

Lựa chọn qui trình làm giảm kích thước và đồng nhất hóa tiểu phân trong bào chế liposom resveratrol

Nguyễn Thị Lập*, Hoàng Thị Minh

Trường Đại học Dược Hà Nội

* E-mail: lvknlap@yahoo.com

Summary

Unilamellar liposomal vesicles of resveratrol were formed and homogenized by probe sonication and extrusion. In comparison, the average size of liposomes by extrusion and probe sonication were 109.9 nm and 158.6 nm, respectively; the amount of resveratrol encapsulated by the obtained liposomes were about 95.0 % and 94.8 %, respectively. The polydispersity indice of the liposomes by extrusion and probe sonication methods were lower than 0.05 and 0.302, respectively. TEM images also showed that extrusion technique provided a better approach for preparation of liposomal resveratrol in terms of physical morphology.

Keywords: Resveratrol, liposom, vesicle homogenization, preparation.

Đặt vấn đề

Mặc dù resveratrol (RES) được cho là có tiềm năng cải thiện sức khỏe và phòng ngừa bệnh mạn tính nhưng trên thực tế việc sử dụng resveratrol dạng tự do gặp nhiều hạn chế do RES kém ổn định dưới tác động của ánh sáng, nhiệt độ. RES tự do sau khi hấp thu qua đường uống bị chuyển hóa nhanh và nhiều ở gan làm cho sinh khả dụng đường uống rất thấp. Để khắc phục các nhược điểm của dạng tự do, liposom không chỉ bảo vệ RES khỏi tác động bất lợi của môi trường, làm tăng độ ổn định mà còn góp phần cải thiện sinh khả dụng đường uống của RES. Kết quả của một số nghiên cứu trước đã cho thấy liposom có kích thước tiểu phân khoảng 70- 100 nm làm tăng độ ổn định, giảm độc tính và tăng sinh khả dụng của RES^[1-3]. Vì vậy, việc làm nhỏ và đồng nhất hóa kích thước là cần thiết trong quy trình tạo liposom RES. Để góp phần tạo dạng chế phẩm liposom RES ổn định, tăng sinh khả dụng đường uống cho RES chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm mục tiêu: khảo sát và lựa chọn quy trình làm giảm và đồng nhất hóa kích thước liposom RES từ hai phương pháp đẩy qua màng, phương pháp siêu âm cầm tay và đánh giá một số đặc điểm của chế phẩm được tạo thành.

Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Trans- Resveratrol được sản xuất bởi công ty DSM Nutritional Products Ltd (Thụy Sĩ). Phosphatidylcholin đậu nành (Soy phosphatidylcholin- SPC) do công ty Avanti polar Lipids (Mỹ), cholesterol (chol) do Merck (Đức) cung cấp. Triton X- 100, diethyl ether và một số hóa chất khác đạt tiêu chuẩn dùng cho phân tích.

Thiết bị

Màng polycarbonat kích thước lỗ lọc 0,4 μm và 0,08 μm (Whatman, Mỹ). Tủ thẩm tích MWCO: 12000- 14000 Da (Spectrum Labs- Mỹ). Thiết bị liposom extruder cầm tay (Mỹ). Thiết bị siêu âm cầm tay Labsonic tần số 30 kHz (Nhật Bản). Máy đo quang phổ Spectro UV- VIS Double, Labomed, Inc. (Mỹ). Kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) JEOL 1010 (Nhật Bản).

Phương pháp nghiên cứu

Tạo tiểu phân liposom resveratrol thô

Tạo liposom RES theo phương pháp bốc hơi pha đảo, tóm tắt như sau: Hòa tan RES, phospholipid và cholesterol vào diethyl ether

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

với tỉ lệ mol RES/SPC/cholesterol đã khảo sát phù hợp nhất là 1/12/2,4. Bổ sung thêm đệm PBS pH 7,4 (137 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 6,4 mM Na_2HPO_4 ; 1,4 mM KH_2PO_4), sau đó siêu âm liên tục trong thời gian 5 phút, tần số 30 kHz để tạo nhũ tương mịn nước/dầu. Toàn bộ dịch được cất quay chân không ở 40°C, tốc độ quay 100 vòng/phút trong 30 phút. Sau khi lớp màng mỏng lipid được tạo thành cất quay thêm 60 phút để làm bay hơi hết dung môi hữu cơ. Hydrat hóa màng mỏng lipid bằng đệm PBS pH 7,4, ở 40°C, tốc độ quay 80 vòng/phút trong 2 giờ.

Làm nhỏ kích thước và đồng nhất hóa liposom RES

Phương pháp đẩy qua màng: Hỗn dịch liposom thô được ủ ấm ở nhiệt độ 45°C trước khi đẩy. Đầu tiên đẩy qua màng polycarbonat kích thước lỗ màng lọc 400 nm, sau đó đẩy tiếp qua màng 80 nm. Thay đổi số lần đẩy ở mỗi loại màng và khảo sát ảnh hưởng của số lần đẩy tới các đặc tính của liposom RES.

Phương pháp siêu âm: Hỗn dịch liposom thô sau khi bảo chế bằng phương pháp bốc hơi pha đảo được cho vào lọ thủy tinh, thể tích mẫu liposom khoảng 10 ml. Sử dụng thiết bị siêu âm cầm tay Labsonic@M, tần số 30 kHz để làm giảm kích thước tiểu phân. Que siêu âm được đặt ngập vào khoảng 2/3 mẫu. Khảo sát ảnh hưởng của nhịp phát xung (liên tục hay gián đoạn) và thời gian siêu âm tới kích thước tiểu phân (KTPP), phân bố KTPP, hiệu suất liposom hóa

Tính chất liposom resveratrol

Hút hỗn dịch liposom sau khi làm nhỏ và đồng nhất hóa kích thước bằng đẩy qua màng hoặc siêu âm cho vào túi thẩm tích (12000 – 14000 D) được kẹp chặt hai đầu. Môi trường thẩm tích là đệm PBS pH 7,4 có thể tích gấp ít nhất 100 lần thể tích dịch liposom trong túi thẩm tích. Tổng thời gian thẩm tích là 8 giờ, cứ mỗi 2 giờ thay đệm mới một lần, duy trì nhiệt độ 2 – 8 °C, tránh ánh sáng.

Đánh giá liposom tạo thành

Hình thức

Bảng cảm quan, liposom RES sau khi thẩm tích phải là hỗn dịch màu trắng đục, không có các tiểu phân kích thước lớn có thể quan sát bằng mắt thường, có thể lắng sau một thời gian bảo

quản nhưng phải nhanh chóng phân tán đồng nhất trở lại sau khi lắc.

Kích thước tiểu phân, phân bố kích thước tiểu phân

Xác định KTPP, phân bố KTPP bằng thiết bị Zetasizer ZS90 (Anh) sau khi pha loãng hỗn dịch 200 lần bằng dung dịch NaCl 0,9 % đã lọc qua màng lọc 0,2 μm .

Đánh giá hiệu suất liposom hóa resveratrol

Trước tiên, định lượng RES trong hỗn dịch liposom trước và sau khi thẩm tích loại RES tự do bằng phương pháp quang phổ UV- VIS: Hòa tan 0,01 g RES trong dung dịch Triton X- 100 (1%). Quét phổ hấp thụ của RES trong khoảng bước sóng từ 200 nm đến 800 nm để tìm ra bước sóng hấp thụ cực đại của RES ($\lambda_{\text{max}} = 308,5 \text{ nm}$). Khảo sát mối tương quan giữa nồng độ RES và mật độ quang và đánh giá độ lặp lại của phương pháp. Đường chuẩn thu được dạng đường thẳng có phương trình hồi quy tuyến tính là $y = 0,1078x + 0,0198$ với hệ số tương quan $R_2 = 0,9999$. Kết quả khảo sát độ lặp lại cho thấy độ lệch chuẩn tương đối của giá trị độ hấp thụ quang là $\text{RSD} = 0,88\% < 2\%$. Phương pháp định lượng RES bằng kỹ thuật đo quang không bị ảnh hưởng bởi tá dược SPC, cholesterol, có độ lặp lại cao và có tính tuyến tính nên có thể áp dụng để định lượng RES và đánh giá hiệu suất liposom hóa RES

Hiệu suất liposom hóa (EE) được tính bằng tỉ lệ % giữa nồng độ RES trong hỗn dịch liposom sau khi thẩm tích loại RES tự do với nồng độ RES trong hỗn dịch liposom trước khi thẩm tích theo công thức:

$$\text{EE} \% = \frac{\text{CE}}{\text{CT}} \times 100 = \frac{\text{AE}}{\text{AT}} \times 100$$

Trong đó:

CE là nồng độ RES trong hỗn dịch liposom sau khi thẩm tích loại RES tự do ($\mu\text{g/ml}$). CT là nồng độ RES trong hỗn dịch liposom trước khi thẩm tích ($\mu\text{g/ml}$). AE là độ hấp thụ quang của hỗn dịch liposom sau khi thẩm tích, AT là độ hấp thụ quang của hỗn dịch liposom trước khi thẩm tích.

Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft office Excel 2007 để tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn SD. Sử dụng kiểm

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

định t- test để đánh giá sự khác nhau giữa các kết quả. Sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

Kết quả và bàn luận

Lựa chọn quy trình giảm kích thước và đồng nhất hóa bằng phương pháp đẩy qua màng

Liposom nhiều lớp được giảm kích thước và đồng nhất hóa bằng phương pháp đẩy qua màng. Đầu tiên mẫu được đẩy qua màng có kích thước lỗ 400 nm và sau đó đẩy qua màng có kích thước lỗ 80 nm

Với các mẫu liposom qua các lần đẩy ở màng

400 nm, kết quả được trình bày ở bảng 1 cho thấy kích thước trung bình và chỉ số PDI của hệ giảm dần theo số lần đẩy. Sau 7 lần đẩy PDI giảm mạnh nhất, giảm tới 50 % (từ 0,535 xuống còn 0,256). Các lần đẩy tiếp theo PDI giảm trung bình 20- 30 %, PDI giảm rõ rệt ở lần đẩy thứ 9 và thấp nhất ở lần đẩy thứ 13. Số lượng pic và tỷ lệ phần trăm theo thể tích của các tiểu phân kích thước lớn hàng nghìn nm giảm, tỷ lệ phần trăm theo thể tích của các tiểu phân kích thước nhỏ tăng lên qua các lần đẩy và đến lần đẩy thứ 13 thu được hệ phân tán với 1 pic. Do vậy, lựa chọn số lần đẩy qua màng 400 nm là 13 lần cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 1: Các thông số đánh giá tiểu phân liposom sau khi đẩy qua màng 400 nm

Số lần đẩy	PDI	KTTP trung bình của hệ (d.nm)	Pic	KTTP trung bình mỗi pic (d.nm)	% theo thể tích	Độ rộng pic (d.nm)
0	0,535	970,9	1	1000	37,1	269
			2	143,86	2,6	31,88
			3	5502	60,3	620,80
7	0,256	259,9	1	150,72	7,8	29,12
			2	364,80	15,3	164,50
			3	4456	76,9	1115,60
9	0,197	251,9	1	95,40	27,5	26,78
			2	373,60	72,5	165,64
			3	0	0	0
11	0,197	246,9	1	134,02	32,6	35,80
			2	414,20	67,4	180,18
			3	0	0	0
13	0,140	224,4	1	248	100	102,28
			2	0	0	0
			3	0	0	0

Tiếp theo, mẫu liposom sau khi đẩy 13 lần qua màng có kích thước lỗ lọc 400 nm được đẩy tiếp qua màng 80 nm, khảo sát số lần đẩy khác nhau: 5, 7, 9, 11, 13, 15 lần. Lấy mẫu ở số lần

đẩy khác nhau đem thẩm tích loại RES tự do, sau đó đánh giá ảnh hưởng của số lần đẩy tới kích thước, phân bố KTTP và hiệu suất liposom hóa. Kết quả các thông số đánh giá liposom được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2: Các thông số đánh giá tiểu phân liposom sau khi đẩy qua màng 80 nm

Số lần đẩy	PDI	KTTP trung bình của hệ (d.nm)	Pic	KTTP trung bình mỗi pic (d.nm)	% theo thể tích	Độ rộng pic (d.nm)	Hiệu suất (%)
5	0,111	127,0	1	112,40	100	44,63	95,10
7	0,096	117,9	1	106,50	100	33,58	94,80
9	0,080	113,2	1	102,06	100	30,64	95,18
11	0,062	112,9	1	101,50	100	30,10	95,04
13	0,054	110,8	1	100,94	100	27,78	94,93
15	0,043	109,9	1	100,46	100	26,82	95,06

Kết quả ở bảng 2 cho thấy PDI của hệ thu được sau các lần đẩy qua màng 80 nm giảm dần về 0. Từ sau lần đẩy thứ 9 kích thước trung bình của hệ giảm không đáng kể, tuy nhiên PDI giảm thấp nhất sau 15 lần đẩy. Hiệu suất liposom hóa của các mẫu liposom RES thu được ở số lần đẩy khác nhau không chênh lệch nhiều (khoảng 95%). Kích thước tiểu phân giảm dần theo sự tăng số lần đẩy qua màng, sau lần đẩy thứ 15 kích thước liposom thấp nhất là 109,9 nm. Do vậy, chọn số lần đẩy qua màng 80 nm là 15 lần cho các nghiên cứu tiếp theo.

Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện siêu âm tới các đặc tính của liposom

Lấy các mẫu liposom sau các khoảng thời gian siêu âm khác nhau với tần số siêu âm liên tục hay gián đoạn (nhịp phát xung 0,6 s) Tiến hành đánh giá kích thước, phân bố KTTT và hiệu suất liposom hóa RES, kết quả được trình bày ở bảng 3. Thời gian siêu âm càng dài kích thước trung bình và PDI càng giảm, hệ trở nên đồng nhất hơn (it pic hơn và/ hoặc pic gọn hơn). Mặt khác, với cùng thời gian siêu âm thì siêu âm liên tục tạo ra hệ liposom có kích thước và PDI nhỏ hơn so với siêu âm ngắt quãng. Trong phương pháp siêu âm cầm tay các tiểu phân ở càng gần cực siêu âm càng chịu tác động lực siêu âm với cường độ lớn hơn, do đó các tiểu phân được làm nhỏ với mức độ khác nhau. Vì vậy hệ liposom thu được có khoảng phân bố kích thước rộng

(bảng 3). Trong nghiên cứu trước đó, Isailovic và cộng sự^[2] đã tiến hành tạo liposom RES thô bằng phương pháp hydrat hóa màng phim, sau đó cũng dùng kỹ thuật siêu âm cầm tay (siêu âm liên tục trong thời gian 6 phút). Kết quả cho PDI bằng 0,47, phù hợp với kết quả nghiên cứu này. Trong khi đó, kích thước trung bình của hệ liposom trong nghiên cứu của Isailovic cao hơn nghiên cứu của chúng tôi (290 nm so với 158,6 nm sau siêu âm liên tục). Có thể do Isailovic và cộng sự có sử dụng một tỉ lệ cholesterol cao. Sự có mặt của cholesterol thành phần màng phospholipid có xu hướng làm tăng kích thước trung bình của hệ liposom^[4]. Bảng 3 cũng cho thấy thời gian siêu âm càng dài hiệu suất liposom hóa càng giảm. Với cùng thời gian siêu âm thì siêu âm liên tục có hiệu suất liposom hóa thấp hơn siêu âm gián đoạn. Siêu âm cầm tay đưa một năng lượng lớn vào mẫu, lực phân cắt lớn có thể làm nứt vỡ liposom và làm tăng nhiệt độ mẫu siêu âm, đặc biệt là khi siêu âm liên tục. Nếu không kiểm soát tốt, nhiệt độ có thể tăng trên nhiệt độ chuyển pha của SPC. Hậu quả là lớp màng lipid kép ở trạng thái lỏng lỏng, khả năng lưu giữ RES kém đi và RES có thể bị lực siêu âm đẩy ra khỏi màng làm giảm hiệu suất liposom hóa. Điều này có thể giải thích cho hiện tượng giảm hiệu suất liposom hóa RES khi tăng thời gian siêu âm và thay đổi nhịp phát xung.

Bảng 3: Ảnh hưởng của điều kiện siêu âm tới KTTT, phân bố KTTT, hiệu suất liposom hóa RES

Điều kiện	PDI	KTTT trung bình của hệ (d.nm)	Pic	KTTT trung bình mỗi pic (d.nm)	% theo thể tích	Độ rộng pic (d.nm)	Hiệu suất liposom hóa (%)
Chưa siêu âm	0,535	970,9	1	1000	37,1	269	
			2	143,86	2,6	31,88	
			3	5502	60,3	620,8	
Siêu âm liên tục 3 phút	0,31	183,4	1	82,22	60,7	42,7	92,20
			2	524,6	19,1	264,4	
			3	5046	20,2	829,4	
Siêu âm liên tục 5 phút	0,302	158,6	1	70,08	87,2	40,38	90,03
			2	385,6	12,8	144,1	
			3	0	0	0	
Siêu âm gián đoạn nhịp phát xung 0,6 s 3 phút	0,492	257,4	1	159,5	16,3	60,38	95,10
			2	1375,6	30,6	449,4	
			3	5294	53,1	708	
Siêu âm gián đoạn nhịp phát xung 0,6 s 5 phút	0,447	219,6	1	35,3	5,9	5,97	94,80
			2	132,06	28,2	94,9	
			3	2968	65,8	1549	
Siêu âm gián đoạn nhịp phát xung 0,6 s 7 phút	0,422	212,8	1	193,96	13,8	125,16	93,79
			2	3482	63,6	1247	
			3	40,56	22,6	10,30	
Siêu âm gián đoạn nhịp phát xung 0,6 s 10 phút	0,396	193,82	1	84,56	32,4	41,84	92,90
			2	439,4	9,2	187,98	
			3	4892	58,4	904	

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Như vậy, khi siêu âm liên tục kích thước và PDI giảm nhiều hơn siêu âm gián đoạn tuy nhiên hiệu suất liposom hóa lại thấp hơn. Với siêu âm gián đoạn mặc dù hệ liposom sau siêu âm 10 phút có PDI giảm nhiều nhất (0,396 so với 0,535 trước khi siêu âm) tuy nhiên hiệu suất liposom hóa lại thấp nhất. Do đó, để đảm bảo hiệu suất liposom, chúng tôi lựa chọn điều kiện siêu âm gián đoạn nhịp phát xung 0,6 s trong thời gian 5 phút.

So sánh 2 phương pháp giảm kích thước tiểu phân: đẩy qua màng và siêu âm cầm tay

Bảng 4: Kích thước tiểu phân trung bình, chỉ số đa phân tán và hiệu suất của hệ liposom đồng nhất hóa theo hai phương pháp: đẩy qua màng và siêu âm đầu dò

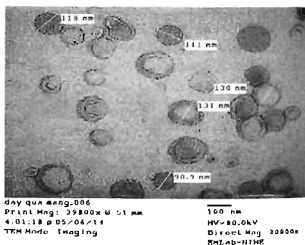
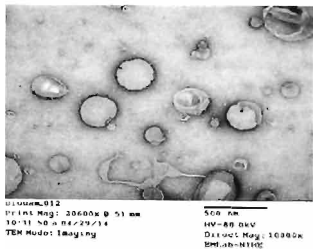
Phương pháp	Kích thước tiểu phân trung bình theo đường kính	Chỉ số đa phân tán (PDI)	Hiệu suất %
Siêu âm	219,6	0,447	94,80
Đẩy qua màng	109,9	0,043	95,06

Bảng 4 cho thấy hệ liposom tạo thành theo hai phương pháp siêu âm và đẩy qua màng có hiệu suất gần tương tự nhau. Tuy nhiên phương pháp đẩy qua màng cho tiểu phân liposom kích thước nhỏ hơn 1/2 lần và chỉ số PDI nhỏ hơn

Trong nghiên cứu này đã so sánh kết quả của phương pháp đẩy qua màng và phương pháp siêu âm cầm tay. Điều kiện siêu âm thích hợp nhất là phát 5 phút với nhịp phát xung 0,6 giây. Liposom được tạo bằng phương pháp bốc hơi pha đảo và được làm nhỏ kích thước tiểu phân theo một trong hai phương pháp siêu âm cầm tay hoặc đẩy qua màng (đẩy lần lượt 13 lần qua màng 400 nm và 15 lần qua màng 80 nm). Đánh giá liposom tạo thành về KTTP, phân bố KTTP, hiệu suất liposom hóa và hình thái liposom. Kết quả thể hiện ở bảng 4.

nhiều lần, tức là hệ đồng nhất hơn so với phương pháp siêu âm.

Đánh giá hình thái liposom tạo thành bằng thiết bị TEM với kỹ thuật nhuộm soi âm bản. Kết quả thu được thể hiện ở hình 1.



Hình 1: Hình ảnh chụp TEM của mẫu liposom làm nhỏ kích thước bằng phương pháp siêu âm (trái, độ phóng đại 10 000 lần) và đẩy qua màng (phải, độ phóng đại 20 000 lần)

Kết quả hình 1 cho thấy các liposom tạo từ hai phương pháp đều có dạng gần cầu. Các tiểu phân tạo được từ phương pháp đẩy qua màng cho liposom có kích thước phân bố khá đồng đều. Trong khi đó, các tiểu phân tạo bởi phương pháp siêu âm tạo liposom kích thước phân tán hơn, quan sát thấy có hiện tượng nứt vỡ liposom.

Kết luận

Đã nghiên cứu lựa chọn và áp dụng hai phương pháp siêu âm cầm tay và đẩy qua màng trong giảm kích thước tiểu phân liposom resveratrol. Kết quả cho thấy, với quy trình đẩy hỗn dịch liposom thô 13 lần qua màng 400 nm và tiếp tục đẩy 15 lần qua màng 80 nm thu được hệ

liposom có kích thước trung bình 109,9 nm, PDI là 0,043, hiệu suất liposom hóa là 95,06 %. Trong khi đó, phương pháp siêu âm cầm tay với điều kiện thích hợp nhất trong thời gian 5 phút, nhịp phát xung 0,6 giây, thu được hệ liposom có kích thước trung bình 219,6 nm, PDI là 0,447, hiệu suất liposom hóa là 94,80%. Kết quả nghiên cứu cũng chứng minh được các ưu điểm của phương pháp đẩy qua màng so với phương pháp siêu âm đầu dò trong giảm kích thước và đồng nhất hóa tiểu phân liposom.

Tài liệu tham khảo

1. Caddeo C., Teskač K., Sinico C., Kristl J. (2008), "Effect of resveratrol incorporated in liposoms on proliferation and UV - B protection of cells", *International Journal of Pharmaceutics*, (363), 183 - 191.

2. Isalović B. D., Kostić I. T., Zvonar A., Đorđević V. B. et al. (2013), "Resveratrol loaded liposoms produced by different techniques", *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 181 - 189

3. Kristl J., Teskač K., Caddeo C., Abramović Z., Sentjurc M. (2009), "Improvement of cellular stress response on resveratrol in liposoms", *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 73 253 - 259.

4. Lapinski M. M, Castro F.A., Greiner A. J. et al (2007), "Compansion of liposoms formed by sonication and extrusion: rotational and translational diffusion of an embedded chromophore", *Langmuir*, 23(23), pp. 11677 - 11683.

5. Narayanan N. K., Nargi D., Randolph C., Narayanan B. A. (2009), "Liposom encapsulation of curcumin and resveratrol in combination reduces prostate cancer incidence in PTEN knockout mice", *Int. J. Cancer*, 125, 1 - 8

(Ngày nhận bài: 01/08/2014 - Ngày duyệt đăng: 08/09/2014)

✓ Nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch của Hôi xuân hoàn trên chuột nhắt trắng bị gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid

Phạm Thùy Phương¹, Trương Việt Bình¹, Phạm Thị Vân Anh^{2*}

Nguyễn Thùy Dương¹, Nguyễn Trọng Thông²

¹Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

²Bộ môn Dược lý, Trường Đại học Y Hà Nội

* E- mail: phamthivananhhai@yahoo.com.vn

Summary

The immunostimulant activity of HXH ("Hoi xuan hoan") at two daily doses, one of 1.2 g/kg and the other 3.6 g/kg, both given orally in 7 consecutive days to immunosuppressed Swiss mice was studied. The drug effect was examined by relative spleen and thymus weight, lymphoid organ histology, total leukocyte count and the leukocyte formula of the peripheral blood, IgG levels, delayed type hypersensitivity (OA-antigen), IL-2 and INF α levels in the peripheral blood. Such oral administration of HXH caused a significant decrease in relative spleen weight. A significant increase ($p < 0.05$) of peripheral blood leukocytes was observed compared to the controls. HXH provoked a significant increase ($p < 0.05$) in IgG, IL-2 and INF α levels of the peripheral blood. Experimentally, the HXH proved to be a potential immunostimulant.

Keywords: Hoi xuan hoan, cyclophosphamide, immunomodulatory activity, mice.