

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC

VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

**NGUYỄN VĂN TOÀN**

NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP CÁC NANOGEL MANG THUỐC ĐA  
CHỨC NĂNG TRÊN CƠ SỞ DẪN XUẤT CHITOSAN-PLURONIC  
ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG ĐIỀU TRỊ UNG THƯ

Chuyên ngành: Hóa Hữu cơ

Mã số: 9 44 01 14

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC**

**Hồ Chí Minh-2023**

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học 1: GS. TS. Trần Ngọc Quyển

Người hướng dẫn khoa học 2: TS. Lương Thị Bích

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi ... giờ ...', ngày ... tháng ... năm 2023

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
- Thư viện Quốc gia Việt Nam

## MỞ ĐẦU

### 1. Tính cấp thiết của luận án

Theo hệ thống phân loại sinh dược học của Cơ quan Quản lý Thuốc và Thực phẩm Hoa Kỳ (FDA), trên 75% các hoạt chất nghiên cứu thuốc hiện nay có tính tan kém trong các môi trường dịch sinh lý, hạn chế khả năng hấp thu và đưa thuốc vào tuần hoàn máu. Đối với dược chất kém tan, dược chất được đưa vào bên trong giá mang nano lõi thân dầu giúp tăng đáng kể khả năng hòa tan dược chất. Bề mặt tiểu phân nano thân nước nên dễ dàng phân tán trong môi trường nước và cải thiện vượt trội tính tan dược chất. Trong số các hệ thống phân phối thuốc thì hệ thống phân phối thuốc trên cơ sở vật liệu nanogel được xem là nổi bật do có thể tăng cường hiệu quả nang hóa thuốc thông qua các tương tác tĩnh điện và kỵ nước cũng như đáp ứng việc phân phối thuốc chống ung thư nhắm mục tiêu. Đối với vật liệu phân phối thuốc nanogel, sự kết hợp giữa các vật liệu polymer tự nhiên và polymer tổng hợp đang được quan tâm nhiều vì tận dụng được các tính năng nổi bật của từng loại polymer. Đối với polymer có nguồn gốc tự nhiên, chitosan thường được dùng để tạo ra các loại vật liệu y sinh mang thuốc vì có nhóm chức mang điện tích dương  $-NH_2$  dễ biến tính hóa học hoặc tạo liên kết ngang với phân tử mang điện tích âm, không độc hại và tương thích sinh học tốt. Đối với polymer tổng hợp, polymer lưỡng tính trên cơ sở poly(ethylene glycol) và poly(propylene glycol) đã được sử dụng trong y dược như Pluronic F68 và Pluronic F127. Các nanogel mang thuốc trên cơ sở chitosan ghép Pluronic cho đến nay chỉ được nghiên cứu với Pluronic F127, trong khi đó có rất nhiều loại Pluronic có tiềm năng chưa được nghiên cứu. Các nanogel mang thuốc trên cơ sở chitosan và Pluronic liên hợp với các phối tử hướng đích như folic acid, biotin cho đến nay chỉ được nghiên cứu đối với chitosan hoặc Pluronic riêng lẻ, các nanogel chitosan ghép Pluronic liên hợp với các phối tử này vẫn chưa được nghiên cứu.

Chính vì những lý do trên chúng tôi đã tiến hành thực hiện đề tài: “*Nghiên cứu tổng hợp các nanogel mang thuốc đa chức năng trên cơ sở chitosan–Pluronic định hướng ứng dụng điều trị ung thư*” để tìm ra hệ chất mang nanogel có hiệu quả nang hóa các hợp chất sinh học kỵ nước tốt nhất kết hợp với tác nhân hướng đích (phối tử) nhằm giải phóng thuốc đúng vị trí khối u cần điều trị do tương tác đặc hiệu của phối tử với thụ thể của tế bào ung thư, sẽ giảm đáng kể tác dụng gây độc của thuốc lên tế bào lành. Bên cạnh đó hệ chất mang nanogel có thể kéo dài thời gian phóng thích thuốc góp phần tăng sinh khả dụng của thuốc và hiệu quả của mô hình điều trị.

### **Mục tiêu nghiên cứu**

Điều chế và đánh giá các đặc tính của nanogel trên cơ sở chitosan ghép với các loại Pluronic với các giá trị HLB khác nhau từ kỵ nước đến ưa nước nhằm mục đích tìm ra loại Pluronic nào tạo ra nanogel mang lại hiệu quả nang hóa curcumin cao nhất. Từ đó, thiết kế các hệ thống phân phối thuốc nanogel trên cơ sở chitosan–Pluronic tương ứng với loại Pluronic tốt nhất liên hợp với các phối tử nhằm mục tiêu là acid folic, biotin mang thuốc paclitaxel ứng dụng trong điều trị ung thư vú.

### **Nội dung nghiên cứu**

1. Tổng hợp hệ phân phối thuốc chitosan ghép Pluronic với 4 loại Pluronic L61, P123, F127 và F68. Đánh giá cấu trúc hóa học, đặc tính hóa lý, khả năng tải và giải phóng curcumin, khả năng tương thích sinh học, khả năng ức chế tế bào ung thư vú MCF-7 của hệ chitosan–Pluronic mang curcumin.
2. Tổng hợp hệ phân phối thuốc chitosan–Pluronic liên hợp với tác nhân hướng đích acid folic và biotin. Đánh giá cấu trúc hóa học, đặc tính hóa lý, khả năng tải và giải phóng paclitaxel, khả năng tương thích sinh học, khả năng ức chế tế bào ung thư vú MCF-7 của hệ chitosan–Pluronic hướng đích mang paclitaxel.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

### 1.1. Hệ phân phối thuốc trên cơ sở chitosan

Các thuộc tính của CS như khả năng tương thích sinh học, khả năng phân hủy sinh học kết hợp với các thuộc tính của nanogel như khả năng biến dạng, mềm, diện tích bề mặt lớn, khả năng tải cao và ổn định dễ dàng làm cho nanogel trên cơ sở CS thành vật liệu đầy hứa hẹn để dẫn truyền thuốc, nuôi cấy tế bào và trị liệu.

### 1.2. Hệ phân phối thuốc trên cơ sở Pluronic

Polymer Pluronic® đã được FDA chấp thuận cho sử dụng trong dược phẩm và đã được nghiên cứu cho các ứng dụng điều trị khác nhau. Do tính chất lưỡng tính của chúng, các chất đồng trùng hợp này thể hiện các đặc tính của chất hoạt động bề mặt, bao gồm khả năng tương tác với các bề mặt kỵ nước và màng sinh học. Khi nồng độ của chúng lớn hơn nồng độ micelle tới hạn (CMC), các micelle Pluronic có thể hình thành một cách tự nhiên, dẫn đến một số đặc tính có lợi: khối PPO có thể được sử dụng để mang thuốc kỵ nước, chuỗi PEO ưa nước có tác dụng ổn định và tránh bị loại bỏ bởi hệ thống lưới nội mô. Phần ưa nước của micelle mang lại sự ổn định không gian và do đó kéo dài thời gian lưu thông trong cơ thể, trong khi chất đồng trùng hợp khối kỵ nước có khả năng tải thuốc cao và khả năng tương thích tốt. Hơn nữa, khối kỵ nước của Pluronic có thể cải thiện hiệu quả của quá trình thực bào và thúc đẩy sự hấp thụ thuốc. Một số Pluronic cũng có thể làm cạn kiệt adenosine triphosphate (ATP) nội bào, ức chế chức năng của P-glycoprotein (P-gp), ảnh hưởng đến dòng chảy và vận chuyển thuốc, đồng thời có tác dụng đảo ngược tình trạng kháng đa thuốc của khối u.

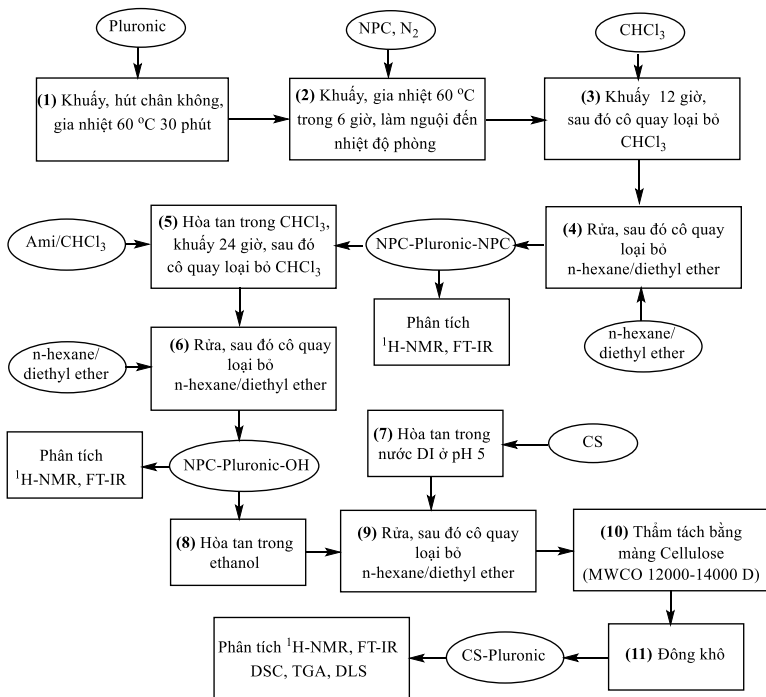
### 1.3. Hệ phân phối thuốc trên cơ sở chitosan–Pluronic

Việc liên hợp giữa chitosan và Pluronic giúp cho các phân tử monome Pluronic được gắn kết trong cùng một khối với phân tử chitosan, từ đó các

phân tử Pluronic không bị phân tán ở nồng độ thấp, góp phần bảo nang hóa các phân tử thuốc kỵ nước bên trong lõi micelle. Các micelle tạo thành từ chitosan liên hợp với Pluronic có độ bền và độ ổn định cao hơn các polysaccharide khác như alginate, hyaluronic acid.... Điều này là do chitosan mang điện tích dương còn Pluronic mang điện tích âm nên các micelle chitosan liên hợp với Pluronic có sự tương tác tĩnh điện giữa hai loại polyme này và chitosan tạo thành lớp vỏ bao bọc bên ngoài lõi kỵ nước bên trong micelle được hình thành bởi phần PPO của Pluronic.

## CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Tổng hợp chitosan – Pluronic (CS–Pluronic)

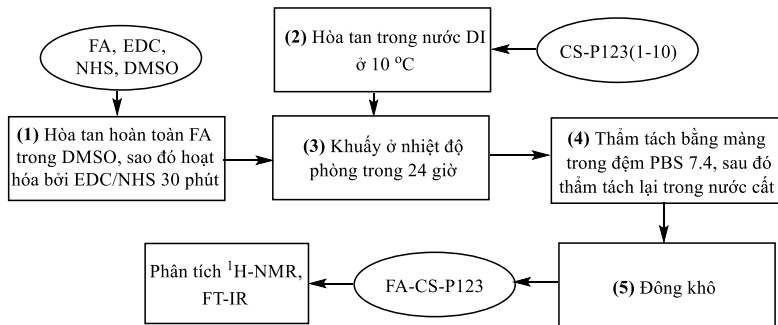


Hình 2. 1. Lưu đồ quy trình tổng hợp CS–Pluronic.

Quá trình tổng hợp chitosan – Pluronic với 4 loại Pluronic khác nhau L61, P123, F127 và F68 trải qua ba giai đoạn bao gồm: hoạt hóa hai đầu hydroxyl của Pluronic với 4-Nitrophenyl chloroformate (NPC) để tạo thành NPC–Pluronic–NPC; các phân tử NPC–Pluronic–NPC được thay thế một phân tử phenylcarbamate ở một đầu mạch bởi phân tử 3-Amine-1-propanol để tạo thành phân tử NPC–Pluronic–OH; ghép phân tử NPC–Pluronic–OH lên mạch chitosan để tạo thành CS–Pluronic. Quy trình tổng hợp được thực hiện theo lưu đồ Hình 2.1.

## 2.2. Tổng hợp folate–chitosan–Pluronic P123 (FA–CS–P123)

FA-CS-P123 được tổng hợp bằng cách liên hợp phân tử FA lên mạch chitosan của phân tử CS-P123. Quy trình tổng hợp được thực hiện theo lưu đồ Hình 2.2.

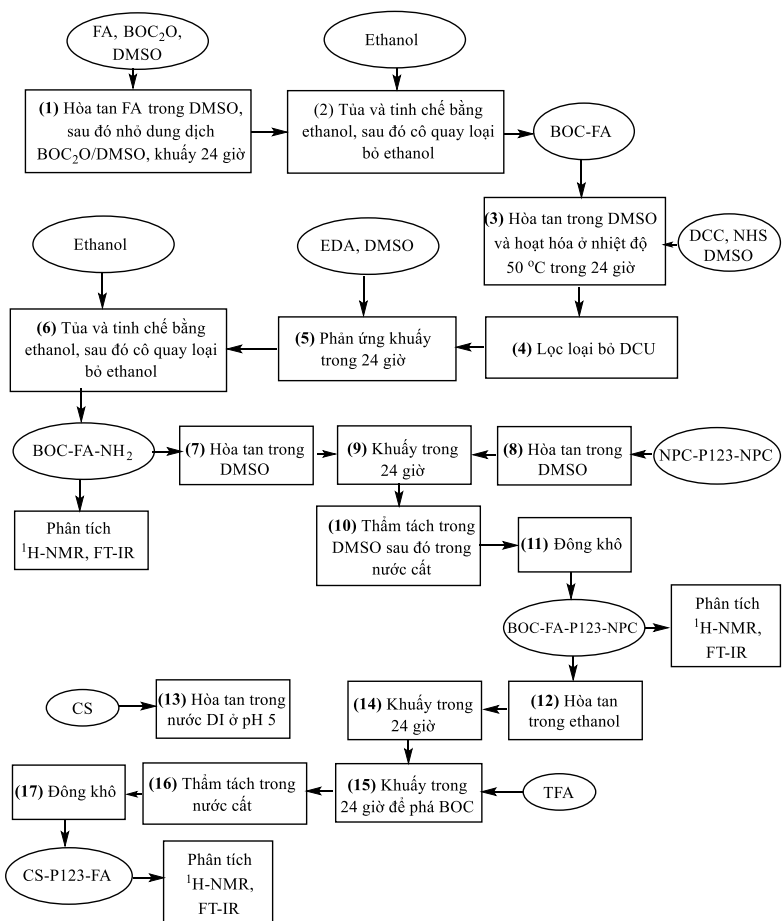


Hình 2. 2. Lưu đồ quy trình tổng hợp FA–CS–P123.

## 2.3. Tổng hợp chitosan–Pluronic P123–folate (CS–P123–FA)

Quá trình tổng hợp CS–P123–FA trải qua ba giai đoạn bao gồm: bảo vệ nhóm chức –NH<sub>2</sub> và liên hợp với EDA của phân tử FA để tạo ra BOC–FA–NH<sub>2</sub>; thay thế nhóm NPC của phân tử NPC–P123–NPC để tạo ra BOC–FA–P123–NPC; ghép phân tử BOC–FA–P123–NPC lên mạch CS

đồng thời phá –BOC để tạo thành CS-P123-FA. Quy trình tổng hợp được thực hiện theo lưu đồ Hình 2.3.



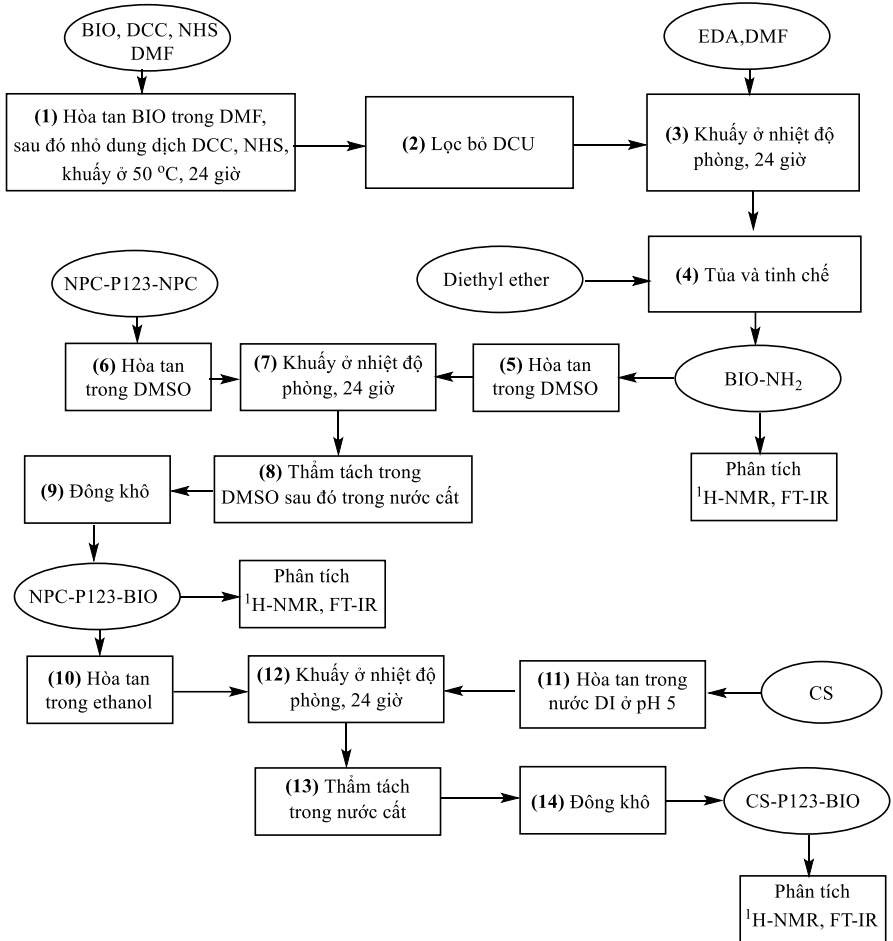
Hình 2. 3. Lưu đồ quy trình tổng hợp CS-P123-FA.

#### 2.4. Tổng hợp chitosan-Pluronic P123-biotin (CS-P123-BIO)

Quá trình tổng hợp CS-P123-BIO trải qua ba giai đoạn bao gồm: BIO được liên hợp với EDA để tạo ra BIO-NH<sub>2</sub>; thay thế nhóm NPC của phân tử NPC-P123-NPC để tạo ra NPC-P123-BIO; ghép phân tử NPC-P123-BIO



lên mạch CS để tạo thành CS-P123-BIO. Quy trình tổng hợp được thực hiện theo lưu đồ Hình 2.4.



Hình 2. 4. Lưu đồ quy trình tổng hợp CS-P123-FA.

### 2.5. Xác định nồng độ micelle tới hạn (CMC) của nanogel

Trong nghiên cứu này, giá trị CMC được xác định bằng phương pháp iốt. Ion iot hòa tan tham gia vào môi trường kỵ nước của các khối PPO của Pluronic,

gây ra sự chuyển I3- thành I2 từ KI dư trong dung dịch. Dưới các giá trị CMC, các chất hoạt động bề mặt thể hiện dưới dạng hợp nhất hơn là ở dạng micelle. Do đó, không có sự chuyển đổi I3- thành I2 làm cho cường độ hấp thụ của dung dịch hỗn hợp không đổi. Sau khi hình thành mixen, I3- được chuyển thành I2 bị cuốn vào không gian kỵ nước của các khối PPO dẫn đến sự gia tăng đáng kể cường độ hấp thụ. Cường độ hấp thụ của I2 đã được vẽ đồ thị dưới dạng hàm của nồng độ của các loại polymer

### **2.6. Xác định khả năng nang hóa thuốc của nanogel**

Trong nghiên cứu này, CUR được sử dụng như là một hoạt chất sinh học kỵ nước và PTX được sử dụng như là một thuốc chống ung thư kỵ nước. Dựa vào đặc điểm của chitosan-Pluronic và các hợp chất kỵ nước, phương pháp hydrat hóa màng mỏng được sử dụng để nang hóa thuốc là phương án tối ưu nhất.

### **2.7. Khảo sát khả năng giải phóng thuốc của nanogel**

Để đánh giá khả năng giải phóng thuốc của hệ nanogel, phương pháp sử dụng màng thẩm tách được sử dụng khá phổ biến trong việc nghiên cứu này. Hỗn hợp dung nanogel mang thuốc được đặt trong màng thẩm tách có kích thước lỗ thẩm tách sao cho lớn hơn kích thước phân tử thuốc nhưng vẫn nhỏ hơn kích thước các phân tử polymer nhằm đảm bảo chỉ cho các phân tử thuốc đi qua màng thẩm tách. Túi thẩm tách được đặt trong môi trường giải phóng ở các giá trị pH khảo sát ở 37 °C.

### **2.8. Đánh giá tính tương thích sinh học của nanogel và độc tính tế bào của hạt nanogel mang thuốc**

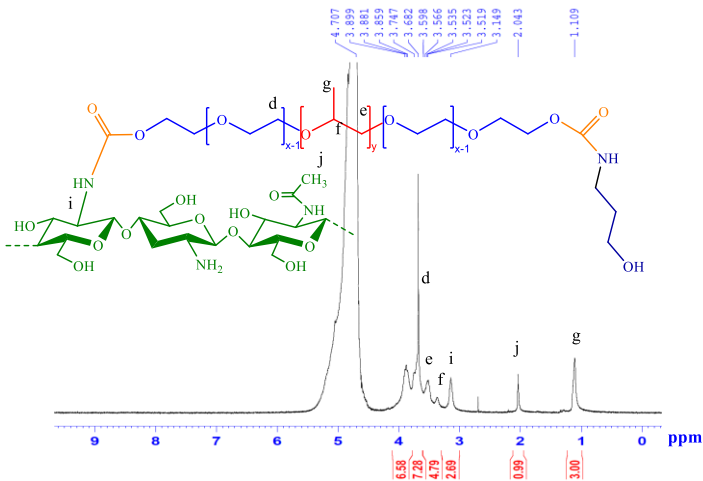
Khả năng tương thích sinh học của các hạt nanogel được thử nghiệm trên dòng tế bào nguyên bào sợi (fibroblast) và độc tính tế bào của các hạt nanogel mang thuốc được thử nghiệm trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 bằng phương pháp nhuộm Sulforhodamine B (SRB).

## CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

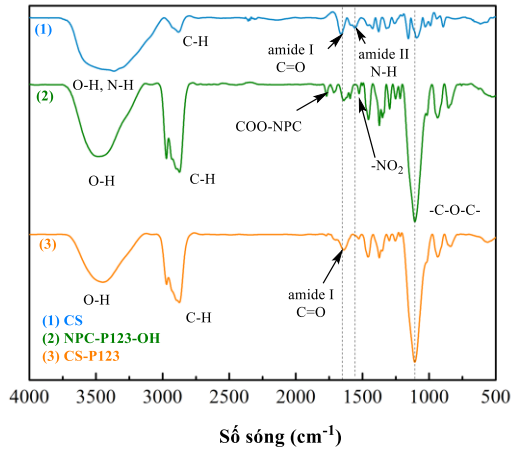
### 3.1 Hệ phân phối thuốc CS–Pluronic

#### 3.1.1. Đặc điểm cấu trúc

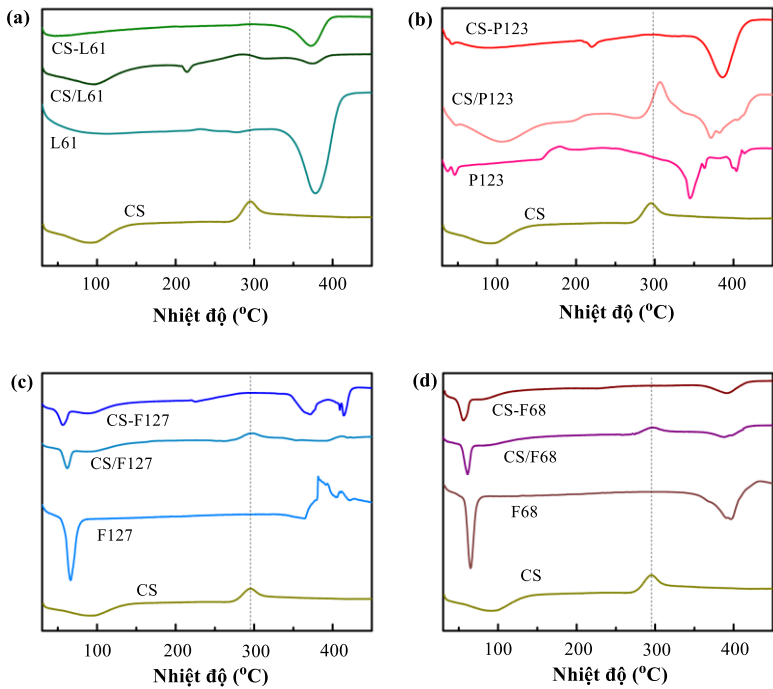
Kết quả phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân Hình 3.1, cho thấy cho thấy rõ ràng các peak cộng hưởng của proton trên cấu trúc Pluronic ở  $\delta \sim 3.7$  ppm (d),  $\delta \sim 3.5$  ppm (e),  $\delta \sim 3.3$  ppm (f) và  $\delta \sim 1.1$  ppm (g). Sự xuất hiện của hai cực đại ở  $\delta \sim 3.0$  ppm (i) và  $\delta \sim 2.0$  ppm (j) được gán cho proton proton nhóm metylen ở vị trí C2 và methyl ( $-\text{CH}_3$ ) của chitosan. Bên cạnh đó, sự biến mất của các tín hiệu hóa học của NPC ở  $\delta \sim 8.3$  ppm (a) và  $\delta \sim 7.4$  ppm (b) cho thấy Pluronic đã được ghép thành công vào chitosan. Đối với phổ FT-IR của các nanogel CS–Pluronic, peak dao động đặc trưng của liên kết N–H của amine và amide II bị suy yếu ở CS–L61, CS–P123 và bị mất đi ở CS–F127, CS–F68, trong khi đó peak dao động đặc trưng cho amide I được tăng cường rõ ràng. Peak amide II giảm đi đồng thời làm mạnh peak amide I có lẽ là do mất nhóm amine bậc một ( $-\text{NH}_2$ ) thành liên kết amide giữa chitosan và Pluronic (Hình 3.2).



Hình 3. 1. Phổ <sup>1</sup>H-NMR của CS–P123.



Hình 3. 2. Phổ FT-IR của CS (1), NPC-P123-OH (2) và CS-P123 (3).



Hình 3. 3. Biểu đồ DSC của CS, các loại Pluronic, các loại CS-Pluronic và hỗn hợp phối trộn vật lý CS/Pluronic. L61 (a), P123 (b), F127 (c) và F68 (d).

Các mẫu được quét ở nhiệt độ dao động từ 30 đến 450 °C với tốc độ gia nhiệt 10 °C/phút. Kết quả phân tích DSC được thể hiện trong Hình 3.3. So sánh biểu đồ nhiệt DSC của các CS-Pluronic và CS/Pluronic ta thấy tất cả biểu đồ nhiệt của CS-Pluronic đều không còn xuất hiện peak tỏa nhiệt tại vùng ~300 °C liên quan đến sự phân hủy các đơn vị amin ( $-NH_2$ ), trong khi đó biểu đồ nhiệt DSC của hỗn hợp CS/Pluronic vẫn xuất hiện peak tỏa nhiệt ở 284 °C (CS/L61), 306 °C (CS/P123), 296 °C (CS/F127) và 297 °C (CS/F68). Sự mất peak tỏa nhiệt tại vùng ~300 °C đối với CS-Pluronic là do các nhóm  $-NH_2$  của phân tử chitosan đã tham gia phản ứng với các phân tử Pluronic tạo thành liên kết amide bền vững.

### 3.1.2. Xác định khả năng ghép của Pluronic lên mạch CS, khả năng nang hóa CUR và đặc điểm của nanogel

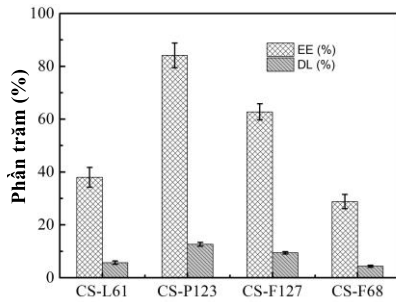
Kết quả tính toán hàm lượng Pluronic và hiệu suất ghép của Pluronic trên mạch chitosan được trình bày trong Bảng 3.1. Kết quả cho thấy hàm lượng của L61 trong CS-L61 là 64.38% với hiệu suất 82.02%, lượng của P123 trong CS-LP123 là 83.95% với hiệu suất 92.33%, hàm lượng của F127 trong CS-F127 là 88.46% với hiệu suất 92.63%, hàm lượng của F68 trong CS-F68 là 81.78% với hiệu suất 87.50%.

Bảng 3. 1. Hiệu suất phản ứng của Pluronic lên chitosan.

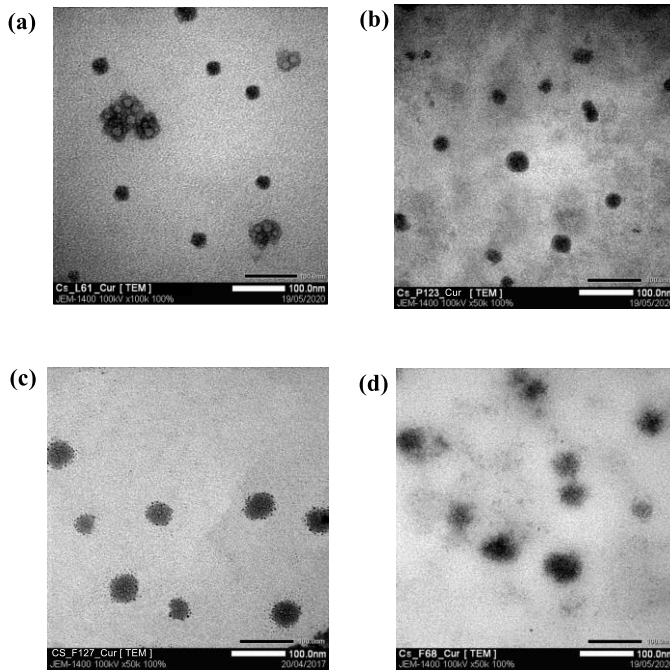
Công thức	% $m_{420}(CS)$	% $m_{420}(nanogel)$	% $m_{CS}(nanogel)$	% $m_{Pluronic}(nanogel)$	% $H$
CS-L61	40.28	14.96	35.62	64.38	82.02
CS-P123	40.28	6.47	16.06	83.94	92.33
CS-F127	40.28	4.65	11.54	88.46	92.63
CS-F68	40.28	7.34	18.22	81.78	87.50

Kết quả nang hóa CUR được đánh giá qua hai giá trị DL% và EE% được thể hiện trên Hình 3.4. Khả năng tải CUR (DL%) của các nanogel CS-L61, CS-P123, CS-F127 và CS-F68 là  $5.70 \pm 0.65\%$ ,  $12.62 \pm 0.71\%$ ,  $9.41 \pm$

0.46% và  $4.32 \pm 0.41\%$  tương ứng với hiệu suất đóng gói (EE%) là  $37.98 \pm 3.75\%$ ,  $84.12 \pm 4.70\%$ ,  $62.76 \pm 3.06\%$  và  $28.82 \pm 2.71\%$ .



Hình 3. 4. Hiệu quả nang hóa CUR của các loại CS-Pluronic



Hình 3. 5. Kết quả TEM của CS-L61/CUR (a), CS-P123/CUR (B), CS-F127/CUR (c) và CS-F68/CUR (d).

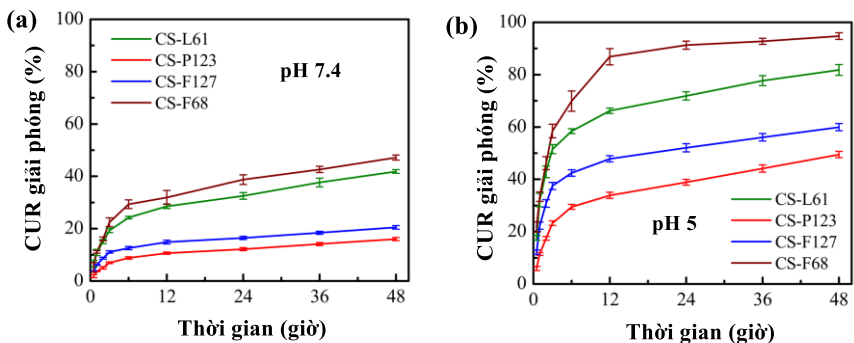
Kết quả TEM được trình bày trong Hình 3.5 cho các hạt nanogel CS-Pluronic/CUR có dạng hình cầu. Đường kính động học và thế zeta của CS-Pluronic/CUR cho thấy các hạt nanogel có kích thước nhỏ hơn 200 nm với điện thế dương phù hợp ứng dụng trong dẫn truyền thuốc điều trị ung thư (Bảng 3.2).

Bảng 3. 2. Kết quả DLS và thế zeta của các hạt nanogel CS-Pluronic/CUR

Tên mẫu	DLS (nm)	Thế zeta (mV)
CS-L61/CUR	157 ± 5.6	99.6 ± 5.4
CS-P123/CUR	77.6 ± 5.5	57.7 ± 3.7
CS-F127/CUR	86.7 ± 3.9	49.2 ± 4.9
CS-F68/CUR	147 ± 4.2	60.5 ± 5.1

### 3.1.3. Kết quả khảo sát khả năng giải phóng CUR của các nanogel CS-Pluronic/CUR

Kết quả khảo sát khả năng giải phóng CUR của các nanogel CS-Pluronic được thể hiện trên Hình 3.6. Nhìn chung, các hạt nanogel CS-Pluronic/CUR giữ CUR ở pH 7.4 và giải phóng mạnh mẽ ở pH 5. Các hạt nanogel CS-P123 có khả năng giải phóng CUR chậm nhất so với các nanogel con lại.



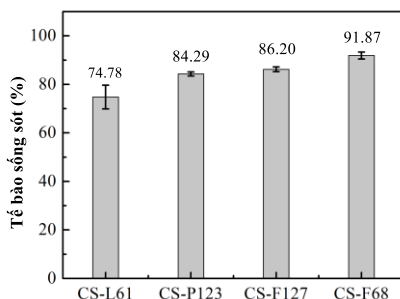
Hình 3. 6. Biểu đồ mô tả quá trình giải phóng CUR của các nanogel CS-Pluronic ở pH 7.4 (a) và pH 5 (b).

### 3.1.4. Đánh giá sự ổn định của nanogel CS-Pluronic/CUR trong quá trình bảo quản sau khi đông khô

Tỷ lệ lưu giữ CUR (DR%) trong các nanogel là thông số quan trọng để đánh giá khả năng giữ thuốc trong lõi micelle của nanogel trong suốt quá trình bảo quản. Tỷ lệ lưu trữ DR% được tính toán với kết quả  $88.35 \pm 3.95$  (CS-L61/CUR),  $97.91 \pm 1.99$  (CS-P123/CUR),  $96.86 \pm 4.23$  (CS-F127/CUR) và  $87.92 \pm 8.92$  (CS-F68/CUR) sau 6 tháng cho thấy CS-P123 có khả năng lưu trữ thuốc kỵ nước cao nhất.

### 3.1.5. Thử nghiệm tính tương thích sinh học của nanogel CS-Pluronic và độc tính tế bào ung thư vú của nanogel CS-Pluronic/CUR

Khả năng sống sót của các tế bào nguyên bào sợi được ủ với các nanogel CS-Pluronic là  $74.78 \pm 4.87\%$  (CS-L61),  $84.29 \pm 0.83\%$  (CS-P123),  $86.20 \pm 0.96\%$  (CS-F127) và  $91.87 \pm 1.44\%$  (CS-F68) ở nồng độ  $100 \mu\text{g/mL}$  sau 48 giờ tiếp xúc (Hình 3.7). Kết quả cho thấy đối với các Pluronic có giá trị HLB tăng dần như L61 (HLB=3), P123 (HLB=8), F127 (HLB=22) và F68 (HLB=29) thì tính tương thích sinh học của các nanogel CS-Pluronic cao.

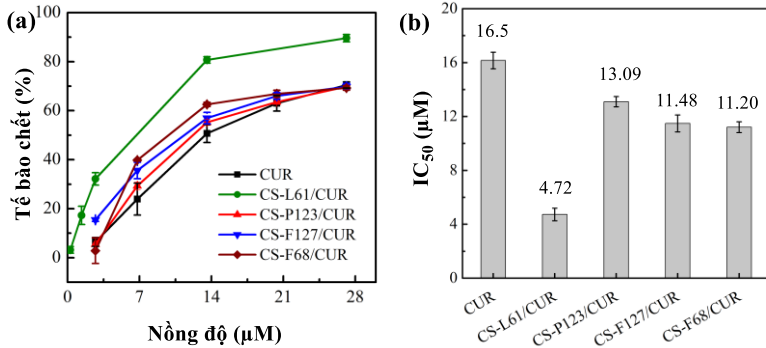


Hình 3. 7. Tỷ lệ sống sót của tế bào fibroblast sau 48 giờ ủ với các loại nanogel CS-Pluronic.

Kết quả độc tính tế bào MCF-7 được trình bày ở Hình 3.8 với giá trị  $IC_{50}$  đạt được là  $16.15 \pm 0.62 \mu\text{M}$  (CUR),  $4.72 \pm 0.46 \mu\text{M}$  (CS-L61/CUR),  $13.09 \pm$



0.38  $\mu\text{M}$  (CS-P123/CUR), 11.48  $\pm$  0.63  $\mu\text{M}$  (CS-F127/CUR) và 11.20  $\pm$  0.40  $\mu\text{M}$  (CS-F68/CUR). Như vậy chất mang nanogel đã tăng cường độc tính của nanogel so với CUR tự do.



Hình 3. 8. Kết quả gây độc tế bào (a) và giá trị  $\text{IC}_{50}$  (b) tính theo CUR.

## 3.2. Tổng hợp hệ dẫn truyền thuốc hướng đích với các phối tử folate (FA) và biotin (BIO)

### 3.2.1. Đặc điểm cấu trúc của FA-CS-P123, CS-P123-FA và CS-P123-BIO

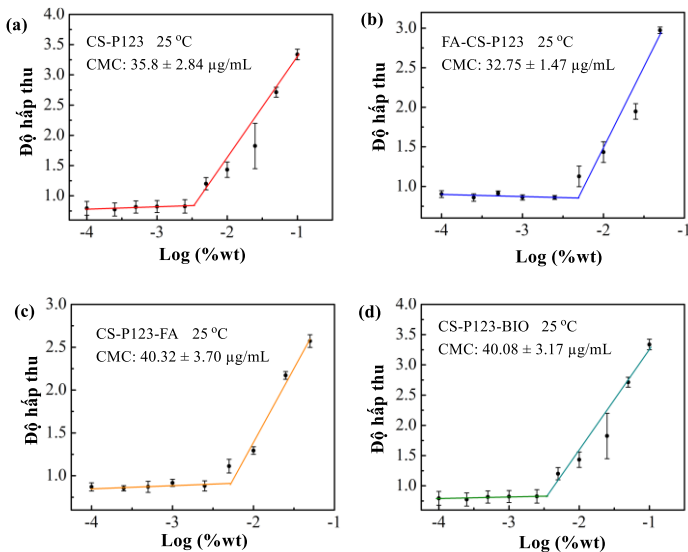
Đặc điểm cấu trúc của các hệ nanogel FA-CS-P123, CS-P123-FA và CS-P123-BIO được xác định bằng phổ  $^1\text{H-NMR}$  và FT-IR. Thông qua việc phân tích phổ đã khẳng định các phối tử FA và BIO đã liên hiệp với phân tử CS-P123.

### 3.2.2. Xác định giá trị CMC, khả năng nang hóa PTX và đặc điểm của nanogel.

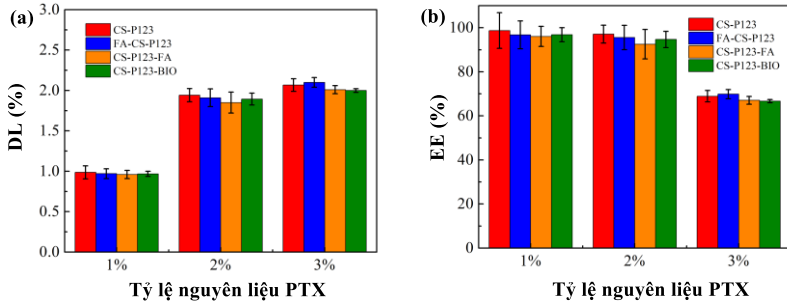
Kết quả đo CMC của CS-P123, FA-CS-P123, CS-P123-FA và CS-P123-BIO được xác định từ biểu đồ Hình 3.9. Giá trị CMC đo được là 35.8  $\pm$  2.84  $\mu\text{g/mL}$  (CS-P123) 32.75  $\pm$  1.47  $\mu\text{g/mL}$  (FA-CS-P123), 40.32  $\pm$  3.70  $\mu\text{g/mL}$  (CS-P123-FA) và 40.08  $\pm$  3.17  $\mu\text{g/mL}$  (CS-P123-BIO) ở 25

°C. Kết quả cho thấy giá trị CMC của các nanogel thấp hơn P123 tinh khiết ( $89.64 \pm 16.37 \mu\text{g/mL}$ ). Kết quả CMC đưa ra một dấu hiệu về sự ổn định nhiệt động học của các micelle.

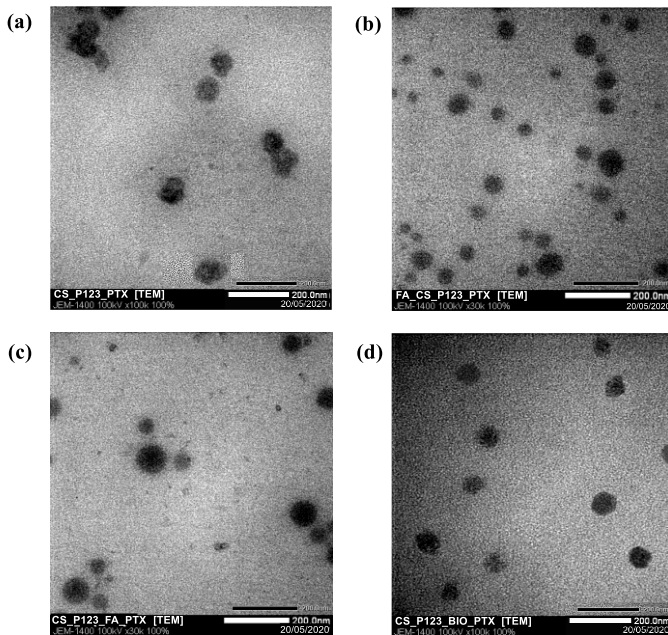
Kết quả nang hóa PTX của các nanogel được thể hiện trên Hình 3.10 cho thấy, ở nồng độ 2% PTX, các công thức nanogel đạt được khả năng nang hóa PTX tối đa với giá trị EE% là  $93.00 \pm 7.32\%$  (CS-P123/PTX),  $95.57 \pm 5.51\%$  (FA-CS-P123/PTX),  $92.51 \pm 6.68\%$  (CS-P123-FA/PTX) và  $87.17 \pm 7.96\%$  (CS-P123-BIO/PTX). Sự khác biệt không có ý nghĩa được quan sát giữa 1% PTX và 2% PTX ( $p > 0.05$ ) và sự khác biệt có ý nghĩa được quan sát thấy ở 2% PTX và 3% PTX ( $p < 0.05$ ) đối với EE%, chứng tỏ sự lựa chọn nồng độ tải PTX ở mức 2% sẽ làm giảm sự mất mát của PTX. Ngoài ra, sự khác biệt đáng kể đã được quan sát thấy giữa 1% PTX và 2% PTX ( $p < 0.05$ ), và sự khác biệt không có ý nghĩa được quan sát thấy ở 2% PTX và 3% PTX ( $p > 0.05$ ) đối với DL%, chứng tỏ các nanogel có hiệu suất tải tối đa khoảng 2% PTX.



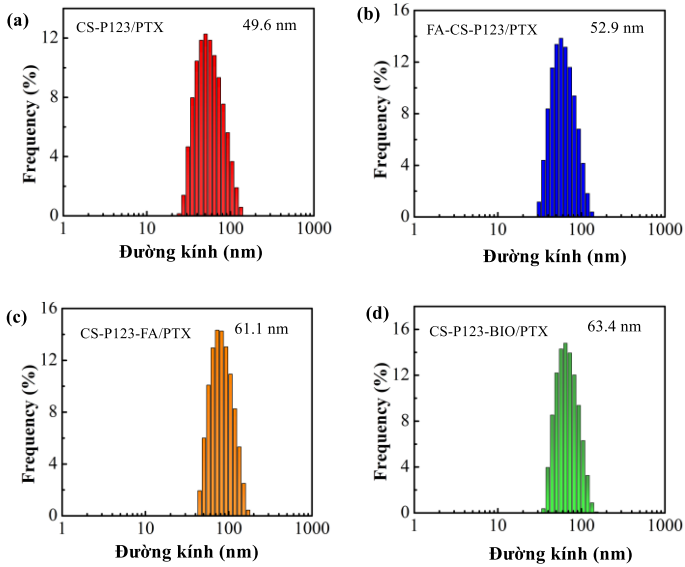
Hình 3. 9. Biểu đồ xác định giá trị CMC của CS-P123 (a), FA-CS-P123 (b), CS-P123-FA (c) và CS-P123-BIO (d).



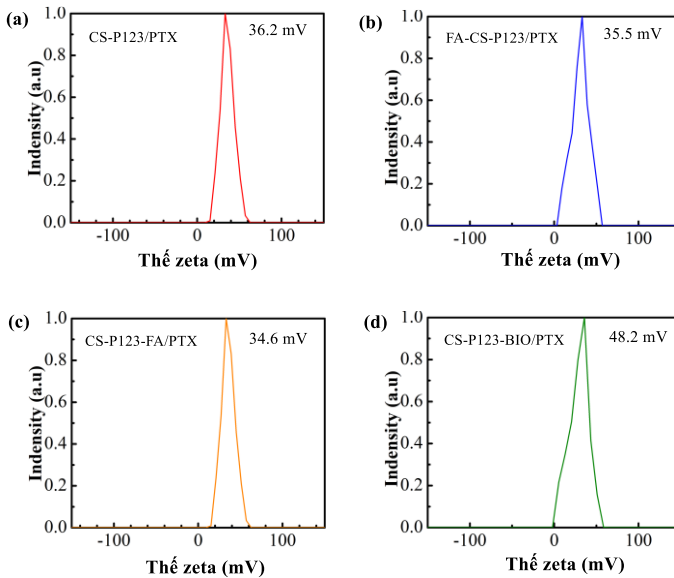
Hình 3. 10. Biểu đồ biểu diễn phần trăm PTX (DL) (a) và hiệu suất PTX (EE) (b) được mang trong các loại nanogel.



Hình 3. 11. Hình TEM của CS-P123/PTX (a), FA-CS-P123/PTX (b), CS-P123-FA/PTX (c) và CS-P123-BIO/PTX (d).



Hình 3. 12. Kết quả DLS của CS-P123/PTX (a), FA-CS-P123/PTX (b), CS-P123-FA/PTX (c) và CS-P123-BIO/PTX (d).

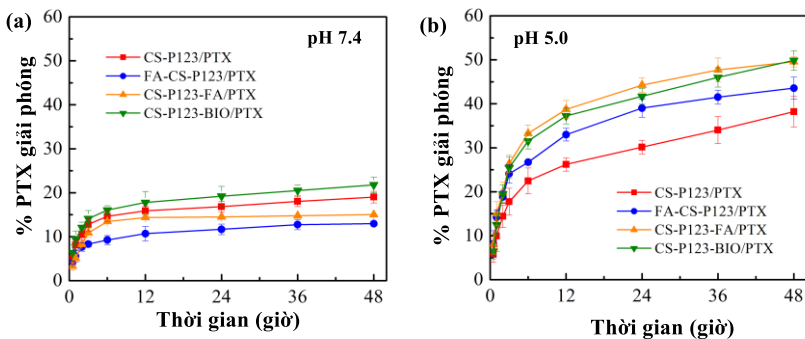


Hình 3. 13. Kết quả thế zeta của CS-P123/PTX (a), FA-CS-P123/PTX (b), CS-P123-FA/PTX (c) và CS-P123-BIO/PTX (d).

Kết quả TEM, DLS và thế zeta của các nanogel mang PTX được thể hiện trên Hình 3.11, Hình 3.12 và Hình 3.13. Từ kết quả TEM và DLS cho thấy, các nanogel có hình cầu với đường kính động học là  $49.6 \pm 1.1$  nm (CS-P123/PTX),  $52.90 \pm 2.16$  nm (FA-CS-P123/PTX),  $61.13 \pm 2.43$  nm (CS-P123-FA/PTX) và  $63.4 \pm 0.6$  nm (CS-P123-BIO/PTX). Giá trị điện thế zeta được ghi lại ở  $36.2 \pm 1.6$  mV (CS-P123/PTX),  $35.5 \pm 1.3$  mV (FA-CS-P123/PTX),  $34.6 \pm 1.0$  mV (CS-P123-FA/PTX) và  $48.2 \pm 1.0$  mV (CS-P123-BIO/PTX).

### 3.2.3. Kết quả khảo sát khả năng giải phóng PTX của các nanogel mang PTX

Khả năng giải phóng PTX của các nanogel FA-CS-P123/PTX và CS-P123-FA/PTX được đánh giá trong hai môi trường sinh lý cơ thể (pH 7.4) và tại khối u (pH 5) được thể hiện trên Hình 3.14. Kết quả cho thấy, ở pH 7.4, phần trăm giải phóng tích lũy của PTX từ nanogel lần lượt là 19.02% (CS-P123/PTX), 12.96% (FA-CS-P123/PTX), 15.04% (CS-P123-FA/PTX) và 21.78% (CS-P123-BIO/PTX) sau 48 giờ. Ngược lại, các số liệu giải phóng PTX từ các nanogel ở pH 5.0 sau 48 giờ cao hơn đáng kể, lần lượt là 38.21% (CS-P123/PTX), 43.56% (FA-CS-P123/PTX), 49.56% (CS-P123-FA/PTX) và 49.86% (CS-P123-BIO/PTX).



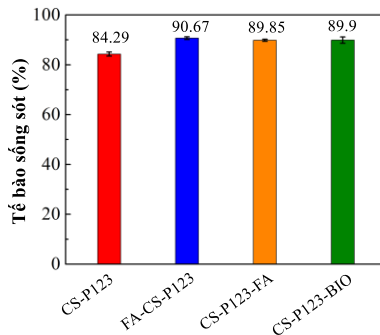
Hình 3. 14. Biểu đồ mô tả quá trình giải phóng PTX của các nanogel ở pH 7.4 (a) và pH 5.0 (b).

### 3.3.4. Đánh giá sự ổn định trong quá trình bảo quản của nanogel mang PTX sau khi đông khô

Tính ổn định của các nanogel mang PTX đã được nghiên cứu ở nhiệt độ phòng trong vòng 6 tháng được phản ánh bằng việc giảm nhẹ EE%, DL%, và sự gia tăng nhỏ trong kích thước các micelle (DLS), thế zeta. Ngoài ra, tỷ lệ lưu giữ PTX (DR%) trong các nanogel trên 95%.

### 3.3.5. Thử nghiệm tính tương thích sinh học của nanogel và độc tính tế bào ung thư vú của nanogel mang PTX

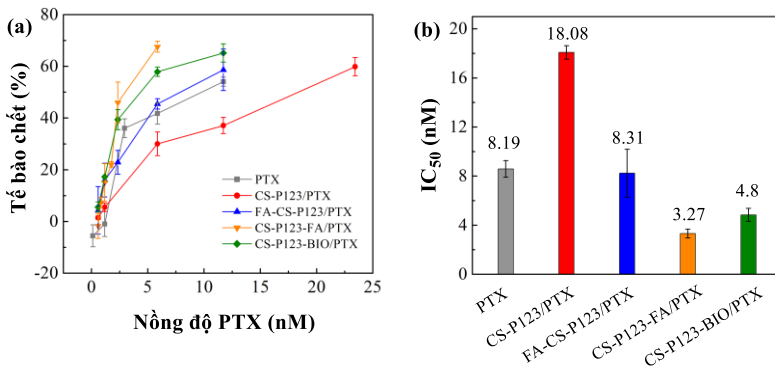
Kết quả thử nghiệm tính tương thích sinh học trên tế bào fibroblast được thể hiện trên Hình 3.15, khả năng sống sót của các tế bào nguyên bào sợi được ủ với các nanogel là  $84.29 \pm 0.83\%$  (CS-P123),  $90.67 \pm 0.55\%$  (FA-CS-P123)  $89.86 \pm 0.42\%$  (CS-P123-FA) và  $89.90 \pm 1.26\%$  (CS-P123-BIO) ở nồng độ  $100 \mu\text{g/mL}$  sau 48 giờ tiếp xúc. Kết quả cho thấy các hạt nanogel mang phối tử hướng đích có khả năng ức chế sự phát triển tế bào fibroblast thấp hơn so với các hạt nanogel không mang phối tử (CS-P123).



Hình 3. 15. Tỷ lệ sống sót của tế bào nguyên bào sợi sau khi u với nanogel ở nồng độ  $100 \mu\text{g/mL}$  sau 48 giờ.

Kết quả độc tính tế bào MCF-7 được trình bày ở Hình 3.16 với giá trị  $IC_{50}$  đạt được là  $8.19 \pm 1.17 \text{ nM}$  (PTX tự do),  $18.08 \pm 0.55 \text{ nM}$  (CS-P123/PTX),

$8.31 \pm 1.99$  nM (FA-CS-P123/PTX),  $3.27 \pm 0.35$  nM (CS-P123-FA/PTX) và  $4.80 \pm 0.46$  nM (CS-P123-BIO/PTX). Kết quả chỉ ra rằng các hạt nanogel mang phối tử hướng đích FA hoặc BIO có khả năng tiêu diệt tế bào MCF-7 mạnh hơn so với nanogel không mang phối tử (CS-P123) và PTX tự do. Tuy nhiên, khả năng tiêu diệt tế bào MCF-7 của FA-CS-P123/PTX thấp hơn so với CS-P123-FA/PTX là do hàm lượng FA trong FA-CS-P123 ít hơn so với CS-P123-FA.



Hình 3. 16. Kết quả gây độc tế bào (a) và giá trị IC<sub>50</sub> (b) của PTX tự do và các nanogel mang PTX.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

Với mục tiêu và nội dung nghiên cứu của luận án “Nghiên cứu tổng hợp các nanogel mang thuốc đa chức năng trên cơ sở dẫn xuất chitosan-Pluronic định hướng ứng dụng điều trị ung thư”. Một số kết quả nổi bật của luận án đã đạt được tóm tắt như sau:

1. Đã tổng hợp thành công hệ phân phối thuốc nanogel CS-Pluronic với 4 loại Pluronic khác nhau là L61, P123, F127 và F68 thông qua kết quả phân tích phổ <sup>1</sup>H-NMR, FT-IR, TGA, DSC. Kết quả đánh giá mối quan hệ giữa DL (%), CMC và HLB của các loại Pluronic tương ứng cho thấy giá trị DL

(%) của CS-P123 > CS-F127 > CS-L61 > CS-F68, giá trị CMC của CS-P123 < CS-F127 < CS-L61 < CS-F68 và P123 < F127 < L61 < F68, giá trị HLB của L61 < P123 < F127 < F68. Như vậy khả năng nang hóa CUR của nanogel CS-Pluronic phụ thuộc vào giá trị CMC của CS-Pluronic cũng như Pluronic mà không phụ thuộc vào giá trị HLB của Pluronic tiền chất. Trong số các loại nanogel CS-Pluronic, CS-P123 có khả năng nang hóa CUR cao nhất tương ứng với giá trị CMC thấp nhất, đồng thời có khả năng lưu giữ CUR cao nhất sau thời gian 6 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng. Kết quả phân tích TEM, DLS cho thấy các hạt nanogel CS-Pluronic mang CUR có kích thước phù hợp cho việc phân phối thuốc. Kết quả khảo sát khả năng giải phóng CUR cho thấy các nanogel CS-Pluronic giữ thuốc ở môi trường pH 7.4 (phù hợp với môi trường sinh lý cơ thể) và giải phóng mạnh ở môi trường pH 5 (phù hợp với môi trường khối u ung thư). Nghiên cứu độc tính tế bào *in vitro* cho thấy nanogel an toàn và ít độc tính và phù hợp để phân phối CUR hỗ trợ điều trị ung thư vú. Hiệu quả nang hóa hợp chất kỵ nước cao và ổn định, CS-P123 là lựa chọn hiệu quả cho việc nghiên cứu hệ phân phối thuốc.

2. Đã tổng hợp thành công hệ phân phối thuốc CS-P123 với tác nhân hướng đích là FA và BIO. Các nanogel đã được xác định cấu trúc hóa học, giá trị CMC, khả năng nang hóa PTX, đặc điểm hình thái, kích thước, điện tích thông qua các kết quả phân tích  $^1\text{H-NMR}$ , FT-IR, TGA, DSC, TEM, DLS. Kết quả cho thấy, khả năng nang hóa PTX của các nanogel không khác nhau đáng kể, đạt mức tối ưu là 2% PTX, các hạt nanogel mang PTX có kích thước phù hợp cho việc phân phối thuốc. Kết quả thử nghiệm *in vitro* cho thấy khả năng giải phóng PTX của nanogel mạnh trong môi trường acid, trong khi đó giữ thuốc trong môi trường sinh lý cơ thể. Với phương án thiết kế liên hợp phối tử hướng đích FA lên mạch Pluronic P123 của hệ CS-P123-FA so với phương án thiết kế liên hợp phối tử FA lên mạch chitosan của hệ



FA-CS-P123 là một phương pháp mới chưa được nghiên cứu trước đây. Với phương án thiết kế này, hàm lượng FA trong hệ CS-P123-FA (0.71%) lớn hơn trong hệ FA-CS-P123 (0.31%) và do đó hệ CS-P123-FA mang lại hiệu quả tương tác hướng đích tế bào ung thư vú (MCF-7) hơn so với hệ FA-CS-P123, điều này thể hiện qua hình ảnh huỳnh quang cũng như khả năng tiêu diệt tế bào MCF-7 của CS-P123-FA/PTX ( $IC_{50}=3.27\text{ nM}$ ) mạnh hơn so với FA-CS-P123/PTX ( $IC_{50}=8.31\text{ nM}$ ). Trên cơ sở đó, phối tử hướng đích BIO được lựa chọn phương án thiết kế liên hợp với mạch Pluronic P123 trong hệ CS-P123-BIO để đánh giá hiệu quả hướng đích của BIO so với FA. Việc thử nghiệm khả năng tiêu diệt tế bào MCF-7 của PTX thông qua nanogel CS-P123-BIO/PTX ( $IC_{50}=4.8\text{ nM}$ ) có thể khẳng định BIO là một phối tử có thể thay thế FA trong việc thiết kế hệ phân phối thuốc hướng đích.

## KIẾN NGHỊ

1. Tiếp tục đánh giá khả năng sử dụng hệ nanogel CS-Pluronic mang CUR cho việc điều trị viêm loét dạ dày theo đường uống.
2. Tiếp tục lựa chọn các tác nhân hướng đích khác nhau như: peptit, các kháng thể (antibody) nhằm lựa chọn tác nhân hướng đích tốt nhất có thể.
3. Sử dụng phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy (flow cytometry) để xác định tế bào apoptotic.
4. Tiếp tục nghiên cứu *in vivo* để đánh giá một cách toàn diện tác dụng của tác nhân hướng đích FA và BIO.
5. Tiếp tục nghiên cứu khả năng mang đa thuốc chống ung thư của hệ chất mang CS-P123 hướng đích trên cơ sở paclitaxel kết hợp với cyclophosphamide, mitoxantrone, edatrexate, 5-fluorouracil và doxorubicin.

## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. Lyna Pham, Le Hang Dang, Minh Dung Truong, Thi Hiep Nguyen, Ly Le, Van Thu Le, Nguyen Dang Nam, Long Giang Bach, **Van Toan Nguyen**, Ngoc Quyen Tran, A dual synergistic of curcumin and gelatin on thermal-responsive hydrogel based on Chitosan-P123 in wound healing application, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2019**, *117*, 109183. IF: 7.419, Q1.
2. **Van Toan Nguyen**, Phuong Doan, Dinh Trung Nguyen, Van-Dat Doan, Tan Phat Dao, Vitalii Plavskii, Bich Tram Nguyen, Ngoc Quyen Tran, Effect of targeting ligand designation of self-assembly chitosan-poloxamer nanogels loaded Paclitacel on inhibiting MCF-7 cancer cell growth. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **2021**, *33(4)*, 426-442. IF: 3.517, Q2.
3. **Van Toan Nguyen**, Quoc Trung Nguyen, Ngoc Thach Pham, Dinh Trung Nguyen, Tri Nhut Pham, Ngoc Quyen Tran, An in vitro investigation into targeted paclitaxel delivery nanomaterials based on CS-Plu P123-biotin copolymer for inhibiting human breast cancer cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **2021**, *66*, 102807. IF: 5.062, Q1.