

Hesperidin bảo vệ tế bào HEK293 trong mô hình tổn thương thận cấp *in vitro*

Vũ Thị Thu*, Ngô Thị Hải Yến

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 10/5/2022; ngày chuyển phản biện 13/5/2022, ngày nhận phản biện 27/5/2022, ngày chấp nhận đăng 1/6/2022

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, tế bào biểu mô thận HEK293 được sử dụng để gây mô hình bệnh thiếu máu thận cấp *in vitro*. Hoạt tính sinh học của Hesperidin (Hes) được đánh giá thông qua tỷ lệ sống của tế bào HEK293 và hàm lượng lipid màng trong ty thể (cardiolipin). Kết quả cho thấy, Hes (nồng độ 4-32 μM) làm tăng đáng kể khả năng sống của tế bào HEK293 ở nhóm mô hình bệnh so với đối chứng ($p < 0,05$). Đặc biệt, nhóm tế bào được tiền xử lý với Hes (nồng độ 4 và 8 μM) trước giai đoạn thiếu oxy - tái cung cấp oxy có hàm lượng cardiolipin cao hơn so với nhóm tế bào mô hình bệnh nhưng không được xử lý với Hes. Kết quả thu được đã bước đầu chỉ ra rằng, Hes có thể là hoạt được tiềm năng trong việc bảo vệ tế bào HEK293 và ty thể của tế bào này chống lại tổn thương do thiếu oxy - tái cung cấp oxy.

Từ khóa: cardiolipin, HEK293, Hesperidin, ty thể.

Chỉ số phân loại: 3.5

1. Đặt vấn đề

Tổn thương thận cấp (acute kidney injury) liên quan đến sự suy giảm đột ngột (vài giờ đến vài ngày) mức lọc cầu thận, dẫn đến tích tụ độc tố trong máu [1]. Các nghiên cứu dịch tễ học đã chứng minh rằng, tổn thương thận cấp thường phát triển thành bệnh thận mạn tính và là yếu tố tăng tiến triển của bệnh thận giai đoạn cuối, do vậy chi phí điều trị là rất lớn [2]. Có nhiều nguyên nhân gây tổn thương thận cấp, trong đó có thể kể đến tổn thương thiếu máu cục bộ thận hay còn gọi là tổn thương thiếu oxy [3]. Trong giai đoạn thiếu hay nhồi máu cục bộ, giảm lượng máu nuôi dưỡng mô làm mô bị tổn thương [4]. Do vậy, việc tái tưới máu kịp thời sau nhồi máu là cần thiết để cứu vùng mô, tế bào bị tổn thương do thiếu máu cục bộ. Tuy nhiên, việc tái thông dòng máu, tái cung cấp oxy cũng có thể làm trầm trọng hơn những tổn thương trước đó [5]. Cho đến nay, sinh lý bệnh của tổn thương thận cấp do thiếu máu - tái tưới máu vẫn đang tiếp tục được làm rõ. Bên cạnh đó, nghiên cứu sàng lọc hoạt được mới có tác dụng phòng và giảm tổn thương do thiếu máu - tái tưới máu luôn được các nhà khoa học quan tâm và phát triển.

Ty thể là bào quan sinh năng lượng chính của tế bào và đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh lý bệnh thiếu máu - tái tưới máu thận [6]. Do vậy, duy trì ổn định chức năng ty thể là cần thiết để giảm thiểu tổn thương đối với tế bào biểu mô thận cũng như hạn chế tiến triển của bệnh. Thực tế, nghiên cứu sàng lọc được chất có tác dụng bảo vệ thận có cơ chế tác động nhắm đích ty thể đã đạt được một số thành tựu nhưng cũng rất cần tiếp tục được mở rộng nghiên cứu hơn nữa [3].

Hes là một flavanon glycosid (flavanon-7-rhamnoglucosid) và chiếm hàm lượng cao trong vỏ của quả thuộc chi Cam chanh [7]. Hes được chứng minh là có nhiều tác dụng sinh học như: kháng viêm [8], kháng virus [9], chống oxy hóa [10] và nấm [11]. Hes cũng được ghi nhận là có vai trò quan trọng trong cải thiện khả năng ghi nhớ [12], bảo vệ tế bào thần kinh trước ảnh hưởng của methotrexate [13], bảo vệ một số cơ quan trước tổn thương thiếu máu - tái tưới máu [14, 15]. Tuy nhiên, cơ sở khoa học về tác dụng bảo vệ hướng đích ty thể của Hes trong mô hình bệnh thiếu máu thận *in vitro* sử dụng tế bào HEK293 còn chưa rõ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát tác dụng của Hes trong mô hình bệnh thận cấp *in vitro* (thiếu oxy - tái cung cấp oxy, HR) bằng việc phân tích tỷ lệ sống của tế bào HEK293 cũng như thành phần lipid màng ty thể của tế bào này.

2. Đối tượng, vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng, vật liệu

Dòng tế bào biểu mô phôi thận người HEK293 (ATCC® - USA) được cung cấp bởi Trường Đại học Inje, Hàn Quốc. He ($\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$) được cung cấp bởi Viện Dược liệu có độ tinh khiết 95% (HPLC, tính theo % diện tích đỉnh) [16]. Nghiên cứu được thực hiện tại Trung tâm Khoa học Sự sống, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

2.2. Hóa chất, thiết bị

Môi trường nuôi tế bào Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Mỹ); đệm phosphate buffered saline (PBS, Gibco, Mỹ); huyết thanh phôi bê (Fetal bovine serum, FBS, Gibco, Mỹ); kit phân tích tế bào (Cell Counting Kit-8, CCK-8,

*Tác giả liên hệ: Email: vtthu2015@gmail.com

Hesperidin exerts protective effects on HEK293 cells in an acute kidney injury model *in vitro*

Thi Thu Vu*, Thi Hai Yen Ngo

University of Science, Vietnam National University - Hanoi,
334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 10 May 2022; revised 27 May 2022; accepted 1 June 2022

Abstract:

In this research, HEK293 cells were subjected to a hypoxia-reoxygenation (HR) model *in vitro*. The protective effects of hesperidin (Hes) were evaluated by assessing the cell viability value and the mitochondrial cardiolipin content. In contrast to the HR-subjected cell group, Hes (concentrations of 4-32 μM) significantly improved the HEK293 cell viability value ($p < 0.05$). Moreover, the group of cells pretreated with Hes (concentrations of 4 and 8 μM) before the HR phase had higher cardiolipin content than the group of disease model cells but not treated with Hes. These preliminary results showed that Hes could be a potential compound in protecting HEK293 cells and their mitochondria against HR injury.

Keywords: cardiolipin, HEK293, hesperidin, mitochondria.

Classification number: 3.5

Dojindo, Nhật Bản); chất nhuộm chỉ thị cardiolipin màng ty thể 10-N-nonyl acridin orange (NAO, Invitrogen, Mỹ); kháng sinh Penicillin-Streptomycin (PS, Gibco, Mỹ); dung môi Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Sigma, Mỹ); đĩa nuôi cấy 60x15 mm, 90x20 mm, đĩa 96 giếng trong (SPL-Life Sciences, Hàn Quốc), đĩa 96 giếng đen (Corning, Mỹ); tủ ấm CO_2 ; kính hiển vi soi ngược Axiovert (Carl Zeiss, Đức); máy đọc đĩa 96 giếng Spectramax plus 384, Tristar 2; các thiết bị, vật tư tiêu hao khác.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Nuôi tế bào HEK293: tế bào biểu mô thận người HEK293 được nuôi trong môi trường DMEM 4,5 g/l glucose có bổ sung 10% FBS và 1% PS ở 37°C và 5% CO_2 . Môi trường nuôi được thay mới sau 2 ngày cấy chuyển. Mẫu tế bào được cấy chuyển khi mật độ che phủ đĩa nuôi đạt khoảng 80%.

Mô hình bệnh thận cấp *in vitro* bằng CoCl_2 : Mô hình bệnh thận cấp *in vitro* (thiếu oxy - tái cung cấp oxy, HR) được tạo bằng cách sử dụng CoCl_2 [17, 18]. Tế bào HEK293 được nuôi với mật độ 10^4 tế bào/giếng. Sau 24 giờ nuôi, mẫu tế bào tiếp tục được chia thành 2 nhóm như sau:

1) Nhóm đối chứng: tế bào HEK293 được nuôi trong điều kiện bình thường (DMEM, 10% FBS, 1% PS, 37°C và 5% CO_2) trong 48 giờ tiếp theo.

2) Nhóm thử nghiệm: Tế bào HEK293 được nuôi trong môi trường chứa CoCl_2 nồng độ 25-800 μM trong 24 giờ để mô phỏng điều kiện thiếu oxy. Tiếp đó, nhóm tế bào này được chuyển sang điều kiện nuôi bình thường (DMEM, 10% FBS, 1% PS, 37°C và 5% CO_2) trong 24 giờ để mô phỏng giai đoạn tái cung cấp oxy. Hiệu quả hoạt động của mô hình được đánh giá bằng cách phân tích khả năng sống của tế bào (kit CCK-8).

Đánh giá khả năng sống của tế bào bằng kit CCK-8: Tỷ lệ sống của tế bào được xác định gián tiếp thông qua kit CCK-8 với nguyên lý là WST-8 (theo hướng dẫn sử dụng). Các mẫu tế bào ở các nhóm thí nghiệm được ủ với dung dịch CCK-8 trong 1-4 giờ, ở 37°C . Mẫu tế bào được đo bằng máy đọc đĩa ở bước sóng hấp thụ 450 nm [19]. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Đánh giá thành phần cardiolipin: Cardiolipin được đo gián tiếp bằng kit huỳnh quang NAO. Tế bào HEK293 được nuôi trong đĩa 96 giếng thành đen, đáy kính trong (10^4 tế bào/giếng, 37°C , 5% CO_2). Các mẫu tế bào HEK293 được nhuộm NAO nồng độ 0,1 μM (ex/em: 495/519 nm) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau bước rửa bằng PBS, mật độ huỳnh quang NAO được xác định bằng máy đọc đĩa 96 giếng. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Đánh giá tác dụng của Hes đối với khả năng sống của tế bào HEK293 ở điều kiện bình thường: Tế bào HEK293 được nuôi trong đĩa 96 giếng trong (mật độ 10^4 tế bào/giếng). Sau 24 giờ nuôi, môi trường cũ được loại bỏ, tế bào tiếp tục nuôi trong môi trường chứa Hes ở các nồng độ 2-128 μM trong 24 giờ. Tại cuối thời gian thí nghiệm, tỷ lệ tế bào sống ở các nồng độ thử nghiệm của Hes được đánh giá bằng kit CCK-8. Trong nghiên cứu này, Hes được hòa tan trong DMSO và được bổ sung vào môi trường nuôi ở các nồng độ lựa chọn. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Đánh giá tác dụng của Hes đối với tế bào HEK293 trong điều kiện thiếu oxy - tái cung cấp oxy: Trong thí nghiệm này, các mẫu tế bào được chia thành các nhóm sau:

1) Nhóm đối chứng: Tế bào HEK293 được nuôi liên tục trong điều kiện thường trong 72 giờ.

2) Nhóm thử nghiệm: sau 24 giờ nuôi bình thường, tế bào HEK293 tiếp tục được chia thành: i) Nhóm DMSO (CoCl_2 + DMSO 0,1%): tế bào được nuôi trong môi trường có chứa DMSO 0,1%. Sau 24 giờ nuôi, CoCl_2 (300 μM) được bổ sung vào môi trường nuôi trong 24 giờ tiếp theo. Sau đó, môi trường chứa CoCl_2 bị loại bỏ, tế bào tiếp tục được nuôi ở điều kiện bình thường trong 24 giờ. ii) Nhóm Hes (CoCl_2 + DMSO 0,1% + Hes): trong giai đoạn tiền xử lý, tế bào HEK293 được nuôi trong môi trường DMEM chứa Hes ở dải nồng độ 2-64 μM trong 24 giờ. Sau đó, các mẫu tế bào HEK293 này tiếp tục được nuôi trong môi trường có chứa CoCl_2 (300 μM) trong 24 giờ tiếp theo. Sau 24 giờ nuôi mô phỏng giai đoạn tái cung cấp oxy, tỷ lệ sống của tế bào được đánh giá bằng kit CCK-8. Hàm lượng cardiolipin màng trong ty thể được đánh giá bằng kit NAO. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

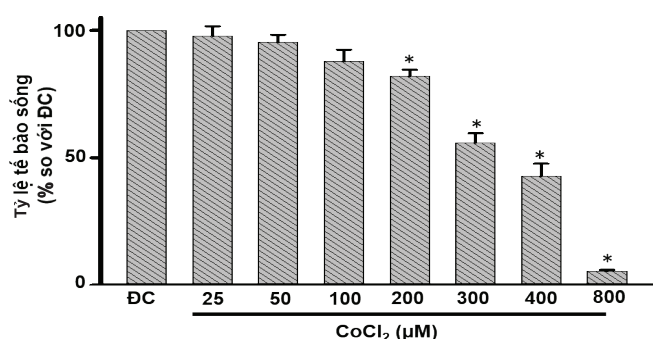
2.4. Xử lý số liệu

Các phần mềm Excel 2016 và Origin 8.5 được sử dụng để xử lý thống kê. Số liệu được trình bày dưới dạng $X \pm SD$ (X : giá trị trung bình, SD : độ lệch chuẩn). Sự khác biệt được phân tích bằng Anova, Tukey's test, $p < 0,05$ phản ánh sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (giá trị p lấy theo hai phía).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Hiệu quả hoạt động của mô hình bệnh thận cấp *in vitro*

Trong nghiên cứu này, mô hình thiếu máu thận cấp (HR) *in vitro* được thiết lập bằng cách sử dụng $CoCl_2$ nhằm mô phỏng điều kiện thiếu oxy. Ảnh hưởng của $CoCl_2$ ở các nồng độ khác nhau được đánh giá thông qua tỷ lệ sống của tế bào HEK293 trong điều kiện HR (hình 1).

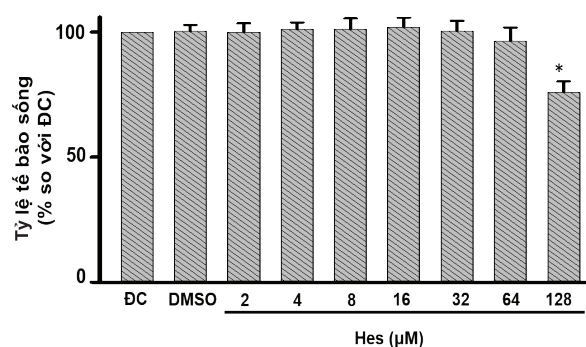


Hình 1. Tỷ lệ sống của tế bào HEK293 trong môi trường chứa $CoCl_2$. ĐC (đối chứng): tế bào được nuôi trong điều kiện bình thường; $CoCl_2$: tế bào được nuôi trong môi trường có $CoCl_2$ ở nồng độ 25-800 μM trong 24 giờ; *: $p < 0,05$ so với ĐC.

Kết quả thể hiện ở hình 1 cho thấy, tỷ lệ sống của nhóm tế bào HEK293 khi được nuôi 24 giờ trong môi trường có $CoCl_2$ (nồng độ 200-800 μM) giảm mạnh so với tỷ lệ này được ghi nhận ở nhóm tế bào được dùng làm đối chứng ($p < 0,05$). So với nhóm đối chứng (100%), tỷ lệ sống của tế bào HEK293 khi được nuôi trong môi trường chứa $CoCl_2$ 200 và 800 μM lần lượt là $82,04 \pm 2,51\%$ và $5,53 \pm 1,59\%$. Sự giảm tỷ lệ sống này có thể liên quan đến tác động của $CoCl_2$ trong việc làm tăng quá trình sản sinh gốc oxy tự do, giảm điện thế màng ty thể, hoạt hóa enzyme caspase-3, kích thích sự chết theo chương trình của tế bào, từ đó gây tổn thương và gây chết tế bào [20, 21]. Tương tự nghiên cứu trước đây [17, 18], kết quả nghiên cứu thể hiện mô hình HR gây bởi $CoCl_2$ hoạt động hiệu quả và có thể sử dụng để nghiên cứu sàng lọc các hợp chất có tác dụng bảo vệ tế bào HEK293 trong điều kiện bệnh lý. Dựa vào kết quả thu được, nồng độ $CoCl_2$ (300 μM) được lựa chọn để gây mô hình bệnh trong các phân tích tiếp theo.

3.2. Tác dụng của Hes đối với tế bào HEK293 trong điều kiện bình thường

Tác dụng của Hes đối với tế bào HEK293 trong điều kiện bình thường được đánh giá qua kết quả tỷ lệ tế bào sống trong môi trường nuôi có chứa Hes nồng độ 2-128 μM (hình 2).

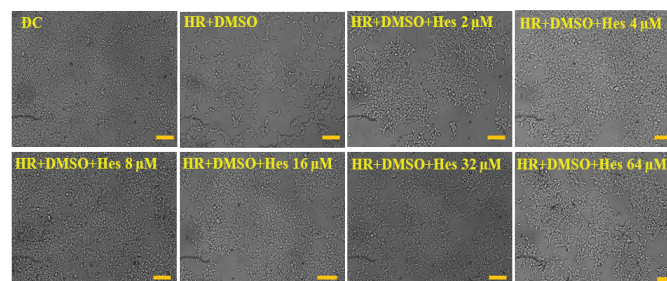


Hình 2. Tỷ lệ sống của tế bào HEK293 trong môi trường nuôi bình thường có chứa Hes. ĐC: tế bào được nuôi trong điều kiện thường; DMSO: tế bào được nuôi trong môi trường có chứa DMSO 0,1%; Hes: tế bào được nuôi trong môi trường có chứa Hes ở nồng độ 2-128 μM ; *: $p < 0,05$ so với ĐC.

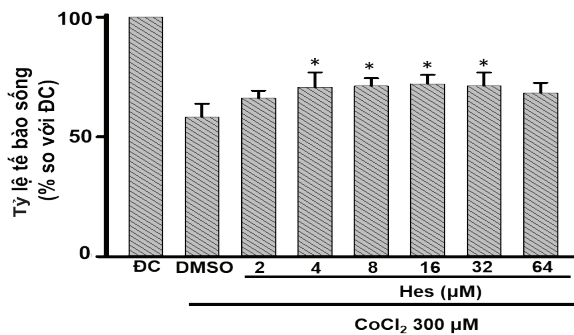
Kết quả cho thấy, tỷ lệ sống của tế bào HEK293 trong các nhóm DMSO và Hes (nồng độ 2-64 μM) khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với tỷ lệ này ở nhóm đối chứng ($p > 0,05$). Điều này thể hiện Hes 2-64 μM gần như không gây độc đối với tế bào HEK293. Hơn nữa, việc sử dụng DMSO 0,1% không ảnh hưởng tới kết quả phân tích thí nghiệm. Ngược lại, khi được nuôi trong môi trường có bổ sung Hes ở nồng độ 128 μM , tỷ lệ sống của nhóm tế bào HEK293 giảm còn $75,9 \pm 4,35\%$ so với đối chứng (100%, $p < 0,05$). Điều này chứng tỏ, Hes ở nồng độ cao (128 μM) gây độc tế bào HEK293. Trên cơ sở kết quả này, dải nồng độ 2-64 μM của Hes được chọn dùng cho các phân tích sâu hơn về tác dụng của hợp chất đối với tế bào HEK293 trong mô hình HR.

3.3. Tác dụng của Hes đối với tỷ lệ sống của tế bào HEK293 trong mô hình bệnh thận cấp *in vitro*

Trong giai đoạn thiếu máu, sự thiếu oxy là nguyên nhân chủ yếu gây tổn thương và chết tế bào. Trong nghiên cứu này, tác dụng của Hes đối với HEK293 trong mô hình thiếu máu thận HR *in vitro* được xác định thông qua phân tích sự thay đổi tỷ lệ sống của tế bào (hình 3 và 4).



Hình 3. Hình ảnh tế bào HEK293 trong mô hình bệnh thận thiếu oxy - tái cung cấp oxy và xử lý Hes. ĐC: tế bào được nuôi trong điều kiện thường; HR+DMSO: tế bào mô hình HR được nuôi trong điều kiện có DMSO 0,1%; HR+DMSO+Hes: tế bào mô hình HR được nuôi trong điều kiện có DMSO 0,1% và bổ sung Hes nồng độ 2-64 μM . Ảnh được chụp bởi vật kính 10X, thước đo 100 μm .



Hình 4. Tỷ lệ sống của tế bào HEK293 trong mô hình bệnh thận thiếu oxy - tái cung cấp oxy và xử lý Hes. ĐC: tế bào được nuôi trong điều kiện thường; DMSO: tế bào mô hình HR được nuôi trong điều kiện có DMSO 0,1%; Hes: tế bào mô hình HR được nuôi trong điều kiện có DMSO 0,1% và bổ sung Hes nồng độ 2-64 μM; *: $p < 0,05$ so với DMSO; số lần lặp lại thí nghiệm là 3.

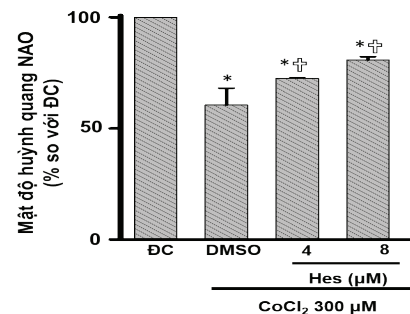
Tương tự kết quả ảnh chụp hình thái mẫu tế bào (hình 3), nhóm DMSO có tỷ lệ tế bào sống giảm còn $58,39 \pm 5,4\%$ so với đối chứng ($p < 0,05$, hình 4). Tiền xử lý với Hes ở các nồng độ 2, 4, 8, 16, 32 và 64 (μM) trong 24 giờ trước khi giai đoạn thiếu oxy - tái cung cấp oxy giúp tỷ lệ sống của tế bào HEK293 tăng, với các giá trị lần lượt là $66,20 \pm 3,09$, $70,71 \pm 6,19$, $71,29 \pm 3,14$, $72,18 \pm 3,64$, $71,41 \pm 3,16$ và $64,98 \pm 1,04\%$. Như vậy, tỷ lệ sống tăng và có khác biệt đáng kể khi mẫu tế bào được tiền xử lý với Hes ở các nồng độ 4, 8, 16 và 32 μM ($p < 0,05$). Mặt khác, tỷ lệ sống của tế bào trong các mẫu được bổ sung Hes ở nồng độ 4, 8, 16 và 32 μM là khá tương đương ($p > 0,05$). Tương tự với các nghiên cứu gần đây về Hes [16, 19], Hes ở nồng độ 4 và 8 μM tiếp tục được dùng để phân tích điều kiện tác động tối ưu của hợp chất.

Kết quả thu được cho thấy, Hes có tiềm năng trong việc bảo vệ tế bào HEK293 chống lại những tổn thương thận cấp trong mô hình bệnh sử dụng CoCl_2 . Điều này có thể được lý giải do Hes có tác dụng chống oxy hóa [10], chống viêm và chống lại sự chết theo chu trình của tế bào [22]. Tác dụng của Hes đối với tế bào HEK293 là khá tương đồng với tác dụng bảo vệ của hoạt động này đối với tế bào cơ tim chuột H9C2 trong nghiên cứu trước đây [16, 19]. Khả năng bảo vệ tế bào H9C2 trong điều kiện thiếu oxy - tái cung cấp oxy của Hes là do hợp chất này có tác dụng bảo tồn cấu trúc, chức năng ty thể và giảm sự hình thành gốc oxy tự do. Kết quả công bố về tỷ lệ tế bào sống cũng khẳng định vai trò của Hes trong việc cải thiện tổn thương gây ra bởi thiếu máu - tái tưới máu thận *in vivo* [23]. Nghiên cứu này đã cung cấp dẫn liệu về khả năng bảo vệ của Hes chống lại tổn thương thận do thiếu máu - tái tưới máu gây ra thông qua con đường tín hiệu TLR-4/NF-κB / iNOS [23]. Gần đây, vai trò chống oxy hóa của Hes cũng được công bố trong nghiên cứu về thiếu máu - tái tưới máu thận *in vivo* [24]. Nhóm chuột mô hình bệnh được bổ sung Hes có mức biểu hiện các enzyme có tác dụng chống oxy hóa cao hơn nhóm chuột mô hình bệnh không được bổ sung Hes [24]. Trong nghiên cứu hiện tại, vai trò của Hes trong việc bảo vệ tế bào HEK293 chống lại tổn thương do HR

bước đầu được làm rõ. Kết quả thu được có thể là cơ sở tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn để xác định cơ chế sinh học của hoạt động này trong mô hình bệnh lý thận cấp.

3.4. Tác dụng của Hes đối với ty thể tế bào HEK293 trong mô hình bệnh thận cấp *in vitro*

Vai trò của Hes đối với ty thể của tế bào HEK293 được đánh giá thông qua hàm lượng lipid (cardiolipin) tham gia cấu trúc màng trong ty thể. Hàm lượng cardiolipin được đo gián tiếp dựa vào giá trị mật độ huỳnh quang NAO (hình 5).



Hình 5. Mật độ huỳnh quang NAO của tế bào HEK293. ĐC: tế bào được nuôi trong điều kiện bình thường; DMSO: tế bào mô hình HR được nuôi trong điều kiện có DMSO 0,1%; Hes: tế bào mô hình HR được nuôi trong điều kiện có DMSO 0,1% và bổ sung Hes nồng độ 2-64 μM; *: $p < 0,05$ so với ĐC; *: $p < 0,05$ so với DMSO; số lần lặp lại thí nghiệm là 3.

Cardiolipin là phospholipid đóng vai trò quan trọng đối với việc duy trì ổn định cấu trúc và hoạt động chức năng năng ty thể [25]. Trong bệnh thiếu máu - tái tưới máu thận, sự tăng stress oxy hóa ty thể dẫn đến sự oxy hóa cardiolipin, qua đó ảnh hưởng tới hoạt động của chuỗi vận chuyển điện tử và qua đó làm rối loạn hoạt động chức năng ty thể [26], thậm chí có thể gây chết tế bào. Do vậy, việc bảo toàn thành phần cardiolipin có vai trò quan trọng giúp giảm thiểu tổn thương đối với ty thể và tế bào thận trong bệnh thiếu máu tái tưới máu.

Kết quả cho thấy, giá trị mật độ huỳnh quang NAO của nhóm tế bào được tiền xử lý với Hes ở nồng độ 4 và 8 μM tăng và có giá trị lần lượt là $72,57 \pm 1,13\%$ và $80,79 \pm 1,43\%$ (% so với đối chứng, hình 4). Các giá trị này là cao hơn đáng kể so với nhóm DMSO ($60,51 \pm 7,66\%$, $p < 0,05$). Như vậy, Hes ở các nồng độ 4 và 8 μM có khả năng bảo tồn cardiolipin màng ty thể trong tổn thương gây ra do HR, qua đó làm tăng khả năng chống oxy hóa và bảo toàn hiệu quả hoạt động của chuỗi vận chuyển điện tử [26, 27]. Bên cạnh đó, kết quả cũng chỉ ra rằng, tỷ lệ mật độ huỳnh quang NAO của nhóm tế bào được tiền xử lý với Hes 8 μM cao hơn so với nhóm tế bào được tiền xử lý với Hes 4 μM (hình 4). Tuy nhiên, sự khác biệt này là không đáng kể ($p > 0,05$). Kết quả này khá phù hợp với sự thay đổi tỷ lệ sống của tế bào HEK293 ở trên.

Như vậy, kết quả cho thấy Hes có khả năng bảo vệ tế bào biểu mô thận HEK293 và ổn định cấu trúc màng ty thể. Tuy nhiên, nghiên cứu hiện tại chưa đánh giá cơ chế tác động ở cấp độ phân

tử của Hes trong việc bảo vệ tế bào HEK293 chống lại tổn thương HR *in vitro*.

4. Kết luận

Nghiên cứu này bước đầu đã cung cấp số liệu về vai trò của Hes đối với tế bào HEK293 trong mô hình thiếu máu thận cấp *in vitro*. Hes ở nồng độ 4 và 8 μM có tác dụng làm giảm tỷ lệ tế bào HEK293 trong điều kiện thiếu oxy - tái cung cấp oxy thông qua việc bảo toàn thành phần cardiolipin màng ty thể. Kết quả có thể là tiền đề cho các nghiên cứu đánh giá sâu hơn về cơ chế tác dụng của Hes trong mô hình bệnh liên quan.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Trung tâm Khoa học Sự sống, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội đã tạo điều kiện để thực hiện nghiên cứu; chân thành cảm ơn GS Han Jin đã tặng nhóm nghiên cứu mẫu tế bào HEK293, PGS.TS Phương Thiện Thương và TS Nguyễn Thị Hà Ly đã cung cấp tinh chất Hes, TS Phạm Thị Bích và ThS Nguyễn Trung Chức đã hỗ trợ chuẩn bị một số điều kiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.J. Han, H.T. Lee (2019), "Mechanisms and therapeutic targets of ischemic acute kidney injury", *Kidney Res. Clin. Pract.*, **38**(4), pp.427-440, DOI: 10.23876/j.krcp.19.062.
- [2] G. Clermont, C.G. Acker, D.C. Angus, et al. (2002), "Renal failure in the ICU: Comparison of the impact of acute renal failure and end-stage renal disease on ICU outcomes", *Kidney Int.*, **62**(3), pp.986-996, DOI: 10.1046/j.1523-1755.2002.00509.x.
- [3] N. Pabla, A. Bajwa (2021), "Role of mitochondrial therapy for ischemic reperfusion injury and acute kidney injury", *Nephron*, **146**(3), pp.253-258, DOI: 10.1159/000520698.
- [4] K.R. Thomson, A.C. Venbrux, K.P.J. Murphy, et al. (2020), *Image-Guided Interventions*, Elsevier Health Sciences, 1072pp.
- [5] M. Malek, M. Nematbakhsh (2015), "Renal ischemia/reperfusion injury: from pathophysiology to treatment", *Journal of Renal Injury Prevention*, **4**(2), pp.20-27, DOI: 10.12861/jrip.2015.06.
- [6] J.L. Martin, A.V. Gruszczuk, T.E. Beach, et al. (2019), "Mitochondrial mechanisms and therapeutics in ischaemia reperfusion injury", *Pediatr. Nephrol.*, **34**(7), pp.1167-1174, DOI: 10.1007/s00467-018-3984-5.
- [7] J.J. Peterson, J.T. Dwyer, G.R. Beecher, et al. (2006), "Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: A compilation and review of the data from the analytical literature", *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**(1), pp.S66-S73, DOI: 10.1016/j.jfca.2005.12.006.
- [8] S. Ansoorge, D. Reinhold, U. Lendeckel (2003), "Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF-beta1 production of human immune cells", *Z. Naturforsch C. J. Biosci.*, **58**(7-8), pp.580-589, DOI: 10.1515/znc-2003-7-823.
- [9] R.K. Saha, T. Takahashi, T. Suzuki (2009), "Glucosyl hesperidin prevents influenza A virus replication in vitro by inhibition of viral sialidase", *Biol. Pharm. Bull.*, **32**(7), pp.1188-1192, DOI: 10.1248/bpb.32.1188.
- [10] P.K. Wilmsen, D.S. Spada, M. Salvador (2005), "Antioxidant activity of the flavonoid Hesperidin in chemical and biological systems", *J. Agric. Food Chem.*, **53**(12), pp.4757-4761, DOI: 10.1021/jf0502000.
- [11] J.A. del Rio, P. Gómez, A.G. Baidez, et al. (2004), "Changes in the levels of polymethoxyflavones and flavanones as part of the defense mechanism of *Citrus sinensis* (cv. Valencia Late) fruits against *Phytophthora citrophthora*", *J. Agric. Food Chem.*, **52**(7), pp.1913-1917, DOI: 10.1021/jf035038k.

- [12] A. Aranarochana, S. Kaewngam, T. Anosri, et al. (2021), "Hesperidin reduces memory impairment associated with adult rat hippocampal neurogenesis triggered by valproic acid", *Nutrients*, **13**(12), DOI: 10.3390/nu13124364.
- [13] J.U. Welbat, S. Naewla, W. Pannangrong, et al. (2020), "Neuroprotective effects of Hesperidin against methotrexate-induced changes in neurogenesis and oxidative stress in the adult rat", *Biochemical Pharmacology*, **178**, DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114083.
- [14] E. Celik, H. Oguzturk, N. Sahin, et al. (2016), "Protective effects of Hesperidin in experimental testicular ischemia/reperfusion injury in rats", *Arch. Med. Sci.*, **12**(5), pp.928-934, DOI: 10.5114/aoms.2015.47697.
- [15] M. Pashai, S.N.S. Toutouchi, M. Rameshrad, et al. (2016), "The effects of Hesperidin on ischemia/reperfusion induced arrhythmias and infarct size in isolated rat heart", *Pharm. Sci.*, **22**(2), pp.68-75, DOI: 10.1517/PS.2016.12.
- [16] V.T. Thu, P.T. Thuong (2021), "Hesperidin extracted from *Citrus reticulata* Blanco protects cardiac mitochondria against hypoxia/reoxygenation injury", *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, **37**(4), pp.40- 47, DOI: 10.25073/2588-1140/vnunst.5328.
- [17] N.T.H. Yen, D.T.Dau, P.T. Bich, et al. (2019), "Designing and evaluating the effectiveness of hypoxia chamber applied in myocardial hypoxia-reoxygenation model *in vitro*", *Vietnam Journal of Physiology*, **23**(3), pp.1-8 (in Vietnamese).
- [18] X. Ge, L. Zhao, L. He, et al. (2012), "Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2, Flk-1/KDR) protects HEK293 cells against CoCl₂-induced hypoxic toxicity", *Cell Biochemistry and Function*, **30**(2), pp.151-157, DOI: 10.1002/cbf.1829.
- [19] N.T.H. Yen, H.L. Phuong, N.T.H. Ly, et al. (2020), "Evaluating the protective effects of Hesperidin on H9C2 cells against hypoxia/reoxygenation injury *in vitro*", *The 4th National Scientific Conference on Biological Research and Education in Vietnam*, pp.630-637 (in Vietnamese).
- [20] A. Lan, X. Liao, L. Mo, et al. (2017), "Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced injury by inhibiting ROS-activated ERK1/2 and p38MAPK signaling pathways in PC12 cells", *PLOS ONE*, **25**(4), pp.615-619, DOI: 10.1371/journal.pone.0025921.
- [21] N.K. Rana, P. Singh, B. Koch (2019), "CoCl₂ simulated hypoxia induce cell proliferation and alter the expression pattern of hypoxia associated genes involved in angiogenesis and apoptosis", *Biological Research*, **52**(1), DOI: 10.1186/s40659-019-0221-z.
- [22] H. Parhiz, A. Roohbakhsh, F. Soltani, et al. (2015), "Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An updated review of their molecular mechanisms and experimental models", *Phytotherapy Research*, **29**(3), pp.323-331, DOI: 10.1002/ptr.5256.
- [23] X. Meng, M. Wei, D. Wang, et al. (2020), "The protective effect of Hesperidin against renal ischemia-reperfusion injury involves the TLR-4/NF- κ B/iNOS pathway in rats", *Physiol. Int.*, **107**(1), pp.82-91, DOI: 10.1556/2060.2020.00003.
- [24] W.S. Park, M.S. Park, S.W. Kang, et al. (2019), "Hesperidin shows protective effects on renal function in ischemia-induced acute kidney injury (Sprague-Dawley Rats)", *Transplantation Proceedings*, **51**(8), pp.2838-2841, DOI: 10.1016/j.transproceed.2019.02.055.
- [25] J. Dudek (2017), "Role of cardiolipin in mitochondrial signaling pathways", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **5**(90), pp.1-17, DOI: 10.3389/fcell.2017.00090.
- [26] G.P.V. Paradies, V. Paradies, V.D. Benedictis, et al. (2014), "Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics", *Biochimica et Biophysica Acta. (BBA) - Bioenergetics*, **1837**(4), pp.408-417, DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.10.006.
- [27] D. Wang, L. Liu, X. Zhu, et al. (2014), "Hesperidin alleviates cognitive impairment, mitochondrial dysfunction and oxidative stress in a mouse model of alzheimer's disease", *Cellular and Molecular Neurobiology*, **34**(8), pp.1209-1221, DOI: 10.1007/s10571-014-0098-x.