

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HCM



NGUYỄN THỊ DUNG

NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP NANO SELEN/ β -GLUCAN
CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC BẰNG PHƯƠNG PHÁP
CHIẾU XẠ

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học

Mã số ngành: 9.42.02.01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thành phố Hồ Chí Minh - 2025

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HCM



NGUYỄN THỊ DUNG

NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP NANO SELEN/ β -GLUCAN
CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC BẰNG PHƯƠNG PHÁP
CHIẾU XẠ

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học

Mã số ngành: 9.42.02.01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Lê Quang Luân

PGS.TS. Trần Thị Lệ Minh

Thành phố Hồ Chí Minh - 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi cam đoan luận án tiến sĩ ngành Công nghệ Sinh học với đề tài “Nghiên cứu tổng hợp nano selen/ β -glucan có hoạt tính sinh học bằng phương pháp chiếu xạ” là công trình khoa học do tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Lê Quang Luân và PGS.TS. Trần Thị Lệ Minh. Những kết quả nghiên cứu của luận án này hoàn toàn trung thực và chính xác.

Ngoài ra, trong luận án có sử dụng một số nhận xét, đánh giá cũng như so sánh với số liệu của các tác giả, cơ quan tổ chức khác và đều có trích dẫn, chú thích nguồn tham khảo. Nếu phát hiện có bất kỳ sự gian lận nào, tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về nội dung luận án của mình.

TP. Hồ Chí Minh, ngày tháng năm 2025

Nghiên cứu sinh

Nguyễn Thị Dung

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin được dành sự biết ơn sâu sắc đến PGS.TS. Lê Quang Luân người đã tận tình hướng dẫn, hỗ trợ và định hướng cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận án. Thầy đã luôn quan tâm giúp đỡ, góp ý để tôi hoàn thiện không chỉ luận án này mà còn giúp tôi hoàn thiện kỹ năng khác trong công việc nghiên cứu khoa học cũng như trong cuộc sống. Tôi xin được cảm ơn PGS.TS. Trần Thị Lệ Minh đã hướng dẫn, quan tâm và giúp đỡ tôi rất nhiều. Cô đã luôn tận tâm góp ý cho tôi xuyên suốt quá trình thực hiện đề tài.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Trường Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện để tôi hoàn thành luận án này. Ngoài ra xin gửi lời cảm ơn tới thầy cô Khoa Khoa học Sinh học - Trường Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh đặc biệt là quý thầy cô: TS. Đinh Xuân Phát, PGS.TS. Nguyễn Vũ Phong, TS. Cao Thị Thanh Loan đã tận tâm giảng dạy, hỗ trợ và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt quá trình học tập cũng như khi thực hiện luận án này.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn đến Trung tâm Công nghệ Sinh học và Sở Khoa học Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi theo học chương trình đào tạo tiến sĩ và hỗ trợ kinh phí, cơ sở vật chất để tôi thực hiện luận án này. Bên cạnh đó, tôi xin cảm ơn quỹ học bổng Foundation Vallet-Rencontres du Vietnam dành cho nghiên cứu sinh đã tạo động lực giúp tôi cố gắng trong quá trình nghiên cứu. Đồng thời, tôi cũng xin chân thành cảm ơn các bạn phòng CNSH Vật Liệu và Nano và phòng CNSH Thực phẩm, trung tâm Công nghệ Sinh học đã luôn tận tình hỗ trợ tôi trong quá trình thực hiện luận án. Lời cảm ơn triu mến nhất, tôi xin gửi đến chồng Trần Thanh Tuấn đã luôn bên cạnh sẻ chia những buồn vui, áp lực trong công việc cũng như trong cuộc sống, luôn là điểm tựa, là niềm tin và là nguồn động lực giúp tôi vượt qua mọi khó khăn trong cuộc sống. Sau cùng, con xin gửi lời biết ơn sâu sắc của con đến cha mẹ, người đã sinh thành, nuôi nấng và dạy dỗ con nên người. Cha mẹ đã không quản ngại khó khăn, vất vả để tạo mọi điều kiện tốt nhất cho hai chị em

con học hành, đó là hành trang và là tài sản quý giá nhất để chúng con bước vào đời. Cảm ơn gia đình chồng, ba má chồng đã và đang là nguồn động viên to lớn đối với con. Thật hạnh phúc và may mắn khi được là một thành viên của đại gia đình.

Tôi xin trân trọng cảm ơn!

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH SÁCH BẢNG	xi
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	xii
TÓM TẮT.....	xiv
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề	1
2.Mục tiêu nghiên cứu	3
3.Ý nghĩa khoa học của luận án.....	3
4. Ý nghĩa thực tiễn của luận án	3
5. Tính mới của luận án	4
6. Đối tượng nghiên cứu.....	4
7. Phạm vi nghiên cứu	4
Chương 1. TỔNG QUAN.....	6
1.1. Tổng quan công nghệ nano.....	6
1.2. Tổng quan nano selen.....	8
1.2.1 Tổng quan về selen	8
1.2.2. Nhu cầu sử dụng selen đối với sức khỏe con người.....	10
1.3. Các phương pháp tổng hợp nano selen.....	11
1.3.1. Phương pháp hóa học	12
1.3.2. Phương pháp sinh học	13
1.3.3. Phương pháp vật lý.....	15
1.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến sản phẩm SeNPs khi tổng hợp.....	20
1.5. Các phương pháp phân tích đặc trưng của các hạt nano selen	22
1.6. Hoạt tính sinh học của nano selen.....	26
1.6.1. Hoạt tính chống oxy hóa.....	26
1.6.2. Hoạt tính tăng cường miễn dịch.....	28
1.6.3. Hoạt tính ức chế tế bào ung thư	30
1.7. Tổng quan về β -glucan.....	35

1.7.1. Cấu trúc, nguồn gốc.....	35
1.7.2. Thu nhận β -glucan từ nấm men	36
1.7.3. Hoạt tính sinh học của β -glucan.....	37
1.7.4. Vai trò của β -glucan trong việc làm chất ổn định trong tổng hợp nano.....	38
1.8. Những nghiên cứu liên quan đến luận án.....	39
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	42
2.1. Vật liệu nghiên cứu:	42
2.2. Nội dung của luận án.....	43
2.3. Phương pháp nghiên cứu	45
2.3.1. Tổng hợp nano selen ổn định trong β -glucan có Mw thấp và tan trong nước bằng phương pháp chiếu xạ	45
2.3.1.1 Chuẩn bị các dung dịch stock.....	45
2.3.1.2 Phương pháp chiếu xạ tổng hợp nano selen ổn định trong β -glucan	45
2.3.1.3 Xác định liều chiếu xạ chuyển hóa bão hòa của các nồng độ Se^{4+} khác nhau	45
2.3.2. Phương pháp đánh giá các điều kiện ảnh hưởng đến kích thước hạt SeNPs/ β -glucan.....	46
2.3.2.1 Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ Se^{4+} đến kích thước hạt SeNPs/ β -glucan.....	46
2.3.2.2 Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ chất ổn định β -glucan đến kích thước hạt SeNPs/ β -glucan.....	47
2.3.2.3 Đánh giá ảnh hưởng của suất liều đến kích thước SeNPs/ β -glucan.....	47
2.3.2.4 Đánh giá ảnh hưởng của pH đến quá trình tổng hợp SeNPs/ β -glucan	47
2.3.3. Khảo sát độ ổn định của SeNPs/ β -glucan sau khi tổng hợp.....	48
2.3.4. Khảo sát ảnh hưởng của phương pháp sấy khô đến kích thước hạt của SeNPs/ β -glucan.....	48
2.3.5. Xác định đặc trưng của SeNPs/ β -glucan	49
2.3.5.1 Phương pháp đo giảm độ nhiễu xạ tia X.....	49
2.3.5.2 Phương pháp đo phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR).....	49
2.3.5.3 Phương pháp xác định kích thước hạt SeNPs/ β -glucan bằng DLS.....	49
2.3.5.4 Phương pháp chụp ảnh TEM	50
2.3.6. Đánh giá độc tính cấp của SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ.....	50

2.3.7. Phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs/ β -glucan.....	51
2.3.7.1 Khảo sát ảnh hưởng của kích thước hạt SeNPs đến khả năng bắt gốc tự do ABTS ⁺	51
2.3.7.2 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ SeNPs/ β -glucan đến khả năng bắt gốc tự do ABTS ⁺	52
2.3.8. Đánh giá hoạt tính tăng cường miễn dịch của SeNPs/ β -glucan trên chuột gây suy giảm miễn dịch.....	52
2.3.8.1 Phương pháp tạo mô hình chuột bị ức chế miễn dịch.....	52
2.3.8.2 Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đến chỉ số lách và các chỉ số cytokine và immunoglobulin trong lách chuột.....	53
2.3.8.3 Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đến chỉ số cytokine và immunoglobulin trên chuột.....	53
2.3.8.4 Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đến chỉ số miễn dịch tế bào	54
2.3.9. Đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan HepG2 của SeNPs/ β -glucan.....	55
2.3.9.1 Đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan HepG2	55
2.3.9.2 Độc tính của SeNPs/ β -glucan trên nguyên bào sợi L929.....	55
2.3.9.3 Đánh giá cảm ứng apoptosis đối với tế bào HepG2.....	56
2.3.9.4 Phương pháp đánh giá cảm ứng chu kỳ tế bào (cell cycle).....	57
2.3.10. Phương pháp xử lý số liệu	57
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	58
3.1. Kết quả tổng hợp nano selen ổn định trong β -glucan có Mw thấp và tan trong nước bằng phương pháp chiếu xạ.....	58
3.1.1. Kết quả xác định liều xạ chuyển hóa bão hòa.....	58
3.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ Se ⁴⁺ đến kích thước hạt của SeNPs/ β -glucan tạo thành. .	60
3.1.3. Ảnh hưởng của nồng độ β -glucan đến kích thước hạt SeNPs/ β -glucan tạo thành..	62
3.1.4. Ảnh hưởng của suất liều đến kích thước hạt SeNPs/ β -glucan tạo thành	65
3.1.5. Ảnh hưởng của pH đến kích thước hạt SeNPs/ β -glucan tạo thành	67
3.1.6. Kết quả khảo sát độ ổn định của SeNPs/ β -glucan sau khi tổng hợp	70
3.1.7. Kết quả khảo sát tạo chế phẩm SeNPs/ β -glucan dạng bột	73

3.1.8. Quy trình tổng hợp nano selen ổn định trong β -glucan có Mw thấp và tan trong nước bằng phương pháp chiếu xạ	81
3.2. Độc tính cấp của SeNPs/ β -glucan	86
3.3. Kết quả khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của dung dịch keo SeNPs/ β -glucan.....	90
3.3.1. Hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs/ β -glucan theo kích thước hạt.....	90
3.3.2. Ảnh hưởng của nồng độ SeNPs/ β -glucan đến hoạt tính chống oxy hóa.....	93
3.4. Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đối với hoạt tính miễn dịch của SeNPs/ β -glucan	95
3.4.1. Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đến trọng lượng của chuột suy giảm miễn dịch	95
3.4.2. Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đến các chỉ số miễn dịch ở lách trên chuột suy giảm miễn dịch.....	96
3.4.2. Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đến các chỉ số cytokine và immunoglobulin trên chuột suy giảm miễn dịch	99
3.4.3. Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đến các chỉ số miễn dịch tế bào trong máu ngoại vi.....	101
3.4.4. Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan lên các chỉ số miễn dịch trong tủy xương	104
3.5. Hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan HepG2 của SeNPs/ β -glucan	110
3.5.1. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan HepG2.....	110
3.5.2. Kết quả khả năng cảm ứng apoptosis tế bào ung thư.....	117
3.5.3. Kết quả phân tích chu kỳ tế bào	122
Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	128
4.1. Kết luận.....	128
4.2. Kiến nghị	128
TÀI LIỆU THAM KHẢO	130
Tài liệu tiếng Việt.....	130
Tài liệu tiếng Anh.....	130
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ	141
PHỤ LỤC	143

DANH SÁCH HÌNH

Hình 1.1. Hoạt động điều hòa miễn dịch của SeNPs	30
Hình 1.2. Các con đường ức chế tế bào ung thư của SeNPs	33
Hình 1.3. Cấu trúc phân tử β -glucan	36
Hình 2.1. Sơ đồ nội dung nghiên cứu chính của luận án	44
Hình 3.1. Liều chuyển hóa bão hòa của dung dịch Se^{4+} có nồng độ khác nhau	59
Hình 3.2. Dung dịch SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ ở các nồng độ Se^{4+} khác nhau	59
Hình 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ Se^{4+} ban đầu đến kích thước hạt SeNPs/ β - glucan tạo thành sau khi chiếu xạ	62
Hình 3.4. Kích thước hạt của mẫu SeNPs/ β -glucan tổng hợp được ở các nồng độ chất ổn định β -glucan khác nhau	64
Hình 3.5. Kích thước hạt của mẫu SeNPs/ β -glucan tổng hợp được ở các suất liều khác nhau	67
Hình 3.6. Kích thước hạt của mẫu SeNPs/ β -glucan tổng hợp được ở các điều kiện pH khác nhau	69
Hình 3.7. Kích thước hạt của dung dịch SeNPs/ β -glucan tổng hợp sau 30 ngày bảo quản ở điều kiện nhiệt độ khác nhau.	70
Hình 3.8. Kích thước hạt của dung dịch SeNPs/ β -glucan tổng hợp sau 60 ngày bảo quản ở điều kiện nhiệt độ khác nhau	71
Hình 3.9. Ảnh hưởng của các phương pháp tạo bột đến kích thước hạt của mẫu SeNPs/ β -glucan dạng bột.....	74
Hình 3.10. Chế phẩm bột SeNPs/ β -glucan ở các phương pháp sấy khác nhau .	75
Hình 3.11. Mẫu dung dịch SeNPs/ β -glucan sau khi tổng hợp ở điều kiện tối ưu	76
Hình 3.12. Ảnh TEM và phân bố kích thước hạt của SeNPs/ β -glucan tạo thành.....	77

Hình 3.13. Phổ FTIR của mẫu SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ.....	78
Hình 3.14. Giản đồ XRD của mẫu SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ.....	79
Hình 3.15. Sơ đồ quá trình tổng hợp SeNPs/ β -glucan bằng phương pháp chiếu xạ.....	80
Hình 3.16. Quy trình tổng hợp SeNPs/ β -glucan bằng phương pháp chiếu xạ...	82
Hình 3.17. Hình ảnh SeNPs/ β -glucan dạng bột.....	86
Hình 3.18. Hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs/ β -glucan có kích thước hạt khác nhau ở nồng độ 10 ppm	92
Hình 3.19. Hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs/ β -glucan có kích thước hạt 92,02 nm ở các nồng độ khác nhau	94
Hình 3.20. Thể trọng chuột sau 14 ngày điều trị với SeNPs/ β -glucan.....	96
Hình 3.21. Ảnh hưởng của nồng độ SeNPs/ β -glucan lên các chỉ số miễn dịch trong lách ở chuột gây bị suy giảm miễn dịch.....	98
Hình 3.22. Ảnh hưởng của nồng độ SeNPs/ β -glucan lên các chỉ số miễn dịch dịch thể trong huyết thanh ở chuột bị gây suy giảm miễn dịch	100
Hình 3.23. Ảnh hưởng của nồng độ SeNPs/ β -glucan lên các chỉ số miễn dịch tế bào máu ngoại vi ở chuột bị gây suy giảm miễn dịch	103
Hình 3.24. Ảnh hưởng của nồng độ SeNPs/ β -glucan lên các chỉ số miễn dịch trong tủy xương ở chuột bị gây suy giảm miễn dịch	106
Hình 3.25. Tỷ lệ sống của tế bào HepG2 khi xử lý với các nồng độ SeNPs/ β -glucan khác nhau	110
Hình 3.26. Giá trị IC ₅₀ của SeNPs/ β -glucan trên tế bào ung thư gan HepG2 ..	111
Hình 3.27. Hình ảnh tế bào ung thư gan HepG2 khi xử lý với các nồng độ SeNPs/ β -glucan khác nhau.....	111
Hình 3.28. Tỷ lệ sống của nguyên bào sợi L929 khi xử lý với các SeNPs/ β -glucan khác nhau	115
Hình 3.29. Giá trị IC ₅₀ của SeNPs/ β -glucan trên nguyên bào sợi L929.....	116

Hình 3.30. Hình ảnh nguyên bào sợi L929 khi xử lý SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 1 - 20 ppm	116
Hình 3.31. Tỷ lệ sống tế bào HepG2 phân bố các vùng khác nhau sau khi xử lý với SeNPs/ β -glucan	117
Hình 3.32. Kết quả phân tích Flow cytometry của tế bào HepG2 sau khi xử lý SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 1 - 20 ppm.	120
Hình 3.33. Hình ảnh tế bào trước và sau khi xử lý SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 1 - 20 ppm.....	121
Hình 3.34. Biểu đồ phân bố chu kỳ tế bào HepG2 được xử lý SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 1 - 20 ppm.....	123
Hình 3.35. Kết quả phân bố chu kỳ tế bào của các tế bào HepG2 xử lý SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 1 - 20 ppm	124

DANH SÁCH BẢNG

Bảng 3.1. Kết quả kiểm tra chất lượng sản phẩm tạo thành.....	84
Bảng 3.2. Độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt của chế phẩm SeNPs/ β -glucan ở các liều khác nhau (đợt cho uống thứ nhất)	86
Bảng 3.3. Độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt của chế phẩm SeNPs/ β -glucan ở các liều khác nhau (đợt cho uống thứ hai)	86
Bảng 3.4. Độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt của chế phẩm SeNPs/ β -glucan ở các liều khác nhau (đợt cho uống thứ ba).....	87
Bảng 3.5. Các biểu hiện của chuột thử nghiệm ở các liều thử khác nhau.....	88

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

ATBS	2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
7AAD	7-amino-actinomycin D
BSA	Bovine Serum Albumin (albumin huyết thanh bò)
Co-60	Cobalt 60
CNSH	Công nghệ Sinh học
CD34	Tế bào biểu hiện tế bào tạo máu CD34 (glycoprotein)
CD4	Tế bào biểu hiện tế bào bạch cầu T (tế bào lympho T)
CTX	Cytoxan (cyclophosphamide)
CTS	Chitosan
DLS	Dynamic light scattering (tán xạ ánh sáng động)
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium (Môi trường nuôi cấy tế bào)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNase	Deoxyribonucleases
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)-2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ĐC	Nghiệm thức đối chứng
ĐC(+)	Normal control (nghiệm thức chuột khỏe mạnh)
ĐC(-)	Nghiệm thức đối chứng âm chuột bị suy giảm miễn dịch bởi cytoxan
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay (kỹ thuật xét nghiệm miễn dịch enzyme)
FBS	Fetal bovine serum (huyết thanh bào thai bò)
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy (quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier)
kDa	Kilo dalton

GPC	Gel permeation chromatography (sắc ký gel thấm qua)
Gy	Gray
IC ₅₀	Inhibitory Concentration 50% (nồng độ ức chế 50%)
IFN	Interferon
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IL-2	Interleukin 2
LD	Lethal dose (liều gây chết)
Mw	Molecular weight (khối lượng phân tử)
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazol brom
NK	Cell natural killer cell (tế bào giết tự nhiên)
NCR	National Research Council
NP	Nanoparticle
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Propidium iodide
ROS	Reactive oxygen species (gốc oxy phản ứng)
Se	Selen (selenium)
SeNPs	Selen nanoparticles (nano selen)
SI	Selectivity index (chỉ số lựa chọn)
SEM	Scanning electron microscope (kính hiển vi điện tử quét)
TEM	Transmission electron microscope (kính hiển vi điện tử truyền qua)
Tia γ	Tia gamma
TNF	Tumor necrosis factor (yếu tố hoại tử khối)
UV- Vis	Ultraviolet- visible spectroscopy (quang phổ khả kiến)
WBC	White blood cell (bạch cầu tổng số)
WHO	World Health Organization (Tổ chức y tế thế giới)
XRD	X-ray powder diffraction (nhiễu xạ tia X)

TÓM TẮT

Selen (selenium - Se) là nguyên tố vi lượng quan trọng và rất cần thiết cho người và động vật. Các hạt nano selen (SeNPs) là một dạng sản phẩm của Se đã và đang được chú trọng và ứng dụng nhờ tính khả dụng sinh học và độc tính thấp hơn rất nhiều so với các dạng selen vô cơ và hữu cơ. Do đó việc nghiên cứu tổng hợp hạt SeNPs và đánh giá các hoạt tính sinh học của chúng nhằm hướng tới ứng dụng nó như một tác nhân chống oxy hóa, kích thích miễn dịch và điều trị ung thư là rất cần thiết.

Đề tài “Nghiên cứu tổng hợp nano selen/ β -glucan có hoạt tính sinh học bằng phương pháp chiếu xạ” được thực hiện từ tháng 09/2020 đến tháng 5/2024 tại Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh và Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh. Mục tiêu của đề tài là xây dựng thành công quy trình và tổng hợp được chế phẩm SeNPs ổn định trong β -glucan bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma Co-60, đồng thời đánh giá được hoạt tính chống oxy hóa, khả năng ức chế tế bào ung thư gan HepG2 và hoạt tính tăng cường miễn dịch của chế phẩm SeNPs/ β -glucan sau khi tổng hợp.

Sau quá trình thực hiện đề tài đã đạt được một số kết quả như sau: Đã tổng hợp thành công dung dịch SeNPs ổn định trong β -glucan bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60 bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma Co-60, xác định được liều chiếu xạ chuyển hóa bão hòa là 4, 6, 8, 10 và 12 kGy đối với các mẫu SeNPs/ β -glucan có nồng độ Se^{4+} ban đầu tương ứng là 40, 60, 80, 100 và 120 ppm. Và theo đó, kích thước hạt của các SeNPs/ β -glucan cũng được xác định lần lượt là 64,79, 71,74, 92,02, 96,71 và 110,1 nm khi chiếu xạ ở liều chiếu xạ chuyển hóa bão hòa. Kết quả đạt được cho thấy điều kiện phù hợp để tổng hợp chế phẩm SeNPs/ β -glucan bao gồm: nồng độ Se^{4+} 80 ppm và nồng độ chất ổn định β -glucan 2%, pH dung dịch ~ 5 và suất liều là 10 kGy/h. Sản phẩm dung dịch SeNPs/ β -glucan tạo thành có kích thước hạt 92 nm. Ảnh hưởng của các điều kiện bảo quản dung dịch SeNPs/ β -glucan ở 25, 4 và 0°C đến kích thước hạt

SeNPs/ β -glucan cũng được đánh giá sau 30 và 60 ngày lưu trữ. Ngoài ra, phương pháp đông khô cũng được chứng minh là phương pháp tốt nhất để tạo SeNPs dạng bột mà không làm gia tăng kích thước hạt. Chế phẩm SeNPs/ β -glucan tổng hợp được bằng phương pháp chiếu xạ đã thiện hiện hoạt tính chống oxy hóa cao và rất bền theo thời gian. Chế phẩm SeNPs/ β -glucan còn thể hiện hoạt tính tăng cường miễn dịch cao với các chỉ số miễn dịch tế bào và miễn dịch dịch thể trong máu ngoại vi, tủy xương và trong lách trên mô hình chuột gây suy giảm miễn dịch bằng cytoxan. Kết quả cho thấy ở liều 6 mg/kg thể trọng đã có tác dụng phục hồi mạnh mẽ các chỉ số miễn dịch với giá trị tương đương so với chuột bình thường không gây suy giảm miễn dịch. Thêm vào đó, kết quả từ nghiên cứu này còn cho thấy, Chế phẩm SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ đã thể hiện rõ hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan HepG2 nhưng lại không gây độc đối với nguyên bào sợi L929 ở các nồng độ sử dụng dưới 20 ppm. Nghiên cứu cũng đã chứng minh được chế phẩm SeNPs/ β -glucan ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư gan HepG2 thông qua cảm ứng apoptosis và ức chế chu kỳ phân chia tế bào.

Từ những kết quả của luận án cho thấy chế phẩm SeNPs/ β -glucan tổng hợp được từ phương pháp chiếu xạ tia gamma Co-60 hứa hẹn là hoạt chất bổ sung tốt, hiệu quả, an toàn và có triển vọng ứng dụng cao để làm nguyên liệu trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe với mục đích chống oxy hóa, ức chế ung thư và tăng cường miễn dịch nhằm đáp ứng nhu cầu thị trường về dòng sản phẩm này.

SUMMARY

Selenium (Se) is an essential trace element for maintaining the health of mammals due to its broad functions in biological systems, such as antioxidant, immune modulation, cancer prevention, and antiviral activities. Selenium nanoparticles (SeNPs), which are considered a novel Se compound, have attracted widespread attention due to their excellent bioavailability, high bioactivity, and low toxicity compared to their inorganic and organic counterparts. Therefore, it is necessary to study the synthesis of nano selenium and evaluate its biological activities to explore its application as agents for immunostimulation and anticancer treatment.

The project "Study on synthesis of selenium nanoparticles stabilized in β -glucans (SeNPs/ β -Glucan) with high bioactivities by gamma Co-60 irradiation" has been carried out at the Biotechnology Center of Ho Chi Minh City and Nông Lâm University from September 2020 to May 2024. The aim of the thesis is to apply the γ - ray irradiation method for the synthesis of SeNPs stabilized in water-soluble and low molecular weight yeast β -glucan with high antioxidant, antitumor and immunostimulant activity.

After project implementation, the obtained results in this dissertation can be summarized as bellow: Successfully synthesized the colloidal solutions of selenium nanoparticles (SeNPs) stabilised in water-soluble β -glucan by the gamma ray (Co-60) irradiation method. The saturation irradiation dose for complete reduction of solutions contained 40, 60, 80, 100 and 120 ppm Se^{4+} were determined at 4, 6, 8, 10, and 12 kGy. The particles size of SeNPs/ β -glucan colloidal solution were also determined 64.79, 71.74, 92.02, 96.71 and 110.1 nm when irradiated at saturable metabolic irradiation dose of SeNPs/ β -glucan. Determined the appropriate conditions to synthesize SeNPs/ β -glucan colloidal solution with particle size of 92 nm as follows: selenium concentration of 80 ppm, β -glucan stabilizer concentration is 2%, pH ~ 5 and dose rate is 10 kGy/h.

The antioxidant activity of SeNPs/ β -glucan was much higher than that of vitamin C at the same tested concentration and this activity was increased by the increase of reaction time. The smaller particles size in the product displayed the higher antioxidant activity.

In vivo tests in cytoxan-induced immunosuppressed mice revealed that the daily supplementation of SeNPs/ β -glucan at concentrations of 6 mg per kg body weight of tested mice significantly stimulated the generation of cellular immune factors (white blood cells, neutrophil, lymphocyte, B cells, CD4+ cells, CD34+ cells and natural killer cells) and humoral immune indexes (IgM, IgG, TNF- α , IFN- γ and IL-2) in peripheral blood, bone marrow and spleen of the immunosuppressed mice. SeNPs/ β -glucan products synthesized by irradiation have strong inhibitory activity against HepG2 liver cancer cells. In addition, the tested results on L929 cell line also revealed a low cytotoxicity of SeNPs/ β -glucan on this cell line at concentrations below 20 ppm. The research results also demonstrate that SeNPs/ β -glucan inhibit the proliferation of HepG2 liver cancer cells by inducing apoptosis and disrupting the cell cycle.

From the results of the project, it can be indicated that the synthetic SeNPs/ β -glucan product promises to be a good, effective, safe, and active supplement and may potential be used in nutra-pharmaceutical for liver cancer prevention and supportive therapy.

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Công nghệ nano là một lĩnh vực nghiên cứu hiện đại liên quan đến thiết kế, tổng hợp và phân tích các cấu trúc hạt có kích thước từ khoảng 1- 100 nm. Đây là một công nghệ tiên tiến hiện đã và đang có tác động đáng kể, góp phần rất lớn trong hầu hết các ngành và lĩnh vực của xã hội do những lợi ích mang lại như: tạo được sản phẩm an toàn, hiệu quả với khả năng ứng dụng cao.

Selen (selenium - Se) là nguyên tố vi lượng quan trọng và rất cần thiết cho người và động vật. Selen ảnh hưởng lớn đến các hoạt động sinh học như các hoạt tính chống oxy hóa, ức chế tế bào ung thư, kháng virus, vi khuẩn, đặc biệt là hoạt tính tăng cường miễn dịch. Nó tham gia vào cấu trúc coenzyme của glutathione peroxydase, là một chất chống oxy hóa, giữ vai trò quan trọng bảo vệ cơ thể chống lại tác hại của các gốc tự do. Tuy có mặt trong cơ thể với hàm lượng rất ít nhưng selen lại đóng vai trò rất quan trọng đối với sức khỏe. Sự thiếu hụt selen có thể dẫn đến một số bệnh nghiêm trọng như ung thư, tim mạch và rối loạn miễn dịch hoặc gây ức chế miễn dịch, trong khi đó việc bổ sung selen với liều thấp có thể làm tăng hoặc phục hồi các chức năng miễn dịch (Skalickova và ctv, 2017). Các hạt nano selen (SeNPs) thu hút nhiều sự nghiên cứu và ứng dụng nhờ tính khả dụng sinh học cao và độc tính thấp hơn các dạng selen vô cơ và hữu cơ (Rayman và Phil, 2000). Hiện nay chưa có sản phẩm SeNPs nào được thương mại để sử dụng cho vật nuôi, thủy sản hay cho người, do đó việc tổng hợp tạo sản phẩm SeNPs nhằm đánh giá các hoạt tính sinh học của chúng và hướng tới làm thực phẩm chức năng để tăng cường các hoạt động miễn dịch là rất cần thiết nhằm tăng cường sức đề kháng và hỗ trợ trong điều trị bệnh.

Hầu hết các nghiên cứu để tổng hợp SeNPs chủ yếu sử dụng các phương pháp như nhiệt độ, vi sóng, áp suất, hoặc sử dụng chất khử (ascorbic acid, acetic acid, oxalic acid, gallic acid, hydrazine, natri borohydride) (Zhang và ctv, 2004; Hou và ctv, 2014; Yu và ctv, 2016, Cui và ctv, 2018 v.v). Các phương pháp này khá phổ biến, dễ thực hiện, không tốn nhiều thời gian tuy nhiên tồn tại một số hạn

chế như kích thước hạt lớn, nồng độ và độ đồng đều sản phẩm thấp đồng thời độ tinh khiết không cao và còn tồn tại nhiều chất khử. Trong khi đó tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ được cho là có nhiều ưu điểm như độ khử đồng đều nên tạo sản phẩm có độ đồng nhất cao, không sử dụng chất khử nên độ tinh khiết cao, dễ dàng điều chỉnh kích thước hạt và nồng độ sản phẩm, có thể tạo sản phẩm có chất ổn định như mong muốn, dễ dàng triển khai ở quy mô lớn (Hien và ctv, 2018).

Tuy nhiên, các hạt SeNPs dạng nguyên tố dễ bị kết cụm lại với nhau làm tăng kích thước hạt và giảm hoạt tính, do đó chất ổn định đóng vai trò một mạng lưới bao bọc để ngăn sự kết cụm của hạt SeNPs, nhằm duy trì hoạt tính sinh học. Nhiều nghiên cứu chỉ ra hạt SeNPs kết hợp với các chất ổn định như polysaccharide giúp chống khả năng kết cụm, tương thích sinh học tốt hơn và hoạt tính sinh học cao (Jia và ctv, 2015; Hien và ctv, 2018; Duy và ctv, 2021). β -glucan là một loại polysaccharide phổ biến trong nhiều loài vi sinh vật và thực vật, nhận được nhiều sự chú ý do có các hoạt tính sinh học quý như: giảm cholesterol, ức chế tế bào ung thư, kháng viêm, chống oxy hóa và hỗ trợ chức năng miễn dịch, đặc biệt là β -glucan từ nấm men. Đây là polysaccharide có độ phân nhánh cao do đó được sử dụng làm chất ổn định giúp các hạt nano phân tán tốt, ổn định hơn, chống kết tụ hạt sau quá trình tổng hợp. β -glucan chứa các nhóm chức giàu điện tử chẳng hạn như nhóm $-\text{CH}_2$ và $-\text{OH}$, giúp ổn định SeNPs thông qua liên kết hydro và tương tác tĩnh điện với các hạt nano giúp tăng sự ổn định cấu trúc hạt. Cho đến nay có rất ít nghiên cứu sử dụng β -glucan làm chất ổn định trong tổng hợp SeNPs. Đặc biệt là chưa có công bố nào sử dụng β -glucan tan trong nước tách chiết từ thành tế bào nấm men làm chất ổn định. Xuất phát từ những lý do trên, nghiên cứu: “Nghiên cứu tổng hợp SeNPs/ β -glucan có hoạt tính sinh học bằng phương pháp chiếu xạ” được thực hiện. Nghiên cứu hướng đến tổng hợp chế phẩm SeNPs ổn định trong polymer tự nhiên β -glucan với khả năng ổn định tốt, đồng thời đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, ức chế tế bào ung thư gan, tăng cường miễn dịch của chế phẩm sau khi

tổng hợp, từ đó định hướng ứng dụng SeNPs/ β -glucan làm nguyên liệu trong sản xuất sản phẩm tăng cường sức đề kháng và hỗ trợ trong điều trị bệnh.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Xây dựng thành công quy trình và tổng hợp được chế phẩm SeNPs ổn định trong β -glucan (SeNPs/ β -glucan) có hoạt tính sinh học bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60.

Mục tiêu cụ thể

- Xây dựng được quy trình tổng hợp chế phẩm SeNPs ổn định trong β -glucan tan trong nước có hoạt tính sinh học bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60.

- Tổng hợp thành công chế phẩm SeNPs/ β -glucan có hoạt tính sinh học bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60.

- Đánh giá được hoạt tính chống oxy hóa, ức chế tế bào ung thư gan HepG2 và tăng cường miễn dịch của chế phẩm SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ.

3. Ý nghĩa khoa học của luận án

Kết quả nghiên cứu của đề tài là các cơ sở dữ liệu khoa học rất có ý nghĩa trong việc cung cấp các thông số trong quy trình tổng hợp cũng như các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp SeNPs/ β -glucan bằng phương pháp chiếu xạ. Kết quả nghiên cứu của luận án còn cho thấy SeNPs/ β -glucan tổng hợp được có hoạt tính chống oxy hóa, ức chế tế bào ung thư, hoạt tính tăng cường miễn dịch. Kết quả nghiên cứu của luận án có thể sử dụng làm tài liệu tham khảo cho nghiên cứu, giảng dạy và chuyển giao công nghệ.

Kết quả đạt được của đề tài sẽ tạo tiền đề cho đề tài khoa học nghiên cứu sâu hơn về việc ứng dụng bức xạ gamma để tổng hợp vật liệu SeNPs ổn định trong β -glucan nói riêng và polysaccharide nói chung.

4. Ý nghĩa thực tiễn của luận án

Đề tài đã đưa ra được quy trình công nghệ tổng hợp chế phẩm SeNPs/ β -glucan dạng bột có hoạt tính sinh học cao và độ ổn định tốt, tạo thuận lợi trong

quá trình bảo quản, vận chuyển và tăng khả năng ứng dụng để sản xuất các sản phẩm tăng cường miễn dịch, ức chế ung thư bảo vệ sức khỏe.

Hiện nay chỉ có các sản phẩm bổ sung selen ở dạng vô cơ và hữu cơ, do đó chế phẩm SeNPs hứa hẹn là nguyên liệu có triển vọng ứng dụng cho sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe chống oxy hóa, ức chế ung thư và tăng cường miễn dịch thể hệ mới an toàn và hiệu quả cao.

5. Tính mới của luận án

Luận án là một trong số ít nghiên cứu đầu tiên tổng hợp thành công chế phẩm SeNPs ổn định β -glucan bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma Co-60 với độ ổn định tốt và hoạt tính sinh học cao.

Nghiên cứu đã đánh giá một cách chi tiết hoạt tính tăng cường miễn dịch của chế phẩm SeNPs/ β -glucan trên mô hình chuột gây suy giảm miễn dịch bằng cytoxan thông qua các chỉ số miễn dịch trong máu ngoại vi (WBC, lympho, tế bào B, tế bào NK, tế bào CD4, IgG, IgM, IFN- α và TNF- β), trong tủy xương (WBC, bạch cầu lympho và tế bào CD34) và trong lách (Chỉ số lách, IgG, IgM, IL-2, TNF- α và IFN- γ).

Nghiên cứu đã xác định được cơ chế ức chế tế bào ung thư gan HepG2 là thông qua cảm ứng apoptosis và ức chế chu kỳ phân chia tế bào.

Chế phẩm SeNPs/ β -glucan chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ là chế phẩm công nghệ cao có nguồn gốc tự nhiên và có triển vọng ứng dụng để sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe thể hệ mới hỗ trợ tăng cường miễn dịch và hỗ trợ phòng trị ung thư an toàn và hiệu quả.

6. Đối tượng nghiên cứu

- Chuột nhắt trắng dòng BALB/c sử dụng đánh giá hoạt tính tăng cường miễn dịch trên mô hình chuột bị suy giảm miễn dịch;

- Dòng tế bào ung thư gan HepG2, tế bào nguyên bào sợi L929 sử dụng đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan.

7. Phạm vi nghiên cứu

- Tổng hợp SeNPs sử dụng phương pháp chiếu xạ tia γ Co-60 và ổn định trong β -glucan tách chiết từ thành tế bào nấm men có Mw thấp.
- Nghiên cứu đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs/ β -glucan sử dụng phương pháp bắt gốc tự do ABTS⁺.
- Đánh giá độc tính cấp của SeNPs/ β -glucan được thực hiện trên chuột BALB/c.
- Đánh giá hoạt tính tăng cường miễn dịch của SeNPs/ β -glucan được thực hiện trên mô hình chuột BALB/c bị gây suy giảm miễn dịch bằng cytoxan.
- Đánh giá khả năng ức chế tế bào ung thư sử dụng dòng tế bào ung thư gan HepG2 và dòng tế bào nguyên bào sợi L929.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan công nghệ nano

Công nghệ nano là nhánh của khoa học liên quan đến việc tổng hợp và mô tả đặc tính của các hạt có kích thước nanomet. Công nghệ nano là một lĩnh vực mang tính cách mạng và có số lượng ứng dụng lớn trong mọi lĩnh vực của đời sống (Sahoo và ctv, 2020). Công nghệ nano đã và đang có tác động lớn trong hầu hết các ngành và lĩnh vực của xã hội do những lợi ích như: tạo được sản phẩm ứng dụng cao, an toàn hơn và hiệu quả cao. Công dụng vật liệu nano có thể được tìm thấy trong mỹ phẩm, y tế, thực phẩm bảo vệ sức khỏe, phụ gia bảo quản thực phẩm, vật liệu y sinh, năng lượng và môi trường, trong điện tử và một số vật dụng hàng ngày khác.

Công nghệ tổng hợp sản phẩm nano có thể được phân loại thành hai cách tiếp cận chính đó là công nghệ “từ dưới lên (bottom-up)” trong đó tiền chất là các nguyên tử hoặc ion, và công nghệ “từ trên xuống (top-down)” trong đó tiền chất là vật liệu khối và sự kết hợp của chúng. Trong công nghệ bottom-up, thường bắt đầu từ các phân tử trong dung dịch, chúng kết tụ lại thành các phân tử có cấu trúc hoặc vô định hình. Phần lớn các vật liệu nano ứng dụng trong nông nghiệp được tổng hợp từ phương pháp này. Phương pháp từ dưới lên có thể là phương pháp vật lý, phương pháp hóa học hoặc kết hợp cả hai. Công nghệ bottom-up có ưu điểm là tính chính xác khá cao, kiểm soát được kích thước và hình dạng tạo thành. Tuy nhiên công nghệ này có nhược điểm là khó đưa ra ứng dụng quy mô lớn. Các hạt nano kim loại như vàng, bạc, bạch kim, v.v. được chế tạo chủ yếu theo kiểu “từ dưới lên” theo nguyên tắc các ion kim loại như Ag^+ , Au^{3+} , Pt^+ bị khử thành dạng nguyên tử Ag^0 và Au^0 , Pt^0 , v.v. Các nguyên tử này sẽ liên kết với nhau tạo thành cụm nhỏ (cluster) rồi phát triển thành hạt nano (Gautam và ctv, 2007). Công nghệ top-down thường bắt đầu từ các tinh thể hoặc phân tử có kích thước cỡ µm trở lên và làm giảm kích thước đến cỡ nano. Phương pháp này được đánh giá là một phương pháp khá đơn giản, dễ thực hiện và có thể tạo được số lượng sản phẩm lớn. Tuy nhiên, sản phẩm thu được có độ tinh khiết và

độ đồng nhất không cao, chất lượng vật liệu nano còn nhiều hạn chế. Trong quá trình tổng hợp, khó điều chỉnh kích thước và hình dạng của cấu trúc nano, dẫn đến sản phẩm đồng nhất không cao. Công nghệ top - down sử dụng các kỹ thuật như: nghiền, ăn mòn kim loại, điện phân kết hợp với ion.

Các hạt nano từ các nguồn khác nhau có các đặc tính khác nhau. Các tính năng đặc trưng của các hạt nano (NP) như kích thước nhỏ, diện tích bề mặt lớn, đặc tính bề mặt, đặc tính hóa lý, khả năng hòa tan, khả dụng sinh học và độ độc tính thấp, do đó được coi là vật liệu đầy hứa hẹn cho nhiều ứng dụng (Chen và ctv, 2008; Torres và ctv, 2012). Các thông số như kích thước hạt, hình dạng và hình thái bề mặt, sự phân bố bề mặt là những thông số quan trọng xác định sự tương tác của vật liệu nano. Do đó, việc tổng hợp các hạt nano cần quan tâm tới các thông số và đặc tính sản phẩm, nhằm hướng đến các ứng dụng của chúng trong sức khỏe và môi trường và chọn lọc phương pháp tổng hợp là rất quan trọng, nhất là hướng ứng dụng các SeNPs trong lĩnh vực y sinh. Kích thước của các hạt nano đóng một vai trò quan trọng liên quan đến hoạt tính sinh học của sản phẩm. Hạt nano nhỏ hơn thường có tỉ lệ diện tích bề mặt trên thể tích lớn hơn. Điều này có thể làm tăng khả năng phản ứng hóa học và tương tác của chúng với các chất khác. Các hạt nano có thể dễ dàng phân tán hơn trong các môi trường khác nhau, nhưng cũng có thể dễ bị kết tụ. Do hạt nano có thể dễ bị tác động bởi các yếu tố môi trường do đó cần có biện pháp kiểm soát đặc biệt để đảm bảo tính ổn định và an toàn khi sử dụng.

Với kích thước tương đương với các phân tử sinh học và nhiều tính năng độc đáo khác, công nghệ nano đang được đẩy mạnh nghiên cứu, đặc biệt là trong lĩnh vực y sinh với nhiều ứng dụng khác nhau. Các hạt nano (hạt nano vàng, nano từ, chấm lượng tử, v.v.) được sử dụng để đánh dấu các phân tử sinh học, vi sinh vật, phát hiện các chuỗi gen nhờ vào cơ chế bắt cặp bổ sung của DNA hoặc cơ chế bắt cặp kháng nguyên - kháng thể nhằm tăng cường độ nhạy, độ chính xác (Logothetidis, 2012; Wolfe và ctv, 2015). Ngoài ra, các hạt nano cũng được sử dụng như chất mang dẫn truyền thuốc tới tế bào nhằm đúng mục tiêu mong

muốn nhằm đạt được hiệu quả cao cũng như giúp tiết kiệm thuốc, tránh các tác dụng phụ (Liu và ctv, 2012; Gao và ctv, 2014).

1.2. Tổng quan nano selen

1.2.1 Tổng quan về selen

Selen là một vi lượng tự nhiên cần thiết cho sự sinh trưởng, phát triển và chức năng sinh lý của người và động vật. Đây là một phi kim, ít phổ biến trong tự nhiên, có nguồn gốc từ việc phun núi lửa, hiếm thấy ở dạng nguyên tố. Selen có trong sulfua kim loại như đồng, niken, sắt, chì và trong các khoáng vật hiếm như Cu_2Se , PbSe và As_2Se . Selen có nguyên tử lượng: 78,96 đvC, là nguyên tố hóa học thuộc nhóm VIA trong bảng tuần hoàn các nguyên tố, có số thứ tự 34, cấu hình electron lớp ngoài cùng là $4s^24p^2$. Một số hằng số vật lý của selen: tỷ trọng: $4,8 \text{ g/cm}^3$, nhiệt độ nóng chảy: 221°C , nhiệt độ sôi: $684,9^\circ\text{C}$. Hàm lượng của selen phân bố rất đa dạng và không đồng đều. Hàm lượng selen trong đất có thể dao động lớn, phụ thuộc vào loại đất, khoáng chất có trong đó và các yếu tố địa chất. Một số vùng có thể có hàm lượng selen cao, trong khi những vùng khác lại thiếu. Selen trong đất đá khoáng 0,1 ppm (các khu vực thiếu selen ở New Zealand) đến 1200 ppm (một vùng ở Ireland). Nồng độ selen trong nước chiếm từ 0,1 $\mu\text{g/L}$ đến 9 mg/L (Papp và Lu, 2007), trong nước biển khoảng 0,05 - 0,5 $\mu\text{g/L}$. Mức độ selen trong thực vật phụ thuộc vào hàm lượng selen trong đất mà chúng sinh trưởng. Hàm lượng selen trong động vật cũng phụ thuộc vào nguồn thức ăn và môi trường sống của chúng Selen vô cơ tồn tại chủ yếu trong đất và nước, tuy nhiên chúng cũng được tìm thấy trong các cơ thể sống như động, thực vật và vi sinh vật (Navarro và Cabrera, 2008). Selen hữu cơ như dimetyl selenua $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$, dimetyl diselenua $(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$ và dimetylselenon $(\text{CH}_3)_2\text{SeO}_2$ được tìm thấy trong nước thải, bùn, đất cát, nguồn nước ngầm tự nhiên và trong cả các cơ thể sống (Shibata và ctv, 1992; Pyrzyńska, 1998). Trong thủy - hải sản, hàm lượng selen chiếm khá lớn, các dạng selen được tìm thấy là selen vô cơ như selenit, selenat, và selen hữu cơ như selenmethionin, selencystein, selencystin, selenprotein. Trong các cơ thể sống, selen chủ yếu tồn tại ở dạng

aminoacid, như selencystein, selenmethionin, selenglutathion, v.v. và các selenprotein (Shibata và ctv, 1992; Pyrzyńska, 1998; Loinski và ctv, 2000).

Selen có hoạt tính sinh lý ở dạng selencystein, một dẫn xuất của acid amin cysteine, trong đó lưu huỳnh trong nhóm thiol (-SH) của cysteine được thay thế bằng selen. Selen có vai trò quan trọng trong việc tạo thành các enzyme và protein trong cơ thể (Bar và ctv, 2018). Selen là thành phần chính của các enzyme như glutathione peroxidase (GPx), thioredoxin reductase (TRx) và deiodinases. Các enzyme này đóng vai trò quan trọng trong hoạt động chống oxy hóa, chức năng cơ và ức chế khối u trong cơ thể (Arthur và ctv, 2003; Chhabria và ctv, 2016). GPx là một trong những enzyme quan trọng nhất có tác dụng trung hòa phản ứng ROS (Reactive oxygen species) và phospholipid hydroperoxide để duy trì cân bằng oxy hóa - khử trong tế bào. Nhiều nghiên cứu cho thấy lượng selen trong cơ thể có tác động tốt đến chức năng của hệ miễn dịch, phòng chống ung thư do hoạt tính chống oxy hóa, trung hòa gốc tự do. Nghiên cứu trên động vật cho thấy selen giúp tăng phản ứng của tế bào kích thích kháng nguyên và tăng khả năng ức chế các tế bào ung thư (Arthur và ctv, 2003; Rayman, 2000). Selen tham gia vận chuyển ion qua màng tế bào, tổng hợp protein của hồng cầu và gan, điều khiển hệ thống tổng hợp tổng hợp DNA, RNA, làm tăng cường miễn dịch nhờ cơ chế tổng hợp immunoglobulin miễn dịch. Ngoài ra, selen còn giúp giải độc chất gây ung thư, điều hòa hoạt động của tế bào, ức chế sự xâm nhập của tế bào ung thư và ức chế sự hình thành mạch máu để ngăn chặn sự truyền máu tới khối u (Sladkov và ctv, 2002; Hoffmann và ctv, 2008). Thêm vào đó, selen còn có khả năng bảo vệ não chống lại các thoái hóa thần kinh thông qua việc loại bỏ các ROS dư thừa và kích thích quá trình chống oxy hóa (Wrobel và ctv, 2016).

Trong chăn nuôi, selen có tác dụng hỗ trợ tăng trưởng, tăng chất lượng thịt, trứng và tăng cường hệ miễn dịch ở nhiều loại vật nuôi như (Cai và ctv, 2012; Chadio và ctv, 2015), dê (Shi và ctv, 2011). Selen còn kích thích hệ miễn dịch ở

thủy sản như cá (đặc biệt là các loại cá da trơn) và tôm, giúp chống lại các tác nhân gây bệnh. (Hồ Sơn Lâm và Phạm Thị Anh, 2016).

1.2.2. Nhu cầu sử dụng selen đối với sức khỏe con người

Selen được xem là nguyên tố hiếm, có mặt trong cơ thể với hàm lượng rất ít nhưng lại đóng vai trò vô cùng quan trọng giúp duy trì sức khỏe vì selen là một thành phần của selenoprotein (chủ yếu ở dạng acid amin selenocysteine) tham gia vào một loạt các quá trình sinh lý tế bào. Theo Tổ chức y tế thế giới (WHO), hàm lượng selen trong máu người trung bình đạt trên 0,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ thì mới đủ lượng cần thiết cho cơ thể. Sự thiếu hụt selen trong cơ thể có thể dẫn đến một số các hội chứng như giảm khả năng sinh trưởng, điều hòa hormone tuyến giáp, tổn thương thần kinh, suy giảm miễn dịch, bệnh tim mạch, hoại tử gan, xơ hóa tụy, giảm sắc tố mô, tăng khả năng ung thư và giảm chức năng não và có thể dẫn đến tử vong (Stoica và ctv, 2002; Bùi Thị Hòa, 2005).

Theo Hội Đồng Nghiên cứu Quốc gia Hoa kỳ (NCR) khuyến cáo, lượng selen nam giới nên dùng 80 $\mu\text{g}/\text{ngày}$ và nữ giới là 55 $\mu\text{g}/\text{ngày}$. Theo nghiên cứu, cơ thể hấp thu lượng Se hàng ngày ít hơn 13 - 19 $\mu\text{g}/\text{ngày}$ có thể có nguy cơ mắc các bệnh liên quan đến thiếu selen, trong khi những người tiêu thụ trên 260 $\mu\text{g}/\text{ngày}$ có thể dễ bị nhiễm độc selen, mặc dù một số nghiên cứu đã chỉ ra mức độ hấp thu selen an toàn có thể thấp hơn nhiều so với dự đoán (Vinceti và ctv, 2017).

Nhiều nghiên cứu cũng đã chứng minh SeNPs có độc tính thấp, an toàn cho người và động vật so với selen ở dạng vô cơ và hữu cơ khác (Huang và ctv, 2018; Hosnedlova và ctv, 2018) đã báo cáo SeNPs tổng hợp được có độc tính cấp tính thấp hơn 7 lần so với natri selenite (LD_{50} 113 và 15 mg/kg, tương ứng) (Zhang và ctv, 2001). Nghiên cứu của Wang và ctv (2007) cũng đã chứng minh SeNPs độc tính thấp hơn so với selenomethionine 3,6 lần (LD_{50} 92,1 và 25,6 mg/kg, tương ứng) (Wang và ctv, 2007).

Có thể thấy các hợp chất selen ở các dạng hóa học khác nhau, trạng thái oxy hóa và độ hòa tan khác nhau đóng một vai trò quan trọng và ảnh hưởng khác

nhau đến độc tính cấp tính của selen. Do đó việc lựa chọn loại sản phẩm selen phù hợp để bổ sung mà không gây độc là rất quan trọng và cần thiết.

1.3. Các phương pháp tổng hợp nano selen

Nano selen (SeNPs) là một dạng selen, có tiềm năng lớn cho một số ứng dụng trong các lĩnh vực y học, chẩn đoán, trị liệu được coi là vật liệu đầy hứa hẹn, thu hút nhiều sự chú ý nhờ tính khả dụng sinh học cao và độc tính thấp hơn các dạng selen vô cơ và hữu cơ.

Đặc tính của các hạt SeNPs phụ thuộc vào nhiều yếu tố: Kích thước hạt, hình dạng, sự phân bố kích thước hạt. Xác định chính xác kích thước với các đặc điểm bề mặt cụ thể là yếu tố cần thiết trong quá trình tổng hợp hạt nano. Ngoài ra các đặc tính như: Độc tính tế bào, hoạt tính sinh học, chi phí, v.v. cũng là những mối quan tâm lớn. Nhìn chung, các hạt SeNPs nhỏ hơn có hoạt tính sinh học cao hơn và hoạt tính giảm khi kích thước hạt tăng lên. Do đó, để đánh giá tính chất, đặc điểm của SeNPs, cải thiện khả dụng sinh học của chúng hướng đến khả năng ứng dụng cao cũng cần quan tâm lựa chọn phương pháp tổng hợp hiệu quả.

Ưu điểm của SeNPs là khả năng sử dụng selen ở trạng thái oxy hóa không (Se nguyên tố-Se⁰), có độc tính thấp và sinh khả dụng tuyệt vời hơn so với các trạng thái oxy hóa khác (Se⁴⁺, Se⁶⁺) (Wang và ctv, 2007). Tuy nhiên, SeNPs thường không ổn định và dễ chuyển thành dạng không hoạt động. Việc sử dụng các chất ổn định trong tổng hợp SeNPs có thể giúp tăng độ ổn định của chúng. Các chất ổn định trong tổng hợp SeNPs thường sử dụng là các polymer tổng hợp như polyvinyl alcohol (PVA), polyvinyl pyrrolidon (PVP), v.v. các chất hoạt động bề mặt như sodium dodecyl sunfat (SDS), tween 80, v.v. các polymer tự nhiên như chitosan, alginate, gelatin, v.v. Do đó tổng hợp SeNPs có hoạt tính sinh học cần quan tâm đến kích thước thu nhận được, sự phân bố kích thước và độ ổn định của chúng.

1.3.1. Phương pháp hóa học

Phương pháp tổng hợp hóa học được coi là phương pháp phổ biến nhất để tổng hợp SeNPs. Trong quá trình tổng hợp hóa học, selen ở trạng thái hóa trị +4, chẳng hạn như selenite, selenic acid, hoặc SeO_2 , thường được sử dụng làm tiền chất, trong khi các chất khử như các chất hoạt động bề mặt: Vitamin C (ascorbic acid) và glutathione (GSH) và các hóa chất tương thích sinh học (chitosan, pectic, v.v.) được sử dụng để ổn định SeNPs.

Zhang và ctv (2004) đã tổng hợp SeNPs bằng cách sử dụng ascorbic acid (vitamin C) làm tác nhân để khử acid selenic và ổn định trong các loại polysaccharide như chitosan, glucomannan, acacia gum và carboxymethyl cellulose. Nghiên cứu cho thấy kích thước, độ ổn định và hoạt tính của SeNPs phụ thuộc vào khối lượng phân tử (Mw) và các nhóm chức đặc trưng của loại polysaccharides sử dụng làm chất ổn định (Zhang và ctv, 2004). Ngoài ra, một số tác nhân khử khác cũng được sử dụng để tổng hợp SeNPs. Năm 2010, Langi và ctv đã nghiên cứu tổng hợp các hạt SeNPs bằng phản ứng của dung dịch ion với natri selenosulphate, tiền chất selen, sử dụng chất ổn định rượu polyvinyl, trong môi trường nước. Phương pháp này có khả năng tạo ra các hạt SeNPs hình cầu trong phạm vi kích thước 50 - 76 nm. Đây là báo cáo đầu tiên về việc tổng hợp SeNPs được hỗ trợ bởi một ion chất lỏng. Các hạt nano tổng hợp có thể dễ dàng tách ra khỏi dung dịch nước bằng máy ly tâm tốc độ cao và có thể được phân tán lại trong môi trường nước. Chen và ctv (2015) đã nghiên cứu tổng hợp chitosan-SeNPs sử dụng Na_2SeO_3 làm tiền chất, vitamin C như chất khử, và kali iodua (KI) làm chất ổn định. Bai và ctv (2017) đã nghiên cứu tổng hợp SeNPs sử dụng vitamin C làm chất khử và được ổn định trong dung dịch chitosan (CTS) sau đó được bảo quản bằng cách sấy phun tạo thành dạng hạt vi cầu SeNPs (SeNPs-M). Sản phẩm có kích thước ~ 35 nm. Kết quả thử nghiệm độc tính cấp tính chỉ ra SeNPs-M an toàn hơn nhiều so với selen vô cơ, với LD_{50} gấp khoảng 18 lần so với selen vô cơ. Ngoài ra, chỉ số GSH, TBARS (tương đương MDA), GSH-Px, SOD và CAT được đo để đánh giá hoạt tính chống oxy hóa

của SeNPs-M. Kết quả cho thấy SeNPs-M có hoạt tính chống oxy hóa rất cao. Zeng và ctv (2018) đã nghiên cứu tổng hợp các hạt SeNPs ổn định trong chitosan (CTS-SeNPs) thông qua quá trình khử sodium selenite (Na_2SeO_3) bằng vitamin C. Các điều kiện tổng hợp CTS-SeNPs đã được khảo sát cho thấy, các CTS-SeNPs có kích thước khoảng 54 nm được tổng hợp trong điều kiện nhiệt độ 25°C , thời gian phản ứng 2 giờ, nồng độ ascorbic acid là 0,04 M và nồng độ CTS là 1,0 mg/mL. CTS-SeNPs có hình cầu đồng nhất và có thể ổn định trong khoảng 60 ngày ở 4°C . Wang và ctv (2018) đã tổng hợp SeNPs sử dụng polysaccharide-protein (PSP) từ nghêu châu Á (*Corbicula fluminea*) làm chất ổn định thông qua quá trình khử Na_2SeO_3 bằng vitamin C. Kết quả cho thấy PSP-SeNPs tạo thành có cấu trúc hình cầu đồng nhất và đơn phân tán với kích thước từ 40 - 70 nm. Shahabadi và ctv (2021) đã tổng hợp thành công SeNPs khi sử dụng vitamin C là chất khử. Kết quả phân tích kích thước hạt bằng kỹ thuật TEM cho thấy, SeNPs được tổng hợp có dạng hình cầu phân tán tốt trong dung dịch với kích thước hạt ~ 134 nm. Kết quả thử nghiệm cho thấy SeNPs có khả năng gây độc tế bào ung thư bạch huyết MCK-7 với giá trị IC_{50} đạt 23,20 mg/mL. Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH đạt 70,65% ở nồng độ 38,24 mg/mL (Shahabadi và ctv, 2021).

Phương pháp tổng hợp hóa học có nhiều ưu điểm như quá trình tổng hợp diễn ra nhanh, không tốn nhiều thời gian, dễ thực hiện và kiểm soát. Tuy nhiên có nhược điểm là độ tinh khiết sản phẩm không cao, tốn chi phí để loại bỏ chất khử, nồng độ sản phẩm thấp và kích thước hạt thường rất lớn. Ngoài ra, phương pháp tổng hợp hóa học dễ gây ô nhiễm môi trường và tích tụ vật liệu tổng hợp trong cơ thể, ngoài ra đôi khi cũng gây tốn kém chi phí, do đó cũng cần được xem xét lựa chọn.

1.3.2. Phương pháp sinh học

Để giải quyết vấn đề tồn tại của phương pháp tổng hợp hóa học, các phương pháp tổng hợp sử dụng chất khử có nguồn gốc sinh học đã được nghiên cứu nhiều. Trong đó, dịch nội bào của vi sinh vật và dịch chiết từ thực vật được xem

là các tác nhân khử tiềm năng. Nhiều chủng vi sinh vật như *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus megaterium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus terreus*, v.v cũng đã được nghiên cứu sử dụng để tổng hợp hạt SeNPs. Fesharaki và ctv (2010) đã sử dụng dịch nuôi cấy *Klebsiella.pneumonia* để chuyển hóa Se_2Cl_2 thành SeNPs với kích thước ~ 245 nm. Năm 2012, Torres và ctv đã sử dụng chủng *Pantoea agglomerans* trong điều kiện hiếu khí ở nhiệt độ phòng để tổng hợp các hạt SeNPs với kích thước < 100 nm. Zare và ctv (2013) đã nghiên cứu tổng hợp các hạt SeNPs sử dụng chủng nấm *Aspergillus terreus*. Kết quả cho thấy sản phẩm SeNPs tổng hợp được ở dạng hạt hình cầu có kích thước ~ 47 nm. Gần đây, Zhang và ctv (2019) đã nghiên cứu sử dụng chủng nấm *Mariannaea* sp. HJ để tổng hợp SeNPs. Kết quả nghiên cứu lựa chọn điều kiện môi trường với SeO_2 nồng độ 2 mM và pH 10 giúp loại bỏ hoàn toàn SeO_2 và thu nhận được SeNPs ngoại bào ở các giá trị pH kiềm. Tổng hợp SeNPs bằng phương pháp sinh học sử dụng vi sinh vật có hiệu quả hơn tổng hợp hóa học, nhờ những ưu điểm như độ tinh khiết cao, quy trình sản xuất rẻ hơn và đơn giản, dễ thực hiện, khả năng kiểm soát các thông số tốt hơn (Eszenyi và ctv, 2011).

Ngoài ra phương pháp tổng hợp sinh học còn sử dụng chiết xuất thực vật. Một số dịch chiết từ lá, quả, hạt thực vật đã được nghiên cứu để tổng hợp SeNPs. Phương pháp này có khả năng tổng hợp hạt SeNPs trong phạm vi kích thước khoảng 50 - 150 nm. Năm 2013, Ramamurthy và ctv cũng đã tổng hợp các hạt SeNPs sử dụng khả năng khử của chiết xuất từ hạt giống fenugreek (cỏ cà ri). Sản phẩm SeNPs tổng hợp được có kích thước khoảng 50 - 150 nm. Các hạt nano tổng hợp có thể dễ dàng tách ra khỏi dung dịch bằng máy ly tâm tốc độ cao. Nhóm tác giả đã thử nghiệm độc tính tế bào của SeNPs trên tế bào ung thư vú (MCF-7). Kết quả cho thấy SeNPs có thể ức chế sự phát triển của tế bào ung thư phụ thuộc vào nồng độ. Ngoài ra, sự kết hợp của SeNPs và doxorubicin cho thấy hiệu quả ức chế ung thư tốt hơn so với các phương pháp điều trị riêng lẻ. Cui và ctv (2018) đã tổng hợp SeNPs bằng cách sử dụng chiết xuất từ quả táo

gai (quả sơn trà) làm chất khử và chất ổn định và xác định được hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào HepG2. Li và ctv (2019) đã nghiên cứu tổng hợp và đánh giá độc tính tế bào của các hạt SeNPs được ổn định bởi α -D-glucan (CPA) từ hạt dẻ *Castanea mollissima* Blume. Phân tử sinh học hiện diện trong thực vật như protein/enzyme, polysaccharide, alkaloid, flavonoid, terpenoid, hợp chất phenolic và vitamin là thường tham gia vào quá trình khử sinh học, hình thành, bảo vệ và ổn định các hạt nano kim loại với hình dạng tốt hơn và kích thước nhỏ hơn, ít độc tính hơn.

Phương pháp tổng hợp sinh học được đánh giá là đơn giản, thân thiện với môi trường, tiết kiệm chi phí, yêu cầu ít thời gian phản ứng hơn và diễn ra ở điều kiện môi trường xung quanh. Tuy nhiên phương pháp tổng hợp sinh học vẫn có một số hạn chế đó là sản phẩm tạo ra có nồng độ thấp, độ ổn định và độ tinh khiết sản phẩm chưa cao.

1.3.3. Phương pháp vật lý

Đây là phương pháp tổng hợp sử dụng các tác nhân vật lý như vi sóng, nhiệt độ và áp suất, v.v. để hỗ trợ quá trình tạo ra các hạt selen có kích thước nano và cố định chúng trên các bề mặt chất mang như fibroin, silicon, v.v. Có nhiều nghiên cứu sử dụng phương pháp này để tổng hợp và đánh giá đặc tính sản phẩm tạo thành. Năm 2011, Hou và ctv đã tổng hợp SeNPs/trơ fibroin(NSeSFC) bằng phương pháp vi sóng. Kết quả phân tích ảnh TEM cho thấy kích thước của các hạt SeNPs đạt khoảng 50 nm và phân tán một cách đồng đều. Sản phẩm NSeSFC thể hiện sự ổn định và có thể được lưu giữ trong thời gian dài. Ahmad (2016) cũng đã sử dụng phương pháp vi sóng để tổng hợp SeNPs. Phản ứng của selen với acid hydrofluoric trên bề mặt silicon là do tác động của bức xạ vi sóng dưới áp suất cao (60 bar) và nhiệt độ 160°C. Phương pháp này cho thấy có sự lắng đọng các hạt hình cầu trên bề mặt silicon và có kích thước từ hàng chục nanomet đến hàng chục micromet. Động học hình thành của cấu trúc hình cầu được giải thích trên cơ sở khử các loại selen bằng hydro bên trong các bọt khí được tạo ra trên bề mặt silicon bằng quá trình ăn mòn. Yu và ctv (2016) đã tổng

hợp SeNPs bằng phương pháp quang hóa sử dụng PEG làm chất phủ bề mặt và khuôn mẫu. Hạt nano (PEG-SeNPs) tổng hợp được đã chứng minh tính hiệu ứng phát xạ đáng kể bằng tia X.

Một phương pháp tổng hợp vật lý khác gần đây đã được áp dụng nhiều đó là tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ sử dụng các nguồn bức xạ khác nhau để tạo ra các biến đổi mức độ nguyên tử.

Phương pháp chiếu xạ

Có thể nói, hiện nay công nghệ bức xạ đã đóng góp một cách khá hữu quả và rõ nét trong phát triển kinh tế xã hội. Ở các nước phát triển như Nhật, Mỹ, Úc, v.v., tỷ lệ đóng góp của công nghệ bức xạ là rất lớn so với đóng góp chung của ngành năng lượng hạt nhân. Ở Việt Nam, tuy ngành này còn khá mới mẻ, nhưng cũng đã có những đóng góp hiệu quả trong phát triển kinh tế xã hội ở các lĩnh vực như: Kích thích và tạo đột biến trong chọn tạo giống cây trồng mới, sơn phủ bề mặt, khử trùng dụng cụ y tế, chiếu xạ thực phẩm, mỹ phẩm v.v. Đây là công nghệ sử dụng bức xạ làm nguồn năng lượng trong quá trình nghiên cứu và ứng dụng. Hiện nay, nguồn bức xạ được dùng phổ biến là nguồn gamma phát ra từ đồng vị Co-60, Cr-157 và Ce-137, chùm điện tử gia tốc bằng điện từ (Electron Beam) và chùm tia ion phát từ máy gia tốc ion (Ion Beam). Trong đó, bức xạ ion hoá năng lượng cao được sử dụng để tạo ra các biến đổi ở mức nguyên tử. Một số dạng bức xạ ion hóa phổ biến như hạt alpha, hạt beta, tia gamma, tia X. Năng lượng hấp thụ bức xạ trên một đơn vị khối lượng vật chất được tính bằng Gray (Gy), theo hệ đo lường chuẩn SI thì $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$ (Trần Đại Nghiệp, 2006). Liều chiếu xạ $X = dQ/dm$, là khả năng ion hóa của tia X hoặc là tia gamma trong đơn vị thể tích không khí. Suất liều là khả năng ion hóa của bức xạ trong một đơn vị thời gian. Đơn vị là R/s, R/min và R/h. Liều hấp thụ $D = dE/dm$ là năng lượng bức xạ được hấp thụ bởi một đơn vị khối lượng vật chất. Đơn vị là Gray (Gy), $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$. Suất liều hấp thụ $D = dD/dt$ là năng lượng bức xạ hấp thụ bởi một đơn vị vật chất trong một đơn vị thời gian. Đơn vị là Gy/s, kGy/h, v.v (Nguyễn Quốc Hiến, 1999).

Phương pháp chiếu xạ được đánh giá là khá đơn giản, tiết kiệm thời gian, hiệu quả cao, thân thiện với môi trường và dễ dàng áp dụng trên quy mô công nghiệp hơn những phương pháp tổng hợp khác. Hơn nữa quá trình chiếu xạ hầu như không phụ thuộc vào nhiệt độ, nhiều quy trình thực hiện ở nhiệt độ thấp và không cần tới các chất khơi mào và xúc tác.

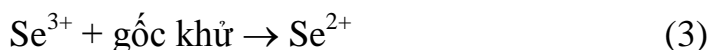
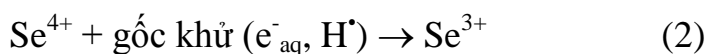
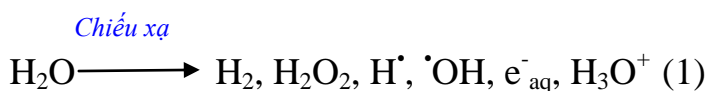
Trong quá trình chiếu xạ, các yếu tố liều xạ, suất liều, nồng độ chất ban đầu, nồng độ chất ổn định v.v., có ảnh hưởng đến kích thước hạt và sự phân bố kích thước hạt. Liều chiếu xạ đóng một vai trò quan trọng. Tùy thuộc vào điều kiện và ion kim loại mà liều chiếu xạ khác nhau ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp các hạt nano, lượng hạt tạo thành mà còn ảnh hưởng đến kích thước hạt. Liều chiếu xạ làm thay đổi kích thước hạt vì khi dung dịch phản ứng được chiếu xạ ở liều thấp, tốc độ tạo ra các gốc khử chậm hơn so với sự liên kết của các ion với các nguyên tử. Do đó, quá trình khử hầu hết xảy ra trên bề mặt của các hạt; trong khi ở liều chiếu xạ cao, việc tổng hợp các hạt thuận lợi hơn do phản ứng hoàn toàn với các gốc khử. (Belloni, 2006; Naghavi và ctv, 2010). Nhiều tác giả cũng đã nghiên cứu và cho thấy khi tăng liều chiếu xạ, lượng hạt nano tạo ra tăng và kích thước hạt giảm (Gharibshahi và ctv, 2017; Korolkov và ctv, 2017).

Suất liều cũng được báo cáo có ảnh hưởng đáng kể đến kích thước hạt của sản phẩm nano (Hien và ctv, 2012; Khoa và ctv 2014). Điều chỉnh suất liều trong quá trình tổng hợp hạt nano giúp kiểm soát kích thước và phân bố kích thước của sản phẩm cuối cùng. Suất liều cao thường giúp thu hẹp dải kích thước và tạo ra hạt nano có kích thước đồng nhất hơn. Hien và ctv (2012) đã báo cáo việc tăng suất liều từ 0,5 đến 5 kGy/h dẫn đến việc giảm kích thước của hạt nano vàng (AuNPs) từ 9,5 xuống 5 nm tương ứng. Nghiên cứu Khoa và ctv (2014) cho thấy suất liều càng cao dẫn đến sự phân bố kích thước của sản phẩm AuNPs càng bị thu hẹp. Sự tăng cường tốc độ phản ứng và sự hình thành hạt có thể làm giảm sự phân bố kích thước của các hạt. Điều này là do các điều kiện phản ứng được kiểm soát chặt chẽ, quá trình kết tụ có thể đồng đều hơn, dẫn đến các hạt nano có kích thước gần nhau hơn. Trong khi chiếu xạ ở suất liều thấp, tốc độ tạo

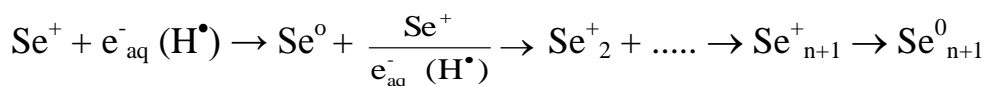
ra các gốc khử chậm hơn tốc độ liên kết của các ion với nguyên tử quá trình hình thành và phát triển của các hạt nano vàng thường diễn ra chậm hơn và không đồng đều. Điều này có thể dẫn đến sự phân bố kích thước rộng hơn của các hạt nano, vì các hạt nhỏ hơn có thể hình thành và phát triển ở các tốc độ khác nhau, tạo ra một dải kích thước lớn hơn.

Nồng độ của các ion kim loại, phi kim (Ag, Au, Se), chất ổn định ảnh hưởng đến hình dạng, kích thước hạt và đóng một vai trò quan trọng trong việc ổn định các hạt nano. Nồng độ của ion kim loại có thể làm tăng hoặc giảm kích thước và sự phân bố của các hạt do sự thay đổi của các ion bị hấp phụ trên bề mặt của hạt nhân. Bên cạnh đó, nồng độ chất ổn định có ảnh hưởng rất nhiều đến kích thước hạt của hệ keo nano và thông thường khi tăng nồng độ chất ổn định thì sẽ có tác dụng làm giảm kích thước hạt.

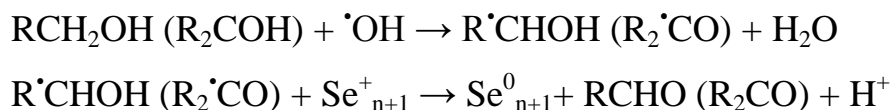
Cơ chế quá trình tổng hợp SeNPs bằng phương pháp chiếu xạ được mô tả như sau: Khi nguồn bức xạ có năng lượng cao như tia X, tia gamma được chiếu vào dung dịch chứa các ion Se^{4+} . Trong quá trình chiếu xạ, các gốc tự do có tính khử mạnh như electron hydrat (e^-_{aq}), hydrogen nguyên tử (H^\bullet) được tạo ra từ quá trình xạ ly nước có thể khử ion selen (Se^{4+}) thành nguyên tử selen (Se^0), quá trình này có thể mô tả như trong phản ứng (1-5) (Salah và ctv, 2009, Nguyễn Ngọc Duy, 2014, Hien và ctv, 2018).



e^-_{aq} và H^\bullet là tác nhân khử selen ion (Se^+) thành selen kim loại (Se^0):



Gốc tự do $\cdot\text{OH}$ có tính oxy hóa sẽ chuyển thành gốc tự do có tính khử bằng việc thêm vào hệ chất bắt gốc tự do (scavenger), thường là các alcol bậc 1 hoặc bậc 2.



Phản ứng (5) là giai đoạn hình thành hạt Se^0 ở dạng nguyên tử. Sau khi được hình thành các hạt có xu hướng kết tụ và tạo thành hạt SeNPs như phản ứng (6). Tốc độ phản ứng khử sẽ quyết định kích thước hạt hình thành. Khi tốc độ khử nhanh, phản ứng hình thành hạt nhân ưu tiên, kết quả nhận được kích thước hạt nhỏ. Ngược lại, tốc độ phản ứng khử chậm ưu tiên cho quá trình kết tụ dẫn đến hình thành hạt nano có kích thước lớn hơn.

Selen nguyên tử tạo thành từ phương pháp chiếu xạ hay bất kỳ phương pháp nào khác đều có xu hướng kết hợp với nhau tạo thành cụm (cluster) và phát triển thành hạt lớn hơn. Nguyên nhân là do quá trình chiếu xạ có sự ly giải nước, sản sinh ra các gốc tự do có tính oxy hóa mạnh nên có thể oxy hóa hạt selen Se_n^0 làm cho chúng kết thành cụm ion (ion cluster), ảnh hưởng đến kích thước hạt tạo thành và làm giảm hiệu suất tổng hợp SeNPs. Để hạn chế kích thước hạt, các polyme tổng hợp như polyvinyl alcohol (PVA), polyvinyl pyrrolidon (PVP), v.v. các chất hoạt động bề mặt như sodium dodecyl sunfat (SDS), tween 80, v.v. các polyme tự nhiên như chitosan, alginate, gelatin, gum arabic, v.v. được bổ sung vào hệ phản ứng với vai trò là chất ổn định. Các polymer sẽ ngăn cản sự kết tụ của các đám SeNPs nhờ lực đẩy tĩnh điện hoặc do sự cản trở theo hiệu ứng không gian. Ngoài ra, để tổng hợp sản phẩm SeNPs ổn định tốt hơn theo thời gian lưu giữ, có thể sử dụng phối hợp các chất ổn định bao gồm cả hai hiệu ứng ổn định trên.

Phương pháp tổng hợp SeNPs sử dụng công nghệ bức xạ gamma Co-60 được xem là phương pháp hiệu quả với hiệu suất tổng hợp cao. Nhiều nghiên cứu trong nước và quốc tế đã chứng minh hiệu quả của phương pháp chiếu xạ tia gamma Co-60 tổng hợp nano kim loại hiệu quả hơn so với phương pháp hóa học

và sinh học (Luan và ctv, 2014). Một số ưu điểm như phản ứng thực hiện ở điều kiện thường vẫn cho hiệu suất cao; tạo hạt nano có độ ổn định tốt và độ tinh sạch cao; dễ dàng kiểm soát kích thước hạt thông qua điều chỉnh liều chiếu xạ hoặc nồng độ các chất trong dung dịch; kiểm soát được quá trình tạo nano kim loại một cách hiệu quả mà không cần bổ sung chất khử và có thể kiểm soát được sản phẩm oxy hóa dư thừa trong quá trình sản xuất. Chiếu xạ tia gamma không độc hại, không gây ô nhiễm môi trường, có khả năng áp dụng trong sản xuất ở quy mô lớn và đáp ứng yêu cầu về thời gian sản xuất, số lượng, chất lượng sản phẩm cũng như độ tinh sạch.

Đến thời điểm hiện tại mới chỉ có nghiên cứu của Hien và ctv (2018) và Duy và ctv (2021) nghiên cứu tổng hợp SeNPs bằng phương pháp chiếu xạ sử dụng dextran và oligochitosan làm chất ổn định mà hoàn toàn chưa sử dụng β -glucan làm chất ổn định. Một số nghiên cứu quốc tế sử dụng β -glucan làm chất ổn định trong sản phẩm SeNPs nhưng không sử dụng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60.

1.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến sản phẩm nano selen khi tổng hợp

Các đặc trưng của sản phẩm nano được quan tâm cho các ứng dụng khác nhau của nó như: Hình dạng, kích thước hạt, thành phần, đặc tính bề mặt và độ phân tán, sự phân bố kích thước hạt, độ ổn định của sản phẩm. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy các điều kiện tổng hợp như nồng độ và loại tiền chất và chất khử selen, sự hiện diện của chất ổn định, nhiệt độ, pH dung dịch ảnh hưởng nhiều đến kích thước, hình dạng và độ ổn định của hạt SeNPs. Một số tài liệu báo cáo nồng độ Se^{4+} là một trong những thông số chính ảnh hưởng đến hình dạng, kích thước hạt và sự phân bố kích thước của chế phẩm SeNPs. Hình dạng của hạt nano có thể ảnh hưởng đến tính chất vật lý và hóa học của nó. Nano selen có thể tồn tại dưới nhiều hình dạng khác nhau như hạt cầu, que, hoặc tấm mỏng. Hình dạng của SeNPs có thể ảnh hưởng đến khả năng hấp thụ ánh sáng (quang học) và hoạt tính sinh học. Hình dạng hạt có thể ảnh hưởng đến khả năng của SeNPs trong ứng dụng y học. Kích thước của các hạt SeNPs ảnh hưởng đến hoạt tính sinh

học của chúng, các hạt nano nhỏ hơn có hoạt tính sinh học cao hơn (Torres và ctv, 2012). Kích thước của hạt nano có ảnh hưởng lớn đến khả năng hấp thu của chúng vào tế bào và sự phân phối trong các cơ quan của cơ thể. Ví dụ, sự hấp thu trong tế bào *in vitro* của các hạt có kích thước 0,1 μm cao hơn 2,5 và 6 lần so với các hạt 1 và 10 μm tương ứng (Desai và ctv, 1997). Đặc tính bề mặt như độ nhám hoặc tính tương tác bề mặt với các phân tử khác có thể ảnh hưởng đến khả năng tương tác và hiệu quả của sản phẩm SeNPs. Trong công nghiệp và y học, đặc tính bề mặt của SeNPs có thể ảnh hưởng đến khả năng trong việc liên kết với các phân tử khác hoặc trong việc cải thiện khả năng truyền tải thuốc. Sự phân bố kích thước hạt ảnh hưởng đến tính đồng nhất của sản phẩm. Phân bố kích thước hạt không đồng đều có thể dẫn đến các vấn đề về hiệu quả và an toàn của sản phẩm. Độ ổn định của sản phẩm là khả năng của SeNPs giữ được các đặc tính của nó trong suốt thời gian sử dụng và dưới các điều kiện môi trường khác nhau.

Tính ổn định của các hạt nano cũng cần được quan tâm để hướng đến ứng dụng sản phẩm. Tính ổn định sản phẩm nano phụ thuộc vào một số yếu tố bao gồm nồng độ, loại chất ổn định, kích thước, pH của dung dịch và nhiệt độ trong quá trình bảo quản (Hien và ctv 2018; Piacenza và ctv, 2021). Trong đó, nhiệt độ ảnh hưởng mạnh mẽ đến sự ổn định và tính chất của hạt nano. Ở nhiệt độ thấp, màu sắc của dung dịch SeNPs hầu như không thay đổi và kích thước hạt có sự ổn định trong quá trình lưu trữ và bảo quản. Trong khi ở nhiệt độ cao tính ổn định các hạt nano giảm, các hạt nano co cụm tạo thành một sản phẩm có kích thước lớn hơn và màu sắc của sản phẩm cũng thay đổi (Bai và ctv, 2017, Duy và ctv, 2021). Duy và ctv (2021) báo cáo kích thước các hạt SeNPs sản phẩm trong SeNPs/oligochitosan được bảo quản ở 27°C tăng nhanh hơn ở 4°C và SeNPs/oligochitosan trở nên không ổn định sau khi bảo quản hơn 28 ngày và chuyển sang dạng khối đen sau 42 ngày bảo quản ở 25°C. Các sản phẩm SeNPs dạng dung dịch khó bảo quản hơn sản phẩm dạng bột. Nguyên nhân do các hạt SeNPs trong dung dịch có xu hướng kết cụm và lắng do đó chúng dễ dàng tập

hợp lại để tạo thành một hạt lớn hơn ở nhiệt độ cao theo chuyển động Brown (chuyển động của các hạt trong môi trường lỏng) (Bai và ctv, 2017).

Khối lượng phân tử (Mw) và các nhóm chức đặc trưng của loại chất ổn định cũng ảnh hưởng đến kích thước, độ ổn định và tính chất của SeNPs. Các chất có vai trò làm chất ổn định trong tổng hợp SeNPs thường sử dụng là các polymer tổng hợp như polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidon, v.v. các chất hoạt động bề mặt như sodium dodecyl sunfat (SDS), tween 80, v.v. các polymer tự nhiên như chitosan, alginate, gelatin, gum arabic, v.v. Các nhóm chức trên polymer tương tác với selen tạo điều kiện để gắn các phân tử polymer lên bề mặt. Khi đó chuỗi polymer sẽ ngăn cản sự keo tụ nhờ lực đẩy tĩnh điện hoặc do sự cản trở bề mặt không gian. Nồng độ chất ổn định cũng ảnh hưởng đến độ ổn định cấu trúc, kích thước và phân bố kích thước của hệ keo SeNPs. Thông thường khi tăng nồng độ chất ổn định thì sẽ có tác dụng làm giảm kích thước hạt.

Do khả năng tương thích sinh học, khả năng hấp thu và tác dụng sinh học, SeNPs ngày càng được ứng dụng nhiều hơn trong phòng và điều trị, đóng vai trò như các sản phẩm dược phẩm, chất vận chuyển thuốc và thuốc thử chẩn đoán để khắc phục một số hạn chế của vật liệu truyền thống. Do đó phương pháp tổng hợp, điều kiện tổng hợp là rất quan trọng để tạo được sản phẩm SeNPs đáp ứng được hiệu quả sử dụng.

1.5. Các phương pháp phân tích đặc trưng của các hạt nano selen

Để phân tích các đặc tính cấu trúc, kích thước, phân bố kích thước hạt, diện tích bề mặt v.v các nghiên cứu thường sử dụng các phương pháp khác nhau. Các phương pháp phân tích thường được sử dụng như: Phương pháp phân tích quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-Vis), quang phổ hồng ngoại biến đổi (FTIR), kính hiển vi điện tử quét (SEM), kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM), phân tích tia X phân tán năng lượng (EDX), tán xạ ánh sáng động (DLS - dynamic light scattering) và nhiễu xạ tia X (XRD).

Phương pháp phân tích UV-Vis sử dụng phổ hấp thụ trong phạm vi vùng cực tím cho tới vùng ánh sáng nhìn thấy. Phương pháp này có thể định lượng nhanh

chóng với độ nhạy và độ chính xác tương đối cao. Đây được xem là một trong các phương pháp cơ bản để nghiên cứu phản ứng các chất trong dung dịch để xác định thành phần và cấu trúc của hợp chất dựa trên cơ sở đo cường độ dòng sáng còn lại sau khi đi qua dung dịch bị chất phân tích hấp thụ một phần. Bởi vì các thuộc tính quang học của dung dịch chứa hạt nano phụ thuộc vào hình dạng, kích thước và nồng độ của hạt, nên phổ UV-Vis có thể được sử dụng để xác định các thuộc tính trên. Việc quét quang phổ được thực hiện từ bước sóng từ 250 nm đến 750 nm. Vùng bước sóng mà ở đó đỉnh hấp thụ đặc trưng được ghi nhận do sự thay đổi màu từ Na_2SeO_3 không màu sang màu đỏ gạch. Việc cộng hưởng plasmon bề mặt có thể là nguyên nhân gây ra sự thay đổi màu sắc này. Nhiều tác giả đã báo cáo việc tổng hợp thành công các hạt SeNPs sau khi phân tích dữ liệu quang phổ thu được qua máy quang phổ UV-Vis. Prasad và ctv đã chỉ ra cực đại hấp thụ ở bước sóng 395 nm cho thấy dấu hiệu rõ ràng về sự hình thành hạt SeNPs (Prasad và ctv, 2013). Trong một nghiên cứu khác, quang phổ UV-Vis của SeNPs tổng hợp từ *Acinetobacter* sp. SW30 cho thấy hai cực đại hấp thụ ở bước sóng 300 nm và 500 nm biểu thị hai kích thước hạt nano SeNPs (Wadhvani và ctv, 2017). Alam và ctv (2019) đã tổng hợp các hạt SeNPs từ chiết xuất lá ổi *Psidium guajava* cho thấy quang phổ UV-Vis ở 381 nm biểu thị kích thước hạt SeNPs (Alam và ctv, 2019).

Đặc trưng cấu trúc tinh thể của SeNPs được đo bằng giản đồ nhiễu xạ tia X (XRD). XRD thường dùng để phân tích cấu trúc tinh thể và pha tinh thể của vật liệu tổng hợp được. Phương pháp này mô tả hiện tượng khi chùm tia X nhiễu xạ trên các mặt tinh thể của chất rắn do tính tuần hoàn của cấu trúc tinh thể tạo nên các cực đại và cực tiểu nhiễu xạ. Phân tích XRD còn cho biết thành phần hóa học trung bình của mẫu. Theo Lin và ctv (2014) thì góc nhiễu xạ tia X thấp để quan sát cấu trúc vô định hình của tinh thể. Tác giả chỉ rõ ở vùng 10 - 30° sự xuất hiện các nhiễu xạ ở vùng 23,41; 29,61° tương ứng với các mặt phẳng tinh thể (100) và (101) đây được cho là pha vô định hình của selen nguyên tử (Se^0) (Lin và ctv, 2014). Prasad và Selvaraj (2014) báo cáo phân tích hạt SeNPs cho

thấy các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng ở giá trị 2θ là 23,59; 29,78; 41,29; 43,67; 45,84; 51,74; 56,13 và 61,81 tương ứng với các mặt phẳng tinh thể selen (100; 101; 110; 102; 111; 201; 112 và 202) (Prasad và Selvaraj, 2014). Hạt SeNPs nguyên chất ở dạng tinh thể nhưng một số các tác giả đã báo cáo có cả dạng vô định hình (Tugarova và ctv, 2014; Wang và ctv, 2018; Qiu và ctv, 2018). Theo đó Wang và ctv (2018) đã phân tích cho thấy hạt SeNPs ở pha kết tinh nhưng độ kết tinh của chúng bị phá hủy sau khi ổn định bằng polysaccharide-protein (PSP). Do đó, phân tích XRD cho thấy PSP-SeNPs là vô định hình (Wang và ctv, 2018). Baskar và ctv (2019) cũng phân tích XRD cho thấy SeNPs tổng hợp được có dạng tinh thể (Baskar và ctv, 2019).

Quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) được sử dụng để phân tích sự tương tác bề mặt giữa các hạt nano tổng hợp với các phân tử khác tham gia vào quá trình tổng hợp và ổn định các hạt nano. Một trong những ưu điểm vượt trội của phương pháp này so với những phương pháp phân tích cấu trúc khác (nhiễu xạ tia X, cộng hưởng từ điện tử) là cung cấp thông tin về cấu trúc phân tử nhanh, không đòi hỏi các phương pháp tính toán phức tạp. Kỹ thuật này dựa trên hiệu ứng đơn giản là: Các hợp chất hoá học có khả năng hấp thụ chọn lọc bức xạ hồng ngoại. Sau khi hấp thụ các bức xạ hồng ngoại, các phân tử của các hợp chất hoá học dao động với nhiều vận tốc dao động và xuất hiện dải phổ hấp thụ gọi là phổ hấp thụ bức xạ hồng ngoại. Phương pháp này ghi nhận các dao động đặc trưng của các liên kết hóa học giữa các nguyên tử. Nó cũng được sử dụng để nghiên cứu trạng thái vật lý và thành phần hóa học của mẫu. Các đám phổ khác nhau có mặt trong phổ hồng ngoại tương ứng với các nhóm chức đặc trưng và các liên kết có trong phân tử hợp chất hoá học. Dải hấp thụ đặc trưng của các nhóm chức năng gần như không đổi từ hợp chất này sang hợp chất khác. Dải hấp thụ từ 4000 nm đến 1500 cm^{-1} thường là do sự hiện diện của các chất chức năng các nhóm như nhóm hydroxyl ($-\text{OH}$), amin ($-\text{NH}$), carboxyl ($\text{C}=\text{O}$), và nhóm methyl ($-\text{CH}_3\text{O}$ và vùng từ 1500 đến 400 cm^{-1} được gọi là vùng vân tay. Các dải hấp thụ ở “vùng dấu vân tay” là do các hoạt động nội phân tử. Sự dịch

chuyển của dải xảy ra do tương tác của kim loại hoặc á kim với các phân tử sinh học có trong thực vật và vi khuẩn. Trong một nghiên cứu, phổ FTIR của hạt SeNPs chiết xuất từ lá cây *Terminalia arjuna* cho thấy các dải tương ứng với -OH, -NH, -C = O và -CO dao động kéo giãn, cho thấy sự có mặt của hydroxyl, amino, Các nhóm carbonyl và ketone có chức năng như chất ổn định và chất kết dính cho SeNPs (Prasad và ctv, 2013). Tương tự, Ramamurthy ctv (2013) báo cáo kết quả phân tích phổ FTIR có cực đại ở các số sóng 2.356, 1.618, 1.284, 2.360, 1.723 và 1.638 cm^{-1} tương ứng với độ giãn và dao động của các nhóm -C = C-, -NH₂, -COOH, -CH và -CO liên quan đến sự khử nguyên liệu tiền thân cho sự hình thành hạt SeNPs (Ramamurthy và ctv, 2013).

Kích thước và phân bố kích thước hạt SeNPs được phân tích bằng tán xạ ánh sáng động (DLS), kính hiển vi truyền qua (TEM) và kính hiển vi điện tử quét (SEM). Kỹ thuật DLS được sử dụng để đo thủy động lực học đường kính hạt nano tổng hợp được. SEM phân tích kích thước hạt của hạt SeNPs vào khoảng 50 - 150 nm (Ramamurthy và ctv, 2013). Phương pháp này cũng được sử dụng để nghiên cứu ảnh hưởng của một số phân tử sinh học lên hạt SeNPs. Zeng và ctv (2018) đã báo cáo hạt SeNPs vô định hình, không đồng nhất và dạng que và nó trở nên đồng nhất sau khi ổn định bằng chitosan (Zeng và ctv, 2018). TEM được sử dụng để nghiên cứu cấu trúc bên trong của các sản phẩm có kích thước nano và micro. Kỹ thuật TEM dựa trên việc sử dụng các electron để chiếu xuyên qua mẫu vật và tạo ra hình ảnh với độ phóng đại rất cao. Do bước sóng của các electron ngắn hơn bước sóng của ánh sáng, nên các hình ảnh của TEM có độ phân giải cao hơn so với các hình ảnh của một kính hiển vi ánh sáng, có độ phân giải cao nên nó cho phép quan sát được nhiều chi tiết hình dạng, kích thước hạt, phân bố kích thước hạt của mẫu vật. TEM có thể quan sát được kích thước hạt nhỏ đến 0,2 nm. Độ phân giải của nó đạt khoảng 0,07 nm và tùy thuộc vào độ dày của mẫu và điện áp gia tốc. Do TEM thường cung cấp thông tin chính xác hơn về kích thước, hình dạng, và tinh thể học của các hạt nano nên được ưu tiên sử dụng trong nhiều nghiên cứu, tuy nhiên chi phí phân tích khá cao và hoạt

động phức tạp. Nhiều tác giả đã báo cáo phân tích TEM trong các nghiên cứu của họ với các kích thước khác nhau từ dải 30-200 nm. (Torres và ctv, 2012; Akar và ctv, 2013; Prasad và ctv, 2013; Estevez và ctv, 2014; Zhang và ctv, 2019). Một số nghiên cứu báo cáo kích thước của các hạt nano quan sát từ DLS phù hợp với quan sát từ TEM (Chen và ctv, 2018; Meng và ctv, 2018; Qiu và ctv, 2018; Tang và ctv, 2019; Bai và ctv, 2020). Tuy nhiên trong hầu hết các nghiên cứu, kích thước được đo bằng DLS được phát hiện là lớn hơn kích thước được đo bằng TEM (Zhang và ctv, 2015; Cai và ctv, 2018; Qiu và ctv, 2018; Li và ctv, 2019). Các tác giả giải thích TEM có thể chỉ quan sát hạt nano mà không quan sát polysaccharide bao bọc, trong khi DLS có thể đo kích thước của vật liệu nano và cả polysaccharide bao bọc trong quá trình ổn định sản phẩm. Do đó đối với các hạt nano phân tán trong dung môi, DLS là một kỹ thuật phù hợp có thể cho phép tiếp cận không chỉ kích thước hạt mà còn cả sự hiện diện của các chất kết tụ.

1.6. Hoạt tính sinh học của nano selen

1.6.1. Hoạt tính chống oxy hóa

Quá trình stress oxy hóa (oxidative stress) là sự mất cân bằng giữa các gốc tự do và chất chống oxy hóa trong cơ thể. Các gốc oxy phản ứng (ROS) là sản phẩm phụ của trao đổi chất, được biết đến như con dao hai lưỡi trong cơ thể để điều chỉnh stress oxy hóa. Cụ thể ROS đóng một vai trò quan trọng trong phân tử tín hiệu và cân bằng nội môi, trong khi liều ROS vượt quá sẽ gây tổn thương màng, lipid, acid nucleic và bào quan (He và ctv, 2023). Sự tương tác giữa ROS và chất chống oxy hóa là rất quan trọng trong việc duy trì một sức khỏe tốt. Se được biết đến là một phần không thể thiếu trong vị trí xúc tác của ít nhất 25 selenoprotein và enzyme, đóng vai trò bảo vệ tế bào khỏi tổn thương oxy hóa. Nó cũng đóng góp quan trọng để bảo vệ màng tế bào và thành phần tế bào khác khỏi bị tổn thương oxy hóa thông qua việc xúc tác quá trình chuyển hóa hydroperoxide và lipid hydroperoxide, sử dụng glutathione (GSH) làm chất khử trong quá trình thực bào và/hoặc chuyển hóa sinh lý (Chen và ctv, 2022). SeNPs

có thể thường hoạt động như một yếu tố chống oxy hóa trong các mô và tế bào bình thường, kiểm soát nồng độ ROS để điều chỉnh một số tín hiệu quan trọng của cơ thể. (Hosnedlova và ctv, 2018). Do đó hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs đóng vai trò quan trọng trong hoạt tính sinh học của các hạt nano này.

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh SeNPs có khả năng chống oxy hóa cao trong cả điều kiện *in vitro* cũng như trên mô hình tế bào và động vật. Có thể giả thuyết SeNPs tham gia trong quá trình tổng hợp selenomethionine, dẫn đến sự hình thành selenocysteine từ tiền chất qua selenocystathionine. Selenocysteine là thành phần cấu tạo nên selenogluthathione. Selenogluthathione đóng một vai trò tích cực trong trung hòa ROS kết hợp với glutathione peroxidase. Do đó có thể ức chế sự sản sinh ROS quá mức và tăng cường hoạt động của tế bào miễn dịch.

Trong một nghiên cứu của Huang và ctv (2003) đã báo cáo, các hạt SeNPs được tổng hợp bằng việc sử dụng albumin huyết thanh bò (BSA) làm chất khử có hiệu quả ức chế tốt các gốc tự do được tạo bởi 2,2'-azo-bis- (2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), superoxide anion (O_2^-), NO. Các sản phẩm SeNPs còn cho thấy tác dụng bảo vệ chống lại quá trình oxy hóa DNA. Wang và ctv (2007) cho thấy so với selenomethionine, selen nguyên tố ở kích thước nano có hiệu quả tương đương trong việc tăng hoạt tính chống oxy hóa và hoạt động của glutathione peroxidase và thioredoxin reductase nhưng có độc tính thấp hơn nhiều.

Hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs cũng phụ thuộc vào nồng độ, liều lượng thời gian phản ứng. Hien và ctv (2018) đã nghiên cứu đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của các hạt SeNPs/dextran tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ tia γ Co-60 cho thấy, SeNPs/dextran ở 25 ppm SeNPs/dextran đạt tới khả năng bắt gốc tự do ABTS 78% trong vòng 60 phút phản ứng, trong khi ở 100 ppm đạt tới ~99% chỉ trong 5 phút.

Nhờ hoạt tính bảo vệ tế bào khỏi tổn thương oxy hóa do stress oxy hóa, SeNPs có khả năng ứng dụng hiệu quả trong điều trị các bệnh liên quan đến

stress oxy hóa như ung thư, tim mạch, thoái hóa thần kinh, điều chỉnh hệ miễn dịch và tăng cường khả năng phòng thủ của cơ thể đối với các tác nhân gây hại.

1.6.2. Hoạt tính tăng cường miễn dịch

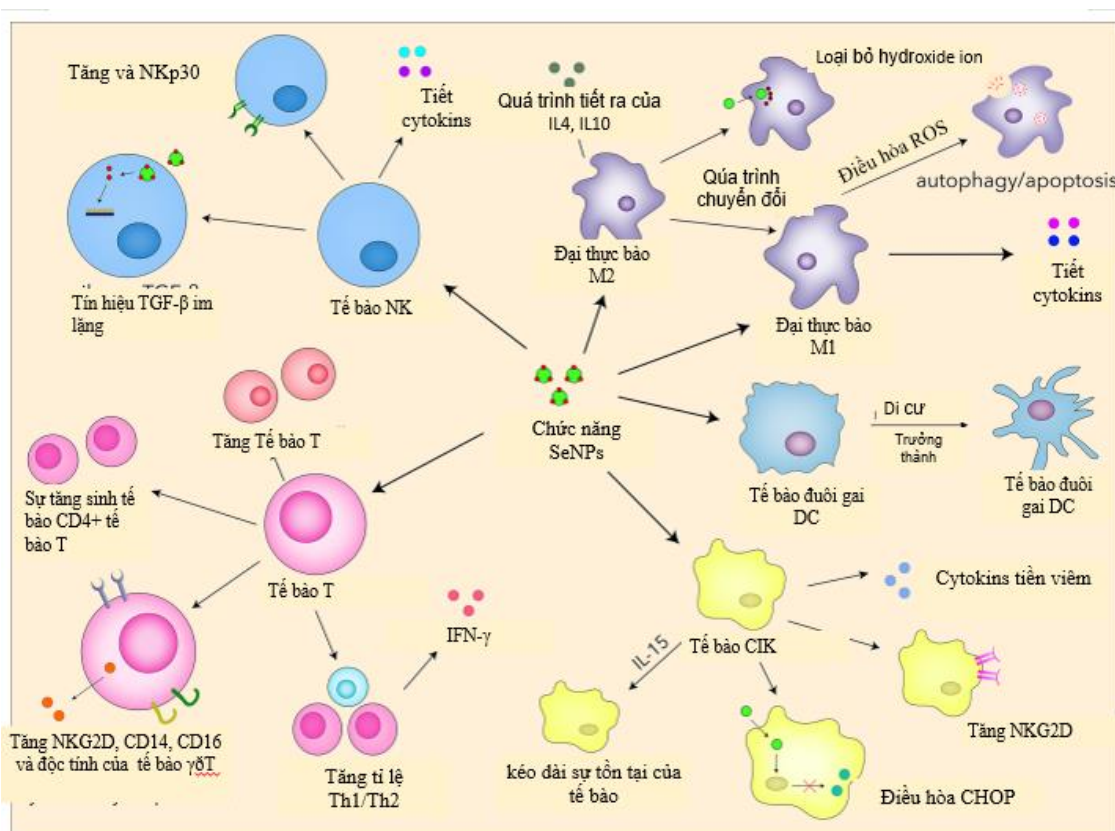
Ở người và động vật, cơ chế hoạt động của hệ thống miễn dịch là một cơ chế bảo vệ nghiêm ngặt chống lại vi khuẩn và kháng nguyên lạ. Rối loạn chức năng miễn dịch có thể dẫn đến các bệnh tự miễn dịch, bệnh viêm nhiễm và thậm chí ung thư (Gao và ctv, 2019). Trong những năm gần đây, các chất điều hòa miễn dịch bẩm sinh và tổng hợp được coi là một trong những lựa chọn thay thế hứa hẹn nhất cho chứng rối loạn chức năng miễn dịch của vật chủ. Với ưu điểm độc tính thấp, SeNPs đã thu hút được sự chú ý lớn trong việc cải thiện khả năng miễn dịch của vật chủ. Phản ứng miễn dịch của vật chủ bao gồm miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thích ứng, phụ thuộc vào một số yếu tố quan trọng các cơ quan miễn dịch như tuyến ức, tủy xương và lá lách, cũng như các tế bào miễn dịch khác.

SeNPs đã được chứng minh là có tiềm năng ứng dụng trong liệu pháp miễn dịch, giúp cải thiện đáng kể hiệu quả điều trị ung thư, các bệnh truyền nhiễm và mãn tính bằng cách điều chỉnh các chức năng của tế bào miễn dịch khác nhau. Có hai khả năng đã được đề xuất để giải thích cơ chế điều hòa miễn dịch SeNPs đó là: Thứ nhất, SeNPs có thể mang lại lợi ích gián tiếp cho hệ thống miễn dịch thông qua các hoạt động chống oxy hóa của selenoprotein (Avery và ctv, 2018). Thứ hai, SeNPs ảnh hưởng tới mọi thành phần của hệ thống miễn dịch, đặc biệt là quá trình hình thành, phát triển và sự hoạt động của bạch cầu. Selen kích thích miễn dịch tế bào, giúp bảo vệ các tế bào miễn dịch như bạch cầu đa nhân trung tính, tế bào lympho và đại thực bào. SeNPs có thể tăng cường khả năng miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thích ứng bằng cách điều chỉnh nhiều tế bào miễn dịch, điều này góp phần chính xác vào các chiến lược liệu pháp miễn dịch mới. Có hai kiểu đáp ứng miễn dịch là miễn dịch thể và miễn dịch tế bào. Miễn dịch tế bào (miễn dịch qua trung gian tế bào) là bào là một phương thức đáp ứng đặc hiệu nhằm loại trừ kháng nguyên, do tế bào lympho T đảm nhiệm. Selen kích

thích miễn dịch tế bào, SeNPs có thể ảnh hưởng đáng kể đến quá trình trao đổi chất, tăng sinh và biệt hóa của tế bào T. Là một loại tác nhân điều hòa miễn dịch mới, SeNPs có thể tăng cường phản ứng miễn dịch của các tế bào T khác nhau, do đó điều khiển khả năng miễn dịch thích ứng để giúp điều trị bệnh. Đồng thời, selen cũng tăng cường miễn dịch dịch thể và tham gia vào cấu tạo của các kháng thể - gọi là các Globulin miễn dịch (IgA, IgM, IgG) - giúp cơ thể tiêu diệt các tác nhân gây bệnh (Puchau và ctv, 2010). Đáp ứng miễn dịch dịch thể là đáp ứng do các lympho bào B đảm nhiệm. Sau khi nhận biết kháng nguyên, tế bào lympho B sẽ tăng sinh và biệt hóa thành tương bào, bắt đầu sản xuất ra kháng thể Ig. Các kháng thể này đảm đương chức năng nhận biết, kết hợp đặc hiệu với kháng nguyên để gây hiện tượng tủa, ngưng kết và hoạt hóa hệ miễn dịch không đặc hiệu. Khi có kháng nguyên xâm nhập, IgM xuất hiện đầu tiên, IgG xuất hiện muộn hơn và sẽ thay thế cho IgM. Tế bào lympho T và B được biết là phản ứng với sự kích thích được kích hoạt bởi các kháng nguyên hoặc nguyên nhân phân bào, đây là một loại điều hòa miễn dịch không đặc hiệu phổ biến. Sự tăng sinh tế bào lympho là tín hiệu rõ về tăng cường miễn dịch của vật chủ. Nhiều nghiên cứu chứng minh, việc bổ sung SeNPs, phần lớn giúp kích thích miễn dịch, được đo bằng một loạt các thông số bao gồm tăng sinh tế bào T, hoạt động tế bào NK và các chỉ số miễn dịch bẩm sinh và nhiều yếu tố khác (hình 1.1). Các SeNPs đã được chứng minh là có tác động hiệu quả đến việc chuyển đổi kiểu hình của đại thực bào, thường là từ loại M2 sang M1, có tác dụng ức chế ung thư và kháng khuẩn tiềm năng. Các SeNPs tác dụng thúc đẩy tế bào T tăng sinh và điều chỉnh chức năng của các tế bào T, như tế bào Th1 (CD4+), tế bào T gây độc tế bào (CD8+) và tế bào $\gamma\delta$ T bằng cách hoạt động như một chất điều hòa miễn dịch. Các chỉ số này tăng lên giúp tạo ra sự giải phóng IFN- γ cao hơn giúp hoạt động ức chế tế bào ung thư mạnh hơn. Tế bào NK đóng vai trò quan trọng trong hệ miễn dịch bẩm sinh phản ứng với bệnh ung thư và nhiễm trùng, có liên quan nhiều đến thụ thể bề mặt để nhận biết khối u và tế bào nhiễm mầm bệnh. Các tế bào NK có thể tác động trực tiếp hoạt động gây độc tế bào ức chế lại các tế bào

ung thư và cũng như kích thích sản xuất các cytokine. Những tác động của SeNPs lên các tế bào miễn dịch được thể hiện cụ thể ở hình 1.1.

Xia và Ivan (2019) đã nghiên cứu ảnh hưởng của chitosan-SeNPs (CTS-SeNPs) lên hệ thống miễn dịch cá ngựa vằn (*Danio rerio*). Các tác giả báo cáo CTS-SeNPs ảnh hưởng đến các con đường liên quan hệ thống miễn dịch, chuyển hóa lipid và thích ứng với môi trường ở thận cá ngựa vằn. CTS-SeNPs có vai trò thiết yếu trong việc điều chỉnh phản ứng oxy hóa khử và tham gia vào nhiều biểu hiện selenoprotein. Từ đó tăng cường sự biểu hiện của các phân tử MHC và IFN thúc đẩy đáng kể việc tăng cường miễn dịch của CTS-SeNPs (Xia và Ivan, 2019).



Hình 1.1. Hoạt động điều hòa miễn dịch của SeNPs (Chen và ctv, 2022)

1.6.3. Hoạt tính ức chế tế bào ung thư

Hiện nay có nhiều nghiên cứu về hoạt tính ức chế tế bào ung thư của SeNPs trên nhiều dòng tế bào như: Ung thư vú, gan phổi, thận, v.v. trên mô hình *in vivo* và *in vitro*. Các hạt SeNPs có thể đóng vai trò điều hòa cân bằng phản ứng ROS trong các tế bào bình thường nhưng có thể làm tăng đáng kể việc sản xuất ROS

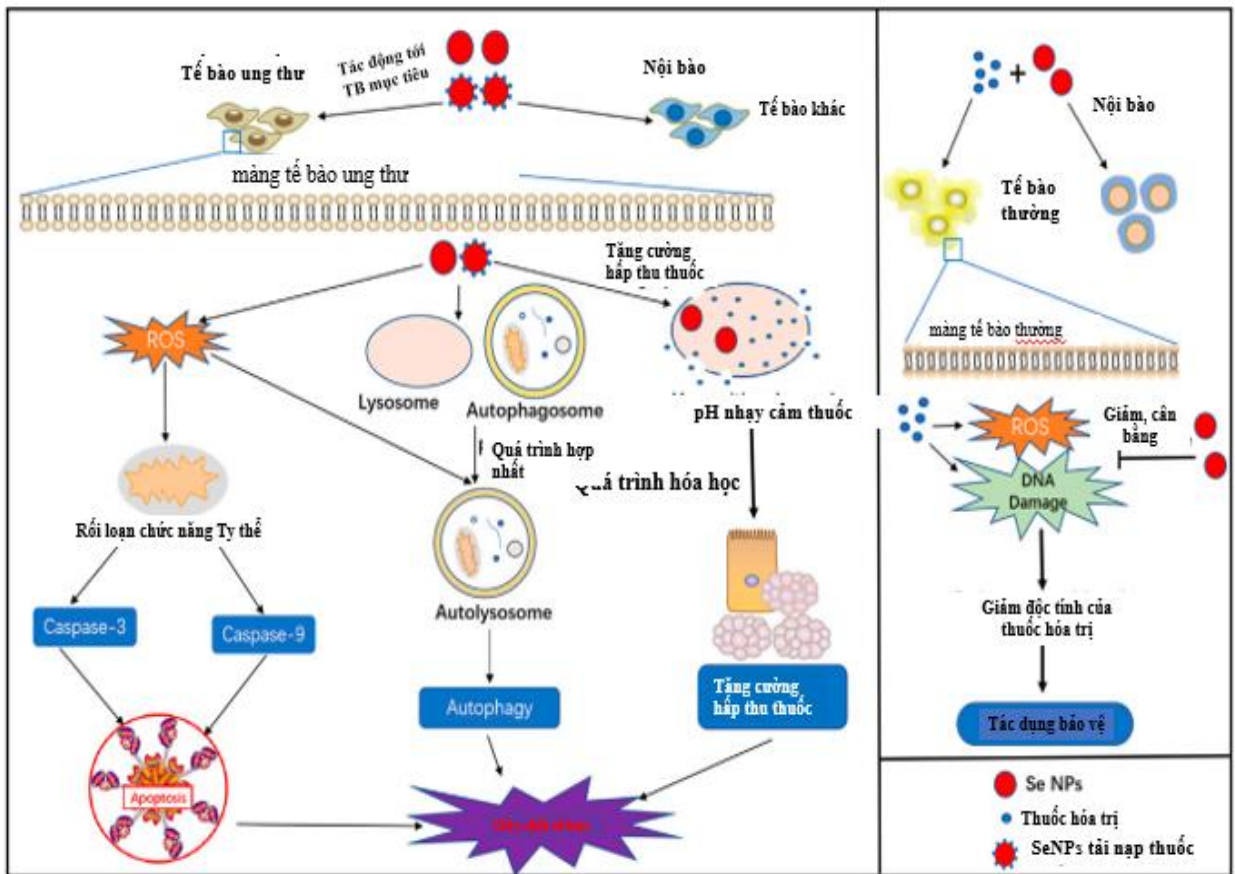
trong tế bào ung thư. Gần đây, ngày càng có nhiều nghiên cứu chứng minh việc sản xuất quá nhiều ROS có thể phá vỡ cân bằng nội môi oxy hóa khử trong tế bào ung thư sự gián đoạn phụ này liên tục dẫn đến tổn thương oxy hóa đối với các tế bào quan trọng các thành phần như protein, lipid và DNA. Vì vậy, vật liệu SeNPs với đặc tính cảm ứng ROS có thể được coi là tác nhân ức chế ung thư hiệu quả.

Nhiều nghiên cứu thể hiện cơ chế tác động ức chế tế bào ung thư của các hạt SeNPs chủ yếu thể hiện tác dụng gây độc tế bào bằng cách gây ra apoptosis của tế bào và/hoặc gây ra sự rối loạn chu kỳ tế bào ở các giai đoạn khác nhau trong chu kỳ phân chia tế bào. Huang và ctv (2013) chứng minh SeNPs có thể gây ra sự sản xuất quá mức ROS trong các tế bào ung thư và kích hoạt quá trình apoptosis thông qua con đường dẫn tín hiệu p53 (Huang và ctv, 2013). Apoptosis có thể theo con đường thụ thể bên ngoài (Extrinsic pathway) và con đường nội môi (Intrinsic pathway) hoặc ty thể. Con đường bên ngoài có thể được bắt đầu khi các phối tử (ligand) gắn vào thụ thể chết (death receptor) trên màng tế bào. Các thụ thể này thường thuộc nhóm thụ thể TNF (tumor necrosis factor). Khi thụ thể này được kích hoạt, giúp kích thích một chuỗi phản ứng enzyme (caspase) dẫn đến quá trình chết tế bào. Con đường nội môi được bắt đầu từ bên trong tế bào thông qua các caspase, do tổn thương DNA hoặc một số loại căng thẳng tế bào nghiêm trọng khác. Có thể mô tả như sau: Ty thể là cơ quan chính chịu trách nhiệm sản xuất các gốc oxy phản ứng (ROS), có liên quan chặt chẽ đến quá trình apoptosis của tế bào. Sản xuất ROS quá mức có thể dẫn đến suy giảm chức năng của ty thể, bao gồm cả giảm điện thế màng ty thể ($\Delta\Psi_m$) và sự kích hoạt con đường apoptotic của ty thể. Trung tâm của cơ chế điều hòa apoptosis là sự kích hoạt các caspase, do đó dẫn đến apoptosis qua trung gian ty thể. Khi các caspase được kích hoạt sẽ dẫn đến quá trình chết tế bào. Một mục tiêu quan trọng của các caspase là một chất ức chế DNase, khi được kích hoạt sẽ gây ra sự phân mảnh của DNA. Chúng phân cắt các protein tế

bào, dẫn đến phá vỡ tế bào, màng tế bào bị bong tróc và phân mảnh DNA tế bào (Menon và ctv, 2018).

Li và ctv (2019) đã nghiên cứu tổng hợp và đánh giá độc tính tế bào của các hạt SeNPs được ổn định bởi α -D-glucan (CPA) từ hạt dẻ *Castanea mollissima* Blume. Kết quả khảo sát trên tế bào ung thư cổ tử cung HeLa cho thấy, CPA-SeNPs có tác dụng ức chế đáng kể quá trình tăng sinh trên tế bào HeLa. Nhóm tác giả đã báo cáo CPA-SeNPs kích hoạt tăng ROS nội bào, gây rối loạn chu kỳ tế bào, cảm ứng apoptosis tế bào, rối loạn chức năng màng (Li và ctv, 2019).

Ngoài ra SeNPs còn được sử dụng làm chất mang, chất dẫn truyền thuốc trong điều trị phòng và ức chế ung thư. Các hạt nano giúp tăng cường khả năng nhắm mục tiêu, tăng tính chọn lọc, độ hòa tan trong nước và độ ổn định, giảm độc tính và kéo dài thời gian hấp thu của thuốc trong cơ thể con người. Liu và ctv (2012), đã nghiên cứu SeNPs có thể được sử dụng như một chất mang với 5-fluorouracil để tạo được sự cộng gộp hoạt tính ức chế ung thư trên năm dòng tế bào ung thư ở người (A375, MCF-7, HepG2, Colo201 và PC3). Kết quả nghiên cứu cũng thể hiện rõ SeNPs có tính chọn lọc giữa tế bào ung thư và tế bào bình thường và được dự đoán là ứng cử viên trong tác nhân hóa trị liệu để điều trị ung thư. Ramamurthy và ctv (2013) đã báo cáo nano SeNPs có thể ức chế sự phát triển của tế bào ung thư vú MCF-7 ở người theo liều kết hợp doxorubicin. Ngoài ra, sự kết hợp của các SeNPs và doxorubicin cho thấy tác dụng ức chế ung thư tốt hơn các phương pháp điều trị riêng lẻ khác. Gao và ctv (2014) đã nghiên cứu kết hợp Irinotecan (một loại thuốc ức chế ung thư) với SeNPs, kết quả cho thấy sản phẩm giúp tăng tác dụng ức chế ung thư đối với tế bào HCT-8 qua việc tăng cường kích hoạt p53 gây ra cảm ứng apoptosis (Gao và ctv, 2014). Leung Chan và ctv (2017) đã chứng minh dựa trên hiệu ứng điện tử Auger và hiệu ứng Compton của nguyên tử Se, SeNPs kết hợp với hạt ^{125}I đạt được hiệu ứng tổng hợp, nhằm mục tiêu và ức chế sự phát triển của tế bào ung thư và thông qua việc cảm ứng quá trình apoptosis.



Hình 1.2. Các con đường ức chế tế bào ung thư của SeNPs (Lin và ctv, 2021)

Các đặc tính kích thước, độ ổn định, hình dạng và sự biến đổi bề mặt của chúng ảnh hưởng rất lớn đến sinh lý và sinh học của các hạt nano. Do đó, việc lựa chọn các loại thuốc nano có thể áp dụng để chống lại ung thư nhằm tăng cường hiệu quả hoạt động và giảm độc tính của chúng là rất quan trọng. Tác dụng ức chế ung thư của SeNPs phụ thuộc vào nồng độ, kích thước và liều lượng. Tùy thuộc vào kích thước và liều lượng, các hạt nano có thể ảnh hưởng trực tiếp đến sự ổn định vật lý, sự hấp thu và phân phối của hạt nano tới tế bào đích (Ren và ctv, 2013). Nghiên cứu của Ali và ctv (2013) đã thử nghiệm và cho thấy chuột được uống SeNPs có kích thước hạt trong khoảng 50-80 nm với liều lượng 0,2 mg/kg thể trọng có khả năng ức chế ung thư phổi. Faghfuri và ctv (2015) đã báo cáo cho thấy, khối lượng khối u vú ở chuột bổ sung 200 µg SeNPs/ngày trong 60 ngày giảm so với nhóm đối chứng. Cui và ctv (2018) đã nghiên cứu hoạt tính ức chế ung thư trên tế bào HepG2 của SeNPs được tổng hợp bằng cách sử dụng HE (chiết xuất từ táo gai) làm chất khử và chất ổn định.

Nghiên cứu cho thấy tỉ lệ sống sót của tế bào HepG2 giảm dần khi tăng dần nồng độ HE-SeNPs. Sản phẩm HE-SeNPs cho thấy hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan HepG2 tốt, với IC_{50} khoảng 19,22 mg/mL. Trong khi đó, HE-SeNPs hầu như không gây độc tế bào đến tế bào HL02 (tế bào gan khỏe mạnh). Kết quả nhuộm Annexin V-FITC/PI cho thấy tăng tỷ lệ tế bào tăng trong giai đoạn apoptosis sớm và sau khi điều trị bằng HE-SeNPs (Cui và ctv, 2018). Tang và ctv (2019) đã nghiên cứu thử nghiệm tác động độc tính lên tế bào ung thư của sản phẩm SeNPs ổn định bởi arabinogalactans (LAG). Kết quả chỉ ra SeNPs/LAG có tác dụng ức chế đáng kể trên các dòng tế bào A549, HepG-2 và MCF-7 và hiệu quả ức chế tế bào ung thư phụ thuộc vào liều lượng. Cơ chế độc tính của LAG-SeNPs chủ yếu qua cơ chế gây cảm ứng apoptosis tế bào, ức chế sự tăng sinh của tế bào. Năm 2020, Indumathy và ctv (2020) đã nghiên cứu thử nghiệm *in vitro* để đánh giá độc tính của SeNPs trên dòng tế bào HepG2. Nhóm nghiên cứu cũng kết luận, khả năng gây ức chế tăng sinh tế bào HepG2 của SeNPs phụ thuộc vào liều lượng và kết quả cho thấy ở nồng độ 30 μ g/mL, tế bào chỉ đạt tỉ lệ sống 33,7%, do đó SeNPs được cho phép sử dụng như một tác nhân hóa trị liệu (Indumathy và ctv, 2020). SeNPs được biết đến có đặc tính khả dụng sinh học cao và độc tính thấp đối với tế bào bình thường nhưng độc tính cao đối với tế bào ung thư. SeNPs cũng được cho rằng có khả dụng sinh học cao hơn các dạng nano khác. Nghiên cứu Khaled và cộng tác viên (2024) đã nghiên cứu đnhg giá so sánh các tác dụng gây độc tế bào trong ống nghiệm của cả hạt nano bạc chứa Ber (Ber-AgNPs) và hạt nano selen chứa Ber (Ber-SeNPs) trong dòng tế bào ung thư gan người (HepG2) và tế bào gan bình thường của chuột (BNL). Kết quả cho thấy Ber-AgNPs, Ber-SeNPs có tác dụng chống khối u tốt đối với các tế bào HepG2 bằng cách gây ra apoptosis thông qua việc điều hòa tăng nồng độ p53, Bax, cytochrome C trong tế bào chết và hoạt động của caspase-3, và điều hòa giảm nồng độ Bcl-2. Trong đó Ber-SeNPs thể hiện hiệu quả cao hơn Ber-AgNPs. Kết quả này có thể là do đặc tính chống ung thư vốn có của selen (Khaled và ctv, 2024).

Có thể thấy, SeNPs có tiềm năng trong việc phát triển chiến lược trị liệu ung thư trong tương lai. Tuy nhiên hiện nay vẫn chưa có nghiên cứu nào đánh giá ức chế tế bào ung thư gan của SeNPs tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ.

Nghiên cứu về hoạt tính sinh học của SeNPs còn đang tiếp tục mở rộng, mặc dù nhiều kết quả cho thấy hiệu quả cao vẫn cần thêm nghiên cứu để hiểu rõ hơn về tất cả các cơ chế hoạt động cũng như đảm bảo an toàn và hiệu quả trong các ứng dụng thực tế.

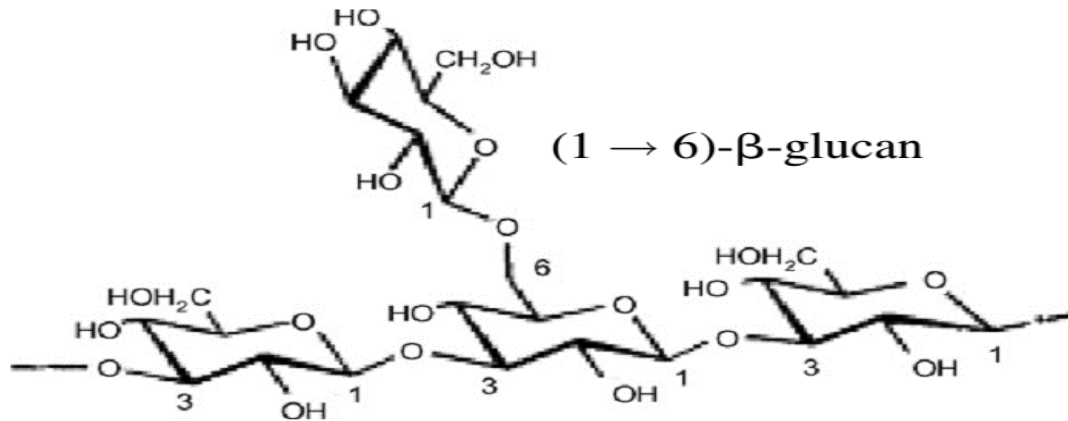
1.7. Tổng quan về β -glucan

1.7.1. Cấu trúc, nguồn gốc

β -glucan là một chuỗi các D-glucose hay còn gọi là polysaccharides được kết nối thông qua liên kết glycosid. Các β -glucan là nhóm phân tử có cấu trúc không gian 3 chiều. β -glucan có mặt trong các thành tế bào của nhiều nguồn từ tự nhiên như vi khuẩn, nấm men như *Saccharomyces cerevisiae*, các loại nấm như *Aspergillus* sp. và *Agaricus*, sp. tảo, nấm ăn như nấm linh chi, nấm bào ngư và các loại ngũ cốc như yến mạch, lúa mạch, lúa mì và lúa mạch đen (Gunjan và ctv, 2017). β -glucan trong yến mạch và lúa mạch thường có hoạt tính sinh học thấp. β -glucan tìm thấy trong nấm lớn chỉ có phân nhánh với một phân tử glucose, do vậy chúng có hoạt tính sinh học (tăng cường miễn dịch) đến một mức độ nào đó. Trong khi đó, β -glucan tách chiết từ thành tế bào nấm men có cấu trúc phân nhánh với nhiều phân tử glucose và có hoạt tính sinh học cao nhất trong tất cả các loại β -glucan (Phạm Việt Cường, 2009). Thành tế bào nấm men được cấu thành chủ yếu từ β -glucan và mannoprotein, một phần nhỏ chitin (1-3%) và lipid (2-5%) (Dallies và ctv, 1998). Trong đó, (1,3;1,6)- β -glucan chiếm tới 50-60% thành tế bào nấm men, hình thành nên một cấu trúc lõi.

Tùy thuộc vào nguồn gốc, β -glucan có cấu trúc liên kết glycosid khác nhau (Mason, 2001). Mạch thẳng của β -glucan được tạo thành bởi các liên kết β -(1,3)-D-glycoside và các mạch nhánh được tạo bởi các liên kết β -(1,6)-D-glycoside (thường được gọi là ((1,3)/(1,6))- β -glucan) hoặc β -(1,4)-D-glycoside (thường được gọi là ((1,3)/(1,4))- β -glucan) (Mantovani và ctv, 2008). Những

khác biệt về cấu trúc của β -glucan có thể làm thay đổi độ hòa tan, khối lượng phân tử, v.v. dẫn đến ảnh hưởng tới chức năng, tác dụng tăng cường miễn dịch.(Chan và ctv, 2009).



Hình 1.3. Cấu trúc phân tử β -glucan (Mantovani và ctv, 2008)

β -glucan không hòa tan trong nước, ethanol, aceton nhưng lại tan trong NaOH và DMSO $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$. Khả năng tan của β -glucan phụ thuộc vào mức độ polymer hóa. Độ polymer hóa trung bình của β -glucan thường là ~ 1500 đơn phân, tương đương với $M_w \sim 240$ kDa. Khả năng hoà tan của chúng tăng khi mức độ polymer hóa trong phân tử giảm (Mantovani, 2008).

1.7.2. Thu nhận β -glucan từ nấm men

Để tách chiết β -glucan từ thành tế bào nấm men *S. cerevisiae* thường sử dụng dung dịch kiềm (NaOH, KOH) (Suphantharika và ctv, 2003; Javmen và ctv, 2012; Pengkumsri và ctv, 2016). Khi đó, protein, acid nucleic và lipids phân cực sẽ bị thủy phân và tan trong kiềm. Từ đó có thể dễ dàng thu hồi β -glucan không tan trong kiềm sau khi ly tâm dung dịch thủy phân (Javmen và ctv, 2012; Pengkumsri và ctv, 2016). Sau đó, β -glucan thô thường được tinh sạch bằng cách xử lý với acid và rửa với dung môi (ethanol, aceton, isopropanol, v.v.) để loại bỏ chitin, chitosan, glycogen và một phần protein (Suphantharika và ctv, 2003; Javmen và ctv, 2012; Pengkumsri và ctv, 2016). Quy trình tách chiết β -glucan bằng kiềm phụ thuộc nhiều vào thời gian xử lý mẫu, nhiệt độ, pH.

Ngoài ra phương pháp tách chiết β -glucan từ tế bào nấm men kết hợp giữa hóa học và sinh học cũng đã được Magnani (2009) và Silva Araújo và ctv (2014) nghiên cứu. Theo đó, tế bào nấm men được bổ sung dung dịch NaCl 3% và đặt ổn nhiệt trong 24 giờ ở 55°C. Nhằm phá vỡ cấu trúc của thành tế bào thu nhận β -glucan thô, Magnani và ctv (2009) và Silva Araújo và ctv (2014) đã dùng sóng siêu âm tác động lên thành tế bào và ly tâm thu phần không tan. Sau đó, các dung môi như isopropanol và petroleum ether đã được sử dụng để loại bỏ lipid. Cuối cùng, để tinh sạch sản phẩm β -glucan thu được, enzyme protamex (một protease) đã được sử dụng để loại bỏ protein còn sót lại (Magnani và ctv, 2009; Silva Araújo và ctv, 2014).

1.7.3. Hoạt tính sinh học của β -glucan

Giống như các polysaccharide khác, β -glucan cơ chế hoạt động bao gồm giảm hấp thu chất dinh dưỡng và cải thiện đường ruột. β -glucan có thể là một nguồn nguyên liệu tiềm năng cho quá trình lên men ở vi khuẩn đường ruột và có tác dụng như một prebiotic. Hơn nữa, chúng còn giúp cơ thể vật chủ tăng cường khả năng miễn dịch, ức chế tăng sinh các tế bào ung thư (Iwabuchi và Nagaoca, 2002). Khả năng tăng cường miễn dịch của β -glucan phụ thuộc vào mức độ phân nhánh, khối lượng phân tử (Mw), cấu trúc bậc 3 và khả năng hòa tan của chúng. Các thử nghiệm *in vivo* và *in vitro* cho thấy β -glucan tác dụng trên miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thích ứng (Qi và ctv, 2011). Nhiều nghiên cứu cho thấy, β -glucan được biết đến như một chất có khả năng kích thích miễn dịch và là nguyên liệu có hiệu quả trong việc tăng cường miễn dịch ở nhiều động vật (Chae và ctv, 2006; Meena và ctv, 2013). Đặc biệt, β -glucan có Mw thấp có hoạt tính sinh học tốt hơn so với β -glucan có Mw lớn.

β -glucan có nhiều hoạt tính sinh học tốt do đó được sử dụng nhiều trong các lĩnh vực khác nhau như thực phẩm, mỹ phẩm, nông nghiệp, chăn nuôi, nuôi trồng thủy sản và đặc biệt là y học. β -glucan còn ngăn ngừa hoặc làm giảm nhiễm khuẩn, giúp vết thương mau lành hơn. Theo Vetvicka (2011), β -glucan cũng giúp kích thích sự tạo máu, β -glucan dạng hạt hay dạng tan đều có khả

năng phục hồi đáng kể một lượng máu sau khi xạ trị. Điều này cho thấy β -glucan có thể đẩy lùi chứng suy tủy sau khi xạ trị. β -glucan còn giúp cải thiện tiêu hóa ở động vật được thử nghiệm, cải thiện sự trao đổi chất trong máu, kích thích sản xuất tiểu cầu trong máu, đẩy mạnh khả năng làm lành vết thương, nâng cao sức khỏe đường ruột, v.v. (Mason, 2001).

β -glucan còn có thể làm giảm nồng độ lipid máu thông qua việc làm giảm lượng acid mật tái hấp thu và tăng tổng hợp acid mật mới từ cholesterol, từ đó làm giảm lượng cholesterol hấp thu vào máu. β -glucan cũng được chứng minh là ức chế quá trình sinh tổng hợp cholesterol của gan bằng các acid béo chuỗi ngắn tạo ra từ quá trình lên men với vi khuẩn đường ruột (Hara và ctv, 1999; Levrat-Verny và ctv, 2000).

1.7.4. Vai trò của β -glucan trong việc làm chất ổn định trong tổng hợp nano

Polysaccharides gần đây thu hút nhiều nghiên cứu với vai trò làm chất ổn định trong quá trình tổng hợp các hạt nano. Các nhóm chức như hydroxyl, amino, sunfate và cacboxylic acid trong các hợp chất polysaccharide giúp hình thành liên kết hydro dọc theo chuỗi polymer hỗ trợ trong việc ổn định cấu trúc hạt nano (Liu và ctv, 2017). Sự liên kết với các nhóm chức này sẽ ngăn cản sự hấp thụ protein, giúp cho sự tương tác của SeNPs với các tế bào đích và lớp lipid kép của chúng hiệu quả hơn. Polysaccharides dễ thu nhận từ nhiều nguồn, và có chi phí thu nhận thấp (Liu và ctv, 2017). Vì vậy, với các công nghệ tổng hợp hiện nay, polysaccharides là nguồn nguyên liệu lý tưởng cho tổng hợp các hạt nano. Nhiều nghiên cứu đã báo cáo đánh giá hoạt tính sinh học của các sản phẩm SeNPs khi kết hợp với các polysaccharide khác nhau: Polysaccharide từ trà xanh, nấm dược liệu, nấm men, các hạt thực vật (Zhang và ctv, 2012; Chen và ctv, 2018; Cui và ctv, 2018; Tang và ctv, 2019; Gao và ctv, 2020, Hien và ctv, Duy và ctv, 2021). Các nghiên cứu đã cho thấy sự kết hợp của cả hai mang đến nhiều đặc tính sinh học tuyệt vời trong nhiều ứng dụng. Sự kết hợp này có thể làm giảm những hạn chế cố hữu của selen, làm tăng sinh khả dụng sinh học

và độ hòa tan của chúng. Hơn nữa, chức năng hóa với polysaccharides sinh học có thể kéo dài thời gian lưu trú của SeNPs và do đó làm tăng khả năng hấp thu sinh học. (Liu và ctv, 2008).

β -glucan được biết đến với khả năng tương hợp sinh học cao, có thể liên kết với protein và các hoạt chất khác mà không làm thay đổi hoạt tính sinh học của hoạt chất. Ngoài ra, đặc tính cấu trúc của β -glucan tách chiết từ thành tế bào nấm men như độ phân nhánh cao cũng giúp β -glucan trở thành một ứng cử viên nổi bật cho việc sử dụng làm chất ổn định giúp các hạt nano phân tán tốt, ổn định hơn, kháng kết tụ hạt sau quá trình tổng hợp. Cũng giống như các polysaccharid khác (alginate, dextran, và gelatin, chitosan), β -glucan bao gồm các nhóm chức như nhóm $-\text{COO}$ và $-\text{OH}$, dễ dàng ổn định SeNPs thông qua liên kết hydro và tương tác tĩnh điện với các hạt nano. Bên cạnh đó, β -glucan tách chiết từ thành tế bào nấm men còn có khả năng hòa tan trong nước tốt và hoạt tính sinh học đa dạng như giảm cholesterol, ức chế tế bào ung thư, kháng viêm, chống oxy hóa, tăng cường miễn dịch. Do đó polysaccharide này sẽ rất tiềm năng sử dụng làm chất ổn định trong tổng hợp SeNPs.

1.8. Những nghiên cứu liên quan đến luận án

Cho đến nay, hầu hết các nghiên cứu quốc tế chủ yếu sử dụng các tác nhân vật lý như nhiệt độ, vi sóng, áp suất, v.v. (Hou và ctv, 2011; Yu và ctv, 2016; Ahmad, 2016), hóa học như vitamin C, 1-methylimidazole hay glutathione (Zhang và ctv, 2004; Langi và ctv, 2010; Verma và Maheshwari, 2018) hay sinh học sử dụng dịch chiết thực vật (Cui và ctv, 2018; Ramamurthy và ctv, 2013; Zhang và ctv, 2017) và vi sinh vật (Fesharaki và ctv, 2010; Hosnedlova và ctv, 2018; Zhang và ctv, 2019). Ở Việt Nam, Hien và ctv (2018) đã nghiên cứu tổng hợp SeNPs bằng chiếu xạ tia Gamma Co-60 ổn định trong 1% dung dịch dextran và khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của chúng. Việc sử dụng phương pháp chiếu xạ khắc phục được các tồn tại của các phương pháp hóa học, sinh học, vật lý khác như kiểm soát được kích thước dễ dàng, sản phẩm không tồn tại chất khử, dễ thực hiện, hiệu suất tổng hợp cao. Tuy nhiên nhóm tác giả này sử dụng

dextran làm chất ổn định mà hoàn toàn chưa sử dụng β -glucan làm chất ổn định. Năm 2019, nhóm tác giả Nguyễn T. M. L và ctv cũng có công trình nghiên cứu tổng hợp và đánh giá hiệu ứng của hỗn hợp selen nano/oligochitosan và *Spirulina platensis* đến số lượng bạch cầu ở chuột. Kết quả nghiên cứu cho thấy sản phẩm selen nano được ổn định trong oligochitosan tổng hợp được có thời gian bảo quản dưới 45 ngày (ở 4°C). Số lượng bạch cầu ở chuột tăng 1,59 lần khi sử dụng hỗn hợp selen nano/oligochitosan và *S. platensis* (với liều dùng 0,1 mg selen nano/kg/ngày và 0,1 g *S. platensis*/kg/ngày) so với đối chứng. Duy và ctv (2021) báo cáo SeNPs/oligochitosan được tổng hợp bằng chiếu xạ γ có thể phục hồi các tế bào bạch cầu ở chuột được chiếu xạ. Tuy nhiên, tác dụng kích thích miễn dịch của SeNPs vẫn chưa được nghiên cứu trên chuột bị ức chế miễn dịch. Đến thời điểm này vẫn chưa có một công trình nào sử dụng β -glucan làm chất ổn định. Qua đó cho thấy việc nghiên cứu tổng hợp sản phẩm SeNPs sử dụng β -glucan làm chất ổn định bằng phương pháp chiếu xạ là hoàn toàn mới. Ngoài ra cũng rất ít những nghiên cứu khảo sát về hoạt tính sinh học trong miễn dịch và ức chế tế bào ung thư liên quan đến sản phẩm tạo ra. Rất ít công bố nghiên cứu và phân tích theo chu kỳ tế bào để đánh giá chính xác cơ chế ức chế tế bào ung thư của SeNPs.

Một số nghiên cứu quốc tế sử dụng β -glucan làm chất ổn định trong sản phẩm SeNPs nhưng không sử dụng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60 (Jia và ctv, 2015, Li và ctv, 2019). Đến thời điểm hiện tại, chưa có nghiên cứu nào tổng hợp SeNPs bằng phương pháp chiếu xạ sử dụng β -glucan từ thành tế bào nấm men để làm chất ổn định và khảo sát hoạt tính sinh học. Việc sử dụng β -glucan tan trong nước từ thành tế bào nấm men với độ phân nhánh cao, có các nhóm chức như nhóm $-\text{COO}$, $-\text{OH}$, dễ dàng ổn định SeNPs thông qua liên kết hydro tương tác tĩnh điện với các hạt nano để tổng hợp SeNPs trong nghiên cứu này hứa hẹn nhiều triển vọng ứng dụng bởi giúp giữ độ ổn định của sản phẩm tạo ra và hiệu ứng kết hợp giữa selen và polysaccharide quý này trong hướng ứng dụng phòng chống oxy hóa, ức chế tế bào ung thư và tăng cường miễn dịch. Từ những tổng

quan trên có thể thấy, nghiên cứu tổng hợp SeNPs là rất cần thiết. Mặt khác, phương pháp tổng hợp SeNPs bằng phương pháp chiếu xạ được cho là phương pháp có hiệu quả cao. Tuy nhiên, hiện nay mới chỉ có hai nghiên cứu của Hien và ctv (2018) và Duy và ctv (2021) nghiên cứu tổng hợp SeNPs bằng phương pháp chiếu xạ nhưng các nhóm tác giả này chưa sử dụng β -glucan làm chất ổn định. Do đó đề tài: “Nghiên cứu tổng hợp SeNPs/ β -glucan có hoạt tính sinh học bằng phương pháp chiếu xạ” là một hướng nghiên cứu có tính mới. Mục đích của nghiên cứu nhằm hướng đến tổng hợp chế phẩm SeNPs ổn định trong polymer tự nhiên β -glucan với khả năng ổn định tốt, đồng thời đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, ức chế tế bào ung thư gan, tăng cường miễn dịch của chế phẩm sau khi tổng hợp, từ đó định hướng ứng dụng SeNPs/ β -glucan làm nguyên liệu trong sản xuất sản phẩm tăng cường sức đề kháng và hỗ trợ trong điều trị bệnh.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu:

- β -glucan (tan trong nước, Mw = 25 kDa, độ tinh sạch 92,5%) được tách chiết từ thành tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* theo quy trình được công bố bởi Long và ctv (2019) do Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. HCM cung cấp.

- Selen dioxid (SeO_2) dạng tinh khiết được cung cấp bởi hãng Sigma- USA.

- Cytoxan - cyclophosphamide (CTX) (Sigma), NaOH, ABTS (2,2'-azinobis (3 ethylbenzothiazonline-6-sulfonate), MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazol brom), DMEM (Dulbecco's modified eagle medium), $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, DMSO, nước khử ion, ELISA Kit (IgM-ab133047; IgG-ab151276; IL-2-ab223588, IFN γ -ab100689 and TNF α -ab208348) của hãng Abcam (USA), DNase - free RNase A (Thermo), Trypsin - EDTA (Sigma), propidium iodide (PI) (Sigma), Triton X-100 Penicillin - Streptomycin, FBS, phosphate buffer saline (Sigma), BSA, Dulbecco's PBS (Biobasic).

- Chuột nhắt trắng dòng BALB/c khỏe mạnh có trọng lượng 20 ± 5 g/con được cung cấp bởi Viện Tế bào gốc, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học quốc gia TP. HCM.

- Dòng tế bào ung thư gan HepG2, nguyên bào sợi L929 (ATCC # CCL-1) được cung cấp bởi Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. HCM.

Các thiết bị chính: Nguồn xạ Gamma Co-60 model GC-5000 (BRIT, Ấn Độ). Máy ly tâm tốc độ cao Himac CR22N (Hitachi, Nhật Bản). Máy đông khô Christ (Đức). Máy quang phổ tử ngoại GENESY 10S UV-Vis (Thermo, USA). Máy quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) (Jasco, Nhật Bản). Hệ thống Zetasizer Nano ZSP, model ZEN5600 (Malvern, Anh). Hệ thống nhiễu xạ tia X D8 Advance ECO (Bruker, Đức), Máy phân tích tế bào theo dòng chảy (Flow cytometry) (FACS Aria III- BD, USA), Tủ ủ CO₂ (PE-Nhật), Tủ cấy an toàn sinh học cấp II AC2-4E8.

Thời gian thực hiện: Từ tháng 09/2020 đến tháng 9/2024

Địa điểm thực hiện: Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. HCM và Trường Đại học Nông Lâm TP. HCM

Tất cả các thử nghiệm trên chuột đều được thực hiện theo hướng dẫn đạo đức nghiên cứu động vật của (AAALAC) và được Hội đồng Khoa học Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh phê duyệt (số phê duyệt: 380/QĐ-CNSH) và được cấp phép của hội đồng Y đức trường Đại Học Nông Lâm (AEC-NLU) theo số 20210108NLU.

2.2. Nội dung của luận án

Nội dung 1: Tổng hợp SeNPs ổn định trong β -glucan có Mw thấp và tan trong nước bằng phương pháp chiếu xạ;

Nội dung 1.1: Khảo sát các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp SeNPs ổn định trong β -glucan có Mw thấp và tan trong nước bằng phương pháp chiếu xạ;

Nội dung 1.2: Khảo sát độ ổn định của chế phẩm SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ;

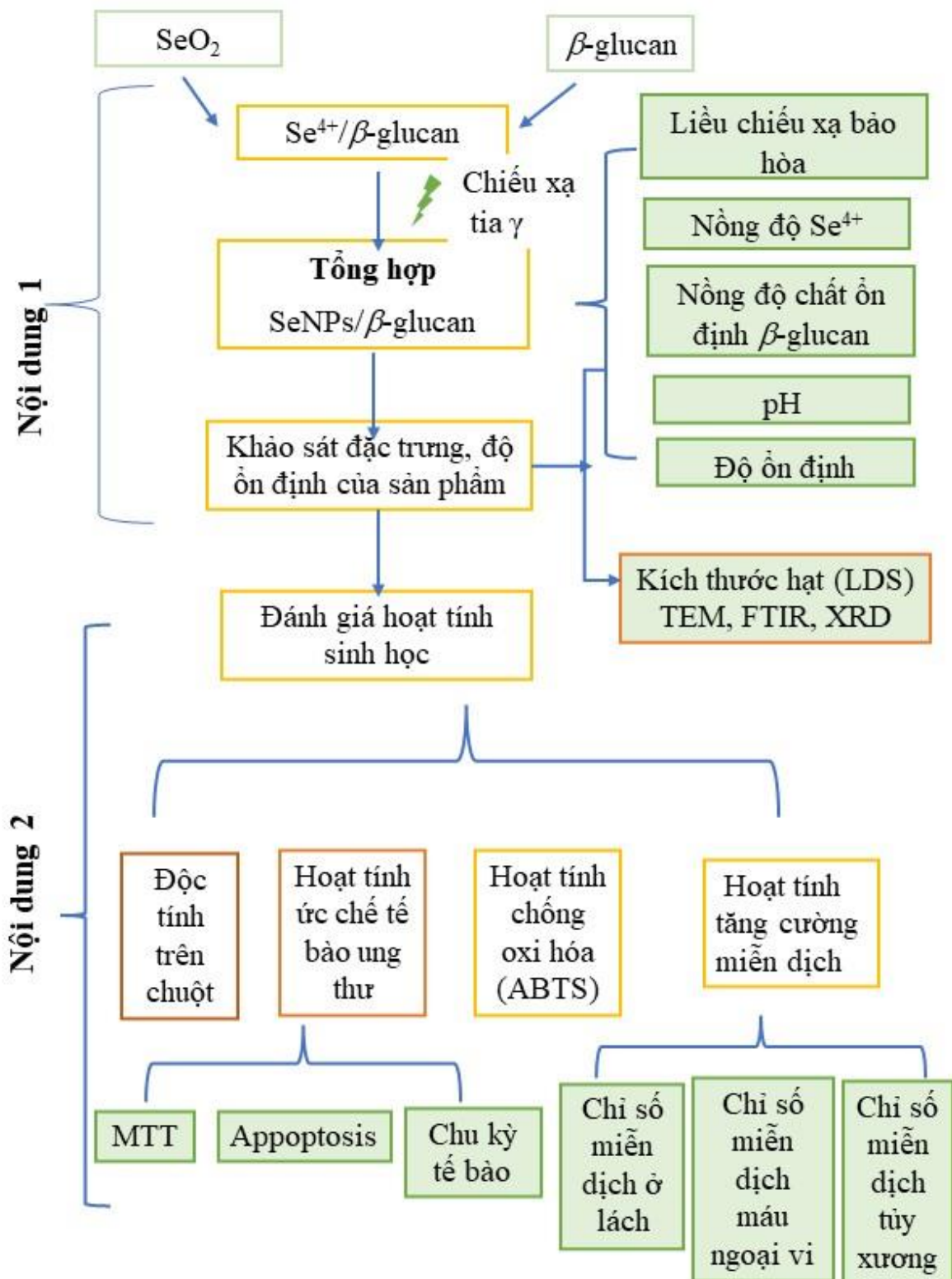
Nội dung 2: Đánh giá hoạt tính sinh học của SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ;

Nội dung 2.1: Xác định độc tính cấp của chế phẩm SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ ;

Nội dung 2.2: Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ;

Nội dung 2.3: Đánh giá hoạt tính tăng cường miễn dịch của SeNPs/ β -glucan trên mô hình chuột gây suy giảm miễn dịch;

Nội dung 2.4: Đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan HepG2 của SeNPs/ β -glucan.



Hình 2.1. Sơ đồ nội dung nghiên cứu chính của luận án

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Tổng hợp SeNPs ổn định trong β -glucan có Mw thấp và tan trong nước bằng phương pháp chiếu xạ

2.3.1.1 Chuẩn bị các dung dịch stock

Chuẩn bị β -glucan 10%: Cân 10 g β -glucan tan trong nước ($M_w \sim 25$ kDa) và cho vào 80 mL nước, sau đó khuấy đều cho đến khi hòa tan hoàn toàn β -glucan, tiếp tục bổ sung nước vừa đủ 100 mL, tạo dung dịch stock β -glucan tan trong nước 10%.

Chuẩn bị các stock dung dịch Se^{4+} 800 ppm: Cân 112,5 mg SeO_2 được cho vào 60 mL nước khử ion (giữ trong bình tối), khuấy đều cho đến khi SeO_2 tan hoàn toàn, sau đó bổ sung nước vừa đủ 100 mL, tạo dung dịch stock Se^{4+} 800 ppm.

2.3.1.2 Phương pháp chiếu xạ tổng hợp SeNPs ổn định trong β -glucan

Tiến hành thực hiện chiếu xạ theo phương pháp của Hien và ctv (2018). Từ 2 dung dịch stock Se^{4+} 800 ppm và β -glucan tan trong nước 10%, tiến hành tạo các dung dịch $Se^{4+}/2\%$ β -glucan với các nồng độ Se^{4+} lần lượt là 40; 60; 80; 100 và 120 ppm. Sau đó chiếu xạ các dung dịch này với các liều xạ từ 2 - 14 kGy để tổng hợp SeNPs/ β -glucan trên nguồn gamma Co-60 suất liều 10 kGy/h bằng nguồn xạ gamma Co-60 (GC-5000, BRIT, Ấn Độ) tại Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. HCM.

2.3.1.3 Xác định liều chiếu xạ chuyển hóa bão hòa của các nồng độ Se^{4+} khác nhau

Liều xạ chuyển hóa bão hòa là liều chiếu xạ mà tại đó toàn bộ Se^{4+} bị khử thành Se^0 , được xác định trên cơ sở phân tích hàm lượng ion Se^{4+} còn lại trong dung dịch sau khi chiếu xạ theo phương pháp của Mathew và Nayarana (2006). Để xác định liều chiếu xạ bão hòa, sử dụng phương pháp ly tâm tốc độ cao (50.000 vòng/phút) để thu hết SeNPs và phân tích hàm lượng muối Se^{4+} còn lại sau khi chiếu xạ.

Dung dịch SeNPs/ β -glucan sau khi chiếu xạ để ổn định trong 12 giờ trước khi đo UV-Vis nhằm xác định liều chiếu xạ chuyển hóa bão hòa. Quy trình thực hiện như sau: Cân 1,405 g SeO_2 được cho vào 600 mL nước khử ion, khuấy đều cho đến khi tan hoàn toàn, sau đó bổ sung nước vừa đủ 1000 mL, tạo dung dịch stock Se^{4+} 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tiến hành dựng đường chuẩn: Lấy 1 thể tích chất chuẩn có chứa lần lượt 2, 4, 6, 8 và 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ selen chuẩn cho vào bình định mức 10 mL, sau đó thêm vào 1 mL KI 2% và 1 mL HCl 2M. Lắc nhẹ đến khi hỗn hợp có màu vàng, thể hiện sự giải phóng iod. Thêm vào 2 mL azure B 0,1% và lắc đều. Thêm nước vừa đủ 10 mL. Hỗn hợp được đo độ hấp thụ ở bước sóng 644 nm. Sử dụng nước cất làm mẫu trắng.

Phân tích mẫu thử: Lấy 1 lượng mẫu thử (≤ 4 mL) có nồng độ selen < 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cho vào bình định mức 10 mL. Sau đó bổ sung 0,5 mL NaOH 1 M và 0,5 mL EDTA 0,2 M. Lắc đều và ly tâm để loại bỏ tủa. Dịch ly tâm được chuyển vào bình định mức 10 mL mới và xác định hàm lượng selen theo quy trình trên. Hàm lượng selen trong mẫu thử được tính dựa theo đường chuẩn. Liều xạ chuyển hóa bão hòa Se^{4+} thành Se^0 là liều mà từ giá trị này trở đi thì mật độ quang thay đổi không đáng kể hoặc mật độ quang suy giảm và bước sóng hấp thụ cực đại dịch chuyển về thang có giá trị lớn hơn.

2.3.2. Phương pháp đánh giá các điều kiện ảnh hưởng đến kích thước hạt SeNPs/ β -glucan.

2.3.2.1 Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ Se^{4+} đến kích thước hạt SeNPs/ β -glucan

Dung dịch Se^{4+}/β -glucan với các nồng độ Se^{4+} lần lượt là 40, 60, 80, 100 và 120 ppm được ổn định trong dung dịch β -glucan tan trong nước 2% (w/v) được tạo ra bằng cách phối trộn 2 dung dịch stock Se^{4+} 800 ppm và β -glucan tan trong nước 10% theo tỉ lệ phù hợp. Chiếu xạ các dung dịch này trên nguồn gamma Co-60 với các liều xạ chuyển hoá bão hòa đã được xác định (mục 2.3.1.3). Dung dịch SeNPs/ β -glucan sau khi chiếu xạ được phân tích kích thước hạt bằng

phương pháp DLS (dynamic light scattering) sử dụng hệ Zetasizer Nano ZSP, ZEN5600 (Malvern, Anh).

2.3.2.2 Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ chất ổn định β -glucan đến kích thước hạt SeNPs/ β -glucan

Dung dịch Se^{4+}/β -glucan với nồng độ Se^{4+} được chọn ở thí nghiệm trên (mục 2.3.2.1) được ổn định trong các dung dịch β -glucan tan trong nước có nồng độ lần lượt là 1, 2, 3 và 4% (w/v) được tạo ra bằng cách phối trộn 2 dung dịch stock Se^{4+} 800 ppm và β -glucan tan trong nước 10% theo tỉ lệ phù hợp, khuấy nhẹ cho tan đều và chỉnh pH~9 bằng dung dịch NH_4OH 5%. Chiếu xạ các dung dịch này với các liều xạ chuyển hoá bão hòa đã được xác định (mục 2.3.1.3) trên nguồn gamma Co-60. Dung dịch SeNPs/ β -glucan sau khi chiếu xạ được phân tích kích thước hạt và phân bố kích thước hạt bằng phương pháp đo tán xạ ánh sáng động DLS sử dụng hệ Zetasizer.

2.3.2.3 Đánh giá ảnh hưởng của suất liều đến kích thước SeNPs/ β -glucan

Dung dịch Se^{4+}/β -glucan với nồng độ Se^{4+} được chọn ở thí nghiệm trên (mục 2.3.2.1) ổn định trong dung dịch β -glucan có nồng độ lựa chọn là theo thí nghiệm mục 2.3.2.2. Chiếu xạ các dung dịch này với các liều xạ chuyển hoá bão hòa đã được xác định (mục 2.3.1.3) tổng hợp SeNPs/ β -glucan trên nguồn gamma Co-60 với các suất liều khác nhau 2,5, 5 và 10 kGy/giờ. Dung dịch SeNPs/ β -glucan sau khi chiếu xạ được phân tích kích thước hạt và phân bố kích thước hạt bằng phương pháp DLS sử dụng hệ Zetasizer.

2.3.2.4 Đánh giá ảnh hưởng của pH đến quá trình tổng hợp SeNPs/ β -glucan

Dung dịch Se^{4+}/β -glucan với nồng độ Se^{4+} được chọn ở thí nghiệm trên (mục 2.3.2.1) ổn định trong dung dịch β -glucan có nồng độ lựa chọn là theo thí nghiệm mục 2.3.2.2. Sau đó, điều chỉnh pH dung dịch về các giá trị 5, 6, 7, 8 và 9 và chiếu xạ các dung dịch này với liều xạ chuyển hoá bão hòa đã được xác định ở trên để tổng hợp SeNPs/ β -glucan. Dung dịch SeNPs/ β -glucan sau khi

chiếu xạ được phân tích phân tích kích thước hạt và phân bố kích thước hạt bằng phương pháp DLS sử dụng hệ Zetasizer.

2.3.3. Khảo sát độ ổn định của SeNPs/ β -glucan sau khi tổng hợp

Các dung dịch SeNPs/ β -glucan sau khi chiếu xạ theo các điều kiện đã xác định ở mục 2.3 được lưu trữ, bảo quản ở các nhiệt độ 0, 4 và 25°C. Tiến hành phân tích kích thước hạt và phân bố kích thước hạt của dung dịch SeNPs/ β -glucan sau 30 và 60 ngày bảo quản bằng phương pháp DLS sử dụng hệ Zetasizer.

2.3.4. Khảo sát ảnh hưởng của phương pháp sấy khô đến kích thước hạt của SeNPs/ β -glucan

Các dung dịch SeNPs/ β -glucan sau khi chiếu xạ sẽ tiến hành tạo sản phẩm dạng bột SeNPs/ β -glucan qua các phương pháp khác nhau: kết tủa - sấy (ở 60°C), sấy phun và đông khô. Sau đó, bột SeNPs/ β -glucan được hòa tan, phân tán lại trong nước khử ion. Xác định kích thước hạt và phân bố kích thước hạt SeNPs/ β -glucan bằng phương pháp DLS sử dụng hệ Zetasizer.

Phương pháp kết tủa: Dung dịch SeNPs/ β -glucan được kết tủa trong dung dịch ethanol với tỉ lệ 1:9 (v/v). Kết tủa được thu bằng cách ly tâm ở tốc độ 6000 vòng trong 20 phút ở 4°C. Tủa được sấy khô ở 60°C, nghiền mịn và thu nhận bột SeNPs/ β -glucan.

Phương pháp sấy phun: Dung dịch SeNPs/ β -glucan được sấy qua máy sấy Mini Spray Dryer B-290 (Buchi, St. Gallen, Thụy Sĩ) với nhiệt độ đầu vào là 120°C, tốc độ dòng là 31 m³/giờ và áp lực khí nén là 0,45 bar.

Phương pháp đông khô: Dung dịch SeNPs/ β -glucan được tiến hành đông khô qua hệ máy freeze dryer model GAMMA 1-16 LSCplus (Christ, Lower Saxony, Đức) ở nhiệt độ -80°C và áp suất là 0,1 mbar.

Cuối cùng, các mẫu bột có kích thước hạt trung bình và phân bố kích thước hạt phù hợp được lựa chọn để phân tích phổ XRD, FTIR và chụp ảnh TEM để xác định đặc trưng của chế phẩm SeNPs/ β -glucan.

2.3.5. Xác định đặc trưng của SeNPs/ β -glucan

2.3.5.1 Phương pháp đo giản đồ nhiễu xạ tia X

Giản đồ XRD của hạt SeNPs/ β -glucan được xác định trên hệ thống nhiễu xạ tia X D8 Advance ECO (Bruker, Đức) sử dụng ống phát bức xạ $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$, $U = 40 \text{ kV}$, $I = 25 \text{ mA}$). Mẫu SeNPs được đông khô và nghiền nhỏ, sau đó mẫu được trải đều thành một mặt phẳng trên đế đựng mẫu chuyên dụng. Tiến hành quét giản đồ nhiễu xạ tia X ở góc từ $30 - 100^\circ$ (2θ) với kích thước bước nhảy $0,05^\circ$ (2θ) và thời gian đếm là $0,5/\text{s}$. Dữ liệu được xử lý trên phần mềm Diffrac.Eva V.4.3.1. và Excel 2016.

2.3.5.2 Phương pháp đo phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR)

Để phân tích sự tương tác bề mặt, các nhóm chức đặc trưng và các liên kết giữa các hạt nano tổng hợp với các phân tử khác tham gia vào quá trình tổng hợp SeNPs/ β -glucan, tiến hành đo phổ hồng ngoại FTIR trên máy quang phổ hồng ngoại (model 4700, Jasco, Nhật Bản). SeNPs/ β -glucan bột được trộn đều với KBr với nồng độ mẫu là 1% trước khi ép tạo dạng viên nén bằng máy ép chuyên dụng với tỷ lệ 3 mg mẫu/100 mg KBr. Chuyển mẫu vào đế đựng mẫu và tiến hành đo phổ FTIR trong khoảng số sóng $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$. Kết quả được so sánh với thư viện phổ chuẩn để xác định các đỉnh đặc trưng của mẫu.

2.3.5.3 Phương pháp xác định kích thước hạt SeNPs/ β -glucan bằng DLS

Kích thước và phân bố kích thước hạt SeNPs/ β -glucan được xác định bằng phương pháp đo DLS sử dụng hệ Zetasizer (Nano ZSP, model ZEN5600 (Malvern, Anh). Đây là phương pháp tán xạ ánh sáng được sử dụng để đo thủy động lực học đường kính hạt nano tổng hợp được (bao gồm cả sự hiện diện cả vật liệu nano và polyshachride kết tụ). SeNPs/ β -glucan sau khi tổng hợp được pha loãng khoảng 50 lần bằng nước khử ion trước khi đo. Sau đó hút 1 mL mẫu chuyển vào cuvet thạch anh và tiến hành đo kích thước hạt sử dụng nguồn laser

632,8 nm, chỉ số khúc xạ hạt 1,590, hệ số hấp thụ hạt 0,01, chiết suất nước 1,33 ở 25°C. Dữ liệu được xử lý trên phần mềm Zetasizer Softwave V.7.12.

2.3.5.4 Phương pháp chụp ảnh TEM

Kích thước và phân bố kích thước hạt SeNPs/ β -glucan được xác định bằng cách chụp ảnh TEM. Đây là phương pháp có thể đo chính xác hình dạng, kích thước, phân bố kích thước các hạt nano rất nhỏ. TEM có ưu điểm nhờ bước sóng của chùm điện tử năng lượng cao. Phương pháp thực hiện như sau: nhỏ giọt SeNPs lên lưới đồng đã phủ lớp cacbon, để khô tự nhiên 15 phút, chụp ảnh TEM trên kính hiển vi điện tử truyền qua. Kích thước hạt trung bình và độ phân bố kích thước hạt được xác định từ ảnh TEM. Xử lý thống kê kết quả nhằm đánh giá kích thước và sự phân bố kích thước SeNPs trong dung dịch. Các kết quả được tính toán và xử lý thống kê bằng phần mềm Photoshop và Excel.

2.3.6. Đánh giá độc tính cấp của SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ

Độc tính cấp (acute toxicity) của sản phẩm là độc tính xảy ra khi dùng liều thử duy nhất, dùng một lần (OECD, 2001). Trong nghiên cứu này, chuột nhắt trắng BALB/c 6 - 7 tuần tuổi (20 - 25 g) khỏe mạnh được lựa chọn và nuôi ổn định trong 5 ngày. Sau đó, chuột được cho uống SeNPs/ β -glucan để xác định liều thấp nhất gây chết 100% chuột (LD_{100}) và liều gây chết 50% chuột (LD_{50}).

Chọn 6 con chuột (3 đực, 3 cái) và cho nhịn đói ít nhất 12 giờ trước khi cho uống SeNPs/ β -glucan với liều 960 mg/kg thể trọng chuột (100 μ L/con). Liều thử nghiệm cao gấp 3 lần liều tham khảo gây chết 100% chuột thử nghiệm theo các nghiên cứu). Trong 3 ngày (72 giờ) sau khi cho uống, tiến hành theo dõi và ghi nhận các biểu hiện, trạng thái lông, khả năng ăn uống, và số lượng chết của chuột. Sau đó tiếp tục theo dõi trong vòng 14 ngày nếu chuột không có dấu hiệu bất thường hoặc chết. Nếu sau khi uống SeNPs/ β -glucan, số chuột thử nghiệm vẫn bảo toàn, xác định liều SeNPs/ β -glucan cao nhất có thể qua đường uống mà không làm chuột chết (D_{max}). Trường hợp sau khi cho chuột uống SeNPs/ β -glucan tỷ lệ chuột tử vong là 100% thì thử với liều giảm $\frac{1}{2}$ liều đầu. Tiếp tục

giảm liều đến khi tìm được liều tối thiểu gây chết 100% chuột (LD_{100}) và liều tối đa không gây chết chuột (LD_0). Tiến hành thử nghiệm xác định LD_{50} : Chia chuột làm 4 lô, mỗi lô ít nhất 6 con. Chia 4 liều theo cấp số cộng khoảng từ LD_0 - LD_{100} . Ở những liều gần LD_{50} , tăng số lượng chuột lên để sự đo lường được chính xác hơn. Theo dõi trong 3 ngày, ghi nhận các diễn biến của chuột, số lượng chuột chết ở mỗi lô, lập tỉ lệ tử vong để tìm LD_{50} . Trường hợp tỉ lệ tử vong thấp hơn 100%, không xác định được liều gây chết tuyệt đối, không thể xác định được LD_{50} . Tuy nhiên, trong trường hợp này có thể xác định liều tối đa không gây chết chuột, gọi là liều dưới liều chết (LD_0) (Bộ y tế, 2015; Đỗ Trung Đàm, 2014). Liều an toàn tương đối D_s dùng cho thực nghiệm có giá trị bằng 1/5 hoặc 1/10 LD_0 .

2.3.7. Phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs/ β -glucan

2.3.7.1 Khảo sát ảnh hưởng của kích thước hạt SeNPs đến khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺

Khả năng bắt gốc ABTS⁺ của SeNPs/ β -glucan được tiến hành theo phương pháp nghiên cứu của Shalaby và ctv (2013). Để tạo gốc tự do ABTS⁺, dung dịch $K_2S_2O_8$ 2,45 mM được thêm vào 17,2 mg ABTS, dung dịch sau pha được giữ trong tối 14 - 16 tiếng. Sau đó, thêm nước cất sao cho giá trị OD đo tại bước sóng 734 nm đạt khoảng $0,7 \pm 0,02$ và được sử dụng trong thử nghiệm bắt gốc ABTS⁺ của SeNPs/ β -glucan. Hút 50 μ L dung dịch SeNPs/ β -glucan 10 ppm với các kích thước khác nhau được cho phản ứng với 1 mL dung dịch ABTS⁺. Hỗn hợp sau khi lắc trong 15 giây, để ở nhiệt độ phòng tránh ánh sáng trong khoảng 6 phút. Đo độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng ở bước sóng 734 nm. Hoạt tính bắt gốc tự do được tính theo công thức: $H (\%) = (1 - A/A_0) \times 100$. Trong đó: A là độ hấp thụ của mẫu thử, A_0 là độ hấp thụ của mẫu đối chứng ở bước sóng 734 nm. Tiến hành tương tự với chất chống oxy hóa khác là acid ascorbic ở nồng độ để so sánh kết quả.

2.3.7.2 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ SeNPs/ β -glucan đến khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺

Quy trình được thực hiện tương tự 2.3.7.1 với dung dịch SeNPs/ β -glucan ở các nồng độ SeNPs/ β -glucan từ 10 - 25 ppm.

2.3.8. Đánh giá hoạt tính tăng cường miễn dịch của SeNPs/ β -glucan trên chuột gây suy giảm miễn dịch

2.3.8.1 Phương pháp tạo mô hình chuột bị ức chế miễn dịch

Chuột BALB/c giống đực (54 con) 12 tuần tuổi có trọng lượng cơ thể khoảng 25 - 30 g được nuôi tại phòng thí nghiệm tiêu chuẩn của Viện Tế bào gốc, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học quốc gia TP. HCM theo hướng dẫn của Hiệp hội Đánh giá và Công nhận Chăm sóc Động vật Quốc tế (AAALAC). Sau hai tuần được nuôi ở nhiệt độ 22°C và chu kỳ sáng - tối 12 giờ, tiến hành chia những con chuột được thành 2 nhóm. Nhóm thứ nhất là 9 con chuột nhóm chuột khỏe mạnh không gây suy giảm miễn dịch gồm 9 con chuột được nuôi điều kiện bình thường (ĐC(+)). Nhóm thứ 2 gồm 45 con chuột bị ức chế miễn dịch bằng cách tiêm CTX vào màng bụng với liều 100 mg/kg thể trọng liên tục trong 3 ngày (Han và ctv, 2018; Guo và ctv, 2019). Sau đó, nhóm những con chuột được tiêm bằng CTX được chia ngẫu nhiên thành 5 nhóm nhỏ (mỗi nhóm 9 con). Nhóm đối chứng (ĐC(-)) chỉ cho uống nước cất, 4 nhóm còn lại cho uống chế phẩm SeNPs/ β -glucan liên tục trong 14 ngày với liều 0 (chỉ cho uống β -glucan tan trong nước và không có SeNPs/ β -glucan), 2, 4 và 6 mg/kg thể trọng. Trong vòng 14 ngày kể từ ngày xác nhận suy giảm miễn dịch và bắt đầu sử dụng mẫu thí nghiệm. Ghi lại số lượng chuột sống và chết trong quá trình thí nghiệm. Sau lần thử nghiệm cuối cùng, chuột được cân và sau đó thu các mẫu (lách, tủy xương) và máu phân tích các chỉ số miễn dịch.

Theo kết quả nghiên cứu của Shakibaie và ctv (2013) về độc tính bán trường diễn trên chuột của SeNPs cho thấy không có thay đổi sinh hóa nào được quan sát thấy khi sử dụng 2,5, 5 và 10 mg/kg SeNPs, do đó ở nghiên cứu này khảo sát

các mức liều 2, 4 và 6 mg/kg thể trọng để đánh giá khả năng tăng cường miễn dịch trên chuột.

2.3.8.2 Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đến chỉ số lách và các chỉ số cytokine và immunoglobulin trong lách chuột

Chuột được cho uống SeNPs/ β -glucan với liều như bố trí ở trên. Sau 14 ngày tiến hành lấy ngẫu nhiên, mỗi nghiệm thức 3 con. Tiến hành cân trọng lượng và xác định chỉ số lách, theo công thức sau (Han và ctv, 2018).

Chỉ số lách (mg/10g) = $[m_{\text{lách}} \text{ (mg)}/m_{\text{cơ thể}} \text{ (g)}] \times 10$. Trong đó: $m_{\text{lách}}$: Trọng lượng lách chuột (mg); $m_{\text{cơ thể}}$: Trọng lượng cơ thể chuột (g). Để phân tích các chỉ số cytokine và immunoglobulin trong lách chuột, sau 14 ngày cho uống SeNPs/ β -glucan, các nghiệm thức sẽ được chọn ngẫu nhiên 3 con để lấy lách. Thực hiện theo quy trình của Han và ctv (2018) như sau: Tiến hành mổ chuột và ngâm với ethanol 70% trong 3 phút để khử trùng. Sau đó, thu nhận mẫu lách chuột trong điều kiện vô trùng và rửa bằng dung dịch Hank's buffer. Cắt lấy 100 mg mô lách và đồng nhất trong 2 mL dung dịch nước muối sinh lý trong điều kiện lạnh. Tiến hành ly tâm ở 3500 vòng/phút trong 15 phút và thu nhận phân lớp dịch phía trên. Sau đó, xác định nồng độ các chỉ số cytokine và immunoglobulin trong huyết thanh bằng Kit ELISA (abcam, USA) ở các chỉ số cụ thể: Chỉ số cytokine bao gồm: IL-2, TNF- α và IFN- γ .; Chỉ số immunoglobulin bao gồm: IgG và IgM.

2.3.8.3 Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đến chỉ số cytokine và immunoglobulin trên chuột

Để đánh giá ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đến các chỉ số cytokine và immunoglobulin trên chuột, sau 14 ngày cho chuột uống SeNPs/ β -glucan, tiến hành chọn ngẫu nhiên mỗi nghiệm thức 3 con chuột để lấy máu. Ly tâm mẫu máu ở 3000 vòng/phút, trong 10 phút để thu nhận huyết thanh. Sau đó, xác định nồng độ các chỉ số cytokine (TNF- α và IFN- γ) và chỉ số immunoglobulin (IgG và IgM) trong huyết thanh tương tự trong lách bằng Kit ELISA (abcam, USA).

2.3.8.4 Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đến chỉ số miễn dịch tế bào

Tỷ lệ tế bào tiền thân tạo máu (CD34-ab81289 cho kháng thể chính và ab150077 cho kháng thể thứ cấp), tế bào T-CD4⁺ (kháng thể CD4-ab269349 kết hợp với fluorescein isothiocyanate), tế bào B (CD20-ab64088 cho kháng thể chính và ab150077 cho kháng thể thứ cấp), tế bào NK (CD161-ab137059 cho kháng thể chính và ab150077 cho kháng thể thứ cấp), bạch cầu trung tính (dòng 7/4 nhận ra kháng nguyên Ly-6B.2 trong kháng thể 129J-ab53453 kết hợp với fluorescein isothiocyanate), bạch cầu và tế bào lympho được kiểm tra dựa trên hai máy dò quang học: Tán xạ phía trước và tán xạ bên trong máu ngoại vi và tủy xương của chuột thử nghiệm được xác định bằng phương pháp phân tích dòng chảy tế bào flow cytometry FACSAria III.

- **Trong máu ngoại vi:** Tất cả các tế bào hồng cầu trong máu được ly giải bằng đệm ly giải hồng cầu và sau đó rửa một lần với 45 mL PBS trong FBS 2%. FBS 2%. Phần nổi phía trên được hút bỏ và phần cặn được ủ trong dung dịch albumin BSA 1% sau đó được tái hòa tan trong nước muối đệm phosphat (PBS). Các tế bào lơ lửng được nhuộm với kháng thể trong 30 phút, rửa hai lần bằng PBS, và thu hồi qua ly tâm. Tiến hành phân tích các chỉ số miễn dịch tế bào trong máu ngoại vi bằng phương pháp phân tích flow cytometry FACSAria III.

- **Trong tủy xương:** Tiến hành thu nhận các đoạn xương đùi từ xương ống chân của những con chuột thử nghiệm. Sau đó được rửa bằng PBS 2 - 3 lần để loại bỏ hoàn toàn phần cơ còn sót lại. Cắt rời các đoạn xương đùi ra khỏi xương cẳng chân và tiến hành dùng kim tiêm 1 mL hút môi trường nuôi tế bào (DMEM/F12 có bổ sung 10% FBS và 1% penicillin-streptomycin) bơm vào tủy xương 2 - 3 lần hoặc đến khi ống xương chuyển sang màu trắng để rửa và thu tế bào tủy xương. Chuyển toàn bộ huyền phù tế bào vào ống falcon sạch và ly tâm với tốc độ 2500 vòng trong 10 phút, thu nhận cặn tế bào. Huyền phù tế bào trong 1 mL PBS và xác định phần trăm tế bào dương tính với CD34⁺ bằng phương pháp phân tích flow cytometry FACSAria III.

2.3.9. Đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan HepG2 của SeNPs/ β -glucan.

2.3.9.1 Đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan HepG2

Tế bào ung thư gan HepG2 được rửa đông và nuôi cấy trong môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kháng sinh penicilin và streptomycin ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Tế bào được nuôi cấy đến khi đạt được mật độ khoảng 80% diện tích bề mặt đĩa nuôi cấy, tiến hành cấy chuyển và chia tế bào ra làm nhiều đĩa nuôi cấy mới để tiến hành các thí nghiệm.

Dịch huyền phù tế bào (100 μL) mật độ 1×10^4 tế bào/giếng được bổ sung vào đĩa 96 giếng trong môi trường DMEM nuôi cấy ở 37°C, 5% CO₂ trong 24 giờ. Sau đó bổ sung SeNPs/ β -glucan ở các nồng độ khác nhau (0, 1, 5, 10 và 20 ppm). Sau thời gian ủ 24 giờ, bổ sung 50 μL dung dịch MTT nồng độ 0,4 mg/mL vào mỗi giếng, tiếp tục ủ trong 4 giờ. Sau đó, loại bỏ môi trường và bổ sung 100 μL DMSO để hòa tan formazan tạo ra trong tế bào. Lượng muối formazan được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 570 nm bằng máy Microplate reader. Các tế bào trước khi phân tích MTT được chụp ảnh dưới kính hiển vi soi ngược ở độ phóng đại 200 lần. Xác định tỷ lệ sống sót của tế bào được tính theo công thức sau: % tỉ lệ sống tế bào = $(\text{OD}_m / \text{OD}_{\text{blank}}) \times 100$. Trong đó OD_m là độ hấp thụ của tế bào với chất thử nghiệm, OD_{blank} là độ hấp thụ của mẫu blank. Hoạt tính ức chế 50% sự phát triển của tế bào (IC₅₀) được xác định bằng phần mềm GraphPad Prism 8.

2.3.9.2 Độc tính của SeNPs/ β -glucan trên nguyên bào sợi L929

Đánh giá khả năng ức chế sự phát triển nguyên bào sợi L929 theo phương pháp MTT, được thực hiện tương tự 3.9.2.1 với mẫu SeNPs/ β -glucan ở các nồng độ khác nhau (0, 1, 5, 10 và 20 ppm). Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50%) được xác định bằng phần mềm GraphPad Prism 8. Tính chỉ số chọn lọc SI (selectivity index) để đánh giá tiềm năng ứng dụng và phát triển hướng làm nguyên liệu trong thuốc chống ung thư.

Phương pháp phân tích chỉ số chọn lọc SI: Chỉ số được tính toán dựa vào giá trị IC_{50} của hợp chất ức chế của dòng tế bào bình thường chia cho giá trị IC_{50} của tế bào ung thư (Da'i và ctv, 2019). Hợp chất được phân loại là có độ chọn lọc cao nếu giá trị $SI > 3$ và ít chọn lọc hơn nếu giá trị $SI < 3$ (Sutejo và ctv, 2016). Giá trị SI được xác định theo biểu thức: $SI = IC_{50}(L929)/IC_{50}(HepG2)$.

2.3.9.3 Đánh giá cảm ứng apoptosis đối với tế bào HepG2

Dòng tế bào ung thư gan HepG2 được nuôi cấy trong điều kiện bề mặt đĩa bám dính chứa môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS đạt mật độ 4×10^6 tế bào/mL trong 24 giờ. Tế bào được xử lý với SeNPs/ β -glucan ở các nồng độ khác nhau, trong thời gian 24 giờ. Thu nhận tế bào và rửa lại 1 lần với dung dịch PBS. Tế bào được huyền phù trong 200 μ L dung dịch đệm 1X (đi kèm theo bộ kit) với mật độ tế bào 1×10^6 tế bào/mL. Sau đó, mẫu được nhuộm kép với dung dịch nhuộm gồm 5 μ L Annexin V-PE và 5 μ L 7AAD và lắc đều trong 20 giây ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng. Sau 20 phút, 300 μ L dung dịch đệm 1X được bổ sung vào mỗi mẫu. Kết quả được đánh giá thông qua sự phát huỳnh quang của tế bào sau khi nhuộm kép với Annexin V-FITC và 7 AAD (7-amino-actinomycin D). Annexin V là một protein liên kết phospholipid, có ái lực cao với PS. 7-AAD có hằng số liên kết DNA cao và bị các tế bào nguyên vẹn loại trừ hiệu quả. Do đó, điều này hữu ích cho phân tích DNA và phân biệt tế bào chết trong quá trình phân tích dòng chảy tế bào (flow cytometry) FACSAria III. Do quá trình ngoại hóa PS xảy ra ở giai đoạn đầu của quá trình apoptosis, nhuộm Annexin V có thể có thể giúp phân biệt được tế bào apoptosis sớm (Annexin V dương tính, 7 AAD âm tính), tế bào apoptosis muộn (Annexin V-FITC dương tính, 7 AAD dương tính), tế bào sống (Annexin V-FITC âm tính, 7 AAD âm tính), tế bào necrosis (Annexin V-FITC âm tính, 7 AAD dương tính). Các tỉ lệ tế bào apoptosis được định lượng bằng phần mềm CellQuest Pro trên hệ thống FACTV Calibur của BD Biosciences.

2.3.9.4 Phương pháp đánh giá cảm ứng chu kỳ tế bào (cell cycle)

Sau 24 giờ xử lý với dung dịch SeNPs ở các nồng độ khác nhau, các tế bào được tách khỏi bề mặt đĩa bằng cách xử lý với trypsin/EDTA và được thu lại bằng ly tâm 1500 vòng trong 3 phút và được cố định trong ethanol 70% qua đêm ở - 20°C. Tiếp theo, tế bào được ly tâm ở 1500 vòng trong 4 phút và rửa với đệm PBS + BSA 0,1%, Sau đó tế bào được nhuộm với dung dịch fluorochrome (chứa Triton X-100 0,1%, PBS, DNase-free RNase A (10 mg/mL) PI (Propidium Iodide) trong thời gian 30 phút ở 20°C trước khi phân tích trên hệ thống phân tích flow cytometry FACSAria III. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm chuyên dụng cho hệ thống BD-Accuri C6 plus.

2.3.10. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả được xử lý bằng phần mềm Excel và thống kê theo phần mềm GraphPad Prism 8. Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp phân tích phương sai một chiều (ANOVA). Các số liệu được trình bày dưới dạng số liệu trung bình các lần lặp lại \pm SE (standard error).

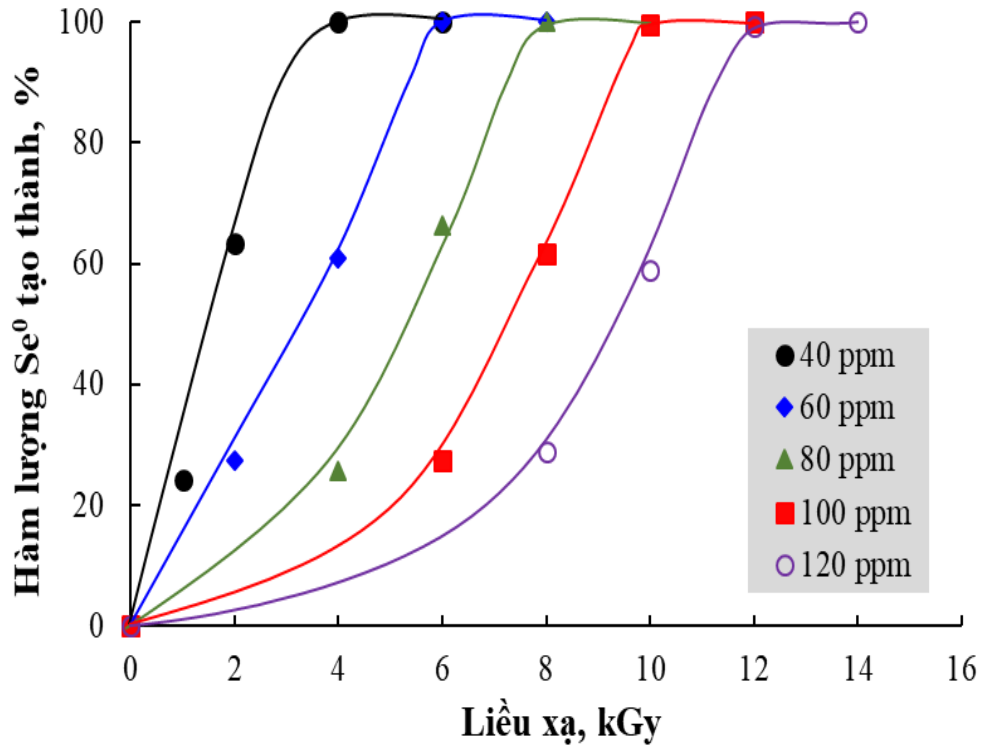
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tổng hợp SeNPs ổn định trong β -glucan có Mw thấp và tan trong nước bằng phương pháp chiếu xạ

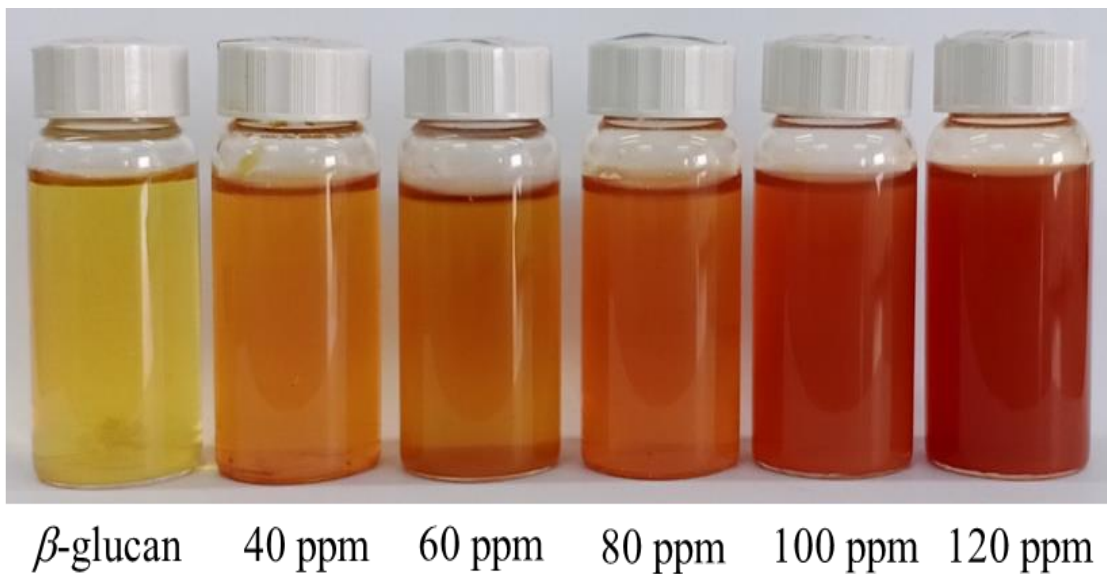
3.1.1. Kết quả xác định liều xạ chuyển hóa bão hòa

Trong nghiên cứu này, các dung dịch Se^{4+} lần lượt là 40, 60, 80, 100 và 120 ppm ổn định với 2% β -glucan được chiếu xạ ở các liều xạ từ 2 - 14 kGy. Kết quả đo UV-Vis xác định liều chiếu xạ chuyển hóa bão hòa của các dung dịch Se^{4+} ở các nồng độ 40, 60, 80 100 và 120 ppm được trình bày tại hình 3.1. Kết quả cho thấy nồng độ Se^{4+} trong dung dịch SeNPs/ β -glucan sau chiếu xạ giảm dần khi tăng dần liều chiếu xạ, cần liều chiếu xạ là 8 kGy để khử hết toàn bộ 1 mM Se^{4+} (~ 80 ppm) trong dung dịch SeNPs/ β -glucan. Liều chiếu xạ chuyển hóa bão hòa của dung dịch SeNPs/ β -glucan có chứa 40 ppm Se^{4+} là 4 kGy, 60 ppm Se^{4+} là 6 kGy, 80 ppm Se^{4+} là 8 kGy, 100 ppm Se^{4+} là 10 kGy và 120 ppm Se^{4+} là 12 kGy. Theo Hien và ctv, 2018, hàm lượng Se^0 tạo ra sau quá trình chiếu xạ phụ thuộc vào số lượng các gốc khử được sinh ra trong quá trình xạ ly nước (liều xạ) và nồng độ Se^{4+} ban đầu.

Kết quả hình 3.2 cho thấy, sản phẩm SeNPs/ β -glucan sau chiếu xạ ở dạng dung dịch keo và có sự thay đổi màu sắc của dung dịch trước và sau khi chiếu xạ. Dung dịch SeNPs/ β -glucan có sự chuyển dần từ cam sang đỏ cam khi nồng độ SeNPs/ β -glucan tăng từ 40 lên 120 ppm. Điều này một lần nữa chứng tỏ quá trình khử ion selen thành SeNPs/ β -glucan đã diễn ra. Nguyên nhân là do nước bị xạ ly tạo thành các tác nhân có tính khử mạnh như e^- và H^\bullet nên dễ dàng khử Se^{4+} thành Se^0 . Kết quả này khá phù hợp với kết quả đã công bố của Remita và ctv (2005), Nhien và ctv (2018) cũng như của Hien và ctv (2018), Duy và ctv (2021). Các tác giả đều khẳng định việc tăng kích thước hạt SeNPs dẫn đến sự thay đổi màu sắc từ màu vàng nhạt đến nâu đỏ sẫm. Hàm lượng Se càng nhiều thì tính oxy hóa khử và tốc độ phản ứng cao hơn, sản phẩm tạo thành chuyển sang màu nâu đỏ càng đậm.



Hình 3.1. Liều chuyển hóa bão hòa của dung dịch Se^{4+} có nồng độ khác nhau



Hình 3.2. Dung dịch SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ ở các nồng độ Se^{4+} khác nhau

Remita và ctv (2005) đã chứng minh, liều xạ tối thiểu để khử 1 mM kim loại hoá trị I từ dạng ion về dạng bão hoà điện tích là khoảng 1,67 kGy, tuy nhiên giá trị này có thể tăng lên khi trong dung dịch phản ứng có chứa các hợp chất có khả

năng phản ứng với gốc tự do e_{aq} , H^\bullet và OH^\bullet như linoleic acid, chitosan, v.v. Cho đến nay chưa có nhiều nghiên cứu ứng dụng công nghệ chiếu xạ để tổng hợp SeNPs được công bố, đặc biệt là tổng hợp SeNPs ổn định trong β -glucan.

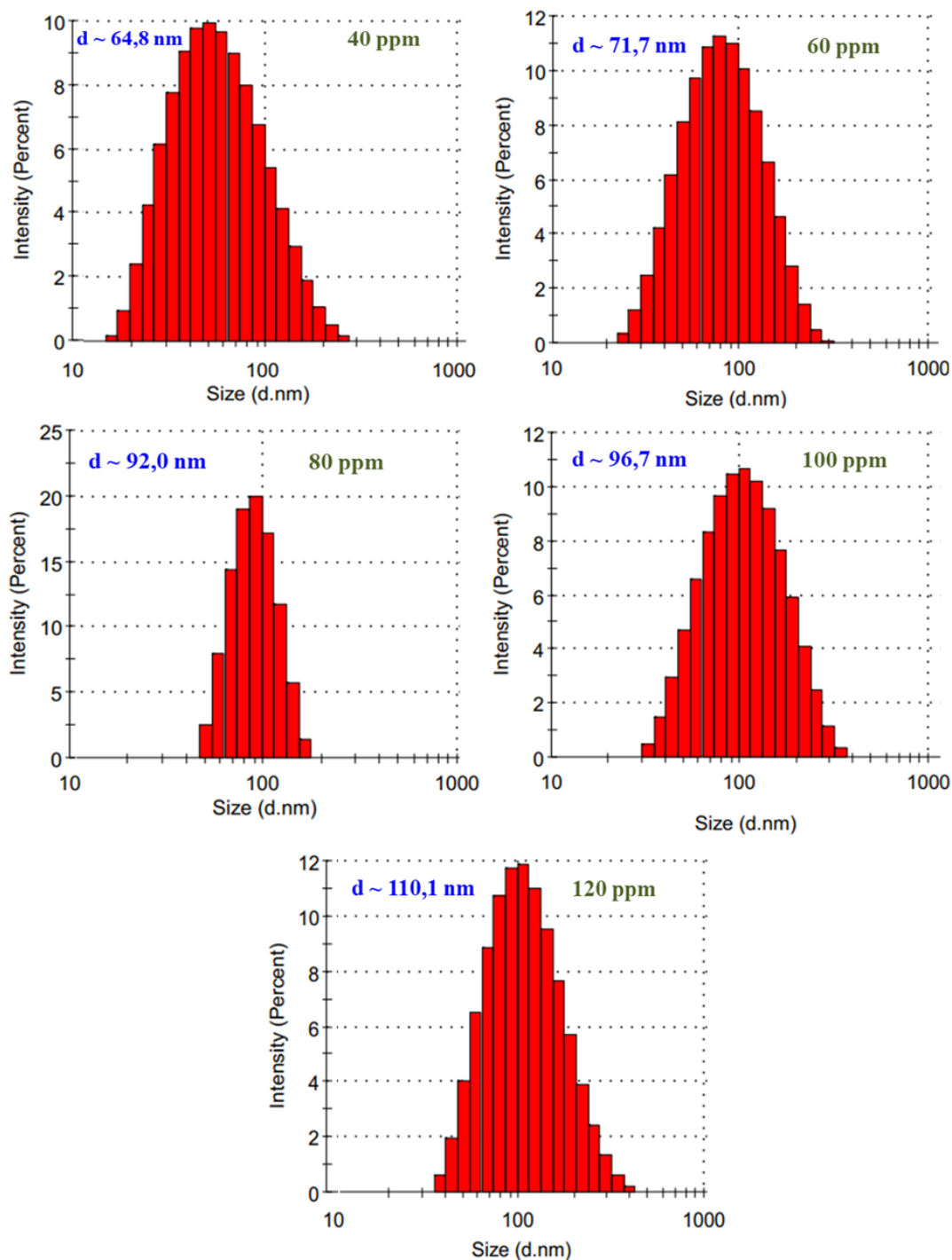
Như vậy đối với các mẫu SeNPs/ β -glucan có nồng độ Se^{4+} ban đầu là 40, 60, 80, 100 và 120 ppm xác định được các liều chiếu xạ chuyển hóa bão hòa là 4, 6, 8, 10 và 12 kGy.

3.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ Se^{4+} đến kích thước hạt của SeNPs/ β -glucan tạo thành.

Ở thí nghiệm này, dung dịch SeNPs/ β -glucan ở các nồng độ Se^{4+} ban đầu từ 40, 60, 80, 100 và 120 ppm được chiếu xạ với các liều chiếu xạ chuyển hóa bão hòa tương ứng là 4, 6, 8, 10 và 12 kGy để khảo sát đặc trưng của dung dịch SeNPs/ β -glucan tạo thành như kích thước hạt SeNPs bằng phương pháp DLS. Kết quả ở hình 3.3 cho thấy, khi tổng hợp ở các nồng độ nồng độ Se^{4+} khác nhau, kích thước hạt SeNPs tạo thành tăng dần khi nồng độ Se^{4+} trong mẫu tăng. Cụ thể, tại nồng độ Se^{4+} ban đầu là 40 ppm, kích thước hạt SeNPs trung bình là 64,79 nm. Tuy nhiên khi tăng nồng độ Se^{4+} trong mẫu lên 60, 80, 100 và 120 ppm thì kích thước trung bình hạt SeNPs cũng tăng lên tương ứng là 71,74, 92,02, 96,71 và 110,1 nm. Các hạt SeNPs/ β -glucan tạo thành tại nồng độ Se^{4+} ban đầu là 40 và 60 ppm có phổ phân bố kích thước hạt không đồng đều trong khoảng phân bố rộng từ 15 - 150 nm. Trong khi đó, tại nồng độ Se^{4+} ban đầu là 80 ppm, các hạt SeNPs phân bố hẹp hơn về kích thước, tập trung trong vùng kích thước từ 80 - 140 nm và nhiều nhất là 80 đến dưới 100 nm. Khi tiếp tục tăng nồng độ Se^{4+} ban đầu lên 100 và 120 ppm, các hạt SeNPs có xu hướng kết cụm lớn với phân bố của các hạt có kích thước đến ~ 300 nm. Điều này cho thấy nồng độ Se^{4+} ban đầu cũng ảnh hưởng đến kích thước hạt SeNPs/ β -glucan sau khi tạo thành. Nồng độ Se^{4+} ban đầu càng tăng, kích thước hạt càng lớn. Có thể giải thích, do quá trình cạnh tranh hấp thụ Se^{4+} lên các hạt nano mới tạo ra với phản ứng khử Se^{4+} thành Se^0 tự do. Trong dung dịch có nồng độ Se^{4+} ban đầu cao, các ion Se^{4+} được khử thành Se^0 tạo thành các hạt mầm nano đồng thời

nồng độ chất ổn định lại không đổi do đó khả năng bảo vệ và ổn định các hạt mầm nano vừa tạo ra bị giảm đi, lúc này phản ứng hấp thụ Se^{4+} lên các hạt mầm nano có sẵn được ưu tiên hơn. Do đó sản phẩm tạo thành có xu hướng kết cụm nhiều hơn dẫn đến kích thước hạt trung bình sẽ lớn. Trong khi đó, dung dịch có nồng độ ion Se^{4+} ban đầu thấp, phản ứng tạo hạt mầm nano lại được ưu tiên xảy ra hơn phản ứng hấp thụ do khả năng bảo vệ hiệu quả của chất ổn định đối với các hạt mầm nano vừa tạo ra. Do đó giảm hiện tượng kết cụm nên kích thước các hạt SeNPs/ β -glucan tạo ra nhỏ hơn. Kết quả là ở dung dịch có nồng độ Se^{4+} ban đầu càng cao hạt SeNPs tạo ra có kích thước càng lớn.

Kết quả nhận được cũng cho thấy các hạt SeNPs/ β -glucan có nồng độ Se^{4+} ban đầu là 80 ppm có kích thước hạt là 92 nm và phân bố kích thước hạt khá hẹp so với các mẫu còn lại. Kết quả này tương đối phù hợp với công bố của Jia và ctv (2015). Tác giả cũng cho thấy các hạt SeNPs được tạo thành ở dung dịch có nồng độ Se^{4+} ban đầu cao có xu hướng kết cụm nhiều hơn dẫn đến kích thước hạt trung bình sẽ lớn hơn so với các hạt SeNPs ở dung dịch có nồng độ Se^{4+} ban đầu thấp. Do đó nghiên cứu lựa chọn nồng độ Se^{4+} tối ưu để tổng hợp SeNPs bằng phương pháp chiếu xạ là 80 ppm.



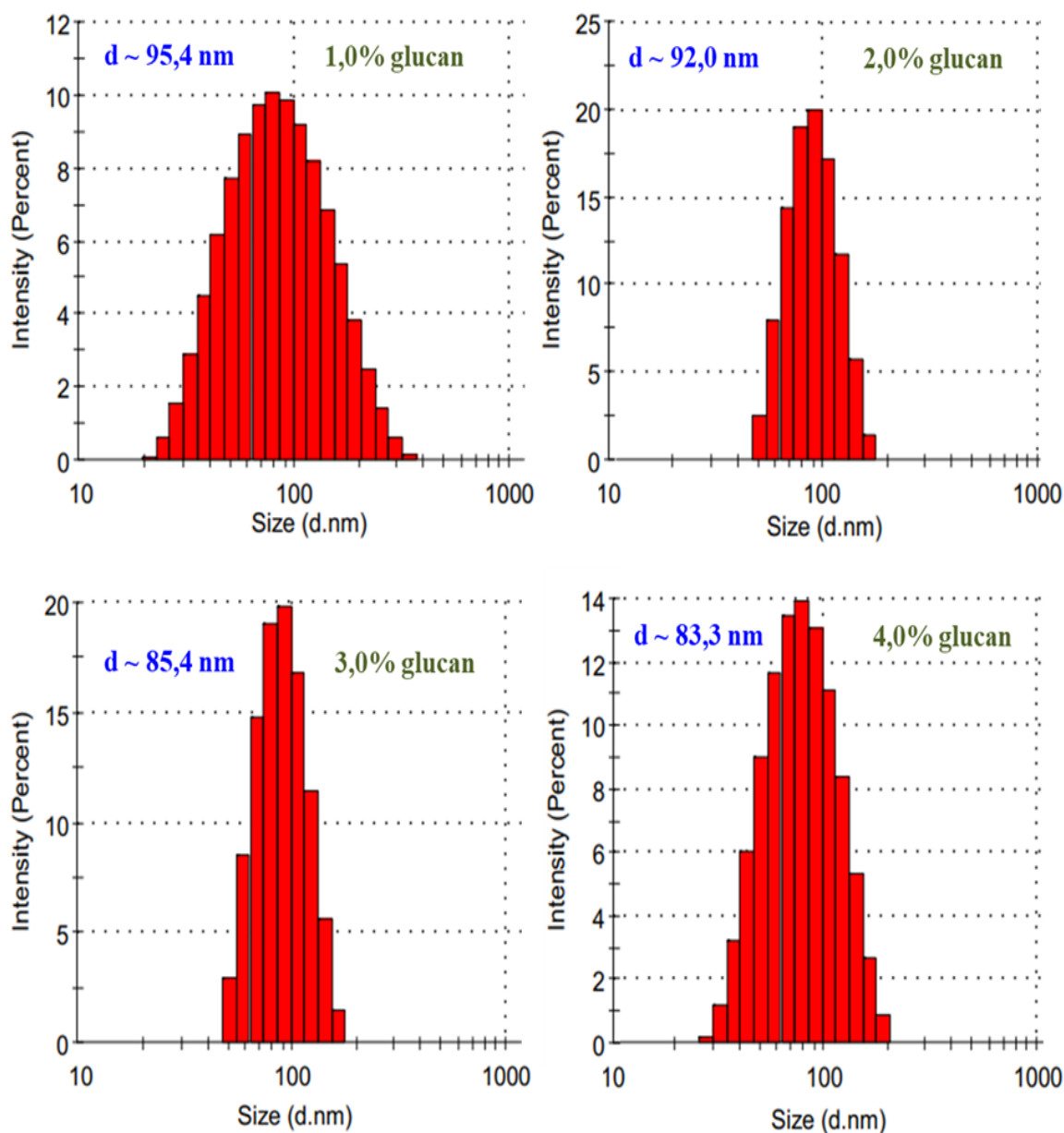
Hình 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ Se⁴⁺ ban đầu đến kích thước hạt SeNPs/β-glucan tạo thành sau khi chiếu xạ

3.1.3. Ảnh hưởng của nồng độ β-glucan đến kích thước hạt SeNPs/β-glucan tạo thành

Trong chế tạo các vật liệu nano kim loại, chất ổn định có ảnh hưởng rất lớn đến kích thước hạt nano. β-glucan được biết đến với khả năng tương hợp sinh

học cao, có thể liên kết với protein và các hoạt chất khác mà không làm thay đổi hoạt tính sinh học của hoạt chất. Bên cạnh đó, nghiên cứu sử dụng β -glucan tách chiết từ thành tế bào nấm men có đặc tính cấu trúc đặc trưng đó là độ phân nhánh cao cũng giúp β -glucan trở thành một ứng cử viên nổi bật cho việc sử dụng làm chất ổn định giúp các hạt nano phân tán tốt, ổn định hơn, chống kết tụ hạt sau quá trình tổng hợp. Đây là cơ sở cho việc đề tài sử dụng β -glucan làm chất ổn định. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các nồng độ β -glucan 1, 2, 3 và 4% đến kích thước hạt SeNPs/ β -glucan ở hình 3.4 cho thấy kích thước trung bình hạt SeNPs giảm dần khi tăng dần nồng độ chất ổn định β -glucan trong mẫu. Cụ thể, dung dịch SeNPs/ β -glucan với 1% β -glucan có kích thước trung bình hạt là 95,4 nm, phân bố rộng trong khoảng từ 20 - 300 nm. Các hạt phân bố tập trung từ khoảng 80 - 150 nm. Trong khi dung dịch SeNPs/ β -glucan với 2 và 3% β -glucan có kích thước hạt trung bình tương ứng là 92,0 và 85,4 nm, tập trung ở khoảng phân bố hẹp từ 50 - 190 nm. Khi tiếp tục tăng nồng độ β -glucan lên 4% trong dung dịch SeNPs/ β -glucan kích thước trung bình của hạt giảm nhanh xuống còn 83,03 nm và phân bố lại rộng hơn, trong khoảng từ 30 - 200 nm.

Kết quả nghiên cứu phù hợp với báo cáo của Bai và ctv (2017). Nhóm tác giả đã nghiên cứu ảnh hưởng của các chất ổn định gồm monosaccharide (glucose), oligosaccharide (sucrose) và polysaccharides (chitosan) đến kích thước, hình thái và tính ổn định của SeNPs trong quá trình phân tán dung dịch. Kết quả cho thấy sự phân bố kích thước của SeNPs bị ảnh hưởng đáng kể bởi nồng độ polysaccharide trong quá trình tổng hợp. Chitosan 0,1% là nồng độ tốt nhất giúp ổn định kích thước hạt nano và phân bố kích thước hạt.



Hình 3.4. Kích thước hạt của mẫu SeNPs/ β -glucan tổng hợp được ở các nồng độ chất ổn định β -glucan khác nhau

Như vậy có thể kết luận khi tăng nồng độ chất ổn định có thể giúp giảm dần kích thước hạt nano. Điều này có thể giải thích do khi tăng nồng độ β -glucan làm tăng mạng lưới bao bọc SeNPs tạo thành ngay sau khi chiếu xạ, giúp hiệu ứng bảo vệ tăng lên, do đó các hạt SeNPs/ β -glucan khó kết cụm lại với nhau dẫn đến kích thước SeNPs giảm dần. Cũng giống như các polysaccharide khác như alginate, dextran, gelatin, oligochitosan, β -glucan có các nhóm chức giàu điện tử: nhóm $-\text{OH}$ và $-\text{COO}$ sẽ giúp ổn định các hạt SeNPs thông qua liên kết liên

kết tinh điện của β -glucan tại nhóm $-\text{OH}$ và $-\text{COO}$ với các hạt nano SeNPs/ β -glucan tạo thành sau khi chiếu xạ tạo nên sự ổn định trong cấu trúc. Kết quả này khá tương đồng với các kết quả đã công bố của Duy và ctv (2021) khi tổng hợp SeNPs/oligochitosan, sự hình thành liên kết $\text{Se}-\text{O}$ giữa SeNPs và oligochitosan làm ổn định SeNPs trong mạng lưới oligochitosan. Có thể dễ dàng nhận thấy mẫu có nồng độ β -glucan từ 2 - 3% có kích thước hạt trung bình từ 85 - 92 nm nhưng mẫu sử dụng nồng độ β -glucan 2% có độ phân bố kích thước hạt hẹp nhất. Sự phân bố kích thước hạt của sản phẩm nano là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến nhiều khía cạnh của ứng dụng sản phẩm. Sự phân bố kích thước hạt ảnh hưởng đến tính đồng nhất của sản phẩm. Sự phân bố kích thước hạt cũng ảnh hưởng đến tính ổn định của sản phẩm trong quá trình sản xuất và lưu trữ. Sự phân bố kích thước hạt không đồng đều có thể dẫn đến sự lắng đọng hoặc sự phân tách của sản phẩm, làm giảm hiệu quả và tính ổn định của sản phẩm cuối cùng. Khi sản phẩm có phân bố kích thước hạt hẹp, kích thước của các hạt trong sản phẩm nano gần như đồng nhất và nằm trong một khoảng rất nhỏ, giúp tăng cường hiệu suất và ổn định của sản phẩm. Trong các ứng dụng, nhất là y học, kích thước hạt đồng đều giúp kiểm soát sự hấp thụ và phân phối tốt hơn. Do đó, nghiên cứu lựa chọn nồng độ β -glucan 2% để tổng hợp SeNPs/ β -glucan.

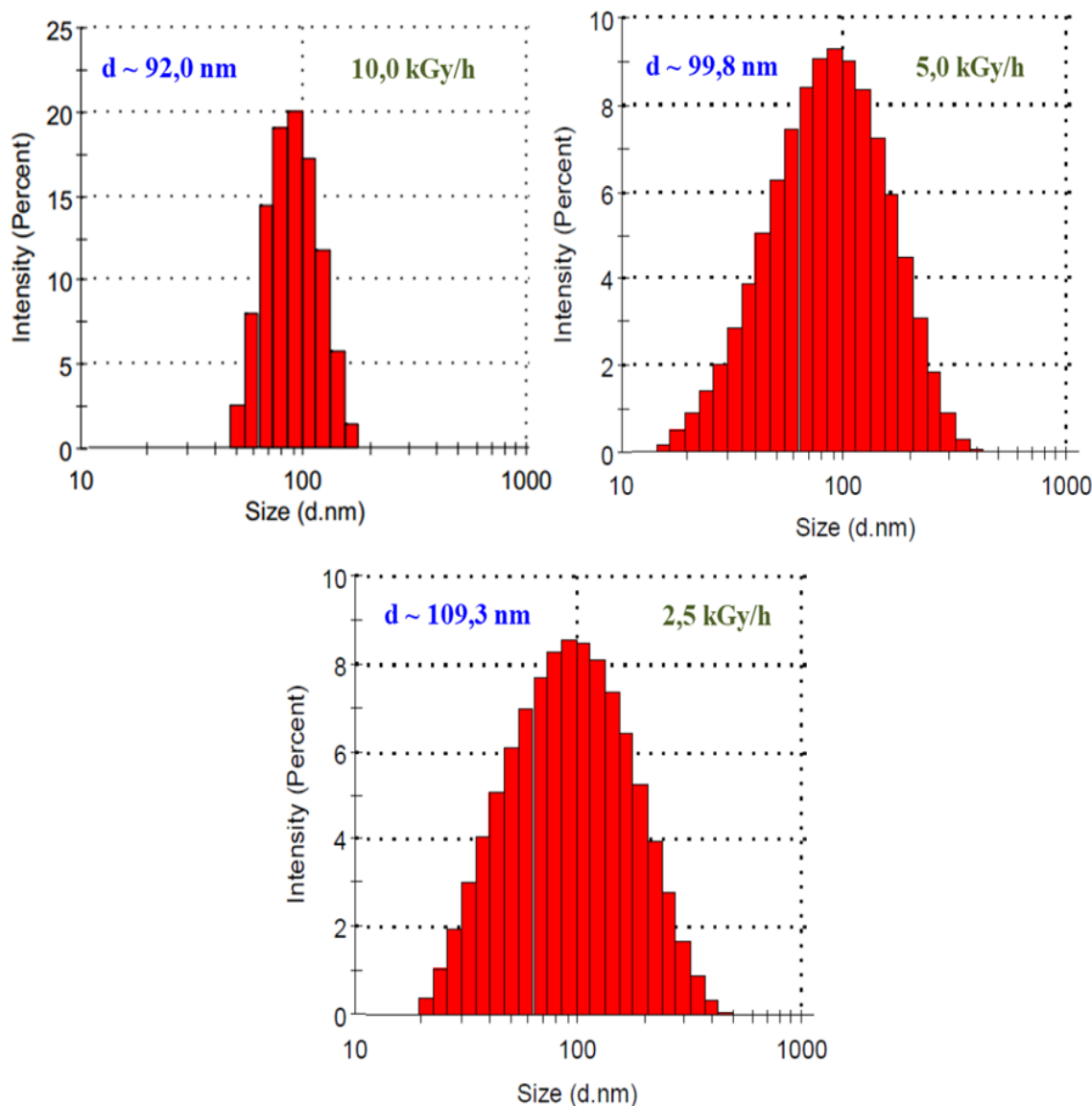
Các kết quả thu được một lần nữa khẳng định, trong quá trình tổng hợp nano, nồng độ chất ổn định ảnh hưởng khá nhiều đến kích thước hạt và sự phân bố kích thước hạt trong dung dịch keo nano tạo thành. Từ kết quả khảo sát, nồng độ β -glucan 2% là nồng độ tối ưu để tổng hợp SeNPs/ β -glucan.

3.1.4. Ảnh hưởng của suất liều đến kích thước hạt SeNPs/ β -glucan tạo thành

Một trong các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp hạt SeNPs/ β -glucan là suất liều. Có thể nhận thấy thời gian để đạt đến liều chuyển hoá bão hoà của dung dịch SeNPs/ β -glucan phụ thuộc chủ yếu vào hoạt độ của nguồn xạ hay suất liều chiếu xạ. Đối với nguồn xạ có suất liều thấp dẫn đến kéo dài thời gian chiếu xạ, ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp SeNPs. Với nguồn xạ Gamma Co-60

model GC-5000 (BRIT, Ấn Độ) tại Trung tâm Công nghệ Sinh học TP.HCM có suất liều tối đa của nguồn xạ là 10 kGy/giờ, do đó đề tài khảo sát các suất liều từ 2,5, 5,0 và 10 kGy/giờ. Kết quả phân tích DLS của các hạt SeNPs tổng hợp với các suất liều khác nhau ở hình 3.5 cho thấy, kích thước hạt SeNPs tăng dần khi suất liều giảm. Cụ thể, kích thước hạt SeNPs được tổng hợp ở suất liều 2,5, 5,0 và 10 kGy/giờ lần lượt là 109,3, 99,8 và 92,02 nm. Đồng thời kết quả cho thấy, khi suất liều giảm dần dẫn đến sự phân bố kích thước hạt tăng lên. Tại suất liều 10 kGy/giờ SeNPs có khoảng phân bố từ 40 - 200 nm trong khi tại suất liều 2,5 và 5 kGy/giờ khoảng phân bố kích thước của SeNPs là 15 - 400 nm và 20 - 400 nm tương ứng. Các kết quả này cũng tương đồng với một số nghiên cứu trước đó. Nghiên cứu của Hien và ctv (2012) cũng cho thấy việc tăng suất liều từ 0,5 đến 5 kGy/giờ dẫn đến việc giảm kích thước của hạt nano vàng (AuNPs) từ 9,5 xuống 5 nm tương ứng. Khoa và ctv (2014) đã báo cáo suất liều càng cao giúp thu hẹp khoảng phân bố kích thước của AuNPs.

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy khi tăng suất liều giúp giảm kích thước hạt và phân bố kích thước hạt hẹp hơn. Có thể giải thích điều này là do sự cạnh tranh giữa sự hấp phụ Se^{4+} vào các cụm SeNPs đã hình thành và phản ứng khử $\text{Se}^{4+} \rightarrow \text{Se}^{3+} \rightarrow \text{Se}^{2+} \rightarrow \text{Se}^{1+} \rightarrow \text{Se}^0$ để tạo thành các cụm SeNPs mới. Ở suất liều cao, phản ứng khử là chủ yếu, do đó có nhiều cụm SeNPs mới được hình thành dẫn đến kích thước trung bình của SeNPs trong dung dịch nhỏ và có khoảng phân bố kích thước hẹp. Ngược lại, ở suất liều thấp, sự hấp phụ của Se^{4+} vào các cụm SeNPs đã hình thành là chủ yếu, sau đó các ion Se^{4+} trên các cụm SeNPs này mới bị khử về dạng Se^0 dẫn đến kích thước trung bình của SeNPs sẽ lớn hơn so với SeNPs tổng hợp ở suất liều cao. Như vậy, suất liều có ảnh hưởng nhiều đến kích thước hạt và sự phân bố kích thước hạt.



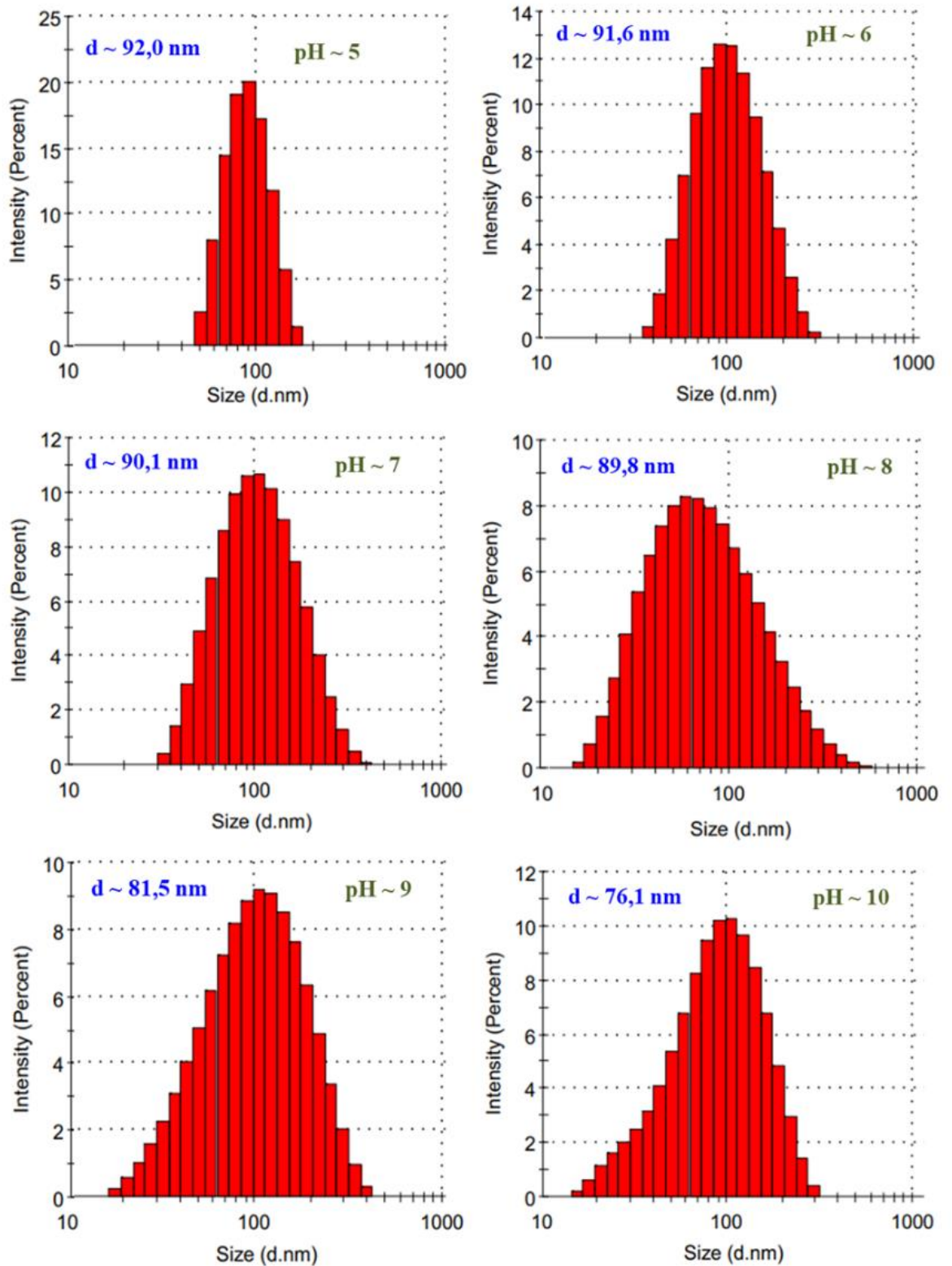
Hình 3.5. Kích thước hạt của mẫu SeNPs/ β -glucan tổng hợp được ở các suất liều khác nhau

Dung dịch SeNPs/ β -glucan tổng hợp ở suất liều 10 kGy/giờ với kích thước hạt nhỏ và khoảng phân bố kích thước hạt hẹp nên rất phù hợp để lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo trong nghiên cứu này.

3.1.5. Ảnh hưởng của pH đến kích thước hạt SeNPs/ β -glucan tạo thành

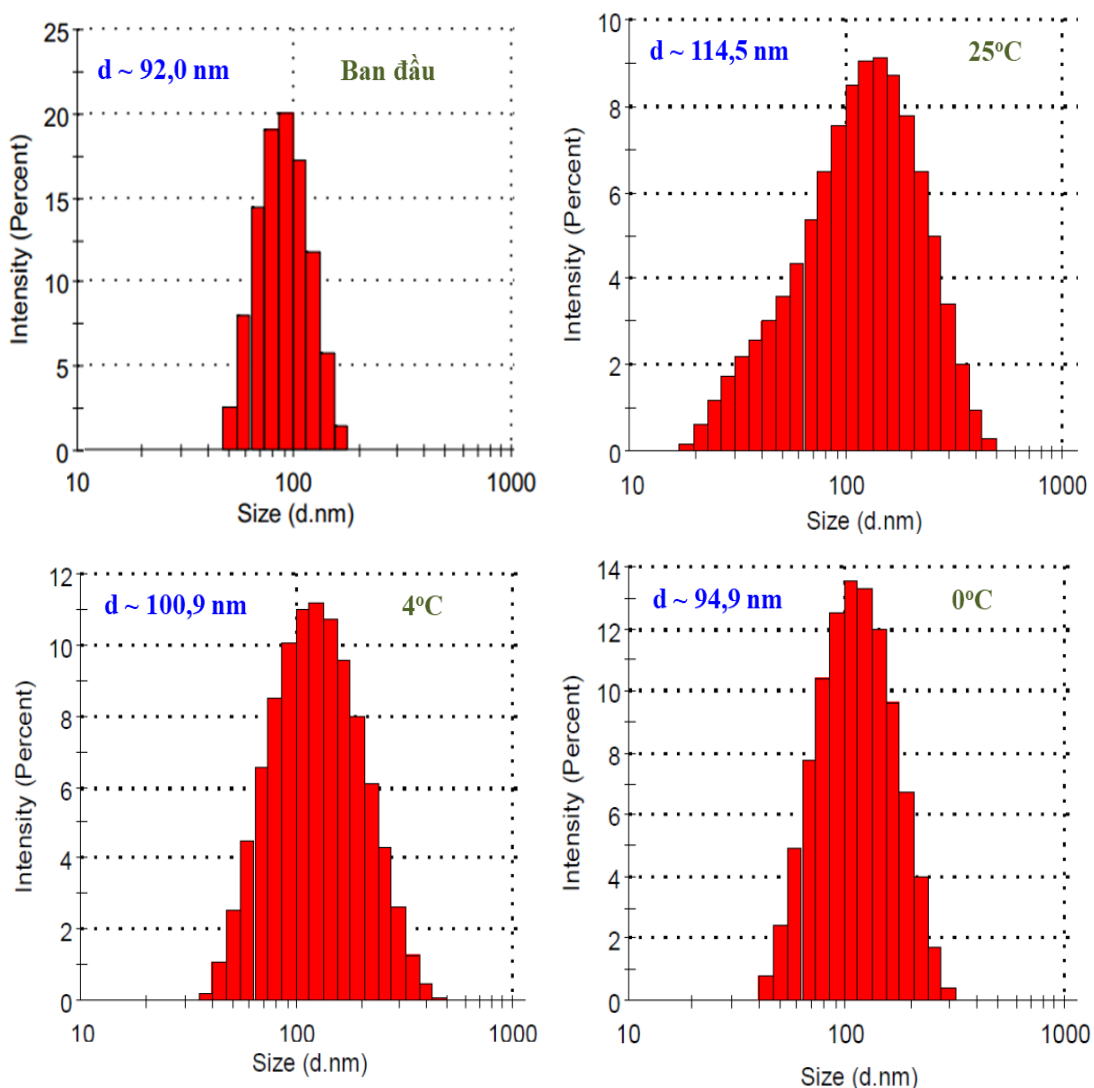
Kết quả phân tích bằng DLS về sự thay đổi kích thước hạt trong mẫu SeNPs/ β -glucan tổng hợp ở các điều kiện pH khác nhau được thể hiện ở hình 3.6. Kết quả cho thấy kích thước hạt trung bình của hạt SeNPs phụ thuộc khá nhiều vào độ pH của mẫu. Kích thước hạt SeNPs/ β -glucan có xu hướng giảm

khi pH dung dịch SeNPs/ β -glucan tăng từ 5 lên 7 và sau đó giảm nhẹ khi pH tăng lên 9 và 10. Cụ thể kích thước hạt SeNPs/ β -glucan lần lượt là 92,02, 91,56, 90,05, 89, 83, 81,52 và 76,13 nm tương ứng với các khoảng pH của mẫu là 5, 6, 7, 8, 9 và 10. Ngoài ra, khi tăng pH của dung dịch SeNPs/ β -glucan phân bố kích thước hạt trong mẫu SeNPs/ β -glucan có xu hướng rộng hơn và xuất hiện sự co cụm. Điều này cho thấy giảm độ ổn định của dung dịch SeNPs/ β -glucan ở các giá trị pH tăng dần. Có thể giải thích, trong môi trường kiềm, phản ứng hóa học, sự ion hóa diễn ra chậm hơn có thể dẫn đến việc phân bố kích thước hạt không đồng đều. Bên cạnh đó sự thay đổi pH có thể làm thay đổi độ nhớt của dung dịch hoặc điện tích bề mặt của các nano, từ đó ảnh hưởng gián tiếp đến động học của chuyển động Brown (chuyển động của các hạt trong môi trường lỏng). Khi tăng pH, các nhóm chức trong dung dịch có thể bị ion hóa mạnh, dẫn đến sự thay đổi trong cấu trúc của dung dịch và làm thay đổi độ nhớt, tạo ra điện tích bề mặt mạnh hơn từ đó có thể giúp các hạt nano phân tán tốt hơn, giảm sự kết tụ và kích thước hạt nhỏ hơn. Độ nhớt cao sẽ làm chậm chuyển động Brown của các hạt nano, sự phân bố kích thước hạt trở nên không đồng đều. Ngoài ra có thể là do sự gia tăng độ trương nở của phân tử β -glucan trong dung dịch có pH cao hơn, dẫn đến cấu trúc mạng liên kết của chất ổn định β -glucan với SeNPs trở nên bị lỏng lẻo dẫn đến giảm độ ổn định. Từ kết quả nghiên cứu khẳng định pH có thể ảnh hưởng đáng kể đến kích thước hạt nano trong quá trình tổng hợp. Do đó điều chỉnh pH là một cách quan trọng để kiểm soát kích thước và tính chất của các hạt nano trong quá trình tổng hợp hạt nano. Trong dải pH khảo sát, pH~5,0 với kích thước hạt 92,02 nm và các hạt có độ phân bố kích thước hạt đồng đều, tập trung hơn, khoảng phân bố kích thước hạt hẹp phù hợp lựa chọn để tổng hợp SeNPs/ β -glucan.



Hình 3.6. Kích thước hạt của mẫu SeNPs/ β -glucan tổng hợp được ở các điều kiện pH khác nhau

3.1.6. Kết quả khảo sát độ ổn định của SeNPs/ β -glucan sau khi tổng hợp

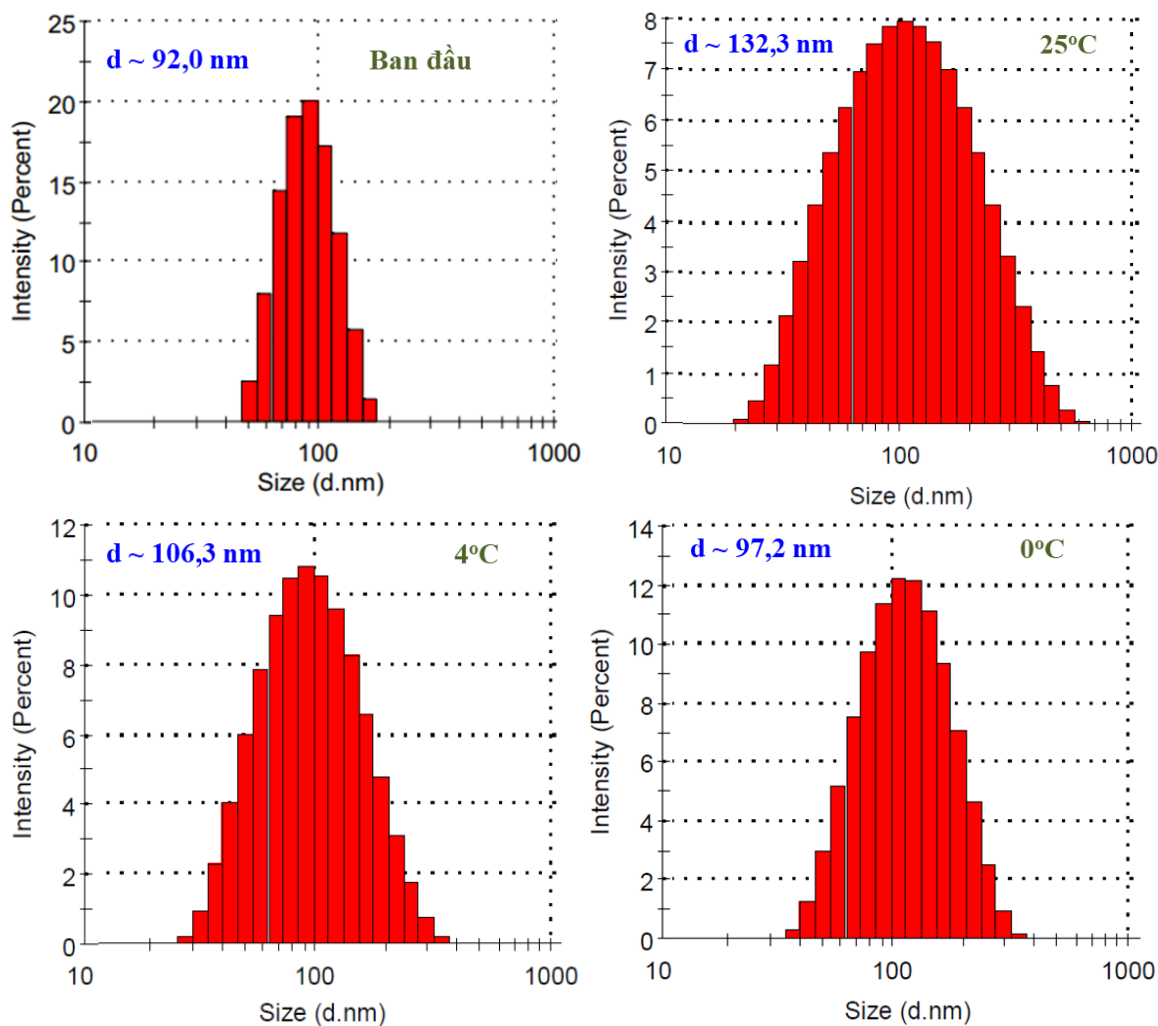


Hình 3.7. Kích thước hạt của dung dịch SeNPs/ β -glucan sau 30 ngày bảo quản ở điều kiện nhiệt độ khác nhau

Để giữ ổn định về kích thước hạt và sự phân bố hạt của dung dịch SeNPs/ β -glucan trong quá trình bảo quản là vấn đề tương đối khó do SeNPs/ β -glucan trong dung dịch thường có xu hướng kết cụm và lắng trong quá trình lưu giữ. Trong nghiên cứu này, độ ổn định của dung dịch SeNPs/ β -glucan được khảo sát trong 2 thời gian 30 ngày và 60 ngày tại các điều kiện nhiệt độ khác nhau được trình bày ở hình 3.7 và 3.8.

Kết quả sau 30 ngày bảo quản (hình 3.7) cho thấy kích thước hạt của dung dịch SeNPs/ β -glucan bảo quản ở nhiệt độ 25°C và 4°C có sự thay đổi đáng kể về

kích thước hạt. Cụ thể, kích thước hạt của dung dịch SeNPs/ β -glucan bảo quản ở 25°C là 114,5 nm tăng 22,48 nm và kích thước hạt của dung dịch SeNPs/ β -glucan bảo quản ở 4°C là 100,9 nm tăng 8,88 nm so với dung dịch SeNPs/ β -glucan ban đầu. Tuy nhiên, dung dịch SeNPs/ β -glucan bảo quản ở 0°C sau 30 ngày có kích thước hạt và sự phân bố kích thước hạt hầu như không thay đổi hoặc thay đổi rất ít so với dung dịch SeNPs/ β -glucan sau khi tổng hợp.



Hình 3.8. Kích thước hạt của dung dịch SeNPs/ β -glucan sau 60 ngày bảo quản ở điều kiện nhiệt độ khác nhau

Kết quả từ hình 3.8 có thể thấy sau 60 ngày bảo quản kích thước hạt của dung dịch SeNPs/ β -glucan bảo quản ở 25°C là 132,3 nm tăng 40,3 nm và bảo quản ở 4°C là 106,3 nm tăng 14,3 nm. Sự phân bố kích thước hạt ở các điều kiện bảo quản 4°C và 25°C cũng rộng hơn, đặc biệt là ở điều kiện bảo quản 25°C. Trong

khi đó, dung dịch SeNPs/ β -glucan bảo quản ở 0°C sau 60 ngày có kích thước hạt 97,2 nm tăng 5,1 nm so với dung dịch SeNPs/ β -glucan ban đầu. Tuy nhiên, độ phân bố của dung dịch SeNPs/ β -glucan bảo quản ở 0°C sau 60 ngày không thay đổi so với dung dịch SeNPs/ β -glucan bảo quản ở cùng điều kiện ở ngày thứ 30. Kết quả này khá phù hợp với nghiên cứu của Duy và ctv (2021) cho thấy kích thước SeNPs trong SeNPs/oligochitosan được bảo quản ở 27°C tăng nhanh hơn ở 4°C. Tác giả cũng báo cáo cho thấy SeNPs/oligochitosan trở nên không ổn định sau khi bảo quản hơn 28 ngày và chuyển sang kết tủa đen sau 42 ngày bảo quản ở 25°C. Điều này được giải thích là do tại nhiệt độ thấp chuyển động Brown bị hạn chế, khi nhiệt độ tăng sẽ làm tăng chuyển động Brown, làm tăng khả năng giao động giữa các phối tử có trong dung dịch do đó các hạt SeNPs gần nhau có xác suất va chạm với nhau cao làm cho các hạt kết dính lại với nhau từ đó gây ra hiện tượng keo tụ làm màu của dung dịch đậm lên và kích thước hạt cũng tăng lên. Thêm vào đó, các hạt nano chịu ảnh hưởng của hiệu ứng tương tác bề mặt giữa các hạt vàng nano với ánh sáng làm cho chúng dễ dàng kết tụ với nhau hơn để tạo thành các cụm vàng có kích thước lớn. Xu hướng tăng kích thước hạt SeNPs theo thời gian bảo quản cũng được ghi nhận ở nhiều nghiên cứu khác của Lin và Wang, 2005; Lopez Heras và ctv, 2014; Bai và ctv, 2017.

Từ những kết quả khảo sát các điều kiện tổng hợp SeNPs/ β -glucan trên cho thấy, độ ổn định của dung dịch keo nano là quan trọng nhất đối với ứng dụng và nó phụ thuộc vào một số yếu tố bao gồm nồng độ, loại chất ổn định, độ pH của dung dịch và nhiệt độ trong quá trình bảo quản. Nhiệt độ ảnh hưởng rất lớn đến độ ổn định cũng như các đặc trưng tính chất của dung dịch SeNPs/ β -glucan trong quá trình bảo quản. Kết quả cho thấy trong quá trình bảo quản để giảm thiểu sự kết cụm của các hạt SeNPs trong dung dịch cần phải bảo quản ở điều kiện 0°C. Mặc dù ở điều kiện này có thể bảo quản được trong 60 ngày nhưng điều kiện bảo quản này khá phức tạp, sẽ cần tiêu tốn nhiều năng lượng và chi phí bảo quản. Việc hạ nhiệt độ bảo quản ở 0°C khó thực hiện đặc biệt là hướng ứng dụng và thương mại của sản phẩm. Chính vì vậy để khắc phục hạn chế trên cũng

như mở rộng phạm vi ứng dụng, việc nghiên cứu chuyên sâu dạng bột SeNPs/ β -glucan sẽ là giải pháp để giảm thiểu quá trình kết tụ của SeNPs cũng như thuận lợi cho quá trình thương mại.

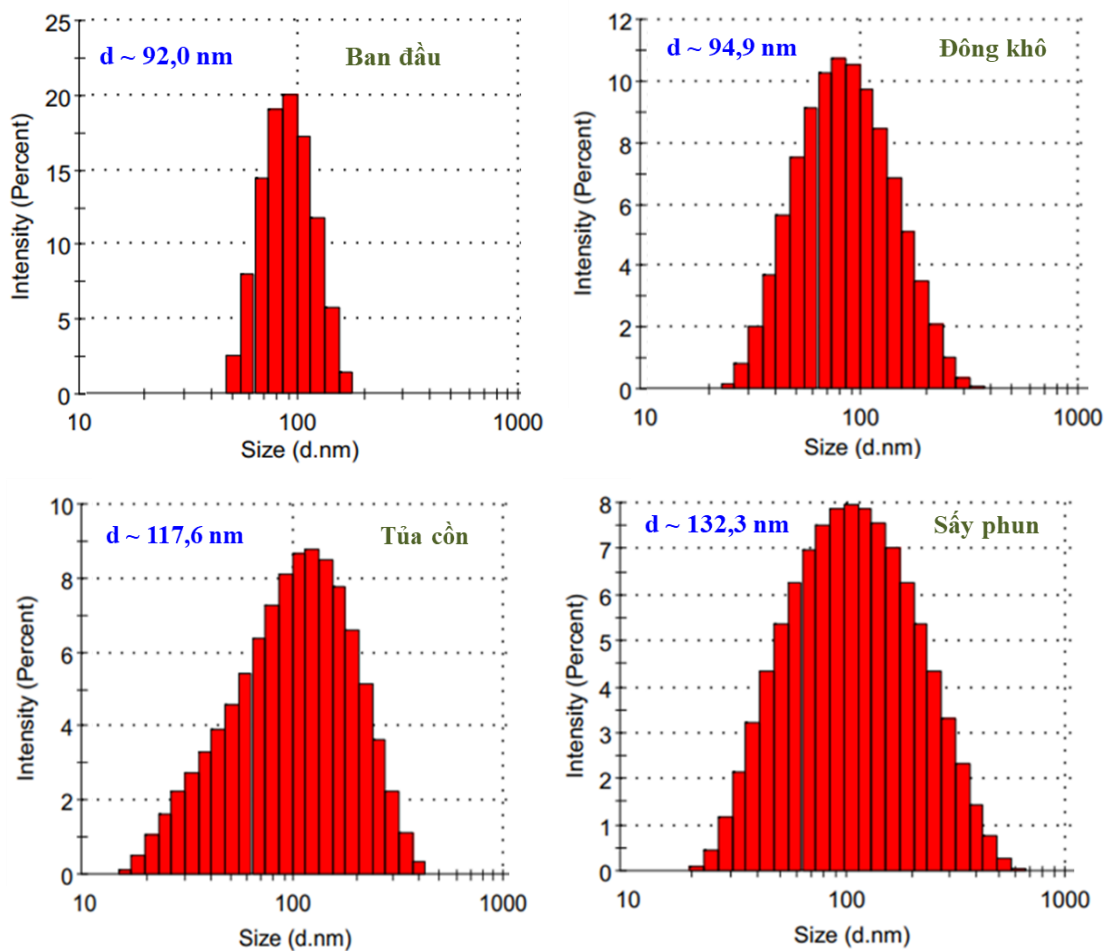
3.1.7. Kết quả khảo sát tạo chế phẩm SeNPs/ β -glucan dạng bột

Có thể nhận thấy chế phẩm SeNPs sau khi tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ ở dạng dung dịch keo thường bảo quản rất khó khăn và thời gian bảo quản ngắn. Nguyên nhân các hạt SeNPs trong dung dịch có xu hướng lắng và kết tụ. Do đó qua thời gian, ở nhiệt độ thay đổi chúng dễ dàng tập hợp lại để tạo thành một hạt lớn hơn theo chuyển động Brown. Điều này sẽ làm giảm hoặc mất hoạt tính của sản phẩm. Đây là vấn đề rất khó khăn cho việc ứng dụng của sản phẩm này nếu ở dạng dung dịch keo. Do vậy nghiên cứu các phương pháp tạo chế phẩm dạng bột nhằm dễ dàng bảo quản và hướng đến nhiều ứng dụng tốt hơn.

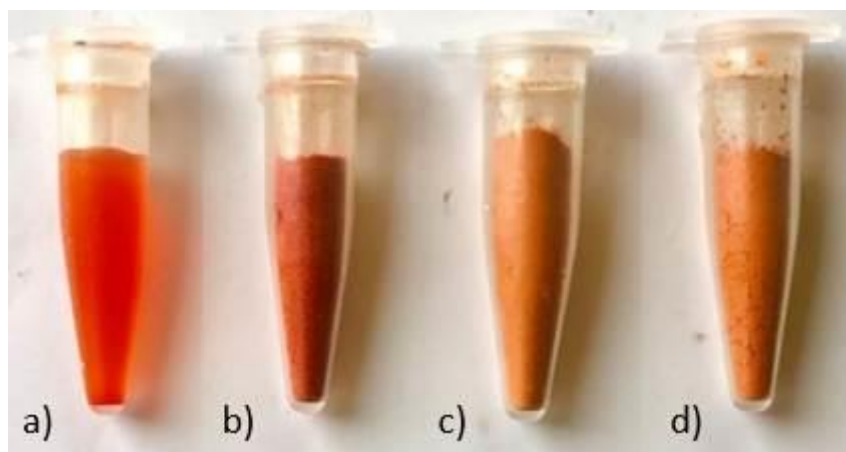
Trong phạm vi của luận án, nghiên cứu sử dụng 3 phương pháp thông dụng để tạo chế phẩm SeNPs/ β -glucan dạng bột từ mẫu dung dịch đó là phương pháp đông khô, phương pháp sấy phun và tua cùn sấy khô. Kết quả kích thước hạt và phân bố kích thước hạt của SeNPs/ β -glucan sau khi tạo dạng bột được trình bày ở hình 3.9 và 3.1

0. Kết quả cho thấy kích thước hạt SeNPs tăng từ 92,02 nm đối với dung dịch SeNPs/ β -glucan lên 94,98 nm khi đông khô, 132,3 nm khi sấy phun và 117,6 nm khi tua cùn và sấy. Trong ba phương pháp nói trên thì phương pháp đông khô cho kết quả tốt nhất bởi kích thước hạt SeNPs/ β -glucan thay đổi không đáng kể so với kích thước hạt SeNPs đo được ngay sau khi tổng hợp. Đồng thời, độ phân bố kích thước SeNPs/ β -glucan trong phương pháp đông khô cũng hẹp hơn so với hai phương pháp còn lại. Màu sắc chế phẩm bột tạo thành ở ba phương pháp cho thấy, phương pháp đông khô giữ được màu sắc chế phẩm tươi sáng hơn, màu không bị phai nhạt như sản phẩm bột của hai phương pháp còn lại (hình 3.10), điều này có thể giúp giữ được đặc tính hóa lý, hoạt tính sinh học tốt hơn hai phương pháp còn lại.

Từ kết quả khảo sát có thể kết luận, đông khô là phương pháp tạo chế phẩm dạng bột đã được sử dụng rộng rãi trong ngành dược phẩm, nghiên cứu sinh học, dinh dưỡng và các sản phẩm chăm sóc sức khỏe, thực phẩm và các ngành công nghiệp khác. Đây là phương pháp khử nước hiệu quả, giúp tạo sản phẩm dạng bột với đặc tính không thay đổi đáng kể, từ đó giúp bảo quản sản phẩm được lâu hơn, mang đến nhiều ứng dụng hơn.



Hình 3.9. Ảnh hưởng của các phương pháp tạo bột đến kích thước hạt của mẫu SeNPs/ β -glucan dạng bột



Hình 3.10. Chế phẩm bột SeNPs/ β -glucan ở các phương pháp sấy khác nhau

- a) Mẫu ban đầu sau khi tổng hợp; b) Mẫu đông khô; c) Mẫu sấy phun;
d) Mẫu tủa còn

Nhiều nghiên cứu cũng đã khảo sát các phương pháp hướng đến tạo sản phẩm dạng bột cho hướng ứng dụng sản phẩm. Thao và ctv (2017) đã khảo sát phương pháp sấy phun, tủa và ly tâm cho việc tạo thành sản phẩm bột AuNP/dextran. Các tác giả đã báo cáo sự thay đổi kích thước hạt bột AuNPs tạo bằng phương pháp sấy phun và tủa là nhỏ hơn so với AuNPs được tạo ra bằng cách ly tâm. Gần đây, công bố của Duy và ctv (2021) cho thấy kích thước hạt của dung dịch SeNPs/oligochitosan dạng bột (xác định từ ảnh TEM) bằng phương pháp sấy phun tăng từ 41,8 nm đến 43,8 nm.

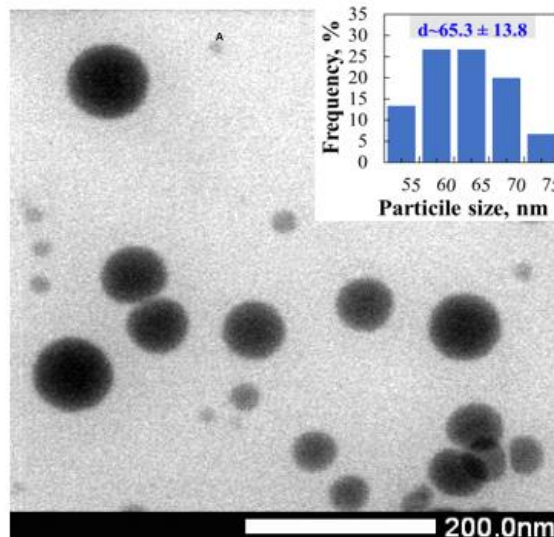
Tóm lại, từ những kết quả khảo sát và đánh giá các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp SeNPs/ β -glucan bằng phương pháp chiếu xạ, có thể kết luận nghiên cứu đã tổng hợp thành công chế phẩm SeNPs/ β -glucan với các điều kiện tổng hợp như sau: nồng độ Se^{4+} ban đầu là 80 ppm, nồng độ chất ổn định β -glucan là 2%, pH dung dịch ~ 5 , chiếu xạ ở liều xạ 8 kGy trên nguồn xạ gamma Co-60 ở suất liều 10 kGy/giờ. Dung dịch SeNPs/ β -glucan tạo thành có màu đỏ cam, trong suốt không cặn lắng (hình 3.11). Kết quả sản phẩm SeNPs/ β -glucan có kích thước hạt trung bình đạt khoảng 92 nm và phân bố kích thước hạt hẹp. Để hướng ứng dụng chế phẩm SeNPs/ β -glucan, đề tài lựa chọn sử dụng phương pháp đông khô nhằm thu chế phẩm dạng bột có kích thước và phân bố kích

thước cũng như màu sắc chế phẩm đẹp hơn, độ ổn định sản phẩm được tốt nhất. SeNPs/ β -glucan được tổng hợp ở điều kiện trên được sử dụng để phân tích đặc trưng cấu trúc và hoạt tính sinh học nhằm định hướng ứng dụng cho chế phẩm.



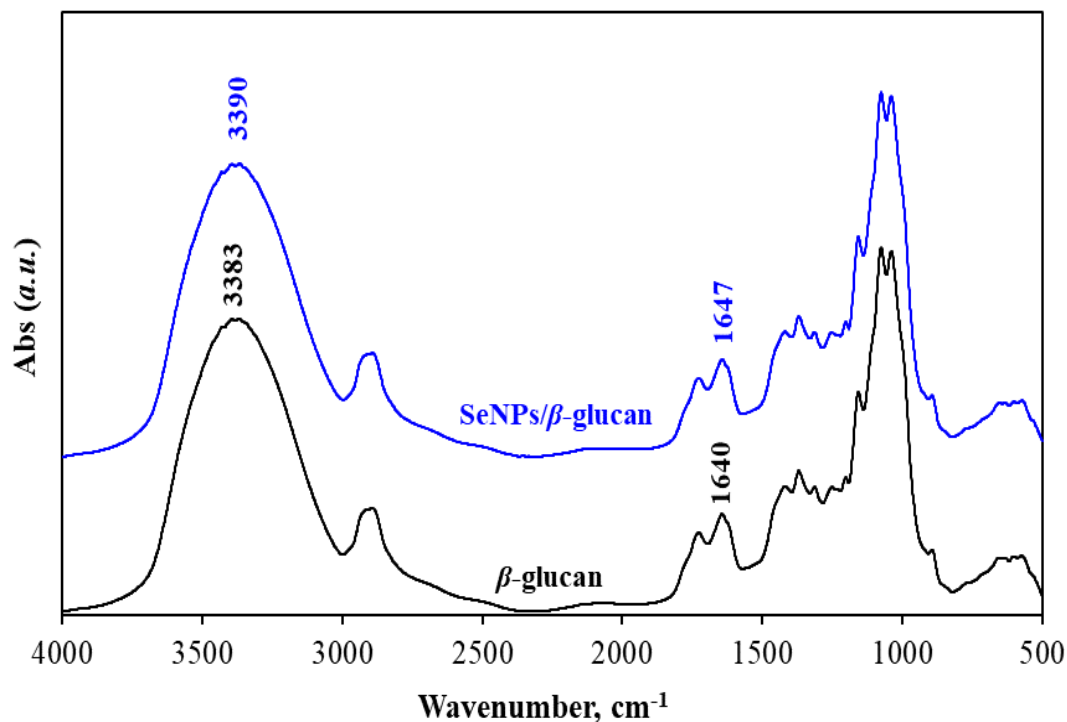
Hình 3.11. Mẫu dung dịch SeNPs/ β -glucan sau khi tổng hợp ở điều kiện tối ưu (nồng độ Se^{4+} ban đầu 80 ppm, nồng độ chất ổn định β -glucan: 2%, pH dung dịch ~ 5 , ở liều chiếu xạ: 8 kGy trên nguồn xạ gamma Co-60, suất liều 10 kGy/giờ)

Chế phẩm SeNPs/ β -glucan có nồng độ Se^{4+} ban đầu là 80 ppm, nồng độ chất ổn định là 2%, pH ~ 5 được chiếu xạ ở liều xạ 8 kGy trên nguồn xạ gamma Co-60 ở suất liều 10 kGy/giờ được xác định kích thước hạt và phân bố cấu trúc qua kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Đây là thiết bị nghiên cứu vi cấu trúc vật rắn, sử dụng chùm điện tử có năng lượng cao chiếu xuyên qua mẫu vật rắn mỏng và sử dụng các thấu kính từ để tạo ảnh với độ phóng đại cực lớn. Trong thí nghiệm này hình ảnh TEM của các hạt SeNPs/ β -glucan và phân bố kích thước hạt của chúng được trình bày ở hình 3.12.



Hình 3.12. Ảnh TEM và phân bố kích thước hạt của SeNPs/ β -glucan tạo thành

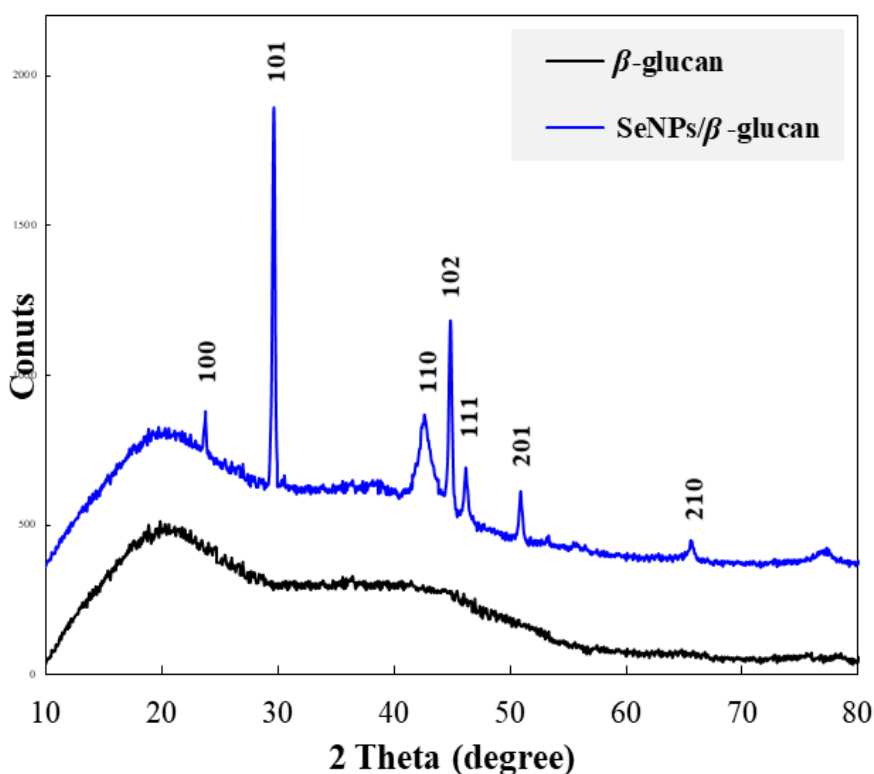
Kết quả cho thấy các hạt SeNPs của mẫu SeNPs/ β -glucan có dạng hình cầu, kích thước tương đối đồng đều và sự phân bố kích thước hạt là tương đối hẹp. Chế phẩm với kích thước hạt trung bình khoảng 65,3 nm thấp hơn 26,7 nm so với kích thước SeNPs đo bằng DLS. Đồng thời độ phân bố kích thước hạt đo bằng phương pháp TEM cũng hẹp hơn, dao động chủ yếu trong khoảng 55 - 75 nm so với 80 - 140 nm đo bằng phương pháp DLS. Theo Souza và ctv (2016) kích thước hạt trung bình các hạt nano khi đo bằng DLS luôn cao hơn khoảng 20% so với kích thước hạt trung bình khi đo bằng TEM vì DLS cho kết quả kích thước thủy động lực học là kích thước của hạt nano cộng với lớp chất ổn định bao bọc xung quanh hạt trong khi kích thước đo bằng TEM cho kích thước thực tế của hạt nano và không bao gồm lớp chất ổn định bao bọc bên ngoài. Nhiều nghiên cứu cũng cho kết quả tổng hợp SeNPs ở cấu trúc đồng nhất, phân tán ở các kích thước từ 30 - 200 nm. Wang và ctv (2018) đã tổng hợp SeNPs sử dụng polysaccharide-protein (PSP) từ nghêu châu Á (*Corbicula fluminea*) làm chất ổn định thông qua quá trình khử sodium selenite (Na_2SeO_3) bằng vitamin C. Kết quả cho thấy PSP-SeNPs tạo thành có cấu trúc hình cầu đồng nhất và đơn phân tán với kích thước từ 40 - 70 nm.



Hình 3.13. Phổ FTIR của mẫu SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ. Trong đó, các đỉnh số sóng hấp thụ đặc trưng của β -glucan và SeNPs/ β -glucan bao gồm $-OH$ (3383 cm^{-1}), $-CH_2$ (2986 cm^{-1}), $-C=O$ (1640 cm^{-1}), $C-O-C$ (1156 cm^{-1}) và β -glucan (890 cm^{-1}) đều có mặt, tuy nhiên, các đỉnh số sóng điển hình của nhóm $-OH$ và $-C=O$ đã bị dịch chuyển đáng kể từ 3383 cm^{-1} sang 3390 cm^{-1} và từ 1640 cm^{-1} sang 1647 cm^{-1} trong phổ tương ứng của SeNPs/ β -glucan.

Chế phẩm SeNPs/ β -glucan cũng được khảo sát đặc trưng cấu trúc bằng phổ hồng ngoại và so sánh với mẫu β -glucan. Kết quả hình 3.13 cho thấy dung dịch keo SeNPs/ β -glucan cũng có các liên kết đặc trưng cho β -glucan như nhóm ($-OH$), ($-CO$), ($-COO$) và ($-COC$), v.v. Tuy nhiên kết quả phân tích cho thấy có hiện tượng dịch chuyển đỉnh số sóng của liên kết ($-OH$) tại số sóng 3383 cm^{-1} của dung dịch β -glucan đối chứng sang số sóng cao hơn là 3390 cm^{-1} và số sóng đặc trưng cho liên kết ($-CO$) tại vị trí 1640 cm^{-1} của dung dịch β -glucan đối chứng sang số sóng 1647 cm^{-1} trong mẫu SeNPs/ β -glucan. Nguyên nhân dịch chuyển số sóng đặc trưng bởi các nhóm chức được giải thích là do sự tương tác tĩnh điện giữa các hạt SeNPs và β -glucan tại nhóm liên kết ($-OH$) và ($-CO$) và

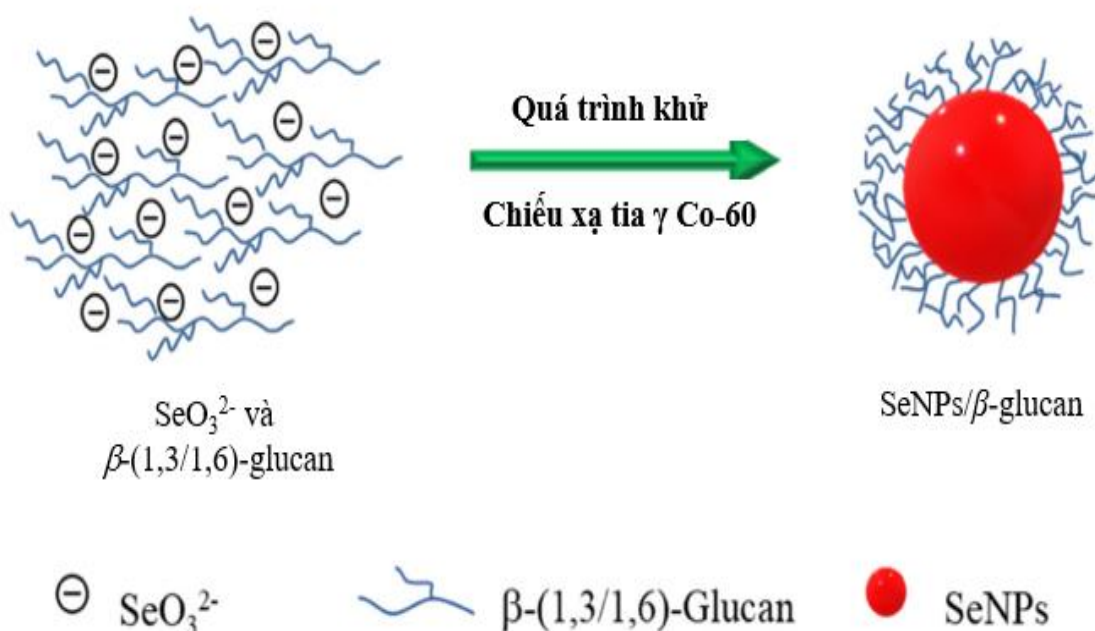
ổn định trong mạng lưới liên kết này. Chính sự liên kết này đã bảo vệ các hạt SeNPs tránh khỏi sự keo tụ cũng như chứng minh cơ chế bảo vệ SeNPs của β -glucan khi được dùng làm chất ổn định. Kết quả nghiên cứu này khá tương đồng với các công bố của các tác giả Jia và ctv (2015); Hien và ctv (2018 và Menazea và ctv (2020). Các nghiên cứu trên cũng cho thấy SeNPs sau khi được tạo thành cũng có các đỉnh liên kết đặc trưng của các nhóm ($-\text{OH}$) và ($-\text{CO}$), dễ dàng tạo liên kết với hydro giữa O–H, liên kết glycosid C–O–H và C–O–C của các phân tử polysaccharide như dextran, chitosan, carboxymethyl chitosan, D-galactose với SeNPs. Do đó làm dịch chuyển các đỉnh đặc trưng của các nhóm chức và giúp ổn định trong mạng lưới của chúng.



Hình 3.14. Giản đồ nhiễu xạ tia X (XRD) của mẫu SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ và β -glucan. Trong đó, các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng của SeNPs ở $23,7^\circ$ (100); $29,5^\circ$ (101), $42,7^\circ$ (110), $44,8^\circ$ (102), $46,2^\circ$ (111), 51° (201) và $65,3^\circ$ (210).

Cấu trúc của SeNPs sau khi chiếu xạ được phân tích bằng XRD. Kết quả từ giản đồ nhiễu xạ tia X (hình 3.14) cho thấy sự tồn tại cấu trúc hạt SeNPs trong

dung dịch β -glucan. Điều quan trọng là khi so sánh đặc trưng cấu trúc của các sản phẩm với β -glucan, kết quả cho thấy sự tồn tại cấu trúc hạt SeNPs trong mẫu SeNPs/ β -glucan với các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng của SeNPs ở $23,7^\circ$ (100); $29,5^\circ$ (101), $42,7^\circ$ (110), $44,8^\circ$ (102), $46,2^\circ$ (111), 51° (201) và $65,3^\circ$ (210) do cấu trúc tinh thể của SeNPs. Kết quả này tương đối phù hợp với những công trình được công bố trước đây của Jia và ctv (2015), Duy và ctv (2021).



Hình 3.15. Sơ đồ quá trình tổng hợp SeNPs ổn định β -glucan khối lượng phân tử thấp tan trong nước bằng phương pháp chiếu xạ tia γ Co-60

Từ các kết quả thu được có thể khẳng định, nghiên cứu đã thành công trong việc tổng hợp SeNPs/ β -glucan bằng phương pháp chiếu xạ, xác định được liều chiếu xạ chuyên hóa bão hòa và điều kiện phù hợp để tổng hợp SeNPs/ β -glucan như sau: nồng độ Se⁴⁺ ban đầu là 80 ppm và nồng độ chất ổn định β -glucan là 2%, pH ~ 5 và suất liều là 10 kGy/h. Chế phẩm SeNPs/ β -glucan thu được ở dạng dung dịch keo, màu đỏ nâu, có kích thước hạt ổn định ở khoảng 92 nm. Cơ chế của quá trình tổng hợp SeNPs/ β -glucan bằng phương pháp chiếu xạ được mô tả tóm tắt ở hình 3.15. Khi nguồn bức xạ có năng lượng cao như tia gamma chiếu vào dung dịch chứa các ion Se⁴⁺, các gốc tự do có tính khử mạnh như

electron hydrat (e^-_{aq}), hydro (H^\bullet) được tạo ra từ quá trình xạ ly nước có thể khử ion selen (Se^{4+}) thành nguyên tử selen (Se^0). Se^0 ở dạng nguyên tử, sau khi được hình thành các hạt có xu hướng kết tụ và hình thành hạt SeNPs. Các hạt SeNPs tạo thành sẽ liên kết tĩnh điện với β -glucan thông qua nhóm ($-OH$) và ($-COO$) tạo nên sự ổn định và phân bố đồng đều các hạt trong hệ keo nano.

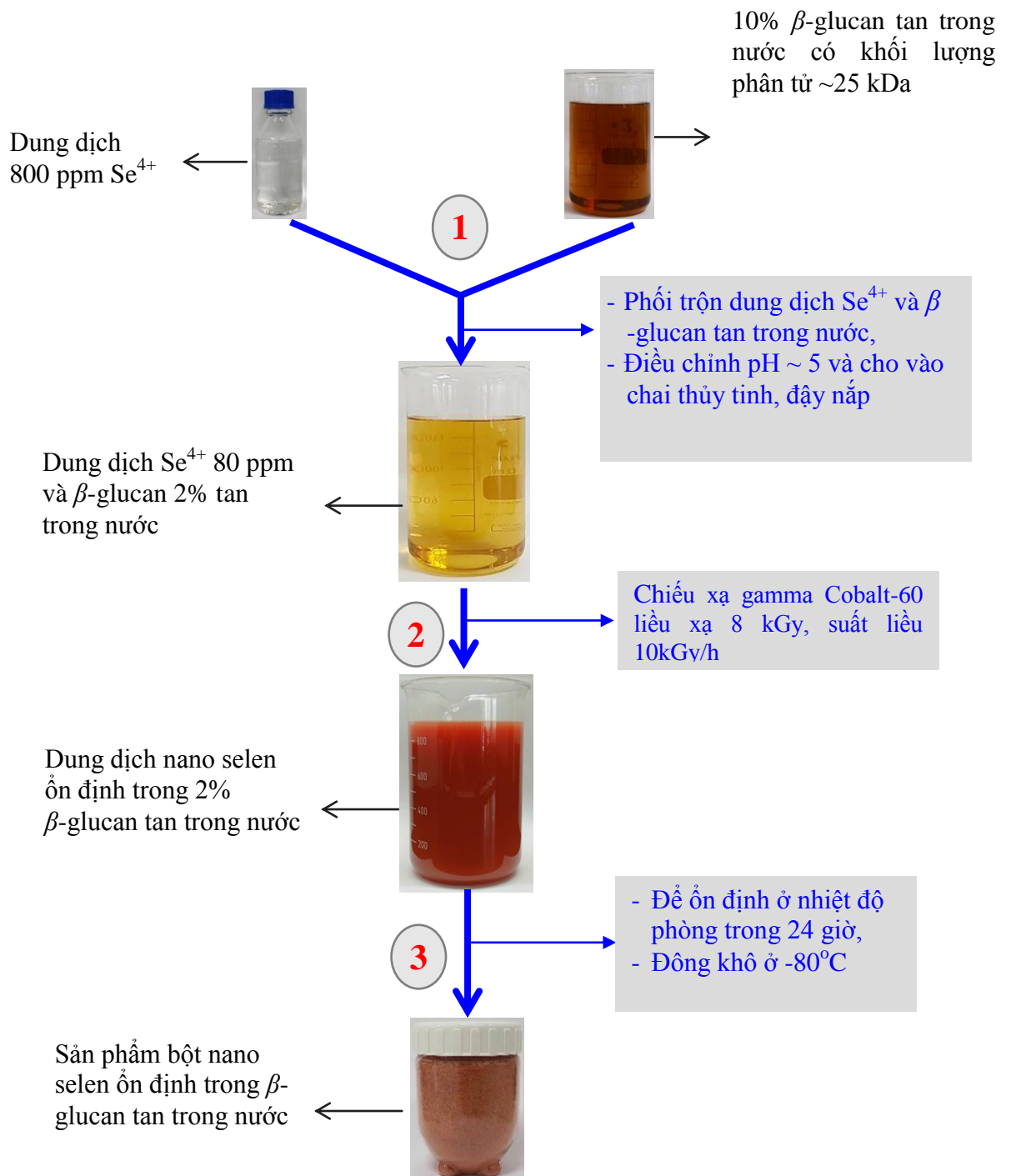
Kết quả nghiên cứu cũng đã xác định được điều kiện bảo quản tốt nhất cho chế phẩm SeNPs/ β -glucan là 60 ngày ở nhiệt độ $0^\circ C$ và cũng xác định được phương pháp đông khô là phương pháp tốt nhất để tạo SeNPs/ β -glucan dạng bột mà không làm gia tăng kích thước hạt.

3.1.8. Quy trình tổng hợp SeNPs ổn định trong β -glucan có Mw thấp và tan trong nước bằng phương pháp chiếu xạ

Từ những kết quả nghiên cứu và khảo sát các điều kiện, thông số trong quá trình tổng hợp SeNPs ổn định trong β -glucan bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60, quy trình chế tạo SeNPs ổn định trong β -glucan bằng phương pháp chiếu xạ đã được xây dựng hoàn thiện.

Sơ đồ quy trình tổng hợp SeNPs ổn định trong β -glucan có Mw thấp và tan trong nước bằng phương pháp chiếu xạ được thể hiện ở hình 3.16

Quy mô: 3000 mL/mẻ



Hình 3.16. Quy trình tổng hợp SeNPs/β-glucan bằng phương pháp chiếu xạ

Diễn giải quy trình:

Nguyên vật liệu và thiết bị

- β -glucan khối lượng phân tử thấp ($M_w \sim 25$ kDa) và tan trong nước
- Selenium dioxide (SeO_2 , Sigma), Sodium hydroxide (NaOH, scharlau).
- Máy khuấy, máy đông khô Freeze dryer model GAMMA 1-16 LSCplus (Christ, Osterode, Đức).
- Nguồn xạ gamma Co-60 model GC- 5000 (BRIT, Ấn Độ) tại Trung tâm Công nghệ Sinh học, suất liều 10kGy/h

Bước 1: Chuẩn bị nguyên liệu

Chuẩn bị dung dịch Se^{4+} 80 ppm trong 2% β -glucan tan trong nước có khối lượng phân tử 25 kDa (25,343 g/mol): Dung dịch Se^{4+} 800 ppm được chuẩn bị bằng cách hòa tan 337,5 mg SeO_2 trong 400 mL nước khử ion (giữ trong bình tối), khuấy nhẹ cho đến khi SeO_2 tan hoàn toàn, bổ sung nước khử ion đủ 500 mL, dung dịch 10% β -glucan tan trong nước được chuẩn bị bằng cách cân 60 g β -glucan tan trong nước có khối lượng phân tử 25 g/mol và cho vào 500 mL nước khử ion, sau đó khuấy đều cho đến khi hòa tan hoàn toàn trước khi bổ sung nước khử ion vừa đủ 600 mL, cho từ từ toàn bộ 500 mL dung dịch Se^{4+} 800 ppm vào 600 mL dung dịch 10% β -glucan tan trong nước, khuấy nhẹ cho tan đều và chỉnh pH~5 bằng dung dịch NH_4OH 5% trước khi bổ sung nước khử ion đủ 3000 mL.

Bước 2: Tổng hợp dung dịch keo SeNPs trong β -glucan bằng phương pháp chiếu xạ:

Chuyển toàn bộ 3000 mL dung dịch Se^{4+} trong β -glucan tan trong nước có khối lượng phân tử 25 kDa vào bình thủy tinh và tiến hành chiếu xạ trên nguồn xạ gamma Co-60 với liều chiếu xạ 8 kGy để tổng hợp SeNPs dạng dung dịch keo. Hàm lượng SeNPs tạo thành được xác định bằng cách ly tâm dung dịch sau khi chiếu xạ ở tốc độ 50 nghìn vòng/phút, trong 30 phút để thu nhận phần lắng và phân tích hàm lượng selen trong phần lắng bằng phổ hấp phụ nguyên tử để xác định hàm lượng SeNPs tạo thành sau khi chiếu xạ là 100%; kích thước của hạt SeNPs trong mẫu được phân tích bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động

(DLS) trên hệ máy Zetasizer model ZEN5600 (Malvern, Anh) sử dụng nguồn laser 632,8 nm, chỉ số khúc xạ hạt 1,590 với hệ số hấp thụ hạt là 0,01 và chiết suất nước (1,33) ở nhiệt độ 25°C) đạt 92 nm là phù hợp.

Bước 3: Đông khô tạo chế phẩm bột SeNPs/ β -glucan

Dung dịch keo SeNPs 80 ppm ổn định trong 2% β -glucan tan trong nước sau khi tổng hợp được để ổn định qua đêm và tiến hành đông khô ở nhiệt độ -80°C để thu nhận khoảng 60 g SeNPs dạng bột ổn định trong β -glucan tan trong nước (có khối lượng phân tử khoảng 25 kDa).

Tiến hành kiểm tra chất lượng chế phẩm tạo thành ở các mẻ khác nhau. Kết quả được trình bày ở bảng 3.1. Kết quả qua các mẻ thực hiện, cho thấy quy trình tổng hợp có độ ổn định chất lượng ở các chỉ tiêu đánh giá.

Đánh giá kết quả chế phẩm:

Sau khi tổng hợp sản phẩm, tiến hành kiểm tra các đặc trưng của sản phẩm SeNPs như sau:

- + Màu sắc: màu đỏ cam
- + Đặc trưng: dạng bột mịn, khô ráo
- + Chế phẩm bột SeNPs sau khi đông khô kích thước hạt đạt khoảng 92,5 nm được phân tích bằng phổ hấp phụ nguyên tử và kích thước hạt SeNPs được phân tích bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động trên máy Zetasizer. Hàm lượng β -glucan ~ 2%
- + Hình dạng hạt: hình cầu, kích thước hạt trung bình khoảng 65,32 nm và độ phân bố kích thước hạt dao động trong chủ yếu khoảng từ 55 - 75 nm (xác định bằng phương pháp đo kính hiển vi điện tử truyền qua - TEM (hình. 3.17)).

Bảng 3.1. Kết quả kiểm tra chất lượng sản phẩm tạo thành

STT	Chỉ tiêu đánh giá	Số mẻ		
		Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3
1	Kích thước hạt selen nano (nm)	92,05	91,56	92,55
2	Hàm lượng β -glucan (%)	2,05	2,15	2,06
3	Khối lượng phân tử của β -glucan (g/mol)	25.350	24.980	25.560
4	Giá trị pH	5,11	5,09	5,05
5	Cảm quan	Dung dịch có màu đỏ cam, trong suốt không cặn lắng, mùi đặc trưng. Sản phẩm dạng bột có màu đỏ gạch, mịn	Dung dịch có màu đỏ cam, trong suốt không cặn lắng, mùi đặc trưng. Sản phẩm dạng bột có màu đỏ gạch, mịn	Dung dịch có màu đỏ cam, trong suốt không cặn lắng, mùi đặc trưng. Sản phẩm dạng bột có màu đỏ gạch, mịn



Hình 3.17. Hình ảnh sản phẩm bột SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60

3.2. Độc tính cấp của SeNPs/ β -glucan

Quá trình tiến hành thử nghiệm độc tính cấp cho thấy, SeNPs/ β -glucan dạng bột được phân tán trong nước cất ở nồng độ cao nhất có thể cho chuột qua đường uống là 960 mg/kg thể trọng chuột. Sử dụng liều thử nghiệm cao gấp 3 lần liều tham khảo gây chết 100% chuột theo nghiên cứu của Shakibaie và ctv (2013). Kết quả thử nghiệm độc tính của SeNPs/ β -glucan trên chuột khỏe mạnh ở các mức liều khác nhau được ghi nhận ở 3 đợt thử nghiệm. Sau khi cho chuột uống chế phẩm SeNPs/ β -glucan, chuột giảm di chuyển trong vòng 5 phút, tuy nhiên chuột hoạt động lại bình thường sau 30 phút. Ở đợt cho uống thứ nhất, sau 3 ngày thử nghiệm, số chuột chết được ghi nhận là 1/6 con. Bên cạnh đó, số lượng chuột chết sau khi cho uống chế phẩm SeNPs/ β -glucan với liều 960, 800, 640 thể trọng chuột lần lượt là 1/6, 1/6, và 1/6 con sau 3 ngày theo dõi. Những con chuột còn lại đều khỏe mạnh, không có bất thường về hành vi, trạng thái lông, khả năng ăn uống và tiêu tiểu trong 14 ngày theo dõi tiếp theo. Các biểu hiện của những chuột khỏe mạnh được thể hiện ở bảng 3.5.

Ở lần cho uống thứ 2, tỉ lệ chuột chết lần lượt là 1/6, 1/6, 0/6 và 0/6 con tương ứng với các nghiệm thức cho chuột uống chế phẩm SeNPs/ β -glucan lần lượt với các nồng độ 960 - 800 mg/kg thể trọng chuột. ở các nồng độ dưới 800 mg/kg không khi nhận chuột chết. Ở đợt cho uống thứ 3, chỉ có 1 con chuột chết khi cho uống chế phẩm SeNPs/ β -glucan với nồng độ 960 mg/kg thể trọng. Các

thực nghiệm còn lại không ghi nhận chuột chết. Mặt khác, số chuột còn sống đều khỏe mạnh, không có bất thường về hành vi, trạng thái lông, khả năng ăn uống, tiêu tiêu trong 14 ngày theo dõi tiếp theo.

Bảng 3.2. Độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt của chế phẩm SeNPs/ β -glucan ở các liều khác nhau (đợt cho uống thứ nhất)

Liều cho uống (mg/kg)	Trọng lượng trung bình (g/con)				Tỉ lệ chuột chết	
	Ban đầu	Sau 3 ngày	Sau 7 ngày	Sau 14 ngày	Sau 3 ngày	sau 14 ngày
160	22,91 \pm 0,7	23,72 \pm 0,65	25,4 \pm 0,86	26,95 \pm 0,79	0/6	0/6
320	21,82 \pm 0,98	23,55 \pm 1,06	25,08 \pm 0,95	27,21 \pm 0,91	0/6	0/6
480	20,16 \pm 0,38	22,65 \pm 0,43	24,13 \pm 0,36	25,99 \pm 0,32	0/6	0/6
640	21,12 \pm 0,89	23,39 \pm 0,65	25,19 \pm 0,72	27,18 \pm 1,02	1/6	1/6
800	21,16 \pm 1,03	22,79 \pm 1,42	25,2 \pm 1,38	28,66 \pm 1,44	1/6	1/6
960	22,24 \pm 0,38	25,96 \pm 0,67	28,09 \pm 0,72	29,59 \pm 0,65	1/6	1/6

Bảng 3.3. Độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt của chế phẩm SeNPs/ β -glucan ở các liều khác nhau (đợt cho uống thứ 2)

Liều cho uống (mg/kg)	Trọng lượng trung bình (g/con)				Tỉ lệ chuột chết	
	Ban đầu	Sau 3 ngày	Sau 7 ngày	Sau 14 ngày	Sau 3 ngày	sau 14 ngày
160	20,97 \pm 0,48	22,44 \pm 0,44	23,28 \pm 0,42	25,63 \pm 0,82	0/6	0/6
320	20,7 \pm 0,4	23,44 \pm 0,57	24,56 \pm 0,58	27,1 \pm 0,56	0/6	0/6
480	21,52 \pm 0,76	23,35 \pm 0,84	25,68 \pm 0,75	27,27 \pm 0,89	0/6	0/6
640	21,34 \pm 0,73	23,02 \pm 0,79	24,86 \pm 1,12	27,89 \pm 1,01	0/6	0/6
800	20,35 \pm 0,37	21,52 \pm 1,08	23,95 \pm 0,91	27,36 \pm 1,04	1/6	1/6
960	21,22 \pm 0,89	24,31 \pm 1,56	26,7 \pm 1,41	28,22 \pm 1,2	1/6	1/6

Bảng 3.4. Độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt của chế phẩm SeNPs/ β -glucan ở các liều khác nhau (đợt cho uống thứ 3)

Liều cho uống (mg/kg)	Trọng lượng trung bình (g/con)				Tỉ lệ chuột chết	
	Ban đầu	Sau 3 ngày	Sau 7 ngày	Sau 14 ngày	Sau 3 ngày	sau 14 ngày
160	21,38 \pm 0,56	22,95 \pm 0,58	25,26 \pm 0,76	27,35 \pm 0,77	0/6	0/6
320	21,02 \pm 0,58	22,89 \pm 0,52	24,99 \pm 0,94	26,84 \pm 0,84	0/6	0/6
480	21,07 \pm 0,74	22,66 \pm 0,99	25,06 \pm 0,64	27,08 \pm 0,74	0/6	0/6
640	20,53 \pm 0,61	22,13 \pm 0,7	24,78 \pm 1,06	26,85 \pm 1,09	0/6	0/6
800	20,84 \pm 0,63	22,97 \pm 0,63	25,1 \pm 0,61	27,49 \pm 0,68	0/6	0/6
960	20,98 \pm 0,53	22,37 \pm 0,58	25,22 \pm 0,93	28,1 \pm 0,52	1/6	1/6

Từ các kết quả trên, có thể thấy không thể xác định được giá trị LD₅₀ đối với chuột BALB/c của chế phẩm nano SeNPs/ β -glucan và liều tối đa cho uống không gây chết chuột thử nghiệm được xác định (LD₀) là 480 mg/kg thể trọng chuột. Từ D₀ = 480 mg/kg suy ra được liều an toàn tương đối D_s trong các thực nghiệm được lý có thể bằng 1/5 D₀ = 96 mg/kg. Như vậy chế phẩm SeNPs/ β -glucan tổng hợp được được xem là an toàn.

Bảng 3.5. Các biểu hiện của chuột thử nghiệm ở các liều thử khác nhau

Chỉ tiêu theo dõi	Liều thử nghiệm (160-480 mg/kg)						Liều thử nghiệm (640 mg/kg)					
	ĐC	30 phút	4 giờ	24 giờ	7 ngày	14 ngày	Đối chứng	30 phút	4 giờ	24 giờ	7 ngày	14 ngày
Vận động	B	B	B	B	B	B	B	↓	B	B	B	B
Tình trạng lông và da	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Mất	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Tình trạng hô hấp	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Co giật	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Run rẩy	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Nôn mửa	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Đi ngoài	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Hôn mê	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Chết	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Chỉ tiêu theo dõi	Liều thử nghiệm (800 mg/kg)						Liều thử nghiệm (960 mg/kg)					
	ĐC	30 phút	4 giờ	24 giờ	7 ngày	14 ngày	Đối chứng	30 phút	4 giờ	24 giờ	7 ngày	14 ngày
Vận động	B	↓	B	B	B	B	B	↓	B	B	B	B
Tình trạng lông và da	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Mất	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Tình trạng hô hấp	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Co giật	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Run rẩy	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Nôn mửa	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Đi ngoài	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Hôn mê	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Chết	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K

Chú thích: B - bình thường, K- không có, ↓ - giảm, ĐC - đối chứng

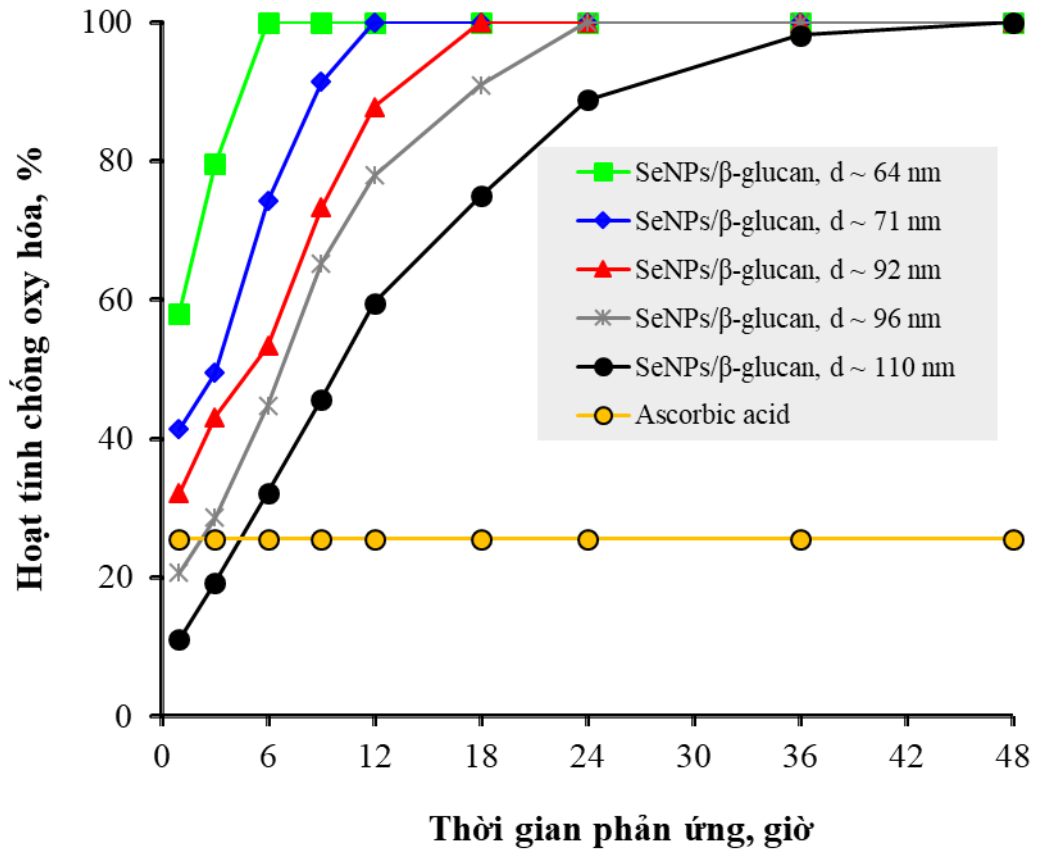
3.3. Kết quả khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của dung dịch keo SeNPs/ β -glucan

3.3.1. Hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs/ β -glucan theo kích thước hạt

Phương pháp đánh giá khả năng bắt gốc tự do ABTS là một phương pháp thường được sử dụng cho việc khảo sát khả năng ức chế gốc tự do hay đánh giá khả năng cung cấp hydro của các chất chống oxy hóa. ABTS⁺ là một gốc tự do bền phát quang màu xanh, được đặc trưng ở độ hấp thụ 734 nm. Khi cho chất chống oxy hóa vào dung dịch chứa ABTS⁺, các chất chống oxy hóa sẽ khử ion này thành ABTS. ABTS có thể phản ứng với nhiều loại gốc tự do khác nhau (như các gốc tự do peroxy, hydroxyl) và có thể mô phỏng quá trình oxy hóa trong cơ thể. Đây là phương pháp đơn giản, hiệu quả và ổn định, có thể thực hiện ở phạm vi pH rộng hơn, bao gồm cả trong môi trường nước và dung dịch hữu cơ nên được sử dụng rộng rãi để sàng lọc các chất chống oxy hóa. Do đó nghiên cứu lựa chọn khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của mẫu SeNPs/ β -glucan bằng phương pháp bắt gốc tự do ABTS. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các kích thước hạt khác nhau đến hoạt tính chống oxy hóa được thể hiện ở hình 3.18.

Kết quả cho thấy hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs/ β -glucan giảm khi kích thước hạt SeNPs tăng và sản phẩm có kích thước càng nhỏ thì hoạt tính chống oxy hóa càng cao. Cụ thể, sau 1 giờ phản ứng, hoạt tính chống oxy hóa của dung dịch keo SeNPs/ β -glucan có kích thước hạt ~ 64,79 nm ở nồng độ 10 ppm đạt 58,06%, nhưng lại giảm xuống còn 41,36% ở khi kích thước hạt tăng 71,74 nm và giảm còn 32,11% khi kích thước hạt SeNPs là 92,02 nm. Khi tiếp tục tăng kích thước hạt lên 96,71 và 110,1 nm thì hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs/ β -glucan tiếp tục giảm tương ứng còn 20,7 và 11,13% (thấp hơn ascorbic acid ở cùng nồng độ). Khi so sánh với acid ascorbic có thể thấy ở nồng độ 10 ppm, ascorbic acid thể hiện hoạt tính chống oxy hóa ngay khi phản ứng và ở thời điểm ban đầu hoạt tính oxy hóa acid ascorbic cao hơn, nhưng khi tăng thời gian phản ứng, hoạt tính chống oxy hóa của acid ascorbic không tăng. Trong khi đó, khi

tăng thời gian phản ứng lên 6 giờ thì dung dịch keo SeNPs/ β -glucan có kích thước 64,79 nm mới khử hoàn toàn ABTS^{•+} (hoạt tính chống oxy hóa đạt 100%). Các dung dịch keo SeNPs/ β -glucan có kích thước hạt lớn hơn thì cần thời gian lâu hơn để phản ứng hoàn toàn với ABTS^{•+} (cụ thể dung dịch keo SeNPs/ β -glucan có kích thước hạt lần lượt là 71, 74, 92,03, 96,72 và 110,1 sau 12, 18, 24 và 48 giờ phản ứng để đạt trạng thái chống oxy hóa 100%). Điều này có thể giải thích được là khi ở cùng một hàm lượng nhưng kích thước hạt SeNPs nhỏ có diện tích bề mặt lớn hơn, khả năng tương tác tốt hơn với gốc tự do, và tính đồng đều trong kích thước hạt là những yếu tố chính giúp hiệu quả chống oxy hóa tăng lên. Bên cạnh đó, SeNPs với kích thước nhỏ, được bảo vệ trong chất ổn định thích hợp giúp tăng khả năng cũng như diện tích tiếp xúc và chống oxy hóa bề mặt của các hạt SeNPs với các gốc tự do theo nhiều hướng, cho phép nhiều phản ứng hóa học xảy ra trên bề mặt của hạt, dẫn đến hoạt tính chống oxy hóa cao hơn. Các kết quả thu được cho thấy dung dịch keo SeNPs/ β -glucan có kích thước hạt càng nhỏ thì hoạt tính chống oxy hóa càng cao. Kết quả này khá phù hợp với nghiên cứu của Hien và ctv (2018). Nhóm tác giả đã đánh giá hoạt tính chống oxy hóa SeNPs/dextran tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ. Kết quả thể hiện khả năng bắt gốc tự do ATBS của SeNPs/dextran cao phụ thuộc vào nồng độ và thời gian phản ứng, nồng độ càng cao thì khả năng bắt gốc ATBS càng cao. Cụ thể nồng độ 25 ppm SeNPs/dextran (d~74 nm) phản ứng với ABTS^{•+} trong 60 phút cho hoạt tính chống oxy hóa là 78% và đạt gần 100% ở nồng độ 100 ppm trong 5 phút.



Hình 3.18. Hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs/ β -glucan có kích thước hạt khác nhau ở nồng độ 10 ppm

Hoạt tính chống oxy hóa của acid ascorbic vẫn không đổi theo thời gian ở tất cả các nồng độ thí nghiệm có thể giải thích là do acid ascorbic hòa tan hoàn toàn trong nước, do đó khi phản ứng với gốc tự do $ABTS^{\bullet+}$ xảy ra ở dạng đồng thể và phụ thuộc nhiều vào yếu tố nồng độ, đồng thời acid ascorbic có hoạt tính chống oxy hóa, bắt gốc tự do nhanh, phản ứng của nó xảy ra hoàn toàn và sau khi phản ứng thì các phân tử acid ascorbic không còn khả năng khử gốc tự do tiếp được nữa. Trong khi đó, phản ứng giữa SeNPs và dung dịch $ABTS^{\bullet+}$ là phản ứng dị thể, các dung dịch keo nano sẽ phản ứng với các gốc tự do trong dung dịch dạng lỏng nên quá trình phản ứng chống oxy hóa của chúng sẽ diễn ra lâu hơn và khó bị oxy hóa hơn ascorbic acid. Khả năng bắt gốc tự do $ABTS^{\bullet+}$ của SeNPs tuy không xảy ra nhanh như acid ascorbic, mức độ bắt gốc chậm, phản ứng diễn ra một cách từ từ nhưng hiệu ứng chống oxy hóa lại tăng dần và ổn định theo thời gian.

Từ những kết quả trên có thể thấy SeNPs là hoạt chất chống oxy hóa rất tiềm năng với những ưu điểm như bền, khó bị oxy hóa, hoạt tính được duy trì lâu và ổn định. Khả năng chống oxy hóa của SeNPs/ β -glucan bền hơn nhiều so với acid ascorbic theo thời gian. Mặc dù, acid ascorbic là chất oxy hóa mạnh, có thể phản ứng chống oxy hóa tốt ngay khi tiếp xúc nhưng lại kém bền, rất dễ bị oxy hóa bởi các gốc tự do có mặt trong môi trường phản ứng. Đây là sự khác biệt đáng chú ý và mang ý nghĩa quan trọng trong ứng dụng thực tiễn. Do đó có thể thấy hoạt tính kháng oxy hóa ổn định, bền theo thời gian của SeNPs là một trong các ưu điểm của SeNPs được quan tâm, chú ý nhiều nhất và cũng được xem như là chất có hoạt tính chống oxy hóa hiệu quả nhất, là nguyên liệu tiềm năng để sản xuất chế tạo ra các sản phẩm chống oxy hóa ứng dụng trong các lĩnh vực mỹ phẩm và thực phẩm chức năng.

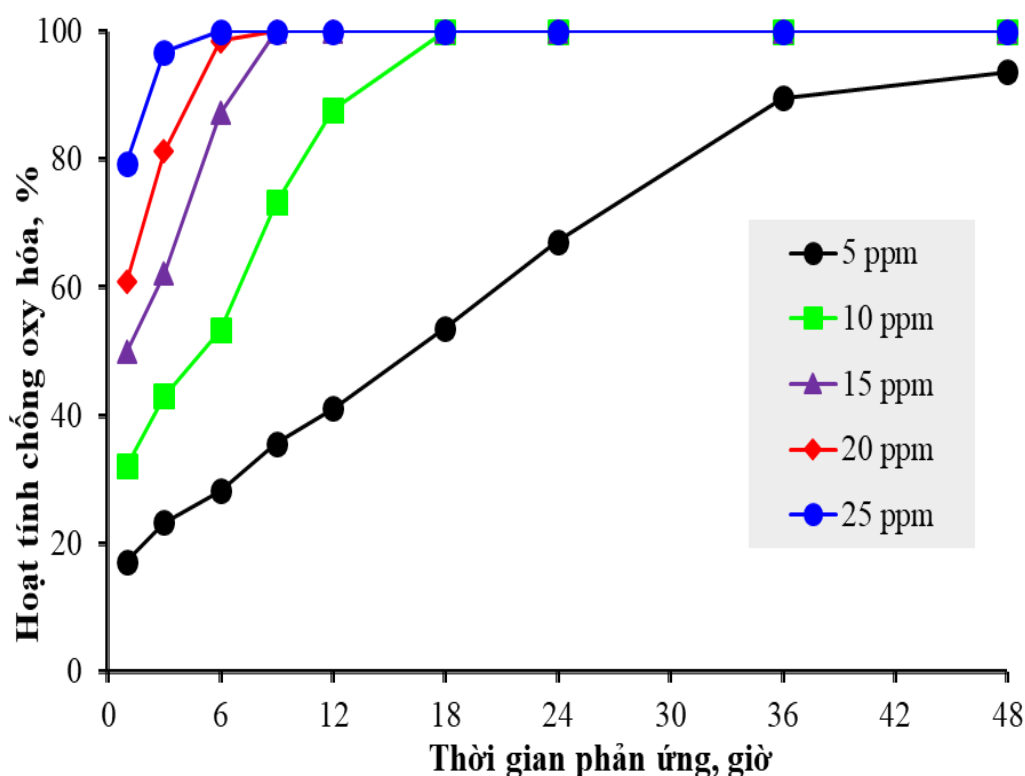
3.3.2. Ảnh hưởng của nồng độ SeNPs/ β -glucan đến hoạt tính chống oxy hóa.

Dung dịch keo SeNPs/ β -glucan có kích thước hạt khoảng 92,02 nm tiếp tục được sử dụng để khảo sát hoạt tính chống oxy hóa theo thời gian ở nhiều nồng độ khác nhau từ 5 - 25 ppm, trong khoảng thời gian 1 - 48 giờ.

Kết quả thể hiện ở hình 3.19, cho thấy hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs/ β -glucan đối với các gốc tự do ABTS^{•+} tăng theo nồng độ trong thời gian 48 giờ khảo sát. Tuy nhiên, sau 48 giờ khảo sát, hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 5 ppm vẫn chưa đạt trạng thái bão hòa. Đối với dung dịch SeNPs/ β -glucan có nồng độ 10 ppm, sau 1 giờ phản ứng, hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs/ β -glucan chỉ đạt 32,11%, nhưng sau 18 giờ phản ứng thì hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs đã đạt trạng thái bão hòa (100%). Trong khi đó, ở các nồng độ cao hơn (15 và 20 ppm) thì hiệu quả chống oxy hóa tối đa đạt được tương ứng sau 9 giờ phản ứng. Ở nồng độ 25 ppm thì sau 6 giờ phản ứng, các hạt SeNPs đã đạt hiệu quả chống oxy hóa 100%. Điều này được giải thích là khi tăng nồng độ dung dịch keo SeNPs thì cũng đồng thời tăng số lượng hạt nano có trong dung dịch làm tăng khả năng tiếp xúc và trung hòa gốc tự do tốt hơn, các

hạt SeNPs có thể tương tác với nhiều gốc tự do hơn. Như vậy, nồng độ càng cao thì hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs càng cao và xảy ra càng nhanh, những mẫu SeNPs/ β -glucan ở nồng độ thấp thì cần phải có thời gian phản ứng đủ dài để đạt được trạng thái chống oxy hóa cao nhất. Tuy nhiên, mặc dù nồng độ cao có thể dẫn đến hoạt tính chống oxy hóa mạnh mẽ hơn, việc xác định và duy trì nồng độ tối ưu là quan trọng để đảm bảo hiệu quả chống oxy hóa tốt nhất và tránh các tác dụng phụ. Do đó việc kiểm soát nồng độ SeNPs là cần thiết nhằm hướng ứng dụng đạt kết quả cao nhất.

Từ những kết quả thu được, có thể kết luận hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs/ β -glucan không chỉ phụ thuộc vào kích thước hạt SeNPs/ β -glucan mà còn phụ thuộc vào các yếu tố khác như nồng độ và thời gian phản ứng.



Hình 3.19. Hoạt tính chống oxy hóa của SeNPs/ β -glucan có kích thước hạt 92,02 nm ở các nồng độ khác nhau

Kết quả nghiên cứu đã cho thấy SeNPs/ β -glucan hoạt động như một chất chống oxy hóa mạnh. Thông qua khả năng cân bằng phản ứng ROS và giảm căng thẳng oxy hóa, SeNPs giúp bảo vệ các tế bào miễn dịch khỏi tổn thương oxy hóa từ đó có thể làm chậm sự phát triển của tế bào ung thư. Do đó, hoạt tính

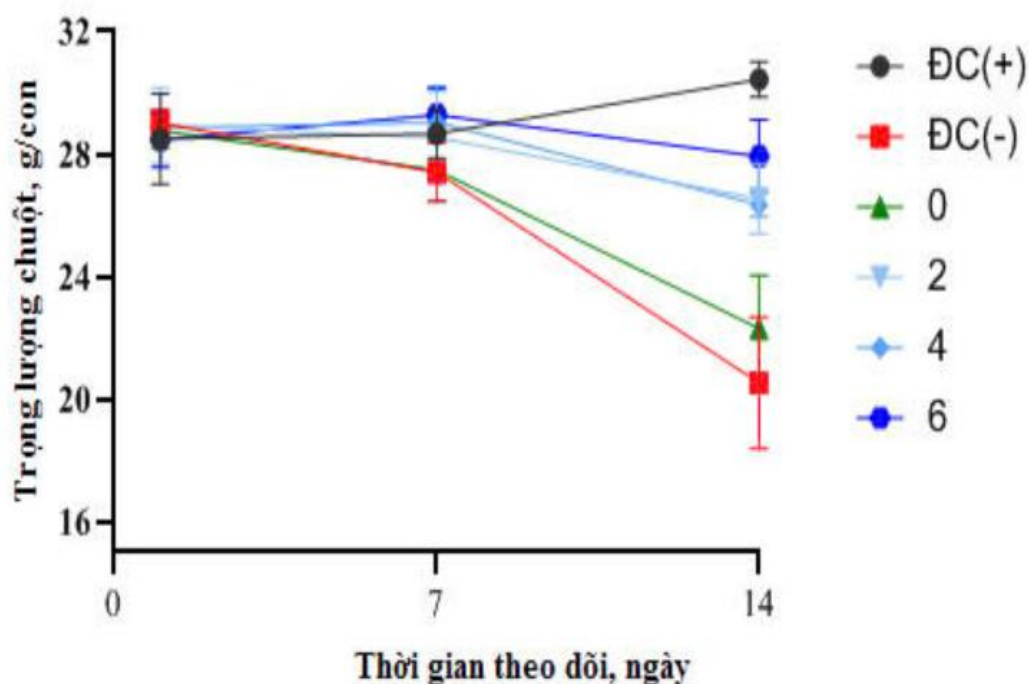
chống oxy hóa của SeNPs có mối liên hệ mật thiết với khả năng tăng cường miễn dịch và ức chế ung thư.

3.4. Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đối với hoạt tính miễn dịch của SeNPs/ β -glucan

3.4.1. Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đến trọng lượng của chuột suy giảm miễn dịch

Ở người và động vật, điều hòa miễn dịch rất quan trọng để bảo vệ kháng lại một số bệnh, bao gồm ức chế ung thư (Yu và ctv, 2016). Vì vậy, để nghiên cứu tác dụng tăng cường miễn dịch của một chất, người ta thường tiến hành nghiên cứu trên hệ miễn dịch đã bị suy yếu. Mô hình chuột ức chế miễn dịch do CTX gây ra thường được sử dụng. CTX là thuốc hóa trị liệu nổi tiếng được sử dụng để điều trị khối u có gây tác dụng phụ lên hệ thống miễn dịch và gây ức chế miễn dịch. CTX được chuyển hóa ở gan tạo sản phẩm có hoạt tính alkyl hóa cao, làm giảm bạch cầu, hồng cầu, tiểu cầu, lympho B, lympho T và gây tổn thương các cơ quan của cơ thể (Emadi và Brodsky, 2009). Chuột BALB/c sau khi bị ức chế miễn dịch bằng cách tiêm CTX vào màng bụng với liều 100 mg/kg thể trọng liên tục trong 3 ngày. Sau đó được điều trị với SeNPs/ β -glucan ở các liều khác nhau. Trọng lượng (cân nặng) của những con chuột ở các nghiệm thức được ghi lại sau 7 và 14 ngày xử lý. Kết quả hình 3.20 cho thấy ở giai đoạn 7 ngày, trọng lượng chuột ở các nghiệm thức gần như không có sự khác biệt. Tuy nhiên, sau 14 ngày xử lý, ở nghiệm thức chuột bị suy giảm miễn dịch bởi CTX, trọng lượng chuột gần như giảm mạnh. Việc gây suy giảm miễn dịch bởi CTX gần như đã ức chế sự phát triển của chuột. Trong khi ở nhóm cho uống SeNPs/ β -glucan ở các liều 2 - 6 mg/kg thể trọng cho thấy trọng lượng chuột tương đối ổn định, không bị giảm nhiều sau 14 ngày. Kết quả có sự khác biệt đáng kể so với nhóm ĐC(-) và nhóm chỉ cho uống β -glucan, đặc biệt ở liều 6 mg/kg. Kết quả này tương tự với những nghiên cứu của Bai và ctv (2017). Nhóm tác giả đã đánh giá trọng lượng chuột được trong quá trình xử lý bằng nước muối (đôi chứng),

natri selenite, và SeNPs-M trong 14 ngày liên tiếp và kết luận là sử dụng SeNPs-M liều 2- 8 mg/kg thể trọng không ảnh hưởng nhiều đến tăng trọng của chuột.



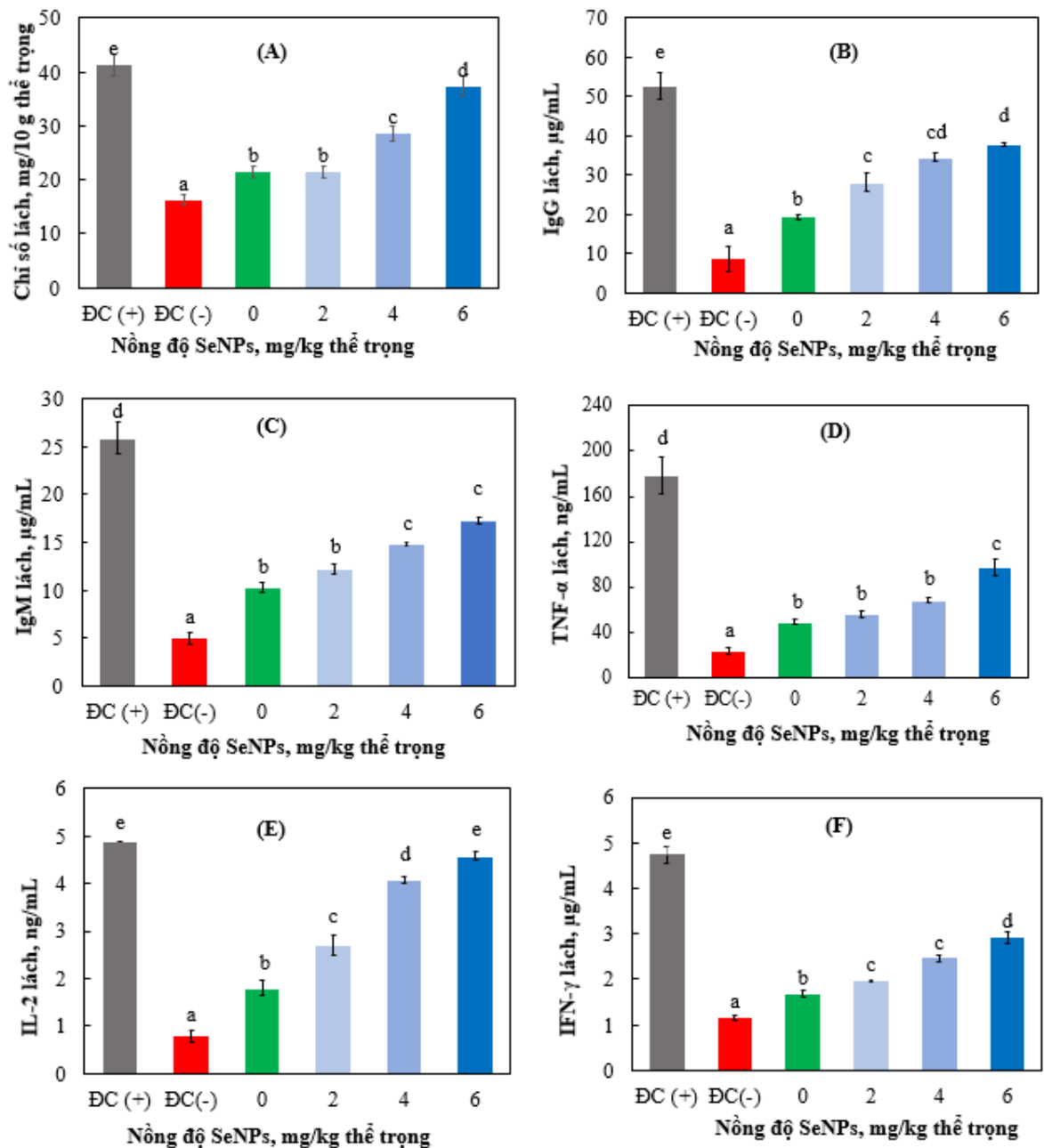
Hình 3.20. Thể trọng chuột sau 14 ngày điều trị với SeNPs/ β -glucan

Giá trị thống kê $p < 0,05$. Trong đó, ĐC(+): chuột khỏe mạnh không gây suy giảm miễn dịch và chỉ cho uống nước cất; ĐC(-): chuột gây suy giảm miễn dịch bằng CTX và chỉ cho uống nước cất, 0, 2, 4, 6 là SeNPs/ β -glucan ở các liều 0 - 6 mg/kg thể trọng

3.4.2. Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đến các chỉ số miễn dịch ở lách trên chuột suy giảm miễn dịch

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan lên các chỉ số miễn dịch ở lách chuột bị suy giảm miễn dịch được thể hiện trong hình 3.21. Kết quả cho thấy, sử dụng CTX gây ức chế miễn dịch chuột đã làm giảm mạnh chỉ số số miễn dịch ở lách của chuột. Giá trị của các chỉ số IgM, IgG, TFN- α , IFN- γ và IL-2 trong lách nhóm chuột ĐC(-) tương ứng chỉ đạt 5,0, 8,7, 23,4, 1,2 và 0,78 g/mL. Các giá trị này thấp hơn nhiều so với nhóm chuột khỏe mạnh không gây suy giảm miễn dịch. Ở các nhóm chuột chỉ cho uống bổ sung β -glucan cũng thấy có tác dụng gia tăng chỉ số lách so với nhóm ĐC(-) nhưng không đáng kể. Trong

khi nhóm chuột uống SeNPs/ β -glucan thấy có sự tăng đáng kể chỉ số này các so với nhóm ĐC (-) và nhóm chỉ cho uống β -glucan, đặc biệt ở liều 6 mg/kg thể trọng. Cụ thể chỉ số lách của chuột nhóm suy giảm miễn dịch CTX đối chứng là 16,3 mg/10 g thể trọng và giá trị này là tăng lên 21,5 - 37,3 mg/10 g tương ứng ở các nhóm cho uống SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 2 - 6 mg SeNPs/kg thể trọng. Nhóm chuột bổ sung SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 2 - 6 mg/kg thể trọng giúp tăng giá trị các chỉ số IgM, IgG, TNF- α , IFN- γ và IL-2 lên lần lượt 12,2 - 17,3, 28,2 - 37,8, 56,2 - 97,2, 2,0 - 2,9 và 2,7 - 4,6 μ g/mL. Giá trị đạt cao nhất của các chỉ số này được xác định ở nhóm chuột được cho uống 6 mg/kg, đặc biệt ở chỉ số lách và chỉ số IL-2 ở lách ghi nhận được gần như tương đương với nhóm chuột khỏe mạnh không gây suy giảm miễn dịch (ĐC(+)). Nghiên cứu của Yazdi và ctv (2012) và Raahati và ctv (2020) cũng đã báo cáo bổ sung SeNPs ở nồng độ 100 μ g mỗi ngày giúp tăng đáng kể các chỉ số điều hòa miễn dịch tế bào (granzyme B, IFN- γ và IL-2) trong tế bào lá lách của chuột mang khối u.



Hình 3.21. Ảnh hưởng của nồng độ SeNPs/ β -glucan lên các chỉ số miễn dịch trên lách ở chuột bị gây suy giảm miễn dịch

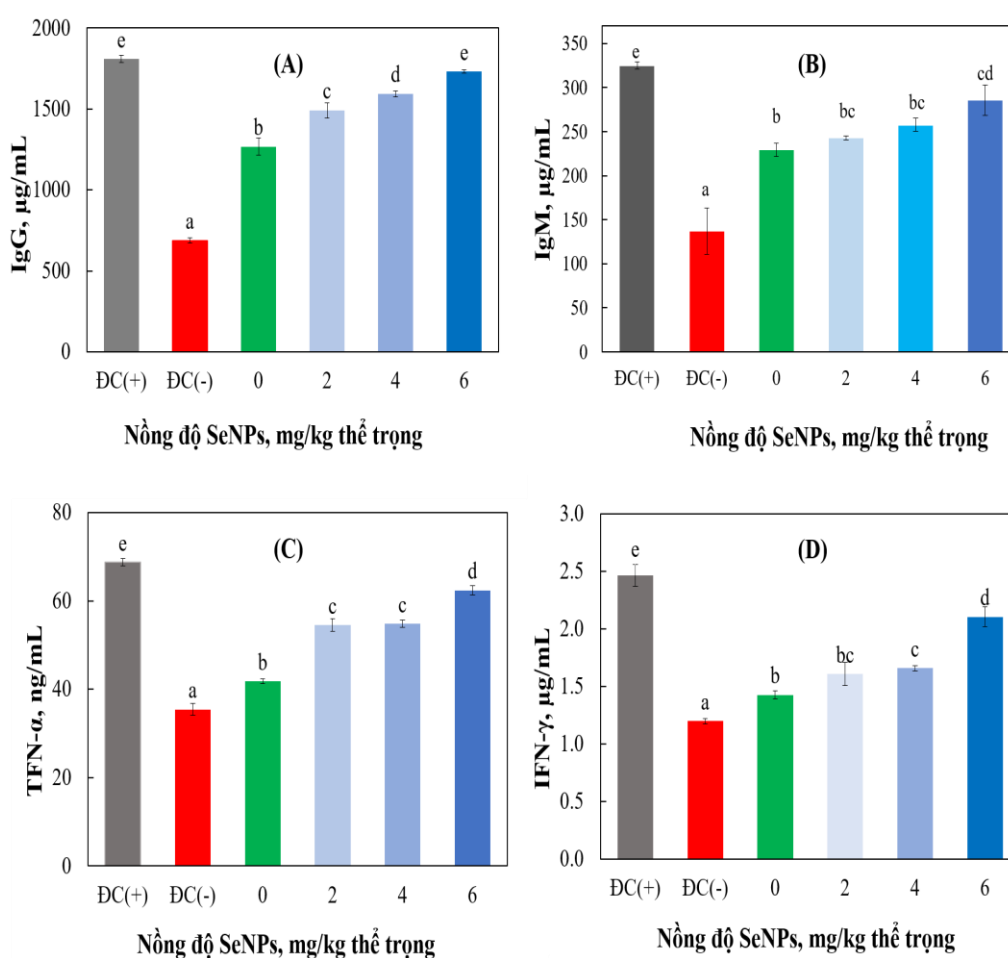
Những ký tự giống nhau thì sai khác không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Trong đó, A: Chỉ số lách, B: chỉ số IgG, C: Chỉ số IgM, D: Chỉ số TNF- α , E: Chỉ số IL-2, F: IFN- γ . ĐC(+): chuột khỏe mạnh không gây suy giảm miễn dịch và chỉ cho uống nước cất; ĐC(-): chuột gây suy giảm miễn dịch bằng CTX và chỉ cho uống nước cất.

Trong cơ thể, lá lách là một cơ quan quan trọng trong hệ thống miễn dịch, là một tổ chức lympho ngoại vi lớn, là nơi trú ngụ của các lympho bào (tế bào lympho B và T) và đại thực bào. Đây cũng là nơi tập trung kháng nguyên, nhất là các kháng nguyên vào cơ thể bằng đường máu. Sau khi xâm nhập và được đại thực bào xử lý, kháng nguyên sẽ kích thích các tế bào lympho B tại lách phân chia, biệt hóa thành tương bào và sản xuất kháng thể để loại trừ kháng nguyên đó. Sự tăng sinh tế bào lách là một điểm quan trọng trong chuỗi kích hoạt của cả tế bào và đáp ứng miễn dịch dịch thể (Zhang và ctv, 2020). Tế bào lympho T chịu trách nhiệm về miễn dịch tế bào và tế bào lympho B là chỉ những tế bào có khả năng tạo ra phản ứng miễn dịch dịch thể. Việc kích thích tăng sinh chỉ số lách và các tế bào ở lách lách có thể kích hoạt hệ thống miễn dịch (Chen và ctv, 2019). Kết quả đánh giá chỉ số miễn dịch ở lách cho thấy, SeNPs/ β -glucan đã giúp đẩy nhanh quá trình phục hồi kích thước lá lách và chỉ số lá lách ở những con chuột bị ức chế miễn dịch do CTX gây ra. SeNPs/ β -glucan cũng thúc đẩy sự tăng sinh các chỉ miễn dịch ở lách và kết quả cho thấy sự tăng lên các chỉ số lách phụ thuộc vào liều lượng. Ở liều 6 mg/kg SeNPs/ β -glucan cho thấy khả năng phục hồi các chỉ số miễn dịch ở lách tốt nhất.

3.4.2. Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đến các chỉ số cytokine và immunoglobulin trên chuột suy giảm miễn dịch

Thông thường, các phân tử miễn dịch bao gồm các immunoglobulins là các yếu tố chính trong hệ thống miễn dịch của cơ thể bên cạnh các tế bào và cơ quan miễn dịch. Cytokine là sản phẩm của các tế bào miễn dịch, hoạt động như các chất trung gian tế bào và điều hòa các quá trình miễn dịch. TNF- α , được tiết ra chủ yếu bởi đại thực bào và bạch cầu đơn nhân, tham gia chính vào việc điều hòa các phản ứng viêm thông thường và khả năng tự miễn dịch (Yu và ctv, 2019) IFN- γ , chủ yếu được sản xuất bởi tế bào NK và Th1 (CD4+), được coi là một phần của đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch đặc hiệu (Ding và ctv, 2019). Kết quả thể hiện ở hình 3.22, cho thấy việc xử lý CTX gây ra sự ức chế hoạt động qua trung gian tế bào miễn dịch, làm giảm nồng độ chỉ số cytokine và

immunoglobulin như IgG, IgM, TNF- α và IFN- γ của chuột, nhóm chuột cho uống bổ sung β -glucan (không có SeNPs) và SeNPs/ β -glucan với nồng độ 2 - 6 mg/kg thể trọng đều có tác dụng gia tăng các chỉ số IgG, IgM, TNF- α và IFN- γ . Tuy nhiên ở nhóm chuột cho uống bổ sung SeNPs/ β -glucan 2 - 6 mg/kg thì mức độ gia tăng các chỉ số trên cao hơn nhiều so với nhóm đối chứng suy giảm miễn dịch và nhóm chỉ cho uống β -glucan, cụ thể, tăng nồng độ các chỉ số IgG, IgM, TNF- α và IFN- γ tăng tương ứng từ 687,3 lên 1491 - 1730 μ g/mL, 137,1 lên 243 - 285,7 μ g/mL, 35,5 lên 54,6 - 62,4 μ g/mL và từ 1,2 lên 1,6 - 2,11 μ g/mL.



Hình 3.22. Ảnh hưởng của nồng độ SeNPs/ β -glucan lên các chỉ số miễn dịch dịch thể trong huyết thanh ở chuột bị gây suy giảm miễn dịch

Những ký tự giống nhau thì sai khác không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Trong đó, A: Chỉ số IgG, B: Chỉ số IgM, C: Chỉ số TNF- α , D: chỉ số IFN- γ . DC(+): chuột khỏe mạnh không gây suy giảm miễn dịch và chỉ cho uống nước cất; DC(-): chuột gây suy giảm miễn dịch bằng CTX và chỉ cho uống nước cất

Kết quả nghiên cứu cho thấy việc tăng các chỉ số cytokine và immunoglobulin phụ thuộc vào liều lượng. Mức tăng cao nhất của các chỉ số này được tìm thấy ở nhóm chuột được bổ sung SeNPs 6 mg/kg thể trọng với hàm lượng gần như tương đương với nhóm chuột khỏe mạnh không gây suy giảm miễn dịch (ĐC(+)). Kết quả này chứng minh SeNPs/ β -glucan có thể tăng cường hoạt động miễn dịch thông qua điều chỉnh tăng chỉ số cytokine và immunoglobulin ở chuột bị ức chế miễn dịch.

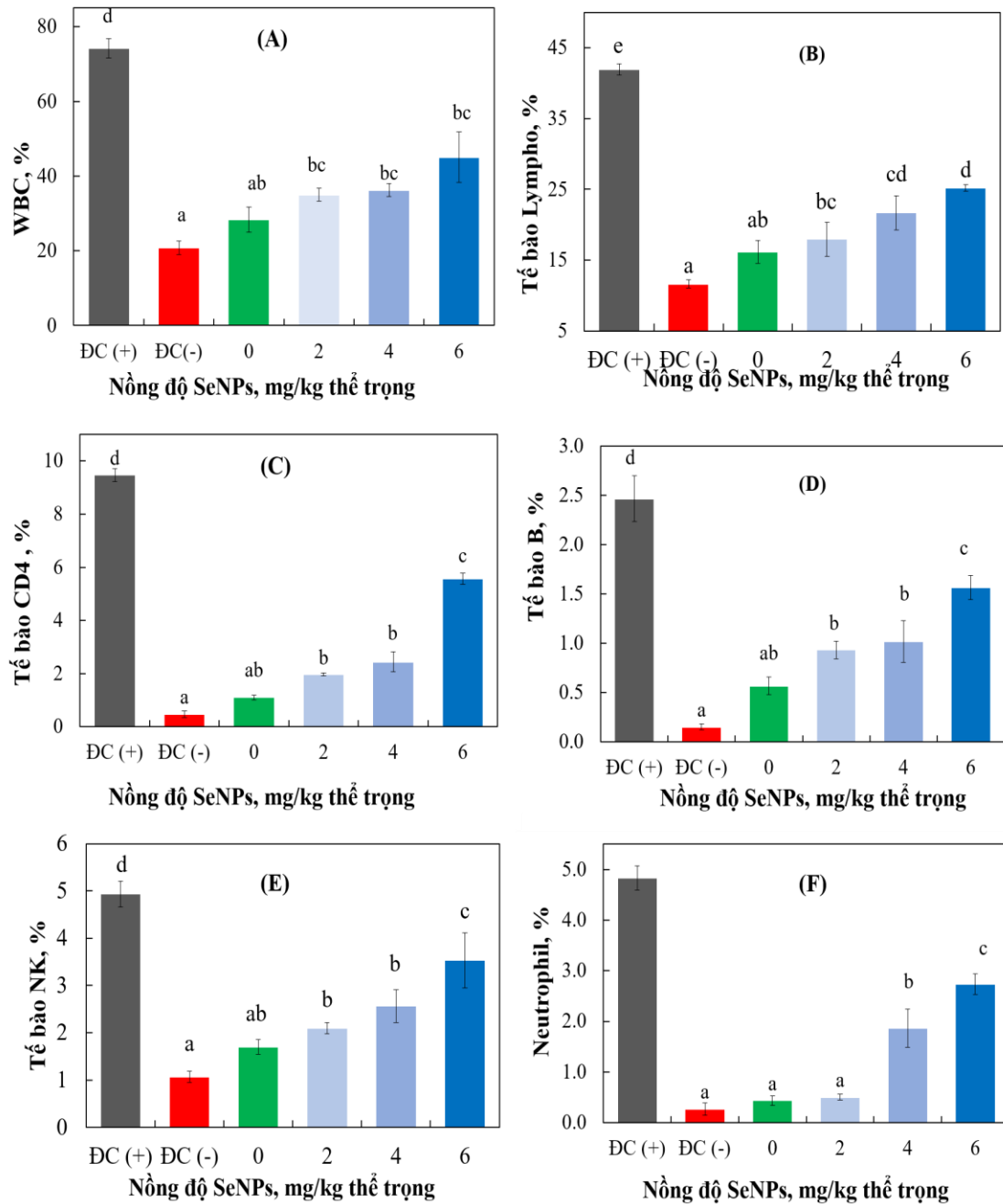
Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với một số nghiên cứu liên quan. Yazdi và ctv (2012) đã cho thấy, việc bổ sung đường uống SeNPs cho thấy khả năng sản xuất các cytokine IFN- γ và TNF- α tăng ở chuột mang khối u, và mức sản xuất IL-12 như một tác nhân CD4+ là cũng được tăng lên đáng kể so với những con chuột đối chứng. Nghiên cứu chỉ ra được tỷ lệ sống sót của những con chuột được điều trị với SeNPs/ β -glucan cao hơn đáng kể so với đối chứng.

3.4.3. Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đến các chỉ số miễn dịch tế bào trong máu ngoại vi

Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan ở các nồng độ khác nhau đối với các chỉ số miễn dịch tế bào trong máu ngoại vi của chuột thử nghiệm được thể hiện ở hình 3.23. Kết quả có thể thấy việc bổ sung SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 2 - 6 mg/kg thể trọng qua đường uống giúp tăng chỉ số bạch cầu tổng số WBC trong máu ngoại vi của chuột bị ức chế miễn dịch do CTX gây ra. So với hàm lượng WBC trong máu ngoại vi ở nhóm chuột suy giảm miễn dịch đối chứng ĐC(-) (20,8%), việc bổ sung SeNPs/ β -glucan nồng độ 4 - 6 mg/kg thể trọng giúp tăng hàm lượng tế bào này lên 35 - 45,1%. Ngoài ra, kết quả khảo sát chỉ số tế bào bạch cầu cũng cho thấy tỷ lệ tế bào bạch cầu trung tính, tế bào lympho, tế bào B, tế bào CD4+ và tế bào NK cũng tăng đáng kể trong máu ngoại vi ở các nhóm chuột bị ức chế miễn dịch được bổ sung 4 - 6 mg SeNPs/ β -glucan. Cụ thể tế bào bạch cầu trung tính tăng từ 0,27% đến 1,87 - 2,73%, tế bào lympho tăng từ 11,6% đến 21,7 - 25,2%, tế bào B tăng từ 0,15% đến 1,02 - 1,57%, tế bào CD4+ tăng từ 0,47% lên 1,97 - 5,57% và tế bào NK tăng từ 1,07% lên 2,57 - 3,53%.

Kết quả này tương tự kết quả của Song và ctv, 2021. Nhóm tác giả đã báo cáo SeNPs có thể tăng chỉ số miễn dịch của các tế bào khác nhau, cụ thể giúp tăng cường sự tăng sinh các tế bào T: tế bào Th1 (CD4+), tế bào cytotoxic T cells (CD8+), tế bào $\gamma\delta$ và tế bào NK. Do đó có thể thúc đẩy sự phát triển của chiến lược trị liệu miễn dịch hiệu quả. Chen và ctv (2022) cũng cho rằng liệu pháp miễn dịch dựa trên tế bào NK là một chiến lược đầy hứa hẹn để khắc phục những trở ngại trong điều trị bệnh, nhất là ung thư (Chen và ctv, 2022). IFN- γ là một cytokine có vai trò quan trọng trong kích hoạt các tế bào NK, tăng cường miễn dịch ức chế các tế bào ung thư và nhiễm virus. IL-12 góp phần vào việc kích thích tế bào NK và CD4+ sản xuất IFN- γ . TNF- α , IL-2 cần thiết cho sự phát triển và chức năng của tế bào và thường được cơ thể sản xuất trong quá trình đáp ứng miễn dịch.

Trong máu ngoại vi, các tế bào bạch cầu (WBC) là một phần rất quan trọng trong hệ miễn dịch của động vật để kháng lại các yếu tố tác động bên ngoài và sự biệt hóa của WBC cũng ảnh hưởng đến các phản ứng miễn dịch. Tế bào T là một trong những tế bào lympho bạch cầu thiết yếu nhất đóng vai trò quan trọng nhất trong các phản ứng miễn dịch thích ứng, tham gia bảo vệ cơ thể kháng lại nhiễm trùng, ung thư, viêm nhiễm và các bệnh mãn tính khác. Việc kích hoạt bạch cầu trong máu người đã được chứng minh là tăng khi bổ sung thực phẩm giàu selen (Bentley-Hewitt và ctv, 2014). SeNPs cũng được báo cáo là có khả năng phục hồi WBC ở những con chuột bị ức chế miễn dịch gây ra do bức xạ. Trước đó, Yazdi và ctv (2012) cũng đã chứng minh việc bổ sung hàng ngày 100 μg SeNPs cho chuột giúp gia tăng số lượng bạch cầu bao gồm tổng số tế bào bạch cầu trung tính và tế bào lympho trong máu của những chuột bị chiếu xạ tia X. Shakibaie và ctv (2013) cũng đã nghiên cứu và cho thấy chỉ số WBC ở chuột bình thường đã tăng lên đáng kể khi cho uống với SeNPs ở nồng độ 20 mg/kg thể trọng. Trong khi Duy và ctv (2021) đã báo cáo cho thấy việc sử dụng hàng ngày 20 μg SeNPs/oligochitosan cũng cho thấy tác dụng mạnh mẽ đối với sự phục hồi bạch cầu trong máu của những con chuột chiếu xạ.



Hình 3.23. Ảnh hưởng của nồng độ SeNPs/ β -glucan lên các chỉ số miễn dịch tế bào máu ngoại vi ở chuột bị gây suy giảm miễn dịch

Những ký tự giống nhau thì sai khác không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Trong đó, A: Chỉ số WBC, B: chỉ số tế bào lympho, C: Chỉ số CD4, D: Chỉ số tế bào B, E: Chỉ số tế bào NK, F: Chỉ số Neutrophil. ĐC(+): chuột khỏe mạnh không gây suy giảm miễn dịch và chỉ cho uống nước cất; ĐC(-): chuột gây suy giảm miễn dịch bằng CTX và chỉ cho uống nước cất

Kết quả nghiên cứu cho thấy SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ có thể cải thiện đáng kể các chỉ số miễn dịch tế bào ở máu ngoại vi của chuột bị ức chế miễn dịch do CTX gây ra.

3.4.4. Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan lên các chỉ số miễn dịch trong tủy xương

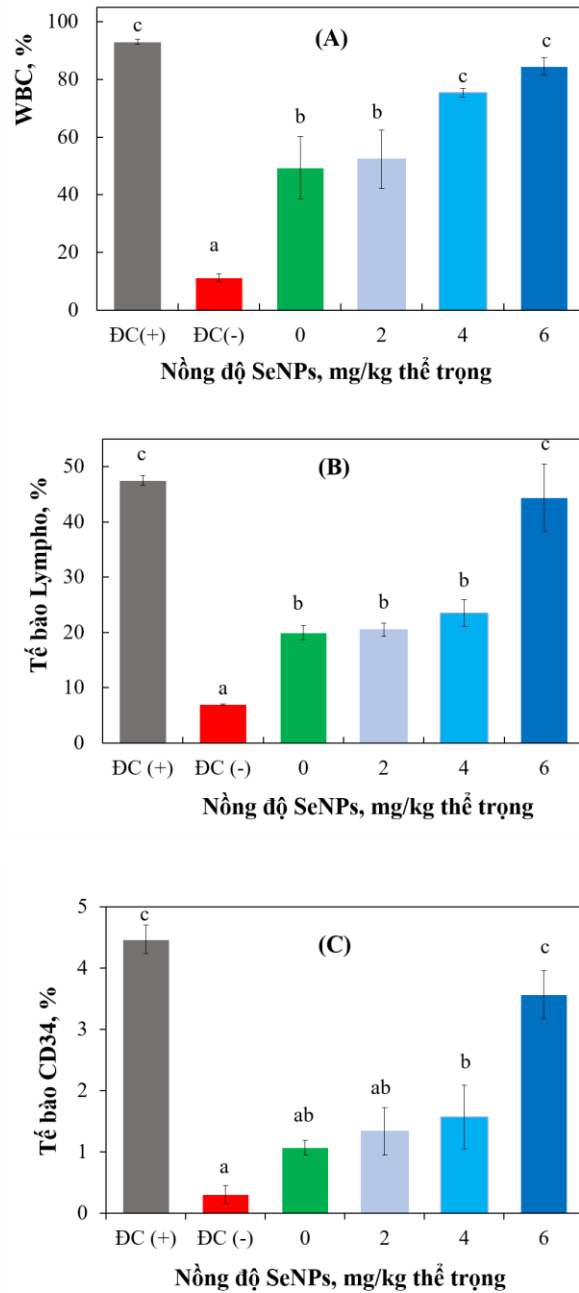
Trong cơ thể người và động vật có vú, tủy xương là cơ quan tạo máu và là cơ quan miễn dịch trung ương quan trọng. Việc ức chế tủy xương là một trong những tác dụng phụ rõ ràng nhất của thuốc hóa trị bao gồm cả điều trị CTX (Han và ctv, 2012). Nhiều nghiên cứu đã cho thấy thời gian tồn tại của bạch cầu trong máu ngoại vi là ngắn và cần được bổ sung liên tục từ tủy xương (Arslan và ctv, 2014). Tới thời điểm hiện nay, hầu như chưa có các nghiên cứu trong và ngoài nước đánh giá khả năng phục hồi các chỉ số miễn dịch trong tủy xương của SeNPs đối với chuột bị ức chế miễn dịch. Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đến chỉ số cytokine của dịch huyền phù tủy xương của chuột được xử lý bằng CTX đã được đánh giá trong nghiên cứu này.

Kết quả ở hình 3.24 (A) cho thấy, chỉ số WBC trong tủy xương ở những con chuột bị ức chế miễn dịch bằng CTX giảm mạnh. Trong khi chỉ số WBC trong tủy xương của những con chuột được điều trị bằng SeNPs/ β -glucan tăng lên đáng kể. Theo đó, tỷ lệ bạch cầu tổng số trong dịch tủy xương của nhóm đối chứng CTX được xác định là 11,2% và tỷ lệ này ở nhóm được cho uống với 2; 4 và 6 mg SeNPs/ β -glucan tăng lên lần lượt lên 52,3; 75,5 và 84,6% (hình 3.24). Ở nghiệm thức khi cho chuột uống SeNPs/ β -glucan với liều 4 - 6 mg/kg thể trọng thì chỉ số WBC phục hồi gần như hoàn toàn.

Bên cạnh đó, lymphocytes bao gồm: tế bào T, tế bào B và tế bào đóng vai trò quan trọng trong hệ thống miễn dịch thích ứng đối với hầu như các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn, vi rút và ung thư ở người cũng như ở động vật có vú. Đồng thời chúng cũng giúp hệ thống miễn dịch của cơ thể “ghi nhớ” và chống lại sự tái xâm nhiễm của các bệnh trên trong tương lai. Kết quả ở hình 3.24 (B) có thể thấy chỉ số lymphocytes trong tủy xương ở nhóm chuột không bị ức chế miễn

dịch (ĐC(+)) đo được là 47,5%, giảm còn 6,97% ở nhóm chuột bị ức chế miễn dịch (ĐC(-)). Khi bổ sung SeNPs ở nồng độ 2 - 4 mg/kg chỉ số lymphocytes có sự tăng lên, tuy nhiên chỉ số này tăng lên chưa cao, chỉ đạt 20,5; 23,5% tương ứng. Điều này có thể giải thích do lymphocytes chiếm tỷ lệ cao nhất trong tổng số lượng bạch cầu của cơ thể nên chúng chịu ảnh hưởng lớn nhất đối với quá trình hoá trị nói chung và hoá trị bằng CTX nói riêng. Tuy nhiên khi tăng nồng độ SeNPs lên 6 mg SeNPs/kg thể trọng chuột đã có tác dụng phục hồi một cách đáng kể chỉ số lymphocyte trong tuỷ xương ở nhóm chuột bị ức chế miễn dịch. Cụ thể, chỉ số lymphocyte đạt 44,4%. Kết quả cho thấy phục hồi gần như hoàn toàn khi so sánh với nghiệm thức ĐC(+). Trong nghiên cứu của Yazdi và ctv (2013) sau 30 ngày cho uống SeNPs/ β -glucan sự hồi phục của tế bào bạch cầu lympho và bạch cầu trung tính ở chuột bị ức chế miễn dịch bởi bức xạ.

CD34+ là một glycoprotein xuyên màng, được xem như là một dấu hiệu để nhận biết các tế bào gốc tạo máu (Hematopoietic stem cells-HSC) ở người và động vật có vú. Sự biệt hoá HSC tạo các tế bào máu trưởng thành như: hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu và tế bào lympho, những tế bào này giữ vai trò quan trọng trong hệ thống miễn dịch cũng như trong hoạt động sống của cơ thể động vật nói chung (Pei và ctv, 1999). Các tế bào CD34+ thường bị suy giảm nghiêm trọng dưới tác động của hoá chất trong quá trình hoá trị. Kết quả từ hình 3.24 (C) cho thấy chỉ số tế bào CD34+ của nhóm chuột bị ức chế miễn dịch bởi CXT được xác định là 0,3%, giảm gần 15 lần so với nhóm chuột bình thường (4,47%). Điều trị bằng SeNPs/ β -glucan với nồng độ 2 - 6 mg/kg thể trọng chuột trong 14 ngày giúp hồi phục một cách đáng kể chỉ số tế bào CD34+ trong tuỷ xương chuột. Đặc biệt, SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 6 mg/kg thể trọng cho hiệu quả phục hồi tốt nhất chỉ số tế bào CD34+ (3,6%) ở chuột được thử nghiệm.



Hình 3.24. Ảnh hưởng của nồng độ SeNPs/ β -glucan lên các chỉ số miễn dịch trong tủy xương ở chuột bị gây suy giảm miễn dịch

Những ký tự giống nhau thì sai khác không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). A: Chỉ số WBC trong tủy xương, B: chỉ số lymphocyte trong tủy xương, C: Chỉ số CD34 trong tủy xương. Những ký tự giống nhau thì sai khác không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). ĐC(+): chuột khỏe mạnh không gây suy giảm miễn dịch và chỉ cho uống nước cất; ĐC(-): chuột gây suy giảm miễn dịch bằng CTX và chỉ cho uống nước cất.

Kết quả thu được cho thấy SeNPs/ β -glucan được tổng hợp bằng chiếu xạ đã cải thiện đáng kể sự tăng sinh tế bào miễn dịch trong tủy xương, điều này rất quan trọng để duy trì liên tục các chỉ số miễn dịch tế bào và miễn dịch dịch thể trong máu ngoại vi của chuột bị ức chế miễn dịch. Nồng độ thích hợp để bổ sung SeNPs/ β -glucan qua đường uống được xác định là 6 mg/kg thể trọng chuột.

Ở người, điều hòa miễn dịch rất quan trọng để bảo vệ chống lại một số bệnh, bao gồm ung thư. Hầu hết các loại thuốc hóa trị liệu ức chế ung thư như CTX, gemcitabine, và 5-fluorouracil v.v, đều gây ra tác dụng gây ức chế miễn dịch, có thể đe dọa tính mạng. Các tác dụng ức chế tế bào ung thư của CTX tỷ lệ thuận với lượng CTX dùng và thường dẫn đến ức chế miễn dịch và tác dụng gây độc tế bào. Do đó việc sử dụng sản phẩm sinh học làm giảm tác dụng phụ của thuốc điều trị ung thư là rất quan trọng để cải thiện chức năng miễn dịch của bệnh nhân ung thư.

Hệ thống miễn dịch của cơ thể bao gồm các cơ quan miễn dịch (lá lách, tủy xương, tuyến ức, hạch bạch huyết, amidan, v.v.), tế bào miễn dịch (tế bào bạch huyết, tế bào thực bào, v.v.) và các phân tử miễn dịch (cytokine, immunoglobulin, lysozyme, v.v.) (Yu và cộng sự, 2019). Phản ứng miễn dịch của vật chủ được tạo thành từ miễn dịch bẩm sinh (miễn dịch tự nhiên) và miễn dịch thích ứng (miễn dịch thích nghi), phụ thuộc vào một số cơ quan miễn dịch quan trọng như tuyến ức và lá lách (Zhang, Wang, Lai, & Wu, 2016). Tuyến ức và lá lách là hai cơ quan có tác dụng kháng khuẩn và chống nấm quan trọng cơ quan phản ứng miễn dịch, kết hợp hệ thống miễn dịch bẩm sinh và hệ thống miễn dịch thích ứng trong một tổ chức duy nhất. Đây là cơ quan được gọi là các chỉ số ban đầu phản ánh khả năng miễn dịch. Miễn dịch bẩm sinh bao gồm các hàng rào biểu mô, hệ thống thực bào (tế bào trung tính và đại thực bào), tế bào NK và các protein. Miễn dịch thích ứng bao gồm các tế bào lympho và các sản phẩm của chúng. Tế bào lympho B được xem là trụ cột của hệ thống miễn dịch thích ứng. Sau khi nhận biết kháng nguyên, tế bào lympho B sẽ tăng sinh và biệt hóa thành tương bào, bắt đầu sản xuất ra kháng thể Ig kháng thể chuyên biệt

dưới dạng protein hòa tan. Các kháng thể - gọi là các Globulin miễn dịch (IgA, IgM, IgG) đảm nhiệm chức năng nhận biết, có thể nhanh chóng phát hiện mầm bệnh và các chất lạ có khả năng gây hại (kháng nguyên lạ), sau đó gắn vào chúng tạo ra phức hợp kháng nguyên - kháng thể được gọi là phức hợp miễn dịch, làm vô hiệu hóa các kháng nguyên và tạo điều kiện cho các đại thực bào tới dọn dẹp, giải phóng chúng ra khỏi cơ thể. Từ đó giúp cơ thể tiêu diệt các tác nhân gây bệnh.

Tế bào lympho T được sản xuất trong tủy xương sau đó di chuyển đến tuyến ức (thymus), thuộc nhóm các tế bào bạch cầu, chịu trách nhiệm nhận diện, phá hủy, đào thải các tế bào bị nhiễm bệnh ra khỏi cơ thể. Khi một mầm bệnh được tìm thấy, các tế bào lympho T sẽ được nhân lên nhanh chóng và phát triển thành các tế bào chuyên biệt, tạo ra các phản ứng phòng thủ, tiêu diệt và loại bỏ các tác nhân ra khỏi cơ thể. Tăng sinh tế bào T dẫn đến tỷ lệ Th1/Th2 tăng, giúp kích hoạt quá trình đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và miễn dịch dịch thể. Tế bào Th1 và Th2 sản xuất ra các cytokine đặc hiệu để kiểm soát trực tiếp và gián tiếp phản ứng miễn dịch đặc hiệu, cụ thể các cytokine IL-2, IFN- γ và TNF- α được điều hòa bởi các tế bào Th1. Cytokine rất quan trọng trong phản ứng miễn dịch và đóng vai trò then chốt trong cuộc chiến chống lại sự phát triển của khối u và vi khuẩn.

Trong nghiên cứu này, các tác dụng tăng cường miễn dịch của SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ trên mô hình chuột BALB/c bị ức chế miễn dịch do CTX gây ra đã được đánh giá thành công. Từ các kết quả trên cho thấy, khi tiêm CTX liều 100 mg/kg thể trọng/ngày tiêm phúc mạc liên tục trong 3 ngày đã làm chuột bị suy giảm rõ rệt trọng lượng cơ thể, và các chỉ số miễn dịch ở lách, máu ngoại vi và cả trong tủy xương. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, khi chuột được điều trị bằng SeNPs/ β -glucan sau 14 ngày đã giúp ổn định được trọng lượng chuột, tăng khối lượng lách cải thiện hiệu quả các chỉ số miễn dịch ở các cơ quan miễn dịch trên mô hình chuột bị ức chế miễn dịch bởi CTX. Cụ thể chỉ số lách ở các nghiệm thức bổ sung SeNPs/ β -

glucan so với nhóm suy giảm miễn dịch CTX đối chứng tăng lên đáng kể. Nhóm chuột bổ sung SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 2 - 6 mg/kg thể trọng có thể tăng cường thúc đẩy, kích thích sự tiết ra các cytokine IL-2, TNF- α , IFN- γ và các immoglobulin IgG và IgM ở chuột bị suy giảm miễn dịch do CTX gây ra để khôi phục hệ thống miễn dịch và cân bằng tế bào Th1 và Th2. SeNPs/ β -glucan giúp tăng cường miễn dịch dịch thể và kích thích tạo các kháng thể IgA, IgG và IgM giúp cơ thể tiêu diệt các tác nhân gây bệnh. Các kháng thể này đảm nhận chức năng nhận biết, kết hợp đặc hiệu với kháng nguyên, tạo tủa, ngưng kết và hoạt hóa hệ miễn dịch không đặc hiệu. Do đó SeNPs có thể tăng cường hoạt động của các tế bào miễn dịch như tế bào T và tế bào B. Khả năng điều chỉnh sản xuất các cytokine tiền viêm (như TNF- α , IL-6) từ đó điều chỉnh phản ứng miễn dịch. Điều này giúp cơ thể phản ứng nhanh và hiệu quả hơn với các tác nhân gây bệnh, giúp tăng cường miễn dịch cơ thể.

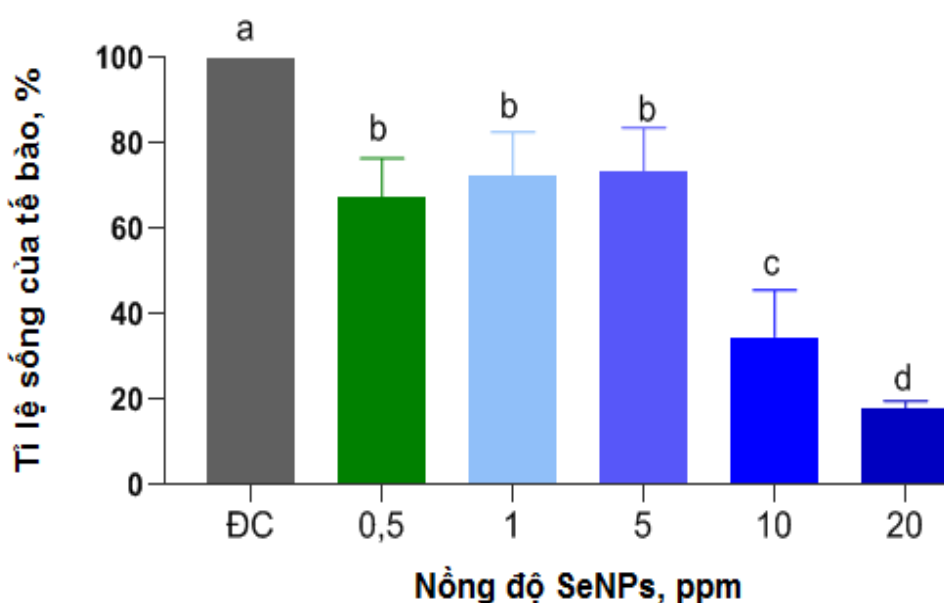
Tóm lại, chế phẩm SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ đã cho thấy rõ khả năng tác động kích thích tăng cường miễn dịch. Bằng cách tương tác trực tiếp với các tế bào miễn dịch bẩm sinh, chẳng hạn như đại thực bào, tế bào NK, các hạt SeNPs/ β -glucan có thể điều chỉnh khả năng miễn dịch bẩm sinh để ngăn chặn sự phát triển của bệnh, được báo cáo là thúc đẩy các phương pháp điều trị chống ung thư, chống nhiễm trùng và chống viêm. Hơn nữa, các hạt SeNPs cũng có thể kích hoạt và phục hồi các tế bào T khác nhau để điều chỉnh miễn dịch thích ứng nhằm tăng cường khả năng gây độc tế bào để chống lại các tế bào ung thư. Điều này cho thấy tiềm năng của các hạt SeNPs đối với sự phát triển liệu pháp miễn dịch mới, đặc biệt là điều trị ung thư trong liệu pháp miễn dịch điều khiển các thành phần miễn dịch khác nhau để nhắm mục tiêu và loại bỏ các tác nhân gây bệnh như tế bào ung thư hoặc làm giảm các triệu chứng mà không tồn tại khả năng kháng thuốc. Khi hệ miễn dịch hoạt động hiệu quả, nó có thể nhận diện và tiêu diệt các tế bào ung thư khi chúng mới hình thành. Điều này giúp ngăn chặn sự phát triển và lan rộng của ung thư. Do đó

SeNPs/ β -glucan có thể là một ứng cử viên đầy hứa hẹn trong ứng dụng phát triển sản phẩm hỗ trợ kiểm soát bệnh tật, nhất là ung thư.

3.5. Hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan HepG2 của SeNPs/ β -glucan

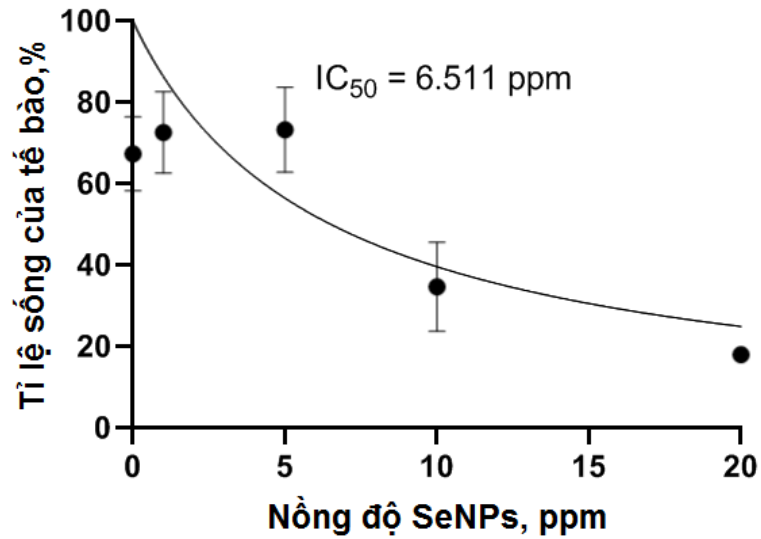
3.5.1. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan HepG2

Muối MTT khi được vận chuyển vào trong tế bào sẽ bị khử ở ty thể bởi enzyme mitochondria reductase tạo ra sản phẩm là formazan ở dạng tinh thể màu tím hấp thụ cực đại hấp thụ ở 540 nm. Formazan sau khi tổng hợp được tích lũy trong ty thể, giải phóng ra ngoài khi phá vỡ tế bào và được hòa tan trong DMSO. Formazan giải phóng ra sẽ được xác định bằng phương pháp đo mật độ quang. Khả năng khử MTT thành formazan của tế bào cho thấy sự nguyên vẹn của ty thể, hay sự sống sót của tế bào. Do vậy, nếu tế bào được nuôi trong môi trường có chất thử nghiệm và MTT, tạo ra cường độ màu của formazan càng đậm chứng tỏ sự sống sót của tế bào càng cao, độc tính của chất thử nghiệm lên tế bào càng thấp.

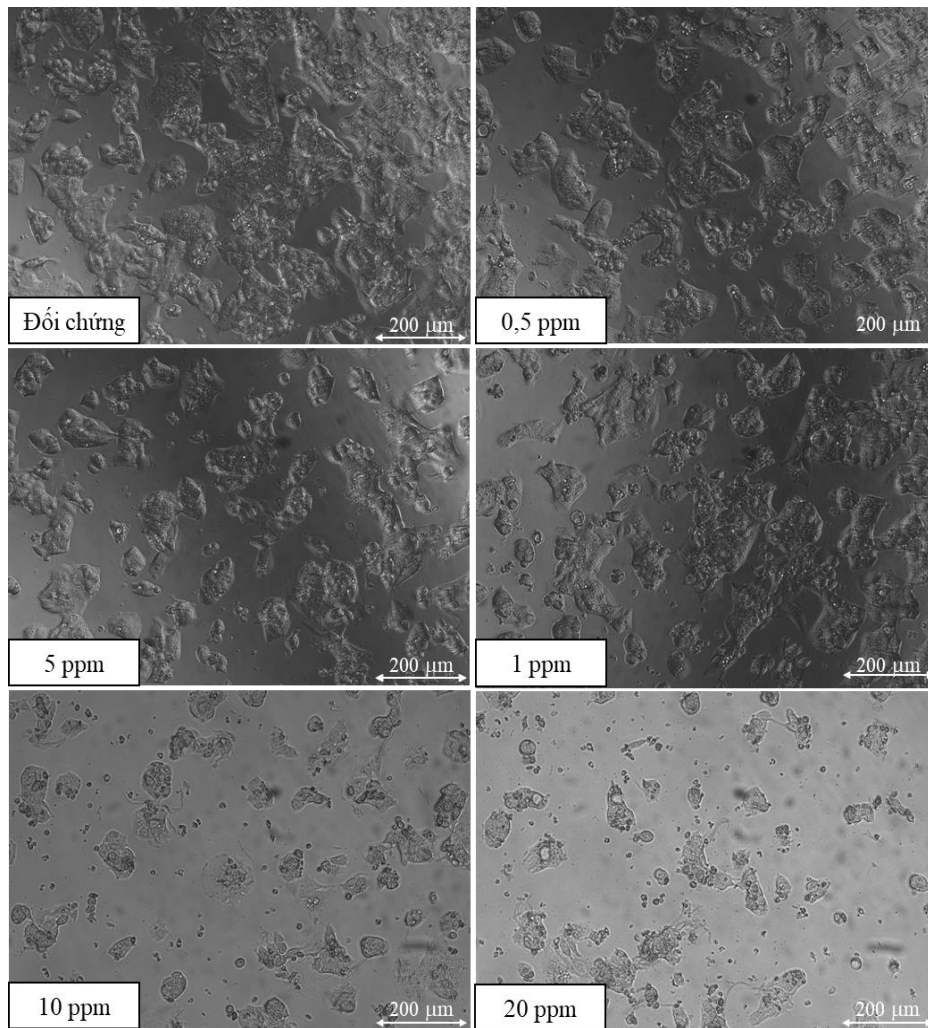


Hình 3.25. Tỉ lệ sống của tế bào HepG2 khi xử lý với các nồng độ SeNPs/ β -glucan khác nhau

Những ký tự giống nhau thì sai khác không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). ĐC: Nghiệm thức đối chứng âm.



Hình 3.26. Giá trị IC_{50} của SeNPs/ β -glucan trên tế bào ung thư gan HepG2



Hình 3.27. Tế bào ung thư gan HepG2 khi xử lý với các nồng độ SeNPs/ β -glucan khác nhau.

Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan HepG2 của SeNPs/ β -glucan bằng phương pháp MTT được thể hiện ở hình 3.25. Kết quả cho thấy sự tăng sinh của tế bào ung thư gan HepG2 giảm dần khi tăng nồng độ SeNPs/ β -glucan. Ở các nghiệm thức với nồng độ SeNPs/ β -glucan 0,5 - 5 ppm gần như chưa thể hiện tác dụng ức chế tăng sinh tế bào HepG2, tỉ lệ tế bào sống đạt trên 70% và kết quả ở các nghiệm thức này không khác biệt ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên ở các nghiệm thức với nồng độ SeNPs cao hơn, khả năng sống sót của các tế bào đã giảm đáng kể, có khác biệt nhiều so với đối chứng. Từ nồng độ SeNPs/ β -glucan 10 ppm trở đi, sự tăng sinh của tế bào HepG2 giảm mạnh và tỉ lệ sống tế bào chỉ còn dưới 50%. Cụ thể nghiệm thức nồng độ 10 và 20 ppm tỉ lệ sống của tế bào HepG2 chỉ còn tương ứng là 34 và 17%. Điều này cho thấy ở nồng độ 20 ppm chế phẩm SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ đã ức chế gần như hoàn toàn tế bào ung thư gan. Giá trị IC_{50} của SeNPs/ β -glucan đối với dòng tế bào ung thư HepG2 là 6,511 ppm (hình 3.26).

Quan sát hình ảnh tế bào dưới kính hiển vi cũng cho thấy sự thay đổi đáng kể hình thái tế bào ở các nồng độ xử lý khác nhau. Ở nồng độ 10 và 20 ppm, tế bào đã không còn bám dính nhau mà có sự co rút và phân mảnh (hình 3.27). Pi và ctv (2013) đã chứng minh việc xử lý với SeNPs đã làm thay đổi các đặc tính cơ học, sinh học của tế bào ung thư, đặc biệt làm giảm đáng kể lực bám dính và modun Young của tế bào của tế bào MCF-7. Nhóm tác giả đã nghiên cứu biểu hiện của các phân tử CD44, cấu trúc và lượng phân tử sợi F-actin. Kết quả cho thấy lực bám dính giảm một phần là do những thay đổi của các phân tử màng tế bào do SeNPs gây ra, chẳng hạn như sự điều hòa giảm các phân tử CD44 xuyên màng. Ngoài ra, sự giảm mô đun Young của các tế bào MCF-7 là do sự mất tổ chức và giảm sự liên kết của phân tử F-actin dạng sợi do SeNP gây ra. Kết quả của nhóm nghiên cứu đã cho thấy màng tế bào có tầm quan trọng trong độc tính do SeNPs gây ra ở tế bào ung thư, có thể được dùng làm mục tiêu tiềm năng cho việc điều trị ung thư bằng SeNPs (Pi và ctv, 2013).

Khảo sát trên dòng nguyên bào sợi L929 khi bổ sung SeNPs/ β -glucan ở các nồng độ tương đương từ 1-20 ppm cho kết quả tỉ lệ sống của tế bào L929 đạt gần 70%. Đặc biệt ở các nghiệm thức bổ sung SeNPs/ β -glucan nồng độ 5 và 10 ppm tỉ lệ tăng sinh tế bào đạt trên 80%. Các kết quả được thể hiện ở hình 3.28. Giá trị IC_{50} của SeNPs/ β -glucan đối với dòng tế bào L929 đạt 48,3 ppm (hình 3.29).

Từ giá trị IC_{50} trên dòng tế bào ung thư và tế bào thường có thể tính được chỉ số chọn lọc SI (selectivity index) để đánh giá tiềm năng ứng dụng và phát triển hướng làm nguyên liệu trong thuốc chống ung thư. Chỉ số chọn lọc SI có thể được định nghĩa là tỷ lệ nồng độ độc hại của một mẫu so với nồng độ hoạt tính sinh học hiệu quả của nó. Giá trị SI càng cao có thể đánh giá hợp chất đó càng có tính chọn lọc cao trong tiêu diệt hoặc ức chế sự phát triển của tế bào ung thư. Ở nghiên cứu này giá trị $SI = 7,4$, điều này cho thấy tiềm năng của SeNPs/ β -glucan là rất lớn cho nghiên cứu phát triển thành thuốc chống ung thư gan. Theo nhận định của Gunawan và ctv (2020), việc đưa ra giá trị SI rất quan trọng để xác định liệu các nghiên cứu tiếp theo có thể được tiếp tục hay không. Weerapreeyakul và ctv (2012) và Sutejo và ctv (2016) đã nghiên cứu và đề xuất giá trị $SI > 3$ là hợp chất có giá trị chọn lọc cao, có thể phân loại những hợp chất có tiềm năng nghiên cứu trong việc ức chế ung thư. Giá trị SI càng cao cho thấy tính chọn lọc mạnh trong việc nhắm mục tiêu vào các tế bào ung thư trong khi giảm thiểu các tác động có hại lên các tế bào bình thường, điều này cũng phù hợp với các tiêu chí do Weerapreeyakul và ctv (2012) và Indrayanto và ctv (2021) khẳng định trong việc đánh giá các hợp chất có tiềm năng ứng dụng điều trị ung thư.

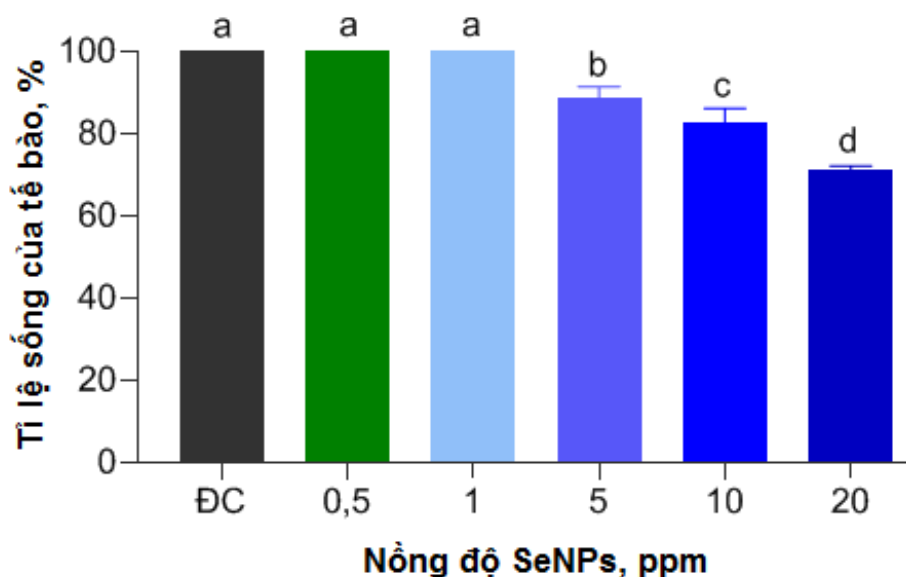
Kết quả thu được có thể nhận định chế phẩm SeNPs/ β -glucan có khả năng ức chế mạnh đối với sự phát triển tế bào ung thư gan HepG2 nhưng không gây độc trên nguyên bào sợi L929 ở các nồng độ dưới 20 ppm. SeNPs/ β -glucan có tính chọn lọc đối với dòng tế bào ung thư và tế bào thường. Do đó có thể xem xét

hướng ứng dụng SeNPs/ β -glucan trong các sản phẩm phòng và hỗ trợ điều trị ung thư trong tương lai.

Bên cạnh đó, hình ảnh quan sát tế bào dưới kính hiển vi cho thấy không có sự thay đổi đáng kể hình thái tế bào L929 ở các nồng độ SeNPs/ β -glucan (hình 3.30). Điều này có thể giải thích rằng SeNP liên quan đến kích thước hoặc tính chất bề mặt của chúng. Kích thước hạt SeNPs/ β -glucan khoảng 92 nm có thể xâm nhập qua các mô ung thư do kích thước các mô của khối u khoảng 100 - 800 nm và ức chế, tiêu diệt chúng nhưng không xâm nhập được vào mô tế bào khỏe mạnh do kích thước các mô tế bào khỏe mạnh nhỏ hơn (khoảng 2 - 6 nm). Màng các tế bào khỏe mạnh có các giới hạn về kích thước và điện tích bề mặt cụ thể có thể ảnh hưởng đến quá trình hấp thụ hạt nano. Bên cạnh đó, lớp phủ bề mặt hoặc các nhóm chức năng của SeNPs có thể ảnh hưởng đến quá trình hấp thụ tế bào của chúng. Các nhóm chức năng liên kết của SeNPs tăng cường khả năng tương thích sinh học hoặc nhắm mục tiêu có thể ảnh hưởng đến mức độ dễ dàng hấp thụ các hạt nano của các loại tế bào cụ thể. Tran và ctv (2009) đã được chứng minh SeNPs có khả năng chọn lọc giữa tế bào bình thường và tế bào ung thư. SeNPs tác dụng ức chế tế bào ung thư và thúc đẩy tế bào khỏe mạnh thông qua quá trình nhập bào và xuất bào, gây ra apoptosis tế bào bằng cách kích hoạt đường dẫn truyền tín hiệu apoptosis (Tran và ctv, 2009). Chen và ctv (2008) cũng khẳng định, bên cạnh hiệu quả chống ung thư độc đáo, SeNPs có tính chọn lọc tốt hơn giữa tế bào bình thường và tế bào ung thư so với Se^{4+} ở nồng độ tương tự. Trong điều trị ung thư, đây là điểm đặc biệt giúp phát triển chiến lược trị liệu mới nhằm nhắm đích, ức chế tế bào ung thư bằng phương pháp chủ động, tăng cường khả năng thẩm thấu tới tế bào đích và hiệu quả lưu giữ, tăng cường khả năng tác động trúng đích. Các hạt nano có kích thước trong phạm vi 10 - 100 nm được coi là lý tưởng vì chúng đủ nhỏ để tránh sự hấp thụ của hệ thống lưới nội mô, nhưng đủ lớn để thoát khỏi quá trình lọc ở thận.

Alam và ctv (2019) đã nghiên cứu cho biết giá trị IC_{50} của SeNPs được tổng hợp bằng chiết xuất lá ổi *Psidium guajava* trên dòng tế bào ung thư gan (HepG2)

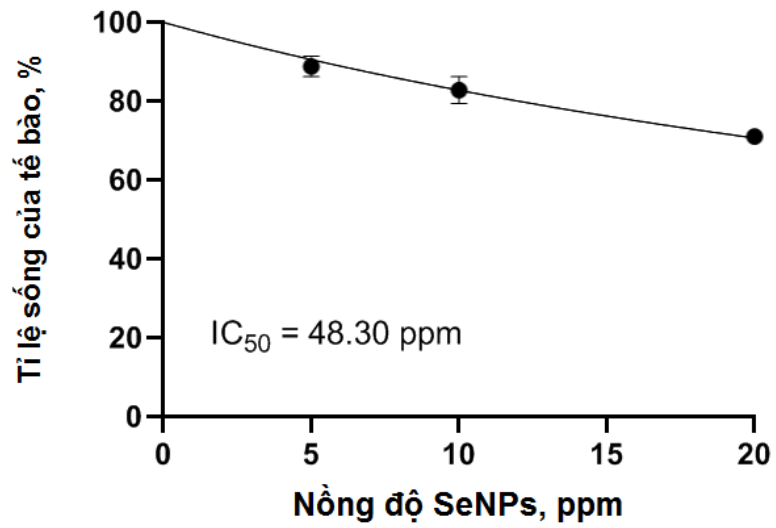
là 25 µg/mL. Cui và ctv (2018) cũng đã nghiên cứu hoạt tính ức chế ung thư trên tế bào HepG2 của SeNPs được tổng hợp bằng cách sử dụng HE (chiết xuất từ táo gai) cho thấy tỉ lệ sống sót của tế bào HepG2 giảm dần khi tăng dần nồng độ HE-SeNPs. Sản phẩm HE-SeNPs cho thấy hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan HepG2 tốt, với IC₅₀ là 19,22 µg/mL. Nghiên cứu cũng cho thấy, HE-SeNPs hầu như không gây độc tế bào đến tế bào HL02 (tế bào gan khỏe mạnh). Indumathy và ctv (2020) cũng đã đánh giá hoạt tính gây độc tế bào HepG2 của SeNPs, với kết quả cho thấy khả năng sống của tế bào HepG2 đạt 33,7 % ở nồng độ 30 µg/mL và nghiên cứu khẳng định tác dụng gây độc tế bào ung thư phụ thuộc vào liều lượng (Indumathy và ctv, 2020).



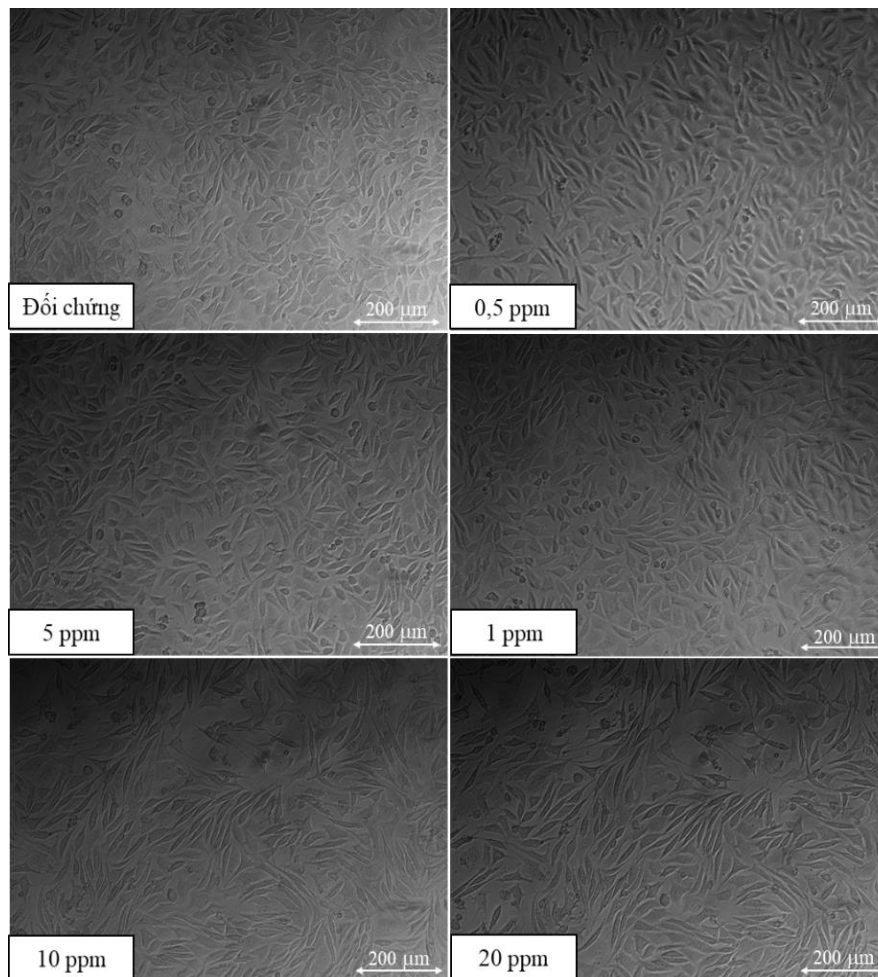
Hình 3.28. Tỉ lệ sống của nguyên bào sợi L929 khi xử lý SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 1 - 20 ppm.

Những ký tự giống nhau thì sai khác không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Trong đó, ĐC: Nghiệm thức đối chứng âm;



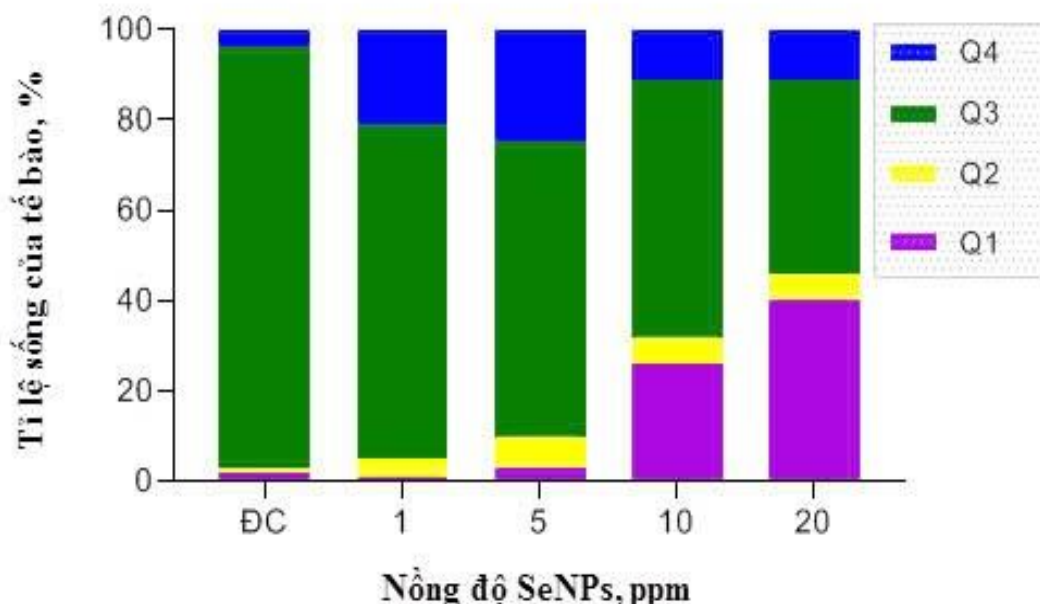
Hình 3.29. Giá trị IC_{50} của SeNPs/ β -glucan trên nguyên bào sợi L929



Hình 3.30. Nguyên bào sợi L929 khi xử lý SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 1 - 20 ppm

Như vậy kết quả khảo sát bước đầu có thể thấy SeNPs/ β -glucan có tiềm năng ứng dụng trong hỗ trợ phòng và điều trị ung thư. Kết quả này cao hơn kết quả của một số nghiên cứu SeNPs gần đây trên dòng tế bào ung thư gan.

3.5.2. Kết quả khả năng cảm ứng apoptosis tế bào ung thư



Hình 3.31. Tỷ lệ sống tế bào HepG2 phân bố các vùng khác nhau sau khi xử lý với SeNPs/ β -glucan

Tỷ lệ tế bào HepG2 phân bố ở các vùng được xác định bằng phương pháp nhuộm kép Annexin V-FITC/7AAD và phân tích trên hệ thống máy Flow cytometry FACS Aria III. Trong đó, ĐC: Nghiệm thức đối chứng (xử lý với H₂O). Q1- tế bào apoptosis sớm, Q2- tế bào apoptosis muộn; Q3- tế bào sống, Q4- tế bào necrosis.

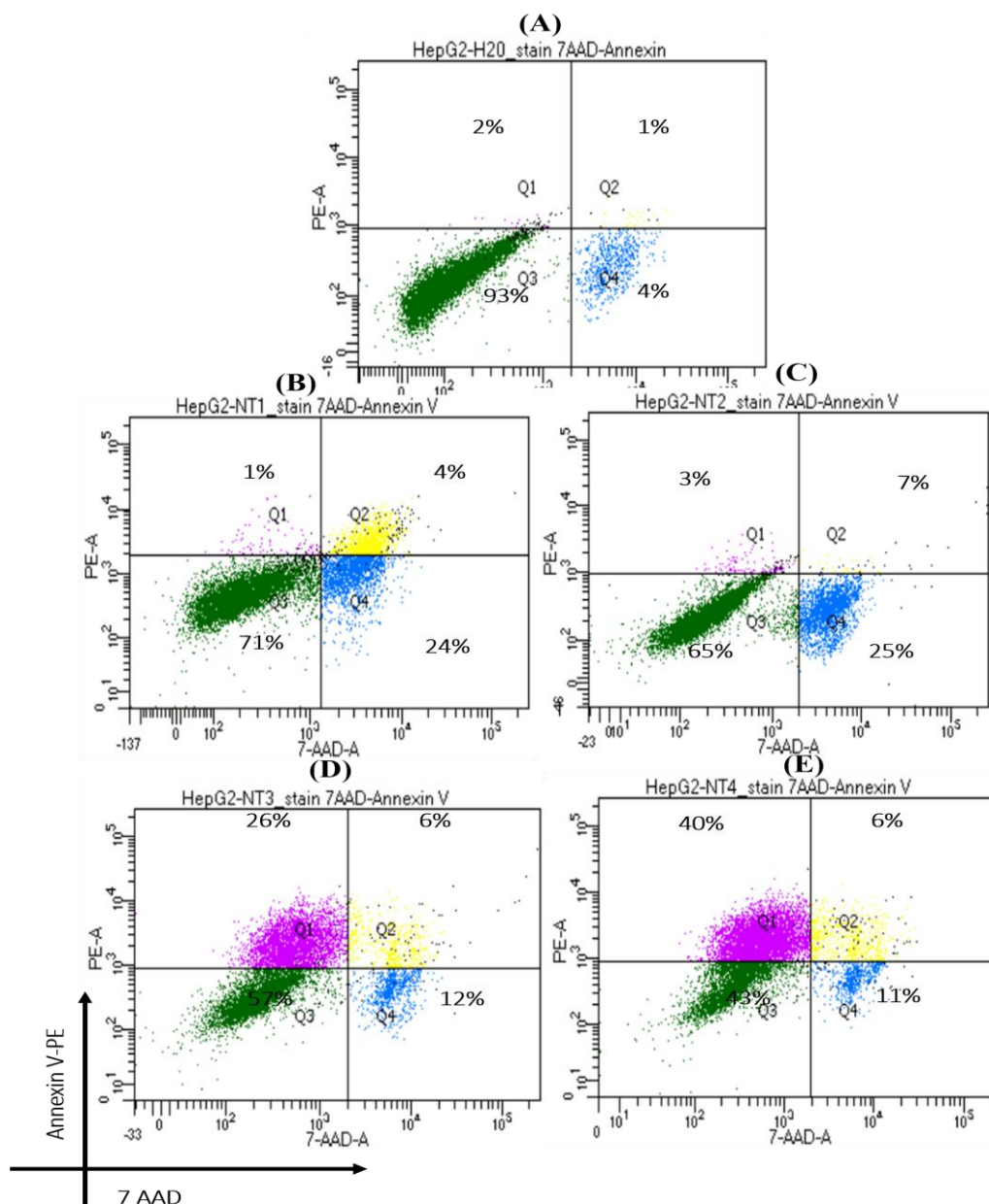
Apoptosis là một quá trình sinh lý bình thường của cơ thể. Nó là một dạng tự chết theo lập trình của tế bào xảy ra trong trường hợp bệnh lý trong các thể sinh vật và góp phần thay thế tế bào, tái tạo mô và loại bỏ các tế bào bị hư hỏng trong điều kiện bình thường (Boil và ctv, 1997). Việc hoạt hóa quá trình apoptosis được xem là một trong các cách tiếp cận chính để loại bỏ tế bào ung thư. Tế bào ung thư thường có khả năng chống lại quá trình apoptosis do sự thay đổi trong các gene kiểm soát chu trình tế bào và quá trình chết tế bào, như các đột biến

trong p53, các yếu tố tín hiệu từ thụ thể, hoặc thay đổi trong các protein ức chế apoptosis (như Bcl-2). Các chất tiềm năng chống ung thư thường được đánh giá qua cơ chế chủ yếu là có khả năng đưa tế bào ung thư vào chu trình apoptosis. Apoptosis thường được đặc trưng bởi những thay đổi điển hình về mặt cấu trúc của tế bào, bao gồm sự co lại tế bào, sự cô đặc của chromatin, sự phân mảnh DNA và sự dịch chuyển của phân tử Phosphatidylserine từ bên trong ra bên ngoài màng tế bào. Quá trình apoptosis được kích hoạt bởi các kích thích bên trong và bên ngoài, từ đó hình thành hai con đường chính. Thứ nhất là con đường nội bào hay còn gọi là con đường ti thể. Thứ hai là con đường ngoại bào hay còn gọi là con đường phụ thuộc vào thụ thể trên bề mặt tế bào.

Trong các tế bào apoptotic, màng phospholipid phosphatidylserine (PS) được chuyển từ mặt trong sang mặt ngoài của màng plasma. Annexin V là một protein liên kết phospholipid, có ái lực cao với PS. Do quá trình ngoại hóa PS xảy ra ở giai đoạn đầu của quá trình apoptosis, nhuộm Annexin V được liên hợp với huỳnh quang có thể xác định apoptosis ở giai đoạn sớm. Do đó, để làm rõ hơn quá trình apoptosis của tế bào ung thư gan HepG2 sau khi xử lý với SeNPs/ β -glucan ở các nồng độ khác nhau, phương pháp nhuộm kép AnnexinV-FITC và 7AAD được sử dụng để phân biệt tế bào sống, tế bào apoptosis sớm, tế bào apoptosis muộn hoặc tế bào hoại tử bằng phương pháp phân tích flow cytometry (hình 3.31). Kết quả ở hình 3.31 và hình 3.32 cho thấy, ở nghiệm thức mẫu ĐC (xử lý với H₂O), lượng tế bào không bắt màu Annexin V-PE và 7AAD cao vùng Q3 (tế bào sống) đạt khoảng 92%. Trong khi ở vùng Q1, Q2 và Q4 đều chiếm tỷ lệ rất thấp (< 5%). Tuy nhiên khi xử lý ở các nồng độ SeNPs/ β -glucan tăng dần từ 1 - 20 ppm, lượng tế bào sống (Q3) giảm dần. Đặc biệt ở nghiệm thức xử lý 20 ppm, thậm chí không ghi nhận tế bào sống. Mặt khác, ở nồng độ 1 ppm và 5 ppm tỉ lệ Q4 lại cao (7AAD dương tính và Annexin V-PE âm tính). Mặc dù vậy, tỉ lệ vùng Q1 (7AAD âm tính và Annexin V-PE dương tính -apoptosis sớm) lại hầu như không có, chỉ chiếm < 5%. Trong khi đó, bắt đầu từ mẫu xử lý ở nồng độ 5 ppm, tỉ lệ tế bào ở vùng Q1 tăng dần (từ 26% lên 66%). Và tiếp tục xử lý

với nồng độ 20 ppm hầu như tỉ lệ tế bào tập trung ở vùng Q1- giai đoạn apoptosis sớm. Từ những kết quả trên có thể thấy, SeNPs/ β -glucan được tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ có khả năng cảm ứng apoptosis đối với tế bào ung thư gan và phụ thuộc vào nồng độ xử lý. Ở nồng độ càng cao, số lượng tế bào tăng dần ở giai đoạn apoptosis sớm. Do đó, có thể kết luận SeNPs/ β -glucan có khả năng ức chế tế bào ung thư gan và đưa tế bào ung thư gan vào quá trình chết theo chu trình. Điều này có ý nghĩa rất quan trọng cho tiềm năng ứng dụng chế phẩm SeNPs/ β -glucan trong phát triển sản phẩm bảo vệ sức khỏe.

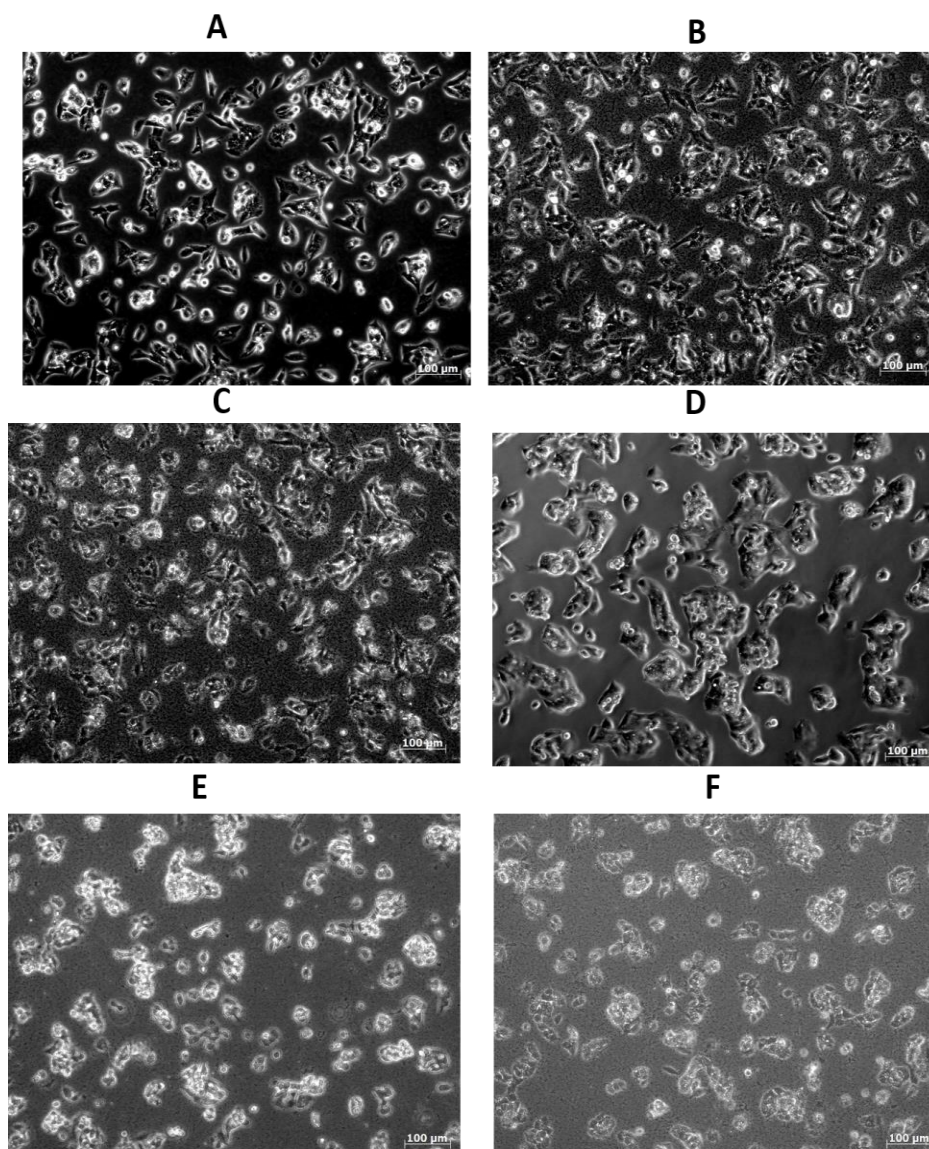
Quan sát tế bào qua kính hiển vi (hình 3.33), ở nghiệm thức đối chứng ĐC (nghiệm thức xử lý với H₂O) tế bào có hình thái tế bào phát triển bình thường. Khi xử lý với nồng độ 1 và 5 ppm, tế bào vẫn bám trên mặt đĩa nhưng độ phủ thấp hơn. Từ mẫu xử lý ở 5 ppm, đã ghi nhận có 1 số tế bào không bám được trên mặt đĩa và trôi nổi trong môi trường. Số lượng tế bào bị giảm mạnh so với trước khi xử lý với SeNPs/ β -glucan (còn $0,78 \times 10^6$ tế bào), một số tế bào đã có dấu hiệu co cụm lại và không còn khả năng bám trên đĩa. Tăng dần nồng độ xử lý, ở nồng độ 5 ppm và 10 ppm, tế bào có hiện tượng co cụm và không còn khả năng bám dính. Số lượng tế bào sống chỉ còn $0,45 \times 10^6$ tế bào. Ở nghiệm thức xử lý với 20 ppm SeNPs/ β -glucan khi kiểm tra với trypan blue lượng tế bào sống giảm mạnh.



Hình 3.32. Kết quả phân tích Flow cytometry của tế bào HepG2 sau khi xử lý SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 1 - 20 ppm

Tỉ lệ tế bào HepG2 phân bố ở các vùng được xác định bằng phương pháp nhuộm kép Annexin V-FITC/7AAD và phân tích bằng kỹ thuật dòng chảy tế bào Flow cytometry FACSaria III. Mỗi biểu đồ gồm 4 ô: ô góc phân tư thứ 1 Q1: (tế bào apoptosis sớm); ô góc phân tư thứ 2 Q2: (tế bào apoptosis muộn); ô góc phân tư thứ 3 Q3 (tế bào sống) và ô góc phân tư thứ 4 Q4 (tế bào necrosis). Trong đó, A: Nghiệm thức đối chứng, B, C, D, E: Các nghiệm thức SeNPs/ β -glucan ở các nồng độ 1, 5, 10 và 20 ppm.

Nghiên cứu của Cui và ctv (2018) cũng cho thấy có sự tăng tỷ lệ tế bào HepG2 trong giai đoạn apoptosis sớm sau khi điều trị bằng HE-SeNPs. Tang và ctv (2020) cũng đã chứng minh cơ chế ức chế đáng kể các dòng tế bào A549, HepG-2 và MCF-7 của LAG-SeNPs thông qua cơ chế gây ra cảm ứng apoptosis.



Hình 3.33. Hình ảnh tế bào HepG2 trước và sau khi xử lý SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 1 - 20 ppm. Trong đó, A: mẫu trước khi xử lý, B: Mẫu xử lý với nước, C, D, E, F: Các mẫu xử lý với SeNPs/ β -glucan ở các nồng độ 1, 5, 10 và 20 ppm.

Như vậy, ngoài việc đánh giá hiệu quả ức chế tăng sinh tế bào ung thư gan HepG2, kết quả nghiên cứu cũng chứng minh được SeNPs/ β -glucan ức chế

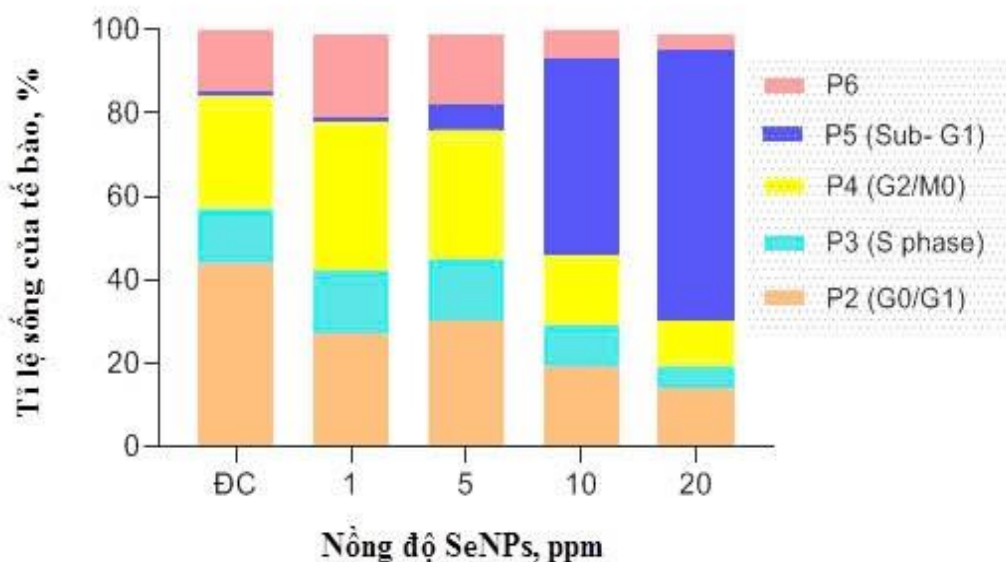
sự tăng sinh của tế bào ung thư gan thông qua cảm ứng apoptosis. Trong nghiên cứu này, SeNPs/ β -glucan gây ra hiện tượng apoptosis trong tế bào HepG2 được xác định bởi sự cô đặc chromatin và sự phân mảnh DNA. Đây là một cơ chế cân bằng nội mô quan trọng đảm bảo sự hài hòa giữa sự phân chia tế bào và sự chết của tế bào nhằm duy trì số lượng tế bào thích hợp trong mỗi cấu trúc mô.

3.5.3. Kết quả phân tích chu kỳ tế bào

Rối loạn trong phân chia tế bào là một trong những đặc trưng cơ bản nhất của tế bào ung thư. Nó là kết quả của sự phân chia tế bào không kiểm soát do sự phá vỡ các cơ chế điều chỉnh chu kỳ tế bào. Do đó, ức chế chu kỳ phân chia tế bào là một trong những đích quan trọng để phát triển các loại thuốc chống ung thư hiện nay. Chu kỳ phân chia tế bào thường được chia làm 5 pha: G0 (pha nghỉ), G1 (pha tăng trưởng bình thường), S (pha nhân đôi DNA), G2 (chuẩn bị nguyên phân) và M (nguyên phân). Phân tích chu kỳ tế bào được sử dụng để xác định tỷ lệ tế bào trong từng giai đoạn (từng pha). Tế bào được nhuộm với thuốc nhuộm huỳnh quang có khả năng gắn với DNA (thường là Propidium Iodide (PI)). PI không bắt màu với các tế bào sống (do có thành tế bào) nên các tế bào sẽ được cố định với ethanol trước khi nhuộm.

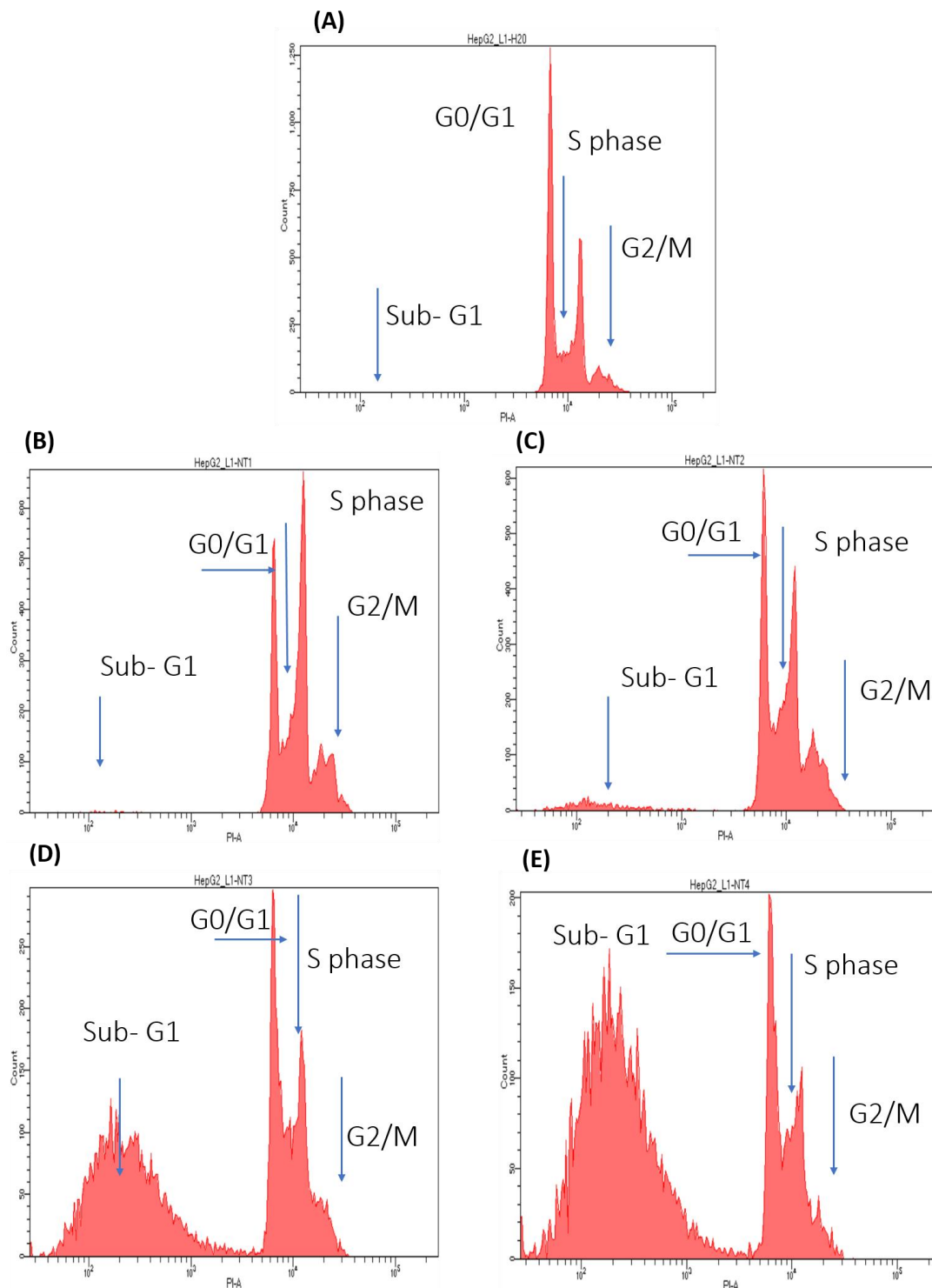
Kết quả phân tích chu kỳ tế bào bằng kỹ thuật Flow cytometry (hình 3.34 và hình 3.35) cho thấy, sau 24 h xử lý, ở nghiệm thức ĐC (xử lý với H₂O) tỉ lệ tế bào phân bố ở pha P2 (G0/G1) chiếm trên 40% đây là pha của chu kỳ tế bào mà tại đó các tế bào ở trạng thái nghỉ, không có các hoạt động phân chia tế bào; Pha S, tế bào đang trong kỳ phân chia tế bào chiếm 11 - 12%, P4 (G2/M) chiếm 27% và P5 (sub-G1) hầu như không có. Ở nghiệm thức xử lý với SeNPs/ β -glucan với nồng độ 1 ppm và 5 ppm, bắt đầu có sự thay đổi so với mẫu đối chứng. Cụ thể, tỉ lệ tế bào ở pha G0/G1 giảm còn ~30%, trong khi tỉ lệ tế bào ở pha S và G2/M có sự tăng nhẹ, cho thấy tế bào đang không phân chia. Ngoài ra, còn xuất hiện từ 2 -7% trong quần thể ở vùng P5. Điều này đúng với kết quả nhuộm trypan blue khi số lượng tế bào ở nghiệm thức nồng độ SeNPs/ β -glucan 1 ppm và 5 ppm không tăng, thậm chí còn giảm so với lượng tế bào ban đầu. Khi tăng nồng độ

SeNPs/ β -glucan >10 ppm, tỉ lệ tế bào ở pha G0/G1 tiếp tục giảm, nhận thấy ở cả hai nghiệm thức này, tỉ lệ tế bào ở pha S và G2/M đều giảm mạnh chứ không tăng như khi xử lý với nồng độ 1 ppm và 5 ppm. Trong khi đó, ở pha P5 (sub - G1) tỉ lệ tế bào lại tăng lên đáng kể. Đặc biệt, khi tăng nồng độ xử lý lên 20 ppm, hầu như tỉ lệ tế bào đều tập trung ở vùng P5 (sub - G1). Điều này cho thấy, SeNPs/ β -glucan đã ức chế sự tăng sinh tế bào HepG2, làm các tế bào dừng (làm chậm) chu kỳ tế bào tại pha không phân chia (G0/G1) và giảm lượng tế bào ở chu kỳ phân chia S-G2/M và đưa tế bào vào pha sub - G1, tại pha này xuất hiện các mảnh vỡ tế bào, các tế bào apoptotic giai đoạn trễ (late-stage apoptosis) và các tế bào hoại tử (necrotic cells) nên DNA phân mảnh, cường độ PI thấp. Như vậy có thể thấy tỉ lệ sống của tế bào HepG2 giảm dần khi tăng nồng độ xử lý với SeNPs/ β -glucan, tế bào đều bị ức chế hoàn toàn chu kỳ phân chia ở pha S và G2/M, tất cả tế bào đi vào pha sub -G1. Đây là pha tế bào ở trạng thái nghỉ hoặc bị apoptosis. Những kết quả này cho thấy khả năng gây ra rối loạn trong chu kỳ phân chia tế bào có thể là một trong những cơ chế ức chế sự tăng sinh tế bào HepG2 của SeNPs/ β -glucan.



Hình 3.34. Biểu đồ phân bố chu kỳ tế bào HepG2 được xử lý SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 1 - 20 ppm

Trong đó, , ĐC: nghiệm thức đối chứng (xử lý với H₂O)



Hình 3.35. Kết quả phân bố chu kỳ tế bào của các tế bào HepG2 được xử lý SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 1 - 20 ppm
 Trong đó, A: nghiệm thức đối chứng (xử lý với H₂O), B, C, D, E: là các nghiệm thức xử lý với SeNPs/ β -glucan ở các nồng độ 1 - 20 ppm

Lopez-Heras và ctv (2014) đã nghiên cứu ảnh hưởng của các Ch-SeNPs (SeNPs ổn định trong chitosan) đến quá trình apoptosis và chu kỳ tế bào của tế bào ung thư gan HepG2. Nhóm tác giả khẳng định Ch-SeNPs gây quá trình apoptosis trên dòng tế bào HepG2 và gây rối loạn chu kỳ phân chia tế bào. Kết quả cũng cho thấy sự giảm số lượng tế bào trong pha G0/G1 cùng với sự gia tăng S-G2/M, cho thấy Ch-SeNPs tạo ra tế bào dừng chu kỳ ở pha S. Ch-SeNPs gây ra sự rối loạn chu kỳ tế bào, làm tế bào phân chia mất kiểm soát. Nhóm tác giả cũng khẳng định hiệu quả tác động lên tế bào HepG2 là do chính Ch-SeNP tiếp xúc, chitosan ảnh hưởng không đáng kể đến quá trình tác động này. Li và ctv (2019) cũng đã nghiên cứu xác định cơ chế tiềm năng liên quan đến tác dụng chống tăng sinh của CPA-SeNPs bằng phân tích chu kỳ tế bào, kết quả cũng cho thấy việc ức chế chu kỳ tế bào có thể là một trong những cơ chế ức chế sự tăng sinh tế bào HeLa, cụ thể tế bào ở pha S tăng theo liều lượng, kèm theo sự giảm ở pha G0/G và không tăng đáng kể ở pha G2/M

Những năm gần đây, tỉ lệ mắc mới và tử vong do ung thư trên toàn thế giới nói chung và Việt Nam nói riêng đang tăng nhanh, do đó tạo ra mối quan tâm lớn giữa các bác sĩ lâm sàng và các nhà nghiên cứu. Theo dự đoán của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) tổng số ca ung thư mắc mới và số ca tử vong do ung thư sẽ còn tiếp tục tăng trong một vài thập kỷ tới. Ước tính vào những năm 2030 và 2040 tới số ca mắc mới sẽ lần lượt là 12 và 16,4 triệu ca, số ca tử vong sẽ là 24 và 29,5 triệu ca (NguyễnThị Hà và Nguyễn Thành Đô, 2019). Hiện nay, theo báo cáo có đến 21% và 9% số ca tử vong ở các nước phát triển và đang phát triển được báo cáo là có liên quan đến ung thư. Trong đó, ung thư gan là bệnh phổ biến tại các nước đang phát triển, đặc biệt là tại các nước Đông Á và Đông Nam Á. Năm 2018, tại Việt Nam ung thư gan lại là ung thư đứng hàng đầu trong các ung thư mắc mới ở các nam và nữ (Phạm Thị Thu Thủy, 2019). Phác đồ điều trị ung thư hiện nay thường dựa vào phẫu thuật, xạ trị cũng như thuốc hóa trị liệu, nhưng những phương thức này thường sẽ ức chế cả các tế bào khỏe mạnh một cách không đặc hiệu, từ đó gây ra các phản ứng phụ cho bệnh nhân

(Kumari và ctv, 2017). Ngoài ra các phương pháp hóa trị liệu thông thường đề ức chế ung thư thường gặp phải những hạn chế như độ hòa tan kém của thuốc chống ung thư, thiếu tính chọn lọc và đa kháng thuốc (Narvekar và ctv, 2011). Do đó việc phát triển chiến lược trị liệu mới nhằm nhắm mục đích tiêu diệt tế bào ung thư bằng phương pháp chủ động đang được nhiều nghiên cứu hướng đến. Nhiều nghiên cứu cũng đã chứng minh công nghệ nano một trong những công nghệ tiềm năng trong việc hướng đến giải quyết vấn đề này. Trong liệu pháp điều trị ung thư, các hạt nano được sử dụng làm thuốc điều trị hoặc đóng vai trò là chất mang, chất dẫn truyền thuốc giúp cải thiện độ hòa tan của thuốc, tăng cường sự ổn định trong hệ tuần hoàn và giảm độc tính của thuốc (Sahu và ctv, 2008). Các hạt SeNPs và thuốc chống ung thư chủ yếu tác dụng gây độc tế bào ung thư bằng cách gây cảm ứng apoptosis của tế bào và/hoặc gây ra sự ngừng chu kỳ tế bào ở các giai đoạn khác nhau của chu kỳ tế bào (Huang và ctv, 2013). Nhóm tác giả đã báo cáo SeNPs có thể đóng vai trò là chất chống oxy hóa trong các tế bào bình thường nhưng có thể làm tăng đáng kể sản xuất ROS trong các tế bào ung thư, điều này có thể là do tình trạng chuyển hóa bất thường của các tế bào ung thư, SeNPs có thể tác động khiến sản xuất quá mức ROS trong các tế bào ung thư và kích hoạt apoptosis thông qua con đường p53. Hơn nữa, SeNPs cũng có thể khiến apoptosis bằng cách tác động đến ty thể. Đầu tiên, SeNPs đã được đưa vào bên trong tế bào có thể khiến tế bào sản xuất quá mức ROS, gây ra sự tích tụ ROS trong các tế bào. Sau đó, việc sản xuất quá mức ROS gây tổn hại DNA tế bào và kích thích tính thấm ty thể. Điều này dẫn đến việc giải phóng cytochrome c, làm gián đoạn chuỗi vận chuyển điện tử, dẫn đến cytochrome c rò rỉ tổn thương ty thể, do đó gây ra quá trình apoptosis. Zhang và ctv (2013) đã khẳng định kích thước nhỏ của các hạt nano cho phép nó thoát khỏi lưới nội mô hệ thống tế bào và ngăn cản sự hấp thu của chúng bởi đại thực bào.

Từ những kết quả thu được ở nghiên cứu này cho thấy SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ có thể ứng dụng trong liệu pháp điều trị ung thư

tiềm năng. SeNPs/ β -glucan thể hiện độc tính thấp đối với các tế bào bình thường và có tính chọn lọc đối với tế bào ung thư. Cụ thể SeNPs/ β -glucan hoạt tính ức chế mạnh đối với tế bào ung thư gan HepG2 nhưng không gây độc trên nguyên bào sợi L929 ở các nồng độ dưới 20 ppm. Tại nồng độ này, SeNPs/ β -glucan đã ức chế gần như hoàn toàn tế bào ung thư gan. Giá trị IC_{50} của SeNPs/ β -glucan đối với dòng tế bào ung thư HepG2 là 6,511 ppm, trong khi tỉ lệ sống của tế bào thường đạt trên 70%.

Ngoài việc đánh giá hiệu quả ức chế tăng sinh tế bào ung thư, các kết quả nghiên cứu cũng chứng minh được SeNPs/ β -glucan ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư gan HepG2 thông qua sự cảm ứng apoptosis và tác động làm rối loạn chu kỳ tế bào. Cụ thể, khi xử lý với nồng độ 20 ppm hầu như tỉ lệ tế bào tập trung ở vùng Q1- giai đoạn apoptosis sớm. Ngoài ra quan sát thấy có sự phân mảnh DNA. Đây là một cơ chế cân bằng nội mô quan trọng đảm bảo sự hài hòa giữa sự phân chia tế bào và sự chết của tế bào nhằm đảm bảo số lượng tế bào thích hợp trong mỗi cấu trúc mô. Phân tích chu kỳ tế bào cho thấy, khả năng gây ra rối loạn chu kỳ phân chia tế bào của SeNPs/ β -glucan, làm tế bào bị ức chế hoàn toàn chu kỳ phân chia ở pha S và G2/M, tất cả tế bào đi vào pha sub - G1. Đây là pha tế bào ở trạng thái nghỉ hoặc bị apoptosis. Từ kết quả thu được có thể kết luận SeNPs/ β -glucan có thể ức chế tế bào ung thư gan, làm rối loạn chu kỳ phân chia tế bào và đưa tế bào ung thư gan vào quá trình chết theo chu trình. Điều này có ý nghĩa rất quan trọng cho tiềm năng ứng dụng chế phẩm SeNPs/ β -glucan trong việc phát triển sản phẩm bảo vệ sức khỏe.

Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Luận án đã nghiên cứu đưa ra được quy trình tổng hợp SeNPs ổn định trong β -glucan có hoạt tính sinh học cao bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60. Các điều kiện tổng hợp dung dịch SeNPs/ β -glucan cụ thể là: nồng độ selen Se^{4+} là 80 ppm, nồng độ chất ổn định β -glucan là 2%, pH ~ 5 và suất liều là 10 kGy/h. Chế phẩm SeNPs/ β -glucan tổng hợp được có hình cầu, kích thước hạt trung bình khoảng 92,5 nm (đo bằng LDS), khoảng 65,32 nm (đo bằng TEM) và sự phân bố kích thước hạt dao động trong chủ yếu khoảng từ 55 - 75 nm. Nghiên cứu đã đánh giá được điều kiện bảo quản ở 0°C giúp kích thước hạt và sự phân bố kích thước hạt của dung dịch SeNPs/ β -glucan được ổn định nhất. Đánh giá được phương pháp đông khô là phương pháp tốt nhất để tạo SeNPs/ β -glucan dạng bột mà không làm gia tăng kích thước hạt.

Chế phẩm SeNPs/ β -glucan tổng hợp được có hoạt tính chống oxy hóa cao và khá bền theo thời gian. Chế phẩm SeNPs/ β -glucan cho thấy có hoạt tính tăng cường miễn dịch khá tốt với các chỉ tiêu theo dõi ở miễn dịch tế bào và miễn dịch dịch thể trong máu ngoại vi, trong tủy xương và trong lách trên mô hình chuột bị gây suy giảm miễn dịch bằng CTX. Bên cạnh đó, sản phẩm SeNPs/ β -glucan còn cho thấy hoạt tính ức chế mạnh đối với tế bào ung thư gan HepG2 nhưng hầu như không gây độc đối với nguyên bào sợi L929 ở các nồng độ 1 - 20 ppm. Ngoài ra các kết quả nghiên cứu cũng chứng minh được SeNPs/ β -glucan ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư gan HepG2 thông qua sự cảm ứng apoptosis và rối loạn chu kỳ phân chia tế bào.

Chế phẩm SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ có triển vọng ứng dụng để sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe thể hệ mới hỗ trợ tăng cường miễn dịch và hỗ trợ phòng trị ung thư an toàn và hiệu quả.

4.2. Kiến nghị

Để hoàn thiện thêm hướng nghiên cứu này, đề tài có một số kiến nghị như sau:

Tiếp tục nghiên cứu đánh giá thêm về hoạt tính ức chế trên các dòng tế bào ung thư khác.

Nâng cấp quy trình và sản xuất thử nghiệm chế phẩm SeNPs/ β -glucan qui mô pilot. Nghiên cứu áp dụng trong sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe từ SeNPs/ β -glucan hoặc thuốc bổ sung hỗ trợ điều trị ung thư gan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Bùi Thị Hòa, 2005. Nghiên cứu định lượng selen có trong các chế phẩm thuốc bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử, Bộ Y tế, Hà Nội.
2. Đỗ Trung Đàm, 2014. *Phương pháp xác định độc tính của thuốc*. Nhà xuất bản Y Học, 264 trang.
3. Hồ Sơn Lâm and Phạm Thị Anh, 2016. Ảnh hưởng của selenium hữu cơ lên tăng trưởng, tỷ lệ sống và khả năng chịu sốc độ mặn của cá khoang cổ (*Amphiprion ocellaris* CUVIER, 1830), *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 43: 89-96.
4. Nguyễn Quốc Hiến, 1999. *Công nghệ bức xạ trong sinh học*. Đại học Đà Lạt, 161 trang.
5. Nguyễn, T. M. L., Võ, T. L. T., Quách, P. Đông, Đặng, V. P., and Nguyễn, Q. H. (2019). Khảo sát hiệu ứng của hỗn hợp selen nano/oligochitosan và *Spirulina platensis* đến số lượng bạch cầu ở chuột. *Bản B của Tạp Chí Khoa học Và Công nghệ Việt Nam*, 61(5): 21-25.
6. Phạm Việt Cường, 2009. Hoàn thiện công nghệ sản xuất chế phẩm chứa beta-glucan và acid amin từ nấm men. *Báo cáo tổng hợp kết quả khoa học công nghệ dự án, Liên hiệp khoa học sản xuất Công nghệ Sinh học và Môi trường*, Viện Công nghệ Sinh học Hà Nội.
7. Trần Đại Nghiệp, 2006. *Giáo trình xử lý bức xạ và cơ sở của công nghệ bức xạ*. Nhà xuất bản Đại học quốc gia Hà Nội, 154 trang.

Tài liệu tiếng Anh

1. Ahmad M., 2016. Solvothermal synthesis of selen nano and microspheres deposited on silicon surface by microwave-assisted method. *Materials Research Express* 3(10): 105031-105040.
2. Akar N., Asar B., Dizge N. and Koyuncu I., 2013. Investigation of characterization and biofouling properties of PES membrane containing selenium and copper nanoparticles. *Journal of Membrane Science* 437: 216-226.
3. Alam H., Khatoon N., Raza M., Ghosh P. C., and Sardar M., 2019. Synthesis and Characterization of Nano Selenium Using Plant Biomolecules and Their Potential Applications. *BioNanoScience* 9: 96-104.
4. Ali E.N., El-Sonbaty S.M., and Salem F.M., 2013. Evaluation of selenium nanoparticles as a potential chemopreventive agent against lung carcinoma. *Int Journal of PharmBiology Chemistry Science* 2(4): 38-46.
5. Arslan S., Ozyurek E. and Gunduz-Demir C., 2014. A color and shape based algorithm for segmentation of white blood cells in peripheral blood and bone marrow images. *Cytometry Part A* 85: 480-490
6. Arthur J.R., Kenzie R.C. and Backeet G.J., 2003. Selenium in the immune system. *Journal of Nutrition* 133: 1457S-1459S.

7. Avery J., and Hoffmann P., 2018. Selenium, selenoproteins, and Immunity. *Nutrients*, 10(9), 1203.
8. Bai K., Hong B., He J., Hong Z. and Tan R., 2017. Preparation and antioxidant properties of selenium nanoparticles-loaded chitosan microspheres. *International Journal of NanoMedicine*, 12, 4527-4539.
9. Bak D.W, Gao J., Wang C. and Weerapana E. 2018. A quantitative chemoproteomic platform to monitor selenocysteine reactivity within a complex proteome. *Cell Chemical Biology* 25(9):1157-1167.e1154.
10. Barrett C.W., Short S.P. and Williams C.S., 2017. Selenoproteins and oxidative stress-induced inflammatory tumorigenesis in the gut, *Cellular and Molecular Life Science* 74(4), 607-616.
11. Baskar G., Lalitha K. and Garrick B.G, 2019. Synthesis, characterization and anticancer activity of selenium nanobiocomposite of l-asparaginase. *Bulletin of Materials Science* 42: 4.
12. Bentley-Hewitt K.L., Chen R.K., Lill R.E., Hedderley D.I., Herath T.D., Matich A.J. and McKenzie M.J., 2014. Consumption of selenium-enriched broccoli increases cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated ex vivo, a preliminary human intervention study. *Molecular Nutrition & Food Research* 58(12): 2350-2357.
13. Bold R.J., Termuhlen P.M. and McConkey D.J., “Apoptosis, cancer and cancer therapy”, *Journal of Surgical Oncology* 6: 133-142.
14. Cai X., Yang Q., Weng Q. and Wang S., 2019. PH sensitive doxorubicin-loaded nanoparticle based on Radix pseudostellariae protein-polysaccharide conjugate and its improvement on HepG2 cellular uptake of doxorubicin. *Food and Chemical Toxicology* 111099.
15. Carlson B.A., Yoo M.H., Shrimali R.K., Irons R., Gladyshev V.N. and Hatfield D.L., 2010. Role of selenium-containing proteins in T-cell and macrophage function. *Proceeding of the Nutrition Society* 69(3): 300-310.
16. Chae B.J., Lohakare J.D., Moon W.K., Lee S.L., Park Y.H. and Hahn T.W., 2006. Effects of supplementation of β -glucan on the growth performance and immunity in broilers, *Research in Veterinary Science* 80(3): 291-298.
17. Chen W., Yue L., Jiang Q. and Xia W., 2019. Effect of chitosan with different molecular weight on the stability, antioxidant and anticancer activities of well-dispersed selenium nanoparticles. *Nanobiotechnology* 13(1): 30-5.
18. Chen W., Li Y., Yang S., Yue L., Jiang, Q., and Xia, W., 2015. Synthesis and antioxidant properties of chitosan and carboxymethyl chitosan-stabilized selenium nanoparticles, *Carbohydrate Polymers* 132: 574-581.
19. Chen G., Yang F., Fan S., Jin H., Liao K., Li X., Liu G - B., Liang J., Zhang J., Xu J - F. and Pi J., 2022. Immunomodulatory roles of selenium nanoparticles: novel

arts for potential immunotherapy strategy development. *Frontiers in Immunology* 13: 956181.

20. Chen W., Cheng H. and Xia W., 2022. Progress in the Surface Functionalization of Selenium Nanoparticles and Their Potential Application in Cancer Therapy *Antioxidants* 11(10):1965

21. Constantinescu A.D., Frîncu R., Capră L. and Oancea F., 2018. Selenium analysis and speciation in dietary supplements based on next - generation selenium ingredients, *Nutrients* 10(10): 1466-1499.

22. Cui D., Liang T., Sun L., Meng L., Yang C., Wang L. and Li Q., 2018. Green synthesis of selenium nanoparticles with extract of hawthorn fruit induced HepG2 cells apoptosis. *Pharmaceutical Biology* 56(1): 528-534.

23. Dallies N., Francois J. and Paque V., 1998. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall Application to the cell wall defective mutants of *Sachharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14(14):1297-1306,

24. Da'i M., Meilinasary K.A, Suhendi A. and Haryanti S., 2019. Selectivity Index of *Alpinia galanga* Extract and 1' - Acetoxychavicol Acetate on Cancer Cell Lines. *Indonesia. Journal of. Cancer Chemoprevent* 10(2): 95-100

25. Desai M.P., Labhasetwar V., Walter E., Levy R.J. and Amidon G.L., 1997. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco - 2 cells is size dependent. *Pharmaceutical Research* 14(11): 1568-1573.

26. Ding Y., Yan Y., Chen D., Ran L., Mi J., Lu L. and Cao Y., 2019. Modulating effects of polysaccharides from the fruits of *Lycium barbarum* on the immune response and gut microbiota in cyclophosphamide - treated mice. *Food & Function* 10(6): 3671-3683.

27. Dumore N.S. and Mukhopadhyay M., 2019. Antioxidant properties of aqueous selenium nanoparticles (ASeNPs) and its catalysts activity for 1, 1 - diphenyl - 2 - picrylhydrazyl (DPPH) reduction. *Journal of Molecular Structure* 127637.

28. Duy N.N., Phu D.V., Quoc L.A., Lan N.T.K., Hien N.Q., Ngan T.T.T., Ha T.L.B., Tuan P.D. and Ha B.M., 2021. Preparation and effect of selenium nanoparticles/oligochitosan on the white blood cell recovery of mice exposed to gamma - ray radiation. *Journal of Chemistry* 6635022.

29. Emadi R.L. and Brodsky R.A., 2009. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary, *Nature Reviews Clinical Oncology* 6: 638- 647.

30. Estevez H., Garcia - lidon J.C., Luque - garcia J.L. and Camara C., 2014. Effects of chitosan stabilized selenium nanoparticles on cell proliferation, apoptosis, and cell cycle pattern in HepG2 cells: comparison with other selenospecies. *Colloids and Surfaces B* 122: 184-193.

31. Faghfuri E., Yazdi M.H., Mahdavi M. Sepehrizadeh, Z., Faramarzi M.A., Mavandadnejad F. and Shahverdi A.R., 2015. Dose - response relationship study of

selenium nanoparticles as an immunostimulatory agent in cancer - bearing mice. *Archives of Medical Research* 46(1): 31-37.

32. Feng Y., Su J., Zhao Z., Zheng W., Wu H., Zhang Y. and Chen T., 2014. Differential effects of amino acid surface decoration on the anticancer efficacy of selenium nanoparticles. *Journal of Chemical Society, Dalton transactions* 43 (4): 1854-861.

33. Fesharaki P.J., Nazari P., Shakibaie M., Rezaie S., Banoee M., Abdollahi M. and Shahverdi A.R., 2010. Biosynthesis of selenium nanoparticles using *Klebsiella pneumoniae* and their recovery by a simple sterilization process. *Brazilian Journal of Microbiology* 41(2): 461-466.

34. Gao F., Yuan Q., Gao, L., Cai P., Zhu H., Liu R., Wang Y., Wei Y., Huang J.G. and Liang X., 2014. Cytotoxicity and therapeutic effect of irinotecan combined with selenium nanoparticles. *Biomaterial* 35: 8854-8866

35. Gautam A., Singh G.P. and Ram S., 2007. A simple polyol synthesis of silver metal nanopowder of uniform particles. *Synthetic Metals* 157(1): 5-10.

36. Gharibshahi E., Saion E., Ashraf A. and Gharibshahi L., 2017. Size- controlled and optical properties of platinum nanoparticles by gamma radiolytic synthesis *Applied Radiation and Isotopes* 130: 211-217.

37. Gunawan I., Galih S. P. and Farida S., 2020. Validation of *in vitro* bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* 46: 273-307.

38. Han L., Meng M., Guo M., Cheng D., Shi L., Wang X. and Wang C., 2018. Immunomodulatory activity of a water - soluble polysaccharide obtained from highland barley on immunosuppressive mice models, *Food & Function* 10(1): 304-314.

39. Hara H., Haga S., Aoyama Y. and Kiriya S., 1999. Short - chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine, *Journal of Nutrient* 129(5): 942-948.

40. Hien N.Q., Tuan P.D., Phu D.V., Quoc L.A., Lan N.T.K., Duy N.N. and Hoa T.T., 2018. Gamma Co-60 ray irradiation synthesis of dextran stabilized selenium nanoparticles and their antioxidant activity. *Materials Chemistry and Physics* 205: 29-34.

41. Hosnedlova B., Kepinska M., Skalickova S., Fernandez C., Ruttkay - Nedecky B., Peng Q., Baron M., Melcova M., Opatrilova R., Zidkova J., Bjorklund G., Sochor J. and Kizek R., 2018. Nano - selenium and its nanomedicine applications: a critical review. *International Journal of NanoMedicine* 13: 2107-2128.

42. Hou J.Y., Ai S.I. and Shi W.J., 2011. Preparation and characterization of Nano - Se/Silk Fibroin Colloids. *Chemistry Research Chinese University* 27(1): 158-60.

43. Huang B., Zhang J., Hou J. and Chen C., 2003. Free radical scavenging efficiency of Nano - Se *in vitro*. *Free Radical Biological Medicine* 35(7): 805- 13.

44. Huang G., Zhang Y., Zhang Q., Zhang B. and Wen L., 2010. Vacuolization and apoptosis induced by nano - selenium in HeLa cell line. *Science China Chemistry* 53(11): 2272-2278.
45. Huang G., Liu Z., He L., Luk K.H., Cheung S.T., Wong K.H. and Chen T., 2018. Autophagy is an important action mode for functionalized selenium nanoparticles to exhibit anti - colorectal cancer activity. *Biomaterials Science* 6(9): 2508-2517.
46. Indumathy M., Raj S.S., Arumugham I.M. and Kumar R.P., 2020. Assessment of Toxicity of Selenium Nanoparticle Varnish Using HepG2 Cell Lines: *In vitro* Study. *Journal of Pharmaceutical Research International* 32(27): 33-39.
47. Iwabuchi K. and Nagaoka I., 2002. Lactosylceramide - enriched glycosphingolipid signaling domain mediates superoxide generation from human neutrophils. *Blood* 100: 1454-1464.
48. Javmen A., Grigiškis, S. and Gliebutė, R., 2012. β -glucan extraction from *Saccharomyces cerevisiae* yeast using *Actinomyces rutgersensis* 88 yeast lyzing enzymatic complex. *Biologija* 58: 51-59.
49. Jia, X., Liu Q., Zou S., Xu X. and Zhang L., 2015. Construction of selenium nanoparticles/ β -glucan composites for enhancement of the antitumor activity. *Carbohydrate Polymers* 117: 434 -42.
50. Khaled, A.M., Othman M.S., Obeidat S.T., Aleid G.M., Aboelnaga S.M., Fehaid A., Hathout H.M.R., Bakkar A.A., Moneim A.E.A. and El-Garawani I.M. 2024. Green-Synthesized Silver and Selenium Nanoparticles Using Berberine: A Comparative Assessment of *In vitro* Anticancer Potential on Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line (HepG2). *Cells* 13: **287**
51. Kumari M., Ray L., Purohit M.P., Patnaik S., Pant A.B. and Shukla Y. and Gupta K.C., 2017. Curcumin loading potentiates the chemotherapeutic efficacy of selenium nanoparticles in HCT116 cells and Ehrlich's ascites carcinoma bearing mice. *The European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 117: 346-362.
52. Korolkov I. V, Güven O., Mashentseva A.A., Atıcı A.B., Gorin Y.G., Zdorovets M. V and Taltenov A.A., 2017. Radiation induced deposition of copper nanoparticles inside the nanochannels of poly (acrylic acid) - grafted poly (ethylene terephthalate) track - etched membranes. *Radiation Physics and Chemistry* 130: 480-487.
53. Langi B., Shah C., Singh K., Chaskar A., Kumar M. and Bajaj P.N., 2010. Ionic liquid - induced synthesis of selenium nanoparticles. *Material Research Bulletin* 45(6): 668-671.
54. Logothetidis S., 2012. *Nanostructured Materials and Their Applications*, Springer Science & Business Media, 220 pages.
55. Long N.T., Ha T.L.T., Nghia Son H. and Luan L. Q., 2019. Radiation Degradation of β -Glucan Extracted from Brewer's Yeast for Enhancing Growth

Promotion and Immunostimulant Activities on Broilers. *International Journal of Polymer Science* 1-9.

56. Lopez H I., Sanchez – D.R., Anunciação D.S., Madrid Y. and Luque - Garcia J.L., 2014. Effect of Chitosan - Stabilized Selenium Nanoparticles on Cell Cycle Arrest and Invasiveness in Hepatocarcinoma Cells Revealed by Quantitative Proteomics. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* 05(05):226.

57. Nhien L.T.A., Luong N.D., Tien N.T.T and Luan L.Q.: 2018. Radiation synthesis of silver nanoparticles/chitosan for controlling leaf fall disease on rubber trees causing by *Corynespora cassiicola*. *Journal of Nanomaterial* 1-9.

58. Levrat - Verny M.A., Behr S., Mustad V., Rémésy C. and Demigné C., 2000. Low levels of viscous hydrocolloids lower plasma cholesterol in rats primarily by impairing cholesterol absorption. *Journal of Nutrient* 130(2): 243-248.

59. Li H., Liu D., Li S. and Xue C., 2019. Synthesis and cytotoxicity of selenium nanoparticles stabilized by α - D-glucan from *Castanea mollissima* Blume. *International Journal of Biological Macromolecules* 129: 818-26.

60. Lin W., Zhang J., Xu J.F. and Pi J., 2021. The Advancing of Selenium Nanoparticles Against Infectious Diseases. *Frontiers in Pharmacology* 12: 682284.

61. Liu L., Xiao Z., Niu S., He Y., Wang G., Pei X. and Wang M., 2019. Preparation, characteristic, and feeble induced apoptosis performance of non - dialysis requiring selenium nanoparticles/chitosan. *Material Design* 182 (108024): 1-10.

62. Liu W., Li X. and Wong Y.S., 2012. Selenium nanoparticles as a carrier of 5 - fluorouracil to achieve anticancer synergism. *ACTV Nano* 6(8): 6578-6591.

63. Loinski R., Edmonds J.S., Suzuki K.T. and Uden P.C., 2000. Speciesselective determination of selenium compounds in biological materials. *Pure and Apply Chemistry* 72(3): 447-461.

64. Luan L.Q., Linh D.T.P., Uyen N.H.P., Phu D.V. and Hien N.Q. (2014), Biodistribution of gold nanoparticles synthesized by γ -irradiation after intravenous administration in mice. *Advances in Natural Science: Nanoscience and Nanotechnology* 5(2): 025009.

65. Luo H., Wang F., Bai Y., Chen T. and Zheng W., 2012. Selenium nanoparticles inhibit the growth of HeLa and MDA-MB-231 cells through induction of S phase arrest. *Colloids Surfaces Biointerfaces* 94: 304-308.

66. Magnani M., Calliari C.M., de Macedo F.C., Mori M.P., de Syllos Cólus I.M. and Castro - Gomez R.J.H., 2009. Optimized methodology for extraction of (1 - 3) (1 - 6) - β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and *in vitro* evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative, *Carbohydrate Polymer* 78(4): 658-665.

67. Mantovani M.S., Bellini M.F., Angeli J.P.F., Oliveira R.J., Silva A.F. and Ribeiro L.R., 2008. β - Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer, *Mutation Research* 658(3): 154-161.

68. Mason R., 2001. What is beta glucan? A concise guide to the benefits and uses of the most powerful natural immune enhancer known to science. *U.S.A, Safe Goods*.
69. Mathew M. and Nayarana B., 2006. An easy spectrophotometric determination of selenium using azure B as a chromogenic reagent, *Indian Journal of Chemistry Technology* 13: 455-458.
70. Meena D.K., Das, P., Kumar S., Mandal S.C., Prusty A.K., Singh S.K., Akhtar M.S., Behera B.K., Kumar K., Pal, A.K. and Mukherjee S.C., 2013. Beta - glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiology and Biochemistry* 39(3): 431-457.
71. Meng Y., Zhang Y., Jia N., Qiao, Zhu H.M., Meng Q., Lu Q. and Zu Y., 2018. Synthesis and evaluation of a novel water - soluble high Seen reached Astragalus polysaccharide nanoparticle. *International Journal of Biological Macromolecules* 118, 1438-48.
72. Menon S., Ks S.D., Santhiya R., Rajeshkumar S. and Venkat Kumar S., 2018. Selenium nanoparticles: A potent chemotherapeutic agent and an elucidation of its mechanism. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 170, 280-292.
73. Narvekar M., Xue H.Y., Eoh J.Y. and Wong H.L., 2014. Nanocarrier for poorly water - soluble anticancer drugs-barriers of translation and solutions. *Pharmaceutical Science & Technology* 15(4): 822-833.
74. National Research Council, 2000. Recommended dietary allowance. *National Academy Press, Washington, DC*.
75. Navarro-Alarcon M. and Cabrera-Vique C., 2008. Selenium in Food and the Human Body: A Review. *Science & Environment* 400: 115-141.
76. Pei X. 1999. Who is hematopoietic stem cell: CD34+ or CD34-? *International Journal of Hematology* 70(4): 213-5.
77. Pengkumsri N., Sivamaruthi B.S., Sirilun S., Peerajan S., Kesika P., Chaiyasut K. and Chaiyasut C. 2016. Extraction of β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of different extraction methods and *in vivo* assessment of immunomodulatory effect in mice, *Food Science and Technology* 37(1):124-130.
78. Pi J., Yang F. and Jin H., 2013. Selenium nanoparticles induced membrane bio-mechanical property changes in MCF-7 cells by disturbing membrane molecules and F-actin. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letter* 23(23): 6296-6303.
79. Piacenza E., Presentato A., Ferrante F., Cavallaro G., Alduina R. and Martino D.F.C., 2021. Biogenic Selenium Nanoparticles: A Fine Characterization to Unveil Their Thermodynamic Stability. *Nanomaterials* 11: 1105-1195.
80. Prasad K.S., and Selvaraj K., 2014. Biogenic synthesis of selenium nanoparticles and their effect on As (III)-induced toxicity on human lymphocytes. *Biological Trace Element Research* 157: 275-283.

81. Prasad K.S., Patel H., Patel T., Patel K., Selvaraj K., Suranjit K., Patel H., Patel T., Patel K., Selvaraj K. and Prasad K.S., 2013. Biosynthesis of Se nanoparticles and its effect on UV-induced DNA damage. *Colloids Surfaces B* 103: 261-266.
82. Pyrzyńska K., 1998. Speciation of selenium compounds. *Analytical Science* 14: 479-483.
83. Qi C., Cai Y., Gunn L., Ding C., Li B., Kloecker G., Qian K., Vasilakos J., Saijo S., Iwakura Y., Yannelli J.R. and Yan J., 2011. Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived β -glucans. *Blood* 117(25): 6825-6836.
84. Qiu W.Y., Wang Y.Y., Wang M. and Yan J. K., 2018. Construction, stability, and enhanced antioxidant activity of pectin-decorated selenium nanoparticles. *Colloids and Surf B: Biointerfaces* 170: 692-700.
85. Ramamurthy C., Sampath K.S., Arunkumar P., Kumar M.S., Sujatha V., Premkumar K. and Thirunavukkarasu C., 2013. Green synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its augmented cytotoxicity with doxorubicin on cancer cells. *Bioprocess Biosystems Engineering* 36(8): 1131-1139.
86. Rayman M.P., 2000. The importance of selenium to human health. *The Lancet* 356: 233-241.
87. Remita S., Fontaine P., Rochas C., Muller F. and Goldmann M., 2005. Radiation induced synthesis of silver nanoshells formed onto organic micelles. *European Physical Journal D* 34: 231-233.
88. Ren Y., Zhao T., Mao G., Zhang M., Li F., Zou Y., Yang L. and Wu X., 2013. Antitumor activity of hyaluronic acid-selenium nanoparticles in Heps tumor mice models. *International Journal of Biological Macromolecules* 57: 57-62.
89. Sahoo B.M., Kumar B.V., Patra C.N., Panda J.R., Mohanta, B. C., and Palei, N. N. (2020). Nanotechnology: A Novel Approach for Drug Development in Health Care System. *Current Nanomaterials* 05.
90. Sahu A., Kasoju N. and Bora U. 2008. Fluorescence study of the curcumin casein micelle complexation and its application as a drug nano carrier to cancer cells. *Biomacromolecules* 9(10): 2905-2912.
91. Shahabadi N., Zendehecheshm S., and Khademi F. 2021. Selenium nanoparticles: Synthesis, *in vitro* cytotoxicity, antioxidant activity and interaction studies with ct-DNA and HSA, HHb and Cyt c serum proteins. *Biotechnology Reports* 30: 615.
92. Shakibaie M., Shahverdi A.R., Faramarzi M.A., Hassanzadeh G.R., Rahimi H.R. and Sabzevari O., 2013. Acute and subacute toxicity of novel biogenic selenium nanoparticles in mice. *Pharmaceutical Biology* 58-63.
93. Shalaby E. and Shanab S.M., 2013. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*, *Indian Journal Geo-Marine Science* 42(5): 556-564.

94. Shi J., Votruba A.R., Farokhzad O.C. and Langer R., 2010. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications, *Nano Letters* 10(9): 3223-3230.
95. Shoeibi S. and Mashreghi M., 2017. Biosynthesis of selenium nanoparticles using *Enterococcus faecalis* and evaluation of their antibacterial activities. *Journal of Trace Elements Medicine and Biology* 39: 135-139.
96. Silva Araújo V.B.D., Melo A.N.F.D., Costa A.G., Castro-Gomez R.H., Madruga M.S., Souza E.L.d. and Magnani M., 2014. Followed extraction of β -glucan and mannoprotein from spent brewer's yeast (*Saccharomyces uvarum*) and application of the obtained mannoprotein as a stabilizer in mayonnaise. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 23: 64-170.
97. Silva G.A., 2004. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surgical Neurology International Impact* 61 (3): 216-220.
98. Souza T.G., Ciminelli V.S. and Mohallem N.D., 2016. A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles. *Journal of Physics* 733: 012039.
99. Stoica A.I., Babaua G.R., Iorgulescu E.E., Marinescu D. and Baiulescu G. 2002. Differential pulse cathodic stripping voltammetric determination of selenium in pharmaceutical products. *Journal Pharm Biomed Analysis* 30(4): 1425-1429.
100. Sutejo I.R., Putri H. and Meiyanto E., 2016, The Selectivity of Ethanolic Extract of Buah Makassar (*Brucea javanica*) on Metastatic Breast Cancer Cells, *Journal of Agromedicine Medicine Science* 2: 1-6.
101. Suphantharika M., Khunrae P., Thanardkit P. and Verduyn C., 2003. Preparation of spent brewer's yeast β -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp *Penaeus monodon*, *Bioresource technology* 88: 55-60.
102. Tang S., Wang T., Jiang M., Huang C., Lai C., Fan Y. and Yong Q., 2019. Construction of arabinogalactans/selenium nanoparticles composites for enhancement of the antitumor activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 28: 444-45.
103. Thao D.T.T.; Phu D.V.; Duy N.N.; Quy H.T.D.; Hoa, T.T. and Hien, N.Q. 2017. Synthesis of gold nanoparticles stabilized in dextran solution by gamma Co-60 ray irradiation and preparation of gold nanoparticles/dextran powder. *Journal of Chemistry* 1-8.
104. Tran P. A., Taylor, E., Sarin L., Hurt R.H., and Webster T.J. 2009. Novel Anti-Cancer, Anti-Bacterial Coatings for Biomaterial Applications: Selenium Nanoclusters. *MRS Proceedings* 1209.
105. Torres S.K., Campos V.L. and León C.G., 2012. Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Pantoea agglomerans* and their antioxidant activity. *Journal of Nanoparticle Research* 14(11): 1236.

106. Verma P. and Maheshwari S.K., 2018. Preparation of silver and selenium nanoparticles and its characterization by dynamic light scattering and scanning electron microscopy. *Journal Microscopy Ultrastructure* 6(4): 182-187.
107. Vetricka V., 2011. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. *World Journal of Clinical Oncology* 2(2): 115-119.
108. Vinceti M., Filippini T., Cilloni S., Bargellini A., Vergoni A., Tsatsakis A. and Ferrante M., 2017. Health risk assessment of environmental selenium: Emerging evidence and challenges (Review). *Molecular Medicine Reports* 15: 3323-3335
109. Wadhvani S.A., Gorain M., Banerjee P., Shedbalkar U.U., Sing R. and Kundu G.C., 2017. Green synthesis of selenium nanoparticles using *Acinetobacter* sp. SW30: optimization, characterization, and its anticancer activity in breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine* 12: 6841-6855.
110. Wang H., Zhang J. and Yu H., 2007. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: Comparison with selenomethionine in mice. *Free Radical Biology and Medicine* 42(10): 1524-1533.
111. Wang Y.Y., Qiu W.Y., Sun L., Ding Z. C. and Yan J.K., 2018. Preparation, characterization, and antioxidant capacities of selenium nanoparticles stabilized using polysaccharide–protein complexes from *Corbicula fluminea*. *Food Bioscience* 26: 177-184.
112. Weerapreeyakul N., Nonpunya A, Barusrux S., Thitimetharoch T. and Sripanidkulchai B., 2012. Evaluation of the anticancer potential of six herbs against a hepatoma cell line. *China Medicine* 7 (2012) 15.
113. Wolfe T., Chatterjee D., Lee J., Grant J.D., Bhattarai S., Taylor, R., Goodrich G., Nicolucci P. and Krishnan, S., 2015. Targeted gold nanoparticles enhance sensitization of prostate tumors to megavoltage radiation therapy *in vivo*, *Nanomedicine*, 11(5): 1277-1283.
114. Xia F. and Ivan, 2019. Effects of dietary chitosan-selenium nanoparticles (CTS-SeNPs) on zebrafish (*danio rerio*) immune system nanoparticles enhance immunity and disease resistance in zebrafish. *Fish Shellfish Immunology* 87: 449-59.
115. Yazdi M.H., Mahdavi M., Varastehmoradi B., Faramarzi M.A. and Shahverdi A.R., 2012. The immunostimulatory effect of biogenic selenium nanoparticles on the 4T1 breast cancer model: an *in vivo* study. *Biological trace element* 149: 22-28.
116. Yu B., You P., Song M., Zhou Y., Yua F. and Zheng W., 2016. A facile and fast synthetic approach to create selenium nanoparticles with diverse shapes and their antioxidation ability. *New Journal of Chemistry* 40(2):1118-1123.
117. Yu, F., Zhang, Z., Ye, S., Hong, X., Jin, H., Huang, F. and Ding, G., 2019. Immunoenhancement effects of pentadecapeptide derived from *Cyclina sinensis* on immune-deficient mice induced by cyclophosphamide. *Journal of Functional Foods* 60: 103408.

118. Zare B., Babaie S., Setayesh N. and Shahverdi A.R., 2013. Isolation and characterization of fungus for extracellular synthesis of small selenium nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* 1(1): 14-20.
119. Zeng S., Ke Y., Liu Y., Shen Y., Zhang L., Li C. and Liu Y., 2018. Synthesis and antidiabetic properties of chitosan-stabilized selenium nanoparticles. *Colloids and Surf B: Biointerfaces* 170: 115-121.
120. Zhang C., Zhai X. and Zhao G., 2015. Synthesis, characterization, and controlled release of selenium nanoparticles stabilized by chitosan of different molecular weights. *CHO Polymers* 134: 158.
121. Zhang H., Zhou H., Bai J., Li Y., Yang J., Ma Q. and Yuanyua Q., 2019. Biosynthesis of selenium nanoparticles mediated by fungus *Mariannaea* sp. HJ and their characterization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 571: 9-16.
122. Zhang S.Y., Zhang J., Wang H.Y. and Chen H.Y., 2004. Synthesis of selenium nanoparticles in the presence of polysaccharides. *Material Letters*, 58(21): 2590-2594.
123. Zhang W.N., Gong L.L., Liu Y., Zhou Z.B., Wan C.X., Xu J.J. and Chen Y., 2020. Immunoenhancement effect of crude polysaccharides of *Helvella leucopus* on cyclophosphamide-induced immunosuppressive mice. *Journal of Funcional Foods* 69: 103942.
124. Zhang Y., Huang X. Li, Zheng W., Fan C. and Chen T., 2013. Enhancement of cell permeabilization apoptosis-inducing activity of selenium nanoparticles by ATP surface decoration. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 9: 74-84.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Nguyen Thi Dung**, Tran Duc Trong, Nguyen Thanh Vu, Nguyen Trong Binh, Tran Thi Le Minh, Le Quang Luan. Radiation Synthesis of Selenium Nanoparticles Capped with β -Glucan and Its Immunostimulant Activity in Cytoxan-Induced Immunosuppressed Mice. *Nanomaterials* 2021, 11(9), 2439 (IF: 5,076, SCIE, Q1)

2. **Nguyễn Thị Dung**, Trần Đức Trọng, Nguyễn Thanh Vũ, Nguyễn Trọng Nghĩa, Lê Quang Luân. Nghiên cứu tổng hợp nano selen ổn định trong β -glucan tan trong nước bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*, 2022. (ISSN: 1859-4794).

3. **Nguyễn Thị Dung**, Trần Đức Trọng, Nguyễn Trọng Nghĩa, Huỳnh Vũ, Nguyễn Thanh Vũ, Nguyễn Thị Ngọc Anh, Trần Thị Lệ Minh, Lê Quang Luân. Hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan HepG2 của SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ gamma co-60. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc năm 2021*, NXB ĐH Thái Nguyên, ISBN: 978-604-9987-88-5.

4. Tham dự HỘI NGHỊ

- Báo cáo oral tại HỘI NGHỊ CÔNG NGHỆ SINH HỌC TOÀN QUỐC 2021: Hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan HepG2 của SeNPs/ β -glucan tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ gamma co-60. **Nguyễn Thị Dung**, Trần Đức Trọng, Nguyễn Trọng Nghĩa, Huỳnh Vũ, Nguyễn Thanh Vũ, Nguyễn Thị Ngọc Anh, Trần Thị Lệ Minh, Lê Quang Luân.

- Báo cáo poster tại HỘI NGHỊ CÔNG NGHỆ SINH HỌC CHÂU Á 2023: Anticancer activity *against* liver cancer cell line HepG2 and immunostimulant activity in cytoxan-induced immunosuppression mice of radiation synthesized SeNPs/ β -glucan. **Nguyen Thi Dung**, Tran Duc Trong, Nguyen Trong Nghia, Nguyen Thanh Vu, Tran Thi Le Minh, Le Quang Luan

5. Sáng chế/ giải pháp hữu ích

Quyết định chấp nhận đơn: Quy trình sản xuất bột nano selen ổn định trong beta-glucan tan trong nước có hoạt tính tăng cường miễn dịch bằng phương pháp

chiếu xạ tia gamma (Cobalt-60) và bột nano selen ổn định trong beta-glucan tan trong nước được sản xuất từ quy trình này. Quyết định số 4416w/QĐ- SHTT ngày 11 tháng 3 năm 2022, Lê Quang Luân, **Nguyễn Thị Dung** (2021), Nguyễn Thanh Vũ, Trần Đức Trọng.

6. Giải thưởng

Giải khuyến khích sáng tạo Khoa học Kỹ thuật TP. HCM

(Quyết định số 28/ QĐ - LHH ngày 27 tháng 6 năm 2023)

Giải khuyến khích sáng tạo Khoa học Kỹ thuật Toàn quốc

(Quyết định số: 1236/QĐ - LHHVN ngày 29 tháng 12 năm 2023)

Tên giải pháp: Chế tạo chế phẩm nano selen@ β -glucan có hoạt tính tăng cường miễn dịch cao bằng phương pháp chiếu xạ

PHỤ LỤC

BẢNG KÊ CÁC PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Phương pháp xác định hàm lượng β -glucan theo hướng dẫn của Hãng Megazym (Ai-len)

Phụ lục 2. Phương pháp xác định hàm lượng nano selen

Phụ lục 3. Ảnh hưởng của nồng độ nồng độ Se^{4+} ban đầu và liều xạ đến hàm lượng hàm lượng Se^{4+} còn lại sau khi chiếu xạ ở các liều xạ khác nhau

Phụ lục 4. Hoạt tính kháng oxy hóa của dung dịch SeNPs/ β -glucan

Phụ lục 5. Độc tính cấp của chế phẩm SeNPs/ β -glucan được tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ

Phụ lục 6. Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đến miễn dịch trên chuột gây suy giảm miễn dịch

Phụ lục 7. Kết quả khả năng cảm ứng apoptosis tế bào ung thư

Phụ lục 8. Kết quả phân tích chu kỳ tế bào

Phụ lục 9. Hình ảnh flow cytometry apoptosis

Phụ lục 10. Hình ảnh flow cytometry chu kỳ tế bào

Phụ lục 11 Hình ảnh chế phẩm

Phụ lục 1. Phương pháp xác định hàm lượng β -glucan theo hướng dẫn của Hãng Megazym (Ai-len)

Nguyên tắc: Mẫu được thủy phân hoàn toàn trong HCl tạo glucan. Sau đó Glucan được thủy phân nhờ enzyme *exo-1,3- β -glucanase* (100 u/ml) và *β -glucosidase* (20 u/mL) tạo D-glucose có khả năng bắt màu với dung dịch GOPOD. Xác định độ màu tạo thành bằng phương pháp đo OD để xác định hàm lượng glucan tổng số, β -glucan và α -glucan

Chuẩn bị thuốc thử

1. Thêm 8 ml dung dịch buffer sodium acetate (pH = 5) 200 mM vào lọ *Enzyme exo-1,3- β -glucanase* (100 u/mL) và *β -glucosidase* (20 u/mL). Chia nhỏ và giữ trong các ống nghiệm ở -20°C (để dùng lâu dài) và 4°C để sử dụng ngay.

2. Giữ lọ *Amyloglucosidase* (1630 u/mL) và *invertase* (500 u/mL) trong glycerol ở 4°C .

3. Pha loãng lọ *Buffer glucose* với 1 lít nước đã khử ion và giữ ở 4°C.
4. Hòa tan lọ *Glucose determination reagent* vào lọ *Buffer glucose* đã pha loãng, dung dịch này được gọi là GOPOD reagent. Chia nhỏ và trữ tối ở -20°C (trong khoảng 12 tháng) và 4°C (để sử dụng ngay).
5. Dùng lọ dung dịch chuẩn D-glucose trong 4% acid benzoic như được cung cấp.
6. Dùng lọ *β -glucan chuẩn* như được cung cấp.

Chuẩn bị dung dịch

1. *Chuẩn bị dung dịch đệm sodium acetate 200 mM, pH~5*: Dùng pipet lấy chính xác 11,6 mL dung dịch axit acetic băng (1,05 g/mL) cho vào 900 mL nước cất và chuẩn pH dung dịch về 5 bằng dung dịch NaOH 4 M sau đó cho nước khử ion đến thể tích 1 lít để sử dụng.
2. *Chuẩn bị dung dịch đệm sodium acetate 1,2 M, pH~3,8*: Dùng pipet lấy chính xác 69,6 mL dung dịch axit acetic băng (1,05 g/mL) cho vào 800 mL nước cất và chuẩn pH của dung dịch về 3,8 bằng dung dịch NaOH 4M sau đó cho nước khử ion đến thể tích 1 lít để sử dụng.
3. *Chuẩn bị dung dịch KOH 2M*: Cân 112 g KOH cho vào 800 mL nước khử ion và khuấy tan hết sau đó chỉnh về thể tích 1 lít bằng nước khử ion.
4. Dung dịch HCl 37% đậm đặc.

Xác định hàm lượng β -glucan tổng số

- a. Thủy phân glucan tổng số trong mẫu
 - Nghiền mẫu để thể tích cỡ 0,5 mm
 - Cân 100 mg mẫu cho vào ống nghiệm 20×125 mm
 - Thêm 1,5 mL HCl 37% vào ống nghiệm, đậy nắp và khuấy mạnh bằng máy lắc rung mẫu. Đặt ống nghiệm vào bồn ủ nhiệt ở 30°C trong 45 phút. Lắc mẫu mạnh sau mỗi 15 phút đến khi mẫu tan hết hoàn toàn.
 - Mở nắp sau đó đóng lỏng và ủ ở nhiệt độ 100°C. Sau 5 phút đóng nắp chặt lại và ủ trong thời gian 2 giờ.
 - Làm lạnh mẫu ở nhiệt độ phòng, mở nắp và thêm vào 10 mL NaOH 2N.
 - Chuyển hết mẫu từ ống nghiệm vào bình định mức 100 mL, dùng đệm sodium acetate 200 mM (pH~5) để rửa ống nghiệm, điều chỉnh thể tích, lắc đều.
 - Lọc qua giấy lọc hoặc ly tâm 1500 g trong 10 phút.

b. Đo tổng glucan và D-glucose

- Chuyển 0,1 mL mẫu vào ống nghiệm 16×100mm
 - Thêm 0,1 mL dung dịch hỗn hợp gồm Enzyme exo-1,3- β -glucanase (100 u/mL), β -glucosidase (20 u/mL) và đệm sodium acetate vào ống nghiệm. Trộn mẫu bằng máy lắc và ủ ở 40°C trong 60 phút.
 - Thêm 3 mL dung dịch GOPOD vào mỗi ống nghiệm và ủ thêm 20 phút ở 40°C.
 - Đo độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 510 nm và của dung dịch blank.
 - *Dung dịch blank*: 0,2 mL đệm sodium acetate (200 mM, pH=5) + 3,0 mL GOPOD.
 - *Dung dịch glucose đối chứng*: 0,1ml dung dịch chuẩn glucose (1 mg/mL) + 0,2 mL đệm sodium acetate (200 mM, pH=5) + 3,0 mL GOPOD.
 - Đo nồng độ α -glucan
 - Cân 100 g mẫu cho vào ống nghiệm 20×125mm.
 - Thêm 2 mL dung dịch KOH 2M vào ống nghiệm, cho cá từ vào khuấy trong khoảng 20 phút trong bồn đá trên máy khuấy từ.
 - Thêm 8 mL dung dịch sodium acetate 1,2 M (pH~3,8) vào mỗi ống nghiệm. Sau đó lập tức thêm 0,2 mL amyloglucosidase (1630 u/mL) và investase (500 u/mL), trộn đều, trộn kỹ và đặt ống nghiệm lên bể ổn nhiệt ở 40°C.
 - Chuyển tất cả thể tích trên vào bình định mức 100 mL. Dùng bình tia và chỉnh thể tích đạt 100 mL. Trộn kỹ, ly tâm mẫu ở 1500 g trong 10 phút.
 - Chuyển 0,1 mL dịch nổi vào ống nghiệm thủy tinh (16×100mm) thêm 0,1 mL buffer sodium acetate (200 mM, pH~5) và 3,0 mL GOPOD. Ủ ở 40°C, 20 phút.
 - Sau khi phản ứng lên màu, đo độ hấp thụ dung dịch mẫu ở 510 nm.
 - Mẫu chuẩn β -glucan chuẩn cũng được làm song song tương tự.
 - Tính toán kết quả về hàm lượng glucan tổng số, β -glucan và α -glucan
- $$\text{Glucan tổng số (\%w/w)} = \Delta E \times F \times \frac{100}{0,1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{w} \times \frac{162}{180} = \Delta E \times \frac{F}{w} \times 90$$
- $$\alpha - \text{glucan (\%w/w)} = \Delta E \times F \times 1000 \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{w} \times \frac{162}{180} = \Delta E \times \frac{F}{w} \times 90$$
- Trong đó: ΔE : Hiệu số hấp thụ của dung dịch cần đo và mẫu chuẩn;
 $F = 100/\text{độ hấp thụ của GOPOD cho } 100 \mu\text{g D-glucose chuẩn};$
 $W = \text{khối lượng của mẫu.}$
- $$\beta\text{-glucan (\%)} = \text{glucan tổng số} - \alpha\text{-glucan}$$

Khối lượng phân tử của β -glucan

Mẫu SeNPs/ β -glucan được pha loãng trong nước khử ion với nồng độ β -glucan 0,1%.

Sau đó tiến hành phân tích khối lượng phân tử trên máy GPC Model Agilent 1100 GPC system (USA) được trang bị detector RID G1362A và Bin pump G1312A. Cột sử dụng là cột Ultrahydrogel columns (7.8 id \times 300 mm) model 250 và 500 của Hãng Waters (USA) có gắn với cột bảo vệ (6 id \times 40 mm) (guard Ultrahydrogel column, Waters, USA). Thể tích mẫu đo là 20 μ L, nhiệt độ đo là 40°C và tốc độ bơm là 1 mL/phút. Mẫu chuẩn sử dụng là các chuẩn pullulan có Mw là 7,78; 12,2; 23,7; 48; 100 và 380 kDa (Polymer Laboratories, USA)

Phụ lục 2. Phương pháp xác định hàm lượng SeNPs

Dựng đường chuẩn

Cân 1,190 g NaHSeO₃ được cho vào 600 mL nước khử ion, khuấy đều cho đến khi tan hoàn toàn, sau đó bổ sung nước vừa đủ 1000 mL, tạo dung dịch stock Se⁴⁺ 1000 μ g/mL.

Tiến hành dựng đường chuẩn: Lấy 1 thể tích chất chuẩn có chứa lần lượt 2, 4, 6, 8 và 10 μ g/mL Selen chuẩn cho vào bình định mức 10 mL, sau đó thêm vào 1 mL KI 2% và 1 mL HCL 2M. Lắc nhẹ đến khi hỗn hợp có màu vàng, thể hiện sự giải phóng iod. Thêm vào 2 mL azure B 0,1% và lắc đều. Thêm nước vừa đủ 10 mL. Hỗn hợp được đo độ hấp thụ ở bước sóng 644 nm. Mẫu trắng sử dụng nước cất thay cho dung dịch Selen chuẩn.

Phân tích mẫu thử

Lấy 1 lượng mẫu thử (\leq 4 mL) có nồng độ selen $<$ 10 μ g/mL cho vào bình định mức 10 mL. Sau đó bổ sung 0,5 mL NaOH 1 M và 0,5 mL EDTA 0,2 M. Lắc đều và ly tâm để loại bỏ tủa. Dịch ly tâm được chuyển vào bình định mức 10 mL mới và xác định hàm lượng selen theo quy trình trên. Hàm lượng Selen trong mẫu thử được tính dựa theo đường chuẩn.

Giá trị pH: Giá trị pH của chế phẩm được xác định bằng máy đo pH (Horiba-F-74BW-G, Nhật Bản): dải đo 0,00 - 14,00; độ phân giải 0,01 pH; nhiệt độ 25°C.

Phụ lục 1. Ảnh hưởng của nồng độ Se⁴⁺ ban đầu và liều xạ đến hàm lượng Se⁴⁺ còn lại sau khi chiếu xạ ở các liều xạ khác nhau

Nồng độ selen, ppm	Liều xạ, kGy	Hàm lượng Se ⁴⁺ còn sau chiếu xạ, ppm		
40	1	30,35	27,66	33,04
	2	15,51	14,66	13,80
	4	0	0	0
	6	0	0	0
60	2	44,74	43,50	42,26
	4	25,73	21,30	23,51
	6	0	0	0
	8	0	0	0
80	4	59,36	62,49	56,23
	6	28,22	26,93	25,65
	8	0	0	0
	10	0	0	0
100	6	72,50	79,18	65,82
	8	38,55	38,35	38,45
	10	0	0	0
	12	0	0	0
120	8	81,54	89,34	85,44
	10	47,18	49,38	51,58
	12	0	0	0
	14	0	0	0

Phụ lục 2. Hoạt tính kháng oxy hóa của SeNPs/ β -glucan

➤ *Hoạt tính kháng oxy hóa của dung dịch SeNPs/ β -glucan theo kích thước hạt*

Thời gian, giờ	SeNPs, d ~ 64 nm	SeNPs, d ~ 71 nm	SeNPs, d ~ 92 nm	SeNPs, d ~ 96 nm	SeNPs, d ~ 110 nm	Acid ascorbic
1	58,06	41,36	32,11	20,70	11,13	25,61
3	79,57	49,47	43,11	28,64	19,33	25,61
6	100,00	74,26	53,41	44,79	32,24	25,61
9	100,00	91,44	73,33	65,26	45,72	25,61
12	100,00	100,00	87,79	77,90	59,58	25,61
18	100,00	100,00	100,00	90,95	74,99	25,61
24	100,00	100,00	100,00	100,00	88,80	25,61
36	100,00	100,00	100,00	100,00	98,14	25,61
48	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	25,61

➤ *Ảnh hưởng của nồng độ đến hoạt tính kháng oxy hóa của dung dịch SeNPs/ β -glucan*

Thời gian, giờ	0 ppm	5 ppm	10 ppm	15 ppm	20 ppm	25 ppm
1	0,00	17,15	32,11	49,94	60,87	79,46
3	0,00	23,26	43,11	62,15	81,25	96,88
6	0,00	28,21	53,41	87,32	98,58	100,00
9	0,00	35,67	73,33	100,00	100,00	100,00
12	0,00	41,10	87,79	100,00	100,00	100,00
18	0,00	53,64	100,00	100,00	100,00	100,00
24	0,00	67,17	100,00	100,00	100,00	100,00
36	0,00	89,68	100,00	100,00	100,00	100,00
48	0,00	93,69	100,00	100,00	100,00	100,00

Phụ lục 3: Độc tính cấp của chế phẩm SeNPs/ β -glucan được chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ

➤ *Độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt của chế phẩm SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 160 mg chế phẩm/kg thể trọng chuột*

Đợt	Chuột thử nghiệm	Giới tính	Trọng lượng trung bình (g/con)				Chuột chết	
			Ban đầu	Sau 3 ngày	Sau 7 ngày	Sau 14 ngày	Sau 3 ngày	sau 14 ngày
1	1	♂	21,61	24,03	25,76	29,45		
	2	♂	20,57	20,85	21,32	23,67		
	3	♂	24,62	25,15	27,42	28,11		
	4	♀	22,28	23,33	25,9	26,68		
	5	♀	24,93	25,14	26,53	27,16		
	6	♀	23,44	23,84	25,45	26,61		
2	7	♂	19,94	21,91	23,48	23,72		
	8	♂	21,77	23,82	24,15	28,62		
	9	♂	22,00	23,14	24,55	25,83		
	10	♀	21,75	22,66	23,3	24,23		
	11	♀	19,13	20,67	22,14	24,04		
	12	♀	21,25	22,45	22,06	27,35		
3	13	♂	22,35	21,19	23,56	23,89		
	14	♂	19,19	24,15	28,58	27,35		
	15	♂	21,78	24,67	25,89	27,32		
	16	♀	20,7	21,56	24,35	28,72		
	17	♀	23,15	23,56	25,38	29,35		
	18	♀	21,09	22,55	23,8	27,45		

➤ Độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt của chế phẩm SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 320 mg chế phẩm/kg thể trọng chuột

Đợt	Chuột thử nghiệm	Giới tính	Trọng lượng trung bình (g/con)				Chuột chết	
			Ban đầu	Sau 3 ngày	Sau 7 ngày	Sau 14 ngày	Sau 3 ngày	sau 14 ngày
1	1	♂	24,14	25,32	26,47	27,35		
	2	♂	18,1	19,27	21,21	23,72		
	3	♂	24,42	26,31	27,57	28,38		
	4	♀	22,47	24,79	25,18	27,89		
	5	♀	20,36	23,76	26,38	30,17		
	6	♀	21,41	21,84	23,67	25,73		
2	7	♂	21,72	22,28	24,17	25,78		
	8	♂	19,59	25,6	26,26	29,28		
	9	♂	21,56	24,56	24,89	26,35		
	10	♀	20,57	22,16	24,57	25,88		
	11	♀	19,48	23,58	25,38	27,95		
	12	♀	21,25	22,45	22,06	27,35		
3	13	♂	19,35	20,65	22,55	24,72		
	14	♂	23,13	23,56	26,76	28,65		
	15	♂	20,14	23,45	24,57	27,35		
	16	♀	22,17	24,35	28,71	29,46		
	17	♀	21,12	22,78	23,45	24,32		
	18	♀	20,18	22,56	23,9	26,56		

➤ Độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt của chế phẩm SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 480 mg chế phẩm/kg thể trọng chuột

Đợt	Chuột thử nghiệm	Giới tính	Trọng lượng trung bình (g/con)				Chuột chết	
			Ban đầu	Sau 3 ngày	Sau 7 ngày	Sau 14 ngày	Sau 3 ngày	sau 14 ngày
1	1	♂	20,87	23,12	24,09	26,07		
	2	♂	20,55	22,09	23,51	25,64		
	3	♂	19	20,88	22,83	25,68		
	4	♀	21,41	24,01	25,36	27,38		
	5	♀	19,35	22,98	24,35	25,01		
	6	♀	19,75	22,79	24,62	26,17		
2	7	♂	23,88	25,42	26,48	27,75		
	8	♂	20,34	21,97	23,09	26,17		
	9	♂	23,42	22,85	26,58	24,47		
	10	♀	19,09	22,42	23,66	25,76		
	11	♀	21,85	26,31	27,6	29,59		
	12	♀	20,54	21,14	26,67	29,85		
3	13	♂	19,42	19,56	23,87	26,35		
	14	♂	23,94	25,03	25,8	29,62		
	15	♂	19,12	20,06	22,76	24,35		
	16	♀	21,23	22,76	24,79	26,36		
	17	♀	22,26	25,32	27,08	27,92		
	18	♀	20,46	23,24	26,05	27,87		

➤ Độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt của chế phẩm SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 640 mg chế phẩm/kg thể trọng chuột

Đợt	Chuột thử nghiệm	Giới tính	Trọng lượng trung bình (g/con)				Chuột chết	
			Ban đầu	Sau 3 ngày	Sau 7 ngày	Sau 14 ngày	Sau 3 ngày	sau 14 ngày
1	1	♂	21,24	23,25	25,72	27,86		
	2	♂	18,27	21,75	23,94	25,5		
	3	♂	20,51				x	
	4	♀	23,43	25,25	27,18	29,91		
	5	♀	19,45	22,27	23,2	24,27		
	6	♀	23,81	24,42	25,92	28,37		
2	7	♂	20,28	23,29	24,65	26,64		
	8	♂	24,62	26,18	29,32	31,18		
	9	♂	21,45	23,73	25,7	29,68		
	10	♀	21,19	22,26	24,56	28,86		
	11	♀	21,17	22,28	24,15	26,63		
	12	♀	19,35	20,36	20,78	24,35		
3	13	♂	23,18	23,62	24,48	25,16		
	14	♂	21,15	23,14	28,64	31,82		
	15	♂	19,26	24,09	26,47	27,25		
	16	♀	20,17	20,85	23,06	24,27		
	17	♀	19,22	19,91	21,18	25,75		
	18	♀	20,17	21,15	24,83	26,85		

➤ Độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt của chế phẩm SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 800 mg chế phẩm/kg thể trọng chuột

Đợt	Chuột thử nghiệm	Giới tính	Trọng lượng trung bình (g/con)				Chuột chết	
			Ban đầu	Sau 3 ngày	Sau 7 ngày	Sau 14 ngày	Sau 3 ngày	sau 14 ngày
1	1	♂	24,29	26,14	26,52	28,32		
	2	♂	18,62				x	
	3	♂	24,35	26,05	26,72	31,34		
	4	♀	19,72	19,44	21,81	24,73		
	5	♀	20,44	22,17	28,8	32,42		
	6	♀	19,52	20,15	22,13	26,51		
2	7	♂	21,21	20,15	22,97	26,42		
	8	♂	19,51	25,45	27,26	30,92		
	9	♂	20,9	22,15	24,57	27,61		
	10	♀	20,25	20,49	22,52	24,56		
	11	♀	21,15				x	
	12	♀	19,05	19,35	22,44	27,29		
3	13	♂	22,15	23,06	24,35	27,05		
	14	♂	19,28	22,39	25,07	28,58		
	15	♂	23,18	25,85	27,09	26,37		
	16	♀	20,73	22,83	23,07	25,85		
	17	♀	19,46	22,34	26,58	30,35		
	18	♀	20,24	21,33	24,43	26,76		

➤ Độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt của chế phẩm SeNPs/ β -glucan ở nồng độ 960 mg chế phẩm/kg thể trọng chuột

Đợt	Chuột thử nghiệm	Giới tính	Trọng lượng trung bình (g/con)				Chuột chết	
			Ban đầu	Sau 3 ngày	Sau 7 ngày	Sau 14 ngày	Sau 3 ngày	sau 14 ngày
1	1	♂	21,74	25,25	27,35	28,85		
	2	♂	20,82	24,52	28,07	30,96		
	3	♂	22,18	26,86	28,64	29,29		
	4	♀	23,55	28,12	30,38	31,16		
	5	♀	22,79	25,06	26,01	27,7		
	6	♀	22,36				x	
2	7	♂	21,33				x	
	8	♂	19,21	20,23	23,75	25,27		
	9	♂	18,25	21,62	23,17	25,63		
	10	♀	22,8	27,83	28,17	29,27		
	11	♀	24,13	27,79	30,59	31,49		
	12	♀	21,61	24,06	27,82	29,45		
3	13	♂	20,52	21,35	23,16	27,73		
	14	♂	22,46	24,26	28,21	28,94		
	15	♂	19,91	21,48	25,06	26,35		
	16	♀	22,24				x	
	17	♀	19,21	23,19	26,19	29,29		
	18	♀	21,52	21,56	23,46	28,17		

❖ **Xử lý thống kê**

➤ **Trọng lượng chuột ban đầu**

CanNang

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					160	18		
320	18	21.1756	1.67301	.39433	20.3436	22.0075	18.10	24.42
480	18	20.9156	1.61463	.38057	20.1126	21.7185	19.00	23.94
640	18	20.9956	1.76427	.41584	20.1182	21.8729	18.27	24.62
800	18	20.7806	1.70990	.40303	19.9302	21.6309	18.62	24.35
960	18	21.4794	1.57625	.37153	20.6956	22.2633	18.25	24.13
Total	108	21.1832	1.65418	.15917	20.8677	21.4988	18.10	24.93

Test of Homogeneity of Variances

CanNang

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.078	5	102	.995

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12.262	5	2.452	.892	.490
Within Groups	280.522	102	2.750		
Total	292.784	107			

CanNang

NT	N	Subset for alpha = 0.05
		1
800	18	20.7806
480	18	20.9156
640	18	20.9956
320	18	21.1756
960	18	21.4794
160	18	21.7528
Sig.		.128

Trọng lượng chuột sau 3 ngày uống chế phẩm

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
160	18	23.0372	1.40125	.33028	22.3404	23.7340	20.67	25.15
320	18	23.2928	1.76561	.41616	22.4148	24.1708	19.27	26.31
480	18	22.8861	1.84639	.43520	21.9679	23.8043	19.56	26.31
640	17	22.8118	1.70632	.41384	21.9345	23.6891	19.91	26.18
800	16	22.4588	2.34068	.58517	21.2115	23.7060	19.35	26.14
960	15	24.2120	2.62407	.67753	22.7588	25.6652	20.23	28.12
Total	102	23.1001	1.98410	.19645	22.7104	23.4898	19.27	28.12

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.648	5	96	.155

ANOVA

CanNang

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28.103	5	5.621	1.460	.210
Within Groups	369.497	96	3.849		
Total	397.600	101			

CanNang

Duncan

NT	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
800	16	22.4588	
640	17	22.8118	22.8118
480	18	22.8861	22.8861
160	18	23.0372	23.0372
320	18	23.2928	23.2928
960	15		24.2120
Sig.		.279	.066

Trọng lượng chuột sau 7 ngày uống chế phẩm

Descriptives

CanNang

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
160	18	24.6456	1.90519	.44906	23.6981	25.5930	21.32	28.58
320	18	24.8750	1.94751	.45903	23.9065	25.8435	21.21	28.71
480	18	24.9550	1.54356	.36382	24.1874	25.7226	22.76	27.60
640	17	24.9282	2.27017	.55060	23.7610	26.0954	20.78	29.32
800	16	24.7706	2.17162	.54291	23.6134	25.9278	21.81	28.80
960	15	26.6687	2.50765	.64747	25.2800	28.0574	23.16	30.59
Total	102	25.1049	2.11565	.20948	24.6893	25.5205	20.78	30.59

Test of Homogeneity of Variances

CanNang

Levene Statistic	df	df2	Sig.
	1		
.978	5	96	.435

ANOVA

CanNang

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	44.153	5	8.831	2.078	.075
Within Groups	407.922	96	4.249		
Total	452.074	101			

CanNang

Duncan

NT	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
160	18	24.6456	
800	16	24.7706	
320	18	24.8750	
640	17	24.9282	
480	18	24.9550	
960	15		26.6687
Sig.		.704	1.000

➤ Trọng lượng chuột sau 14 ngày uống chế phẩm

Descriptives

CanNang

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
160	18	26.6417	1.97308	.46506	25.6605	27.6229	23.67	29.45
320	18	27.0494	1.81586	.42800	26.1464	27.9525	23.72	30.17
480	18	26.7783	1.69269	.39897	25.9366	27.6201	24.35	29.85
640	17	27.3147	2.37468	.57594	26.0938	28.5357	24.27	31.82
800	16	27.8175	2.34187	.58547	26.5696	29.0654	24.56	32.42
960	15	28.6367	1.87999	.48541	27.5956	29.6778	25.27	31.49
Total	102	27.3277	2.08188	.20614	26.9188	27.7367	23.67	32.42

**Test of Homogeneity of
Variances
CanNang**

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.714	5	96	.615

**ANOVA
CanNang**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	44.840	5	8.968	2.191	.061
Within Groups	392.917	96	4.093		
Total	437.757	101			

**CanNang
Duncan**

NT	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
160	18	26.6417	
480	18	26.7783	
320	18	27.0494	
640	17	27.3147	27.3147
800	16	27.8175	27.8175
960	15		28.6367
Sig.		.137	.075

Phụ lục 4: Ảnh hưởng của SeNPs/ β -glucan đến miễn dịch trên chuột gây suy giảm miễn dịch

Chỉ số lách

Khối lượng lách, mg						
Checking	ĐC	0	2mg/kg	4mg/kg	6mg/kg	
1	126,1	31,4	49,9	54,1	64	101,2
2	121	36,1	50	49,3	85,2	100,9
3	128,8	32,8	42,7	68,1	75,6	109,4
	125,3	33,43333333	47,53333333	57,16666667	74,933333	103,83333
Khối lượng chuột, g						
Checking	ĐC	0	2mg/kg	4mg/kg	6mg/kg	
1	30,2	19,3	21,3	25,3	26,7	27,4
2	31,1	23	24,3	26,7	25,9	29,3
3	30	19,3	21,3	27,6	26,4	27,1
Chỉ số lách, mg/10g						
M spleen/M body weight *10						
N- Ctrl	CTX-Ctrl	0	2mg/kg	4mg/kg	6mg/kg	
1	41,75	16,27	23,43	21,38	23,97	36,93
2	38,91	15,70	20,58	18,46	32,90	34,44
3	42,93	16,99	20,05	24,67	28,64	40,37
	41,20	16,32	21,35	21,51	28,50	37,25

Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
						Lower Bound	Upper Bound
CD34_TX	1.00	3	4.4667	.40415	.23333	3.4627	5.4706
	2.00	3	.3000	.26458	.15275	-.3572	.9572
	4.00	3	1.0667	.20817	.12019	.5496	1.5838
	5.00	3	1.3333	.66583	.38442	-.3207	2.9874
	6.00	3	1.5667	.90185	.52068	-.6737	3.8070
	7.00	3	3.5667	.66583	.38442	1.9126	5.2207

	Total	18	2.0500	1.5849 5	.37358	1.2618	2.8382
WBC_TX	1.00	3	93.1000	1.4525 8	.83865	89.4916	96.7084
	2.00	3	11.1667	2.4664 4	1.42400	5.0397	17.2936
	4.00	3	49.4000	18.836 40	10.87520	2.6078	96.1922
	5.00	3	52.2667	17.538 05	10.12560	8.6997	95.8336
	6.00	3	75.4667	2.5774 7	1.48810	69.0639	81.8694
	7.00	3	84.6000	5.2716 2	3.04357	71.5046	97.6954
	Total	18	61.0000	29.587 93	6.97394	46.2863	75.7137
LYM_TX	1.00	3	47.5000	1.5716 2	.90738	43.5959	51.4041
	2.00	3	6.9667	.20817	.12019	6.4496	7.4838
	4.00	3	19.9667	2.1825 1	1.26007	14.5450	25.3883
	5.00	3	20.4667	2.1079 2	1.21701	15.2303	25.7030
	6.00	3	23.5000	4.1904 7	2.41937	13.0903	33.9097
	7.00	3	44.3667	10.602 04	6.12109	18.0297	70.7036

	Total	18	27.1278	15.273 65	3.60003	19.5324	34.7232
--	-------	----	---------	--------------	---------	---------	---------

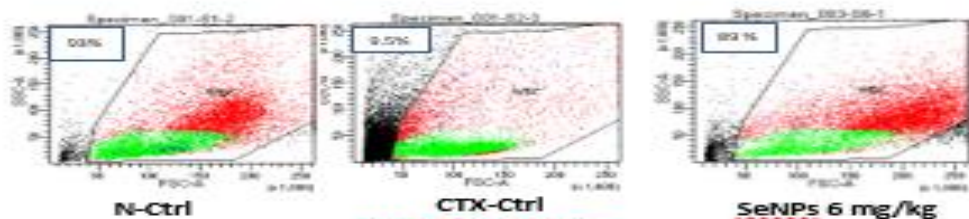
ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CD34_TX	Between Groups	38.752	5	7.750	23.525	.000
	Within Groups	3.953	12	.329		
	Total	42.705	17			
WBC_TX	Between Groups	13472.540	5	2694.508	22.931	.000
	Within Groups	1410.040	12	117.503		
	Total	14882.580	17			
LYM_TX	Between Groups	3682.469	5	736.494	31.189	.000
	Within Groups	283.367	12	23.614		
	Total	3965.836	17			

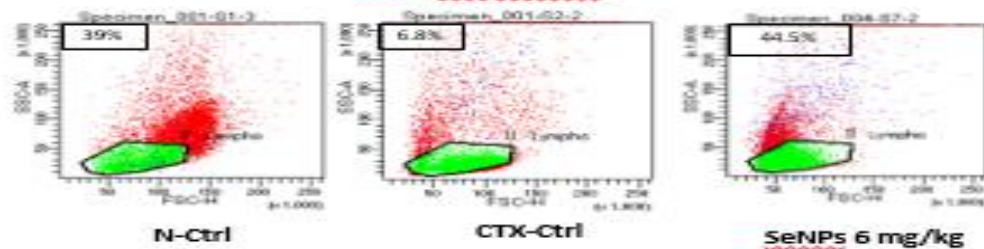
CD34_TX				
Duncan				
NT	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
2.00	3	.3000		
4.00	3	1.0667	1.0667	
5.00	3	1.3333	1.3333	
6.00	3		1.5667	
7.00	3			3.5667
1.00	3			4.4667
Sig.		.057	.330	.079
WBC_TX				
Duncan				
NT	N	Subset for alpha = 0.05		

		1	2	3
2.00	3	11.1667		
4.00	3		49.4000	
5.00	3		52.2667	
6.00	3			75.4667
7.00	3			84.6000
1.00	3			93.1000
Sig.		1.000	.752	.082

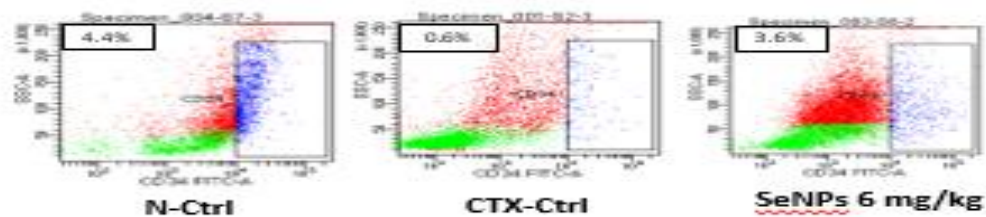
LYM_TX				
Duncan				
NT	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
2.00	3	6.9667		
4.00	3		19.9667	
5.00	3		20.4667	
6.00	3		23.5000	
7.00	3			44.3667
1.00	3			47.5000
Sig.		1.000	.414	.445



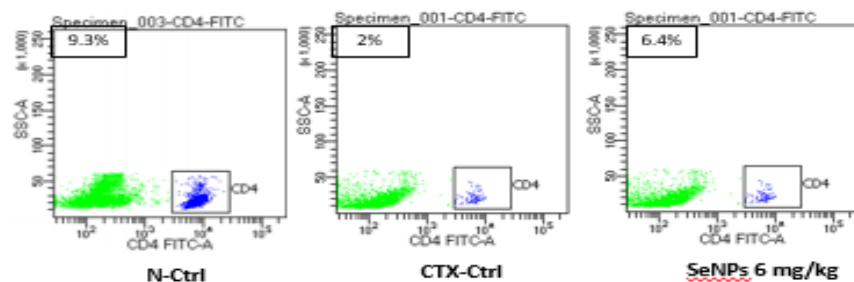
WBC tủy xương



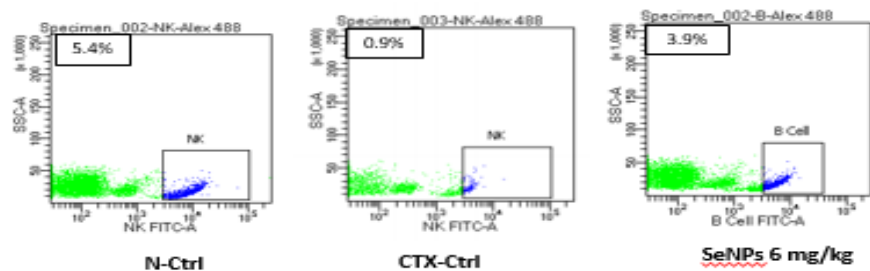
Lymphocyte tủy xương



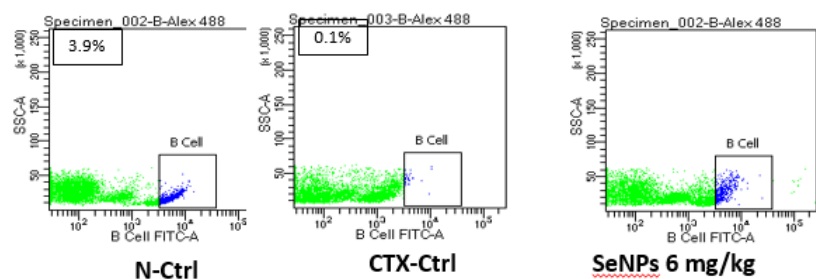
CD34 cells tủy xương



CD4 cells máu ngoại vi

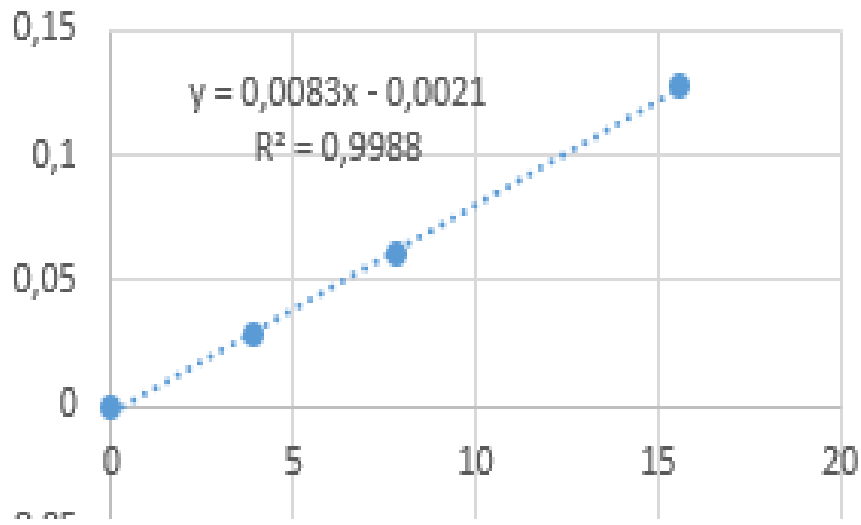


NK cells máu ngoại vi



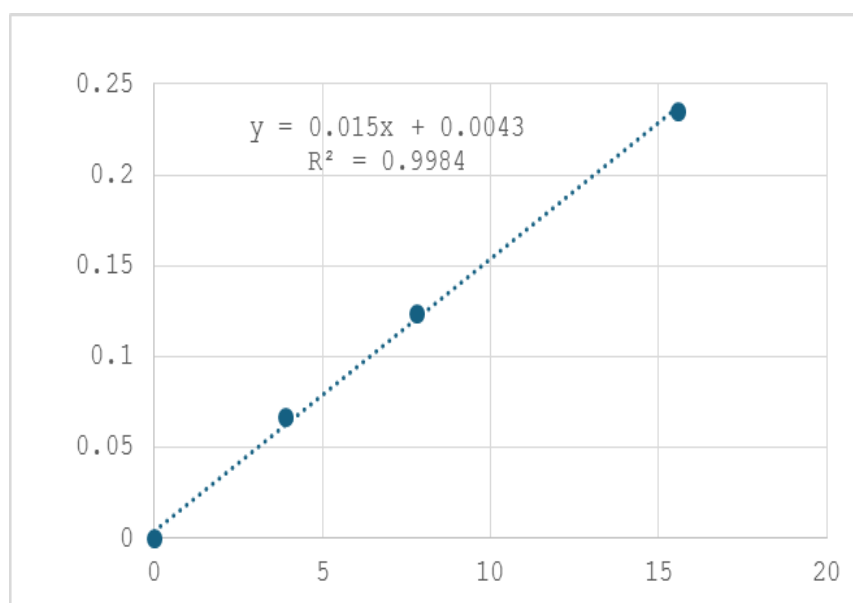
B cells máu ngoại vi

IgM trong lách



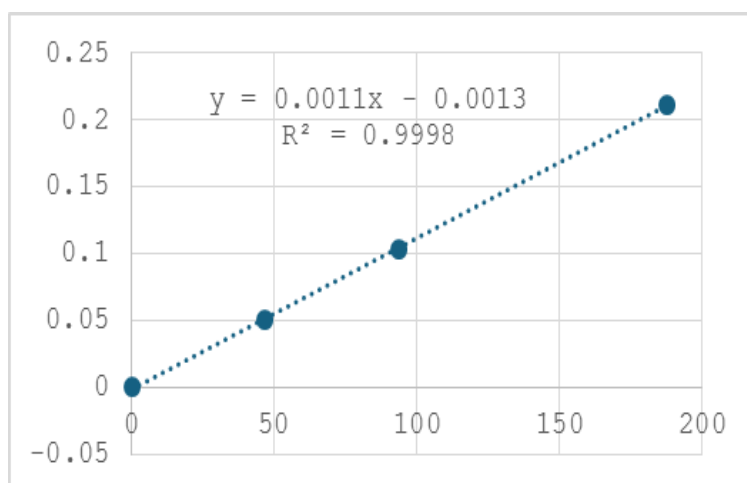
Trong Lách pha loãng 1/10000			IgM $\mu\text{g/mL}$	SE
Chuột	OD	IgM ng/mL		
N-Ctrl	0,02175	2,873	28,73	1,67
	0,01935	2,584	25,84	
	0,01695	2,295	22,95	
CTX-Ctrl	0,00195	0,488	4,88	0,59
	0,00125	0,404	4,04	
	0,00295	0,608	6,08	
0	0,00645	1,030	10,30	0,49
	0,00715	1,114	11,14	
	0,00575	0,946	9,46	
2	0,00735	1,139	11,39	0,49
	0,00805	1,223	12,23	
	0,00875	1,307	13,07	
4	0,01015	1,476	14,76	0,21
	0,01055	1,524	15,24	
	0,00995	1,452	14,52	
6	0,01175	1,669	16,69	0,40
	0,01205	1,705	17,05	
	0,01285	1,801	18,01	

IgG trong lách



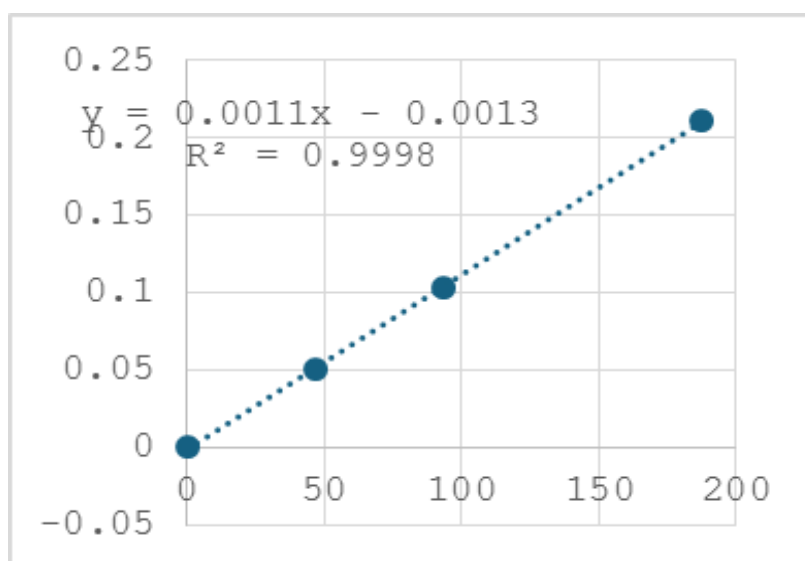
Trong Lách pha loãng 1/10000			IgG $\mu\text{g/mL}$	SE
Chuột	OD	IgG ng/mL		
N-Ctrl	0,0749	4,71	47,07	3,33
	0,0922	5,86	58,60	
	0,08355	5,28	52,83	
CTX-Ctrl	0,0101	0,39	3,87	3,12
	0,0159	0,77	7,73	
	0,0261	1,45	14,53	
0	0,0314	1,81	18,07	0,62
	0,0341	1,99	19,87	
	0,0343	2,00	20,00	
2	0,0479	2,91	29,07	2,44
	0,0522	3,19	31,93	
	0,0397	2,36	23,60	
4	0,0562	3,46	34,60	1,23
	0,053	3,25	32,47	
	0,0594	3,67	36,73	
6	0,0619	3,84	38,40	0,42
	0,0614	3,81	38,07	
	0,0598	3,70	37,00	

TNF- α trong lách



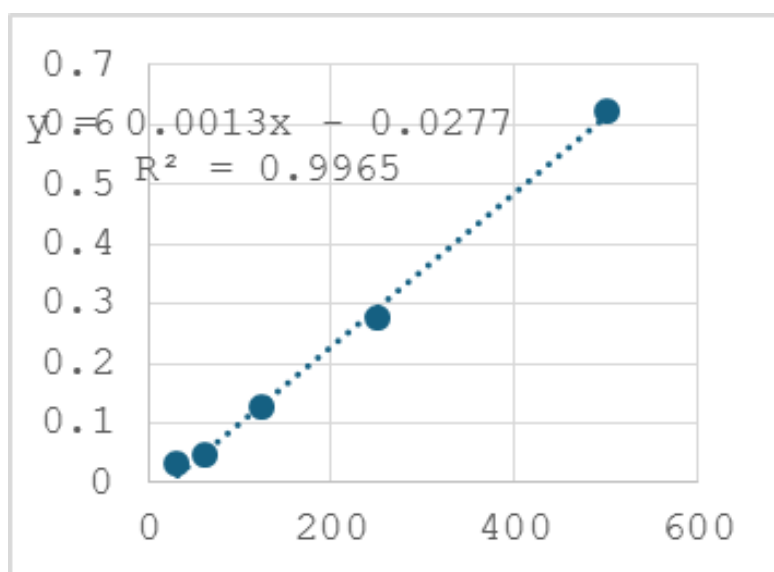
Trong Lách pha loãng 1/4			TNF- α ng/mL	SE
Chuột	OD	TNF- α ng/mL		
N-Ctrl	0,0402	37,73	150,91	16,27
	0,0557	51,82	207,27	
	0,04795	44,77	179,09	
CTX-Ctrl	0,0066	7,18	28,73	2,70
	0,0042	5,00	20,00	
	0,0046	5,36	21,45	
0	0,0131	13,09	52,36	2,36
	0,0109	11,09	44,36	
	0,0124	12,45	49,82	
2	0,0142	14,09	56,36	2,83
	0,0155	15,27	61,09	
	0,0128	12,82	51,27	
4	0,0167	16,36	65,45	1,95
	0,0172	16,82	67,27	
	0,0185	18,00	72,00	
6	0,02545	24,32	97,27	6,82
	0,0222	21,36	85,45	
	0,0287	27,27	109,09	

IFN- γ trong lách



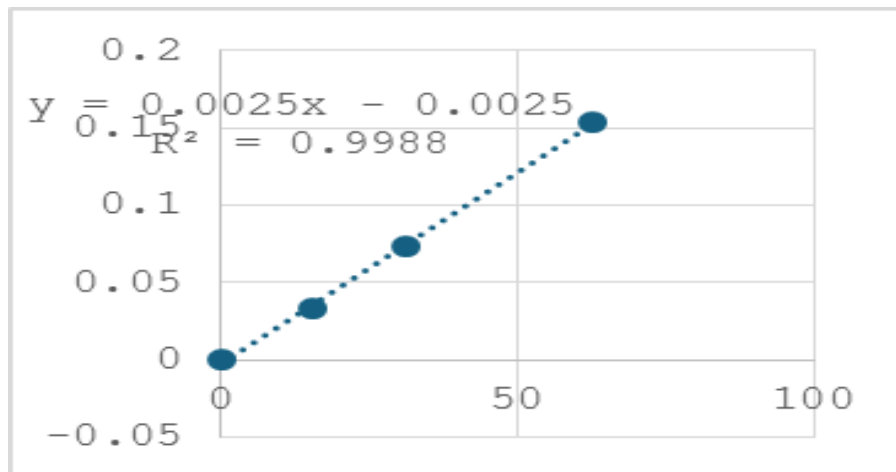
Trong huyết thanh pha loãng 1/1000			IFN- α $\mu\text{g/mL}$	SE
Chuột	OD	IFN- α ng/mL		
N-Ctrl	0,0086	4,44	4,44	0,17
	0,0101	5,04	5,04	
	0,00935	4,74	4,74	
CTX-Ctrl	0,0002	1,08	1,08	0,05
	0,0006	1,24	1,24	
	0,0004	1,16	1,16	
0	0,0017	1,68	1,68	0,07
	0,0014	1,56	1,56	
	0,002	1,80	1,80	
2	0,0023	1,92	1,92	0,02
	0,0024	1,96	1,96	
	0,0025	2,00	2,00	
4	0,00365	2,46	2,46	0,06
	0,0034	2,36	2,36	
	0,0039	2,56	2,56	
6	0,0048	2,92	2,92	0,14
	0,0042	2,68	2,68	
	0,0054	3,16	3,16	

IL-2 trong lách



Trong Lách pha loãng 1/10			IL-2 μg/mL	SE
Chuột	OD	IL-2 ng/mL		
N-Ctrl	0,6049	486,62	4,87	0,01
	0,611	491,31	4,91	
	0,60795	488,96	4,89	
CTX-Ctrl	0,0442	55,31	0,55	0,13
	0,0781	81,38	0,81	
	0,1007	98,77	0,99	
0	0,213	185,15	1,85	0,15
	0,1685	150,92	1,51	
	0,2363	203,08	2,03	
2	0,2913	245,38	2,45	0,20
	0,3026	254,08	2,54	
	0,3761	310,62	3,11	
4	0,5022	407,62	4,08	0,09
	0,4829	392,77	3,93	
	0,5215	422,46	4,22	
6	0,5534	447,00	4,47	0,09
	0,5598	451,92	4,52	
	0,5895	474,77	4,75	

IFN- γ máu ngoại vi



Trong huyết thanh pha loãng 1/1000			IFN- α $\mu\text{g/mL}$	SE
Chuột	OD	IFN- α ng/mL		
N-Ctrl	0,0039	2,56	2,56	0,09
	0,0039	2,56	2,56	
	0,0032	2,28	2,28	
CTX-Ctrl	0,0006	1,24	1,24	0,02
	0,0004	1,16	1,16	
	0,0005	1,20	1,20	
0	0,0012	1,48	1,48	0,04
	0,0011	1,44	1,44	
	0,0009	1,36	1,36	
2	0,002	1,80	1,80	0,10
	0,0014	1,56	1,56	
	0,00115	1,46	1,46	
4	0,00175	1,70	1,70	0,02
	0,00165	1,66	1,66	
	0,00155	1,62	1,62	
6	0,0032	2,28	2,28	0,09
	0,0026	2,04	2,04	
	0,0025	2,00	2,00	

Phụ lục 5. Bảng số liệu đếm tế bào (nhuộm trypan blue) 24 giờ sau xử lý

LẦN 1						
	Live	Dead	Volume (mL)	Density (x106 cells/mL)	Total cell (x106 cells)	live cell/total cell (%)
ĐC	300	3	1.4	3.00	4.20	99.01
1ppm	83	94	1.4	0.83	1.16	46.89
5ppm	111	50	1.4	1.11	1.55	68.94
10ppm	56	36	1.4	0.56	0.78	60.87
20ppm	32	28	1.4	0.32	0.45	53.33
LẦN 2						
	Live	Dead	Volume (mL)	Density (x106 cells/mL)	Total cell (x106 cells)	live cell/total cell (%)
ĐC	289	3	1.4	2.89	4.05	98.97
1ppm	142	32	1.4	1.42	1.99	81.61
5ppm	123	65	1.4	1.23	1.72	65.43
10ppm	67	36	1.4	0.67	0.94	65.05
20ppm	40	30	1.4	0.40	0.56	57.14
20ppm	0	-	1.4	0.00	0.00	#VALUE!
LẦN 3						
	Live	Dead	Volume (mL)	Density (x106 cells/mL)	Total cell (x106 cells)	live cell/total cell (%)
ĐC	301	3	1.4	3.01	4.21	99.01
1ppm	148	32	1.4	1.48	2.07	82.22
5ppm	117	56	1.4	1.17	1.64	67.63
10ppm	53	30	1.4	0.53	0.74	63.86
20ppm	45	29	1.4	0.45	0.63	60.81

Trung Bình						
ĐC	Live	Dead	Volume (mL)	Density (x106 cells/mL)	Total cell (x106 cells)	live cell/total cell (%)
	296.67	3.00	1.40	2.97	4.15	99.00
1ppm	124.33	52.67	1.40	1.24	1.74	70.24
5ppm	117.00	57.00	1.40	1.17	1.64	67.33
10ppm	58.67	34.00	1.40	0.59	0.82	63.26
20ppm	39.00	29.00	1.40	0.39	0.55	57.10

Phụ lục 6. Kết quả khả năng cảm ứng apoptosis tế bào ung thư

Lần 1

Số liệu events

		P1	P2	P3	Q1	Q2	Q3	Q4
ĐC	Stain	9769	543	510	298	190	8940	341
1ppm	Stain	9364	1165	2871	77	1088	6349	1850
5ppm	Stain	9341	2308	4478	393	1915	4394	2639
10ppm	Stain	9751	3147	2097	2265	882	5347	1257
20ppm	Stain	9811	3745	2054	2835	824	4841	1311

Số liệu %

		P1	P2	P3	Q1	Q2	Q3	Q4
ĐC	Stain	100	6	5	3	2	92	3
1ppm	Stain	100	12	31	1	12	68	20
5ppm	Stain	100	25	48	4	21	47	28
10ppm	Stain	100	32	22	23	9	55	13
20ppm	Stain	100	38	21	29	8	49	13

Lần 2

		P1	P2	P3	Q1	Q2	Q3	Q4
ĐC	Stain	9803	22	658	10	19	9130	644
1ppm	Stain	9687	46	1827	39	35	7806	1807
5ppm	Stain	9799	104	2175	100	31	7449	2219
10ppm	Stain	9788	3995	1222	3680	494	4846	768
20ppm	Stain	9791	5515	1148	5231	578	3348	634

		P1	P2	P3	Q1	Q2	Q3	Q4
ĐC	Stain	100	0	7	0	0	93	7
1ppm	Stain	100	0	19	0	0	81	19
5ppm	Stain	100	1	22	1	0	76	23
10ppm	Stain	100	41	12	38	5	50	8
20ppm	Stain	100	56	12	53	6	34	6

Lần 3

		P1	P2	P3	Q1	Q2	Q3	Q4
ĐC	Stain	9792	224	380	168	72	9234	318
1ppm	Stain	9708	137	2541	91	53	7066	2498
5ppm	Stain	9737	477	2297	381	103	7033	2220
10ppm	Stain	9804	1912	1619	1703	245	6464	1392
20ppm	Stain	9824	4019	1836	3557	498	4412	1357

		P1	P2	P3	Q1	Q2	Q3	Q4
ĐC	Stain	100	2	4	2	1	94	3
1ppm	Stain	100	1	26	1	1	73	26
5ppm	Stain	100	5	24	4	1	72	23
10ppm	Stain	100	20	17	17	2	66	14
20ppm	Stain	100	41	19	36	5	45	14

Trung bình

		P1	P2	P3	Q1	Q2	Q3	Q4
ĐC		100	3	5	2	1	93	4
1ppm		100	5	25	1	4	74	21
5ppm		100	10	31	3	7	65	25
10ppm		100	31	17	26	6	57	12
20ppm		100	45	17	40	6	43	11

Phụ lục 6. Kết quả phân tích chu kỳ tế bào

	Lần 1					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
ĐC	9825	4490	1497	2638	80	1159
1ppm	9404	2369	1340	3709	147	1866
5ppm	9556	2713	1306	2983	849	1731
10ppm	9846	1594	871	1261	5455	659
20ppm	9937	1206	553	737	7141	300
	%					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
ĐC	100	46	15	27	1	12
1ppm	100	25	14	39	2	20
5ppm	100	28	14	31	9	18
10ppm	100	16	9	13	55	7
20ppm	100	12	6	7	72	3

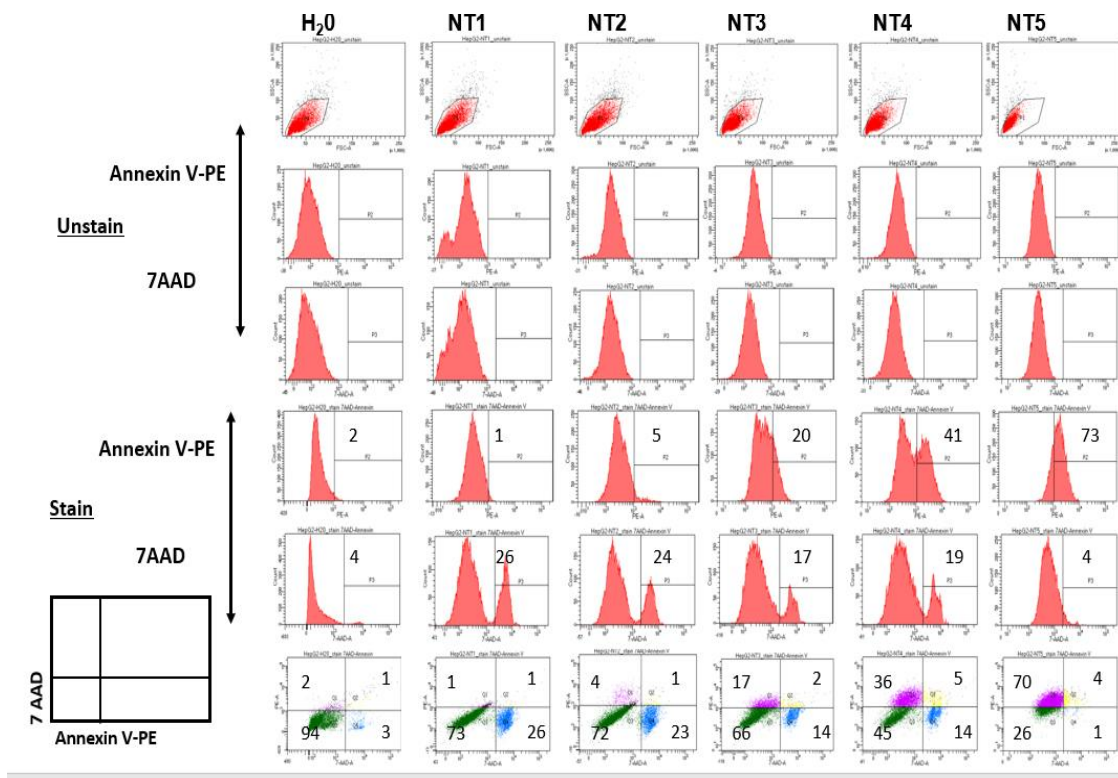
	Lần 2					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
ĐC	9587	4249	1051	2393	67	1827
NT1	9070	2395	1529	3141	95	1910
NT2	9138	2641	1520	2811	525	1641
NT3	9848	2493	1004	2408	3088	855
NT4	9875	2077	699	2162	4278	659
	%					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
ĐC	100	44	11	25	1	19
1ppm	100	26	17	35	1	21
5ppm	100	29	17	31	6	18
10ppm	100	25	10	24	31	9
20ppm	100	21	7	22	43	7

	Lần 3					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
ĐC	9520	4098	1135	2842	72	1373
1ppm	9168	2706	1399	3084	144	1832
5ppm	9590	3267	1483	2854	454	1528
10ppm	9728	1613	1021	1194	5184	716
20ppm	9739	924	296	466	7757	296
	%					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
ĐC	100	43	12	30	1	14
1ppm	100	30	15	34	2	20
5ppm	100	34	15	30	5	16
10ppm	100	17	10	12	53	7
20ppm	100	9	3	5	80	3

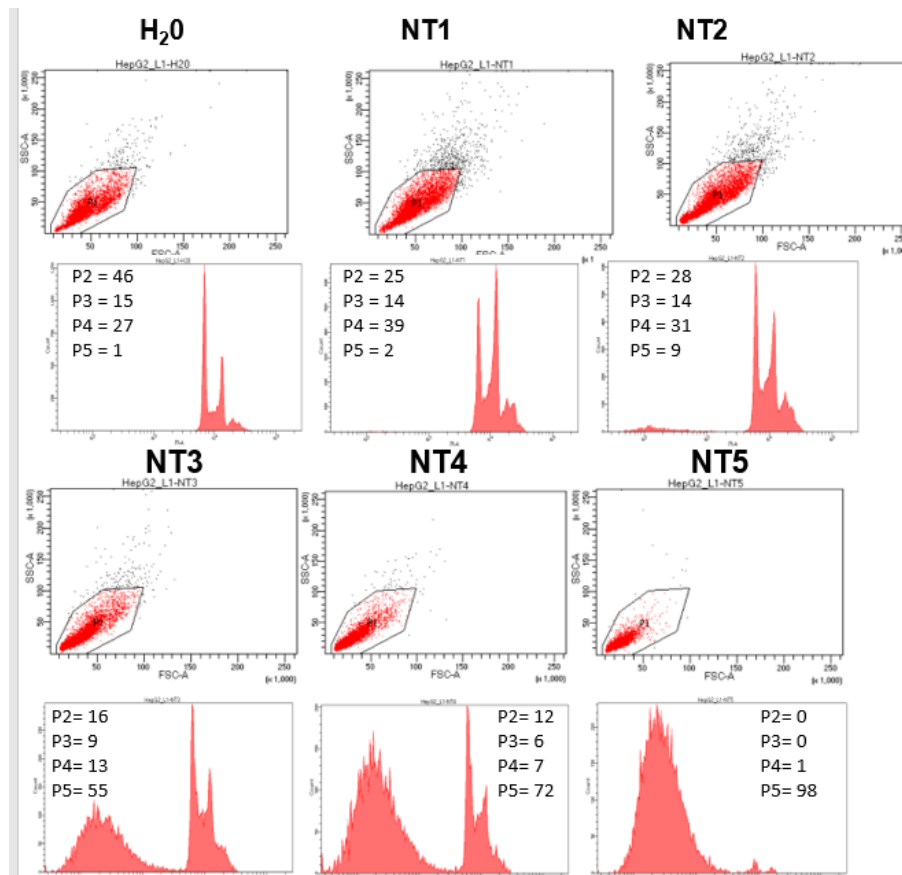
Trung bình

	P1	P2 (G0/G1)	P3 (S phase)	P4 (G2/M0)	P5 (Sub- G1)	P6
ĐC	100	44	13	27	1	15
1ppm	100	27	15	36	1	20
5ppm	100	30	15	31	6	17
10ppm	100	19	10	17	47	8
20ppm	100	14	5	11	65	4

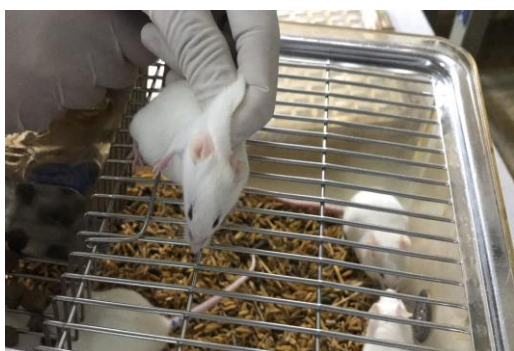
Phụ lục 7. Hình ảnh flowcytometry apoptosis



Phụ lục 8. Hình ảnh flowcytometry chu kỳ tế bào



Phụ lục 9: Hình ảnh chế phẩm





MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING
NONG LAM UNIVERSITY - HO CHI MINH CITY
Linh Trung Ward – Thu Duc District – Ho Chi Minh City
Tel: 84 8 38966946; Fax: 84 8 38960713

Animal Ethics Committees
Pursuant to Article 1624/QĐ-BHNL-TCCB on 14/6/2019
Nong Lam University www.aec.nlu.edu
Email: aec@hemuaf.edu.vn



Ho Chi Minh city, 20 August, 2021

Dear Assoc. Prof. **Le Quang Luan**

Animal Ethics Committees in Nong Lam University (AEC – NLU) has recently reviewed your application for the animal ethical approval of the project mentioned below. Your proposal fully meets the requirement of using animal in research that are in accordance with accepted international assessment standards adopted by the committee and Vietnam legislation. AECs is honour to grant the ethical approval

Approval No.:	20210108NLU
Project title:	Study on synthesis of selenium nanoparticles stabilized in β-glucans (SeNPs/β-Glucan) with high bio-activities by gamma Co-60 irradiation
Funding source:	Ho Chi Minh City Department of Science and Technology and Biotechnology Center of Hochiminh City (100/2019/HĐ-QPTKHCN)
Principle investigator:	Assoc. Prof. Le Quang Luan
Research Institution:	Biotechnology center of Ho Chi Minh city
Site for research:	Nong Lam University HCMC
Approval date:	20 Aug 2021
Expiry date:	20 Aug 2022
AECs decision:	Unconditionally approved the protocol

The standard conditions of this approval are (i) perform the protocol to use animal strictly as described in the application, any changes should be requested and approved by AEC-NLU; (ii) Provide satisfactory annual progress report as per the reporting schedule described in the application, (iii) provide adverse event reports immediately following any adverse events, (iv) provide a satisfactory final report on project completion.

Please note that failure to follow the above conditions may result in withdrawal of this approval.

Best regards,