



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
1-0022424

(51)⁷ **A61K 31/00**

(13) **B**

(21) 1-2016-04101

(22) 26.10.2016

(45) 25.12.2019 381

(43) 25.05.2018 362

(73) **VIỆN KHOA HỌC VẬT LIỆU - VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆT NAM (VN)**

Nhà A2, 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội, Việt Nam

(72) Hà Phương Thư (VN)

(54) **PHƯƠNG PHÁP VI BAO CURCUMIN BẰNG FUCOIDAN ĐƯỢC CHIẾT TỪ
RONG NÂU (LAMINARIA JAPONICA ARESCH) VÀ SAPONIN ĐƯỢC CHIẾT
TÁCH TỪ CỦ TAM THẤT BẮC (PANAX NOTOGINSENG (BURK.) F. H.
CHEN) VÀ HỆ NANO (FUCOIDAN-GINSENG-CURCUMIN) THU ĐƯỢC THEO
PHƯƠNG PHÁP NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp vi bao curcumin bằng fucoidan được chiết tách từ rong nâu (*Laminaria japonica* Aresch) và saponin được chiết tách từ củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) và hệ nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) thu được theo phương pháp này. Hệ nano theo sáng chế có tính hòa tan trong nước rất tốt và tạo thành dung dịch có màu vàng trong suốt, kích thước hạt 50 - 70 nm. Hệ nano này không gây độc trên động vật thí nghiệm, có khả năng kháng tế bào ung thư người (tế bào ung thư phổi người dòng A549, tế bào ung thư gan người dòng Hep 3B và tế bào ung thư vòm họng người dòng HTB 43). Hệ nano theo sáng chế được dùng để bào chế dược phẩm có tác dụng điều trị dự phòng và điều trị dự phòng kết hợp tiêm hóa chất hạn chế sự phát triển khối u trên chuột thiếu hụt miễn dịch, kích thích miễn dịch: tăng tỉ lệ % đại thực bào, tỉ lệ tế bào giết tự nhiên (NK), tế bào tua (DC) và tế bào tua trưởng thành.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực dược phẩm. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp vi bao curcumin bằng fucoidan được chiết tách từ rong nâu (*Laminaria japonica* Aresch) và saponin được chiết tách từ củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) và hệ nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) thu được bằng phương pháp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Saponin là thành phần chính được nghiên cứu trong củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) - một loại dược liệu phổ biến trong Y học cổ truyền Phương Đông với những tác dụng tuyệt vời như điều trị cao huyết áp, chống cục máu đông, chống xơ vữa động mạch, bảo vệ thần kinh, bồi bổ cơ thể... Saponin trong tam thất được nghiên cứu cho thấy tác dụng bảo vệ gan in vivo, phòng ngừa và điều trị bệnh xơ hóa tổ chức kẽ và các bệnh thận giai đoạn cuối, phòng ngừa các bệnh tim mạch, điều trị đái tháo đường... Trong khoảng 10 năm trở lại đây, saponin trong tam thất còn được nghiên cứu và ứng dụng với tác dụng phòng ngừa nhiều loại ung thư, như tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư gan người, tế bào ung thư tuyến tiền liệt, tế bào ung thư vú... và khả năng ngăn ngừa ung thư vú di căn. Cơ chế tác dụng của các saponin là bắt giữ tế bào và khởi động quá trình chết theo chu trình của tế bào ung thư. Ngoài ra, nhờ tác dụng làm trì hoãn các pha trong chu trình tế bào, saponin giúp tế bào có thời gian hình thành các hàng rào phòng thủ, thông qua hoạt động của các hệ thống sửa chữa ADN. Các saponin trong tam thất còn có tác dụng chống oxy hóa, do đó ngăn ngừa hoạt động của các gốc tự do trong cơ thể, phòng ngừa sự hình thành ung thư đồng thời ức chế bơm tổng thuốc P-gp

– một trong các nguyên nhân làm giảm hấp thu thuốc qua thành ruột và cơ chế kháng thuốc của một số tế bào ung thư. Các kết quả nghiên cứu này đã mở ra một hướng ứng dụng tiềm năng cho loại thảo dược có giá trị này.

Fucoidan là tên gọi chung của một nhóm polysaccarit sulfate giàu fucose, gồm các tiểu đơn vị α -L-fucose. Ngoài việc được sử dụng như một polysaccarit làm chất mang thuốc đơn thuần, fucoidan còn được biết đến với nhiều tác dụng dược lý tuyệt vời như điều hòa miễn dịch, chống viêm... và đặc biệt là tác dụng chống ung thư. Cơ chế chống ung thư của fucoidan không chỉ thông qua hoạt hóa quá trình chết theo chu trình của tế bào và không ảnh hưởng đến tế bào lành mà còn ức chế hoạt động của receptor của yếu tố tăng trưởng biểu bì, đồng thời tăng cường phản ứng miễn dịch của cơ thể. Ngoài ra, fucoidan còn có khả năng chống ung thư di căn.

Nhiều nghiên cứu đã được thiết kế để chứng minh cho khả năng mang thuốc và tác dụng chống ung thư của fucoidan. Kết quả cho thấy, fucoidan có khả năng mang thuốc tốt, đồng thời có tác dụng hiệp đồng làm tăng tác dụng tiêu diệt tế bào ung thư của các thuốc hóa trị.

Curcumin là thành phần chính được chiết xuất từ củ cây nghệ, là một giống cây rất phổ biến ở Việt Nam. Curcumin sở hữu nhiều hoạt tính sinh dược quý báu như chống oxy hóa, kháng viêm, làm lành vết thương, chống ung thư. Trong số đó, hoạt tính chống ung thư của Curcumin thu hút nhiều sự quan tâm. Curcumin có khả năng phòng ngừa và hỗ trợ điều trị nhiều bệnh ung thư như ung thư dạ dày, ruột, trực tràng, vú và ngăn ngừa di căn ung thư vú sang ung thư phổi, ung thư đầu và cổ. Curcumin có khả năng tác động tới tế bào ung thư theo nhiều cơ chế hoạt động. Curcumin ức chế hoạt động của những con đường truyền tin thông qua nhân tố NF- κ B và STAT3 đóng vai trò then chốt cho sự phát triển của các tế bào ung thư. Curcumin cũng có khả năng ức chế hoạt động của protein Sp-1 giúp ngăn chặn sự hình thành, di trú và xâm lấn của các tế bào ung thư. Ngoài ra, Curcumin cũng có khả năng gây hiện tượng chết theo chương trình apoptosis trên các tế bào ung thư mà không gây độc cho các tế

bào thường. Một đặc tính lý thú nữa ở Curcumin là khả năng ngăn chặn hiện tượng kháng đa thuốc của các tế bào ung thư thông qua việc ức chế hoạt động của P-Glycoprotein. Có thể nói, tiềm năng của Curcumin trong việc ngăn chặn sự phát triển của tế bào ung thư là rất lớn. Tuy nhiên, cũng giống như đa số các loại tác nhân chống ung thư khác, nhược điểm lớn nhất của Curcumin là độ tan trong nước kém dẫn tới tính tương thích sinh học thấp. Điều này làm hạn chế hiệu lực trị liệu của Curcumin trong những ứng dụng lâm sàng.

Nhiều nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng, các nhược điểm của Curcumin sẽ được khắc phục đồng thời tác dụng ưu việt của nó được phát huy tối đa nhờ công nghệ nano. Công nghệ nano sử dụng các polyme tự nhiên hoặc tổng hợp có khả năng tương hợp sinh học làm chất mang bao các hợp chất khó tan, nhờ đó làm tăng độ tan của hoạt chất, đồng thời vận chuyển các chất này đến đích tác dụng mà không gây tác dụng phụ trên mô lành. Các polyme thiên nhiên thường sở hữu khả năng tương hợp sinh học cao, khả năng tan trong nước tốt và an toàn đối với cơ thể. Chúng thường là các loại polysacarit như: chitosan, alginat, glucan, mannan.... Đặc biệt, các polysacarit thường có rất nhiều nhóm chức ưa nước như nhóm hydroxyl (-OH), carboxyl (-COOH) và nhóm amino (-NH₂). Những nhóm chức này có khả năng hình thành những tương tác với những phân tử sinh học (chủ yếu là những lớp màng niêm mạc và màng biểu mô), qua đó giúp tạo nên sự bám dính sinh học. Sự bám dính này tạo điều kiện nâng cao thời gian tồn tại của những hệ mang trong môi trường cơ thể và do đó giúp nâng cao khả năng hấp thụ của thuốc. Ngoài ra nhiều nghiên cứu cũng cho thấy khi kết hợp Curcumin với các thành phần có hoạt tính chống ung thư (như fucoidan, tam thất...) tác dụng hiệp đồng của các thành phần giúp tăng cường khả năng chống ung thư lên gấp nhiều lần.

Trong nghiên cứu của mình, các tác giả sáng chế đã tiến hành tách chiết saponin từ củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen). Sau đó, saponin đã được tinh sạch và fucoidan được sử dụng để làm chất bao Curcumin. Chất saponin còn có công dụng là chất hoạt động bề mặt giúp cho

sản phẩm được bền vững hơn. Sáng chế này tập trung nghiên cứu chế tạo hệ nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) nhằm làm tăng độ tan của Curcumin trong nước, tăng sinh khả dụng của Curcumin cũng như tăng hoạt tính chống ung thư và kéo dài sự sống của bệnh nhân ung thư của hệ nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế nhằm đáp ứng vấn đề nêu trên. Cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp vi bao Curcumin bằng saponin được chiết tách từ củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) và fucoidan được chiết tách từ rong nâu (*Laminaria japonica* Aresch).

Phương pháp vi bao curcumin bằng saponin được chiết tách từ củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) và fucoidan từ rong nâu (*Laminaria japonica* Aresch) theo sáng chế bao gồm các bước:

- a) hòa tan Curcumin vào rượu etylic tuyệt đối, trong đó tỉ lệ Curcumin : rượu etylic là 1 : 1 (khối lượng : thể tích);
- b) hòa tan saponin và fucoidan vào nước cất (tỉ lệ saponin : fucoidan : nước là 1 : 3 : 1 (khối lượng : khối lượng : thể tích));
- c) bổ sung từ từ dung dịch chứa Curcumin vào dung dịch chứa saponin và fucoidan theo tỷ lệ 1:1 (về thể tích) và khuấy đều trên máy khuấy từ ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ;
- d) làm bay hơi dung môi từ từ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 24 giờ, sau đó dung dịch được ly tâm 3 lần rồi lọc và loại bỏ phần Curcumin không được bao lắng xuống, thu được dung dịch chứa nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin);
- e) làm đông khô dung dịch chứa nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) thu được để cho ra sản phẩm nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) ở dạng bột màu vàng, trong đó kích thước hạt nano thu được nằm trong khoảng từ 50 đến 70 nm,;

trong đó saponin được chiết tách từ củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) bằng phương pháp bao gồm các bước:

- (i) thu hoạch củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen), phơi khô và xay thành bột mịn, thu được nguyên liệu bột có độ ẩm 4%;
- (ii) ủ bột tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) với diethyl ete trong 6 giờ, lọc loại dung môi,
- (iii) ngâm chiết nguyên liệu bột tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) thu được ở bước (ii) bằng rượu etylic 70% theo tỷ lệ 1:10 (khối lượng bột (kg)/ thể tích rượu etylic (lít)) trong bình cầu hồi lưu ở nhiệt độ 78°C trong thời gian 24 giờ, tiếp đó lọc để thu được dịch chiết còn; cất quay loại một phần dung môi;
- (iv) rót từ từ dịch chiết còn thu được ở bước (iii) vào axeton, để qua đêm cho toàn bộ saponin kết tinh lại và lắng xuống;
- (v) lọc và thu phần saponin kết tinh, nén loại bớt nước rồi sấy ở 60°C trong 24 giờ; xác định sơ bộ thành phần các chất trong saponin tổng bằng phương pháp LC-MS, saponin thu được bao gồm các thành phần chủ yếu ginsenoside Rb1, ginsenoside Rg1, trong đó hàm lượng saponin tổng chiết tách được từ củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) là 9,1%.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất hệ nano (Fucoïdan-Ginseng-Curcumin) thu được theo phương pháp của sáng chế. Hệ nano (Fucoïdan-Ginseng-Curcumin) thu được theo sáng chế có khả năng tan tốt trong nước, tạo thành dung dịch màu vàng trong suốt. Kích thước hạt nano từ 50 – 70 nm.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm chứa hệ nano (Fucoïdan-Ginseng-Curcumin) này. Chế phẩm chứa hệ nano (Fucoïdan-Ginseng-Curcumin) có khả năng tan tốt trong nước tạo thành dung dịch màu vàng trong suốt, kích thước hạt từ 50 đến 70 nm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ quy trình tách chiết saponin từ bột tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen)).

Hình 2 là sơ đồ quy trình sản xuất sản phẩm dạng bột nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin).

Hình 3 là phổ FT-IR của (1) Fucoidan, (2) Saponin ginseng, (3) Curcumin và (4) Nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin).

Hình 4 là hình vẽ minh họa hình thái học của nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) được khảo sát bởi phương pháp FeSEM.

Hình 5 là hình vẽ minh họa sự phân bố kích thước và thế zeta của nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin).

Hình 6 là sắc kí đồ phân tích bằng LC-MS của dung dịch nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) hòa tan trong nước.

Hình 7 là hình ảnh giải phẫu bệnh gan và thận thỏ nhóm uống nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) 200 mg/kg/ bán trường diễn 30 ngày, ở thời điểm 15 ngày sau kết thúc uống.

Hình 8 là hình ảnh tế bào A549 trên đĩa nuôi có nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) nồng độ 60 μ M/ml.

Hình 9 là hình ảnh tế bào Hep 3B trên đĩa nuôi có nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) nồng độ 40 μ M/ml.

Hình 10 là hình ảnh tế bào HTB43 trên đĩa nuôi có nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) nồng độ 40 μ M/ml.

Hình 11 là đồ thị mô tả kích thước trung bình khối u của các nhóm trong quá trình thí nghiệm.

Hình 12 là biểu đồ mô tả tỉ lệ % kích thước khối u của các nhóm được điều trị bằng nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) giảm so với nhóm chứng.

Hình 13 là đồ thị mô tả kích thước trung bình khối u của các nhóm chuột trong quá trình thí nghiệm.

Hình 14 là đồ thị mô tả tỉ lệ % kích thước khối u của các nhóm điều trị giảm so với nhóm chứng.

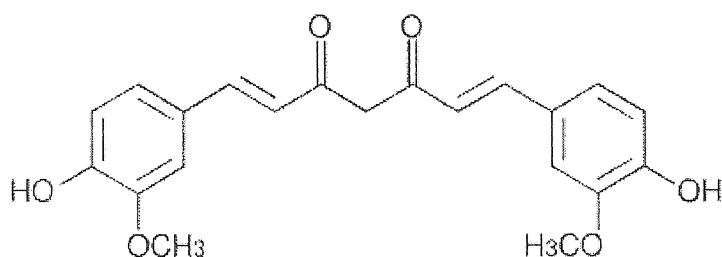
Hình 15 là hình minh họa kích thước khối u của các nhóm chuột giai đoạn tuần thứ 7, tính từ khi bắt đầu điều trị.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp vi bao Curcumin bằng saponin được chiết tách từ củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) nêu trên và fucoidan từ rong nâu (*Laminaria japonica* Aresch).

Curcumin là thành phần chính của curcuminoid – được tách từ củ nghệ có tên khoa học là *Curcuma longa*, thuộc họ gừng. Nghệ là cây thân thảo lâu năm, có thể cao đến 1 mét. Thân rễ hình trụ hoặc hơi dẹt, khi bẻ hoặc cắt ngang có màu vàng cam sẫm do có chứa chất màu Curcumin. Curcumin là một hợp chất polyphenol, không tan trong nước, tan trong rượu etylic, axit acetic khan, tạo hợp chất màu nâu đỏ khi hòa tan trong kiềm, tạo màu vàng sáng với axit.

Curcumin được mua từ hãng Merck với hàm lượng 99%. Công thức cấu tạo:



Curcumin có đặc tính tự phát huỳnh quang. Trong dung môi ethanol/nước (tỷ lệ 1:1), Curcumin hấp thụ cực đại tại bước sóng 422 nm và phát xạ phổ huỳnh quang cực đại tại 542nm.

Tam thất bắc là một trong các loại dược liệu quý được sử dụng từ rất lâu trong Y học cổ truyền các nước phương Đông, trong đó có Việt Nam. Tam thất

bắc có tên khoa học là *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae). Tam thất được trồng chủ yếu ở các vùng núi cao 1200-1500 mét, như ở Hà Giang, Lào Cai, Cao Bằng... Thành phần đóng góp chủ yếu vào tác dụng của tam thất là saponin, gồm một số loại chính như: ginsenoside Rb1, Rg1... (trong sáng chế này chúng tôi gọi saponin tổng chiết tách từ củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) là saponin ginseng).

Saponin có cấu tạo gồm một phần genin kỵ nước và một phần đường ưa nước, nhờ đó saponin có tính chất hoạt động bề mặt, làm tăng hòa tan và hấp thu của các hợp chất khó tan và ổn định hệ nano.

Rong nâu là ngành rong có trữ lượng lớn nhất và phân bố đa dạng nhất. Rong nâu phân bố nhiều nhất ở Nhật Bản, Canada, Việt Nam... Fucoïdan là một trong các polysacarit có hoạt tính sinh học trong rong nâu. Fucoïdan là một sunfat polysacarit có cấu trúc hóa học phức tạp, thành phần bao gồm nhiều loại đường, chủ yếu là đường fucose. Trong sáng chế, chúng tôi sử dụng fucoïdan nhập khẩu từ Nhật Bản với hàm lượng 30%.

Các thành phần nguyên liệu đều có bán sẵn trên thị trường và là loại đạt tiêu chuẩn được sử dụng trong lĩnh vực dược phẩm.

Như được thể hiện trên hình 2, phương pháp vi bao Curcumin bằng saponin được chiết tách từ củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) và fucoïdan từ rong nâu (*Laminaria japonica* Aresch) theo sáng chế được tiến hành như sau.

Đầu tiên, hòa tan Curcumin vào rượu etylic tuyệt đối (trong đó tỉ lệ khối lượng Curcumin : thể tích rượu etylic là 1 : 1). Tiếp đó hòa tan saponin và fucoïdan vào nước cất (tỉ lệ khối lượng saponin : khối lượng fucoïdan và thể tích nước cất là 1 : 3 : 1). Dung dịch chứa Curcumin được nhỏ từ từ vào dung dịch chứa saponin và fucoïdan theo tỷ lệ 1:1 (về thể tích) và khuấy đều trên máy khuấy từ ở nhiệt độ trong phòng. Sau 48 giờ, dung môi được cho bay hơi từ từ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 24 giờ. Hỗn hợp thu được được ly tâm 3 lần để loại bỏ phần Curcumin không được bao lắng xuống, thu được dung dịch

chứa nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin). Để bảo quản sản phẩm tốt hơn, chúng tôi tiến hành đông khô dung dịch chứa nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) thu được để cho ra sản phẩm nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) ở dạng bột màu vàng.

Quy trình chiết tách saponin từ củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) theo sáng chế được mô tả như sau. Củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) sau khi thu hoạch được phơi khô và xay thành bột mịn, thu được nguyên liệu bột có độ ẩm 4%. Bột tam thất sau đó được ủ với dietyl ete trong 6 giờ, lọc loại dung môi. Sau đó tiến hành ngâm chiết nguyên liệu bột tam thất bắc sau khi ủ bằng rượu etylic 70% theo tỷ lệ 1:10 (khối lượng bột (kg)/ thể tích cồn (lít)) trong bình cầu hồi lưu ở nhiệt độ 78°C trong thời gian 24 giờ. Tiếp đó lọc để thu được dịch chiết cồn; cất quay loại bớt một phần dung môi. Rót từ từ dịch chiết saponin trong cồn vào axeton, để qua đêm cho toàn bộ saponin kết tinh lại và lắng xuống. Lọc và thu phần saponin kết tinh, nén loại bớt nước rồi sấy ở 60°C trong 24 giờ. Thành phần các chất trong saponin tổng được xác định sơ bộ bằng phương pháp LC-MS bao gồm các thành phần chủ yếu ginsenoside Rb1, ginsenoside Rg1, v.v., trong đó hàm lượng saponin tổng chiết tách được từ củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) là 9,1%.

Hiệu suất vi bao:

$$H\% = \frac{\text{khối lượng Curcumin đầu vào} - \text{khối lượng Curcumin không được bao}}{\text{khối lượng Curcumin đầu vào}} \times 100\%$$

Kết quả hiệu suất vi bao là 85%.

Các tác giả sáng chế đã tiến hành đo phổ hấp thụ hồng ngoại của nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin). Hình 3 là phổ hồng ngoại FT-IR của Fucoidan, saponin ginseng, Curcumin và nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin). Dễ dàng nhận thấy một số đỉnh hấp thụ đặc trưng của các nguyên liệu (Fucoidan, Curcumin, saponin ginseng) đã bị dịch chuyển khi được nano hóa trong sản

phẩm. Cụ thể, các dao động đặc trưng của liên kết O-H của Curcumin (3150), Fucoidan (3387) và saponin ginseng (3395) đều bị dịch chuyển trong phổ của sản phẩm (3391). Tương tự như thế, liên kết đôi C=O ở Curcumin (1628) và saponin ginseng (1647) cũng thay đổi số sóng khi xuất hiện trong phổ của sản phẩm nano (1636). Ngoài ra, sự thay đổi không quá nhiều của dao động C-O-C của các chất ban đầu (Curcumin 1026, Fucoidan 1022, saponin ginseng 1038) so với của sản phẩm (1030) cũng góp phần chứng minh sự biến đổi về cấu trúc của các thành phần trong sản phẩm so với nguyên liệu ban đầu. Sự dịch chuyển của các pic trong phổ của sản phẩm nano so với phổ của các hợp chất ban đầu thể hiện sự nano hóa Curcumin bằng fucoidan và saponin ginseng đã xảy ra.

Hình 4 là ảnh chụp FeSEM cho thấy kích cỡ của nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) khá nhỏ và đồng đều trong khoảng 50 – 70 nm. Kết quả phân bố kích thước theo phương pháp DLS (hình 5) cũng khẳng định lại hệ nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) thu được có phân bố kích thước hẹp, kích thước trung bình khoảng 65 nm. Hệ nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) được đánh giá khá bền vững thông qua giá trị thế zeta âm là -32,3 mV. Độ tan của nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) được xác định bằng phương pháp LC-MS, cho thấy nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) tan tốt trong nước ở nồng độ 49,87 mg/ml (tương đương 11,19 mg Curcumin/ml) (hình 6).

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến hệ nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) thu được theo phương pháp của sáng chế.

Như chúng ta đã biết, nhược điểm của Curcumin là độ hòa tan trong nước kém và không có khả năng tác dụng chọn lọc trên tế bào ung thư. Hệ nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) kích thước nano mà các tác giả sáng chế chế tạo được có ưu điểm rất lớn là tan tốt trong nước và có kích thước lý tưởng cho việc hấp thu hệ dẫn thuốc nano qua đường tiêu hóa và khả năng hướng đích chọn lọc vào mô ung thư theo cơ chế hướng đích thụ động.

Theo lý thuyết, khi được đưa vào cơ thể, hệ dẫn thuốc nano sẽ được xem như vật lạ đối với cơ thể và sẽ bị nhận dạng và đào thải bởi hệ thống lưới nội

mô trước khi đi đến được vào đích tác dụng. Do đó, kích thước hạt là một yếu tố quan trọng trong việc đảm bảo thời gian lưu thông và tác dụng của hệ dẫn thuốc. Các nghiên cứu đã cho thấy, những hạt có kích thước lớn hơn 500 nm sẽ nhanh chóng bị hệ thống miễn dịch phát hiện và loại trừ khỏi cơ thể, trong khi những hạt có kích thước dưới 4 nm lại dễ dàng bị đào thải qua thận. Ngoài ra, sự khác biệt trong cấu tạo mạch máu của khối u và mạch máu của mô lành là yếu tố chủ chốt đem lại khả năng tích lũy thuốc ở khối u theo cơ chế hướng đích bị động dựa trên hiệu ứng EPR (Enhanced Permeability and Retention effect). Không như các mạch máu của mô lành với cấu trúc chặt chẽ, ở vách huyết quản của các tổ chức tế bào ung thư có các khoảng hở với đường kính từ 600 – 800 nm. Nhờ đó, những tiểu phân có kích thước dưới 400 nm có thể dễ dàng thâm nhập vào khối u mà không tích tụ ở mô lành. Hơn nữa, sự rối loạn chức năng của hệ bạch huyết tại khối u cũng làm giảm thải trừ các tiểu phân ra khỏi khối u so với tại mô lành dẫn tới kéo dài thời gian lưu trữ thuốc tại khối u ung thư. Như vậy với kích thước nhỏ từ 50 – 70 nm, hệ nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) có tiềm năng ứng dụng chữa trị bệnh ung thư.

Độc tính và tác dụng điều trị và hỗ trợ điều trị ung thư của nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) được đánh giá thông qua các thử nghiệm sinh học in vitro, in vivo.

- Độc tính cấp: Không tìm được LD 50 của nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) trên chuột nhắt trắng với mức liều uống tối đa 22.500mg/kg

- Độc tính bán trường diễn: Thỏ uống bán trường diễn nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) không ảnh hưởng tới tình trạng toàn thân, cân nặng, chỉ số huyết học (số lượng bạch cầu, hồng cầu, tiểu cầu và lượng huyết sắc tố), không tổn thương tới chức năng và cấu trúc gan, thận (hoạt độ GOT, GPT; nồng độ bilirubin, ure và creatinine máu và hình ảnh giải phẫu bệnh lý (hình 7))

- Tác dụng kháng ung thư in vitro: nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) có tác dụng kháng tế bào ung thư phổi người dòng A549 với IC50 là 149,6;

47,4 và 26,3 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (tính theo Curcumin) lần lượt tương ứng với các thời điểm 24, 48 và 72 giờ. Đánh giá dưới kính hiển vi soi nổi, có thể thấy hình ảnh tế bào thưa thớt dần theo thời gian ủ với nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin). Phát hiện thấy nhiều tế bào hình dáng không nguyên vẹn, thoái hóa, mất khả năng bám dính (hình 8).

Nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) có tác dụng kháng tế bào ung thư gan người dòng Hep 3B với IC_{50} là 208,4; 90,7 và 33,3 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (tính theo Curcumin) lần lượt tương ứng với các thời điểm 24, 48 và 72 giờ. Đánh giá dưới kính hiển vi, có thể thấy tế bào ung thư gan cũng có biểu hiện thưa thớt dần theo thời gian ủ với nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin). Nhiều tế bào hình dáng không nguyên vẹn, thoái hóa, mất khả năng bám dính, đặc biệt là tại thời điểm 72 giờ (hình 9).

Nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) có tác dụng kháng tế bào ung thư vảy vùng vòm họng người dòng HTB 43 với IC_{50} là 460,3; 51,3 và 36,7 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (tính theo Curcumin) lần lượt tương ứng với các thời điểm 24, 48 và 72 giờ. Hình ảnh tế bào được thể hiện trên hình 10.

Chưa tìm được IC_{50} của nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) trên dòng tế bào ung thư tiền liệt người PC 3 và ung thư vú người T47D.

- Tác dụng kháng ung thư in vivo: Uống dự phòng nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) và tiếp tục nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) sau khi ghép tế bào ung thư phổi người dòng A549 với liều 100 mg/kg thể trọng đã làm hạn chế sự phát triển khối u trên chuột thiếu hụt miễn dịch so với nhóm chứng (hình 11, hình 12).

Chuột mang khối ung thư phổi người dòng A549 được điều trị bằng Doxorubicin và được uống dự phòng nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) hạn chế được mức độ giảm cân so với nhóm dùng hóa chất thông thường

- Tác dụng dự phòng ung thư và hỗ trợ sau điều trị hóa chất của nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin): Ở tuần thứ 7 của quá trình điều trị, nhóm điều trị dự phòng bằng nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) và nhóm điều trị dự phòng kết hợp tiêm hóa chất có kích thước khối u ung thư giảm rõ rệt so với

nhóm chứng không điều trị hoặc dùng hóa chất đơn thuần ($p < 0,05$) (hình 13). Kích thước trung bình khối u giảm hơn so với nhóm chứng ở các nhóm DP-HC, DP và HC lần lượt đạt xấp xỉ 50%, 30% và 20% (hình 14, 15).

- Tác dụng kích thích miễn dịch: Trong số các nhóm chuột mang khối ung thư phổi người dòng A549:

Nhóm chuột sử dụng nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) điều trị dự phòng (trước ghép tế bào ung thư) và điều trị (sau ghép tế bào ung thư) có tỉ lệ % tế bào đại thực bào cao hơn so với tất cả các nhóm khác, gồm cả nhóm chứng (bảng 1).

Nhóm dùng nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) dự phòng (trước ghép tế bào ung thư) và điều trị (sau ghép tế bào ung thư) kết hợp với hóa chất Doxorubicin có tỉ lệ tế bào giết tự nhiên (NK), tế bào tua (DC) và tế bào tua trưởng thành (matured DC) cao hơn so với tất cả các nhóm khác, và bao gồm cả nhóm chứng (bảng 1).

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa hệ nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) thu được theo phương pháp của sáng chế.

Chế phẩm chứa hệ nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) thu được theo sáng chế có độ tan trong nước tốt, tạo thành dung dịch màu vàng trong suốt. Kích thước tiểu phân đo được trong khoảng từ 50 đến 70 nm. Chế phẩm chứa hệ nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) có khả năng hướng đích tới tế bào ung thư theo cơ chế thụ động. Chế phẩm chứa hệ nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) không gây độc trên động vật thí nghiệm giúp làm giảm mức độ giảm cân, giảm kích thước khối u. Sử dụng dự phòng bằng chế phẩm chứa hệ nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) và sử dụng dự phòng kết hợp tiêm hóa chất Doxorubicin giúp làm tăng cường khả năng miễn dịch: tăng tỉ lệ đại thực bào, tế bào giết tự nhiên (NK), tế bào tua (DC) và tế bào tua trưởng thành (matured DC).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dòng tế bào thử nghiệm tác dụng kháng ung thư in vitro: Năm dòng tế bào ung thư người: Ung thư phổi dòng A549 (CCL185), Ung thư biểu mô tế bào gan dòng Hep3B (HB8064), Ung thư biểu mô vảy vùng vòm họng dòng FaDu (HTB43), Ung thư biểu mô tuyến tiền liệt, dòng PC3 (CRL1435), Ung thư biểu mô tuyến vú dòng T47D (HTB133)

Động vật thí nghiệm:

- Nghiên cứu độc tính cấp: chuột nhắt trắng giống Swiss, cân nặng 20~22g
- Nghiên cứu độc tính bán trường diễn: thỏ trắng thuần chủng, cân nặng 2-2,5 kg;
- Tác dụng kháng ung thư in vivo: chuột thiếu hụt miễn dịch

Thiết bị:

Máy rung siêu âm, máy đông khô, kính hiển vi soi ngược có chụp ảnh, Box laminar, tủ ấm CO₂, máy đọc Elisa, các vật liệu nuôi cấy tế bào, phòng thí nghiệm và các điều kiện nuôi động vật thí nghiệm.

Phương pháp nghiên cứu vật liệu

- Phổ hồng ngoại FTIR (FTIR SHIMADZU Spectrophotometer)
- Kính hiển vi điện tử quét FESEM (Hitachi S-4800)
- Phổ hấp thụ điện tử UV-Vis-NIR (VARIAN Spectrophotometer Cary 5000 UV-VIS-NIR)
- Thiết bị đo kích thước và thế zeta (Nano ZS - Malvern – UK).

Phương pháp thử nghiệm sinh học:

- Đánh giá độc tính cấp trên chuột nhắt trắng ở các mức liều khác nhau nhằm chọn các mức liều thử sao cho có thể phát hiện được khả năng gây độc (nếu có) của sản phẩm, liều gây chết tối thiểu, liều gây chết 50% hoặc liều dung nạp tối đa. Thời gian theo dõi trung bình từ 48-72 giờ, có thể kéo dài đến 7 hoặc 10 ngày tùy thuộc vào thời gian bán thải và mức độ độc của mẫu thử.

Nếu có chuột chết, chuột được mổ để quan sát, phân tích hình ảnh đại thể các cơ quan phủ tạng động vật.

Phương pháp tính toán và xử lý kết quả: Dựa vào tỷ lệ sống, chết của chuột giữa các nhóm, tính toán để tìm ra liều LD50 (nếu có) theo phương pháp Berhens hoặc Litchfiel - Willcoxon, liều dung nạp tối đa hoặc liều tối thiểu gây chết.

- Đánh giá độc tính bán trường diễn của sản phẩm trên thỏ dựa trên các thông số: cân nặng, các chỉ số sinh hóa và huyết học, hình ảnh đại thể các mô, tạng, làm tiêu bản mô bệnh học mô gan và mô thận.

- Đánh giá tác dụng độc tế bào ung thư in vitro trên 5 dòng tế bào ung thư người thông qua thử nghiệm MTT. Tính toán nồng độ ức chế 50% tế bào (IC50) của sản phẩm trên từng dòng tế bào so với giếng trắng.

- Nghiên cứu tác dụng kháng ung thư in vivo trên chuột thiếu hụt miễn dịch đã ghép tế bào ung thư người. Theo dõi tốc độ phát triển khối u, trọng lượng cơ thể chuột, thời gian sống, tỉ lệ sống/chết của các nhóm chuột ung thư được điều trị bằng nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) khi nhóm chứng chết khoảng 50% số chuột.

- Đánh giá tác dụng dự phòng ung thư và hỗ trợ điều trị sau hóa chất trên chuột thiếu hụt miễn dịch qua các thông số: Tỷ lệ xuất hiện khối ung thư trên các nhóm, tốc độ phát triển khối ung thư, trọng lượng trung bình của chuột, thời gian sống, tỉ lệ sống/chết của chuột ung thư ở các nhóm khi nhóm chứng chết khoảng 50% số chuột.

- Đánh giá tác dụng kích thích miễn dịch trên chuột mang khối u ung thư người thông qua kết quả phân tích quần thể tế bào NK (natural killer cells), DC (Dendritic cells) và đại thực bào (Macrophage) lách chuột sau khi được điều trị bằng nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin)

Ví dụ 1: Phương pháp chiết tách saponin ginseng từ củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen)

100 g bột tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) có độ ẩm 4% được ủ với 200 ml dietyl ete trong 6 giờ để loại chất béo. Lọc loại dung môi. Bột sau khi loại chất béo được ngâm chiết trong 1 lít rượu etylic 70% có hồi lưu ở nhiệt độ 78°C trong 24 giờ. Lọc thu được dịch chiết còn. Cát quay loại một phần dung môi. Rót từ từ dịch chiết còn cô đặc vào 1 lít axeton, để qua đêm cho toàn bộ saponin kết tinh lại và lắng. Lọc và thu phần saponin kết tinh, nén loại bớt nước rồi sấy ở 60°C trong 24 giờ.

Thành phần các chất trong saponin tổng được xác định sơ bộ bằng phương pháp LC-MS. Hàm lượng saponin tổng chiết được từ củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) là 9,1%.

Ví dụ 2: Phương pháp vi bao Curcumin bằng saponin được chiết tách từ củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) và fucoidan từ rong nâu (*Laminaria japonica* Aresch)

Hòa tan hoàn toàn 100 mg Curcumin tinh khiết vào 100 ml rượu etylic tuyệt đối. Đồng thời, hòa tan 100 mg saponin và 300 mg fucoidan vào 100 ml nước cất hai lần. Cho từ từ dung dịch Curcumin trong cồn vào dung dịch chứa saponin và fucoidan, khuấy đều trên máy khuấy từ ở nhiệt độ phòng trong vòng 48 giờ. Tiếp đó, dung môi được cho bay hơi từ từ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 24 giờ. Dung dịch sau đó được ly tâm 3 lần để loại phần Curcumin không được bao. Sản phẩm thu được là dung dịch chứa nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin). Phần Curcumin không tan được sấy và cân có khối lượng 15 mg. Như vậy sẽ có 85 mg Curcumin được bao trong hệ nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin). Hiệu suất của quá trình vi bao Curcumin là: $(100-15)/100 = 85\%$.

Phần dung dịch chứa nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) được đem đi đông khô thu được dạng bột nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin). Kích thước hạt nano đo được khoảng từ 50 – 70 nm.

Ví dụ 3: Đánh giá tác dụng kích thích miễn dịch của sản phẩm nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin)

Chuột được chia thành 4 nhóm mang khối ung thư gồm nhóm chứng, nhóm dự phòng (DP, uống nano (Fucoïdan-Ginseng-Curcumin)), nhóm dự phòng + hóa chất (DP-HC, uống nano (Fucoïdan-Ginseng-Curcumin) và tiêm hóa chất Doxorubicin) và nhóm sử dụng hóa chất đơn thuần (HC), mỗi nhóm 3-4 con, sau khi uống thuốc, có u trên tất cả các chuột, kích thước khối u đạt khoảng 1cm đường kính. Lách chuột được phẫu tích và rửa sạch bằng dung dịch PBS. Tiến hành phân tích đánh giá quần thể tế bào tham gia đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu, tham gia trong cơ chế chống ung thư. Tế bào được gắn với các kháng thể đặc hiệu:

Kháng thể kháng CD11b gắn với tế đại thực bào – Macrophage;

Kháng thể CD49b gắn với tế bào giết tự nhiên – NK;

Kháng thể CD11c gắn với tế bào tua – DC;

Kháng thể CD197 gắn với tế bào tua trưởng thành – mature DC.

Kết quả.

Bảng 1. Tỷ lệ Tế bào biểu hiện kháng thể của các nhóm chuột

	% ĐTB	% NK	%DC	% mDC
	Cd11b	Cd49b	Cd11c	Cd197
Chứng	24,4	5,2	5,4	0,6
DP-HC	22,3	9,7	6,4	2,0
DP	28,2	5,5	2,6	0,7
Hóa chất	10,8	3,7	2,0	1,2

Trong số các nhóm chuột mang khối ung thư phổi người dòng A549:

- Nhóm chuột sử dụng nano (Fucoïdan-Ginseng-Curcumin) (DP) trị dự phòng (trước ghép tế bào ung thư) và điều trị (sau ghép tế bào ung thư) có tỷ lệ

% tế bào đại thực bào cao hơn so với tất cả các nhóm khác, gồm cả nhóm chứng.

- Nhóm dùng nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) dự phòng (trước ghép tế bào ung thư) và điều trị (sau ghép tế bào ung thư) kết hợp với hóa chất Doxorubicin có tỉ lệ tế bào giết tự nhiên (NK), tế bào tua (DC) và tế bào tua trưởng thành (matured DC) cao hơn so với tất cả các nhóm khác, và bao gồm cả nhóm chứng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp vi bao curcumin bằng saponin được chiết tách từ củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) và fucoidan từ rong nâu (*Laminaria japonica* Aresch) bao gồm các bước:

- a) hòa tan Curcumin vào rượu etylic tuyệt đối, trong đó tỉ lệ khối lượng Curcumin : thể tích rượu etylic là 1 : 1;
- b) hòa tan saponin và fucoidan vào nước cất tỉ lệ khối lượng saponin: khối lượng fucoidan và thể tích nước cất là 1 : 3: 1;
- c) bổ sung từ từ dung dịch chứa Curcumin vào dung dịch chứa saponin và fucoidan theo tỷ lệ 1:1 và khuấy đều trên máy khuấy từ ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ;
- d) làm bay hơi dung môi từ từ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 24 giờ, sau đó dung dịch được ly tâm 3 lần để loại bỏ phần Curcumin không được bao lắng xuống, thu được dung dịch chứa nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin);
- e) làm đông khô dung dịch chứa nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) thu được để cho ra sản phẩm nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) ở dạng bột màu vàng, trong đó kích thước hạt nano thu được nằm trong khoảng từ 50 đến 70 nm,;

trong đó saponin được chiết tách từ củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) bằng phương pháp bao gồm các bước:

- (i) thu hoạch củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen), phơi khô và xay thành bột mịn, thu được nguyên liệu bột có độ ẩm 4%;
- (ii) ủ bột tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) với diethyl ete trong 6 giờ, lọc loại dung môi;
- (iii) ngâm chiết nguyên liệu bột tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) thu được ở bước (ii) bằng rượu etylic 70% theo tỷ lệ 1:10 (khối lượng bột (kg)/ thể tích rượu etylic (lít)) trong bình cầu hồi lưu ở

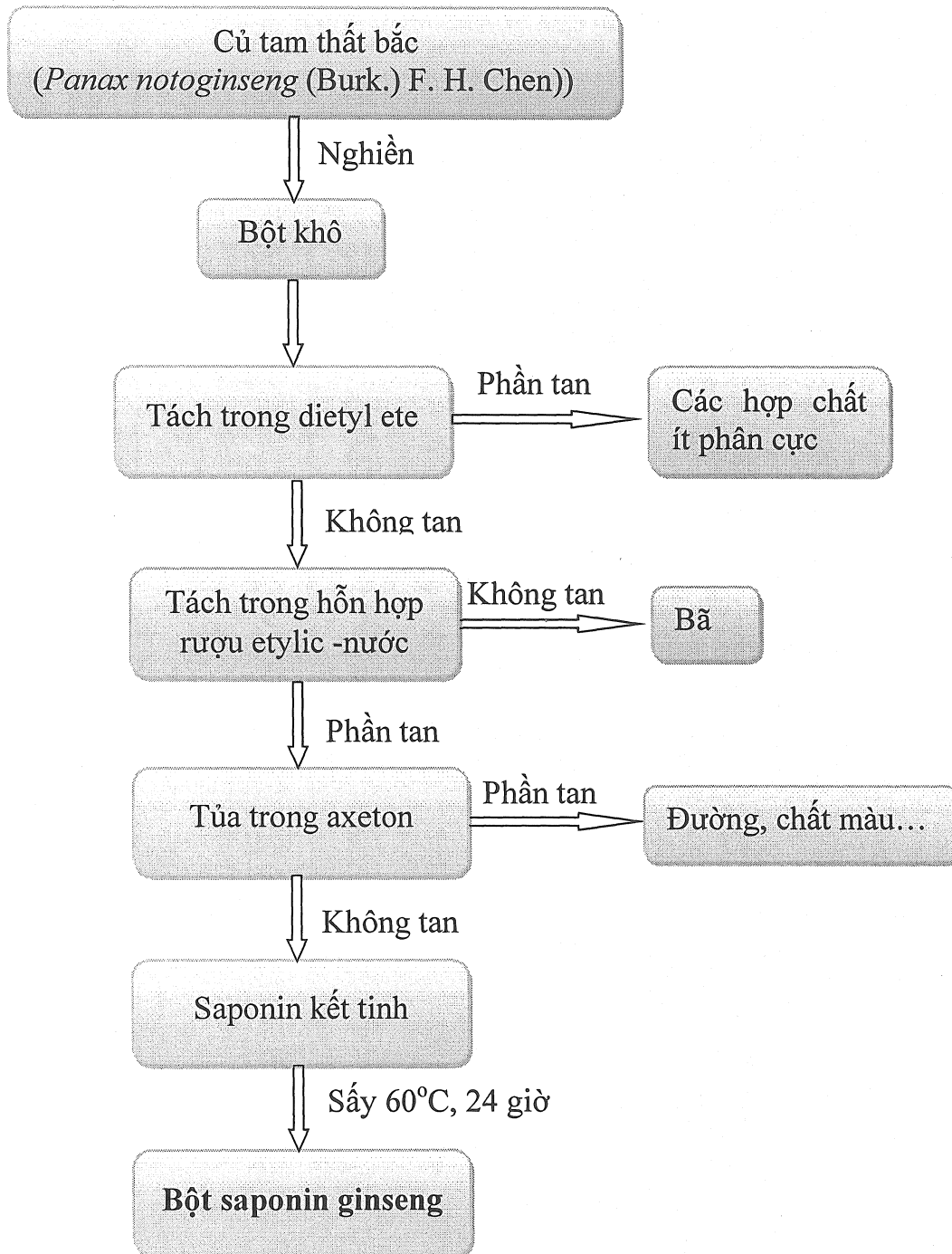
nhiệt độ 78°C trong thời gian 24 giờ, tiếp đó lọc để thu được dịch chiết còn; cất quay loại một phần dung môi;

(iv) rót từ từ dịch chiết còn thu được ở bước (iii) vào axeton, để qua đêm cho toàn bộ saponin kết tinh lại và lắng xuống;

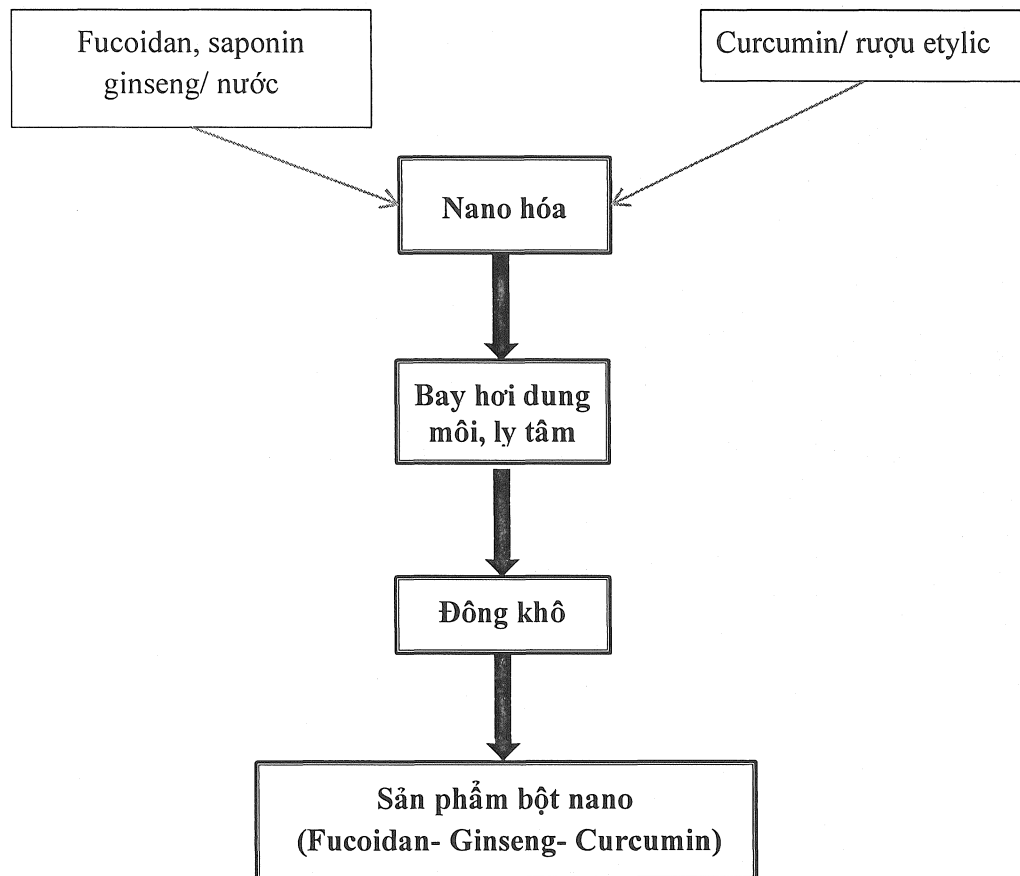
(v) lọc và thu phân saponin kết tinh, nén loại bớt nước rồi sấy ở 60°C trong 24 giờ; xác định sơ bộ thành phần các chất trong saponin tổng bằng phương pháp LC-MS, saponin thu được bao gồm các thành phần chủ yếu ginsenoside Rb1, ginsenoside Rg1, trong đó hàm lượng saponin tổng chiết tách được từ củ tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) là 9,1%.

2. Hệ nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) thu được theo phương pháp như được xác định trong điểm 1 có khả năng tan tốt trong nước, tạo thành dung dịch màu vàng trong suốt, kích thước hạt từ 50 đến 70 nm, trong đó hệ nano theo sáng chế không gây độc trên động vật thí nghiệm, có khả năng tiêu diệt tế bào ung thư người, hoặc được sử dụng dự phòng giúp làm giảm mức độ giảm cân và giảm kích thước khối u trên chuột mang khối u ung thư người, hoặc được sử dụng dự phòng kết hợp tiêm hóa chất Doxorubicin có tác dụng kích thích miễn dịch trên chuột mang khối u ung thư người.

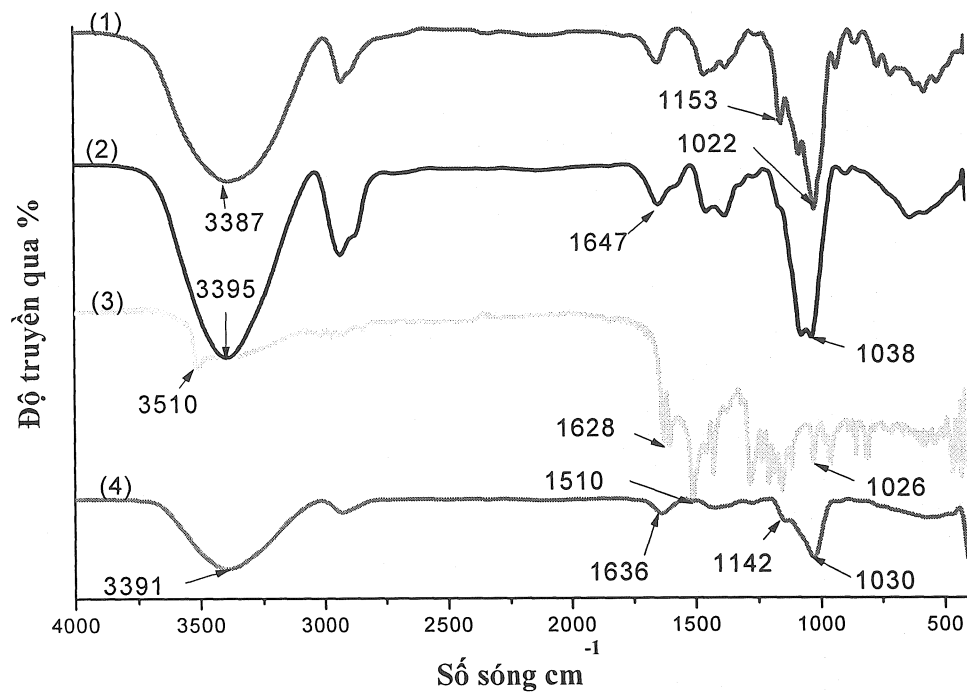
Hình 1. Sơ đồ quy trình tách chiết saponin từ bột tam thất bắc (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen))



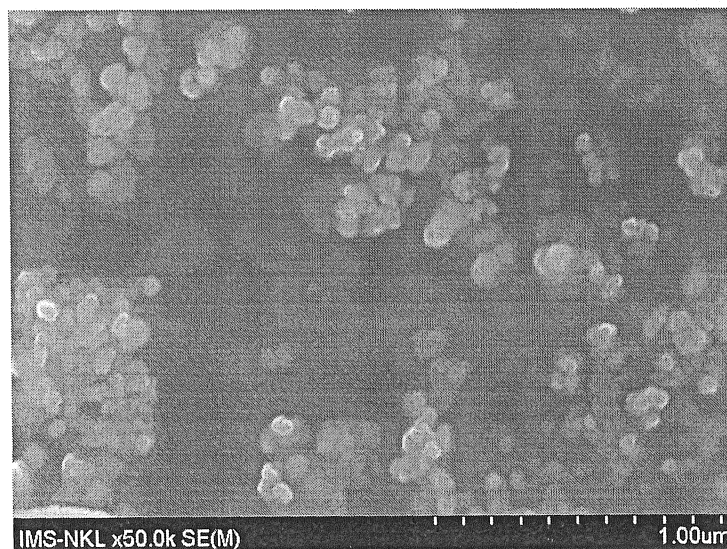
Hình 2. Sơ đồ quy trình chế tạo sản phẩm dạng bột nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin)



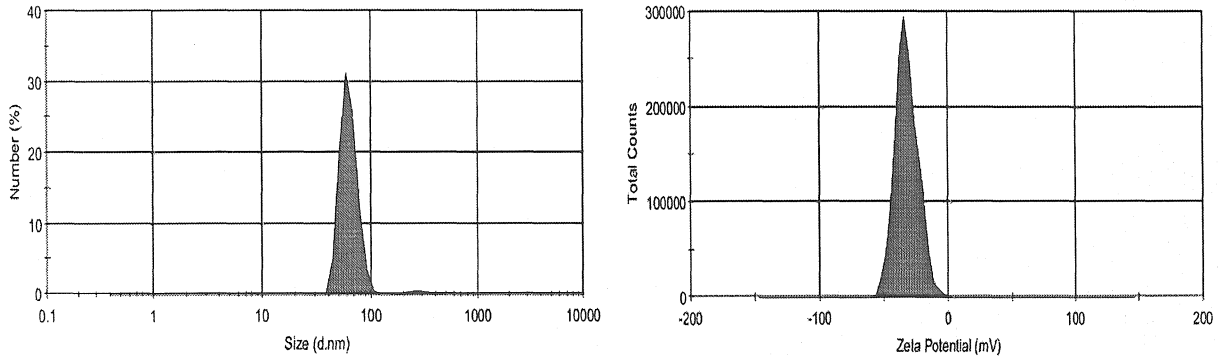
Hình 3. Phổ FT-IR của (1) Fucoïdan, (2) saponin ginseng, (3) Curcumin và (4) Nano (Fucoïdan-Ginseng-Curcumin)



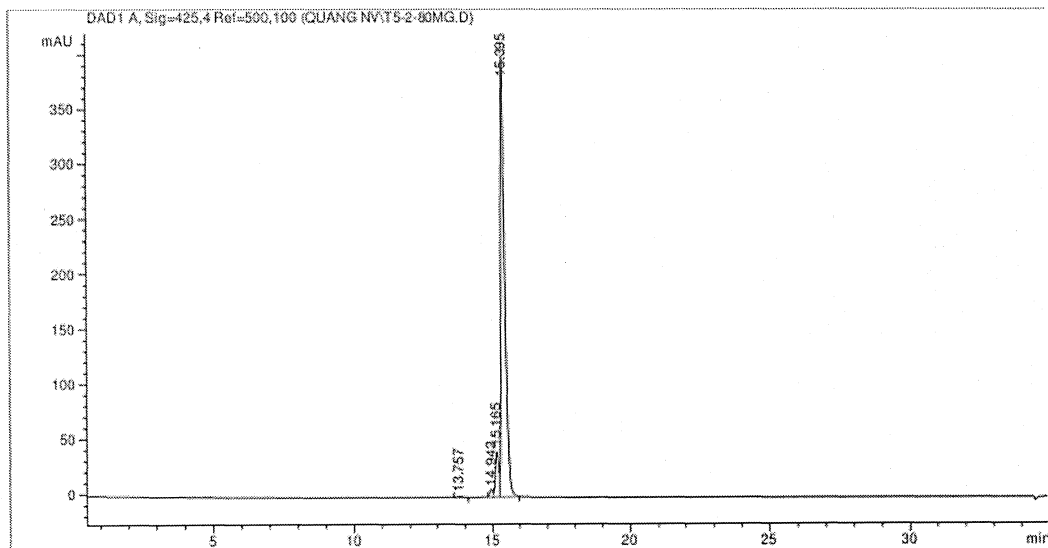
Hình 4. Ảnh chụp FESEM của nano (Fucoïdan- Ginseng- Curcumin)



Hình 5. Phân bố kích thước và thế zeta của nano (Fucooidan-Ginseng- Curcumin)



Hình 6. Sắc kí đồ phân tích bằng LC-MS của dung dịch nano (Fucooidan-Ginseng- Curcumin) hòa tan trong nước

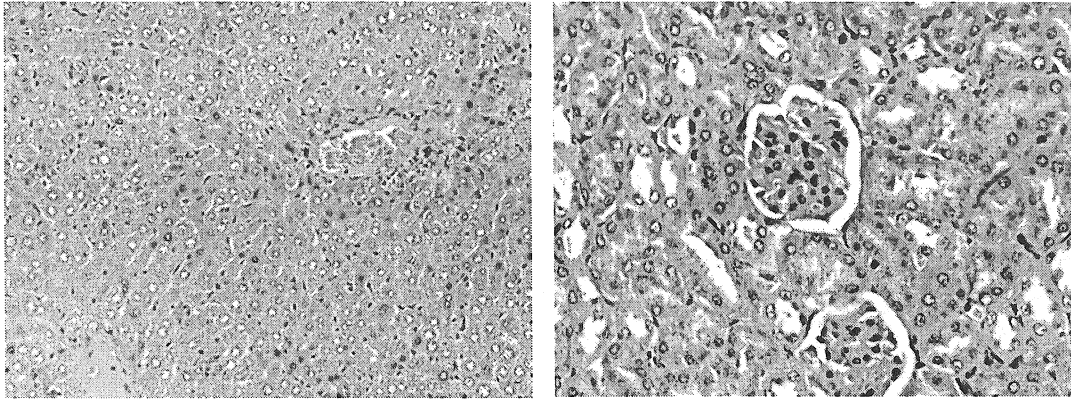


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	13.757	BB	0.1951	14.65613	1.19492	0.3182
2	14.942	BV	0.1254	54.68480	6.69066	1.1874
3	15.165	VV	0.1257	344.41623	41.96748	7.4786
4	15.395	VB	0.1534	4191.59229	402.74719	91.0157

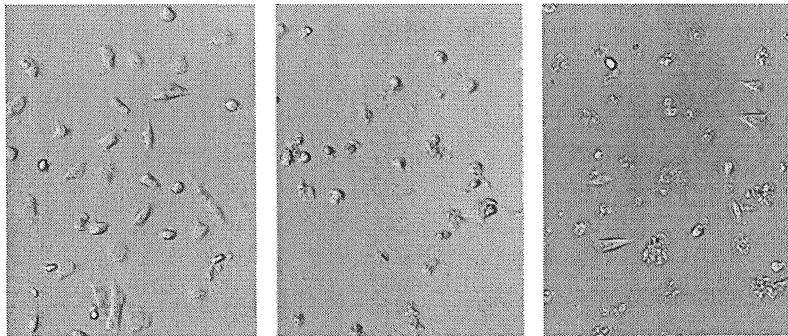
Totals : 4605.34944 452.60025

Totals curcumine : 11.19 mg

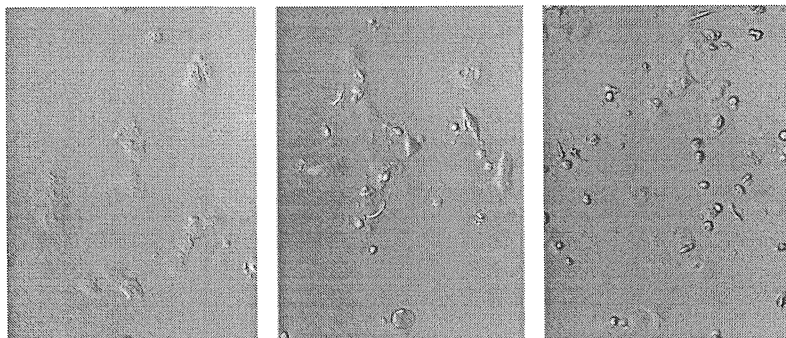
Hình 7. Hình ảnh giải phẫu bệnh gan và thận thỏ nhóm uống nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) 200 mg/kg/ bán trường diễn 30 ngày, ở thời điểm 15 ngày sau khi kết thúc uống



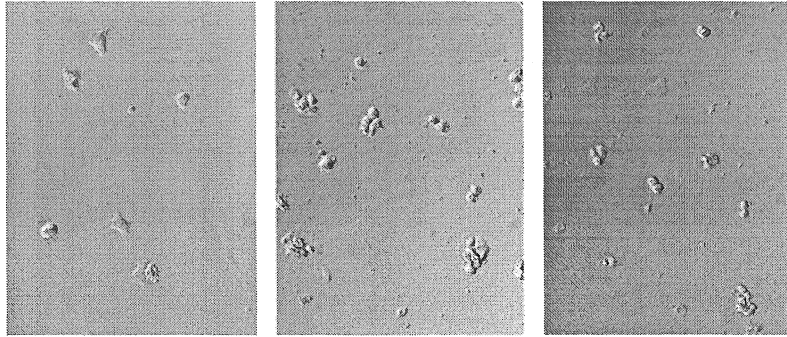
Hình 8. Hình ảnh tế bào A549 trên đĩa nuôi có nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) nồng độ 60 μ M/ml (Từ trái qua phải: thời điểm 24, 48 và 72h)



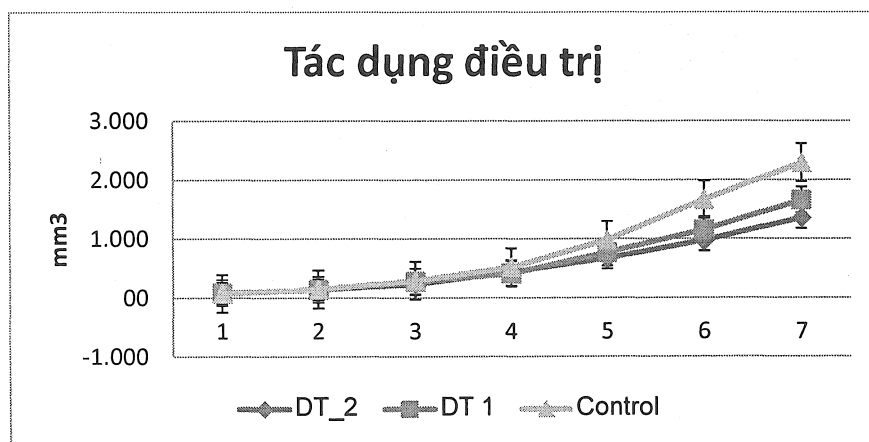
Hình 9. Hình ảnh tế bào Hep 3B trên đĩa nuôi có nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) nồng độ 40 μ M/ml (Từ trái qua phải: thời điểm 24, 48 và 72h)



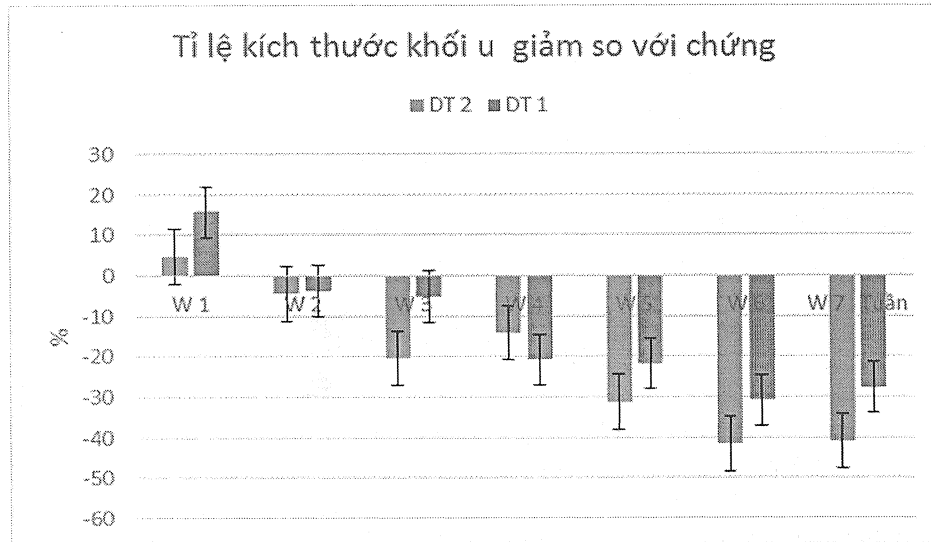
Hình 10. Hình ảnh tế bào HTB43 trên đĩa nuôi có nano (Fucooidan-Ginseng-Curcumin) nồng độ 40 $\mu\text{M}/\text{ml}$
(Từ trái qua phải: thời điểm 24, 48 và 72h)



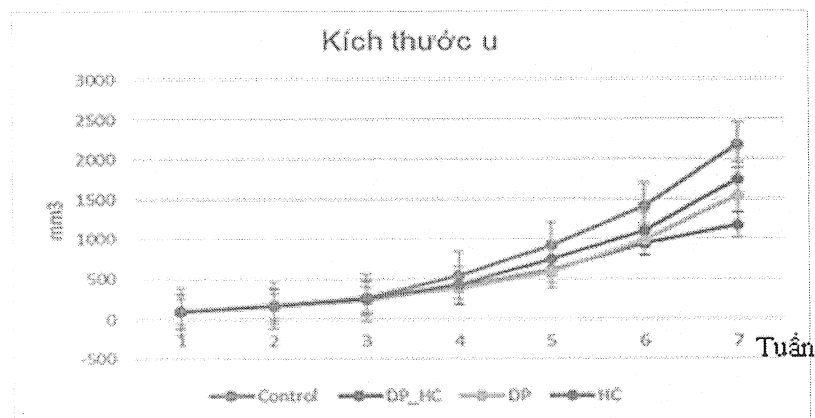
Hình 11. Kích thước trung bình khối u của các nhóm trong quá trình thí nghiệm.



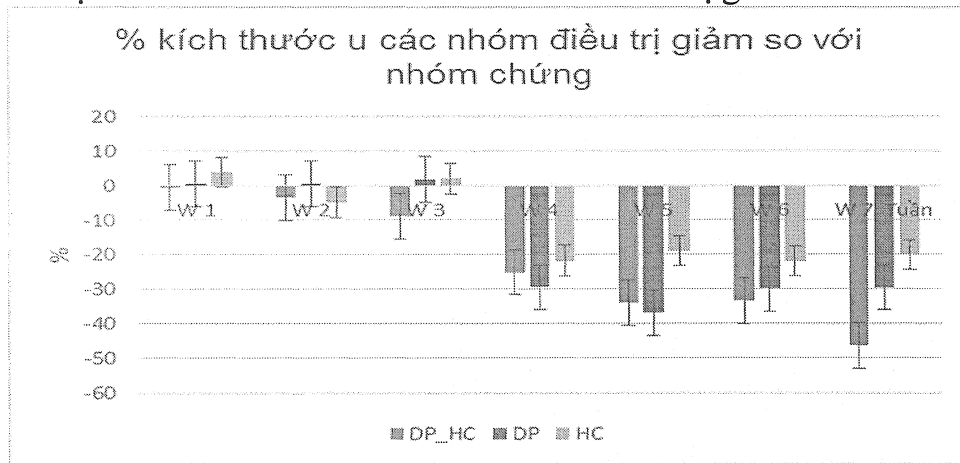
Hình 12. Tỷ lệ % kích thước khối u của các nhóm được điều trị bằng nano (Fucoidan-Ginseng-Curcumin) giảm so với nhóm chứng



Hình 13. Kích thước trung bình khối u của các nhóm chuột trong quá trình thí nghiệm



Hình 14. Tỷ lệ % kích thước khối u của các nhóm điều trị giảm hơn so với nhóm chứng



Hình 15. Hình minh họa kích thước khối u của các nhóm chuột giai đoạn tuần thứ 7, tính từ khi bắt đầu điều trị.

