

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

-----



**ĐINH VĂN THOẠI**

**TỔNG HỢP VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CÁC HỆ GELATIN  
PLURONIC NANOGEL MANG QUERCETIN KẾT HỢP  
THUỐC CHỐNG UNG THƯ**

**LUẬN ÁN TIẾN SỸ HÓA HỌC**

**TP. HỒ CHÍ MINH – 2022**

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

-----

**ĐINH VĂN THOẠI**

**TỔNG HỢP VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CÁC HỆ GELATIN  
PLURONIC NANOGEL MANG QUERCETIN KẾT HỢP  
THUỐC CHỐNG UNG THƯ**

Chuyên ngành: Hóa Hữu cơ

Mã số: 9 44 01 14

**LUẬN ÁN TIẾN SỸ HÓA HỌC**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. LÊ VĂN THỤ

2. PGS.TS TRẦN NGỌC QUYÊN

**TP. HỒ CHÍ MINH – 2022**

## LỜI CAM ĐOAN

Công trình được thực hiện tại phòng Hóa dược – Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng – Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam tại Thành phố Hồ Chí Minh.

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi và được sự hướng dẫn khoa học của TS. Lê Văn Thụ và PGS.TS Trần Ngọc Quyển. Các nội dung nghiên cứu, các kết quả trong luận án này là trung thực, được hoàn thành dựa trên các kết quả nghiên cứu của tôi và các kết quả này chưa được dùng cho bất kỳ luận án cùng cấp nào.

Nghiên cứu sinh

**Đinh Văn thoại**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin trân trọng cảm ơn PGS.TS Trần Ngọc Quyên và TS. Lê Văn Thụ đã định hướng khoa học, giúp đỡ tận tình trong suốt quá trình thực hiện luận án. Xin gửi đến Thầy những lời biết ơn chân thành nhất.

Tôi xin cảm ơn sự hỗ trợ của các anh chị và các em trong Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng – Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Tôi xin cảm ơn sự giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi của Học viện Khoa học Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trong suốt thời gian tôi thực hiện luận án.

Sau cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn đến gia đình, bạn bè, đồng nghiệp đã động viên, giúp đỡ cho tôi hoàn thành luận án này.

Nghiên cứu sinh

**Đinh Văn Thoại**

## TÓM TẮT

Trong lĩnh vực dược phẩm có rất nhiều loại thuốc điều trị là các hợp chất hữu cơ, bên cạnh những hiệu quả điều trị của chúng, các hợp chất này luôn có những nhược điểm là khả năng hòa tan kém trong nước dẫn đến hiệu quả trị liệu kém. Ngoài ra, trong quá trình điều trị, các phân tử thuốc sẽ tuần hoàn khắp cơ thể và gây ra những tác dụng phụ không mong muốn tới các tế bào lành, đặc biệt là các loại thuốc điều trị bệnh ung thư, là căn bệnh nguy hiểm gây chết người và hiện nay chưa có phương pháp điều trị một cách hiệu quả, triệt để. Vì vậy, việc nghiên cứu nhằm tìm ra phương pháp điều trị bệnh ung thư đang được đông đảo các nhà khoa học quan tâm, nghiên cứu. Có nhiều hướng nghiên cứu nhằm nâng cao hiệu quả trong điều trị ung thư, như tìm kiếm thuốc mới hiệu quả hơn, hay kết hợp nhiều phương pháp trị liệu như hóa trị, xạ trị. Tuy nhiên, có một hướng nghiên cứu đang được quan tâm là tổng hợp ra các loại vật liệu có khả năng dẫn truyền thuốc. Các loại vật liệu mới này đóng vai trò lưu giữ, vận chuyển thuốc đến đúng mục tiêu cần điều trị và có khả năng nhả chậm thuốc đúng liều lượng nhằm duy trì sinh khả dụng cũng như giảm thiểu độc tính của thuốc đối với các tế bào lành trong cơ thể. Trải qua quá trình tham khảo, nghiên cứu tài liệu và nhận thấy tiềm năng của hướng nghiên cứu này, chúng tôi đã triển khai đề tài nghiên cứu với mục tiêu tổng hợp thành công vật liệu mang thuốc mới trên cơ sở polymer gelatin ghép với các pluronic khác nhau nhằm kết hợp và phát huy được đặc tính ưu việt của hai loại vật liệu này trong vai trò là vật liệu dẫn truyền thuốc.

Kết quả thu được cho tín hiệu khả quan. Cụ thể, mẫu vật liệu có tiềm năng ứng dụng mang thuốc trong điều trị ung thư đã được tổng hợp thành công. Các vật liệu này có kích thước nano được tổng hợp gồm gelatin-F127, gelatin-P123, gelatin-F68, gelatin-F87, đồng thời xác định được vật liệu cho kết quả tối ưu nhất là gelatin-P123 (GP-P123) với tỷ lệ gelatin:pluronic 1:4. Hơn nữa, phối tử hướng đích folic acid (FA) cũng được ghép thành công vào hệ vật liệu và cho kết quả tốt hơn khi ứng dụng mang hai loại thuốc được chọn trong nghiên cứu là quercetin (một hoạt chất có khả năng điều trị ung thư), và paclitaxel (thuốc điều trị ung thư phổ biến hiện nay).

Các nguyên liệu, sản phẩm tạo thành trong phạm vi nghiên cứu được phân tích bởi các phương pháp hiện đại như  $^1\text{H-NMR}$ , FT-IR, TGA, DLS, TEM. Kích thước hạt nano thu được với vật liệu GP-P123 (tỷ lệ gelatin:P123 bằng 1:4) là 32,37 nm,

hiệu quả mang quercetin đạt gần 8%wt, paclitaxel đạt từ 0,5 đến 2,0%wt, khả năng nhả chậm quercetin khoảng 70% sau 120 giờ, vượt trội khi so sánh với quercetin tự do (giải phóng hết 100% chỉ sau 24 giờ) và nhả chậm paclitaxel hơn 90% sau 72 giờ, trong khi paclitaxel dạng tự do giải phóng hoàn toàn trong thời gian chưa đầy 12 giờ. Trong phạm vi nghiên cứu, thử nghiệm *in vitro* đã được tiến hành khảo sát tính tương thích sinh học của vật liệu, hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư và đặc biệt, thử nghiệm *in vivo* khảo sát khả năng tiêu diệt khối u ung thư của quercetin và paclitaxel được nang hóa lên vật liệu nanogel FA-GP-P123. Kết quả cho thấy tác dụng tích cực của vật liệu mang đến hiệu quả trị liệu của thuốc. Công thức nang hóa kết hợp hai loại thuốc FA-GP-P123/PTX+QU có thể làm giảm khối u lên đến 94% sau 14 ngày thí nghiệm trên chuột, lớn hơn nhiều so với 83% khi dùng kết hợp PTX+QU dạng tự do. Đặc biệt, hệ nanogel FA-GP-QU/PTX+QU không gây triệu chứng sưng viêm ở chuột thí nghiệm, thậm chí có trường hợp chuột mất hẳn khối u. Từ kết quả thu được, có thể khẳng định vật liệu nanogel FA-GP-P123 có tiềm năng ứng dụng mang thuốc trong điều trị bệnh được tổng hợp thành công theo quy trình nghiên cứu của đề tài.

## ABSTRACT

In the pharmaceutical field, there are a large number of drugs which are organic compounds, beside their therapeutic effects, they always have drawbacks such as poor solubility which results in poor efficiency of treatment. Additionally, during disease treatment, these drug substances will circulate all over the body and affect strong cells negatively. Especially, drugs for cancers which are deadly diseases and nowadays, there has not been way to treat cancers effectively and strictly. Therefore, studying to find out more beneficial methods for cancers are interested by a lot of scientists. There are many tendencies to investigate to aim gaining enhancing cancer treatment such as researching for new drugs which are more effective, or combining two or more ways as using both treating methods chemotherapy and radiotherapy. However, there is vital tendency which is noticed by scientists to be synthesizing to create drug delivering materials. Crucial roles of these materials are keeping drug substances in their structure, carry drugs to goal tissues which need to be treated, and these materials can release the drug slowly, enough dose to maintain bioavailability as well as minimising toxicity of the drug which can affect to strong cells of the body disadvantageously. Experiencing the reference, studying researching related documents and realizing enormous potentialities of this tendency, our researching group performed synthesizing of new materials for deliver drugs base on grafting of gelatine and some kinds of pluronic such as F127, P123, F68 and F87 to aim applying beneficial characteristics of both these substances for using creating drug carrier.

Obtained results bring to positive signals, specifically, the materials for drug delivery were synthesized successfully. The drug delivery materials with nano sizes which are created to be gelatine-F127, gelatine-P123, gelatine-F68 and gelatin-F87. Especially, studying determined material which lead to the best result to be gelatin-P123 at ratio 1:4. Moreover, target ligand folic acid (FA) grafted into the structure of nano particles and brought to more effective with quercetin, an active substance has potentiality for cancer treatment, and paclitaxel, a popular cancer drug, too.

The materials and gained products were analyzed by modern technologies such as  $^1\text{H-NMR}$ , FT-IR, TGA, DLS, TEM. Particle size of GP-P123 at ratio

gelatin:pluronic (1:4) is 32,37nm, loading efficacy of quercetin achieve nearly 8,0%wt, loading efficacy of paclitaxel reach 0,5 to 2,0%wt, slowly releasing quercetin around 70% after 120 hours of process experiment, more effective comparison with free form of quercetin (releasing completely 100% only after 24 hours) and more 90% of paclitaxel was released after 72 hours, better result paclitaxel's free form (releasing completely after 12 hours). Within the researching, *in vitro* experiments were performed to investigate biocompatibility of the drug delivery, killing effect cancer cells and *in vivo* to test killing effect cancer tumour of quercetin and paclitaxel which are loaded by nanogel of FA-GP-P123. Testing datas demonstrate positive effects of ligand FA, specifically, formula FA-GP-P123/PTX+QU can decrease 94% size of cancer tumour after 14 days of process experiment, while free form of PTX+QU only can reduce around 83% of size one. Especially, using nanogel FA-GP-P123/PTX+QU does not cause symptoms of inflammation on tested rats, even there is rat that loses cancer tumour completely. Obtained researching datas lead to determining that nanogel FA-GP-P123 synthesized successfully, can supply a potential solution for medicinal purposes.

**Keywords:** Quercetin, Paclitaxel, gelatin-pluronic, nanogel, drug delivery, chemotherapy



## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	
LỜI CẢM ƠN	
TÓM TẮT	
MỤC LỤC.....	i
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT .....	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	viii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ .....	ix
<b>MỞ ĐẦU .....</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Giới thiệu về nanogel .....</b>	<b>5</b>
<i>1.1.1. Khái niệm và ứng dụng nanogel .....</i>	<i>5</i>
<i>1.1.2. Phương pháp tổng hợp nanogel.....</i>	<i>7</i>
<b>1.2. Vật liệu gelatin.....</b>	<b>13</b>
<i>1.2.1. Tổng quan về gelatin.....</i>	<i>13</i>
<i>1.2.2. Ứng dụng gelatin trong tổng hợp hệ dẫn truyền thuốc.....</i>	<i>16</i>
<b>1.3. Pluronic .....</b>	<b>23</b>
<i>1.3.1. Tổng quan về pluronic .....</i>	<i>23</i>
<i>1.3.2. Ứng dụng pluronic trong tổng hợp hệ dẫn truyền thuốc.....</i>	<i>25</i>
<b>1.4. Ung thư và thuốc chống ung thư .....</b>	<b>26</b>
<i>1.4.1. Tổng quan về bệnh ung thư.....</i>	<i>26</i>
<i>1.4.2. Hoạt chất quercetin (QU) .....</i>	<i>26</i>
<i>1.4.3. Paclitaxel (PTX).....</i>	<i>28</i>
<b>1.5. Tác nhân hướng đích folic acid (FA).....</b>	<b>30</b>
<b>1.6. Những nghiên cứu trước đây .....</b>	<b>31</b>
<b>CHƯƠNG 2. NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>38</b>
<b>2.1. Hóa chất .....</b>	<b>38</b>
<b>2.2. Dụng cụ và thiết bị .....</b>	<b>38</b>
<b>2.3. Phương pháp nghiên cứu.....</b>	<b>40</b>

<b>2.3.1. Phương pháp tổng hợp các copolymer ghép trên cơ sở gelatin liên hợp pluronic.....</b>	<b>40</b>
<b>2.3.2. Phương pháp đánh giá cấu trúc, hình thái các copolymer ghép.....</b>	<b>40</b>
2.3.2.1. Đánh giá cấu trúc copolymer bằng <sup>1</sup> H-NMR.....	40
2.3.2.2. Đánh giá cấu trúc copolymer bằng FT-IR.....	40
2.3.2.3. Xác định thành phần copolymer bằng phương pháp TGA .....	40
2.3.2.4. Khảo sát nồng độ tạo micelle (CMC) của copolymer GP .....	41
2.3.2.5. Khảo sát điện tích bề mặt (thế Zeta) của nanogel GP .....	41
2.3.2.6. Khảo sát kích thước hạt nanogel bằng phương pháp DLS.....	41
2.3.2.7. Khảo sát hình dạng và kích thước hạt nanogel bằng phương pháp TEM ...	42
<b>2.3.3. Phương pháp tổng hợp hệ nanogel mang thuốc PTX và hoạt chất QU.....</b>	<b>42</b>
<b>2.3.4. Khả năng nhả chậm QU và PTX của vật liệu nanogel GP và động học giải phóng thuốc.....</b>	<b>43</b>
2.3.4.1. Khảo sát khả năng nhả chậm thuốc từ hệ nanogel.....	43
2.3.4.2. Nghiên cứu động học giải phóng thuốc từ hệ nanogel .....	44
<b>2.3.5. Phương pháp đánh giá độc tính tế bào (dòng tế bào MCF-7 và tế bào thường) của vật liệu nanogel GP.....</b>	<b>44</b>
<b>2.3.6. Thí nghiệm trên động vật.....</b>	<b>45</b>
2.3.6.1. Phương pháp ghép tế bào MCF-7 tạo mô hình chuột mang khối u .....	45
2.3.6.2. Phương pháp tính thể tích khối u.....	46
2.3.6.3. Phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch bằng kháng thể SOD2.....	47
2.3.6.4. Phương pháp nhuộm Hemaoxylin - Eosin (H&E).....	47
<b>2.4. Thực nghiệm .....</b>	<b>48</b>
<b>2.4.1. Tổng hợp và khảo sát nanogel trên cơ sở gelatin ghép pluronic GP .....</b>	<b>48</b>
2.4.1.1. Tổng hợp nanogel GP .....	48
2.4.1.2. Tổng hợp nanogel FA-GP.....	54
<b>2.4.2. Khảo sát khả năng nang hóa thuốc lên vật liệu nanogel GP.....</b>	<b>54</b>
<b>2.4.3. Khảo sát khả năng nhả QU và động học giải phóng QU của GP .....</b>	<b>56</b>
<b>2.4.4. Đánh giá độc tính tế bào in-vitro.....</b>	<b>57</b>
<b>2.4.5. Tổng hợp, khảo sát đặc tính và đánh giá hiệu quả của nanogel FA-GP-P123 mang PTX kết hợp QU (FA-GP-P123/PTX/QU) lên chuột mang khối u .....</b>	<b>57</b>

2.4.5.1. Tổng hợp hệ nanogel FA-GP-P123 .....	57
2.4.5.2. Tổng hợp hệ nanogel FA-GP-P123 mang PTX kết hợp QU.....	58
2.4.5.3. Đánh giá cấu trúc, hình thái FA-GP-P123 mang PTX kết hợp QU .....	59
2.4.5.4. Đánh giá độc tính dòng tế bào in vitro MCF-7 và HeLa.....	59
2.4.5.5. Khảo sát khả năng nhả thuốc và đánh giá động học giải phóng thuốc của FA-GP-P123/PTX/QU .....	59
2.4.5.6. Quy trình tạo mô hình chuột suy giảm miễn dịch và ghép khối u dị loài ....	59
2.4.5.7. Quy trình thử nghiệm thuốc .....	60
2.4.5.8. Quy trình đánh giá hiệu quả của thuốc.....	62
<b>CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN .....</b>	<b>64</b>
<b>3.1. Kết quả tổng hợp và khảo sát nanogel GP-F127.....</b>	<b>64</b>
<b>3.1.1. Kết quả xác định thành phần, cấu trúc các copolymer GP-F127 .....</b>	<b>64</b>
3.1.1.1. Kết quả phân tích phổ FT-IR và <sup>1</sup> H-NMR của sản phẩm trung gian NPC-F127-NPC và NPC- F127-OH.....	64
3.1.1.2. Kết quả phân tích phổ FT-IR và <sup>1</sup> H-NMR của GP-F127.....	69
3.1.1.3. Kết quả phân tích TGA của GP-F127.....	71
3.1.1.4. Kết quả phân tích giá trị CMC của GP-F127.....	73
3.1.1.5. Kết quả phân tích thế zeta và kích thước hạt của GP-F127 .....	74
<b>3.1.2. Kết quả tổng hợp nanogel GP-F127 mang QU và PTX.....</b>	<b>78</b>
3.1.2.1. Kết quả tổng hợp nanogel GP-F127 mang QU .....	78
3.1.2.2. Kết quả tổng hợp nanogel GP-F127 mang PTX.....	80
<b>3.2. Kết quả tổng hợp và khảo sát nanogel GP-P123, GP-F87, GP-F68 so sánh với GP-F127 .....</b>	<b>81</b>
<b>3.2.1. Kết quả xác định thành phần, cấu trúc các copolymer GP-P123, GP-F87 và GP-F68 .....</b>	<b>81</b>
3.2.1.1. Kết quả phân tích phổ FT-IR và <sup>1</sup> H-NMR của sản phẩm trung gian NPC-P123-NPC, NPC- P123-OH, NPC-F87-NPC, NPC-F87-OH, NPC-F68-NPC và NPC-F68-OH .....	82
3.2.1.2. Kết quả phân tích phổ FT-IR và <sup>1</sup> H-NMR của GP-P123, GP-F87 và GP-F68 .....	83
3.2.1.3. Kết quả phân tích TGA của GP-P123, GP-F87 và GP-F68.....	85

3.2.1.4. Kết quả phân tích giá trị CMC/CGC của GP-P123, GP-F127, GP-F87 và GP-F68.....	88
3.2.2. Kết quả tổng hợp nanogel GP-P123, GP-F127, GP-F87 và GP-F68 mang QU.....	91
3.2.3. So sánh kết quả phân tích các nanogel GP-P123, GP-F127, GP-F87 và GP-F68 mang QU.....	92
3.2.4. Khảo sát khả năng nhả chậm QU từ các nanogel GP-P123, GP-F127, GP-F87 và GP-F68.....	93
3.2.4.1. Khả năng nhả chậm QU từ các nanogel GP.....	93
3.2.4.2. Động học giải phóng QU từ các nanogel GP.....	96
3.2.5. So sánh khả năng ức chế tế bào ung thư của nanogel GP-P123 và GP-F127 mang QU.....	97
3.3. Kết quả khảo sát nanogel GP-P123 ở các tỉ lệ ghép khác nhau.....	99
3.3.1. Kết quả phân tích thế Zeta và kích thước hạt của nanogel GP-P123 ở các tỉ lệ ghép khác nhau.....	99
3.3.2. Kết quả tổng hợp nanogel GP-P123 mang PTX và QU.....	101
3.3.2.1. Kết quả tổng hợp nanogel GP-P123 ở các tỉ lệ ghép khác nhau mang QU.....	101
3.3.2.2. Kết quả tổng hợp nanogel GP-P123 ở các tỉ lệ ghép khác nhau mang PTX.....	101
3.4. Kết quả tổng hợp và đánh giá nanogel FA-GP-P123.....	103
3.4.1. Kết quả phân tích phổ FT-IR của <sup>1</sup> HNMR của FA-GP-P123.....	103
3.4.2. Kết quả phân tích đặc tính của vật liệu nanogel FA-GP-P123.....	104
3.4.2.1. Kết quả TGA của FA-GP-P123.....	104
3.4.2.2. Kết quả CMC của FA-GP-P123.....	105
3.4.2.3. Kết quả tổng hợp nanogel FA-GP-P123 mang QU.....	106
3.4.2.4. Kết quả tổng hợp nanogel FA-GP-P123 mang PTX.....	107
3.5. Kết quả tổng hợp và đánh giá nanogel FA-GP-P123 mang thuốc PTX kết hợp QU (FA-GP-P123/PTX/QU) lên chuột mang khối u.....	107
3.5.1. Khả năng mang PTX kết hợp QU của vật liệu nanogel FA-GP-P123.....	107
3.5.2. Kết quả khảo sát khả năng nhả thuốc của FA-GP-P123/PTX/QU.....	108

3.5.2.1. Khả năng nhả chậm thuốc từ các nanogel FA-GP-P123 .....	108
3.5.2.2. Động học giải phóng thuốc từ nanogel FA-GP-P123 .....	111
<b>3.5.3. Kết quả đánh giá in vitro hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư của nanogel FA-GP-P123 mang thuốc.....</b>	<b>113</b>
3.5.3.1. Kết quả đánh giá in vitro tính tương thích sinh học của nanogel GP-P123 .....	113
3.5.3.2. Kết quả đánh giá in vitro hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư MCF-7 của nanogel FA-GP-P123 mang PTX và QU.....	115
3.5.3.3. Kết quả đánh giá in vitro hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư HeLa của nanogel FA-GP-P123 mang PTX và QU.....	117
<b>3.5.4. Kết quả đánh giá in vivo hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư của nanogel FA-GP-P123/PTX/QU .....</b>	<b>119</b>
<b>KẾT LUẬN.....</b>	<b>127</b>
<b>KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>129</b>
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ.....</b>	<b>130</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>131</b>
<b>PHỤ LỤC</b>	

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Ý nghĩa
Ge	Gelatin
Plu	Pluronic
QU	Quercetin
PTX	Paclitaxel
Plu	Pluronic
FA	Folic acid
NPC	<i>p</i> -nitrophenyl chloroformate
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
NHS	N-hydroxysuccinimide
Ami	3-amino-1-propanol
Da	Dalton
DLS	Dynamic Light Scattering: máy đo phân tán động học laser
TEM	Transmission Electron Microscopy: Kính hiển vi điện tử truyền qua
<sup>1</sup> H-NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
TGA	Thermo gravimetric Analyzer: Phân tích nhiệt trọng lượng
UV-vis	Máy quang phổ tử ngoại khả kiến
FT-IR	Fourier Transform Infrared spectroscopy
IU	international unit
LMWH	Low Molecular Weight Heparin: Heparin khối lượng phân tử thấp
EPR	Enhanced Permeability and Retention Effect
PEO-PPO-PEO	poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)
PEG	Polyethylene glycol
CMC	Critical Micelle Concentration

HLB	Hydrophilic-lipophilic balance: Cân bằng ưa nước - ưa béo
FDA	Food and Drug Administration
SRB	Sulforhodamine B colorimetric assay
PBS	Phosphate buffered saline
DI	Deionized
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
HeLa	Tế bào ung thư cổ tử cung
MWCO	Molecular weight cut-off

## DANH MỤC CÁC BẢNG

<b>Bảng 1.1.</b> Đặc điểm gelatin loại A và B .....	14
<b>Bảng 1.2.</b> Thông số đặc trưng của một số pluronic .....	25
<b>Bảng 1.3.</b> Tóm tắt kết quả các đề tài nghiên cứu liên quan.....	36
<b>Bảng 2.1.</b> Danh mục hóa chất.....	38
<b>Bảng 2.2.</b> Số liệu các pluronic (mmol) trong tổng hợp vật liệu nanogel GP-F127, GP-P123, GP-F87 và GP-F68 .....	52
<b>Bảng 2.3.</b> Thông số quá trình nang hóa thuốc lên vật liệu nanogel .....	56
<b>Bảng 3.1.</b> Kết quả phổ FT-IR của F127, NPC-F127-NPC, NPC-F127-OH .....	65
<b>Bảng 3.2.</b> Kết quả phổ FT-IR của NPC-F127-OH, Gelatin và GP-F127 .....	69
<b>Bảng 3.3.</b> Kích thước của nanogel GP-F127 đo bằng kỹ thuật DLS .....	75
<b>Bảng 3.4.</b> Thế zeta và kích thước của nanogel GP-F127 đo bằng kỹ thuật TEM ....	77
<b>Bảng 3.5.</b> Kết quả phổ FT-IR của NPC-P123-OH, Gelatin và GP-P123.....	84
<b>Bảng 3.6.</b> Phần trăm khối lượng pluronic được ghép vào gelatin .....	87
<b>Bảng 3.7.</b> Biểu thị giá trị CMC/CGC của pluronic và gelatin-pluronic .....	90
<b>Bảng 3.8.</b> Kích thước các hạt nanogel trước và sau khi tải QU .....	92
<b>Bảng 3.9.</b> Dữ liệu giải phóng thuốc được biểu diễn dưới dạng hồi quy giữa các mô hình giải phóng thuốc từ thực nghiệm và một số mô hình động học.....	96
<b>Bảng 3.10.</b> Kích thước của nanogel GP-P123 đo bằng kỹ thuật DLS .....	100
<b>Bảng 3.11.</b> Thế zeta và kích thước của nanogel GP-P123 đo bằng kỹ thuật TEM	100
<b>Bảng 3.12.</b> Kết quả mang PTX và QU của nanogel FA-GP-P123.....	108
<b>Bảng 3.13.</b> Kết quả động học giải phóng QU của nanogel FA-GP-P123 .....	111
<b>Bảng 3.14.</b> Kết quả động học giải phóng PTX của nanogel FA-GP-P123 .....	112



## DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ

<b>Hình 1.1.</b> Cấu trúc hạt nanogel.....	5
<b>Hình 1.2.</b> Phương pháp tạo nhũ pha đảo .....	9
<b>Hình 1.3.</b> Phản ứng tổng hợp hệ hạt nano gelatin theo phương pháp tự keo tụ biến tính bằng hexanoyl .....	11
<b>Hình 1.4.</b> Sự hình thành hạt nano với chất tạo liên kết ngang sodium sulfate và GA .....	12
<b>Hình 1.5.</b> Cấu tạo và trạng thái của gelatin .....	14
<b>Hình 1.6.</b> Thí nghiệm in vitro giải phóng doxorubicin từ hạt nano GNPs trước và sau xử lý với các enzyme khác nhau.....	19
<b>Hình 1.7.</b> Cấu trúc và quá trình hình thành gel của pluronic .....	24
<b>Hình 1.8.</b> Cấu tạo hóa học của Quercetin.....	27
<b>Hình 1.9.</b> Ảnh hưởng của Quercetin lên chu kỳ tế bào.....	28
<b>Hình 1.10.</b> Cấu trúc hóa học của Paclitaxel .....	28
<b>Hình 1.11.</b> Cấu trúc của Acid Folic.....	30
<b>Hình 1.12.</b> Mô hình vật liệu mang thuốc gắn folic acid hướng đích.....	31
<b>Hình 2.1.</b> Tiêm tế bào MCF-7 trên lưng chuột đã suy giảm miễn dịch .....	46
<b>Hình 2.2.</b> Quá trình tổng hợp các gelatin ghép pluronic GP .....	48
<b>Hình 2.3.</b> Sơ đồ phản ứng tổng hợp nanogel GP-F127 .....	49
<b>Hình 2.4.</b> Phản ứng tổng hợp NPC-F127-NPC .....	49
<b>Hình 2.5.</b> Quy trình tổng hợp NPC-F127-NPC.....	50
<b>Hình 2.6.</b> Khóa một đầu sản phẩm hoạt hóa NPC-F127-OH.....	51
<b>Hình 2.7.</b> Quy trình tổng hợp NPC-F127-OH.....	51
<b>Hình 2.8.</b> Phản ứng tổng hợp GP-F127 .....	52
<b>Hình 2.9.</b> Sơ đồ quá trình tổng hợp vật liệu nanogel GP .....	53
<b>Hình 2.10.</b> Phản ứng tổng hợp copolymer FA-GP.....	54
<b>Hình 2.11.</b> Quá trình nang hóa thuốc lên vật liệu nanogel.....	55
<b>Hình 2.12.</b> Hình minh họa quá trình mang QU vào hệ nanogel GP.....	56
<b>Hình 2.13.</b> Sơ đồ phản ứng tổng hợp copolymer FA-GP-P123 .....	58
<b>Hình 2.14.</b> Kỹ thuật tiêm chuột trong quá trình thí nghiệm.....	61

<b>Hình 2.15.</b> Khối u được thu nhận sau khi kết thúc thí nghiệm .....	62
<b>Hình 3.1.</b> Phổ FT-IR của F127 và NPC-F127-NPC.....	64
<b>Hình 3.2.</b> Phổ FT-IR của NPC-F127-NPC và NPC-F127-OH .....	65
<b>Hình 3.3.</b> Phổ $^1\text{H-NMR}$ của NPC-F127-NPC .....	66
<b>Hình 3.4.</b> Phổ $^1\text{H-NMR}$ của NPC-F127-OH .....	68
<b>Hình 3.5.</b> Phổ FT-IR của Gelatin, GP-F127 (A) và các tỷ lệ GP-F127 (B).....	69
<b>Hình 3.6.</b> Phổ $^1\text{H-NMR}$ của gelatin.....	70
<b>Hình 3.7.</b> Phổ $^1\text{H-NMR}$ của GP-F127 .....	71
<b>Hình 3.8.</b> Kết quả TGA của F127, gelatin và các copolymer ghép GP-F127.....	72
<b>Hình 3.9.</b> Kết quả đo CMC của các copolymer ghép GP-F127 .....	73
<b>Hình 3.10.</b> Kết quả DLS ở hai nhiệt độ của: F127 (A); GP-F127 (1:5) (B); GP-F127 (1:10) (C); GP-F127 (1:15) (D); GP-F127 (1:18) (E) .....	76
<b>Hình 3.11.</b> Kết quả TEM của pluronic F127 .....	77
<b>Hình 3.12.</b> Kết quả TEM của (a): GP-F127 (1:5); (b): GP-F127 (1:10); (c): GP-F127 (1:15); (d): GP-F127 (1:18) .....	78
<b>Hình 3.13.</b> Nanogel GP-F127 mang QU .....	79
<b>Hình 3.14.</b> Kết quả mang QU vào F127 và GP-F127 .....	79
<b>Hình 3.15.</b> Kết quả mang PTX vào F127 và GP-F127 .....	80
<b>Hình 3.16.</b> Phổ FT-IR của gelatin và GP-P123 .....	83
<b>Hình 3.17.</b> Phổ $^1\text{H-NMR}$ của GP-P123 .....	84
<b>Hình 3.18.</b> Kết quả TGA của P123, F127, F87, F68, gelatin và copolymer ghép GP.....	86
<b>Hình 3.19.</b> Kết quả CGC của GP-P123 .....	88
<b>Hình 3.20.</b> Kết quả CMC/CGC của GP-P123 (A) và GPs (B).....	89
<b>Hình 3.21.</b> Kết quả mang QU vào pluronic và GP .....	91
<b>Hình 3.22.</b> Ảnh TEM, dữ liệu DLS của các nanogel GP mang QU .....	92
<b>Hình 3.23.</b> Kết quả giải phóng của QU từ hệ nanogel GP-QU .....	94
<b>Hình 3.24.</b> Khả năng ức chế tế bào ung thư của hệ nanogel mang QU .....	98
<b>Hình 3.25.</b> Khả năng ức chế tế bào ung thư của QU trước và sau khi được nang hóa lên vật liệu nanogel GP-P123.....	98
<b>Hình 3.26.</b> Kết quả TEM (a) và zeta (b) của P123.....	100

<b>Hình 3.27.</b> Kết quả nang hóa QU vào nanogel P123 và GP-P123.....	101
<b>Hình 3.28.</b> Kết quả nang hóa PTX vào nanogel P123 và GP-P123 .....	102
<b>Hình 3.29.</b> Phổ FT-IR của FA-GP-P123 .....	103
<b>Hình 3.30.</b> Phổ <sup>1</sup> H-NMR của FA- GP-P123 .....	104
<b>Hình 3.31.</b> Kết quả TGA của gelatin, P123, FA, GP-P123 và FA-GP-P123.....	104
<b>Hình 3.32.</b> Kết quả CGC của FA-GP-P123.....	106
<b>Hình 3.33.</b> Kết quả nang hóa QU vào nanogel FA-GP-P123 .....	106
<b>Hình 3.34.</b> Kết quả nang hóa PTX vào nanogel FA-GP-P123.....	107
<b>Hình 3.35.</b> Kết quả giải phóng QU (a) và PTX (b) từ vật liệu nanogel FA-GP-P123 .....	109
<b>Hình 3.36.</b> Kết quả khảo sát độc tính tế bào của nanogel ghép GP-P123.....	114
<b>Hình 3.37.</b> Khả năng ức chế sự phát triển tế bào ung thư MCF-7 của QU tự do và QU được nang hóa bởi vật liệu nanogel .....	115
<b>Hình 3.38.</b> Khả năng ức chế sự phát triển tế bào ung thư MCF-7 của PTX tự do và PTX được nang hóa bởi vật liệu nanogel.....	116
<b>Hình 3.39.</b> Khả năng ức chế sự phát triển tế bào ung thư HeLa của QU tự do và QU được nang hóa bởi vật liệu nanogel .....	117
<b>Hình 3.40.</b> Khả năng ức chế sự phát triển tế bào ung thư HeLa của PTX tự do và PTX được nang hóa bởi vật liệu nanogel.....	118
<b>Hình 3.41.</b> Kích thước khối u tại các thời điểm N0, N7 và N14.....	120
<b>Hình 3.42.</b> Hình thái tế bào trong mô khối u cắt lát .....	121
<b>Hình 3.43.</b> So sánh hình thái khối u trước và sau khi gây tạo.....	121
<b>Hình 3.44.</b> Hiệu quả tác động của các công thức thuốc lên thể tích khối u .....	122
<b>Hình 3.45.</b> Hình dạng đuôi chuột của các nghiệm thức .....	122
<b>Hình 3.46.</b> Diễn biến khối lượng chuột ở các công thức thử nghiệm .....	124
<b>Hình 3.47.</b> Hình ảnh nhuộm H&E của các nghiệm thức.....	125

## MỞ ĐẦU

Trong lĩnh vực dược phẩm có nhiều loại thuốc, đặc biệt là các loại thuốc điều trị bệnh ung thư, có những hạn chế làm giảm tác dụng điều trị như khả năng hòa tan trong nước kém, nồng độ của thuốc giảm nhanh sau khi đi vào cơ thể, gây ra những tác dụng hóa học không mong muốn hay thuốc phân bố trải rộng khắp cơ thể, thiếu chọn lọc với các mô bị bệnh khiến các mô bình thường cũng bị ảnh hưởng. Chính các hạn chế này đã thúc đẩy đông đảo các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu, phát triển các loại thuốc mới, các phương pháp dẫn truyền thuốc, hệ nano mang thuốc hướng đích,...[1].

Công nghệ nano là một công nghệ tiên tiến, bao gồm quá trình tổng hợp, gia công các hạt nano và ứng dụng chúng trong khoa học, đời sống [2]. Do những đặc tính có được từ cỡ hạt, tính chất hóa lý của vật liệu tạo hạt, công nghệ nano đã thu hút được sự quan tâm nghiên cứu, ứng dụng rộng rãi của các ngành khoa học, trong đó có ngành công nghệ dược phẩm. Nhiều hệ mang thuốc với kích thước nano như liposome, các hạt micelle polymer, các hạt nano dendrimer và các tinh thể nano được phát triển. Các hệ dẫn truyền thuốc này đã cải thiện được phần nào hiệu quả trong công nghệ bào chế thuốc. Ví dụ, hạt micelle được tạo bởi các phân tử polymer nhờ cấu trúc đặc trưng với nhân chứa thuốc có thể kéo dài thời gian tuần hoàn và ổn định của thuốc. Tuy nhiên, các hệ micelle polymer còn có hạn chế vì hiệu quả mang thuốc, số lượng hạt cũng như độ bền thấp trong môi trường nước, thậm chí chúng có thể bị phân ly trong khi pha loãng. Tương tự, liposome, được phát minh từ những năm 1960, có cấu trúc dạng cầu gồm một hoặc nhiều lớp lipid bao quanh một nhân nước. Có một số loại thuốc được sản xuất dựa trên công thức này được thị trường dược phẩm chấp nhận. Tuy nhiên, một số hạn chế của liposome cũng được báo cáo là không hoạt động như mong đợi trong cơ thể sống, có hiện tượng thiếu ổn định, hiệu quả tải thuốc thấp, không bền trong môi trường máu và khả năng lưu trữ, bảo quản thấp. Vì vậy, chỉ có rất ít các công thức dạng liposome được ứng dụng trong thực tế. Dendrimer, được báo cáo là vật liệu có nhiều tiềm năng mang thuốc có tính chọn lọc. Dendrimer đã được ứng dụng mang các thuốc như methotrexate – một loại thuốc chống ung thư, các thuốc ngăn ngừa HIV hoặc làm tăng hoạt tính sinh học của pilocarpine chữa các bệnh về thị giác. Nghiên cứu còn khẳng định vật liệu

dendrimer ngoài các đặc tính thông thường của vật liệu mang thuốc như có kích thước nhỏ, dễ dàng vượt qua màng tế bào, dễ dàng được gắn các tác nhân nhằm vận chuyển thuốc tới mô đích cần điều trị, dendrimer còn có thể khắc phục được một số nhược điểm của liposome như có khả năng mang được lượng thuốc lớn hơn, hay cấu trúc hạt có sự ổn định hơn. Tuy nhiên, dendrimer cũng được báo cáo là có độc tính cao, cơ chế giải phóng nucleic acid (được mang bởi dendrimer) gặp nhiều khó khăn [3-5].

Các hạt nano được tạo ra từ polymer đang được nghiên cứu rộng rãi cho vai trò làm vật liệu dẫn truyền thuốc trong cơ thể, chúng có chức năng đặc biệt khi dẫn truyền thuốc một cách có mục tiêu, vận chuyển các phân tử thuốc đến đúng các mô bị bệnh, và với đặc tính cỡ hạt, nano polymer có tất cả các lợi thế của các liposome. Nhưng không giống liposome, các hạt polymer với kích thước nano có thời gian tồn tại lâu hơn và mang được nhiều các phân tử thuốc hơn. Một số nghiên cứu cũng nhận thấy rằng số lượng hạt nano đi qua mô ruột lớn hơn các hạt cỡ micro ( $> 1 \mu\text{m}$ ). Các polymer có nguồn gốc tự nhiên, có tính tương thích sinh học là những ứng cử viên tốt cho vai trò làm vật liệu mang thuốc, chúng được kỳ vọng sẽ còn nguyên vẹn sau khi thấm qua thành ruột khi cung cấp theo đường miệng đi vào cơ thể [6]. Các báo cáo liên quan vật liệu mang thuốc với cấu trúc nanogel – có bản chất là một hydrogel với kích thước hạt cỡ nano do sự hình thành liên kết ngang của phân tử polymer ưa nước. Các liên kết ngang hóa học hoặc hóa lý giữa các polymer tổng hợp hoặc polymer có nguồn gốc sinh học tạo thành các nanogel. Nanogel được báo cáo là vật liệu có nhiều lợi thế như: Có thể kiểm soát được kích thước hạt trong quá trình điều chế; có thể mang được tất cả các thuốc có tính chất kỵ nước cũng như ưa nước và có khả năng kiểm soát cũng như duy trì sự nhả chậm của thuốc – đây là lợi thế lớn nhất của vật liệu nanogel trong ứng dụng dẫn truyền thuốc [7]. Những ưu điểm này đã hình thành hướng nghiên cứu tìm kiếm các polymer phù hợp với từng loại thuốc, trong đó các polymer nguồn gốc tự nhiên có tiềm năng ứng dụng.

Gelatin là một polymer tự nhiên, có nhiều trong da và xương động vật, giá thành không đắt, dễ bị phân hủy bởi vi khuẩn, không độc hại về mặt sinh học và là một polyampholyte với đặc điểm cấu trúc có cả hai nhóm cationic ( $-\text{NH}_2\text{OH}$ ), anionic ( $-\text{COOH}$ ) cùng với cấu trúc có đặc tính hút nước làm cho thể tích tăng lên nhưng vẫn giữ

nguyên cấu trúc tạo thành cấu trúc gel. Các đặc tính này có thể được ứng dụng tạo nên các dẫn xuất có thể mang và dẫn truyền các loại thuốc có độ hòa tan kém trong nước hay có tích điện trái dấu với gelatin [5].

Pluronic là một nhóm các polymer như F127, P123, F68, F87, có đặc điểm cấu trúc gồm nhóm ưa nước ethylene oxide (EO) và nhóm kỵ nước propylene oxide (PO) được sắp xếp theo cấu trúc bậc ba  $EO_x-PO_y-EO_x$  và thường được ký hiệu là (PEO-PPO-PEO), cấu trúc các pluronic đều giống nhau, chỉ khác nhau số x, y và biến đổi trong khoảng giá trị 2 – 130 và 16 – 70 phần. Pluronic là nguyên liệu an toàn, đã được Cục An toàn Dược phẩm và Thực phẩm Hoa kỳ chấp thuận ứng dụng trong lĩnh vực dược phẩm và y học [8]. Tuy nhiên, gelatin và pluronic có nguồn gốc tự nhiên nên hệ copolymer này cũng có những hạn chế như điều kiện bảo quản không tốt sẽ ảnh hưởng đến chất lượng của hệ nanogel, quá trình tinh sạch hệ nanogel tổng hợp bị ảnh hưởng bởi điều kiện thực nghiệm và khả năng mang thuốc phụ thuộc chủ yếu vào gốc pluronic ghép vào khung gelatin.

Trải qua quá trình nghiên cứu, tổng hợp tài liệu, tôi chọn hướng nghiên cứu tổng hợp các dẫn xuất của gelatin điều chế vật liệu nanogel ứng dụng dẫn truyền thuốc và thực hiện đề tài: *“Tổng hợp và đánh giá hoạt tính các hệ gelatin Pluronic nanogel mang quercetin kết hợp thuốc chống ung thư”*.

### **Mục tiêu của luận án:**

Nghiên cứu, tổng hợp hệ vật liệu nanogel ứng dụng dẫn truyền thuốc trên cơ sở kết hợp gelatin và pluronic nhằm kết hợp các đặc tính ưu việt của cả hai nguyên liệu trong vai trò mang và nhả các phân tử thuốc quercetin, paclitaxel. Nghiên cứu cũng tiến hành ghép tác nhân hướng đích (folic acid) lên phân tử copolymer tổng hợp được với mong muốn tạo vật liệu mới có thể vận chuyển thuốc tới các mô bị bệnh trong cơ thể, từ đó nâng cao được hiệu quả điều trị, hạn chế được những tác dụng phụ của thuốc. Cụ thể, các hạt nano phải đạt được các yêu cầu cơ bản như có dung lượng chứa thuốc lớn, có khả năng vận chuyển và giải phóng thuốc một cách chọn lọc tới đúng vị trí xác định – là các cơ quan, các mô, hoặc các tế bào của cơ thể, nơi cần đến sự hoạt động của thuốc nhằm mục đích trị liệu. Luận án tập trung giải quyết các vấn đề gồm khảo sát tìm loại pluronic, cũng như tỷ lệ của chúng nhằm tạo ra cấu trúc hạt nanogel theo yêu cầu về mặt

cấu trúc, kích thước hạt, khả năng mang quercetin, paclitaxel và khả năng giải phóng thuốc có kiểm soát. Bên cạnh đó, các thí nghiệm *in vitro* và *in vivo* cũng được tiến hành nhằm đánh giá hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư của vật liệu nanogel mang quercetin, paclitaxel có gắn tác nhân hướng đích làm cơ sở so sánh với hiệu quả khi sử dụng hai loại thuốc này ở dạng tự do.

**Để đạt được những mục tiêu trên, luận án đã thực hiện các nội dung sau:**

- **Nội dung 1:** Tổng hợp các copolymer trên cơ sở gelatin ghép Pluronic P123, F127, F87 và F68 với các tỉ lệ ghép khác nhau, tìm tỷ lệ ghép tối ưu, có gắn tác nhân hướng đích folic acid.

- **Nội dung 2:** Đánh giá cấu trúc, kích thước hạt, nồng độ tạo micelle (CMC), thế Zeta bề mặt hạt, hiệu suất tổng hợp copolymer.

- **Nội dung 3:** Khảo sát khả năng nang hóa quercetin và paclitaxel của nanogel. Từ đó chọn ra hệ nanogel mang thuốc tốt nhất để tiến hành các thử nghiệm tiếp theo.

- **Nội dung 4:** Đánh giá khả năng giải phóng thuốc của các vật liệu mang nanogel tổng hợp ở điều kiện môi trường: pH = 7,4; pH = 5,5; nhiệt độ 37 °C trong dung dịch đệm PBS (Phosphate Buffered Saline).

- **Nội dung 5:** Đánh giá *in vitro* hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư của hệ nanogel mang thuốc.

- **Nội dung 6:** Đánh giá *in vivo* hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư của hệ nanogel mang thuốc.

**Ý nghĩa khoa học và thực tiễn:**

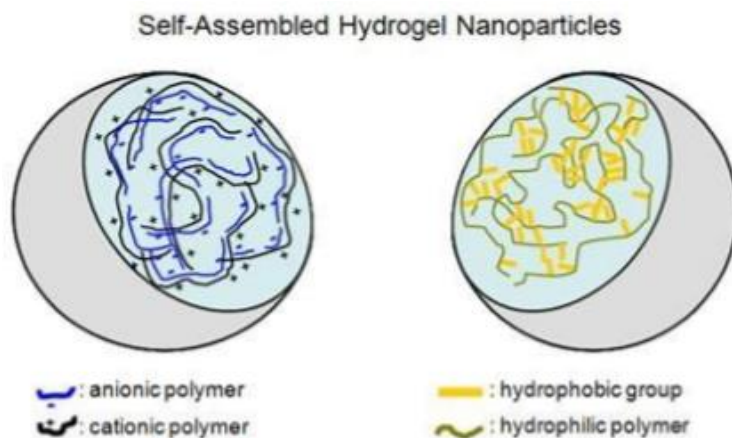
Thành công của đề tài có thể đóng góp giải pháp hiệu quả cho lĩnh vực công nghệ dược phẩm, giúp bào chế ra các loại dược phẩm tốt hơn theo hướng tổng hợp các vật liệu mang mới nhằm cải thiện sinh khả dụng của các loại thuốc kém tan trong nước cũng như khắc phục các tác dụng phụ mà thuốc gây ra. Kết quả của đề tài đã được ứng dụng thử nghiệm trên mô hình chuột mang khối u ghép dị loài sẽ làm nền tảng ứng dụng cho các nghiên cứu sâu hơn trong lâm sàng. Đồng thời, các nội dung nghiên cứu, các phương pháp thực hiện đề tài, và kết quả thí nghiệm thu được sẽ góp phần cung cấp cơ sở lý luận cho các nghiên cứu liên quan tiếp theo.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

### 1.1. Giới thiệu về nanogel

#### 1.1.1. Khái niệm và ứng dụng nanogel

Nanogel là các hạt có kích thước nano được hình thành bởi mạng lưới các polymer liên kết với nhau thông qua liên kết hóa học hoặc tương tác hóa lý. Các hạt nanogel có tính chất trương nở tốt trong dung môi. Sự phát triển mạnh mẽ trong lĩnh vực công nghệ nano đã phát triển các hệ nanogel có tiềm năng ứng dụng để mang các loại thuốc điều trị bệnh với khả năng hướng đích và duy trì nồng độ thuốc trong ngưỡng có hiệu quả điều trị. Những thành tựu nổi bật trong lĩnh vực khoa học về polymer, có thể tạo ra các hệ nano thông minh có hiệu quả cao trong điều trị cũng như các thí nghiệm trong lĩnh vực chữa bệnh. Các hạt nanogel có khả năng mang thuốc tốt hơn các hệ khác vì cỡ hạt và các đặc tính bề mặt có thể được biến đổi để tránh được sự tiêu hủy của các thể thực bào; sự giải phóng thuốc một cách có kiểm soát và duy trì nồng độ thuốc tại đúng mục tiêu, nâng cao hiệu quả điều trị và giảm thiểu các tác dụng phụ; lượng thuốc được mang trên vật liệu tương đối cao và có thể không có phản ứng hóa học xảy ra với phân tử thuốc, đây là yếu tố quan trọng nhằm bảo vệ nguyên vẹn hoạt tính của thuốc; khả năng vượt tới được các mạch mao dẫn nhỏ nhất, do thể tích của chúng nhỏ, và thâm nhập các mô bằng cách ghép hoặc xuyên qua; ngoài ra, các hạt nanogel còn có khả năng tương thích sinh học và phân hủy sinh học cao [9-11].



Hình 1.1. Cấu trúc hạt nanogel [12]



(- *Self-Assembled Hydrogel Nanoparticles: Các hạt nano dạng hydrogel được hình thành quá quá trình tự lắp ráp.*

- *Anionic polymer: Polymer mang điện tích âm.*

- *Cationic polymer: Polymer mang điện tích dương.*

- *Hydrophobic group: Nhóm kỵ nước.*

- *Hydrophilic polymer: Polymer ưa nước.)*

Các đặc tính quan trọng của vật liệu mang mới nanogel được quyết định bởi các yếu tố nhiệt độ, sự có mặt của nhóm ưa nước, nhóm kỵ nước trong mạng lưới của phân tử polymer, mật độ liên kết ngang của hệ gel cũng như mạng polymer, và nồng độ các chất hoạt động bề mặt.

Trong ứng dụng làm vật liệu dẫn truyền thuốc, hệ nanogel có nhiều ưu điểm vượt trội. Đặc tính trương nở và phá hủy trương nở với tốc độ nhanh là đặc tính có lợi nhất của hệ nanogel. Với nhiều nhóm chức có khả năng hấp thu, giải phóng thông qua liên kết hydro, tương tác bề mặt Van der Waals, thậm chí có khả năng tạo liên kết với nhiều loại thuốc hoặc protein trong mạng lưới polymer nên hệ nanogel có dung lượng mang thuốc cao hơn. Với kích thước trong khoảng 20 – 200 nm, các hạt nanogel có thể tránh được sự ngăn chặn nhanh chóng của thận và đủ nhỏ để tránh được sự hấp thu của hệ thống màng lưới trong, đặc biệt với kích thước vô cùng nhỏ, các hạt nanogel có thể vượt qua rào cản của mạch máu não. Các hệ nanogel còn có khả năng mang nhiều loại thuốc kỵ nước cũng như các tác nhân chuẩn đoán bệnh trong nhân hoặc trong mạng lưới gel của chúng. Ngoài ra, các hệ nanogel được tạo thành mà không cần sử dụng năng lượng hay các điều kiện khắc nghiệt như sóng siêu âm hoặc quá trình đồng nhất, điều này mang lại khả năng mang các phân tử thuốc một cách thuận lợi. Các hệ nanogel cũng có sự ổn định hơn các micelle chất hoạt động bề mặt và có nồng độ tạo gel tới hạn thấp hơn, tốc độ phân ly thấp hơn, do đó thời gian lưu của thuốc được mang dài hơn và thường không gây ra sự đáp ứng miễn dịch của cơ thể. Tuy nhiên, việc sử dụng các hệ nanogel làm vật liệu mang thuốc vẫn tồn tại một số hạn chế như kỹ thuật tách các chất hoạt động bề mặt sau quá trình tạo nanogel có chi phí cao và hàm lượng vết các chất hoạt động bề mặt hay các monomer còn sót lại có thể gây ngộ độc [9-11].

Do sở hữu những đặc tính hấp dẫn, các hệ nanogel đã thu hút được sự quan tâm nghiên cứu vài thập kỷ qua. Với khả năng hút nước, cấu trúc mạng lưới xốp, tính tương thích với các hệ sinh học và có khả năng tương tác dễ dàng với các tác nhân có hoạt tính như các loại thuốc, các phân tử sinh học đã làm cho chúng trở thành nhân tố không thể thiếu trong lĩnh vực ứng dụng y sinh như làm các hệ vận chuyển thuốc hướng đích, các vật liệu nền, ứng dụng làm khung cho kỹ thuật tái sinh mô và trong lĩnh vực tổng hợp vật liệu composite [9-11, 13-18]. Các hạt nanogel mang điện còn thu hút sự quan tâm nghiên cứu đặc biệt bởi trong phân tử của chúng có chứa các nhóm chức ion hóa, các hệ nanogel này có thể phản ứng với môi trường pH, có khả năng liên kết với các phần mang điện tích đối lập tạo thành các phức chất, tính chất mang điện này của hệ nanogel được ứng dụng phổ biến nhất trong việc kết hợp với các ion kim loại tạo thành hệ có cấu trúc mang điện tích dương – một cấu trúc rất hữu hiệu cho mục đích vận chuyển gen [19].

### ***1.1.2. Phương pháp tổng hợp nanogel***

Do có nhiều ứng dụng trong chế tạo vật liệu vận chuyển thuốc, vận chuyển gen nên hạt nano với cấu trúc gel (nanogel) có nhiều nghiên cứu được công bố, từ năm 1987 đã có những công trình nghiên cứu đầu tiên về các phương pháp tổng hợp hệ nano từ gelatin.

Kỹ thuật desolvat dựa vào việc cộng thêm tác nhân desolvat như alcohol hoặc acetone vào dung dịch gelatin hòa tan trong nước để thực hiện phản ứng khử nước của các phân tử gelatin dẫn đến thay đổi hình thể từ dạng kéo căng sang thể cuộn lại. Bước tiếp theo, tiến hành quá trình đông cứng các hạt bằng phản ứng liên kết chéo. Tuy nhiên, sử dụng các sản phẩm hạt gelatin tự nhiên chỉ thu được các hạt kích thước lớn, phân bố cỡ hạt rộng do tính không đồng nhất khối lượng phân tử của gelatin. Kỹ thuật desolvat hai bước được thực hiện bởi nhà khoa học Coester và cộng sự đã cho thấy hiệu quả hơn khi tạo được các hạt nano với kích thước nhỏ hơn và đồng đều hơn. Gelatin khối lượng phân tử lớn được kết tủa trong bước desolvat đầu tiên để loại bỏ các phân tử gelatin khối lượng phân tử nhỏ. Sau đó, các phân tử gelatin phân tử lớn được hòa tan lại và thực hiện bước desolvat tiếp theo [12].

Phương pháp desolvat một bước được đơn giản hóa do Ofokansi và cộng sự phát triển không cần thời gian dài hơn để thực hiện bước desolvat ban đầu trong việc loại bỏ

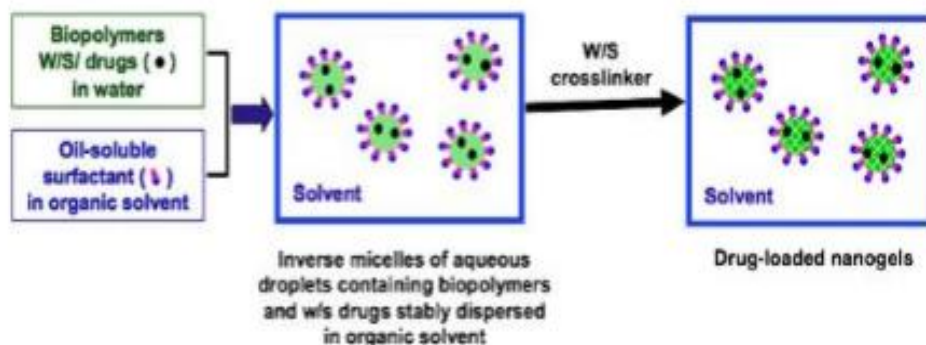
các mảnh gelatin phân tử nhỏ. Trong phương pháp này, trước khi thực hiện sự desolvat, giá trị pH của dung dịch gelatin được điều chỉnh tới môi trường trung tính ( $\text{pH} = 7,0$ ) trên giá trị pI để các phân tử gelatin không tích điện một cách đầy đủ và duy trì độ nhạy quá trình desolvat vì các phân tử tích điện sẽ ngăn cản chúng kết tụ với nhau. Hơn nữa, nhiệt độ tiến hành được duy trì liên tục ở  $37\text{ }^\circ\text{C}$  để đảm bảo sự phân bố khối lượng phân tử gelatin được duy trì cân đối. Các hạt nano thu được có kích cỡ từ 253 đến 479 nm và chỉ số phân tán PDI (polydispersity index) là 0,073. Mặc dù được sử dụng rộng rãi, nhưng kỹ thuật desolvat vẫn còn hai mặt hạn chế chính là việc sử dụng các dung môi hữu cơ và các chất tạo liên kết ngang (liên kết chéo) có độc tính [20].

Phương pháp keo tụ phân đoạn cũng được nghiên cứu áp dụng cho mục tiêu tạo hạt nano từ gelatin. Đây là một quá trình trong đó dung dịch đồng nhất của các phân tử cỡ lớn mang điện trải qua quá trình phân đoạn lỏng – lỏng, thu được phân đoạn giàu polymer ở dưới, phân đoạn ít polymer trong suốt ở trên [21]. Việc bổ sung muối hoặc alcohol thông thường sẽ thúc đẩy sự keo tụ và thu được các hạt nano mong muốn. Bằng kỹ thuật này, các hạt nano có kích cỡ từ 600 đến 1000 nm đã được tổng hợp thành công bằng việc bổ sung một cách từ từ muối sodium sulfate vào dung dịch gelatin trong nước có chứa chất hoạt động bề mặt Tween 20 theo sau bước bổ sung isopropanol để hòa tan kết tủa của natri sunphát. Một lượng dư natri sunphát được bổ sung đến khi dung dịch chuyển sang thể đục, cho thấy gelatin đã được keo tụ [20]. Nước cất được thêm vào hệ đến khi dung dịch chuyển thành trong và glutaraldehyde (GA) được bổ sung với vai trò là chất liên kết ngang để tạo các hạt nano. Phương pháp này có hạn chế là hạt nano thu được có kích thước lớn.

Phương pháp bốc hơi dung môi tạo nhũ đã được phát triển để tạo các hạt nano. Các hạt nano có kích thước trong khoảng 100 đến 400 nm được hình thành dựa trên quá trình tạo nhũ đơn nước – dầu (W/O). Pha nước chứa cả gelatin và thuốc cần vận chuyển được trộn và lắc với pha dầu – là dung môi hữu cơ của polymethylmethacrylate hoặc dầu paraffin cùng với chất đóng vai trò tạo liên kết ngang là GA hoặc genipin [22-25]. Một kỹ thuật tạo nhũ nước – nước cũng được nghiên cứu phát triển để vận chuyển insulin [26], cỡ hạt thu được là 250 nm dưới các điều kiện phù hợp để bảo vệ hoạt tính của

insulin. Cụ thể, dung dịch ẩm của gelatin chứa insulin được bổ sung nhỏ giọt dung dịch poloxamer, kết hợp khuấy đồng thời để tạo nhũ ở điều kiện 5 °C và thúc đẩy quá trình tạo hạt bằng tác nhân liên kết ngang.

Tạo nhũ pha đảo cũng được nghiên cứu phát triển trong tổng hợp hệ hạt nano. Trong phương pháp này, dung dịch của gelatin trong nước được bổ sung bởi dung dịch chất hoạt động bề mặt là sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT) trong dung môi n-hexan, sau đó GA được thêm vào để tạo liên kết ngang trong cấu trúc hạt. Theo sau là quá trình bay hơi dung môi n-hexan để thu hồi hạt nano. Chất hoạt động bề mặt khi được hòa tan vào các dung môi không phân cực sẽ tạo thành các hạt micelle đảo nơi đuôi kỵ nước sẽ được tập hợp lại hướng về phần dung môi không phân cực còn đầu ưa nước được hướng thẳng vào mặt trong của dung môi bao quanh một nhân nước, trong nhân chứa dung dịch của gelatin này, tác nhân tạo liên kết ngang được hòa tan và vì vậy các hạt nano được hình thành, quá trình tạo liên kết ngang xảy ra bên trong nhân nước của các giọt micelle nhỏ. Kích thước các nhân nước của hạt micelle nằm trong khoảng kích thước nano. Vì vậy, các hạt được tạo ra trong các nhân phản ứng nano này cũng sẽ có kích thước nano, giá trị kích thước trung bình thu được là 37 nm. Ưu điểm của phương pháp này là kích cỡ các hạt nano được tạo thành có thể được kiểm soát bằng cách điều chỉnh kích thước nhân micelle. Hệ hạt nano được tạo thành có hiệu suất mang fluorescein isothiocyanate-dextran – một chất đánh dấu huỳnh quang đạt xấp xỉ 90% [27, 28].



**Hình 1.2. Phương pháp tạo nhũ pha đảo [9]**

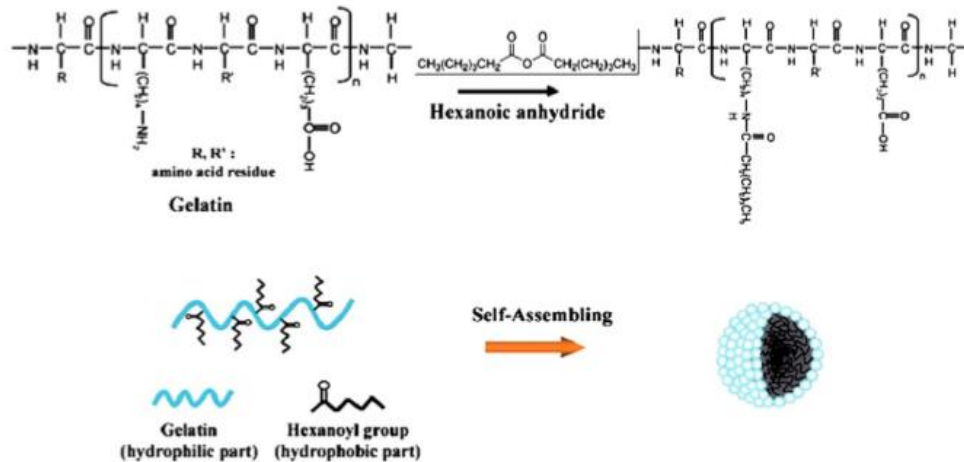
(- *Biopolymers W/S drugs in water*: Các polymer nguồn gốc sinh học và các phân tử thuốc ưa nước/dung môi trong môi trường nước.

- *Oil-soluble surfactant in organic solvent: Chất hoạt động bề mặt có thể hòa tan trong pha dầu được hòa tan trong dung môi hữu cơ.*
- *W/S crosslinker: Chất liên kết chéo nước/dung môi.*
- *Inverse micelles of aqueous droplets containing biopolymers and W/S drugs stably dispersed in organic solvent: Các micelle nghịch đảo của các giọt nước chứa các polymer sinh học và các phân tử thuốc phân tán một cách ổn định trong dung môi hữu cơ.*
- *Drug-loaded nanogels: Các hạt nanogel được nang hóa thuốc.)*

Phương pháp kết tủa nano thu hút được sự quan tâm nghiên cứu trong lĩnh vực tổng hợp hạt nano. Nước được sử dụng như một pha dung môi chứa gelatin, các phân tử thuốc được bổ sung một cách từ từ vào ethanol là pha dung môi không hòa tan chứa poloxamer làm chất ổn định, sau đó GA được bổ sung tạo liên kết ngang trong hạt. Cỡ hạt thu được phân bố quanh giá trị 251 nm. Cơ chế hình thành hạt được giải thích bằng sự chuyển động bề mặt phân pha được tạo ra trong quá trình thay thế dung môi. Sau đó, một sự phân tán mãnh liệt xảy ra vì tính chất có thể trộn lẫn vào nhau giữa các dung môi. Những giọt dung môi với cỡ hạt nano bị phá vỡ từ bề mặt phân pha, được ổn định nhanh chóng bằng tác nhân ổn định, quá trình khuếch tán dung môi hoàn thành, sự đông đặc protein xảy ra. Phương pháp có nhiều lợi thế, kỹ thuật không phức tạp, tốc độ nhanh, dễ thực hiện, tạo ra các hạt nano kích thước nhỏ. Hơn nữa, phương pháp không đòi hỏi tốc độ phân cắt lớn, sự siêu âm hoặc nhiệt độ rất cao trong quá trình tổng hợp [29-32].

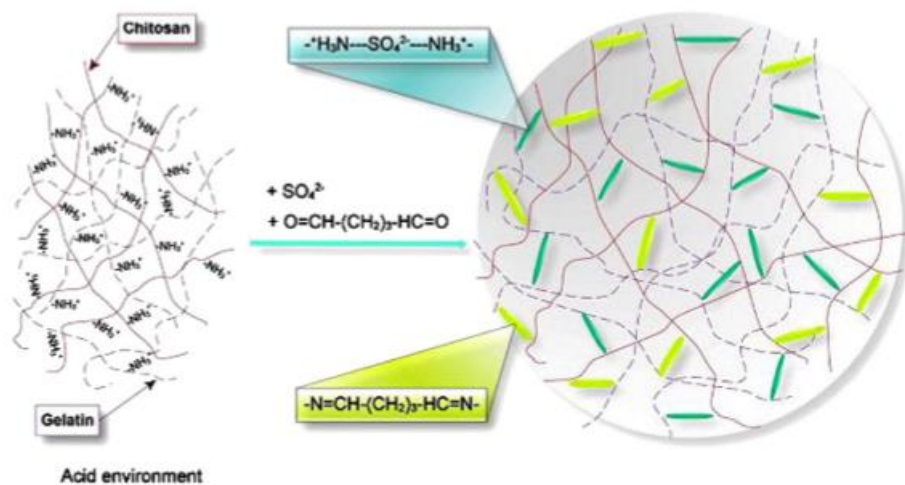
Hạt nano cũng có thể được tạo ra nhờ các phân tử polymer tự keo tụ với nhau thông qua kỹ thuật biến tính hóa học cấu trúc phân tử hoặc bằng kỹ thuật khuấy trộn đơn giản. Trong kỹ thuật biến tính hóa học, phần cấu trúc ưa nước của gelatin làm cho nó có khả năng liên kết hóa học với rất nhiều các phân tử kỵ nước để tạo thành polymer lưỡng tính. Gelatin được biến tính với các phân tử kỵ nước có khả năng trải qua quá trình sắp xếp lại cấu trúc khi hòa tan trong môi trường nước, do đó xảy ra quá trình tự keo tụ tạo thành các hạt micelle giống dạng nanosphere do các mảnh kỵ nước sẽ tập hợp lại hướng vào trong và tạo thành nhân bẫy các phân tử thuốc kỵ nước với lớp vỏ ưa nước hướng ra ngoài. Hạt nano dạng nanosphere được tổng hợp theo phương pháp tự keo tụ được nghiên

cứu lần đầu tiên bởi tác giả Kim và Byun nhờ phản ứng ghép cặp các nhóm cacboxyl của deoxycholic acid (DOCA) và carboxylated monomethoxy polyethylen glycol (MPEG) với nhóm amin của gelatin thông qua dichlorohexylcarbodiimide (DCC) [33]. Cấu trúc gelatin/DOCA/MPEG tổng hợp được đánh siêu âm tạo hạt nano, DOCA hoạt động như nhân kỵ nước, gelatin và chuỗi ưa nước MPEG ở phía ngoài của hạt. Hexanoyl anhydride và  $\alpha$ -tocopheryl succinate (TOS) được sử dụng như những nhóm kỵ nước để biến tính hóa học gelatin ưa nước. Nang hóa phân tử thuốc kỵ nước vào nhân hạt nano, phân tử camphothecin hoặc 17-AAG (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin) được trộn với dung dịch copolymer lưỡng tính dưới điều kiện đánh siêu âm. Lượng thuốc tự do không được giữ trong nhân hạt được loại bỏ bằng kỹ thuật ly tâm hoặc thẩm tách, sản phẩm trải qua quá trình khô lạnh. Một nồng độ rất thấp của CAC (0,00216 mg/mL) được khảo sát cho các dung dịch nước của gelatin biến tính bằng hexanoyl, cho thấy sự ổn định cấu trúc của các hạt nano trong vòng tuần hoàn của máu. Tanigo và cộng sự dùng thuốc simvastatin hòa tan bằng nước thông qua các micelle gelatin ghép cặp với L-lactic acid oligomer, hạt micelle được trộn với gelatin sau đó thực hiện phản ứng liên kết ngang tạo hydrogel gelatin. Trong môi trường có mặt enzyme phân hủy collagen, hydrogel thoái biến tạo gelatin có khả năng hòa tan trong nước, giải phóng simvastatin được duy trì liên tục [34-39].



**Hình 1.3. Phản ứng tổng hợp hệ hạt nano gelatin theo phương pháp tự keo tụ biến tính bằng hexanoyl [40]**

Hệ nano mang thuốc cũng có thể được tạo thành chỉ bằng phương pháp đơn giản là trộn trực tiếp dung dịch gelatin và thuốc, cho phép chúng tương tác trực tiếp dựa trên ái lực riêng mà không cần biến tính gelatin. Trong một nghiên cứu mang catechin hoặc ellagitannin của chè vào trong nano gelatin, liên kết hydro đóng vai trò chính cho quá trình tự keo tụ tạo thành hạt nano chỉ bằng phương pháp trộn trực tiếp chúng vào nhau. Tương tác kỵ nước cũng được cho là có vai trò trong quá trình hình thành hạt nano. Thông thường, phân tử protein với cấu trúc bậc ba ken đặc cung cấp ít các vị trí kỵ nước, hạn chế sự tương tác với các phân tử tannin. Tuy nhiên, gelatin là một protein giàu proline với hình dạng cuộn ngẫu nhiên được mở rộng, vì vậy gelatin cung cấp nhiều hơn vị trí tương tác cho các phân tử tannin, từ đó đẩy mạnh ái lực cao hơn cho các phân tử tannin [41, 42].



**Hình 1.4. Sự hình thành hạt nano với chất tạo liên kết ngang sodium sulfate và GA [40]**

Ngoài các phương pháp tổng hợp hạt nano ở trên, còn một phương pháp nữa cũng được nghiên cứu áp dụng, đó là phương pháp phủ liên tiếp các lớp polymer mang điện tích âm – dương đối nhau, ví dụ sử dụng các hệ polymer như polystyrene sulfonate/polyallylamine hydrochloride, polyglutamic acid/poly-L-lysine, dextran sulfate/protamin sulfate, cacboxymethyl cellulose/gelatin, loại A. Sự tích điện bề mặt qua lại với lớp liên tiếp của các lớp polymer mang điện tích dương và polymer mang điện tích âm được tuân theo. Các polyphenol khác nhau được gắn vào trong hạt nano bằng sự hấp thu từ các dung dịch đậm đặc của chúng. Năng suất hấp thu vào hạt nano

của các polyphenol có số nhóm chức phenol lớn hơn, trọng lượng phân tử lớn hơn sẽ cao hơn, ví dụ đạt 70% đối với theaflavin. Sự biến tính bề mặt các hạt nano với các lớp vỏ có cấu trúc lớp mang điện thay đổi liên tiếp bằng các polymer mang điện trái dấu cho phép điều chỉnh phù hợp sự hấp thu tế bào với hạt nano, cung cấp một khuôn mẫu cho sự biến tính của chúng với các tác nhân hướng đích tới các mô, làm tăng tính ổn định của keo, kiểm soát các đặc tính mang và giải phóng các phân tử thuốc [43, 44].

Trong các phương pháp tạo hạt nano từ gelatin, các nhà khoa học nhận thấy việc sử dụng các tác nhân tạo liên kết ngang (liên kết chéo) sẽ thu được các hệ nano ổn định hơn, có hình dạng và thời gian lưu thông được tăng cường hơn so với việc không sử dụng chất tạo liên kết ngang. Các chất đóng vai trò tạo liên kết ngang cho hệ hạt nano thường được sử dụng như các aldehyde, genipin, carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (CDI/NHS), microbial transglutaminase (MTG).

## **1.2. Vật liệu gelatin**

### ***1.2.1. Tổng quan về gelatin***

Từ “gelatin” được dùng phổ biến từ năm 1700 bắt nguồn từ tiếng latin là “gelatus” có nghĩa là màng hay chất làm đông. Gelatin là chuỗi polypeptide được tạo thành từ sự thủy phân collagen loại I. Bên cạnh những tính chất vốn có của collagen như tính tương hợp sinh học, khả năng phân rã sinh học, là thành phần chính của chất nền ngoại bào có vai trò trong việc điều khiển quá trình trao đổi với tế bào giúp tế bào bám dính, tăng sinh và tái tạo lại vùng mô tổn thương, gelatin còn là những đoạn ngắn chứa ít vùng antigen nên có thể kích hoạt hệ miễn dịch hơn collagen giúp ngăn cản đào thải vật liệu. Gelatin có thể tạo gel trong điều kiện lạnh và tan ở nhiệt độ trên 40 °C [45]. Gelatin là một loại polymer tự nhiên thu được bằng cách thủy phân một phần collagen như da cá, mô của khớp nối, xương động vật và thường được ứng dụng cho dược phẩm, y tế do tính phân hủy sinh học và tương thích sinh học của nó trong môi trường sinh lý. Thành phần acid amine gần đúng của gelatin như sau:

Tyrosine < 0,5%, methionine và histidine < 1%, 1% hydroxylysine, 1% isoleucine, 2% threonine, 2% phenylalamine, 2% valine, 3% leucine, 4% serine, 4% lysine, 6% aspartic, 8% arginine, 9% alanine, 10% acid glutamic, 12% hydroxyproline, 12%





dạng dung dịch và dạng gel có tính thuận nghịch. Tính chất này được ứng dụng trong quá trình chế biến thực phẩm [46].

Gelatin có thể tạo gel không cần phối hợp với chất nào khác, tính chất gel của gelatin phụ thuộc rất lớn vào nồng độ, nhiệt độ, pH và thời gian. Khi nồng độ càng tăng và nhiệt độ cao thì độ nở của gelatin càng lớn. Nồng độ của gelatin càng tăng và độ nở càng cao thì độ nhớt của gel càng lớn. Nhiệt độ và thời gian gia nhiệt càng cao thì độ cứng của gel càng giảm. Giá trị pH càng thấp thì độ cứng của gel càng giảm, với cùng một giá trị pH nếu thời gian gia nhiệt càng dài thì độ cứng của gel giảm càng nhanh [47].

Độ nhớt cũng quan trọng như khả năng tạo gel và cũng phụ thuộc nhiệt độ, nồng độ gelatin. Độ nhớt tỷ lệ thuận với nồng độ dung dịch, tỷ lệ nghịch với nhiệt độ. Dưới 20 °C dung dịch tồn tại ở dạng gel (ngoại trừ nồng độ quá thấp). Trong khoảng 20 – 35 °C, dung dịch vừa tồn tại dạng gel, vừa tồn tại ở dạng dung dịch nhớt hoặc ở dạng chất lỏng có độ nhớt không ổn định. Trên 35 °C, các phân tử gelatin trở nên rời rạc, cho dù có tăng nồng độ gelatin trong dung dịch thì chúng vẫn không liên kết với nhau [46, 47].

Phân tử gelatin tích điện trong dung dịch base hay acid, chúng sẽ di chuyển trong điện trường. Ở môi trường có giá trị pH = 2, tất cả các nhóm carboxyl không tích điện, phân tử gelatin mang điện tích dương cực đại (do điện tích nhóm amino và guanidino). Khi pH tăng các nhóm carboxyl bắt đầu tích điện và ở pH = 6,5 các nhóm carboxyl tích điện âm. Điện tích của phân tử ảnh hưởng đến tính chất của gelatin. Ở giá trị pH mà không có sự di chuyển xảy ra trong điện trường, gọi là điểm đẳng điện và tại giá trị pH này, dung dịch gelatin kém bền nhất, dễ kết tủa, có hàm lượng tối đa các phân tử protein không tích điện. Gelatin được xử lý bằng kiềm có điểm đẳng điện (pI = 4,8 – 5,2), xử lý bằng acid (pI = 7 – 9) [46].

Gelatin là một protein điển hình, có khả năng hoạt động như một acid hay một base. Tính chất lưỡng tính này là do các nhóm carboxyl (-COOH) thể hiện tính acid và nhóm amine (-NH<sub>2</sub>) thể hiện tính base được tạo ra trong suốt quá trình thủy phân. Một cách tổng quát, gelatin tồn tại trong dung dịch dưới dạng lưỡng cực  $^+NH_3-CH_2-COO^-$ , thường được gọi là ion “Zwitter”. Vì vậy, gelatin là một protein điện ly lưỡng tính, cụ thể, trong môi trường acid, sự phân ly của nhóm acid bị kìm hãm, gelatin tác dụng như một base,

ngược lại trong môi trường base sự phân ly của nhóm base bị kìm hãm, gelatin tác dụng như một acid. Tính lưỡng tính được xác định dễ dàng khi cho gelatin phản ứng với acid hay base [46, 47].

Gelatin tan một phần trong nước, gelatin khô sẽ phồng lên do ngậm nước khi được khuấy trong nước (không quá 34% gelatin). Ở nhiệt độ 40 °C và thời gian 30 phút, gelatin sẽ hòa tan hoàn toàn tạo thành dung dịch đồng nhất. Độ hòa tan của gelatin phụ thuộc vào nhiệt độ, nồng độ và kích thước phân tử. Gelatin tan trong các dung môi như: glycerol, sorbitol, không tan trong alcohols, acetone, cacbon tetrachloride, benzene, petroleum ether và hầu hết trong các dung môi hữu cơ không phân cực [48].

### ***1.2.2. Ứng dụng gelatin trong tổng hợp hệ dẫn truyền thuốc***

Do có tính tương thích sinh học, phân hủy sinh học, không độc nên gelatin được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực y tế, dược phẩm như tạo lớp vỏ bao viên nang thuốc, đóng gói giúp ngăn ngừa quá trình oxy hóa. Gelatin còn được ứng dụng trong chữa trị chấn thương sụn. Dẫn xuất furfuryamine liên hợp gelatin (gelatin-FA) là một chất nhạy cảm với ánh sáng, có khả năng tạo liên kết ngang khi được chiếu sáng giúp hình thành khung cho các tế bào mô xương phát triển [48].

Hiện nay gelatin có nhiều ứng dụng như là chất vận chuyển protein bởi khả năng giảm thoái hóa protein và bảo vệ DNA plasmid khỏi suy giảm nhanh chóng do enzyme nucleases. Một số dẫn xuất được tạo ra bằng cách thay đổi thành phần hóa học của nhóm amin như etylendamin (Ed), spermidine (SD) và spermine (Sm) được sử dụng vận chuyển DNA plasmid [48]

Các loại thuốc và gen khi được mang bởi các hạt nano sẽ được hấp thu trong nền cấu trúc hạt hoặc trên bề mặt của hạt, sự hấp thu này xảy ra trong suốt quá trình hạt nano được hình thành. Các loại thuốc ưa nước có thể được mang thành công vào cấu trúc phía trong các hạt nano bằng quá trình trộn lẫn chúng với dung dịch nước của gelatin trước khi quá trình hình thành hạt nano xảy ra, cho phép hình thành lên các liên kết giữa phân tử thuốc với gelatin thông qua một số cơ chế tương tác như tương tác tĩnh điện, hoặc liên kết cộng hóa trị [49]. Ngoài ra, tương tác hydro, tương tác đuôi kỵ nước giữa thuốc và gelatin cũng được các nghiên cứu khảo sát [41, 42]. Phân tử thuốc DXR có thể được kết

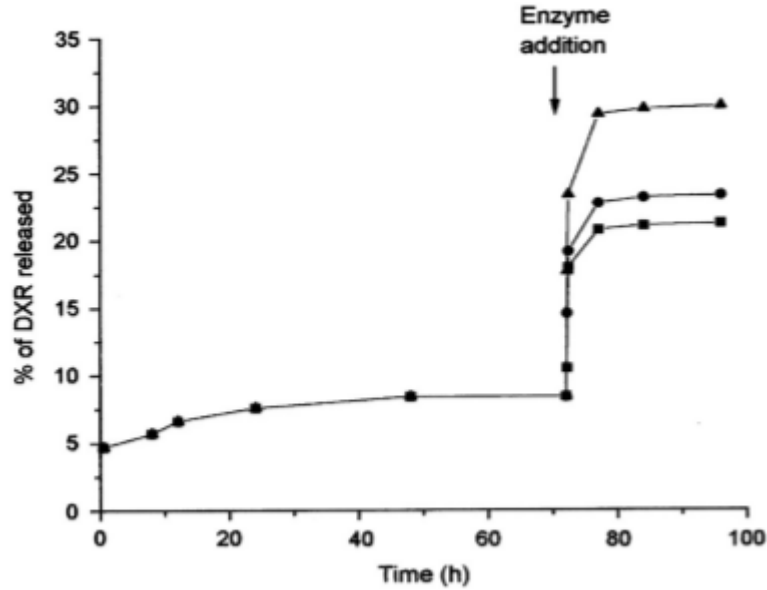
hợp vào trong các hạt nano từ tính thông qua tương tác tĩnh điện giữa các nhóm tích điện dương của DXR với nhóm tích điện âm của  $\text{FeO}^-$  và nhóm  $\text{COO}^-$  sau quá trình trương nở trong dung dịch thuốc [25]. Hơn nữa, một giả thuyết khác được đưa ra là có xảy ra liên kết cộng hóa trị giữa phân tử thuốc DXR với cấu trúc nền của phân tử protein thông qua phân tử GA, một chất đóng vai trò tạo liên kết ngang trong hạt nano. Các hạt nano được gắn thuốc DXR đã cho thấy số lượng các nhóm amino tự do lớn hơn số lượng nhóm không được gắn, nguyên nhân chính là do có sự cạnh tranh giữa nhóm amino của DXR với nhóm amino của gelatin trong quá trình liên kết ngang xảy ra [50]. Có một nghiên cứu đã chỉ ra sự cạnh tranh giữa các nhóm cacboxyl của phân tử gatifloxacin và các nhóm aldehyd của GA trong phản ứng với nhóm amino của phân tử gelatin đã dẫn tới sự giảm hiệu quả nang hóa gatifloxacin vào trong các hạt nano có sử dụng liên kết ngang trong quá trình tổng hợp hạt nano so với các hạt nano không sử dụng tác nhân tạo liên kết ngang này [30].

Để vận chuyển các loại thuốc có đặc tính kỵ nước, quá trình mang thuốc bằng các hạt nano được thực hiện bằng cách trộn dung dịch thuốc (được hòa tan trong hệ dung môi hữu cơ – nước với tỷ lệ thích hợp) với dung dịch gelatin dưới điều kiện khuấy và siêu âm liên tục để thực hiện đồng thời hai quá trình desolvat và quá trình mang thuốc trước khi các phản ứng tạo liên kết ngang được hình thành trong cấu trúc hạt. Quá trình mang các loại thuốc có tính kỵ nước lên các hạt nano có thể được giải thích dựa trên hiện tượng gắn ưu tiên các phân tử thuốc vào bên trong nhân của các hạt nano, là phần có tính ưa nước kém hơn so với phần vỏ phía ngoài hướng vào môi trường nước [51]. Cũng có nghiên cứu khác đã chỉ ra rằng, một loại thuốc kỵ nước là hydrocortisone đã được kết hợp với các cyclodextrin để làm tăng khả năng hòa tan vào nước của nó trước khi được trộn với dung dịch gelatin [52]. Hơn nữa, các phân tử thuốc có tính ưa dầu có thể được mang thành công vào nhân của các hạt nano gelatin lưỡng tính được tổng hợp bằng phương pháp tự keo tụ với một hàm lượng cao hơn [36, 37]. Quy mô và hiệu quả mang thuốc của các hạt nano phụ thuộc vào khối lượng phân tử và cấu trúc tự nhiên của các chất kết hợp với nhau tạo nên hạt nano đó. Các nghiên cứu của tác giả Truong-Le và cộng sự đã chỉ ra rằng hiệu quả mang thuốc của các hạt nano sẽ tăng khi khối lượng phân

tư của phân tử tạo nano tăng [53] Tương tự, nghiên cứu của tác giả Saxena và cộng sự cũng khẳng định hiệu quả mang cycloheximid tăng tương ứng từ 26, 34,1 và 41% trong hạt nano chứa gelatin có khối lượng phân tử thay đổi là 22,40 và 87,5 kDa

Khả năng giải phóng thuốc sau khi được mang trong các hạt nano là một yếu tố rất quan trọng, quyết định hiệu quả trong ứng dụng làm hệ vận chuyển thuốc của vật liệu. Sự phóng thích thuốc ra khỏi các hạt nano có thể do ba cơ chế gồm quá trình giải hấp hóa học, quá trình khuếch tán và quá trình phân hủy sinh học của các hạt nano [49, 54]. Các nghiên cứu đã chỉ ra, mật độ các liên kết ngang trong hạt nano có ảnh hưởng lớn đến tốc độ giải phóng thuốc ra khỏi cấu trúc nền của hạt. Hai tác giả Bajpai và Choubey đã phát hiện ra rằng sự giải phóng của cytarabine khỏi hạt và tỷ lệ trương nở của hạt tăng khi nồng độ chất tạo liên kết ngang GA tăng tới 10,6 mM và giảm khi nồng độ GA vượt giới hạn này. Kết quả này có thể được giải thích vì GA là một chất tạo liên kết ngang ưa nước, khi nồng độ của nó tăng sẽ cải thiện tính ưa nước của hạt nano, dẫn đến làm tăng lượng nước trong hạt và hiển nhiên sẽ làm tăng sự phóng thích và tỷ lệ trương nở của hạt. Tuy nhiên khi nồng độ GA vượt ngưỡng 10,6 mM, cỡ hạt nano sẽ giảm do sự tăng cường của mật độ liên kết ngang, vì thế cả hai thông số phóng thích thuốc và tỷ lệ trương nở của hạt sẽ giảm [24].

Sự có mặt các enzyme phân hủy protein sẽ thúc đẩy quá trình phân hủy sinh học các hạt nano được cấu tạo trên cơ sở gelatin, sự giải phóng thuốc khỏi hạt diễn ra nhanh hơn. Leo và cộng sự đã nghiên cứu sự phóng thích thuốc DOX ra khỏi hạt nano bằng kỹ thuật thẩm tách trong hai trường hợp không có mặt và có mặt của trypsin. Kết quả là chỉ một phần nhỏ thuốc được giải phóng ra với trường hợp vắng mặt của enzyme, từ 9 đến 10%, kết quả này phù hợp với lượng thuốc tự do có trong hệ. Khi trypsin được thêm vào, kết quả phóng thích thuốc tăng lên từ 10 đến 15% lượng thuốc được mang trong hạt, kết quả này có thể do một phần liên kết peptid với DOX được tạo thành khi các hạt nano bị phân hủy, khối lượng phân tử thấp hơn giới hạn màng (3500 Da). Thành phần chính của DOX (khoảng 70%) được liên kết với protein nền của hạt nano thông qua tác nhân tạo liên kết ngang, hình thành các liên kết của thuốc với kích thước lớn hơn giới hạn của màng thẩm tách nên chúng không thể khuếch tán tự do qua màng [55].



**Hình 1.6. Thí nghiệm in vitro giải phóng doxorubicin từ hạt nano GNPs trước và sau xử lý với các enzyme khác nhau [40]**  
(protease(▲);  $\alpha$ -chymotrypsin(●);trypsin)

Đa số các hệ hạt nano được điều chế trong báo cáo tổng hợp này có kích thước hạt nằm trong khoảng 200 đến 400 nm. Sự ổn định của hạt keo, hiệu quả mang thuốc, dung lượng mang thuốc, khả năng phóng thích thuốc và sự phân bố sinh học, động học tế bào bị ảnh hưởng lớn bởi cỡ hạt. Các thông số như nhiệt độ, pH, mức độ liên kết ngang, gelatin tự nhiên và loại tác nhân desolvat ảnh hưởng lên cỡ hạt nano đã được nghiên cứu bởi các nhà khoa học. Nahar và cộng sự đã chỉ ra sự tăng nồng độ GA đã dẫn tới sự giảm đáng kể kích thước hạt nano khi mang thuốc amphotericin B, điều này có thể được giải thích bởi sự hình thành các liên kết ngang của các nhóm amin tự do trên bề mặt hạt nano với GA, điều này làm cho các hạt trở nên đông đặc hơn, co lại và cỡ hạt thu được sẽ nhỏ hơn. Vì lượng chất tạo liên kết ngang tăng lên, các nhóm được liên kết sẽ tăng lên và dĩ nhiên mức độ tạo mạng lưới sẽ dày đặc hơn [50].

Nhiệt độ nhỏ nhất và tối ưu nhất để thu được các hạt nano với kích thước và sự phân bố tập trung nhất ở 40 °C vì độ nhớt cao của phân tử gelatin ở nhiệt độ phòng. Nguyên nhân có thể là do cấu trúc xoắn ốc bậc ba của gelatin, cấu trúc này sẽ bị duỗi thẳng khi nhiệt độ tăng. Tuy nhiên khi nhiệt độ tăng cao hơn, khoảng 50 và 60 °C, thì

cỡ hạt thu được có kích thước tăng không mong muốn, khả năng là do sự duỗi thẳng hoàn toàn cấu trúc phân tử gelatin [51]. Thêm nữa, sự hình thành pH ở bước desolvat thứ hai là quan trọng để thu được các hạt nano có kích thước và giá trị PDI thấp mong muốn. Ở giá trị pH bằng 3 đối với gelatin loại A và 11 đối với gelatin loại B, được cho là tối ưu vì sự hình thành hạt nano được kết hợp với những tương tác tĩnh điện ở cấp độ cao hơn gây ra sự trung hòa điện tích và vì vậy hình thành lên các hạt nano khi bổ sung thêm các tác nhân desolvat vào dung dịch của gelatin. Như vậy, trạng thái phụ thuộc pH của gelatin có thể được giải thích là do cấu trúc polymer tích điện của chúng (cấu trúc của chúng có chứa cả nhóm amino và carboxyl ở cuối chuỗi tại giá trị pI của chúng), và vì giá trị pH được thay đổi xoay quanh giá trị tạo môi trường acid hay base, nên dạng ion  $\text{NH}_3^+$  hay  $\text{COO}^-$  chiếm ưu thế sẽ phụ thuộc vào từng loại gelatin. Do đó, ở một vài giá trị pH này, sự tương tác tĩnh điện mạnh có thể là cực đại dẫn tới kết quả là thu được cỡ hạt nano nhỏ ở điều kiện PDI thấp [56]. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng khi tăng độ mở của gelatin sẽ dẫn tới cỡ hạt nano thu được có kích thước và giá trị PDI nhỏ [51]. Tuy nhiên sự tăng nồng độ gelatin và thể tích ethanol sẽ làm tăng cỡ hạt [57], khi nồng độ ethanol trong khoảng 65 – 70% khối lượng sẽ thu được các hạt nano cỡ nhỏ và giá trị PDI thấp [58]. Tác giả Azarmi và cộng sự đã chỉ ra rằng phương pháp tạo hạt nano bằng tác nhân desolvat là acetone sẽ thu được các hạt nano có kích thước nhỏ hơn cũng như giá trị PDI thấp hơn so với việc sử dụng ethanol [59].

Thế Zeta là một chỉ số quan trọng cho sự ổn định các hạt nano tạo thành. Giá trị tuyệt đối của thế zeta cao cho thấy giá trị tích điện cao trên bề mặt hạt nano mang thuốc, điều này tạo ra lực đẩy tĩnh điện trên khắp bề mặt hạt và ngăn cản các hạt tự kết tụ với nhau [49]. Bề mặt hạt tích điện dương đối với các gelatin loại A có thể do ưu thế của nhóm  $\text{NH}_3^+$  và bề mặt hạt tích điện âm đối với gelatin loại B là do lượng ưu thế của nhóm  $\text{COO}^-$  trong quá trình tổng hợp hạt nano trong môi trường acid (pH = 3) hay base (pH = 11). Nahar và cộng sự cũng khám phá ra rằng cùng là gelatin loại A nhưng có khối lượng phân tử cao hơn sẽ có thế zeta cao hơn và cũng được giải thích là do có nhiều nhóm amin hơn trên bề mặt [51].

Tính tương thích sinh học và không độc là yêu cầu quan trọng đối với vật liệu dẫn truyền thuốc, và các hạt nano mang thuốc được tổng hợp từ gelatin có ưu điểm này. Thí nghiệm về độc tính tế bào được thực hiện để xác định ảnh hưởng của hạt nano tổng hợp từ nguyên liệu gelatin lên khả năng tồn tại của các tế bào trong môi trường nuôi cấy mô. Thí nghiệm MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) là một phương pháp so màu không phóng xạ đơn giản được áp dụng để đo độc tính tế bào, sự phát triển hoặc khả năng tồn tại của tế bào. Sử dụng thí nghiệm dùng chuẩn MTT, tác giả Gupta và cộng sự đã chứng minh được rằng các nguyên bào sợi của người khi được ủ với các hạt nano tổng hợp từ gelatin đã duy trì được sự sống sót hơn 100% ở nồng độ cao 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [27]. Hơn thế nữa, sau khi ủ các hạt nano với các tế bào biểu mô cuống phổi, các hạt nano này còn cho thấy chúng có tác dụng làm cho ít hoặc không độc khi sử dụng liên tục các cấp độ enzym lactate dehydrogenase bằng nhau để kiểm chứng sau khoảng thời gian 48 giờ và 96 giờ. Thêm nữa, các hạt nano này đã cho thấy chúng không có khả năng gây viêm vì chúng không khởi xướng bất kỳ quá trình phát sinh chất chống viêm interleukin-8 nào trong tế bào thậm chí ở một nồng độ cao đến 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [60]. Vì thế, các nghiên cứu này đã cho thấy các hạt nano từ gelatin có tính tương thích sinh học cao, không độc và là vật liệu an toàn cho các ứng dụng làm tác nhân vận chuyển thuốc. Tuy nhiên, khi so sánh với hiệu quả của các hạt nano rHG (recombinant human gelatin) sau quá trình thí nghiệm ủ với các phôi tế bào thận của người thì khả năng sống sót của tế bào khi sử dụng các hạt nano từ gelatin thấp hơn so với trường hợp sử dụng hạt nano rHG, nhưng sự thấp hơn là không nhiều. Điều này được giải thích là do các hạt nano rHG có tính tương thích sinh học cao hơn trong ứng dụng vận chuyển thuốc so với hạt nano được tổng hợp từ gelatin [57].

Hiệu quả thẩm qua, đi được vào trong tế bào chính là điều kiện tiên quyết để các hạt nano có thể được ứng dụng làm vật liệu mang thuốc. Khả năng này của các hạt nano được xác định bằng phương pháp chụp laser tiêu điểm (confocal laser scan microscopy (CLSM)) và đếm tế bào nhuộm màu (FACS). Các hạt nano gelatin loại B mang thuốc nhuộm đại phân tử fluorescent (tetramethylrhodamine-conjugated dextran, TMR-dextran) có thể được thử nghiệm bằng các tế bào nguyên bào sợi của chuột NIH-3T3 cho



đến tế bào nội không đặc trưng trong vòng 12 giờ, tải trọng có thể được giải phóng và được tích lũy quanh vùng nhân tế bào. Các nghiên cứu khác cũng đã chứng minh sự tiếp thu của chất thăm dò fluorescent trong các hạt nano bởi các tế bào sợi tủy xương của chuột (DCs) là cao hơn (88%) dạng hòa tan của TMR-dextran (4%). Các hạt nano được tiêu hóa theo thể thực bào bởi DCs và hầu hết được khoan vùng bởi thể thực thể, với một số thoát vào bào tương nhưng không được khoan vùng trong nhân bào. Tuy nhiên, Karthikeyan và cộng sự đã chỉ ra rằng các hạt nano chứa thuốc thể hiện tốc độ xâm nhập tế bào rất nhanh và hiệu quả hơn trong các tế bào ung thư phổi so với thuốc tự do bằng sự phát huỳnh quang được tìm thấy trong nhân bào, điều này chỉ ra rằng các hạt nano là hữu ích, có tính đặc hiệu vị trí trong vận chuyển thuốc tới các nhân tế bào [61]. Nhiều thí nghiệm cũng chỉ ra rằng các hạt nano gelatin được thu nhận một cách hiệu quả và được khoan vùng trong phạm vi nhiều loại loại tế bào khác nhau, điều này cho thấy hạt nano gelatin có thể được ứng dụng vận chuyển nội bào một cách có hiệu quả các dược phẩm sinh học cũng như làm tăng khả năng vận chuyển thuốc vượt qua các vách ngăn tế bào.

Sự ổn định động học trong môi trường sinh học là đặc tính không thể thiếu của vật liệu nano mang thuốc. Sự ổn định của các hạt mang thuốc có thể cải thiện thời gian tuần hoàn của chúng trong máu [36]. Vì vậy, đánh giá sự ổn định vật lý riêng biệt của của hệ nhũ các hạt keo nano ở hai nhiệt độ lưu trữ 4 °C và nhiệt độ cơ thể 37 °C là rất quan trọng. Sự ổn định cao trong lưu trữ của các hạt nano ở thể nhũ tại 4 °C đã được báo cáo và cho thấy kết quả thay đổi không đáng kể về kích thước hạt, thế zeta cũng như giá trị PDI với thời gian lưu trữ lên đến 6 tháng [62, 63]. Tuy nhiên, sự phát triển đáng kể của cỡ hạt và giảm thế zeta của thể nhũ các hạt nano được mang cryptolepine được ghi nhận chỉ sau 2 tuần lưu trữ ở nhiệt độ phòng [64]. Vì vậy, để có thời gian lưu trữ dài ở nhiệt độ phòng, phương pháp thích hợp là ở trạng thái khô lạnh. Trong nghiên cứu của tác giả Zillies và cộng sự, các hạt nano mang oligonucleotide đã được làm khô lạnh thành công bằng việc sử dụng trehalose như là một chất chống đông lạnh nhờ nhiệt độ thủy tinh hóa cao và trạng thái tự nhiên vô định hình của nó, cụ thể, các hạt nano này vẫn duy trì được hoạt tính sinh học của chúng sau bốn tuần lưu trữ ở 40 °C [40, 65].

Gelatin đã thu hút được nhiều sự chú ý vì có khả năng tương thích sinh học và phân hủy sinh học cao. Nhờ có các chuỗi peptide Arg-Gly-Asp trong phân tử, gelatin có thể thúc đẩy sự bám dính tế bào [66]. Ngoài ra, gelatin có trạng thái mang điện tích dương trong môi trường sinh lý của cơ thể người [67]. Nhờ các lý do này mà gelatin có thể giúp tạo ra sự tương tác cao với các tế bào ung thư cũng như các tế bào thường trong cơ thể.

Chung-Kai Sun và cộng sự nghiên cứu tổng hợp vật liệu mang thuốc có khả năng nhả chậm dựa trên vật liệu gelatin. Nghiên cứu đã điều chế thành công vật liệu hydrogel (transglutaminase (TGase) cross-linked/antibiotics-encapsulated gelatin-alginate hydrogel) mang lần lượt hai thuốc kháng sinh Gentamicin và Vancomycin ứng dụng ngăn sự nhiễm trùng trong phẫu thuật cấy mô chỉnh hình. Trong vật liệu này, gelatin được kết hợp alginate và phân tử enzyme TGase đóng vai trò chất liên kết ngang tạo làm tăng tính bền vững của vật liệu. Kết quả thu được cho thấy TGase đóng vai trò quan trọng đến khả năng nhả chậm thuốc của vật liệu. Trong cả hai loại thuốc được khảo sát với vật liệu có TGase ở nồng độ 0%, 0,5% và 1% đều cho thấy với mẫu không chứa TGase, chỉ trong khoảng 10 giờ, lượng thuốc được giải phóng gần 80% và với mẫu vật liệu có chứa chất tạo liên kết ngang TGase cho thấy hiệu quả nhả chậm vượt trội, với nồng độ TGase 0,5% và 1% trong cấu trúc cần hơn 100 giờ để Gentamicin giải phóng gần 100% và 70%, tương ứng với Vancomycin lần lượt là 83% và 55%. Điều này được giải thích do xuất hiện các liên kết cộng hóa trị của TGase trong cấu trúc vật liệu [68].

Carolina Hermida-Merino và cộng sự đã tiến hành điều chế vật liệu cấu trúc hydrogel ứng dụng mang thuốc (thử nghiệm với Crocin và DOX) từ gelatin thu nhận từ da cá ngừ. Kết quả thu được cho thấy vật liệu mang có khả năng nhả chậm thuốc trong môi trường thí nghiệm (đệm PBS pH 7,4 ở 30 °C), sau 250 giờ khảo sát quá trình nhả thuốc, chỉ gần 10% thuốc Crocin và gần 12,5% DOX giải phóng khỏi vật liệu mang. Đây là tín hiệu tích cực cho mục tiêu chế tạo vật liệu mang thuốc có kiểm soát [69].

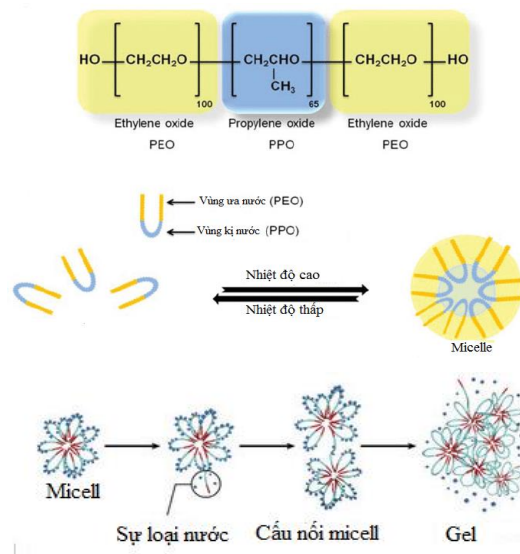
### **1.3. Pluronic**

#### ***1.3.1. Tổng quan về pluronic***

Tất cả các pluronic đều có cấu tạo hóa học giống nhau, chỉ khác nhau ở số lượng tương đối của poly (ethylene oxide)-poly (propylene oxide), và thường được ký hiệu là

(PEO-PPO-PEO) chính vì thế mà tính chất, trọng lượng phân tử cũng như đặc tính hoạt động bề mặt của mỗi loại là khác nhau, các pluronic phổ biến thường được ứng dụng là F127, F68, F87, P123 [70-73]. Hầu hết các pluronic là các chất rắn có khả năng tan trong nước và chúng hòa tan trong nước lạnh nhiều hơn trong nước nóng, đó là kết quả của việc gia tăng sự solvat hóa và liên kết hydro ở nhiệt độ thấp. Tại nhiệt độ thấp sẽ tồn tại một lớp hydrate hóa bao quanh các phân tử pluronic trong dung dịch nước, làm phân tán chúng và kết quả là các pluronic được hòa tan trong nước. Khi nhiệt độ được nâng lên, các chuỗi ưa nước của pluronic không được solvat hóa do sự đứt gãy các liên kết hydro, do đó pluronic tan không tốt trong nước có nhiệt độ cao ( $> 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) [74].

Một số pluronic có tính chất đặc trưng là biến đổi trạng thái bởi nhiệt độ. Ở nhiệt độ thấp ( $0 - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), pluronic với nồng độ thích hợp sẽ tồn tại ở trạng thái lỏng, khi tăng lên nhiệt độ phòng ( $20 \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) lại chuyển sang dạng gel rắn. Nhiệt độ tạo gel là nhiệt độ tới hạn, khi nhiệt độ cao hơn nhiệt độ tới hạn, dung dịch polymer đông lại thành gel do nhóm PEO ưa nước, nhóm PPO kỵ nước nên khi hòa tan trong nước cấu trúc micelle được hình thành với nhân là PPO và lớp vỏ ngoài là PEO. Việc tăng nhiệt độ sẽ dẫn đến sự loại nước và cấu trúc thay đổi tại vùng chứa các nhóm kỵ nước, kết quả là các nhóm PPO có xu hướng mất nước tạo thành lõi với vỏ bên ngoài là chuỗi PEO ngâm nước hợp thành micelle hình cầu bền nhiệt động và cấu trúc gel được hình thành [75].



**Hình 1.7. Cấu trúc và quá trình hình thành gel của pluronic [75]**

Sự nang hóa các loại thuốc kém tan trong nước của các hạt micelle pluronic có thể làm tăng khả năng hòa tan và tăng sự ổn định của thuốc, do đó có thể cải thiện được dược tính cũng như tăng sự phân tán sinh học của thuốc [73, 76-83].

Mặc dù, pluronic là vật liệu nhạy nhiệt tốt, tuy nhiên nó còn nhiều hạn chế, đặc biệt là độ bền cơ học kém và hệ quả là cấu trúc hạt bị sỏi mòn nhanh chóng, nghĩa là bề mặt của gel tạo thành dễ dàng bị hoà tan dẫn đến các phân tử thuốc hay phân tử được mang trong hạt bị nhả ra một cách nhanh chóng. Để giải quyết vấn đề trên, các nhà khoa học đã nghiên cứu tìm giải pháp, và phương pháp của Allan S.Hoffman (1997) đã giải quyết được vấn đề trên bằng cách sử dụng một polymer có tính chất kết dính sinh học (bioadhesive) nhằm làm chậm lại quá trình nhả thuốc. Các nhà khoa học thường ghép pluronic F127 với các polymer thiên nhiên như hyaluronic acid (một polysaccharid có trong các dịch nhầy bôi trơn các khớp), chitosan, gelatin dùng trong y sinh [43, 77].

### ***1.3.2. Ứng dụng pluronic trong tổng hợp hệ dẫn truyền thuốc***

Một số pluronic là copolymer không độc được sử dụng rộng rãi như một tá dược làm tăng tính ổn định và cải thiện đặc tính kém tan trong nước của thuốc. Sự kết hợp của các loại thuốc kém tan vào trong các hạt micelle pluronic có thể cải thiện được dược tính của thuốc và tăng sự phân tán sinh học [43]. Pluronic có tiềm năng lớn ứng dụng mang các thuốc khó tan trong nước, đặc biệt là thuốc trị ung thư, nó dễ dàng kết hợp với một chất khác để tạo ra hệ nano mang thuốc hiệu quả hơn (do có nhóm chức -OH đầu mạch).

**Bảng 1.1. Thông số đặc trưng của một số pluronic**

<b>Pluronic</b>	<b>Trạng thái</b>	<b>Tổng số nhóm PEO</b>	<b>Tổng số nhóm PPO</b>	<b>Giá trị HLB</b>	<b>Khối lượng phân tử (Da)</b>	<b>CMC</b>
L121	Lỏng	10,00	68,28	1	4400	$1,0 \times 10^{-6}$
L61	Lỏng	4,55	31,03	3	1950	$1,1 \times 10^{-4}$
P123	Hồ keo	39,20	69,40	8	5750	$4,4 \times 10^{-6}$
P105	Hồ keo	73,86	56,03	15	6500	$6,2 \times 10^{-6}$
F127	Rắn	200,45	65,17	22	12600	$2,8 \times 10^{-6}$
F87	Rắn	122,50	39,83	24	7700	$9,1 \times 10^{-5}$
F68	Rắn	152,73	28,97	29	8400	$4,8 \times 10^{-4}$

Nhờ cấu trúc gồm có cả phần ưa nước, kỵ nước, và là polymer nhạy nhiệt nên pluronic được ứng dụng trong lĩnh vực dược phẩm. Abhishiek Sahu và cộng sự đã sử dụng hai pluronic là F127 và F68 phát triển vật liệu mang curcumin, một hợp chất tự nhiên có hoạt tính chống ung thư, đã thu được kết quả tích cực trong việc nâng cao hiệu quả của curcumin và tính ổn định của hoạt chất. Kết quả thí nghiệm của nhóm tác giả cũng khẳng định F127 có khả năng mang lại hiệu quả nang hóa curcumin tốt hơn F68, đồng thời cho thấy vật liệu mang có khả năng nhả chậm hoạt chất curcumin. Từ đó có thể nhận định pluronic có tiềm năng ứng dụng điều chế vật liệu mang thuốc [8].

## **1.4. Ung thư và thuốc chống ung thư**

### ***1.4.1. Tổng quan về bệnh ung thư***

Theo số liệu thống kê của tổ chức Y tế Thế giới (WHO) tháng 9/2018, bệnh ung thư là nguyên nhân hàng đầu gây nên cái chết của khoảng 9,6 triệu người trên toàn thế giới. Có 6 loại ung thư phổ biến gây tử vong hàng đầu gồm: (1) ung thư phổi – 1,76 triệu ca, (2) ung thư ruột kết tràng – 862 ngàn ca, (3) ung thư dạ dày – 783 triệu ca, (4) ung thư gan – 782 ngàn ca và (5) ung thư vú – 627 ngàn ca tử vong. Các loại bệnh ung thư nói chung, được dự đoán sẽ tăng lên 70% trong 2 thập niên tới [84-86].

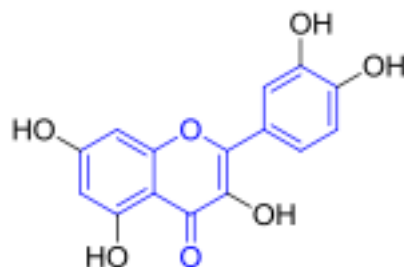
Ung thư xảy ra do sự đột biến trong ADN, dẫn đến quá trình tế bào tăng sinh vô hạn độ, vô tổ chức, không tuân theo các cơ chế kiểm soát về phát triển cơ thể. Vấn đề quan trọng nhất của bệnh lý là sự phân biệt giữa các khối u lành tính và ác tính. Nếu là khối u ác tính, chúng có khả năng xâm nhập quanh các mô bình thường và lan truyền khắp cơ thể thông qua hệ thống tuần hoàn. Ung thư được chứng minh có liên quan đến yếu tố di truyền, do sự biến đổi trong các gene dẫn đến những thay đổi trong chức năng và sự phân chia tế bào. Những thay đổi này là kết quả của sự tương tác giữa các yếu tố di truyền và các tác nhân bên ngoài, bao gồm: các tác nhân vật lý như tia cực tím, bức xạ ion hóa; các tác nhân hóa học như arsenic, aflatoxin và đặc biệt là khói thuốc lá, các tác nhân sinh học như nhiễm trùng bởi virus, vi khuẩn, ký sinh trùng [87-91].

### ***1.4.2. Hoạt chất quercetin (QU)***

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) thuộc nhóm polyphenolic. Các hợp chất flavonoid hầu như được tìm thấy phổ biến ở thực vật và thực phẩm có nguồn gốc

từ thực vật. QU thường xuyên ở dạng glycosides (các chất dẫn xuất của đường). Tên gọi QU được sử dụng từ năm 1857 và có nguồn gốc từ quercetum – rừng sồi.

QU có nhiều trong các loại thảo mộc như hoa hòe, lá dâu tằm. QU đã được khoa học chứng minh là có hoạt tính chống oxy hóa, có khả năng kiểm soát sự tăng đường huyết, và có tiềm năng trong điều trị ung thư [92]. Có nghiên cứu nỗ lực thu nhận QU từ một số loài thực vật khác nhau, cụ thể trong khoảng mười mẫu thực vật được thí nghiệm, đã tìm ra hàm lượng QU trong nụ hoa Hòe là lớn nhất, sau đó đến lá Sen với lượng tương ứng là 15423,04 và 5190,82 (mg/100g nguyên liệu khô), hoạt tính chống oxy hóa lần lượt là 55,26% và 32,23% [93]. Nhờ hoạt tính kháng oxy hóa trong cơ thể mà QU có tác dụng cải thiện sức khỏe cho con người. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng QU có thể được sử dụng như một loại thực phẩm chức năng nhằm chống lại một số loại bệnh vì nó có thể tác động lên glutathione, các enzyme. Tuy nhiên, ứng dụng của QU trong lĩnh vực dược phẩm bị hạn chế vì khả năng hấp thụ thấp trong cơ thể do khả năng hòa tan kém trong nước, sinh khả dụng thấp, khả năng thâm nhập thấp và kém ổn định [94].



Quercetin

(3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone

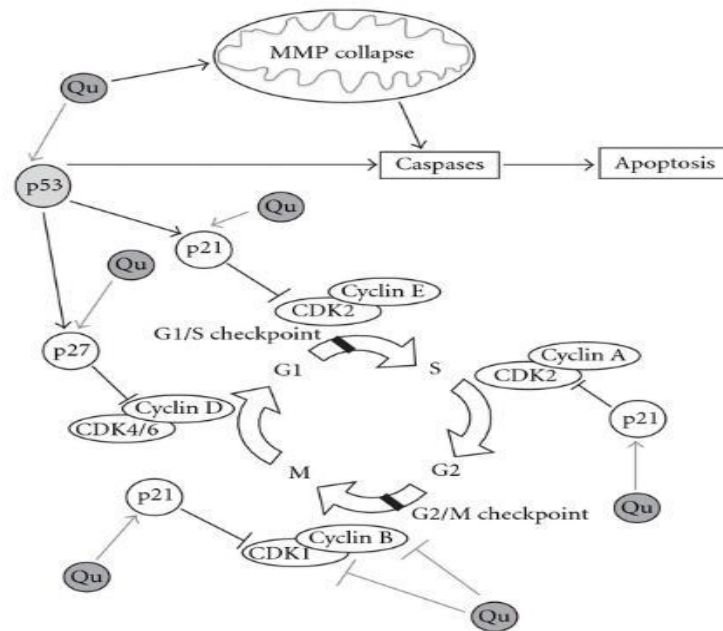
3',4',5,7-tetrahydroxyflavonol

3,3',4',5,7-pentahydroxy-2-phenylchromen-4-one)

### Hình 1.8. Cấu tạo hóa học của Quercetin [95]

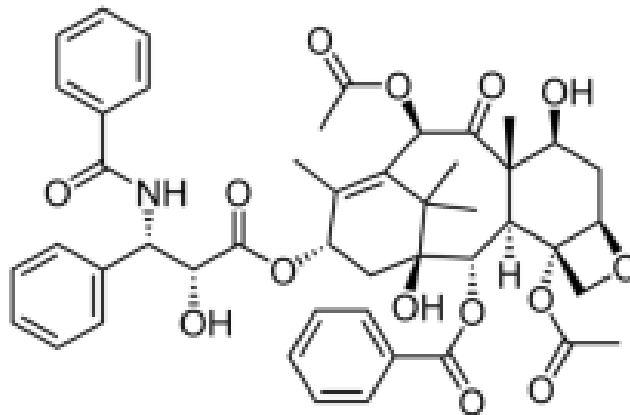
Với mục đích làm tăng tính ổn định và khả năng hòa tan của quercetin, nhóm các nhà nghiên cứu Nutsarun Wangsawangrungrung và cộng sự đã tiến hành tổng hợp vật liệu mang quercetin dựa trên hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) bằng phương pháp bốc hơi dung môi. Kết quả đạt hiệu suất 90,50% (%EE). Kết quả khảo sát độc tính tế bào cho thấy đặc tính kháng oxy hóa của QU tăng lên đáng kể khi được mang bởi vật liệu so với dạng quercetin tự do [96].

Quercetin tiêu diệt tế bào ung thư bằng cách tác động vào chu kỳ tế bào. QU có thể điều chỉnh chu kỳ tế bào bằng cách liên kết trực tiếp một số mục tiêu phân tử và tùy thuộc vào loại tế bào và nguồn gốc khối u. Ngoài việc ngăn chặn sự phát triển của tế bào thông qua tác động trực tiếp lên các bộ điều biến chính của chu kỳ tế bào, QU còn có thể gây ra apoptosis thông qua con đường ty thể: QU có thể phá vỡ MMP, từ đó kích thích giải phóng cytochrome C trong tế bào chất, một hiện tượng kích hoạt nhiều caspase, chẳng hạn như caspase-3 và caspase-7 (hình 1.9).



**Hình 1.9: Ảnh hưởng của Quercetin lên chu kỳ tế bào [97]**

#### 1.4.3. Paclitaxel (PTX)



**Hình 1.10. Cấu trúc hóa học của Paclitaxel [98]**

Paclitaxel (PTX) là một trong những hợp chất hóa học hiệu quả nhất trong điều trị nhiều loại ung thư, bao gồm ung thư buồng trứng, vú, đại tràng, bàng quang, thực quản, phổi, đa u tủy và ung thư Kaposi. Phương pháp thu nhận PTX đầu tiên là chiết xuất từ vỏ cây *Taxus brevifolia*. Nhờ sự phát triển của các ngành khoa học và công nghệ, PTX được sản xuất bằng nhiều phương pháp khác nhau như tổng hợp hóa học hữu cơ, phương pháp bán tổng hợp, tổng hợp bằng con đường sinh học thông qua vi khuẩn hoặc men, phương pháp thu nhận PTX hiện đại nhất là từ công nghệ tế bào [98, 99].

PTX ức chế tế bào ung thư bằng cách nhắm vào vi ống. Các tế bào được điều trị bằng PTX có khiếm khuyết trong quá trình lắp ghép trục chính phân bào, phân tách nhiễm sắc thể và phân chia tế bào. Không giống như các thuốc nhắm mục tiêu vi ống khác, chẳng hạn như colchicine, có tác dụng ức chế sự tập hợp vi ống, PTX ổn định polymer của vi ống và bảo vệ nó khỏi sự tháo gỡ. Do đó, nhiễm sắc thể không thể đạt được cấu hình trục chính metaphase. Điều này ngăn chặn sự tiến triển của quá trình nguyên phân và kích hoạt kéo dài của điểm kiểm tra phân bào kích hoạt quá trình apoptosis hoặc đảo ngược sang pha G0 của chu kỳ tế bào mà không phân chia tế bào [100, 101]. Khả năng của PTX để ức chế chức năng trục chính nói chung là do sự ức chế của động lực học vi ống [102], nhưng các nghiên cứu khác đã chứng minh rằng sự ức chế động lực xảy ra ở nồng độ thấp hơn mức cần thiết để ngăn chặn quá trình nguyên phân. Ở nồng độ trị liệu cao hơn, PTX xuất hiện để ngăn chặn sự tách rời vi ống ra khỏi các trung tâm, một quá trình thường được kích hoạt trong quá trình nguyên phân [103]. PTX liên kết với các tiểu đơn vị beta-tubulin của vi ống [104].

Tuy nhiên, do độ hòa tan kém trong môi trường nước (dưới 0,5 mg/L) và chỉ số điều trị thấp, vì vậy ứng dụng lâm sàng của PTX vẫn còn hạn chế. Bệnh nhân sau khi dùng PTX đều bị rụng tóc, hơn 90% bệnh nhân bị suy tủy. Một số bệnh nhân bị các phản ứng phụ như sung huyết, ngoại ban (39%), kém ăn (25%), phù ngoại biên (10%) [105]. Vì vậy, vấn đề được đặt ra là làm thế nào khắc phục tính khó tan trong nước, nâng cao hiệu quả trị liệu của PTX, đồng thời làm giảm những hiệu ứng phụ do loại thuốc này gây ra [106-109].

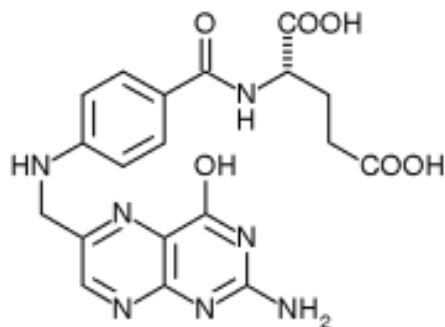


Để tăng khả năng hấp thu tế bào và vận chuyển hướng đích PTX, nhóm nghiên cứu của tác giả Hoon Hyun đã phát triển vật liệu dạng hydrogel từ methacrylated glycol chitosan (MGC) liên kết với 6-monodeoxy-6-monoamino- $\beta$ -cyclodextrin·hydrochloride và folic acid, khẳng định đã tạo ra vật liệu mang PTX tiềm năng nâng cao khả năng điều trị bệnh ung thư vú [110].

Tác giả Line Aanerud Omtvedt đã cùng cộng sự phát triển vật liệu mang PTX nhằm làm tăng sinh khả dụng của thuốc nhờ làm tăng khả năng hòa tan, bảo vệ thuốc khỏi sự phân hủy, hay duy trì nồng độ thuốc một cách có kiểm soát. Tác giả sử dụng nguyên liệu chính polysaccharide alginate tự nhiên gắn với beta-cyclodextrins ( $\beta$ -CyD) là phân tử có khả năng gắn với PTX một cách dễ dàng. Nghiên cứu chỉ ra rằng vật liệu được gắn một phần  $\beta$ -CyD có thể hấp thu được lượng thuốc có đặc tính kỵ nước giống như PTX lớn hơn. Kết quả cũng khẳng định alginate được ghép trong vật liệu có tác động đến khả năng nhả và phân hủy PTX [111].

### 1.5. Tác nhân hướng đích folic acid (FA)

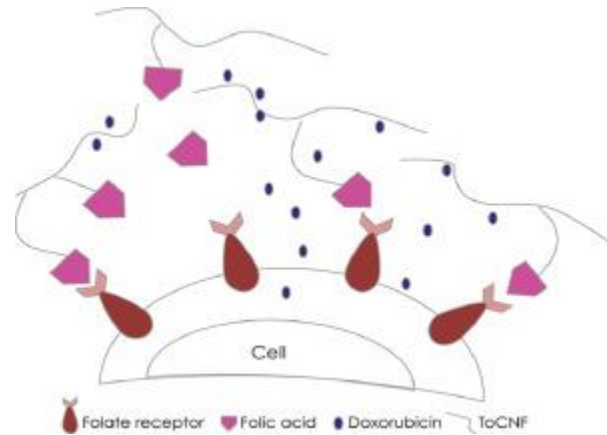
Folic acid (FA) là vitamin B, rất quan trọng đối với các chức năng thiết yếu của cơ thể, FA tham gia vào quá trình chuyển hóa protein, tổng hợp DNA cũng như sản xuất hồng cầu. Nghiên cứu đã phát hiện ra rằng các thụ thể của axit folic biểu hiện quá mức trong nhiều loại tế bào ung thư, đặc biệt là ung thư buồng trứng. Do đó, axit folic đã được sử dụng trong thiết kế hệ thống phân phối thuốc hướng đích dựa trên các protein thụ thể bề mặt để đưa thuốc đến đúng các khối u [112].



**Hình 1.11. Cấu trúc của Acid Folic**

Tác giả Eugen Barbu và cộng sự thực hiện nghiên cứu điều chế vật liệu mang thuốc có gắn phối tử hướng đích folic acid, ứng dụng mang thuốc chống ung thư phổ

biến là doxorubicin (DOX). Vật liệu mang thuốc dựa trên 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) và oxidized cellulose nanofibers (oCNF) gắn folic acid (FA), mô hình được ký hiệu ToCNF-FA/doxorubicin (ToCNF-FA/DOX), ứng dụng trong thí nghiệm ức chế tế bào ung thư MCF-7. Kết quả thu được chỉ ra DOX được phân phối bởi vật liệu mang giảm đáng kể độc tính khi so sánh với DOX dạng tự do ở thời điểm thí nghiệm sau 10 và 24 giờ (hình 1.12).



**Hình 1.12. Mô hình vật liệu mang thuốc gắn folic acid hướng đích [113]**

Với vai trò quan trọng đối với cơ thể, folic acid cũng được sử dụng như một loại thuốc trong nhiều trường hợp như các loại kem điều trị da. Nhưng do folic acid thường bị tích lũy dưới da vì cấu trúc ưa dầu, hơn nữa folic acid được cho là dễ bị tác động bởi ánh nắng mặt trời bị biến đổi thành các chất gây hại, do đó đã có các nghiên cứu nhằm nâng cao hiệu quả sử dụng của hoạt chất này. Ví dụ, Fatma Nur Parin và cộng sự đã tiến hành tổng hợp vật liệu mang folic acid nhằm kiểm soát và duy trì sự giải phóng nồng độ folic acid theo yêu cầu sử dụng [114].

Liên quan tới ứng dụng điều chế vật liệu dẫn truyền thuốc gắn tác nhân hướng đích folic acid, tác giả Sang Hoon Lee và cộng sự cũng khẳng định thành công trong việc phát triển vật liệu mang thuốc nhạy pH trên cơ sở folic acid được ghép với vật liệu aminoclay (FA-AC) dùng cho đường miệng, ứng dụng mang kháng thể là infliximab (IFX). Kết quả cho thấy hiệu quả mang (EE) đạt 87%, kích thước hạt phân bố tại giá trị 384 nm. Thí nghiệm cũng khẳng định nhóm nghiên cứu đã thành công trong việc bảo vệ thuốc trong suốt quá trình trị liệu [115].

## 1.6. Những nghiên cứu trước đây

Năm 2004, tác giả Jan Zillies và Conrad Coester đã tiến hành thí nghiệm tạo hạt nano gelatin bằng phương pháp đề solvat hóa hai bước. Bề mặt hạt điều chế bằng liên kết cộng hóa trị với một amin bậc bốn là 1-ethy-3-dimethyl aminopropylcarbodiimide tạo ra mạng lưới tích điện dương. DNA và RNA Oligonucleotit được hấp thu lên bề mặt hạt ở mức 50  $\mu\text{g}/\text{mg}$  hạt nano trong điều kiện ba môi trường khác nhau là nước tinh khiết cao, dung dịch đệm phosphate pH = 7,4 và dung dịch 0,9% NaCl, tốc độ khuấy 800 vòng/phút ở 22 °C. Các tác giả khẳng định hạt nano được tạo ra trong thí nghiệm có khả năng mang thành công hai loại thuốc oligonucleotit [116].

Tác giả Z.Lu và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu phát triển hạt nano từ gelatin mang thuốc PTX sử dụng trong điều trị ung thư bằng quang. PTX có chứa Cremophor, là chất tạo các hạt micelle và bẫy các phân tử thuốc. Hạt nano gelatin gắn PTX được tạo bằng phương pháp đề solvat hóa và tiến hành khảo sát đặc tính sinh học, lý – hóa của chúng. Thu được cỡ hạt từ 600-1000 nm và làm tăng khối lượng phân tử của polymer gelatin. Với điều kiện tối ưu đã nang hóa hơn 80% thuốc, chiếm 0,7% khối lượng hạt. Khảo sát X-ray cũng cho thấy PTX được “nhốt” trong hạt nano ở dạng vô định hình, là dạng có độ tan trong nước cao hơn dạng tinh thể. Tốc độ nhả thuốc được quan sát trong môi trường PBS, và nước tiểu với xấp xỉ 90% được giải phóng ở 37 °C sau 2 giờ. Khi xử lý với một enzyme protein, các hạt nano này bị suy biến nhanh và chu kỳ bán hủy là 23,8 phút, 0,6 phút và 0,4 phút tương ứng với các nồng độ enzyme sử dụng là 0,01, 0,05 và 0,25 mg/mL. Các hạt nano mang PTX có hoạt tính chống lại các tế bào ung thư bằng quang chuyên tiếp RT4 ở người. Nồng độ tương đương PTX  $\text{CI}_{50}$  được xác định gần giống độ tan trong nước của phân tử thuốc PTX 30 mmol/L (tương đương 25 ng/mL) trong 2 giờ xử lý và 4 mmol/L trong 96 giờ xử lý. Các hạt nano mang PTX tạo thành ứng dụng thí nghiệm trên loài chó và thu được kết quả là các nano gelatin mang PTX có tốc độ nhả thuốc nhanh và hoạt tính sinh học của chúng có thể được sử dụng trong điều trị ung thư bằng quang [20].

Năm 2011, Kumari và cộng sự đã tổng hợp thành công hạt nano từ polymer tổng hợp poly-D, L-lactide (PLA) bằng phương pháp bốc hơi dung môi nhằm khắc phục hạn

chế của QU như làm tăng khả năng thấm qua màng huyết tương, tăng tính ổn định và độ hòa tan. Cỡ hạt đạt được trung bình 250 nm và năng suất mang QU xấp xỉ 40% [117].

Năm 2011, nhóm nghiên cứu của TS. Trần Ngọc Quyên tại Đại học Ajou, Hàn Quốc tổng hợp thành công chất mang nanogel âm điện – nhạy nhiệt trên cơ sở heparin để mang và nhả chậm các protein tích điện dương hoặc các tác nhân kích thích phát triển sinh học ứng dụng trong y sinh.

Cùng thời gian này, tác giả Choi J.H. và đồng nghiệp của ông báo cáo tổng hợp thành công nanogel heparin-pluronic mang thuốc indomethacin (IMC) và kháng thể đơn dòng 3D8 scFv với kích thước hạt dưới 100 nm. Kết quả thí nghiệm mang thuốc ở nhiều tỷ lệ khối lượng khác nhau dao động từ 15,25% đến 81,83%. Bên cạnh đó, nanogel cũng cho thấy khả năng nhả thuốc bền vững [73].

Năm 2011, tác giả Zhihong Liu cùng cộng sự đã nghiên cứu về vấn đề polymer micelle Pluronic P123 mang Docetaxel, và đánh giá trên cả *in vitro* lẫn *in vivo* [118].

Wei Zhang và Yuan Shi cùng các cộng sự (2011) đã nghiên cứu về tiềm năng của micelle pluronic trong việc mang thuốc PTX để điều trị khối u ác tính di căn dưới da và phổi trên chuột [119].

Emilie Roger và cộng sự (2012) tiến hành nghiên cứu chức năng của folic acid trên hệ vật liệu nang nanogel trong vận chuyển thuốc dạng uống [120]

Han và cộng sự đã tiến hành tổng hợp và khảo sát đặc tính vật lý, khả năng mang QU của hệ hạt nano được tạo bởi solid lipid (SL, palmitic acid) và một tỷ lệ chất hoạt động bề mặt Tween® 80 bằng phương pháp đồng hóa và siêu âm để bào chế thuốc ngấm qua da. Cỡ hạt nano thu được trong khoảng 274,0 – 986,6 nm và hiệu quả mang QU trong khoảng 15,2 – 46,2% [121].

Pitto-Barry và Nicolas P. E. Barry (2014) đã có một bài nghiên cứu về Pluronic® block-copolymers trong y học: Từ tính đa dạng trong hóa học và sinh học đến sự hợp lý và tiến bộ lâm sàng [122].

Bên cạnh Rutin thì quercetin (QU), cũng là một polyphenolic flavonoid và có một số tác dụng sinh học như tính chống oxy hóa, chống ung thư, kháng khuẩn và có thể ngăn sự phát triển không kiểm soát của tế bào cả trong cơ thể sống cũng như trong ống nghiệm.

Hạn chế của QU trong ứng dụng làm thuốc là phải sử dụng với liều lượng cao do sự hòa tan kém trong nước dẫn đến giảm hoạt tính sinh học. Mặc dù dẫn xuất có khả năng hòa tan trong nước của QU đã được tổng hợp nhưng hoạt tính sinh học của nó cũng chỉ đạt 20%. Mục đích của nghiên cứu tạo hạt nano QU nhằm cải thiện khả năng hòa tan trong nước của nó. Các tác giả đã tạo ra các hạt nano QU bằng kỹ thuật trộn ethanol vào nước với tỷ lệ 1:35, tốc độ dòng trộn là 8 – 10 mL/phút, dưới điều kiện khuấy từ liên tục 1000 vòng/phút, nồng độ là 5 mg/mL để dung môi không hòa tan quercetin, dung dịch được rót và tạo hạt bằng bơm áp lực với tốc độ lớn. Các hạt nano QU được lọc và làm khô. Đặc tính lý – hóa của hạt được nghiên cứu bằng các kỹ thuật như Dynamic Light Scattering (DLS), Zetasizer Nano ZS, SEM, FTIR, nhiễu xạ X-ray và BET vùng bề mặt. Kết quả cho thấy hạt nano cải thiện đặc tính tan kém trong nước của QU. Phương pháp có thể được ứng dụng để cải thiện hoạt tính chống oxy hóa, khả năng kháng khuẩn, chống ung thư của QU trong lĩnh vực chăm sóc sức khỏe [123].

Năm 2015, Kuma và cộng sự phát triển hệ mang polyphenolic flavonoid (quercetin) dựa trên hạt nano polymer phân hủy sinh học poly ( $\epsilon$  caprolactone), cỡ hạt thu được phân bố trong khoảng 215,9 – 253,4 nm với hiệu quả mang quercetin khoảng 66,3 – 69,3% và duy trì khả năng nhả chậm ở giá trị 62 – 66% sau 48 giờ. Nghiên cứu khẳng định đã điều chế được vật liệu kích thước nano mang quercetin với chức năng kiểm soát được sự giải phóng và làm tăng tính ổn định vật lý của thuốc [124].

Md. Khalid Anwer và cộng sự đã nghiên cứu tổng hợp hạt nano từ polymer lactide-co-glycolic acid (PLGA) ứng dụng dẫn truyền quercetin (QU). Hệ nano mang QU được tác giả phát triển bằng phương pháp bốc hơi dung môi tạo nhũ một bước, đã tạo ra được vật liệu nano mang QU kích thước trung bình khoảng 189 nm (F2) và 186 nm (F3) với hiệu quả mang QU tương ứng là 86,48% và 83,71%. Kết quả cho thấy lượng QU khi được mang bởi hạt nano giải phóng ra có sự khác biệt rất lớn so với dạng QU tự do, điều này khẳng định rằng có sự tương tác mạnh giữa QU và vật liệu mang (PLGA) [125].

Năm 2018, tác giả Aghabour đã công bố nghiên cứu ứng dụng hạt nano trên cơ sở silica mang quercetin. Kích thước hạt nano thu được là 84 nm và hiệu suất mang đạt 32% so với tổng lượng QU đưa vào [126].

Tác giả Zhang cùng cộng sự đã công bố kết quả nghiên cứu sử dụng vật liệu micelle điều chế trên cơ sở Poly(ethylene glycol)-*block*-poly([aspartic acid]-*graft*-[Cystamine dihydrochloride]) (PEG-*b*-(PAsp-*g*-Cys) mang đồng thời hai hợp chất là all-trans-retinoic acid (ATRA) and paclitaxel (PTX). Cỡ hạt phân bố quanh giá trị 100 nm, hiệu quả mang thuốc của vật liệu (DL) với PTX và ATRA lần lượt đạt là  $14,1\% \pm 3,5\%$  (giá trị EE là  $82\% \pm 7,5$ ) và  $13,7\% \pm 2,7\%$  [127].

PGS.TS. Hà Phương Thư đã kết hợp PTX với Curcumin trong cùng một hệ dẫn thuốc nano với mục tiêu chế tạo hệ dẫn thuốc nano đa chức năng, hướng đích ung thư, phân tán tốt trong nước, trên cơ sở PTX và Curcumin được bọc bằng copolymer Poly lactic acid-D-a-Tocopheryl polyetylen glycol 1000 succinat (PLA-TPGS) gắn yếu tố hướng đích folate; và thử nghiệm độc tính cũng như khả năng hướng đích tế bào ung thư của hệ dẫn thuốc chế tạo được, làm tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng khả năng tiêu diệt tế bào ung thư của hệ nano PTX kết hợp Curcumin. Kết quả thu được hạt nano với kích thước nhỏ hơn 100 nm và khả năng tải Curcumin, PTX lần lượt là: 201,67  $\mu\text{g/mL}$ , 203,71  $\mu\text{g/mL}$  [128].

Năm 2019, tác giả Sadhukhan và cộng sự đã công bố nghiên cứu tổng hợp vật liệu mang kích thước nano zinc oxide (ZnO) ứng dụng mang QU. Kết quả thu được kích thước hạt nano có giá trị từ 135 – 361 nm và hiệu quả mang QU đạt 72,4% [129].

Quá trình nghiên cứu, tham khảo các tài liệu liên quan, có thể thấy hướng nghiên cứu ứng dụng điều chế vật liệu dẫn truyền quercetin/paclitaxel cũng như các loại thuốc, các hợp chất có hoạt tính sinh học nhằm làm tăng hiệu quả của chúng đã thu hút được sự quan tâm rộng rãi. Có nhiều phương pháp chế tạo vật liệu được ứng dụng trong các báo cáo nghiên cứu và đã mang lại kết quả nhất định. Phát huy những kiến thức, bài học kinh nghiệm tiếp thu được, tôi lựa chọn luận án với nguyên liệu điều chế vật liệu là gelatin kết hợp pluronic nhằm tạo ra vật liệu mang thuốc có những ưu điểm được kết hợp từ hai nguyên liệu này. Cụ thể, với cấu trúc copolymer tổng hợp được, luận án hướng đến một cấu trúc hạt nanogel lõi – vỏ đặc trưng nhờ quá trình tự lắp ráp giữa các copolymer có cấu trúc là các đầu ưa nước và kỵ nước trên cùng một cấu trúc phân tử, có tính ổn định hơn nhờ lớp lõi và lớp vỏ của hạt tích điện trái dấu, kích thước hạt đáp ứng

được yêu cầu đặt ra, lõi của hạt có thể chứa được lượng thuốc lớn hơn. Ngoài ra, với cấu trúc của gelatin, có thể dễ dàng gắn các tác nhân hướng đích tế bào ung thư như folic acid, sẽ được nghiên cứu trong luận án.

**Bảng 1.3. Tóm tắt kết quả các đề tài nghiên cứu liên quan**

<b>TT</b>	<b>Tác giả</b>	<b>Nguyên liệu</b>	<b>Đặc tính vật liệu</b>	<b>Hiệu quả mang thuốc (%)</b>	<b>Khả năng nhả chậm thuốc (%)</b>
1	Jan Zillies and Conrad Coester [116]	Gelatin mang oligonucleotit	182 – 278 nm		
2	Ze Lu et al	Gelatin mang PTX	600 – 1000 nm	- DL: 0,7%	90% sau 2 giờ ở 37 °C
3	Kumari et al [117]	poly-d,l-lactide (PLA) mang QU	- PLA: 195 ± 55 nm. - PLA/QU: 250 ± 68 nm.	- EE: 40%	Khoảng 70% sau 100 giờ
4	Choi et al [73]	Pluronic-conjugated heparin mang indomethacin (IMC)	Khoảng 100 nm.	- EE: 15,25 – 81,83%.	
5	Zhang W et al [119]	Pluronic polymeric micelle mang PTX	Khoảng 25 nm.	- EE: > 90%	
6	Roger E et al [120]	- Hạt nano poly(D,L-lactide-co-glycolide)	200 – 300 nm; -10 tới -13 mV.	- DL: 12 – 13 µg PTX/mg	

		(PLGA) mang PTX			
7	S. B. Han et al	- Palmitic acid và Tween <sup>®</sup> 80 mang QU	274,0–986,6 nm; Từ –50,4 đến –29,4 mV.	- EE: Từ 15,2–46,2%	
8	Soheir N et al	Tạo hạt nano QU trong môi trường ethanol	Từ 16-17 nm.		
9	Dinesh Kumar et al	Poly ( $\epsilon$ caprolactone) mang QU	215,9 - 253,4 nm.	EE: 66,3 – 69,3%	62 – 66% sau 48 giờ
10	Md. Khalid Anwer et al [125]	Polyme lactide-co-glycolic acid (PLGA) mang QU	186 - 189 nm	EE: 83,71 - 86,48%	56 - 65% sau 24 giờ
11	Sadhukhan [129]	Nano ZnO mang QU	135 – 361 nm	EE: 72,4%	14% (48 giờ, pH 7,4) 82% (48 giờ, pH 5,0)
12	Zhang [119]	PEG- <i>b</i> - (PAsp- <i>g</i> -Cys mang PTX và ATRA	100 nm	82% $\pm$ 7,5	
13	Hà Phương Thu [128]	PLA-TPGS	< 100 nm	Curcumin: 201,67 $\mu$ g/mL PTX: 203,71 $\mu$ g/mL	
14	Aghabour [126]	Nano silica mang QU	84 nm	EE: 32%	



## CHƯƠNG 2. NGHIÊN CỨU

### 2.1. Hóa chất

**Bảng 2.1. Danh mục hóa chất**

Hóa chất	Xuất xứ
Gelatin	Merck, Đức
Pluronic P123 (MW= 5.800)	Sigma–Aldrich, Hoa Kỳ
Pluronic F127 (MW= 12.600)	Sigma–Aldrich, Hoa Kỳ
Pluronic F68 (MW= 8.400)	Sigma–Aldrich, Hoa Kỳ
Pluronic F87 (MW= 7.700)	Sigma–Aldrich, Hoa Kỳ
Folic acid	Merck, Đức
Quercetin (C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> , KLPT=302 g/mol)	Sigma–Aldrich, Hoa Kỳ
Paclitaxel	Sigma–Aldrich, Hoa Kỳ
p-nitrophenyl chlorofomate (p-NPC) (MW=201,56 g/mol)	Acros organics, Hoa Kỳ
Tetrahydrofuran (THF)	Merck, Đức
Diethyl ether	RCI Labscan, Thái Lan
3-amino-1-propanol	Acros organics, Hoa Kỳ
Chloroform	Fisher Chemical, Hoa Kỳ
Methanol	Merck, Đức
Ethanol	Fisher Chemical, Hoa Kỳ
Dichloromethane	RCI Labscan, Thái Lan
<i>n</i> -hexane (99%)	Acros Organics, Hoa Kỳ
1,4 - Diaminobutane, 99%	Acros Organics, Hoa Kỳ
N-Hydroxysuccinimide - BASF Corp	Sigma–Aldrich, Hoa Kỳ
1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodimide	Acros Organics, Hoa Kỳ
Khí Nitrogen	Việt Nam

### 2.2. Dụng cụ và thiết bị

- Dụng cụ

Bình cầu cổ nhám một cổ, ba cổ.

Falcon, ống đong, micropipette, cá từ, khóa nhám cung cấp nitrogen.

Thước kẹp Mitutoyo (Nhật Bản) độ chia nhỏ nhất 0,02 mm.

Túi thẩm tách Spectra Por Regenerated Cellulose Membrane MWCO 3500 Da, 6000 - 8000 Da, 12000 - 14000 Da và các dụng cụ khác.

- **Thiết bị**

Cân điện tử, 4 số lẻ (A&D company-Nhật), máy khuấy từ có hiệu chỉnh nhiệt (VELP Scientifica - Ý), máy đông khô (FDU-1200 EYELA - Nhật), máy ly tâm (Hermle Labortechnik GmbH - Đức), máy cô quay chân không (Hahnvapor-Hàn Quốc), tại phòng thí nghiệm Hóa dược, Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Máy phân tích nhiệt lượng TGA - DSC (Mettler Toledo - Thụy Sĩ), máy đo sự phân bố kích thước hạt DLS (Horiba SZ-100 - Nhật Bản), máy quang phổ hồng ngoại biến đổi FT-IR (PerkinElmer Frontier - Úc), máy đo quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-1800 UV-VIS Spectrophotometer) - Nhật Bản, tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Xác định hình thái, kích thước hạt bằng ảnh hiển vi điện tử truyền qua (TEM) được chụp bằng máy JEOL JEM 1400 ở 140 kV - Nhật Bản, tại Trường Đại học Bách Khoa, Thành phố Hồ Chí Minh.

Phổ  $^1\text{H-NMR}$  đo trên máy cộng hưởng từ hạt nhân NMR, Bruker Avance 500MHz, tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Đánh giá độc tính tế bào MCF-7 và độc tính nguyên bào sợi đo tại Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia, Thành phố Hồ Chí Minh.

Mô hình thí nghiệm chuột mang khối u được thực hiện tại phòng thí nghiệm Bộ môn Sinh lý học và Công nghệ Sinh học Động vật, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Đánh giá mô học mẫu khối u bằng phương pháp nhuộm Hemaoxylin – Eosin (H&E) và hóa mô miễn dịch tại khoa Giải phẫu bệnh thuộc Bệnh viện Nhi đồng 1, Thành phố Hồ Chí Minh.

## 2.3. Phương pháp nghiên cứu

### 2.3.1. Phương pháp tổng hợp các copolymer ghép trên cơ sở gelatin liên hợp pluronic

Tổng hợp các copolymer trên cơ sở ghép gelatin và pluronic (GP-P123, GP-F127, GP-F87, GP-F68) với tỉ lệ ghép khác nhau bằng cách sử dụng *p*-nitrophenyl chloroformate (NPC) và 3-aminopropanol (Ami) hoạt hóa pluronic, các pluronic hoạt hóa được ghép với gelatin thông qua phản ứng tạo liên kết urethane của nhóm amine ( $-NH_2$ ) trên gelatin và nhóm cacbonyl ( $=C=O$ ) của NPC được gắn trên phân tử pluronic, quá trình phản ứng được trình bày chi tiết trong phần thực nghiệm (2.4) của Luận án.

### 2.3.2. Phương pháp đánh giá cấu trúc, hình thái các copolymer ghép

#### 2.3.2.1. Đánh giá cấu trúc copolymer bằng $^1H-NMR$

Để chứng minh tổng hợp thành công hệ copolymer gelatin-pluronic, các nguyên liệu (gelatin, pluronic) cũng như sản phẩm trung gian (NPC-Pluronic-NPC, NPC-Pluronic-OH), sản phẩm GP-P tạo thành cần được xác định cấu trúc bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân (máy đo phổ Bruker Advance 500\_MHz, USA, Viện Hóa học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội) với chất chuẩn là tetramethyl silane (TMS) có độ dịch chuyển hóa học  $\delta$  ppm bằng 0.

#### 2.3.2.2. Đánh giá cấu trúc copolymer bằng FT-IR

Phổ hồng ngoại là một trong các phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử có nhiều ứng dụng trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu khác nhau, giúp xác định chính xác cấu tạo các hợp chất hữu cơ. Phổ FT-IR của các tác chất, sản phẩm tạo thành trong quá trình tổng hợp được sử dụng để xác định sự thành công trong quá thực hiện. Phổ FT-IR được đo bằng máy quang phổ hồng ngoại biến đổi FT-IR (PerkinElmer Frontier – Úc) tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

#### 2.3.2.3. Xác định thành phần copolymer bằng phương pháp TGA

Hàm lượng các chất có trong mẫu được xác định bằng máy phân tích nhiệt trọng lượng TGA (Thermogravimetric Analysis) tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Phương pháp phân tích TGA ghi nhận sự suy giảm khối lượng vật chất của mẫu khảo sát theo nhiệt độ trong suốt quá trình gia nhiệt mẫu liên tục.

#### 2.3.2.4. *Khảo sát nồng độ tạo micelle (CMC) của copolymer GP*

Phương pháp quang phổ UV-Vis được sử dụng để xác định giá trị CMC của pluronic và GP nanogel trong nước. Dung dịch chuẩn KI/I<sub>2</sub> được chuẩn bị bằng cách hòa tan 0,25 g iốt (I<sub>2</sub>) và 0,5 g kali iodua (KI) trong 25 ml nước cất. Một dãy gồm 20 mẫu dung dịch polymer (20 mL) cần xác định CMC có nồng độ biến đổi từ 0,00001% đến 0,1%. Cho vào mỗi mẫu 10  $\mu$ L dung dịch KI/I<sub>2</sub> và ủ trong 12 giờ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trước khi tiến hành đo. Giá trị độ hấp thụ tử ngoại của các mẫu polymer/copolymer với nồng độ khác nhau được đo ở bước sóng 366 nm bằng máy quang phổ UV-Vis (Shimadzu UV-2401, Shimadzu, Tokyo, Nhật Bản). Tại mỗi nồng độ của polymer/copolymer, thí nghiệm được thực hiện ba lần độc lập nhau. Giá trị cường độ hấp thụ đo được biến đổi theo hàm logarit của nồng độ polymer/copolymer tương ứng. Nồng độ tạo micelle (CMC) là nồng độ tương ứng với nồng độ của polymer/copolymer mà tại đó độ hấp thụ tăng mạnh được quan sát [130, 131].

#### 2.3.2.5. *Khảo sát điện tích bề mặt (thế Zeta) của nanogel GP*

Điện tích bề mặt của vật liệu mang cũng như của phân tử thuốc đóng vai trò quan trọng, ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng nang hóa thuốc [2]. Phân tích điện tích bề mặt hạt nanogel (thế Zeta) được thực hiện bằng máy đo sự phân bố kích thước hạt DLS (Horiba SZ-100 – Nhật Bản), tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trong ánh sáng tán xạ điện di (ELS) tốc độ của các hạt được đo bằng sự hiện diện của một điện trường. Tốc độ di chuyển các hạt nhanh tương ứng với điện thế Zeta của các hạt cao. Nồng độ các mẫu được khảo sát tại giá trị 1 mg/mL trong dung dịch muối đệm phosphate (pH = 7,4), nhiệt độ được kiểm soát tại 25 °C. Các phép đo được thực hiện trong ba lần độc lập nhau cho kết quả là giá trị trung bình.

#### 2.3.2.6. *Khảo sát kích thước hạt nanogel bằng phương pháp DLS*

Kích thước hạt được đo bằng máy SZ-100 (tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam), sử dụng công nghệ tán xạ ánh sáng động học (DLS). Các hạt nano trong cell chuyển động Brownian, một nguồn sáng được chiếu qua cell, ánh sáng tán xạ được thu nhận tại hai góc 90° hoặc 173°. Hệ thống sẽ tự động lựa chọn góc tán xạ tối ưu và vị trí của cell phụ thuộc vào nồng độ mẫu và cường

độ ánh sáng. Tín hiệu thu nhận từ ánh sáng tán xạ được đưa vào bộ thu nhận đa kênh (multi-channel correlator) có chức năng xác định hệ số khuếch tán tịnh tiến của hạt được phân tích. Kích thước hạt được tính toán theo phương trình Stokes-Einstein.

### 2.3.2.7. *Khảo sát hình dạng và kích thước hạt nanogel bằng phương pháp TEM*

Hình dạng và kích thước hạt nano được hiển thị bằng cách sử dụng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Dung dịch mẫu (1  $\mu\text{L}$ ) được nhỏ giọt trên khung lưới và để khô tự nhiên khoảng 6 – 7 phút trước khi đặt khung lưới chứa mẫu vào dung dịch uranyl acetate 1% (w/v), lắc nhẹ. Tiến hành đo mẫu trên máy JEM-1400 JEOL (tại Đại học Bách khoa, Tp. Hồ Chí Minh) ở 25 °C.

### 2.3.3. *Phương pháp tổng hợp hệ nanogel mang thuốc PTX và hoạt chất QU*

Các copolymer ghép GP-P123, GP-F127, GP-F87, GP-F68 có thể tự lắp ráp thành các nanogel có kích thước nano trong dung dịch nước nhờ vào đặc tính lưỡng tính của polymer và giá trị CMC thấp, hình thành vật liệu nanogel mang thuốc ổn định.

Nanogel tổng hợp thành được tiến hành đánh giá hiệu quả mang thuốc chống ung thư PTX và hoạt chất QU. Cơ sở khoa học của quá trình nang hóa thuốc dựa trên tương tác kỵ nước và tương tác tĩnh điện giữa hệ chất mang và thuốc. Cấu trúc các nanogel mang thuốc được xác định bằng phương pháp quang phổ hồng ngoại biến đổi FT-IR.

Hàm lượng các phân tử thuốc trong vật liệu mang nanogel GP được xác định bằng phương pháp quang phổ tử ngoại UV-Vis với bước sóng hấp thụ cực đại đặc trưng của QU tại  $\lambda = 374 \text{ nm}$  và PTX tại  $\lambda = 230 \text{ nm}$  trên thiết bị Agilent 8453 UV-Vis Spectrophotometer tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hàm lượng QU được mang bởi hệ nanogel được tính theo công thức [81]:

$$\%EE = \frac{W_{\text{total QU}} - W_{\text{free QU}}}{W_{\text{total QU}}} \times 100\%$$

$$\%DL = \frac{W_{\text{total QU}} - W_{\text{free QU}}}{W_{\text{total QU}} + W_{\text{chất mang GP}} - W_{\text{free QU}}} \times 100\%$$

Trong đó: - %EE: Hiệu quả mang QU (%)

- %DL: Hiệu suất mang QU (%)

- $W_{\text{total-QU}}$ : Lượng QU ban đầu (mg).
- $W_{\text{free QU}}$ : Lượng QU không được nang hóa vào hạt nano (mg).
- $W_{\text{chất mang GP}}$ : Lượng chất mang (mg).

Hàm lượng PTX được tính toán tương tự QU.

### **2.3.4. Khả năng nhả chậm QU và PTX của vật liệu nanogel GP và động học giải phóng thuốc**

#### **2.3.4.1. Khảo sát khả năng nhả chậm thuốc từ hệ nanogel**

Đệm PBS là một dung dịch đẳng trương có pH = 7,4 giống với pH trong cơ thể sinh vật, là dung dịch điển hình để thẩm tách các chất tương hợp sinh học. Thành phần của đệm gồm: NaCl, KCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  với tỷ lệ thích hợp.

Phương pháp màng thẩm tách được sử dụng khảo sát quá trình giải phóng của các thuốc từ vật liệu mang. Túi thẩm tách có khối lượng phân tử 3,5 kDa chứa 1 mL mẫu được treo lơ lửng trong 20 mL dung dịch phosphate-buffered saline (PBS) có pH = 7,4 được đặt trong bể điều nhiệt và khuấy ở  $37 \pm 1$  °C. Ở mỗi khoảng thời gian khác nhau của quá trình thẩm tách: 0, 2, 5, 8, 12, 17, 24, 48, 72, 96, 120 (giờ), 1 mL mẫu được rút ra, đồng thời bổ sung 1 mL dung dịch PBS vào hệ nhằm đảm bảo thể tích hệ phản ứng không đổi. Hàm lượng thuốc giải phóng ra được xác định bằng phương pháp quang phổ tử ngoại khả kiến bằng thiết bị phân tích Agilent 8453 UV-Vis Spectrophotometer. Thí nghiệm nhả chậm thuốc được lặp lại 3 lần với khoảng tin cậy lớn hơn 95%. Lượng thuốc giải phóng được tính bằng công thức (Wendy H. Chern):

$$Q = C_n V_s + V_t \sum_{i=1}^{n-1} C_{n-1}$$

Trong đó, Q là lũy tuyến lượng thuốc đã giải phóng

$C_n$  là nồng độ đo được tại thời điểm n

$V_s$  là thể tích PBS trong ống thủy tinh

$C_{n-1}$  là tổng nồng độ đo được từ mốc đầu tiên cho đến thời điểm n-1

$V_t$  là thể tích thu nhận để đánh giá.

### 2.3.4.2. Nghiên cứu động học giải phóng thuốc từ hệ nanogel

Để phân tích động học và cơ chế giải phóng thuốc, dữ liệu giải phóng thuốc được phân tích bằng cách sử dụng bốn mô hình sau (Phương trình (1) – (4)).

- (1) Động học bậc không  $M_t/M_\infty = k_0.t$
- (2) Động học bậc nhất  $\ln(M_\infty/M_t) = k_1.t$
- (3) Mô hình Higuchi  $M_t/M_\infty = k_H t^{1/2}$
- (4) Mô hình Power law  $M_t/M_\infty = k t^n$

Trong  $M_t/M_\infty$  là phần của thuốc giải phóng tại mỗi thời gian ( $t$ ),  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_H$  và  $k$  lần lượt là hằng số giải phóng thuốc bậc 0, bậc một, hằng số Higuchi và hằng số Korsmeyer – Peppas. Trong mô hình Power law lũy thừa  $n$  là một số mũ đặc trưng cho cơ chế động học giải phóng khuếch tán. Vì cơ chế giải phóng từ các hệ polymer/copolymer rất phức tạp, mô hình này được sử dụng khi cơ chế chính xác chưa được biết hoặc khi có nhiều hơn một cơ chế liên quan đến giải phóng thuốc. Dữ liệu chỉ được phân tích trong khoảng lượng thuốc giải phóng được 60% lượng ban đầu. Các giá trị của  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_H$ ,  $k$  và  $n$  được xác định bằng cách đưa dữ liệu giải phóng thuốc thu được từ thực nghiệm vào các phương trình tương ứng và được trình bày với các hệ số hồi quy ( $R^2$ ) [79, 132].

### 2.3.5. Phương pháp đánh giá độc tính tế bào (dòng tế bào MCF-7 và tế bào thường) của vật liệu nanogel GP

Đánh giá độc tính tế bào trên dòng tế bào MCF-7 của hệ nanogel mang thuốc và đánh giá độc tính tế bào của hệ nanogel trên nguyên bào sợi được thực hiện bằng phương pháp nhuộm Sulforhodamine B (SRB), tại trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh. Đây là phương pháp được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (NCI) đưa ra năm 1985 và xác nhận là phương pháp đánh giá chuẩn về độc tính trên tế bào của các thuốc có khả năng ức chế và tiêu diệt tế bào ung thư [133, 134]

#### • Nguyên tắc

Thử nghiệm SRB là một phương pháp so màu đơn giản và nhạy để xác định độc tính tế bào của một chất. SRB là một thuốc nhuộm tích điện âm sẽ liên kết tĩnh điện được với các phân tích điện dương của protein. Lượng thuốc nhuộm liên kết sẽ phản ánh lượng protein tổng của tế bào.

Trong thử nghiệm này, tế bào được cố định, rửa và nhuộm với SRB. Sau đó SRB liên kết với protein tế bào được hòa tan tạo dung dịch trong suốt màu hồng. Mật độ quang đo được của dung dịch tương quan với lượng protein tổng hay số lượng tế bào. Sự thay đổi lượng tế bào so với mẫu chứng phản ánh độc tính tế bào của chất nghiên cứu.

- Chuẩn bị tế bào MCF-7

Dòng tế bào ung thư vú MCF-7 do ATCC (Hoa Kỳ) cung cấp, được nuôi cấy trong môi trường E'MEM có bổ sung L-glutamine (2 mM), HEPES (20 mM), amphotericin B (0,025 µg/mL), penicillin G (100 UI/mL), streptomycin (100 µg/mL), 10% (v/v) huyết thanh bào thai bò FBS và ủ ở 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

- Quy trình khảo sát hoạt tính gây độc bằng phương pháp nhuộm SRB

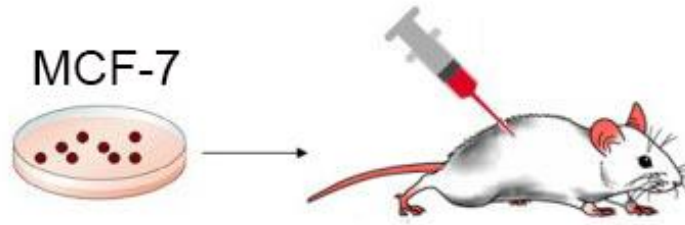
Tế bào đơn được cấy trên những đĩa nuôi cấy 96 giếng với mật độ là 10<sup>4</sup> tế bào/giếng. Sau 24 giờ nuôi cấy, quần thể tế bào được ủ với chất khảo sát ở các nồng độ trong 48 giờ. Sau đó, protein tổng từ tế bào thử nghiệm được cố định bằng dung dịch trichloroacetic acid (Sigma) 50% lạnh và nhuộm với dung dịch sulforhodamine B 0,2% (Sigma). Kết quả được đọc bằng máy ELISA reader ở hai số sóng 492 nm và 620 nm. Các thí nghiệm được lặp lại ba lần và kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn.

### **2.3.6. Thí nghiệm trên động vật**

#### **2.3.6.1. Phương pháp ghép tế bào MCF-7 tạo mô hình chuột mang khối u**

Mô hình chuột mang khối u ghép dị loài bao gồm các tế bào khối u có nguồn gốc từ người được cấy vào chuột nhắt trắng *Mus musculus* var. *Albino*. Mô hình thí nghiệm chuột mang khối u được thực hiện theo quy trình tại phòng Công nghệ Động vật - Khoa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh. Chuột sau khi đã được làm suy giảm miễn dịch để có thể tiếp nhận những tế bào khối u từ người nên những khối u có đặc điểm tương tự khối u ở người. Trong nghiên cứu này, dòng tế bào MCF-7 được tiêm trực tiếp vào bên dưới da, tại vị trí lưng chuột [89].





**Hình 2.1. Tiêm tế bào MCF-7 trên lưng chuột đã suy giảm miễn dịch**

- Quy trình ghép tế bào tạo khối u:

MCF-7 được nuôi trong môi trường Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) bổ sung 5% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% kháng sinh. Các tế bào được nuôi trong các Roux 25 cm<sup>2</sup> ở 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Thay môi trường 2 - 3 ngày mỗi lần và cấy chuyển khi tế bào phủ 70 - 80% bề mặt nuôi cấy. Để bỏ môi trường cũ, rửa lại bình nuôi tế bào MCF-7 bằng dung dịch phosphate-buffered saline (PBS). Bổ sung 1ml Trypsin/EDTA 0,25%. Tráng đều, ủ 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> trong 1 phút. Tách các tế bào MCF-7 lên khỏi bề mặt nuôi cấy bằng dung dịch trypsin/EDTA 0,25%. Ly tâm, thu lại cặn tế bào, loại bỏ trypsin. Rửa lại cặn bằng dung dịch PBS. Huyền phù cặn tế bào vào dung dịch PBS. Xác định số lượng tế bào đạt 10<sup>7</sup> tế bào/100 μL và pha loãng đến nồng độ ghép.

Gây mê chuột, tiêm thuốc mê vào ổ bụng với mỗi liều chích là 80 μL/36 g chuột, tỉ lệ thuốc trong mỗi liều (Xylazil : Ketamil : NaCl = 2 : 3 : 3). Trước mỗi đợt tiêm, chuột được cân khối lượng và sau đó thuốc được lấy đúng liều tương ứng với khối lượng chuột.

Cố định chuột, làm sạch lông, sát trùng vùng da ghép bằng ethanol 70°.

Dùng ống tiêm 1 mL, hút dịch huyền phù tế bào. Xuyên kim vào bên dưới da chuột ở một bên lưng khoảng 3 – 5 mm và tiêm 100 μL dịch tế bào.

Mô hình dị ghép có lợi thế là ít tổn kém, dễ thực hiện, khối u nhanh chóng xuất hiện. Vì thế, mô hình này có thể đáp ứng được phần lớn các mục tiêu thử nghiệm thuốc cận lâm sàng điều trị cho các cơ quan có tỉ lệ mắc bệnh ung thư cao ở người.

#### 2.3.6.2. Phương pháp tính thể tích khối u

Phương pháp đo kích thước và tính thể tích khối u được thực hiện bằng thước kẹp Mitutoyo (Nhật Bản) với độ chia nhỏ nhất 0,02 mm. Dùng thước kẹp đo khối u nổi lên tại vị trí lưng chuột, sau đó tính thể tích khối u theo công thức [133].

$$V(\text{mm}^3) = \frac{a \times b^2}{2}$$

Trong đó: a là đường kính lớn nhất của khối u

b là đường kính nhỏ nhất của khối u

Kết thúc thí nghiệm, các khối u được thu nhận và bảo quản qua đêm trong dung dịch formalin 10%. Mẫu được gửi đến Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh Viện Nhi Đồng 1, Thành phố Hồ Chí Minh nhuộm Hemaoxylin – Eosin (H&E) và mô hóa miễn dịch.

#### 2.3.6.3. Phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch bằng kháng thể SOD2

Phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch bằng kháng thể SOD2 (Superoxide dismutase 2) nhằm xác định khối u ung thư vú vừa gây tạo trên mô hình chuột suy giảm miễn dịch có nguồn gốc là tế bào MCF-7 từ người, không chứa các loại tế bào khác có nguồn gốc từ chuột với mục tiêu tạo mô hình khối u ung thư có thành phần tế bào tương tự như khối u phát triển trên cơ thể người.

SOD2 là enzyme kháng oxy hóa, nằm trong ty thể, được biểu hiện rất cao trong ung thư biểu mô cổ tử cung, ung thư vú, ung thư dạ dày, ruột kết. Nghiên cứu cho thấy SOD2 đóng vai trò như một gene gây ung thư, SOD2 được xem như một biomarker, là dấu hiệu để dự đoán tiến trình di căn của khối u vú, vì sự biểu hiện gen của SOD2 có sự khác biệt giữa tế bào ung thư vú và tế bào ở tuyến vú bình thường.

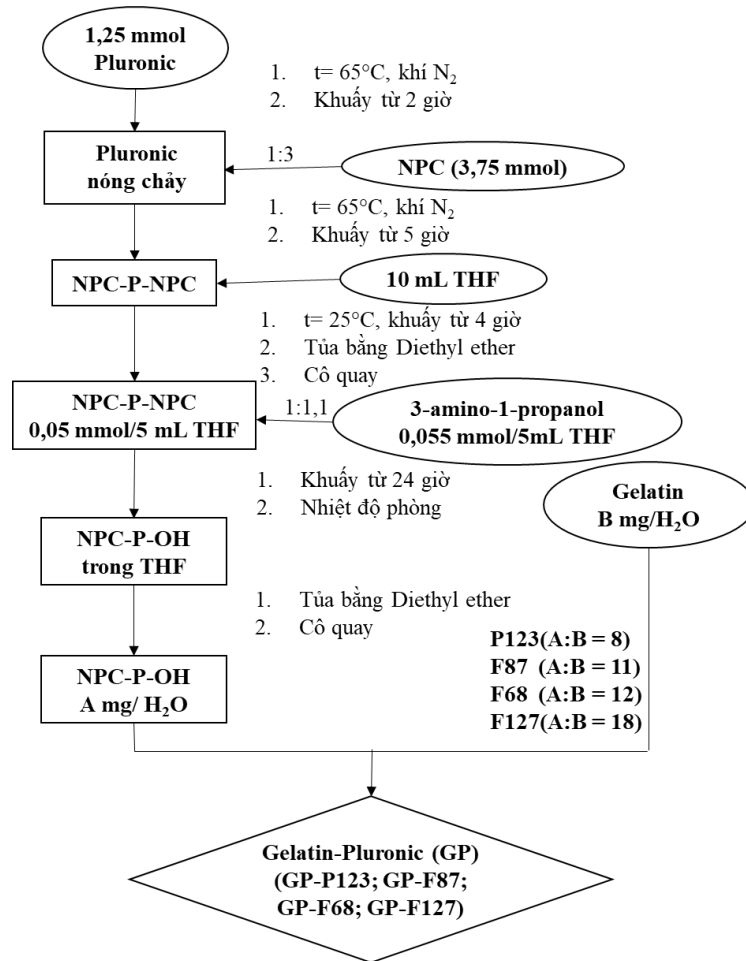
Để nhận biết đặc hiệu cho tế bào ung thư vú ở người, kháng thể SOD2 được sử dụng để quan sát sự bắt màu của nhân và chất nền tế bào, hình thái mô học của khối u, tế bào chất sẽ có màu nâu và nhân có màu tím nhạt.

#### 2.3.6.4. Phương pháp nhuộm Hemaoxylin - Eosin (H&E)

Phương pháp dựa trên cơ sở là khả năng bắt màu khác nhau của nhân tế bào và tế bào chất khi nhuộm bằng cặp thuốc nhuộm hematoxylin và eosin. Hematoxylin có màu xanh đậm, bắt màu với acid nucleic bằng một phản ứng phức tạp, chưa hoàn chỉnh. Eosin có màu hồng, có khả năng kết hợp với các protein không đặc hiệu. Phương pháp H&E giúp quan sát tổng quát về cấu trúc mô học, đồng thời giúp phân biệt được cấu trúc mô bình thường, viêm hoặc có sự bất thường hay vùng mô chứa nhiều tế bào ung thư để chẩn đoán bệnh.

## 2.4. Thực nghiệm

### 2.4.1. Tổng hợp và khảo sát nanogel trên cơ sở gelatin ghép pluronic GP

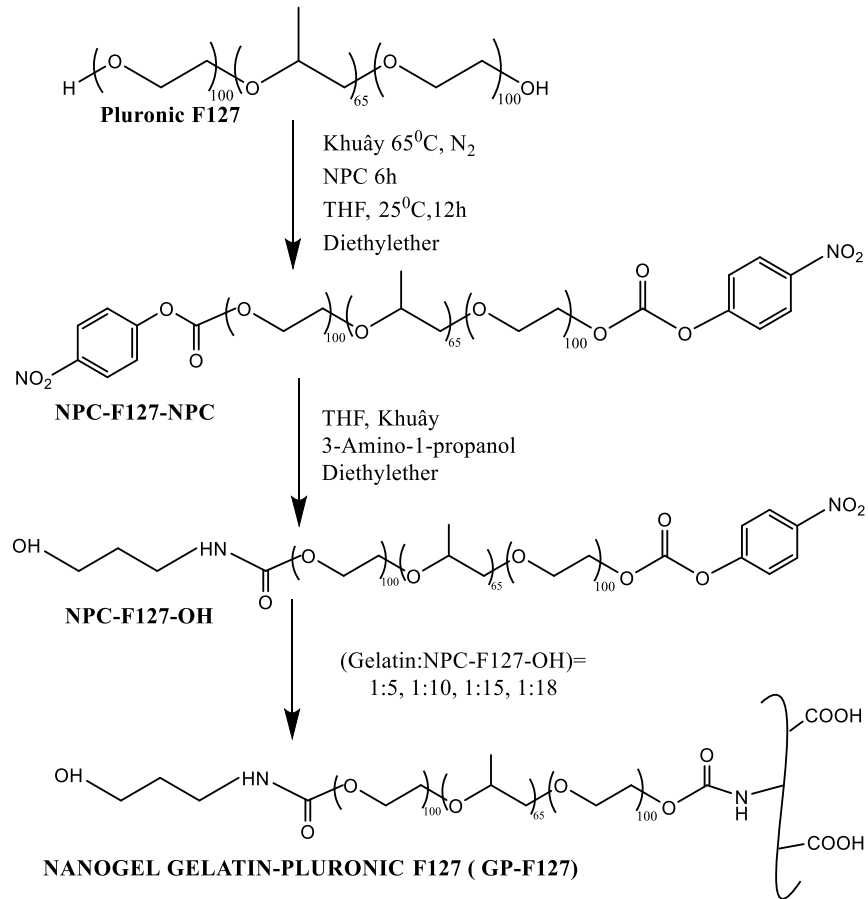


**Hình 2.2. Quá trình tổng hợp các gelatin ghép pluronic GP**

Trong phạm vi nghiên cứu của đề tài, các hệ nanogel được tổng hợp trên cơ sở gelatin ghép Pluronic (F127, P123, F87, F68) thông qua sự hình thành liên kết urethane của nhóm amine ( $-\text{NH}_2$ ) trên gelatin và nhóm cacbonyl ( $=\text{C}=\text{O}$ ) của NPC được gắn trên phân tử Pluronic, quá trình gồm 3 giai đoạn trung gian [81, 135-138].

#### 2.4.1.1. Tổng hợp nanogel GP

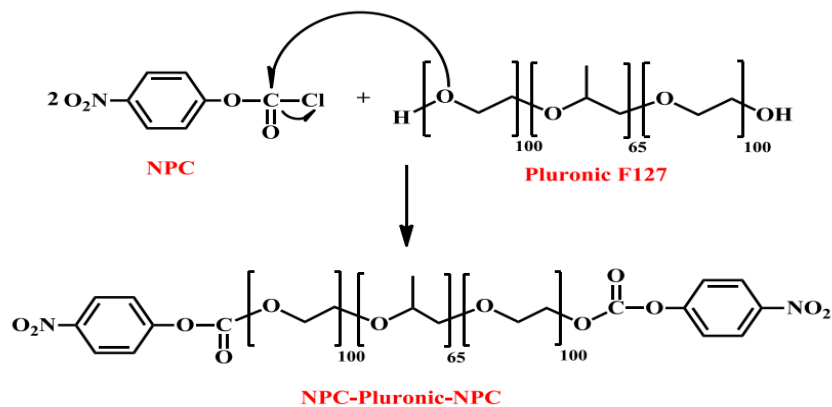
Tổng hợp các copolymer GP-F127 với các tỉ lệ ghép khác nhau được thực hiện qua quá trình 3 bước:



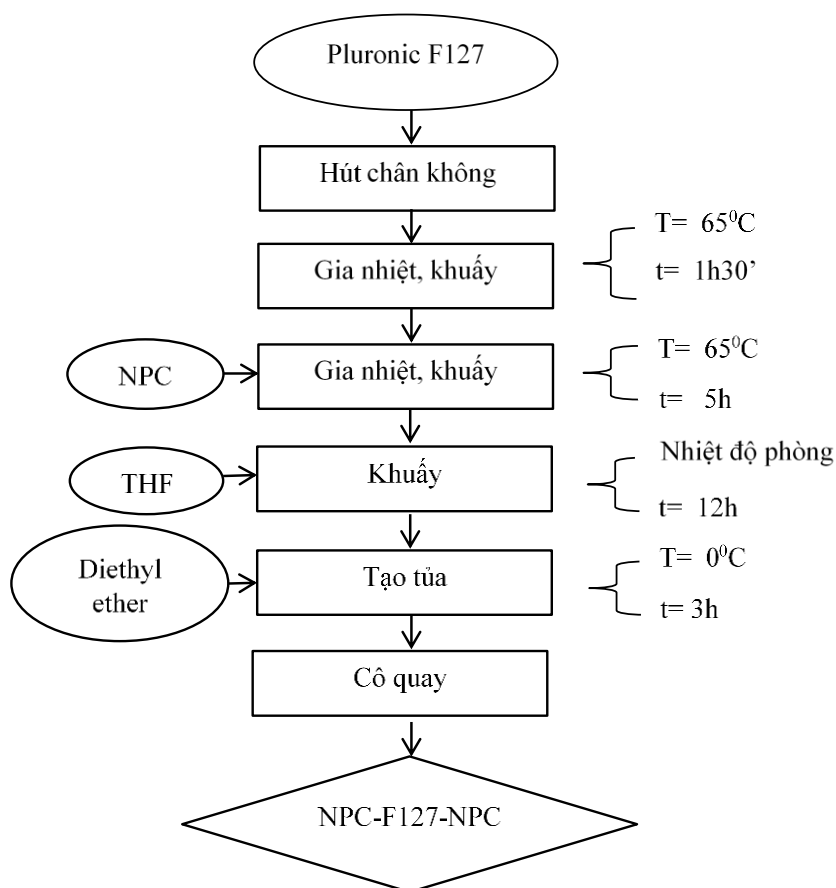
**Hình 2.3. Sơ đồ phản ứng tổng hợp nanogel GP-F127**

• Bước 1: Tổng hợp NPC-F127-NPC

NPC-F127-NPC được tổng hợp thông qua sự hoạt hóa 2 nhóm hydroxyl -OH ở 2 đầu trên phân tử pluronic F127 bằng chất hoạt hóa NPC hình thành liên kết ester giữa nhóm -OH trên pluronic F127 và nhóm acyl ( $-C=O-Cl$ ) trên NPC (hình 2.4).



**Hình 2.4. Phản ứng tổng hợp NPC-F127-NPC**

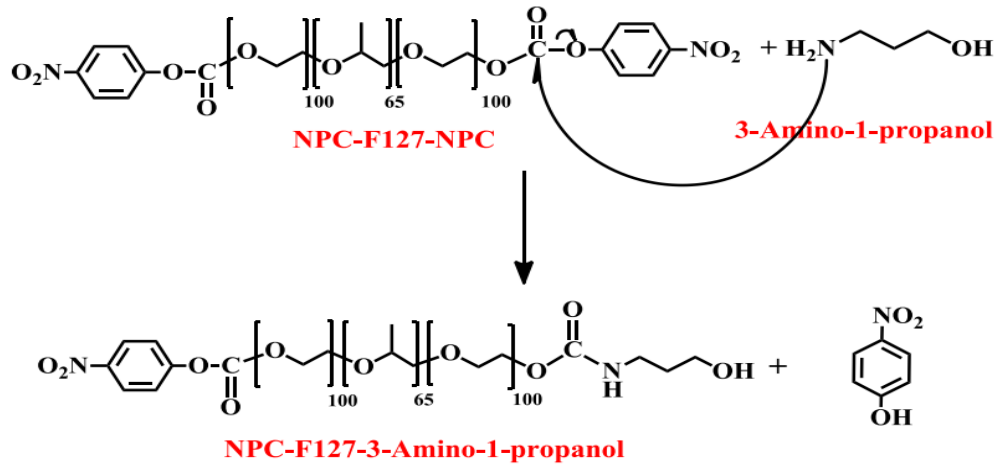


**Hình 2.5. Quy trình tổng hợp NPC-F127-NPC**

Pluronic (1,25 mmol) được gia nhiệt trong môi trường khí trơ  $N_2$  ở  $65^\circ C$ , khuấy từ liên tục trong khoảng 2 giờ đến nóng chảy hoàn toàn và loại bỏ hàm lượng ẩm. Tiếp theo, hệ phản ứng được bổ sung tác chất NPC (3,75 mmol), duy trì điều kiện nhiệt độ, môi trường khí trơ và tốc độ khuấy trong 5 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được thêm 10 mL THF đồng thời đưa về nhiệt độ phòng, khuấy liên tục trong 4 giờ. Kết tủa sản phẩm với 250 mL diethyl ether. Cô quay thu được sản phẩm là NPC-P-NPC có màu trắng dạng bột của NPC-F127-NPC, NPC-F87-NPC, NPC-F68-NPC và dạng gel của (NPC-P123-NPC). Quá trình được minh họa cụ thể với pluronic F127 (hình 2.4 và 2.5). Cấu trúc sản phẩm NPC-F127-NPC được xác định bằng phương pháp đo phổ  $^1H$ -NMR và FT-IR.

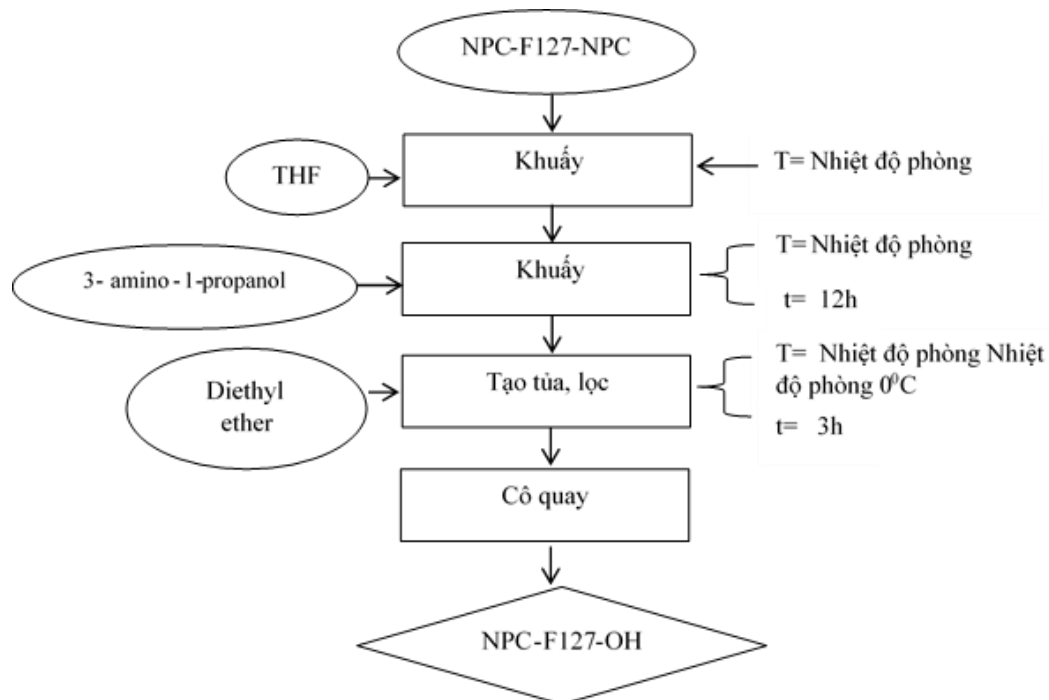
● **Bước 2: Tổng hợp NPC-F127-OH**

Phương pháp tổng hợp NPC-F127-OH dựa trên nguyên tắc tạo liên kết urethane giữa NPC-F127-NPC và 3-amino-1-propanol (hình 2.6).



**Hình 2.6. Khóa một đầu sản phẩm hoạt hóa NPC-F127-OH**

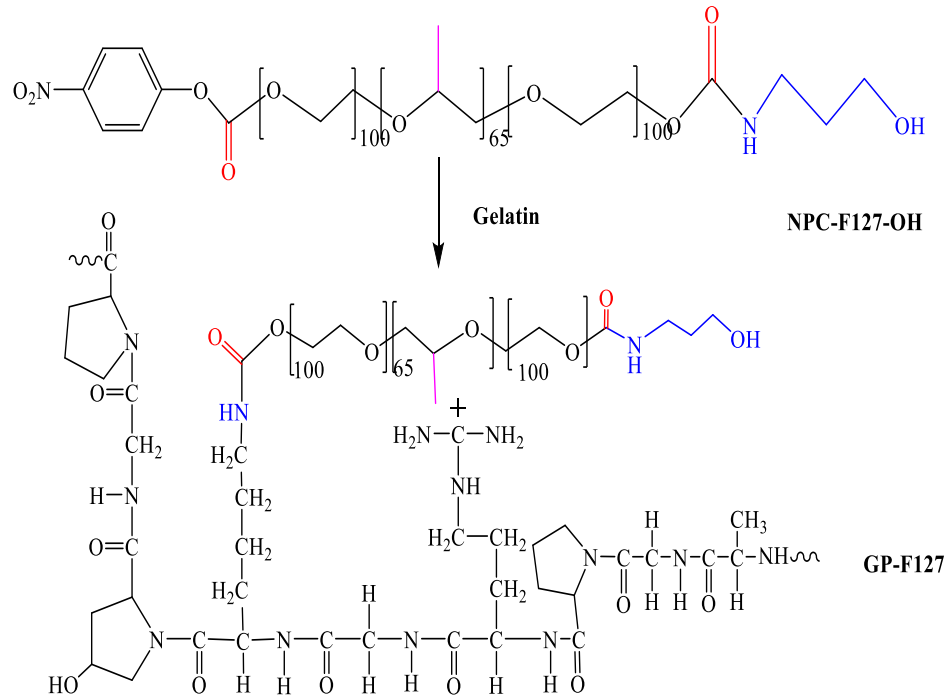
Nhỏ từ từ (0,055 mmol) 3-amino-1-propanol (trong 5 mL THF) vào dung dịch NPC-P-NPC (0,05 mmol) và khuấy từ ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Kết tủa sản phẩm bằng 250 mL diethylether, cô quay thu được NPC-P-OH dạng bột màu trắng (NPC-F127-OH, NPC-F87-OH, NPC-F68-OH) và dạng gel màu trắng (NPC-P123-OH). Toàn bộ quá trình được mô tả cụ thể với pluronic F127 (hình 2.6 và 2.7). Cấu trúc NPC-F127-OH được xác định bằng phương pháp đo phổ  $^1\text{H-NMR}$  và FT-IR.



**Hình 2.7. Quy trình tổng hợp NPC-F127-OH**

• Bước 3: Tổng hợp nanogel GP-F127

Các copolymer GP-F127 được tổng hợp dựa trên sự hình thành liên kết amide (-NHCO-) giữa NPC-F127-OH và gelatin tương ứng (hình 2.8).

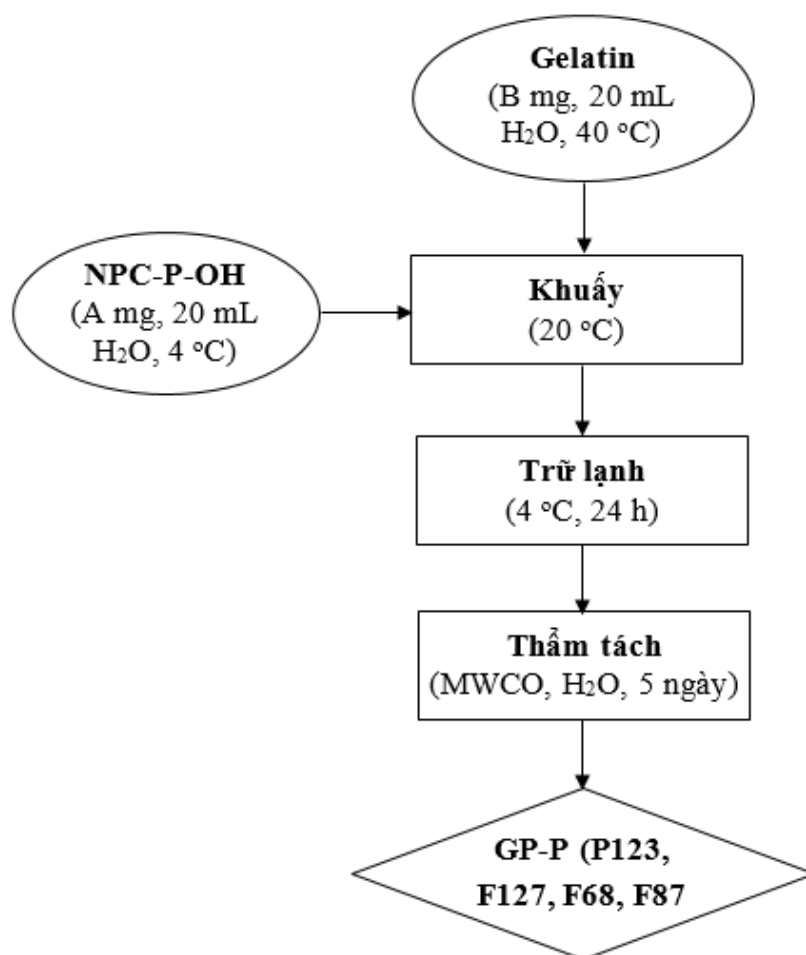


**Hình 2.8. Phản ứng tổng hợp GP-F127**

**Bảng 2.2. Số liệu các pluronic (mmol) trong tổng hợp vật liệu nanogel GP-F127, GP-P123, GP-F87 và GP-F68**

Ge:P(w/w)	1:2	1:4	1:5	1:6	1:8	1:10	1:11	1:12	1:15	1:18
<b>F127</b>			0,1			0,2			0,3	<b>0,36</b>
<b>P123</b>	0,09	<b>0,18</b>		0,27	<b>0,36</b>					
<b>F87</b>							<b>0,36</b>			
<b>F68</b>								<b>0,36</b>		

(Khối lượng gelatin luôn có định 250 mg, các pluronic quy đổi ra số mmol đồng nhất)

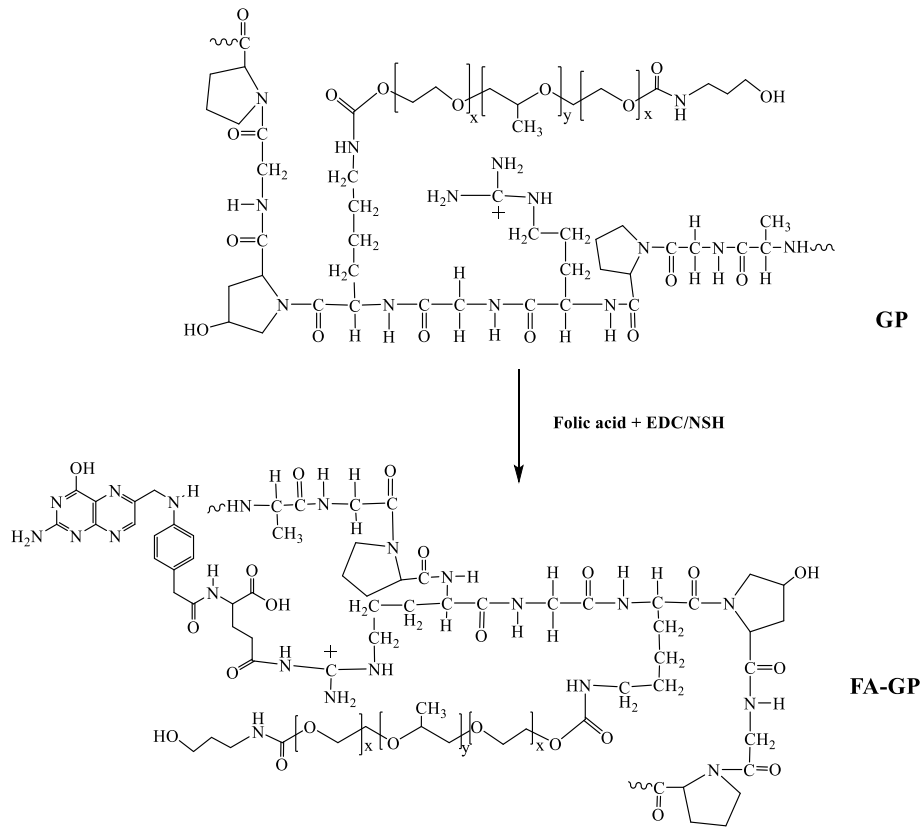


**Hình 2.9. Sơ đồ quá trình tổng hợp vật liệu nanogel GP**

Phản ứng tổng hợp các copolymer trên cơ sở gelatin ghép pluronic (GP-P123, GP-F127, GP-F87, GP-F68) (hình 2.9) xảy ra khi dung dịch chứa A mg NPC-P-OH (trong 20 mL nước) được nhỏ từ từ vào dung dịch chứa B mg gelatin (trong 20 mL nước), (tỷ lệ A:B sẽ thay đổi tùy theo khối lượng phân tử của pluronic sao cho cả 4 loại pluronic có cùng số mol trong phản ứng) ở nhiệt độ phòng và được khuấy từ liên tục trong 24 giờ. Kết thúc quá trình phản ứng, sản phẩm thô được thẩm tách với nước bằng màng MWCO 12000 – 14000 Da trong thời gian 5 ngày. Đông khô thu được sản phẩm các GP (GP-P123, GP-F127, GP-F87, GP-F68). Quá trình phản ứng gelatin ghép pluronic được minh họa cụ thể bằng quá trình khảo sát tìm tỷ lệ Gelatin:Pluronic tối ưu tổng hợp nanogel GP-F127 và GP-P123.



### 2.4.1.2. Tổng hợp nanogel FA-GP

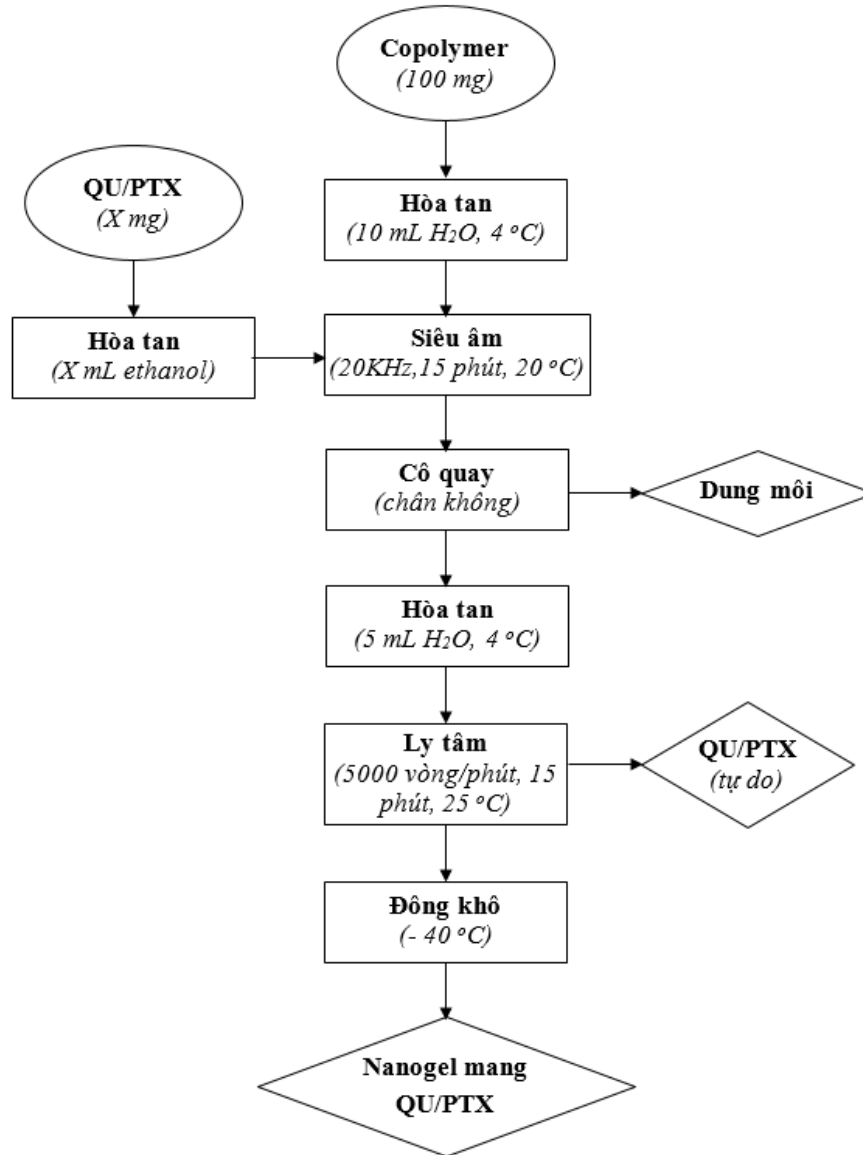


**Hình 2.10. Phản ứng tổng hợp copolymer FA-GP**

Quy trình tổng hợp nanogel FA-GP được biểu diễn trên hình 2.10. Dung dịch folic acid được hoạt hóa bởi EDC và NHS (tỷ lệ mol 1:1:1) trong dung môi DMSO (1 mg folic acid/1 mL DMSO). Folic acid hoạt hóa được nhỏ giọt chậm vào dung dịch GP (100 mg/1 mL nước cất DI), khuấy liên tục 12 giờ ở nhiệt độ phòng trong bóng tối, sản phẩm của phản ứng là hợp chất GP liên kết folic acid. Sản phẩm được tiến hành thẩm tách lại trong môi trường nước DI bằng màng cellulose (MWCO = 12 – 14 kDa) trong 5 ngày liên tục. Đông khô thu được sản phẩm FA-GP (gelatin ghép pluronic gắn folic acid). Sự tổng hợp thành công được khẳng định bằng phổ  $^1\text{H-NMR}$  và FT-IR.

### 2.4.2. Khảo sát khả năng nang hóa thuốc lên vật liệu nanogel GP

Hệ nanogel mang thuốc (PTX/QU) dựa trên tương tác tĩnh điện (giữa gelatin và thuốc) và tương tác kỵ nước (giữa các phân đoạn kỵ nước trên pluronic và thuốc), khi nhiệt độ tăng các đoạn kỵ nước trong cấu trúc xuất hiện nhiều hơn, làm tăng tương tác kỵ nước tạo khối polymer để hình thành các hạt nanogel mang thuốc (QU/PTX).

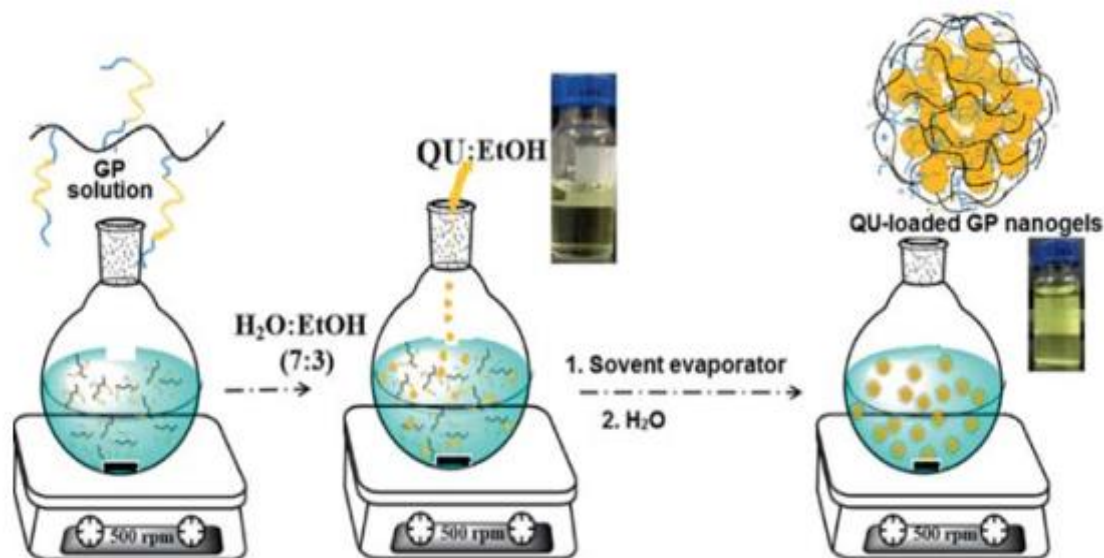


**Hình 2.11. Quá trình nang hóa thuốc lên vật liệu nanogel**

Thuốc (QU/PTX) được hòa tan trong dung môi ethanol, nhỏ giọt từ từ vào dung dịch của vật liệu mang (10 mg/mL nước) dưới tác động của siêu âm (20 °C trong 15 phút). Hỗn hợp được cô quay loại bỏ dung môi và hòa tan lại hoàn toàn với 5 mL nước ở 4 °C. Mẫu được ly tâm 5000 vòng/phút ở 25 °C trong 15 phút. Loại bỏ thuốc tự do không phân tán. Tiến hành quá trình đông khô thu được hệ vật liệu nanogel mang thuốc, sơ đồ chi tiết được thể hiện trên hình 2.11. Một phần sản phẩm nanogel mang thuốc của quá trình nang hóa được phân tích đánh giá hiệu quả (EE, DL) của quá trình. Phần còn lại được lưu trữ, bảo quản, sử dụng cho những thí nghiệm khảo sát tiếp theo của đề tài.

**Bảng 2.3. Thông số quá trình nang hóa thuốc lên vật liệu nanogel**

Công thức với 100 mg GP (FA-GP)	QU (mg)	PTX (mg)	(QU + PTX) (mg)
GP-F127/QU	(X: 5 - 30)		
GP-P123/QU	(X: 5 - 30)		
GP-F87/QU	(X: 5 - 30)		
GP-F68/QU	(X: 5 - 30)		
FA-GP-F127/QU	(X: 5 - 30)		
FA-GP-P123/QU	(X: 5 - 30)		
GP-F127/PTX		(X: 0,5 - 3)	
GP-P123/PTX		(X: 0,5 - 3)	
GP-F87/PTX		(X: 0,5 - 3)	
GP-F68/PTX		(X: 0,5 - 3)	
FA-GP-F127/PTX		(X: 0,5 - 3)	
FA-GP-P123/PTX		(X: 0,5 - 3)	
GP-P123/PTX/QU			5 mg QU + 1 mg PTX
FA-GP-P123/PTX/QU			5 mg QU + 1 mg PTX

**Hình 2.12. Hình minh họa quá trình mang QU vào hệ nanogel GP****2.4.3. Khảo sát khả năng nhả QU và động học giải phóng QU của GP**

Quy trình giải phóng QU từ hệ chất mang GP (GP-P123, GP-F127, GP-F87, GP-F68) được thực hiện bằng cách cho 3 mẫu GP có khối lượng bằng nhau, được hòa tan hoàn toàn 3 mL nước cất. Mỗi mẫu cho vào 1 túi thẩm tách MWCO 3500 Da (1 mL/túi).

Tiến hành thẩm tách trong đệm PBS (20 mL) ở 37 °C ở điều kiện pH 7,4. Sau mỗi khoảng thời gian nhất định là sẽ lấy mẫu một lần, mỗi lần lấy 1 mL sau đó thêm vào tương ứng 1 mL dung dịch đệm PBS cho đủ 20 mL như ban đầu. Hàm lượng QU được xác định bằng UV-vis. Kết quả được chạy động học nhằm tìm ra cơ chế giải phóng thuốc của từng vật liệu.

#### **2.4.4. Đánh giá độc tính tế bào *in-vitro***

Độc tính tế bào của GP mang QU được thực hiện trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 bằng phương pháp nhuộm SRB.

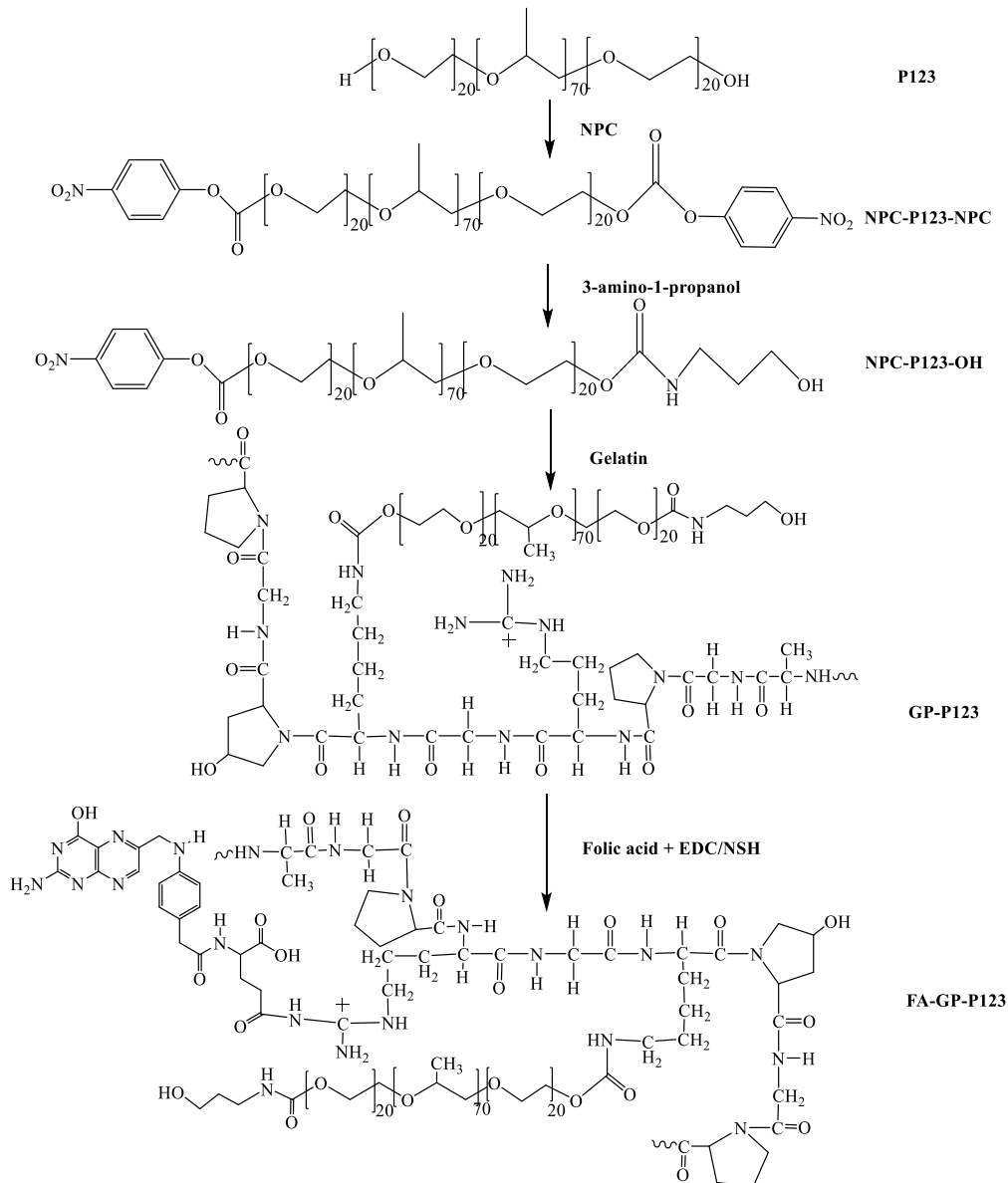
Đồng thời GP cũng được thử nghiệm độc tính trên nguyên bào sợi để đánh giá tính tương hợp sinh học.

#### **2.4.5. Ứng dụng tổng hợp và đánh giá nanogel FA-GP-P123 mang thuốc PTX kết hợp QU (FA-GP-P123/PTX/QU) lên chuột mang khối u**

Trên cơ sở kết quả nghiên cứu hiệu quả mang thuốc của các hệ nanogel GP (GP-P123, GP-F127, GP-F87, GP-F68) chúng tôi tiến hành chọn hệ nanogel GP-P123 (1:4) gắn tác nhân hướng đích FA để ứng dụng mang thuốc PTX kết hợp với QU và đánh giá hiệu quả điều trị lên chuột mang khối u dòng tế bào MCF-7 ghép dị loài từ người.

##### **2.4.5.1. Tổng hợp hệ nanogel FA-GP-P123**

Quy trình tổng hợp FA-GP-P123 được thực hiện giống như quy trình tổng hợp FA-GP (Mục 2.4.1.2).



**Hình 2.13. Sơ đồ phản ứng tổng hợp copolymer FA-GP-P123**

#### 2.4.5.2. Tổng hợp hệ nanogel FA-GP-P123 mang PTX kết hợp QU

Trong thử nghiệm, 100 mg mỗi copolymer lưỡng tính GP-P123 và FA-GP-P123 đã được hòa tan với 10 ml nước cất. 5 mg QU và 1 mg PTX được hòa tan trong 15 mL ethanol. Dung dịch QU+PTX sau đó được thêm từng giọt vào các dung dịch copolymer đồng thời siêu âm (20 °C trong 15 phút) ta sẽ thu được hệ nhũ tương chứa QU+PTX và copolymer, dung dịch thu được được làm bay hơi để loại bỏ toàn bộ ethanol. Sau khi cô quay chân không, mẫu FA-GP-P123 mang QU+PTX ở dạng gel, thêm vào 4 mL nước lạnh để hòa tan toàn bộ sản phẩm. Sản phẩm tiếp tục được ly tâm lạnh với tốc độ 5000

vòng/phút trong thời gian 15 phút ở 25 °C. QU và PTX tự do sẽ bị loại ra khỏi hệ chất mang và kết tủa dưới đáy, thu dung dịch phía trên đem đi đông khô loại bỏ nước ta thu được FA-GP-P123/PTX/QU.

#### 2.4.5.3. Đánh giá cấu trúc, hình thái FA-GP-P123 mang PTX kết hợp QU

Hình thái, kích thước nanogel FA-GP-P123/PTX/QU được xác định bằng kính hiển vi điện tử truyền qua TEM và DLS.

Phần trăm thuốc PTX và QU được mang vào nanogel FA-GP-P123/PTX/QU được xác định bằng phương pháp đo UV-Vis.

#### 2.4.5.4. Đánh giá độc tính dòng tế bào in vitro MCF-7 và HeLa

Độc tính tế bào của QU, PTX, GP-P123/QU, FA-GP-P123/QU, GP-P123/PTX/QU và FA-GP-P123/PTX/QU được thực hiện trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 và ung thư cổ tử cung HeLa bằng phương pháp nhuộm SRB.

#### 2.4.5.5. Khảo sát khả năng nhả thuốc và đánh giá động học giải phóng thuốc của FA-GP-P123/PTX/QU

Quy trình giải phóng PTX và QU được thực hiện bằng cách cho mẫu hòa tan hoàn toàn trong 3 mL nước cất. Mẫu được cho vào 3 màng thấm tách Cellulose MWCO 3500 Da. Tiến hành thấm tách trong đệm PBS (20 mL) ở 37°C ở 2 điều kiện pH khác nhau (5,5 và 7,4). Sau khoảng thời gian nhất định, mẫu sẽ được lấy một lần, mỗi lần lấy 1 mL, bổ sung vào hệ tương ứng 1 mL dung dịch đệm PBS cho đủ 20 mL như ban đầu. Lượng PTX và QU có trong mẫu theo thời gian được xác định bằng phương pháp UV-Vis.

#### 2.4.5.6. Quy trình tạo mô hình chuột suy giảm miễn dịch và ghép khối u dị loài

Phương pháp và các bước tạo mô hình chuột suy giảm miễn dịch và mang khối u ghép dị loài được thực hiện theo quy trình tại phòng thí nghiệm Bộ môn Sinh lí học và Công nghệ sinh học động vật, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia, Thành phố Hồ Chí Minh.

Chuột nhắt trắng (*Mus musculus* Var. *Albino*) được mua từ viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh với số lượng 30 con (đực), khoảng 35 – 37 g/con. Số lượng chuột thí nghiệm được phân chia thành 6 chuồng (5 con/chuồng) và nuôi ổn định 2 đến 3 ngày trước khi gây suy giảm miễn dịch.

*a. Quy trình gây suy giảm miễn dịch*

Mô hình chuột bị ức chế miễn dịch phục vụ cho việc ghép tế bào ung thư MCF-7 được tiến hành bằng busulfan kết hợp với cyclophosphamide liều cao kéo dài trong nhiều ngày như sau:

<b>Ngày</b>	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9
<b>Tiêm</b>	BU	CY	CY	CY	CY			<b>Tế bào</b>	CY*

BU: Tiêm Busulfan liều 20 mg/kg

CY: Tiêm Cyclophosphamide liều 50 mg/kg

CY\*: Tiêm Cyclophosphamide liều 25 mg/kg

Thời gian xử lý thuốc trên chuột trước khi ghép tế bào ung thư là 7 ngày, từ ngày N1→ N7. Ngày N1 tiêm 1 liều busulfan 20 mg/kg. Bốn ngày tiếp theo, từ ngày N2→ N5, mỗi ngày tiêm 1 liều cyclophosphamide 50 mg/kg, tiêm tại vùng bụng.

Kiểm tra chuột ở ngày thứ 6 (đảm bảo chuột đã suy giảm miễn dịch), đánh giá hiệu quả suy giảm miễn dịch bằng phương pháp bạch cầu tổng.

*b. Ghép tế bào MCF-7 tạo khối u*

Ngày ghép tế bào MCF-7 là ngày N8, tiêm tế bào MCF-7 tạo khối u trên lưng chuột, các ngày từ N8 trở đi được xem là khoảng thời gian sau khi ghép. Từ ngày N9 trở đi, cách 3 ngày tiêm 1 liều cyclophosphamide 25 mg/kg nhằm duy trì tình trạng ức chế miễn dịch cho chuột trong suốt thời gian thí nghiệm.

Để theo dõi sự phát triển của mô hình, khối u được tiến hành đo kích thước, ghi nhận đường kính lớn nhất, đường kính nhỏ nhất 2 ngày một lần trong suốt thời gian thí nghiệm.

*2.4.5.7. Quy trình thử nghiệm thuốc*

*a. Nuôi chuột:*

- Chuột được phân thành 6 chuồng (5 con/chuồng).
- Bắt đầu nuôi từ ngày 20/6/2020. Theo dõi cân nặng chuột hàng ngày.
- Thức ăn bổ sung theo khối lượng chuột dựa trên công thức tính toán (đã được chứng minh qua các nghiên cứu trước).

*b. Tạo khối u:*

Quy trình đã được chuẩn hóa và được tiến hành nhiều lần tại phòng thí nghiệm.

- Sau khi nuôi chuột được 3 ngày, bắt đầu tiêm thuốc tạo mô hình chuột suy giảm miễn dịch.

- Ngày đầu tiên tiêm Busulfan. 4 ngày tiếp theo tiêm liên tiếp cyclophosphamid.

- Kiểm tra chuột ở ngày thứ 6 (đảm bảo chuột đã suy giảm miễn dịch).

- Sau 2 ngày tiến hành tiêm tế bào ung thư MCF-7 tạo khối u tại lớp dưới da trên lưng chuột.

- Tiêm duy trì gây suy giảm miễn dịch chuột ở ngày kế tiếp (3 ngày/lần trong suốt thời gian thí nghiệm).



**Hình 2.14. Kỹ thuật tiêm chuột trong quá trình thí nghiệm**

*c. Thử thuốc:*

Chuột được cân và đo theo dõi kích thước khối u hàng ngày. Dựa vào cân nặng và kích thước khối u, sắp xếp chuột theo mô hình ngẫu nhiên để bố trí thí nghiệm chính xác. 4 nghiệm thức được tiến hành:

Nghiệm thức 1: Nước muối sinh lý (NaCl 0,9%).

Nghiệm thức 2: PTX (2,5 mg/kg trọng lượng).

Nghiệm thức 3: PTX (2,5 mg/kg trọng lượng) kết hợp QU.

Nghiệm thức 4: FA-GP-P123 mang PTX (2,5 mg/kg trọng lượng) kết hợp QU.

- Bắt đầu tiêm thuốc trên chuột theo liều lượng đã tính toán với tần suất 4 ngày/lần, tổng cộng 4 lần trong 2 tuần.



- Theo dõi khối lượng chuột và kích thước khối u hàng ngày. Mỗi lần tiêm, thuốc được chuẩn bị theo khối lượng chuột dựa trên công thức đã có.

- Sau 4 lần tiêm: Đánh giá hiệu quả dựa trên độ suy giảm của khối u và kết quả nhuộm mô quan sát tế bào khối u.

*d. Theo dõi sự hình thành khối u:*

Mục đích của phương pháp là đánh giá khả năng tương thích giữa mô chủ và tế bào ung thư vú của người. Sau khi ghép tế bào lên chuột, tại vị trí ghép sẽ có sự thay đổi về hình thái và cấu trúc mô. Sự xuất hiện chấm trắng nhỏ là dấu hiệu của sự phát triển khối u đầu tiên mà ta có thể quan sát được bằng mắt thường.

*e. Chỉ tiêu đánh giá:*



**Hình 2.15. Khối u được thu nhận sau khi kết thúc thí nghiệm**

**Đánh giá hiệu quả ức chế miễn dịch:** Đánh giá hiệu quả ức chế miễn dịch thực hiện dựa trên đánh giá sự biến động bạch cầu tổng so với chuột bình thường và trước khi xử lý thuốc dựa trên phương pháp đếm bạch cầu tổng bằng buồng đếm hồng cầu. Những chuột đạt tiêu chuẩn nồng độ bạch cầu tổng trong máu giảm còn dưới 1.000 tế bào bạch cầu/mm<sup>3</sup> được chọn để tiến hành ghép tế bào ung thư.

**Đo kích thước khối u:** Quan sát hình thái khối u theo thời gian nhằm xác định thời gian xuất hiện khối u, thời gian tồn tại khối u, kích thước khối u biến đổi theo thời gian.

**2.4.5.8. Quy trình đánh giá hiệu quả của thuốc**

Quy trình đánh giá hiệu quả của thuốc dựa trên độ suy giảm thể tích của khối u và kết quả nhuộm mô quan sát tế bào khối u.

Sau khi ghép tế bào MCF-7 lên chuột, tại vị trí ghép sẽ có sự thay đổi về hình thái và cấu trúc mô. Sự xuất hiện chấm trắng nhỏ là dấu hiệu sự phát triển khối u đầu tiên mà ta có thể quan sát được bằng mắt thường.

Các chỉ tiêu đánh giá gồm: Kích thước khối u được đo bằng thước kẹp Mitutoyo (Nhật Bản) với độ chia nhỏ nhất 0,02 mm và đánh giá hiệu quả điều trị của thuốc bằng phương pháp nhuộm mô khối u, tại Khoa Giải phẫu bệnh thuộc Bệnh viện Nhi đồng 1, Thành phố Hồ Chí Minh.

## CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1. Kết quả tổng hợp và khảo sát nanogel GP-F127

Cấu trúc của các copolymer GP-F127 được xác định bằng quang phổ hồng ngoại biến đổi FT-IR, phổ cộng hưởng từ hạt nhân  $^1\text{H-NMR}$ , TGA, TEM và CMC.

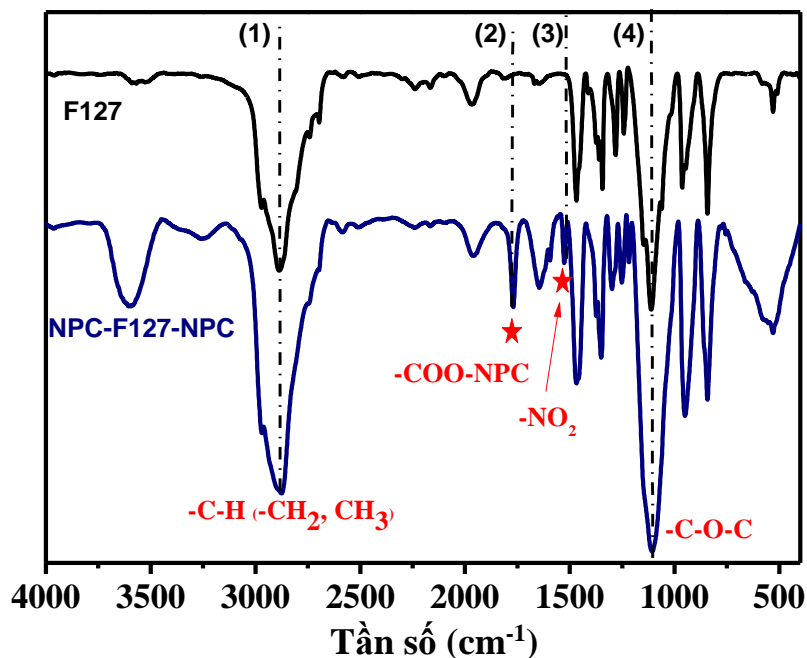
#### 3.1.1. Kết quả xác định thành phần, cấu trúc các copolymer GP-F127

Trong tổng hợp các copolymer GP-F127 các thành phần cấu trúc của sản phẩm trung gian NPC-F127-NPC, NPC-F127-OH, GP-F127 cũng được xác định qua kết quả phân tích phổ FT-IR và  $^1\text{H-NMR}$ .

##### 3.1.1.1. Kết quả phân tích phổ FT-IR và $^1\text{H-NMR}$ của sản phẩm trung gian NPC-F127-NPC và NPC-F127-OH

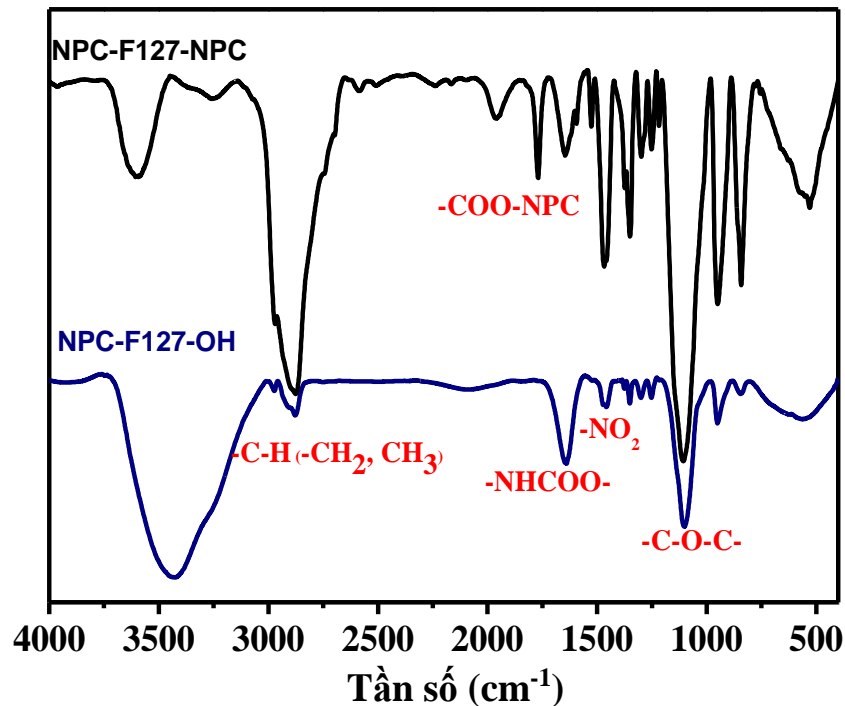
Các sản phẩm NPC-F127-NPC và NPC-F127-OH được tổng hợp từ F127, NPC và 3-amino-1-propanol có dạng bột màu trắng. Đầu tiên hoạt hóa 2 nhóm -OH đầu và cuối mạch của F127 bởi NPC tạo sản phẩm NPC-F127-NPC. Sau đó NPC-F127-NPC được dùng làm tác chất cho phản ứng ghép với 3-amino-1-propanol. Trong phản ứng này liên kết urethane được tạo thành từ phản ứng giữa nhóm amine trong phân tử Ami và nhóm  $-\text{C}=\text{O}$  của hợp chất NPC-F127-NPC tạo sản phẩm là NPC-F127-OH.

##### a. Kết quả phân tích phổ FT-IR của NPC-F127-NPC và NPC-F127-OH



Hình 3.1. Phổ FT-IR của F127 và NPC-F127-NPC

Dữ liệu phổ FT-IR của NPC-F127-NPC (hình 3.1) có các dải hấp thụ đặc trưng nhóm  $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_3$   $2883,43\text{ cm}^{-1}$  (1) trong F127. Đồng thời, trên phổ FTIR của NPC-F127-NPC, nhóm  $-\text{NO}_2$  liên kết trực tiếp với nhân thơm trên phân tử NPC xuất hiện tại số sóng  $1593,77\text{ cm}^{-1}$  (3) và có sự dịch chuyển dao động xuất hiện peak  $1769,58\text{ cm}^{-1}$  (2), đây là dao động hóa trị liên kết  $-\text{C}=\text{O}$  của nhóm ester do sự hình thành liên kết ester giữa pluronic F127 với NPC tạo sản phẩm NPC-F127-NPC. Dữ liệu FT-IR góp phần khẳng định thực hiện thành công phản ứng hoạt hóa pluronic F127.



Hình 3.2. Phổ FT-IR của NPC-F127-NPC và NPC-F127-OH

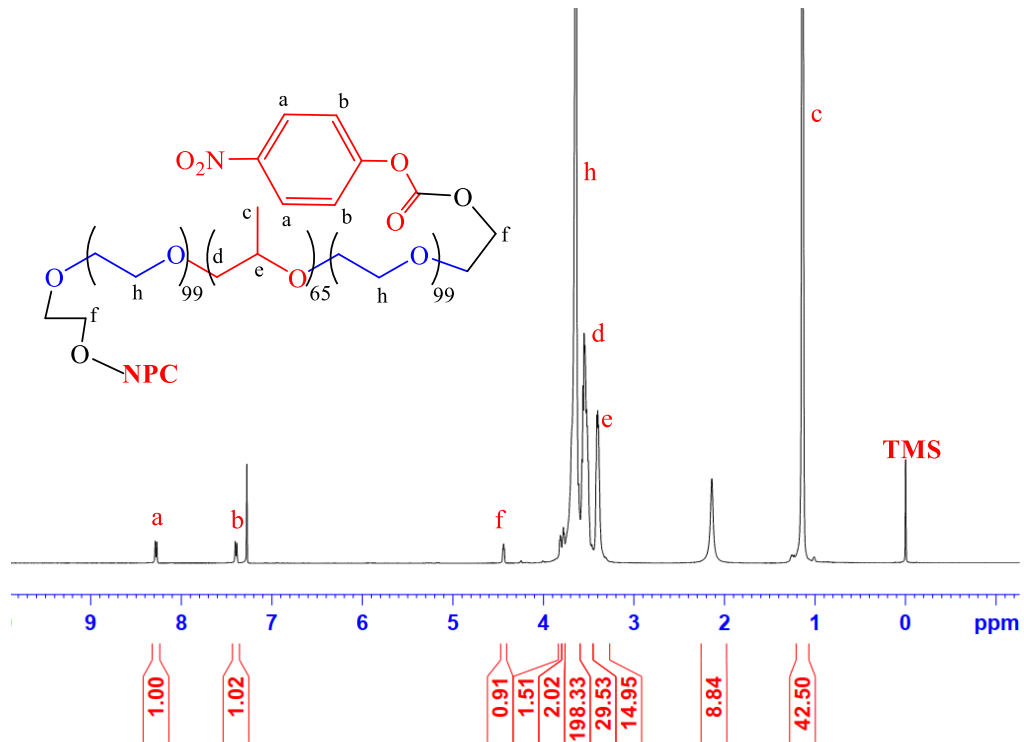
Bảng 3.1. Kết quả phổ FT-IR của F127, NPC-F127-NPC, NPC-F127-OH

Nhóm chức	Số sóng ( $\text{cm}^{-1}$ )		
	F127	NPC-F127-NPC	NPC-F127-OH
$-\text{CH}$ ( $-\text{CH}_2$ và $-\text{CH}_3$ )	2972-2887	2972-2887	2972-2887
C-O-C	1108	1108	1108
$-\text{NO}_2$		1593	1593
$-\text{COO-NPC}$		1769	1769
$-\text{NHCOO-}$			1642

Trong phổ đồ FT-IR của NPC-F127-OH ở hình 3.2 xuất hiện tín hiệu mới tại độ chuyển dịch  $1643.35\text{ cm}^{-1}$ , do sự thay thế một phần gốc *p*-nitrophenyl chloroformate bằng 3-amino-1-propanol thông qua nối ureathan (-NHCOO-), điều này chứng tỏ đã tổng hợp thành công sản phẩm NPC-F127-OH.

*b. Kết quả phân tích  $^1\text{H-NMR}$  của NPC-F127-NPC và NPC-F127-OH*

Kết quả phân tích cấu trúc của NPC-F127-NPC được thể hiện qua phổ cộng hưởng từ hạt nhân  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm). Phổ đồ ở hình 3.3 thu được cho thấy các tín hiệu đặc trưng sau:



**Hình 3.3. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của NPC-F127-NPC**

Hai mũi đôi ở vị trí  $\delta = 7,39\text{ ppm}$  và  $\delta = 8,28\text{ ppm}$  chứng tỏ sự có mặt của proton H ở vị trí liên kết (-CH) trên vòng benzen của NPC.

Một mũi đa có cường độ chuyển dịch  $\delta = 4,44\text{ ppm}$  là proton H trên dây PEO liên kết trực tiếp với phần NPC (-CH<sub>2</sub>-O-NPC). Tín hiệu này chỉ xuất hiện khi pluronic được hoạt hóa bằng NPC.

Một mũi đặc trưng ở vị trí  $\delta = 3,62\text{ ppm}$  chứng tỏ sự có mặt của proton H trên dây PPO ở vị trí liên kết với nhóm (-CH<sub>2</sub>-CH-).

Một mũi đặc trưng ở vị trí 3,2 - 3,5 chứng tỏ sự có mặt của proton H trên PPO ở vị trí (-CH<sub>2</sub>, -CH).

Một mũi đơn ở vị trí  $\delta = 1,14$  ppm chứng tỏ sự có mặt của proton H trên dây PPO ở vị trí liên kết với nhóm (-CH<sub>3</sub>).

Kết hợp các số liệu trên, có thể kết luận đã hoạt hóa thành công NPC vào 2 đầu F127 với hiệu suất tạo NPC-F127-NPC đạt 100% được tính dựa trên dữ liệu phổ <sup>1</sup>H-NMR theo công thức của tác giả Nguyễn Thị Bích Trâm và Trần Ngọc Quỳnh [139].

$$X\% = \frac{\frac{S_{H(-CH)}(a)}{S_{H(-CH_3)}(c)}}{\frac{\sum_{H(-CH)}(a)}{\sum_{H(-CH_3)}(c)}} \times 100\%$$

**Trong đó:**

X%: Hiệu suất hoạt hóa

$S_{H(a)}$ ,  $S_{H(c)}$ : Lần lượt là diện tích tích phân của peak a và c

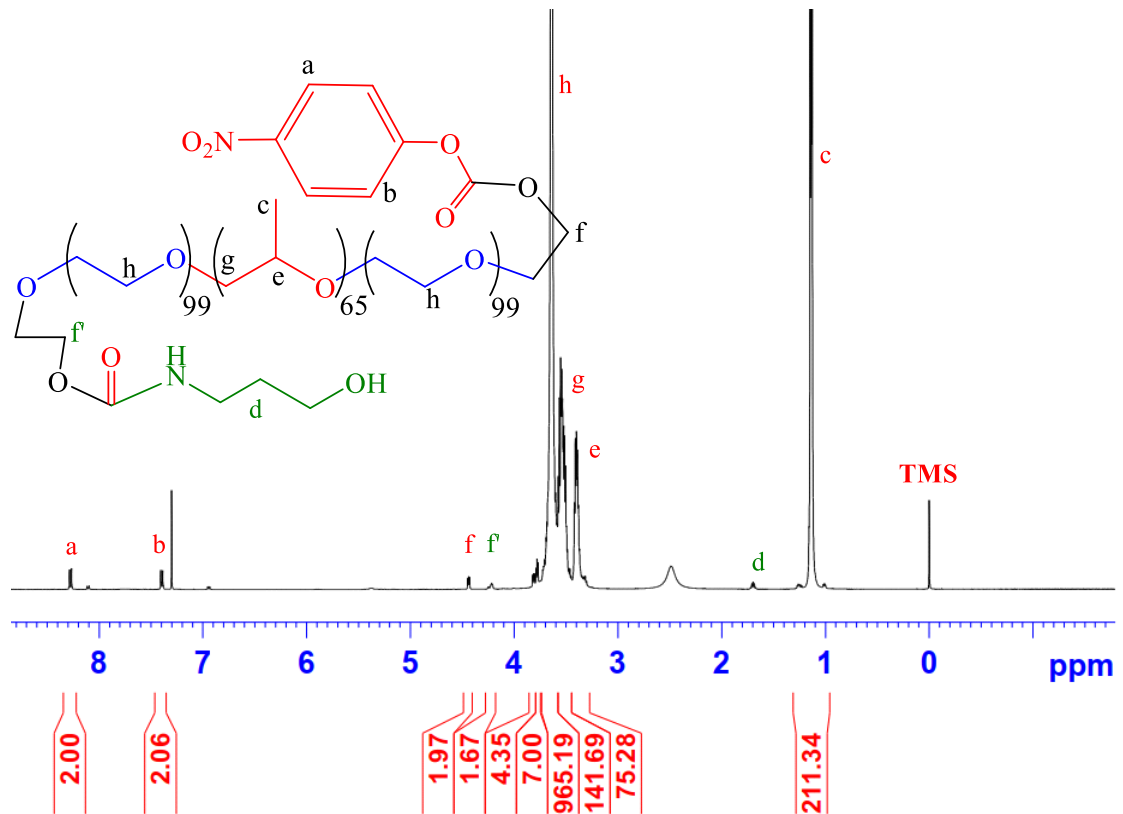
$\sum_{H(-CH_3)}(c)$ : Tổng số proton của nhóm -CH<sub>3</sub> trên dây PPO của F127

$\sum_{H(-CH)}(a)$ : Tổng số proton của nhóm -CH trên vòng benzen của NPC

Hiệu suất:

$$X\% = \frac{\frac{1}{42,5}}{\frac{4}{3 \times 65}} \times 100\% \approx 100\%$$

NPC-F127-NPC được dùng làm tác chất cho phản ứng ghép với 3-amino-1-propanol tạo sản phẩm là NPC-F127-OH.



**Hình 3.4. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của NPC-F127-OH**

Trên phổ  $^1\text{H-NMR}$  của NPC-F127-OH (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm) (hình 3.4) chứng minh một nhóm NPC trên NPC-F127-NPC đã được khóa thành công. Đối với phân tử được thế một phần 3-amino-1-propanol, ngoài những mũi cộng hưởng đặc trưng cho các proton trên NPC-F127-NPC còn xuất hiện tín hiệu cộng hưởng ở vị trí  $\delta = 4,44$  ppm thể hiện proton H trên dây PEO ở vị trí liên kết với nhóm ( $-\text{CH}_2\text{-O-NPC}$ ) dịch chuyển một phần đáng kể về vùng  $\delta = 4,22$  ppm do sự thay thế một đầu NPC bằng 3-amino-1-propanol, thể hiện proton H trên dây PEO liên kết trực tiếp với nhóm ( $-\text{O-NH-}$ ). Độ thế 3-amino-1-propanol càng cao, cường độ tín hiệu ở  $\delta = 4,22$  ppm sẽ càng tăng. Một mũi đặc trưng ở vị trí  $\delta = 1,70 - 2,2$  ppm là của proton H trên C bão hòa không liên kết trực tiếp với N nằm trong nhóm 3-amino-1-propanol ( $-\text{CO-NH-CH}_2\text{-CH}_2-$ ), khẳng định 1 đầu NPC được thay thế bởi 3-amino-1-propanol. Khoảng 46% gốc NPC đã được thay thế bởi 3-amino-1-propanol, kết quả này thu được từ phép tính tỷ lệ tích phân của proton trên NPC và proton của Ami theo công thức của tác giả Nguyễn Thị Bích Trâm và Trần Ngọc Quyền [139].

$$X\% = \frac{S_{H(f')}}{S_{H(f')} + S_{H(f)}} \times 100\%$$

**Trong đó:**

X%: Hiệu suất chuyển hóa

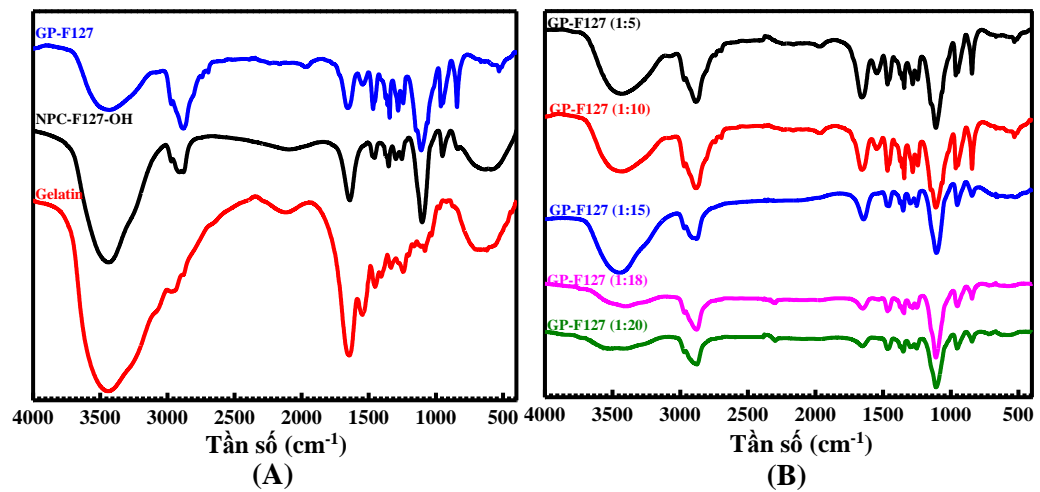
$S_{H(f)}$ ,  $S_{H(f')}$ : Lần lượt là diện tích tích phân của peak f và f'

**Hiệu suất:**

$$X\% = \frac{1,67}{1,67 + 1,97} \times 100\% = 45,88\%$$

### 3.1.1.2. Kết quả phân tích phổ FT-IR và $^1\text{H-NMR}$ của GP-F127

#### a. Kết quả phân tích phổ FT-IR của GP-F127



**Hình 3.5. Phổ FT-IR của Gelatin, GP-F127(A) và các tỷ lệ GP-F127 (B)**

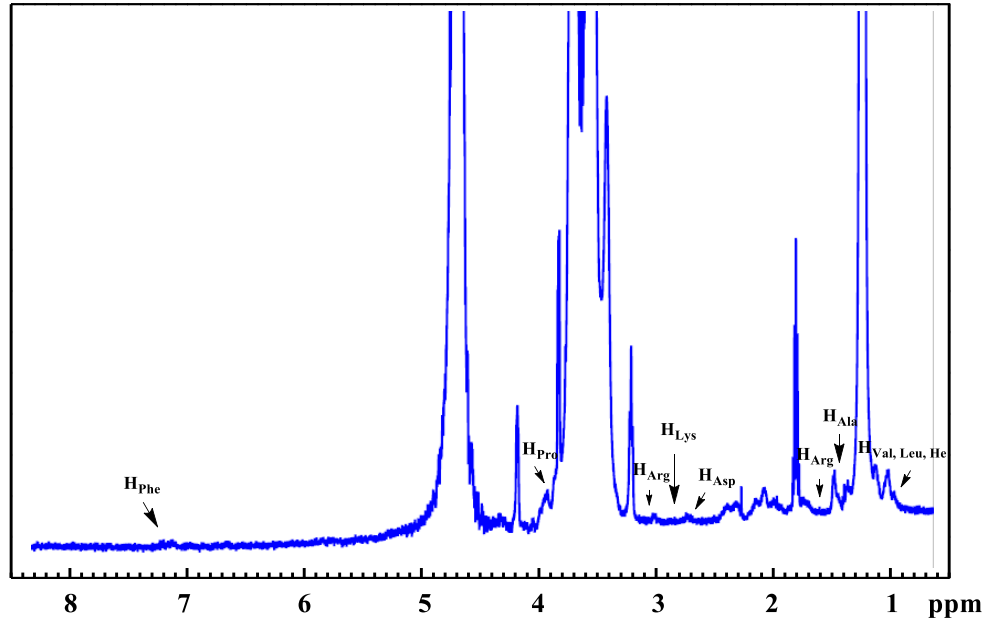
**Bảng 3.2. Kết quả phổ FT-IR của NPC-F127-OH, Gelatin và GP-F127**

Nhóm chức	Số sóng ( $\text{cm}^{-1}$ )		
	NPC-F127-OH	Gelatin	GP-F127
-OH	3453	3567	3567
-C-H (-CH <sub>2</sub> và -CH <sub>3</sub> )	2972-2887		2972-2887
C-O-C (F127)	1107		1107
-NO <sub>2</sub> (NPC)	1593		
-COO-NPC	1769		
-NHCOO-			1659



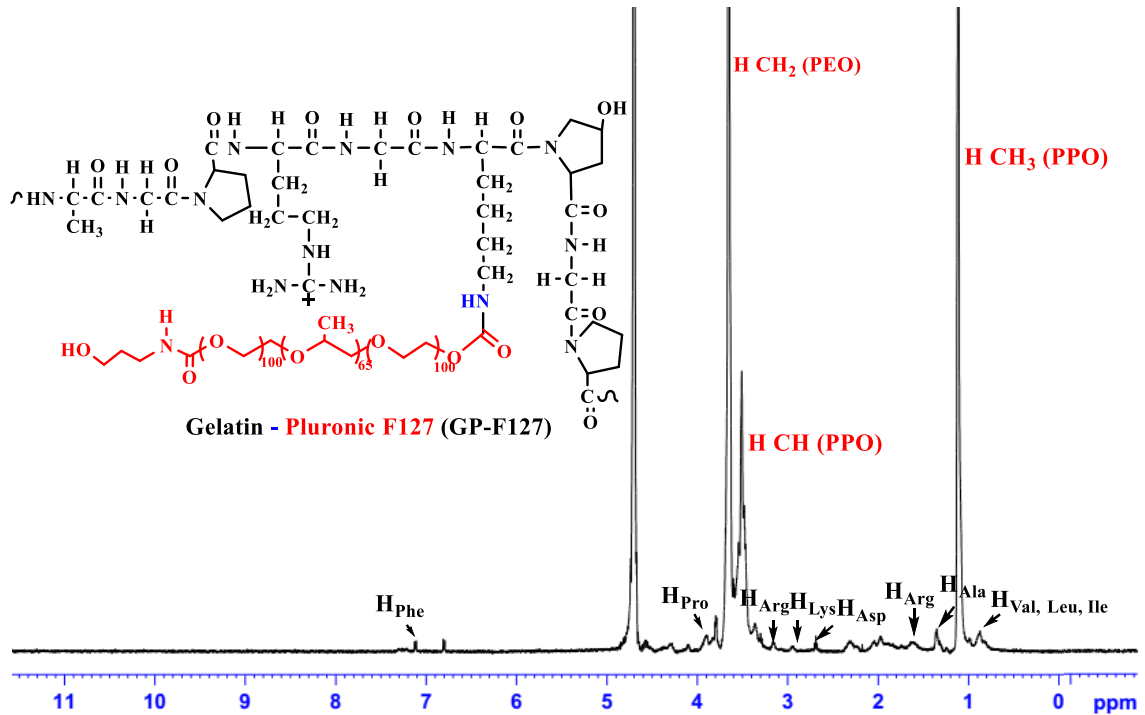
Phổ đồ của gelatin (hình 3.5) có các peak dao động đặc trưng như tín hiệu peak ở số sóng  $3567\text{ cm}^{-1}$  là dao động hóa trị -OH trên gelatin;  $\text{HNC=O}$  ở  $1690\text{ cm}^{-1}$ , dao động giãn của liên kết C-O và dao động uốn C-H vòng thơm ở  $1233\text{ cm}^{-1}$  và  $1030\text{ cm}^{-1}$ , dao động uốn ngoài mặt phẳng C-H vòng thơm ở  $876\text{ cm}^{-1}$  và  $712\text{ cm}^{-1}$ . GP-F127 có những mũi hấp thụ tại vùng  $1297,96 - 1659,05\text{ cm}^{-1}$  đặc trưng cho dao động của các amide bậc 1, 2, 3 trên chuỗi gelatin, các tín hiệu này không xuất hiện trong phổ FT-IR của NPC-F127-OH, do phản ứng được tạo thành từ nhóm ( $-\text{NH}_2$ ) trên mạch gelatin và nhóm ( $-\text{C=O}$ ) của sản phẩm trung gian NPC-F127-OH khi tổng hợp GP-F127. Từ các dữ liệu này có thể khẳng định pluronic F127 đã được ghép thành công vào mạch phân tử gelatin.

*b. Kết quả phân tích  $^1\text{H-NMR}$  của GP-F127*



**Hình 3.6: Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của gelatin**

Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của gelatin trong  $\text{D}_2\text{O}$  (hình 3.6) cho các tín hiệu đặc trưng của các amino acid trong gelatin: tín hiệu 4,58 ppm của ( $-\text{CH}-$ , proline); tín hiệu 4,27 ppm của ( $-\text{CH}-$ , hydroxyproline); tín hiệu 3,88 ppm ( $-\text{CH}-$ , alanine); tín hiệu 1,34 ppm của ( $-\text{CH}_3$ , alanine); tín hiệu 3,57 ppm của ( $-\text{CH}_2-$ , glycine); tín hiệu 2,23 ppm của ( $-\text{CH}_2-$ , glutamic acid); tín hiệu 1,60 ppm của ( $-\text{CH}_2-$ , arginine); tín hiệu 3,14 ppm của nhóm ( $-\text{CH}_2-$ , phenylalanine); tín hiệu 7,20 ppm, 7,23 ppm và 7,29 ppm của ( $-\text{CH}-$ , phenylalanine) (Phụ lục 17).



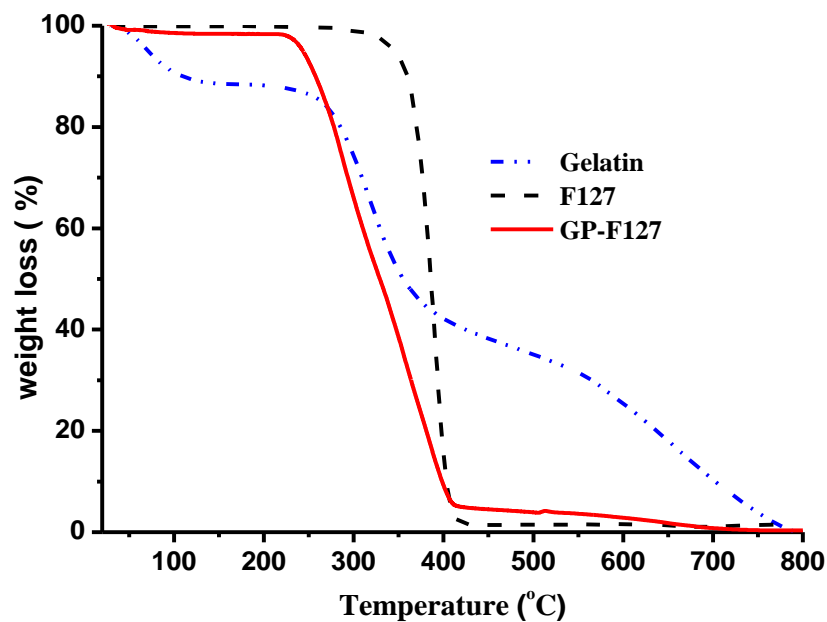
**Hình 3.7. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của GP-F127**

Gelatin ghép cặp với NPC-F127-OH bằng liên kết urethane giữa nhóm amine của gelatin với một đầu NPC còn lại của hợp chất NPC-F127-OH. Phổ đồ của copolymer gelatin-pluronic (GP-F127) có các tín hiệu proton có trong gelatin như mũi đơn ở vị trí 4,8 ppm (proton vị trí aromatic carbon của gelatin) và các mũi đặc trưng khác ở vị trí 0,8 – 4,6 ppm (proton của các nhóm alkyl của gelatin), tín hiệu 7,23 – 7,29 ppm cho thấy có proton liên kết với carbon vòng benzen của phenylalanine và một số proton khác của các acid amin trong gelatin được thể hiện ở hình 3.7. Các proton phần PPO của F127 (–CH<sub>3</sub>) ở vị trí 1,08 ppm và (–CH<sub>2</sub>) phần PEO ở vị trí 3,6 ppm) cũng xuất hiện trong phổ đồ. Bên cạnh đó, có sự triệt tiêu các mũi tín hiệu của p-NPC ở vị trí 7,39 và 8,28 ppm (hình 3.4, phổ  $^1\text{H-NMR}$  của NPC-F127-OH) đã chứng tỏ có sự thay thế đầu NPC bởi nhóm amin bậc I của gelatin để tạo thành copolymer GP. Phổ đồ còn cho thấy số proton trong pluronic F127 nhiều nên cường độ tín hiệu trong phổ phần lớn là của F127.

### 3.1.1.3. Kết quả phân tích TGA của GP-F127

Sự ổn định nhiệt của các copolymer ghép GP-F127 cùng với gelatin và pluronic F127 được phân tích bằng phép đo TGA để nghiên cứu đặc tính nhiệt của các sản phẩm.

Mẫu được sử dụng trong 10 mg, ở nhiệt độ 25 °C – 800 °C với tốc độ 10 °C/phút, dưới điều kiện khí nitrogen.



**Hình 3.8. Kết quả TGA của F127, gelatin và các copolymer ghép GP-F127**

Hình 3.8 cho thấy sự suy giảm khối lượng của gelatin nguyên chất xảy ra với ba giai đoạn trong quá trình phân tích nhiệt. Tại khoảng nhiệt độ gây suy giảm khối lượng đầu tiên, 120 – 140 °C, được giải thích do sự mất nước (ở dạng tự do) trong mẫu vì cấu trúc phân tử gelatin chứa nhiều nhóm chức ái nước như –OH, =O của acid cacboxylic. Các khoảng nhiệt độ phân hủy còn lại 200 – 420 °C và 500 – 800 °C do cấu trúc không gian ba chiều (3D) bị phá vỡ kết hợp quá trình phân hủy mẫu bởi nhiệt [140].

Nhiệt độ phân hủy các copolymer ghép có đoạn cuối cao hơn so với pluronic nguyên chất, điều này cho thấy gelatin góp phần làm tăng tính ổn định của cấu trúc copolymer. Cụ thể, nhiệt độ phân hủy các pluronic ở khoảng 420 °C, trong khi nhiệt phân hủy các copolymer ghép có khoảng nhiệt độ lên đến 550 – 800 °C.

Hiệu suất phản ứng ghép gelatin-pluronic được tính toán bằng tỷ lệ phần trăm trọng lượng suy giảm mẫu copolymer tổng hợp (GP-F127) tại điểm 420 °C khi pluronic đã bị phân hủy hoàn toàn cùng với một lượng gelatin, lượng mẫu còn lại và tiếp tục bị phân hủy ở nhiệt độ cao hơn là của gelatin nguyên chất. Dữ liệu này cho phép tính hiệu suất ghép theo công thức được báo cáo bởi Kang và các cộng sự [81]. Áp dụng với (GP) ở tỷ

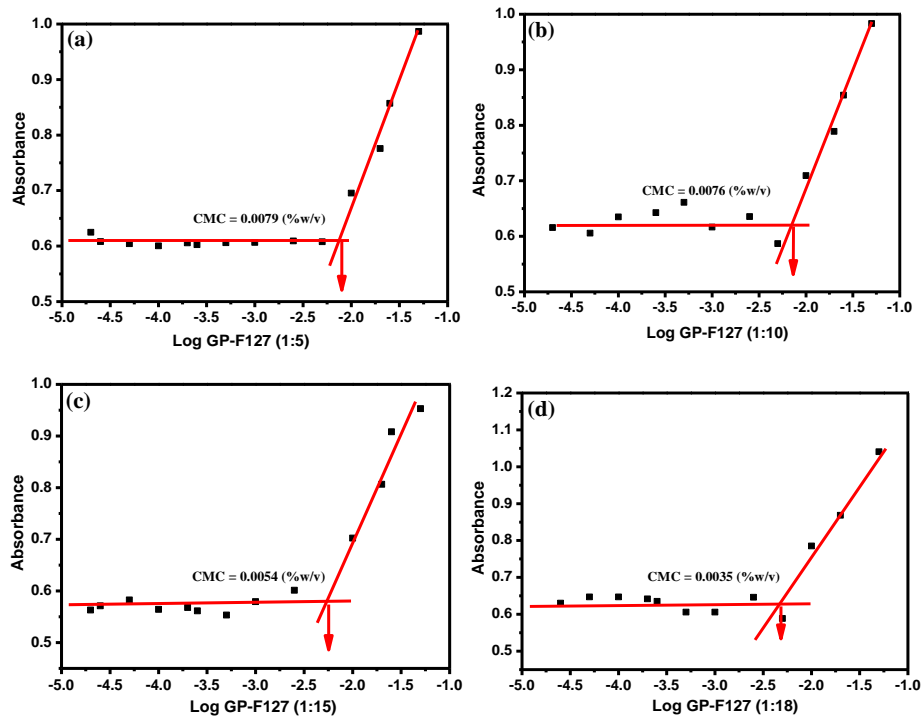
lệ GP-F127 (1:18), tính được lượng gelatin và pluronic F127 có trong hệ copolymer lần lượt là 10,17% và 89,83%, tương ứng tỷ lệ 1,17:8,83. Hiệu suất tổng hợp copolymer này được tính:

$$H\% = \frac{1,17 + 8,83}{1 + 18} \times 100\% = 52,63\%$$

#### 3.1.1.4. Kết quả phân tích giá trị CMC của GP-F127

Các copolymer lưỡng tính có thể tự lắp ráp để hình thành micelle, trong đó copolymer pluronic F127 được biết với cấu trúc khối PPO kỵ nước và khối PEO ưa nước có thể dễ dàng hình thành micelle trong dung dịch nước [141, 142].

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng iodine và phương pháp quang phổ UV-Vis để xác định sự hình thành nanogel của các copolymer ghép trên cơ sở gelatin liên hợp pluronic F127 (GP-F127) thông qua giá trị nồng độ tạo micelle tới hạn (CMC) của các copolymer ghép GP-F127 trong nước DI. CMC là một tham số đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành micelle của các copolymer lưỡng tính để phân phối thuốc. Sự hình thành micelle nhờ vào tương tác kỵ nước có giá trị trong việc cân bằng sự ổn định và giải phóng thuốc [143].



**Hình 3.9. Kết quả đo CMC của các copolymer ghép GP-F127**

Trong thực nghiệm này, giá trị CMC được xác định bằng cách sử dụng iodine đóng vai trò như đầu dò kỵ nước. Iodine được hòa tan trong dung dịch sẽ tham gia vào môi trường kỵ nước của pluronic F127 gây ra sự dịch chuyển  $I_3^-$  thành  $I_2$  từ KI dư có trong dung dịch. CMC được tính bằng cách vẽ cường độ hấp thụ của  $I_2$  so với log của nồng độ polymer (% wt).

Hình 3.9 thể hiện cường độ hấp thụ của iodine bắt đầu tăng đáng kể ở giá trị nồng độ ghép GP-F127 từ 0,035 – 0,079%wt, chỉ ra rằng các phân tử iodine bắt đầu hòa tan trong vùng kỵ nước PPO của pluronic F127. Điều này cho thấy, ở nồng độ này các copolymer ghép GP-F127 đã tự lắp ráp để hình thành mạng lưới polymer liên kết ngang dưới dạng một nanogel có thể hoạt động như chất mang thuốc kỵ nước. Trên giá trị nồng độ này, cường độ hấp thụ của iodine sẽ tăng dần khi tăng nồng độ polymer. Đồng thời cấu trúc tự lắp ráp của copolymer ghép GP-F127 cũng sẽ khác hơn nhiều so với cấu trúc micelle của pluronic F127, sự hình thành mạng lưới polymer liên kết ngang của nanogel GP-F127 không chỉ nhờ vào tương tác kỵ nước giữa các khối PPO, mà còn là sự tập hợp sắp xếp không đồng đều giữa các khối kỵ nước PPO và khối ưa nước PEO được liên kết với chèn gelatin ưa nước bằng liên kết hydro hoặc tương tác tĩnh điện. Cấu trúc độc đáo này có thể giúp cho nanogel có độ ổn định cao và trở thành hệ mang thuốc lý tưởng [81, 144-146].

Mặt khác, giá trị CMC của các nanogel GP-F127 còn liên quan đến tỉ lệ giữa chiều dài chuỗi ưa nước và kỵ nước trong cấu trúc của copolymer ghép [147]. Giá trị CMC của dung dịch F127 tinh khiết là 0,0035%wt [81]. Trong khi đó giá trị CMC của các copolymer ghép đo được từ 0,035 - 0,079%wt lớn hơn so với giá trị CMC của F127 nguyên chất, cho thấy sự có mặt của gelatin sẽ làm tăng phần ưa nước của copolymer ghép dẫn đến làm tăng giá trị CMC của dung dịch mẫu [81, 144-146, 148]. Sự khác biệt về giá trị CMC của các nanogel GP-F127 và pluronic F127 cũng có thể giúp tăng hiệu quả mang thuốc kỵ nước của các nanogel.

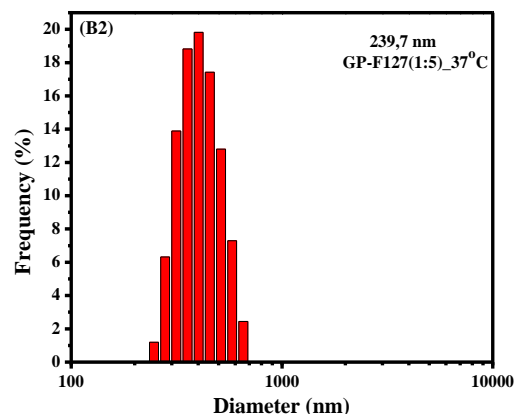
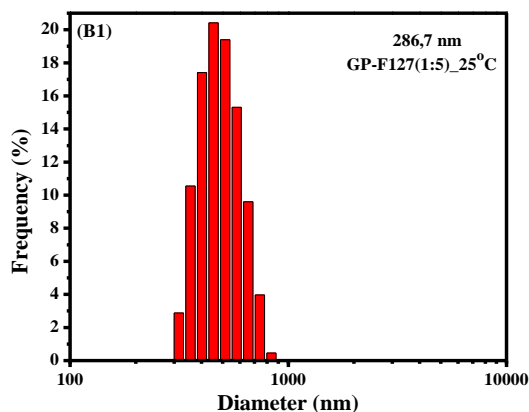
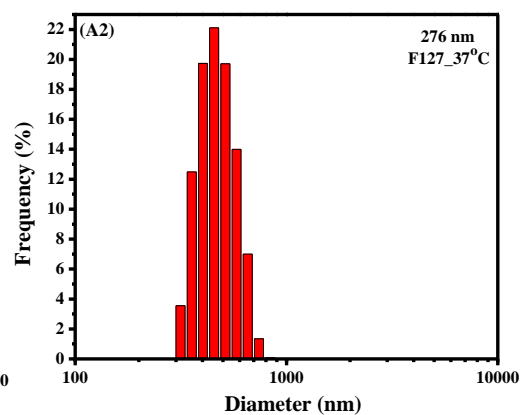
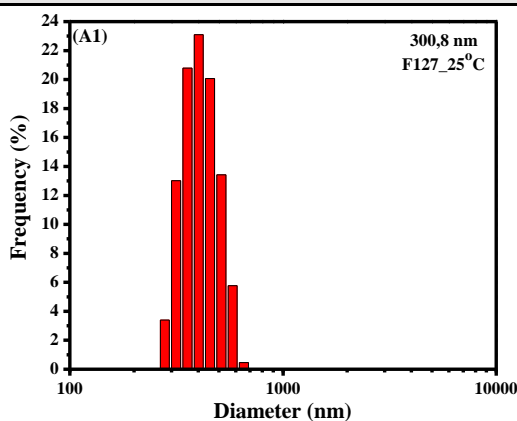
### 3.1.1.5. Kết quả phân tích thế zeta và kích thước hạt của GP-F127

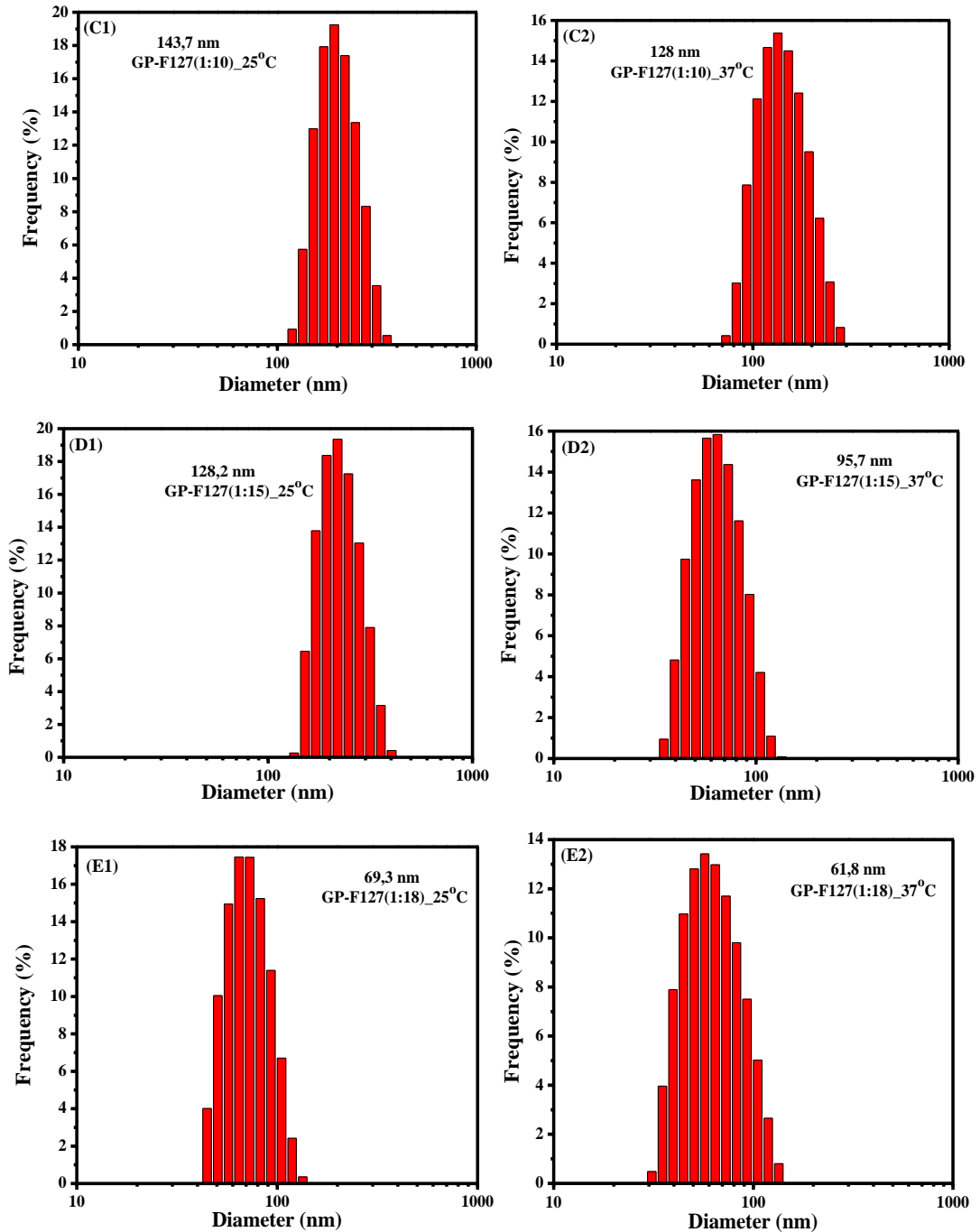
Trong mục tiêu tổng hợp hệ mang thuốc dựa trên tương tác tĩnh điện giữa vật liệu mang và phân tử thuốc thì thông số Zeta của vật liệu đóng vai trò quan trọng, thông số

này lại được quyết định bởi các trung tâm mang điện tích trong cấu trúc phân tử của chúng và phản ánh khả năng tăng hoặc giảm lượng thuốc được mang.

**Bảng 3.3. Kích thước của nanogel GP-F127 đo bằng kỹ thuật DLS**

Mẫu	DLS (nm)	PDI	DLS (nm)	PDI
	25 °C		37 °C	
F127	303,5 ± 3,41	0,48 ± 0,05	278,46 ± 4,73	0,69 ± 0,18
GP-F127 (1:5)	285,4 ± 2,72	0,46 ± 0,04	239,71 ± 3,15	0,57 ± 0,15
GP-F127 (1:10)	145 ± 2,98	0,43 ± 0,1	127,13 ± 3,27	0,43 ± 0,05
GP-F127 (1:15)	126,7 ± 2,65	0,37 ± 0,06	93,82 ± 2,82	0,39 ± 0,04
GP-F127 (1:18)	68,5 ± 1,23	0,29 ± 0,09	62,49 ± 1,16	0,27 ± 0,06





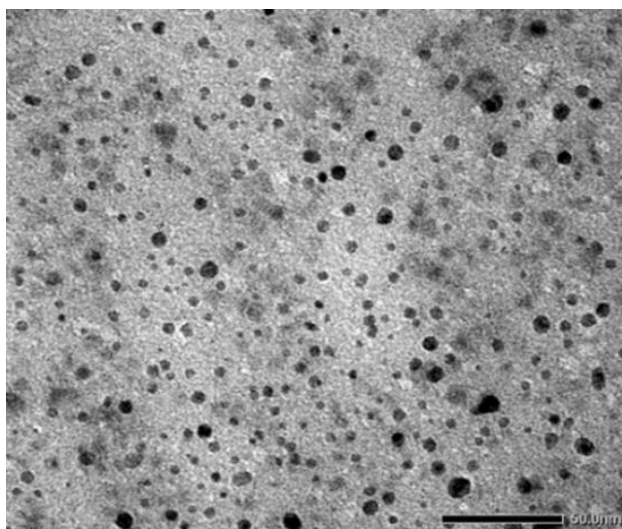
**Hình 3.10. Kết quả DLS ở hai nhiệt độ của: F127 (A); GP-F127 (1:5) (B); GP-F127 (1:10) (C); GP-F127 (1:15) (D); GP-F127 (1:18) (E)**

Hình thái và sự phân bố kích thước của các nanogel GP-F127 có thể được quan sát bởi kết quả DLS. Kết quả DLS của các các nanogel GP-F127 được thể hiện qua hình 3.10 và thống kê qua bảng 3.3.

Kết quả TEM cho thấy kích thước của micelle pluronic F127 từ  $24,5 \pm 7,82$  nm, và có dạng hình cầu (hình 3.11), trong khi đó kích thước trung bình của các nanogel GP-F127 từ 58-206 nm theo TEM (bảng 3.4 và hình 3.12) lớn hơn so với kích thước của micelle pluronic F127. Kết quả DLS của các nanogel GP-F127 từ 68-285 nm (hình 3.10 và bảng 3.3) nhỏ hơn nhiều kích thước micelle pluronic F127. Kích thước nanogel đo bằng DLS lớn hơn TEM do sự hydrat hóa của PEO (F127) trong nước làm cấu trúc nanogel tăng đáng kể, trong khi TEM thể hiện trạng thái tĩnh của vật liệu.

**Bảng 3.4. Thế Zeta và kích thước của nanogel GP-F127 đo bằng kỹ thuật TEM**

Mẫu	TEM (nm)	Thế zeta (mV)
Gelatin	--	$21,53 \pm 0,31$
F127	$24,5 \pm 7,82$	$-22,67 \pm 0,21$
GP-F127 (1:5)	$205,9 \pm 6,74$	$15,14 \pm 0,42$
GP-F127 (1:10)	$142,8 \pm 7,19$	$11,71 \pm 0,29$
GP-F127 (1:15)	$98,6 \pm 7,05$	$9,5 \pm 0,71$
GP-F127 (1:18)	$58,4 \pm 6,44$	$7,76 \pm 0,22$

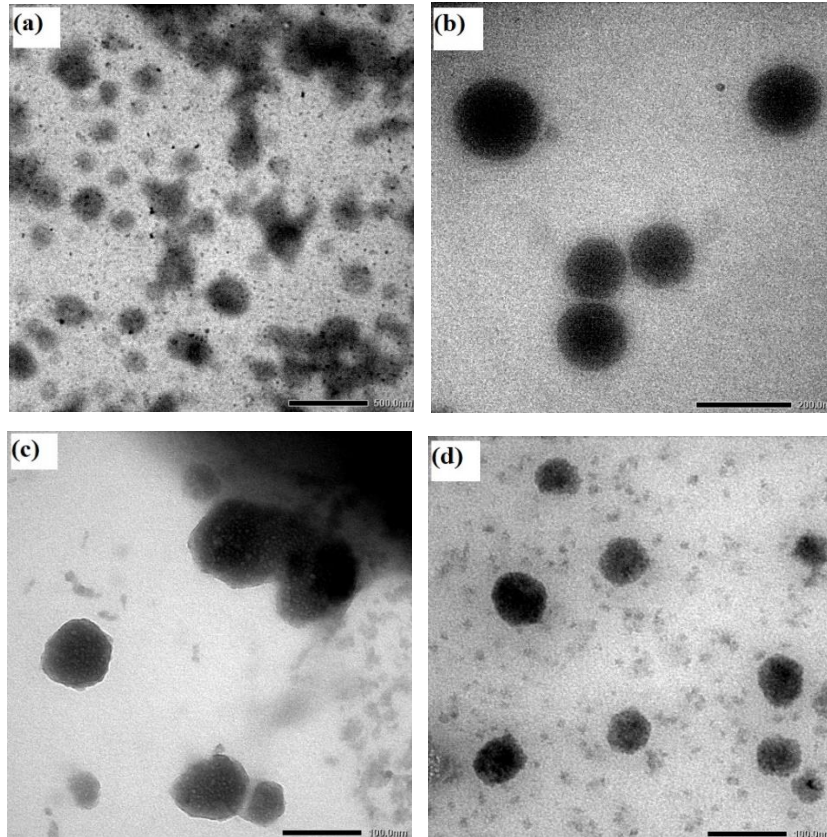


**Hình 3.11. Kết quả TEM của pluronic F127**

Kết quả đo kích thước hạt của GP-F127 giảm dần khi tăng tỷ lệ ghép, điều này chỉ ra rằng khi các phân tử F127 được ghép vào gelatin, ở nồng độ CMC các copolymer tự lắp ráp để hình thành nanogel với cấu trúc mạng lưới bên trong có sự tập hợp sắp xếp không đồng đều của nhiều chuỗi polymer, dẫn đến vùng cấu trúc không gian bên trong chứa



nhiều PPO(F127), hệ ghép càng nhiều F127 vùng kỵ nước càng lớn tương tác tĩnh điện giữa gelatin và pluronic F127 càng mạnh, khi đó hệ nanogel sẽ tụ lại với nhau làm cho kích thước tròn, nhỏ.

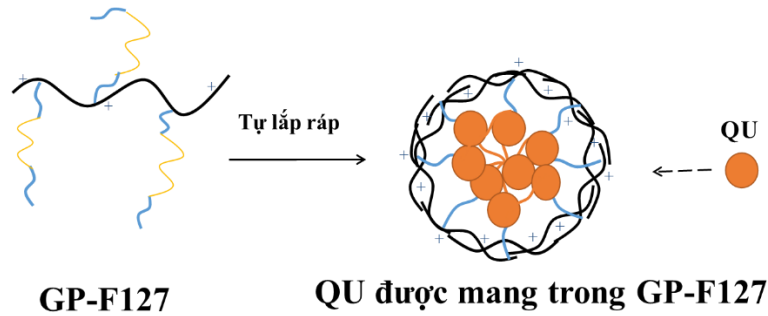


**Hình 3.12. Kết quả TEM của (a): GP-F127 (1:5); (b): GP-F127 (1:10); (c): GP-F127 (1:15); (d): GP-F127 (1:18)**

Hình 3.12 và bảng 3.4 còn cho thấy các hạt nanogel GP-F127 có dạng hình cầu (TEM), với sự phân bố kích thước hạt trung bình trong khoảng từ  $68,5 \pm 1,23$  nm đến  $285,4 \pm 2,72$  nm bằng DLS, ở  $25^\circ\text{C}$  và phụ thuộc vào lượng pluronic F127 được liên hợp. Khi lượng pluronic F127 ghép vào gelatin tăng làm kích thước hạt của nanogel GP-F127 giảm theo, một phần là do pluronic F127 có sự tích điện âm ( $-23$  mV), trong cấu trúc của nanogel GP-F127 chứa gelatin dương điện ( $+22$  mV) do chứa số lượng các nhóm amin trong cấu trúc phân tử, vì vậy có thể tạo ra lực tương tác tĩnh điện các nhóm tích điện dương có trên sườn gelatin và F127.

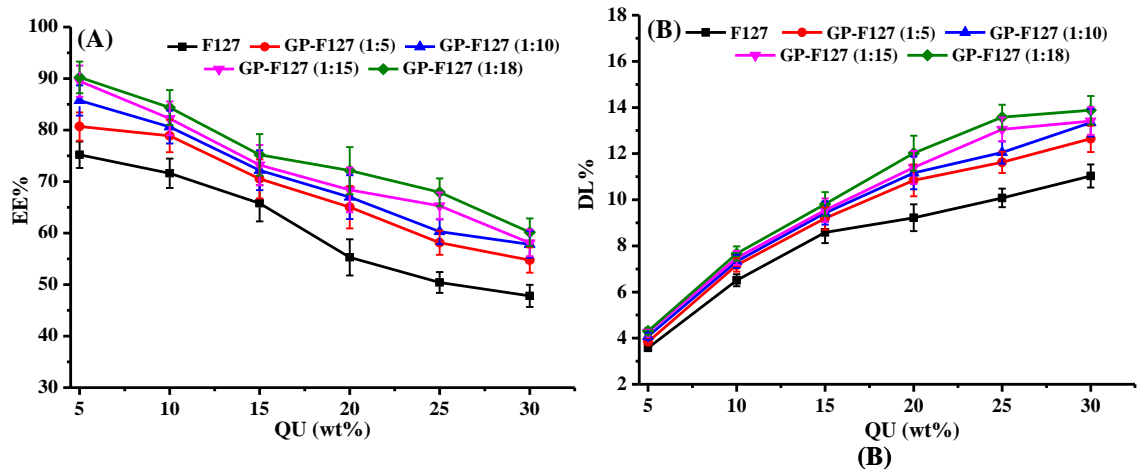
### **3.1.2. Kết quả tổng hợp nanogel GP-F127 mang QU và PTX**

#### **3.1.2.1. Kết quả tổng hợp nanogel GP-F127 mang QU**



**Hình 3.13. Nanogel GP-F127 mang QU**

Các copolymer GP-F127 mang QU thông qua tương tác kỵ nước (PEO) và tương tác tĩnh điện giữa nhóm mang điện tích dương trên sườn gelatin với QU. Trong dung dịch nước, hệ nano mang QU tự lắp ráp nhờ vào 2 tương tác hình thành hệ nanogel mang QU (hình 3.13). Sự nang hóa QU trong hệ nanogel giúp khắc phục hạn chế do đặc tính kỵ nước của QU, từ đó làm tăng hiệu quả điều trị của hoạt chất này.



**Hình 3.14. Kết quả mang QU vào F127 và GP-F127**

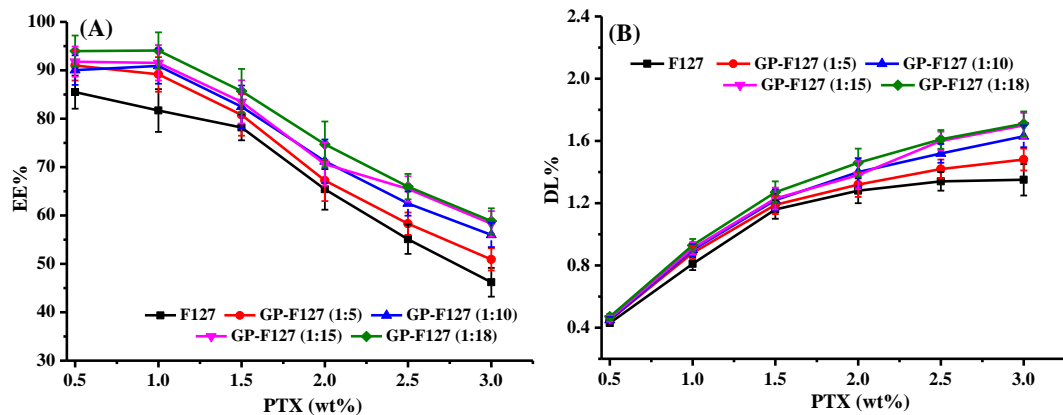
*(EE: Hiệu quả mang QU (A) và DL: Hiệu suất tải QU (B))*

Thí nghiệm khảo sát khả năng mang QU của pluronic F127 và nanogel tổng hợp từ gelatin ghép pluronic F127 ở một số tỷ lệ khác nhau tại các nồng độ QU biến đổi trong khoảng 5,0 – 30,0%wt. Kết quả thí nghiệm thu được cho thấy, với pluronic F127 hay các copolymer GP-F127 ở các tỷ lệ khác nhau đều cho giá trị EE giảm và DL tăng dần khi tăng nồng độ QU. Dựa vào hai giá trị EE và DL có thể lựa chọn được nồng độ QU tối ưu. Kết quả cũng cho thấy pluronic F127 luôn cho hiệu quả mang QU kém hơn so với các copolymer của chúng với gelatin (GP-F127) và hiệu quả luôn cao nhất với tỷ lệ

GP-F127 (1:18), là tỷ lệ cung cấp nhiều nhất nhóm kỵ nước PPO của F127 so với các tỷ lệ thấp hơn trong thí nghiệm. Ở tất cả các nồng độ thí nghiệm của QU, giá trị EE và DL của GP-F127 (1:18) luôn lớn nhất, ví dụ, EE đạt hơn 85%, DL đạt gần 8% ở giá trị nồng độ của QU là 10% wt. Điều này được giải thích do QU khi được nang hóa vào hạt nanogel F127 chỉ do tương tác kỵ nước, trong khi QU có tương tác với hạt nanogel GP-F127 bằng cả hai tương tác kỵ nước và tương tác tĩnh điện.

### 3.1.2.2. Kết quả tổng hợp nanogel GP-F127 mang PTX

Trong phạm vi nghiên cứu, paclitaxel (PTX) được hòa tan hoàn toàn trong ethanol với tỷ lệ mẫu PTX khô trên dung môi là 1 mg/5mL.



**Hình 3.15. Kết quả mang PTX vào F127 và GP-F127**

(EE: Hiệu quả mang PTX (A) và DL: Hiệu suất tải PTX (B))

Hình 3.15 biểu diễn kết quả khảo sát khả năng tải PTX của F127 và GP-F127. Nồng độ PTX khảo sát từ 0,5 đến 3% wt PTX so với toàn bộ vật liệu mang.

Giá trị EE giảm dần và DL tăng dần khi tăng nồng độ PTX trong khoảng giá trị 0,5 – 3%. Mục tiêu chính của nghiên cứu là hướng tới giảm độc tính của thuốc PTX, tăng thời gian lưu giữ, tăng sinh khả dụng và tăng độ phân tán trong môi trường sinh lý, vì vậy lượng PTX được nang hóa một cách tối đa hay giá trị DL cao không phải là mục tiêu quan trọng nhất của đề tài. Thay vào đó, thông số EE được quan tâm hơn. Các micelle của pluronic tạo vỏ bọc các thuốc kỵ nước trong cấu trúc của nó, giữ thuốc tránh khỏi cơ chế kháng thuốc của tế bào – một trong những nguyên nhân chính gây ra sự thất bại khi sử dụng thuốc điều trị các bệnh ung thư.

Kết quả cho thấy khi lượng pluronic F127 được ghép vào gelatin càng nhiều sẽ tạo ra tương tác kỵ nước trên phân tử GP-F127 càng lớn làm cho kết quả mang PTX cao hơn so với pluronic F127, cụ thể: GP-F127 (1:18) > GP-F127 (1:15) > GP-F127 (1:10) > GP-F127 (1:5) > F127. Nhìn chung, phần trăm PTX được mang vào trong nanogel GP-F127 thông qua tương tác kỵ nước tăng tương ứng với sự tăng tương tác kỵ nước trên phân tử GP-F127. Kết quả này khớp với các nghiên cứu trước đây, trong đó dendrimer liên hợp nhiều pluronic ưa dầu sẽ mang được nhiều thuốc chống ung thư kỵ nước [113]. Bên cạnh đó, trên mạch cấu trúc của gelatin có chứa các nhóm amin, các nhóm này sẽ tạo tương tác tĩnh điện với PTX. Nhờ có hai tương tác cùng ảnh hưởng nên khả năng mang PTX của GP-F127 hơn pluronic F127.

Từ kết quả khảo sát thực nghiệm khả năng mang thuốc của các nanogel GP-F127, chúng tôi tiến hành chọn hệ nanogel GP-F127 (1:18) có hiệu quả mang QU/PTX cao nhất để tiếp tục đánh giá và so sánh với các hệ nanogel GP khác.

### **3.2. Kết quả tổng hợp và khảo sát nanogel GP-P123, GP-F87, GP-F68 so sánh với GP-F127**

Từ kết quả mang thuốc của các hệ chất mang GP-F127 với 4 tỉ lệ ghép khác nhau (1:5; 1:10; 1:15; 1:18) cho thấy GP-F127 (1:18) cho kết quả tốt nhất, chúng tôi tiếp tục tiến hành tổng hợp các nanogel trên cơ sở gelatin ghép với các pluronic khác nhau gồm P123, F87 và F68 để so sánh (số liệu tại bảng 2.2).

Cấu trúc của các copolymer ghép GP-P123, GP-F87 và GP-F68 được xác định bằng quang phổ hồng ngoại FT-IR, phổ cộng hưởng từ hạt nhân  $^1\text{H-NMR}$ , TGA, TEM, DLS và giá trị CMC.

#### **3.2.1. Kết quả xác định thành phần, cấu trúc các copolymer GP-P123, GP-F87 và GP-F68**

Để tổng hợp GP-P123, GP-F87 và GP-F68 cần phải hoạt hóa hai nhóm -OH cuối của pluronic P123, F87 và F68 bởi *p*-nitrophenyl chloroformate tạo sản phẩm trung gian NPC-P123-NPC, NPC-F87-NPC, NPC-F68-NPC.

Phản ứng tạo liên kết urethane từ nhóm  $-NH_2$  trên phân tử 3-aminopropanol với nhóm  $C=O$  của sản phẩm trung gian NPC-P123-NPC, NPC-F87-NPC, NPC-F68-NPC tạo sản phẩm NPC-P123-OH, NPC-F87-OH, NPC-F68-OH

Sau cùng nhóm  $-NH_2$  trên phân tử gelatin sẽ tấn công vào liên kết  $-C=O$  của hợp chất NPC-P123-OH, NPC-F87-OH, NPC-F68-OH bằng phản ứng urethane tạo sản phẩm GP-P123, GP-F87 và GP-F68.

### *3.2.1.1. Kết quả phân tích phổ FT-IR và $^1H$ -NMR của sản phẩm trung gian NPC-P123-NPC, NPC-P123-OH, NPC-F87-NPC, NPC-F87-OH, NPC-F68-NPC, NPC-F68-OH*

Thành phần, cấu trúc các sản phẩm trung gian NPC-P123-NPC, NPC-P123-OH, NPC-F87-NPC, NPC-F87-OH, NPC-F68-NPC, NPC-F68-OH được xác định bằng quang phổ hồng ngoại FT-IR và phổ cộng hưởng từ hạt nhân  $^1H$ -NMR.

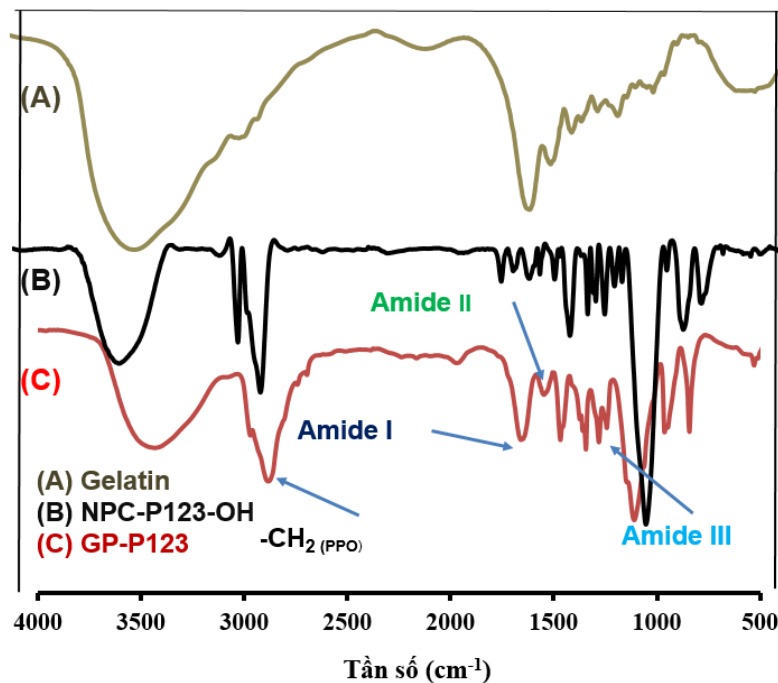
Kết quả phân tích phổ FT-IR của các sản phẩm NPC-P123-NPC, NPC-P123-OH, NPC-F87-NPC, NPC-F87-OH, NPC-F68-NPC, NPC-F68-OH cho kết quả tương tự phổ FT-IR của NPC-F127-NPC và NPC-F127-OH được thể hiện ở phụ lục 1,2,3,4.

Thành phần, cấu trúc của các sản phẩm NPC-P123-NPC, NPC-F87-NPC, NPC-F68-NPC được xác định bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân cũng cho kết quả tương tự với kết quả phổ cộng hưởng từ hạt nhân của NPC-F127-NPC được thể hiện ở phụ lục 5, 6, 7,8. Trên phổ đồ có các tín hiệu của các proton có trong pluronic P123, F87, F68 như: dao động đặc trưng proton của nhóm methyl  $-CH_3$  trên PPO của pluronic; dao động proton methylene  $-OCH_2-CH_2O-$  của PEO, hai tín hiệu đặc trưng của proton vòng thơm nhóm  $(-CH=CH-)$  của NPC [81, 136, 146]. Đặc biệt, sự xuất hiện của tín hiệu ở  $\delta_H = 4,43$  ppm được coi là tín hiệu proton methylene  $-CH_2-O-NPC$  liên kết trực tiếp với nhóm carbonate trên NPC. Độ hoạt hóa của các pluronic đạt trên 90% được tính từ tỷ lệ tích phân của proton thơm (NPC) và proton methyl (Pluronic F127) theo công thức của Thi Bich Tram Nguyen và Ngọc Quyên Tran [139]. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trước [81, 136, 146, 149].

Kết quả phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân của các sản phẩm NPC-P123-OH, NPC-F87-OH, NPC-F68-OH cũng cho kết quả tương tự với phổ đồ của NPC-F127-OH được thể hiện ở phụ lục 9,10,11,12. Trên phổ đồ ngoài các tín hiệu proton đặc trưng có

trong pluronic P123, F87 và F68, có sự xuất hiện của tín hiệu proton methylene liên kết trực tiếp với nhóm carbonate của NPC tại  $\delta_H = 4,43$  ppm ( $-\text{CH}_2\text{-O-NPC}$ ) dịch chuyển một phần đáng kể về vùng  $\delta_H = 4,22$  ppm, đây là tín hiệu proton methylene liên kết trực tiếp với nhóm carbonate của 3-aminopropanol ( $-\text{CH}_2\text{-O-Ami}$ ), do phản ứng thay thế một gốc NPC bằng 3-aminopropanol. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trước [81, 149] Khoảng 50% gốc NPC đã được thay thế bởi 3-aminopropanol, được tính từ phép tính tỷ lệ tích phân của proton trên NPC và proton của Ami, theo báo cáo của Thi Bích Tram Nguyen và Ngoc Quyen Tran [139].

### 3.2.1.2. Kết quả phân tích phổ FT-IR và $^1\text{H-NMR}$ của GP-P123, GP-F87 và GP-F68



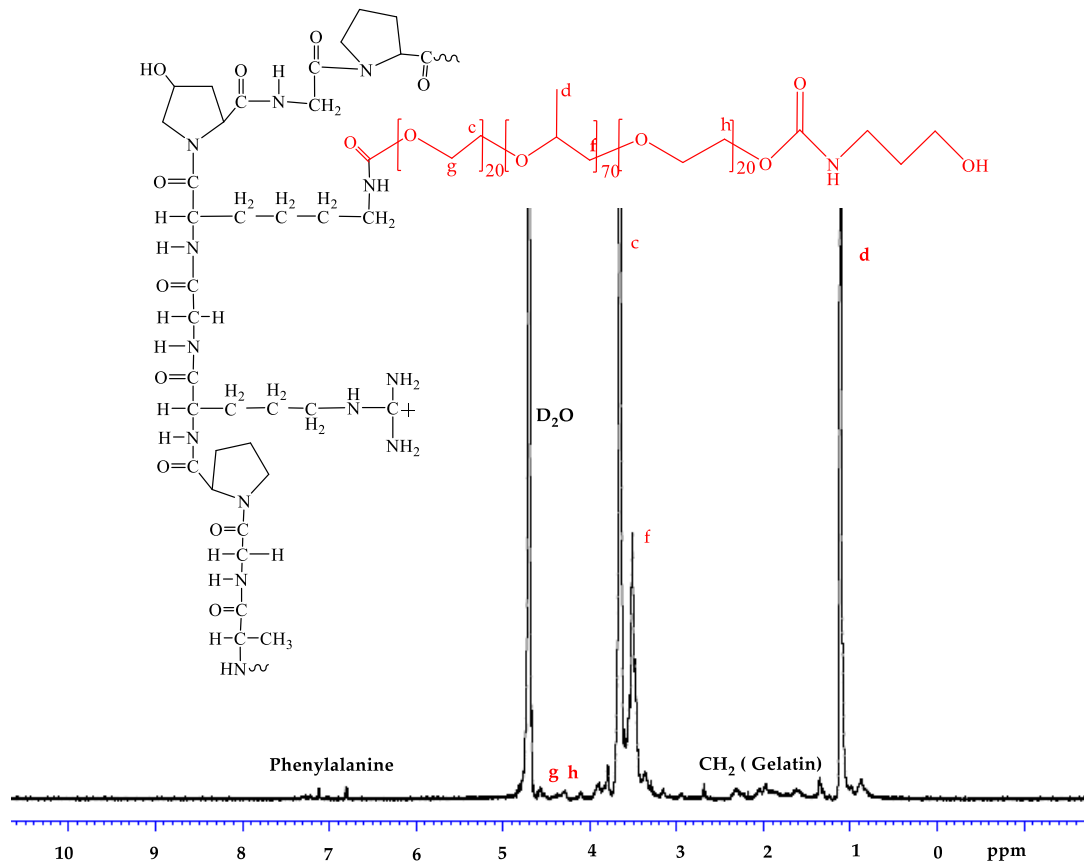
**Hình 3.16. Phổ FT-IR của gelatin và GP-P123**

Phổ FT-IR của gelatin (hình 3.16, bảng 3.5) có các dao động đặc trưng như tín hiệu ở số sóng  $3492\text{ cm}^{-1}$  là dao động hóa trị của  $-\text{OH}$  trên phân tử gelatin; dao động hóa trị  $\text{C}=\text{O}$  của acid carboxylic xuất hiện ở  $1641\text{ cm}^{-1}$  chỉ ra sự có mặt của acid trong phân tử gelatin. GP-P123 có các mũi hấp thụ tại vùng  $1297,96 - 1659,05\text{ cm}^{-1}$  đặc trưng cho dao động của các amide bậc 1, 2, 3 trên chuỗi gelatin, các tín hiệu này không xuất hiện trong phổ FT-IR của NPC-P123-OH, do phản ứng được tạo thành từ nhóm ( $-\text{NH}_2$ ) trên mạch gelatin và nhóm ( $-\text{C}=\text{O}$ ) của sản phẩm trung gian NPC-P123-OH khi tổng hợp GP-P123.

Từ dữ liệu này có thể khẳng định pluronic P123 được ghép thành công vào mạch phân tử gelatin. Khảo sát phổ FT-IR cũng cho thấy kết quả tương tự với pluronic F127.

**Bảng 3.5. Kết quả phổ FT-IR của NPC-P123-OH, Gelatin và GP-P123**

Nhóm chức	Số sóng (cm <sup>-1</sup> )		
	NPC-P123-OH	Gelatin	GP-P123
-OH	3453	3492	3492
-C-H (-CH <sub>2</sub> và -CH <sub>3</sub> )	2972-2887		2972-2887
C-O-C (P123)	1107		1107
-NO <sub>2</sub> (NPC)	1593		
-COO-NPC	1769		
-NHCOO-			1641



**Hình 3.17. Phổ <sup>1</sup>H-NMR của GP-P123**

Kết quả phân tích thành phần, cấu trúc GP-P123 được thể hiện qua phổ  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ppm) (hình 3.17). Phổ đồ xuất hiện các tín hiệu proton trên phân tử gelatin như: các tín hiệu 4,8 ppm (proton vị trí aromatic carbon của gelatin), các mũi đặc trưng khác ở vị trí 0,8 – 4,6 ppm (proton của các nhóm alkyl của gelatin). Đồng thời xuất hiện các tín hiệu proton đặc trưng trên phân tử P123 như:  $\delta\text{H} = 1,09$  ppm là dao động đặc trưng proton của nhóm methyl  $-\text{CH}_3$  (d) trên PPO;  $\delta\text{H} = 3,63\text{-}3,67$  ppm là dao động proton methylene  $-\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{O}-$  (f) của PEO.

Ngoài ra, trên phổ không còn xuất hiện các tín hiệu của proton thơm của NPC ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ ) ở  $\delta\text{H} = 7,38\text{-}7,40$  ppm và  $\delta\text{H} = 8,27\text{-}8,28$  ppm và tín hiệu proton methylene liên kết trực tiếp với nhóm carbonate của NPC tại  $\delta\text{H} = 4,43$  ppm ( $-\text{CH}_2\text{-O-NPC}$ ) đã biến mất, chỉ còn tín hiệu tại  $\delta\text{H} = 4,22$  ppm của proton methylene tại vị trí liên hợp với Ami ( $-\text{CH}_2\text{-O-Ami}$ ), chứng tỏ rằng 100% NPC đã bị loại bỏ trong quá trình hình thành GP-P123 bằng phản ứng nối giữa gelatin và NPC-P123-OH. Từ kết quả phổ FT-IR và phổ  $^1\text{H-NMR}$  cho thấy đã tổng hợp thành công GP-P123.

Kết quả phổ FT-IR,  $^1\text{H-NMR}$  của GP-P123, GP-F87 và GP-F68 cho kết quả tương tự với các phổ tương ứng của GP-F127 (phụ lục 13 – 16 và 18 – 21).

### 3.2.1.3. Kết quả phân tích TGA của GP-P123, GP-F87 và GP-F68

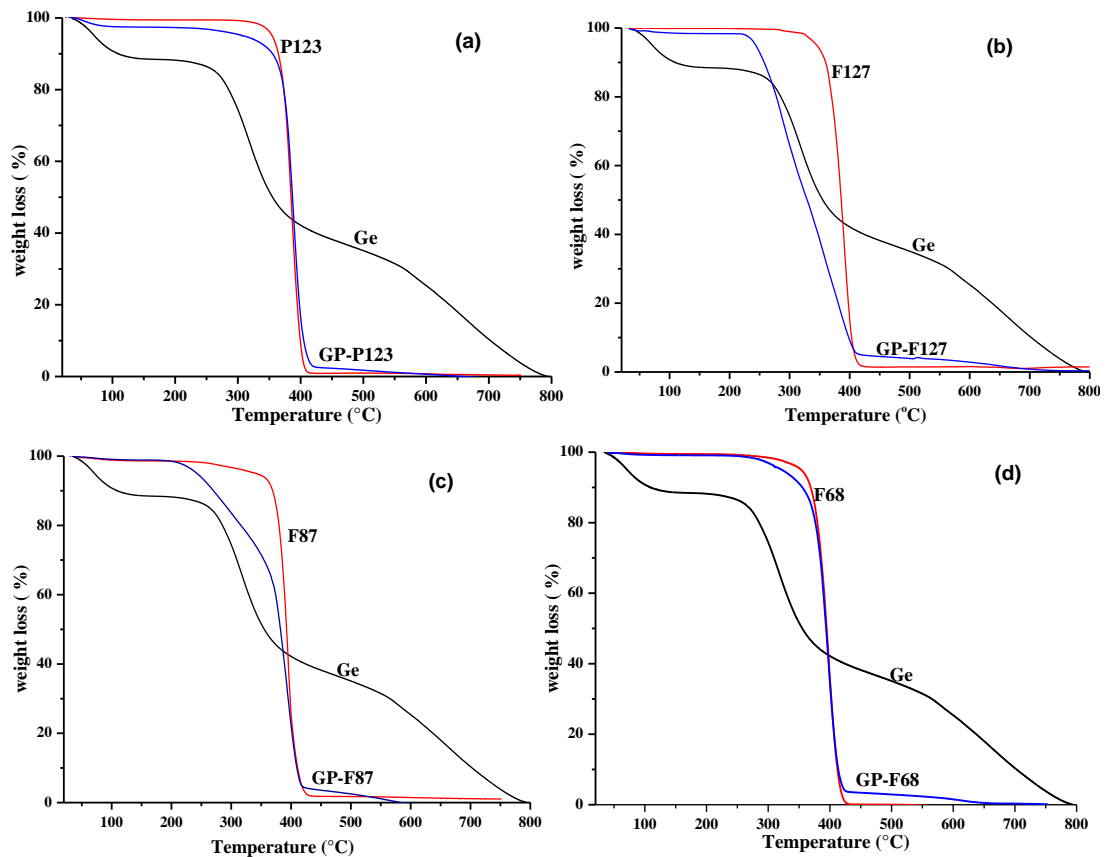
Sự ổn định nhiệt của các copolymer ghép GP-P123, GP-F87 và GP-F68 cùng với gelatin và các pluronic P123, F87, F68 được phân tích bằng phép đo TGA để nghiên cứu đặc tính nhiệt của các thành phần có trong copolymer ghép. Mẫu được sử dụng trong 10 mg mẫu, ở nhiệt độ  $25\text{ }^\circ\text{C} - 800\text{ }^\circ\text{C}$  với tốc độ  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{phút}$ , dưới điều kiện khí nitrogen.

Hình 3.18 cho thấy giản đồ TGA của cả 4 pluronic P123, F127, F87 và F68 đều ổn định ở nhiệt độ lên đến  $320\text{ }^\circ\text{C}$  và bắt đầu bị phân hủy ở nhiệt độ  $350\text{ }^\circ\text{C}$ , và tổng khối lượng sẽ bị mất hoàn toàn ở nhiệt độ trên  $420\text{ }^\circ\text{C}$ . TGA với Ge xảy ra với 3 giai đoạn trong khoảng nhiệt độ khảo sát. Giảm khối lượng đầu tiên ở khoảng  $120\text{-}140\text{ }^\circ\text{C}$ , ở giảm cấp đầu tiên chúng tôi gọi là sự loại bỏ nước trong cấu trúc, do cấu trúc của Ge chứa nhiều nhóm chức amin hay caboxylic, bản chất chúng rất ái nước, cấu trúc này khiến Ge giữ một lượng nước trong mình cộng thêm bản thân Ge cấu thành từ các axit amin nên công thức nhiều nhóm  $-\text{OH}$ ,  $=\text{O}$ . Giảm trọng lượng thứ hai bắt đầu ở khoảng  $200 - 420$



°C và giảm trọng lượng cuối cùng ở trên 500 °C kết thúc tại 800 °C, sự giảm trọng lượng từ trên 200 °C cho thấy cấu trúc Ge bị biến tính bởi nhiệt thông qua sự tương tác trong phân tử giữa các axit amin, chính các axit amin tạo thành cấu trúc 3D của Ge [140].

Kết quả không có sự khác biệt giữa các pluronic trong phân tích nhiệt TGA (hình 3.18). Bốn loại pluronic, P123 (hình 3.18a), F127 (hình 3.18b), F87 (hình 3.18c), F68 (hình 3.18d) đều cho thấy một bước giảm khối lượng duy nhất và nhiệt độ xảy ra bước chuyển nằm trong khoảng 300 – 410 °C.



**Hình 3.18. Kết quả TGA của P123, F127, F87, F68, gelatin và copolymer ghép GP**

Các kết quả chúng tôi thu được từ phân tích TGA phù hợp với các báo cáo trước đây liên quan đến sự phân hủy của polymer pluronic [81, 150, 151]. Các mẫu GP của từng pluronic cũng được quan sát qua kết quả đo TGA. Quan sát ta thấy có sự khác biệt giữa đường cong TGA của GP và pluronic cũng như Ge. Các đường cong TGA của tất cả các copolymer Ge lưỡng tính (GP-P123, GP-F127, GP-F87 và GP-F68) bị giảm khối lượng lớn nhất trong phạm vi nhiệt độ trên 250 °C. Sự khác biệt giữa các mẫu GP so với

pluronic cho thấy pluronic gắn thành công vào Ge hay kết quả này cũng ngụ ý sự hiện diện của Ge trong các copolyme ghép này, do có Ge nên có thể giải thích sự khác biệt trong kết quả phân hủy nhiệt của GP. Nói cách khác, sự có mặt của Ge đã giúp tăng tính ổn định nhiệt của pluronic làm cho hệ GP có nhiệt độ phân hủy cao hơn pluronic nguyên chất. Các kết quả TGA chỉ ra rằng nhiệt độ phân hủy nhiệt của các pluronic là khoảng dưới 420 °C trong khi GP và Ge nguyên chất là khoảng trên 550 – 800 °C. Do có sự khác biệt về phân hủy nhiệt của pluronic, Ge và GP nên hiệu suất ghép pluronic vào Ge sẽ được tính toán thông qua phần trăm giảm trọng lượng của các mẫu GP ở 420 °C. Tại nhiệt độ 420 °C pluronic đã bị phân hủy hoàn toàn, trong mẫu GP lúc này sẽ chỉ còn lại Ge. Dựa trên tỷ lệ phần trăm khối lượng của Ge nguyên chất và phần trăm khối lượng còn lại trong mẫu GP ở tại 420 °C, hiệu suất được tính theo báo cáo của Kang et al và các báo cáo trước đây của chúng tôi [81, 152]. Hiệu suất ghép của GP-P123 cao nhất đạt 75,19% và thấp nhất là GP-F127 với kết quả 49,07% như trong bảng 3.3.

**Bảng 3.6. Phần trăm khối lượng pluronic được ghép vào gelatin**

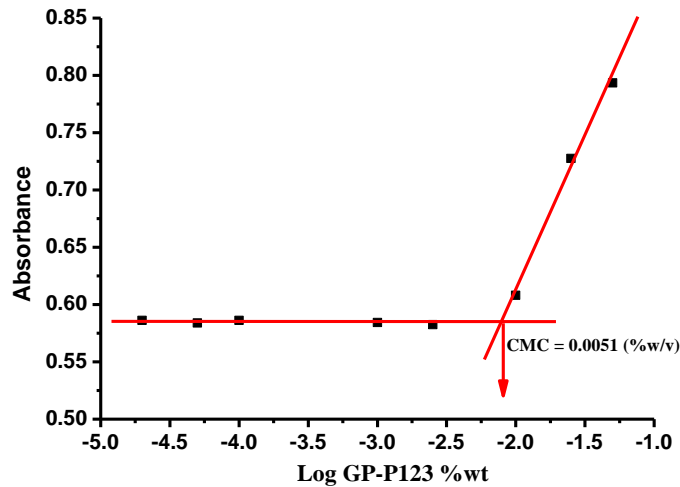
Mẫu	Mw của pluronic	Gelatin (%)	Pluronic (%)	Hiệu suất ghép (%)
GP-P123	5800	6,88	93,12	75,19
GP-F87	7700	9,04	90,96	55,9
GP-F68	8400	10,05	89,95	49,72
GP-F127	12600	10,17	89,83	52,63

Điều thú vị ở đây, chúng tôi thấy hiệu suất ghép pluronic vào Ge tuyến tính theo khối lượng phân tử của pluronic, khối lượng phân tử pluronic càng lớn thì hiệu suất ghép càng giảm. Kết quả bảng 3.6 đã làm rõ điều đó. Khối lượng phân tử pluronic trên 7000 Da (F87) hiệu suất ghép bị giảm đáng kể từ 75,19% (P123) xuống còn 55,9% (F87), Nhưng khi khối lượng phân tử trên 8000 Da hiệu suất ghép giảm không đáng kể và hầu như không thay đổi, kết quả được chứng minh rõ ràng ở F68 và F127. Mạch polymer càng công kênh thì ảnh hưởng của án ngữ không gian đến phản ứng càng cao. Hiệu suất chỉ đạt gần 50% với những pluronic có mạch dài trên 8400 Da (F68) và 12600 Da (F127). Tổng hợp các kết quả phân tích đã trình bày trước và kết quả TGA, chúng tôi khẳng định

đã chuẩn bị thành công vật liệu nanogel polymer amphiphilic GPs (các GPs vừa ưa nước, vừa kỵ nước) với bốn loại pluronic khác nhau.

#### 3.2.1.4. Kết quả phân tích giá trị CMC/CGC của GP-P123, GP-F127, GP-F87 và GP-F68

Sử dụng iodine và phương pháp quang phổ UV-Vis để xác định sự hình thành nanogel của copolymer ghép GP-P123 thông qua giá trị nồng độ tạo gel tới hạn (CGC) trong nước DI.

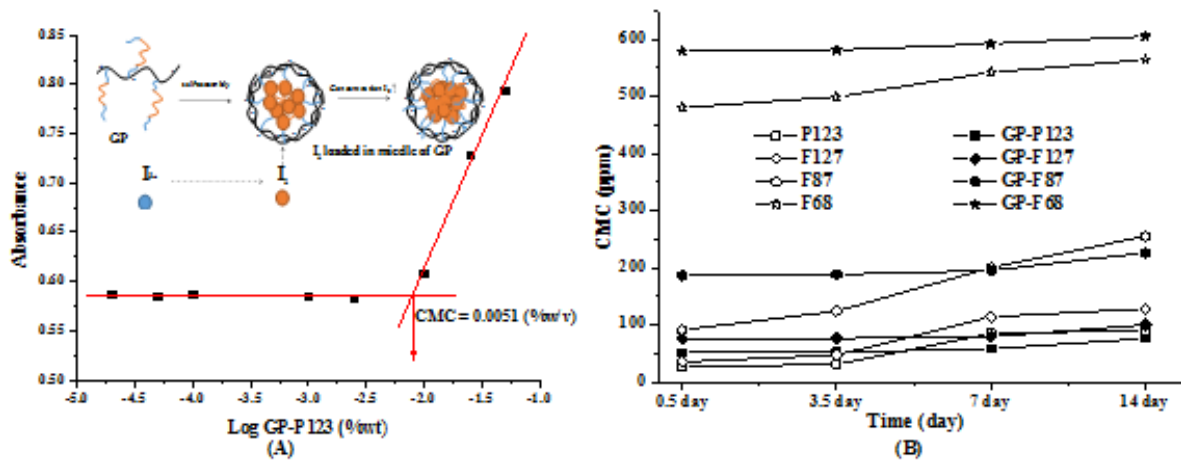


**Hình 3.19. Kết quả CGC của GP-P123**

Giá trị CGC của GP-P123 là 0,0051%wt (hình 3.19), chỉ ra rằng các phân tử iodine bắt đầu hòa tan trong vùng kỵ nước PPO của pluronic P123 trong copolymer GP-P123. Điều này cho thấy, ở nồng độ này copolymer ghép GP-P123 đã tự lắp ráp để hình thành mạng lưới polymer liên kết ngang dưới dạng một nanogel có thể hoạt động như chất mang thuốc kỵ nước tương tự như nanogel GP-F127. Giá trị CGC của GP-P123 cũng lớn hơn so với giá trị CMC của P123 dạng nguyên chất là 0,0028%wt, chỉ ra rằng gelatin khi được ghép vào P123 sẽ làm tăng phần ưa nước của polymer dẫn đến làm tăng giá trị CMC của dung dịch mẫu.

Các copolymer lưỡng tính P123, F127, F87 và F68 với cấu trúc khối PPO kỵ nước và khối PEO ưa nước nên có thể dễ dàng hình thành micelle trong dung dịch nước. Sử dụng iodine và phương pháp quang phổ UV-Vis để xác định sự hình thành nanogel của các copolymer ghép GP-P123, GP-F127, GP-F87 và GP-F68 thông qua giá trị nồng độ

tạo micelle tới hạn (CMC) trong nước. Sự hình thành micelle nhờ vào tương tác kỵ nước có giá trị trong việc cân bằng sự ổn định và giải phóng thuốc của nanogel. Mối liên quan giữa giá trị CMC và hiệu quả mang thuốc kỵ nước của micelle hoặc nanogel đã được công bố trong các báo cáo trước [81, 136, 146, 149].



**Hình 3.20. Kết quả CMC/CGC của GP-P123 (A) và GPs (B)**

Hình 3.20 mô phỏng phương pháp quang phổ UV-vis iốt nhằm xác định CMC của pluronic và GPs trong nước DI. Nồng độ tạo gel tới hạn (CGC) của tác nhân sử dụng làm chất mang thuốc kỵ nước là thông số đóng vai trò quan trọng, quyết định đến hiệu quả mang thuốc. Khi nồng độ polymer thấp hơn giá trị tạo gel, độ hấp thu bức xạ của iot có giá trị không đổi và nằm trên đường thẳng (hình 3.20(A)). Tuy nhiên, khi nồng độ vượt quá giá trị tạo gel, độ hấp thu bức xạ tăng nhanh bởi các phân tử I<sub>2</sub> phân tán trong hạt micelle, từ giao điểm của hai đường thẳng biểu thị cường độ hấp thu của hai giai đoạn giúp xác định được nồng độ tạo gel/micelle của các copolymer/polymer. Các hạt nanogel sẽ đạt trạng thái ổn định nhiệt động khi nồng độ polymer cao hơn nồng độ CGC của chúng. Vì giá trị CGC của polymer luôn được quyết định bởi chỉ số cân bằng ưa nước – ưa dầu HLB (Hydrophilic-lipophilic balance) của phân tử, nên phần kỵ nước PPO của phân tử pluronic đóng vai trò quan trọng trong quá trình tạo hạt nanogel của copolymer gelatin-pluronic [3]. Giá trị CGC của các nanogel GP-P123, GP-F127, GP-F87 và GP-F68 đo được cũng lớn hơn so với giá trị CMC của dung dịch pluronic tinh

kiết P123, F127, F87 và F68 tương ứng (hình 3.20). Tỷ lệ chiều dài chuỗi ưa nước và kỵ nước trong cấu trúc copolymer ghép cũng liên quan đến giá trị CGC, chiều dài chuỗi kỵ nước càng tăng thì giá trị CGC sẽ càng giảm, trong đó chiều dài khối PPO<sub>P123</sub> = 70 (PEO<sub>20</sub>-PPO<sub>70</sub>-PEO<sub>20</sub>) > PPO<sub>F127</sub> = 65 (PEO<sub>100</sub>-PPO<sub>65</sub>-PEO<sub>100</sub>) > PPO<sub>F87</sub> = 40 (PEO<sub>61</sub>-PPO<sub>40</sub>-PEO<sub>61</sub>) > PPO<sub>F68</sub> = 29 (PEO<sub>76</sub>-PPO<sub>29</sub>-PEO<sub>76</sub>), cấu trúc của copolymer GP-P123 có chiều dài chuỗi PPO kỵ nước của pluronic P123 lớn nhất dẫn đến làm tăng tương tác kỵ nước trong cấu trúc của copolymer ghép, và kết quả làm cho giá trị CMC càng giảm.

**Bảng 3.7. Biểu thị giá trị CMC/CGC của pluronic và gelatin-pluronic**

Pluronic	HLB <sup>a</sup>	Nhóm PEO <sup>b</sup>	Nhóm PPO <sup>c</sup>	%PEO <sup>d</sup>	CMC (ppm)	GP	CGC (ppm)
P123	8	40	70	30	26	GP-P123	51
F127	22	200	65	70	35	GP-F127	76
F87	24	122	40	70	91	GP-F87	186
F68	29	152	29	80	480	GP-F68	579

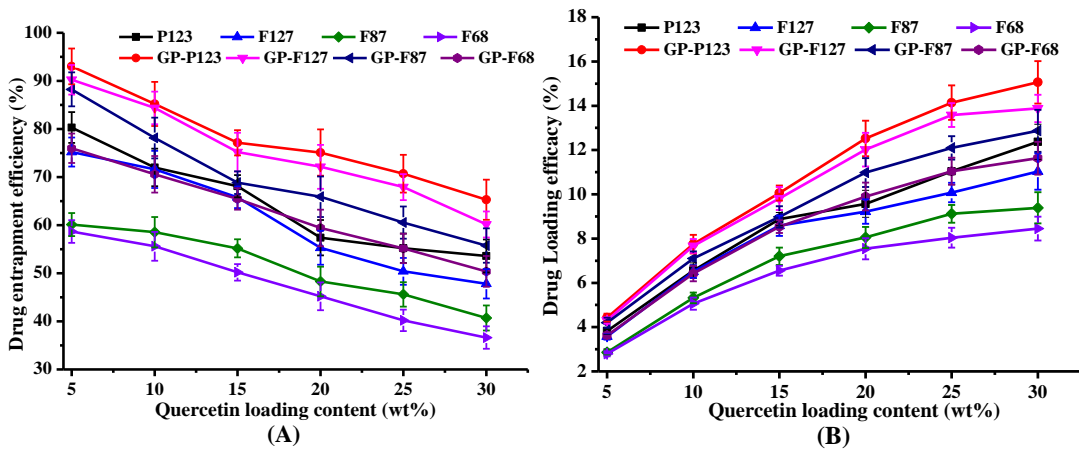
<sup>(a,b,c)</sup> Đây là các thông số của nhà sản xuất đưa ra (Sigma Aldrich (St. Louis, MI, USA))

<sup>d</sup> Phần trăm của nhóm PEO được tính dựa trên tỷ lệ khối lượng PEO và khối lượng của pluronic tương ứng.)

Giá trị CMC/CGC của polymer/copolymer tỉ lệ thuận với giá trị HLB của phân tử, hay tỷ lệ nghịch với phần ưa dầu (PPO) trong cấu trúc phân tử của chúng (bảng 3.7). Kết quả CGC của các copolymer tổng hợp thu được là tương đối nhỏ, đặc biệt là copolymer GP-P123, là yếu tố thuận lợi trong việc tạo hạt nano mang thuốc ở một giá trị nồng độ thấp của copolymer. Hình 3.20(B) mô tả kết quả thử nghiệm độ ổn định của một số nanogel pluronic nguyên chất và các copolymer GP tổng hợp tương ứng. Kết quả cho thấy các copolymer GP có tính ổn định động học hơn các pluronic tinh khiết tương ứng. Giá trị CGC của chúng dường như không thay đổi hoặc thay đổi không đáng kể sau thời gian lưu trữ 14 ngày. Ngược lại, giá trị CMC của các pluronic tăng lên đáng kể chỉ sau hơn 3 ngày lưu trữ và tiếp tục gia tăng sau 2 tuần lưu trữ tiếp theo. Độ ổn định động học của các copolymer là yếu tố quan trọng, đặc biệt trong điều kiện giải phóng thuốc không cân bằng khi nồng độ của chúng giảm xuống dưới giá trị CGC của chúng. Sự ổn định cho phép hạt nanogel có khả năng lưu trữ thuốc được lâu hơn, có khả năng vận chuyển lượng thuốc cao hơn tới các vị trí cần điều trị trong cơ thể, nghĩa là chúng có thể làm tăng sinh khả dụng của thuốc khi so sánh với các vật liệu mang là pluronic nguyên chất.

### 3.2.2. Kết quả tổng hợp nanogel GP-P123, GP-F127, GP-F87 và GP-F68 mang QU

Hệ nanogel gelatin-pluronic mang QU được điều chế bằng phương pháp tạo vi nhũ dưới điều kiện siêu âm tần số cao. Trong đó, QU là hoạt chất kém tan trong nước và có tính âm điện yếu, copolymer gelatin-pluronic đóng vai trò là một vật liệu mang với cấu trúc lưỡng tính (có đồng thời hai phần ưa nước, phần kỵ nước) mang điện tích dương. Liên kết hóa học giữa pluronic và gelatin tạo dẫn xuất có thể hòa tan tốt trong nước, có tính chất phân tán của pluronic. Nanogel gelatin-pluronic mang điện tích dương, do đó, ngoài khả năng nang hóa thuốc kỵ nước có tính âm điện trong vùng nhân (kỵ nước) của hạt, còn có thể mang thuốc tại vỏ (phía ngoài) chứa gelatin của hạt nanogel.



**Hình 3.21. Kết quả mang QU vào pluronic và GP**

(EE: Hiệu quả mang QU (A) và DL: Hiệu suất tải QU (B))

Các copolymer GP-P123, GP-F127, GP-F87 và GP-F68 có thể tự lắp ráp để hình thành nanogel trong dung dịch nước thông qua giá trị CGC đo được. Kết quả giá trị CGC của các nanogel cho thấy phụ thuộc vào tỉ lệ chiều dài của khối ưa nước PEO và khối kỵ nước PPO trong cấu trúc của nanogel. Khi tỉ lệ chiều dài khối kỵ nước tăng giá trị CGC đo được càng giảm, cụ thể:  $PPO_{P123} = 70$  ( $PEO_{20}$ - $PPO_{70}$ - $PEO_{20}$ ) >  $PPO_{F127} = 65$  ( $PEO_{100}$ - $PPO_{65}$ - $PEO_{100}$ ) >  $PPO_{F87} = 40$  ( $PEO_{61}$ - $PPO_{40}$ - $PEO_{61}$ ) >  $PPO_{F68} = 29$  ( $PEO_{76}$ - $PPO_{29}$ - $PEO_{76}$ ), trong đó nanogel GP-P123 có giá trị CGC đo được nhỏ nhất. Giá trị CGC có ý nghĩa trong việc cân bằng sự ổn định và phân phối thuốc của nanogel. Kết quả này cũng chỉ ra rằng các hệ nanogel được hình thành có ý nghĩa trong việc sử dụng làm hệ chất mang các thuốc kỵ nước.

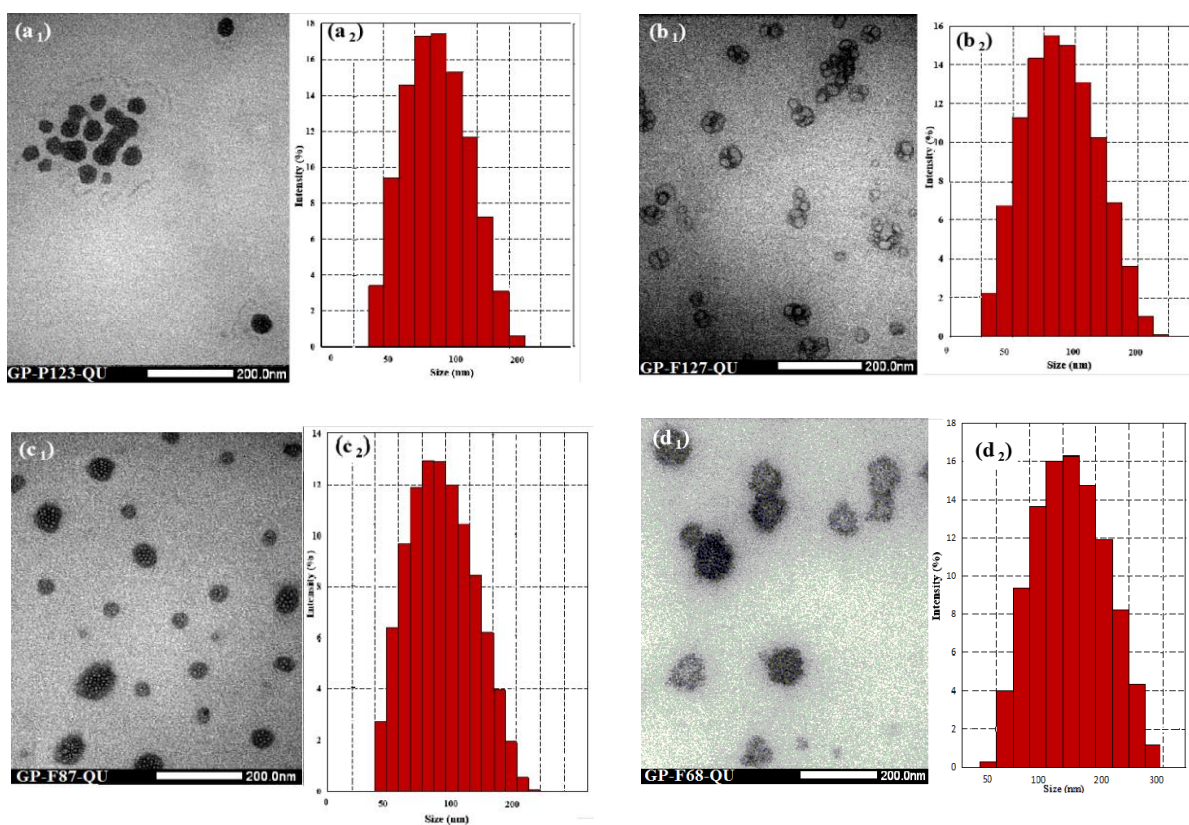


Khả năng mang QU của nanogel GP-P123, GP-F127, GP-F87 và GP-F68 tăng tương ứng với tăng tỉ lệ ghép pluronic, ảnh hưởng bởi tương tác kỵ nước và chỉ số HLB của các pluronic. HLB càng nhỏ tương ứng với sự tăng tương tác kỵ nước trên chất mang GP-P123 > GP-F127 > GP-F87 > GP-F68, cụ thể: P123 (HLB = 8) < F127 (HLB = 22) < F87 (HLB = 24) < F68 (HLB = 29), nanogel GP-P123 mang QU tốt nhất (hình 3.21).

### 3.2.3. So sánh kết quả phân tích các nanogel GP-P123, GP-F127, GP-F87 và GP-F68 mang QU

**Bảng 3.8. Kích thước các hạt nanogel trước và sau khi tải QU**

GP	DLS (nm)	PDI	GP-QU	DLS (nm)	PDI
GP-P123	42,12 ± 2,84	0,24 ± 0,03	GP-P123-QU	79,52 ± 3,22	0,11 ± 0,05
GP-F127	68,61 ± 4,25	0,23 ± 0,06	GP-F127-QU	84,68 ± 5,27	0,15 ± 0,07
GP-F87	78,42 ± 5,17	0,35 ± 0,11	GP-F87-QU	92,88 ± 5,24	0,22 ± 0,15
GP-F68	125,63 ± 4,72	0,41 ± 0,15	GP-F68-QU	152,51 ± 4,97	0,35 ± 0,18



**Hình 3.22. Ảnh TEM, dữ liệu DLS của các nanogel GP mang QU**

(GP-P123-QU (a) GP-F127-QU (b) GP-F87-QU (c) và GP-F68-QU (d))

Kết quả TEM và DLS (hình 3.22 và bảng 3.8) cho thấy cấu trúc và sự phân bố kích thước hạt nanogel. Kích thước hạt GP-QU tăng dần theo chiều tăng của giá trị CGC của GPs, tăng từ 40 nm đến 120 nm. GP-P123 có kích thước TEM nhỏ nhất, phân bố nhiều nhất tại giá trị  $42 \pm 2,51$  nm, tiếp theo là GP-F127 với giá trị phân bố tại  $64 \pm 3,72$  nm, GP-F87 có kích thước  $87 \pm 5,29$  nm và GP-F68 cho kích thước lớn nhất với giá trị phân bố lớn nhất tại  $122 \pm 2,93$  nm. Giá trị DLS thu được cũng thống nhất với kết quả TEM. Kích thước hạt thu được từ phương pháp DLS có giá trị lớn hơn so với giá trị chụp TEM là do sự hydrat hóa của các phân tử nước lên bề mặt hạt. Các hạt nanogel với kích thước dưới 100 nm mở ra tiềm năng ứng dụng dẫn chuyển thuốc trong cơ thể vì chúng có thể tránh bị đào thải ở thận (dưới 10 nm), hoặc tránh bị bắt giữ ở gan (lớn hơn 100 nm) [153]. Với kích thước trung bình từ 42 nm đến 126 nm các hệ nano mang thuốc có thể dễ dàng thâm nhập vào các mô tế bào ung thư bằng phương pháp phân phối thuốc thụ động thông qua hiện tượng tăng tính thấm và tăng hiệu quả lưu giữ đặc trưng ở các mô ung thư. Tại hầu hết các mô khỏe mạnh, kích thước các khe hở lớp nội mô thành mạch máu thường nhỏ hơn 2 nm, các khe hở này quá nhỏ so với kích thước của chất mang nanogel. Còn tại mô ung thư, do sự phát triển của các tế bào ung thư đòi hỏi sự tăng sinh mạch máu, các vi mạch máu mới được hình thành tại các mô ung thư và có kích thước từ 100 – 800 nm. Do đó các hạt nanogel mang thuốc có thể vượt qua dễ dàng và đi vào mô ung thư [70-72].

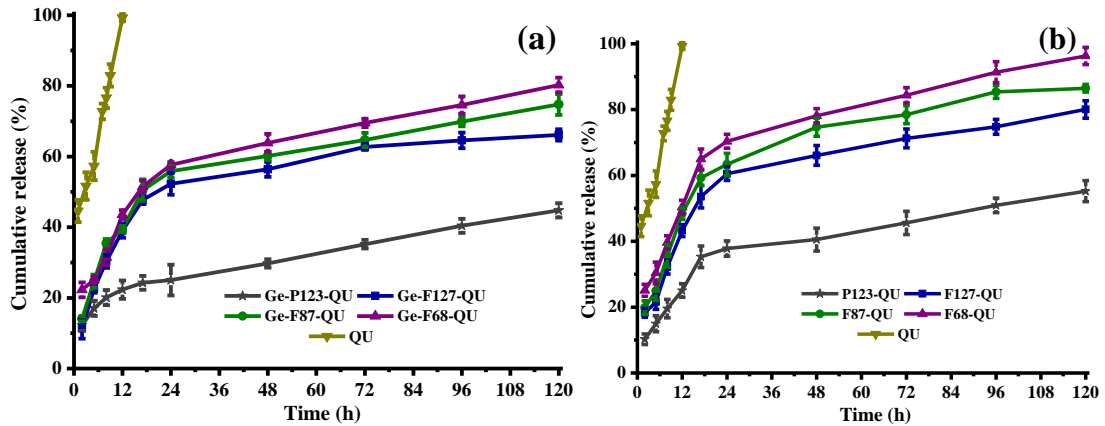
Xu hướng tăng kích thước hạt nano của GP mang QU tỷ lệ thuận với chiều tăng của giá trị HLB của pluronic, cũng là chiều tăng của nhóm PEO ưa nước trong cấu trúc vật liệu. HLB càng nhỏ thì nhóm kỵ nước (PPO) càng nhiều, khoang chứa quercetin càng lớn, cấu trúc hạt nanogel sẽ đặc hơn, tròn hơn. Ngược lại, nhóm ưa nước PEO càng nhiều, không gian lưu giữ quercetin càng hạn chế, hạt sẽ có kích thước lớn hơn do sự ảnh hưởng của môi trường nước [154-156].

### **3.2.4. Khảo sát khả năng nhả chậm QU từ các nanogel GP-P123, GP-F127, GP-F87 và GP-F68**

#### **3.2.4.1. Khả năng nhả chậm QU từ các nanogel GP**



Kết quả giải phóng QU từ hệ nanogel pluronic (P123, F127, F87 và F68) và GP của chúng cho thấy khả năng nang hóa QU của vật liệu nanogel GP (hình 3.23). Sau 12 giờ khảo sát giải phóng thuốc, lượng QU sử dụng ở dạng tự do giải phóng tới 75,65% và giải phóng hoàn toàn chỉ sau 24 giờ. Trong khi đó các mẫu pluronic và GP khảo sát cùng thời gian cho thấy tốc độ nhả QU chậm hơn rất nhiều so với mẫu QU tự do.



**Hình 3.23. Kết quả giải phóng của QU từ hệ nanogel GP-QU**

(Trong môi trường sinh lý pH 7,4 ( $37 \pm 1$  °C;  $n = 3$ ). Các thanh sai số đại diện cho độ lệch chuẩn và trung bình của thí nghiệm)

Hình 3.23a thể hiện tốc độ nhả QU từ hệ GP-QU, kết quả cho thấy mẫu GP-P123 có tốc độ giải phóng QU chậm nhất và nhanh nhất là GP-F68, kết quả này khá phù hợp với lập luận về giá trị HLB và CMC của các pluronic, P123 có HLB thấp nhất và chỉ số CMC nhỏ nhất nên khả năng nang hóa cao và tốc độ giải phóng chậm nhất. Mặt khác, kết quả mang QU thuận lợi nhất còn được giải thích bởi giá trị thế Zeta của vật liệu GP-P123 có giá trị dương lớn nhất trong các vật liệu GP tổng hợp. Lớp vỏ GP có tương tác kỵ nước trong nhân với QU, ngoài ra còn có tương tác tĩnh điện giữa khung gelatin tích điện dương và QU tích điện âm [81].

Hình 3.23b thể hiện tốc độ nhả QU từ các hệ mang, kết quả giải phóng QU của vật liệu pluronic nguyên chất nhanh hơn so với GP. Trong các pluronic, vật liệu mang từ P123 có tốc độ giải phóng chậm nhất. Dữ liệu về nhả QU của các pluronic tương đồng với kết quả của GP tương ứng, tức là tốc độ giải phóng của chúng tuyến tính theo HLB, CMC và thế Zeta. Dữ liệu bảng 3.4, 3.6 và hình 3.23 cho thấy rõ quy luật. Khi giá trị

CMC càng nhỏ thì khả năng vật liệu mang được tạo từ pluronic tinh khiết và GP sẽ tự động lắp ráp tạo cấu trúc micelle ở nồng độ thấp, đồng nghĩa với sự ổn định của cấu trúc micelle khi bị pha loãng trong môi trường sinh lý của người. Với giá trị CMC, HLB nhỏ nhất và giá trị thế Zeta dương lớn nhất, vật liệu P123 và GP-P123 tỏ ra có ưu thế trong ứng dụng nang hóa và giữ thuốc kéo dài (hình 3.23). Giá trị CMC có ý nghĩa vô vùng quan trọng trong ứng dụng nang hóa thuốc của vật liệu micelle/nanogel, giá trị này càng thấp chứng tỏ vật liệu có thể tồn tại dạng cấu trúc micelle/nanogel ở nồng độ loãng. Chỉ số HLB liên quan đến độ ưa nước – ưa dầu của vật liệu, giá trị HLB càng cao vật liệu càng dễ dàng hòa tan trong nước, và ngược lại [81, 149].

Kết quả thí nghiệm giải phóng QU cho thấy sau khi được nang hóa trong cấu trúc của vật liệu nanogel, QU được bảo vệ tốt hơn trong môi trường pH. Các vật liệu GP và pluronic trải qua 2 giai đoạn trong quá trình nhả thuốc, giai đoạn đầu xảy ra trong vòng 24 giờ, các mẫu giải phóng lượng QU khá nhanh nằm trong khoảng 50%, đây là hiện tượng vật liệu mang giải phóng thuốc không cân bằng do sự chênh lệch nồng độ. Phân tử QU nằm trên khung Ge (bởi lực tương tác tĩnh điện) sẽ bị tác động trực tiếp bởi môi trường sinh lý, chúng sẽ nhanh chóng bị đào thải ra ngoài thông qua cơ chế khuếch tán nhằm đạt được nồng độ cân bằng. Ở giai đoạn 2, lượng QU giải phóng chủ yếu từ các phân tử QU được giữ bên trong cấu trúc micelle bằng tương tác kỵ nước – QU nằm trên phân đoạn PPO của pluronic và được khung Ge phía ngoài bao bọc, vì vậy QU được bảo vệ bởi lớp vỏ nên sẽ ít bị tác động bởi môi trường. Mặt khác, do là tương tác kỵ nước giữa phần PPO với QU, nên ở giai đoạn 2 của quá trình giải phóng QU, những vật liệu nano có khoang chứa kỵ nước lớn, phân đoạn PPO dài, chỉ số HLB/CMC thấp sẽ có khả năng nang hóa cũng như lưu giữ QU tốt hơn, tốc độ giải phóng sẽ chậm hơn. Và như đã trình bày ở bảng 3.4, P123 có HLB thấp nhất nên có khả năng tải được QU nhiều nhất và lưu giữ QU lâu nhất. Các kết quả khảo sát sự giải phóng QU thống nhất với các nhận định về kết quả nang hóa. Kết quả nổi bật thu được trong thí nghiệm này là khi kết hợp với Ge, các pluronic tăng khả năng nang hóa và tăng khả năng lưu giữ QU. Trong các pluronic tinh khiết được khảo sát, P123 có kết quả mang và nhả thuốc tốt nhất. Trong các mẫu GP, GP-P123 cũng cho kết quả tương đồng. So sánh kết quả giữa P123 và GP-

P123 thì GP-P123 có khả năng tốt hơn. Điều này được giải thích do tương tác tĩnh điện đã giúp tăng tính ổn định cấu trúc của mẫu khảo sát. Cụ thể, thế Zeta của các vật liệu GP có giá trị dương nhiều hơn sẽ có hiệu quả nang hóa thuốc lớn hơn và tốc độ nhả thuốc chậm hơn. Kết quả thí nghiệm thu được nói lên khả năng của từng pluronic và GP tương ứng trong ứng dụng mang QU nói riêng và mang các thuốc kỵ nước nói chung.

### 3.2.4.2. Động học giải phóng QU từ các nanogel GP

**Bảng 3.9. Dữ liệu giải phóng thuốc được biểu diễn dưới dạng hồi quy giữa các mô hình giải phóng thuốc từ thực nghiệm và một số mô hình động học (Zero-order, First-order, Higuchi và Power)**

Công thức QU	Các mô hình toán học cho động học giải phóng thuốc pH 7,4								
	Zero order		First order		Higuchi		Power law		
	$k_0$	$R^2$	$k_1$	$R^2$	$k_H$	$R^2$	$k$	$n$	$R^2$
Free QU	0,3095	0,8316	0,0748	0,5690	0,6191	0,7282	4,1572	0,2504	0,9547
P123	0,0584	0,8758	0,0478	0,6144	0,1368	0,8758	1,0822	0,3436	0,9823
GP-P123	0,0458	0,9019	0,0448	0,5873	0,0917	0,9019	1,0115	0,3007	0,9944
F127	0,0881	0,8386	0,0531	0,5631	0,1762	0,8386	1,0270	0,5658	0,9874
GP-F127	0,0754	0,8114	0,0511	0,5598	0,1507	0,8114	1,5188	0,3475	0,9722
F87	0,0974	0,8419	0,0543	0,5577	0,2357	0,8419	1,2364	0,5284	0,9836
GP-F87	0,0818	0,8334	0,0521	0,5556	0,1635	0,8334	1,5312	0,3775	0,9770
F68	0,1058	0,8488	0,0554	0,6144	0,2529	0,8488	1,4228	0,5210	0,9913
GP-F68	0,0872	0,8549	0,0529	0,5503	0,1743	0,8549	1,6723	0,3630	0,9826

Mẫu QU cho thấy  $n = 0,25$ , cơ chế không được xác định rõ ràng. Giá trị này thấp hơn tham chiếu để xét khả năng khuếch tán Fickian.

Mẫu P123 có  $n = 0,34$ , giá trị này nhỏ hơn 0,45, nên cơ chế giải phóng QU từ hệ P123 liên quan Fickian, giải phóng theo dạng hình cầu (nanogel). Trong khi đó các pluronic còn lại có giá trị  $n$  lớn hơn 0,5. Cơ chế giải phóng là vận chuyển không phải là Fickian hoặc dị thường, và cơ chế giải phóng thuốc bị chi phối bởi sự khuếch tán và độ trương. Tỷ lệ khuếch tán và trương là tương đương. Sự sắp xếp lại các chuỗi polymer xảy ra chậm và quá trình khuếch tán đồng thời gây ra các hiệu ứng dị

thường phụ thuộc thời gian. Điều đặc biệt, các mẫu GP đều có kiểu giải phóng QU giống với P123, giải phóng theo dạng hình cầu liên quan đến Fickian [79, 132].

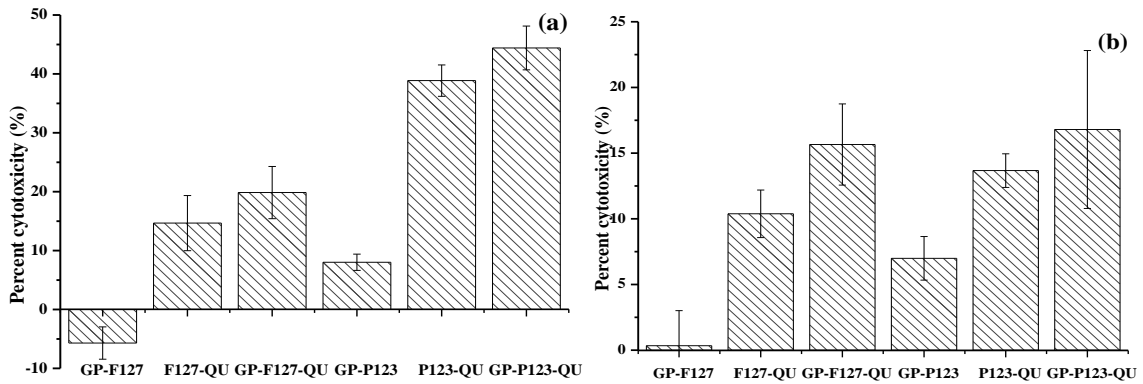
Từ kết quả động học giải phóng QU cho thấy được cơ chế giải phóng QU từ các hệ nanogel. Đây là tiền đề quan trọng cho các nghiên cứu sâu hơn về tiền lâm sàng và *in vivo* trên động vật.

### **3.2.5. So sánh khả năng ức chế tế bào ung thư của vật liệu nanogel GP-P123 và GP-F127 mang QU**

Các thử nghiệm được tiến hành tại Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP. HCM, Việt Nam. Cụ thể, dòng tế bào ung thư vú MCF-7 và dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa ở người được ủ trong các đĩa 96 giếng với mật độ  $5 \times 10^3$  tế bào mỗi giếng. Trong nghiên cứu, phương pháp Sulforhodamine B (SRB) được sử dụng để đánh giá sự ức chế tăng trưởng tế bào ung thư của các mẫu nanogel GP không mang QU (GP-F127, GP-P123), QU dạng tự do và QU được mang bởi các vật liệu nanogel GP (GP-F127/QU, GP-P123/QU) ở nồng độ 100 ppm. Từ thí nghiệm, nồng độ QU ức chế một nửa tế bào ung thư ( $IC_{50}$ ) được xác định để so sánh hiệu quả gây độc tế bào và tìm ra vật liệu có tiềm năng tốt nhất trong các mẫu khảo sát cho ứng dụng điều trị ung thư.

Để đánh giá khả năng ức chế tế bào ung thư của QU trước và sau khi được nang hóa trong vật liệu nanogel GP, thí nghiệm được tiến hành ở nồng độ 100 ppm các mẫu GP-QU với GP tích điện dương và mang lượng QU cao nhất (GP-P123 và GP-F127). Hình 3.21 biểu diễn kết quả thử nghiệm sàng lọc tế bào ở 100 ppm các mẫu với 2 dòng tế bào MCF7 và HeLa. Mẫu vật liệu GP-F127 không gây ức chế tăng trưởng với dòng ung thư vú MCF-7 ngược lại GP-P123 thể hiện khả năng ức chế cao hơn, có thể do P123 với phân ky nước nhiều ảnh hưởng đến màng tế bào. Các kết quả thử nghiệm trên đều chưa đạt đến nồng độ  $IC_{50}$ . Vì mẫu GP không có khả năng gây độc (được cấu thành từ pluronic, nguyên liệu được FDA cho phép sử dụng và gelatin – một protein tương thích sinh học cao), nên kết quả thử nghiệm với vật liệu mang GP-P123 (chưa có quercetin) đều dưới 10%, thậm chí vật liệu GP-F127 còn giúp tăng sinh tế bào ung thư MCF-7. Hàm lượng QU được cố định giống nhau trong các mẫu khảo sát ở giá trị 5%wt QU được nang hóa trong các vật liệu. Kết quả cho thấy QU được mang bởi vật liệu GP-P123

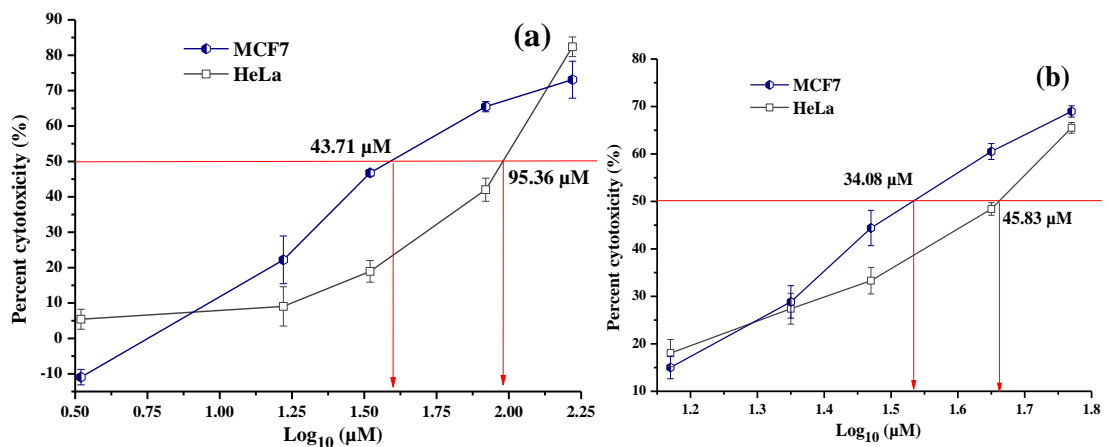
luôn có khả năng ức chế mạnh hơn so với GP-F127, vì vậy, vật liệu GP-P123 được sử dụng trong thí nghiệm xác định giá trị  $IC_{50}$  trên 2 dòng tế bào MCF7 và HeLa cũng như kiểm tra độc tính trên tế bào lành (đánh giá khả năng tương thích sinh học của vật liệu).



**Hình 3.24. Khả năng ức chế tế bào ung thư của hệ nanogel mang QU**

(MCF-7 (a), HeLa (b). Mẫu mang QU, nồng độ QU luôn cố định 5% so với hạt nanogel)

Các giá trị thử nghiệm được thể hiện tại hình 3.25, (hàm lượng hoạt chất QU trong mẫu đã được quy đổi so với QU tự do). Với QU tự do nồng độ ức chế tế bào MCF7 là  $43,71 \pm 0,96 \mu\text{M}$  và tế bào HeLa là  $95,36 \pm 2,71 \mu\text{M}$ , các kết quả này gần tương đồng với các công bố trước đây trên 2 dòng tế bào ung thư [157, 158].



**Hình 3.25. Khả năng ức chế tế bào ung thư của QU trước và sau khi được mang hóa lên vật liệu nanogel GP-P123**

((a): QU tự do và (b): QU được mang trong hệ GP-P123)

Giá trị  $IC_{50}$  giảm khi QU khi được nang hóa trong vật liệu nanogel GP-P123, cụ thể, giá trị  $IC_{50}$  đối với tế bào MCF7 là  $34,08 \pm 2,62 \mu\text{M}$  và tế bào HeLa là  $45,83 \pm 1,13 \mu\text{M}$ . Do đó, có thể khẳng định đã có sự ảnh hưởng tích cực của vật liệu mang đến khả năng ức chế tế bào ung thư của quercetin, mặc dù các giá trị sàng lọc tế bào ung thư với vật liệu GP không mang quercetin đều không thể hiện độc tính dù nồng độ khảo sát lên tới 200 ppm. Gelatin với cấu trúc amin có tương tác tốt với màng tế bào, giúp bảo vệ hạt nanogel vượt qua được rào chắn của màng tế bào tốt hơn, xâm nhập vào nội bào.

Khảo sát độc tính tế bào trên mô hình *in vitro* đã khẳng định vật liệu nanogel GP-P123 có khả năng tăng cường hoạt chất của QU, nhờ tăng khả năng phân tán trong môi trường nước, tăng thời gian lưu giữ. Các kết quả khảo sát giúp đưa ra một hệ các vật liệu nano có khả năng tăng cường hoạt tính của QU nói riêng và các hoạt chất sinh học nói chung, mở ra tiềm năng ứng dụng dẫn truyền các loại thuốc, đặc biệt là các loại thuốc chống ung thư.

### **3.3. Kết quả khảo sát nanogel GP-P123 ở các tỉ lệ ghép khác nhau**

Trên cơ sở kết quả tổng hợp và khảo sát khả năng mang, nhả thuốc của các copolymer ghép GP-P123, GP-F127, GP-F87 và GP-F68 với cùng tỷ lệ, theo đó GP-P123 cho hiệu quả mang cao nhất và giải phóng chậm nhất hoạt chất quercetin, chúng tôi tiếp tục tiến hành tổng hợp hệ nanogel GP-P123 với các tỉ lệ ghép khác nhau và khảo sát khả năng mang, nhả thuốc nhằm tìm ra tỉ lệ tối ưu để gắn phối tử hướng đích acid folic, mang đồng thời hai loại thuốc kết hợp (PTX, QU) thử nghiệm *in vitro* và *in vivo*.

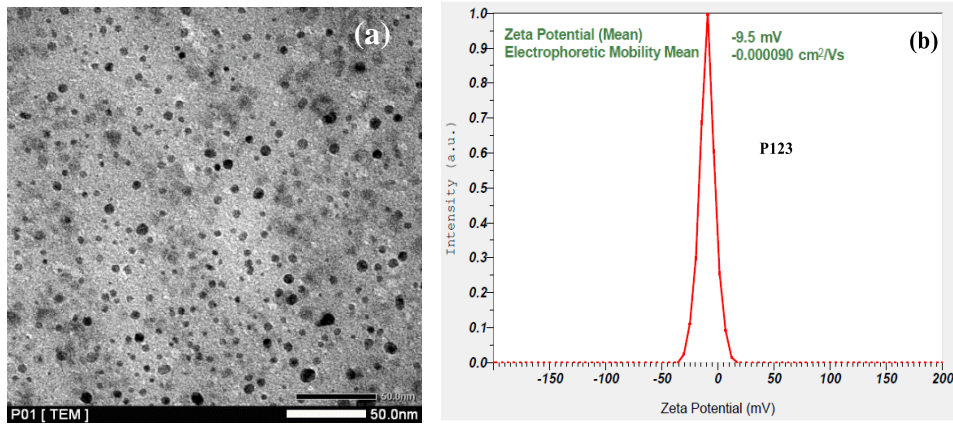
Các copolymer GP-P123 được tổng hợp với 4 tỉ lệ ghép là GP-P123(1:2); GP-P123(1:4); GP-P123(1:6); GP-P123(1:8). GP-P123 thành phần, cấu trúc của sản phẩm được xác định qua các kết quả phân tích phổ FT-IR và  $^1\text{H-NMR}$ .

#### **3.3.1. Kết quả phân tích thế Zeta và kích thước hạt của nanogel GP-P123 ở các tỉ lệ ghép khác nhau**

Hình thái, sự phân bố kích thước hạt của nanogel GP-P123 có thể được quan sát bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) và phương pháp đo phân tán động học bằng laser (DLS).

**Bảng 3.10. Kích thước của nanogel GP-P123 đo bằng kỹ thuật DLS**

Mẫu	DLS (nm)	PDI	DLS (nm)	PDI
	25 °C		37 °C	
GP-P123 (1:2)	50,9 ± 1,73	0,45 ± 0,03	44,87 ± 1,25	0,51 ± 0,02
GP-P123 (1:4)	43 ± 1,28	0,36 ± 0,07	32,37 ± 1,32	0,35 ± 0,09
GP-P123 (1:6)	53,7 ± 2,92	0,43 ± 0,05	47,57 ± 2,48	0,47 ± 0,08
GP-P123 (1:8)	79,2 ± 2,5	0,48 ± 0,15	58,7 ± 1,46	0,42 ± 0,04

**Hình 3.26. Kết quả TEM (a) và Zeta (b) của P123****Bảng 3.11. Thế zeta và kích thước của nanogel GP-P123 đo bằng kỹ thuật TEM**

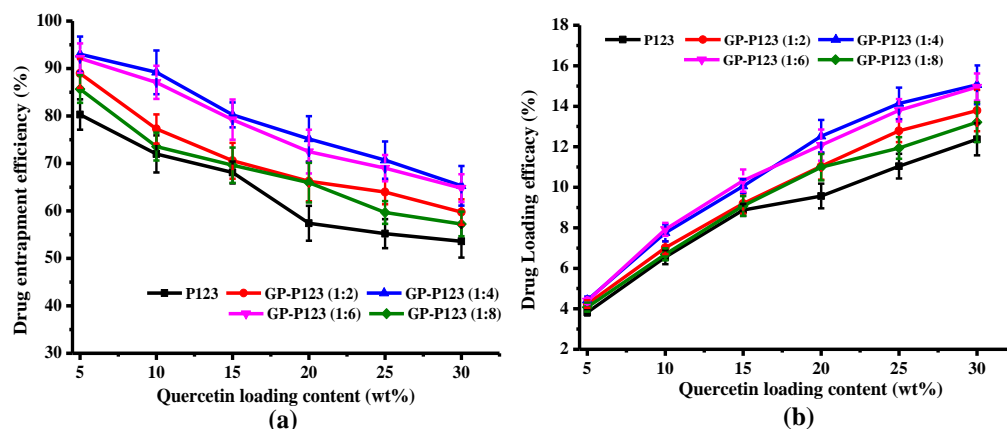
Mẫu	TEM (nm)	Thế zeta (mV)
Gelatin	--	21,53 ± 0,31
P123	8,34 ± 3,67	-8,79 ± 0,54
GP-P123 (1:2)	40,71 ± 5,52	12,17 ± 0,67
GP-P123 (1:4)	30,75 ± 4,29	9,1 ± 0,17
GP-P123 (1:6)	45,19 ± 5,17	3,0 ± 0,1
GP-P123 (1:8)	55,24 ± 4,69	-8,13 ± 0,4

Hình thái và kích thước của mẫu nanogel được quan sát bởi TEM và DLS (Bảng 3.10, bảng 3.11), cho thấy các hạt có dạng hình cầu với đường kính phân bố trong khoảng 40 – 55 nm (theo TEM) và 50 – 79 nm (theo DLS) ở 25°C. Kết quả cho thấy kích thước hạt nanogel GP-P123 lớn hơn so với kích thước của micelle pluronic P123 nguyên chất

( $8,34 \pm 3,67$  nm), chỉ ra rằng khi P123 được ghép vào gelatin, ở nồng độ CMC các copolymer tự lắp ráp để hình thành nanogel.

### 3.3.2. Kết quả tổng hợp nanogel GP-P123 mang PTX và QU

#### 3.3.2.1. Kết quả tổng hợp nanogel GP-P123 ở các tỉ lệ ghép khác nhau mang QU



**Hình 3.27. Kết quả nang hóa QU vào nanogel P123 và GP-P123**

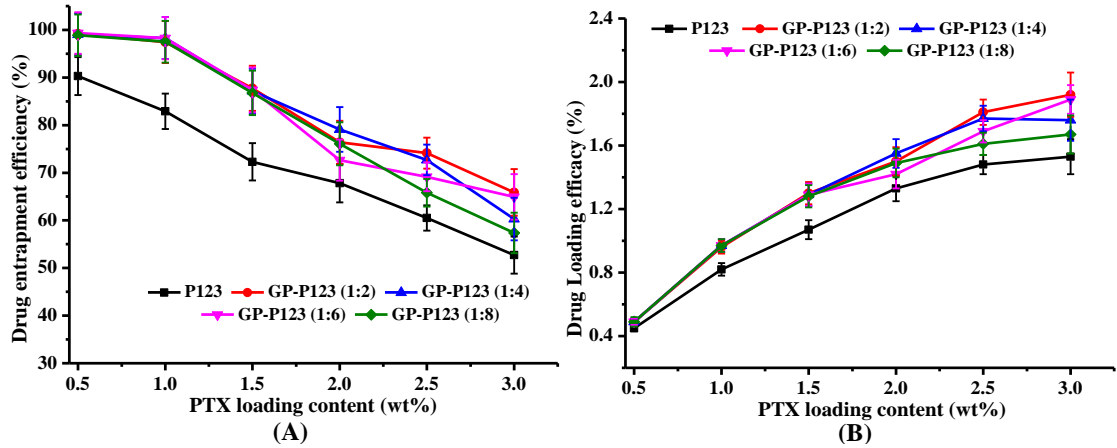
(EE: Hiệu quả mang QU và DL: Hiệu suất tải QU DL)

Kết quả khảo sát các giá trị EE và DL của các vật liệu pluronic P123 nguyên chất và copolymer của nó với gelatin nang hóa QU ở các tỷ lệ ghép và nồng độ QU khác nhau cũng cho thấy quy luật biến thiên giá trị giống với trường hợp F127. Tuy nhiên, với P123, tỷ lệ ghép (1:4) của GP-P123 cho giá trị tối ưu nhất, điều này hoàn toàn phù hợp với thí nghiệm khảo sát kích thước hạt, thế Zeta và được giải thích là do cấu trúc P123 có phần kỵ nước lớn và công kênh hơn rất nhiều so với F127, và khi tăng tỷ lệ P123 vượt quá giới hạn, tính chất của P123 sẽ lấn áp tính chất của gelatin, làm triệt tiêu ảnh hưởng của gelatin lên đặc tính chung của copolymer tổng hợp.

So sánh giá trị EE và DL, kích thước hạt, thế Zeta, của nanogel copolymer gelatin-pluronic, có thể nhận thấy vật liệu GP-P123 (1:4) cho kết quả tốt nhất. Vì vậy, copolymer GP-P123 tỷ lệ (1:4) được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo của đề tài.

#### 3.3.2.2. Kết quả tổng hợp nanogel GP-P123 ở các tỉ lệ ghép khác nhau mang PTX





**Hình 3.28. Kết quả nang hóa PTX vào nanogel P123 và GP-P123**

(*EE*: Hiệu quả mang PTX (A) và *DL*: Hiệu suất tải PTX (B))

Giá trị EE giảm dần và DL tăng dần khi tăng nồng độ PTX trong khoảng giá trị 0,5 - 3%. Mục tiêu chính của nghiên cứu là hướng tới giảm độc tính của thuốc PTX, tăng thời gian lưu giữ, tăng sinh khả dụng và tăng độ phân tán trong môi trường sinh lý, vì vậy lượng PTX được nang hóa một cách tối đa hay giá trị DL cao không phải là mục tiêu quan trọng nhất của đề tài. Thay vào đó, thông số EE được quan tâm hơn. Các micelle của pluronic P123 tạo vỏ bọc các thuốc kỵ nước trong cấu trúc của nó, giữ thuốc tránh khỏi cơ chế kháng thuốc của tế bào – một trong những nguyên nhân chính gây ra sự thất bại khi sử dụng thuốc điều trị các bệnh ung thư.

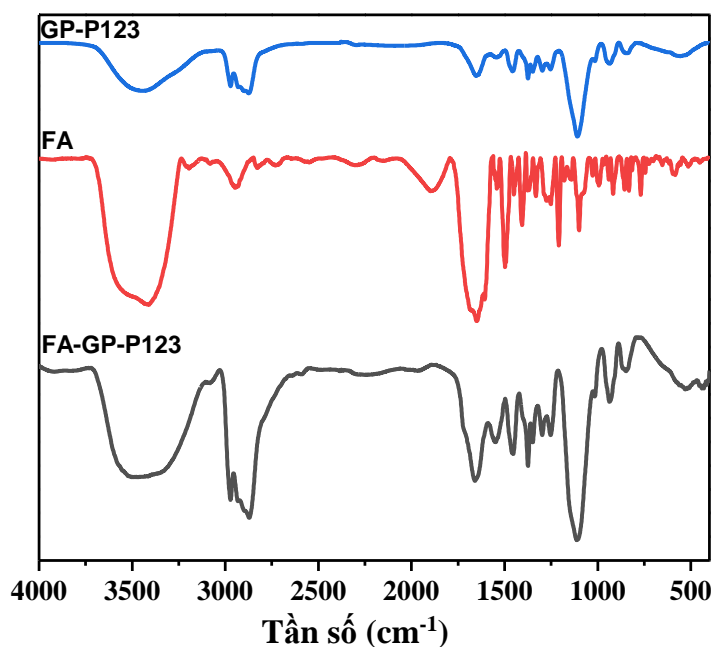
Các mẫu nanogel copolymer GP-P123 ở tất cả các tỷ lệ ghép cho giá trị mang PTX không khác nhau trong khoảng nồng độ PTX từ 0,5 đến 1,5%. Các kết quả dao động gần nhau và hiệu quả EE giảm dần khi nồng độ PTX tăng lên. Đặc biệt, tất cả các mẫu nanogel ghép (GP-P123) đều cho kết quả EE tốt hơn so với nanogel được tạo bởi P123 nguyên chất. Từ dữ liệu này dẫn tới một số nhận định, thứ nhất, với cấu trúc dài có nhiều nhóm ưa nước rất phù hợp cho cấu trúc hạt nanogel với vỏ chứa gelatin và nhân là các phân kỵ nước của phân đoạn PPO trong cấu trúc P123. Chính cấu trúc vỏ-lõi đặc biệt này mà PTX được lưu giữ tốt hơn so với hạt nano được tạo bởi P123 tinh khiết. Thứ hai là cấu trúc gelatin với điện tích bề mặt dương nên khi ghép với P123 sẽ dẫn tới điện tích của P123 biến đổi dần từ giá trị điện tích âm về giá trị điện tích dương tùy thuộc vào tỷ lệ ghép. Vì vậy, vật liệu GP-P123 sẽ tương tác tĩnh điện với PTX bên cạnh sự tương tác

ky nước. Kết quả mang PTX thu được cũng tương đồng với các kết quả mang QU được thực hiện, điều này góp phần củng cố vững chắc hơn những kết luận về vật liệu GP được tổng hợp theo quy trình của đề tài. Và tỷ lệ GP-P123 (1:4) tối ưu nhất trong các tỷ lệ khảo sát của P123.

### 3.4. Kết quả tổng hợp và đánh giá nanogel FA-GP-P123

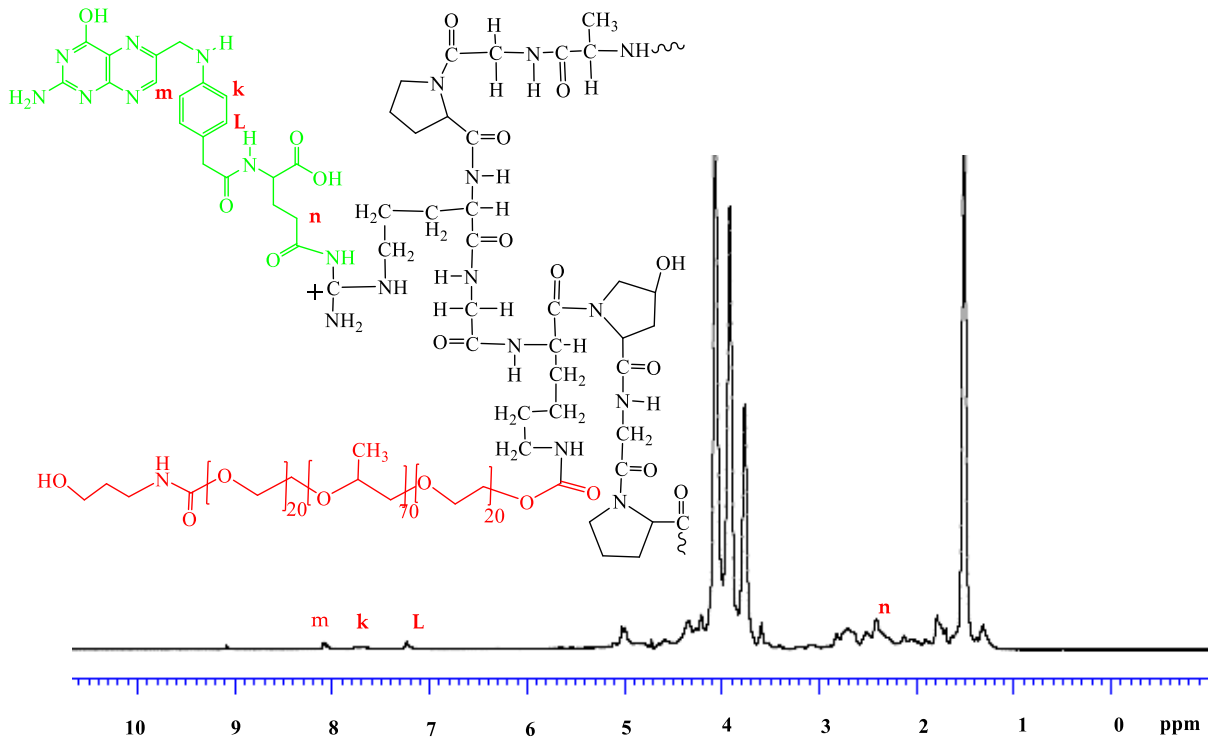
Từ kết quả mang thuốc của các nanogel GP-P123, GP-F127, GP-F87 và GP-F68 với các tỉ lệ ghép khác nhau, cho thấy GP-P123 tốt nhất, chúng tôi lựa chọn GP-P123 để thử nghiệm tiếp theo

#### 3.4.1. Kết quả phân tích phổ FT-IR của <sup>1</sup>HNMR của FA-GP-P123



**Hình 3.29. Phổ FT-IR của FA-GP-P123**

Hình 3.29 cho thấy xuất hiện đồng thời các tín hiệu đặc trưng của folic acid (FA) và GP-P123. Tín hiệu hấp thụ tại  $1605\text{ cm}^{-1}$ ,  $1497\text{ cm}^{-1}$  và  $1466\text{ cm}^{-1}$  của  $\text{-C=C-}$  vòng thơm, tín hiệu được thu nhận tại  $1512\text{ cm}^{-1}$  của N-H, chứng minh trong hệ có FA. Bên cạnh đó có những mũi hấp thụ tại vùng  $1297,96 - 1659,05\text{ cm}^{-1}$  đặc trưng cho dao động của các amide bậc 1, 2, 3 trên chuỗi gelatin, Phổ hồng ngoại FT-IR chứng minh đã tổng hợp thành công FA-GP-P123.

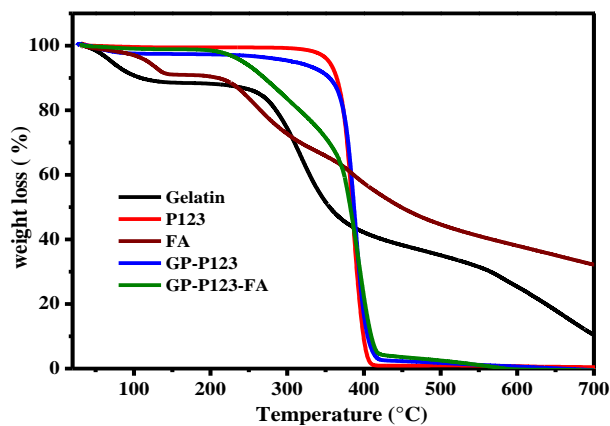


**Hình 3.30. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của FA- GP-P123**

Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của FA-GP-P123 (hình 3.30) cho thấy sự xuất hiện của ba mũi cực đại tại  $\delta \sim 8,8$  ppm (m),  $\delta \sim 7,4$  ppm (k) và  $\delta \sim 6,7$  ppm (L) được cho là cộng hưởng proton thơm đặc trưng của gốc folate. Bên cạnh các tín hiệu của gelatin và pluronic P123. Từ các kết quả FTIR và  $^1\text{HNMR}$  khẳng định đã tổng hợp thành công FA-GP-P123.

### 3.4.2. Kết quả phân tích đặc tính của vật liệu nanogel FA-GP-P123

#### 3.4.2.1. Kết quả TGA của FA-GP-P123

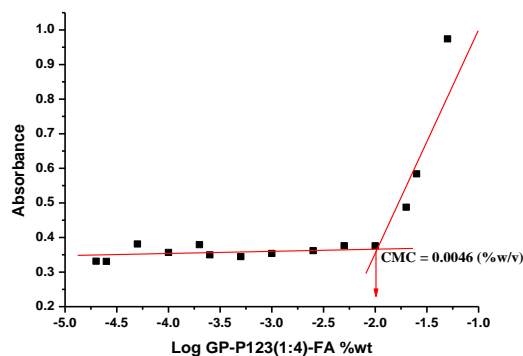


**Hình 3.31. Kết quả TGA của gelatin, P123, FA, GP-P123 và FA-GP-P123**

Dữ liệu phân tích nhiệt trọng lượng (TGA) giúp so sánh sự phân hủy nhiệt, độ ổn định và độ bền của vật liệu tổng hợp và các thành phần nguyên liệu riêng lẻ. Kết quả cho thấy có sự khác biệt giữa đường cong TGA của các mẫu khảo sát (hình 3.31). Sự khác nhau này là một trong những cơ sở khoa học quan trọng giúp khẳng định quá trình tổng hợp thành công vật liệu dẫn truyền thuốc FA-GP-P123 từ các nguyên liệu ban đầu (gelatin, pluronic, folic acid). Cụ thể, pluronic P123 nguyên chất có một bước giảm khối lượng duy nhất tại khoảng nhiệt độ xung quanh giá trị 410 °C, dữ liệu này phù hợp với các báo cáo trước đây liên quan đến sự phân hủy nhiệt của polymer pluronic [81, 151]. Acid folic (FA) có 2 giai đoạn giảm khối lượng, giai đoạn đầu là sự mất nước dạng tự do có trong mẫu khảo sát kéo dài từ 100 °C đến 150 °C, giai đoạn sau từ 200 °C – 700 °C, với tốc độ giảm khối lượng diễn ra chậm, thể hiện cấu trúc FA bị biến đổi và phân hủy bởi nhiệt. Mẫu khảo sát GP-P123 bị giảm khối lượng lớn nhất trong phạm vi nhiệt độ trên 250 °C. Trong khi đó, mẫu FA-GP-P123 có 2 giai đoạn giảm, giai đoạn đầu chậm và kéo dài từ 200 °C đến 375 °C, giai đoạn sau từ 375 °C đến 420 °C với sự suy giảm khối lượng nhanh chóng (70%). Các đường cong TGA của các nguyên liệu (gelatin, pluronic P123, folic acid) cũng như sản phẩm tổng hợp (GP-P123, FA-GP-P123) có dạng khác nhau là cơ sở khẳng định pluronic P123 gắn thành công với gelatin tạo thành GP-P123 và acid folic (FA) gắn thành công vào cấu trúc của GP-P123 tạo thành cấu trúc FA-GP-P123.

#### 3.4.2.2. Kết quả CMC của FA-GP-P123

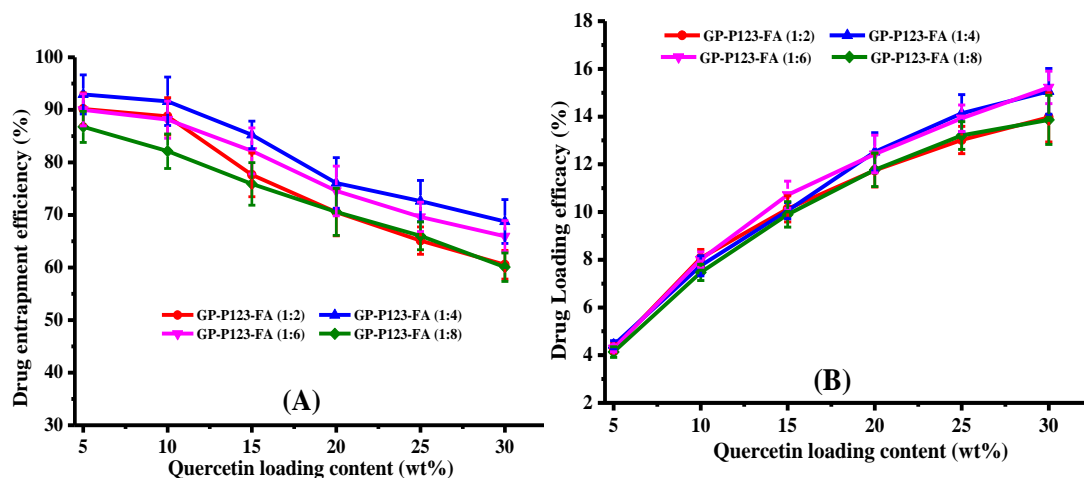
Sử dụng iodine và phương pháp quang phổ UV-Vis để xác định sự hình thành nanogel của copolymer ghép FA-GP-P123 thông qua giá trị nồng độ tạo gel tới hạn (CGC) trong nước. Hình 3.32 cho thấy giá trị CGC của copolymer FA-GP-P123 là 0,0046% wt, chỉ ra rằng các phân tử iodine bắt đầu hòa tan trong vùng kỵ nước PPO của các pluronic P123 trong copolymer FA-GP-P123. Điều này cho thấy, ở nồng độ này copolymer ghép FA-GP-P123 đã tự lắp ráp để hình thành mạng lưới polymer liên kết ngang dưới dạng nano có cấu trúc gel (nanogel) có thể hoạt động như vật liệu có khả năng mang các loại thuốc kỵ nước tương tự như nanogel GP-P123.



**Hình 3.32. Kết quả CGC của FA-GP-P123**

Giá trị CGC của copolymer ghép FA-GP-P123 đo được (hình 3.32) cũng lớn hơn so với giá trị CMC của P123 nguyên chất là 0,0028 % wt, đặc biệt giá trị CGC của FA-GP-P123 thấp hơn so với GP-P123. Kết quả này chỉ ra rằng FA khi được ghép vào GP-P123 sẽ làm tăng phần kỵ nước của polymer dẫn đến làm giảm giá trị CMC của dung dịch mẫu. Giá trị CGC thấp cũng đồng nghĩa với khả năng mang thuốc có tính kỵ nước cao. Do đó, vật liệu FA-GP-P123 có khả năng mang PTX/QU cao hơn vật liệu GP-P123.

#### 3.4.2.3. Kết quả tổng hợp nanogel FA-GP-P123 mang QU



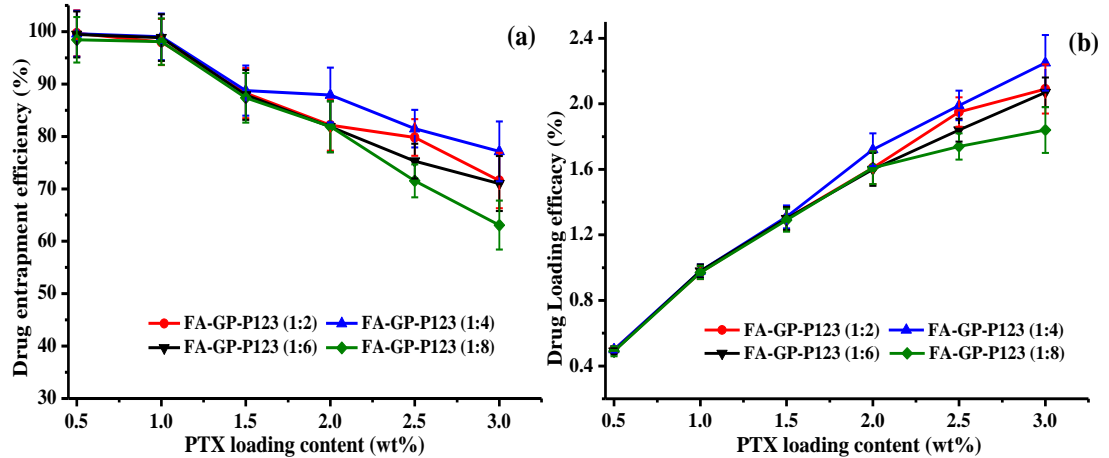
**Hình 3.33. Kết quả nang hóa QU vào nanogel FA-GP-P123**

(*EE*: Hiệu quả mang QU (A) và *DL*: Hiệu suất tải QU (B))

Giá trị EE và DL của vật liệu nanogel GP-P123 có gắn thêm folic acid (FA-GP-P123) nang hóa QU cũng tuân theo quy luật biến đổi không khác nhiều so với nanogel GP-P123, giá trị tối ưu nhất vẫn là tỷ lệ FA-GP-P123 (1:4). Việc gắn phối tử FA không

ảnh hưởng tới khả năng mang QU của vật liệu và chỉ đóng vai trò hướng đích của vật liệu lên tế bào ung thư.

#### 3.4.2.4. Kết quả tổng hợp nanogel FA-GP-P123 mang PTX



**Hình 3.34. Kết quả nang hóa PTX vào nanogel FA-GP-P123**

(*EE*: Hiệu quả mang PTX (a) và *DL*: Hiệu suất tải PTX (b))

Hình 3.34 thể hiện kết quả mang PTX của nanogel tạo bởi copolymer FA-GP-P123 ở các tỷ lệ ghép khác nhau. Kết quả thu được có sự tương đồng với kết quả mang PTX của nanogel GP-P123. Cụ thể, giá trị EE giảm dần và DL tăng dần khi nồng độ PTX tăng trong khoảng 0,5-3%. Và tỷ lệ Ge:P123 ở giá trị (1:4) cho kết quả tốt nhất. Các micelle của pluronic tạo vỏ bọc lưu trữ các thuốc kỵ nước trong nhân cấu trúc của nó, bảo vệ thuốc khỏi những tác động kháng thuốc của tế bào. Phối tử folic acid (FA) đóng một vai trò quan trọng trong cơ chế phân phối thuốc đến các mục tiêu cần trị liệu. FA giúp cấu trúc micelle liên kết với tế bào/mô cụ thể, liên kết đặc biệt với các thụ thể mục tiêu trên màng tế bào ung thư. Thuốc được hướng đích, dẫn đến hấp thu nội bào cao hơn và giảm độc tính của hệ thống, tránh thất thoát thuốc và gây tác dụng phụ lên các tế bào lành. Kết quả thu được với các thí nghiệm khảo sát ở các tỷ lệ QU và PTX đơn khác nhau cho thấy vật liệu nanogel FA-GP-P123 (1:4) là lựa chọn tối ưu cho các thí nghiệm chuyên sâu về nang hóa và giải phóng thuốc trong tiêu diệt tế bào ung thư của đề tài.

### 3.5. Kết quả tổng hợp và đánh giá nanogel FA-GP-P123 mang thuốc PTX kết hợp QU (FA-GP-P123/PTX/QU) lên chuột mang khối u

#### 3.5.1. Khả năng mang PTX kết hợp QU của vật liệu nanogel FA-GP-P123

Từ kết quả khảo sát thu được, copolymer FA-GP-P123 (1:4) được chọn ứng dụng mang hai loại hoạt chất kết hợp có khả năng trị liệu ung thư là PTX và QU.

**Bảng 3.12. Kết quả mang PTX và QU của nanogel FA-GP-P123**

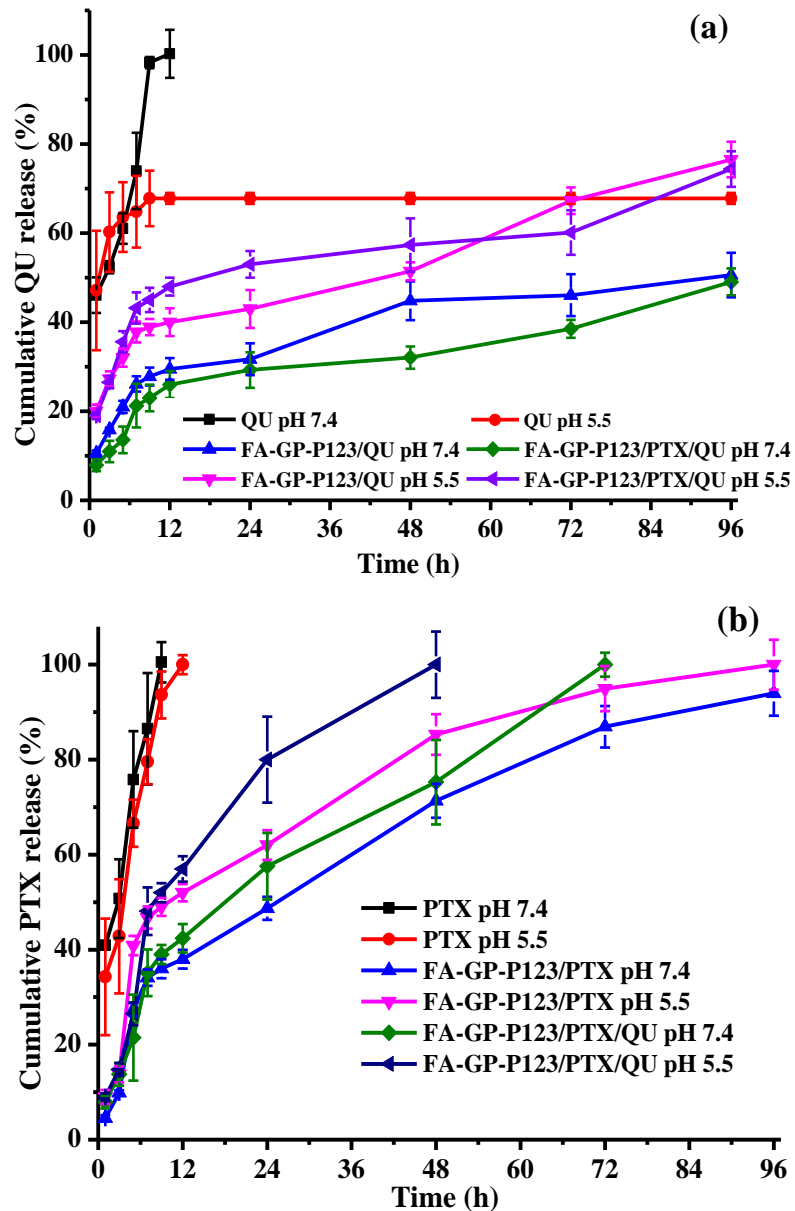
Mẫu	DLS (nm)	TEM (nm)	Thế zeta (mV)	Hiệu suất mang thuốc (%EE)	
				QU	PTX
FA-GP-P123	50,27 ± 0,4	40,9 ± 5,21	-15,13 ± 3,59	-	-
FA-GP-P123/QU	84,43 ± 0,38	60,75 ± 4,26	-19,5 ± 0,3	91,63 ± 4,6	-
FA-GP-P123/PTX	50,87 ± 0,93	45,24 ± 5,67	-20,53 ± 1,99	-	97,01 ± 2,05
FA-GP-P123/QU+PTX	84,03 ± 2,9	62,36 ± 5,22	-20,17 ± 1,55	88,57 ± 2,62	98,67 ± 2,38

Kết quả thực nghiệm cho thấy, đối với vật liệu mang một loại thuốc FA-GP-P123/QU và FA-GP-P123/PTX hiệu suất mang thuốc (EE) lần lượt đạt xấp xỉ 91,63% và 97,01% ở 37°C. Hệ nanogel mang PTX đồng thời kết hợp QU (FA-GP-P123/PTX/QU) đã nang hóa được 88,57% QU và 98,67% PTX. Kết quả thu được mang lại tiềm năng lớn trong việc kết hợp hai hay nhiều loại thuốc vì hiệu quả nang hóa QU và PTX khi kết hợp không bị ảnh hưởng nhiều so với nang hóa QU hay PTX đơn lẻ. Trong phạm vi nghiên cứu của đề tài, vật liệu mang hai thuốc kết hợp FA-GP-P123/PTX/QU được ứng dụng thử nghiệm trên khối u ung thư.

### 3.5.2. Khảo sát khả năng nhả thuốc của FA-GP-P123/PTX/QU

#### 3.5.2.1. Khả năng nhả chậm thuốc từ các nanogel FA-GP-P123

Các nghiên cứu nhả chậm thuốc *in vitro* rất quan trọng, giúp đánh giá hiệu quả của các hoạt chất chống ung thư thông qua tiêm tĩnh mạch. Các nghiên cứu nhằm đánh giá khả năng giải phóng, phân tán ổn định và kéo dài sinh khả dụng thuốc của vật liệu mang.



**Hình 3.35. Kết quả giải phóng QU (a) và PTX (b) từ vật liệu nanogel FA-GP-P123**

Hình 3.35 (a) thể hiện kết quả giải phóng QU. QU tự do bị phóng thích hoàn toàn sau 12 giờ trong môi trường sinh lý pH = 7,4. Trong môi trường pH = 5,5, QU bị kết tủa, quá trình phóng thích kết thúc tại thời điểm 12 giờ với hơn 65% lượng QU. Khi được gắn vào vật liệu nanogel FA-GP-P123, QU không những không bị kết tủa mà còn phóng thích nhanh hơn trong môi trường pH = 5,5 (môi trường giống với môi trường của khối u ung thư) so với môi trường pH = 7,4, giúp cho việc tiêu diệt các tế bào ung thư tốt hơn.

Nanogel FA-GP-P123 cho thấy quá trình giải phóng QU diễn ra trong hai giai đoạn đặc trưng, phóng thích nhanh ban đầu sau khi khuếch tán qua màng và phóng thích chậm,



ổn định ở giai đoạn sau. Tốc độ phóng thích nhanh ban đầu có thể là do thuốc rời hạt mang từ bề mặt nanogel, trong khi sự phóng thích chậm giai đoạn sau là kết quả của việc giải phóng thuốc được duy trì từ phía trong nhân của các micelle. Bên cạnh đó, tương tác kỵ nước kết hợp tương tác tĩnh điện giữa nanogel FA-GP-P123 (điện tích dương) và thuốc (điện tích âm) làm cho thuốc được chứa chủ yếu vào nhân bên trong của hạt nanogel. Các nghiên cứu về giải phóng thuốc *in vitro* cho thấy quá trình vận chuyển thuốc ra khỏi cấu trúc hạt nanogel FA-GP-P123 tuân theo cơ chế kiểm soát khuếch tán. Lượng QU có trong nanogel FA-GP-P123/QU được phóng thích với lượng lớn hơn so với FA-GP-P123/PTX/QU. PTX có trong nanogel FA-GP-P123/PTX/QU giải phóng rất nhanh trong khi QU nhả chậm, chỉ khoảng 60% ở pH = 5,5 và 50% ở pH = 7,4.

PTX dạng tự do ở cả 2 môi trường đệm PBS pH = 7,4 và 5,5 đều được phóng thích trước 12 giờ. Tuy nhiên, nhờ có sự bảo vệ của hệ nanogel FA-GP-P123 nên cùng một giá trị thời gian, lượng PTX được nang hóa trong các mẫu FA-GP-P123/PTX và FA-GP-P123/PTX/QU phóng thích chậm hơn (<50%). Nhìn chung, các mẫu nhả thuốc nhanh trong khoảng thời gian từ 0 – 12 giờ khảo sát đầu tiên. Sau đó, thuốc được phóng thích chậm với tốc độ ổn định. Kết quả cho thấy PTX được phóng thích nhanh hơn ở môi trường đệm pH 5,5. Đặc biệt với mẫu FA-GP-P123/PTX/QU, chỉ sau 48 giờ với môi trường pH = 5,5 lượng thuốc đã được phóng thích hết, trong khi ở điều kiện pH = 7,4 cần tới 72 giờ. Khả năng nhả chậm trong 72 giờ với pH = 7,4 và nhanh ở pH 5,5 có ý nghĩa to lớn trong việc vận chuyển thuốc hướng đích đến tế bào ung thư.

Mẫu FA-GP-P123/PTX phóng thích thuốc chậm nhất khi cần tới 96 giờ để 90% PTX được phóng thích trong môi trường pH 5,5 và 85% trong môi trường pH = 7,4. Kết quả này được giải thích do có hai tương tác tĩnh điện của nhóm (-NH<sub>2</sub><sup>+</sup>) trên cấu trúc gelatin và tương tác kỵ nước của P123 đóng vai trò chính trong việc hình thành cấu trúc hạt nanogel, ngoài ra, còn có thêm tương tác tĩnh điện của FA (-NH<sub>2</sub><sup>+</sup>). Nhờ vậy, cấu trúc hạt nanogel bền vững hơn. Bên cạnh đó, gelatin có khả năng khắc phục đặc tính kém tan trong nước và tính kém thân thiện với tế bào của P123, từ đó có thể làm tăng tính tương thích sinh học của vật liệu mang thuốc với tế bào. Việc gắn thêm tác nhân hướng đích FA sẽ giúp tăng khả năng vận chuyển PTX xuyên bào, đồng thời tăng khả

năng hấp thụ trên các tế bào ung thư vốn giàu các thụ thể của FA, do đó hạt nanogel mang thuốc được vận chuyển đến các cơ quan đó nhanh hơn. Các kết quả khảo sát khả năng phóng thích PTX của vật liệu FA-GP-P123 mang đơn và đa thuốc, cho thấy thấy tiềm năng ứng dụng vật liệu FA-GP-P123 trong lĩnh vực y sinh.

### 3.5.2.2. Động học giải phóng thuốc từ nanogel FA-GP-P123

**Bảng 3.13. Kết quả động học giải phóng QU của nanogel FA-GP-P123**

Công thức QU	Các mô hình toán học cho động học giải phóng thuốc QU								
	Zero order		First order		Higuchi		Power law		
	$k_0$	$R^2$	$k_1$	$R^2$	$k_H$	$R^2$	$k$	$n$	$R^2$
Free QU (pH 5,5)	0,0935	0,2054	0,0280	0,2343	0,2601	0,2054	5,8300	0,0131	0,9626
Free QU (pH 7,4)	0,3095	0,8316	0,0748	0,5690	0,6191	0,7282	4,1572	0,2504	0,9547
FA-GP-P123/QU (pH 5,5)	0,0969	0,8898	0,0281	0,7692	0,2317	0,8898	2,2708	0,2156	0,9726
FA-GP-P123/QU (pH 7,4)	0,0684	0,8637	0,0419	0,7922	0,2421	0,8637	0,9662	0,4974	0,9595
FA-GP-P123/PTX/QU (pH 5,5)	0,0970	0,7970	0,0283	0,6786	0,1939	0,7970	2,5172	0,2188	0,9757
FA-GP-P123/PTX/QU (pH 7,4)	0,0597	0,8943	0,0337	0,8189	0,1194	0,8943	0,9432	0,3462	0,9712

Sự ổn định cấu trúc hạt nano làm cho sự ổn định các hạt đó trong môi trường máu, ngăn chặn sự phóng thích thuốc và làm tăng thời gian lưu thông trong cơ thể. Tuy nhiên, điều này trở thành thách thức để giải phóng thuốc từ các micelle ổn định tại các vị trí cụ thể. Nhìn chung, yêu cầu đặt ra đối với cấu trúc hạt phải được thu gọn, có khả năng giữ và cản trở thuốc giải phóng khi được nang hóa trong cấu trúc hạt ổn định. Do đó, điều quan trọng là phải có một cơ chế kích hoạt có thể điều khiển sự nhả thuốc từ các vật liệu mang (các hạt nano) ổn định tại vị trí mục tiêu.

Mẫu QU cho thấy  $n = 0,2504$  (pH = 7,4) và  $n = 0,0131$ , cơ chế không được xác định rõ ràng. Giá trị này thấp hơn tham chiếu để xét khả năng khuếch tán Fickian. QU có sự phóng thích nhanh chóng khỏi màng khảo sát và ảnh hưởng bởi pH trong môi trường giải phóng.

Mẫu FA-GP-P123/QU (pH 5,5) có  $n = 0,2156$ , giá trị này nhỏ hơn 0,45, nên cơ chế giải phóng QU từ hệ P123 liên quan Fickian, giải phóng theo dạng hình cầu (nanogel). FA-GP-P123/QU (pH 7,4) có  $n = 0,4974$  việc giải phóng thuốc bị chi phối bởi sự khác biệt. Tốc độ vận chuyển hoặc khuếch tán trong dung môi lớn hơn nhiều so với quá trình giãn chuỗi polymer. Cân bằng của sự hấp thụ trên bề mặt tiếp xúc của hệ thống polymer diễn ra nhanh chóng, dẫn đến các điều kiện của các liên kết phụ thuộc vào thời gian. Động học của hiện tượng này được đặc trưng bởi độ khuếch tán. Mẫu FA-GP-P123/PTX/QU (pH = 5,5 và pH = 7,4) có  $n$  từ 0,2188 – 0,3462 cho thấy cơ chế giải phóng là sự khuếch tán Fickian [79, 132].

**Bảng 3.14. Kết quả động học giải phóng PTX của nanogel FA-GP-P123**

Công thức PTX	Các mô hình toán học cho động học giải phóng thuốc PTX								
	Zero order		First order		Higuchi		Power law		
	$k_0$	$R^2$	$k_1$	$R^2$	$k_H$	$R^2$	$k$	$n$	$R^2$
Free PTX (pH 5,5)	1,0018	0,9534	0,2504	0,8612	2,0037	0,9534	3,0576	0,4468	0,9903
Free PTX (pH 7,4)	1,2622	0,9525	0,3169	0,8525	2,5244	0,9525	3,7223	0,4072	0,9901
FA-GP-P123/PTX (pH 5,5)	0,1346	0,8801	0,0331	0,7203	0,2691	0,8801	1,6048	0,4563	0,9459
FA-GP-P123/PTX (pH 7,4)	0,1197	0,9359	0,0541	0,7580	0,3627	0,9359	1,0327	0,5135	0,9579
FA-GP-P123/PTX/QU (pH 5,5)	0,2632	0,9031	0,0668	0,7704	0,5265	0,9031	0,8167	0,8131	0,9769
FA-GP-P123/PTX/QU (pH 7,4)	0,1607	0,9464	0,0415	0,8091	0,3214	0,9464	0,9958	0,5675	0,9826

Mẫu PTX cho thấy  $n = 0,4072$  (pH 7,4) và  $n = 0,4468$  (pH = 5,5), nên cơ chế giải phóng PTX liên quan Fickian, khuếch tán nồng độ theo thời gian

Mẫu FA-GP-P123/PTX (pH = 5,5) có  $n = 0,4563$  và FA-GP-P123/QU (pH = 7,4) có  $n = 0,5135$ . Cơ chế giải phóng là vận chuyển vận chuyển bất thường [79, 132].

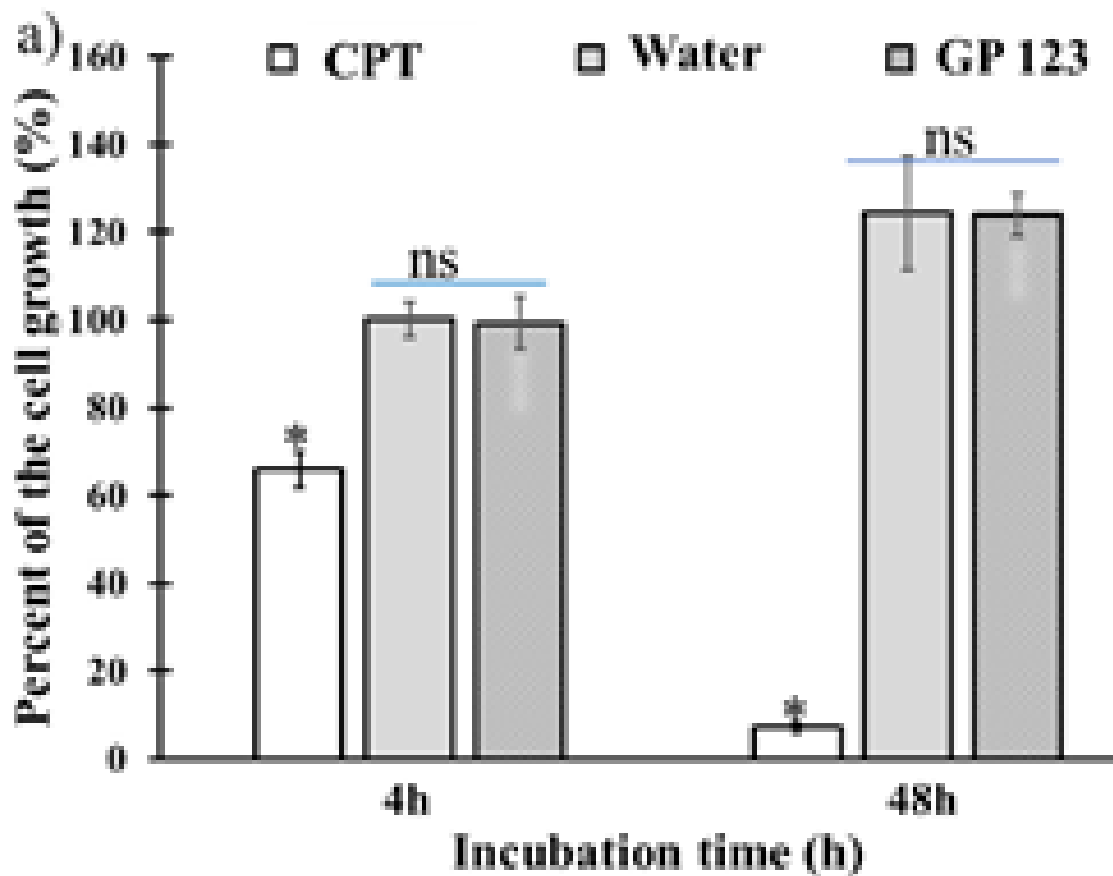
Mẫu FA-GP-P123/PTX/QU (pH = 5,5 và pH = 7,4) có  $n$  lần lượt là 0,8131 và 0,5675 mô hình là vận chuyển không phải là Fickian hoặc dị thường, và cơ chế giải phóng thuốc bị chi phối bởi sự khuếch tán và độ trương. Tỷ lệ khuếch tán và trương là

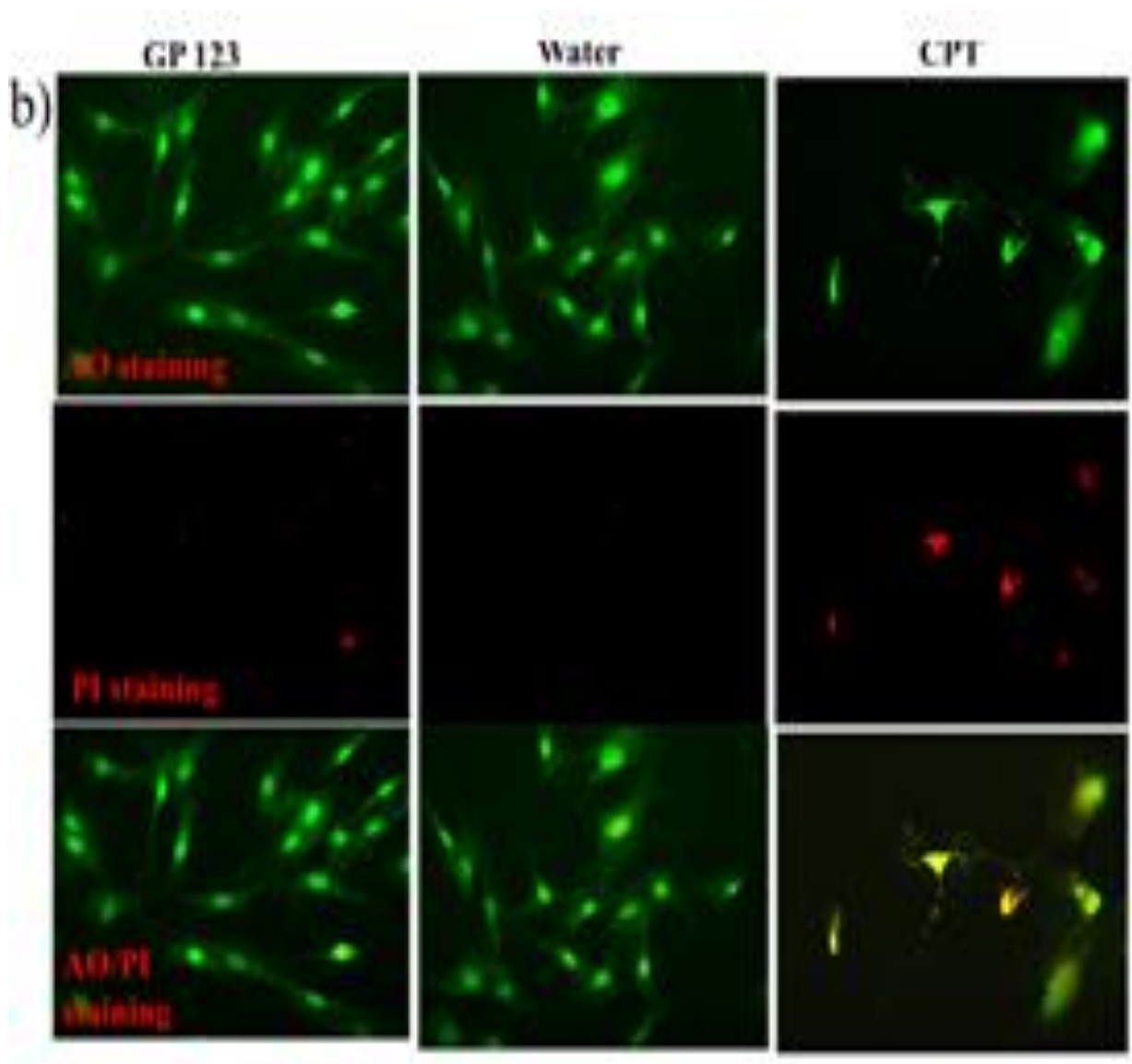
tương đương. Sự sắp xếp lại các chuỗi polymer xảy ra chậm và quá trình khuếch tán đồng thời gây ra các hiệu ứng dị thường phụ thuộc thời gian.

### 3.5.3. Kết quả đánh giá *in vitro* hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư của nanogel FA-GP-P123 mang thuốc

#### 3.5.3.1. Kết quả đánh giá *in vitro* tính tương thích sinh học của nanogel GP-P123

Trong phạm vi nghiên cứu của đề tài, độc tính tế bào của vật liệu GP-P123 đã được kiểm tra bằng cách sử dụng tế bào lành (nguyên bào sợi của người). Nguyên bào sợi được ủ trực tiếp với GP-P123 (100 ppm), CPT (đối chứng dương, 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), DMEM (mẫu trắng) và nước (đối chứng âm tính) trong 4 và 48 giờ.





**Hình 3.36: Kết quả khảo sát độc tính tế bào của nanogel ghép GP-P123**

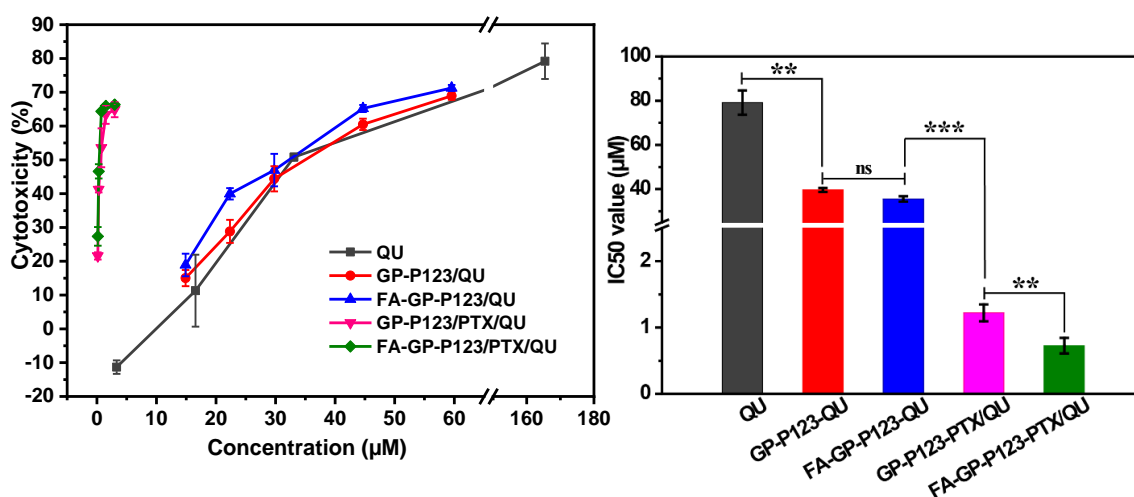
(- (a): Phần trăm tăng sinh nguyên bào sợi trên môi trường GP-P123, nước và Camptothecin (CPT) ở các khoảng thời gian khác nhau;

- b): Hình ảnh huỳnh quang của AO/PI các tế bào được ủ với đối chứng âm, đối chứng dương và GP-P123 lúc 48 giờ)

Như thể hiện trong hình 3.16(a), khả năng sống sót của tế bào đã giảm 9 lần với mẫu đối chứng dương, trong khi nguyên bào sợi được xử lý bằng GP-P123 ( $p = 0,02012 < 0,05$ , 4 giờ so với 48 giờ) và nước ( $p = 0,02062 < 0,05$ , 4 giờ so với 48 giờ) đã tăng lên đáng kể. Tỷ lệ sống sót của nguyên bào sợi được ủ với vật liệu GP-P123 tương tự như mẫu đối chứng âm ở cả hai thời điểm nuôi cấy được thiết kế (4 giờ,  $p = 0,98097$  và 48

giờ,  $p = 0,98934$ ), kết quả này cho thấy vật liệu nanogel GP-P123 có khả năng tương thích sinh học tốt. Ảnh hưởng của vật liệu GP-P123 đối với khả năng tồn tại của tế bào sợi cũng được xác nhận thông qua phương pháp nhuộm kép Acridine da cam (AO) và propidium iodide (PI). Sự phát triển của các nguyên bào sợi được quan sát thấy sau 48 giờ ủ với vật liệu GP-P123 ở nồng độ tương tự 100 ppm. Đối chứng dương thể hiện cả huỳnh quang đỏ và huỳnh quang xanh ở vị trí nucleolus (hình 3.16(b)), cho thấy hiệu suất tiêu diệt tế bào lớn của Camptothecin (CPT). Hoạt động của AO rõ ràng hơn trong khi PI dường như bị giảm bớt trong các giếng được ủ với GP-P123 và nước. Nói cách khác, những nguyên bào sợi này phát triển tốt. Ngoài ra, mật độ tế bào trên GP-P123 không thể bị đánh giá là khác biệt khi so sánh với đối chứng âm. Hơn nữa, hình thái của các tế bào nguyên bào sợi là bất thường trong trường hợp CPT trong khi chúng được duy trì hình thái và khả năng kết dính trong trường hợp của GP-P123, tương tự như đối chứng âm. Các kết quả kiểm tra khả năng sống của tế bào và nhuộm dựa trên hình thái học cho thấy GP-P123 là vật liệu mang thuốc tiềm năng mà không có bất kỳ tác dụng phụ nào.

### 3.5.3.2. Kết quả đánh giá *in vitro* hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư MCF-7 của nanogel FA-GP-P123 mang PTX và QU

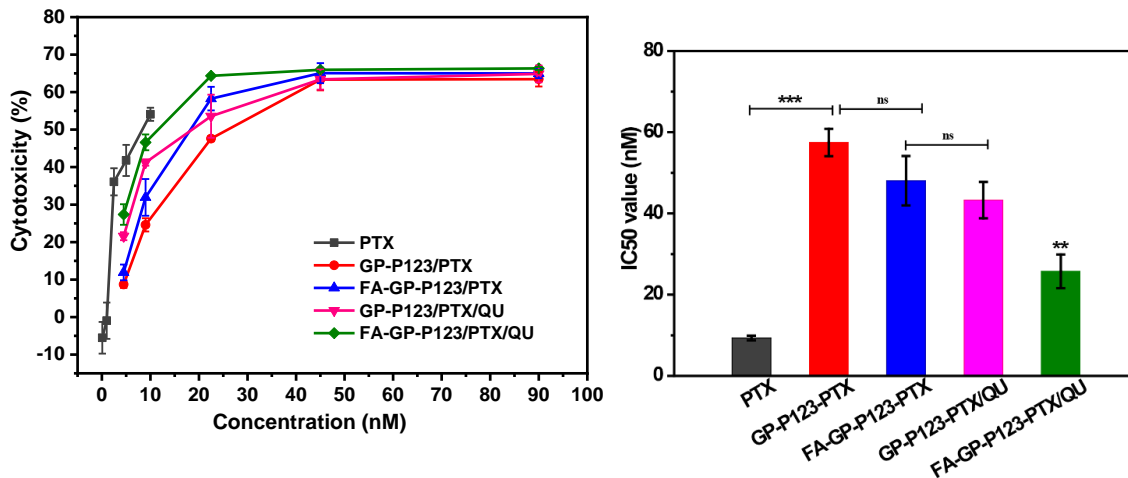


**Hình 3.37: Khả năng ức chế sự phát triển tế bào ung thư MCF-7 của QU tự do và QU được nang hóa bởi vật liệu nanogel**

(+  $n = 3$ , trung bình  $\pm$  S.D., ANOVA một chiều được sử dụng để phân tích thống kê.

+ \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$  và ns  $P \geq 0,05$  được sử dụng để chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê).

Phân tích dữ liệu trên hình 3.37 về giá trị  $IC_{50}$  và phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào ung thư MCF-7 của các mẫu QU tự do và QU được mang trong hệ GP-P123/QU, FA-GP-P123/QU, GP-P123/PTX/QU, FA-GP-P123/PTX/QU. Kết quả cho thấy giá trị  $IC_{50}$  giảm khi QU được mang bởi các vật liệu nanogel gelatin-pluronic, các mẫu đều cho giá trị khác biệt. QU dạng tự do và QU trong GP-P123/QU ( $P=0,00394 < 0,01$ ) có sự khác biệt lớn, chứng tỏ khả năng ức chế tế bào MCF-7 của QU có hiệu quả hơn khi được mang bởi vật liệu. Trong khi đó ở mẫu GP-P123/QU và FA-GP-P123/QU ( $P=0,05849 > 0,05$ ) giá trị thu được có sự khác biệt không đáng kể, không có ý nghĩa thống kê, vì vậy tác nhân hướng đích FA không đóng góp vai trò trong trường hợp này. Giá trị  $IC_{50}$  giảm xuống khi có tác nhân hướng đích FA và kết hợp hai loại thuốc QU và PTX trong cấu trúc. Giữa FA-GP-P123/QU và GP-P123/PTX/QU ( $P=1,905 \times 10^{-5} < 0,001$ ), giá trị khảo sát cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, cụ thể, nồng độ  $IC_{50}$  của GP-P123/PTX/QU là  $1,22293 \pm 0,12684 \mu\text{M}$  trong khi giá trị  $IC_{50}$  của FA-GP-P123/PTX/QU là  $0,72783 \pm 0,11647 \mu\text{M}$  ( $P=0,0078 < 0,01$ ), điều này khẳng định vai trò tích cực của tác nhân hướng đích FA trong cấu trúc vật liệu FA-GP-P123.



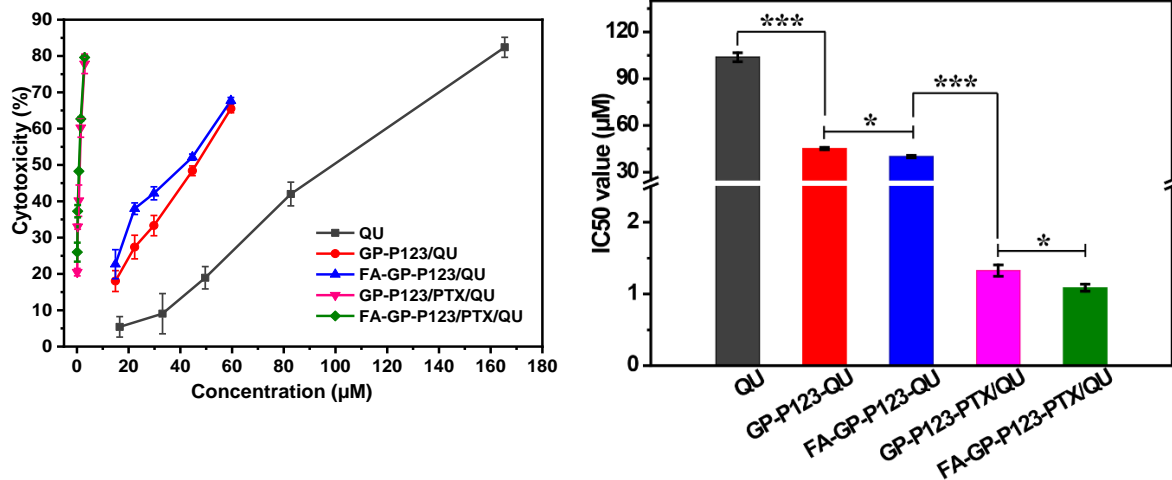
**Hình 3.38. Khả năng ức chế sự phát triển tế bào ung thư MCF-7 của PTX tự do và PTX được nang hóa bởi vật liệu nanogel**

( $n = 3$ , trung bình  $\pm$  S.D., ANOVA một chiều được sử dụng để phân tích thống kê. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$  và ns  $P \geq 0,05$  phản ánh sự khác biệt có ý nghĩa thống kê).

Hình 3.38 cho thấy giá trị  $IC_{50}$  tăng dần khi PTX được mang bởi vật liệu nanogel tổng hợp, giúp giảm độc tính của PTX so với PTX dạng tự do. PTX và GP-P123/PTX ( $P = 1,694 \times 10^{-5} < 0,001$ ) cho giá trị có sự khác biệt rất lớn, chứng tỏ hiệu quả tích cực của vật liệu mang GP-P123. Mẫu GP-P123/PTX và FA-GP-P123/PTX ( $P = 0,0788 > 0,05$ ) cho sự khác biệt không đáng kể, không có ý nghĩa thống kê, do đó FA không đóng vai trò trong trường hợp này. Nồng độ  $IC_{50}$  của GP-P123/PTX/QU là  $43,28514 \pm 4,48935$  nM trong khi đó  $IC_{50}$  của FA-GP-P123/PTX/QU là  $25,7612 \pm 4,12227$  nM ( $P = 0,0076 < 0,01$ ), sự khác biệt lớn, khẳng định vai trò tích cực của phối tử hướng đích FA trong cấu trúc vật liệu mang.

Từ các kết quả *in vitro* trên dòng tế bào MCF-7 cho thấy tiềm năng ứng dụng của hệ nanogel FA-GP-P123 có chức năng hướng đích tiêu diệt tế bào ung thư cũng như giảm độc tính của PTX, tăng sinh khả dụng của thuốc và tăng cường hiệu quả điều trị của thuốc.

### 3.5.3.3. Kết quả đánh giá *in vitro* hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư HeLa của nanogel FA-GP-P123 mang PTX và QU

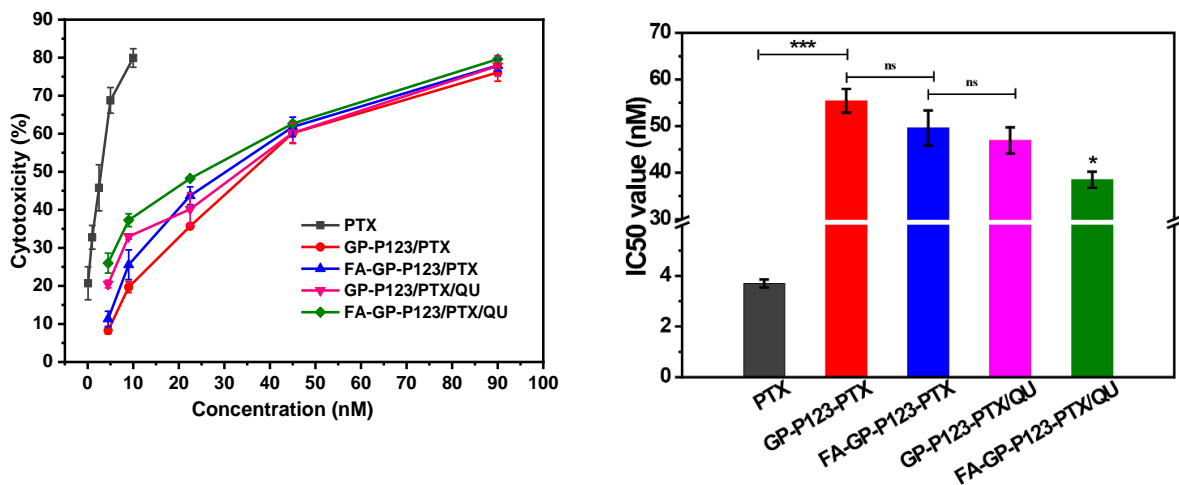


**Hình 3.39. Khả năng ức chế sự phát triển tế bào ung thư HeLa của QU tự do và QU được nang hóa bởi vật liệu nanogel**

( $n = 3$ , trung bình  $\pm$  S.D., ANOVA một chiều được sử dụng để phân tích thống kê. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$  và ns  $P \geq 0,05$  phản ánh sự khác biệt có ý nghĩa thống kê).



Trong thí nghiệm này, các mẫu được quy đổi về cùng nồng độ hoạt chất (QU/PTX) nhằm so sánh khả năng ức chế tế bào ung thư giữa thuốc tự do và vật liệu mang nanogel gelatin-pluronic. Dữ liệu phản ánh trên hình 3.39 là giá trị  $IC_{50}$  và phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào ung thư HeLa của các mẫu QU tự do và QU được mang trong hệ GP-P123/QU, FA-GP-P123/QU, GP-P123/PTX/QU, FA-GP-P123/PTX/QU. Kết quả thu được cho thấy khả năng sống sót của tế bào ung thư giảm mạnh bởi các mẫu GP-P123/PTX/QU, FA-GP-P123/PTX/QU ở nồng độ thấp hơn nhiều, trong khi các mẫu còn lại cần lượng thuốc tương đương nhau để có được cùng một giá trị phần trăm ức chế. Giá trị  $IC_{50}$  giảm dần khi QU được nang hóa vào vật liệu mang nanogel của copolyme, giá trị thu được từ các mẫu khảo sát đều có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Kết quả thu được giữa QU dạng tự do ( $IC_{50} > 90,0 \mu M$ ) và GP-P123/QU ( $IC_{50}$  chỉ gần  $45,0 \mu M$ ) ( $P = 0,0002 < 0,001$ ) có sự khác biệt rất lớn, chứng tỏ khả năng ức chế tế bào HeLa của QU khi được mang bởi vật liệu copolyme ghép tốt hơn.



**Hình 3.40. Khả năng ức chế sự phát triển tế bào ung thư HeLa của PTX tự do và PTX được nang hóa bởi vật liệu nanogel**

( $n = 3$ , trung bình  $\pm$  S.D., ANOVA một chiều được sử dụng để phân tích thống kê. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$  và ns  $P \geq 0,05$  chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê).

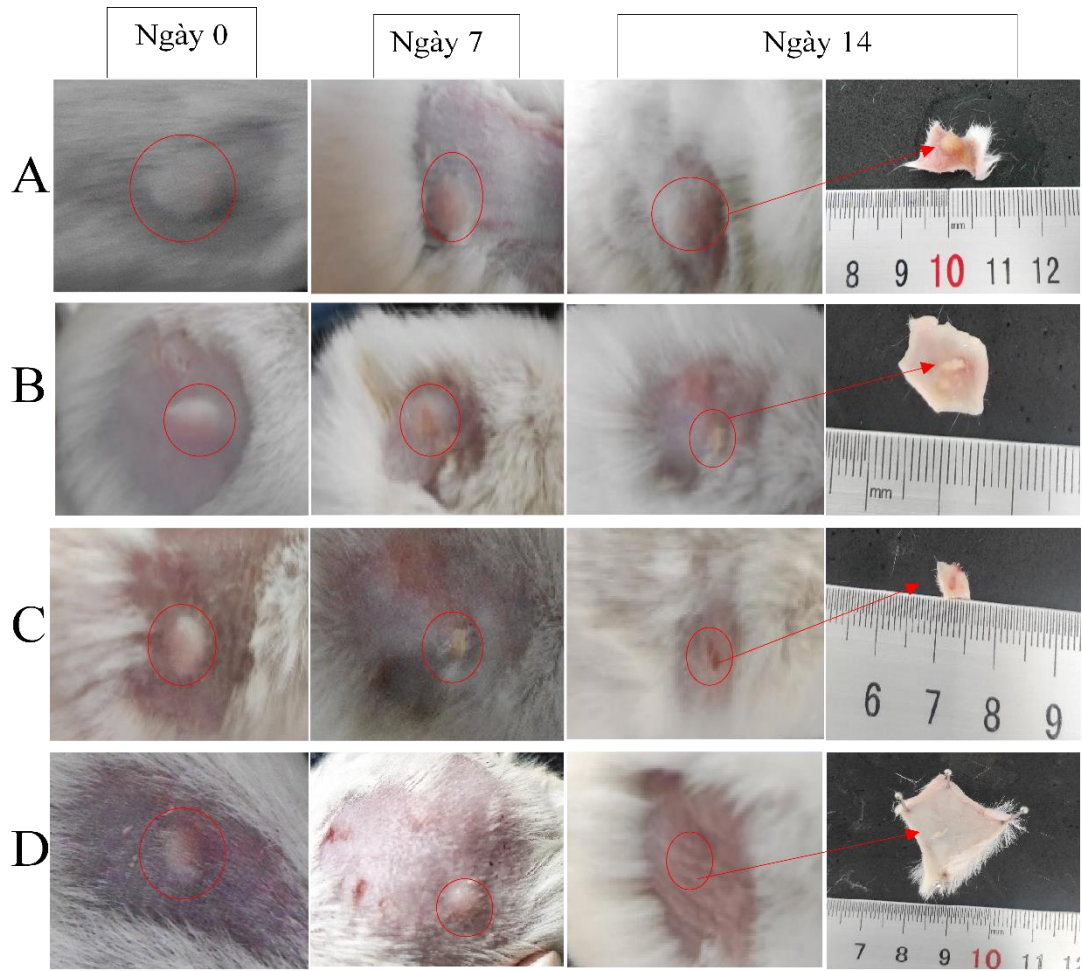
Dữ liệu từ hình 3.40 cho thấy giá trị  $IC_{50}$  tăng dần khi PTX được mang vào các vật liệu mang nanogel, các mẫu đều có sự khác biệt thống kê so với PTX tự do, chứng tỏ PTX được giữ trong cấu trúc hạt nanogel. Điều này rất có ý nghĩa khi PTX (một thuốc điều trị ung thư có những tác dụng phụ lên các tế bào lành trong cơ thể) giảm tiếp xúc

trực tiếp nên làm giảm độc tính của PTX, và có khả năng nhả chậm, dẫn đến tăng hiệu quả điều trị vì giữa PTX và GP-P123/PTX ( $P = 3,6965 \times 10^{-6} < 0,001$ ) cho kết quả khác biệt lớn. Khi có tác nhân hướng đích FA, giá trị  $IC_{50}$  của vật liệu mang hai loại thuốc FA-GP-P123/PTX/QU giảm xuống còn khoảng 38,0 nM so với GP-P123/PTX/QU), khoảng 47,0 nM. Điều này chứng minh hiệu quả hướng đích của FA trong vật liệu mang.

#### ***3.5.4. Kết quả đánh giá in vivo hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư của nanogel FA-GP-P123/PTX/QU***

Trên cơ sở tham khảo nhiều công bố trên thế giới về hướng sử dụng các hệ nano dẫn truyền thuốc PTX cũng như các kết quả kiểm tra tế bào, nhóm nghiên cứu thiết lập 4 nghiệm thức thử nghiệm như sau:

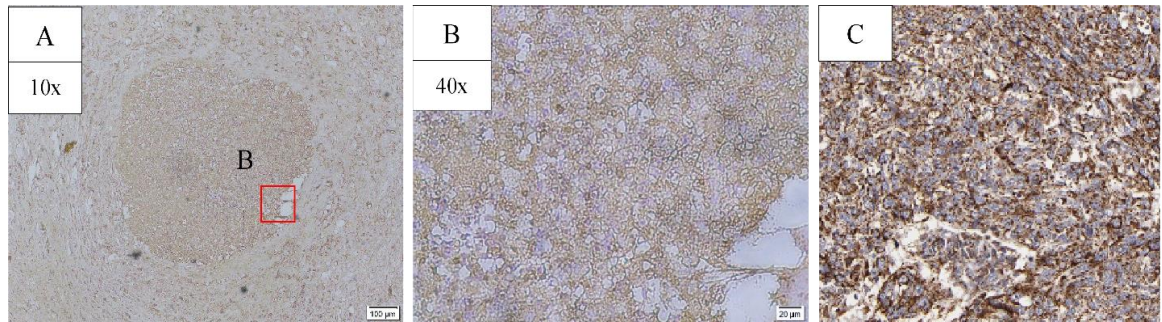
- + *Nghiệm thức 1: Chuột mang khối u được tiêm nước muối sinh lý (đối chứng).*
- + *Nghiệm thức 2: Chuột mang khối u được tiêm thuốc PTX (2,5 mg/kg chuột)*
- + *Nghiệm thức 3: Chuột mang khối u được tiêm thuốc PTX (2,5 mg/kg chuột) kết hợp QU.*
- + *Nghiệm thức 4: Chuột mang khối u được tiêm nanogel FA-GP-P123 mang PTX (2,5 mg/kg) kết hợp QU.*



**Hình 3.41. Kích thước khối u tại các thời điểm N0, N7 và N14**

((A): *Nghiệm thức NaCl 0.9%*; (B): *Nghiệm thức PTX*; (C): *Nghiệm thức PTX-QU*;  
(D): *Nghiệm thức FA-GP-P123/PTX/QU*)

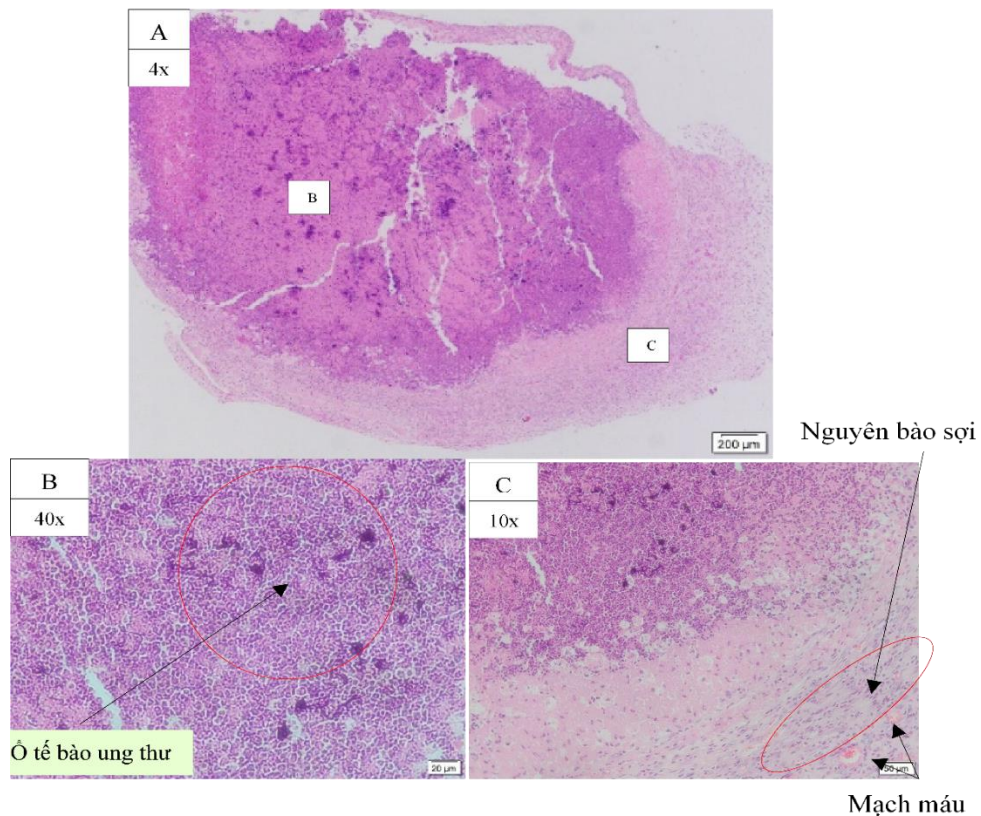
Chuột suy giảm miễn dịch được ghép tế bào ung thư MCF-7 có nguồn gốc từ người bằng cách tiêm  $1,5 \cdot 10^7$  tế bào/con vào vị trí dưới da vùng lưng chuột. Sau 2 – 3 ngày tiêm tế bào, có thể nhận thấy sự xuất hiện khối u rắn, cứng, gồ lên khỏi lớp da tại vị trí ghép. Khối u sau đó tiếp tục phát triển rõ và tăng dần thể tích trong suốt thời gian từ lúc bắt đầu tiêm tế bào cho đến khi kết thúc thí nghiệm. Sau quá trình gây tạo khối u, tiến hành chọn những chuột với yêu cầu thể tích khối u lớn hơn  $50 \text{ mm}^3$ , khối u rõ, ổn định, dễ đo kích thước và có thể quan sát bằng mắt. Xét về thể trạng, tất cả chuột có hiện tượng xù lông, sụt cân nhẹ trong 4 ngày đầu nhưng sau đó cân nặng tăng trở lại và ổn định cho đến giai đoạn tiêm thuốc thí nghiệm điều trị. Khối u tạo thành được đánh giá mô học.



**Hình 3.42. Hình thái tế bào trong mô khối u cắt lát**

*(Nhuộm hóa mô miễn dịch bằng kháng thể SOD2 (Sigma-Aldrich Co. LLC))*

So sánh cấu trúc mô học của khối u thu nhận được từ mô hình chuột mang khối u (hình 3.42A-B) với mẫu nhuộm của khối u gồm các tế bào ung thư vú từ người (hình 3.42C), tại thư viện The Human Protein Atlas cho thấy kết quả tương đương nhau: Tế bào chất đậm đặc (màu nâu), các nhân tế bào có màu tím, cho thấy mô hình khối u cấy tạo có thành phần chiếm đa số là các tế bào ung thư có nguồn gốc từ người.

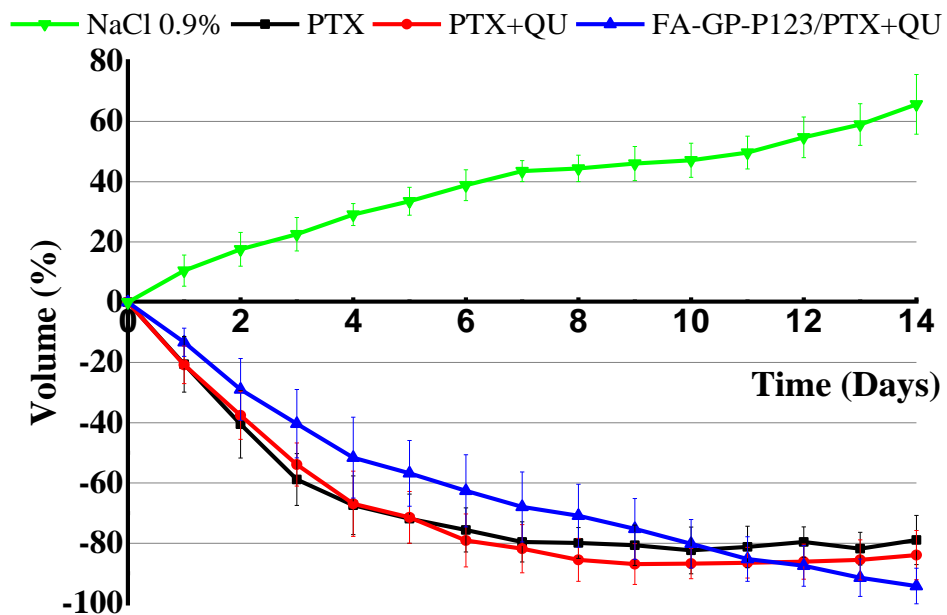


**Hình 3.43. So sánh hình thái khối u trước và sau khi gây tạo**

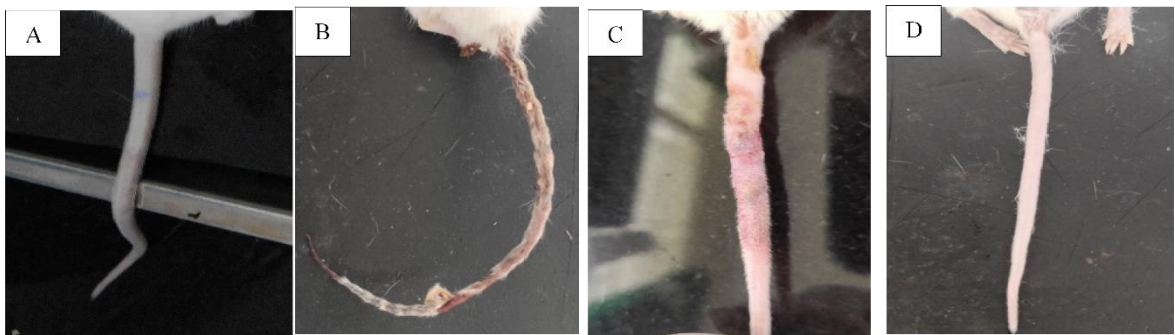
*((A) Hình thái khối u ban đầu; (B) Mô khối u có ô tế bào ung thư; (C) Vùng nguyên bào sợi có mạch máu được hình thành, bao quanh khối u)*



Phân tích mẫu cắt lát mô nhuộm H&E ở vật kính 4x (hình 3.43A), cho thấy trong khối u ở chuột có thành phần tế bào ung thư MCF-7, tế bào mỡ, tế bào nền, nguyên bào sợi. Trong khối u chuột xuất hiện nhiều ổ tế bào ung thư bắt màu tím đậm (hình 3.43B) và có nhiều mạch máu xâm nhập trong mô (tế bào hồng cầu hiện diện nhiều trong lòng mạch) để nuôi tế bào ung thư và giúp khối u phát triển, tăng thể tích (hình 3.43C). Từ đó, cho thấy khối u phù hợp để đánh giá khả năng tiêu giảm khối u của các loại thuốc chứa PTX và QU.



**Hình 3.44. Hiệu quả tác động của các công thức thuốc lên thể tích khối u**



**Hình 3.45: Hình dạng đuôi chuột của các nghiệm thức**

((A): Nghiệm thức muối sinh lý NaCl 0,9%; (B): Nghiệm thức PTX; (C): Nghiệm thức PTX+QU; (D): Nghiệm thức FA-GP-P123/PTX/QU))

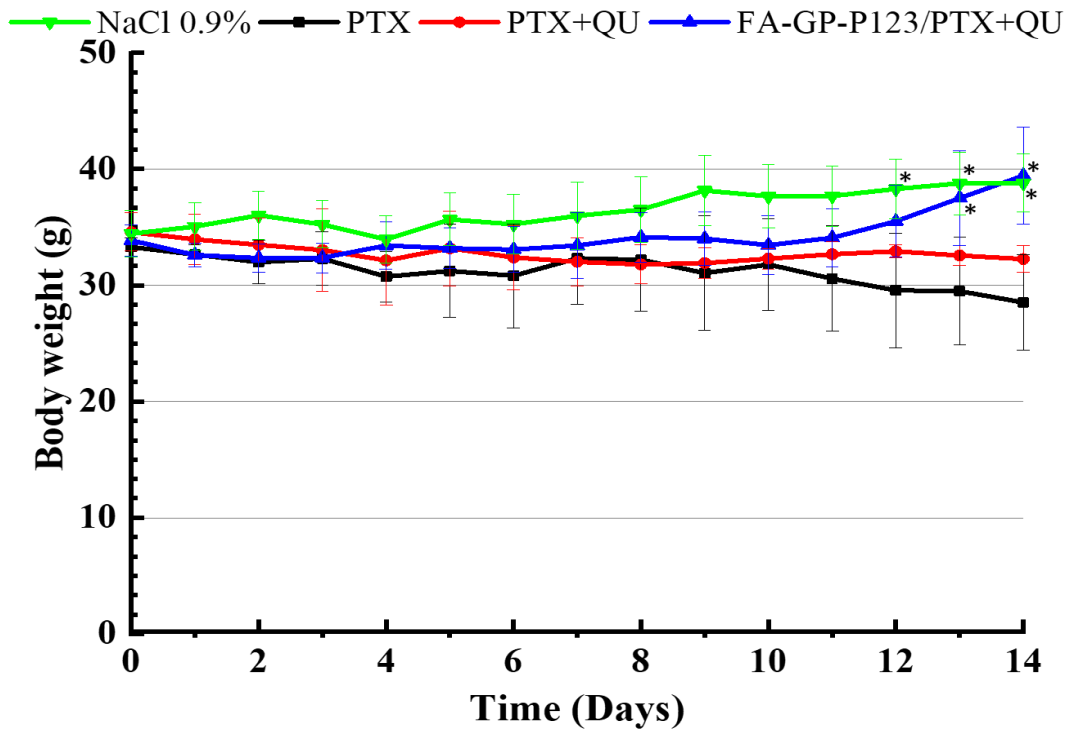
Từ quá trình quan sát khối u ở các thời điểm khảo sát (hình 3.41), biểu đồ tác động của các công thức thuốc lên thể tích khối u được thiết lập. Theo hình 3.44, nghiệm thức đối chứng NaCl 0,9% có sự tăng dần thể tích khối u qua các ngày thí nghiệm, từ N1 (ngày thứ nhất) đến N14 (ngày thứ 14), thể tích khối u tăng là  $65,66 \pm 9,9\%$ .

Đối với nghiệm thức sử dụng PTX dạng tự do, đến ngày thứ 5 của quá trình thử nghiệm, một con chuột ở mô hình này bị chết. Khối u có biểu hiện tăng giảm không ổn định, nhưng nhìn chung thì thể tích vẫn giảm được  $78,93 \pm 8,18\%$  sau 14 ngày thí nghiệm. Tuy nhiên, vùng đuôi của chuột có biểu hiện sưng viêm và hoại tử (hình 3.45B). Có thể nhận định rằng khả năng phân phối thuốc tới vị trí khối u không cao, đồng thời gây độc mạnh tới hệ miễn dịch của chuột.

Đối với nghiệm thức sử dụng kết hợp PTX+QU ở dạng tự do, ở ngày thử nghiệm N5 (ngày thứ 5) và N7 (ngày thứ 7), hai con chuột trong mô hình này chết, thể tích khối u giảm  $86,92 \pm 6,7\%$  sau 9 ngày. Tuy nhiên, có biểu hiện tăng sinh khối u sau đó, nhưng không cao, sau 14 ngày thể tích khối u chỉ giảm được  $83,94 \pm 8,15\%$ , chuột cũng bị viêm sưng đuôi ở vùng chích nhưng không xuất hiện dấu hiệu hoại tử (hình 3.45C). Khi kết hợp QU với PTX, hiệu quả điều trị cao hơn nhiều so với sử dụng đơn thuốc PTX, tuy nhiên lại có biểu hiện kháng thuốc làm giảm hiệu quả điều trị.

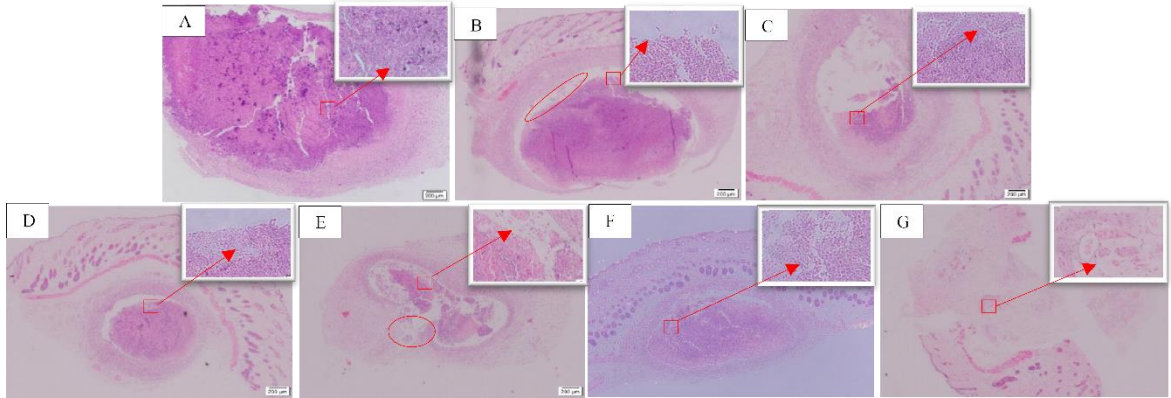
Sau cùng, với nghiệm thức nanogel FA-GP-P123 mang hai thuốc kết hợp PTX và QU, thể tích khối u giảm tới  $94,20 \pm 5,9\%$  sau 14 ngày thử nghiệm và chuột không xuất hiện sưng viêm ở vùng đuôi, nơi chích thuốc, đồng thời có một con trong nhóm có khối u bị triệt tiêu sau 14 ngày (hình 3.41D). Vùng đuôi của chuột không có biểu hiện sưng viêm hay hoại tử như 2 nghiệm thức thuốc tự do (hình 3.45D). So sánh các kết quả thí nghiệm cho thấy, vật liệu nanogel FA-GP-P123/PTX/QU có thể góp phần tăng hiệu quả tiêu diệt khối u và giảm đáng kể tác dụng phụ gây độc của thuốc. Hơn thế nữa, khi điều trị bằng hệ nanogel FA-GP-P123/PTX/QU giúp chuột hồi sức nhanh hơn so với khi sử dụng thuốc tự do. Kết luận này được khẳng định thông qua biểu đồ theo dõi khối lượng chuột qua các ngày thí nghiệm. Đối với các nghiệm thức thuốc tự do PTX và PTX+QU, khối lượng chuột giảm mạnh trong 14 ngày, trong khi đó ở nghiệm thức thuốc là hệ nanogel FA-GP-P123/PTX/QU khối lượng cơ thể chuột bắt đầu tăng cao ở ngày thứ 12

(hình 3.46). Khối lượng chuột ở nghiệm thức NaCl 0,9% luôn cao hơn so với các nghiệm thức khác, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê so với PTX tự do. So với PTX, nghiệm thức PTX+QU có khối lượng chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ( ngày 12,  $p = 0,1048$ ; ngày 13,  $p = 0,1589$ ; ngày 14,  $p = 0,1744$ ). Nhưng so với PTX, nghiệm thức FA-GP-P123/PTX+QU có khối lượng chuột thay đổi có ý nghĩa thống kê ở ngày 13 và 14 ( $p = 0,0355$  và  $p = 0,0224$ ). Điều này chứng tỏ hiệu quả của vật liệu FA-GP-P123 khi nang hóa hai thuốc kết hợp PTX+QU.



**Hình 3.46. Diễn biến khối lượng chuột ở các công thức thử nghiệm**

(ANOVA một chiều được sử dụng để phân tích thống kê so với PTX \*  $p < 0,05$  chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê)



**Hình 3.47. Hình ảnh nhuộm H&E của các nghiệm thức**

((A): Nghiệm thức NaCl 0,9% tại N14; (B,C): Nghiệm thức PTX tại N5 và N14; (D,E): Nghiệm thức PTX+QU tại N5 và N14; (F,G): Nghiệm thức FA-GP-P123/PTX/QU tại N5 và N14)

Phân tích mô học cho thấy, trong mô hình đối chứng (hình 3.47A) mật độ tế bào ung thư rất cao, đan xen giữa chất nền dày đặc sau 14 ngày thí nghiệm. Trong khi đó nghiệm thức tiêm PTX ở ngày thứ 5 (Hình 3.47B) một phần nguyên bào sợi bị tiêu biến và vùng tế bào bắt màu tím đậm giảm đáng kể, có sự phân rã mô và chất nền (vùng tế bào bắt màu nhạt) và tới ngày thứ 14 mật độ tế bào ung thư đã giảm mạnh, không còn hình dạng ban đầu, cũng có sự tiêu biến nguyên bào sợi và phân hủy chất nền ở mức cao (hình 3.47C). Với nghiệm thức PTX kết hợp với QU, ở thời điểm ngày thứ 5 của thí nghiệm, các tế bào ung thư cũng bị phá hủy một phần (hình 3.47D), tới ngày thứ 14 hiệu quả điều trị của hai thuốc kết hợp PTX và QU rõ rệt hơn, mật độ tế bào giảm mạnh, đồng thời một phần nguyên bào sợi bao quanh khối u bị phá hủy làm hình dạng khối u biến dạng, chất nền tế bào chiếm đa số (hình 3.47E). Điều này cho thấy độc tính cao của thuốc PTX và QU ở dạng tự do đối với tế bào ung thư.

Đối với mẫu sử dụng kết hợp PTX và QU được mang bởi vật liệu nanogel FA-GP-P123 (hình 3.47F,G), ở ngày thứ 5, các tế bào ung thư không còn gắn kết chặt chẽ, chất nền bị phân rã và sau 14 ngày khối u chỉ còn lại rất ít bên trong không bào, đồng thời lớp nguyên bào sợi bao quanh vùng tế bào ung thư cũng bị biến dạng và tiêu biến gần như toàn bộ. Khi so sánh kết quả với hai nghiệm thức sử dụng thuốc tự do ở cả hai mốc thời gian N5 và N14, có thể thấy được lượng tế bào ung thư ở nghiệm thức FA-GP-



P123/PTX/QU giảm mạnh và nhiều hơn đáng kể so với hai nghiệm thức còn lại.

Từ kết quả thí nghiệm thu được, có thể đưa ra nhận định hệ nanogel FA-GP-P123/PTX/QU có các ưu điểm nổi bật so với các nghiệm thức cùng tiến hành thí nghiệm, cụ thể, có khả năng tiêu diệt khối u cao hơn ( $94,20 \pm 5,9\%$  sau 14 ngày), làm giảm độc tính, giảm các tác dụng phụ, giảm khả năng kháng thuốc và tăng sinh khả dụng thuốc so với thuốc sử dụng ở dạng tự do. Đồng thời, kết quả nhuộm H&E cũng cho thấy mật độ tế bào ung thư giảm mạnh khi sử dụng hệ nanogel FA-GP-P123/PTX/QU. Điều này cho thấy hệ nanogel tổng hợp FA-GP-P123 nang hóa kết hợp hai loại thuốc PTX và QU có hiệu quả cao trong điều trị ung thư.

## KẾT LUẬN

Trải qua quá trình nghiên cứu, luận án đã đạt được các kết quả sau:

1. Đã tổng hợp thành công các vật liệu ứng dụng dẫn truyền thuốc kích thước hạt nano từ gelatin ghép pluronic nhằm kết hợp đặc tính của hai nguyên liệu này. Các vật liệu nanogel GP-P123 và FA-GP-P123 là các vật liệu mang mới, được gắn thành công tác nhân hướng đích folic acid chưa được nghiên cứu trước đây. Các sản phẩm nanogel tổng hợp được đánh giá cấu trúc bằng các phương pháp  $^1\text{H-NMR}$ , FT-IR, TGA, CMC/CGC, DLS, TEM.

2. Các vật liệu nanogel GP tổng hợp (Ge:P123, tỷ lệ 1:4, Ge:F127, tỷ lệ 1:18) mang thuốc QU đạt từ 2,85 đến 13,29%wt, mang PTX đạt từ 0,5 đến 2%wt. Trong đó, nanogel GP-P123 ở tỷ lệ ghép 1:4 của gelatin-pluronic P123 có khả năng mang QU và PTX cao nhất, phù hợp với nhận định về đặc tính của vật liệu như giá trị CMC/CGC càng nhỏ, khả năng tạo gel và nang hóa thuốc có đặc tính kỵ nước càng lớn, thế Zeta có giá trị dương càng lớn sẽ nang hóa thuốc mang điện tích âm càng tốt. Các đặc tính thuận lợi này được tạo ra khi kết hợp ghép gelatin với pluronic. Đây là tính mới của luận án.

3. Đã tiến hành nang hóa thành công đồng thời hai loại thuốc PTX và QU lên vật liệu nanogel hướng đích FA-GP-P123. Việc kết hợp PTX với các loại thuốc khác cũng đã được nghiên cứu và cho kết quả tốt hơn so với phác đồ chỉ dùng đơn lẻ PTX. Khi so sánh giữa hai vật liệu nanogel GP-P123 và FA-GP-P123 với cùng tỷ lệ ghép Ge:P123 là 1:4, cho thấy vật liệu FA-GP-P123 có khả năng mang PTX tốt hơn.

4. Vật liệu nanogel GP-P123 và FA-GP-P123 (cùng tỷ lệ ghép Ge:P123 là 1:4) mang QU và PTX có tốc độ giải phóng thuốc chậm hơn nhiều so với mẫu QU và PTX dạng tự do (đối chứng) nhờ các phân tử thuốc kỵ nước được nang hóa trong nhân – phần kỵ nước của hạt nano, đồng thời được bao bọc, tương tác tạo sự ổn định cấu trúc hạt của lớp vỏ gelatin. Ngoài ra, so sánh giữa 2 giá trị pH khảo sát cho thấy phần trăm thuốc QU và PTX giải phóng ra ở môi trường pH = 5,5 – giống với giá trị pH môi trường ngoại bào của tế bào ung thư) lớn hơn so với môi trường pH = 7,4 – giống với giá trị pH của

cơ thể người. Điều này góp phần nâng cao khả năng giải phóng thuốc hướng đích tới các tế bào ung thư.

5. Vật liệu nanogel FA-GP-P123 (gắn tác nhân hướng đích FA) mang QU và PTX có khả năng ức chế sự phát triển của dòng tế bào MCF-7/Hela cao hơn so với QU và PTX được mang bởi nanogel GP-P123 tương ứng do trên bề mặt tế bào ung thư chứa nhiều các thụ thể folate, từ đó, các hạt nano mang thuốc có gắn FA sẽ dễ dàng được hấp thụ vào các tế bào ung thư hơn.

6. Vật liệu nanogel FA-GP-P123 khi được ứng dụng mang kết hợp đồng thời hai loại thuốc là PTX và QU đã cho hiệu quả cao với thử nghiệm trên mô hình chuột nhắt trắng mang khối u dòng tế bào MCF-7 ghép dị loài từ người. Cụ thể, khối u có thể tích giảm đến  $94,20 \pm 5,9\%$  sau 14 ngày thử nghiệm. Ngoài ra, thuốc PTX có độc tính giảm hơn nhiều so với mẫu PTX dạng tự do (đối chứng), chuột không xuất hiện triệu chứng sưng viêm và hoại tử ở vùng đuôi, nơi tiêm thuốc. Điều này phù hợp với kết quả thí nghiệm về khả năng giải phóng chậm PTX của vật liệu mang, một trong những mục tiêu quan trọng cần hướng tới của luận án, trong đó nanogel FA-GP-P123 mang đồng thời hai thuốc PTX, QU chưa được nghiên cứu và thử nghiệm trên động vật trước đây.

## KIẾN NGHỊ

Sau khi luận án được thông qua, tôi sẽ tiếp tục nghiên cứu đề tài trên với các thí nghiệm tiến hành khảo sát khả năng mang các loại thuốc chống ung thư khác của các vật liệu nanogel tổng hợp được nhằm đạt được hiệu quả tốt hơn.

Tiếp tục nghiên cứu đánh giá trên chuột nude mice được cấy gene gây suy giảm miễn dịch (đây là mô hình đánh giá có độ ổn định và chính xác nhất) kết hợp đa thuốc chống ung thư trên các vật liệu nanogel tổng hợp được, nhằm tăng hiệu quả điều trị cũng như giảm độc tính của thuốc.

Nghiên cứu biến tính các copolymer ghép với các tác nhân hướng đích, nhằm tăng hiệu quả điều trị khối u của các loại thuốc chống ung thư kém tan trong nước.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ**

1. **Van Thoai, D.**, Nguyen, D. T., Nguyen, N. H., Nguyen, V. T., Doan, P., Nguyen, B. T., Le, V. T., Nguyen, N. T. & Quyen, T. N. *Lipophilic effect of various pluronic-grafted gelatin copolymers on the quercetin delivery efficiency in these self-assembly nanogels.* Journal of Polymer Research, 27(12), 1-12.,2020. (IF: **3.097**, Q2)
2. Trung Nguyen Dinh, **Thoai Dinh Van**, Hang Dang Le, Nam Nguyen Dang, Bach, Long Giang, Truc Nguyen Cong, Bich Tram Nguyen Thi, Van Thu Le, Ngoc Quyen Tran, *Dual interactions of amphiphilic gelatin copolymer and nanocurcumin improving the delivery efficiency of the nanogels,* Polymers. 11(5), 814 (2019) (IF **4.329**, Q1).

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Allen, T.M. and P.R. Cullis, 2004, Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*. 303(5665): p. 1818-1822.
2. Bandyopadhyay, A.K., *Nano materials*. 2008: New Age International.
3. Mishra, I., 2011, Dendrimer: a novel drug delivery system. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 1(2).
4. Kim, S., et al., 2009, Engineered polymers for advanced drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 71(3): p. 420-430.
5. C Silva, A., et al., 2015, Delivery systems for biopharmaceuticals. Part II: liposomes, micelles, microemulsions and dendrimers. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 16(11): p. 955-965.
6. Wu, Y., et al., 2005, Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *International journal of pharmaceutics*. 295(1-2): p. 235-245.
7. Sharma, A., et al., 2016, Nanogel—an advanced drug delivery tool: Current and future. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 44(1): p. 165-177.
8. Sahu, A., et al., 2011, Encapsulation of curcumin in Pluronic block copolymer micelles for drug delivery applications. *Journal of biomaterials applications*. 25(6): p. 619-639.
9. Sultana, F., et al., 2013, An overview of nanogel drug delivery system. *J Appl Pharm Sci*. 3(8): p. 95-105.
10. Alliot, J., et al., 2019, Tumor targeted micellar nanocarriers assembled from epipodophyllotoxin-based amphiphiles. *Nanoscale*. 11(19): p. 9756-9759.
11. Hanafy, N.A., M. El-Kemary, and S. Leporatti, 2018, Micelles structure development as a strategy to improve smart cancer therapy. *Cancers*. 10(7): p. 238.
12. Coester, C., et al., 2000, Gelatin nanoparticles by two step desolvation a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *Journal of microencapsulation*. 17(2): p. 187-193.
13. Kim, S., et al., 2010, Overcoming the barriers in micellar drug delivery: loading efficiency, in vivo stability, and micelle–cell interaction. *Expert opinion on drug delivery*. 7(1): p. 49-62.
14. Savić, R., et al., 2006, Assessment of the integrity of poly (caprolactone)-b-poly (ethylene oxide) micelles under biological conditions: a fluorogenic-based approach. *Langmuir*. 22(8): p. 3570-3578.
15. Ragi, C., et al., 2005, The effects of poly (ethylene glycol) on the solution structure of human serum albumin. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. 78(5): p. 231-236.
16. Mikhail, A.S. and C. Allen, 2009, Block copolymer micelles for delivery of cancer therapy: transport at the whole body, tissue and cellular levels. *Journal of Controlled Release*. 138(3): p. 214-223.

17. Kedar, U., et al., 2010, Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 6(6): p. 714-729.
18. Yadav, H.K., N.A. Al Halabi, and G.A. Alsalloum, 2017, Nanogels as novel drug delivery systems-a review. *J. Pharm. Pharm. Res.* 1(5): p. 1-8.
19. Sahiner, N., 2009, A facile method for the preparation of poly (4-vinylpyridine) nanoparticles and their characterization. *Turkish Journal of Chemistry*. 33(1): p. 23-31.
20. Lu, Z., et al., 2004, Paclitaxel-loaded gelatin nanoparticles for intravesical bladder cancer therapy. *Clinical Cancer Research*. 10(22): p. 7677-7684.
21. Mohanty, B., et al., 2005, Synthesis of gelatin nanoparticles via simple coacervation. *Journal of Surface Science and Technology*. 21(3/4): p. 149.
22. Cascone, M.G., et al., 2002, Gelatin nanoparticles produced by a simple W/O emulsion as delivery system for methotrexate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 13(5): p. 523-526.
23. Bajpai, A. and J. Choubey, 2006, Design of gelatin nanoparticles as swelling controlled delivery system for chloroquine phosphate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 17(4): p. 345-358.
24. Bajpai, A. and J. Choubey, 2006, In vitro release dynamics of an anticancer drug from swellable gelatin nanoparticles. *Journal of applied polymer science*. 101(4): p. 2320-2332.
25. Choubey, J. and A. Bajpai, 2010, Investigation on magnetically controlled delivery of doxorubicin from superparamagnetic nanocarriers of gelatin crosslinked with genipin. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 21(5): p. 1573-1586.
26. Zhao, Y.-Z., et al., 2012, Experiment on the feasibility of using modified gelatin nanoparticles as insulin pulmonary administration system for diabetes therapy. *Acta diabetologica*. 49(4): p. 315-325.
27. Gupta, A.K., et al., 2004, Effect of cellular uptake of gelatin nanoparticles on adhesion, morphology and cytoskeleton organisation of human fibroblasts. *Journal of Controlled Release*. 95(2): p. 197-207.
28. Hou, M., M. Kim, and D. Shah, 1988, A light scattering study on the droplet size and interdroplet interaction in microemulsions of AOT—oil—water system. *Journal of colloid and interface science*. 123(2): p. 398-412.
29. Quintanar-Guerrero, D., et al., 1998, Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug development and industrial pharmacy*. 24(12): p. 1113-1128.
30. Lee, E.J., et al., 2012, Studies on the characteristics of drug-loaded gelatin nanoparticles prepared by nanoprecipitation. *Bioprocess and biosystems engineering*. 35(1): p. 297-307.
31. Bilati, U., E. Allémann, and E. Doelker, 2005, Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 24(1): p. 67-75.

32. Khan, S.A. and M. Schneider, 2013, Improvement of nanoprecipitation technique for preparation of gelatin nanoparticles and potential macromolecular drug loading. *Macromolecular bioscience*. 13(4): p. 455-463.
33. Kim, K.J. and Y. Byun, 1999, Preparation and characterizations of self-assembled PEGylated gelatin nanoparticles. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 4(3): p. 210-214.
34. Andhariya, N., et al., 2013, Folic acid conjugated magnetic drug delivery system for controlled release of doxorubicin. *Journal of nanoparticle research*. 15(1): p. 1-12.
35. Fung, S., H. Yang, and P. Chen, 2007, Formation of colloidal suspension of hydrophobic compounds with an amphiphilic self-assembling peptide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 55(2): p. 200-211.
36. Li, W.-M., D.-M. Liu, and S.-Y. Chen, 2011, Amphiphilically-modified gelatin nanoparticles: Self-assembly behavior, controlled biodegradability, and rapid cellular uptake for intracellular drug delivery. *Journal of Materials Chemistry*. 21(33): p. 12381-12388.
37. Won, Y.-W., et al., 2011, Nano self-assembly of recombinant human gelatin conjugated with  $\alpha$ -tocopheryl succinate for Hsp90 inhibitor, 17-AAG, delivery. *ACS nano*. 5(5): p. 3839-3848.
38. Tanigo, T., R. Takaoka, and Y. Tabata, 2010, Sustained release of water-insoluble simvastatin from biodegradable hydrogel augments bone regeneration. *Journal of Controlled Release*. 143(2): p. 201-206.
39. Han, S., et al., 2013, Construction of amphiphilic copolymer nanoparticles based on gelatin as drug carriers for doxorubicin delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 102: p. 833-841.
40. Elzoghby, A.O., 2013, Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: reviewing three decades of research. *Journal of Controlled Release*. 172(3): p. 1075-1091.
41. Chen, Y.-C., et al., 2010, Novel technology for the preparation of self-assembled catechin/gelatin nanoparticles and their characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(11): p. 6728-6734.
42. Li, Z. and L. Gu, 2011, Effects of mass ratio, pH, temperature, and reaction time on fabrication of partially purified pomegranate ellagitannin– gelatin nanoparticles. *Journal of agricultural and food chemistry*. 59(8): p. 4225-4231.
43. Ai, H., S.A. Jones, and Y.M. Lvov, 2003, Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles. *Cell biochemistry and biophysics*. 39(1): p. 23-43.
44. Shutava, T.G., et al., 2009, Layer-by-layer-coated gelatin nanoparticles as a vehicle for delivery of natural polyphenols. *ACS nano*. 3(7): p. 1877-1885.
45. Huỳnh Thị Ngọc, T., *Nghiên cứu điều chế Hydrogel nhạy cảm với nhiệt độ cơ thể từ dẫn xuất Gelatin để mang nhà chậm Curcumin ứng dụng trong chữa lành vết thương*. 2017, Đại học Trà Vinh.
46. Duconseille, A., et al., 2015, Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. *Food hydrocolloids*. 43: p. 360-376.



47. Mariod, A.A. and H. Fadul, 2013, Gelatin, source, extraction and industrial applications. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 12(2): p. 135-147.
48. Kim, D.H., et al., 2010, Preparation of thermosensitive gelatin-pluronic copolymer for cartilage tissue engineering. *Macromolecular research*. 18(4): p. 387-391.
49. Kommareddy, S., D.B. Shenoy, and M.M. Amiji, 2007, Gelatin nanoparticles and their biofunctionalization. *Nanotechnologies for the life sciences: Online*.
50. Leo, E., et al., 1997, Doxorubicin-loaded gelatin nanoparticles stabilized by glutaraldehyde: involvement of the drug in the cross-linking process. *International journal of Pharmaceutics*. 155(1): p. 75-82.
51. Nahar, M., et al., 2008, Development, characterization, and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 4(3): p. 252-261.
52. Vandervoort, J. and A. Ludwig, 2004, Preparation and evaluation of drug-loaded gelatin nanoparticles for topical ophthalmic use. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 57(2): p. 251-261.
53. Truong-Le, V.L., J.T. August, and K.W. Leong, 1998, Controlled gene delivery by DNA-gelatin nanospheres. *Human gene therapy*. 9(12): p. 1709-1717.
54. Kaul, G. and M. Amiji, 2002, Long-circulating poly (ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles for intracellular delivery. *Pharmaceutical research*. 19(7): p. 1061-1067.
55. Leo, E., R. Cameroni, and F. Forni, 1999, Dynamic dialysis for the drug release evaluation from doxorubicin-gelatin nanoparticle conjugates. *International journal of pharmaceutics*. 180(1): p. 23-30.
56. Saxena, A., et al., 2005, Effect of molecular weight heterogeneity on drug encapsulation efficiency of gelatin nano-particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 45(1): p. 42-48.
57. Won, Y.-W. and Y.-H. Kim, 2009, Preparation and cytotoxicity comparison of type A gelatin nanoparticles with recombinant human gelatin nanoparticles. *Macromolecular Research*. 17(7): p. 464-468.
58. Ofokansi, K., et al., 2010, Matrix-loaded biodegradable gelatin nanoparticles as new approach to improve drug loading and delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 76(1): p. 1-9.
59. Abrams, D., et al., 2006, Optimization of a two-step desolvation method for preparing gelatin nanoparticles and cell uptake studies in 143B osteosarcoma cancer cells.
60. Brzoska, M., et al., 2004, Incorporation of biodegradable nanoparticles into human airway epithelium cells—in vitro study of the suitability as a vehicle for drug or gene delivery in pulmonary diseases. *Biochemical and biophysical research communications*. 318(2): p. 562-570.
61. Karthikeyan, S., et al., 2013, Anticancer activity of resveratrol-loaded gelatin nanoparticles on NCI-H460 non-small cell lung cancer cells. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 3(1): p. 64-73.

62. Won, Y.-W. and Y.-H. Kim, 2008, Recombinant human gelatin nanoparticles as a protein drug carrier. *Journal of Controlled Release*. 127(2): p. 154-161.
63. Fuchs, S., et al., 2010, Transglutaminase: new insights into gelatin nanoparticle cross-linking. *Journal of microencapsulation*. 27(8): p. 747-754.
64. Kuntworbe, N. and R. Al-Kassas, 2012, Design and in vitro haemolytic evaluation of cryptolepine hydrochloride-loaded gelatine nanoparticles as a novel approach for the treatment of malaria. *Aaps Pharmscitech*. 13(2): p. 568-581.
65. Zillies, J.C., et al., 2008, Formulation development of freeze-dried oligonucleotide-loaded gelatin nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 70(2): p. 514-521.
66. Schuster, C., et al., 2016, Evaluation of cell binding to collagen and gelatin: a study of the effect of 2D and 3D architecture and surface chemistry. *J Mater Sci Mater Med*. 27: p. 148.
67. Van Vlierberghe, S., et al., *Porous hydrogel biomedical foam scaffolds for tissue repair*, in *Biomedical foams for tissue engineering applications*. 2014, Elsevier. p. 335-390.
68. Sun, C.-K., et al., 2021, Transglutaminase cross-linked gelatin-alginate-antibacterial hydrogel as the drug delivery-coatings for implant-related infections. *Polymers*. 13(3): p. 414.
69. Hermida-Merino, C., et al., 2022, Characterization of Tuna Gelatin-Based Hydrogels as a Matrix for Drug Delivery. *Gels*. 8(4): p. 237.
70. Russo, E. and C. Villa, 2019, Poloxamer Hydrogels for Biomedical Applications. *Pharmaceutics*. 11(12).
71. Zarrintaj, P., et al., 2020, Poloxamer: A versatile tri-block copolymer for biomedical applications. *Acta Biomater*. 110: p. 37-67.
72. Batrakova, E.V. and A.V. Kabanov, 2008, Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J Control Release*. 130(2): p. 98-106.
73. Choi, J.H., et al., 2011, Self-assembled nanogel of pluronic-conjugated heparin as a versatile drug nanocarrier. *Macromolecular Research*. 19(2): p. 180-188.
74. Batrakova, E.V. and A.V. Kabanov, 2008, Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of controlled release*. 130(2): p. 98-106.
75. Luo, L., et al., 2016, Efficient inhibition of ovarian cancer by degradable nanoparticle-delivered survivin T34A gene. *International journal of nanomedicine*. 11: p. 501.
76. Tong, N.-A.N., et al., 2016, Aqueated cisplatin and heparin-pluronic nanocomplexes exhibiting sustainable release of active platinum compound and NCI-H460 lung cancer cell antiproliferation. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*. 27(8): p. 709-720.
77. Phuong Thu, H., et al., 2013, Preparation and biological properties of platinum (II) complex-loaded copolymer PLA-TPGS. *Journal of Nanomaterials*. 2013.

78. Dang, L.H., et al., 2019, Effect of Ultrasonication on Self-Assembled Nanostructures Formed by Amphiphilic Positive-Charged Copolymers and Negative-Charged Drug. *ACS Omega*. 4(3): p. 4540-4552.
79. Pham, L., et al., 2019, A dual synergistic of curcumin and gelatin on thermal-responsive hydrogel based on Chitosan-P123 in wound healing application. *Biomed Pharmacother*. 117: p. 109183.
80. Van Thoai, D., et al., 2020, Lipophilic effect of various pluronic-grafted gelatin copolymers on the quercetin delivery efficiency in these self-assembly nanogels. *Journal of Polymer Research*. 27(12).
81. Nguyen, D.T., et al., 2019, Dual interactions of amphiphilic gelatin copolymer and nanocurcumin improving the delivery efficiency of the nanogels. *Polymers*. 11(5): p. 814.
82. Nguyen, N.T., et al., 2018, Synergic Activity Against MCF-7 Breast Cancer Cell Growth of Nanocurcumin-Encapsulated and Cisplatin-Complexed Nanogels. *Molecules*. 23(12).
83. Dang, L.H., et al., 2019, Injectable nanocurcumin-dispersed gelatin-pluronic nanocomposite hydrogel platform for burn wound treatment. *Bulletin of Materials Science*. 42(2).
84. Ahmad, A., 2019, Breast cancer statistics: recent trends. *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance*: p. 1-7.
85. Crown, J., O'Leary, M., & Ooi, W. S., 2004, Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience. *The oncologist*. 9: p. 24-32.
86. Moo, T.A., Sanford, R., Dang, C., & Morrow, M., 2018, Overview of breast cancer therapy. *PET clinics*. 13(3): p. 339-354.
87. Anampa, J., Makower, D., & Sparano, J. A., 2015, Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview. *BMC medicine*. 13(1): p. 1-13.
88. Rouzier, R., Perou, C. M., Symmans, W. F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., ... & Pusztai, L., 2005, Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clinical cancer research*. 11(16): p. 5678-5685.
89. Jung, J., 2014, Human tumor xenograft models for preclinical assessment of anticancer drug development. *Toxicological research*. 30(1): p. 1-5.
90. Kossatz, S., Grandke, J., Couleaud, P., Latorre, A., Aires, A., Crosbie-Staunton, K., ... & Hilger, I., 2015, Efficient treatment of breast cancer xenografts with multifunctionalized iron oxide nanoparticles combining magnetic hyperthermia and anti-cancer drug delivery. *Breast Cancer Research*, . 17(1): p. 1-17.
91. Rugo, H.S., Barry, W. T., Moreno-Aspitia, A., Lyss, A. P., Cirrincione, C., Leung, E., ... & Winer, E. P., 2015, Randomized phase III trial of paclitaxel once per week compared with nanoparticle albumin-bound nab-paclitaxel once per week or ixabepilone with bevacizumab as first-line chemotherapy for locally recurrent or metastatic breast cancer: CALGB 40502/NCCTG N063H (Alliance). *Journal of Clinical Oncology*. 33(21): p. 2361.

92. Ou-yang, Z., et al., 2013, Pharmacokinetic study of rutin and quercetin in rats after oral administration of total flavones of mulberry leaf extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 23: p. 776-782.
93. Le Huy, H., et al., 2019, Study of Ultrasound-assisted Acid Hydrolysis to Obtain Quercetin and their Antioxidant Activities from some Plants. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*. 35(4).
94. Xu, D., et al., 2019, Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules*. 24(6): p. 1123.
95. Massi, A., et al., 2017, Research progress in the modification of quercetin leading to anticancer agents. *Molecules*. 22(8): p. 1270.
96. Wangsawangrung, N., et al., 2022, Quercetin/Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complex-Loaded Hydrogels for Accelerated Wound Healing. *Gels*. 8(9): p. 573.
97. Gibellini, L., et al., 2011, Quercetin and cancer chemoprevention. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2011.
98. Crowell, L., *Localization of Paclitaxel*. 2018, Worcester Polytechnic Institute.
99. Shu, Y., et al., 2018, RNA-based micelles: A novel platform for paclitaxel loading and delivery. *Journal of Controlled Release*. 276: p. 17-29.
100. Bharadwaj, R. and H. Yu, 2004, The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene*. 23(11): p. 2016-2027.
101. Brito, D.A., Z. Yang, and C.L. Rieder, 2008, Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied. *The Journal of cell biology*. 182(4): p. 623-629.
102. Jordan, M.A. and L. Wilson, 2004, Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature reviews cancer*. 4(4): p. 253-265.
103. Ganguly, A., H. Yang, and F. Cabral, 2010, Paclitaxel-dependent cell lines reveal a novel drug activity. *Molecular cancer therapeutics*. 9(11): p. 2914-2923.
104. Löwe, J., et al., 2001, Refined structure of  $\alpha\beta$ -tubulin at 3.5 Å resolution. *Journal of molecular biology*. 313(5): p. 1045-1057.
105. Feng, S.-s. and G. Huang, 2001, Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol®) from nanospheres of biodegradable polymers. *Journal of Controlled Release*. 71(1): p. 53-69.
106. Roni, M.A., G. Kibria, and R.U. JALIL, 2009, In vitro studies of controlled release alfuzosin matrix tablets prepared with ethylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose.
107. Gao, X., et al., 2015, Combined Delivery and Anti-Cancer Activity of Paclitaxel and Curcumin Using Polymeric Micelles. *J Biomed Nanotechnol*. 11(4): p. 578-89.
108. Han, L.M., et al., 2006, Pharmacokinetics and biodistribution of polymeric micelles of paclitaxel with Pluronic P123. *Acta Pharmacol Sin*. 27(6): p. 747-53.
109. Zhan, Y., et al., 2014, Potentiation of paclitaxel activity by curcumin in human breast cancer cell by modulating apoptosis and inhibiting EGFR signaling. *Arch Pharm Res*. 37(8): p. 1086-95.

110. Hyun, H., et al., 2021, Injectable glycol chitosan hydrogel containing folic acid-functionalized cyclodextrin-paclitaxel complex for breast cancer therapy. *Nanomaterials*. 11(2): p. 317.
111. Omtvedt, L.A., et al., 2021, Alginate hydrogels functionalized with  $\beta$ -cyclodextrin as a local paclitaxel delivery system. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 109(12): p. 2625-2639.
112. Cheung, A., et al., 2016, Targeting folate receptor alpha for cancer treatment. *Oncotarget*. 7(32): p. 52553.
113. Barbu, E., et al., 2021, Conjugation of folic acid with TEMPO-oxidized cellulose hydrogel for doxorubicin administration. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*. 2: p. 100019.
114. Parin, F.N., et al., 2022, Co-electrospun-electrosprayed PVA/folic acid nanofibers for transdermal drug delivery: Preparation, characterization, and in vitro cytocompatibility. *Journal of Industrial Textiles*. 51(1\_suppl): p. 1323S-1347S.
115. Lee, S.H., J.G. Song, and H.-K. Han, 2022, Site-selective oral delivery of therapeutic antibodies to the inflamed colon via a folic acid-grafted organic/inorganic hybrid nanocomposite system. *Acta Pharmaceutica Sinica B*.
116. Zillies, J. and C. Coester, 2005, Evaluating gelatin based nanoparticles as a carrier system for double stranded oligonucleotides. *J Pharm Pharm Sci*. 7(4): p. 17-21.
117. Kumari, A., et al., 2011, Nanoencapsulation and characterization of Albizia chinensis isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 82(1): p. 224-232.
118. Liu, Z., et al., 2011, Docetaxel-loaded pluronic p123 polymeric micelles: in vitro and in vivo evaluation. *International journal of molecular sciences*. 12(3): p. 1684-1696.
119. Zhang, W., et al., 2011, The potential of Pluronic polymeric micelles encapsulated with paclitaxel for the treatment of melanoma using subcutaneous and pulmonary metastatic mice models. *Biomaterials*. 32(25): p. 5934-5944.
120. Roger, E., et al., 2012, Folic acid functionalized nanoparticles for enhanced oral drug delivery. *Molecular pharmaceutics*. 9(7): p. 2103-2110.
121. Han, S., et al., 2014, Physical characterization and in vitro skin permeation of solid lipid nanoparticles for transdermal delivery of quercetin. *International Journal of Cosmetic Science*. 36(6): p. 588-597.
122. Pitto-Barry, A. and N.P. Barry, 2014, Pluronic® block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances. *Polymer Chemistry*. 5(10): p. 3291-3297.
123. Abd El-Rahmanand, S.N. and S. Suhailah, 2014, Quercetin nanoparticles: Preparation and characterization. *Indian Journal of Drugs*. 2(3): p. 96-103.
124. Kumar, V.D., P.R.P. Verma, and S.K. Singh, 2015, Development and evaluation of biodegradable polymeric nanoparticles for the effective delivery of quercetin using a quality by design approach. *LWT-Food Science and Technology*. 61(2): p. 330-338.

125. Anwer, M.K., et al., 2016, Development and evaluation of PLGA polymer based nanoparticles of quercetin. *International journal of biological macromolecules*. 92: p. 213-219.
126. Aghapour, F., et al., 2018, Quercetin conjugated with silica nanoparticles inhibits tumor Application of nanoceutical technology for fast and efficient control of illness 507 growth in MCF-7 breast cancer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 500(4): p. 860-865.
127. Zhang, Y., et al., 2018, pH and redox dual-responsive copolymer micelles with surface charge reversal for co-delivery of all-trans-retinoic acid and paclitaxel for cancer combination chemotherapy. *International journal of nanomedicine*. 13: p. 6499.
128. Lê, T.H., *Nghiên cứu chế tạo hệ dẫn thuốc Nano Paclitaxel phối hợp Curcumin và đánh giá tác động của chúng lên các tế bào ung thư*. 2017, H.: ĐHQGHN, Khoa Y-Dược.
129. Sadhukhan, P., et al., 2019, Microwave induced synthesis of ZnO nanorods and their efficacy as a drug carrier with profound anticancer and antibacterial properties. *Toxicology Reports*. 6: p. 176-185.
130. Pawar, A., et al., 2018, Development of fisetin-loaded folate functionalized pluronic micelles for breast cancer targeting. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 46(sup1): p. 347-361.
131. Fares, A.R., A.N. ElMeshad, and M.A. Kassem, 2018, Enhancement of dissolution and oral bioavailability of lacidipine via pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles: formulation, optimization using central composite design and in vivo bioavailability study. *Drug delivery*. 25(1): p. 132-142.
132. Ding, H., et al., 2011, Non-invasive tumor detection in small animals using novel functional Pluronic nanomicelles conjugated with anti-mesothelin antibody. *Nanoscale*. 3(4): p. 1813-1822.
133. Voigt, W., *Sulforhodamine B assay and chemosensitivity*, in *Chemosensitivity*. 2005, Springer. p. 39-48.
134. Nguyen, M.-N.T. and T.-D. Ho-Huynh, 2016, Selective cytotoxicity of a Vietnamese traditional formula, Nam Dia long, against MCF-7 cells by synergistic effects. *BMC complementary and alternative medicine*. 16(1): p. 1-10.
135. Dang, L.H., et al., 2019, Injectable nanocurcumin-dispersed gelatin-pluronic nanocomposite hydrogel platform for burn wound treatment. *Bulletin of Materials Science*. 42(2): p. 1-10.
136. Nguyen, T.H., et al., 2018, Novel amphiphilic heparin-pluronic P123 copolymers exhibiting a great potential for Cisplatin delivery. *Journal of Materials Science*. 53(18): p. 12692-12703.
137. Pham, L., et al., 2019, A dual synergistic of curcumin and gelatin on thermal-responsive hydrogel based on Chitosan-P123 in wound healing application. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 117: p. 109183.

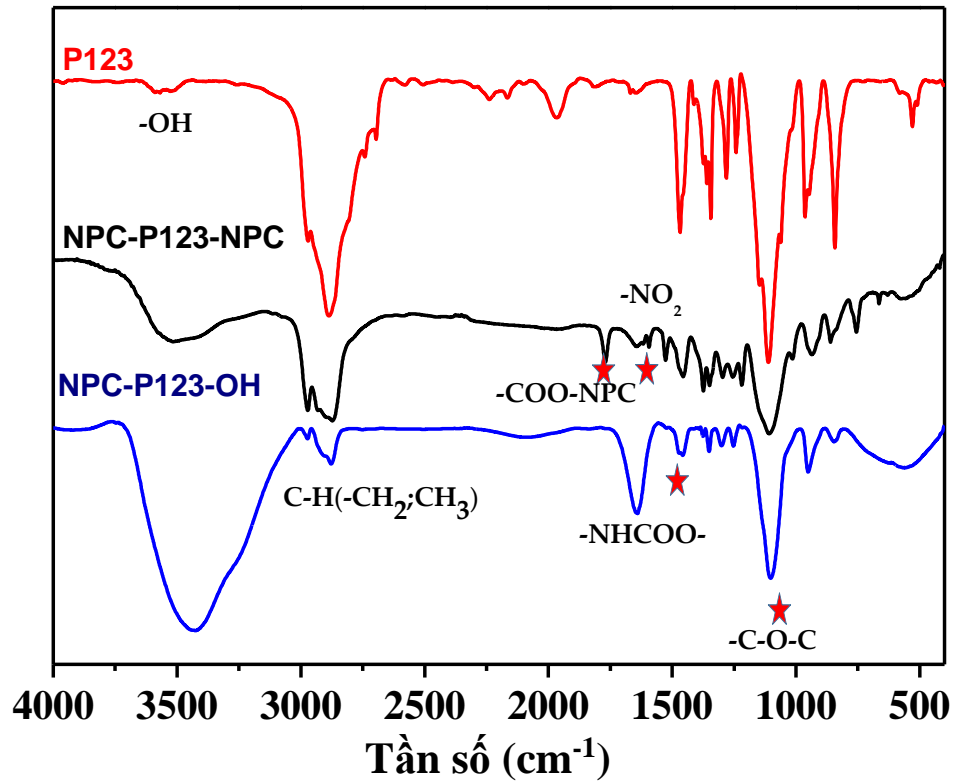
138. Tong, N.-A.N., et al., 2018, Thermosensitive heparin-Pluronic® copolymer as effective dual anticancer drugs delivery system for combination cancer therapy. *International Journal of Nanotechnology*. 15(1-3): p. 174-187.
139. Nguyen, T.B.T., et al., 2015, <sup>1</sup>H NMR spectroscopy as an effective method for predicting molecular weight of polyaminoamine dendrimers and their derivatives. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*. 20(1): p. 57-68.
140. Rahman, M.A., M.A. Khan, and S.M. Tareq, 2010, Preparation and characterization of polyethylene oxide (PEO)/gelatin blend for biomedical application: Effect of gamma radiation. *Journal of Applied Polymer Science*. 117(4): p. 2075-2082.
141. Krupka, T.M. and A.A. Exner, 2011, Structural parameters governing activity of Pluronic triblock copolymers in hyperthermia cancer therapy. *International Journal of Hyperthermia*. 27(7): p. 663-671.
142. Kozlov, M.Y., et al., 2000, Relationship between pluronic block copolymer structure, critical micellization concentration and partitioning coefficients of low molecular mass solutes. *Macromolecules*. 33(9): p. 3305-3313.
143. Croy, S. and G. Kwon, 2006, Polymeric micelles for drug delivery. *Current pharmaceutical design*. 12(36): p. 4669-4684.
144. Zhang, H., et al., 2016, New progress and prospects: The application of nanogel in drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*. 60: p. 560-568.
145. Nguyen, N.T., et al., 2022, Curcumin and Paclitaxel co-Loaded Heparin and Poloxamer P403 Hybrid Nanocarrier for Improved Synergistic Efficacy in Breast Cancer. *Current Drug Delivery*.
146. Nguyen, N.T., et al., 2022, Curcuminoid Co-Loading Platinum Heparin-Poloxamer P403 Nanogel Increasing Effectiveness in Antitumor Activity. *Gels*. 8(1): p. 59.
147. Rapoport, N., 2007, Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. *Progress in Polymer Science*. 32(8-9): p. 962-990.
148. Wu, Z., et al., 2017, Effects of copolymer component on the properties of phosphorylcholine micelles. *International Journal of Nanomedicine*. 12: p. 487.
149. Van Thoai, D., et al., 2020, Lipophilic effect of various pluronic-grafted gelatin copolymers on the quercetin delivery efficiency in these self-assembly nanogels. *Journal of Polymer Research*. 27(12): p. 1-12.
150. Nguyen, T.D., et al., 2019, Nanoencapsulation enhances anticoagulant activity of adenosine and dipeptide IleTrp. *Nanomaterials*. 9(9): p. 1191.
151. Mirhosseini, M.M., V. Haddadi-Asl, and S.S. Zargarian, 2016, Fabrication and characterization of polymer–ceramic nanocomposites containing pluronic F127 immobilized on hydroxyapatite nanoparticles. *RSC advances*. 6(84): p. 80564-80575.
152. Liu, J., et al., 2012, Preparation and characterization of poly (glycidyl methacrylate) grafted from magnesium hydroxide particles via SI-ATRP. *Applied surface science*. 258(16): p. 6127-6135.
153. Miyata, K., R.J. Christie, and K. Kataoka, 2011, Polymeric micelles for nano-scale drug delivery. *Reactive and Functional Polymers*. 71(3): p. 227-234.

154. Le, P.N., C.K. Huynh, and N.Q. Tran, 2018, Advances in thermosensitive polymer-grafted platforms for biomedical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 92: p. 1016-1030.
155. Eslami, P., F. Rossi, and S. Fedeli, 2019, Hybrid Nanogels: Stealth and Biocompatible Structures for Drug Delivery Applications. *Pharmaceutics.* 11(2).
156. Salmaso, S. and P. Caliceti, 2013, Stealth properties to improve therapeutic efficacy of drug nanocarriers. *J Drug Deliv.* 2013: p. 374252.
157. Niazvand, F., et al., 2019, Effects of quercetin-loaded nanoparticles on MCF-7 human breast cancer cells. *Medicina.* 55(4): p. 114.
158. Clemente-Soto, A.F., et al., 2019, Quercetin induces G2 phase arrest and apoptosis with the activation of p53 in an E6 expression-independent manner in HPV-positive human cervical cancer-derived cells. *Molecular medicine reports.* 19(3): p. 2097-2106.

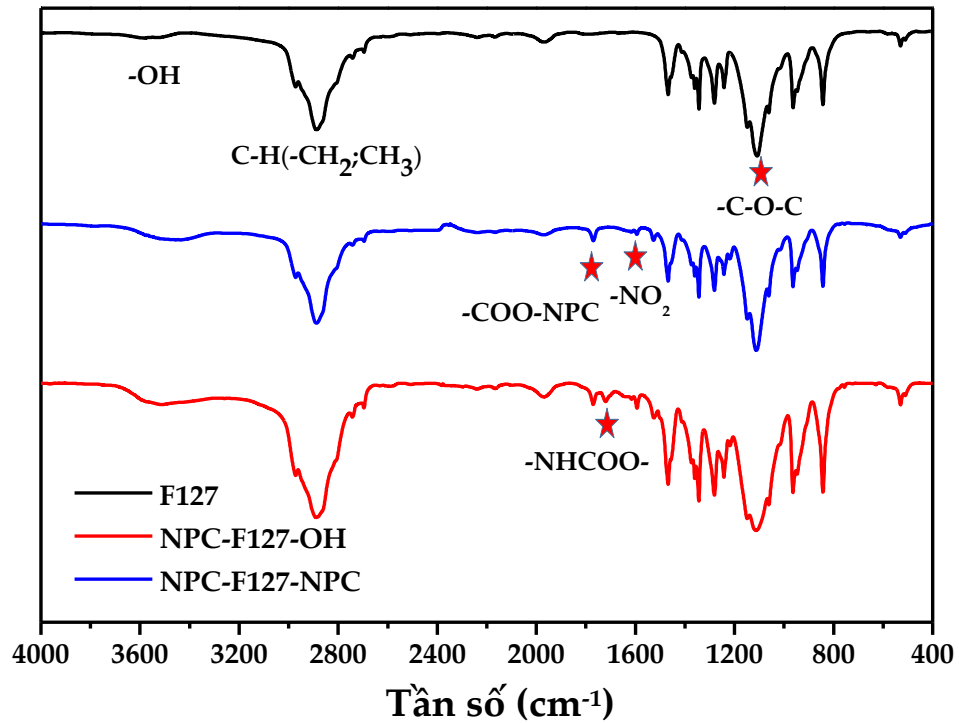


## PHỤ LỤC

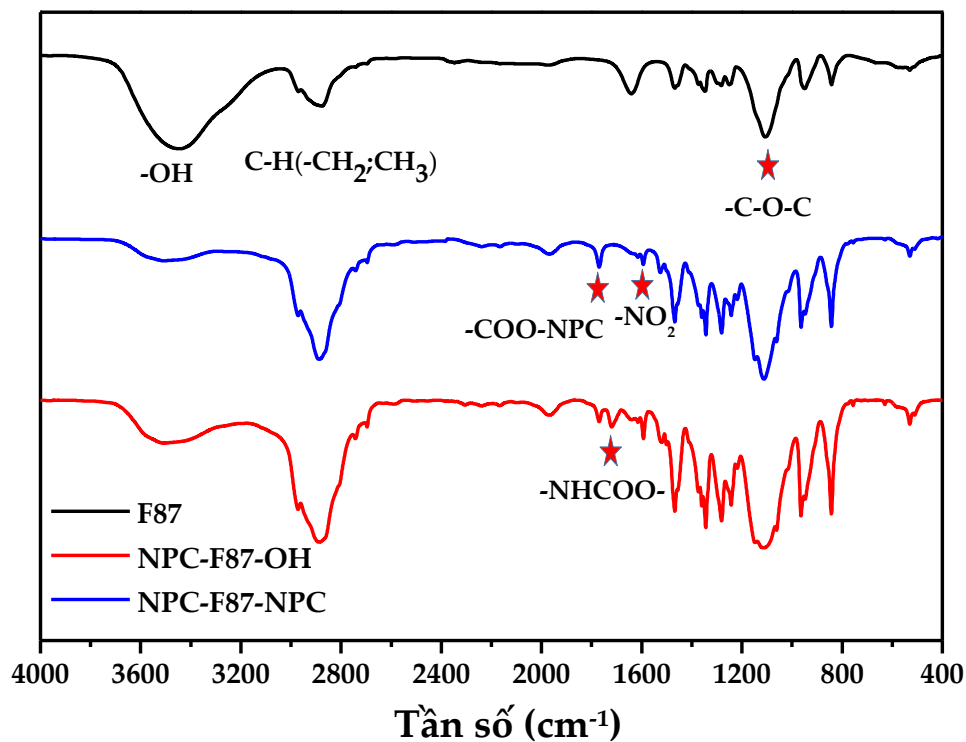
**Phụ lục 1:** Kết quả phổ FT-IR của P123, NPC-P123-NPC và NPC-P123-OH



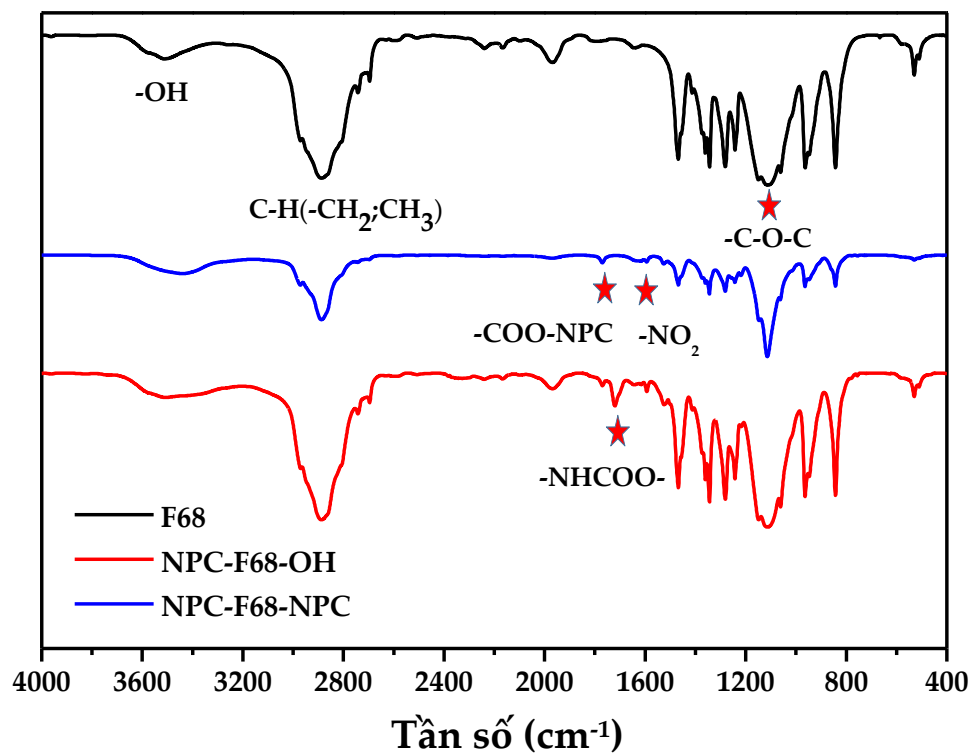
**Phụ lục 2:** Kết quả phổ FT-IR của F127, NPC-F127-NPC và NPC-F127-OH



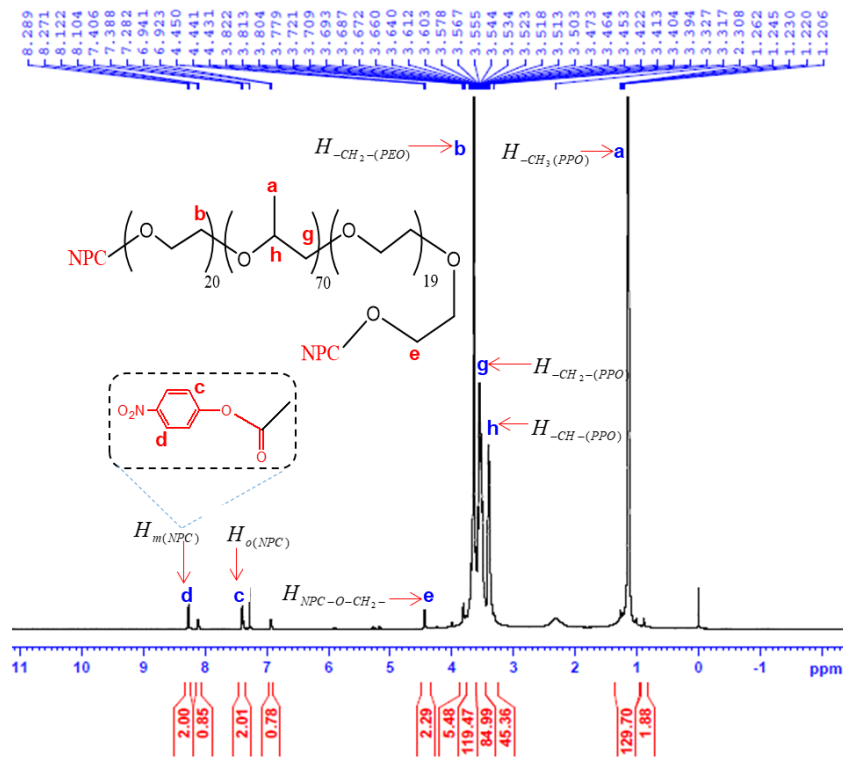
**Phụ lục 3:** Kết quả phổ FT-IR của F87, NPC-F87-NPC và NPC-F87-OH



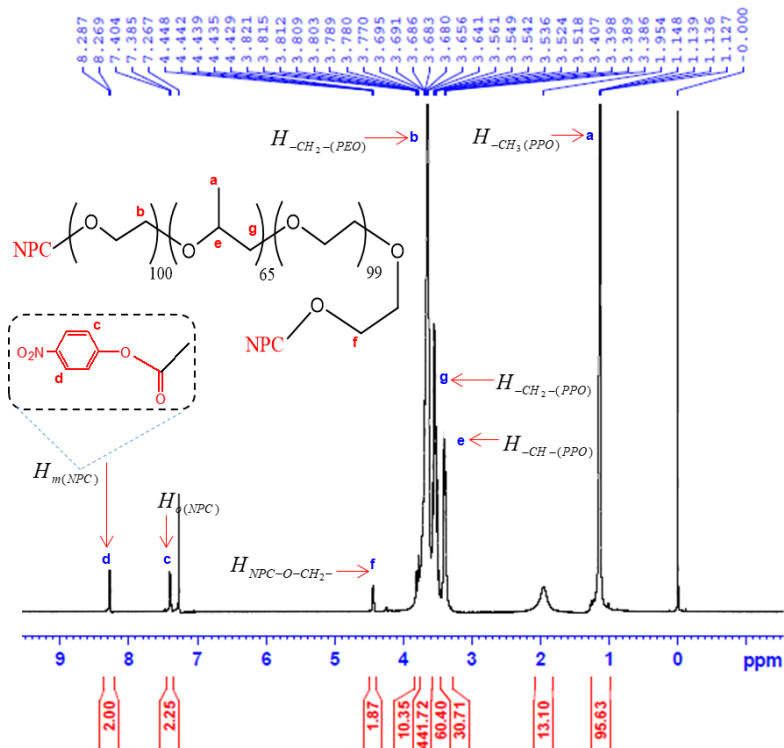
**Phụ lục 4:** Kết quả phổ FT-IR của F68, NPC-F68-NPC và NPC-F68-OH



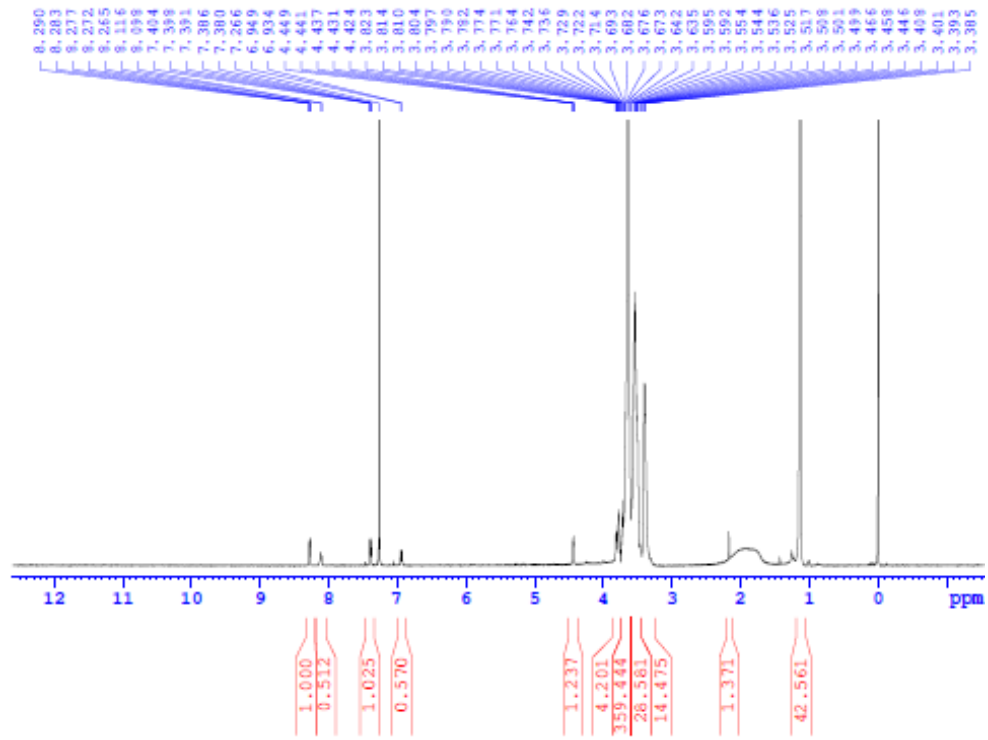
**Phụ lục 5: Kết quả phân tích phổ  $^1\text{H-NMR}$  của NPC-P123-NPC**



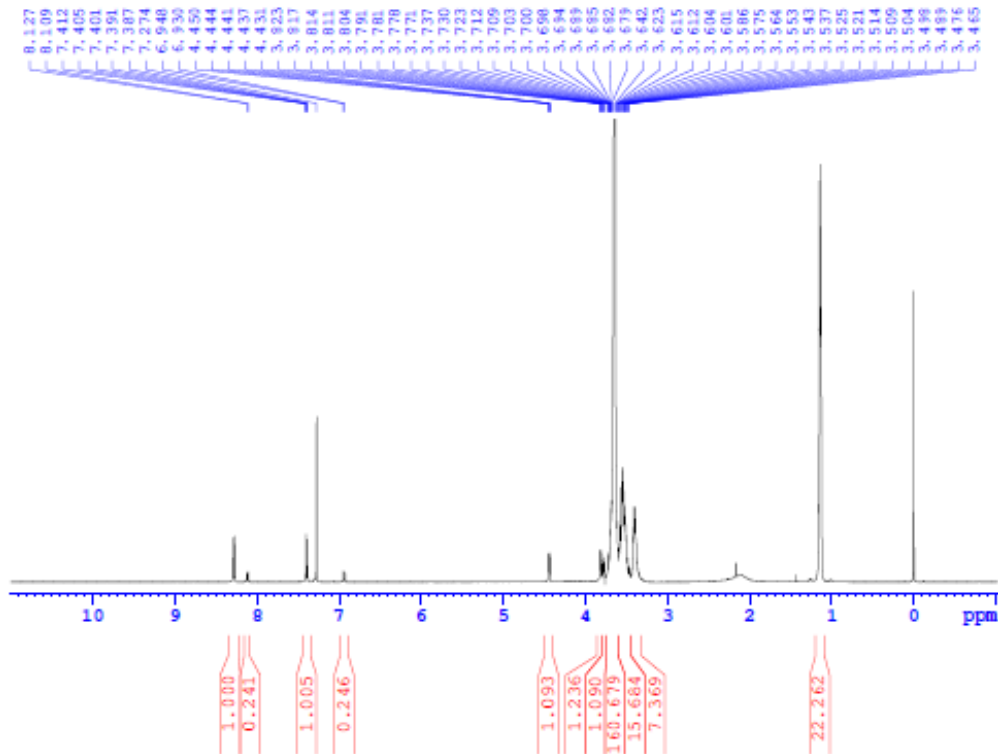
**Phụ lục 6: Kết quả phân tích phổ  $^1\text{H-NMR}$  của NPC-F127-NPC**



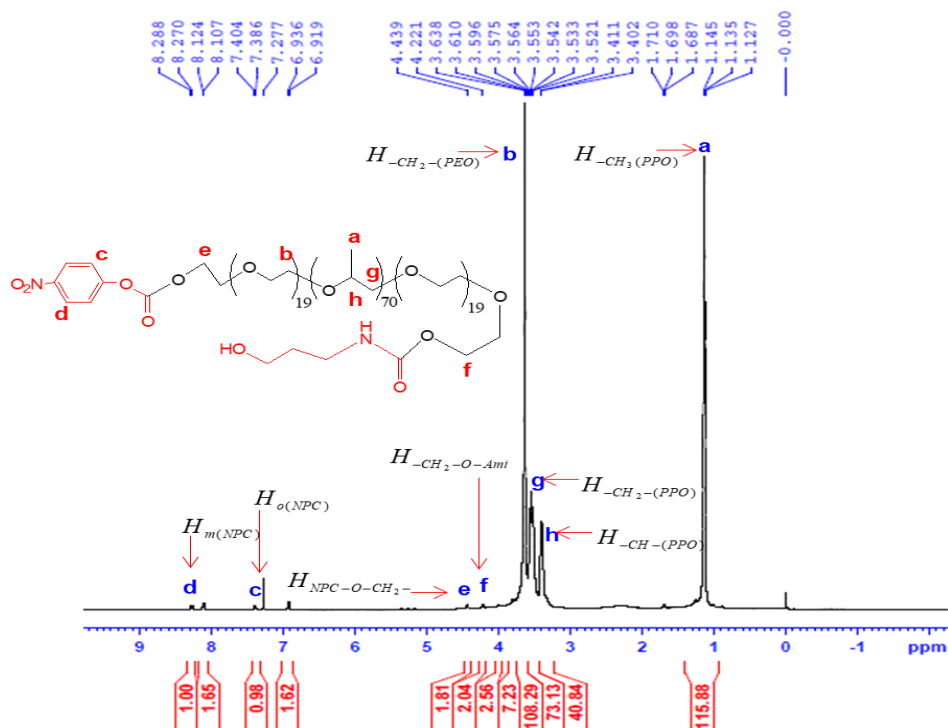
### Phụ lục 7: Kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$ của NPC-F87-NPC



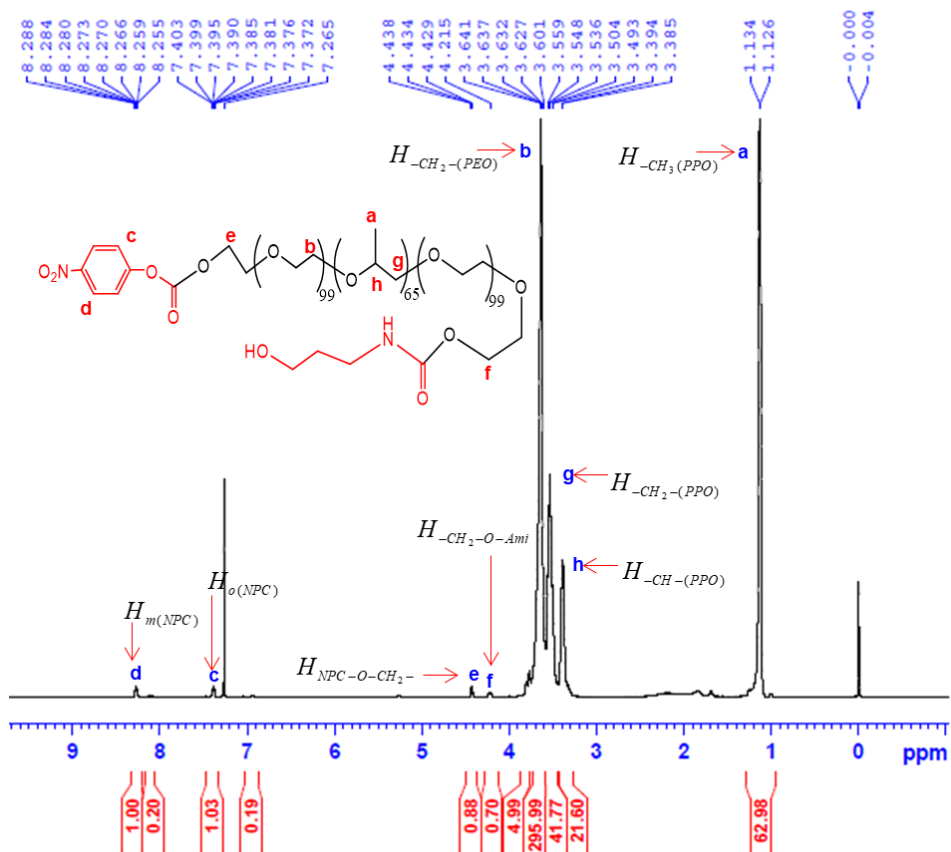
### Phụ lục 8: Kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$ của NPC-F68-NPC



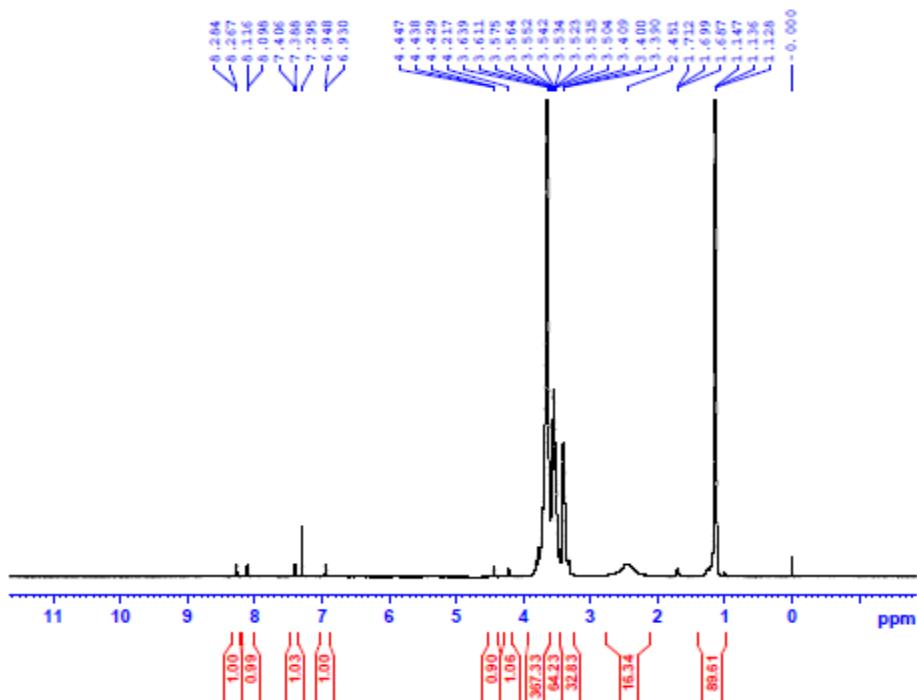
### Phụ lục 9: Kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$ của NPC-P123-OH



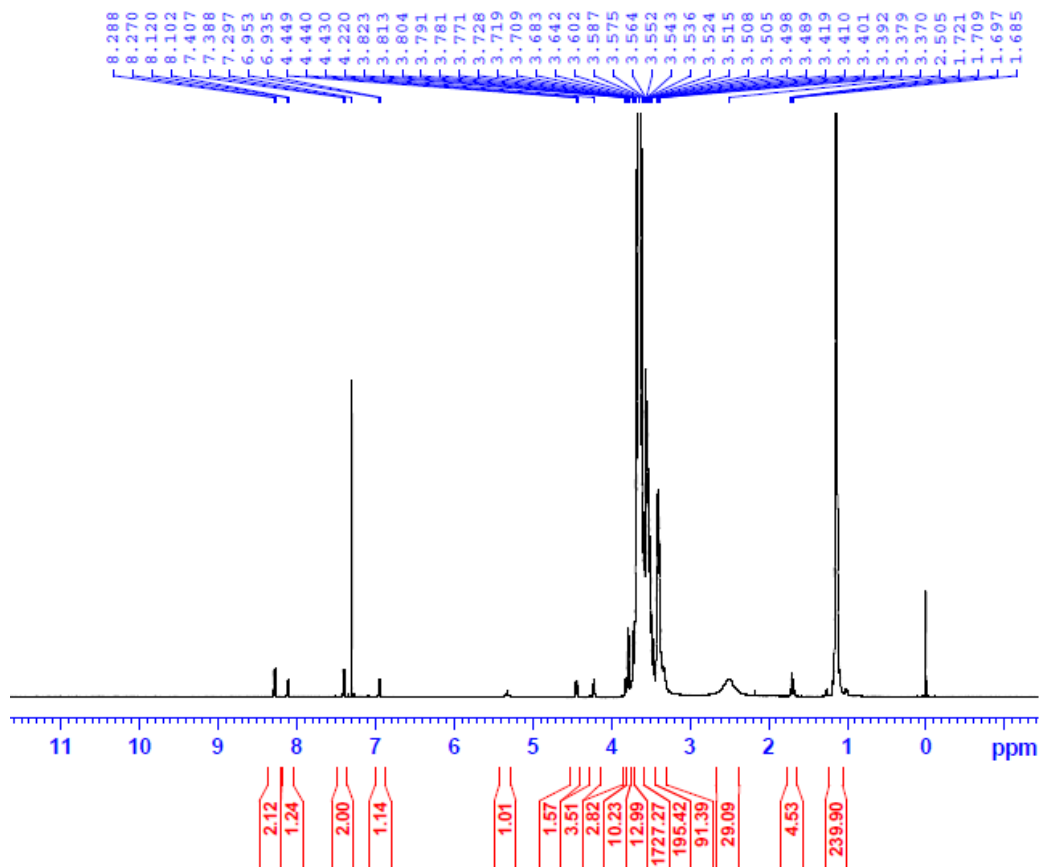
### Phụ lục 10: Kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$ của NPC-F127-OH



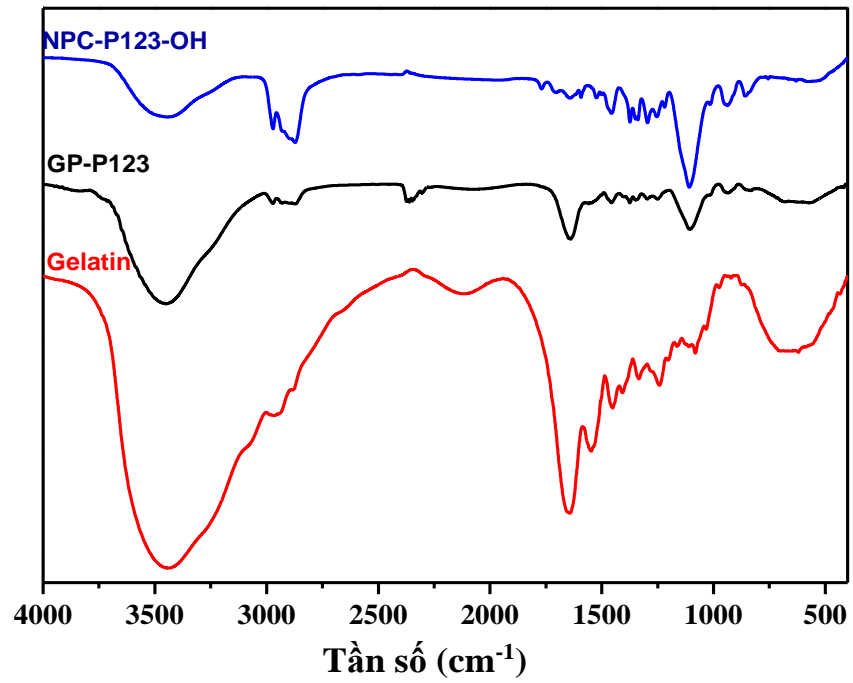
### Phụ lục 11: Kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$ của NPC-F87-OH



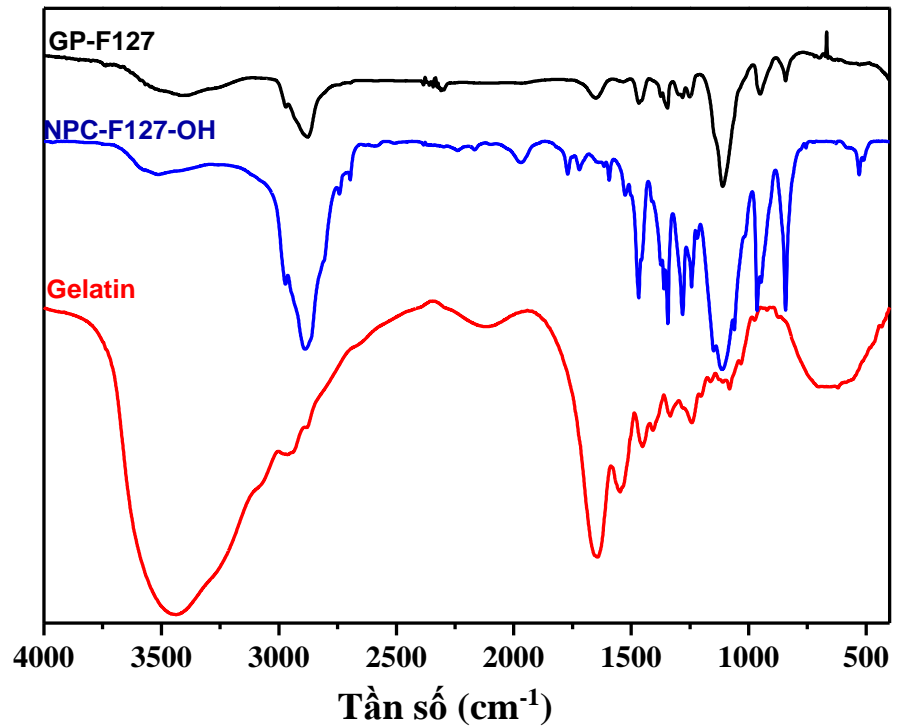
### Phụ lục 12: Kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$ của NPC-F68-OH



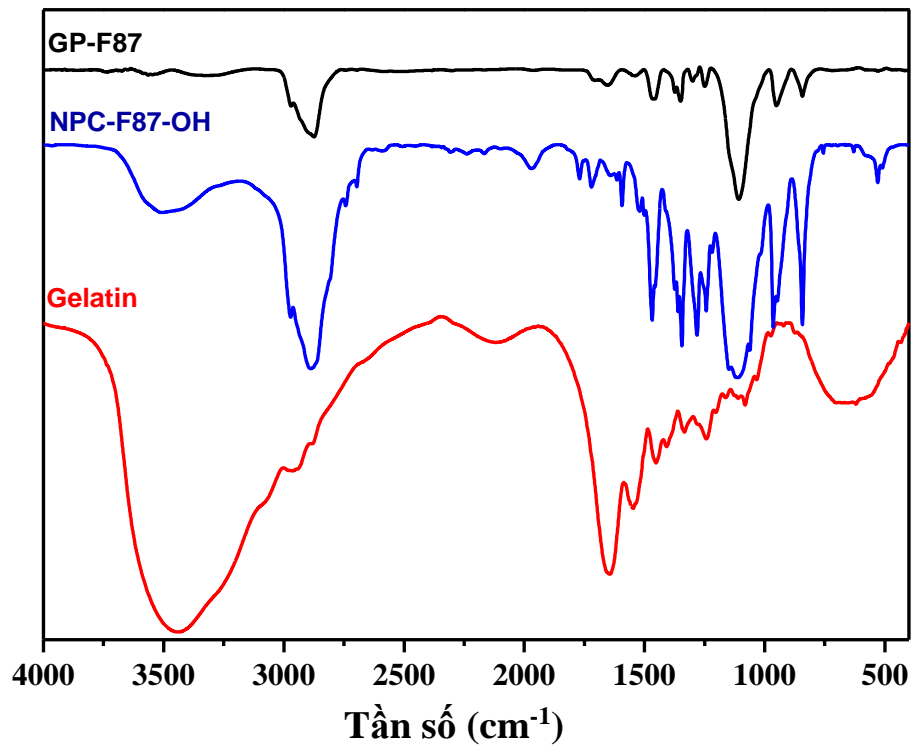
**Phụ lục 13:** Kết quả phân tích phổ FT-IR của GP-P123



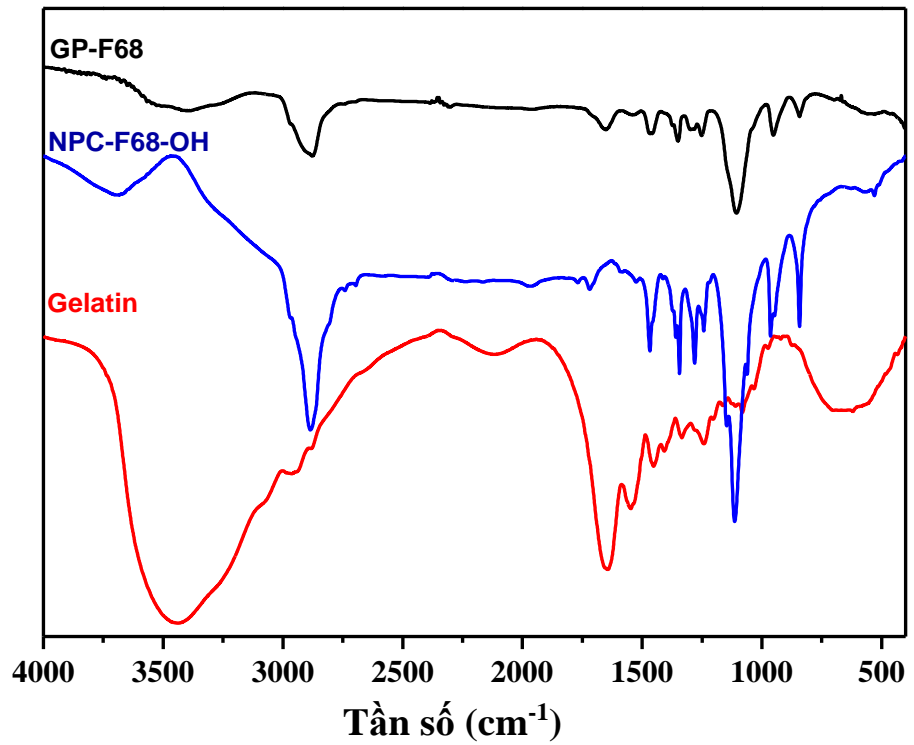
**Phụ lục 14:** Kết quả phân tích phổ FT-IR của GP-F127



**Phụ lục 15:** Kết quả phân tích phổ FT-IR của GP-F87

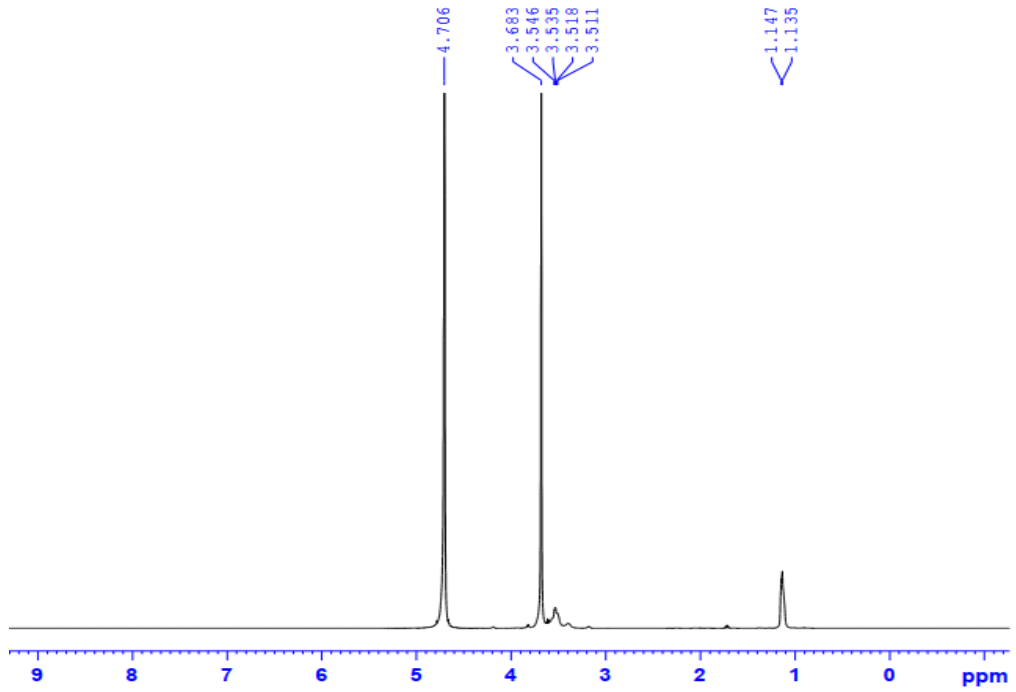


**Phụ lục 16:** Kết quả phân tích phổ FT-IR của GP-F68

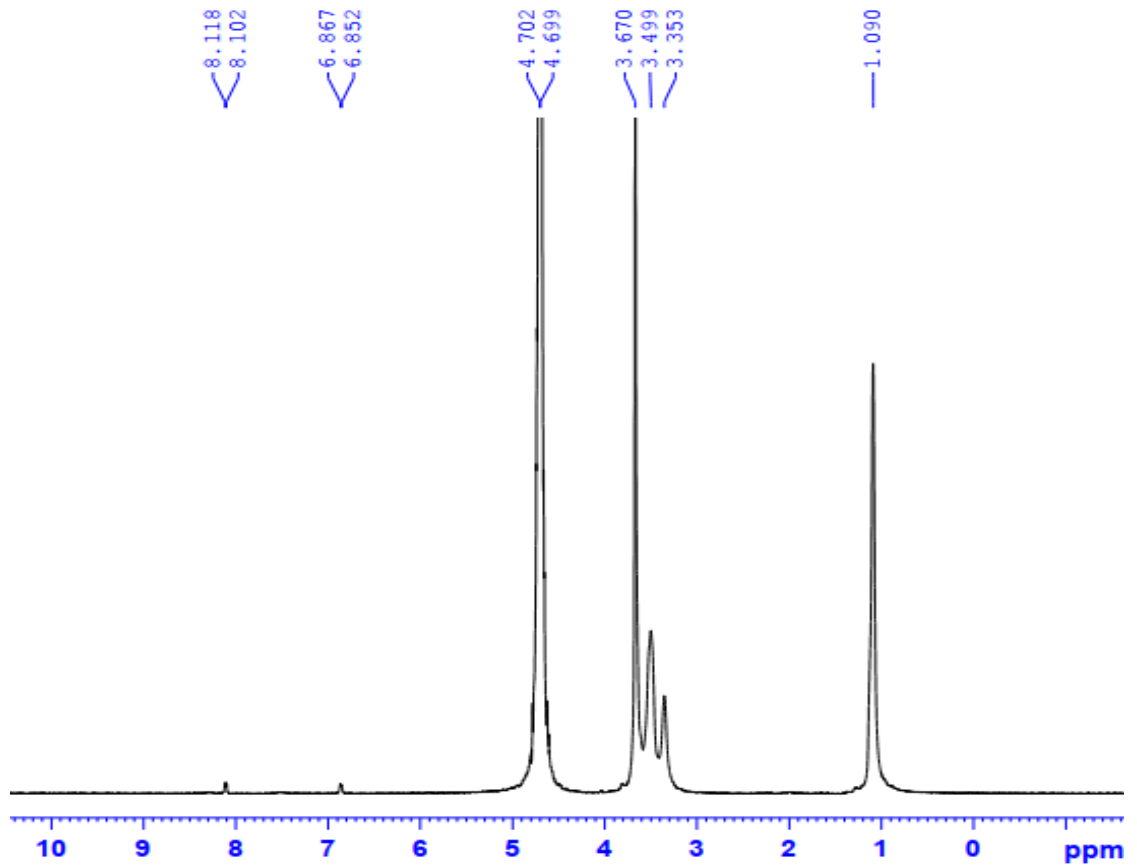




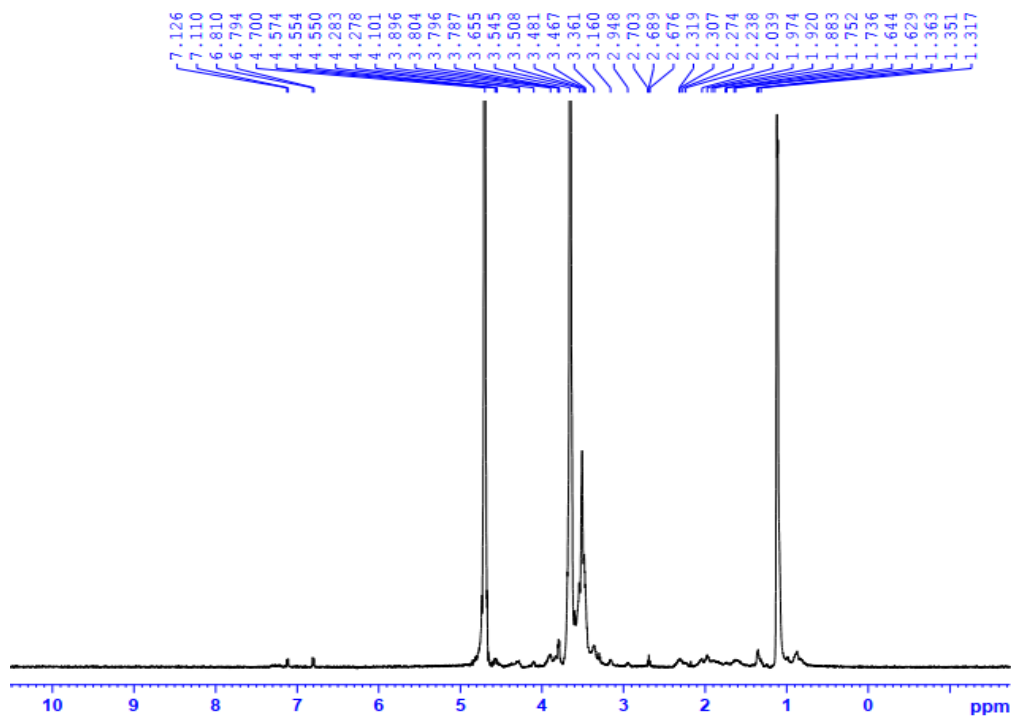
**Phụ lục 17:** Kết quả phân tích phổ  $^1\text{H-NMR}$  của gelatin



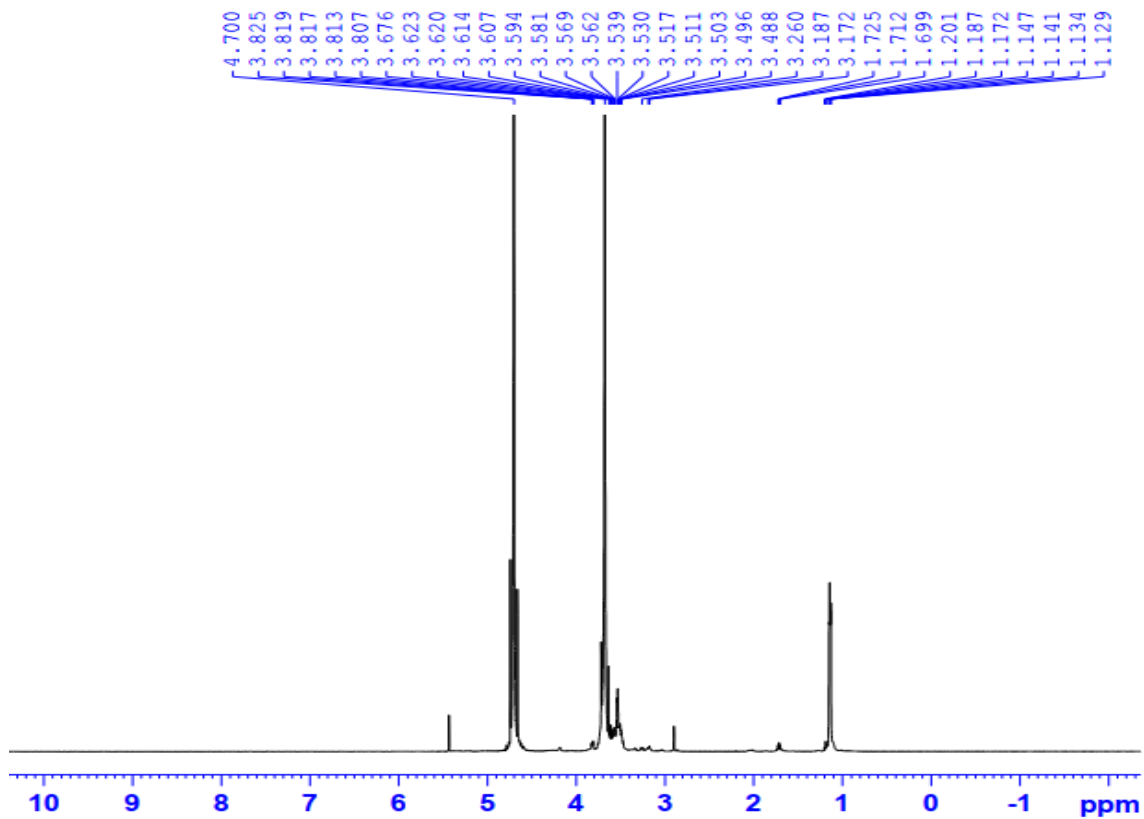
**Phụ lục 18:** Kết quả phổ  $^1\text{H-NMR}$  của GP-P123



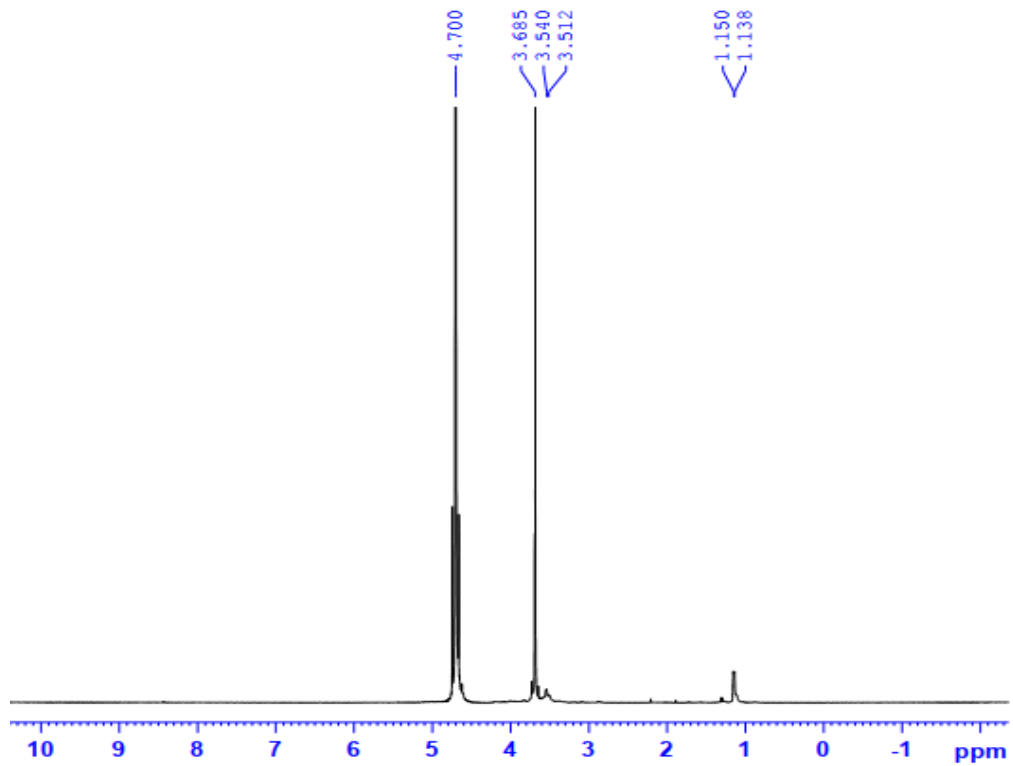
### Phụ lục 19: Kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$ của GP-F127



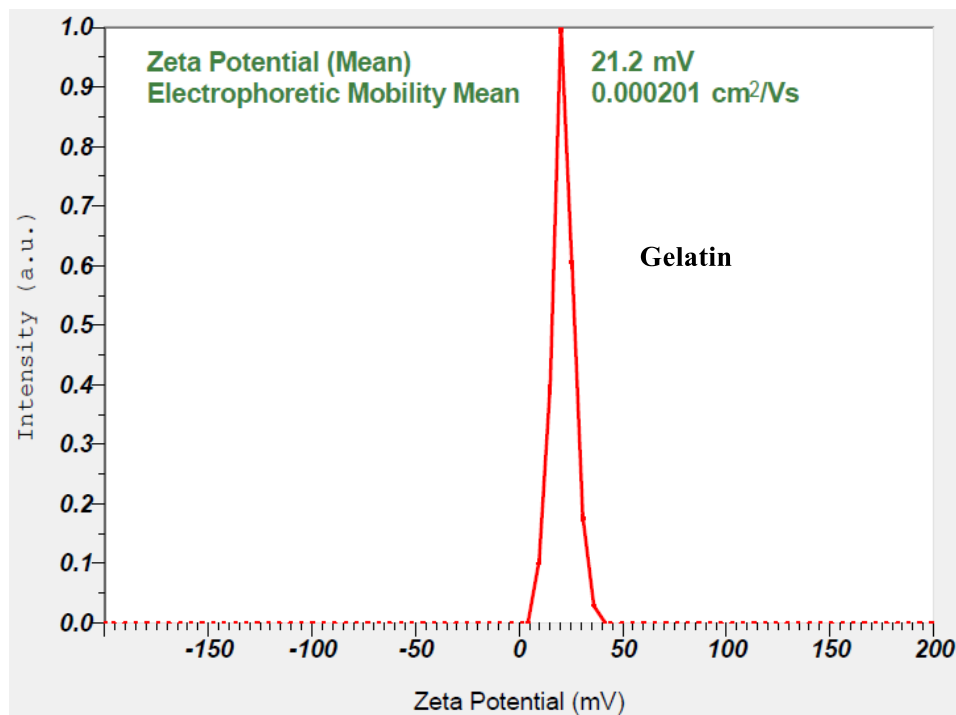
### Phụ lục 20: Kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$ của GP-F87



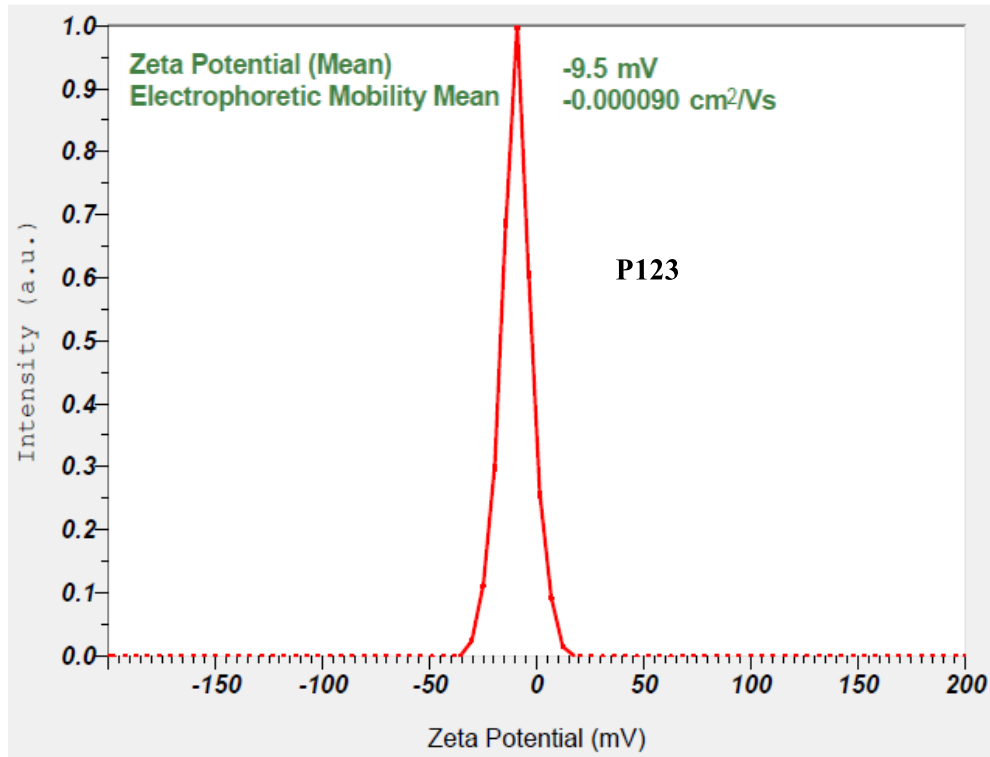
**Phụ lục 21:** Kết quả phổ  $^1\text{H-NMR}$  của GP-F68



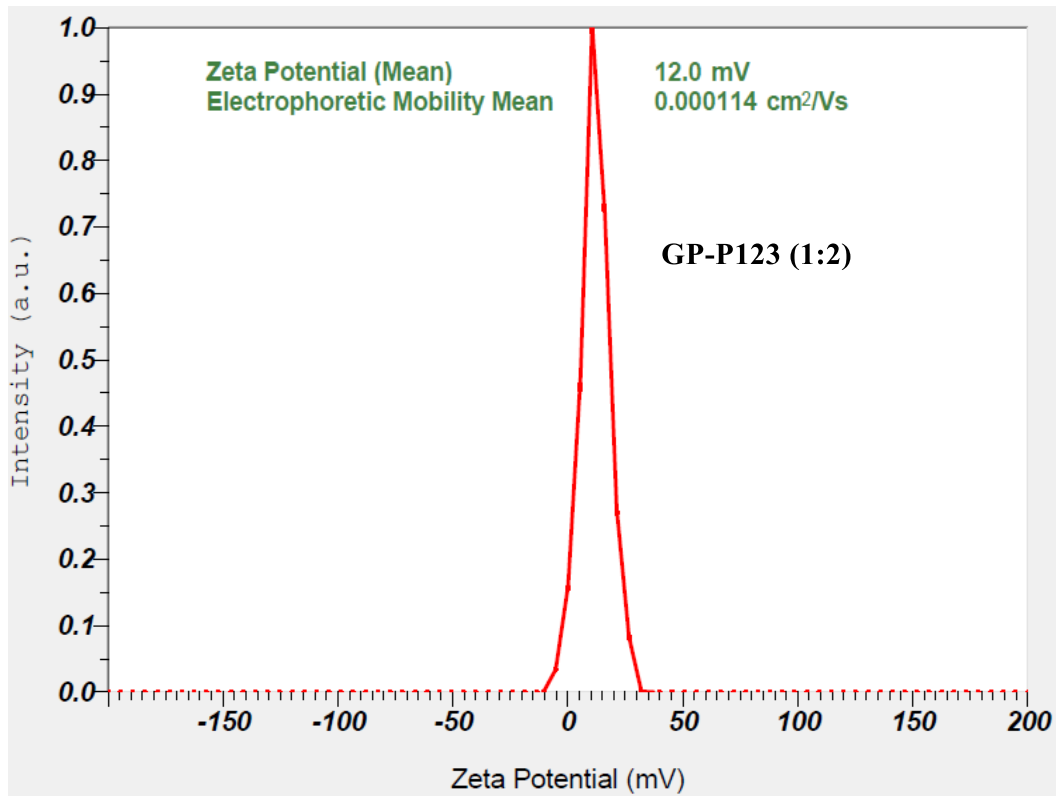
**Phụ lục 22:** Thế zeta của gelatin



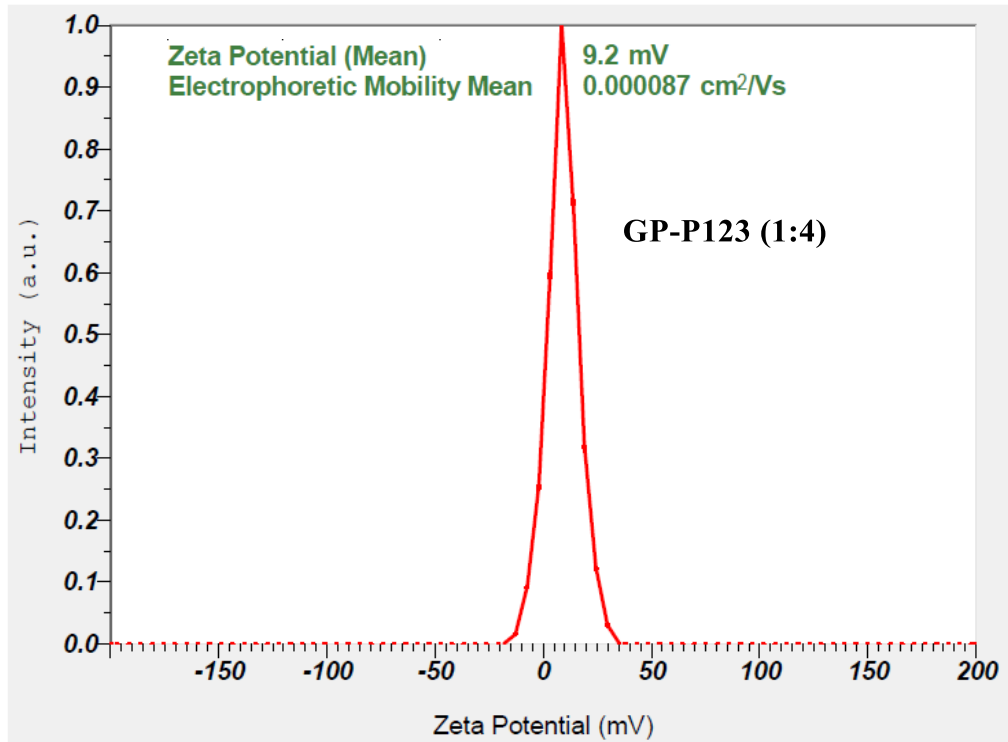
**Phụ lục 23:** Thế zeta của P123



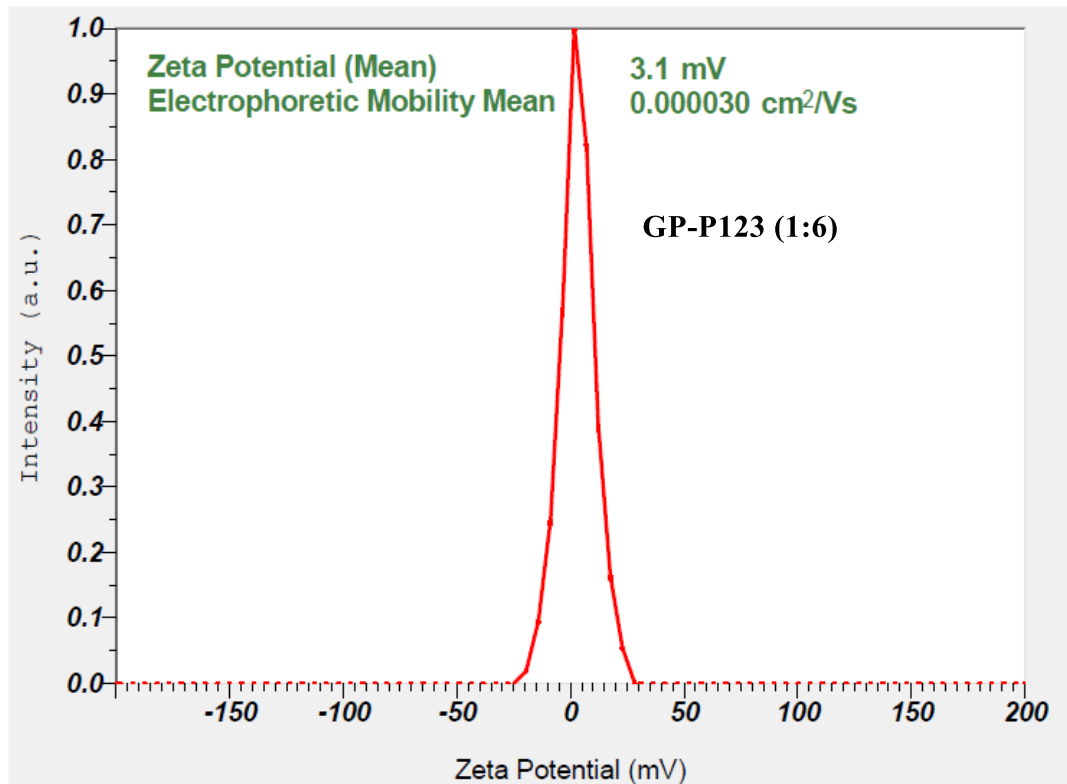
**Phụ lục 24:** Thế zeta của GP-P123 (1:2)



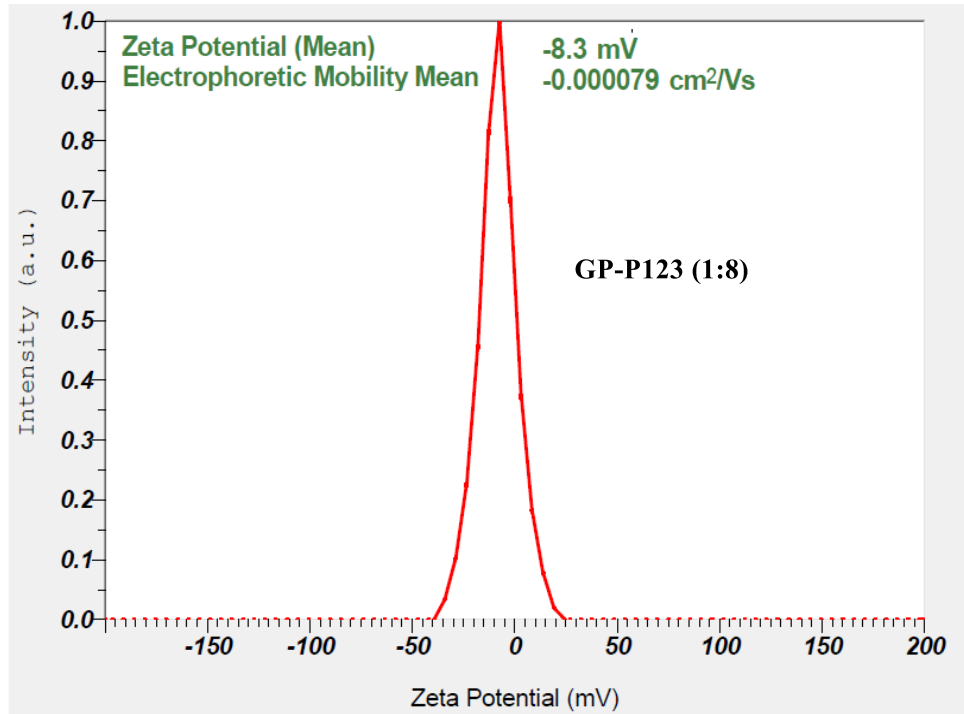
**Phụ lục 25:** Thế zeta của GP-P123 (1:4)



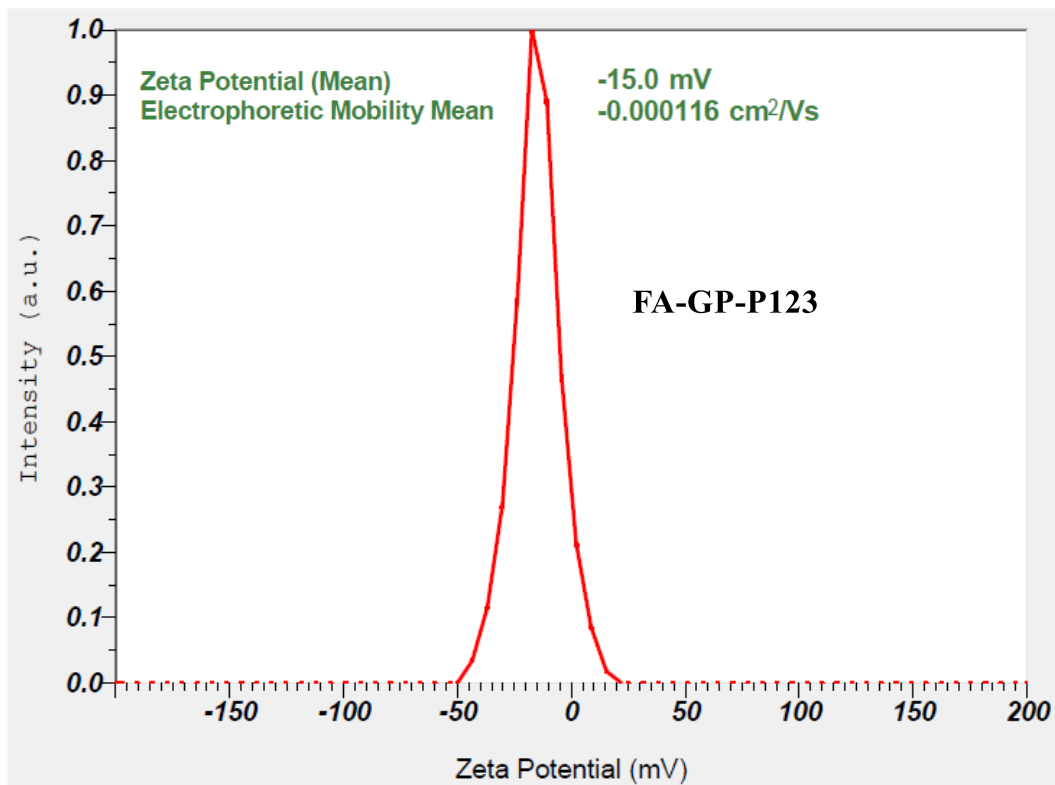
**Phụ lục 26:** Thế zeta của GP-P123 (1:6)



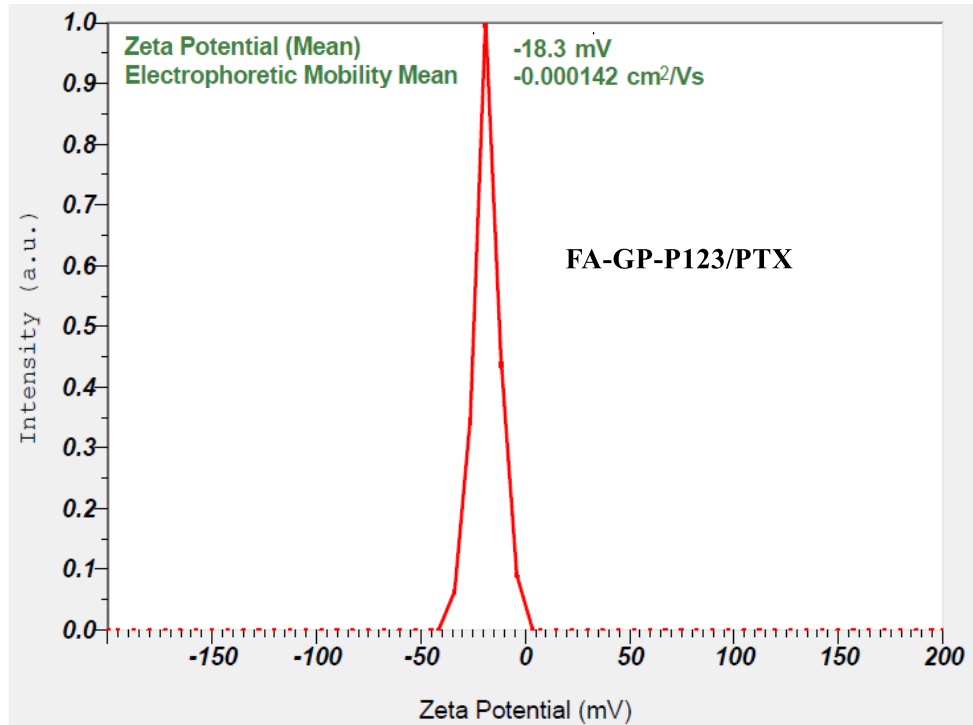
**Phụ lục 27:** Thế zeta của GP-P123 (1:8)



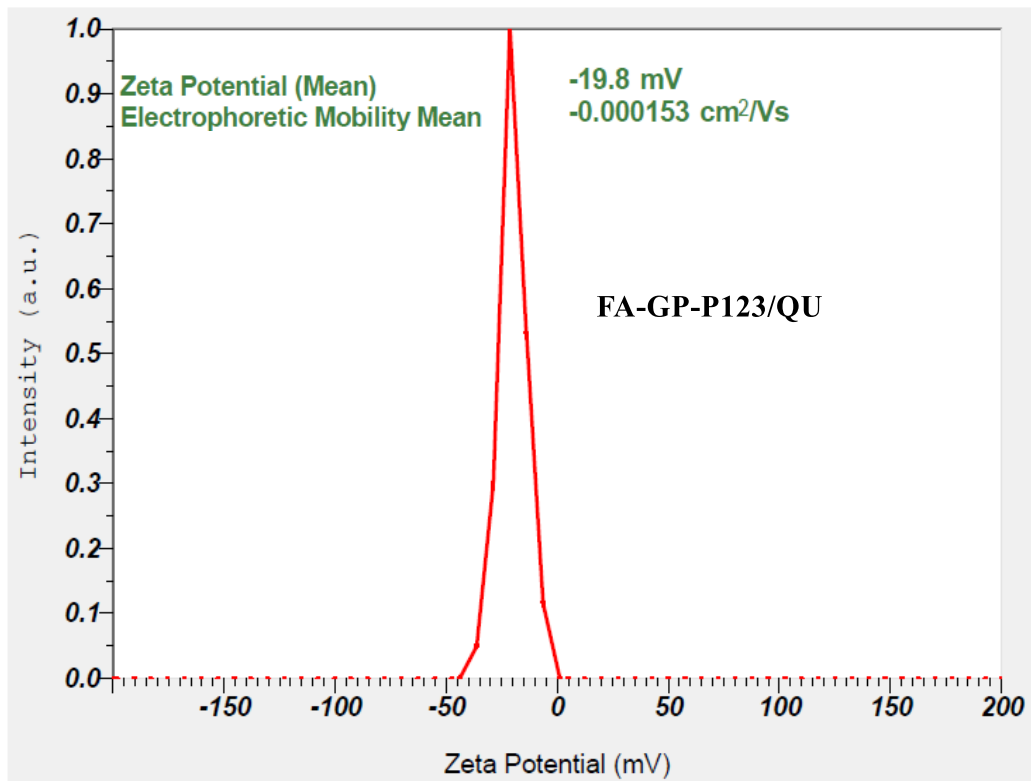
**Phụ lục 28 :** Thế zeta của FA-GP-P123



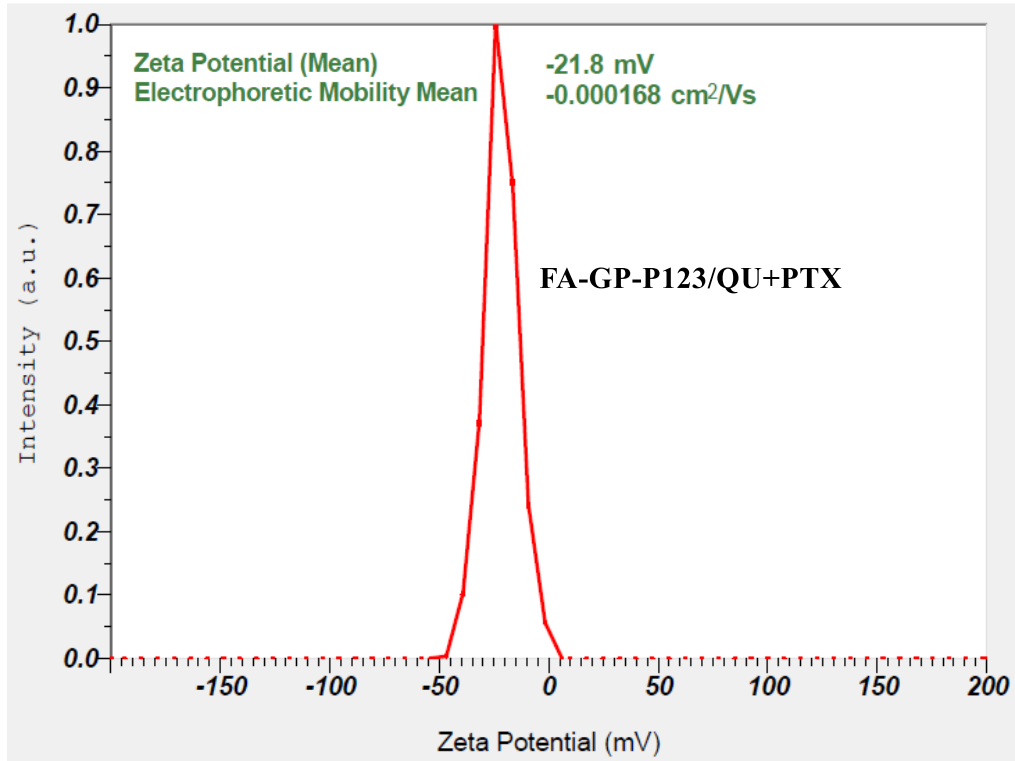
**Phụ lục 29:** Thế zeta của FA-GP-P123/PTX



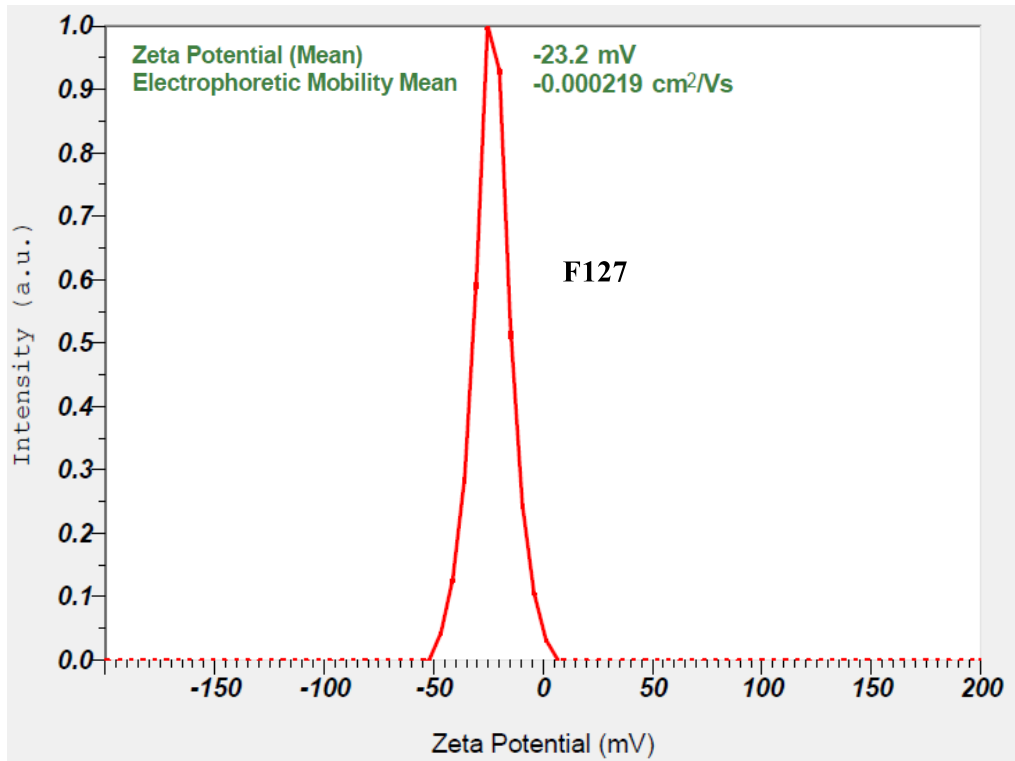
**Phụ lục 30:** Thế zeta của FA-GP-P123/QU



**Phụ lục 31:** Thế zeta của FA-GP-P123/PTX/QU

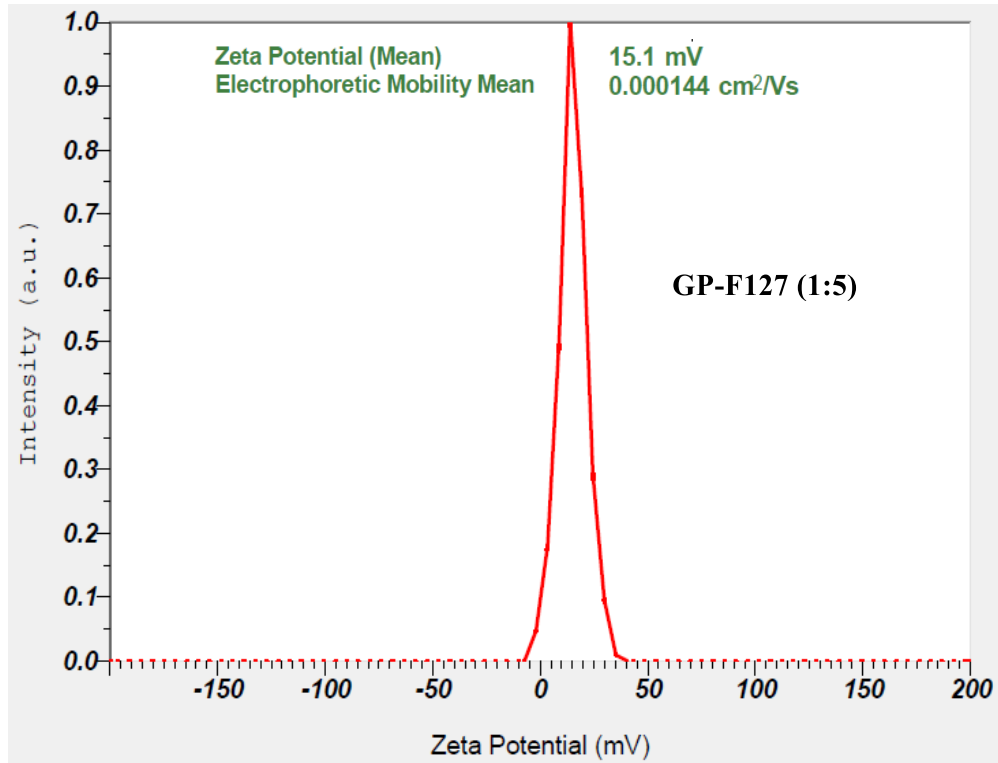


**Phụ lục 32:** Thế zeta của F127

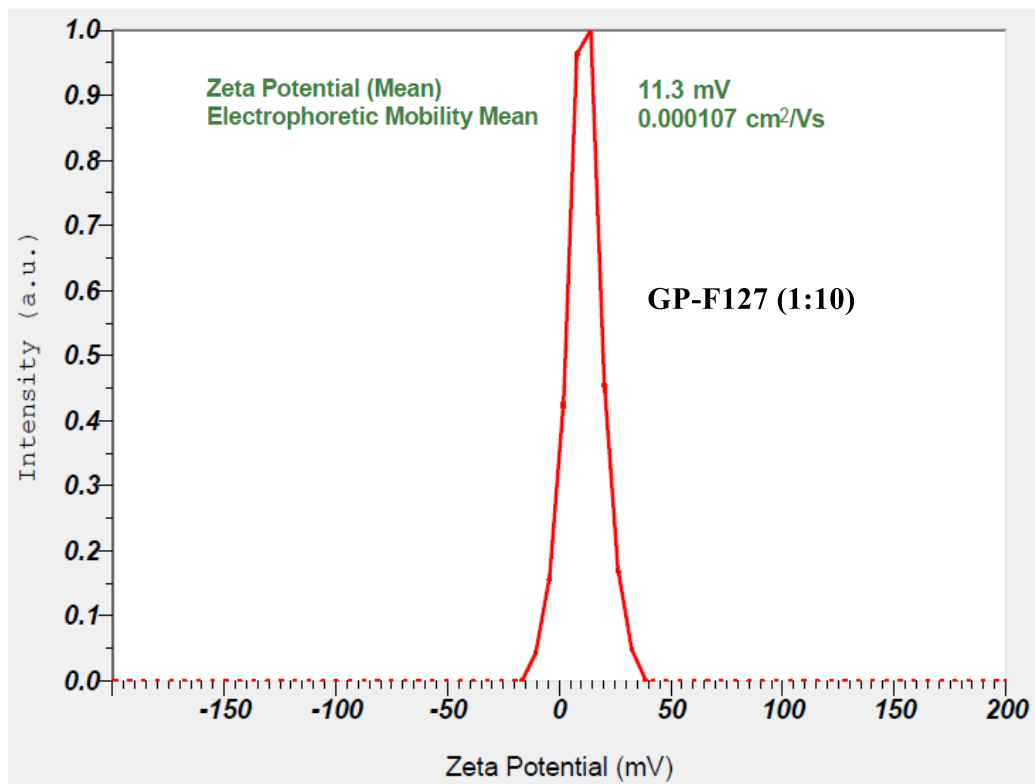




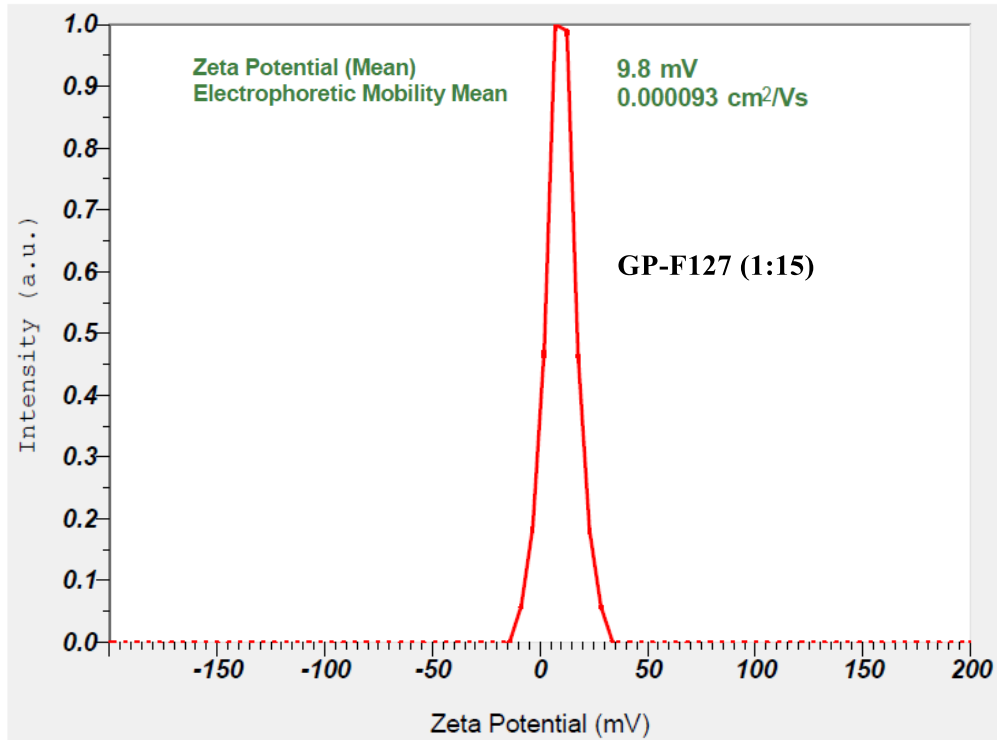
**Phụ lục 33:** Thế zeta của GP-F127 (1:5)



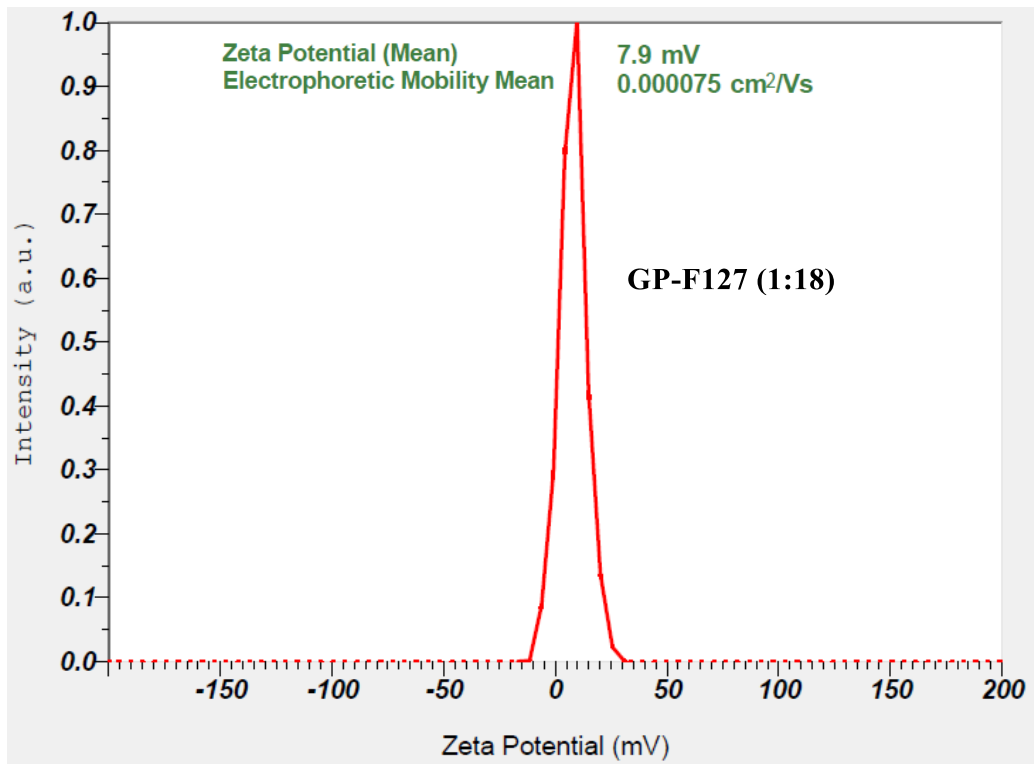
**Phụ lục 34:** Thế zeta của GP-F127 (1:10)



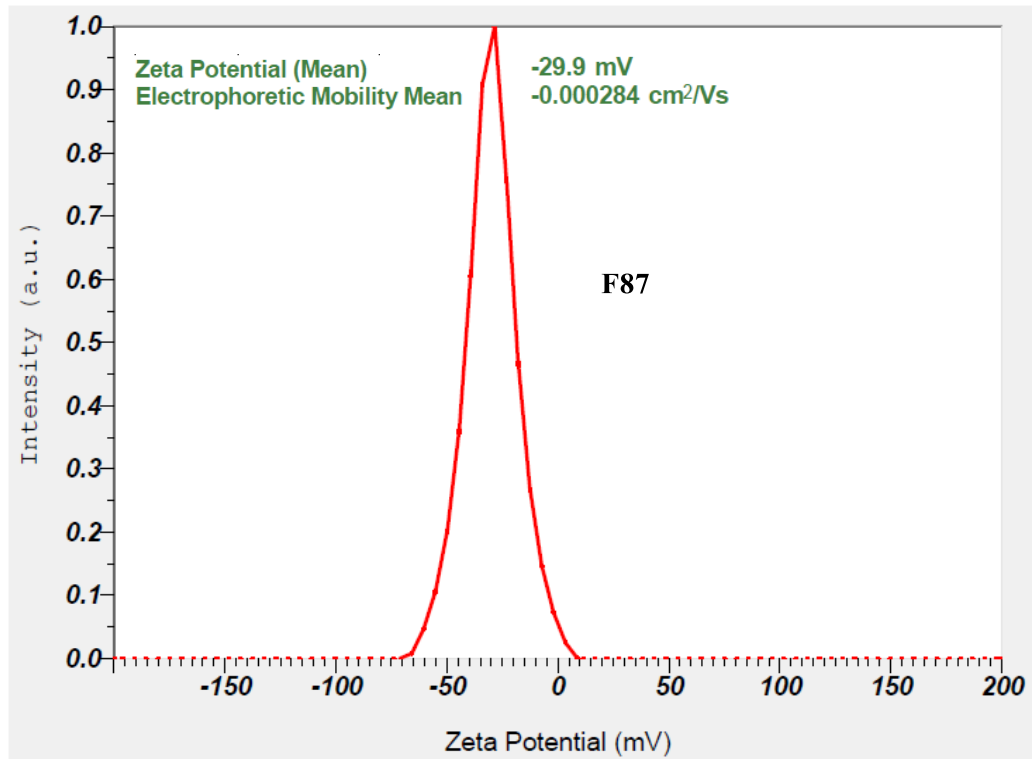
**Phụ lục 35:** Thế zeta của GP-F127 (1:15)



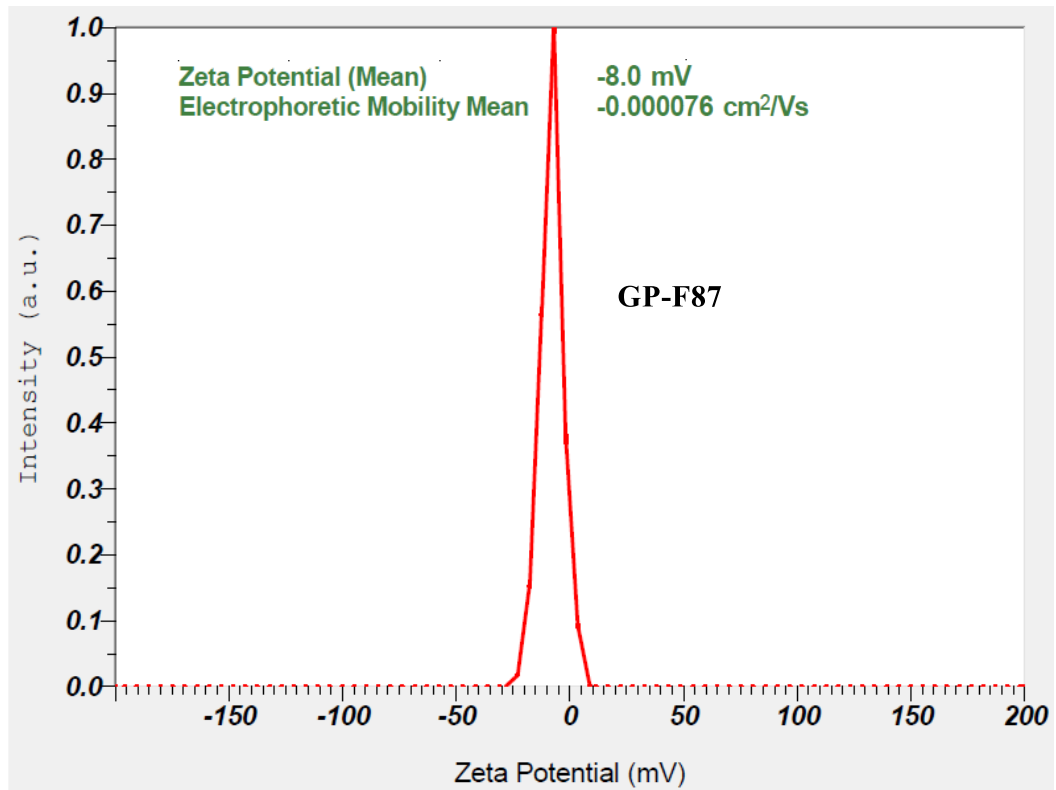
**Phụ lục 36:** Thế zeta của GP-F127 (1:18)



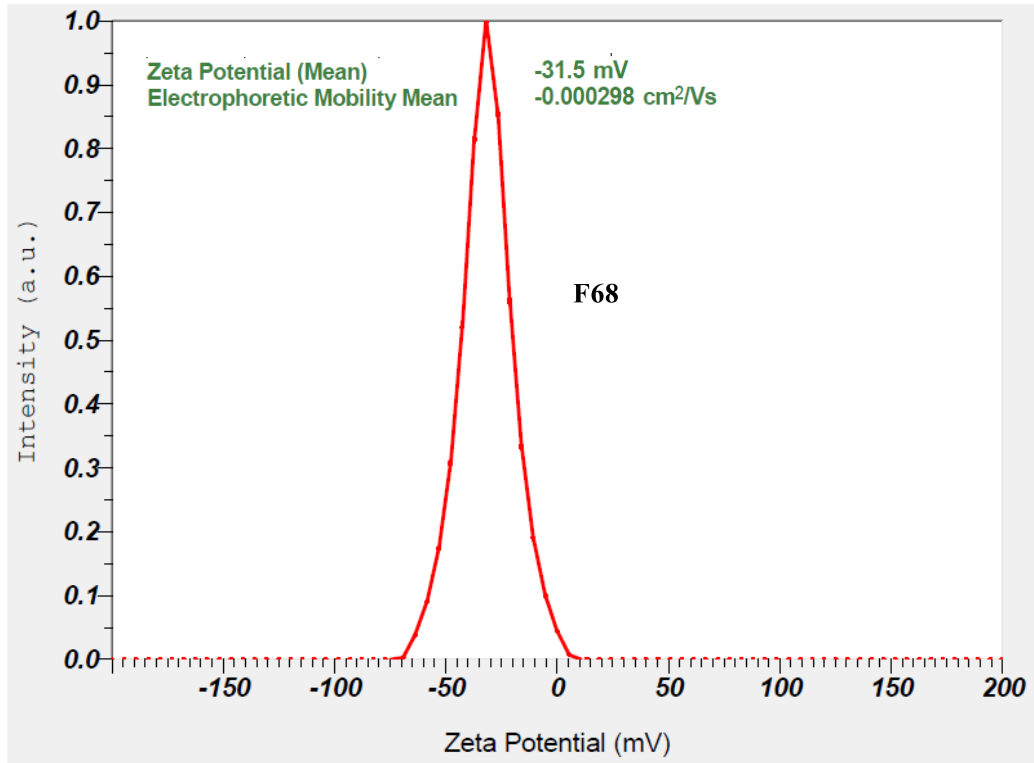
**Phụ lục 37: Thế zeta của F87**



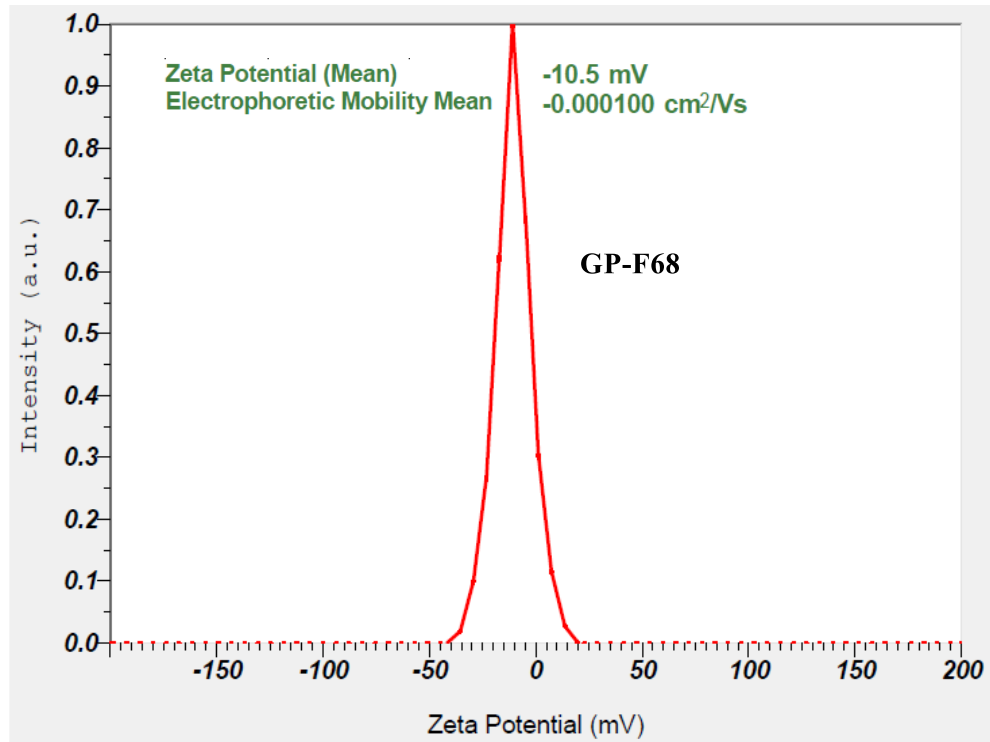
**Phụ lục 38: Thế zeta của GP-F87**



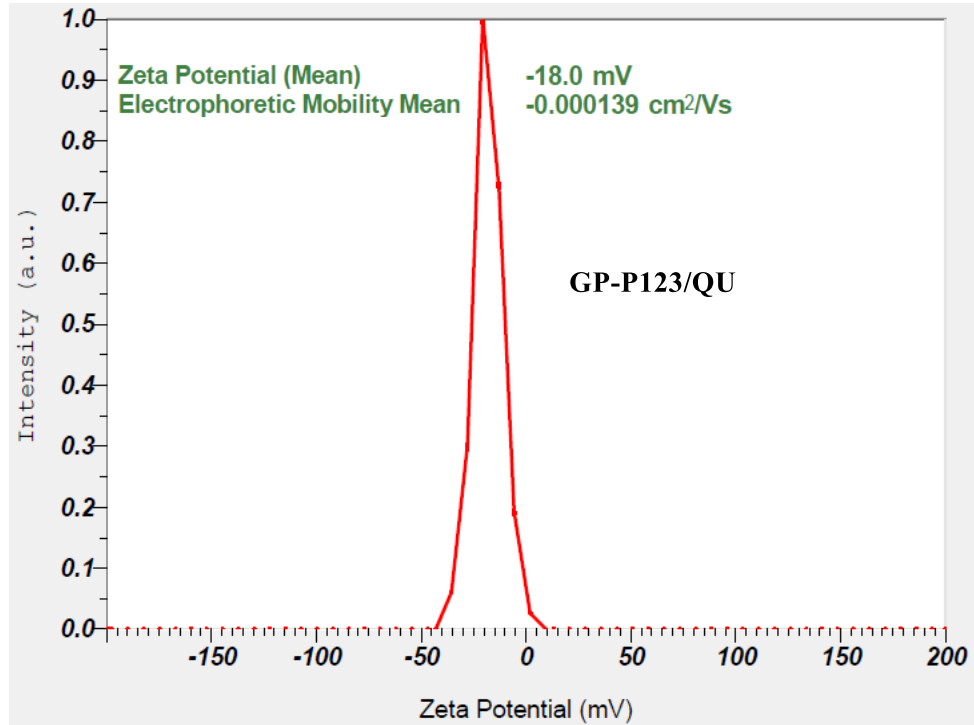
**Phụ lục 39: Thế zeta của F68**



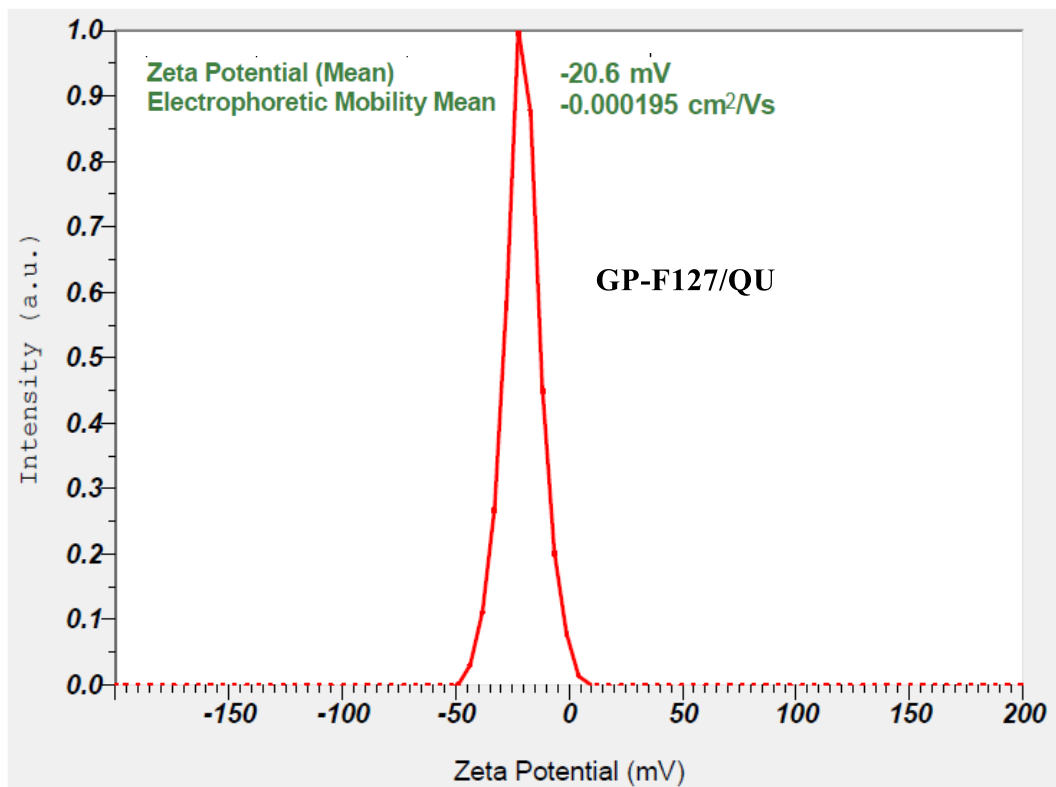
**Phụ lục 40: Thế zeta của GP-68**



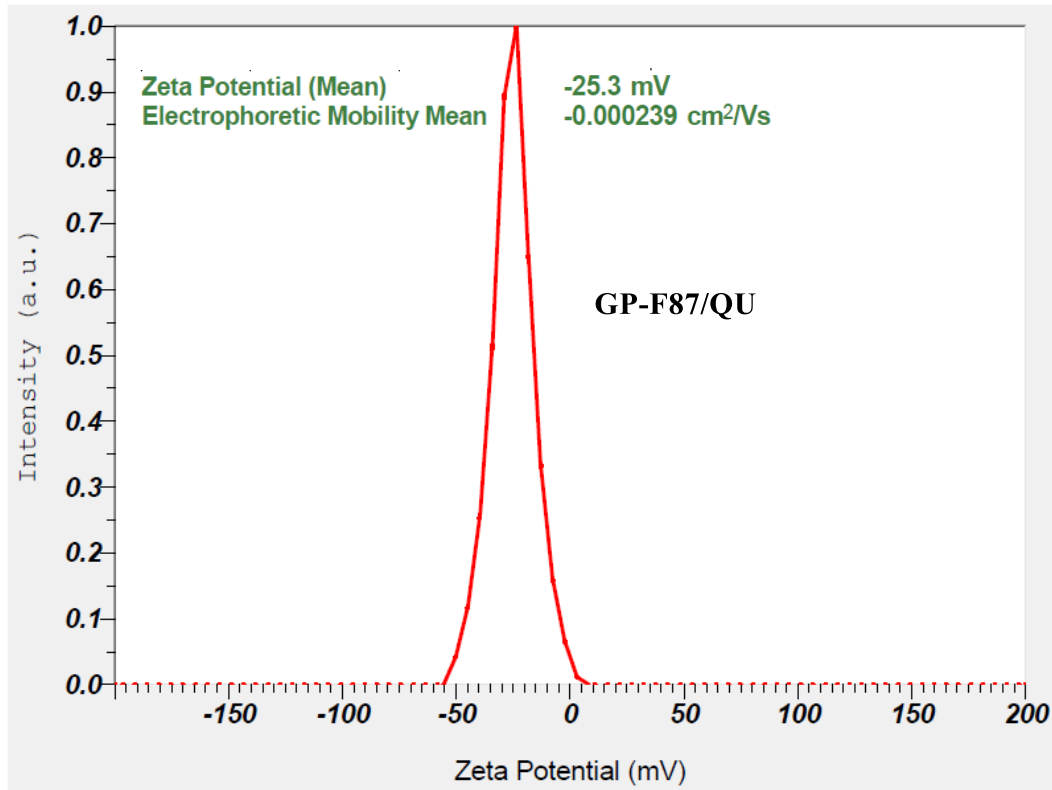
**Phụ lục 41:** Thế zeta của GP-P123/QU



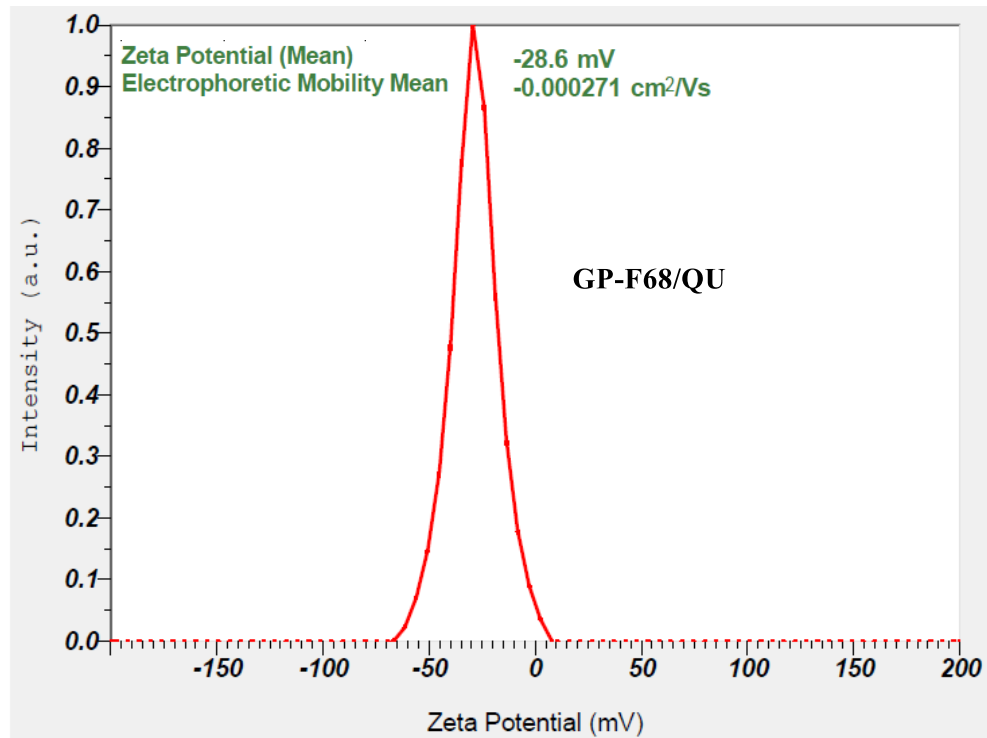
**Phụ lục 42:** Thế zeta của GP-F127/QU



**Phụ lục 43:** Thế zeta của GP-F87/QU



**Phụ lục 44:** Thế zeta của GP-F68/QU



**Phụ lục 45:** Kết quả khảo sát hiệu quả mang QU của vật liệu GP-P123 (EE, DL)

EE	P123	GP-P123 (1:2)	GP-P123 (1:4)	GP-P123 (1:6)	GP-P123 (1:8)
5	80,3 ± 3,21	88,98 ± 3,03	93,02 ± 3,72	92,15 ± 3,13	85,67 ± 2,91
10	72 ± 3,89	77,26 ± 3,09	89,2 ± 4,6	87,08 ± 3,48	73,56 ± 2,94
15	68,1 ± 2,32	70,56 ± 3,77	80,23 ± 2,62	79,23 ± 4,23	69,61 ± 3,72
20	57,4 ± 3,67	66,23 ± 4,2	75,15 ± 4,81	72,5 ± 4,6	65,94 ± 4,18
25	55,2 ± 3,06	63,97 ± 2,56	70,7 ± 3,92	69,01 ± 2,76	59,68 ± 2,39
30	53,6 ± 3,43	59,75 ± 2,69	65,28 ± 4,18	64,8 ± 2,92	57,24 ± 2,58

DL	P123	GP-P123 (1:2)	GP-P123 (1:4)	GP-P123 (1:6)	GP-P123 (1:8)
5	3,82 ± 0,15	4,24 ± 0,19	4,43 ± 0,18	4,39 ± 0,15	4,08 ± 0,22
10	6,55 ± 0,35	7,02 ± 0,32	7,75 ± 0,42	7,92 ± 0,32	6,69 ± 0,3
15	8,88 ± 0,3	9,2 ± 0,5	10,06 ± 0,34	10,33 ± 0,55	9,08 ± 0,49
20	9,57 ± 0,61	11,04 ± 0,66	12,52 ± 0,8	12,08 ± 0,77	10,99 ± 0,65
25	11,04 ± 0,61	12,79 ± 0,56	14,14 ± 0,78	13,8 ± 0,55	11,94 ± 0,53
30	12,37 ± 0,79	13,79 ± 1,02	15,06 ± 0,96	14,95 ± 0,67	13,21 ± 0,98

**Phụ lục 46:** Kết quả khảo sát hiệu quả mang QU của vật liệu GP-F127 (EE, DL)

EE	F127	GP-F127 (1:5)	GP-F127 (1:10)	GP-F127 (1:15)	GP-F127 (1:18)
5	75,2 ± 2,56	80,69 ± 2,74	85,74 ± 2,92	89,5 ± 3,04	90,23 ± 3,07
10	71,6 ± 2,86	78,88 ± 3,16	80,6 ± 3,22	82,25 ± 3,29	84,38 ± 3,38
15	65,8 ± 3,51	70,52 ± 3,77	72,21 ± 3,86	73,21 ± 3,91	75,19 ± 4,02
20	55,3 ± 3,51	65,03 ± 4,12	66,98 ± 4,25	68,39 ± 4,34	72,14 ± 4,57
25	50,4 ± 2,02	58,12 ± 2,32	60,27 ± 2,41	65,27 ± 2,61	67,92 ± 2,72
30	47,8 ± 2,15	54,76 ± 2,46	57,8 ± 2,6	58,1 ± 2,61	60,15 ± 2,71

DL	F127	GP-F127 (1:5)	GP-F127 (1:10)	GP-F127 (1:15)	GP-F127 (1:18)
5	3,58 ± 0,12	3,84 ± 0,13	4,08 ± 0,14	4,26 ± 0,14	4,3 ± 0,15
10	6,51 ± 0,26	7,17 ± 0,29	7,33 ± 0,29	7,48 ± 0,3	7,67 ± 0,31
15	8,58 ± 0,46	9,2 ± 0,49	9,42 ± 0,5	9,55 ± 0,51	9,81 ± 0,52
20	9,22 ± 0,58	10,84 ± 0,69	11,16 ± 0,71	11,4 ± 0,72	12,02 ± 0,76
25	10,08 ± 0,4	11,62 ± 0,46	12,05 ± 0,48	13,05 ± 0,52	13,58 ± 0,54
30	11,03 ± 0,5	12,64 ± 0,57	13,34 ± 0,6	13,41 ± 0,6	13,88 ± 0,62

**Phụ lục 47:** Kết quả khảo sát hiệu quả mang QU của vật liệu GP-F87 và GP-F68 (EE, DL)

EE	F87	GP-F87	F68	GP-F68
5	60,13 ± 2,41	88,24 ± 3,53	58,67 ± 2,35	75,99 ± 3,04
10	58,54 ± 3,16	78,12 ± 4,22	55,61 ± 3	70,59 ± 3,81
15	55,17 ± 1,88	68,84 ± 2,34	50,19 ± 1,71	65,46 ± 2,23
20	48,29 ± 3,09	65,9 ± 4,22	45,21 ± 2,89	59,42 ± 3,8
25	45,6 ± 2,53	60,52 ± 3,35	40,22 ± 2,23	55,18 ± 3,06
30	40,71 ± 2,61	55,75 ± 3,57	36,62 ± 2,34	50,39 ± 3,22

DL	F87	GP-F87	F68	GP-F68
5	2,86 ± 0,13	4,2 ± 0,23	2,79 ± 0,11	3,62 ± 0,14
10	5,32 ± 0,24	7,1 ± 0,32	5,06 ± 0,27	6,42 ± 0,35
15	7,2 ± 0,39	8,98 ± 0,48	6,55 ± 0,22	8,54 ± 0,29
20	8,05 ± 0,48	10,98 ± 0,65	7,54 ± 0,48	9,9 ± 0,63
25	9,12 ± 0,4	12,1 ± 0,53	8,04 ± 0,45	11,04 ± 0,61
30	9,39 ± 0,7	12,87 ± 0,95	8,45 ± 0,54	11,63 ± 0,74

**Phụ lục 48:** Kết quả khảo sát hiệu quả mang QU của vật liệu FA-GP-P123 (EE, DL)

EE	P123	FA-GP-P123 (1:2)	FA-GP-P123 (1:4)	FA-GP-P123 (1:6)	FA-GP-P123 (1:8)
5	80,3 ± 3,21	90,17 ± 3,07	92,94 ± 3,72	90,01 ± 3,06	86,76 ± 2,95
10	72 ± 3,89	88,76 ± 3,55	91,63 ± 4,6	88,13 ± 3,53	82,14 ± 3,29
15	68,1 ± 2,32	77,64 ± 4,15	85,24 ± 2,62	82,19 ± 4,39	75,92 ± 4,05
20	57,4 ± 3,67	70,52 ± 4,47	76,09 ± 4,81	74,57 ± 4,73	70,59 ± 4,48
25	55,2 ± 3,06	65,12 ± 2,6	72,64 ± 3,92	69,64 ± 2,79	66,04 ± 2,64
30	53,6 ± 3,43	60,54 ± 2,72	68,76 ± 4,18	65,94 ± 2,97	60,07 ± 2,7

DL	P123	FA-GP-P123 (1:2)	FA-GP-P123 (1:4)	FA-GP-P123 (1:6)	FA-GP-P123 (1:8)
5	3,82 ± 0,15	4,29 ± 0,19	4,43 ± 0,18	4,29 ± 0,15	4,13 ± 0,22
10	6,55 ± 0,35	8,07 ± 0,36	8,33 ± 0,42	8,01 ± 0,32	7,47 ± 0,34
15	8,88 ± 0,3	10,13 ± 0,55	11,12 ± 0,34	10,72 ± 0,57	9,9 ± 0,53
20	9,57 ± 0,61	11,75 ± 0,7	12,68 ± 0,8	12,43 ± 0,79	11,77 ± 0,7
25	11,04 ± 0,61	13,02 ± 0,57	14,53 ± 0,78	13,93 ± 0,56	13,21 ± 0,58
30	12,37 ± 0,79	13,97 ± 1,03	15,87 ± 0,96	15,22 ± 0,68	13,86 ± 1,03



**Phụ lục 49:** Kết quả khảo sát hiệu quả mang PTX của vật liệu GP-P123

<b>EE</b>	<b>P123</b>	<b>GP-P123 (1:2)</b>	<b>GP-P123 (1:4)</b>	<b>GP-P123 (1:6)</b>	<b>GP-P123 (1:8)</b>
0,5	90,3 ± 3,97	99,18 ± 4,36	99,02 ± 4,35	99,35 ± 4,37	98,87 ± 4,35
1	82,9 ± 3,73	97,45 ± 4,38	98,29 ± 4,42	98,28 ± 4,42	97,51 ± 4,38
1,5	72,3 ± 3,90	87,74 ± 4,73	87,14 ± 4,70	87,4 ± 4,71	86,78 ± 4,68
2	67,8 ± 4,027	76,38 ± 4,53	79,09 ± 4,69	72,65 ± 4,31	76,09 ± 4,51
2,5	60,5 ± 2,66	74,12 ± 3,26	72,7 ± 3,19	69,15 ± 3,04	65,81 ± 2,89
3	52,7 ± 3,89	65,88 ± 4,87	60,28 ± 4,46	64,93 ± 4,80	57,35 ± 4,24

<b>DL</b>	<b>P123</b>	<b>GP-P123 (1:2)</b>	<b>GP-P123 (1:4)</b>	<b>GP-P123 (1:6)</b>	<b>GP-P123 (1:8)</b>
0,5	0,45 ± 0,02	0,49 ± 0,02	0,49 ± 0,02	0,49 ± 0,02	0,49 ± 0,03
1	0,82 ± 0,04	0,96 ± 0,04	0,97 ± 0,04	0,97 ± 0,04	0,97 ± 0,04
1,5	1,07 ± 0,06	1,3 ± 0,07	1,29 ± 0,07	1,29 ± 0,07	1,28 ± 0,07
2	1,33 ± 0,08	1,5 ± 0,09	1,55 ± 0,09	1,42 ± 0,09	1,49 ± 0,09
2,5	1,48 ± 0,06	1,81 ± 0,08	1,77 ± 0,08	1,69 ± 0,07	1,61 ± 0,07
3	1,53 ± 0,11	1,92 ± 0,14	1,76 ± 0,13	1,89 ± 0,09	1,67 ± 0,12

**Phụ lục 50:** Kết quả khảo sát hiệu quả mang PTX của vật liệu GP-F127

<b>EE</b>	<b>F127</b>	<b>GP-F127 (1:5)</b>	<b>GP-F127 (1:10)</b>	<b>GP-F127 (1:15)</b>	<b>GP-F127 (1:18)</b>
0,5	85,5 ± 3,42	90,98 ± 3,09	90,03 ± 3,06	91,79 ± 3,12	93,98 ± 3,19
1	81,7 ± 4,41	89,16 ± 3,56	90,89 ± 3,63	91,54 ± 3,66	94,08 ± 3,76
1,5	78,2 ± 2,65	80,78 ± 4,31	82,47 ± 4,40	83,48 ± 4,45	85,7 ± 4,57
2	65,4 ± 4,18	67,24 ± 4,26	71,21 ± 4,51	70,62 ± 4,47	74,7 ± 4,73
2,5	55,1 ± 3,05	58,31 ± 2,33	62,47 ± 2,49	65,48 ± 2,61	65,97 ± 2,63
3	46,2 ± 2,95	50,92 ± 2,29	55,98 ± 2,51	58,29 ± 2,62	58,85 ± 2,64

<b>DL</b>	<b>F127</b>	<b>GP-F127 (1:5)</b>	<b>GP-F127 (1:10)</b>	<b>GP-F127 (1:15)</b>	<b>GP-F127 (1:18)</b>
0,5	0,43 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,47 ± 0,02
1	0,81 ± 0,04	0,88 ± 0,04	0,9 ± 0,04	0,91 ± 0,04	0,93 ± 0,04
1,5	1,16 ± 0,06	1,19 ± 0,06	1,22 ± 0,07	1,23 ± 0,07	1,27 ± 0,07
2	1,28 ± 0,08	1,32 ± 0,08	1,4 ± 0,09	1,38 ± 0,09	1,46 ± 0,09
2,5	1,34 ± 0,06	1,42 ± 0,06	1,52 ± 0,06	1,6 ± 0,06	1,61 ± 0,06
3	1,35 ± 0,1	1,48 ± 0,07	1,63 ± 0,07	1,7 ± 0,08	1,71 ± 0,08

**Phụ lục 51:** Kết quả khảo sát hiệu quả mang PTX của vật liệu GP-F87 và GP-F68

<b>EE</b>	<b>F87</b>	<b>GP-F87</b>	<b>F68</b>	<b>GP-F68</b>
0,5	82,9 ± 3,31	90,9 ± 3,63	78,65 ± 3,14	88,09 ± 3,52
1	81,8 ± 4,41	90,5 ± 4,88	78,68 ± 4,22	87,94 ± 4,74
1,5	73,4 ± 2,49	78,89 ± 2,68	65,02 ± 2,21	75,96 ± 2,58
2	58,7 ± 3,75	68,91 ± 4,41	47,3 ± 3,02	65,07 ± 4,16
2,5	45,62 ± 2,52	60,57 ± 3,35	43,8 ± 2,42	57,85 ± 3,20
3	40,51 ± 2,59	55,05 ± 3,52	37,75 ± 2,41	52,84 ± 3,38

<b>DL</b>	<b>F87</b>	<b>GP-F87</b>	<b>F68</b>	<b>GP-F68</b>
0,5	0,41 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,39 ± 0,02	0,44 ± 0,02
1	0,81 ± 0,04	0,9 ± 0,04	0,78 ± 0,04	0,87 ± 0,05
1,5	1,08 ± 0,06	1,17 ± 0,06	0,96 ± 0,03	1,12 ± 0,04
2	1,15 ± 0,07	1,35 ± 0,08	0,93 ± 0,06	1,28 ± 0,08
2,5	1,11 ± 0,05	1,48 ± 0,07	1,07 ± 0,06	1,41 ± 0,08
3	1,18 ± 0,09	1,6 ± 0,12	1,1 ± 0,07	1,54 ± 0,1

**Phụ lục 52:** Kết quả khảo sát hiệu quả mang PTX của vật liệu FA-GP-P123

<b>EE</b>	<b>P123</b>	<b>FA-GP-P123 (1:2)</b>	<b>FA-GP-P123 (1:4)</b>	<b>FA-GP-P123 (1:6)</b>	<b>FA-GP-P123 (1:8)</b>
0,5	90,3 ± 3,97	99,7 ± 4,38	99,61 ± 4,38	99,46 ± 4,37	98,46 ± 4,33
1	82,9 ± 3,73	98,02 ± 4,4	99,01 ± 4,45	98,86 ± 4,44	98,09 ± 4,41
1,5	72,3 ± 3,90	88,27 ± 4,76	88,76 ± 4,79	87,92 ± 4,74	87,38 ± 4,71
2	67,8 ± 4,02	82,16 ± 4,88	87,9 ± 5,22	81,85 ± 4,86	81,87 ± 4,86
2,5	60,5 ± 2,66	79,8 ± 3,51	81,49 ± 3,58	75,3 ± 3,31	71,52 ± 3,14
3	52,7 ± 3,89	71,59 ± 5,29	77,17 ± 5,71	71,01 ± 5,25	63,09 ± 4,66

<b>DL</b>	<b>P123</b>	<b>FA-GP-P123 (1:2)</b>	<b>FA-GP-P123 (1:4)</b>	<b>FA-GP-P123 (1:6)</b>	<b>FA-GP-P123 (1:8)</b>
0,5	0,45 ± 0,02	0,5 ± 0,02	0,5 ± 0,02	0,49 ± 0,02	0,49 ± 0,03
1	0,82 ± 0,04	0,97 ± 0,04	0,98 ± 0,04	0,98 ± 0,04	0,97 ± 0,04
1,5	1,07 ± 0,06	1,3 ± 0,07	1,31 ± 0,07	1,3 ± 0,07	1,29 ± 0,07
2	1,33 ± 0,08	1,61 ± 0,1	1,72 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,61 ± 0,1
2,5	1,48 ± 0,07	1,95 ± 0,09	1,99 ± 0,09	1,84 ± 0,07	1,74 ± 0,08
3	1,53 ± 0,11	2,09 ± 0,15	2,25 ± 0,17	2,07 ± 0,09	1,84 ± 0,14

**Phụ lục 53:** Kết quả xác định hoạt tính của GP-P123 và FA-GP-P123 mang QU trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7

Mẫu	Nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Phần trăm gây độc tế bào (%)			
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB $\pm$ DLC
GP-P123	100	6,73	9,48	7,82	<b>8,01 <math>\pm</math> 1,38</b>
GP-P123-FA	100	11,36	14,79	17,32	<b>14,49 <math>\pm</math> 2,99</b>

Vì 2 mẫu này ở nồng độ 100  $\mu\text{g/mL}$  có phần trăm gây độc tế bào <50% nên không xác định  $\text{IC}_{50}$ .

**Giá trị  $\text{IC}_{50}$  của các mẫu trên dòng tế bào MCF-7**

Mẫu	Giá trị $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB $\pm$ DLC
QU	23,141	26,051	23,2	24,131 $\pm$ 1,663
GP-P123/QU	129,852	133,445	135,757	133,018 $\pm$ 2,976
FA-GP-P123/QU	122,138	121,4	114,949	119,495 $\pm$ 3,955

TB: Trung bình; DLC: Độ lệch chuẩn

Mẫu	Nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Phần trăm gây độc tế bào (%)			
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB $\pm$ DLC
QU	50	77,79	74,79	85,01	<b>79,20 <math>\pm</math> 5,25</b>
	25	71,85	70,22	71,15	<b>71,07 <math>\pm</math> 0,82</b>
	10	50,64	51,92	49,91	<b>50,82 <math>\pm</math> 1,02</b>
	5	21,31	0,14	12,45	<b>11,30 <math>\pm</math> 10,63</b>
	1	-9,12	11,86	12,99	<b>11,32 <math>\pm</math> 1,99</b>
GP-P123/QU	50	14,52	12,94	17,64	<b>15,03 <math>\pm</math> 2,39</b>
	75	32,57	28,12	25,84	<b>28,84 <math>\pm</math> 3,42</b>
	100	45,85	47,20	40,18	<b>44,41 <math>\pm</math> 3,72</b>
	150	62,02	60,79	58,72	<b>60,51 <math>\pm</math> 1,67</b>
	200	68,94	67,78	70,15	<b>68,96 <math>\pm</math> 1,19</b>
FA-GP-P123/QU	50	17,02	16,94	22,76	<b>18,91 <math>\pm</math> 3,34</b>
	75	41,54	38,20	40,16	<b>39,97 <math>\pm</math> 1,68</b>
	100	41,54	48,66	50,70	<b>46,97 <math>\pm</math> 4,81</b>
	150	66,35	65,01	64,27	<b>65,21 <math>\pm</math> 1,05</b>
	200	71,27	70,38	72,19	<b>71,28 <math>\pm</math> 0,91</b>

**Phụ lục 54: Kết quả xác định hoạt tính của GP-P123 và FA-GP-P123 mang QU trên dòng tế bào HeLa**

Mẫu	Nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Phần trăm gây độc tế bào (%)			
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB $\pm$ DLC
GP-P123	100	5,4	6,84	8,72	<b>6,99 <math>\pm</math> 1,66</b>
GP-P123-FA	100	6,31	12,74	7,3	<b>8,78 <math>\pm</math> 3,46</b>

Vì 2 mẫu này ở nồng độ 100  $\mu\text{g/mL}$  có phần trăm gây độc tế bào  $<50\%$  nên không xác định  $\text{IC}_{50}$ .

**Giá trị  $\text{IC}_{50}$  của các mẫu trên dòng tế bào HeLa**

Mẫu	Giá trị $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB $\pm$ DLC
QU	43,87	46,07	40,25	43,4 $\pm$ 2,94
GP-P123/QU	149,2	152,69	154	151,98 $\pm$ 2,47
FA-GP-P123/QU	135,6	137,053	132	134,89 $\pm$ 2,6

*TB: Trung bình; DLC: Độ lệch chuẩn*

Mẫu	Nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Phần trăm gây độc tế bào (%)			
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB $\pm$ DLC
QU	50	52,31	49,97	58,72	<b>53,67</b> $\pm$ <b>4,53</b>
	25	40,38	37,1	39,16	<b>38,88</b> $\pm$ <b>1,66</b>
	10	22,4	20,38	17,05	<b>19,94</b> $\pm$ <b>2,70</b>
	5	4,89	14,72	13,51	<b>11,04</b> $\pm$ <b>5,36</b>
	1	9,5	3,14	1,75	<b>4,80</b> $\pm$ <b>4,13</b>
GP-P123/QU	50	17,42	15,53	21,17	<b>18,04</b> $\pm$ <b>2,87</b>
	75	30,94	26,71	24,55	<b>27,40</b> $\pm$ <b>3,25</b>
	100	34,39	35,4	30,14	<b>33,31</b> $\pm$ <b>2,79</b>
	150	49,62	48,63	46,98	<b>48,41</b> $\pm$ <b>1,33</b>
	200	65,49	64,39	66,64	<b>65,51</b> $\pm$ <b>1,13</b>
FA-GP-P123/QU	50	20,42	20,33	27,31	<b>22,69</b> $\pm$ <b>4,00</b>
	75	39,46	36,29	38,15	<b>37,97</b> $\pm$ <b>1,59</b>
	100	40,16	43,5	42,93	<b>42,20</b> $\pm$ <b>1,79</b>
	150	53,08	52,01	51,42	<b>52,17</b> $\pm$ <b>0,84</b>
	200	67,71	66,86	68,58	<b>67,72</b> $\pm$ <b>0,86</b>

**Phụ lục 55:** Kết quả xác định hoạt tính của GP-P123 và FA-GP-P123 mang PTX trên dòng tế bào MCF7

Mẫu	Nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Phần trăm gây độc tế bào (%)			
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB $\pm$ DLC
GP-P123	100	6,73	9,48	7,82	<b>8,01 <math>\pm</math> 1,38</b>
GP-P123-FA	100	11,36	14,79	17,32	<b>14,49 <math>\pm</math> 2,99</b>

Vì 2 mẫu này ở nồng độ 100  $\mu\text{g/mL}$  có phần trăm gây độc tế bào <50% nên không xác định IC<sub>50</sub>.

**Giá trị IC<sub>50</sub> của các mẫu trên dòng tế bào MCF-7**

Mẫu	Giá trị IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB $\pm$ DLC
PTX	0,0031	0,003	0,003	0,0032 $\pm$ 0,0001
GP-P123/PTX	5,171	5,071	5,531	5,26 $\pm$ 0,24
FA-GP-P123/PTX	4,682	3,929	5,061	4,56 $\pm$ 0,576

*TB: Trung bình; DLC: Độ lệch chuẩn*

Mẫu	Nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Phần trăm gây độc tế bào (%)			
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB $\pm$ DLC
PTX	0,0100	52,07	55,18	55,03	<b>54,09 <math>\pm</math> 1,75</b>
	0,0050	37,09	44,95	43,30	<b>41,78 <math>\pm</math> 4,14</b>
	0,0025	31,89	38,12	38,20	<b>36,07 <math>\pm</math> 3,62</b>
	0,0010	2,02	1,64	-6,56	<b>-0,97 <math>\pm</math> 4,85</b>
	0,0001	-2,44	-3,79	-10,34	<b>-5,52 <math>\pm</math> 4,23</b>
GP-P123/PTX	10	64,55	64,56	61,21	<b>63,44 <math>\pm</math> 1,93</b>
	5	63,72	66,00	60,29	<b>63,34 <math>\pm</math> 2,87</b>
	2,5	46,87	48,23	47,71	<b>47,60 <math>\pm</math> 0,69</b>
	1,0	24,58	26,37	22,84	<b>24,60 <math>\pm</math> 1,77</b>
	0,5	9,75	8,39	7,99	<b>8,71 <math>\pm</math> 0,92</b>
FA-GP-P123/PTX	10	65,35	65,98	63,58	<b>64,97 <math>\pm</math> 1,24</b>
	5	64,76	67,87	62,54	<b>65,06 <math>\pm</math> 2,68</b>
	2,5	56,63	61,89	56,27	<b>58,26 <math>\pm</math> 3,15</b>
	1,0	30,72	37,32	27,76	<b>31,93 <math>\pm</math> 4,89</b>
	0,5	11,60	14,17	10,00	<b>11,92 <math>\pm</math> 2,10</b>

**Phụ lục 56:** Kết quả xác định hoạt tính của GP-P123 và FA-GP-P123 mang PTX trên dòng tế bào HeLa

**Giá trị IC<sub>50</sub> của các mẫu trên dòng tế bào HeLa**

Mẫu	Giá trị IC <sub>50</sub> (µg/mL)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB ± DLC
PTX	0,0031	0,003	0,003	0,0032 ± 0,0001
GP-P123/PTX	5,171	5,071	5,531	5,26 ± 0,24
FA-GP-P123/PTX	4,765	4,327	5,03	4,71 ± 0,36

*TB: Trung bình; DLC: Độ lệch chuẩn*

Mẫu	Nồng độ (µg/mL)	Phần trăm gây độc tế bào (%)					
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB ± DLC		
PTX	0,008	79,08	82,67	78,01	<b>79,92</b>	±	<b>4,53</b>
	0,004	65,33	68,92	72,06	<b>68,77</b>	±	<b>1,66</b>
	0,002	48,24	50,24	38,9	<b>45,79</b>	±	<b>2,70</b>
	0,001	30,72	31,27	36,35	<b>32,78</b>	±	<b>5,36</b>
	0,0005	25,43	19,72	16,94	<b>20,70</b>	±	<b>4,13</b>
GP-P123/PTX	10	77,46	77,47	73,45	<b>76,13</b>	±	<b>2,32</b>
	5	60,53	62,7	57,28	<b>60,17</b>	±	<b>2,73</b>
	2,5	35,15	36,17	35,78	<b>35,70</b>	±	<b>0,51</b>
	1	19,66	21,1	18,27	<b>19,68</b>	±	<b>1,42</b>
	0,5	9,26	7,97	7,59	<b>8,27</b>	±	<b>0,88</b>
FA-GP-P123/PTX	10	78,42	79,18	76,3	<b>77,97</b>	±	<b>1,49</b>
	5	61,52	64,48	59,41	<b>61,80</b>	±	<b>2,55</b>
	2,5	42,47	46,42	42,2	<b>43,70</b>	±	<b>2,36</b>
	1	24,58	29,86	22,21	<b>25,55</b>	±	<b>3,92</b>
	0,5	11,02	13,46	9,5	<b>11,33</b>	±	<b>2,00</b>

**Phụ lục 57:** Kết quả xác định hoạt tính của GP-P123 và FA-GP-P123 mang PTX và QU trên dòng tế bào HeLa

**Giá trị IC<sub>50</sub> của các mẫu trên dòng tế bào HeLa**

Mẫu	Giá trị IC <sub>50</sub> (µg/mL)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB ± DLC
PTX	0.003	0.003	0.003	0.003 ± 0.0001
GP/PTX/QU	4.33	4.76	4.27	4.45 ± 0.27
FA-GP/PTX /QU	3.53	3.59	3.84	3.65 ± 0.16

*TB: Trung bình; DLC: Độ lệch chuẩn*

Mẫu	Nồng độ (µg/mL)	Phần trăm gây độc tế bào (%)				
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB ± DLC	
PTX	0.008	79.08	82.67	78.01	<b>79.92</b>	± <b>4.53</b>
	0.004	65.33	68.92	72.06	<b>68.77</b>	± <b>1.66</b>
	0.002	48.24	50.24	38.9	<b>45.79</b>	± <b>2.70</b>
	0.001	30.72	31.27	36.35	<b>32.78</b>	± <b>5.36</b>
	0.0005	25.43	19.72	16.94	<b>20.70</b>	± <b>4.13</b>
GP/PTX/QU	10	80.41	75.06	78.04	<b>77.84</b>	± <b>2.68</b>
	5	62.18	57.27	61.27	<b>60.24</b>	± <b>2.61</b>
	2.5	38.5	36.95	45.08	<b>40.18</b>	± <b>4.32</b>
	1	32.46	33.75	32.74	<b>32.98</b>	± <b>0.68</b>
	0.5	20.41	21.54	19.52	<b>20.49</b>	± <b>1.01</b>
FA-GP/PTX /QU	10	80.12	79.18	79.52	<b>79.61</b>	± <b>0.48</b>
	5	63.1	62.08	62.81	<b>62.66</b>	± <b>0.53</b>
	2.5	48.35	48.07	48.36	<b>48.26</b>	± <b>0.16</b>
	1	38.07	38.42	35.34	<b>37.28</b>	± <b>1.69</b>
	0.5	27.47	27.53	22.97	<b>25.99</b>	± <b>2.62</b>

**Phụ lục 58:** Kết quả xác định hoạt tính của GP-P123 và FA-GP-P123 mang PTX và QU trên dòng tế bào MCF7

**Giá trị IC<sub>50</sub> của các mẫu trên dòng tế bào MCF-7**

Mẫu	Giá trị IC <sub>50</sub> (µg/mL)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB ± DLC
PTX	0,008	0,007	0,007	0,007 ± 0,001
GP/PTX/QU	4,006	4,574	3,74	4,107 ± 0,4
FA-GP/PTX /QU	2,592	2,019	2,894	2,44 ± 0,39

*TB: Trung bình; DLC: Độ lệch chuẩn*

Mẫu	Nồng độ (µg/mL)	Phân trăm gây độc tế bào (%)			
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB ± DLC
PTX	0,01	52,07	55,18	55,03	<b>54,09 ± 1,75</b>
	0,005	37,09	44,95	43,30	<b>41,78 ± 4,14</b>
	0,0025	31,89	38,12	38,20	<b>36,07 ± 3,62</b>
	0,001	2,02	1,64	-6,56	<b>-0,97 ± 4,85</b>
	0,0001	-2,44	-3,79	-10,34	<b>-5,52 ± 4,22</b>
GP/PTX/QU	10	67,01	62,55	65,03	<b>64,86 ± 2,23</b>
	5	65,45	60,28	64,49	<b>63,41 ± 2,75</b>
	2,5	51,33	49,27	60,1	<b>53,57 ± 5,75</b>
	1	40,58	42,19	40,92	<b>41,23 ± 0,85</b>
	0,5	21,48	22,67	20,55	<b>21,57 ± 1,06</b>
FA-GP/PTX/QU	10	66,77	65,98	66,27	<b>66,34 ± 0,4</b>
	5	66,42	65,35	66,12	<b>65,96 ± 0,55</b>
	2,5	64,46	64,09	64,48	<b>64,34 ± 0,22</b>
	1	47,59	48,03	44,18	<b>46,6 ± 2,11</b>
	0,5	28,92	28,98	24,18	<b>27,36 ± 2,75</b>