

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG BẢO VỆ GAN CỦA NANOMELANIN TRÊN MÔ HÌNH CHUỘT MANG KHỐI UNG THƯ ĐƯỢC XẠ TRỊ

Nguyễn Thị Lê Na¹, Nguyễn Lê Minh Trí¹, Ngọc Hoàng Dũng¹, Bùi Thị Vân Khánh¹
Tùng Quang⁴, Nguyễn Thị Hiền³, Nguyễn Đình Thắng¹, Hồ Anh Sơn²

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá khả năng bảo vệ tế bào gan của nanomelanin ở mức liều điều trị 40 mg/kg thể trọng trên mô hình chuột mang khối ung thư được xạ trị. **Vật liệu và phương pháp:** Nghiên cứu thực nghiệm, hạt nanomelanin kích thước 80 - 200 nm; phương pháp phân tích mô học, phân tích chỉ tiêu hóa sinh, sử dụng kỹ thuật RT-PCR để đánh giá mức độ biểu hiện gen mã hóa CAT, GPx ở mô gan. **Kết quả và kết luận:** Nanomelanin mức liều điều trị 40 mg/kg thể trọng làm giảm tình trạng viêm mô gan. Kích thước khối ung thư giảm 80% so với nhóm chứng sau đợt điều trị ($p < 0,01$). Chỉ tiêu enzyme chức năng gan (AST) tăng nhẹ ($p < 0,05$), đồng thời mức độ biểu hiện gen mã hóa các enzyme CAT, GPx tăng tương ứng 1,86 và 1,5 lần ở mô gan sau xạ trị.

* Từ khóa: Nanomelanin; Melanin; Xạ trị ung thư.

Evaluation of the Ability of Nanomelanin to Protect Liver Cells on Tumor-Bearing Mice Irradiated with X-ray

Summary

Objectives: To evaluate the ability of nanomelanin (40 mg/kg) to protect liver cells on tumor-bearing mice irradiated with X-ray. **Materials and methods:** Experimental method, histological, biochemical criteria, RT-PCR technique to evaluate the expression level of genes coding CAT and Gpx in liver tissue. **Results and conclusion:** Nanomelanin with a dose of 40 mg/kg reduces inflammation in liver tissue. Nanomelanin reduced 80% of tumor volume ($p < 0.01$) and increased slightly AST level in blood ($p < 0.05$). The transcription levels of CAT and GPx were increased 1.86 and 1.5 times, respectively, during radiation therapy.

* Keywords: Nanomelanin; Melanin; Radiation therapy.

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y

³Trường Cao đẳng Y tế Hà Đông

⁴Bộ môn - Khoa Tai Mũi Họng, Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y

Người phản hồi: Hồ Anh Sơn (hoanhsonhp@gmail.com)

Ngày nhận bài: 16/4/2021

Ngày bài báo được đăng: 01/6/2021

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, trong điều trị bệnh ung thư, xạ trị và hóa trị là 2 phương pháp chính được sử dụng. Tuy nhiên, tác dụng phụ của 2 phương pháp này ảnh hưởng đến tế bào thường, làm chết tế bào và tăng sinh mô. Xạ trị có thể gây ra các phản ứng phụ cấp tính cũng như mạn tính và có thể gây ra một loại ung thư khác (ung thư thứ phát) cho bệnh nhân. Xạ trị hay hóa trị thường trực tiếp phá hủy DNA và sinh ra các gốc oxy hóa có hoạt tính cao (ROS). Nồng độ của ROS tăng tiếp tục phá hủy DNA làm thay đổi quá trình trao đổi chất bình thường của tế bào, dẫn đến làm chết tế bào và các mô bình thường [1, 2].

DNA bị phá hủy và sinh ra ROS dẫn tới kích hoạt chuỗi các tương tác sinh học thông qua sự hoạt hóa của nhiều nhân tố phiên mã, các cytokine tiền viêm hay các enzyme như NF- κ B, IL-1 β , IL-6, TNF α , SOD [3]. Việc sinh ra các cytokine tiền viêm hay các nhân tố phiên mã này làm tăng tiết enzyme, phân hủy chất nền ngoại bào metalloprotease, đồng thời các cytokine viêm có mặt trong sự phát triển và di căn của tế bào ung thư [4]. Vì vậy, loại bỏ ROS sinh ra trong quá trình hóa trị và xạ trị là một trong những yếu tố góp phần làm giảm tác dụng phụ của xạ trị. Gan là một trong những cơ quan quan trọng nhất, đóng vai trò sống còn trong cơ thể, có chức năng loại bỏ chất độc ra khỏi máu, đồng thời là nơi dự trữ năng lượng, các enzyme và hormon quan trọng trong cơ thể. Trong liệu pháp chiếu xạ đối với bệnh nhân ung thư, gan là một trong những cơ quan chịu ảnh hưởng mạnh của tia xạ. Đặc biệt, khi chiếu xạ liều cao sẽ gây hiện tượng xơ gan, viêm gan,

đồng thời quá trình trao đổi chất bình thường trong gan sẽ bị ảnh hưởng [5].

Melanin là một hợp chất polymer tự nhiên được tìm thấy trong hầu hết các sinh vật sống, có hoạt tính kháng oxy hóa và khả năng hấp phụ tia UV cũng như tia xạ mạnh. Tuy nhiên, đây là một polymer sinh học có độ tan rất thấp, hoàn toàn không tan trong nước và các loại dung môi hữu cơ hay acid đặc, chỉ tan một phần rất nhỏ trong môi trường kiềm [6].

Ở nghiên cứu trước, chúng tôi đã thành công trong việc đưa melanin về dạng hạt nano với kích thước 80 - 200 nm để tăng tính tan và hoạt tính sinh học [6]. Trong nghiên cứu này, trên mô hình chuột bị ung thư được chiếu xạ, chúng tôi bước đầu đánh giá ảnh hưởng của nanomelanin lên các tế bào gan thông qua các chỉ tiêu về mô học, hóa sinh và sử dụng kỹ thuật RT-PCR để kiểm tra mức độ biểu hiện của gen mã hóa enzyme GP-x, CAT trong mô gan. Đây là 2 enzyme đóng vai trò quan trọng trong quá trình tiêu thụ các gốc tự do nội sinh hay ngoại sinh. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm: *Đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào gan của nanomelanin trên mô hình chuột mang khối ung thư được xạ trị.*

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Động vật thí nghiệm và tế bào:

- Tế bào ung thư biểu mô liên kết sarcoma 180 nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 được bổ sung 10% huyết thanh (FBS) và 1% penicillin/streptomycin ở 37°C đặt trong tủ ẩm 5% CO₂.

- Chuột Swiss 5 tuần tuổi (Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp) được chia

thành 4 nhóm, mỗi nhóm 5 con: Nhóm 1 đối chứng sinh học (NIL); nhóm 2 gây u, không được điều trị (NC); nhóm 3 có gây u, được chiếu xạ (IR); nhóm 4 có gây u, được chiếu xạ, điều trị bằng nanomelanin (IR + MEL).

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Phương pháp tạo dung dịch nanomelanin:*

Bột melanin (CAS Number: 8049-97-6; hãng Sigma Aldrich, Mỹ) được hòa tan trong dung dịch NaOH. Nanomelanin kích thước 80 - 100 nm được tạo ra trong nghiên cứu đã được công bố [6].

* *Phương pháp tạo khối u dưới da:*

Được mô tả trong nghiên cứu trước [6]: Tạo khối u dưới da bằng cách tiêm dưới da chuột dung dịch mang tế bào sarcoma 180 ở nồng độ $1,5 \times 10^6$ /ml. Quan sát sự hình thành khối u. Khi kích thước khối u khoảng 7 cm, tiến hành chiếu xạ trong điều kiện có hoặc không điều trị bằng dung dịch nanomelanin.

* *Phương pháp chiếu xạ điều trị khối u trên chuột:*

Phát triển dựa theo nghiên cứu của Agnieszka MP và CS (2019) [9]: Chuột đã

gây u được tiêm dung dịch nanomelanin (40 mg/kg thể trọng) trước khi chiếu xạ tia X cường độ 6 Gy. Sau đó, tiêm thêm 2 liều nanomelanin bổ sung sau chiếu xạ 3 và 6 ngày với liều lượng không đổi.

* *Phương pháp phân tích mô học:*

Các mẫu mô gan chuột được lưu giữ trong dung dịch formalin 10%, sau đó loại canxi bằng acid formic và cố định trong paraffin. Tiếp theo, các mô gan trong paraffin được cắt lát mỏng cố định trên lam kính tạo thành các tiêu bản. Sau đó, nhuộm các mẫu mô bằng hematoxylin và eosin trước khi quan sát dưới kính hiển vi.

* *Phương pháp RT-PCR:*

ARN tổng số được tách từ mẫu mô gan chuột thí nghiệm bằng kit tách ARN (hãng Thermo Fisher Scientific, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó, cDNA được tổng hợp từ ARN tổng số bằng bộ kit tổng hợp cDNA (hãng Thermo Fisher Scientific, Singapore). Phản ứng RT-PCR đo bằng hệ thống LightCycler 96 (hãng Roche Diagnostics GmbH, Đức). Các bản sao của gen mã hóa GPx và CAT được định lượng bằng phản ứng RT-PCR qua so sánh với số lượng bản sao của gen nội chứng GAPDH.

Bảng 1: Trình tự các cặp mồi của gen mã hóa các enzyme.

Tên Gen	Trình tự (5' - 3')
Mouse GAPDH (F)	CCCATCACCATCTTCCAGGAGC
Mouse GAPDH (R)	CCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC
Mouse GP-x (F)	AAGAAATCAAGGAGTTTGCAGG-
Mouse GP-x (R)	ATCCATTTCCACAGTGGGTG
Mouse CAT (F)	AGGCGGGAACCCAATAG
Mouse CAT (R)	TTTTGCGTGTACCACTCTC

* *Xử lý số liệu:* Bằng phần mềm Student's t-test.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

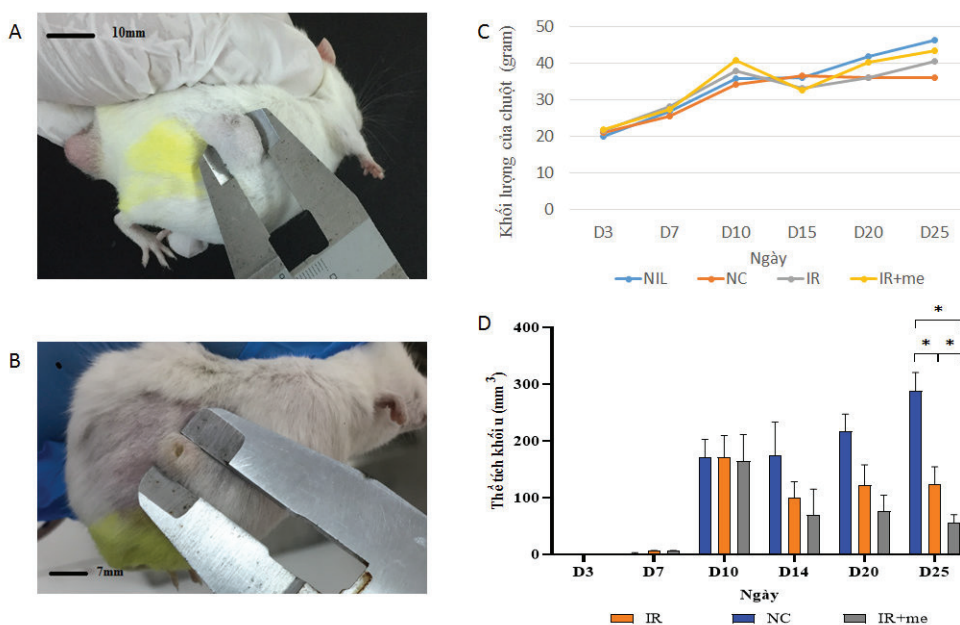
1. Kết quả mô học và hình thái gan chuột

Bảng 2: Mức độ viêm gan của các nhóm chuột.

Nhóm chuột	Mức độ viêm gan (%)			
	Vừa	Nhẹ	Thoái hóa nhẹ tế bào gan	Không
NIL	-	-	-	-
NC	60	40	-	-
IR	20	60	20	-
IR + MEL	-	60	20	20

Không quan sát thấy khác biệt về mặt hình thái của gan giữa các nhóm chuột được điều trị và không được điều trị nanomelanin. Phân tích đánh giá mô học của các mẫu gan ở các nhóm chuột thấy có sự khác biệt giữa các nhóm được điều trị và không được điều trị nanomelanin. Ở nhóm chuột được chiếu xạ (IR) mức liều 6 Gy, số lượng mẫu xuất hiện viêm gan mức độ vừa chiếm 20%, mức độ nhẹ và có sung huyết là 80%. Ở nhóm được tiêm nanomelanin mức liều 40 mg/kg thể trọng, mức độ viêm gan giảm rõ rệt, chuột chỉ bị viêm gan mức độ nhẹ, các tế bào gan xuất hiện thoái hóa, số lượng mẫu không bị viêm gan chiếm 20%. Trong khi đó, ở nhóm không được chiếu xạ, chỉ gây u (NC), 100% chuột bị viêm gan mức độ vừa và nặng. Điều này cho thấy nanomelanin mức liều điều trị 40 mg/kg thể trọng có tác dụng hạn chế tình trạng viêm gan.

2. Thay đổi trọng lượng, thể tích khối u trong quá trình điều trị



Hình 1: Chuột được gây u bằng sarcoma 180 ở lưng (A, B); Trọng lượng chuột thay đổi theo thời gian trong quá trình điều trị (C); Thể tích khối u trong quá trình điều trị (D).

Theo dõi cân nặng và sự phát triển của khối u trong 25 ngày điều trị (*hình 1C, D*): Trọng lượng chuột tăng dần cho đến sau ngày thứ 10, chuột được chiếu xạ mức liều 6 Gy. Sau chiếu xạ, trọng lượng chuột ở nhóm IR và IR + MEL giảm. Đến ngày thứ 15, trọng lượng chuột tăng trở lại. Kích thước khối u ở nhóm NC tăng dần theo thời gian (*hình 1D*). Kích thước khối u ở các nhóm chuột được chiếu xạ (IR và IR + MEL) đều giảm so với nhóm NC.

Sau ngày thứ 25, kích thước khối u ở nhóm IR + MEL giảm 80% so với nhóm NC ($p < 0,01$) và giảm 45% so với nhóm IR ($p < 0,05$). Điều này cho thấy, nanomelanin có tác dụng ức chế sự phát triển của khối u sarcoma 180. Kết quả

này tương tự nghiên cứu trước đây của chúng tôi khi sử dụng nanomelanin trên mô hình chuột gây khối ung thư phổi [6].

3. Kết quả phân tích các enzyme chức năng gan

Đánh giá, phân tích và định lượng mẫu máu của các nhóm chuột theo 2 chỉ số men aspartate aminotransferase (AST) hay còn gọi là glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) và men alanine aminotransferase (ALT) hay còn gọi là glutamic-pyruvic transaminase (GPT). Nồng độ AST và ALT được xem là dấu ấn sinh học dễ nhận thấy trong việc đánh giá chức năng sinh học của gan và tham gia vào quá trình trao đổi chuyển hóa các nhóm amino acid [7].

Bảng 2: Chỉ số AST và ALT của các nhóm chuột.

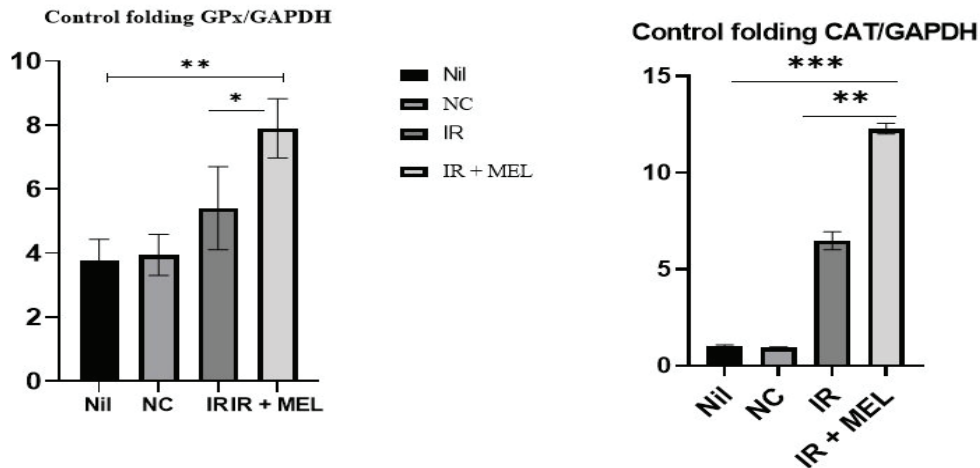
Enzyme	Đơn vị	Nhóm chuột			
		NIL	NC	IR	IR + MEL
AST (GOT)	U/l	253,1 ± 20,2	175,6 ± 24,3	163 ± 45,6	206,4 ± 21,5
ALT (GPT)	U/l	66,6 ± 12,3	41,8 ± 10,3	49,3 ± 7,4	56,4 ± 12,2

Chỉ số AST ở nhóm NC, IR và IR + MEL đều giảm so với nhóm NIL ($p < 0,05$), do đây là các nhóm chuột đã bị gây u. Nhóm NC có chỉ số AST và ALT rất thấp. Sau xạ trị, nồng độ AST ở các nhóm IR và IR + MEL đều tăng so với nhóm NC ($p < 0,05$), tuy nhiên nồng độ ALT không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm NC.

4. Kết quả đánh giá mức độ biểu hiện gen mã hóa các enzyme CAT, GPx ở mô gan

Các mẫu gan ở các nhóm chuột được tách ARN, tổng hợp cDNA và sử dụng kỹ thuật RT-PCR để đánh giá ảnh hưởng của nanomelanin đến mức độ biểu hiện gen mã hóa các enzyme CAT và GPx. Enzyme CAT (Catalase) là một protein có kích thước 240 kDa với 4 tiểu phần đơn vị bằng nhau, mỗi tiểu phần có kích thước 60 kDa. CAT là một enzyme đóng vai trò kháng oxy hóa và có mặt ở mọi cơ quan của cơ thể sống. Enzyme sử dụng sắt hoặc đồng như là một cofactor và xúc tác quá trình phân hủy H_2O_2 thành phân tử nước và oxy. Đây là một cơ chế quan trọng trong hàng rào bảo vệ cơ thể sống chống lại các gốc tự do. GPx là một enzyme nội bào có khả năng phân

hủy H₂O₂ và lipid peroxides thành các gốc rượu tương ứng ở ty thể, đôi khi ở cytosol. CAT và GPx là 2 enzyme có vai trò quan trọng trong cơ chế bảo vệ cơ thể trước ảnh hưởng của các gốc tự do nội sinh hay ngoại sinh [8, 9].



Hình 2: Ảnh hưởng của nanomelanin đến tăng mức độ biểu hiện gen của CAT và GPx ở các mẫu gan.

Sau quá trình chiếu xạ, các gen mã hóa 2 enzyme CAT và GPx đều tăng đáng kể so với nhóm chứng ($p < 0,01$), nguyên nhân do quá trình chiếu xạ phá hủy DNA của tế bào tạo nên rất nhiều gốc tự do (ROS). Các gen mã hóa những enzyme này tăng lên cho thấy cơ thể đang phản ứng lại với việc tăng đột ngột các gốc tự do sau chiếu xạ. Các enzyme CAT và GPx được tổng hợp sẽ tăng cường các phản ứng tự bảo vệ cơ thể để giảm thiểu tình trạng căng thẳng gây nên bởi nồng độ ROS vượt quá ngưỡng cân bằng [10].

Ở nhóm IR + MEL, mức độ biểu hiện gen mã hóa enzyme CAT và GPx tăng tương ứng 1,89 và 1,5 lần so với nhóm IR ($p < 0,05$). Điều này cho thấy nanomelanin có khả năng bảo vệ các tế bào gan thông qua việc làm tăng mức độ biểu hiện gen mã hóa các enzyme có vai trò kháng oxy

hóa trong cơ thể chuột sau quá trình chiếu xạ.

Trong những năm gần đây, vai trò của melanin được nghiên cứu ở nhiều khía cạnh. Các tiềm năng của melanin như khả năng kháng oxy hóa, chống tan máu, kháng ung thư có thể ứng dụng trong dược phẩm [11]. Vai trò giảm tình trạng viêm gan khi kết hợp với hạt nano vàng là một tác dụng khác của melanin [12].

Kết quả nghiên cứu ban đầu đã chỉ ra nanomelanin có khả năng làm giảm tình trạng viêm gan và sự phát triển kích thước khối u sarcoma 180 trên mô hình chuột mang khối ung thư được xạ trị. Tăng mức độ biểu hiện của các enzyme CAT và GPx sau khi chiếu xạ có thể là một trong những lý do giúp cải thiện tình trạng viêm gan ở các nhóm chuột được điều trị bằng nanomelanin.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu bước đầu thử nghiệm khả năng bảo vệ mô gan của hạt nanomelanin kích thước 80 - 200 nm trên mô hình xạ trị ung thư ở chuột nhất trắng. Nanomelanin mức liều 40 mg/kg thể trọng có tác dụng giảm nhẹ mức độ tổn thương của các tế bào gan. Đồng thời, khi chuột được điều trị bằng nanomelanin giúp phục hồi nhẹ men gan AST ($p < 0,05$) và tăng mức độ biểu hiện gen CAT, GPx tương ứng 1,89 và 1,5 lần trong các tế bào mô gan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Travis LB, Hodgson D, Allan JM, Van Leeuwen FE. Second Cancers. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. Cancer: Principles and practice of oncology. 8th edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2004; 3(4):294-300.
2. Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102(20): 1536-1546.
3. Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(4):277-284.
4. Pico JL, Avila-Garavito A, Naccache P. Mucositis: Its occurrence, consequences, and treatment in the oncology setting. *Oncologist* 1998; 3(6):446-451.
5. Tetsuo Nakajima, Yasuharu Ninomiya, Mitsuru Neno. Radiation-induced reactions in the liver-modulation of radiation effects by lifestyle-related factors. *International Journal of Molecular Science* 2018; 19(12):3855.
6. Nguyen Thi Le Na, Sai Duc Loc, Nguyen Le Minh Tri, Nguyen Thi Bich Loan, Ho Anh Son, Nguyen Linh Toan, Ha Phuong Thu, Hoang Thi My Nhung, Nguyen Lai Thanh, Nguyen Thi Van Anh, Nguyen Dinh Thang. Nanomelanin potentially protects the spleen from radiotherapy-associated damage and enhances immunoactivity in tumor-bearing mice. *Materials* 2019; 12(10):1725.
7. Sookoian S, Pirola CJ. Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: From systems biology to the personalized medicine. *World J Gastroenterol* 2015; 21:711-725.
8. OM Ighodaroab, OA Akinloyeb. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 2019; 54(4):287-293.
9. Agnieszka Małgorzata Pudlarz, Ewa Czechowska, Michał S Karbownik, Katarzyna Ranhoszek-Soliwoda, Emilia Tomaszewska, Grzegorz Celichowski, Jarosław Grobelny, Ewa Chabielska, Anna Gromotowicz-Popławska, Janusz Szemraj. The effect of immobilized antioxidant enzymes on the oxidative stress in UV-irradiated rat skin. *Nanomedicine*. 2019; 15(1):166.
10. Úrsula Muñoz Morón, Inma Castilla-Cortázar. Protection against oxidative stress and IGF-I deficiency conditions. *Antioxidant Enzyme*. Mohammed Amr El-Missiry, IntechOpen 2012. DOI: 10.5772/51047.
11. Noura El-Ahmady El-Naggar, Sara M El-Ewasy. Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. *Scientific Reports* 2017; 7:42129. DOI: 10.1038/srep42129.
12. Mohamed Anwar K Abdelhalim, Sherif A Abdelmottaleb Moussa, Huda AY Qaid, Mohammed Suliman Al-Ayed. Effect of melanin on gold nanoparticle-induced hepatotoxicity and lipid peroxidation in rats. *Int J Nanomedicine* 2018; 13:5207-5213.