

COMPARISON GENETIC PROTECTION ON HUMAN LYMPHOCYTES FROM IONIZING RADIATION BETWEEN CURCUMIN-ENCAPSULATED LIPOSOMES AND SILIBININ-ENCAPSULATED LIPOSOMES

Nguyen Minh Hiep*, Tran Thi Ngoc Mai

Center of Radiation Technology and Biotechnology - Nuclear Research Institute

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 27/7/2021	This study aims to compare the genetic protection of curcumin-encapsulated nanoliposomes (Lip-CUR) and silibinin-encapsulated nanoliposomes (Lip-SIL) on human lymphocytes from ionizing radiation. Firstly, Lip-CUR and Lip-SIL were prepared using a combined method of lipid-film hydration and sonication. After that, penetration of Lip-CUR and Lip-SIL into lymphocytes was observed using fluorescence microscopy. Finally, radioprotective effectiveness for the genome of human lymphocytes against ionizing radiation of Lip-CUR and Lip-SIL was evaluated by micronucleus assay. The results showed that Lip-CUR and Lip-SIL were successfully prepared with a mean particle size of 209.2 nm and 87.68 nm, respectively, and zeta potentials of more than -20 mV. These nanoparticles were well penetrated into human lymphocytes. The results also illustrated the radioprotective effectiveness of Lip-SIL was better than Lip-CUR and achieved the highest radioprotection at a SIL concentration of 10 µg/mL. Moreover, the results also imply that the radioprotective mechanism of SIL differed from CUR because it was dependent not only on the free radical scavenging mechanism but also on the activation of intracellular mechanisms. This has opened up the prospect of combining biological compounds to generate novel formulations with better radioprotection.
Revised: 25/10/2021	
Published: 26/10/2021	
KEYWORDS	
Curcumin	
Lymphocytes	
Nanoliposome	
Radioprotection	
Silibinin	

SO SÁNH KHẢ NĂNG BẢO VỆ DI TRUYỀN CHO TẾ BÀO LYMPHO NGƯỜI CHỐNG LẠI TÁC ĐỘNG CỦA BỨC XẠ ION HÓA GIỮA NANOLIPOSOME ĐÓNG GÓI CURCUMIN VÀ NANOLIPOSOME ĐÓNG GÓI SILIBININ

Nguyễn Minh Hiệp*, Trần Thị Ngọc Mai

Trung tâm Công nghệ bức xạ và Công nghệ sinh học - Viện Nghiên cứu Hạt nhân

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 27/7/2021	Nghiên cứu nhằm so sánh hiệu quả bảo vệ di truyền cho tế bào lympho người chống lại bức xạ ion hóa giữa nanoliposome đóng gói curcumin (Lip-CUR) và nanoliposome đóng gói silibinin (Lip-SIL). Đầu tiên, Lip-CUR và Lip-SIL được điều chế bằng phương pháp hydrat hóa màng lipid kết hợp với sóng siêu âm và sự xâm nhập của chúng vào tế bào lympho người cũng được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang. Cuối cùng, hiệu quả bảo vệ di truyền cho tế bào lympho chống lại bức xạ ion hóa của Lip-CUR và Lip-SIL được khảo sát bằng phương pháp phân tích vi nhân. Kết quả cho thấy, Lip-CUR và Lip-SIL đã được tổng hợp với kích thước trung bình lần lượt là 209,2 nm và 87,68 nm, thế zeta lớn hơn -20 mV và cả 2 hệ đều có khả năng xâm nhập tốt vào tế bào lympho người. Việc xử lý bằng Lip-SIL cho hiệu quả bảo vệ bức xạ tốt hơn so với Lip-CUR và đạt hiệu quả tốt nhất ở nồng độ SIL 10 µg/mL. Ngoài ra, kết quả cũng chứng minh được SIL có cơ chế bảo vệ bức xạ khác với CUR, không chỉ dựa vào cơ chế bắt gốc oxy hóa tự do, mà còn dựa vào việc hoạt hóa các cơ chế nội bào. Điều này đã mở ra triển vọng trong việc kết hợp các hoạt chất sinh học để tạo ra các công thức chế phẩm có hiệu quả bảo vệ bức xạ tốt hơn.
Ngày hoàn thiện: 25/10/2021	
Ngày đăng: 26/10/2021	
TỪ KHÓA	
Bảo vệ bức xạ	
Curcumin	
Nanoliposome	
Silibinin	
Tế bào lympho	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4807>

* Corresponding author. Email: jackminhhiep@yahoo.com

1. Mở đầu

Ngày nay, bức xạ ion hóa (BXIH) đang được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực y sinh: chụp X-quang, chuẩn đoán và điều trị ung thư bằng xạ trị, v.v. Tuy nhiên, bên cạnh những lợi ích, BXIH còn gây ra các tác động tiêu cực đến con người [1]. Đặc biệt, trong phương pháp xạ trị ung thư, BXIH không những giúp tiêu diệt tế bào ung thư mà còn gây tổn thương đến các tế bào lành, đặc biệt là tổn thương tế bào lympho [2]. Theo nghiên cứu của Carvalho và Villar (2018), các tế bào lympho (lympho B, lympho T và lympho NK) là các đối tượng rất nhạy cảm với bức xạ [3]. Trong đó, các tia BXIH không những có khả năng gây ảnh hưởng đến chu trình tế bào, đến quá trình tổng hợp mRNA và sự sinh tổng hợp protein, mà trên hết là gây tổn thương DNA,... dẫn đến gây đột biến và thúc đẩy quá trình “apoptosis” (chết theo chu trình), đặc biệt là ở lympho T và lympho B trưởng thành [3], [4]. Các loại tổn thương phân tử DNA do BXIH gây ra có thể kể đến bao gồm tổn thương base, mất base, đứt gãy chuỗi đơn (SSBs), đứt gãy chuỗi đôi (DSBs), liên kết chéo DNA-protein; trong đó, 65% tổn thương DNA là do tác động gián tiếp gây ra thông qua các gốc oxy hoạt động (Reactive Oxygen Species - ROS) [5], [6]. Hơn thế nữa, các nghiên cứu này cũng cho thấy việc chiếu xạ trực tiếp vào vùng tủy xương làm giảm đáng kể số lượng tế bào lympho, cũng như làm suy giảm nhanh chóng khả năng miễn dịch của cơ thể bệnh nhân, làm gia tăng khả năng mắc các bệnh truyền nhiễm [3], [4]. Do đó, việc nghiên cứu tìm ra chế phẩm giúp bảo vệ di truyền cho tế bào lympho người chống lại tác động của BXIH sẽ không những có ý nghĩa về mặt khoa học mà còn có ý nghĩa rất lớn về mặt ứng dụng thực tiễn.

Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng, các hoạt chất tự nhiên thường có khả năng bảo vệ bức xạ (BVBX) thông qua 2 cơ chế: thứ nhất là bắt trực tiếp các gốc tự do tạo ra bởi tia BXIH; thứ hai là kích hoạt tăng cường enzyme nội bào, giảm peroxide hóa lipid, hoạt hóa các con đường tín hiệu, giúp tế bào chống lại những tổn thương do BXIH gây ra [7]. Gần đây, CUR đã được nghiên cứu như một tác nhân BVBX, đặc biệt là đối với tế bào lympho [8]. Bên cạnh đó, SIL là hoạt chất tự nhiên được ứng dụng rộng rãi trong điều trị bệnh gan, có khả năng chống oxy hóa và chống ung thư. Tuy nhiên, việc so sánh hiệu quả bảo vệ di truyền cho tế bào lympho người chống lại ảnh hưởng BXIH của SIL và CUR cũng chưa được tiến hành. Thêm vào đó, cơ chế BVBX của chúng vẫn chưa được giải thích rõ [9]. Mặt khác, CUR và SIL có độ tan trong nước kém (CUR: 0,6 mg/L, SIL: <50 mg/L), kém bền với điều kiện môi trường, khả năng hấp thụ vào tế bào thấp, dễ bị loại thải ra khỏi cơ thể bởi cơ chế chuyển hóa đầu tiên ở gan và cơ chế opsonin hóa,...[10], [11]. Chính các nguyên nhân này đã làm giảm độ sinh khả dụng của CUR và SIL.

Trong khi đó, nanoliposome do được tổng hợp từ các phân tử phospholipid (là thành phần của màng tế bào) nên có độ tương thích cao, không gây độc hoặc không gây dị ứng đối với cơ thể, có khả năng “đóng gói” cả các hoạt chất tan trong nước và các hoạt chất tan trong dầu, giúp tăng khả năng thâm của các hoạt chất vào bên trong tế bào và có thể đưa vào cơ thể bằng nhiều cách khác nhau như theo đường uống, đường hít, tiêm vào cơ thể,...[12]. Do đó, việc đóng gói CUR hoặc SIL vào bên trong hệ mang nanoliposome sẽ giúp cải thiện các nhược điểm của chúng, từ đó làm gia tăng độ sinh khả dụng. Mặt khác, việc so sánh hiệu quả bảo vệ di truyền cho tế bào lympho người chống lại ảnh hưởng của BXIH của CUR và SIL dạng đóng gói trong nanoliposome cũng chưa được tiến hành.

Do đó, nghiên cứu này đã được thực hiện với mục tiêu tổng hợp hệ Lip-CUR, Lip-SIL và so sánh hiệu quả bảo vệ di truyền cho tế bào lympho người chống lại tác động của BXIH của 2 hệ nano này nhằm cung cấp thêm các nền tảng khoa học để ứng dụng tạo ra các sản phẩm BVBX có hiệu quả cao cho những người làm việc trong môi trường thường xuyên tiếp xúc với BXIH và các bệnh nhân đang được tiến hành xạ trị.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và hóa chất

Curcumin độ tinh khiết 95% (Alfa Aesar, Anh); Silibinin độ tinh khiết 98% (Sigma Adrich, Mỹ); Phospholipon 90G (Lipoid, Đức); DPPH – 1,1 diphenyl 2-picrylhydrazyl (Sigma Aldrich,

Mỹ); Cytochalasin B (C6762 – 1MG) (Sigma Aldrich, Mỹ) và một số hóa chất khác đều có độ tinh khiết ở mức độ phân tích.

2.2. Tổng hợp nanoliposome chứa curcumin (Lip-CUR) và nanoliposome chứa silibinin (Lip-SIL)

Lip-CUR và Lip-SIL được tổng hợp bằng phương pháp hydrat hóa màng lipid kết hợp với giảm kích thước bằng sóng siêu âm [13]. Hỗn hợp CUR/SIL và phospholipon 90G (tỉ lệ 1:10, w/w) được hòa tan trong hỗn hợp dung môi hữu cơ gồm chloroform và methanol (tỉ lệ 2:1, v/v). Dung dịch hòa tan sau đó được loại bỏ hoàn toàn dung môi bằng thiết bị cô quay chân không trong 2 giờ ở 50°C. Màng lipid mỏng có chứa chất hoạt tính được hình thành sẽ được hydrat hóa với 40 mL nước cất. Sau 1 giờ, dịch phân tán liposome dạng thô hình thành được thực hiện giảm kích thước bằng sóng siêu âm (công suất 40%, đánh 7 phút và nghỉ 3 phút, lặp lại 3 lần). Dịch phân tán nanoliposome chứa CUR hoặc SIL được bảo quản trong điều kiện 4°C để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.3. Phân tích đặc điểm của Lip-CUR và Lip-SIL

Kích thước hạt trung bình, chỉ số phân tán (PDI) và thế zeta của nanoliposome chứa CUR hoặc SIL được xác định bằng thiết bị Zetasizer Nano. Cụ thể, dịch phân tán nano sau khi được tổng hợp sẽ được pha loãng 100 lần bằng nước cất. Phép đo được thực hiện ở 25°C, góc đo là 173°.

Bên cạnh đó, hình dáng của Lip-CUR và Lip-SIL được xác định bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Cụ thể, 20 µL dịch phân tán Lip-CUR hoặc Lip-SIL được nhỏ lên lưới đồng chuyên dùng cho TEM. Mẫu được để yên 20-30 giây. Sau đó, toàn bộ dịch phân tán sẽ được rút bỏ bằng giấy thấm. Rửa lưới đồng có chứa mẫu 2 lần bằng nước cất (lặp lại theo thao tác như trên). Mẫu được để khô qua đêm ở điều kiện nhiệt độ phòng trước khi được đưa vào thiết bị TEM để quan sát [12].

2.4. Phương pháp xác định hiệu suất đóng gói và sức tải

Xác định hiệu suất đóng gói

Dịch phân tán Lip-CUR hoặc Lip-SIL sau khi được tổng hợp sẽ được lọc qua màng lọc có kích thước lỗ 1,2 µm. Sau đó, mẫu sẽ được hòa tan vào ethanol với tỉ lệ thích hợp (1:100, v/v). Nồng độ CUR hoặc SIL trong dịch pha loãng được xác định bằng máy đo quang phổ UV-Vis ở bước sóng 423 nm cho CUR và 287 nm cho SIL [11]. Hiệu suất đóng gói được tính bằng công thức (1):

$$\text{Hiệu suất đóng gói (\%)} = \frac{\text{Lượng hoạt chất được đóng gói trong nanoliposome}}{\text{Tổng lượng hoạt chất ban đầu (mg)}} \times 100 \quad (1)$$

Xác định sức tải

Hút 5 mL dịch phân tán Lip-CUR hoặc Lip-SIL (sau khi lọc qua màng lọc kích thước lỗ 1,2 µm) cho vào lọ thủy tinh. Mẫu được cấp đông bằng nitơ lỏng và được tiến hành đông khô bằng thiết bị Freeze Dryer (IlshinBiobase, Hàn Quốc). Sau đó, 10 mg bột đông khô Lip-CUR/Lip-SIL được hòa tan vào trong 10 mL ethanol, trộn đều trong 3 phút và pha loãng 10 lần. Lượng CUR hoặc SIL chứa trong một khối lượng xác định Lip-CUR hoặc Lip-SIL cũng được xác định bằng phương pháp đo quang phổ UV-Vis như mục xác định hiệu suất đóng gói [11]. Sức tải được tính bằng công thức (2):

$$\text{Sức tải (\%)} = \frac{\text{Lượng hoạt chất có trong nanoliposome (mg)}}{\text{Khối lượng nanoliposome (mg)}} \times 100 \quad (2)$$

2.5. Khảo sát và so sánh khả năng bắt gốc oxy hóa của CUR và SIL

Khả năng bắt gốc oxy hóa ở CUR và SIL được thực hiện bằng phương pháp bắt gốc oxy hóa tự do DPPH (1,1-diphenyl 2-picrylhydrazyl) [13]. Về nguyên tắc, các chất chống oxy hóa sẽ

trung hòa gốc tự do DPPH bằng cách cho hydrogen và làm màu dung dịch chuyển từ màu tím sang màu vàng nhạt.

Mẫu CUR hoặc SIL được pha loãng trong ethanol ở cùng nồng độ 0,1 g/L. Sau đó, 1950 μ L DPPH (0,1 mM, pha loãng trong ethanol) được cho vào các ống eppendorf, bổ sung 50 μ L chất hoạt tính, trộn đều và ủ trong tối 30 phút. Với mẫu DPPH hòa tan trong ethanol được dùng làm đối chứng. Tiến hành đo mật độ quang phổ OD ở bước sóng 517 nm bằng thiết bị đo quang phổ UV-Vis. Tỷ lệ phần trăm hoạt tính bắt gốc oxy hóa được tính theo công thức (3):

$$\text{Phần trăm bắt gốc oxy hóa (\%)} = \left[1 - \frac{OD_s}{OD_b} \right] \times 100 \quad (3)$$

OD_s : giá trị mật độ quang của mẫu đo, OD_b : giá trị mật độ quang của đối chứng âm

2.6. Chứng minh sự xâm nhập của Lip-CUR và Lip-SIL vào tế bào lympho người

Chất nhuộm thân dầu có khả năng phát huỳnh quang (Methyl Red) được đồng đóng gói vào trong hệ mang nano cùng với hoạt chất (SIL hoặc CUR) với tỉ lệ 0,1% (w/w). Dịch phân tán sau tổng hợp được lọc qua màng lọc vô trùng 0,45 μ m và ủ với môi trường RPMI-1640 chứa máu ngoại vi toàn phần trong 16 giờ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Sau đó mẫu được dùng làm tiêu bản và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang với phin lọc DAPI SP100v2.

2.7. Khảo sát hiệu quả bảo vệ bức xạ của Lip-CUR và Lip-SIL bằng kỹ thuật phân tích vi nhân

Dịch phân tán Lip-CUR và Lip-SIL sau khi tổng hợp được lọc qua màng lọc vô trùng (0,45 μ m). Nồng độ CUR/SIL trong dịch phân tán sau lọc sẽ được xác định bằng phương pháp quang phổ UV-Vis như ở mục xác định hiệu suất đóng gói và sức tải. Sau đó, dịch phân tán Lip-CUR và Lip-SIL với các nồng độ chất hoạt tính khác nhau (5; 10; 30; 50 và 70 μ g/mL) được ủ với môi trường RPMI-1640 chứa máu ngoại vi toàn phần (tỉ lệ 9:1, v/v). Mẫu máu sau khi được ủ trong 16 giờ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂ được rửa hai lần bằng môi trường RPMI-1640. Sau đó, môi trường được loại bỏ sau khi ly tâm tại 1200 vòng/phút trong 8 phút. Mẫu máu được chiếu xạ bằng nguồn chiếu Gamma Cobalt-60 (Issledavachel, Russia) ở liều chiếu 2 Gy, suất liều 0,43 Gy/phút. Mẫu máu không chứa Lip-CUR và Lip-SIL được sử dụng làm đối chứng. Bước vào quá trình nuôi cấy, 600 μ L máu được ủ với 6 mL môi trường nuôi cấy RPMI-1640 đầy đủ có bổ sung 15% fetal bovine serum – FBS (Gibco, USA) và 1,5% phytohemagglutinin – PHA (Sigma Aldrich, USA). Nuôi cấy được thực hiện ở tủ ấm 37°C, 5% CO₂. Cytochalasin B (3,0-6,0 μ g/ml, Sigma Aldrich, USA) được thêm vào sau 44 giờ kể từ khi bắt đầu nuôi cấy, tiếp tục nuôi cấy thêm 28 giờ. Tế bào được thu hoạch, xử lý với 0,075 M KCl lạnh và được cố định bằng hỗn hợp dung dịch methanol : acid acetic (tỉ lệ 3:1, v/v). Tế bào được cố định trên tiêu bản hiển vi, để khô, nhuộm Giemsa và tiến hành phân tích vi nhân. Phân tích ít nhất 1000 tế bào hai nhân/mẫu để xác định tần số xuất hiện vi nhân. Phương pháp này được thực hiện dưới kính hiển vi huỳnh quang với sự hỗ trợ của phần mềm Metafer 4.0 và MNscore (Metasystem).

2.8. Phương pháp xử lý số liệu

Giá trị được trình bày bằng số trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn ($n = 3$), tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel. Đồ thị được vẽ bằng phần mềm Sigma Plot v12.0. One-way ANOVA với phép thử Duncan ($p < 0,05$) của phần mềm IBM SPSS Statistics software được sử dụng để đánh giá sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các số liệu trong Hình 4 và Hình 5.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tổng hợp LIP-CUR và LIP-SIL

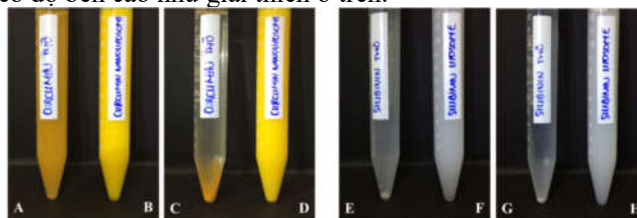
Lip-CUR và Lip-SIL được tổng hợp bằng phương pháp hydrat hóa màng lipid kết hợp với phương pháp giảm kích thước bằng sóng siêu âm. Kết quả bảng 1 nhận thấy, Lip-CUR có kích

thước trung bình là $209,2 \pm 4,7$ nm với chỉ số phân tán (PDI) là $0,277 \pm 0,017$, thế zeta $-22,0 \pm 0,3$ mV. Tương tự, Lip-SIL cũng có kích thước đạt mức nano ($87,68 \pm 2,00$ nm) với chỉ số phân tán là $0,226 \pm 0,015$ và thế zeta là $-21,7 \pm 0,4$ mV. Theo các nghiên cứu trước đây, các hệ nano có thế zeta lớn hơn 20 mV sẽ tạo được lực đẩy tĩnh điện đủ lớn giữa các hạt nano làm cho chúng khó kết hợp với nhau thành các hạt có kích thước lớn hơn, do đó sẽ có độ bền cao [14]. Từ đó cho thấy, cả hai hệ nano Lip-CUR và Lip-SIL đều rất bền. Hiệu suất đóng gói của Lip-CUR và Lip-SIL lần lượt là $86,16 \pm 3,0\%$ và $38,4 \pm 0,8\%$. Bên cạnh đó, sức tải của Lip-CUR và Lip-SIL đạt lần lượt là $7,83 \pm 0,3\%$ và $3,49 \pm 0,15\%$, phù hợp cho các thí nghiệm kế tiếp.

Bảng 1. Các thông số đặc điểm của Lip-CUR và Lip-SIL ($n = 3$)

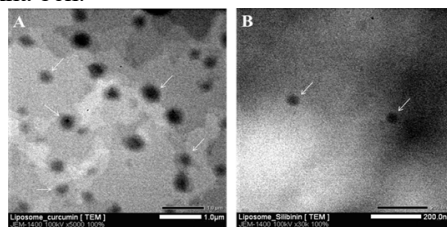
Hệ liposome	Chỉ tiêu	Kích thước hạt (nm)	Chỉ số phân tán (PDI)	Thế điện động zeta (mV)	Hiệu suất đóng gói (%)	Sức tải (%)
Lip-CUR		$209,2 \pm 4,7$	$0,277 \pm 0,017$	$-22,0 \pm 0,3$	$86,16 \pm 3,0$	$7,83 \pm 0,30$
Lip-SIL		$87,68 \pm 2,0$	$0,226 \pm 0,015$	$-21,7 \pm 0,4$	$38,4 \pm 0,8$	$3,49 \pm 0,15$

CUR và SIL ở dạng đóng gói trong nanoliposome có độ phân tán trong nước tốt hơn gấp nhiều lần so với dạng thô. Lip-CUR sau khi tổng hợp có màu vàng và phân tán tốt trong nước (Hình 1B), trong khi đó CUR dạng thô có màu vàng cam và phân tán không đều (Hình 1A). Nguyên nhân là do CUR thô có độ tan trong nước kém, nhưng khi được đóng gói trong hệ mang nanoliposome đã làm tăng độ tan (thực chất là độ phân tán) nên dịch phân tán Lip-CUR có màu vàng nhạt. Sau 3 ngày quan sát, CUR dạng thô tách khỏi pha nước và tủa xuống đáy ống, dung dịch mất màu vàng cam (Hình 1C). Trong khi, Lip-CUR vẫn phân tán tốt, có màu vàng nhạt (Hình 1D). Điều này là do giá trị tuyệt đối thế zeta của Lip-CUR lớn hơn 20 mV đã giúp cho dịch phân tán Lip-CUR có độ bền cao như giải thích ở trên.



Hình 1. So sánh độ phân tán giữa Lip-CUR và CUR ở dạng thô. (A)(E) CUR/SIL dạng thô trong nước cất; (B) (F) Dịch phân tán Lip-CUR/Lip-SIL sau khi được tổng hợp; (C) (G) CUR/SIL dạng thô trong nước cất sau 3 ngày; (D) (H) Dịch phân tán Lip-CUR/Lip-SIL sau 3 ngày

Tương tự, SIL dạng thô phân tán kém trong nước (Hình 1E), nhưng khi được đóng gói vào nanoliposome lại cho thấy khả năng phân tán rất tốt (Hình 1F). Sau 3 ngày kể từ khi tổng hợp, Lip-SIL vẫn phân tán đồng đều và giữ nguyên màu sắc (Hình 1H). Trong khi, SIL dạng thô đã lắng tủa hoàn toàn (Hình 1G). Từ những kết quả này, có thể thấy rằng hệ mang nanoliposome đã góp phần làm tăng độ tan (thực chất là độ phân tán) của CUR và SIL; đồng thời cũng cho thấy hệ Lip-CUR và Lip-SIL cũng khá bền.

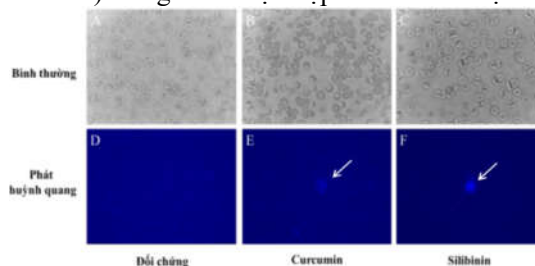


Hình 2. Ảnh chụp TEM của (A) Curcumin-nanoliposome; (B) Silibinin-nanoliposome

Ngoài ra, hình dạng của Lip-CUR và Lip-SIL được xác định bằng ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Kết quả ảnh chụp cho thấy, cả Lip-CUR và Lip-SIL đều có dạng hình cầu và đạt kích thước nano (Hình 2). Từ đó góp phần cho thấy sự thành công trong việc tổng hợp Lip-CUR và Lip-SIL.

3.2. Chứng minh sự xâm nhập của Lip-CUR và Lip-SIL vào tế bào lympho người

Trong thí nghiệm nghiên cứu này, mặc dù CUR có khả năng phát huỳnh quang, nhưng SIL lại không có khả năng này nên chất nhuộm huỳnh quang Methyl Red đã được đồng đóng gói vào trong Lip-CUR và Lip-SIL. Kết quả cho thấy, ở mẫu đối chứng (mẫu máu không được xử lý Lip-CUR và Lip-SIL), không có tín hiệu phát huỳnh quang của tế bào lympho ở cả điều kiện quang học bình thường và điều kiện phát huỳnh quang (Hình 3A, D). Trong khi đó, ở mẫu có xử lý chế phẩm Lip-CUR và Lip-SIL, thì tín hiệu huỳnh quang màu xanh lục được phát hiện trong các tế bào lympho (Hình 3E, F). Điều này đã chứng tỏ sự có mặt của Lip-CUR và Lip-SIL trong các tế bào lympho. Mặt khác, trong nghiên cứu này, tín hiệu huỳnh quang chỉ được phát hiện trong tế bào lympho mà hầu như không được phát hiện trong các tế bào hồng cầu và điều này có thể giải thích do các hạt nano (như nanoliposomes) có thể xâm nhập vào trong tế bào bằng nhiều con đường khác nhau; tuy nhiên, con đường nhập bào (endocytosis) đóng vai trò chủ đạo [15, 16]. Trong khi đó, nghiên cứu của Gao và cộng sự (2017) cho thấy, chính bộ xương màng hồng cầu (erythrocyte membrane skeleton) đã ngăn cản sự nhập bào của các hạt nano [17].



Hình 3. Chứng minh sự xâm nhập của Lip-CUR và Lip-SIL vào trong tế bào lympho người

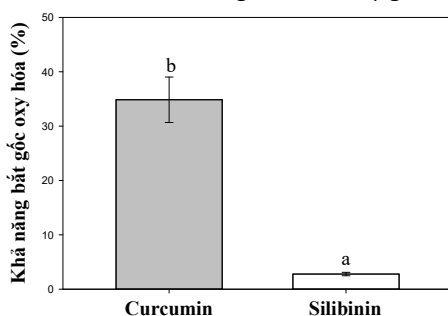
(A) Vị trí của tế bào lympho khi không ủ với chế phẩm ở điều kiện quang học bình thường; (B) Vị trí của tế bào lympho khi ủ với Lip-CUR hoặc (C) ủ với Lip-SIL được chụp ở điều kiện quang học bình thường; (D) Tế bào lympho không xử lý Lip-CUR và Lip-SIL ở điều kiện phát huỳnh quang; (E) Sự hiện diện của Lip-CUR trong tế bào lympho khi được chụp dưới điều kiện phát huỳnh quang; (F) Sự hiện diện của Lip-SIL trong tế bào lympho khi được chụp dưới điều kiện phát huỳnh quang.

3.3. Khảo sát và so sánh khả năng BVBX trên hệ tế bào lympho người của Lip-CUR và Lip-SIL bằng phương pháp phân tích vi nhân

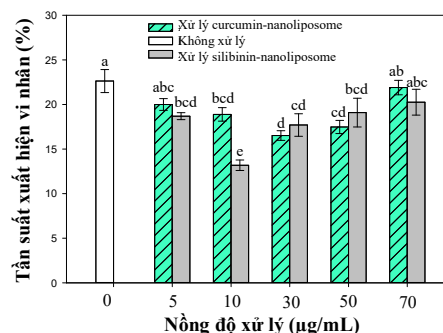
Khả năng bảo vệ di truyền cho tế bào lympho người chống lại tác động của BXIH của Lip-CUR và Lip-SIL được đánh giá dựa trên giá trị tần suất xuất hiện vi nhân sau khi mẫu máu chứa tế bào lympho được lấy từ người khỏe mạnh, không hút thuốc (có hoặc không xử lý chế phẩm) được chiếu xạ bởi nguồn gamma Co-60 với liều 2 Gy. Trong phép phân tích này, ít nhất 1000 tế bào hai nhân được quan sát và ghi nhận số vi nhân hình thành (tổn thương tế bào). Kết quả hình 5 cho thấy, ở mẫu không xử lý với chế phẩm (Lip-CUR hoặc Lip-SIL), tần suất xuất hiện vi nhân là $22,63 \pm 1,29\%$ nhưng khi tăng được xử lý bằng Lip-CUR hoặc Lip-SIL thì tần suất xuất hiện đều giảm. Cụ thể, với mẫu được xử lý bằng Lip-CUR ở nồng độ CUR từ 5 $\mu\text{g/mL}$ đến 30 $\mu\text{g/mL}$, sự tăng nồng độ của CUR dẫn đến giảm tần suất xuất hiện vi nhân và tần suất xuất hiện vi nhân đạt giá trị thấp nhất (tương ứng với hiệu quả BVBX cao nhất) là $16,52 \pm 0,54\%$ ở nồng độ CUR 30 $\mu\text{g/mL}$. Trong khi, ở các mẫu được xử lý ở nồng độ CUR vượt quá 30 $\mu\text{g/mL}$ thì khả năng BVBX không những không tăng mà lại giảm (tần suất xuất hiện vi nhân ở nồng độ 50 $\mu\text{g/mL}$ và 70 $\mu\text{g/mL}$ lần lượt là $17,48 \pm 0,74\%$ và $21,90 \pm 0,8\%$). Điều này là do CUR ở nồng độ cao sẽ đóng vai trò làm tăng khả năng nhạy cảm bức xạ của tế bào [18], [19]. Các kết quả trên cho thấy, Lip-CUR có tác dụng làm giảm ảnh hưởng tiêu cực của BXIH đến bộ máy di truyền của tế bào lympho người và sự BVBX đạt hiệu quả cao nhất ở nồng độ CUR 30 $\mu\text{g/mL}$.

Tương tự, mẫu được xử lý với Lip-SIL ở tất cả các nồng độ SIL 5; 10; 30; 50; 70 $\mu\text{g/mL}$ đều cho thấy khả năng BVBX tốt hơn so với mẫu đối chứng (Hình 5). Trong khi đó, khi tế bào được xử lý bởi Lip-SIL với nồng độ SIL 10 $\mu\text{g/mL}$ thì tần suất xuất hiện vi nhân đạt giá trị thấp nhất

($13,19 \pm 0,59\%$), nghĩa là hiệu quả BVBX cao nhất. Việc tăng nồng độ xử lý lên 30-70 $\mu\text{g/mL}$ không những không làm tăng hiệu quả BVBX mà còn làm tăng tần suất xuất hiện vi nhân (gia tăng tổn thương bộ máy di truyền). Cụ thể, tần suất xuất hiện vi nhân ở các nồng độ xử lý 30; 50; 70 $\mu\text{g/mL}$ lần lượt là $17,70 \pm 1,26\%$; $19,09 \pm 1,61\%$ và $20,26 \pm 1,4\%$ (so với 13,19% của nồng độ xử lý ở nồng độ SIL 10 $\mu\text{g/mL}$). Điều này có thể là do SIL cũng có khả năng làm tăng mức độ nhạy cảm bức xạ của tế bào ở nồng độ cao. Do đó, trong thí nghiệm này, nồng độ tối ưu của Lip-SIL để bảo vệ di truyền cho tế bào lympho chống lại bức xạ Gamma Co-60 (liều chiếu 2 Gy) được xác định là ở nồng độ SIL 10 $\mu\text{g/mL}$.



Hình 4. Khả năng bắt gốc oxy hóa của CUR và SIL. Các chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng phương pháp One-way Anova, phép thử Duncan (Mức ý nghĩa $p < 0,05$; $n = 3$)



Hình 5. Tần suất xuất hiện vi nhân của tế bào lympho người ủ với Lip-CUR hoặc Lip-SIL. Các chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng phương pháp One-way Anova, phép thử Duncan (Mức ý nghĩa $p < 0,05$; $n = 3$)

Bên cạnh đó, sự so sánh về khả năng BVBX của Lip-CUR và Lip-SIL cũng được thể hiện ở Hình 5. Cụ thể, việc xử lý tế bào bằng Lip-SIL ở nồng độ SIL tối ưu 10 $\mu\text{g/mL}$ cho tần suất xuất hiện vi nhân là $13,19 \pm 0,59\%$, thấp hơn so với tần suất xuất hiện vi nhân ở nghiệm thức xử lý bằng Lip-CUR ở nồng độ CUR tối ưu 30 $\mu\text{g/mL}$ ($16,52 \pm 0,54\%$). Từ đó cho thấy, khả năng bảo vệ di truyền cho tế bào lympho người khỏi ảnh hưởng của bức xạ gamma của SIL cao hơn CUR.

Kết quả khảo sát khả năng bắt gốc oxy hóa của CUR và SIL được thực hiện bằng phương pháp bắt gốc tự do DPPH (Hình 4) cho thấy khả năng bắt gốc oxy hóa tự do của SIL rất kém (chỉ $2,78 \pm 0,64\%$); trong khi đó, khả năng bắt gốc oxy hóa của CUR lại cao hơn rất nhiều ($34,86 \pm 4,18\%$), gấp 13 lần so với SIL. Từ đó có thể suy luận rằng, việc BVBX của SIL cho tế bào sẽ chủ yếu theo cơ chế kích thích nội bào như: cơ chế kích thích gia tăng sự tổng hợp các chất chống oxy hóa của tế bào; cơ chế điều hòa tăng sinh các enzyme như catalase (CAT), glutathione transferase (GST), glutathione peroxidase (GSHpx), superoxide dismutase (SOD), hệ thống thioredoxin (Trx); giảm sự peroxide lipid, hoặc ức chế sự hoạt hóa của PKC, MAPK và NO, v.v. [20], [21]. Đồng thời, kết quả của các thí nghiệm trên cũng đã cho thấy triển vọng kết hợp giữa các hoạt chất dạng nano để làm tăng hiệu quả bảo vệ di truyền cho các tế bào lành (tế bào lympho, tế bào da, tế bào lành xung quanh khối u) khỏi tác động tiêu cực của các bức xạ ion hóa.

4. Kết luận

Trong bài báo này, Lip-CUR và Lip-SIL đã được tổng hợp thành công với kích thước trung bình lần lượt là 209,2 nm và 86 nm, với thế zeta lớn hơn -20 mV. Đồng thời ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử truyền qua cho thấy, Lip-CUR và Lip-SIL sau khi tổng hợp có dạng hình cầu và có kích thước nano. Sự xâm nhập của Lip-CUR và Lip-SIL vào tế bào lympho người cũng đã được chứng minh bằng hình ảnh quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Kết quả thí nghiệm khảo sát khả năng bảo vệ di truyền cho tế bào lympho người khỏi ảnh hưởng của BXIH (bức xạ gamma Co-60, liều chiếu 2 Gy) của Lip-CUR và Lip-SIL đã cho thấy, Lip-SIL ở nồng độ SIL 10 $\mu\text{g/mL}$ cho hiệu quả BVBX tốt nhất. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy rằng, SIL có cơ chế BVBX khác với CUR và việc BVBX không chỉ dựa vào cơ chế bắt gốc tự do có chứa oxy, mà

còn dựa vào việc hoạt hóa các cơ chế nội bào. Điều này đã mở ra triển vọng trong việc kết hợp các hoạt chất sinh học để tạo ra các công thức chế phẩm có hiệu quả BVBX tốt nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] S. A. Kaliberov and D. J. Buchsbaum, "Cancer treatment with gene therapy and radiation therapy," *Adv Cancer Res*, vol. 115, pp. 221-263, 2012.
- [2] M. Cheki, A. Shirazi, A. Mahmoudzadeh, and J. Tavakkoly, "The radioprotective effect of metformin against cytotoxicity and genotoxicity induced by ionizing radiation in cultured human blood lymphocytes," *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, vol. 809, pp. 24-32, 2016.
- [3] H. A. Carvalho and R. C. Villar, "Radiotherapy and immune response: the systemic effects of a local treatment," *Clinics (Sao Paulo)*, vol. 73, p. e557s, 2018.
- [4] J. Puskin, *Health risks from exposure to low level of ionizing radiation*, National Research Couynceil (US) Board on Radiation Effects Research BEIR VII, Phase I, Letter Report, 1998.
- [5] M. Karbownik and R. J. Reiter, "Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation," *Proc Soc Exp Biol Med*, vol. 225, no. 1, pp. 9-22, 2000.
- [6] C. Arena, V. De Micco, E. Macaeva, and R. Quintens, "Space radiation effects on plant and mammalian cells," *Acta Astronautica*, vol. 104, pp. 419-431, 2014.
- [7] A. Chatterjee, "Reduced glutathione: A radioprotector or a modulator of DNA-repair activity?" *Nutrients*, vol. 5, pp. 525-542, 2013.
- [8] T. Feng, Y. Wei, L. J. Lee, and L. Zhao, "Liposomal curcumin and its application in cancer," *Int J Nanomedicine*, vol. 12, pp. 6027-6044, 2017.
- [9] D. Citrin, A. P. Cotrim, F. Hyodo, B. J. Baum, M. C. Krishna, and J. B. Michell, "Radioprotectors and Mitigators of Radiation-Induced Normal Tissue Injury," *Oncologist*, vol. 15, pp. 360-371, 2010.
- [10] B. T. Kurien, A. Singh, H. Matsumoto, and R. H. Scofield, "Improving the Solubility and Pharmacological Efficacy of Curcumin by Heat Treatment," *Assay Drug Dev Technol*, vol. 5, pp. 567-577, 2007.
- [11] H. M. Nguyen, H. Yu, T. Y. Kiew, and K. Hadinoto, "Cost effective alternative to nanoencapsulation: amorphous curcumin-chitosan nanoparticle complex exhibiting high payload and supersaturation generation," *Eur J Pharm Biopharm*, vol. 96, pp. 1-10, 2015.
- [12] H. M. Nguyen, N. B. D. Vu, T. H. N. Nguyen, H. S. Le, H. T. Le, T. T. Tran, X. C. Le, V. T. Le, T. T. Nguyen, C. B. Bui, and H. J. Park, "In vivo comparison of wound healing and scar treatment effect between curcumin – oligochitosan nanoparticle complex and oligochitosan-coated curcumin-loaded-liposome," *J Microencapsul*, vol. 36, no. 2, pp. 156-168, 2019.
- [13] B. Mahdi-Pour, S. L. Johty, L. Y. Latha, Y. Chen, and S. Sasidharan, "Antioxidant activity of methanol extracts of different parts of *Lantana camara*," *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 2, no. 12, pp. 960-965, 2012.
- [14] S. Honary and F. Zahir, "Effect of zeta potential on the properties of NanoDrug delivery systems – a review (part 2)," *Trop J Pharm Res*, vol. 12, pp. 265-273, 2013.
- [15] N. Düzgüneş and S. Nir, "Mechanisms and kinetics of liposome-cell-interactions," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 40, no. 1-2, pp. 3-18, 1999.
- [16] E. Ducat, B. Evrard, O. Peulen, and G. Piel, "Cellular uptake of liposomes monitored by confocal microscopy and flow cytometry," *J Drug Del Sci Tech*, vol. 21, no. 6, pp. 469-477, 2011.
- [17] X. Gao, T. Yue, F. Tian, Z. Liu, and X. Zhang, "Erythrocyte membrane skeleton inhibits nanoparticle endocytosis," *AIP Adv*, vol. 7, no. 6, pp. 1-12, 2017.
- [18] D. Chendil, R. S. Ranga, D. Meigooni, S. Sathishkumar, and M. M. Ahmed, "Curcumin confers radiosensitizing effect in prostate cancer cell line PC-3," *Oncogene*, vol. 23, no. 8, pp. 1599-1607, 2004.
- [19] G. C. Jagetia, "Radioprotection and radiosensitization by curcumin," *Adv Exp Med Biol*, vol. 595, pp. 301-320, 2007.
- [20] M. Subramanian, Sreejayan, M. N. Rao, T. P. Devasagayam, and B. B. Singh, "Diminution of singlet oxygen-induced DNA damage by curcumin and related antioxidants," *Mutat Res*, vol. 331, pp. 249-255, 1994.
- [21] S. M. Khopde, K. I. Priyadarsini, S. N. Guha, J. G. Satav, P. Venkatesan, and M. N. Rao, "Inhibition of radiation-induced lipid peroxidation by Tetrahydrocurcumin. Possible mechanisms by pulse radiolysis," *Biosci Biotechnol Biochem*, vol. 64, pp. 503-509, 2000.