

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

0000000

ĐẶNG THỊ MINH LỰA

**NGHIÊN CỨU TẠO PHỨC HỆ NANO
TÍCH HỢP CURCUMIN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Hà Nội - 2012

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

ooo0ooo

ĐẶNG THỊ MINH LỰA

**NGHIÊN CỨU TẠO PHỨC HỆ NANO
TÍCH HỢP CURCUMIN**

Ngành: Sinh học

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60.42.30

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. LÊ QUANG HUẤN

Hà Nội - 2012

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới **PGS. TS. Lê Quang Huân**, Trưởng phòng Phòng Công nghệ tế bào động vật - Viện Công nghệ sinh học - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình hướng dẫn, dạy bảo và dành phần kinh phí thích hợp từ đề tài khoa học cơ bản định hướng ứng dụng để thực hiện các nội dung nghiên cứu của đề tài.

Tôi xin chân thành cảm ơn **TS. Lã Thị Huyền, ThS. Lê Thị Minh Phúc** và nhóm nanomedicine phòng Công nghệ tế bào động vật đã trực tiếp giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện khóa luận này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới các anh, chị, các bạn đồng nghiệp tại phòng Công nghệ tế bào động vật đã giúp đỡ và tạo điều kiện cho tôi trong quá trình làm khóa luận.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới các thầy giáo, cô giáo dạy khoa Sinh học, Trường Đại học Thái Nguyên, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã dạy bảo và giúp đỡ tôi trong thời gian học tập và nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình, người thân và bạn bè luôn động viên và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Hà Nội, ngày 26 tháng 9 năm 2012

Học viên

Đặng Thị Minh Lụa

NHỮNG TỪ VIẾT TẮT

Chi	Chitosan
CMC	Critical Micelle Concentration
Cs	Cộng sự
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
MN	Magnetic Nanoparticles
NC	Nanocapsules
NE	Nanoemulsion
NLC	Nanostructured Lipid Carriers
NPs	Nanoparticles
NS	Nanospheres
NSAIDs	Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs
PEG	Polyethyleneglycol
PF	Pluronic® F-127
PLGA	Poly-D,L-lactide-co-glycolide
QD	Quantum Dots
RES	Reticuloendothelial System
SEM	Scanning Electron Microscopy
SLN	Solid Lipid Nanoparticles
TEM	Transmission Electron Microscopy
TPP	Tripolyphosphate

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN	3
1.1. Các hệ vận chuyển thuốc kích thước nano.....	3
1.1.1. Khái niệm	3
1.1.2. Phân loại.....	3
1.2. Tổng quan về chitosan và nano chitosan	6
1.2.1. Cấu trúc của chitosan.....	6
1.2.2. Tính chất chitosan.....	7
1.2.3. Ứng dụng của chitosan.....	8
1.2.4. Nano chitosan	8
1.3. Curcumin	10
1.3.1. Cấu trúc hóa học của curcumin	10
1.3.2. Dược động học của curcumin	12
1.3.3. Tác dụng dược lý của curcumin	13
1.3.4. Hệ vận chuyển curcumin	15
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	20
2.1. Hóa chất và thiết bị	20
2.2. Phương pháp nghiên cứu	21
2.2.1. Phương pháp tạo chitosan phân tử lượng thấp.....	21
2.2.2. Phương pháp tạo hạt nano chitosan	21
2.2.3. Phương pháp tạo phức hệ nano tích hợp curcumin	22
2.2.4. Phương pháp chụp kính hiển vi điện tử truyền qua (<i>Transmission Electron Microscope - TEM</i>)	23
2.2.5. Phương pháp chụp kính hiển vi điện tử quét (<i>Scanning Electron Microscope - SEM</i>).....	24
2.2.6. Phương pháp soi kính hiển vi huỳnh quang.....	25
2.2.7. Phương pháp đo size, phân bố size và thế zeta.....	26

2.2.8. Phương pháp xác định hiệu suất đóng gói.....	29
2.2.9. Khảo sát tính thấm của hạt nano vào tế bào động vật	29
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	31
3.1. Kết quả tạo nano chitosan.....	31
3.2. Hình thể học của hạt nano tích hợp curcumin.....	33
3.3. Kết quả đo size, phân bố size và thế zeta của hạt nano tích hợp curcumin.....	34
3.4. Hiệu suất đóng gói curcumin.....	36
3.5. Tính thấm của hạt nano vào tế bào HEK293.....	39
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	41
TÀI LIỆU THAM KHẢO	42

MỞ ĐẦU

Công nghệ nano đã tạo ra hàng loạt hệ vật chất kích thước từ vài nm tới hàng trăm nm để vận chuyển dược chất đến các bộ phận mong muốn trong cơ thể. Các hệ vận chuyển thuốc có nhiều triển vọng là polymer-micelles, dendrimers, các hạt nano có nguồn gốc kim loại polymer, ceramic, protein, virus, và các hạt nano liposome. Các dược chất hoặc các tác nhân chẩn đoán được tích hợp vào bên trong liên kết hóa học hoặc gắn vào bề mặt của các hạt nano này.

Curcumin là hoạt chất được chiết xuất từ củ nghệ vàng. Curcumin có nhiều hoạt tính sinh học và dược học quan trọng như tính kháng viêm, chống ung thư và kháng virus, cũng như các ứng dụng y học tiềm năng do tính độc thấp của chúng. Trong những năm gần đây, curcumin đã được chứng minh là có khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào trên nhiều dòng tế bào ung thư *in vitro* và đã được sử dụng để ngăn ngừa và điều trị nhiều bệnh ung thư *in vivo*. Tuy nhiên, do độ hòa tan kém, sinh khả dụng thấp và bị chuyển hóa nhanh chóng tại ruột và gan đã làm hạn chế các ứng dụng của curcumin. Curcumin có thể được phát triển như một loại thuốc điều trị thông qua thay đổi công thức hoặc gắn lên hệ vận chuyển, cho phép nâng cao khả năng hấp thụ của tế bào. Để vận chuyển curcumin đến các cơ quan đích, cần phải cải thiện độ hòa tan và sinh khả dụng của nó [1]. Gần đây, nhiều nghiên cứu đã tập trung tạo ra các hạt nano polyme dựa trên copolymer Pluronic® F-127 (PF).

Pluronic® F-127 (PF) là một copolymer không độc hại ưa nước, được sử dụng rộng rãi như một tá dược để làm tăng tính ổn định và độ hòa tan của thuốc. PF là một ABA copolymer bao gồm tiểu phần A polyoxyethylene (PEO), tiểu phần B polyoxypropylene (PPO) [2]. Khi gia tăng nhiệt độ của dung dịch PF tiểu phần A, PPO có xu hướng mất nước tạo thành lõi với vỏ bên ngoài là chuỗi PEO ngậm nước hợp thành hình cầu micelle [3]. Cấu trúc

micelle tạo bởi copolymer có thể tích hợp được các thuốc ưa nước, kỵ nước và kéo dài thời gian giải phóng thuốc [4,5]. Tuy nhiên, việc sử dụng các micelle PF làm hệ vận chuyển thuốc đường dài là không thực tế, vì các hạt micelle có thể bị kết tụ và thay đổi cấu trúc khi tiếp xúc nồng độ và nhiệt độ khác nhau. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự ổn định của các hạt micelle có thể được cải thiện sau khi được phủ một lớp polymer với các vật liệu như PLGA, polyvinylchloride hoặc chitosan [6].

Chitosan là một loại polymer carbohydrate tự nhiên, được tạo ra bằng cách deacetyl hóa đầu N- của chitin. Chitosan có nhiều ưu điểm để làm vật mang trong các hệ thống vận chuyển thuốc kích cỡ nano. Chitosan không độc, có khả năng tương thích sinh học, phân hủy sinh học và đã được chứng minh để kiểm soát sự giải phóng thuốc, protein hay các peptide. Chitosan hòa tan tốt trong nước, tránh việc sử dụng các dung môi hữu cơ độc hại, và không cần tinh sạch khi tạo ra các hạt nano [7].

Sự kết hợp polymer-micelles, phức hệ nano Chitosan-PF tích hợp curcumin tạo ra hệ vận chuyển curcumin đầy hứa hẹn. Xuất phát từ những cơ sở khoa học và thực tiễn trên, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: “ ***Nghiên cứu tạo phức hệ nano tích hợp curcumin***” với mục tiêu:

- Tạo được phức hệ nano tích hợp curcumin
- Kiểm tra, đánh giá phức hệ nano đã tạo được
- Khảo sát tính thấm của hạt nano vào tế bào động vật, kiểm tra độc tính trên tế bào ung thư, từ đó định hướng ứng dụng trong điều trị ung thư.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. Các hệ vận chuyển thuốc kích thước nano

1.1.1. Khái niệm

Hệ vận chuyển thuốc kích thước nano là hệ được cấu tạo như các hạt nano có kích thước từ 1-1000 nm, với thiết kế thích hợp có vai trò như một phương tiện vận chuyển chuyên biệt, đảm bảo vận chuyển các hoạt chất đến đích tác dụng.

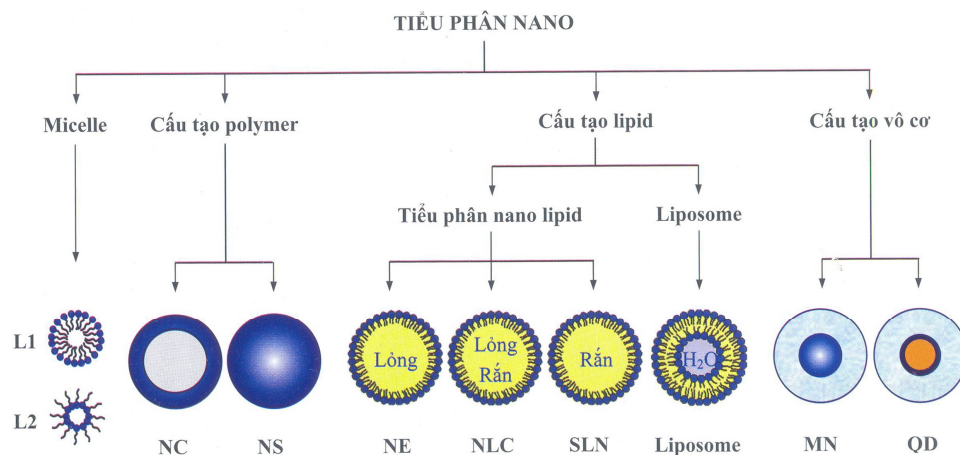
Công nghệ nano đã tạo ra hàng loạt hệ vật chất với kích thước từ vài nm tới hàng trăm nm được sử dụng để vận chuyển dược chất đến các bộ phận mong muốn trong cơ thể với liều lượng thích hợp và theo đúng thời gian mong muốn, đảm bảo được 3 yếu tố góp phần tạo nên tính an toàn và hiệu quả của thuốc: đúng nơi, đúng lúc và đúng liều. Các hệ vận chuyển thuốc có nhiều triển vọng là polymer-micelles, dendrimers, các hạt nano có nguồn gốc kim loại polymer, ceramic, protein, virus, và các hạt nano liposome. Các dược chất hoặc các tác nhân chẩn đoán sẽ được đưa vào bên trong liên kết hoá học hoặc gắn vào bề mặt của các hạt nano này.

1.1.2. Phân loại

Hiện nay các hạt nano vận chuyển thuốc thường được phân loại theo thành phần cấu tạo, cấu trúc và đặc tính bề mặt của hạt nano.

Thành phần cấu tạo của các hạt nano chủ yếu là polyme, lipid và các hợp chất vô cơ, do vậy có thể phân thành 3 lớp lớn:

- Hạt nano polyme (polymeric nanoparticles)
- Hạt nano lipid (lipid nanoparticles)
- Hạt nano vô cơ (inorganic nanoparticles)



Hình 1.1. Một số hạt nano thường gặp

Ngoài ra, còn có những hạt nano có cấu trúc hỗn hợp giữa polyme, lipid và hợp chất vô cơ. Các polymer có khả năng phân hủy sinh học và tương thích sinh học thường được sử dụng là polylactide, polyglycolide, poly(lactide-co-glycolide), poly(ϵ -caprolactone), poly(alkyl-cyanoacrylate), gelatine, chitosan... Các lipid thường được sử dụng là các lipid không độc với cơ thể, có cấu tạo khá tương đồng với lipid sinh học như phospholipid, cholesterol, glyceride... và dẫn xuất của các lipid này. Các hạt nano vô cơ thường được sử dụng trong chẩn đoán và điều trị như: hạt nano từ tính (magnetic nanoparticle), chấm lượng tử (quantum dots).

Phân loại theo cấu trúc, các hạt nano có thể chia thành 3 dạng:

- Hạt nano dạng màng bao: cấu tạo giống như túi (vesicle) hoặc nang (capsule), gồm một thành phần polymer hoặc một màng đơn hay màng kép lipid bao quanh một lõi có thể ở trạng thái rắn, rắn-lỏng hoặc lỏng ưa nước hoặc ưa dầu.
- Hạt nano cấu trúc dạng khung xốp (matrix): khung xốp polyme, lipid hoặc các hợp chất vô cơ phân bố đều bên trong hạt nano thường có dạng hình cầu.