



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.033

NGHIÊN CỨU TẠO PHỨC HỢP NANOSILICA - CURCUMIN - BROMELAIN VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH LÊN DÒNG NGUYÊN BÀO SỢI TRÊN MÔ HÌNH ĐỘNG VẬT

Lại Đình Biên*, Chiêm Thị Anh Thư và Trương Thị Thúy An

Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Lại Đình Biên (email: bienld@cntp.edu.vn)

ABSTRACT

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 25/02/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

Research in creating nanosilica - curcumin - bromelain complex and evaluating the activity on fibroblasts in animal models

Từ khóa:

Bromelain, burns scar, curcumin, nanosilica

Keywords:

Bromelain, curcumin, liên sẹo bỏng, nanosilica

According to the Vietnam National Institute of Burns since 2017, the number of burns has increased and is the second common accident type after traffic accident. With the development of beauty technology, requirement of the quick, complete, and without scarring treatment for burns wound is very interested and necessary. Bromelain in pineapple combine with curcumin from turmeric to form an effective anti-inflammatory, quickwound healing. Applying nanotechnology to the preparation of the silica-curcumin-bromelain complex produces a nanoparticle complex that enhances the body's ability to be exposed and absorbed by the body while maintaining biological activity, as well as, support for the treatment of open wounds, burns, keloids, concave faster. In the test, nanosilica-bromelain-curcumin with size 10 - 100 nm was successfully assessmented on the fibroblasts cell line from white mice and optimal concentration of active ingredient at 7.5%. In addition, the application of nanosilica-bromelain-curcumin in the treatment of burns on the mouse model burns heat level II, after 18 days, burns scar was healed and hair growth faster than no treatment for 7 days.

TÓM TẮT

Theo thống kê Viện bỏng Việt Nam từ năm 2017, số ca bỏng ngày một tăng. Bỏng là tai nạn phổ biến thứ hai sau tai nạn giao thông. Việc điều trị vết thương từ bỏng nhanh chóng và hoàn toàn không để lại sẹo rất được quan tâm và ủng hộ. Bromelain trong dứa và curcumin từ nghệ khi kết hợp tạo nên sự cộng hưởng giúp kháng viêm hiệu quả, làm liền vết thương nhanh hơn. Ứng dụng công nghệ nano vào việc điều chế phức hợp silica - curcumin - bromelain tạo ra hạt phức hợp có kích thước nano tăng khả năng tiếp xúc, hấp thụ của cơ thể mà vẫn giữ được hoạt tính sinh học từng chất, cũng như hỗ trợ cho quá trình điều trị các vết thương hở, vết bỏng, sẹo lồi, lõm nhanh hơn. Đề tài đã thử nghiệm hạt nanosilica - curcumin - bromelain kích thước 10 - 100 nm thành công trên dòng tế bào nguyên bào sợi thu nhận từ chuột nhắt trắng và tối ưu nồng độ hoạt chất ở 7,5%. Bên cạnh đó, ứng dụng phức hợp nanosilica - curcumin - bromelain trong điều trị vết bỏng cấp độ II trên mô hình chuột nhắt trắng đã cho kết quả liền sẹo và mọc lông sau 18 ngày, nhanh hơn so với không điều trị 7 ngày.

Trích dẫn: Lại Đình Biên, Chiêm Thị Anh Thư và Trương Thị Thúy An, 2019. Nghiên cứu tạo phức hợp nanosilica - curcumin - bromelain và đánh giá hoạt tính lên dòng nguyên bào sợi trên mô hình động vật. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(1): 252-260.

1 GIỚI THIỆU

Hạt nano đã được sử dụng rộng rãi như một vật liệu phân phối thuốc vì hạt nano không chỉ làm tăng khả năng tương thích sinh học và độ tan của thuốc,

mà còn tăng khả năng lưu thông máu (Barenholz, 2012). Các cấu trúc nano cũng có thể được thiết kế sửa chữa mô, chúng có khả năng rà soát để phát hiện các tổn thương, thậm chí chúng có khả năng sửa chữa trong một vài trường hợp (Phan Kim Ngọc và

Phạm Văn Phúc, 2007). Theo Murali *et al.* (2010) các hạt nano có khả năng kháng viêm làm tăng độ hòa tan của thuốc và tích lũy chọn lọc trong mô nhiễm sau khi uống, do đó làm tăng hiệu quả điều trị. Nanosilica là một vật liệu có lõi bên trong rỗng hoặc cấu trúc vỏ hạt của nó sẽ là vật liệu lý tưởng cho dẫn thuốc, giúp lượng thuốc hấp thu cao hơn, liệu pháp điều trị hiệu quả hơn và độc tính thấp hơn trong cơ thể (Yang *et al.* 2017). Do đó, có thể nói rằng nanosilica có một tiềm năng rất lớn để phát triển như một nền tảng dẫn thuốc đa năng và mạnh mẽ cho việc giúp đỡ mở rộng liệu pháp điều trị (Gao *et al.*, 2011).

Việc kết hợp giữa các phương pháp điều trị hiện đại với các dược liệu tự nhiên đang là một hướng đi có nhiều bước tiến mới cho y học. Bromelain và curcumin khi kết hợp sẽ tạo hiệu quả cộng hưởng trong điều trị làm lành vết thương. Bromelain tăng khả năng hấp thụ curcumin của tế bào, thúc đẩy nhanh quá trình làm sạch vết thương sau 4 giờ, lấy đi các vật lạ và mô chết để không còn trở ngại nào, hỗ trợ cho hoạt tính của curcumin trong chữa lành vết thương, ngoài ra bromelain còn giảm khả năng tăng trưởng hỗn loạn của nguyên bào sợi trong quá trình tăng sinh giảm bớt hình thành sẹo. Curcumin và bromelain tan trong nước rất kém – làm giảm khả năng hấp thụ và bám dính trên tế bào nên gây nhiều hạn chế cho việc sử dụng rộng rãi trong lâm sàng và nghiên cứu. Ứng dụng công nghệ nano vào việc điều chế phức hợp silica-curcumin-bromelain tạo ra hạt phức hợp có kích thước nano tăng khả năng tiếp xúc, hấp thụ của cơ thể mà vẫn giữ được hoạt tính sinh học từng chất, cũng như hỗ trợ cho quá trình điều trị các vết thương hở, vết bỏng, sẹo lồi, lõm nhanh hơn.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

2.1.1 Chuẩn bị phức hợp nanosilica – curcumin – bromelain

Vật liệu bao gồm: Bromelain 2 manson U/mg hoạt tính sinh học EC 3.4.22.32. CAS 9001-00-7, pH 5 (50 g/l, H₂O, 20 °C) của Merk Germany. Tetraethylorthosilicate (TEOs) của Merk Germany, CAS 73-10-4. Curcumin tinh sạch 98% ly trích từ Phòng thí nghiệm của trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Phương pháp tạo phức hợp nanosilica – curcumin – bromelain

Phối trộn TEOs, curcumin, bromelain theo tỷ lệ 1:1:1 và sử dụng phương pháp đánh sóng siêu âm liên tục theo trình tự thời gian khác nhau qua từng giai đoạn. Quy trình cải tiến từ nghiên cứu của Rajesh *et al.* (2013) để phù hợp với mục đích tạo hạt gồm ba chất. Dụng cụ sử dụng đánh sóng siêu âm liên tục

> 70°C trong vòng 30 phút để khử sạch tạp chất dung dịch nano sau khi đánh sóng siêu âm được đem đi rửa giải các chất phụ gia trong quá trình tạo hạt bằng phương pháp ly tâm. Phức hợp nanosilica – curcumin – bromelain được kiểm tra chất lượng và kích thước bằng phương pháp chụp TEM, hoạt tính của bromelain cũng được kiểm tra bằng phương pháp đồng tụ sữa.

2.2.2 Phương pháp thu nhận phần da lung

Mô da lung được lấy từ chuột nhắt trắng 13 đến 18 ngày tuổi. Chuột nhắt trắng được mua tại khu chăn nuôi động vật thí nghiệm viện Pasteur, Thành phố Hồ Chí Minh. Chuột được giết đột ngột bằng cách kéo giãn đột cổ, sát trùng vùng da bụng chuột bằng cồn 70°C, tiến hành cắt ngang bụng chuột lấy toàn bộ các thai chuột (còn trong màng ối). Sau đó loại bỏ nhau thai, rốn, màng ối, các cơ quan phức nội tạng và thu phần lung trên mình thai chuột.

Cắt phần mô này thành từng miếng nhỏ bằng kéo, dùng kẹp chuyên dụng chuyển mẫu mô vào eppendorf đã có sẵn PBS (nước muối sinh lý) và kháng sinh để mẫu ổn định, sau đó loại bỏ phần dịch trong. Lặp lại quá trình 3 lần.

Tách tế bào đơn bằng trypsin ấm

Sau khi thực hiện quy trình, tiếp tục cho 1 ml môi trường vào trộn đều, cho tế bào rời ra tạo huyền phù tế bào. Quan sát và xác định mật độ tế bào/ml. Nuôi cấy sơ cấp dòng tế bào nguyên bào sợi. Chuyển lượng tế bào huyền phù ban đầu với lượng môi trường nuôi cấy DMEM/F12 và 1% antibiotic – antimycotic có bổ sung huyết thanh với nồng độ 15% với mật độ 2×10^4 tế bào/ml. Để đĩa nuôi vào tủ nuôi ở nuôi ở 37°C, 5% CO₂. Quan sát dưới kính hiển vi và ghi nhận kết quả.

2.2.3 Thí nghiệm đánh giá hoạt tính dựa trên sự phát triển của nguyên bào sợi

Chuẩn bị môi trường DMEM, FBS 15%, anti 1% với các tỷ lệ phối trộn hạt nanosilica – curcumin – bromelain thử nghiệm là 2,5%; 5%; 7,5%; 10%. Từ tế bào đã thu nhận và cấy chuyển 2 lần. Bổ sung vào môi trường thử nghiệm với mật độ $2,57 \pm 3,02 \times 10^4$ TB/ml (đếm mật độ 0h trên buồng đếm hồng cầu và xử lý thống kê ANOVA với độ tin cậy 95%).

Đánh giá hoạt tính của hạt phức hợp ảnh hưởng sự phát triển của nguyên bào sợi trên khả năng tăng sinh và bám dính của tế bào bằng kính hiển vi và phương pháp đếm buồng đếm hồng cầu. Từ đó so sánh được hoạt tính của phức hợp nanosilica-curcumin- bromelain đối với các mẫu đối chứng khác, cũng như tìm được nồng độ tối ưu để tăng trưởng của tế bào nguyên bào sợi. Lặp lại thí nghiệm 5 lần.

2.2.4 Phương pháp tạo mô hình chuột bông và thử nghiệm, đánh giá

Chuột nhắt trắng được nuôi trong điều kiện đồng nhất. Làm sạch lông một vùng nhỏ. Sử dụng miếng sắt (đường kính khoảng 1,5cm) hơ lửa khoảng 30 giây rồi gây bông lên vùng đã làm sạch trong 4 giây.

Thử nghiệm điều trị. Bố trí thí nghiệm với nghiệm thức sau: Không sử dụng điều trị; Sử dụng kem nghệ Thorakao; Sử dụng vaseline; Sử dụng nanosilica – curcumin – bromelain – vaseline; Sử dụng nanosilica – curcumin – bromelain – vaseline. Thoa mỗi ngày 2 lần (sáng và chiều), quan sát ghi nhận kết quả hằng ngày đến lúc lành vết thương.

2.2.5 Kỹ thuật tách tế bào để đếm mật độ

Đổ bỏ môi trường cũ trong đĩa nuôi có tế bào. Dùng pipet hút 2 ml PBS sạch cho vào giếng nuôi, rửa sạch huyết thanh và tế bào chết. Dùng pipet hút 0,1 ml trypsin cho vào đĩa nuôi. Lắc nhẹ, ủ trong vòng 5 phút. Hút 2 ml môi trường nuôi cấy vào đĩa tráng đều bề mặt đĩa nuôi có tế bào. Hút 0,1 ml môi trường đếm mật độ, phần còn lại tiếp tục nuôi.

Xác định mật độ tế bào bằng buồng đếm Neubauer

Rửa sạch buồng đếm và lamelle bằng nước cất, bằng cồn rồi để khô. Đặt 1 miếng lamelle lên trên buồng đếm. Lấy 100µl dịch huyền phù tế bào cho vào một eppendorf, bổ sung 900µl thuốc nhuộm

trypan blue 0,4% vào eppendorf, trộn đều, rồi hút dịch cho vào buồng đếm. Đếm tế bào trong 5 ô vuông lớn.

$$\text{Mật độ tế bào trong 1ml } C = N \times d \times 5 \times 10^4$$

C: số tế bào trong 1ml dịch nuôi

N: số tế bào đếm trong 5 ô lớn

d: nồng độ pha loãng

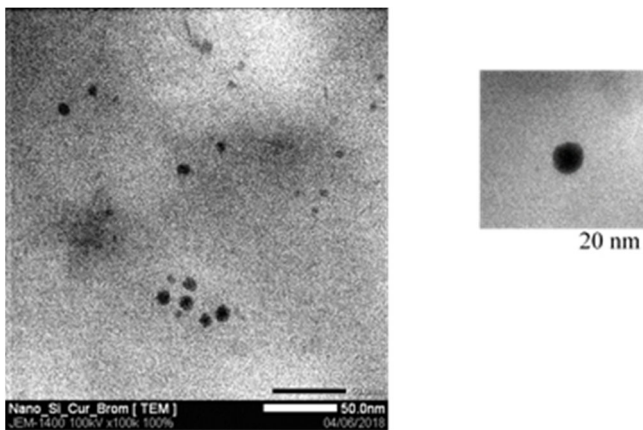
2.2.6 Phương pháp xử lý số liệu

Các thực nghiệm đếm mật độ được tiến hành lặp lại 5 lần. Số liệu thu nhận được xử lý bằng phần mềm Statgraphics Centurion 15.1 tính toán thống kê sai số chuẩn, độ khác biệt có ý nghĩa nhỏ nhất ở mức ý nghĩa 95% bằng phương pháp phân tích phương sai ANOVA

3 KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

3.1 Tạo hạt phức hợp nanosilica – curcumin – bromelain từ phương pháp đánh siêu âm

Dựa trên quy trình 2.1, đã tạo thành công hạt phức hợp nanosilica – curcumin – bromelain có kích thước từ 10 – 100 nm được chụp dưới kính hiển vi điện tử truyền qua như Hình 1. Hình ảnh hạt so sánh với Fu *et al.* (2013) chưa đạt được hình ảnh rõ ràng của cấu trúc vô lõi. Tuy nhiên vẫn có thể nhìn thấy sự kết hợp các chất và vỏ silica phát sáng bao bọc.



Hình 1: Ảnh hiển vi điện tử truyền qua của hạt nano silica – curcumin – bromelain

3.2 Thử nghiệm hoạt tính phức hạt nanosilica – curcumin – bromelain trên dòng tế bào nguyên bào sợi thu nhận từ chuột nhắt trắng

Từ mẫu chuột nhắt trắng mang bầu 13 đến 18 ngày tuổi, tiến hành thu nhận tế bào đơn bằng phương pháp tách trypsin ấm. Lượng tế bào thu được sau tách trypsin đếm trên buồng đếm hồng cầu, tính toán và xử lý thống kê ANOVA với độ tin cậy 95% nhận được kết quả là $26,6 \pm 3,56 \times 10^4$ tế

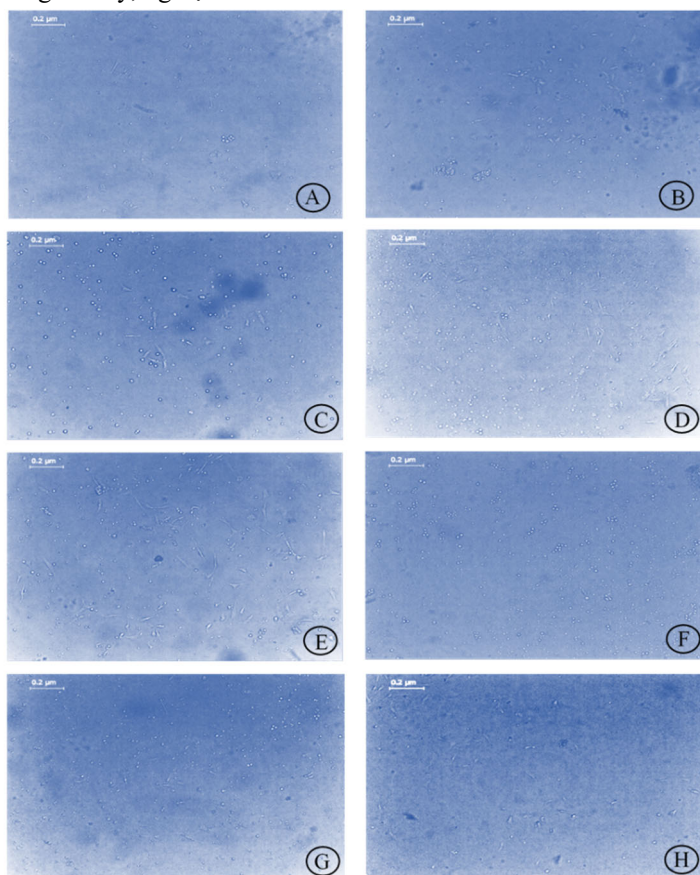
bào/gam mô. Mẫu thu nhận nuôi trong môi trường DMEM bổ sung 15% FBS và 1% anti.

Sau hai lần cấy chuyển như Hình 2, tiến hành phân lô thử nghiệm với nồng độ phức hợp 2,5%; 5%; 7,5%; 10%. Theo dõi và quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 10X ở các mốc thời gian 24h, 48h, 72h, 96h.

Sau 24h (Hình 2), cho kết quả hầu hết tế bào ở các mẫu thử nghiệm đều bám dính và bắt đầu lan.

Có sự khác biệt nhiều ở Hình 2E, hình ảnh nguyên bào sợi nuôi cấy trong môi trường khảo sát có chứa 5% bromelain, các tế bào kết tụ và không xuất hiện hình ảnh bám dính. Hình ảnh nguyên bào sợi của mẫu khảo sát curcumin đơn là bám dính tốt nhất, lan dài và đều bề mặt. Với những nghiệm thức còn lại, sự sai khác về mặt hình ảnh chưa đánh giá được. Sau 72h, trong môi trường chứa 5% bromelain đơn (Hình 3F), tế bào có hiện tượng chết dần tạo rất nhiều huyền phù trong giếng nuôi. Tất cả tế bào đều co tròn và trôi trong môi trường nuôi cấy. Theo mô tả của Kathrin *et al.* (2013), bromelain làm giảm đáng kể lượng myofibroblast, điều này có lợi trong việc giảm sẹo vết thương, kết quả hình ảnh nghiệm thức F phù hợp với điều này. Nghiệm thức A – 2,5% phức hợp 3 chất cũng có xuất hiện nhiều huyền phù trong môi trường nuôi cấy. Tế bào có hiện tượng chết dần. Tại mốc thời gian này, nghiệm thức C và

H cho kết quả tế bào tiếp tục phát triển tốt hơn các nghiệm thức còn lại. Tế bào sáng, lan đều và chia nhánh tăng sinh nhiều. Ở nghiệm thức H (Hình 3H), tế bào già hóa nhanh hơn so với Hình 5C. Nghiệm thức D – 10% phức hợp 3 chất những mốc thời gian trước phát triển rất tốt, nhưng đến thời điểm 72h (Hình 3D) tế bào chậm tăng trưởng, có nhiều tế bào yếu, co tròn không bám dính trên bề mặt nuôi cấy. Nghiệm thức G – 5% curcumin, hình ảnh cho kết quả tế bào tăng sinh chậm lại, tế bào lan dài nhưng hẹp và yếu. Có thể xác định nghiệm thức C – 7,5% nồng độ phức hợp 3 chất phát triển ổn định. Bám dính tốt qua các mốc thời gian không có sự suy giảm như nghiệm thức D và không già hóa nhanh như nghiệm thức H. Đến thời điểm 96h thể hiện rõ sự tối ưu của nồng độ 7,5% hoạt chất so với những nghiệm thức khác.



Hình 2: Hình ảnh tế bào nguyên bào sợi nuôi cấy trong những môi trường đánh giá khác nhau lúc 24 giờ

A;B;C;D: Nồng độ nanosilica- curcumin- bromelain 2,5%;5%;7,5%;10%;

E: Nồng độ nano silica – curcumin 5%; F: Nồng độ bromelain 5%; G: Nồng độ curcumin 5%;

H: Không có thử nghiệm hoạt chất

Mật độ tế bào được đếm dưới buồng đếm hồng cầu và tính toán xử lý thống kê ANOVA với độ tin

cậy 95% trình bày trong bảng sau:

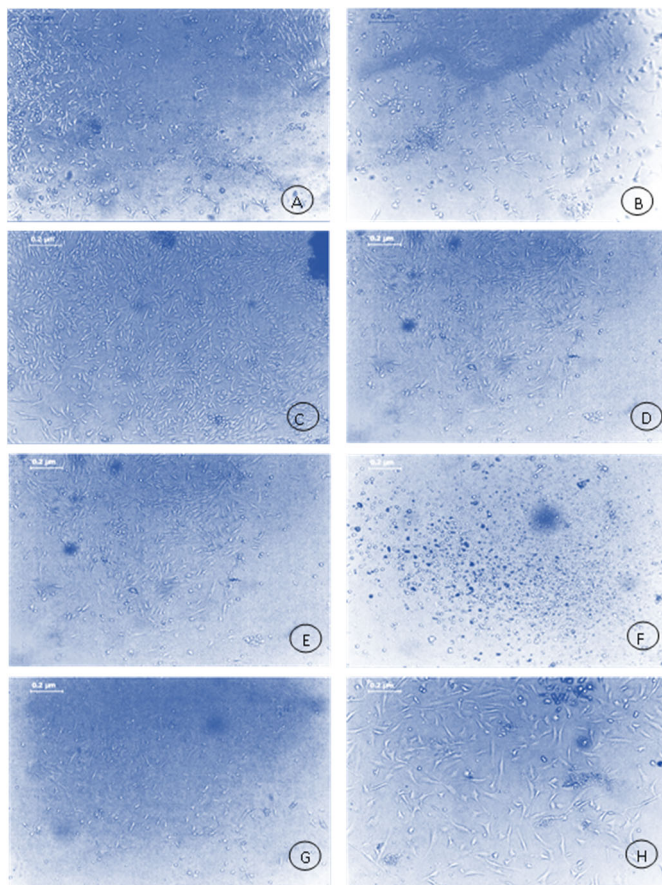
Bảng 1: Mật độ tế bào nguyên bào sợi ($\times 10^4$ TB/ml) qua các mốc thời gian

Thời gian	Nghiệm thức							
	A	B	C	D	E	F	G	H
24h	34,17 ^a ± 5,72	25,28 ^{cb} ± 6,06	28,06 ^{cba} ± 2,45	26,06 ^{cb} ± 2,94	23,56 ^c ± 4,80c	30,72 ^{ba} ± 5,85	25,72 ^{cb} ± 2,75	30,17 ^{ba} ± 2,63
48h	40,33 ^{cb} ± 2,21	42,83 ^{cba} ± 5,38	42,00 ^{cba} ± 7,59	43,61 ^{cba} ± 12,76	46,83 ^{ba} ± 6,13	35,17 ^c ± 5,38	36,61 ^{cb} ± 6,55	51,72 ^a ± 6,56
72h	39,00 ^{cb} ± 8,34	43,39 ^{cb} ± 2,87	86,11 ^a ± 22,72	77,22 ^a ± 32,65	81,44 ^a ± 23,13	29,78 ^c ± 12,69	61,17 ^{ba} ± 9,46	80,44 ^a ± 24,94

A;B;C;D: Nồng độ nanosilica- curcumin- bromelain 2,5%;5%;7,5%;10%;

E: Nồng độ nano silica – curcumin 5%; F: Nồng độ bromelain 5%; G: Nồng độ curcumin 5%;

H: Không có thử nghiệm hoạt chất



Hình 3: Hình ảnh tế bào nguyên bào sợi nuôi cấy trong những môi trường đánh giá khác nhau lúc 72 giờ

A;B;C;D: Nồng độ nanosilica- curcumin- bromelain 2,5%;5%;7,5%;10%;

E: Nồng độ nano silica – curcumin 5%; F: Nồng độ bromelain 5%; G: Nồng độ curcumin 5%;

H: Không có thử nghiệm hoạt chất

Sau 24h, nghiệm thức F – 5% bromelain, A – 2,5% phức hợp 3 chất, C – 7,5% phức hợp 3 chất, H – không sử dụng hoạt chất có mật độ tế bào cao như nhau. Mật độ tế bào nghiệm thức B – 5% phức hợp 3 chất, D – 10% phức hợp 3 chất, E – 5% phức hợp hai chất, G – 5% curcumin có mật độ tương đồng nhau và thấp hơn.

Sau 72h, nghiệm thức F có mật độ tế bào giảm nhiều và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại. Kết quả này tương thích với đánh giá bằng hình ảnh dưới kính hiển vi. Mật độ của nghiệm thức C, D, E, H cao như nhau cho thấy sự tăng sinh như nhau của các nghiệm thức này sau 72h nuôi cấy thử nghiệm.

Khi so sánh sự tăng trưởng của nguyên bào sợi trong các môi trường nuôi được bổ sung và điều chỉnh theo từng nồng độ được liệu, đối chứng cho thấy khi bổ sung với nồng độ 7,5% lượng phức hợp 3 chất nanosilica – curcumin – bromelain thì tế bào phát triển tốt, tăng trưởng ổn định. Sự trao đổi chất của tế bào được gia tăng lên đáng kể theo thời gian khảo sát được đánh giá bằng cách quan sát hình thái và đếm bằng buồng đếm hồng cầu cho kết quả mật độ của nồng độ tối ưu là cao nhất sau 72h (Bảng 1). Sự kết dính, bám dính và lan rộng của tế bào sau khi quan sát dưới kính hiển vi Leica với độ phóng đại 10X thể hiện sự tương thích của hoạt chất cùng sự cộng hưởng của bromelain và curcumin ở nồng độ 7,5%. Khi so sánh với mô tả về khả năng kết dính của nano silica đã nghiên cứu Nguyễn Thị Liên Thương (2017), khả năng kháng viêm, kháng khuẩn và cắt mô bông cấp độ ba, tăng cường khả năng hấp thụ thuốc của bromelain. Như mô tả của Steven (1988) cũng như kết quả về tối ưu hạt nanosilica –

curcumin trong nghiên cứu tiền đề thì kết quả nghiên cứu trên đây chứng minh được những tác dụng sinh học của các chất trong phức hợp và sự tối ưu tác dụng khi các chất được kết hợp với nhau ở dạng cực nhỏ 10-100 nm giúp tế bào nguyên bào sợi tăng trưởng và phát triển ổn định. Là cơ sở phân tích, chứng minh khả năng làm lành vết thương tối ưu của phức hợp nanosilica – curcumin – bromelain.

3.3 Thử nghiệm ảnh hưởng của nanosilica – curcumin – bromelain trong làm lành vết thương ở mô hình động vật

Sau 21 ngày quan sát và theo dõi mẫu đánh giá *in vivo* trên chuột bằng cách gây bông nóng và điều trị bằng 5 nghiệm thức khác nhau: A: đối chứng âm (không điều trị), B: đối chứng dương (kem nghệ Thorakao), C: đối chứng vaseline, D: hợp chất nano silica – curcumin, E: hợp chất nanosilica- curcumin- bromelain. Đường kính trung bình vết thương ban đầu khoảng 1,03cm.

	Đối chứng âm (A)	Kem nghệ Thorakao (B)	Vaseline (C)	Nanosilica-curcumin (D)	Nanosilica-curcumin-bromelain (E)
0 ngày					
6 ngày					
12 ngày					
18 ngày					
21 ngày					

Hình 4: Kết quả *in vivo* theo thời gian

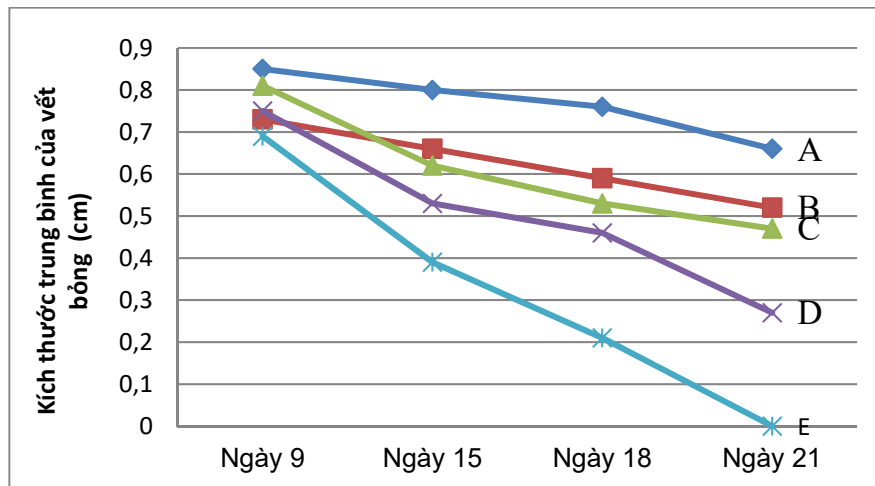
5 nghiệm thức khác nhau: A: đối chứng âm (không điều trị), B: đối chứng dương (kem nghệ Thorakao), C: đối chứng vaseline, D: hợp chất nano silica – curcumin, E: hợp chất nanosilica- curcumin- bromelain

Bảng 2: Kích thước trung bình của vết bỏng đánh giá sau 21 ngày điều trị với 5 nghiệm thức (cm) qua các mốc thời gian

Nghiệm thức	Ngày có tác động khác biệt			
	Ngày 9	Ngày 15	Ngày 18	Ngày 21
A	0,85 ^d ± 0,006	0,80 ^d ± 0,001	0,76 ^c ± 0,017	0,66 ^d ± 0,053
B	0,73 ^{ab} ± 0,031	0,66 ^c ± 0,053	0,59 ^b ± 0,012	0,52 ^c ± 0,029
C	0,81 ^{bc} ± 0,031	0,62 ^c ± 0,066	0,53 ^b ± 0,029	0,47 ^c ± 0,042
D	0,75 ^{ab} ± 0,030	0,53 ^b ± 0,052	0,46 ^b ± 0,017	0,27 ^b ± 0,065
E	0,69 ^a ± 0,079	0,39 ^a ± 0,011	0,21 ^a ± 0,179	0,00 ^a ± 0,0
F	*	*	*	*

Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ở mức 1% (*) và có chiều hướng tác động giảm dần từ a đến d

5 nghiệm thức khác nhau: A: đối chứng âm (không điều trị), B: đối chứng dương (kem nghệ Thodakao), C: đối chứng vaseline, D: hợp chất nano silica – curcumin, E: hợp chất nanosilica- curcumin- bromelain



Hình 5: Biểu đồ đánh giá kích thước (cm) vết thương thay đổi theo các mốc thời gian trong 21 ngày điều trị với 5 nghiệm thức

Đánh giá mức độ nhiễm khuẩn

Sau khi tiến hành gây vết thương bỏng, bằng phương pháp bỏng nóng trên lô chuột gồm 5 con cho một thực nghiệm, cả 5 mẫu đều có hiện tượng viêm nhẹ, đáy vết bỏng màu đỏ, có dịch nốt bỏng đục, đám da lõm hơi nông có hiện tượng hoại tử (hoại tử ít) sau 3 đến 6 ngày. Thử cảm giác vùng bỏng vẫn cho thấy chuột có phản ứng còn đau, chưa mất hoàn toàn cảm giác. Đối chiếu theo chỉ tiêu phân loại cấp độ bỏng, vết bỏng được tiến hành khảo sát cho 5 nghiệm thức nằm ở mức độ bỏng trung bình (bong độ II sâu).

Từ 9 đến 12 ngày tiếp theo, quan sát thấy mẫu đối chứng có hiện tượng đóng mòi dày và nhiễm khuẩn nặng hơn so với bốn mẫu còn lại. Miệng vết bỏng của 4 mẫu B, C, D, E bắt đầu khô dần và có sự bong tróc mòi. Tuy nhiên, mẫu D và E có sự nổi trội hơn.

Điều này cho thấy mức độ kháng khuẩn các thành phần như: curcumin, bromelain, silica,

vaseline tác động đến quá trình lành vết thương. So sánh mức độ kháng khuẩn của A, B, C, D, E cho thấy D và E kháng khuẩn tốt nhất. Những mẫu B, C cũng kháng khuẩn khá tốt so với mẫu A.

Đánh giá mức độ kháng thuốc

Các mẫu B, C, D, E đều cho thấy vết bỏng hồi phục bình thường, không có hoại tử nặng. Chuột sống bình thường, nhiệt độ cơ thể ổn định, không có hiện tượng tăng động, stress hay bỏ ăn. Điều này cho thấy các vật liệu điều trị đều không gây hiện tượng kháng thuốc trên chuột.

Đánh giá mức độ hồi phục vết bỏng

Quan sát miệng vết thương của các mẫu trong 6 ngày đầu mẫu E có hiện tượng tróc mòi trắng, diện tích của các mẫu gần như nhau. Cho đến ngày thứ 9 hầu hết các vết bỏng đều có hiện tượng kéo mòi và khép miệng vết thương lại khoảng 0,8-1,0cm ngoại trừ mẫu A có kích thước khá lớn là 1,02 cm, diện tích vết bỏng gần như không đổi so với 9 ngày trước đó.

Qua 15 ngày thử nghiệm, sự thay đổi và chênh lệch rõ rệt giữa các mẫu thử nghiệm. Mẫu A đã hết viêm nhiễm và tróc mài, bắt đầu giai đoạn tái tạo da để hình thành sẹo tuy nhiên là mẫu có quá trình lành vết thương chậm nhất. Trong nghiệm thức này, mẫu D và E vẫn tiếp xúc có quá trình lành vết thương khá tốt, E là vượt trội hơn hẳn vì đã tróc hẳn mài và miệng vết bỏng được tái tạo ổn định, không xuất hiện sẹo lồi, sẹo lõm, sẹo phì đại. Qua đó cho thấy sự xuất hiện của bromelain tác động rất tốt đến quá trình tái tạo nguyên bào sợi một cách ổn định.

Sau 18 ngày điều trị, mẫu E sử dụng hỗn hợp nanosilica- curcumin- bromelain cho thời gian điều trị nhanh nhất, diện tích vết bỏng giảm nhanh, độ kháng khuẩn tốt nhất, không hề xuất hiện hiện tượng kháng thuốc, đặc biệt mẫu E có quá trình liền sẹo tương đối ổn định và nhanh nhất trong 5 mẫu thử nghiệm. Mẫu D sử dụng nanosilica – curcumin có mức độ lành vết thương cũng như kháng khuẩn tốt, tuy nhiên so với mẫu E thì thời gian và mức độ liền sẹo vẫn còn hạn chế. Hai mẫu đối chứng B và C đều kháng khuẩn và thúc đẩy quá trình lành vết thương nhưng thời gian hồi phục vẫn không khác nhiều so với mẫu đối chứng âm (không điều trị).

Kết quả của ngày thứ 21, mẫu E và D đã gần như bình phục, lông mọc đều trên miệng vết thương cũ, mẫu D vết sẹo có phần rõ hơn so với mẫu E.

Ở điều kiện bình thường khả năng hòa tan của curcumin trong nước kém làm hạn chế hoạt tính sinh học, nên khi sử dụng curcumin như truyền thống sẽ không phát huy hết tác dụng (Anand *et al.*, 2007). Quá trình tăng sinh quá nhanh của các nguyên bào sợi sinh ra nhiều nguyên bào sợi là nguyên nhân chính gây ra sẹo lồi, sẹo lõm, sẹo phì đại gây mất thẩm mỹ trong quá trình điều trị bỏng, việc sử dụng bromelain bổ sung vào hợp chất dẫn được hỗ trợ cho quá trình làm lành vết thương và ổn định sự tái tạo của tế bào nguyên bào sợi hạn chế sẹo cho việc điều trị (Roxana, 2007), hơn thế nữa tác dụng cộng hưởng của bromelain và curcumin trong việc xúc tác hoạt tính của curcumin làm tăng khả năng trong quá trình điều trị.

Nanosilica là vật liệu nanocompozit, chúng là các quả cầu rỗng có khả năng tan tốt trong nước và tạo thành lớp màng bảo vệ nhưng không có tác dụng điều trị sinh lý, chính vì thế khi sử dụng đơn thuần nanosilica không tạo hiệu quả trong điều trị bỏng (Jegan *et al.*, 2015). Các hạt nanosilica là chất nền bắt giữ curcumin và bromelain giúp chúng được phân tán đồng đều và được giữ cố định trên bề mặt các hạt nanosilica, từ đó nhờ nanosilica mà curcumin và bromelain có khả năng hòa tan tốt trong nước, đồng thời không bị kết tụ. Kết quả điều trị từ hạt nano hỗn hợp tốt, chứng tỏ các hạt nano phức

hợp đã bắt giữ tốt curcumin và bromelain, đồng thời cũng không mất đi hoạt tính curcumin và bromelain trong quá trình đánh sóng siêu âm. Hạt phức hợp nanosilica – curcumin – bromelain là sự kết hợp ưu điểm cũng như khắc phục nhược điểm của từng chất curcumin, bromelain và nanosilica.

4 KẾT LUẬN

Đề tài đã tạo thành công hạt phức hợp nanosilica – curcumin – bromelain đạt kích thước từ 10 – 100 nm và kiểm tra được hoạt tính bromelain vẫn có tác dụng đồng tụ sữa. Đã tiến hành thử nghiệm hoạt tính phức hợp nanosilica – curcumin – bromelain với 8 nghiệm thức bao gồm 4 mẫu khảo sát với các nồng độ khác nhau và 4 mẫu đối chứng lên dòng nguyên bào sợi thu nhận từ chuột nhắt trắng. Qua thực nghiệm, kết luận được ở nồng độ 7,5% hoạt chất là tối ưu cho khả năng tăng sinh và bám dính của tế bào nguyên bào sợi đánh giá qua mật độ đếm trên buồng đếm hồng cầu và hình ảnh dưới kính hiển vi tiêu cự 10X. Tiến hành thử nghiệm ảnh hưởng của nanosilica – curcumin – bromelain trong làm lành vết thương ở mô hình động vật (chuột nhắt trắng - *Mus musculus* var. Albino). Bằng phương pháp gây bỏng nhiệt trên 5 lô mẫu tương ứng với 5 nghiệm thức điều trị. Sau 18 ngày, đánh giá ở mẫu điều trị bằng hạt phức hợp nanosilica – curcumin – bromelain là có thời gian lành nhanh nhất, miệng vết thương đóng và không để lại sẹo quá rõ. Đến ngày 21 mẫu được điều trị bằng nanosilica – curcumin – bromelain đã bắt đầu mọc lông tại miệng vết thương cũ và vết sẹo gần như không thấy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anand, P., Kunnumakkara, B. and Robert, A., et al., 2007. Bioavailability of Curcumin problems and promises. *Mol. Pharm* 4(6): 807-818.
- Gao, Y., Li Z. and Sun, M., et al., 2011. Preparation and characterization of intravenously injectable curcumin nanosuspension. *Drug delivery* 18(2): 131-142.
- Jegan, A, Periasamy, V. S. and Alhazmi M., et al., 2015. Synthesis of biogenic silica nanoparticles from rice husks for biomedical applications. *Ceramics international* 41(1): 275-281.
- Kathrin, A., Bubel, M. and Deubel, G., et al., 2013. Bromelain down-regulates myofibroblast differentiation in an in vitro wound healing assay. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 386(10): 853-863.
- Yallapu, Murali. M., Maher., et al., 2010. Curcumin induces chemo/radio-sensitization in ovarian cancer cells and Curcumin nanoparticles inhibit ovarian cancer cells growth. *Journal of Ovarian Research* 3(1): 11.
- Nguyễn Thị Liên Thương, Đặng Huỳnh Thanh Tâm và Phan Bách Thắng, 2017. Bước đầu nghiên

- cứu thành công keo dán vết thương từ vật liệu nano tại Việt Nam. Tạp chí ISBG: 9-11-2017
- Phan Kim Ngọc và Phạm Văn Phúc, 2007. Công nghệ sinh học trên người và động vật, xuất bản lần thứ 3. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, 896.
- Roxana, B., 2007. In vivo Antitumoral of stem pineapple (*Ananas comosus*) Bromelain. *Planta medica* 73(13): 1377-1383.
- Steven, J., Taussig and Stanley Batkin, 1988. Bromelain, the enzyme complex pineapple (*ananas comosus*) and its clinical application. *Journal of ethnopharmacology* 22(2): 191-203.
- Shu Yang, Huile Gao, 2017. Nanoparticles for modulating tumor microenvironment to improve drug delivery and tumor therapy. *Pharmacological research* 126(4): 97-108.
- Y. Barenholz, 2012. Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 160(2): 117-134.