

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ
ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ
HỒ CHÍ MINH



HUỲNH BẠCH CÚC

TÁC DỤNG CỦA HYPOXIC EXOSOME TỪ
TẾ BÀO GỐC MÔ MỠ NGƯỜI TRÊN
MÔ HÌNH LÃO HÓA DA DO TIA CỰC TÍM

Ngành: Nội khoa (Da liễu)

Mã số: 9720107

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH – NĂM 2026

Công trình được hoàn thành tại:

Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. Văn Thế Trung

PGS.TS. Phạm Văn Phúc

Phản biện 1:

Phản biện 2

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm
luận án cấp trường họp tại

vào hồi giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Khoa học Tổng hợp
- Thư viện Đại học

1. Giới thiệu luận án:

a. Lý do và tính cần thiết của nghiên cứu

Lão hóa da là quá trình biến đổi cấu trúc và chức năng sinh lý của da dưới tác động của yếu tố nội sinh và ngoại sinh. Trong các yếu tố ngoại sinh, ánh sáng mặt trời, đặc biệt là tia cực tím (ultraviolet-UV), đóng vai trò quan trọng làm khởi phát sớm và trầm trọng thêm tình trạng lão hóa da. Nghiên cứu cho thấy hơn 80% các dấu hiệu lão hóa da có liên quan đến tiếp xúc với tia UV. Lão hóa da do tia UV không chỉ gây ảnh hưởng thẩm mỹ mà còn làm suy giảm chức năng sinh lý của da. Các phương pháp điều trị và phòng ngừa lão hóa da hiện nay còn hạn chế về hiệu quả và tồn tại nhiều tác dụng phụ.

Exosome từ tế bào gốc trung mô (mesenchymal stem cell: MSC) là phương pháp sinh học mới cho thấy tiềm năng cải thiện lão hóa da. Tuy nhiên, việc ứng dụng còn nhiều trở ngại, chủ yếu liên quan đến sản lượng exosome thu nhận còn hạn chế cũng như hoạt tính sinh học của các thành phần chứa trong exosome chưa đạt mức tối ưu. Nuôi cấy MSC trong điều kiện oxy thấp có kiểm soát (1% O₂ – hypoxia) là phương pháp đang được sử dụng khá phổ biến để tăng sản lượng và tăng cường hiệu quả điều trị của exosome (hypoxic exosome). Thông qua trục HIF-1 α , hypoxic exosome được gia tăng hoạt tính bằng cách thay đổi thành phần, từ đó tăng tác dụng sinh học.

Cho đến nay, vẫn chưa có nghiên cứu đánh giá vai trò của hypoxic exosome từ tế bào gốc trung mô từ mô mỡ (adipose-

derived stem cell: ADSC) trong điều trị lão hóa da. Câu hỏi đặt ra là hypoxic exosome từ ADSC (hypADSC-Exo) có cải thiện lão hóa da do tia UV trên mô hình *in vitro* và *in vivo* không? Để trả lời cho câu hỏi trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu “Tác dụng của hypoxic exosome từ tế bào gốc mô mỡ người trên mô hình lão hóa da do tia cực tím”.

b. Mục tiêu nghiên cứu

Nghiên cứu bao gồm 4 mục tiêu:

1. Tạo được nguyên bào sợi người lão hóa do tia cực tím;
2. Tạo được mô hình chuột BALB/c lão hóa da do tia cực tím;
3. Đánh giá được tác dụng của hypoxic exosome từ tế bào gốc mô mỡ người trên nguyên bào sợi người lão hóa do tia cực tím;
4. Đánh giá được tác dụng của hypoxic exosome từ tế bào gốc mô mỡ người trên mô hình chuột lão hóa da do tia cực tím.

c. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: (1) nguyên bào sợi người, (2) chuột BALB/c, (3) hypoxic exosome từ ADSC người.

- Phương pháp nghiên cứu:

(1) hypADSC-Exo được phân lập từ dịch nuôi ADSC trong điều kiện oxy 1%;

(2) Mô hình nguyên bào sợi lão hóa được thiết lập bằng chiếu tia UVA kết hợp UVB;

(3) Mô hình chuột lão hóa da được thiết lập bằng chiếu tia UVA kết hợp UVB;

(4) Nguyên bào sợi lão hóa được xử lý với hypADSC-Exo liều 10 $\mu\text{g/mL}$ một lần và đánh giá sự thay đổi các dấu hiệu lão hóa;

(5) Chuột lão hóa da được điều trị bằng thoa hypADSC-Exo liều 50 $\mu\text{g/mL}$ (Exo1) và 100 $\mu\text{g/mL}$ (Exo2), hai lần/tuần trong 6 tuần và đánh giá sự thay đổi các dấu hiệu lão hóa.

d. Những đóng góp mới của nghiên cứu về mặt lý luận và thực tiễn

(1) Thiết lập thành công mô hình nguyên bào sợi lão hóa với một lần chiếu kết hợp tia UVA/ UVB với liều chiếu thấp;

(2) Thiết lập thành công mô hình chuột BALB/c lão hóa da bằng chiếu kết hợp tia UVA/ UVB trong 12 tuần;

(3) Nghiên cứu đóng góp bằng chứng cho thấy hypADSC-Exo có khả năng cải thiện lão hóa nguyên bào sợi và lão hóa da do tia UV ở chuột BALB/c;

(4) Về mặt thực tiễn, nghiên cứu là cơ sở cho các nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng trên người.

e. Bố cục của luận án

Luận án bao gồm 149 trang, trong đó Đặt vấn đề: 2 trang, Tổng quan tài liệu: 35 trang, Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: 36 trang, Kết quả: 38 trang, Bàn luận: 35 trang, Kết luận và Kiến nghị: 3 trang. Luận án có 05 bảng, 28 hình, 20 biểu đồ, 262 tài liệu tham khảo tiếng Anh và 03 tài liệu tham khảo tiếng Việt.

2. Tổng quan tài liệu

2.1. Lão hóa da do tia cực tím

Tia UV gây nhiều tác động trực tiếp và gián tiếp lên tất cả các

thành phần của da, bao gồm các tế bào trong lớp thượng bì, lớp bì và hạ bì, tạo nên tất cả các thay đổi ở da lão hóa. Gần 50% tác động gián tiếp do tia UV đến từ việc hình thành các gốc oxy phản ứng (ROS), trong khi tác động phá hủy trực tiếp lên tế bào và những cơ chế khác chiếm phần còn lại.

Cơ chế của lão hóa da do tia UV bao gồm nhiều yếu tố phức tạp như hiện tượng đột biến DNA ti thể do tia UV, dẫn đến lão hóa và mất chức năng tế bào; sự rút ngắn telomere là kết quả của đáp ứng với sự phá hủy DNA tế bào; stress oxy hóa; viêm mạn tính và thoái giáng chất nền ngoại bào (extracellular matrix: ECM). Lão hóa da do tia UV xảy ra do sự giảm tổng hợp và tăng thoái giáng ECM. Hậu quả gây mất collagen và tăng lắng đọng các sản phẩm thoái biến elastin bất thường trong lớp bì theo thời gian.

2.2. Mô hình nguyên bào sợi lão hóa do tia cực tím

Một số phương pháp được sử dụng để gây lão hóa tế bào trong các thí nghiệm *in vitro* bao gồm chiếu tia UV, sử dụng đồng sulfate, hydrogen peroxyde hoặc Cyr61/CCN1. Các phương pháp gây lão hóa tế bào bằng hóa chất có ưu điểm là thời gian tác động nhanh và tạo ra các tế bào lão hóa đồng đều. Trong khi đó, phương pháp chiếu UV giúp tạo ra mô hình lão hóa tế bào tương tự trên da người lão hóa do UV, là tác nhân chủ yếu gây lão hóa ngoại sinh. Các nghiên cứu gây lão hóa tế bào bằng chiếu tia UV chủ yếu sử dụng cường độ năng lượng thấp, dưới liều gây độc tế bào, với thời gian chiếu lặp lại nhiều lần.

2.3. Mô hình chuột lão hóa da do tia cực tím

Chuột được sử dụng để tạo mô hình lão hóa da vì sự tương đồng trong cấu trúc da ở chuột và người. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy sự thay đổi các cytokine sau chiếu tia UVB ở da chuột có sự tương đồng với da người, vì vậy, kết quả nghiên cứu trên chuột có thể ngoại suy trên người.

Đa số các nghiên cứu trên chuột không lông cho thấy khi chiếu tia UVB ở cả liều dưới ngưỡng gây đỏ da và liều cao hơn với thời gian chiếu khác nhau đều có khả năng gây lão hóa da. Trong đó, tia UVB có khuynh hướng hình thành nếp nhăn da và gây hiện tượng dày thượng bì, mất collagen và thoái giáng sợi đàn hồi trên mô học. Trong khi đó, tia UVA chủ yếu gây chảy xệ và hình thành thoái giáng sợi đàn hồi trên mô học nhưng không làm mất nhiều collagen. Cả hai tia đều làm tăng các tế bào trong lớp bì trong thời gian đầu và tăng glycosaminoglycan. Khi ngưng chiếu, tình trạng lão hóa không có dấu hiệu phục hồi sau nhiều tuần. Chính vì sử dụng nhiều loại chuột và phương pháp chiếu khác nhau với sự dao động kết quả lớn, cho đến nay vẫn chưa có quy trình thiết lập và liều UV chuẩn để tạo mô hình lão hóa da trên chuột.

2.4. Tác dụng của hypoxic exosome từ ADSC trong điều trị lão hóa da do tia cực tím

Vai trò của exosome từ ADSC (ADSC-Exo) trong phòng ngừa và điều trị lão hóa da do ánh sáng đã được chứng minh qua một số nghiên cứu. Nghiên cứu *in vitro* cho thấy ADSC-Exo

được nguyên bào sợi thu nhận và kích thích sự tăng sinh, di chuyển và tổng hợp collagen loại I, elastin và tiết yếu tố tăng trưởng tế bào tạo sừng ở những liều khác nhau. Bên cạnh đó, ADSC-Exo cũng bảo vệ da khỏi tác hại gây lão hóa từ tia UVB thông qua ức chế tổn thương DNA, điều chỉnh nồng độ gốc oxy tự do và matrix metalloproteinase-1 (MMP)-1 thông qua con đường Nrf2 và MAPK/AP-1. Exosome cũng hoạt hóa con đường TGF- β /Smad để tăng biểu hiện của procollagen loại I.

Tuy nhiên, việc nuôi cấy để thu được exosome tinh khiết với nồng độ đủ lớn tạo nên tác động sinh học trên lâm sàng là một thách thức. Để gia tăng số lượng cũng như hoạt tính các thành phần sinh học của exosome, khuynh hướng hiện nay là sử dụng exosome từ tế bào gốc tự nhiên được chỉnh sửa. Trong đó, nuôi cấy tế bào trong môi trường có nồng độ oxy thấp (hypoxia, 1–5% O₂) là một phương pháp tương đối đơn giản đang được sử dụng khá rộng rãi và mang lại hiệu quả cao.

Hypoxic exosome có khuynh hướng kích thích tăng sinh mạch máu, giảm đại thực bào M1 và tăng đại thực bào M2, mang nhiều chất dinh dưỡng đến vị trí thiếu oxy, đồng thời tăng tổng hợp ECM. Vì vậy, các nghiên cứu ứng dụng hypoxic exosome trong da liễu hiện tại chủ yếu liên quan đến tác dụng kích thích tăng sinh mạch máu và thúc đẩy lành vết thương. Tuy nhiên, từ một số đặc tính đã được xác định, hypoxic exosome cho thấy tiềm năng tác động cải thiện lão hóa da do tia UV thông qua một số cơ chế như kích thích tăng sinh nguyên bào sợi, kích thích nguyên

bào sợi tăng tiết collagen và ECM, kích thích tăng sinh mạch máu, giảm stress oxy hóa và kháng viêm. Hypoxic exosome chứa những thành phần đặc hiệu như các miRNA cảm ứng bởi HIF-1 α (miRNA-210), các mRNA gen đích của HIF-1 α , nhiều protein khác liên quan chuyển hóa, tăng sinh mạch máu như VEGF và HSP.

2.5. Nghiên cứu về tác dụng của hypoxic exosome từ ADSC trong điều trị lão hóa da do tia cực tím

Cho đến nay, chưa có nghiên cứu đề cập đến vai trò của hypADSC-Exo trong điều trị lão hóa da do tia UV. Các nghiên cứu cho thấy tiềm năng của hypADSC-Exo trong cải thiện lão hóa da đến từ kết quả của các nghiên cứu về tác dụng của hypADSC-Exo trong kích thích lành thương.

Năm 2024, nghiên cứu của Yanting Liu và cộng sự ghi nhận tác dụng của hypADSC-Exo chuột trong phòng ngừa tổn thương da cấp tính do tia UV trên chuột BALB/c. Nghiên cứu trên có những điểm khác biệt so với nghiên cứu của chúng tôi. Thứ nhất, nghiên cứu trên sử dụng hypADSC-Exo từ chuột đã được bảo quản đông lạnh trong môi trường -80°C. Trong khi chúng tôi sử dụng hypADSC-Exo tươi từ người. Thứ hai, nghiên cứu trên chỉ đánh giá một số tổn thương da cấp ở chuột do chiếu tia UVB như các yếu tố gây viêm, ROS và sự thoái giáng collagen I. Trong khi đó, chúng tôi tập trung đánh giá các đặc điểm tổn thương da đặc trưng của lão hóa do tia UV. Ngoài ra, can thiệp được thực hiện trong nghiên cứu trên theo hướng dự phòng bằng tiêm trong phúc

mặc trước khi chiếu UV, khác biệt với phương pháp điều trị bằng đường thoa trong nghiên cứu của chúng tôi. Vì vậy, nghiên cứu của chúng tôi mang tính mới và không trùng lặp với các nghiên cứu trước đó.

3. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

3.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu tiền lâm sàng, *in vitro* và *in vivo*, ngẫu nhiên, có đối chứng.

3.2. Đối tượng nghiên cứu

- Nguyên bào sợi được phân lập từ mẫu da bụng của người cho thu nhận sau phẫu thuật thẩm mỹ.

- Chuột BALB/c cái, 6-8 tuần tuổi, được cung cấp bởi Viện Tế bào gốc, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

- Hypoxic exosome được tách chiết từ nguồn tế bào gốc trung mô từ mô mỡ người (hADSC), được phân lập từ mô mỡ do Bệnh viện Thẩm mỹ Emcas cung cấp, đơn vị được cấp Giấy phép hoạt động ngân hàng mô số 15/BYT-GPHĐNHM.

3.3. Cỡ mẫu nghiên cứu cho thí nghiệm trên động vật

- Cỡ mẫu cho mục tiêu 2:

Mục tiêu 2 gồm 3 nhóm thí nghiệm ($k=3$), đo lường lặp lại 6 lần (tuần 0, 4, 6, 8, 12, 20), có sinh thiết chuột tại mỗi lần đo ($r=6$). Áp dụng công thức trên, tổng số cá thể chuột (N) cần cho mục tiêu 2 là 36 (12 con/lô), hiệu chỉnh cho tỉ lệ tổn thất chuột 15%, tổng sau cùng là 45 cá thể (15 con/lô). Lặp lại thí nghiệm 2

lần, tổng là 90 cá thể chuột. Nghiên cứu tiền cứu sử dụng thêm 50 cá thể.

- Cỡ mẫu cho mục tiêu 4:

Mục tiêu 4 gồm 6 nhóm thí nghiệm ($k=6$), đo lường lặp lại 4 lần (tuần 0, 2, 4, 6), có sinh thiết chuột tại mỗi lần đo ($r=4$). Áp dụng công thức trên, tổng số cá thể chuột (N) cần là 48 (8 con/lô), hiệu chỉnh cho tỉ lệ tổn thất chuột 15%, tổng sau cùng là 60 cá thể (10 con/lô). Lặp lại thí nghiệm 2 lần, tổng là 120 cá thể chuột. Nghiên cứu tiền cứu sử dụng thêm 50 cá thể.

Tổng số cá thể chuột cần cho toàn bộ nghiên cứu là 310 cá thể.

3.4. Phương pháp nghiên cứu

- hypADSC-Exo được phân lập từ dịch nuôi ADSC và được định danh thông qua khảo sát hình dạng bằng kính hiển vi truyền qua (TEM); xác định nồng độ và kích thước bằng kỹ thuật phân tích hạt nano (NTA); định danh dấu ấn bề mặt CD9, CD63, CD81 bằng kỹ thuật phân tích tế bào theo dòng chảy (FCM);

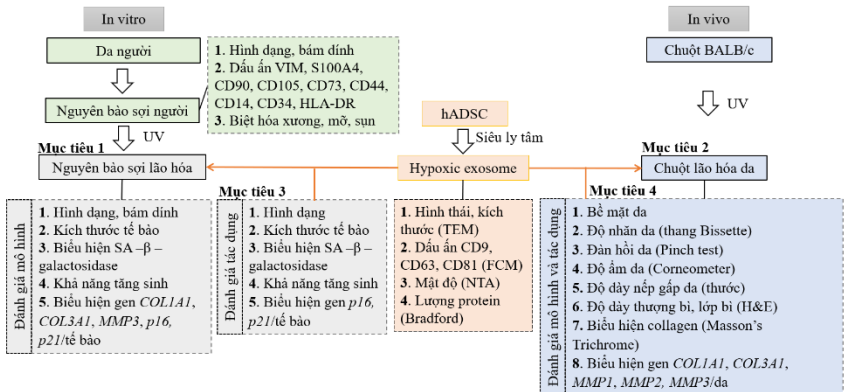
- Nguyên bào sợi được gây lão hóa bằng chiếu tia UVA/UVB một lần trong 15 phút;

- Chuột BALB/c được gây lão hóa da bằng chiếu tia UVA/UVB bốn ngày/ tuần trong 12 tuần liên tiếp;

- hypADSC-Exo 10 $\mu\text{g/mL}$ được xử lý một lần trên nguyên bào sợi lão hóa và đánh giá các tiêu chí lão hóa tế bào thông qua hình dạng, kích thước, khả năng tăng sinh của tế bào, biểu hiện men SA- β -galactosidase, biểu hiện gen mã hóa p16 và p21;

- hypADSC-Exo 50 $\mu\text{g/mL}$ và 100 $\mu\text{g/mL}$ được thoa trên vùng da lão hoá của chuột 2 lần/ tuần trong 6 tuần. Tác dụng cải thiện lão hóa da được đánh giá thông qua thay đổi độ nhăn, độ dày, độ đàn hồi, độ ẩm da; độ dày thượng bì và lớp bì, mật độ collagen; biểu hiện gen mã hoá collagen 1, collagen 3, MMP-1, MMP-2 và MMP-3.

3.5. Quy trình nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

4. Kết quả

4.1. Định danh hypoxic exosome từ dịch nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ mô mỡ

Hình ảnh qua TEM cho thấy hypADSC-Exo có dạng hình chiếc cốc. Lượng protein exosome phân lập được từ 100 mL dịch nuôi cấy ADSC ban đầu là 80,4 μg , ghi nhận bằng phương pháp nhuộm Bradford. Kích thước trung bình của hypADSC-Exo là $102,3 \pm 35,4$ nm, nồng độ exosome là $7,02 \times 10^{10}$ hạt/mL, đánh

giá bằng NTA. Những hạt nano thu được biểu hiện dấu ấn bề mặt của exosome, bao gồm dương tính với CD9 ($52,78\% \pm 8,15\%$), CD63 ($95,23\% \pm 3,02\%$) và CD81 ($91,98\% \pm 5,50\%$), xác định bằng FCM. Như vậy, các hạt thu nhận được biểu hiện đặc tính của exosome.

4.2. Kết quả tạo nguyên bào sợi người lão hóa do tia cực tím

Hình dạng tế bào biểu hiện lão hóa và giảm mật độ sau 48, 72 và 96 giờ sau chiếu UV ở nhóm tế bào được chiếu với liều UV1 (UVB 780 mJ/cm^2 + UVA 480 mJ/cm^2 trong 10 phút) và UV2 (UVB 1170 mJ/cm^2 + UVA 720 mJ/cm^2 trong 15 phút) so với tế bào nhóm bình thường.

Kích thước tế bào lớn hơn và biểu hiện kiểu hình lão hóa khi bắt màu xanh dương với thuốc nhuộm SA- β -galactosidase ở cả hai nhóm UV1 và UV2 so với tế bào nhóm bình thường. Số lượng tế bào biểu hiện kiểu hình lão hóa tăng dần sau 48, 72 và 96 giờ, biểu hiện ở nhóm UV2 rõ hơn nhóm UV1.

Khả năng tăng sinh của tế bào thấp hơn ở nhóm UV1 và UV2 so với nhóm bình thường tại thời điểm 72 giờ sau chiếu, nhóm UV2 giảm tăng sinh nhiều hơn nhóm UV1. Sự khác biệt duy trì đến ngày 8 sau chiếu UV.

Biểu hiện gen mã hóa collagen I và collagen III giảm, trong khi biểu hiện gen mã hóa MMP-3, p16, p21 tăng ở nhóm chiếu liều UV2 so với nhóm bình thường. Tóm lại, nguyên bào sợi lão hoá được thiết lập thành công ở liều UV2 sau một lần chiếu trong 15 phút.

4.3. Kết quả tạo mô hình chuột BALB/c lão hóa da do tia cực tím

Nếp nhăn ngang trên lưng chuột biểu hiện nhiều hơn ở nhóm chiếu liều UV2 (2 MED) so với nhóm UV1 (1 MED) và nhóm bình thường tại thời điểm 12 tuần sau chiếu.

Điểm nhăn theo thang Bissette ở nhóm UV1 và UV2 tăng có ý nghĩa so với nhóm bình thường ở tuần 4, 6, 8 và 12.

Độ dày nếp gấp da tăng trong khi độ đàn hồi và độ ẩm da giảm ở nhóm UV1 và UV2 so với nhóm bình thường, khác biệt có ý nghĩa ở tuần 12.

Độ dày thượng bì và lớp bì tăng, trong khi mật độ collagen giảm ở nhóm UV2 so với nhóm bình thường, khác biệt có ý nghĩa tại tuần 8 và tuần 12. Nhóm UV1 không thể hiện rõ xu hướng.

Mức biểu hiện mRNA của *COL1A1* và *COL3A1* giảm và của *MMPI1*, *MMP2* và *MMP3* tăng ở nhóm UV2 so với nhóm bình thường không chiếu UV, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại tuần 12. Tóm lại, mô hình chuột BALB/c lão hoá da được thiết lập thành công khi chiếu liều UV2 bốn lần/tuần trong 12 tuần liên tiếp.

4.4. Tác dụng của hypoxic exosome từ tế bào gốc mô mỡ người trên nguyên bào sợi người lão hóa da do tia cực tím

Nguyên bào sợi ở nhóm điều trị với hypADSC-Exo có sự phục hồi một phần hình dạng lão hóa, giảm hoạt động men SA- β -galactosidase và giảm kích thước tế bào so với nhóm điều trị

với PBS tại thời điểm 48 giờ và 72 giờ.

Nguyên bào sợi ở nhóm điều trị với hypADSC-Exo được kích thích khả năng tăng sinh tạm thời sau 24 và 48 giờ xử lý, đồng thời giảm biểu hiện gen mã hoá p16 và p21 ở tế bào so với nhóm điều trị với PBS.

Tóm lại, hypADSC-Exo liều 10 $\mu\text{g/mL}$ có khả năng cải thiện kiểu hình và kiểu gen lão hoá ở nguyên bào sợi sau xử lý 48 giờ.

4.5. Tác dụng của hypoxic exosome từ tế bào gốc mô mỡ trên chuột lão hóa da do tia cực tím

Điểm nhấn giảm có ý nghĩa thống kê ở chuột lão hoá da được điều trị với hypADSC-Exo liều 100 $\mu\text{g/mL}$ so với nhóm không được điều trị và nhóm điều trị với PBS.

Ngoài ra, hypADSC-Exo ở cả hai liều còn làm tăng độ ẩm, tăng độ đàn hồi và giảm độ dày nếp gấp da ở da lão hoá do tia UV, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm không điều trị và điều trị với PBS tại tuần thứ 4 và thứ 6.

Trên mô học, độ dày thượng bì và lớp bì giảm ở nhóm điều trị với hypADSC-Exo liều 100 $\mu\text{g/mL}$ so với nhóm không điều trị và điều trị với PBS. Mật độ collagen giảm có ý nghĩa thống kê trong cả hai nhóm điều trị với hypADSC-Exo so với nhóm không điều trị và điều trị với PBS.

Mức độ biểu hiện mRNA *COL1A1* và *COL3A1* ở nhóm điều trị với hypADSC-Exo liều 100 $\mu\text{g/mL}$ cao hơn so với chỉ số tương tự ở nhóm điều trị với hypADSC-Exo liều 50 $\mu\text{g/mL}$, mặc dù sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Trong khi đó,

biểu hiện của *MMPI*, *MMP2* và *MMP3* ở nhóm điều trị với hypADSC-Exo liều 100 µg/mL thấp hơn so với nhóm bình thường và nhóm UV. Tóm lại, hypADSC-Exo ở liều 100 µg/mL (Exo2) có khả năng cải thiện lão hoá da do tia cực tím trên chuột ở mức độ bề mặt da, mô học và phân tử.

5. Bàn luận

5.1. Định danh hypoxic exosome từ dịch nuôi cấy tế bào gốc trung mô từ mô mỡ

Hình dạng của các hạt thu được ghi nhận qua TEM là hình chiếc cốc, tương tự với hình dạng của hypoxic exosome từ ADSC trong các nghiên cứu trước đó. Nồng độ hypoxic exosome ghi nhận được bằng NTA là 7×10^{10} hạt/mL, cao hơn báo cáo trước đó với nồng độ là $15,98 \times 10^8$ hạt/mL. Sự khác biệt về số lượng hạt có thể do nồng độ oxy khác nhau giữa hai nghiên cứu.

Tỉ lệ dương tính các dấu ấn CD9, CD63 và CD81 của hypoxic exosome từ ADSC trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn các nghiên cứu trước đó. Như vậy, quy trình phân lập exosome trong nghiên cứu của chúng tôi có khả năng thu nhận được các hạt đáp ứng tiêu chuẩn của exosome với số lượng tương đối cao để sử dụng cho các thí nghiệm điều trị tiếp theo.

5.2. Mô hình nguyên bào sợi người lão hóa do tia cực tím

Liều UVB 1,17 J/cm² + UVA 0,72 J/cm² làm thay đổi hình dạng tế bào thành dạng lão hóa như hình đa giác, dẹt hơn; tăng hoạt tính của men SA-β-galactosidase và giảm hoạt động chuyển hóa tế bào. Đồng thời, kết quả ghi nhận tế bào có xu hướng giảm

biểu hiện mRNA của *COL1A1*, *COL3A1* và tăng biểu hiện mRNA của *MMP3*, *p16* và *p21*. Các đặc điểm lão hóa này tương tự với ghi nhận từ những nghiên cứu trước đó.

Quy trình chiếu UV trong nghiên cứu của chúng tôi có một số khác biệt so với các nghiên cứu trước. Liều UV sử dụng trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn giúp ngăn hiện tượng độc tế bào. Giải thích cho mức liều thấp đến từ việc nghiên cứu của chúng tôi sử dụng phối hợp đồng thời hai loại tia UVA và UVB nhằm mục đích mô phỏng tác động tương tự ánh sáng mặt trời. Vì vậy, chúng tôi có thể tạo ra mô hình lão hóa tế bào với liều UV thấp nhằm gây ảnh hưởng giống như trong lão hóa tự nhiên.

Nghiên cứu cũng tạo ra tế bào lão hóa trong thời gian chiếu ngắn là 15 phút, một lần duy nhất, giúp tối ưu hóa quy trình thiết lập. Mốc thời gian phù hợp để bắt đầu đánh giá lão hóa tế bào là 72 giờ sau chiếu và thời gian đánh giá tốt nhất kéo dài 3 ngày sau đó.

5.3. Mô hình chuột lão hoá da do tia cực tím

Liều UVA 1080 mJ/cm² và UVB 115,2 mJ/cm² (tương đương lô UV2) chiếu 4 ngày/tuần trong 12 tuần gây nên các đặc điểm lão hoá da ở chuột như hình thành các nếp nhăn sâu, tăng điểm nhăn da theo thang điểm Bissett, tăng độ dày nếp gấp da, giảm độ ẩm và độ đàn hồi da. Ngoài ra, độ dày lớp thượng bì và lớp bì cũng tăng ở nhóm chiếu UV, tương tự các nghiên cứu trước.

Thượng bì dày được cho rằng do đáp ứng ban đầu của các tế bào tạo sừng trong thượng bì với tia UV, thông qua hoạt hóa thụ

thể yếu tố tăng trưởng thượng bì (EGFR). Độ dày lớp bì tăng ở nhóm chiếu UV so với nhóm bình thường, có thể được giải thích do sự hình thành các nang bì, thoái giáng sợi đàn hồi và thay thế các sợi collagen bằng glycosaminoglycan trong lớp bì.

Trong nghiên cứu này, thoái giáng sợi đàn hồi quan sát được ở tuần thứ 12, tương đối phù hợp với nghiên cứu trước đó của tác giả Bissett khi thoái giáng sợi đàn hồi chỉ quan sát được sau thời gian dài tiếp xúc với UV, cụ thể là 16 tuần trong nghiên cứu trên. Những đặc điểm lão hóa này tương tự các dấu hiệu lão hóa do ánh sáng ghi nhận ở người.

Nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận ở giai đoạn đầu sau khi chiếu UV có sự tăng số lượng collagen thoát qua, sau đó collagen giảm dần khi tiếp xúc thời gian dài với tia UV. Các báo cáo trước đây cho thấy tia UV ban đầu kích thích tổng hợp collagen nhưng sau đó làm giảm tổng hợp collagen thay vì trực tiếp phá hủy collagen sau khi tiếp xúc thời gian dài.

Biểu hiện của gen mã hóa collagen I và collagen III giảm nhẹ, trong khi biểu hiện của các gen mã hóa MMP-1, MMP-2 và MMP-3 tăng lên trong nhóm tiếp xúc với liều UV2. Những phát hiện này phù hợp với các nghiên cứu trước đây, cho thấy sự lão hóa nguyên bào sợi và mất các kích thích cơ học ở các mô lão hóa có thể làm giảm quá trình tổng hợp collagen. Ngoài ra, chiếu tia UV còn làm tăng mức độ và hoạt động của MMP, dẫn đến sự phân hủy và phân mảnh các sợi collagen và elastin trong lớp bì

thông qua quá trình cảm ứng AP-1.

Tổng hợp lại, những kết quả này chứng minh rằng phương thức chiếu tia UVA+UVB trong nghiên cứu đã thiết lập thành công mô hình chuột lão hóa do ánh sáng.

5.4. Tác dụng của hypoxic exosome từ tế bào gốc mô mỡ người trên nguyên bào sợi người lão hóa do tia cực tím

Nhóm hypADSC-Exo ghi nhận ít tế bào lão hóa và nhiều tế bào trẻ hơn thể hiện qua hình dạng hình thoi và kích thước tế bào nhỏ. Kết quả thu được có thể được giải thích theo hai hướng. Thứ nhất, sau khi chiếu UV, các tế bào lão hóa vẫn tồn tại nhưng mất khả năng phân chia. Tuy nhiên, trong quần thể vẫn còn tồn tại một số tế bào không bị ảnh hưởng bởi tia UV do chúng tôi đã lựa chọn không đồng bộ hóa tế bào trước khi chiếu. Các tế bào này vẫn tiếp tục phân chia nhưng với tốc độ không đủ để bù đắp cho số lượng tế bào lão hóa. Tế bào lão hóa cũng tiết các chất tiết liên quan kiểu hình lão hoá gây ức chế tăng sinh hoặc kiềm hãm hoạt động của các tế bào lân cận, dẫn đến tổng số tế bào giảm dần ở nhóm không điều trị.

Sự tồn tại của các tế bào không bị ảnh hưởng bởi tia UV có thể được lí giải là do chỉ những tế bào đang trong pha S hoặc G1 của chu kì phân bào mới bị tia UV tác động và rơi vào trạng thái lão hóa, các tế bào ở pha khác vẫn có khả năng duy trì chức năng bình thường. Quan sát này phù hợp với nghiên cứu trước đó, trong đó các tế bào không bị tổn thương sau chiếu UV tiếp tục tăng sinh, trong khi các tế bào lão hóa vẫn tồn tại nhưng không

tăng sinh. Trong khi đó, ở nhóm được xử lý với hypADSC-Exo, các exosome có thể thúc đẩy quá trình tăng sinh của các tế bào không bị tổn thương bởi tia UV, góp phần làm gia tăng số lượng tế bào mới, biểu hiện là các tế bào trẻ dạng hình thoi.

Hướng lí giải thứ hai đặt ra giả thuyết rằng hypADSC-Exo có thể làm giảm biểu hiện lão hóa của các tế bào bị lão hóa do tia UV. Hình thái tế bào thay đổi theo hướng trẻ hơn sau điều trị gợi ý khả năng phục hồi chức năng của các tế bào lão hóa. Để kiểm chứng giả thuyết này, các thí nghiệm tiếp theo đã được thiết kế nhằm đánh giá sự cải thiện đặc điểm lão hóa tế bào sau khi xử lý với hypADSC-Exo.

Nguyên bào sợi được xử lý với hypADSC-Exo có mức biểu hiện SA- β -galactosidase thấp hơn so với nhóm đối chứng điều trị bằng PBS. Điều này cho thấy số lượng tế bào biểu hiện kiểu hình lão hóa giảm trong nhóm hypADSC-Exo, gợi ý rằng hypADSC-Exo có thể góp phần cải thiện biểu hiện lão hóa hoặc thúc đẩy quá trình trẻ hóa của các nguyên bào sợi già. Một số nghiên cứu trước đây sử dụng ADSC-Exo trong điều kiện đủ oxy cũng ghi nhận kết quả tương tự.

Mức độ biểu hiện của gen *p16* và *p21* giảm đáng kể ở nhóm được xử lý bằng hypADSC-Exo so với nhóm đối chứng PBS. Quan sát tương tự cũng được nhận thấy ở ADSC-Exo khi tác động lên HDF tổn thương do H₂O₂. Những kết quả này củng cố vai trò của hypADSC-Exo trong việc cải thiện tình trạng lão hóa

tế bào và thúc đẩy khả năng tăng sinh của HDF bị tổn thương do tia UV.

5.5. Tác dụng của hypoxic exosome từ tế bào gốc mô mỡ người trên chuột lão hóa da do tia cực tím

hypADSC-Exo liều 100 $\mu\text{g/mL}$ có khả năng cải thiện nếp nhăn bề mặt da lão hóa sau 6 tuần bôi. Những ghi nhận này tương tự với công bố của tác giả Huang Zhang năm 2024, trong nghiên cứu này, nếp nhăn ở da chuột lão hóa do tia UVB cũng cải thiện sau hai tuần điều trị bằng tiêm dưới da ADSC-EVs liều 200 μg /cá thể chuột.

Độ ẩm da của chuột ở nhóm điều trị hypADSC-Exo còn cho thấy xu hướng tăng từ tuần 0 đến tuần 6, trong khi độ dày da và thời gian phục hồi da giảm dần. Những kết quả này cho thấy hypADSC-Exo có thể tăng cường chức năng hàng rào bảo vệ da và phục hồi độ đàn hồi ở da lão hóa do tia UV, hiệu quả phụ thuộc vào liều sử dụng. Những nghiên cứu trước đây trên ADSC-Exo nuôi cấy trong điều kiện đủ oxy cũng cho thấy khả năng cải thiện một số đặc điểm chức năng của da lão hóa như giảm độ dày lớp thượng bì, cụ thể là giảm thành phần lớp sừng, và tăng độ dày lớp bì, tăng biểu hiện collagen I và giảm biểu hiện collagen III, MMP-1 và MMP-3.

Độ dày thượng bì ở da lão hóa giảm dần ở nhóm điều trị bằng hypADSC-Exo so với nhóm UV. Mặt khác, độ dày lớp bì giảm ở tuần 2 và tuần 4 nhưng duy trì ổn định từ tuần 4 đến tuần 6. Những thay đổi này có thể do hiện tượng giảm những khối sợi

elastin bất thường và glycosaminoglycan, thay bằng các cấu trúc sợi collagen ở giai đoạn sau nên độ dày lớp bì duy trì.

Kết quả cho thấy không có sự thay đổi đáng kể mật độ collagen ở hai tuần đầu sau điều trị giữa nhóm điều trị bằng hypADSC-Exo và nhóm UV. Tuy nhiên, tại tuần 4 và tuần 6, mật độ collagen ở nhóm điều trị với liều Exo2 cao hơn có ý nghĩa so với nhóm UV và UV+PBS, cho thấy liều Exo2 có tác động ưu thế. Những kết quả này tương tự phát hiện trong nghiên cứu của Huang Zhang khi túi ngoại bào từ ADSC có khả năng làm giảm độ dày thượng bì và phục hồi mật độ collagen ở da chuột lão hóa do tia UV. Kết quả trên cũng tương đồng với những phát hiện trong nghiên cứu của Yu-shuai Wang's, nghiên cứu này cho thấy exosome từ ADSC nuôi cấy trong môi trường đủ oxy có tăng biểu hiện miR-1246 hoặc LncRNA H19 có thể làm giảm sự hình thành nếp nhăn và giảm độ dày thượng bì do tia UV ở chuột Kunming.

Biểu hiện mRNA của *COL1A1* và *COL3A1* tăng, trong khi giảm biểu hiện *MMPI*, *MMP2* và *MMP3* ở nhóm điều trị với liều Exo2 so với nhóm UV, mặc dù những thay đổi này không có ý nghĩa thống kê, cần thêm những thí nghiệm với cỡ mẫu lớn hơn. Nghiên cứu trước đó cho thấy hypADSC-Exo có thể chống lại sự ảnh hưởng của các ROS, giảm biểu hiện yếu tố gây viêm và ức chế hoạt động thoái giáng collagen quá mức thông qua vận chuyển GLRX5. Từ những cơ chế trên, nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận khả năng của hypADSC-Exo trong cải thiện các đặc điểm của lão hóa da trên *in vivo*.

Tất cả các cá thể chuột được thoa hypoxic exosome đều không xuất hiện các tác dụng phụ như hồng ban, sưng nề, tróc vảy. Chuột cũng không phản ứng bất thường sau khi thoa exosome như không kích động, không liếm vùng thoa thuốc. Ngoài ra, các cá thể chuột vẫn ăn uống, sinh hoạt và tăng cân bình thường. Khi so với nhóm điều trị bằng tretinoin 0,05%, 50% số cá thể chuột có các tác dụng phụ như xuất hiện hồng ban, tróc vảy mức độ nhẹ, vẫn tiếp tục được điều trị và tác dụng phụ tự cải thiện sau 1 tuần. Tuy nhiên, 80% cá thể chuột có phản ứng kích thích tại vùng da thoa thuốc trong vòng 30 phút ngay sau điều trị, biểu hiện bằng hành động phát ra tiếng kêu liên tục, liếm vùng thoa thuốc.

Những ghi nhận này bước đầu cho thấy hypoxic exosome đường thoa không gây kích ứng tại chỗ, không có các tác dụng phụ như phương pháp điều trị chuẩn bằng tretinoin. Chuột thể hiện sự dung nạp tốt và không xuất hiện độc tính của thuốc lên sức khỏe chuột.

6. Kết luận và kiến nghị

6.1. Kết luận

Nghiên cứu đã đánh giá tác dụng của exosome tách chiết từ ADSC người nuôi trong điều kiện thiếu oxy (hypADSC-Exo) trên mô hình lão hoá da do UV, thông qua thí nghiệm *in vitro* trên nguyên bào sợi và *in vivo* trên chuột.

6.1.1. Mô hình nguyên bào sợi người lão hóa do tia cực tím

- Nguyên bào sợi lão hóa được thiết lập bằng cách chiếu đồng thời tia UVA và UVB, tổng liều chiếu là UVB 1,17 J/cm² + UVA 0,72 J/cm², chiếu một lần duy nhất trong 15 phút.

- Nguyên bào sợi biểu hiện các đặc điểm lão hóa sau chiếu UV 72 giờ, bao gồm hình dạng tế bào thay đổi phẳng hơn, mất dạng hình thoi; tăng kích thước tế bào; tăng biểu hiện men SA- β -galactosidase; giảm khả năng tăng sinh tế bào; giảm biểu hiện gen *COL1A1*, *COL3A1*, và tăng biểu hiện gen *MMP3*, *p16* và *p21*.

- Thời gian đánh giá lão hóa tế bào phù hợp là 72 giờ sau chiếu UV và kéo dài 3 ngày sau đó.

6.1.2. Mô hình chuột BALB/c lão hóa da do tia cực tím

- Mô hình chuột BALB/c lão hóa da được thiết lập bằng cách chiếu đồng thời tia UVA và UVB, liều chiếu UVA 1080 mJ/cm² và UVB 115,2 mJ/cm². Thời gian chiếu là 4 ngày liên tiếp/ tuần trong 12 tuần. Tổng liều UVA và UVB lần lượt là 51,8 J/cm² và 5,53 J/cm².

- Chuột biểu hiện các đặc điểm lão hóa da sau 12 tuần chiếu UV, bao gồm xuất hiện nếp nhăn sâu, da dày, giảm độ ẩm và giảm đàn hồi; tăng độ dày thượng bì và lớp bì trên mô học, giảm mật độ collagen; giảm biểu hiện gen *COL1A1*, *COL3A1* và tăng biểu hiện gen *MMPI*, *MMP2* và *MMP3*.

- Thời gian tiến hành thí nghiệm điều trị trên mô hình lão hóa phù hợp là trong vòng 8 tuần sau khi ngưng chiếu UV.

6.1.3. Tác dụng của hypoxic exosome từ tế bào gốc mô mỡ người trên nguyên bào sợi người lão hóa do tia cực tím

- Nguyên bào sợi lão hóa khi điều trị bằng hypADSC-Exo liều 10 $\mu\text{g/mL}$ một lần duy nhất không ghi nhận hiện tượng độc tế bào.

- hypADSC-Exo liều 10 $\mu\text{g/mL}$ có khả năng phục hồi hình dạng, kích thước của tế bào lão hóa; giảm biểu hiện SA- β -galactosidase; tăng khả năng tăng sinh; cũng như giảm biểu hiện gen *p16* và *p21*.

- Kết quả phục hồi lão hóa tế bào tạm thời được ghi nhận tại thời điểm sau điều trị 48 giờ.

6.1.4. Tác dụng của hypoxic exosome từ tế bào gốc mô mỡ người trên mô hình chuột lão hóa da do tia cực tím

- Chuột lão hóa da được điều trị với hypADSC-Exo không ghi nhận các tác dụng phụ như hồng ban hoặc tróc vảy so với điều trị bằng tretinoin.

- Phương thức điều trị bằng cách thoa hypADSC-Exo hai lần mỗi tuần trong 6 tuần liên tiếp bước đầu cho thấy hiệu quả.

- hypADSC-Exo đường thoa có khả năng giảm các nếp nhăn do lão hóa, giảm độ dày, tăng độ ẩm và độ đàn hồi da; đồng thời làm giảm độ dày thượng bì và lớp bì trên mô học, tăng mật độ collagen; tăng biểu hiện *COL1A1*, *COL3A1* và giảm biểu hiện *MMPI*, *MMP2* và *MMP3*.

- Liều hypADSC-Exo 100 $\mu\text{g/mL}$ (tương đương 10 μg hypADSC-Exo/8 cm^2) cho hiệu quả điều trị tốt hơn liều

hypADSC-Exo 50 $\mu\text{g/mL}$ (tương đương 5 μg hypADSC-Exo/8 cm^2).

6.2. Kiến nghị

Các nghiên cứu tiếp theo có thể được thực hiện theo định hướng sau:

1. Tiến hành các nghiên cứu chuyên sâu hơn để làm rõ cơ chế tác động phân tử của hypADSC-Exo, đặc biệt là vai trò của các miRNA, protein hoặc lipid đặc hiệu chứa trong exosome.

2. Bổ sung thí nghiệm đánh giá khả năng hấp thu qua da và thời gian tồn tại của hypADSC-Exo trong da.

3. hypADSC-Exo ở liều 100 $\mu\text{g/mL}$ (10 $\mu\text{g}/8 \text{ cm}^2$) đường thoa tại chỗ có hiệu quả cải thiện biểu hiện lão hóa da do tia cực tím, nên sử dụng liều này cho các nghiên cứu tiếp theo.

4. Bổ sung thí nghiệm so sánh với exosome trong điều kiện đủ oxy ở cùng liều điều trị.

5. Thực hiện thêm các nghiên cứu đánh giá độ an toàn dài hạn và xác định liều điều trị tối ưu của hypADSC-Exo trên các mô hình khác (mô hình da heo, *ex vivo*, organoid), làm cơ sở cho việc tiến đến thử nghiệm lâm sàng trên người.

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA
TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. **Huynh Bach Cuc**, Vu Bich Ngoc, Pham Van Phuc, Van The Trung. Establishment of aged human dermal fibroblasts by ultraviolet irradiation. Vietnam medical journal, Vol. 544, No. 2, 105-114, 2024.
2. **Huynh CB**, Vu NB, Van TT, Pham PV. Effects of Exosomes From Hypoxia-Induced Adipose-Derived Stem Cells on Ameliorating Photoaging. Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology. 2025; 18:1683-1702 <https://doi.org/10.2147/CCID.S523936>.