

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



ĐỖ THỊ MAI HỒNG

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CỦA HỆ NANO PLGA – HONOKIOL
TRÊN CHUỘT MANG KHỐI U NGOẠI LAI**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ
SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

ĐỖ THỊ MAI HỒNG

SINH HỌC THỰC NGHIỆM

2022

Hà Nội - 2022

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



ĐỖ THỊ MAI HỒNG

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CỦA HỆ NANO PLGA – HONOKIOL TRÊN
CHUỘT MANG KHỐI U NGOẠI LAI**

Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm
Mã số: 8 4 2 01 14

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH
SINH HỌC**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:
TS. LÊ THỊ THÙY DƯƠNG**

Hà Nội - 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm.

Tác giả luận văn ký và ghi rõ họ tên

LỜI CẢM ƠN

Em xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Lê Thị Thùy Dương đã dành cho em sự giúp đỡ tận tình, những định hướng và kiến thức khoa học hiệu quả trong suốt quá trình thực hiện luận văn này.

Em cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành tới cô Bùi Thị Vân Khánh – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, đã nhiệt tình giúp đỡ cũng như tạo điều kiện để em có thể hoàn thiện đề tài này.

Em xin gửi lời cảm ơn đến các thầy cô, các anh chị kỹ thuật viên thuộc phòng Sinh hóa Thực vật đã giúp đỡ em trong suốt quá trình thực hiện đề tài. Em cũng xin gửi lời cảm ơn đến các thầy cô, các anh chị kỹ thuật viên, Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen và Phòng ADN ứng dụng, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi về cơ sở vật chất để em thực hiện đề tài.

Em xin cảm ơn sự giúp đỡ tận tình, tạo tất cả các điều kiện thuận lợi cho em của ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo và các ban phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ để em hoàn thành luận văn trong thời gian học tập và nghiên cứu tại Học viện.

Cuối cùng, em xin cảm ơn sự giúp đỡ tận tình của bạn bè, sự động viên, tạo điều kiện của những người thân trong gia đình trong suốt quá trình em hoàn thành luận án này.

Xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 30 tháng 11 năm 2022

Học viên

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT	i
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	iii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ.....	iv
DANH MỤC SƠ ĐỒ	v
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	3
1.1. Ứng dụng của y học nano trong điều trị ung thư	3
1.1.1. Tình hình ung thư trên thế giới và Việt Nam.....	3
1.1.2. Tổng quan về y học nano	5
1.1.3. Hệ nano polyme	8
1.2. Hoạt chất Honokiol	11
1.2.1. Hoạt tính sinh học của Honokiol.....	11
1.2.2. Hoạt tính kháng u.....	12
1.2.3. Hệ nano Honokiol	14
1.3. Một số nghiên cứu ứng dụng của các hệ nano ở Việt Nam	18
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	21
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	21
2.2. HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU.....	21
2.2.1. Hóa chất nghiên cứu.....	21
2.2.2. Thiết bị nghiên cứu	22
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	22
2.3.1. Quy trình nghiên cứu	22
2.3.2. Nuôi cấy dòng tế bào 3LL.....	23
2.3.3. Gây u thực nghiệm cho chuột	24
2.3.4. Quy trình xử lý chất trên chuột thực nghiệm	24
2.3.5. Xác định các chỉ số huyết học và sinh hóa trong máu	26

2.3.6. Phân tích mô bệnh học	26
2.2.7. Xử lý số liệu và phân tích thống kê	27
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	28
3.1. Kết quả gây u trên chuột	28
3.2. Ảnh hưởng của Hono và Nano-PLGA-Hono lên trọng lượng cơ thể.....	29
3.3. Ảnh hưởng của Hono và Nano-PLGA-Hono lên các chỉ số huyết học và sinh hóa máu.....	32
3.3.1. Chỉ số huyết học.....	32
3.3.2. Chỉ số sinh hóa máu	36
3.4. Kết quả mô bệnh học.....	39
3.5. Tác dụng ức chế sự phát triển khối u của Hono và Nano-PLGA-Hono..	42
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	50
KẾT LUẬN	50
KIẾN NGHỊ	51
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	52
PHỤ LỤC	64
Phụ lục 1. Kết quả các chỉ số huyết học, sinh hóa và mô bệnh học của 05 nhóm nghiên cứu	64

DANH MỤC CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

ATCC	American Type Culture Collection (ngân hàng nuôi cấy tế bào Mỹ)
ĐCSH	Đôi chứng sinh học
ĐCUT	Đôi chứng ung thư
EFR	Enhanced permeability and retention (Tăng cường khả năng thẩm thấu và lưu giữ)
EGFR	Epidermal growth factor receptor (Thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì)
EMA	European Medicines Agency (Cơ quan quản lý dược phẩm Châu Âu)
FDA	Food and Drug Administration (Cơ quan Quản lý Thuốc và Thực phẩm Mỹ)
GA	Axit glycolic
GOT	Glutamic oxaloacetic transaminase
GPT	Glutamic pyruvic transaminase
HCT	Chỉ số hematocrit
HDL-C	High density lipoprotein cholesterol
HGB	Nồng độ hemoglobin
Hono	Honokiol
HK NPs	HK-loaded PGC nanoparticles
HK-PCEC	Honokiol-loaded PCL-PEG-PCL
HK-loaded NCs	Honokiol-Loaded PEGylated PLGA Nanocapsules
HNK/PP-DOX-PM	HNK-loaded conjugate micelles
LA	Axit lactic
LDL-C	Low density lipoprotein cholesterol
LYM	Số lượng tế bào lympho
MCH	Nồng độ huyết sắc tố trung bình trong máu

MCV	Thể tích trung bình tế bào hồng cầu
m-TOR	Mammalian target of rapamycin
NCI	National Cancer Institute
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
nm	Nanometer
Nano-PLGA-Hono	Nano-PLGA-Honokiol
PEG	Polyethylene glycol
PLGA	Poly(lactide-co-glycolide)
PLT	Số lượng tiểu cầu
RBC	Số lượng hồng cầu
SEC	Solid Ehrlich Carcinoma
STAT3	Signal transducers and activator of transcription 3
UV	Ultraviolet
WBC	Số lượng bạch cầu
WHO	World Health Organization (Tổ chức Y tế Thế giới)

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu	22
Bảng 2.2. Thang hiệu lực kháng u	26
Bảng 3.1. Trọng lượng cơ thể trước và sau 22 ngày điều trị	32
Bảng 3.2. Kết quả các chỉ số huyết học	35
Bảng 3.3. Kết quả phân tích các chỉ tiêu sinh hóa	37
Bảng 3.4. Hiệu lực kháng u của các nhóm điều trị	47

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ

Hình 1.1. Các tác dụng phụ của thuốc hóa trị	4
Hình 1.2. Các đặc điểm hóa lý của hạt nano	6
Hình 1.3. Hệ thống phân phối thuốc thụ động và chủ động	7
Hình 1.4. Phân loại hạt nano polyme theo cấu trúc	9
Hình 1.5. Cấu trúc hóa học của PLGA	10
Hình 1.6. Hệ nano PLGA-PEG	11
Hình 1.7. Cấu trúc phân tử và hoạt tính sinh học của hoạt chất Hono	12
Hình 3.1. Tế bào ung thư biểu mô phổi Lewis – 3LL	28
Hình 3.2. Chuột mang khối u 3LL	29
Hình 3.3. Trọng lượng cơ thể của chuột	30
Hình 3.4. Kết quả các chỉ số huyết học	33
Hình 3.5. Kết quả các chỉ số sinh hóa máu	38
Hình 3.6. Kết quả mô học gan và thận	40
Hình 3.7. Kết quả mô học lá lách	41
Hình 3.8. Thể tích khối u của chuột mang khối u 3LL	42
Hình 3.9. Khối u của các nhóm sau mũi tiêm cuối cùng	43
Hình 3.10. Trọng lượng trung bình của khối u	44
Hình 3.11. Hình ảnh khối u của các nhóm	47

DANH MỤC SƠ ĐỒ

Sơ đồ 2.1. Sơ đồ quy trình nghiên cứu.....	23
Sơ đồ 2.2. Cách phân chia nhóm điều trị	25

MỞ ĐẦU

Hóa trị liệu là phương pháp sử dụng thuốc hóa trị để tiêu diệt tế bào ung thư, ngăn chặn sự phát triển và di căn của khối u, dẫn đến thu nhỏ phạm vi và thể tích của khối u. Tuy nhiên, trong điều trị ung thư thuốc hóa trị truyền thống vẫn còn chứa tác dụng phụ nghiêm trọng đối với sức khỏe của bệnh nhân tiếp nhận điều trị. Nguyên nhân chính là khả năng tan kém trong nước và sự phân phối toàn thân không đặc hiệu, thời gian lưu hành ngắn của thuốc hóa trị trong cơ thể. Do vậy, việc nghiên cứu thuốc hóa trị mới và các hệ dẫn thuốc có tính năng ưu việt để cải thiện các vấn đề của thuốc hóa trị truyền thống là rất cần thiết.

Honokiol là một hoạt chất thiên nhiên được tách chiết chủ yếu từ vỏ của một số loài cây thuộc họ Mộc Lan. Trong y học cổ truyền, vỏ và một số bộ phận khác của cây thuộc họ Mộc Lan được sử dụng với các công dụng như giảm đau, giảm lo âu, được đưa vào một số bài thuốc hoặc làm trà thảo mộc. Còn trong nghiên cứu, một số hoạt tính sinh học của Honokiol đặc biệt được chú ý như hoạt tính kháng u và chống oxy hóa, chống tăng sinh mạch máu. Honokiol có thể là một thuốc hóa trị mới do tiềm năng kháng u của Honokiol đã được chứng minh qua nhiều thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* trước đây. Tuy nhiên, sinh khả dụng của Honokiol có thể bị hạn chế bởi khả năng hòa tan kém trong nước của nó. Vì vậy, một số hệ dẫn thuốc mới đã được sử dụng để nghiên cứu cải thiện sinh khả dụng của Honokiol.

Phân phối thuốc bằng các hệ nano (hệ dẫn thuốc nano) đã mang lại những lợi thế liên quan đến cải thiện khả năng hòa tan, phân phối đặc hiệu, tăng thời gian lưu hành, dẫn đến cải thiện sinh khả dụng của thuốc. Trong số các vật liệu để tổng hợp hạt nano, Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) là một loại polyme sở hữu khả năng phân hủy sinh học ưu việt. Hệ nano PLGA được đánh giá là hệ thống phân phối thuốc tiên tiến trong điều trị ung thư, với nhiều hệ dẫn thuốc nano PLGA đã được Cơ quan Quản lý Thuốc và Thực phẩm Mỹ cấp phép. Hệ dẫn thuốc nano PLGA có thể cải thiện nồng độ thuốc tích tụ tại vị trí khối u bằng cơ chế vận chuyển thụ động thông qua hiệu ứng tăng cường khả năng thẩm thấu và lưu giữ (EFR). Hơn nữa, một số hệ dẫn thuốc nano polyme sẽ được lưu thông trực tiếp trong hệ tuần hoàn bằng đường tiêm tĩnh mạch, giúp tránh khỏi các rào cản đến từ hệ tiêu hóa khi sử dụng bằng đường uống. Do đó, hệ dẫn thuốc nano dùng bằng đường tiêm tĩnh mạch có thể làm tăng hiệu suất điều trị

khối u của thuốc. Vì vậy, áp dụng hệ dẫn thuốc nano PLGA để cải thiện sinh khả dụng của hoạt chất Honokiol đã và đang là một hướng nghiên cứu tiềm năng.

Hiện nay, chất chiết xuất từ cây Hậu phác (*Magnolia officinalis* Rehd. et Wils) thuộc họ Mộc Lan được biết đến là chứa hàm lượng cao hoạt chất Honokiol, có công dụng rất đa dạng như điều trị hạ huyết áp, chống viêm trong các bài thuốc dân gian và trà thảo dược. Tuy nhiên, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về tiềm năng kháng u của Honokiol cũng như dạng nano polyme hóa của Honokiol được thực hiện, vì vậy chúng tôi thực hiện đề tài nghiên cứu: **“NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CỦA HỆ NANO PLGA – HONOKIOL TRÊN CHUỘT MANG KHỐI U NGOẠI LAI”**, với mục tiêu nghiên cứu là đánh giá hiệu quả tiêu giảm khối u của hệ Nano-PLGA-Honokiol trên chuột mang khối u ngoại lai.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Ứng dụng của y học nano trong điều trị ung thư

1.1.1. Tình hình ung thư trên thế giới và Việt Nam

Ung thư được xếp hạng là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu thế giới với số ca tử vong tính đến năm 2020 là khoảng 10 triệu ca, chỉ riêng ở Việt Nam là 122.690 ca [1, 2]. Ung thư là một nhóm lớn các bệnh có thể xuất hiện ở hầu hết mọi bộ phận của cơ thể; các tế bào bất thường tăng sinh không kiểm soát và không trải qua quá trình apoptosis sẽ dẫn đến việc hình thành khối u. Khi khối u phát triển vượt ra ngoài ranh giới thông thường của chúng để xâm lấn các bộ phận xung quanh thì được gọi là giai đoạn di căn (National Cancer Institute – NCI). Di căn trên diện rộng chính là nguyên nhân gây tử vong của bệnh ung thư. Hiện nay, đã có nhiều thủ thuật và loại thuốc có sẵn để điều trị ung thư, ngoài ra còn nhiều liệu pháp điều trị khác vẫn đang được nghiên cứu và thử nghiệm tiền lâm sàng. Từ trước đến nay, phẫu thuật, hóa trị, xạ trị vẫn luôn là những phương pháp chính để điều trị ung thư. Các phương pháp điều trị có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp để có một phác đồ điều trị phù hợp và hiệu quả nhất đối với từng bệnh nhân.

Phẫu thuật và xạ trị là phương pháp điều trị “cục bộ”, được sử dụng để điều trị khối u phát triển trong một phạm vi nhất định. Trong đó, hóa trị được sử dụng với mục đích làm chậm sự phát triển và tiêu diệt tế bào khối u, dẫn đến tiêu giảm kích thước của khối u, ngoài ra còn được dùng để làm giảm triệu chứng như đau cho bệnh nhân ung thư. Hóa trị còn được gọi là phương pháp điều trị “toàn thân” vì thuốc hóa trị có thể ảnh hưởng đến toàn bộ các cơ quan trong cơ thể. Hóa trị được bác sĩ chuyên môn chỉ định trong điều trị dựa trên loại ung thư, giai đoạn phát triển và mục đích điều trị đối với từng bệnh nhân. Tuy nhiên, tác dụng của thuốc hóa trị bị hạn chế bởi các nhược điểm của thuốc bao gồm khả năng hòa tan kém và phân phối không đặc hiệu đến vị trí khối u [3]. Thêm vào đó, sự lưu hành và thời gian lưu hành của thuốc có thể bị hạn chế bởi các môi trường sinh học khác nhau trong cơ thể chúng ta, ví dụ như máu. Trong điều trị lâm sàng để đạt được hiệu quả điều trị tốt hơn đã yêu cầu sử dụng thuốc hóa trị với liều lượng cao. Hơn nữa, tế bào khối u có xu hướng phát triển nhanh hơn tế bào thường nên cơ chế tác dụng của thuốc hóa trị còn là nhắm đích vào các tế bào có tốc độ phát triển nhanh. Điều này dẫn đến các tế bào khỏe mạnh có

tốc độ phát triển nhanh chẳng hạn như tế bào tạo máu trong tủy xương, tế bào trong khoang miệng, nang tóc có thể cũng bị tổn thương bởi tác dụng của thuốc hóa trị (NCI). Ngoài ra, trên thế giới đã ghi nhận tỉ lệ bệnh nhân ung thư kháng lại thuốc hóa trị đang ngày càng gia tăng, hậu quả nặng nhất của kháng hóa trị có thể là tử vong [4]. Do vậy có nhiều vấn đề phát sinh hoặc vốn đã tồn tại khi sử dụng phương pháp hóa trị bao gồm kinh phí điều trị, độ an toàn của thuốc và tác dụng phụ ảnh hưởng đến sức khỏe của bệnh nhân ung thư sau tiếp nhận điều trị.



Hình 1.1. Các tác dụng phụ của thuốc hóa trị [5].

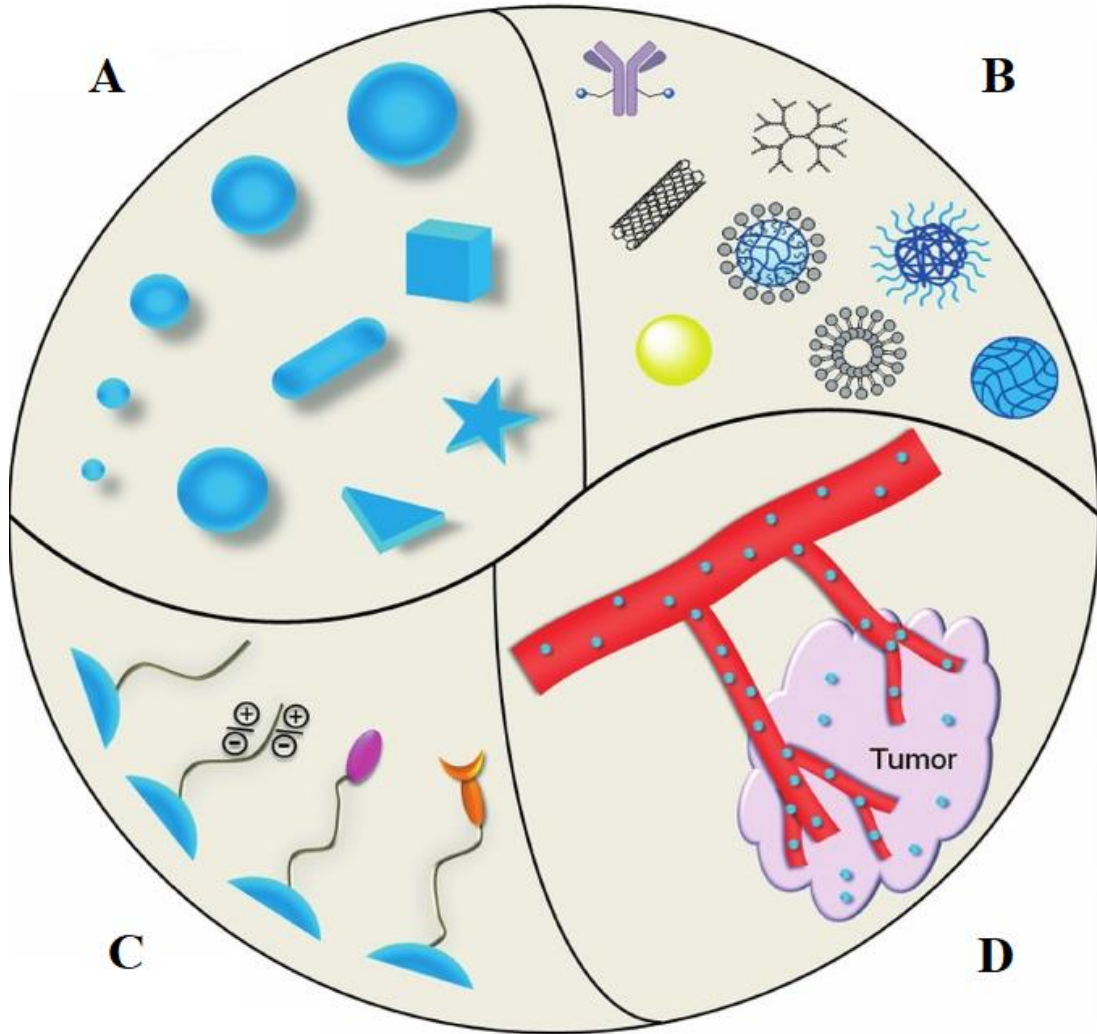
Độc tính và tác dụng phụ mà bệnh nhân có thể gặp phải bao gồm nhiễm trùng, suy nhược, mệt mỏi, buồn nôn, biếng ăn, thay đổi vị giác, đau họng, các bệnh đường tiêu hóa (táo bón, tiêu chảy), các bệnh lý thần kinh ngoại biên, rụng tóc, thậm chí là vô sinh (hình 1.1) [5]. Những tác dụng phụ này đã ảnh hưởng nghiêm trọng đến chất lượng cuộc sống của bệnh nhân. Nhưng hóa trị vẫn là phương pháp trị liệu không thể thiếu đối với những bệnh nhân ung thư. Do đó, việc tạo ra các hệ dẫn thuốc mới nhằm cải thiện độ hòa tan và hướng đích tế bào khối u của các thuốc hóa trị để đạt hiệu quả điều trị tốt hơn, là rất cần thiết.

1.1.2. Tổng quan về y học nano

Công nghệ nano đã được ứng dụng ở rất nhiều lĩnh vực nghiên cứu và sản xuất, trong đó, ứng dụng của nó trong y học hay còn gọi là y học nano (nanomedicine) rất đa dạng, chẳng hạn như chẩn đoán, theo dõi, kiểm soát, phát triển vắc xin và hệ thống dẫn truyền thuốc để điều trị bệnh ung thư. Hệ thống phân phối thuốc sử dụng các hạt nano, gọi tắt là hệ dẫn thuốc nano, đã giải quyết được một số vấn đề liên quan đến các thuốc hóa trị trong điều trị bệnh ung thư. Các vấn đề hạn chế của thuốc hóa trị như khả năng hòa tan trong nước kém, phân bố không đặc hiệu, độc tính toàn thân và hiệu quả điều trị thấp có thể được giải quyết khi đưa vào các hệ dẫn thuốc nano [3]. Không những thế, trong lĩnh vực phân phối thuốc, hệ dẫn thuốc nano còn được sử dụng với mục đích bảo vệ thuốc khỏi các rào cản sinh học trong cơ thể. Khả năng hòa tan kém và tính thấm kém là nguyên nhân chính dẫn đến nhiều thất bại về nghiên cứu dược động học của nhiều loại thuốc theo hệ thống phân loại sinh dược học (Biopharmaceutical classification system - BCS) của Cơ quan Quản lý Thuốc và Thực phẩm Mỹ (Food and Drug Administration - FDA) [6]. Đối với tính thấm kém của thuốc, theo BCS, trên 25% các dược chất có tính thấm kém qua thành ruột làm hạn chế khả năng hấp thụ và đưa thuốc vào tuần hoàn máu. Do đó, các nhà nghiên cứu đã tạo ra các hạt nano có đặc tính bề mặt thân nước để làm tăng khả năng hòa tan của các thuốc. Hơn nữa, việc đưa thuốc vào hệ nano có kích thước nhỏ là một lợi thế làm tăng khả năng thấm qua lớp biểu mô và lớp màng tế bào (hình 1.2). Ngoài ra, khả năng phân phối thuốc đến vị trí khối u của các hệ dẫn thuốc nano dựa trên các cơ chế đặc biệt.

Các hệ dẫn thuốc nano có khả năng vận chuyển thuốc hiệu quả và đặc hiệu bằng cách tận dụng các cấu trúc và đặc điểm của môi trường vi mô khối u. Các hệ dẫn thuốc nano được chia thành 2 loại dựa trên cơ chế vận chuyển bao gồm vận chuyển chủ động (active delivery) và thụ động (passive delivery) (hình 1.3). Vận chuyển chủ động là nhắm mục tiêu khối u để phân phối thuốc qua các tương tác phối tử/ thụ thể, các hạt nano được gắn các phối tử bề mặt có khả năng nhận diện và bắt cặp đặc hiệu với các thụ thể trên màng tế bào khối u, từ đó các hạt nano được phân phối hướng đích một cách hiệu quả [7]. Mặt khác, vận chuyển thụ động là vận chuyển thông qua hiệu ứng tăng cường khả năng thấm thấu và lưu giữ (EPR), dẫn đến cải thiện nồng độ và thời gian tích tụ của thuốc tại vị trí khối u [8]. Các yếu tố ảnh hưởng đến EPR bao gồm các đặc tính hóa lý

như kích thước, hình dạng, điện tích bề mặt và thành phần hóa học bề mặt của hạt nano. Do đó, bằng cách tận dụng các cấu trúc và đặc điểm của môi trường vi mô khối u, các hạt nano được điều chỉnh trong thiết kế để đạt được hiệu quả vận chuyển thuốc tối đa.

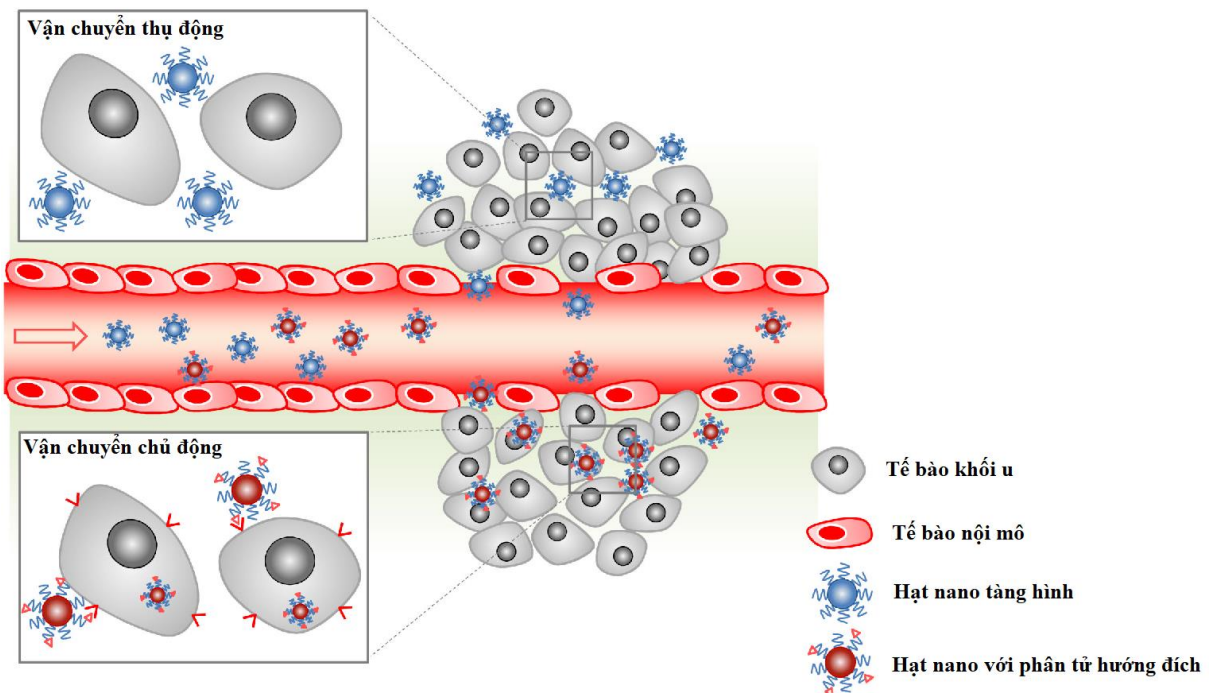


Hình 1.2. Các đặc điểm hóa lý của hạt nano [3].

Trong hình 1.2, A là hình dạng các hạt nano, B là các vật liệu tổng hợp hạt nano, C là các biến đổi bề mặt hạt nano và D là phân phối hướng đích khối u.

Các hệ dẫn thuốc nano được thiết kế theo cơ chế vận chuyển thụ động thường lợi dụng các đặc điểm môi trường vi mô khối u, chẳng hạn như pH môi trường, nhiệt độ và điện tích bề mặt. Hiệu quả giải phóng thuốc đúng đích có thể được cải thiện nhờ giải phóng đáp ứng nhiệt của các hạt nano, nhiệt độ của tế bào khối u được chỉ ra là cao hơn nhiệt độ tế bào bình thường, nên các hạt nano được thiết kế để việc giải phóng thuốc chỉ xảy ra khi gặp vùng tế bào có nhiệt độ

cao khoảng 37 đến 42°C [3]. Như đã được nghiên cứu trước đó, cấu trúc mạch máu tại vị trí khối u phát triển cũng là một yếu tố quan trọng để sàng lọc kích thước hạt nano phù hợp. Do các tế bào khối u phát triển không kiểm soát với tốc độ nhanh hơn bình thường dẫn đến thành mạch máu (blood vascular wall) bị phá vỡ, dẫn đến tạo khoảng trống giữa các tế bào nội mô (endothelial cells) trong hệ vi mạch máu của khối u [9]. Các khoảng trống này có kích thước dao động từ 100 đến 780 nm tùy loại khối u, khu vực khu trú và môi trường [10]. Mà các thuốc hóa trị hay hệ dẫn thuốc nano được dùng phổ biến qua đường tiêm tĩnh mạch, do đó, các hạt nano được thiết kế với kích thước thích hợp có thể dễ dàng xâm nhập vào khối u qua các khoảng trống trên thành của vi mạch máu khối u (hình 1.3). Các khối u còn được đặc trưng bởi hệ thống dẫn lưu bạch huyết kém, do đó, các hạt nano không bị đào thải nhanh chóng và được tích tụ lâu hơn tại vị trí các khe hở trong cấu trúc của khối u [11].



Hình 1.3. Hệ thống phân phối thuốc thụ động và chủ động [12].

Hơn nữa, các hạt nano có nguy cơ cao bị đào thải bởi hệ thống lưới nội mô (RES – Reticuloendothelial System). RES là một phần của hệ thống miễn dịch giữ chức năng loại bỏ các tế bào già ra khỏi dòng máu (blood stream) và tạo các thực bào để đáp ứng miễn dịch và phản ứng viêm [13]. Trước đây, một số nghiên cứu đã chứng minh rằng kích thước hạt nano càng nhỏ thì càng dễ dàng tránh khỏi sự đào thải của RES và kích thước nhỏ hơn 100 nm được cho là lý tưởng trong sản xuất hệ dẫn thuốc nano [12, 14-17]. Tuy nhiên, theo như tác

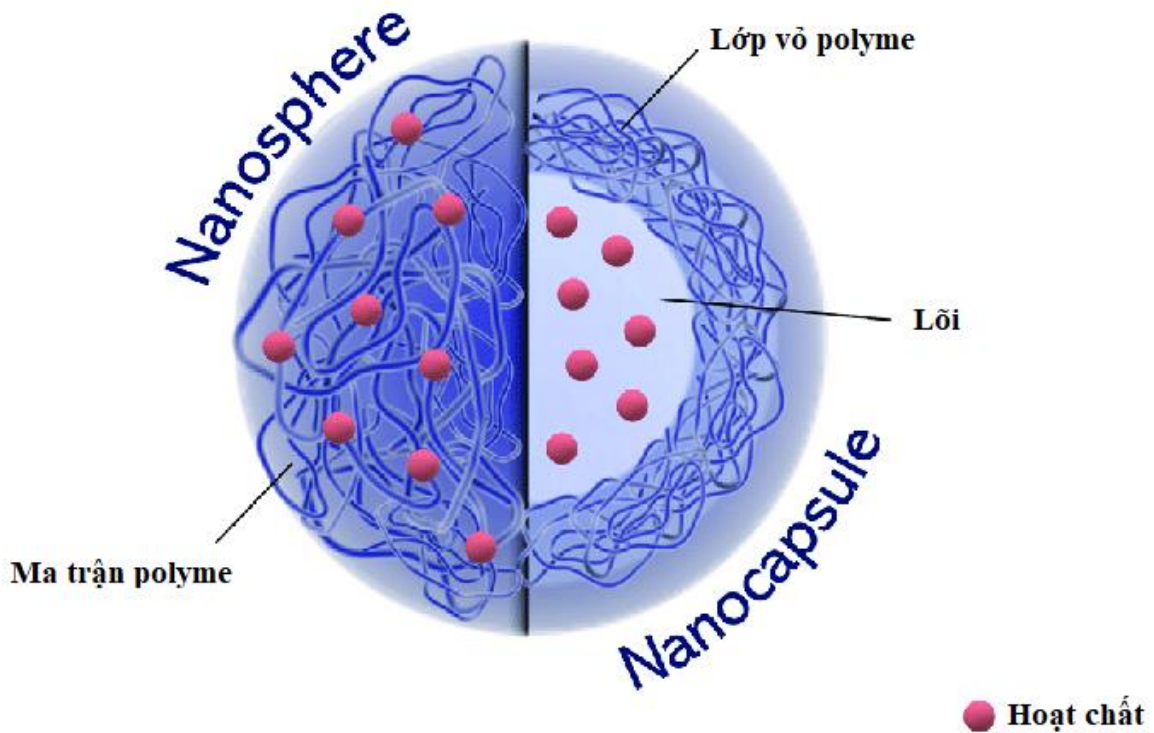
giả Alexis thì khoảng kích thước từ 5 đến 250 nm sẽ là kích thước hạt nano tiềm năng để cải thiện các hệ dẫn thuốc nano trong điều trị bệnh, do ở kích thước này hạt nano có khả năng vượt qua nhiều rào cản sinh học và giải phóng thuốc điều trị ở một liều lượng tối ưu [18]. Vì vậy, để tận dụng hiệu ứng EPR một cách hiệu quả, điều quan trọng là thiết kế các hạt nano có kích thước, hình dạng, thành phần và cải tiến bề mặt thích hợp tránh được sự đào thải của miễn dịch và tăng thời gian lưu hành của hạt nano trong cơ thể.

Công nghệ nano cho phép tổng hợp các hạt nano có kích thước và các đặc tính hóa lý đa dạng. Trong đó các đặc điểm như hình dáng (hình cầu, hình ống), đặc tính bề mặt đa dạng (gắn phối tử, phủ lớp bề mặt bằng PEG, thay đổi điện tích bề mặt), thành phần hóa học có thể được cải tiến dựa trên mục đích thiết kế (hình 1.2). Việc thiết kế hệ dẫn thuốc nano dựa trên đặc điểm của tế bào khối u đã làm giảm khả năng làm tổn thương các mô tế bào lành dẫn đến giảm tác dụng phụ cho đối tượng được điều trị. Ứng dụng điều trị ung thư của các hệ dẫn thuốc nano vẫn đang tiếp tục được nghiên cứu tại nhiều nước trên thế giới.

1.1.3. Hệ nano polyme

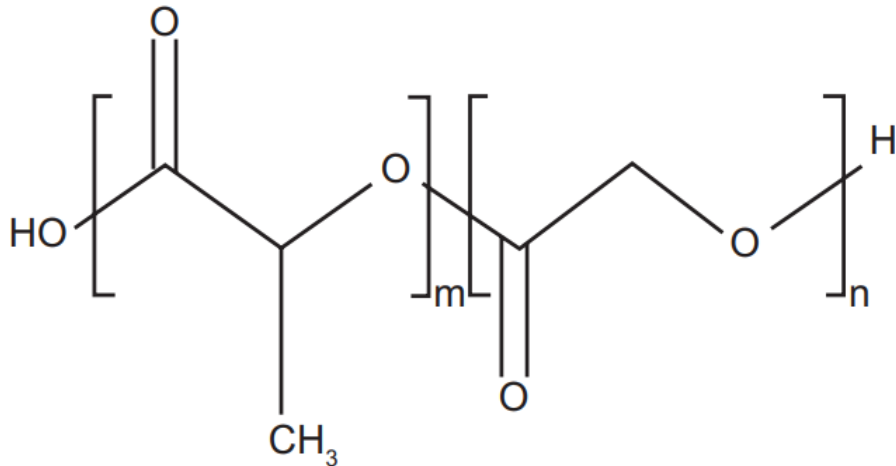
Một trong những hệ nano được ứng dụng phổ biến để sản xuất hệ dẫn thuốc điều trị ung thư là hệ nano polyme (Polymeric Nanoparticles). Một số polyme tổng hợp bao gồm poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), polylactide (PLA), polyglycolide, polycaprolactone (PCL), poly(D, L-lactide) và PLGA-polyethylene glycol (PLGA-PEG), cũng như các polyme tự nhiên gồm chitosan, albumin, heparin, dextran, gelatin, alginate và collagen đã được sử dụng rộng rãi để điều chế hệ nano polyme và bao gói thuốc điều trị [19]. Quá trình tổng hợp của hạt nano polyme có thể được điều chỉnh để tạo ra 2 dạng cấu trúc khác nhau là “nanosphere” và “nanocapsule” (hình 1.4). Nanosphere có cấu trúc là một hệ thống ma trận, sau khi bao gói thuốc sẽ phân tán bên trong ma trận đó. Nanocapsule hay còn được gọi là nang nano, nó có cấu trúc bao gồm lớp bên trong là lõi chứa dung môi (có thể là dầu hoặc nước) và bao bọc bên ngoài là lớp vỏ polyme, thuốc sẽ được tải vào lõi của nang nano [20]. Ưu điểm của các hạt nano polyme đến từ các đặc tính của chúng, chẳng hạn như trọng lượng phân tử, tính kỵ nước, khả năng phân hủy sinh học. Hơn nữa, các polyme này đủ ổn định trong ống nghiệm và tuần hoàn dài trong cơ thể sống bên cạnh đó chúng cho thấy khả năng nội hóa tế bào ung thư cao nhờ hiệu ứng EPR để đạt được mục

tiêu thụ động đến vị trí khối u. Do đó mà nano polyme được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu thuốc hóa trị điều trị ung thư.



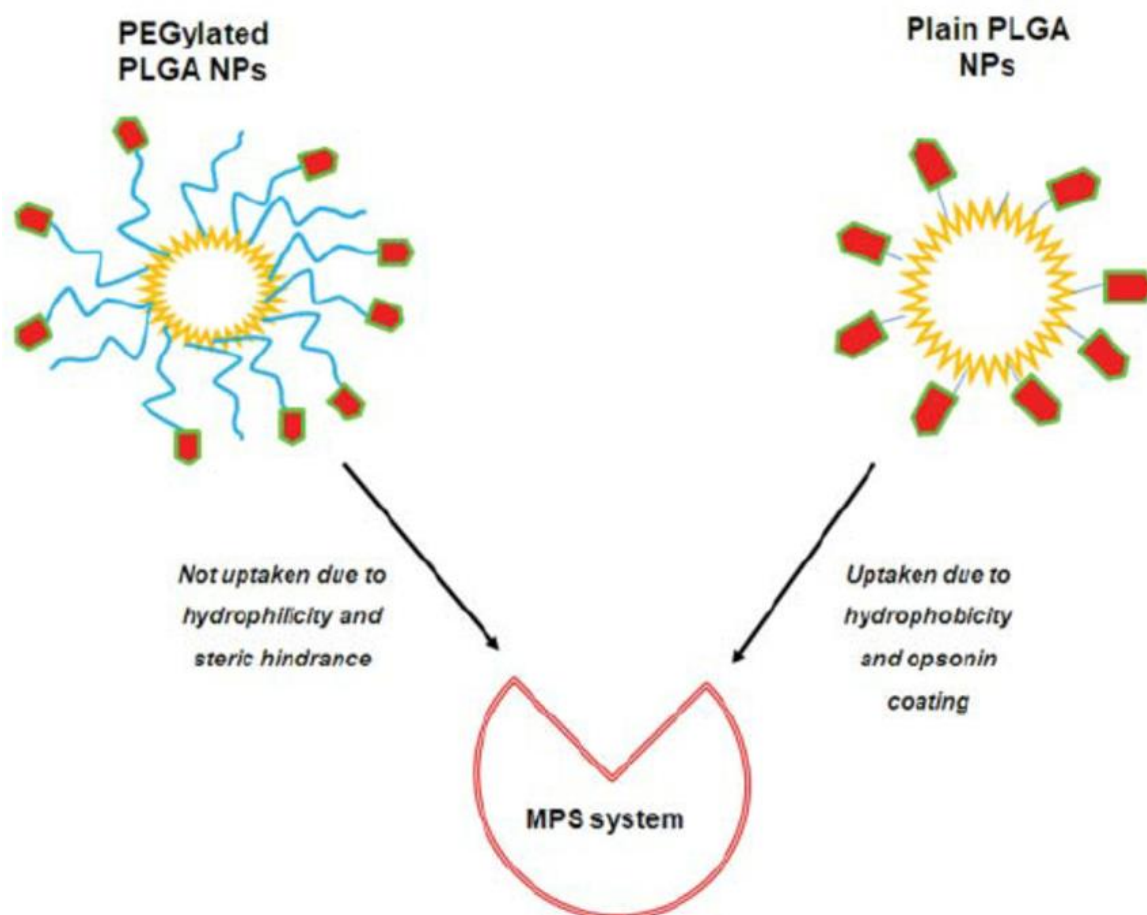
Hình 1.4. Phân loại hạt nano polyme theo cấu trúc [21] .

Trong số các polyme tổng hợp, PLGA đã được FDA và EMA cấp phép để sử dụng trong sản xuất hệ dẫn thuốc nano và trong chẩn đoán, điều trị lâm sàng. PLGA thu hút sự quan tâm khi sở hữu khả năng phân hủy sinh học, tính tương thích sinh học với thuốc, độ bền cơ học tốt, độc tính thấp và quy trình xử lý dễ dàng [22]. PLGA là một chất đồng trùng hợp mạch thẳng có thể được điều chế ở các tỉ lệ khác nhau giữa các monome cấu thành của nó, bao gồm axit lactic (LA) và axit glycolic (GA), có công thức hóa học lần lượt là $C_3H_6O_3$ và $C_2H_4O_3$ (hình 1.5). Trong đó, axit lactic có tính kỵ nước cao hơn axit glycolic, do đó khi PLGA tổng hợp với thành phần LA nhiều hơn GA sẽ cho PLGA kỵ nước và hấp thụ nước ít hơn, dẫn đến tốc độ phân hủy của hạt chậm hơn. Tỉ lệ suy thoái của PLGA là một hàm của tỉ lệ LA trên GA, nó được chứng minh là một trong những yếu tố quyết định sự tương thích sinh học, phân hủy sinh học của hạt nano polyme PLGA. Do đó, việc lựa chọn PLGA với các tỉ lệ LA và GA phù hợp có thể thu được dạng polyme PLGA sở hữu hiệu suất bao gói và khả năng hòa tan tốt để ứng dụng trong sản xuất các hệ dẫn thuốc nano điều trị ung thư tiềm năng [23].



Hình 1.5. Cấu trúc hóa học của PLGA [23].

Tuy nhiên, khi phân phối thuốc, hệ nano polyme gặp phải rào cản sinh học quan trọng là quá trình opsonin hóa (opsonization). Các protein opsonin có trong huyết thanh nhanh chóng nhận ra và tạo liên kết với các hạt nano lạ đi vào mạch máu. Từ đó cho phép các đại thực bào của MPS (hệ thống thực bào đơn nhân) dễ dàng nhận ra và loại bỏ các hạt nano trước khi chúng phát huy tác dụng điều trị [24]. Dẫn đến hiệu quả điều trị của các hệ nano polyme bị hạn chế rất nhiều. Để giải quyết vấn đề này, ngoài tối ưu kích thước hạt nano thì một số phương pháp khác đã được phát triển để bảo vệ hạt nano khỏi sự phát hiện của hệ thống MPS. Trong đó, cải tiến bề mặt hạt nano PLGA bằng polyethylene glycol (PEG) đang được sử dụng rất phổ biến. PEG là một polyme không độc, không gây miễn dịch, không kháng nguyên và hòa tan tốt trong nước, cũng đã được FDA chấp thuận trong điều trị lâm sàng [25]. Việc chức năng hóa bề mặt hạt nano polyme PLGA bằng PEG không những tạo một lớp màng bảo vệ có tính ưa nước mà còn giúp hạt nano tránh được sự hấp thụ của protein opsonin trong huyết thanh thông qua lực đẩy steric, sau đó là thoát khỏi sự phát hiện của MPS (hình 1.6). Vì vậy giúp ngăn chặn và trì hoãn bước đầu tiên của quá trình opsonin hóa [24]. Hiện nay để cải thiện hiệu quả điều trị của các hệ nano PLGA, quá trình sản xuất thường được kết hợp với quá trình cải tiến bề mặt bằng PEG.



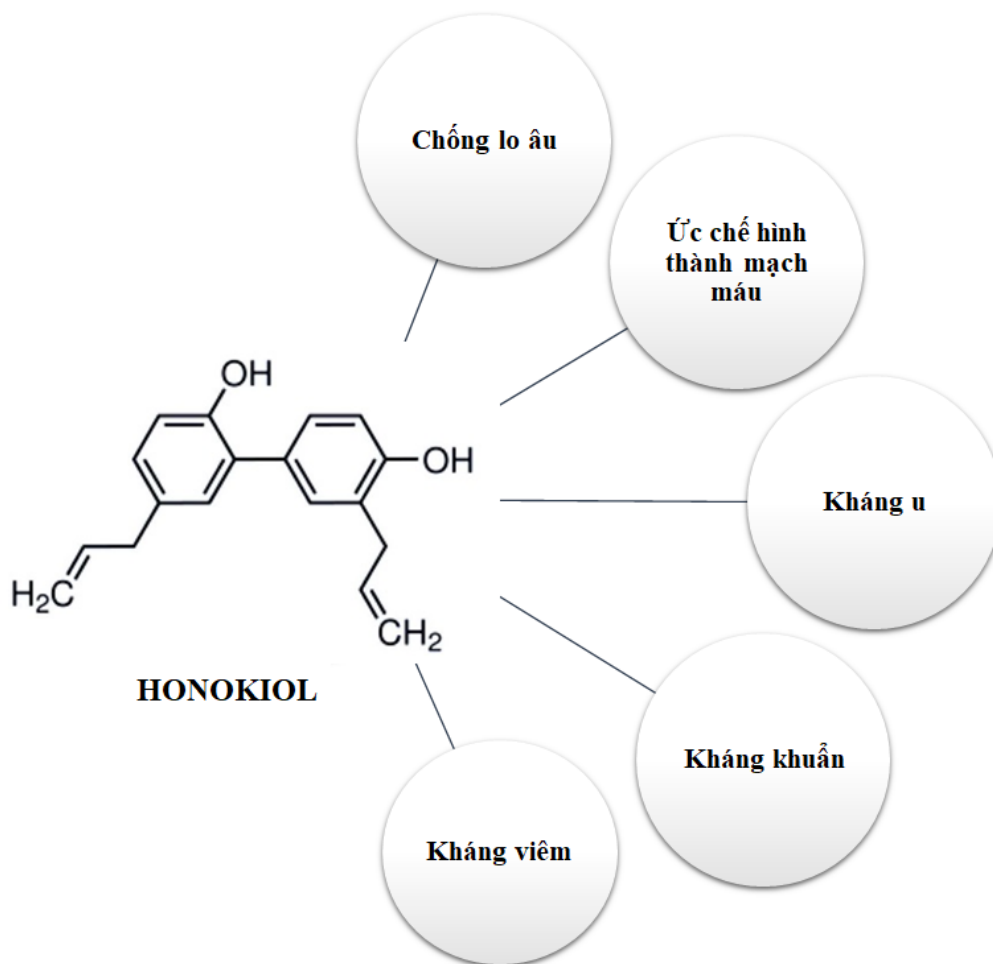
Hình 1.6. Hệ nano PLGA-PEG [26].

1.2. Hoạt chất Honokiol

1.2.1. Hoạt tính sinh học của Honokiol

Nghiên cứu thuốc hóa trị mới được bắt đầu từ việc sàng lọc các hoạt chất thiên nhiên. Các hoạt chất thiên nhiên chứa các lợi thế bao gồm sự phong phú đa dạng, nguồn vật liệu dồi dào, đặc biệt là khả năng tương thích sinh học, được động học mạnh mẽ, ít độc tính. So với các vật liệu tổng hợp, hoạt chất thiên nhiên sở hữu ưu điểm trong việc dễ dàng được hệ thống sinh học của cơ thể nhận ra, xử lý trao đổi chất thông qua các con đường được đã được thiết lập sẵn. Mặt khác, các vật liệu tổng hợp có thể gây ra độc tính, ẩn chứa các vấn đề về kích thích đáp ứng miễn dịch cơ thể hoặc dễ bị đào thải với tốc độ nhanh. Đã có rất nhiều các hoạt chất thiên nhiên và dẫn xuất của chúng có hoạt tính kháng u được tìm thấy. Honokiol (Hono) là một hoạt chất polyphenol tự nhiên, có công thức hóa học là $C_{18}H_{18}O_2$, khối lượng phân tử là 266 g/mol, và được tách chiết từ vỏ, lá của một số cây thuộc Họ Mộc lan [27]. Nó đã được sử dụng rộng rãi như một phương thuốc dân gian trong nhiều thế kỷ để điều trị rối loạn tiêu hóa, ho, lo lắng, đột quỵ và các bệnh dị ứng, và cũng được sử dụng như một chất

chống huyết khối, chống trầm cảm, chống nôn và kháng khuẩn [28, 29]. Hiện nay, Hono được nghiên cứu và chứng minh là có các hoạt tính sinh học đặc biệt bao gồm hoạt tính kháng viêm, chống lo âu, ức chế hình thành mạch máu, kháng u và kháng khuẩn (hình 1.7) [30-33]. Trong đó, Hono thu hút sự quan tâm với tiềm năng kháng u hiệu quả. Trước đây, một số nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* đã chứng minh hiệu quả của Hono để chống lại các loại khối u khác nhau, chẳng hạn như ung thư phổi, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư vú, ung thư túi mật, ung thư ruột kết, ung thư da và ung thư biểu mô gan [28]. Ngoài ra, với nguồn gốc là hoạt chất tự nhiên, Hono có độc tính thấp và an toàn khi sử dụng, điều đã được chứng minh trên nhiều mô hình thử nghiệm tiền lâm sàng. Với nhiều hoạt tính sinh học như vậy, Hono đang là đối tượng có nhiều nhà khoa học đang tập trung nghiên cứu để tìm ra thuốc hóa trị mới trong điều trị ung thư.



Hình 1.7. Cấu trúc phân tử và hoạt tính sinh học của hoạt chất Hono [34].

1.2.2. Hoạt tính kháng u

Ung thư tiến triển thông qua một loạt các đột biến di truyền và biểu sinh gây ra rối loạn điều hòa các con đường tín hiệu tế bào quan trọng [35]. Cơ chế

ức chế khối u của Hono được chứng minh là nhắm mục tiêu vào nhiều con đường tín hiệu liên quan mạnh mẽ đến quá trình khởi phát và tiến triển tế bào khối u, chẳng hạn như NF- κ B, STAT3, EGFR và m-TOR [33]. Hono có tác dụng điều hòa biểu hiện các con đường tín hiệu này. Đầu tiên, Hono có khả năng ức chế sự biểu hiện quá mức của NF- κ B thông qua ức chế Akt và hoạt hóa IKK (inhibitor kinase), sau đó dẫn đến sự phosphoryl hóa và thoái hóa của I κ B α [36]. Thứ hai là, Hono ức chế hoạt động của STAT3 thông qua việc ức chế yếu tố tăng trưởng IL-6 [37]. Thứ ba là, Hono cho thấy khả năng ức chế biểu hiện của EGFR thông qua việc ức chế quá trình phosphoryl hóa của chính EGFR. Cuối cùng là, Hono ngăn chặn sự hoạt hoá quá mức của m-TOR bằng cách ức chế các con đường ERK và Akt [38]. Vẫn còn nhiều cơ chế kháng u của Hono đã và đang được chứng minh.

Hoạt tính kháng u của Hono đã được khảo sát và chứng minh thông qua các nghiên cứu ức chế tăng sinh, thúc đẩy quá trình apoptosis trên các dòng tế bào ung thư (*in vitro*), hay ở cấp độ lớn hơn là ức chế sự phát triển của khối u trên các mô hình động vật tiền lâm sàng (*in vivo*). Các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* về Hono đã cung cấp một lượng dữ liệu lớn về hiệu lực kháng u cũng như ảnh hưởng của Hono đến các cơ quan trong cơ thể. Năm 2003, Bai và cộng sự là một trong những nhóm nghiên cứu tiên phong công bố kết quả nghiên cứu hiệu lực kháng u của Hono. Họ sử dụng mô hình tế bào SVR để nghiên cứu sự tăng sinh và apoptosis, mô hình chuột thiếu hụt miễn dịch (chuột nude) gây u bằng tế bào SVR để đánh giá hiệu lực kháng khối u của Hono. Kết quả công bố chỉ ra rằng Hono ở liều lượng 4 đến 10 μ g/mL đều thể hiện ức chế tăng sinh và tăng tỉ lệ tế bào apoptosis sớm trên dòng tế bào SVR, ngoài ra Hono còn ức chế 50% sự phát triển của khối u trong mô hình chuột nude trong nghiên cứu này [39]. Nhóm nghiên cứu của Chilampalli và cộng sự đã đánh giá tác dụng của Hono bằng việc sử dụng chuột nude SKH-1 mang khối u trên da. Khối u được hình thành do chiếu bức xạ tia UV, sau đó mỗi con chuột được điều trị bằng 3 mg Hono. Hiệu lực kháng u của Hono được chứng minh thông qua kết quả làm giảm 80% kích thước khối u và giảm 62% sự tiến triển ác tính từ u nhú thành u ác tính so với nhóm không được điều trị. Đồng thời, tác dụng làm giảm trọng lượng khối u đã được ghi nhận trên nhóm điều trị bằng Hono, và tỉ lệ ức chế sự phát triển của khối u tính được là khoảng 45% so với nhóm đối chứng chỉ tiêm 200 μ L acetone [40].

Đối với ung thư trực tràng, nghiên cứu tác dụng kháng u của Hono cũng được ghi nhận trên mô hình chuột nude BALB/c được gây u bằng tế bào ung thư biểu mô trực tràng RKO. Thời gian sống sót trung bình của chuột điều trị bằng Hono (50.9 ngày) tăng lên đáng kể so với nhóm đối chứng không điều trị (29.7 ngày), chứng tỏ tác dụng của Hono đã cải thiện đáng kể thời gian sống thêm của động vật mang khối u RKO lên gấp 1.7 lần [41]. Ngoài ra, nghiên cứu tác dụng kháng u của Hono cũng được thực hiện trên mô hình khối u não. Các khối u não đặc biệt khó điều trị vì hàng rào máu não và hàng rào máu não tủy đã tạo ra các hạn chế cho các thuốc hóa trị truyền thống. Tuy nhiên, Hono được chứng minh là có khả năng vượt qua hai hàng rào này một cách hiệu quả và thực hiện tác dụng điều trị đối với khối u não [42]. Hai mô hình chuột nude mang khối u từ dòng tế bào ung thư thần kinh đệm trong não bao gồm 9L gliosarcoma và U251 glioma được sử dụng để đánh giá hiệu lực kháng u của Hono. Hono đã thể hiện khả năng kháng u thông qua việc làm giảm thể tích khối u với tỉ lệ lần lượt là 52% trên khối u 9L gliosarcoma và 50% trên khối u U251 glioma. Hơn nữa, kết quả nghiên cứu này chỉ ra rằng khoảng 10% lượng Hono trong huyết tương vượt qua được hàng rào máu tủy não để đi vào dịch não tủy. Nghiên cứu này đã chỉ ra rằng Hono có tiềm năng như một ứng cử viên điều trị mới để điều trị u thần kinh đệm [42]. Từ các dữ liệu tiền lâm sàng đã công bố, thấy rằng Hono là một tác nhân hóa trị liệu đầy tiềm năng trong tương lai.

1.2.3. Hệ nano Honokiol

Mặc dù sở hữu tiềm năng kháng u hiệu quả nhưng sinh khả dụng và tiềm năng trong điều trị của Hono còn bị hạn chế với nguyên nhân chính là khả năng hòa tan và phân phối không đặc hiệu. Cấu trúc phân tử của Hono chứa các nhóm hydroxyl phenolic dẫn đến hiện tượng hình thành liên kết hydro nội phân tử (hình 1.7), đây là nguyên nhân chính làm hạn chế khả năng hòa tan trong nước của Hono [43]. Thông qua việc thiết kế hạt nano nhóm oxy hoặc hydroxyl để có thể hình thành liên kết với Hono, sẽ dẫn đến ức chế hình thành các liên kết hydro nội phân tử. Do đó có thể cải thiện được độ hòa tan của Hono trong nước một cách đáng kể [44]. Ngoài ra, Hono được bao gói sẽ được bảo vệ bên trong hạt nano và giải phóng hiệu quả tại đích điều trị nhờ cơ chế vận chuyển hướng đích của các hệ dẫn thuốc nano. Vì vậy, Hono đã và đang được nghiên cứu với nhiều hệ dẫn thuốc nano khác nhau.

Năm 2008 đã có 4 nghiên cứu công bố kết quả thực hiện đánh giá tác dụng của hệ dẫn thuốc nano liposome bao gói Hono trên các đối tượng khác nhau [32, 45-47]. Các nghiên cứu đã thực hiện đánh giá hiệu quả kháng u của Hono khi được bao gói trên các loại khối u như khối u ung thư biểu mô phổi (Lewis và A549), ung thư biểu mô buồng trứng (A2780, SKOV3). Kết quả công bố từ các nghiên cứu này chỉ ra rằng khả năng hòa tan và phân phối đến khối u của Hono đã được cải thiện thông qua hiệu quả kháng u của các hệ nano liposome bao gói Hono đều cao hơn Hono ở dạng tự do. Đến năm 2011, Wang và cộng sự đã tổng hợp thành công hệ nano Honokiol-in-HP- β -CD-in-liposome với tốc độ giải phóng Hono đã được cải thiện, thông qua quan sát chỉ có 24% Hono được giải phóng trong vòng 8 giờ khi đưa vào hệ nano này. Nhưng hiệu quả chống tăng sinh trên 2 dòng tế bào ung thư A549 và HepG2 của hệ nano Honokiol-in-HP- β -CD-in-liposome này chỉ tương tự so với sử dụng Hono tự do [48]. Tiếp đến năm 2018, hệ nano Kolliphor HS15 honokiol liposome (HS15-LP-HNK) đã được công bố bởi Zhou và cộng sự. Kết quả của nghiên cứu này chỉ ra rằng hiệu quả kháng u của hệ nano HS15-LP-HNK đã được cải thiện hơn so với Hono tự do. Thêm vào đó, khi so sánh với hệ nano PEGylated-liposomal-Honokiol (tiêm cho nhóm đối chứng) thì nhóm tác giả này đã không ghi nhận thấy sự khác biệt trong hiệu quả ức chế sự phát triển của khối u giữa 2 nhóm [49]. Qua 2 nghiên cứu này, có thể thấy mặc dù các nhà khoa học dành rất nhiều công sức để tạo ra được một hệ nano liposome bao gói Hono mới, nhưng để đạt được hiệu quả kháng u tối ưu hơn thì vẫn còn là một vấn đề thách thức đối với các nhà khoa học. Do đó, các nghiên cứu hệ nano bao gói Hono khác vẫn tiếp tục được thực hiện.

Trong nghiên cứu của Guo và cộng sự (2017), hệ nano co-dendrimer PGC có đánh dấu huỳnh quang được tạo từ PAMAM G4.0 và oligoethylene glycol dendron được sử dụng để điều chế hệ nano HK-loaded PGC nanoparticles (HK NPs). Thời gian lưu hành và giải phóng thuốc của HK NPs được cải thiện một cách đáng kể khi Hono được phát hành liên tục và hoàn thành trong vòng 120 giờ. HK NPs đã mang lại hiệu quả kháng u mạnh mẽ trên mô hình chuột mang khối u ung thư vú 4T1, và không quan sát thấy tác dụng phụ đáng kể nào [50]. Trong nghiên cứu của Zhang và cộng sự năm 2022, các hạt nano zein biến tính bằng axit polysialic (PSA-Zein-HNK) được thiết kế để phân phối có mục tiêu nhằm nâng cao hiệu quả phân phối và phân phối sinh học đặc hiệu của Hono tại

các vị trí khối u. Kết quả công bố bao gồm hiệu suất đóng gói Hono là $79.2 \pm 2.3\%$. PSA-Zein-HNK duy trì sự giải phóng Hono một cách đồng đều trong huyết thanh với thời gian lưu hành khoảng 48 giờ, và đạt được tỉ lệ ức chế sự phát triển khối u cao (52,3%) so với nhóm đối chứng [51]. Hiện nay, Hono vẫn đang được đưa vào nghiên cứu cùng nhiều hệ nano khác nhau để cải thiện sinh khả dụng và hiệu quả điều trị khối u của Hono.

Ngoài các hệ nano trên, hệ nano polyme vẫn là hệ nano được sử dụng nhiều nhất để nghiên cứu cải thiện sinh khả dụng và hoạt tính kháng u của Hono. Đã có nhiều dạng nano polyme hóa của Hono được công bố, chẳng hạn như honokiol-loaded PCL-PEG-PCL (HK-PCEC), Honokiol loaded MPEG-PLA nanoparticles, HNK-loaded conjugate micelles (HNK/PP-DOX-PM), Honokiol-Loaded PEGylated PLGA Nanocapsules (HK-loaded NCs), Honokiol-eluting PLGA-based scaffold, và một số hệ nano polyme khác [52-56]. Trong đó, hệ nano HK-PCEC là một trong những hệ nano polyme bao gói Hono được phát triển sớm nhất vào năm 2010, và kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy ở việc hệ nano HK-PCEC đã giải phóng Hono một cách bền vững hơn trong vòng 14 ngày tiêm [54]. Tiếp theo là nghiên cứu hệ nano Honokiol loaded MPEG-PLA của Zheng và cộng sự, kết quả chỉ ra hệ nano MPEG-PLA đã giải phóng 53% lượng Hono được bao gói trong khi Hono tự do đã giải phóng hoàn toàn trong vòng 24 giờ đánh giá. Ngoài ra kết quả nghiên cứu này có ghi nhận tác dụng làm giảm khả năng sống đối với dòng tế bào ung thư A2780s (Cisplatin-sensitive cell line A2780) [55]. Ngoài ra, tác giả Zou và cộng sự đã nghiên cứu bao gói đồng thời doxorubicin và Hono vào hệ nano micelle polyme (HNK/PP-DOX-PM). Kết hợp các kết quả được báo cáo trong nghiên cứu này thì hệ nano HNK/PP-DOX-PM thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của dòng tế bào MDA-MB-231 (một dòng tế bào ung thư biểu mô vú) và ức chế sự phát triển, sự di căn của các tế bào khối u MDA-MB-231 trên mô hình chuột nude [56]. Thêm một nghiên cứu nữa trong năm 2019 về hệ nano polyme bao gói Hono được cải tiến bề mặt bằng một lớp vỏ polydopamine gắn phối tử folic (HK-PDA-FA-NPs). Hệ nano HK-PDA-FA-NPs này được thiết kế theo cơ chế nhạy cảm với độ pH môi trường vi mô khối u, vì vậy các hạt nano có thể tồn tại ổn định trong các môi trường sinh lý khác nhau và thể hiện độ nhạy với pH trong quá trình phóng thích thuốc trong ống nghiệm. HK-PDA-FA-NP có khả năng nhắm mục tiêu đến tế bào khối u ung thư vú 4T1 tốt dẫn đến tỷ lệ ức chế khối u đạt 80%

trong nghiên cứu *in vivo*, cao hơn đáng kể so với hệ nano chưa được cải tiến [57]. Mặc dù, các công bố trước đây đều cho thấy sự cải thiện trong hiệu quả bao gói, tốc độ giải phóng thuốc, hay tác dụng của hệ nano bao gói Hono trên các dòng tế bào hay khối u khác nhau, thì những vấn đề liên quan đến khả năng hòa tan và hiệu quả bao gói Hono vẫn cần được nghiên cứu để tối ưu hóa thêm.

Khả năng hòa tan của hoạt chất được bao gói phụ thuộc nhiều vào đặc điểm hóa lý của hạt nano, do đó để tiếp tục cải thiện khả năng hòa tan của Hono thì việc tối ưu các thành phần vật liệu và cấu trúc của hạt nano là yếu tố quan trọng để tạo ra sản phẩm mới có tính năng ưu việt hơn. Như đã đề cập ở trên, PLGA và PEG là những polyme được sử dụng rộng rãi để tổng hợp các hệ dẫn thuốc nano mới, cả hai polyme này đều đã được FDA cấp phép sử dụng trong điều trị lâm sàng trên người. Do đó, chúng là lựa chọn hàng đầu để nghiên cứu tạo các hạt nano polyme có hiệu suất bao gói tốt và giải phóng bền vững, cải thiện khả năng hòa tan của thuốc. Trong nghiên cứu của nhóm tác giả Hamedani và cộng sự, PLGA và kỹ thuật điện tử (electrospinning) đã được sử dụng để tổng hợp hệ nano Honokiol-eluting PLGA-based scaffold. Hệ nano này có cấu trúc là các polyme dạng sợi tạo thành hệ thống mạng lưới và Hono đã được tải lên mạng lưới này. Kết quả nghiên cứu của Hamedani chỉ ra rằng hệ nano Honokiol-eluting PLGA-based scaffold có thể giải phóng 24% hàm lượng Hono đã tải trong vòng 24 giờ, tuy nhiên với lượng Hono được giải phóng như vậy thì hiệu quả gây ra quá trình apoptosis đối với 2 dòng tế bào ung thư thận chỉ có hiệu suất tương đương với khi sử dụng Hono dạng tự do [53]. Vì vậy để cải tiến hơn nữa hệ nano PLGA, thiết kế hệ nano mới đã được kết hợp với việc cải tiến bề mặt sử dụng PEG. Trong một ví dụ, nhóm tác giả Avgoustakis và các đồng nghiệp đã nghiên cứu việc sử dụng các hạt PLGA-PEG nano để bao gói Cisplatin. Họ phát hiện ra rằng sự phân hủy nội bào của các hạt nano PLGA-PEG phụ thuộc vào thành phần hóa học của chính hệ nano này. Với hàm lượng PEG cao hơn, tốc độ phân hủy sinh học của các hạt nano tăng lên, dẫn đến việc giải phóng Cisplatin xảy ra nhanh hơn [58]. Đối với PLGA, đây là một loại polyme có thể dễ dàng tối ưu tỉ lệ thành phần để tạo ra những sản phẩm hạt nano có kích thước, trọng lượng và đặc tính hóa lý khác nhau. Tỉ lệ LA trên GA là một trong những yếu tố quyết định sự tương thích sinh học, phân hủy sinh học của PLGA. Và năm 2020, Haggag và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu hệ nano Honokiol-Loaded PEGylated PLGA Nanocapsules (HK-loaded NCs). Hệ HK-

loaded NCs này được thiết kế ở dạng nanocapsule và có tỉ lệ thành phần bao gồm 15% PEG-PLGA, có lõi là dầu hạnh nhân [52]. Ngay cả với các chiến lược tăng cường khả năng thâm nhập đầy hứa hẹn, việc áp dụng hiệu quả các hệ nano polyme trên vào việc nhắm mục tiêu khối u đã và đang được thử nghiệm lâm sàng. Vì vậy, việc nghiên cứu tối ưu hệ nano polyme PLGA mang các hoạt chất chống khối u sử dụng cho đường tiêm truyền mới hứa hẹn sẽ tạo ra một sản phẩm hệ nano tốt hơn.

Các hệ dẫn thuốc nano có thể được sử dụng qua các đường khác nhau bao gồm tiêm tĩnh mạch, tiêm trong phúc mạc, uống và hít qua phổi [59]. Trong đó, tiêm tĩnh mạch đang là giải pháp để sử dụng thuốc với phản ứng gần như tức thời và cho phép kiểm soát phân phối thuốc trên diện rộng khi đưa vào cơ thể. Ngoài ra, tiêm tĩnh mạch có thể cải thiện hiệu quả điều trị so với đường uống khi thuốc không phải tiếp xúc với các dịch tiêu hóa và hấp thụ qua thành ruột để đi vào máu. Tiêm tĩnh mạch giúp hệ dẫn thuốc không gặp phải sự phân hủy bởi các axit và chất nhầy trong dạ dày làm hạn chế sinh khả dụng của thuốc [60]. Sản phẩm hệ dẫn thuốc nano tiêm tĩnh mạch đầu tiên phải kể đến Abraxane® (một dạng cải tiến của paclitaxel), đã được FDA chấp thuận vào năm 2006 [61]. Vì thế hệ dẫn thuốc nano thông qua đường tiêm tĩnh mạch có thể tiềm năng mang lại hiệu quả điều trị tốt hơn.

1.3. Một số nghiên cứu ứng dụng của các hệ nano ở Việt Nam

Ở Việt Nam đã có nhiều nghiên cứu thực hiện trên các hệ dẫn thuốc nano khác nhau và các hoạt chất chống ung thư khác nhau. Điển hình như năm 2014, nhóm nghiên cứu của TS. Hà Thị Phương Thư đã nghiên cứu thành công hệ nano Cur-OCMCs và Fol-Cur-OCMCs có kích thước từ 50 đến 100 nm phù hợp cho các ứng dụng phân phối thuốc [62]. Hiệu quả nhắm mục tiêu thành công hoạt chất curcumin điều trị ung thư đến hai dòng tế bào ung thư HT29 và HeLa của hệ nano này đã được chứng minh. Năm 2019, luận văn tiến sĩ của Phan Quốc Thông nghiên cứu về tiềm năng ứng dụng của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng nền copolyme PLA-PEG có và không có hạt từ (Fe_3O_4), kết quả nghiên cứu bao gồm tổng hợp thành công hệ chất lỏng nano từ $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PLA-PEG và $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PLA-PEG/Cur, hai hệ nano này có các ứng dụng như tăng tương phản ảnh MRI, nhiệt từ trị hay điều khiển giải phóng thuốc từ xa, hứa hẹn một tương lai được ứng dụng trong sinh y [63]. Luận án tiến sĩ của Nguyễn Ngọc Hòa năm 2020 nghiên cứu cải thiện khả năng mang thuốc điều trị ung thư cisplatin của hệ

dẫn thuốc nano dendrimer đã chỉ ra được hiệu quả làm giảm độc tính của cisplatin khi chuyển vào các hệ nano PAMAM dendrimer G3.5-Cisplatin, G3.5-PNIPAM-Cisplatin-5FU và G4.0-PAA-Cisplatin, mà không làm giảm hoạt tính ức chế sự phát triển của tế bào ung thư của cisplatin [64]. Năm 2021, luận án tiến sĩ của Hồ Nhật Minh thực hiện đánh giá độc tính của hệ nano dendrimer poly(amidoamine) mang thuốc chống ung thư carboplatin và oxaliplatin trên 3 dòng tế bào ung thư là HeLa, A549 và MCF-7. Kết quả nghiên cứu cho thấy hệ PAMAM G4.0-PEG là hệ nano mang hoạt chất chống ung thư có khả năng thúc đẩy tiêu diệt tế bào ung thư HeLa và MCF-7 [65]. Đối với nhóm nghiên cứu, chúng tôi cũng đã có một số công trình ứng dụng công nghệ nano trong nghiên cứu các liệu pháp điều trị ung thư. Trong đó phải kể đến là đã sử dụng polyme như poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate (PLA-TPGS) để làm nguyên liệu tạo hệ dẫn truyền thuốc VX680 [66]. Sử dụng polyme poly(ethylene glycol)-block-poly(ϵ -caprolactone) để ứng dụng thành công cho sự bao gói thuốc điều trị ung thư docetaxel (Doc) bằng việc sử dụng phương pháp tủa nano kết hợp với siêu âm. Các nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào ở *in vitro* trên tế bào ung thư cổ tử cung Hela đã chỉ ra hiệu quả ức chế sự phát triển tế bào của các hạt nano PEG-PCL bao gói Doc cao hơn gấp 3 lần so với Doc tự do [67]. Nhóm nghiên cứu cũng đã sử dụng chitosan trọng lượng phân tử thấp để tạo hệ nano dẫn truyền gen. Hệ nano chitosan được tạo thành mang plasmid pcDNA.3.1 có chứa đoạn gen biểu hiện protein ECD (extracellular domain) thuộc vùng ngoại bào của thụ thể HER2 được gọi là vector vaccine DNA (pcDNA3.1-EDC) và điều tra sự đáp ứng miễn dịch trên thỏ bằng việc tiêm dưới da. Kết quả của nghiên cứu đã cho thấy protein HER2 trong huyết thanh thỏ cao hơn khi được tiêm bắp với hạt nano chitosan mang pcDNA3.1-EDC so với nhóm đối chứng và nhóm chỉ tiêm pcDNA3.1-EDC. Kết quả cũng chỉ ra hệ nano polyme này là không độc và có thể sử dụng như một hệ thống chuyển gen tốt để tạo vaccine trong điều trị ung thư [68]. Năm 2015 -2016, nhóm nghiên cứu đã sử dụng polyme PLGA kết hợp với PEG để tổng hợp các hạt nano bao gói các phân tử thuốc docetaxel và hệ hạt nano này có sự đồng nhất ổn định trong nước. Và hiện nay nhóm nghiên cứu cũng đã và đang tiến hành tổng hợp và thử nghiệm một số hệ nano polyme dẫn truyền thuốc điều trị ung thư trên mô hình *in vitro* và *in vivo*.

Tuy nhiên, hiệu quả điều trị ung thư vẫn cần phải nghiên cứu thêm trong các nghiên cứu tiền lâm sàng, nhưng những thành tựu của công nghệ nano cũng góp phần thúc đẩy những nghiên cứu về hệ dẫn thuốc nano trong điều trị ung thư. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu nghiên cứu là đánh giá hiệu quả tiêu giảm khối u của hệ Nano-PLGA-Honokiol trên chuột mang khối u ngoại lai.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Honokiol được tách chiết và tinh sạch tại phòng Sinh hóa Thực vật – Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Hệ nano PLGA dùng để bao gói Honokiol (Nano-PLGA) được tổng hợp và tối ưu từ các nghiên cứu trước của nhóm nghiên cứu chúng tôi [68-70].

Chuột nhắt trắng chủng Swiss (*Mus musculus*), giống đực có cân nặng từ 20 – 22 gam, trung bình khoảng 5 đến 8 tuần tuổi, được cung cấp bởi Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. Chuột được nuôi trong điều kiện chuồng đảm bảo nhiệt độ, độ ẩm, độ thông khí và ánh sáng thích hợp. Môi trường thí nghiệm được đảm bảo vệ sinh, chuột được cung cấp chế độ thức ăn và nước uống phù hợp. Tất cả chuột được nuôi để thích nghi với môi trường và đảm bảo trạng thái sinh lý ổn định trước khi tiến hành thử nghiệm khoảng 3 ngày. Thí nghiệm được tiến hành tại khu nghiên cứu động vật thực nghiệm, Nhóm nghiên cứu ung thư thực nghiệm, bộ môn Sinh học tế bào, Khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Dòng tế bào ung thư biểu mô phổi Lewis (3LL) từ bộ môn Sinh học tế bào, Khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, được hoạt hóa và nuôi cấy với mục đích gây u trên chuột. Toàn bộ quy trình này được thực hiện tại Nhóm nghiên cứu Ung thư Thực nghiệm, bộ môn Sinh học tế bào, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

2.2. HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU

2.2.1. Hóa chất nghiên cứu

- Hóa chất để tạo khối u và tiêm trên chuột được liệt kê trong bảng 2.1.
- Bộ kit định lượng các chỉ số hóa sinh trong máu: Glutamic pyruvic transaminase (GPT), Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), Creatinine, Urea, Triglyceride, High density lipoprotein cholesterol (HDL-C) và Low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) do hãng Biosystem (Tây Ban Nha) cung cấp.
- Bộ kit định lượng các chỉ số huyết học trong máu Swelab Alfa Cap Piercer Package do hãng Swelab (Thụy Điển) cung cấp.

Bảng 2.1. Các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu.

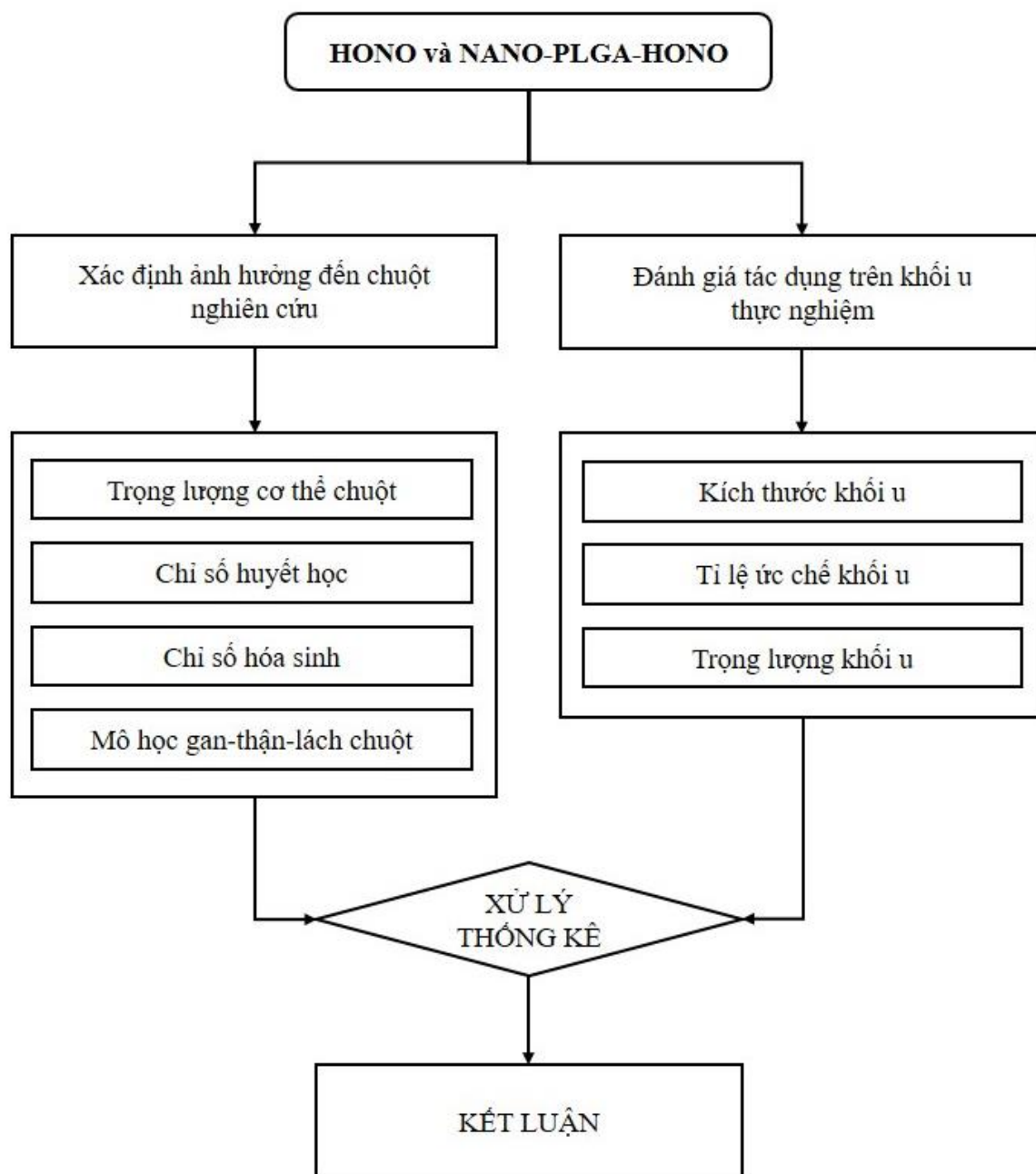
STT	Tên hóa chất	Hãng cung cấp
1	DMSO	St. Louis, MO, USA
2	Cisplatin	St. Louis, MO, USA
3	Fetal bovine serum (FBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, CHLB, Đức
4	Penicillin – Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, CHLB, Đức
5	Trypsin-EDTA	St. Louis, MO, USA
6	PBS	St. Louis, MO, USA
7	NaCl	St. Louis, MO, USA
8	Dulbecco's Modified Eagle's Medium – DMEM	St. Louis, MO, USA

2.2.2. Thiết bị nghiên cứu

- Máy xét nghiệm huyết học tự động Swelab Alfa – Automatic hematology analyzer Swelab Alfa Cap Piercer (Boule Medical AB, Thụy Điển).
- Máy sinh hóa bán tự động BTS 350 – Semi-Automatic Biosystem Bts 350 (Biosystem, Tây Ban Nha).
- Máy đúc khối nền là Leica EG1160 (công ty Leica Microsystem, Đức)
- Máy cắt là microtome (công ty Leica Microsystem, Đức).
- Máy nhuộm HE là Leica Autostainer XL (công ty Leica Microsystem, Đức)
- Kính soi là kính hiển vi quang học Leica DM1000, công ty Leica Microsystems (Đức).

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**2.3.1. Quy trình nghiên cứu**

Quy trình nghiên cứu được thực hiện nghiêm ngặt và tuân thủ theo quy trình trong sơ đồ nghiên cứu (sơ đồ 2.1).



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ quy trình nghiên cứu.

2.3.2. Nuôi cấy dòng tế bào 3LL

Dòng tế bào 3LL được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy DMEM có bổ sung thêm fetal bovine serum 10% (FBS 10%), 1% penicillin và streptomycin. Mỗi bình nuôi cấy diện tích 75 cm² được cấy chứa 10⁶ tế bào. Tế bào được nuôi cấy tăng sinh và thay môi trường 3 lần mỗi tuần ở điều kiện nhiệt độ 37°C, CO₂ 5%, độ ẩm 95%. Khi tế bào phát triển đạt 80% diện tích thì tiến hành cấy chuyển sang chai mới [71].

2.3.3. Gây u thực nghiệm cho chuột

Trước khi gây u, tế bào 3LL được rửa hai lần bằng dung dịch PBS 1X, sau đó được tách ra bằng dung dịch Trypsin-EDTA 1X. Chuẩn bị huyền dịch môi trường nuôi cấy và tế bào ung thư sao cho trong môi trường chứa 10^7 tế bào/mL. Sau đó tiến hành tiêm 200 μ L huyền dịch tế bào (tương ứng 2×10^6 tế bào) vào dưới da vùng lưng lệch về bên phải của chuột Swiss để tạo khối u. Khi bắt đầu thí nghiệm, trọng lượng cơ thể được đo để tiến hành phân nhóm chuột nghiên cứu có trọng lượng trung bình gần tương đương nhau.

2.3.4. Quy trình xử lý chất trên chuột thực nghiệm

Sau 3 ngày cấy tế bào 3LL, 20 con chuột gây u thành công được phân ngẫu nhiên thành 4 nhóm và đánh dấu để phân biệt giữa các nhóm. Tiếp theo chuột xử lý bằng các chất theo đường tiêm tĩnh mạch đuôi tương ứng theo sơ đồ 2.2. Thể tích chất trong mỗi lần tiêm tĩnh mạch là 200 μ L đối với các tất cả các chất bao gồm Nano-PLGA cho nhóm ĐCUT, 2.2 mg/kg Cisplatin cho nhóm Cisplatin, 5.3 mg/kg hoạt chất Hono cho nhóm Hono và nhóm Nano-PLGA-Hono ($n = 5$ con chuột cho mỗi nhóm). Các liều sử dụng là liều đơn với mỗi lần tiêm, với nồng độ các chất đã được tối ưu ở nghiên cứu trước của nhóm nghiên cứu chúng tôi trong đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn [72]. Ngoài ra, thử nghiệm còn bao gồm 01 nhóm đối chứng sinh học (ĐCSH), nhóm này được nuôi trong cùng điều kiện nghiên cứu với 4 nhóm trên và không tiêm bằng bất kỳ hoạt chất nào (sơ đồ 2.2). Hoạt chất Honokiol được pha trong dung dịch DMSO để thu được dung dịch Honokiol stock với nồng độ là 100 mg/ml. Sau đó lấy 1,3 μ L dung dịch stock để pha trong 198,7 μ L nước cất để thu được 200 μ L dung dịch chứa 130 μ g Hono. Tiêm 200 μ L dung dịch trên vào chuột có trọng lượng cơ thể trung bình là 22g, vậy nồng độ Hono được tiêm trên mỗi con chuột tương đương là 5.3 mg/kg. Quá trình tiêm thử nghiệm các chất được thực hiện trong 22 ngày trên các nhóm chuột nghiên cứu, các lần tiêm được tiến hành 2 ngày/lần. Song song với thời gian tiêm thử nghiệm, thể trạng, cân nặng của chuột và kích thước khối u được theo dõi và ghi lại.

Từ kích thước khối u ghi nhận được, thể tích khối u được tính theo công thức của Tomayko M. M. [73]:

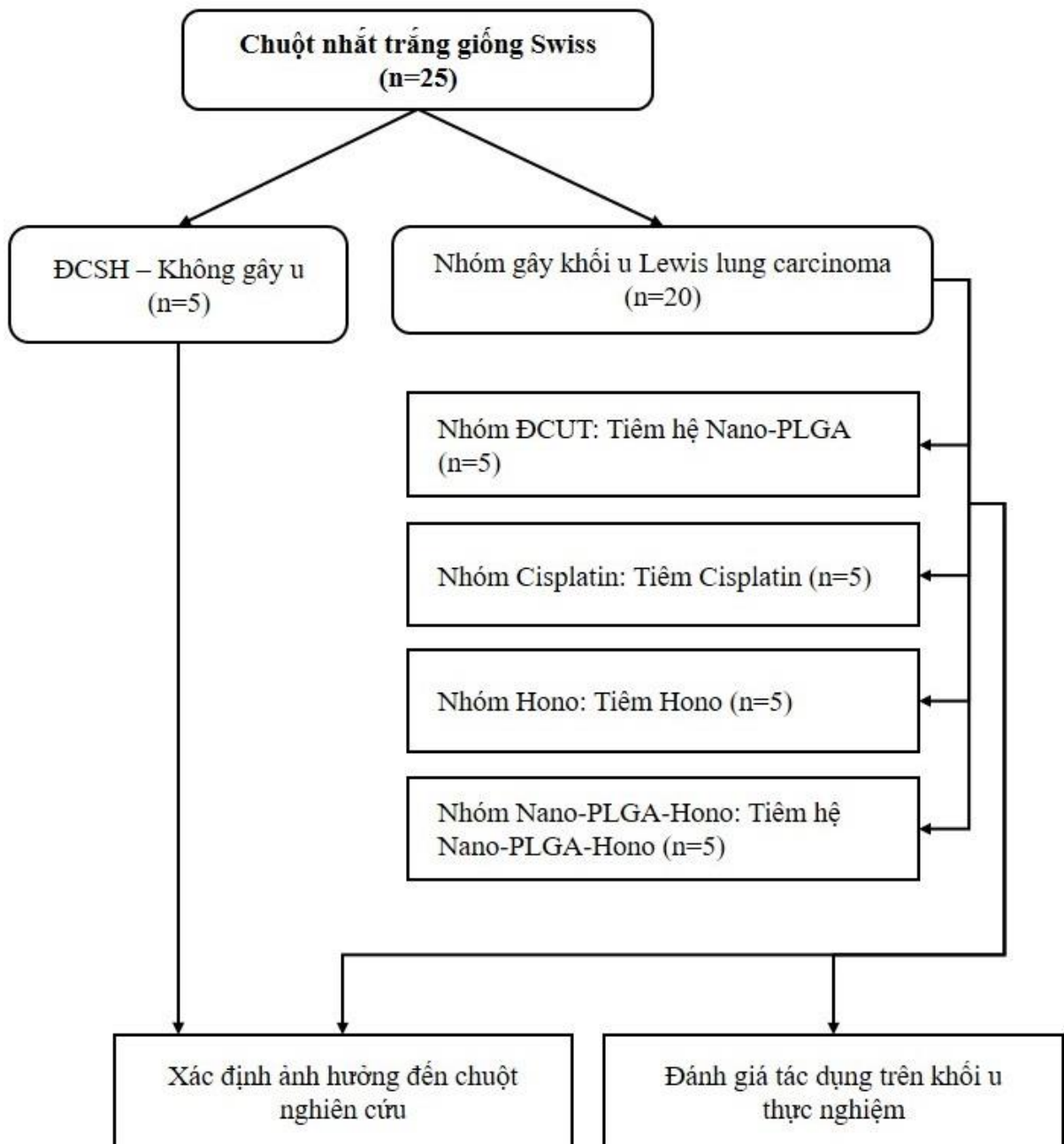
$$V (\text{mm}^3) = 0.5 \times a \times b^2$$

Trong đó, có V là thể tích khối u, đơn vị là mm^3 , a là chiều dài của khối u, b là chiều rộng của khối u, cả a và b đều có đơn vị là mm.

Để đánh giá hiệu lực ức chế khối u, tỉ lệ ức chế khối u – Tumor Inhibition Rate (IR) đã được tính theo công thức:

$$\text{IR (\%)} = ((A - B) / A) \times 100$$

Trong đó, A là trọng lượng khối u trung bình của nhóm ĐCUT và B lần lượt là trọng lượng khối u của 3 nhóm Cisplatin, Hono, Nano-PLGA-Hono.



Sơ đồ 2.2. Cách phân chia nhóm điều trị.

Dựa trên tỉ lệ ức chế khối u để xác định và đánh giá hiệu lực kháng u của các chất điều trị. Thang hiệu lực kháng u được sử dụng trong nghiên cứu này là thang tiêu chuẩn của H. Itokawa (bảng 2.2) [74].

Bảng 2.2. Thang hiệu lực kháng u.

IR (%)	Hiệu lực kháng u
0-30	-
31-60	+
61-90	++
91-100	+++

2.3.5. Xác định các chỉ số huyết học và sinh hóa trong máu

Mẫu máu được lấy vào ống EDTA để phân tích các chỉ số huyết học, trong đó các chỉ số quan trọng cần để đánh giá ảnh hưởng bao gồm số lượng bạch cầu (WBC), số lượng hồng cầu (RBC), nồng độ hemoglobin (HGB), chỉ số hematocrit (HCT), thể tích trung bình tế bào hồng cầu (MCV), nồng độ huyết sắc tố trung bình trong máu (MCH), số lượng tế bào lympho (LYM) và số lượng tiểu cầu (PLT). Xét nghiệm huyết học được thực hiện trên hệ máy xét nghiệm huyết học tự động Swelab Alpha sử dụng bộ hóa chất do công ty Swelab sản xuất (Boule Medical AB, Thụy Điển). Xét nghiệm huyết học được thực hiện trong vòng 2 giờ tính từ khi lấy mẫu.

Mẫu máu để làm xét nghiệm sinh hóa tiếp theo được lấy vào ống Heparin và các chỉ số được phân tích bằng Máy sinh hóa bán tự động BTS 350, hóa chất sử dụng là bộ hóa chất GOT, GPT, Ure, Creatinin do công ty Biosystem cung cấp (Biosystem, Tây Ban Nha). Nguyên lý xét nghiệm nồng độ ure huyết tương dựa vào phương pháp phân tích quang phổ, xét nghiệm nồng độ creatinin huyết tương sử dụng phương pháp đo màu Jaffe, xét nghiệm hoạt độ enzym GOT, GPT huyết tương sử dụng phương pháp phân tích quang phổ động học enzym.

2.3.6. Phân tích mô bệnh học

Khối u, gan, thận và lá lách ngay lập tức được cố định trong dung dịch formaldehyde 10% trong 24 giờ, ngay sau khi được tách từ cơ thể của chuột.

Các mẫu được khử nước với gradient nồng độ từ 70% đến 100% còn sau bước cố định, mỗi nồng độ còn ngâm trong 3 phút. Tiếp theo là ngâm paraffin ở nhiệt độ 58-60°C, thực hiện trên máy xử lý mô tự động Leica ASP 200S (công ty Leica Microsystem, Đức). Sau khi đúc khuôn thành công, các mẫu được cắt thành những lát mỏng khoảng 3µm, và được đem đi nhuộm bằng thuốc nhuộm hematoxylin-eosin sử dụng máy Leica Autostainer XL (Leica Microsystems, Đức). Phân tích được thực hiện ở độ phóng đại quang học 100X, 200X và 400X bằng hệ thống kính hiển vi ánh sáng Leica DM1000 (Leica Microsystems, Đức).

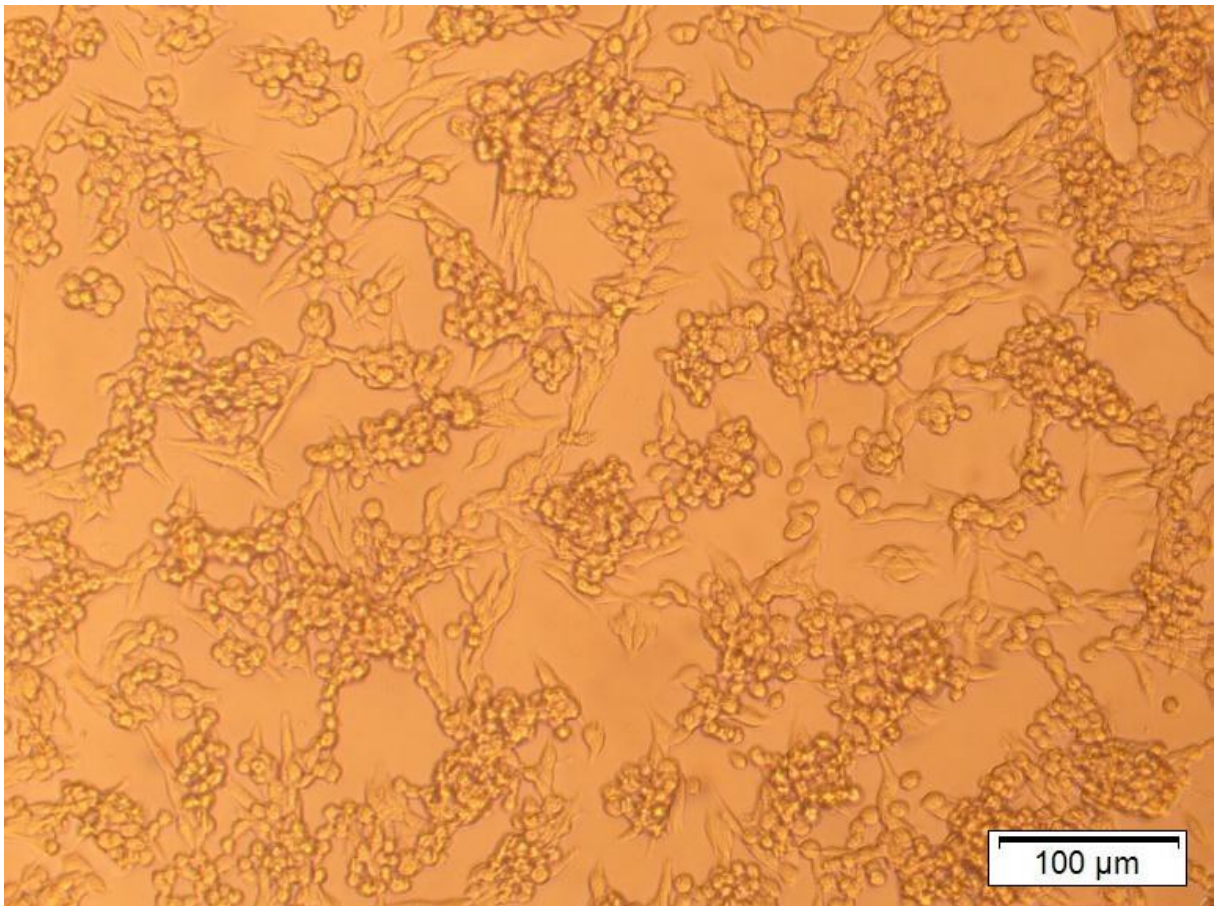
2.2.7. Xử lý số liệu và phân tích thống kê

Tất cả các số liệu đã ghi nhận trong quá trình thực nghiệm đều được tính toán và biểu thị ở dạng giá trị trung bình và sai số chuẩn (MEAN ± SEM) trước khi thực hiện phân tích thống kê. Phân tích sự khác nhau và thay đổi giữa các nhóm được thực hiện sử dụng thuật toán One-way ANOVA. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi p có giá trị nhỏ hơn 0.05 ($p < 0.05$).

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

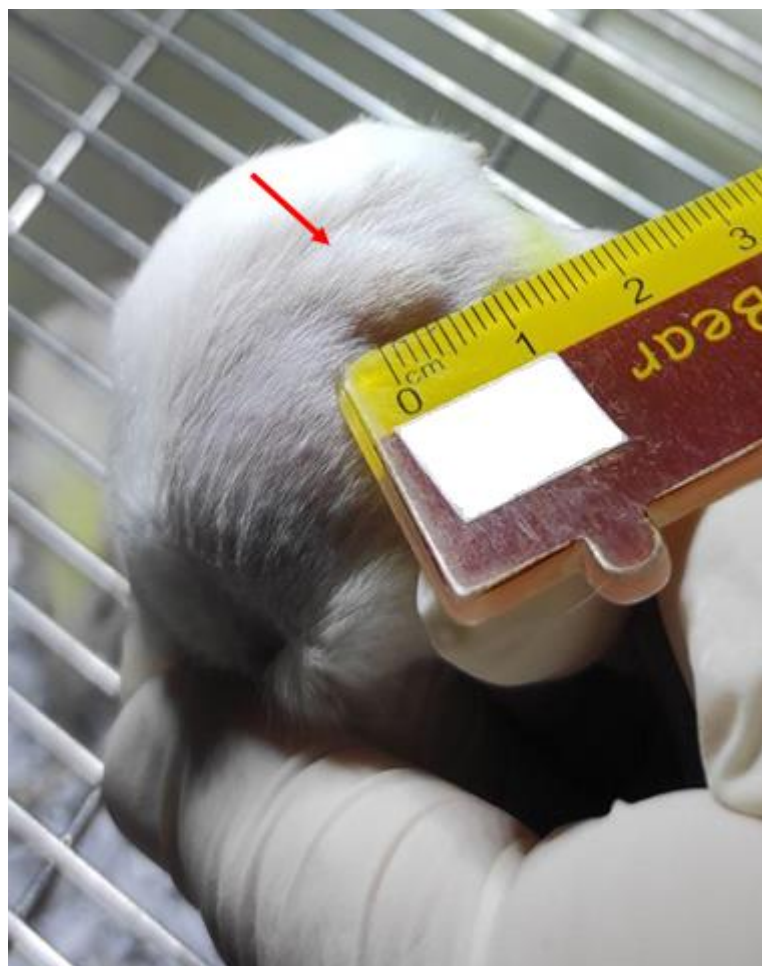
3.1. Kết quả gây u trên chuột

Sau quá trình hoạt hóa và nuôi cấy nhân lên với số lượng lớn dòng tế bào ung thư biểu mô phổi Lewis - 3LL, kết quả thu được một lượng lớn tế bào 3LL có hình thái bình thường và phát triển ổn định để gây u trên chuột (hình 3.1). Trước khi gây u, lông tại vị trí tiêm tế bào 3LL được xử lý sạch sẽ để tạo điều kiện thuận lợi cho việc quan sát sự phát triển của khối u trong quá trình thử nghiệm. Tiến hành tiêm 2×10^6 tế bào 3LL ở dưới da tại vùng lưng lệch phải của mỗi con chuột. Sau 3 ngày cấy tế bào, tại vị trí tiêm đều quan sát thấy sự hình thành của khối u với kích thước gần tương đương nhau (hình 3.2).



Hình 3.1. Tế bào ung thư biểu mô phổi Lewis – 3LL.

Các tế bào 3LL có thể phát triển và hình thành khối u sau 3 ngày tiêm. Khối u có thể quan sát được bằng mắt và sờ thấy, khối u này nhô lên một cách rõ ràng ở vùng lưng của con chuột được gây u (hình 3.2). Theo thống kê, thể tích khối u ở 4 nhóm chuột nghiên cứu gần như bằng nhau với giá trị trung bình khoảng 21.65 mm^3 . Giai đoạn đầu khối u mới hình thành, các cá thể chuột đều hoạt động bình thường, tiêu thụ thức ăn tốt.



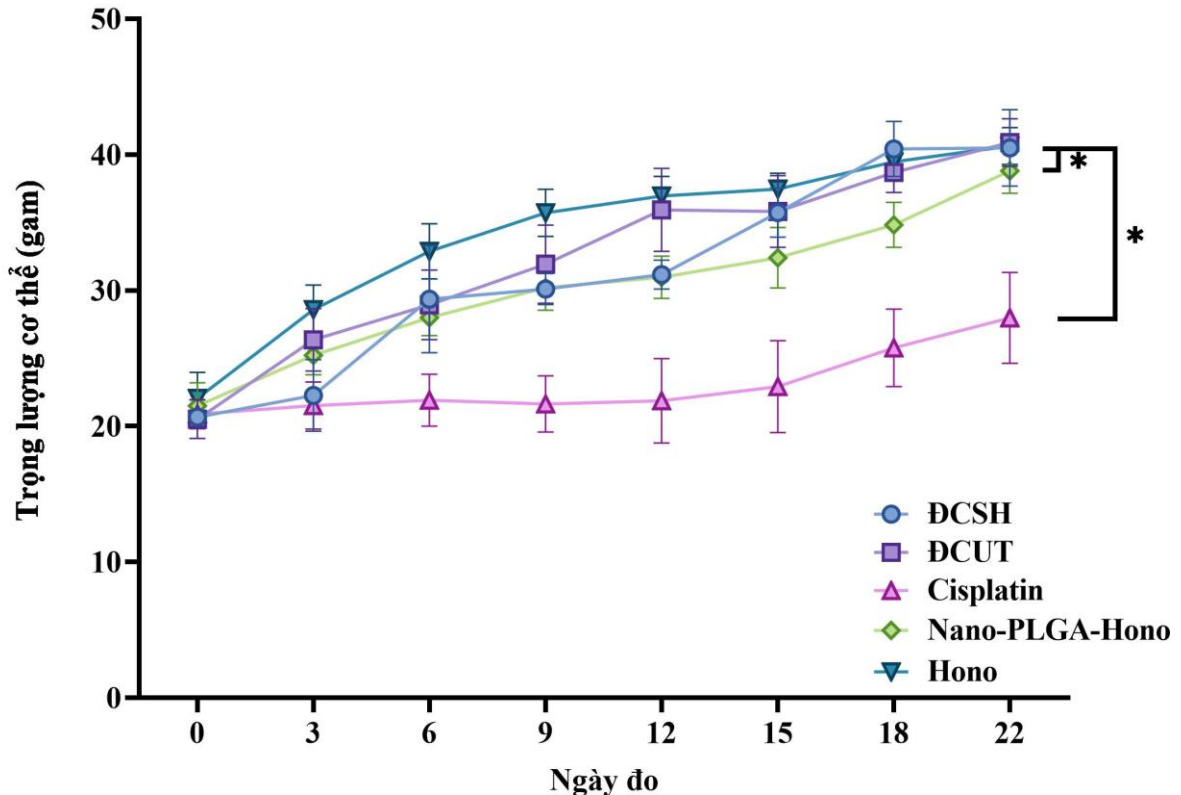
Hình 3.2. Chuột mang khối u 3LL.

Trong nghiên cứu này, mô hình chuột nhắt trắng Swiss (*Mus musculus*) được sử dụng để làm động vật nghiên cứu. Dòng tế bào 3LL được sử dụng phổ biến để tạo khối u ung thư biểu mô phổi Lewis, được phát hiện vào năm 1951 bởi Tiến sĩ Margaret Lewis của Viện Wistar và trở thành một trong những loại khối u được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu các loại thuốc hóa trị [75, 76]. Vì vậy mô hình chuột mang khối u 3LL đã và đang được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu *in vivo* [77, 78]. Và đây là lần đầu tiên chúng tôi điều tra *in vivo* để đánh giá tác dụng của Hono và hệ Nano-PLGA-Hono lên sự phát triển của khối u ở trên mô hình chuột nhắt trắng Swiss mang khối u 3LL.

3.2. Ảnh hưởng của Hono và Nano-PLGA-Hono lên trọng lượng cơ thể

Các số liệu trọng lượng cơ thể chuột đã được ghi nhận trong quá trình thử nghiệm để đánh giá sự khác biệt và thay đổi trọng lượng giữa các nhóm chuột nghiên cứu. Kết quả phân tích trọng lượng cơ thể trung bình của các nhóm bao gồm Cisplatin, Hono và Nano-PLGA-Hono đều khác biệt đáng kể so với nhóm ĐCSH (với $p < 0.05$). Trong 22 ngày theo dõi, trọng lượng cơ thể của các nhóm

ĐCSH, ĐCUT, Cisplatin, Hono và Nano-PLGA-Hono đều thay đổi theo xu hướng tăng dần so với ngày bắt đầu tiêm các chất (hình 3.3). Cụ thể là sau thử nghiệm 22 ngày, trọng lượng cơ thể chuột ở các nhóm ĐCSH, ĐCUT, Hono và Nano-PLGA-Hono đều đã tăng trung bình khoảng 20 gam (bảng 3.1). Với xu hướng cân nặng tăng như vậy, bước đầu có thể phán đoán rằng khi tiêm hai loại hoạt chất Hono và Nano-PLGA-Hono này, các cá thể chuột đều dung nạp tốt và không làm giảm trọng lượng cơ thể chuột mang khối u 3LL.



Hình 3.3. Trọng lượng cơ thể của chuột.

Với * thể hiện giá trị $p < 0.05$ so với nhóm ĐCSH.

Tuy nhiên, qua phân tích trọng lượng cơ thể của nhóm Cisplatin, kết quả chỉ ra trọng lượng cơ thể của nhóm này cũng chỉ có xu hướng tăng nhẹ và tăng ít cân hơn so với các nhóm ĐCSH, ĐCUT, Hono và Nano-PLGA-Hono còn lại (với $p < 0.05$) (hình 3.3). Số liệu trong bảng 3.1 chỉ ra rằng sau 3 tuần tiêm, trọng lượng cơ thể của nhóm Cisplatin chỉ tăng trung bình 7.08 gam so với trọng lượng cơ thể ở ngày tiêm thứ nhất. Hơn nữa, quan sát hằng ngày ghi nhận chuột trong nhóm Cisplatin có thể trạng yếu dần, di chuyển chậm chạp và ít hoạt động hơn ở thời điểm cuối thử nghiệm. Hiện nay, Cisplatin được biết đến là một loại thuốc hóa trị được FDA chấp thuận trong điều trị một số bệnh ung thư như ung thư buồng trứng, ung thư tinh hoàn và bàng quang, ung thư phổi tế bào nhỏ và

ung thư vú [79, 80]. Trong mô hình nghiên cứu *in vivo*, Cisplatin còn được sử dụng làm chất đối chứng, đặc biệt là trong các nghiên cứu hoạt chất điều trị ung thư mới, bởi vì Cisplatin thể hiện hoạt tính kháng u trên các mô hình chuột mang khối u khác nhau [46, 81]. Trong nghiên cứu này, Cisplatin đã được sử dụng làm chất điều trị đối chứng để so sánh hiệu quả làm tiêu giảm kích thước khối u của hoạt chất Hono và hệ Nano-PLGA-Hono. Với liều lượng Cisplatin được tiêm là 2.2 mg/kg, thì kết quả nghiên cứu đã ghi nhận được các biểu hiện được cho là do sự ảnh hưởng của Cisplatin lên thể trạng và trọng lượng cơ thể của chuột (hình 3.3 và bảng 3.1).

Những thay đổi về trọng lượng cơ thể của chuột trong thí nghiệm đã được ghi lại để điều tra tác dụng và ảnh hưởng của Hono và hệ Nano-PLGA-Hono đến thể trạng của chuột mang khối u. Ngược lại nhóm Cisplatin, trọng lượng cơ thể chuột trong 4 nhóm ĐCSH, ĐCUT, Hono và Nano-PLGA-Hono được quan sát thấy có sự tăng lên rõ rệt. Tuy nhiên, trên mô hình chuột mang khối u 3LL trong nghiên cứu này, sự phát triển của khối u có thể ảnh hưởng đến trọng lượng cơ thể chuột. Sự tăng kích thước khối u trong thời gian thử nghiệm của nhóm ĐCUT, Hono và Nano-PGLA-Hono có thể dẫn đến sự tăng trọng lượng cơ thể của chuột. Việc đưa một hoạt chất lạ vào cơ thể bằng con đường tiêm tĩnh mạch sẽ đều gây ra một hoặc một số ảnh hưởng nhất định đến thể trạng và trọng lượng cơ thể của chuột. Trong quá trình thử nghiệm, trọng lượng cơ thể chuột được theo dõi như một chỉ số về độc tính toàn thân của hoạt chất được tiêm vào cơ thể [50]. Trước đó, đã có nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng Hono đã được dung nạp tốt ở mô hình động vật khi dùng các phương pháp khác nhau để đưa vào cơ thể khác nhau chẳng hạn như đường uống, tiêm tĩnh mạch và tiêm qua đường trong phúc mạc [42, 47, 82, 83]. Hơn nữa, trọng lượng cơ thể được ghi nhận là không bị ảnh hưởng khi các hệ nano bao gói Hono trong các nghiên cứu trước đây, chẳng hạn như hệ nano Liposomal honokiol, Kolliphor HS15 honokiol liposome, HK-loaded PGC nanoparticles, honokiol-loaded PEGylated PLGA nanocapsules [32, 46, 49, 50, 52]. Trên kết quả phân tích, chúng tôi thấy rằng có sự khác biệt về trọng lượng cơ thể ở nhóm tiêm Hono và Nano-PLGA-Hono so với nhóm đối chứng ĐCSH (với $p < 0.05$). Nhưng kết hợp với nghiên cứu trước đây và sự tăng trọng lượng cơ thể của chuột trong nghiên cứu này, thì kết quả nghiên cứu của chúng tôi có thể khẳng định lại một lần nữa độ an toàn của Hono và hơn nữa là

có thể chứng minh được tính an toàn của hệ Nano-PLGA-Hono trong nghiên cứu này thông qua các chỉ số về trọng lượng cơ thể và thể trạng của chuột.

Bảng 3.1. Trọng lượng cơ thể trước và sau 22 ngày điều trị.

	Ngày 0	Ngày 22
ĐCSH	19.68 ± 0.46	40.5 ± 2.81
ĐCUT	20.52 ± 1.42	40.9 ± 1.75
Cisplatin	20.9 ± 1.06	27.98 ± 3.35
Nano-PLGA-Hono	21.52 ± 1.70	38.84 ± 1.66
Hono	22.06 ± 1.92	40.64 ± 1.35

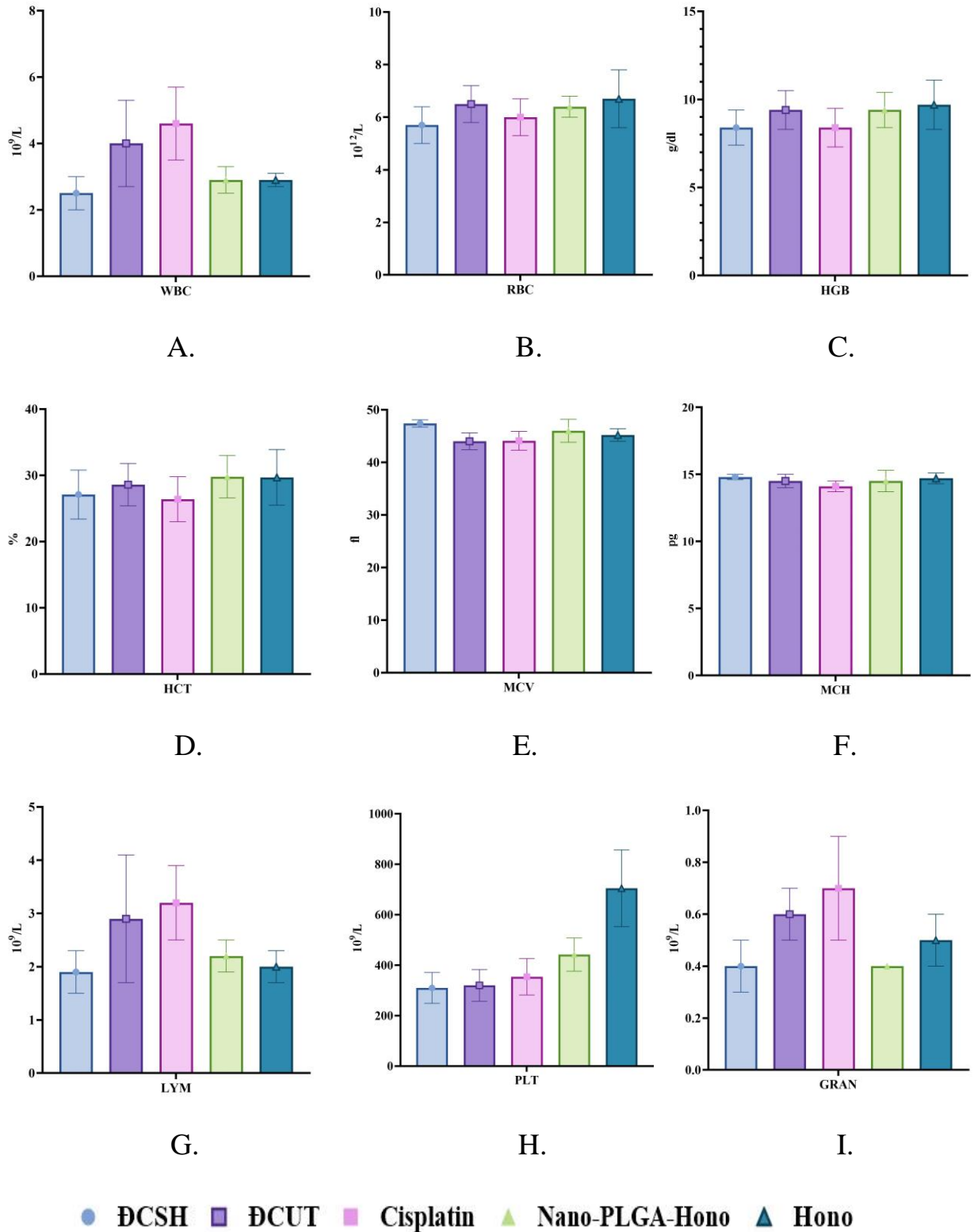
3.3. Ảnh hưởng của Hono và Nano-PLGA-Hono lên các chỉ số huyết học và sinh hóa máu

Mẫu máu toàn phần được thu vào 2 loại ống chứa chất chống đông khác nhau bao gồm EDTA và Heparin để thực hiện phân tích các chỉ số huyết học và sinh hóa máu, tất cả các kết quả gốc được trình bày trong phụ lục 1.

3.3.1. Chỉ số huyết học

Kết quả phân tích chỉ ra rằng các chỉ số huyết học không có sự khác biệt giữa nhóm ĐCSH với các nhóm nghiên cứu còn lại bao gồm ĐCUT, Cisplatin, Hono và Nano-PLGA-Hono (với $p > 0.05$) (hình 3.4). Chỉ số số lượng bạch cầu (WBC), số lượng bạch cầu hạt (GRAN) và số lượng bạch cầu lympho (LYM) có giá trị trung bình tăng cao hơn ở các nhóm ĐCUT và Cisplatin so với nhóm ĐCSH. Tuy nhiên, hai chỉ số WBC và LYM này có giá trị gần xấp xỉ nhau ở cả hai nhóm Hono và Nano-PLGA-Hono so với nhóm ĐCSH. Các chỉ số khác bao gồm chỉ số số lượng hồng cầu (RBC), nồng độ hemoglobin (HGB), chỉ số hematocrit (HCT), thể tích trung bình tế bào hồng cầu (MCV) và nồng độ huyết sắc tố trung bình trong máu (MCH) là có giá trị trung bình tương đương giữa tất cả 5 nhóm nghiên cứu. Còn lại chỉ số số lượng tiểu cầu (PLT) là có giá trị trung bình cao hơn ở nhóm Hono ($704.8 \pm 152 \cdot 10^9/L$) so với nhóm ĐCSH ($309.8 \pm$

61.2 $10^9/L$). Và chỉ số PLT này chỉ tăng nhẹ ở nhóm Nano-PLGA-Hono với giá trị trung bình là 442 ± 65.9 ($10^9/L$). Tuy nhiên, giá trị trung bình của chỉ số PLT vẫn nằm trong khoảng giới hạn bình thường (bảng 3.2). Kết quả phân tích các chỉ số huyết học cho thấy việc tiêm Nano-PLGA-Hono ít làm ảnh hưởng đến các chỉ số đánh giá chức năng tạo máu ở chuột hơn là hoạt chất Hono.



Hình 3.4. Kết quả các chỉ số huyết học.

Trong đó hình 3.4, A là số lượng bạch cầu (WBC), B là số lượng hồng cầu (RBC), C là nồng độ hemoglobin (HGB), D là chỉ số hematocrit (HCT), E là thể tích trung bình tế bào hồng cầu (MCV), F là nồng độ huyết sắc tố trung bình trong máu (MCH), G là số lượng tế bào lympho (LYM), H là số lượng tiểu cầu (PLT) và I là số lượng bạch cầu hạt (GRAN).

Trong nghiên cứu của Jiang và cộng sự, kết quả phân tích máu ngoại vi cũng cho thấy RBC, PLT, WBC, LYM và bạch cầu trung tính không có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm tiêm hệ nano Liposomal honokiol so với các nhóm đối chứng bao gồm nhóm tiêm Hono tự do, nhóm tiêm liposome và nhóm tiêm Cisplatin [46]. Như biểu đồ trong hình 3.4 H, giá trị trung bình của PLT gần như bằng nhau ở nhóm ĐCSH, ĐCUT, Cisplatin và Nano-PLGA-Hono nhưng lại cao hơn ở nhóm Hono. Trong đánh giá chức năng tạo máu và các chỉ số huyết học nói chung, PLT đóng một vai trò thiết yếu trong quá trình hình thành mạch và ổn định mạch máu, chỉ số PLT cao hơn giới hạn bình thường có thể dẫn tới hiện tượng tiểu cầu kết dính với nhau, tạo thành cục máu đông dẫn đến một số bệnh lý khác [84]. Mặc dù, chỉ số PLT của nhóm Hono cao hơn các nhóm còn lại, nhưng giá trị của nó vẫn nằm trong khoảng bình thường ở chuột vì vậy chúng em vẫn chưa có đủ thông tin để kết luận có sự thay đổi bệnh lý trong trường hợp này. Hơn nữa, giá trị PLT của nhóm Nano-PLGA-Hono cũng thấp hơn đáng kể so với nhóm Hono, cho thấy hệ nano Nano-PLGA-Hono thể hiện khả năng tương thích máu tốt hơn so với Hono tự do. Zou và cộng sự cũng đã quan sát thấy giá trị PLT tăng đáng kể trên nhóm chuột tiêm hệ nano micelle bao gói Hono và Doxorubicin với tỉ lệ 5:1 so với nhóm chuột đối chứng tiêm saline [56]. Trong các nghiên cứu khác về ảnh hưởng của Hono tự do và hệ nano liposomal honokiol, kết quả của các chỉ số máu đều thống nhất rằng Hono không gây độc và ảnh hưởng đến chức năng tạo máu trên mô hình thử nghiệm động vật [42, 46, 85, 86]. Trong nghiên cứu này, ngoại trừ chỉ số PLT tăng ở nhóm Hono và tăng nhẹ ở nhóm Nano-PLGA-Hono thì các chỉ số huyết học khác đều không có sự thay đổi nào được quan sát, cho nên từ kết quả chỉ số huyết học có thể chỉ ra cả Hono và Nano-PLGA-Hono đều không có ảnh hưởng rõ ràng đến chức năng tạo máu trên mô hình chuột mang khối u 3LL.

Bảng 3.2. Kết quả các chỉ số huyết học.

Chỉ số	ĐCSH	ĐCUT	Cisplatin	Nano-PLGA-Hono	Hono	Đơn vị
RBC	5.7 ± 0.7	6.5 ± 0.7	6 ± 0.7	6.4 ± 0.4	6.7 ± 1.1	10 ¹² /L
HGB	8.4 ± 1	9.4 ± 1.1	8.4 ± 1.1	9.4 ± 1	9.7 ± 1.4	g/dl
HCT	27.1 ± 3.7	28.6 ± 3.2	26.4 ± 3.4	29.8 ± 3.2	29.7 ± 4.2	%
MCV	47.4 ± 0.7	44 ± 1.6	44.1 ± 1.8	46 ± 2.2	45.2 ± 1.2	fl
MCH	14.8 ± 0.2	14.5 ± 0.5	14.1 ± 0.4	14.5 ± 0.8	14.7 ± 0.4	pg
MCHC	31.3 ± 0.8	32.9 ± 0.3	32 ± 0.4	31.6 ± 0.3	32.5 ± 0.1	g/dl
WBC	2.5 ± 0.5	4 ± 1.3	4.6 ± 1.1	2.9 ± 0.4	2.9 ± 0.2	10 ⁹ /L
GRAN	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.4 ± 0	0.5 ± 0.1	10 ⁹ /L
LYM	1.9 ± 0.4	2.9 ± 1.2	3.2 ± 0.7	2.2 ± 0.3	2 ± 0.3	10 ⁹ /L
MID	0.3 ± 0	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0	10 ⁹ /L
GRA%	17.6 ± 2.9	19.6 ± 4.2	16.2 ± 1.1	14.9 ± 1.1	18 ± 3.9	%
LYM%	72.7 ± 3.6	68.6 ± 4.8	71.8 ± 2	76.5 ± 0.8	69.8 ± 4.5	%
MID%	9.7 ± 1.1	11.9 ± 0.9	12 ± 1.5	8.6 ± 1	12.2 ± 0.5	%
PLT	309.8 ± 61.2	319.8 ± 62.9	354 ± 72.2	442 ± 65.9	704.8 ± 152	10 ⁹ /L
MPV	6.4 ± 0.5	6.4 ± 0.5	6.1 ± 0.6	5.8 ± 0.4	6.5 ± 0.4	fl
PDW	10.4 ± 0.7	10.3 ± 0.6	9.7 ± 0.7	9.4 ± 0.5	10.6 ± 0.6	fl
PCT	0.2 ± 0	0.2 ± 0	0.2 ± 0	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	%
RDW%	25.7 ± 2.7	22 ± 0.8	21.6 ± 1.2	21.2 ± 2.1	26.6 ± 2.5	%
RDWa	49.4 ± 4.1	39 ± 2.8	38.1 ± 1.8	38.5 ± 1.3	45.7 ± 2.7	fl

Các chỉ số về số lượng bạch cầu, số lượng bạch cầu hạt và số lượng bạch cầu lympho tăng ở nhóm ĐCUT có thể liên quan đến sự phát triển của khối u 3LL. Trong nghiên cứu của Wang và cộng sự, họ đã đánh giá các chỉ số huyết học thông qua xét nghiệm máu trên đối tượng là chuột mang khối u sau khi cấy tế bào ung thư vú 4T1. Kết quả của nghiên cứu này chỉ ra rằng việc cấy ghép tế bào ung thư vú 4T1 vào chuột BALB/c đã dẫn đến thay đổi trong các chỉ số huyết học cụ thể như chỉ số số lượng bạch cầu [87]. Số lượng bạch cầu cao đã được báo cáo là thường xuyên hơn ở những bệnh nhân ung thư di căn [88]. Bạch cầu được tạo ra bởi tủy xương và số lượng bạch cầu cao là dấu hiệu của tình trạng viêm nhiễm, chấn thương, dị ứng, bệnh bạch cầu hoặc nhiễm trùng [89].

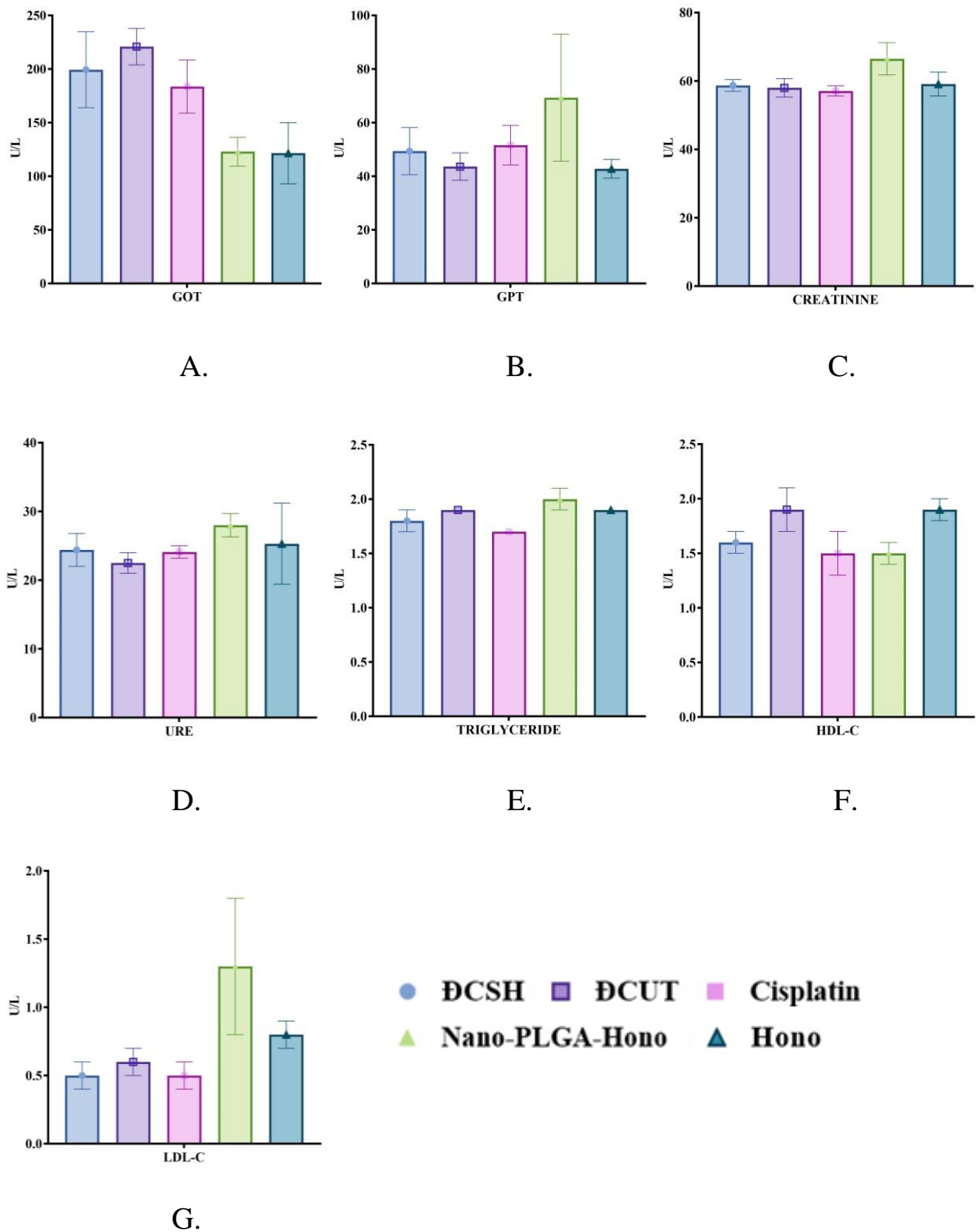
3.3.2. Chỉ số sinh hóa máu

Các chỉ số sinh hóa bao gồm GOT, GPT, Creatinine, Urea, Triglyceride, HDL-C và LDL-C qua phân tích ANOVA đều có không khác biệt nhiều giữa các nhóm ĐCUT, Cisplatin, Hono và Nano-PLGA-Hono so với nhóm ĐCSH (với $p > 0.05$). Từ kết quả phân tích, chúng tôi đã quan sát thấy hai loại enzym trao đổi amin (transaminase) bài tiết từ gan bao gồm GOT và GPT có sự khác biệt ở 2 nhóm Hono và Nano-PLGA-Hono so với nhóm ĐCSH (Hình 3.5 A và B). Chỉ số GOT ở nhóm Hono và nhóm Nano-PLGA-Hono đồng thời thấp hơn so với nhóm ĐCSH. Ngược lại, chỉ số GPT chỉ cao hơn ở nhóm Nano-PLGA-Hono so với nhóm ĐCSH (bảng 3.3). Chỉ số LDL-C ở nhóm Nano-PLGA-Hono được quan sát là cao hơn so với các nhóm còn lại bao gồm ĐCSH, ĐCUT, Cisplatin và Hono (hình 3.5 G và bảng 3.3). Tuy nhiên, chỉ số GPT và LDL-C đều có giá trị trung bình nằm trong khoảng bình thường, ngược lại chỉ số GOT lại có giá trị trung bình thấp hơn một chút so với giới hạn dưới của khoảng bình thường là 150 U/lit (bảng 3.3). GPT được tìm thấy trong thận, tim, cơ và tập trung nhiều hơn ở gan so với các mô khác của cơ thể, trong nghiên cứu này quan sát được chỉ số GPT cao hơn tại nhóm Nano-PLGA-Hono nhưng vẫn nằm trong khoảng bình thường. Còn GOT được tìm thấy ở nồng độ cao nhất trong tim so với các mô khác của cơ thể như gan, cơ xương và thận. Ở đây, chỉ số GOT ở nhóm Hono và Nano-PLGA-Hono chỉ thấp hơn một chút so với giới hạn dưới của khoảng bình thường. Hơn nữa ý nghĩa của các chỉ số GOT, GPT hoặc tỉ lệ GOT/GPT trong lâm sàng được sử dụng như thước đo để chẩn đoán mức độ tổn thương của gan [90]. Khi giá trị GPT hay GOT tăng cao hơn giới hạn trên của khoảng bình thường, có thể nghi ngờ có sự viêm hoặc tổn thương tại bộ phận

gan trong cơ thể. Nhưng từ kết quả trong nghiên cứu này không có sự tăng hay giảm rõ rệt giá trị của chỉ số GPT và GOT tại 2 nhóm được tiêm Hono và Nano-PLGA-Hono, cho nên chưa thể kết luận được sự thay đổi bệnh lý của gan. Tương tự với thử nghiệm của chúng tôi, nhóm nghiên cứu của Haggag và cộng sự đã đánh giá ảnh hưởng đến chức năng gan và thận khi tiêm phức mạch hệ nano Honokiol-Loaded PEGylated PLGA Nanocapsules vào cơ thể chuột. Kết quả nghiên cứu đã công bố của nhóm tác giả này cho thấy ở tất cả các chuột được điều trị không có ảnh hưởng đáng kể đến nồng độ GOT, GPT và Creatinine trong các mẫu huyết thanh so với nhóm đối chứng. Dựa trên kết quả này, Haggag đã kết luận hệ nano Honokiol-Loaded PEGylated PLGA Nanocapsules là an toàn sau khi dùng đường toàn thân với liều 15 mg/kg bằng cách tiêm trong phức mạch [52]. Với các kết quả phân tích trên có thể thấy Hono và Nano-PLGA-Hono không ảnh hưởng đến các chỉ số đánh giá chức năng thận và các chỉ số mỡ máu.

Bảng 3.3. Kết quả phân tích các chỉ tiêu sinh hóa.

Chỉ số	ĐCSH	ĐCUT	Cisplatin	Nano-PLGA-Hono	Hono	Đơn vị
GOT	199.4 ± 35.4	220.9 ± 17	183.7 ± 24.8	122.9 ± 13.5	121.5 ± 28.5	U/L
GPT	49.4 ± 8.8	43.6 ± 5.1	51.6 ± 7.4	69.3 ± 23.7	42.8 ± 3.5	U/L
Creatinine	58.7 ± 1.7	58.0 ± 2.7	57.1 ± 1.5	66.5 ± 4.7	59.1 ± 3.5	μmol/L
Urea	24.4 ± 2.4	22.5 ± 1.5	24.1 ± 0.9	28.0 ± 1.7	25.3 ± 5.9	mmol/L
Triglyceride	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0	1.7 ± 0	2.0 ± 0.1	1.9 ± 0	mmol/L
HDL-C	1.6 ± 0.1	1.9 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.9 ± 0.1	mmol/L
LDL-C	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	1.3 ± 0.5	0.8 ± 0.1	mmol/L



Hình 3.5. Kết quả các chỉ số sinh hóa máu.

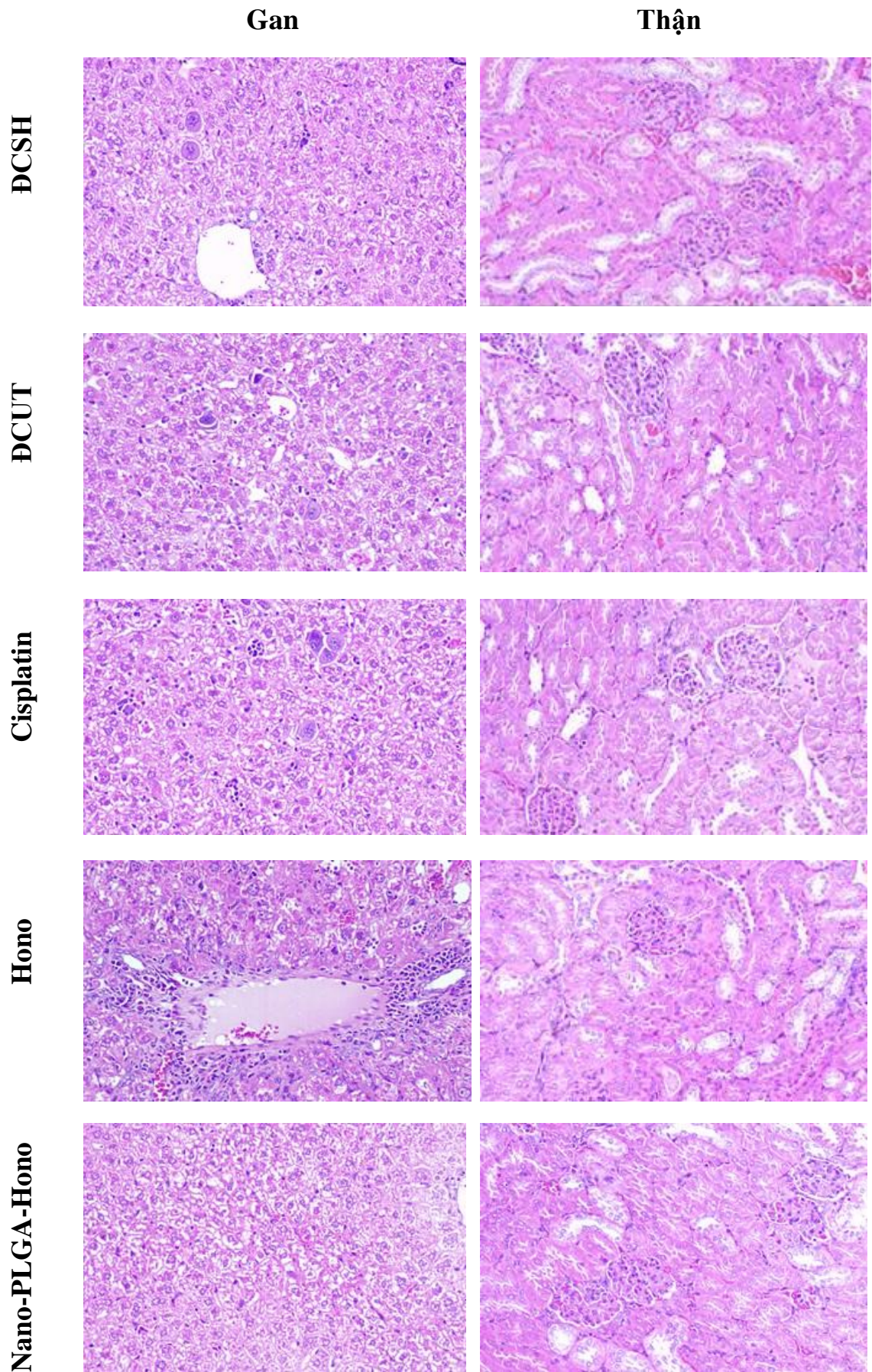
Trong đó, A là GOT, B là GPT, C là Creatinine, D là Urea, E là Triglyceride, F là HDL-C và G là LDL-C.

3.4. Kết quả mô bệnh học

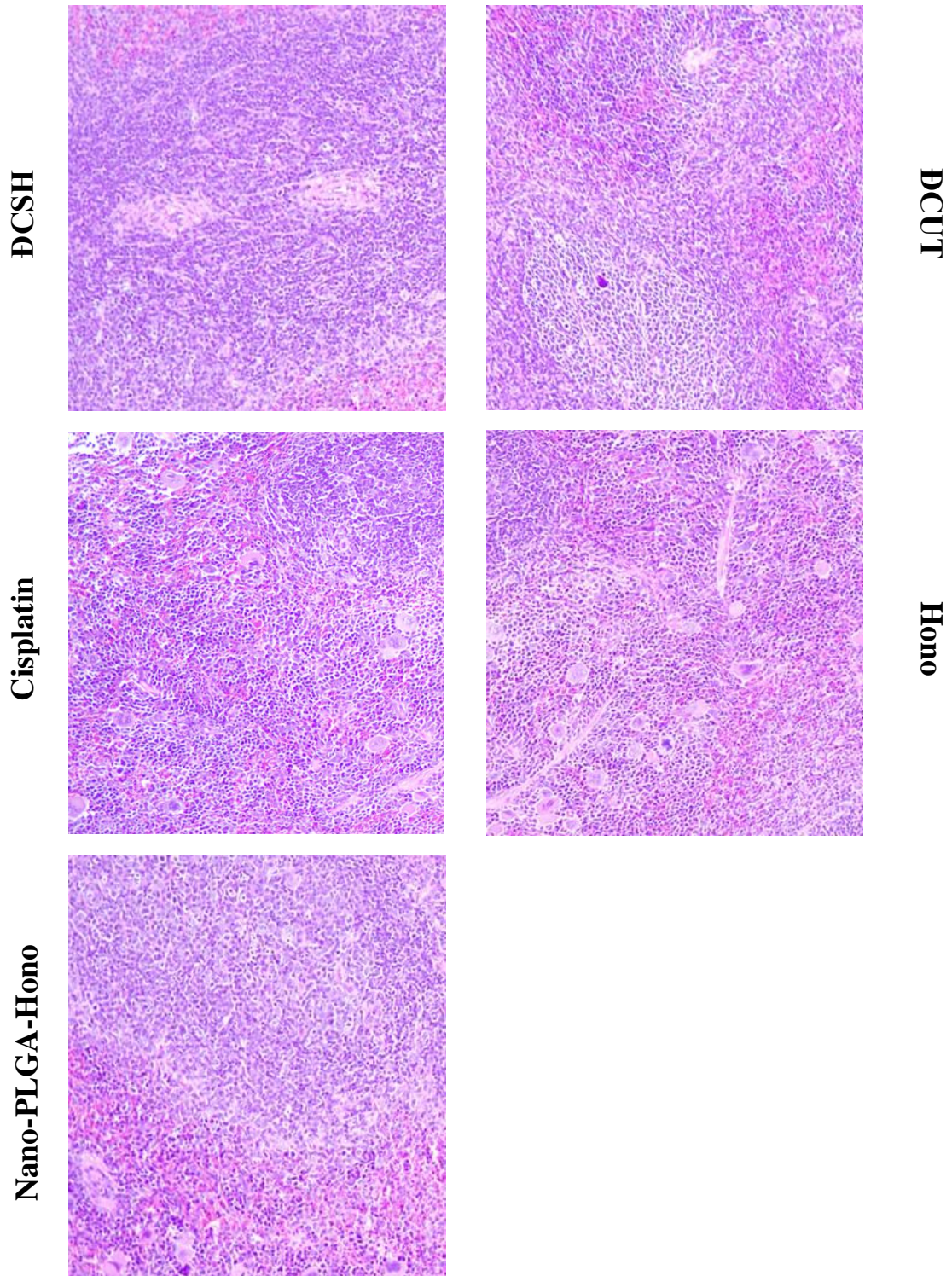
Giải phẫu mô là một trong các xét nghiệm cần thiết để đánh giá ảnh hưởng của một hoạt chất mới. Khi đưa hoạt chất vào cơ thể qua đường tiêm tĩnh mạch, sự phân phối của hoạt chất đến các cơ quan có thể làm ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của các cơ quan này. Việc xác định sự xuất hiện và mức độ thoái hóa của tế bào, tình trạng hoại tử và tình trạng viêm trong các cơ quan là cơ sở để đánh giá ảnh hưởng độc tính của hoạt chất tại các cơ quan đó. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của Nano-PLGA-Hono cũng như Hono được thực hiện đánh giá trên ba cơ quan bao gồm gan, thận và lá lách của chuột. Các cơ quan này đã được thu ngay sau quá trình lấy máu toàn phần cho xét nghiệm đánh giá các chỉ số huyết học và sinh hóa máu.

Kết quả phân tích cấu trúc vi thể của mô gan cho thấy các tế bào gan có sự thoái hóa nhẹ. Các tĩnh mạch trung tâm bị xung huyết nhẹ và không quan sát thấy các tế bào viêm ở khoang cửa (hình 3.6). Nhu mô gan được kết luận là thoái hóa nhẹ ở tất cả các nhóm chuột nghiên cứu từ nhóm ĐCSH, ĐCUT đến nhóm tiêm Cisplatin, Hono và Nano-PLGA-Hono. Hơn nữa, do sự thoái hóa nhẹ của các tế bào gan được ghi nhận ở tất cả các nhóm chuột nghiên cứu bao gồm cả nhóm ĐCSH. Thử nghiệm được tiến hành trên nhóm chuột Swiss trưởng thành (khoảng từ 5 đến 8 tuần tuổi), sau hơn 3 tuần nghiên cứu chuột đã chuyển sang giai đoạn già hóa nên có thể có những thay đổi như trên là hoàn toàn phù hợp với sự phát triển và sinh lý bình thường của chuột. Cho nên chưa nhận định được ảnh hưởng của cả Hono và hệ Nano-PLGA-Hono đến cấu trúc vi thể và chức năng gan của chuột trong nghiên cứu này.

Tiếp đến kết quả phân tích cấu trúc vi thể của mô thận và mô lá lách đều cho thấy nhu mô thận và lá lách đều bình thường. Hình ảnh vi thể vỏ cầu thận bình thường thể hiện qua sự sắp xếp theo một cách trật tự của các thành phần bao gồm các cầu thận, ống thận và các mạch máu giữa các ống thận (hình 3.6). Qua phân tích, quan sát thấy các mạch máu có hiện tượng xung huyết nhẹ. Tuy nhiên, không có sự xuất hiện của các tế bào thoái hóa hoặc hoại tử trên tất cả các tiêu bản mô thận được giải phẫu. Nhu mô lá lách có cấu trúc vi thể bao gồm vùng tủy trắng và tủy đỏ. Có nhiều tế bào tiểu cầu tập trung xung quanh các nang lympho. Kết luận cuối cùng không phát hiện bất thường cấu trúc vi thể của nhu mô thận và lá lách.



Hình 3.6. Kết quả mô học gan và thận.

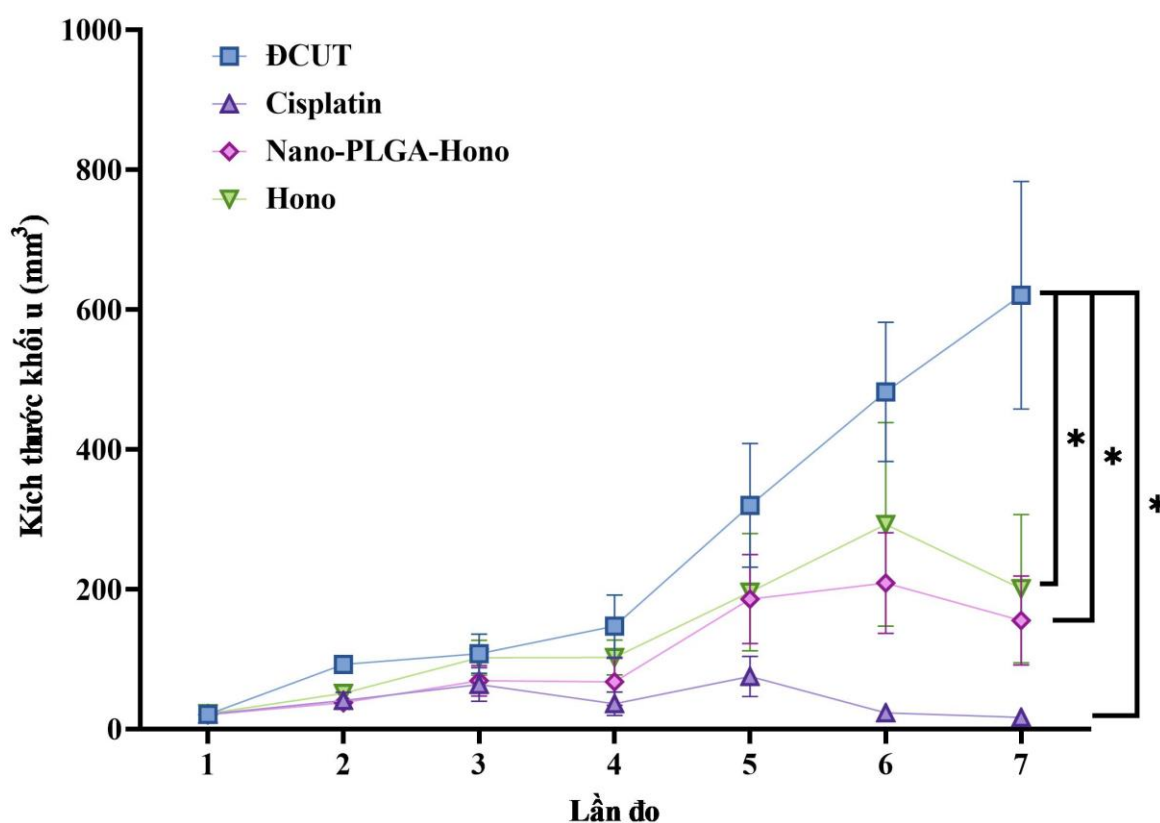


Hình 3.7. Kết quả mô học lá lách.

Trước đây, kết quả đưa ra trong các nghiên cứu về Hono tự do và hệ nano Liposomal-Honokiol đã chỉ ra các mô cơ quan như gan, thận, lá lách, tim và phổi đều không có bất kỳ sự thay đổi bệnh lý nào [42, 45, 47]. Năm 2015, nghiên cứu của Zhang và cộng sự cũng thực hiện đánh giá độc tính của Hono tự do dựa trên kết quả của xét nghiệm các chỉ số máu và giải phẫu mô bệnh học. Kết quả kiểm tra mô học các cơ quan gan, lá lách, phổi và thận của họ đã chỉ ra

rằng cả nhóm đối chứng và nhóm tiêm Hono tự do đều có khả năng gặp các thay đổi bệnh lý với tỉ lệ xấp xỉ giống nhau [85]. Rõ ràng gan và thận là cơ quan quan trọng nhất để chuyển hóa và đào thải thuốc trong cơ thể, đồng thời cũng là cơ quan dễ bị tổn thương nhất do tác dụng của thuốc. Do đó, các xét nghiệm chỉ số sinh hóa cũng được sử dụng để đảm bảo phân tích chính xác các thay đổi bệnh lý trong cơ thể tiếp nhận điều trị bằng Hono và hệ Nano-PLGA-Hono. Kết hợp kết quả phân tích các chỉ số sinh hóa từ mục 3.3.2 và kết quả mô bệnh học, chúng tôi thấy rằng tiêm Hono và Nano-PLGA-Hono ở liều 5.3 mg/kg không gây ra các thay đổi bệnh lý trên gan, thận và lá lách của chuột nghiên cứu.

3.5. Tác dụng ức chế sự phát triển khối u của Hono và Nano-PLGA-Hono

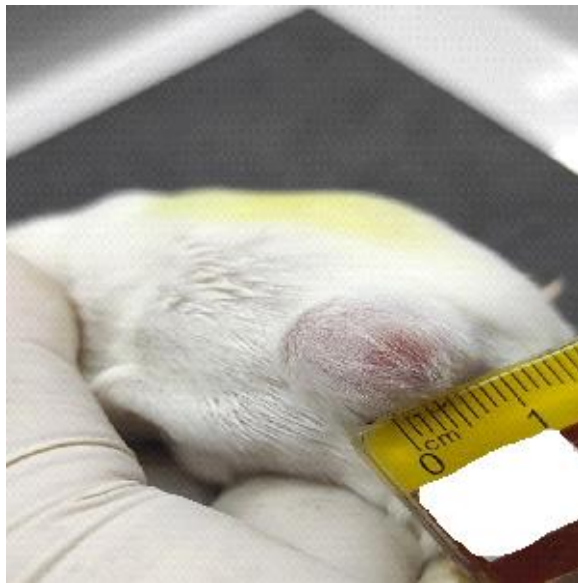


Hình 3.8. Thể tích khối u của chuột mang khối u 3LL.

Với * thể hiện giá trị $p < 0.05$ so với nhóm ĐCUT.

Kích thước khối u của từng nhóm được đo cách nhau 2 ngày và ghi nhận dữ liệu để phân tích sự phát triển của khối u. Theo biểu đồ thể hiện trong hình 3.8, kết quả kích thước khối u trung bình cho thấy sự phát triển mạnh mẽ của khối u ở nhóm ĐCUT ($620.5 \pm 162.7 \text{ mm}^3$). Thể tích khối u trung bình của nhóm ĐCUT khác biệt rất lớn so với các nhóm còn lại bao gồm Hono ($201.0 \pm 106.2 \text{ mm}^3$), Nano-PLGA-Hono ($155.6 \pm 63.5 \text{ mm}^3$), và đặc biệt là so với nhóm

Cisplatin có thể tích khối u trung bình là $17.1 \pm 6.3 \text{ mm}^3$ (với $p < 0.05$). Ở 2 nhóm Hono và Nano-PLGA-Hono có thể quan sát được tốc độ phát triển của khối u chậm hơn so với nhóm ĐCUT. Hơn nữa, qua hình 3.8 có thể thấy thể tích khối u của 2 nhóm Hono và Nano-PLGA-Hono đã giảm nhẹ ở thời điểm kết thúc thử nghiệm. Kết quả cho thấy thể tích khối u trung bình của nhóm Nano-PLGA-Hono nhỏ hơn của nhóm Hono. Từ kết quả này có thể bước đầu phán đoán rằng cả Nano-PLGA-Hono và Hono được tiêm vào chuột có tác dụng ức chế sự phát triển của khối u 3LL sau 3 tuần tiêm tĩnh mạch ở liều 5.3 mg/kg.



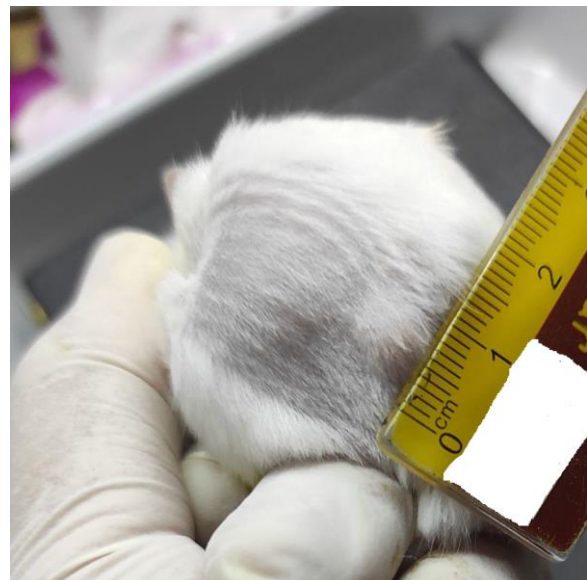
A. Nhóm ĐCUT



B. Nhóm Cisplatin



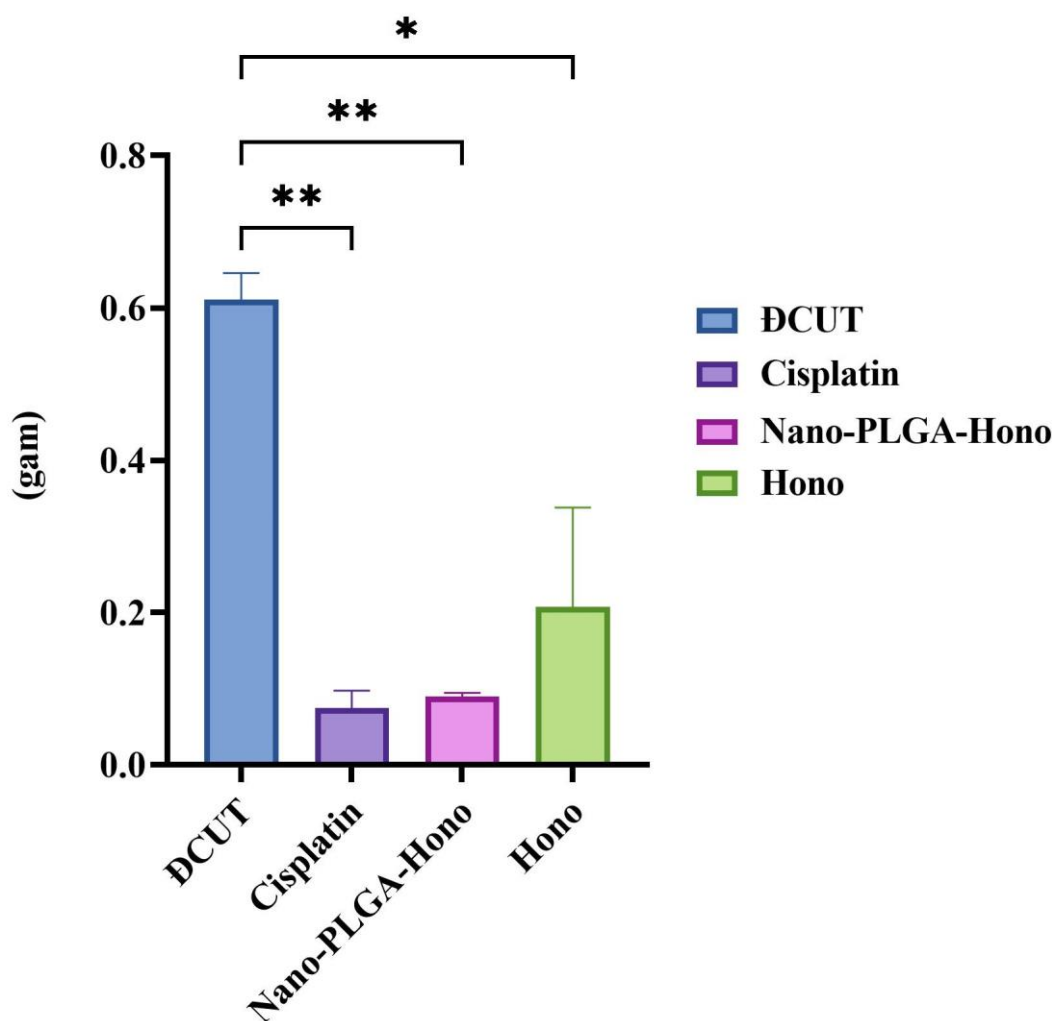
C. Nhóm Hono



D. Nhóm Nano-PLGA-Hono

Hình 3.9. Khối u của các nhóm sau mũi tiêm cuối cùng.

Thông qua kết quả quan sát khối u trong 22 ngày thử nghiệm tiêm các chất, chúng tôi thấy rằng sự tiêu giảm kích thước khối u 3LL đặc biệt được thể hiện rõ ở nhóm Cisplatin (hình 3.9 B). Khối u 3LL ở thời điểm bắt đầu tiêm các chất của tất cả các nhóm bao gồm ĐCUT, Cisplatin, Hono và Nano-PLGA-Hono đều có kích thước trung bình khá giống nhau (hình 3.8). Nhưng đến cuối thử nghiệm, quan sát thấy khối u của nhóm Cisplatin tiêu giảm một cách rõ ràng với kích thước khối u nhỏ hơn rất nhiều so với nhóm ĐCUT. Mặc dù quan sát được khối u của nhóm Hono nhỏ hơn đáng kể cho với nhóm ĐCUT nhưng kích thước khối u trung bình của nhóm Hono vẫn lớn hơn so với 2 nhóm Cisplatin và Nano-PLGA-Hono (hình 3.9 B, C, D). Cuối cùng, kích thước khối u trung bình của nhóm Nano-PLGA-Hono có giá trị gần giống với nhóm Cisplatin nhất thông qua kích thước và hình thái khối u quan sát được (hình 3.8 và 3.9).



Hình 3.10. Trọng lượng trung bình của khối u.

Với * và ** thể hiện giá trị của $p < 0.05$ và $p < 0.01$ so với nhóm ĐCUT.

Trọng lượng khối u được xác định ngay sau khi khối u được tách ra từ cơ thể chuột. Giá trị trung bình của trọng lượng khối u được thể hiện dưới dạng biểu đồ cột (hình 3.10). Kết quả phân tích chỉ ra rằng khối u ở hai nhóm Nano-PLGA-Hono (0.09 ± 0.0028 g) và nhóm Cisplatin (0.07 ± 0.01 g) đều có trọng lượng trung bình nhỏ hơn đáng kể so với nhóm ĐCUT (0.61 ± 0.02 g) (với $p < 0.01$). Khối u của nhóm Hono (0.21 ± 0.08 g) cũng nhỏ hơn một cách rõ ràng so với nhóm ĐCUT (với $p < 0.05$). Tương tự so với nhóm ĐCUT trọng lượng khối u ở nhóm Hono đã giảm đi xấp xỉ 2.9 lần và ở nhóm Nano-PLGA-Hono đã giảm mạnh hơn với xấp xỉ 6.7 lần (bảng 3.4). So sánh giữa nhóm Hono và Nano-PLGA-Hono chỉ ra rằng hiệu quả ức chế sự phát triển của khối u tại nhóm tiêm Nano-PLGA-Hono đã được cải thiện hơn. Cuối cùng, có thể chỉ ra rằng ở nhóm điều trị bằng Hono và Nano-PLGA-Hono đồng thời có sự tiêu giảm khối u thông qua kết quả phân tích thể tích trung bình và trọng lượng trung bình của khối u.

Trọng lượng khối u cũng được dùng trong tính toán và xác định tỉ lệ ức chế khối u (IR%) giữa nhóm ĐCUT và các nhóm Cisplatin, Hono và Nano-PLGA-Hono (bảng 3.4). Từ tỉ lệ ức chế khối u và hiệu lực kháng u, Hono một lần nữa cho thấy có hiệu quả ức chế sự phát triển của khối u với tỉ lệ ức chế khối u lên đến 65.99%. Trước đây, Hono được chứng minh là đã ức chế sự phát triển của khối u trong mô hình chuột nude, làm giảm thể tích khối u khối u 9L gliosarcoma và U251 glioma với tỉ lệ lần lượt là 52% và 50% so với nhóm đối chứng [39, 42]. Tuy nhiên ở nhóm Nano-PLGA-Hono, tỉ lệ ức chế khối u đạt giá trị là 85.32% xấp xỉ giá trị của nhóm điều trị đối chứng Cisplatin là 87.83%. Điều này thể hiện rằng ở nhóm Nano-PLGA-Hono đã xảy ra một sự ức chế khối u mạnh mẽ hơn so với ở nhóm Hono. Hơn nữa cả 3 nhóm điều trị bằng Cisplatin, Hono và Nano-PLGA-Hono đều đạt hiệu lực kháng u (++) theo thang đánh giá của H. Itokawa (bảng 3.4).

Một số nghiên cứu trước đây trên các dạng nano hóa khác nhau của Hono đều cho kết quả cải thiện được tỉ lệ ức chế sự phát triển của khối u so với sử dụng ở dạng Hono tự do. Ví dụ như, Zhou và cộng sự công bố kết quả nghiên cứu rằng hiệu quả kháng u của hệ nano Kolliphor HS15 honokiol liposome đã được cải thiện với tỉ lệ ức chế khối u lên đến $57.46 \pm 5.89\%$ cao hơn đáng kể so với Hono tự do ($25.92 \pm 5.05\%$) [49]. Thêm vào đó, kết quả nghiên cứu của Haggag và cộng sự chỉ ra hệ nano Honokiol-Loaded PEGylated PLGA Nanocapsules đã cải thiện khả năng điều trị khối u của Hono với tỉ lệ ức chế

khối u SEC là 80.25% lớn hơn gấp 2.3 lần so với nhóm điều trị bằng Hono tự do là 35% [52]. Kết quả nghiên cứu của Luo và cộng sự cho thấy việc bao gói Hono bằng liposome (Liposomal-Honokiol) đã ức chế sự phát triển của khối u với tỉ lệ ức chế được cải thiện lên đến 84–88% so với nhóm đối chứng và kéo dài thời gian sống thêm của chuột mang khối u biểu mô buồng trứng được điều trị [45]. Nghiên cứu của Hu và cộng sự với hướng đi là điều trị kết hợp liposomal-honokiol (Lipo-HNK) và xạ trị (radiotherapy), đã cho thấy thể tích khối u ung thư biểu mô phổi Lewis giảm 78% so với nhóm đối chứng sau 12 ngày điều trị kết hợp. Điều trị kết hợp đã cải thiện hiệu quả điều trị với tỉ lệ ức chế khối u tăng 1.3 lần so với các nhóm đơn trị bằng Lipo-HNK hay xạ trị [32]. Nghiên cứu khác đã đánh giá hiệu quả của hệ nano Pegylated liposomal honokiol cho thấy tỉ lệ ức chế khối u SKOV3 đạt được là 66.83% so với nhóm đối chứng tiêm bằng dung dịch NaCl [47]. Vậy thì với mục tiêu nghiên cứu là làm cải thiện hiệu quả điều trị khối u của Hono tự do thì kết quả thu được từ các nghiên cứu này cho thấy tỉ lệ ức chế khối u của Hono tự do đã được cải thiện một cách đáng kể. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng hệ Nano-PLGA-Hono đã cải thiện đáng kể hiệu quả kháng u của Hono tự do với tỉ lệ ức chế khối u lên đến 85.32%, thấp hơn một chút so với nhóm tiêm Cisplatin là 87.83%.

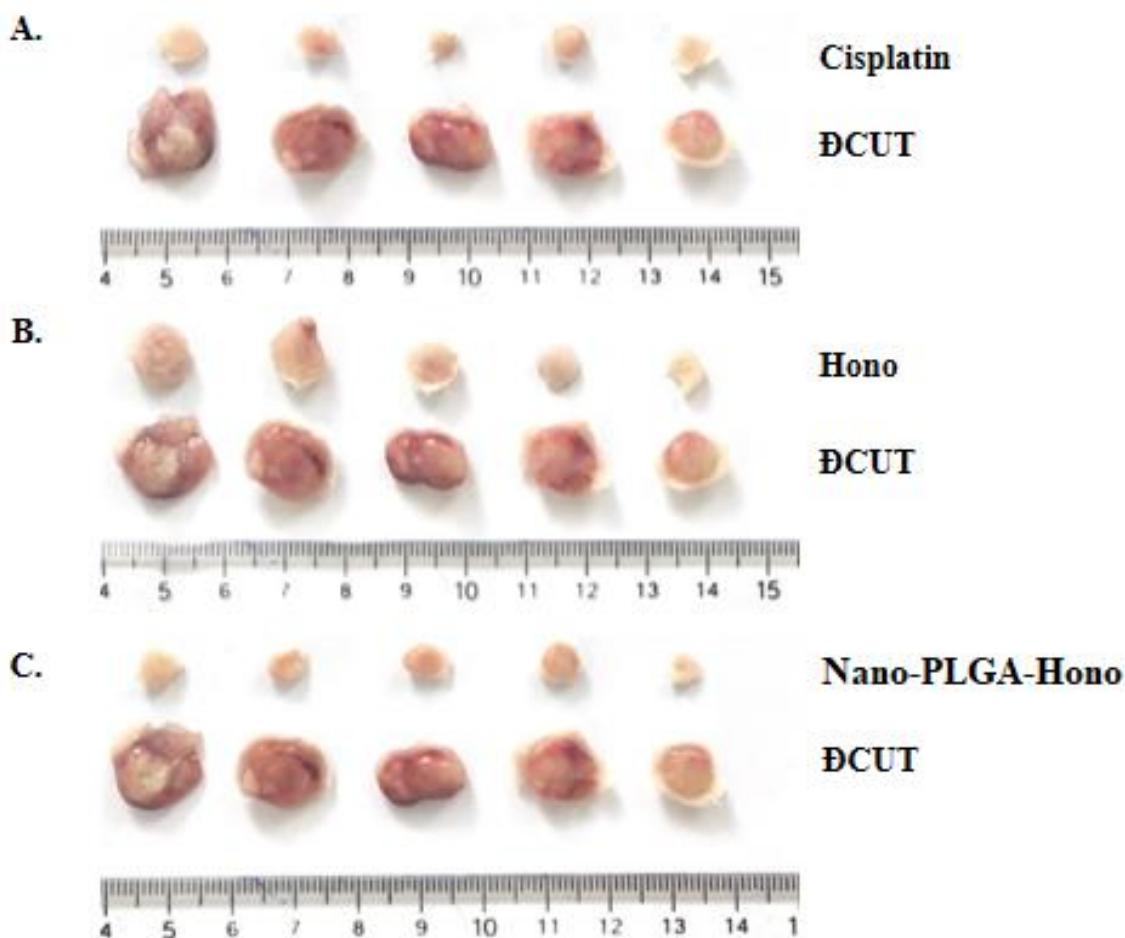
Bảng 3.4. Hiệu lực kháng u của các nhóm điều trị.

	Trọng lượng khối u (gam)	IR (%)	Hiệu lực kháng u
ĐCUT	0.61 ± 0.02	-	-
Cisplatin	0.07 ± 0.01	87.83	++
Nano-PLGA-Hono	0.09 ± 0.0028	85.32	++
Hono	0.21 ± 0.08	65.99	++

Khối u được tạo thành công bằng việc tiêm 2×10^6 tế bào 3LL dưới da ở vị trí lưng của mỗi con chuột. Những khối u này phát triển ổn định và thể hiện một cách rất rõ ràng đặc điểm đặc trưng cho từng nhóm điều trị khác nhau. Cụ thể, từ hình 3.8, 3.5.3 và 3.5.4 có thể thấy khối u của nhóm ĐCUT phát triển nhanh, thể

tích và trọng lượng khối u tăng đều được quan sát từ mỗi lần cân đo và có giá trị trung bình khác biệt hẳn so với các nhóm điều trị. Ở nhóm Cisplatin, khối u có kích thước tiêu giảm đều sau mỗi lần tiêm ở liều 2.2 mg/kg. Tại thời điểm kết thúc thử nghiệm, khối u của nhóm Cisplatin có kích thước nhỏ hơn đáng kể so với nhóm ĐCUT (với $p < 0.05$) và trọng lượng khối u giảm nhiều hơn (với $p < 0.01$). Nhưng dựa trên các kết quả đã phân tích có thể thấy rằng Cisplatin có tác dụng phụ ảnh hưởng đến thể trạng và trọng lượng của chuột với tỉ lệ ức chế khối u lên đến 87.83%.

Trong hình 3.11, A là ảnh khối u của nhóm Cisplatin và ĐCUT, B là ảnh khối u của nhóm Hono và ĐCUT, và C là ảnh khối u của nhóm Nano-PLGA-Hono và ĐCUT. Kết hợp các kết quả phân tích của thể tích, trọng lượng và tỉ lệ ức chế khối u với hình ảnh khối u thực tế, có thể thấy rằng hình ảnh các khối u của từng nhóm đều phản ánh tính xác thực của các số liệu ghi nhận được. Khối u của nhóm ĐCUT có kích thước lớn hơn, màu đỏ sẫm, cho thấy sự khác biệt rõ ràng với khối u của các nhóm còn lại (hình 3.11). Trong khi đó, khối u của các nhóm tiêm hóa chất đều nhỏ gọn hơn.



Hình 3.11. Hình ảnh khối u của các nhóm.

Như đã thảo luận trước đó, hoạt tính kháng u của Hono đã được chứng minh thông qua cơ chế ức chế hình thành mạch máu, thúc đẩy quá trình apoptosis, cung cấp hoạt động gây độc tế bào trực tiếp, điều chỉnh đường truyền tín hiệu của tế bào ung thư, điều chỉnh biểu hiện di truyền, tăng cường tác dụng của các tác nhân hóa trị liệu khác, và ức chế đa kháng thuốc [83]. Hono đã được chứng minh là ức chế các con đường tín hiệu chẳng hạn như kích hoạt con đường truyền tín hiệu caspase-3, p53/PI3K/Akt/mTOR, NF- κ B, STAT3, và EGFR. Trong những năm gần đây, một số cơ chế ức chế khối u khác của Hono thông qua việc kích thích quá trình apoptosis được cập nhật. Một trong số đó bao gồm việc điều hòa các con đường tín hiệu ROS/ERK1/2, AMPK/mTOR, hoặc bằng cách làm bùng phát oxy hóa và tăng phân cực ty thể trên nghiên cứu dòng tế bào ung thư bằng quang [91-93]. Ngoài ra, các hoạt tính sinh học khác của Hono cũng được liệt kê chẳng hạn như bảo vệ chống lại nhiễm độc gan, huyết khối và các bệnh về máu. Vì vậy, Hono được đánh giá là có tiềm năng trở thành thuốc hóa trị mới trong điều trị ung thư.

Hono là một hoạt chất thiên nhiên nên việc sử dụng Hono trong điều trị có thể bị hạn chế bởi đặc điểm hóa sinh không ổn định, vì tính ổn định của Hono có thể bị ảnh hưởng bởi các điều kiện thủy phân và oxy hóa do cấu trúc bisphenol của chúng [94]. Xong việc sử dụng tiềm năng của Hono trong các ứng dụng lâm sàng có lẽ bị hạn chế do sinh khả dụng qua đường uống rất thấp, khả năng hấp thụ Hono qua đường tiêu hóa do đó cũng bị ảnh hưởng [95]. Hơn nữa, sinh khả dụng kém của Hono trong có mô hình *in vivo* được cho là do khả năng hòa tan trong nước rất thấp, vì vậy đã làm cản trở nó phân phối đến khối u ở nồng độ hiệu quả. Để giải quyết vấn đề này, cần có một hệ thống dẫn thuốc phù hợp với mục đích cải thiện khả năng hòa tan và tăng cường sự tích tụ của nó tại vị trí khối u. Hiện nay đã có nhiều hệ nano bao gói Hono khác nhau được công bố [32, 45-53, 56, 57, 68, 85, 95-99]. Trong đó, khả năng kháng u của một số hệ nano đã được chứng minh là hiệu quả hơn so với Hono tự do, chẳng hạn như hệ nano Kolliphor HS15 honokiol liposome, Pegylated liposomal honokiol, Honokiol-Loaded PEGylated PLGA Nanocapsules [47, 49, 52]. Với các kết quả đã công bố, mỗi hệ nano đều có một hay một số ưu điểm trong số các ưu điểm chẳng hạn như cải thiện khả năng hòa tan, cải thiện hiệu quả bao gói Hono, khả năng phân phối và giải phóng Hono tại vị trí khối u, gây ra apoptosis, ức chế tăng sinh đối với các dòng tế bào ung thư hay ức chế sự phát triển của khối u.

Tuy nhiên, với sự có sẵn và đa dạng của các vật liệu nano, ngày càng có nhiều hệ nano khác nhau được nghiên cứu để bao gói Hono và để cố gắng cải thiện nhiều nhất có thể hiệu quả điều trị của Hono. Vì vậy, chúng tôi thực hiện đánh giá hệ Nano-PLGA-Hono thông qua xác định tác dụng ức chế sự phát triển của khối u 3LL và xác định các chỉ số huyết học, sinh hóa và mô bệnh học. Khối u thuộc nhóm Nano-PLGA-Hono có kích thước, trọng lượng nhỏ hơn đáng kể so với nhóm ĐCUT, khối u thu gọn và được dự đoán là có thể sẽ tiêu biến nếu chuột tiếp tục được điều trị. Và dựa trên tất cả các kết quả thu được, có thể kết luận rằng hệ Nano-PLGA-Hono đã cải thiện đáng kể hiệu quả kháng u so với Hono tự do với hiệu lực kháng u là (++) và tỉ lệ ức chế khối u là 85.32%. Các chỉ số huyết học, sinh hóa và mô bệnh học còn chỉ ra hệ Nano-PLGA-Hono là an toàn khi tiêm liều 5.3 mg/kg/3 ngày một lần.

Trong nghiên cứu này, hiệu quả ức chế sự phát triển khối u 3LL ở trên chuột của hệ Nano-PLGA-Hono được cải thiện có khả năng tan tốt trong nước bằng việc tối ưu hóa bề mặt hạt nano bằng PEG, với kích thước hạt nano từ 100 đến 150 nm và được sử dụng cho đường tiêm truyền. Kích thước hạt phù hợp là một yếu tố quyết định sự phân phối với nồng độ cao và thời gian lưu giữ Hono tại vị trí khối u thông qua cơ chế vận chuyển thụ động. Tuy nhiên, nếu kích thước hạt nano quá nhỏ dễ dẫn đến quá trình thanh thải nhanh hơn qua đường bài tiết sau khi tiêm vào tĩnh mạch, làm giảm hiệu suất điều trị. Trước đây, các nghiên cứu chỉ ra rằng kích thước hạt nano nhỏ hơn 8 nm sẽ dễ bị đào thải qua thận [3]. Cho nên, sử dụng phương pháp phủ bề mặt hạt nano PLGA bằng PEG đã được áp dụng như một chiến lược để kéo dài thời gian lưu thông, giảm thiểu sự hấp thu không đặc hiệu và tạo điều kiện cho việc nhắm mục tiêu khối u thụ động cụ thể thông qua hiệu ứng EPR [24]. Ngoài ra PEG còn có tác dụng làm ngăn chặn và trì hoãn bước đầu tiên của quá trình opsonin hóa giúp hệ dẫn thuốc nano phát huy tác dụng một cách hiệu quả [25]. Vì vậy, Hono được đưa vào hệ Nano-PLGA-Hono có thể an toàn đi qua các rào cản trong cơ thể như RES, hơn nữa còn lưu thông lâu hơn trong cơ thể cũng như tích tụ với nồng độ cao tại vị trí khối u. Trước đây, hệ nano PLGA được PEG hóa cũng được chứng minh là cải thiện dược động học và phân phối sinh học của Docetaxel trong nghiên cứu của Rafiei và cộng sự [100]. Do đó hệ Nano-PLGA-Hono có tiềm năng là một hệ dẫn truyền Hono có hiệu quả làm tiêu giảm khối u hơn so với dạng Hono tự do, và khá an toàn khi thử nghiệm trên chuột mang khối u ngoại lai.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ**KẾT LUẬN**

Từ những kết quả nghiên cứu của đề tài luận văn, chúng em đưa ra những kết luận sau:

(1) Honokiol và hệ Nano-PLGA-Honokiol đều không ảnh hưởng đến thể trạng và trọng lượng cơ thể của các nhóm chuột tại liệu nghiên cứu.

(2) Cả Honokiol và hệ Nano-PLGA-Honokiol không ảnh hưởng đến chức năng tạo máu ở chuột và không làm ảnh hưởng đến các chỉ số sinh hóa phản ánh chức năng gan, thận và lá lách của chuột tại liệu nghiên cứu.

(3) Cả Honokiol và Nano-PLGA-Honokiol đều làm tiêu giảm thể tích khối u 3LL so với nhóm đối chứng ung thư.

(4) Trọng lượng khối u trung bình của nhóm tiêm Nano-PLGA-Honokiol nhỏ hơn nhóm đối chứng ung thư xấp xỉ 6.7 lần và so với nhóm được tiêm Honokiol xấp xỉ 2.3 lần.

(5) Hệ Nano-PLGA-Honokiol đã ức chế sự phát triển của khối u 3LL với tỉ lệ ức chế đạt 85.32% và với hiệu lực kháng u là (++). Hệ Nano-PLGA-Honokiol cải thiện đáng kể hiệu quả ức chế khối u so với Honokiol với tỉ lệ ức chế khối u đạt 65.99%.

KIẾN NGHỊ

Cần xác định thêm thời gian lưu hành trong cơ thể cũng như khả năng giải phóng thuốc tại vị trí khối u của hệ Nano-PLGA-Hono.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F., 2021, Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), pp. 209-249.
2. Tế B.Y. *Tình hình ung thư tại Việt Nam*. 2021 19/01/2021; Available from: https://moh.gov.vn/hoat-dong-cua-dia-phuong/-/asset_publisher/gHbla8vOQDuS/content/tinh-hinh-ung-thu-tai-viet-nam.
3. Sun T., Zhang Y.S., Pang B., Hyun D.C., Yang M., Xia Y., 2021, Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy, *Nanomaterials Neoplasms*, pp. 31-142.
4. Krishna R., Mayer L., 2000, Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of multidrug resistance and the role of multi-drug resistance modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs, *Eur. J. Pharm. Sci*, 11, pp. 265-283.
5. Haematology C.f.C. *Side effects of Chemotherapy*. 2020; Available from: <https://cfch.com.sg/chemotherapy-side-effects/#1593590870760-e7a52cf9-3806>.
6. Jain D., Pathak D., Pathak K., 2009, Pharmaceutical product development technologies based on the biopharmaceutical classification system, *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64(8), pp. 483-490.
7. Pearson R.M., Hsu H.-j., Bugno J., Hong S., 2014, Understanding nano-bio interactions to improve nanocarriers for drug delivery, *Mrs Bulletin*, 39(3), pp. 227-237.
8. Hobbs S.K., Monsky W.L., Yuan F., Roberts W.G., Griffith L., Torchilin V.P., Jain R.K., 1998, Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), pp. 4607-4612.
9. Maeda H., Nakamura H., Fang J., 2013, The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor

- uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo, *Advanced drug delivery reviews*, 65(1), pp. 71-79.
10. Steinhäuser I., Spänkuch B., Strebhardt K., Langer K., 2006, Trastuzumab-modified nanoparticles: optimisation of preparation and uptake in cancer cells, *Biomaterials*, 27(28), pp. 4975-4983.
 11. Altınog˘lu E.I., Russin T.J., Kaiser J.M., Barth B.M., Eklund P.C., Kester M., Adair J.H., 2008, Near-infrared emitting fluorophore-doped calcium phosphate nanoparticles for in vivo imaging of human breast cancer, *ACS nano*, 2(10), pp. 2075-2084.
 12. Gullotti E., Yeo Y., 2009, Extracellularly activated nanocarriers: a new paradigm of tumor targeted drug delivery, *Molecular pharmaceuticals*, 6(4), pp. 1041-1051.
 13. Torchilin V.P., *Nanoparticulates as drug carriers*. 2006: Imperial college press.
 14. Bawarski W.E., Chidlowsky E., Bharali D.J., Mousa S.A., 2008, Emerging nanopharmaceuticals, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology Medicine*, 4(4), pp. 273-282.
 15. Neuberger T., Schöpf B., Hofmann H., Hofmann M., Von Rechenberg B., 2005, Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system, *Journal of Magnetism Magnetic materials*, 293(1), pp. 483-496.
 16. Li S.-D., Huang L., 2008, Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles, *Molecular pharmaceuticals*, 5(4), pp. 496-504.
 17. Davis M.E., Chen Z.G., Shin D.M., 2008, Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer, *Nature reviews Drug discovery*, 7(9), pp. 771-782.
 18. Alexis F., Pridgen E., Molnar L.K., Farokhzad O.C., 2008, Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles, *Molecular pharmaceuticals*, 5(4), pp. 505-515.
 19. Barreto J.A., O'Malley W., Kubeil M., Graham B., Stephan H., Spiccia L., 2011, Nanomaterials: applications in cancer imaging and therapy, *Advanced materials*, 23(12), pp. H18-H40.

20. Prabhu R.H., Patravale V.B., Joshi M.D., 2015, Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights, *International journal of nanomedicine*, 10, pp. 1001.
21. Gagliardi A., Giuliano E., Venkateswararao E., Fresta M., Bulotta S., Awasthi V., Cosco D., 2021, Biodegradable polymeric nanoparticles for drug delivery to solid tumors, *Frontiers in pharmacology*, 12, pp. 601626.
22. Wu J.W., Li G.H., Cui S.Q., Wang J.H., Gu X.L., Dong P.X., Sun H.W., Fu C.H. *The current research status of PLGA as drug and gene carrier*. in *Journal of Nano Research*. 2016. Trans Tech Publ.
23. Dinarvand R., Sepehri N., Manoochehri S., Rouhani H., Atyabi F., 2011, Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents, *International journal of nanomedicine*, 6, pp. 877.
24. Owens III D.E., Peppas N.A., 2006, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 307(1), pp. 93-102.
25. Veronese F.M., Pasut G., 2005, PEGylation, successful approach to drug delivery, *Drug discovery today*, 10(21), pp. 1451-1458.
26. Jain A.K., Das M., Swarnakar N.K., Jain S., 2011, Engineered PLGA nanoparticles: an emerging delivery tool in cancer therapeutics, *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 28(1).
27. Esumi T., Makado G., Zhai H., Shimizu Y., Mitsumoto Y., Fukuyama Y., 2004, Efficient synthesis and structure–activity relationship of honokiol, a neurotrophic biphenyl-type neolignan, *Bioorganic medicinal chemistry letters*, 14(10), pp. 2621-2625.
28. Banik K., Ranaware A.M., Deshpande V., Nalawade S.P., Padmavathi G., Bordoloi D., Sailo B.L., Shanmugam M.K., Fan L., Arfuso F., 2019, Honokiol for cancer therapeutics: A traditional medicine that can modulate multiple oncogenic targets, *Pharmacological research*, 144, pp. 192-209.
29. Kong Z.-L., Tzeng S.-C., Liu Y.-C., 2005, Cytotoxic neolignans: an SAR study, *Bioorganic medicinal chemistry letters*, 15(1), pp. 163-166.

30. Chao L.K., Liao P.-C., Ho C.-L., Wang E.I.-C., Chuang C.-C., Chiu H.-W., Hung L.-B., Hua K.-F., 2010, Anti-inflammatory bioactivities of honokiol through inhibition of protein kinase C, mitogen-activated protein kinase, and the NF- κ B pathway to reduce LPS-induced TNF α and NO expression, *Journal of agricultural food chemistry*, 58(6), pp. 3472-3478.
31. Maruyama Y., Kuribara H., Morita M., Yuzurihara M., Weintraub S.T., 1998, Identification of magnolol and honokiol as anxiolytic agents in extracts of saiboku-to, an oriental herbal medicine, *Journal of Natural Products*, 61(1), pp. 135-138.
32. Hu J., Chen L.-j., Liu L., Chen X., Chen P., Yang G.-l., Hou W.-l., Tang M.-h., Zhang F., Wang X.-h., 2008, Liposomal honokiol, a potent anti-angiogenesis agent, in combination with radiotherapy produces a synergistic antitumor efficacy without increasing toxicity, *Experimental molecular medicine*, 40(6), pp. 617-628.
33. Arora S., Singh S., Piazza G.A., Contreras C.M., Panyam J., Singh A.P., 2012, Honokiol: a novel natural agent for cancer prevention and therapy, *Current molecular medicine*, 12(10), pp. 1244-1252.
34. Woodbury A., Yu S.P., Wei L., García P., 2013, Neuro-modulating effects of honokiol: a review, *Frontiers in neurology*, 4, pp. 130.
35. Hanahan D., Weinberg R.A., 2011, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell death disease*, 144(5), pp. 646-674.
36. Grivennikov S.I., Karin M., 2010, Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer, *Cytokine growth factor reviews*, 21(1), pp. 11-19.
37. Rajendran P., Li F., Shanmugam M.K., Vali S., Abbasi T., Kapoor S., Ahn K.S., Kumar A.P., Sethi G., 2012, Honokiol inhibits signal transducer and activator of transcription-3 signaling, proliferation, and survival of hepatocellular carcinoma cells via the protein tyrosine phosphatase SHP-1, *Journal of cellular physiology*, 227(5), pp. 2184-2195.
38. Leeman-Neill R.J., Cai Q., Joyce S.C., Thomas S.M., Bhola N.E., Neill D.B., Arbiser J.L., Grandis J.R., 2010, Honokiol Inhibits Epidermal

- Growth Factor Receptor Signaling and Enhances the Antitumor Effects of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors Honokiol's Effects in Head and Neck Cancer, *Clinical cancer research*, 16(9), pp. 2571-2579.
39. Bai X., Cerimele F., Ushio-Fukai M., Waqas M., Campbell P.M., Govindarajan B., Der C.J., Battle T., Frank D.A., Ye K., 2003, Honokiol, a small molecular weight natural product, inhibits angiogenesis in vitro and tumor growth in vivo, *Journal of biological chemistry*, 278(37), pp. 35501-35507.
 40. Chilampalli S., Zhang X., Fahmy H., Kaushik R.S., Zeman D., Hildreth M.B., Dwivedi C., 2010, Chemopreventive effects of honokiol on UVB-induced skin cancer development, *Anticancer Research*, 30(3), pp. 777-783.
 41. Wang T., Chen F., Chen Z., Wu Y.-F., Xu X.-L., Zheng S., Hu X., 2004, Honokiol induces apoptosis through p53-independent pathway in human colorectal cell line RKO, *World Journal of Gastroenterology*, 10(15), pp. 2205.
 42. Wang X., Duan X., Yang G., Zhang X., Deng L., Zheng H., Deng C., Wen J., Wang N., Peng C., 2011, Honokiol crosses BBB and BCSFB, and inhibits brain tumor growth in rat 9L intracerebral gliosarcoma model and human U251 xenograft glioma model, *Plos one*, 6(4), pp. e18490.
 43. Amorati R., Zotova J., Baschieri A., Valgimigli L., 2015, Antioxidant activity of magnolol and honokiol: kinetic and mechanistic investigations of their reaction with peroxy radicals, *The Journal of Organic Chemistry*, 80(21), pp. 10651-10659.
 44. Schaper K.J., Kunz B., Raevsky O.A., 2003, Analysis of water solubility data on the basis of HYBOT descriptors: Part 2. Solubility of liquid chemicals and drugs, *QSAR Combinatorial Science*, 22(9-10), pp. 943-958.
 45. Luo H., Zhong Q., Chen L.-j., Qi X.-r., Fu A.-f., Yang H.-s., Yang F., Lin H.-g., Wei Y.-q., Zhao X., 2008, Liposomal honokiol, a promising agent for treatment of cisplatin-resistant human ovarian cancer, *Journal of cancer research clinical oncology*, 134(9), pp. 937-945.

46. Jiang Q.-q., Fan L.-y., Yang G.-l., Guo W.-H., Hou W.-l., Chen L.-j., Wei Y.-q., 2008, Improved therapeutic effectiveness by combining liposomal honokiol with cisplatin in lung cancer model, *BMC cancer*, 8(1), pp. 1-8.
47. Liu Y., Chen L., He X., Fan L., Yang G., Chen X., Lin X., Du L., Li Z., Ye H., 2008, Enhancement of therapeutic effectiveness by combining liposomal honokiol with cisplatin in ovarian carcinoma, *International Journal of Gynecologic Cancer*, 18(4).
48. Wang X., Deng L., Cai L., Zhang X., Zheng H., Deng C., Duan X., Zhao X., Wei Y., Chen L., 2011, Preparation, characterization, pharmacokinetics, and bioactivity of honokiol-in-hydroxypropyl- β -cyclodextrin-in-liposome, *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(8), pp. 3357-3364.
49. Zhou C., Guo C., Li W., Zhao J., Yang Q., Tan T., Wan Z., Dong J., Song X., Gong T., 2018, A novel honokiol liposome: formulation, pharmacokinetics, and antitumor studies, *Drug development industrial pharmacy*, 44(12), pp. 2005-2012.
50. Guo Y., Zhao Y., Wang T., Zhao S., Qiu H., Han M., Wang X., 2017, Honokiol nanoparticles stabilized by oligoethylene glycols codendrimer: in vitro and in vivo investigations, *Journal of Materials Chemistry B*, 5(4), pp. 697-706.
51. Zhang Q., Li D., Guan S., Liu D., Wang J., Xing G., Yue L., Cai D., 2022, Tumor-targeted delivery of honokiol via polysialic acid modified zein nanoparticles prevents breast cancer progression and metastasis, *International Journal of Biological Macromolecules*, 203, pp. 280-291.
52. Haggag Y.A., Ibrahim R.R., Hafiz A.A., 2020, Design, formulation and in vivo evaluation of novel honokiol-loaded PEGylated PLGA nanocapsules for treatment of breast cancer, *International journal of nanomedicine*, 15, pp. 1625.
53. Hamedani Y., Chakraborty S., Sabarwal A., Pal S., Bhowmick S., Balan M., 2020, Novel Honokiol-eluting PLGA-based scaffold effectively restricts the growth of renal cancer cells, *Plos one*, 15(12), pp. e0243837.

54. Gou M., Gong C., Zhang J., Wang X., Wang X., Gu Y., Guo G., Chen L., Luo F., Zhao X., 2010, Polymeric matrix for drug delivery: Honokiol-loaded PCL-PEG-PCL nanoparticles in PEG-PCL-PEG thermosensitive hydrogel, *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, The Australian Society for Biomaterials, The Korean Society for Biomaterials*, 93(1), pp. 219-226.
55. Zheng X., Kan B., Gou M., Fu S., Zhang J., Men K., Chen L., Luo F., Zhao Y., Zhao X., 2010, Preparation of MPEG–PLA nanoparticle for honokiol delivery in vitro, *International Journal of Pharmaceutics*, 386(1-2), pp. 262-267.
56. Zou Y., Zhou Y., Jin Y., He C., Deng Y., Han S., Zhou C., Li X., Zhou Y., Liu Y., 2018, Synergistically enhanced antimetastasis effects by honokiol-loaded pH-sensitive polymer–doxorubicin conjugate micelles, *ACS applied materials interfaces*, 10(22), pp. 18585-18600.
57. Yu R., Zou Y., Liu B., Guo Y., Wang X., Han M., 2019, Surface modification of pH-sensitive honokiol nanoparticles based on dopamine coating for targeted therapy of breast cancer, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 177, pp. 1-10.
58. Avgoustakis K., Beletsi A., Panagi Z., Klepetsanis P., Karydas A., Ithakissios D., 2002, PLGA–mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties, *Journal of controlled release*, 79(1-3), pp. 123-135.
59. Chenthamara D., Subramaniam S., Ramakrishnan S.G., Krishnaswamy S., Essa M.M., Lin F.-H., Qoronfleh M.W., 2019, Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration, *Biomaterials research*, 23(1), pp. 1-29.
60. Parker S., Davey P., 1992, Pharmacoeconomics of intravenous drug administration, *Pharmacoeconomics*, 1(2), pp. 103-115.
61. Wong J., Brugger A., Khare A., Chaubal M., Papadopoulos P., Rabinow B., Kipp J., Ning J., 2008, Suspensions for intravenous (IV) injection: a review of development, preclinical and clinical aspects, *Advanced drug delivery reviews*, 60(8), pp. 939-954.

62. Thu H.P., Nam N.H., Duong L., Tham N., Quang B., Thi H., 2014, Targeting effect of folate on cancer cell through curcumin carrier nano-system, *Int J Drug Deliv*, 6(4), pp. 351-358.
63. Thông P.Q., 2019, *Nghiên cứu chế tạo, đặc trưng và khảo sát tiềm năng ứng dụng của hệ dẫn chất nano đa chức năng nền Copolyme PLA-PEG có và không có hạt từ (Fe_3O_4)*, Luận án Tiến sĩ Khoa học vật liệu, Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
64. Hoà N.N., 2020, *Nghiên cứu cải thiện khả năng mang thuốc chống ung thư Cisplatin của chất mang nano Dendrimer*, Luận án Tiến sĩ Khoa học vật liệu, Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
65. Minh H.N., 2021, *Nghiên cứu tổng hợp hệ nano dendrimer poly(amidoamine) mang thuốc chống ung thư (carboplatin, oxaliplatin)*, Luận án Tiến sĩ Khoa học vật liệu, Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
66. Le T.T.D., Ha P.T., Tran T.H.Y., Nguyen D.T., Nguyen H.N., Hoang M.N., 2016, In vitro evaluation of Aurora kinase inhibitor—VX680—in formulation of PLA-TPGS nanoparticles, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience Nanotechnology*, 7(2), pp. 025010.
67. Le T.T.D., La T.H., Le T.M.P., Nguyen T.M.H., Le Q.H., 2013, Docetaxel and curcumin-containing poly (ethylene glycol)-block-poly (ϵ -caprolactone) polymer micelles, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience Nanotechnology*, 4(2), pp. 025006.
68. Le D.T.T., Dang L.T.M., Hoang N.T.M., La H.T., Nguyen H.T.M., Le H.Q., 2015, Antitumor activity of docetaxel PLGA-PEG nanoparticles with a novel anti-HER2 scFv, *J. Nanomed. Nanotechnol*, 6, pp. 1000267.
69. Le T.T.D., Pham T.H., Nguyen T.N., Ngo T.H.G., Hoang T.M.N., Le Q.H., 2016, Evaluation of anti-HER2 scFv-conjugated PLGA-PEG nanoparticles on 3D tumor spheroids of BT474 and HCT116 cancer cells, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience Nanotechnology*, 7(2), pp. 025004.

70. Quyet Nguyen Ngoc, Huan Le Quang, Nhung Hoang Thi My, Thuy D.L.T., 2015, Honokiol loaded PLGA nanoparticles with modified surface by chitosan, *Indian Journal of Applied Research*, Vol.5(2).
71. StankeVICIUS V., Vasauskas G., Bulotiene D., Butkyte S., Jarmalaite S., Rotomskis R., Suziedelis K., 2016, Gene and miRNA expression signature of Lewis lung carcinoma LLC1 cells in extracellular matrix enriched microenvironment, *BMC cancer*, 16(1), pp. 1-13.
72. Hương B.T., 2022, Thử nghiệm độc tính cấp tính và độc tính bán trường diễn đối với dẫn chất Nano - PLGA - Honokiol, *Khóa luận tốt nghiệp Đại học ngành Dược học, Trường Đại học Y dược*.
73. Tomayko M.M., Reynolds C.P., 1989, Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice, *Cancer chemotherapy pharmacology*, 24(3), pp. 148-154.
74. Siripong P., Boonsong K., Kwanjai K., 1998, Study on antitumor potential of *A. ebracteatus* Vahl. Roots, *Thai Cancer Journal*, 24, pp.29-39.
75. Rashidi B., Yang M., Jiang P., Baranov E., An Z., Wang X., Moossa A., Hoffman R., 2000, A highly metastatic Lewis lung carcinoma orthotopic green fluorescent protein model, *Clinical experimental metastasis*, 18(1), pp. 57-60.
76. Kellar A., Egan C., Morris D., 2015, Preclinical murine models for lung cancer: clinical trial applications, *BioMed research international*, 2015.
77. Peppolonii S., Herberman R.B., Gorelik E., 1987, Lewis lung carcinoma (3LL) cells treated in vitro with ultraviolet radiation show reduced metastatic ability due to an augmented immunogenicity, *Clinical experimental metastasis*, 5(1), pp. 43-56.
78. Sacchi A., Corsi A., Caputo M., Zupi G., 1979, In vitro and in vivo selection of two Lewis lung carcinoma cell lines, *Tumori Journal*, 65(6), pp. 657-664.
79. Ozols R.F., Bundy B.N., Greer B.E., Fowler J.M., Clarke-Pearson D., Burger R.A., Mannel R.S., DeGeest K., Hartenbach E.M., Baergen R., 2003, Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer:

- a Gynecologic Oncology Group study, *Journal of Clinical Oncology*, 21(17), pp. 3194-3200.
80. Kondagunta G.V., Bacik J., Donadio A., Bajorin D., Marion S., Sheinfeld J., Bosl G.J., Motzer R.J., 2005, Combination of paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin is an effective second-line therapy for patients with relapsed testicular germ cell tumors, *Journal of Clinical Oncology*, 23(27), pp. 6549-6555.
81. Staffhorst R.W., van der Born K., Erkelens C.A., Hamelers I.H., Peters G.J., Boven E., de Kroon A.I., 2008, Antitumor activity and biodistribution of cisplatin nanocapsules in nude mice bearing human ovarian carcinoma xenografts, *Anti-cancer drugs*, 19(7), pp. 721-727.
82. Hahm E.-R., Arlotti J.A., Marynowski S.W., Singh S.V., 2008, Honokiol, a constituent of oriental medicinal herb magnolia officinalis, inhibits growth of PC-3 xenografts in vivo in association with apoptosis induction, *Clinical cancer research*, 14(4), pp. 1248-1257.
83. Eliaz I., 2014, Honokiol Research Review, *Natural Medicine Journal*.
84. Battinelli E.M., *The Role of Platelets in Angiogenesis*, in *Platelets*. 2019, Elsevier. p. 433-441.
85. Zhang Q., Li J., Zhang W., An Q., Wen J., Wang A., Jin H., Chen S., 2015, Acute and sub-chronic toxicity studies of honokiol microemulsion, *Regulatory Toxicology Pharmacology*, 71(3), pp. 428-436.
86. Liu Z., Zhang X., Cui W., Zhang X., Li N., Chen J., Wong A.W., Roberts A., 2007, Evaluation of short-term and subchronic toxicity of magnolia bark extract in rats, *Regulatory Toxicology Pharmacology*, 49(3), pp. 160-171.
87. Wang C., Chen Y.G., Gao J.L., Lyu G.Y., Su J., Zhang Q., Ji X., Yan J.-Z., Qiu Q.L., Zhang Y.L., 2015, Low local blood perfusion, high white blood cell and high platelet count are associated with primary tumor growth and lung metastasis in a 4T1 mouse breast cancer metastasis model, *Oncology letters*, 10(2), pp. 754-760.
88. Kahramanca P., Kaya O., Özgehan G., Ýrem B., Dural Ý., Küçükpýnar T., Kargýcý H., 2014, Are neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-

- lymphocyte ratio as effective as Fournier's gangrene severity index for predicting the number of debridements in Fournier's gangrene?, *Turkish Journal of Trauma Emergency Surgery*, 20(2), pp. 107-112.
89. Min B., Brown M.A., LeGros G., 2012, Understanding the roles of basophils: breaking dawn, *Immunology*, 135(3), pp. 192-197.
 90. Huang X.-J., Choi Y.-K., Im H.-S., Yarimaga O., Yoon E., Kim H.-S., 2006, Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques, *Sensors*, 6(7), pp. 756-782.
 91. Huang K., Chen Y., Zhang R., Wu Y., Ma Y., Fang X., Shen S., 2018, Honokiol induces apoptosis and autophagy via the ROS/ERK1/2 signaling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo, *Cell death disease*, 9(2), pp. 1-17.
 92. Lee J.S., Sul J.Y., Park J.B., Lee M.S., Cha E.Y., Ko Y.B., 2019, Honokiol induces apoptosis and suppresses migration and invasion of ovarian carcinoma cells via AMPK/mTOR signaling pathway, *International Journal of Molecular Medicine*, 43(5), pp. 1969-1978.
 93. Hsiao C.H., Yao C.J., Lai G.M., Lee L.M., Whang-Peng J., Shih P.H., 2019, Honokiol induces apoptotic cell death by oxidative burst and mitochondrial hyperpolarization of bladder cancer cells, *Experimental Therapeutic Medicine*, 17(5), pp. 4213-4222.
 94. Usach I., Alaimo A., Fernández J., Ambrosini A., Mocini S., Ochiuz L., Peris J.-E., 2021, Magnolol and Honokiol: Two Natural Compounds with Similar Chemical Structure but Different Physicochemical and Stability Properties, *Pharmaceutics*, 13(2), pp. 224.
 95. Han M., Yu X., Guo Y., Wang Y., Kuang H., Wang X., 2014, Honokiol nanosuspensions: preparation, increased oral bioavailability and dramatically enhanced biodistribution in the cardio-cerebro-vascular system, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 116, pp. 114-120.
 96. Tang P., Sun Q., Yang H., Tang B., Pu H., Li H., 2018, Honokiol nanoparticles based on epigallocatechin gallate functionalized chitin to

enhance therapeutic effects against liver cancer, *International Journal of Pharmaceutics*, 545(1-2), pp. 74-83.

97. Lin H.-L., Cheng W.-T., Chen L.-C., Ho H.-O., Lin S.-Y., Hsieh C.-M., 2021, Honokiol/magnolol-loaded self-assembling lecithin-based mixed polymeric micelles (lbMPMs) for improving solubility to enhance oral bioavailability, *International journal of nanomedicine*, 16, pp. 651.
98. Yang B., Ni X., Chen L., Zhang H., Ren P., Feng Y., Chen Y., Fu S., Wu J., 2017, Honokiol-loaded polymeric nanoparticles: an active targeting drug delivery system for the treatment of nasopharyngeal carcinoma, *Drug Delivery*, 24(1), pp. 660-669.
99. Wei X., Fang Z., Sheng J., Wang Y., Lu P., 2020, Honokiol-mesoporous Silica Nanoparticles Inhibit Vascular Restenosis via the Suppression of TGF- β Signaling Pathway, *International journal of nanomedicine*, 15, pp. 5239.
100. Rafiei P., Haddadi A., 2017, Docetaxel-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles for intravenous application: pharmacokinetics and biodistribution profile, *International journal of nanomedicine*, 12, pp. 935.

PHỤ LỤC

**Phụ lục 1. Kết quả các chỉ số huyết học, sinh hóa và mô bệnh học của
05 nhóm nghiên cứu**