

SỞ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO HÀ NỘI

-----***-----

SÁNG KIẾN KINH NGHIỆM

**PHÁT TRIỂN NĂNG LỰC
NGHIÊN CỨU KHOA HỌC HOÁ HỌC
CỦA HỌC SINH THPT HÀ NỘI**

Lĩnh vực: HÓA HỌC

Cấp học: THPT

Tên tác giả : TS Trần Thị Thu Huệ

Đơn vị công tác: trường THPT PHAN ĐÌNH PHÙNG

Chức vụ: Tổ trưởng chuyên môn

Năm học 2019 -2020

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, cuộc cách mạng công nghiệp 4.0 đang diễn ra với sự phát triển của khoa học kỹ thuật công nghệ cao. Trước sự phát triển đó đòi hỏi phải nâng cao chất lượng giáo dục để đào tạo nguồn nhân lực có trình độ cao.

Nghiên cứu khoa học (NCKH) là quá trình nhận thức khoa học, là hoạt động trí tuệ đặc thù bằng những phương pháp nghiên cứu nhất định để tìm ra một cách chính xác và có mục đích những điều mà con người chưa biết đến hoặc biết chưa đầy đủ, tức là tạo ra sản phẩm mới dưới dạng tri thức mới về nhận thức hoặc phương pháp. Trong tiến trình đổi mới căn bản, toàn diện giáo dục đào tạo hiện nay thì đổi mới giáo dục phổ thông đóng vai trò quan trọng và không thể thiếu của hoạt động NCKH. NCKH trong nhà trường là một trong những nội dung được đẩy mạnh, nhằm thực hiện mục tiêu đổi mới căn bản toàn diện nền giáo dục. Để phát huy những lợi ích trên, hoạt động NCKH phải được chú trọng ngay trong độ tuổi học trò, có như vậy mới có cơ sở xây dựng và phát triển được đội ngũ nhân lực chất lượng cao cho xã hội.

Việc đẩy mạnh NCKH cho học sinh góp phần tích cực trong việc đổi mới giáo dục phổ thông theo định hướng phát triển toàn diện về phẩm chất, năng lực học sinh.

Mỗi thầy cô giáo với vai trò là người định hướng, truyền lửa để lan tỏa niềm đam mê NCKH cho học sinh, để NCKH trong mỗi nhà trường được đẩy mạnh, hiệu quả với những sản phẩm thiết thực. Việc tham gia NCKH chính là khuyến khích các em nghiên cứu, sáng tạo, tự học, biết cách vận dụng kiến thức đã học vào giải quyết những vấn đề thực tiễn cuộc sống.

Điều này góp phần thúc đẩy đổi mới nội dung, chương trình, đổi mới hình thức tổ chức và phương pháp dạy học, kiểm tra đánh giá kết quả học tập; nâng cao chất lượng dạy học trong các cơ sở giáo dục trung học... Đây cũng chính là những điểm cốt lõi để chúng tôi lựa chọn đề tài ***“Phát triển năng lực nghiên cứu khoa học Hoá học cho học sinh THPT Hà Nội”***.

Và coi đây là một giải pháp quan trọng trong thời gian trước mắt góp phần đổi mới chất lượng GD phổ thông, góp phần thực hiện hiệu quả của dạy học liên môn, giáo dục theo phương pháp STEM, tăng cường rèn luyện khả năng tự học, tự nghiên cứu, phát huy sự sáng tạo của học sinh... đồng thời góp phần nâng cao chất lượng giáo dục THPT, tiếp cận với nghiên cứu khoa học cho HS trong bậc học tiếp theo ở các trường đại học trong nước và phát huy khả năng của học sinh Việt Nam khi đi du học ở các nước có nền giáo dục tiên tiến.

GIẢI QUYẾT VẤN ĐỀ

Trong khuôn khổ đề tài SKKN này, chúng tôi không có tham vọng đưa các nội dung lý thuyết chuyên sâu về phương pháp nghiên cứu khoa học mà thay vào đó chúng tôi tiếp tục lựa chọn giới thiệu thêm một đề tài NCKH của thầy trò chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu trong năm học tiếp theo 2019-2020 với hai học sinh:

1. Lưu Hải Long Lớp: 12A3 Trường: THPT Phan Đình Phùng
2. Nguyễn Như Đức Minh Lớp: 11A1 Trường: THPT Phan Đình Phùng

Phần 1 – LÝ DO CHỌN ĐỀ TÀI

Thống kê của WHO năm 2018, trên thế giới có 325 triệu người đang nhiễm virus viêm gan B, C; 83% trường hợp bệnh nhân mắc ung thư gan xảy ra ở các nước đang phát triển trong đó có Việt Nam. Trung bình cứ 100.000 người Việt có 29,3 người ung thư gan. Mỗi năm, nước ta có 21 triệu người nhiễm virus viêm gan B và C; 8 triệu người đang bị viêm xơ gan và ung thư gan; 22.000 người chết vì ung thư gan. Chi phí điều trị chữa bệnh gan trong một năm từ 60 - 200 triệu đồng/ bệnh nhân. WHO cảnh báo con số tử vong trong các năm từ 2015 - 2030 dự đoán lên 20 triệu người.

Việt Nam có rất nhiều loại thảo dược có thể phối hợp, điều trị bệnh gan thay thế cho thuốc nhập khẩu như: điệp hạ châu, cà gai leo, ung bất bại, cây kế sữa, hoa atiso. Trong đó, cây kế sữa đóng vai trò quan trọng vì trong cây kế sữa có chứa hợp chất silymarin có các dụng rất tốt cho gan như: chống oxy hóa mạnh, tăng cường chức năng gan, ổn định tế bào gan, kích thích sự phát triển của tế bào gan mới, ngăn ngừa các biến chứng nguy hiểm của bệnh gan. Tuy nhiên, silymarin có dược tính đa dạng, kỵ nước, kém ổn định và có những nhược điểm như ít tan trong nước; sinh khả dụng vào cơ thể rất kém, tỉ lệ bị đào thải ra khỏi cơ thể cao.

Nếu tạo ra được silymarin dưới dạng phân tử nano sẽ giúp tăng tính tan của silymarin, tăng khả năng hấp thụ vào máu và cơ thể, từ đó tăng tính sinh khả dụng và giảm tác dụng phụ. Đồng thời, sau khi tìm hiểu Quyết định số 66/2014/QĐ-TTg của Thủ tướng Chính phủ về việc phê duyệt Danh mục công nghệ cao được ưu tiên đầu tư phát triển, danh mục Công nghệ vật liệu nano (Mục 56; Phụ lục I). Đây là cơ sở và tiền đề cho nhóm chọn lĩnh vực nghiên cứu: “Khoa học công nghệ” để đi sâu vào nghiên cứu phát triển sản phẩm nano silymarin.

Vì vậy, nhóm nghiên cứu chúng em lựa chọn đề tài: ***“Nghiên cứu quy trình điều chế nano silymarin hỗ trợ điều trị hai dòng ung thư gan và ung thư đại tràng.”***

PHẦN II. TỔNG QUAN VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

2.1. Mục đích nghiên cứu:

Nghiên cứu, đề xuất và vận dụng quy trình điều chế nano silymarin có kích thước nhỏ hơn 150 nm nhằm tăng khả năng hấp thụ từ đó tăng tính sinh khả dụng của silymarin cho người sử dụng. Các tế bào tạo nên thành mạch máu ở trạng thái khỏe mạnh phân bố cách nhau là 4nm – 6nm. Khi có khối u hoặc viêm nhiễm, các tế bào thành mạch sẽ dẫn ra đến kích thước từ 200nm – 400nm. Các hoạt chất ức chế tế bào ung thư tồn tại trong máu được vận chuyển theo vòng khép kín, khi đi qua vùng bị bệnh với kích thước nhỏ, sẽ xuyên qua màng thành mạch máu tới khối u bị bệnh để tác động lên tế bào ung thư.

2.2. Nhiệm vụ nghiên cứu:

- Nghiên cứu tài liệu khoa học về silymarin được chiết xuất từ cây kế sữa. Nghiên cứu tài liệu về vật liệu nano hoá dược. Nghiên cứu các quy trình nano hóa các hợp chất tự nhiên có hoạt tính cao. Nghiên cứu các thiết bị làm giảm kích thước của silymarin.

2.3. Giả thuyết khoa học:

Nếu điều chế thành công nano silymarin với kích thước hạt nhỏ dưới 150nm sẽ tăng hiệu quả hấp thụ, giúp phòng ngừa và hỗ trợ bệnh gan. Đồng thời, nano silymarin được dự đoán có tác dụng tiêu diệt mạnh tế bào ung thư gan Hep G2 và ung thư đại tràng HCT116.

2.4. Phương pháp nghiên cứu:

Phương pháp nghiên cứu lý thuyết; Phương pháp lấy ý kiến chuyên gia; Phương pháp thí nghiệm; Phương pháp phân tích.

2.5. Điểm mới của đề tài:

- Đề xuất được quy trình điều chế nano silymarin.
- Điều chế được nano silymarin giữ nguyên được cấu trúc hóa học, có kích thước nhỏ hơn 150 nm.
- Điều chế thành công nano silymarin có hàm lượng >5% silymarin.
- Thử nghiệm thành công *in-vitro* trên 2 dòng tế bào ung thư gan Hep G2 và ung thư đại tràng HCT116

PHẦN III. NỘI DUNG ĐỀ TÀI

3.1. Tìm hiểu cây kế sữa

Cây kế sữa có tên khoa học là *Silybum marianum*, là một loài thực vật trong họ Cúc. Trong giới y học đã phát hiện trong cây kế sữa chứa một nhóm hợp chất Flavonoid, có tên chung là silymarin - có hoạt tính chống oxy hóa và chống viêm và khả năng giải độc gan mạnh.

3.1.1. Tác dụng của cây kế sữa và silymarin từ cây kế sữa đến gan và bệnh gan nhiễm mỡ:

Được sử dụng rộng rãi như một phương thuốc dân gian điều trị các bệnh về gan, kế sữa được xem là một loại thảo dược an toàn. Kế sữa và silymarin từ cây kế sữa có khả năng dung nạp tốt vào cơ thể, giúp bảo vệ gan tránh khỏi các tổn thương do rượu hoặc thuốc, chất gây độc gây ra.

- Ổn định màng tế bào gan, ngăn cản sự xâm nhập của các chất độc vào bên trong gan.

- Tăng tổng hợp protein ở tế bào gan do kích thích hoạt động của RNA polymerase, góp phần giải độc cho gan.

- Thúc đẩy sự phục hồi các tế bào gan đã bị hủy hoại, kích thích sự phát triển của các tế bào gan mới thay thế các tế bào gan đã bị hủy hoại.

- Ức chế sự biến đổi của gan thành các tổ chức xơ, giảm sự hình thành và lắng đọng của các sợi collagen dẫn đến xơ gan. Giúp các bệnh nhân bị xơ gan do còn sống lâu hơn.

- Chống oxy hóa lipid, tăng khả năng oxy hóa axit béo của gan, làm ổn định các tế bào gây viêm, ức chế phản ứng viêm, giảm các nồng độ enzym gan, làm cải thiện các triệu chứng của bệnh gan như gan nhiễm mỡ, viêm gan.

- Xơ gan, viêm gan nhiễm mỡ (do còn và không do còn), nhiễm độc gan do hóa chất hoặc ma túy là các nguy cơ tiềm tàng gây ra bệnh ung thư biểu mô tế bào gan (HCC). Kháng insulin và tình trạng mất cân bằng các tác nhân oxy hóa là những cơ chế phát sinh bệnh chủ yếu dẫn đến tổn thương tế bào gan ở những bệnh nhân này. Làm giảm đáng kể sự phát triển tế bào ung thư, sự tạo mạch cũng như sự hình thành kháng insulin.

3.1.2. Ứng dụng cây kế sữa và silymarin từ cây kế sữa trong y học

Hiện nay, silymarin từ cây kế sữa được ứng dụng rất nhiều trong các loại thuốc y học và các loại viên uống, thực phẩm chức năng trong việc hỗ trợ phòng và điều trị bệnh gan. Với thành phần silymarin - thành phần chính quan trọng - cây kế sữa có chứa khoảng 65% đến 80% flavonolignas.

Hoạt tính của silymarin rất tốt nhưng silymarin tồn tại những nhược điểm như: rất ít tan trong nước; dễ bị đào thải ra ngoài cơ thể; hấp thụ vào máu rất kém nên sinh khả dụng thấp. Do đó, yêu cầu cấp thiết là phải đưa silymarin về dạng nano để khắc phục những nhược điểm trên.

3.2. Tìm hiểu công nghệ nano

Hiện nay có nhiều quy trình làm tăng khả năng hấp thụ của các hợp chất khó tan trong nước vào cơ thể. Ví dụ, để tăng khả năng hấp thụ của cơ thể đối với

curcumin, người ta thường phối hợp curcumin với hợp chất piperin - được chiết xuất từ hạt tiêu hay bromelain – được chiết xuất từ thân cây dứa. Tuy nhiên, phương pháp này lại không áp dụng được với silymarin. Hiểu và thấy được tầm quan trọng tác dụng của silymarin chính vì vậy nhóm đã nghiên cứu, học hỏi, bên cạnh sự hướng dẫn tận tình của các thầy cô giáo cùng tìm ra quy trình làm tăng khả năng hấp thụ của silymarin bằng việc ứng dụng công nghệ nano.

*** Công nghệ nano**

Công nghệ nano là ngành công nghệ làm thay đổi hình dáng, kích thước của vật chất ở mức nanomet ($1\text{ nm} = 10^{-9}\text{ m}$). Y học là một trong những lĩnh vực áp dụng nhiều công nghệ nano. Có thể kể đến nghiên cứu sử dụng các hạt nano vàng để chống lại nhiều loại ung thư, dự án nanorobot với những chú robot có kích thước siêu nhỏ có thể di chuyển vào bên trong cơ thể con người để đưa thuốc điều trị đến những bộ phận cần thiết, chính việc cung cấp thuốc một cách trực tiếp đã làm tăng khả năng cũng như hiệu quả điều trị bệnh.

Tại Việt Nam, công nghệ nano ứng dụng trong lĩnh vực sinh học và y học vẫn còn khá mới mẻ nhưng đã thu hút được sự quan tâm nghiên cứu đặc biệt. Năm bắt được xu hướng nghiên cứu và tình yêu đam mê với nghiên cứu nhóm em đã tìm đọc tài liệu và tìm hiểu quy trình điều chế nano silymarin với mong muốn đóng góp ý tưởng và kết quả vào sự phát triển và nghiên cứu của nền khoa học Việt Nam.

3.3. Phương pháp nghiên cứu

Đề tài này sử dụng phương pháp nano hoá trong dung dịch sử dụng hệ chất mang và chất hoạt động bề mặt phù hợp để có thể tạo ra hạt nano và ổn định hệ vi nhũ tương. Về nguyên tắc khi cho các chất hoạt động bề mặt thì sẽ tạo thành các micelle. Các micelle này sẽ có vai trò phân tán hạt nano và làm bền hệ vi nhũ tương nano. Để làm được điều đó hệ các chất bề mặt và chất mang là vô cùng quan trọng. Chúng tôi đã lựa chọn hệ chất mang PEG-PLA và chất hoạt động bề mặt Tween 80 dùng trong nghiên cứu này.

Phương pháp đặc trưng cấu trúc và tính chất sản phẩm sử dụng trong công trình này là các phương pháp hiện đại nhất như phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), phương pháp phân tích hàm lượng chất bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và phương pháp quan sát hình thái học của hạt sử dụng kính hiển vi điện tử truyền qua phân giải cao (HR-TEM). Với sự hỗ trợ của các công cụ rất hiện đại này, sẽ làm cho kết quả đo và đánh giá với độ tin cậy cao nhất.

3.4. Tiến hành nghiên cứu

3.4.1. Chuẩn bị hóa chất, vật tư, thiết bị

3.4.1.1. Hóa chất sử dụng

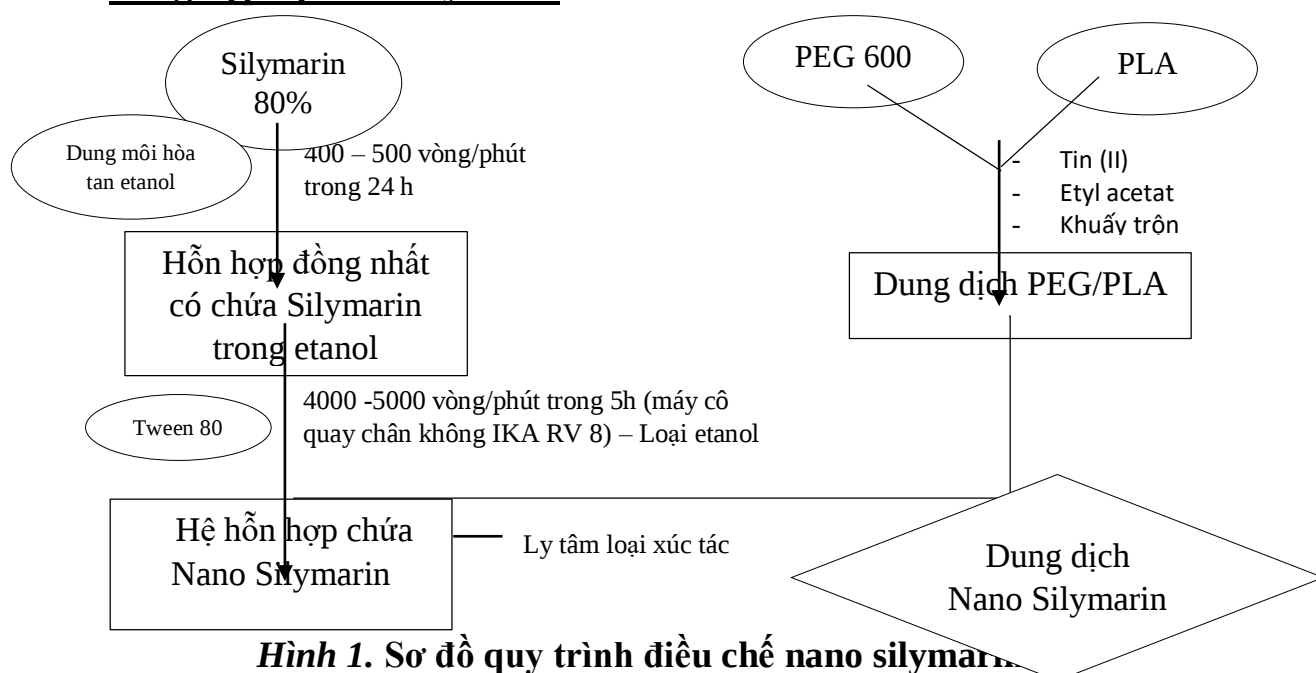
Silymarin dạng bột với độ tinh khiết 80% (dùng cho thực/duyệt phẩm), Dung môi etanol (dùng cho thực phẩm), Polyetylen glycol (PEG 600 USP duyệt điển Mỹ); Xúc tác Tin(II)2-Etyhexanoat (USP duyệt điển Mỹ); Axit Lactic (LA USP duyệt điển Mỹ); Tween 80 (Polysorbate 80 USP/EP duyệt điển Mỹ/EU)

3.4.1.2. Một số thiết bị chính sử dụng trong quá trình nghiên cứu

Tủ sấy, Tủ nung (tủ lão hóa, Nhiệt kế, Máy khuấy từ gia nhiệt, Ống đong, Pipet, Cốc thủy tinh, Đũa khuấy, Cân phân tích, Máy cắt quay chân không RV8

3.4.2. Quy trình điều chế nano silymarin

Tổng hợp hệ nano silymarin



Hình 1. Sơ đồ quy trình điều chế nano silymarin

3.4.2.1. Hoà tan silymarin trong dung môi ethanol

Silymarin (80%) được hòa tan trong dung môi etanol với tỷ lệ silymarin : etanol là 5g:100 ml và khuấy với tốc độ không đổi 400 – 500 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong vòng 24 tiếng để tạo dung dịch đồng nhất silymarin trong etanol.

Etanol là dung môi hoà tan tốt silymarin nhằm tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân tán silymarin ở bước tiếp theo.

3.4.2.2. Điều chế chất mang PEG-PLA

Chất mang PEG-PLA được điều chế dựa trên phản ứng đồng trùng hợp mở vòng phân tán đều LA (Axit Lactic) vào PEG 600 (Polyetylen Glycol) với xúc tác Tin(II)2 - etyhexanoat với tỷ lệ PLA: PEG là 4g:10ml. Phản ứng được tiến hành sau 5 giờ tại nhiệt độ 120 °C trên hệ thống cô quay.

3.4.2.3. Khuấy trộn tạo hỗn hợp 1

Tiến hành trộn dung dịch silymarin trong ethanol vào chất mang PEG-PLA và cho thêm chất hoạt động bề mặt Tween 80. Hỗn hợp được khuấy đều tạo ra hỗn hợp 1. Thành phần của hỗn hợp 1 bao gồm PLA: PEG: Tween 80 = 5: 7: 100 (g:g:ml).

3.4.2.4. Cô quay chân không để tạo hỗn hợp 2

Hỗn hợp 1 được cho vào hệ thống cô quay khuấy ở tốc độ 400-500 vòng/phút, ở nhiệt độ khoảng 120⁰ C độ trong vòng 5 giờ ta thu được hỗn hợp 2.

3.4.2.5. Ly tâm loại bỏ xúc tác để tạo hệ nano silymarin

Hỗn hợp 2 được để qua đêm, sau đó đem ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong thời gian 30 phút và lặp lại ly tâm 5 lần. Lọc bỏ xúc tác rắn ta thu được hệ nano silymarin.

3.5. Phương pháp phân tích và đánh giá sản phẩm

3.5.1. Phương pháp phân tích hàm lượng (HPLC)

Hàm lượng của silymarin trong hệ vi nhũ tương nano được phân tích trên máy HPLC tại Viện kiểm nghiệm an toàn thực phẩm quốc gia.

3.5.2. Phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân của mẫu silymarin ban đầu được hoà tan trong dung môi axeton-d₆. Sau đó mẫu được đo ở máy JEOL FT-NMR 400 MHz với số vòng quét tương ứng. Mẫu nano silymarin được tinh chế tách bởi dung môi hexan và metanol và cũng được đo tương tự như mẫu silymarin ban đầu.

3.5.3. Phương pháp kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM)

Kích thước hạt của silymarin được đo tại phòng nghiên cứu HR-TEM tại Viện Hàn Lâm khoa học Công nghệ Việt Nam.

3.5.4. Phương pháp thử nghiệm trên tế bào (In-vitro)

Để kiểm tra độc tính của nano silymarin trên dòng tế bào ung thư gan HepG2 và ung thư đại tràng HCT116

3.5.5. Phương pháp thử lão hoá

Độ ổn định của nano silymarin được kiểm tra trong tủ lão hoá thời gian khoảng 2 tháng. Sau 2 tháng mẫu được kiểm tra độ kiềm, độ sa lắng để đánh giá sự ổn định của hệ.

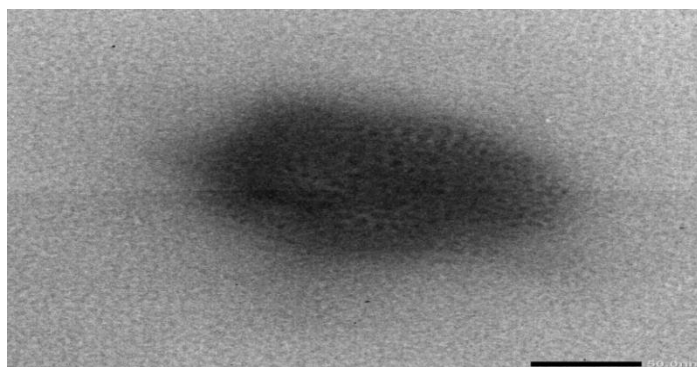
3.5.6. Phương pháp thử tính tan

Tính tan của các chất được kiểm tra bằng sự tán xạ ánh sáng tia laser đỏ.

3.6. Kết quả nghiên cứu

3.6.1. Kết quả đo TEM

Kết quả đo HR-TEM cho thấy các tiểu phần silymarin được nano hóa có dạng hình cầu nằm phân bố đều từng cụm nhỏ, kích thước 100 nm.



Hình 2. Kết quả phân tích kích thước nano silymarin

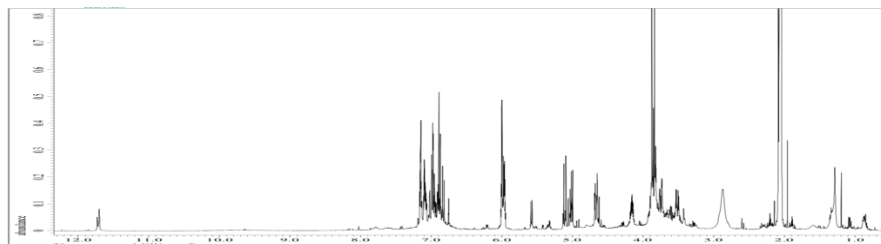
3.6.2. Kết quả phân tích hàm lượng

Phân tích hàm lượng nano silymarin đạt 5.98 g/100g bằng phương pháp thử HPLC. Như vậy, 200 g hệ vi nhũ tương nano silymarin đã được điều chế thành công với hàm lượng >5% cao hơn so với các sản phẩm hiện có trên thị trường.

Bảng 1. Kết quả phân tích hàm lượng nano silymarin

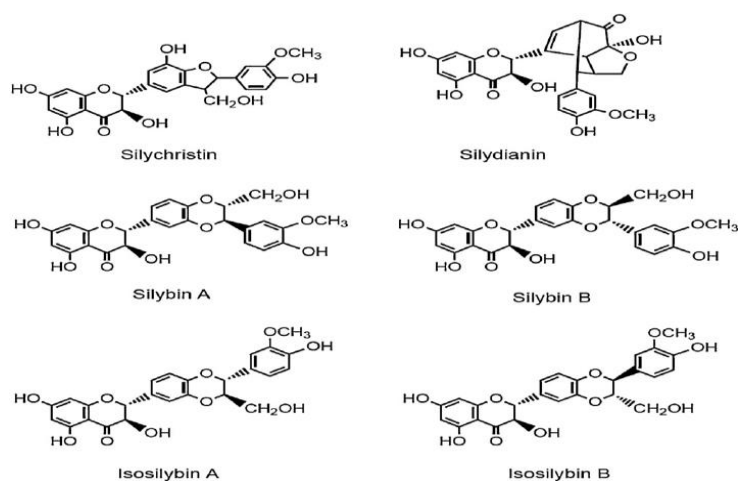
STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Phương pháp thử	Kết quả
1	Hàm lượng Silymarin tổng	g/100g	NIFC.0.5.184 (HPLC) (USP 38 - NF33)	5.98

3.6.3. Phân tích NMR – Cộng phổ từ hạt nhân

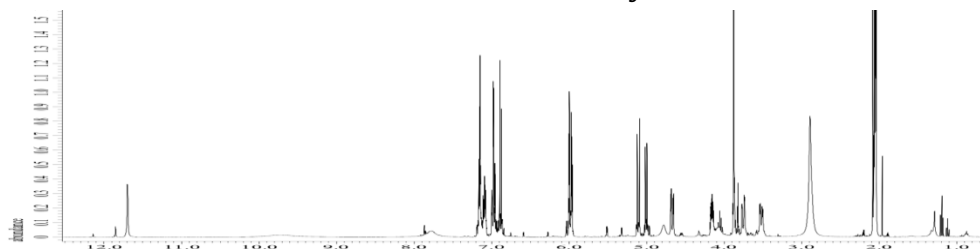


Hình 3: Phổ ¹H-NMR của mẫu silymarin trong axeton-d₆

Phổ ¹H-NMR của silymarin được đưa ra ở **Hình 3**. Trên phổ, ngoài tín hiệu của dung môi tại 2.05 ppm, các tín hiệu còn lại được quy kết cho các hợp chất chứa trong silymarin. Theo các nghiên cứu trên silymarin, các tín hiệu này được quy kết cho các hợp chất silybin như ở **Hình 4**. Sau khi nano hoá, cấu trúc của silymarin không thay đổi, được thể hiện trên phổ các tín hiệu proton giống như là mẫu silymarin ban đầu.



Hình 4: Cấu trúc của silymarin



Hình 5: Phổ ^1H -NMR của mẫu nano silymarin chiết với dung môi etylhexan

3.6.4. Kiểm định vi sinh vật và kim loại nặng

Các chỉ tiêu kỹ thuật được phân tích tại Viện kiểm nghiệm An toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia. Kết quả cho thấy sản phẩm hoàn toàn phù hợp đáp ứng vệ sinh an toàn thực phẩm quốc gia và của Bộ Y tế.

Bảng 2: Kết quả phân tích chỉ tiêu vi sinh và hóa lý.

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Phương pháp thử	Kết quả
1	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	CFU/g	ISO 4833-1:2013	KPH (LOD: 1 CFU/g)
2	Cl.perfringens	CFU/g	TCVN 4991:2005	KPH (LOD: 1 CFU/g)
3	Coliforms	CFU/g	TCVN 6848:2007	KPH(LOD: 1 CFU/g)
4	E.coli	CFU/g	TCVN7924-2:2018	KPH (LOD: 1 CFU/g)
5	Tổng số bào tử nấm mốc-men	CFU/g	TCVN 8275-2:210	KPH (LOD: 1 CFU/g)
6	Hàm lượng Cd	mg/kg	NIFC.03.M.45(ICP-MS)	KPH(LOD:0,004 mg/kg)
7	Hàm lượng Pb	mg/kg	NIFC.03.M.45(ICP-MS)	<0,012
8	Hàm lượng Hg	mg/kg	NIFC.03.M.45(ICP-MS)	KPH(LOD:0,003 mg/kg)
9	pH	-	NIFC.05.M.196	5,85
10	Tỷ trọng	-	NIFC.05.M.197	1,147

3.6.5. Kiểm định Invitro

Để xác định độc tính của nano silymarin, nhóm nghiên cứu đã thử độc tính trên dòng tế bào ung thư gan HepG2 và ung thư đại tràng HCT116.

Phương pháp tiến hành:

- Cây tế bào trên đĩa 96 giếng với mật độ 5000 tế bào/giếng trong môi trường DMEM bổ sung FBS 10% và kháng sinh PS 1%. Ủ đĩa nuôi cây tế bào trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂ trong 24 h.

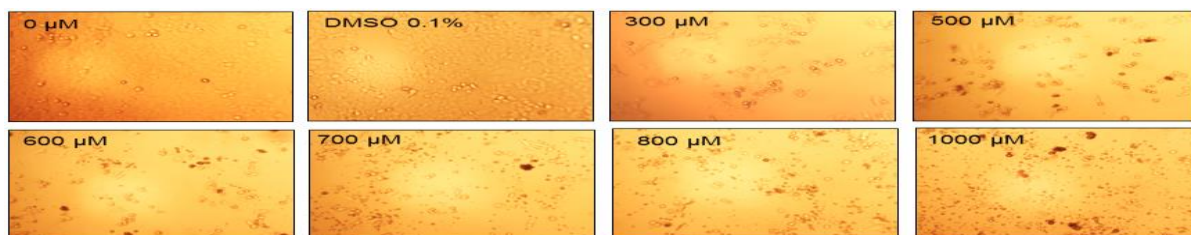
- Nano silymarin được hòa tan trong DMSO 0.1%, sau đó được thử độc tính tế bào theo dãy pha loãng 6 nồng độ gồm 1000 μ M, 800 μ M, 700 μ M, 600 μ M, 500 μ M và 300 μ M. Chuẩn bị 2 đối chứng gồm tế bào được bổ sung DMSO 0.1% và đối chứng tế bào không bổ sung nano silymarin (nồng độ 0 μ M) và DMSO 0.1%. Mỗi mẫu thí nghiệm và đối chứng được tiến hành lặp lại 3 lần. Ủ tế bào trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂ trong 72 h.

- Bổ sung 20 μ L MTS vào mỗi giếng tế bào. Ủ tế bào trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂ khoảng 4 h. Sau đó, đọc kết quả trên máy ELISA ở bước sóng 490 nm.

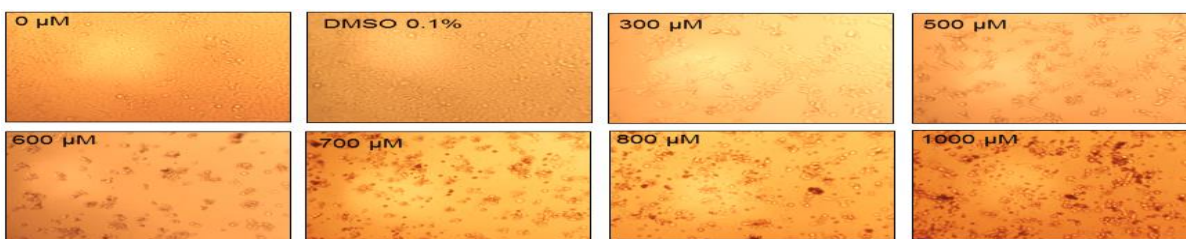
KẾT QUẢ

Kết quả 1: Hình thái tế bào khi thử nano silymarin ở các nồng độ khác nhau sau 72h

Sau khi thử nano silymarin trên dòng tế bào HepG2 và HCT116 được nuôi cấy trên đĩa 96 giếng ở dải nồng độ 1000 μ M, 800 μ M, 700 μ M, 600 μ M, 500 μ M và 300 μ M, hình thái của tế bào được quan sát bằng kính hiển vi điện tử soi ngược với độ phóng đại 10X tại các thời điểm sau tra thuốc 4h, 24h, 48h và 72h. Sau 4h tra thuốc, ở tất cả các nồng độ và đối chứng, hình thái tế bào giống hệt nhau. Sau 24h, tại nồng độ thuốc 1000 μ M, 800 μ M, 700 μ M, tế bào có dấu hiệu bị ức chế phát triển. Sau 48h, tại tất cả các nồng độ thuốc, tế bào đều có dấu hiệu bị ức chế tăng sinh so với đối chứng. Sự ức chế của tế bào do tác dụng của nano silymarin rõ rệt nhất sau 72 h (hình 6 và hình 7).



Hình 6. Hình ảnh so sánh hình thái tế bào HepG2 sau khi thử nano silymarin ở các nồng độ lần lượt là 1000; 800; 700; 600; 500 và 300 (μ M) cùng với đối chứng dung môi DMSO và ĐC (tế bào không tra nano silymarin và dung môi DMSO) sau 72h nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂. Tế bào được chụp ảnh bằng phần mềm OPTIKA với độ phóng đại 10X của vật kính hiển vi.



Hình 7. Hình ảnh so sánh hình thái tế bào HCT116 sau khi thử nano silymarin ở các nồng độ lần lượt là 1000; 800; 700; 600; 500 và 300 (μM) cùng với đối chứng dung môi DMSO và ĐC (tế bào không tra nano silymarin và dung môi DMSO) sau 72h nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C , 5% CO_2 . Tế bào được chụp ảnh bằng phần mềm OPTIKA với độ phóng đại 10X của vật kính hiển vi.

Nhận xét:

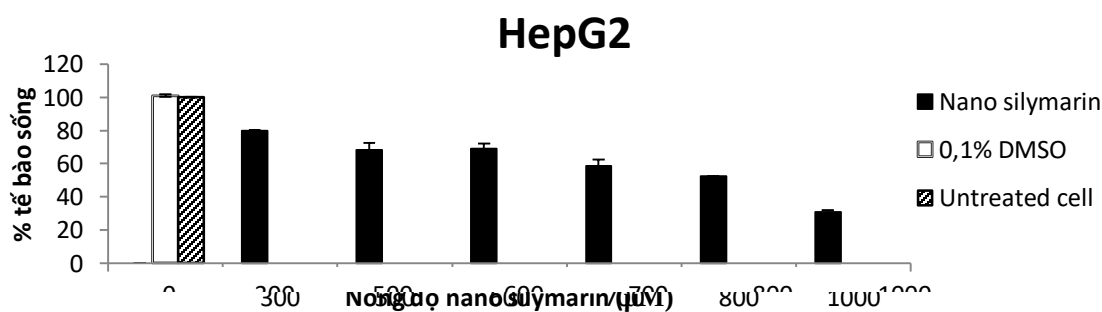
Ở nồng độ dưới $500 \mu\text{M}$, nano silymarin hòa tan tốt trong môi trường nuôi cấy. Từ nồng độ cao hơn $500 \mu\text{M}$, nano silymarin bị kết hạt li ti màu đen phủ lên trên tế bào. Nano silymarin thể hiện rõ rệt sự phát triển của cả 2 dòng tế bào ung thư gan HepG2 và ung thư đại tràng HCT116 bắt đầu từ nồng độ $500 \mu\text{M}$ sau 72 h tế bào tiếp xúc với nano silymarin so với đối chứng tế bào không bổ sung nano silymarin.

Kết quả 2: Định lượng tế bào sống sau khi thử với nano silymarin

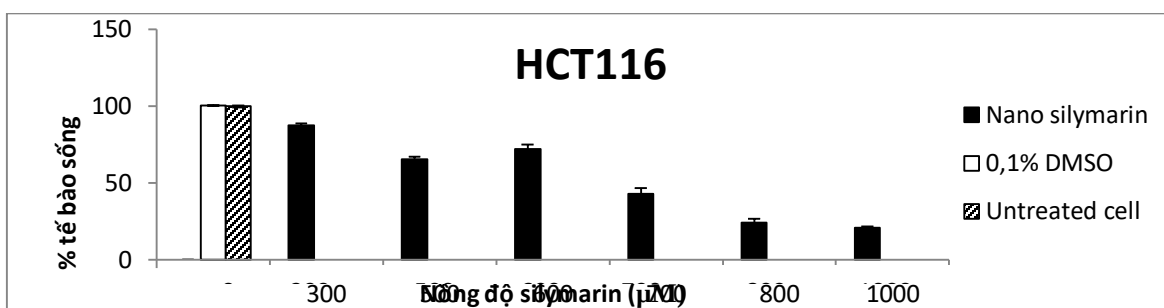
Phương pháp MTS dựa trên sự chuyển cơ chất MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] thành MTS-formazan hòa tan trong môi trường nuôi cấy tế bào có màu xanh tím bởi enzyme hô hấp ở ti thể của tế bào. Coi khả năng sống sót của tế bào ở mẫu đối chứng là 100%.

$$\text{Tỷ lệ sống sót của tế bào (\%)} = \frac{\text{OD}_{490}(\text{thí nghiệm}) - \text{OD}_{490}(\text{blank})}{\text{OD}_{490}(\text{đối chứng}) - \text{OD}_{490}(\text{blank})} \times 100\%$$

Hình 8. Hiệu quả ức chế của nano silymarin trên dòng tế bào ung thư gan HepG2 sau 72 h.



Tế bào được cấy vào mỗi giếng trên đĩa nuôi cấy 96 giếng với cùng mật độ 5000 tế bào/giếng với nồng độ nano silymarin trong dải 300-1000 μM . Đối chứng gồm đối chứng dung môi DMSO 0.1% và đối chứng tế bào (untreated cell) không bổ sung nano silymarin và DMSO. Mỗi mẫu được tiến hành lặp lại 3 lần.



Hình 9. Hiệu quả ức chế của nano silymarin trên dòng tế bào ung đại tràng HCT 116 sau 72 h.

Tế bào được cấy vào mỗi giếng trên đĩa nuôi cấy 96 giếng với cùng mật độ 5000 tế bào/giếng với nồng độ nano silymarin trong dải 300-1000 µM. Đối chứng (untreated cell) gồm đối chứng dung môi DMSO 0.1% và đối chứng tế bào không bổ sung nano silymarin và DMSO. Mỗi mẫu được tiến hành lặp lại 3 lần.

NHẬN XÉT

- Nano silymarin có khả năng gây ức chế sự phát triển của cả hai dòng tế bào ung thư gan HepG2 và ung thư đại tràng HCT116 từ nồng độ 500 µM-1000 µM.

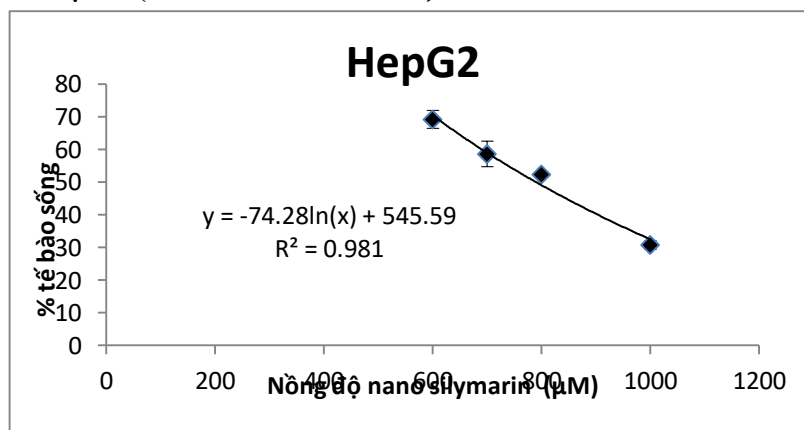
- Nano silymarin gây chết 50% tế bào ung thư gan so với đối chứng trong khoảng nồng độ 700-800 µM.

- Nano silymarin gây chết 50% tế bào ung thư gan so với đối chứng trong khoảng nồng độ 600-700 µM.

*** Xác định giá trị IC_{50}**

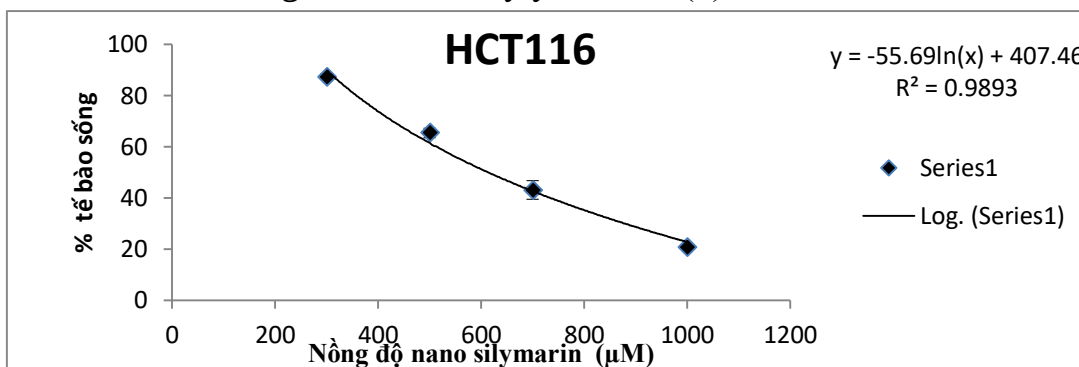
IC_{50} là nồng độ của nano silymarin gây ức chế 50% tế bào ung thư phát triển so với đối chứng.

Giá trị IC_{50} được xác định thông qua tỉ lệ tế bào sống sót tại dải nồng độ đã khảo sát 300-1000 µM (hình 10 và hình 11).



Hình 10. Đồ thị đường chuẩn xác định nồng độ nano silymarin gây ức chế tế bào HepG2 tại các nồng độ 300-1000 µM. Mỗi nồng độ nano silymarin được thử nghiệm lặp lại 3 lần.

Từ các giá trị % tế bào sống sót sau khi tra thuốc tại các nồng độ tương ứng đã khảo sát và bằng phần mềm excel 2016, xác định được phương trình tổng quát mô tả tỉ lệ tế bào sống sót của tế bào HepG2 là: $y = -74.28 + 545.59$, ($R^2 = 0.981$) (1). Để xác định được giá trị IC_{50} , thay $y=50$ vào (1) tính được $IC_{50} = x = 789.908 \mu M$.



Hình 11. Đồ thị đường chuẩn xác định nồng độ nano silymarin gây ức chế tế bào HCT116 tại các nồng độ 300-1000 μM . Mỗi nồng độ nano silymarin được thử nghiệm lặp lại 3 lần.

Từ các giá trị % tế bào sống sót sau khi tra thuốc tại các nồng độ tương ứng đã khảo sát và bằng phần mềm excel 2016, chúng tôi xác định được phương trình tổng quát mô tả tỉ lệ tế bào sống sót của tế bào là: $y = -55.69 \ln(x) + 407.46$, ($R^2 = 0.9893$) (2). Để xác định được giá trị IC_{50} , thay $y = 50$ vào phương trình (2) tính được $IC_{50} = x = 613.234 \mu M$.

KẾT LUẬN

Nano silymarin có khả năng ức chế sự phát triển của cả hai dòng tế bào ung thư gan người HepG2 và ung thư đại tràng người HCT116. Trên dòng ung thư gan HepG2: $IC_{50} = 789.908 \mu M$ tương đương với nồng độ 0.38 mg/mL. Trên dòng ung thư đại tràng HCT116: $IC_{50} = 613.234 \mu M$ tương đương với nồng độ 0.296 mg/mL.

So với hàm lượng của nano silymarin trong một viên nang là 20 mg, kết quả thu được cho thấy sản phẩm nano silymarin viên nang của nhóm có tiềm năng tiêu diệt cả hai loại tế bào ung thư gan và ung thư đại tràng.

3.6.6. Thử nghiệm lão hóa

Mẫu nano silymarin được thử nghiệm trong tủ lão hóa từ tháng 6/2019 đến tháng 8/2019. Kết quả cho thấy mẫu sau thử nghiệm có độ pH trước và sau khi lão hóa thay đổi không đáng kể, riêng độ nhớt không thay đổi và mẫu không có hiện tượng kết tủa hay phân lớp. Theo nhà sản xuất, thời gian thử nghiệm 2 tháng trong tủ lão hoá cấp tốc ở nhiệt độ 40-60 $^{\circ}C$, độ ẩm tương đương với 2 năm khi ở điều kiện bên ngoài.

3.6.7. Thử nghiệm khả năng tan trong nước

Tính tan trong nước được thử nghiệm sử dụng 3 cốc: cốc 1 chứa nước nguyên chất, cốc 2 chứa silymarin trong nước (200mg silymarin – 2ml nước), cốc 3 chứa nano silymarin trong nước (200mg nano silymarin – 2ml nước). Chiếu tia laser đỏ đi qua cả 3 cốc. Cốc chứa silymarin tia laser ko đi qua được do các hạt silymarin có kích thước lớn, phản xạ toàn bộ ánh sáng, còn cốc chứa nano silymarin thì tia laser đi thẳng chứng tỏ kích thước hạt nano rất nhỏ nên ta nhìn thấy tia xuyên qua cốc nước dễ dàng.

PHẦN IV. KẾT LUẬN

1. Các kết quả chính của nghiên cứu:

Nhóm nghiên cứu đã nghiên cứu thành công quy trình điều chế nano silymarin.

Tổng hợp thành công nano silymarin với kích thước 100 nm đồng đều; điều chế được 200 g nano silymarin hàm lượng nano silymarin đạt 5,98g/100g bằng phương pháp HPLC, tăng khả năng hòa tan trong nước mà vẫn giữ được cấu trúc hóa học, hoạt tính sinh học của silymarin trong quá trình nano hóa. Vì vậy, nano silymarin có thể thâm nhập dễ dàng qua màng tế bào để phát huy hiệu quả và tăng độ hòa tan của silymarin trong nước, từ đó làm tăng tính sinh khả dụng của silymarin.

2. Các điểm mới của nghiên cứu:

Trong công trình nghiên cứu của chúng em, PEG 600 được sử dụng kết hợp với PLA đóng vai trò chất nhũ hoá cùng với Tween 80. Hệ nhũ hoá này có khả năng tạo ra hệ mixen hình cầu, phân bố đều, bền vững với thời gian, giúp cho việc bảo vệ các hạt nano được tốt hơn.

Thông qua việc sử dụng hệ nhũ hoá kết hợp này, quy trình điều chế của chúng em lần đầu tiên đã thành công trong việc tạo ra được hạt nano silymarin với kích thước 100 nm ở hàm lượng lớn (>5%). Nhóm nghiên cứu hi vọng rằng quy trình điều chế nano silymarin sẽ được tiếp tục nghiên cứu sâu hơn để triển khai ứng dụng thực tế đem lại giá trị mặt khoa học và kinh tế cho xã hội và cuộc sống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Silymarin in the prevention and treatment of liver diseases and primary liver cancer.
- [2]. Silymarin in the treatment of chronic liver diseases: past and future.
- [3]. Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years.
- [4]. Hepatoprotective effect of silymarin.
- [5]. Hepatoprotective effects of silymarin on CCl₄-induced hepatic damage in broiler chickens model.
- [6]. Protective effects of silymarin, a milk thistle (*Silybium marianum*) derivative on ethanol-induced oxidative stress in liver.

KẾT LUẬN

1. Số lượng đề tài NCKH qua các năm học của tổ Hoá Sinh CN:

Năm học	Đề tài NCKH	Kết quả Cấp Cụm	Kết quả cấp TP, QG
2017-2018	0	0	0
2018-2019	03	1 Nhất, 2 giải Ba	start up: 1 Nhất TP, 1 Nhất QG
2019-2020	03	1 Nhất, 2 giải Ba	1 Nhất TP, tham gia thi QG

2.. Sự thành công của đề tài đã tạo động lực cho thầy trò nhà trường tiếp tục đẩy mạnh phong trào tham gia nghiên cứu KHKT

3. Công tác NCKH góp phần hình thành tính năng động, sáng tạo, khả năng vận dụng sáng tạo kiến thức lý thuyết vào thực tế của học sinh, tiếp cận chương trình, sách giáo khoa mới theo hướng phát triển năng lực và phẩm chất người học.

4. Kỹ năng học tập, làm việc nhóm, lập luận, trình bày... của học sinh được cải thiện, góp phần thúc đẩy việc thay đổi phương pháp dạy học theo hướng tích cực hiện nay; tạo sân chơi mới lý thú, bổ ích, hấp dẫn

5. Kết quả của đề tài, dự án cho thấy ưu thế của học sinh Hà Nội - là cơ sở để tăng cường đầu tư thiết bị, thí nghiệm hiện đại, tạo điều kiện cho các em sớm tham gia NCKH, tiếp cận con đường khoa học chân chính. Đề tài là một tài liệu tham khảo hữu ích cho giáo viên và học sinh tham gia công tác nghiên cứu khoa học.

KIẾN NGHỊ

1.Đẩy mạnh công tác tuyên truyền: Tổ chức truyền thông rộng rãi về mục đích, ý nghĩa, nội dung, kế hoạch các cuộc thi, hội thi đến các đơn vị chức năng, ngành giáo dục đào tạo, cán bộ, giáo viên, học sinh, phụ huynh học sinh và cộng đồng xã hội, từ đó nâng cao nhận thức cho các đơn vị, cá nhân, xã hội và chất lượng giáo dục, đào tạo.

2.Nâng cao năng lực nghiên cứu cho học sinh và giáo viên: Tổ chức các hoạt động hội thảo, tập huấn bồi dưỡng cho cán bộ quản lý giáo dục, GV, HS về phương pháp, kỹ năng NCKH;; tạo điều kiện, khuyến khích để HS, GV tham gia hội nghị, hội thảo khoa học và triển khai áp dụng kết quả nghiên cứu vào thực tiễn.

3.Tổ chức thực hiện, cơ chế chính sách: Cần có chế độ ưu tiên, khuyến khích đối với giáo viên, người hướng dẫn NCKH, học sinh đoạt giải cấp cơ sở; người có nhiều đóng góp tích cực trong Cuộc thi, kịp thời khích lệ, động viên, khuyến khích những học sinh có thành tích cao trong các Cuộc thi khoa học và kỹ thuật

4. Liên kết, liên hệ với các nhà khoa học, các trường ĐH trên địa bàn để có những hỗ trợ, chia sẻ, hướng dẫn nhằm giúp cho việc NCKH của học sinh đạt kết quả tốt nhất.