

STUDY ON RADIOPROTECTION EFFECT FOR HUMAN LYMPHOCYTES AND FIBROBLASTS OF RESVERATROL-ENCAPSULATED LIPOSOME

Nguyen Minh Hiep^{1*}, Pham Ngoc Duy¹, Vu Ngoc Bich Dao¹,
Tran Thanh Mai¹, Tran Thi Ngoc Mai¹, Nguyen Thi Huynh Nga²

¹Center of Radiation Technology and Biotechnology, ²Dalat University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 19/02/2022	This study aims to evaluate radioprotection effect of resveratrol-encapsulated liposomes (Lip-RES). Firstly, Lip-RES was prepared by a combining method of lipid-film hydration method and sonication. Penetration of Lip-RES into human lymphocytes and human fibroblasts (HF cells) was observed by fluorescence microscopy. The results demonstrated that Lip-RES was successfully prepared with a relatively spherical shape, good characteristics (mean particle size of 103.9 nm, polydispersity index of 0.211, zeta potential of -31.9 mV, encapsulation efficiency of 92.31% and payload of 8.47%), and a relatively high stability. Lip-RES was well penetrated into human lymphocytes and HF cells. Under non-irradiated condition, Lip-RES showed a negligible genotoxicity, but exhibited a significant cytotoxicity for lymphocytes and HF cells at RES concentration of more than 10 µg/mL. Under irradiated condition at a dose of 2 Gy, compared to the control, Lip-RES could decrease the percentage of cell death of 16-30% and decrease the number of foci/cell of 10-15%. This indicates the radioprotection effect of Lip-RES for human lymphocytes and fibroblasts. Moreover, at a RES concentration of 2.5 µg/mL, Lip-RES showed a best radioprotection.
Revised: 18/4/2022	
Published: 18/4/2022	
KEYWORDS	
Fibroblasts	
Liposome	
Lymphocytes	
Radioprotection	
Resveratrol	

KHẢO SÁT HIỆU QUẢ BẢO VỆ BỨC XẠ CHO TẾ BÀO LYMPHO NGƯỜI VÀ NGUYÊN BÀO SỢI NGƯỜI CỦA LIPOSOME ĐÓNG GÓI RESVERATROL

Nguyễn Minh Hiệp^{1*}, Phạm Ngọc Duy¹, Vũ Ngọc Bích Đào¹,
Trần Thanh Mai¹, Trần Thị Ngọc Mai¹, Nguyễn Thị Huỳnh Nga²

¹Viện Nghiên cứu Hạt nhân, ²Trường Đại học Đà Lạt

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 19/02/2022	Nghiên cứu nhằm mục đích đánh giá hiệu quả bảo vệ bức xạ của liposome đóng gói resveratrol (RES-Lip). Đầu tiên, Lip-RES được tổng hợp bằng phương pháp hydrate hóa màng lipid kết hợp với sóng siêu âm để giảm kích thước. Khả năng xâm nhập của Lip-RES vào tế bào lympho người và nguyên bào sợi người (tế bào HF) được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang. Kết quả nghiên cứu cho thấy, Lip-RES đã được tổng hợp thành công với kích thước hạt trung bình, chỉ số phân tán, thế zeta, hiệu suất đóng gói, sức tải đạt lần lượt là 103,9 nm, 0,211, -31,9 mV, 92,31%, 8,47%, có dạng hình cầu và có độ bền cao. Lip-RES có khả năng xâm nhập tốt vào tế bào lympho và tế bào HF. Ở điều kiện không chiếu xạ, Lip-RES hầu như không gây độc tính di truyền cho tế bào, tuy nhiên lại gây chết đáng kể cho cả 2 loại tế bào này khi ở nồng độ RES lớn hơn 10 µg/mL. Ở điều kiện chiếu xạ với liều chiếu 2 Gy, Lip-RES giúp làm giảm 16-30% tỉ lệ tế bào chết và giúp làm giảm 10-15% số foci/tế bào, từ đó cho thấy khả năng bảo vệ bức xạ của Lip-RES đối với 2 loại tế bào này. Hơn thế nữa, Lip-RES đạt hiệu quả bảo vệ bức xạ tối ưu ở nồng độ RES 2,5 µg/mL.
Ngày hoàn thiện: 18/4/2022	
Ngày đăng: 18/4/2022	
TỪ KHÓA	
Bảo vệ bức xạ	
Liposome	
Nguyên bào sợi	
Resveratrol	
Tế bào lympho	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5556>

* Corresponding author. Email: jackminhhiep@yahoo.com

1. Đặt vấn đề

Ngày nay, phương pháp xạ trị vẫn đóng vai trò quan trọng trong điều trị ung thư [1]. Trong phương pháp này, tế bào ung thư sẽ bị tiêu diệt bởi các bức xạ ion hóa (gamma, alpha, beta và tia X). Tuy nhiên, chính các bức xạ này ngoài việc tiêu diệt tế bào ung thư thì cũng luôn gây tác dụng phụ lên tế bào lympho (thành phần của máu) và ảnh hưởng nghiêm trọng đến các tế bào da. Cụ thể, theo nghiên cứu của Carvalho và Villar, các tế bào lympho (lympho B, lympho T và lympho NK) là các đối tượng rất nhạy cảm với bức xạ [2], [3]. Trong đó, các tia bức xạ gây ảnh hưởng đến chu trình tế bào, đến quá trình tổng hợp mRNA và sự sinh tổng hợp protein, gây tổn thương DNA, gây đột biến các tế bào này và thúc đẩy quá trình “apoptosis” (chết theo chu trình) ở các tế bào lympho T và lympho B trưởng thành [2], [3]. Bên cạnh đó, các bức xạ dùng trong xạ trị ung thư còn có thể gây tác dụng cho da (hơn 80% bệnh nhân được xạ trị), bao gồm tác dụng phụ sớm (ban đỏ, bong vảy khô, tăng sắc tố và rụng lông, tóc) và tác dụng phụ muộn (teo da, khô, giãn da, loạn sắc tố, xơ hóa và loét) cho bệnh nhân [4]. Hơn nữa, ở một số bệnh nhân xạ trị vùng đầu, cổ và vùng xương chậu thì các tác động của bức xạ lên da càng nghiêm trọng hơn bao gồm gây ngứa, đau, nhiễm trùng và nghiêm trọng hơn là trong một số trường hợp dẫn đến gián đoạn việc điều trị.

Một cách cụ thể ở cấp độ tế bào, bức xạ ion hóa gây ảnh hưởng lên các đại phân tử sinh học, trong đó quan trọng nhất là gây tổn thương và đứt gãy DNA, dẫn đến tổn thương tế bào, làm tế bào chết và gây ra các đột biến thứ cấp khác [5]. Để hạn chế tác động của bức xạ ion hóa, tế bào có những cơ chế nội bào chuyên biệt như cơ chế kích thích gia tăng sự tổng hợp các chất chống oxy hóa của tế bào, cơ chế tăng cường các enzyme nội bào, cơ chế sửa chữa DNA, kích hoạt các con đường quản lý các điểm kiểm soát của chu trình tế bào (đặc biệt là ở điểm kiểm soát G1/S), sinh tổng hợp ATM protein,... [6]. Tuy nhiên, các tổn thương vẫn xảy ra nếu số lượng gốc tự do vượt quá khả năng điều tiết của các tế bào. Vì vậy, việc tạo ra chế phẩm giúp làm giảm tác động của bức xạ lên tế bào lympho và tế bào da sẽ góp phần nâng cao sức khỏe cho bệnh nhân và nâng cao hiệu quả của phương pháp xạ trị ung thư. Trong đó, việc bảo vệ DNA cho tế bào được xem là chỉ tiêu đánh giá quan trọng về khả năng bảo vệ bức xạ (BVBX) cho tế bào lành của hoạt chất/chế phẩm.

Resveratrol (RES) (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene), một polyphenol tự nhiên có trong rượu vang đỏ, nho, đậu phộng, dâu tằm và một số quả mọng khác [7]. RES có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh, có khả năng ức chế cho hầu hết các giai đoạn phát triển của nhiều loại ung thư [7]-[8]. Ngoài ra, RES còn có khả năng kháng viêm, bảo vệ tim mạch, chống co mạch, bảo vệ thần kinh, v.v. [7]. Nghiên cứu của Smith và cộng sự cho thấy, RES có khả năng BVBX cho tế bào, đặc biệt là bảo vệ DNA chống lại tác hại của bức xạ ion hóa [8]. Tuy nhiên, các nghiên cứu này đều được thực hiện với RES dạng thô với độ tan nước kém (30 µg/mL) và độ sinh khả dụng thấp [7], [8]. Trong khi đó, hệ liposome (Lip) với thành phần cấu tạo chỉ gồm phospholipid (đôi khi bổ sung cholesterol) chính là thành phần cấu tạo tế bào nên có độ tương thích sinh học rất cao với cơ thể. Ngoài ra, Lip có khả năng đóng gói các hợp chất kỵ nước, giúp tăng độ phân tán trong nước của chúng lên gấp hàng trăm, hàng ngàn lần, đồng thời giúp tăng khả năng thẩm thấu của dược chất vào bên trong tế bào lympho, vào mô/tế bào da và giúp kiểm soát tốc độ phóng thích, từ đó kéo dài thời gian tác dụng và độ sinh khả dụng [9]. Tuy nhiên, việc nghiên cứu về hiệu quả BVBX cho tế bào lành trong xạ trị ung thư của Lip đóng gói RES (Lip-RES) vẫn chưa được nghiên cứu nhiều.

Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng của Lip-RES trong việc hỗ trợ bảo vệ tế bào da và tế bào lympho cho bệnh nhân xạ trị ung thư. Đầu tiên, Lip-RES sẽ được điều chế bằng phương pháp hydrate hóa màng lipid kết hợp với sóng siêu âm. Các thông số đặc điểm và khả năng xâm nhập của Lip-RES vào tế bào lympho người và nguyên bào sợi người (tế bào HF) sẽ được đánh giá. Sau cùng, ảnh hưởng của Lip-RES lên tỉ lệ chết và độ tổn thương DNA của tế bào lympho người và tế bào HF ở điều kiện không chiếu xạ và có chiếu xạ cũng sẽ được khảo sát.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu và hóa chất

Resveratrol độ tinh khiết 99% (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ); Phospholipon 90G (Lipoid, Đức); Methyl red (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ); môi trường RPMI-1640 (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ); môi trường DMEM (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ); Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) JBW301 (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ); Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ); nguyên bào sợi người HF (Phòng thí nghiệm Kỹ nghệ mô và Vật liệu Y sinh, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh); các hóa chất khác đều có độ tinh khiết ở mức độ phân tích.

2.2. Điều chế dịch phân tán Lip-CUR

Phospholipon (170 mg) và RES (17 mg) được hòa tan hoàn toàn vào 15 mL hỗn hợp chloroform và methanol (2:1, v/v). Dung dịch hòa tan được cho vào bình cầu và tiến hành loại bỏ hoàn toàn dung môi bằng thiết bị cô quay chân không IKA RV 06 trong thời gian 6 giờ ở 55°C để hình thành màng lipid (gồm phospholipon và RES). Màng lipid được hydrate hóa bằng 17 mL nước cất trong 2 giờ trên hệ thống cô quay chân không IKA RV 06 (chỉ sử dụng chế độ quay) để tạo thành dịch phân tán Lip-RES dạng thô. Dịch phân tán Lip-RES dạng thô được giảm kích thước hạt bằng thiết bị Ultrasonic Liquid Processor (Sonics & Materials Inc., Hoa Kỳ) với công suất 40%, thời gian 30 phút (đánh 7 phút, nghỉ 3 phút). Dịch phân tán Lip-RES được để yên 1 giờ ở nhiệt độ phòng và được lọc qua màng lọc kích thước lỗ 1,2 µm để loại bỏ lượng RES chưa được “đóng gói” vào trong Lip. Dịch phân tán Lip-RES sau lọc sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm sau.

2.3. Xác định các thông số đặc điểm của Lip-CUR

Kích thước hạt trung bình, chỉ số phân tán và thế zeta của dịch phân tán Lip-RES được xác định bằng thiết bị Zeta Sizer Nano ZS (Malvern, UK). Cụ thể, dịch phân tán Lip-CUR được pha loãng 100 lần với nước cất và phép đo được thực hiện ở nhiệt độ 25°C, góc đo 173°.

Hình thái của Lip-RES được xác định bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Cụ thể, 20 µL dịch phân tán Lip-CUR 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.

Hiệu suất đóng gói của Lip-RES được xác định bằng cách định lượng RES đã được đóng gói vào hệ nano so với lượng RES ban đầu [9]. Cụ thể, lấy 1 mL dịch phân tán Lip-RES hòa tan trong 19 mL ethanol. Lượng RES trong dung dịch ethanol được xác định bằng sắc ký lỏng cao áp (HPLC) LC – 20AD (SHIMADZU, Nhật Bản), cột sắc ký C18 (Vydac, Vương Quốc Anh) và đầu dò UV-Vis SPD – 20A ở bước sóng 306 nm, pha động là hỗn hợp ethanol:nước (92:8, v/v), tốc độ dòng 1 mL/phút. Hiệu suất đóng gói được xác định bằng công thức (1):

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

Sức tải của Lip-RES được xác định bằng cách định lượng RES chứa trong một khối lượng Lip-RES xác định [9]. Cụ thể, 5 mL dịch phân tán Lip-RES được 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-RES được hòa tan vào trong 10 mL ethanol, trộn đều trong 3 phút và pha loãng 10 lần. Lượng RES cũng được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với các điều kiện tiến hành tương tự như phần xác định hiệu suất đóng gói. Sức tải của Lip-RES được xác định bằng công thức (2):

$$\text{Sức tải (\%)} = \frac{\text{Lượng RES chứa trong Lip-RES (mg)}}{\text{Khối lượng Lip-RES (mg)}} \times 100 \quad (2)$$

2.4. Sự xâm nhập của Lip-RES vào tế bào lympho người và nguyên bào sợi người (tế bào HF)

Khả năng xâm nhập của Lip-RES vào tế bào lympho người và tế bào HF được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang Carl Zeiss AXIO Imager Z2 với phin lọc FITC. Trong đó, methyl red được đông đóng gói cùng với chất BVBX vào hệ Lip ở tỉ lệ methyl red/lipid là 1/200 (w/w) để quan sát vị trí của Lip-RES. Do đó, vị trí phát tín hiệu huỳnh quang màu xanh cũng chính là vị trí của Lip-RES.

Tế bào lympho người được tách từ máu ngoại vi bằng Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ) theo quy trình của nhà sản xuất. Cụ thể, máu ở tĩnh mạch cánh tay được lấy bằng ống tiêm vô trùng sử dụng 1 lần. Máu được giữ trong ống Lithium Heparine vô trùng ở 18 – 24°C đến khi xử lý tế bào. Sau đó, pha loãng tỷ lệ 1:1 (v/v) máu toàn phần trong RPMI-1640 có 10% huyết thanh, hút máu pha loãng chuyển vào tạo thành lớp trên trong ống ly tâm có chứa Ficoll-Paque PLUS 1077, ly tâm 1500 vòng/phút trong 30 phút, hút lấy lớp tế bào trắng đục là lớp tế bào đơn nhân chứa phần lớn tế bào lympho, dùng PBS pH 7,2 để rửa tế bào, huyền phù tế bào trong môi trường RPMI-1640 có bổ sung Lip-RES chứa methyl red, ủ tế bào ở 37°C và 5% CO₂. Sau 16 giờ, tế bào được rửa với PBS và được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang với phin lọc FITC.

Tế bào HF được nuôi cấy trên lamên 22 × 22 mm (đặt trong đĩa petri Ø35 mm vô trùng) trong môi trường DMEM có bổ sung 10% huyết thanh ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Khi tế bào đã bám dính lên lamên, môi trường nuôi cấy cũ được loại bỏ và thay bằng môi trường DMEM không chứa huyết thanh. Lip-RES chứa methyl red được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Sau 16 giờ, lamên (có chứa tế bào) được rửa 3 lần với PBS và được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang với phin lọc FITC.

2.5. Đánh giá ảnh hưởng của Lip-RES lên tỉ lệ chết của tế bào lympho người và nguyên bào sợi người (tế bào HF) ở điều kiện không chiếu xạ và có chiếu xạ

Ảnh hưởng của hệ Lip-RES lên tế bào lympho người và tế bào HF ở điều kiện không chiếu xạ được đánh giá dựa vào tỉ lệ tế bào chết bằng phương pháp nhuộm trypan blue [10].

a- Đối với tế bào lympho người:

- Ở điều kiện không chiếu xạ:

Đầu tiên, nồng độ của RES trong dịch phân tán Lip-RES sau khi lọc vô trùng sẽ được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với các điều kiện như đã trình bày ở mục 2.2. Sau đó, Lip-RES với các nồng độ RES khác nhau (0, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30 và 50 µg/mL) được cho vào môi trường RPMI-1640 có chứa tế bào lympho người ở mật độ 10⁶ tế bào/mL (số lượng tế bào lympho được xác định bằng buồng đếm hồng cầu sau khi được nhuộm bằng Trypan blue, hiệu chỉnh mật độ tế bào trong môi trường bằng cách pha loãng sau khi đã xác định được số lượng tế bào lympho thu được). Tất cả các nghiệm thức được ủ 16 giờ trong 5% CO₂ ở 37°C. Sau đó, tế bào được rửa bằng môi trường RPMI-1640 mới. 100 µL dịch huyền phù tế bào được nhuộm với trypan blue và đếm bằng buồng đếm hồng cầu để đánh giá ảnh hưởng của Lip-RES đến tỉ lệ sống chết của tế bào lympho. Tỉ lệ chết của tế bào được xác định bằng công thức (3):

$$\text{Tỉ lệ tế bào chết (\%)} = \frac{\text{Tổng số tế bào chết trong 1 mL}}{\text{Tổng số tế bào trong 1 mL}} \times 100 \quad (3)$$

- Ở điều kiện chiếu xạ:

Sau khi cho Lip-RES với các nồng độ RES khác nhau (0, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30 và 50 µg/mL) vào môi trường RPMI-1640 có chứa tế bào lympho ở mật độ 10⁶ tế bào/mL. Tất cả các nghiệm thức được ủ 16 giờ trong 5% CO₂ ở 37°C. Kế tiếp, tế bào được rửa bằng môi trường RPMI-1640. Sau đó, tất cả các mẫu được chiếu xạ bằng nguồn tia X (Radioflex-200EGM, Rigaku Corporation, Nhật Bản) với liều chiếu 2 Gy, suất liều 0,5 Gy/min. Tiếp tục ủ tế bào ở 37°C, 5% CO₂ trong 24 giờ, xác định tỉ lệ tế bào chết bằng phương pháp nhuộm với trypan blue như trên. Ngoài ra, “tỉ lệ tế bào chết do chiếu xạ” được xác định bằng hiệu số giữa “tỉ lệ tế bào

chết sau chiếu xạ” và “tỉ lệ tế bào chết ở điều kiện không chiếu xạ”. Trong đó, “tỉ lệ tế bào chết sau chiếu xạ” chính là giá trị tỉ lệ tế bào chết đếm được bằng phương pháp trypan blue sau chiếu xạ.

b- *Đối với tế bào HF:*

- Ở điều kiện không chiếu xạ:

Nuôi cấy tế bào HF ở mật độ 10^5 tế bào/mL ở điều kiện 37°C và 5% CO₂ trong môi trường DMEM có bổ sung 10% huyết thanh. Khi tế bào mọc kín khoảng 90%, thay môi trường DMEM mới có 0,1% huyết thanh và Lip-RES với các nồng độ RES khác nhau (0, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30 và 50 µg/mL) và ủ trong 16 giờ. Sau đó, tế bào được rửa bằng môi trường DMEM, tỉ lệ tế bào chết cũng được xác định bằng phương pháp trypan blue.

- Ở điều kiện chiếu xạ:

Tế bào HF được nuôi cấy và xử lý với Lip-RES ở các nồng độ RES khác nhau (0, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30 và 50 µg/mL) trong 16 giờ. Sau đó, tế bào được rửa bằng môi trường DMEM và chiếu xạ bằng nguồn tia X (Radioflex-200EGM, Rigaku Corporation, Nhật Bản) với liều chiếu 2 Gy, suất liều 0,5 Gy/phút. Tiếp tục ủ tế bào ở 37°C, 5% CO₂ trong 24 giờ, xác định tỷ lệ tế bào chết bằng phương pháp nhuộm với trypan blue. Tỉ lệ tế bào chết do chiếu xạ cũng được xác định như đã nêu ở trên.

2.6. Đánh giá ảnh hưởng của các Lip-RES lên độ tổn thương DNA của tế bào lympho người và tế bào HF ở điều kiện không chiếu xạ và có chiếu xạ

Trong thí nghiệm này, ảnh hưởng của Lip-RES lên độ tổn thương DNA của tế bào lympho và tế bào HF ở điều kiện không chiếu xạ và có chiếu xạ được đánh giá bằng phương pháp γ -H2AX [11].

a- *Đối với tế bào lympho người:*

- Ở điều kiện không chiếu xạ:

Tế bào lympho sau khi ủ 16 giờ trong môi trường RPMI-1640 có bổ sung Lip-RES với các nồng độ RES khác nhau (0, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30 và 50 µg/mL) sẽ được cố định lên lamên 22 × 22 mm với mật độ 2×10^5 tế bào/mL, cố định tế bào bằng 4% formaldehyde/PBS pH 7,0 trong 15 phút ở nhiệt độ phòng, ổn định tế bào bằng methanol ở -20°C trong 10 phút, xử lý tế bào với 1 mL 0,5% Triton X100/PBS 7,0 trong 10 phút ở nhiệt độ phòng, blocking bằng 1 mL 1% FBS/PBS pH 7,0 trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, ủ kháng thể Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) JBW301 (pha loãng 1000 lần trong PBS pH 7,0) ở 37°C trong 60 phút, ủ kháng thể Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (kháng thể thứ 2 bắt vào kháng thể thứ 1 để phát tín hiệu huỳnh quang, pha loãng 1000 lần trong PBS pH 7,0) ở 37°C trong 30 phút, đặt lamên có tế bào đã gắn kháng thể đánh dấu huỳnh quang lên tiêu bản có DAPI. Tiêu bản hiển vi được phân tích bằng kính hiển vi huỳnh quang Carl Zeiss AXIO Imager Z2 với phin lọc huỳnh quang DAPI và FITC, độ phóng đại ×1000 kết hợp phần mềm Metafer 4.0 và Metacyte (Metasystem) điều khiển hệ thống tự động chụp ảnh huỳnh quang để phân tích số lượng γ H2AX foci trên tế bào. Nhân tế bào phát màu huỳnh quang xanh dương (DAPI) và γ H2AX foci phát màu huỳnh quang xanh lá (FITC).

- Ở điều kiện chiếu xạ:

Tế bào lympho sau khi ủ 16 giờ trong môi trường RPMI-1640 có bổ sung Lip-RES với các nồng độ RES khác nhau (0, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30 và 50 µg/mL) sẽ được chiếu xạ bằng nguồn tia X (Radioflex-200EGM, Rigaku Corporation, Nhật Bản) với liều chiếu 2 Gy, suất liều 0,5 Gy/phút. Sau đó, tế bào được ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 60 phút. Thực hiện kỹ thuật phân tích γ H2AX foci ở tế bào lympho theo các bước như trên.

b- *Đối với tế bào HF:*

- Ở điều kiện không chiếu xạ:

Tế bào HF (10^5 tế bào/mL) được nuôi cấy trong môi trường DMEM trên đĩa petri Ø35 mm có lamên 22×22 mm, ở điều kiện 37°C và 5% CO₂ trong thời gian 48 giờ. Sau đó, mẫu được thay bằng môi trường DMEM bổ sung 0,1% huyết thanh, ủ tế bào với Lip-RES ở các nồng độ RES khác nhau (0, 2,5, 5, 10, 15, 20, 30 µg/mL) trong 16 giờ. Thực hiện kỹ thuật phân tích γ H2AX foci ở tế bào lympho theo các bước như trên.

- Ở điều kiện chiếu xạ:

Tế bào HF (10^5 tế bào/mL) sau khi được nuôi cấy 48 giờ trong môi trường DMEM có bổ sung 10% huyết thanh sẽ được thay môi trường DMEM mới có 0,1% huyết thanh và bổ sung Lip-RES với các nồng độ RES khác nhau (0, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30 và 50 $\mu\text{g/mL}$). Sau khi ủ ở 37°C , 5% CO_2 trong 16 giờ, tế bào sẽ được chiếu xạ bằng nguồn tia X (Radioflex-200EGM, Rigaku Corporation, Nhật Bản) với liều chiếu 2 Gy, suất liều 0,5 Gy/phút. Sau đó, tế bào được ủ ở 37°C , 5% CO_2 trong 45 phút. Thực hiện kỹ thuật phân tích γH2AX foci ở nguyên bào sợi theo các bước như trên.

Ảnh hưởng của Lip-RES lên độ tổn thương DNA của tế bào được đánh giá dựa trên số γH2AX foci/tế bào, được tính theo công thức (4):

$$\text{Số } \gamma\text{H2AX foci/tế bào} = \frac{\text{Tổng số } \gamma\text{H2AX foci}}{\text{Tổng số tế bào}} \quad (4)$$

2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Giá trị được trình bày bằng số trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn ($n \geq 3$), 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 nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của Lip-RES trên tế bào lympho người và tế bào HF ở điều kiện không/có chiếu xạ.

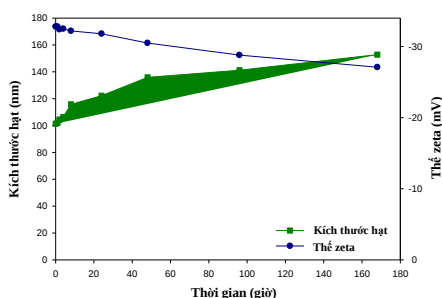
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tổng hợp Lip-RES

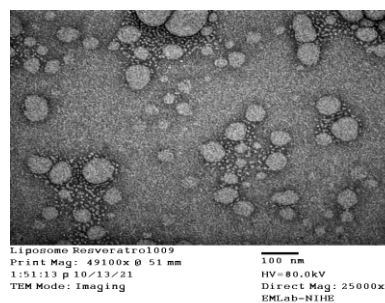
Kết quả ở Bảng 1 cho thấy, Lip-RES đã được tổng hợp thành công với kích thước hạt trung bình và chỉ số phân tán lần lượt là 103,9 nm và 0,211. Điều này chứng tỏ Lip-CUR có kích thước nano và các hạt nano trong dịch phân tán khá đồng đều nhau về mặt kích thước. Hiệu suất đóng gói của Lip-RES đạt 92,31% và sức tải đạt 8,47%, thích hợp cho các thí nghiệm *in tro* trên tế bào lympho người và nguyên bào sợi người (tế bào HF). Ngoài ra, thế zeta của Lip-RES đạt -31,9 mV, mà theo các nghiên cứu trước đây, nếu hệ nano có trị tuyệt đối 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 [12]. Điều này được chứng minh bởi kết quả ở Hình 1. Cụ thể, kích thước hạt và thế zeta của Lip-RES chỉ thay đổi từ 101,4 nm lên 152,8 nm và từ -32,8 mV xuống còn -27,1 mV sau 168 giờ ở nhiệt độ phòng. Ngoài ra, ảnh chụp TEM (Hình 2) đã cho thấy, Lip-RES hầu như có dạng hình cầu với kích thước đạt được mức độ nano. Điều này góp phần chứng minh sự tổng hợp thành công của Lip-RES bằng phương pháp hydrate hóa màng lipid kết hợp với sóng siêu âm để giảm kích thước.

Bảng 1. Thông số đặc điểm của Lip-RES ($n = 3$)

Kích thước hạt (nm)	Chỉ số phân tán	Thế zeta (mV)	Hiệu suất đóng gói (%)	Sức tải (%)
$103,9 \pm 4,6$	$0,211 \pm 0,007$	$-31,9 \pm 1,2$	$92,31 \pm 2,54$	$8,47 \pm 0,21$



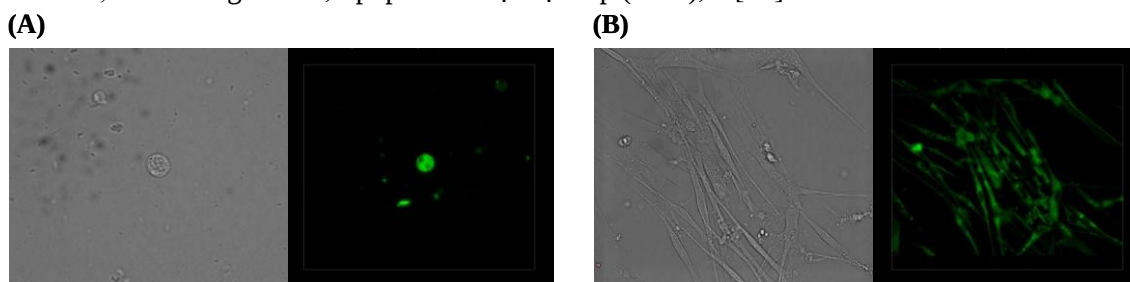
Hình 1. Sự thay đổi của kích thước hạt trung bình và thế zeta của Lip-RES theo thời gian



Hình 2. Ảnh chụp TEM của Lip-RES

3.2. Sự xâm nhập của Lip-RES vào tế bào lympho người và nguyên bào sợi người (tế bào HF)

Kết quả ở Hình 3 cho thấy rằng, sau 16 giờ ủ với Lip-RES, tín hiệu huỳnh quang màu xanh đều hiện diện trong tế bào lympho (Hình 3A) và tế bào HF (Hình 3B). Điều này đã giúp chúng mình được khả năng xâm nhập của Lip-RES vào cả 2 loại tế bào này. Việc xâm nhập nhanh chóng của Lip-RES vào trong tế bào lympho và tế bào HF cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Ducat và cộng sự (2011) khi đã chứng minh được Lip có thể xâm nhập vào trong tế bào bằng nhiều con đường khác nhau, nhưng trong đó con đường nhập bào (endocytosis) đóng vai trò chủ đạo [13]. Cụ thể, điện tích âm của phospholipid (thành phần cấu tạo của Lip) sẽ thúc đẩy sự liên kết mạnh mẽ, nhanh chóng với tế bào với mật độ tối đa khoảng 10^4 Lip/tế bào và Lip được nhập bào thông qua các hố (coated pits) được bao phủ bởi các thụ thể liên kết bề mặt như transferrin, $\alpha 2$ -macroglobulin, lipoprotein mật độ thấp (LDL),...[14].

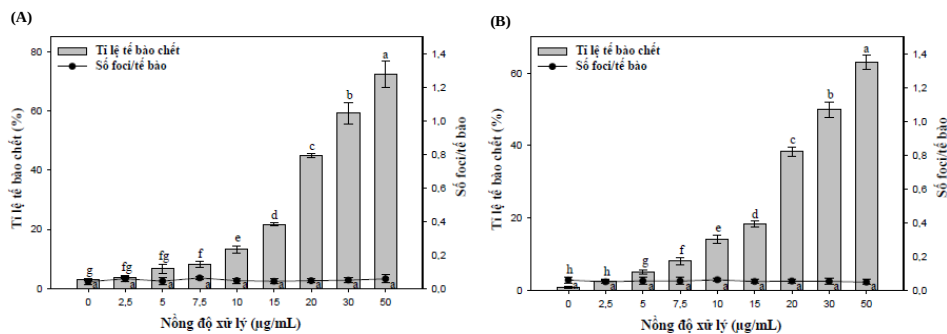


Hình 3. Sự xâm nhập của Lip-RES vào (A) tế bào lympho người và (B) tế bào HF

3.3. Ảnh hưởng của các hệ Lip-BVBX lên tế bào lympho người và tế bào HF ở điều kiện không chiếu xạ và ở điều kiện có chiếu xạ

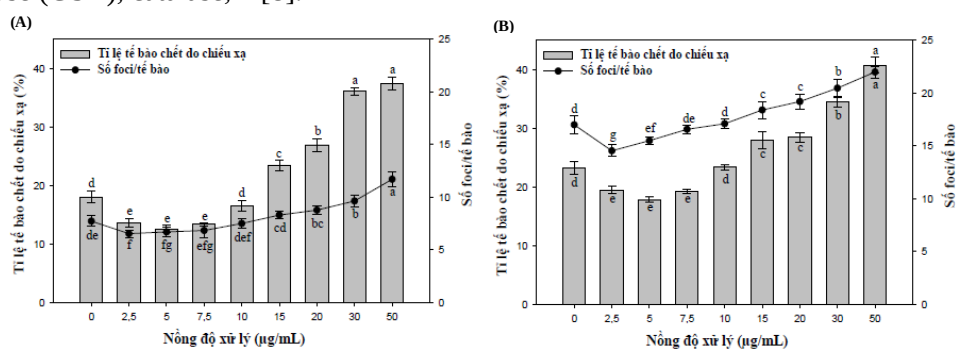
Ảnh hưởng của Lip-RES lên tế bào lympho người và tế bào HF ở điều kiện không chiếu xạ và có chiếu xạ được đánh giá dựa trên tỉ lệ tế bào chết (đánh giá bằng phương pháp trypan blue) và độ tổn thương DNA của tế bào (đánh giá bằng phương pháp γ -H2AX).

Kết quả ở Hình 4A và Hình 4B cho thấy, ở điều kiện không chiếu xạ, số foci/tế bào của tế bào lympho và tế bào HF khi xử lý với Lip-RES ở các nồng độ RES từ 50 $\mu\text{g/mL}$ trở xuống đều nhỏ hơn 0,1 và không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê so với mẫu đối chứng. Điều này cho thấy, Lip-RES hầu như không gây độc tính di truyền cho tế bào. Tuy nhiên, kết quả ở 2 hình này cũng cho thấy, việc xử lý RES (dạng Lip) ở nồng độ cao sẽ gây chết cho tế bào. Cụ thể, Lip-RES ở nồng độ RES 10 $\mu\text{g/mL}$ đã bắt đầu gây độc đáng kể cho tế bào lympho và tế bào HF với tỉ lệ tế bào chết lần lượt là 13,3% và 14,1%. Ở nồng độ RES trên 30 $\mu\text{g/mL}$, tỉ lệ tế bào chết ở cả 2 loại tế bào này đều trên 50%. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trước đây của Berardi và cộng sự [15] và Moreno và cộng sự [16] khi cũng đã chứng minh rằng RES ở nồng độ cao sẽ gây độc tính cho tế bào.



Hình 4. Ảnh hưởng của Lip-RES lên tỉ lệ tế bào chết và số foci/tế bào của (A) tế bào lympho người và (B) tế bào HF ở điều kiện không chiếu xạ. 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 $p < 0,05$; $n = 3$)

Ở điều kiện chiếu xạ với liều chiếu 2 Gy và không xử lý Lip-RES, tỉ lệ tế bào chết do chiếu xạ ở tế bào lympho người là 18% (so với 2,9% ở điều kiện không chiếu xạ) và ở tế bào HF là 23,2% (so với 0,79% ở điều kiện không chiếu xạ) (Hình 4 và Hình 5). Ngoài ra, số foci/tế bào ở tế bào lympho và tế bào HF đạt lần lượt là 7,7 foci/tế bào và 16,9 foci/tế bào (Hình 5), cao hơn gấp nhiều lần so với giá trị tương ứng ở điều kiện không chiếu xạ (Hình 4). Tuy nhiên, việc xử lý tế bào bằng Lip-RES trước khi chiếu xạ đã giúp giảm đáng kể tỉ lệ chết, đồng thời giúp làm giảm độ tổn thương DNA cho cả 2 loại tế bào này (Hình 5). Cụ thể, việc xử lý tế bào lympho và tế bào HF bằng Lip-RES ở nồng độ từ 2,5-10 $\mu\text{g/mL}$ trước khi tiến hành chiếu xạ đã giúp làm giảm tỉ lệ tế bào chết khoảng 16-30% và giúp làm giảm số foci/tế bào (chính là tổn thương DNA) khoảng 10-15% so với kết quả ở nghiệm thức đối chứng (mẫu không xử lý bằng Lip-RES trước khi chiếu xạ). Trong đó, việc xử lý bằng Lip-RES ở nồng độ RES 2,5 $\mu\text{g/mL}$ đã giúp làm giảm 24,4% tỉ lệ tế bào chết và 15,4% số foci/tế bào. Tương tự, ở tế bào HF, tỉ lệ tế bào chết và số foci/tế bào cũng lần lượt giảm 17,7% và 14,5% so với các giá trị tương ứng ở nghiệm thức đối chứng. Điều này có thể là do RES là một chất bắt gốc oxy hóa mạnh, do đó có thể trực tiếp làm giảm lượng gốc oxy hóa do bức xạ ion hóa tạo ra [9]. Bên cạnh đó, RES cũng đã được chứng minh là có khả năng làm giảm ảnh hưởng của các gốc oxy hóa gây ra cho tế bào thông qua việc hoạt hóa các cơ chế nội bào như: giúp gia tăng lượng protein Sirt1 (một protein có vai trò quan trọng trong việc bảo vệ tế bào khỏi các stress oxy hóa), gia tăng lượng protein FoxO và hoạt hóa các chất chống oxy hóa khác như glutathione hay các enzyme kháng oxy hóa như superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH), catalase,...[8].



Hình 5. Ảnh hưởng của Lip-RES lên tỉ lệ tế bào chết và số foci/tế bào của (A) tế bào lympho người và (B) tế bào HF ở điều kiện chiếu xạ liều 2 Gy

4. Kết luận

Lip-RES đã được tổng hợp thành công với kích thước hạt trung bình, chỉ số phân tán, thế zeta, hiệu suất đóng gói, sức tải đạt lần lượt là 103,9 nm, 0,211, -31,9 mV, 92,31%, 8,47% và có độ bền cao. Lip-RES có khả năng xâm nhập tốt vào tế bào lympho người và nguyên bào sợi người (tế bào HF). Ở điều kiện không chiếu xạ, Lip-RES không gây độc tính di truyền cho tế bào, tuy nhiên lại gây chết đáng kể cho cả 2 loại tế bào này khi ở nồng độ RES lớn hơn 10 $\mu\text{g/mL}$. Ở điều kiện chiếu xạ với liều chiếu 2 Gy, Lip-RES giúp làm giảm 16-30% tỉ lệ tế bào chết và giúp làm giảm 10-15% số foci/tế bào, từ đó cho thấy khả năng BVBX của Lip-RES đối với 2 loại tế bào này. Hơn thế nữa, Lip-RES đạt hiệu quả BVBX tối ưu ở nồng độ RES 2,5 $\mu\text{g/mL}$.

Lời cảm ơn

Tác giả xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Viện Nghiên cứu hạt nhân và Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam đã hỗ trợ cho nghiên cứu này (Mã số: 11/21/VNCHN, hợp đồng số: 12/HĐ/ĐTCB).

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] A. Maciejczyk, I. Skrzypczyński, and M. Janiszewska, "Lung cancer. Radiotherapy in lung cancer: Actual methods and future trends," *Rep. Pract. Oncol. Radiother.*, vol. 19, pp. 353-360, 2014.
- [2] H. A. Carvalho and R. C. Villar, "Radiotherapy and immune response: the systemic effects of a local treatment," *Clinics (Sao Paulo)*, vol. 73, 2018, Art. no. e557s.
- [3] J. Puskin, *Health risks from exposure to low level of ionizing radiation*, National Research Council (US) Board on Radiation Effects Research BEIR VII, Phase I, Letter Report, 1998.
- [4] F. Haubner, E. Ohmann, F. Pohl, J. Strutz, and H. G. Gassner, "Wound healing after radiation therapy: Review of the literature," *Radiat. Oncol.*, vol. 7, p. 162, 2012.
- [5] K. B. Kalpana, N. Devipriya, and M. Srinivasan, "Investigation of the radioprotective efficacy of hesperidin against gamma-radiation induced cellular damage in cultured human peripheral blood lymphocytes," *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 676, pp. 54-61, 2009.
- [6] L. Li, M. Story, and R. J. Legerski, "Cellular responses to ionizing radiation damage," *Int. J. Radiat. Oncol.*, vol. 40, pp. 1157-1162, 2001.
- [7] B. Salehi, A. P. Mishra, M. Nigam *et al.*, "Resveratrol: A double-edged sword in health benefits," *Biomedicines*, vol. 6, p. 91, 2018.
- [8] A. Quarta, A. Gaballo, B. Pradhan *et al.*, "Beneficial oxidative stress-related trans-resveratrol effects in the treatment and prevention of breast cancer," *Appl. Sci.*, vol. 11, p. 11041, 2021.
- [9] M. H. Nguyen, P. N. Duy, B. Dong, K. Hadinoto *et al.*, "Radioprotective activity of curcumin-encapsulated liposomes against genotoxicity caused by gamma Cobalt-60 irradiation in human blood cells," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 93, pp. 1267-1273, 2017.
- [10] W. Strober, "Trypan blue exclusion test of cell viability," *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. 111, pp. A3.B.1-A3.B.2, 2015.
- [11] K. Rothkamm and S. Horn, "Gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure," *Ann. Ist. Super. Sanita.*, vol. 45, pp. 265-271, 2009.
- [12] 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.
- [13] 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, pp. 469-477, 2011.
- [14] M. S. Robert, H. Keelung, S. F. Daniel, and P. Demetrios, "Endocytosis of liposomes and intracellular fate of encapsulated molecules: Encounter with a low pH compartment after internalization in coated vesicles," *Cell*, vol. 32, pp. 1069-1079, 1983.
- [15] V. Berardi, F. Ricci, M. Castelli *et al.*, "Resveratrol exhibits a strong cytotoxic activity in cultured cells and has an antiviral action against polyomavirus: potential clinical use," *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 28, p. 96, 2009.
- [16] C. Moreno, S. Rogero, T. Ikeda *et al.*, "Resveratrol and radiation biological effects," *Int. J. Nutrology.*, vol. 5, 2012, doi: 10.1055/s-0040-1701425.