

INVESTIGATION OF SCAR TREATMENT EFFECTIVENESS OF THERMAL-RESPONSIVE GEL CONTAINING CURCUMIN-ENCAPSULATED LIPOSOMES

Nguyen Minh Hiep*

Dalat Nuclease Research Institute

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 13/02/2022 Revised: 08/4/2022 Published: 13/4/2022	This study aims to evaluate scar treatment effectiveness of thermal-responsive gel containing curcumin-encapsulated liposome (GelTM-Lip-CUR). Firstly, Lip-CUR was prepared using a combined method of lipid-film hydration and sonication. GelTM-Lip-CUR was prepared from F127 and PVA. Scar treatment effectiveness of Lip-CUR and Gel-Lip-CUR was carried out using mice <i>Mus. musculus var. Albino</i>. The results indicated that Lip-CUR was successfully prepared with mean particle size, polydispersity index, zeta potential, encapsulation efficiency, payload of 229.6 nm, 0.245, -26.6 mV, 90.2%, 8.1%, respectively. In addition, the results also showed that Lip-CUR was stable under storage conditions. GelTM-Lip-CUR was liquid at a temperature of lower than 25°C and gelled at body temperature. The <i>in vivo</i> results on mice <i>Mus. musculus var. Albino</i> indicated that, scar treatment efficiency of Lip-CUR was higher than that of native CUR, and achieved the highest efficiency at CUR concentration of 0.01 mg/mL. Moreover, GelTM-Lip-CUR exhibited a significant better scar treatment effect compared to Lip-CUR, with the optimal CUR concentration of 0.05 mg/mL. The results of histological analysis indicated that the tissue structure at the scar area of GelTM-Lip-CUR at a CUR concentration of 0.05 mg/mL was nearly fully recovered to normal. Therefore, GelTM-Lip-CUR has a great potential to be widely applied in scar treatment.
KEYWORDS Curcumin Liposome Gel Scar treatment Thermal responsive	

KHẢO SÁT HIỆU QUẢ ĐIỀU TRỊ Sẹo CỦA GEL THÔNG MINH NHẠY NHIỆT CHỨA LIPOSOME ĐÓNG GÓI CURCUMIN

Nguyễn Minh Hiệp

Trung tâm Công nghệ bức xạ và Công nghệ sinh học - Viện Nghiên cứu Hạt nhân

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 13/02/2022 Ngày hoàn thiện: 08/4/2022 Ngày đăng: 13/4/2022	Nghiên cứu nhằm mục đích đánh giá khả năng điều trị sẹo của gel thông minh nhạy nhiệt chứa liposome đóng gói curcumin (GelTM-Lip-CUR). Đầu tiên, Lip-CUR được tổng hợp bằng phương pháp hydrate hóa màng lipid kết hợp với sóng siêu âm để giảm kích thước. GelTM chứa Lip-CUR được điều chế từ Pluronic F127 và PVA. Hiệu quả điều trị sẹo của Lip-CUR và GelTM-Lip-CUR được thực hiện trên chuột nhắt trắng. Kết quả thực nghiệm cho thấy, Lip-CUR đã được tổng hợp thành công với kích thước hạt, chỉ số phân tán, thể zeta, hiệu suất đóng gói, sức tải lần lượt là 229,6 nm, 0,245, -26,6 mV, 90,2%, 8,1% và có độ bền tương đối cao. GelTM-Lip-CUR có trạng thái lỏng ở nhiệt độ thấp hơn 25°C và trạng thái gel khi tiếp xúc với nhiệt độ cơ thể. Kết quả khảo sát trên chuột nhắt trắng cho thấy, Lip-CUR cho hiệu quả điều trị sẹo tốt hơn rất nhiều so với CUR dạng thô. Hơn nữa, GelTM-Lip-CUR cho hiệu quả điều trị sẹo tốt hơn Lip-CUR và đạt hiệu quả điều trị tốt nhất ở nồng độ CUR 0,05 mg/mL. Kết quả phân tích mô học cho thấy cấu trúc mô da vùng sẹo của nghiệm thức GelTM-Lip-CUR ở nồng độ CUR 0,05 mg/mL đã hồi phục gần như hoàn toàn; từ đó cho thấy tiềm năng ứng dụng thực tiễn to lớn của GelTM-Lip-CUR trong lĩnh vực điều trị sẹo.
TỪ KHÓA Curcumin Điều trị sẹo Gel Liposome Nhạy nhiệt	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5537>

Email: jackminhhiep@yahoo.com

<http://jst.tnu.edu.vn>

117

Email: jst@tnu.edu.vn

1. Giới thiệu

Ở người, đa phần các vết thương đều hình thành sẹo ở các mức độ khác nhau, phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: tuổi tác, cơ địa, loại da,... [1]. Sẹo gây mất tự tin, ảnh hưởng tới tâm lý của người bị sẹo. Sẹo càng để lâu thì việc điều trị càng khó khăn, nên việc điều trị sẹo cần được thực hiện càng sớm càng tốt [2]. Hiện nay, có hai phương pháp cơ bản giúp điều trị sẹo bao gồm phương pháp xâm lấn (phẫu thuật, tiêm, laser,...) và phương pháp không xâm lấn (điều trị bởi các loại thuốc điều trị sẹo ở dạng bôi) [3], [4]. Tuy nhiên, dù sử dụng phương pháp xâm lấn nhưng sau đó vẫn phải kết hợp sử dụng các chế phẩm chứa được chất để hạn chế tái phát sẹo [4].

Curcumin (CUR), một hợp chất polyphenol tự nhiên, chiếm tỉ lệ khoảng 2 – 6% trong củ nghệ [5]. Ngày nay, CUR được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi là nhờ vào khả năng hỗ trợ làm lành vết thương, điều trị sẹo, chống viêm, chống vi khuẩn, điều trị các bệnh mãn tính như ung thư, thần kinh, tim mạch,... [5], [6]. Tuy nhiên, việc ứng dụng của CUR còn nhiều hạn chế bởi độ tan nước rất thấp (khoảng 0,6 $\mu\text{g/mL}$), không bền ở môi trường trung tính và kiềm, độ thâm qua ruột kém và bị xếp vào nhóm IV của hệ thống Phân loại Sinh dược học [7].

Trong khi đó, nanoliposome (Lip) là một hệ mang nano có tính tương hợp sinh học cao nhất trong hơn 100 hệ mang nano đã được nghiên cứu và phát triển, do được cấu tạo từ lớp màng kép phospholipids (đôi khi có bổ sung thêm cholesterol), là thành phần chính của màng tế bào, nên không gây độc và không gây dị ứng đối với cơ thể [8]. Hệ Lip còn có thể đóng gói đồng thời cả những dược chất tan trong nước và tan trong dầu, giúp tăng độ phân tán trong nước của các dược chất tan trong dầu lên gấp hàng trăm, hàng ngàn lần, đồng thời giúp tăng khả năng thâm của dược chất vào bên trong mô/tế bào và giúp kiểm soát tốc độ phóng thích, từ đó kéo dài thời gian tác dụng và độ sinh khả dụng [8]. Do đó, việc đóng gói CUR vào bên trong hệ Lip sẽ hứa hẹn mang lại hiệu quả điều trị sẹo vượt trội do với việc sử dụng CUR ở dạng thô.

Bên cạnh đó, gel thông minh nhạy nhiệt (GelTM) là một dạng hydrogel có khả năng thay đổi trạng thái vật lý từ lỏng sang rắn (gel) khi môi trường có sự thay đổi đáng kể về nhiệt độ [9]. Trong đó, nhiệt độ gel của vật liệu sẽ dễ dàng được điều chỉnh bằng loại polymer sử dụng và tỉ lệ giữa các loại polymer trong hỗn hợp [9]. Việc ở dạng lỏng khi nhiệt độ thấp sẽ giúp cho chế phẩm (chứa dược chất) tiếp xúc hoàn toàn với bề mặt vết thương (kể cả vết thương lõm) và việc gel lại sau đó của chế phẩm khi ở nhiệt độ cơ thể sẽ vừa kết hợp được các ưu điểm của màng hydrogel (có khả năng giữ ẩm cho vết thương, tạo điều kiện thuận lợi cho các đại thực bào sản sinh collagenase và protease để loại bỏ các mô hoại tử [10], [11], giúp ngăn cản sự xâm nhập của các vi sinh vật gây hại từ bên ngoài để giảm sự viêm nhiễm [12], từ đó giúp hạn chế sự hình thành sẹo), vừa giúp cho các dược chất có thể dễ dàng tiếp xúc với toàn bộ bề mặt vết thương. Do đó, việc tạo ra gel thông minh nhạy nhiệt chứa Lip đóng gói CUR (GelTM-Lip-CUR) sẽ hứa hẹn cho ra một chế phẩm có hiệu quả cao trong điều trị sẹo.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu và hóa chất

Curcumin độ tinh khiết 95% (Alfa Aesar, Anh); Phospholipon 90G (Lipoid, Đức); Chloroform (J. T. Baker, Hoa Kỳ); Methanol (J. T. Baker, Hoa Kỳ); MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ); Pluronic F127 (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ); Polyvinyl alcohol (PVA) (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ); các hóa chất khác đều có độ tinh khiết ở mức độ phân tích.

2.2. Điều chế dịch phân tán Lip-CUR

Lip-CUR được tổng hợp bằng phương pháp hydrate hóa màng lipid kết hợp với phương pháp sử dụng sóng siêu âm [13]. Cụ thể, CUR và Phospholipon 90 (tỉ lệ 1:10, w/w) được hòa tan trong hỗn hợp dung môi hữu cơ gồm chloroform và methanol (tỉ lệ 2:1, v/v). Dung dịch hòa tan được cho vào bình cầu và tiến hành loại bỏ hoàn toàn dung môi bằng thiết bị cô quay chân không IKA

RV 06 trong thời gian 6 giờ ở 55°C để hình thành màng lipid (gồm phospholipon và CUR). Màng lipid được hydrate hóa bằng 40 mL nước cất trong 2 giờ trên hệ thống cô quay chân không IKA RV 06 (chỉ sử dụng chế độ quay) để tạo thành dịch phân tán Lip-CUR thô. Dịch phân tán Lip-CUR thô được giảm kích thước hạt bằng thiết bị Ultrasonic Liquid Processor với công suất 40%, thời gian 30 phút (đánh 7 phút, nghỉ 3 phút). Dịch phân tán được để yên 1 giờ ở nhiệt độ phòng, lọc qua màng lọc kích thước lỗ 1,2 µm để loại bỏ lượng CUR chưa được đóng gói vào trong hệ Lip. Dịch phân tán Lip-CUR này sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm sau.

2.3. Xác định các thông số đặc điểm của Lip-CUR

Kích thước hạt trung bình, chỉ số phân tán và thế zeta của dịch phân tán Lip-CUR được xác định bằng thiết bị Zeta Sizer Nano ZS (Malvern, UK). Cụ thể, dịch phân tán Lip-CUR được pha loãng 100 lần với nước cất và phép đo được thực hiện ở nhiệt độ 25°C, góc đo 173°.

Hình thái của Lip-CUR được xác định bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Cụ thể, 20 µL dịch phân tán Lip-CUR được nhỏ lên lưới đồng chuyên dùng cho TEM. Mẫu được để yên 20-30 giây. Sau đó, toàn bộ dịch phân tán sẽ được rút bỏ bằng giấy thấm. Rửa lưới đồng có chứa mẫu 2 lần bằng nước cất (lặp lại theo thao tác như trên). Mẫu được để khô qua đêm ở điều kiện nhiệt độ phòng trước khi được đưa vào thiết bị TEM để quan sát.

Hiệu suất đóng gói của Lip-CUR được xác định bằng công thức (1). Cụ thể, dịch phân tán Lip-CUR sau khi lọc qua màng lọc có kích thước lỗ 1,2 µm được hòa tan vào ethanol với tỉ lệ 1:100 (v/v). Nồng độ CUR trong dịch pha loãng được xác định bằng thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) (LC-20 AD, Shimadzu, Nhật Bản) với đầu dò UV-Vis SPD-20A, cột Vydac C18 (250 mm × 4,6 mm) (Hichrom, Vương Quốc Anh). Pha động là hỗn hợp ethanol và nước với tỉ lệ 95:5 (v/v), tốc độ dòng 1 mL/phút và bước sóng phát hiện là 423 nm [13].

$$\text{Hiệu suất đóng gói (\%)} = \frac{\text{Lượng CUR được đóng gói trong nanoliposome}}{\text{Tổng lượng CUR ban đầu (mg)}} \times 100 \quad (1)$$

Sức tải của Lip-CUR được xác định bằng công thức (2). Cụ thể, 5 mL dịch phân tán Lip-CUR (sau khi lọc qua màng lọc kích thước lỗ 1,2 µm) được cho vào lọ thủy tinh. Mẫu được cấp đông bằng nitơ lỏng và được tiến hành đông khô bằng thiết bị Freeze Dryer (IlshinBiobase, Hàn Quốc). Sau đó, 10 mg bột đông khô Lip-CUR được hòa tan vào trong 10 mL ethanol, trộn đều trong 3 phút và pha loãng 10 lần. Lượng CUR cũng được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với các điều kiện tiến hành tương tự như phần xác định hiệu suất đóng gói. Sau đó, nhân với độ pha loãng để xác định lượng CUR chứa trong một khối lượng xác định Lip-CUR.

$$\text{Sức tải (\%)} = \frac{\text{Lượng CUR có trong nanoliposome (mg)}}{\text{Khối lượng nanoliposome (mg)}} \times 100 \quad (2)$$

2.4. Khảo sát độc tính tế bào của Lip-CUR

Độc tính tế bào của Lip-CUR được khảo sát trên tế bào dòng nguyên bào sợi chuột 3T3 bằng phương pháp so màu MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) [14]. Cụ thể, sau khi nuôi cấy, nguyên bào sợi được cho vào đĩa nuôi cấy 96 giếng với mật độ tế bào khoảng 10⁴ tế bào/giếng có chứa môi trường DMEM. Sau khi nuôi cấy ở điều kiện 37°C, 5% CO₂ trong 24 giờ, môi trường DMEM cũ được thay mới và các chế phẩm cần khảo sát độc tính tế bào bao gồm: CUR dạng thô hòa tan trong DMSO và Lip-CUR được cho vào các giếng với các nồng độ khác nhau tương ứng với lượng CUR 0,25 mg/mL (nồng độ cao), 0,05 mg/mL (nồng độ trung bình) và 0,01 mg/mL (nồng độ thấp) và các giếng được ủ tiếp trong 24 giờ. Trong đó, giếng chỉ gồm tế bào và môi trường DMEM được sử dụng như là nghiệm thức đối chứng. Sau thời gian nuôi cấy, môi trường được hút loại bỏ và môi trường DMEM không có serum có chứa 100 µL của dung dịch MTT (nồng độ 0,5% trong PBS) được cho vào mỗi giếng và được ủ tiếp trong 4 giờ. Tính

thể Formazan hình thành ở mỗi giếng được hòa tan trong DMSO và được đo ở bước sóng 550 nm bằng thiết bị ELISA absorbance microplate reader (IRE 96, France). Tỷ lệ sống của tế bào được xác định bằng tỷ lệ phần trăm của giá trị OD của các nghiệm thức được xử lý chế phẩm so với giá trị OD của nghiệm thức đối chứng.

2.5. Tổng hợp gel thông minh nhạy nhiệt chứa Lip-CUR (GelTM-Lip-CUR)

GelTM-Lip-CUR được tạo thành từ Pluronic F127 và PVA theo phương pháp của Maria và cộng sự [9]. Cụ thể, PVA 15% (w/v) được hòa tan trong nước ở 60°C. Đồng thời, dung dịch F127 15% (w/v) cũng được khuấy tan ở nhiệt độ thường. Hệ gel được tạo ra bằng phương pháp phối trộn hai dung dịch theo tỷ lệ PVA/F127 là 3/1 (v/v). Lip-CUR được đưa vào hệ gel với nồng độ CUR là 0,1, 0,05 và 0,01 mg/mL để cho ra các GelTM-Lip-CUR với các nồng độ CUR tương ứng.

2.6. Khảo sát hiệu quả điều trị sẹo của Lip-CUR và GelTM-Lip-CUR trên chuột nhắt trắng

Vết thương được tạo theo quy trình đã được mô tả ở nghiên cứu của Zhao và cộng sự [15]. Cụ thể, chuột bạch có cân nặng từ 18 – 22 g được gây mê bằng dung dịch ketamine với liều lượng 2 mg/kg trọng lượng cơ thể. Phần lông chuột ở lưng được loại bỏ và vết thương dạng hình tròn có đường kính khoảng 8 mm được tạo bằng thiết bị chuyên dụng. Phân lô chuột theo các nghiệm thức (ít nhất 6 con chuột/nghiệm thức), bao gồm:

- Nghiệm thức đối chứng (-): vết thương không được xử lý CUR (để vết thương tự lành).
- Nghiệm thức đối chứng (+): vết thương được xử lý bằng CUR dạng thô pha trong nước với nồng độ 0,25 mg/mL.
- Nghiệm thức xử lý vết thương bằng Lip-CUR ở các nồng độ CUR khác nhau (0,005 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,05 mg/mL và 0,1 mg/mL).
- Nghiệm thức xử lý vết thương bằng GelTM không chứa Lip-CUR.
- Nghiệm thức xử lý vết thương bằng GelTM-Lip-CUR ở các nồng độ CUR khác nhau (0,01 mg/mL, 0,05 mg/mL và 0,1 mg/mL).

Boi chế phẩm cho chuột mỗi ngày hai lần, cho chuột ăn và uống nước hằng ngày. Sự hình thành sẹo được đánh giá vào ngày thứ 22 khi cấu trúc của các vết sẹo tương đối ổn định [16]. Mức độ hình thành sẹo được đánh giá bằng cảm quan (đo kích thước bằng thước kỹ thuật và quan sát bằng mắt).

Ngoài ra, cấu trúc sẹo còn được đánh giá bằng phương pháp nhuộm collagen. Cụ thể, mẫu da chuột sau khi lấy ra khỏi cơ thể chuột được cố định ngay trong dung dịch formol 10%. Sau 5 ngày, mẫu được xử lý cắt lớp mỏng 3 μ m bằng thiết bị cắt mô lạnh Tissue-Tek Cryo3 B115 Microtome, cố định trên lame và nhuộm collagen theo phương pháp nhuộm Masson's trichrome. Đầu tiên, mẫu tiêu bản mô da được cố định trong dung dịch Bouin 15 phút. Sau đó, rửa dưới dòng nước chảy 5 phút và tiến hành nhuộm với Haematoxylin trong 10 phút. Mẫu tiêu bản sau khi nhuộm được rửa 5 phút bằng nước cất và cho vào Biebrich scarlet acid fuchsin 5 phút rồi rửa qua nước cất. Sau đó, đặt mẫu tiêu bản trong phosphotungstic acid 10 phút và aniline xanh thời gian là 5 phút, rửa lại với nước cất 3 lần. Cuối cùng, mẫu tiêu bản được để khô và dán lamen để quan sát dưới kính hiển vi.

2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Giá trị được trình bày bằng số trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn ($n \geq 3$), tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel. Đồ thị được vẽ bằng phần mềm Sigma Plot v12.0. One-way ANOVA với phép thử Duncan ($p < 0,05$) của phần mềm IBM SPSS Statistics software được sử dụng để đánh giá sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các số liệu trong **Bảng 2** (kích thước sẹo hình thành).

3. Kết quả và thảo luận

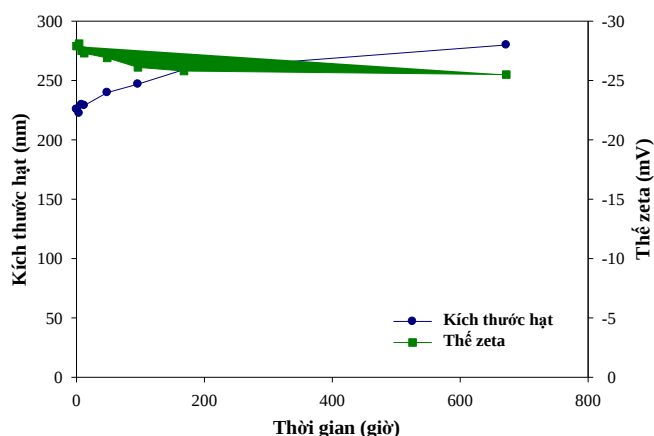
3.1. Tổng hợp Lip-CUR và Gel-Lip-CUR

Đầu tiên, Lip-CUR được tổng hợp bằng phương pháp hydrate hóa màng lipid kết hợp với sóng siêu âm để giảm kích thước [13]. Như trình bày ở Bảng 1, Lip-CUR đã được tổng hợp thành công với kích thước hạt trung bình khoảng 229 nm và chỉ số phân tán đạt giá trị là 0,245. Điều này chứng tỏ Lip-CUR có kích thước nano và các hạt nano trong dịch phân tán khá đồng đều nhau về mặt kích thước. Mặt khác, hiệu suất đóng gói và sức tải của Lip-CUR đạt lần lượt là 90,2% và 8,1%, thích hợp cho các thí nghiệm *in vivo* trên chuột nhắt trắng.

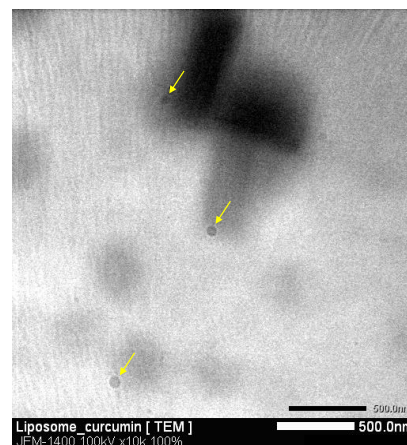
Bảng 1. Thông số đặc điểm của Lip-CUR ($n = 3$)

Kích thước hạt (nm)	Chỉ số phân tán	Thế zeta (mV)	Hiệu suất đóng gói (%)	Sức tải (%)
229,6 $\pm$ 7,2	0,245 $\pm$ 0,008	-26,6 $\pm$ 0,3	90,2 $\pm$ 0,4	8,1 $\pm$ 0,2

Bên cạnh đó, kết quả **Hình 1** cho thấy, kích thước hạt trung bình và thế zeta của Lip-CUR thay đổi rất ít sau 672 giờ ở nhiệt độ phòng, chứng tỏ dịch phân tán Lip-CUR tương đối ổn định. Điều này là do thế zeta của Lip-CUR đạt khoảng -26,6 mV (**Bảng 1**), mà theo các nghiên cứu trước đây, các hạt nano có trị tuyệt đối thế zeta lớn hơn 20 mV sẽ tạo được lực đẩy tĩnh điện đủ lớn giữa các hạt nano làm cho chúng khó kết hợp với nhau thành các hạt có kích thước lớn hơn, do đó sẽ có độ bền cao [17].



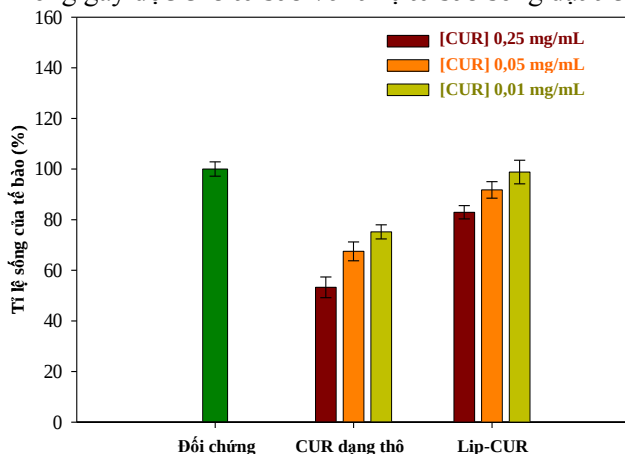
Hình 1. Sự thay đổi của kích thước hạt trung bình và thế zeta của Lip-CUR theo thời gian ở nhiệt độ phòng



Hình 2. Ảnh chụp TEM của Lip-CUR. Mũi tên màu vàng chỉ vị trí của Lip-CUR

Bên cạnh đó, ảnh chụp TEM (**Hình 2**) cho thấy, Lip-CUR có dạng hình cầu và đạt kích thước nano, góp phần chứng minh sự thành công trong việc tổng hợp Lip-CUR. Mặt khác, như trình bày ở **Hình 3**, việc xử lý bằng CUR dạng thô (hoà tan trong DMSO) ở nồng độ cao (0,25 mg/mL) cho tỉ lệ sống của nguyên bào sợi chuột 3T3 chỉ khoảng 53,27%. Việc giảm CUR xuống nồng độ thấp hơn (0,01 mg/mL) dẫn đến sự gia tăng tỉ lệ sống của nguyên bào sợi lên 75,18%. Điều này là do dung môi hòa tan của CUR là DMSO ở một mức độ nào đó cũng gây độc hoặc làm giảm sự phát triển tế bào [18]. Bên cạnh đó, đã có rất nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng CUR ở nồng độ thấp có thể kích thích sự phát triển của tế bào, tuy nhiên khi ở nồng độ cao lại ức chế sự phát triển hoặc gây độc cho tế bào [19]. Trong khi đó, khi xử lý CUR ở dạng Lip-CUR, tỉ lệ sống của tế bào cao hơn so với xử lý CUR dạng thô ở các nồng độ tương ứng. Cụ thể, ở nồng độ CUR 0,25 mg/mL và 0,05 mg/mL, tỉ lệ sống của tế bào ở nghiệm thức xử lý bằng Lip-CUR lần lượt là 82,9% và 91,8% (so với các giá trị 53,27% và 67,48% khi xử lý bằng CUR dạng thô ở các nồng độ tương ứng). Điều này có thể do hai nguyên nhân: *Một là*, DMSO dùng để hoà tan CUR trong nghiệm thức xử lý bằng CUR dạng thô tuy dùng ở nồng độ thấp nhưng ít nhiều cũng gây độc cho tế bào; *Hai là*, việc “đóng gói” CUR vào trong Lip-CUR sẽ giúp CUR phóng thích ra từ từ, từ đó không những giúp kéo dài thời gian tác dụng, mà còn giúp làm giảm độc tính của CUR lên tế bào

khi xử lý ở nồng độ cao. Điều này cũng khá tương đồng với nghiên cứu của Greenwald và cộng sự [20]. Kết quả ở Hình 3 cũng chỉ ra rằng, ở nồng độ CUR 0,01 mg/mL, Lip-CUR hầu như không gây độc cho tế bào với tỉ lệ tế bào sống đạt trên 98,5%.



Hình 3. Tỉ lệ sống của nguyên bào sợi chuột 3T3 khi được xử lý bằng CUR dạng thô và Lip-CUR ở các nồng độ CUR là 0,25 mg/mL, 0,05 mg/mL và 0,01 mg/mL



Hình 4. Trạng thái vật lý của GelTM-Lip-CUR theo nhiệt độ

Với mục đích nâng cao hiệu quả điều trị sẹo, Lip-CUR đã được đưa vào hệ gel thông minh nhạy nhiệt để tạo thành GelTM-Lip-CUR. Trong nghiên cứu này, GelTM được điều chế từ việc phối trộn giữa dung dịch F127 (15%, w/v) và PVA (15%, w/v) theo tỉ lệ 1/3 (v/v). Trong đó, PVA là một polymer tan trong nước có độ tương hợp sinh học cao và có khả năng tạo “gel thuận nghịch nhiệt độ” ở 19 - 20°C, và Pluronic F127, một vật liệu được nghiên cứu, sử dụng khá phổ biến để điều chế các hệ vận chuyển dược chất, có nhiệt độ gel khoảng 39°C ở nồng độ 15% (w/v) [9], [21]. Do đó, việc có mặt của F127 sẽ giúp nâng cao nhiệt độ gel của gel thông minh nhạy nhiệt làm từ hỗn hợp F127 và PVA, để phù hợp với thực tế lưu trữ và sử dụng. Như thể hiện ở Hình 4, GelTM-Lip-CUR ở dạng lỏng khi nhiệt độ dưới 25°C và gel lại khi nhiệt độ trên 25°C. Do đó, thích hợp cho các thí nghiệm và ứng dụng trên người và động vật đẳng nhiệt (nhiệt độ cơ thể thường trên 37°C).

3.2. Hiệu quả điều trị sẹo của GelTM-Lip-CUR

Hiệu quả điều trị sẹo của GelTM-Lip-CUR được đánh giá thông qua các kết quả đánh giá về cảm quan (Hình 5A), đo kích thước sẹo (Bảng 2) và phân tích mô học vùng sẹo (Hình 5B).

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, việc xử lý vết thương bằng CUR dạng thô (đối chứng (+)) tuy cho kích thước sẹo nhỏ hơn so với vết thương không được xử lý (đối chứng (-)), nhưng giá trị sai khác về kích thước sẹo là không đáng kể. Khi vết thương được xử lý bằng Lip-CUR ở nồng độ CUR từ 0,005 - 0,05 mg/mL thì kích thước sẹo đã nhỏ hơn đáng kể so với các nghiệm thức đối chứng. Đặc biệt, khi xử lý vết thương bằng Lip-CUR ở nồng độ CUR 0,01 mg/mL thì chiều dài sẹo và chiều rộng sẹo lần lượt chỉ còn 3,33 mm và 1,46 mm. Từ đó cho thấy, Lip-CUR đạt hiệu quả điều trị sẹo tối ưu ở nồng độ CUR này. Mặt khác, kết quả ở Bảng 2 cũng cho thấy, việc xử lý vết thương bằng Lip-CUR ở nồng độ CUR cao (0,1 mg/mL) lại cho hiệu quả điều trị sẹo thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng (+). Điều này có thể do ở nồng độ CUR cao, Lip-CUR lại gây độc cho các tế bào da (Hình 3), từ đó gây ảnh hưởng đến quá trình hình thành sẹo. Kết quả cũng cho thấy, việc xử lý vết thương bằng GelTM-Lip-CUR cho hiệu quả điều trị sẹo tốt hơn. Cụ thể, khi vết thương được xử lý bằng GelTM (không chứa Lip-CUR) đã cho hiệu quả điều trị sẹo cao hơn so với nghiệm thức đối chứng (-) và nghiệm thức đối chứng (+) với chiều dài sẹo và chiều rộng sẹo lần lượt là 3,87 mm và 1,90 mm. Điều này là do, khi GelTM tiếp xúc với cơ thể chuột (nhiệt độ cơ thể 37 – 38°C) thì sẽ gel lại nên đóng vai trò là một màng hydrogel giúp giữ ẩm cho

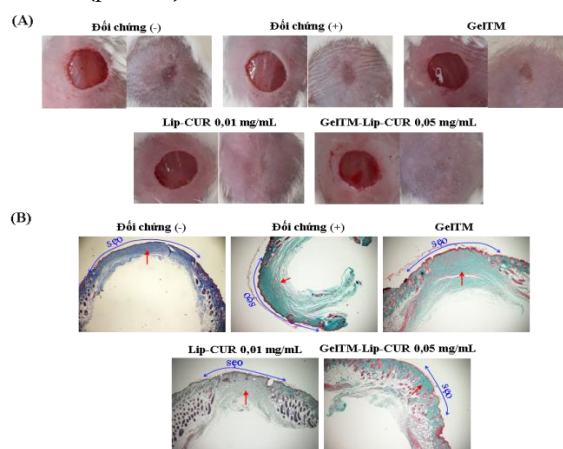
vết thương, tạo điều kiện thuận lợi cho các đại thực bào sản sinh collagenase và protease để loại bỏ các mô hoại tử, giúp ngăn cản sự xâm nhập của các vi sinh vật gây hại từ bên ngoài để giảm sự viêm nhiễm [10]-[12], từ đó giúp hạn chế sự hình thành sẹo. Đặc biệt, nghiệm thức xử lý bằng GelTM-Lip-CUR ở nồng độ CUR 0,05 mg/mL cho hiệu quả điều trị sẹo tốt hơn so với nghiệm thức Lip-CUR ở nồng độ CUR tối ưu (0,01 mg/mL) với kích thước sẹo nhỏ nhất (chiều dài sẹo: 2,81 mm và chiều rộng sẹo: 1,34 mm).

Mặt khác, kết quả đánh giá cảm quan (Hình 5A) cũng đã cho thấy, việc xử lý vết thương bằng Lip-CUR và GelTM-Lip-CUR ở nồng độ CUR tối ưu không những cho kích thước sẹo nhỏ nhất (Bảng 2), mà còn giúp cho sẹo hình thành mờ hơn so với các nghiệm thức đối chứng. Hơn thế nữa, kết quả phân tích mô học tại vị trí vết sẹo hình thành (Hình 5B) cũng cho thấy rằng, ở nghiệm thức đối chứng (-), nghiệm thức đối chứng (+) và nghiệm thức GelTM (không chứa Lip-CUR), cấu trúc mô vùng sẹo vẫn “bất thường” chỉ bao gồm các thành phần collagen, myofibroblast, mà thiếu đi các thành phần khác như nang lông, tế bào mỡ, tuyến bã nhờn, mạch máu,... [13]. Trong khi đó, hình ảnh mô học vùng sẹo của nghiệm thức xử lý bằng Lip-CUR ở nồng độ CUR 0,01 mg/mL cho thấy, cấu trúc mô vùng sẹo (mũi tên màu xanh dương trong hình nhuộm mô, Hình 5B) đã bắt đầu hồi phục với sự xuất hiện của các thành phần có trong mô da bình thường (như đề cập ở trên), tuy nhiên, cấu trúc vùng da bất thường (mũi tên màu đỏ) vẫn còn. Đặc biệt, hình ảnh mô học vùng sẹo khi vết thương được xử lý bằng GelTM-Lip-CUR ở nồng độ CUR 0,05 mg/mL cho thấy, tuy sẹo (mũi tên màu xanh dương trong hình nhuộm mô, Hình 5B) vẫn có kích thước nhất định (chiều dài: 2,81 mm và chiều rộng: 1,34 mm) nhưng cấu trúc mô vùng sẹo đã gần như hồi phục hoàn toàn, vùng cấu trúc mô “bất thường” (mũi tên màu đỏ) chỉ còn rất ít. Điều này cũng góp phần giải thích vì sao sẹo ở nghiệm thức này lại mờ nhất (Hình 5A).

Bảng 2. Thông số đặc điểm của Lip-CUR ($n \geq 6$)

	Đối chứng (-)	Đối chứng (+)	Lip-CUR				GelTM	GelTM-Lip-CUR		
			0,1 mg/mL	0,05 mg/mL	0,01 mg/mL	0,005 mg/mL		0,1 mg/mL	0,05 mg/mL	0,01 mg/mL
Chiều dài sẹo (mm)	4,84 ± 0,42 ^a	4,70 ± 0,77 ^a	4,82 ± 0,27 ^a	3,71 ± 0,33 ^{bc}	3,33 ± 0,21 ^c	3,83 ± 0,24 ^b	3,87 ± 0,28 ^b	3,31 ± 0,28 ^c	2,81 ± 0,29 ^d	3,47 ± 0,22 ^{bc}
Chiều rộng sẹo (mm)	2,02 ± 0,30 ^a	1,65 ± 0,29 ^{bc}	1,69 ± 0,18 ^{bc}	1,66 ± 0,14 ^{bc}	1,46 ± 0,13 ^{cd}	1,70 ± 0,21 ^{bc}	1,90 ± 0,23 ^{ab}	1,51 ± 0,19 ^{cd}	1,34 ± 0,17 ^d	1,57 ± 0,15 ^{cd}

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng 1 dòng chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng phương pháp One-way Anova, phép thử Duncan ($p < 0,05$)



Hình 5. Hiệu quả điều trị sẹo của GelTM-Lip-CUR trên chuột nhắt trắng. (A) Hình ảnh sẹo hình thành và (B) Hình ảnh phân tích mô học của mô vùng sẹo ở thời điểm 22 ngày. Độ dài mũi tên màu xanh dương chỉ độ dài vết sẹo, mũi tên màu đỏ chỉ vùng bất thường của cấu trúc mô vùng sẹo

4. Kết luận

Lip-CUR đã được tổng hợp thành công với kích thước hạt trung bình, chỉ số phân tán, thế zeta, hiệu suất đóng gói, sức tải đạt lần lượt là 229,6 nm, 0,245, -26,6 mV, 90,2%, 8,1% và có độ bền tương đối cao. Lip-CUR ít gây độc cho nguyên bào sợi hơn CUR dạng thô và Lip-CUR ở nồng độ CUR nhỏ hơn 0,05 mg/mL hầu như không gây độc cho tế bào. GelTM-Lip-CUR được điều chế thành công từ hỗn hợp Pluronic F127 và PVA với trạng thái lỏng ở nhiệt độ nhỏ hơn 25°C và trạng thái gel khi tiếp xúc với nhiệt độ cơ thể. Kết quả khảo sát trên chuột nhắt trắng cho thấy, Lip-CUR cho hiệu quả điều trị sẹo tốt hơn CUR ở dạng thô và đạt hiệu quả tối ưu ở nồng độ CUR 0,01 mg/mL. Hơn thế nữa, GelTM-Lip-CUR cho hiệu quả điều trị sẹo tốt hơn Lip-CUR và đạt hiệu quả điều trị tốt nhất ở nồng độ CUR 0,05 mg/mL. Kết quả phân tích mô học cho thấy cấu trúc da vùng sẹo của nghiệm thức xử lý bằng GelTM-Lip-CUR ở nồng độ CUR 0,05 mg/mL đã hồi phục gần như hoàn toàn.

Lời cảm ơn

Tác giả xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Viện Nghiên cứu hạt nhân đã hỗ trợ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] I. L. Cameron and R. C. Greulich, "Evidence for an essentially constant duration of DNA synthesis in renewing epithelia of the adult mouse," *J. Cell Biol.*, vol. 18, pp. 31-40, 1963.
- [2] S. Guo and L. A. DiPietro, "Factors Affecting Wound Healing," *J. Dent. Res.*, vol. 89, pp. 219-229, 2010.
- [3] C. J. Van-den-Helder and J. J. Hage, "Sense and nonsense of scar creams and gels," *Aesthetic Plast. Surg.*, vol. 18, pp. 307-313, 1994.
- [4] P. S. Powers, S. Sarkar, D. B. Goldgof, C. W. Cruse, and L. V. Tsap, "Scar assessment: current problems and future solutions," *J. Burn Care Rehabil.*, vol. 20, pp. 54-60, 1999.
- [5] B. B. Aggarwal, C. Sundaram, N. Malani, and H. Ichikawa, "Curcumin: the Indian solid gold," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 595, pp. 1-75, 2007.
- [6] S. K. Borra, P. Gurumurthy, J. Mahendra, K. M. Jayamathi, C. N. Cherian, and R. Chand, "Antioxidant and free radical scavenging activity of CUR determined by using different *in vitro* and *ex vivo* models," *J. Med. Plants Res.*, vol. 7, pp. 2680-2690, 2013.
- [7] H. M. Nguyen, H. Yu, T. Y. Kiew, and K. Hadinoto, "Cost effective alternative to nanoencapsulation: amorphous curcumin-chitosan nanoparticle complex exhibiting high payload and supersaturation generation," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 96, pp. 1-10, 2015.
- [8] M. S. Mufamadi, V. Pillay, Y. E. Choonara, L. C.D. Toit, G. Modi, D. Naidoo, and V. M. K. Ndesendo, "A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery," *J. Drug Deliv.*, 2011, doi: 10.1155/2011/939851.
- [9] B. Maria, N. D. Raluca, E. N. Lorendana, and M. Simona, "Temperature responsive gels based on Pluronic F127 and Poly(vinyl alcohol)," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 50, pp. 4199-4206, 2011.
- [10] A. Singhal, E. D. Reis, and M. D. Kerstein, "Options for nonsurgical debridement of necrotic wounds," *Adv. Skin Wound Care*, vol. 14, pp. 96-101, 2001.
- [11] M. Sahiner, D. Alpaslan, and B. O. Bitlisli, "Collagen-based hydrogels films as drug delivery devices with antimicrobial properties," *Polym. Bull.*, vol. 71, pp. 3017-3033, 2014.
- [12] N. Sahiner, S. Sagbas, M. Sahiner, C. Silan, N. Aktas, and M. Turk, "Agar/Chitosan IPN Thin Hydrogel Films with Antimicrobial and Antioxidant Properties for Potential Dressing Applications," *Curr. Appl. Polym. Sci.*, vol. 1, pp. 52-62, 2017.
- [13] H. M. Nguyen, N. B. D. Vu, T. H. N. Nguyen, H. S. Le, H. T. Le, T. T. Tran, X. C. Le, V. T. Le, T. T. Nguyen, C. B. Bui, and H. J. Park, "In vivo comparison of wound healing and scar treatment effect between curcumin – oligochitosan nanoparticle complex and oligochitosan-coated curcumin-loaded-liposome," *J. Microencapsul.*, vol. 36, pp. 156-168, 2019.
- [14] F. Denizot and R. Lang, "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability," *J. Immunol. Methods*, vol. 89, pp. 271-277, 1986.

-
- [15] H. Zhao, S. Lu, J. Chai, Y. Zhang, X. Ma, M. Wan, and Y. Liu, "Hydrogen sulfide improves diabetic wound healing in ob/ob mice via attenuating inflammation," *J. Diabetes Complications*, vol. 31, pp. 1363-1369, 2017.
- [16] A. Ridiandries, C. Bursill, and J. Tan, "Broad-spectrum inhibition of the CC-chemokine class improves wound healing and wound angiogenesis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, p. 155, 2017.
- [17] S. Honary and F. Zahir, "Effect of zeta potential on the properties of NanoDrug delivery systems – a review (part 2)," *Trop. J. Pharm. Res.*, vol. 12, pp. 265-273, 2013.
- [18] L. D. A. Costa, M. H. F. Ottoni, M. G. D. Santos, A. B. Meireles, V. G. Almeida, W. D. F. Pereira, B. A. D. Avelar-Freitas, and G. E. A. Brito-Melo, "Dimethyl Sulfoxide (DMSO) decrease cell proliferation and TNF- α , IFN- γ , and IL-2 cytokines production in cultures of peripheral blood lymphocytes," *Molecules*, vol. 22, pp. 1-10, 2017, Art. no. 1789.
- [19] G. O'Sullivan-Coyne, G. C. O'Sullivan, T. R. O'Donovan, K. Piwocka, and S. L. McKenna, "Curcumin induces apoptosis-independent death in oesophageal cancer cells," *Br. J. Cancer*, vol. 101, pp. 1585-1595, 2009.
- [20] M. B. Y. Greenwald, M. Frusic-Zlotkin, Y. Soroka, R. Sasson, H. Bianco-Peled, and R. Kohen, "Curcumin protects skin against UVB-induced cytotoxicity via the Keap1-Nrf2 pathway: The use of a microemulsion delivery system," *Oxid. Med. Cell Longev.*, vol. 2017, pp.1-17, 2017.
- [21] H. Geng, H. Song, J. Qi, and D. Cui, "Sustained release of VEGF from PLGA nanoparticles embedded thermo-sensitive hydrogel in full-thickness porcine bladder acellular matrix," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 6, p. 312, 2011.