

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**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ HÓA HỌC

Hồ Chí Minh - 2023

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

LUẬN ÁN TIẾN SỸ HÓA HỌC

Mã số: 9 44 01 14

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1

Người hướng dẫn 2

PGS. TS. Trần Ngọc Quyên

TS. Lương Thị Bích

Hồ Chí Minh - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận án 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 án là trung thực, nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Nghiên cứu sinh**Nguyễn Văn Toàn**

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin trân trọng cảm ơn thầy cô đã định hướng khoa học, giúp đỡ tận tình trong suốt quá trình thực hiện luận án. Xin gửi đến Thầy và Cô những lời biết ơn chân thành nhất.

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

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

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

Nghiên cứu sinh

Nguyễn Văn Toàn

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	3
1.1. Tổng quan về bệnh ung thư và những tiến bộ trong hóa trị liệu.....	3
1.1.1. Ung thư và những thách thức trong hóa trị liệu	3
1.1.2. Các hệ thống phân phối thuốc trên cơ sở vật liệu nano	5
1.1.3. Phân phối thuốc hướng đích	8
1.2. Hệ phân phối thuốc nanogel.....	10
1.2.1. Vật liệu chế tạo nanogel.....	10
1.2.2. Tính chất đặc trưng của nanogel	11
1.2.3. Ứng dụng của nanogel trong phân phối thuốc trị liệu	13
1.3. Hệ phân phối thuốc nanogel trên cơ sở chitosan	16
1.3.1. Đặc điểm và tính chất của chitosan	16
1.3.2. Hệ phân phối thuốc nanogel trên cơ sở chitosan	17
1.4. Hệ phân phối thuốc nanogel trên cơ sở Pluronic	20
1.4.1. Đặc điểm và tính chất của Pluronic.....	20
1.4.2. Hệ phân phối thuốc nanogel trên cơ sở Pluronic	22
1.5. Định hướng nghiên cứu hệ phân phối thuốc nanogel trên cơ sở chitosan ghép Pluronic	28
1.5.1. Những nghiên cứu hệ phân phối thuốc nanogel chitosan ghép Pluronic	28
1.5.2. Lựa chọn tác nhân nang hóa cho nanogel chitosan ghép Pluronic	33
CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM	35
2.1. Hóa chất và thiết bị	35
2.1.1. Hóa chất	35
2.1.2. Dụng cụ, thiết bị thí nghiệm.....	35
2.1.3. Thiết bị phân tích tính chất và cấu trúc của vật liệu	35
2.2. Thực nghiệm	36
2.2.1. Tổng hợp chitosan – Pluronic (CS–Pluronic).....	36
2.2.2. Tổng hợp folate–chitosan–Pluronic P123 (FA–CS–P123).....	40

2.2.3. Tổng hợp chitosan–Pluronic P123–folate (CS–P123–FA).....	41
2.2.3. Tổng hợp chitosan–Pluronic P123–biotin (CS–P123–BIO).....	43
2.2.4. Xác định nồng độ micelle tới hạn (CMC) của nanogel	45
2.2.5. Xác định khả năng nang hóa thuốc của nanogel.....	45
2.2.6. Khảo sát khả năng giải phóng thuốc của nanogel.....	47
2.2.7. Động học quá trình giải phóng thuốc từ nanogel.....	48
2.2.8. Đánh giá sự ổn định trong quá trình bảo quản của nanogel mang thuốc sau khi đông khô.....	49
2.2.9. Đánh giá tính tương thích sinh học của nanogel và độc tính tế bào của hạt nanogel mang thuốc	49
2.2.10. Đánh giá khả năng hấp thu nội bào của các hạt nanogel mang thuốc	51
2.2.11. Phân tích thống kê.....	51
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	52
3.1. Hệ phân phối thuốc CS–Pluronic.....	52
3.1.1. Tổng hợp NPC–Pluronic–NPC	52
3.1.2. Tổng hợp NPC–Pluronic–OH	55
3.1.3. Tổng hợp hệ phân phối thuốc CS–Pluronic	58
3.1.4. Xác định khả năng ghép của Pluronic lên mạch CS, khả năng nang hóa CUR và đặc điểm của nanogel.....	62
3.1.5. Kết quả khảo sát khả năng giải phóng CUR của các nanogel CS–Pluronic/CUR	74
3.1.6. Đánh giá sự ổn định của nanogel CS–Pluronic/CUR trong quá trình bảo quản sau khi đông khô.....	77
3.1.7. Thử nghiệm tính tương thích sinh học của nanogel CS–Pluronic và độc tính tế bào ung thư vú của nanogel CS–Pluronic/CUR	78
3.1.8. Tổng kết các kết quả đạt được của hệ phân phối thuốc nanogel CS–Pluronic mang CUR	82
3.2. Tổng hợp hệ phân phối thuốc hướng đích với các phối tử folate (FA) và biotin (BIO)	83
3.2.1. Tổng hợp FA–CS–P123	83
3.2.2. Tổng hợp CS–P123–FA.....	86

3.3.3. Tổng hợp CS–P123–BIO	92
3.3.4. Xác định giá trị CMC, khả năng nang hóa PTX và đặc điểm của nanogel.	99
3.3.5. Kết quả khảo sát khả năng giải phóng PTX của các nanogel mang PTX	103
3.3.6. Đánh giá sự ổn định trong quá trình bảo quản của nanogel mang PTX sau khi đông khô	105
3.3.7. Thử nghiệm tính tương thích sinh học của nanogel và độc tính tế bào ung thư vú của nanogel mang PTX.....	106
3.3.8. Tổng kết các kết quả đạt được của hệ phân phối thuốc nanogel CS–Pluronic hướng đích mang PTX.....	111
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	112
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ	114
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	115
PHỤ LỤC.....	136

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Ý nghĩa
CS	Chitosan
L61	Pluronic L61
Plu	Pluronic
P123	Pluronic P123
F127	Pluronic F127
F68	Pluronic F68
NPC	p-nitrophenyl chloroformate
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylamino)propyl carbodiimide
NHS	N-hydroxysuccinimide
DCC	Dicyclohexyl carbodiimide
Ami	3-amine-1-propanol
EDA	Ethylenediamine
CUR	Curcumin
BOC ₂ O	Di-tert-butyl dicarbonate
PTX	Paclitaxel
FA	Folic acid
BIO	Biotin
DLS	Dynamic Light Scattering
TEM	Transmission Electron Microscopy
¹ H-NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
FT-IR	Fourier Transform Infrared spectroscopy
TGA	Thermogravimetric Analyzer: Phân tích nhiệt trọng lượng
DSC	Differential Scanning Calorimeter
CMC	Critical Micelle Concentration: Nồng độ micelle tới hạn
CMT	Critical micellar temperature: Nhiệt độ micelle tới hạn
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance: Cân bằng ưa nước - ưa béo
SRB	Sulforhodamine B colorimetric assay

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2. 1. Hàm lượng Pluronic và NPC tham gia phản ứng.....	38
Bảng 2. 2. Hàm lượng NPC-Pluronic-NPC và 3-Amine-1-propanol tham gia phản ứng.....	39
Bảng 2. 3. Tỷ lệ CS và NPC-P123-OH tham gia phản ứng.....	40
Bảng 2. 4. Tỷ lệ CUR, polymer và dung môi dùng để nang hóa.....	46
Bảng 2. 5. Tỷ lệ PTX, polymer và dung môi dùng để nang hóa.....	47
Bảng 3. 1. Kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$ của các loại NPC-Pluronic-NPC.	53
Bảng 3. 2. Hiệu suất hoạt hóa NPC của các loại Pluronic.	53
Bảng 3. 3. Kết quả phổ FT-IR của các loại NPC-Pluronic-NPC.	54
Bảng 3. 4. Kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$ của các loại NPC-Pluronic-OH.	56
Bảng 3. 5. Phần trăm nhóm NPC còn giữ lại trên phân tử NPC-Pluronic-OH.....	56
Bảng 3. 6. Kết quả phổ FT-IR của các loại NPC-Pluronic-OH.	58
Bảng 3. 7. Kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$ của các loại CS-Pluronic.	59
Bảng 3. 8. Kết quả phổ FT-IR của các loại CS và các loại CS-Pluronic.	60
Bảng 3. 9. Hiệu suất phản ứng của P123 lên chitosan.	63
Bảng 3. 10. Hiệu suất phản ứng của Pluronic lên chitosan.....	68
Bảng 3. 11. Giá trị DLS của các loại CS-Pluronic ở 25 °C và 37 °C.....	70
Bảng 3. 12. Kết quả DLS và thế zeta của các hạt nanogel CS-Pluronic/CUR.	73
Bảng 3. 13. Các thông số mô hình động học giải phóng CUR của các nanogel CS-Pluronic.	75
Bảng 3. 14. Các thông số giải phóng CUR từ các nanogel CS-Pluronic.	76
Bảng 3. 15. Sự ổn định của các nanogel CS-Pluronic/CUR bảo quản sau đông khô ở nhiệt độ phòng.....	77
Bảng 3. 16. So sánh kết quả đạt được của hệ phân phối thuốc CS-L61, CS-P123, CS-F127 và CS-F68.	82
Bảng 3. 17. Kết quả phân tích phổ FT-IR của FA, CS-P123, FA-CS-P123.....	85
Bảng 3. 18. Kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$ của FA và BOC-FA-NH ₂	87
Bảng 3. 19. Kết quả phổ FT-IR của FA và BOC-FA-NH ₂	88

Bảng 3. 20. Kết quả phân tích phổ FT-IT của NPC-P123-NPC và BOC-FA-P123-NPC.....	90
Bảng 3. 21. Kết quả phân tích phổ FT-IR của BOC-FA-P123-NPC và CS-P123-FA.....	92
Bảng 3. 22. Kết quả phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$ của BIO và BIO-NH ₂	94
Bảng 3. 23. Kết quả phân tích phổ FT-IR của BIO và BIO-NH ₂	95
Bảng 3. 24. Kết quả phân tích phổ FT-IR của NPC-P123-NPC và NPC-P123-BIO.	97
Bảng 3. 25. Kết quả phân tích phổ FT-IR của CS, NPC-P123-BIO và CS-P123-BIO.	99
Bảng 3. 26. Các thông số mô hình động học giải phóng PTX của các nanogel.	104
Bảng 3. 27. Các thông số giải phóng PTX của của các nanogel.....	105
Bảng 3. 28. Sự ổn định của các nanogel mang PTX bảo quản sau đông khô ở nhiệt độ phòng.....	106
Bảng 3. 29. So sánh các kết quả đạt được hệ phân phối thuốc nanogel hướng đích mang PTX.	111

DANH MỤC HÌNH

Hình 1. 1. Phân phối thuốc bị động [48].	9
Hình 1. 2. Phân phối thuốc hướng đích chủ động [50].	10
Hình 1. 3. Cấu trúc hóa học của chitosan [104].	16
Hình 1. 4. Sơ đồ tổng hợp chitosan-galactose [123].	18
Hình 1. 5. Sơ đồ tổng hợp chitosan-folate [125].	19
Hình 1. 6. Sơ đồ tổng hợp chitosan-biotin [139].	20
Hình 1. 7. Cấu trúc hóa học của Pluronic (a) và sự hình thành micelle (b) [118].	21
Hình 1. 8. Quá trình hình thành hydrogel [148].	21
Hình 1. 9. Sơ đồ tổng hợp Pluronic F127-FA [162].	23
Hình 1. 10. Sơ đồ tổng hợp Pluronic F127-biotin [163].	24
Hình 1. 11. Sơ đồ tổng hợp chitosan-Pluronic F127 [178].	29
Hình 1. 12. Sơ đồ tổng hợp chitosan-Pluronic F127 [179].	29
Hình 1. 13. Sơ đồ tổng hợp oligochitosan-Pluronic F127 [180].	30
Hình 1. 14. Sơ đồ tổng hợp chitosan-Pluronic L61 [181].	31
Hình 1. 15. Sơ đồ tổng hợp Pluronic F127/F68 diacrylate và chitosan acrylate [182].	31
.....	31
Hình 1. 16. Cấu trúc hóa học của curcumin và paclitaxel.	34
Hình 2. 1. Lưu đồ quy trình tổng hợp CS-Pluronic.	37
Hình 2. 2. Lưu đồ quy trình tổng hợp FA-CS-P123.	41
Hình 2. 3. Lưu đồ quy trình tổng hợp CS-P123-FA.	42
Hình 2. 4. Lưu đồ quy trình tổng hợp CS-P123-BIO.	44
Hình 2. 5. Sơ đồ mô tả sự chuyển hóa giữa I_3^- và I_2 trong phương pháp xác định nồng độ CMC bằng UV-Vis.	45
Hình 2. 6. Phương pháp hydrate màng mỏng nang hóa thuốc.	46
Hình 2. 7. Phương pháp thực nghiệm giải phóng thuốc.	47
Hình 3. 1. Sơ đồ tổng hợp NPC-Pluronic-NPC.	52
Hình 3. 2. Phổ 1H -NMR của NPC-P123-NPC.	53
Hình 3. 3. Phổ FT-IR của P123 (1) và NPC-P123-NPC (2).	54
Hình 3. 4. Sơ đồ tổng hợp NPC-Pluronic-OH.	55
Hình 3. 5. Phổ 1H -NMR của NPC-P123-OH.	56

Hình 3. 6. Phổ FT-IR của NPC-P123-NPC (1) và NPC-P123-OH (2).	57
Hình 3. 7. Sơ đồ tổng hợp CS-Pluronic.	58
Hình 3. 8. Phổ ¹ H-NMR của CS-P123.	59
Hình 3. 9. Phổ FT-IR của CS (1), NPC-P123-OH (2) và CS-P123 (3).	60
Hình 3. 10. 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).	61
Hình 3. 11. Biểu đồ TGA của CS, P123 và CS-P123 với các tỷ lệ ghép khác nhau.	63
Hình 3. 12. Giá trị CMC của P123 và CS-P123 ở các tỷ lệ ghép khác nhau tại nhiệt độ 25 °C và 37 °C.	64
Hình 3. 13. Giá trị DLS của P123 và CS-P123 ở các tỷ lệ khác nhau tại nhiệt độ 25 °C và 37 °C.	65
Hình 3. 14. Biểu đồ biểu diễn giá trị EE (%) và DL(%) của P123 và CS-P123 mang CUR.	66
Hình 3. 15. Biểu đồ biểu diễn giá trị EE, DL và CMC của P123 và CS-P123.	67
Hình 3. 16. Biểu đồ TGA của CS, các loại Pluronic và các loại CS-Pluronic. L61 (a), P123 (b), F127 (c) và F68 (d).	68
Hình 3. 17. Biểu đồ biểu diễn sự thay đổi giá trị CMC và HLB của các loại Pluronic.	69
Hình 3. 18. Biểu đồ biểu diễn sự thay đổi giá trị CMC của các loại CS-Pluronic và HLB của các loại Pluronic.	70
Hình 3. 19. Hiệu quả nang hóa CUR của các loại CS-Pluronic.	71
Hình 3. 20. Biểu đồ biểu diễn giá trị EE, DL và CMC của các loại CS-Pluronic.	71
Hình 3. 21. Kết quả TEM của CS-L61/CUR (a), CS-P123/CUR (B), CS-F127/CUR (c) và CS-F68/CUR (d).	72
Hình 3. 22. Biểu đồ biểu diễn giá trị thế zeta và hàm lượng CS của các mẫu CS-Pluronic/CUR.	73
Hình 3. 23. Biểu đồ mô tả quá trình giải phóng CUR của các nanogel CS-Pluronic ở pH 7.4 (a) và pH 5 (b).	74
Hình 3. 24. Biểu đồ biểu diễn giá trị CMC và %CUR giải phóng sau 48 giờ ở pH 7.4 và pH 5 của các mẫu CS-Pluronic/CUR.	74

Hình 3. 25. Tỷ lệ sống sót của tế bào fibroblast sau 48 giờ ủ với các loại nanogel CS-Pluronic.	79
Hình 3. 26. Hình ảnh hiển vi huỳnh quang của tế bào nguyên bào sợi nhuộm màu kép AO/EB sau khi xử lý với các loại CS-Pluronic: đối chứng (a), CS-L61 (b), CS-P123 (c), CS-F127 (d) và CS-F68 (e) sau 48 giờ ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$	79
Hình 3. 27. Kết quả gây độc tế bào (a) và giá trị IC_{50} (b) tính theo CUR.....	81
Hình 3. 28. Hình ảnh hiển vi huỳnh quang của tế bào MCF-7 nhuộm màu kép AO/EB sau khi xử lý với các loại CS-Pluronic/CUR: đối chứng (a), CS-L61/CUR (b), CS-P123/CUR (c), CS-F127/CUR (d) và CS-F68/CUR (e) sau 48 giờ ở nồng độ IC_{50}	81
Hình 3. 29. Sơ đồ tổng hợp FA-CS-P123.	83
Hình 3. 30. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của FA-CS-P123.	84
Hình 3. 31. Phổ FT-IR của FA (1), CS-P123 (2) và FA-CS-P123 (3).....	85
Hình 3. 32. Sơ đồ tổng hợp CS-P123-FA.	86
Hình 3. 33. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của BOC-FA-NH ₂	87
Hình 3. 34. Phổ FT-IR của FA (1) và BOC-FA-NH ₂	88
Hình 3. 35. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của BOC-FA-P123-NPC.	89
Hình 3. 36. Phổ FT-IR của NPC-P123-NPC (1) và BOC-FA-P123-NPC (2).	90
Hình 3. 37. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của CS-P123-FA.....	91
Hình 3. 38. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của BOC-FA-P123-NPC (1) và CS-P123-FA (2).....	92
Hình 3. 39. Sơ đồ tổng hợp CS-P123-BIO.....	93
Hình 3. 40. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của BIO-NH ₂	94
Hình 3. 41. Phổ FT-IR của BIO (1) và BIO-NH ₂	95
Hình 3. 42. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của NPC-P123-BIO.....	96
Hình 3. 43. Phổ FT-IR của NPC-P123-NPC và NPC-P123-BIO.....	97
Hình 3. 44. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của CS-P123-BIO.....	98
Hình 3. 45. Phổ FT-IR của CS (1), NPC-P123-BIO (2) và CS-P123-BIO(3).	98
Hình 3. 46. Biểu đồ xác định giá trị CMC của CS-P123 (a), FA-CS-P123 (b), CS-P123-FA (c) và CS-P123-BIO (d).....	100
Hình 3. 47. Biểu đồ biểu diễn phần trăm PTX (DL) (a) và hiệu suất PTX (EE) (b) được mang trong các loại nanogel.	100

Hình 3. 48. Hình TEM của CS-P123/PTX (a), FA-CS-P123/PTX (b), CS-P123-FA/PTX (c) và CS-P123-BIO/PTX (d).	101
Hình 3. 49. Kết quả DLS của CS-P123/PTX (a), FA-CS-P123/PTX (b), CS-P123-FA/PTX (c) và CS-P123-BIO/PTX (d).	102
Hình 3. 50. 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).	103
Hình 3. 51. Biểu đồ mô tả quá trình giải phóng PTX của các nanogel ở pH 7.4 (a) và pH 5.0 (b).	104
Hình 3. 52. Tỷ lệ sống sót của tế bào nguyên bào sợi sau khi u với nanogel ở nồng độ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sau 48 giờ.	107
Hình 3. 53. Hình ảnh hiển vi huỳnh quang của tế bào fibroblast nhuộm màu kép AO/EB của mẫu đối chứng (a) sau khi xử lý với CS-P123 (b), FA-CS-P123 (c), CS-P123-FA (d) và CS-P123-BIO (e) sau 48 giờ ở nồng độ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	107
Hình 3. 54. Hình ảnh hiển vi huỳnh quang quan sát sự hấp thu tế bào của nanogel trong tế bào MCF-7 sau 1 giờ ủ ở nồng độ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	109
Hình 3. 55. Kết quả gây độc tế bào (a) và giá trị IC_{50} (b) của PTX tự do và các nanogel mang PTX.	109
Hình 3. 56. Hình ảnh hiển vi huỳnh quang của tế bào MCF-7 nhuộm màu kép AO/EB của mẫu đối chứng (a) sau khi xử lý với CS-P123/PTX (b), FA-CS-P123/PTX (c), CS-P123-FA/PTX (d) và CS-P123-BIO/PTX (e) sau 48 giờ ở nồng độ IC_{50}	110

MỞ ĐẦU

Lý do chọn đề tài

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 tiêu 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.

Những đóng góp mới của luận án

Đề tài có giá trị trong việc nghiên cứu hệ phân phối thuốc nanogel trên cơ sở chitosan ghép Pluronic. Trong số các loại Pluronic L61, P123, F127 và F68 với các giá trị HLB tương ứng 3, 8, 24 và 29 thì khả năng nang hóa curcumin của các nanogel chitosan – Pluronic không phụ thuộc vào giá trị HLB của Pluronic mà phụ thuộc vào giá trị CMC của Pluronic cũng như chitosan – Pluronic. Chitosan đã tăng cường hiệu quả nang hóa curcumin của các hệ micelle CS–Pluronic so với hệ micelle Pluronic tiền chất. Các nanogel có tính tương thích sinh học tốt với tế bào lành. Các nanogel mang curcumin có khả năng ức chế tế bào ung thư vú MCF-7.

Các hạt nanogel chitosan–Pluronic P123 (CS–P123) liên hợp với phối tử nhắm mục tiêu tự động như folic acid, biotin lần đầu tiên được tổng hợp đã tăng cường khả năng tiêu diệt tế bào ung thư vú MCF-7 của paclitaxel so với paclitaxel tự do và được nang hóa trong nanogel không có phối tử. Các phối tử folic acid liên hợp lên mạch Pluronic có khả năng hấp thu tế bào ung thư vú MCF-7 hiệu quả hơn so với liên hợp lên mạch chitosan. Các phối tử folic acid tăng cường khả năng tiêu diệt tế bào ung thư vú MCF-7 mạnh hơn so với biotin trên cùng một mô hình thí nghiệm *in vitro*.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về bệnh ung thư và những tiến bộ trong hóa trị liệu

1.1.1. Ung thư và những thách thức trong hóa trị liệu

Ung thư là một vấn đề sức khỏe cộng đồng lớn trên toàn thế giới. Theo thống kê của GLOBOCAN về số ca mắc ung thư và số ca tử vong do ung thư trên toàn thế giới thì có khoảng 19.3 triệu trường hợp ung thư mới và gần 10 triệu trường hợp tử vong do ung thư xảy ra vào năm 2020. Ung thư vú ở nữ đã vượt qua ung thư phổi là loại ung thư được chẩn đoán phổ biến nhất, với ước tính có khoảng 2.3 triệu ca mắc mới (11.7%), tiếp theo là ung thư phổi (11.4%), đại trực tràng (10.0%), tuyến tiền liệt (7.3%) và dạ dày (5.6%). Ung thư phổi vẫn là nguyên nhân gây tử vong do ung thư hàng đầu, với ước tính 1.8 triệu ca tử vong (18%), tiếp theo là ung thư đại trực tràng (9.4%), gan (8.3%), dạ dày (7.7%) và ung thư vú ở nữ (6.9%). Số ca mắc ung thư toàn cầu dự kiến là 28.4 triệu ca vào năm 2040, tăng 47% so với năm 2020 [1]. Tại Việt Nam, ước tính có 182563 ca mắc mới và 122690 ca tử vong do ung thư vào năm 2020. Cứ 100000 người thì có 159 người chẩn đoán mắc mới ung thư và 106 người tử vong do ung thư. Ung thư gan dẫn đầu với số người mắc bệnh chiếm 14.5%, tiếp theo là ung thư phổi 14.4%, ung thư vú ở nữ (11.8%), ung thư dạ dày (9.8%) và ung thư đại trực tràng (9%) [2].

Hầu hết bệnh nhân ung thư được phẫu thuật và cũng được điều trị bổ sung sau phẫu thuật, chẳng hạn như hóa trị, liệu pháp hormone hoặc xạ trị. Hóa trị cũng có thể được chỉ định trước khi phẫu thuật trong một số tình huống. Ngành công nghiệp dược phẩm ngày càng tập trung nỗ lực vào việc nghiên cứu, phát triển và tiếp thị các sản phẩm thuốc điều trị ung thư mới để đáp ứng nhu cầu y tế chưa được đáp ứng, dẫn đến việc FDA Hoa Kỳ phê duyệt 90 loại thuốc điều trị ung thư mới kể từ năm 2012 [3]. Các thành phần dược hoạt tính được sử dụng để điều trị ung thư rất đa dạng về cấu trúc hóa học và dược lý, bao gồm các phân tử nhỏ, kháng thể đơn dòng và peptide [4]. Hầu hết các phương pháp điều trị ung thư vú thường được áp dụng hiện nay là phác đồ phối hợp. Tuy nhiên, để thành công, các dược chất trị liệu này luôn yêu cầu việc lựa chọn các đường dùng tốt nhất cho đơn trị liệu (uống hoặc tiêm), tối ưu hóa công thức và hệ thống phân phối thuốc để cho phép tiếp cận tối ưu với các tế bào ung thư được nhắm mục tiêu.

Các đường dùng khác nhau thường được sử dụng trong các liệu pháp điều trị ung thư, đặc biệt là đường uống và đường tiêm tĩnh mạch, trong khi đường tiêm dưới da cho đến nay rất hạn chế. Hầu hết, phương thức điều trị được sử dụng quyết định việc lựa chọn đường dùng. Do đó, phân phối qua đường miệng là tiêu chuẩn

vàng cho các phân tử nhỏ, trong khi tiêm tĩnh mạch vẫn là đường ưa thích đối với các phân tử thách thức hơn như sinh học, hoặc hệ thống phân phối thuốc ở kích thước nano. Tiêm dưới da là phương pháp tạo ra nhiều nghiên cứu tiền lâm sàng nhưng vẫn ít được thể hiện trong quá trình phát triển và phê duyệt thuốc ung thư giai đoạn cuối. Do đó, các giải pháp cải tiến trong công thức và hệ thống phân phối thuốc sẽ được yêu cầu để cung cấp tính linh hoạt hơn và nhiều lựa chọn hơn trong đường dùng thuốc, cho phép phân phối thuốc tối ưu đến các tế bào hoặc mô ung thư [5,6]. Tiêm tĩnh mạch cho phép thuốc tiếp cận trực tiếp vào bất kỳ hệ mạch máu cơ quan nào trong cơ thể và đảm bảo sinh khả dụng cao hơn so với đường uống. Tuy nhiên, con đường phân phối thuốc điều trị ung thư bằng tiêm tĩnh mạch này vẫn phải đối mặt với các thách thức trong điều trị như thời gian truyền thường kéo dài do được động học kém, chuyển hóa mạnh, đào thải nhanh hoặc thời gian cư trú ngắn tại vị trí khối u [7-9].

Các tác nhân hóa trị liệu thông thường không đặc hiệu và phân bố ở cả mô bình thường, dẫn đến các tác dụng phụ nghiêm trọng và gây độc tính ngoài mục tiêu điều trị mong muốn, do đó đòi hỏi các liệu pháp nhắm mục tiêu để tăng hiệu quả điều trị. Một số liệu pháp điều trị ung thư khác, chẳng hạn như liệu pháp miễn dịch hoặc liệu pháp nhắm mục tiêu, cũng có thể có biểu hiện mục tiêu rộng hơn, không chỉ giới hạn ở các vị trí khối u mà còn hiện diện ở nhiều cơ quan bình thường, dẫn đến tác dụng phụ không mong muốn [10].

Một số thành phần dược liệu cho thấy khả năng hòa tan kém với sinh khả dụng hạn chế. Chúng cũng có thể có tính ổn định kém trong đường tiêu hóa và khả năng thẩm thấu kém qua biểu mô ruột khiến chúng không thích hợp để dùng theo đường uống. Ví dụ các kháng thể đơn dòng ocrelizumab (Ocrevus®) hoặc atezolizumab (Tecentriq®) được sử dụng như tác nhân điều trị miễn dịch và được tiêm vào tĩnh mạch để kích thích hệ thống miễn dịch ung thư. Các thành phần dược liệu có các đặc tính hóa lý hoặc dược động học không thuận lợi cho việc sử dụng con đường uống hoặc tiêm tĩnh mạch. Chẳng hạn, các phân tử nhỏ như paclitaxel (Taxol®) hoặc doxorubicin (Adriamycin®) thường kém tan trong môi trường sinh học, do đó yêu cầu cần sửa đổi hóa học hoặc pha trộn với các tá dược khác để dễ dàng sử dụng chúng cho đường tiêm. Các phân tử hoạt tính này cũng có các tác dụng phụ trong các mô bình thường, điều này sẽ hạn chế hiệu quả điều trị của chúng [11].

Xem xét tất cả những trở ngại này, các chiến lược phát triển hệ thống phân phối thuốc để đảm bảo phân phối đúng loại thuốc, đúng vị trí khối u cần điều trị,

thời gian lưu giữ thuốc phù hợp, đồng thời giảm thiểu tác dụng phụ đối với các tế bào khỏe mạnh đang được nghiên cứu và ứng dụng trong điều trị ung thư. Mặc dù các công nghệ điều chế và cải tiến các hệ thống phân phối thuốc có tính tương thích sinh học đã đạt được những thành công trong ứng dụng điều trị ung thư nhưng các chiến lược cải tiến dựa trên việc sử dụng công nghệ nano trong phân phối thuốc có thể giải quyết được phần nào cho các thách thức nêu trên.

1.1.2. Các hệ thống phân phối thuốc trên cơ sở vật liệu nano

Sự phát triển của công nghệ nano tạo ra rất nhiều bước tiến vượt bậc trong tất cả các lĩnh vực khoa học công nghệ. Công nghệ nano đã tạo ra hàng loạt vật liệu mới, kích thước từ vài nm tới 100 nm được sử dụng trong nghiên cứu các dạng thuốc mới có khả năng vận chuyển dược chất đến các bộ phận mong muốn trong cơ thể với liều lượng thích hợp và theo đúng thời gian mong muốn [12, 13].

Liposome được Alec Bangham phát hiện vào năm 1960 được xem là một trong những hệ thống phân phối thuốc được nghiên cứu và ứng dụng nhiều nhất trong ngành dược phẩm và mỹ phẩm. Chúng có cấu trúc như một chiếc túi dạng hình cầu được cấu tạo từ phospholipid và steroid [14]. Liposome làm cho các hợp chất trị liệu trở nên ổn định, có thể được sử dụng với các loại thuốc ưa nước và kỵ nước, đồng thời cũng có khả năng tương thích sinh học và phân hủy sinh học. Ngoài ra, liposome cũng được liên kết với các phân tử polyetylen glycol (PEG) trên bề mặt để đạt được thời gian lưu thông trong máu cao, hoặc liên hợp với phối tử nhắm mục tiêu thông chuỗi PEG đã gắn trước đó để tăng cường phân phối thuốc đúng mục tiêu vị trí khối u. Ví dụ như Doxil, một loại liposome PEG hóa được nạp doxorubicin (DOX) là các hạt nano liposome đầu tiên được FDA chấp thuận vào năm 1995 để điều trị bệnh Sarcoma Kaposi liên quan đến AIDS. Công thức này làm giảm đáng kể các tác dụng phụ của doxorubicin [15, 16]. Kể từ đó, các công thức liposome khác đã được FDA chấp thuận cho điều trị ung thư, chẳng hạn như Myocet và DaunoXome [17–19].

Dendrimer là polymer có cấu trúc ba chiều, phân nhánh cao, được xác định rõ ràng. Chúng có dạng hình cầu và bề mặt của chúng được chức năng hóa dễ dàng theo cách được kiểm soát, điều này làm cho chúng trở thành vật liệu phân phối thuốc được quan tâm [20,21,22]. Các dendrimer được phân chia thành nhiều loại tùy theo các gốc chức năng của chúng bao gồm PAMAM, PPI, tinh thể lỏng, lõi-vỏ, bất đối kháng, peptide, glycodendrimer và PAMAMOS, trong đó PAMAM được nghiên cứu nhiều nhất để phân phối thuốc qua đường uống vì nó dễ hòa tan được trong nước và có thể đi qua mô biểu mô [23]. Các dendrimer bị hạn chế trong các

ứng dụng lâm sàng do có sự hiện diện của các nhóm amine. Các nhóm này tích điện dương khiến chúng trở nên độc hại, do đó dendrimer thường được biến đổi bề mặt để giảm hoặc loại bỏ vấn đề độc tính này. Việc tải thuốc trong dendrimer được thực hiện thông qua các cơ chế đóng gói đơn giản, tương tác tĩnh điện hoặc liên hợp cộng hóa trị. Dendrimer thực hiện giải phóng thuốc theo hai con đường khác nhau như phân hủy các liên kết cộng hóa trị giữa dendrimer và thuốc trong *in vivo* với tác nhân enzym thích hợp hoặc môi trường thuận lợi để cắt đứt các liên kết và giải phóng thuốc như pH, nhiệt độ, ... [24]. Dendrimer cũng đã được phát triển để phân phối thuốc qua da, qua đường miệng, mắt, phổi [25]. Jain cùng cộng sự (2014) đã phát triển dendrimer poly-L-lysine liên hợp với tác nhân hướng đích folate để mang doxorubicin như một mô hình mang thuốc chống ung thư nhắm mục tiêu có khả năng giải phóng thuốc phụ thuộc vào pH và được chứng minh qua nồng độ doxorubicin trong khối u gấp 121.5 lần sau 24 giờ so với DOX tự do [26].

Các hạt nano vô cơ bao gồm các hạt nano bạc, vàng, oxit sắt và silica phần lớn chúng vẫn đang trong giai đoạn thử nghiệm phân phối thuốc lâm sàng. Đối với các hạt nano vô cơ, thuốc có thể được liên hợp với bề mặt hạt nano thông qua liên kết ion, cộng hóa trị hoặc hấp thụ vật lý. Chúng có thể phân phối và kiểm soát sự giải phóng thuốc thông qua các kích thích sinh học hoặc kích hoạt ánh sáng [27]. Các hạt nano bạc phần lớn ứng dụng kháng khuẩn, và rất ít nghiên cứu ứng dụng phân phối thuốc, ví dụ, Prusty và Swain (2018) đã điều chế hydrogel polyacrylamide/dextran liên kết với các hạt nano bạc qua liên kết cộng hóa trị để phân phối thuốc ornidazole [28]. Đối với các hạt nano oxit sắt, Marcu và các cộng sự (2013) các hạt nano oxit sắt được tổng hợp bằng phương pháp nhiệt phân laze và được bao phủ bởi Violamycine B1, kháng sinh antracyclinic dùng để ức chế và tiêu diệt tế bào ung thư vú MCF-7 [29]

Các chấm lượng tử (QDs) đã được nghiên cứu rộng rãi như phân phối thuốc mục tiêu, cảm biến và hình ảnh sinh học. QDs cũng có thể mang lại lợi ích trong việc giải phóng bền vững và có kiểm soát các phân tử trị liệu thông qua kích thích bên ngoài bằng ánh sáng, nhiệt, tần số vô tuyến hoặc từ trường [30]. Cai và cộng sự (2016) đã điều chế chấm lượng tử nhạy pH ZnO phủ PEG và hyaluronic acid (HA) để tăng cường độ ổn định trong điều kiện sinh lý và để nhắm mục tiêu các tế bào CD44 mang thụ thể HA. Các hạt nano này nạp DOX bằng cách tạo phức với ion Zn^{2+} hoặc liên hợp với PEG và DOX chỉ được giải phóng trong môi trường nội bào có tính acid của khối u do sự phá vỡ các QDs ZnO. Kết quả cho thấy hoạt động chống khối u được tăng cường nhờ sự kết hợp giữa DOX và QDs ZnO [31]. Olerile và cộng sự (2017) đã phát triển một hệ thống trị liệu dựa trên sự kết hợp của QDs và

thuốc chống ung thư PTX được bọc trong chất mang lipid có cấu trúc nano như một hệ thống đa chức năng với hiệu quả bao bọc PTX cao ($80.7 \pm 2.11\%$) và tỷ lệ ức chế sự phát triển của khối u là 77.85% [32].

Polysaccharide và protein được gọi chung là polymer sinh học tự nhiên và được chiết xuất từ các nguồn sinh học như thực vật, động vật, vi sinh vật và nguồn biển [33, 34]. Các hạt nano dựa trên protein thường có thể phân hủy, chuyển hóa và dễ dàng chức năng hóa để gắn với các loại thuốc hoặc các phối tử nhắm mục tiêu khác. Các hạt nano dựa trên protein được thay đổi về mặt hóa học để kết hợp các phối tử nhắm mục tiêu xác định các tế bào và mô chính xác nhằm tăng cường cơ chế nhắm mục tiêu của chúng [35]. Polysaccharide có nhược điểm chính là dễ phân hủy ở nhiệt độ cao và hầu hết hòa tan trong nước, điều này hạn chế ứng dụng của chúng trong một số lĩnh vực y học nano, chẳng hạn như kỹ thuật mô. Tuy nhiên, việc tạo liên kết ngang của chuỗi polymer đã được sử dụng để đảm bảo tính ổn định của chuỗi polysaccharide trong môi trường nước [36, 37]. Thành công của các polymer sinh học này trong lĩnh vực phân phối thuốc là có thể chế tạo vật liệu nano với các đặc tính và cấu trúc mong muốn như gel mềm, cấu trúc xốp, độ cứng và chúng có sự tương đồng lớn với các thành phần của ngoại bào, có thể tránh được các phản ứng miễn dịch [38, 39].

Nanogel, một loại vật liệu mang phân phối thuốc toàn thân, là hydrogel có cấu trúc có cấu trúc 3D được hình thành bởi các liên kết vật lý hoặc hóa học với kích thước hạt nằm trong phạm vi dưới từ 20 đến 250 nm [40]. Nanogel được điều chế từ polymer tự nhiên, polymer tổng hợp hoặc sự kết hợp của chúng, góp phần vào việc bao bọc các phân tử nhỏ, oligonucleotide và thậm chí cả protein. Những đặc tính độc đáo này trang bị cho nanogel khả năng phân phối thuốc, chẩn đoán và chụp ảnh [41]. Là một loại hydrogel, nanogel giữ được bản chất ngậm nước cao và đặc tính trương nở co rút trong các điều kiện môi trường khác nhau [42]. Cấu trúc 3D của chúng cho phép đóng gói các thuốc kỵ nước hoặc ưa nước trong mạng nội bộ của chúng và có khả năng bảo vệ các thuốc này khỏi sự xuống cấp trong quá trình bảo quản hoặc lưu thông (chẳng hạn như sự xuống cấp do thủy phân hoặc enzyme) [43]. Không giống như các hạt nano điển hình, nanogel có thể điều chỉnh được kích thước, hình dạng hạt và độ nhạy cảm với pH, nhiệt độ, nồng độ ion, điều kiện oxy hóa khử và các kích thích bên ngoài khác, mang lại cho chúng các đặc tính giải phóng thuốc được kiểm soát hiệu quả [44]. Hơn nữa, nanogel có thể được điều chỉnh để trở nên đa chức năng và được nhắm mục tiêu, đồng thời thời có thể tăng thời gian lưu thông của chúng bằng cách sửa đổi bề mặt [45]. Dựa trên những ưu

điểm trên, hệ thống phân phối thuốc nanogel đã trở nên phổ biến và có tác động đáng kể trong những năm gần đây.

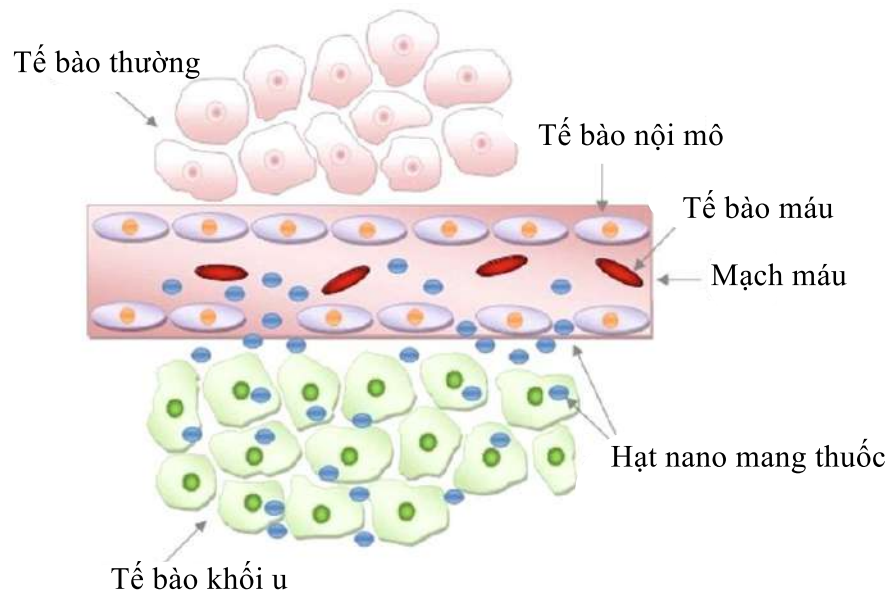
1.1.3. Phân phối thuốc hướng đích

Hệ dẫn thuốc nano đang là lĩnh vực được ứng dụng mạnh mẽ nhất trong công nghệ bào chế dược phẩm. Công nghệ này góp phần tạo ra nhiều chế phẩm với những đặc điểm dễ hấp thu và có tính ưu việt hơn, mở rộng hiệu lực điều trị. Đặc biệt, các nano phân phối thuốc này có tác dụng tại đích, giúp quá trình điều trị diễn ra một cách nhanh chóng. Mang lại hiệu quả hơn trong nhiều loại bệnh và giảm được các tác dụng phụ của thuốc. Các tiểu phân nano dễ dàng đi qua được tế bào, xâm nhập vào máu, hệ thống nội bào, gan, tủy xương, màng ruột, lớp niêm mạc... Điều này khắc phục được hoàn toàn nhược điểm của các dược chất trước đó có đặc tính như tính thấm qua biểu mô tế bào kém, tan kém trong nước.... Về mặt cơ chế hoạt động, phân phối thuốc hướng đích được phân chia thành hai loại chính: bị động và chủ động tùy thuộc vào đặc điểm của vật liệu mang [46]

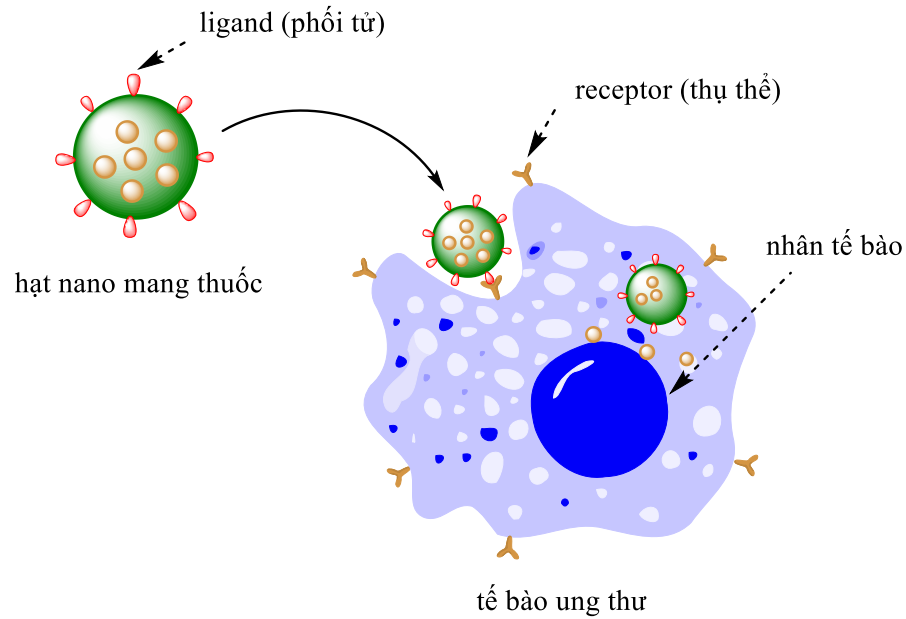
Hướng đích bị động dựa trên sự khác biệt trong cấu trúc của các mô, cơ quan thường và các khối u ung thư. Khác với hệ mạch máu chặt khít trong các mô, cơ quan thường, hệ mạch máu của các khối u ung thư do bị tổn thương nên có rất nhiều khe nang với kích thước từ 400 – 800 nm. Do vậy, những hệ dẫn thuốc có kích thước nhỏ hơn hoặc trong khoảng này có khả năng xâm nhập và tập trung cao tại các khối u trong khi giảm thiểu khả năng tập trung tại các mô, cơ quan thường. Qua đó, nâng cao hiệu lực tác động của thuốc tại vùng khối u, đồng thời hạn chế tác động của thuốc trên những mô, cơ quan thường hay nói cách khác là giảm thiểu tác dụng phụ của thuốc. Ngoài ra, so với các phân tử thuốc có khối lượng nhỏ, các hạt nano có khối lượng lớn hơn 80kDa (kilo Dalton - đơn vị đo khối lượng phân tử, siêu nhỏ) có khả năng lưu trữ lâu hơn bên trong các khối u so với những hạt có khối lượng nhỏ hơn (Hình 1.1) [47, 48].

Hướng đích chủ động là cơ chế hướng đích dựa trên sự bắt cặp đặc hiệu giữa các thụ thể biểu hiện đặc trưng trên các tế bào ung thư và các tác nhân hướng đích được gắn trên bề mặt của các hệ mang thuốc nano. Những hệ dẫn thuốc nano được trang bị các tác nhân hướng đích sẽ có khả năng định vị một cách chính xác vị trí của các tế bào ung thư, thúc đẩy quá trình nhập bào bằng những con đường nhập bào thông qua thụ thể (Hình 1.2) [49, 50]. Một số yếu tố giúp phân biệt các tế bào ung thư và tế bào thường có thể kể đến như các thụ thể trên màng tế bào, thành phần lipid trên màng tế bào hay những kháng nguyên hoặc protein có mặt trên bề mặt tế bào. Tương ứng với mỗi yếu tố sẽ có những cơ chế nhập bào khác nhau. Ví

dụ khi hệ dẫn thuốc được gắn với thành phần lipid có trên màng tế bào sẽ làm thay đổi thành phần lipid của màng tế bào dẫn tới sự thay đổi khả năng thẩm thấu, tính lưu động của lớp màng. Trong trường hợp này, tác nhân hướng đích phải tạo ra những thay đổi có lợi cho việc nhập bào của các hệ dẫn thuốc. Trong trường hợp yếu tố hướng đích liên kết với thụ thể trên bề mặt màng tế bào, tương tác giữa tác nhân hướng đích và thụ thể sẽ làm thúc đẩy quá trình nhập bào thông qua con đường nhập bào được điều hòa bởi thụ thể. Một số lượng lớn các phối tử sinh học đã được xác định và nghiên cứu để tạo điều kiện thuận lợi cho việc nhắm mục tiêu chủ động cho các hạt nano. Các phối tử sinh học như vậy thường liên kết với các thụ thể cụ thể trên bề mặt của tế bào đích, và theo cách này làm tăng sự hấp thu của tế bào đối với các hạt nano chứa thuốc và cũng làm tăng hiệu quả điều trị [51]. So với phối tử đơn, mật độ phối tử tăng lên có lợi cho việc thúc đẩy liên kết và sự hấp thu tế bào thông qua hiệu ứng đa hóa trị [52]. Nhiều loại phối tử khác nhau đã được sử dụng cho mục đích này, bao gồm protein, polysaccharide, acid nucleic, peptide và các phân tử nhỏ. Nói chung, các hạt nano được chức năng hóa với các phối tử này theo hai cách. Chúng có thể được liên hợp hóa học hoặc hấp phụ vật lý trên các hạt nano sau khi hình thành hạt nano, hoặc có thể được liên kết với các thành phần của hạt nano, chẳng hạn như polymer trước khi hình thành [53, 54].



Hình 1. 1. Phân phối thuốc bị động [48].



Hình 1. 2. Phân phối thuốc hướng đích chủ động [50].

1.2. Hệ phân phối thuốc nanogel

1.2.1. Vật liệu chế tạo nanogel

Nhiều loại vật liệu có thể được sử dụng để điều chế nanogel. Khả năng phân hủy sinh học là điều cần thiết để tránh việc tích tụ nội tạng, có khả năng dẫn đến độc tính và các tác dụng phụ không mong muốn khác [55, 56]. Các hạt nano hydrogel được làm từ polymer tự nhiên hoặc tổng hợp. Trong số này, polysaccharide thường được sử dụng hơn. Polysaccharide là các polymer gốc carbohydrate có trong tự nhiên, được hình thành từ các đơn vị lặp lại (monosaccharide) liên kết với nhau bằng các liên kết glycosidic. Chúng có thể được lấy từ các nguồn tảo (alginate), thực vật (cellulose, tinh bột) và động vật (chitosan), có cấu trúc và tính chất khá thay đổi, các nhóm chức khác nhau, nhiều loại trọng lượng phân tử và thành phần hóa học thay đổi. Polysaccharide có thể được chia thành không polyelectrolyte (dextran, dextrin, pullulan) và polyelectrolyte. Các polysaccharide polyelectrolyte có thể được chia thành tích điện dương (chitosan) và tích điện âm (heparin, hyaluronic acid). Polysaccharide có tính ổn định cao, an toàn, không độc hại, ưa nước và phân hủy sinh học. Ngoài ra, chúng còn là nguồn tài nguyên thiên nhiên dồi dào và có thể được chế biến với chi phí thấp.

Trong số các polymer tổng hợp thường được sử dụng chế tạo nanogel, copolymer khối bao gồm hai hoặc nhiều phân đoạn polymer đơn giản (khối) tham gia theo một số cách sắp xếp. Các copolymer khối thường được phân loại theo số khối mà mỗi phân tử chứa từ hai, ba hoặc nhiều khối tương ứng với các khối

diblock, triblock hoặc multiblock. Các copolymer khối điển hình được sử dụng làm vật liệu chế tạo nanogel như poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) và Pluronic [57].

1.2.2. Tính chất đặc trưng của nanogel

Nanogel được giới thiệu lần đầu tiên bởi Vinogradov vào năm 1999 để mô tả một hệ thống keo được cấu tạo bởi mạng lưới polymer ưa nước được điều chế từ polyethylene glycol (PEG) và polyethylenimine (PEI) liên kết ngang, có thể được sử dụng làm hệ thống phân phối thuốc [58]. Kể từ đó trở đi, nhiều bước phát triển khác nhau đã diễn ra trong lĩnh vực này, nhiều công thức khác nhau đã được phát triển và nhiều ứng dụng *in vitro* và *in vivo* đã được thử nghiệm. Hơn nữa, trong những năm qua, nanogel đã ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau nhờ vào nhiều đặc tính của chúng.

Nanogel có khả năng phản ứng lại với sự kích thích bởi một tín hiệu bên ngoài xuất phát từ môi trường trong cơ thể như thay đổi độ pH, nhiệt độ, điều kiện oxy hóa khử, nồng độ enzyme hoặc tác nhân kích thích từ bên ngoài như ánh sáng, từ trường, v.v. Các tác nhân kích thích này sau đó gây ra sự thay đổi về hình dạng hoặc cấu trúc của nanogel. Những thay đổi này cũng làm thay đổi tính ưa nước và tính kỵ nước của nanogel hay nói cách khác là mức độ tương tác của hệ thống với các phân tử nước và hầu hết được biểu hiện dưới dạng trương nở của nanogel, từ đó gây ra các phản ứng như giải phóng các phân tử thuốc bên trong nanogel [59]. Một trong những ưu điểm đáng kể của nanogel là phản ứng rất nhanh đối với sự thay đổi của điều kiện môi trường [60]. Khả năng phản ứng của nanogel với các tín hiệu vật lý hoặc hóa học bên ngoài có thể được điều chỉnh bằng cách kiểm soát cấu trúc của vật liệu được sử dụng để điều chế nanogel [61, 62]. Mức độ trương nở cũng phụ thuộc vào đặc điểm cấu trúc của nanogel như thành phần hóa học, tính ưa nước và mức độ liên kết ngang của mạng lưới nanogel, điều khiển sự tự do di chuyển về hình dạng của các chuỗi polymer [63, 64].

Tính oxy hóa khử của nanogel thể hiện qua việc các liên kết ngang của nanogel chứa các liên kết disulfide ổn định trong môi trường ngoại bào nhưng bị phân cắt trong môi trường nội bào. Điều này là do sự khác biệt về điện thế khử giữa các khoang ngoại bào và nội bào và đã được sử dụng thành công trong việc điều chế các nanogel phản ứng oxy hóa khử [65]. Các nanogel với các liên kết disulfide ổn định trong quá trình lưu thông trong máu nhưng không bền khi được hấp thụ trong tế bào, do đó, tạo điều kiện thuận lợi cho việc giải phóng thuốc. Matyjaszewski và cộng sự (2007) đã điều chế các nanogel có khả năng phân hủy sinh học với các liên

kết ngang dimethacrylate có chức năng disulfide phân hủy thành các chuỗi polymer riêng lẻ với sự có mặt của glutathione và cho phép giải phóng thuốc được đóng gói trong nanogel [66].

Tính nhạy nhiệt của nanogel thể hiện qua sự đáp ứng lại sự thay đổi năng lượng tự do của môi trường xung quanh. Khả năng phản ứng của nanogel với sự thay đổi nhiệt độ môi trường xung quanh phụ thuộc vào mức độ tương tác của các phân tử polymer được phân loại là kỵ nước hoặc ưa nước. Một sự thay đổi tích cực hoặc một sự thay đổi tiêu cực trong năng lượng tự do của hỗn hợp cho biết tính kỵ nước hoặc tính ưa nước của nó [67]. Sự liên kết của các phân tử nước với các phân tử polymer là nguyên nhân chính của sự thay đổi năng lượng tự do. Các phân tử nước ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ dung dịch tới hạn dưới (LCST) sắp xếp tốt xung quanh các phần ưa nước của polymer. Tuy nhiên, ở nhiệt độ trên LCST, do tính kỵ nước của polymer, các phân tử nước bắt đầu tách ra và đó là sự phân tách pha giữa nước và polymer. Hơn nữa, khi nhiệt độ tăng, sự liên kết của các phân tử nước bị sụp đổ do các chất kỵ nước, và entropi của hệ thống tăng lên, dẫn đến sự hình thành gel. Nói cách khác, khi nhiệt độ thấp hơn LCST, tương tác ưa nước - ưa nước mạnh hơn tương tác kỵ nước - kỵ nước, và điều này làm tăng khả năng hòa tan của polymer. Khi nhiệt độ tăng, tương tác kỵ nước-kỵ nước trở nên mạnh hơn tương tác ưa nước-ưa nước, cuối cùng dẫn đến sự kết tụ của các phân tử kỵ nước và hình thành nanogel [68-70].

Nanogel làm tăng thời gian lưu thông của thuốc trong cơ thể cùng với khả năng phân phối thuốc đến vị trí khối u mong muốn trong cơ thể. Để đạt được điều này, các nanogel phải vượt qua các rào cản liên quan đến con đường sử dụng. Tùy thuộc vào đường sử dụng, các nanogel được thiết kế đặc biệt để vượt qua các rào cản liên quan và đạt được sự lưu thông nguyên vẹn. Các nanogel được thiết kế phải đảm bảo ngăn chặn quá trình giải phóng thuốc nhanh chóng và ngăn chặn được quá trình phân hủy hoặc chuyển hóa nhanh chóng các phân tử thuốc. Một trong những trở ngại nhất của việc đảm bảo thời gian lưu thông là quá trình opsonin hóa các nanogel, sau đó là quá trình đào thải chúng qua các cơ quan của đại thực bào đơn nhân như gan và lá lách, nơi chúng được các tế bào đơn nhân và đại thực bào thường trú hấp thụ [71]. Để tăng thời gian lưu thông, các hạt nanogel được biến tính bề mặt với polyethylene glycol (PEG) hay còn gọi là PEG hóa bề mặt nanogel để tăng tính ưa nước của nanogel, thiết lập lực cản không gian đối với tương tác protein huyết thanh [72]. Mặc dù PEG hóa làm tăng thời gian lưu thông của nanogel và làm giảm sự hấp thụ của hệ thống đại thực bào đơn nhân nhưng cuối cùng quá trình opsonin hóa và thanh thải đại thực bào vẫn xảy ra [73].

Nanogel có khả năng phân phối thuốc hướng đích tới các vị trí khối u theo cách thụ động hoặc chủ động. Các nanogel thường quá lớn để đi qua các mối nối chặt chẽ của lớp nội mô bình thường nhưng có thể tích tụ một cách hiệu quả trong các khối u rắn hoặc các mô bị viêm. Đối với các mô bị viêm, các mạch máu thường bị rò rỉ và nén lỏng lẻo và dẫn lưu bạch huyết bị suy giảm dẫn đến tính thấm và lưu giữ của nanogel được tăng cường, điều này có thể xem là phân phối thuốc hướng đích thụ động [74]. Ngoài khả năng thấm và lưu giữ, sự kết hợp sinh học của nanogel với các phối tử nhắm mục tiêu cho phép hướng chúng đến các thụ thể hoặc phân tử cụ thể được biểu hiện quá mức một cách khác biệt trên các tế bào bị bệnh, do đó cải thiện khả năng lưu giữ của chúng tại vị trí được nhắm mục tiêu cũng như tạo điều kiện cho sự hấp thu tế bào của chúng [75, 76]. Nhiều phân tử nhỏ, peptide, aptamer, kháng thể hoặc các mảnh kháng thể đã được khám phá để phân phối mục tiêu các nanogel tới vị trí khối u [77]. Nhắm mục tiêu qua trung gian phối tử ảnh hưởng đến cấu hình phân phối sinh học tổng thể của các nanogel so với các nanogel không được nhắm mục tiêu của chúng. Điều này có thể giúp tránh sự tích tụ quá mức của các nanogel tại các vị trí ngoài mục tiêu và giảm các tác dụng phụ liên quan.

1.2.3. Ứng dụng của nanogel trong phân phối thuốc trị liệu

Nanogel có khả năng trương nở rất lớn và có thể kết hợp nhiều phân tử sinh học hoặc thuốc trị liệu thông qua tương tác tĩnh điện, van der Waals, kỵ nước hoặc liên kết cộng hóa trị với chuỗi polymer. Khả năng tải này của nanogel cao hơn rất nhiều và vượt quá khả năng của liposome [78, 79]. Do quá trình nạp thuốc, các nanogel bị phá vỡ cấu trúc tạo thành các hạt nano ổn định, trong đó các tác nhân sinh học hoặc thuốc trị liệu bị cuốn vào bên trong lõi hạt nanogel. Việc biến tính bề mặt nanogel bằng PEG có thể ngăn chặn sự kết tụ của chúng. Trong quá trình lưu thông phức hợp thuốc-nanogel, các chuỗi polymer ưa nước lộ ra trên bề mặt và tạo thành một lớp bảo vệ xung quanh nanogel. Khả năng kiểm soát và tính linh hoạt của hóa học polymer cho phép thiết kế một loạt các công thức thuốc nanogel có khả năng mang nhiều thuốc trị liệu trong cùng một chất mang nanogel [80, 81]. Sự giải phóng thuốc đáp ứng với kích thích do nhiệt độ hoặc pH gây ra cũng có thể rất hấp dẫn đối với việc ứng dụng nanogel trong phân phối thuốc. Chức năng hóa của bề mặt nanogel có thể tạo điều kiện thuận lợi hơn nữa cho sự tích lũy có chọn lọc của chúng trong mô hoặc tế bào đích [82, 83]. Việc phát triển các nanogel có thể mang, bảo vệ, nhắm mục tiêu và giải phóng các tác nhân trị liệu theo cách được kiểm soát theo mong muốn đang diễn ra tích cực và các công thức thiết kế hợp lý của chúng có thể cung cấp một nền tảng cho nhiều ứng dụng.

Trong vài năm qua, khoa học đã đạt được những tiến bộ đáng kể trong việc ứng dụng nanogel làm chất mang phân phối cho các phân tử nhỏ có hoạt tính sinh học trong điều trị bệnh. Nanogel có thể là một nền tảng linh hoạt để kết hợp các phân tử thuốc nhỏ khác nhau thông qua tương tác tĩnh điện, kỵ nước cũng như sự hình thành liên kết hydro [84]. Sự trương nở của nanogel trong môi trường nước cho phép các phân tử nhỏ dễ dàng thẩm thấu qua khe nang của khối u. Sự thiết kế hợp lý của các nanogel có thể là một công cụ hiệu quả để điều chỉnh tốc độ giải phóng thuốc nhằm đạt được hiệu quả điều trị mong muốn của thuốc. Một trong những tính năng quan trọng nhất của nanogel được điều chế từ các polymer mang điện tích có liên kết ngang yếu là khả năng kết hợp các phân tử sinh học mang điện tích trái dấu của chúng [84, 85]. Ngoài ra, các nanogel điều chế từ các polymer mang điện tích cũng có thể tạo phức với các phân tử thuốc nhỏ như 5'-triphosphate, cisplatin [86-88]. Nanogel cũng đã được khám phá như một chất mang cho các loại thuốc khó tan trong nước như paclitaxel, dexamethasone [89, 90].

Các oligonucleotide (ON) trị liệu bao gồm antisense oligodeoxynucleotide (ODN), siRNA và miRNA có tiềm năng lớn với tư cách là các tác nhân trị liệu và đang trở thành một công cụ mạnh đối với các nhà sinh học phân tử. Các ON đang được quan tâm trong điều trị và chẩn đoán ung thư, rối loạn thoái hóa thần kinh và nhiễm virus gây chết người [91-93]. Một số liệu pháp dựa trên ON đã đạt được thành công đáng kể trong các thử nghiệm lâm sàng [94, 95]. Tuy nhiên, việc đưa các ON trị liệu vào các tế bào mục tiêu vẫn là một thách thức chính để nhận ra tiềm năng điều trị đầy đủ của chúng vì ON không thể tự xâm nhập vào màng tế bào, có thể bị phân hủy bởi các tác nhân nội sinh và có thể kích thích hệ thống miễn dịch bẩm sinh. Do đó, các ON yêu cầu một phương tiện phân phối để đưa chúng đến vị trí hoạt động mà không có tác dụng phụ. Các nanogel cation đã nổi lên như một loại vật liệu nano mới đầy hứa hẹn để giải quyết những thách thức trong việc cung cấp các ON *in vivo* [96]. Các nanogel này bao gồm các chuỗi polymer ưa nước liên kết ngang yếu, có độ xốp cao cho phép đóng gói hiệu quả các ON, điều này thường không thể đạt được với các chất mang nano thông thường. Một trong những báo cáo đầu tiên, Vinogradov và cộng sự (2014) đã điều chế nanogel PEG-PEI cation làm chất mang tiềm năng cho ODN đặc hiệu cho gen *mdr1* của con người [97]. Ngày nay, nhiều loại hạt nanogel cation đã được điều chế để phân phối phân tử siRNA [98].

Ngoài khả năng đóng gói các phân tử trị liệu nhỏ có hoạt tính sinh học, nanogel cũng đã được khám phá rộng rãi để cung cấp protein và peptide. Akiyoshi và cộng sự (1998) đã điều chế nanogel của pullulan biến đổi cholesterol tự lắp ráp

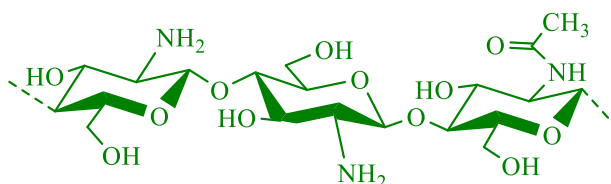
tạo thành một phức hợp với nhiều loại protein khác nhau một cách tự nhiên, chủ yếu thông qua các tương tác kỵ nước [99]. Lượng protein được tạo phức bởi các nanogel như vậy phụ thuộc vào trọng lượng phân tử và tính kỵ nước của protein. Quá trình tạo phức đã ngăn chặn mạnh mẽ sự biến tính nhiệt và sự tổng hợp protein sau đó cũng như bảo vệ chúng khỏi sự phân hủy bởi enzyme. Trên cơ sở nền tảng này, Ayame và cộng sự (2008) đã điều chế các nanogel cation hóa dựa trên polysaccharide để tận dụng cả tương tác kỵ nước và tương tác tĩnh điện để tăng hiệu quả việc bẫy protein và tăng cường quá trình nội bào của các nanogel chứa protein [100]. Trong một báo cáo được công bố bởi nhóm Akiyoshi và Kiyono (2010), nanogel pullulan-cholesterol cation đã được khám phá như một hệ thống phân phối protein cho vaccine nhỏ mũi không có chất bổ trợ [101].

Nanogel cũng có khả năng phân phối đồng thời nhiều tác nhân trị liệu phục vụ cho mục tiêu tăng cường khả năng trị liệu. Sự kết hợp các loại thuốc trong một chất mang phân phối là một chiến lược phù hợp để kiểm soát dược động học và đồng phân phối tỷ lệ thuốc mong muốn trong cơ thể sống. Do cấu trúc nanogel có thể dễ dàng điều chỉnh để tích hợp các tính năng của các vật liệu khác nhau và do đó mang lại lợi thế cho việc đóng gói tổ hợp các loại thuốc có các đặc tính hóa lý khác nhau như phân tử nhỏ, protein và acid nucleic. Fahmy và cộng sự (2012) đã phát triển các nanogel liposome gồm cyclodextrin phức hợp với thuốc và các polymer phân hủy sinh học đóng gói cytokine có thể cung cấp chất ức chế TGF- β có tính kỵ nước và protein cytokine IL-2 hòa tan trong nước. Họ đã chứng minh rằng tác dụng hiệp đồng của TGF- β và IL-2 được phân phối đồng thời khi kích hoạt hệ thống miễn dịch dẫn đến làm chậm sự phát triển của khối u và tăng khả năng sống sót của chuột mang khối u hắc tố sau khi dùng thuốc toàn thân [102]. Nanogel cũng có khả năng cung cấp nhiều loại thuốc có đặc tính khác nhau, Desale và cộng sự (2013) đã điều chế nanogel PEG-poly(L-glutamic acid)-poly(L-phenylalanine) (PEG-PGlu-Pphe) có một lõi kỵ nước được hình thành bởi các chuỗi Pphe và một lớp anion liên kết ngang của các chuỗi PGlu cùng với lớp vỏ bên ngoài bao gồm các chuỗi PEG có khả năng phân hủy sinh học này có thể chứa một lượng đáng kể thuốc có các tính chất vật lý rất khác nhau như cisplatin ưa nước (tải 15% trọng lượng) và paclitaxel kỵ nước (9% trọng lượng). Sự kết hợp hai thuốc này trong nanogel thể hiện tác dụng gây độc tế bào tổng hợp chống lại tế bào ung thư buồng trứng A2780 của con người và tạo ra hoạt động chống khối u vượt trội so với các nanogel nạp thuốc riêng lẻ hoặc thuốc tự do [103].

1. 3. Hệ phân phối thuốc nanogel trên cơ sở chitosan

1.3.1. Đặc điểm và tính chất của chitosan

Chitosan (CS) là một polysaccharide cation ưa nước có cấu trúc tuyến tính bao gồm D-glucosamine và N-acetyl-D-glucosamine được liên kết với nhau tại vị trí β -(1-4) (Hình 1.3), thu được bằng cách khử nhóm N-deacetyl bằng kiềm hoặc enzyme của chitin, là loại polymer phổ biến thứ hai trong tự nhiên sau cellulose [104]. Chitin có trong bộ xương ngoài của giáp xác (tôm, cua, mực), côn trùng và các chủng nấm [105]. Các nhóm hydroxyl và amine trong cấu trúc của CS chịu trách nhiệm về khả năng phản ứng hóa học, khả năng hòa tan và hoạt tính sinh học của nó. CS có độ hòa tan thấp ở pH sinh lý nhưng trong dung dịch acid loãng, các nhóm amine chính được proton hóa và CS trở nên tích điện dương và hòa tan trong nước [106]. Điện tích dương cũng giải thích sự tương tác của CS với màng tế bào vi sinh vật mang điện tích điện âm và do đó gây ra tác dụng kháng khuẩn của nó [107].



Hình 1. 3. Cấu trúc hóa học của chitosan [104].

CS là một ứng cử viên lý tưởng cho hệ phân phối thuốc vì nó không độc hại, tương thích sinh học, phân hủy sinh học, sinh miễn dịch thấp và kết dính sinh học. Hơn nữa, cấu trúc của nó tương tự như collagen và có thể được sử dụng để mô phỏng chất nền ngoại bào [106]. Ngoài ra, CS được chứng minh là có tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm, cầm máu, hạ đường huyết, chống acid và chống loét, kháng viêm, chống oxy hóa, trị đái tháo đường và bảo vệ thần kinh [108, 109]. Dựa trên những đặc điểm đặc biệt này, CS là một vật liệu sinh học đầy hứa hẹn và đã thu hút sự chú ý ngày càng tăng của các nhà nghiên cứu để phát triển các vật liệu dựa trên CS cho các ứng dụng y sinh, đặc biệt là hệ phân phối thuốc [106]. Các hệ phân phối thuốc dựa trên CS được sử dụng để cung cấp protein, peptide, các yếu tố tăng trưởng, thuốc chống viêm, kháng sinh, thuốc chống ung thư,... cũng như trong liệu pháp gen [110, 111].

Các hạt mang nano dựa trên CS có nhiều ưu điểm do kích thước nhỏ và tăng diện tích bề mặt, đặc tính kết dính nhờ khả năng tạo liên kết ngang chặt chẽ. Chúng có thể được sử dụng để nhắm mục tiêu thuốc đến tế bào và mô nhờ khả năng xâm nhập vào màng tế bào bằng quá trình nội tiết hoặc chuyển hóa tế bào qua trung gian

thụ thể. Các hạt nano CS có thể tăng cường độ ổn định của thuốc, kiểm soát được quá trình giải phóng của thuốc [110, 112].

CS ở dạng đơn lẻ hoặc dưới dạng vật liệu tổng hợp đều là những chất nền phù hợp trong việc chế tạo các loại sản phẩm khác nhau như hydrogel, màng, hạt, bột xốp, hạt nano, gel tại chỗ, vi hạt [113]. Sự hình thành các cấu trúc nano dựa trên CS tự lắp ráp thể hiện các tính năng nổi bật, chẳng hạn như khả năng đóng gói protein cao và quá trình giải phóng thuốc kéo dài [114].

1.3.2. Hệ phân phối thuốc nanogel 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 phân phối thuốc, nuôi cấy tế bào và trị liệu [115, 116]. Một số phương pháp điều chế nanogel từ CS chẳng hạn như tạo gel ion, tạo gel vật lý, trùng hợp, tự lắp ráp và vi nhũ tương đã được báo cáo [116].

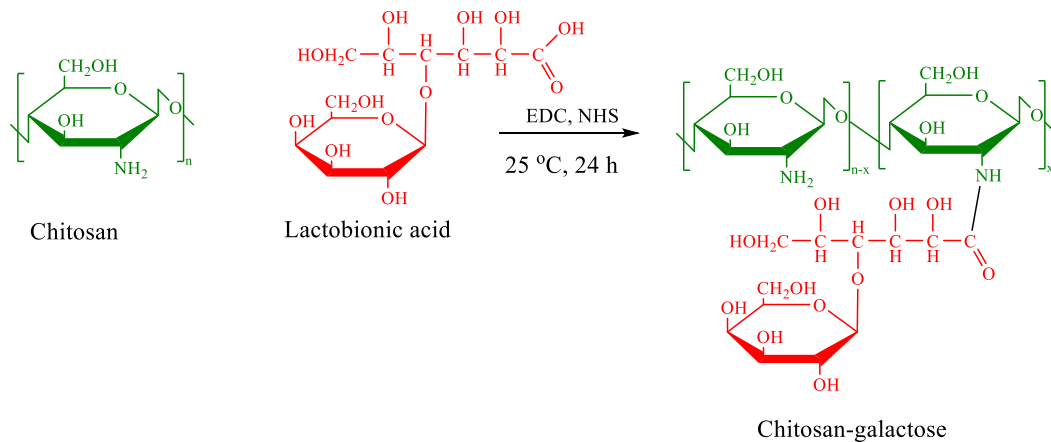
CS có khả năng tự tạo gel để tạo thành nanogel mà không cần bất kỳ chất hoạt động bề mặt, dung môi hay chất liên kết ngang nào, do sự có mặt của nhóm $-OH$ và $-NH_2$ dẫn đến khả năng hình thành tương tác tĩnh điện và liên kết hydro giữa các chuỗi polymer [116, 117]. Các nanogel CS được hình thành theo cách này này chỉ chứa nước và CS có kích thước từ 0.2 nm đến 1000 nm. Một số đặc điểm của CS như khối lượng phân tử, độ deacetyl, độ nhớt và nồng độ của dung dịch polymer có thể góp phần đáng kể vào sự phân bố kích thước hạt và cũng ảnh hưởng đến các tính năng nhạy cảm với nhiệt của loại nanogel này. Ngoài ra, sự proton hóa của nhóm $-NH_2$ ở pH thấp góp phần tạo ra điện tích dương của CS và tương tác tĩnh điện với các thành phần của chất nhầy hoặc với bề mặt biểu mô mang điện tích âm. Các loại tương tác này cung cấp các đặc tính kết dính niêm mạc thuận lợi cho việc sử dụng nanogel CS làm hệ thống phân phối thuốc [118].

Các nanogel CS có thể đóng vai trò là chất mang, bảo vệ thuốc khỏi bị phân hủy hoặc đào thải. Bản chất ưa nước của nanogel CS hạn chế việc sử dụng chúng để phân phối thuốc ưa nước. Việc nang hóa thuốc kỵ nước vào các hạt nanogel CS có thể thực hiện bằng cách biến tính CS với các nhóm kỵ nước như alkyl, cholesterol, acyl, acid 5-cholanic, cholic acid và deoxycholic acid [119, 120].

CS liên hợp phối tử hướng đích để giảm thiểu phân phối thuốc không đúng mục tiêu gây ra tác dụng phụ. Galactose, folate, mannose và kháng thể là những

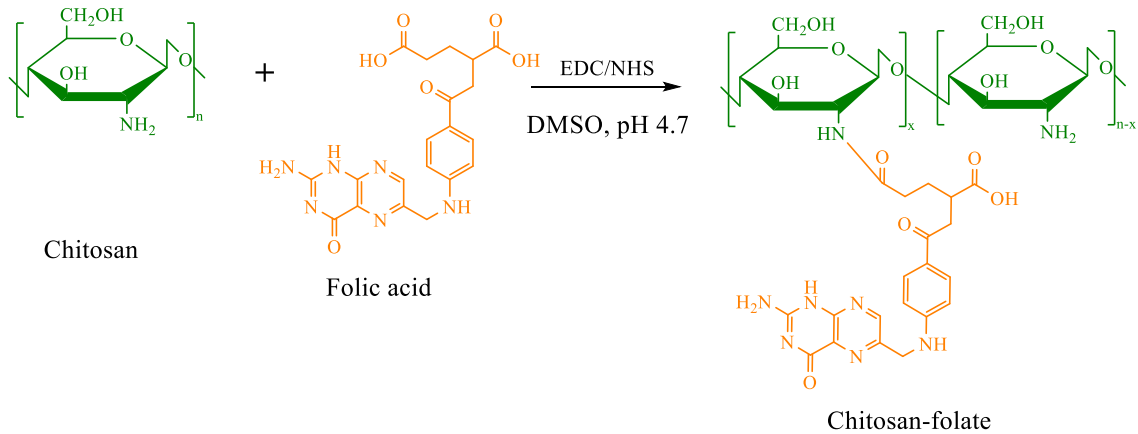
phổi tử thường được sử dụng được kết hợp với CS để đạt được sự phân phối thuốc đến mục tiêu hiệu quả.

Galactose là một loại đường monosaccharide có khả năng liên kết đặc hiệu với các thụ thể asialoglycoprotein (ASGPR) hiện diện rất nhiều với mật độ 500.000 thụ thể trên mỗi tế bào gan cũng như trên các dòng tế bào ung thư gan khác nhau ở người [121]. Các hạt nanogel CS liên hợp với galactose cũng có thể được điều chế bởi nhóm Alex (2011) và nhóm Zheng (2012) bằng cách sử dụng CS hòa tan trong nước được kết hợp với lactobionic acid thông qua phản ứng amide hóa với sự có mặt của xúc tác 1-ethyl-3-(3-dimethylamineopropyl) carbodiimide (EDC) và N-hydroxysuccinimide (NHS) (Hình 1.4) [122, 123].



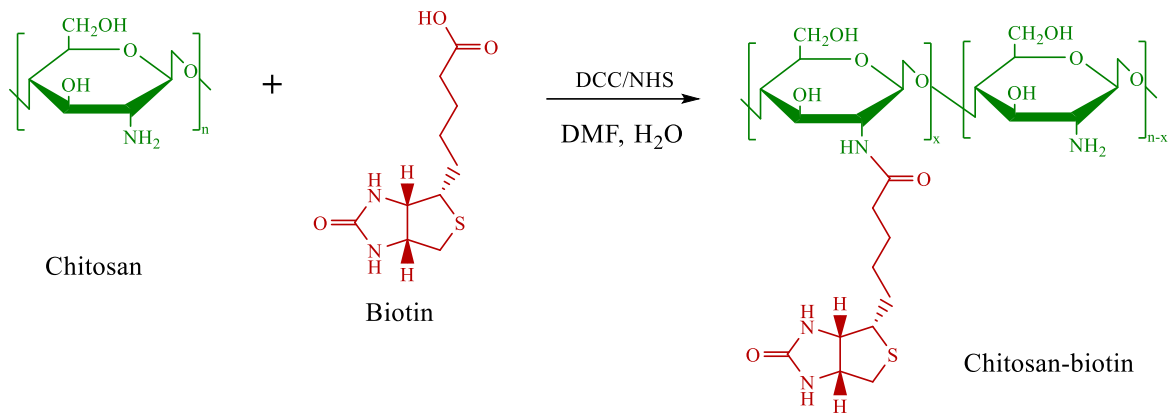
Hình 1. 4. Sơ đồ tổng hợp chitosan-galactose [123].

Folic acid (pteroylglutamate) là một loại vitamine tan trong nước và rất quan trọng đối với quá trình tổng hợp, methyl hóa và sửa chữa DNA. Sự biểu hiện quá mức của các thụ thể folate ($FR\alpha$) trong các bệnh ung thư như phổi, thận, vú, biểu mô, buồng trứng, đại tràng, trực tràng và não đã được khai thác để phân phối mục tiêu các kháng thể folate liên hợp CS [124]. Các hạt nanogel CS liên hợp với folic acid thông qua phản ứng amide hóa giữa nhóm $-NH_2$ của chitosan và nhóm $-COOH$ của folic acid với xúc tác EDC/NHS trong môi trường hỗn hợp nước và dung môi DMSO (Hình 1.5) cũng được thực hiện bởi các nhóm nghiên cứu Xu (2013), Song (2013), Li (2015) và Liu (2013) [125-128].



Hình 1. 5. Sơ đồ tổng hợp chitosan-folate [125].

Biotin (vitamine B7) được biết là có vai trò thiết yếu đối với sự phát triển của tế bào và hầu hết các phản ứng trao đổi chất [129]. Các thụ thể biotin được biểu hiện quá mức trong các tế bào khối u khác nhau như buồng trứng (OV 2008, ID8), bệnh bạch cầu (L1210FR), u tế bào mast (P815), ruột kết (Colo-26), các dòng tế bào ung thư vú (4T1, JC, MMT06056), thận (RENCA, RD0995) và phổi (M109) trong khi chúng bị hạn chế nhiều ở các mô khỏe mạnh [130]. Một số bằng chứng đã chứng minh sự gia tăng khả năng hấp thụ thuốc trong các tế bào được điều trị bằng chất mang liên hợp biotin so với những tế bào được ủ với chất mang tương tự không có biotin [131]. Là một tác nhân nhắm mục tiêu phân tử nhỏ, biotin mang lại nhiều lợi thế hơn so với các tác nhân nhắm mục tiêu lớn, bao gồm việc hạn chế các tác động đáng kể đến được động học và khả năng sinh miễn dịch của các công thức tạo chất mang [132]. CS liên hợp với biotin đã được nghiên cứu rộng rãi vì nó kết hợp các đặc tính tương hợp sinh học nổi bật của chitosan với khả năng nhắm mục tiêu của biotin. Nhờ có nhóm cacboxyl ($-\text{COOH}$), biotin dễ dàng tham gia liên kết với nhóm amine ($-\text{NH}_2$) của CS, làm tăng cường mật độ phân tử biotin trên bề mặt của các hạt nanogel được làm từ CS (Hình 1.6) cũng được thực hiện bởi các nhóm nghiên cứu Liu (2010), Yao (2013) và Tian (2014) [133–155]. So với các hạt nano không chứa biotin, các hạt gắn biotin tăng độc tính tế bào đối với tế bào ung thư vú (MCF-7) và tế bào ung thư buồng trứng (Hela). Hơn nữa, các thử nghiệm *in vitro* cho thấy các hạt nanogel CS gắn biotin được hấp thụ trong các tế bào MCF-7 và Hela bởi quá trình nội bào trung gian thụ thể biotin và được tích lũy một cách hiệu quả vào khối u [136-139].



Hình 1. 6. Sơ đồ tổng hợp chitosan-biotin [139].

Tương tự như vậy, CS liên hợp với protein bao gồm các kháng thể (antibody) và transferrin, peptide, aptamer (DNA hoặc RNA) trong phân phối thuốc đến các tế bào đích được biểu hiện với các kháng nguyên và thụ thể [140-143].

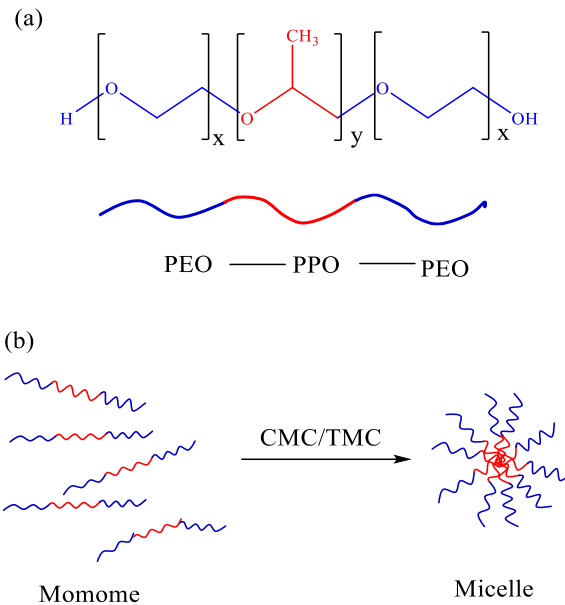
Một xem xét quan trọng khác khi lựa chọn phối tử cho các hạt nano là giá thành của chúng. Ví dụ, kháng thể là phối tử hấp dẫn do tính đặc hiệu cao và mục tiêu đa dạng, nhưng chi phí sản xuất của chúng rất cao [144]. Từ quan điểm này, các phân tử hóa học nhỏ thường rẻ hơn protein hoặc aptamer. Chúng tôi hy vọng rằng các hạt nano nhắm mục tiêu sẽ ngày càng được thương mại hóa và có sẵn để mang lại lợi ích lớn hơn nhằm giảm tác dụng phụ và cải thiện hiệu quả điều trị.

1.4. Hệ phân phối thuốc nanogel trên cơ sở Pluronic

1.4.1. Đặc điểm và tính chất của Pluronic

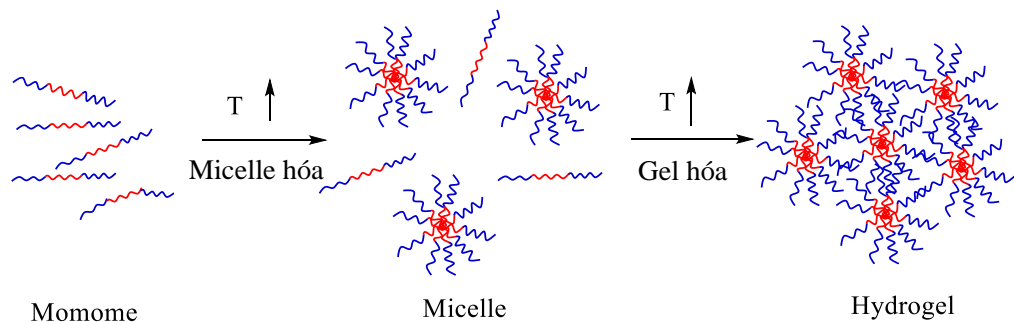
Pluronic hoặc poloxamer là các copolymer gồm ba khối poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide)–poly(ethylene oxide) (PEO–PPO–PEO) và chúng có khả năng đáp ứng nhiệt trong dung dịch nước ở nhiệt độ sinh lý. Các đặc tính dung dịch nước của Pluronic đã được nghiên cứu và xem xét kỹ lưỡng do biểu hiện độ đục của chúng và mang lại lợi ích cho vô số ứng dụng. Trong dung dịch nước, đặc tính lưỡng tính của Pluronic làm cho các phân tử Pluronic tự kết tụ thành các micelle với lõi bên trong được cấu tạo bởi các khối kỵ nước và lớp vỏ bên ngoài được cấu tạo bởi các khối ưa nước với kích thước nano, thường nằm trong khoảng từ 10 đến 200 nm, xuất hiện ở nồng độ micelle tới hạn (CMC) và ở nhiệt độ micelle tới hạn (CMT) (Hình 1.7). Giá trị CMC của dung dịch Pluronic giảm khi nhiệt độ và số lượng PPO tăng, cho thấy rằng các polymer có miền kỵ nước (PPO) lớn hơn tạo thành các micelle ở nồng độ và nhiệt độ thấp hơn [145]. Do đó, nhiệt độ thường được sử dụng như một thông số điều khiển để điều chỉnh cấu trúc, kích thước và

hình dạng của các micelle Pluronic. Nhiệt độ tăng hơn nữa khiến dung dịch tách thành hai pha trên điểm đục (CP) [146, 147].



Hình 1. 7. Cấu trúc hóa học của Pluronic (a) và sự hình thành micelle (b) [118].

Dung dịch Pluronic thể hiện độ nhạy với nhiệt độ, đặc biệt là “gel hóa thuận nghịch nhiệt” đối với các dung dịch đủ đậm đặc. Quá trình tạo gel của Pluronic bao gồm hai bước: (i) quá trình micelle hóa trong đó các micelle hình cầu được hình thành và (ii) quá trình gel hóa trong đó sự xếp chồng của các micelle hình cầu để tạo thành gel (Hình 1.8) [148].



Hình 1. 8. Quá trình hình thành hydrogel [148].

Nhờ cấu trúc lõi-vỏ của chúng, lõi kỵ nước có thể hoạt động như một vị trí nạp thuốc, tạo ra không gian để bao bọc các thuốc kỵ nước thông qua việc thiết lập các tương tác vật lý hoặc hóa học. Các đặc tính của vỏ ngoài và lõi bên trong của micelle có thể thúc đẩy quá trình giải phóng thuốc dễ dàng hơn hoặc bền vững hơn. Do các đặc tính nêu trên, các micelle Pluronic có thể phân phối một số loại thuốc, cải thiện thời gian lưu thông, cũng như tăng cường tính thấm thấu và lưu giữ hiệu

quả. Hơn nữa, các hệ thống này có nguy cơ nhiễm độc mãn tính thấp vì các micelle Pluronic được tháo rời trong cơ thể, thành các chuỗi polymer đơn có thể được bài tiết qua thận [149].

1.4.2. Hệ phân phối thuốc nanogel trên cơ sở Pluronic

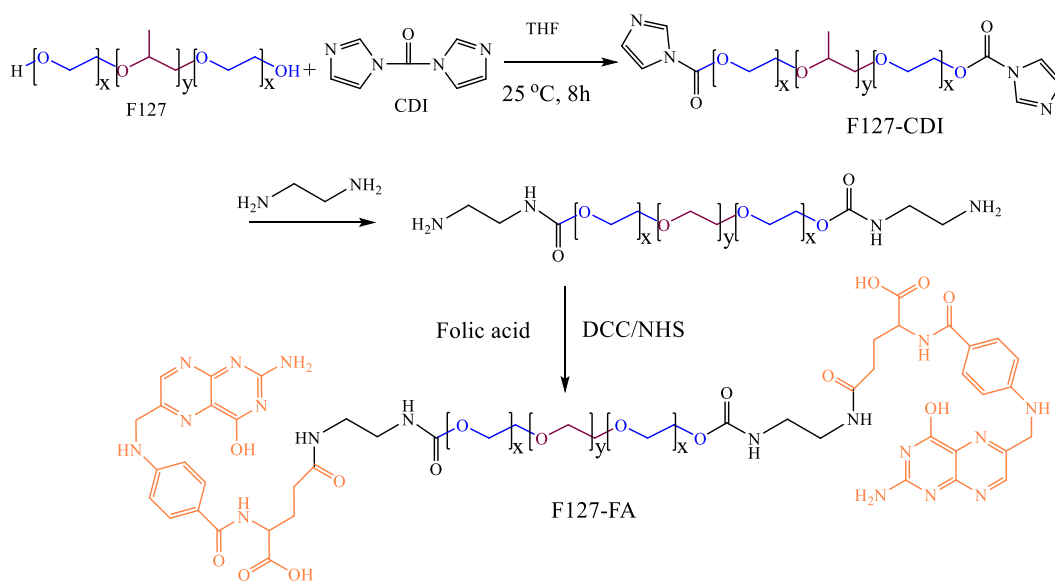
Polymer Pluronic® đã được FDA chấp thuận cho sử dụng trong dược phẩm và đã được nghiên cứu cho các ứng dụng điều trị khác nhau [150]. Khi nồng độ của Pluronic trong dung dịch lớn hơn nồng độ micelle tới hạn (CMC), các micelle Pluronic có thể hình thành một cách tự nhiên, dẫn đến một số đặc tính có lợi: 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 [151, 152]. 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 khối kỵ nước có khả năng tải thuốc cao và khả năng tương thích tốt [153]. 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 phân phối thuốc, đồng thời có tác dụng đảo ngược tình trạng kháng đa thuốc của khối u [154, 155].

Pluronic có thể được chia thành bốn nhóm tùy theo sự khác biệt trong cân bằng hydrophilic-lipophilic (ưa nước-ưa béo) (HLB) và độ dài chuỗi PPO của chúng. Nhóm thứ nhất là các loại Pluronic ưa nước có giá trị HLB từ 20–29 như Pluronic F68, Pluronic F108 và Pluronic F127. Nhóm thứ hai có giá trị HLB < 20 và PPO < 30 như Pluronic L35, Pluronic L44 và Pluronic L64. Nhóm thứ ba là các Pluronic với HLB < 20 và PPO từ 30–60, chẳng hạn như Pluronic P85, Pluronic P105 và Pluronic L61. Nhóm thứ tư bao gồm các Pluronic với HLB < 20 và chuỗi PPO > 60, chẳng hạn như Pluronic P123 và Pluronic L121 [156].

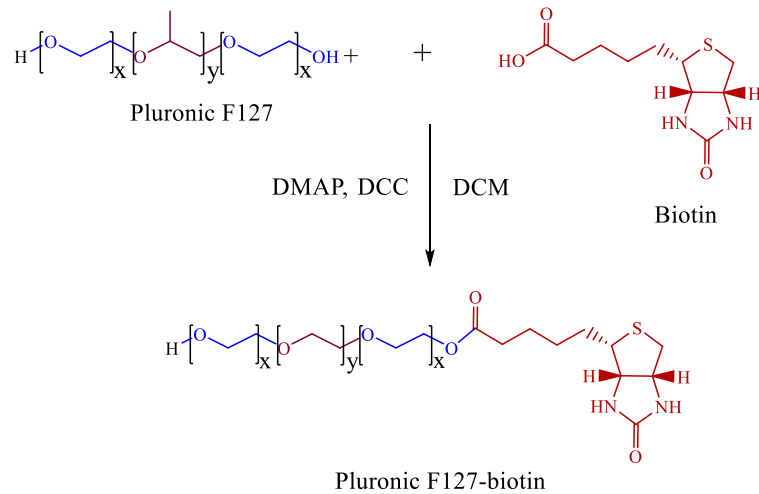
Nhóm Pluronic thứ nhất bao gồm F68, F108 và F127. Chúng không chỉ có tính ưa nước tốt mà còn có khả năng tương thích sinh học và kéo dài thời gian lưu thông máu [157, 158]. Tuy nhiên, các nanogel phản ứng nhiệt dựa trên Pluronic nhóm này được phát hiện có độ bền cơ học và độ ổn định không phù hợp khiến chúng không phù hợp cho các ứng dụng y sinh nhất định. Một số lượng đáng kể các nghiên cứu đã được thực hiện tập trung vào việc cải thiện độ bền cơ học của nanogel nhóm này bằng cách phối trộn hoặc biến đổi với các thành phần polymer khác.

Butt cùng cộng sự (2012) đã phối trộn Pluronic F127 và D- α -tocopheryl polyetylen glycol 1000 succinat (TPGS) tạo thành một hệ chất mang nanogel mang

DOX ổn định chống lại sự kết tủa DOX trong huyết thanh [159]. Trên cơ sở micelle F127/TPGS, Meng cùng cộng sự (2020) đã phát triển các micelle nhắm mục tiêu não bằng cách kết hợp TPGS với nhóm nhạy cảm điện ferrocene (Fc) (TPGS-Fc). Vì quá trình oxy hóa Fc bị khử bởi dòng điện có thể chuyển nhóm kỵ nước thành nhóm ưa nước, kích hoạt sự phân hủy các micelle và giải phóng thuốc [160]. Pluronic F127 cũng được biến tính với chuỗi peptide nhỏ có thể liên kết chọn lọc với các thụ thể của tế bào ung thư gan (Hep G2) đã được điều chế bởi Li cùng cộng sự (2013), Pluronic F127 liên hợp với chuỗi peptide PKKKRKY (Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val, PV7), một peptide gồm bảy amineo acid được chứng minh làm tăng độ ổn định của micelle và có sự hấp thụ nội bào cao [161]. Zhang cùng cộng sự (2011) đã điều chế các hạt nanogel mang PTX bằng cách phối trộn hai loại Pluronic F127 và P123 với nhau để tiêu diệt tế bào ung thư biểu mô (KBv), trong đó Pluronic F127 được liên hợp với acid folic để tăng cường khả năng hấp thụ nội bào của nanogel (Hình 1.9). Kết quả thử nghiệm *in vivo* cho thấy, các nanogel liên hợp với phối tử folate đã tăng cường sinh khả dụng của PTX lên gấp 3 lần so với nanogel không liên hợp với phối tử folate [162]. Tương tự như vậy, Russo và cộng sự (2016) đã điều chế các hạt nanogel mang niclosamide (NCL) bằng cách phối trộn Pluronic F127 và P123 để tiêu diệt tế bào ung thư phổi A549, trong đó Pluronic F127 được liên hợp với biotin để tăng cường khả năng hấp thụ nội bào của NCL (Hình 1.10). Kết quả thử nghiệm *in vitro* cho thấy các hạt nanogel giải phóng NCL bền vững trong môi trường giàu protein và độc tính tế bào mạnh hơn so với NCL tự do [163].



Hình 1. 9. Sơ đồ tổng hợp Pluronic F127-FA [162].



Hình 1. 10. Sơ đồ tổng hợp Pluronic F127-biotin [163].

Pluronic F68 là loại polymer có giá trị HLB 29, dễ tan trong nước, khả năng tạo thành micelle thấp, nồng độ tạo micelle cao, do đó khả năng nang hóa thuốc kém. Vì vậy, để tăng khả năng nang hóa thuốc cũng như tăng cường khả năng kháng đa thuốc, Pluronic thường được phối trộn với các loại polymer có giá trị HLB thấp hoặc biến tính với các thành phần có gốc ưa béo. Mei cùng cộng sự (2009) đã phát triển các hạt nanogel bằng cách phối trộn Pluronic F68 với poly (ε-caprolactone) (PCL) để nang hóa docetaxel nhằm tăng cường khả năng kháng đa thuốc trong điều trị ung thư vú. Kết quả cho thấy Pluronic F68 đã tăng cường mức độ độc tính tế bào của các hạt nanogel mang thuốc hơn đáng kể so với các hạt nano PCL mang thuốc [164]. Song cùng cộng sự (2014) đã liên kết một đầu của Pluronic F68 với cholesterol thông qua phản ứng ester hóa đã làm giảm giá trị CMC của nó xuống 400 lần so với Pluronic F68, đồng thời làm tăng khả năng nang hóa thuốc chống ung thư cabazitaxel. Các nghiên cứu về giải phóng *in vitro* đã chứng minh rằng các nanogel Pluronic F68-cholesterol được nạp cabazitaxel có đặc tính giải phóng chậm và gây độc tế bào mạnh hơn so với dung dịch cabazitaxel được nang hóa bởi Tween 80 [165].

Cho đến nay những kết quả nghiên cứu sử dụng Pluronic F108 như một tác nhân phân phối thuốc chưa được công bố nhiều. Một nghiên cứu về Pluronic F108 đã được Wang và cộng sự (2012) sử dụng như một chất phân tán cho ống nano carbon giúp bảo vệ các ống này khỏi làm hỏng màng lysosomal trong quá trình điều trị bệnh nhân xơ hóa phổi [166].

Nhóm Pluronic thứ hai bao gồm các loại Pluronic như Pluronic L64 và Pluronic L35. Các polymer trong nhóm này có PEO và PPO nhỏ nhất, không chỉ

mang lại cho cấu trúc nano khả năng tự lắp ráp trong môi trường nước mà còn mang lại cho chúng kích thước phù hợp và cấu trúc ổn định hơn [167].

Magalhães và cộng sự (2018) đã phát triển một loại hệ thống nanogel trên cơ sở Pluronic L64 và polymer PEI để phân phối gen miR-145 đến vị trí khối u ung thư xương. Trong đó, Pluronic L64 có vai trò tạo ra các nanogel có khả năng tự lắp ráp trong môi trường nước, đồng thời có kích thước phù hợp và cấu trúc ổn định, tránh được sự bắt giữ không đặc hiệu của hệ thống lưới nội mô. Trong khi đó, polymer PEI đã giúp tăng cường sự hấp thu của tế bào thông qua con đường nội tiết [168].

Li và cộng sự (2015) đã thiết kế một hệ thống phân phối thuốc theo phương thức đồng trùng hợp khối bao gồm poly(L-lactide acid) (PLLA) và Pluronic L35 (L35) với cấu trúc PLLA–L35–PLLA để tạo thành nanogel nhạy nhiệt mang docetaxel và oxaliplatin. Pluronic L35 không chỉ cải thiện sinh khả dụng và thời gian lưu thông máu của nanogel mà còn giảm độc tính toàn thân, từ đó nâng cao hiệu quả tiêu diệt khối u và mang lại độ an toàn cao hơn. Rõ ràng, hệ thống phân phối thuốc cao phân tử dựa trên Pluronic L35 đưa ra một chiến lược mới để điều trị ung thư ruột kết như một hệ thống phân phối thuốc kép có kiểm soát [169].

Nhóm Pluronic thứ ba bao gồm các loại Pluronic như Pluronic L85, Pluronic P105 và Pluronic L61. Đặc điểm của các loại Pluronic nhóm này là khả năng hòa tan và tự lắp ráp của chúng trong nước được sử dụng để tải các thuốc kỵ nước. Hơn nữa, chúng có ưu điểm là tiêu thụ ATP trong tế bào ung thư kháng đa thuốc (MDR) để ức chế dòng P-gp đi ra ngoài, đồng thời giúp kéo dài thời gian lưu thông trong máu của thuốc mà chúng phân phối [170].

Pelosi cùng cộng sự (2019) đã điều chế nanogel bằng cách phối trộn hai loại Pluronic P85 và Pluronic F127–biotin mang đồng thời thuốc temozolomide và chất cảm quang verteporfin để điều trị u nguyên bào thần kinh đệm (GBM) theo liệu pháp sinh học và liệu pháp quang động (PDT). Cả hai Pluronic này có thể tự lắp ráp thành các nanogel lõi-vỏ trong nước, chứa các loại thuốc kỵ nước, bảo vệ các loại thuốc này khỏi sự thoái hóa và thanh thải qua thận, do đó cải thiện tính chọn lọc của các loại thuốc này đối với các khối u thông qua việc tăng cường tính thấm và lưu giữ (EPR). Trong số đó, F127–biotin có khả năng tương thích sinh học tốt nên có thể được tế bào ung thư và thậm chí cả tế bào u nguyên bào thần kinh đệm hấp thụ. Tuy nhiên, hàng rào máu não (BBB) kiểm soát sự ra vào của các chất đến não, gây khó khăn cho việc điều trị các khối u não. Điều đáng nói là P85 có thể gây miễn cảm hiệu quả với P–glycoprotein và vượt qua BBB, do đó làm tăng sự hấp thu có

chọn lọc của các tế bào ung thư. Do đó, các hệ thống phân phối thuốc polymer dựa trên Pluronic P85 và F127–biotin đã đóng một vai trò quan trọng trong việc điều trị hiệu quả GBM thông qua các chiến lược điều trị kết hợp PDT/hóa trị liệu [171].

Niu cùng cộng sự (2020) đã điều chế các nanogel dựa trên Pluronic P105 đa năng được chức năng hóa bằng glucose và folic acid để tăng cường phân bố não. Chất phân phối glucose 1 (GLUT1) tập trung nhiều ở các mạch máu não, do đó glucose trong các nanogel này không chỉ đáp ứng nhu cầu năng lượng của não mà còn có thể đi qua BBB một cách hiệu quả. Đồng thời, các thụ thể folate (FR) được biểu hiện quá mức trong các tế bào ung thư và do đó phù hợp với các loại thuốc nhắm mục tiêu vào não. Ngoài ra, Pluronic P105 có khả năng tiêu thụ ATP trong các tế bào ung thư MDR để ức chế dòng P–gp, thúc đẩy các nanogel mang DOX nhắm mục tiêu kép để giải phóng thuốc trong não. Hệ thống phân phối thuốc dựa trên Pluronic P105 này có thể cung cấp những ý tưởng mới cho các loại thuốc nhắm mục tiêu kép và phương pháp điều trị chống khối u tốt hơn [172].

Zheng và cộng sự (2019) đã thiết kế một loạt các nanogel nhạy cảm với pH bằng cách liên kết ngang các polymer tự nhiên với các tác nhân liên kết ngang dựa trên orthoester. Các tác giả đã điều chế hai thành phần bao gồm pullulan methacrylate (Pullulan-M) làm tác nhân liên kết ngang và Pluronic L61 biến đổi orthoester không bền với acid (L61-MOE). Pluronic L61 không chỉ mang lại cho nanogel khả năng tương thích sinh học tốt mà còn có thời gian lưu thông máu dài và không làm hỏng các mô bình thường. Với tất cả những điều này, hệ thống phân phối thuốc cao phân tử dựa trên Pluronic L61 cho thấy tiềm năng tuyệt vời để sử dụng trong nanogel nhạy cảm pH và liệu pháp điều trị khối u đích [173].

Nhóm Pluronic thứ tư bao gồm các loại Pluronic P123 và Pluronic L121. Đặc điểm của các loại Pluronic nhóm này là chúng có chuỗi PPO dài nhất nên tính kỵ nước của chúng lớn hơn và chúng được sử dụng rộng rãi nhất làm chất mang để nang hóa thuốc. Hơn nữa, chúng cũng có lợi thế là tiêu thụ ATP trong các tế bào ung thư đa kháng thuốc (MDR), giúp ức chế dòng P–glycoprotein (P–gp) [174].

Wang cùng cộng sự (2017) đã thiết kế một loại nanogel có khả năng phản ứng oxi hóa khử từ ba thành phần bao gồm polyethylene glycol (PEG), Pluronic P123 và polyethylenimine (PEI) để tạo thành PEG–SS–P123–PEI thông qua cầu nối liên kết disulfide. Các nanogel này có khả năng tự lắp ráp thành các micelle cation trong môi trường nước, sau đó nang hóa PTX và siRNA thông qua tương tác kỵ nước và tương tác tĩnh điện để tạo thành các micelle cation có khả năng phản ứng oxi hóa khử với glutathione (GSH). Polymer PEI có thể được sử dụng để sửa

đôi P123 (được gọi là PEI-P123) để cung cấp các đặc tính cation và PEG được sử dụng để tạo thành mạng lưới micelle bảo vệ ổn định về mặt không gian có khả năng vượt qua hàng rào sinh lý. Ngoài ra, P123 không chỉ được sử dụng làm chất mang thuốc mà còn được sử dụng để làm cạn kiệt ATP nhanh chóng, nơi nó đảo ngược MDR một cách hiệu quả cả *in vivo* và *in vitro*. Do đó, sự phân cắt các liên kết disulfide trong môi trường khử giàu GSH của các tế bào khối u không chỉ thúc đẩy giải phóng PTX và siRNA mà còn kích hoạt sự cạn kiệt ATP. Hệ thống phân phối thuốc dựa trên Pluronic P123 là lựa chọn hữu ích đối với các bệnh ung thư nhạy cảm với oxy hóa khử hiệu quả và để khắc phục MDR [175].

Cheng cùng cộng sự (2020) đã thiết kế một loại nanogel nhạy cảm với pH từ Pluronic P123 liên kết với α -tocopherol succinate (α -TOS) thông qua liên kết orthoester (OE) không bền với acid. Các nanogel có độ nhạy do acid kích hoạt và có thể được sử dụng để nhắm mục tiêu giải phóng thuốc trong khu vực khối u và cũng có thể được sử dụng để đảo ngược MDR. Kết quả là các nanogel có tác dụng ức chế khối u tốt. Điều này dẫn đến hiệu quả ổn định và chống pha loãng máu tốt hơn, đồng thời giúp tích lũy và lưu giữ thuốc trong các tế bào MDR, do đó làm tăng khả năng gây độc tế bào và quá trình chết theo chương trình khi so sánh với các phương pháp truyền thống. Những phát hiện này chỉ ra rằng các hệ thống phân phối thuốc dựa trên Pluronic P123 có thể được sử dụng hiệu quả cho các phương pháp điều trị ung thư nhạy cảm với pH vượt qua MDR [176].

Lim cùng cộng sự (2018) đã điều chế một hệ nanogel bằng cách phối trộn hai loại Pluronic L121 và F127, trong đó Pluronic F127 được liên kết với phối tử nhắm mục tiêu tripeptide cyclic arginine-glycine-aspartate (cRGD). Các hạt nanogel này mang lại một số lợi ích bao gồm khả năng tăng hấp thu tế bào ung thư, tăng hoạt động chống ung thư và hỗ trợ tích lũy thuốc docetaxel (DTX) hiệu quả [177]. Như vậy, đối với nhóm Pluronic thứ tư, các loại Pluronic thường được biến tính hóa học hoặc phối trộn với các loại polymer hoặc Pluronic khác có giá trị HLB cao để cải thiện thời gian lưu thông của nanogel trong cơ thể.

Như vậy, trong số bốn nhóm Pluronic nêu trên, các Pluronic nhóm thứ nhất là loại Pluronic ưa nước, đóng vai trò trong việc cải thiện thời gian lưu thông của nanogel trong cơ thể và thường được phối trộn với các loại polymer có HLB < 20 hoặc biến tính hóa học với thành phần ưa béo để tăng cường khả năng nang hóa thuốc kỵ nước. Các Pluronic thuộc nhóm thứ hai có khối lượng phân tử thấp thường được biến tính với các loại polymer khác để tăng kích thước micelle và tăng khả năng phân phối thuốc và gen. Các Pluronic thuộc nhóm thứ ba và thứ tư có giá trị

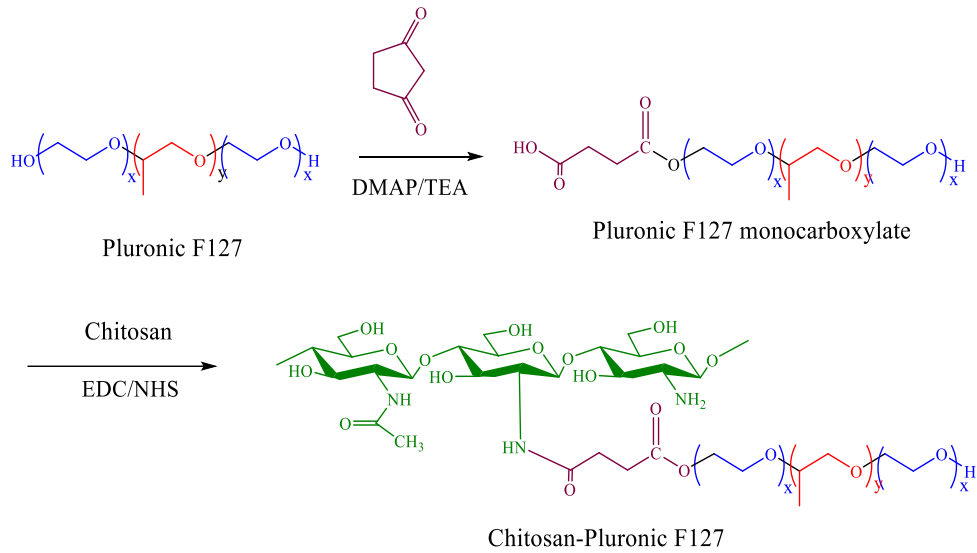
HLB < 20 có khả năng tiêu thụ ATP trong các tế bào ung thư đa kháng thuốc (MDR), giúp ức chế dòng P-glycoprotein (P-gp) và thường được phối trộn hoặc biến tính hóa học với các loại polymer có giá trị HLB > 20 để cải thiện thời gian lưu thông của nanogel trong cơ thể.

1.5. Định hướng nghiên cứu hệ phân phối thuốc nanogel trên cơ sở chitosan ghép Pluronic

1.5.1. Những nghiên cứu hệ phân phối thuốc nanogel chitosan ghép Pluronic

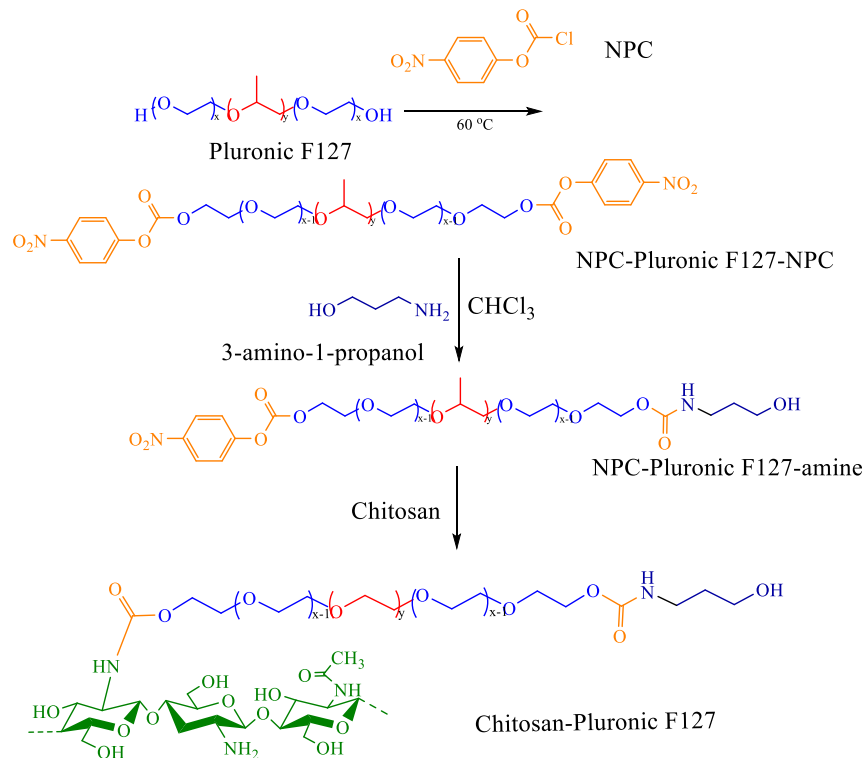
Một trong những bất lợi của việc sử dụng Pluronic làm micelle phân phối thuốc là khả năng ổn định của micelle trong dung dịch nước kém. Vì là loại polymer nhạy nhiệt nên khi nhiệt độ dung dịch thấp hơn nhiệt độ dung dịch tới hạn dưới của Pluronic thì các micelle sẽ phân tách thành các monomer phân tán trong nước. Để tăng cường độ ổn định của micelle, các Pluronic thường được liên hợp hóa học với các loại polysaccharide như alginate, hyaluronic acid, cellulose, chitosan hoặc protein như gelatin,.... Việc liên hợp hóa học này giúp cho các phân tử Pluronic được gắn kết trong cùng một khối với phân tử polysaccharide, từ đó các phân tử Pluronic không bị phân tán ở nồng độ thấp và lưu giữ các phân tử thuốc kỵ nước bên trong lõi micelle. Trong số các loại polysaccharide liên hợp hóa học với Pluronic, chitosan được đánh giá là mang lại hiệu quả cao trong việc phân phối thuốc. Các micelle tạo thành từ chitosan liên hợp với Pluronic có độ bền và độ ổn định cao hơn các polysaccharide mang điện tích âm như alginate, hyaluronic acid.... Điều này là do chitosan mang điện tích dương còn Pluronic mang điện tích âm nên các micelle tạo thành có sự tương tác tĩnh điện có thể tăng cường hiệu quả nang hóa thuốc thông qua các tương tác tĩnh điện và kỵ nước của hệ nanogel và thuốc được nang hóa. Trong môi trường nước có tính acid, chitosan bị proton hóa tạo thành lớp vỏ bao bọc khối PPO kỵ nước của Pluronic bên trong lõi micelle.

Có nhiều phương pháp khác nhau để điều chế các hạt nanogel chitosan ghép với Pluronic, tùy thuộc vào mỗi phương pháp mà các micelle tạo thành có các đặc điểm hóa lý khác nhau. Park cùng cộng sự (2008) đã tiến hành ester hóa một đầu Pluronic F127 để tạo thành Pluronic F127-carboxylate và sau đó liên hợp với chitosan có khối lượng phân tử 300 kDa, độ deacetyl hóa 75–85% với xúc tác EDC/NHS (Hình 1.11). Các hạt nanogel này nang hóa indomethacin (IMC) với đường kích động học 120 nm có độ ổn định trong môi trường nước và đạt được mức độ giải phóng IMC bền vững so với các nanogel Pluronic F127 đơn lẻ [178].



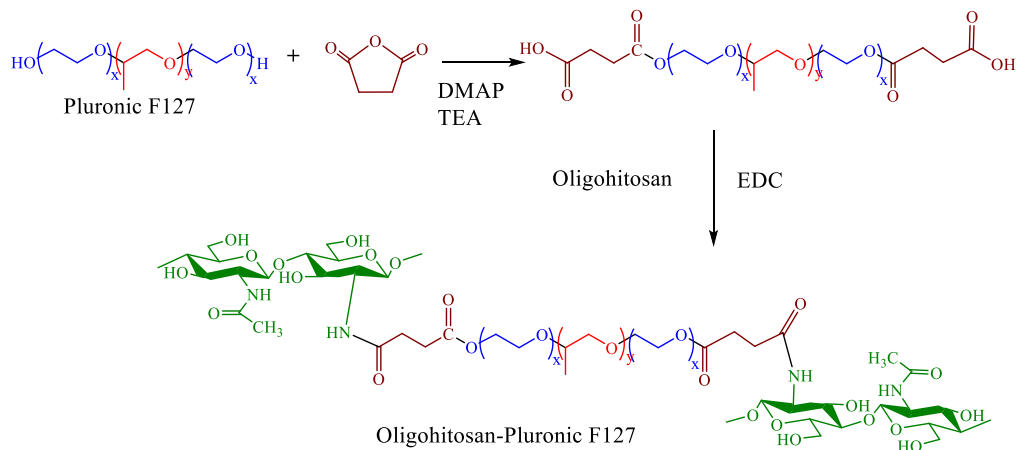
Hình 1. 11. Sơ đồ tổng hợp chitosan-Pluronic F127 [178].

Một phương pháp khác để hoạt hóa Pluronic F127 trước khi liên hợp với chitosan đã được Nguyen cùng cộng sự phát triển (2016). Pluronic F127 được hoạt hóa với 4-nitrophenyl chloroformate (NPC) ở hai đầu mạch, sau đó khóa một đầu phân tử Pluronic F127-dicarbonate bằng 3-amino-1-propanol. Phản ứng amide hóa giữa chitosan và Pluronic 127 monocarbonate tạo thành chitosan liên hợp Pluronic F127 (Hình 1.12). Các hạt nanogel này nang hóa curcumin có độ ổn định tốt, không thay đổi màu sắc đặc trưng và không bị tách pha sau 1 tháng bảo quản [179].



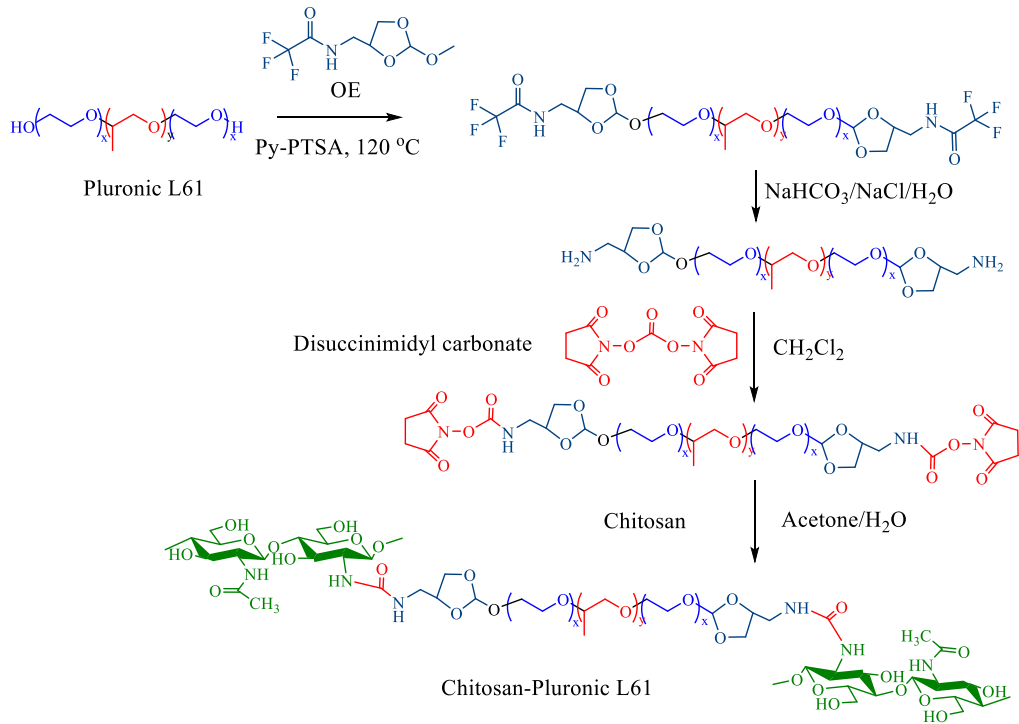
Hình 1. 12. Sơ đồ tổng hợp chitosan-Pluronic F127 [179].

Zhang cùng cộng sự (2010) đã tiến hành ester hóa hai đầu mạch Pluronic F127 để tạo thành Pluronic F127 dicarboxylate, sau đó liên hợp với các phân tử oligochitosan ở hai đầu mạch Pluronic F127 (Hình 1.13). Các hạt nanogel này mang ethidium bromide được tế bào ung thư vú (MCF-7) hấp thụ mạnh hơn so với tế bào lành (C3H10T1/2). Đặc biệt, các viên nang nanogel này có kích thước ~37 nm ở 37 °C và tăng lên ~240 nm khi làm lạnh xuống 4 °C, do đó các viên nang nanogel này có khả năng giải phóng ethidium bromide được kiểm soát bởi nhiệt độ [180].



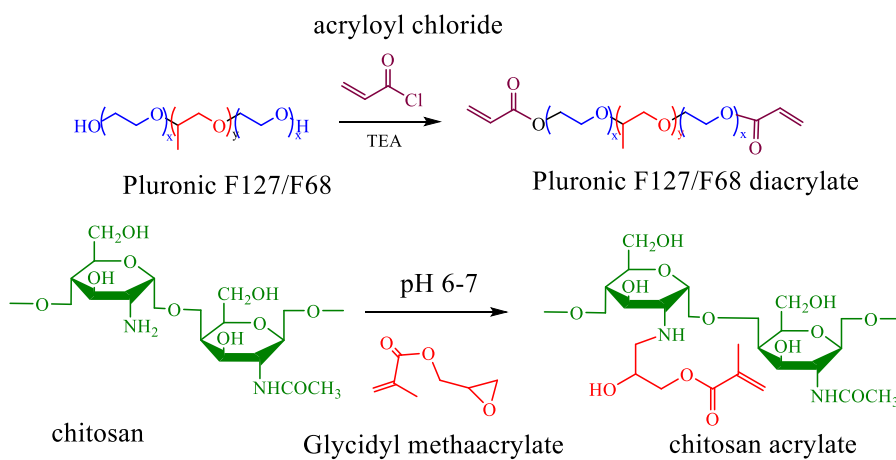
Hình 1. 13. Sơ đồ tổng hợp oligochitosan-Pluronic F127 [180].

Xu và cộng sự (2021) đã đưa ra một phương pháp khác điều chế nanogel chitosan liên hợp Pluronic L61 nhạy cảm với pH. Để tạo ra các hạt nanogel này, Pluronic L61 được biến tính với ortho-ester (OE) không bền acid để tạo ra Pluronic L61-OE, sau đó phản ứng với disuccinimidyl carbonate (DSC) để tạo thành Pluronic L61-OE-SC. Chitosan phản ứng Pluronic L61-OE-SC tạo thành CS-OE-L61 để nang hóa DOX (Hình 1.14). Các hạt nanogel CS-OE-L61 mang DOX có khả năng hấp thu các tế bào ung thư gan (Hep G2) và (H22), sau đó giải phóng DOX và Pluronic L61 trong tế bào chết do liên kết ortho-ester bị phân hủy. Ngoài tác dụng gây độc tế bào do DOX gây ra, Pluronic L61 cũng có tác dụng gây độc tế bào. Trong thử nghiệm phân phối thuốc *in vivo* đã chứng minh rằng các hạt nano L61-OE-CS/DOX có thể kéo dài thời gian lưu thông DOX và cải thiện hiệu quả nồng độ DOX tại các vị trí khối u. Do đó, các hạt nanogel nhạy cảm với pH dựa trên Pluronic L61 và chitosan có tiềm năng to lớn trong việc sử dụng như vật liệu phân phối thuốc dạng nanogel để điều trị khối u hiệu quả [181].



Hình 1. 14. Sơ đồ tổng hợp chitosan-Pluronic L61 [181].

Kim và cộng sự (2010) đã đưa ra một phương pháp khác điều chế nanogel chitosan liên hợp Pluronic F68 hoặc Pluronic F127. Các loại Pluronic được phản ứng với acryloyl chloride để tạo thành các dẫn xuất Pluronic diacrylate. Bên cạnh đó, chitosan cũng được phản ứng với glycidyl methacrylate để tạo thành chitosan acrylate (Hình 1.15). Các hạt nanogel chitosan liên hợp với các Pluronic được tạo ra từ phản ứng Michael giữa Pluronic diacrylate và chitosan acrylate. Sự liên hợp chitosan với Pluronic đã làm tăng đáng kể sự hấp thu tế bào ung thư biểu mô (SCC-7) của chúng so với các hạt nanogel từ Pluronic [182].



Hình 1. 15. Sơ đồ tổng hợp Pluronic F127/F68 diacrylate và chitosan acrylate [182].

Như vậy cho đến nay, có nhiều phương pháp khác nhau để điều chế nanogel chitosan liên hợp với Pluronic. Các hạt nanogel được tạo ra bằng cách ghép một đầu phân tử Pluronic lên mạch chitosan [178, 179]. Đối với phương pháp này, có thể ghép được nhiều phân tử Pluronic lên cùng một mạch chitosan và có thể không chế kích thước hạt mong muốn bằng cách thay đổi hàm lượng Pluronic. Các hạt nanogel phân tán tốt trong môi trường nước và không bị kết tụ. Các hạt nanogel cũng được tạo ra bằng cách ghép hai đầu mạch phân tử Pluronic lên hai phân tử chitosan [180, 181]. Đối với phương pháp này, việc không chế kích thước hạt nanogel trở nên khó khăn vì Pluronic đóng vai trò như tác nhân liên kết ngang, liên kết các phân tử chitosan với nhau. Ngoài ra, các hạt nanogel cũng được tạo ra bằng phản ứng Michael sau khi Pluronic và chitosan được acrylate hóa [182]. Đối với phương pháp này, việc tạo ra cấu trúc lõi - vỏ (core - shell) trở nên khó khăn vì có khả năng xảy ra phản ứng khâu mạch giữa các phân tử chitosan.

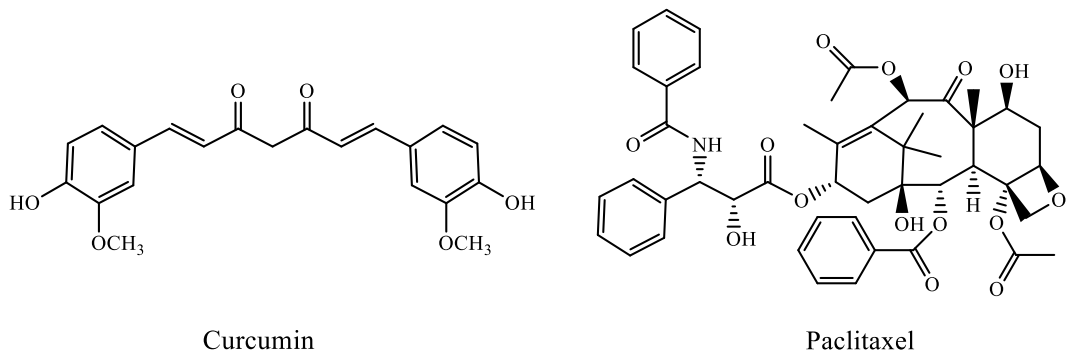
Như vậy, với phương pháp ghép các phân tử Pluronic lên cùng một mạch chitosan là phương pháp được đánh giá là đơn giản và hiệu quả nhất và chỉ được nghiên cứu đối với Pluronic F127. Để đánh giá khả năng phân phối thuốc kỵ nước của nanogel chitosan ghép với Pluronic từ các loại Pluronic khác nhau được thực hiện trên cùng một phương pháp điều chế, chúng tôi lựa chọn 4 loại Pluronic với các giá trị HLB khác nhau trong các nhóm Pluronic đã được phân loại ở trên bao gồm Pluronic L61 (HLB=3), P123 (HLB=8), F127 (HLB=22) và F68 (HLB=29). Việc lựa chọn phối tử cho các hạt nano mang thuốc điều trị ung thư phụ thuộc vào mục đích điều trị từng loại khối u, độ ổn định các hạt nano mang thuốc, và giá thành sản phẩm. Đối với các hạt nanogel trên cơ sở chitosan ghép Pluronic có kích thước trung bình từ 100 đến 200 nm phù hợp với phân phối thuốc nhắm mục tiêu thụ động. Các phối tử protein tuy có độ đặc hiệu cao nhưng có kích thước lớn và không ổn định và nếu kết hợp với các hạt nanogel chitosan ghép Pluronic sẽ làm tăng kích thước hạt đáng kể, do đó cản trở lưu thông của các hạt nanogel trong mạch máu. Các phối tử peptide và aptamer có tính đặc hiệu cao, kích thước nhỏ nhưng chi phí cao. Các phối tử thuộc nhóm phân tử nhỏ như acid folic, biotin có kích thước nhỏ, chi phí thấp. Cho đến nay, các phối tử folic acid và biotin chỉ được sử dụng như tác nhân nhắm mục tiêu chủ động cho các hạt nanogel chitosan và Pluronic đơn lẻ. Trong khi đó, các hạt nanogel chitosan ghép Pluronic sử dụng folic acid và biotin làm tác nhân nhắm mục tiêu chủ động chưa được nghiên cứu. Chính vì vậy, folic acid và biotin là lựa chọn làm phối tử nhắm mục tiêu cho các hạt nanogel chitosan ghép Pluronic cần được nghiên cứu.

1.5.2. Lựa chọn tác nhân nang hóa cho nanogel chitosan ghép Pluronic

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thử nghiệm khả năng chống ung thư của các hạt nanogel chitosan ghép Pluronic trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7. Để đánh giá khả năng tải các hoạt chất sinh học có tính kỵ nước của nanogel chitosan ghép Pluronic, chúng tôi lựa chọn hai tác nhân kỵ nước là curcumin và paclitaxel.

Curcumin (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) (Hình 1.16), còn được gọi là diferuloylmethane, là polyphenol tự nhiên chính được tìm thấy trong thân rễ của *Curcuma longa* (nghệ). *Curcuma longa* đã được sử dụng theo truyền thống ở các nước châu Á như một loại thảo mộc y tế do đặc tính chống oxy hóa, chống viêm [183]. Trong những năm gần đây, các nghiên cứu đã chỉ ra rằng CUR có thể ức chế sự tăng sinh và tồn tại, gây chết tế bào apoptotic và không apoptotic, đồng thời giảm sự xâm lấn và di chuyển của các loại tế bào ung thư ác tính [184]. Thông qua việc điều chỉnh sự biểu hiện của các gen liên quan đến quá trình chết tế bào theo chương trình, CUR gây ra hiện tượng tự chết ở mức độ cao ở các tế bào ung thư vú ở người [185]. Mặc dù lợi ích được báo cáo của nó thông qua các cơ chế chống viêm và chống oxy hóa, nhưng một trong những vấn đề chính khi hấp thụ curcumin là khả dụng sinh học kém, chủ yếu là do hấp thụ kém, chuyển hóa nhanh và đào thải nhanh.

Paclitaxel (PTX) là một alkaloid (Hình 1.16) và là một loại thuốc chống ung thư có tác động đến sự ổn định của các vi ống, đại diện cho một tác nhân hóa trị liệu được sử dụng rộng rãi trong nhiều bệnh ung thư. Tác dụng của PTX như một loại thuốc chống phân bào đã được ghi nhận trong một số lượng lớn các nghiên cứu [186-188]. Hơn nữa, các cơ chế hoạt động của PTX liên quan đến việc ức chế sự phát triển của khối u có thể hoạt động ở các mức độ khác nhau. Trong những nghiên cứu này, PTX bắt đầu một chuỗi các con đường tín hiệu dẫn đến chết tế bào theo chương trình [189, 190]. Hơn nữa, PTX có thể gây ra nhiều ảnh hưởng tích cực đến việc điều chỉnh phản ứng miễn dịch thông qua việc điều chỉnh các chemokine, cytokine hoặc tế bào miễn dịch [191, 192]. Sự kháng thuốc của tế bào ung thư vú đối với PTX là nguyên nhân dẫn đến kết quả lâm sàng tồi tệ hơn cho bệnh nhân mắc ung thư vú [193, 194]. Thách thức toàn cầu trong việc áp dụng PTX như một tác nhân hóa trị liệu chống ung thư chiếm ưu thế là giảm tác dụng phụ và tăng hiệu quả sử dụng thuốc.



Hình 1. 16. Cấu trúc hóa học của curcumin và paclitaxel.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn CUR là tác nhân để đánh giá khả năng nang hóa của các nanogel chitosan–Pluronic với các loại Pluronic khác nhau (L61, P123, F127 và F68) vì tính kém hòa tan của nó trong môi trường nước, đồng thời đánh giá hoạt tính chống ung thư của nó trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7. Chúng tôi lựa chọn PTX để đánh giá khả năng nang hóa thuốc của các hạt nanogel chitosan–Pluronic nhằm mục tiêu chủ động vì tính hòa tan kém của nó trong nước và nhằm cải thiện tính kháng đa thuốc của nó đối với tế bào ung thư vú MCF-7.

CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thiết bị

2.1.1. Hóa chất

Các hóa chất được sử dụng cho luận án này là hóa chất tinh khiết bao gồm bao gồm chitosan (50494), Pluronic L61 (435422), Pluronic P123 (435465), Pluronic F127 (P2443) và Pluronic F68 (K4894), curcumin (C1386), paclitaxel (T7402), di-tert-butyl dicarbonate (205249), acid folic (F7876) và biotin (14400) được mua từ Sigma Aldrich (Mỹ). 1-ethyl-3-(3-dimethylamino)propyl carbodiimide (10397490), N-hydroxysuccinimide (11494063), dicyclohexyl carbodiimide (11320370), 4-Nitrophenyl chloroformate (10657554), 3-Amino-1-propanol (10794781) và ethylenediamine (11460083) được mua từ Thermo Scientific (Mỹ).

Các dung môi tinh khiết bao gồm Dimethylsulfoxide, N,N-Dimethylformamide, chloroform, diethyl ether, ethanol, methanol, acid trifluoroacetic được mua từ Fisher BioReagents (Mỹ).

2.1.2. Dụng cụ, thiết bị thí nghiệm

Dụng cụ thí nghiệm bao gồm các dụng cụ thủy tinh như bình cầu ba cổ, cốc, đĩa.... Thiết bị thí nghiệm bao gồm: cân phân tích, máy khuấy từ gia nhiệt, máy lọc hút chân không, tủ hút, bộ cất quay, hệ thống đông khô....

2.1.3. Thiết bị phân tích tính chất và cấu trúc của vật liệu

Phổ hồng ngoại FT-IR: được thực hiện trên máy quang phổ hồng ngoại biến đổi FT-IR, PerkinElmer Frontier, tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Sử dụng chế độ đo độ truyền qua với dải số sóng từ 4000 – 400 cm^{-1} , số điểm 3601, số lần quét. Mẫu được chuẩn bị bằng cách nghiền mịn với bột KBr theo tỷ lệ 5 - 10 μg chất/1gam KBr và ép thành màng trong suốt.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$: được đo trên máy BRUKER ADVANCE – 500M của Đức tại Phòng phân tích cấu trúc - Viện Hoá học - Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mẫu được phân tích ở tần số 500 MHz, dung môi CDCl_3 , D_2O và DMSO-d_6 , chất chuẩn nội TMS.

Phân tích nhiệt quét vi sai (DSC): kết quả phân tích nhiệt DSC được thực hiện trên máy Setaram Labsys Sta tại Trường đại học Sư phạm Kỹ thuật thành phố Hồ Chí Minh được sử dụng để chứng minh Pluronic ghép thành công lên mạch

chitosan. Các mẫu được quét ở nhiệt độ dao động từ 30 đến 450 °C với tốc độ gia nhiệt 10 °C/phút. Khối lượng mẫu khoảng 10 mg.

Phân tích nhiệt trọng lượng (TGA): được thực hiện trên máy phân tích nhiệt TGA - DSC, Mettler Toledo, tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam. Các mẫu được quét ở nhiệt độ dao động từ 30 đến 450 °C với tốc độ gia nhiệt 10 °C/phút. Khối lượng mẫu khoảng 10 mg.

Kích thước hạt (DLS) và điện thế zeta: giá trị DLS và thế zeta của nanogel được đo bằng máy HORIBA SZ-100-S2, Nhật Bản, tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Điều kiện đo DLS: mẫu được phân tán trong môi trường nước DI ở nồng độ 1000 ppm, góc tán xạ 90, nhiệt độ 25 °C và 37 °C. Điều kiện đo thế Zeta: mẫu được phân tán trong môi trường nước DI ở nồng độ 1000 ppm, nhiệt độ 37 °C. Các thí nghiệm được thực hiện 3 lần.

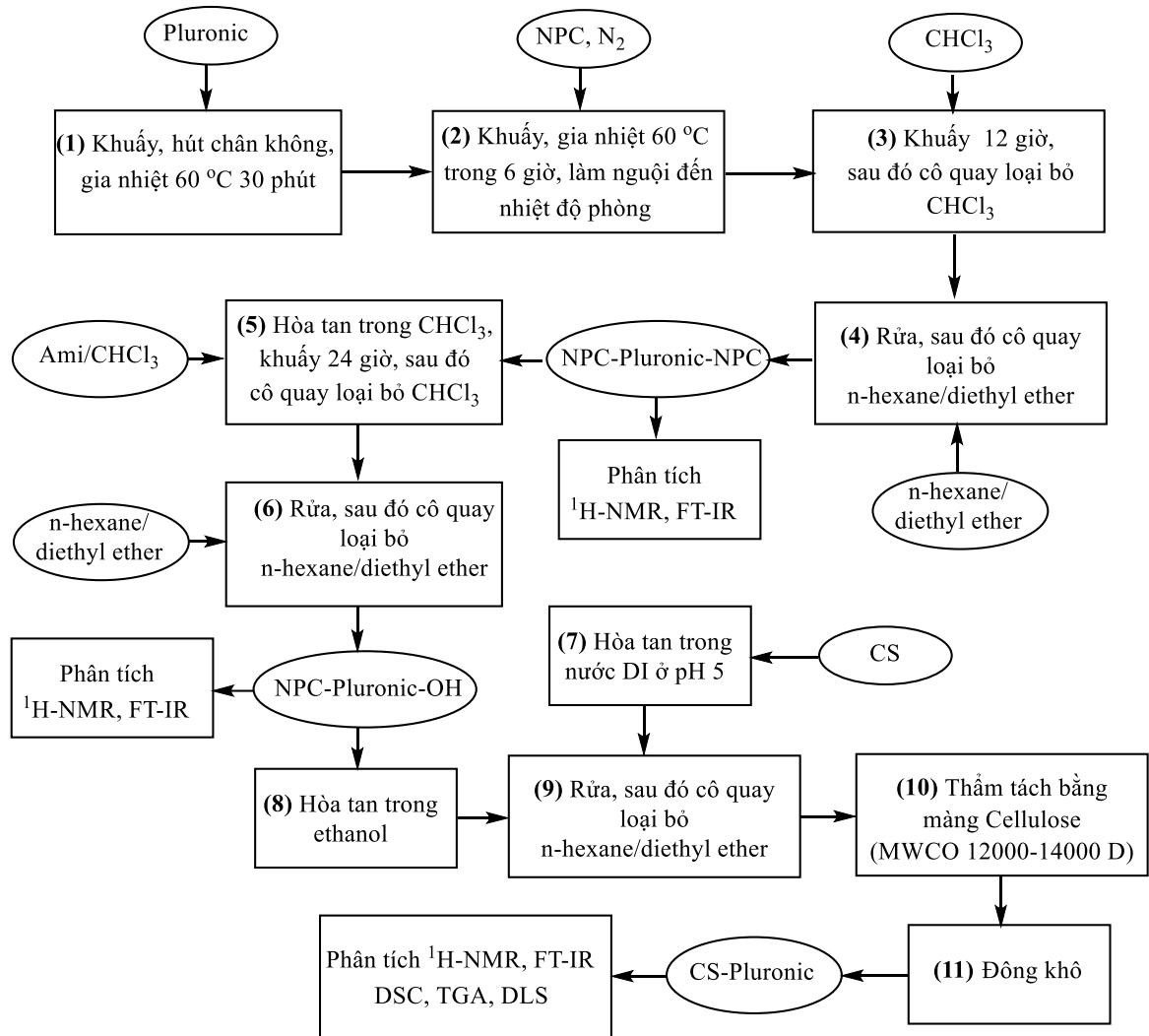
Kính hiển vi điện tử (TEM): hình thái của các hạt nanogel được xác định bằng kính hiển vi điện tử truyền qua TEM, JEM 1010 (JEOL, Japan), Đại học Bách khoa, Thành phố Hồ Chí Minh và Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Quang phổ hấp thụ UV-Vis: Giá trị độ hấp thụ tử ngoại của các dung dịch nanogel ở các nồng độ khác nhau được đo bằng máy quang phổ UV-Vis, Shimadzu UV-2401, Tokyo, Nhật Bản, tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Thực nghiệm

2.2.1. Tổng hợp chitosan – Pluronic (CS–Pluronic)

Quá trình tổng hợp chitosan – Pluronic 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 phenylcarbomate 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.



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

Tổng hợp Pluronic dinitrophenylcarbonate (NPC-Pluronic-NPC): trong nghiên cứu này, bốn loại Pluronic L61, P123, F127 và F68 được sử dụng để hoạt hóa hai đầu hydroxyl của Pluronic với 4-Nitrophenyl chloroformate (NPC). Phương pháp hoạt hóa Pluronic bởi NPC đã được báo cáo trước đây [179]. Hàm lượng các chất tham gia phản ứng được cho trong Bảng 2.1. Quy trình tổng hợp được thực hiện theo lưu đồ Hình 2.1 từ bước (1) đến (4). Làm nóng chảy lượng Pluronic cần phản ứng trong bình cầu 3 cổ, khuấy trong 30 phút trong môi trường chân không ở nhiệt độ 65 °C để loại bỏ hoàn toàn hơi ẩm. 4-Nitrophenyl chloroformate (NPC) với khối lượng cần thiết được thêm vào để hoạt hóa Pluronic trong môi trường khí N₂ trong thời gian 6 giờ. Khi hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ phòng, pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng 10 mL chloroform và tiếp tục khuấy hỗn hợp phản ứng trong thời gian 12 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm sạch lượng NPC còn dư bằng hỗn hợp dung môi hexane:diethylether (1:1) lạnh và thu hồi sản phẩm bằng cô quay chân không để loại bỏ hoàn toàn dung môi. Cấu trúc sản phẩm được xác

định bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ và quang phổ hồng ngoại biến đổi FT-IR. Dựa trên kết quả phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$, hiệu suất hoạt hóa Pluronic bởi NPC được tính toán dựa trên công thức (1) [195].

$$\% \text{ NPC} = \frac{\frac{S_{H(-\text{CH}_3)}}{S_{H(-\text{CH}=\)}}}{\frac{\sum H(-\text{CH}_3)}{\sum H(-\text{CH}=\)}} \times 100 \quad (1)$$

Trong đó, $S_{H(-\text{CH}_3)}$ là diện tích peak của proton nhóm $-\text{CH}_3$ của phân tử Pluronic, $S_{H(-\text{CH}=\)}$ là diện tích peak của proton nhóm $-\text{CH}=\text{}$ của phân tử NPC, $\sum H(-\text{CH}_3)$ là tổng số proton nhóm $-\text{CH}_3$ của phân tử Pluronic, $\sum H(-\text{CH}=\text{})$ là tổng số proton nhóm $-\text{CH}=\text{}$ tại một vị trí vòng benzen của phân tử NPC.

Bảng 2. 1. Hàm lượng Pluronic và NPC tham gia phản ứng.

Tên sản phẩm	Lượng Pluronic tham gia phản ứng	Lượng NPC tham gia phản ứng
NPC-L61-NPC	5 gam (2,5 mmol)	1142 mg (5,5 mmol)
NPC-P123-NPC	10 gam (1,73 mmol)	788 mg (3,79 mmol)
NPC-F127-NPC	10 gam (0,793 mmol)	363 mg (1,746 mmol)
NPC-F68-NPC	10 gam (1,19 mmol)	555 mg (2,61 mmo)

Tổng hợp 4-nitrophenylcarbonate-pluronic-3-hydroxylpropylcarbamate (NPC-Pluronic-OH): với bốn loại Pluronic L61, P123, F127 và F68 sau khi hoạt hóa hai đầu mạch với NPC, các phân tử NPC-Pluronic-NPC được thay thế một phân tử phenylcarbonate ở một đầu mạch bởi phân tử 3-Amine-1-propanol để tạo thành phân tử NPC-Pluronic-OH. Phương pháp thay thế một phân tử NPC bằng 3-Amineo-1-propanol từ NPC-Pluronic-NPC đã được báo cáo trước đây [179]. Hàm lượng các chất tham gia phản ứng được cho trong Bảng 2.2. Quy trình tổng hợp được thực hiện theo lưu đồ Hình 2.1 từ bước (5) đến bước (6). Hòa tan lượng NPC-Pluronic-NPC cần phản ứng trong 15 mL chloroform. 10 mL dung dịch chloroform chứa lượng 3-Amine-1-propanol cần thiết được nhỏ từ từ vào dung dịch NPC-Pluronic-NPC, phản ứng được khuấy trộn trong thời gian 12 giờ. Loại bỏ dung môi cloroform, sản phẩm được tinh chế bằng hỗn hợp dung môi hexane:diethylether (1:1). lạnh và thu hồi sản phẩm bằng cô quay chân không để loại bỏ hoàn toàn dung môi. Cấu trúc sản phẩm được xác định bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ và quang phổ hồng ngoại biến đổi FT-IR.

Dựa trên kết quả phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$, số lượng nhóm NPC còn lại được tính toán dựa trên công thức (1) [195].

Bảng 2. 2. Hàm lượng NPC-Pluronic-NPC và 3-Amine-1-propanol tham gia phản ứng.

Tên sản phẩm	Lượng NPC-Pluronic-NPC tham gia phản ứng	Lượng 3-Amine-1-propanol tham gia phản ứng
NPC-L61-OH	4 gam (1.71 mmol)	131 μL (1.71 mmol)
NPC-P123-OH	8 gam (1.3 mmol)	100 μL (1.3 mmol)
NPC-F127-OH	8 gam (0.618 mmol)	47 μL (0.618 mmol)
NPC-F68-OH	8 gam (0.916 mmol)	70 μL (0.916 mmo)

Tổng hợp hệ phân phối thuốc chitosan-Pluronic (CS-Pluronic): Trong số bốn loại Pluronic khác nhau (L61, P123, F127 và F68), Pluronic P123 được chứng minh là có khả năng tải thuốc chống ung thư fluorouracil (5-FU) cao hơn so với Pluronic F127 và F68 sau khi ghép lên polyamidoamine dendrimer (G 4.0) [196]. Để đánh giá khả năng nang hóa CUR của các hạt nanogel CS-Pluronic, Pluronic P123 được sử dụng để khảo sát tỷ lệ ghép tối ưu lên mạch chitosan cũng như khả năng nang hóa CUR cao nhất. Từ tỷ lệ ghép này, chúng tôi tiến hành ghép các Pluronic (L61, F127 và F68) lên mạch chitosan nhằm đánh giá khả năng tải CUR của các loại Pluronic sau khi ghép lên chitosan. Tỷ lệ CS và NPC-P123-OH được trình bày trong Bảng 2.3. Quy trình tổng hợp được thực hiện theo lưu đồ Hình 2.1 từ bước (7) đến bước (11). Cân một lượng CS cần thiết hòa tan trong nước DI bằng cách điều chỉnh pH của dung dịch bằng 5 với dung dịch HCl 0,1 N. Hòa tan lượng NPC-Pluronic-OH cần thiết trong dung môi ethanol. Nhỏ từ từ dung dịch NPC-Pluronic-OH vào dung dịch CS, phản ứng được thực hiện trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Dung dịch sau phản ứng được thẩm tách qua màng Cellulose MWCO 12000 – 14000 D trong nước cất với 10% ethanol để loại bỏ p-nitrophenol và NPC-Pluronic-OH chưa phản ứng ra khỏi sản phẩm sau đó thẩm tách lại trong nước cất. Cuối cùng dung dịch sau thẩm tách được đông khô để thu sản phẩm CS-Pluronic. Sử dụng phổ $^1\text{H-NMR}$ và FT-IR để xác định cấu trúc. Kết quả phân tích nhiệt DSC được sử dụng để chứng minh Pluronic ghép thành công lên mạch chitosan.

Bảng 2. 3. Tỷ lệ CS và NPC–P123–OH tham gia phản ứng.

Tên công thức	Tỷ lệ khối lượng (CS/P123)	Khối lượng CS	Khối lượng P123
CS-P123 (1-5)	1:5	100 mg (0,56 mmol)	500 mg (0,083 mmol)
CS-P123(1-10)	1:10	100 mg (0,56 mmol)	1000 mg (0,165 mmol)
CS-P123(1-15)	1:15	100 mg (0,56 mmol)	1500 mg (0,247 mmol)
CS-P123(1-20)	1:20	100 mg (0,56 mmol)	2000 mg (0,330 mmol)

* Số mol chitosan được tính theo số mol đơn vị glucosamine

Sử dụng phương pháp TGA để xác định phần trăm lượng chitosan đã tham gia phản ứng ghép với Pluronic. Chitosan biểu hiện ba giai đoạn suy thoái. Giai đoạn đầu tiên xảy ra trong khoảng nhiệt độ từ 50 đến 100 °C do sự bay hơi của độ ẩm. Giai đoạn giảm trọng lượng thứ hai của chitosan bắt đầu ở 230 đến 400 °C và giai đoạn cuối cùng mà chitosan tiếp tục phân hủy trên 400 °C [197]. Đối với Pluronic tại nhiệt độ trên 420 °C, tất cả các loại Pluronic đều bị phân hủy hoàn toàn. Như vậy, tại nhiệt độ t trên nhiệt độ phân hủy của Pluronic, phần còn lại của chitosan-Pluronic được xem như thành phần của chitosan. Dựa vào phần trăm trọng lượng phần còn lại ở nhiệt độ t của chitosan-Pluronic và chitosan tinh khiết ta tính được phần trăm khối lượng chitosan đã tham gia phản ứng ghép với Pluronic theo công thức (2) [198].

$$\% m_{CS(nanogel)} = \frac{\% m_t(nanogel)}{\% m_t CS} \times 100 \quad (2)$$

Trong đó, $\% m_t(CS-Pluronic)$ và $\% m_t CS$ là phần trăm trọng lượng phần còn lại của chitosan-Pluronic và chitosan tinh khiết.

Vậy hiệu suất Pluronic đã tham gia phản ứng được tính theo công thức (3):

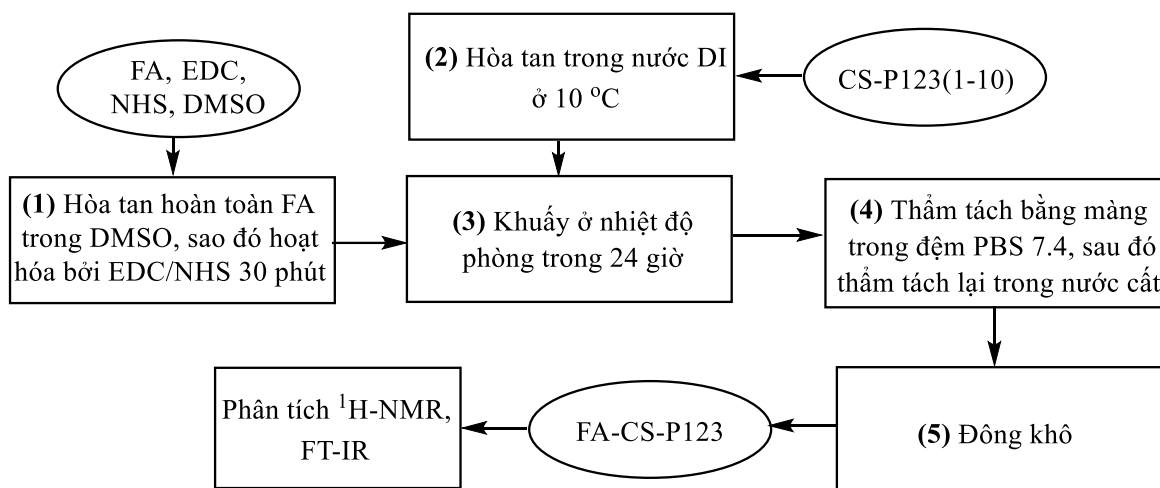
$$\% H = \frac{100 - \% m_{CS(nanogel)}}{\% m_{Pluronic(nanogel)}} \times 100 \quad (3)$$

Trong đó $\% m_{Pluronic}$ là phần trăm khối lượng Pluronic tham gia phản ứng ban đầu.

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

FA–CS–P123 được tổng hợp theo lưu đồ Hình 2.2. Hòa tan 1 gam CS–P123(1–10) trong 10 mL nước DI ở nhiệt độ 10 °C. Hòa tan 100 mg folic acid (FA) trong 50 mL dung môi DMSO, 35 mg EDC và 52 mg NHS được thêm vào để hoạt hóa nhóm cacboxyl của FA trong thời gian 30 phút. Nhỏ từ từ dung dịch

CS-P123(1-10) vào dung dịch FA, phản ứng được thực hiện 24 h trong bóng tối. Tiến hành thẩm tách hỗn hợp phản ứng bằng màng Cellulose (MWCO=12000-14000 Da) trong đệm phosphate pH 7.4 để loại bỏ hoàn toàn FA chưa phản ứng ra khỏi sản phẩm, sau đó thẩm tách lại trong nước cất trước khi đông khô thu sản phẩm. Cấu trúc FA-CS-P23 được xác định bằng bằng $^1\text{H-NMR}$ và FT-IR.



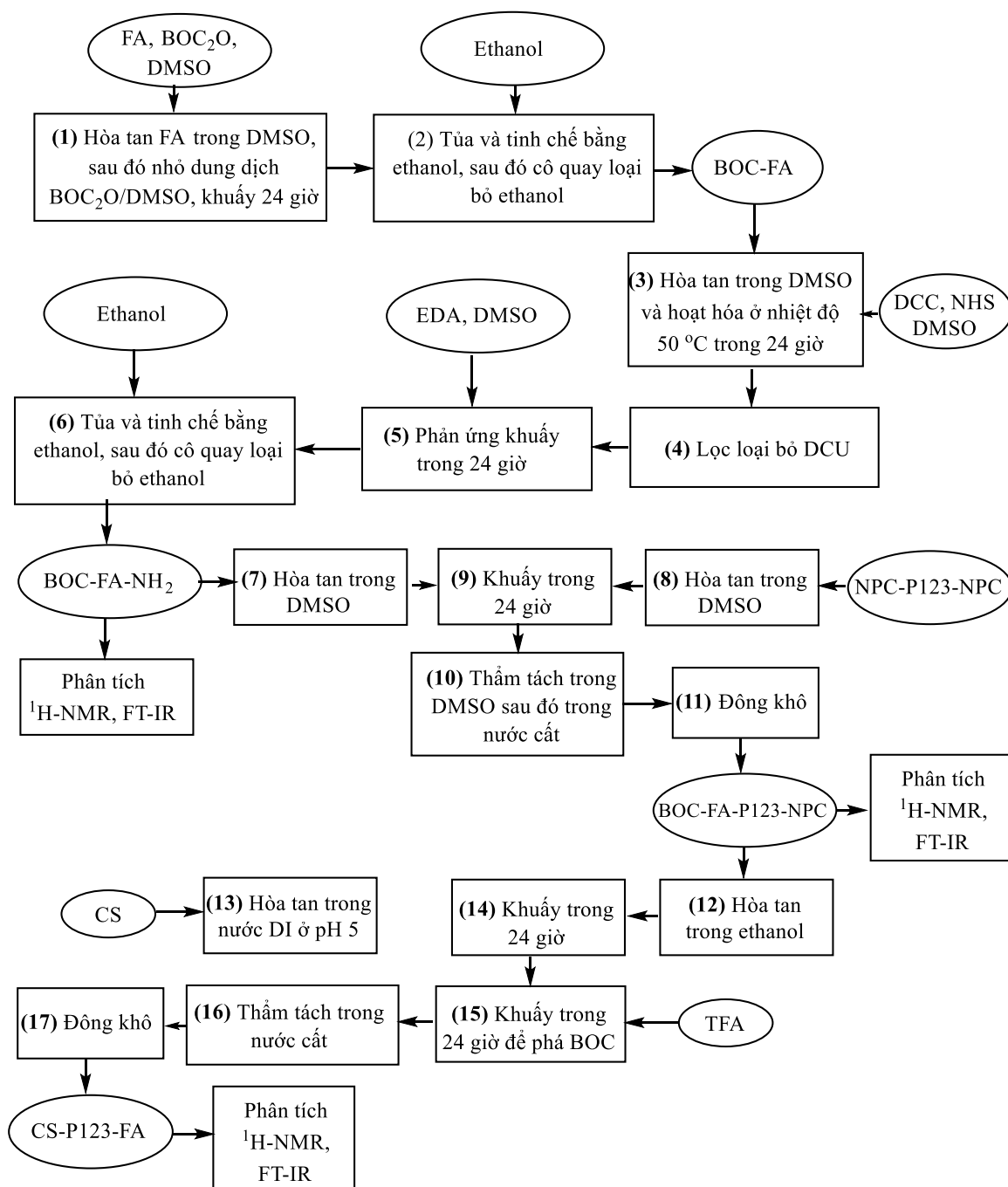
Hình 2. 2. Lưu đồ quy trình tổng hợp FA-CS-P123.

2.2.3. 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 $-\text{NH}_2$ và liên hợp với EDA của phân tử FA để tạo ra BOC-FA-NH₂; 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 $-\text{BOC}$ để tạo thành CS-P123-FA. Quy trình tổng hợp được thực hiện theo lưu đồ Hình 2.3.

Tổng hợp BOC-FA-NH₂: quy trình tổng hợp được thực hiện theo lưu đồ Hình 2.3 từ bước (1) đến bước (6) theo hai giai đoạn. Giai đoạn một, tiến hành hành bảo vệ nhóm chức $-\text{NH}_2$ của phân tử FA được thực hiện theo báo cáo trước đây [199]. Hòa tan 1 gam (2,26 mmol) FA trong 50 mL dung môi DMSO, đồng thời hòa tan 988 mg (4.53 mmol) di-tert-butyl dicarbonate (BOC₂O) trong 5 mL DMSO, sau đó nhỏ từng giọt vào dung dịch FA, phản ứng khuấy ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ trong bóng tối. Sản phẩm được kết tủa và tinh chế nhiều lần bằng ethanol, sau đó cô quay loại bỏ dung môi để thu được BOC-FA. Giai đoạn hai, liên hợp phân tử BOC-FA với ethylen diamine để hình thành BOC-FA-NH₂ được thực hiện theo báo cáo trước đây [200]. Hòa tan lại BOC-FA trong 50 mL DMSO có sẵn 934 mg (4.53 mmol) dicyclohexyl carbodiimide (DCC) và 521 mg (4.53 mmol) EDC. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 50 °C trong thời gian 24 giờ trong bóng, sau đó lọc bỏ

sản phẩm phụ dicyclohexylurea (DCU) để thu được dung dịch BOC-FA-NHS. Thêm từng giọt dung dịch BOC-FA-NHS vào 10 mL dung dịch DMSO chứa sẵn 1.5 mL (22.65 mmol) ethylenediamine (EDA), phản ứng khuấy trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng trong bóng tối. Sau đó, sản phẩm được kết tủa và tinh chế nhiều lần trong ethanol và cô quay để loại bỏ hoàn toàn ethanol để thu được BOC-FA-NH₂. Cấu trúc của BOC-FA-NH₂ được xác nhận bằng phổ ¹H-NMR và FT-IR.



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

Tổng hợp BOC-FA-P123-NPC: quy trình tổng hợp được thực hiện theo lưu đồ Hình 2.3 từ bước (7) đến bước (11). BOC-FA-NH₂ (475 mg) được hòa tan trong 30 mL DMSO và sau đó thêm từng giọt vào dung dịch NPC-P123-NPC (5 gam trong 25 mL DMSO) trong điều kiện khuấy ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Cuối cùng, sản phẩm được thẩm tách với DMSO bằng cách sử dụng màng cellulose (MWCO = 3500 Da) trong 2 ngày để loại bỏ hoàn toàn p-nitrophenol và BOC-FA-NH₂ chưa phản ứng, thẩm tách với nước cất trong 2 ngày để loại bỏ DMSO trước khi đông khô để thu được BOC-FA-P123-NPC. Cấu trúc BOC-FA-P123-NPC được xác nhận bằng phổ ¹H-NMR và FT-IR.

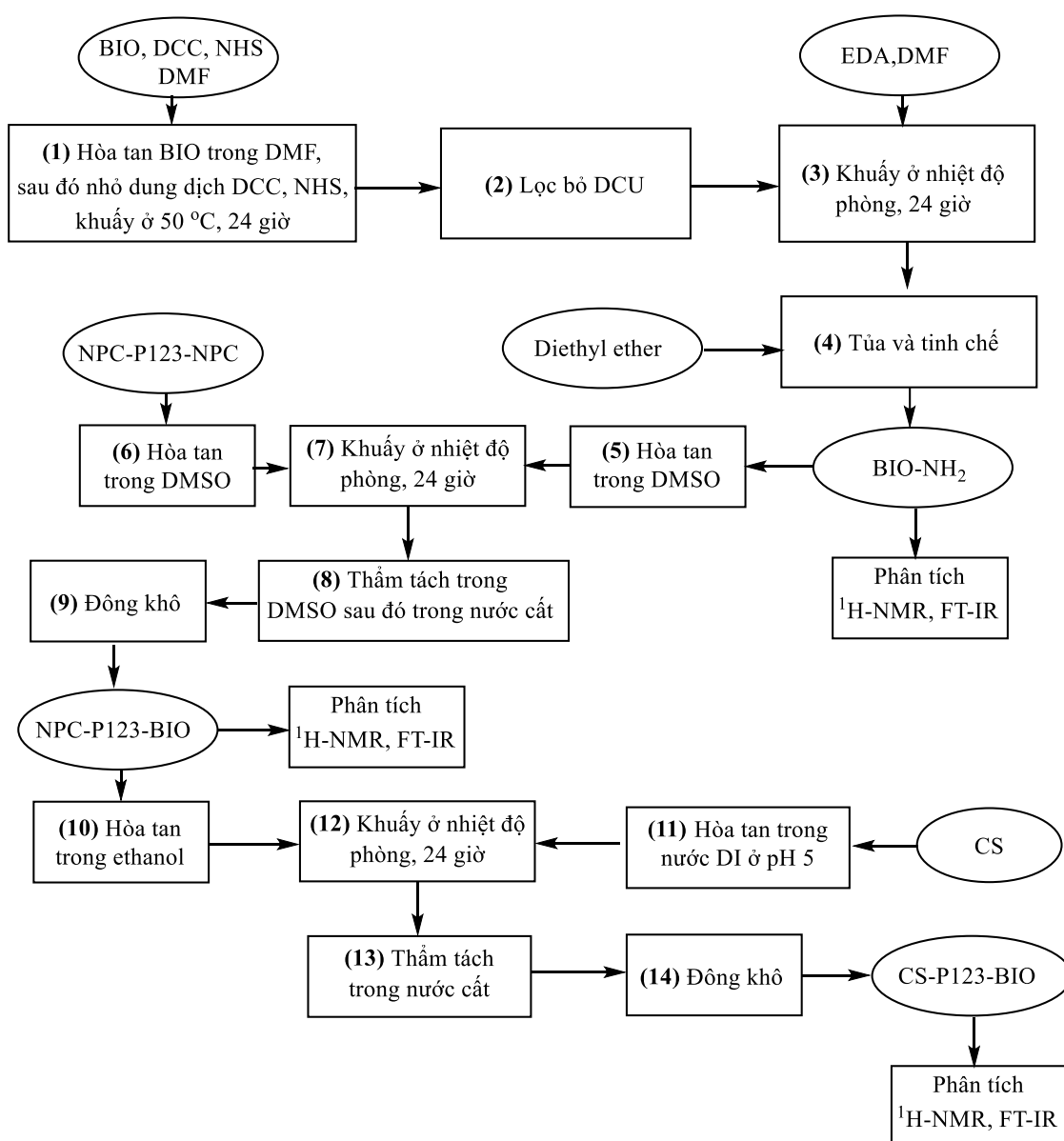
Tổng hợp CS-P123-FA: quy trình tổng hợp được thực hiện theo lưu đồ Hình 2.3 từ bước (12) đến bước (17). Hòa tan 1 gam BOC-FA-P123-NPC vào 10 mL dung môi ethanol. Hòa tan 100 mg CS trong 10 mL nước DI ở pH 5. Nhỏ từ từ dung dịch BOC-FA-P123-NPC vào dung dịch CS, phản ứng khuấy trong thời gian 24 giờ. Sau đó, 10 mL trifluoroacetic acid (TFA) được thêm vào dung dịch phản ứng và khuấy trong 3 giờ. Sản phẩm được thẩm tách với nước cất chứa 10% ethanol bằng màng cellulose (MWCO=12000 – 14000 Da) trước khi đông khô để thu được CS-P123-FA. Cấu trúc của CS-P123-FA đã được xác nhận bằng phổ ¹H-NMR và FT-IR.

2.2.3. 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-NH₂; 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.

Tổng hợp BIO-NH₂: quy trình tổng hợp được thực hiện theo lưu đồ Hình 2.4 từ bước (1) đến bước (4) theo báo cáo trước đây [201]. Hòa tan 1 gam (4 mmol) biotin (BIO) trong 20 mL dung môi dimethylformamide (DMF) ở nhiệt độ 50 °C, 1689 mg (8 mmol) DCC và 942 mg (8 mmol) NHS được thêm vào dung dịch BIO, phản ứng khuấy giờ trong môi trường khí N₂. Sau 24 giờ, dicyclohexylurea (DCU) tạo thành được lọc để thu được dung dịch BIO-NHS. Nhỏ từ từ dung dịch BIO-NHS vào dung dịch 10 mL DMF chứa 2733 μL (40 mmol) EDA khuấy trong vòng 24 giờ trong môi trường khí N₂. Dung môi DMF được loại bỏ bằng áp suất thấp và sản phẩm được kết tủa và tinh chế nhiều lần trong diethylether và cô quay để loại bỏ hoàn toàn diethylether để thu BIO-NH₂. Cấu trúc sản phẩm được xác định bằng ¹H-NMR và FT-IR.

Tổng hợp NPC-P123-BIO: quy trình tổng hợp được thực hiện theo lưu đồ Hình 2.4 từ bước (5) đến bước (9). Hòa tan 280 mg (0.97 mmol) BIO-NH₂ trong 10 mL dung môi DMSO rồi nhỏ từ từ vào dung dịch DMSO có chứa 5 gam (0.81 mmol) NPC-P123-NPC hòa tan và khuấy trong 24 giờ. Sản phẩm được tinh chế bằng cách sử dụng mang cellulose (MWCO = 3500 Da) trong dung môi DMSO trong 2 ngày để loại bỏ hoàn toàn p-nitrophenol và BIO-NH₂ chưa phản ứng và thẩm tách với nước cất trong 2 ngày để loại bỏ DMSO trước khi đông khô để thu được BOC-FA-P123-NPC. Cấu trúc BOC-FA-P123-NPC được xác nhận bằng phổ ¹H-NMR và FT-IR.

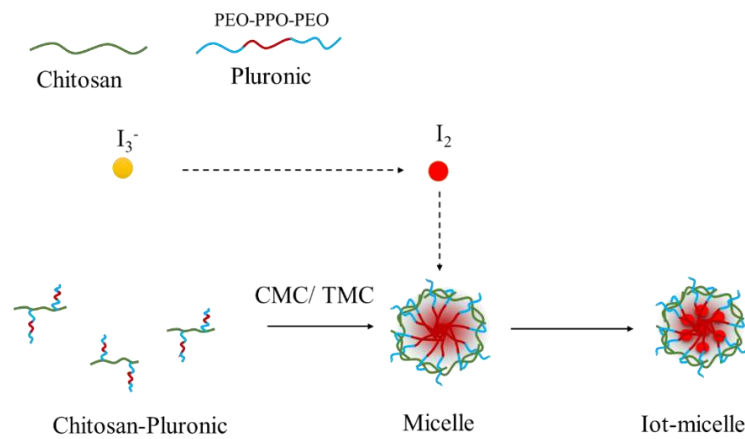


Hình 2. 4. Lưu đồ quy trình tổng hợp CS-P123-BIO.

Tổng hợp CS-P123-BIO: quy trình tổng hợp được thực hiện theo lưu đồ Hình 2.4 từ bước (10) đến bước (14). Hòa tan 1 gam NPC-P123-BIO vào 10 mL dung môi ethanol. Hòa tan 100 mg CS trong 10 mL nước DI ở pH 5. Nhỏ từ từ dung dịch NPC-P123-BIO vào dung dịch CS, phản ứng khuấy trong thời gian 24 giờ. Sau đó, dung dịch được thẩm tách với nước cất chứa 10% ethanol bằng màng cellulose (MWCO=12000 – 14000 Da) trước khi đông khô để thu được CS-P123-BIO. Cấu trúc của CS-P123-BIO đã được xác nhận bằng phổ $^1\text{H-NMR}$ và FT-IR.

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

Trong nghiên cứu này, giá trị CMC được xác định bằng phương pháp iốt [202]. Ion iốt hòa tan tham gia vào môi trường kỵ nước của các khối PPO của Pluronic, gây ra sự chuyển I_3^- thành I_2 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 I_3^- thành I_2 làm cho cường độ hấp thụ của dung dịch hỗn hợp không đổi. Sau khi hình thành mixen, I_3^- được chuyển thành I_2 bị cuốn vào không gian kỵ nước của các khối PPO dẫn đến sự gia tăng đáng kể cường độ hấp thụ như được minh họa trong Hình 2.5. Cường độ hấp thụ của I_2 đã được vẽ đồ thị dưới dạng hàm của nồng độ của các loại polymer ở bước sóng 366 nm.



Hình 2. 5. Sơ đồ mô tả sự chuyển hóa giữa I_3^- và I_2 trong phương pháp xác định nồng độ CMC bằng UV-Vis.

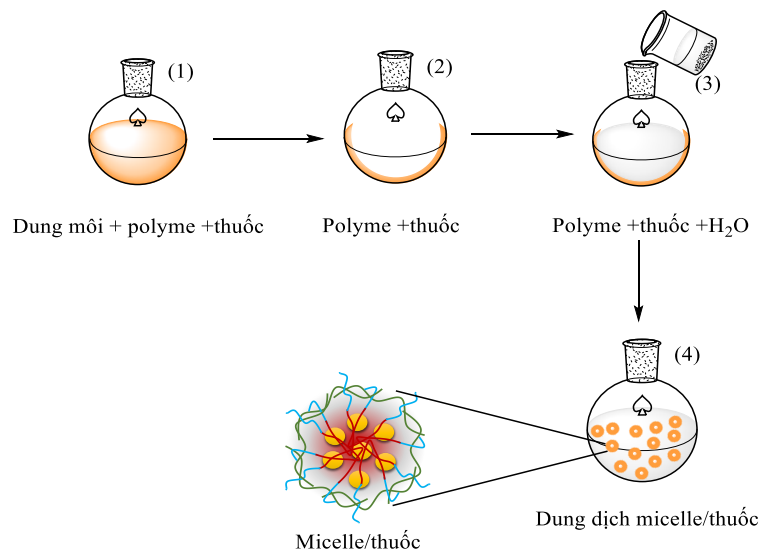
2.2.5. Xác định khả năng nang hóa thuốc của nanogel

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 [203, 204]. Phương pháp hydrat màng mỏng được thực hiện theo sơ đồ Hình 2.6. Trong phương pháp này, thuốc, polymer và dung môi được hòa tan vào nhau (1), sau đó hỗn hợp được cho bay hơi ở áp suất thấp để loại bỏ hoàn toàn dung môi (2). Hỗn hợp sau đó được cho một lượng nước thích hợp để phân tán hỗn hợp thuốc và polymer (3) và các micelle polymer bao thuốc sẽ được hình thành trong dung dịch nước (4). Để bảo quản hỗn hợp polymer và thuốc, dung dịch micelle sẽ được đông khô để thu sản phẩm. Tỷ lệ giữa CUR, PTX, polymer và dung môi được trình bày trong Bảng 2.4 và Bảng 2.5. Lượng CUR và PTX trong micelle được xác định bằng cách sử dụng độ hấp thụ UV-Vis ở bước sóng 420 nm và 254 nm. Hiệu quả đóng gói (EE%) và khả năng tải thuốc (DL%) được tính theo công thức (3) và (4).

$$EE (\%) = \frac{\text{Hàm lượng thuốc trong micelle}}{\text{Hàm lượng thuốc dùng để nang hóa}} \times 100 \quad (4)$$

$$DL (\%) = \frac{\text{Hàm lượng thuốc trong micelle}}{\text{Hàm lượng polymer và thuốc trong micelle}} \times 100 \quad (5)$$



Hình 2. 6. Phương pháp hydrate màng mỏng nang hóa thuốc.

Bảng 2. 4. Tỷ lệ CUR, polymer và dung môi dùng để nang hóa.

Hàm lượng CUR (mg)	Hàm lượng polymer (mg)	Hàm lượng H ₂ O (mL)	Hàm lượng EtOH/DCM (7:3) (mL)
5	95	2	5
10	90	2	10
15	85	2	15

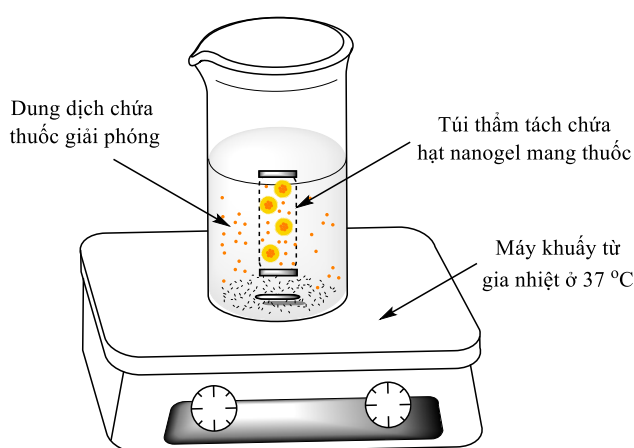
Bảng 2. 5. Tỷ lệ PTX, polymer và dung môi dùng để nang hóa.

Hàm lượng PTX (mg)	Hàm lượng polymer (mg)	Hàm lượng H ₂ O (mL)	Hàm lượng MeOH (mL)
1	99	2	5
2	98	2	10
3	97	2	15

2.2.6. Khảo sát khả năng giải phóng thuốc của nanogel

Khả năng giải phóng CUR và PTX của hệ nanogel được đánh giá trong hai môi trường pH 7.4 và pH 5. Hai môi trường này phù hợp với điều kiện sinh lý của cơ thể và tại khối u của tế bào ung thư.

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 (Hình 2.7).



Hình 2. 7. Phương pháp thực nghiệm giải phóng thuốc.

Để xác định lượng thuốc được giải phóng ra, ta tiến hành lấy hoàn toàn mẫu nước thẩm tách bên ngoài màng tại các thời điểm khảo sát. Mỗi lần lấy mẫu xong, thêm vào lượng dung môi tương ứng ban đầu. Nồng độ thuốc khuếch tán ra ngoài

màng thẩm tách được xác định bằng phương pháp UV-Vis. Phần trăm thuốc giải phóng tích lũy (CR%) theo thời gian được tính theo công thức (5) [205].

$$CR (\%) = \sum_{t=0}^{t=\infty} \frac{M_t}{M_0} \times 100 \quad (6)$$

Trong đó M_t là lượng thuốc trong môi trường giải phóng trong tại thời gian t giờ và M_0 là lượng thuốc trong nanogel. Tất cả các thí nghiệm được thực hiện 3 lần.

Cân 9 mg mẫu nanogel đã nang hóa thuốc phân tán trong 9 mL nước DI. Hoạt hóa các túi thẩm tách MWCO (3500 Da) trong thời gian 24 h trong môi trường đệm PBS cần để khảo sát khả năng giải phóng thuốc. Cho vào mỗi túi thẩm tách 2 mL dung dịch (nồng độ tương ứng là 2000 ppm). Đặt túi thẩm tách vào cốc thủy tinh tối màu có chứa sẵn 15 mL đệm PBS đặt trên máy khuấy từ với tốc độ 100 vòng/phút. Để xác định lượng thuốc được giải phóng ra, ta tiến hành lấy hoàn toàn mẫu nước thẩm tách bên ngoài màng tại các thời điểm 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h và 48 h. Mỗi lần lấy mẫu xong, thêm vào lượng dung môi tương ứng ban đầu là 15 mL.

Nồng độ CUR, PTX khuếch tán ra ngoài màng thẩm tách được xác định bằng phương pháp UV-Vis tại bước sóng 420 nm dựa trên đường chuẩn CUR tinh khiết và 254 nm dựa trên đường chuẩn PTX tinh khiết trong cùng điều kiện đo.

2.2.7. Động học quá trình giải phóng thuốc từ nanogel

Để nghiên cứu cơ chế giải phóng CUR từ các hạt nanogel, dữ liệu giải phóng được đưa vào các phương trình bậc không, bậc nhất, Higuchi và Power Law. Kết quả phân tích hồi quy được chọn dựa trên hệ số tương đối (R^2) để xác định cơ chế giải phóng thuốc [206, 207]. Giá trị thời gian hòa tan trung bình (MDT) được sử dụng để đánh giá tốc độ giải phóng thuốc từ dạng bào chế và để chỉ ra tác động của hạt nanogel trong việc làm chậm quá trình giải phóng thuốc. Giá trị MDT cao hơn cho thấy khả năng giữ thuốc của nanogel cao hơn và ngược lại. MDT được tính toán từ dữ liệu động học giải phóng thuốc bằng công thức sau (Mockel và Lippold) [208].

$$MTD (giờ) = \left(\frac{n}{n+1} \right) \cdot k^{-\frac{1}{n}} \quad (7)$$

Trong đó n là số mũ giải phóng và k là hằng số tốc độ giải phóng từ phương trình Power Law.

2.2.8. Đánh giá sự ổn định trong quá trình bảo quản của nanogel mang thuốc sau khi đông khô

Độ ổn định bảo quản của các micelle đã chọn đông khô thể hiện khả năng bao bọc thuốc cao nhất được đánh giá 6 tháng ở nhiệt độ phòng. Các nanogel đông khô được phân tán trong nước khử ion để kiểm tra EE %, DL%, DLS và thế zeta tại thời điểm 6 tháng so với thời điểm ban đầu. Tỷ lệ lưu giữ thuốc DR (%) của các micelle được lưu trữ cũng được tính toán vào cuối nghiên cứu theo công thức (8) [209]:

$$DR(\%) = \frac{EE(\%)_{6\text{ tháng}}}{EE(\%)_{\text{ban đầu}}} \times 100 \quad (8)$$

Trong đó, $EE(\%)_{6\text{ tháng}}$, $EE(\%)_{\text{ban đầu}}$ là hiệu suất nang hóa sau thời gian bảo quản 6 tháng và lúc ban đầu.

2.2.9. 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), tại trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Thử nghiệm SRB (Sulforhodamine B) là một phương pháp so màu đơn giản và nhạy để xác định độc tính tế bào của một chất [210]. Tế bào nguyên bào sợi với mật độ ban đầu là 10^4 tế bào/giếng được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng trong 24 giờ trước khi được ủ với các loại nanogel không mang thuốc ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ để đánh giá tính tương hợp sinh học. Tế bào MCF-7 được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng với mật độ 10^4 tế bào/giếng trong 24 giờ trước khi được ủ với thuốc tự do (CUR, PTX) hoặc các nanogel mang Thuốc ở các nồng độ khác nhau để xác định giá trị IC_{50} . Sau 48 giờ ủ, các tế bào đã xử lý được cố định bằng dung dịch acid trichloroacetic 50% (w/v) lạnh (Merck) trong 1-3 giờ, rửa sạch và nhuộm với 0.2% (w/v) SRB (Sigma) trong 20 phút. Sau năm lần rửa bằng acid acetic 1% (Merck), thuốc nhuộm liên kết với protein được hòa tan trong dung dịch gốc Tris 10 mM (Promega). Nước được sử dụng làm đối chứng trong nghiên cứu này. Các giá trị mật độ quang học được xác định bằng đầu đọc đĩa vi hiệu 96 giếng ELISA reader ở bước sóng 492 nm và 620 nm. Phần trăm ức chế sinh trưởng (Inh%) được tính theo công thức (9).

Xử lý kết quả:

Sau khi có giá trị mật độ quang ở bước sóng 492 nm và 620 nm (ký hiệu là OD₄₉₂ và OD₆₂₀):

- Tính giá trị OD = OD₄₉₂ – OD₆₂₀ (a)
- Tính OD₄₉₂ (hoặc OD₆₂₀) = OD_{tb} – OD_{blank} (b)
- Tính tỉ lệ (%) gây độc tế bào theo công thức:

$$Inh (\%) = \left(1 - \frac{OD_{TN}}{OD_C} \right) \times 100 \quad (9)$$

- Với:
- OD_{tb}: giá trị OD của giếng có chứa tế bào
 - OD_{blank}: giá trị OD của giếng blank (không có tế bào)
 - OD_{TN}: giá trị OD của mẫu thử tình từ công thức (a) và (b)
 - OD_C: giá trị OD của mẫu chứng (control) tình từ công thức (a) và (b)

IC₅₀ được xác định bằng cách sử dụng phần mềm Prism với phương pháp hồi quy không tuyến tính đa thông số và R² > 0.9.

Bên cạnh đó, sử dụng phương pháp nhuộm acridine cam/ ethidium bromide (AO/EB) để quan sát hình thái tế bào chết. Nguyên tắc của phương pháp AO/EB sử dụng một vết tồn tại trong đó AO khuếch tán vào tất cả các tế bào và EB không thể khuếch tán qua màng tế bào trừ khi nó bị tổn thương (dẫn đến hoại tử) hoặc tế bào bị chết. Tế bào chỉ có AO bên trong phát huỳnh quang màu xanh lục, tế bào đã chết hoặc có màng bị tổn thương sẽ hấp thụ EB chiếm ưu thế hơn AO và kết quả là tế bào phát huỳnh quang màu đỏ [211]. Hình thái tế bào được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang, tại trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Các tế bào fibroblast được gieo trong đĩa 6 giếng (2×10⁵ tế bào/ giếng) được nuôi ở 37 °C, 5% CO₂ trong 24 giờ. Hút bỏ môi trường cũ, cho vào giếng môi trường mới chứa các nanogel ở nồng độ 100 µg/mL hoặc đối chứng dung môi. Các tế bào MCF-7 được gieo trong đĩa 6 giếng (2×10⁵ tế bào/ giếng) được nuôi ở 37 °C, 5% CO₂ trong 24 giờ. Hút bỏ môi trường cũ, cho vào giếng môi trường mới chứa các hạt nanogel mang thuốc ở nồng độ IC₅₀ hoặc đối chứng dung môi. Sau 48h tiến hành thu mẫu, nhuộm và chụp hình dưới kính hiển vi huỳnh quang. Đổ bỏ dịch môi trường, rửa tế bào với PBS 2 lần, thêm vào 20 µL dung dịch thuốc nhuộm AO:EB (100 µg/mL:100 µg/mL). Đặt lame và quan sát ở ánh sáng huỳnh quang màu xanh và đỏ.

2.2.10. Đánh giá khả năng hấp thu nội bào của các hạt nanogel mang thuốc

Các hạt nanogel được đánh dấu huỳnh quang bằng tác nhân huỳnh quang Fluorescein isothiocyanate (FITC). Việc tổng hợp các hạt nanogel dán nhãn FITC dựa trên phản ứng giữa nhóm isothiocyanate của FITC và nhóm amine chính của chitosan. Các hạt nanogel dán nhãn FITC phát huỳnh quang màu xanh lục (green) ở bước sóng 516 nm [212]. Hòa tan 100 mg polymer trong 2 ml nước DI và hòa tan 2 mg FITC trong 4 mL metanol. Trộn hai hỗn hợp này và khuấy ở nhiệt độ phòng trong điều kiện tối trong vòng 24 h. Sản phẩm được thẩm tách với nước khử ion trong 3 ngày và được đông khô để thu được polymer đã được gắn FITC

Sự nội hóa tế bào của các hạt nanogel được nghiên cứu bằng cách sử dụng kính hiển vi huỳnh quang. Các tế bào MCF-7 được gieo trong đĩa 6 giếng (2×10^5 tế bào/giếng) được nuôi cấy ở 37 °C, 5% CO₂ trong 24 giờ. Sau đó, các tế bào được ủ FITC tự do, các hạt nanogel gắn FITC ở nồng độ 100 µg/mL. Sau 1 giờ ủ, các tế bào được rửa bằng dung dịch PBS và nhuộm bằng dung dịch DAPI (100 µg/mL). Hình thái tế bào được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang. Ảnh của các tế bào được chụp bởi bộ lọc huỳnh quang FITC và DAPI. Dữ liệu thu được được xử lý bằng phần mềm Image J. Hình thái tế bào được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang, tại trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2.11. Phân tích thống kê

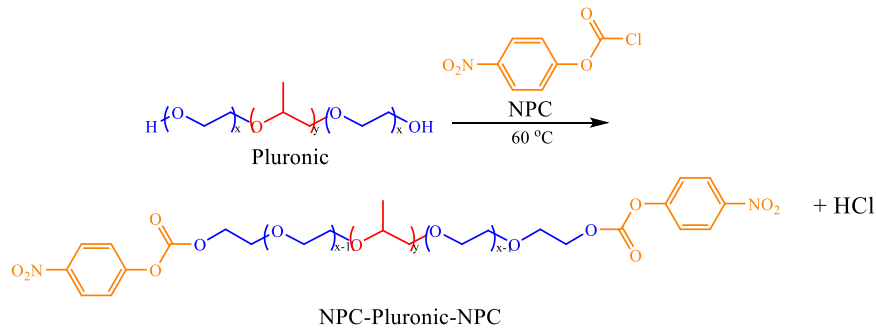
Phân tích thống kê được thực hiện bằng ANOVA một chiều với chương trình có sẵn trên thị trường (ORIGIN 8.5.1, OriginLab Inc., Northampton, MA, USA). Các thí nghiệm trong nghiên cứu này được thực hiện ba lần và dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình \pm SD. * $p < 0,05$, ns $p \geq 0,05$ được sử dụng để chỉ ra rằng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hệ phân phối thuốc CS–Pluronic

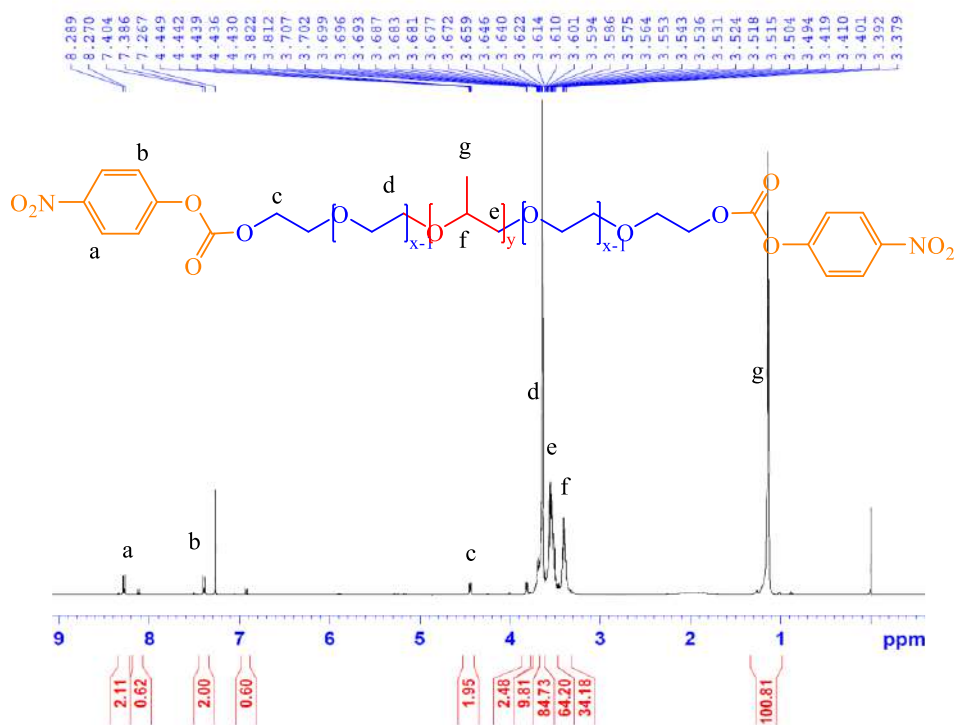
3.1.1. Tổng hợp NPC–Pluronic–NPC

Để ghép các phân tử Pluronic lên mạch chitosan, Pluronic phải được biến tính để tạo ra các nhóm chức ở hai đầu mạch Pluronic. Có nhiều phương pháp khác nhau để biến tính nhóm hydroxyl ở hai đầu mạch Pluronic, tuy nhiên, phương pháp hoạt hóa nhóm hydroxyl bởi NPC được đánh giá là thành công nhất với hiệu suất hoạt hóa gần 100% [179, 195]. Trong nghiên cứu này, các loại Pluronic với các giá trị HLB khác nhau như L61, P123, F127 và F68 được hoạt hóa với NPC để tạo ra các loại NPC–Pluronic–NPC ở hai đầu mạch Pluronic theo phương trình phản ứng như Hình 3.1.



Hình 3. 1. Sơ đồ tổng hợp NPC-Pluronic-NPC.

Kết quả phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , ppm) cho thấy thành công đầu tiên của việc hoạt hóa Pluronic thành NPC–Pluronic–NPC (Hình 3.2, Phụ lục 1, Phụ lục 2, Phụ lục 3 và Bảng 3.1). Các tín hiệu proton trên nhóm thơm của NPC ở ở $\delta \sim 8.26-8.28$ ppm (a) và $\delta \sim 7.37-7.39$ ppm (b). Ngoài ra, Pluronic được kích hoạt thành công bậc lộ thông qua sự dịch chuyển hóa học của proton trên nhóm ester methylene ($-\text{CH}_2-\text{O}-\text{NPC}$) ở đầu tận cùng của chuỗi Pluronic ở $\delta \sim 4.42-4.44$ ppm (c). Các tín hiệu proton của Pluronic cũng được thể hiện ở $\delta \sim 3.61-3.69$ ppm (d) là đặc trưng của các proton trên nhóm $-\text{CH}_2-$ trong khối PEO, trong khi peak cộng hưởng ở $\delta \sim 3.50-3.56$ ppm (e), $\delta \sim 3.37-3.41$ ppm (f) và $\delta \sim 1.12-1.14$ ppm (g), lần lượt là đặc trưng của các proton của các nhóm $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}-$ và $-\text{CH}_3$ trên chuỗi PPO của phân tử Pluronic. Bằng cách sử dụng các vùng tích phân của peak cộng hưởng ở $\delta \sim 7.37-7.39$ ppm (b) và $1.12-1.14$ ppm (g), phần trăm nhóm hydroxyl đầu cuối của các Pluronic đã được hoạt hóa bởi NPC tính theo công thức (1) được trình bày trong Bảng 3.2. Kết quả cho thấy hiệu suất hoạt hóa Pluronic tương đương với các nghiên cứu trước đây [179, 196].



Hình 3. 2. Phổ ^1H -NMR của NPC-P123-NPC.

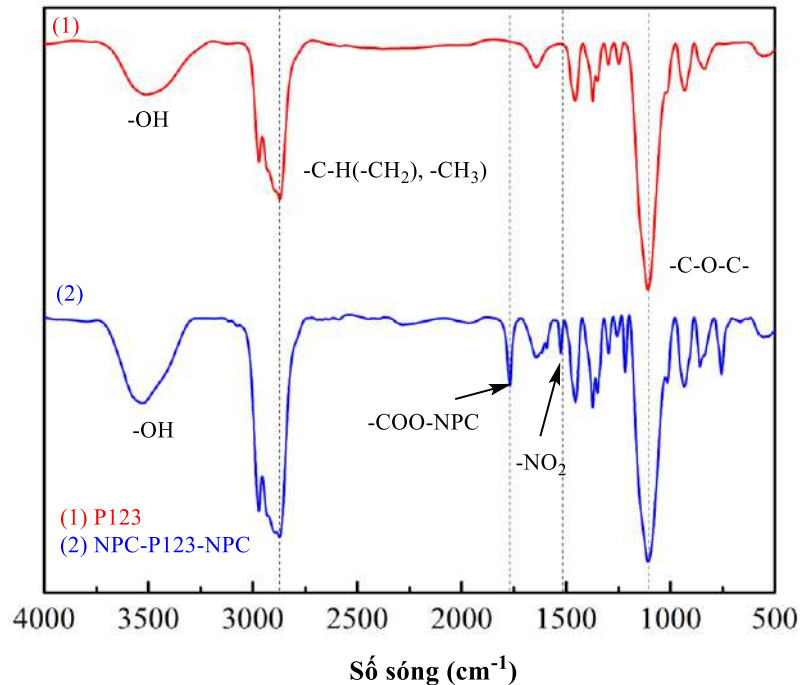
Bảng 3. 1. Kết quả phổ ^1H -NMR của các loại NPC-Pluronic-NPC.

Vị trí	H của nhóm	Độ dịch chuyển hóa học (δ , ppm)			
		NPC-L61-NPC	NPC-P123-NPC	NPC-F127-NPC	NPC-F68-NPC
a	-CH= (NPC)	8.25-8.27	8.26-8.28	8.24-8.26	8.22-8.24
b	-CH= (NPC)	7.37-7.39	7.37-7.39	7.36-7.38	7.28-7.36
c	-CH ₂ -O-NPC	4.39-4.43	4.42-4.44	4.42	4.39
d	-CH ₂ -(PEO)	3.62-3.68	3.61-3.69	3.61-3.63	3.57
e	-CH ₂ -(PPO)	3.49-3.56	3.50-3.56	3.52-3.52	3.47-3.49
f	-CH (PPO)	3.36-3.41	3.37-3.41	3.37	3.33-3.34
g	-CH ₃ (PPO)	1.11-1.16	1.12-1.14	1.11	1.09

Bảng 3. 2. Hiệu suất hoạt hóa NPC của các loại Pluronic.

Tên mẫu	Phần trăm nhóm hydroxyl đã được thay thế (%)
NPC-L61-NPC	83.19
NPC-P123-NPC	108.94
NPC-F127-NPC	102.22
NPC-F68-NPC	97.61

Kết quả phân tích phổ FT-IR được thể hiện trên Hình 3.3, Phụ lục 4÷Phụ lục 9 và các dữ liệu peak của NPC-Pluronic-NPC được trình bày trong Bảng 3.3. Khi so sánh phổ FT-IR giữa Pluronic tinh khiết và NPC-Pluronic-NPC ta thấy, các tín hiệu peak trong vùng 3500 cm^{-1} là dao động liên kết O-H nhóm -OH tự do của hơi ẩm. Tín hiệu peak ở vùng từ 2800 đến 3000 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị liên kết C-H của nhóm $-\text{CH}_2$ và $-\text{CH}_3$ và tín hiệu peak tại vị trí $\sim 1107\text{ cm}^{-1}$ là dao động hóa trị liên kết C-O nhóm $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ trên phân tử Pluronic. Sự xuất hiện tín hiệu peak ở $\sim 1520\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động liên kết N-O của nhóm $-\text{NO}_2$ trên phân tử -NPC và tín hiệu peak ở $\sim 1770\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động C=O của nhóm $-\text{COO}-\text{NPC}$ do sự hình thành liên kết carbonate ester giữa Pluronic với NPC tạo sản phẩm NPC-Pluronic-NPC.



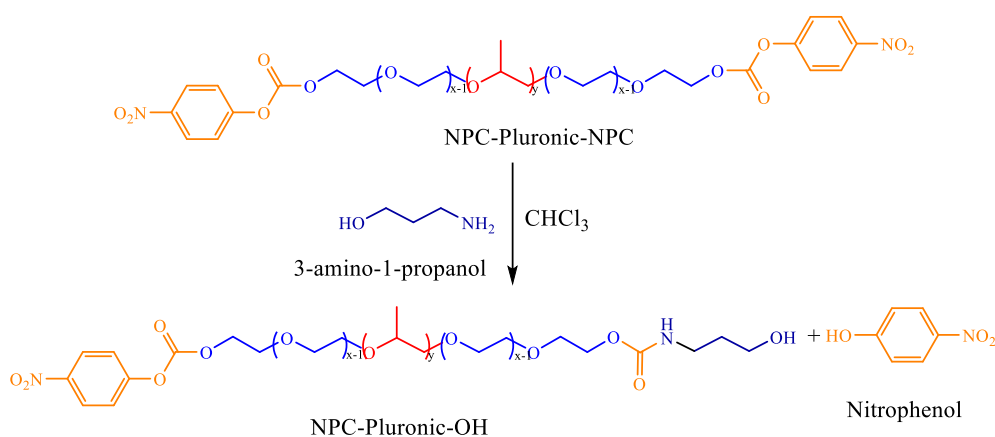
Hình 3. 3. Phổ FT-IR của P123 (1) và NPC-P123-NPC (2).

Bảng 3. 3. Kết quả phổ FT-IR của các loại NPC-Pluronic-NPC.

Nhóm chức	Số sóng (cm^{-1})			
	NPC-L61-NPC	NPC-P123-NPC	NPC-F127-NPC	NPC-F68-NPC
-OH	3496	3500	3588	3521
-C-H ($-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$)	2972-2877	2971-2873	2970- 2887	2887
$-\text{COO}-\text{NPC}$	1771	1769	1770	1770
$-\text{NO}_2$	1528	1526	1524	1518
$-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$	1105	1107	1110	1111

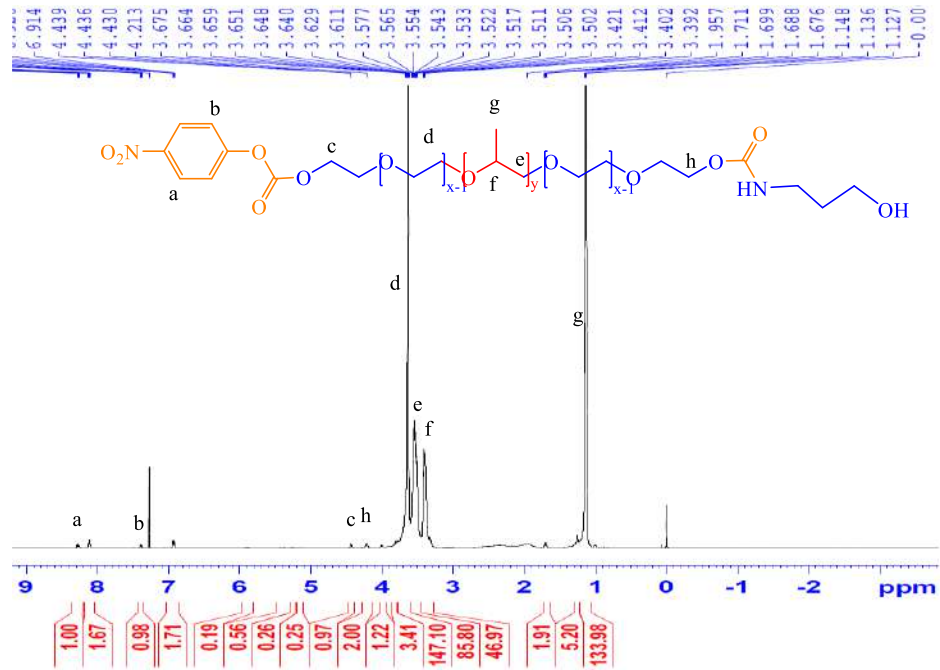
3.1.2. Tổng hợp NPC-Pluronic-OH

Trong nghiên cứu này, các loại NPC-Pluronic-NPC được phản ứng với 3-amino-1-propanol (Ami) để thay thế một phân tử NPC tại một đầu của phân tử NPC-Pluronic-NPC để tạo ra NPC-Pluronic-OH (Hình 3.4). Mục đích của việc tạo ra phân tử NPC-Pluronic-OH nhằm tránh tạo liên kết ngang giữa các phân tử chitosan bởi NPC-Pluronic-NPC.



Hình 3. 4. Sơ đồ tổng hợp NPC-Pluronic-OH.

Kết quả phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, ppm) cho thấy thành công đầu tiên của việc thay thế nhóm NPC của phân tử NPC-Pluronic-NPC thành NPC-Pluronic-OH (Hình 3.4, Phụ lục 10 ÷ Phụ lục 12 và Bảng 3.4). Khi so sánh với phổ ¹H-NMR của NPC-Pluronic-NPC thì các tín hiệu proton trên nhóm thơm của phân tử NPC ở $\delta \sim 8.25-8.28$ ppm (a) và $\delta \sim 7.36-7.39$ ppm (b) và proton trên nhóm ester methylene (-CH₂-O-NPC) ở $\delta \sim 4.4$ ppm (c) và các tín hiệu đặc trưng cho Pluronic vẫn còn tồn tại đối với NPC-Pluronic-OH. Đặc biệt, proton methylene liên kết trực tiếp với nhóm carbonate của NPC xuất hiện tại tín hiệu $\delta \sim 4.42-4.44$ ppm (-CH₂-O-NPC) (c) dịch chuyển một phần đáng kể về vùng $\delta \sim 4.17-4.20$ ppm (h) do phản ứng thay thế một gốc NPC bằng Ami trên phân tử NPC-Pluronic-OH. Bằng phép tính tỷ lệ tích phân của proton trên NPC ở $\delta \sim 7.36-7.39$ ppm (b) và proton của nhóm -CH₃ trên Pluronic ở $\delta \sim 1.11-1.14$ ppm (g) theo công thức (1), phần trăm nhóm -NPC còn giữ lại trên phân tử NPC-Pluronic-OH xấp xỉ 50% (Bảng 3.5).



Hình 3. 5. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của NPC-P123-OH.

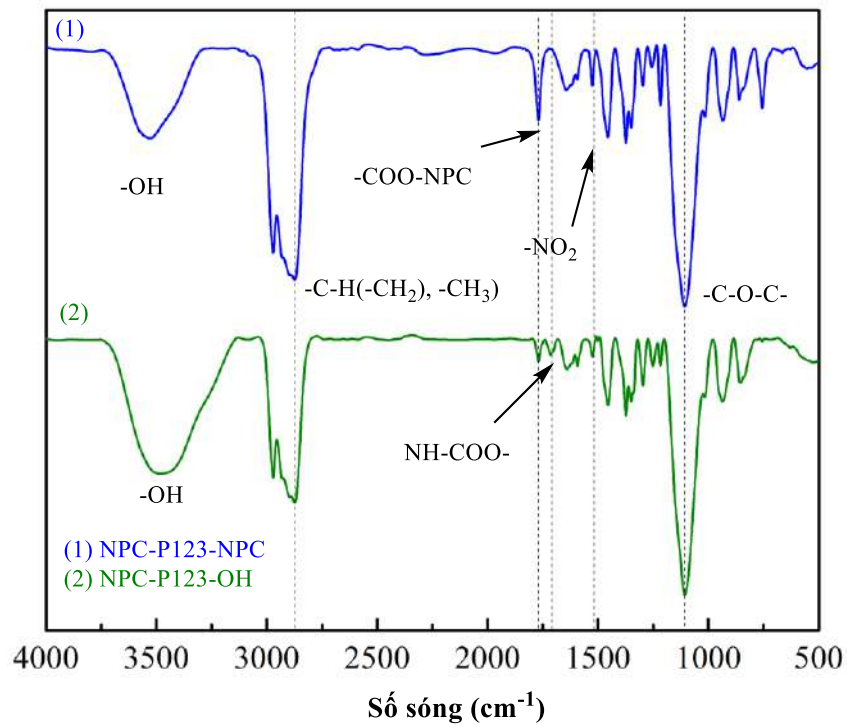
Bảng 3. 4. Kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$ của các loại NPC-Pluronic-OH.

Vị trí	H của nhóm	Độ dịch chuyển hóa học (δ , ppm)			
		NPC-L61-OH	NPC-P123-OH	NPC-F127-OH	NPC-F68-OH
a	-CH= (NPC)	8.24-8.27	8.25-8.28	8.27-8.29	8.27-8.28
b	-CH= (NPC)	7.36-7.38	7.36-7.39	7.40-7.40	7.38-7.40
c	-CH ₂ -O-NPC	4.38-4.42	4.42-4.44	4.43-4.45	4.39-4.41
d	-OCH ₂ - (PEO)	3.60-3.67	3.60-3.65	3.58-3.63	3.57-3.67
e	-CH ₂ - (PPO)	3.46-3.56	3.49-3.56	3.49-3.54	3.45-3.54
f	-CH (PPO)	3.29-3.40	3.38-3.41	3.38-3.40	3.34-3.38
g	-CH ₃ (PPO)	1.11-1.13	1.11-1.14	1.12-1.14	1.09-1.11
h	-CH ₂ -CO-(Ami)	4.17-4.21	4.17-4.20	4.21-4.22	4.18

Bảng 3. 5. Phần trăm nhóm NPC còn giữ lại trên phân tử NPC-Pluronic-OH

Tên mẫu	Phần trăm nhóm NPC còn giữ lại (%)
NPC-L61-OH	45.76
NPC-P123-OH	49.15
NPC-F127-OH	58.68
NPC-F68-OH	48.49

Kết quả phân tích phổ FT-IR được thể hiện trên Hình 3.6, Phụ lục 13÷Phụ lục 15 và các dữ liệu peak của NPC-Pluronic-OH được trình bày trong Bảng 3.6. Khi so sánh kết quả phân tích phổ FT-IR giữa NPC-Pluronic-NPC và NPC-Pluronic-OH ta thấy, các tín hiệu peak trong vùng 3500 cm^{-1} là dao động liên kết O-H nhóm -OH tự do của hơi ẩm. Tín hiệu peak ở vùng từ 2800 đến 3000 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị liên kết C-H của nhóm $-\text{CH}_2$ và $-\text{CH}_3$, tín hiệu peak tại vị trí $\sim 1107\text{ cm}^{-1}$ là dao động hóa trị liên kết C-O nhóm $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$, tín hiệu peak ở $\sim 1520\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động liên kết N-O của nhóm $-\text{NO}_2$ trên phân tử -NPC và tín hiệu peak ở $\sim 1770\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động C=O của nhóm $-\text{COO}-\text{NPC}$ trên phân tử NPC-Pluronic-NPC. Sự xuất hiện tín hiệu peak ở vùng bước sóng 1720 cm^{-1} là do sự thay thế một phần gốc NPC bằng Ami thông qua liên kết urethane ($-\text{NHCOO}-$), điều này chứng tỏ đã tổng hợp thành công sản phẩm NPC-Pluronic-OH.



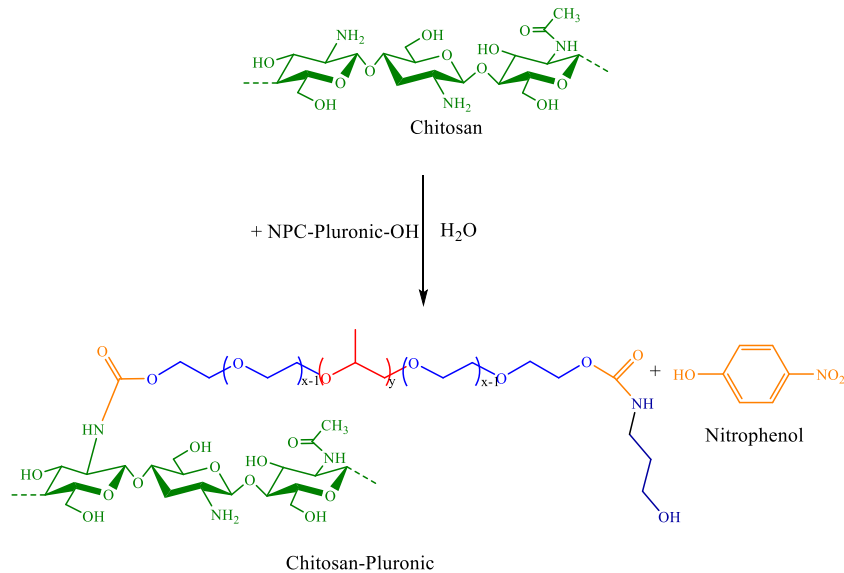
Hình 3. 6. Phổ FT-IR của NPC-P123-NPC (1) và NPC-P123-OH (2).

Bảng 3. 6. Kết quả phổ FT-IR của các loại NPC-Pluronic-OH.

Nhóm chức	Số sóng (cm ⁻¹)			
	NPC-L61-OH	NPC-P123-OH	NPC-F127-OH	NPC-F68-OH
-OH	3500	3500	3500	3500
-C-H (-CH ₂ , -CH ₃)	2972-2874	2971-2873	2970-2886	2887
-COO-NPC	1771	1769	1770	1766
-NO ₂	1594	1593	1593	1592
-C-O-C-	1102	1107	1112	1113
-NH-COO-	1721	1715	1720	1720

3.1.3. Tổng hợp hệ phân phối thuốc CS-Pluronic

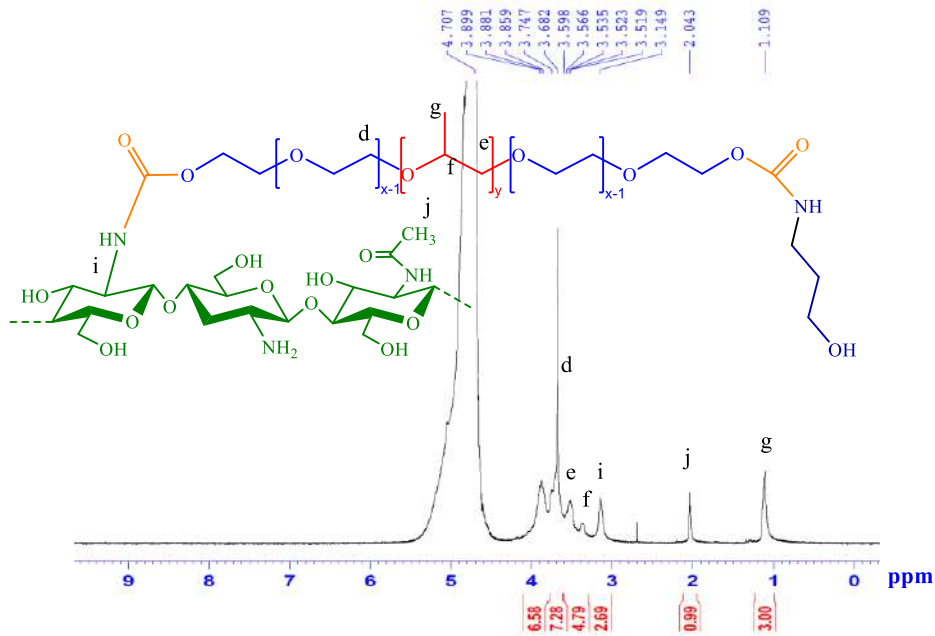
Trong nghiên cứu này, các loại NPC-Pluronic-OH được phản ứng ghép với chitosan thông qua phản ứng amide hóa bằng cách thay thế nhóm NPC của Pluronic bằng nhóm amine -NH₂ của chitosan thông qua liên kết amide (-NHCO-) để tạo thành CS-Pluronic (Hình 3.7). Chúng tôi sử dụng loại chitosan có độ nhớt thấp, dễ dàng hòa tan trong nước là loại chitosan duy nhất để thực hiện nghiên cứu này.



Hình 3. 7. Sơ đồ tổng hợp CS-Pluronic.

Kết quả phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR (500 MHz, D₂O, ppm) thể hiện trên Hình 3.8, Phụ lục 16 ÷ 18 và Bảng 3.7 cho thấy rõ ràng các peak cộng hưởng của proton trên cấu trúc Pluronic ở δ ~ 3.74-3.89 ppm (d), δ ~ 3.52-3.68 ppm (e), δ ~ 3.51 ppm (f) và δ ~ 1.10 ppm (g). Sự xuất hiện của

hai cực đại ở $\delta \sim 3.03$ ppm (i) và $\delta \sim 2.04$ ppm (j) được gán cho proton nhóm methylene ở vị trí C2 và methyl ($-\text{CH}_3$) của chitosan [213]. Bên cạnh đó, sự biến mất của các tín hiệu hóa học của NPC ở $\delta \sim 8.25-8.28$ ppm (a) và $\delta \sim 7.36-7.39$ ppm (b) cho thấy Pluronic đã được ghép thành công vào chitosan.



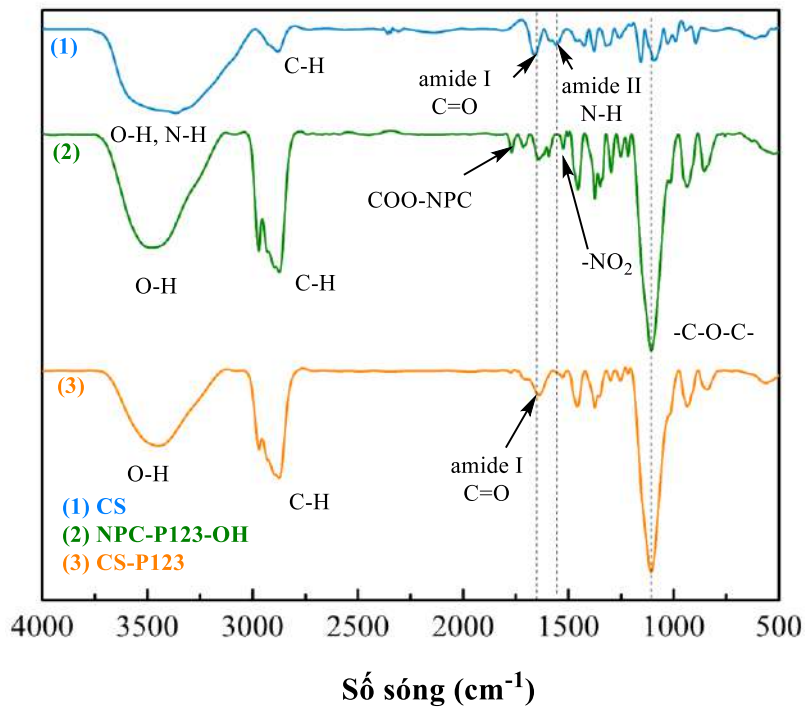
Hình 3. 8. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của CS-P123.

Bảng 3. 7. Kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$ của các loại CS-Pluronic.

Vị trí	H của nhóm	Độ dịch chuyển hóa học (δ , ppm)			
		CS-L61	CS-P123	CS-F127	CS-F68
d	$-\text{OCH}_2-\text{CH}_2\text{O}-$ (PEO)	3.73-3.90	3.74-3.89	3.78	3.73-3.91
e	$-\text{CH}_2-$ (PPO)	3.53-3.66	3.52-3.68	3.53-3.67	3.55-3.70
f	$-\text{CH}$ (PPO)	3.31-3.31	3.51	3.36	3.35-3.39
g	$-\text{CH}_3$ (PPO)	1.12	1.10	1.09-1.14	0.92-1.17
i	$-\text{CH}-$ (CS)	2.93-2.93	3.03	3.147	3.18
j	$-\text{CH}_3$ (CS)	2.02	2.04	2.037	2.06

Kết quả phân tích phân tích phổ FT-IR thể hiện trên Hình 3.9, Phụ lục 19 ÷ 21 và Bảng 3.8. Phổ FT-IR của chitosan cho thấy peak ở 1660 cm^{-1} đặc trưng cho dao động của liên kết $\text{C}=\text{O}$ (amide I) và 1557 cm^{-1} là kết quả của sự bẻ cong mạnh liên kết $\text{N}-\text{H}$ ở các nhóm amine bậc một ($-\text{NH}_2$) và amide II (độ uốn $\text{N}-\text{H}$ yếu hơn so với amine bậc một) trong các nhóm acetamide ($-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-\text{CH}_3$) (khoảng 5%)

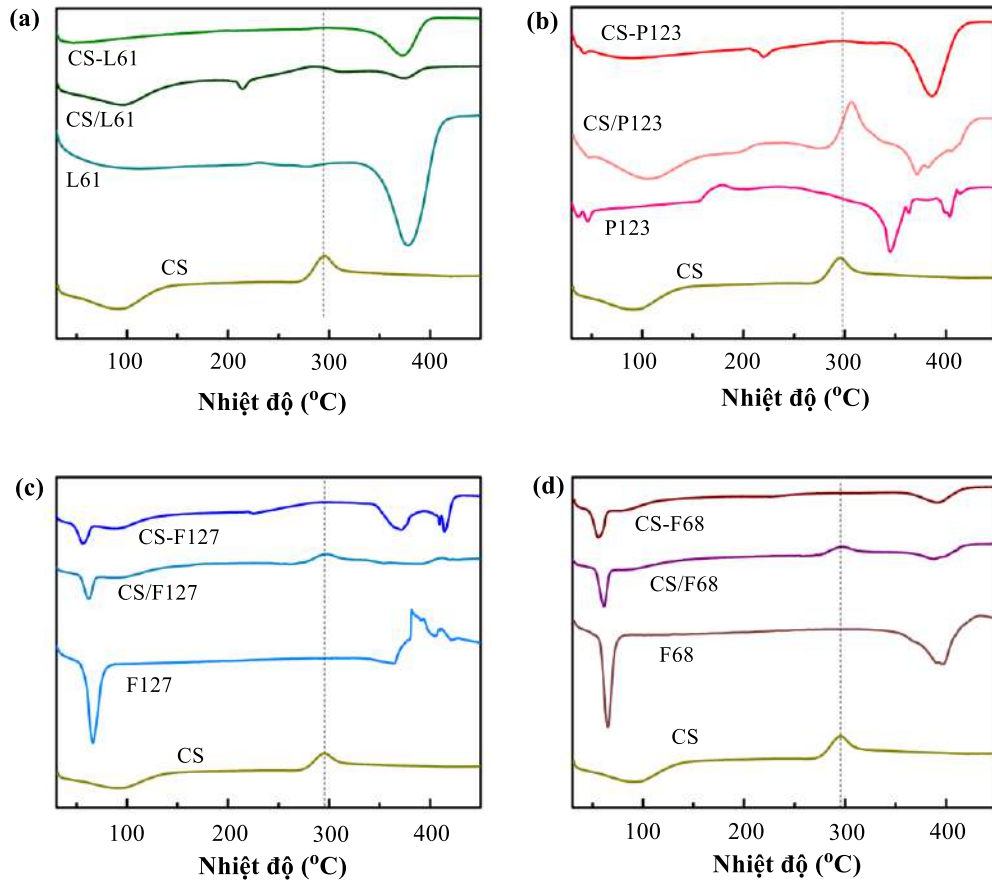
trong phân tử chitosan [214]. Đối với phổ FT-IR của các nanogel CS-Pluronic, peak dao động đặc trưng của liên kết N-H của amine và amide II bị suy yếu ở CS-L61, CS-P123 và bị mất đi ở CS-F127, CS-F68, trong khi đó peak dao động đặc trưng cho amide I được tăng cường rõ ràng. Peak amide II giảm đi đồng thời làm mạnh peak amide I có lẽ là do mất nhóm amine bậc một ($-NH_2$) thành liên kết amide giữa chitosan và Pluronic [214, 215]. Ngoài ra peak đặc trưng cho dao động của liên kết C=O của nhóm ($-COO-NPC$) (1770 cm^{-1}) trên phân tử NPC-Pluronic-OH không còn tồn tại trên phân tử CS-Pluronic chứng tỏ sự liên hợp giữa chitosan và Pluronic thông qua sự hình thành liên kết amide.



Hình 3. 9. Phổ FT-IR của CS (1), NPC-P123-OH (2) và CS-P123 (3).

Bảng 3. 8. Kết quả phổ FT-IR của các loại CS và các loại CS-Pluronic.

Nhóm chức	Số sóng (cm^{-1})				
	CS	CS-L61	CS-P123	CS-F127	CS-F68
O-H, N-H	3409	3446	3449	3442	3447
-C-H	2882	2887	2970-2873	2880	2882
Amit I (C=O)	1660	1634	1641	1647	1639
Amit II (N-H)	1557	1527	1527	—	—
-C-O-C-	1090	1113	1107	1110	1101



Hình 3. 10. 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).

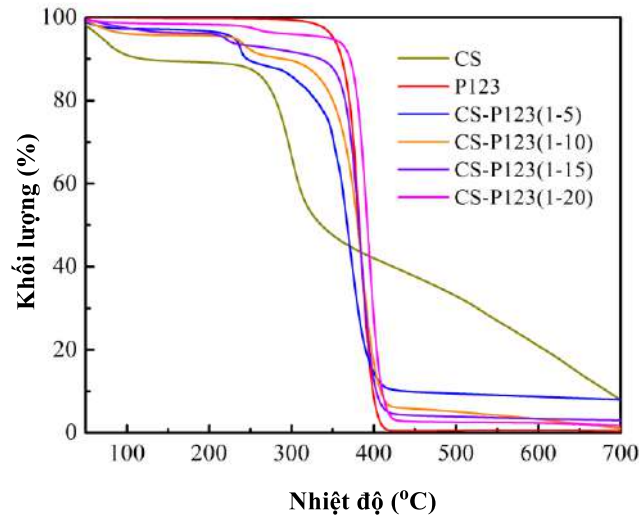
Để chứng minh Pluronic đã được ghép lên mạch chitosan, phép đo nhiệt lượng quét vi sai (DSC) được sử dụng để mô tả đặc tính của chitosan, Pluronic, CS–Pluronic và hỗn hợp CS/Pluronic. Các mẫu được quét ở nhiệt độ dao động từ 30 đến 450 °C với tốc độ gia nhiệt 10 °C/phút. Kết quả phân tích DSC được thể hiện trong Hình 3.10. Trong biểu đồ nhiệt DSC của CS, một peak thu nhiệt rộng quan sát được ở 92 °C có thể được coi là mất nước và peak tỏa nhiệt thứ hai ở 295 °C liên quan đến sự phân hủy các đơn vị amine ($-NH_2$) [216-218]. Trong biểu đồ nhiệt DSC của các loại Pluronic, nhiệt độ nóng chảy (T_m) của L61 nằm ở vùng thấp hơn 30 °C nên không thể quan sát được, trong khi đó T_m của các loại Pluronic P123 là 46 °C, F127 là 66 °C và F68 là 64 °C. Một điều quan sát được là sự tăng nhiệt độ nóng chảy của CS–Pluronic so với Pluronic tinh khiết và hỗn hợp CS/Pluronic, điều này là do tính linh động của Pluronic bị giảm đáng kể khi liên kết hóa học với chitosan. 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 amine ($-NH_2$), 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 -NH₂ của phân tử chitosan đã tham gia phản ứng với các phân tử Pluronic tạo thành liên kết amide bền vững.

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

Để so sánh khả năng nang hóa hợp chất kỵ nước (CUR) của các nanogel CS-Pluronic, Pluronic P123 được sử dụng để khảo sát và tìm ra tỷ lệ tối ưu của P123 ghép lên mạch chitosan hình thành các hạt nanogel có khả năng nang hóa CUR cao nhất từ đó so sánh với các loại nanogel CS-Pluronic từ L61, F127 và F68 ở cùng tỷ lệ phản ứng.

Để khảo sát khả năng ghép giữa CS và P123, các tỷ lệ phản ứng giữa CS và P123 lần lượt là 1/5, 1/10, 1/15 và 1/20 tính theo khối lượng tương ứng với các mẫu CS-P123(1-5), CS-P123(1-10), CS-P123(1-15) và CS-P123(1-20). Biểu đồ nhiệt TGA của CS, P123 tinh khiết và dẫn xuất CS-P123 được thể hiện trong Hình 3.11. Đường cong TGA của CS biểu hiện ba giai đoạn suy thoái. Giai đoạn đầu tiên xảy ra trong khoảng nhiệt độ từ 50 °C đến 100 °C do sự bay hơi của nước. Giai đoạn giảm trọng lượng thứ hai của CS bắt đầu ở 230 đến 400 °C và giai đoạn cuối cùng mà CS tiếp tục phân hủy trên 400 °C. Đường cong TGA của P123 cho thấy chỉ có một giai đoạn giảm trọng lượng. Quá trình suy thoái bắt đầu ở nhiệt độ 350 °C và phân hủy hoàn toàn ở 420 °C. Đối với CS-P123, diễn biến suy thoái và khả năng duy trì trọng lượng nằm giữa các biểu hiện của CS và P123. Giai đoạn đầu tiên xảy ra trong khoảng nhiệt độ từ 50 đến 100 °C do sự bay hơi của nước. Giai đoạn thứ hai từ 230 °C đến 320 °C do sự suy thoái của các thành phần CS trong phân tử CS-P123. Giai đoạn giảm trọng lượng thứ ba từ 320 °C đến 420 °C do sự phân hủy P123 trong phân tử CS-P123. Giai đoạn cuối cùng là phần còn lại của CS tiếp tục phân hủy ở 420 °C. Ở 420 °C, nơi mà sự phân hủy P123 của CS-P123 được xem gần như đã hoàn toàn và trọng lượng của CS-P123 còn lại được xem như là của CS. Căn cứ vào phần trăm trọng lượng CS có trong CS-P123 và phần trăm trọng lượng CS tinh khiết tại nhiệt độ 420 °C, phần trăm CS có trong CS-P123 được tính theo công thức (2) và hiệu suất P123 đã tham gia phản ứng theo công thức (3). Kết quả được trình bày trong Bảng 3.9 cho thấy hàm lượng của P123 được ghép vào chuỗi CS nằm trong khoảng từ 73.93% đến 89.92% khối lượng CS-P123 và đạt đến trạng thái cân bằng của phản ứng là 93.98 % ở CS-P123(1-15). Ngay cả khi tăng hơn nữa, hiệu suất ghép của P123 lên CS thay đổi không đáng kể.



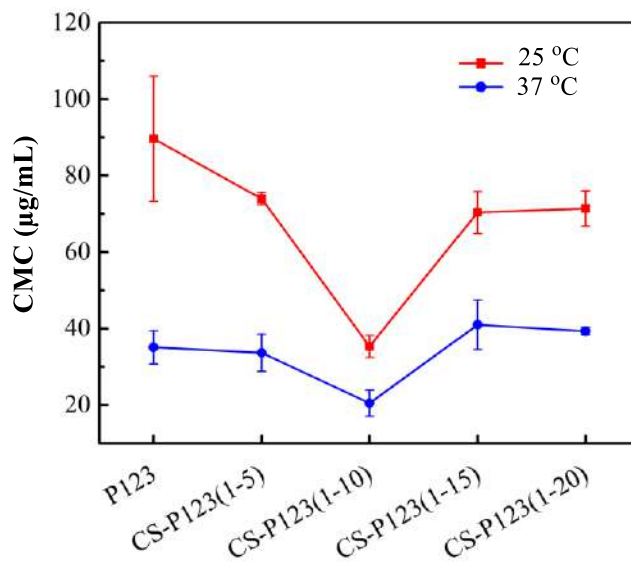
Hình 3. 11. Biểu đồ TGA của CS, P123 và CS–P123 với các tỷ lệ ghép khác nhau.

Bảng 3. 9. Hiệu suất phản ứng của P123 lên chitosan.

Công thức	% $m_{420}(CS)$	% $m_{420}(nanogel)$	% $m_{CS}(nanogel)$	% $m_{Pluronic}(nanogel)$	% H
CS-P123(1-5)	40.28	10.5	26.07	73.93	88.72
CS-P123(1-10)	40.28	6.47	16.06	83.94	92.33
CS-P123(1-15)	40.28	4.79	11.89	88.11	93.98
CS-P123(1-20)	40.28	4.06	10.08	89.92	94.42

Việc xác định giá trị CMC của các nanogel đóng vai trò quan trọng trong việc đánh giá sự ổn định của các nanogel trong dung dịch nước cũng như khả năng nang hóa thuốc kỵ nước [219]. Chính vì vậy, các nanogel từ CS–P123 ở các tỷ lệ ghép khác nhau cũng được khảo sát nhằm tìm ra tỷ lệ ghép tốt nhất tương ứng với giá trị CMC nhỏ nhất. Giá trị CMC được xác định ở 25 °C, đây là nhiệt độ chuẩn bị và bảo quản của một số công thức thuốc thương mại và ở 37 °C là nhiệt độ cơ thể. Các giá trị CMC của P123 và CS-P123 ở các tỷ lệ ghép khác nhau trong dung dịch nước được trình bày trong Hình 3.12 và Phụ lục 22. Kết quả cho thấy giá trị CMC của P123, CS–P123(1–5), CS–P123(1–10), CS–P123(1–15) và CS–P123(1–20) là $89.64 \pm 16.37 \mu\text{g/mL}$, $74.00 \pm 1.63 \mu\text{g/mL}$, $35.31 \pm 2.84 \mu\text{g/mL}$, $70.35 \pm 5.49 \mu\text{g/mL}$ và $71.37 \pm 4.59 \mu\text{g/mL}$ ở 25 °C. Nhìn chung, các nanogel CS–P123 có giá trị CMC thấp hơn P123 tinh khiết. Nhiều nghiên cứu trước đây cũng chỉ ra rằng sự liên hợp với CS dẫn đến việc giảm giá trị CMC của Pluronic [220, 221]. Nguyên nhân của việc giảm giá trị CMC là do CS liên kết với các chuỗi P123 tạo thành một

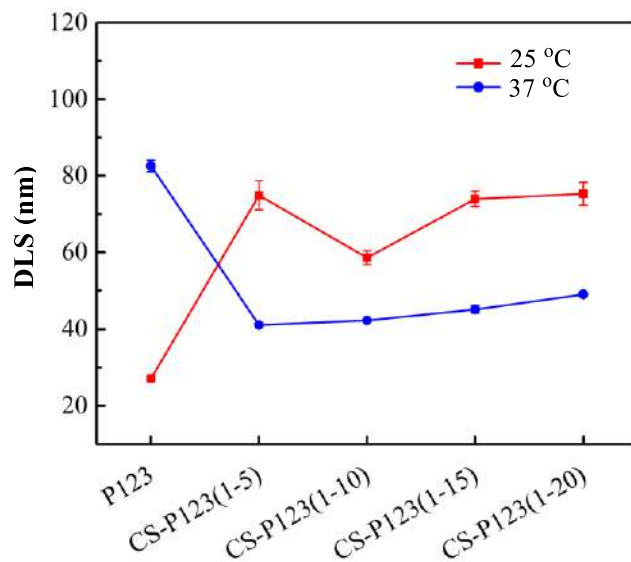
lớp vỏ bảo vệ các khối kỵ nước PPO của P123 tương tác với nước, làm giảm năng lượng tự do bề mặt của các hạt nanogel CS-P123 với nước. Việc giảm thiểu năng lượng tự do giữa các bề mặt phân tử CS-P123 làm giảm nồng độ bắt đầu hình thành micelle [222]. So sánh giá trị CMC của các nanogel ta thấy CS-P123(1-10) có giá trị CMC nhỏ hơn CS-P123(1-5). Điều này là do hàm lượng CS trong phân tử CS-P123(1-5) cao hơn CS-P123(1-10) đồng nghĩa với thành phần ưa nước của CS-P123(1-5) lớn hơn CS-P123(1-10) sẽ làm giảm sự tương tác của khối kỵ nước PPO của CS-P123(1-5). Tuy nhiên, khi tăng hàm lượng P123 thì giá trị CMC ở CS-P123(1-15) và CS-P123(1-20) lại giảm. Sự giảm giá trị CMC của P123 và các CS-P123 ở nhiệt độ 37 °C so với ở 25 °C cho thấy P123 nhạy cảm với nhiệt độ. Khi nhiệt độ tăng, liên kết hydro giữa các phân tử nước với P123 trở nên yếu, điều này làm giảm tính phân cực của các phân tử P123 và làm cho chúng trở nên kỵ nước, do đó giá trị CMC sẽ giảm [223, 224]. Giá trị CMC ở 37 °C của P123, CS-P123(1-5), CS-P123(1-10), CS-P123(1-15) và CS-P123(1-20) là $35.10 \pm 4.34 \mu\text{g/mL}$, $33.66 \pm 4.84 \mu\text{g/mL}$, $20.47 \pm 3.41 \mu\text{g/mL}$, $41.00 \pm 6.48 \mu\text{g/mL}$ và $39.30 \pm 1.00 \mu\text{g/mL}$.



Hình 3. 12. Giá trị CMC của P123 và CS-P123 ở các tỷ lệ ghép khác nhau tại nhiệt độ 25 °C và 37 °C.

Kết quả nghiên cứu kích thước micelle của P123 và CS-P123 ở các tỷ lệ ghép khác nhau được trình bày ở Hình 3.13 và Phụ lục 23. Ở 25 °C, các micelle P123, CS-P123(1-5), CS-P123(1-10), CS-P123(1-15) và CS-P123(1-20) có kích thước $27.1 \pm 0.3 \text{ nm}$, $74.9 \pm 3.8 \text{ nm}$, $58.6 \pm 1.8 \text{ nm}$, $74.0 \pm 2.0 \text{ nm}$ và $75.3 \pm 3.0 \text{ nm}$. Nhìn chung, kích thước micelle của CS-P123 đều lớn hơn P123, điều này

là do CS đã tập hợp các đơn phân tử P123 tạo thành một khối CS-P123 có kích thước lớn. Micelle CS-P123(1-5) có kích thước lớn hơn CS-P123(1-10) là do thành phần ưu nước CS của CS-P123(1-5) lớn, tạo thành một lớp vỏ CS chứa đầy các phân tử nước. Tuy nhiên, các micelle CS-P123(1-15) và CS-P123(1-20) có kích thước tăng dần là do thành phần lõi kỵ nước PPO của P123 lớn. Ở 37 °C, các micelle P123, CS-P123(1-5), CS-P123(1-10), CS-P123(1-15) và CS-P123(1-20) có kích thước 82.6 ± 1.5 nm, 41.1 ± 0.6 nm, 42.3 ± 0.4 nm, 45.2 ± 1.0 nm và 49.0 ± 0.3 nm. Khi tăng nhiệt độ lên 37 °C, kích thước micelle của P123 tăng lên, điều này cho thấy rằng sự kết tụ của P123 được kích thích bởi nhiệt độ. P123 có chiều dài khối ưa nước PEO ngắn và PPO dài, khi nhiệt độ tăng lên, liên kết hydro giữa khối PEO và nước bị suy yếu, dễ dàng tạo điều kiện tương tác giữa các khối PPO kỵ nước. Điều này cũng được chứng minh đối với các loại Pluronic kỵ nước như P185 [225]. Đối với các micelle CS-P123, khi tăng nhiệt độ thì kích thước micelle giảm, điều này là do các liên kết hydro bị suy yếu, nước trong lớp vỏ micelle bị đẩy ra ngoài. Nhìn chung, các hạt nanogel CS-P123 có kích thước nhỏ, điều này giúp giảm thiểu nguy cơ tắc nghẽn trong mao mạch đồng thời tránh sự lọc ở thận và sự hấp thu của hệ thống lưới nội mô, và do đó có thể lưu thông trong máu trong thời gian dài, cuối cùng đi qua các mao mạch của khối u [226].

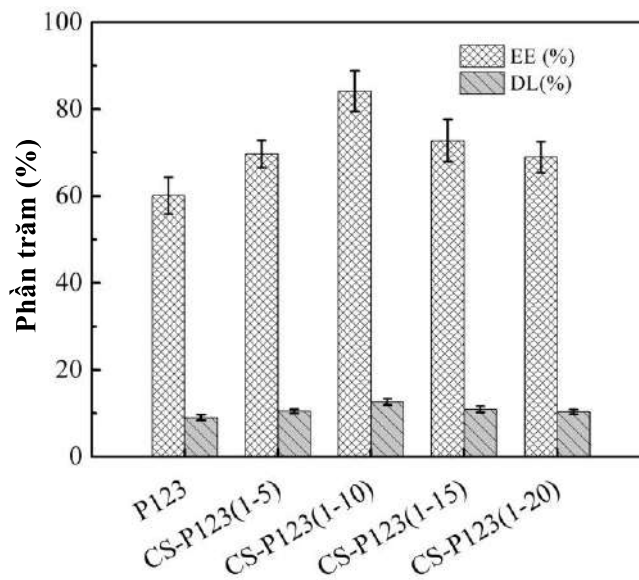


Hình 3. 13. Giá trị DLS của P123 và CS-P123 ở các tỷ lệ khác nhau tại nhiệt độ 25 °C và 37 °C.

Để đánh giá khả năng nang hóa thuốc có tính kỵ nước cao đối với P123 và CS-P123, CUR được sử dụng như một tác nhân sinh học có tính kỵ nước Việc khảo

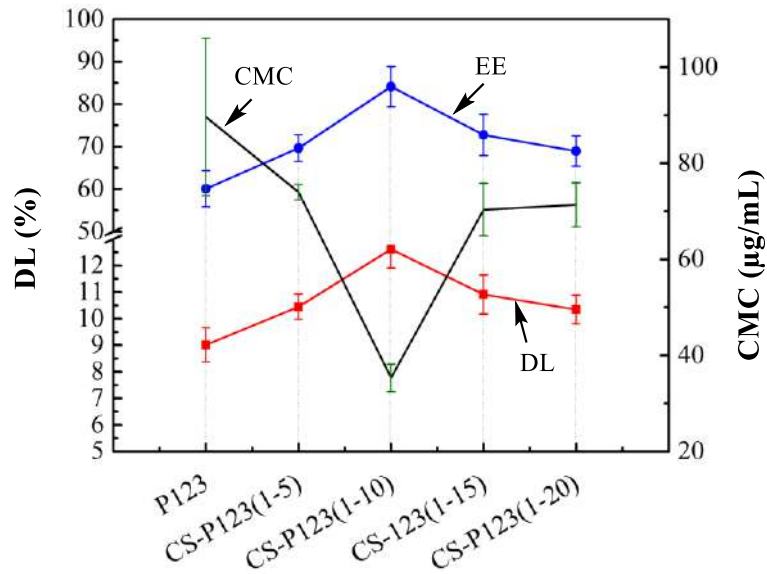
sát này nhằm so sánh khả năng nang hóa thuốc giữa P123 tinh khiết và nanogel CS-P123 cũng như tìm ra tỷ lệ ghép tối ưu giữa CS và P123 có khả năng nang hóa thuốc kỵ nước cao nhất.

Kết quả nang hóa CUR được đánh giá qua hai giá trị DL% và EE% được thể hiện trên Hình 3.14. Khả năng nang hóa CUR (DL%) của các nanogel P123, CS-P123(1-5), CS-P123(1-10), CS-P123(1-15) và CS-P123(1-20) là $9.01 \pm 0.64\%$, $10.45 \pm 0.47\%$, $12.62 \pm 0.71\%$, $10.91 \pm 0.73\%$, $10.34 \pm 0.54\%$ và tương ứng với hiệu suất đóng gói (EE%) là $60.07 \pm 4.24\%$, $69.64 \pm 3.13\%$, $84.12 \pm 4.70\%$, $72.76 \pm 4.85\%$ và $68.92 \pm 3.57\%$. Kết quả cho thấy CS đã làm tăng cường khả năng nang hóa CUR khi kết hợp với P123 so với P123 tinh khiết. Ở các tỷ lệ ghép khác nhau, ta thấy CS-P123(1-10) đạt hiệu quả tối đa trong việc nang hóa thuốc.



Hình 3. 14. Biểu đồ biểu diễn giá trị EE (%) và DL(%) của P123 và CS-P123 mang CUR.

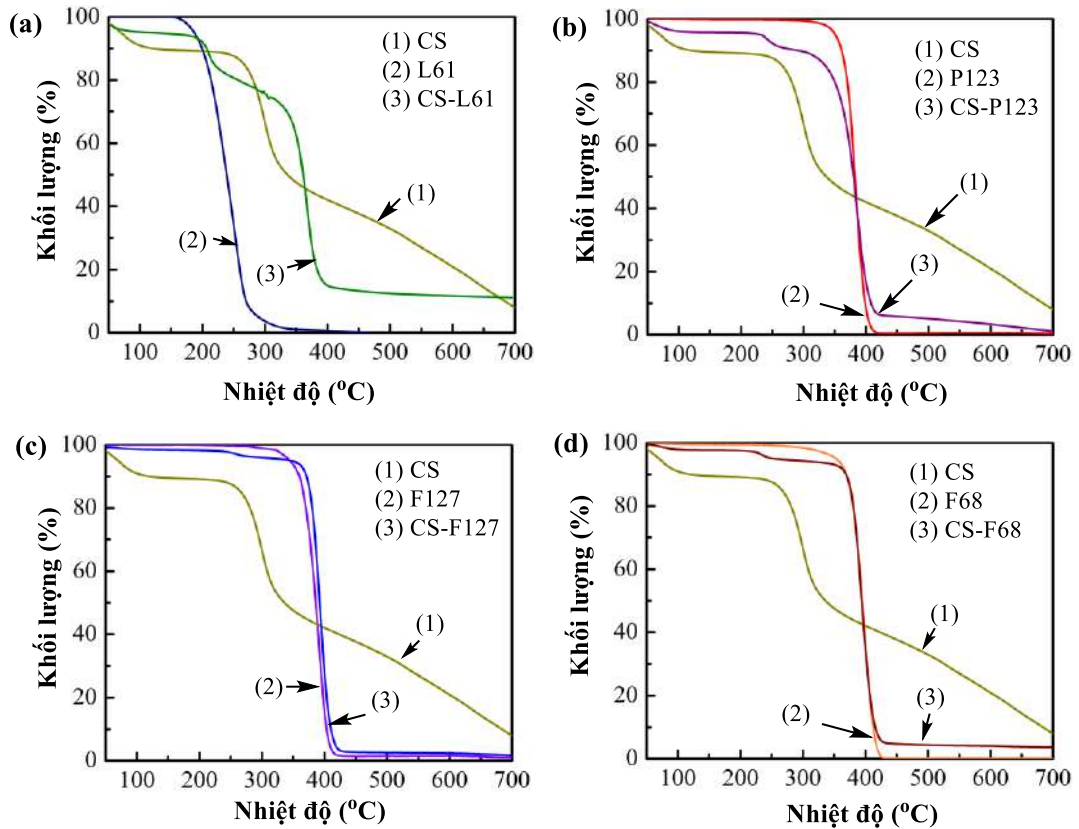
Mối quan hệ giữa giá trị CMC và khả năng nang hóa CUR của nanogel được thể hiện trên Hình 3.15. Kết quả cho thấy khả năng tải CUR của các hạt nanogel tỷ lệ nghịch với giá trị CMC, điều này có nghĩa là giá trị CMC càng thấp thì khả năng nang hóa các thuốc kỵ nước càng cao. Như vậy việc ghép Pluronic lên mạch CS sẽ tăng cường tính ổn định của Pluronic đồng thời tăng cường khả năng nang hóa thuốc kỵ nước của Pluronic.



Hình 3. 15. Biểu đồ biểu diễn giá trị EE, DL và CMC của P123 và CS-P123.

Như vậy ở các tỷ lệ ghép giữa CS và P123, CS-P123(1-10) có hiệu quả nhất trong việc nang hóa các thuốc kỵ nước. Trên cơ sở này, chúng tôi tiến hành khảo sát các loại Pluronic khác như L61, F127 và F68 để so sánh khả năng nang hóa thuốc kỵ nước của các loại Pluronic này khi ghép lên phân tử chitosan.

Để so sánh khả năng ghép của các loại Pluronic lên mạch chitosan ở cùng tỷ lệ mol giữa các loại Pluronic so với chitosan (số mol tính theo đơn vị glucosamine). Tỷ lệ mol của các loại Pluronic tham gia phản ứng so với chitosan là tỷ lệ mol của công thức CS-P123(1-10). Biểu đồ nhiệt TGA của CS, Pluronic và CS-Pluronic được thể hiện trên Hình 3.16. Nhìn chung, tất cả các loại Pluronic đều trải qua một giai đoạn suy thoái do nhiệt. Pluronic P123, F127 và F68 đều bắt đầu suy thoái ở nhiệt độ 350 °C và phân hủy hoàn toàn ở 420 °C, tuy nhiên Pluronic L61 bắt đầu suy thoái ở nhiệt độ sớm hơn là 200 °C và kết thúc ở 400 °C. Kết quả tính toán hàm lượng Pluronic và hiệu suất ghép của Pluronic trên mạch chitosan được trình bày trong Bảng 3.10. Kết quả cho thấy hàm lượng của L61 trong CS-L61 là 64.38% với hiệu suất 82.02%, hàm 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%. Hiệu suất phản ứng của P123 và F127 lớn hơn L61 và F68 là do phần trăm nhóm NPC còn lại trên phân tử NPC-P123-OH (49.15%) và NPC-F127-OH (58.68%) lớn hơn NPC-L61-OH (45.76%) và NPC-F68-OH (48.49%). Ngoài ra, hiệu suất phản ứng của Pluronic L61 thấp là do khả năng hòa tan kém của nó trong môi trường nước.



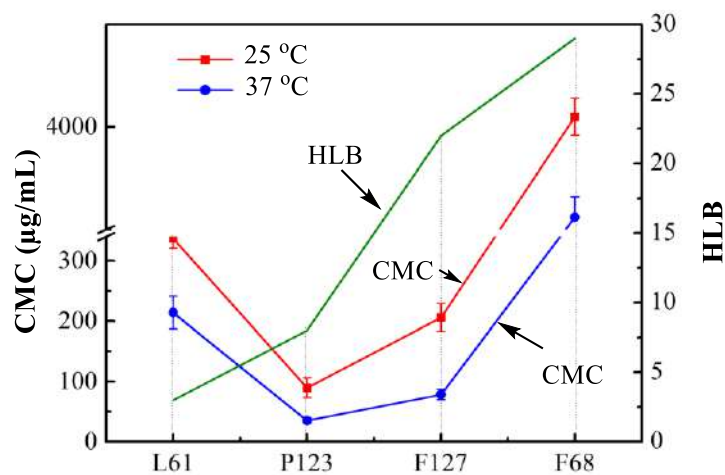
Hình 3. 16. Biểu đồ TGA của CS, các loại Pluronic và các loại CS–Pluronic. L61 (a), P123 (b), F127 (c) và F68 (d).

Bảng 3. 10. 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 đánh giá giữa mối quan hệ giữa giá trị CMC và khả năng nang hóa thuốc kỵ nước của CS–P123 cho thấy giá trị CMC càng thấp thì hiệu quả nang hóa càng cao. Tuy nhiên giá trị CMC có phụ thuộc vào giá trị HLB hay không, chúng tôi tiến hành đo giá trị CMC của các loại Pluronic L61, P123, F127 và F68 với giá trị HLB là 3, 8, 22 và 29. Kết quả CMC của L61, P123, F127 và F68 tinh khiết được trình bày ở Phụ lục 24 với kết quả là $337 \pm 16 \mu\text{g/mL}$ (L61), $89.64 \pm 16.37 \mu\text{g/mL}$ (P123), $206 \pm 23 \mu\text{g/mL}$ (F127) và $4049 \pm 90 \mu\text{g/mL}$ (F68) ở 25°C . Trong khi đó, ở 37°C , giá trị CMC đo được là $214 \pm 27 \mu\text{g/mL}$ (L61), $35.10 \pm 4.34 \mu\text{g/mL}$

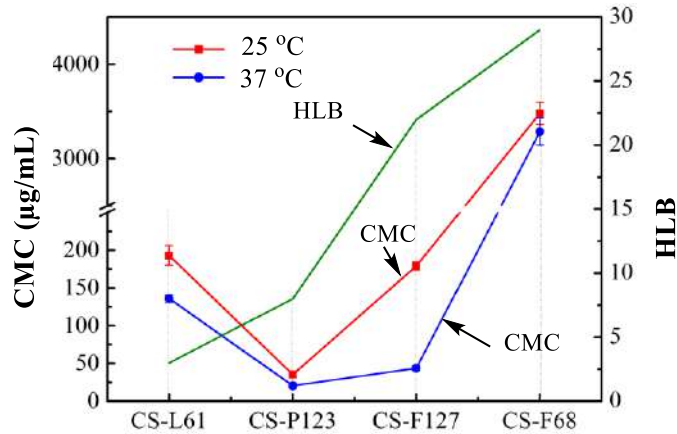
(P123), $78.33 \pm 8.49 \mu\text{g/mL}$ (F127) và $3560 \pm 99 \mu\text{g/mL}$ (F68). Từ kết quả cho thấy giá trị CMC của Pluronic giảm khi tăng nhiệt độ từ 25°C lên 37°C . Mối quan hệ giữa giá trị HLB và giá trị CMC của Pluronic được trình bày trong Hình 3.17 cho thấy giá trị CMC không phụ thuộc vào giá trị HLB hay tính kỵ nước của Pluronic. Chẳng hạn, giá trị HLB của L61 nhỏ hơn P123 nhưng giá trị CMC của L61 lại lớn hơn P123. Attwood và cộng sự báo cáo rằng, đối với Pluronic, các giá trị CMC bị ảnh hưởng bởi sự thay đổi của độ dài khối ưa nước PEO khi hai loại Pluronic có cùng độ dài khối kỵ nước PPO và giá trị CMC phụ thuộc vào độ dài khối ưa nước PEO và khi chiều dài đoạn PEO càng lớn thì giá trị CMC càng lớn [227]. Chẳng hạn, xét hai phân tử Pluronic P123 và F127 có độ dài khối PPO của P123 (69.40) và F127 (65.17) là xấp xỉ nhau, đó độ dài khối PEO của P123 (39.20) nhỏ hơn rất nhiều so với F127 (200.45), trong khi đó giá trị CMC ở 25°C của P123 ($89.64 \pm 16.37 \mu\text{g/mL}$) nhỏ hơn F127 ($206 \pm 23 \mu\text{g/mL}$). Tương tự, xét hai phân tử Pluronic L61 và F68 có độ dài khối PEO của L61 (31.03) và F68 (28.97) là xấp xỉ nhau, đó độ dài khối PEO của L61 (4.55) nhỏ hơn rất nhiều so với F68 (152.73), trong khi đó giá trị CMC ở 25°C của L61 ($337 \pm 16 \mu\text{g/mL}$) nhỏ hơn F68 ($4049 \pm 90 \mu\text{g/mL}$). Như vậy, giá trị CMC của Pluronic không phụ thuộc vào giá trị HLB của chúng mà phụ thuộc vào độ dài khối PEO nếu hai phân tử Pluronic có cùng độ dài khối PPO.



Hình 3. 17. Biểu đồ biểu diễn sự thay đổi giá trị CMC và HLB của các loại Pluronic.

Kết quả CMC của các CS-Pluronic được trình bày ở Phụ lục 25 với kết quả là $193 \pm 13 \mu\text{g/mL}$ (CS-L61), $35.31 \pm 2.84 \mu\text{g/mL}$ (CS-P123), $179 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ (CS-F127) và $3480 \pm 118 \mu\text{g/mL}$ (CS-F68) ở 25°C . Trong khi đó, ở 37°C , giá trị CMC đo được là $136 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ (CS-L61), $20.47 \pm 3.41 \mu\text{g/mL}$ (CS-P123), 43.67

$\pm 3.09 \mu\text{g/mL}$ (CS-F127) và $3286 \pm 144 \mu\text{g/mL}$ (CS-F68). Nhìn chung, giá trị CMC của các loại CS-Pluronic giảm khi tăng nhiệt độ. Từ biểu đồ Hình 3.18 cho thấy giá trị CMC của các CS-Pluronic thay đổi theo thứ tự CS-P123 < CS-F127 < CS-L61 < CS-F68 tương ứng với sự thay đổi giá trị CMC của các loại Pluronic P123 < F127 < L61 < F68. Như vậy, giá trị CMC của các loại CS-Pluronic cũng không phụ thuộc vào giá trị HLB của Pluronic tương ứng.



Hình 3. 18. Biểu đồ biểu diễn sự thay đổi giá trị CMC của các loại CS-Pluronic và HLB của các loại Pluronic.

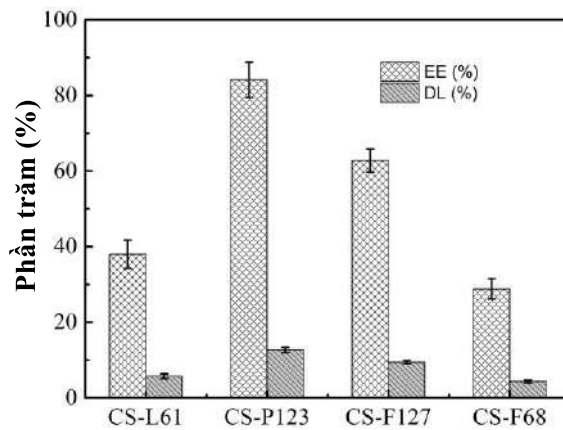
Bảng 3. 11. Giá trị DLS của các loại CS-Pluronic ở 25 °C và 37 °C.

Tên mẫu	DLS (nm)	
	25 °C	37 °C
CS-L61	75.2 ± 1.3	58.9 ± 1.9
CS-P123	58.6 ± 1.8	42.3 ± 0.4
CS-F127	64.3 ± 7.3	27.9 ± 2.8
CS-F68	—	—

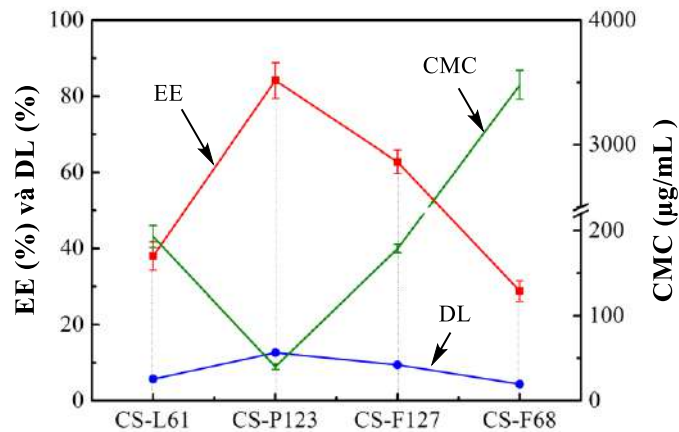
Để đánh giá kích thước micelle của các loại CS-Pluronic, chúng tôi lựa chọn một nồng độ duy nhất là $1000 \mu\text{g/mL}$ để đánh giá sự khác biệt kích thước micelle của các loại CS-Pluronic ở nhiệt độ 25 °C và 37 °C. Kết quả đo DLS được trình bày ở Phụ lục 26 và Bảng 3.11 cho thấy kích thước micelle của các loại CS-Pluronic giảm khi tăng nhiệt độ. Ở $1000 \mu\text{g/mL}$ là nồng độ thấp hơn nồng độ tạo micelle tới hạn (CMC) của CS-F68 nên kích thước micelle của CS-F68 không xác định được. Khi tăng nhiệt độ, kích thước micelle của CS-F127 thay đổi đáng kể so với

CS-L61 và CS-P123, điều này do CS-F127 có hàm lượng khối PEO lớn tạo thành một lớp vỏ chứa nước lớn và khi tăng nhiệt độ thì nước sẽ thoát khỏi lớp vỏ làm cho kích thước micelle giảm mạnh.

Kết quả nang hóa CUR được đánh giá qua hai giá trị DL% và EE% được thể hiện trên Hình 3.19. 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 $28.82 \pm 2.71\%$. Biểu đồ Hình 3.20 cho thấy rằng khả năng nang hóa CUR được xếp theo thứ tự CS-P123 > CS-F127 > CS-L61 > CS-F68 tương ứng với sự thay đổi giá trị CMC của các loại CS-Pluronic theo thứ tự CS-P123 < CS-F127 < CS-L61 < CS-F68. Điều này cho thấy khả năng nang hóa CUR của CS-Pluronic phụ thuộc vào giá trị CMC của CS-Pluronic mà không phụ thuộc vào giá trị HLB của các loại Pluronic tương ứng.

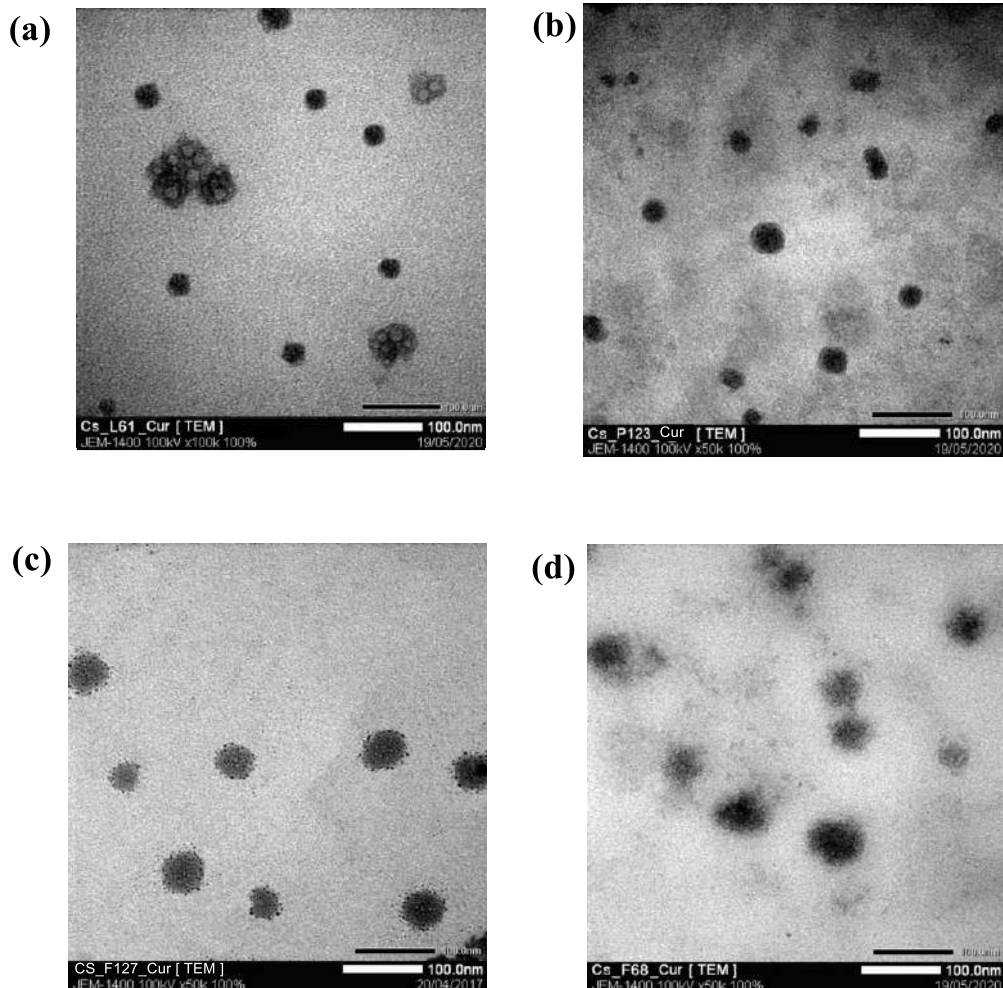


Hình 3. 19. Hiệu quả nang hóa CUR của các loại CS-Pluronic.



Hình 3. 20. Biểu đồ biểu diễn giá trị EE, DL và CMC của các loại CS-Pluronic.

Hình thái TEM của CS-L61/CUR, CS-P123/CUR, CS-F127/CUR và CS-F68/CUR được thể hiện trong Hình 3.21. Kết quả TEM cho thấy tất cả các loại CS-Pluronic/CUR đều có hình cầu, tuy nhiên, đối với CS-L61/CUR có xu hướng kết tụ lại, điều này có thể là do thành phần khối ưa nước PEO của L61 thấp, không đủ tạo thành một lớp vỏ bao bọc lõi kỵ nước PPO và CUR của các hạt nanogel CS-L61/CUR. Đối với CS-P123/CUR, các hạt nanogel dạng hình cầu phân bố đều không có sự tụ lại như CS-L61/CUR. Các hạt nanogel CS-F127/CUR có dạng hình cầu phân bố đều, có kích thước lớn hơn CS-L61/CUR và CS-P123/CUR. Các hạt nanogel CS-F68/CUR có thành phần khối ưa nước PEO cao, thành phần khối kỵ nước PPO thấp, hàm lượng CUR nang hóa thấp nên hình dạng không được rõ ràng, không tạo ra được cấu trúc lõi-vỏ rõ ràng.

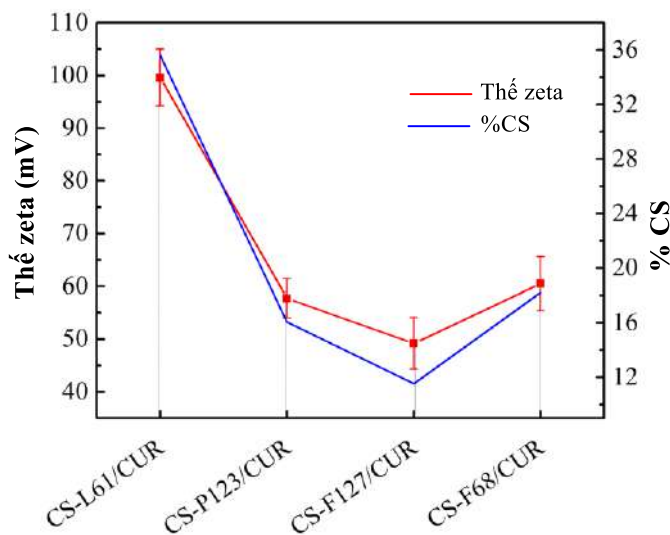


Hình 3. 21. Kết quả TEM của CS-L61/CUR (a), CS-P123/CUR (B), CS-F127/CUR (c) và CS-F68/CUR (d).

Kết quả đo kích thước hạt DLS và thế zeta được trình bày trong Phụ lục 27, Phụ lục 28 và Bảng 3.12 cho thấy ở 25 °C và nồng độ 1000 µg/mL, các hạt nanogel có kích thước dưới 200 nm, điều này giúp cho các hạt nanogel tích tụ trong các mô làm tăng tính thấm thành mạch, chẳng hạn như ở các vị trí khối u ung thư thông qua hiệu ứng tăng cường tính thấm thấu và lưu giữ (EPR) [228]. Kết quả thế zeta cho thấy các hạt nanogel mang điện tích dương, là điện tích do các phân tử CS có nhóm amine quyết định. Từ biểu đồ Hình 3.22, ta thấy điện tích của các hạt nanogel phụ thuộc vào hàm lượng CS có trong CS–Pluronic. Hàm lượng CS trong các hạt nanogel được xếp theo thứ tự CS–L61 > CS–F68 > CS–P123 > CS–F127 tương ứng với thứ tự điện thế zeta CS–L61 > CS–F68 > CS–P123 > CS–F127.

Bảng 3. 12. 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

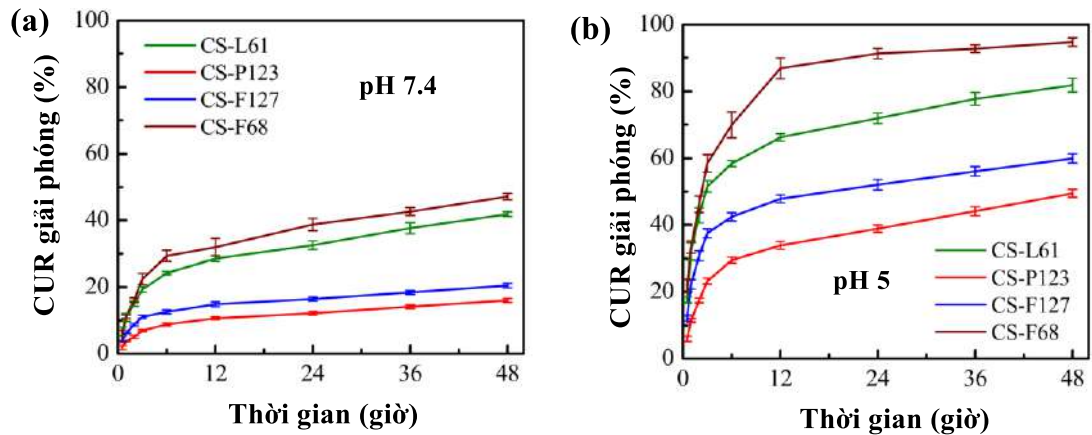


Hình 3. 22. Biểu đồ biểu diễn giá trị thế zeta và hàm lượng CS của các mẫu CS–Pluronic/CUR.

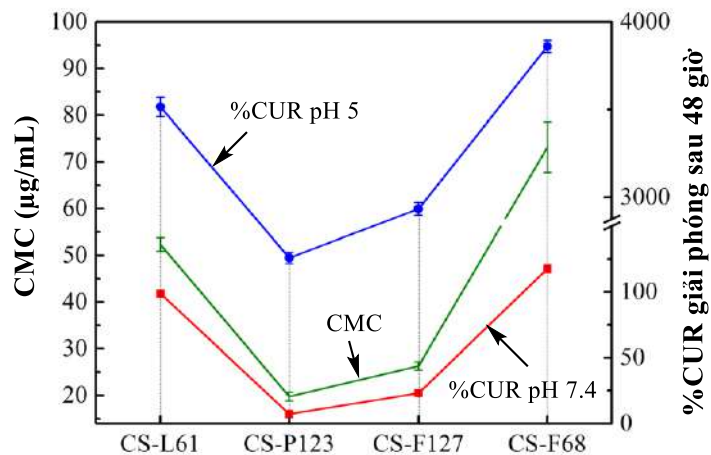
Như vậy khi so sánh đặc điểm và khả năng nang hóa CUR của các loại nanogel CS–Pluronic ta thấy rằng các hạt nanogel CS–Pluronic nhạy cảm với nhiệt độ, điện thế các hạt nanogel phụ thuộc vào hàm lượng chitosan có trong nanogel,

kích thước micelle phù hợp để làm vật liệu phân phối thuốc. Các hạt nanogel có giá trị CMC không phụ thuộc vào giá trị HLB của Pluronic tương ứng. Pluronic P123 có giá trị CMC thấp nhất và có khả năng nang hóa thuốc kỵ nước cao nhất.

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



Hình 3. 23. Biểu đồ mô tả quá trình giải phóng CUR của các nanogel CS-Pluronic ở pH 7.4 (a) và pH 5 (b).



Hình 3. 24. Biểu đồ biểu diễn giá trị CMC và %CUR giải phóng sau 48 giờ ở pH 7.4 và pH 5 của các mẫu CS-Pluronic/CUR.

Khả năng giải phóng CUR của hệ nanogel được đánh giá trong hai môi trường pH 7.4 và pH 5.0 phù hợp với điều kiện sinh lý của cơ thể và tại khối u của tế bào ung thư. Dữ liệu giải phóng CUR được trình bày ở Phụ lục 31, Phụ lục 32 và diễn biến quá trình giải phóng CUR được thể hiện trên Hình 3.23. Kết quả cho thấy,

lần lấy mẫu đầu tiên sau 30 phút, hàm lượng CUR giải phóng ra là 6.65% (CS-L61), 1.88% (CS-P123), 3.63% (CS-F127) và 5.18% (CS-F68) ở pH 7.4. Cùng thời điểm này, ở pH 5, hàm lượng CUR giải phóng ra được ghi nhận là 17.66% (CS-L61), 5.92% (CS-P123), 12.16% (CS-F127) và 21.78% (CS-F68). Sau 48 giờ, hàm lượng CUR giải phóng ra là 41.85% (CS-L61), 16.59% (CS-P123), 20.49% (CS-F127) và 47.16% (CS-F68) ở pH 7.4. Cùng thời điểm này, ở pH 5, hàm lượng CUR giải phóng ra được ghi nhận là 81.78% (CS-L61), 49.47% (CS-P123), 59.93% (CS-F127) và 94.73% (CS-F68). Nhìn chung, các hạt nanogel CS-Pluronic/CUR giữ CUR ở pH 7.4 và giải phóng mạnh mẽ ở pH 5.0. Kết quả này cho thấy sự giải phóng CUR của các hạt nanogel CS-Pluronic phụ thuộc vào pH, điều này là do các hạt nanogel có các nhóm amine của phân tử CS sẽ được proton hóa và tích điện dương ở pH 5.0, làm cho CS hòa tan trong dung dịch nước dẫn đến lớp vỏ micelle trở nên lỏng lẻo và thư giãn, tạo điều kiện cho CUR giải phóng ra khỏi lõi micelle. Ở pH cao hơn (vùng kiềm), nhóm amine này trở nên khử proton hóa và không tích điện, do đó tạo ra mạng hydrogel sinh học không hòa tan, ngăn cản sự giải phóng CUR từ lõi micelle [229]. Đặc tính này giúp cho các nanogel giữ thuốc ở môi trường sinh lý cơ thể và giải phóng thuốc ở môi trường sinh lý khối u ung thư. Biểu đồ Hình 3.25 cho thấy khả năng giải CUR ở pH 5 của các nanogel CS-Pluronic/CUR phụ thuộc vào giá trị CMC của chúng. Nanogel CS-P123 có giá trị CMC thấp nhất nên giải phóng CUR chậm nhất so với các nanogel còn lại.

Bảng 3. 13. Các thông số mô hình động học giải phóng CUR của các nanogel CS-Pluronic.

Tên mẫu	pH	Mô hình toán học động học giải phóng CUR					
		Zero-order	First-order	Higuchi	Korsmeyer-Peppas		
		R^2	R^2	R^2	k	n	R^2
CS-L61/CUR	7.4	0.8405	0.6371	0.9482	0.1230	0.3173	0.9566
CS-P123/CUR		0.8441	0.6093	0.9392	0.0419	0.3466	0.9406
CS-F127/CUR		0.7920	0.5858	0.9133	0.0700	0.2787	0.9251
CS-F68/CUR		0.7934	0.5502	0.9184	0.1356	0.3284	0.9082
CS-L61/CUR	5	0.6988	0.5131	0.8475	0.3484	0.2309	0.9104
CS-P123/CUR		0.8082	0.5696	0.9267	0.1412	0.3266	0.9301
CS-F127/CUR		0.6985	0.5068	0.8457	0.2485	0.2363	0.9054
CS-F68/CUR		0.6453	0.5162	0.8185	0.4038	0.2432	0.9085

Động học giải phóng CUR từ các hạt nanogel CS–Pluronic được phân tích bằng cách đưa dữ liệu giải phóng *in vitro* vào các mô hình toán học dựa trên các phương trình động học Zero-order, First-order, Higuchi và Korsmeyer-Peppas (Power law), sau đó tính toán hệ số tương quan của chúng (R^2). Kết quả phân tích động học giải phóng CUR được trình bày ở Phụ lục 33 ÷ Phụ lục 36 và Bảng 3.13. Kết quả cho thấy sự thống nhất và phù hợp cho hầu hết các công thức CS–Pluronic/CUR với mô hình Korsmeyer-Peppas ở cả hai môi trường giải phóng pH 7.4 và 5, CS–L61 ($R^2 = 0.9566$ và 0.9104), CS–P123 ($R^2 = 0.9406$ và 0.9301), CS–F127 ($R^2 = 0.9251$ và 0.9054) và CS–F68 ($R^2 = 0.9082$ và 0.9085). Cơ chế giải phóng CUR từ các hạt nanogel CS–Pluronic được đánh giá bằng mô hình Korsmeyer-Peppas. Giá trị tính toán của n của các nanogel CS–Pluronic nhỏ hơn 0.45 cho thấy cơ chế giải phóng CUR từ chúng là do khuếch tán.

Để đánh giá khả năng giải phóng CUR của các loại CS–Pluronic, các giá trị $t_{25\%}$, $t_{50\%}$, $t_{75\%}$, và MDT được sử dụng để so sánh thời gian cần thiết để giải phóng 25%, 50%, 75% và thời gian trung bình giải phóng CUR của các nanogel CS–Pluronic. Kết quả tính toán từ công thức (7) được trình bày ở Bảng 3.14. Kết quả cho thấy, tại pH 7.4, CS–L61/CUR và CS–F68/CUR mất 9 giờ và 6 giờ để giải phóng 25% CUR, trong khi đó CS–P123/CUR và CS–F127/CUR cần thời gian rất lâu để giải phóng 25% CUR trong vòng 173 giờ và 96 giờ. Tương tự, ở pH 5, CS–L61/CUR và CS–F68/CUR thì chưa đầy 1 giờ đã giải phóng 25% CUR, trong khi đó CS–P123/CUR và CS–F127/CUR thì cần 5.75 giờ và 6.44 giờ để giải phóng 25% CUR. Đánh giá một cách tổng thể, thời gian giải phóng CUR trung bình của các loại CS–Pluronic/CUR được sắp xếp theo thứ tự sau: CS–P123/CUR > CS–F127/CUR > CS–L61 > CS–F68/CUR. Kết quả này cho thấy, tốc độ giải phóng thuốc phụ thuộc vào giá trị CMC của CS–Pluronic mà không phụ thuộc vào giá trị HLB của Pluronic tương ứng.

Bảng 3. 14. Các thông số giải phóng CUR từ các nanogel CS–Pluronic.

Tên mẫu	pH	$t_{25\%}$ (giờ)	$t_{50\%}$ (giờ)	$t_{75\%}$ (giờ)	MDT (giờ)
CS–L61/CUR	7.4	9	83	298	177
CS–P123/CUR		173	1278	4117	2430
CS–F127/CUR		96	1158	4961	3035
CS–F68/CUR		6	53	182	108
CS–L61/CUR	5	0.24	4.78	27.68	18.05
CS–P123/CUR		5.75	48.01	166.16	98.71
CS–F127/CUR		1.03	19.27	107.20	69.23
CS–F68/CUR		0.14	2.41	12.75	8.14

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

Bảng 3. 15. Sự ổn định của các nanogel CS–Pluronic/CUR bảo quản sau đông khô ở nhiệt độ phòng.

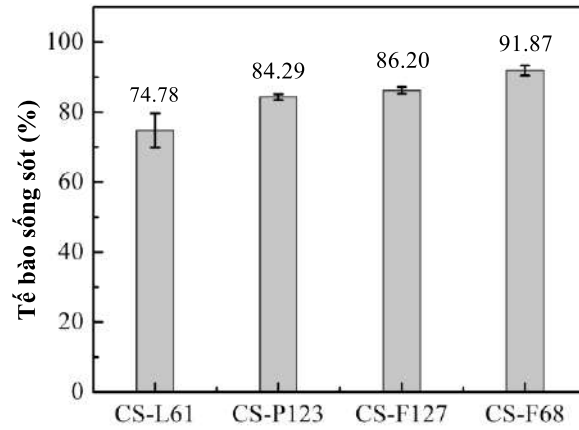
Tên mẫu	Thông số đo	0 tháng	6 tháng
CS–L61/CUR	EE%	$37.98 \pm 3.75\%$	33.41 ± 1.96
	DL%	5.70 ± 0.65	5.01 ± 0.29
	DLS (nm)	157 ± 5.6	183 ± 23.5
	Thế zeta (mV)	99.6 ± 5.4	96.3 ± 0.6
	DR%	–	88.35 ± 3.95
CS–P123/CUR	EE%	84.12 ± 4.70	82.37 ± 5.08
	DL%	12.62 ± 0.71	12.36 ± 0.78
	DLS (nm)	77.6 ± 5.5	81.6 ± 1.7
	Thế zeta (mV)	57.7 ± 3.7	54.73 ± 0.78
	DR%	–	97.91 ± 1.99
CS–F127/CUR	EE%	62.76 ± 3.06	60.71 ± 2.43
	DL%	9.41 ± 0.46	9.21 ± 0.36
	DLS (nm)	86.7 ± 3.9	93.3 ± 0.5
	Thế zeta (mV)	49.2 ± 4.9	48.0 ± 1.24
	DR%	–	96.86 ± 4.23
CS–F68/CUR	EE%	28.82 ± 2.71	25.10 ± 0.41
	DL%	4.32 ± 0.41	3.28 ± 0.05
	DLS (nm)	147 ± 4.2	150.0 ± 7.9
	Thế zeta (mV)	60.5 ± 5.1	54.3 ± 2.75
	DR%	–	87.92 ± 8.92

Trước khi sản xuất quy mô lớn các sản phẩm dược phải đánh giá độ ổn định của quá trình bảo quản. Sấy đông khô là một kỹ thuật đáng tin cậy để đảm bảo sự ổn định lâu dài của các sản phẩm này. Tính ổn định của các nanogel CS–Pluronic/CUR đã được nghiên cứu ở nhiệt độ phòng trong vòng 6 tháng được phản ánh bằng việc giảm nhẹ EE%, DL%, thế zeta và sự gia tăng nhỏ trong kích thước các micelle (DLS) (Bảng 3.15). Ngoài ra, tỷ lệ lưu giữ CUR (DR%) trong các micelle 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 theo công thức (8) với kết quả 88.35 ± 3.95 (CS–L61/CUR), 97.91 ± 1.99 (CS–P123/CUR), 96.86 ± 4.23 (CS–F127/CUR) và 87.92 ± 8.92 (CS–F68/CUR) trong thời gian bảo

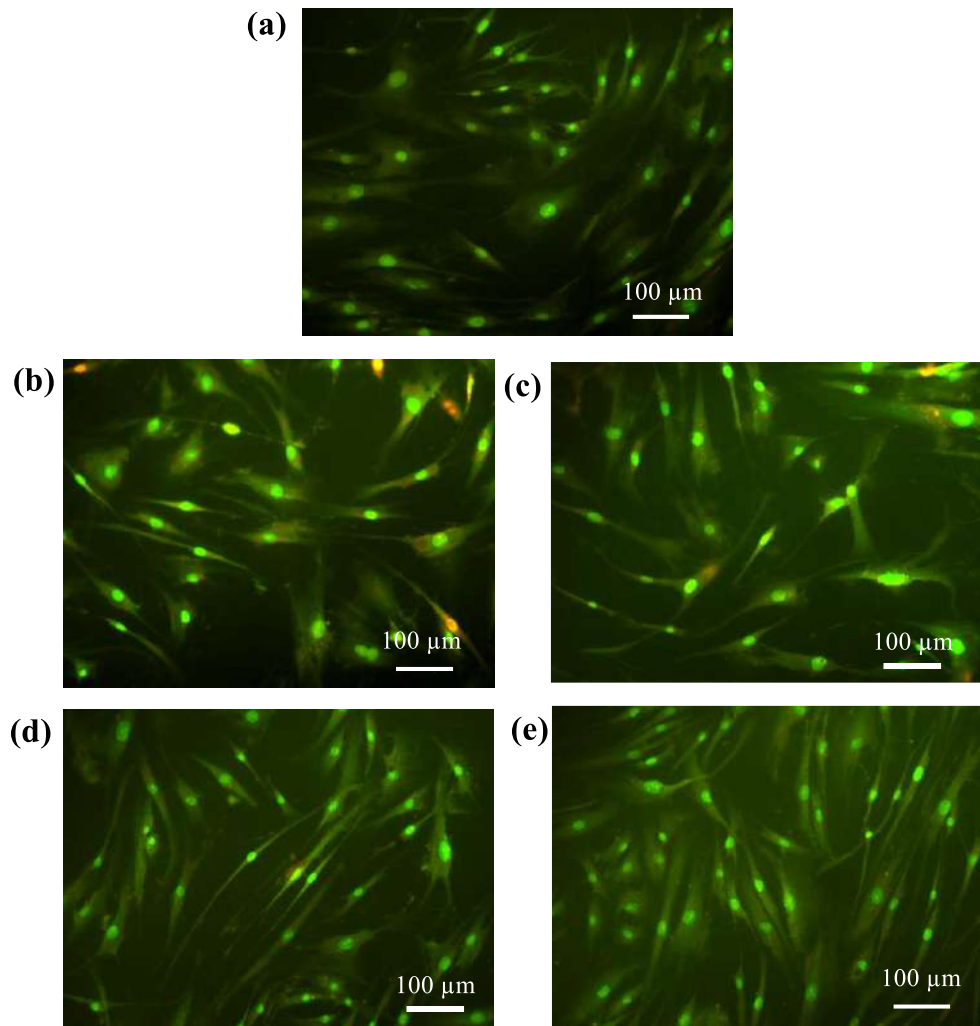
quản 6 tháng ở nhiệt độ phòng cho thấy CS–P123 có khả năng lưu trữ CUR cao nhất.

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

Trước khi sử dụng nanogel CS–Pluronic làm chất mang phân phối thuốc *in vivo*, phải tiến hành sàng lọc khả năng gây độc tế bào *in vitro*. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của các nanogel CS–Pluronic đối với khả năng tồn tại và tăng sinh của nguyên bào sợi ở người đã được đánh giá. Việc đo tính tương hợp sinh học của các loại nanogel CS–Pluronic đối với tế bào nguyên bào sợi (fibroblast) được thực hiện bằng phương pháp nhuộm SRB. Như thể hiện trong Phụ lục 37 và Hình 3.25, 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sau 48 giờ ủ. 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. Các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng chitosan có khả năng gây độc tế bào nguyên bào sợi. Theo báo cáo của Chen cùng cộng sự, nồng độ chitosan có thể gây độc tế bào nguyên bào sợi được phân lập từ mô sẹo ở người với nồng độ 10 mg/mL [230]. Nguyên nhân gây chết tế bào nguyên bào sợi là do chitosan giải phóng các cytokine chống viêm từ chitosan và gây ra sự chết tế bào theo chương trình [231]. Đối với các nanogel CS–Pluronic, nồng độ chitosan cao nhất ở CS–L61 là 35% và nồng độ nanogel thử nghiệm 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ thì không thể kết luận rằng nguyên nhân gây chết tế bào của các nanogel CS–Pluronic là do chitosan gây ra. Sự tương thích sinh học của các nanogel CS–Pluronic giảm dần theo giá trị HLB của Pluronic, nguyên nhân có thể là do Pluronic. Theo các báo cáo trước đây, Pluronic F127 và F68 không gây độc tế bào nguyên bào sợi ở nồng độ 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (tỷ lệ tế bào sống trên 90%) [232, 233]. Theo hiểu biết của chúng tôi, độc tính của Pluronic L61 và P123 chưa được nghiên cứu trước đây và độc tính quan sát được ở CS–L61 và CS–P123 phù hợp với các nghiên cứu về độc tính của các loại Pluronic có hàm lượng PPO cao. Nguyên nhân gây chết tế bào của các loại Pluronic có hàm lượng kỵ nước cao liên quan đến khả năng kết hợp của chúng trong màng tế bào làm thay đổi độ nhớt vi mô của nó và cũng làm giảm nồng độ ATP nội bào, từ đó gây chết tế bào [234, 235]. Dựa trên những kết quả này, chúng ta có thể hiểu sự suy giảm khả năng tương thích sinh học của CS–L61 có thể Pluronic L61 gây ra.



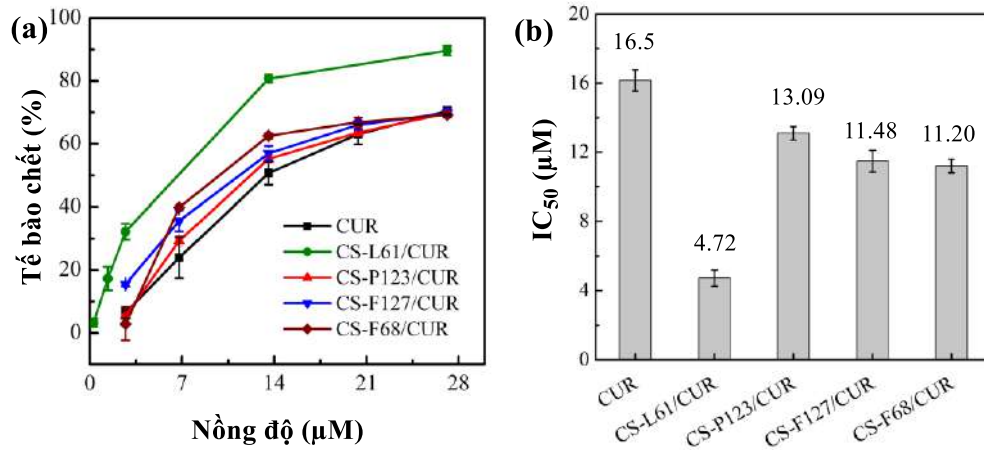
Hình 3. 25. Tỷ lệ sống sót của tế bào fibroblast sau 48 giờ ủ với các loại nanogel CS-Pluronic.



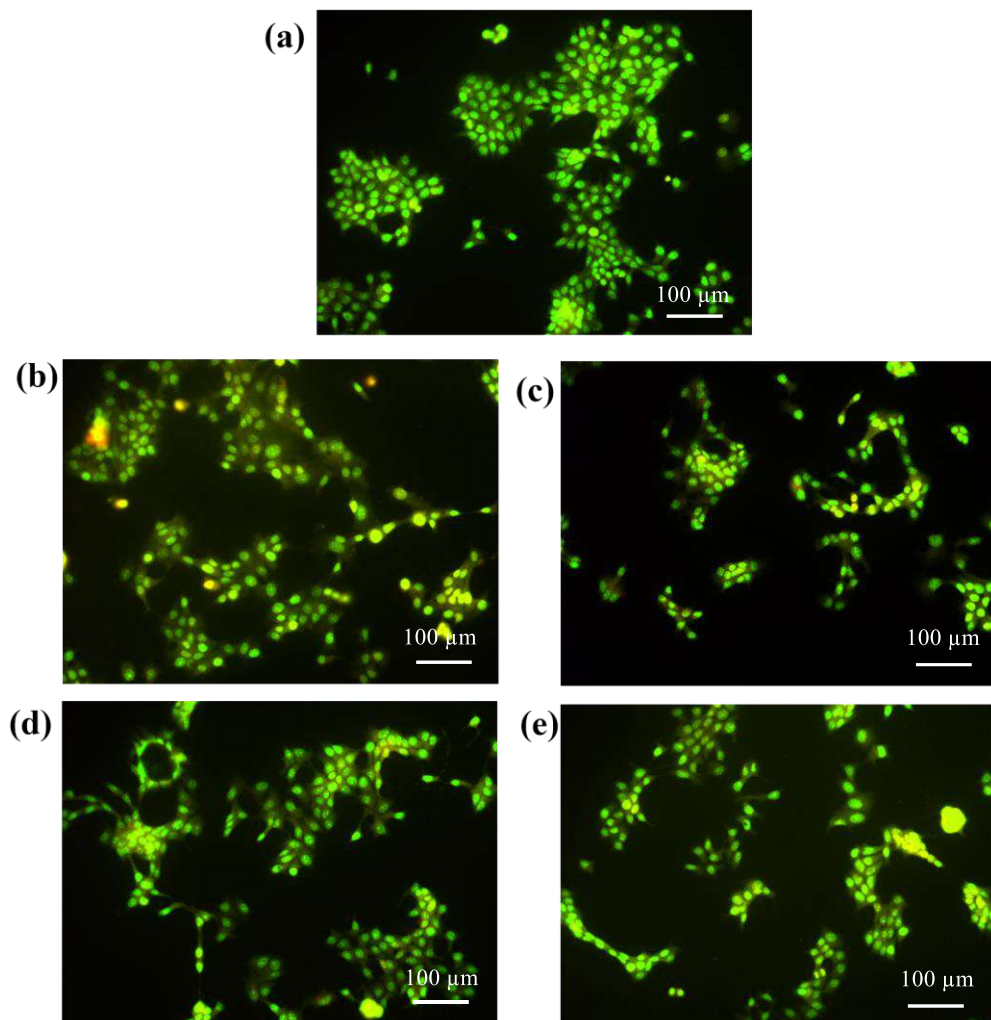
Hình 3. 26. Hình ảnh hiển vi huỳnh quang của tế bào nguyên bào sợi nhuộm màu kép AO/EB sau khi xử lý với các loại CS-Pluronic: đối chứng (a), CS-L61 (b), CS-P123 (c), CS-F127 (d) và CS-F68 (e) sau 48 giờ ở nồng độ 100 μg/mL.

Phân tích AO/EB được sử dụng để kiểm tra những thay đổi về hình thái hạt nhân trong các tế bào nguyên bào sợi được xử lý với các nanogel CS-Pluronic được thể hiện trong Hình 3.26 ở nồng độ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sau 48 giờ ủ. Các tế bào sống phát huỳnh quang màu xanh lục do AO khuếch tán vào bên trong nhân tế bào. Các tế bào chết hoặc có màng bị tổn thương sẽ hấp thụ EB chiếm ưu thế hơn AO và phát huỳnh quang màu đỏ/cam [211]. Đối với nanogel Cs-L61, hình ảnh cho thấy rõ hiện tượng rỉ màng, quá trình apoptosis muộn với màu đỏ/cam đã được quan sát thấy tại nhân tế bào do EB liên kết với DNA của tế bào chết. Đối với các mẫu tế bào được xử lý Cs-P123, Cs-F127 và Cs-F68, hiện tượng rỉ màng được quan sát thấy ở mức độ thấp hơn so với Cs-L61. Kết quả cho thấy, nuôi cấy tế bào nguyên bào sợi với cả các loại CS-Pluronic khác nhau có hình thái đồng nhất so với mẫu đối chứng, hình dạng kéo dài điển hình và giống hình trục chính. Do đó, có thể khẳng định các nanogel CS-P123, CS-F127 và CS-F68 có tính tương hợp sinh học hơn CS-L61.

Độc tính tế bào của các loại nanogel CS-Pluronic/CUR và CUR tự do trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 được thực hiện theo phương pháp SRB trong 48 giờ. Kết quả được trình bày ở Phụ lục 38, Phụ lục 39 và Hình 3.27 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). Dựa vào giá trị IC_{50} của các mẫu nanogel CS-Pluronic/CUR tính theo nồng độ CUR có trong nanogel so với giá trị IC_{50} của CUR tự do ta thấy các chất mang nanogel đã tăng cường độc tính của CUR. Theo một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng một số loại Pluronic có thể làm cạn kiệt adenosine triphosphate (ATP) trong tế bào, ức chế chức năng của P-glycoprotein (P-gp) làm đảo ngược tình trạng kháng đa thuốc của khối u, do đó làm tăng cường khả năng hấp thụ tế bào của nanogel CS-Pluronic [236, 237]. Ngoài ra, do đặc tính kết dính sinh học và tăng cường thâm thấu, chitosan đã nhận được sự quan tâm đáng kể như một hệ thống phân phối thuốc [238]. Kết quả cho thấy CS-L61/CUR có khả năng gây độc tế bào MCF-7 cao hơn CS-P123/CUR, CS-F127/CUR, CS-F68/CUR, điều này có thể là do bên cạnh tác dụng gây độc tế bào của CUR còn có tác dụng gây độc của Pluronic L61. Hong cùng cộng sự đã chứng minh rằng khi bổ sung các monomer Pluronic L61 vào nanogel đã tăng cường khả năng tiêu diệt tế bào ung thư của CUR trong nanogel [239]. Vì vậy, khi các hạt nanogel CS-L61/CUR hấp thụ vào tế bào, các nanogel trải qua quá trình phân rã và giải phóng Pluronic L61 gây chết tế bào.



Hình 3. 27. Kết quả gây độc tế bào (a) và giá trị IC₅₀ (b) tính theo CUR.



Hình 3. 28. Hình ảnh hiển vi huỳnh quang của tế bào MCF-7 nhuộm màu kép AO/EB sau khi xử lý với các loại CS-Pluronic/CUR: đối chứng (a), CS-L61/CUR (b), CS-P123/CUR (c), CS-F127/CUR (d) và CS-F68/CUR (e) sau 48 giờ ở nồng độ IC₅₀.

Phân tích AO/EB được sử dụng để kiểm tra khả năng sống chết của tế bào MCF-7 được xử lý với các nanogel CS-Pluronic/CUR ở nồng độ IC₅₀ sau 48 giờ ủ được trình bày trong Hình 3.28. Kết quả của nghiên cứu cho thấy các tế bào MCF-7 của mẫu đối chứng với có mật độ dày hơn so với các mẫu xử lý với CS-Pluronic/CUR. Ngoài ra, các tế bào của mẫu đối chứng có cấu trúc nhân nguyên vẹn trong khi các tế bào được xử lý với các nanogel CS-Pluronic/CUR có những thay đổi hình thái của dấu hiệu tự chết muộn (tế bào ung thư có hạt nhân huỳnh quang màu xanh lục đến nâu với chất nhuộm sắc cô đặc hoặc phân mảnh).

3.1.8. Tổng kết các kết quả đạt được của hệ phân phối thuốc nanogel CS-Pluronic mang CUR

Bảng 3. 16. So sánh kết quả đạt được của hệ phân phối thuốc CS-L61, CS-P123, CS-F127 và CS-F68.

Thông số	Tên mẫu			
	CS-L61/CUR	CS-P123/CUR	CS-F127/CUR	CS-F68/CUR
EE%	37.98 ± 3.75	84.12 ± 4.70	62.76 ± 3.06	28.82 ± 2.71
DL%	5.70 ± 0.65	12.62 ± 0.71	9.41 ± 0.46	4.32 ± 0.41
DLS (nm)	157 ± 5.6	77.6 ± 5.5	86.7 ± 3.9	147 ± 4.2
Thế zeta (mV)	99.6 ± 5.4	57.7 ± 3.7	49.2 ± 4.9	60.5 ± 5.1
DR%	88.35 ± 3.95	97.91 ± 1.99	96.86 ± 4.23	87.92 ± 8.92
Tương thích sinh học (% tế bào fibroblast sống sót)	74.78 ± 4.87	84.29 ± 0.83	86.20 ± 0.96	91.87 ± 1.44
IC ₅₀ (µM) đối với tế bào MCF-7	4.72 ± 0.46	13.09 ± 0.38	11.48 ± 0.63	11.20 ± 0.40

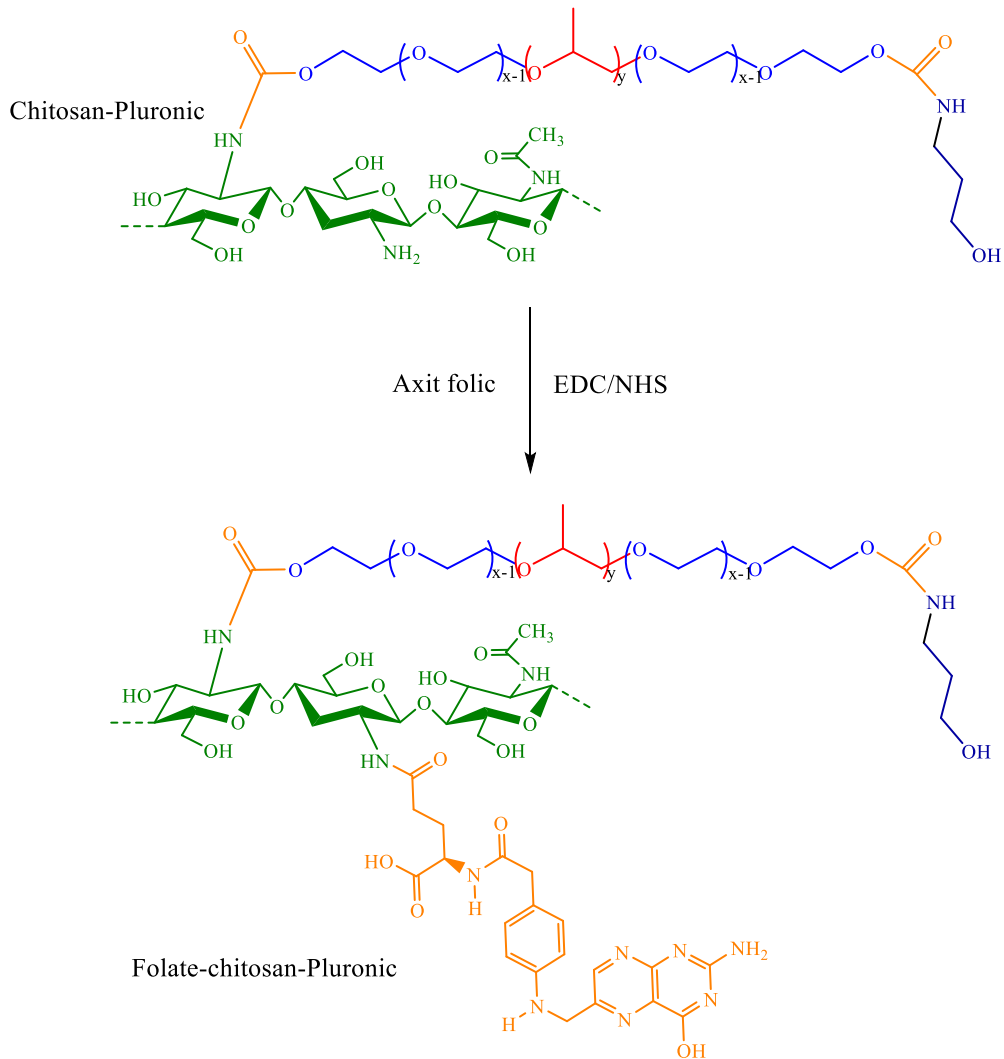
Các thông số cơ bản của các hệ phân phối thuốc CS-Pluronic được trình bày trong Bảng 3.16. Kết quả cho thấy CS-P123 có khả năng tải CUR cao nhất so với CS-L61, CS-F127 và CS-F68. Kích thước micelle dưới 200 nm thuận lợi cho quá trình phân phối thuốc. Thế zeta có độ dương điện từ 50 mV dễ dàng phân tán trong môi trường nước. Nanogel CS-P123 có khả năng duy trì lượng CUR cao nhất so với CS-L61, CS-F127 và CS-F68 sau 6 tháng bảo quản. Hầu hết các nanogel đều có khả năng tương thích sinh học (trên 70% tế bào fibroblast sống sót) nhưng CS-L61 tỏ ra tương thích sinh học yếu hơn CS-P123, CS-F127 và CS-F68. Khả năng gây độc tế bào ung thư MCF-7 của CS-L61/CUR mạnh hơn so với CS-P123, CS-F127 và CS-F68, điều này là do sự cộng hưởng của Pluronic L61. So sánh kết

quả đạt được của các hệ phân phối thuốc, CS-P123 được lựa chọn cho nghiên cứu liên hợp với các nhân hướng đích tiếp theo vì khả năng tải thuốc cao và duy trì ổn định trong thời gian bảo quản, đồng thời tương thích sinh học với tế bào fibroblast.

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

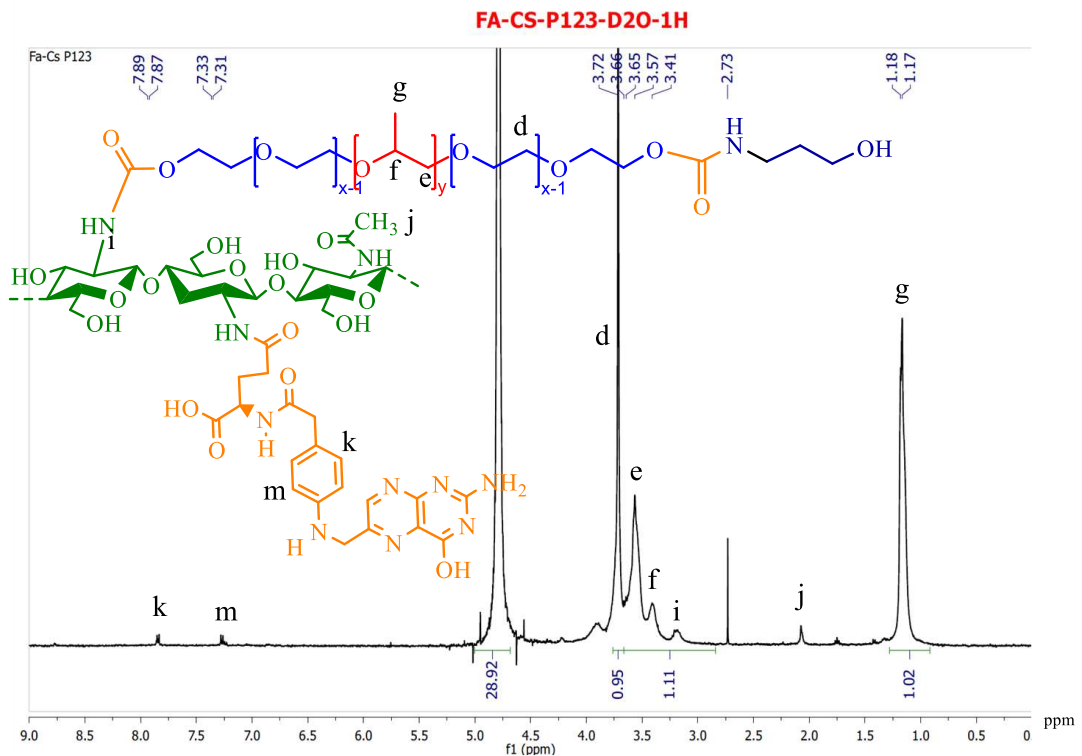
3.2.1. Tổng hợp FA-CS-P123

Các hạt nanogel CS-P123 vẫn còn một số nhóm amine ($-NH_2$) trên phân tử chitosan, vì vậy các phối tử acid folic (FA) có nhóm carboxyl ($-COOH$) dễ dàng liên kết với phân tử CS-P123 thông qua phản ứng amide hóa giữa hai nhóm chức này để tạo thành FA-CS-P123 (Hình 3.29).



Hình 3. 29. Sơ đồ tổng hợp FA-CS-P123.

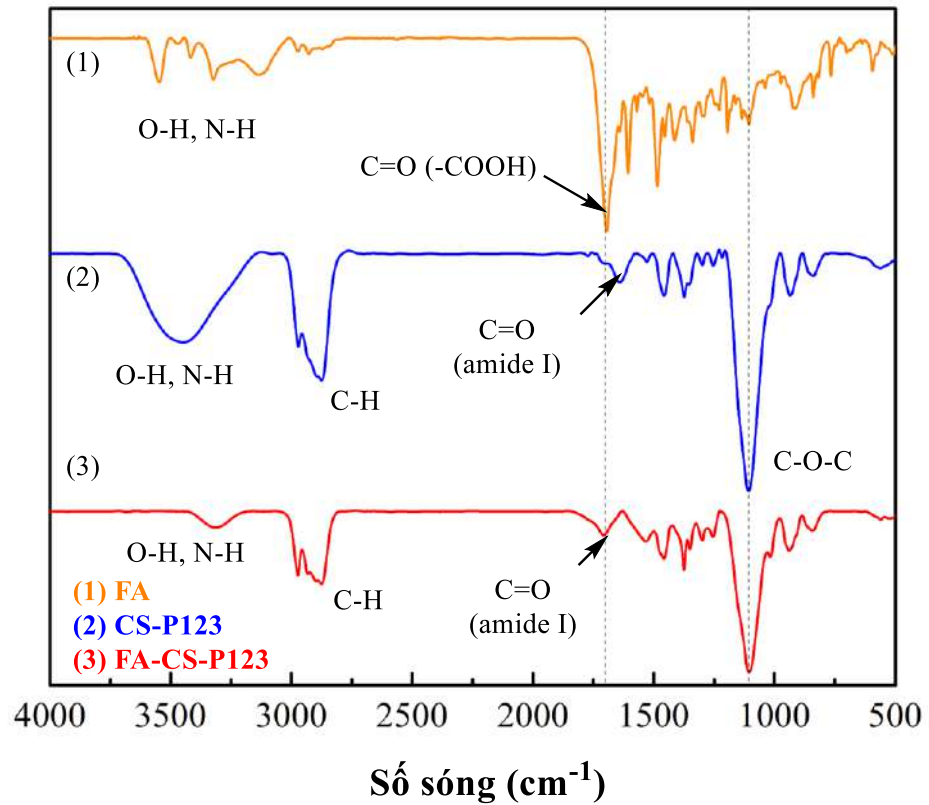
Kết quả phân tích $^1\text{H-NMR}$ của FA-CS-P123 được trình bày ở Hình 3.30. Tín hiệu peak ở $\delta \sim 2.04$ ppm (j) đặc trưng cho proton của nhóm methyl ($-\text{CH}_3$) và $\delta \sim 3.27$ ppm (i) đặc trưng cho proton nhóm ethylen ở vị trí C2 của CS. Các tín hiệu proton của P123 cũng được thể hiện ở $\delta \sim 3.72$ ppm (d) là đặc trưng của các proton trên nhóm $-\text{CH}_2-$ trong khối PEO, trong khi các peak cộng hưởng ở $\delta \sim 3.41$ ppm (f), $\delta \sim 3.65$ ppm (e) và $\delta \sim 1.17$ ppm (g) lần lượt là đặc trưng của các proton của các nhóm $\text{CH}-$, $-\text{CH}_2-$ và $-\text{CH}_3$ trên chuỗi PPO của phân tử P123. Hai tín hiệu peak ở $\delta \sim 7.88-7.87$ ppm (k) và $\delta \sim 7.33-7.31$ ppm (m) là các tín hiệu đặc trưng cho proton trong vòng thơm của phân tử FA.



Hình 3. 30. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của FA-CS-P123.

Kết quả phân tích phổ FT-IR được thể hiện trên Hình 3.31 và các dữ liệu peak được trình bày trong Bảng 3.17. Phổ FT-IR của FA cho thấy peak ở 1695 cm^{-1} đặc trưng cho dao động liên kết $\text{C}=\text{O}$ của nhóm carboxyl, peak ở 1605 cm^{-1} liên quan đến dạng uốn của dao động $-\text{NH}$. Phổ FT-IR của CS-P123 cho thấy peak ở 1641 cm^{-1} đặc trưng cho dao động của liên kết $\text{C}=\text{O}$ (amide I). Tuy nhiên phổ dao động đặc trưng cho liên kết $\text{C}=\text{O}$ (amide I) của FA-CS-P123 bị dịch chuyển về 1701 cm^{-1} do ảnh hưởng của dao động liên kết nhóm $-\text{COOH}$ còn lại trên phân tử FA, điều đó chứng tỏ FA đã liên hợp lên phân tử CS-P123. Sử dụng phổ UV – Vis để xác định hàm lượng FA trong các nanogel cho thấy các mẫu FA và nanogel liên

hợp với FA hấp thu ở bước sóng 364.5 nm trong hỗn hợp dung môi DMSO: H₂O (1:1 v/v) (Phụ lục 40). Kết quả tính toán chỉ ra rằng hàm lượng FA liên hợp chiếm 0.31% trong FA-CS-P123.



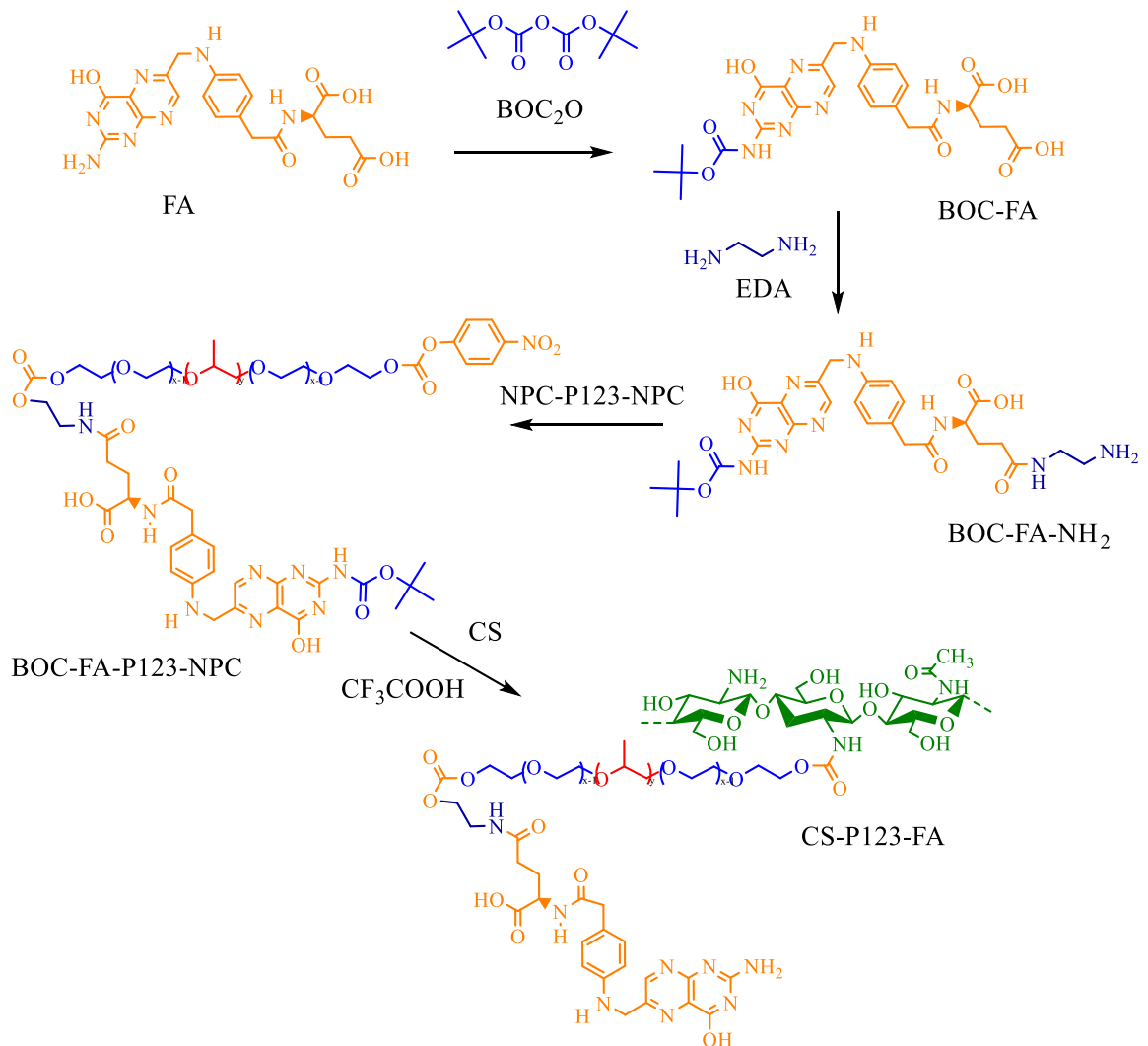
Hình 3. 31. Phổ FT-IR của FA (1), CS-P123 (2) và FA-CS-P123 (3).

Bảng 3. 17. Kết quả phân tích phổ FT-IR của FA, CS-P123, FA-CS-P123.

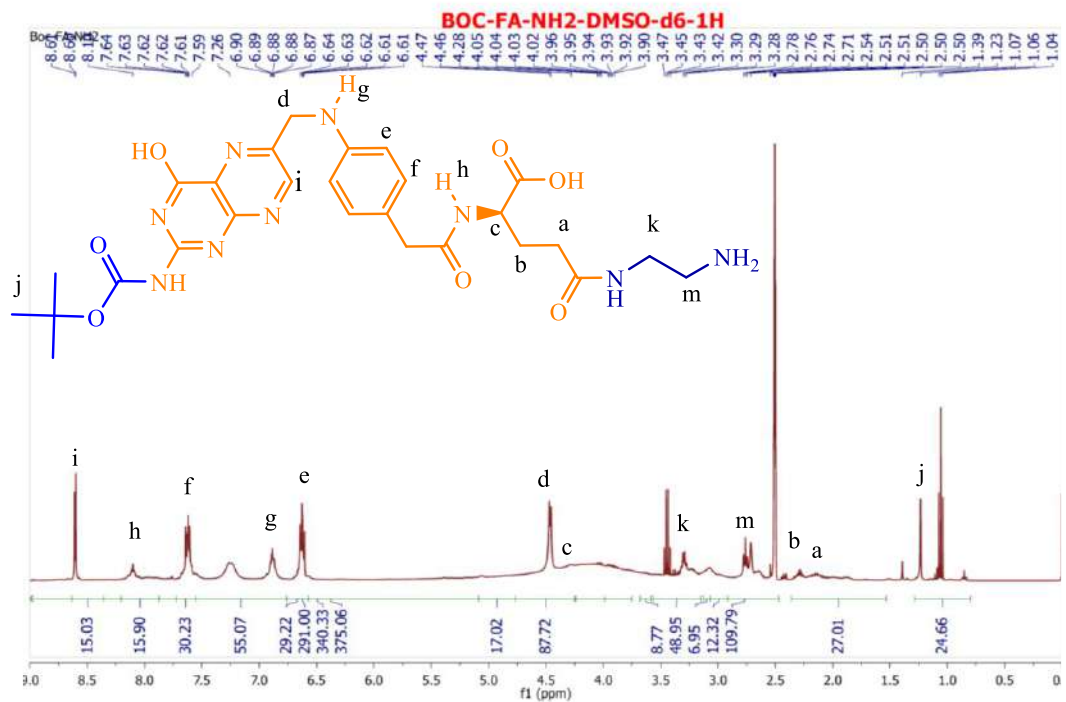
Nhóm chức	Số sóng (cm ⁻¹)		
	FA	CS-P123	FA-CS-P123
O-H, N-H	3400-3600	3449	3313
-C-H	2800-2900	2970-2873	2875-2972
C=O (COOH)	1695	-	1707
-NH	1605	-	1707
Amit I (C=O)	-	1641	-
Amit II (N-H)	-	1527	1533
-C-O-C-	-	1107	1104

3.2.2. Tổng hợp CS-P123-FA

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đưa ra phương án thiết kế liên hợp phối tử FA lên phân tử P123 trước khi liên hợp với CS để tạo thành CS-P123-FA nhằm tăng cường mật độ phối tử FA trên bề mặt nanogel CS-P123. Mục đích của nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của phối tử FA đến khả năng nội hóa tế bào ung thư vú MCF-7 theo hai cách thiết kế khác nhau là FA-CS-P123 và CS-P123-FA. Để liên hợp phối tử FA lên phân tử NPC-P123-NPC, cần bảo vệ nhóm chức $-NH_2$ trên phối tử FA và biến tính nhóm $-COOH$ thành nhóm $-NH_2$ để liên hợp với phân tử NPC-P123-NPC tạo thành BOC-FA-P123-NPC. Các hạt nanogel CS-P123-FA được hình thành thông qua liên kết amide ($-NHCO-$) giữa phân tử CS và BOC-FA-P123-NPC sau khi loại bỏ BOC bằng TFA (Hình 3.32).



Hình 3. 32. Sơ đồ tổng hợp CS-P123-FA.

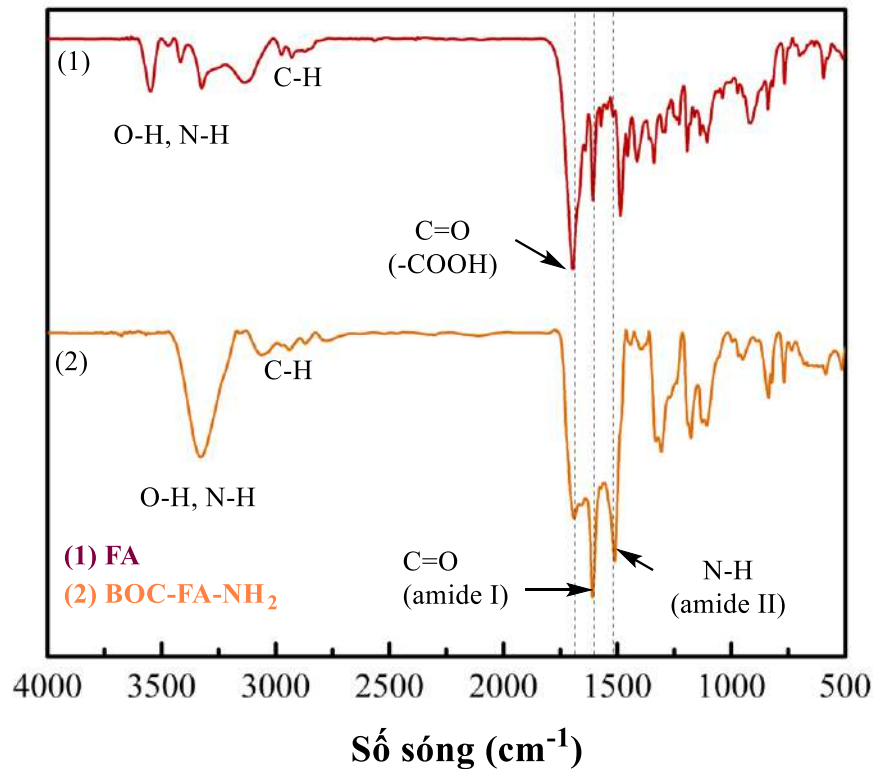


Hình 3. 33. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của BOC-FA-NH₂.

Bảng 3. 18. Kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$ của FA và BOC-FA-NH₂.

Vị trí	H của nhóm	Độ dịch chuyển hóa học (δ , ppm)	
		FA	BOC-FA-NH ₂
a	-CH ₂ - của FA	1.91-2.03	2.14-2.26
b	-CH ₂ - của FA	2.29-2.33	2.40-2.43
c	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---C---} \\ \end{array}$ của FA	4.30-4.36	4.26-4.28
d	-CH ₂ - của FA	4.47-4.49	4.45-4.46
e	-CH= của FA	6.63-6.65	6.60-6.88
f	-CH= của FA	7.63-7.66	7.60-7.61
g	$\begin{array}{c} \text{---N-H} \\ \end{array}$ của FA	6.91-6.94	6.86-6.88
h	$\begin{array}{c} \text{---N-H} \\ \end{array}$ của FA	8.11-8.13	8.09
i	-CH= của FA	8.64	8.59
j	-CH ₃ của tert-butyl	—	1.38
m	-CH ₂ - của EDA	—	2.74-2.77
k	-CH ₂ - của EDA	—	3.27-3.30

Kết quả phân tích $^1\text{H-NMR}$ của BOC-FA-NH_2 được thể hiện trong Hình 3.33 và Bảng 3.18 trong việc so sánh với FA tinh khiết (Phụ lục 42). Ngoài các tín hiệu peak đặc trưng cho các proton của FA tinh khiết, tín hiệu peak quan sát được ở $\delta \sim 1.38$ ppm (j) tương ứng với proton của nhóm tert-butyl (BOC) và các peak ở $\delta \sim 3.27-3.30$ ppm (k) và $\delta \sim 2.74-2.77$ ppm (m) đặc trưng bởi các proton nhóm $-\text{CH}_2-$ của EDA. Kết quả này phù hợp với báo cáo của Liu [240].



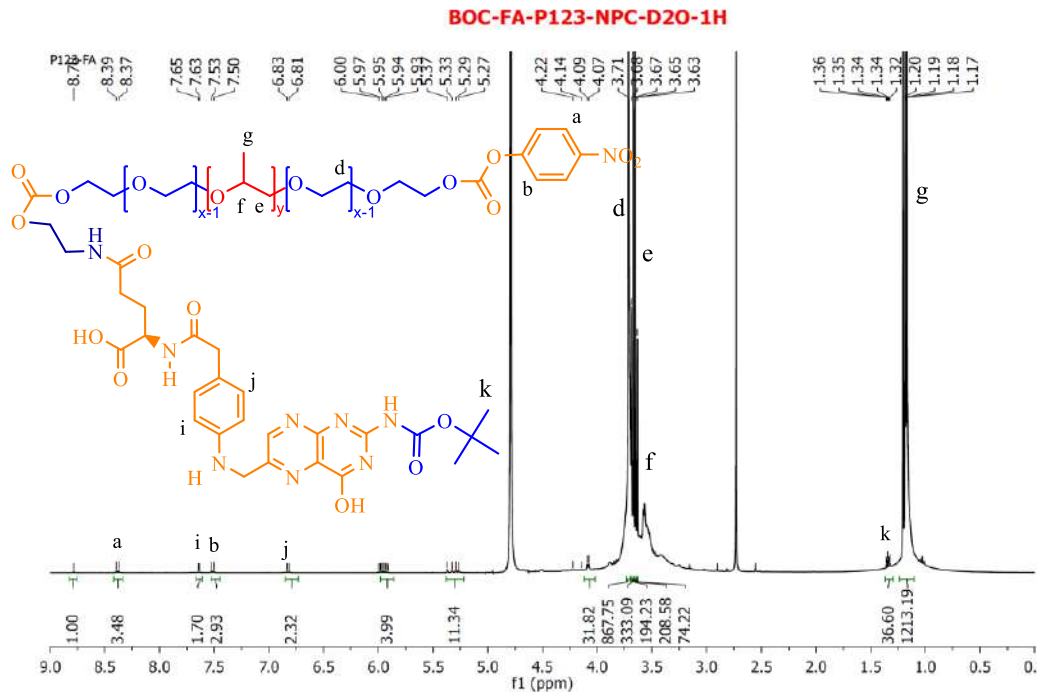
Hình 3. 34. Phổ FT-IR của FA (1) và BOC-FA-NH_2 .

Bảng 3. 19. Kết quả phổ FT-IR của FA và BOC-FA-NH_2 .

Nhóm chức	Số sóng (cm^{-1})	
	FA	BOC-FA-NH_2
O-H, N-H	3400-3600	3326
C-H	2800-2900	2927-2839
C=O (-COOH)	1695	1688
NH-	1605	1607
C = O (amide I)	-	1657
N-H (amide II)	-	1560

Kết quả phân tích FT-IR của FA và BOC-FA-NH₂ được trình bày trong Hình 3.34 và Bảng 3.19. Đối với FA tinh khiết, đỉnh dao động kéo dài của C=O (nhóm -COOH) xuất hiện ở 1695 cm⁻¹, trong khi dải ở 1605 cm⁻¹ liên quan đến dạng uốn của dao động -NH. Tuy nhiên đối với BOC-FA-NH₂, xuất hiện tín hiệu peak đặc trưng cho dao động liên kết C=O (amide I) ở 1657 cm⁻¹ và tín hiệu peak đặc trưng cho dao động liên kết N-H (amide II) ở 1560 cm⁻¹, đồng thời tín hiệu peak đặc trưng cho liên kết C=O (nhóm -COOH) bị suy giảm và dịch chuyển về 1688 cm⁻¹, điều đó chứng tỏ nhóm -COOH ở vị trí γ đã tham gia phản ứng với EDA chỉ còn lại nhóm -COOH ở vị trí α của phân tử FA.

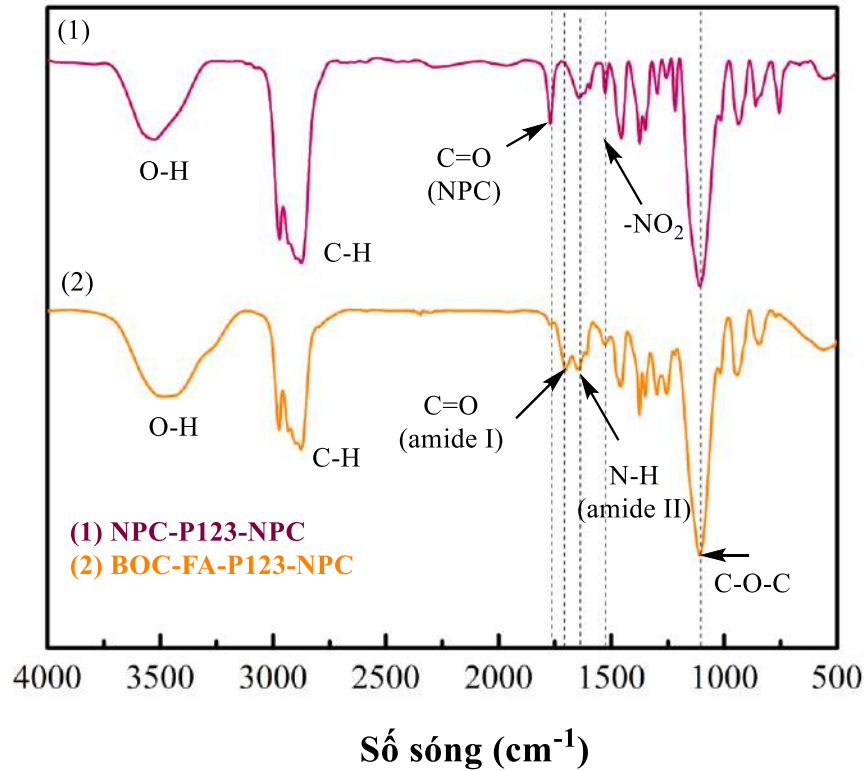
Kết quả phân tích Phổ ¹H-NMR của BOC-FA-P123-NPC được thể hiện trên Hình 3.35 cho thấy BOC-FA-NH₂ đã liên hợp thành công lên NPC-P123-NPC. Các tín hiệu peak ở δ ~ 3.71 ppm (d), δ ~ 3.63-3.66 ppm (e), δ ~ 3.5 ppm (f) và δ ~ 1.17-1.20 ppm (g) đặc trưng cho proton của phân tử P123. Ngoài các tín hiệu peak ở δ ~ 8.37-8.39 ppm (a) và δ ~ 7.50-7.53 ppm (b) đặc trưng cho proton của vòng thơm nhóm -NPC, các tín hiệu mới xuất hiện ở δ ~ 7.63-7.65 ppm (i) và δ ~ 6.81-6.83 ppm (j) đặc trưng cho proton của vòng thơm trên phân tử FA, tín hiệu peak ở δ ~ 1.32-1.36 ppm (k) đặc trưng cho proton nhóm tert-butyl (BOC).



Hình 3. 35. Phổ ¹H-NMR của BOC-FA-P123-NPC.

Kết quả phân tích phổ FT-IR của BOC-FA-P123-NPC khi so sánh với NPC-P123-NPC được thể hiện trên Hình 3.36 và dữ liệu được trình bày trong

Bảng 3.20. Kết quả cho thấy sự xuất hiện tín hiệu peak đặc trưng cho dao động của liên kết C=O (amide I) ở 1703 cm^{-1} và N-H (amide II) ở 1647 cm^{-1} trên phân tử BOC-FA-P123-NPC chứng tỏ BOC-FA-NH₂ đã thay thế một phần nhóm -NPC của NPC-P123-NPC để hình thành liên kết amide.

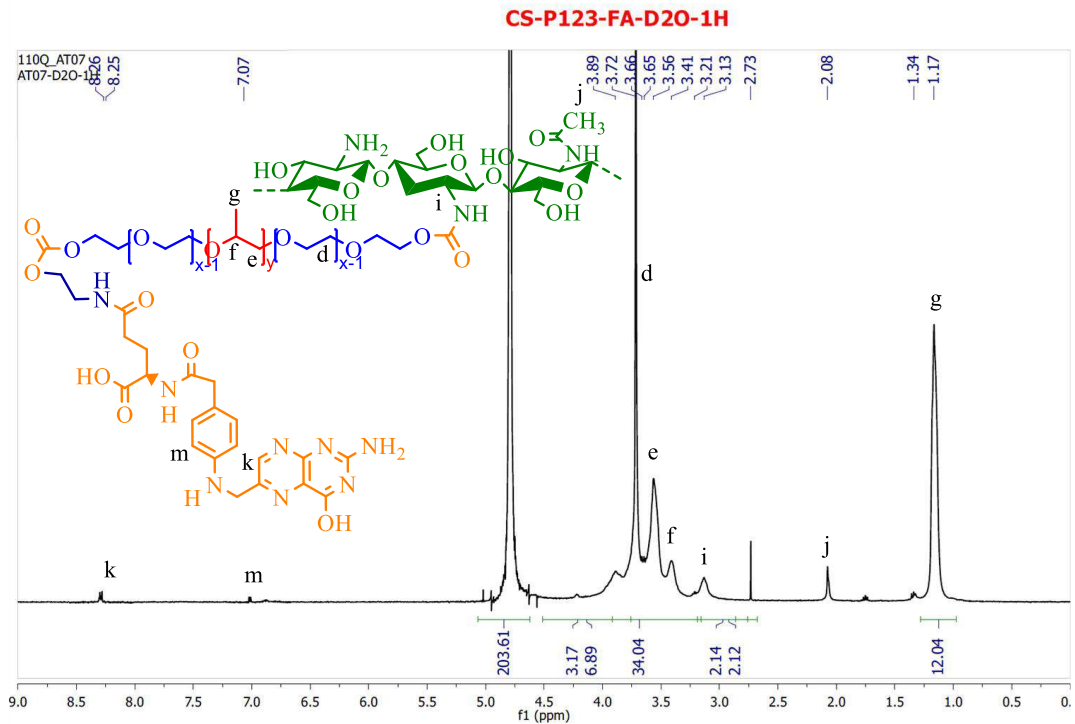


Hình 3. 36. Phổ FT-IR của NPC-P123-NPC (1) và BOC-FA-P123-NPC (2).

Bảng 3. 20. Kết quả phân tích phổ FT-IT của NPC-P123-NPC và BOC-FA-P123-NPC.

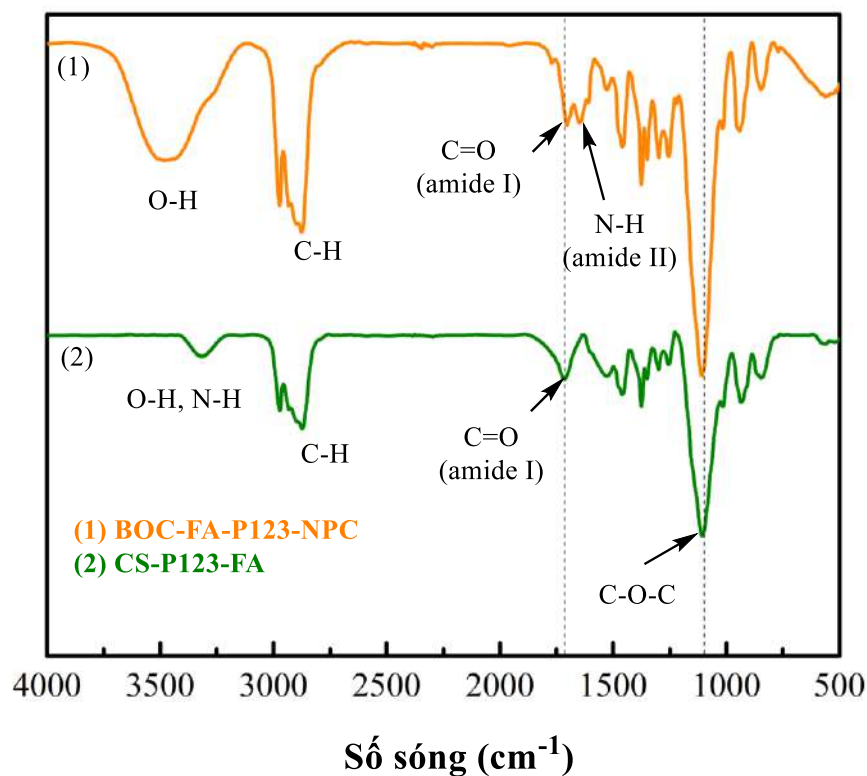
Nhóm chức	Số sóng (cm^{-1})	
	NPC-P123-NPC	BOC-FA-P123-NPC
OH,	3533	3470
-C-H (-CH ₂ và -CH ₃)	2873-2971	2874-2973
COO-NPC	1769	1770
C=O (amit I)	-	1703
N-H (amit II)	-	1647
-NO ₂	1526	1527
Tert-butyl		1254-1298
-C-O-C-	1107	1107

Kết quả phân tích $^1\text{H-NMR}$ của CS-P123-FA được trình bày ở Hình 3.37. Tín hiệu peak ở $\delta \sim 2.08$ ppm (j) đặc trưng cho proton của nhóm methyl ($-\text{CH}_3$) và $\delta \sim 3.13$ ppm (i) đặc trưng cho proton nhóm ethylen ở vị trí C2 của CS. Các tín hiệu proton của P123 cũng được thể hiện ở $\delta \sim 3.72$ ppm (d) là đặc trưng của các proton trên nhóm $-\text{CH}_2-$ trong khối PEO, trong khi các peak cộng hưởng ở $\delta \sim 3.41-3.42$ ppm (f), $\delta \sim 3.56-3.66$ ppm (e) và $\delta \sim 1.17$ ppm (g) lần lượt là đặc trưng của các proton của các nhóm $-\text{CH}-$, $-\text{CH}_2-$ và $-\text{CH}_3$ trên chuỗi PPO của phân tử P123. Hai tín hiệu peak ở $\delta \sim 8.25-8.26$ ppm (k) và $\delta \sim 7.07$ ppm (m) là các tín hiệu đặc trưng cho cho proton trong vòng thơm của phân tử FA.



Hình 3. 37. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của CS-P123-FA.

Kết quả phân tích phổ FT-IR của CS-P123-FA so sánh với BOC-FA-P123-NPC được thể hiện trên Hình 3.38 và các dữ liệu peak được trình bày trong Bảng 3.21. Phổ FT-IR của CS-P123-FA cho thấy peak ở 1715 cm^{-1} đặc trưng cho dao động của liên kết $\text{C}=\text{O}$ (amide I). Tín hiệu peak ở 1105 cm^{-1} đặc trưng cho dao động liên kết $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ điển hình của phân tử P123. Sử dụng phổ UV - Vis để xác định hàm lượng FA trong các nanogel cho thấy các mẫu FA và nanogel liên hợp với FA hấp thụ ở bước sóng 364.5 nm trong hỗn hợp dung môi DMSO: H_2O (1:1 v/v) (Phụ lục 40). Kết quả tính toán chỉ ra rằng hàm lượng FA liên hợp chiếm 0.71% trong CS-P123-FA.



Hình 3. 38. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của BOC-FA-P123-NPC (1) và CS-P123-FA (2).

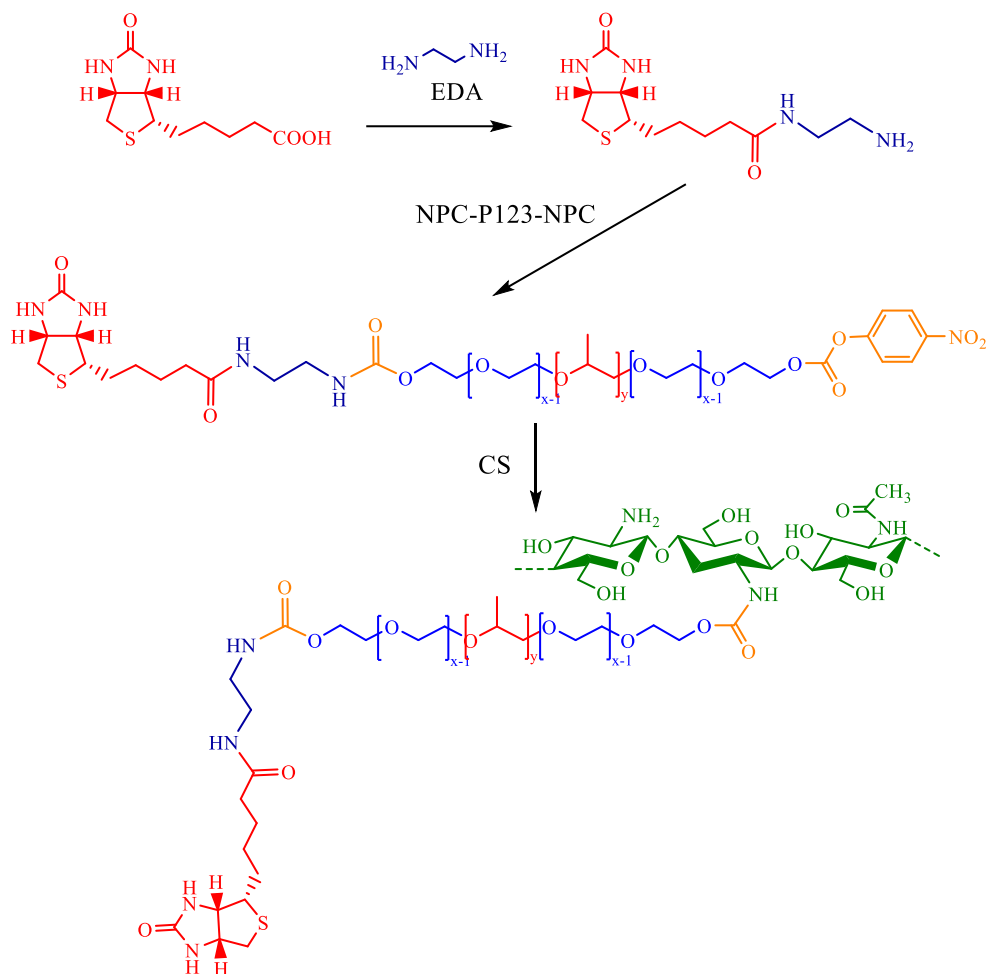
Bảng 3. 21. Kết quả phân tích phổ FT-IR của BOC-FA-P123-NPC và CS-P123-FA.

Nhóm chức	Số sóng (cm^{-1})	
	BOC-FA-P123-NPC	CS-P123-FA
O-H, N-H	3470	3315
C-H	2874-2973	2872-2972
C=O (amit I)	1703	1715
N-H (amit II)	1647	-
C-O-C	1107	1105

3.3.3. Tổng hợp CS-P123-BIO

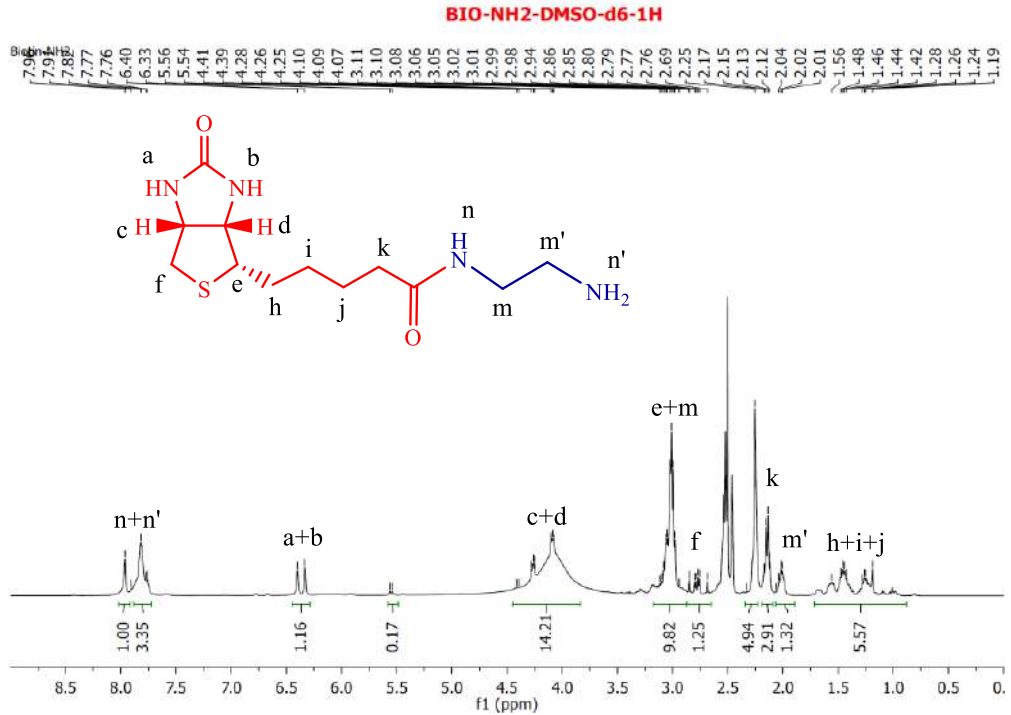
Trong nghiên cứu hệ phân phối thuốc CS-P123 với tác nhân hướng đích FA, thiết kế CS-P123-FA đạt được hàm lượng FA cao hơn so với thiết kế FA-CS-P123. Sự khác nhau về hàm lượng FA trong nanogel trong hai thiết kế này có thể là do phân tử CS-P123 có cấu trúc phức tạp, các nhóm chức $-\text{NH}_2$ còn lại của phân tử CS ít và bị che chắn bởi phân tử P123 làm hạn chế khả năng liên hợp

phân tử FA lên phân tử CS-P123. Vì vậy, trong nghiên cứu này, BIO được sử dụng như là một tác nhân hướng đích thay thế cho FA với thiết kế CS-P123-BIO nhằm phát huy tác dụng của BIO. Trước hết, BIO được liên hợp với EDA để tạo ra BIO-NH₂, là tác nhân thay thế nhóm NPC trên phân tử NPC-P123-NPC để tạo thành NPC-P123-BIO. Các hạt nanogel CS-P123-BIO được hình thành thông qua liên kết amide (-NHCO-) giữa phân tử CS và NPC-P123-BIO (Hình 3.39).



Hình 3. 39. Sơ đồ tổng hợp CS-P123-BIO.

Kết quả phân tích ¹H-NMR của BIO và BIO-NH₂ được trình bày trong Phụ lục 42, Hình 3.40 và Bảng 3.22. Từ kết quả cho thấy tín hiệu peak ở δ ~ 12 ppm đặc trưng cho proton của nhóm acid (-COOH) của phân tử BIO bị biến mất ở BIO-NH₂, đồng thời xuất hiện hai tín hiệu peak δ ~ 7.82-7.98 ppm (n) và δ ~ 7.76-7.77 ppm (n) đặc trưng cho proton N-H (amide II) và nhóm -NH₂ (amine). Điều này cho thấy có sự chuyển hóa từ BIO thành BIO-NH₂ và kết quả này cũng hợp với báo cáo của Jiang [241].



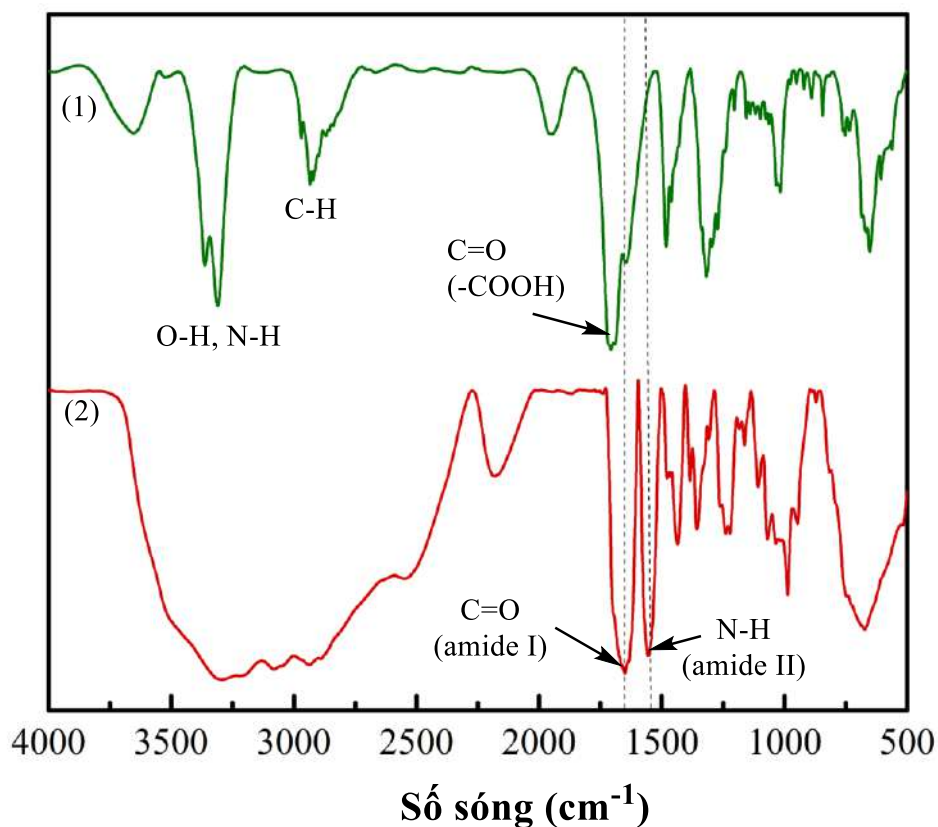
Hình 3. 40. Phổ ¹H-NMR của BIO-NH₂.

Bảng 3. 22. Kết quả phân tích phổ ¹H-NMR của BIO và BIO-NH₂.

Vị trí	H của nhóm	Độ dịch chuyển hóa học (δ, ppm)	
		BIO	BIO-NH ₂
	-COOH của acid	11.98	–
n + n'	N-H	–	7.76-7.96
a + b	N-H	6.35-6.43	6.33-6.40
c + d	C-H	4.11-4.32	4.07-4.26
h+i+j	C-H	1.28-1.66	0.98-1.68

Kết quả phân tích phổ FT-IR của BIO và BIO-NH₂ được thể hiện trong Hình 3.40 và dữ liệu được trình bày trong Bảng 3.23. Phổ FT-IR của BIO cho thấy tín hiệu peak ở 1707 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động của liên kết C=O bất đối xứng của nhóm carboxylate (-COOH), trong khi dải ở 1646 cm⁻¹ là do dao động kéo dài liên kết C=O của nhóm ureido [242]. Tuy nhiên, đối với BIO-NH₂, tín hiệu peak đặc trưng cho dao động của liên kết C=O (-COOH) bị biến mất và tín hiệu peak ở 1664 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động của liên kết C=O (amide I) được tăng cường mạnh đồng thời xuất hiện tín hiệu peak ở 1559 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động của liên

kết N-H (amide II). Kết quả này có thể khẳng định BIO đã chuyển hóa thành BIO-NH₂.



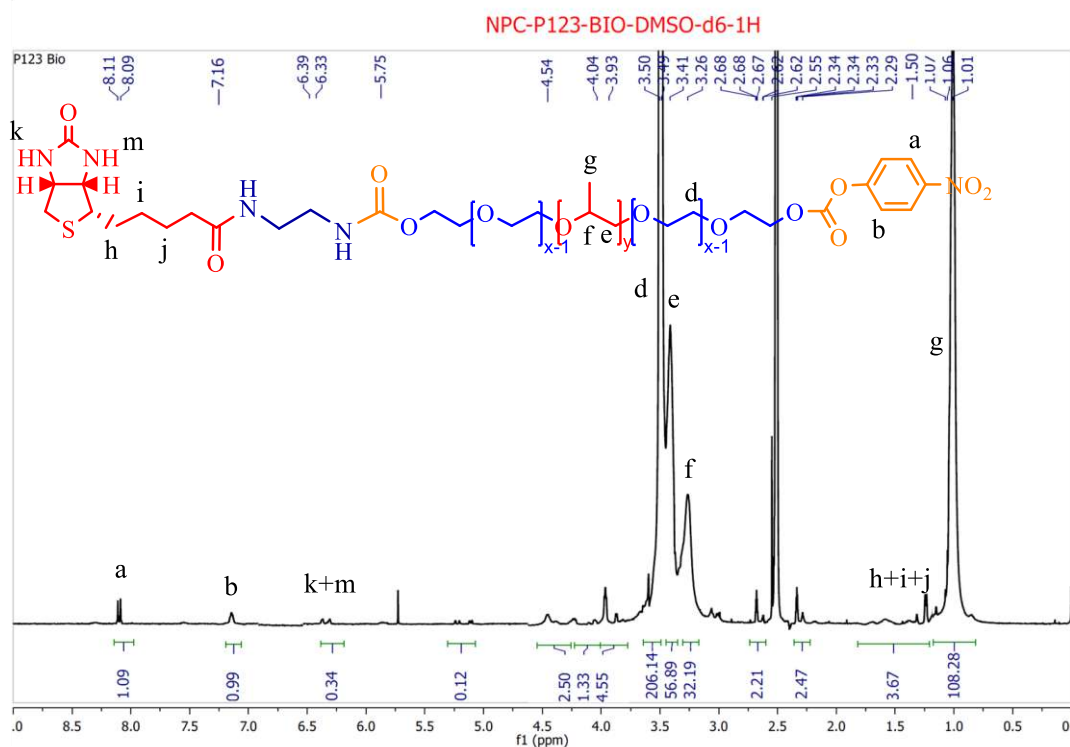
Hình 3. 41. Phổ FT-IR của BIO (1) và BIO-NH₂.

Bảng 3. 23. Kết quả phân tích phổ FT-IR của BIO và BIO-NH₂.

Nhóm chức	Số sóng (cm ⁻¹)	
	BIO	BIO-NH ₂
O-H, N-H	3310-3655	3220- 3296
C-H	2868- 3143	2890- 3079
C=O của nhóm -COOH	1707	—
C=O của nhóm ureido	1646	—
C=O (amide I)	—	1664
N-H (amide II)	—	1559

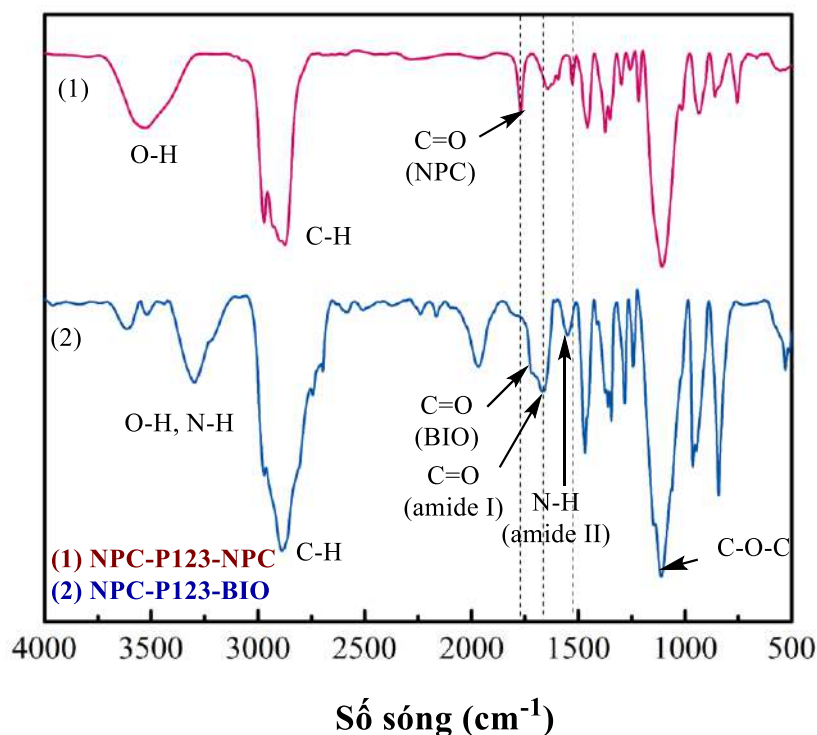
Kết quả phân tích phổ ¹H-NMR của NPC-P123-BIO được trình bày trong Hình 3.42 với các tín hiệu peak ở δ ~ 8.09-8.11 ppm (a) và 7.16 ppm (b) đặc trưng

cho proton của vòng thiom NPC. Tín hiệu peak ở $\delta \sim 6.33-6.39$ ppm (k + m) đặc trưng cho proton N–H của BIO. Ngoài ra, các tín hiệu proton của P123 cũng được thể hiện ở $\delta \sim 3.49-3.50$ ppm (d) là đặc trưng của các proton trên nhóm $-\text{CH}_2-$ trong khối PEO, trong khi các peak cộng hưởng ở $\delta \sim 3.41$ ppm (e), $\delta \sim 3.26$ ppm (f) và $\delta \sim 1.01-1.07$ ppm (g) lần lượt là đặc trưng của các proton của các nhóm $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}-$ và $-\text{CH}_3$ trên chuỗi PPO của phân tử P123.



Hình 3. 42. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của NPC–P123–BIO.

Kết quả phân tích phổ FT–IR của NPC–P123–BIO so sánh với NPC–P123–NPC thể hiện trên Hình 3.43 và dữ liệu trình bày trong Bảng 3.24 cho thấy tín hiệu peak ở 1769 cm^{-1} đặc trưng cho dao động của liên kết $\text{C}=\text{O}$ của nhóm ester cacbonate (NPC), đồng thời xuất hiện tín hiệu peak ở 1750 cm^{-1} đặc trưng cho dao động của liên kết $\text{C}=\text{O}$ của nhóm ureido (BIO), tín hiệu peak ở 1667 cm^{-1} đặc trưng cho dao động của liên kết $\text{C}=\text{O}$ (amide I) và tín hiệu peak ở 1548 cm^{-1} đặc trưng cho dao động liên kết N-H (amide II). Kết quả này chứng tỏ BIO– NH_2 đã thay thế thành công một phần nhóm NPC trên phân tử NPC–P123–NPC để hình thành NPC–P123–BIO.



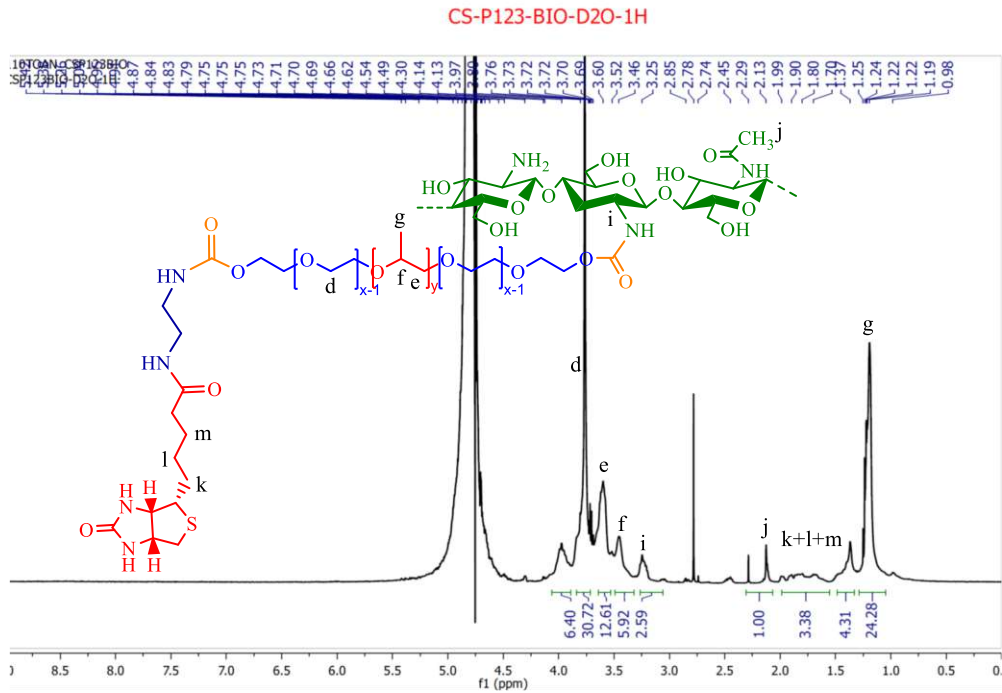
Hình 3. 43. Phổ FT-IR của NPC-P123-NPC và NPC-P123-BIO.

Bảng 3. 24. Kết quả phân tích phổ FT-IR của NPC-P123-NPC và NPC-P123-BIO.

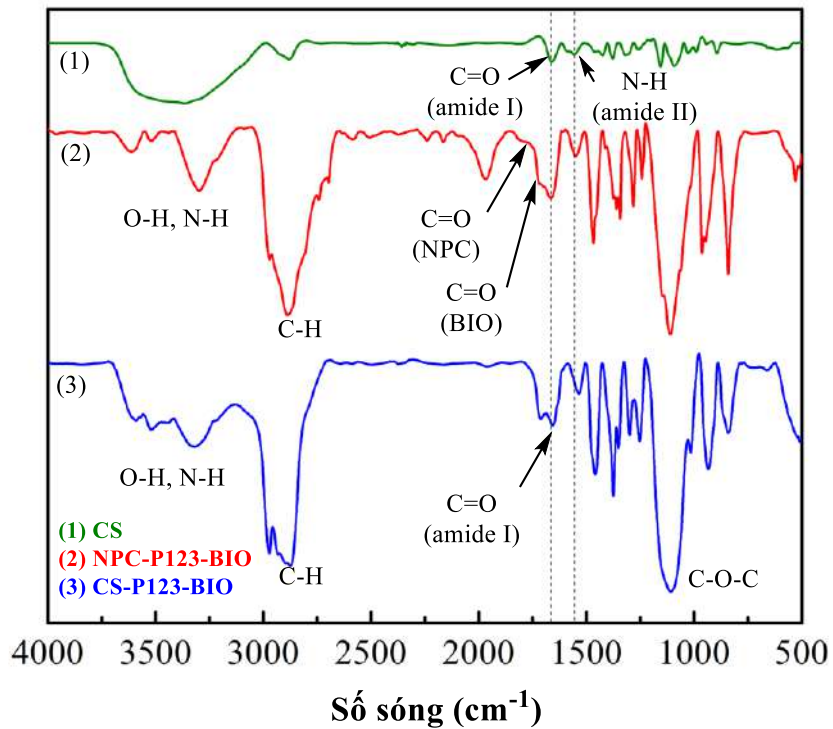
Nhóm chức	Số sóng (cm ⁻¹)	
	NPC-P123-NPC	NPC-P123-BIO
OH, N-H	3533	3296-3612
-C-H (-CH ₂ và -CH ₃)	2873.-2971	2886-2971
COO-NPC	1769	1769
C=O của nhóm ureido	-	1750
C=O (amide I)	-	1667
N-H (amide II)	-	1549
-C-O-C-	1107	1111

Kết quả phân tích phổ ¹H-NMR của CS-P123-BIO được thể hiện trên Hình 3.44 cho thấy các tín hiệu peak đặc trưng cho proton methyl (-CH₃) và methylene ở vị trí C2 của CS ở δ ~ 2.13 ppm (j) và δ ~ 3.26 ppm (i). Các tín hiệu peak đặc trưng cho proton của P123 ở δ ~ 3.70-3.76 ppm (d), δ ~ 3.52-3.69 ppm (e), δ ~ 3.46 ppm (f) và δ ~ 1.19-1.25 ppm (g). Sự xuất hiện các tín hiệu peak trong khoảng 1.37 – 1.99 ppm và 2.45 ppm đặc trưng cho proton methylene, tín hiệu peak ở 4.3 ppm đặc

trung cho proton methin của BIO. Các tín hiệu đặc trưng của BIO rất yếu do hàm lượng thấp của nó trong polymer đánh dấu BIO [243].



Hình 3. 44. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của CS-P123-BIO.



Hình 3. 45. Phổ FT-IR của CS (1), NPC-P123-BIO (2) và CS-P123-BIO(3).

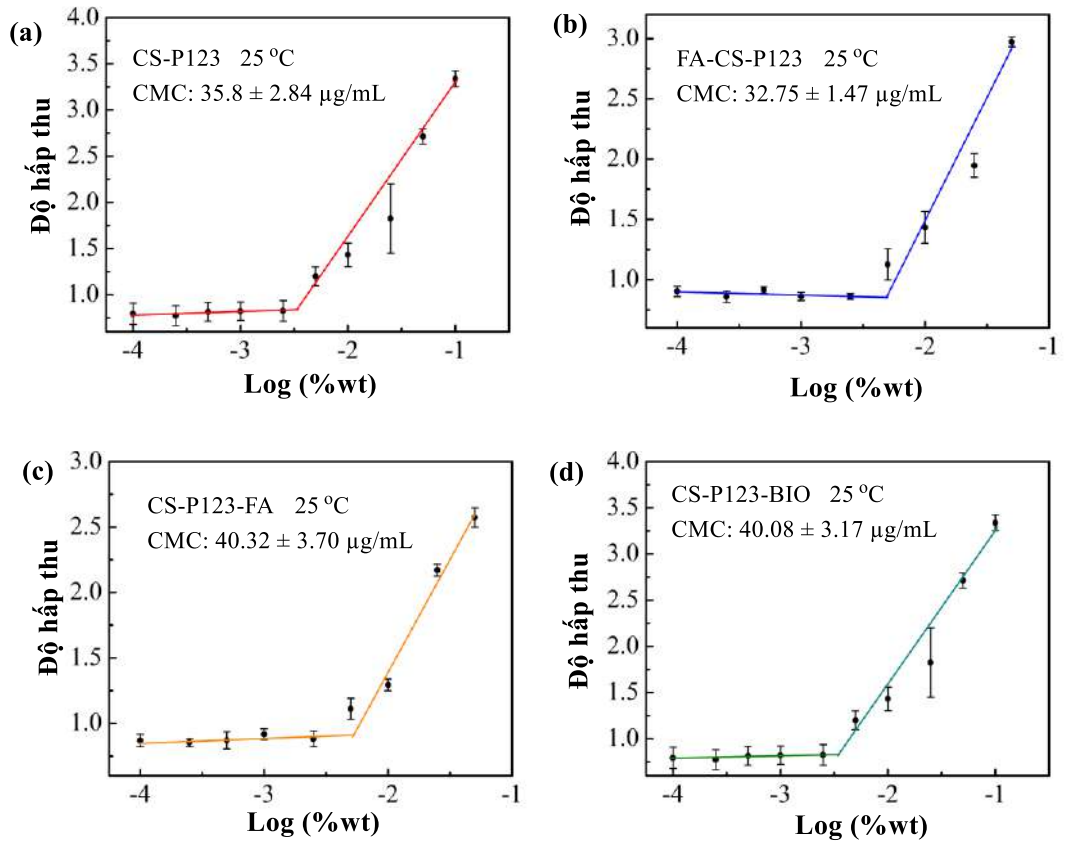
Kết quả phân tích phổ FT-IR của CS-P123-BIO so với CS và NPC-P123-BIO được thể hiện trên Hình 3.45 và dữ liệu được trình bày trong Bảng 3. 25. Kết quả cho thấy các peak dao động của liên kết C=O (amide I) và N-H (amide II) ở 1657 cm^{-1} và 1534 cm^{-1} . Tín hiệu đặc trưng cho dao động liên kết C=O của nhóm ureido (BIO) vẫn còn tồn tại ở 1710 cm^{-1} . So với CS và NPC-P123-BIO, trong phổ FT-IR của CS-P123-BIO có thể lưu ý rằng độ giãn O-H chồng lấp với độ giãn N-H ($3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$) đã được tăng cường đáng kể.

Bảng 3. 25. Kết quả phân tích phổ FT-IR của CS, NPC-P123-BIO và CS-P123-BIO.

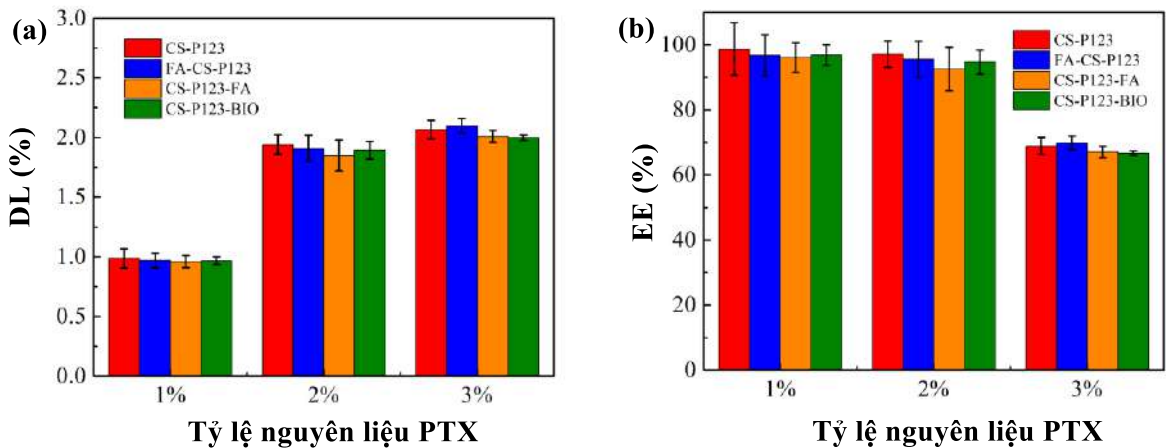
Nhóm chức	Số sóng (cm^{-1})		
	CS	NPC-P123-BIO	CS-P123-BIO
O-H, N-H	3300	3296-3612	3319-3590
-C-H ($-\text{CH}_2$ và $-\text{CH}_3$)	2882	2886-2971	2874-2972
C=O (BIO)	–	1750	1710
C=O (amide I)	1660	1667	1657
N-H (amide II)	1557	1549	1534
-C-O-C-	1090	1111	1107

3.3.4. 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 3.46. Giá trị CMC đo được là $35.8 \pm 2.84\text{ }\mu\text{g/mL}$ (CS-P123) $32.75 \pm 1.47\text{ }\mu\text{g/mL}$ (FA-CS-P123), $40.32 \pm 3.70\text{ }\mu\text{g/mL}$ (CS-P123-FA) và $40.08 \pm 3.17\text{ }\mu\text{g/mL}$ (CS-P123-BIO) ở $25\text{ }^\circ\text{C}$. Kết quả cho thấy giá trị CMC của các nanogel thấp hơn P123 tinh khiết ($89.64 \pm 16.37\text{ }\mu\text{g/mL}$). Kết quả CMC này đưa ra một dấu hiệu về sự ổn định nhiệt động học của các micelle. Giá trị CMC thấp hơn có lợi cho việc bao gói thuốc trong điều kiện pha loãng đáng kể. Việc giảm giá trị CMC dẫn đến tăng tổng số phân tử polymer tham gia vào quá trình hình thành micelle, do đó làm tăng số lượng micelle có sẵn cho quá trình hòa tan các phân tử thuốc trong dung dịch nước.



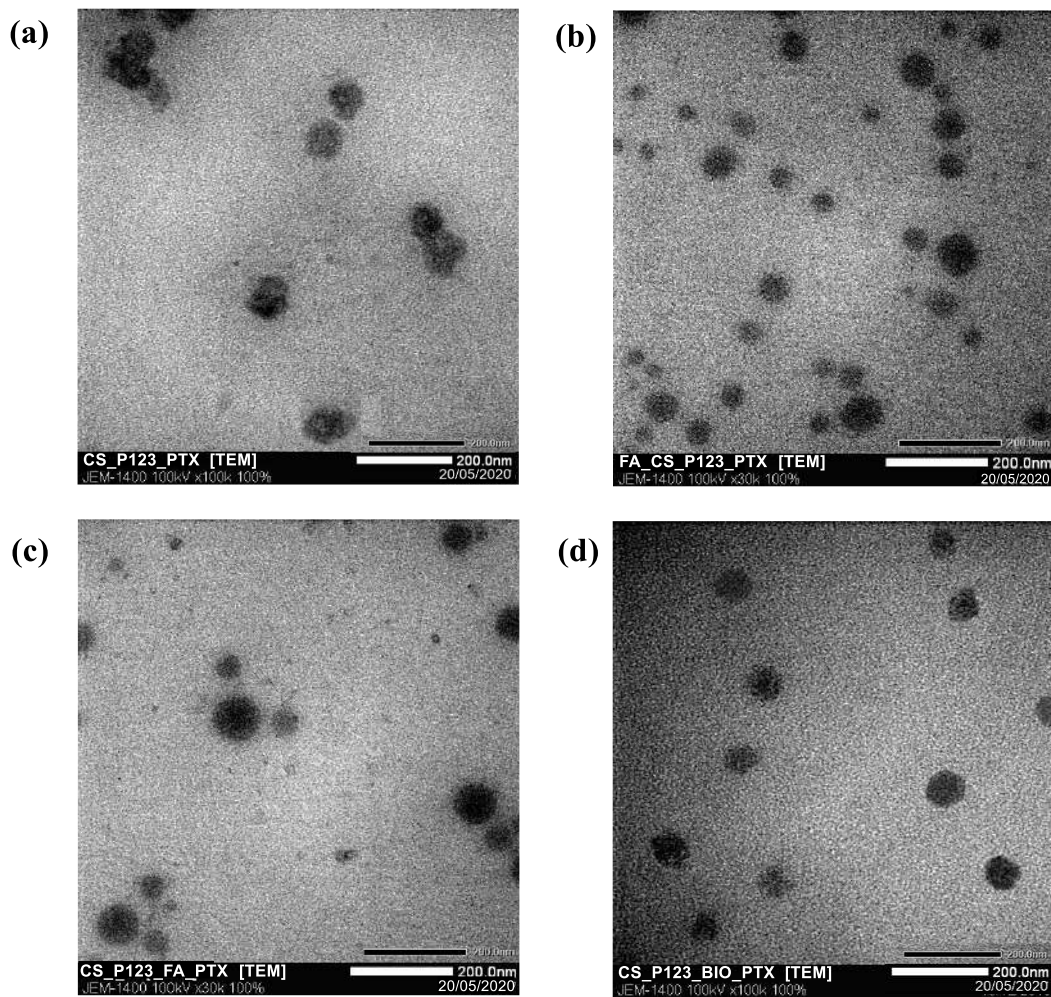
Hình 3. 46. Biểu đồ xác định giá trị CMC của CS-P123 (a), FA-CS-P123 (b), CS-P123-FA (c) và CS-P123-BIO (d).



Hình 3. 47. Biểu đồ biểu diễn phần trăm PTX (DL) (a) và hiệu suất PTX (EE) (b) được mang trong các loại nanogel.

Kết quả nang hóa PTX của các nanogel được thể hiện trên Hình 3.47 và dữ liệu trình bày ở Phụ lục 43 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), $92.51 \pm 6.68\%$

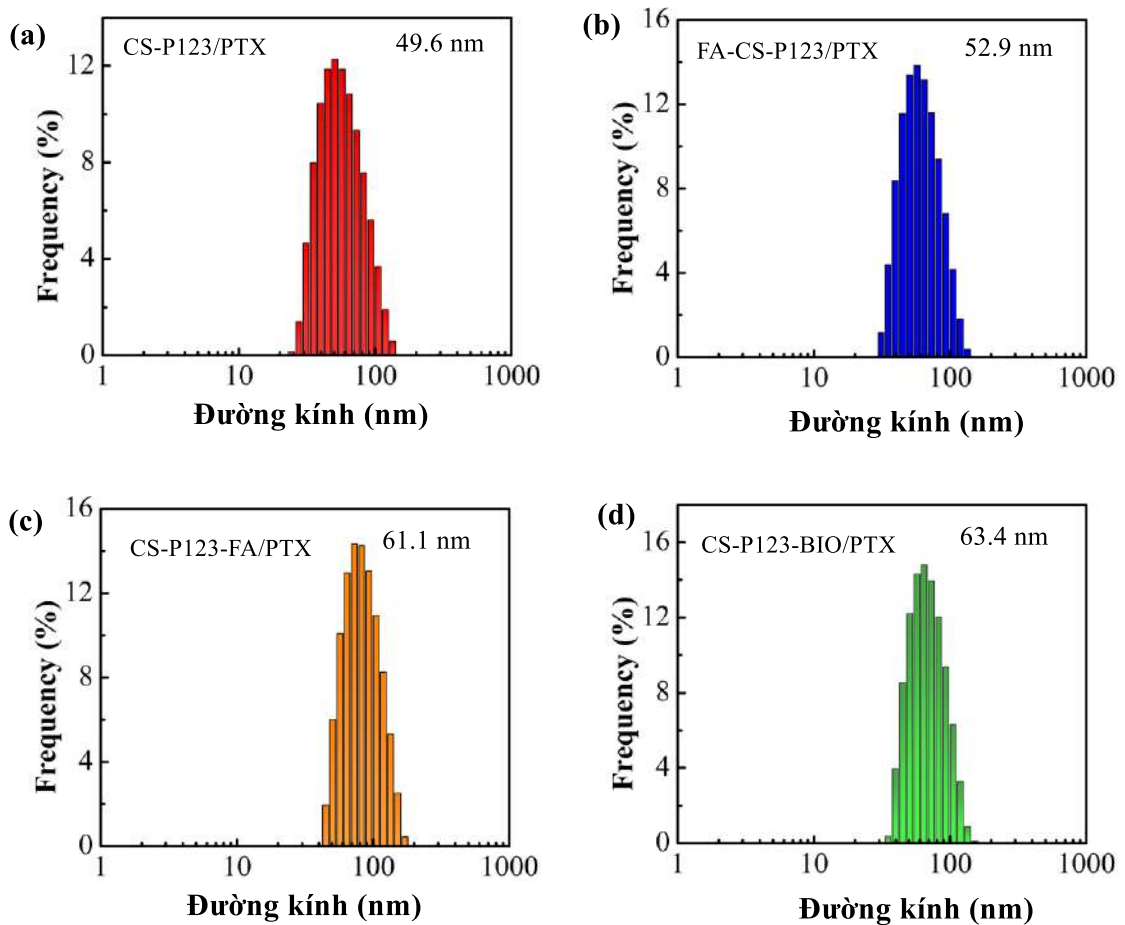
(CS-P123-FA/PTX) và $87.17 \pm 7.96\%$ (CS-P123-BIO/PTX). Sự khác biệt không có ý nghĩa được quan sát giữa 1% PTX và 2% PTX ($p > 0.05$) và sự khác biệt có ý nghĩa được quan sát thấy ở 2% PTX và 3% PTX ($p < 0.05$) đối với EE%, chứng tỏ sự lựa chọn nồng độ tải PTX ở mức 2% sẽ làm giảm sự mất mát của 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.



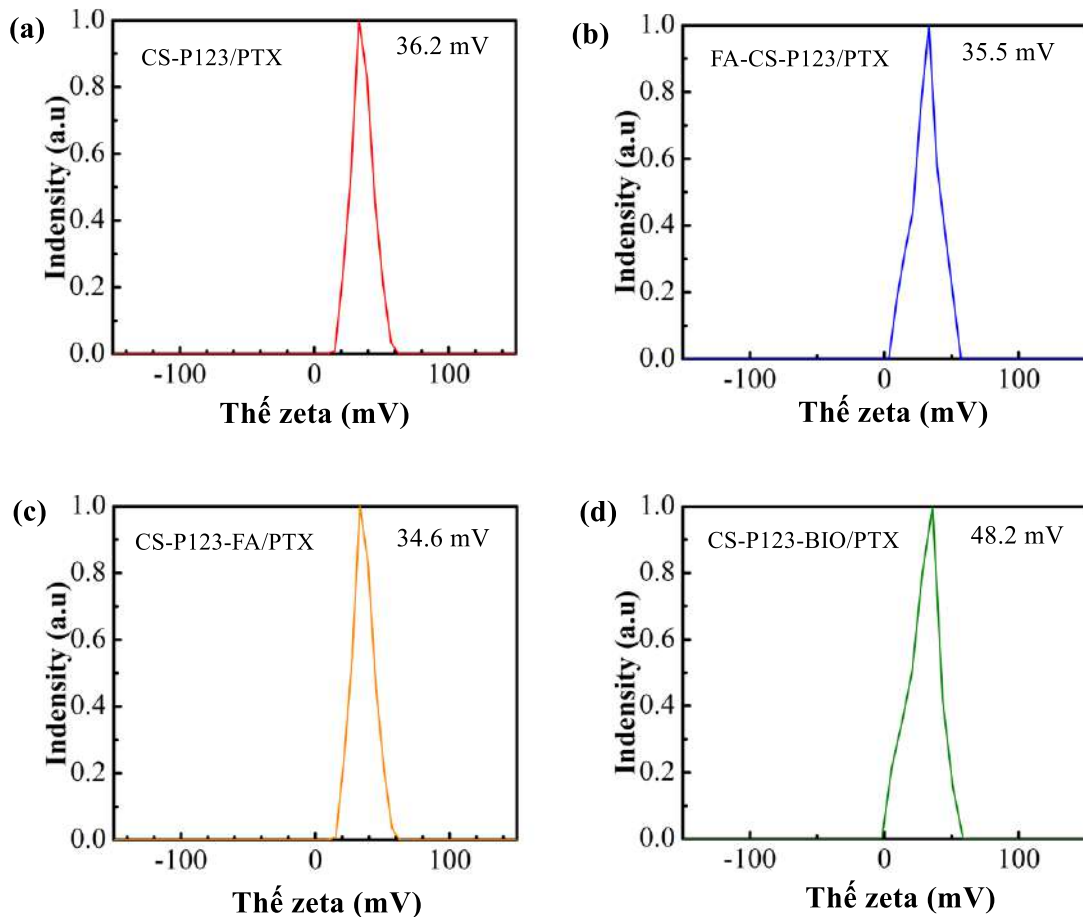
Hình 3. 48. Hình TEM của CS-P123/PTX (a), FA-CS-P123/PTX (b), CS-P123-FA/PTX (c) và CS-P123-BIO/PTX (d).

Kết quả TEM, DLS và thế zeta của các nanogel mang PTX được thể hiện trên Hình 3.48, Hình 3.48 và Hình 3.50. Từ kết quả TEM và DLS cho thấy, các nanogel có hình cầu với đường kính động học là 49.6 ± 1.1 nm (CS-P123/PTX), 52.90 ± 2.16 nm (FA-CS-P123/PTX), 61.13 ± 2.43 nm (CS-P123-FA/PTX) và 63.4 ± 0.6 nm (CS-P123-BIO/PTX). Giá trị điện thế zeta được ghi lại ở 36.2 ± 1.6

mV (CS-P123/PTX), 35.5 ± 1.3 mV (FA-CS-P123/PTX), 34.6 ± 1.0 mV (CS-P123-FA/PTX) và 48.2 ± 1.0 mV (CS-P123-BIO/PTX). Những kết quả này có thể chỉ ra rằng không có sự khác biệt đáng kể về đặc điểm giữa các loại nanogel mang PTX. Các đặc điểm này khá phù hợp với các hệ thống phân phối thuốc nhằm mục tiêu chủ động. Các nghiên cứu *in vitro* và mô hình động vật gần đây đã nhấn mạnh tầm quan trọng của kích thước hạt nano nhỏ hơn 200 nm chiếm thời gian lưu thông lâu hơn, độc tính tế bào thấp hơn và ổn định hơn nhờ hiệu ứng tăng cường tính thấm và lưu giữ [244, 245].



Hình 3. 49. Kết quả DLS của CS-P123/PTX (a), FA-CS-P123/PTX (b), CS-P123-FA/PTX (c) và CS-P123-BIO/PTX (d).

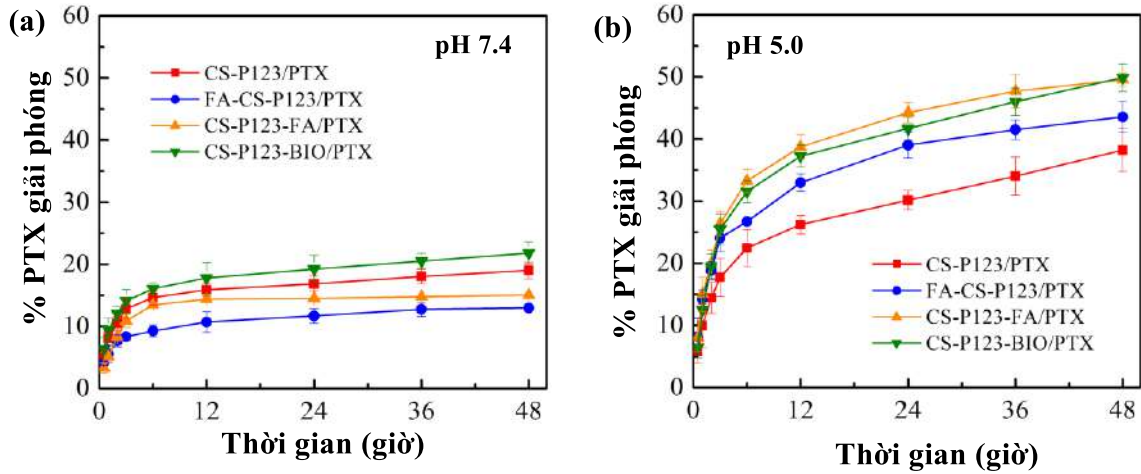


Hình 3. 50. Kết quả thế zeta của CS–P123/PTX (a), FA–CS–P123/PTX (b), CS–P123–FA/PTX (c) và CS–P123–BIO/PTX (d).

3.3.5. 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). Dữ liệu giải phóng PTX được trình bày ở Phụ lục 44, Phụ lục 45 và diễn biến quá trình giải phóng PTX từ nanogel được thể hiện trên Hình 3.51. 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). Nguyên nhân của việc giải phóng thuốc nhanh chóng ở pH 5.0 là do các nhóm amine của các chuỗi CS còn lại đã proton hóa, tạo ra lực đẩy tĩnh điện giữa các chuỗi CS, làm cho cấu trúc của các hạt nanogel trở nên lỏng lẻo và các phân tử PTX có cơ hội khuếch tán ra ngoài môi

trường. Nhìn chung, các hạt nanogel giữ PTX ở pH 7.4 và giải phóng mạnh mẽ ở pH 5. Đặc tính này giúp cho các nanogel giữ thuốc ở môi trường sinh lý cơ thể và giải phóng thuốc ở môi trường sinh lý khối u ung thư.



Hình 3. 51. Biểu đồ mô tả quá trình giải phóng PTX của các nanogel ở pH 7.4 (a) và pH 5.0 (b).

Bảng 3. 26. Các thông số mô hình động học giải phóng PTX của các nanogel.

Tên mẫu	pH	Mô hình toán học động học giải phóng PTX					
		Zero-order	First-order	Higuchi	Korsmeyer-Peppas		
		R^2	R^2	R^2	k	n	R^2
CS-P123/PTX	7.4	0.6587	0.5038	0.8139	0.0886	0.2078	0.8788
FA-CS-P123/PTX		0.7338	0.5927	0.8777	0.0611	0.2057	0.9349
CS-P123-FA/PTX		0.5022	0.4004	0.6840	0.0718	0.2175	0.9190
CS-P123-BIO/PTX		0.7120	0.5635	0.8585	0.1011	0.2057	0.9184
CS-P123/PTX	5	0.8277	0.6132	0.9403	0.1141	0.3132	0.9442
FA-CS-P123/PTX		0.7803	0.5914	0.9151	0.1552	0.2789	0.9344
CS-P123-FA/PTX		0.7452	0.5532	0.8923	0.1726	0.2884	0.9196
CS-P123-BIO/PTX		0.7619	0.5371	0.8994	0.1581	0.3062	0.9052

Động học giải phóng PTX từ các hạt nanogel CS-P123/PTX và CS-P123-BIO/PTX được phân tích bằng cách đưa dữ liệu giải phóng in vitro vào các mô hình toán học dựa trên các phương trình động học Zero-order, First-order, Higuchi và Korsmeyer-Peppas (Power law), sau đó tính toán hệ số tương quan của chúng (R^2). Kết quả phân tích động học giải phóng PTX được trình bày ở Phụ lục 46 ÷ Phụ lục 49 và Bảng 3.26. Kết quả cho thấy sự thống nhất và phù hợp cho hầu

hết các công thức nanogel mang PTX với mô hình Korsmeyer-Peppas ở cả hai môi trường giải phóng pH 7.4 và pH 5.0. Cơ chế giải phóng PTX từ các hạt nanogel được đánh giá bằng mô hình Korsmeyer-Peppas. Giá trị tính toán của n của các nanogel nhỏ hơn 0.45 cho thấy cơ chế giải phóng PTX từ chúng là do khuếch tán.

Để đánh giá khả năng giải phóng PTX của các nanogel FA-CS-P123/PTX và CS-P123-FA/PTX, các giá trị $t_{25\%}$, $t_{50\%}$, $t_{75\%}$, và MDT được sử dụng để so sánh thời gian cần thiết để giải phóng 25%, 50%, 75% và thời gian trung bình giải phóng PTX của các nanogel. Kết quả tính toán từ công thức (7) được trình bày ở Bảng 3.27. Thời gian giải phóng PTX trung bình của các nanogel là 19995 giờ (CS-P123/PTX), 136017 giờ (FA-CS-P123/PTX), 32448 giờ (CS-P123-FA/PTX) và 11758 giờ (CS-P123-BIO/PTX) ở pH 7.4. Trong khi đó, ở pH 5, các nanogel chỉ cần mất thời gian là 244 giờ, 173.65 giờ, 98.95 giờ và 96 giờ. Kết quả này cho thấy khả năng giữ thuốc của các hạt nanogel ở môi trường sinh lý làm hạn chế tác động của thuốc lên tế bào khỏe mạnh.

Bảng 3. 27. Các thông số giải phóng PTX của của các nanogel.

Tên mẫu	pH	$t_{25\%}$ (giờ)	$t_{50\%}$ (giờ)	$t_{75\%}$ (giờ)	MDT (giờ)
CS-P123/PTX	7.4	147	4136	29109	19995
FA-CS-P123/PTX		943	27425	196886	136017
CS-P123-FA/PTX		309	7501	48391	32448
CS-P123-BIO/PTX		81	2370	17020	11758
CS-P123/PTX	5	12.24	111.89	408.35	244.03
FA-CS-P123/PTX		5.53	66.33	283.86	173.65
CS-P123-FA/PTX		3.61	39.97	163.03	98.95
CS-P123-BIO/PTX		4.47	42.96	161.48	96.86

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

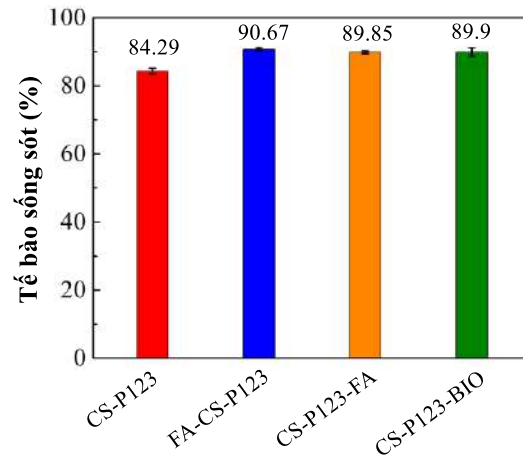
Trước khi sản xuất quy mô lớn các sản phẩm dược phải đánh giá độ ổn định của quá trình bảo quản. Sấy đông là một kỹ thuật đáng tin cậy để đảm bảo sự ổn định lâu dài của các sản phẩm này. Tính ổn định của các nanogel mang PTX đã được nghiên cứu ở nhiệt độ phòng trong vòng 6 tháng được phản ánh bằng việc giảm nhẹ EE%, DL%, và sự gia tăng nhỏ trong kích thước các micelle (DLS), thế zeta (Bảng 3.28). Ngoài ra, tỷ lệ lưu giữ PTX (DR%) trong các nanogel trên 95%.

Bảng 3. 28. Sự ổn định của các nanogel mang PTX bảo quản sau đông khô ở nhiệt độ phòng.

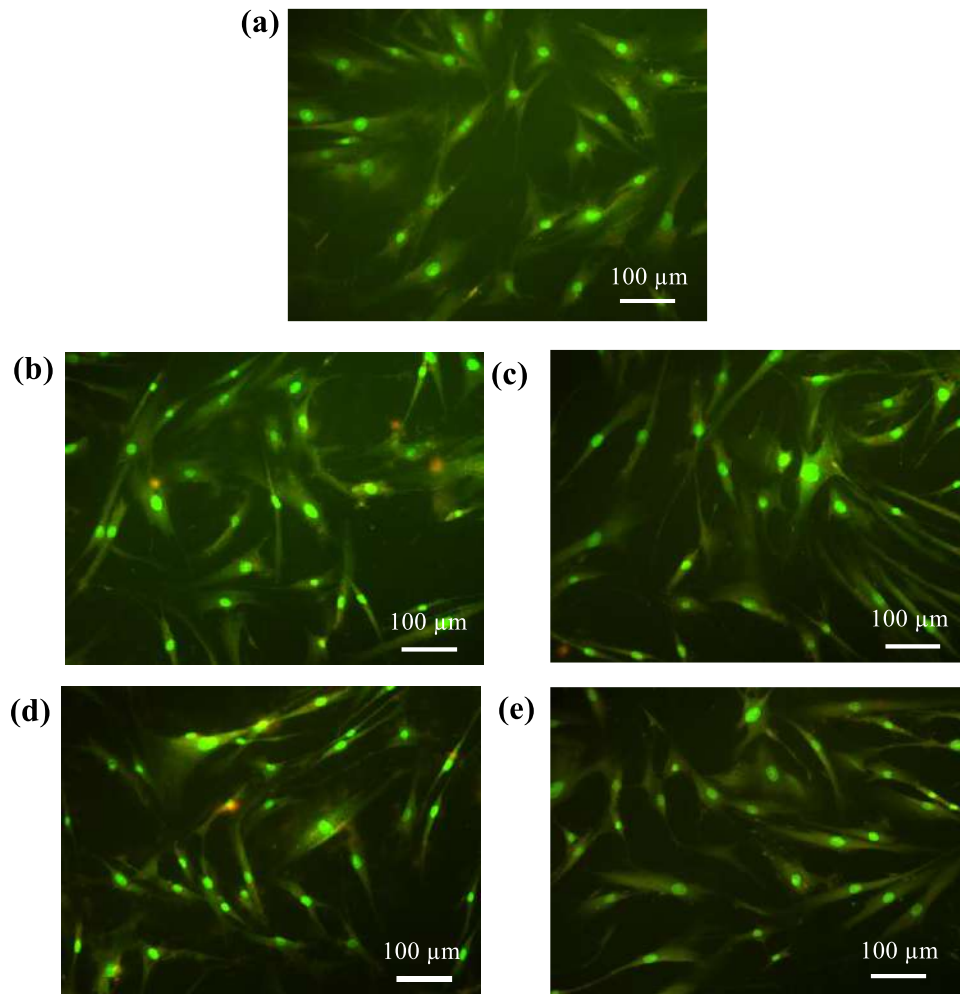
Tên mẫu	Thông số đo	0 tháng	6 tháng
CS-P123/PTX	EE%	93.00 ± 5.98	89.65 ± 1.61
	DL%	1.86 ± 0.12	1.79 ± 0.03
	DLS (nm)	49.6 ± 1.1	56.5 ± 0.6
	Thế zeta (mV)	36.2 ± 1.6	42.33 ± 0.34
	DR%		96.7 ± 4.70
FA-CS-P123/PTX	EE%	95.57 ± 5.51	90.55 ± 4.88
	DL%	1.91 ± 0.11	1.81 ± 0.1
	DLS (nm)	52.90 ± 2.16	57.5 ± 1.2
	Thế zeta (mV)	35.5 ± 1.3	39.4 ± 4.2
	DR%		94.48 ± 2.51
CS-P123-FA/PTX	EE%	92.52 ± 6.68	88.52 ± 7.77
	DL%	1.85 ± 0.13	1.77 ± 0.16
	DLS (nm)	61.13 ± 2.43	64.4 ± 4.4
	Thế zeta (mV)	34.6 ± 1.0	42.8 ± 0.5
	DR%		95.57 ± 1.55
CS-P123-BIO/PTX	EE%	87.17 ± 6.50	84.22 ± 5.42
	DL%	1.74 ± 0.13	1.68 ± 0.11
	DLS (nm)	63.4 ± 0.6	66.9 ± 0.5
	Thế zeta (mV)	48.2 ± 1.0	49.60 ± 1.10
	DR%		96.69 ± 1.22

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

Việc đo tính tương hợp sinh học của các loại nanogel đối với tế bào nguyên bào sợi (fibroblast) được thực hiện bằng phương pháp nhuộm SRB. Như thể hiện trên Hình 3.52, 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. 52. 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.

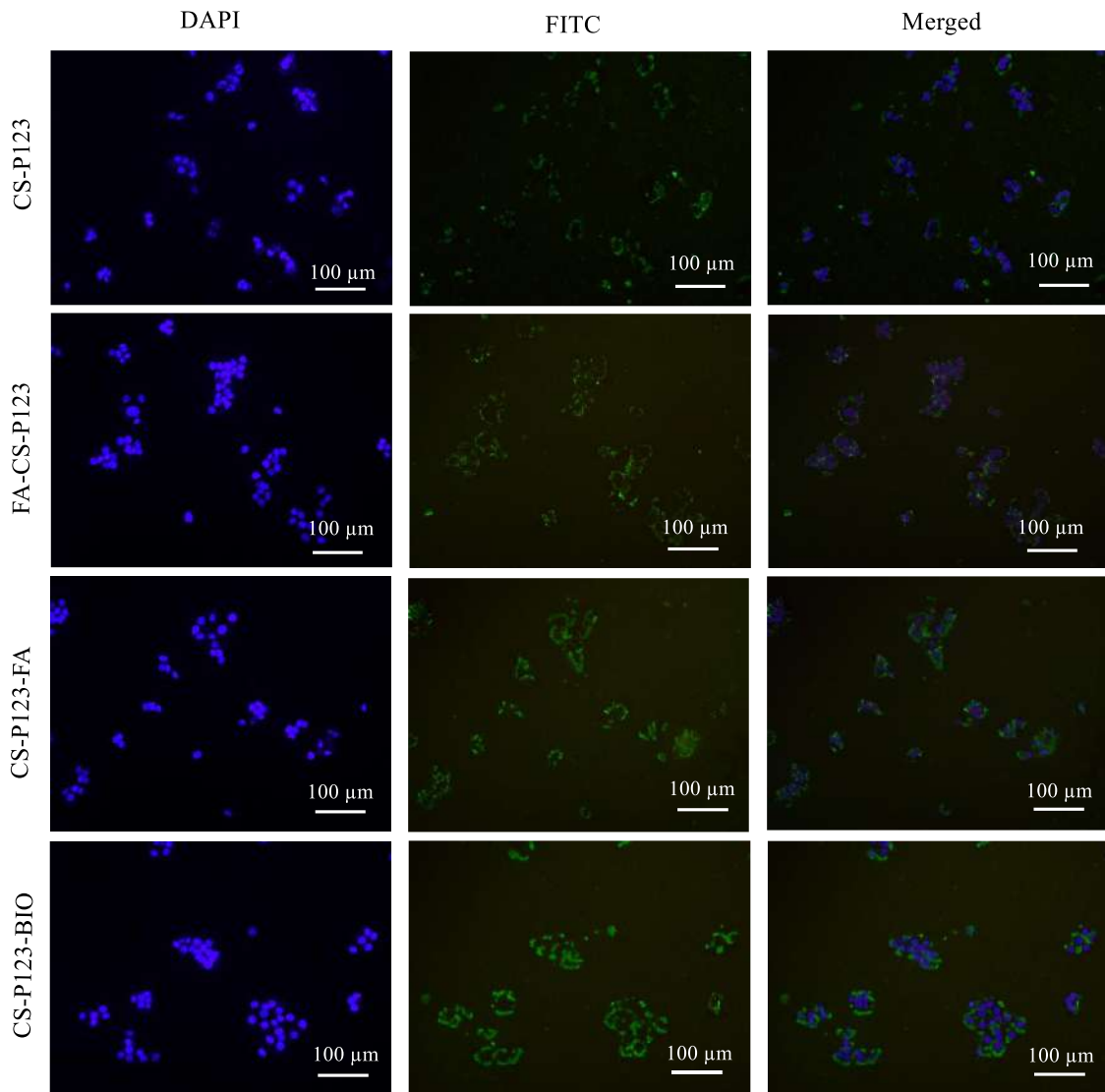


Hình 3. 53. Hình ảnh hiển vi huỳnh quang của tế bào fibroblast nhuộm màu kép AO/EB của mẫu đối chứng (a) sau khi xử lý với CS-P123 (b), FA-CS-P123 (c), CS-P123-FA (d) và CS-P123-BIO (e) sau 48 giờ ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$.

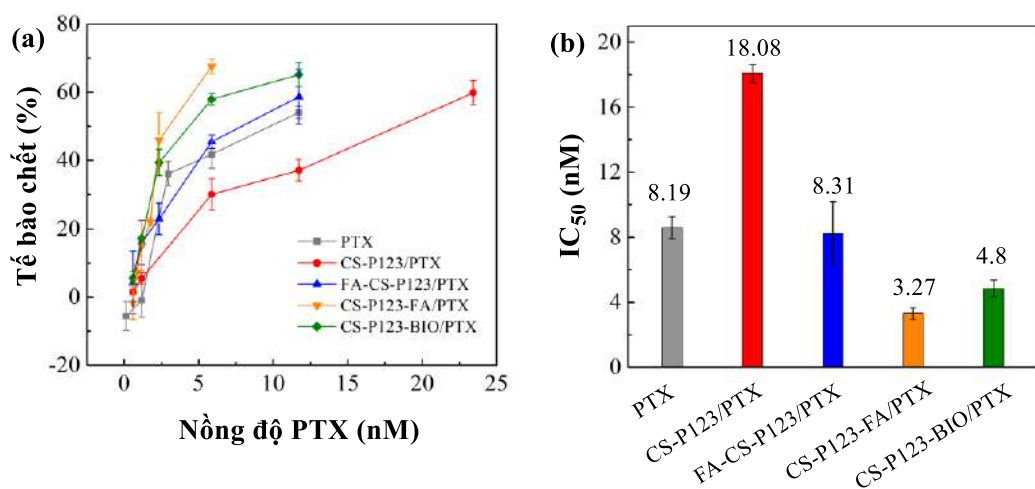
Song song với việc này, đánh giá định tính về hình thái của tế bào cũng được xác nhận thông qua phương pháp nhuộm kép AO/EB. Sức khỏe của nguyên bào sợi được quan sát sau 48 giờ được ủ với nanogel ở 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Hầu hết các nguyên bào sợi trong đối chứng âm tính có màu xanh lục của nhân nguyên vẹn. Tuy nhiên, khi ủ với các nanogel, một số tế bào đã bị viêm màng tế bào (màng tế bào màu vàng). Như thể hiện trong Hình 3.53, nguyên bào sợi được nuôi cấy nanogel vẫn duy trì hình thái đồng nhất so với đối chứng, hình dạng thuôn dài điển hình và hình dạng giống trục chính. Những kết quả này có thể xác nhận rằng các nanogel có khả năng tương thích sinh học phù hợp cho ứng dụng y tế.

Để kiểm tra sự hấp thu các nanogel lên tế bào MCF-7, các nanogel được liên kết với tác nhân phát huỳnh quang FITC màu xanh lục (green) ở bước sóng 516 nm. Đồng thời sử dụng thuốc nhuộm DAPI thêm vào tế bào nuôi cấy sẽ nhanh chóng đưa vào AND của nhân tế bào và tạo ra huỳnh quang màu xanh dương (blue) ở bước sóng 461 nm. Các tế bào MCF-7 sau khi ủ 1 giờ với các hạt nanogel dán nhãn huỳnh quang FITC được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang để xem xét khả năng hấp thu tế bào của các nanogel. Dựa vào cường độ huỳnh quang màu xanh lục phát ra xung quanh nhân tế bào màu xanh dương để đánh giá khả năng hấp thu của các hạt nanogel lên tế bào. Kết quả cho thấy rằng các hạt nanogel CS-P123-FA và CS-P123-BIO có cường độ huỳnh quang màu xanh lục xung quanh nhân tế bào mạnh hơn so với các hạt nanogel CS-P123 và FA-CS-P123 (Hình 3.54). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Martínez-Relimpio rằng các hạt nanogel mang FA đã cải thiện khả năng hấp thu tế bào MCF-7 của các hạt nanogel không mang FA [246]. Tương tự, Lv cũng đã chứng minh rằng các hạt nanogel mang BIO có khả năng hấp thu tế bào MCF-7 cao hơn các hạt nanogel không mang BIO [247].

Để đánh giá hiệu quả điều trị của các hạt nanogel mang PTX đối với bệnh ung thư vú, các thử nghiệm độc tính tế bào in vitro trên tế bào MCF-7 đã được tiến hành bằng phương pháp SRB sau 48 giờ ủ. Kết quả được trình bày ở Phụ lục 51, Phụ lục 28 và Hình 3.55 với giá trị IC_{50} đạt được là 8.19 ± 1.17 nM (PTX tự do), 18.08 ± 0.55 nM (CS-P123/PTX), 8.31 ± 1.99 nM (FA-CS-P123/PTX), 3.27 ± 0.35 nM (CS-P123-FA/PTX) và 4.80 ± 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.

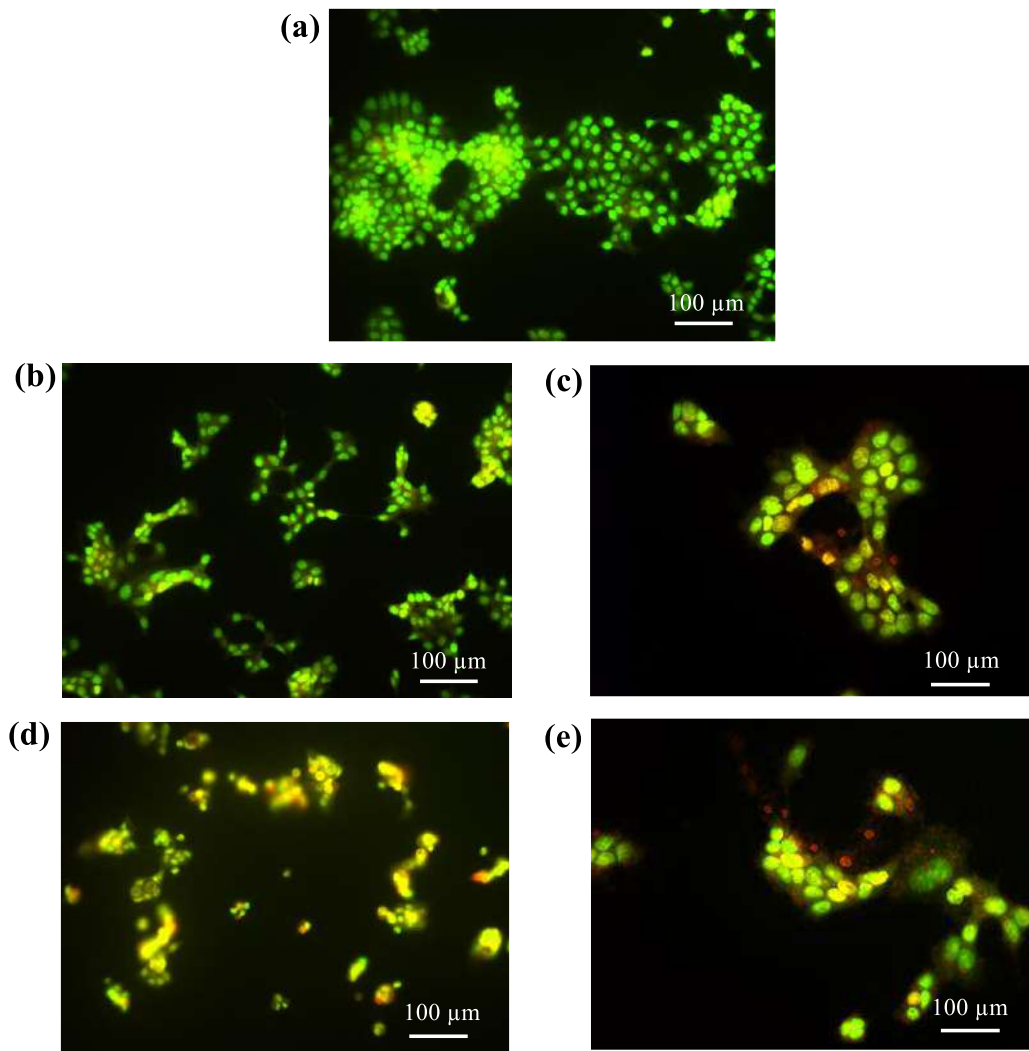


Hình 3. 54. Hình ảnh hiển vi huỳnh quang quan sát sự hấp thu tế bào của nanogel trong tế bào MCF-7 sau 1 giờ ủ ở nồng độ 100 µg/mL.



Hình 3. 55. Kết quả gây độc tế bào (a) và giá trị IC₅₀ (b) của PTX tự do và các nanogel mang PTX.

Để đánh giá cơ chế tự chết của tế bào MCF-7, phương pháp nhuộm kép AO/EB được sử dụng để đánh giá hình thái 48 giờ ủ với các nanogel mang PTX ở nồng độ IC_{50} . Sau 48 giờ, các tế bào hoại tử tăng kích thước và cho thấy huỳnh quang màu cam sáng không đồng đều ở ngoại vi của chúng. Các tế bào màu đỏ dường như đang trong quá trình phân hủy. Do đó, những thay đổi hình thái quan sát được cho thấy nanogel mang PTX có khả năng gây chết tế bào, chủ yếu thông qua quá trình apoptosis (Hình 3.56).



Hình 3. 56. Hình ảnh hiển vi huỳnh quang của tế bào MCF-7 nhuộm màu kép AO/EB của mẫu đối chứng (a) sau khi xử lý với CS-P123/PTX (b), FA-CS-P123/PTX (c), CS-P123-FA/PTX (d) và CS-P123-BIO/PTX (e) sau 48 giờ ở nồng độ IC_{50} .

3.3.8. Tổng kết các kết quả đạt được của hệ phân phối thuốc nanogel CS-Pluronic hướng đích mang PTX

Các thông số cơ bản của hệ phân phối thuốc CS-P123/PTX, FA-CS-P123/PTX, CS-P123-FA/PTX và CS-P123-BIO/PTX được trình bày trong Bảng 3.29. Kết quả cho thấy, khả năng nang hóa của các nanogel hầu như không khác nhau đáng kể. Kích thước micelle của các nanogel FA-CS-P123/PTX, CS-P123-FA/PTX và CS-P123-BIO/PTX tương đối bằng nhau và lớn hơn so với CS-P123/PTX. Giá trị thế zeta của CS-P123-BIO/PTX có độ dương điện hơn so với CS-P123/PTX, FA-CS-P123/PTX và CS-P123-FA/PTX. Khả năng duy trì nồng độ thuốc PTX sau 6 tháng bảo xấp xỉ nhau. Khả năng tương thích sinh học không có sự thay đổi sau khi liên hợp với tác nhân hướng đích FA và BIO. Khả năng tiêu diệt tế bào ung thư MCF-7 của CS-P123-FA/PTX và CS-P123-BIO/PTX đã tăng lên so với CS-P123/PTX và FA-CS-P123/PTX. Tuy nhiên khả năng tiêu diệt tế bào MCF-7 của CS-P123-FA/PTX mạnh hơn so với CS-P123-BIO/PTX. Vì vậy có thể xem CS-P123-FA và CS-P123-BIO là hai chất mang thuốc nhắm mục tiêu trong điều trị ung thư vú hiệu quả.

Bảng 3. 29. So sánh các kết quả đạt được hệ phân phối thuốc nanogel hướng đích mang PTX.

Thông số	Tên mẫu			
	CS-P123/PTX	FA-CS-P123/PTX	CS-P123-FA/PTX	CS-P123-BIO/PTX
EE%	93.00 ± 5.98	95.57 ± 5.51	92.52 ± 6.68	87.17 ± 6.50
DL%	1.86 ± 0.12	1.91 ± 0.11	1.85 ± 0.13	1.74 ± 0.13
DLS (nm)	49.60 ± 1.10	52.90 ± 2.16	61.13 ± 2.43	63.40 ± 0.6
Thế zeta (mV)	36.20 ± 1.60	35.5 ± 1.30	34.6 ± 1.00	48.20 ± 1.00
DR%	96.70 ± 4.70	94.48 ± 2.51	95.57 ± 1.55	96.69 ± 1.22
Tương thích sinh học (% tế bào fibroblast sống sót)				
IC ₅₀ (μM) đối với tế bào MCF-7	18.08 ± 0.55	8.31 ± 1.99	3.27 ± 0.35	4.80 ± 0.46

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 $^1\text{H-NMR}$, 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-Pluornic 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-Pluornic 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 ($IC_{50}= 3.27$ nM) mạnh hơn so với FA-CS-P123/PTX ($IC_{50}=8.31$ 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 ($IC_{50}= 4.8$ 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-ploxamer 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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F, 2021, Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
2. The Global Cancer Observatory, March, 2021.
3. Center Watch. FDA approved drugs for oncology. ReC^o, retrieved from. 2018.
4. Kang M. J., Lim, J., Han, S. S., Park H. M., Kim S. W., Lee W. J., ... & Park S. J, 2022, Distinct prognosis of biliary tract cancer according to tumor location, stage, and treatment: a population-based study, *Scientific Reports*, 12(1), 10206.
5. Lewis A. L., & Richard J, 2015, Challenges in the delivery of peptide drugs: an industry perspective, *Therapeutic Delivery*, 6(2), 149-163.
6. Richard J, 2012, Parenteral biologics delivery: recent progresses, key challenges and perspectives, *European Journal of Parenteral Sciences and Pharmaceutical Sciences*, 17(3), 94.
7. Rofstad E. K., Galappathi K., & Mathiesen, B. S, 2014, Tumor interstitial fluid pressure—a link between tumor hypoxia, microvascular density, and lymph node metastasis, *Neoplasia*, 16(7), 586-594.
8. Albin A., Sporn M. B, 2007, The tumour microenvironment as a target for chemoprevention, *Nature Reviews Cancer*, 7(2), 139-147.
9. Muchmore, J. H., Wanebo, H. J, 2008, Regional chemotherapy: overview. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 17(4), 709-730.
10. Zhao Z., Ukidve A., Kim, J., Mitragotri, S, 2020, Targeting strategies for tissue-specific drug delivery, *Cell*, 181(1), 151-167.
11. Lorscheider M., Gaudin, A., Chassaing, C, 2021, Challenges and opportunities in the delivery of cancer therapeutics: update on recent progress, *Therapeutic Delivery*, 12(1), 55-76.
12. Obeid M. A., Ferro V. A, 2017, Delivering natural products and biotherapeutics to improve drug efficacy, *Therapeutic delivery*, 8(11), 947-956.
13. Miele E., Spinelli G. P., Miele, Gulino, A, 2012, Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA: challenges for cancer therapy, *International journal of nanomedicine*, 3637-3657.
14. Bozzuto G. and Molinari A., 2015, Liposomes as nanomedical devices. *International journal of nanomedicine*, 10, p.975.

15. Sercombe L., Veerati, T., Moheimani, Hua, S, 2015, Advances and challenges of liposome assisted drug delivery, *Frontiers in pharmacology*, 6, 286.
16. Barenholz, Y. C, 2012, Doxil®—The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *Journal of controlled release*, 160(2), 117-134.
17. Markman M, 2006, Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of cancers of the breast and ovary, *Expert opinion on pharmacotherapy*, 7(11), 1469-1474.
18. Hofheinz R. D., Gnad-Vogt S. U., Hochhaus, A, 2005, Liposomal encapsulated anti-cancer drugs, *Anti-cancer drugs*, 16(7), 691-707.
19. Malam Y., Seifalian A. M, 2009, Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer, *Trends in pharmacological sciences*, 30(11), 592-599.
20. Kesharwani P., Xie, L., Iyer A. K, 2015, Hyaluronic acid-conjugated polyamidoamine dendrimers for targeted delivery of 3, 4-difluorobenzylidene curcumin to CD44 overexpressing pancreatic cancer cells, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, 413-423.
21. Zhu J., Shi, X, 2013, Dendrimer-based nanodevices for targeted drug delivery applications, *Journal of Materials Chemistry B*, 1(34), 4199-4211.
22. Madaan K., Kumar S., Pandita D, 2014, Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues, *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 6(3), 139.
23. Noriega-Luna B., Godínez, L. A., Bustos E, 2014, Applications of dendrimers in drug delivery agents, diagnosis, therapy, and detection, *Journal of Nanomaterials*, 2014, 39-39.
24. Tripathy S., Das M. K, 2013, Dendrimers and their applications as novel drug delivery carriers, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(9), 142-149.
25. Kesharwani P., Jain K., Jain, N. K, 2014, Dendrimer as nanocarrier for drug delivery, *Progress in Polymer Science*, 39(2), 268-307.
26. Jain K., Gupta U., Jain N. K, 2014, Dendronized nanoconjugates of lysine and folate for treatment of cancer, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87(3), 500-509.
27. Kong F. Y., Wang, W, 2017, Unique roles of gold nanoparticles in drug delivery, targeting and imaging applications, *Molecules*, 22(9), 1445.
28. Prusty K., Swain, S. K, 2018, Nano silver decorated polyacrylamide/dextran nanohydrogels hybrid composites for drug delivery applications, *Materials Science and Engineering: C*, 85, 130-141.

29. Marcu A., Pop, S., Morjan I, 2013, Magnetic iron oxide nanoparticles as drug delivery system in breast cancer, *Applied Surface Science*, 281, 60-65.
30. Huang C. L., Huang C. C, Chang, J. Y, 2015, Application of paramagnetic graphene quantum dots as a platform for simultaneous dual-modality bioimaging and tumor-targeted drug delivery, *Journal of Materials Chemistry B*, 3(4), 651-664.
31. Olerile L. D., Liu, Y., Zhang, N, 2017, Near-infrared mediated quantum dots and paclitaxel co-loaded nanostructured lipid carriers for cancer theragnostic, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 150, 121-130.
32. Cai X., Luo, Lin, Y, 2016, pH-Sensitive ZnO quantum dots–doxorubicin nanoparticles for lung cancer targeted drug delivery, *ACS applied materials & interfaces*, 8(34), 22442-22450.
33. Balaji A. B., Pakalapati H., Khalid M., Walvekar R., Siddiqui, H, 2018, Natural and synthetic biocompatible and biodegradable polymers, *Biodegradable and biocompatible polymer composites*, 286, 3-32.
34. Bassas-Galia, M., Follonier, S., Pusnik, M., & Zinn, M. (2017). Natural polymers: A source of inspiration. In *Bioresorbable polymers for biomedical applications* (pp. 31-64). Woodhead Publishing.
35. Lohcharoenkal W., Wang, L., Chen, Y. C., Rojanasakul, Y, 2014, Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy. *BioMed research international*, 2014.
36. Poole-Warren, L. A., & Patton, A. J, 2016, Introduction to biomedical polymers and biocompatibility. In *Biosynthetic Polymers for Medical Applications* (pp. 3-31). Woodhead Publishing.
37. Pertici, G, 2017, Introduction to bioresorbable polymers for biomedical applications. In *Bioresorbable polymers for biomedical applications* (pp. 3-29). Woodhead Publishing.
38. Bassas-Galia, Zinn, M, 2017, Natural polymers: A source of inspiration. In *Bioresorbable polymers for biomedical applications* (pp. 31-64). Woodhead Publishing.
39. Cardoso, M. J., Costa, R. R., Mano, J. F, 2016, Marine origin polysaccharides in drug delivery systems. *Marine drugs*, 14(2), 34.
40. Jiang, Y., Chen, J., Deng, C., Zhong, Z, 2014, Click hydrogels, microgels and nanogels: Emerging platforms for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 35(18), 4969-4985.

41. Soni, K. S., Desale, S. S., Bronich, T. K, 2016, Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation. *Journal of Controlled Release*, 240, 109-126.
42. Li, Y., Maciel, D., Tomas, H, 2015, Biodegradable polymer nanogels for drug/nucleic acid delivery. *Chemical reviews*, 115(16), 8564-8608.
43. Raemdonck, K., Demeester, J., De Smedt, S, 2009, Advanced nanogel engineering for drug delivery. *Soft Matter*, 5(4), 707-715.
44. Sahiner, N., John, V. T, 2006, Microgel, nanogel and hydrogel–hydrogel semi-IPN composites for biomedical applications: synthesis and characterization. *Colloid and Polymer Science*, 284, 1121-1129.
45. Vinogradov, S. V., Bronich, T. K., Kabanov, A. V, 2002, Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Advanced drug delivery reviews*, 54(1), 135-147.
46. Salahuddin, N., Galal, A, 2017, Improving chemotherapy drug delivery by nanoprecision tools. In *Nanostructures for Cancer Therapy* (pp. 87-128). Elsevier.
47. Attia, M. F., Anton, N., Vandamme, T. F, 2019, An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(8), 1185-1198.
48. Patel, J. K., Patel, A. P, 2019, Passive targeting of nanoparticles to cancer. *Surface modification of nanoparticles for targeted drug delivery*, 125-143.
49. Langer, R., Peer, D., Margalit, R, 2007, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol*, 2, 751-760.
50. Anarjan, F. S, 2019, Active targeting drug delivery nanocarriers: Ligands. *Nano-Structures & Nano-Objects*, 19, 100370.
51. Muhamad, N., Plengsuriyakarn, T., Na-Bangchang, K, 2018, Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: a systematic review. *International journal of nanomedicine*, 13, 3921.
52. Montet, X., Josephson, L, 2006, Multivalent effects of RGD peptides obtained by nanoparticle display. *Journal of medicinal chemistry*, 49(20), 6087-6093.
53. Liu, Y., Hui, Zhao, C. X, 2018, Synergetic combinations of dual-targeting ligands for enhanced in vitro and in vivo tumor targeting. *Advanced healthcare materials*, 7(15), 1800106.

54. Ran, R., Wang, H., Liu, Y., Hui, Zhao, C. X, 2018, Microfluidic self-assembly of a combinatorial library of single-and dual-ligand liposomes for in vitro and in vivo tumor targeting. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 130, 1-10.
55. Plard, J. P., Bazile, D, 1999, Comparison of the safety profiles of PLA50 and Me. PEG-PLA50 nanoparticles after single dose intravenous administration to rat. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 16(1-4), 173-183.
56. Peracchia, M. T., Fattal, E., Couvreur, P, 1999, Stealth® PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *Journal of Controlled Release*, 60(1), 121-128.
57. Hans, M. L., Lowman, A. M, 2002, Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6(4), 319-327.
58. Mauri, E., Giannitelli, S. M., Trombetta, M., Rainer, A, 2021, Synthesis of nanogels: Current trends and future outlook. *Gels*, 7(2), 36.
59. Mok, H., Jeong, H., Kim, S. J., Chung, B. H, 2012, Indocyanine green encapsulated nanogels for hyaluronidase activatable and selective near infrared imaging of tumors and lymph nodes. *Chemical communications*, 48(69), 8628-8630.
60. Eichenbaum, G. M., Kiser, P. F., Simon, S. A., Needham, D, 1998, pH and ion-triggered volume response of anionic hydrogel microspheres. *Macromolecules*, 31(15), 5084-5093.
61. Kabanov, A. V., Vinogradov, S. V, 2009, Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(30), 5418-5429.
62. Motornov, M., Roiter, Y., Tokarev, I., Minko, S, 2010, Stimuli-responsive nanoparticles, nanogels and capsules for integrated multifunctional intelligent systems. *Progress in polymer science*, 35(1-2), 174-211.
63. Pikabea, A., Aguirre, G., Forcada, J, 2015, Understanding of nanogels swelling behavior through a deep insight into their morphology. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 53(17), 2017-2025.
64. Eichenbaum, & Needham, D, 1999, Investigation of the swelling response and loading of ionic microgels with drugs and proteins: The dependence on cross-link density. *Macromolecules*, 32(15), 4867-4878.

65. Li, M., Tang, Chen, X, 2013, pH and reduction dual-responsive nanogel cross-linked by quaternization reaction for enhanced cellular internalization and intracellular drug delivery. *Polymer Chemistry*, 4(4), 1199-1207.
66. Oh, J. K., Matyjaszewski, K, 2007, Biodegradable nanogels prepared by atom transfer radical polymerization as potential drug delivery carriers: synthesis, biodegradation, in vitro release, and bioconjugation. *Journal of the American Chemical Society*, 129(18), 5939-5945.
67. Dong, H., Xu, Q., Li, Y., Liu, L, 2008, The synthesis of biodegradable graft copolymer cellulose-graft-poly (L-lactide) and the study of its controlled drug release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 66(1), 26-33.
68. Guo, Y., Wang, X., Shu, X., Shen, Z., Sun, R. C, 2012, Self-assembly and paclitaxel loading capacity of cellulose-graft-poly (lactide) nanomicelles. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(15), 3900-3908.
69. Cho, J. K., Park, W., Na, K, 2009, Self-organized nanogels from pullulan-g-poly (l-lactide) synthesized by one-pot method: Physicochemical characterization and in vitro doxorubicin release. *Journal of applied polymer science*, 113(4), 2209-2216.
70. Schauerl, M., Liedl, K. R, 2016, Enthalpic and entropic contributions to hydrophobicity. *Journal of chemical theory and computation*, 12(9), 4600-4610.
71. Owens III, D. E., Peppas, N. A, 2006, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 307(1), 93-102.
72. Mitragotri, S., Lahann, J. 2009, Physical approaches to biomaterial design. *Nature materials*, 8(1), 15-23.
73. Jokerst, J. V., Lobovkina, T., Zare, R. N., Gambhir, S. S, 2011, Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine*, 6(4), 715-728.
74. Maeda, H., Bharate, G. Y., Daruwalla, J, 2009, Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 71(3), 409-419.
75. Hong, S., Holl, M. M. B, 2007, The binding avidity of a nanoparticle-based multivalent targeted drug delivery platform. *Chemistry & biology*, 14(1), 107-115.
76. Danhier, F., Feron, O., Préat, V, 2010, To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of controlled release*, 148(2), 135-146.

77. Kamaly, N., Xiao, Z., Farokhzad, O. C, 2012, Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2971-3010.
78. Kabanov, A. V., Vinogradov, S. V, 2009, Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(30), 5418-5429.
79. Torchilin, V. P, 2006, Multifunctional nanocarriers. *Advanced drug delivery reviews*, 58(14), 1532-1555.
80. Desale, S. S., Cohen, S. M., Zhao, Y., Kabanov, A. V., Bronich, T. K, 2013, Biodegradable hybrid polymer micelles for combination drug therapy in ovarian cancer. *Journal of Controlled Release*, 171(3), 339-348.
81. Desale, S. S., Bronich, T. K, 2015, Polypeptide-based nanogels co-encapsulating a synergistic combination of doxorubicin with 17-AAG show potent anti-tumor activity in ErbB2-driven breast cancer models. *Journal of Controlled Release*, 208, 59-66.
82. Vinogradov, S. V., Batrakova, E. V., Kabanov, A. V, 2004, Nanogels for oligonucleotide delivery to the brain. *Bioconjugate chemistry*, 15(1), 50-60.
83. Nukolova, N. V., Oberoi, H. S., Zhao, Y., Chekhonin, V. P., Bronich, T. K, 2013, LHRH-targeted nanogels as a delivery system for cisplatin to ovarian cancer. *Molecular pharmaceuticals*, 10(10), 3913-3921.
84. Vinogradov, S. V, 2006, Colloidal microgels in drug delivery applications. *Current pharmaceutical design*, 12(36), 4703-4712.
85. Bronich, T. K., Vinogradov, S. V., Kabanov, A. V, 2001, Interaction of nanosized copolymer networks with oppositely charged amphiphilic molecules. *Nano Letters*, 1(10), 535-540.
86. Kohli, E., Han, H. Y., Zeman, A. D., Vinogradov, S. V, 2007, Formulations of biodegradable Nanogel carriers with 5'-triphosphates of nucleoside analogs that display a reduced cytotoxicity and enhanced drug activity. *Journal of controlled release*, 121(1-2), 19-27.
87. Galmarini, C. M., Warren, G., Kohli, E., Zeman, A., Mitin, A., Vinogradov, S. V, 2008, Polymeric nanogels containing the triphosphate form of cytotoxic nucleoside analogues show antitumor activity against breast and colorectal cancer cell lines. *Molecular cancer therapeutics*, 7(10), 3373-3380.
88. Oberoi, H. S., Laquer, F. C., Marky, L. A., Kabanov, A. V., Bronich, T. K, 2011, Core cross-linked block ionomer micelles as pH-responsive carriers for

- cis-diamminedichloroplatinum (II). *Journal of controlled release*, 153(1), 64-72.
89. Wang, Y., Xu, H., Wang, J., Ge, L. Zhu, J., 2014. Development of a thermally responsive nanogel based on chitosan–poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylamide) for paclitaxel delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*, 103(7), pp.2012-2021.
 90. Coll Ferrer, M.C., Shuvaev, V.V., Zern, B.J., Composto, R.J., Muzykantov, V.R. Eckmann, D.M., 2014. Icam-1 targeted nanogels loaded with dexamethasone alleviate pulmonary inflammation. *PloS one*, 9(7), p.e102329.
 91. Dias, N. Stein, C.A., 2002. Potential roles of antisense oligonucleotides in cancer therapy. The example of Bcl-2 antisense oligonucleotides. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 54(3), pp.263-269.
 92. McCarthy, M.M., Auger, A.P., Mong, J.A., Sickel, M.J. Davis, A.M., 2000. Antisense oligodeoxynucleotides as a tool in developmental neuroendocrinology. *Methods*, 22(3), pp.239-248.
 93. Janssen, H.L., Reesink, H.W., Lawitz, E.J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., Van Der Meer, A.J., Patick, A.K., Chen, A., Zhou, Y. and Persson, R., 2013. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *New England Journal of Medicine*, 368(18), pp.1685-1694.
 94. Kim, D.H, Rossi, J.J., 2007. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nature Reviews Genetics*, 8(3), pp.173-184.
 95. Kanasty, R., Dorkin, J.R., Vegas, A. , Anderson, D., 2013. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nature materials*, 12(11), pp.967-977.
 96. Vinogradov, S.V., Batrakova, E.V., Kabanov, A.V., 2004. Nanogels for oligonucleotide delivery to the brain. *Bioconjugate chemistry*, 15(1), pp.50-60.
 97. Vinogradov, S., Batrakova, E.,Kabanov, A., 1999. Poly (ethylene glycol)–polyethyleneimine NanoGel™ particles: novel drug delivery systems for antisense oligonucleotides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 16(1-4), pp.291-304.
 98. Fujii, H., Shin-Ya, M., Mazda, O., 2014. Cycloamylose-nanogel drug delivery system-mediated intratumor silencing of the vascular endothelial growth factor regulates neovascularization in tumor microenvironment. *Cancer Science*, 105(12), pp.1616-1625.
 99. Akiyoshi, K., Kobayashi, S., Shichibe, S., Mix, D., Baudys, M., Sunamoto, J., 1998. Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as

- a carrier of protein drugs: complexation and stabilization of insulin. *Journal of Controlled Release*, 54(3), pp.313-320.
100. Ayame, H., Akiyoshi, K., 2008. Self-assembled cationic nanogels for intracellular protein delivery. *Bioconjugate chemistry*, 19(4), pp.882-890.
 101. Nochi, T., Yuki, Y., Takahashi, H., Tokuhara, D., 2010. Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines. *Nature materials*, 9(7), pp.572-578.
 102. Park, J., Wrzesinski, S.H., Stern, E., Ferrandino, A.F., 2012. Combination delivery of TGF- β inhibitor and IL-2 by nanoscale liposomal polymeric gels enhances tumour immunotherapy. *Nature materials*, 11(10), pp.895-905.
 103. Desale, S.S., Cohen, S.M., Zhao, Y., Bronich, T.K., 2013. Biodegradable hybrid polymer micelles for combination drug therapy in ovarian cancer. *Journal of Controlled Release*, 171(3), pp.339-348.
 104. Kavianiinia, I., Plieger, P.G., Cave, N.J., Harding, D.R., 2016. Design and evaluation of a novel chitosan-based system for colon-specific drug delivery. *International journal of biological macromolecules*, 85, pp.539-546.
 105. Lupascu, F.G., Dash, M., Samal, S.K., Profire, L., 2015. Development, optimization and biological evaluation of chitosan scaffold formulations of new xanthine derivatives for treatment of type-2 diabetes mellitus. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77, pp.122-134.
 106. Tao, F., Ma, S., Tao, H., Jin, L., Luo, Y., Deng, H., 2021. Chitosan-based drug delivery systems: From synthesis strategy to osteomyelitis treatment—A review. *Carbohydrate Polymers*, 251, p.117063.
 107. Shafabakhsh, R., Yousefi, B., Asemi, Z., Nikfar, B., Hallajzadeh, J., 2020. Chitosan: A compound for drug delivery system in gastric cancer—a review. *Carbohydrate Polymers*, 242, p.116403.
 108. Abd Elgadir, M., Uddin, M.S., Sarker, M.Z.I., 2015. Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review. *Journal of food and drug analysis*, 23(4), pp.619-629.
 109. Shariatinia, Z., 2019. Pharmaceutical applications of chitosan. *Advances in colloid and interface science*, 263, pp.131-194.
 110. Bakshi, P.S., Selvakumar, D., Kumar, N.S., 2020. Chitosan as an environment friendly biomaterial—a review on recent modifications and applications. *International journal of biological macromolecules*, 150, pp.1072-1083.

111. Ali, A., Ahmed, S., 2018. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *International journal of biological macromolecules*, 109, pp.273-286.
112. Lang, X., Wang, T., Sun, M., Liu, Y., 2020. Advances and applications of chitosan-based nanomaterials as oral delivery carriers: A review. *International journal of biological macromolecules*, 154, pp.433-445.
113. Bernkop-Schnürch, A., Dünnhaupt, S., 2012. Chitosan-based drug delivery systems. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 81(3), pp.463-469.
114. Yang, Y., Wang, S., Wang, Y., Wang, X., Chen, M., 2014. Advances in self-assembled chitosan nanomaterials for drug delivery. *Biotechnology advances*, 32(7), pp.1301-1316.
115. Manuel Laza, J., 2016. Covalently and ionically crosslinked chitosan nanogels for drug delivery. *Current pharmaceutical design*, 22(22), pp.3380-3398.
116. Wang, H., Ding, F., 2017. Recent advances in engineered chitosan-based nanogels for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(34), pp.6986-7007.
117. M. Ways, T.M., Khutoryanskiy, V.V., 2018. Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems. *Polymers*, 10(3), p.267.
118. Xing, L., Fan, Y.T., Shen, L.J., Jiang, H.L., 2019. pH-sensitive and specific ligand-conjugated chitosan nanogels for efficient drug delivery. *International journal of biological macromolecules*, 141, pp.85-97.
119. Del Valle, L.J., Puiggalí, J., 2017. Hydrogels for biomedical applications: cellulose, chitosan, and protein/peptide derivatives. *Gels*, 3(3), p.27.
120. Bewersdorff, T., Gruber, A., Haase, A., 2019. Amphiphilic nanogels: Influence of surface hydrophobicity on protein corona, biocompatibility and cellular uptake. *International journal of nanomedicine*, pp.7861-7878.
121. Jain, A., Kesharwani, P., Katare, O.P., 2015. Galactose engineered solid lipid nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 134, pp.47-58.
122. Alex, S.M., Sharma, C.P., 2011. Spermine grafted galactosylated chitosan for improved nanoparticle mediated gene delivery. *International journal of pharmaceutics*, 410(1-2), pp.125-137.
123. Zheng, D., Duan, C., Zhang, D., Jia, L., Zhang, Q., 2012. Galactosylated chitosan nanoparticles for hepatocyte-targeted delivery of oridonin. *International Journal of Pharmaceutics*, 436(1-2), pp.379-386.

124. Lin, J.J., Chen, J.S., Huang, S.J., Wang, L.F., 2009. Folic acid–Pluronic F127 magnetic nanoparticle clusters for combined targeting, diagnosis, and therapy applications. *Biomaterials*, 30(28), pp.5114-5124.
125. Xu, S., Xu, Q., Zhang, L., 2013. Preparation and characterization of folate-chitosan-gemcitabine core–shell nanoparticles for potential tumor-targeted drug delivery. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13(1), pp.129-138.
126. Song, H., Su, C., Cui, W., Zhu, B., Zhao, L., 2013. Folic acid-chitosan conjugated nanoparticles for improving tumor-targeted drug delivery. *BioMed research international*, 2013.
127. Li, P., Yang, Z., Wang, Y., Peng, Z., Wang, Q., 2015. Microencapsulation of coupled folate and chitosan nanoparticles for targeted delivery of combination drugs to colon. *Journal of microencapsulation*, 32(1), pp.40-45.
128. Liu, X., Zhang, Y., Ma, D., Yao, S., 2013. Biocompatible multi-walled carbon nanotube-chitosan–folic acid nanoparticle hybrids as GFP gene delivery materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, pp.224-231.
129. Cui, Y., Li, Y., Kakuchi, T., 2013. Preparation of hyaluronic acid microhydrogel by biotin–avidin-specific bonding for doxorubicin-targeted delivery. *Applied biochemistry and biotechnology*, 169, pp.239-249.
130. Maiti, S, Paira, P., 2018. Biotin conjugated organic molecules and proteins for cancer therapy: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 145, pp.206-223.
131. Patil, Y.B., Toti, U.S., Panyam, J., 2009. Single-step surface functionalization of polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. *Biomaterials*, 30(5), pp.859-866.
132. Gunn, J., Park, S.I., Zhang, M., 2011. A pretargeted nanoparticle system for tumor cell labeling. *Molecular BioSystems*, 7(3), pp.742-748.
133. Liu, J., Zhang, Zhao, X., 2010. Preparation and characterization of lectin-conjugated chitosan fluorescent nanoparticles. *Molecular BioSystems*, 6(6), pp.954-957.
134. Yao, Q., Liu, W., Gou, X.J., Guo, X.Q., Chen, T., 2013. Preparation, characterization, and cytotoxicity of various chitosan nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2013.
135. Tian, X., Yin, H., Zhang, S., Fang, J., 2014. Bufalin loaded biotinylated chitosan nanoparticles: an efficient drug delivery system for targeted

- chemotherapy against breast carcinoma. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87(3), pp.445-453.
136. Chen, H., Xie, L.Q., Qin, J., Jia, Y., Cai, X., Zhang, Q.Q., 2016. Surface modification of PLGA nanoparticles with biotinylated chitosan for the sustained in vitro release and the enhanced cytotoxicity of epirubicin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 138, pp.1-9.
 137. Chen, H., Nan, W., Wei, X., Wang, Y., Zhang, Q., 2017. Toxicity, pharmacokinetics, and in vivo efficacy of biotinylated chitosan surface-modified PLGA nanoparticles for tumor therapy. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 45(6), pp.1115-1122.
 138. Poudel, I., Ahiwale, R., Pawar, A., Bothiraja, C., 2018. Development of novel biotinylated chitosan-decorated docetaxel-loaded nanocochleates for breast cancer targeting. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(sup2), pp.229-240.
 139. Wu, J.L., He, X.Y., Cheng, S.X., 2016. Biotinylated carboxymethyl chitosan/CaCO₃ hybrid nanoparticles for targeted drug delivery to overcome tumor drug resistance. *RSC advances*, 6(73), pp.69083-69093.
 140. Yousefpour, P., Atyabi, F., Dinarvand, R., 2011. Targeted delivery of doxorubicin-utilizing chitosan nanoparticles surface-functionalized with anti-Her2 trastuzumab. *International journal of nanomedicine*, pp.1977-1990.
 141. Nag, M., Gajbhiye, V., Jain, N.K., 2016. Transferrin functionalized chitosan-PEG nanoparticles for targeted delivery of paclitaxel to cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148, pp.363-370.
 142. Han, H.D., Mangala, L.S., Lee, J.W., Lee, S.J., 2010. Targeted Gene Silencing Using RGD-Labeled Chitosan Nanoparticles Targeted Gene Silencing. *Clinical Cancer Research*, 16(15), pp.3910-3922.
 143. Sayari, E., Dinarvand, M., Amini, M., Azhdarzadeh, Atyabi, F., 2014. MUC1 aptamer conjugated to chitosan nanoparticles, an efficient targeted carrier designed for anticancer SN38 delivery. *International journal of pharmaceutics*, 473(1-2), pp.304-315.
 144. Fleck, L.M., 2006. The costs of caring: Who pays? Who profits? Who panders?. *The Hastings Center Report*, 36(3), pp.13-17.
 145. Alexandridis, P., Hatton, T.A., 1994. Micellization of poly (ethylene oxide)-poly (propylene oxide)-poly (ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association. *Macromolecules*, 27(9), pp.2414-2425.

146. Alexandridis, P., Lindman, B., 2000. *Amphiphilic block copolymers: self-assembly and applications*. Elsevier.
147. Wanka, G., Hoffmann, H., Ulbricht, W., 1994. Phase diagrams and aggregation behavior of poly (oxyethylene)-poly (oxypropylene)-poly (oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solutions. *Macromolecules*, 27(15), pp.4145-4159.
148. Klouda, L., Mikos, A.G., 2008. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 68(1), pp.34-45.
149. Rahdar, A., Kazemi, S., Askari, F., 2018. Pluronic as nano-carrier for drug delivery systems. *Nanomedicine Research Journal*, 3(4), pp.174-179.
150. Dutta, B., Barick, K.C., Verma, G., Hassan, P.A., 2017. PEG coated vesicles from mixtures of Pluronic P123 and 1- α -phosphatidylcholine: structure, rheology and curcumin encapsulation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(39), pp.26821-26832.
151. Batrakova, E.V., Kabanov, A.V., 2008. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of controlled release*, 130(2), pp.98-106.
152. Wang, M., Wu, B., Lu, Q., 2016. Poly (ester amine) constructed from polyethylenimine and pluronic for gene delivery in vitro and in vivo. *Drug Delivery*, 23(9), pp.3224-3233.
153. Adams, M.L., Kwon, G.S., 2003. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*, 92(7), pp.1343-1355.
154. Zhang, M., Jing, S., Zhang, J., Zhang, J., Zang, X., Chen, D., 2017. Intracellular release of PluronicL64 unimers into MCF-7/ADR cells to overcome multidrug resistance by surface-modified PAMAM. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(21), pp.3970-3981.
155. Hong, W., Chen, D., Zhang, X., Qiao, M., 2013. Reversing multidrug resistance by intracellular delivery of Pluronic® P85 unimers. *Biomaterials*, 34(37), pp.9602-9614.
156. Yu, J., Qiu, H., Yin, S., Li, Y., 2021. Polymeric drug delivery system based on pluronics for cancer treatment. *Molecules*, 26(12), p.3610.
157. Torchilin, V.P., 2001. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of controlled release*, 73(2-3), pp.137-172.

158. Pitto-Barry, A., Barry, N.P., 2014. Pluronic® block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances. *Polymer Chemistry*, 5(10), pp.3291-3297.
159. Butt, A.M., Amin, M.C.I.M., Katas, H., Sarisuta, N., Benjakul, R., 2012. In vitro characterization of pluronic F127 and D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate mixed micelles as nanocarriers for targeted anticancer-drug delivery. *Journal of Nanomaterials*, 2012, pp.112-112.
160. Meng, X.Y., Li, J.J., Ni, T.J., Xiao-tong, L., Shen, T., 2020. Electro-responsive brain-targeting mixed micelles based on Pluronic F127 and d- α -tocopherol polyethylene glycol succinate–ferrocene. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 601, p.124986.
161. Li, Y.Y., Li, L., Dong, Ren, T.B., 2013. Pluronic F127 nanomicelles engineered with nuclear localized functionality for targeted drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 33(5), pp.2698-2707.
162. Zhang, W., Shi, Y., Chen, Y., Ye, J., Fang, X., 2011. Multifunctional Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles loaded with paclitaxel for the treatment of multidrug resistant tumors. *Biomaterials*, 32(11), pp.2894-2906.
163. Russo, A., Pellosi, D.S., Pagliara, V., Quaglia, F., 2016. Biotin-targeted Pluronic® P123/F127 mixed micelles delivering niclosamide: A repositioning strategy to treat drug-resistant lung cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 511(1), pp.127-139.
164. Mei, L., Zhang, Y., Zheng, Y., Li, Z., 2009. A novel docetaxel-loaded poly (ϵ -caprolactone)/pluronic F68 nanoparticle overcoming multidrug resistance for breast cancer treatment. *Nanoscale research letters*, 4(12), pp.1530-1539.
165. Song, Y., Tian, Q., Huang, Z., Fan, D., She, Z., Deng, Y., 2014. Self-assembled micelles of novel amphiphilic copolymer cholesterol-coupled F68 containing cabazitaxel as a drug delivery system. *International journal of nanomedicine*, 9, pp.2307-2317.
166. Wang, X., Xia, T., Duch, Wang, M., 2012. Pluronic F108 coating decreases the lung fibrosis potential of multiwall carbon nanotubes by reducing lysosomal injury. *Nano letters*, 12(6), pp.3050-3061.
167. Ileri Ercan, N., Stroeve, P., Faller, R., 2016. Understanding the interaction of pluronics L61 and L64 with a DOPC lipid bilayer: an atomistic molecular dynamics study. *Langmuir*, 32(39), pp.10026-10033.
168. Magalhães, M., Almeida, M., Figueiras, A., 2018. miR-145-loaded micelleplexes as a novel therapeutic strategy to inhibit proliferation and

- migration of osteosarcoma cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 123, pp.28-42.
169. Li, X., Fan, R., Wang, Y., Wu, M., Guo, G., 2015. In situ gel-forming dual drug delivery system for synergistic combination therapy of colorectal peritoneal carcinomatosis. *RSC advances*, 5(123), pp.101494-101506.
170. Alakhov, V.Y., Moskaleva, E.Y., Kabanov, A.V., 1996. Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by pluronic P85 block copolymer. *Bioconjugate chemistry*, 7(2), pp.209-216.
171. Pellosi, D.S., Paula, L.B., Tedesco, A.C., 2019. Targeted and synergic glioblastoma treatment: multifunctional nanoparticles delivering verteporfin as adjuvant therapy for temozolomide chemotherapy. *Molecular Pharmaceutics*, 16(3), pp.1009-1024.
172. Niu, J., Wang, L., Yuan, Zhang, Y., 2020. Dual-targeting nanocarrier based on glucose and folic acid functionalized pluronic P105 polymeric micelles for enhanced brain distribution. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 57, p.101343.
173. Zheng, Y., Tang, R., 2019. pH-sensitive and pluronic-modified pullulan nanogels for greatly improved antitumor in vivo. *International journal of biological macromolecules*, 139, pp.277-289.
174. Nagarajan, R., 1999. Solubilization of hydrocarbons and resulting aggregate shape transitions in aqueous solutions of Pluronic®(PEO–PPO–PEO) block copolymers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 16(1-4), pp.55-72.
175. Wang, H., Li, Y., Zhang, Ping, Y., 2017. Redox-activatable ATP-depleting micelles with dual modulation characteristics for multidrug-resistant cancer therapy. *Advanced Healthcare Materials*, 6(8), p.1601293.
176. Cheng, X., Zeng, X., Tang, R., 2020. pH-sensitive pluronic micelles combined with oxidative stress amplification for enhancing multidrug resistance breast cancer therapy. *Journal of colloid and interface science*, 565, pp.254-269.
177. Lim, C., Moon, J., Sim, Oh, K.T., 2018. Cyclic RGD-conjugated Pluronic® blending system for active, targeted drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 13, p.4627.
178. Park, K.M., Bae, J.W., Park, K.D., 2008. Nanoaggregate of thermosensitive chitosan-Pluronic for sustained release of hydrophobic drug. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63(1), pp.1-6.
179. Nguyen, T.B.T., Dang, L.H., Nguyen, T.T.T., and Tran, N.Q., 2016. Green processing of thermosensitive nanocurcumin-encapsulated chitosan hydrogel

- towards biomedical application. *Green Processing and synthesis*, 5(6), pp.511-520.
180. Zhang, W., Gilstrap, He, X., 2010. Synthesis and characterization of thermally responsive pluronic F127– chitosan nanocapsules for controlled release and intracellular delivery of small molecules. *ACS nano*, 4(11), pp.6747-6759.
 181. Xu, X., Tang, R., 2021. Hybrid nanoparticles based on ortho ester-modified pluronic L61 and chitosan for efficient doxorubicin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, pp.1596-1606.
 182. Kim, J.Y., Choi, W.I., Kwon, I.C., 2010. In-vivo tumor targeting of pluronic-based nano-carriers. *Journal of Controlled Release*, 147(1), pp.109-117.
 183. Li, Y.B., Gao, J.L., Wang, Y.T., 2013. Bisdemethoxycurcumin suppresses MCF-7 cells proliferation by inducing ROS accumulation and modulating senescence-related pathways. *Pharmacological Reports*, 65(3), pp.700-709.
 184. Basnet, P., Skalko-Basnet, N., 2011. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules*, 16(6), pp.4567-4598.
 185. Wang, Y., Yu, J., Cui, R., Ding, X., 2016. Curcumin in treating breast cancer: A review. *Journal of laboratory automation*, 21(6), pp.723-731.
 186. Kellokumpu-Lehtinen, P., Tuunanen, T., Asola, R., Elomaa, L., Heikkinen, M., Huusko, M., 2013. Weekly paclitaxel—An effective treatment for advanced breast cancer. *Anticancer research*, 33(6), pp.2623-2627.
 187. van Vuuren, R.J., Joubert, A.M., 2015. Antimitotic drugs in the treatment of cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 76, pp.1101-1112.
 188. McGrogan, B.T., Gilmartin, B., McCann, A., 2008. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1785(2), pp.96-132.
 189. Matsuyoshi, S., Shimada, K., Konishi, N., 2006. Bcl-2 phosphorylation has pathological significance in human breast cancer. *Pathobiology*, 73(4), pp.205-212.
 190. Pan, Z., Avila, A., Gollahon, L., 2014. Paclitaxel induces apoptosis in breast cancer cells through different calcium—regulating mechanisms depending on external calcium conditions. *International journal of molecular sciences*, 15(2), pp.2672-2694.
 191. Wanderley, C.W., Colon, D.F., Speck-Hernandez, C.A., 2018. Paclitaxel Reduces Tumor Growth by Reprogramming Tumor-Associated Macrophages

- to an M1 Profile in a TLR4-Dependent Manner Paclitaxel Drives TAMs to an M1 Profile. *Cancer research*, 78(20), pp.5891-5900.
192. Panis, C., Pavanelli, W.R., 2015. Cytokines as mediators of pain-related process in breast cancer. *Mediators of inflammation*, 2015.
193. Chen, J., Tian, W., He, H., Chen, Z., 2018. Downregulation of miR-200c-3p contributes to the resistance of breast cancer cells to paclitaxel by targeting SOX2. *Oncology reports*, 40(6), pp.3821-3829.
194. Xu, R., Sato, N., Yanai, K., Katano, M., 2009. Enhancement of paclitaxel-induced apoptosis by inhibition of mitogen-activated protein kinase pathway in colon cancer cells. *Anticancer research*, 29(1), pp.261-270.
195. Nguyen, T.B.T., Nguyen, T.T.C., Tran, H.C., Tran, N.Q., 2015. ¹H NMR spectroscopy as an effective method for predicting molecular weight of polyaminoamine dendrimers and their derivatives. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 20(1), pp.57-68.
196. Nguyen, T.T.C., Nguyen, C.K., Tran, N.Q., 2017. Highly lipophilic pluronics-conjugated polyamidoamine dendrimer nanocarriers as potential delivery system for hydrophobic drugs. *Materials Science and Engineering: C*, 70, pp.992-999.
197. Kumar, S., Koh, J., 2012. Physicochemical, optical and biological activity of chitosan-chromone derivative for biomedical applications. *International journal of molecular sciences*, 13(5), pp.6102-6116.
198. Debnath, T., Islam, M.S., Rahman, M.M., 2020. Preparation and characterization of chitosan grafted poly (lactic acid) films for biomedical composites. *Journal of Polymer Engineering*, 40(4), pp.333-341.
199. Birdhariya, B., Jain, N.K., 2015. Effect of surface capping on targeting potential of folate decorated poly (propylene imine) dendrimers. *Drug development and industrial pharmacy*, 41(8), pp.1393-1399.
200. Mukhopadhyay, R., Debnath, M.C., 2020. Gemcitabine co-encapsulated with curcumin in folate decorated PLGA nanoparticles; a novel approach to treat breast adenocarcinoma. *Pharmaceutical Research*, 37, pp.1-19.
201. Jiang, X., Ahmed, M., Narain, R., 2009. Biotinylated glyco-functionalized quantum dots: synthesis, characterization, and cytotoxicity studies. *Bioconjugate chemistry*, 20(5), pp.994-1001.
202. Liu, J., Zhang, L., Wang, C., Zhao, X., 2010. Preparation and characterization of lectin-conjugated chitosan fluorescent nanoparticles. *Molecular BioSystems*, 6(6), pp.954-957.

203. Gao, Q., Liang, Q., Yu, F., Xu, J., Sun, B., 2011. Synthesis and characterization of novel amphiphilic copolymer stearic acid-coupled F127 nanoparticles for nano-technology based drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88(2), pp.741-748.
204. Muzzalupo, R., Picci, N., 2011. A new approach for the evaluation of niosomes as effective transdermal drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(1), pp.28-35.
205. Liu, K., Chen, W., Yang, T., Zhang, W., 2017. Paclitaxel and quercetin nanoparticles co-loaded in microspheres to prolong retention time for pulmonary drug delivery. *International journal of nanomedicine*, 12, p.8239.
206. Sahu, A., Kasoju, N., Bora, U., 2011. Encapsulation of curcumin in Pluronic block copolymer micelles for drug delivery applications. *Journal of biomaterials applications*, 25(6), pp.619-639.
207. Kuksal, A., Jain, S., 2006. Formulation and in vitro, in vivo evaluation of extended-release matrix tablet of zidovudine: influence of combination of hydrophilic and hydrophobic matrix formers. *AAPS pharmscitech*, 7, pp.E1-E9.
208. Roni, M.A., JALIL, R.U., 2009. In vitro studies of controlled release alfuzosin matrix tablets prepared with ethylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose.
209. Mohamed, E.A., Abu Hashim, I.I., Badria, F.A.E., 2018. Polymeric micelles for potentiated antiulcer and anticancer activities of naringin. *International journal of nanomedicine*, pp.1009-1027.
210. Nguyen, M.N.T., Ho-Huynh, T.D., 2016. Selective cytotoxicity of a Vietnamese traditional formula, Nam Dia long, against MCF-7 cells by synergistic effects. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), pp.1-10.
211. Liu, K., Liu, P.C., Wu, X., 2015. Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry. *Medical science monitor basic research*, 21, p.15.
212. Mi, F.L., Wu, Y.Y., Chiu, Y.L., Huang, M.F., 2007. Synthesis of a novel glycoconjugated chitosan and preparation of its derived nanoparticles for targeting HepG2 cells. *Biomacromolecules*, 8(3), pp.892-898.
213. Hoven, V.P., Tangpasuthadol, V., Kiatkamjornwong, S., 2007. Surface-charged chitosan: Preparation and protein adsorption. *Carbohydrate Polymers*, 68(1), pp.44-53.

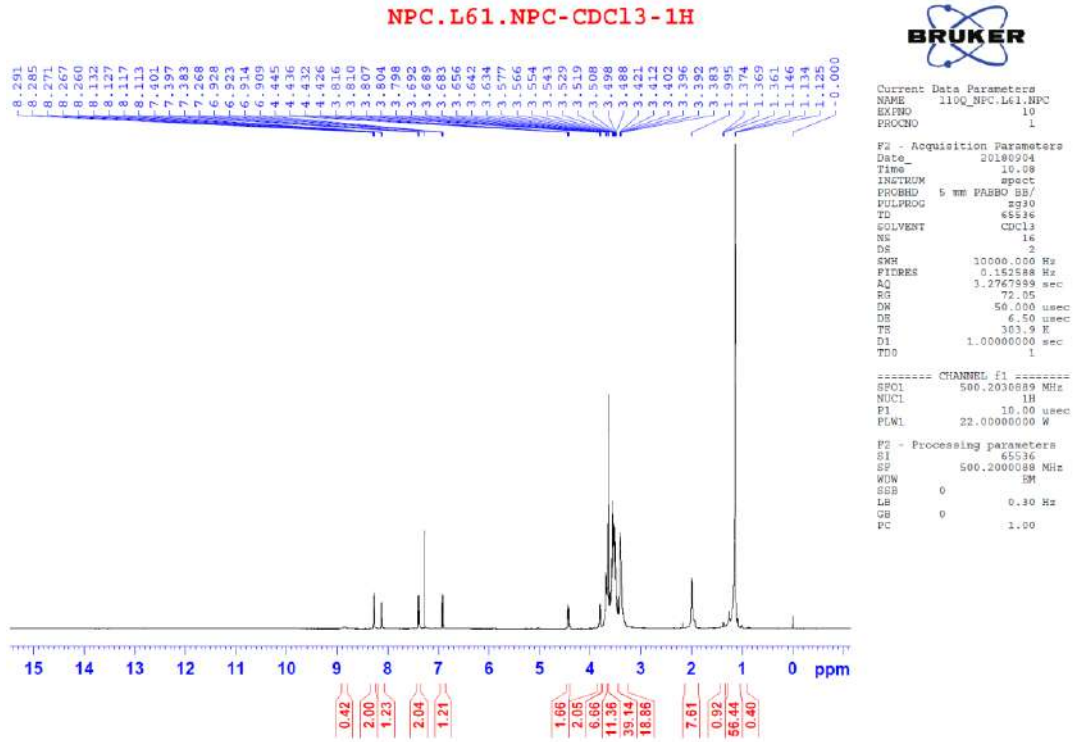
214. Zhang, W., Gilstrap, K., Wu, L., He, X., 2010. Synthesis and characterization of thermally responsive pluronic F127– chitosan nanocapsules for controlled release and intracellular delivery of small molecules. *ACS nano*, 4(11), pp.6747-6759.
215. KC, R.B., Lee, S.M., Do Ghim, H., 2009. Glycoconjugated chitosan stabilized iron oxide nanoparticles as a multifunctional nanoprobe. *Materials Science and Engineering: C*, 29(5), pp.1668-1673.
216. KC, R.B., Lee, S.M., Do Ghim, H., 2009. Glycoconjugated chitosan stabilized iron oxide nanoparticles as a multifunctional nanoprobe. *Materials Science and Engineering: C*, 29(5), pp.1668-1673.
217. Guinesi, L.S., Cavalheiro, É.T.G., 2006. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. *Thermochimica Acta*, 444(2), pp.128-133.
218. Ferrero, F., Periolatto, M., 2012. Antimicrobial finish of textiles by chitosan UV-curing. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 12(6), pp.4803-4810.
219. Zhang, W., Shi, Y., Chen, Y., Fang, X., 2011. Multifunctional Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles loaded with paclitaxel for the treatment of multidrug resistant tumors. *Biomaterials*, 32(11), pp.2894-2906.
220. Park, K.M., Bae, J.W., Joung, Y.K., Park, K.D., 2008. Nanoaggregate of thermosensitive chitosan-Pluronic for sustained release of hydrophobic drug. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63(1), pp.1-6.
221. Kumar, V., Gupta, P.K., Pawar, V.K., Verma, Mishra, P.R., 2014. In-Vitro and In-Vivo Studies on Novel Chitosan-g-pluronic F-127 copolymer based nanocarrier of Amphotericin B for improved antifungal activity. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 4(3), pp.210-216.
222. Owen, S.C., Chan, D.P., Shoichet, M.S., 2012. Polymeric micelle stability. *Nano today*, 7(1), pp.53-65.
223. Chaibundit, C., Ricardo, N.M., Costa, F.D.M., Booth, C., 2007. Micellization and gelation of mixed copolymers P123 and F127 in aqueous solution. *Langmuir*, 23(18), pp.9229-9236.
224. Kadam, Y., Bahadur, A., 2009. Solubilization of poorly water-soluble drug carbamezapine in Pluronic® micelles: effect of molecular characteristics, temperature and added salt on the solubilizing capacity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72(1), pp.141-147.
225. Kwon, G.S., Kataoka, K., 1995. Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles. *Advanced drug delivery reviews*, 16(2-3), pp.295-309.

226. Šturcová, A., Schmidt, P., Dybal, J., 2010. Role of hydration and water coordination in micellization of Pluronic block copolymers. *Journal of colloid and interface science*, 352(2), pp.415-423.
227. Attwood, D., Booth, C., Yeates, S.G., Ricardo, N.M., 2007. Block copolymers for drug solubilisation: Relative hydrophobicities of polyether and polyester micelle-core-forming blocks. *International journal of pharmaceutics*, 345(1-2), pp.35-41.
228. Khanal, S., Adhikari, U., Rijal, N.P., Bhattarai, N., 2016. pH-responsive PLGA nanoparticle for controlled payload delivery of diclofenac sodium. *Journal of functional biomaterials*, 7(3), p.21.
229. Sahay, G., Alakhova, D.Y., Kabanov, A.V., 2010. Endocytosis of nanomedicines. *Journal of controlled release*, 145(3), pp.182-195.
230. Chen, Q., Lu, H., Yang, H., 2014. Chitosan inhibits fibroblasts growth in Achilles tendon via TGF- β 1/Smad3 pathway by miR-29b. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(12), p.8462.
231. Uğur Aydın, Z., Akpınar, K.E., Erdönmez, D., 2018. Assessment of toxicity and oxidative DNA damage of sodium hypochlorite, chitosan and propolis on fibroblast cells. *Brazilian Oral Research*, 32.
232. Demirci, S., Doğan, A., Karakuş, E., Halıcı, Z., Sahin, F., 2015. Boron and poloxamer (F68 and F127) containing hydrogel formulation for burn wound healing. *Biological trace element research*, 168, pp.169-180.
233. Arranja, A., Schroder, A.P., Mendes, E., 2014. Cytotoxicity and internalization of Pluronic micelles stabilized by core cross-linking. *Journal of Controlled Release*, 196, pp.87-95.
234. Kabanov, A.V., Alakhov, V.Y., 2002. Pluronic® block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. *Advanced drug delivery reviews*, 54(5), pp.759-779.
235. Batrakova, E.V., Li, S., Kabanov, A.V., 2003. Optimal structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304(2), pp.845-854.
236. Wei, Z., Yuan, S., Fang, X., 2013. Mechanism of inhibition of P-glycoprotein mediated efflux by Pluronic P123/F127 block copolymers: relationship between copolymer concentration and inhibitory activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 83(2), pp.266-274.

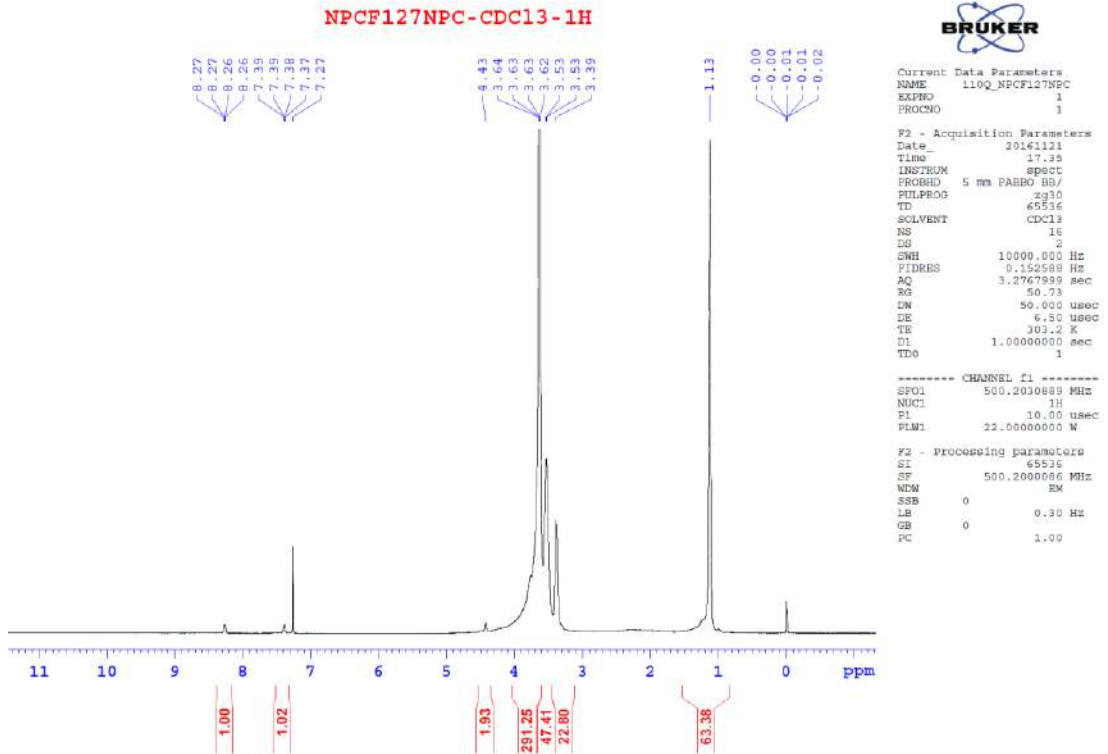
237. Zhang, M., Jing, S., Zhang, J., Zhang, J., Chen, D., 2017. Intracellular release of PluronicL64 unimers into MCF-7/ADR cells to overcome multidrug resistance by surface-modified PAMAM. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(21), pp.3970-3981.
238. Kotze, A.F., Luessen, H.L., Lehr, C., 1999. Chitosan and chitosan derivatives as absorption enhancers for peptide drugs across mucosal epithelia. *Drugs and the pharmaceutical sciences*, 98, pp.341-386.
239. Hong, W., Shi, H., Kang, L., 2017. pH-sensitive micelles for the intracellular co-delivery of curcumin and Pluronic L61 unimers for synergistic reversal effect of multidrug resistance. *Scientific Reports*, 7(1), p.42465.
240. Liu, J., Li, Z., Yang, X., Liu, W., Zhu, W., 2015. A high-performance imaging probe with NIR luminescence and synergistically enhanced T₁-T₂ relaxivity for in vivo hepatic tumor targeting and multimodal imaging. *Chemical Communications*, 51(69), pp.13369-13372.
241. Jiang, X., Ahmed, M., Narain, R., 2009. Biotinylated glyco-functionalized quantum dots: synthesis, characterization, and cytotoxicity studies. *Bioconjugate chemistry*, 20(5), pp.994-1001.
242. Hegde, S., Kapoor, S., Mukherjee, T., 2006. Self-assembly of Ag nanoparticle-biotin composites into long fiberlike microstructures. *Journal of colloid and interface science*, 297(2), pp.637-643.
243. Balan, V., Redinciuc, V., Verestiuc, L., 2016. Biotinylated N-palmitoyl chitosan for design of drug loaded self-assembled nanocarriers. *European Polymer Journal*, 81, pp.284-294.
244. Gad, A., Kydd, J., Rai, P., 2016. Targeting cancer using polymeric nanoparticle mediated combination chemotherapy. *International journal of nanomedicine and nanosurgery*, 2(3).
245. Saha, C., Kaushik, A., Majumder, D., 2016. Anthracycline drugs on modified surface of quercetin-loaded polymer nanoparticles: a dual drug delivery model for cancer treatment. *Plos one*, 11(5), p.e0155710.
246. Martínez-Relimpio, A.M., Blanco, M.D., 2021. Paclitaxel-loaded folate-targeted albumin-alginate nanoparticles crosslinked with ethylenediamine. synthesis and in vitro characterization. *Polymers*, 13(13), p.2083.
247. Lv, L., Liu, C., Chen, C., Li, G., 2016. Quercetin and doxorubicin co-encapsulated biotin receptor-targeting nanoparticles for minimizing drug resistance in breast cancer. *Oncotarget*, 7(22), p.32184.

PHỤ LỤC

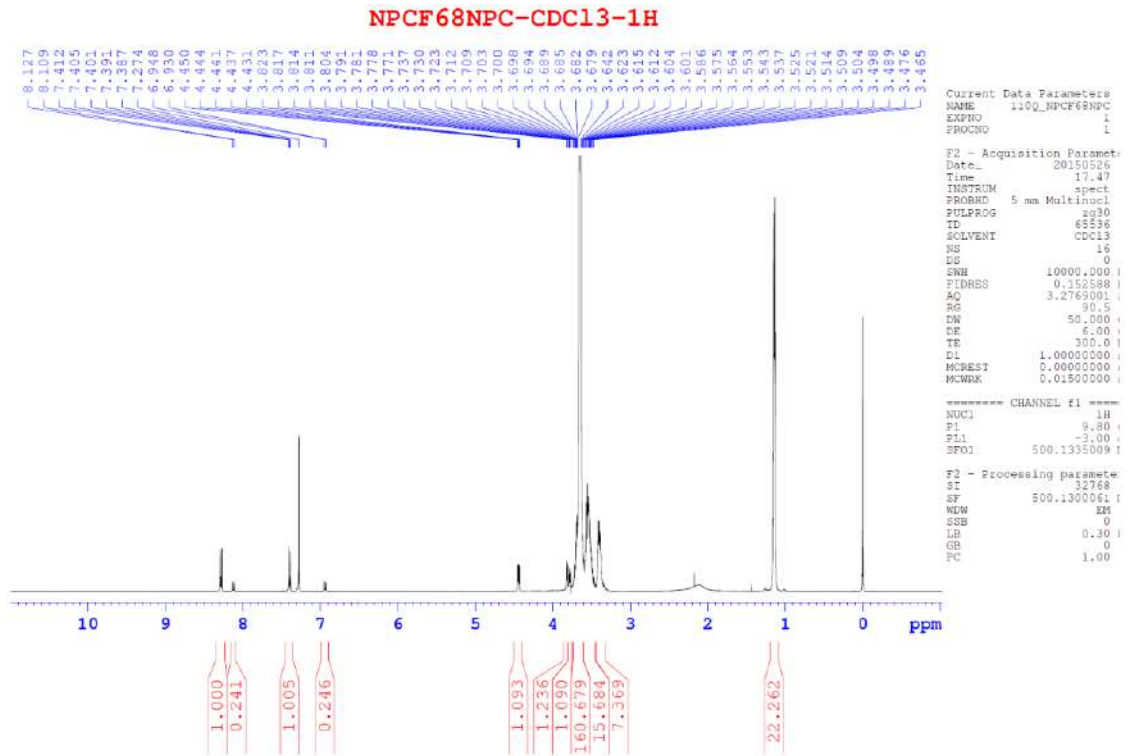
Phụ lục 1. Phổ ¹H-NMR của NPC-L61-NPC.



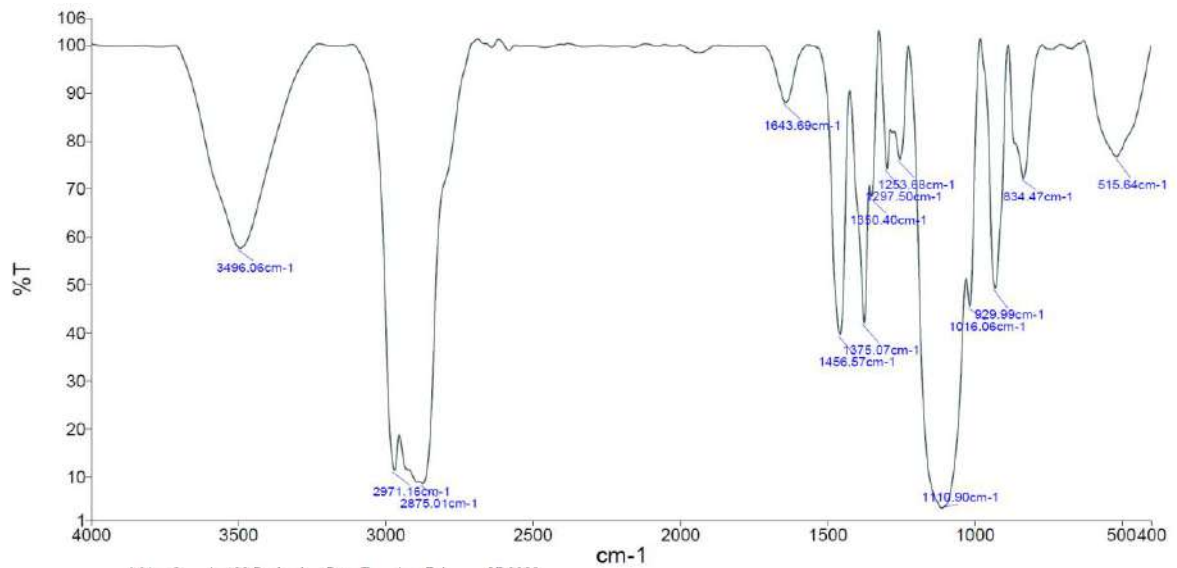
Phụ lục 2. Phổ ¹H-NMR của NPC-F127-NPC.

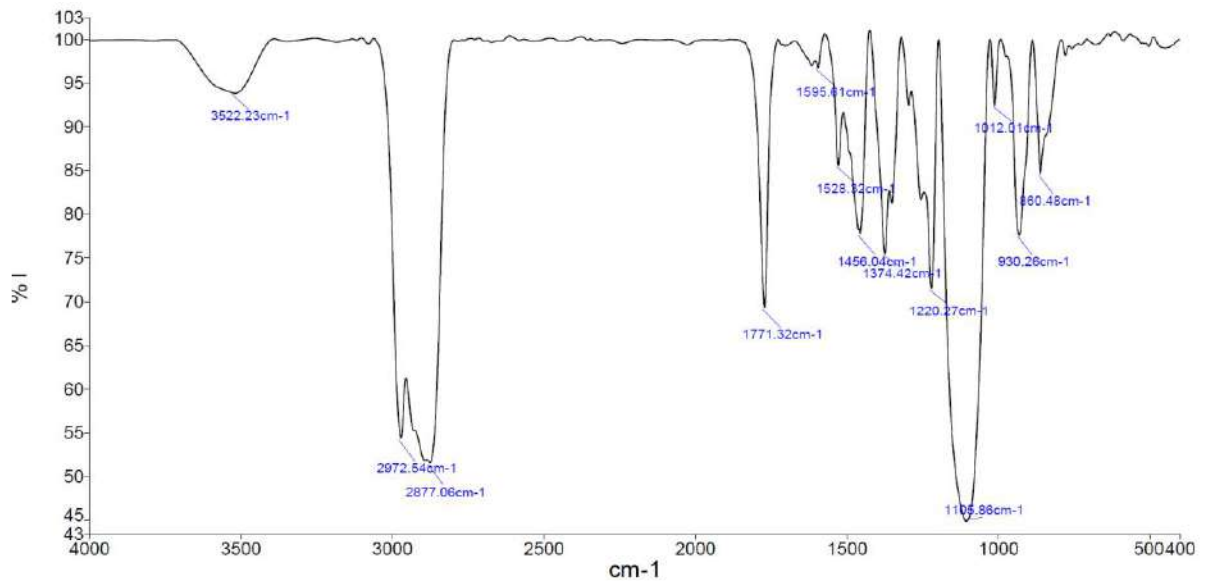
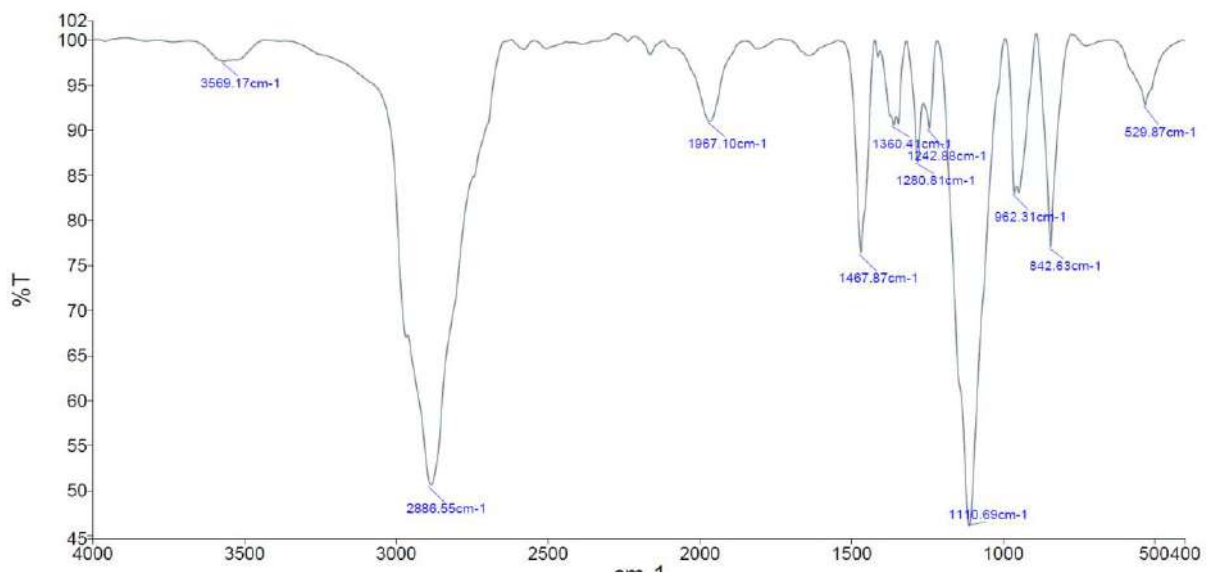


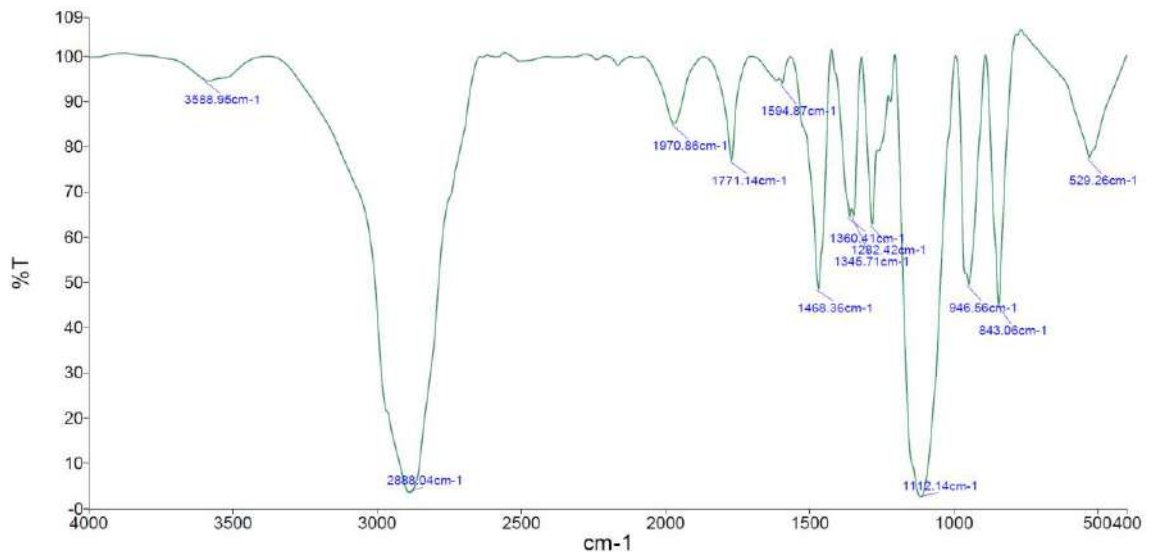
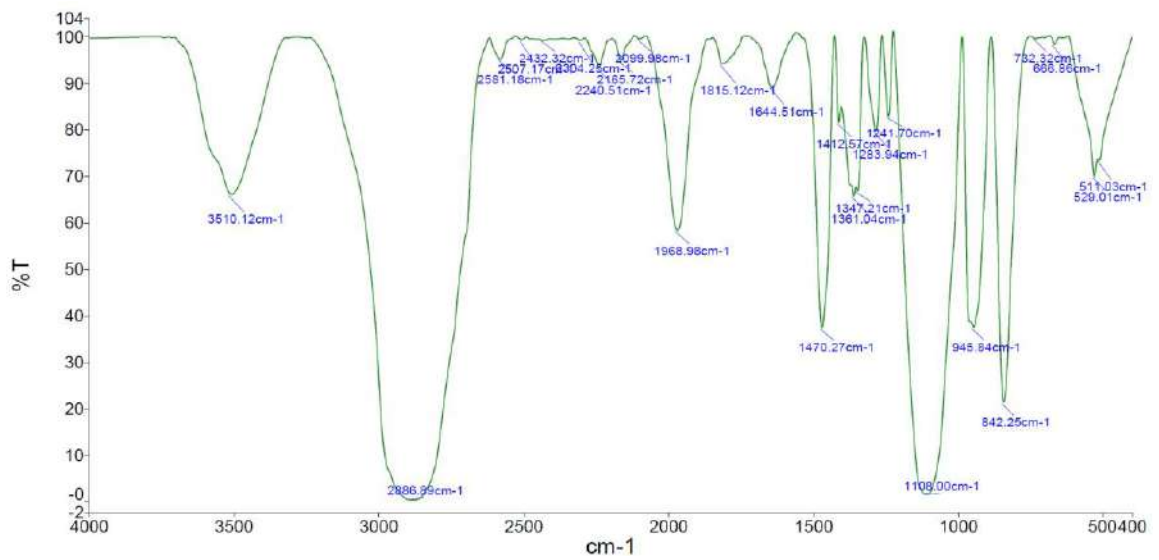
Phụ lục 3. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của NPC-F68-NPC.



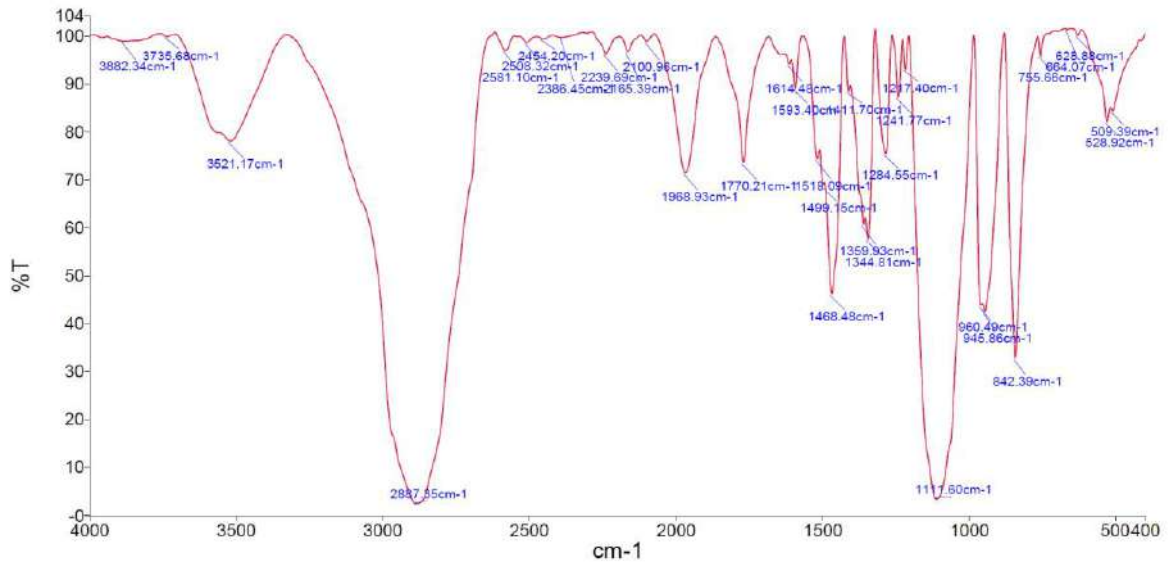
Phụ lục 4. Phổ FT-IR của Pluronic L61.



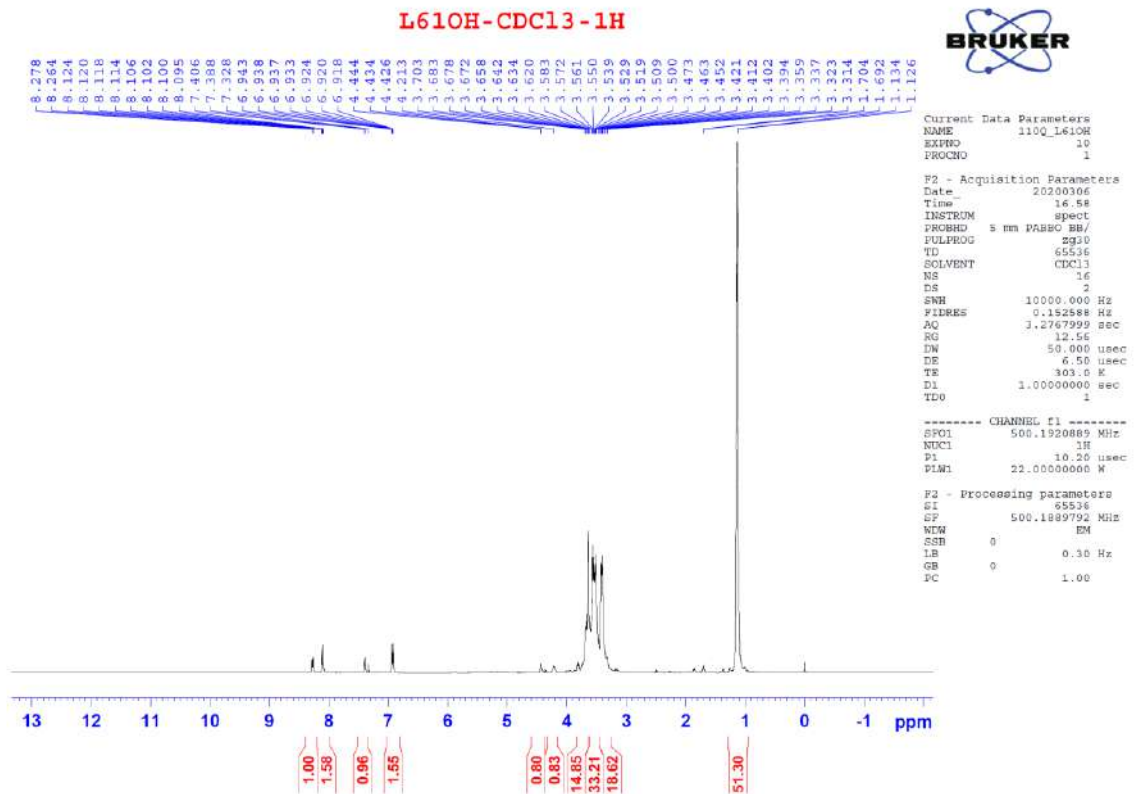
Phụ lục 5. Phổ FT-IR của NPC-L61-NPC.**Phụ lục 6. Phổ FT-IR của Pluronic F127.**

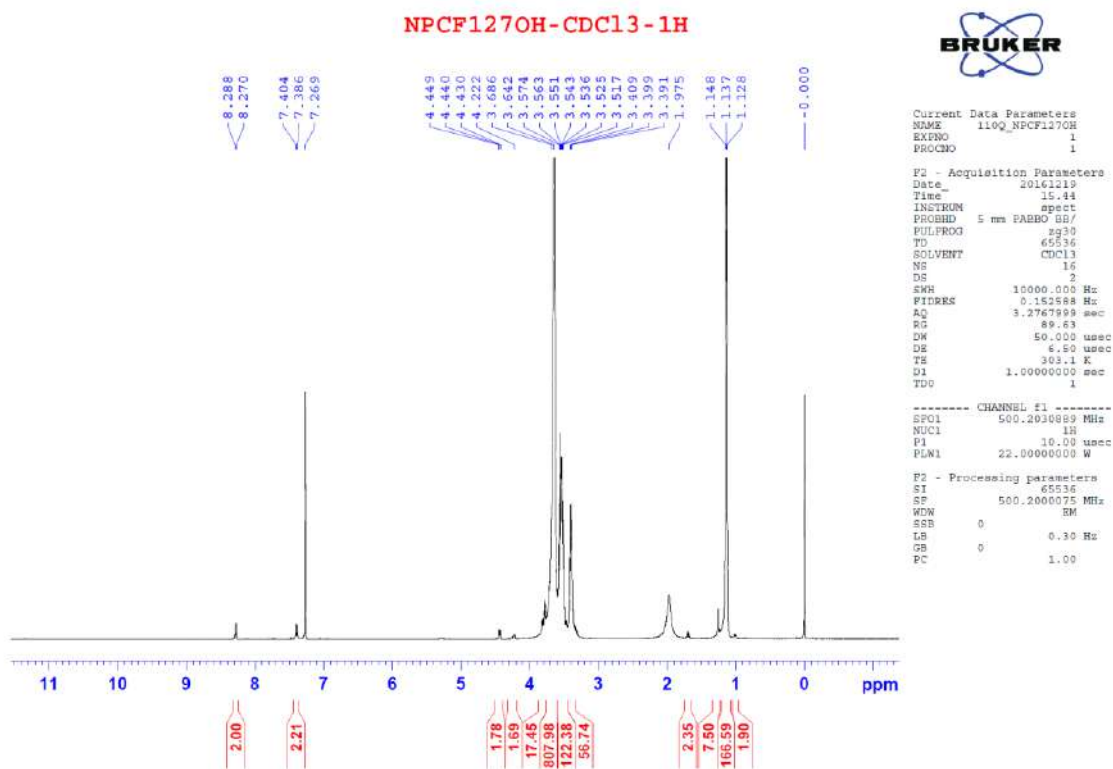
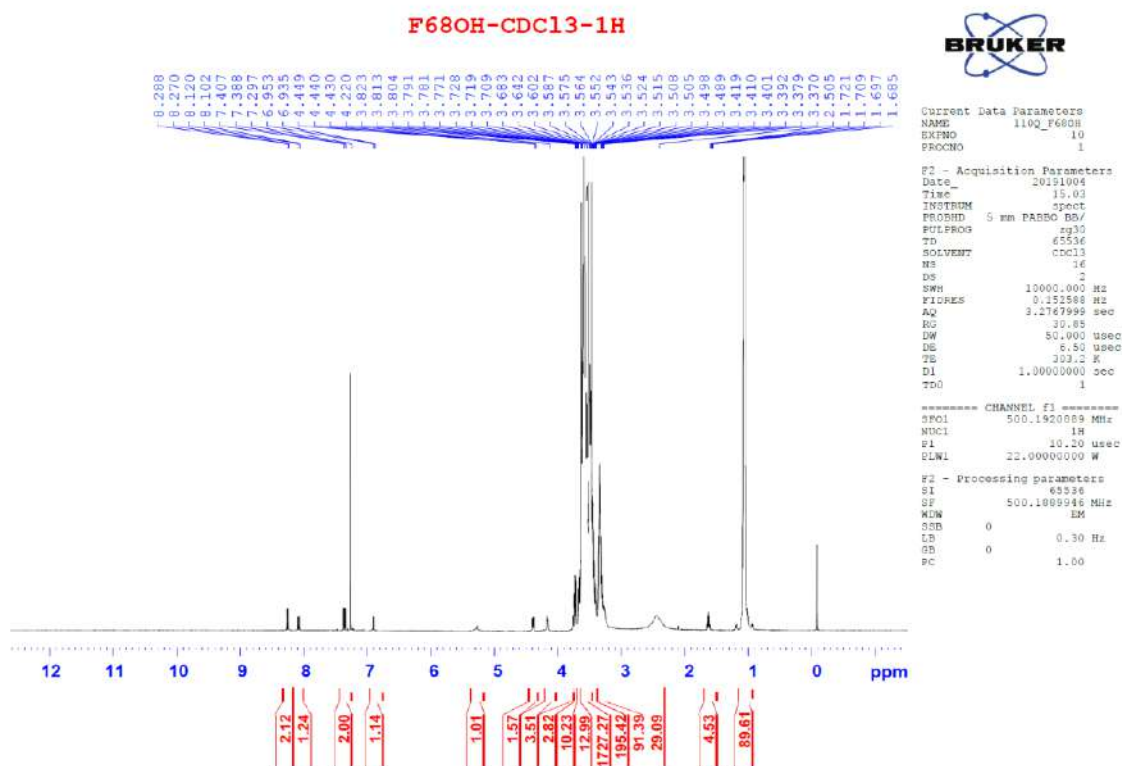
Phụ lục 7. Phổ FT-IR của NPC-F127-NPC.**Phụ lục 8. Phổ FT-IR của Pluronic F68.**

Phụ lục 9. Phổ FT-IR của NPC-F68-NPC.

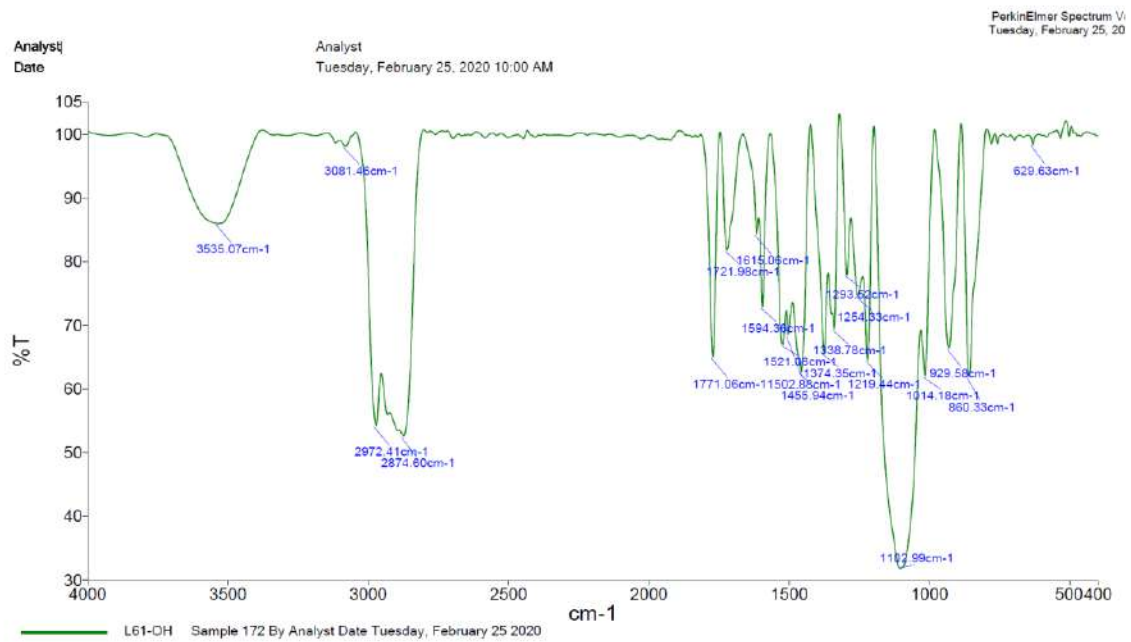


Phụ lục 10. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của NPC-L61-OH.

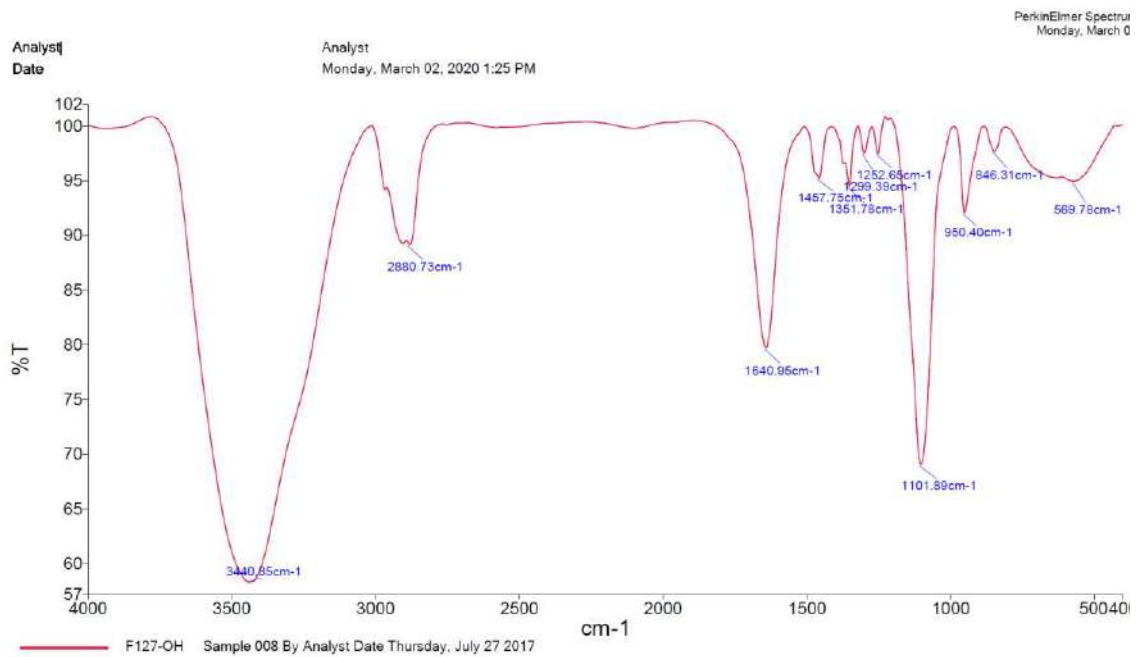


Phụ lục 11. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của NPC-F127-OH.Phụ lục 12. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của NPC-F168-OH.

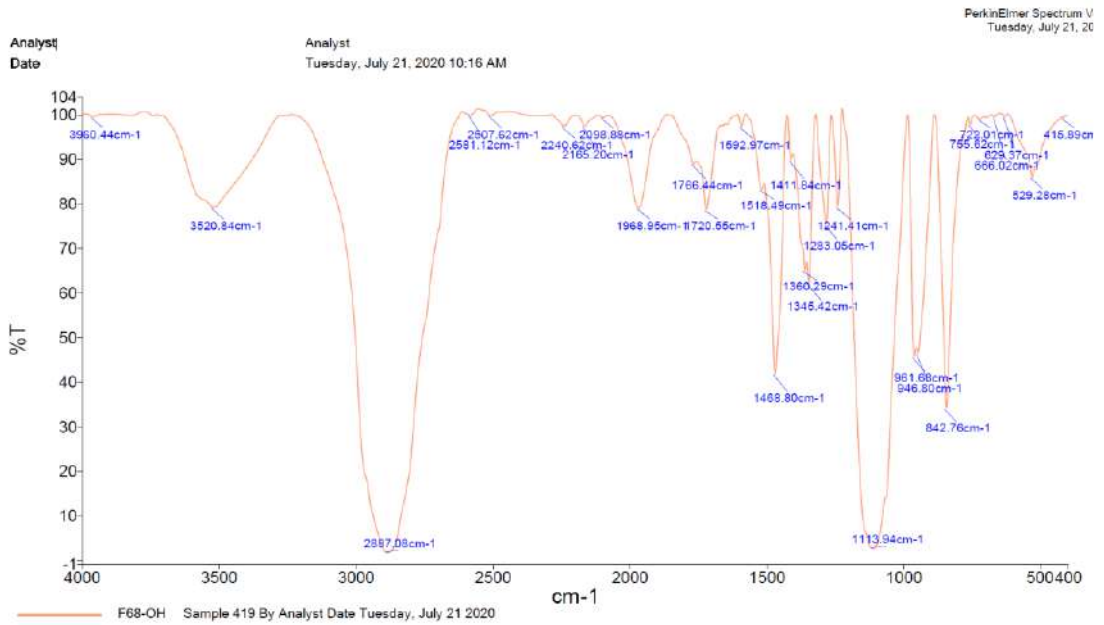
Phụ lục 13. Phổ FT-IR của NPC-L61-OH.



Phụ lục 14. Phổ FT-IR của NPC-F127-OH.

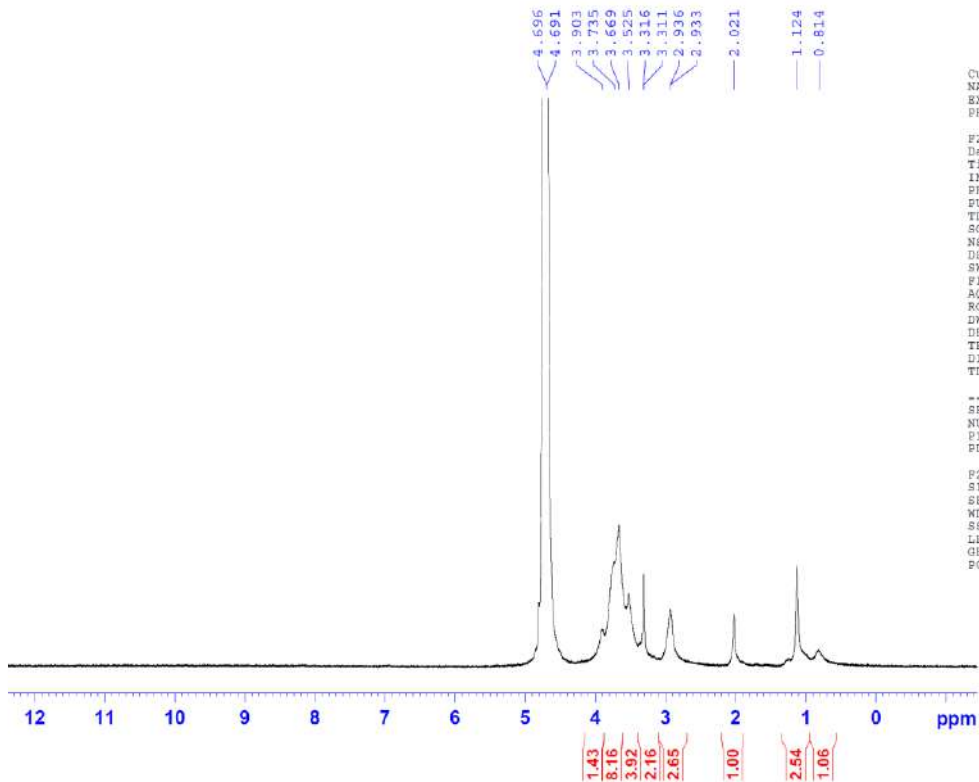


Phụ lục 15. Phổ FT-IR của NPC-F68-OH.



Phụ lục 16. Phổ ¹H-NMR của CS-L61.

CSL61-D2O-1H

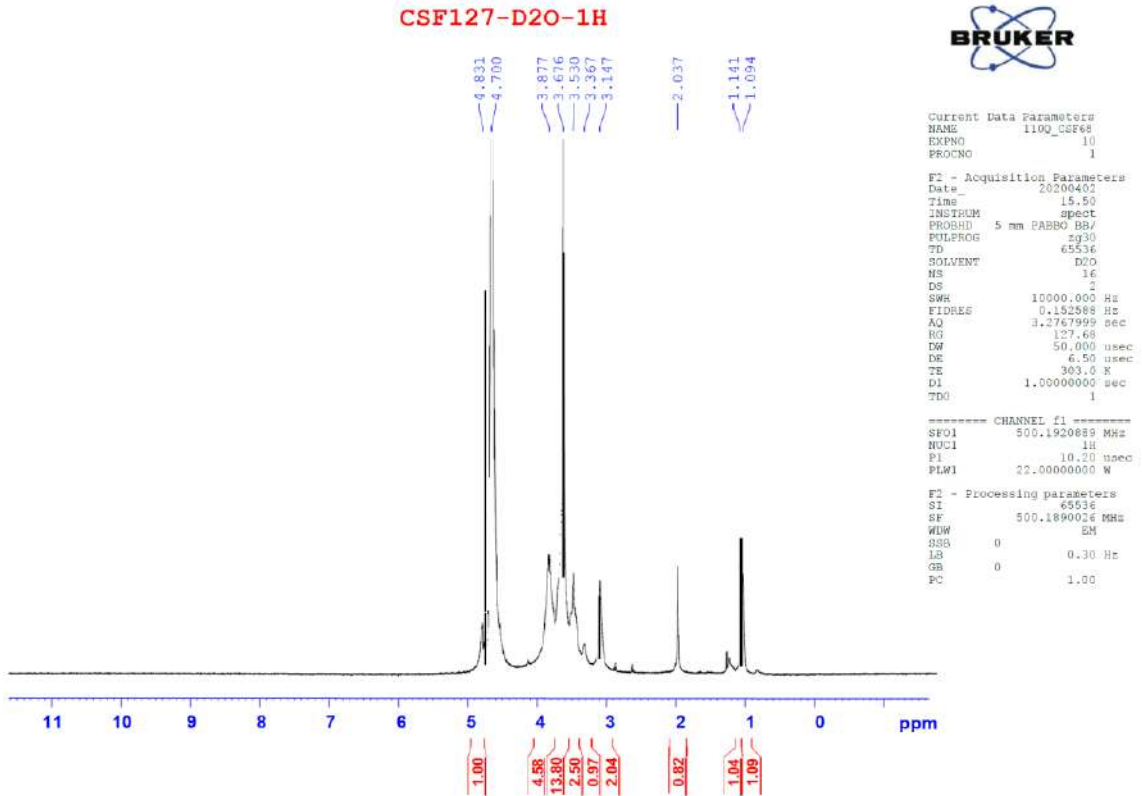
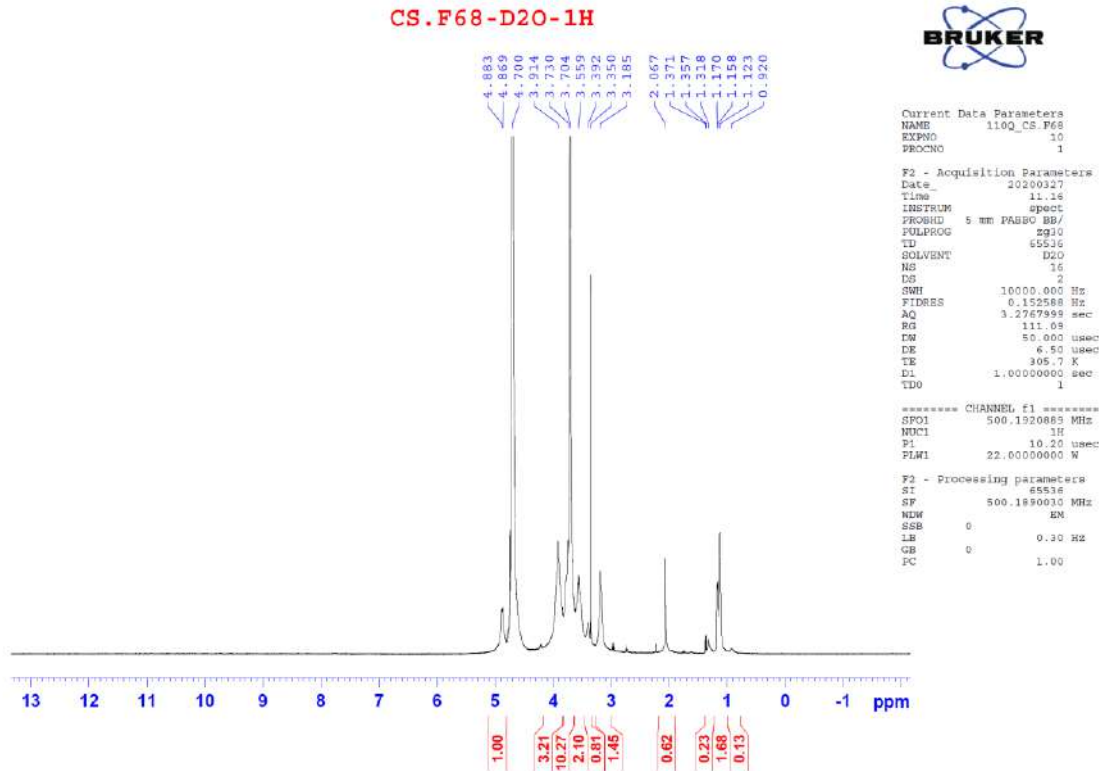


Current Data Parameters
NAME 110Q_CSL61
EXPNO 10
PROCNO 1

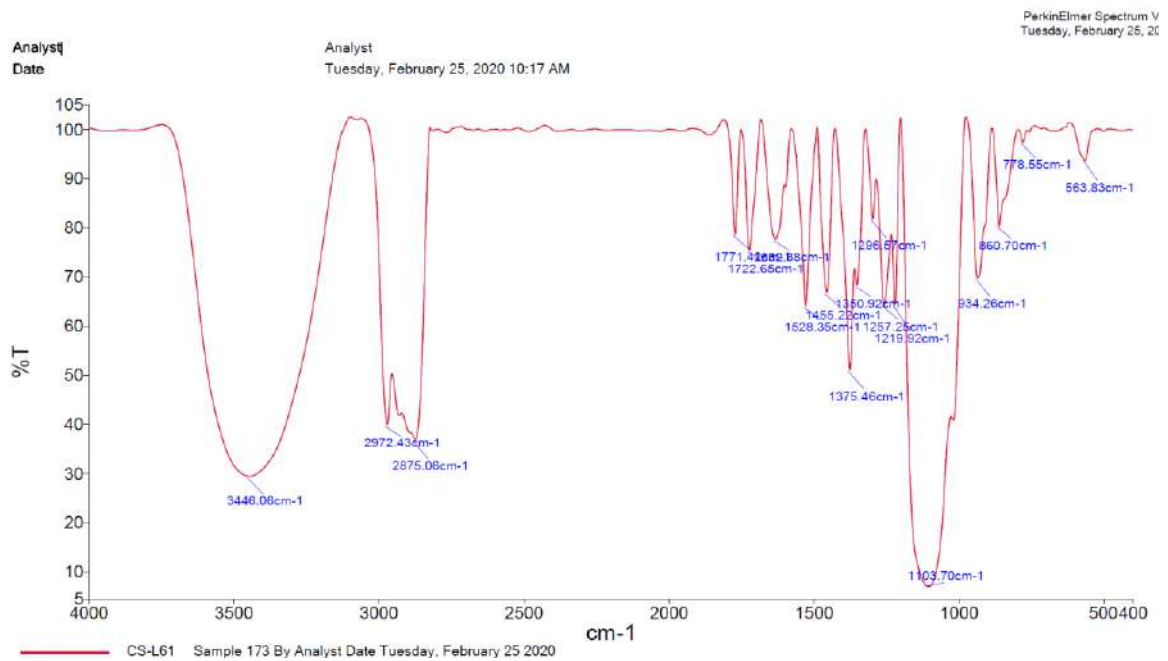
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20200306
Time 17.04
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB/
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 16
DS 2
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.152588 Hz
AQ 3.2767999 sec
RG 157.35
DW 50.000 usec
DE 6.50 usec
TE 303.0 K
D1 1.00000000 sec
TDO 1

----- CHANNEL f1 -----
SFO1 500.1920889 MHz
NUC1 1H
P1 10.20 usec
PLW1 22.00000000 W

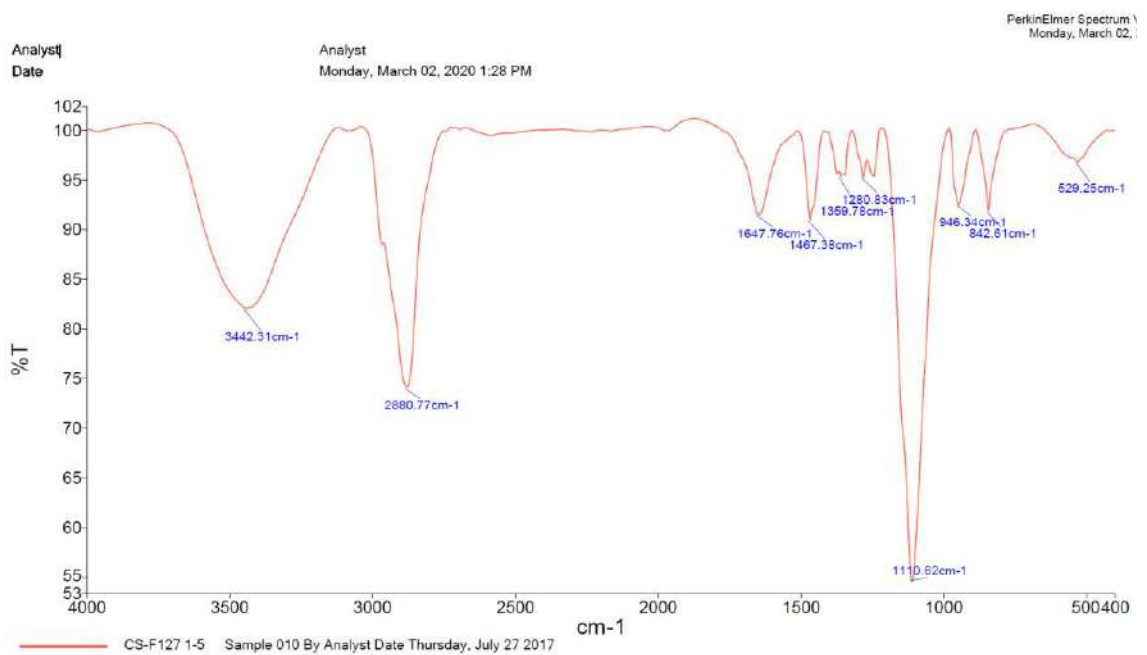
F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 500.1890079 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

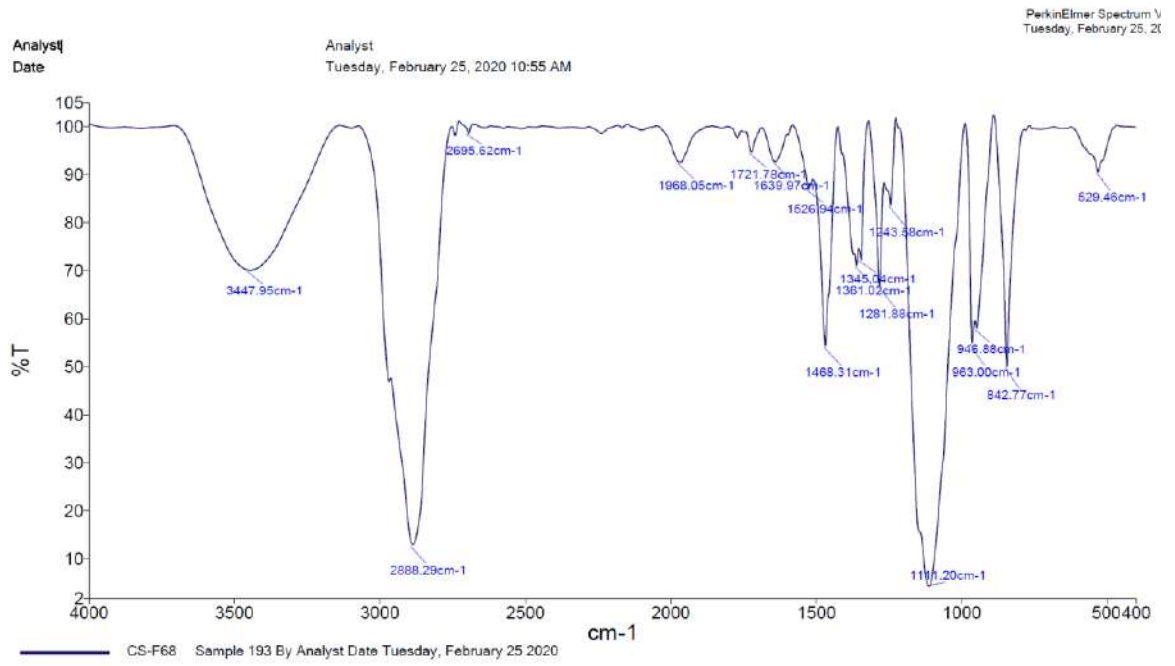
Phụ lục 17. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của CS-F127.Phụ lục 18. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của CS-F68.

Phụ lục 19. Phổ FT-IR của CS-L61.

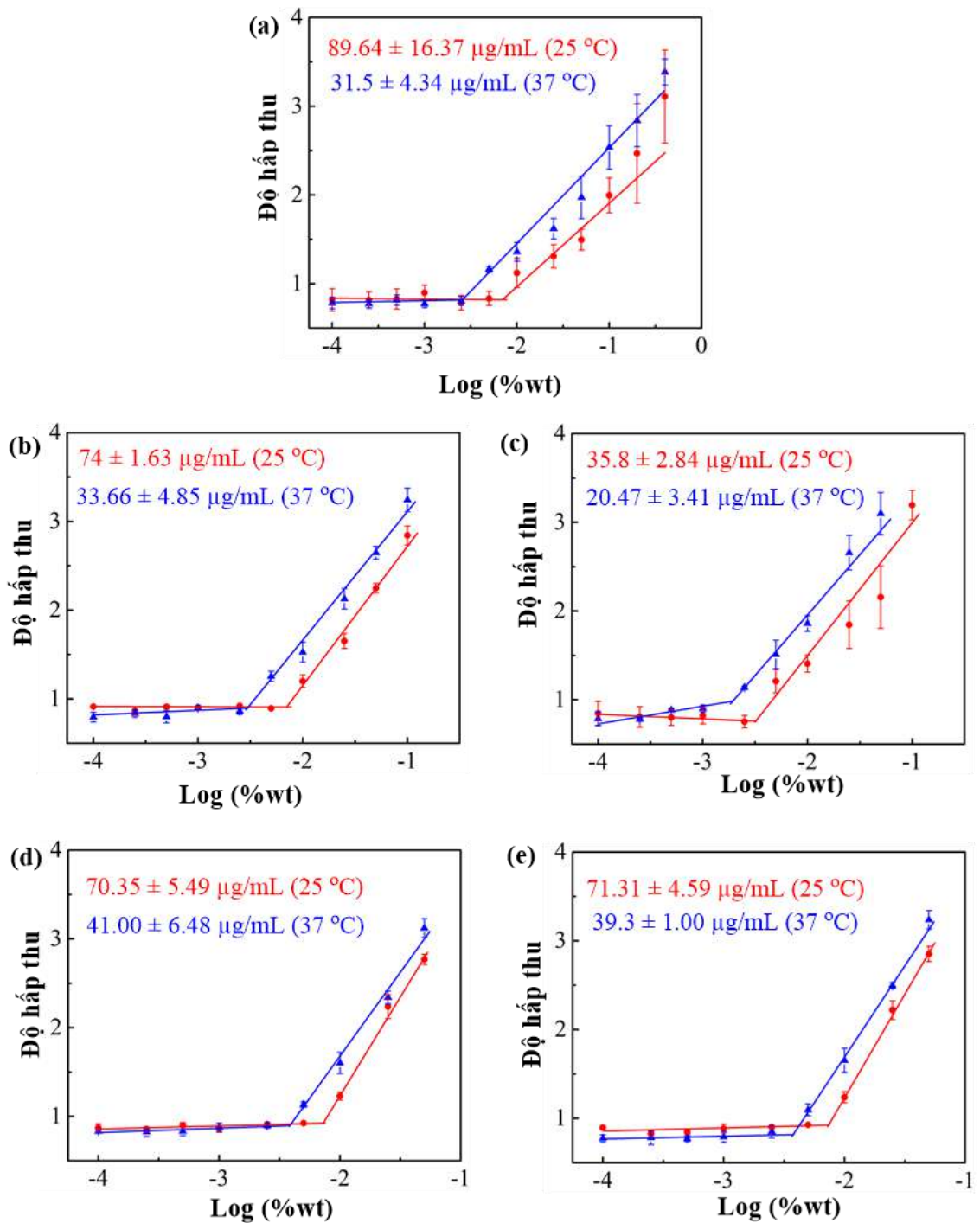


Phụ lục 20. Phổ FT-IR của CS-F127.

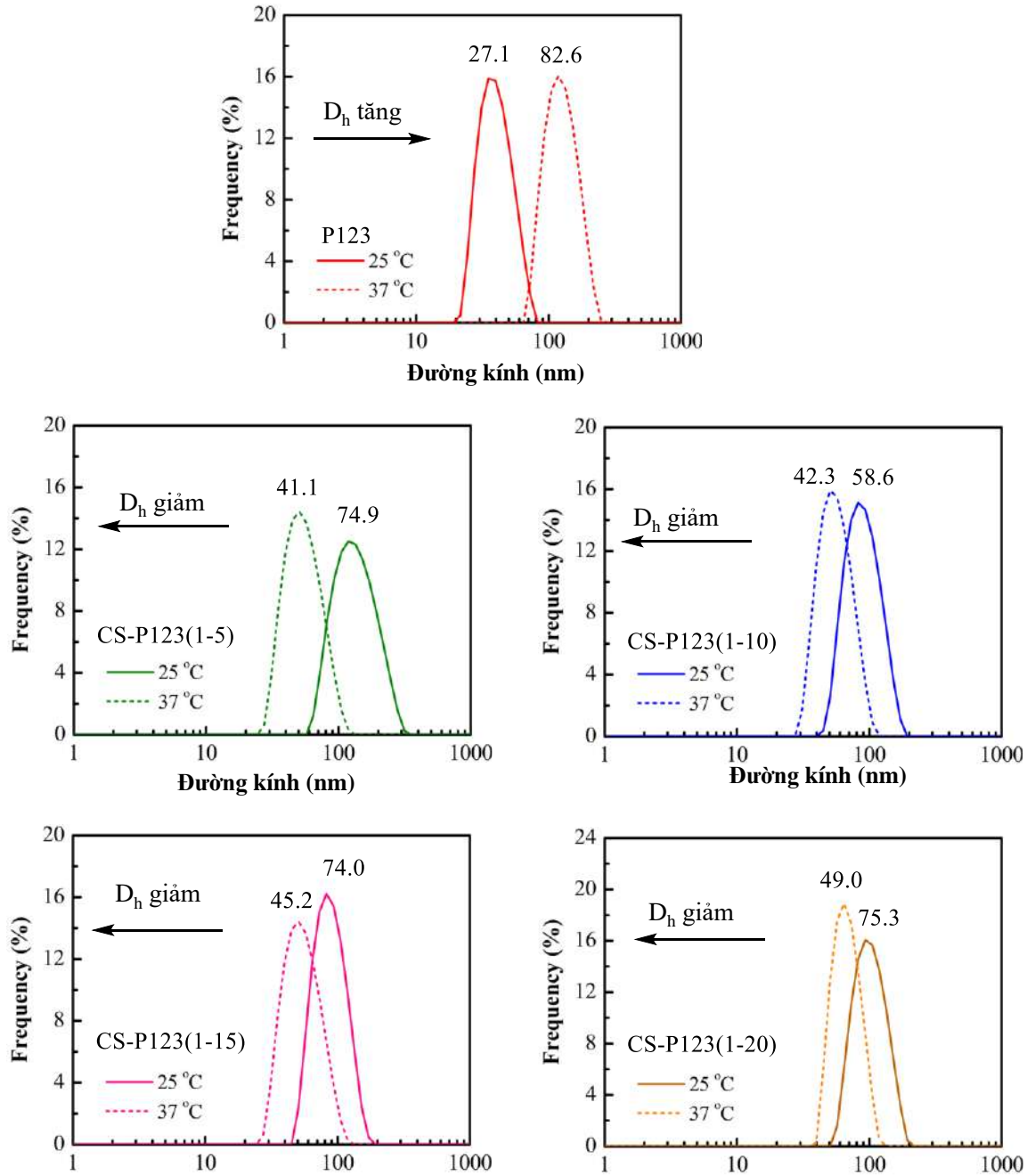


Phụ lục 21. Phổ FT-IR của CS-F68.

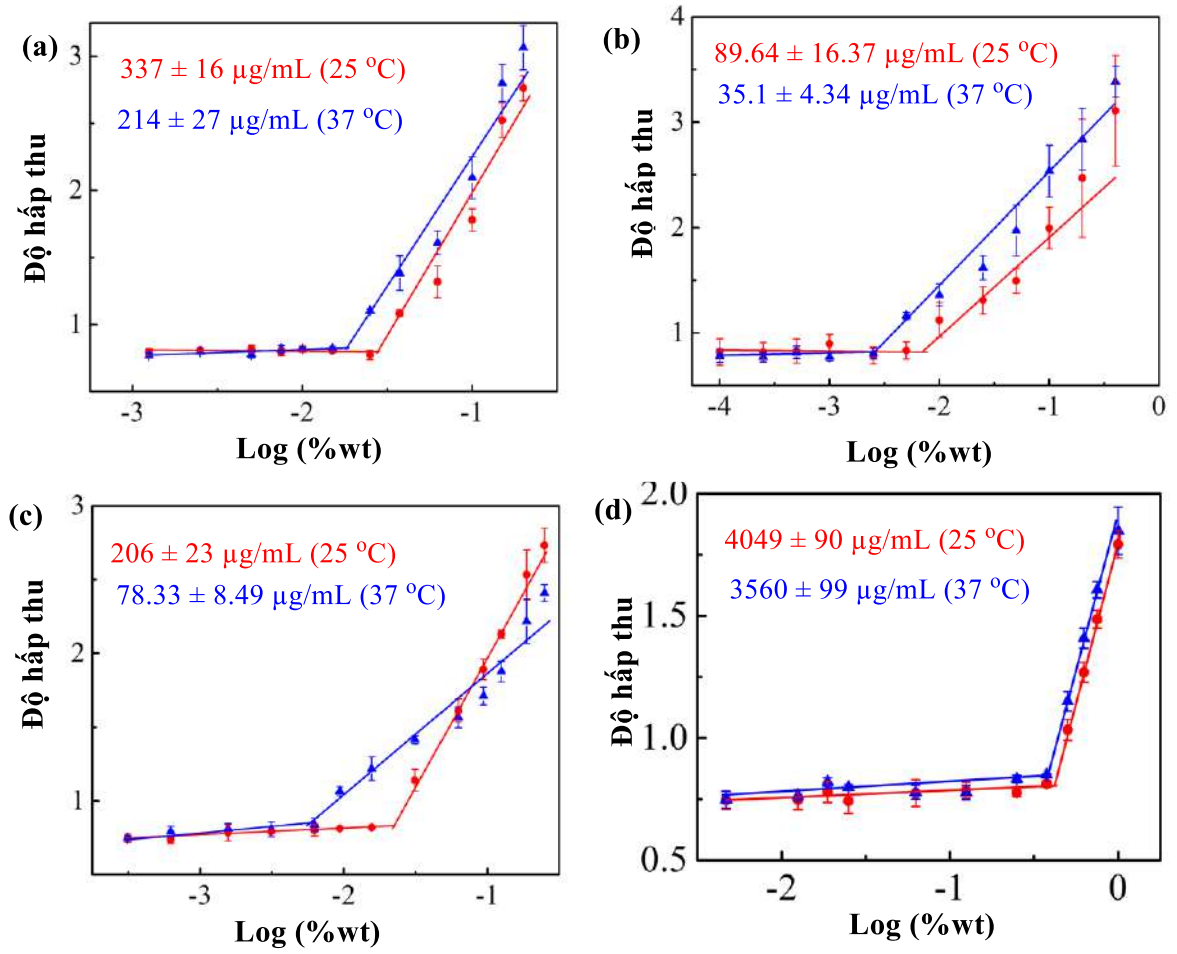
Phụ lục 22. Biểu đồ xác định giá trị CMC của P123 (a), CS-P123(1-5) (b), CS-P123(1-10) (c), CS-P123(1-15) (d) và CS-P123(1-20) (e) ở 25 °C và 37 °C.



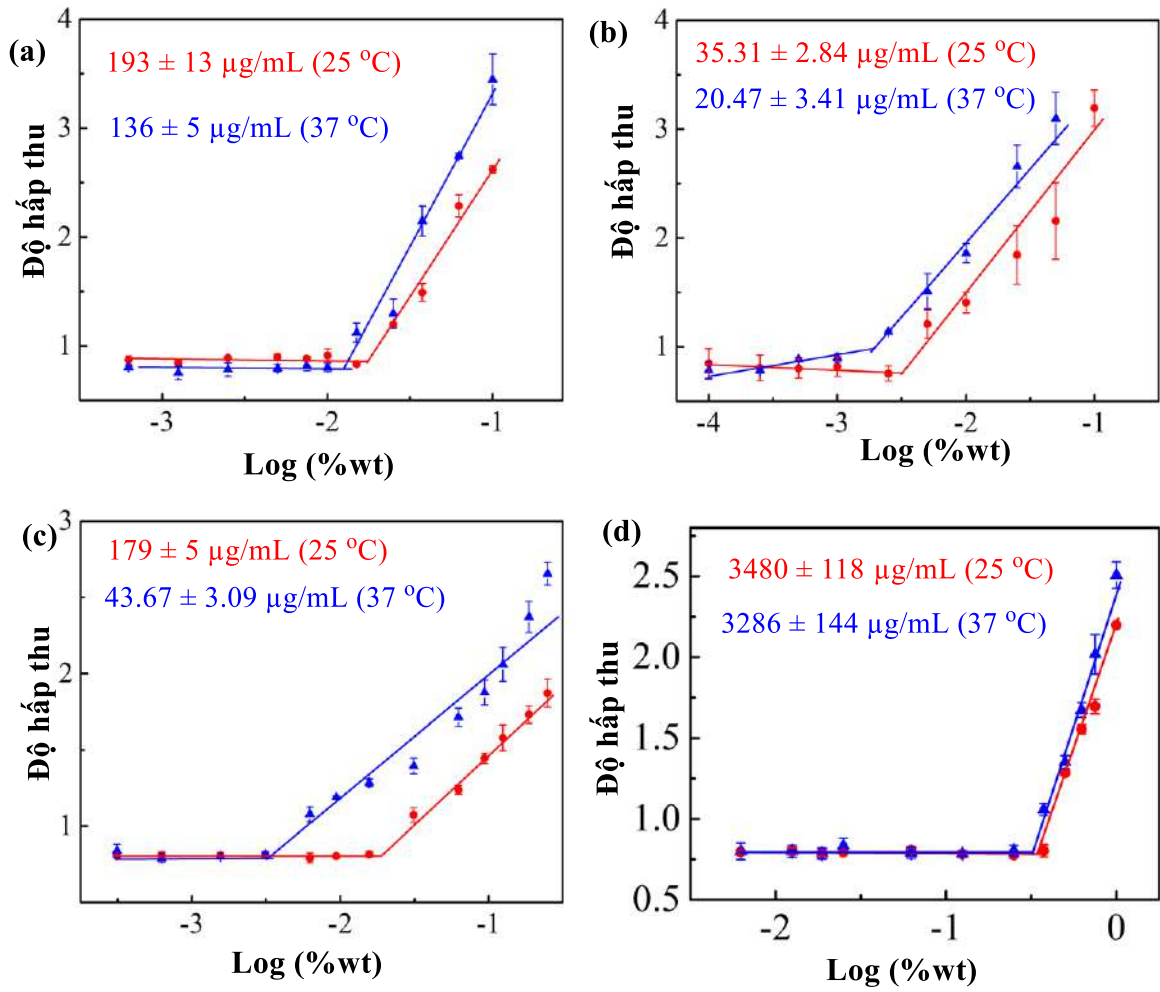
Phụ lục 23. Biểu đồ so sánh kết quả DLS của P123, CS-P123(1-5), CS-P123(1-10), CS-P123(1-15) và CS-P123(1-20) ở 25 °C và 37 °C.



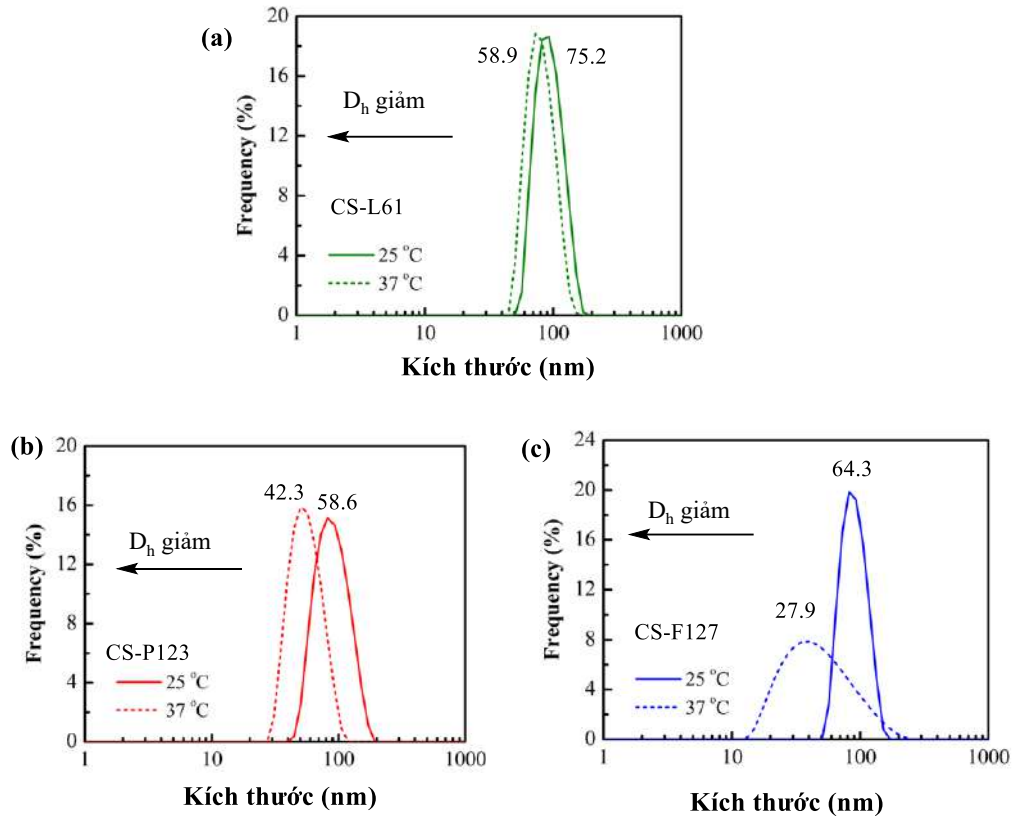
Phụ lục 24. Biểu đồ xác định giá trị CMC của L61 (a), P123 (b), F127 (c) và F68 ở 25 °C và 37 °C.



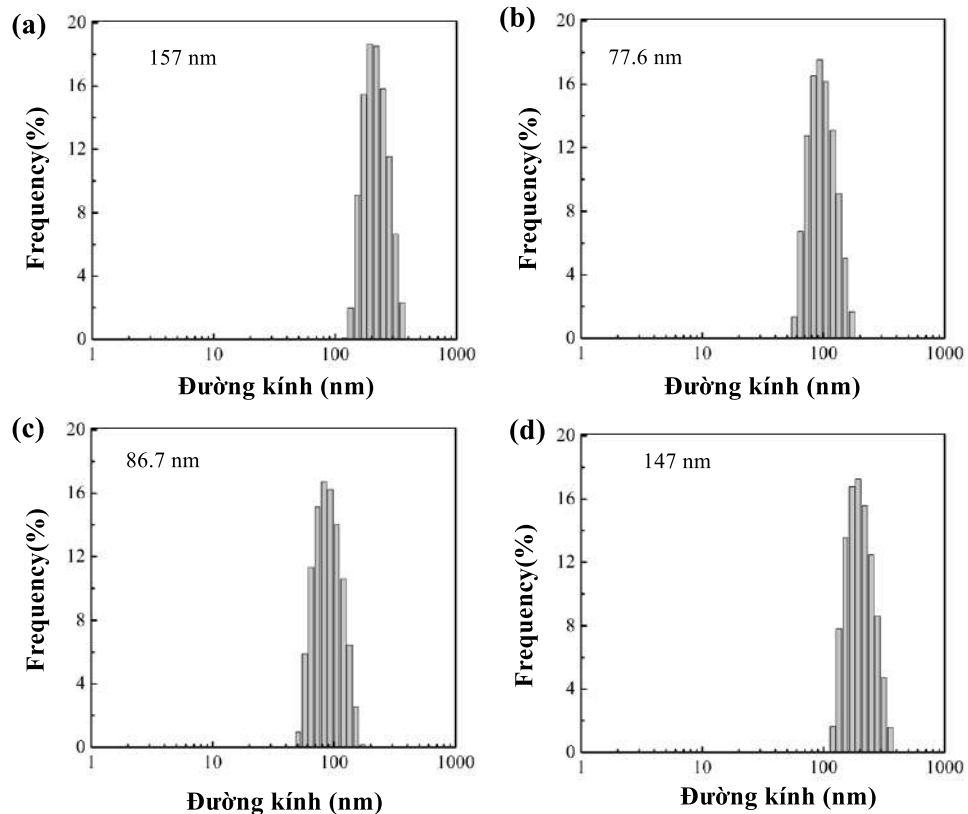
Phụ lục 25. Biểu đồ xác định giá trị CMC của CS-L61 (a), CS-P123 (b), CS-F127 (c) và CS-F68 (d) ở 25 °C và 37 °C.



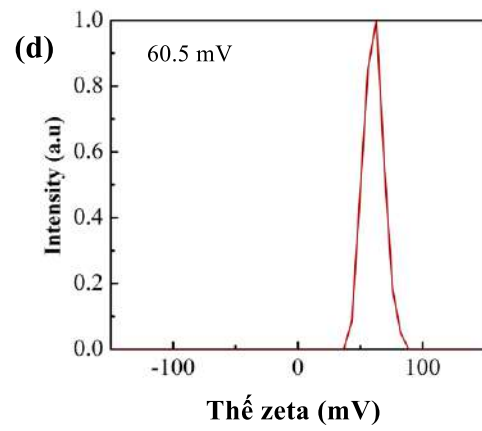
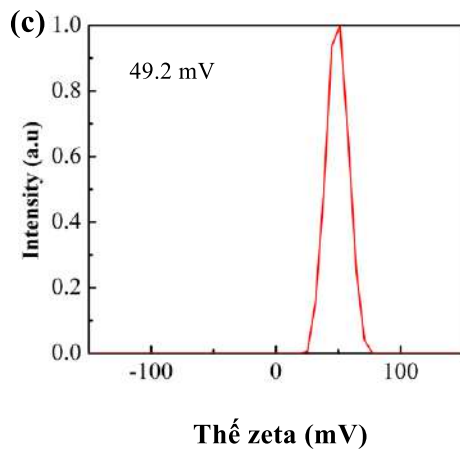
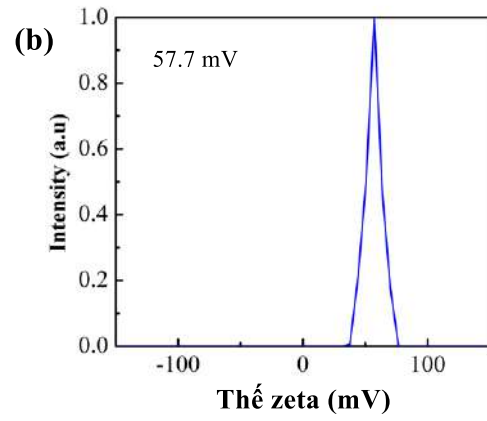
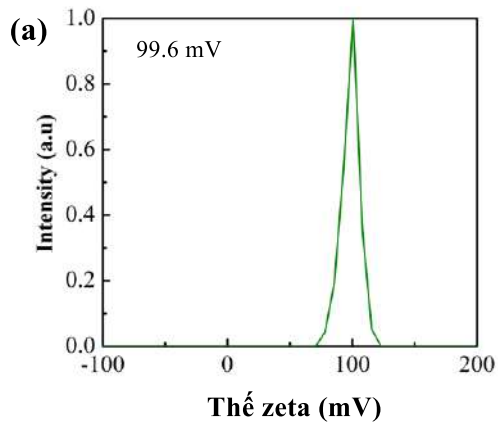
Phụ lục 26. Biểu đồ xác định giá trị DLS của CS-L61 (a), CS-P123 (b), CS-F127 (c) ở 25 °C và 37 °C.

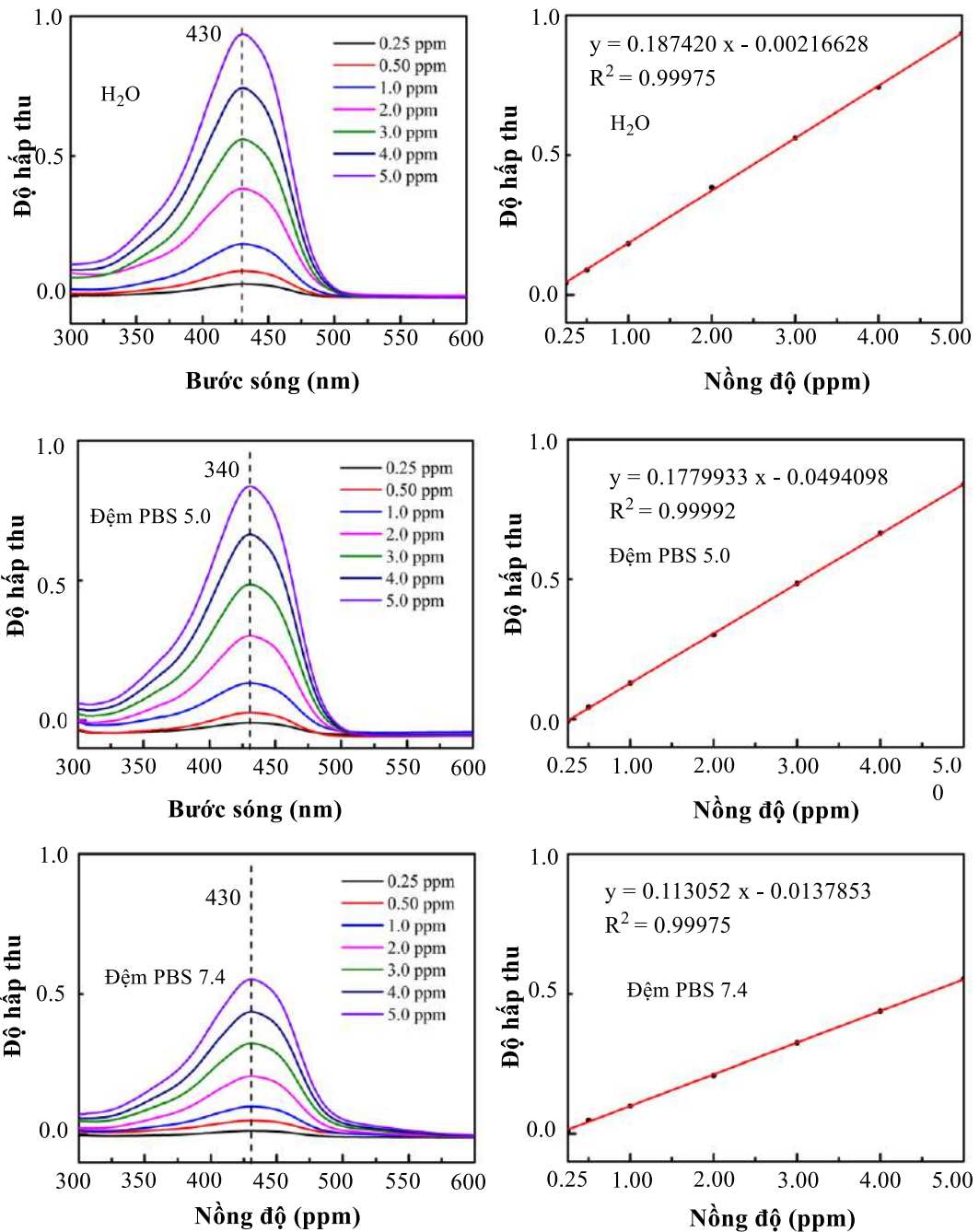


Phụ lục 27. Biểu đồ xác định giá trị DLS của CS-L61/CUR (a), CS-P123/CUR (b), CS-F127/CUR (c) và CS-F68/CUR (c) ở 25 °C.



Phụ lục 28. Biểu đồ xác định giá trị thế zeta của CS-L61/CUR (a), CS-P123/CUR (b), CS-F127/CUR (c) và CS-F68/CUR (c) ở 25 °C.



Phụ lục 29. Đường chuẩn CUR đo ở các môi trường khác nhau bằng UV-Vis.**Phụ lục 30.** Hiệu suất nang hóa CUR.

Tên mẫu	Hàm lượng CUR (%)	Nồng độ mẫu đo (ppm)	Nồng độ CUR (ppm)	Nồng độ CUR đo được (ppm)			DL (%)	EE (%)
				Lần 1	Lần 2	Lần 3		
P123	5	50	2.5	2.40	2.40	2.32	4.74 ± 0.08	94.88 ± 1.53
	10	25	2.5	2.31	2.05	2.17	8.71 ± 0.44	87.05 ± 4.36
	15	25	3.75	2.46	2.23	2.07	9.01 ± 0.64	60.07 ± 4.24
CS-P123(1-5)	5	50	2.5	2.55	2.44	2.40	4.92 ± 0.13	98.49 ± 2.64
	10	25	2.5	2.41	2.35	2.10	9.15 ± 0.53	91.45 ± 5.33

Tên mẫu	Hàm lượng CUR (%)	Nồng độ mẫu đo (ppm)	Nồng độ CUR (ppm)	Nồng độ CUR đo được (ppm)			DL (%)	EE (%)
				Lần 1	Lần 2	Lần 3		
	15	25	3.75	2.50	2.77	2.57	10.45 ± 0.47	69.64 ± 3.13
CS-P123(1-10)	5	50	2.5	2.40	2.49	2.49	4.92 ± 0.08	98.47 ± 1.64
	10	25	2.5	2.51	2.41	2.40	9.76 ± 0.21	97.57 ± 2.06
	15	25	3.75	3.10	3.39	2.97	12.62 ± 0.71	84.12 ± 4.70
CS-P123(1-15)	5	50	2.5	2.50	2.46	2.40	4.91 ± 0.08	98.21 ± 1.65
	10	25	2.5	2.30	2.50	2.41	9.60 ± 0.33	96.03 ± 3.27
	15	25	3.75	2.68	2.97	2.53	10.91 ± 0.73	72.76 ± 4.85
CS-P123(1-15)	5	50	2.5	2.40	2.57	2.41	4.92 ± 0.15	98.32 ± 3.10
	10	25	2.5	2.40	2.38	2.51	9.71 ± 0.22	97.09 ± 2.25
	15	25	3.75	2.70	2.40	2.66	10.34 ± 0.54	68.92 ± 3.57
CS-L6	5	50	2.5	2.12	2.28	2.04	4.29 ± 0.20	85.88 ± 3.96
	10	25	2.5	1.37	1.17	1.30	5.12 ± 0.34	51.17 ± 3.41
	15	25	3.75	1.55	1.49	1.23	5.70 ± 0.56	37.98 ± 3.75
CS-F127	5	50	2.5	2.35	2.48	2.58	4.94 ± 0.19	98.83 ± 3.81
	10	25	2.5	2.21	2.36	2.20	9.02 ± 0.29	90.24 ± 2.89
	15	25	3.75	2.20	2.48	2.38	9.41 ± 0.46	62.76 ± 3.06
CS-F68	5	50	2.5	1.91	2.02	2.00	3.96 ± 0.10	79.20 ± 1.93
	10	25	2.5	1.13	0.99	0.97	4.12 ± 0.29	41.20 ± 2.89
	15	25	3.75	1.21	0.97	1.06	4.32 ± 0.41	28.82 ± 2.71

Phụ lục 31. Nồng độ CUR giải phóng theo thời gian ở pH 7.4.

Tên mẫu	Nồng độ mẫu (ppm)	Nồng độ CUR có trong mẫu (ppm)	Thời gian	Nồng độ CUR đo theo thời gian (ppm)			Phần trăm CUR tích lũy (%)
				Lần 1	Lần 2	Lần 3	
CS-L61/CUR	2000	117.70	0.5	0.29	0.30	0.19	6.65 ± 1.29
			1	0.10	0.21	0.20	10.91 ± 1.19
			2	0.12	0.17	0.20	15.06 ± 0.79
			3	0.12	0.18	0.19	19.31 ± 0.80
			6	0.21	0.17	0.20	24.23 ± 0.48
			12	0.19	0.12	0.20	28.55 ± 0.88
			24	0.22	0.11	0.14	32.52 ± 1.26
			36	0.29	0.15	0.16	37.64 ± 1.64
CS-P123/CUR	2000	247.12	0.5	0.12	0.12	0.23	1.88 ± 0.63
			1	0.16	0.15	0.14	3.68 ± 0.11
			2	0.15	0.12	0.06	5.03 ± 0.45
			3	0.17	0.12	0.19	6.98 ± 0.33
			6	0.10	0.19	0.16	8.81 ± 0.45
			12	0.19	0.15	0.11	10.65 ± 0.40
			24	0.19	0.07	0.12	12.16 ± 0.56

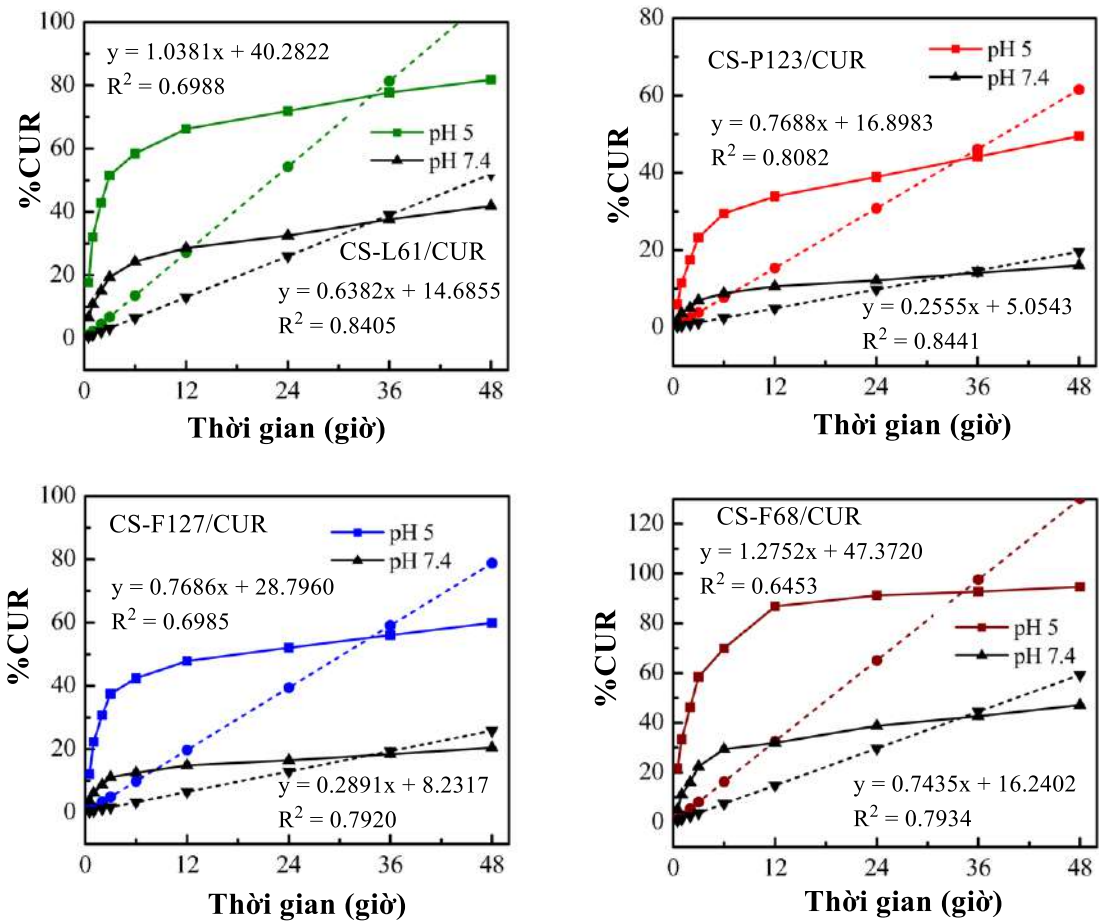
			36	0.22	0.16	0.11	14.12 ± 0.56
			48	0.22	0.10	0.15	16.03 ± 0.59
CS-F127/CUR	2000	188.32	0.5	0.21	0.25	0.22	3.63 ± 0.30
			1	0.16	0.15	0.16	6.16 ± 0.11
			2	0.13	0.18	0.18	8.71 ± 0.36
			3	0.19	0.13	0.13	11.09 ± 0.47
			6	0.10	0.14	0.04	12.56 ± 0.62
			12	0.20	0.09	0.15	14.86 ± 0.71
			24	0.10	0.15	0.06	16.45 ± 0.59
			36	0.14	0.08	0.16	18.43 ± 0.56
			48	0.19	0.12	0.08	20.49 ± 0.67
CS-F68/CUR	2000	95.49	0.5	0.25	0.13	0.11	5.18 ± 1.86
			1	0.17	0.19	0.21	11.15 ± 0.53
			2	0.19	0.15	0.14	16.08 ± 0.72
			3	0.19	0.15	0.27	22.42 ± 1.67
			6	0.22	0.16	0.29	29.35 ± 1.66
			12	0.01	0.20	0.04	31.94 ± 2.64
			24	0.17	0.19	0.30	38.74 ± 1.83
			36	0.11	0.09	0.18	42.65 ± 1.20
			48	0.16	0.17	0.10	47.16 ± 0.97

Phụ lục 32. Nồng độ CUR giải phóng theo thời gian ở pH 5.

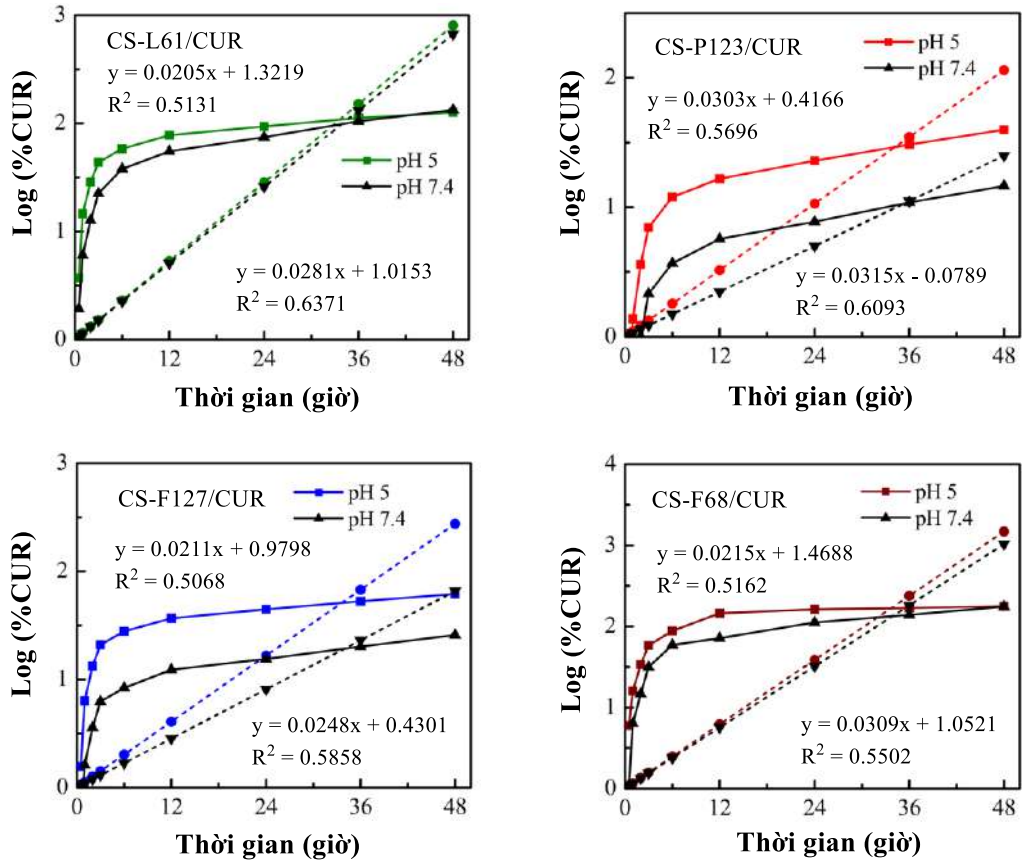
Tên mẫu	Nồng độ mẫu (ppm)	Nồng độ CUR có trong mẫu (ppm)	Thời gian	Nồng độ CUR đo theo thời gian (ppm)			Phần trăm CUR tích lũy (%)
				Lần 1	Lần 2	Lần 3	
CS-L61/CUR	2000	119.68	0.5	0.75	0.69	0.67	17.66 ± 0.90
			1	0.70	0.58	0.45	32.06 ± 2.56
			2	0.54	0.44	0.32	42.87 ± 2.22
			3	0.40	0.39	0.25	51.52 ± 1.73
			6	0.30	0.23	0.30	58.41 ± 0.88
			12	0.36	0.31	0.26	66.20 ± 1.02
			24	0.30	0.15	0.23	71.87 ± 1.58
			36	0.29	0.28	0.13	77.72 ± 1.92
			48	0.28	0.10	0.11	81.78 ± 2.05
CS-P123/CUR	2000	246.77	0.5	0.57	0.49	0.41	5.92 ± 0.80
			1	0.52	0.45	0.41	11.49 ± 0.55
			2	0.50	0.56	0.42	17.46 ± 0.70
			3	0.58	0.42	0.43	23.24 ± 0.88
			6	0.58	0.56	0.40	29.47 ± 0.94
			12	0.45	0.41	0.23	33.87 ± 1.19
			24	0.52	0.41	0.30	38.89 ± 1.10
			36	0.59	0.34	0.36	44.13 ± 1.40
			48	0.52	0.30	0.49	49.47 ± 1.18
CS-F127/CUR	2000	188.05	0.5	0.84	0.72	0.73	12.16 ± 0.85

			1	0.73	0.65	0.52	22.32 ± 1.38
			2	0.62	0.56	0.41	30.78 ± 1.47
			3	0.53	0.40	0.32	37.46 ± 1.39
			6	0.37	0.36	0.20	42.42 ± 1.23
			12	0.44	0.33	0.26	47.85 ± 1.20
			24	0.28	0.13	0.37	52.03 ± 1.57
			36	0.38	0.21	0.18	56.06 ± 1.42
			48	0.32	0.28	0.12	59.93 ± 1.37
			0.5	0.62	0.77	0.68	21.78 ± 1.97
			1	0.45	0.31	0.35	33.37 ± 1.83
			2	0.35	0.52	0.36	46.21 ± 2.49
			3	0.38	0.50	0.29	58.46 ± 2.62
			6	0.24	0.33	0.53	69.90 ± 3.85
			12	0.46	0.68	0.47	86.87 ± 3.11
			24	0.21	0.12	0.09	91.27 ± 1.52
			36	0.02	0.10	0.02	92.74 ± 1.17
			48	0.03	0.12	0.04	94.73 ± 1.29
CS-F68/CUR	2000	95.22					

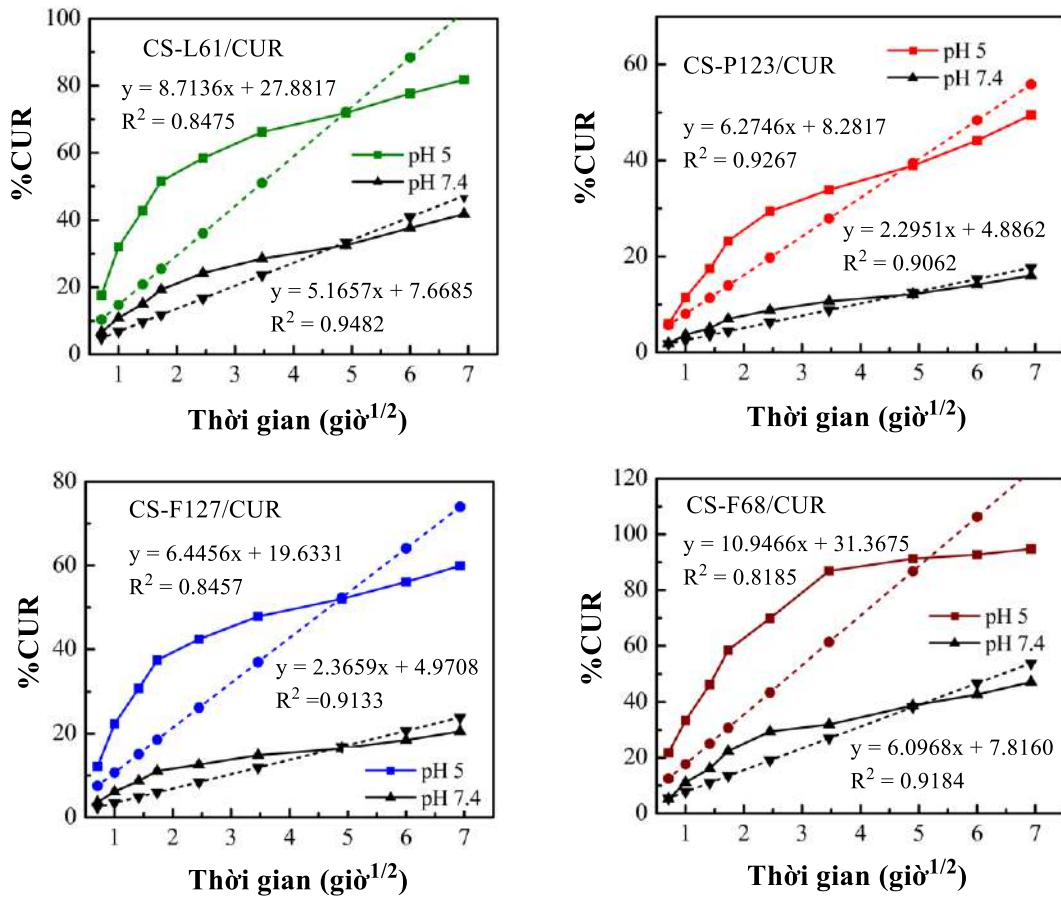
Phụ lục 33. Mô hình động học Zero-order của các nanogel CS-Pluronic/CUR.

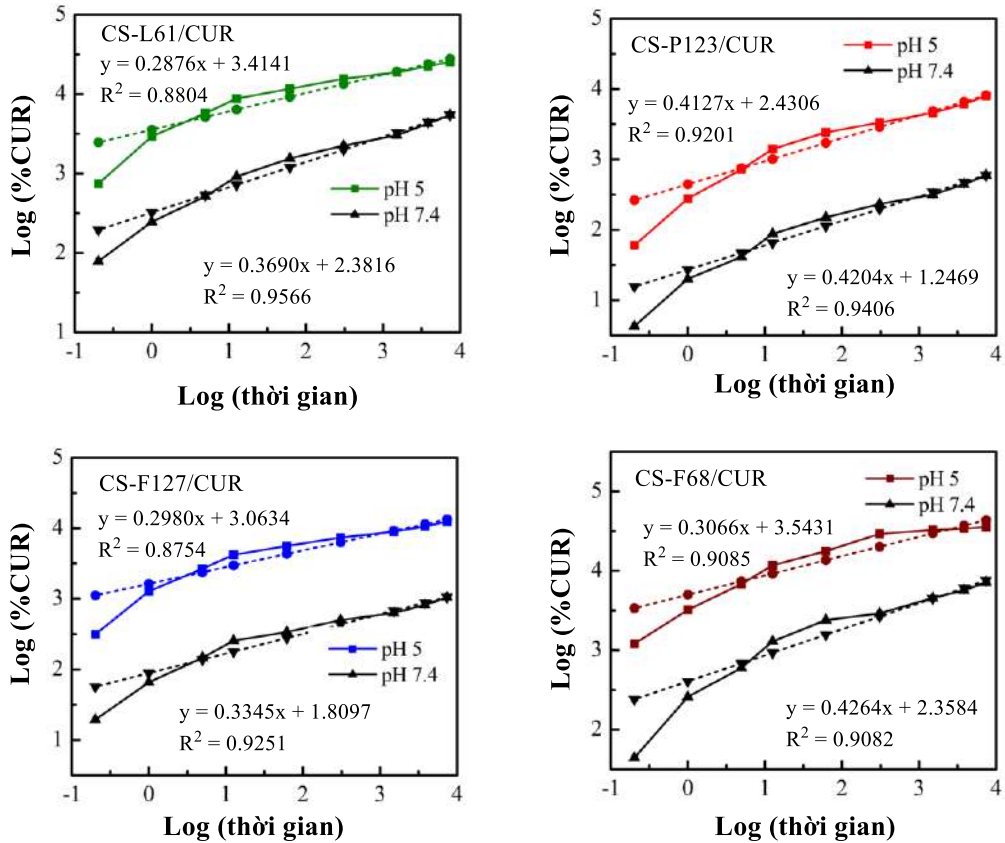


Phụ lục 34. Mô hình động học First-order của các nanogel CS–Pluronic/CUR.



Phụ lục 35. Mô hình động học Higuchi của các nanogel CS–Pluronic/CUR.



Phụ lục 36. Mô hình động học Power Law của các nanogel CS–Pluronic/CUR.**Phụ lục 37.** Phần trăm tế bào sống sót sau khi ủ với các loại nanogel CS–Pluronic trên nguyên bào sợi (tế bào Fibroblast) ở nồng độ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sau 48 giờ.

Tên mẫu	Phần trăm tế bào sống sót (%)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình
CS–L61	79.84	74.38	70.12	74.78 \pm 4.87
CS–P123	85.23	83.97	83.67	84.29 \pm 0.83
CS–F127	87.04	86.41	85.15	86.20 \pm 0.96
CS–F68	90.34	93.2	92.08	91.87 \pm 1.44

Phụ lục 38. Phần trăm gây độc tế bào của các mẫu trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 ở các nồng độ khác nhau.

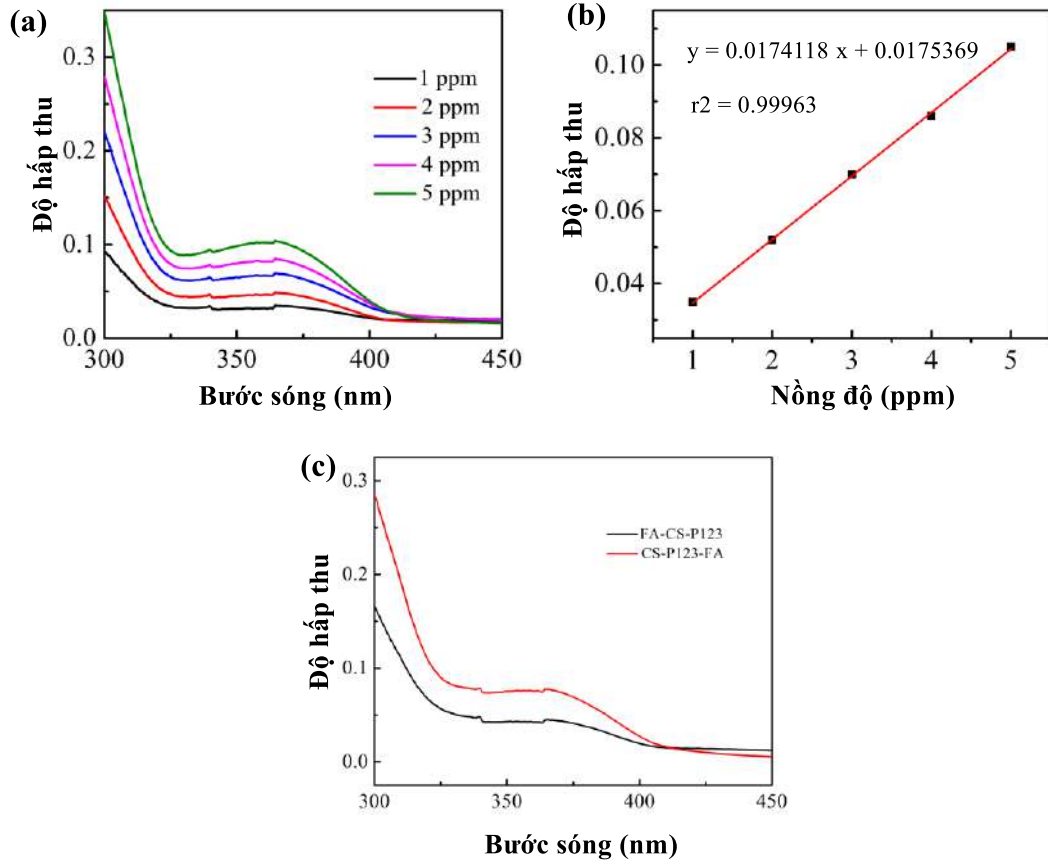
Tên mẫu	Nồng độ CUR (μM)	Phần trăm gây độc tế bào MCF-7 (%)			
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB
CUR	27.15	70.64	71.66	69.16	70.49 \pm 1.26
	20.36	65.77	59.57	63.65	63.00 \pm 3.15
	13.57	53.37	46.49	52.27	50.71 \pm 3.70
	6.79	29.37	16.7	25.75	23.94 \pm 6.53
	2.71	5.78	8.49	5.02	6.43 \pm 1.82

Tên mẫu	Nồng độ CUR (μM)	Phần trăm gây độc tế bào MCF-7 (%)			
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB
CS-L61/CUR	27.15	89.25	91.26	88.32	89.61 \pm 1.50
	13.57	79.77	82.27	80.14	80.73 \pm 1.35
	2.71	31.10	35.08	30.37	32.18 \pm 2.54
	1.36	17.46	20.85	13.43	17.25 \pm 3.71
	0.27	1.62	3.75	4.21	3.19 \pm 1.38
CS-P123/CUR	27.15	69.36	71.04	69.04	69.81 \pm 1.07
	20.36	63.14	63.33	64.10	63.52 \pm 0.51
	13.57	56.00	53.79	55.89	55.23 \pm 1.25
	6.79	30.56	27.63	29.74	29.31 \pm 1.51
	2.71	4.99	5.50	5.91	5.47 \pm 0.46
CS-F127/CUR	27.15	69.25	71.29	68.81	69.78 \pm 1.32
	20.36	66.27	64.57	67.18	66.01 \pm 1.32
	13.57	59.33	54.68	56.91	56.97 \pm 2.33
	6.79	38.19	31.81	36.8	35.60 \pm 3.36
	2.71	15.77	15.96	14.70	15.48 \pm 0.68
CS-F68/CUR	27.15	69.25	70.16	68.34	69.25 \pm 0.91
	20.36	68.13	65.28	67.27	66.89 \pm 1.46
	13.57	62.31	61.86	63.54	62.57 \pm 0.87
	6.79	39.83	39.36	40.31	39.83 \pm 0.48
	2.71	-1.07	0.86	8.78	2.86 \pm 5.22

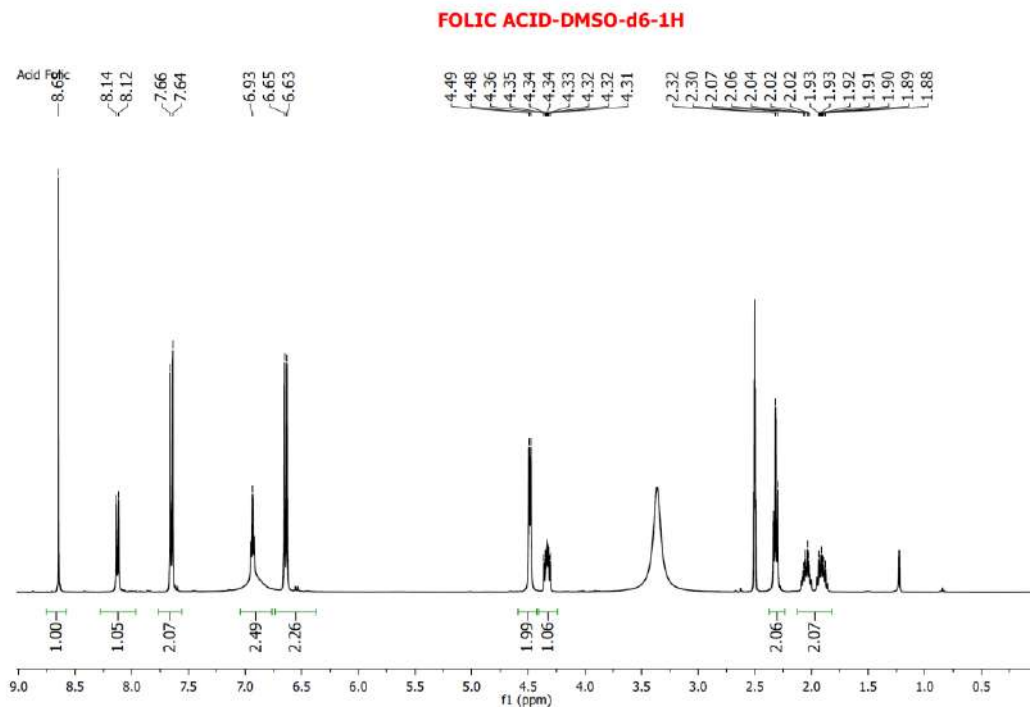
Phụ lục 39. Giá trị IC_{50} của các mẫu CS-Pluronic/CUR trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7.

Tên mẫu	Giá trị IC_{50} (μM)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB
CUR	15.61	16.83	16.02	16.15 \pm 0.62
CS-L61/CUR	4.86	4.21	5.10	4.72 \pm 0.46
CS-P123/CUR	13.11	13.46	12.70	13.09 \pm 0.38
CS-F127/CUR	10.91	12.16	11.37	11.48 \pm 0.63
CS-F68/CUR	11.35	11.51	10.75	11.20 \pm 0.40

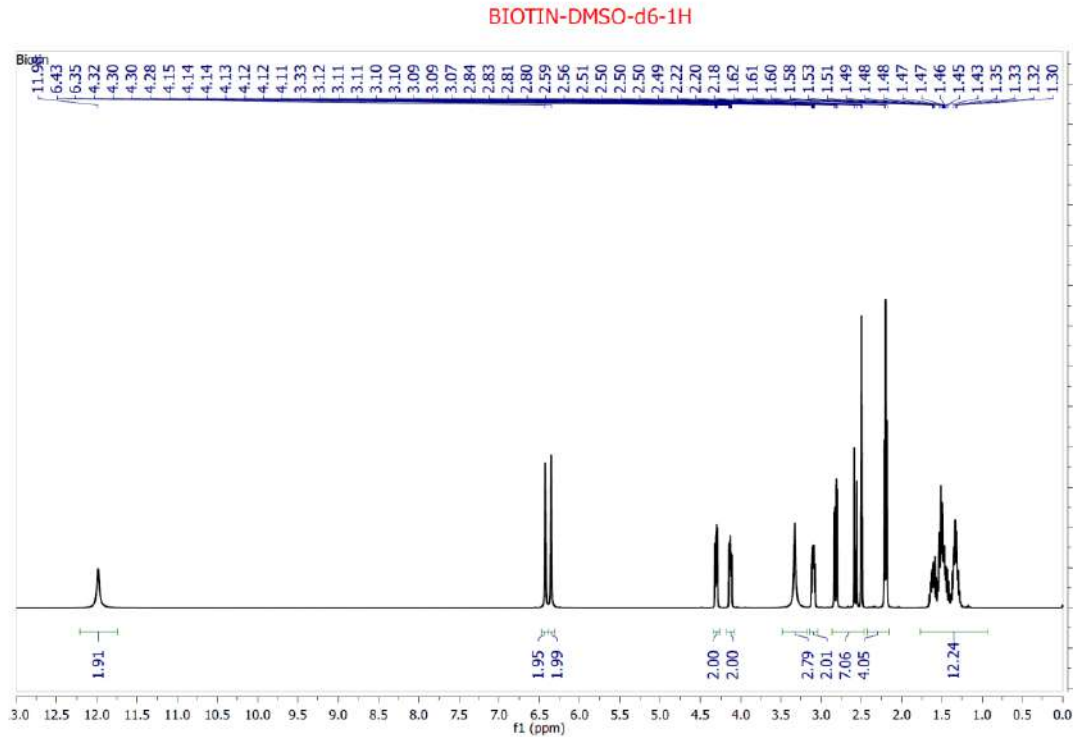
Phụ lục 40. Độ hấp thu axit folic (a), Đường chuẩn axit folic (b) và độ hấp thu của FACS-P123 và CS-P123-FA trong hỗn hợp dung môi DMSO: H₂O (9:1 v/v).



Phụ lục 41. Phổ ¹H-NMR của FA.



Phụ lục 42. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của BIO.



Phụ lục 43. Kết quả xác định giá trị DL% và EE% của các nanogel mang thuốc PTX.

Tên mẫu	Nồng độ mẫu đo (ppm)	Nồng độ PTX (ppm)	Nồng độ PTX đo được (ppm)			DL (%)	EE (%)
			Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	TB
CS-P123/PTX	100	1	0.934	0.905	0.919	0.92 ± 0.01	91.93 ± 1.18
		2	1.983	1.899	1.698	1.86 ± 0.12	93.00 ± 5.98
		3	2.025	2.188	1.877	2.03 ± 0.13	67.67 ± 4.23
FA-CS-P123/PTX	100	1	0.955	0.897	1.05	0.97 ± 0.06	96.73 ± 6.31
		2	1.784	2.053	1.897	1.91 ± 0.11	95.57 ± 5.51
		3	2.098	2.172	2.018	2.10 ± 0.06	69.87 ± 2.10
CS-P123-FA/PTX	100	1	1.002	0.982	0.897	0.96 ± 0.05	96.03 ± 4.55
		2	1.683	2.01	1.858	1.85 ± 0.13	92.52 ± 6.68
		3	2.009	1.948	2.078	2.01 ± 0.05	67.06 ± 1.77
CS-P123-BIO/PTX	100	1	0.975	0.997	0.876	0.96 ± 0.03	94.93 ± 5.26
		2	1.879	1.568	1.783	1.89 ± 0.07	94.17 ± 6.50
		3	2.008	2.272	2.008	1.99 ± 0.02	69.87 ± 4.15

Phụ lục 44. Nồng độ PTX giải phóng khỏi nanogel theo thời gian ở pH 7.4.

Tên mẫu	Nồng độ mẫu (ppm)	Nồng độ PTX có trong mẫu (ppm)	Thời gian (giờ)	Nồng độ PTX đo theo thời gian (ppm)			Phần trăm PTX tích lũy (%)
				Lần 1	Lần 2	Lần 3	
CS-P123- /PTX	2000	1.860	0.5	0.158	0.101	0.109	4.95 ± 1.24
			1	0.107	0.058	0.068	8.08 ± 1.04
			2	0.091	0.048	0.039	10.47 ± 1.12
			3	0.056	0.022	0.095	12.80 ± 1.47
			6	0.076	0.016	0.045	14.64 ± 1.21
			12	0.056	0.005	0.032	15.89 ± 1.03
			24	0.058	0.01	0.003	16.84 ± 1.21
			36	0.063	0.019	0.007	18.04 ± 1.19
FA-CS-P123- /PTX	2000	1.874	0.5	0.112	0.093	0.099	4.05 ± 0.32
			1	0.008	0.084	0.021	5.56 ± 1.33
			2	0.059	0.021	0.078	7.67 ± 0.95
			3	0.038	0.009	0.002	8.32 ± 0.62
			6	0.003	0.008	0.059	9.26 ± 1.01
			12	0.094	0.007	0.007	10.70 ± 1.64
			24	0.067	0.002	0.005	11.68 ± 1.20
			36	0.009	0.068	0.003	12.75 ± 1.17
CS-P123- FA/PTX	2000	1.850	0.5	0.101	0.092	0.053	3.32 ± 0.84
			1	0.038	0.046	0.047	5.09 ± 0.16
			2	0.084	0.058	0.094	8.28 ± 0.62
			3	0.073	0.028	0.091	10.88 ± 1.07
			6	0.054	0.064	0.073	13.46 ± 0.31
			12	0.012	0.019	0.037	14.38 ± 0.43
			24	0.003	0.005	0.002	14.51 ± 0.05
			36	0.003	0.008	0.009	14.78 ± 0.11
CS-P123- BIO/PTX	2000	1.743	0.5	0.104	0.189	0.149	6.34 ± 1.83
			1	0.108	0.084	0.021	9.39 ± 1.93
			2	0.055	0.038	0.094	12.07 ± 1.24
			3	0.011	0.036	0.095	14.11 ± 1.86
			6	0.058	0.018	0.059	16.05 ± 1.01
			12	0.008	0.005	0.108	17.78 ± 2.52
			24	0.093	0.005	0.002	19.22 ± 2.22
			36	0.063	0.018	0.009	20.51 ± 1.24

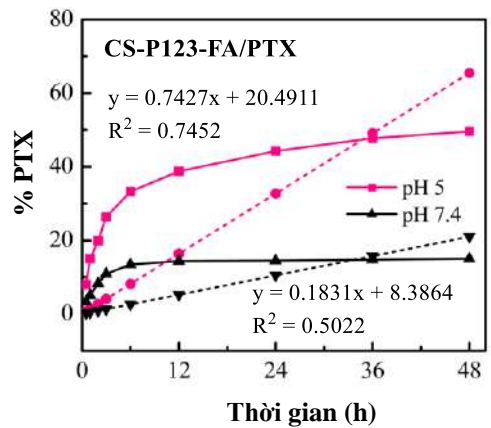
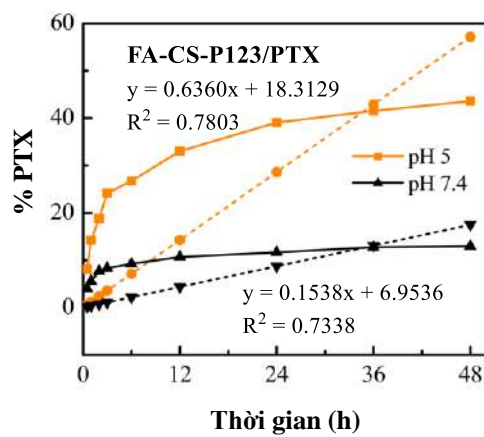
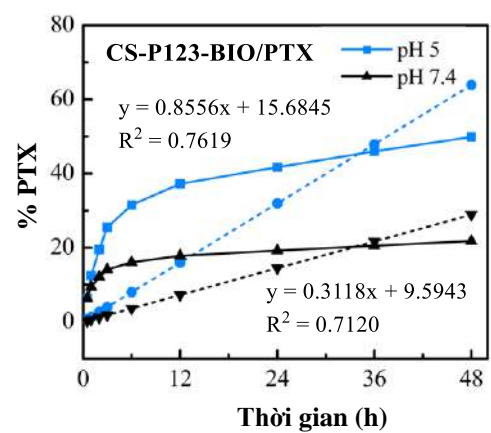
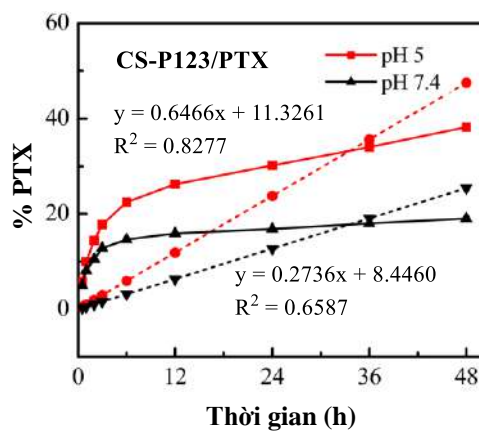
Tên mẫu	Nồng độ mẫu (ppm)	Nồng độ PTX có trong mẫu (ppm)	Thời gian (giờ)	Nồng độ PTX đo theo thời gian (ppm)			Phần trăm PTX tích lũy (%)
				Lần 1	Lần 2	Lần 3	
				48	0.078	0.005	

Phụ lục 45. Nồng độ PTX giải phóng khỏi nanogel theo thời gian ở pH 5.0.

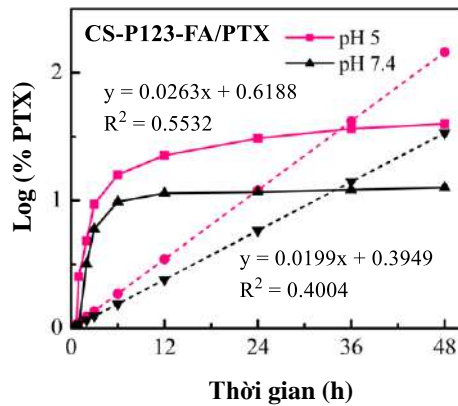
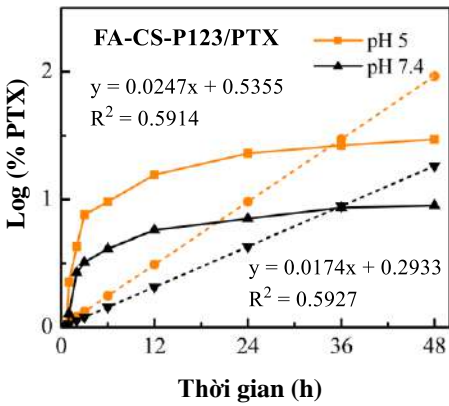
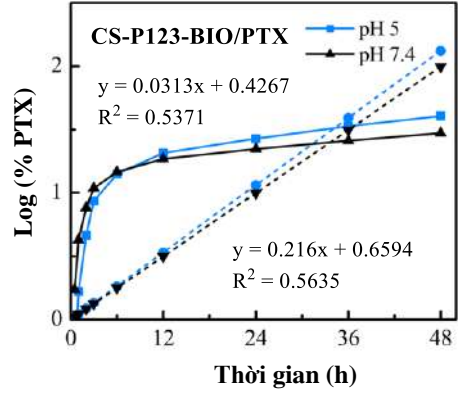
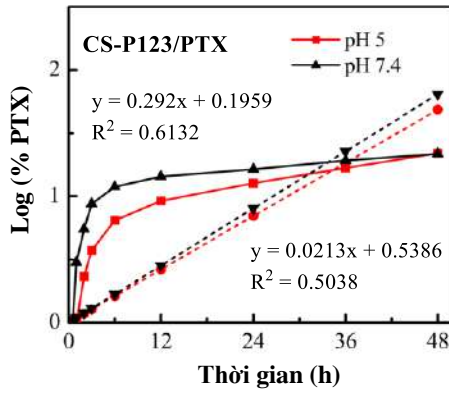
Tên mẫu	Nồng độ mẫu (ppm)	Nồng độ PTX có trong mẫu (ppm)	Thời gian (giờ)	Nồng độ PTX đo theo thời gian (ppm)			Phần trăm PTX tích lũy (%)
				Lần 1	Lần 2	Lần 3	
				CS-P123- /PTX	2000	1.860	
			1	0.091	0.196	0.025	9.96 ± 3.48
			2	0.076	0.184	0.072	14.42 ± 2.56
			3	0.025	0.168	0.054	17.74 ± 3.05
			6	0.093	0.199	0.059	22.46 ± 2.94
			12	0.078	0.136	0.065	26.21 ± 1.52
			24	0.054	0.112	0.127	30.15 ± 1.55
			36	0.056	0.184	0.048	34.02 ± 3.08
			48	0.056	0.203	0.053	38.21 ± 3.46
FA-CS-P123- /PTX	2000	1.874	0.5	0.112	0.093	0.099	4.05 ± 0.32
			1	0.008	0.084	0.021	5.56 ± 1.33
			2	0.059	0.021	0.078	7.67 ± 0.95
			3	0.038	0.009	0.002	8.32 ± 0.62
			6	0.003	0.008	0.059	9.26 ± 1.01
			12	0.094	0.007	0.007	10.70 ± 1.64
			24	0.067	0.002	0.005	11.68 ± 1.20
			36	0.009	0.068	0.003	12.75 ± 1.17
			48	0.004	0.006	0.006	12.96 ± 0.04
CS-P123- FA/PTX	2000	1.850	0.5	0.101	0.092	0.053	3.32 ± 0.84
			1	0.038	0.046	0.047	5.09 ± 0.16
			2	0.084	0.058	0.094	8.28 ± 0.62
			3	0.073	0.028	0.091	10.88 ± 1.07
			6	0.054	0.064	0.073	13.46 ± 0.31
			12	0.012	0.019	0.037	14.38 ± 0.43
			24	0.003	0.005	0.002	14.51 ± 0.05
			36	0.003	0.008	0.009	14.78 ± 0.11
			48	0.008	0.005	0.006	15.04 ± 0.05
CS-P123- BIO/PTX	2000	1.743	0.5	0.126	0.128	0.196	6.45 ± 1.71
			1	0.109	0.203	0.108	12.48 ± 2.35
			2	0.182	0.197	0.109	19.47 ± 2.03

Tên mẫu	Nồng độ mẫu (ppm)	Nồng độ PTX có trong mẫu (ppm)	Thời gian (giờ)	Nồng độ PTX đo theo thời gian (ppm)			Phần trăm PTX tích lũy (%)
				Lần 1	Lần 2	Lần 3	
			3	0.123	0.092	0.203	25.47 ± 2.46
			6	0.174	0.154	0.095	31.53 ± 1.77
			12	0.178	0.126	0.094	37.24 ± 1.82
			24	0.096	0.148	0.067	41.70 ± 1.77
			36	0.067	0.159	0.074	46.00 ± 2.20
			48	0.063	0.149	0.057	49.86 ± 2.21

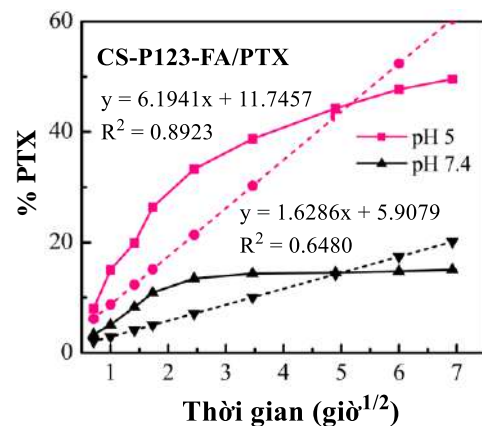
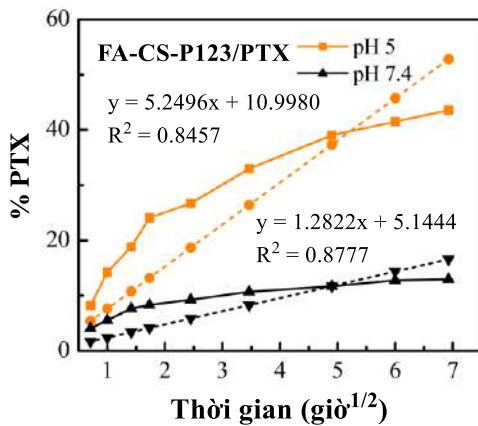
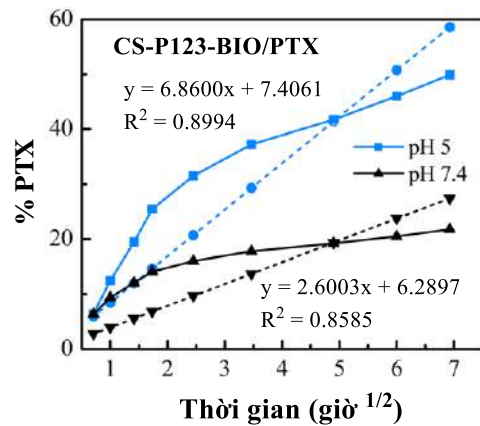
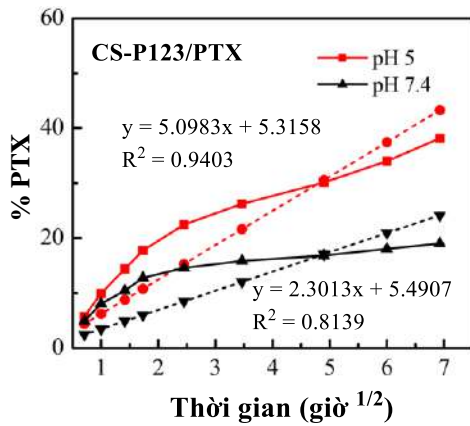
Phụ lục 46. Mô hình động học Zero-order.



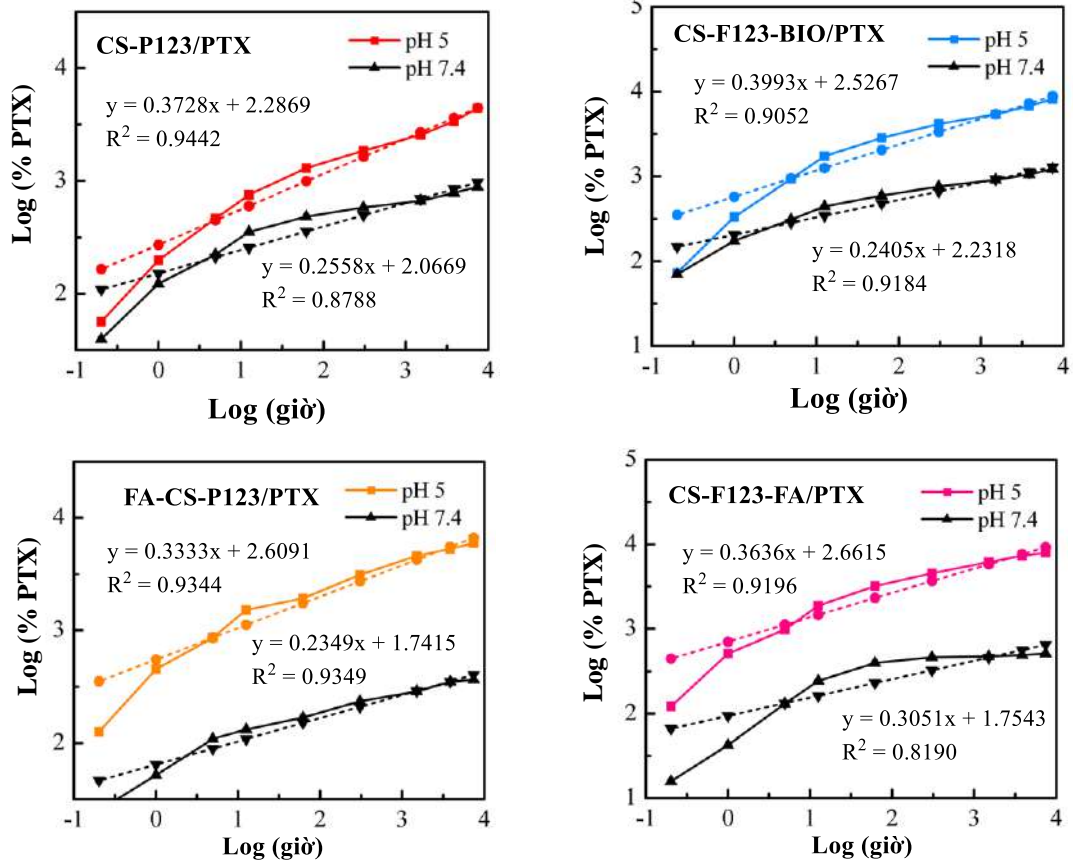
Phụ lục 47: Mô hình động học First-order.



Phụ lục 48: Mô hình động học Higuchi.



Phụ lục 49: Mô hình động học Power Law.



Phụ lục 50. Phần trăm tế bào sống sót sau khi ủ với các loại nanogel trên nguyên bào sợi (tế bào Fibroblast) ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ sau 48 giờ.

Tên mẫu	Phần trăm tế bào sống sót (%)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình
CS-P123	85.23	83.97	83.67	84.29 \pm 0.83
FA-CS-P123	90.36	90.35	91.31	90.67 \pm 0.55
CS-P123-FA	89.38	90.16	90.03	89.86 \pm 0.42
CS-P123-BIO	88.92	91.32	89.47	89.90 \pm 1.26

Phụ lục 51. Phần trăm gây độc tế bào của các mẫu PTX, nanogel mang PTX trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 ở các nồng độ khác nhau.

Tên mẫu	Nồng độ PTX (nM)	Phần trăm gây độc tế bào MCF-7 (%)			
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB
PTX	11.71	52.07	55.18	55.03	54.09 \pm 1.75
	5.86	37.09	44.95	43.3	41.78 \pm 4.14
	2.93	31.89	38.12	38.2	36.07 \pm 3.62
	1.17	2.02	1.64	-6.56	-0.97 \pm 4.85

Tên mẫu	Nồng độ PTX (nM)	Phần trăm gây độc tế bào MCF-7 (%)			
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB
	0.12	-2.44	-3.79	-10.34	-5.52 ± 4.23
CS-P123/PTX	23.42	56.02	60.56	63.01	59.86 ± 3.55
	11.71	40.56	34.44	36.31	37.10 ± 3.14
	5.86	35.01	26.02	29.03	30.02 ± 4.58
	1.17	5.74	3.73	7.02	5.50 ± 1.66
	0.59	2.05	1.67	0.67	1.46 ± 0.71
FA-CS- P123/PTX	11.71	66.26	59.45	50.26	58.66 ± 8.03
	5.86	47.74	44.62	44.01	45.46 ± 2.00
	2.34	18.33	22.83	27.52	22.89 ± 4.60
	1.17	9.07	16.91	22.05	16.01 ± 6.54
	0.59	-1.7	-0.37	14.9	4.28 ± 9.22
CS-P123- FA/PTX	5.86	65.35	67.87	69.5	67.57 ± 2.09
	2.34	40.97	41.95	55.1	46.01 ± 7.89
	1.76	21.54	21.43	23.23	22.07 ± 1.01
	1.17	6.68	19.53	18.99	15.07 ± 7.27
	0.82	6.65	5.7	9.53	7.29 ± 1.99
	0.59	-7.13	2.25	-0.35	-1.74 ± 4.84
CS-P123- BIO/PTX	11.71	67.55	61.12	66.85	65.17 ± 3.53
	5.86	59.72	56.09	57.91	57.91 ± 1.82
	2.34	43.55	38.63	35.93	39.37 ± 3.86
	1.17	16.97	17.58	17.23	17.26 ± 0.31
	0.59	3.96	5.05	7.71	5.57 ± 1.93

Phụ lục 52. Giá trị IC₅₀ của các mẫu PTX, nanogel mang PTX trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7.

Tên mẫu	Giá trị IC ₅₀ (µM)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB
PTX	9.37	8.20	8.20	8.19 ± 1.17
CS-P123/PTX	18.38	18.42	17.45	18.08 ± 0.55
FA-CS-P123/PTX	6.68	7.61	10.42	8.31 ± 1.99
CS-P123-FA/PTX	3.63	3.40	2.93	3.27 ± 0.35
CS-P123-BIO/PTX	4.33	5.39	4.80	4.80 ± 0.46