

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đỗ Bích Hòa

**ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ENZYME
ACETYLCHOLINESTERASE VÀ BẢO VỆ TẾ BÀO THẦN
KINH CỦA NANO ASTAXANTHIN TRÊN DÒNG
TẾ BÀO THẦN KINH**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Hà Nội - 2023

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đỗ Bích Hòa

**ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ENZYME
ACETYLCHOLINESTERASE VÀ BẢO VỆ TẾ BÀO THẦN
KINH CỦA NANO ASTAXANTHIN TRÊN DÒNG
TẾ BÀO THẦN KINH**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM
Mã số: 8 42 01 14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:
TS. Hoàng Thị Minh Hiền

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Hà Nội, ngày 8 tháng 11 năm 2023

Học viên



Đỗ Bích Hòa

LỜI CẢM ƠN

Với sự kính trọng và cả tấm lòng, em xin gửi lời cảm ơn sâu sắc, chân thành nhất đến cô TS. Hoàng Thị Minh Hiền – Trưởng phòng Công nghệ Tảo, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ đã tận tình hướng dẫn từng chi tiết, chỉ dạy tỉ mỉ và đồng hành cùng em trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận văn. Nhờ có cô, em đã tự tin và hoàn thành luận văn của bản thân thành công, nâng cao thêm hiểu biết và kiến thức trong lĩnh vực nghiên cứu. Em có thêm nhiều trải nghiệm trong cả lĩnh vực chuyên môn và kiến thức đời sống. Em chân thành cảm ơn cô Hiền rất nhiều. Em luôn kính mến, kính trọng và biết ơn cô.

Em xin gửi lời cảm ơn đến GS. Đặng Diễm Hồng, TS. Ngô Thị Hoài Thu, TS. Lê Thị Thơm, TS. Nguyễn Cẩm Hà, KS. Nguyễn Mạnh Đạt cùng các bạn nghiên cứu viên phòng Công nghệ Tảo, Viện Công nghệ sinh học đã tận tình giúp đỡ, chỉ bảo em trong quá trình thực hiện luận văn.

Em xin gửi lời cảm ơn đến TS. Hoàng Mai Hà, TS. Hồ Thị Oanh, phòng Vật liệu tiên tiến, Viện Hoá học, Viện Hàn lâm đã cung cấp cho em nguyên liệu nano astaxanthin.

Em xin gửi lời cảm ơn đến Ban Lãnh đạo, các thầy, cô giáo Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ đã chỉ dạy, cung cấp các kiến thức chuyên môn bổ ích cho em để em có hành trang tốt nhất cho công việc cũng như tương lai sau này.

Luận văn được thực hiện trong khuôn khổ đề tài Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia - Nafosted, Bộ Khoa học và Công nghệ: “Nghiên cứu chế tạo và đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và giảm rối loạn chuyển hóa lipit của tổ hợp nano astaxanthin/kaempferol trên mô hình *in vitro* và *in vivo*” mã số 108.06-2019.314 do TS. Hoàng Thị Minh Hiền làm chủ nhiệm.

Và em xin gửi lời cảm ơn đến bố mẹ, gia đình đã là hậu phương vững chắc để em tiếp tục hành trình cho những dự định sau này.

Em xin cảm ơn tất cả những người bạn, luôn là nguồn động viên, là những lời khuyên, là những kỉ niệm trong suốt 2 năm học nói chung và quá trình thực hiện luận văn nói riêng.

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT.....	v
DANH MỤC BẢNG.....	ix
DANH MỤC HÌNH ẢNH	x
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	3
1.1. TỔNG QUAN VỀ BỆNH ALZHEIMER.....	3
1.1.1. Alzheimer	3
1.1.2. Các phương pháp điều trị phân tử đối với bệnh AD.....	4
1.1.3. Các mô hình tế bào cho nghiên cứu bệnh AD	7
1.2. TỔNG QUAN VỀ ASTAXANTHIN.....	7
1.2.1. Tác dụng chống oxy hóa.....	8
1.2.2. Tác dụng chống viêm.....	9
1.3. NANO ASTAXANTHIN VÀ TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA NÓ.....	11
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	15
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	15
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	15
2.1.2. Hóa chất và thiết bị	15
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	15
2.2.1. Xác định hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase (AChE).....	16
2.2.2. Phương pháp nuôi cấy tế bào	17
2.2.3. Phương pháp đánh giá độc tính của nano astaxanthin	17
2.2.4. Phương pháp đánh giá khả năng hấp thu tế bào	17
2.2.5. Phương pháp đánh giá khả năng bảo vệ tế bào của nano astaxanthin chống lại stress oxy hóa trong tế bào C6 được cảm ứng H ₂ O ₂	17
2.2.6. Phương pháp đánh giá khả năng bảo vệ tế bào thần kinh C6 của nano astaxanthin chống lại tác hại gây độc thần kinh gây ra bởi A β ₂₅₋₃₅	18
2.2.7. Phân tích biểu hiện gen liên quan đến khả năng bảo vệ thần kinh của nano astaxanthin bằng phương pháp quantitative Real-Time PCR (qPCR)...	18
2.2.8. Phương pháp xử lý số liệu.....	19

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	20
3.1. NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ENZYME ACETYLCHOLINESTERASE (ACHE) CỦA NANO ASTAXANTHIN ...	20
3.2. NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC LIÊN QUAN ĐẾN KHẢ NĂNG BẢO VỆ TẾ BÀO THẦN KINH CỦA NANO ASTAXANTHIN	21
3.2.1. Nghiên cứu đánh giá khả năng gây độc tế bào C6 của nano astaxanthin.....	21
3.2.2. Nghiên cứu đánh giá khả năng hấp thu nano astaxanthin của tế bào C6.....	22
3.2.3. Đánh giá khả năng bảo vệ tế bào của nano astaxanthin chống lại stress oxy hóa trong tế bào C6 được cảm ứng bởi H ₂ O ₂	24
3.2.4. Đánh giá khả năng bảo vệ tế bào thần kinh C6 khỏi tác hại gây độc của A β ₂₅₋₃₅ của nano astaxanthin.....	25
3.3. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA NANO ASTAXANTHIN ĐẾN SỰ BIỂU HIỆN MỘT SỐ GEN LIÊN QUAN ĐẾN HOẠT TÍNH BẢO VỆ THẦN KINH TRÊN DÒNG TẾ BÀO C6 ĐƯỢC CẢM ỨNG VỚI CÁC TÁC NHẬN GÂY ĐỘC THẦN KINH.....	27
3.3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện gen của các enzyme chống oxy hóa trong tế bào C6.....	27
3.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện gen của các enzyme gây viêm trong tế bào C6 của nano astaxanthin.....	32
3.3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện gen mã hóa cho các protein tham gia vào quá trình sinh tổng hợp acetylcholine trong tế bào C6.....	35
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	38
KẾT LUẬN	38
KIẾN NGHỊ	38
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....	39
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	40

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Các chữ viết tắt	Tên đầy đủ	Tên tiếng việt
6-OHDA	6-hydroxydopamine	
AChE	Acetylcholinesterase	Enzyme acetylcholinesterase
ACTI	Acetylthiocholin iodid	
AD	Alzheimer's disease	Bệnh Alzheimer
AICD	Amyloid precursor protein intracellular domain	Miền nội bào của protein tiền chất amyloid
Akt	Protein kinase B	
ALS	Amyotrophic lateral sclerosis	Bệnh xơ cứng teo cơ một bên
APP	Amyloid precursor protein	Protein tiền chất amyloid
A β	Amyloid-beta	
BACE1	Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1	Enzym phân cắt protein tiền chất amyloid ở vị trí beta 1
BBB	Blood-brain barrier	Hàng rào máu não
CD4	Cluster of differentiation 4	Cụm biệt hóa 4
CNS	Central nervous system	Hệ thống thần kinh trung ương
COS	Chitosan oligosaccharides	
CTF	Carboxy-terminal fragment	
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium	
DMSO	Dimethyl sulfoxide	
DNA	Deoxyribonucleic acid	
DSS	Dextran sulfate sodium	Dextran natri sulfat
DTNB	Acid 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic	Axit 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic
EBI	Early brain injury	Chấn thương não sớm
ERK	Extracellular regulated protein kinase	Protein kinase điều hòa ngoại bào
FBS	Fetal bovine serum	Huyết thanh thai bò

GABA	Gamma-aminobutyric acid	
GLUT-1	Glucose transporter-1	Chất vận chuyển glucose-1
GST- α 1	Glutathione- S-transferase- α 1	
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide	
HO-1	Heme oxygenase-1	
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1	Phân tử bám dính giữa các tế bào-1
IFN	Interferon	
IKK β	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta	Chất ức chế beta tiểu đơn vị kappa-B kinase của nhân tổ hạt nhân
IL	Interleukin	
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	Tổng hợp oxit nitric cảm ứng
I κ B	Inhibitor of NF- κ B	Chất ức chế NF- κ B
JAK1	Janus kinase 1	
LPS	Lipopolysaccharide	
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	Protein kinase được kích hoạt bằng mitogen
MCAO	Middle cerebral artery occlusion	Tắc động mạch não giữa
MCP1	Monocyte chemotactic protein 1	Protein hóa hướng động đơn bào 1
MPP ⁺	1-methyl-4-phenylpyridinium	
mRNA	Messenger ribonucleic acid	RNA thông tin
MSK1	Mitogen- and stress-activated protein kinase-1	
NADP(H)	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	
ND	Neurodegenerative disorders	Các bệnh thoái hóa

		thần kinh
NF-KB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B	Yếu tố hạt nhân tăng cường chuỗi nhẹ kappa của các tế bào B hoạt động
NFT	Neurofibrillary tangles	Các đám rối sợi thần kinh
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartate	
NO	Nitric oxide	Oxit nitric
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	Tổng hợp oxit nitric cảm ứng
NOX2	NADPH oxidase 2	
NR1	NMDA receptor subunit 1	
Nrf2	Nuclear erythroid 2-related factor 2	
PD	Parkinson's disease	Bệnh Parkinson
PGE2	Prostaglandin E2	
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	
PLGA	Poly lactic- co -glycolic acid	
RNS	Reactive nitrogen species	
ROS	Reactive oxygen species	
RPE	Retinal pigment epithelial	Tế bào biểu mô sắc tố võng mạc
SAH	Subarachnoid hemorrhage	Xuất huyết dưới mạng nhện
Sp1	Specificity protein 1	Protein đặc hiệu 1

STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	Bộ chuyển đổi tín hiệu và bộ kích hoạt phiên mã 3
TLR4	Toll-like receptor 4	Thụ thể giống Toll 4
TNF	Tumor Necrosis Factors	Yếu tố hoại tử khối u
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Yếu tố tăng nội mô mạch máu tăng

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1: Bảng trình tự các môi được sử dụng trong qPCR 19

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1: Con đường dẫn đến suy giảm nhận thức trong bệnh Alzheimer.	4
Hình 1.2: Cơ chế tác động của các chất chống oxy hóa trong thoái hóa thần kinh.....	6
Hình 1.3: Cơ chế tác động của các chất gây viêm trong thoái hóa thần kinh	6
Hình 1.4: Tác dụng chống oxy hóa của astaxanthin trong các bệnh thần kinh	9
Hình 1.5: Tác dụng chống viêm của astaxanthin trong các bệnh thần kinh.....	11
Hình 2.1: Sơ đồ nghiên cứu khả năng bảo vệ tế bào thần kinh của nano astaxanthin.....	16
Hình 3.1: Kết quả thử hoạt tính ức chế enzyme AchE của nano astaxanthin.....	21
Hình 3.2: Ảnh hưởng của nano astaxanthin lên khả năng sống sót của tế bào C6.....	22
Hình 3.3: Hiệu suất hấp thu astaxanthin ở dạng tự do và nano hóa của tế bào C6.	23
Hình 3.4: Sắc ký đồ HPLC của astaxanthin được tách chiết từ tế bào C6 được ủ với astaxanthin dạng tự do (A) và dạng nano hóa (B).....	23
Hình 3.5: Khả năng bảo vệ tế bào chống khỏi stress oxy hóa trong tế bào C6 cảm ứng H ₂ O ₂ của nano astaxanthin.....	24
Hình 3.6: Khả năng bảo vệ tế bào chống khỏi sự gây độc thần kinh trong tế bào C6 cảm ứng A β ₂₅₋₃₅ của nano astaxanthin.....	26
Hình 3.7: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen mã hóa cho enzyme CAT tham gia vào quá trình chống oxy hóa trong tế bào C6.....	29
Hình 3.8: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen mã hóa cho enzyme SOD tham gia vào quá trình chống oxy hóa trong tế bào C6.....	30
Hình 3.9: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen mã hóa cho enzyme GPx tham gia vào quá trình chống oxy hóa trong tế bào C6.....	30
Hình 3.10: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen mã hóa cho enzyme Nrf2 tham gia vào quá trình chống oxy hóa trong tế bào C6.	31

Hình 3.11: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen iNOS liên quan đến tình trạng viêm ở tế bào C6.	33
Hình 3.12: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen COX liên quan đến tình trạng viêm ở tế bào C6.	33
Hình 3.13: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen TNF- α liên quan đến tình trạng viêm ở tế bào C6.	34
Hình 3.14: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen IL-6 liên quan đến tình trạng viêm ở tế bào C6.	34
Hình 3.15: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen mã hóa cho ChAT tham gia vào quá trình giải phóng acetylcholine trong tế bào C6.	37
Hình 3.16: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen mã hóa cho VAcChT tham gia vào quá trình giải phóng acetylcholine trong tế bào C6	37

MỞ ĐẦU

Thoái hóa thần kinh đã được xác định là sự thay đổi sinh lý bệnh chủ yếu trong hầu hết các rối loạn liên quan đến não. Bệnh Alzheimer (AD) là một trong những bệnh thoái hóa thần kinh điển hình gây ra chứng mất trí nhớ trong xã hội già hóa của chúng ta. Stress oxy hóa, viêm, tế bào chết theo chương trình (apoptosis) và tăng hoạt tính của enzyme acetylcholinesterase (AChE) dẫn đến sự thiếu hụt cholinergic được xem như là các con đường gây bệnh chính. Kích hoạt tế bào thần kinh đệm và giải phóng cytokine/chemokine của các con đường viêm, cũng như các gốc tự do oxy hóa và tổn thương ty thể trong con đường stress oxy hóa dẫn đến quá trình thoái hóa thần kinh và cuối cùng là gây chết tế bào.

Mặc dù có nhiều phát triển trong lĩnh vực chăm sóc sức khỏe lâm sàng, các liệu pháp bảo vệ thần kinh đối với chứng thoái hóa thần kinh và các rối loạn liên quan đến gây chết tế bào thần kinh vẫn là những thách thức lâm sàng mà không có giải pháp hữu hiệu. Do đó, nhu cầu phát triển phương pháp điều trị đa mục tiêu liên quan đến các con đường tín hiệu đang được các nhà khoa học đặc biệt quan tâm nghiên cứu để cải thiện chất lượng cuộc sống của những người mắc bệnh thoái hóa thần kinh.

Astaxanthin là một trong những carotenoid quan trọng, có ứng dụng điều trị phong phú và đa dạng đối với các bệnh về gan, tim mạch, điều trị ung thư, bảo vệ da và mắt chống lại bức xạ tia cực tím và tăng cường sức đề kháng hệ thống miễn dịch. Bên cạnh đó, các nhà nghiên cứu cũng chỉ ra rằng astaxanthin có tác dụng bảo vệ hệ thần kinh và như là một tác nhân bảo vệ thần kinh đa mục tiêu, astaxanthin tác động lên nhiều cơ chế hoạt động để giải quyết các cơ chế sinh lý bệnh phức tạp của bệnh thoái hóa thần kinh. Tuy nhiên, nhược điểm của astaxanthin là có độ tan trong nước thấp và dễ bị oxy hóa dẫn đến sinh khả dụng bị hạn chế. Gần đây, trong đề tài “Nghiên cứu chế tạo và đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và giảm rối loạn chuyển hóa lipid của tổ hợp nano astaxanthin/kaempferol trên mô hình *in vitro* và *in vivo*” do quỹ Nafosted tài trợ năm 2019 – 2023, phòng Công nghệ tạo, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCVN kết hợp với Viện Hóa học đã chế tạo thành công nano astaxanthin có tính sinh khả dụng (gấp 5-6) và hoạt tính chống oxy hóa và giảm lipid cao hơn nhiều so với astaxanthin tự do.

Do đó, với những lợi ích và tầm quan trọng như vậy, đề tài “**Đánh giá khả năng ức chế enzyme acetylcholinesterase và bảo vệ tế bào thần kinh của nano astaxanthin trên dòng tế bào thần kinh**” được thực hiện.

1. Mục tiêu của đề tài:

Đánh giá được khả năng ức chế enzyme acetylcholinesterase (AChE); Khả năng bảo vệ tế bào thần kinh chống lại các tác nhân gây độc thần kinh và đánh giá biểu hiện một số gen liên quan đến hoạt tính bảo vệ thần kinh của nano-astaxanthin trên dòng tế bào C6.

2. Nội dung nghiên cứu:

- **Nội dung 1:** Xác định hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase (AChE).
- **Nội dung 2:** Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học liên quan đến khả năng bảo vệ tế bào thần kinh của nano astaxanthin.
- **Nội dung 3:** Nghiên cứu biểu hiện một số gen liên quan đến hoạt tính bảo vệ thần kinh của nano astaxanthin trên dòng tế bào C6 được cảm ứng với các tác nhân gây độc thần kinh.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

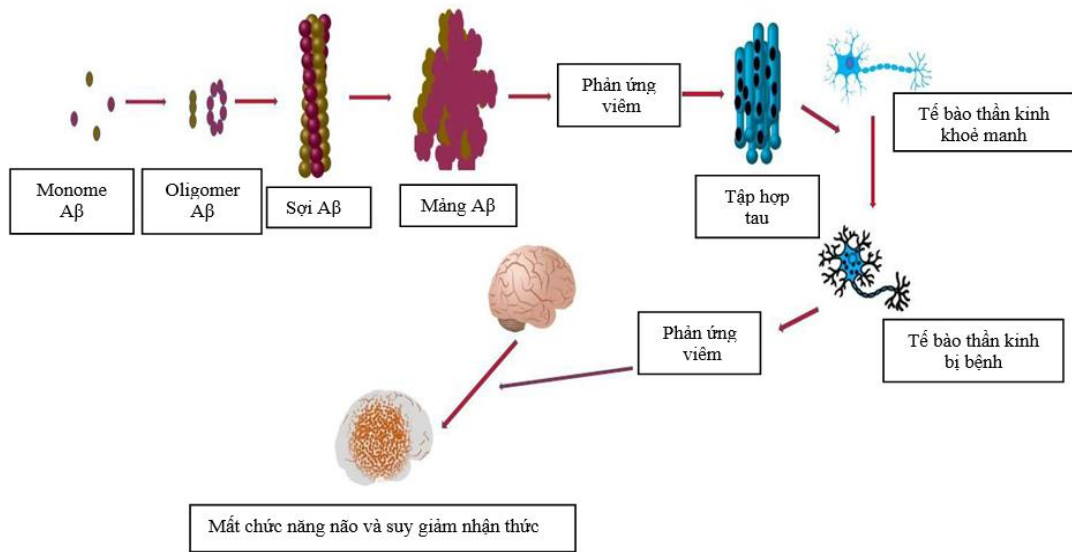
1.1. TỔNG QUAN VỀ BỆNH ALZHEIMER

1.1.1. Alzheimer

Tế bào thần kinh là trung tâm cho hoạt động bình thường của bộ não con người vì chúng đóng vai trò quan trọng trong giao tiếp. Hầu hết các tế bào thần kinh bắt nguồn từ não, tuy nhiên, tế bào thần kinh có mặt ở mọi nơi trong cơ thể. Các tế bào gốc thần kinh tạo ra phần lớn tế bào thần kinh ở trẻ em và số lượng này giảm đáng kể khi trưởng thành. Khi các tế bào thần kinh bị chết hoặc mất cấu trúc hay chức năng sẽ dẫn đến hiện tượng thoái hóa thần kinh, nguyên nhân chính gây ra sinh lý bệnh của một số rối loạn não như bệnh Alzheimer.

Chứng mất trí nhớ Alzheimer (AD) là một căn bệnh phổ biến ảnh hưởng đến trí nhớ và nhận thức. Sinh lý bệnh của suy giảm nhận thức liên quan đến AD được cho là do mất tế bào thần kinh cholinergic. Ức chế acetylcholinesterase (AChE) dẫn đến giảm phân hủy và tích tụ acetylcholine sau đó. Lượng acetylcholine dư thừa này dẫn đến tăng kích thích các thụ thể muscarinic và nicotinic, cung cấp một số biện pháp điều trị giảm trí nhớ trong AD [1].

Các nghiên cứu gần đây về sinh lý bệnh AD đã chỉ ra rằng sự tích tụ amyloid-beta ($A\beta$) và protein Tau là trung tâm của sự tiến triển của AD (Hình 1.1) [2]. Sự hình thành các mảng chứa $A\beta$ trong não, được liên kết với các đám rối sợi thần kinh (neurofibrillary tangles - NFT) bao gồm Tau tăng phosphoryl hóa, đã được xác định là đặc điểm cổ điển của AD. Sự hình thành mảng bám làm gián đoạn mạch hồi hải mã dẫn đến việc củng cố trí nhớ ngắn hạn kém thành các dấu vết dài hạn. Trong AD, có sự mất mát tế bào thần kinh trên diện rộng, các kết nối khớp thần kinh bị lỗi và tổn thương hệ thống dẫn truyền thần kinh thiết yếu cần thiết cho các chức năng của não, bao gồm cả trí nhớ. Do đó, triệu chứng lâm sàng phổ biến nhất ở giai đoạn đầu của AD là suy giảm trí nhớ có chọn lọc. Ngoài ra, hồi hải mã và các chức năng phụ thuộc vào thùy thái dương ở giữa, chẳng hạn như trí nhớ tình tiết khai báo, cũng thường bị ảnh hưởng. Cuối cùng, suy giảm chức năng điều hành, phán đoán và giải quyết vấn đề là những biểu hiện lâm sàng bổ sung và thường xuất hiện sớm [3]. Bên cạnh đó, stress oxy hóa và sự hình thành các loại oxy phản ứng (ROS) cũng được coi là nguyên nhân chính gây ra bệnh này.



Hình 1.1: Con đường dẫn đến suy giảm nhận thức trong bệnh Alzheimer [4].

Các monome amyloid-beta ($A\beta$) kết tụ lại với nhau để tạo thành các oligome có cấu trúc biến thể. Sau đó, các oligome tập hợp lại tạo thành các sợi $A\beta$, sắp xếp tạo thành các mảng $A\beta$. Sự hình thành mảng bám gây ra phản ứng viêm bao gồm sự hình thành các tập hợp Tau dẫn đến việc chuyển đổi các tế bào thần kinh khỏe mạnh thành các tế bào thần kinh bị bệnh. Sự hiện diện của nhiều tế bào thần kinh bị bệnh hơn sẽ gây ra một phản ứng viêm khác dẫn đến mất nhiều tế bào thần kinh hơn và sau đó là mất chức năng não cũng như suy giảm nhận thức.

Vì AD là một bệnh đa yếu tố, nhiều phương pháp điều trị đã được đề xuất để điều trị nó.

1.1.2. Các phương pháp điều trị phân tử đối với bệnh AD

Các phương pháp điều trị AD được phân thành hai con đường điều trị hiệu quả chính là cholinergic và không cholinergic. Ở những bệnh nhân bị AD, rối loạn dẫn truyền thần kinh cholinergic gây ra sự suy giảm chất dẫn truyền thần kinh acetylcholine (ACh) [5].

AChE là một enzyme cholinergic chủ yếu được tìm thấy ở các điểm nối thần kinh cơ sau synap, đặc biệt là ở cơ và dây thần kinh. Enzyme này thủy phân acetylcholine (ACh), một chất dẫn truyền thần kinh tự nhiên, thành axit axetic và choline. Vai trò chính của AChE là chấm dứt sự truyền dẫn và truyền tín hiệu thần kinh giữa các khớp thần kinh để ngăn chặn sự phân tán ACh và kích hoạt các thụ thể gần đó. Do đó, các chất ức chế AChE có thể tái

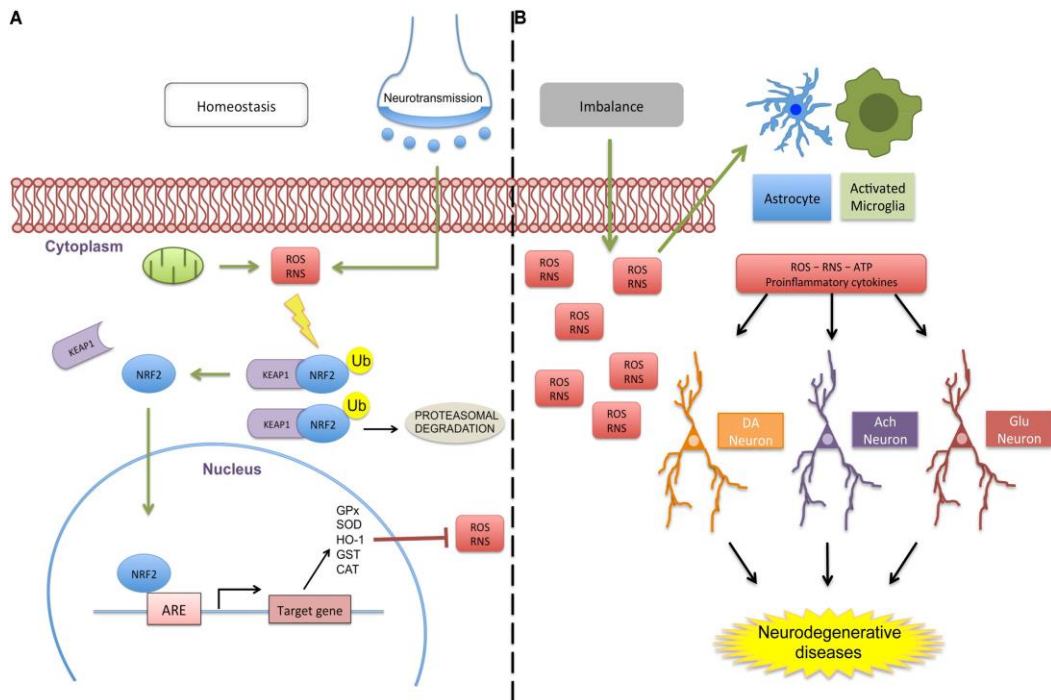
cân bằng mức acetylcholine bằng hoạt động của AChE. Acetylcholine được tích tụ trong khe sinap thần kinh. Con đường này được gọi là phương pháp tiếp cận choline và được coi là phương pháp điều trị triệu chứng chính cho AD.

Một phương pháp điều trị khác phụ thuộc vào việc ngăn chặn sự tích tụ của amyloid-beta ($A\beta$). Do đó, bất kỳ hợp chất nào, có thể làm giảm hoặc ngăn chặn sự kết tụ $A\beta$ giữa các nơron, đều có thể là một ứng cử viên tiềm năng của thuốc chống AD và có thể làm giảm sự tiến triển của bệnh [6].

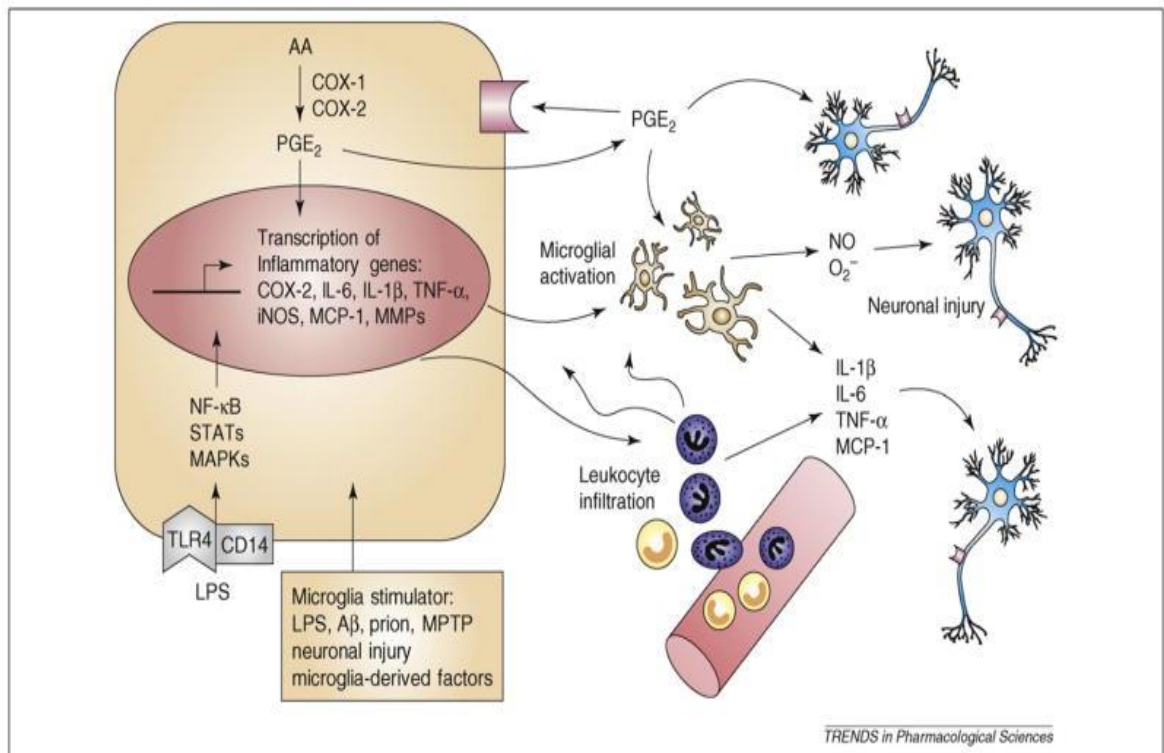
Bên cạnh đó, các phương pháp tiếp cận khác bao gồm nhiều hợp chất và đường hướng như chất chống oxy hóa, kháng viêm, ức chế Tau tạo ra quá trình phosphoryl hóa và NFT nội bào tích lũy, sử dụng yếu tố hướng thần kinh có nguồn gốc từ não, liệu pháp tế bào gốc và liệu pháp nội tiết tố [7].

Trong đó, các phân tử oxy hóa (ví dụ, reactive oxygen species - ROS và reactive nitrogen species - RNS) được tạo ra bởi quá trình hô hấp tế bào hoặc dẫn truyền thần kinh sẽ kích hoạt con đường chống oxy hóa bằng cách phân ly phức hợp Nrf2/Keap1 (Nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2/ Kelch-like ECH-associated protein 1). Khi được tách ra khỏi Keap1, Nrf2 sẽ di chuyển vào nhân tế bào, kích hoạt sự biểu hiện của một số gen cân bằng nội môi với trình tự AREs (antioxidant responsive elements) trong các vùng khởi động của chúng, bao gồm glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), heme oxygenase 1 (HO-1), glutathione S-transferase (GST) và catalase (CAT) (Hình 1.2A).

Khi cân bằng nội môi bị thay đổi thúc đẩy sản xuất ROS/RNS quá mức có thể kích hoạt các tế bào thần kinh đệm (tế bào hình sao và microglia) giải phóng các chất gây viêm, làm gián đoạn dẫn truyền thần kinh và rối loạn hoạt động thần kinh đệm, từ đó gây nên các bệnh về rối loạn thoái hóa thần kinh (Hình 1.2 B).



Hình 1.2: Cơ chế tác động của các chất chống oxy hóa trong thoái hóa thần kinh [8].



Hình 1.3: Cơ chế tác động của các chất gây viêm trong thoái hóa thần kinh [9].

Các kích thích khác nhau (ví dụ: lipopolysaccharide - LPS, A β ...) có thể tác động vào microglia, đặc biệt, sự tương tác của LPS với thụ thể giống Toll 4/ cụm biệt hóa 14 (TLR4/CD14) có thể hoạt hóa các tín hiệu nội bào (ví

dụ: NF- κ B, MAPK và JAK/STAT), dẫn đến hoạt hóa các tế bào thần kinh đệm và giải phóng các chất trung gian gây viêm như oxit nitric cảm ứng (inducible nitric oxidase synthase, iNOS), cyclooxygenase 2 (COX-2), các cytokine (ví dụ interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 và yếu tố hoại tử khối u- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)), chemokine (ví dụ: protein hóa hướng động đơn bào 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)),... có liên quan đến tình trạng viêm thần kinh và dẫn đến tổn thương tế bào thần kinh (Hình 1.3).

1.1.3. Các mô hình tế bào cho nghiên cứu bệnh AD

Các dòng tế bào có khả năng nuôi cấy ổn định thường được sử dụng để nghiên cứu để nghiên cứu các bệnh thoái hóa thần kinh bao gồm PC-12, Luhmes, SH-SY5Y và C6 [10]. Trong đó, tế bào Luhmes là tế bào tiền thân tế bào thần kinh phôi, tế bào PC-12 giống như các tế bào thần kinh hạch giao cảm, tế bào SH-SY5Y là tế bào được nhân bản từ dòng tế bào u nguyên bào thần kinh và tế bào C6 là dòng tế bào thần kinh đệm được phân lập từ não của một con chuột bị u thần kinh đệm.

Sau khi biệt hóa, các tác nhân gây độc thần kinh được thêm vào môi trường nuôi cấy tế bào để gây ra độc tính và chết tế bào. Việc bổ sung A β oligomers, chất cảm ứng stress oxy hóa vào các tế bào thần kinh sẽ tạo nên các kiểu hình cholinergic gây ra apoptosis. Đây là một mô hình nổi tiếng của AD rất hữu ích để đánh giá các tác dụng bảo vệ thần kinh tiềm năng của các loại thuốc mới. Trong nhóm, các dòng tế bào sử dụng để nghiên cứu vai trò bảo vệ thần kinh nói trên, C6 là một trong những dòng tế bào có phản ứng nhanh chóng với các kích thích bên ngoài, chẳng hạn như H₂O₂, có thể tạo ra stress oxy hóa.

C6 là dòng tế bào thần kinh đệm được phân lập từ não của một con chuột mắc bệnh Glioma (u thần kinh đệm). Khối u thần kinh đệm được tạo ra bởi N-nitrosomethylurea sau một loạt quá trình nuôi cấy và chuyển động vật thay thế.

1.2. TỔNG QUAN VỀ ASTAXANTHIN

Astaxanthin là một carotenoid tự nhiên có màu đỏ, dễ hòa tan trong lipid với công thức phân tử C₄₀H₅₂O₄ và khối lượng mol 596,84 g/mol. Astaxanthin có mặt trong nhiều sinh vật biển như cá hồi, tôm, nhuyễn thể, tôm hùm, hay trong vi sinh vật và một số loài thực vật.

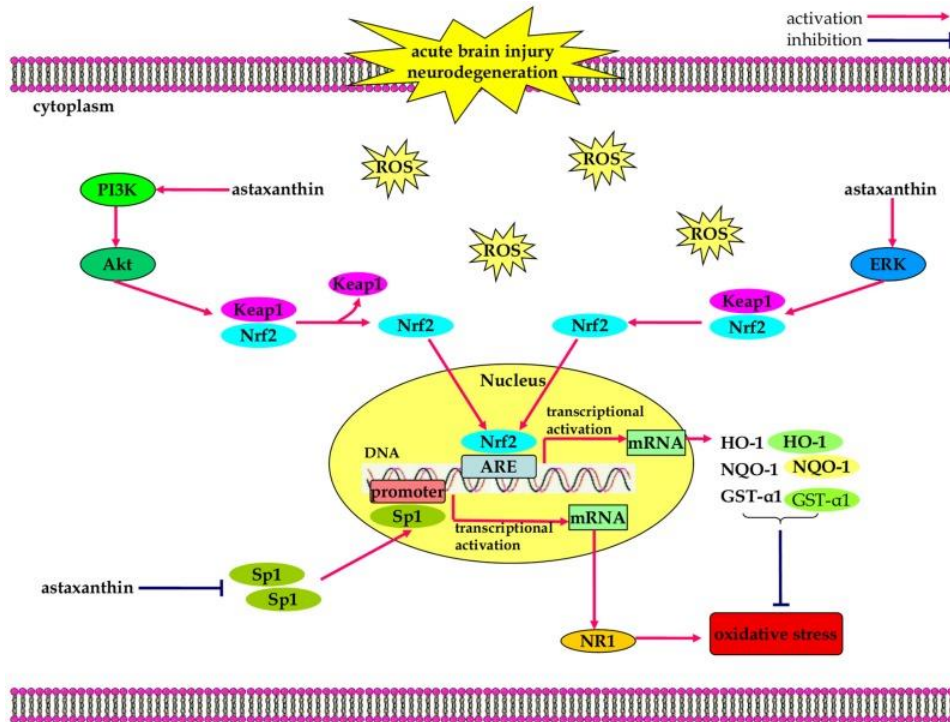
Các nghiên cứu lâm sàng và trên động vật thực nghiệm đã chứng minh

rằng astaxanthin có nhiều hoạt tính sinh học như tiêu diệt hiệu quả các gốc tự do, kháng viêm, chống lão hóa, giảm sự hình thành khối u, phòng ngừa bệnh tim mạch và tai biến mạch máu não, bảo vệ gan, chống tiểu đường, bảo vệ cơ thể khỏi bức xạ tia cực tím v.v... Bên cạnh đó, các nhà nghiên cứu cũng chỉ ra rằng astaxanthin có tác dụng bảo vệ hệ thần kinh và như là một tác nhân bảo vệ thần kinh đa mục tiêu, astaxanthin tác động lên nhiều cơ chế hoạt động để giải quyết các cơ chế sinh lý bệnh phức tạp của bệnh thoái hóa thần kinh.

1.2.1. Tác dụng chống oxy hóa

Stress oxy hóa là một chất trung gian chính trong bệnh lý của các bệnh thần kinh. Sự xáo trộn trạng thái cân bằng của các phản ứng tiền oxy hóa/chống oxy hóa trong tế bào có thể dẫn đến stress oxy hóa, gây ra sự hình thành ROS (reactive oxygen species) và các gốc tự do.

Tác dụng chống oxy hóa của astaxanthin cũng đã được nghiên cứu trong các mô hình thí nghiệm về tình trạng thần kinh cấp tính (hình 1.4). Lee và cộng sự đã báo cáo rằng astaxanthin cung cấp tác dụng bảo vệ thần kinh chống lại stress oxy hóa gây ra bởi sự thiếu hụt oxy-glucose trong các tế bào u nguyên bào thần kinh người SH-SY5Y và thiếu máu não cục bộ trong 10 phút ở chuột [11]. Trong một mô hình chuột bị đột quỵ do thiếu máu cục bộ, việc điều trị trước bằng astaxanthin làm giảm sản xuất ROS và giảm peroxid hóa lipid ở não cùng bên của chuột bị tắc động mạch não giữa (middle cerebral artery occlusion - MCAO) [12]. Đồng thời, astaxanthin làm giảm nhồi máu não và thúc đẩy phục hồi chức năng vận động sau MCAO [12]. Zhang và cộng sự đã phát hiện ra rằng sử dụng astaxanthin có khả năng làm giảm tổn thương não sớm (early brain injury - EBI) sau khi xuất huyết dưới nhện (subarachnoid hemorrhage - SAH) thông qua các đặc tính chống oxy hóa của nó [13]. Điều trị bằng astaxanthin được cho là mang lại tác dụng bảo vệ bằng cách khôi phục các enzym chống oxy hóa nội sinh glutathione (GSH) và superoxide dismutase (SOD) sau SAH [13]. Wu và cộng sự đã báo cáo rằng việc điều trị astaxanthin sau SAH đã tạo điều kiện thuận lợi cho con đường Nrf2-ARE và cải thiện EBI trong một mô hình bê chứa prechiasmatic của SAH [14]. Astaxanthin kích hoạt con đường truyền tín hiệu Nrf2-ARE làm tăng sự biểu hiện của các enzyme do Nrf2 điều khiển như heme oxygenase-1 (HO-1), NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 (NQO-1) và glutathione-*S*-transferase- α 1 (GST- α 1) để chống lại stress oxy hóa [14] (Hình 1.4).



Hình 1.4: Tác dụng chống oxy hóa của astaxanthin trong các bệnh thần kinh [15].

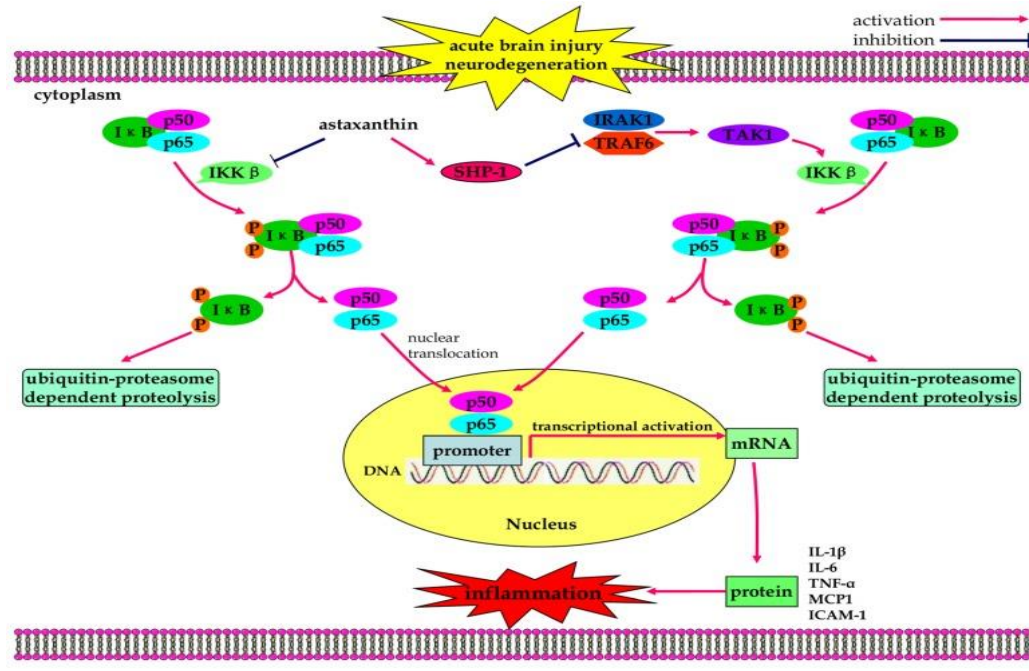
Astaxanthin tạo điều kiện cho sự phân ly và truyền tin nội bào của yếu tố liên quan đến hồng cầu hạt nhân 2 (Nrf2), thông qua việc kích hoạt các con đường truyền tín hiệu PI3K/Akt và ERK, góp phần làm tăng biểu hiện của các enzyme điều hòa Nrf2 như HO-1, NQO-1, và GST- α 1 chống lại stress oxy hóa. Ngoài ra, astaxanthin điều hòa ngược âm tính đường truyền tín hiệu Sp1/NR1, làm giảm việc sản xuất ROS nội bào và stress oxy hóa.

1.2.2. Tác dụng chống viêm

Viêm được định nghĩa là một loạt các phản ứng miễn dịch phức tạp xảy ra về mặt sinh học như một phản ứng đối với các vết thương của cơ thể. Trong hệ thống thần kinh trung ương (CNS), tình trạng viêm đóng vai trò quan trọng trong cả tình trạng cấp tính (đột quỵ và chấn thương) và tình trạng thoái hóa thần kinh mãn tính (ví dụ: AD, PD). Đặc biệt, astaxanthin thể hiện tác dụng kháng viêm trong viêm màng bồ đào do lipopolysaccharit gây ra bằng cách trực tiếp ngăn chặn hoạt động của enzym tổng hợp oxit nitric (nitric oxide synthase - NOS) (Hình 1.5). Ngoài ra, astaxanthin ức chế biểu hiện gen của các chất trung gian gây viêm (TNF- α và IL-1 β) và làm giảm viêm màng bồ đào do nội độc tố gây ra bằng cách ngăn chặn con đường truyền tín hiệu phụ thuộc NF- κ B [16]. Trong điều kiện bình thường, NF- κ B, một phân tử

dimer bao gồm các tiểu đơn vị p50 và p65, tương tác với chất ức chế NF- κ B (I κ B) và duy trì chúng ở trạng thái bất hoạt trong bào tương [17]. Khi được kích thích, I κ B trải qua quá trình phosphoryl hóa bởi I κ B kinase β (IKK β) và bị phân hủy thông qua con đường proteasome ubiquitin [18, 19]. Sự phân ly của I κ B từ phân tử dimer p50/p65 đã tạo ra tín hiệu chuyển phân tử NF- κ B tới nhân, dẫn đến sự chuyển vị trí của NF- κ B (p65) vào nhân để điều chỉnh quá trình phiên mã của các gen gây viêm [20]. Điều trị bằng astaxanthin làm giảm hiệu quả tình trạng viêm liên quan đến NF- κ B ở gan của chuột được ăn chế độ nhiều đường và chất béo cao bằng cách ức chế quá trình phosphoryl hóa IKK β và truyền tin nội bào của tiểu đơn vị NF- κ B (p65) [21]. Astaxanthin cũng ức chế biểu hiện gen do ROS gây ra bởi NF- κ B (p65) và giảm sản xuất các cytokine tiền viêm (IL-1 β , IL-6 và TNF- α) trong các tế bào đơn nhân U937 bằng cách khôi phục mức độ sinh lý của protein tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) [22]. Trong một mô hình chuột thí nghiệm về tăng sinh mạch màng đệm, Izumi-Nagai đã chứng minh rằng điều trị bằng astaxanthin dẫn đến sự ức chế đáng kể sự xâm nhập của đại thực bào vào quá trình tăng sinh mạch màng đệm [23]. Hơn nữa, astaxanthin ngăn chặn sự phân hủy I κ B- α và truyền tin nội bào NF- κ B, dẫn đến giảm các yếu tố gây viêm (IL-6, yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (vascular endothelial growth factor - VEGF), phân tử bám dính giữa các tế bào-1 (intercellular adhesion molecule-1 - ICAM-1), và protein hóa hướng động đơn bào 1 (monocyte chemotactic protein 1 - MCP1) [23]. Astaxanthin cũng làm giảm viêm dạ dày ở chuột bị nhiễm *Helicobacter pylori*, cảm nhiễm tế bào lympho T từ Th1 sang Th1/Th2 [24]. Ngoài ra, astaxanthin làm giảm sản xuất oxit nitric (NO) và hoạt động tổng hợp oxit nitric cảm ứng (inducible nitric oxide synthase - iNOS) trong đại thực bào, dẫn đến ức chế cyclooxygenase và điều hòa giảm prostaglandin E2 (PGE2) và TNF- α ở chuột [25]. Sử dụng astaxanthin trong chế độ ăn kiêng đã ức chế đáng kể sự hoạt hóa NF- κ B bất thường ở niêm mạc đại tràng, làm giảm biểu hiện gen của IL-1 β , IL-6 và COX-2, góp phần làm suy giảm viêm đại tràng do dextran natri sulfat (dextran sulfate sodium - DSS) [26]. Lee và các đồng nghiệp đã phát hiện ra rằng astaxanthin ngăn ngừa quá trình viêm bằng cách ngăn chặn sự hoạt hóa tín hiệu NF- κ B và sản xuất các cytokine gây viêm (ví dụ: TNF- α và IL-1 β) bằng cách sử dụng cả mô hình *in vitro* và *in vivo* [27]. Trong tế bào sừng của con người, Terazawa và cộng sự đã chứng

minh rằng astaxanthin làm gián đoạn quá trình tự phosphoryl hóa và tự hoạt hóa protein kinase-1 (MSK1), dẫn đến giảm quá trình phosphoryl hóa NF- κ B (p65) và thiếu hoạt động liên kết DNA của NF- κ B [28]. Kết quả là, sự biểu hiện và bài tiết PGE2, IL-8 do UVB gây ra được điều chỉnh giảm trong các tế bào sừng này của con người [28].



Hình 1.5: Tác dụng chống viêm của astaxanthin trong các bệnh thần kinh [15].

Thông qua việc ngăn chặn sự thoái hóa I κ B- α và ức chế truyền tin nội bào NF- κ B, astaxanthin ức chế các yếu tố gây viêm IL-6, ICAM-1 và MCP1. Astaxanthin cũng ức chế truyền tin nội bào NF- κ B và làm giảm việc sản xuất các cytokine gây viêm ở hạ bì bằng cách khôi phục mức sinh lý của SHP-1.

1.3. NANO ASTAXANTHIN VÀ TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA NÓ

Mặc dù có nhiều hoạt tính sinh học quý nhưng astaxanthin lại được xếp vào nhóm hoạt chất có độ tan trong nước rất thấp. Do đó, nhiều phương pháp đã được áp dụng để cải thiện khả năng hấp thụ cũng như bảo vệ hoạt tính đầy tiềm năng của astaxanthin như là công nghệ nano, biến đổi cấu trúc, tạo phức chất vùi... Trong đó, công nghệ nano mang lại hiệu quả vượt trội hơn cả trong việc nâng cao độ phân tán và cải thiện sự hấp thu vào trong tế bào. Được thiết kế phù hợp với đường đi của thuốc bên trong cơ thể, tiểu phân nano có khả năng giúp vận chuyển thuốc đến đúng vị trí cần giải phóng hoạt chất hoặc

đích sinh học như tế bào bệnh, mô bệnh hoặc bào quan bên trong tế bào bệnh. Trên đường vận chuyển đến đích có nhiều tác nhân phân hủy như: nhiệt độ, độ ẩm, oxy, không khí và ánh sáng, pH, dịch sinh lý, enzyme. Do đó, các hoạt chất kém bền như astaxanthin được bao bọc bên trong tiểu phân nano sẽ tránh được các tác động trên và đưa thuốc đến đích an toàn. Đồng thời, việc đó sẽ tránh được sự phân bố thuốc đến các mô lành và tế bào lành.

Năm 2011, Meor Mohd Affandi và nhóm nghiên cứu đã chế tạo thành công nano nhũ tương bằng phương pháp ly tâm tốc độ cao 9000 vòng/phút ở áp suất 800 bars. Nhũ tương nano astaxanthin bao gồm các thành phần: 4% w/w chất hoạt động bề mặt, 2% w/w astaxanthin, 14% w/w dầu và 80% w/w nước. Sản phẩm nano thu được có kích thước là 150-160 nm, dễ hòa tan trong nước và có khả năng tăng hoạt tính sinh học mà không thay đổi cấu trúc hóa học của astaxanthin [29].

Trong thí nghiệm nghiên cứu tác dụng bảo vệ da do tia cực tím của nano astaxanthin, astaxanthin tan trong dầu và lutein của Harada và cộng sự đã cho thấy, chuột được uống nano astaxanthin có tác dụng giảm viêm, giảm số lượng tế bào niêm mạc bị chết cùng với giảm mức độ biểu hiện của các gen COX-2, p-IkB-a, TNF α và CD45 cao nhất khi so sánh với các nhóm chuột được uống astaxanthin pha trong dầu và lutein [30]. Nghiên cứu chứng minh rằng nano astaxanthin có hiệu quả trong việc bảo vệ bề mặt mắt chống lại các tác động có hại của việc tiếp xúc với tia UVB cấp tính, mà không có tác dụng phụ bất lợi rõ ràng nào được quan sát thấy. Nano astaxanthin tạo ra một chất hòa tan trong nước có nguồn gốc tự nhiên đầy hứa hẹn để bảo vệ chống lại tổn thương bề mặt mắt trong điều kiện căng thẳng oxy hóa cao khi sử dụng theo đường uống.

Liu và cộng sự đã nghiên cứu chế tạo astaxanthin bao bọc trong các hạt nano poly (axit lactic-co-glycolic) (PLGA) và chitosan oligosaccharide (COS). Sự bao bọc tốt của các hạt nano PLGA và COS đã cho kết quả sản phẩm nano chứa astaxanthin có dạng hình cầu, kích thước hạt trung bình khoảng 150 nm. Hiệu suất bao bọc (> 85%) và khả năng tải (> 15%) của astaxanthin trong các hạt nano là tương đối cao. Phân tích tia X cho thấy rằng astaxanthin được bao bọc ở dạng vô định hình. Các hạt nano có khả năng phân tán tốt và ổn định trong dung dịch nước và có khả năng tương thích tế bào cao [31].

Bên cạnh đó, Guan và cộng sự cũng đã chế tạo thành công sản phẩm nano chứa astaxanthin bằng phương pháp đông khô. Bột nano cho khả năng phân tán rất tốt trong nước. Tuy nhiên hàm lượng astaxanthin có trong sản phẩm tương đối thấp chỉ 2,9%. Kết quả thử nghiệm trên chuột cho thấy với liều uống là 2,4 mg/kg, sau 28 ngày sử dụng liên tiếp không có độc tính [32].

Trong nghiên cứu của Sun và cộng sự, nhũ tương nano astaxanthin không chứa nước (ASX-NANE) được chế tạo bằng phương pháp đồng nhất áp suất cao [33]. Sản phẩm kết hợp các ưu điểm của chất mang nano và nhũ tương không chứa nước. ASX-NANE thu được có dạng hình cầu với sự phân bố kích thước đồng đều và hiệu suất bám cao ($98,4 \pm 0,3\%$). Phân tích FTIR chỉ ra rằng astaxanthin đã được bao bọc thành công vào lõi lipid của ASX-NANE. Hệ nano nhũ tương này có tính ổn định trong khoảng thời gian 4 tuần ở 25°C và có thể bảo vệ astaxanthin chống lại sự oxy hóa. Nghiên cứu tế bào *in vitro* cho thấy ASX-NANE có độc tính thấp và có thể bảo vệ tế bào chống lại stress oxy hóa. Nghiên cứu thẩm thấu trong ống nghiệm và các phân mô học da cho thấy sự thẩm thấu tăng cường của astaxanthin và sự biến đổi của lớp sừng với sự hấp thụ toàn thân thấp và biểu bì không thay đổi. Do đó, nhũ tương nano không chứa nước có thể là một chiến lược thích hợp để sản xuất chế phẩm astaxanthin bôi tại chỗ.

Bằng phương pháp nhũ hóa - bay hơi, Oh và cộng sự đã chế tạo astaxanthin lecithin nano-liposol (ASTA @ Lec NS) có kích thước 169-187 nm và chỉ số đa phân tán <0.3 [34] ASTA @ Lec NS ổn định trong một thời gian đủ dài và dễ dàng đông khô thành bột khi thêm một lượng sucrose thích hợp. Ngoài ra, khả năng hòa tan trong nước tốt của ASTA @ Lec NS đã cải thiện đáng kể sinh khả dụng của astaxanthin. Sản phẩm ASTA @ Lec NS có thể loại bỏ các gốc tự do (ROS) và thúc đẩy quá trình chữa lành vết thương của các tế bào NIH 3T3 (nguyên bào sợi) hiệu quả hơn mà không gây ra bất kỳ độc tính tế bào nào. Kết quả nghiên cứu đã khẳng định khả năng chống oxy hóa tại chỗ và *in vitro* của ASTA@Lec NS đều cao hơn so với astaxanthin tinh khiết và lecithin.

Ở nước ta, các nghiên cứu về bào chế dạng nano của các hoạt chất có hoạt tính sinh học đang được quan tâm và phát triển trong những năm gần đây. Tuy nhiên, việc nghiên cứu chế tạo dạng nano astaxanthin nói riêng cho tới thời điểm hiện tại là rất ít. Liên quan tới hoạt chất này, tại Việt Nam mới

chỉ triển khai nghiên cứu chiết tách astaxanthin từ các nguồn nguyên liệu khác nhau, trong đó các nghiên cứu đều đưa ra kết luận: Vi tảo *Haematococcus pluviialis* là nguồn nguyên liệu cho hàm lượng tích lũy astaxanthin cao nhất và sản phẩm astaxanthin thu được có khả năng ứng dụng sử dụng được cho con người [35].

Trong đề tài “Nghiên cứu chế tạo và đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và giảm rối loạn chuyển hóa lipid của tổ hợp nano astaxanthin/kaempferol trên mô hình *in vitro* và *in vivo*” do quỹ Nafosted tài trợ năm 2019 – 2023, nhóm nghiên cứu phòng Công nghệ tảo, Viện Công nghệ sinh học đã kết hợp với Viện Hóa học đã chế tạo thành công nano astaxanthin có tính sinh khả dụng (gấp 5-20 lần) và hoạt tính chống oxy hóa và giảm lipid cao hơn so với astaxanthin tự do. Chính vì vậy, “Đánh giá khả năng ức chế enzyme acetylcholinesterase và bảo vệ tế bào thần kinh của nano astaxanthin trên dòng tế bào thần kinh” được tiến hành để làm rõ hơn về vai trò của nano astaxanthin, đồng thời góp phần định hướng cho các nghiên cứu sau này.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Nano astaxanthin có nguồn gốc từ astaxanthin tách chiết từ vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* do TS. Hoàng Mai Hà, phòng Vật liệu tiên tiến, Viện Hoá học, Viện Hàn lâm cung cấp với kích thước hạt là 98 ± 2 nm, hình cầu, chỉ số PDI là $0,184 \pm 0,003$ và giá trị tuyệt đối của thế zeta là 36,8 mV. Nano astaxanthin phân bố đồng đều và phân tán tốt trong nước.

Tế bào thần kinh đệm C6 (ATCC, CCL-107™) do TS. Nguyễn Văn Trữ, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN cung cấp.

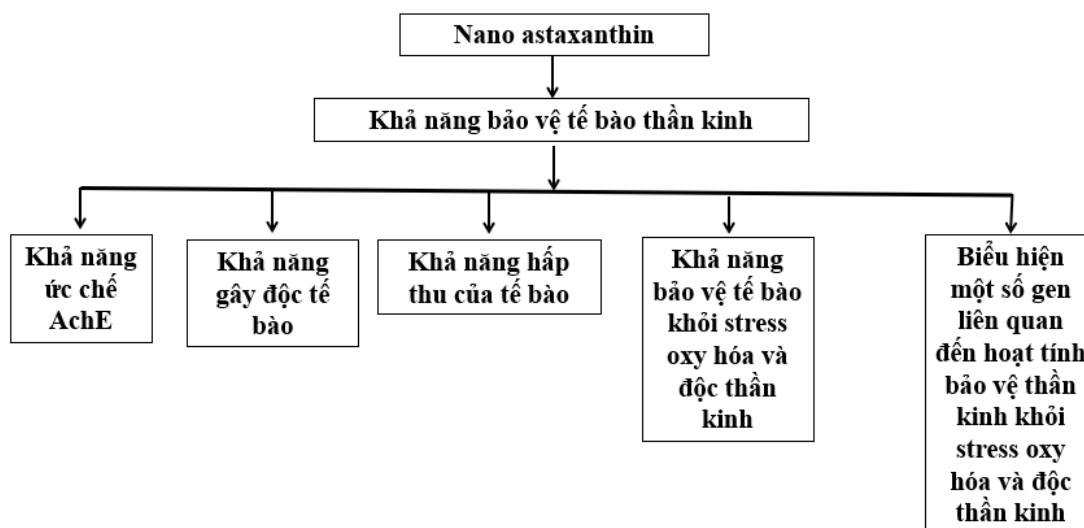
2.1.2. Hóa chất và thiết bị

Hóa chất: Môi trường nuôi cấy tế bào dulbecco's modified eagle medium (DMEM)/high glucose (Gibco™, Thermo Fisher, Singapore), fetal bovine serum (FBS; Sigma), penicillin, và streptomycin (Invitrogen, Mỹ), ascorbic acid (Trung Quốc), galantamine hydrobromide (Sopharma AD, Bulgaria), H₂O₂ (Trung Quốc), A β 25-35 (purity $\geq 97\%$, No. A.4559; Sigma, USA), acetylcholinesterase inhibitor screening Kit (MAK 119; Sigma, USA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Invitrogen, USA), TRIzol™ (Invitrogen, Singapore), Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit (New England BioLabs Inc., UK), Mũi (Công ty Phù Sa, Việt Nam).

Thiết bị: Dụng cụ cho nghiên cứu gồm Cân kỹ thuật Precisa XB 1200C (Switzerland), Cân phân tích Shimadzu AY 120 (Nhật Bản); Máy ly tâm Sorvall® LEGEND RT (Đức), Máy khuấy từ Kika Labortechnik (Đức), Máy ly tâm Sorvall Legen RT 1900W (Kendro, Germany), Nồi khử trùng (ALP, Nhật Bản), Tủ lạnh thường, Pipetteman các loại (Gilson, France) và các dụng cụ thông thường của phòng thí nghiệm.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Khả năng bảo vệ tế bào thần kinh của nano astaxanthin được tiến hành tại Phòng Công nghệ tảo, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN từ tháng 2-9/2023 như được trình bày trong hình 2.1.



↑ Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 2-9/2023,
Tại phòng Công nghệ Tảo, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCVN ↓

Hình 2.1: Sơ đồ nghiên cứu khả năng bảo vệ tế bào thần kinh của nano astaxanthin.

2.2.1. Xác định hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase (AChE)

Tác dụng ức chế enzyme AChE (Sigma Aldrich, Singapore) của mẫu thử được tiến hành bằng kit Acetylcholinesterase Inhibitor Screening Kit (MAK324, Sigma, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phương pháp này dựa trên nguyên tắc sau: Cơ chất acetylthiocholin iodid (ACTI) bị thủy phân nhờ xúc tác của AChE tạo thiocholin. Thiocholin sau đó phản ứng với axit 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic DTNB tạo thành sản phẩm acid 5-thio-2-nitrobenzoic có màu vàng và so màu ở bước sóng 412 nm. Lượng sản phẩm được tạo thành tỷ lệ thuận với hoạt độ của AChE. Galantamine (ở nồng độ 4, 20, 100 và 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) được sử dụng làm đối chứng dương tính. Hoạt tính AChE được đánh giá dựa trên độ hấp thụ của nano astaxanthin hoặc galantamine đo được ở bước sóng 412 nm bằng máy microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Đánh giá kết quả thông qua phần trăm ức chế hoạt độ enzyme AChE (I%) theo công thức:

$$I\% = (1 - \Delta\text{OD}_{\text{test}} / \Delta\text{OD}_{\text{No inhibitor}}) \times 100\%.$$

Trong đó: I%: phần trăm hoạt tính AChE bị ức chế; $\Delta\text{OD}_{\text{test}}$: Sự thay đổi giá trị OD_{412} của giếng chứa nano astaxanthin hoặc chất chuẩn ở thời điểm 0 phút và 10 phút $\Delta\text{OD}_{\text{No inhibitor}}$: Sự thay đổi giá trị OD_{412} của giếng đối chứng không ức chế.

2.2.2. Phương pháp nuôi cấy tế bào

Tế bào C6 được nuôi cấy trên môi trường DMEM có chứa 10% FBS, 100 U/mL penicillin, và 0,1 mg/mL streptomycin trong tủ nuôi cấy vô trùng ở 37 °C, 5% CO₂.

2.2.3. Phương pháp đánh giá độc tính của nano astaxanthin

Độc tính của nano astaxanthin ở các nồng độ khác nhau (10, 50, 100, 200 và 500 µg/mL) trên dòng tế bào C6 được phân tích theo phương pháp so màu MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) theo công bố của Hien và cộng sự (2023) [36] cụ thể là tế bào C6 được nuôi cấy vào trong đĩa 96 giếng với mật độ 2×10^4 tế bào/giếng/100 µL môi trường đầy đủ. Ủ qua 24 giờ cho tế bào phát triển ổn định. Sau đó, tế bào được ủ với nano astaxanthin hoặc nước cất khử trùng (0,01%) trong 24 giờ tiếp theo. Sau 24h, bổ sung 5 µL của dung dịch MTT (5 mg/mL) vào từng giếng và tiếp tục ủ trong 4 giờ. Môi trường được loại bỏ sau 4h và bổ sung 100 µL DMSO hòa tan các tinh thể được tạo thành với MTT. Màu của dung dịch được đọc ở bước sóng 570nm bằng bằng máy microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Tỷ lệ sống sót của tế bào được tính bằng cách so sánh độ hấp thụ của mẫu với mẫu đối chứng. Trong đó phần trăm sống sót của tế bào được xác định như sau:

Tỷ lệ tế bào sống (%) = (Số tế bào sống/Tổng số tế bào) x 100%.

Thí nghiệm được lặp lại ít nhất ba lần.

2.2.4. Phương pháp đánh giá khả năng hấp thu tế bào

Khả năng hấp thu của nano astaxanthin so với astaxanthin tự do trong tế bào C6 được tiến hành theo phương pháp được mô tả bởi Hien và cộng sự [36]. Cụ thể là, các tế bào C6 được nuôi cấy trước trong 24 giờ với mật độ 1×10^6 tế bào trên mỗi đĩa và sau đó được xử lý bằng 5 µg/mL astaxanthin tự do hoặc 50 µg/mL nano astaxanthin (chứa một lượng tương đương 5 µg/mL astaxanthin) trong 4 giờ. Sau thời gian ủ, các tế bào được rửa ba lần bằng dung dịch muối đệm photphat (PBS), ly giải và ly tâm ở 2000 vòng/phút trong 3 phút. Nồng độ của astaxanthin trong các tế bào được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), theo báo cáo trước đây của Hien và cộng sự [36].

2.2.5. Phương pháp đánh giá khả năng bảo vệ tế bào của nano astaxanthin chống lại stress oxy hóa trong tế bào C6 được cảm ứng H₂O₂

Tế bào C6 được cấy vào các đĩa 96 giếng với mật độ 2×10^4 tế bào/giếng/100 μL môi trường đầy đủ. Ủ qua 24 giờ cho tế bào phát triển ổn định. Sau đó, tế bào được ủ với nano astaxanthin ở các dải nồng độ khác nhau. Mỗi nồng độ được lặp lại 3-5 lần. Sau 24 giờ nuôi cấy ở 37°C bổ sung vào mỗi giếng 1 μL H_2O_2 (10mM). Tế bào tiếp tục được nuôi cấy ở 37°C , 5% CO_2 trong thời gian 1h. Sau 1 giờ đánh giá khả năng sống sót của tế bào bằng phương pháp MTT.

2.2.6. Phương pháp đánh giá khả năng bảo vệ tế bào thần kinh C6 của nano astaxanthin chống lại tác hại gây độc thần kinh gây ra bởi $\text{A}\beta_{25-35}$

Tế bào C6 được cấy vào các đĩa 96 giếng với mật độ 2×10^4 tế bào/giếng/100 μL môi trường đầy đủ. Ủ qua 24 giờ cho tế bào phát triển ổn định. Sau đó, tế bào được ủ với nano astaxanthin ở các dải nồng độ khác nhau. Mỗi nồng độ được lặp lại 3-5 lần. Sau 24 giờ nuôi cấy ở 37°C tiếp tục thêm vào mỗi giếng 1 μL protein $\text{A}\beta_{25-35}$ (2mM). Tế bào tiếp tục được nuôi cấy ở 37°C không khí chứa 5% CO_2 . Sau 24 giờ đánh giá khả năng sống sót của tế bào bằng phương pháp định lượng MTT.

2.2.7. Phân tích biểu hiện gen liên quan đến khả năng bảo vệ thần kinh của nano astaxanthin bằng phương pháp quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Tế bào C6 được nuôi cấy trong đĩa 6 giếng với mật độ ban đầu 1×10^6 tế bào/giếng trong 24 giờ, sau đó ủ với nano astaxanthin ở các nồng độ khác nhau (50 và 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) hoặc galantamine (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) trong 24 giờ, và tiếp tục xử lý với H_2O_2 (10 mM) trong 24 giờ nữa. Nước cất được sử dụng làm đối chứng. Khi kết thúc quá trình nuôi cấy, tế bào được rửa 3 lần bằng dung dịch muối đệm phốt phát (PBS), ly giải và ly tâm ở 2000 vòng/phút trong 3 phút. Tổng số RNA từ tế bào được tách chiết bằng thuốc thử TRIzol™ (Invitrogen, Singapore) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. PCR thời gian thực định lượng được thực hiện bằng cách sử dụng kit RT-qPCR một bước Luna®Universal (New England BioLabs Inc., UK) trong thiết bị MyGo Pro real-time PCR (IT-IS Life Science Ltd., Dublin, Republic of Ireland). Trình tự các cặp mồi sử dụng được trình bày trong bảng 2.1. Phản ứng qPCR được thực hiện trong điều kiện phản ứng là: 95°C trong 10 phút tiếp theo là 45 chu kỳ của 95°C trong 20 giây, 58°C trong 10 giây và 72°C trong 20 giây. Tính đặc hiệu của mồi được xác định ở $58-95^\circ\text{C}$ với tốc độ làm nóng $0,1^\circ\text{C}/\text{s}$ và kết thúc bằng

cách hạ nhiệt độ xuống 40°C trong 30 giây. β -actin được sử dụng để chuẩn hóa số liệu.

Bảng 2.1: Bảng trình tự các môi được sử dụng trong qPCR

Môi	Trình tự (5'-3')		TLTK
	Môi xuôi	Môi ngược	
CHAT	AGCCCTGCTGTGATCTTTGCTCG	CCTTGGCCCAGTCAGTGGGAA	[37]
VACHT	CCCTTAAGCGGGCCTTTCATTGAT	AAAGGCAAACATGACTGTGGAGGC	[37]
Keap1	GGCCCTCTCTAGTTCCAG	CAGCATAGATACAGTTGTGCAG	[38]
Nrf2	GCGTGTAGCCGATTACCGAGTG	CATGATGAGCTGTGGACCGTGTG	[38]
SOD	GCCTGGATGGCTACGTACA	GGTCCAGCGGATGAAGAG	[39]
CAT	AATGAAGACAACGTCACCTCAGG	TGTTCTCACACAGGCGTTTC	[39]
GPX	GCAATCAGTTCGGACATCAG	CACCGGGTCGGACATACTT	[39]
β -actin	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	GCCTGGATGGCTACGTACA	[39]
iNOS	AGAAGGAAATGGCTGCAGAA	GCTCGGCTTCCAGTATTGAG	[39]
COX	TTCTGCCCTCTGTACCCAAA	AAGGATGAGGCGAGTGGTCT	[40]
TNF- α	CCCAGATAGATGGGCTCAT	CAGGGACCTCTCTAATCA	[40]
IL-6	TGAACTCCTTCTCCACAAGCG	GCTCTTCTGGGAAGTAGACAG	[40]

2.2.8. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được biểu thị dưới dạng trung bình \pm (SD) và được xử lý thống kê theo phương pháp Student's t-test bằng phần mềm E-xcel hoặc ANOVA một chiều và phân tích Tukey-Kramer post-hoc để xác định sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm ở mức $P < 0,05$.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

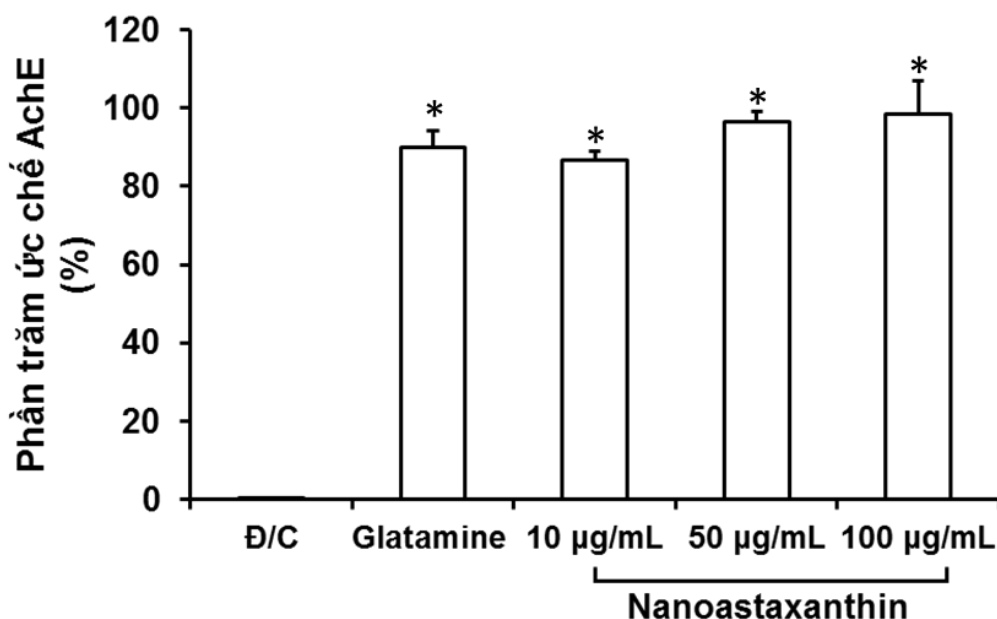
3.1. NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ENZYME ACETYLCHOLINESTERASE (ACHE) CỦA NANO ASTAXANTHIN

Với các triệu chứng lâm sàng như suy giảm nhận thức, bệnh Alzheimer (AD) là chứng rối loạn thoái hóa thần kinh phổ biến nhất và là nguyên nhân thường gặp nhất của chứng mất trí. Nó ảnh hưởng đến các hoạt động của cuộc sống hàng ngày và rối loạn hành vi tiến triển trong suốt quá trình bệnh. Theo giả thuyết cholinergic, việc phát sinh AD có liên quan đến sự thiếu hụt chất dẫn truyền thần kinh acetylcholine (ACh) trong não tới gần 90% bệnh nhân mắc AD là sự suy giảm nồng độ ACh trong vùng dưới đồi và vỏ não [41].

Là chất dẫn truyền thần kinh tại khe synapse, acetylcholine có vai trò quan trọng trong hoạt động của hệ thần kinh và nồng độ acetylcholine được duy trì ổn định bởi enzyme acetylcholinesterase (AChE). AChE là một enzyme có chức năng làm ngưng lại hoạt động của chất dẫn truyền thần kinh acetylcholine tại các synapse thần kinh cholinergic thông qua việc thủy phân acetylcholine tạo thành cholin và axit axetic. Ở các bệnh nhân mắc AD, do có sự tích tụ các mảng amyloid và các đám rối thần kinh, khiến cho nồng độ acetylcholine bị suy giảm đáng kể. Do vậy, các thuốc ức chế AChE nhằm duy trì nồng độ acetylcholine đóng một vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn sự tiến triển của bệnh AD. Trong nghiên cứu này, việc xác định hoạt tính ức chế AChE của nano astaxanthin đã được tiến hành và thể hiện trong hình 3.1.

Kết quả trong hình 3.1 cho thấy nano astaxanthin có tác dụng ức chế enzyme AChE phụ thuộc vào nồng độ. Phần trăm ức chế enzyme AChE của nano astaxanthin ở các nồng độ 10, 50 và 100 $\mu\text{g/mL}$ đạt tương ứng là 86,8%, 96,6% và 98,6% (Hình 3.1). Khả năng ức chế của nano astaxanthin có thể so sánh ngang bằng hoặc thậm chí là cao hơn so với chất chuẩn galatamine.

Wang và cộng sự (2022) chỉ ra rằng all-trans astaxanthin ức chế AChE theo cách phụ thuộc vào liều với giá trị IC_{50} là 8,64 $\mu\text{mol/L}$ [42], trong khi giá trị đó của nano astaxanthin tương đương là 1,66 $\mu\text{mol/L}$. Rõ ràng, acetylcholinesterase nhạy cảm hơn nhiều với astaxanthin ở dạng nano hoá so với dạng tự do.



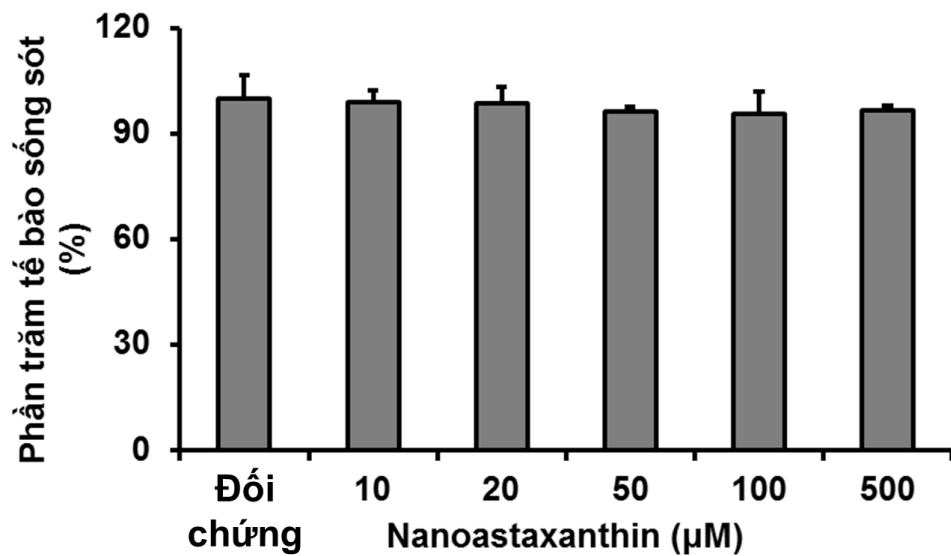
Hình 3.1: Kết quả thử hoạt tính ức chế enzyme AchE của nano astaxanthin. Dữ liệu được biểu thị bằng trung bình \pm SD (n=3). Sự khác biệt đáng kể được so sánh với nhóm đối chứng, * P <0,001.

3.2. NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC LIÊN QUAN ĐẾN KHẢ NĂNG BẢO VỆ TẾ BÀO THẦN KINH CỦA NANO ASTAXANTHIN

3.2.1. Nghiên cứu đánh giá khả năng gây độc tế bào C6 của nano astaxanthin

Trước khi đánh giá khả năng hấp thu nội bào và hoạt động bảo vệ thần kinh của nano astaxanthin trên dòng tế bào C6, độc tính tế bào của nó đã được kiểm tra để loại trừ tác động thứ cấp của độc tính đối với hoạt tính sinh học của nano astaxanthin. Kết quả thử độc tính tế bào của nano astaxanthin ở các nồng độ khác nhau trên dòng tế bào C6 được trình bày trong hình 3.2.

Kết quả trong hình 3.2 cho thấy, tế bào C6 được ủ với các nồng độ astaxanthin (10, 20, 50, 100 và 500 µg/mL) vẫn phát triển bình thường với tỷ lệ sống sót đạt trên 98%. Điều này cho thấy rằng nano astaxanthin không gây ra độc tế bào ở các nồng độ astaxanthin thử nghiệm.

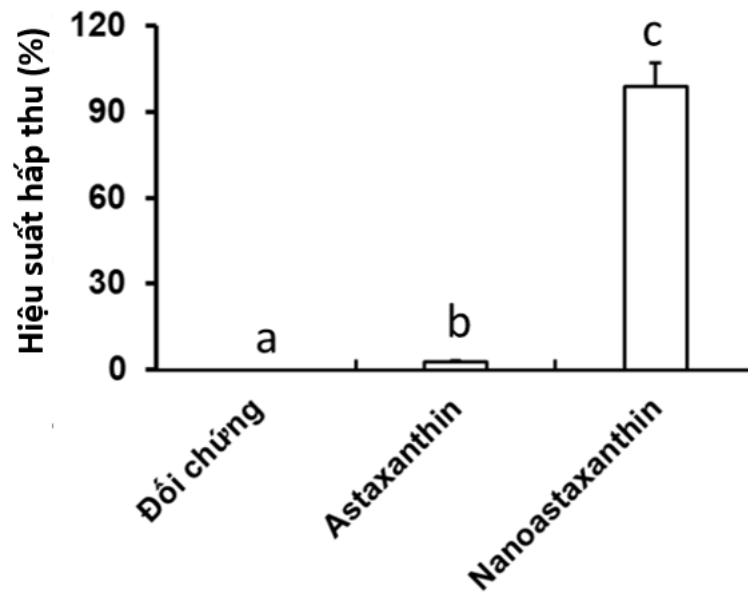


Hình 3.2: Ảnh hưởng của nano astaxanthin lên khả năng sống sót của tế bào C6.

Số liệu được đưa ra dưới dạng giá trị trung bình \pm SD ($n = 3$).

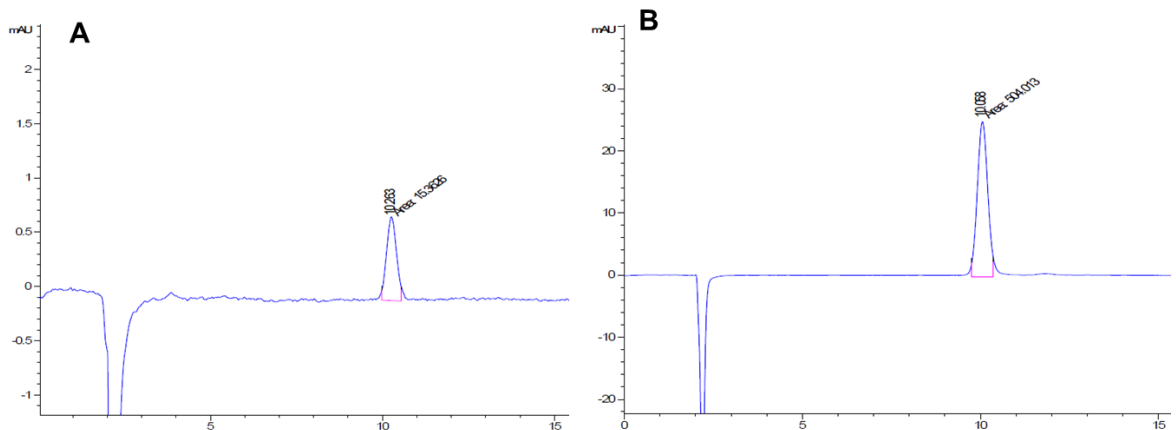
3.2.2. Nghiên cứu đánh giá khả năng hấp thu nano astaxanthin của tế bào C6

Mặc dù có nhiều hoạt tính sinh học quý giá nhưng việc sử dụng astaxanthin bị hạn chế trong công nghiệp dược phẩm và thực phẩm do khả năng hòa tan kém trong nước dẫn đến sinh khả dụng thấp. Do đó, trước tiên, các hạt nano astaxanthin được đánh giá về khả năng hấp thu tế bào của nó (Hình 3.3 và 3.4).



Hình 3.3: Hiệu suất hấp thu astaxanthin ở dạng tự do và nano hóa của tế bào C6.

Các giá trị a, b, c có ý nghĩa sai khác nhau với $P < 0.001$.

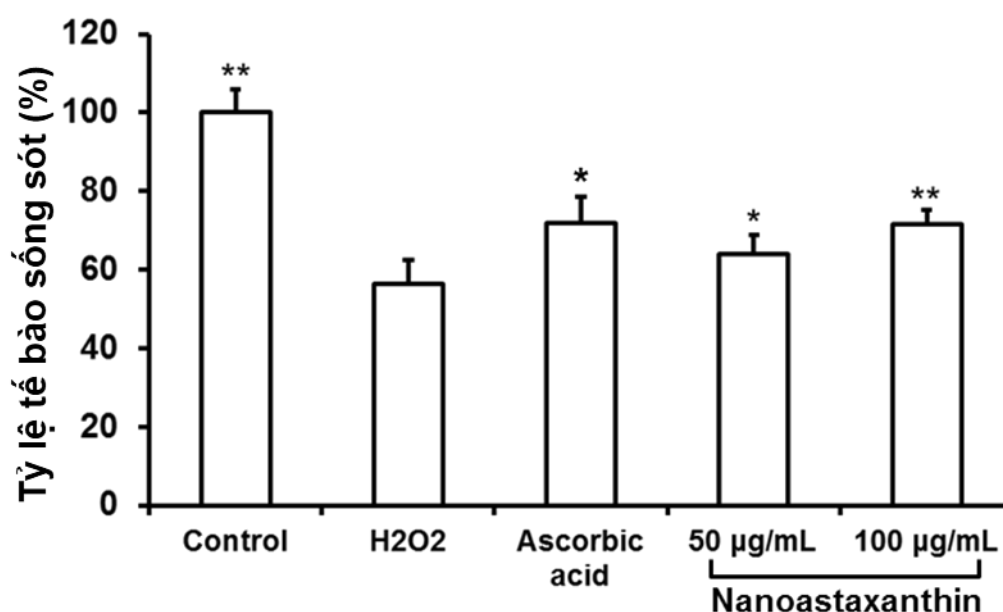


Hình 3.4: Sắc ký đồ HPLC của astaxanthin được tách chiết từ tế bào C6 được ủ với astaxanthin dạng tự do (A) và dạng nano hóa (B).

Hình 3.3 và 3.4 cho thấy rằng sự hấp thu astaxanthin dạng nano hóa trong tế bào C6 lớn hơn nhiều so với astaxanthin dạng tự do. Hiệu suất hấp thu tế bào của nano astaxanthin cao hơn gấp 35 lần so với astaxanthin dạng tự do, điều này cho thấy rằng các hạt nano được nạp astaxanthin với chất hoạt động bề mặt (Tween® 80 và lecithin) và tác nhân bao bọc (β -cyclodextrin) đã tăng cường sự hấp thu astaxanthin trong các tế bào C6.

3.2.3. Đánh giá khả năng bảo vệ tế bào của nano astaxanthin chống lại stress oxy hóa trong tế bào C6 được cảm ứng bởi H₂O₂

Căng thẳng oxy hóa được cho là nguyên nhân bệnh lý chính gây ra một số bệnh thần kinh bao gồm Bệnh Parkinson (PD), AD và đột quỵ. Hơn nữa, do sự mất cân bằng giữa sản xuất ROS và hệ thống phòng thủ chống oxy hóa, stress oxy hóa có thể gây tổn thương tế bào thần kinh do H₂O₂ gây ra. Bên cạnh đó, các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng việc bổ sung trực tiếp H₂O₂ vào môi trường nuôi cấy có thể dẫn đến stress oxy hóa và giết chết tế bào [43]. Trong nghiên cứu trước đây, nano astaxanthin đã được chỉ ra là có hoạt tính chống oxy hóa cao và khả năng bảo vệ tế bào gan HepG2 khỏi tác động gây hại của stress oxy hóa [44]. Do đó, trong nghiên cứu này, khả năng bảo vệ thần kinh của nano astaxanthin được đánh giá chống lại các tổn thương oxy hóa do H₂O₂ gây ra trong tế bào thần kinh C6 (Hình 3.5).



Hình 3.5: Khả năng bảo vệ tế bào chống khỏi stress oxy hóa trong tế bào C6 cảm ứng H₂O₂ của nano astaxanthin.

Dữ liệu được biểu thị bằng trung bình ± SD (n=3). Sự khác biệt đáng kể được so sánh với nhóm cảm ứng duy nhất H₂O₂, * P < 0,05, ** P < 0,001.

Kết quả trong hình 3.5 cho thấy, xử lý với 10mM H₂O₂ làm giảm đáng kể khả năng sống của tế bào xuống 56,4% trong khi tỷ lệ này đạt 100% khi tế bào được nuôi cấy trong môi trường không bổ sung H₂O₂ (đôi chứng). Ủ tế

bào với nano astaxanthin trước khi bổ sung H_2O_2 đã ức chế đáng kể tác động gây hại của H_2O_2 đối với tế bào, khả năng sống của tế bào tăng từ 56,4% ở tế bào được xử lý H_2O_2 lên 64,2% và 71,7% ở tế bào được xử lý trước nano astaxanthin ở nồng độ lần lượt là 50 và 100 $\mu\text{g/mL}$. So với nhóm tế bào được xử lý trước bằng nano astaxanthin, nhóm axit ascorbic cũng đạt tỷ lệ sống là 71,9%.

Lu và cộng sự (2010) cho thấy tỷ lệ sống sót của tế bào tăng đáng kể từ 63,9% lên 73,9% khi các tế bào này được xử lý trước với 316 nM astaxanthin tự do trước khi tiếp xúc với H_2O_2 [45]. Wang và cộng sự (2017) và Oh và cộng sự (2020) không tìm thấy bất kỳ tác dụng bảo vệ tế bào nào của astaxanthin tự do ở nồng độ từ 10 đến 40 μM đối với stress oxy hóa gây chết tế bào trong tế bào Caco-2 và ARPE-19 được cảm ứng H_2O_2 [46, 43]. Trong luận văn này, một lượng nhỏ astaxanthin (4,2 - 8,3 nM) ở dạng hạt nano của nó có thể bảo vệ tế bào khỏi stress oxy hóa do H_2O_2 gây ra. Giảm kích thước hạt và tăng khả năng hòa tan và sự hấp thu của tế bào đối với astaxanthin ở dạng nano hóa đã cải thiện khả năng chống oxy hóa dẫn đến bảo vệ tế bào thần kinh khỏi các tổn thương do stress oxy hóa gây ra.

3.2.4. Đánh giá khả năng bảo vệ tế bào thần kinh C6 khỏi tác hại gây độc của $A\beta_{25-35}$ của nano astaxanthin

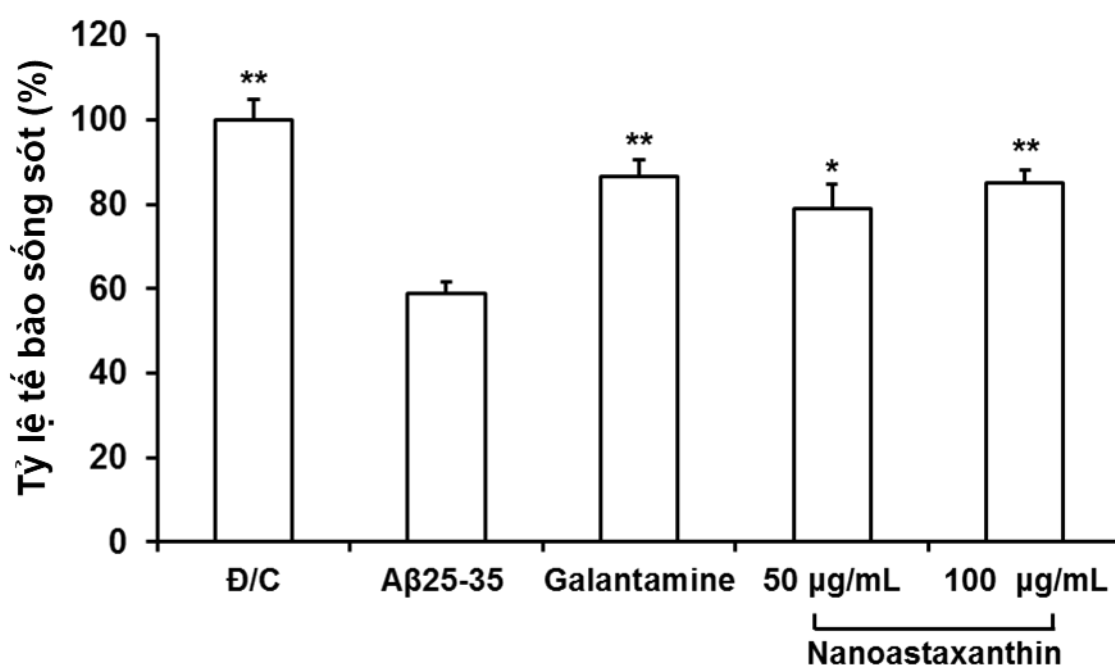
Bệnh Alzheimer (AD) là chứng rối loạn thoái hóa thần kinh phổ biến nhất dẫn đến suy giảm nhận thức tiến triển với các dấu hiệu bệnh lý của mảng bám tuổi già và sự hình thành đám rối sợi thần kinh trong não. Năm 1984, Glenner & Wong phát hiện ra rằng protein amyloid β ($A\beta$) là thành phần trung tâm của các mảng amyloid ngoại bào trong AD [47]. Kể từ đó, $A\beta$ đã được coi là yếu tố thúc đẩy các quá trình bệnh lý của bệnh Alzheimer.

Trong điều kiện bình thường, sự phân cắt APP bởi α -secretase dẫn đến sự hình thành tiền chất amyloid protein-s alpha (APPs- α) và carboxy-terminal fragment-alpha (CTF- α), tiếp theo là sự phân cắt bởi phức hợp γ -secretase để tạo ra p3 và đoạn nội bào có tên là miền nội bào của protein tiền chất amyloid (AICD) [48, 49]. APPs- α có thể điều chỉnh quá trình truyền qua khớp thần kinh thông qua thụ thể GABA. Trong điều kiện bệnh lý, $A\beta$ là sản phẩm phân giải protein của APP bởi enzyme cắt APP tại vị trí β I (BACE-1) [50], trong đó APP phân tách thành APP- β và CTF- β , sau đó là phân tách γ -secretase, tạo ra $A\beta$ và AICD. $A\beta$ được tạo ra sẽ được tiết vào không gian ngoại bào dưới

dạng monome [51]. Các monome A β (đặc biệt là A β 42) dễ dàng tập hợp thành các oligome có trọng lượng phân tử thấp, thành các protofibril và cuối cùng thành các fibrils chứa các tấm β độc hại. Ngoài ra, A β dường như cũng gây ra những thay đổi bệnh lý ở gai đuôi gai và hiệu suất synap. A β tổng hợp này là tổn thương rõ ràng có thể gây nhiễm độc thần kinh [51].

Sato và cộng sự đã đề xuất rằng A β ₂₅₋₃₅ đại diện cho vùng hoạt động sinh học của A β vì đây là đoạn ngắn nhất thể hiện cấu trúc tổng hợp tấm β lớn và giữ lại độc tính của peptide có chiều dài đầy đủ [52]. Dạng đơn phân của A β ₂₅₋₃₅ có thể gây độc tế bào [53]. Theo đó, A β ₂₅₋₃₅ thường được chọn làm mô hình cho A β có độ dài đầy đủ trong các nghiên cứu về cấu trúc và chức năng.

Trong nghiên cứu này, A β ₂₅₋₃₅ ở nồng độ 20 μ M đã gây chết tế bào thần kinh đến 59% khi so sánh với các tế bào đối chứng (hình 3.6). Ủ tế bào C6 với nano astaxanthin hoặc galantamine (0,1 mg/mL) trước khi bổ sung A β ₂₅₋₃₅ đã làm giảm đáng kể tác hại gây độc thần kinh của A β ₂₅₋₃₅. Ở nồng độ 50 và 100 μ g/mL, nano astaxanthin có tác dụng tăng tỷ lệ sống sót của tế bào ủ A β ₂₅₋₃₅ từ 59% lên tương ứng 79% và 85% (Hình 3.6).



Hình 3.6: Khả năng bảo vệ tế bào chống khỏi sự gây độc thần kinh trong tế bào C6 cảm ứng A β ₂₅₋₃₅ của nano astaxanthin.

Dữ liệu được biểu thị bằng trung bình \pm SD (n = 3). Sự khác biệt đáng kể được so sánh với nhóm cảm ứng duy nhất A β ₂₅₋₃₅, * P < 0,05, ** P < 0,001.

Các kết quả thu được cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây [54, 55, 56]. Theo đó, astaxanthin ở nồng độ 0,1 μM có thể làm giảm độc tính của $\text{A}\beta_{25-35}$ trong tế bào PC-12 khi được xử lý trong 48 giờ [55], nồng độ từ 0,1 cho đến 50 μM trong tế bào PC-12 khi được xử lý trong 24 giờ [54] và việc xử lý tế bào SH-SY5Y bằng astaxanthin ở mức 10 μM trong 24 giờ giúp tế bào phục hồi khỏi tác hại gây độc của $\text{A}\beta_{25-35}$ [56]. Trong nghiên cứu này, ở dạng nano hoá, astaxanthin ở nồng độ 4,2 - 8,3 nM đã có tác dụng bảo vệ tế bào khỏi tác hại gây độc tế bào của $\text{A}\beta_{25-35}$. Như vậy, việc nano hoá astaxanthin giúp tăng khả năng hoà tan và hấp thu vào trong tế bào dẫn đến tăng hoạt tính của astaxanthin lên rất nhiều lần so với bình thường.

3.3. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA NANO ASTAXANTHIN ĐẾN SỰ BIỂU HIỆN MỘT SỐ GEN LIÊN QUAN ĐẾN HOẠT TÍNH BẢO VỆ THẦN KINH TRÊN DÒNG TẾ BÀO C6 ĐƯỢC CẢM ỨNG VỚI CÁC TÁC NHẬN GÂY ĐỘC THẦN KINH

3.3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện gen của các enzyme chống oxy hóa trong tế bào C6

Stress oxy hóa được biết đến như là một trong những yếu tố quan trọng nhất liên quan đến việc kích hoạt stress ty thể và mạng lưới nội chất dẫn đến đến một loạt các bất thường như chết theo chương trình, hoại tử và các hậu quả nghiêm trọng khác. Catalase (CAT), superoxide dismutases (SOD) và glutathione peroxidase (GPx) là các enzym chống oxy hóa quan trọng giúp duy trì sự cân bằng động của stress oxy hóa. Khi stress oxy hóa xảy ra, các enzym này hoạt động như chất chống oxy hóa nội sinh chống lại các gốc tự do và loại bỏ các gốc tự do quá mức sinh ra trong tế bào bằng cách xúc tác trực tiếp trong quá trình phân hủy H_2O_2 thành O_2 [57].

Superoxide dismutase (SOD) là chất chống oxy hóa mạnh nhất trong tế bào và là enzyme giải độc đầu tiên. Nó là một thành phần của hệ thống phòng thủ tuyến đầu chống lại các loại oxy phản ứng (ROS) hoạt động dưới dạng là một enzyme chống oxy hóa nội sinh quan trọng. Nó xúc tác quá trình phân hủy hai phân tử anion superoxide (O_2^-) thành hydrogen peroxide (H_2O_2) và oxy phân tử (O_2), do đó làm cho anion superoxide có khả năng gây hại ít nguy hiểm hơn.

Tình trạng thiếu enzym SOD là phổ biến. Do đó, enzyme này không thể thiếu đối với sức khỏe của tế bào, bảo vệ các tế bào cơ thể khỏi các gốc oxy

quá mức, các gốc tự do và các tác nhân gây hại khác thúc đẩy quá trình lão hóa hoặc chết tế bào. Mức độ SODs giảm theo tuổi tác, trong khi sự hình thành gốc tự do tăng lên. Người ta cho rằng việc bổ sung SOD hàng ngày thích hợp sẽ bảo vệ hệ thống miễn dịch và giảm đáng kể khả năng mắc bệnh của một người và cuối cùng là làm chậm quá trình lão hóa [58].

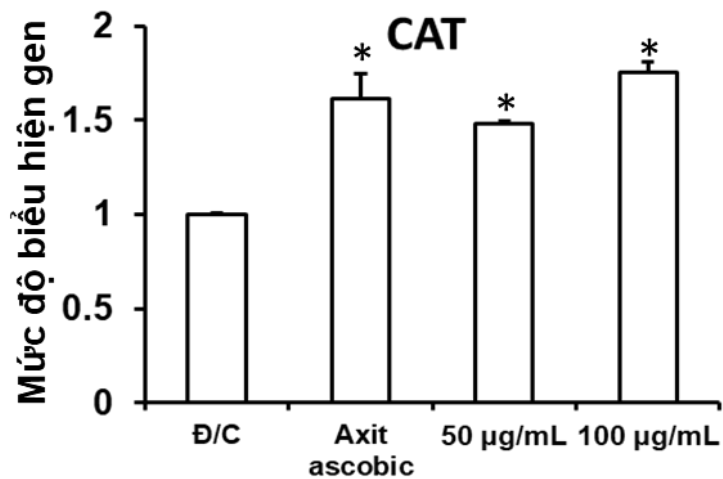
Catalase (CAT) là một enzym chống oxy hóa phổ biến hiện diện hầu hết trong tất cả các mô sống sử dụng oxy. Enzyme này sử dụng sắt hoặc mangan làm đồng yếu tố và xúc tác quá trình phân hủy hoặc khử hydro peroxide (H_2O_2) thành nước và oxy phân tử, do đó hoàn thành quá trình khử độc được mô phỏng bởi SOD [59]. Nó có nhiều trong các tế bào, nơi nó liên tục tìm kiếm các phân tử hydro peroxide. CAT có hiệu quả cao; nó có thể phá vỡ hàng triệu phân tử hydrogen peroxide trong một giây.

Zámocký và Koller đã nghiên cứu đến tổn thương DNA và nguy cơ dễ bị ung thư ở những người có đa hình di truyền và biểu hiện/hoạt động gen bị thay đổi trong CAT [60]. Sự phát triển của chứng rối loạn tâm thần cũng là kết quả của tính đa hình trong gen mã hóa CAT.

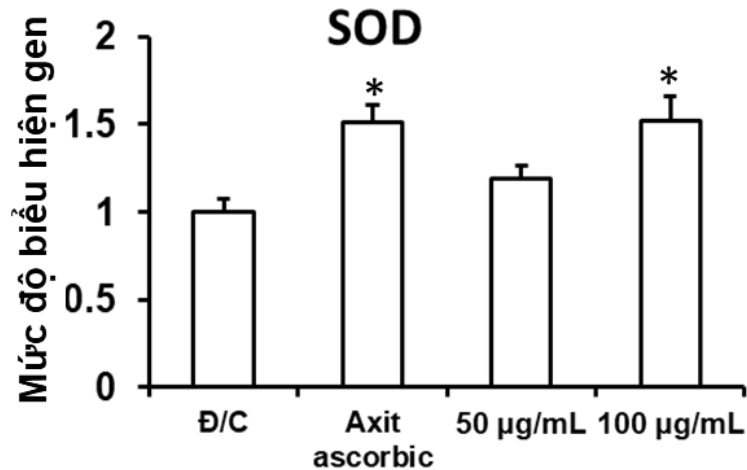
Glutathione Peroxidase (GPx) là một enzym nội bào quan trọng giúp phân hủy hydrogen peroxide (H_2O_2) thành nước; và peroxid lipid thành rượu tương ứng của chúng chủ yếu ở ty thể và đôi khi ở tế bào chất. Hầu hết, hoạt động của nó phụ thuộc vào một đồng yếu tố vi chất dinh dưỡng được gọi là selen. Vì lý do này, GPx thường được gọi là selenocystein peroxidase. Enzyme đóng vai trò quan trọng hơn trong việc ức chế quá trình peroxy hóa lipid, và do đó bảo vệ tế bào khỏi stress oxy hóa.

Tầm quan trọng lâm sàng của GPx đã được nhấn mạnh bởi một số nghiên cứu. Chabory và cộng sự. giả định rằng những cá nhân có hoạt động GPx thấp hơn dễ bị suy giảm khả năng bảo vệ chống oxy hóa, dẫn đến tổn thương oxy hóa đối với các axit béo màng và protein chức năng, và theo suy luận, tổn thương do nhiễm độc thần kinh [61]. Forgione và các đồng nghiệp trước đây đã đưa ra giả thuyết rằng sự thiếu hụt GPx1 trực tiếp gây ra sự gia tăng căng thẳng oxy hóa mạch máu, kèm theo rối loạn chức năng nội mô [62]. Glutathione peroxidase, đặc biệt là GPx1 cũng có liên quan đến sự phát triển và ngăn ngừa nhiều bệnh phổ biến và phức tạp, bao gồm ung thư và bệnh tim mạch.

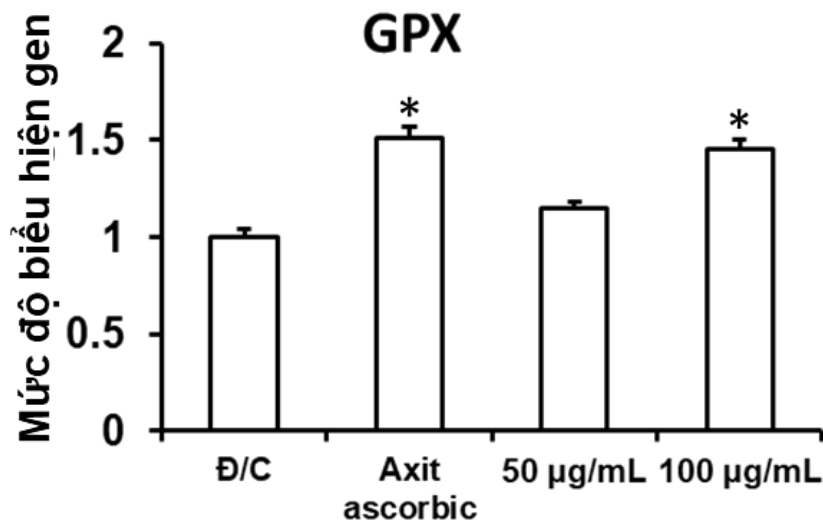
Trong luận văn này, có thể thấy rằng so với nhóm đối chứng, chất chuẩn axit ascorbic có tác dụng tăng mức độ biểu hiện của gen mã hóa cho các enzyme CAT, SOD và GPX lần lượt là +61, +50 và +51% ($P < 0.05$) (Hình 3.7 – 3.9). Tương tự như đối với chất chuẩn, tế bào được ủ với nano astaxanthin có tác dụng tăng mức độ biểu hiện của các enzyme chống oxy hóa CAT, SOD và GPX phụ thuộc vào nồng độ. Mức độ biểu hiện của gen mã hóa cho CAT có ý nghĩa tăng +46 và +75% trong tế bào được ủ với 50 và 100 $\mu\text{g/mL}$ nano astaxanthin (hình 3.7). Ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$, nano astaxanthin có ý nghĩa tăng mức độ biểu hiện của các gen SOD và GPX lên tương ứng +52 và +45% so với đối chứng (hình 3.8 và 3.9).



Hình 3.7: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen mã hóa cho enzyme CAT tham gia vào quá trình chống oxy hóa trong tế bào C6. Dữ liệu được biểu thị bằng trung bình \pm SD ($n = 3$). Sự khác biệt đáng kể khi so sánh với nhóm đối chứng, * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$.



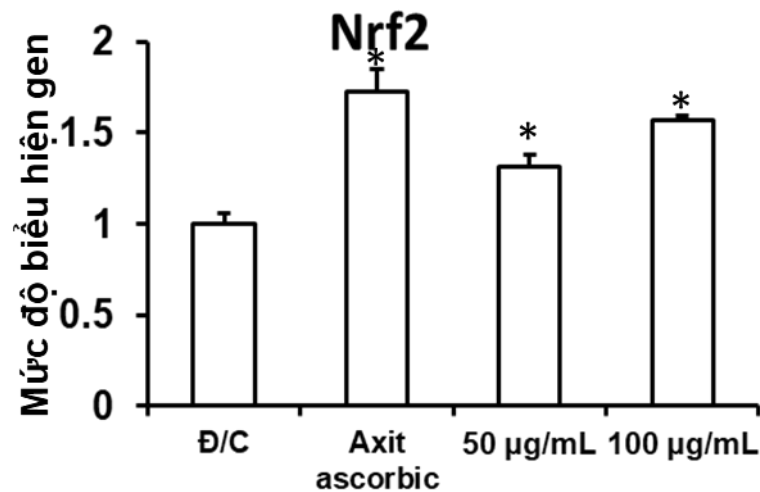
Hình 3.8: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen mã hóa cho enzyme SOD tham gia vào quá trình chống oxy hóa trong tế bào C6. Dữ liệu được biểu thị bằng trung bình \pm SD (n = 3). Sự khác biệt đáng khi so sánh với nhóm đối chứng, * P <0,05, ** P <0,001.



Hình 3.9: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen mã hóa cho enzyme GPx tham gia vào quá trình chống oxy hóa trong tế bào C6. Dữ liệu được biểu thị bằng trung bình \pm SD (n = 3). Sự khác biệt đáng khi so sánh với nhóm đối chứng, * P <0,05, ** P <0,001.

Các heme chống oxy hóa như Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) được sử dụng để duy trì sự cân bằng trong quá trình khử - oxy hóa. Khi tế bào cân bằng trong quá trình khử - oxy hóa, Nrf2 kết hợp với Keap1 trong tế bào chất và không hoạt động. Khi bị tổn thương do stress oxy hóa,

Nrf2 tự tách khỏi Keap1, di chuyển vào bên trong nhân và phản ứng với ARE, dẫn đến điều hòa các enzyme chống oxy hóa HO-1 (mã hóa heme oxygenase 1) và NQO-1 (mã hóa NAD(P)H quinone dehydrogenase), dẫn đến các tế bào được bảo vệ chống lại stress oxy hóa [63]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng biểu hiện nhân Nrf2 có ý nghĩa giảm trong bệnh nhân AD và kết quả phân tích meta microarray gần đây đã xác định được sự giảm của 31 gen ARE trong các bệnh nhân AD [64-66]. Tương tự như vậy, trong các mô hình chuột biến đổi gen của AD, việc mất Nrf2 đã được chứng minh là làm tăng mức độ A β và Tau phosphoryl hóa [67, 68]; tăng kích hoạt thần kinh đệm, các dấu hiệu của stress oxy hóa và thoái hóa thần kinh; và làm trầm trọng thêm tình trạng suy giảm nhận thức [68, 69]. Trong nghiên cứu này, mức độ mRNA của Nrf2 có ý nghĩa tăng phụ thuộc vào nồng độ trong tế bào được ủ với nano astaxanthin (hình 3.10). Ở nồng độ 50 và 100 $\mu\text{g/mL}$, nano astaxanthin có ý nghĩa tăng mức độ biểu hiện gen của Nrf2 lên +31 và +57% khi so với đối chứng. Tác dụng điều hòa biểu hiện của nano astaxanthin có thể so sánh được so với chất chuẩn axit ascorbic (hình 3.10).



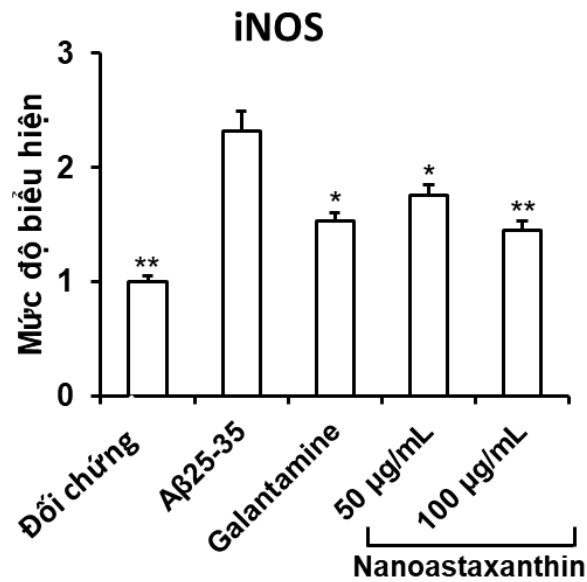
Hình 3.10: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen mã hóa cho enzyme Nrf2 tham gia vào quá trình chống oxy hóa trong tế bào C6. Dữ liệu được biểu thị bằng trung bình \pm SD ($n = 3$). Sự khác biệt đáng kể khi so sánh với nhóm đối chứng, * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$.

Từ các kết quả thu được ở trên, có thể thấy rằng tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của nano astaxanthin khỏi stress oxy hóa gây ra bởi H_2O_2 trong tế bào C6 là do nano astaxanthin tăng cường mức độ biểu hiện của các enzyme chống oxy hóa CAT, SOD, GPX và Nrf2.

3.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện gen của các enzyme gây viêm trong tế bào C6 của nano astaxanthin

Viêm thần kinh là một cơ chế quan trọng trong phản ứng phòng vệ trước các sự kiện gây bệnh, chấn thương và độc tố môi trường, nhưng nó cũng được công nhận là tác nhân chính gây ra các bệnh thoái hóa thần kinh và thần kinh khác nhau bao gồm bệnh Alzheimer (AD), bệnh Parkinson (PD), bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), bệnh đa xơ cứng (MS), chấn thương sọ não (TBI), chứng mất trí nhớ do HIV và các bệnh prion. Các tế bào thần kinh đệm cư trú trong não, chủ yếu là microglia, làm trung gian cho phản ứng miễn dịch bẩm sinh và góp phần vào sự tiến triển của bệnh. Microglia được kích hoạt tạo ra một số chất trung gian gây viêm và gây độc thần kinh bao gồm bổ thể, cytokine, chemokine, axit arachidonic (AA) và các chất chuyển hóa lipid của nó cũng như các loại oxy và nitơ phản ứng, một số trong đó góp phần trực tiếp gây tổn thương tế bào thần kinh [70].

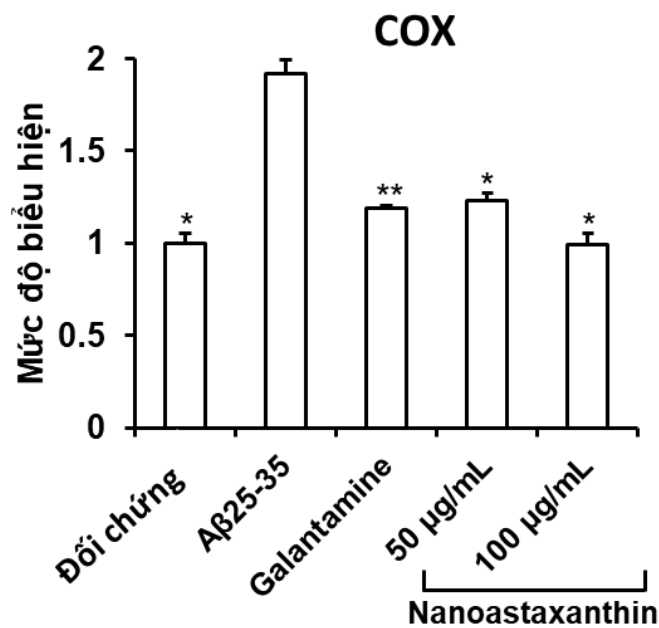
Tích lũy A β là một trong những đặc điểm nổi bật của AD. A β có thể thúc đẩy bệnh lý bằng cách kích thích viêm thần kinh và giải phóng các cytokinase gây viêm, chẳng hạn như yếu tố hoại tử khối u- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), nitric oxide synthase (iNOS) và cyclooxygenase (COX), chúng được biết là nguyên nhân gây độc tế bào thần kinh và tử vong [71]. Do đó, vai trò của nano astaxanthin trong việc điều hòa biểu hiện của các gen liên quan đến quá trình viêm trong tế bào C6 đã được nghiên cứu (hình 3.11-3.14).



Hình 3.11: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen iNOS liên quan đến tình trạng viêm ở tế bào C6.

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình \pm SD (n = 3). Sự khác biệt đáng kể về mức độ tổn thương tế bào do A β ₂₅₋₃₅ gây ra được ký hiệu là:

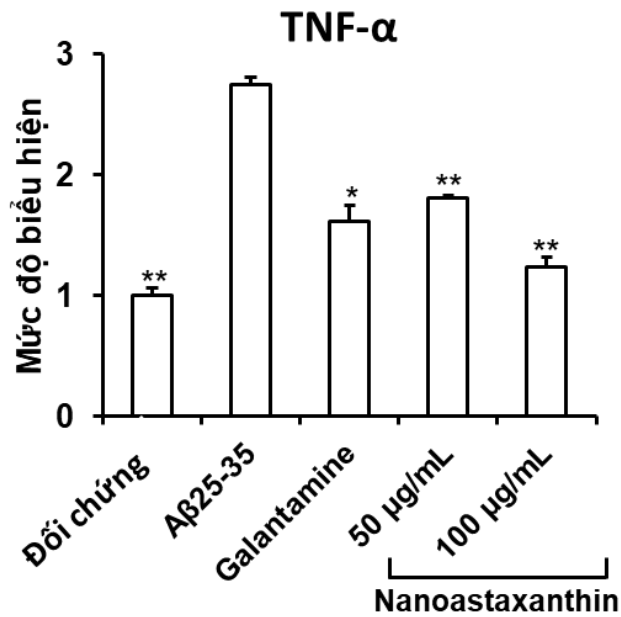
* P<0,05; ** P<0,001.



Hình 3.12: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen COX liên quan đến tình trạng viêm ở tế bào C6.

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình \pm SD (n = 3). Sự khác biệt đáng kể về mức độ tổn thương tế bào do A β ₂₅₋₃₅ gây ra được ký hiệu là:

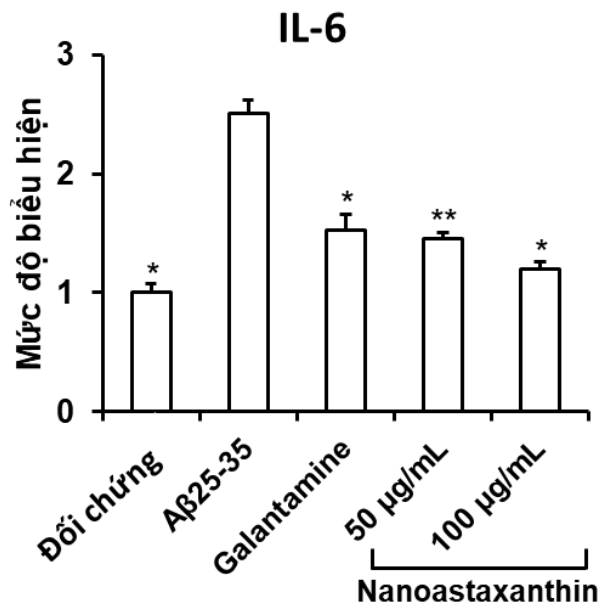
* P<0,05; ** P<0,001.



Hình 3.13: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen TNF- α liên quan đến tình trạng viêm ở tế bào C6.

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình \pm SD (n = 3). Sự khác biệt đáng kể về mức độ tổn thương tế bào do A β_{25-35} gây ra được ký hiệu là:

* P<0,05; ** P<0,001.



Hình 3.14: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen IL-6 liên quan đến tình trạng viêm ở tế bào C6.

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình \pm SD (n = 3). Sự khác biệt đáng kể về mức độ tổn thương tế bào do A β_{25-35} gây ra được ký hiệu là:

* P<0,05; ** P<0,001.

Kết quả qPCR cho thấy rằng các tế bào được xử lý với 20 mM A β ₂₅₋₃₅ dẫn đến tăng đáng kể mức độ mRNA của iNOS, COX, TNF- α và IL-6, trong khi tiền xử lý nano astaxanthin ức chế rõ rệt các gen đó theo hướng phụ thuộc nồng độ (hình 3.11 - 3.14). Các tế bào được xử lý trước với 100 μ g/mL nano astaxanthin làm giảm đáng kể mức độ mRNA của iNOS, COX, TNF- α và IL-6 tương ứng là -37,3%, -48,4%, -55,2% và -52,4% so với nhóm được ủ với A β ₂₅₋₃₅ đơn lẻ. Vì vậy, nano astaxanthin bảo vệ tế bào khỏi quá trình gây độc thần kinh thông qua điều hòa biểu hiện các gen tham gia vào quá trình tích lũy viêm như iNOS, COX, TNF- α và IL-6.

3.3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện gen mã hóa cho các protein tham gia vào quá trình sinh tổng hợp acetylcholine trong tế bào C6

Acetylcholine có nguồn gốc từ hai thành phần, choline và một nhóm acetyl, nhóm sau có nguồn gốc từ coenzym acetyl-CoA [72]. Choline hiện diện tự nhiên trong các loại thực phẩm như lòng đỏ trứng, gan, hạt của nhiều loại rau và cây họ đậu. Choline cũng được gan sản xuất tự nhiên. Một khi choline lưu thông trong huyết tương, nó có thể dễ dàng vượt qua hàng rào máu não và được các đầu dây thần kinh cholinergic hấp thụ thông qua các kênh hấp thụ phụ thuộc vào natri. Bước giới hạn tốc độ trong sản xuất acetylcholine là sự sẵn có của acetate có nguồn gốc từ acetyl-CoA ty thể và choline có nguồn gốc trực tiếp từ huyết tương và từ sự tái hấp thụ từ khe hở tiếp hợp.

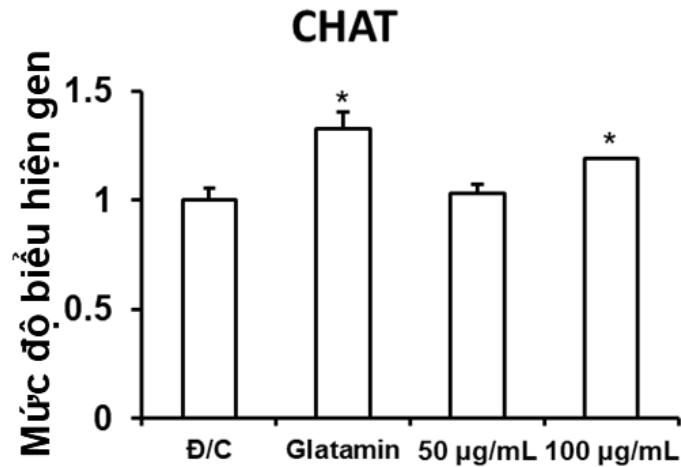
Sự tổng hợp acetylcholine xảy ra ở đầu cuối của sợi trục. Choline acetyltransferase (ChAT) là enzyme xúc tác phản ứng của choline với acetyl-CoA để tạo ra phân tử acetylcholine mới. ChAT được tạo ra trong tế bào thần kinh (cơ thể) và sau đó được vận chuyển đến đầu sợi trục thông qua vận chuyển axoplasmic trong đó các túi chứa đầy các loại protein khác nhau được “kết nối” với các sợi Actin trải dài theo chiều dài của tế bào thần kinh để vận chuyển. Mặc dù khu trú chủ yếu ở đầu sợi trục, ChAT hiện diện khắp tế bào thần kinh [73].

Ở đầu sợi trục, acetylcholine mới được hình thành sẽ được đặt trong các túi với số lượng rất nhỏ các phân tử tự do vẫn còn tự do trong bào tương. Các túi được axit hóa thông qua một bơm phụ thuộc năng lượng (H-ATPase), được sử dụng để tạo ra một gradient cho acetylcholine đi vào thông qua chất

vận chuyển acetylcholine dạng mụn nước (VACHT), chất này trao đổi một proton trong túi cho một phân tử acetylcholine [74].

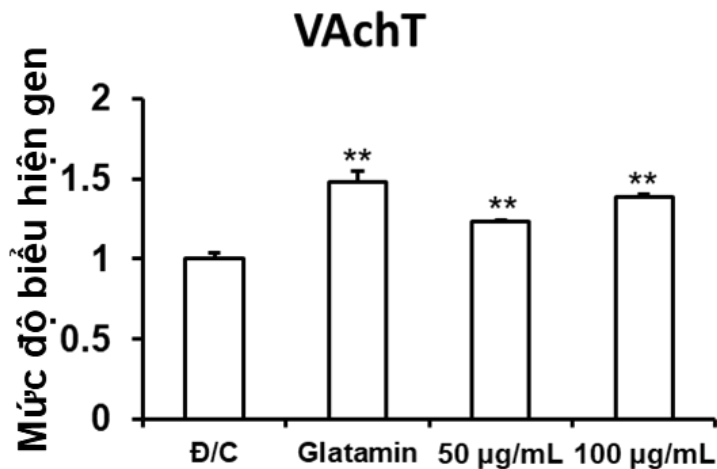
Quá trình tổng hợp, lưu trữ và giải phóng acetylcholine đòi hỏi phải có sự biểu hiện của một số protein chuyên biệt, bao gồm choline acetyltransferase (ChAT) và chất vận chuyển ACh dạng túi (VACHT). Gen VACHT nằm trong intron đầu tiên của gen ChAT. Tổ chức bộ gen độc đáo này cho phép kích hoạt phối hợp biểu hiện của hai gen bằng các yếu tố ngoại bào. Người ta biết rất ít về các yếu tố làm giảm sự biểu hiện của kiểu hình cholinergic. Sự thiếu hụt cholinergic là một trong những đặc điểm chính của AD và não AD được đặc trưng bởi sự lắng đọng amyloid bao gồm chủ yếu là A β peptide. Mặc dù peptide A β gây độc thần kinh, nhưng một phần của sự thiếu hụt cholinergic trong AD có thể là do sự ức chế các dấu hiệu cholinergic trong trường hợp không có tế bào chết.

Ở đây, tế bào được xử lý với thuốc galantamine có tác dụng tăng mức biểu hiện gen của cả hai gen mã hóa cho ChAT và VACHT khi so sánh với đối chứng (hình 3.15, hình 3.16). Nano astaxanthin cũng có tác dụng tương tự. Tế bào được ủ với nano astaxanthin ở nồng độ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ có tác dụng tăng mức độ mRNA của ChAT và VACHT lên 18 và 39% khi so sánh với đối chứng (hình 3.15, 3.16). Kết quả của nghiên cứu này tương tự như các nghiên cứu trước đây trong đó fucoxanthin đảo ngược A β oligomer gây ra giảm ChAT ở vùng hồi hải mã và có thể làm giảm A β oligomer gây ra mất tế bào thần kinh cholinergic [75].



Hình 3.15: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen mã hóa cho ChAT tham gia vào quá trình giải phóng acetylcholine trong tế bào C6.

Dữ liệu được biểu thị bằng trung bình \pm SD (n = 3). Sự khác biệt đáng khi so sánh với nhóm đối chứng, * P <0,05, ** P <0,001.



Hình 3.16: Ảnh hưởng của nano astaxanthin đến sự biểu hiện của gen mã hóa cho VAChT tham gia vào quá trình giải phóng acetylcholine trong tế bào C6.

Dữ liệu được biểu thị bằng trung bình \pm SD (n = 3). Sự khác biệt đáng khi so sánh với nhóm đối chứng, * P <0,05, ** P <0,001.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Qua kết quả nghiên cứu được trình bày ở trên, một số kết luận được rút ra như sau:

- Nano astaxanthin không gây độc tế bào u thần kinh đệm của chuột dòng C6 ở nồng độ 10-500 $\mu\text{g/mL}$, giúp làm tăng khả năng hấp thu vào tế bào gấp 35 lần so với astaxanthin ở dạng tự nhiên, và ức chế enzyme acetylcholinesterase (AChE) với $\text{IC}_{50} = 1,66 \mu\text{mol/L}$;
- Nano astaxanthin có khả năng bảo vệ tế bào thần kinh: bảo vệ tế bào C6 khỏi tác động độc của yếu tố stress oxy hóa H_2O_2 , và protein $\text{A}\beta_{25-35}$;
- Dưới tác dụng của nano astaxanthin, các gen mã hóa enzyme liên quan đến chống oxy hóa trong tế bào C6 bao gồm CAT, SOD, GPx, Nrf2, chống viêm bao gồm iNOS, COX, TNF- α , IL-6 tăng. Đồng thời, nó tăng cường tổng hợp acetylcholine thông qua CHAT và VAChT.

KIẾN NGHỊ

Cần tiếp tục nghiên cứu khả năng bảo vệ thần kinh nano astaxanthin trên mô hình *in vivo* để khẳng định sử dụng chúng làm nguyên liệu cho sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe (có tác dụng sinh dược bảo vệ thần kinh) cho con người.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

Do Bich Hoa, Ngo Thi Hoai Thu, Nguyen Van Tru, Ho Thi Oanh, Hoang Mai Ha, Hoang Thi Minh Hien, 2023, *In vitro* neuroprotective effect of nanoastaxanthin, Proceeding of The 8th Academic Conference on Natural Science for Young Scientists, Master and PhD. Students from ASEAN Countries, 27-30 August 2023, Vinh City, Vietnam (accepted).

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lazarevic-Pasti T., Leskovac A., Momic T., Petrovic S., Vasic V., 2017, Modulators of Acetylcholinesterase Activity: From Alzheimer's Disease to Anti-Cancer Drugs, *Current Medicinal Chemistry*, 24(30), pp. 3283-3309.
2. Pickett E.K., Herrmann A.G., McQueen J., Abt K., Dando O., Tulloch J., Jain P., Dunnett S., Sohrabi S., Fjeldstad M.P., 2019, Amyloid beta and tau cooperate to cause reversible behavioral and transcriptional deficits in a model of Alzheimer's disease, *Cell Reports*, 29, pp. 3592–3604.e5.
3. Akhondzadeh S., Noroozian M., 2002, Alzheimer's disease: Pathophysiology and pharmacotherapy, *IDrugs: the investigational drugs journal*, 5, pp. 1062–1069.
4. Lamptey R.N.L., Chaulagain B., Trivedi R., Gothwal A., Layek B., Singh J., 2022, A review of the common neurodegenerative disorders: Current therapeutic approaches and the potential role of nanotherapeutics, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), pp. 1851.
5. Konrath E.L., Passos Cdos S., Klein L.C. Jr., Henriques A.T., 2013, Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(12), pp.1701-25.
6. Chen G.F., Xu T.H., Yan Y., Zhou Y.R., Jiang Y., Melcher K., Xu H.E., 2017, Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development, *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(9), pp. 1205-1235.
7. Day G.S., Gordon B.A., Jackson K., Christensen J.J., Rosana Ponisio M., Su Y., Ances B.M., Benzinger T.L.S., Morris J.C., 2017, Tau-PET binding distinguishes patients with early-stage posterior cortical atrophy from amnesic Alzheimer disease dementia, *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 31(2), pp. 87-93.
8. Choi S.H., Aid S., Bosetti F., 2009, The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research, *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(4), pp.174-81.
9. Vasconcelos A.R., Dos Santos N.B., Scavone C., Munhoz C.D., 2019, Nrf2/ARE pathway modulation by dietary energy regulation in neurological disorders, *Frontiers in Pharmacology*, 10(33).
10. Cetin S., Knez D., Gobec S., Kos J., Pišlar A., 2022, Cell models for Alzheimer's and Parkinson's disease: At the interface of biology and drug discovery, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 149, pp. 112924.
11. Lee D.H., Lee Y.J., Kwon K.H., 2010, Neuroprotective effects of

astaxanthin in oxygen-glucose deprivation in SH-SY5Y cells and global cerebral ischemia in rat, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 47, pp. 121–129.

12. Shen H., Kuo C.C., Chou J., Delvolve A., Jackson S.N., Post J., Woods A.S., Hoffer B.J., Wang Y., Harvey B.K., 2009, Astaxanthin reduces ischemic brain injury in adult rats, *FASEB Journal*, 23, pp. 1958–1968.

13. Zhang X.S., Zhang X., Zhou M.L., Zhou X.M., Li N., Li W., Cong Z.X., Sun Q., Zhuang Z., Wang C.X., 2014, Amelioration of oxidative stress and protection against early brain injury by astaxanthin after experimental subarachnoid hemorrhage, *Journal of Neurosurgery*, 121, pp. 42–54.

14. Wu Q., Zhang X.S., Wang H.D., Zhang X., Yu Q., Li W., Zhou M.L., Wang X.L., 2014, Astaxanthin activates nuclear factor erythroid-related factor 2 and the antioxidant responsive element (Nrf2-ARE) pathway in the brain after subarachnoid hemorrhage in rats and attenuates early brain injury, *Marine Drugs*, 12, pp. 6125–6141.

15. Wu H., Niu H., Shao A., Wu C., Dixon B.J., Zhang J., Yang S., Wang Y., 2015, Astaxanthin as a potential neuroprotective agent for neurological diseases, *Marine Drugs*, 13(9), pp. 5750–66.

16. Suzuki Y., Ohgami K., Shiratori K., Jin X.H., Ilieva I., Koyama Y., Yazawa K., Yoshida K., Kase S., Ohno S., 2006, Suppressive effects of astaxanthin against rat endotoxin-induced uveitis by inhibiting the NF- κ B signaling pathway, *Experimental Eye Research*, 82, pp. 275–281.

17. Ghosh S., May M.J., Kopp E.B., 1998, NF- κ B and Rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses, *Annual Review of Immunology*, 16, pp. 225–260.

18. Yamamoto Y., Yin M.J., Gaynor R.B., 2000, IkappaB kinase alpha (IKKalpha) regulation of IKKbeta kinase activity, *Molecular and Cellular Biology*, 20, pp. 3655–3666.

19. Poyet J.L., Srinivasula S.M., Lin J.H., Fernandes-Alnemri T., Yamaoka S., Tsichlis P.N., Alnemri E.S., 2000, Activation of the Ikappa B kinases by RIP via IKKgamma /NEMO-mediated oligomerization, *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 275, pp. 37966–37977.

20. Shao A.W., Wu H.J., Chen S., Ammar A.B., Zhang J.M., Hong Y., 2014, Resveratrol attenuates early brain injury after subarachnoid hemorrhage

through inhibition of NF-kappaB-dependent inflammatory/MMP-9 pathway, *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 20, pp. 182–185.

21. Bhuvanewari S., Yogalakshmi B., Sreeja S., Anuradha C.V., 2014, Astaxanthin reduces hepatic endoplasmic reticulum stress and nuclear factor-kappaB-mediated inflammation in high fructose and high fat diet-fed mice, *Cell Stress and Chaperones*, 19, pp. 183–191.

22. Speranza L., Pesce M., Patruno A., Franceschelli S., de Lutiis M.A., Grilli A., Felaco M., 2012, Astaxanthin treatment reduced oxidative induced pro-inflammatory cytokines secretion in U937: SHP-1 as a novel biological target, *Marine Drugs*, 10, pp. 890–899.

23. Izumi-Nagai K., Nagai N., Ohgami K., Satofuka S., Ozawa Y., Tsubota K., Ohno S., Oike Y., Ishida S., 2008, Inhibition of choroidal neovascularization with an anti-inflammatory carotenoid astaxanthin, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49, pp. 1679–1685.

24. Bennedsen M., Wang X., Willen R., Wadstrom T., Andersen L.P., 1999, Treatment of H. pylori infected mice with antioxidant astaxanthin reduces gastric inflammation, bacterial load and modulates cytokine release by splenocytes, *Immunology Letters*, 70, pp. 185–189.

25. Ohgami K., Shiratori K., Kotake S., Nishida T., Mizuki N., Yazawa K., Ohno S., 2003, Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44, pp. 2694–2701.

26. Yasui Y., Hosokawa M., Mikami N., Miyashita K., Tanaka T., 2011, Dietary astaxanthin inhibits colitis and colitis-associated colon carcinogenesis in mice via modulation of the inflammatory cytokines, *Chemico-Biological Interactions*, 193, pp. 79–87.

27. Lee S.J., Bai S.K., Lee K.S., Namkoong S., Na H.J., Ha K.S., Han J.A., Yim S.V., Chang K., Kwon Y.G., 2003, Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation, *Molecular Cell*, 16, pp. 97–105.

28. Terazawa S., Nakajima H., Shingo M., Niwano T., Imokawa G., 2012, Astaxanthin attenuates the UVB-induced secretion of prostaglandin E2 and interleukin-8 in human keratinocytes by interrupting MSK1 phosphorylation

in a ROS depletion-independent manner, *Experimental Dermatology*, 21, pp. S11–S17.

29. Meor Mohd Affandi MMR., Julianto T., Majeed ABA., 2011, Development and stability evaluation of astaxanthin nanoemulsion, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 4(1), pp. 143-148.

30. Harada F., Morikawa T., Lennikov A., Mukwaya A., et al., Kitaichi N., 2017, Protective effects of oral astaxanthin nanopowder against ultraviolet-induced photokeratitis in mice, *Oxidative medicine and cellular longevity*, pp. 1-13.

31. Liu C., Zhang S., McClements DJ., Wang D., Xu Y, 2019, Design of astaxanthin-loaded core-shell nanoparticles consisting of chitosan oligosaccharides and poly(lactic-co-glycolic acid): Enhancement of water solubility, stability, and bioavailability, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(18), pp. 5113-5121.

32. Guan L., Liu J., Yu H., Wu G., Liu B., Tian H., Liang X, 2019, Water-dispersible astaxanthin-rich nanopowder preparation, oral safety and antioxidant activity *in vivo*, *Food & Function*, 10, pp. 1386-1397.

33. Sun R., Xia N., Xia, Q, 2019, Non-aqueous nanoemulsions as a new strategy for topical application of astaxanthin, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 41(29).

34. Oh H., Lee J.S., Sung D., Lim J.M., Choi W.I, 2020, Potential antioxidant and wound healing effect of nano-liposomal with high loading amount of astaxanthin, *International Journal of Nanomedicine*, 15, pp. 9231-9240.

35. Luu Thi Tam, Dang Diem Hong, Ambati Ranga Rao, Gokare A. Ravishankar, 2021, Chapter 29: Astaxanthin production and technology in Vietnam and other Asian countries, in book global perspectives on astaxanthin from industrial production to food, health, and pharmaceutical applications, *Elsevier*, pp. 595-633.

36. Hien H.M., Oanh H.T., Quynh Q.T., Thu N.H., Hanh N.V., Hong D.D., Hoang M.H., 2023, Astaxanthin-loaded nanoparticles enhance its cell uptake, antioxidant and hypolipidemic activities in multiple cell lines, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 80, pp. 104133.

37. Akpan N., Caradonna K., Chuenkova M.V., PereiraPerrin M., 2008,

Chagas' disease parasite-derived neurotrophic factor activates cholinergic gene expression in neuronal PC12 cells, *Brain Research*, 1217, pp. 195-202.

38. Wu H., Niu H., Shao A., Wu C., Dixon B., Zhang J., Yang S., Wang Y., 2015, Astaxanthin as a potential neuroprotective agent for neurological diseases, *Marine Drugs*, 13, pp. 5750–5766.

39. Altınöz E., Ekici C., Özyazgan B., Çiğremiş Y., 2016, The effects of crocin (active constituent of saffron) treatment on brain antioxidant enzyme mRNA levels in diabetic rats, *Turkish Journal of Biochemistry*, 41, pp. 112-117.

40. Esmaili Tarzi M., Kordestani Z., Mehrabani M., Yahyapour R., Raeiszadeh M., Bahrapour Juybari K., Sharififar F., 2023, The effect of hydro alcoholic extract of *Nigella sativa* seeds on inflammatory mediators in C6 glioma cell line, *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 81(3), pp. 446-456.

41. Orhan I., Kartal M., Naz Q., Ejaz A., Yilmaz G., 2007, Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species, *Food Chemistry*, 103, pp. 1247.

42. Wang X., Zhang T., Chen X., Xu Y., Li Z., Yang Y., Du X., Jiang Z., Ni H., 2022, Simultaneous inhibitory effects of all-trans astaxanthin on acetylcholinesterase and oxidative stress, *Marine Drugs*, 2022, 20(4), pp. 247.

43. Oh H., Lee J.S., Sung D., Lim J.M., Choi W.I., 2020, Potential antioxidant and wound healing effect of nano-liposomal with high loading amount of astaxanthin, *International Journal of Nanomedicine*, 15, pp. 9231-9240.

44. Hien H.M., Oanh H.T., Quynh Q.T., Thu N.T.H., Hong D.D., Ha H.M., 2022, Astaxanthin-loaded nanoparticles enhance its cell uptake, antioxidant and hypolipidemic activities in multiple cell lines, *SSRN 4154319*.

45. Lu Y.P., Liu S.Y., Sun H., Wu X.M., Li J.J., Zhu L., 2010, Neuroprotective effect of astaxanthin on H₂O₂-induced neurotoxicity *in vitro* and on focal cerebral ischemia *in vivo*, *Brain Research*, 1360, pp. 40–48.

46. Wang Q., Zhao Y., Guan L., Zhang Y., Dang Q., Dong P., Li J., Liang X., 2017, Preparation of astaxanthin-loaded DNA/chitosan nanoparticles for

improved cellular uptake and antioxidation capability, *Food Chemistry*, 227, pp. 9-15.

47. Glenner G.G., Wong C.W., 1984, Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biochem Biophys. Research Communications*, 120, pp. 885–890.

48. Jabir N.R., Rehman M.T., Alsolami K., S. Shakil, Zughaihi T.A., Alserihi R.F., 2021, Concatenation of molecular docking and molecular simulation of BACE-1, γ -secretase targeted ligands: in pursuit of Alzheimer's treatment, *Annals of Medicine*, 53 (1), pp. 2332-44

49. Yazdani M., Edraki N., Badri R., Khoshneviszadeh M., Irajii A., Firuzi O., 2020, 5,6-Diphenyl triazine-thio methyl triazole hybrid as a new Alzheimer's disease modifying agents, *Molecular Diversity*, 24 (3), pp. 641-54

50. Edraki N., Firuzi O., Fatahi Y., Mahdavi M., Asadi M., Emami S., 2015, N-(2-(Piperazin-1-yl) phenyl) arylamide derivatives as β -Secretase (BACE1) inhibitors: simple synthesis by ugi four-component reaction and biological evaluation, *Archiv der Pharmazie*, 348 (5), pp. 330-337

51. Irajii A., Firuzi O., Khoshneviszadeh M., Nadri H., Edraki N., Miri R., 2018, Synthesis and structure-activity relationship study of multi-target triazine derivatives as innovative candidates for treatment of Alzheimer's disease, *Bioorganic Chemistry*, 77, pp. 223-35.

52. Sato K., Wakamiya A., Maeda T., Noguchi K., Takashima A., Imahori K., 1995, Correlation among secondary structure, amyloid precursor protein accumulation, and neurotoxicity of amyloid beta (25–35) peptide as analyzed by single alanine substitution, *Journal of Biochemistry*, 118, pp. 1108–1111.

53. Wei G., Shea J.E., 2006, Effects of solvent on the structure of the Alzheimer amyloid- β (25–35) peptide, *Biophysical Journal*, 91, pp. 1638–1647

54. Alghazwi M., Smid S., Musgrave I., Zhang W., 2019, In vitro studies of the neuroprotective activities of astaxanthin and fucoxanthin against amyloid beta ($A\beta$ 1-42) toxicity and aggregation, *Neurochemistry International*, 124, pp. 215-224.

55. Chang C.S., Chang C.L., Lai G.H., 2013, Reactive oxygen species scavenging activities in a chemiluminescence model and neuroprotection in

- rat pheochromocytoma cells by astaxanthin, beta-carotene, and canthaxanthin, *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 29(8), pp. 412-21.
56. Wang H.Q., Sun X.B., Xu Y.X., Zhao H., Zhu Q.Y., Zhu C.Q., 2010, Astaxanthin upregulates heme oxygenase-1 expression through ERK1/2 pathway and its protective effect against beta-amyloid-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells, *Brain Research*, 1360, pp. 159-67.
57. García-Pérez R., Esteller-Cucala P., Mas G., 2021, Epigenomic profiling of primate lymphoblastoid cell lines reveals the evolutionary patterns of epigenetic activities in gene regulatory architectures, *Nature Communications*, 12, pp. 3116.
58. Krishnamurthy P., Wadhvani A., 2012, Antioxidant enzymes and human health, *Antioxidant enzyme*.
59. Chelikani P., Fita I., Loewen P.C., 2004, Diversity of structures and properties among catalases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, pp. 192-20
60. Zámocký M., Koller F., 1999, Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis, *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 72, pp. 19-66.
61. Chabory E., Damon C., Lenoir A., 2009, Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice, *Journal of Clinical Investigation*, 119, pp. 2074.
62. Forgione M.A., Weiss N., Heydrick S., 2002, Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 282, pp. H1255-H1261.
63. Lever J.M., Boddu R., George JF., Agarwal A., 2016, Heme oxygenase-1 in kidney health and disease, *Antioxidants & Redox Signaling*, 25, pp. 165-183.
64. Ramsey C.P., Glass C.A., Montgomery M.B., Lindl K.A., Ritson G.P., Chia L.A., Hamilton R.L., Chu C.T., Jordan-Sciutto K.L., 2007, Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 66, pp. 75–85.
65. Kanninen K., Kanninen K., Malm T. M., Jyrkkänen H. K., Goldsteins G., Keksa-Goldsteine V., Tanila H., Yamamoto M., Ylä-Herttuala S., Levonen A. L., Koistinaho J., 2008, Nuclear factor erythroid 2-related factor

2 protects against beta amyloid, *Molecular and Cellular Neuroscience*, 39, pp. 302–313.

66. Wang Q., Li WX., Dai SX., Guo YC., Han FF., Zheng JJ., Li GH., Huang JF., 2017, Meta-analysis of Parkinson's disease and Alzheimer's disease revealed commonly impaired pathways and dysregulation of NRF2-dependent genes, *Journal of Alzheimer's Disease*, 56, pp. 1525–1539.

67. Branca C., Ferreira E., Nguyen TV., Doyle K., Caccamo A., Oddo S., 2017, Genetic reduction of Nrf2 exacerbates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease, *Human Molecular Genetics*, 26, pp. 4823–4835.

68. Rojo AI., Pajares M., Rada P., Nunez A., Nevado-Holgado AJ., Killik R., Van Leuven F., Ribe E., Lovestone S., Yamamoto M., Cuadrado A., 2017, NRF2 deficiency replicates transcriptomic changes in Alzheimer's patients and worsens APP and TAU pathology, *Redox Biology*, 13, pp. 444–451.

69. Rojo AI., Pajares M., Garcia-Yague AJ., Buendia I., Van Leuven F., Yamamoto M., Lopez MG., Cuadrado A., 2018, Deficiency in the transcription factor NRF2 worsens inflammatory parameters in a mouse model with combined tauopathy and amyloidopathy, *Redox Biology*, 18, pp. 173–180.

70. Gao H.M., Hong J.S., 2008, Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression, *Trends in Immunology*, 29, pp. 357–365.

71. H. Akiyama, S. Barger, S. Barnum, B. Bradt, J. Bauer, G.M. Cole, N.R. Cooper, P. Eikelenboom, M. Emmerling, B.L. Fiebich, 2000, Inflammation and Alzheimer's disease, *Neurobiology of Aging*, 21, pp. 383–421.

72. Akaike A, Izumi Y., 2018, Overview, *In: Akaike A, Shimohama S, Misu Y, editors. Nicotinic acetylcholine receptor signaling in neuroprotection [Internet], Springer Singapore*, pp. 1–15.

73. Radziejewska A., Chmurzynska A., 2019, Folate and choline absorption and uptake: Their role in fetal development, *Biochimie*, 158, pp. 10–19.

74. Muramatsu I., Masuoka T., Uwada J., Yoshiki H., Yazama T., Lee K.S., Sada K., Nishio M., Ishibashi T., Taniguchi T., 2018, A new aspect of cholinergic transmission in the central nervous system, *In: Akaike A,*

Shimohama S, Misu Y, editors, Nicotinic acetylcholine receptor signaling in neuroprotection [Internet], Springer Singapore, pp. 45–58.

75. Batool Z., Chen J.H., Gao Y., Lu L.W., Xu H., Liu B., Wang M., Chen F., 2022, Natural carotenoids as neuroprotective agents for Alzheimer's disease: An evidence-based comprehensive review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(50), pp. 15631-15646.