

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC MỞ HÀ NỘI



ĐỒ ÁN TỐT NGHIỆP

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học

Mã ngành: 8420201

**Đề tài: ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ENZYME
ACETYLCHOLINESTERASE, BẢO VỆ VÀ KÍCH THÍCH TĂNG TRƯỞNG
SỢI THẦN KINH CỦA HỖN HỢP HUPERZINE A, ADENOSINE VÀ
CORDYCEPIN**

HỌC VIÊN THỰC HIỆN: NGUYỄN THANH TÙNG

HƯỚNG DẪN KHOA HỌC 1: TS. HỒ NGỌC ANH

HƯỚNG DẪN KHOA HỌC 2: TS. ĐẶNG BẢO SƠN

Hà Nội, 2026

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC MỞ HÀ NỘI

ĐỒ ÁN TỐT NGHIỆP

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học

Mã ngành: 8420201

**Đề tài: ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ENZYME
ACETYLCHOLINESTERASE, BẢO VỆ VÀ KÍCH THÍCH TĂNG TRƯỞNG
SỢI THẦN KINH CỦA HỖN HỢP HUPERZINE A, ADENOSINE VÀ
CORDYCEPIN**

HỌC VIÊN THỰC HIỆN: NGUYỄN THANH TÙNG

HƯỚNG DẪN KHOA HỌC 1: TS. HỒ NGỌC ANH

HƯỚNG DẪN KHOA HỌC 2: TS. ĐẶNG BẢO SƠN

Hà Nội, 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi và một số kết quả cùng cộng tác với các cộng sự khác.

Các số liệu kết quả nêu trong luận văn này là trung thực, một phần đã được công bố trên các hội nghị, phần còn lại chưa được ai công bố trong bất cứ công trình nào khác.

Nếu có gì sai sót, tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm

Học viên

(Ký và ghi rõ họ tên)

LỜI CẢM ƠN

Em xin chân thành cảm ơn thầy TS. Hồ Ngọc Anh, Viện Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình hướng dẫn, định hướng các tư duy và cách làm việc khoa học tạo điều kiện tốt nhất để em hoàn thành đồ án tốt nghiệp.

Em xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến thầy TS. Đặng Bảo Sơn, Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Mở Hà Nội đã đưa ra những lời khuyên, chỉ bảo tận tình trong quá trình học tập cũng như đồ án tốt nghiệp này.

Em xin chân thành cảm ơn các thầy, cô tại Trường Đại học Mở Hà Nội. Đặc biệt là các thầy cô trong Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm đã truyền đạt những kiến thức bổ ích, tạo mọi điều kiện trong quá trình học tập nghiên cứu giúp chúng em có hành trang vững chắc trước khi tốt nghiệp.

Cuối cùng, em xin gửi lời cảm ơn chân thành đến gia đình, bạn bè đã luôn động viên, chia sẻ cũng như đồng hành cùng em trong suốt chặng đường vừa qua.

Em xin chân thành cảm ơn.

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC BẢNG	vii
DANH MỤC HÌNH ẢNH	viii
I. Đặt vấn đề	1
1.1. Tính cấp thiết của đề tài.....	1
1.2. Mục tiêu và nội dung nghiên cứu.....	2
1.3. Tính sáng tạo, tư duy hệ thống và tư duy thiết kế.....	2
1.4. Các yếu tố phục vụ cộng đồng.....	6
II. Tổng quan tài liệu	8
2.1. Hoạt chất Huperzine A.....	8
2.2. Tổng quan về Acetylcholinesterase (AChE).....	11
2.3. Hoạt chất Adenosine, Cordycepin và nấm trùng thảo <i>Cordyceps militaris</i>	12
2.4. Bệnh Alzheimer và sa sút trí tuệ	14
2.5. Tế bào F11 và mô hình tổn thương bằng 6-OHDA	17
2.6. Nghiên cứu trong nước và ngoài nước	18
III. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu	19
3.1. Vật liệu nghiên cứu.....	19
3.2. Hóa chất và dụng cụ chính.	19

3.3.	Một số thiết bị cần sử dụng.....	20
3.4.	Phương pháp nghiên cứu.....	21
3.4.1.	Phương pháp định tính, định lượng HupA bằng HPLC-DAD	22
3.4.2.	Phương pháp tinh sạch, kết tinh và thu nhận Huperzine A tinh khiết ..	23
3.4.3.	Phương pháp tách chiết, thu nhận và định lượng Adenosine, Cordycepin từ nấm trùng thảo	23
3.4.4.	Phương pháp đánh giá hoạt tính cộng hợp của hỗn hợp thuốc theo phương pháp ô bàn cờ (ô tổ hợp)	25
3.4.5.	Phương pháp đánh giá khả năng ức chế enzyme Acetylcholinesterase của Huperzine A in vitro	29
3.4.6.	Phương pháp đánh giá hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh	30
3.4.7.	Phương pháp đánh giá hoạt tính tăng sinh sợi liên kết tế bào thần kinh	
	31	
IV.	Kết quả và thảo luận.....	33
4.1.	Kết quả định lượng Adenosine và Cordycepin từ cao chiết trùng thảo và đánh giá độ tinh sạch của HupA	33
4.2.	Đánh giá hoạt tính ức chế enzyme AChE, xác định tác dụng cộng hợp của các tỷ lệ phối trộn hỗn hợp A+C và chất sạch huperzine A.....	38
4.3.	Đánh giá hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh	40
4.4.	Đánh giá hoạt tính tăng sinh sợi liên kết thần kinh (LKTK)	47
V.	Kết luận và kiến nghị.....	56
5.1.	Kết luận	56
5.2.	Kiến nghị	56
	TÀI LIỆU THAM KHẢO	58

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Thuật ngữ đầy đủ Tiếng Anh	Thuật ngữ đầy đủ Tiếng Việt
6-OHDA	6-Hydroxydopamine	
AD	Alzheimer's Disease	Bệnh Alzheimer
AChE	Acetylcholinesterase	Enzyme acetylcholinesterase
A β	Amyloid beta	
A	Adenosin	
C	Cordycepin	
A+C	Adenosine + Cordycepin	
DAD	Diode Array Detector – Đầu dò mảng diode	Đầu dò mảng diode
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)	
FBS	Fetal Bovine Serum	Huyết thanh bào thai bò
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HupA	Huperzine A	
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration	Nồng độ ức chế 50%
mNGF	Mouse Nerve Growth Factor	Yếu tố tăng trưởng thần kinh chuột
NMDA	N-methyl-D-aspartate	
OD	Optical Density – Mật độ quang	Mật độ quang
PBS	Phosphate Buffered Saline – Dung dịch đệm phosphat	Dung dịch đệm phosphat
RT	Retention Time – Thời gian lưu	Thời gian lưu
SSTT		Sa sút trí tuệ
SGTN		Suy giảm trí nhớ

Từ viết tắt	Thuật ngữ đầy đủ Tiếng Anh	Thuật ngữ đầy đủ Tiếng Việt
TK		Thần kinh
WST-8	Water Soluble Tetrazolium-8	Muối tetrazolium hòa tan trong nước số 8

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1. Môi trường và thành phần môi trường nuôi cấy.....	19
Bảng 2. Hóa chất, dụng cụ và thiết bị sử dụng	20
Bảng 3. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế enzyme AChE của chất sạch Huperzine A, hỗn hợp A + C, donepezil.....	39
Bảng 4. Kết quả đánh giá tác dụng cộng hợp của các tỷ lệ giữa Huperzine A và hỗn hợp A +C	39
Bảng 5. Quy ước giá trị p	47

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1. Cấu trúc phân tử của Huperzin A	8
Hình 2. Cây Thạch tùng răng cưa <i>Huperzia serrata</i>	8
Hình 3. Hình ảnh nấm trùng thảo <i>Cordyceps militaris</i>	12
Hình 4. Cấu trúc phân tử của Adenosine và Cordycepin.....	13
Hình 5. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu	21
Hình 6. Đồ thị đường chuẩn Adenosine.....	33
Hình 7. Đồ thị đường chuẩn Cordycepin.....	34
Hình 8. Đồ thị đường chuẩn HupA	35
Hình 9. Phổ UV của mẫu HupA	36
Hình 10. Sắc ký đồ của mẫu HupA	36
Hình 11. Phổ UV của chất chuẩn HupA.....	37
Hình 12. Hoạt tính gây độc tế bào của 6-OHDA.....	41
Hình 13. Hoạt tính bảo vệ TBTK của các mẫu thử (A-G)	42
Hình 14. Hoạt tính tăng sinh sợi liên kết thần kinh của NGF	48
Hình 15. Hoạt tính tăng sinh sợi liên kết thần kinh của cao chiết nấm trùng thảo ..	50
Hình 16. Hoạt tính tăng sinh sợi liên kết thần kinh của công thức phối trộn.....	52

I. Đặt vấn đề

1.1. Tính cấp thiết của đề tài

Bệnh Alzheimer (Alzheimer's disease, AD) là nguyên nhân phổ biến nhất của sa sút trí tuệ, chiếm khoảng 60–70% số trường hợp. Năm 2021, ước tính có khoảng 57 triệu người sống chung với sa sút trí tuệ trên toàn cầu; gánh nặng này tiếp tục tăng cùng quá trình già hóa dân số [1,2].

AD là bệnh thoái hóa thần kinh đa yếu tố, liên quan đến amyloid- β , protein tau, suy giảm dẫn truyền cholinergic, rối loạn synapse, stress oxy hóa, viêm thần kinh và mất tế bào thần kinh [2]. Bên cạnh các thuốc điều trị triệu chứng như thuốc ức chế acetylcholinesterase và memantine, các liệu pháp kháng amyloid đã mở rộng lựa chọn điều trị ở AD giai đoạn sớm; tuy nhiên hiệu quả, độ an toàn và khả năng tiếp cận vẫn còn những giới hạn [3,4]. Vì vậy, các chiến lược tác động trên nhiều đích sinh học vẫn là hướng nghiên cứu đáng quan tâm.

Huperzine A (HupA) là alkaloid ức chế acetylcholinesterase thuận nghịch, đồng thời có một số tác dụng bảo vệ thần kinh trong các mô hình tiền lâm sàng [5–7]. Adenosine tham gia điều hòa dẫn truyền thần kinh qua các thụ thể purinergic, còn cordycepin (3'-deoxyadenosine) được ghi nhận có hoạt tính chống stress oxy hóa, chống viêm và bảo vệ tế bào ở một số mô hình thực nghiệm [8–12]. Các cơ chế này tạo cơ sở để khảo sát khả năng hỗ trợ của HupA với adenosine và cordycepin, nhưng không mặc nhiên chứng minh tính hiệp đồng.

Trong nghiên cứu này, HupA được thu nhận từ sinh khối nấm nội sinh *Penicillium* sp. LDL4.4; adenosine và cordycepin được cung cấp dưới dạng cao chiết *Cordyceps militaris*. Khoảng trống cần làm rõ là hoạt tính của tổ hợp trên cùng một chuỗi phép thử gồm ức chế AChE, duy trì hoạt tính chuyển hóa của tế bào F11 chịu tổn thương bởi 6-OHDA và hình thành neurite.

Xuất phát từ các cơ sở trên, đề tài “Đánh giá khả năng ức chế enzyme acetylcholinesterase, bảo vệ và kích thích tăng trưởng sợi thần kinh của hỗn hợp Huperzine A, Adenosine và Cordycepin” được thực hiện nhằm làm rõ tiềm năng của

một tổ hợp hoạt chất tự nhiên theo định hướng đa mục tiêu [2,5,8,10]. Việc đánh giá đồng thời tác dụng của hỗn hợp trên ba phương diện gồm ức chế enzyme AChE, bảo vệ tế bào thần kinh và kích thích tăng trưởng neurite sẽ góp phần bổ sung bằng chứng thực nghiệm cho chiến lược hỗ trợ điều trị bệnh thoái hóa thần kinh bằng hoạt chất tự nhiên có chuẩn hóa [2,3,7,13]. Nếu chứng minh được hiệu quả phối hợp, nghiên cứu này không chỉ có ý nghĩa về mặt học thuật mà còn có thể tạo tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn theo hướng phát triển sản phẩm hỗ trợ thần kinh có nguồn gốc tự nhiên, phù hợp với điều kiện nghiên cứu và nguồn nguyên liệu trong nước [13–15].

1.2. Mục tiêu và nội dung nghiên cứu.

Mục tiêu nghiên cứu

Đánh giá in vitro khả năng ức chế AChE, bảo vệ tế bào F11 trước tổn thương do 6-OHDA và thúc đẩy hình thành neurite của HupA, adenosine, cordycepin và công thức phối hợp được lựa chọn.

Nội dung nghiên cứu

Nghiên cứu gồm bốn nội dung: (i) thu nhận, tinh sạch và định lượng HupA; (ii) thu nhận cao chiết *C. militaris* và định lượng adenosine, cordycepin; (iii) sàng lọc tỷ lệ phối hợp trên phép thử ức chế AChE; và (iv) đánh giá công thức được lựa chọn trên mô hình tế bào F11 và phép đo hình thành neurite. Kết quả được xem là bằng chứng sàng lọc in vitro, làm cơ sở cho các nghiên cứu xác nhận tiếp theo.

1.3. Tính sáng tạo, tư duy hệ thống và tư duy thiết kế

Tính sáng tạo

(1) Cách tiếp cận “đa mục tiêu” có kiểm chứng cộng hợp trên 3 trục tác động then chốt

Điểm sáng tạo của đề tài nằm ở việc không đánh giá rời rạc từng tác dụng, mà thiết kế nghiên cứu để định lượng hiện tượng cộng hợp (synergism) đồng thời trên ba

cơ chế liên quan trực tiếp sinh lý bệnh Alzheimer: ức chế AChE – bảo vệ tế bào thần kinh – kích thích tăng trưởng neurite.

(2) Tổ hợp hoạt chất và hướng tạo sản phẩm ứng dụng mới

Đề tài đặt trọng tâm phối hợp Huperzine A với nhóm hoạt chất từ *Cordyceps militaris* (Adenosine, Cordycepin) và đánh giá tác động cộng hợp dựa trên các phép thử sinh học; hướng nghiên cứu này được định hướng tạo ra sản phẩm mới và trong đề án có nêu đây là hướng “chưa từng có trên thị trường” cho phối hợp HupA + trùng thảo.

(3) Tính sáng tạo về nguồn nguyên liệu HupA theo hướng bền vững

Thay vì phụ thuộc vào nguồn thực vật quý hiếm, đề tài kế thừa hướng thu HupA từ sinh khối nấm nội sinh (*Penicillium* sp. LDL4.4) nhằm gia tăng tính khả thi, chủ động nguyên liệu và giảm áp lực khai thác thạch tùng răng cưa (được nêu là dược liệu quý hiếm).

(4) Chuẩn hóa – định lượng (QC) làm nền cho đánh giá hiệp đồng

Điểm mới về mặt triển khai là chuẩn hóa/định lượng HupA, Adenosine, Cordycepin bằng HPLC-DAD trước khi bước sang tối ưu phối trộn và thử nghiệm sinh học, giúp kết quả cộng hợp có cơ sở định lượng, giảm sai lệch do “không biết chính xác hàm lượng hoạt chất trong mẫu”.

Tư duy hệ thống (Systems thinking)

(1) Nhìn đề tài như một hệ thống “đầu vào → xử lý → đầu ra → phản hồi”

Đề được tổ chức theo chuỗi logic của một hệ thống nghiên cứu:

Nguồn nguyên liệu (sinh khối nấm/ trùng thảo) → tách chiết – tinh sạch → định lượng/chuẩn hóa → tối ưu tỷ lệ phối hợp bằng ô bàn cờ → đánh giá 3 hoạt tính sinh học → phân tích cộng hợp bằng mô hình thống kê-sinh học.

(2) Quản trị phụ thuộc giữa các cấu phần (interdependencies)

Độ tinh sạch và định lượng là điều kiện nền để quy đổi liều/đáp ứng đúng khi tính IC₅₀ và so sánh đơn chất-hỗn hợp

Ba hoạt tính không độc lập: ức chế AChE cải thiện dẫn truyền cholinergic; bảo vệ tế bào giảm chết tế bào do độc chất; neurite outgrowth hướng tới phục hồi kết nối synapse—tạo nên “bộ ba bổ sung lẫn nhau” theo đúng giả thuyết hệ thống của đề tài.

(3) Tư duy hệ thống theo vòng lặp tối ưu (feedback loop)

Kết quả của mỗi mô-đun sẽ quay về điều chỉnh mô-đun trước đó: nếu tỷ lệ tối ưu theo AChE chưa tối ưu cho bảo vệ tế bào/neurite, nghiên cứu sẽ quay lại bước ô bàn cờ để tinh chỉnh tỷ lệ; nhờ vậy hệ thống nghiên cứu có cơ chế phản hồi để hội tụ vào “công thức tối ưu đa tiêu chí”.

Tư duy thiết kế (Design thinking)

(1) Đồng cảm (Empathize) – xuất phát từ nhu cầu người dùng/đối tượng hưởng lợi

Đồ án nêu bối cảnh Alzheimer gia tăng, điều trị hiện tại còn hạn chế (chủ yếu đơn cơ chế) và việc phối hợp thuốc hiện có vẫn có vấn đề tác dụng phụ

. Vì vậy, nhu cầu thực tế là một hướng tiếp cận hỗ trợ điều trị an toàn hơn, đa mục tiêu và có khả năng ứng dụng.

(2) Xác định vấn đề (Define) – chuyển nhu cầu thành “bài toán thiết kế”

Bài toán được xác định rõ: xây dựng và kiểm chứng một tổ hợp hoạt chất tự nhiên có thể tác động đồng thời lên 3 mục tiêu (AChE–neuroprotection–neurite) và đo được mức “cộng hợp”, thay vì chỉ cải thiện một chỉ số đơn lẻ.

(3) Hình thành ý tưởng (Ideate) – chọn giải pháp phù hợp bối cảnh

Giải pháp thiết kế được đề xuất là phối hợp HupA + Adenosine + Cordycepin dựa trên cơ sở tác dụng sinh học và định hướng đa mục tiêu, đồng thời gắn với định hướng ứng dụng tạo sản phẩm hỗ trợ (TPBVSK) cho người Việt trong các giai đoạn phát triển.

(4) Tạo mẫu (Prototype) – “nguyên mẫu” ở đây là công thức tỷ lệ phối hợp tối ưu

Nguyên mẫu không phải là dạng bào chế cuối cùng ngay, mà là tỷ lệ phối hợp tối ưu thu được từ ma trận ô bàn cờ, có kèm chuẩn hóa hàm lượng hoạt chất bằng HPLC-DAD để đảm bảo tái lập.

(5) Kiểm thử (Test) – đánh giá theo bộ tiêu chí đa chiều, có lặp và so sánh

Nguyên mẫu công thức sẽ được “test” theo 3 bài kiểm then chốt đúng thiết kế đề án:

AChE in vitro (DTNB) → IC₅₀

Bảo vệ tế bào thần kinh F11 + 6-OHDA (WST-8)

Neurite outgrowth (staining kit, đo OD)

Sau đó, kết quả được tổng hợp để xác định “cộng hợp” theo mô hình phân tích dự kiến.

1.4. Các yếu tố phục vụ cộng đồng

(1) Đáp ứng nhu cầu sức khỏe cộng đồng về suy giảm trí nhớ/sa sút trí tuệ

Nhu cầu sử dụng các sản phẩm/giải pháp hỗ trợ tăng cường trí nhớ đang tăng và phục vụ nhiều nhóm tuổi khác nhau. Đồng thời, Alzheimer là bệnh chưa có thuốc chữa khỏi hoàn toàn nên nhu cầu về giải pháp hỗ trợ đa mục tiêu là rất cấp thiết.

(2) Góp phần giảm gánh nặng cho người bệnh – gia đình – xã hội theo hướng “hỗ trợ điều trị”

Đề tài hướng tới đánh giá tổ hợp hoạt chất trên 3 trục: ức chế AChE – bảo vệ tế bào thần kinh – kích thích neurite, nhằm tạo cơ sở khoa học cho các hướng hỗ trợ duy trì chức năng nhận thức và liên kết thần kinh.

(3) Tăng khả năng tiếp cận giải pháp trong nước thông qua chuẩn hóa hàm lượng và minh bạch chất lượng

Thực tế thị trường Việt Nam có nhiều sản phẩm “bổ não”, nhưng các sản phẩm có thành phần HupA phần lớn nhập khẩu, sản phẩm trong nước có HupA “chưa nhiều và không được làm rõ hàm lượng”; đồng thời hiện chưa có sản phẩm kết hợp thành phần chính từ Huperzine A và trùng thảo (*Cordyceps militaris*).

Vì vậy, hướng nghiên cứu chuẩn hóa bằng HPLC-DAD để định tính–định lượng các hoạt chất sẽ tạo nền tảng cho việc phát triển sản phẩm có kiểm soát chất lượng tốt hơn phục vụ cộng đồng.

(4) Hướng tới giải pháp hỗ trợ có tiềm năng an toàn hơn so với một số phác đồ phối hợp hiện hành

Đồ án chỉ ra việc phối hợp donepezil và memantine tuy hiệu quả nhưng vẫn có “nhiều tác dụng phụ, nguy hiểm đối với người sử dụng”, vì vậy nhu cầu tìm hướng bổ trợ phù hợp là có cơ sở. Đồng thời HupA được xem là hoạt chất hỗ trợ phòng và điều trị AD với “ít tác dụng phụ” thông qua ức chế AChE, tạo nền cho lựa chọn tổ hợp hoạt chất theo hướng cộng hợp.

(5) Bảo tồn nguồn dược liệu và phát triển bền vững nguồn nguyên liệu hoạt chất

HupA thường được chiết xuất từ thạch tùng răng cưa, trong khi tại Việt Nam đây là “loài cây dược liệu quý hiếm” thuộc danh sách đỏ; do đó hướng khai thác/nuôi cấy và tận dụng nguồn sinh học thay thế là có ý nghĩa cộng đồng và môi trường. Đề tài lựa chọn hướng tách chiết, tinh sạch HupA từ sinh khối nấm *Penicillium* sp. LĐL4.4, góp phần giảm phụ thuộc vào khai thác dược liệu tự nhiên.

(6) Thúc đẩy liên kết viện–trường–doanh nghiệp và tạo giá trị cho chuỗi sản xuất trong nước

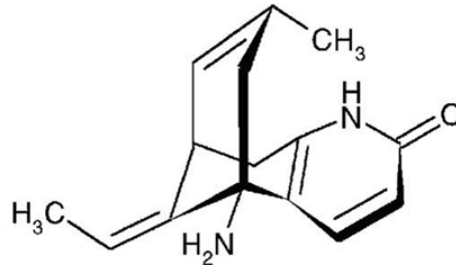
Nguyên liệu trồng thảo dược cung cấp từ doanh nghiệp trong nước, cho thấy khả năng liên kết nguồn lực để tạo chuỗi giá trị “nuôi trồng – chiết xuất – chuẩn hóa – đánh giá hoạt tính”, tăng tiềm năng chuyển giao sau nghiên cứu. Đồng thời định hướng của nhóm nghiên cứu ở các giai đoạn tiếp theo là hướng đến sản phẩm hỗ trợ phòng/điều trị SSTT, trong đó có AD, phù hợp mục tiêu phục vụ cộng đồng.

(7) Lan tỏa tri thức và năng lực nghiên cứu cho cộng đồng khoa học – đào tạo

Việc chuẩn hóa quy trình sàng lọc nhanh trên phiên 96 giếng và xây dựng hệ đánh giá cộng hợp (ô bàn cờ) trên 3 hoạt tính chính giúp tạo một “khung phương pháp” có thể tái sử dụng/đào tạo và mở rộng cho các nghiên cứu hoạt chất tự nhiên khác.

II. Tổng quan tài liệu

2.1. Hoạt chất Huperzine A



Hình 1. Cấu trúc phân tử của Huperzin A

Huperzine A (HupA) là một alkaloid thuộc nhóm Lycopodium, được phân lập từ các loài thuộc họ *Lycopodiaceae*, đặc biệt là *Huperzia serrata*, và từ lâu đã được xem là một trong những hoạt chất tự nhiên tiêu biểu có tiềm năng ứng dụng trong điều trị bệnh AD[5,16]. HupA thu hút sự quan tâm lớn của giới nghiên cứu do vừa có nguồn gốc tự nhiên, vừa thể hiện hoạt tính sinh học rõ rệt trên hệ thần kinh trung ương [5,6]. Các tổng quan dược lý cho thấy HupA đã được phát triển như một thuốc điều trị AD tại Trung Quốc, đồng thời cũng được lưu hành dưới dạng thực phẩm bổ sung ở một số thị trường khác [5,16].



Hình 2. Cây Thạch tùng rừng của *Huperzia serrata*

Về cơ chế tác dụng, HupA nổi bật nhất với vai trò là chất ức chế AChE có tính thuận nghịch, mạnh và tương đối chọn lọc [5,6]. Việc ức chế AChE giúp làm tăng nồng độ acetylcholine tại khe synapse, qua đó cải thiện dẫn truyền cholinergic, một trục bệnh sinh quan trọng trong suy giảm nhận thức ở bệnh AD [5,6]. Liang và cộng sự cho thấy HupA có tác dụng làm tăng nồng độ acetylcholine ở vỏ não chuột và kéo dài tác dụng hơn so với một số thuốc đối chứng như donepezil và rivastigmine trong mô hình thực nghiệm [17]. Những dữ liệu này củng cố cơ sở cho việc xem HupA như một hoạt chất có giá trị trong định hướng hỗ trợ điều trị AD [5,17].

Bên cạnh tác dụng trên AChE, HupA còn được ghi nhận có nhiều đặc tính bảo vệ thần kinh khác ngoài cơ chế cholinergic đơn thuần [5,6]. Các bài tổng quan và nghiên cứu tiền lâm sàng cho thấy HupA có thể làm giảm độc tính do amyloid- β , hạn chế stress oxy hóa, cải thiện rối loạn chức năng ty thể và giảm tổn thương chết tế bào thần kinh trong nhiều mô hình thực nghiệm [5,6]. Qian và Ke nhận định rằng HupA có tiềm năng vượt khỏi vai trò của một thuốc cải thiện triệu chứng, hướng tới đặc tính điều biến tiến trình bệnh trên nhiều mắt xích bệnh sinh của Alzheimer [5]. Vì vậy, HupA thường được xem là một ứng viên phù hợp trong chiến lược tiếp cận đa mục tiêu đối với bệnh thoái hóa thần kinh [5,6].

Một điểm đặc biệt quan trọng đối với đề tài này là HupA còn có liên quan đến quá trình tăng trưởng và biệt hóa thần kinh [7]. Tang và cộng sự đã chứng minh rằng HupA làm tăng tiết nerve growth factor ở tế bào thần kinh đệm vỏ não chuột nuôi cấy, đồng thời làm tăng số lượng tế bào PC12 mang neurite [7]. Kết quả này cho thấy HupA không chỉ tác động trên trực ức chế AChE mà còn có khả năng hỗ trợ tăng trưởng sợi thần kinh, tức một chỉ tiêu có ý nghĩa trong phục hồi kết nối synapse và chức năng neuron [7]. Chính đặc tính tác động đa hướng này khiến HupA trở thành thành phần trung tâm hợp lý trong các nghiên cứu phối hợp với các hoạt chất tự nhiên khác [5,7].

Ở Việt Nam, thạch tùng răng cưa là loài cây dược liệu quý hiếm, thuộc danh sách "đỏ" trong Chương trình Nghiên cứu bảo tồn và phát triển nguồn gen quý hiếm về cây thuốc. Việc nghiên cứu phân lập các chủng nấm nội sinh trong cây *H. serrata* có khả năng sản sinh hoạt chất HupA đã được các nhà khoa học quan tâm nhằm thay

thể, tăng cường lượng HupA cho ngành công nghiệp dược. Đã có nhiều kết quả nghiên cứu khả quan được công bố, đặc biệt là ở Trung Quốc – nơi có cây *H. serrata* phân bố nhiều. Trong khuôn khổ của các đề tài cấp Nhà nước thuộc Chương trình khoa học và công nghệ trọng điểm cấp Quốc gia giai đoạn 2016 – 2020: “Nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ tiên tiến phục vụ bảo vệ và chăm sóc sức khỏe cộng đồng” và đề tài KC.10/16-20: “Nghiên cứu bào chế viên nang chứa hoạt chất Huperzine A được tách chiết từ một số chủng nấm phân lập từ cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*)”, mã số KC10.01/16-20 (2016-2019) do TS. Lê Thị Minh Thành, Viện Công nghệ sinh học làm chủ nhiệm đã phân lập được 296 chủng nấm nội sinh từ cây dược liệu *H. serrata* tại Langbiang – Đà Lạt – Lâm Đồng và Vườn Quốc gia Hoàng Liên – Lào Cai, Việt Nam. Bằng phương pháp sắc ký màng mỏng (TLC) và sắc ký hiệu năng cao (HPLC), nhóm đề tài đã xác định được 05 chủng vi nấm có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất HupA (*Penicillium reticulisporum* Tsp41, *Penicillium* sp. LDL4.4, *Fusarium* sp. Rsp5.2, *Xylaria* sp. Tsp20 và *Fungal endophyte* sp. Tsp25)[14]. Trong đó chủng *Penicillium* sp. LDL4.4 được chọn làm chủng giống gốc cho lên men sản xuất HupA quy mô 500 lít. Đề tài đã xây dựng được qui trình lên men thu nhận HupA từ chủng LDL4.4 trên qui mô thiết bị 500 lít. Đề tài cũng đã xây dựng được các qui trình cơ bản ban đầu cho công nghệ tách chiết, tinh sạch, thu nhận hoạt chất HupA từ sinh khối nấm qui mô pilot; qui trình công nghệ bào chế viên nang cứng chứa hoạt chất HupA qui mô phòng thí nghiệm/pilot. Chính vì vậy, trong dự án này chúng tôi đã có sự kế thừa từ nguồn nguyên liệu cho tinh sạch HupA từ sinh khối lên men của chủng *Penicillium* sp. LDL4.4.

2.2. Tổng quan về Acetylcholinesterase (AChE).

Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) là enzyme thủy phân nhanh acetylcholine thành choline và acetate tại khe synapse, qua đó kết thúc tín hiệu dẫn truyền cholinergic. Trung tâm hoạt động nằm ở đáy một rãnh hẹp giàu acid amin thơm, gồm vùng xúc tác và vùng gắn cơ chất; ngoài ra, vùng ngoại vi ở miệng rãnh có thể tham gia nhận diện cơ chất và chất ức chế [18].

Trong AD, sự suy giảm neuron cholinergic góp phần làm giảm acetylcholine và liên quan đến rối loạn nhận thức. Ức chế AChE giúp kéo dài thời gian tồn tại của acetylcholine tại synapse, là cơ sở dược lý của donepezil, rivastigmine, galantamine và HupA [4–6,19]. Cơ chế này chủ yếu cải thiện triệu chứng và không đại diện cho toàn bộ bệnh sinh của AD.

Hoạt tính AChE trong đề tài được đo theo nguyên lý Ellman: acetylthiocholine bị AChE thủy phân tạo thiocholine; thiocholine phản ứng với DTNB tạo sản phẩm màu vàng, được theo dõi ở 412 nm [20]. Với cao chiết hoặc mẫu có màu, cần có giếng trắng mẫu và giếng không enzyme để loại trừ hấp thụ nền hoặc tương tác trực tiếp với DTNB.

Do HupA là chất ức chế AChE mạnh, phép thử này được sử dụng làm bước sàng lọc tỷ lệ phối hợp. Các kết quả trên AChE chỉ phản ánh tương tác trong hệ enzyme in vitro; tác dụng bảo vệ tế bào và hình thành neurite cần được đánh giá bằng các mô hình riêng.

2.3. Hoạt chất Adenosine, Cordycepin và nấm trùng thảo *Cordyceps militaris*



Hình 3. Hình ảnh nấm trùng thảo *Cordyceps militaris*

Cordyceps militaris là nấm ký sinh côn trùng có thể nuôi trồng nhân tạo, chứa Adenosine, Cordycepin, polysaccharide, ergothioneine và nhiều chất chuyển hóa khác [10,21,22]. So với *Ophiocordyceps sinensis* tự nhiên, *C. militaris* có ưu thế về khả năng chủ động nguồn nguyên liệu và chuẩn hóa quy trình nuôi cấy.

Nguồn thu nhận và chuẩn hóa hoạt chất

Adenosine là nucleoside có mặt rộng rãi trong tế bào sinh vật và có thể thu nhận từ nguyên liệu sinh học, dịch lên men hoặc tổng hợp hóa học. Trong sản phẩm Cordyceps, hàm lượng Adenosine phụ thuộc chủng nấm, cơ chất, điều kiện nuôi, giai đoạn thu hoạch và phương pháp chiết [10,13,22].

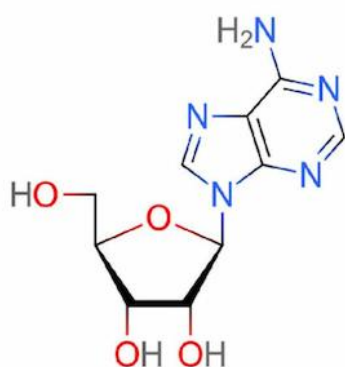
Cordycepin có thể được thu nhận từ quả thể hoặc dịch lên men *C. militaris*, làm giàu bằng các kỹ thuật hấp phụ–giải hấp, sắc ký và kết tinh; ngoài ra còn có các hướng tổng hợp hóa học hoặc chuyển hóa sinh học [10,22]. Do hàm lượng biến động theo lô, định lượng đồng thời Adenosine và Cordycepin là bước cần thiết khi sử dụng cao chiết trong nghiên cứu sinh học [13,23–25].

Cao chiết sử dụng trong đề tài được thu từ quả thể *C. militaris* nuôi trồng nhân tạo. Vì cao còn chứa nhiều thành phần ngoài Adenosine và Cordycepin, kết quả của nhóm cao chiết phải được diễn giải là tác dụng của cao đã chuẩn hóa hai chất chỉ thị, không được quy hoàn toàn cho riêng hai nucleoside.

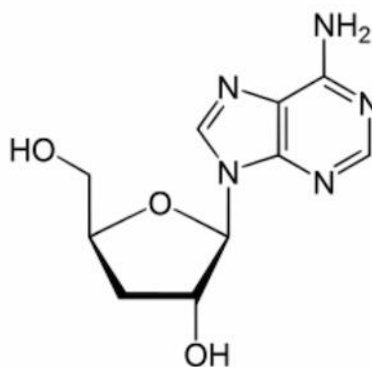
Việc chuẩn hóa nguyên liệu cần tối thiểu các thông tin về khối lượng ban đầu, hiệu suất cao, độ ẩm, hàm lượng hai chất chỉ thị, số lô và độ lặp lại giữa các lần phân tích. Những thông tin này đồng thời là cơ sở quy đổi tỷ lệ HupA:A+C trong công thức phối hợp.

Trong đề tài, adenosine và cordycepin được định lượng bằng HPLC-DAD và dùng để thiết lập hỗn hợp A+C theo tỷ lệ có trong cao. Công thức tế bào sử dụng HupA phối hợp với cao chiết cần được phân biệt rõ với công thức sử dụng HupA phối hợp chất chuẩn A+C.

Các công bố trước đã ghi nhận *C. militaris* thúc đẩy phát triển neurite ở tế bào Neuro2A và cải thiện một số chỉ số trí nhớ trên động vật [26], đồng thời cho thấy tiềm năng bảo vệ thần kinh trong mô hình thiếu máu não [27]. Vì vậy, tính mới của đề tài nằm ở tổ hợp và hệ phép thử cụ thể, không phải ở việc lần đầu ghi nhận tác dụng của *C. militaris* lên neurite.



Adenosine



Cordycepin

Hình 4. Cấu trúc phân tử của Adenosine và Cordycepin

Adenosine là nucleoside nội sinh điều hòa hoạt động thần kinh qua bốn phân nhóm thụ thể A1, A2A, A2B và A3. Trong hệ thần kinh trung ương, hoạt hóa A1

thường làm giảm phóng thích chất dẫn truyền và giảm tính kích thích của neuron, trong khi A2A có thể làm tăng dẫn truyền và điều biến tính dẻo synapse; tác dụng phụ thuộc loại tế bào, vị trí thụ thể và bối cảnh bệnh lý [8,28].

Rối loạn tín hiệu Adenosine, đặc biệt tăng hoạt tính thụ thể A2A tại synapse và tế bào thần kinh đệm, được liên hệ với rối loạn mạng neuron–glia và suy giảm trí nhớ [8,9]. Tuy nhiên, adenosine ngoại sinh không phải chất chủ vận chọn lọc một thụ thể; tác dụng A1 và A2A có thể khác hoặc đối lập. Vì vậy, sự hiện diện của Adenosine trong công thức chỉ tạo giả thuyết về điều hòa purinergic, chưa chứng minh cơ chế thụ thể cụ thể.

Cordycepin (3'-deoxyadenosine) là dẫn xuất nucleoside đặc trưng của *C. militaris*. Sự thiếu nhóm hydroxyl ở vị trí 3' làm Cordycepin có đặc tính sinh học khác Adenosine. Hoạt chất này được ghi nhận có tác dụng chống oxy hóa, chống viêm và điều hòa apoptosis trong nhiều hệ thực nghiệm [10–12].

Trên tế bào HT22, Cordycepin làm giảm apoptosis liên quan stress oxy hóa và stress lưới nội sinh chất do glutamate [11]. Trên tế bào PC12, Cordycepin làm giảm độc tính do 6-OHDA thông qua các đáp ứng chống oxy hóa [12]. Các dữ liệu này hỗ trợ lựa chọn Cordycepin cho trực bảo vệ tế bào, nhưng không cho thấy Cordycepin trực tiếp ức chế AChE.

Cơ sở phối hợp được xây dựng theo hướng bổ trợ cơ chế: HupA tác động trực tiếp lên AChE; adenosine liên quan điều hòa purinergic; cordycepin và các thành phần của cao *C. militaris* có thể tham gia kiểm soát stress oxy hóa và sự sống còn của tế bào. Đây là giả thuyết đa đích cần kiểm chứng thực nghiệm; tính hiệp đồng chỉ được kết luận khi có phân tích tương tác định lượng phù hợp.

2.4. Bệnh Alzheimer và sa sút trí tuệ

Suy giảm trí nhớ (SGTN) là hiện tượng não bộ suy giảm chức năng hoặc quá trình vận chuyển những thông tin và trí nhớ về vỏ não bị ngưng trệ[29]. Gần đây, nhiều nghiên cứu thống kê rằng 85% người trẻ dưới 50 tuổi ít nhất gặp phải một vấn đề về trí nhớ kém, trong đó có đến 20-30% ở người dưới 30 tuổi, phần còn lại tập trung ở lứa tuổi trung niên. Xu hướng này cũng được ghi nhận ở Hoa Kỳ, với tỷ lệ suy giảm nhận thức ở nhóm 18-39 tuổi tăng đáng kể trong thập kỷ qua. Các số liệu trên cho thấy đây là một thực trạng đáng báo động bởi có đến 50% suy giảm trí nhớ

ở người trẻ sẽ diễn tiến thành hội chứng sa sút trí tuệ (SSTT) ở người già, đặc biệt trong số đó là bệnh AD. Trên toàn cầu, AD là nguyên nhân phổ biến nhất của chứng SSTT, chiếm ước tính từ 60% đến 80% các trường hợp [1,30]. Năm 2015, chứng SSTT đã ảnh hưởng đến hơn 47 triệu người trên toàn thế giới, ước tính sẽ tăng lên 76 triệu người vào năm 2030 và 145 triệu người vào năm 2050 [31]. Dự báo gần đây cũng chỉ ra số người mắc bệnh AD có thể tăng gấp ba vào năm 2050 [1,31]. Việt Nam chính thức bước vào giai đoạn già hóa dân số từ năm 2011 khi có 11% số dân là những người trên 60 tuổi. Theo điều tra dân số năm 2017, cả nước có 11 triệu người trên 60 tuổi chiếm khoảng 11,95% dân số, trong đó có khoảng gần 2 triệu người từ 80 tuổi trở lên [32]. Các nguyên nhân SGTN ở người trẻ bao gồm tác động của các gốc tự do được sinh ra trong quá trình chuyển hóa bình thường của cơ thể hằng ngày; áp lực từ công việc, học hành, môi trường ô nhiễm... dễ dẫn đến stress; công việc quá tải làm căng thẳng thần kinh, tác động trực tiếp lên trung tâm thần kinh nhận thức, điều này làm não bộ suy giảm chức năng và trí nhớ sa sút dần [29]. Trong khi đó nguyên nhân của bệnh AD có thể do một số lý do như: i) sự tích tụ của các mảng beta-amyloid lắng đọng trong khoảng trống giữa các tế bào thần kinh, ii) sự hình thành protein Tau gây ra các đám rối sợi thần kinh tích tụ bên trong [2]. Điều này dẫn đến tế bào thần kinh vỏ não mất đi bởi vì chúng ngừng hoạt động, mất liên lạc giữa các tế bào xung quanh và cuối cùng chết đi gây ra sự co lại của não theo thời gian [2]. Chính vì vậy, nhu cầu sử dụng các thuốc, thực phẩm chức năng, thực phẩm bảo vệ sức khỏe để tăng cường trí nhớ ngày càng cao, phục vụ cho nhiều độ tuổi khác nhau [1].

Hiện nay trên thị trường các nhóm thuốc điều trị và hỗ trợ điều trị AD và các bệnh SSTT chỉ nhắm vào 2 cơ chế chính là ức chế enzyme thủy phân AChE (được chứng minh dựa vào hoạt tính bảo vệ tế bào TK và tăng sinh sợi liên kết thần kinh) và thuốc ngăn chặn N-methyl-D-aspartate (NMDA)[19,33]. Ngoài ra, khi sử dụng phối hợp cả 2 cơ chế với hỗn hợp thuốc donepezil và memantine có tác dụng hiệu quả nhất, nhưng sự phối kết hợp này vẫn có rất nhiều tác dụng phụ, nguy hiểm đối với người sử dụng. Trong khi đó, phương pháp chống các mảng bám (do protein Tau và beta-amyloid) không được ứng dụng rộng rãi do tính khả thi không cao. Do vậy, HupA được xem là hoạt chất để hỗ trợ phòng và điều trị bệnh AD với ít tác dụng phụ so với các chất đang được lưu hành thông qua việc ức chế AchE [5]. Nghiên cứu cho

thấy HupA không chỉ có tác dụng ức chế AChE mà còn có các tác dụng bảo vệ thần kinh khác, như bảo vệ tế bào thần kinh chống lại tổn thương do 6-OHDA, cải thiện rối loạn chức năng ty thể và điều chỉnh yếu tố tăng trưởng thần kinh[5,7]. Tuy nhiên hướng nghiên cứu này vẫn tồn tại vài nhược điểm đó là khả năng bảo vệ các tế bào thần kinh khỏi sự tổn thương và chết. Để giảm bớt và khắc phục yếu điểm này, chúng tôi đặt vấn đề nghiên cứu phối kết hợp HupA với cao trùng thảo (*Cordyceps militaris*). Nikkha và cộng sự (2017) đã chứng minh rằng khi phối trộn 2 hay nhiều thuốc với nhau, dựa trên tác động cộng hợp (hiệp đồng), tác dụng của chúng mang lại có thể đạt gấp từ 3 – 4 lần trở lên so với sử dụng riêng lẻ từng đơn chất[34]. Tác động cộng gộp (hiệp đồng) cytotoxic của Cordycepin trong *Cordyceps militaris* liên quan đến hiện tượng apoptosis trong các tế bào bệnh bạch cầu người cũng đã được báo cáo[35]. Trong một nghiên cứu khác, tác động cộng gộp của cao chiết *Cordyceps sinensis* (CSE) phối trộn với cao chiết *Gymnema inodorum* có hiệu quả như một liệu pháp bổ sung để kiểm soát chứng tăng lipid máu và béo phì[36]. Trên thị trường trong nước, đã có một số sản phẩm của Dược phẩm Vinh Gia, Học viện Quân Y, phối trộn cao trùng thảo với cao nấm linh chi, cao chiết nhụy hoa nghệ tây, cao sâm ngọc linh... Trên thế giới, đã có một số sản phẩm thương mại có chứa HupA và với một/nhiều hợp chất tự nhiên khác với hàm lượng HupA 50/100 µg/viên (hoặc 1%) và một/nhiều hợp chất tự nhiên như: Eleuthero, lecithin, citric acid, malic acid, palmitin, stearin, vinpocetine... Việc phối trộn HupA và cao trùng thảo *Cordyceps militaris* và đánh giá tác động cộng gộp của chúng dựa trên phương pháp thử hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh (TBTK) và tăng sinh sợi liên kết thần kinh là một hướng nghiên cứu tạo ra sản phẩm bảo vệ sức khỏe mới.

Tại Việt Nam, trên thị trường đã có rất nhiều sản phẩm bổ não với nhiều dạng từ dạng viên nén để uống đến dạng thuốc nước để cải thiện sức khỏe cho bộ não. Đa phần, các thuốc bổ não có thành phần chính là Ginkgo biloba - một dạng chiết xuất từ lá cây của Bạch quả. Một số bằng chứng cho thấy chiết xuất bạch quả có thể cải thiện trí nhớ ở người lớn khỏe mạnh một cách khiêm tốn [37]. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu chỉ ra rằng bạch quả không cải thiện trí nhớ, sự chú ý hoặc chức năng não [37,38]. Thêm vào đó, các thuốc chứa tinh chất Blueberry có trong quả Việt quất; saponin có trong rễ của cây đinh lăng cũng được sử dụng để bổ dưỡng cho não bộ

của con người, giúp tăng cường sinh lực, trí lực, chống suy nhược thần kinh. Ngoài ra, còn có các nhóm thuốc có chứa cinnarizine, cerebrolysin, citicoline, piracetam... cũng được sử dụng để bổ não nhưng có một số tác dụng phụ nhất định. Tuy vậy, các sản phẩm là thuốc hoặc thực phẩm chức năng hỗ trợ phòng, điều trị SSTT hoặc thực phẩm bảo vệ sức khỏe cải thiện trí nhớ có thành phần từ HupA hầu hết được nhập khẩu từ nước ngoài, các sản phẩm do Việt Nam sản xuất có thành phần HupA thì chưa nhiều và không được làm rõ hàm lượng. Các sản phẩm này chủ yếu dưới dạng cao chiết thạch từng răng cưa với hàm lượng cao chiết từ 65 mg-300 mg. Nghiên cứu trong nước đã phát triển và chứng minh tác dụng tăng cường trí nhớ của viên nang mềm HupA trên mô hình chuột bị SGTN gây bởi scopolamine[39]. Trên thị trường trong và ngoài nước, hiện chưa có sản phẩm nào có thành phần chính từ HupA và cao trùn thảo (*Cordyceps militaris*). Do vậy, trong giai đoạn đầu tiên, trong khuôn khổ của đề tài này, chúng tôi muốn tạo ra một sản phẩm dưới dạng thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người Việt có tác dụng tăng cường trí nhớ sử dụng hợp chất HupA kết hợp với cao trùn thảo(*Cordyceps militaris*). Ở các giai đoạn tiếp theo, chúng tôi muốn hướng đến sản phẩm nhằm hỗ trợ phòng, điều trị bệnh sa sút trí tuệ (SSTT), trong đó có bệnh AD.

2.5. Tế bào F11 và mô hình tổn thương bằng 6-OHDA

F11 là dòng tế bào lai được tạo từ neuron hạch rễ sau của chuột cống phôi và tế bào u nguyên bào thần kinh chuột N18TG2. Dòng tế bào này duy trì một số đặc tính của neuron cảm giác, có khả năng biệt hóa và hình thành neurite trong các điều kiện thích hợp [40]. Nhờ tăng trưởng ổn định và dễ quan sát hình thái, F11 được dùng trong nghiên cứu độc tính, biệt hóa và phát triển neurite.

6-Hydroxydopamine (6-OHDA) là chất tương tự catecholamine dễ bị oxy hóa, tạo các loại oxy phản ứng, gây rối loạn ty thể và làm giảm khả năng sống của tế bào. 6-OHDA thường được sử dụng để tạo tổn thương oxy hóa/dopaminergic trong các mô hình in vitro và tiền lâm sàng [12,41,42]. Dung dịch 6-OHDA cần được pha mới, hạn chế ánh sáng và thời gian tiếp xúc với không khí.

Trong đề tài, F11/6-OHDA được chọn để khảo sát khả năng duy trì hoạt tính chuyển hóa của tế bào và hình thành neurite. Mô hình này phù hợp cho sàng lọc tổn thương tế bào do stress oxy hóa nhưng không đặc hiệu cho AD; kết quả phải được

giới hạn ở mức in vitro và cần xác nhận bằng mô hình liên quan trực tiếp đến amyloid/tau hoặc mô hình động vật.

2.6. Nghiên cứu trong nước và ngoài nước

Trên thế giới, HupA đã được nghiên cứu tương đối sâu cả ở mức hóa học, dược lý và tiền lâm sàng [5,6,16]. Nhiều công trình tập trung vào hoạt tính ức chế AChE, khả năng bảo vệ thần kinh và tiềm năng cải thiện nhận thức của HupA trong các mô hình AD [5,6,17]. Ở nhóm *Cordyceps militaris*, phần lớn nghiên cứu tập trung vào thành phần hóa học, đặc biệt là Cordycepine và Adenosine, cũng như các tác dụng chống oxy hóa, chống viêm và bảo vệ thần kinh của các hợp chất này [10–12]. Tuy nhiên, đa số các công bố quốc tế hiện nay vẫn đánh giá riêng lẻ từng hoạt chất hoặc từng cao chiết, trong khi số nghiên cứu khảo sát trực tiếp một tổ hợp gồm HupA, Adenosine và Cordycepin còn rất hạn chế [5,10–12].

Ở Việt Nam, nghiên cứu về HupA đã có những bước tiến đáng chú ý trong hơn một thập niên gần đây [14,15,43]. Vũ Thị Ngọc và cộng sự đã xác định được sự hiện diện của HupA trong *Huperzia serrata* thu tại Đà Lạt và xây dựng được phương pháp định tính, định lượng bằng TLC và HPLC [43]. Lê Thị Minh Thanh và cộng sự năm 2019 đã phân lập các chủng nấm nội sinh từ *H. serrata* ở Việt Nam và sàng lọc được chủng có khả năng sinh HupA, qua đó mở ra hướng khai thác nguồn hoạt chất thay thế từ vi sinh vật [14]. Đến năm 2023, nhóm này tiếp tục công bố thêm các chủng nấm nội sinh sinh Huperzine từ các loài *Lycopodiaceae* khác, cho thấy khả năng mở rộng nguồn nguyên liệu sinh học cho sản xuất HupA [15]. Đây là nền tảng rất thuận lợi cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo ở trong nước [14,15,43].

Đối với *Cordyceps militaris*, các nghiên cứu trong nước hiện chủ yếu tập trung vào chuẩn hóa nguyên liệu và kiểm soát chất lượng [13]. Nguyễn Thị Thịnh và cộng sự năm 2024 đã xây dựng phương pháp định lượng đồng thời Adenosine và Cordycepin trong các thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa *Cordyceps* đang lưu hành trên thị trường Việt Nam [13]. Công trình này có ý nghĩa thực tiễn vì cho thấy nhu cầu chuẩn hóa định lượng hoạt chất là rất cần thiết trước khi đi sâu vào các nghiên cứu dược lý hoặc phát triển sản phẩm [13]. Tuy vậy, các nghiên cứu về tác dụng thần kinh của tổ hợp HupA – Adenosine – Cordycepin tại Việt Nam hiện vẫn còn rất ít [13–15].

Nhìn chung, khoảng trống nghiên cứu hiện nay nằm ở chỗ đã có tương đối nhiều dữ liệu về từng hoạt chất riêng lẻ, nhưng còn thiếu bằng chứng thực nghiệm đánh giá trực tiếp hiệu quả của hỗn hợp HupA – Adenosine – Cordycepin trên các chỉ tiêu cốt lõi liên quan đến bệnh AD [5,7,8,11,12]. Đặc biệt, rất ít nghiên cứu xem xét đồng thời ba trục tác động gồm ức chế AChE, bảo vệ tế bào thần kinh và kích thích tăng trưởng neurite trong cùng một mô hình thiết kế [5,7,11,12]. Vì vậy, đề tài này có tính kế thừa từ các nghiên cứu trước về nguồn nguyên liệu và chuẩn hóa hoạt chất, đồng thời có tính mới ở định hướng đánh giá tác dụng phối hợp đa mục tiêu của ba hoạt chất tự nhiên liên quan trực tiếp đến bệnh sinh AD [5,13–15].

III. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

3.1. Vật liệu nghiên cứu.

- Sinh khối tươi của chủng *Penicillium* sp. LĐL4.4 có khả năng sinh tổng hợp HupA, kế thừa từ đề tài KC10.01/16-20 [14].
- Quả thể *Cordyceps militaris* được cung cấp bởi Công ty Cổ phần Nghiên cứu và Chuyển giao Khoa học Công nghệ Việt Nam.
- Chất chuẩn HupA, adenosine và cordycepin (Sigma-Aldrich). Dòng tế bào F11; 6-OHDA; mNGF; thuốc thử WST-8 và bộ nhuộm neurite được sử dụng trong các phép thử tế bào.

3.2. Hóa chất và dụng cụ chính.

Bảng 1. Danh mục hóa chất và dụng cụ chính

STT	Tên hóa chất	Nguồn gốc
1	Dung môi: Acetonitrile, nước cất, amoni acetat, acid acetic	Merck (Đức)
2	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco (Mỹ)
3	Huyết thanh thai bò	Gibco (Mỹ)
4	Penicillin	Sigma-Aldrich (Mỹ)
5	Trypsin – EDTA 0.25%	Sigma-Aldrich (Mỹ)
6	Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich (Mỹ)

7	Phosphate buffered saline	Merck (Đức)
8	Chất chuẩn mNGF	Merck (Đức)
9	Chất chuẩn adenosine, cordycepin	Merck (Đức)
10	6-Hydroxydopamine	Merck (Đức)

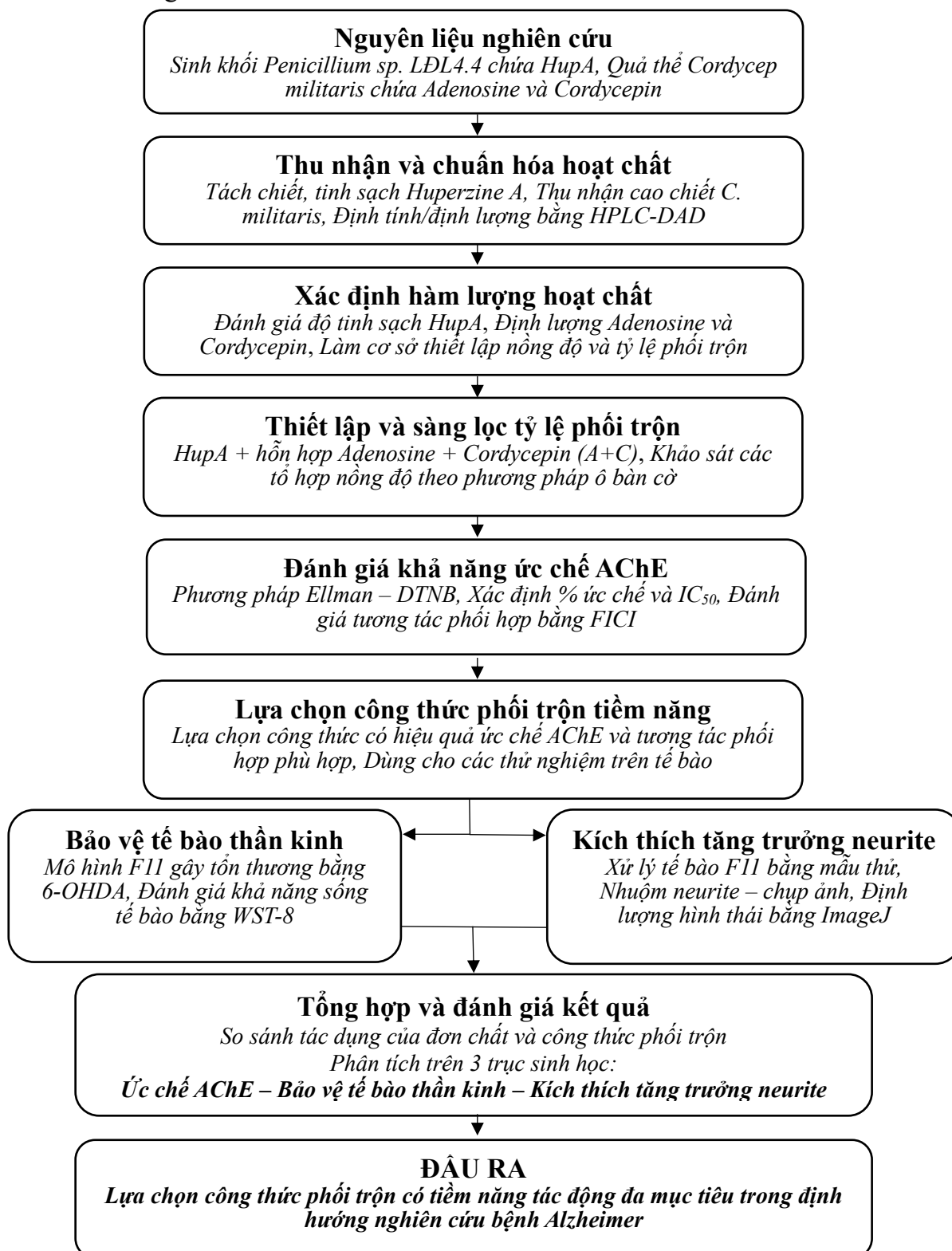
3.3. Một số thiết bị cần sử dụng.

Bảng 2. Hóa chất, dụng cụ và thiết bị sử dụng

STT	Tên thiết bị	Nguồn gốc
1	Cân kỹ thuật điện tử, cân phân tích	Sartorius (Đức)
2	Máy siêu âm	Elma (Đức)
3	Tủ sấy	Binder (Đức)
4	Máy cắt quay chân không	Büchi (Thụy sĩ)
5	Máy ly tâm	Hettich (Đức)
6	Bình cầu cổ nhám dung tích 100 – 1000ml	Duran (Đức)
7	Cột sắc ký	Duran (Đức)
8	Tủ cấy vi sinh an toàn sinh học	Thermo Fisher Scientific (Mỹ)
9	Tủ ấm nuôi cấy tế bào	Thermo Fisher Scientific (Mỹ)
10	Kính hiển vi soi ngược	Zeiss (Đức)
11	Máy ly tâm lạnh	Thermo Fisher (Mỹ)
12	Hệ thống bảo quản mẫu	Thermo Fisher (Mỹ)
13	Buồng đếm tế bào Neubauer	Marienfeld (Đức)
14	Các thiết bị khác: Pipet, đĩa nuôi, ống eppendorf, ống nghiệm,...	Falcon (Mỹ)

3.4. Phương pháp nghiên cứu

Sơ đồ tổng thể của thiết kế nghiên cứu được trình bày dưới đây, theo trình tự từ chuẩn hóa nguyên liệu, sàng lọc hoạt tính ức chế AChE, đánh giá bảo vệ tế bào F11 đến đánh giá hình thành neurite.



Hình 5. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

3.4.1. Phương pháp định tính, định lượng HupA bằng HPLC-DAD

Phương pháp Sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC - DAD

Nguyên lý: Hàm lượng HupA được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC). HPLC là quá trình tách một hỗn hợp chất trong cột sắc ký ở trạng thái lỏng. Các chất mẫu phân tích phải được hòa tan trong một chất lỏng phù hợp thường chính là pha động chạy sắc ký. Các mẫu được phân tích bằng hệ thống HPLC với hệ dung môi ethanol: nước (85:15, v/v), tốc độ dòng chảy 1,0 mL/phút, thời gian chạy 30 phút. Hàm lượng HupA được xác định dựa trên sắc ký đồ HPLC của chuẩn HupA tại nồng độ xác định từ 0,10–1,0 µg/mL.

Dựa trên nguyên tắc mẫu được hòa tan trong pha động và được bơm áp suất cao đẩy qua cột sắc ký chứa pha tĩnh. Dựa trên sự khác biệt về hệ số phân bố và ái lực tương tác hóa học giữa các cấu tử trong mẫu với hai pha, quá trình tách sắc ký diễn ra. Các chất được tách riêng biệt sẽ lần lượt đi qua flow-cell của detector DAD.

Các mẫu dịch lên men và dịch tinh sạch được phân tích trên hệ thống HPLC-DAD. Hàm lượng HupA được xác định dựa trên sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối đầu dò mảng diode của chuẩn HupA.

Cách tiến hành

Định tính và đánh giá độ tinh sạch: Mẫu HupA sau tinh sạch được phân tích bằng HPLC-DAD. Pic HupA được nhận diện bằng cách so sánh thời gian lưu và phổ hấp thụ UV với chất chuẩn HupA; độ tinh sạch tương đối được đánh giá theo tỷ lệ diện tích pic HupA so với tổng diện tích các pic ghi nhận trên sắc ký đồ.

Định lượng HupA theo đường chuẩn: Mẫu phân tích ở dạng dung dịch được lọc qua màng PTFE 0,2 µm trước khi tiêm. Đường chuẩn HupA được xây dựng từ 5 mức nồng độ 10; 50; 200; 500 và 1000 µg/mL. Nồng độ HupA trong mẫu được xác định từ phương trình hồi quy tuyến tính giữa diện tích pic (y) và nồng độ chất chuẩn (x).

Điều kiện HPLC-DAD dùng cho phép định lượng gồm: cột C18 Agilent 250 × 4,6 mm, kích thước hạt 5 µm; pha động A là nước chứa ammonium acetate (AcONH₄) 10 mM, pH 5; pha động B là acetonitrile (MeCN) chứa 0,1% acid acetic (AcOH);

hiệu suất chiết 33 °C; thể tích tiêm 10 µL; tốc độ dòng 1 mL/phút; bước sóng phân tích 310 nm.

Chương trình rửa giải được thiết lập như sau: 0–7 phút, 90% A/10% B; 7,01–14 phút, 80% A/20% B; từ 14,01–20 phút đưa hệ trở lại 90% A/10% B. Sau khi thu diện tích pic của mẫu, nồng độ HupA được tính theo phương trình đường chuẩn $x = (y - b)/a$ [13,23,24].

3.4.2. Phương pháp tinh sạch, kết tinh và thu nhận Huperzine A tinh khiết

Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý làm giàu – loại tạp theo độ tan và tính phân cực của các cấu tử, kết hợp chiết phân bố dung môi và kết tinh (recrystallization) để thu HupA ở dạng tinh thể có độ tinh khiết cao. Nói cách khác, hệ dung môi và điều kiện nhiệt độ/pH được lựa chọn nhằm tạo ra chênh lệch độ tan giữa HupA và các tạp chất: tạp chất tan tốt sẽ nằm lại trong dung dịch ban đầu, còn HupA tan kém trong điều kiện kết tinh sẽ tách ra dạng tinh thể.

Cách tiến hành

Cặn HupA thô được rửa bằng chloroform tỷ lệ 1:1, lắc ở 150 vòng/phút 2 giờ, cất cô quay áp suất giảm ở 40°C, thu cặn. Hòa tan cặn trong cồn và chiết bằng ethyl acetate với tỷ lệ 1:1. Sau đó mẫu được cất cô quay ở 40°C, thu cặn tinh thể màu ánh vàng. Cặn thu được hòa vào ethanol theo tỷ lệ 1:10 (w/v). Mẫu được kết tinh trong acetone lạnh với các điều kiện : nhiệt độ ở 0-10°C, pH 5,0-5,5, nồng độ HupA là 70 mg/L, thời gian là 15 giờ. Sấy khô thu tinh thể màu trắng ngà. Kiểm tra bằng HPLC-DAD và xác định cấu trúc của HupA thu được[14].

3.4.3. Phương pháp tách chiết, thu nhận và định lượng Adenosine, Cordycepin từ nấm trùng thảo

Nguyên lý

Các hoạt chất mục tiêu (đặc biệt Adenosine, Cordycepin) hòa tan vào ethanol, sau đó khuếch tán từ nguyên liệu ra dung môi; việc gia nhiệt và khuấy/đảo định kỳ giúp tăng độ hòa tan và tăng chuyển khối nên nâng hiệu suất chiết. Dịch chiết sau đó được lọc và cô dưới áp suất giảm để thu hồi dung môi, thu cao chiết cô đặc, đồng thời

hạn chế phân hủy hoạt chất do nhiệt.

Tối ưu hóa quy trình chiết tách và thu nhận cao chiết từ nấm trùng thảo với mục đích thu được lượng tối đa của 2 hoạt chất chính mang lại hoạt tính của loài này là Adenosine (A) và Cordycepin (C) theo các phương pháp của Natthapong và cộng sự, 2020 ; Lei và cộng sự, 2009 ; Wangboonskul và cộng sự, 2020[25,44,45].

Cách tiến hành

Cụ thể như sau : Quả thể trùng thảo sau khi thu hoạch, sấy khô, nghiền vỡ. Bột đưa vào bình ngâm kiệt ngâm cồn 95°C ở nhiệt độ 70°C. Bột trùng thảo được ngâm trong thời gian 48 giờ, trong thời gian này cứ 4 giờ thì dịch được đảo một lần từ trên xuống dưới. Sau đó, dịch được rút, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm. Cao trùng thảo cô đặc được thu lại với độ ẩm 10%.

Định lượng Adenosine và Cordycepin bằng HPLC-DAD

Nguyên lý

Adenosine và Cordycepin trong cao chiết nấm trùng thảo được định lượng đồng thời bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép đầu dò mảng diode (HPLC-DAD), tham khảo các phương pháp đã công bố [24,25] và điều chỉnh theo dải nồng độ mẫu của đề tài. Hai nucleoside được phân tách trên cột pha đảo C18 dựa trên sự khác nhau về tương tác với pha tĩnh và pha động; định tính dựa trên thời gian lưu và đặc trưng hấp thụ UV của chất chuẩn, còn định lượng dựa trên diện tích pic sắc ký tại bước sóng 260 nm.

Xây dựng đường chuẩn

Dung dịch chuẩn gốc Adenosine và Cordycepin được chuẩn bị ở nồng độ 1000 µg/mL. Từ dung dịch gốc, pha các dung dịch chuẩn làm việc ở 6 mức nồng độ 10; 20; 50; 100; 200 và 400 µg/mL. Mỗi mức nồng độ được phân tích lặp lại 3 lần trong cùng điều kiện sắc ký. Đường chuẩn được xây dựng bằng cách biểu diễn diện tích pic (y) theo nồng độ chất chuẩn (x) và xác định phương trình hồi quy tuyến tính $y = ax + b$ theo phương pháp bình phương tối thiểu. Hệ số xác định R^2 được sử dụng để đánh

giá độ tuyến tính của đường chuẩn.

Điều kiện sắc ký

Phép phân tích được thực hiện trên hệ thống HPLC-DAD sử dụng cột pha đảo C18. Theo cơ sở phương pháp HPLC-DAD dùng cho Adenosine và Cordycepin trong các sản phẩm Cordyceps [24,25], pha động gồm nước và methanol được vận hành theo chương trình gradient; cột được duy trì ở khoảng 30 °C và tín hiệu được ghi nhận bằng đầu dò DAD ở 260 nm. Dung dịch chuẩn và dung dịch mẫu được lọc qua màng lọc trước khi đưa vào hệ thống. Điều kiện sắc ký được lựa chọn sao cho pic Adenosine và Cordycepin được phân tách rõ, không chồng lấp với các pic nền và nằm trong vùng tuyến tính của đường chuẩn.

Chuẩn bị mẫu và tính hàm lượng

Cao chiết nấm trùng thảo sau khi thu nhận được hòa tan và pha loãng thích hợp để nồng độ Adenosine và Cordycepin nằm trong khoảng tuyến tính của đường chuẩn, sau đó lọc loại cặn trước khi phân tích HPLC-DAD. Adenosine và Cordycepin trong mẫu được nhận diện bằng cách so sánh thời gian lưu với chất chuẩn tương ứng. Nồng độ từng chất trong dung dịch mẫu được tính từ phương trình đường chuẩn; hàm lượng trong cao chiết được quy đổi theo khối lượng mẫu, thể tích dung dịch và hệ số pha loãng, biểu thị dưới dạng mg/100 g cao chiết. Với C là nồng độ xác định từ đường chuẩn (µg/mL), V là thể tích dung dịch mẫu (mL), F là hệ số pha loãng và m là khối lượng cao chiết dùng phân tích (g), hàm lượng X được tính theo công thức: $X \text{ (mg/100 g)} = C \times V \times F / (10 \times m)$. Kết quả định lượng được sử dụng để xác lập tỷ lệ Adenosine:Cordycepin trong hỗn hợp A+C và quy đổi lượng cao chiết sử dụng cho các thí nghiệm phối hợp tiếp theo.

3.4.4. Phương pháp đánh giá hoạt tính cộng hợp của hỗn hợp thuốc theo phương pháp ô bàn cờ (ô tổ hợp)

Nguyên tắc chung

Phương pháp ô bàn cờ (checkerboard assay) là phương pháp phổ biến được sử dụng để đánh giá tương tác dược lý giữa hai hoạt chất khi phối hợp, nhằm xác định

mối quan hệ hiệp đồng (synergism), cộng (additive), không tương tác (indifferent) hoặc đối kháng (antagonism).

Nguyên lý của phương pháp dựa trên việc bố trí các nồng độ khác nhau của hai tác nhân thử nghiệm theo ma trận hai chiều trên phiếu 96 giếng, trong đó mỗi giếng đại diện cho một tổ hợp nồng độ cụ thể của hai hoạt chất. Đáp ứng sinh học thu được tại từng giếng được so sánh với đáp ứng của các chất đơn lẻ, từ đó tính toán chỉ số tương tác và đánh giá mức độ cộng hợp.

Trong đề tài này, phương pháp ô bàn cờ được sử dụng nhằm sàng lọc và lựa chọn tỷ lệ phối hợp tối ưu giữa các hợp chất nghiên cứu, phục vụ đánh giá tác động cộng hợp trên ba nhóm hoạt tính chính gồm:

- (1) ức chế enzyme acetylcholinesterase (AChE);
- (2) bảo vệ tế bào thần kinh;
- (3) kích thích tăng trưởng sợi thần kinh (neurite outgrowth).

Thiết kế thí nghiệm ô bàn cờ

Mục tiêu của thiết kế phối trộn là sàng lọc một cách có hệ thống các tỷ lệ giữa Huperzine A (HupA) và hỗn hợp Adenosine + Cordycepin (A+C), thay vì lựa chọn trước một công thức cố định. Tỷ lệ được lựa chọn sau cùng phải dựa trên kết quả thực nghiệm, ưu tiên công thức cho hiệu lực sinh học tốt trong dải nồng độ khảo sát và phù hợp để tiếp tục đánh giá trên mô hình tế bào.

Cơ sở lựa chọn các tỷ lệ phối trộn khảo sát

Thứ nhất, tỷ lệ giữa Adenosine và Cordycepin bên trong hỗn hợp A+C được cố định theo kết quả định lượng HPLC của cao chiết nấm trùng thảo. Hàm lượng Adenosine và Cordycepin xác định được lần lượt là 1175 và 4987 mg/100 g cao chiết, tương ứng tỷ lệ Adenosine:Cordycepin = 1175:4987 (m/m). Việc giữ cố định tỷ lệ này giúp hỗn hợp A+C phản ánh tương quan hai hoạt chất mục tiêu trong nguyên liệu trùng thảo sử dụng cho nghiên cứu và tạo cơ sở quy đổi sang lượng cao chiết ở các phép thử tế bào tiếp theo.

Thứ hai, yếu tố được thay đổi trong bước sàng lọc là tỷ lệ giữa HupA và tổng hỗn hợp A+C. Trước khi phối hợp, HupA và A+C được thử riêng lẻ để xác định mức

hoạt tính làm cơ sở lựa chọn dải nồng độ khảo sát. HupA có hoạt tính ức chế AChE rõ, trong khi A+C không đạt IC_{50} trong giới hạn nồng độ khảo sát ($IC_{50} > 128 \mu\text{g/mL}$). Vì vậy, nghiên cứu không giả định trước một tỷ lệ tối ưu mà bố trí nhiều mức tương đối của hai thành phần để khảo sát từ vùng công thức ưu thế HupA đến vùng công thức ưu thế A+C.

Thứ ba, các mức phối hợp được bố trí theo ma trận ô bàn cờ 4×4 , trong đó bốn mức HupA được kết hợp với bốn mức A+C tạo thành 16 tổ hợp. Mỗi giao điểm của ma trận đại diện cho một tỷ lệ tương đối HupA:A+C khác nhau. Cách bố trí này giúp đánh giá có hệ thống ảnh hưởng của việc thay đổi tỷ trọng từng thành phần và hạn chế việc lựa chọn công thức theo chủ quan.

Do đó, các tỷ lệ trong ma trận được xem là các tỷ lệ sàng lọc. Tỷ lệ HupA:A+C = 2:3 không phải là tỷ lệ được lựa chọn trước mà là kết quả của bước sàng lọc thực nghiệm, do tổ hợp này cho IC_{50} ức chế AChE thấp nhất trong 16 tổ hợp khảo sát và được lựa chọn để tiếp tục đánh giá trên các phép thử tế bào.

Giai đoạn 1: Xác định đường cong đáp ứng liều đơn lẻ

Trước khi tiến hành phối hợp, HupA đơn lẻ và hỗn hợp (A+C) đơn lẻ bắt buộc phải được thử nghiệm độc lập để làm hệ quy chiếu.

- Các mẫu đơn chất được pha loãng theo chuỗi bậc hai (two-fold serial dilution) tạo thành 7 mức nồng độ khác nhau.
- Tiến hành đánh giá hoạt tính sinh học trên các nồng độ này để xây dựng đường cong đáp ứng liều. Đối với HupA, giá trị IC_{50} trên phép thử ức chế AChE được sử dụng làm mốc tham chiếu cho việc xây dựng dải phối hợp. Đối với A+C, do mức ức chế 50% không đạt được trong giới hạn nồng độ khảo sát, các nồng độ đã thử được sử dụng làm dải tham chiếu để thiết kế ma trận phối hợp, không quy đổi theo một giá trị IC_{50} giả định.

Giai đoạn 2: Thiết kế ma trận quét nồng độ

Để khảo sát toàn diện mọi khả năng tương tác, nghiên cứu sử dụng mô hình phối trộn ô bàn cờ (Checkerboard assay) trên phiên vi lọc 96 giếng (96-well microplate). Cách thức bố trí ma trận được thực hiện nghiêm ngặt như sau:

- Trục dọc (Trục Y): Chứa HupA ở bốn mức nồng độ được lựa chọn trên cơ sở đường cong đáp ứng liều và giá trị IC₅₀ của HupA, nhằm tạo các mức tỷ trọng HupA khác nhau trong công thức phối hợp.
- Trục ngang (Trục X): Chứa hỗn hợp A+C ở bốn mức nồng độ nằm trong khoảng đã được khảo sát đối với A+C. Do A+C có IC₅₀ > 128 µg/mL trong điều kiện thử nghiệm, các mức này được sử dụng như dải tham chiếu để phối hợp, không dựa trên một IC₅₀ giả định.
- Điểm giao thoa: Bốn mức HupA kết hợp với bốn mức A+C tạo thành ma trận 4 × 4 gồm 16 tổ hợp. Mỗi giao điểm đại diện cho một tỷ lệ tương đối HupA:A+C khác nhau; ví dụ, mức HupA = 2 kết hợp với mức A+C = 3 tương ứng tỷ lệ HupA:A+C = 2:3. Thiết kế này cho phép khảo sát đồng thời các công thức có tỷ trọng HupA cao, tỷ trọng hai thành phần gần nhau và tỷ trọng A+C cao.
- Bên cạnh các giếng thử mẫu, ma trận bắt buộc phải bố trí các giếng đối chứng âm (chỉ chứa dung môi/môi trường) và đối chứng dương (sử dụng thuốc chuẩn như Donepezil) để loại trừ sai số hệ thống.

Giai đoạn 3: Tiến hành đánh giá theo từng mô hình sinh học

- Trên mô hình ức chế enzyme AChE

Các tổ hợp nồng độ được ủ cùng enzyme AChE theo quy trình Ellman. Giá trị hấp thụ đo được được quy đổi thành phần trăm ức chế enzyme so với đối chứng. Kết quả thu được dùng để xác định tổ hợp đạt cùng mức hiệu lực (thường 50% ức chế).

- Trên mô hình bảo vệ tế bào thần kinh

Tế bào F11 được tiền xử lý bằng các tổ hợp nồng độ theo ma trận ô bàn cờ, sau đó gây độc bằng 6-OHDA. Khả năng sống sót của tế bào được xác định bằng phương pháp WST-8. Dữ liệu được chuẩn hóa theo nhóm đối chứng để tính tỷ lệ bảo vệ tế bào.

- Trên mô hình tăng trưởng sợi thần kinh

Tế bào được xử lý bằng các tổ hợp hoạt chất theo thiết kế ô bàn cờ, nuôi trong thời gian thích hợp, sau đó nhuộm và định lượng chỉ số neurite. Kết quả thể hiện mức độ kích thích tăng trưởng sợi thần kinh của từng tổ hợp.

Giai đoạn 4: Phân tích tương tác và đánh giá cộng hợp

Hoạt tính cộng hợp được đánh giá thông qua chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn (Fractional Inhibitory Concentration – FIC).

Đối với mỗi tổ hợp đạt cùng mức hiệu lực (ví dụ 50%), các chỉ số được tính như sau:

- $FIC_A = C_A / IC_{50_A}$
- $FIC_B = C_B / IC_{50_B}$

Trong đó:

- C_A và C_B là nồng độ của hai hoạt chất trong tổ hợp;
- IC_{50_A} và IC_{50_B} là nồng độ của từng chất đơn lẻ tạo ra cùng mức hiệu lực.

Chỉ số cộng hợp được tính theo công thức:

$$FICI = FIC_A + FIC_B$$

Giá trị FICI được diễn giải như sau:

- $FICI \leq 0,5$: hiệp đồng (synergism);
- $0,5 < FICI \leq 1,0$: cộng hợp (additive);
- $1,0 < FICI \leq 4,0$: không tương tác;
- $FICI > 4,0$: đối kháng (antagonism).

Giá trị FICI nhỏ nhất thu được trong toàn bộ ma trận (ΣFIC_min) được sử dụng để đại diện cho mức độ tương tác mạnh nhất của cặp phối hợp [35,46,47].

3.4.5. Phương pháp đánh giá khả năng ức chế enzyme Acetylcholinesterase của Huperzine A in vitro

Đánh giá khả năng ức chế enzyme AChE của HupA theo phương pháp của Attar-Rahman và cộng sự. (2001) kế thừa kết quả đề tài KC10.01/16-20 [14,48].

Nguyên lý: là một phương pháp đo màu (colorimetric assay) dùng phổ hấp thụ UV–Vis để xác định hoạt độ enzyme và mức độ ức chế enzyme.

Cách tiến hành

Thêm lần lượt từng dung dịch gồm: dung dịch đệm phosphat (200 mM, pH 7.7) + 15 μ l dịch thử nghiệm + 80 μ l DTNB (3.96 mg DTNB và 1,5 mg sodium bicarbonate hòa tan trong 10 mL phosphate đệm pH 7,7) + 10 μ l AChE (2 U/mL),

trộn đều hỗn hợp, ủ trong 5 phút ở 25°C. Sau đó, thêm 15 µL acetylthiocholine iodide (10,85 mg trong 5 mL phosphate buffer) và ủ lại trong 5 phút. Lắc đều, đo ngay ở bước sóng 412 nm. Hoạt độ enzyme AchE được tính toán dựa trên độ hấp thụ tại bước sóng 412 nm ở trên. Mỗi thử nghiệm được làm lặp lại 3 lần, mỗi lần được làm trên 3 giếng. Giá trị tính toán là % giảm hoạt độ enzyme so với nhóm đối chứng thông qua đo hoạt độ enzyme AchE theo công thức:

$$I \% = \frac{A_{\text{đối chứng}} - A_{\text{thử}}}{A_{\text{đối chứng}}} \times 100\%$$

Trong đó:

- I%: phần trăm hoạt tính bị ức chế của AChE.

$A_{\text{thử}}$ và $A_{\text{đối chứng}}$ lần lượt là độ hấp thụ của mẫu thử và mẫu đối chứng. Giá trị IC_{50} được tính toán dựa trên sự đánh giá tuyến tính của đường cong đáp ứng liều sử dụng ức chế enzyme bằng cách xây dựng đường biểu diễn sự phụ thuộc của % hoạt tính bị ức chế của AChE vào nồng độ chất thử bằng phần mềm Excel 2007. Từ phương trình biểu diễn tính toán được giá trị IC_{50}

3.4.6. Phương pháp đánh giá hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh

Nguyên lý: Tạo mô hình tổn thương/độc tính thần kinh *in vitro* bằng 6-hydroxydopamine (6-OHDA) trên tế bào thần kinh, sau đó định lượng mức độ sống sót của tế bào bằng phép đo màu WST-8 (Cell Counting Kit-8). Khả năng “bảo vệ thần kinh” của mẫu thử được xác định thông qua việc làm tăng tỷ lệ sống sót (hoặc giảm mức chết tế bào) so với nhóm chỉ gây độc.

Cách tiến hành

Tế bào F11 được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 có bổ sung với huyết thanh ngựa bất hoạt nhiệt (10%) và FBS (5%) ở 37°C ở điều kiện ẩm 5% CO₂. Tế bào F11 được nuôi cấy để bổ sung 5 ngày sau khi lưu giữ, và sau đó được xử lý bằng yếu tố tăng trưởng thần kinh chuột (mNGF) và trung bình (1: 100) cho biệt hoá thành các tế bào kiểu neuron. Sau khi biệt hóa, các tế bào F11 đã biệt hóa mNGF được xử lý với các mẫu thử nghiệm trong 6 giờ và khả năng sống sót của tế bào là được đánh giá bằng xét nghiệm WST-8. Phương pháp xác định khả năng sống của tế bào được

đo bằng xét nghiệm WST-8. Thử nghiệm WST-8, được thực hiện bằng bộ đếm tế bào WST-8 (Dojindo, Osaka, Nhật Bản), dựa trên khả năng của các tế bào chuyển đổi 2-(2-metoxi-4-nitrophenyl) -3- (4-nitrophenyl) -5- (2,4-disulfophenyl) -2H-tetrazolium muối monosodium vào một chất hòa tan trong nước formazan. Tế bào được xử lý bằng thuốc thử WST-8 trong 2 giờ ở 37°C và đo độ hấp thụ ở 450 nm. Để phân tích hiệu quả bảo vệ tế bào thần kinh, các tế bào F11 biệt hóa mNGF đã được xử lý trước với các mẫu thử nghiệm trong 6 giờ, tiếp theo là tiếp xúc với 6-OHDA (6-hydroxydopamine) thêm 24 giờ, hoạt tính bảo vệ các tế bào F11 được biệt hóa mNGF chống lại độc tính gây ra bởi 6-OHDA đóng vai trò như nhân tố ngăn chặn quá trình chết của tế bào. Đánh giá hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh được dựa trên kết quả xét nghiệm WST-8[49].

3.4.7. Phương pháp đánh giá hoạt tính tăng sinh sợi liên kết tế bào thần kinh

Nguyên lý: khi tế bào thần kinh được kích thích biệt hoá/hoạt hoá, chúng sẽ hình thành và kéo dài các sợi liên kết thần kinh (tiền thân của sợi trục và sợi nhánh). Mức độ hình thành sợi liên kết thần kinh phản ánh khả năng tăng trưởng và tái lập kết nối thần kinh, do đó được sử dụng như một chỉ thị in vitro để đánh giá tác dụng hỗ trợ phục hồi mạng lưới thần kinh.

Cách tiến hành

Các tế bào thần kinh được cấy trên đĩa 96 giếng với mật độ tế bào sẽ được tối ưu hóa $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ tế bào/ giếng. Sau 24 giờ, môi trường nuôi tế bào được thay bằng môi trường thiếu huyết thanh trong 6 giờ. sau đó các hợp chất cần nghiên cứu sẽ được bổ sung nồng độ không gây độc tế thích hợp. DMSO hoặc mNGF được sử dụng làm mẫu đối chứng. Sau khi ủ nuôi cấy trong thời gian thích hợp (3-5 ngày), các giếng thí nghiệm được rửa lại bằng PBS và ứng dụng bộ thuốc nhuộm cho tăng sinh tế bào thần kinh (Neurite outgrowth staining kit). Và được chụp hình với kính hiển vi huỳnh quang: Đối với thuốc nhuộm nhân tế bào (Cell Viability Indicator): Bước sóng kích thích chuẩn là khoảng 480 nm (hoặc 495 nm) và bước sóng phát xạ đo được phải nằm trong khoảng 520 – 535 nm. Đối với thuốc nhuộm màng tế bào (Cell Membrane Stain): Bước sóng kích thích chuẩn là khoảng 531 - 535nm (hoặc 555 nm) và bước

sóng phát xạ đo được phải nằm trong khoảng 579 – 590 nm. Sau đó, hình ảnh được xử lý bằng phần mềm Image J.

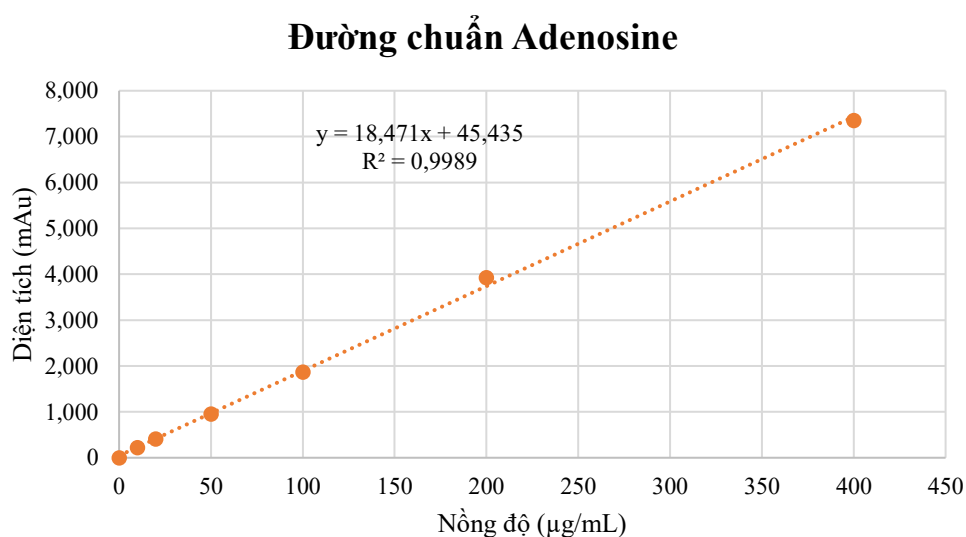
Phương pháp tối ưu hóa tỷ lệ phối trộn nhằm tìm được công thức mang lại hoạt tính cộng hợp (synergistic) được thiết kế theo ô tổ hợp với tỷ lệ nồng độ các chất với đối tượng thử nghiệm của đề tài là các dòng hoạt chất HupA, Adenosine, Cordycepin và dịch chiết của nấm trùng thảo [50,51].

IV. Kết quả và thảo luận

4.1. Kết quả định lượng Adenosine và Cordycepin từ cao chiết trùng thảo và đánh giá độ tinh sạch của HupA

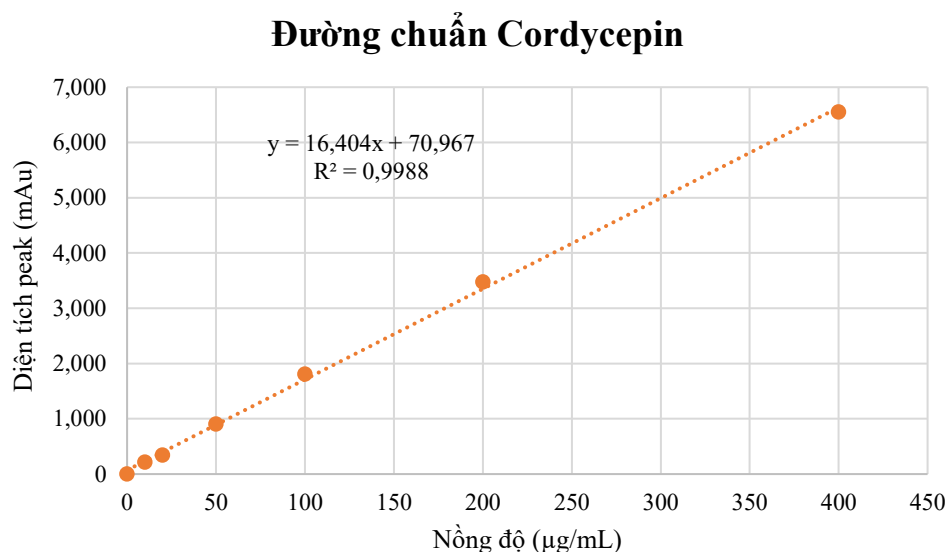
Định lượng Adenosine và Cordycepin từ cao chiết trùng thảo

Để xây dựng đường chuẩn định lượng, các dung dịch chuẩn Adenosine và Cordycepin được pha ở các nồng độ 10; 20; 50; 100; 200; 400 $\mu\text{g/mL}$ từ dung dịch gốc 1000 $\mu\text{g/mL}$. Mỗi nồng độ được phân tích lặp lại ba lần dưới điều kiện sắc ký đã lựa chọn; phương trình hồi quy tuyến tính được thiết lập từ diện tích pic theo nồng độ.



Hình 6. Đồ thị đường chuẩn Adenosine

Kết quả xây dựng đường chuẩn Adenosine cho thấy diện tích pic tăng tỷ lệ thuận với nồng độ chất chuẩn trong khoảng khảo sát. Phương trình hồi quy tuyến tính thu được là $y = 18,471x + 45,435$, với hệ số xác định $R^2 = 0,9989$. Giá trị R^2 gần bằng 1 chứng tỏ đường chuẩn có độ tuyến tính cao và thể hiện mối tương quan chặt chẽ giữa nồng độ Adenosine với diện tích pic sắc ký. Do đó, đường chuẩn này có thể được sử dụng để tính toán hàm lượng Adenosine trong mẫu phân tích. Dựa trên diện tích pic của mẫu và phương trình hồi quy, hàm lượng Adenosine trong cao chiết được xác định là 1175 mg/100 g cao chiết. Kết quả này xác nhận cao chiết thu nhận có chứa Adenosine và cung cấp cơ sở định lượng cho việc chuẩn hóa nguyên liệu sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

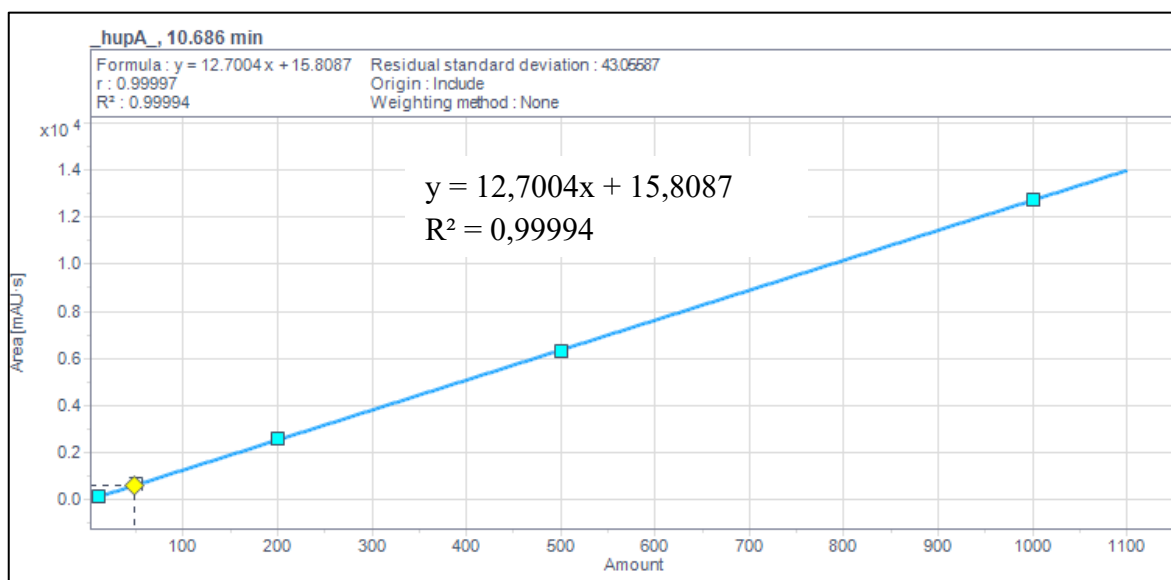


Hình 7. Đồ thị đường chuẩn Cordycepin

Kết quả xây dựng đường chuẩn Cordycepin được trình bày tại Hình 7. Trong khoảng nồng độ khảo sát, diện tích pic sắc ký tăng tương ứng với sự gia tăng nồng độ Cordycepin. Phương trình hồi quy tuyến tính thu được là $y = 16,404x + 70,967$, trong đó (x) là nồng độ Cordycepin (µg/mL) và (y) là diện tích pic (mAU). Hệ số xác định $R^2 = 0,9988$ cho thấy mô hình hồi quy giải thích được khoảng 99,88% sự biến thiên của diện tích pic theo nồng độ Cordycepin. Như vậy, đường chuẩn thể hiện mối tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ chất chuẩn và tín hiệu sắc ký, phù hợp để sử dụng cho việc định lượng Cordycepin trong phạm vi nồng độ đã khảo sát. Dựa trên diện tích pic của mẫu, phương trình đường chuẩn và các hệ số quy đổi trong quá trình xử lý mẫu, hàm lượng Cordycepin trong cao chiết được xác định là 4987 mg/100 g cao chiết. Kết quả này xác nhận cao chiết thu nhận có chứa Cordycepin với hàm lượng đáng kể, đồng thời cung cấp cơ sở để chuẩn hóa cao chiết và xác định lượng mẫu sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

Định lượng HupA theo đường chuẩn HPLC-DAD

Để xây dựng đường chuẩn định lượng, các dung dịch chuẩn HupA được chuẩn bị ở 5 mức nồng độ 10; 50; 200; 500 và 1000 µg/mL. Các dung dịch chuẩn được phân tích trong cùng điều kiện HPLC-DAD đã lựa chọn; phương trình hồi quy tuyến tính được thiết lập từ diện tích pic theo nồng độ.

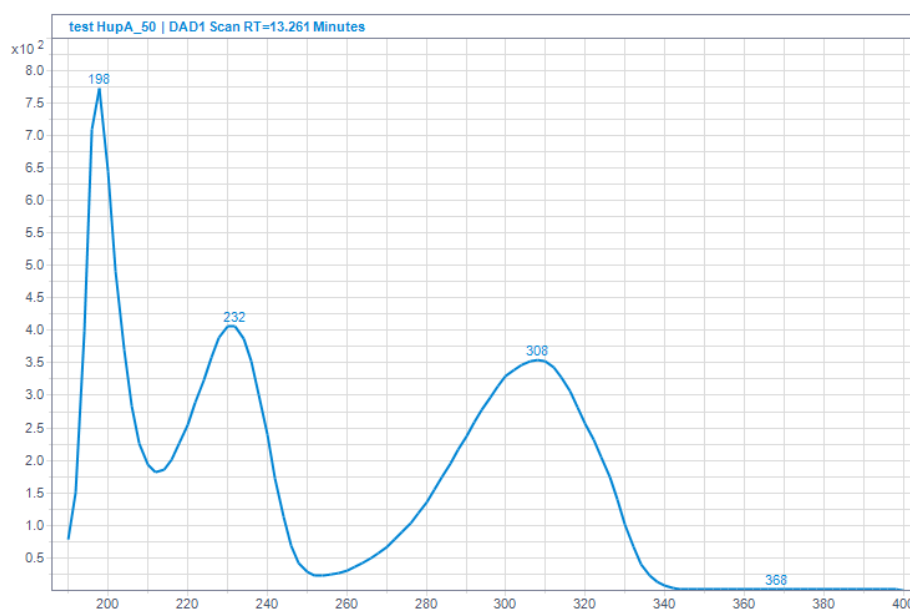


Hình 8. Đồ thị đường chuẩn HupA

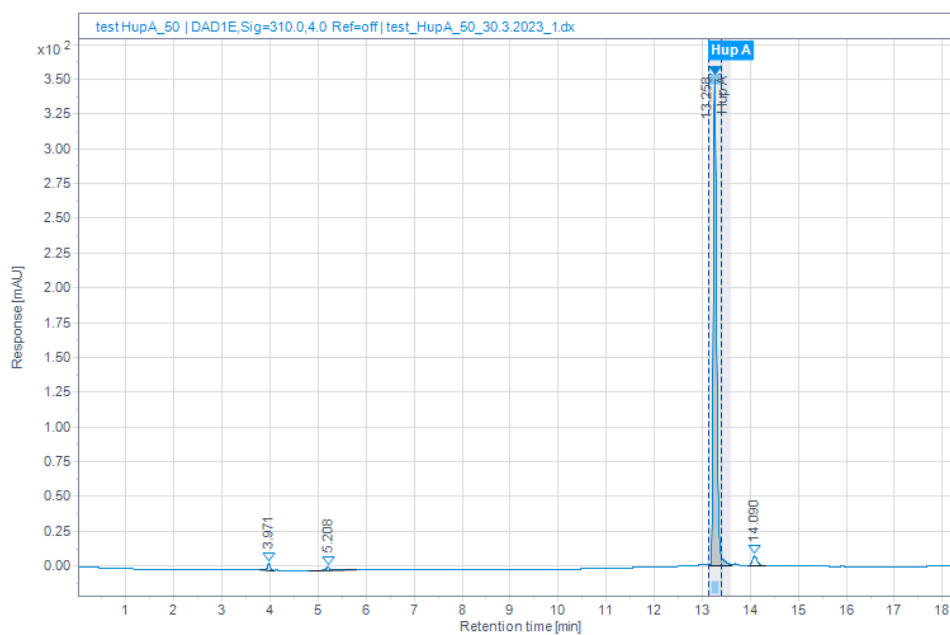
Kết quả xây dựng đường chuẩn HupA được trình bày tại Hình 8. Trong khoảng nồng độ khảo sát, diện tích pic sắc ký tăng tương ứng với sự gia tăng nồng độ HupA. Phương trình hồi quy tuyến tính thu được là $y = 12,7004x + 15,8087$, trong đó x là nồng độ HupA (µg/mL) và y là diện tích pic. Hệ số xác định $R^2 = 0,99994$ cho thấy đường chuẩn có độ tuyến tính rất cao và thể hiện mối tương quan chặt chẽ giữa nồng độ HupA với tín hiệu sắc ký. Do đó, đường chuẩn này phù hợp để sử dụng cho việc định lượng HupA trong mẫu phân tích. Dựa trên diện tích pic của mẫu là 537,046 và phương trình hồi quy, hàm lượng HupA trong mẫu được xác định là 41,04 µg/mL. Kết quả này xác nhận mẫu sau tinh sạch có chứa HupA với hàm lượng định lượng được, đồng thời cung cấp cơ sở cho việc chuẩn hóa nguyên liệu sử dụng trong các thí nghiệm đánh giá hoạt tính sinh học tiếp theo.

Đánh giá độ tinh sạch của HupA

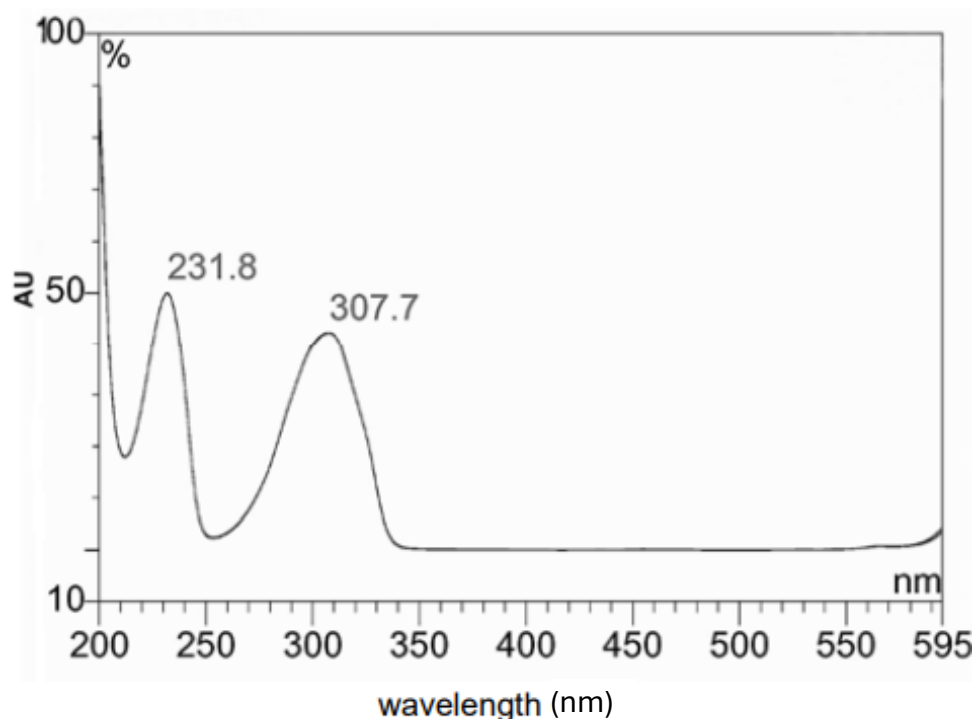
Mẫu HupA tinh sạch được xác định bằng HPLC, cho kết quả như sau:



Hình 9. Phổ UV của mẫu HupA



Hình 10. Sắc ký đồ của mẫu HupA



Hình 11. Phổ UV của chất chuẩn HupA

Kết quả đánh giá độ tinh sạch của mẫu HupA sau quá trình tinh sạch được trình bày tại Hình 9–11. Phổ UV của mẫu HupA xuất hiện hai cực đại hấp thụ tại khoảng 232 và 308 nm, tương đồng với các cực đại hấp thụ của chất chuẩn HupA tại 231,8 và 307,7 nm. Trên sắc ký đồ HPLC, mẫu xuất hiện một pic chính rõ nét tại thời gian lưu khoảng 13,3 phút, phù hợp với thời gian lưu của chất chuẩn HupA; trong khi các pic phụ có cường độ rất thấp. Sự tương đồng đồng thời về thời gian lưu và đặc trưng phổ UV cho phép xác nhận pic chính thu được phù hợp với HupA. Dựa trên tỷ lệ diện tích pic HupA so với tổng diện tích các pic được ghi nhận, độ tinh sạch của mẫu đạt trên 99%. Kết quả này cho thấy quy trình tinh sạch đã loại bỏ phần lớn các tạp chất có trong mẫu HupA thô, tạo được sản phẩm HupA có độ tinh sạch cao và đáp ứng yêu cầu sử dụng trong các thí nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế AChE cũng như các thử nghiệm trên mô hình tế bào tiếp theo.

Đề tài được thiết kế theo hướng tiếp cận đa mục tiêu, tức không chỉ đánh giá một tác dụng đơn lẻ mà đồng thời khảo sát ba trục sinh học có liên quan chặt chẽ đến bệnh AD gồm: ức chế enzyme AChE, bảo vệ tế bào thần kinh và kích thích tăng trưởng neurite. Kết quả thu được cho thấy mẫu HupA sau tinh sạch đạt độ tinh sạch trên 99%, hỗn hợp A+C được xây dựng trên cơ sở tỷ lệ Adenosine/Cordycepin định lượng được

trong cao chiết trùng thảo là 1175/4987 (m/m), và công thức phối hợp tối ưu được sàng lọc tiếp tục cho các phép thử tế bào. Điều này cho thấy nghiên cứu đã xây dựng được một chuỗi đánh giá khá logic từ chuẩn hóa nguyên liệu đến xác lập hoạt tính sinh học, giúp cho việc diễn giải kết quả có cơ sở hơn so với các nghiên cứu chỉ sử dụng cao chiết chưa chuẩn hóa.

Về mặt lý luận, cách tiếp cận này phù hợp với xu hướng nghiên cứu hiện nay đối với AD, vì đây là bệnh lý đa cơ chế, trong đó suy giảm cholinergic, stress oxy hóa, rối loạn chức năng tế bào thần kinh đệm, mất synapse và thoái hóa cấu trúc neurite cùng tham gia vào tiến trình bệnh [2,6,9,28]. Do đó, một công thức có khả năng đồng thời tác động lên nhiều trục sinh học thường có ý nghĩa hơn so với một tác nhân chỉ mạnh trên một đích duy nhất [1], [10]. HupA vốn đã được biết đến như một chất ức chế enzyme AChE tự nhiên có thêm các tác dụng ngoài cholinergic, trong khi Cordycepin và tín hiệu Adenosine lại có liên quan đến bảo vệ thần kinh, chống stress oxy hóa và điều hòa tương tác neuron–glia[2,6,9,28].

4.2. Đánh giá hoạt tính ức chế enzyme AChE, xác định tác dụng cộng hợp của các tỷ lệ phối trộn hỗn hợp A+C và chất sạch huperzine A

HupA tinh sạch và hỗn hợp chuẩn Adenosine + Cordycepin (A+C) được sử dụng làm nguyên liệu cho thí nghiệm đánh giá khả năng ức chế enzyme AChE. Dựa trên kết quả định lượng ở mục 3.1, tỷ lệ Adenosine/Cordycepin trong hỗn hợp A+C được thiết lập tương ứng là 1175/4987 (m/m).

Donepezil được sử dụng làm đối chứng dương. Trước khi khảo sát các công thức phối hợp, nghiên cứu xác định IC_{50} ức chế enzyme AChE của từng thành phần đơn lẻ gồm HupA, hỗn hợp A+C và donepezil.

Để xác định tác dụng cộng hợp của các tỷ lệ phối trộn, thử nghiệm đầu tiên cần xác định là khả năng ức chế enzyme AChE của donepezil, chất sạch HupA và hỗn hợp A+C. Kết quả thử được trình bày ở bảng 3:

Bảng 3. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế enzyme AChE của chất sạch Huperzine A, hỗn hợp A + C, donepezil

STT	Mẫu thử	IC ₅₀ (µg/mL)
1	Huperzine A	0,074 ± 0,001
2	Hỗn hợp A + C	>128
3	Donepezil	0,0138 ± 0,0025

Bằng phép đo quang hoạt độ enzyme AChE tại bước sóng 412 nm, IC₅₀ của HupA, hỗn hợp A+C và donepezil lần lượt được xác định là 0,074 ± 0,001 µg/mL; >128 µg/mL; và 0,0138 ± 0,0025 µg/mL. Kết quả cho thấy HupA là thành phần quyết định hoạt tính ức chế enzyme AChE trong công thức, trong khi hỗn hợp A+C đơn lẻ hầu như không ức chế enzyme AChE ở khoảng nồng độ khảo sát.

Hỗn hợp A+C và HupA tinh sạch được phối trộn theo các tỷ lệ khối lượng khác nhau và thiết kế theo mô hình ô bàn cờ. Các công thức phối hợp sau đó được đánh giá hoạt tính ức chế enzyme AChE; kết quả được trình bày ở Bảng 4:

Bảng 4. Kết quả đánh giá tác dụng cộng hợp của các tỷ lệ giữa Huperzine A và hỗn hợp A +C

HupA	1	2	3	4
A+C				
1	0,0310±0,0032	0,0254±0,0022	0,0842±0,0052	0,0146±0,0016
2	0,0291±0,0031	0,0310±0,0032	0,1103±0,0140	0,0254±0,0022
3	0,0951±0,0083	0,0077±0,0009	0,0310±0,0032	0,0212±0,0029
4	0,0297±0,0021	0,0291±0,0031	0,1413±0,0129	0,0310±0,0032

Trong khuôn khổ đề tài, nhóm nghiên cứu đã thử hoạt tính của 16 mẫu kết hợp ở các nồng độ, tỉ lệ khác nhau giữa HupA và hỗn hợp A+C. Tỷ lệ hupA: A+C=2:3 cho kết quả tốt nhất với IC₅₀ khi ức chế enzyme AChE là 0,0077±0,0009 µg/mL, mạnh hơn gần 1,8 lần so với chất đối chứng donepezil và 9,6 lần so với HupA đơn chất.

Kết quả này là bằng chứng thực nghiệm rất quan trọng cho thấy giữa HupA và hỗn hợp A+C có hiện tượng tăng cường tác dụng trên phép thử enzyme AChE ở tỷ lệ phối hợp thích hợp. Dù hỗn hợp A+C đơn lẻ hầu như không ức chế enzyme, nhưng khi phối hợp lại làm tăng hiệu lực của HupA, gợi ý một dạng tương tác hiệp đồng hoặc ít nhất là tác động tăng cường hiệu lực của thành phần chính[45], [46]. Về mặt cơ chế, từ dữ liệu hiện có chưa thể kết luận chính xác A+C đã làm tăng hiệu quả của HupA bằng con đường nào. Tuy nhiên, đây mới là suy luận từ hiện tượng, chưa phải là cơ chế đã được chứng minh. Vì vậy, cách diễn giải thận trọng nhất là: công thức phối trộn ở tỷ lệ 2:3 đã tạo ra hiệu quả ức chế enzyme AChE vượt trội so với từng thành phần riêng lẻ, và đây là cơ sở để lựa chọn công thức này cho các bước thử nghiệm tế bào tiếp theo. Một giả thuyết hợp lý là Adenosine, Cordycepin hoặc các đặc tính lý hóa liên quan đến hệ phối hợp có thể ảnh hưởng đến khả năng tiếp cận enzyme, độ ổn định của hoạt chất hoặc vi môi trường phản ứng, từ đó làm tăng hiệu quả ức chế ghi nhận được *in vitro*.

4.3. Đánh giá hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh

HupA đã tinh sạch và cao trùng thảo bán thành phẩm là nguyên liệu chính cho thí nghiệm này.

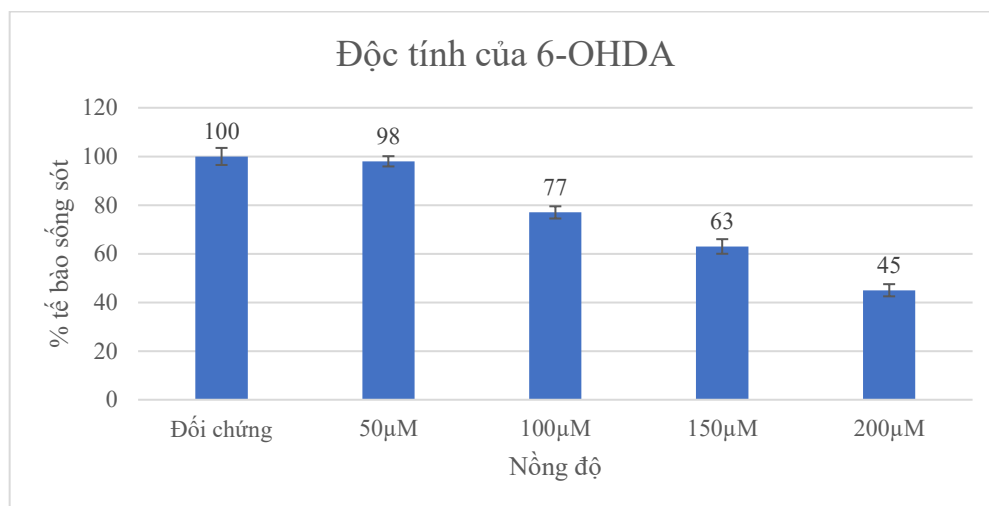
Từ kết quả khi đánh giá tác dụng cộng hợp giữa HupA và hỗn hợp A+C, chúng tôi đã xác định được tỷ lệ 2:3 của HupA và A+C cho hoạt tính hiệu quả nhất. Từ đó nguyên liệu cho thí nghiệm đánh giá hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh này được phối trộn theo tỷ lệ về khối lượng như sau:

Nguyên liệu lý thuyết: 5 mg HupA + 7,5 mg A+C (có mặt trong cao chiết)

Thực tế phối trộn: 5mg HupA + 121,7 mg cao chiết (nồng độ A+C = 1175 mg/100g + 4987 mg/100g).

Một trong các chất đối chứng dương là donepezil là một loại thuốc dùng để điều trị bệnh AD. Chất này phần nào cải thiện chức năng tinh thần và khả năng hoạt động. Tuy nhiên việc sử dụng thuốc này đã không được chứng minh là thay đổi sự tiến triển của bệnh. Điều trị nên được dừng lại nếu không thấy lợi ích.

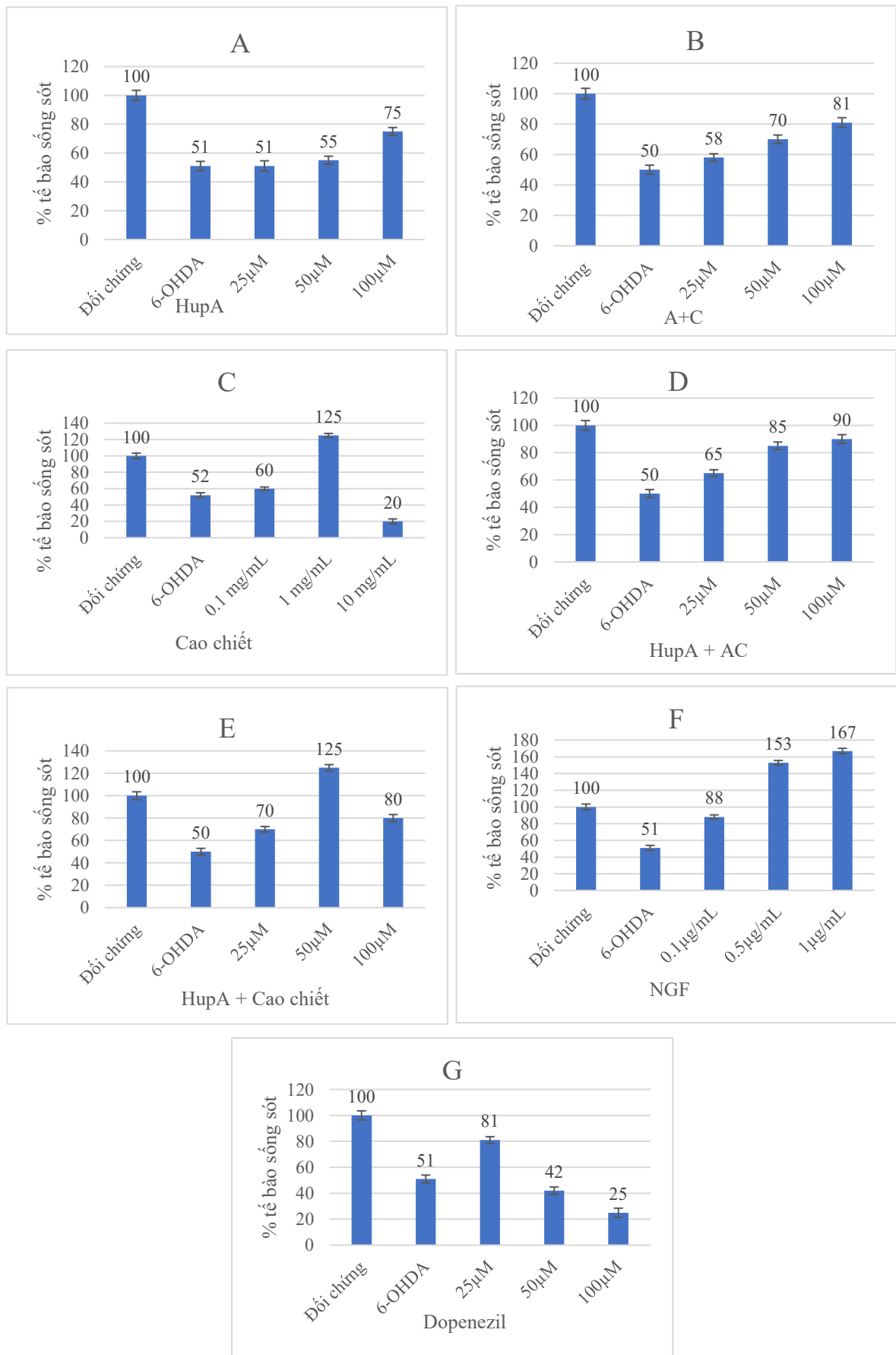
Để xác định hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh, thử nghiệm đầu tiên cần xác định nồng độ gây độc tế bào của 6-OHDA đối với dòng tế bào thử nghiệm F11. Từ đó có được nồng độ của chất này cho phép thử bảo vệ TBTK. Kết quả thử được trình bày ở hình 12 sau:



Hình 12. Hoạt tính gây độc tế bào của 6-OHDA

Kết quả cho thấy, ở nồng độ 50μM, 6-OHDA gần như không gây độc tế bào với 98% số tế bào sống sót. Nồng độ 100μM- 200μM của 6-OHDA gây độc tế bào phụ thuộc vào nồng độ, với tỉ lệ sống sót của tế bào lần lượt là 77%, 63% và 45%. Nồng độ 200μM được sử dụng để gây độc tế bào cho đánh giá hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh.

Kết quả đánh giá hoạt tính ức bảo vệ tế bào thần kinh của hỗn hợp Adenosine và Cordycepin (hai hoạt chất chính trong truffle thảo) và HupA riêng lẻ, cao chiết bán thành phẩm và công thức phối trộn so sánh với chất đối chứng là donepezil, NGF. Thử nghiệm cho đánh giá khả năng bảo vệ tế bào thần kinh của công thức phối trộn được thực hiện với ủ chất thử nghiệm trong 6 giờ, tiếp theo là tiếp xúc với 6-OHDA thêm 24 giờ và xác định số phần trăm tế bào sống sót. Nồng độ của chất thử được thử nghiệm với dải nồng độ cho kết quả ở hình 13 sau:



Hình 13. Hoạt tính bảo vệ TBTK của các mẫu thử

Ghi chú:

Hình 13.A. Hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh của Huperzine A trên mô hình tế bào F11 gây độc bằng 6-OHDA.

Hình 13.B. Hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh của hỗn hợp chuẩn Adenosine và Cordycepin, ký hiệu A+C.

Hình 13.C. Hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh của cao chiết nấm trùng thảo ở các nồng độ khác nhau.

Hình 13.D. Hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh của hỗn hợp Huperzine A phối hợp với hỗn hợp chuẩn A+C.

Hình 13.E. Hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh của công thức phối trộn Huperzine A với cao chiết nấm trùng thảo.

Hình 13.F. Hoạt tính bảo vệ/tăng sinh tế bào thần kinh của NGF, sử dụng làm đối chứng dương.

Hình 13.G. Hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh của donepezil, sử dụng làm chất đối chứng trong mô hình thử nghiệm.

Kết quả cho thấy, tế bào F11 sau khi gây tổn thương bằng 200 μ M 6-OHDA và điều trị bằng HupA với dải nồng độ từ 25 đến 100 μ M có tác dụng bảo vệ tế bào tránh khỏi tổn thương phụ thuộc nồng độ, với tỉ lệ sống sót lần lượt là 51%, 55% và 75% (Hình 13.A). Kết quả này tương tự với hỗn hợp A +C, với tỉ lệ sống sót lần lượt là 58%, 70% và 81% (Hình 13.B).

Trong khi đó, khi tế bào F11 được điều trị bằng cao chiết Trùng thảo, tỉ lệ sống sót của các tế bào tăng dần từ 60% đến vượt quá 100% ở 124% khi tăng nồng độ gấp 10 lần từ 0.1mg/mL đến 1mg/mL. Sau đó, lượng tế bào F11 sống sót giảm xuống còn 20% khi tăng nồng độ cao chiết đến 10mg/mL (Hình 13.C). Kết quả này có thể giải thích được vì trong cao chiết còn có các thành phần khác nên có thể gây độc cho tế bào khi ở nồng độ quá cao, vì vậy lượng tế bào sống sót giảm xuống rõ rệt.

Đối với chất đối chứng dương NGF với dải nồng độ từ 0,1 μ g/mL đến 1 μ g/mL, lượng tế bào sống sót tăng dần theo nồng độ, với tỉ lệ sống sót lần lượt là 88%, 153%, 167% (Hình 13.F), cho thấy khả năng tăng sinh tế bào mạnh mẽ của chất này. Khả năng bảo vệ tế bào thần kinh của chất đối chứng donepezil giảm dần theo nồng độ,

với lượng tế bào sống sót là 81%, 40%, 25% ở lần lượt các nồng độ 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M (Hình 13.G). Điều này cho thấy, khi tăng nồng độ của thuốc, độc tính của thuốc sẽ tăng lên, khả năng bảo vệ tế bào giảm đi.

Hỗn hợp chất sạch Huperzine A và chất chuẩn A + C bảo vệ TBTK từ 65%-90% ở các nồng độ khác nhau (Hình 13.D). Trong khi đó hỗn hợp phối trộn chất sạch HupA và cao chiết bán thành phẩm cho thấy hiệu quả cao của hỗn hợp này khi bảo vệ tế bào thần kinh thấp nhất đạt 70% số tế bào sống sót và cao nhất vượt trên 100% tới 125% sau đó giảm xuống 80% số lượng tế bào sống sót khi so sánh với đối chứng không là DMSO (Hình 13.E).

Hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh được đánh giá trên mô hình tế bào F11 gây độc bằng 6-OHDA. Đây là mô hình phù hợp để khảo sát khả năng bảo vệ tế bào trước tổn thương liên quan đến stress oxy hóa, một trong những cơ chế có vai trò quan trọng trong bệnh sinh của các bệnh thoái hóa thần kinh. 6-OHDA có khả năng tạo ra các gốc tự do, làm tăng stress oxy hóa, gây rối loạn chức năng ty thể và thúc đẩy quá trình chết tế bào theo chương trình ở các dòng tế bào thần kinh [41,42]. Trong nghiên cứu này, 6-OHDA được sử dụng để tạo tổn thương tế bào, sau đó đánh giá khả năng sống sót của tế bào bằng phương pháp WST-8. Kết quả khảo sát ban đầu cho thấy 6-OHDA gây độc tế bào phụ thuộc nồng độ; ở nồng độ 200 μ M, tỷ lệ tế bào sống sót giảm xuống khoảng 50%. Vì vậy, nồng độ này được lựa chọn làm điều kiện gây độc cho các thí nghiệm đánh giá hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh của các mẫu thử.

Kết quả ở Hình 13 cho thấy các mẫu thử gồm HupA, hỗn hợp Adenosine và Cordycepin, cao chiết trùng thảo, công thức phối trộn, NGF và donepezil có mức độ ảnh hưởng khác nhau đến tỷ lệ sống sót của tế bào F11 sau khi gây độc bằng 6-OHDA. Trong đó, HupA thể hiện tác dụng bảo vệ tế bào ở các nồng độ khảo sát. Điều này phù hợp với các dữ liệu đã công bố về khả năng bảo vệ thần kinh của HupA, không chỉ thông qua cơ chế ức chế enzyme AChE mà còn liên quan đến khả năng giảm stress oxy hóa, bảo vệ ty thể, điều hòa các tín hiệu sống còn của tế bào và hạn chế tổn thương tế bào thần kinh [52,53]. Như vậy, HupA có thể được xem là thành phần trung tâm trong công thức phối trộn, đóng vai trò quan trọng trên cả trục ức chế enzyme AChE và trục bảo vệ tế bào thần kinh.

Hỗn hợp Adenosine và Cordycepin, ký hiệu A+C, cũng cho thấy khả năng hỗ trợ bảo vệ tế bào thần kinh, mặc dù tác dụng này không thể hiện rõ trên mô hình ức chế enzyme AChE. Điều này cho thấy A+C có thể không phải là thành phần chính quyết định tác dụng ức chế enzyme, nhưng lại có ý nghĩa hỗ trợ ở mô hình tế bào. Adenosine có liên quan đến điều hòa dẫn truyền thần kinh và tín hiệu purinergic, trong khi Cordycepin đã được ghi nhận có hoạt tính chống oxy hóa, chống viêm và bảo vệ tế bào thần kinh trong một số mô hình thực nghiệm [11,12]. Vì vậy, việc đưa A+C vào công thức phối hợp với HupA là có cơ sở sinh học, đặc biệt trong định hướng xây dựng công thức tác động đa mục tiêu.

Đáng chú ý, kết quả với cao chiết nấm trùng thảo ở Hình 13.C cho thấy tác dụng bảo vệ tế bào chỉ xuất hiện trong một khoảng nồng độ phù hợp. Ở nồng độ thấp đến trung bình, đặc biệt quanh nồng độ 1 mg/mL, cao chiết nấm trùng thảo làm tăng tỷ lệ sống sót của tế bào F11 sau gây độc bằng 6-OHDA. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ lên 10 mg/mL, tỷ lệ sống sót của tế bào giảm mạnh, cho thấy cao chiết thô có thể gây bất lợi hoặc gây độc tế bào khi sử dụng ở nồng độ quá cao. Kết quả này cho thấy hoạt tính của cao chiết nấm trùng thảo không tăng tuyến tính theo nồng độ, mà có thể tồn tại một khoảng nồng độ tối ưu cho tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh.

Hiện tượng giảm tỷ lệ sống sót của tế bào ở nồng độ cao có thể liên quan đến bản chất của cao chiết thô. Ngoài hai hoạt chất mục tiêu là Adenosine và Cordycepin, cao chiết nấm trùng thảo còn có thể chứa nhiều thành phần đi kèm như polysaccharide, protein hoặc peptide, acid amin, đường, acid hữu cơ, muối khoáng, sắc tố, lipid, hợp chất phenolic hoặc các sản phẩm chuyển hóa thứ cấp khác của nấm [10,54]. Ở nồng độ thấp đến trung bình, một số thành phần này có thể góp phần vào tác dụng chống oxy hóa hoặc hỗ trợ bảo vệ tế bào. Tuy nhiên, khi tổng lượng cao chiết đưa vào môi trường nuôi cấy quá cao, các thành phần không đặc hiệu có thể làm thay đổi áp suất thẩm thấu, pH, độ nhớt hoặc thành phần dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy, từ đó gây stress tế bào và làm giảm khả năng sống sót của tế bào F11.

Bên cạnh đó, do cao chiết sử dụng trong nghiên cứu vẫn là cao chiết bán thành phẩm, chưa được tinh sạch sâu, nên không loại trừ khả năng còn tồn tại các tạp chất từ nguyên liệu nuôi cấy, dung môi chiết, sản phẩm phân hủy hoặc các hợp chất có

màu và độ đục cao. Các thành phần này có thể ảnh hưởng trực tiếp đến tế bào hoặc gây nhiễu phép đo quang học WST-8. Một số nghiên cứu cũng cho thấy các phân đoạn hoặc thành phần sinh học từ *Cordyceps militaris* có thể gây ảnh hưởng đến khả năng sống của tế bào trong một số bối cảnh nhất định, đặc biệt khi sử dụng ở nồng độ cao hoặc trên các dòng tế bào nhạy cảm[55,56]. Vì vậy, kết quả ở nồng độ 10 mg/mL không nên được diễn giải theo hướng phủ nhận tiềm năng bảo vệ thần kinh của nấm trùng thảo, mà cần được hiểu là dấu hiệu cho thấy cao chiết thô có giới hạn nồng độ sử dụng an toàn và cần được tinh sạch, chuẩn hóa tốt hơn trước khi phát triển thành công thức ứng dụng.

Khi phối hợp HupA với thành phần hoạt chất từ nấm trùng thảo, công thức phối trộn cho thấy hiệu quả bảo vệ tế bào rõ rệt hơn so với mô hình gây độc. Điều này gợi ý rằng sự kết hợp giữa HupA và các hoạt chất từ nấm trùng thảo có thể tạo ra tác dụng hỗ trợ trên mô hình tổn thương tế bào thần kinh. Trong đó, HupA đóng vai trò chính trên trục ức chế enzyme AChE và bảo vệ neuron, còn Adenosine, Cordycepin và các thành phần có hoạt tính sinh học trong cao chiết trùng thảo có thể góp phần hỗ trợ chống stress oxy hóa và duy trì khả năng sống sót của tế bào[11,12,52]. Tuy nhiên, hiệu quả phối hợp cũng phụ thuộc vào nồng độ sử dụng, do đó cần xác định rõ khoảng nồng độ tối ưu để đạt tác dụng bảo vệ mà không gây độc tế bào.

Từ các kết quả trên, có thể nhận định rằng công thức phối trộn HupA với thành phần hoạt chất từ nấm trùng thảo có tiềm năng trong định hướng phát triển sản phẩm hỗ trợ bảo vệ tế bào thần kinh. Tuy nhiên, kết quả Hình 13.C cũng chỉ ra yêu cầu quan trọng cho các nghiên cứu tiếp theo là cần tinh sạch sâu hơn cao chiết trùng thảo, làm giàu các phân đoạn chứa Adenosine và Cordycepin, đồng thời loại bỏ các thành phần cao phân tử hoặc tạp chất không mong muốn. Các hướng nghiên cứu tiếp theo có thể bao gồm phân đoạn cao chiết bằng lọc màng, sắc ký, tinh sạch pha rắn hoặc các kỹ thuật phân đoạn dung môi; sau đó đánh giá riêng độc tính và hoạt tính bảo vệ tế bào của từng phân đoạn.

Nhìn chung, kết quả đánh giá hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh cho thấy các mẫu thử có tiềm năng hỗ trợ tế bào F11 chống lại tổn thương do 6-OHDA. Công thức phối trộn giữa HupA và thành phần hoạt chất từ nấm trùng thảo là hướng tiếp cận có triển

vọng vì kết hợp được tác dụng của HupA với các hoạt chất có nguồn gốc từ *Cordyceps militaris*. Tuy vậy, để tăng giá trị ứng dụng, cần tiếp tục tối ưu hóa công thức, xác định ngưỡng nồng độ an toàn, tinh sạch cao chiết và đánh giá sâu hơn trên các mô hình *in vivo* trước khi định hướng phát triển sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe hỗ trợ chức năng thần kinh.

4.4. Đánh giá hoạt tính tăng sinh sợi liên kết thần kinh (LKTK)

Hoạt tính tăng sinh sợi LKTK được đánh giá với 3 đối tượng là: NGF, cao chiết trùng thảo và hỗn hợp thử nghiệm của cao chiết nấm trùng thảo và HupA. Phân tích thống kê được thực hiện bằng phân tích phương sai một yếu tố (one-way ANOVA), sau đó sử dụng kiểm định hậu nghiệm Dunnett's multiple comparisons test để so sánh từng nhóm xử lý với nhóm chứng DMSO. Dữ liệu được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD. Đối với chỉ tiêu số lượng neurite, số neurite đếm được trên từng ảnh/vi trường được sử dụng như một đơn vị thống kê độc lập. Đối với chỉ tiêu chiều dài neurite, giá trị trung bình chiều dài neurite của từng ảnh/vi trường được sử dụng như một đơn vị thống kê độc lập.

Bảng 5. Quy ước giá trị p

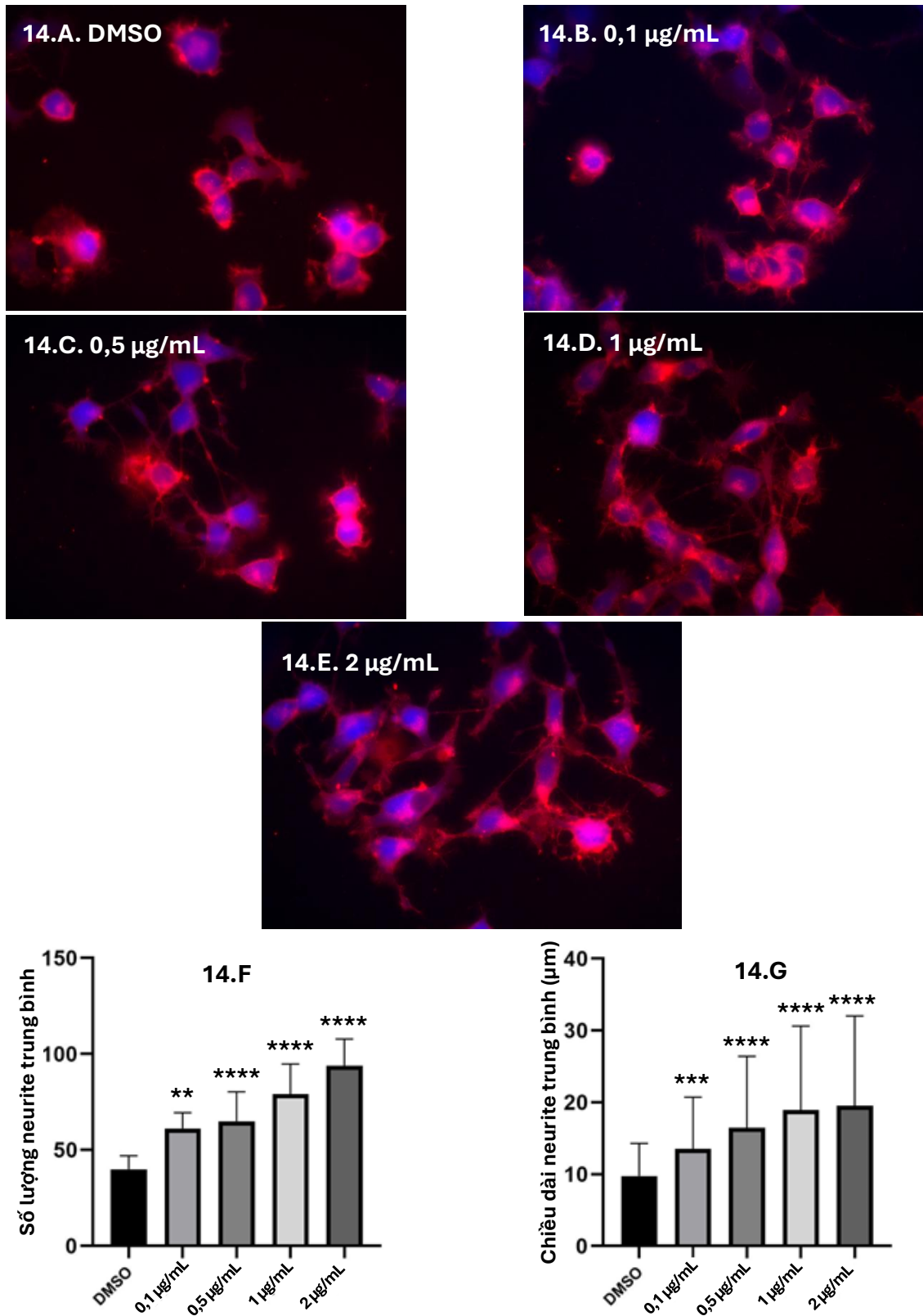
p-value	Ký hiệu	Ý nghĩa
$p \geq 0,05$	ns (not significant)	Không có ý nghĩa thống kê
$p < 0,05$	*	Có ý nghĩa
$p < 0,01$	**	Có ý nghĩa cao
$p < 0,001$	***	Có ý nghĩa rất cao
$p < 0,0001$	****	Có ý nghĩa cực cao

Chúng tôi sử dụng 03 mẫu thí nghiệm này cho đánh giá tối ưu vì theo những tài liệu đã công bố của các mẫu này đã chỉ ra xuất hiện hoạt tính dương của chúng.

Hoạt tính tăng sinh sợi LKTK của NGF

NGF (Sigma Aldrich) là một tác nhân chuyên dùng được sử dụng để kích thích sự phát triển của các dòng tế bào thần kinh. Với thử nghiệm này, chúng tôi chọn lựa NGF làm đối chứng dương nhằm đánh giá khả năng tăng sinh sợi liên kết thần kinh

của các mẫu thử. Nồng độ NGF cho phép thử được xác nhận lần lượt là: 0; 0,1; 0,5; 1; 2 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả thu được ở hình 14 sau:



Hình 14. Hoạt tính tăng sinh sợi liên kết thần kinh của NGF

Ghi chú:

Hình 14.A. Ảnh tế bào ở nhóm chứng DMSO

Hình 14.B. Ảnh tế bào xử lý với NGF nồng độ 0,1 $\mu\text{g/mL}$.

Hình 14.C. Ảnh tế bào xử lý với NGF nồng độ 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

Hình 14.D. Ảnh tế bào xử lý với NGF nồng độ 1 $\mu\text{g/mL}$.

Hình 14.E. Ảnh tế bào xử lý với NGF nồng độ 2 $\mu\text{g/mL}$.

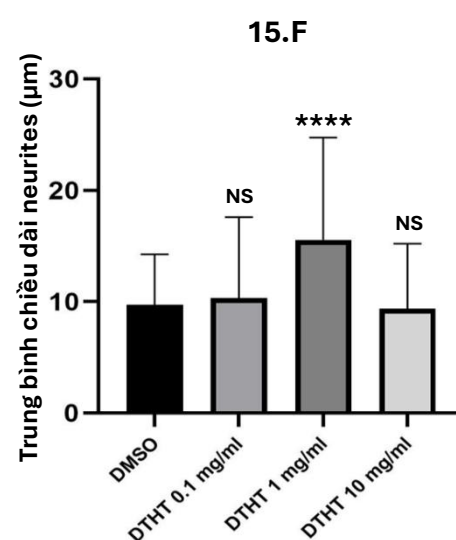
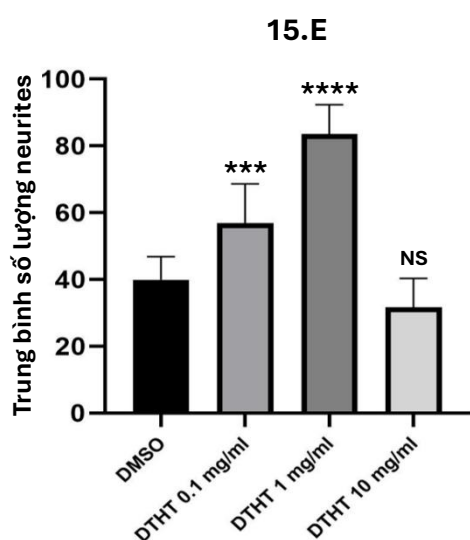
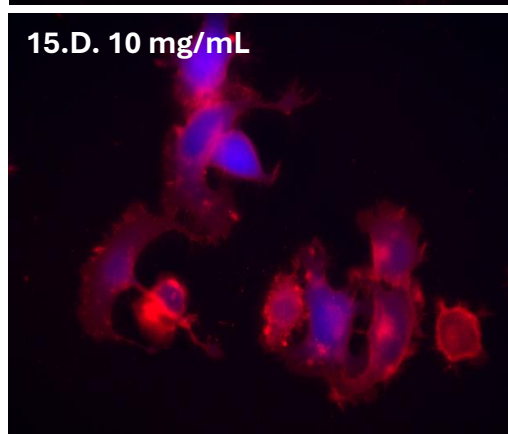
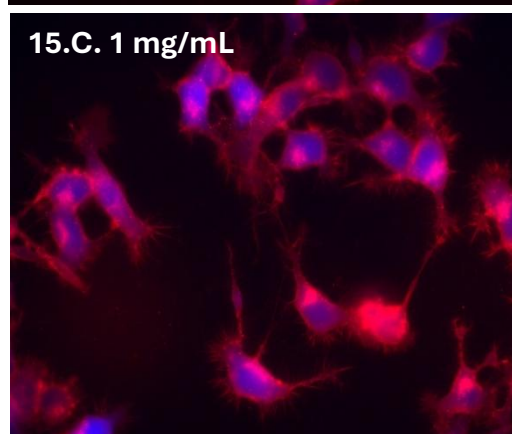
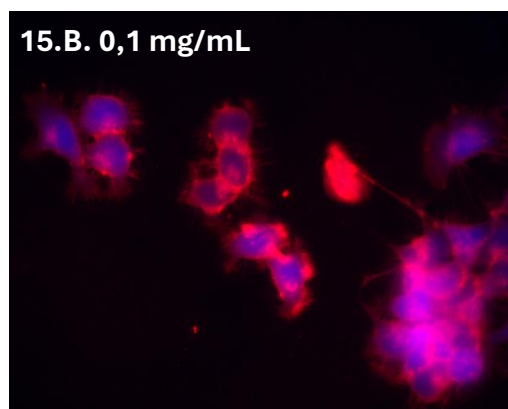
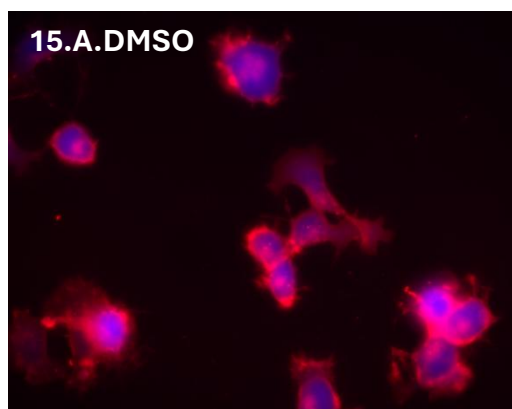
Hình 14.F. Biểu đồ định lượng số lượng neurite trung bình ở các nhóm xử lý NGF(**: $p<0,01$;****: $p<0,0001$).

Hình 14.G. Biểu đồ định lượng chiều dài neurite trung bình ở các nhóm xử lý NGF(**: $p<0,001$;****: $p<0,0001$)

Kết quả hình 14 cho thấy NGF là một chất đối chứng dương cho hoạt tính tốt đối với sự phát triển về số lượng của các sợi liên kết thần kinh (neurite). Số lượng các sợi liên kết thần kinh được tăng lên tuyến tính khi tăng dần nồng độ thử của NGF. Tại nồng độ thử 2 $\mu\text{g/mL}$ số lượng các sợi liên kết thần kinh được tăng lên gấp 2 lần có mang ý nghĩa thống kê. Nhưng với khả năng tăng cường về chiều dài của các sợi liên kết thần kinh thì NGF không thể hiện rõ do kết quả với sai số quá lớn không mang lại ý nghĩa thống kê trên giá trị trung bình.

Hoạt tính tăng sinh sợi LKTK của cao chiết nấm trùng thảo

Cao chiết nấm trùng thảo và đông trùng hạ thảo mặc dù được thử nghiệm rất nhiều với hoạt tính ức chế enzyme AChE, bảo vệ tế bào thần kinh và nhiều hướng đánh giá hoạt tính khác, nhưng thử trên mô hình nhằm vào sợi LKTK lại chưa có công bố nào. Vì định hướng đề tài nhằm tới một sản phẩm hỗ trợ tăng cường trí nhớ, nên việc đánh giá hoạt tính này của cao chiết là một mục tiêu quyết định. Nồng độ cao chiết thử nghiệm là: 0; 0,1; 1; 10 mg/mL . Kết quả thử nghiệm được biểu diễn trên hình 15 sau:



Hình 15. Hoạt tính tăng sinh sợi liên kết thần kinh của cao chiết nấm trùng thảo

Ghi chú:

Hình 15.A. Ảnh tế bào ở nhóm chứng DMSO, thể hiện mức phát triển neurite nền.

Hình 15.B. Ảnh tế bào xử lý với cao chiết nấm trùng thảo nồng độ 0,1 mg/mL.

Hình 15.C. Ảnh tế bào xử lý với cao chiết nấm trùng thảo nồng độ 1 mg/mL.

Hình 15.D. Ảnh tế bào xử lý với cao chiết nấm trùng thảo nồng độ 10 mg/mL.

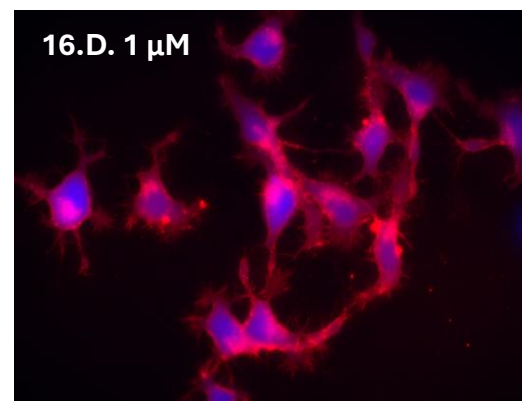
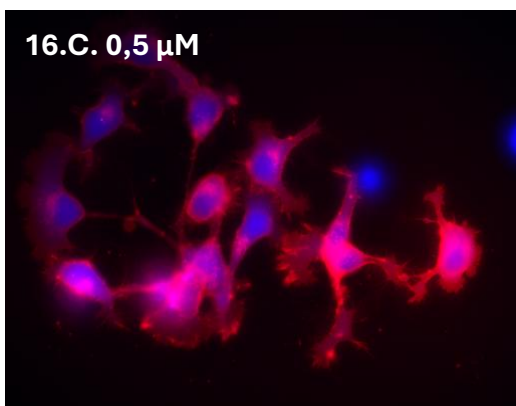
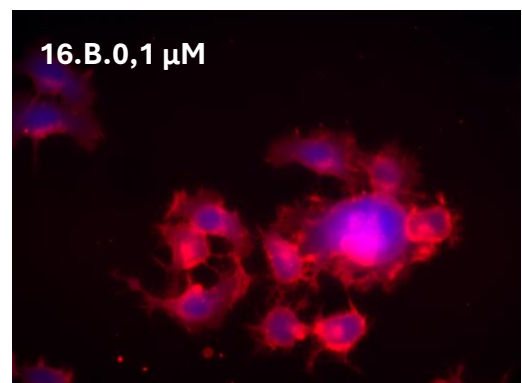
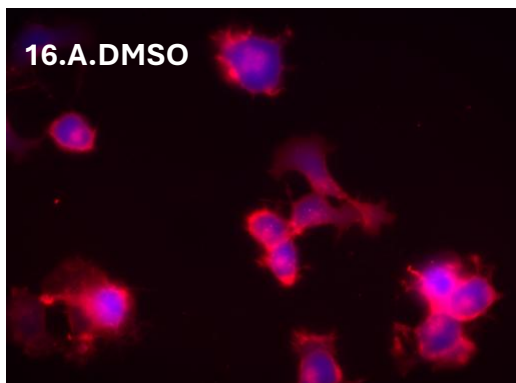
Hình 15.E. Biểu đồ định lượng số lượng neurite trung bình sau xử lý với cao chiết nấm trùng thảo (ns: $p \geq 0,05$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).

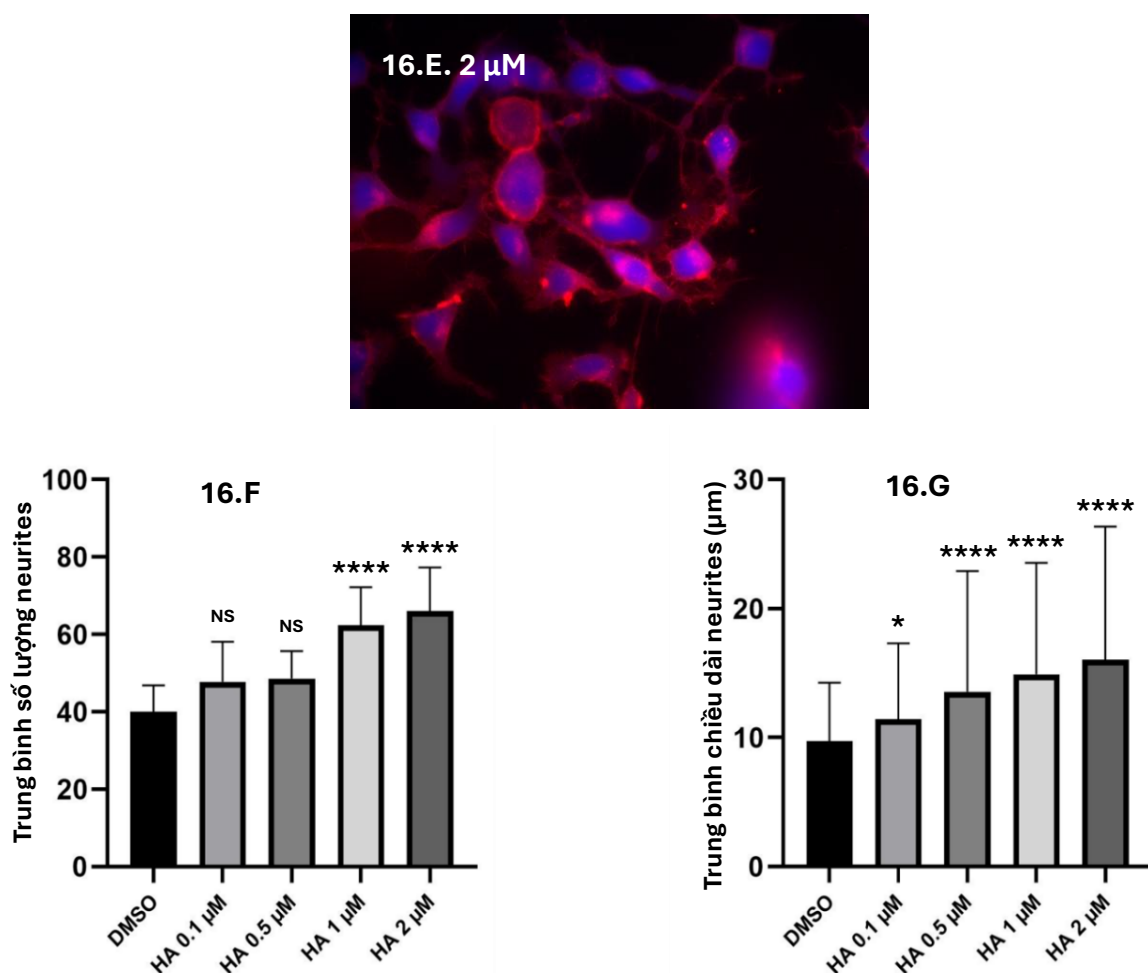
Hình 15.F. Biểu đồ định lượng chiều dài neurite trung bình sau xử lý với cao chiết nấm trùng thảo (ns: $p \geq 0,05$; ****: $p < 0,0001$).

Cao chiết nấm trùng thảo cũng thể hiện rất rõ rệt khả năng tăng sinh sợi liên kết thần kinh tuyến tính ở nồng độ 0,1 mg/mL đến 1 mg/mL. Nhưng ở 10 mg/mL cao chiết lại thể hiện sự ức chế phát triển của dòng tế bào thần kinh này. Ở nồng độ 1 mg/mL cao chiết nấm trùng thảo thử nghiệm, cũng cho thấy sự tăng lên gấp 2 lần của trung bình số lượng các sợi liên kết thần kinh mang ý nghĩa thống kê. Kết quả về chiều dài của tế bào thần kinh có sai số quá lớn nên không mang ý nghĩa thống kê.

Hoạt tính tăng sinh sợi LKTK của hỗn hợp HupA và nấm trùng thảo

HupA mặc dù được thử nghiệm rất nhiều với hoạt tính ức chế enzyme AChE, bảo vệ tế bào thần kinh và nhiều hướng đánh giá hoạt tính khác, nhưng thử trên mô hình nhằm vào sợi LKTK lại chưa có công bố. Hỗn hợp thử nghiệm được phối trộn theo tỷ lệ 5mg HupA/121,7 mg cao chiết. Mẫu thử được tính toán và ký hiệu dựa trên nồng độ HupA thử nghiệm là: 0; 0,1; 0,5; 1; 2 μM . Kết quả thử nghiệm được biểu diễn trên hình 16 sau:





Hình 16. Hoạt tính tăng sinh sợi liên kết thần kinh của công thức phối trộn

Ghi chú:

Hình 16.A. Ảnh tế bào ở nhóm chứng DMSO.

Hình 16.B. Ảnh tế bào xử lý với công thức phối trộn ở nồng độ quy đổi theo HupA là 0,1 μ M.

Hình 16.C. Ảnh tế bào xử lý với công thức phối trộn ở nồng độ quy đổi theo HupA là 0,5 μ M.

Hình 16.D. Ảnh tế bào xử lý với công thức phối trộn ở nồng độ quy đổi theo HupA là 1 μ M.

Hình 16.E. Ảnh tế bào xử lý với công thức phối trộn ở nồng độ quy đổi theo HupA là 2 μ M

Hình 16.F. Biểu đồ định lượng số lượng neurite trung bình sau xử lý với công thức phối trộn (ns: $p \geq 0,05$; ****: $p < 0,0001$)

Hình 16.G. Biểu đồ định lượng chiều dài neurite trung bình sau xử lý với công thức phối trộn (ns: $p \geq 0,05$; *: $p < 0,05$; ****: $p < 0,0001$)

Công thức phối trộn cho thấy hiệu quả tăng lên của trung bình số lượng của các sợi liên kết thần kinh. ở nồng độ HupA 2 μ M tương đương với mẫu thử chứa (0,242 μ g/mL HupA, 5,89 mg/mL cao chiết).

Kết quả cho thấy mô hình LKTK hoạt động phù hợp khi đối chứng dương NGF làm tăng số lượng neurite theo xu hướng phụ thuộc nồng độ, và ở 2 μ g/mL số LKTK tăng xấp xỉ 2 lần so với đối chứng. Điều này xác nhận hệ thống thí nghiệm đủ nhạy để phát hiện sự thay đổi về khả năng tạo LKTK. Trong nghiên cứu tế bào thần kinh, NGF là đối chứng dương kinh điển cho quá trình biệt hóa và phát triển LKTK của tế bào PC12 và các mô hình tương tự [57].

Một số kết quả, đặc biệt là chỉ tiêu chiều dài neurite, vẫn có độ biến động tương đối lớn giữa các lần đo, thể hiện qua độ lệch chuẩn ở một số nhóm thí nghiệm. Nguồn biến động này có thể liên quan đến cả đặc điểm sinh học của mô hình tế bào và các bước định lượng hình thái. Mật độ tế bào và mức độ biệt hóa của tế bào F11 có thể không hoàn toàn đồng nhất giữa các vị trí nuôi; neurite hình thành và phân bố không đều giữa các vi trường; đồng thời chất lượng nhuộm, độ nét của ảnh và vị trí lựa chọn để chụp có thể ảnh hưởng đến khả năng nhận diện sợi thần kinh. Ngoài ra, các neurite có thể giao nhau, phân nhánh, nằm sát thân tế bào hoặc kéo dài vượt khỏi giới hạn trường ảnh, từ đó làm tăng sai số khi xác định số lượng và chiều dài bằng phần mềm ImageJ. Vì vậy, độ lệch chuẩn tương đối lớn ở một số nhóm được xem là một đặc điểm cần lưu ý của phép thử định lượng hình thái neurite và cần được cân nhắc khi diễn giải mức độ tác động của mẫu thử.

Để đánh giá độ lặp lại và ý nghĩa của các khác biệt quan sát được, các số liệu từ những lần lặp của thí nghiệm đã được tổng hợp và phân tích thống kê. Dữ liệu được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD; sự khác biệt giữa các nhóm được đánh giá bằng phân tích phương sai một yếu tố (one-way ANOVA), sau đó sử dụng kiểm định hậu nghiệm Dunnett để so sánh từng nhóm xử lý với nhóm chứng DMSO. Kết quả thống kê cho thấy mặc dù có sự phân tán nhất định giữa các lần lặp, một số nồng độ vẫn tạo ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng, cho thấy xu hướng tác động quan sát được không chỉ phụ thuộc vào một giá trị đo riêng lẻ. Tuy nhiên,

mức độ biến động khác nhau giữa các nhóm cho thấy đáp ứng hình thái của neurite có tính không đồng nhất, đặc biệt đối với chỉ tiêu chiều dài.

Do đó, các kết quả có độ lệch chuẩn lớn cần được diễn giải trên cơ sở đồng thời xem xét giá trị trung bình, mức độ phân tán và giá trị p, thay vì chỉ dựa vào mức tăng tuyệt đối của chiều dài hoặc số lượng neurite. Đối với những nhóm có sự gia tăng giá trị trung bình nhưng độ biến động lớn, kết quả nên được xem là dấu hiệu về xu hướng tác động; trong khi các nhóm vừa có xu hướng tăng rõ ràng vừa đạt ý nghĩa thống kê qua các lần lặp cung cấp bằng chứng đáng tin cậy hơn về tác dụng thúc đẩy hình thành neurite trong điều kiện thí nghiệm.

Trong các nghiên cứu tiếp theo, để tiếp tục giảm sai số và nâng cao độ lặp lại của phép thử, cần chuẩn hóa chặt chẽ mật độ gieo tế bào, thời gian biệt hóa và thời gian xử lý mẫu; thống nhất số lượng và tiêu chí lựa chọn vi trường; duy trì cố định điều kiện nhuộm, chụp ảnh, độ phóng đại và ngưỡng xử lý ảnh trên ImageJ. Việc tăng số lần lặp thí nghiệm và số vi trường được phân tích cũng sẽ giúp giảm ảnh hưởng của tính không đồng nhất về hình thái tế bào, qua đó làm tăng độ tin cậy của kết quả đánh giá số lượng và chiều dài neurite.

Đáng chú ý, cao chiết nấm trùng thảo cũng làm tăng số lượng LKTK rõ rệt trong khoảng 0,1–1 mg/mL và đạt mức tăng khoảng 2 lần ở 1 mg/mL, nhưng lại ức chế sự phát triển ở 10 mg/mL. Kết quả này gợi ý rằng cao chiết trùng thảo không chỉ có tác dụng trên trục chống oxy hóa hay bảo vệ tế bào, mà còn có thể tham gia thúc đẩy quá trình biệt hóa hình thái của tế bào thần kinh. Mặt khác, việc giảm tác dụng ở nồng độ 10 mg/mL cho thấy mô hình LKTK có thể nhạy hơn với hiện tượng quá liều hoặc với ảnh hưởng bất lợi của các thành phần đi kèm trong cao chiết. Điều này cũng phù hợp với quan sát ở phép thử bảo vệ tế bào, nơi công thức phối trộn biểu hiện một khoảng nồng độ tối ưu thay vì hiệu quả tăng tuyến tính không giới hạn.

Khi so sánh với y văn, diễn giải này phù hợp với các công bố trước đó về HupA. Tang và cộng sự đã cho thấy HupA có thể làm tăng tiết NGF ở tế bào thần kinh đệm và làm tăng số lượng tế bào PC12 mang LKTK [7]. Như vậy, việc hỗn hợp chứa HupA biểu hiện tác dụng thuận lợi trên mô hình LKTK trong nghiên cứu này là hợp logic. Đồng thời, do cao chiết trùng thảo cũng cho kết quả dương tính riêng lẻ, nhiều

khả năng tác dụng của công thức trên LKTK là kết quả của sự bổ sung giữa HupA và các thành phần sinh học trong trùng thảo hơn là do một chất đơn độc chi phối hoàn toàn. Tuy nhiên, nghiên cứu hiện tại chỉ cho thấy rõ sự gia tăng về số lượng LKTK, trong khi chiều dài LKTK chưa đạt ý nghĩa thống kê do sai số lớn.

Đối với hỗn hợp HupA và cao chiết trùng thảo, kết quả cho thấy công thức phối trộn làm tăng trung bình số lượng LKTK, trong đó ở nồng độ HupA 2 μ M, tương ứng với 0,242 μ g/mL HupA và 5,89 mg/mL cao chiết, hiệu quả tăng LKTK được ghi nhận rõ. Kết quả này có ý nghĩa vì nó cho thấy công thức sau khi được sàng lọc ở phép thử enzyme AChE và bảo vệ tế bào vẫn giữ được khả năng tác động thuận lợi lên một chỉ tiêu khó hơn, đó là tăng trưởng cấu trúc thần kinh. Nói cách khác, công thức không chỉ giúp tế bào “sống sót” tốt hơn trước độc tính, mà còn có tiềm năng hỗ trợ tái lập kết nối thần kinh thông qua tăng hình thành LKTK. Kết luận phù hợp nhất là công thức có tiềm năng thúc đẩy hình thành LKTK, còn hiệu quả trên kéo dài LKTK cần được kiểm chứng thêm bằng thiết kế đo đạc chính xác hơn [7,50,57].

V. Kết luận và kiến nghị

5.1. Kết luận

Trong phạm vi nghiên cứu in vitro, đề tài đã thu được các kết quả chính theo trình tự sau:

Thứ nhất, mẫu HupA sau tinh sạch có thời gian lưu và phổ UV phù hợp với chất chuẩn; độ tinh sạch tính theo tỷ lệ diện tích pic HPLC đạt trên 99%. Hàm lượng adenosine và cordycepin trong cao chiết nấm trùng thảo lần lượt là 1175 và 4987 mg/100 g cao chiết.

Thứ hai, HupA đơn chất ức chế AChE với $IC_{50} = 0,074 \pm 0,001 \mu\text{g/mL}$, trong khi hỗn hợp adenosine và cordycepin (A+C) có $IC_{50} > 128 \mu\text{g/mL}$. Trong 16 tổ hợp khảo sát, tỷ lệ khối lượng hoạt chất HupA:A+C = 2:3 cho IC_{50} thấp nhất, đạt $0,0077 \pm 0,0009 \mu\text{g/mL}$. Kết quả cho thấy hiệu lực ức chế AChE in vitro tăng so với HupA đơn chất, nhưng chưa đủ để khẳng định tương tác hiệp đồng khi chưa có chỉ số FIC/FICI.

Thứ ba, nồng độ 6-OHDA 200 μM được lựa chọn để gây tổn thương tế bào F11. Công thức HupA phối hợp cao chiết nấm trùng thảo duy trì hoạt tính chuyển hóa WST-8 của tế bào ở mức khoảng 70-125% so với chứng DMSO trong dải nồng độ khảo sát. Tác dụng phụ thuộc nồng độ; riêng cao chiết thô ở 10 mg/mL làm giảm rõ rệt hoạt tính chuyển hóa của tế bào.

Thứ tư, ở công thức tương ứng 0,242 $\mu\text{g/mL}$ HupA và 5,89 mg/mL cao chiết, số lượng neurite trung bình tăng so với chứng. Tuy nhiên, dữ liệu chiều dài neurite có độ biến động lớn nên chưa thể kết luận chắc chắn về khả năng kéo dài neurite.

Nhìn chung, tỷ lệ phối hợp được lựa chọn cho thấy tín hiệu ức chế AChE, duy trì hoạt tính chuyển hóa của tế bào F11 chịu tác động của 6-OHDA và làm thay đổi một số chỉ số hình thái neurite trong điều kiện in vitro. Các kết quả mang tính thăm dò, chưa đủ để khẳng định hiệu quả đối với bệnh Alzheimer, lợi ích nhận thức hoặc khả năng ứng dụng sản phẩm.

5.2. Kiến nghị

Để tiếp tục định hướng phát triển công thức sử dụng trên người, công thức phối trộn Huperzine A : A+C = 2:3 cần được xác nhận lại bằng các thí nghiệm in vitro độc lập, trong đó ưu tiên kiểm tra độ lặp lại của phép thử neurite, chuẩn hóa đơn

vị lặp thống kê và hoàn thiện phân tích tương tác giữa các thành phần. Sau khi độ lặp lại và khoảng nồng độ an toàn được xác nhận, cần tiến hành các nghiên cứu in vivo phù hợp để đánh giá độc tính, liều có hiệu quả và các chỉ tiêu sinh hóa, mô học cũng như chức năng nhận thức liên quan. Trên cơ sở các dữ liệu nhất quán qua các cấp độ nghiên cứu này, có thể tiếp tục hoàn thiện công thức, lựa chọn dạng bào chế và xây dựng thiết kế nghiên cứu lâm sàng phù hợp.

Bên cạnh đó, cần tiếp tục tinh sạch và chuẩn hóa cao chiết nấm trùng thảo. Kết quả in vitro cho thấy cao chiết có đáp ứng phụ thuộc nồng độ và ở nồng độ cao có thể làm giảm hoạt tính chuyển hóa của tế bào. Vì vậy, các nghiên cứu tiếp theo cần phân đoạn và làm giàu Adenosine, Cordycepin; kiểm soát các thành phần đi kèm; xác định khoảng nồng độ không gây độc; đồng thời đánh giá độ ổn định giữa các lô nguyên liệu. Các bước này nhằm tạo mẫu thử có thành phần định lượng rõ ràng, ổn định và phù hợp cho các nghiên cứu tiền lâm sàng tiếp theo theo định hướng phát triển sản phẩm sử dụng cho người.

Trên cơ sở kết quả sàng lọc in vitro hiện có, công thức phối trộn cho thấy tiềm năng tiếp tục được phát triển theo định hướng hỗ trợ chức năng thần kinh và cải thiện trí nhớ. Để tiến tới nghiên cứu và ứng dụng trên người, cần tiếp tục đánh giá độ lặp lại, cơ chế/tương tác, độc tính, hiệu quả in vivo, độ ổn định và khả năng chuẩn hóa; từ đó hoàn thiện cơ sở khoa học cho việc lựa chọn liều, dạng bào chế và thiết kế nghiên cứu lâm sàng phù hợp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. World Health Organization. Dementia. Updated March 31, 2025.
2. Knopman, D.S.; Amieva, H.; Petersen, R.C.; Chételat, G.; Holtzman, D.M.; Hyman, B.T.; Nixon, R.A.; Jones, D.T. Alzheimer Disease. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2021**, *7*, 33.
3. Fox, N.C.; Belder, C.; Ballard, C.; Kales, H.C.; Mummery, C.; Caramelli, P.; Ciccarelli, O.; Frederiksen, K.S.; Gomez-Isla, T.; Ismail, Z. Treatment for Alzheimer's Disease. *The Lancet* **2025**, *406*, 1408–1423.
4. Balázs, N.; Bereczki, D.; Kovács, T. Cholinesterase Inhibitors and Memantine for the Treatment of Alzheimer and Non-Alzheimer Dementias. *Ideggyogy Sz* **2021**, *74*, 379–387.
5. Qian, Z.M.; Ke, Y. Huperzine A: Is It an Effective Disease-Modifying Drug for Alzheimer's Disease? *Front. Aging Neurosci.* **2014**, *6*, 216.
6. Ha, G.T.; Wong, R.K.; Zhang, Y. Huperzine a as Potential Treatment of Alzheimer's Disease: An Assessment on Chemistry, Pharmacology, and Clinical Studies. *Chem. Biodivers.* **2011**, *8*, 1189–1204.
7. Tang, L.; Wang, R.; Tang, X. Effects of Huperzine A on Secretion of Nerve Growth Factor in Cultured Rat Cortical Astrocytes and Neurite Outgrowth in Rat PC12 Cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **2005**, *26*, 673–678.
8. Trinh, P.N.; Baltos, J.-A.; Hellyer, S.D.; May, L.T.; Gregory, K.J. Adenosine Receptor Signalling in Alzheimer's Disease. *Purinergic Signal.* **2022**, *18*, 359–381.
9. Launay, A.; Carvalho, K.; Genin, A.; Gauvrit, T.; Nobili, P.; Gomez-Murcia, V.; Augustin, E.; Burgard, A.; Gambi, J.; Fourmy, D. Upregulation of Adenosine A2A Receptor in Astrocytes Is Sufficient to Trigger Hippocampal Multicellular Dysfunctions and Memory Deficits. *Mol. Psychiatry* **2025**, *30*, 5300–5314.
10. Jędrejko, K.J.; Lazur, J.; Muszyńska, B. Cordyceps Militaris: An Overview of Its Chemical Constituents in Relation to Biological Activity. *Foods* **2021**, *10*, 2634.
11. Jin, M.L.; Park, S.Y.; Kim, Y.H.; Oh, J.-I.; Lee, S.J.; Park, G. The Neuroprotective Effects of Cordycepin Inhibit Glutamate-Induced Oxidative

- and ER Stress-Associated Apoptosis in Hippocampal HT22 Cells. *Neurotoxicology* **2014**, *41*, 102–111.
12. Olatunji, O.J.; Feng, Y.; Olatunji, O.O.; Tang, J.; Ouyang, Z.; Su, Z. Cordycepin Protects PC12 Cells against 6-Hydroxydopamine Induced Neurotoxicity via Its Antioxidant Properties. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *81*, 7–14.
 13. Thịnh, N.T.; Phương, N.T.T.; Hà, Đ.T.; Hà, Đ.V.V.; Hùng, T.V.; Hồng, N.L. Định Lượng Đồng Thời Adenosin và Cordycepin Trong Một Số Nền Mẫu Thực Phẩm Bảo vệ Sức Khỏe Chứa Cordyceps Trên Thị Trường Việt Nam. *Tạp Chí Kiểm Nghiệm Dược Và Mỹ Phẩm* **2024**, *22*, 29–35.
 14. Thi Minh Le, T.; Thi Hong Hoang, A.; Thi Bich Le, T.; Thi Bich Vo, T.; Van Quyen, D.; Hoang Chu, H. Isolation of Endophytic Fungi and Screening of Huperzine A–Producing Fungus from *Huperzia Serrata* in Vietnam. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 16152.
 15. Le, T.T.M.; Pham, H.T.; Trinh, H.T.T.; Tran, H.T.; Chu, H.H. Isolation and Characterization of Novel Huperzine-Producing Endophytic Fungi from Lycopodiaceae Species. *J. Fungi* **2023**, *9*, 1134.
 16. Ma, X.; Tan, C.; Zhu, D.; Gang, D.R.; Xiao, P. Huperzine A from *Huperzia* Species—an Ethnopharmacological Review. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *113*, 15–34.
 17. Liang, Y.Q.; Tang, X.C. Comparative Effects of Huperzine A, Donepezil and Rivastigmine on Cortical Acetylcholine Level and Acetylcholinesterase Activity in Rats. *Neurosci. Lett.* **2004**, *361*, 56–59.
 18. Sussman, J.L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. Atomic Structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo Californica*: A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein. *Science* **1991**, *253*, 872–879.
 19. Tan, C.-C.; Yu, J.-T.; Wang, H.-F.; Tan, M.-S.; Meng, X.-F.; Wang, C.; Jiang, T.; Zhu, X.-C.; Tan, L. Efficacy and Safety of Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, and Memantine for the Treatment of Alzheimer’s Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Alzheimer’s Dis.* **2014**, *41*, 615–631.

20. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres Jr, V.; Featherstone, R.M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.
21. Lin, B.Q.; Li, S.P. Cordyceps as an Herbal Drug. **2011**.
22. Shrestha, B.; Zhang, W.; Zhang, Y.; Liu, X. The Medicinal Fungus Cordyceps Militaris: Research and Development. *Mycol. Prog.* **2012**, *11*, 599–614.
23. Huang, L.-F.; Guo, F.-Q.; Liang, Y.-Z.; Chen, B.-M. Determination of Adenosine and Cordycepin in Cordyceps Sinensis and C. Militaris with HPLC-ESI-MS. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi Zhongguo Zhongyao Zazhi China J. Chin. Mater. Medica* **2004**, *29*, 762–764.
24. Panpraneecharoen, S.; Chatrakoon, T.; Sansenya, S.; Chumanee, S. Optimization and Validation of HPLC/DAD Method for the Determination of Adenosine and Cordycepin in Cordyceps Products. *Anal. Sci. Technol.* **2023**, *36*, 152–160.
25. Wangboonskul, J.; Amnuoypol, S.; Sangvatanakul, P. Analytical Method Development for Quantitation of Adenosine and Cordycepin in Cordyceps and Related Products. *Pharm Sci Asia* **2020**, *47*, 357–365.
26. Lee, B.; Park, J.; Park, J.; Shin, H.-J.; Kwon, S.; Yeom, M.; Sur, B.; Kim, S.; Kim, M.; Lee, H. Cordyceps Militaris Improves Neurite Outgrowth in Neuro2a Cells and Reverses Memory Impairment in Rats. *Food Sci. Biotechnol.* **2011**, *20*, 1599–1608.
27. Kim, Y.O.; Kim, H.J.; Abu-Taweel, G.M.; Oh, J.; Sung, G.-H. Neuroprotective and Therapeutic Effect of Cordyceps Militaris on Ischemia-Induced Neuronal Death and Cognitive Impairments. *Saudi J. Biol. Sci.* **2019**, *26*, 1352–1357.
28. Rahman, A. The Role of Adenosine in Alzheimer's Disease. *Curr. Neuroparmacol.* **2009**, *7*, 207–216.
29. Anand, S.; Schoo, C. Mild Cognitive Impairment. In *StatPearls [Internet]*; StatPearls Publishing, 2024.
30. 2026 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimers Dement.* **2026**, *22*, e71345, doi:10.1002/alz.71345.
31. World Health Organization *Dementia: A Public Health Priority*; World Health Organization, 2012; ISBN 92-4-156445-8.

32. Nam, U.V.; Duc, N.M. Population Ageing and Older Persons in Viet Nam. *Gen. Stat. Off.* **2021**.
33. Patel, L.; Grossberg, G.T. Combination Therapy for Alzheimer's Disease. *Drugs Aging* **2011**, *28*, 539–546.
34. Nikkhah, M.; Hashemi, M.; Najafi, M.B.H.; Farhoosh, R. Synergistic Effects of Some Essential Oils against Fungal Spoilage on Pear Fruit. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *257*, 285–294.
35. Chou, S.-M.; Lai, W.-J.; Hong, T.-W.; Lai, J.-Y.; Tsai, S.-H.; Chen, Y.-H.; Yu, S.-H.; Kao, C.-H.; Chu, R.; Ding, S.-T. Synergistic Property of Cordycepin in Cultivated Cordyceps Militaris-Mediated Apoptosis in Human Leukemia Cells. *Phytomedicine* **2014**, *21*, 1516–1524.
36. Tiomyom, K.; Sirichaiwetchakoon, K.; Hengpratom, T.; Kupittayanant, S.; Srisawat, R.; Thaeomor, A.; Eumkeb, G. The Effects of Cordyceps Sinensis (Berk.) Sacc. and Gymnema Inodorum (Lour.) Decne. Extracts on Adipogenesis and Lipase Activity in Vitro. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2019**, *2019*, 5370473.
37. Lee, H.; Birks, J.S. Ginkgo Biloba for Cognitive Improvement in Healthy Individuals. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, *2018*, CD004671.
38. Solomon, P.R.; Adams, F.; Silver, A.; Zimmer, J.; DeVeaux, R. Ginkgo for Memory Enhancement: A Randomized Controlled Trial. *Jama* **2002**, *288*, 835–840.
39. Trung, Đ.M.; Trung, T.N.; Linh, N.T.; Thư, N.V. 33. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG TĂNG CƯỜNG TRÍ NHỚ CỦA VIÊN NANG MỀM HUP A BẰNG MÔ HÌNH TRIMETHYLTIN CHLORIDE TRÊN CHUỘT NHẮT TRẮNG. *Tạp Chí Học Cộng Đồng* **2024**, *65*.
40. Platika, D.; Boulos, M.H.; Baizer, L.; Fishman, M.C. Neuronal Traits of Clonal Cell Lines Derived by Fusion of Dorsal Root Ganglia Neurons with Neuroblastoma Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1985**, *82*, 3499–3503.
41. Saito, Y.; Nishio, K.; Ogawa, Y.; Kinumi, T.; Yoshida, Y.; Masuo, Y.; Niki, E. Molecular Mechanisms of 6-Hydroxydopamine-Induced Cytotoxicity in PC12

- Cells: Involvement of Hydrogen Peroxide-Dependent and-Independent Action. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *42*, 675–685.
42. Latchoumycandane, C.; Anantharam, V.; Jin, H.; Kanthasamy, A.; Kanthasamy, A. Dopaminergic Neurotoxicant 6-OHDA Induces Oxidative Damage through Proteolytic Activation of PKC δ in Cell Culture and Animal Models of Parkinson's Disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2011**, *256*, 314–323.
 43. Ngọc, V.T.; Hạnh, P.T.; Đạt, N.T.; Thủy, L.T.B. Qualification and Quantification of Huperzine A from *Huperia Serrata* in Da Lat, Lam Dong Province. *Vietnam J. Biotechnol.* **2016**, *14*, 473–478.
 44. Singpoonga, N.; Rittiron, R.; Seang-On, B.; Chaiprasart, P.; Bantadjan, Y. Determination of Adenosine and Cordycepin Concentrations in *Cordyceps Militaris* Fruiting Bodies Using Near-Infrared Spectroscopy. *ACS Omega* **2020**, *5*, 27235–27244.
 45. Huang, L.; Li, Q.; Chen, Y.; Wang, X.; Zhou, X. Determination and Analysis of Cordycepin and Adenosine in the Products of *Cordyceps* Spp. *Afr J Microbiol Res* **2009**, *3*, 957–961.
 46. Wagner, H.; Ulrich-Merzenich, G. Synergy Research: Approaching a New Generation of Phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* **2009**, *16*, 97–110.
 47. Odds, F.C. Synergy, Antagonism, and What the Chequerboard Puts between Them. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *52*, 1–1.
 48. Parveen, S.; Khalid, A.; Farooq, A.; Choudhary, M.I. Acetyl and Butyrylcholinesterase-Inhibiting Triterpenoid Alkaloids from *Buxus Papillosa*. *Phytochemistry* **2001**, *58*, 963–968.
 49. Kulich, S.M.; Horbinski, C.; Patel, M.; Chu, C.T. 6-Hydroxydopamine Induces Mitochondrial ERK Activation. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *43*, 372–383.
 50. Pemberton, K.; Mersman, B.; Xu, F. Using ImageJ to Assess Neurite Outgrowth in Mammalian Cell Cultures: Research Data Quantification Exercises in Undergraduate Neuroscience Lab. *J. Undergrad. Neurosci. Educ.* **2018**, *16*, A186.

51. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682.
52. Friedli, M.J.; Inestrosa, N.C. Huperzine A and Its Neuroprotective Molecular Signaling in Alzheimer's Disease. *Molecules* **2021**, *26*, 6531.
53. Tao, L.; Huang, X.; Chen, Y.; Tang, X.; Zhang, H. Acetylcholinesterase-Independent Protective Effects of Huperzine A against Iron Overload-Induced Oxidative Damage and Aberrant Iron Metabolism Signaling in Rat Cortical Neurons. *Acta Pharmacol. Sin.* **2016**, *37*, 1391–1400.
54. Phull, A.-R.; Ahmed, M.; Park, H.-J. Cordyceps Militaris as a Bio Functional Food Source: Pharmacological Potential, Anti-Inflammatory Actions and Related Molecular Mechanisms. *Microorganisms* **2022**, *10*, 405.
55. Park, S.E.; Yoo, H.S.; Jin, C.-Y.; Hong, S.H.; Lee, Y.-W.; Kim, B.W.; Lee, S.H.; Kim, W.-J.; Cho, C.K.; Choi, Y.H. Induction of Apoptosis and Inhibition of Telomerase Activity in Human Lung Carcinoma Cells by the Water Extract of Cordyceps Militaris. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 1667–1675.
56. Bai, K.-C.; Sheu, F. A Novel Protein from Edible Fungi Cordyceps Militaris That Induces Apoptosis. *J. Food Drug Anal.* **2018**, *26*, 21–30.
57. Greene, L.A.; Tischler, A.S. Establishment of a Noradrenergic Clonal Line of Rat Adrenal Pheochromocytoma Cells Which Respond to Nerve Growth Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1976**, *73*, 2424–2428.