

KHẢO SÁT HIỆU QUẢ LÀM LÀNH VẾT THƯƠNG VÀ ĐIỀU TRỊ SẸO CỦA PHỨC HỢP NANO CHẾ TẠO TỪ CURCUMIN VÀ OLIGOCHITOSAN

NGUYỄN MINH HIỆP¹, NGUYỄN TẤN MÂN¹, VŨ NGỌC BÍCH ĐÀO¹, NGUYỄN THỊ TÂM¹, LÊ XUÂN CƯỜNG¹, NGUYỄN TRỌNG HOÀNH PHONG¹, LÊ HỮU TU¹, LÊ VĂN TOÀN¹, PHẠM BẢO NGỌC¹

¹Trung tâm Công nghệ bức xạ, Viện Nghiên cứu hạt nhân, Đà Lạt, Việt Nam. Email: jackminhhiiep@yahoo.com (Nguyễn Minh Hiệp)

Tóm tắt: Trong khi hoạt tính làm lành vết thương của curcumin (CUR) đã được biết đến từ lâu, tuy nhiên hiệu quả sinh học thực tế của nó lại bị giới hạn bởi độ tan nước kém dẫn đến làm giảm khả năng tiếp xúc và giảm khả năng thâm sâu vào vết thương. Trong nghiên cứu này, đã tổng hợp thành công phức hợp nano giữa CUR và oligochitosan (OCH, được chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60) và đã khảo sát độc tính tế bào của chúng lên dòng nguyên bào sợi chuột 3T3. Hiệu quả làm lành vết thương và điều trị sẹo của chế phẩm cũng đã được khảo sát trên chuột nhắt trắng. Kết quả cho thấy, phức hợp nano CUR-OCH tạo thành có kích thước hạt, thế zeta, hiệu suất tạo phức và sức tải lần lượt là 140 nm, 20 mV, 95% và 85%. Phức hợp nano CUR-OCH đã thể hiện hiệu quả vượt trội trong việc làm lành vết thương (thời gian lành 90% vết thương là 7 ngày so với 9 ngày khi sử dụng CUR dạng thô) và sẹo hình thành có kích thước nhỏ hơn và mờ hơn.

Từ khoá: curcumin, điều trị sẹo, làm lành vết thương, oligochitosan, phức hợp nano

1. MỞ ĐẦU

Curcumin (CUR), một hợp chất polyphenol tự nhiên, chiếm tỉ lệ khoảng 2 – 6% trong củ nghệ [1]. Ngày nay, CUR được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi là nhờ 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, v.v. [1]. Tuy nhiên, hiệu quả sử dụng của CUR còn nhiều hạn chế bởi độ sinh khả dụng thấp do độ tan nước của CUR rất thấp (khoảng 0,6 µg/mL), không bền ở môi trường trung tính và kiềm của ruột, độ thấm qua ruột kém và dễ bị loại thải ra ngoài cơ thể bằng nhiều cơ chế (như sự chuyển hóa đầu tiên ở gan, sự opsoni hóa, v.v.) [2]. Để cải thiện độ sinh khả dụng của CUR, người ta đã nghiên cứu ứng dụng “đóng gói” các phân tử CUR vào trong các hệ mang nano [3, 4]. Tuy nhiên, gần đây, một số nghiên cứu đã đề cập đến việc tổng hợp phức hợp nano giữa các polymer sinh học rẽ tiền (như chitosan, sodium alginate, v.v.) và các dược chất (như CUR, ibuprofen, ciprofloxacin, v.v.) [3, 4]. Ưu điểm của phức hợp nano là điều kiện và quy trình sản xuất đơn giản, nguyên vật liệu rẽ tiền, hiệu suất tạo phức cao và đặc biệt là sức tải của hệ nano này có thể lên đến 80 – 90%, cao gấp nhiều lần so với các hệ mang nano khác [3, 4]. Một số nghiên cứu đã sử dụng chitosan (CHI) có phân tử lượng từ lớn hơn 50 kDa để tạo phức hợp nano với CUR [5]. Tuy nhiên, các phức hợp nano curcumin-chitosan này phải cần sử dụng sóng siêu âm để làm giảm kích thước hạt trong quá trình tổng hợp và kích thước hạt cũng còn khá lớn (khoảng 200 - 400 nm) [5]. Ngoài ra, trong nghiên cứu trước đó, chúng tôi cũng đã chứng minh được rằng việc sử dụng OCH để tổng hợp phức hợp nano với CUR không những giúp làm giảm kích thước hạt xuống còn chỉ bằng 1/3 so với việc sử dụng chitosan, mà còn giúp loại bỏ bớt bước sử dụng sóng siêu âm để giảm kích thước, từ đó giúp cho việc sản xuất ở quy mô công nghiệp được thực hiện dễ dàng hơn [6].

Ngoài ra, OCH, sản phẩm cắt mạch của CHI, được định nghĩa theo một số nghiên cứu là có khối lượng phân tử trung bình nhỏ hơn 10 kDa [7]. Các nghiên cứu trên thế giới chỉ ra rằng,

OCH có tác dụng tích cực đến việc hỗ trợ làm lành vết thương và điều trị sẹo như ngăn cản sự nhiễm khuẩn, thúc đẩy sự phân bào của các nguyên bào sợi, thúc đẩy sự phát triển của các keratinocytes ở động vật, điều tiết quá trình làm lành vết thương thông qua việc điều tiết sự tiết ra osteopontin [8, 9]. Vì vậy, việc tổng hợp nên phức hợp nano giữa CUR và OCH sẽ giúp kết hợp được các ưu điểm của chúng trong hỗ trợ làm lành vết thương và điều trị sẹo. Mặt khác, vẫn chưa có nghiên cứu nào trên thế đề cập đến hiệu quả sinh học ở điều kiện *in vivo* của phức hợp nano nói chung và hiệu quả hỗ trợ làm lành vết thương và điều trị sẹo của phức hợp nano giữa CUR và OCH nói riêng [10].

Do vậy, “Khảo sát hiệu quả làm lành vết thương và điều trị sẹo của phức hợp nano giữa curcumin và oligochitosan” đã được thực hiện trong nghiên cứu này.

2. NỘI DUNG

2.1. Vật liệu và Phương pháp

2.1.1. Vật liệu

OCH: khối lượng phân tử trung bình 2,7 kDa, độ deacetyl: 80,63 %, là sản phẩm tạo ra từ kỹ thuật chiếu xạ gamma Co-60 với sự có mặt của H₂O₂ của Trung tâm Công nghệ Bức xạ (Viện Nghiên cứu hạt nhân), được thực hiện theo phương pháp của Kang và cộng sự [11]. Potassium hydroxide (KOH), acid acetic được mua từ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.). Curcumin (98%) được mua từ Alfar Aesar (St. Parkridge, MA, U.S.). MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ). Tất cả các hóa chất khác đều ở cấp độ phân tích. Dòng tế bào nguyên bào sợi chuột 3T3 được cung cấp bởi Trung tâm Y Sinh học phân tử, Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh

2.1.2. Phương pháp

a. Phương pháp tổng hợp phức hợp nano CUR-OCH

Phức hợp nano CUR-OCH được tổng hợp theo phương pháp được đề cập trong nghiên cứu của Nguyen và cộng sự [4]. Cụ thể, 5 mg của CUR được hòa tan hoàn toàn trong dung dịch KOH 0,1 M để tạo ra các dung dịch chứa các phân tử CUR⁽⁻³⁾. Bên cạnh đó, 9,05 mg OCH được hòa tan vào dung dịch acid acetic để tạo nên dung dịch polymer điện tích dương. Đồng thể tích của dung dịch CUR và dung dịch OCH được trộn đều bằng máy vortex trong thời gian 10 giây để hình thành phức hợp nano. Dịch phân tán phức hợp nano CUR-OCH thu được sẽ được rửa 2 lần với chu kỳ gồm 2 bước: ly tâm ở điều kiện 14000 rpm trong 20 phút và tái phân tán trong nước cất.

b. Phương pháp phân tích đặc điểm của phức hợp nano tạo thành:

Kích thước hạt trung bình và thế zeta (đặc trưng cho giá trị điện tích tĩnh điện bề mặt của hạt nano/micro; thế zeta càng cao thì hệ nano/micro càng bền) của phức hợp nano CUR-OCH được xác định bằng thiết bị Zetasizer Nano ZS (Malvern, Anh Quốc). Cụ thể, dịch phân tán của các phức hợp nano CUR-OCH được pha loãng 100 lần trong nước cất và được đo ở nhiệt độ 25 °C, góc đo 90°.

Hiệu suất tạo phức của CUR được xác định theo phương trình (1) và được thực hiện theo quy trình cải tiến của phương pháp được đề cập trong nghiên cứu của Sin và Hadinoto, Nguyen và cộng sự [3, 4]. Cụ thể, dịch phân tán phức hợp nano CUR-OCH được lọc qua màng lọc có kích thước lỗ 3 μm. Dịch phân tán sau khi lọc được đem ly tâm ở tốc độ 14000 vòng/phút trong 20 phút. Sau đó, phần dịch nổi được bỏ đi và phần tủa được tái phân tán trong một thể tích nước cất tương ứng. 10 μL dịch tái phân tán của phức hợp nano CUR-OCH được hòa tan vào ethanol với tỉ lệ thể tích thích hợp và lượng CUR được xác định bằng phương pháp đo quang phổ sử dụng thiết bị UV-Vis spectrophotometer (UV mini – 1240, Shimadzu, Kyoto, Japan) ở bước sóng 423 nm [3, 4].

$$\text{Hiệu suất tạo phức (\%)} = \frac{\text{Lượng CUR trong phức hợp nano}}{\text{Lượng CUR ban đầu}} \times 100 \quad (1)$$

Sức tải của phức hợp nano được xác định theo công thức (2) với phương pháp cũng được đề cập trong nghiên cứu của Sin và Hadinoto; Nguyen và cộng sự [3, 4]. Cụ thể, 10 mg của phức hợp nano CUR-OCH dạng bột đông khô được hòa tan vào ethanol. Lượng CUR chứa trong dung dịch ethanol cũng được xác định bằng phương pháp đo quang phổ UV-Vis ở bước sóng 423 nm [3, 4]. Từ đó, xác định được lượng CUR chứa trong 10 mg phức hợp nano CUR-OCH.

$$\text{Sức tải (\%)} = \frac{\text{Lượng CUR trong phức hợp nano}}{\text{Lượng phức hợp nano}} \times 100 \quad (2)$$

c. Quan sát hình thái phức hợp nano CUR-OCH tạo thành

Hình thái của phức hợp nano CUR-OCH, CUR dạng thô và OCH được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét xạ trường (FE-SEM). Cụ thể, các mẫu được cho lên màng carbon và được bao phủ bởi Pt. Sau đó, mẫu được đưa vào thiết bị FE-SEM S-4800 (Hitachi, Nhật Bản) để quan sát.

d. Khảo sát độc tính tế bào của hệ phức hợp nano CUR-OCH và hệ OCH-Lip-CUR lên dòng tế bào 3T3 (nguyên bào sợi chuột)

Độc tính tế bào của hệ phức hợp nano CUR-OCH được khảo sát trên dòng nguyên bào sợi chuột 3T3 bằng phương pháp MTT [12]. Trong đó, độc tính tế bào được khảo sát ở 3 nồng độ CUR khác nhau: 0,25 mg/mL (nồng độ cao), 0,05 mg/mL (nồng độ trung bình) và 0,01 (nồng độ thấp). Nồng độ OCH sử dụng trong thí nghiệm này lần lượt là 0,044 mg/mL, 0,0088 mg/mL và 0,00176 mg/mL tương ứng với lượng OCH chứa trong phức hợp nano có chứa lượng CUR tương ứng 0,25 mg/mL, 0,05 mg/mL và 0,01 mg/mL (được tính toán dựa vào sức tải của phức hợp khoảng 85%).

e. Khảo sát hiệu quả làm lành vết thương và điều trị sẹo của phức hợp nano CUR-OCH trên chuột nhắt trắng

Đầu tiên, vết thương được tạo theo quy trình đã được mô tả ở nghiên cứu của Zhao và cộng sự [13]. 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, bao gồm:

- Đối chứng âm: không xử lý với CUR (để vết thương tự lành).
- Đối chứng dương: xử lý bằng CUR dạng thô pha trong nước nồng độ 0,25 mg/mL.
- Xử lý CUR (dạng phức hợp nano CUR-OCH) ở các nồng độ 0,25 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL và 0,01 mg/mL.

Bôi thuốc cho chuột mỗi ngày hai lần, mỗi lần 200 μ L. Khả năng làm lành vết thương được đánh giá dựa vào việc theo dõi kích thước vết thương (đo bằng thước kỹ thuật) ở các khoảng thời gian khác nhau (0, 3, 5, 7, 9, 11, 14 ngày) cho đến khi sẹo hình thành. Kích thước vết thương giảm qua các ngày được quy về phần trăm (%) so với kích thước vết thương được tạo ra ban đầu.

Sự hình thành sẹo được đánh giá vào ngày thứ 22 khi cấu trúc của các vết sẹo tương đối ổn định. Mức độ hình thành sẹo được đánh giá bằng cảm quan (đo kích thước bằng thước kỹ

thuật.; quan sát bằng mắt). Ngoài ra, cấu trúc sợi còn được đánh giá bằng phương pháp nhuộm collagen [14].

d. Phương pháp xử lý số liệu

Các giá trị được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn. ($n = 3$). Giá trị trung bình và độ lệch chuẩn được tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel, các đồ thị được biểu diễn bằng phần mềm Sigma Plot version 8.0. Các kết quả thí nghiệm trên chuột được trình bày dưới dạng giá trị \pm độ lệch chuẩn ($n \geq 6$). Phần mềm SPSS version 12 với phép thử Duncan (mức ý nghĩa $p < 0.05$) được sử dụng để đánh giá sự khác biệt về mặt thống kê về ảnh hưởng của CUR dạng thô và hệ phức hợp CUR-OCH ở các nồng độ CUR khác nhau lên kích thước vết thương và kích thước sẹo hình thành.

2.2. Kết quả và Bàn luận

2.2.1. Tổng hợp phức hợp nano CUR-OCH

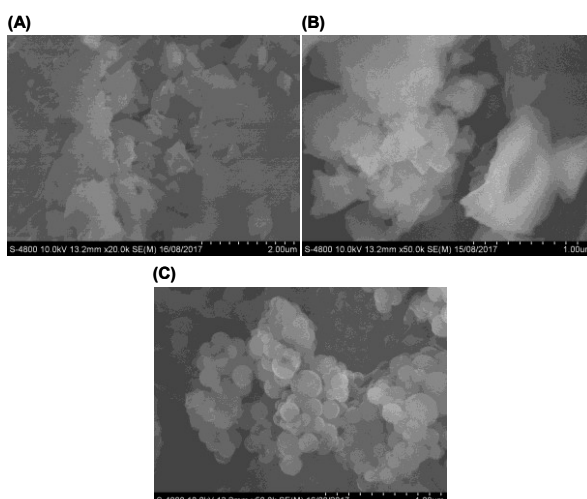
Trong nghiên cứu này, phức hợp CUR-OCH được tổng hợp ở điều kiện pH 4,7; không bổ sung muối, nồng độ CUR 5 mg/mL và tỉ lệ điện tích ROCH/CUR = 1, đạt được kích thước nano khoảng 140 nm với thế zeta lớn hơn 20 mV. Điều này chứng tỏ hệ phức hợp nano có độ bền tương đối cao. Bên cạnh đó, hiệu suất tạo phức và sức tải của phức hợp tạo thành lần lượt đạt 95% và 85% (Bảng 1):

Bảng 1. Thông số đặc điểm của hệ phức hợp nano CUR-OCH được tổng hợp.

Kích thước hạt (nm)	Chỉ số phân tán (PDI)	Thế zeta (mV)	Hiệu suất tạo phức (%)	Sức tải (%)
$139,8 \pm 7,1$	$0,294 \pm 0,052$	$+22,1 \pm 1,0$	$95,52 \pm 0,76$	$85,83 \pm 1,52$

2.2.2. Quan sát hình thái phức hợp nano CUR-OCH tạo thành

Hình thái phức hợp nano giữa CUR-OCH được chụp bằng kính hiển vi điện tử quét xạ trường FE-SEM (Hình 1). Quan sát ảnh FE-SEM cho thấy, phức hợp nano CUR-OCH có hình thái khác hẳn so với hình thái CUR (dạng thô) và OCH. Trong khi CUR dạng thô và OCH có hình dạng tinh thể hoặc vô định hình thì phức hợp CUR-OCH lại có dạng hình cầu và kích thước nằm trong khoảng 100 – 200 nm.



Hình 1. Hình ảnh FE-SEM của (A) CUR dạng thô; (B) OCH; (C) Phức hợp nano CUR-OCH

Ngoài ra, việc so sánh hình thái của các phức hợp nano CUR-OCH với hình thái của CUR dạng thô và OCH đã phần nào chứng minh được sự hình thành phức hợp CUR-OCH.

2.2.6. Khảo sát độc tính tế bào của hệ phức hợp nano CUR-OCH lên nguyên bào sợi chuột 3T3

Như trình bày ở **Bảng 2**, OCH cho thấy không gây độc tính cho tế bào 3T3. Cụ thể, số lượng tế bào sống sót lần lượt là 96,03 và 98,60% khi tế bào được xử lý bằng OCH ở nồng độ cao (0,044 mg/mL) và nồng độ thấp (0,00176 mg/mL). Trong khi đó, việc xử lý bằng CUR dạng thô (hòa tan trong DMSO) ở nồng độ cao (lớn hơn 0,01 mg/mL) đã gây độc tính cho tế bào. Điều này là do DMSO ở nồng độ cao đã gây độc tính cho tế bào [15]. Ngoài ra, một số nghiên cứu trên thế giới cũng đã đề cập đến việc CUR ở nồng độ thấp thì có thể kích thích sự phát triển của tế bào, nhưng ở nồng độ cao thì sẽ ức chế hoặc thậm chí gây độc cho tế bào [16]. Tuy nhiên, việc xử lý bằng phức hợp nano CUR-OCH lại cho kết quả phần trăm tế bào sống cao hơn so với các nghiệm thức xử lý bằng CUR dạng thô ở cùng nồng độ (**Bảng 2**). Đặc biệt, tại nồng độ CUR thấp (0,01 mg/mL), phức hợp nano CUR-OCH hầu như không gây độc cho tế bào 3T3.

Bảng 2. Khảo sát độc tính tế bào trên đối tượng nguyên bào sợi của OCH, CUR dạng thô, phức hợp nano CUR-OCH và OCH-Lip-CUR ở các nồng độ tương ứng với nồng độ CUR khác nhau.

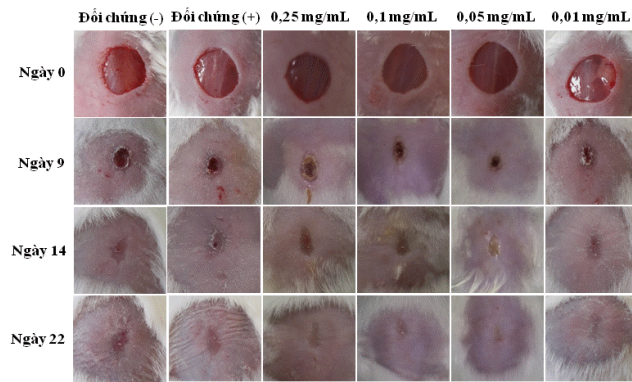
Nghiệm thức		Tỉ lệ sống tế bào (%)
Đối chứng		100 ± 2,82
OCH	0,044 mg/mL	96,03 ± 3,41
	0,0088 mg/mL	100,3 ± 3,15
	0,00176 mg/mL	98,6 ± 2,29
CUR dạng thô	0,25 mg/mL	53,27 ± 4,09
	0,05 mg/mL	67,48 ± 3,72
	0,01 mg/mL	75,18 ± 2,79
Phức hợp nano CUR-OCH	0,25 mg/mL	88,59 ± 2,16
	0,05 mg/mL	93,82 ± 3,64
	0,01 mg/mL	98,41 ± 3,72

2.2.7. Khảo sát hiệu quả làm lành vết thương và điều trị sẹo của phức hợp nano CUR-OCH trên chuột nhắt trắng

Kết quả **Bảng 3** cho thấy rằng, việc xử lý vết thương bằng hệ phức hợp nano CUR-OCH cho hiệu quả rất tốt trong việc giúp làm lành vết thương. Cụ thể, sau 9 ngày xử lý, ở nghiệm thức đối chứng (-) và nghiệm thức đối chứng (+), tỉ lệ vết thương còn lại lần lượt là 34,24% và 30,04% so với kích thước vết thương ban đầu. Trong khi đó, ở các nghiệm thức xử lý bằng hệ phức hợp nano CUR-OCH với nồng độ CUR nhỏ hơn 0,1 mg/mL đều cho hiệu quả làm lành vết thương tốt hơn (**Bảng 3** và **Hình 2**). Đặc biệt, việc xử lý bằng hệ phức hợp nano CUR-OCH cho kết quả làm lành vết thương tốt nhất ở nồng độ CUR 0,05 mg/mL với tỉ lệ vết thương chỉ còn khoảng 17,72% sau 9 ngày xử lý.

Bảng 3. Kích thước vết thương (%) sau khi được xử lý bằng CUR dạng thô, hệ phức hợp nano CUR-OCH và hệ OCH-Lip-CUR.

Ngày	Đối chứng (-)	Đối chứng (+)	0,25 mg/mL	0,1 mg/mL	0,05 mg/mL	0,01 mg/mL
0	100	100	100	100	100	100
3	73,38 ± 4,61 ^a	69,70 ± 3,35 ^{ab}	64,24 ± 9,39 ^b	62,68 ± 5,96 ^{bc}	58,72 ± 4,66 ^c	60,66 ± 6,19 ^{bc}
5	58,41 ± 3,89 ^a	53,84 ± 4,07 ^{ab}	50,55 ± 7,43 ^{bc}	49,11 ± 5,73 ^{bc}	44,47 ± 5,12 ^c	51,20 ± 9,65 ^{bc}
7	48,49 ± 5,41 ^a	40,55 ± 3,39 ^{ab}	38,64 ± 4,97 ^{ab}	33,40 ± 4,27 ^{ab}	31,09 ± 4,69 ^b	36,60 ± 4,56 ^{ab}
9	34,24 ± 4,21 ^a	30,04 ± 3,51 ^{ab}	28,54 ± 3,93 ^b	22,12 ± 4,10 ^{bc}	17,72 ± 5,02 ^c	25,40 ± 7,79 ^{bc}
12	16,46 ± 2,91 ^a	11,70 ± 3,59 ^{ab}	10,17 ± 1,93 ^{ab}	5,78 ± 3,98 ^{bc}	3,05 ± 2,85 ^c	8,82 ± 5,05 ^{ab}
14	1,37 ± 1,78 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b



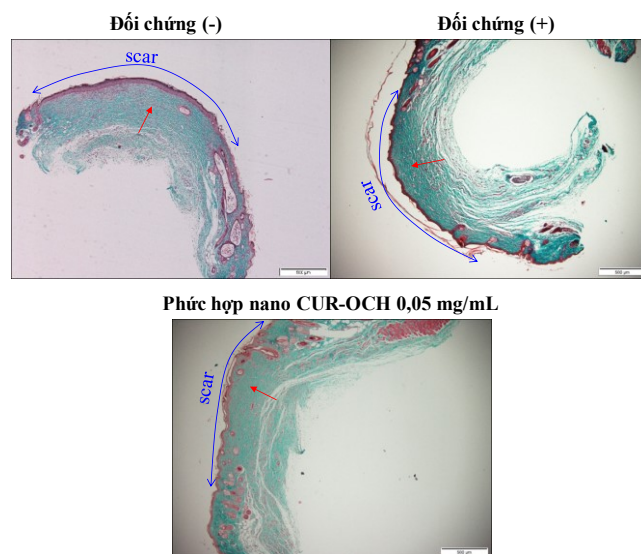
Hình 3. Sự giảm dần kích thước vết thương và sự hình thành sẹo trên chuột khi vết thương được xử lý bằng phức hợp nano CUR-OCH ở các nồng độ CUR khác nhau.

Kết quả thống kê ở **Bảng 4** cho thấy rằng, đối với vết thương không được xử lý chế phẩm (đối chứng (-)) và vết thương chỉ được xử lý bằng CUR dạng thô (đối chứng (+)) thì kích thước sẹo gần như là to nhất (chiều dài: 4,48 mm, chiều rộng: 2,02 mm và chiều dài: 4,70 mm, chiều rộng: 1,65 mm). Từ đó có thể thấy rằng, việc xử lý bằng CUR dạng thô không có tác dụng nhiều trong điều trị sẹo. Thêm vào đó, việc xử lý vết thương bằng hệ phức hợp nano CUR-OCH với nồng độ cao CUR (0,25 mg/mL và 0,1 mg/mL) không cho sự sai khác nhiều về mặt thống kê của kích thước sẹo so với nghiệm thức đối chứng (-) và đối chứng (+). Tuy nhiên, việc xử lý vết thương ở nồng độ CUR 0,05 mg/mL cho kết quả điều trị sẹo tốt nhất với kích thước sẹo nhỏ hơn và sẹo cũng mờ hơn (**Bảng 4** và **Hình 3**).

Ngoài ra, kết quả phân tích mô học bằng hình ảnh nhuộm collagen (**Hình 4**) cho thấy rằng, cấu trúc da ở vị trí vết thương được xử lý vết thương bằng hệ phức hợp nano CUR-OCH nồng độ CUR 0,05 mg/mL có độ hồi phục về cấu trúc bình thường tốt hơn nhiều so với vết thương để tự lành (đối chứng (-)) và vết thương được xử lý bằng CUR dạng thô. Điều này được minh chứng bằng sự xuất hiện trở lại của các thành phần như mạch máu, nang lông, tế bào mỡ, v.v. ở vị trí vùng sẹo.

Bảng 3. Kích thước sẹo hình thành sau khi được xử lý bằng CUR dạng thô, hệ phức hợp nanoCUR-OCH và hệ OCH-Lip-CUR.

	ĐỐI CHỨNG (-)	ĐỐI CHỨNG (+)	0,25	0,1	0,05	0,01
Chiều dài (mm)	4,48 ± 0,42 ^a	4,70 ± 0,77 ^a	3,90 ± 0,85 ^{ab}	3,88 ± 0,84 ^{ab}	3,20 ± 0,49 ^b	3,31 ± 0,45 ^b
Chiều rộng (mm)	2,02 ± 0,30 ^a	1,67 ± 0,29 ^{ab}	1,94 ± 0,65 ^a	1,70 ± 0,15 ^{ab}	1,63 ± 0,23 ^b	1,77 ± 0,33 ^{ab}



Hình 4. Kết quả nhuộm collagen da chuột vùng bị sẹo.

Từ các kết quả **Bảng 3**, **Bảng 4**, **Hình 3** và **Hình 4** có thể thấy rằng, hiệu quả hỗ trợ làm lành vết thương và điều trị sẹo tốt nhất khi vết thương được xử lý bằng phức hợp nano CUR-OCH ở nồng độ CUR 5 mg/mL.

3. KẾT LUẬN

Đã chế tạo được phức hợp nano CUR-OCH với kích thước khoảng 140 nm, thế zeta khoảng +22 mV, hiệu suất tạo phức lớn hơn 95% và sức tải khoảng 85% từ CUR và oligochitosan chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ. Ở nồng độ CUR thấp (nhỏ hơn 0,05 mg/mL), phức hợp nano CUR-OCH hầu như không gây độc tính cho tế bào. Thí nghiệm *in vivo* trên chuột nhắt trắng cũng đã chỉ ra rằng phức hợp nano CUR-OCH cho hiệu quả hỗ trợ làm lành vết thương và điều trị sẹo rất tốt và hiệu quả này cao nhất ở nồng độ CUR xử lý là 0,05 mg/mL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. B. Aggarwal, C. Sundaram, N. Malani, H. Ichikawa. CUR: the Indian solid gold. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2007, 595, 1 – 75.
- [2] K. Berginc, J. Trontelj, N. S. Basnet, A. Kristl. Physiological barriers to the oral delivery of curcumin. *Pharmazie*, 2012, 67, 518 – 524.
- [3] W. Sin, K. Hadinoto. Green amorphous nanoplex as new supersaturating drug delivery system. *Langmuir*, 2012, 28, 6265 – 6275.
- [4] H. M. Nguyen, H. Yu, T. Y. Kiew, K. Hadinoto. Cost effective alternative to nanoencapsulation: amorphous curcumin-chitosan nanoparticle complex exhibiting high payload and supersaturation generation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015, 96, 1 – 10.
- [5] H. Yu, M. H. Nguyen, K. Hadinoto. Effects of chitosan molecular weight on the physical and dissolution characteristics of amorphous curcumin-chitosan nanoparticle complex. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2017, doi: 10.1080/03639045.2017.1373802.
- [6] N.M. Hiệp, T.T. Thủy, V.N.B. Đào, N.T.H. Nga, N.T.H. Phong, L.H. Từ, N.T. Mân, L.X. Cường, P.T. Sâm, T.T. Tâm, N.T.L. Lan, L.V. Toàn, N.D. Hạng, N.N. Phương. Khảo sát ảnh hưởng của khối lượng phân tử chitosan đến sự hình thành phức hợp nano với curcumin. *Tạp chí Khoa học (Khoa học tự nhiên và công nghệ, đại học Sư phạm Tp. Hồ Chí Minh)*, 2018, 15, 130 – 138.
- [7] N. T. Nguyen, D. Q. Hoang, N. D. Nguyen, Q. H. Nguyen. Preparation, characterization, and antioxidant activity of water-soluble oligochitosan. *Green Processing and Synthesis*, 2017, doi.org/10.1515/gps-2016-0126.
- [8] T. Dai, M. Tanaka, Y.Y. Huang, M.R. Hamblin. Chitosan preparations for wound and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2011, 9, 857 – 879.
- [9] K. Azuma, R. Izumi, T. Osaki, S. Ifuku, M. Morimoto, H. Saimoto, S. Minami, Y. Okamoto. Chitin, chitosan, and its derivatives for wound healing: Old and new materials. *Journal of Functional Biomaterials*, 2015, 6, 104 – 142.
- [10] P. M. Kasar, K. S. Kale, D. G. Phadtare. Nanoplex: A review of nanotechnology approach for solubility and dissolution rate enhancement. *International Journal of Current*, 2018, 10, 6 – 10.
- [11] B. Kang, Y. Dai, H. Zhang, D. Chen. Synergetic degradation of chitosan with gamma radiation and hydrogen peroxide. *Polymer Degradation and Stability*, 2007, 92, 359 – 362.
- [12] F. Denizot, R. Lang. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 1986, 89, 271 – 277.
- [13] H. Zhao, S. Lu, J. Chai, Y. Zhang, X. Ma, M. Wan, Y. Liu. Hydrogen sulfide improves diabetic wound healing in ob/ob mice via attenuating inflammation. *Journal of Diabetes Complications*, 2017, 31, 1363 – 1369.

- [14] A. Suvik and A. W. M. Effendy. The use of modified masson's trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study. *Malaysian Journal of Veterinary Research*, 2012, 3, 39 – 47.
- [15] L. De Abreu Costa, M. Henrique Fernandes Ottoni, M. G. Dos Santos, A. B. Meireles, V. Gomes de Almeida, W. De Fatima Pereira, B. Alves De Avelar-Freitas, G. Eustaquio Alvim 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*, 2017, 22, E1789.
- [16] G. O'Sullivan-Coyne, G. C. O'Sullivan, T.R. O'Donovan, K. Piwocka, S. L. McKenna. Curcumin induces apoptosis-independent death in oesophageal cancer cells. *British Journal of Cancer*, 2009, 101, 1585 – 1595.

INVESTIGATION OF *IN VIVO* WOUND HEALING AND SCAR TREATMENT EFFECTIVENESS OF NANOCOMPLEX PREPARED FROM CURCUMIN AND OLIGOCHITOSAN

NGUYEN MINH HIEP¹, NGUYEN TAN MAN¹, VU NGOC BICH DAO¹, NGUYEN THI TAM¹, LE XUAN CUONG¹, NGUYEN TRONG HOANH PHONG¹, LE HUU TU¹, LE VAN TOAN¹, PHAM BAO NGOC¹

¹*Radiation Technology Center, Nuclear Research Institute, Dalat province, Vietnam. Email: jackminhhiep@yahoo.com (Nguyen Minh Hiep)*

Abstract:

Although the wound healing activity of curcumin (CUR) has been well-established, its clinical effectiveness still limited due to the inherently low aqueous CUR solubility, resulting in suboptimal CUR exposure in the wound sites. Herein, we have successfully synthesized the nanocomplex of CUR and oligochitosan (OCH, prepared by gamma Co-60 irradiation method) and studied its cytotoxicity in human keratinocytes (3T3 cell line) as well as its *in vivo* wound healing and scar treatment efficacy on mice. The results showed that particle size, complexation efficiency and payload of the prepared CUR-OCH nanocomplex were found about 140 nm, 20 mV, 95% and 85%, respectively. Compared to native CUR, the CUR-OCH nanocomplex exhibited superior wound healing efficacy (with wound closure of >90% after 7 days versus 9 days of native CUR) and a smaller and fader scars.

Key words: curcumin, nanoplex, oligochitosan, scar treatment, wound healing