

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Lê Thị Vân Anh

**NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP VÀ ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ
ĐẶC ĐIỂM LÝ SINH CỦA HỆ NANO – POLYMER PLGA-
HONOKIOL NHẪM ĐỊNH HƯỚNG TRONG
ĐIỀU TRỊ UNG THƯ**

LUẬN VĂN THẠC SĨ
Sinh học thực nghiệm

LÊ THỊ VÂN ANH

SINH HỌC THỰC NGHIỆM

2023

Hà Nội - 2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Lê Thị Vân Anh

**NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP VÀ ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM
LÝ SINH CỦA HỆ NANO – POLYMER PLGA – HONOKIOL
NHẪM ĐỊNH HƯỚNG TRONG ĐIỀU TRỊ UNG THƯ**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm
Mã số: 8420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH
Sinh học thực nghiệm

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:
TS. Lê Thị Thùy Dương

Hà Nội - 2023

I

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 chịu trách nhiệm.

Tác giả luận văn

Lê Thị Vân Anh

II LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên, em xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành nhất đến giáo viên hướng dẫn của em là TS. Lê Thị Thùy Dương – người cô giàu kinh nghiệm và đầy nhiệt huyết đã hỗ trợ, định hướng, tận tình chỉ bảo để em có thể hoàn thành luận án trong những điều kiện tốt nhất.

Em xin gửi lời cảm ơn đến các thầy cô, các anh chị kỹ thuật viên thuộc phòng Sinh hóa Thực vật đặc biệt là bạn Vũ Mạnh Cường 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 chân thành cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo và các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ đã hỗ trợ em hoàn thành các học phần và mọi thủ tục cần thiết khác để luận văn được hoàn thành.

Cuối cùng, em xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc đến gia đình, bạn bè, đồng nghiệp đã luôn chia sẻ, động viên tinh thần và là nguồn cổ vũ, giúp đỡ tôi vượt qua mọi khó khăn trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Học viên

Lê Thị Vân Anh

III MỤC LỤC

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ CÁI VIẾT TẮT.....	V
DANH MỤC BẢNG.....	VII
DANH MỤC SƠ ĐỒ	VII
DANH MỤC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ.....	VIII
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. Tình hình ung thư trên thế giới và Việt Nam.....	3
1.2. Hoạt chất Honokiol.....	5
1.2.1. Một số đặc tính của Honokiol	5
1.2.2. Hoạt tính kháng ung thư của Honokiol.....	6
1.3. Công nghệ nano trong điều trị ung thư.....	7
1.3.1. Đặc điểm của công nghệ nano trong điều trị ung thư.....	7
1.3.2. Đặc điểm hệ nano Polyme	13
1.3.3. Nano polyme PLGA.....	17
1.4. Hệ nano mang Honokiol.....	19
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	22
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	22
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	22
2.2.1. Quy trình nghiên cứu	22
2.2.2. Tạo hạt nano polymer PLGA bao gói thuốc HK	24
2.2.3. Phân tích một số đặc tính của hệ nano dẫn truyền HK	25
2.2.3.1. Đánh giá các đặc tính lý hóa	25
□ Phân tích hình thái hạt nano	25
□ Phân tích kích thước và thế zeta.....	25
□ Xác định phổ hồng ngoại FT-IR.....	25
□ Đánh giá hiệu quả và dung tích bao gói thuốc	25
□ Đánh giá khả năng giải phóng thuốc	26
2.2.3.2. Đánh giá độc tính tế bào in vitro.....	26
□ Xác định độc tính của hệ nano lên tế bào ung thư bằng MTT	26
□ Đánh giá ảnh hưởng của hệ nano lên hình thái nhân tế bào.....	27

IV

□ Đánh giá ảnh hưởng của hệ nano lên quá trình gây chết tế bào ung thư (apoptosis)	27
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	28
3.1. Kết quả tạo hệ nano - HK.....	28
3.2. Kết quả phân tích một số đặc tính của hệ nano PLGA-PEG-HK	32
3.2.1. Kết quả đánh giá các đặc tính lý hóa của hệ nano PLGA-PEG-HK.....	32
3.2.1.1. Phân tích hình thái hạt nano	32
3.2.1.2. Kích thước và thế zeta của hệ nano PLGA-PEG-HK	33
3.2.1.3. Kết quả phân tích phổ hồng ngoại FT-IR	35
3.2.1.4. Đánh giá hiệu suất và dung tích bao gói thuốc	37
3.2.1.5. Đánh giá khả năng giải phóng thuốc.....	37
3.2.2. Kết quả đánh giá độc tính tế bào in vitro của hệ nano PLGA-PEG-HK	40
3.2.2.1. Xác định độc tính của hệ nano lên tế bào ung thư bằng MTT.....	40
3.2.2.2. Đánh giá ảnh hưởng của hệ nano PLGA-PEG-HK lên hình thái nhân tế bào	45
3.2.2.3. Đánh giá ảnh hưởng của HK tự do và hệ nano PLGA-PEG-HK lên quá trình gây chết tế bào ung thư (apoptosis).	47
KẾT LUẬN	51
KIẾN NGHỊ	51
TÀI LIỆU THAM KHẢO	52

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ CÁI VIẾT TẮT

7-AAD:	7-amino-actinomycin D
A549:	Tế bào ung thư phổi A549
Apoptosis:	Chết tế bào theo chương trình
BT474:	Tế bào ung thư vú BT474
DAPI:	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCM:	Dichloromethane
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
DIEA:	N,N-disopropylethylamine
DLS:	Dynamic light scattering (Kĩ thuật tán xạ ánh sáng động)
EE:	Encapsulation efficiency (Hiệu quả bao gói)
EPR:	Enhanced permeability and retention effect (Hiệu ứng tăng tính thấm và duy trì)
ERK:	Extracellular signal-Regulated Kinase (Ngoại bào tính hiệu quy định Kinase)
FDA:	Food and Drug Administration (Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ)
FT-IR:	Fourier Transformation InfraRed (Hồng ngoại biến đổi Fourier)
GA:	Acid glycolic
HA:	Acid hyaluronic
HK:	Honokiol (3,5-di- (2-propenyl) -1,1-biphenyl-2,2-diol)
IC ₅₀	Nồng độ ức chế tối đa một nửa
LA:	Acid lactic
LC:	Loading capacity (Dung tích bao gói)
MTT:	Cell Proliferation Kit (Kit phân tích tăng sinh tế bào)
PDI:	Polydispersity (Chỉ số đa dạng)

VI

PEG:	Poly (ethylene glycol)
PI:	Propidium iodide
PLGA:	Poly (acid lactic-co-glycolic)
RES:	Reticuloendothelial System (Hệ thống lưới nội mô)
SEM:	Scanning electron microscopy (Kính hiển vi điện tử quét)
siRNA:	small interfering RNA
SSTB:	Sự sống sót tế bào
TEM:	Transmission electron microscopy (Kính hiển vi điện tử truyền qua)

VII

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1: Phần trăm giải phóng hoạt chất.....	37
Bảng 3.2: Phần trăm ức chế vào giá trị IC ₅₀	41
Bảng 3.3: Tín hiệu và vùng phân bố của các quần thể tế bào.....	46
Bảng 3.4: Phần trăm tế bào trải qua quá trình apoptosis.....	48

DANH MỤC SƠ ĐỒ

Sơ đồ 3.1: Sơ đồ quy trình nghiên cứu.....	23
--	----

VIII

DANH MỤC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1: So sánh tế bào thường và tế bào ung thư	03
Hình 1.2: Thống kê về số ca mắc mới ung thư năm 2020.....	04
Hình 1.3: Hoạt chất Honokiol được chiết xuất từ cây Hậu Phác.....	05
Hình 1.4: Thống kê ứng dụng công nghệ nano trong y học năm 2021.....	08
Hình 1.5: Tác dụng phụ của thuốc hóa trị truyền thống.....	08
Hình 1.6: Hệ thống phân phối thuốc chủ động và thụ động.....	12
Hình 1.7: Phân loại nano polyme dựa trên cấu trúc.....	13
Hình 1.8: Cấu trúc hóa học và sự thủy phân của PLGA.....	17
Hình 3.1: Hệ nano được tạo thành bằng hai phương pháp.....	26
Hình 3.2: Hệ nano PLGA-HK bị tủa sau 1 tháng.....	28
Hình 3.3: Hình ảnh hệ nano PLGA-PEG-HK qua thời gian.....	29
Hình 3.4: Hình ảnh nano PLGA-PEG-HK thông qua SEM.....	30
Hình 3.5: Hình ảnh nano PLGA-HK thông qua SEM.....	31
Hình 3.6: Kích cỡ hạt và độ phân tán của hệ nano PLGA-PEG-HK.....	32
Hình 3.7: Thế zeta của hệ nano PLGA-PEG-HK.....	33
Hình 3.8: Phổ hồng ngoại FT-IR.....	34
Hình 3.9: Đường chuẩn Honokiol.....	36
Hình 3.10: Phần trăm giải phóng hoạt chất theo thời gian của HK tự do và hệ PLGA-PEG-HK.....	37
Hình 3.11: Hình ảnh tế bào A549 xử lý bằng HK tự do và nano PLGA-PEG-HK.....	39
Hình 3.12: Phần trăm gây độc lên tế bào A549 và BT474.....	42

IX

Hình 3.13: Đánh giá ảnh hưởng lên hình thái nhân tế bào.....	45
Hình 3.14: Đánh giá tế bào apoptosis bằng việc nhuộm Annexin V.....	47

MỞ ĐẦU

Ngày nay, bệnh ung thư đã trở thành một vấn đề cấp bách của toàn xã hội khi tỷ lệ mắc bệnh ngày càng gia tăng. Các phương pháp điều trị ung thư phổ biến đang được sử dụng là phẫu thuật, xạ trị và hóa trị. Tuy nhiên, các thuốc hóa trị hiện nay vẫn còn gây ra nhiều tác dụng phụ không mong muốn trên tế bào lành bên cạnh các hiệu quả đem lại trong điều trị do khả năng tan kém trong nước, thời gian lưu hành thuốc ngắn và sự phân phối thuốc không đặc hiệu. Với những tiến độ ngày càng tăng trong lĩnh vực điều trị ung thư, các liệu pháp hiệu quả hơn đang được nghiên cứu để khắc phục các hạn chế này trong đó có sử dụng hệ nano dẫn truyền các hoạt chất tự nhiên.

Honokiol (3,5-di- (2-propenyl) -1,1-biphenyl-2,2-diol) (HK) là một polyphenol có hoạt tính sinh học được chiết xuất từ vỏ, lá và nón hạt của một số cây thuộc chi Mộc lan (*Magnolia*). Hoạt chất này được sử dụng trong y học cổ truyền ở các nước châu Á như một loại chè uống hàng ngày. Các nhà khoa học hiện đại cũng đã phát hiện rằng HK có các dược tính rộng khác như kháng viêm, chống đông máu, chống oxy hóa và đặc biệt khả năng chống ung thư. Tuy nhiên, khả năng hòa tan trong nước kém của HK là rào cản khi ứng dụng trong điều trị. Hơn nữa việc điều trị bệnh ung thư không chỉ phụ thuộc vào hiệu quả của thuốc mà còn cả hệ thống phân phối thuốc. Do đó, cần thiết kế hệ thống phân phối thuốc thích hợp để có thể cải thiện tính hòa tan của HK, từ đó làm tăng hiệu quả trong điều trị bệnh ung thư. Các nhà khoa học đã nghiên cứu nhiều phương pháp để dẫn truyền HK đến khối u, trong số đó điển hình nhất đó là sử dụng các hạt nano làm chất mang hoạt chất.

Y học nano đã đạt được những thành tựu to lớn, nổi bật nhất là các nghiên cứu liên quan đến việc mang thuốc đến các tế bào bệnh và chẩn đoán bệnh ở mức phân tử. Trong đó, hệ nano polyme là một trong những vật liệu phổ biến để tạo chất mang thuốc. So với hệ thống phân phối thuốc cổ điển, hệ phân phối này mang lại nhiều ưu điểm như giúp cải thiện tính tan (đối với các loại thuốc không tan hoặc kém tan), nâng cao thời gian lưu thông của thuốc trong hệ tuần hoàn, khả năng tải thuốc và lượng thuốc tập trung tại vùng khối u cao. Hiện nay, có một số polyme được ứng dụng nhiều trong dẫn truyền thuốc, trong đó phải kể đến là poly (lactide-co-glycolide) (PLGA). PLGA là một polyme phân hủy sinh học hiệu quả và ngày càng thu hút sự quan tâm để sử dụng làm chất mang thuốc

trong điều trị ung thư do có độc tính thấp, khả năng kiểm soát và duy trì giải phóng thuốc.

Vì vậy, việc tổng hợp và tối ưu hệ nano PLGA dẫn truyền HK nhằm cải thiện độ hòa tan, nâng cao hiệu quả diệt tế bào ung thư của HK là một hướng tiềm năng trong nghiên cứu điều trị ung thư. Do đó, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: “**Nghiên cứu tổng hợp và đánh giá một số đặc điểm lý sinh của hệ Nano-polymer PLGA-Honokiol nhằm định hướng trong điều trị ung thư.**” với mục tiêu nghiên cứu là tổng hợp, tối ưu được hệ nano polyme PLGA bao gói hoạt chất HK và phân tích một số đặc tính của hệ nano lên hai dòng tế bào ung thư phổi A549 và ung thư vú BT474.

Luận văn thực hiện các nội dung nghiên cứu sau:

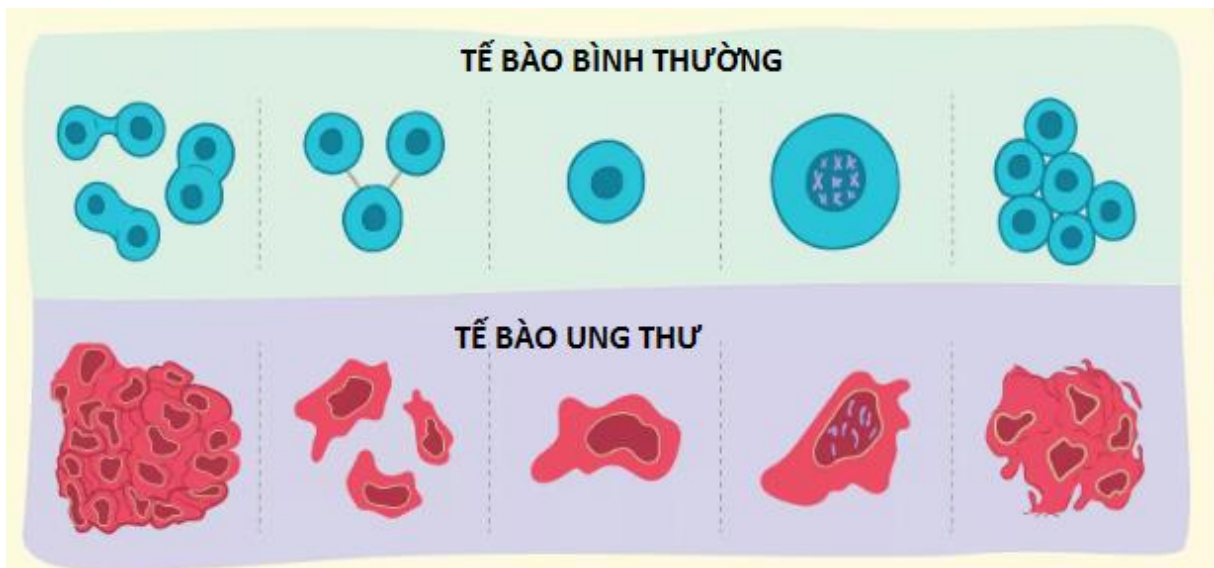
- Tổng hợp và tối ưu hệ nano polyme PLGA - Honokiol.
- Đánh giá một số đặc tính của hệ nano polyme bao gói HK định hướng ứng dụng trong điều trị ung thư.

NỘI DUNG

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

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

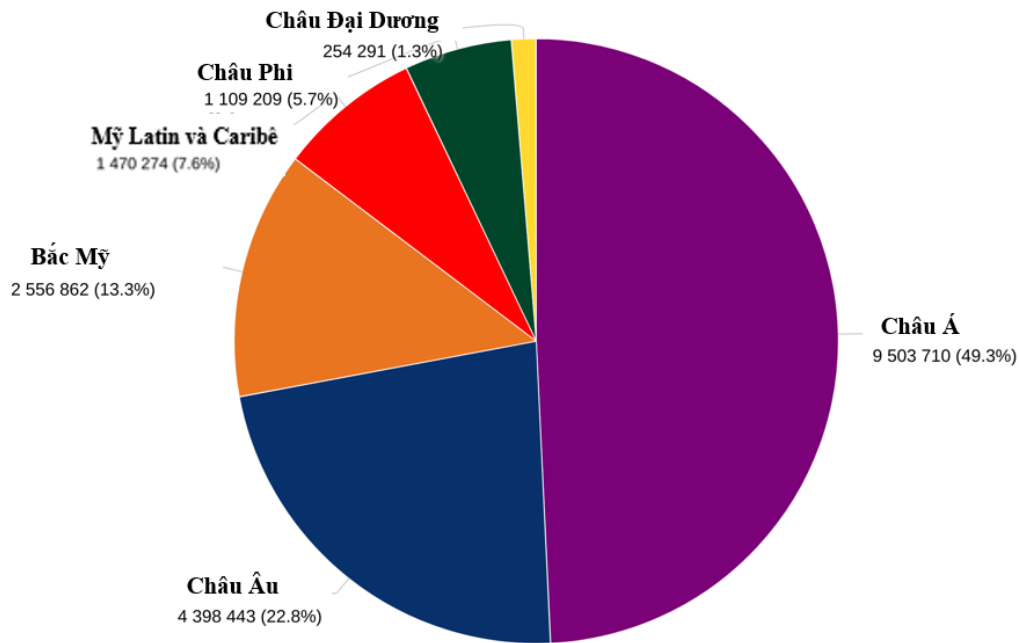
Ung thư là bệnh lý có nguyên nhân xuất phát từ một loạt rối loạn đặc trưng bởi sự tăng sinh tế bào bất thường, sự phân chia không kiểm soát, khả năng xâm nhập và phá hủy các mô bình thường trong cơ thể. Trong quá trình điều hòa, các tế bào đều trải qua chu trình chết theo tế bào (apoptosis), lúc này cơ thể có thể thay thế chúng bằng các tế bào mới hơn, hoạt động tốt hơn. Tế bào ung thư thiếu các tín hiệu để chúng ngừng phân chia và chết đi. Điều này đã làm cho quá trình tự nhiên của cơ thể bị phá vỡ khi ung thư xuất hiện. Các tế bào ngày càng trở nên rối loạn chức năng, các tế bào cũ không chết theo chu trình mà tiếp tục phát triển (hình 1.1). Các tế bào mới liên tục được sản sinh, chúng phát triển không kiểm soát và cuối cùng hình thành các khối bất thường gọi là khối u [1].



Hình 1.1. So sánh tế bào thường và tế bào ung thư

Hình ảnh được cải biên từ tài liệu [1]

Theo thống kê của cơ quan nghiên cứu ung thư quốc tế vào năm 2020 đối với 36 loại ung thư ở 185 quốc gia đã cho thấy rằng tỉ lệ ca mắc mới và tử vong do ung thư trên toàn thế giới ngày càng có xu hướng tăng lên. Cụ thể, số ca mắc ung thư trong năm 2020 đã tăng lên 19,3 triệu và 10 triệu ca tử vong trên toàn thế giới (hình 1.2) [2].



Tổng : 19 292 789

Hình 1.2. Thống kê về số ca mắc mới ung thư năm 2020

Hình ảnh được cải biên từ tài liệu [2]

Tại Việt Nam, theo thống kê của bộ Y tế mỗi năm có hơn 120.000 ca bệnh mới, hơn 75.000 bệnh nhân tử vong vì ung thư. Cứ 100.000 người thì có 106 người qua đời và 159 người phát hiện mắc căn bệnh này. Theo con số thống kê vào năm 2020, Việt Nam xếp thứ 91/185 về tỉ lệ số ca bệnh mới và thứ 50/185 về tỉ lệ ca bệnh tử vong. Thứ hạng vào năm 2018 của nước ta là 99/185 và 56/185. Như vậy, chỉ vòng 2 năm, tình trạng về bệnh ung thư ở nước ta ngày càng ra tăng cả ở số ca mắc mới (tăng 11%) và tỉ lệ tử vong (tăng 7%). Số liệu điều tra toàn quốc về gánh nặng bệnh tật ở Việt Nam cũng cho thấy ung thư là một trong những nguyên nhân gây bệnh tật và tử vong hàng đầu tại nước ta (chiếm 13,3%) [3].

Hiện nay, các phương pháp điều trị ung thư phổ biến là phẫu thuật, hóa trị và xạ trị. Trong hóa trị liệu, một số dược chất đang được sử dụng như cisplatin, mitoxantron, estramustin, doxorubicin, etoposid, vinblastin..., đã được chấp thuận để điều trị cho các bệnh nhân ung thư. Tuy nhiên, các thuốc này vẫn còn gây ra nhiều tác dụng phụ không mong muốn trên tế bào lành bên cạnh những hiệu quả mang lại trong điều trị [4]. Do đó, việc tìm kiếm các loại hoạt chất thiên nhiên để nâng cao hiệu quả chống lại bệnh ung thư và giảm thiểu tác dụng

phụ đang được các nhà khoa học tập trung nghiên cứu hàng đầu. Đã có rất nhiều nghiên cứu chứng minh hiệu quả của hoạt chất có nguồn gốc từ thảo dược thiên nhiên trong điều trị như: hoạt chất germanium từ nấm linh chi, hoạt chất curcumin từ nghệ vàng [5]. Trong số đó, hoạt chất Honokiol (HK) chiết xuất từ các cây thuộc họ Mộc Lan đang ngày càng được quan tâm do những tiềm năng trong điều trị khối u.

1.2. Hoạt chất Honokiol

1.2.1. Một số đặc tính của Honokiol

Honokiol (HK) là một hoạt chất polyphenol có công thức hóa học là $C_{18}H_{18}O_2$, trọng lượng phân tử là 266 g/mol, được tách chiết từ các bộ phận khác nhau như vỏ cây, nón hạt, phiến và cuống lá của các cây thuộc họ Mộc Lan (*Magnolia*) (hình 1.3). HK có kích thước nhỏ, kỵ nước và dễ hòa tan trong lipid [6].



Hình 1.3. Hoạt chất Honokiol được chiết xuất từ cây Hậu Phác [6]

Trong y học cổ truyền ở nhiều nước châu Á, HK từ lâu đã được sử dụng để điều trị lo âu và chóng đột quy, làm giảm các triệu chứng cúm. Sản phẩm tự nhiên này cũng thể hiện các hoạt tính sinh học khác như tác dụng chống loạn nhịp tim, kháng viêm, chống đông máu, chống oxy hóa, kháng nấm, kháng khuẩn, chống virus [7]. Đặc biệt trong các nghiên cứu gần đây, HK đang được các nhà khoa học ngày càng quan tâm nhờ đặc tính chống khối u. Tiềm năng

điều trị của HK đối với nhiều loại ung thư đã được báo cáo trong nhiều nghiên cứu như ung thư bàng quang, u nguyên bào đệm thần kinh, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư vú, ung thư gan, ung thư phổi dạng vảy, ung thư buồng trứng, ung thư biểu mô tế bào, ung thư vòm họng, ung thư ruột kết, da, hắc tố, tuyến giáp, xương, dạ dày [8-10].

1.2.2. Hoạt tính kháng ung thư của Honokiol

HK có khả năng can thiệp vào các con đường tín hiệu khác nhau và các cơ chế điều chỉnh kiểm soát các dấu hiệu của bệnh ung thư, chẳng hạn như EGFR, NF- κ B, STAT3 và m-TOR [11-14]. EGFR một dạng protein gọi là thụ thể của yếu tố tăng trưởng thượng bì. Theo các nghiên cứu, protein này được tìm thấy ở trên 90% các trường hợp chuẩn đoán mắc ung thư đầu và cổ. HK cho thấy khả năng hạn chế biểu hiện của EGFR thông qua việc ức chế quá trình phosphoryl hóa của chính EGFR [11]. NF- κ B và STAT3 là hai yếu tố phiên mã liên quan đến sự biểu hiện của một loạt các gen và các quá trình sinh lý của cơ thể điển hình như sự biểu hiện của các protein trong quá trình apoptosis (Bcl-xL, Bcl-2, c-IAP2); sự điều hòa gen HIF1 và VEGF tham gia vào quá trình xâm nhập và hình thành mạch máu. Do đó, việc tác động và kiểm soát các yếu tố này có thể mang lại hiệu quả phòng ngừa và biểu hiện ung thư. HK 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. HK ức chế hoạt động của STAT3 thông qua việc ức chế yếu tố tăng trưởng IL-6 [12]. Tiếp theo, HK được chứng minh có thể ngăn chặn sự hoạt hoá quá mức của protein kiểm soát sự trao đổi chất và tăng sinh tế bào (m-TOR) bằng cách ức chế các con đường ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) [13]. Hiện tượng này được quan sát thấy ở các tế bào ung thư thực quản khi được điều trị bằng HK [14].

Ngoài ra, vẫn còn nhiều cơ chế kháng u của HK đã và đang được chứng minh. Hoạt tính kháng u của HK đã được khảo sát và chứng minh thông qua các tác động thúc đẩy quá trình apoptosis trên các dòng tế bào ung thư, cung cấp một lượng dữ liệu lớn về hiệu lực kháng u cũng như ảnh hưởng của HK đến các cơ quan trong cơ thể. Chen và cộng sự phát hiện ra rằng tế bào ung thư sụn – chondroarcoma JJ012 ở người bị mất điện thế màng ti thể khi được xử lý bằng 10 μ M HK, từ đó dẫn đến quá trình apoptosis [15]. Hoạt chất này còn được chứng minh là có hiệu quả gây ra quá trình apoptosis ở các tế bào ung thư vú

MDA-MD-231, ung thư phổi, ung thư bàng quang bằng cách ức chế sự hoạt hóa sự biểu hiện của ras-phospholipase D. HK cũng có thể gây ra apoptosis ở tế bào ung thư B16F10 ở chuột, ung thư hắc tố ở người bằng cơ chế tác động đến lưới nội chất trong nghiên cứu của Chiu và cộng sự [16]. Nghiên cứu tác dụng kháng u của HK cũng được thực hiện trên mô hình khối u não. HK 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 [17]. Thêm vào đó, di căn được cho là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây tử vong ở bệnh nhân ung thư. Nhiều nghiên cứu đã phát hiện HK có khả năng ngăn chặn sự di căn của khối u ở nhiều loại ung thư khác nhau. Điển hình như trong nghiên cứu của Shen và cộng sự, tỉ lệ tế bào ung thư bàng quang xâm lấn giảm 67% khi điều trị bằng 4.8 $\mu\text{g/ml}$ HK [18]. Tương tự, HK đã chứng minh khả năng ức chế sự hình thành và di căn khối u gây ra bởi ung thư biểu mô phổi VEGF-D Lewis ở chuột C57BL/6 [19]. Ngoài ra, nhược điểm của các loại thuốc hóa trị hiện nay là không phân phối đặc hiệu đến vị trí khối u, ảnh hưởng đến toàn bộ các cơ quan của cơ thể bao gồm cả tế bào lành. HK được chứng minh là gây ra độc tính rất thấp khi thử nghiệm trên các dòng tế bào thường như FB-1, FB-2, HS68 [20].

Với tiềm năng như vậy, HK được coi là một hoạt chất đầy hứa hẹn trong việc điều trị và ngăn ngừa ung thư. Tuy nhiên, khả năng hòa tan trong nước kém của HK là rào cản đối với khả năng ứng dụng điều trị [21]. Hơn nữa việc điều trị thành công bệnh ung thư không chỉ phụ thuộc vào hiệu quả của hoạt chất mà còn cả hệ thống phân phối thuốc. Do đó, **cần thiết kế hệ thống mang hoạt chất thích hợp để có thể cải thiện tính hòa tan của HK, từ đó làm tăng hiệu quả điều trị.** Hệ thống nano trong dẫn truyền thuốc là một hệ tiềm năng đang nhận được nhiều sự quan tâm khi điều trị ung thư.

1.3. Công nghệ nano trong điều trị ung thư

1.3.1. Đặc điểm của công nghệ nano trong điều trị ung thư

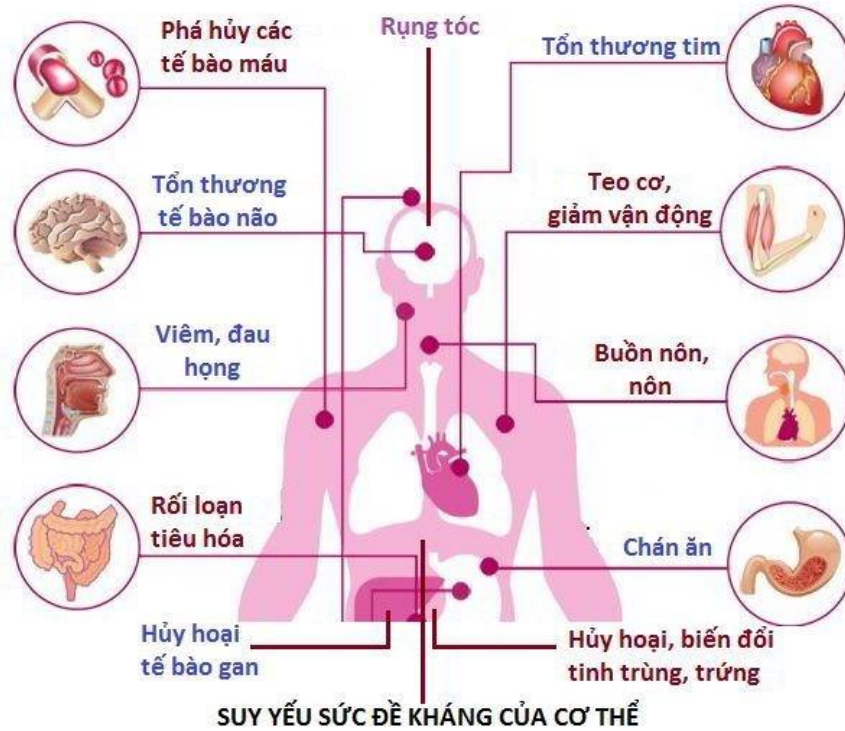
Công nghệ nano ngày càng trở nên phổ biến và ứng dụng ở rất nhiều ngành nghề khác nhau trong cuộc sống. Thế kỉ 21 được coi là thế kỉ của công nghệ nano khi công nghệ này ngày càng được khám phá các tiềm năng triển vọng để phát triển cho nhu cầu hiện tại và tương lai. Công nghệ nano trong y sinh là một trong những ngành đã có những bước phát triển vượt bậc nhờ những nghiên cứu và kết quả đạt được như phát triển vật liệu sinh học, thiết bị y sinh,

chuẩn đoán hình ảnh,..v..v. Trong số đó, theo số liệu thống kê năm 2021 về ứng dụng của công nghệ nano trong y học, ứng dụng trong điều trị ung thư đang nhận được nhiều chú ý (chiếm 53%), đặc biệt là sử dụng hệ nano để mang thuốc đến các tế bào khối u trong quá trình hóa trị (hình 1.4) [22].



*Hình 1.4. Thống kê ứng dụng công nghệ Nano trong y học năm 2021
Hình ảnh được cải biên từ tài liệu [22]*

Hóa trị được bác sĩ 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 truyền thống vẫn bị hạn chế do khả năng hòa tan kém và phân phối không đặc hiệu đến vị trí khối u, thời gian lưu hành thấp. Hơn nữa, khi điều trị bằng biện pháp này, bệnh nhân phải điều trị bằng liều thuốc cao gây ra những tác dụng phụ rất có hại cho cơ thể người bệnh như rụng tóc, suy nhược, phá hủy các tế bào máu, buồn nôn, rối loạn tiêu hóa, ảnh hưởng đến các mô và cơ quan (Hình 1.5) [23].



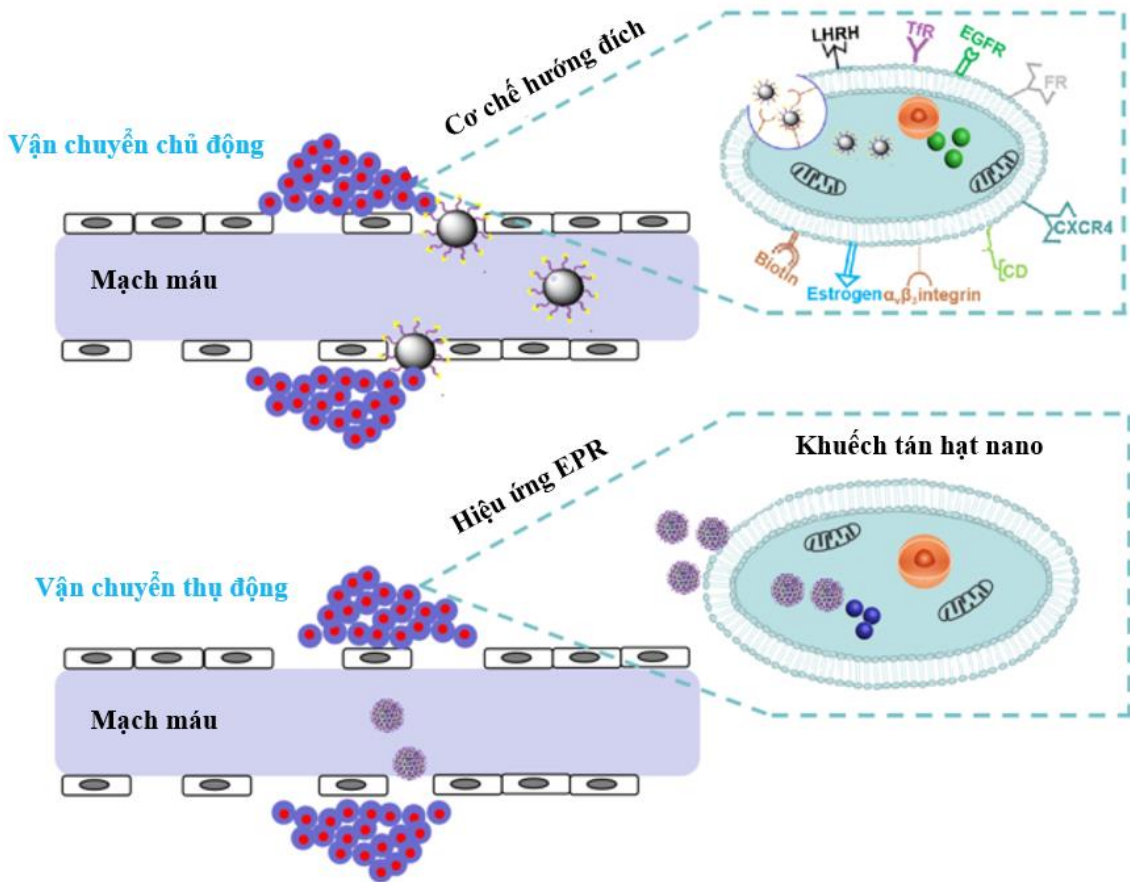
Hình 1.5. Tác dụng phụ của thuốc hóa trị truyền thống [23]

Trong nhiều năm, các nhà nghiên cứu đã cố gắng tìm ra các phương pháp mới để đưa các tác nhân điều trị đến khu vực khối u hiệu quả và giảm tích lũy thuốc không cần thiết trong tế bào bình thường và các mô ngoại vi. Nhiều nghiên cứu được tiến hành để có thể đảm bảo đáp ứng thuốc với một liều lượng nhỏ hơn và ít tác dụng phụ. Hệ nano đã cho thấy những ưu điểm tiềm năng để cải thiện sinh khả dụng của thuốc so với thuốc hóa trị truyền thống [24]. Đầu tiên, nguyên nhân chính dẫn đến nhiều thất bại về nghiên cứu dược động học của nhiều loại thuốc đó là do khả năng hòa tan kém của hoạt chất. Theo thống kê của Cơ quan Quản lý Thuốc và Thực phẩm Hoa Kỳ (FDA), hơn 75% dược chất đang được nghiên cứu hiện nay có độ hòa tan kém trong môi trường dịch sinh lý; hơn 25% dược chất có tính thấm kém qua thành ruột, hạn chế khả năng hấp thu và vận chuyển thuốc vào tuần hoàn máu [25]. Sử dụng hệ nano mang thuốc có thể giúp cải thiện khả năng hòa tan của các dược chất từ đó giúp kéo dài thời gian lưu thông của thuốc trong máu và phân bố trong cơ thể. Trong nghiên cứu của Yang và cộng sự, tác giả đã sử dụng hệ Nano copolyme (ϵ -caprolactone)-poly (ethyleneglycol)-poly (ϵ -caprolactone) (PCEC) để bao gói HK trong thí nghiệm tác động lên tế bào ung thư vòm họng ở người HNE-1. Sự kết hợp này cho kết quả IC_{50} thấp hơn đáng kể so với điều trị bằng HK tự do với giá trị tương ứng là $18.41\mu\text{g/mL}$ và $38.59\mu\text{g/mL}$ sau 24 giờ, từ đó chứng minh hiệu

quả của hệ nano [26]. Không những thế, dựa trên những điểm khác biệt giữa tế bào ung thư và tế bào bình thường, hệ nano dẫn truyền hoạt chất có thể tập trung tác động vào các tế bào gây bệnh, không gây ảnh hưởng đến các tế bào lành, từ đó đem lại hiệu quả chữa trị tối ưu hơn cho người bệnh. Doxil là hệ mang thuốc nano đầu tiên được FDA chấp thuận. Doxil đã được chứng minh vẫn giữ được các hiệu quả trong điều trị, đồng thời ưu điểm chính của hệ mang thuốc nano này so với doxorubicin thông thường đó là không gây độc lên tim [27].

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 thụ động (passive delivery) và chủ động (active delivery) (hình 1.6) [28]. Hệ nano có thể tích lũy thụ động trong tế bào ung thư do sự khác biệt về đặc điểm sinh hóa và sinh lý giữa mô lành tính và ác tính. Môi trường khối u là một môi trường xuất hiện sự bất bình thường về giải phẫu và sinh lý. Sự phát triển của tế bào ung thư không được kiểm soát và sự điều tiết các yếu tố tạo mạch dẫn đến hệ mạch máu phát triển vô tổ chức và các môi trường ngoại mạch dày đặc. Những khiếm khuyết cấu trúc này là nguyên nhân của hiệu ứng tăng tính thấm và khả năng lưu giữ (Enhanced permeability and retention effect - EPR), là nguồn gốc của sự tích lũy và lưu trữ không đồng đều các vật liệu nano trong khối u. Do các tế bào khối u phát triển không kiểm soát với tốc độ nhanh hơn bình thường dẫn đến thành mạch máu bị mở rộng, tạo thành khoảng trống giữa các tế bào nội mô trong hệ vi mạch máu của khối u [29]. 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. Vì vậy, kích thước hạt nano đóng một vai trò quan trọng trong tích lũy khối u thông qua hiệu ứng EPR [30]. Các thông số hóa lý của dung dịch nano như kích cỡ của vật liệu nano ảnh hưởng đến sự thoát mạch bằng việc ảnh hưởng đến độ khuếch tán, tính thấm qua thành mạch máu và những tương tác trong các khối u với các tế bào. Kích thước của hạt nano sử dụng trong một hệ thống phân phối thuốc cần đủ lớn để ngăn chặn sự rò rỉ nhanh chóng ở các mạch máu, nhưng phải đủ nhỏ để không bị đào thải bởi hệ miễn dịch [30]. 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. Một số nghiên cứu gần đây đã cho

rằng, hạt nano ở kích thước 70 đến 200 nm là kích thước tiềm năng sử dụng trong dẫn truyền thuốc [31]. Nguyên nhân là do tại kích thước này, hạt nano có khả năng vượt qua nhiều rào cản sinh học và giải phóng thuốc điều trị ở phạm vi liều lượng tối ưu [32]. Do đó, để khai thác hiệu quả hiệu ứng EPR, 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. Tiếp theo, vận chuyển chủ động là cơ chế nhắm mục tiêu khối u để phân phối thuốc qua các tương tác phối tử/ thụ thể. Các tác nhân nhắm mục tiêu được gắn trên bề mặt hệ nano để nhận diện và bắt cặp đặc hiệu với các thụ thể trên màng tế bào ung thư, từ đó các hạt nano được phân phối hướng đích một cách hiệu quả. Tuy nhiên, để tận dụng được cơ chế hướng đích chủ động, cần sàng lọc nhiều dạng khác nhau để lựa chọn được dạng có ái lực cao với tế bào ung thư, đồng thời tác nhân hướng đích phải liên tục biến đổi để tạo ra những thay đổi có lợi cho việc nhập bào của các hệ dẫn thuốc. Hơn nữa, để tạo hệ nano hướng đích chủ động cần chi phí rất cao [26].



Hình 1.6. Hệ thống phân phối thuốc chủ động và thụ động
Hình ảnh được cải biên từ tài liệu [28]

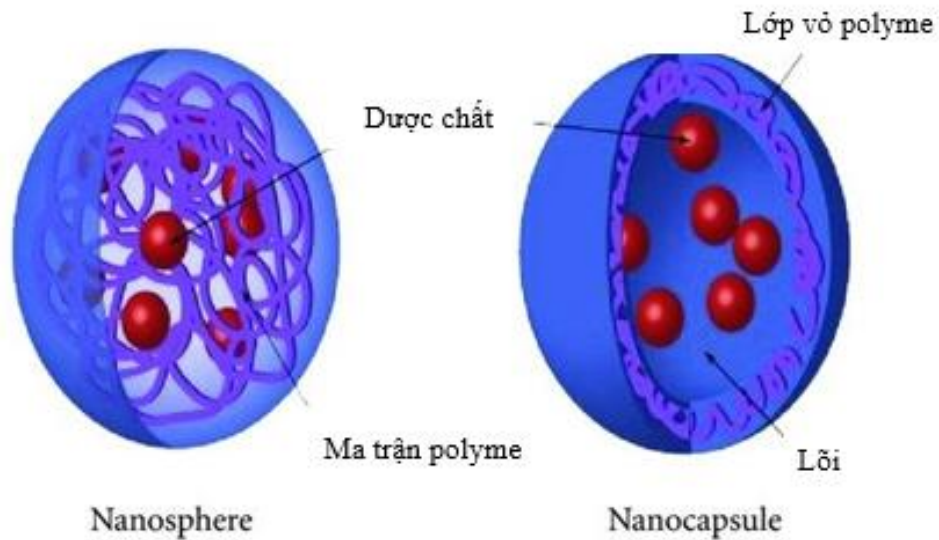
Thuốc nano có thể được sử dụng thông qua các con đường khác nhau bao gồm: tiêm tĩnh mạch, đường uống, nhỏ mắt...v.v.[33]. Trong đó, đường tiêm tĩnh mạch có thể cung cấp các phản ứng gần như tức thời đến được các vị trí trong cơ thể thông qua hệ tuần hoàn và cho phép kiểm soát chính xác liều lượng và tốc độ dẫn truyền thuốc. Thêm vào đó, việc tiêm tĩnh mạch cũng phù hợp với các loại thuốc không thể hấp thụ qua đường tiêu hóa và nó khắc phục được những vấn đề *firstpass metabolism* (sự chuyển hóa thuốc qua gan lần thứ nhất hay chuyển hóa trước khi vào hệ tuần hoàn) làm giảm sinh khả dụng của thuốc khi sử dụng thuốc qua đường uống [34]. Nhiều hệ mang thuốc nano đã được nghiên cứu để sử dụng thông qua đường tiêm. Sản phẩm hệ dẫn thuốc nano tiêm tĩnh mạch đầu tiên là Abraxane® (một dạng cải tiến của paclitaxel), đã được FDA chấp thuận vào năm 2006 [35]. Trong nghiên cứu của Gradishar và cộng sự cũng đã cho thấy thuốc nano ABI007 (nanometersized albumin-bound paclitaxel) có tỉ lệ đáp ứng trong điều trị bệnh ung thư vú cao hơn đáng kể (33%) so với paclitaxel thông thường (19%) khi sử dụng thông qua đường tiêm tĩnh mạch [36]. Do đó, hướng nghiên cứu tạo hệ nano sử dụng theo đường tiêm tĩnh mạch được xem như hướng đi tiềm năng mang lại hiệu quả tốt trong điều trị ung thư.

Với sự tiến bộ trong lĩnh vực công nghệ nano, các nhà khoa học đã không ngừng nghiên cứu để xây dựng các hệ nano đa chức năng có thể dẫn truyền thuốc đến các vị trí khối u, những nghiên cứu này đã cho các kết quả khả quan và tiềm năng lớn trong ứng dụng điều trị ung thư. Nhiều hệ nano khác nhau đã được kiểm tra và nghiên cứu để thiết lập hệ phân phối thuốc như hạt silica trung tính, hạt nano vàng, liposome, dendrimer, micelle, carbon nano...v.v [37-41]. Đầu tiên, một số hệ nano vô cơ đã được các nhà khoa học nghiên cứu trong điều trị ung thư. Điển hình như Xiao và cộng sự đã sử dụng chất mang là hạt nano vàng để bao gói Doxorubicin và small interfering RNA (siRNA) để chống lại gen biểu hiện bệnh ung thư nội tiết thần kinh. Kết quả phức hệ nano này đã cho thấy tác dụng làm giảm biểu hiện gene ung thư ASCL1 và chống tăng sinh ở tế bào ung thư [37]. Trong một nghiên cứu khác, Pramanik và cộng sự cũng đã công nhận khả năng của các hạt nano đồng như một loại thuốc chống ung thư nhờ tác động gây độc lên tế bào khối u hiệu quả. Thí nghiệm đã chứng minh các hạt nano CuCO_3 kết hợp với acid folic gây ra tổn thương DNA và phá vỡ màng ti thể, từ đó dẫn đến quá trình apoptosis ở các tế bào ung thư [38]. Tuy nhiên, việc

sử dụng hạt nano vô cơ làm chất mang đòi hỏi phải thực hiện các sửa đổi vật lý hoặc hóa học thường xuyên để đem lại hiệu quả, đây cũng là hạn chế của việc sử dụng nano vô cơ trong dẫn truyền hoạt chất [39]. Hệ nano dựa trên lipid làm chất mang cũng được quan tâm. Năm 2021, Liu và cộng sự đã tạo ra hệ nano liposome nhiều lớp để kéo dài thời gian giải phóng doxorubicin và paclitaxel, đồng thời giảm độc tính và ảnh hưởng đến tế bào thường [40]. Một thí nghiệm khác, Wu và cộng sự cũng sử dụng liposome để bao bọc doxorubicin và verapamil trong điều trị tế bào ung thư bạch cầu K562, kết quả cũng chỉ ra rằng hệ nano được tạo thành làm giảm độc tính đến tim, đồng thời tập trung nhắm mục tiêu chọn lọc đến các tế bào khối u cần điều trị [41]. Các hệ thống nano liposome khác nhau đã được nghiên cứu, tuy nhiên khả năng tải thuốc hạn chế và độ ổn định kém khiến chúng không thích hợp để sử dụng và sản xuất ở quy mô lớn [39]. Ngoài ra, hệ thống nano polyme mang hoạt chất cũng là mối quan tâm của nhiều nhà khoa học và trở thành vật liệu phổ biến được sử dụng làm hệ phân phối thuốc nhờ các đặc tính ưu việt [42].

1.3.2. Đặc điểm hệ nano Polyme

Nano polyme được chú ý nhiều nhờ tính linh hoạt và đặc điểm có thể điều chỉnh thành phần hóa học của chúng. Các tiểu phân nano polyme được bào chế từ các polyme tương thích hoặc phân hủy sinh học có kích thước nanomet. Nano polyme có đặc điểm chung là dùng polyme làm giá mang hoạt chất với mục đích che chở, bảo vệ hoạt chất, kéo dài tác dụng của hoạt chất và hướng hoạt chất tới đích tác dụng [42]. Tùy theo phương pháp bào chế mà nano polyme được phân loại thành nanospheres hoặc nanocapsules (Hình 1.7) [43]. Nanosphere còn được gọi là nano siêu vi cầu, hệ nano này 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 [44].



Hình 1.7. Phân loại Nano polyme dựa trên cấu trúc
Hình ảnh được cải biên từ tài liệu [43]

Có nhiều loại nano polyme đã được ứng dụng trong dẫn truyền thuốc như poly(lactic acid) (PLA), poly (hyaluronic acid) (PHA) poly (ethylene glycol) (PEG), poly (caprolactone), poly (alkyl cyanacrylate) (PACA), poly(ϵ -caprolactone) (PCL), poly (acid lactic-co-glycolic) (PLGA)..v.v. Điển hình như nghiên cứu của Banzato và cộng sự đã phát triển hệ nano polyme paclitaxel-hyaluronan để điều trị tế bào ung thư buồng trứng ở người IGROV-1 thông qua đường tiêm, kết quả cho thấy hệ nano được tạo thành cho hiệu quả gấp 5 lần so với sử dụng paclitaxel tự do [45]. Hệ nano polyme axit hyaluronic (HA) kết hợp với chitosan dẫn truyền docetaxel được tiến hành nghiên cứu bởi Ravari và cộng sự cũng cho thấy hiệu quả lên dòng tế bào ung thư vú 4T1. Hệ nano được tạo thành có kích thước hạt khoảng 170 nm, giá trị IC_{50} đo được trên mẫu xử lý bằng hệ nano thấp hơn 5 lần so với mẫu xử lý bằng docetaxel tự do với giá trị tương ứng lần lượt là 45.34 μ M và 233.8 μ M [46]. Năm 2016, Zhu và cộng sự đã chế tạo được hệ nano poly (lactic acid) (LA) bao gói docetaxel. Phân tích độc tính của hệ nano LA-Docetaxel lên tế bào ung thư gan HepG2 cho thấy hệ nano này có độc tính cao hơn gấp 8 lần ($IC_{50} = 3.19 \pm 0.56$) so với mẫu xử lý bằng docetaxel tự do ($IC_{50} = 25.66 \pm 1.54$) sau 48 giờ. Kết quả nghiên cứu *in vivo* cũng cho thấy hiệu quả sau khi điều trị bằng hệ nano này khi đã làm giảm trọng lượng khối u gan 5 lần so với đối chứng (từ 500 mg xuống 100 mg) [47]. Trong nghiên cứu khác, Lv và cộng sự đã chế tạo hệ nano deoxycholate decorated

methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(l-glutamic acid)-b-poly(l-lysine) (mPEG-b-PLG-b-PLL) được sử dụng để phân phối thuốc doxorubicin. Hệ nano này đã cho thấy hiệu quả trong ức chế khối u ung thư phổi A549, khối lượng khối u giảm 3.2 lần so với điều trị bằng doxorubicin tự do trong nghiên cứu *in vivo* trên chuột [48]. Thêm vào đó, hệ thống dẫn truyền thuốc nano poly(ethyleneimine)-poly(ϵ -caprolactone) (PEI-PCL) được tạo bởi Cao và cộng sự cũng chứng minh có tác động trong điều trị tế bào ung thư gan ở người Bel7402, thí nghiệm đã ghi nhận rằng phần trăm sống sót của tế bào ung thư Bel7402 giảm xuống chỉ còn 5% sau 96 giờ xử lý bằng hệ nano này [49]. Trong một nghiên cứu gần đây, hệ nano poly (ethylene glycol)-poly (ϵ -caprolactone) (mPEG-PCL) bao gói curcumin được thử nghiệm trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 cho thấy giá trị IC_{50} (9.17 μ M) thấp hơn so với mẫu xử lý bằng curcumin tự do (35.94 μ M) sau 72 giờ [50]. Năm 2017, Zhang và cộng sự đã nghiên cứu thành công hệ nano polyme d- α -tocopherol poly(ethylene glycol)1k-block-poly (β -amino ester) (TPGS-PAE) dẫn truyền doxorubicin và curcumin. Nghiên cứu *in vivo* trên chuột, hệ nano này đã làm 72.4% trọng lượng khối u, hiệu quả hơn so với xử lý bằng nhóm doxorubicin + curcumin tự do (giảm 32.6%) [51]. Bên cạnh đó, Alinejad và cộng sự đã thiết kế hệ nano polyme carboxymethyl dextran - chitosan dẫn truyền IL17RB siRNA, doxorubicin (DOX-siRNA-CMD-ChNPs) tác động đến dòng tế bào ung thư vú MDA-MB361 cũng cho thấy tỉ lệ tế bào ung thư trải qua quá trình apoptosis cao hơn so với xử lý bằng doxorubicin tự do với giá trị tương ứng là 46% và 10.9% [52]. Ngoài ra, nano Poly (acid lactic-co-glycolic) (PLGA) cũng nhận được nhiều sự chú ý và trở thành được một trong số hệ nano polyme được sử dụng nhiều nhất trong việc phát triển các hệ nano mang thuốc trong điều trị ung thư [53].

Một số nghiên cứu hệ nano polyme mang các chất trong điều trị ung thư ở Việt Nam

Các nghiên cứu trong nước cũng đạt được những thành tựu nhất định khi sử dụng hệ nano polyme để mang hoạt chất. Điển hình như nghiên cứu của Hồ Hoàng Nhân và cộng sự chế tạo hệ Nano artesunat-PLGA-chitosan trong điều trị dòng tế bào ung thư vú MCF-7 và ung thư phổi A549. Kết quả của nghiên cứu cho thấy hệ nano này đã làm giảm tỉ lệ sống sót (>95%) ở trên cả hai dòng tế bào ung thư này [54]. Ngoài ra, còn có nghiên cứu chế tạo hệ nano copolyme kết hợp của D-tocopheryl polyethylen glycol 1000 succinat và poly lactic acid mang

Paclitaxel + Curcumin ((Cur+PTX)-PLA-TPGS)) thử nghiệm trên tế bào ung thư gan Hep-G2 và tế bào ung thư biểu mô phổi LU-1 của tác giả Lê Thị Hảo và cộng sự. Thử nghiệm độc tính trên các dòng tế bào này đã cho thấy hiệu quả rõ rệt so với sử dụng paclitaxel tự do, tỉ lệ sống sót của các tế bào ung thư thấp hoặc bị chết hoàn toàn [55]. Năm 2020, Nguyễn Ngọc Hòa thực hiện đề tài 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 [56]. Một số nghiên cứu khác cũng được tiến hành như nghiên cứu bào chế hệ nano dihydroartemisinin-PLGA bao gói acid folic trong điều trị ung thư biểu mô của tác giả Phạm Hữu Phong [57]; nghiên cứu bào chế tiểu phân nano poly (acid lactic-co-glycolic) mang thuốc paclitaxel và artesunat của Trịnh Văn Lương [58]. Thêm vào đó, một số phức hệ Nano polyme dẫn truyền thuốc đã được tạo ra bởi TS. Hà Phương Thư và một trong những hệ nano đã được ứng dụng trong thực tế có thể kể đến là Cumar Gold Kare.

Nhóm nghiên cứu chúng tôi cũng đã đạt được một số kết quả trong việc nghiên cứu hệ nano dẫn truyền thuốc định hướng điều trị ung thư. Trong đó, nghiên cứu vào năm 2015, bằng phương pháp tủa nano, nhóm nghiên cứu đã sử dụng polyme PLGA-PEG để tổng hợp hạt nano mang thuốc Docetaxel. Chúng tôi đã thu được hệ nano có kích thước trung bình là 105 nm với thế zeta -25 mV [59]. Năm 2016, nhóm nghiên cứu đã sử dụng polyme như poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate (PLA-TPGS) để làm nguyên liệu tạo hệ dẫn truyền thuốc VX680. Kết quả là đã tạo ra một hệ nano dẫn truyền thuốc với kích thước hạt nano trung bình là 63 nm, thế zeta là -30 mV với hiệu quả bao gói đạt 76%. Tác động gây độc hiệu quả của hệ nano so với thuốc VX680 tự do cũng được chứng minh khi thử nghiệm trên dòng tế bào Hela (giá trị IC_{50} của hệ nano PLA-TPGS thấp hơn 3.4 lần so với VX680 tự do) [60]. Trong một nghiên cứu khác, nhóm nghiên cứu cũng đã sử dụng một loại polyme khác là poly(ethylene glycol)-block-poly (ϵ -caprolactone) để ứng dụng thành công cho sự bao gói thuốc điều trị ung thư docetaxel và curcumin bằng việc sử dụng phương pháp tủa nano kết hợp với siêu âm. Sau đó sử dụng phương pháp đồng bộ hóa áp lực cao bằng máy EmulsiFlexTM-C5 High Pressure Homogenizer

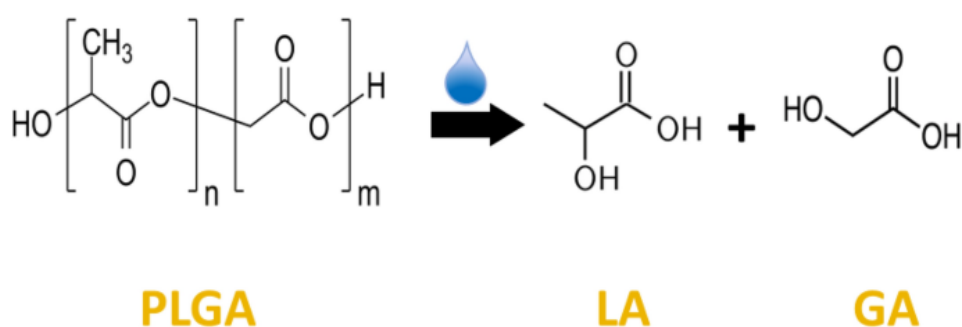
(INVESTIN, Ottawa, Canada) để tạo ra các hạt nano polyme với kích thước trung bình dao động từ 45-80 nm. Thử nghiệm độc tính tế bào được thực hiện bằng kit [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) trên tế bào Hela. Giá trị IC_{50} sau 24 giờ cũng cho giá trị thấp hơn ($1.52 \mu\text{g ml}^{-1}$) so với mẫu chỉ xử lý bằng docetaxel ($3.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) [61]. Năm 2016, nhóm nghiên cứu đã sử dụng polyme PLGA kết hợp với polyme PEG để tổng hợp các hạt nano bao gói các phân tử thuốc docetaxel và các hạt nano này có kích thước trung bình từ 80 – 100 nm. Tác động gây độc khi thử nghiệm trên hai dòng tế bào ung thư vú (BT474) và ung thư ruột kết (HCT116) cũng đã được chứng minh [62].

1.3.3. Nano polyme PLGA

Poly (acid lactic-co-glycolic) (PLGA) là nano polyme tổng hợp được sử dụng rộng rãi trong việc phát triển các hạt nano mang thuốc trong điều trị ung thư. PLGA đã được FDA chấp thuận cho các ứng dụng lâm sàng sử dụng qua đường tiêm do các đặc tính nổi bật của nó như độc tính thấp, tính tương thích sinh học cao trong điều trị ung thư [63]. Đặc tính an toàn sinh học của PLGA đã được chứng minh ở nhiều nghiên cứu. Thử nghiệm độc tính của nano PLGA trên nhiều dòng tế bào như tế bào ung thư biểu mô ruột kết (Caco-2), tế bào ung thư ruột ở người (Colo 205) và dòng tế bào Madin-Darby bovine kidney (MDBK) ở bò cho thấy hệ này không gây độc lên tế bào [64]. Trong các nghiên cứu gần đây, hệ nano PLGA cũng chứng minh không gây độc tính lên chuột [65]. Tiềm năng ứng dụng làm chất mang hoạt chất của hệ PLGA trong điều trị ung thư cũng được chứng minh. Để loại bỏ tình trạng kháng thuốc và tái phát các tế bào ung thư ở vú, Swaminathan và cộng sự đã điều chế các hạt nano PLGA để nhắm mục tiêu tế bào ung thư thông qua việc kết hợp với kháng thể đơn dòng chống CD133 bao gói paclitaxel. Kết quả nghiên cứu *in vivo* trên chuột đã cho thấy trọng lượng khối u khi xử lý bằng hệ nano đã giảm rõ rệt ($518,6 \pm 228 \text{ mm}^3$) so với xử lý bằng paclitaxel tự do ($1370 \pm 295 \text{ mm}^3$) sau 63 ngày điều trị [66]. Tương tự, trong thí nghiệm của Rafiei khi nghiên cứu hệ nano PLGA-PEG vận chuyển docetaxel cũng cho thấy hiệu quả trong dẫn truyền hoạt chất tăng gấp 3.7 lần so với sử dụng docetaxel tự do [67]. Năm 2020, hiệu quả của hệ nano PLGA bao gói doxorubicin trong điều trị tế bào ung thư vú MCF-7

cũng được chứng minh. Hệ nano PLGA – Doxorubicin đã làm giảm kích thước khối u từ $26 \pm 2 \text{ mm}^3$ xuống $23 \pm 2 \text{ mm}^3$ sau khi điều trị [68].

Ngoài ra, PLGA là một copolyme được polyme hóa từ 2 monome là acid glycolic (GA) và acid lactic (LA) (Hình 1.8). Các tỉ lệ monome khác nhau được sử dụng để tạo ra các hệ nano PLGA khác nhau, ví dụ PLGA 50:50 có nghĩa là cả 2 monome (LA và GA) đều có mặt với số lượng bằng nhau, tương tự như PLGA 75:25 hay PLGA 85:15 thì có nghĩa tỉ lệ LA/GA tương ứng là 75:25 và 85:15 [69]. Do có đặc tính hóa học của LA và GA khác nhau (LA có tính kỵ nước và phân hủy thấp, trong khi GA ưa nước và dễ phân hủy), vì vậy 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 [70]. Trong nhiều nghiên cứu cũng đã chứng minh PLGA 50:50 là loại PLGA thường được sử dụng làm chất vận chuyển thuốc nhờ khả năng dễ tan trong nước và bao gói hoạt chất tốt [70].



Hình 1.8. Cấu trúc hóa học và sự thủy phân của PLGA [69]

Tuy nhiên, ứng dụng của hệ nano PLGA bị hạn chế vì quá trình opsonin hóa (opsonization) và thanh thải nhanh bởi hệ thống lưới nội mô khi phân phối qua đường tiêm. 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 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 [71]. Do đó, 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, lựa chọn tỉ lệ LA/GA phù hợp thì cải tiến bề mặt của PLGA cũng được sử dụng để tăng độ ổn định của hệ nano này. Các nhà khoa học đã nghiên cứu nhiều cách khác nhau để tối ưu hóa về mặt PLGA như bằng polyethylene glycol (PEG), polyethylene oxide (PEO), chitosan, lecithin, acid

hyaluronic (HA) hay acid folic..v..v. Trong nghiên cứu của Wohlfart và cộng sự, hệ nano PLGA được cải tiến với lecithin dẫn truyền doxorubicin cho kết quả diện tích khối u trung bình giảm (9.6 – 10.7 mm²) so với sử dụng doxorubicin tự do (21.7 mm²) trong mô hình chuột mang u nguyên bào thần kinh đệm [72]. Trong một nghiên cứu khác, tác giả Ahmad đã đánh giá khả năng được động học *in vivo* của hệ nano PLGA cải tiến bề mặt bằng chitosan mang docetaxel trong điều trị ung thư đường ruột. Hệ nano được tạo thành PLGA-chitosan-docetaxel đã thể hiện khả năng tăng cường tính thấm của hoạt chất trong ruột cao hơn so với hệ nano PLGA-docetaxel (gấp 2.2 lần) và docetaxel tự do (gấp 5 lần) [73]. Ngoài ra, acid hyaluronic (HA) cũng được sử dụng để kết hợp với PLGA dẫn truyền docetaxel trong điều trị ung thư vú CD44. Kết quả cũng cho thấy hệ Nano PLGA-HA-docetaxel kéo dài thời gian lưu thông của hoạt chất trong hệ tuần hoàn cao gấp 2.5 và 3.8 lần so với hệ nano PLGA-docetaxel và docetaxel tự do. Thêm vào đó, cải tiến bề mặt hạt nano PLGA bằng polyethylene glycol (PEG) cũng đang được sử dụng rất phổ biến. PEG là một polyme không độc, không gây miễn dịch và hòa tan tốt trong nước, polyme này cũng đã được FDA chấp thuận trong điều trị lâm sàng [67]. Sự kết hợp hệ nano copolyme PLGA-PEG đã nhận được nhiều chú ý như một công thức mới nhờ tiềm năng có khả năng không gây miễn dịch, có tính ổn định cao, an toàn và có thể cải thiện khả năng hòa tan của các loại thuốc hóa trị để điều trị các loại ung thư khác nhau. Năm 2020, Mousa và cộng sự nghiên cứu sử dụng hệ nano PLGA-PEG dẫn truyền di-indolylmethane và ellagic acid cho kết quả hệ làm giảm khả năng sống sót của tế bào ung thư tuyến tụy, đồng thời ngăn chặn sự phát triển và hình thành mạch khối u [74]. Trong một nghiên cứu khác, hệ nano PLGA-PEG mang 5-fluorouracil (5-FU) đã được chứng minh có cải thiện khả năng đóng gói, giải phóng hoạt chất trong điều trị ung thư vú trong nghiên cứu của Haggag và cộng sự [75]. Vì vậy, chức năng hóa bề mặt PLGA là một hướng đi tiềm năng để tạo ra hệ nano polyme bao gói hoạt chất ổn định, đem lại hiệu quả trong điều trị.

1.4. Hệ nano mang Honokiol

Một số nghiên cứu đã và đang được tiến hành thực hiện để phát triển các hệ nano bao gói HK trong điều trị ung thư. Lou và cộng sự đã tạo ra hệ liposomal dẫn truyền HK và thử nghiệm nó trên các mô hình ung thư buồng trứng A2780s ở người. Kết quả nghiên cứu cho thấy sử dụng liposomal-HK có

thể dẫn đến ức chế sự phát triển của các tế bào ung thư, sự gia tăng rõ rệt của quá trình apoptosis ở các tế bào khối u đã được quan sát (84-88%), đồng thời khi thử nghiệm *in vivo* trên chuột cũng cho thấy thể tích khối u của mẫu xử lý bằng hệ nano so với xử lý bằng HK tự do nhỏ hơn đáng kể với giá trị tương ứng là $222 \pm 71 \text{ mm}^3$ so với $1823 \pm 606 \text{ mm}^3$ [76]. Kết quả tương tự đã được quan sát thấy trong mô hình ung thư ruột kết CT26, trong đó việc kết hợp của liposomal HK với cisplatin dẫn đến ức chế sự phát triển của khối u dưới da [77]. Ngoài ra, Gong và cộng sự đã phát triển các poly(ethylene glycol)-poly(" -caprolactone)-poly(ethylene glycol) (PECE) kết hợp HK để thử nghiệm trên dòng tế bào ung thư phổi A549. Kết quả thử nghiệm độc tính tế bào cho thấy hệ thống phân phối thuốc được tổng hợp là một chất mang an toàn, HK được đóng gói vẫn giữ được tác dụng kháng u mạnh (tỉ lệ sống sót của tế bào ung thư sau 48 giờ xử lý giảm còn 30%) [78]. Thêm vào đó, Zheng đã phát triển nano monomethoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid) (MPEG-PLA) thông qua polyme hóa mở vòng và sau đó được xử lý thành hạt nano để phân phối HK. Kết quả chỉ ra rằng chỉ có 53% HK được giải phóng khỏi hạt trong vòng 24 giờ, trong khi 100% HK tự do được phát tán ra môi trường bên ngoài. Điều này cho thấy rằng nano MPEG-PLA mang HK là công thức có thể đáp ứng yêu cầu tiêm tĩnh mạch. Hơn nữa, các hạt nano MPEG-PLA-HK đã làm giảm đáng kể khả năng sống sót của tế bào ung thư buồng trứng ở người so với HK tự do [79]. Trong một nghiên cứu gần đây, các hạt nano zein biến tính bằng axit polysialic (PSA-Zein-HK) được thiết kế để phân phối có mục tiêu nhằm nâng cao hiệu quả phân phối và phân phối sinh học đặc hiệu của HK tại các vị trí khối u. Kết quả công bố cho thấy hệ nano PSA-Zein-HK có khả năng duy trì sự giải phóng HK 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 không xử lý hoạt chất [80]. Năm 2020, Haggag và đồng nghiệp đã nghiên cứu tác động của hệ nano PLGA dẫn truyền HK trong điều trị bệnh ung thư vú MCF-7. Kết quả của nghiên cứu đã cho thấy hệ này thể hiện tác dụng gây độc đáng kể lên tế bào ung thư, ức chế thành công sự hình thành mạch và tăng cường quá trình apoptosis của các tế bào ung thư. Hơn nữa, kết quả nghiên cứu *in vivo* trên chuột cũng cho kết quả khả quan khi giảm được 80% sự phát triển của khối u, ức chế 85% trọng lượng khối u sau khi điều trị [81]. Ngoài ra, hệ nano epigallocatechin-3-gallate bao gói HK (CE-HK) đã được phát triển bởi Tang và cộng sự trong nghiên cứu

điều trị tế bào ung thư gan HepG2. Hệ nano CE-HK sử dụng với liều lượng 40mg/kg đã được chứng minh trong nghiên cứu này là ức chế sự phát triển của khối u lên tới 83.55% cao hơn nhiều so với mức ức chế khi sử dụng HK tự do là 30.15% [82]. Những thành công bước đầu đã đem đến hướng phát triển tiềm năng trong nghiên cứu hệ nano mang hoạt chất HK trong điều trị ung thư.

Ngoài ra, tiềm năng kháng u của HK mặc dù đã được khai thác trong nhiều nghiên cứu trên thế giới. Tuy nhiên tại Việt Nam, hoạt chất HK mới chỉ được biết đến như một loại trà thảo mộc, và vẫn chưa có nghiên cứu nào tổng hợp tạo hệ nano polyme PLGA dẫn truyền HK trong nghiên cứu ở dạng dung dịch thuốc tiêm để định hướng trong điều trị ung thư. Thêm vào đó, để tạo ra được một hệ dẫn thuốc có khả năng bao gói tốt phụ thuộc dẫn nhiều vào loại polyme, ngay cả trong một loại polyme PLGA cũng có rất nhiều loại khác nhau do khối lượng phân tử khác nhau, tỉ lệ phân tử khác nhau. Vì vậy, việc tổng hợp và tối ưu hệ nano polyme PLGA là rất cần thiết để lựa chọn được dạng nano polyme hiệu quả nhất trong việc tạo các hệ nano dẫn truyền HK trong điều trị ung thư.

Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

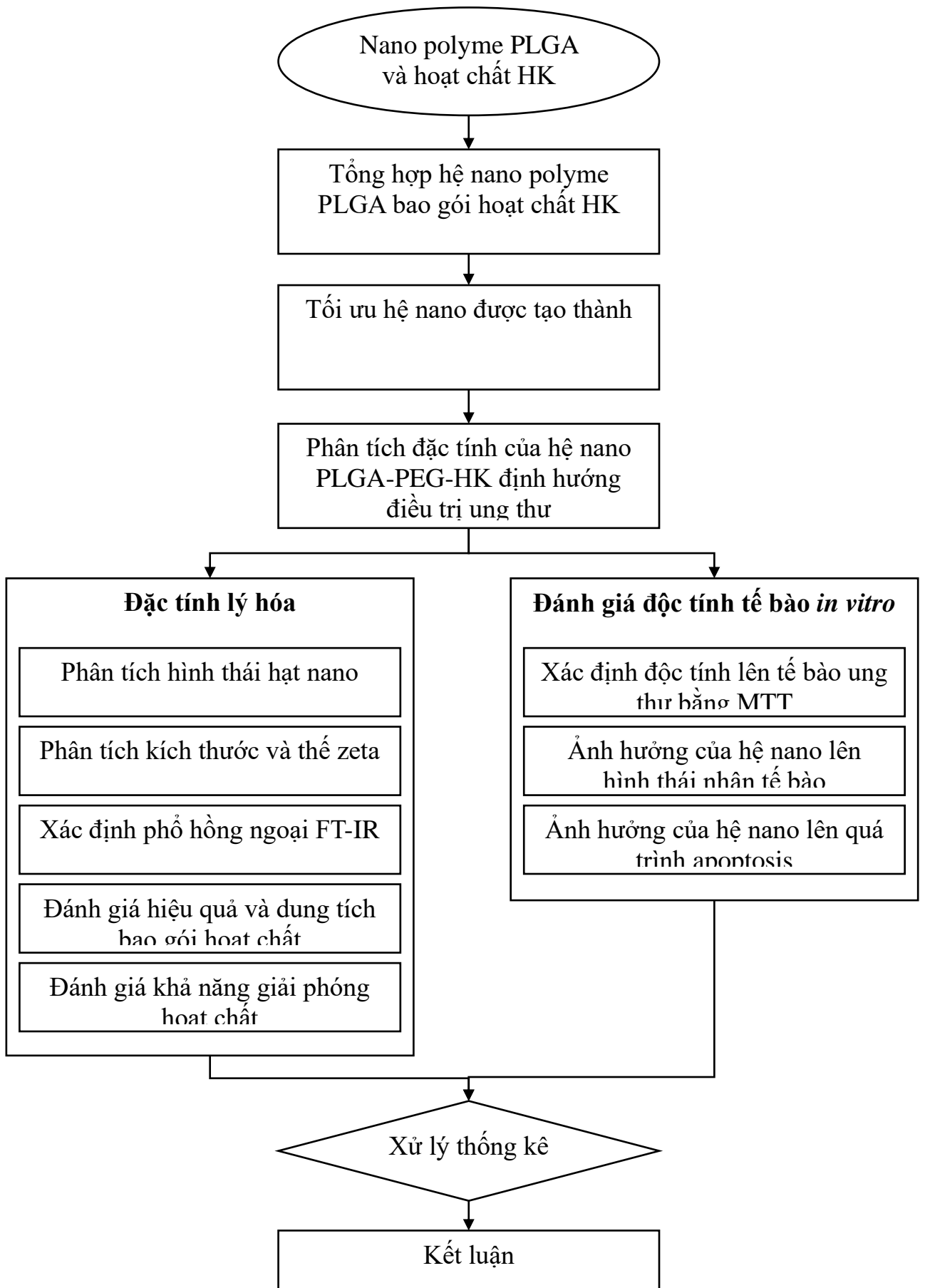
2.1. Đối tượng nghiên cứu

- HK được tách chiết từ cây hậu phác (*Cortex M. officinalis*) và được cung cấp từ Phòng Sinh hóa thực vật, Viện Công nghệ Sinh học với độ tinh khiết > 95%.
- Các loại polymer: Poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA 50:50) có trọng lượng phân tử ~ 7.000 – 17.000, poly (ethylene glycol 2-aminoethyl ether acetic acid (NH₂-PEG-POOH), trọng lượng phân tử ~ 3400), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC) và N-hydroxysuccimide (NHS) được mua từ Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).
- Tất cả các dung môi hữu cơ như acetone, methanol, ethanol, acetonitrile và các đệm cũng như các hóa chất khác được mua từ Fisher Scientific.
- Các dòng tế bào ung thư phổi A549, ung thư vú BT474 được cung cấp từ Viện Công nghệ sinh học.
- Các hóa chất như kit thử độc tính MTT và các hoá chất khác dùng trong nghiên cứu cũng được mua từ các Hãng Sigma, Abcam và Invitrogen.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. 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 3.1).



Sơ đồ 3.1. Sơ đồ quy trình nghiên cứu

2.2.2. Tạo hạt nano polymer PLGA bao gói thuốc HK

❖ *Phương pháp tạo hệ nano dẫn truyền thuốc*

Phương pháp nhũ tương hóa

Phương pháp nhũ tương hóa được tiến hành theo Kadriye và cộng sự có sự cải tiến [84]. Quy trình được tiến hành như sau:

HK và polyme PLGA được hòa tan trong dung môi hữu cơ bao gồm dichloromethane (DCM) và propylene glycol. Dung dịch này sau đó được nhũ hóa bằng dung dịch poly(vinyl alcohol) (PVA) bằng bộ sonicator (70W, công suất 80% trong 2 phút). Tiếp theo, dung dịch nhũ tương nano được khuấy qua đêm ở nhiệt độ phòng. Các hạt nano được cô đặc bằng cách ly tâm ở 9.000 vòng/ phút trong 40 phút ở 4°C, sau đó được rửa bằng nước khử ion 3 lần để loại bỏ PVA dư thừa.

Phương pháp tủa nano

Phương pháp tủa nano để tổng hợp các hạt nano được tiến hành theo Le và cộng sự [59] được tiến hành như sau: 10mg copolymer và 1mg honokiol được hoà tan trong acetone. Hỗn hợp được cho vào dung dịch nước với tỷ lệ dung môi/nước là 1/5, hỗn hợp được khuấy nhẹ ở nhiệt độ phòng với thời gian từ 4-5 giờ. Acetone được loại hoàn toàn bằng máy cô quay chân không để cho bay hơi hết dung môi. Dung dịch hạt nano được đông khô bởi máy đông khô Modulyod trong 8 giờ (ThermoFisher, USA).

❖ *Gắn kết PLGA với PEG*

Sự gắn kết PLGA và PEG được thực hiện theo Le và cộng sự [59]: Hòa tan 150 mg PLGA trong 1ml dichloromethane (DCM). NHS và EDC cũng được hòa tan trong 1 mL DCM. Cho dung dịch EDC/NHS vào dung dịch PLGA rồi khuấy nhẹ. PLGA-NHS thu được sẽ được làm khô bằng máy cô quay chân không (BUCHI, B-169 Vacuum System). Sau khi được làm khô, lấy PLGA-NHS đã được làm khô hòa tan trong DCM và bổ sung thêm 10 COOH-PEG-NH₂ và 7.5 mg N, N-diisopropylethylamine (DIEA). Hỗn hợp dung dịch được khuấy nhẹ ở nhiệt độ phòng qua đêm. Tủa PLGA-PEG bằng hỗn hợp ete/methanol. Làm khô PLGA-PEG bằng máy cô quay chân không để loại bỏ hết ete và methanol.

2.2.3. Phân tích một số đặc tính của hệ nano dẫn truyền HK

2.2.3.1. Đánh giá các đặc tính lý hóa

❖ *Phân tích hình thái hạt nano*

Hình dạng của các hạt nano được phân tích bởi hệ thống kính hiển vi điện tử quét SEM (Scanning electron microscopy - Hitachi S-4800 FE-SEM).

❖ *Phân tích kích thước và thế zeta*

Kích cỡ trung bình của hạt nano và chỉ số đa dạng (PDI) của dung dịch nano được phân tích bởi sự tán xạ ánh sáng động học (dynamic light scattering-DLS) cùng với thế zeta của dung dịch nano được xác định bằng công nghệ M3-PALS. Ba thông số của mẫu được phân tích bằng máy Zetasizer Nano ZS (Malvern instruments Ltd., United Kingdom) ở 25°C.

❖ *Xác định phổ hồng ngoại FT-IR*

Trong thí nghiệm đánh giá tương tác lý hóa của hệ nano dẫn truyền HK, chúng tôi đã sử dụng phương pháp phổ hồng ngoại (Fourier Transformation InfraRed - FTIR) để xác định các đỉnh đặc trưng của các liên kết được hình thành trong các phản ứng hóa học, sự tương tác giữa các nhóm chức, chức năng hóa hạt nano để tạo thành hệ nano mang thuốc. Mẫu được phân tích trong vùng từ 550-4000 cm^{-1} sử dụng thiết bị phân tích hồng ngoại Thermo Scientific Nicolet Nexus 670 (Mỹ) [92].

❖ *Đánh giá hiệu quả và dung tích bao gói thuốc*

Hiệu quả bao gói HK (Encapsulation efficiency – EE)

Hiệu quả bao gói chất của hệ nano PLGA-PEG-HK được xác định như sau [100]: Hỗn dịch tiểu phân nano - HK với nồng độ 3mg/ml được ly tâm bằng ống ly tâm siêu lọc 100K của Pall Corporation (USA) ở tốc độ 2700 g/10 phút để loại bỏ phần HK không được bao gói. Phần HK thu được trong dịch được phân tích bởi quang phổ UV-Vis bởi máy đọc quang phổ NanoDrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific) dựa vào đường chuẩn HK. Đường chuẩn của HK được xác định theo một dải nồng độ cho trước của HK từ 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1 và 2 $\mu\text{g/ml}$. Hiệu quả bao gói thuốc được xác định bởi lượng HK được bao gói so với lượng HK tổng số được sử dụng trong công thức tổng hợp rồi nhân với 100 (công thức 1).

Dung tích bao gói HK (Loading capacity - LC)

Dung tích bao gói HK được xác định như sau [100]: Lượng HK được tải trong hạt nano được xác định bằng trọng lượng của HK trong hạt nano so với trọng lượng tổng số của hệ nano PLGA-PEG-HK và được tính toán theo công thức 2. Quy trình ngắn gọn như sau: khoảng 3 mg hạt nano PLGA-PEG-HK (sau khi đã được ly tâm bằng ống ly tâm siêu lọc và thu phần tủa ở trên) được hòa tan trong 1 ml DCM (dichloromethane). Sau đó cho thêm 1 ml methanol để tủa phần polymer, thu lấy phần dịch nổi chứa HK và cho bay hơi hết dung môi và được hòa lại trong dimethyl sulfoxide (DMSO) và đem phân tích quang phổ UV-Vis dựa vào đường chuẩn HK ở trên.

$$EE (\%) = \frac{\text{HK tổng số} - \text{HK tự do}}{\text{HK tổng số}} * 100\% (1)$$

$$LC (\%) = \frac{\text{Khối lượng HK trong hạt nano}}{\text{Khối lượng của hạt nano}} * 100\% (2)$$

❖ Đánh giá khả năng giải phóng thuốc

Thí nghiệm đánh giá khả năng giải phóng hoạt chất của HK tự do và hệ nano PLGA-PEH-HK được tiến hành theo Lin và cộng sự có sự cải tiến [95]. Quy trình được tiến hành như sau: Thí nghiệm sử dụng túi thẩm tích (Spectral/Por® 4 MWCO 12000-14000 daltons, bề rộng 25 mm). 02 ml dung dịch nano được hút cho vào trong túi thẩm tích, kẹp chặt 2 đầu túi, gắn cố định vào thiết bị sau đó được cho vào 48ml dung dịch đệm phosphate (pH 7.4). Túi thẩm tích được đặt trong ống ly tâm và cho vào bể điều nhiệt ở nhiệt độ 37°C với tốc độ 100 vòng/phút. Sau từng thời điểm nhất định, 01 ml mẫu được hút để định lượng hàm lượng hoạt chất giải phóng và thay thế bằng một thể tích môi trường tương ứng.

2.2.3.2. Đánh giá độc tính tế bào *in vitro*

❖ Xác định độc tính của hệ nano lên tế bào ung thư bằng MTT

Để xác định độc tính tế bào, thí nghiệm sử dụng kit phân tích độc tính - MTT [59]. MTT là một phương pháp so màu để xác định lượng tế bào còn sống trong các thí nghiệm xác định độc tố của các chất. Hệ hạt nano không bao gói thuốc được sử dụng như mẫu đối chứng. Các tế bào A549 và BT474 được nuôi trên đĩa 96 giếng với mật độ tế bào là 5000 tế bào/giếng và được nuôi 24h trước khi tiến hành thí nghiệm. Sau đó, môi trường nuôi cấy được thay thế bằng 100 µl

của HK hoặc dẫn chất nano HK với nồng độ HK trong các mẫu là 1, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ và được ủ trong 72 h ở 37°C . Sự sống sót của tế bào được phân tích bằng kit MTT, và lượng sản phẩm formazan được xác định bằng máy quang phổ (BioTek Synergy® HT microplate reader, USA) ở bước sóng 490 nm. Mỗi phân tích được lặp lại 3 lần. Dùng phần mềm Exel để xử lý số liệu, tính chỉ số IC_{50} . Sự sống sót của tế bào (SSTB) được tính toán bằng công thức sau:

$$\text{SSTB (\%)} = (\text{ODmẫu}/\text{ODđối chứng}) \times 100$$

❖ ***Đánh giá ảnh hưởng của hệ nano lên hình thái nhân tế bào***

Tế bào ung thư (3×10^4 tế bào/ mL) được nuôi vào các đĩa 6 giếng và được xử lý bằng 20 μg hệ nano dẫn truyền HK trong 24 giờ. Sau 24 giờ, nhuộm nhân bằng thuốc nhuộm DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng (30 μL / đĩa), rửa lại bằng PBS 1X x 3 lần (bọc giấy bạc để tránh ánh nắng). Sau đó, tế bào được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang Nikon Ti E Eclipse kết hợp với hệ thống kính đồng tiêu. Bước sóng kích thích 341 nm để phát hiện DNA nhân (phát quang ở bước sóng 408nm – màu xanh). Hình ảnh được phân tích trên phần mềm ImageJ.

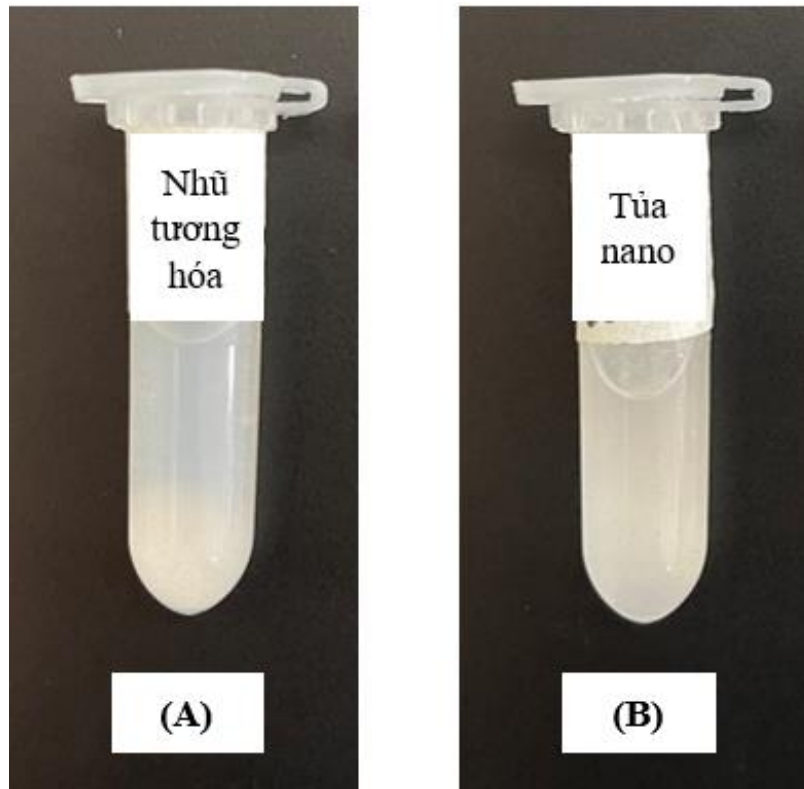
❖ ***Đánh giá ảnh hưởng của hệ nano lên quá trình gây chết tế bào ung thư (apoptosis)***

Để xác định xem khả năng sống sót của các tế bào được xử lý bằng nano polymer PLGA-HK giảm có phải là do quá trình chết theo chu trình - apoptosis không, tế bào sau khi được xử lý dẫn chất trên được tiến hành nhuộm kit phát hiện apoptosis Annexin V-PE. Mỗi thí nghiệm được lặp đi lặp lại ít nhất ba lần. Phương pháp thực hiện được tiến hành cụ thể như sau: Pha loãng 10X Binding Buffer thành 1X bằng nước cất (1ml 10X Binding Buffer + 9 ml dH₂O). Sau đó, tế bào A549 được rửa bằng PBS, và 1 lần trong Binding Buffer 1X. Tái sử dụng các tế bào trong Binding Buffer 1X ở $1-5 \times 10^6$ /ml. Tiếp theo, thêm 5 μL Annexin V với fluorochrome PE vào 100 μL huyền phù tế bào và ủ trong 10-15 phút ở nhiệt độ phòng. Tế bào sẽ được rửa trong 1X Binding Buffer và tái sử dụng trong 200 μL của 1X Binding Buffer. 5 μL dung dịch nhuộm Propidium Iodide Staining Solution (cat. 00-6990) hoặc 7-AAD Viability Staining Solution sẽ được thêm vào dung dịch. Dung dịch được phân tích bằng phương pháp BD Flow Cytometry [98].

Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tạo hệ nano - HK

Hiện nay có nhiều phương pháp để tạo hạt nano bao gói hoạt chất, trong số đó, các phương pháp được sử dụng phổ biến là nhũ tương hóa và tủa nano [85-86]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tạo hệ nano mang HK bằng hai phương pháp trên. Đầu tiên, chúng tôi sử dụng nguyên liệu để bao gói HK là PLGA. Kết quả cho thấy bằng phương pháp nhũ tương hóa, dung dịch thu được có hiện tượng tủa một phần (hình 3.1A). Trong khi tổng hợp bằng phương pháp tủa nano, dung dịch nano tạo thành có độ đồng nhất tốt hơn (hình 3.1B).



Hình 3.1. Hệ nano PLGA-HK tạo bằng phương pháp nhũ tương hóa (A) và phương pháp tủa nano (B)

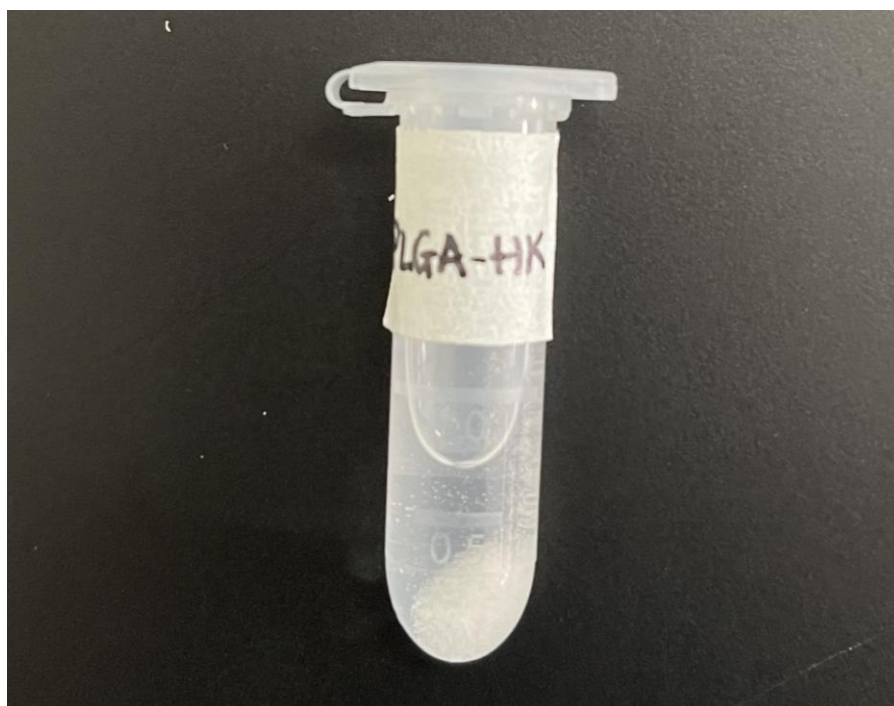
Kết quả này có thể được giải thích là do bên cạnh những ưu điểm như: cải thiện sinh khả dụng của thuốc, không độc và không gây kích ứng, phương pháp nhũ tương hóa vẫn có một số nhược điểm như bề mặt thiếu ổn định do phải qua nhiều bước làm sạch. Ngoài ra, quá trình tổng hợp bằng phương pháp nhũ tương hóa không đảm bảo sự phân bố đồng đều của các hoạt chất trong hệ nano, từ đó

dẫn đến hiện tượng tủa một phần. Trong khi đó, phương pháp tủa nano đơn giản hơn, được sử dụng để bao bọc hoạt chất kỵ nước trong các hạt nano với mức độ tiêu thụ năng lượng thấp. Phương pháp này dẫn đến sự hình thành tức thời của các hạt nano bao gói hoạt chất và là quy trình một bước do đó dễ thực hiện, mang lại sự ổn định và đồng nhất tốt [85]. Phương pháp tủa nano cũng được nhiều tác giả lựa chọn để tạo hệ nano bao gói hoạt chất trong điều trị ung thư điển hình như tạo hệ nano PLGA-lipid hybrid bao gói paclitaxel trong nghiên cứu của Godara và cộng sự năm 2020 [86], nghiên cứu của Alshamsan và cộng sự chế tạo hệ nano PLGA bao bọc cucurbitacin [85]. Vì vậy, từ kết quả thu được trong thử nghiệm, phương pháp tủa nano được chúng tôi lựa chọn để tạo hệ nano dẫn truyền HK.

❖ *Chức năng hóa bề mặt hệ nano PLGA-HK bằng PEG*

PLGA là nano polyme đã được FDA chấp thuận cho các ứng dụng lâm sàng nhờ các đặc tính nổi bật như độc tính thấp, tính tương thích sinh học cao trong điều trị ung thư [81]. Do đó, nhiều nghiên cứu đã sử dụng PLGA trong chế tạo hạt nano dẫn truyền hoạt chất. Điển hình như nghiên cứu của Wohfart và cộng sự tạo hệ nano PLGA-doxorubicin [72] hay như nghiên cứu tổng hợp hệ nano PLGA-cucurbitacin I của Alshamsan [85]..v.v.

Ở nghiên cứu này chúng tôi cũng sử dụng PLGA để bao gói HK bằng phương pháp tủa nano để tạo hệ nano. Tuy nhiên, từ ngày thứ 10, hệ nano này bắt đầu có hiện tượng tủa xảy ra và sau 01 tháng lượng tủa xuất hiện nhiều nhất (hình 3.2), mặc dù được lưu trữ ở điều kiện 4°C. Hiện tượng này có thể được giải thích là do bên cạnh những đặc tính ưu việt, nano PLGA-HK vẫn còn những hạn chế là chưa có sự ổn định theo thời gian.



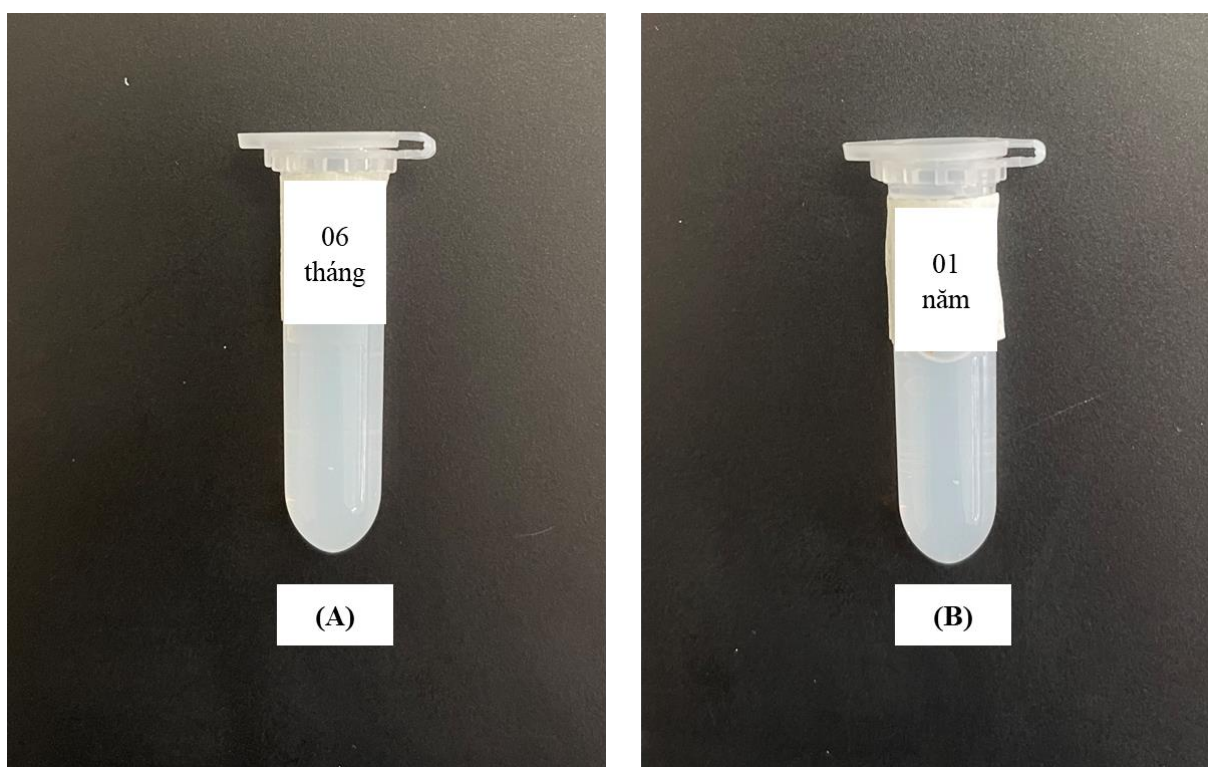
Hình 3.2. Hệ nano PLGA-HK bị tủa sau 1 tháng

Vì vậy, để tăng tính ổn định của hệ nano PLGA trong dung dịch, các tác giả thường chức năng hóa bề mặt PLGA bằng nhiều chất khác nhau như chitosan, lecithin, PEO, PEG..v.v [72-74]. Trong nghiên cứu của Ahmad và cs đã tiến hành cải tiến bề mặt PLGA bằng chitosan, hệ nano PLGA-chitosan-docetaxel được tạo thành đã chứng minh hiệu quả tăng cường tính thấm của hoạt chất cao hơn 2.2 lần so với sử dụng hệ PLGA-docetaxel [73]. Trong nghiên cứu khác, tác giả Wohfart và cs sử dụng cách tối ưu hóa PLGA bằng lecithin trong tạo hệ nano mang doxorubicin điều trị u nguyên bào thần kinh [72]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn PLGA được chức năng hóa bằng PEG, do PEG là một polyme hòa tan tốt trong nước, an toàn, không gây miễn dịch và cũng đã được FDA chấp thuận trong điều trị lâm sàng [87].

Kết quả của thí nghiệm khi sử dụng copolyme PLGA-PEG bao gói HK đã tạo thành dung dịch nano đồng nhất. Dung dịch nano này được lưu giữ ở điều kiện 4°C. Sau khoảng thời gian 6 tháng và 1 năm lưu giữ, dung dịch nano này đều cho hình ảnh hệ tạo thành không xuất hiện tình trạng bị biến đổi, bị tủa như hệ nano PLGA-HK (hình 3.3). Kết quả này có thể được giải thích là do khi kết hợp giữa PLGA và PEG sẽ tạo thành hệ thống phân phối thuốc nano kết cấu lõi – vỏ. Trong cấu trúc này, HK được bao gói trong phần lõi PLGA bằng lực liên kết kỵ nước. Phần vỏ PEG ưa nước sẽ giúp hệ nano copolyme PLGA-PEG tăng

khả năng phân tán tốt trong môi trường và giúp cho độ ổn định của hệ được tạo thành tốt hơn [83].

Ngoài ra, hệ nano PLGA còn bị hạn chế khi phân phối qua đường tiêm do quá trình opsonin hóa và thanh thải nhanh bởi hệ thống lưới nội mô [71]. Các nghiên cứu đã chứng minh 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 hệ thống thực bào [99]. Các tác giả khác cũng cho thấy những kết quả tương tự điển hình Rafiei và cộng sự đã chứng minh hệ nano PLGA-PEG có hệ cấu trúc dược động học tốt hơn, tốc độ giải phóng thuốc hiệu quả hơn so với hệ nano PLGA [67]. Như vậy, việc sử dụng polyme PLGA có gắn thêm PEG để bao gói hoạt chất HK bằng phương pháp tủa nano đã tạo ra được một hệ nano có độ đồng nhất cao.



Hình 3.3. Hình ảnh hệ nano PLGA-PEG-HK qua thời gian

(A) Hệ nano PLGA-PEG-HK sau 6 tháng

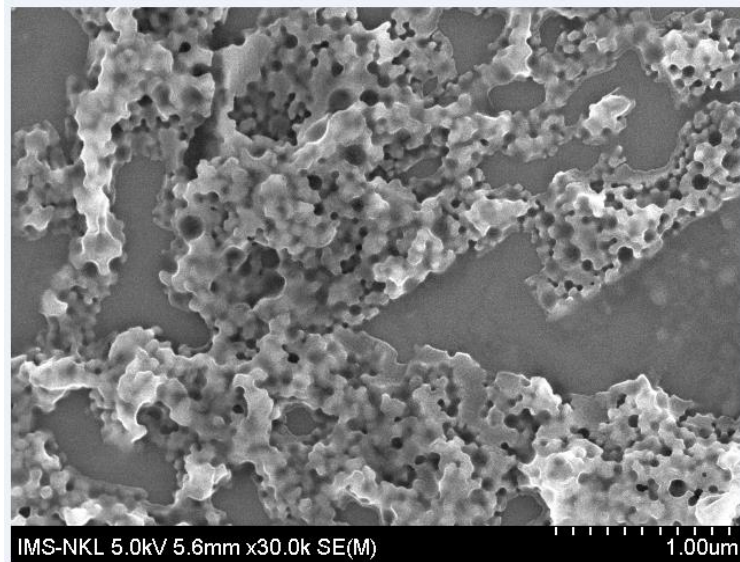
(B) Hệ nano PLGA-PEG-HK sau 1 năm

3.2. Kết quả phân tích một số đặc tính của hệ nano PLGA-PEG-HK

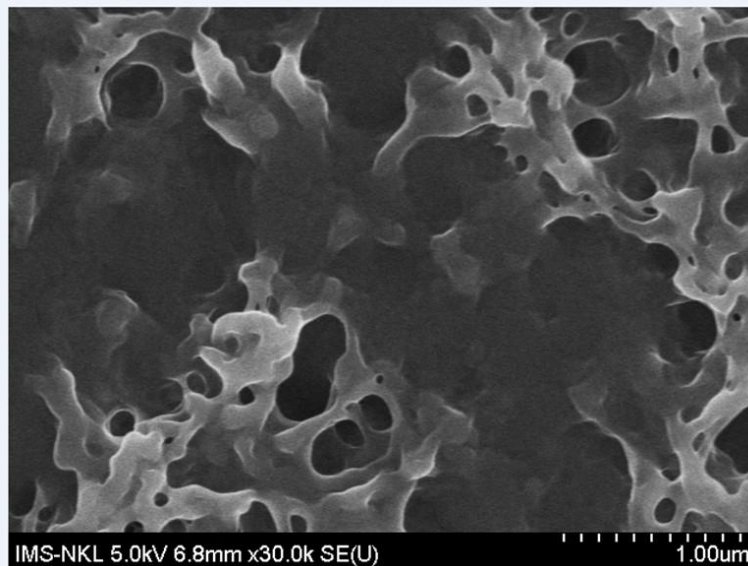
3.2.1. Kết quả đánh giá các đặc tính lý hóa của hệ nano PLGA-PEG-HK

3.2.1.1. Phân tích hình thái hạt nano

Hình thái hệ nano PLGA-PEG-HK sau khi tổng hợp được thể hiện trong hình 3.4. Ảnh SEM cho thấy hệ nano PLGA-PEG-HK tạo thành có dạng hình cầu, trơn nhẵn. Trong khi đó, so sánh với hình thái của hệ nano PLGA-HK quan sát ở hình 3.5 cho thấy hệ này gần như là hình thành các mảng hạt. Kết quả này là do hợp phần ưu nước PEG trong thành phần cấu tạo giúp copolyme PLGA-PEG có khả năng phân tán tốt và ổn định trong môi trường nước [21]. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Beletsi và cộng sự đối với hệ nano copolyme phân phối thuốc [87].



Hình 3.4. Hình ảnh hệ nano PLGA-PEG-HK thông qua SEM

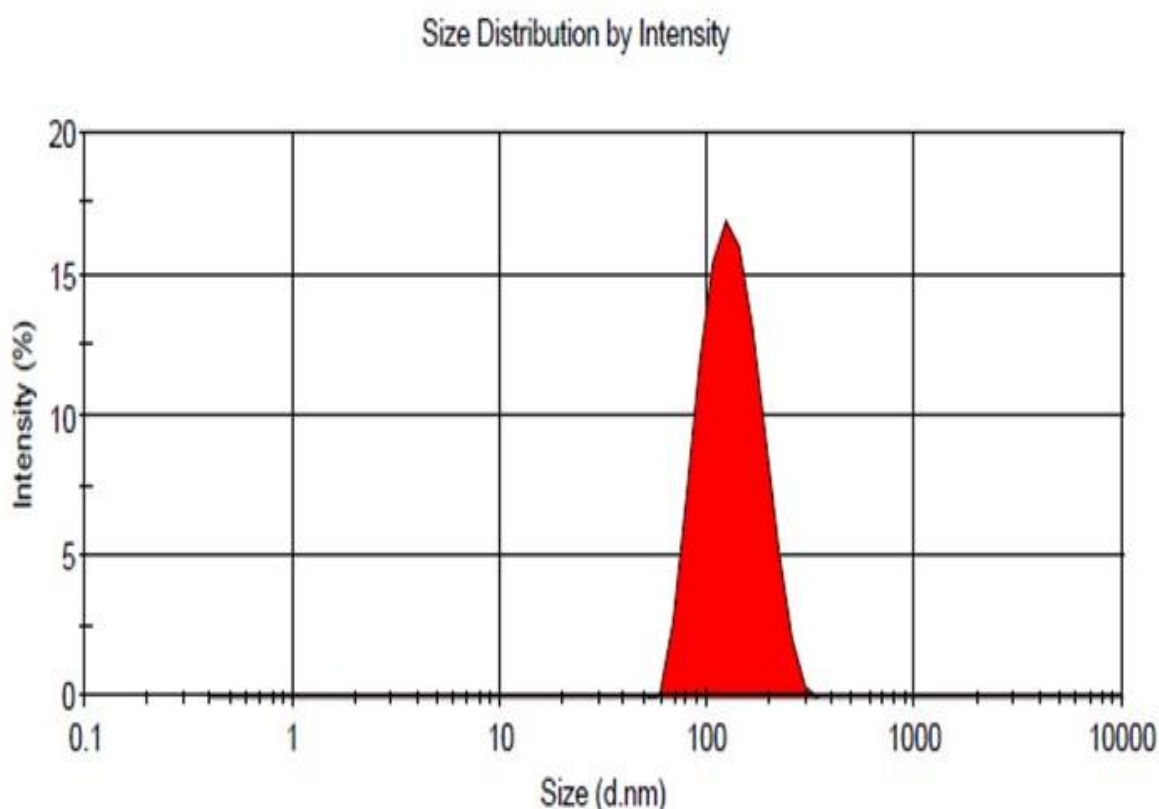


Hình 3.5. Hình ảnh hệ nano PLGA-HK thông qua SEM

3.2.1.2. Kích thước và thế zeta của hệ nano PLGA-PEG-HK

Phân tích kích thước

Kích thước hạt là một trong những thông số quan trọng của hệ nano phân phối thuốc đến khối u thông qua hiệu ứng EPR [30]. Để đánh giá sự phân bố kích thước của hệ nano PLGA-PEG-HK, dung dịch nano được phân tích thông qua DLS. Kết quả phân tích cho thấy hệ nano PLGA-PEG-HK được tạo thành có kích cỡ hạt trung bình là 138.51 ± 3.02 nm (hình 3.6). Một số nghiên cứu đã chứng minh, hệ nano có kích thước nhỏ hơn 70 nm sẽ bị đào thải khỏi hệ tuần hoàn nhanh hơn. Trong khi đó hạt nano có kích thước lớn hơn 200 nm cũng có thể bị loại bỏ do bị hấp phụ bởi đại thực bào và mắc kẹt trong các cơ quan của hệ thống lưới nội mô. Do đó, kích thước hạt nano tối ưu cho các ứng dụng phân phối thuốc là từ 70-200 nm [31]. Vì vậy, hạt nano PLGA-PEG-HK trong nghiên cứu này khá phù hợp cho việc sử dụng phân phối thuốc qua đường tiêm truyền.



Hình 3.6. Kích thước hạt và độ phân tán của dung dịch nano PLGA-PEG-HK.

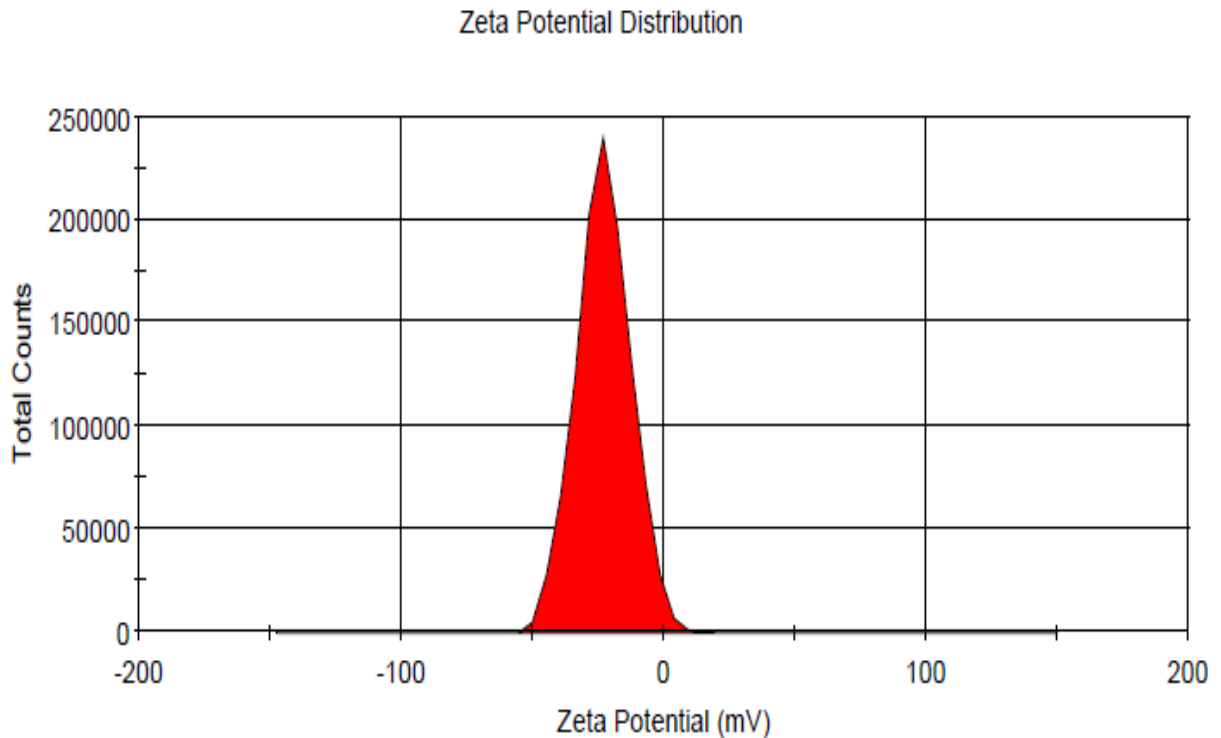
Hơn nữa, giá trị chỉ số đa dạng (polydispersity – PDI) cũng là một trong những đặc điểm được sử dụng để đánh giá sự đồng nhất của hệ nano. Giá trị PDI nằm trong khoảng từ 0 (đối với mẫu hoàn toàn đồng nhất) đến 1 (đối với mẫu có độ phân tán cao với nhiều quần thể kích thước hạt khác nhau). Giá trị PDI nhỏ hơn 0.2 đã được chứng minh là khoảng giá trị cho thấy mẫu có sự đồng nhất tốt đối với hệ phân phối thuốc dựa trên chất mang là polyme [88]. Giá trị PDI của hệ nano PLGA-PEG-HK thu được là $0.04 \pm 0,002$. Kết quả này cho thấy hệ được tạo thành có độ đồng nhất cao.

Xác định thế zeta

Đại lượng đặc trưng cho tính ổn định của hệ nano là thế zeta. Thế zeta cao (giá trị tuyệt đối) sẽ cho độ ổn định cao, hệ phân tán tốt và sẽ chống lại sự keo tụ. Theo nghiên cứu của Tantra và cộng sự, giá trị zeta nằm trong khoảng từ $\pm 15-30$ mV được cho là giá trị lý tưởng thể hiện sự ổn định của hệ nano [89]. Mặt khác, giá trị zeta thấp (giá trị tuyệt đối nhỏ hơn 5 mV) có thể dẫn đến hiện tượng hệ bị keo tụ [90].

Thế zeta của hệ nano PLGA-PEG-HK đo được giá trị trung bình là -24.09 mV ± 0.17 (hình 3.7). Kết quả này cho thấy hệ được tạo thành có độ ổn định cao, hạt phân tán tốt trong dung dịch.

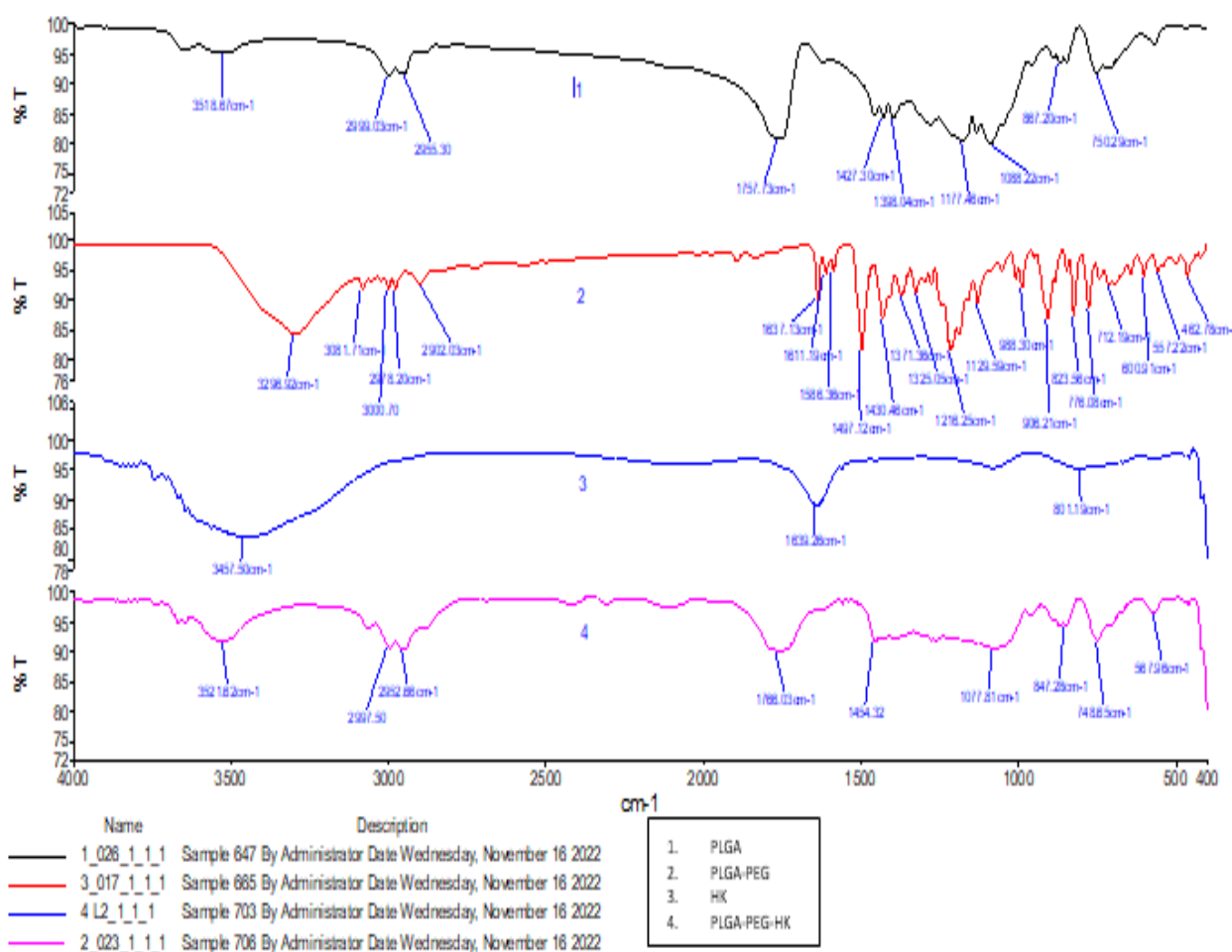
Điện thế bề mặt của hệ nano cũng là một thông số quan trọng ảnh hưởng đến sự tương tác, phân bố và chuyển hóa tiếp theo của hệ nano trong hệ tuần hoàn. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, các hạt nano điện tích bề mặt dương bị hấp thu bởi các đại thực bào nhiều hơn khi so sánh với các hệ nano mang điện tích bề mặt trung tính hoặc điện tích âm [90]. Điều này được giải thích là do các hạt có điện tích bề mặt nhất định sẽ hấp phụ các ion có điện tích trái dấu từ dung dịch. Vì vậy, khi phân phối thuốc trong hệ tuần hoàn, sự hiện diện của các protein huyết thanh tích điện âm sẽ hút các nano mang điện tích trái dấu và dẫn đến hình thành tập hợp các nano mang điện tích dương. Tập hợp có kích thước lớn có thể gây ra tắc mạch hoặc nhanh chóng bị đào thải bởi các đại thực bào [91]. Do đó, giá trị zeta âm của hệ nano PLGA-PEG-HK sẽ phù hợp cho nghiên cứu thông đường tiêm truyền. PEG hoạt động như một lớp chống lại sự tương tác bề mặt nano với các vật liệu khác như protein opsonin. Điều này cung cấp khả năng bảo vệ hiệu quả và góp phần tăng tính ổn định cho hệ nano phân phối thuốc.



Hình 3.7. Thế zeta của hệ nano PLGA-PEG-HK

3.2.1.3. Kết quả phân tích phổ hồng ngoại FT-IR

Thành phần hóa học và tương tác vật lý giữa hệ nano PLGA-PEG-HK được xác định bằng phổ hồng ngoại (FT-IR). Phương pháp FT-IR hoạt động trên cơ sở sự hấp thụ bức xạ hồng ngoại của chất cần nghiên cứu. Quang phổ hồng ngoại cho các dao động đặc trưng của các nhóm liên kết khác nhau dựa trên sự xuất hiện của các đỉnh (peak) đặc trưng trong vùng hồng ngoại. Sự xuất hiện của các peak này và sự dịch chuyển của các đỉnh này sẽ cho ta biết sự hình thành các liên kết đặc trưng, đồng thời liên kết giữa các nhóm chức. Vì vậy, khi phân tích bằng phổ FT-IR, ta sẽ thu được phổ hấp thụ dựa trên bước sóng đặc trưng của các nhóm chức, liên kết có sẵn, sau đó so sánh với phổ ghi được để suy ra cấu trúc của chất đang nghiên cứu. Đối với hệ nano dẫn truyền thuốc, phổ FT-IR là một trong những kỹ thuật được sử dụng nhiều nhất để khẳng định hệ nano đã được tạo thành công [92].



Hình 3.8. Phổ hồng ngoại FT-IR
 (1) PLGA; (2) PLGA-PEG; (3) HK; (4) PLGA-PEG-HK

Các phổ hồng ngoại FTIR của PLGA, PLGA-PEG, HK và hệ PLGA-PEG-HK được hiển thị trong hình 3.8. Phổ FT-IR của PLGA và copolyme PLGA-PEG cho thấy dao động nhóm OH trên PLGA xuất hiện ở vị trí 3518 cm⁻¹ đã dịch chuyển đến vị trí 3296 cm⁻¹ trên copolymer, ngoài ra dao động của nhóm CH₂ trên PLGA xuất hiện ở vị trí 1427 cm⁻¹ đã dịch chuyển đến vị trí 1430 cm⁻¹ trên phổ PLGA-PEG. Mặc khác liên kết C-H ở vị trí 2955 cm⁻¹ trên PLGA đã dịch chuyển đến vị trí 2900 cm⁻¹ của PLGA-PEG và dao động của nhóm C-O-C của PLGA xuất hiện ở vị trí 1757 cm⁻¹ đã dịch chuyển đến vị trí 1611 cm⁻¹ trên copolymer PLGA-PEG. Vị trí 1611 cm⁻¹ là dao động đặc trưng được hình thành trong phản ứng trùng ngưng. Kết quả này cho thấy rằng copolyme PLGA-PEG đã được tạo thành thông qua phản ứng trùng ngưng mở vòng polyme hóa giữa PLGA và PEG [92]. Trong phổ HK tự do (phổ 3), các giao động 3457 cm⁻¹ đặc trưng cho -OH. Một dải nằm ở 1639 cm⁻¹ đại diện

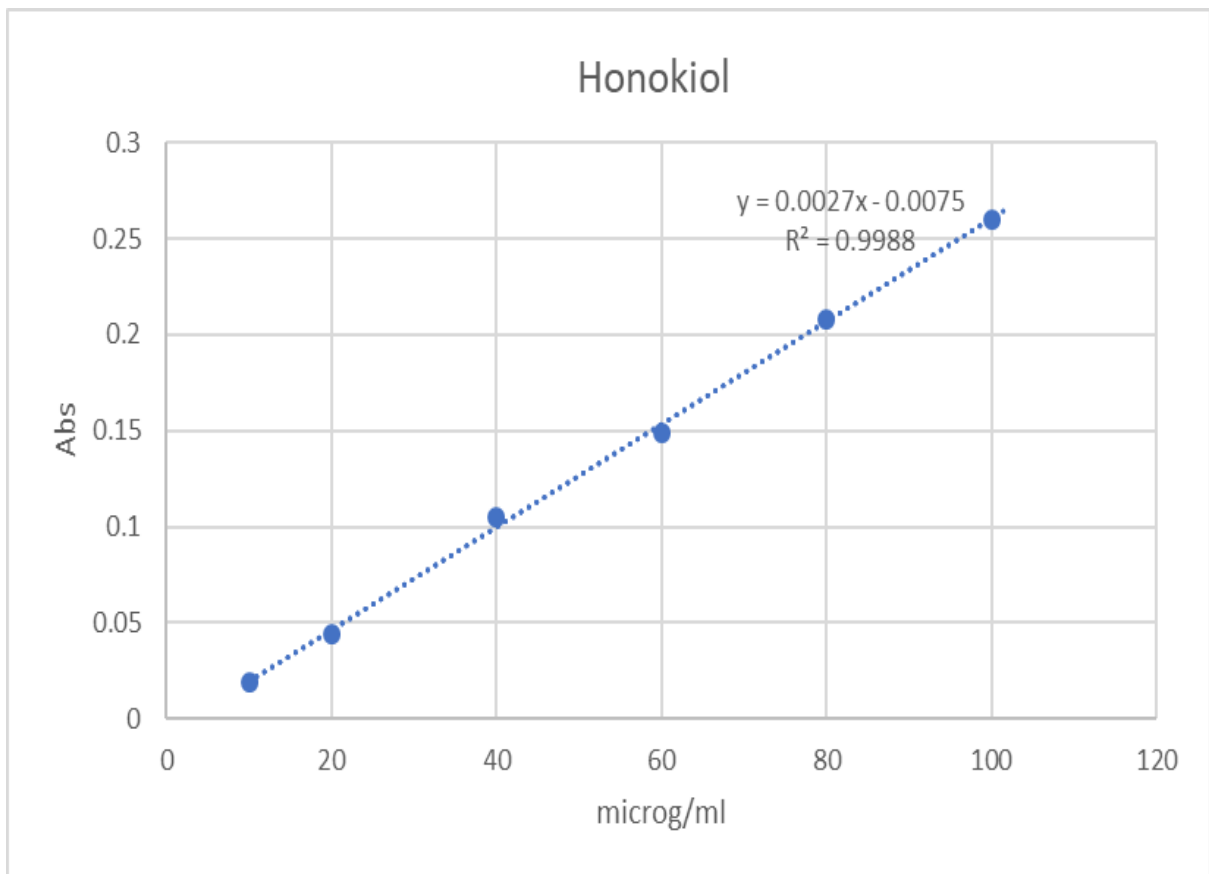
cho hóa trị C=C vòng thơm có trong HK. Các dải cường độ 801 cm^{-1} đặc trưng cho liên kết C-C [93]. Khi HK được bao bọc bởi nano polyme PLGA-PEG, đỉnh đặc trưng của HK vẫn xuất hiện trong phổ hiển thị 4, cụ thể: tại điểm 3457 cm^{-1} dịch chuyển đến 3521 cm^{-1} , điểm 1639 cm^{-1} dịch chuyển sang vị trí 1766 cm^{-1} , điểm 801 cm^{-1} dịch chuyển đến vị trí 848 cm^{-1} . Kết quả này biểu thị sự tương tác giữa HK và polyme. Bên cạnh đó, dao động đặc trưng của copolyme PLGA-PEG tại vị trí 1430 cm^{-1} đã dịch chuyển đến vị trí 1454 cm^{-1} , dao động 2900 dịch chuyển đến vị trí 2952 cm^{-1} trên phổ PLGA-PEG-HK, qua đó chứng minh HK đã được đóng gói thành công trong hệ phân phối thuốc [92, 93].

3.2.1.4. Đánh giá hiệu suất và dung tích bao gói thuốc

Hiệu suất bao gói hoạt chất là một trong những thông số quan trọng khi tổng hợp hệ nano mang thuốc. Một hệ thống nano dẫn truyền hoạt chất hiệu quả phải có hiệu suất mang thuốc cao để hạn chế số lần sử dụng thuốc và mang lại hiệu quả trong điều trị [101]. Hiệu suất bao gói cho biết tỉ lệ khối lượng hoạt chất được mang trên tổng trọng lượng của các chất. Một số nghiên cứu đã chứng minh, hệ nano PLGA-PEG có thể đạt được hiệu suất bao gói thuốc cao với giá trị có thể đạt được từ 75% - 95% [102]. Kết quả của nghiên cứu cũng cho thấy hiệu suất bao gói của hệ nano PLGA-PEG-HK tạo thành đạt giá trị $81.22 \pm 0.59\%$. Kết quả này đã chứng minh hệ nano copolyme đã bao gói thành công HK với hiệu suất mang thuốc cao. Thêm vào đó, việc xác định dung tích bao gói cũng là một trong những giá trị ảnh hưởng đến các ứng dụng của hệ phân phối thuốc nano: thông số này là bắt buộc để có thể tính toán chính xác lượng hoạt chất có trong dung dịch nano trước khi thí nghiệm *in vitro* và *in vivo* [100]. Và dựa vào các công thức tính toán được trình bày ở trên, dung tích bao gói của hệ nano PLGA-PEG-HK trong nghiên cứu là $7.38 \pm 0.05\%$.

3.2.1.5. Đánh giá khả năng giải phóng thuốc

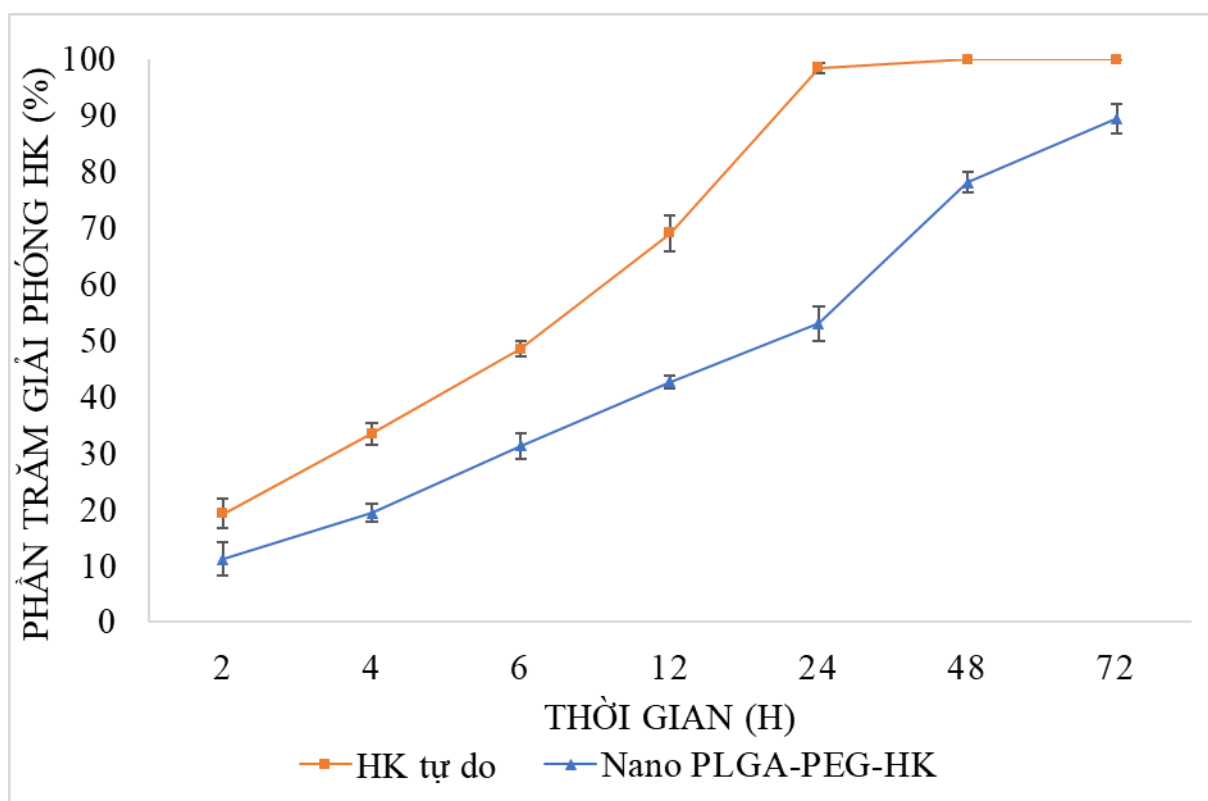
Để đánh giá khả năng giải phóng hoạt chất HK từ hệ nano, đường chuẩn HK được xây dựng dựa trên giá trị đo ở các nồng độ 10, 20, 40, 60, 80 và 100 ($\mu\text{g} / \text{mL}$) trong đệm phosphat. Sự hấp thụ của HK được đo bằng máy quang phổ NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) ở bước sóng 297 nm, sau đó định lượng nồng độ HK được giải phóng dựa vào đường chuẩn được xây dựng (Hình 3.9). Đường chuẩn biểu thị đồ thị hàm số dạng $y = ax + b$, trong đó y là diện tích đỉnh (peak) còn x là nồng độ. R^2 gần bằng 1 cho thấy độ chính xác cao.



Hình 3.9. Đường chuẩn Honokiol

Bảng 3.1. Phần trăm hoạt chất giải phóng

Thời gian giải phóng hoạt chất (giờ)	Nano PLGA-PEG-HK (%)	HK tự do (%)
2	11,2 ± 3,0	19,3 ± 2,7
4	19,4 ± 1,6	33,5 ± 1,9
6	31,3 ± 2,3	48,6 ± 1,3
12	42,7 ± 1,1	69,2 ± 3,2
24	53,1 ± 3,1	98,5 ± 1,0
48	78,2 ± 1,8	0
72	89,5 ± 2,6	0



Hình 3.10. Biểu đồ phần trăm giải phóng hoạt chất theo thời gian của HK tự do và hệ nano PLGA-PEG-HK

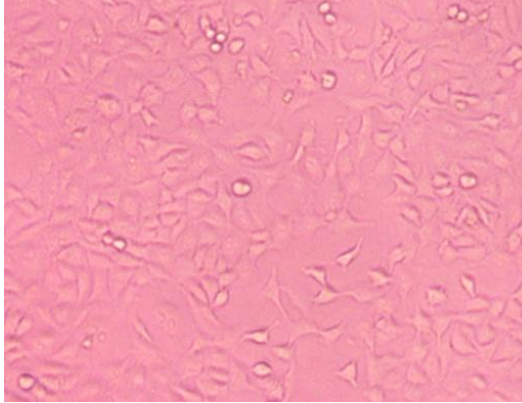
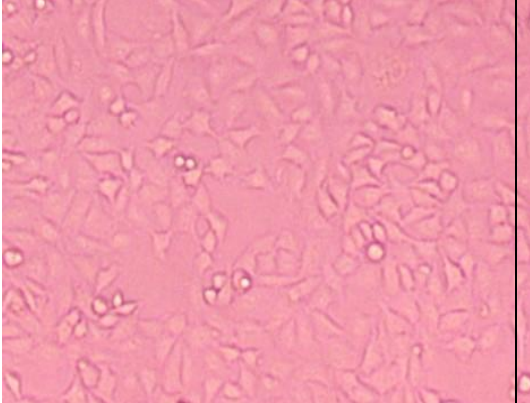
Kết quả phần trăm giải phóng hoạt chất được thể hiện trong bảng 3.1 và hình 3.10. Sau 2 giờ đầu tiên tiến hành thí nghiệm, ở mẫu HK tự do, lượng HK được giải phóng ra là $19.3 \pm 2.7\%$ nhưng ở hệ nano PLGA-PEG-HK chỉ là $11.2 \pm 3.0\%$. Ở những giờ tiếp theo, phần trăm giải phóng hoạt chất khi quan sát trên cả hai mẫu liên tục tăng. Tuy nhiên, kết quả phần trăm giải phóng hoạt chất của hệ nano PLGA-PEG-HK cho giá trị thấp hơn so với HK tự do ở những thời điểm tương đương. Sau 24 giờ, thuốc gần như được giải phóng hoàn toàn ở HK tự do ($98.5 \pm 1\%$), trong khi đó phần trăm hoạt chất giải phóng khỏi hệ nano chỉ bằng một nửa ($53,1 \pm 3,1\%$). Sau 48 giờ, $78.2 + 1.8\%$ hoạt chất HK được giải phóng ra khỏi hệ nano PLGA-PEG-HK, và sau 72 giờ phần trăm giải phóng hoạt chất là $89,5 \pm 2,6\%$. Kết quả này cho thấy hệ nano được tạo thành đã góp phần kéo dài thời gian giải phóng của HK. Điều này có thể được giải thích là do cấu trúc lõi vỏ, sự trương nở và mật độ liên kết ngang trong hệ nano PLGA-PEG-HK đã duy trì sự ổn định và kéo dài thời gian giải phóng hoạt chất [94]. Một số nghiên cứu cũng đã chứng minh hiệu quả của hệ nano kéo dài thời gian giải phóng hoạt chất như nghiên cứu của Lin và cộng sự năm 2021 cũng cho thấy

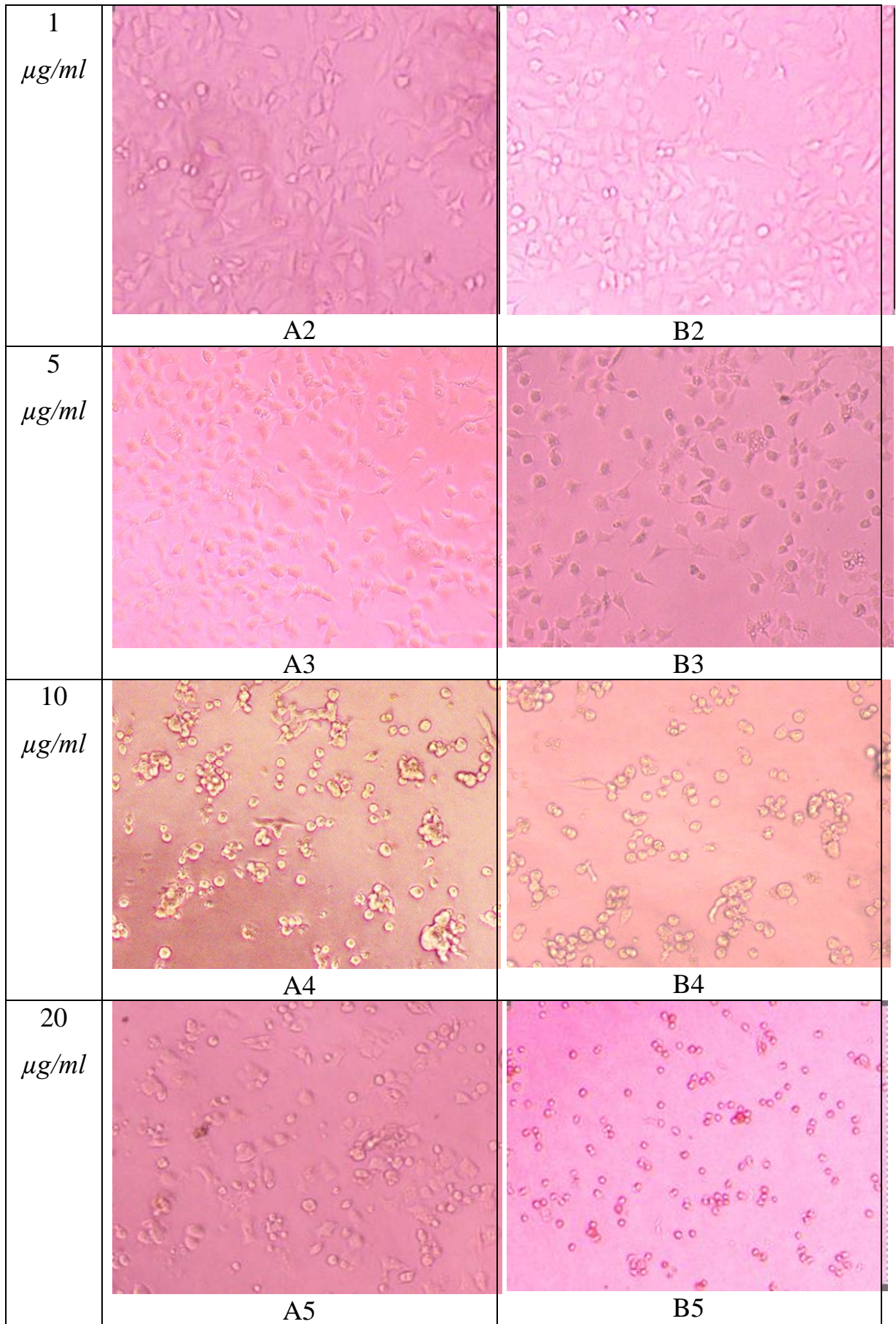
HK tự do giải phóng hoàn toàn chỉ sau 12 giờ, trong khi hệ nano Lecithin-Based Mixed Polymeric Micelles (lbMPMs) đã kéo dài thời gian giải phóng HK (sau 72 giờ có 90% HK giải phóng ra môi trường) [95]. Tương tự một nghiên cứu gần đây của Zhang và cộng sự vào tháng 4, 2022 cũng cho thấy kết quả hệ nano zein – axit polysialic dẫn truyền HK (PSA-Zein-HK) có khả năng duy trì sự phân tán và giải phóng hoạt chất ổn định trong 48 giờ [80]. Công thức hoạt chất giải phóng chậm cũng đã được chứng minh mang lại nhiều lợi ích hơn khi so sánh với các công thức thông thường của cùng hợp chất. Khi phân phối qua đường tiêm, các cấu trúc nano tồn tại trong hệ thống tuần hoàn máu trong một thời gian dài, do đó, chúng gây ra ít dao động huyết tương hơn và giảm tác dụng phụ. Thêm vào đó, hồ sơ giải phóng hoạt chất có thể dự đoán được trong một khoảng thời gian xác định sau mỗi lần tiêm. Từ đó, các nhà nghiên cứu có thể dựa trên thông tin này để giảm tần suất sử dụng thuốc (tiêm ít hơn) mà không ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị và giảm tổng chi phí chăm sóc y tế khi nghiên cứu *in vivo* và áp dụng thực tiễn sau này [96].

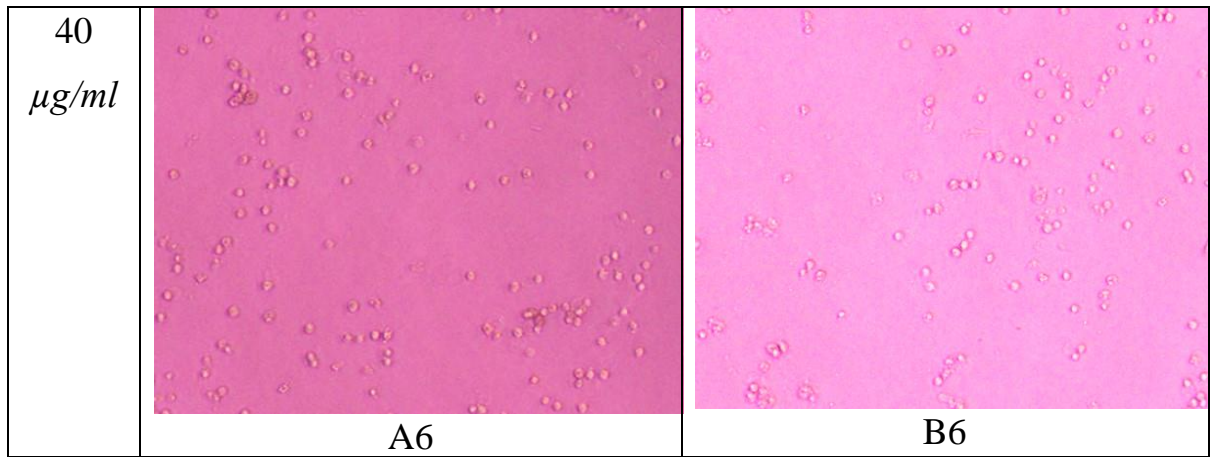
3.2.2. Kết quả đánh giá độc tính tế bào *in vitro* của hệ nano PLGA-PEG-HK

3.2.2.1. Xác định độc tính của hệ nano lên tế bào ung thư bằng MTT

Để xác định độc tính tế bào, thí nghiệm sử dụng kit phân tích độc tính MTT để đánh giá hiệu quả của hệ nano PLGA-PEG-HK và HK tự do lên hai dòng tế bào ung thư phổi A549 và tế bào ung thư vú BT474 thể hiện thông qua giá trị IC_{50} . Giá trị IC_{50} càng thấp càng chứng minh khả năng gây độc lên tế bào ung thư càng cao.

Nồng độ	Hình ảnh tế bào xử lý bằng HK tự do	Hình ảnh tế bào xử lý bằng Hệ nano PLGA-PEG-HK
Đối chứng	 <p style="text-align: center;">A1</p>	 <p style="text-align: center;">B1</p>



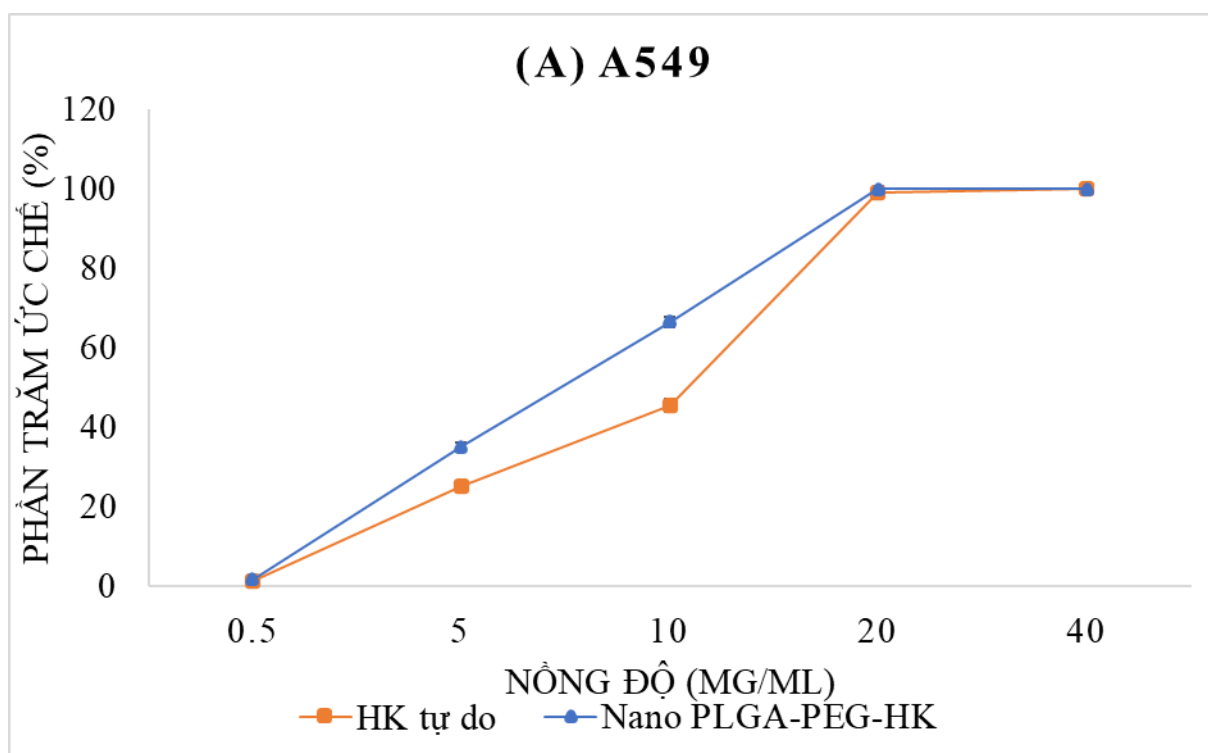


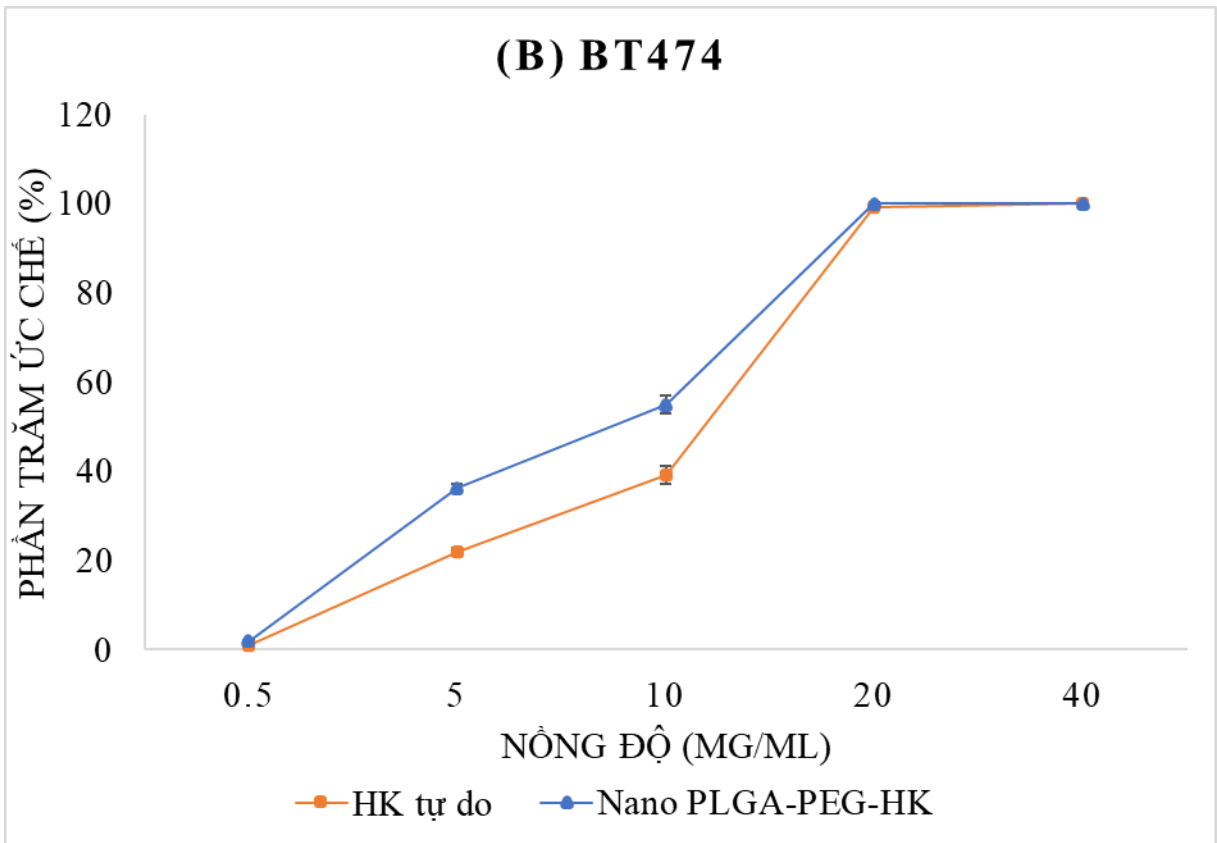
Hình 3.11. Hình ảnh tế bào A549 được xử lý bằng HK tự do (A2, A3, A4, A5 và A6) và hệ nano PLGA-PEG-HK (B2, B3, B4, B5 và B6) sau 72 giờ. Trong đó A1 và B1: đối chứng; A2 và B2: 1 $\mu\text{g/ml}$; A3 và B3: 5 $\mu\text{g/ml}$; A4 và B4: 10 $\mu\text{g/ml}$; A5 và B5: 20 $\mu\text{g/ml}$; ; A6 và B6: 40 $\mu\text{g/ml}$.

Ảnh hưởng của hoạt chất HK tự do và hệ nano PLGA-PEG-HK lên hình thái tế bào A549 được thể hiện trong hình 3.11. Sau 72 giờ, tế bào ở mẫu đối chứng không xử lý hoạt chất có hình dạng bình thường, mật độ tế bào vẫn phát triển và đạt khoảng 80% độ phủ đĩa. Tuy nhiên, ở những mẫu được xử lý HK và hệ nano PLGA-PEG-HK ở các nồng độ khác nhau đã xuất hiện những hiện tượng bất thường. Ở nồng độ 1 $\mu\text{g/ml}$ (hình A2 và hình B2), mật độ tế bào không có sự khác biệt đáng kể so với mật độ tế bào ở mẫu đối chứng. Khi xử lý nồng độ 5 $\mu\text{g/ml}$ (hình A3 và hình B3) và 10 $\mu\text{g/ml}$ (hình A4 và hình B4) thì hình thái tế bào bắt đầu có sự thay và mật độ tế bào trở lên thưa hơn so với mẫu đối chứng. Tiếp theo, ở nồng độ xử lý cao hơn là 20 $\mu\text{g/ml}$ (hình A5 và hình B5), các tế bào có biểu hiện bất thường trở nên rõ rệt, tế bào đều co cụm lại và hầu như không có khả năng sinh trưởng, mật độ tế bào trở nên thưa thớt hơn hẳn so với hai nồng độ trước. Cuối cùng, ở nồng độ 40 $\mu\text{g/ml}$ (hình A6 và hình B6) thì các tế bào trở nên co nhỏ hơn nữa, các tế bào đều chết hết và mật độ tế bào cũng thưa nhất. Như vậy, nồng độ tác động của HK tự do và hệ nano PLGA-PEG-HK càng cao thì số tế bào chết càng nhiều. Đặc biệt khi xử lý ở các nồng độ tương đương, những mẫu xử lý bằng hệ nano PLGA-PEG-HK quan sát thấy tế bào thưa hơn so với HK tự do. Kết quả này chứng minh hệ nano PLGA-PEG-HK có tác dụng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của tế bào A549 mạnh hơn so với HK tự do.

Bảng 3.2: Phần trăm ức chế của HK tự do và hệ nano PLGA-PEG-HK lên tế bào ung thư A549 và BT474 và giá trị IC_{50}

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Phần trăm ức chế (%) A549		Phần trăm ức chế (%) BT474	
	HK tự do	Hệ nano PLGA-PEG-HK	HK tự do	Hệ nano PLGA-PEG-HK
1	1.04 ± 0.09	1.59 ± 0.16	1.13 ± 0.08	1.96 ± 0.15
5	25 ± 1.15	35.01 ± 1.12	22.02 ± 0.82	36.21 ± 0.91
10	45.55 ± 1.61	66.52 ± 1.28	39.18 ± 2.07	54.93 ± 1.99
20	98.94 ± 1.04	100 ± 0.56	99.07 ± 0.18	100 ± 0.25
40	100 ± 0.06	100 ± 0.15	100 ± 0.22	100 ± 0.12
IC_{50}	8.76 ± 0.92	5.88 ± 0.76	10.77 ± 0.25	6.49 ± 0.63





Hình 3.12. Phần trăm gây độc lên các dòng tế bào (A) A549 và (B) BT474

Từ kết quả quan sát hình ảnh tế bào cho thấy cả hệ nano PLGA-PEG-HK và HK tự do đều làm giảm đáng kể số lượng tế bào sống sót trong cả hai dòng tế bào ung thư. Để tiếp tục khẳng định kết quả độc tính tế bào, kít MTT được sử dụng để phân tích độc tính lên tế bào ung thư A549 của hệ nano PLGA-PEG-HK cao hơn 1.5 lần so với xử lý bằng HK tự do với các giá trị IC_{50} tương ứng là 5.88 ± 0.76 và 8.76 ± 0.92 $\mu\text{g/ml}$. Tương tự, độc tính lên tế bào ung thư BT474 của hệ nano cũng cao hơn 1.7 lần so với HK tự do sau 72h xử lý với các giá trị IC_{50} tương ứng là 6.49 ± 0.63 và 10.77 ± 0.25 $\mu\text{g/ml}$. Giá trị IC_{50} càng nhỏ, càng chứng minh được hiệu quả gây độc lên tế bào ung thư. Những kết quả này đã cho thấy rằng việc kết hợp giữa hệ nano PLGA-PEG-HK đã làm tăng cường hoạt động gây độc lên tế bào ung thư. Khả năng gây độc hiệu quả của hệ nano PLGA-PEG-HK so với HK tự do có thể được giải thích là do các cơ chế khác nhau khi thâm nhập vào tế bào ung thư. Các phân tử thuốc thông thường được vận chuyển vào tế bào bằng cơ chế khuếch tán thụ động và bị vận chuyển ra ngoài bằng các P-glycoprotein (protein vận chuyển xuyên màng). Trong khi đó, hệ nano PLGA-PEG-HK đã xâm nhập vào tế bào thông qua quá trình nhập bào (endocytosis), vì vậy chúng có thể thoát khỏi ảnh hưởng của các protein vận

chuyển P-glycoprotein, từ đó dẫn đến sự vận chuyển thuốc và gây độc lên tế bào ung thư hiệu quả hơn so với các phân tử thuốc tự do [97]. Khả năng gây độc hiệu quả lên tế bào ung thư của hệ nano so với xử lý bằng hoạt chất tự do cũng được chứng minh ở nhiều nghiên cứu. Năm 2017, Yang và cộng sự đã chứng minh hệ nano (ϵ -caprolactone)-poly (ethyleneglycol)-poly (ϵ -caprolactone) (PCEC) – Honokiol gây độc hiệu quả lên tế bào ung thư vòm họng HNE-1 hơn so với xử lý bằng HK tự do với giá trị tương ứng là 18.41 $\mu\text{g}/\text{mL}$ và 38.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sau 24 giờ [26]. Tương tự, trong nghiên cứu của Hamidreza và cộng sự cũng cho thấy cho thấy giá trị IC_{50} (9.17 μM) do được trên tế bào ung thư vú MCF-7 xử lý bằng hệ nano poly (ethylene glycol)-poly (ϵ -caprolactone) (mPEG-PCL)-curcumin thấp hơn so với mẫu xử lý bằng curcumin tự do (35.94 μM) sau 72 giờ [50].

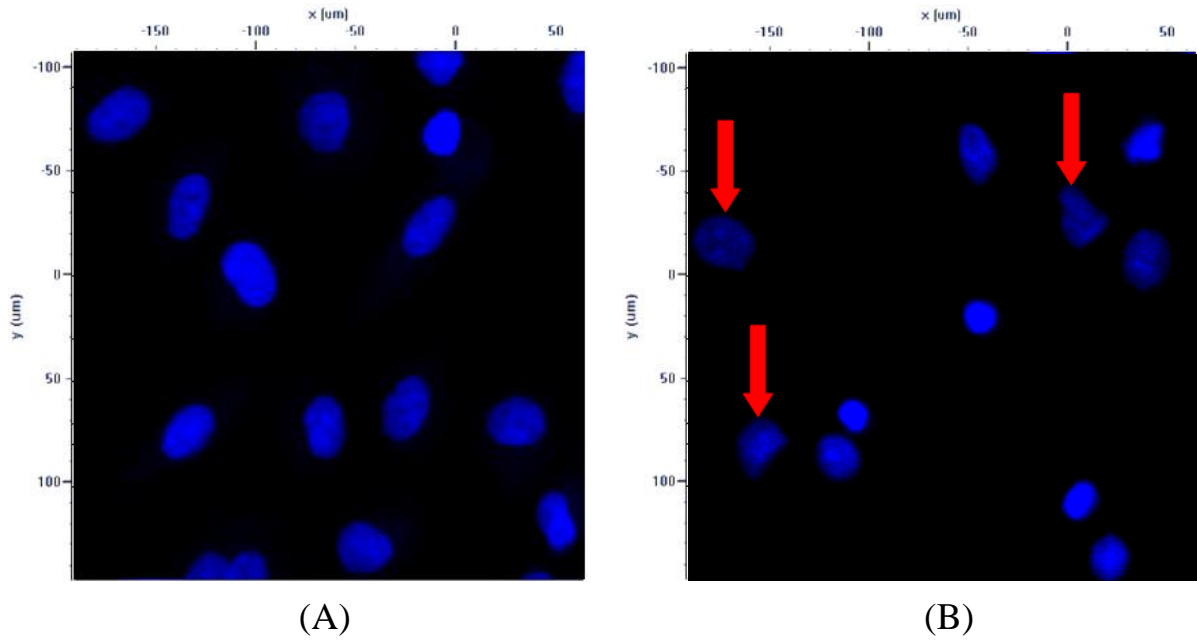
3.2.2.2. Đánh giá ảnh hưởng của hệ nano PLGA-PEG-HK lên hình thái nhân tế bào

Để đánh giá ảnh hưởng của hệ nano PLGA-PEG-HK tác động lên hình thái nhân tế bào, tế bào A549 và BT474 được tiến hành nhuộm với thuốc nhuộm DAPI. Thuốc nhuộm DAPI được sử dụng rộng rãi trong kỹ thuật hiển vi huỳnh quang do có đặc tính huỳnh quang, đóng vai trò như một chất đánh dấu. Thuốc nhuộm này có ái lực cao với nhân tế bào nên được sử dụng để xác định và đánh giá hình thái nhân. DAPI sẽ gắn vào DNA của nhân và phát ra ánh sáng huỳnh quang màu xanh dương khi quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang ở bước sóng 455-461 nm (ánh sáng UV), từ đó giúp dễ dàng nhận diện phần nhân tế bào cần quan sát. Thí nghiệm tiến hành thực hiện trên mẫu đối chứng và mẫu xử lý bằng hệ nano PLGA-PEG-HK.

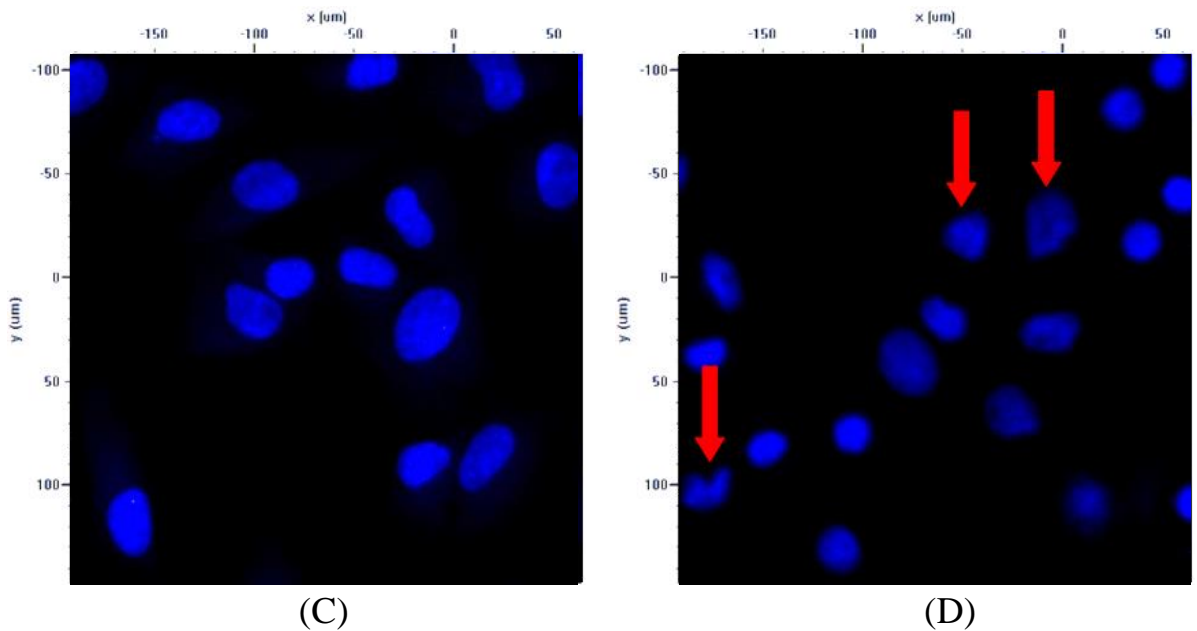
Ảnh hưởng của hệ nano polyme PLGA-PEG-HK lên hình thái nhân tế bào ung thư được thể hiện trong hình 3.13. Ảnh hưởng lên hình thái nhân tế bào được quan sát thấy ở cả tế bào A549 và BT474 khi được xử lý bằng hệ nano PLGA-PEG-HK (hình 3.13B và hình 3.13D). Quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang thấy rằng nhiều nhân tế bào có hiện tượng bất thường, một số tế bào đã bị co nhỏ lại, một số nhân có hiện tượng phân mảnh (hiện tượng xảy ra khi quá trình apoptosis bắt đầu diễn ra). Điều này không được quan sát thấy ở mẫu đối chứng không được xử lý HK (Hình 3.13A và hình 3.13C). Nhân tế bào ở mẫu đối chứng có hình dạng bình thường, các nhân vẫn tương đối đồng đều, màng

nhân rõ ràng và nhân không bị co nhỏ lại. Từ kết quả này đã chứng minh tác dụng của hệ nano PLGA-PEG-HK lên tế bào ung thư cần điều trị.

Dòng tế bào A549



Dòng tế bào BT474



Hình 3.13. Đánh giá ảnh hưởng lên hình thái nhân tế bào ung thư

(A): Mẫu đối chứng- nhân tế bào A549;

(B): Nhân tế bào A549 xử lý bằng hệ nano PLGA-PEG-HK;

(C): Mẫu đối chứng – nhân tế bào BT474;

(D): Nhân tế bào BT474 xử lý bằng hệ nano PLGA-PEG-HK;

3.2.2.3. Đánh giá ảnh hưởng của HK tự do và hệ nano PLGA-PEG-HK lên quá trình gây chết tế bào ung thư (apoptosis).

Apoptosis là một dạng tế bào chết theo chương trình. Nó loại bỏ các tế bào trong quá trình phát triển, đồng thời phá hủy các tế bào tiền ung thư, các tế bào bị nhiễm vi rút. Apoptosis là yếu tố duy trì sự cân bằng của các tế bào người và đặc biệt quan trọng đối với hệ thống miễn dịch. Nhiều căn bệnh nguy hiểm như bệnh thoái hóa thần kinh, tim mạch, bệnh tự miễn và đặc biệt là ung thư là do tế bào được thanh thải quá mức hoặc không đủ. Vì vậy, hướng nghiên cứu sử dụng các hoạt chất tự nhiên có thể gây ra quá trình apoptosis lên tế bào ung thư là hướng nghiên cứu được quan tâm hiện nay [20].

Do đó, để tiếp tục chứng minh hiệu quả của HK và hệ nano PLGA-PEG-HK gây ra quá trình apoptosis trên tế bào ung thư. Chúng tôi tiếp tục tiến hành đánh giá quá trình gây chết tế bào ung thư của HK và hệ nano PLGA-PEG-HK trên dòng tế bào A549 bằng việc nhuộm tế bào với Annexin V và phân tích bằng Flow cytometry.

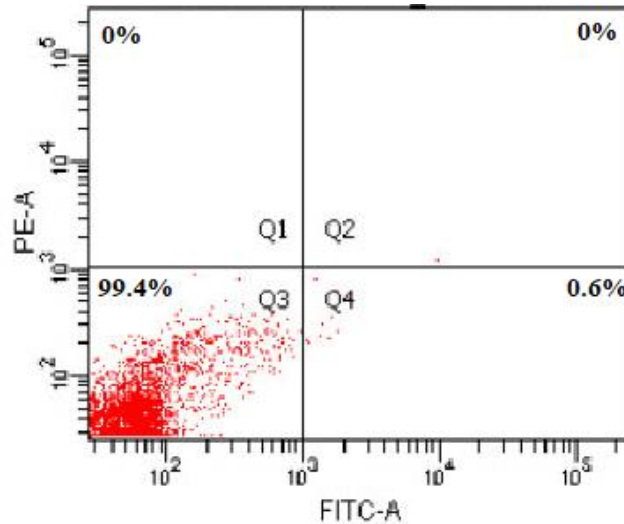
Tế bào A549 được tiến hành nhuộm bằng kit phát hiện apoptosis Annexin V-PE. Phương pháp nhuộm Annexin V có ưu điểm so với các phương pháp dựa trên những thay đổi ở nhân như phân mảnh DNA là có thể xác định được quá trình apoptosis ở giai đoạn sớm hơn. Nhuộm Annexin V kết hợp với thuốc nhuộm propidium iodide (PI) hoặc 7-amino-actinomycin D (7-AAD) cho phép xác định các tế bào apoptosis sớm (Annexin V dương tính, PI âm tính), và những tế bào trong giai đoạn sau của quá trình apoptosis (Annexin V dương tính, PI dương tính) hoặc tế bào đã hoại tử.

Bảng 3.3: Tín hiệu và vùng phân bố của các quần thể tế bào

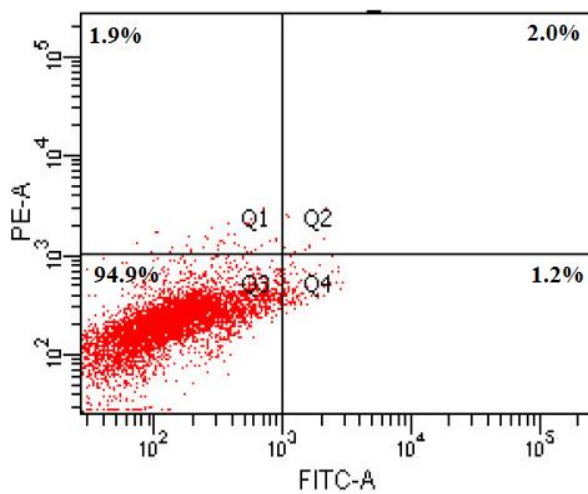
Quần thể tế bào	Tín hiệu Annexin V	Tín hiệu PI	Vùng phân bố
Sống sót	Âm tính (-)	Âm tính (-)	Q3
Apoptosis sớm	Dương tính (+)	Âm tính (-)	Q4
Apoptosis muộn	Dương tính (+)	Dương tính (+)	Q2
Hoạt tử	Âm tính (-)	Dương tính (+)	Q1

Tế bào sau khi nhuộm sẽ được phân tích qua phép đo dòng chảy tế bào và phân loại thành bốn nhóm quần thể tế bào khác nhau: Quần thể thứ nhất là các tế

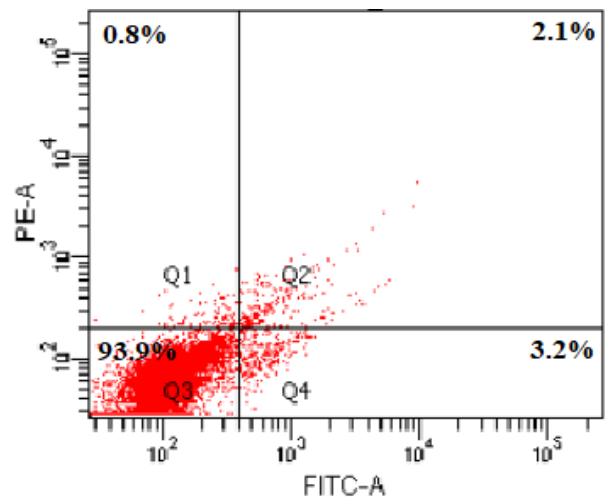
bào còn nguyên vẹn (Q3), quần thể thứ hai là các tế bào ở giai đoạn apoptosis sớm (Q4), quần thể thứ ba là các tế bào ở giai đoạn apoptosis muộn (Q2) và quần thể thứ tư là các tế bào hoạt tử (Q1). Các tế bào phân tích được đánh giá bằng tỉ lệ phần trăm các tế bào trong các quần thể trên (hình 3.14).



(A) Mẫu đối chứng



(B) Mẫu xử lý bằng Honokiol



(C) Mẫu xử lý bằng hệ Nano polymer PLGA-PEG-HK

Hình 3.14. Đánh giá tế bào apoptosis bằng việc nhuộm Annexin V và phân tích bằng Flow cytometry trên dòng tế bào A549 khi xử lý với HK tự do và hệ nano PLGA-PEG-HK

Bảng 3.4: Phần trăm tế bào trải qua quá trình apoptosis

Mẫu	Tế bào apoptosis sớm (%)	Tế bào Apoptosis muộn (%)	Tổng số tế bào trải qua apoptosis (%)
Mẫu đối chứng	0.6 ± 0.05	0	0.6 ± 0.1
Mẫu xử lý bằng HK tự do	1.2 ± 0.08	2.0 ± 0.3	3.2 ± 0.4
Mẫu xử lý bằng hệ nano hệ PLGA-PEG-HK	3.2 ± 0.1	2.1 ± 0.2	5.3 ± 0.3

Kết quả thí nghiệm tiến hành đánh giá tác động của HK tự do và hệ PLGA-PEG-HK lên quá trình apoptosis thông qua tế bào ung thư A549 được thể hiện trong hình 3.14 và bảng 3.4. Từ hình ảnh có thể quan sát thấy rằng nhóm đối chứng gây ra quá trình chết theo chu trình tế bào không đáng kể, tế bào A549 ở trạng thái gần như nguyên vẹn (99.4%) thể hiện bằng sự tập trung tế bào ở cùng Q3 (hình 3.14A). Ngược lại, với các tế bào được xử lý bằng HK, tế bào có hiện tượng trải qua quá trình apoptosis (hình 3.14B, hình 3.14C). Trong tổng số tế bào được xử lý bằng HK tự do, số tế bào bị apoptosis tổng cộng là 3.2% (bao gồm 2.0% tế bào ở giai đoạn apoptosis sớm và 1.2% tế bào ở giai đoạn apoptosis muộn). Tỷ lệ gây chết tế bào A549 tăng lên khi xử lý bằng hệ nano PLGA-PEG-HK với tổng số 5.3% tế bào trải qua quá trình apoptosis (bao gồm 2.1% tế bào ở giai đoạn apoptosis sớm và 3.2% tế bào ở giai đoạn apoptosis muộn). Kết quả tương tự về tác dụng của HK gây ra quá trình apoptosis lên tế bào ung thư cũng được quan sát ở các nghiên cứu khác. Nghiên cứu của Hamedina và cộng sự [98] về tác động của HK và hệ nano PLGA-HK lên quá trình apoptosis ở tế bào ung thư thận ACHN và cũng cho những kết quả tương đồng gây ra tỷ lệ tế bào chết theo chu trình cao hơn so với mẫu xử lý HK tự do và mẫu đối chứng, cụ thể tỷ lệ phần trăm tế bào trải qua quá trình apoptosis tăng từ 7.77% (mẫu đối chứng), lên 16,62% (mẫu xử lý HK tự do) và 17,65% (mẫu xử lý bằng nano PLGA-HK).

Từ những nghiên cứu trên, HK đã chứng minh tiềm năng tác động đến tế bào ung thư thông qua chu trình chết theo tế bào – apoptosis. Khả năng gây ra quá trình apoptosis lên tế bào ung thư có ý nghĩa rất lớn trong việc phát triển các loại hoạt chất điều trị hiện nay. Tế bào ung thư khi trải qua quá trình chết theo chu trình tế bào apoptosis sẽ xảy ra hiện tượng phá hủy DNA của nhân tế bào, từ đó dẫn đến làm mất khả năng phân chia và tăng sinh không kiểm soát của các khối u. Ngoài ra, hệ nano được tạo thành đã cho thấy tác dụng gây ra quá trình apoptosis trên tế bào ung thư hiệu quả hơn khi xử lý bằng HK tự do (gấp 1,6 lần). Kết quả này có thể được giải thích là do tác dụng của hệ nano làm tăng cường tính thấm và lưu giữ thuốc của hệ theo con đường vận chuyển thụ động. Từ đó dẫn đến sự tích tụ và làm tăng nồng độ hoạt chất tại các tế bào cần điều trị [98].

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Từ những kết quả nghiên cứu thu được ở trên, chúng em đưa ra một số kết luận sau:

- Đã tổng hợp và tối ưu được hệ nano PLGA-PEG-HK bằng phương pháp tủa nano. Dung dịch tạo thành cho tỉ lệ đồng nhất cao, hệ nano duy trì được tính ổn định cao sau 1 năm bảo quản ở 4°C.
- Các hạt nano PLGA-PEG-HK được tổng hợp có dạng hình cầu và trơn nhẵn. Hệ nano tạo thành kích thước 138.51 ± 3.02 nm với giá trị PDI là 0.04 ± 0.002 . Thế zeta của hệ PLGA-PEG-HK là -24.09 ± 0.17 mV.
- Hệ nano PLGA-PEG-HK có hiệu suất bao gói là $81.22 \pm 0.59\%$ và dung tích bao gói là $7.38 \pm 0.05\%$.
- Hệ nano PLGA-PEG-HK có tốc độ giải phóng hoạt chất chậm hơn so với HK tự do ($89,5 \pm 2,6\%$ sau 72 giờ, trong khi HK $98,5 \pm 1,0\%$ sau 24 giờ).
- Hệ nano PLGA-PEG-HK cho thấy khả năng gây độc lên tế bào ung thư A549 hiệu quả hơn 1.5 lần so với HK tự do với giá trị IC_{50} tương ứng là 5.88 ± 0.76 và 8.76 ± 0.92 $\mu\text{g/ml}$. Tương tự, độc tính lên tế bào ung thư BT474 của hệ nano cũng cao hơn 1.7 lần so với HK tự do sau 72 giờ xử lý với các giá trị IC_{50} tương ứng là 6.49 ± 0.63 và 10.77 ± 0.25 $\mu\text{g/ml}$.
- Hệ nano PLGA-PEG-HK tác động lên nhân tế bào ung thư làm cho chúng có hiện tượng bất thường, một số nhân tế bào bị co nhỏ lại, một số nhân có hiện tượng phân mảnh (hiện tượng apoptosis). Đồng thời, bằng kit xác định apoptosis đã chỉ ra hệ PLGA-PEG-HK gây ra quá trình apoptosis cao hơn so với HK tự do và mẫu đối chứng với các giá trị tương ứng lần lượt là 5.3%, 3.2% và 0.6% sau 24 giờ xử lý trên tế bào ung thư A549.

KIẾN NGHỊ

Để đạt được mục tiêu nghiên cứu ứng dụng hệ nano PLGA-PEG-HK định hướng trong điều trị ung thư, chúng em đưa ra kiến nghị cần tiến hành thử nghiệm hệ nano PLGA-PEG-HK trên một số dòng tế bào ung thư khác và trên mô hình chuột mang khối u.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ghobrial IM, Witzig TE, 2005, Adjei AA: Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*, 55, 178-194.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al., 2021, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71, 209–49.
3. Bộ Y tế, Tình hình ung thư tại Việt Nam 2020 cập nhật tháng 1 năm 2021.
4. Vogelstein B., Kinzler K.W, 2004, Cancer genes and the pathways they control, *Nat Med*, 10:789–799.
5. Perez-Herrero E, Fernandez-Medarde A., 2015, Advanced Targeted Therapies in Cancer: Drug Nanocarriers, the Future of Chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm*, 93, 52–79.
6. Esumi T, Makado G, Zhai H, Shimizu Y, Mitsumoto Y and Fukuyama Y, 2004, Efficient synthesis and structure-activity relationship of honokiol, a neurotrophic biphenyl-type neolignan, *Bioorg Med Chem Lett*, 14, 2621-2625.
7. Lee YJ, Lee YM, Lee CK, Jung JK, Han SB, Hong JT., 2011, Therapeutic applications of compounds in the Magnolia family, *Pharmacol Ther*, 130(2), 157–176.
8. Lin, J.M.; Prakasha Gowda, A.S.; Sharma, A.K.; Amin, 2012, *In vitro* growth inhibition of human cancer cells by novel honokiol analogs, *Bioorg. Med. Chem*, 20, 3202–3211.
9. Lu, C.H.; Chen, S.H.; Chang, Y.S.; Liu, Y.W.; Wu, J.Y.; Lim, Y.P.; Yu, H.I.; Lee, Y.R., 2017, Honokiol, a potential therapeutic agent, induces cell cycle arrest and program cell death *in vitro* and *in vivo* in human thyroid cancer cells. *Pharmacol. Res.*, 115, 288–298.
10. 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., *Int. J. Mol. Med.*, 43, 1969–1978.
11. Park EJ, Min HY, Chung HJ, et al, 2009, Down-regulation of c-Src/EGFR-mediated signaling activation is involved in the honokiol-induced cell cycle

- arrest and apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cell, *Cancer Lett*, 277: 133-40.
- 12.Grivennikov SI, Karin M., 2010, Dangerous liaisons: STAT3 and NFkappaB collaboration and crosstalk in cancer, *Cytokine Growth Factor Rev*, 21, 11-9.
 - 13.Liu H, Zang C, Emde A, et al, 2008, Anti-tumor effect of honokiol alone and in combination with other anti-cancer agents in breast cancer, *Eur J Pharmacol*, 591: 43-51.
 - 14.Tian, W.; Xu, D.; Deng, Y.-C, 2012, Honokiol, a multifunctional tumor cell death inducer, *Die Pharm. Int. J. Pharm. Sci*, 67, 811–816.
 - 15.Chen, Y.J.; Wu, C.L.; Liu, J.F.; Fong, Y.C.; Hsu, S.F.; Li, T.M.; Su, Y.C.; Liu, S.H.; Tang, C.H., 2010, Honokiol induces cell apoptosis in human chondrosarcoma cells through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress, *Cancer Lett*, 291, 20–30.
 - 16.Chiu, C.-S.; Tsai, C.-H.; Hsieh, M.-S.; Tsai, S.-C.; Jan, Y.-J.; Lin, W.-Y.; Lai, D.-W.; Wu, S.-M.; Hsing, H.-Y., Arbiser, J.L.; et al., 2019, Exploiting Honokiol-induced ER stress CHOP activation inhibits the growth and metastasis of melanoma by suppressing the MITF and -catenin pathways., *Cancer Lett*, 442, 113–125.
 - 17.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.
 - 18.Shen, L.; Zhang, F.; Huang, R.; Yan, J.; Shen, B, 2017, Honokiol inhibits bladder cancer cell invasion through repressing SRC-3 expression and epithelial-mesenchymal transition, *Oncol. Lett*, 14, 4294–4300.
 - 19.Singh, T.; Katiyar, S.K., 2013, Honokiol Inhibits Non-Small Cell Lung Cancer Cell Migration by Targeting PGE2-Mediated Activation of-Catenin Signaling, *PLoS ONE*, 8, e60749.
 - 20.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, *Int. J. Mol. Med.*, 43, 1969–1978.

21. Zheng, X.; Kan, B.; Gou, M.; Fu, S.; Zhang, J.; Men, K.; Chen, L.; Luo, F.; Zhao, Y.; Zhao, X.; et al., 2010, Preparation of MPEG–PLA nanoparticle for honokiol delivery *in vitro*, *Int. J. Pharm*, 386, 262–267.
22. Gadekar V, Borade Y, Kannaujia S, Rajpoot K, Anup N, Tambe V, et al., 2021 Nanomedicines accessible in the market for clinical interventions. *J Contr Release*, 330:372e97.
23. Zhao CY, Cheng R, Yang Z, Tian ZM., 2018, Nanotechnology for Cancer Therapy. Based on Chemotherapy, *Molecules*, 23, 1–29.
24. Zhang C, Yan L, Wang X, Zhu S, Chen C, Gu Z, et al., 2020, Progress, challenges, and future of nanomedicine. *Nano Today*; 35, 101008.
25. Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC, 2017, Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer*, 17 ,20-37.
26. 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 Deliv*, 24, 660–669.
27. Ali ES, Sharker SM, Islam MT, Khan IN, Shaw S, Rahman MA, et al., 2021, Targeting Cancer Cells with Nanotherapeutics and Nanodiagnostics: Current Status and Future Perspectives, *Semin Cancer Biol*, 69, 52–68.
28. Hailong Tian et al, 2022, Enhancing the therapeutic efficacy of nanoparticles for cancer treatment using versatile targeted strategies, *Journal of Hematology & Oncology volume*, 15, 132.
29. 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.
30. Steinhauser 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.
31. Qiang Cai et al, 2016, Systemic delivery to central nervous system by engineered PLGA nanoparticles, *Am J Transl Res*, 8(2), 749-764.
32. K. Kataoka, A. Harada, H. Nagasaki, 2001, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47,113–131.

33. Gullotti E., Yeo Y., 2009, Extracellularly activated nanocarriers: a new paradigm of tumor targeted drug delivery, *Molecular pharmaceuticals*, 6(4), pp. 1041-1051.
34. Parker SE, Davey PG, 1992, Pharmacoeconomics of intravenous drug administration, *Pharmacoeconomics*, 1(2), 103–15.
35. Wong J, Brugger A, Khare A, Chaubal M, Papadopoulos P, Rabinow B, Kipp J, Ning J, et al, 2008, Suspensions for intravenous (IV) injection: a review of development, preclinical and clinical aspects, *Adv Drug Deliv Rev*, 60(8), 939–54.
36. Gradishar WJ, Tjulandin S, Davidson N, Shaw H, Desai N, Bhar P, Hawkins M, O'Shaughnessy J, et al, 2005, Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer, *J Clin Oncol*, 23(31):7794–803.
37. Xiao, Y.; Jaskula-Sztul, R.; Javadi, A.; Xu, W.; Eide, J.; Dammalapati, A.; Kunnimalaiyaan, M.; Chen, H.; Gong, 2012, S. Co-delivery of doxorubicin and siRNA using octreotide-conjugated gold nanorods for targeted neuroendocrine cancer therapy, *Nanoscale*, 4, 7185.
38. Pramanik et al., 2015, Targeted delivery of “copper carbonate” nanoparticles to cancer cells in vivo. *Toxicol. Res*, 4, 1604–1612.
39. Ali ES, Sharkar SM, Islam MT, Khan IN, Shaw S, Rahman MA, et al., 2021, Targeting Cancer Cells with Nanotherapeutics and Nanodiagnostics: Current Status and Future Perspectives, *Semin Cancer Biol*, 69, 52–68.
40. Liu, G.; Yang, L.; Chen, G.; Xu, F.; Yang, F.; Yu, H.; Li, L.; Dong, X.; Han, J.; Cao, C.; et al., 2021, A Review on Drug Delivery System for Tumor Therapy. *Front. Pharmacol.*, 12, 735446.
41. Wu, J et al., 2007, Reversal of multidrug resistance by transferrin-conjugated liposomes co-encapsulating doxorubicin and verapamil, *J. Pharm. Pharm. Sci*, 10, 350–357.
42. Fortuni B, Inose T, Ricci M, et al., 2019, Polymeric Engineering of Nanoparticles for Highly Efficient Multifunctional Drug Delivery Systems, *Sci Rep*, 9 (1):2666.
43. John Christoforidis et al., 2012, Intravitreal Devices for the Treatment of Vitreous Inflammation, *Mediators of Inflammation*, 2, 126463.

44. Gagliardi, A.; Giuliano, E.; Venkateswararao, E.; Fresta, M.; Bulotta, S.; Awasthi, V.; Cosco, D., 2021, Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors., *Front. Pharmacol*, 12, 601626.
45. Banzato, A., Bobisse, S., Rondina, M., Renier, D., Bettella, F., Esposito, G., et al, 2008, A paclitaxel-hyaluronan bioconjugate targeting ovarian cancer affords a potent in vivo therapeutic activity, *Cancer Res*, 14, 3598-3606.
46. Shabani Ravari et al., 2016, Fabrication and biological evaluation of chitosan coated hyaluronic acid-docetaxel conjugate nanoparticles in CD44+ cancer cells, *DARU J. Pharm. Sci*, 24, 1–12.
47. Zhu D et al, 2016, Docetaxel (DTX)-loaded polydopamine-modified TPGS-PLA nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer, *Acta Biomater*, 30, 144-54.
48. Lv, S et al., 2014, Co-delivery of doxorubicin and paclitaxel by PEG-polypeptide nanovehicle for the treatment of non-small cell lung cancer, *Biomaterials*, 35, 6118–6129.
49. Cao, N et al., 2011, The synergistic effect of hierarchical assemblies of siRNA and chemotherapeutic drugs co-delivered into hepatic cancer cells. *Biomaterials*, 32, 2222–2232.
50. Hamidreza Kheiri Manjili et al, 2017, Pharmacokinetics and in vivo delivery of curcumin by copolymeric mPEG-PCL micelles, *Biopharmaceutics*, 116, 17-30.
51. Jinming Zhang et al., 2017, pH-sensitive polymeric nanoparticles for co-delivery of doxorubicin and curcumin to treat cancer via enhanced pro-apoptotic and anti-angiogenic activities, *Acta Biomater*, 58, 349-364.
52. Alinejad V et al, 2016, Co-delivery of IL17RB siRNA and doxorubicin by chitosan-based nanoparticles for enhanced anticancer efficacy in breast cancer cells, *Biomed Pharmacother*, 83, 229–240.
53. Calzoni E, Cesaretti A, Polchi A, et al., 2019, Biocompatible Polymer Nanoparticles for Drug Delivery Applications in Cancer and Neurodegenerative Disorder Therapies, *J Funct Biomater*, 10 (1):4.
54. Hồ Hoàng Nhân, Trần Trọng Biên, Nguyễn Ngọc Chiến, Chul Soon Yong, 2016, Nghiên cứu bào chế và khả năng ức chế tế bào ung thư In vitro của hệ Nano Artesunat chứa PLGA và Chitosan, *Tạp chí Y học thực hành*, 1005, 578-582.

55. Lê Thị Hào, 2012, *Nghiên cứu chế tạo hệ dẫn thuốc Nano Paclitaxel phối hợp Curcumin và đánh giá tác động của chúng lên tế bào ung thư*, Khóa luận tốt nghiệp Dược học, Đại học Quốc Gia Hà Nội, Hà Nội.
56. Nguyễn Ngọc Hòa, 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.
57. Phạm Hữu Phong, 2018, *Nghiên cứu bào chế hệ tiểu phân tử Nano Dihydroartemisinin-PLGA bao acid folic*, Luận văn Thạc sĩ Dược học, Đại học dược Hà Nội, Hà Nội.
58. Trịnh Văn Lương (2016), *Nghiên cứu bào chế tiểu phân nano paclitaxel và artesunat sử dụng polyme mang thuốc poly (acid lactic-co-glycolic)*, Luận văn thạc sĩ dược học, trường Đại học Dược Hà Nội.
59. Thuy Duong Le Thi et al., 2015, Anti-Tumor Activity of Docetaxel PLGA-PEG Nanoparticles with a Novel Anti-HER2 scFv, *J Nanomed Nanotechnol*, 6, 267.
60. Thuy Duong Le Thi, Ha Phuong Thu et al, 2016, In vitro evaluation of Aurora kinase inhibitor—VX680—in formulation of PLA-TPGS nanoparticles, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7, 025010.
61. Thi Thuy Duong Le et al, 2013, Docetaxel and curcumin-containing poly(ethylene glycol)-block-poly(ϵ -caprolactone) polymer micelles, *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol*, 4, 025006.
62. Thi Thuy Duong Le et al, 2016, Evaluation of anti-HER2 scFv-conjugated PLGA-PEG nanoparticles on 3D tumor spheroids of BT474 and HCT116 cancer cells, *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol*, 7 (2), 025006.
63. Fumoto, S.; Nishida, K., 2020, Co-delivery Systems of Multiple Drugs Using Nanotechnology for Future Cancer Therapy, *Chem. Pharm. Bull*, 68, 603–612.
64. Trif, M., et al., 2015, Cytotoxicity and intracellular fate of PLGA and chitosan-coated PLGA nanoparticles in Madin–Darby bovine kidney (MDBK) and human colorectal adenocarcinoma (Colo 205) cells, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(11), 3599-3611.

65. Navarro, S.M., et al., 2016, Biodistribution and toxicity of orally administered poly (lactic-co-glycolic) acid nanoparticles to F344 rats for 21 days, *Nanomedicine*, 11(13), 1653-1669.
66. Swaminathan, S. K., Roger, E., Toti, U., Lin, N., Ohlfest, J. R., and Panyam, 2013, Cd133-targeted paclitaxel delivery inhibits local tumor recurrence in a mouse model of breast cancer. *J. Control. Release*, 171, 280–287.
67. Rafiei P, Haddadi A, 2017, Docetaxel-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles for intravenous application: pharmacokinetics and biodistribution profile, *Int J Nanomedicine*, 12, 935–947.
68. Palanikumar L et al, 2020, pH-responsive high stability polymeric nanoparticles for targeted delivery of anticancer therapeutics, *Communications Biology*, 3(1), 95.
69. Mansoor S, Kondiah PPD, Choonara YE, et al., 2019, Polymer-based nanoparticle strategies for insulin delivery, *Polymers (Basel)*, 11 (9):1380.
70. Abd Ellah NH, Abouelmagd SA., 2017, Surface functionalization of polymeric nanoparticles for tumor drug delivery: approaches and challenges., *Expert Opin Drug Deliv*, 14 (2):201–214.
71. Owens III D.E., Peppas N.A., 2006, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 307(1), pp. 93-102.
72. Wohlfart, S. et al, 2011, Efficient chemotherapy of rat glioblastoma using doxorubicin loaded PLGA nanoparticles with different stabilizers, *PLoS ONE*, 6, e19121.
73. Ahmad et al, 2018, Preparation and characterization of surface-modified PLGA-polymeric nanoparticles used to target treatment of intestinal cancer, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol*, 46, 432–446.
74. Mousa, D. S., El-Far, A. H., Saddiq, A. A., Sudha, T., and Mousa, S. A., 2020, Nanoformulated bioactive compounds derived from different natural products combat pancreatic cancer cell proliferation. *Int. J. Nanomedicine*, 15, 2259–2268.
75. Haggag et al., 2018, Polymeric nano-encapsulation of 5-fluorouracil enhances anti-cancer activity and ameliorates side effects in solid Ehrlich Carcinoma-bearing mice, *Biomed. Pharmacother*, 105, 215–224.

76. 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., *J. Cancer Res. Clin. Oncol*, 134, 937–945.
77. Cheng, N.; Xia, T.; Han, Y.; He, Q.J.; Zhao, R.; Ma, J.R., 2011, Synergistic antitumor effect of liposomal honokiol combined with cisplatin in colon cancer models. *Oncol. Lett*, 2, 957–962.
78. Gong, C.; Wei, X.; Wang, X.; Wang, Y.; Guo, G.; Mao, Y.; Luo, F.; Qian, Z., 2010, Biodegradable self-assembled PEG–PCL–PEG micelles for hydrophobic honokiol delivery: I. Preparation and characterization, *Nanotechnology*, 21, 215103.
79. Zheng, X.; Kan, B.; Gou, M.; Fu, S.; Zhang, J.; Men, K.; Chen, L.; Luo, F.; Zhao, Y.; Zhao, X.; et al., 2010, Preparation of MPEG–PLA nanoparticle for honokiol delivery in vitro, *Int. J. Pharm*, 386, 262–267.
80. 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.
81. Yusuf A Haggag, et al., 2020, Design, Formulation and in vivo Evaluation of Novel Honokiol-Loaded PEGylated PLGA Nanocapsules for Treatment of Breast Cancer, *Dovepress*, 338 (2), 284-293.
82. Tang et al, 2018, Honokiol nanoparticles based on epigallocatechin gallate functionalized chitin to enhance therapeutic effects against liver cancer, *Int. J. Pharm*, 545, 74–83.
83. Chan et al, 2019, Biodegradable Thermosensitive PLGA-PEG-PLGA Polymer for Non-irritating and Sustained Ophthalmic Drug Delivery, *The AAPS Journal*, 21(4), 59.
84. Kadriye Kizibey et al, 2019, Optimization of Rutin-Loaded PLGA Nanoparticles Synthesized by Single-Emulsion Solvent Evaporation Method, *ACS Omega*, 4, 1, 555–562.
85. Alshamsan A, 2014, Nanoprecipitation is more efficient than emulsion solvent evaporation method to encapsulate cucurbitacin I in PLGA nanoparticles, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 22, 219-222.

86. Godara S et al, 2020, Lipid-PLGA hybrid nanoparticles of paclitaxel: Preparation, characterization, in vitro and in vivo evaluation, *Materials Science and Engineering C*, 109, 110576.
87. Beletsi A et al., 2005, Biodistribution properties of nanoparticles based on mixtures of PLGA with PLGA PEG diblock copolymers. *Int. J. Pharm*, 298, 233–241.
88. Clarke, S, 2013, *Development of Hierarchical Magnetic Nanocomposite Materials for Biomedical Applications*, Ph.D. Thesis, Dublin City University, Northside, Dublin.
89. R. Tantra, P. Schulze et al., 2010, Effect of nanoparticle concentration on zeta- potential measurement results and reproducibility, *Particuology*, 8 (3), 279–285.
90. Yoo JW, Chambers E, Mitragotri S, 2010, Factors that control the circulation time of nanoparticles in blood: challenges, solutions and future prospects, *Curr Pharm Des*, 16(21), 2298–2307.
91. Patil et al., 2007, Protein Adsorption and Cellular Uptake of Cerium Oxide Nanoparticles as a Function of Zeta Potential, *Biomaterials*, 28 (31), 4600–4607.
92. Ha P.T., Duong T.Q et al., 2013, In Vitro Apoptosis Enhancement of Hep-G2 Cells by PLA–TPGS and PLA–PEG Block Copolymer Encapsulated Curcumin Nanoparticles. *Chemistry letters*, 42, 255-257.
93. Hesse et al., 2005, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.
94. Albisa, A et al., 2017, Preparation of drug-loaded PLGA-PEG nanoparticles by membrane-assisted nanoprecipitation, *Pharm. Res*, 34, 1296–1308.
95. Lin HL et al., 2021, Honokiol/Magnolol-Loaded Self-Assembling Lecithin-Based Mixed Polymeric Micelles (lbMPMs) for Improving Solubility to Enhance Oral Bioavailability, *Int J Nanomedicine*, 15, 651-665.
96. De Villiers MM, Aramwit P, Kwon GS, 2008, Nanotechnology in drug delivery, *New York: Springer*.
97. Panyam J, Labhasetwar V, 2003, Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells, *Pharm Res*, 20, 212-220.

98. Yasaman Hamedani et al., 2020, Novel Honokiol-eluting PLGA-based scaffold effectively restricts the growth of renal cancer cells, *Plos one*, 15, 255-257.
99. Sherif Ashraf Fahmy et al., 2022, PLGA/PEG Nanoparticles Loaded with Cyclodextrin-Peganum harmala Alkaloid Complex and Ascorbic Acid with Promising Antimicrobial Activities, *Pharmaceutics*, 14(1), 142.
100. Luo, B et al., 2011, Mesoporous Biocompatible and Acid-Degradable Magnetic Colloidal Nanocrystal Clusters with Sustainable Stability and High Hydrophobic Drug Loading Capacity, *Acs Nano*, 5, 1428–1435.
101. Soppimath KS et al., 2001, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *J Control Release*, 70, 1–20.
102. Peracchia MT et al., 1997, PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: investigation of their drug encapsulation and release characteristics, *J Control Release*, 46, 23–223.