

NGHIÊN CỨU HIỆU QUẢ CHỐNG PHÓNG XẠ CỦA CÁC HẠT NANO CẦU VÔ ĐỊNH HÌNH VẬN CHUYỂN CHẤT CHỐNG OXY HÓA GENISTEIN

NGUYỄN HỒNG QUANG ⁽¹⁾, CHUPIN V.V ⁽²⁾, SVET V.I ⁽²⁾,
KOVTON V.YU ⁽³⁾, GREBENYUK A.N ⁽⁴⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, nhu cầu nghiên cứu bảo vệ con người khỏi hậu quả của các tác nhân phóng xạ đang là một vấn đề quan trọng và cấp thiết. Các chất chống oxy hóa đang được nghiên cứu và sử dụng rất nhiều trong việc bào chế các chế phẩm chống các bệnh nhiễm phóng xạ. Các hợp chất này có khả năng bổ sung điện tích cho các gốc tự do hoặc trung hòa các dạng oxy hoạt động được hình thành trong cơ thể khi nhiễm xạ để triệt tiêu khả năng phá hủy các thành phần tế bào của các tác nhân này. Một trong số các hoạt chất chống oxy hóa tiềm năng đang được tập trung nghiên cứu là genistein được tách chiết từ hạt của một số cây họ đậu là chất có thể sử dụng để bào chế thành chế phẩm chống phóng xạ hiệu quả nhờ có hoạt tính chống oxy hóa mạnh và không biểu hiện độc tính cũng như tác dụng phụ khi đưa vào cơ thể [1, 2].

Tuy nhiên việc bào chế các chế phẩm từ hợp chất genistein dạng tự do gặp phải những khó khăn do tính kỵ nước mạnh của nó. Để khắc phục vấn đề này, phương án bào chế chất mang genistein dạng nano đã được nhóm tác giả cân nhắc và thực hiện. Ngoài ra, cho đến thời điểm hiện tại, các nghiên cứu về dạng nano của genistein vẫn còn rất hạn chế và việc xem xét hiệu quả chống phóng xạ của chế phẩm nano từ genistein đang là một hướng nghiên cứu nhiều tiềm năng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

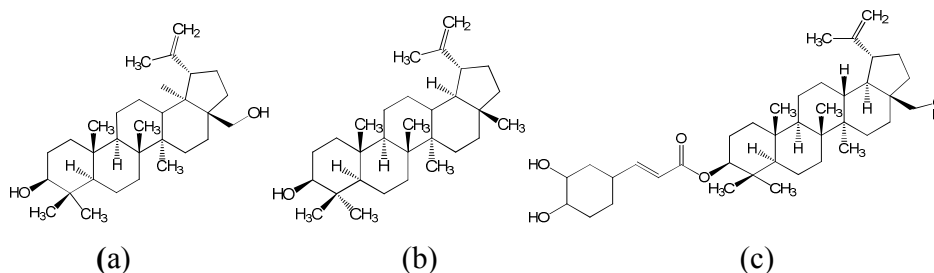
2.1. Hóa chất, thiết bị nghiên cứu

Các hóa chất bao gồm: Hỗn hợp triterpenoid của lớp vỏ cây bạch dương (CTB) được tách chiết tại trường đại học tổng hợp kỹ thuật Moscow - Liên bang Nga; Cholesterin hemisuccinat (CHS) có hàm lượng $\geq 99\%$ (Sigma - Aldrich) dùng làm chất làm ổn định lớp màng hạt nano; Na_2HPO_4 (Sigma - Aldrich); NaH_2PO_4 (Sigma - Aldrich); Tetrahydrofuran (THF) (Sigma - Aldrich); Hợp chất genistein với độ tinh sạch $\geq 99\%$ được tách chiết tại trung tâm khoa học “Farmzasit” thuộc Viện Hàn Lâm khoa học Liên bang Nga; Nước cất được lọc qua bộ lọc với kích thước lỗ 22 nm (Millipore - Mỹ).

Nghiên cứu đã sử dụng các thiết bị: Hệ thống máy cô cất quay Laborota 4000 (Heidolph, Đức); máy khuấy từ IkaRHbasic (IkaLabortechnik, Đức); bể siêu âm SonorexTK-52 (Bandelin, Đức), máy quang phổ UV-VIS Biowave (Biochrom US, Mỹ); máy Vortex LabDancer (IkaLabortechnik, Đức); máy ly tâm CM-6M (ELMI, Latvia). Hệ thống hiển vi điện tử Joel 100CX (Nhật) với độ phóng đại 20000 lần. Hệ thống phân tích kích thước các hạt cầu và xác định điện thế zeta bề mặt Delsa™ Nano (Beckman Coulter, Inc.). Hệ thống quang phổ tự tương quan “Nanosizer” (Submicron Particale Sizer Nicomp 380- Mỹ).

2.2. Phương pháp thu nhận chế phẩm nano cầu vô định hình (Spherical amorphous nanoparticles - SaNP) tải genistein

Vật liệu nano dành cho việc bào chế được nhóm tác giả sử dụng là các cấu trúc nano SaNP được tạo thành từ hỗn hợp triterpenoid của lớp vỏ cây bạch dương (hình 1). Hỗn hợp này có ba thành phần chính với tỉ lệ hàm lượng lần lượt là: betulin 60%; lupeol 30% và kofeat betulin 10%, trong đó chỉ có kofeat betulin với cấu trúc hóa học hai đầu khác nhau (một kỵ nước, một ưa nước) có khả năng cuộn tròn trong môi trường nước thành các SaNP [3]. Các hạt SaNP có kích thước trung bình từ 100÷200nm, không có độc tính và nhờ cấu trúc đặc biệt của mình có thể bao bọc và vận chuyển được các hợp chất thuốc kỵ nước, trong đó có genistein.



Hình 1. Các thành phần chính của hỗn hợp triterpenoid của lớp vỏ cây bạch dương:
(a) - betulin 60%; (b) - lupeol 30%; (c) - kofeat betulin 10%

Các thành phần cần thiết để bào chế chế phẩm nano bao gồm: hỗn hợp CTB hòa tan trong THF 5mg/ml (A); hợp chất genistein hòa tan trong THF 1mg/ml (B); CHS hòa tan trong THF 1mg/ml (C); đệm phophat nồng độ 10^{-2} M, pH 7,5.

Phương pháp bào chế: Trong bình cầu thể tích 100 ml hòa trộn 1 ml dung dịch A và 0,5 ml dung dịch B (hàm lượng genistein tương ứng với 10% theo tỉ lệ với hàm lượng CTB). Để ổn định cấu trúc lớp màng và gia tăng tính ổn định bề mặt cho các hạt nano, bổ sung thêm 0,1 ml dung dịch C (hàm lượng tương ứng với 2% theo tỉ lệ với hàm lượng CTB). Hỗn hợp các dung dịch trên được khuấy trộn bằng máy khuấy từ trong 1 phút, sau đó bổ sung thêm 25 ml dung dịch đệm phophat và tiếp tục khuấy trong thời gian từ 7÷10 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp theo, làm bay hơi dung môi và nước trong hỗn hợp bằng cô cất quay ở 35°C đến thể tích còn 10 ml. Phần thể tích trong bình sau khi bay hơi được ly tâm để lắng kết tủa, loại bỏ toàn bộ kết tủa và thu lấy phần lỏng phía trên là thể phân tán chứa các hạt nano tải hợp chất thuốc genistein.

2.3. Đối tượng thử nghiệm

Các thử nghiệm sinh học được tiến hành trên các cá thể chuột bạch đực không thuần chủng lấy từ trại nuôi “Rappolovo” - Ngoại ô thành phố St. Petersburg - Liên bang Nga. Chỉ lựa chọn các cá thể có khối lượng cơ thể từ 20÷22g để đáp ứng tốt được liều lượng chế phẩm nano sử dụng. Mỗi nhóm nghiên cứu có không ít hơn 10 cá thể (các nhóm đối chứng 10÷12 cá thể, các nhóm thực nghiệm 10÷15 cá thể).

Để tạo ra sự nhiễm phóng xạ, chuột thử nghiệm phải chịu sự chiếu xạ của các tia rơngren. Chiếu xạ tia rơngren lên chuột được thực hiện trên hệ thống thiết bị PUM-17 với các điều kiện: Điện thế 180 kV; cường độ dòng điện 10 mA; bộ lọc 0,5 mm Cu + 1 mm Al, công suất liều lượng 38,2 Roentgen/phút; khoảng cách tiếp xúc với da 50 cm. Các tia rơngren được chiếu theo một hướng đồng nhất từ lưng đến ngực. Liều lượng chiếu xạ 7,5 Grey. Hiệu quả chống phóng xạ của chế phẩm nano được đánh giá bằng các chỉ số về khả năng sống sót của các con chuột nhiễm xạ (%) trong 30 ngày theo dõi và so sánh thời gian sống trung bình của các cá thể đối chứng cũng như các cá thể có sử dụng chế phẩm nano.

2.4. Phác đồ điều trị thử nghiệm

Để đưa vào thử nghiệm, thể phân tán nano SaNP tải genistein thu nhận được pha loãng với nước cất 2 lần để tạo ra liều lượng thích hợp của thuốc. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã chuẩn bị các mẫu thuốc với hai liều lượng 150 mg/kg và 500 mg/kg đưa vào cơ thể chuột bằng đường tiêm ổ bụng. Các liều lượng trên được xác định theo sự tính toán tương ứng với khối lượng của các cá thể chuột thử nghiệm [4]. Quy trình thử nghiệm được tiến hành với hai phác đồ điều trị:

- Phác đồ phòng ngừa: khảo sát hiệu quả chống phóng xạ khi đưa thuốc vào ở 3 thời điểm trước khi chiếu xạ, bao gồm: 24h, 1h và tiêm kế tiếp ở cả hai thời điểm (½ liều đầu ở thời điểm 24h, ½ liều còn lại ở thời điểm 1h).

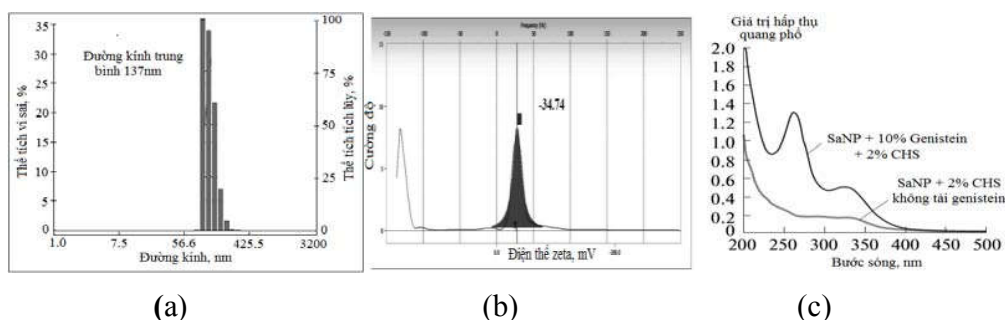
- Phác đồ điều trị nhiễm xạ: khảo sát hiệu quả chống phóng xạ khi đưa thuốc vào ở hai thời điểm 1h và 4h sau khi chiếu xạ.

Các cá thể chuột thuộc nhóm đối chứng sẽ được tiêm một thể tích nước muối sinh lý tương đương để so sánh với các cá thể của nhóm nghiên cứu. Việc sử dụng hợp chất genistein ở dạng tự do để làm mẫu đối chứng chưa được thực hiện trong nghiên cứu này bởi việc bào chế dạng dung dịch tiêm truyền rất khó khăn và tốn kém, cũng như phải sử dụng các hệ dung môi hữu cơ có khả năng gây độc cho các đối tượng thử nghiệm.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Các đặc điểm hóa lý của chế phẩm nano

Các đặc điểm hóa lý của hạt nano SaNP tải genistein được biểu thị trên hình 2.

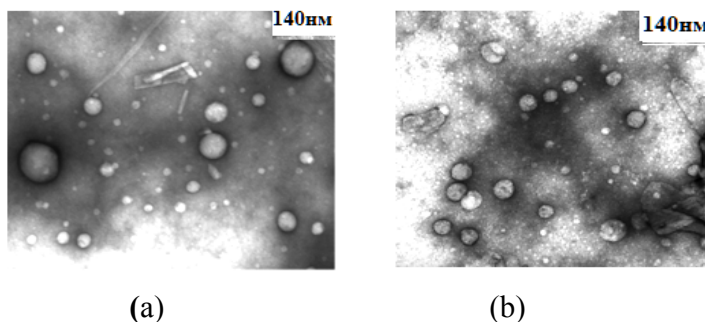


Hình 2. Các đặc điểm hóa lý của hạt nano SaNP tải genistein:

- (a) - kích thước trung bình của hạt; (b) - điện tích zeta bề mặt hạt;
 (c) - quang phổ hấp thụ UV-VIS của genistein trong mẫu dịch nano.

Dữ liệu trên hình 2 cho thấy chế phẩm nano SaNP tải genistein chứa các hạt nano với kích thước trung bình đo được là 137 nm và điện tích zeta bề mặt -34,74 mV. Các giá trị này phù hợp với tiêu chuẩn của các hạt nano vận chuyển thuốc để có thể lưu thông và phân tán tốt trong máu. Kết quả đo quang phổ hấp thụ UV-VIS của genistein trong thể phân tán chỉ ra sự có mặt của hợp chất thông qua sự xuất hiện của đỉnh hấp thụ ở bước sóng 262 nm. Dựa trên việc xây dựng đường chuẩn và tính toán nồng độ của genistein trong thể phân tán theo giá trị hấp thụ quang phổ thu được, nhóm tác giả nhận thấy, ở nồng độ thuốc được tải là 10% (tính theo tỷ lệ với hàm lượng CTB sử dụng), 100% hàm lượng thuốc ban đầu đã được tải vào các hạt nano.

Hình ảnh hiển vi (hình 3) chụp các hạt nano trong thể phân tán chỉ ra sự có mặt của 3 thành phần: (I) các hạt nano; (II) vùng huyền phù màu xám và (III) các mảnh tinh thể nằm rải rác. Theo nhận định của nhóm tác giả qua việc so sánh với hình ảnh mẫu đối chứng không chứa thuốc, các mảnh tinh thể là thành phần không tan và không tạo hạt nano của hỗn hợp CTB (betulin và lupeol), phần huyền phù màu xám hiển thị sự có mặt của hợp chất làm ổn định màng CHS bao bọc xung quanh các hạt nano. Hạt nano được tạo thành từ kofeat betulin có dạng cầu tròn, chứa các phân tử thuốc bám trên các bề mặt và trong pha kỵ nước giữa lớp màng kép của hạt. Sự liên kết giữa các phân tử thuốc genistein với các hạt nano là do sự tương tác kỵ nước giữa thuốc và các thành phần trong pha kỵ nước của hạt nano.

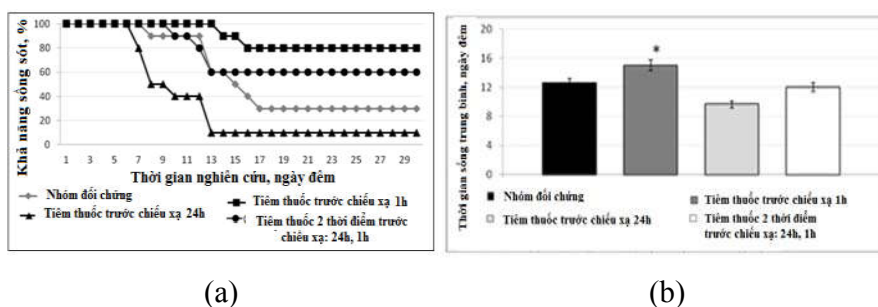


Hình 3. Hình ảnh hiển vi điện tử của hỗn dịch nano SaNP:

- (a) - SaNP + 2% CHS không tải genistein;
- (b) - SaNP tải 10% genistein + 2% CHS.

3.2. Đánh giá hiệu quả chống phóng xạ của chế phẩm nano SaNP tải genistein ở phác đồ phòng ngừa

Ở phác đồ phòng ngừa, các kết quả trên hình 4a chỉ ra rằng, việc đưa chế phẩm nano vào chuột theo đường tiêm ổ bụng với liều lượng 150 mg/kg ở thời điểm 24h trước khi bị nhiễm xạ không mang đến hiệu quả chống phóng xạ mà ngược lại khả năng sống sót của các con chuột còn kém hơn rất nhiều so với nhóm đối chứng chỉ được tiêm nước muối sinh lý thông thường. Trong khi đó, việc sử dụng thuốc ở thời điểm 1h và tiêm kế tiếp hai thời điểm (1h và 24h) trước khi chiếu xạ đã mang đến sự gia tăng rõ rệt khả năng chống phóng xạ và tỷ lệ sống sót của các cá thể chuột với 50% khi tiêm trước 1h và 30% khi tiêm kế tiếp hai thời điểm.

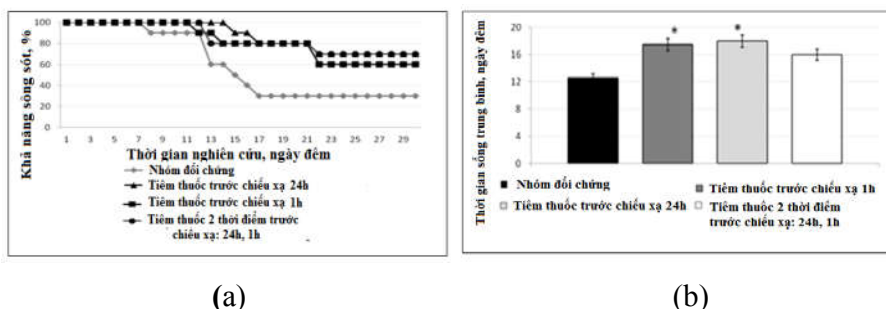


Hình 4. Hiệu quả chống phóng xạ của chế phẩm nano liều lượng 150 mg/kg ở phác đồ phòng ngừa:

(a) - khả năng sống sót sau 30 ngày; (b) - thời gian sống trung bình.

Nhóm tác giả cũng đã nghiên cứu sự ảnh hưởng của việc sử dụng thuốc theo phác đồ phòng ngừa ở liều lượng 150 mg/kg đến thời gian sống trung bình của các con chuột nhiễm phóng xạ. Các kết quả trên hình 4b cho thấy, việc tiêm thuốc ở thời điểm 24h và tiêm kế tiếp hai thời điểm cũng mang đến thời gian sống trung bình ngắn hơn so với nhóm đối chứng. Chỉ có các con chuột được tiêm thuốc ở thời điểm 1h trước khi chiếu xạ là có thời gian sống trung bình tăng lên 3 ngày.

Với liều lượng thuốc 500 mg/kg, nhóm tác giả tiếp tục tiến hành các thử nghiệm như với liều 150 mg/kg (hình 5).



Hình 5. Hiệu quả chống phóng xạ của chế phẩm nano liều lượng 500 mg/kg ở phác đồ phòng ngừa:

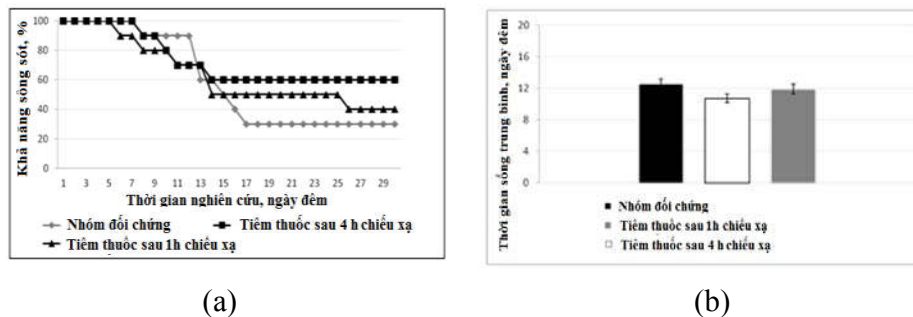
(a) - khả năng sống sót sau 30 ngày; (b) - thời gian sống trung bình.

Các kết quả thu nhận trên hình 5a cho thấy, ở cả 3 thời điểm đưa thuốc vào đều biểu hiện hiệu quả chống phóng xạ tương đối tốt với sự gia tăng tỷ lệ sống sót của các con chuột thuộc nhóm nghiên cứu từ 30÷40% so với nhóm đối chứng. Kết quả khảo sát thời gian sống trung bình (hình 5b) cũng chỉ ra sự gia tăng đồng đều của các con chuột được tiêm thuốc so với nhóm đối chứng. Theo đó, tiêm thuốc với liều 500 mg/kg ở thời điểm 1h và 24h trước khi nhiễm xạ có thể kéo dài thời gian sống trung bình của các con chuột lên đến 5 và 6 ngày.

Như vậy, ở phác đồ điều trị phòng ngừa, hiệu quả chống phóng xạ trên các đối tượng thử nghiệm được biểu hiện rất rõ rệt với khả năng gia tăng tỷ lệ sống sót và thời gian sống trung bình khi sử dụng thuốc ở các liều 150 mg/kg và 500 mg/kg. Ở

phác đồ phòng ngừa, nếu xét theo tiêu chí về sự gia tăng khả năng sống sót sống sót của chuột, hiệu quả chống phóng xạ cao nhất được ghi nhận khi sử dụng thuốc với liều lượng 150 mg/kg ở thời điểm 1h trước khi nhiễm phóng xạ với sự gia tăng tỷ lệ đến 50%. Trong khi đó, theo tiêu chí về gia tăng thời gian sống trung bình, sử dụng thuốc ở thời điểm 24h trước khi nhiễm xạ với liều 500 mg/kg cũng mang lại hiệu quả tốt với sự kéo dài thời gian 6 ngày so với nhóm đối chứng. Mặt khác, các kết quả đối lập nhau về hiệu quả chống phóng xạ của chế phẩm khi sử dụng với hai liều lượng 150 mg/kg và 500 mg/kg ở cùng thời điểm 24h trước khi nhiễm xạ có thể liên quan đến cơ chế tác dụng và nồng độ đáp ứng thấp của thuốc khi sử dụng không đủ liều lượng nếu tiêm trước thời gian dài cũng như thuốc có thể đã bị đào thải dần khỏi cơ thể. Vấn đề này sẽ được nhóm tác giả làm rõ hơn trong nghiên cứu tiếp theo.

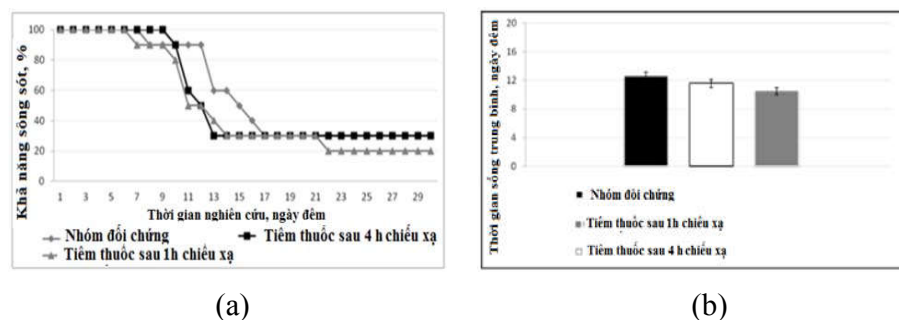
3.2. Đánh giá hiệu quả chống phóng xạ của chế phẩm nano SaNP tải genistein ở phác đồ điều trị nhiễm xạ



Hình 6. Hiệu quả chống phóng xạ của chế phẩm nano với liều 150mg/kg ở phác đồ điều trị nhiễm xạ:

(a) - khả năng sống sót sau 30 ngày; (b) - thời gian sống trung bình.

Các kết quả trên hình 6a cho thấy việc sử dụng chế phẩm nano với liều lượng 150 mg/kg ở thời điểm 1h và 4h sau khi nhiễm xạ có khả năng mang đến sự gia tăng tỉ lệ sống sót cho các con chuột thử nghiệm đến 30% so với nhóm đối chứng. Kết quả khảo sát thời gian sống trung bình của các nhóm đối tượng (hình 6b) cho thấy không có sự chênh lệch đáng kể giữa việc sử dụng và không sử dụng chế phẩm nano.



Hình 7. Hiệu quả chống phóng xạ của chế phẩm nano với liều 500 mg/kg ở phác đồ điều trị nhiễm xạ:

(a) - khả năng sống sót sau 30 ngày; (b) - thời gian sống trung bình.

Với liều 500 mg/kg, kết quả trên hình 7 cho thấy ở cả hai thời điểm sử dụng thuốc, tỉ lệ sống sót của các đối tượng dùng thuốc không tốt hơn so với nhóm đối chứng, trong khi đó thời gian sống trung bình của nhóm đối chứng cũng cao hơn so với các con chuột được tiêm thuốc.

Như vậy có thể kết luận, ở phác đồ điều trị nhiễm xạ, việc sử dụng chế phẩm nano ở các thời điểm khác nhau sau khi nhiễm phóng xạ với tất cả các liều lượng nghiên cứu hoàn toàn không đạt yêu cầu của cả hai tiêu chí là khả năng sống sót và thời gian sống trung bình của các cá thể bị nhiễm. Kết quả này cũng bước đầu cho thấy việc điều trị bằng thuốc sau khi đã bị nhiễm phóng xạ không mang lại hiệu quả khả thi.

3.3. Đánh giá hiệu quả chống phóng xạ của chế phẩm nano ở các liều lượng phóng xạ khác nhau trong phác đồ phòng ngừa

Để làm rõ hơn về mức độ biểu hiện hiệu quả chống phóng xạ của thuốc, ở giai đoạn nghiên cứu tiếp theo, nhóm tác giả đã tiến hành khảo sát sự ảnh hưởng của việc sử dụng chế phẩm nano theo phác đồ điều trị phòng ngừa đến khả năng sống sót của các đối tượng thí nghiệm nhiễm phóng xạ với các liều lượng khác nhau: 6,5; 7,5 và 8,5 Grey. Chế phẩm nano được tiêm vào các con chuột với liều lượng 150 mg/kg ở 3 thời điểm như khảo sát trong phần 3.1. Quá trình quan sát khả năng sống sót của các cá thể được tiến hành trong thời gian 15 ngày. Các kết nghiên cứu được biểu hiện trên bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của việc sử dụng chế phẩm nano (phác đồ điều trị phòng ngừa với liều 150 mg/kg) đến khả năng sống sót và thời gian sống trung bình của các con chuột nhiễm phóng xạ với các cường độ khác nhau

Điều kiện thí nghiệm	Cường độ phóng xạ, Grey	Số lượng cá thể sống sót / tổng số cá thể trong nhóm	Tỷ lệ sống sót, %	Thời gian sống trung bình, ngày
Đối chứng	6,5	5 / 10	50	9,2 ± 1,4
	7,5	4 / 12	30	8,0 ± 2,7
	8,5	3 / 15	20	9,0 ± 2,0
Tiêm thuốc 24h trước nhiễm xạ	6,5	6 / 10	60	11,1 ± 1,1
	7,5	4 / 12	20	9,6 ± 0,8
	8,5	3 / 15	20	9,9 ± 0,6
Tiêm kế tiếp 24h và 1h trước nhiễm xạ	6,5	6 / 10	60	10,8 ± 0,8
	7,5	5 / 12	42	8,8 ± 0,9
	8,5	6 / 15	40	9,7 ± 0,5
Tiêm thuốc 1h trước nhiễm xạ	6,5	7 / 10	70	11,7 ± 0,9
	7,5	7 / 12	58	10,8 ± 2,0
	8,5	5 / 15	33	9,3 ± 1,2

Có thể nhận thấy, mức độ biểu hiện hiệu quả chống phóng xạ cao nhất của chế phẩm nano theo chỉ số về sự gia tăng khả năng sống sót và thời gian sống trung bình của các cá thể nghiên cứu vẫn được thể hiện ở thời điểm dùng thuốc 1h trước khi nhiễm phóng xạ.

4. KẾT LUẬN

- Việc sử dụng hạt nano cầu vô định hình từ hỗn hợp triterpenoid của vỏ cây bạch dương vận chuyển hợp chất genistein ở phác đồ phòng ngừa đã mang đến hiệu quả chống phóng xạ rất rõ rệt, biểu hiện qua sự gia tăng khả năng sống sót và thời gian sống trung bình của các đối tượng thử nghiệm nhiễm phóng xạ được dùng thuốc. Mức độ biểu hiện hiệu quả chống phóng xạ cao nhất được ghi nhận khi dùng chế phẩm ở thời điểm 1h trước khi nhiễm phóng xạ với liều lượng thuốc 150 mg/kg với sự gia tăng khả năng sống sót của nhóm thử nghiệm đến 50%.

- Chế phẩm nano của genistein tỏ ra không hiệu quả khi được sử dụng ở phác đồ điều trị sau khi đã bị nhiễm phóng xạ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bhatia A., Gaur A., Sharma A., Radiation protection by an isoflavone, genistein: a study on the survivability of mice, Nucl. Techn. Rad. Protect, 2007, 1(22):34-39.
2. Тарумов Р.А., Гребенюк А.Н., Башарин В. А. и др., Биологические свойства фитοэстрогена генистеина, Медицина экстремальных ситуаций, 2014, № 2, с.55-68.
3. Каплун А.П., Безруков Д.А., Попенко В.И., Швеи В.И., Сферические аморфные наночастицы из тритерпеноидов бересты. Новый тип субмикронных средств доставки лекарственных субстанций. Биофармацевтический журнал, 2011, 3(2):28-40.
4. Лабораторные животные: Положение и руководство/Под ред. Н.Н. Каркищенко. - М.: Изд-во ВПК, 2003, 138 с.

SUMMARY

STUDY ON THE RADIATION PROTECTIVE EFFECTIVENESS OF SPHERICAL AMORPHOUS NANOPARTICLES, CHARGED WITH ANTIOXIDANT SUBSTANCE GENISTEIN

This study is devoted to the preparation of the nano drug based on antioxidant substance genistein contained in spherical amorphous nanoparticles (SANp) made up of birch bark triterpenoids mixture. The results of in vivo test show that the highest radiation protective effectiveness is observed if the drug is used an hour before radiation exposure with the dose of 150 mg/kg and the use of the drug after radiation exposure is not effective.

Từ khóa: Hạt nano cầu vô định hình, hỗn hợp triterpenoid lớp vỏ cây bạch dương, genistein, hiệu quả chống phóng xạ, chế phẩm nano.

Nhận bài ngày 11 tháng 01 năm 2016

Hoàn thiện ngày 17 tháng 6 năm 2016

⁽¹⁾ Viện Y sinh nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

⁽²⁾ Trường Đại học Tổng hợp kỹ thuật Moscow, Liên bang Nga

⁽³⁾ Trung tâm Khoa học ứng dụng "Farmazasit", Liên bang Nga

⁽⁴⁾ Học viện Quân y Kirova C. M., Liên bang Nga