml là nồng độ tối ưu được xác định trong nghiên cứu.

  Nhóm tế bào nguyên bào sợi xử lý với H_2O_2 có những dấu hiệu lão hóa tế bào: tế bào dừng tăng sinh từ ngày 1 tới ngày 7, tế bào chất và nhân phình to (10527,25 ± 3798,10 µm^2, 383,3 ± 93,7 µm^2), tỉ lệ tế bào dương tính cao với β-galactosidase lão hóa (65,23 ± 11,70%), biểu hiện mức độ cao những nhân tố phiên mã khởi động lão hóa tế bào p53 (gấp 2,4 ± 0,6 so với đối chứng), p21 (gấp 7,0 ± 1,8 so với đối chứng), p16 (gấp 5,4 ± 0,4 so với đối chứng), gia tăng sự biểu hiện enzyme phân hủy protein khuôn nền da MMP1 (gấp 4,7 ± 1,0 so với đối chứng), MMP3 (gấp 5,0 ± 0,4 so với đối chứng), giảm sự biểu hiện protein chính trong da collagen (gấp 0,3 ± 0,1 so với đối chứng), elastin (gấp 0,1 ± 0,0 so với đối chứng) và gia tăng sự biểu hiện marker quá trình lão hóa cyclin D1(gấp 4,7 ± 0,4 so với đối chứng).

  AST-EX 1 µg/ml đã hạn chế tác động có hại của H_2O_2: giúp tế bào duy trì sự tăng sinh (thời gian nhân đôi thế hệ 198,57 ± 46,68 giờ), giảm sự gia tăng kích thước tế bào (3102,7 ± 1172,2, 255,4 ± 42,0 µm^2), giảm sự biểu hiện của b-galactosidase lão hóa (37,19 ± 5,67%), giảm sự biểu hiện các marker lão hóa p21, p16 (gấp 1,8 ± 0,2, 1,9 ± 0,3 so với đối chứng), giảm sự biểu hiện các enzyme phân hủy protein MMP-1, MMP-3 (gấp 1,7 ± 0,2, 2,1 ± 0,4 so với đối chứng), phục hồi sự biểu hiện collagen, elastin (gấp 1,7 ± 0,4, 1,2 ± 0,3 so với đối chứng), giảm sự biểu hiện cyclin D1 (gấp 1,5 ± 0,3 so với đối chứng).
- Dịch chiết tảo *Haematococcus pluvialis* 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.

Sau 8 tuần chiếu tia UVB chuột có những dấu hiệu lão hóa như sau: xuất hiện nhiều nếp nhăn và nhão da (4,5 ± 0,5, 2,5 ± 0,5), độ dày biểu bì tăng cao (58,9 ± 20,9 µm), xuất hiện tế bào viêm trong da, xuất hiện những cấu trúc collagen bất thường.

AST-EX 20 µg/ml hạn chế những biểu hiện những dấu hiệu lão hóa: giảm mức độ nhăn da và nhão da (2,5 ± 0,5, 1,0 ± 0,7), giảm độ dày biểu bì (33,5 ± 9,6 µm), giảm biểu hiện collagen bất thường, da mềm mịn, vẫn duy trì được độ đàn hồi tốt.

KIẾN NGHỊ

- Đánh giá sự biểu hiện những nhân tố gây viêm do tế bào tiết ra khi bị tác động bởi H_2O_2 như IL-6, IL-8… Từ đó xác định được hiệu quả bảo vệ tế bào của AST-EX.
- Đánh giá nồng độ các enzyme ngoại bào MMP1, MMP3 và nồng độ các protein như collagen, elastin trong da chuột trong nhóm xử lý với tia UVB và AST-EX, từ đó xác định rõ hơn hiệu quả bảo vệ protein da chuột của AST-EX.
- Xác định tính thấm của AST trên da chuột

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Brotosudarmo, T.H.P., et al., *Structures of Astaxanthin and Their Consequences for Therapeutic Application.* Int J Food Sci, 2020. **2020**: p. 1-12.
2. Bjorklund, G., et al., *The Role of Astaxanthin as a Nutraceutical in Health and Age-Related Conditions.* Molecules, 2022. **27**(21).
3. Ambati, R.R., et al., *Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications--a review.* Mar Drugs, 2014. **12**(1): p. 128-52.
4. Ambati, R.R., et al., *Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—a review.* Marine drugs, 2014. **12**(1): p. 128-152.
5. Wong, Q.Y.A. and F.T. Chew, *Defining skin aging and its risk factors: a systematic review and meta-analysis.* Scientific Reports, 2021. **11**(1): p. 22075.
6. Huang, A.H. and A.L. Chien, *Photoaging: a Review of Current Literature.* Current Dermatology Reports, 2020. **9**(1): p. 22-29.
7. Chang, M.X. and F. Xiong, *Astaxanthin and its Effects in Inflammatory Responses and Inflammation-Associated Diseases: Recent Advances and Future Directions.* Molecules, 2020. **25**(22).
8. Seki, T. and H. Sueki, *Effects of astaxanthin from Haematococcus pluvialis on human skin.* Fragrance Journal 2001. **12**: p. 98-103.
9. Tominaga, K. and N. Hongo, *Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects.* ACTA BIOCHIMICA POLONICA, 2012. **59**(1): p. 43-47.
10. Dang Diem Hong, D.T.N.M., Bui Dinh Lam, Luu Thi Tam, Nguyen Thi Thu Thuy, Nguyen Cam Ha, Le Thi Thom, Dinh Duc Hoang, Hoang Lan Anh, Ngo Thi Hoai Thu, *Combined effects of nitrate concentration and illumination conditions on the growth of microalga Haematococcus pluvialis.* Academia Joural of Biology, 2012. **34**(4): p. 493-499.
11. Gwak, Y., et al., *Comparative analyses of lipidomes and transcriptomes reveal a concerted action of multiple defensive systems against photooxidative stress in Haematococcus pluvialis.* Journal of Experimental Botany, 2014. **65**(15): p. 4317-4334.
12. Shah, M.M., et al., *Astaxanthin-Producing Green Microalga Haematococcus pluvialis: From Single Cell to High Value Commercial Products.* Front Plant Sci, 2016. **7**: p. 531.
13. Kobayashi, M., et al., *Morphological changes in the life cycle of the green alga Haematococcus pluvialis.* Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997. **84**(1): p. 94-97.
14. Zhang, C., J. Liu, and L. Zhang, *Cell cycles and proliferation patterns in Haematococcus pluvialis.* Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2017. **35**(5): p. 1205-1211.
15. Koller, M., A. Muhr, and G. Braunegg, *Microalgae as versatile cellular factories for valued products.* Algal research, 2014. **6**: p. 52-63.
16. Kindlund, P.J., *Astaxanthin to delay skin aging.* NUTRA foods, 2011. **10**(1): p. 27-31.
17. Kidd, P., *Astaxanthin, Cell Membrane Nutrient with Diverse Clinical Benefits and Anti-Aging Potential.* Alternative Medicine Review, 2011. **17**(4): p. 355-364.

18. Tominaga, K., et al., *Protective effects of astaxanthin on skin deterioration.* Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2017. **61**(1): p. 33-39.
19. Davinelli, S., M. Nielsen, and G. Scapagnini, *Astaxanthin in Skin Health, Repair, and Disease: A Comprehensive Review.* Nutrients, 2018. **10**(4).
20. Lorenz, R.T., *A technical review of Haematococcus algae.* NatuRoseTM Technical Bulletin, 1999. **60**: p. 1-12.
21. Panel, E.F., *Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the request from the European Commission on the safety of use of colouring agents in animal nutrition PART I General Principles and Astaxanthin.* EFSA J, 2005. **291**: p. 1-40.
22. Pechinskii, S.V., A.G. Kuregyan, and E.T. Oganesyan, *Chapter 1 - Synthesis of astaxanthin and its esters*, in *Global Perspectives on Astaxanthin*, G.A. Ravishankar and A. Ranga Rao, Editors. 2021, Academic Press. p. 3-18.
23. Han, D., Y. Li, and Q. Hu, *Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications.* Algae, 2013. **28**(2): p. 131-147.
24. Boussiba, S., *Carotenogenesis in the green alga Haematococcus pluvialis: Cellular physiology and stress response.* Physiologia Plantarum, 2000. **108**(2): p. 111-117.
25. Zhang, W.W., et al., *Enhancing Astaxanthin Accumulation in Haematococcus pluvialis by Coupled Light Intensity and Nitrogen Starvation in Column Photobioreactors.* J Microbiol Biotechnol, 2018. **28**(12): p. 2019-2028.
26. Wong, Y.-K., et al., *Effects of Light Intensity, Illumination Cycles on Microalgae Haematococcus Pluvialis for Production of Astaxanthin.* Journal of Marine Biology and Aquaculture, 2016. **2**.
27. Hirst, D.G. and T. Robson, *Nitric oxide physiology and pathology.* Nitric Oxide: Methods and Protocols, 2011: p. 1-13.
28. Quinlan, C.L., et al., *Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates.* Redox biology, 2013. **1**(1): p. 304-312.
29. Fransen, M., et al., *Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2012. **1822**(9): p. 1363-1373.
30. Lambeth, J.D. and A.S. Neish, *Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited.* Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2014. **9**: p. 119-145.
31. Nguyen, M.V.C., et al., *Les NADPH oxydases, Nox.* médecine/sciences, 2015. **31**: p. 43-52.
32. De Deken, X., et al., *Roles of DUOX-mediated hydrogen peroxide in metabolism, host defense, and signaling.* Antioxidants & redox signaling, 2014. **20**(17): p. 2776-2793.
33. Phaniendra, A., D.B. Jestadi, and L. Periyasamy, *Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases.* Indian journal of clinical biochemistry, 2015. **30**: p. 11-26.
34. Bresciani, G., I.B.M. da Cruz, and J. González-Gallego, *Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation.* Advances in clinical chemistry, 2015. **68**: p. 87-130.
35. Pompella, A. and A. Corti, *The changing faces of glutathione, a cellular protagonist*. 2015, Frontiers Media SA. p. 98.

36. Halliwell, B., *Free radicals and antioxidants: updating a personal view.* Nutrition reviews, 2012. **70**(5): p. 257-265.
37. Rahal, A., et al., *Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay.* BioMed research international, 2014. **2014**.
38. Kayama, Y., et al., *Diabetic Cardiovascular Disease Induced by Oxidative Stress.* Int J Mol Sci, 2015. **16**(10): p. 25234-63.
39. Abdal Dayem, A., et al., *The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles.* Int J Mol Sci, 2017. **18**(1).
40. Xuan, R.R., T.T. Niu, and H.M. Chen, *Astaxanthin blocks preeclampsia progression by suppressing oxidative stress and inflammation.* Mol Med Rep, 2016. **14**(3): p. 2697-2704.
41. Pereira, C.P.M., et al., *Antioxidant and antiinflammatory mechanisms of action of astaxanthin in cardiovascular diseases (Review).* Int J Mol Med, 2020. **47**(1): p. 37-48.
42. Sudharshan, S.J. and M. Dyavaiah, *Astaxanthin protects oxidative stress mediated DNA damage and enhances longevity in Saccharomyces cerevisiae.* Biogerontology, 2021. **22**(1): p. 81-100.
43. Voegeli, D., *Understanding the main principles of skin care in older adults.* Nursing Standard, 2012. **27**(11): p. 59-68.
44. Gromkowska-Kępka, K.J., et al., *The impact of ultraviolet radiation on skin photoaging — review of in vitro studies.* Journal of Cosmetic Dermatology, 2021. **20**(11): p. 3427-3431.
45. Guan, L.L., H.W. Lim, and T.F. Mohammad, *Sunscreens and Photoaging: A Review of Current Literature.* Am J Clin Dermatol, 2021. **22**(6): p. 819-828.
46. Poon, F., S. Kang, and A.L. Chien, *Mechanisms and treatments of photoaging.* Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine, 2015. **31**(2): p. 65-74.
47. Hayflick, L., *The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains.* Experimental Cell Research, 1965. **37**(3): p. 614-636.
48. Di Micco, R., et al., *Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities.* Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2021. **22**(2): p. 75-95.
49. Calcinotto, A., et al., *Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury.* Physiological Reviews, 2019. **99**(2): p. 1047-1078.
50. Xiong, Y. and L. Zhou, *The signaling of cellular senescence in diabetic nephropathy.* Oxidative medicine and cellular longevity, 2019. **2019**.
51. Williams, A.B. and B. Schumacher, *p53 in the DNA-damage-repair process.* Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2016. **6**(5): p. a026070.
52. Lujambio, A., *To clear, or not to clear (senescent cells)? That is the question.* Bioessays, 2016. **38**: p. S56-S64.
53. Ali, A.Y., M.R. Abedini, and B.K. Tsang, *The oncogenic phosphatase PPM1D confers cisplatin resistance in ovarian carcinoma cells by attenuating checkpoint kinase 1 and p53 activation.* Oncogene, 2012. **31**(17): p. 2175-2186.
54. Abuetabh, Y., et al., *DNA damage response revisited: the p53 family and its regulators provide endless cancer therapy opportunities.* Experimental & Molecular Medicine, 2022. **54**(10): p. 1658-1669.
55. Purvis, J.E., et al., *p53 dynamics control cell fate.* Science, 2012. **336**(6087): p. 1440-4.

56. Mijit, M., et al., *Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence.* Biomolecules, 2020. **10**(3).
57. Hsu, C.H., S.J. Altschuler, and L.F. Wu, *Patterns of Early p21 Dynamics Determine Proliferation-Senescence Cell Fate after Chemotherapy.* Cell, 2019. **178**(2): p. 361-373.e12.
58. Helmbold, H., et al., *Rb2/p130 is the dominating pocket protein in the p53–p21 DNA damage response pathway leading to senescence.* Oncogene, 2009. **28**(39): p. 3456-3467.
59. Dirac, A.M. and R. Bernards, *Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53* 210.* Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(14): p. 11731-11734.
60. Nyunoya, T., et al., *Cigarette smoke induces cellular senescence.* American journal of respiratory cell and molecular biology, 2006. **35**(6): p. 681-688.
61. Schieber, M. and N.S. Chandel, *ROS function in redox signaling and oxidative stress.* Current biology, 2014. **24**(10): p. R453-R462.
62. Coso, S., et al., *NADPH oxidases as regulators of tumor angiogenesis: current and emerging concepts.* Antioxidants & redox signaling, 2012. **16**(11): p. 1229-1247.
63. Maryanovich, M. and A. Gross, *A ROS rheostat for cell fate regulation.* Trends in cell biology, 2013. **23**(3): p. 129-134.
64. Liang, R. and S. Ghaffari, *Stem cells, redox signaling, and stem cell aging.* Antioxidants & redox signaling, 2014. **20**(12): p. 1902-1916.
65. Ristow, M. and S. Schmeisser, *Extending life span by increasing oxidative stress.* Free Radical Biology and Medicine, 2011. **51**(2): p. 327-336.
66. Scheibye-Knudsen, M., et al., *Protecting the mitochondrial powerhouse.* Trends in cell biology, 2015. **25**(3): p. 158-170.
67. Dixon, S.J. and B.R. Stockwell, *The role of iron and reactive oxygen species in cell death.* Nature chemical biology, 2014. **10**(1): p. 9-17.
68. Bakunina, N., C.M. Pariante, and P.A. Zunszain, *Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression.* Immunology, 2015. **144**(3): p. 365-373.
69. Lei, Y., et al., *Redox regulation of inflammation: old elements, a new story.* Medicinal research reviews, 2015. **35**(2): p. 306-340.
70. Abais, J.M., et al., *Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector?* Antioxidants & redox signaling, 2015. **22**(13): p. 1111-1129.
71. Cachat, J., et al., *Phagocyte NADPH oxidase and specific immunity.* Clinical science, 2015. **128**(10): p. 635-648.
72. Weyemi, U. and C. Dupuy, *The emerging role of ROS-generating NADPH oxidase NOX4 in DNA-damage responses.* Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2012. **751**(2): p. 77-81.
73. Verbon, E.H., J.A. Post, and J. Boonstra, *The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells.* Gene, 2012. **511**(1): p. 1-6.
74. Kang, S.W., S. Lee, and E.K. Lee, *ROS and energy metabolism in cancer cells: alliance for fast growth.* Archives of pharmacal research, 2015. **38**: p. 338-345.
75. Wu, W.-S., *The signaling mechanism of ROS in tumor progression.* Cancer and Metastasis Reviews, 2006. **25**: p. 695-705.

76. Reuter, S., et al., *Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?* Free radical biology and medicine, 2010. **49**(11): p. 1603-1616.
77. Chiarugi, P., *From anchorage dependent proliferation to survival: lessons from redox signalling.* IUBMB life, 2008. **60**(5): p. 301-307.
78. Davalli, P., et al., *Anticancer activity of green tea polyphenols in prostate gland.* Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2012. **2012**.
79. Assuncao, M. and J.P. Andrade, *Protective action of green tea catechins in neuronal mitochondria during aging.* Frontiers in Bioscience-Landmark, 2015. **20**(2): p. 247-262.
80. López-Otín, C., et al., *The hallmarks of aging.* Cell, 2013. **153**(6): p. 1194-1217.
81. Benz, C.C. and C. Yau, *Ageing, oxidative stress and cancer: paradigms in parallax.* Nature Reviews Cancer, 2008. **8**(11): p. 875-879.
82. Bonomini, F., L.F. Rodella, and R. Rezzani, *Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress.* Aging and disease, 2015. **6**(2): p. 109.
83. Martin, J.E. and M.T. Sheaff, *The pathology of ageing: concepts and mechanisms.* The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland, 2007. **211**(2): p. 111-113.
84. Biala, A.K., R. Dhingra, and L.A. Kirshenbaum, *Mitochondrial dynamics: orchestrating the journey to advanced age.* Journal of molecular and cellular cardiology, 2015. **83**: p. 37-43.
85. Bratic, A. and N.-G. Larsson, *The role of mitochondria in aging.* The Journal of clinical investigation, 2013. **123**(3): p. 951-957.
86. Indo, H.P., et al., *A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging.* Journal of clinical biochemistry and nutrition, 2015. **56**(1): p. 1-7.
87. Genova, M.L. and G. Lenaz, *The interplay between respiratory supercomplexes and ROS in aging.* Antioxidants & redox signaling, 2015. **23**(3): p. 208-238.
88. Fontana, L. and L. Partridge, *Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans.* Cell, 2015. **161**(1): p. 106-118.
89. Zhang, Y., et al., *Mice deficient in both Mn superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 have increased oxidative damage and a greater incidence of pathology but no reduction in longevity.* Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences, 2009. **64**(12): p. 1212-1220.
90. Kwon, M.-J., et al., *SOD3 variant, R213G, altered SOD3 function, leading to ROS-mediated inflammation and damage in multiple organs of premature aging mice.* Antioxidants & redox signaling, 2015. **23**(12): p. 985-999.
91. Edrey, Y.H. and A.B. Salmon, *Revisiting an age-old question regarding oxidative stress.* Free Radical Biology and Medicine, 2014. **71**: p. 368-378.
92. Bertram, C. and R. Hass, *Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging.* 2008.
93. Fimognari, C., *Role of oxidative RNA damage in chronic-degenerative diseases.* Oxidative medicine and cellular longevity, 2015. **2015**.
94. Shimi, T. and R.D. Goldman, *Nuclear lamins and oxidative stress in cell proliferation and longevity.* Cancer Biology and the Nuclear Envelope: Recent Advances May Elucidate Past Paradoxes, 2014: p. 415-430.

95. Rinnerthaler, M., et al., *Oxidative stress in aging human skin.* Biomolecules, 2015. **5**(2): p. 545-589.
96. Yan, L.-J., *Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance.* Redox Biology, 2014. **2**: p. 165-169.
97. Hong, J.W., et al., *Biochemical Composition of a Korean Domestic Microalga Chlorella vulgaris KNUA027.* Microbiology and Biotechnology Letters, 2016. **44**(3): p. 400-407.
98. Imamoglu, E., F.V. Sukan, and M.C. Dalay. *Effect of Different Culture Media and Light Intensities on Growth of Haematococcus pluvialis*. 2007.
99. Tâm, L.T., et al., *Cảm ứng tích lũy astaxanthin ở vi tảo lục Haematococcus pluvialis dưới điều kiện thiếu hụt nito và ánh sáng cao.* Proceedings of Hội nghị KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC TOÀN QUỐC 2013, 2013: p. 523-527.
100. Sarada, R., *An Efficient Method for Extraction of Astaxanthin from Green Alga Haematococcus pluvialis.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**: p. 7585-7588.
101. Yuan, J.P. and F. Chen, *Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of Haematococcus pluvialis during saponification.* J Agric Food Chem, 1999. **47**(1): p. 31-5.
102. Chou, P.-H., et al., *Fluid-induced, shear stress-regulated extracellular matrix and matrix metalloproteinase genes expression on human annulus fibrosus cells.* Stem Cell Research & Therapy, 2016. **7**(1): p. 34.
103. Chou, P.-H., et al., *Development of a two-step protocol for culture expansion of human annulus fibrosus cells with TGF-β1 and FGF-2.* Stem Cell Research & Therapy, 2016. **7**(1): p. 89.
104. Mavrogonatou, E., A. Konstantinou, and D. Kletsas, *Long-term exposure to TNF-α leads human skin fibroblasts to a p38 MAPK- and ROS-mediated premature senescence.* Biogerontology, 2018. **19**(3): p. 237-249.
105. Zhong, G., et al. *CSN5 silencing inhibits invasion and arrests cell cycle progression in human colorectal cancer SW480 and LS174T cells in vitro*. International journal of clinical and experimental pathology, 2015. **8**, 2809-2815.
106. Li, C., et al., *OPCML is frequently methylated in human colorectal cancer and its restored expression reverses EMT via downregulation of smad signaling.* Am J Cancer Res, 2015. **5**(5): p. 1635-48.
107. *<Biodiversity of H pluvialis by ISSR.pdf>*.
108. Agrawal, R. and I.P. Kaur, *Inhibitory Effect of Encapsulated Curcumin on Ultraviolet-Induced Photoaging in Mice.* Rejuvenation research, 2010. **13**: p. 397-410.
109. Bissett, D.L., D.P. Hannon, and T.V. Orr, *An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin.* Photochem Photobiol, 1987. **46**(3): p. 367-78.
110. Yuan, J.-P. and F. Chen, *Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga Haematococcus pluvialis.* Food Chemistry, 2000. **68**(4): p. 443-448.
111. Solovchenko, A.E., *Recent breakthroughs in the biology of astaxanthin accumulation by microalgal cell.* Photosynthesis research, 2015. **125**: p. 437-449.

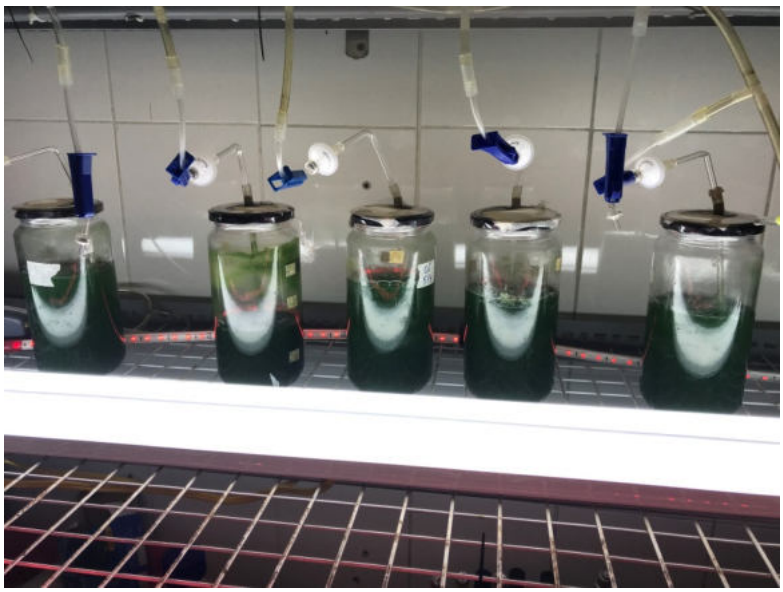
112. Todorovic, B., et al., *Identification and Content of Astaxanthin and Its Esters from Microalgae Haematococcus pluvialis by HPLC-DAD and LC-QTOF-MS after Extraction with Various Solvents.* Plants (Basel), 2021. **10**(11).
113. Galarza, J.I., et al., *Deesterification of astaxanthin and intermediate esters from Haematococcus pluvialis subjected to stress.* Biotechnol Rep (Amst), 2019. **23**: p. e00351.
114. Kim, B., et al., *Cell disruption and astaxanthin extraction from Haematococcus pluvialis: Recent advances.* Bioresource Technology, 2022. **343**: p. 126124.
115. Irshad, M., et al., *Safe and Complete Extraction of Astaxanthin from Haematococcus pluvialis by Efficient Mechanical Disruption of Cyst Cell Wall.* International Journal of Food Engineering, 2019. **15**(10).
116. Schmid, B., et al., *Drying Microalgae Using an Industrial Solar Dryer: A Biomass Quality Assessment.* Foods, 2022. **11**(13).
117. Tan, H.T. and N.M.H. Khong, *Optimization of the Freezing-Thawing Method for Extracting Phycobiliproteins from Arthrospira sp.* 2020. **25**(17).
118. Jaime, L., et al., *Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids' extraction from Haematococcus pluvialis microalgae.* LWT - Food Science and Technology, 2010. **43**(1): p. 105-112.
119. Chintong, S., et al., *In Vitro Antioxidant, Antityrosinase, and Cytotoxic Activities of Astaxanthin from Shrimp Waste.* Antioxidants (Basel, Switzerland), 2019. **8**(5): p. 1-11.
120. Vj, M., et al., *In Vitro Culture Methods of Skin Cells for Optimal Skin Reconstruction by Tissue Engineering.* 2011.
121. Kiyoshima, T., et al., *Oxidative stress caused by a low concentration of hydrogen peroxide induces senescence-like changes in mouse gingival fibroblasts.* Int J Mol Med, 2012. **30**(5): p. 1007-12.
122. Chen, J.H., S.E. Ozanne, and C.N. Hales, *Methods of cellular senescence induction using oxidative stress.* Methods Mol Biol, 2007. **371**: p. 179-89.
123. Davalli, P., et al., *ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases.* Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 3565127.
124. Pole, A., M. Dimri, and G. P. Dimri, *Oxidative stress, cellular senescence and ageing.* AIMS Molecular Science, 2016. **3**(3): p. 300-324.
125. Pieńkowska, N., et al., *Effect of antioxidants on the H₂O₂-induced premature senescence of human fibroblasts.* Aging, 2020. **12**(2): p. 1910-1927.
126. Chen, Q. and B.N. Ames, *Senescence-Like Growth Arrest Induced by Hydrogen Peroxide in Human Diploid Fibroblast F65 Cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(10): p. 4130-4134.
127. Wright, J., et al., *A growing role for hypertrophy in senescence.* FEMS Yeast Res, 2013. **13**(1): p. 2-6.
128. Varma, S.R., et al., *Protective Effects of Triphala on Dermal Fibroblasts and Human Keratinocytes.* PLOS ONE, 2016. **11**(1): p. e0145921.
129. Ezure, T. and S. Amano, *Stanniocalcin-1 mediates negative regulatory action of epidermal layer on expression of matrix-related genes in dermal fibroblasts.* Biofactors, 2019. **45**(6): p. 944-949.

130. Brenneisen, P., et al., *Hydrogen peroxide (H2O2) increases the steady-state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts.* Free Radic Biol Med, 1997. **22**(3): p. 515-24.
131. Alge-Priglinger, C.S., et al., *Oxidative stress-mediated induction of MMP-1 and MMP-3 in human RPE cells.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(11): p. 5495-503.
132. Galicka, A., et al., *Anethole prevents hydrogen peroxide-induced apoptosis and collagen metabolism alterations in human skin fibroblasts.* Molecular and Cellular Biochemistry, 2014. **394**(1): p. 217-224.
133. Hwang, J.W., et al., *Effect of Extracellular Matrix Membrane on Bone Formation in a Rabbit Tibial Defect Model.* Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 6715295.
134. Lim, S.H., et al., *Luteolin suppresses UVB-induced photoageing by targeting JNK1 and p90 RSK2.* J Cell Mol Med, 2013. **17**(5): p. 672-80.
135. Kim, H.N., et al., *Anti-photoaging properties of the phosphodiesterase 3 inhibitor cilostazol in ultraviolet B-irradiated hairless mice.* Sci Rep, 2016. **6**(1): p. 1-10.
136. Kang, S.J., et al., *Beneficial effects of dried pomegranate juice concentrated powder on ultraviolet B-induced skin photoaging in hairless mice.* Exp Ther Med, 2017. **14**(2): p. 1023-1036.
137. Xu, Y.K., et al., *Chemical composition and oxidative evolution of Sacha Inchi oil from Xishuangbanna (China).* Grasas y Aceites, 2014. **65**(1): p. e012.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: hệ thống chiếu chuột bằng UVB

Phục lục 2: hệ thống nuôi tảo



Phụ lục 1: So sánh thống kê ABTS AST

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks Thursday, February 02, 2023, 9:57:37 AM

Dast-EXa source: ABTS AST in Notebook1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Col 1	8	0	8.771	5.166	9.590
Col 2	8	0	15.707	14.943	17.664
Col 3	8	0	36.563	35.165	38.491
Col 4	8	0	59.652	55.534	60.544
Col 5	8	0	82.872	80.862	84.611
Col 6	8	0	90.231	88.592	91.139

H = 44.634 with 5 degrees of freedom. (P = <0.001)

The differences in the median values among the treast-EXment groups are greast-EXer than would be expected by chance; there is a stast-EXistically significant difference (P = <0.001)

To isolast-EXe the group or groups thast-EX differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0.05
Col 6 vs Col 1	305.000	7.702	Yes
Col 6 vs Col 2	255.000	6.440	Yes
Col 6 vs Col 3	184.000	4.647	Yes
Col 6 vs Col 4	120.000	3.030	No
Col 6 vs Col 5	48.000	1.212	Do Not Test
Col 5 vs Col 1	257.000	6.490	Yes
Col 5 vs Col 2	207.000	5.228	Yes
Col 5 vs Col 3	136.000	3.435	No
Col 5 vs Col 4	72.000	1.818	Do Not Test
Col 4 vs Col 1	185.000	4.672	Yes
Col 4 vs Col 2	135.000	3.409	No
Col 4 vs Col 3	64.000	1.616	Do Not Test
Col 3 vs Col 1	121.000	3.056	No
Col 3 vs Col 2	71.000	1.793	Do Not Test

Col 2 vs Col 150.000 1.263 Do Not Test

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between the two rank sums thast-EX enclose thast-EX comparison. For example, if you had four rank sums sorted in order, and found no significant difference between rank sums 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note thast-EX not testing the enclosed rank sums is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treast-EXed as if there is no significant difference between the rank sums, even though one may appear to exist.

Phụ lục 2: Xử lý thống kê ABTS Trolox

Dast-EXa source: Dast-EXa 2 in Notebook1.JNB

Normality Test: Passed(P = 0.069)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.918)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	8	0	15.080	5.897	2.085
Col 2	8	0	20.476	5.075	1.794
Col 3	8	0	31.724	4.944	1.748
Col 4	8	0	41.125	6.480	2.291
Col 5	8	0	61.702	3.797	1.342

Source of Variast-EXion	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	10914.101	2728.525	96.506	<0.001
Residual	35	989.564	28.273		
Total	39	11903.665			

The differences in the mean values among the treast-EXment groups are greast-EXer than would be expected by chance; there is a stast-EXistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Col 5 vs. Col 1	46.623	17.536	<0.001	0.005	Yes

Col 5 vs. Col 2	41.227	15.507	<0.001	0.006	Yes
Col 5 vs. Col 3	29.978	11.276	<0.001	0.006	Yes
Col 4 vs. Col 1	26.046	9.797	<0.001	0.007	Yes
Col 4 vs. Col 2	20.650	7.767	<0.001	0.009	Yes
Col 5 vs. Col 4	20.577	7.740	<0.001	0.010	Yes
Col 3 vs. Col 1	16.645	6.261	<0.001	0.013	Yes
Col 3 vs. Col 2	11.248	4.231	<0.001	0.017	Yes
Col 4 vs. Col 3	9.401	3.536	0.001	0.025	Yes
Col 2 vs. Col 1	5.396	2.030	0.050	0.050	No

Phụ lục 3: Xử lý thống kê FRAP AST

Dast-EXa source: Dast-EXa 3 in Notebook1.JNB

Normality Test: Passed(P = 0.130)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.947)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	8	0	71.336	34.606	12.235
Col 2	8	0	91.627	30.484	10.778
Col 3	8	0	160.799	33.216	11.744
Col 4	8	0	380.195	26.451	9.352
Col 5	8	0	524.005	49.351	17.448
Col 6	8	0	784.743	43.521	15.387

Source of Variast-EXion	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	5	3193028.841	638605.768	463.912	<0.001
Residual		4257815.799	1376.567		
Total		473250844.639			

The differences in the mean values among the treast-EXment groups are greast-EXer than would be expected by chance; there is a stast-EXistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Col 6 vs. Col 1	713.407	38.456	<0.001	0.003	Yes
Col 6 vs. Col 2	693.117	37.363	<0.001	0.004	Yes
Col 6 vs. Col 3	623.944	33.634	<0.001	0.004	Yes
Col 5 vs. Col 1	452.670	24.401	<0.001	0.004	Yes

Col 5 vs. Col 2	432.379	23.308	<0.001	0.005	Yes
Col 6 vs. Col 4	404.548	21.807	<0.001	0.005	Yes
Col 5 vs. Col 3	363.206	19.579	<0.001	0.006	Yes
Col 4 vs. Col 1	308.859	16.649	<0.001	0.006	Yes
Col 4 vs. Col 2	288.568	15.555	<0.001	0.007	Yes
Col 6 vs. Col 5	260.738	14.055	<0.001	0.009	Yes
Col 4 vs. Col 3	219.396	11.827	<0.001	0.010	Yes
Col 5 vs. Col 4	143.810	7.752	<0.001	0.013	Yes
Col 3 vs. Col 1	89.463	4.823	<0.001	0.017	Yes
Col 3 vs. Col 2	69.173	3.729	<0.001	0.025	Yes
Col 2 vs. Col 1	20.291	1.094	0.280	0.050	No

Phụ lục 4: Xử lý thống kê FRAP Trolox

Dast-EXa source: FRAP TROLOX in Notebook1.JNB

Normality Test: Passed(P = 0.134)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.155)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	8	0	67.063	37.483	13.252
Col 2	8	0	141.532	42.177	14.912
Col 3	8	0	286.564	60.842	21.511
Col 4	8	0	412.062	21.367	7.554
Col 5	8	0	370.103	38.344	13.557
Col 6	8	0	592.208	75.536	26.706

Source of Variast-EXion	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	5	1452832.198	290566.440	120.085	<0.001
Residual	42	101626.047	2419.668		
Total	47	1554458.244			

The differences in the mean values among the treast-EXment groups are greast-EXer than would be expected by chance; there is a stast-EXistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Col 6 vs. Col 1	525.145	21.352	<0.001	0.003	Yes
Col 6 vs. Col 2	450.675	18.324	<0.001	0.004	Yes
Col 4 vs. Col 1	344.999	14.027	<0.001	0.004	Yes

Col 6 vs. Col 3	305.644	12.427	<0.001	0.004	Yes
Col 5 vs. Col 1	303.040	12.321	<0.001	0.005	Yes
Col 4 vs. Col 2	270.529	10.999	<0.001	0.005	Yes
Col 5 vs. Col 2	228.571	9.293	<0.001	0.006	Yes
Col 6 vs. Col 5	222.104	9.030	<0.001	0.006	Yes
Col 3 vs. Col 1	219.501	8.925	<0.001	0.007	Yes
Col 6 vs. Col 4	180.146	7.324	<0.001	0.009	Yes
Col 3 vs. Col 2	145.031	5.897	<0.001	0.010	Yes
Col 4 vs. Col 3	125.498	5.103	<0.001	0.013	Yes
Col 5 vs. Col 3	83.539	3.397	0.002	0.017	Yes
Col 2 vs. Col 1	74.469	3.028	0.004	0.025	Yes
Col 4 vs. Col 5	41.958	1.706	0.095	0.050	No

Phụ lực 5: Xử lý thống kê nội dung Độc tính in vitro

Dast-EXa source: Dast-EXa 5 in Notebook1.JNB

Normality Test: Passed(P = 0.793)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.544)

Group Name	**N**	**Missing**	**Mean**	**Std Dev**	**SEM**
Col 1	5	0	0.422	0.0572	0.0256
Col 2	5	0	0.440	0.0361	0.0161
Col 3	5	0	0.410	0.0354	0.0158
Col 4	5	0	0.404	0.0336	0.0150
Col 5	5	0	0.410	0.0324	0.0145
Col 6	5	0	0.0660	0.0270	0.0121
Col 7	5	0	0.440	0.0394	0.0176
Col 8	5	0	0.420	0.0387	0.0173
Col 9	5	0	0.414	0.0586	0.0262
Col 10	5	0	0.428	0.0295	0.0132
Col 11	5	0	0.412	0.0432	0.0193
Col 12	5	0	0.0360	0.0114	0.00510

Source of Variast-EXion	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**P**
Between Groups	11	1.144	0.104	69.029	<0.001
Residual	48	0.0723	0.00151		
Total	59	1.216			

The differences in the mean values among the treast-EXment groups are greast-EXer than would be expected by chance; there is a stast-EXistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):

Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Col 7 vs. Col 12	0.404	16.457	<0.001	0.001	Yes
Col 2 vs. Col 12	0.404	16.457	<0.001	0.001	Yes
Col 10 vs. Col 12	0.392	15.968	<0.001	0.001	Yes
Col 1 vs. Col 12	0.386	15.723	<0.001	0.001	Yes
Col 8 vs. Col 12	0.384	15.642	<0.001	0.001	Yes
Col 9 vs. Col 12	0.378	15.398	<0.001	0.001	Yes
Col 11 vs. Col 12	0.376	15.316	<0.001	0.001	Yes
Col 7 vs. Col 6	0.374	15.235	<0.001	0.001	Yes
Col 2 vs. Col 6	0.374	15.235	<0.001	0.001	Yes
Col 5 vs. Col 12	0.374	15.235	<0.001	0.001	Yes
Col 3 vs. Col 12	0.374	15.235	<0.001	0.001	Yes
Col 4 vs. Col 12	0.368	14.990	<0.001	0.001	Yes
Col 10 vs. Col 6	0.362	14.746	<0.001	0.001	Yes
Col 1 vs. Col 6	0.356	14.501	<0.001	0.001	Yes
Col 8 vs. Col 6	0.354	14.420	<0.001	0.001	Yes
Col 9 vs. Col 6	0.348	14.176	<0.001	0.001	Yes
Col 11 vs. Col 6	0.346	14.094	<0.001	0.001	Yes
Col 3 vs. Col 6	0.344	14.013	<0.001	0.001	Yes
Col 5 vs. Col 6	0.344	14.013	<0.001	0.001	Yes
Col 4 vs. Col 6	0.338	13.768	<0.001	0.001	Yes
Col 2 vs. Col 4	0.0360	1.466	0.149	0.001	No
Col 7 vs. Col 4	0.0360	1.466	0.149	0.001	No
Col 7 vs. Col 3	0.0300	1.222	0.228	0.001	No
Col 7 vs. Col 5	0.0300	1.222	0.228	0.001	No
Col 2 vs. Col 3	0.0300	1.222	0.228	0.001	No
Col 2 vs. Col 5	0.0300	1.222	0.228	0.001	No
Col 6 vs. Col 12	0.0300	1.222	0.228	0.001	No
Col 7 vs. Col 11	0.0280	1.141	0.260	0.001	No
Col 2 vs. Col 11	0.0280	1.141	0.260	0.001	No
Col 7 vs. Col 9	0.0260	1.059	0.295	0.001	No
Col 2 vs. Col 9	0.0260	1.059	0.295	0.001	No
Col 10 vs. Col 4	0.0240	0.978	0.333	0.001	No
Col 7 vs. Col 8	0.0200	0.815	0.419	0.002	No
Col 2 vs. Col 8	0.0200	0.815	0.419	0.002	No
Col 7 vs. Col 1	0.0180	0.733	0.467	0.002	No
Col 10 vs. Col 3	0.0180	0.733	0.467	0.002	No
Col 10 vs. Col 5	0.0180	0.733	0.467	0.002	No
Col 2 vs. Col 1	0.0180	0.733	0.467	0.002	No
Col 1 vs. Col 4	0.0180	0.733	0.467	0.002	No
Col 8 vs. Col 4	0.0160	0.652	0.518	0.002	No
Col 10 vs. Col 11	0.0160	0.652	0.518	0.002	No
Col 10 vs. Col 9	0.0140	0.570	0.571	0.002	No
Col 1 vs. Col 5	0.0120	0.489	0.627	0.002	No

Col 1 vs. Col 3	0.0120	0.489	0.627	0.002	No
Col 7 vs. Col 10	0.0120	0.489	0.627	0.002	No
Col 2 vs. Col 10	0.0120	0.489	0.627	0.002	No
Col 8 vs. Col 3	0.0100	0.407	0.686	0.003	No
Col 8 vs. Col 5	0.0100	0.407	0.686	0.003	No
Col 9 vs. Col 4	0.01000	0.407	0.686	0.003	No
Col 1 vs. Col 11	0.01000	0.407	0.686	0.003	No
Col 10 vs. Col 8	0.00800	0.326	0.746	0.003	No
Col 11 vs. Col 4	0.00800	0.326	0.746	0.003	No
Col 1 vs. Col 9	0.00800	0.326	0.746	0.004	No
Col 8 vs. Col 11	0.00800	0.326	0.746	0.004	No
Col 10 vs. Col 1	0.00600	0.244	0.808	0.004	No
Col 5 vs. Col 4	0.00600	0.244	0.808	0.005	No
Col 8 vs. Col 9	0.00600	0.244	0.808	0.005	No
Col 3 vs. Col 4	0.00600	0.244	0.808	0.006	No
Col 9 vs. Col 5	0.00400	0.163	0.871	0.006	No
Col 9 vs. Col 3	0.00400	0.163	0.871	0.007	No
Col 1 vs. Col 8	0.00200	0.0815	0.935	0.009	No
Col 9 vs. Col 11	0.00200	0.0815	0.935	0.010	No
Col 11 vs. Col 3	0.00200	0.0815	0.935	0.013	No
Col 11 vs. Col 5	0.00200	0.0815	0.935	0.017	No
Col 7 vs. Col 2	0.000	0.000	1.000	0.025	No
Col 3 vs. Col 5	0.000	0.000	1.000	0.050	No

Phụ lục 6:

Dast-EXa source: Dast-EXa 6 in Notebook1.JNB

Normality Test: Passed(P = 0.460)

Equal Variance Test: Failed (P < 0.050)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	6	0	0.174	0.00742	0.00303
Col 2	6	0	0.233	0.0441	0.0180
Col 3	6	0	0.458	0.00956	0.00390
Col 4	6	0	0.470	0.00928	0.00379
Col 5	6	0	0.151	0.0361	0.0147
Col 6	6	0	0.140	0.0451	0.0184
Col 7	6	0	0.135	0.0387	0.0158
Col 8	6	0	0.141	0.0265	0.0108
Col 9	6	0	0.168	0.0191	0.00781
Col 10	6	0	0.175	0.0496	0.0202
Col 11	6	0	0.187	0.0380	0.0155
Col 12	6	0	0.206	0.0484	0.0198
Col 13	6	0	0.170	0.0264	0.0108
Col 14	6	0	0.181	0.0350	0.0143
Col 15	6	0	0.294	0.0579	0.0236

Col 16	6	0	0.345	0.0399	0.0163
Col 17	6	0	0.166	0.00893	0.00365
Col 18	6	0	0.200	0.0320	0.0131
Col 19	6	0	0.316	0.0374	0.0153
Col 20	6	0	0.328	0.0476	0.0194

Source of Variast-EXion	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**P**
Between Groups	19	1.192	0.0627	48.356	<0.001
Residual	100	0.130	0.00130		
Total	119	1.322			

The differences in the mean values among the treast-EXment groups are greast-EXer than would be expected by chance; there is a stast-EXistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor:

Comparison	**Diff of Means**	**t**	**Unadjusted P**	**Critical Level**	**Significant?**
Col 4 vs. Col 7	0.335	16.110	<0.001	0.000	Yes
Col 4 vs. Col 6	0.330	15.886	<0.001	0.000	Yes
Col 4 vs. Col 8	0.329	15.814	<0.001	0.000	Yes
Col 3 vs. Col 7	0.322	15.501	<0.001	0.000	Yes
Col 4 vs. Col 5	0.320	15.373	<0.001	0.000	Yes
Col 3 vs. Col 6	0.318	15.277	<0.001	0.000	Yes
Col 3 vs. Col 8	0.316	15.205	<0.001	0.000	Yes
Col 3 vs. Col 5	0.307	14.764	<0.001	0.000	Yes
Col 4 vs. Col 17	0.304	14.619	<0.001	0.000	Yes
Col 4 vs. Col 9	0.303	14.555	<0.001	0.000	Yes
Col 4 vs. Col 13	0.301	14.459	<0.001	0.000	Yes
Col 4 vs. Col 1	0.296	14.259	<0.001	0.000	Yes
Col 4 vs. Col 10	0.295	14.179	<0.001	0.000	Yes
Col 3 vs. Col 17	0.291	14.010	<0.001	0.000	Yes
Col 3 vs. Col 9	0.290	13.946	<0.001	0.000	Yes
Col 4 vs. Col 14	0.289	13.914	<0.001	0.000	Yes
Col 3 vs. Col 13	0.288	13.850	<0.001	0.000	Yes
Col 3 vs. Col 1	0.284	13.650	<0.001	0.000	Yes
Col 4 vs. Col 11	0.283	13.626	<0.001	0.000	Yes
Col 3 vs. Col 10	0.282	13.569	<0.001	0.000	Yes
Col 3 vs. Col 14	0.277	13.305	<0.001	0.000	Yes
Col 3 vs. Col 11	0.271	13.016	<0.001	0.000	Yes
Col 4 vs. Col 18	0.270	13.008	<0.001	0.000	Yes
Col 4 vs. Col 12	0.264	12.696	<0.001	0.000	Yes

Col 3 vs. Col 180.258	12.399	<0.001	0.000	Yes
Col 3 vs. Col 120.251	12.087	<0.001	0.000	Yes
Col 4 vs. Col 2 0.237	11.397	<0.001	0.000	Yes
Col 3 vs. Col 2 0.224	10.788	<0.001	0.000	Yes
Col 16 vs. Col 70.210	10.091	<0.001	0.000	Yes
Col 16 vs. Col 60.205	9.867	<0.001	0.000	Yes
Col 16 vs. Col 80.204	9.794	<0.001	0.000	Yes
Col 16 vs. Col 50.195	9.354	<0.001	0.000	Yes
Col 20 vs. Col 70.193	9.276	<0.001	0.000	Yes
Col 20 vs. Col 60.188	9.051	<0.001	0.000	Yes
Col 20 vs. Col 80.187	8.979	<0.001	0.000	Yes
Col 19 vs. Col 70.181	8.704	<0.001	0.000	Yes
Col 16 vs. Col 170.179	8.600	<0.001	0.000	Yes
Col 20 vs. Col 50.178	8.538	<0.001	0.000	Yes
Col 16 vs. Col 90.178	8.536	<0.001	0.000	Yes
Col 19 vs. Col 60.176	8.480	<0.001	0.000	Yes
Col 4 vs. Col 150.176	8.464	<0.001	0.000	Yes
Col 16 vs. Col 130.176	8.440	<0.001	0.000	Yes
Col 19 vs. Col 80.175	8.408	<0.001	0.000	Yes
Col 16 vs. Col 10.171	8.239	<0.001	0.000	Yes
Col 16 vs. Col 100.170	8.159	<0.001	0.000	Yes
Col 19 vs. Col 50.166	7.967	<0.001	0.000	Yes
Col 16 vs. Col 140.164	7.895	<0.001	0.000	Yes
Col 3 vs. Col 150.163	7.855	<0.001	0.000	Yes
Col 20 vs. Col 170.162	7.785	<0.001	0.000	Yes
Col 20 vs. Col 90.161	7.721	<0.001	0.000	Yes
Col 15 vs. Col 70.159	7.646	<0.001	0.000	Yes
Col 20 vs. Col 130.159	7.625	<0.001	0.000	Yes
Col 16 vs. Col 110.158	7.606	<0.001	0.000	Yes
Col 20 vs. Col 10.154	7.424	<0.001	0.000	Yes
Col 15 vs. Col 60.154	7.422	<0.001	0.000	Yes
Col 4 vs. Col 190.154	7.406	<0.001	0.000	Yes
Col 15 vs. Col 80.153	7.350	<0.001	0.000	Yes
Col 20 vs. Col 100.153	7.344	<0.001	0.000	Yes
Col 19 vs. Col 170.150	7.214	<0.001	0.000	Yes
Col 19 vs. Col 90.149	7.149	<0.001	0.000	Yes
Col 20 vs. Col 140.147	7.080	<0.001	0.000	Yes
Col 19 vs. Col 130.147	7.053	<0.001	0.000	Yes
Col 16 vs. Col 180.145	6.989	<0.001	0.000	Yes
Col 15 vs. Col 50.144	6.909	<0.001	0.000	Yes
Col 19 vs. Col 10.142	6.853	<0.001	0.000	Yes
Col 4 vs. Col 200.142	6.834	<0.001	0.000	Yes
Col 3 vs. Col 190.141	6.797	<0.001	0.000	Yes
Col 20 vs. Col 110.141	6.791	<0.001	0.000	Yes
Col 19 vs. Col 100.141	6.773	<0.001	0.000	Yes
Col 16 vs. Col 120.139	6.677	<0.001	0.000	Yes
Col 19 vs. Col 140.135	6.508	<0.001	0.000	Yes
Col 3 vs. Col 200.129	6.225	<0.001	0.000	Yes

Col 19 vs. Col 110.129	6.220	<0.001	0.000	Yes
Col 20 vs. Col 180.128	6.174	<0.001	0.000	Yes
Col 15 vs. Col 170.128	6.156	<0.001	0.000	Yes
Col 15 vs. Col 90.127	6.091	<0.001	0.000	Yes
Col 4 vs. Col 160.125	6.019	<0.001	0.000	Yes
Col 15 vs. Col 130.125	5.995	<0.001	0.000	Yes
Col 20 vs. Col 120.122	5.861	<0.001	0.000	Yes
Col 15 vs. Col 10.121	5.795	<0.001	0.000	Yes
Col 15 vs. Col 100.119	5.715	<0.001	0.000	Yes
Col 19 vs. Col 180.116	5.603	<0.001	0.000	Yes
Col 15 vs. Col 140.113	5.450	<0.001	0.000	Yes
Col 3 vs. Col 160.112	5.410	<0.001	0.000	Yes
Col 16 vs. Col 20.112	5.378	<0.001	0.000	Yes
Col 19 vs. Col 120.110	5.290	<0.001	0.000	Yes
Col 15 vs. Col 110.107	5.162	<0.001	0.000	Yes
Col 2 vs. Col 70.0980	4.713	<0.001	0.000	Yes
Col 20 vs. Col 20.0949	4.563	<0.001	0.001	Yes
Col 15 vs. Col 180.0945	4.545	<0.001	0.001	Yes
Col 2 vs. Col 60.0933	4.488	<0.001	0.001	Yes
Col 2 vs. Col 80.0918	4.416	<0.001	0.001	Yes
Col 15 vs. Col 120.0880	4.232	<0.001	0.001	Yes
Col 19 vs. Col 20.0830	3.991	<0.001	0.001	Yes
Col 2 vs. Col 50.0827	3.975	<0.001	0.001	Yes
Col 12 vs. Col 70.0710	3.414	<0.001	0.001	No
Col 2 vs. Col 170.0670	3.222	0.002	0.001	No
Col 12 vs. Col 60.0663	3.190	0.002	0.001	No
Col 2 vs. Col 90.0657	3.158	0.002	0.001	No
Col 12 vs. Col 80.0648	3.118	0.002	0.001	No
Col 18 vs. Col 70.0645	3.102	0.002	0.001	No
Col 2 vs. Col 130.0637	3.062	0.003	0.001	No
Col 15 vs. Col 20.0610	2.934	0.004	0.001	No
Col 18 vs. Col 60.0598	2.877	0.005	0.001	No
Col 2 vs. Col 10.0595	2.861	0.005	0.001	No
Col 18 vs. Col 80.0583	2.805	0.006	0.001	No
Col 2 vs. Col 100.0578	2.781	0.006	0.001	No
Col 12 vs. Col 50.0557	2.677	0.009	0.001	No
Col 2 vs. Col 140.0523	2.517	0.013	0.001	No
Col 11 vs. Col 70.0517	2.485	0.015	0.001	No
Col 16 vs. Col 150.0508	2.445	0.016	0.001	No
Col 18 vs. Col 50.0492	2.364	0.020	0.001	No
Col 11 vs. Col 60.0470	2.260	0.026	0.001	No
Col 2 vs. Col 110.0463	2.228	0.028	0.001	No
Col 14 vs. Col 70.0457	2.196	0.030	0.001	No
Col 11 vs. Col 80.0455	2.188	0.031	0.001	No
Col 14 vs. Col 60.0410	1.972	0.051	0.001	No
Col 10 vs. Col 70.0402	1.932	0.056	0.001	No
Col 12 vs. Col 170.0400	1.924	0.057	0.001	No
Col 14 vs. Col 80.0395	1.900	0.060	0.001	No

Col 12 vs. Col 90.0387	1.859	0.066	0.001	No
Col 1 vs. Col 70.0385	1.851	0.067	0.001	No
Col 12 vs. Col 130.0367	1.763	0.081	0.001	No
Col 11 vs. Col 50.0363	1.747	0.084	0.001	No
Col 10 vs. Col 60.0355	1.707	0.091	0.001	No
Col 13 vs. Col 70.0343	1.651	0.102	0.001	No
Col 10 vs. Col 80.0340	1.635	0.105	0.001	No
Col 20 vs. Col 150.0339	1.629	0.106	0.001	No
Col 1 vs. Col 60.0338	1.627	0.107	0.001	No
Col 18 vs. Col 170.0335	1.611	0.110	0.001	No
Col 2 vs. Col 180.0335	1.611	0.110	0.001	No
Col 12 vs. Col 10.0325	1.563	0.121	0.001	No
Col 1 vs. Col 80.0323	1.555	0.123	0.001	No
Col 9 vs. Col 70.0323	1.555	0.123	0.001	No
Col 18 vs. Col 90.0322	1.547	0.125	0.001	No
Col 17 vs. Col 70.0310	1.491	0.139	0.001	No
Col 12 vs. Col 100.0308	1.483	0.141	0.001	No
Col 14 vs. Col 50.0303	1.459	0.148	0.001	No
Col 18 vs. Col 130.0302	1.451	0.150	0.001	No
Col 13 vs. Col 60.0297	1.427	0.157	0.001	No
Col 16 vs. Col 190.0288	1.387	0.169	0.001	No
Col 13 vs. Col 80.0282	1.355	0.179	0.001	No
Col 9 vs. Col 60.0277	1.330	0.186	0.001	No
Col 2 vs. Col 120.0270	1.298	0.197	0.001	No
Col 17 vs. Col 60.0263	1.266	0.208	0.001	No
Col 9 vs. Col 80.0262	1.258	0.211	0.001	No
Col 18 vs. Col 10.0260	1.250	0.214	0.001	No
Col 12 vs. Col 140.0253	1.218	0.226	0.001	No
Col 17 vs. Col 80.0248	1.194	0.235	0.001	No
Col 10 vs. Col 50.0248	1.194	0.235	0.001	No
Col 18 vs. Col 100.0243	1.170	0.245	0.001	No
Col 1 vs. Col 50.0232	1.114	0.268	0.001	No
Col 19 vs. Col 150.0220	1.058	0.293	0.001	No
Col 11 vs. Col 170.0207	0.994	0.323	0.001	No
Col 12 vs. Col 110.0193	0.930	0.355	0.001	No
Col 11 vs. Col 90.0193	0.930	0.355	0.001	No
Col 13 vs. Col 50.0190	0.914	0.363	0.002	No
Col 18 vs. Col 140.0188	0.906	0.367	0.002	No
Col 11 vs. Col 130.0173	0.834	0.407	0.002	No
Col 9 vs. Col 50.0170	0.818	0.416	0.002	No
Col 16 vs. Col 200.0170	0.815	0.417	0.002	No
Col 17 vs. Col 50.0157	0.753	0.453	0.002	No
Col 5 vs. Col 70.0153	0.737	0.463	0.002	No
Col 14 vs. Col 170.0147	0.705	0.482	0.002	No
Col 14 vs. Col 90.0133	0.641	0.523	0.002	No
Col 11 vs. Col 10.0132	0.633	0.528	0.002	No
Col 18 vs. Col 110.0128	0.617	0.539	0.002	No
Col 4 vs. Col 30.0127	0.609	0.544	0.002	No

Col 20 vs. Col 190.0119	0.571	0.569	0.002	No
Col 11 vs. Col 100.0115	0.553	0.581	0.002	No
Col 14 vs. Col 130.0113	0.545	0.587	0.003	No
Col 5 vs. Col 60.0107	0.513	0.609	0.003	No
Col 5 vs. Col 80.00917	0.441	0.660	0.003	No
Col 10 vs. Col 170.00917	0.441	0.660	0.003	No
Col 10 vs. Col 90.00783	0.377	0.707	0.003	No
Col 1 vs. Col 170.00750	0.361	0.719	0.003	No
Col 14 vs. Col 10.00717	0.345	0.731	0.004	No
Col 12 vs. Col 180.00650	0.313	0.755	0.004	No
Col 8 vs. Col 70.00617	0.297	0.767	0.004	No
Col 1 vs. Col 90.00617	0.297	0.767	0.005	No
Col 11 vs. Col 140.00600	0.289	0.774	0.005	No
Col 10 vs. Col 130.00583	0.281	0.780	0.006	No
Col 14 vs. Col 100.00550	0.264	0.792	0.006	No
Col 6 vs. Col 70.00467	0.224	0.823	0.007	No
Col 1 vs. Col 130.00417	0.200	0.842	0.009	No
Col 13 vs. Col 170.00333	0.160	0.873	0.010	No
Col 13 vs. Col 90.00200	0.0962	0.924	0.013	No
Col 10 vs. Col 10.00167	0.0802	0.936	0.017	No
Col 8 vs. Col 60.00150	0.0721	0.943	0.025	No
Col 9 vs. Col 17	0.00133	0.06410.949	0.050	No