

Bài báo nghiên cứu

ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI GIAN CHIẾU TIA UVA NHÂN TẠO LÊN MỨC ĐỘ TỔN THƯƠNG DA CHUỘT NHẮT TRẮNG (*Mus musculus var. albino*)

Nguyễn Thị Thương Huyền^{1*}, Nguyễn Ngọc Hân², Trương Thị Thuý^{1,3}, Trần Cẩm Tú⁴

¹Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Thanh tra tỉnh Tiền Giang, Việt Nam

³Viện Tế bào gốc, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TPHCM, Việt Nam

⁴Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

*Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Thương Huyền – Email: huyenntth@hcmue.edu.vn

Ngày nhận bài: 27-5-2023; ngày nhận bài sửa: 20-6-2023; ngày duyệt đăng: 22-6-2023

TÓM TẮT

Sự gia tăng chỉ số của tia UV (Ultraviolet), đặc biệt UVA, là một yếu tố góp phần làm gia tăng tốc độ lão hoá da. Tốc độ lão hoá da thay đổi tùy thuộc vào thời gian tiếp xúc với tia UV. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá được ảnh hưởng của thời gian chiếu tia UVA nhân tạo lên mức độ tổn thương da chuột nhắt trắng. Kết quả cho thấy, cùng một liều chiếu (24 mJ/cm²/phút), sự tổn thương lên da chuột có xu hướng tăng dần theo sự tăng dần thời gian chiếu (3 giờ, 6 giờ, và 9 giờ chiếu): tăng mức độ lão hoá bên ngoài, tăng độ dày biểu bì và làm tăng sự đứt gãy cấu trúc collagen. Nghiên cứu này còn dự đoán được các mức độ lão hoá da chuột với các mốc thời gian chiếu UVA nhân tạo giúp cho các đợt thí nghiệm khác bố trí đạt hiệu quả cao. Cần thực hiện nghiên cứu ảnh hưởng của liều chiếu UVA nhân tạo lên cấu trúc da chuột để có thêm căn cứ về đánh giá ảnh hưởng của UVA lên cấu trúc da chuột.

Từ khóa: cấu trúc da chuột; chuột nhắt trắng; lão hoá da; UVA; tia UV

1. Giới thiệu

Da là cơ quan lớn nhất của cơ thể, chiếm 16% khối lượng cơ thể, đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ cơ thể chống lại các tác nhân gây hại của môi trường: tác nhân gây bệnh truyền nhiễm, tác nhân hoá học và tia cực tím (D'Orazio, Jarrett, Amaro-Ortiz, & Scott, 2013; Fuchs, 2007; Slominski et al., 2012). Lão hoá da là một quá trình phức tạp kết hợp giữa các yếu tố bên trong và bên ngoài. Lão hoá bên trong do sự ảnh hưởng của yếu tố di truyền, nguyên nhân bên ngoài được xác định chủ yếu do các tia cực tím. Hai quá trình lão hoá này chồng lên nhau và gây ra sự thay đổi cấu trúc da mà biểu hiện rõ nhất là sự hình

Cite this article as: Nguyen Thi Thuong Huyen, Nguyen Ngoc Han, Truong Thi Thuy, & Tran Cam Tu (2023). Effects of the duration of artificial UVA irradiation exposure on skin damage levels in albino mice. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 20(6), 944-956.

thành các nếp nhăn, da trở nên nhão hơn, khô hơn và kém đàn hồi (D'Orazio et al., 2013; Hwang, Yi, & Choi, 2011).

Nguyên nhân chủ yếu của sự lão hoá da là do từ môi trường bên ngoài, đặc biệt là tác động của tia (UVA (320~400 nm), UVB (280~320 nm) và UVC (100~280 nm). Cả UVA và UVB đều đi sâu tới lớp hạ bì tạo ra các gốc oxy hoá (ROS-Reactive oxygen species), bao gồm cả sự tổng hợp các MMP (matrix metalloproteinases), đây chính là nguyên nhân làm đột biến DNA ti thể. Mặt khác, khi tia UV vượt quá mức có thể ức chế hoạt động của các enzyme chống oxy hoá, phá hủy hệ thống chống oxy hoá, từ đó làm tổn thương da (Komatsu, Sasaki, Manabe, Hirata, & Sugawara, 2017; Slominski et al., 2012). Khi hàm lượng ROS tích lũy quá cao sẽ kéo theo hàng loạt phản ứng xảy ra trong da, làm thoái hoá collagen và elastin, từ đó làm cho da nhăn nheo, chảy sệ (Komatsu et al., 2017). UVA có suốt thời gian trong ngày và suốt mọi ngày trong năm, kể cả những ngày trời râm, lên đến 90%-95%, với khả năng xuyên qua các rào cản như cửa kính, quần áo mỏng. Việc tiếp xúc với tia UVA trong thời gian dài làm xuất hiện quá trình lão hoá da sớm. Sự thay đổi này tích tụ theo thời gian và không thể đảo ngược. UVA đẩy nhanh quá trình lão hoá do chúng có thể phá hủy collagen và mô liên kết dưới bề mặt da, từ đó gây ra những nếp nhăn, đốm nâu làm da mất đi độ đàn hồi (Amaro-Ortiz, Yan, & D'Orazio, 2014; De Grujil, 2000).

Trong cùng một cường độ ánh sáng nhưng thời gian tiếp xúc khác nhau dẫn đến tốc độ lão hoá giữa các vùng da khác nhau và các dấu hiệu lão hoá xuất hiện không đồng đều. Các nghiên cứu và thử nghiệm các sản phẩm bảo vệ da khỏi tia UV đều tiến hành dựa trên mô hình lão hoá da do tia UV gây ra (Feng et al., 2014; Komatsu et al., 2017). Mục tiêu của các nghiên cứu này là xác định tác dụng của các công cụ được lí làm chậm quá trình lão hoá da nhờ tính tương đồng di truyền với con người và tính dễ dàng sử dụng (Hwang et al., 2011). Nhưng ở Việt Nam vẫn chưa có một mô hình cụ thể được tiến hành để đánh giá về mức độ lão hoá và tổn thương do tia UVA gây ra, chưa đánh giá được mối tương quan giữa thời gian tiếp xúc và tốc độ lão hoá. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá được ảnh hưởng của thời gian chiếu tia UVA nhân tạo lên mức độ tổn thương da chuột nhắt trắng, từ đó xác định được thời gian cần thiết gây lão hoá da chuột nhắt trắng dưới tác động của tia UVA.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Hoá chất

Thuốc nhuộm H&E: Hematoxylin và Eosin (Sigma), Formalin 10% (Sigma), các muối KH_2PO_4 và Na_2HPO_4 (Merck).

2.2. Động vật thí nghiệm

Chuột trắng cái (*Mus musculus* var. *albino*) 4 tuần tuổi (12-14 g) được mua từ Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh, nuôi ổn định với chu kỳ 12 giờ sáng/tối, thức ăn tổng hợp và nước uống tại Phòng Thí nghiệm tại Giải phẫu – Sinh lí Người và Động vật, Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh 2 tuần để đạt cân nặng 19-21 g (tương ứng với 6 tuần tuổi).

2.3. Bố trí thí nghiệm

48 chuột cái đạt tiêu chuẩn được chia thành 4 nghiệm thức (12 chuột/nghiệm thức). Mỗi chuồng 4 chuột được đánh số thứ tự, chuồng nuôi chuột được thiết kế bằng thủy tinh (đường kính 30 cm, chiều cao 20 cm) có nắp đậy bằng kẽm mắt cáo, có gắn bình nước 50 mL. Chuồng nuôi được rải trấu với độ cao khoảng 1-2 cm nhằm giữ ẩm. Toàn bộ thí nghiệm được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Giải phẫu - Sinh lí Người và Động vật – Khoa Sinh học Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh; nhuộm H&E mẫu mô da được thực hiện tại Khoa Giải phẫu bệnh – Bệnh viện Quận 2, Thành phố Hồ Chí Minh. Thí nghiệm được thông qua Hội đồng Đạo đức Động vật, mã số 1170B/KHTN-ACUCUS.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

- **Phương pháp chiếu đèn UVA:** chuột được cạo lông vùng lưng có kích thước tối thiểu là 9 cm² vào ngày trước khi tiến hành chiếu đèn. Chiếu đèn UVA cho chuột tương ứng với 4 nghiệm thức trong cùng một cường độ chiếu (2 bóng 15W tương đương 24 mJ/cm²/phút), khoảng cách từ đèn đến lưng chuột 30 cm (Wang et al., 2016), chiếu trong 8 tuần liên tiếp. Cường độ bóng đèn UVA được xác định bằng thiết bị đo cường độ ánh sáng. Thời gian chiếu UVA là 3, 6 và 9 giờ/ngày (Nguyen, Bui, Truong, & Pham, 2019). Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiếu UVA tương ứng với 4 nghiệm thức: T1 (chiếu UVA 3 giờ/ngày), T2 (chiếu UVA 6 giờ/ngày), T3 (chiếu UVA 9 giờ/ngày) và CT (đối chứng: không chiếu).

- **Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của tia UVA lên chuột:** theo dõi hàng ngày, mỗi ngày trước khi chiếu tiến hành ghi nhận các đặc điểm: sự thay đổi bề mặt da, độ đàn hồi da, màu sắc da. Sau mỗi 4 tuần chiếu UVA, tiến hành đánh giá một số đặc điểm trên da: độ đàn hồi, độ nhăn da, các tổn thương mới xuất hiện trên da và các đốm màu bất thường.

- **Phương pháp thu nhận mẫu da:** sau 8 tuần thí nghiệm, tiến hành giải phẫu chuột (chuột được kéo dẫn đốt sống cổ – cái chết nhẹ nhàng) để thu nhận mẫu da lưng. Dùng tay kéo phần da lưng ép sát vào tấm lót, sử dụng dao sinh thiết da chuyên dụng (dao bấm) có đường kính 0,3 cm bấm theo chiều thẳng đứng từ trên xuống để lấy mẫu da. Thu nhận 4 mẫu (tương ứng 2 lần bấm) trên một con chuột. Mẫu da được bảo quản trong dung dịch formalin 10% bổ sung KH₂PO₄ (4 g/1000 mL) và Na₂HPO₄ (6,5 g/1000 mL), ghi nhãn và kí hiệu cho từng nghiệm thức để thực hiện nhuộm H&E tại Khoa Giải phẫu bệnh – Bệnh viện Quận 2, Thành phố Hồ Chí Minh.

- **Phương pháp so sánh đối chiếu tiêu bản mô học:** sau khi thu nhận kết quả nhuộm mô học tiến hành so sánh, đối chiếu và đánh giá về mức độ tổn thương da. Nhuộm và quan sát hình thái mô học da: nhân tế bào xanh đến xanh đen; bào tương tế bào hồng đến đỏ; hồng cầu hồng đậm; sợi tạo keo hồng nhạt (Fischer, Jacobson, Rose, & Zeller, 2008).

- **Phương pháp đo độ dày biểu bì da chuột:** trên tiêu bản mô học tiến hành đo độ dày biểu bì bằng phương pháp đo trực tiếp qua hình ảnh quan sát dưới kính hiển vi vật kính 40 với sự hỗ trợ của phần mềm S – EYE. Mỗi nghiệm thức đo 30 lát cắt, mỗi lát đo 10 lần và lấy độ dày trung bình của từng lát để tiến hành so sánh. Độ dày biểu bì được tính từ vùng tế bào tím đậm (lớp sừng) đến vùng sợi màu hồng nhạt không có nhân (trung bì). Khoảng cách

này được coi là tương đối chính xác khi thanh ngang của thước trùng với lớp tế bào ngoài cùng của lớp sừng, thanh còn lại nằm ở phần ranh giới giữa biểu bì và trung bì.

- **Phương pháp đánh giá mức độ lão hoá da ở chuột thông qua cấu trúc mô học:** qua hình thái mô học, mức độ lão hoá da chuột dưới tác động của UVA được đánh giá cảm quang trên mẫu da được nhuộm H&E và quan sát dưới kính hiển vi, đánh giá ở 4 mức độ lão hoá da thông qua đặc điểm cấu trúc của da ở mỗi mức độ theo nhóm tự phân chia. Mức 0 (không lão hoá): collagen đồng nhất, nén chặt, sợi collagen nguyên vẹn, không bị đứt gãy, các bó sợi cuộn xoắn, liên kết với nhau; biểu bì không có hoặc rất ít nếp nhăn. Mức 1 (có dấu hiệu lão hoá): mật độ collagen bắt đầu không liên tục, xuất hiện một số đứt gãy trong cấu trúc. Mức 2 (lão hoá): cấu trúc collagen lỏng lẻo, sợi collagen đứt gãy, các bó sợi rời rạc, mất sự liên kết; biểu bì bắt đầu bong tróc, có nếp nhăn trên bề mặt. Mức 3 (lão hoá nặng): sự liên kết collagen hầu như không còn, mật độ collagen thấp; nếp nhăn biểu bì xâm lấn sâu, bong tróc nhiều (Wang et al., 2016).

- **Xử lý số liệu:** kết quả thí nghiệm được phân tích, xử lý bằng phần mềm Minitab 18. Các số liệu trong bài được trình bày dưới dạng $\bar{X} \pm 95\% \text{ CI}$. Dùng hàm Anova - One Way, Anova - General Linear Model và hồi quy Ordinal Logistic để kiểm định sự khác biệt về phân phối tỉ lệ giữa các lô thí nghiệm. Số liệu mức độ lão hoá thông qua mật độ collagen được thu thập và trình bày dưới dạng bảng với đơn vị số lượng mẫu được quy đổi thành tỉ lệ phần trăm lão hoá theo công thức:

$$X = \frac{\text{Số lượng mẫu trong từng mức độ lão hoá}}{30} \times 100\%$$

Từ kết quả thực nghiệm, dự đoán xác suất mức độ lão hoá ở mỗi thời gian chiếu UV khác nhau: Công thức mô hình tính xác suất tỉ lệ cược (University of Virginia Library – Research Data Services + Sciences):

$$\text{Logarit}[P(Y \leq j)] = \alpha_j - \beta x, j = 1, 2, \dots; J - 1$$

Trong đó: Y là nghiệm thứ thí nghiệm; j là mức độ lão hoá được sắp xếp theo J (J = 4 mức lão hoá); P là xác suất nghiệm thứ Y lão hoá từ mức 1 đến j; α là hệ số chặn giữa các cấp độ; β là vector hệ số liên quan đến yếu tố dự đoán; x là giá trị của yếu tố tác động.

Khi đó, xác suất tiên đoán được tính như sau (University of Virginia Library - Research Data Services + Sciences)

$$P(Y \leq j) = \frac{\exp(\text{Logarit } P)}{1 + \exp(\text{Logarit } P)}$$

và

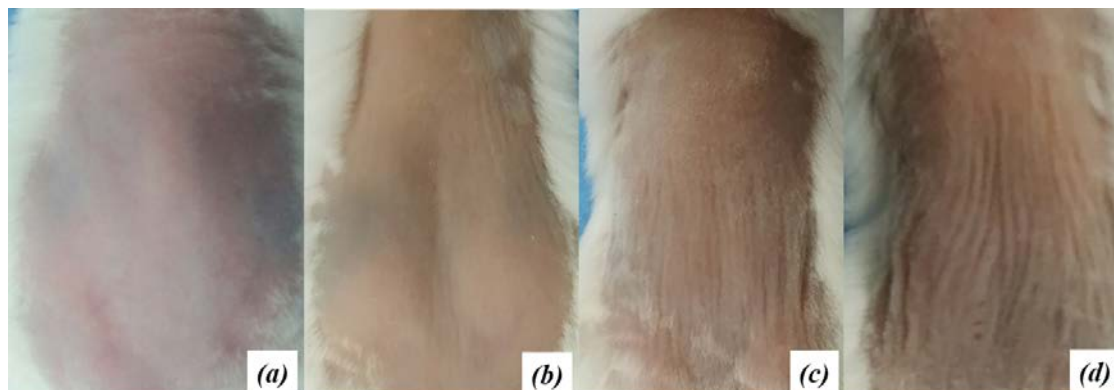
$$P(Y = j) = P(Y \leq j) - P(Y \leq j - 1)$$

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của UV lên mức độ tổn thương da chuột ở mức đại thể

Sau khi chiếu UVA, kết quả thấy có những thay đổi cấu trúc bên ngoài của da, đặc biệt kết quả thể hiện rõ bắt đầu từ tuần thứ 4 (sau 4 tuần chiếu), cụ thể: lô đối chứng, cấu trúc và hình dạng bên ngoài của da không thấy có sự thay đổi so với ban đầu; sự xuất hiện các nếp

nhăn nông và lớp bì bong tróc ở một số chuột trong nghiệm thức T3 (9 giờ chiếu), lớp chân lông màu trắng bắt đầu cứng hơn, cần sử dụng thêm dao để loại bỏ lớp này, sự đàn hồi của da cũng có sự khác biệt giữa nghiệm thức T3 và đối chứng. Ở tuần này, nghiệm thức T1 và T2 không có đặc điểm gì khác biệt so với đối chứng. Kết quả thể hiện một cách rõ ràng nhất là sau khi chiếu 8 tuần, sự khác biệt này được phân biệt một cách dễ dàng thông qua quan sát tổng thể bên ngoài và mức độ cảm nhận sự đàn hồi của da theo thứ tự mức ảnh hưởng tăng dần theo sự tăng thời gian chiếu UVA (Hình 1 và Bảng 1).



Hình 1. Bề mặt da chuột dưới ảnh hưởng của thời gian chiếu UVA sau 8 tuần (a - đối chứng 1; b - 3 giờ; c - 6 giờ; d - 9 giờ)

Bảng 1. Ảnh hưởng của mức thời gian chiếu UVA lên da chuột sau 8 tuần

Nghiệm thức	CT	T1	T2	T3
Các tiêu chí				
Bề mặt da	Nhẵn, mịn	Nhẵn	Không mịn	Da khô, thô
Nếp nhăn	Không có	Nông	Nhiều, nông	Nhiều, sâu
Màu sắc da	Trắng hồng	Trắng hồng	Không đều, trắng đục	Không đều, trắng đục
Sự đàn hồi	Tốt	Tốt	Giảm	Kém
Số tế bào bị bong tróc	Không có	Ít	Nhiều, tạo lớp vảy	Rất nhiều, tạo lớp vảy

CT: đối chứng; T1: 3 giờ; T2: 6 giờ; T3: 9 giờ

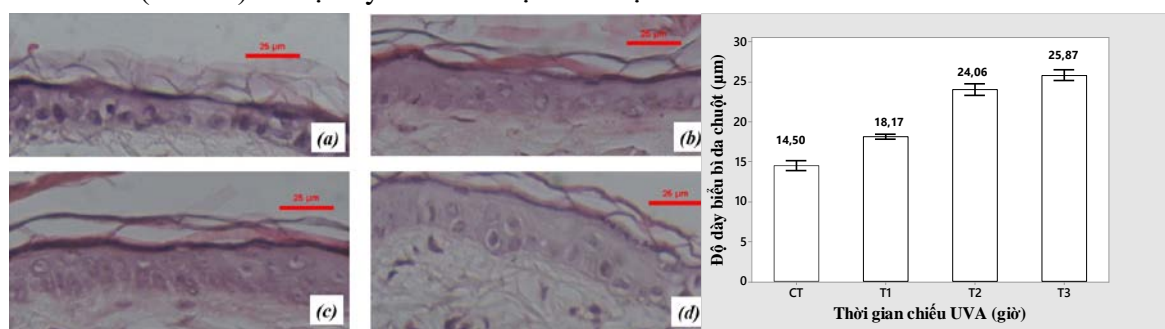
Nghiệm thức đối chứng CT: bề mặt da nhẵn, mịn, không có nếp nhăn, sắc tố đồng đều (toàn bộ vùng da có màu trắng hồng), khi kéo nhẹ thả ra thấy có sự đàn hồi tốt. Đánh giá chung là da có cấu trúc ổn định và rất ít bị tổn thương khi cạo, tốc độ phục hồi nhanh (Hình 1a). Nghiệm thức T1 (3 giờ/ngày): bề mặt da tương đối nhẵn, có dấu hiệu khác biệt so với chuột ở nghiệm thức đối chứng, một số chuột xuất hiện nếp nhăn nông và khó nhận biết (Hình 1b), khi chuột di chuyển có xuất hiện một số nếp nhăn nông nhưng nhanh chóng trở lại trạng thái bình thường, màu da đồng đều, trắng hồng, da đàn hồi tốt, rất ít tế bào bị bong tróc, tốc độ phục hồi nhanh, khá tương đồng so với chuột đối chứng Nghiệm thức T2 (6 giờ/ngày): màu da không đồng nhất, nhiều khu vực có màu trắng đục, bề mặt da xuất hiện khá nhiều nếp nhăn nông, khi chuột di chuyển các nếp nhăn trở nên sâu hơn và dễ nhận thấy bằng mắt thường. Biểu bì bị bong tróc và tạo nên một lớp vảy mỏng màu trắng trên bề mặt

da. Da khô và dễ bị tổn thương, sự đàn hồi của da giảm so với nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức T1, da mất một khoảng thời gian để phục hồi trạng thái ban đầu và có thể quan sát bằng mắt (Hình 1c). Nghiệm thức T3 (9 giờ/ngày): da khô, biểu bì bong tróc, bề mặt da thô ráp và dễ tổn thương, màu da không đồng đều, đa phần vùng lưng bị cạo lông có màu trắng đục, rất ít vùng có màu da trắng hồng như nghiệm thức đối chứng. Khi quan sát, có thể nhận thấy các nếp nhăn rất nhiều ngay cả khi không có tác động, nếp nhăn sâu và nhiều hơn, da chạm vào có cảm giác nhão, da mất nhiều thời gian hơn để trở lại trạng thái ban đầu so với chuột ở nghiệm thức T2 (Hình 1d).

3.2. Ảnh hưởng của UV lên mức độ tổn thương da chuột ở mức vi thể

- **Độ dày biểu bì**

Ảnh hưởng của thời gian chiếu UVA lên độ dày biểu bì chuột sau 8 tuần thí nghiệm ở mức vi thể (Hình 2) có độ dày biểu bì được thể hiện ở biểu đồ Hình 3.



Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian chiếu UAV lên độ dày biểu bì chuột sau 8 tuần (X40)

a - đối chứng 1; b - 3 giờ; c - 6 giờ; d - 9 giờ; scale bar: 25 µm

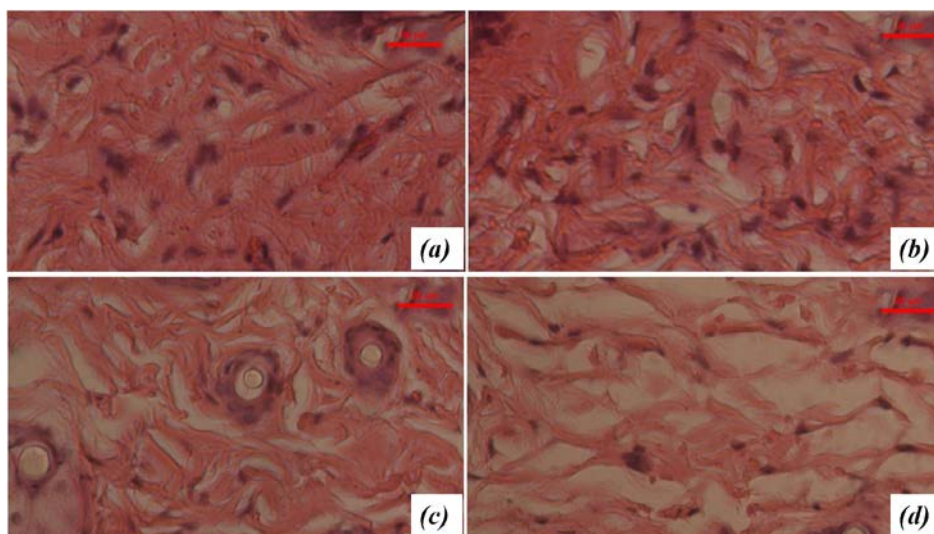
Hình 3. Biểu đồ thể hiện độ dày biểu bì dưới ảnh hưởng của thời gian chiếu UVA

CT: đối chứng; T1: 3 giờ; T2: 6 giờ; T3: 9 giờ

Độ dày biểu bì của chuột bị ảnh hưởng rõ rệt dưới tác dụng của các khoảng thời gian chiếu UVA. So với nghiệm thức đối chứng CT (không chiếu UVA), độ dày trung bình của biểu bì là 14,50 µm, độ dày biểu bì ở các nghiệm thức còn lại (T1, T2 và T3) đều tăng rõ rệt (tăng 3,66; 5,90 và 1,81 µm, tương ứng; $p < 0,001$). Ở mốc chiếu 6 giờ/ngày có tốc độ tăng nhanh nhất, cụ thể là tăng gấp 1,6 lần so với tốc độ tăng của nghiệm thức T1 (chiếu 3 giờ/ngày). Mốc chiếu 9 giờ/ngày có độ dày biểu bì trung bình lớn nhất nhưng tốc độ tăng lại thấp nhất, chỉ bằng khoảng 0,5 lần tốc độ tăng của nghiệm thức T1 (3 giờ/ngày). Như vậy, độ dày biểu bì tăng dần theo ngưỡng thời gian chiếu khi cùng một cường độ chiếu, nhưng tốc độ tăng không theo tuyến tính.

- **Cấu trúc collagen**

Sau khi nhuộm HE, mẫu da được quan sát dưới kính hiển vi, nhận thấy cấu trúc collagen với 4 mức độ khác nhau một cách rõ rệt (Hình 4) và Bảng 2.



Hình 4. Cấu trúc collagen ở các mức độ lão hoá dưới ảnh hưởng của mốc thời gian chiếu UVA (X40)

a - lão hoá mức 0; b - lão hoá mức 1; c - lão hoá mức 2; d - lão hoá mức 3; scale bar: 25 μ m

Bảng 2. Tỷ lệ (%) mức độ lão hoá da dưới ảnh hưởng của mốc thời gian chiếu UVA

Nghiệm thức	Lão hoá mức 0	Lão hoá mức 1	Lão hoá mức 2	Lão hoá mức 3
CT	60,00%	40,00%	0,00%	0,00%
T1	33,00%	47,00%	20,00%	0,00%
T2	6,70%	33,30%	33,30%	26,70%
T3	3,30%	20,00%	50,00%	26,70%

CT: đối chứng; T1: 3 giờ; T2: 6 giờ; T3: 9 giờ

Từ kết quả Bảng 2 cho thấy mức độ lão hoá ở các nghiệm thức thông qua cấu trúc collagen được thể hiện rõ rệt. Ở nghiệm thức đối chứng CT (không chiếu UVA), sau 8 tuần vẫn có tới 40,00% có dấu hiệu lão hoá da (mức 1). Như vậy, trong điều kiện nuôi bình thường, quá trình lão hoá nội tại vẫn diễn ra theo chu trình sống tự nhiên của chuột (chiếm 40,00%); xuất hiện một số đứt gãy trong cấu trúc và mật độ collagen bắt đầu không liên tục (Hình 4a). Tuy nhiên, ở nghiệm thức này không có lão hoá da mức 2 và 3, lão hoá mức 1 vẫn dưới 50,00%. Kết quả này cho thấy chuột nuôi trong điều kiện bình thường, khi đạt 14 tuần tuổi, sự lão hoá do thay đổi cấu trúc collagen là không đáng kể. Điều này giúp cho sự đánh giá ảnh hưởng của tia UVA lên tốc độ lão hoá có tính tin cậy cao.

Nghiệm thức T1, kết quả thực nghiệm cho thấy có tới 47,00% chuột bắt đầu có dấu hiệu lão hoá da (mức 1) và 20,00% chuột bị lão hoá da (mức 2), chưa thấy mẫu nào có hiện tượng lão hoá da nhiều (mức 3). Sự xuất hiện lão hoá mức 2 ở thời gian chiếu 3 giờ/ngày có thể khẳng định rằng, việc chiếu tia UVA có ảnh hưởng đến cấu trúc collagen và làm biến đổi cấu trúc này gây ra hiện tượng đứt gãy và mất sự liên kết giữa các sợi collagen với nhau (Hình 4b).

Nghiệm thức T2, mức độ lão hoá thay đổi rõ rệt so với ở nghiệm thức T1: số lượng mẫu có dấu hiệu lão hoá da (mức 1) chiếm 33,33%; bị lão hoá da (mức 2) chiếm 33,33% và

đặc biệt, có tới 26,70% mẫu da bị lão hoá nặng (mức 3). Như vậy, với thời gian chiếu 6 giờ/ngày, chuột bị lão hoá da tăng so với khi chiếu 3 giờ/ngày (33,33% so 20,00%, tương ứng); sự xuất hiện lão hoá da nặng với tỉ lệ 26,70% chứng tỏ thời gian tiếp xúc với tia UVA lâu hơn đã gây ra hiện tượng đứt gãy hầu hết cấu trúc collagen ở nhiều mức độ khác nhau (Hình 4c).

Nghiệm thức T3, các mức độ lão hoá da (mức 1 và 2) có những biến đổi so với khi chiếu 6 giờ/ngày, cụ thể: số lượng mẫu có dấu hiệu lão hoá da giảm (20,00% so với 33,30%), số lượng mẫu bị lão hoá da tăng gấp 1,5 lần (50,00% so với 33,30%). Riêng hiện tượng lão hoá da mức độ nặng ở nghiệm thức này không thay đổi so với nghiệm thức chiếu 6 giờ/ngày (đều là 26,70%) (Hình 4d). Qua đó có thể thấy, mặc dù với lượng thời gian chiếu dài hơn (9 giờ/ngày) nhưng vẫn chưa tạo sự cách biệt về mức độ lão hoá da nặng so với thời gian chiếu 6 giờ/ngày. Trong khi đó, với thời gian chiếu 6 giờ/ngày cho kết quả mức độ lão hoá da ở các mức khác nhau tương đối hợp lí. Để dự đoán xác suất các cấp độ lão hoá da với các mốc thời gian chiếu khác nhau, các số liệu thực nghiệm được xử lý bằng hồi quy Ordinal Logistic trên phần mềm Minitab. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả xử lý số liệu thực nghiệm bằng hồi quy Ordinal Logistic về mức độ lão hoá dưới các mốc thời gian chiếu UVA khác nhau

Predictor	Coef	SE Coef	Z	P
Const(1)	0,424	0,305	1,390	0,165
Const(2)	2,708	0,413	6,540	0,000
Const(3)	4,638	0,535	8,660	0,000
Thời gian chiếu	- 0,450	0,065	-6,860	0,000

Cont(1), Cont(2), Cont(3) là hệ số chặn tương đương 4 cấp độ lão hoá;

Thời gian chiếu (- 0,450) là vector hệ số liên quan đến thời gian chiếu.

Kết quả cho thấy các ngưỡng thời gian chiếu khác nhau đều ảnh hưởng đến mức độ lão hoá và khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$). Từ kết quả Bảng 3, xác suất các mức độ lão hoá da với các thời gian chiếu UVA khác nhau được dự đoán như ở Bảng 4.

Bảng 4. Dự đoán xác suất các mức độ lão hoá ở mỗi nghiệm thức dưới ảnh hưởng của thời gian chiếu UVA

Nghiệm thức	Lão hoá mức 0	Lão hoá mức 1	Lão hoá mức 2	Lão hoá mức 3
CT	60,47%	33,30%	5,28%	0,95%
T1	28,42%	51,13%	16,85%	3,60%
T2	9,33%	40,87%	37,21%	12,59%
T3	2,61%	18,12%	43,57%	35,70%

CT: đối chứng; T1: 3 giờ; T2: 6 giờ; T3: 9 giờ

Ở nghiệm thức đối chứng CT: trong thực nghiệm chỉ có hai mức độ lão hoá da (mức 0 và mức 1), nhưng trong thực tế lão hoá da mức 2 vẫn tồn tại với tỉ lệ khoảng 5,28% và lão hoá da mức 3 tồn tại với tỉ lệ khoảng 0,95%. Nghiệm thức T1, trong thực nghiệm không có

sự xuất hiện của lão hoá da mức 3, nhưng trong thực tế, xác suất lão hoá da mức 3 khi chiếu đèn UV 3 giờ mỗi ngày là 3,60%. Nghiệm thức T2: trong thực nghiệm cho kết quả lão hoá da mức 1 và mức 2 bằng nhau là 33,33%, nhưng trong thực tế lão hoá da mức 1 chiếm xác suất lớn hơn (40,87% thay vì 33,30%) và xác suất lão hoá mức da 2 là 37,21%; lão hoá da mức 3 chiếm 26,70% nhưng trong thực tế xác suất lão hoá da mức 3 chỉ khoảng 12,59%. Nghiệm thức 3: với kết quả thực nghiệm ghi nhận lão hoá da mức 3 ở nghiệm thức 2 và 3 là tương tự và chiếm 26,70%; nhưng thực tế, xác suất lão hoá da mức 3 ở hai nghiệm thức có sự chênh lệch khá lớn, cụ thể là nghiệm thức 2 xác suất này khoảng 12,59% nhưng ở nghiệm thức 3 xác suất này lên đến 35,70%. Như vậy, từ kết quả thực nghiệm, đề tài có thể dự đoán được xác suất các mức độ lão hoá da ở chuột dưới ảnh hưởng của khoảng thời gian chiếu đèn UVA nhân tạo. Kết quả này giúp cho các mô hình sau này tính toán được việc bố trí thí nghiệm đạt hiệu quả tối ưu.

Tóm lại, từ kết quả phân tích trên có thể nhận định: cùng một cường độ (24 mJ/cm^2), sự tổn thương lên da chuột có xu hướng tăng dần theo sự tăng dần thời gian chiếu (3 giờ, 6 giờ, và 9 giờ chiếu): tăng mức độ lão hoá da bên ngoài (da khô, nếp nhăn nhiều, sự đàn hồi giảm dần); độ dày biểu bì sau 6 và 9 giờ chiếu tương đương nhau nhưng tăng cách biệt so với 3 giờ và 0 giờ chiếu; cấu trúc collagen bị đứt gãy tăng dần; mức độ lão hoá da cũng tăng dần.

3.3. Thảo luận

Theo chiều tăng của thời gian chiếu UVA đã ảnh hưởng đến độ dày của biểu bì da chuột: làm tăng độ dày biểu bì khi tăng mức thời gian chiếu UVA. Kết quả này khá tương đồng với các nghiên cứu đã báo cáo: độ dày biểu bì ở nhóm chuột có chiếu UV lớn hơn so với nhóm chuột không được chiếu UV ($p < 0,001$) (Kim, Kim, Shin, & Choi, 2015); độ dày trung bình của biểu bì chuột ở nhóm chiếu UV tăng gấp 4,63 lần so với nhóm không chiếu UV ($15,62 \mu\text{m}$) (Wang et al., 2016); độ dày biểu bì ở nhóm chuột được chiếu UV lớn hơn so với nhóm không chiếu UV ($p < 0,01$) (Bhattacharyya et al., 2017). Kết quả này có thể được giải thích như sau: khi tiếp xúc với tia cực tím làm cho da tăng độ dày của lớp sừng, đồng thời lớp biểu bì bị sừng hoá quá mức, đây chính là cơ chế để bảo vệ da (Wang et al., 2016); sự quang hoá gây ra bởi tia UV là một quá trình tích lũy chất oxy hoá, cơ chế tương tự như là lão hoá nội tại (Fisher et al., 2002). Ngoài ra, khi có sự gia tăng các phản ứng oxy hoá do tia UV, yếu tố tăng trưởng tế bào sừng thúc đẩy tăng trưởng và biệt hoá biểu mô và tham gia vào sự sống của tế bào sau chấn thương oxy hoá (Kovacs et al., 2009) sẽ tăng hoạt động. Các tế bào sừng có tác dụng chống tia cực tím trên các tế bào da biểu bì, đặc biệt là trung gian đề kháng với tổn thương oxy hoá do UV gây ra (Philips, Chalensouk-Khaosaat, & Gonzalez, 2018). Sự gia tăng độ dày biểu bì dưới tác dụng của tia UV được gọi là chứng tăng sừng. Vì vậy, sau khi tiếp xúc với tia cực tím một vài giờ, tế bào sừng tăng sinh mạnh mẽ (Coelho et al., 2009), dẫn đến sự tích tụ của tế bào sừng làm tăng độ dày biểu bì.

Sự tiếp xúc của da với tia UV dẫn đến sự phá hủy cấu trúc collagen và tăng mức độ lão hoá da. Khi tăng thời gian tiếp xúc với tia UV, sự đứt gãy cấu trúc collagen tăng lên, đồng thời mức độ lão hoá cũng gia tăng. Kết quả này tương đồng với một công bố rằng: tính

đa dạng và mật độ của sợi collagen giảm đáng kể ở vùng trung bì của da ở nhóm chuột bị chiếu UV so với nhóm chuột không chiếu UV ($p < 0,01$) (Kim et al., 2015); sau thời gian dài chiếu UV, hàm lượng collagen ở nhóm có chiếu UV giảm rõ rệt so với nhóm đối chứng ($p < 0,05$) (Wang et al., 2016). Theo một số công bố, các MMP được tiết ra quá mức từ các tế bào sừng bị kích thích do tác dụng tia cực tím, các nguyên bào sợi và các tế bào viêm góp phần làm suy giảm ma trận ngoại bào ở da bị chiếu xạ UV (Dong et al., 2008; Lee et al., 2010). Collagenase MMP-1 và MMP-3 đóng một vai trò nổi bật trong việc bắt đầu sự thoái hoá của collagens loại I, III và IV các thành phần chính của lớp trung bì ở da (Fisher et al., 2001). Gelatinase MMP-9 đóng vai trò chính trong sự thoái hoá cuối cùng của collagen bị phân cắt thành gelatin và các peptide nhỏ, một yếu tố chính chịu trách nhiệm hình thành nếp nhăn (Fisher et al., 2002; Fisher et al., 1997; Kim et al., 2013). MMP-1 phá vỡ các sợi collagen và elastin, trong khi MMP-3 làm suy giảm các sợi đàn hồi và các thành phần liên kết khác, do đó làm mất khả năng đàn hồi của da (Pillai, Oresajo, & Hayward, 2005).

Sự lão hoá da liên quan đến sự phá huỷ các thành phần cấu trúc ngoại bào (ECM - Extracellular Matrix), đặc biệt là các sợi collagen. MMP là gene có vai trò chính trong sự thay đổi và suy thoái của ECM, các phân tử mục tiêu chính là protein ECM bao gồm tất cả các loại collagen, elastin và proteoglycan (Nagase, Visse, & Murphy, 2006). MMP được sản xuất bởi keratinocytes biểu bì, nguyên bào sợi, trong trung gian của sự tái tạo ECM và phát sinh ung thư da (Philips, Burchill, O'Donoghue, Keller, & Gonzalez, 2004; Philips, Hwang, Chauhan, Leonardi, & Gonzalez, 2010; Philips et al., 2009). Tỷ lệ MMP tăng theo sự lão hoá và tăng thêm bởi các chất ô nhiễm môi trường và bức xạ UV, dẫn đến đứt gãy các sợi collagen và elastin gây lão hoá da, thậm chí có thể gây ung thư da (Chung & Eun, 2007). Do đó, chiếu UV làm phát sinh tổn thương da do sự thoái hoá collagen bằng cách tăng biểu hiện của MMP, ức chế tổng hợp Procollagen cũng như giảm biểu hiện của các protein ECM cấu trúc (Quan, He, Kang, Voorhees, & Fisher, 2004).

Tóm lại, việc chiếu UVA trong thời gian dài đã gây tổn hại đến da, làm phá vỡ cấu trúc collagen, dẫn đến sự lão hoá da thông qua các biểu hiện bên ngoài: da nhăn nheo, chảy xệ và mất đi sự đàn hồi. Để có thêm cơ sở khoa học đáng tin cậy về tác động của UVA lên da chuột, cần tiến hành nghiên cứu tác động của liều chiếu UVA.

4. Kết luận

UVA đã có những ảnh hưởng đáng kể đến da chuột nhất trắng. Với cùng một liều chiếu (24 mJ/cm²/phút), sự tổn thương lên da chuột có xu hướng tăng dần theo sự tăng dần thời gian chiếu (3 giờ, 6 giờ, và 9 giờ chiếu): tăng mức độ lão hoá da bên ngoài; độ dày biểu bì tăng sau 6 và 9 giờ chiếu tương đương nhau nhưng tăng cách biệt so với 3 giờ và 0 giờ chiếu; cấu trúc collagen trong da bị đứt gãy tăng dần; mức độ lão hoá da cũng tăng dần theo thời gian. Nghiên cứu này còn dự đoán được các mức độ lão hoá da chuột với các mốc thời gian chiếu UVA nhân tạo giúp cho các đợt thí nghiệm khác bố trí đạt hiệu quả cao. Cần thực hiện nghiên cứu ảnh hưởng của liều chiếu UVA nhân tạo lên cấu trúc da chuột để có thêm căn cứ về đánh giá ảnh hưởng của UVA lên cấu trúc da chuột.

- ❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.
- ❖ **Lời cảm ơn:** Cảm ơn Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh; Khoa Giải phẫu bệnh – Bệnh viện Quận 2, Thành phố Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện cho nhóm chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Amaro-Ortiz, A., Yan, B., & D'Orazio, J. A. (2014). Ultraviolet radiation, aging and the skin: prevention of damage by topical cAMP manipulation. *Molecules*, *19*(5), 6202-6219. doi:10.3390/molecules19056202
- Bhattacharyya, T. K., Hsia, Y., Weeks, D. M., Dixon, T. K., Lepe, J., & Thomas, J. R. (2017). Association of Diet With Skin Histological Features in UV-B-Exposed Mice. *JAMA Facial Plast Surg*, *19*(5), 399-405. doi:10.1001/jamafacial.2017.0060
- Chung, J. H., & Eun, H. C. (2007). Angiogenesis in skin aging and photoaging. *J Dermatol*, *34*(9), 593-600. doi:10.1111/j.1346-8138.2007.00341.x
- Coelho, S. G., Choi, W., Brenner, M., Miyamura, Y., Yamaguchi, Y., Wolber, R., . . . Hearing, V. J. (2009). Short- and long-term effects of UV radiation on the pigmentation of human skin. *J Invest Dermatol Symp Proc*, *14*(1), 32-35. doi:10.1038/jidsymp.2009.10
- D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci*, *14*(6), 12222-12248. doi:10.3390/ijms140612222
- De Gruijl, F. R. (2000). Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. In *Methods Enzymol* (Vol. 319, pp. 359-366): Elsevier.
- Dong, K. K., Damaghi, N., Picart, S. D., Markova, N. G., Obayashi, K., Okano, Y., . . . Yarosh, D. B. (2008). UV-induced DNA damage initiates release of MMP-1 in human skin. *Exp Dermatol*, *17*(12), 1037-1044. doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00747.x
- Feng, X. X., Yu, X. T., Li, W. J., Kong, S. Z., Liu, Y. H., Zhang, X., . . . Lin, Z. X. (2014). Effects of topical application of patchouli alcohol on the UV-induced skin photoaging in mice. *Eur J Pharm Sci*, *63*, 113-123. doi:10.1016/j.ejps.2014.07.001
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc*, *2008*, pdb prot4986. doi:10.1101/pdb.prot4986
- Fisher, G. J., Choi, H. C., Bata-Csorgo, Z., Shao, Y., Datta, S., Wang, Z. Q., . . . Voorhees, J. J. (2001). Ultraviolet irradiation increases matrix metalloproteinase-8 protein in human skin in vivo. *J Invest Dermatol*, *117*(2), 219-226. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01432.x
- Fisher, G. J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S., & Voorhees, J. J. (2002). Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol*, *138*(11), 1462-1470. doi:10.1001/archderm.138.11.1462
- Fisher, G. J., Wang, Z. Q., Datta, S. C., Varani, J., Kang, S., & Voorhees, J. J. (1997). Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med*, *337*(20), 1419-1428. doi:10.1056/NEJM199711133372003

- Fuchs, E. (2007). Scratching the surface of skin development. *Nature*, 445(7130), 834-842. doi:10.1038/nature05659
- Hwang, K. A., Yi, B. R., & Choi, K. C. (2011). Molecular mechanisms and in vivo mouse models of skin aging associated with dermal matrix alterations. *Lab Anim Res*, 27(1), 1-8. doi:10.5625/lar.2011.27.1.1
- Kim, S. R., Jung, Y. R., An, H. J., Kim, D. H., Jang, E. J., Choi, Y. J., . . . Chung, H. Y. (2013). Anti-wrinkle and anti-inflammatory effects of active garlic components and the inhibition of MMPs via NF-kappaB signaling. *PLoS ONE*, 8(9), e73877. doi:10.1371/journal.pone.0073877
- Kim, Y. J., Kim, H. N., Shin, M. S., & Choi, B. T. (2015). Thread Embedding Acupuncture Inhibits Ultraviolet B Irradiation-Induced Skin Photoaging in Hairless Mice. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 539172. doi:10.1155/2015/539172
- Komatsu, T., Sasaki, S., Manabe, Y., Hirata, T., & Sugawara, T. (2017). Preventive effect of dietary astaxanthin on UVA-induced skin photoaging in hairless mice. *PLoS ONE*, 12(2), e0171178. doi:10.1371/journal.pone.0171178
- Kovacs, D., Raffa, S., Flori, E., Aspite, N., Briganti, S., Cardinali, G., . . . Picardo, M. (2009). Keratinocyte growth factor down-regulates intracellular ROS production induced by UVB. *J Dermatol Sci*, 54(2), 106-113. doi:10.1016/j.jdermsci.2009.01.005
- Lee, J. S., Park, K. Y., Min, H. G., Lee, S. J., Kim, J. J., Choi, J. S., . . . Cha, H. J. (2010). Negative regulation of stress-induced matrix metalloproteinase-9 by Sirt1 in skin tissue. *Exp Dermatol*, 19(12), 1060-1066. doi:10.1111/j.1600-0625.2010.01129.x
- Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, 69(3), 562-573. doi:10.1016/j.cardiores.2005.12.002
- Nguyen, T. T. H., Bui, T. K. N., Truong, V. T., & Pham, V. N. (2019). Ảnh hưởng của thời gian chiếu UVA lên khối lượng cơ thể, số lượng tế bào máu và nội quan của chuột nhắt trắng (*Mus musculus* var. *albino*) [Effects of UVA light exposure on the body weight, the blood cells and internal organs of albino mouse (*Mus musculus* var. *albino*)]. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 16(12), 1034-1652.
- Philips, N., Burchill, D., O'Donoghue, D., Keller, T., & Gonzalez, S. (2004). Identification of benzene metabolites in dermal fibroblasts as nonphenolic: regulation of cell viability, apoptosis, lipid peroxidation and expression of matrix metalloproteinase 1 and elastin by benzene metabolites. *Skin Pharmacol Physiol*, 17(3), 147-152. doi:10.1159/000077242
- Philips, N., Chalensouk-Khaosaat, J., & Gonzalez, S. (2018). Simulation of the elastin and fibrillin in non-irradiated or UVA radiated fibroblasts, and direct inhibition of elastase or matrix metalloproteinases activity by nicotinamide or its derivatives. *J Cosmet Sci*, 69(1), 47-56.
- Philips, N., Hwang, H., Chauhan, S., Leonardi, D., & Gonzalez, S. (2010). Stimulation of cell proliferation and expression of matrix metalloproteinase-1 and interleukin-8 genes in dermal fibroblasts by copper. *Connect Tissue Res*, 51(3), 224-229. doi:10.3109/03008200903288431
- Philips, N., Tuason, M., Chang, T., Lin, Y., Tahir, M., & Rodriguez, S. G. (2009). Differential effects of ceramide on cell viability and extracellular matrix remodeling in keratinocytes and fibroblasts. *Skin Pharmacol Physiol*, 22(3), 151-157. doi:10.1159/000208168
- Pillai, S., Oresajo, C., & Hayward, J. (2005). Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of

- inflammation-induced matrix degradation - a review. *Int J Cosmet Sci*, 27(1), 17-34. doi:10.1111/j.1467-2494.2004.00241.x
- Quan, T., He, T., Kang, S., Voorhees, J. J., & Fisher, G. J. (2004). Solar ultraviolet irradiation reduces collagen in photoaged human skin by blocking transforming growth factor-beta type II receptor/Smad signaling. *Am J Pathol*, 165(3), 741-751.
- Slominski, A. T., Zmijewski, M. A., Skobowiat, C., Zbytek, B., Slominski, R. M., & Steketee, J. D. (2012). Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 212, v, vii, 1-115.
- University of Virginia Library - Research Data Services + Sciences. Fitting and Interpreting a Proportional Odds Model. Retrieved from <https://data.library.virginia.edu/fitting-and-interpreting-a-proportional-odds-model/>
- Wang, L., Zhang, X., Li, Y. X., Xu, L. Q., Li, C. L., Zhang, Z. B., . . . Li, Y. C. (2016). Aqueous Extract of *Clerodendranthus spicatus* Exerts Protective Effect on UV-Induced Photoaged Mice Skin. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 9623957. doi:10.1155/2016/9623957

EFFECTS OF THE DURATION OF ARTIFICIAL UVA IRRADIATION EXPOSURE ON SKIN DAMAGE LEVELS IN ALBINO MICE

Nguyen Thi Thuong Huyen^{1*}, Nguyen Ngoc Han², Truong Thi Thuy^{4,3}, Tran Cam Tu⁴

¹Ho Chi Minh City University of Education, Vietnam

²Tien Giang Provincial inspectorate, Vietnam

³Stem cell Institute, University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴Institute of Tropical Biology, VAST, Vietnam

*Corresponding author: Nguyen Thi Thuong Huyen – Email: huyennth@hcmue.edu.vn

Received: May 27, 2023; Revised: June 20, 2023; Accepted: June 22, 2023

ABSTRACT

The rise in the UV ray index, particularly UVA, has played a role in the heightened pace of skin aging. The rate at which skin ages fluctuates depending on the duration of exposure to UV rays. The objective of this study was to examine the impact of varying durations of artificial UVA irradiation on the level of skin damage observed in albino mice. It was observed that as the duration of irradiation increased gradually (3 hours, 6 hours, and 9 hours of exposure), the damage to the mice's skin also increased progressively with the irradiation dose remained constant (24 mJ/cm²/minute): elevated external aging signs, augmented epidermal thickness, and intensified breakdown of collagen. Furthermore, this study offers predictions on the aging patterns of mouse skin when subjected to artificial UVA irradiation timelines, facilitating other experiments to arrange high efficiency. It is necessary to research the effect of artificial UVA irradiation level on rat skin structure to have more evidence to evaluate the effect of UVA on rat skin structure.

Keywords: *Mus musculus* var. *albino*; skin aging; skin structure of mice; UVA; UV rays