

Điều này phù hợp khi tất cả các mẫu *A. baumannii* thử nghiệm đều có gen *AmpC* đề kháng cephalosporin.

Nhóm aminoglycosid (kháng sinh amikacin)
có 01 mẫu còn nhạy, tỉ lệ đề kháng và đề kháng trung gian cao (97,9%). Kết quả kháng sinh đồ khá khác biệt so với kết quả multiplex PCR. Hiện tượng này đã đặt ra vấn đề: *A. baumannii* đã thay đổi cơ chế đề kháng nhóm aminoglycosid nói chung và amikacin nói riêng chưa? Để trả lời câu hỏi trên, có thể cần thiết phải giải trình tự không chỉ đoạn gen *aph (3')-Vla* mà còn toàn bộ hệ gen của các chủng *A. baumannii* này.

Kết luận

Quy trình multiplex PCR phát hiện 03 gen đề kháng kháng sinh của *A. baumannii*, gồm gen *bla_{OXA-51-like}*, gen *AmpC*, gen *aph (3')-Vla* đã được xây dựng. Phản ứng dương tính khi phát hiện được sản phẩm PCR (1) đoạn gen *bla_{OXA-51-like}* ~ 825 bp, (2) gen *AmpC* ~ 663 bp, (3) gen *aph (3')-Vla* ~ 234 bp. Kết quả nhận định về tính đề kháng kháng sinh dựa trên multiplex PCR phù hợp với thử nghiệm *in vitro* độ nhạy của *A. baumannii* bằng kỹ thuật kháng sinh đồ, ngoại trừ trường hợp của amikacin. Tuy nhiên, phương pháp truyền thống như kháng sinh đồ cần khá nhiều thời gian, đặc biệt nếu thực hiện cả xét nghiệm định danh vi khuẩn. Trong khi đó, thực hiện kỹ thuật multiplex PCR trực tiếp từ khuẩn lạc, có thể tiến hành đồng thời vừa định danh vi khuẩn vừa phát hiện một số gen đề kháng kháng sinh. Nhờ vậy, có thể rút ngắn được thời gian xét nghiệm, bác sĩ lâm sàng sẽ đưa ra phác đồ kháng sinh đúng chỉ định trong thời gian sớm nhất. Điều này sẽ góp phần giúp bệnh nhân giảm thời gian cũng như chi phí điều trị và tiền lương bệnh cũng sẽ tiến triển tốt hơn.

(Ngày nhận bài: 31/01/2016 - Ngày duyệt đăng: 04/04/2016)

Nghiên cứu bào chế phức hợp lipid amphotericin B

Trần Thị Hải Yến¹, Dương Thị Thuận¹

Tương Phi Vương², Phạm Xuân Thắng², Phạm Thị Minh Huệ¹

¹Trường Đại học Dược Hà Nội

²Viện 69, Bộ Tư lệnh Bảo vệ lăng Chủ tịch Hồ Chí Minh

*E-mail: yentth@hup.edu.vn

Summary

In conventional formulations, large molecule amphiphilic Amphotericin B (AmB) of board-spectrum antifungal activity, wide use for systemic fungal infection, is dispersed in micells, and as such, AmB is unstable in the human blood and formed toxic aggregates on release; in tendency of developing lipid formulations to reduce the drug toxicity, and retain activity, formation of lipid complex of AmB by solvent displacement was

Tài liệu tham khảo

1. World Health Organization (2011), *Report on the Burden of endemic health care-associated infection worldwide*.
2. CDC-Centers for Disease Control and Prevention (2013), *Antibiotic resistance threats in the United States*.
3. GARP-Nhóm nghiên cứu quốc gia của Việt Nam (2011), *Phân tích thực trạng sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh ở Việt Nam, Hà Nội*.
4. Coelho J., Woodford N., Afzal-Shah M., and Livermore D. (2006), "Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents", *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, pp. 756-758.
5. Stephane Corvec, Nathalie Caroff, Eric Espaze, Cecile Giraudeau, Henri Drugeon and Alain Reynaud (2003), "AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52, pp. 629-635.
6. Vila J, Ruiz J, Navia M, Becerril B, Garcia I, Perea S, Lopez-Hernandez I, Alamo I, Ballester F, Planes AM, Martinez-Beltran J, de Anta TJ (1999), "Spread of amikacin resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemic strain", *Journal of Clinical Microbiolog.* 37(30), pp. 758-761.
7. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Seventeenth Informational Supplement, M100S17, standard by Clinical and Laboratory Standards Institute, 01/2007.
8. Nguyễn Tú Anh, Trương Thị Thu An, Ngô Thị Mộng Thủy (2015), "Định danh và phát hiện vi khuẩn *Acinetobacter baumannii* có trong mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân điều trị tại Bệnh viện Đa khoa tỉnh Bình Dương bằng kỹ thuật sinh học phân tử", *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*. 19 (3), tr. 278-282.
9. Federico Perez, Andrea M. Hujer, Kristine M. Hujer, Brooke K. Decker, Philip N. Rather and Robert A. Bonomo (2007), "Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*", *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(10), pp. 3471-3484.

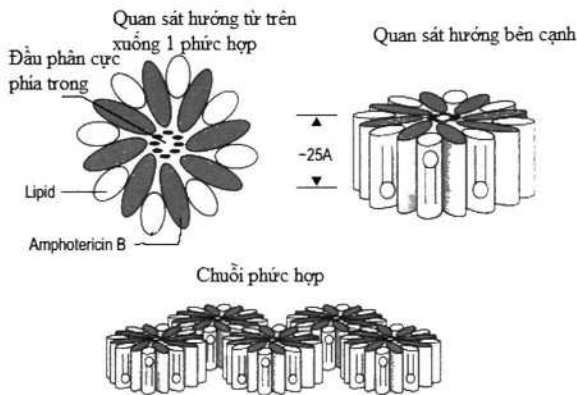
investigated with two synthetic phospholipids, hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC) and distearoyl phosphatidylglycerol (DSPG), in molar ratio 7:3. Ethanol adjusted to pH 1.0 was chosen, and AmB lipid complex was downsized by high pressure homogenization.

Keywords: Amphotericin B, lipid complex, solvent displacement.

Đặt vấn đề

Amphotericin B (AmB) là một kháng sinh chống nấm có tính lưỡng thân, được chỉ định trong trường hợp nhiễm nấm nặng toàn thân do hoạt tính kháng nấm mạnh và phổ tác dụng rộng. Tuy nhiên, thuốc hầu như không hấp thu qua đường tiêu hóa nên phải sử dụng dưới dạng tiêm truyền. Dạng thuốc qui ước (Fungizone®) là dung dịch micelle, gây nhiều độc tính đặc biệt là độc tính trên thận. Các nghiên cứu bào chế liposome mang được chất amphotericin B thể hiện nhiều

ưu điểm song hàm lượng amphotericin B sử dụng thấp, chỉ khoảng 9 mol % so với tổng lượng phospholipid dùng làm tá dược. Nhiều nghiên cứu nước ngoài công bố phức hợp lipid AmB (Abelcet® - Mỹ, Ampholip - Ấn Độ) cho hiệu quả điều trị cao và khả năng giảm độc tính không thua kém gì dạng liposome^[1,2]. Các chế phẩm này sử dụng hai phospholipid là dimirystoyl phosphatidyl cholin (DMPC) và dimirystoyl phosphatidyl glycerol (DMPG) với tỉ lệ mol 7:3 và tỉ lệ được chất so với tổng phospholipid là 100 mol%. Các tác giả đã mô tả cấu trúc của phức hợp lipid như hình dưới đây^[3].



Hình 1: Cấu trúc phức hợp lipid amphotericin B

Phân tử AMB có tính lưỡng thân: một đầu thân nước, một đầu thân dầu. Trong môi trường nước, khi nồng độ AMB dưới nồng độ tạo micelle tới hạn, sự phối hợp giữa AMB với phospholipid tạo liposome. Khi AMB ở nồng độ lớn hơn, AMB có thể chen vào, gây phá vỡ cấu trúc màng kép lipid của liposome. AMB sẽ tự kết tụ với nhau, các phân tử lipid được xen kẽ vào giữa các phân tử AMB để hình thành cấu trúc phức hợp.

Sự sắp xếp giữa lipid và AMB này phù hợp với nhiều nghiên cứu đã quan sát được. Trong phức hợp, đuôi hydrocarbon thân dầu của lipid gắn với chuỗi polyan của AMB, gốc phosphat của phân tử lipid hướng về phía gốc amin của phân tử AMB, hình thành một hình trụ. Các hình trụ nhỏ này xếp cạnh nhau kéo dài cấu trúc chuỗi. Kích thước của phức hợp lipid AmB trong chế phẩm Abelcet® được công bố nằm trong khoảng 1600 - 11000 nm.

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng tá dược phosphatidylcholin đầu nạnh hydrogen hóa (Hydrogenated soy phosphatidylcholin - HSPC) và distearoyl phosphatidyl glycerol (DSPG) tỉ lệ mol (7:3) và tỉ lệ được chất so với tổng phospholipid 100 mol% để bào chế phức hợp lipid AmB. Mục tiêu của nghiên cứu là xây dựng được phương pháp bào chế phức hợp lipid amphotericin B.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu và thiết bị

Amphotericin B (USP32) - Ningbo Honor Chemtech Co., Ltd (Trung Quốc); phosphatidyl đầu nạnh hydrogen hóa (HSPC), distearoyl phosphatidyl glycerol (DSPG) - Lipoid (Đức); chloroform - Labscan (Thái Lan); methanol, natri clorid, acid hydrocloric - Trung Quốc; acetonitril và methanol để chạy HPLC - Bayer (Mỹ).

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Máy khuấy từ (Ika werke, Đức); hệ thống thiết bị đo kích thước tiểu phân Master sizer 3000 (Malvern, Anh); máy siêu âm cầm tay Up200Ht (Hielscher, Đức); cân phân tích BP121S (Satorius, Anh); hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (Alligent, Mỹ); máy đồng nhất hóa tốc độ cao X1000 (Uni-Drive, Đức); máy đồng nhất hóa áp suất cao Emulsiflex C5 (Avestin, Mỹ); máy nén khí SD-310 (Swan, Đài Loan); thiết bị cắt quay (Buchen, Đức); kính hiển vi điện tử quét bề mặt (Jeol, Nhật).

Phương pháp bào chế phức hợp

Phức hợp lipid AMB được bào chế bằng phương pháp thay đổi dung môi.

Hòa tan AMB trong dung môi hữu cơ khảo sát (DMSO, ethanol, isopropanol, methanol) thu được dung dịch 1 (với các dung môi alcohol, sử dụng phương pháp tăng độ tan cho được chất bằng cách acid hóa dung môi hữu cơ đến pH 1,0, sử dụng dung dịch HCl 2,5 N trong dung môi tương ứng). Cần và hòa tan bằng siêu âm HSPC, DSPG với tỉ lệ mol HSPC : DSPG = 7:3 trong hỗn hợp chloroform:dung môi hữu cơ (1:1, v/v), được dung dịch 2. Phối hợp dung dịch 2 vào dung dịch 1, siêu âm để thu được dung dịch đồng nhất 3. Bơm chậm dung dịch 3 vào dung dịch NaCl 0,9% đã gia nhiệt đến khoảng 65°C. Vừa bơm vừa khuấy từ tốc độ chậm và duy trì nhiệt độ của hỗn hợp trong khoảng nhiệt độ trên cho đến khi phối hợp hết dung dịch 3. Bốc hơi dung môi bằng phương pháp thích hợp. Hỗn dịch thu được tiếp tục đem làm giảm kích thước tiểu phân bằng các phương pháp khác nhau.

Phương pháp đánh giá phức hợp

Đánh giá hình thức

Hỗn dịch chứa phức hợp lipid AMB phải là hỗn dịch đục mờ đồng nhất, màu vàng sáng, không có lắng cặn tinh thể, không có các tiểu phân có kích thước lớn có thể quan sát được bằng mắt thường.

Đánh giá kích thước tiểu phân

Hỗn dịch chứa phức hợp lipid được đánh giá kích thước tiểu phân (KTPP) và phân bố KTPP trên thiết bị Master sizer 3000 theo nguyên tắc nhiễu xạ ánh sáng động.

-Tiến hành: Cho khoảng 900 ml nước siêu lọc vào cốc có mỏ 1000 ml. Đặt cốc vào máy đo Master sizer. Nhỏ hỗn dịch phức hợp lipid AMB vào cốc có mỏ cho đến khi độ đục đạt khoảng 20%. Kích thước tiểu phân trung bình là giá trị D[4,3], giá trị Span thể hiện khoảng phân bố kích thước tiểu phân rộng hay hẹp.

Phương pháp định lượng

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với điều kiện sau:

Cột sắc ký: cột Cosmosil 5C18 – MS – II, kích thước cột 250 × 4,6 mm; đường kính hạt nhồi 5 µm.

Pha động: Hỗn hợp dung môi methanol:acetonitril:dung dịch 0,002 M NaEDTA theo thể tích 50:30:20.

Tốc độ dòng: 0,8 ml/phút.

Thể tích tiêm mẫu: 20 µl.

Detector UV, bước sóng 405 nm.

Chuẩn bị mẫu chuẩn: Cân chính xác khoảng 10 mg AMB, hòa tan trong 5 ml DMSO rồi chuyển vào bình định mức 10 ml. Bổ sung DMSO đến vạch. Lắc đều. Hút 5 ml dung dịch thu được cho vào bình định mức 100 ml, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều.

Chuẩn bị mẫu thử: Hút 1 ml hỗn dịch cho vào bình định mức 10 ml. Bổ sung DMSO đến vạch, lắc đều. Hút 5 ml dung dịch thu được cho vào bình định mức 100 ml, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều.

Công thức tính hiệu suất quy trình:

$$H\% = \frac{\text{AMB trong hỗn dịch}}{\text{AMB cần ban đầu}} \times 100\%$$

Phương pháp làm nhỏ KTPP

Phức hợp lipid AMB sau khi bào chế được đồng nhất hóa để làm giảm kích thước tiểu phân bằng các phương pháp sau:

Phương pháp đồng nhất hóa áp suất cao: hỗn dịch được đồng nhất 2 lần ở áp suất 5000 psi trên máy Emulsiflex-c5, khi nên từ máy SWAN SD-310.

Phương pháp đồng nhất hóa tốc độ cao trên máy Uni-drive. Hỗn dịch được đồng nhất hóa ở các mức 15.000 vòng/phút và 4.000 vòng/phút.

Phương pháp siêu âm: hỗn dịch được siêu âm 30 giây rồi nghỉ 30 giây. Tần số và công suất ở hai mức khác nhau là 80 Hz/60 W và 50 Hz/50 W.

Phương pháp chụp hiển vi điện tử bề mặt (SEM)

Phương pháp chụp SEM lạnh (Cryo-SEM)

Hút một lượng nhỏ dung dịch (khoảng 0,5 ml mẫu nghiên cứu) vào xi-lanh. Bơm dung dịch vào lỗ của đế mẫu (bơm hơi gỗ lên so với miệng lỗ, không để tràn ra ngoài). Nhúng giá đỡ mẫu vào ni-tơ lỏng, không nhúng ngập, chờ 5-10 giây cho đế lạnh. Bơm vài giọt dung dịch chồng lên miệng lỗ rồi nhúng ngập vào ni-tơ lỏng ngay sau cho dung dịch đông cứng tạo khối gỗ lên hẳn so với miệng lỗ, chờ 5-10 giây. Tiến hành đưa mẫu vào khoang chứa mẫu, bề lạnh, mạ phủ vàng và soi trên kính hiển vi điện tử quét JSM-5410LV (Jeol, Nhật).

Kết quả nghiên cứu

Khảo sát việc sử dụng dung môi hòa tan AmB

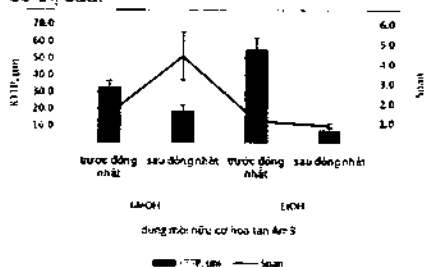
AmB có độ tan rất kém trong các dung môi hữu cơ khác nhau. Do vậy khi bào chế phức hợp lipid nếu không có biện pháp cải thiện độ tan thì sẽ phải dùng lượng dung môi hữu cơ rất lớn. Trong nghiên cứu này chúng tôi khảo sát dung môi để hòa tan AmB là DMSO, ethanol, methanol và isopropanol đã được acid hóa bằng dung dịch HCl 2,5 N trong dung môi tương ứng đến pH khoảng 1,0. Bảo chế 4 mẫu phức hợp lipid AmB M1, M2, M3, M4 sử dụng tương ứng các loại dung môi hữu cơ methanol, ethanol, isopropanol và DMSO bằng phương pháp thay đổi dung môi, mỗi mẫu lặp lại 3 lần thí nghiệm.

Về hình thức

Mẫu M1 và M2 có hình thức là hỗn dịch đồng nhất màu vàng sáng, không có lắng cặn tĩnh thể. Tuy nhiên ở mẫu M3, hỗn dịch thu được có màu vàng sẫm, không đồng nhất, ở mẫu M4 khi sử dụng DMSO để hòa tan AmB không thu được hỗn dịch đồng nhất do hình thành dạng keo vón khi phối hợp 2 pha.

Về kích thước tiểu phân

Hai mẫu hỗn dịch đồng nhất và có cảm quan đẹp là M1 và M2 được đồng nhất hóa bằng áp suất cao 2 lần ở áp suất 5000 psi, KTTP và phân bố KTTP của hai mẫu M1 và mẫu M2 được thể hiện ở đồ thị sau:



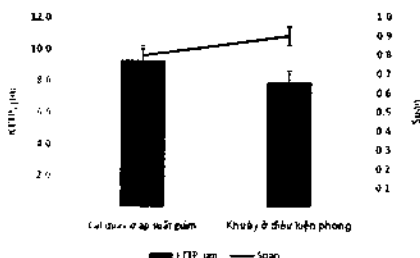
Hình 2: Kích thước tiểu phân và phân bố kích thước tiểu phân của phức hợp lipid AmB được bảo chế sử dụng các dung môi khác nhau để hòa tan được chất ($n = 3$)

Từ kết quả trên cho thấy, khi sử dụng methanol làm dung môi hòa tan được chất, phức hợp mới bào chế có kích thước nhỏ hơn so với mẫu sử dụng ethanol. Tuy nhiên mẫu này sau khi được đồng nhất hóa 2 lần ở áp suất 5000 psi thì phức hợp thu được có KTTP lớn hơn so với phức hợp được bảo chế bằng mẫu ethanol, phân bố KTTP cũng rộng hơn rất nhiều (Span khoảng 4) so với

mẫu sử dụng ethanol (Span < 1). Do vậy lựa chọn ethanol làm dung môi hòa tan được chất.

Khảo sát phương pháp bốc hơi dung môi

Phương pháp thay đổi dung môi đơn giản, dễ tiến hành không cần nhiều dụng cụ nhưng lại tốn nhiều thời gian để bốc hơi dung môi nếu sử dụng phương pháp khuấy trong điều kiện phòng. Do vậy, chúng tôi khảo sát các phương pháp bốc hơi dung môi khác nhau: khuấy ở điều kiện phòng và cất quay trong áp suất giảm, mỗi phương pháp tiến hành 3 thí nghiệm. Kết quả được thể hiện ở đồ thị dưới đây.



Hình 3: KTTP và phân bố KTTP của phức hợp lipid AmB, sử dụng các phương pháp bốc hơi dung môi khác nhau trong quy trình bảo chế ($n = 3$)

Kết quả ở hình 3 cho thấy KTTP của phức hợp bốc hơi dung môi bằng phương pháp cất quay ở áp suất giảm và khuấy ở điều kiện phòng đều có KTTP nhỏ (< 10 μm) và khoảng phân bố kích thước hẹp (Span < 1). Hơn nữa hiệu suất quy trình của hai phương pháp bốc hơi dung môi cũng không khác biệt đáng kể (78,6 và 77,5% tương ứng) phương pháp cất quay ở áp suất giảm và phương pháp khuấy từ ở điều kiện phòng. Tuy nhiên, với phương pháp bốc hơi ở áp suất giảm chỉ mất khoảng 3 giờ là dung môi bay hơi hết, và cần thêm 10 giờ nữa để loại vết dung môi hữu cơ. Nhưng với phương pháp khuấy ở điều kiện phòng phải mất ít nhất 48 giờ để loại dung môi, và vết dung môi có thể không loại được triệt để như phương pháp cất quay ở áp suất giảm. Do vậy, phương pháp cất quay ở áp suất giảm được lựa chọn để bốc hơi dung môi hữu cơ trong quá trình bào chế.

Khảo sát phương pháp làm nhỏ KTTP

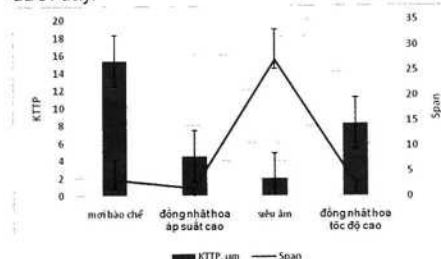
Phức hợp lipid mới bào chế có KTTP rất lớn, do vậy cần khảo sát các phương pháp để làm nhỏ kích thước tiểu phân phức hợp cho phù hợp với đường tiêu truyền. Trong nghiên cứu này chúng tôi khảo sát 3 phương pháp: đồng nhất hóa áp suất cao, siêu âm, đồng nhất hóa tốc độ cao với các thông số kỹ thuật khác nhau. Các mẫu phức hợp lipid AmB được bào chế với quy trình đã nêu trên

rồi làm giảm KTCP bằng 3 phương pháp đã được mô tả, với mỗi thông số của mỗi phương pháp tiến hành 3 thí nghiệm.

Với phương pháp siêu âm, khi siêu âm với thông số 80 Hz/60 W hỗn dịch phức hợp bị tách lớp hoàn toàn do cường độ siêu âm lớn quá, được chất bị tách ra khỏi phức hợp và tạo vữa. Do vậy chỉ sử dụng được siêu âm với thông số 60 Hz/50 W.

Với phương pháp đồng nhất hóa tốc độ cao, khi đồng nhất với tốc độ 15000 vòng/phút thì phía trên hỗn dịch tạo bọt bền, với tốc độ 4000 vòng/phút thì tạo ra hỗn dịch đồng nhất. Do vậy chỉ sử dụng đồng nhất hóa tốc độ cao với thông số 4000 vòng/phút.

KTCP của phức hợp lipid AmB sau khi làm nhỏ bằng ba phương pháp được thể hiện ở biểu đồ dưới đây.

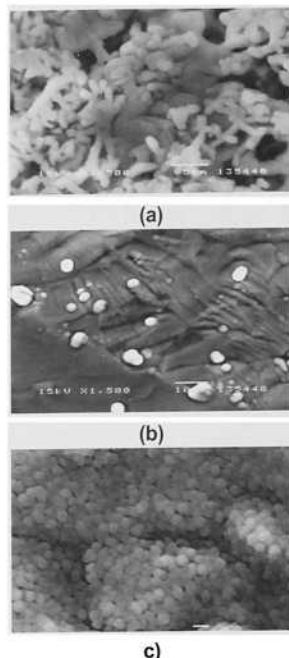


Hình 4: KTCP và phân bố KTCP của phức hợp lipid AmB khi sử dụng các phương pháp làm nhỏ khác nhau ($n = 3$)

Từ kết quả ở hình 2 cho thấy, phương pháp siêu âm cho KTCP trung bình nhỏ (3,49 μm), nhưng phân bố KTCP rộng với chỉ số Span rất lớn (15,431). Phương pháp đồng nhất hóa tốc độ cao cho KTCP trung bình tương đối lớn (14,5 μm). Chỉ có phương pháp đồng nhất hóa áp suất cao sử dụng khí nén cho KTCP trung bình khá nhỏ (7,9 μm) với phân bố kích thước tiểu phân rất hẹp ($\text{Span} < 1$). Do vậy nghiên cứu sẽ lựa chọn phương pháp đồng nhất hóa áp suất cao để làm nhỏ KTCP.

Hình thái phức hợp lipid AmB

Tiến hành bào chế mẫu phức hợp lipid AmB với tỉ lệ được chất so với tổng lipid là 100 mol% với các thông số đã được lựa chọn: dùng ethanol đã acid hóa đến pH 1,0 để hòa tan được chất, bốc hơi dung môi trong áp suất giảm, làm nhỏ kích thước bằng phương pháp đồng nhất hóa áp suất cao 5000 psi. Đồng thời tiến hành bào chế 2 mẫu với tỉ lệ được chất/tổng lipid 25 mol % và 35 mol%. Chụp ảnh hiển vi điện tử đông lạnh 3 mẫu trên thu được kết quả như ở hình dưới đây.



Hình 5: Ảnh chụp SEM đông lạnh của mẫu phức hợp lipid AmB (a) mẫu 25 mol% AmB (b) và mẫu 50 mol% AmB (c)

Từ hình 5 cho thấy, mẫu 25 mol% và 50 mol% cho sản phẩm thu được chủ yếu là liposome có hình cầu. Tuy nhiên khi nâng tỉ lệ được chất lên 100 mol% thì sản phẩm thu được chủ yếu là phức hợp lipid AmB có dạng hình sợi có thể liên kết với nhau và hầu như không xuất hiện liposome trong mẫu này. Do vậy có thể kết luận đã bào chế được phức hợp lipid AmB có cấu trúc hình sợi, không phải cấu trúc đa màng như liposome ở tỉ lệ 100 mol% được chất so với tổng phospholipid.

Bàn luận

Về tá dược sử dụng, trong nghiên cứu này sử dụng hai tá dược là HSPC và DSPG có độ dài mạch hydrocarbon của acid béo là 18, khác với độ dài mạch hydrocarbon của DMPC và DMPG sử dụng trong chế phẩm Abelcet®. Tuy nhiên HSPC có gốc cholin giống DMPC và gốc glycerol của DSPG giống với DMPG, do vậy các nhóm chức của tá dược sử dụng trong nghiên cứu cũng tương tự như tá dược sử dụng trong sản phẩm Abelcet. Mặc dù vậy, khi có điều kiện về kinh phí, nhóm tác giả sẽ tiến hành nghiên cứu trên nhóm tá dược DMPC và DMPG.

(Xem tiếp trang 39)