

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**PHAN KẾ SƠN**

**NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO, ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG HOÁ -  
NHIỆT TRỊ UNG THƯ VÀ SỰ PHÂN BỐ *IN VIVO* CỦA  
HỆ DẪN THUỐC NANO ĐA CHỨC NĂNG GẮN CHẤT  
PHÁT HUỖNH QUANG HỒNG NGOẠI GẦN**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT**

**Hà Nội – 2024**

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

**PHAN KẾ SƠN**

**NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO, ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG HOÁ -  
NHIỆT TRỊ UNG THƯ VÀ SỰ PHÂN BỐ *IN VIVO* CỦA  
HỆ DẪN THUỐC NANO ĐA CHỨC NĂNG GẮN CHẤT  
PHÁT HUỖNH QUANG HỒNG NGOẠI GẦN**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT**

**Ngành: Vật liệu cao phân tử và tổ hợp**

**Mã số: 9440125**

Xác nhận của Học viện  
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1  
(Ký, ghi rõ họ tên)

Người hướng dẫn 2  
(Ký, ghi rõ họ tên)



**PGS.TS. Hà Phương Thư TS. Lê Thị Thu Hương**

**Hà Nội – 2024**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: “**Nghiên cứu chế tạo, đánh giá tác dụng hoá trị - nhiệt trị ung thư và sự phân bố *in vivo* của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần**” là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, 14 tháng 10 năm 2024

Tác giả luận án



**Phan Kế Sơn**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc đến tập thể giảng viên hướng dẫn, PGS.TS. Hà Phương Thư và TS. Lê Thị Thu Hương đã tận tình hướng dẫn, hỗ trợ, định hướng và chỉ bảo cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, Phòng Đào tạo và các phòng chức năng của Học viện đã hỗ trợ tôi hoàn thành các học phần của luận án và mọi thủ tục cần thiết khác trong quá trình thực hiện luận án.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn sự hướng dẫn và chỉ dạy tận tình của GS. Bích Thủy DOAN - Trường Đại học Chimie ParisTech - Université PSL, CNRS (người đã có sự hợp tác nghiên cứu với PGS.TS Hà Phương Thư từ lâu) trong thời gian tôi được thực tập tại Pháp. GS đã hướng dẫn tôi vận hành thiết bị và thực hiện nhiều thử nghiệm *in vivo* để hoàn thành các nội dung nghiên cứu của luận án.

Đặc biệt, tôi xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài của PGS.TS. Hà Phương Thư thuộc Chương trình nghiên cứu cơ bản Quỹ Nafosted mã số 108-05-2019.304 (HPT) và đề tài thuộc Chương trình Hợp tác quốc tế cấp Viện Hàn lâm KHCNVN mã số QTFR01.01/19-20. Đề tài cấp Viện Hàn lâm KHCNVN của PGS.TS. Trần Ngọc Quyên, thuộc Chương trình nhóm nghiên cứu xuất sắc hạng I, mã số NCXS.01.01/23-25.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của Quỹ VINIF với sự tài trợ thuộc Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF) trong thời gian học NCS, các mã số VINIF.2021.TS.038, VINIF.2022.TS.106, VINIF.2023.TS.101.

Tôi xin được cảm ơn sự cộng tác và giúp đỡ đầy hiệu quả của TS. Mai Thị Thu Trang, TS. Phạm Hồng Nam, và các đồng nghiệp tại Trung tâm Vật liệu y sinh tiên tiến - Viện Khoa học vật liệu, Viện Hàn lâm Khoa học và

Công nghệ Việt Nam, vì sự giúp đỡ thực hiện các phép đo, sự quan tâm động viên hết sức quý báu, và đóng góp các ý kiến về chuyên môn trong suốt quá trình thực hiện và bảo vệ luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Khoa Khoa học vật liệu và năng lượng - Học viện Khoa học và Công nghệ; Trung tâm Vật liệu y sinh tiên tiến, Phòng thí nghiệm trọng điểm Quốc gia về Vật liệu và linh kiện điện tử - Viện Khoa học vật liệu, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi về cơ sở vật chất cho tôi trong suốt quá trình thí nghiệm.

Tôi xin chân thành cảm ơn Đảng ủy, Ban lãnh đạo Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Viện Khoa học vật liệu đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong quá trình công tác để tôi hoàn thành luận án này.

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

*Hà nội, ngày 14 tháng 10 năm 2024*

Nghiên cứu sinh



**Phan Kế Sơn**

## MỤC LỤC

	Trang
DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT .....	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ.....	vii
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VỀ HỆ DẪN THUỐC NANO ĐA CHỨC NĂNG TRONG CHẨN ĐOÁN VÀ ĐIỀU TRỊ UNG THƯ .....	5
1.1. Khái quát về hệ dẫn thuốc nano đa chức năng trong chẩn đoán, điều trị ung thư.....	5
1.2. Polyme và các hệ nano polyme.....	6
1.2.1. Polyme .....	6
1.2.2. Copolyme PLA-TPGS .....	13
1.3. Hệ dẫn thuốc nano polyme mang Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	16
1.3.1. Chức năng tăng độ tương phản trong chụp ảnh cộng hưởng từ hạt nhân MRI.....	16
1.3.2. Chức năng nhiệt từ trị .....	23
1.3.3. Chức năng hóa trị .....	26
1.4. Hệ dẫn thuốc nano polyme gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần .....	29
1.4.1. Khái quát về chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần .....	29
1.4.2. Các nghiên cứu sử dụng chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần NIR .....	31
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	38
2.1. Chế tạo vật liệu.....	38
2.1.1. Nguyên vật liệu.....	38
2.1.2. Tổng hợp copolyme PLA-TPGS .....	38
2.1.3. Tổng hợp hạt nano oxit sắt từ (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs) .....	39
2.1.4. Chế tạo hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Doxorubicin.....	39
2.1.5. Chế tạo hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Doxorubicin-Cyanine 5.5 .....	40
2.2. Các phương pháp đặc trưng vật liệu .....	41
2.2.1. Phương pháp phổ hồng ngoại biến đổi Fourier FTIR.....	41
2.2.2. Phương pháp hiển vi điện tử quét phát xạ trường FESEM .....	42
2.2.3. Phương pháp hiển vi điện tử truyền qua TEM.....	42

2.2.4. Phương pháp phân tích nhiệt khối lượng TGA.....	42
2.2.5. Phương pháp xác định phân bố kích thước hạt và thế zeta.....	43
2.2.6. Phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại và khả kiến UV-Vis .....	44
2.2.7. Phổ huỳnh quang.....	44
2.2.8. Phương pháp nhiễu xạ tia X.....	45
2.2.9. Từ kế mẫu rung VSM.....	46
2.2.10. Đốt nóng cảm ứng từ MIH .....	46
2.3. Đánh giá động học và cơ chế giải phóng thuốc <i>in vitro</i> .....	47
2.3.1. Đánh giá động học giải phóng thuốc <i>in vitro</i> .....	47
2.3.2. Xác định cơ chế giải phóng thuốc <i>in vitro</i> .....	47
2.4. Đánh giá hiệu quả và cơ chế gây độc tế bào ung thư của hệ dẫn nano trên các dòng tế bào thử nghiệm .....	48
2.4.1. Nuôi cấy tế bào.....	48
2.4.2. Thử nghiệm độc tính tế bào <i>in vitro</i> bằng phương pháp MTT.....	48
2.4.3. Đánh giá hoạt tính kháng phân bào bằng kỹ thuật hình ảnh huỳnh quang tự động và phân tích, sàng lọc nội hàm cao .....	49
2.5. Đánh giá khả năng tăng độ tương phản ảnh cộng hưởng từ MRI.....	50
2.5.1. Xác định độ hồi phục $r_1, r_2$ .....	50
2.5.2. Đánh giá khả năng tăng độ tương phản MRI <i>in vivo</i> .....	51
2.6. Đánh giá sự phân bố <i>in vivo</i> của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng.....	52
2.6.1. Khảo sát bước sóng kích thích/phát xạ.....	52
2.6.2. Đánh giá sự phân bố <i>in vivo</i> trên mô hình chuột gây khối u CT26 ..	53
2.7. Xác định hàm lượng Fe trong khối u và các cơ quan của chuột.....	54
2.8. Đánh giá tác dụng hóa trị bằng kỹ thuật phát quang sinh học .....	55
2.9. Đánh giá tác dụng nhiệt từ trị.....	56
2.10. Phương pháp xử lý số liệu .....	57
<b>CHƯƠNG 3. HỆ DẪN THUỐC NANO ĐA CHỨC NĂNG .....</b>	<b>59</b>
3.1. Tổng hợp copolymer PLA-TPGS.....	59
3.2. Chế tạo hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Doxorubicin .....	62
3.3. Đặc trưng tính chất lý, hóa.....	64
3.4. Đánh giá động học và cơ chế giải phóng thuốc <i>in vitro</i> .....	71
3.5. Đánh giá tác dụng và cơ chế gây độc tế bào ung thư.....	73

CHƯƠNG 4. HỆ DẪN THUỐC NANO ĐA CHỨC NĂNG GẮN CHẤT PHÁT HUỖNH QUANG HỒNG NGOẠI GẦN .....	79
PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DOXORUBICIN-CYANINE 5.5 .....	79
4.1. Khảo sát các điều kiện chế tạo hệ dẫn thuốc nano đa chức năng gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Doxorubicin-Cyanine 5.5 .....	79
4.2. Đặc trưng tính chất lý, hóa.....	87
4.3. Đánh giá động học giải phóng thuốc <i>in vitro</i> .....	95
4.4. Đánh giá tác dụng và cơ chế gây độc tế bào ung thư.....	96
CHƯƠNG 5. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG TĂNG ĐỘ TƯƠNG PHẢN TRONG CHỤP CỘNG HƯỞNG TỪ HẠT NHÂN, SỰ PHÂN BỐ <i>IN VIVO</i> , TÁC DỤNG HÓA TRỊ VÀ NHIỆT TỬ TRỊ CỦA HỆ DẪN THUỐC NANO ĐA CHỨC NĂNG GẮN CHẤT PHÁT HUỖNH QUANG HỒNG NGOẠI GẦN .....	101
5.1. Đánh giá khả năng tăng độ tương phản trong chụp cộng hưởng từ hạt nhân MRI.....	101
5.1.1. Xác định độ hồi phục $r_1$ , $r_2$ và yếu tố ảnh hưởng.....	101
5.1.2. Đánh giá khả năng tăng độ tương phản MRI trên mô hình <i>in vivo</i> .....	106
5.2. Đánh giá sự phân bố <i>in vivo</i> bằng kỹ thuật hình ảnh quang học .....	110
5.2.1. Khảo sát bước sóng kích thích/phát xạ <i>in vitro</i> .....	110
5.2.2. Đánh giá sự phân bố <i>in vivo</i> trên mô hình chuột được gây khối u CT26 .....	113
5.3. Đánh giá tác dụng hóa trị bằng kỹ thuật phát quang sinh học .....	118
5.4. Đánh giá tác dụng nhiệt tử trị.....	122
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	126
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....	129
TÀI LIỆU THAM KHẢO	



## DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

<b>A549</b>	Human lung adenocarcinoma epithelial cells tế bào biểu mô ung thư biểu mô phổi
<b>AAS</b>	Atomic Absorption Spectroscopy, phổ hấp phụ nguyên tử
<b>APTES</b>	3-Aminopropyl triethoxysilane
<b>CCF-STTG1</b>	Human brain adenocarcinoma cells, tế bào ung thư biểu mô não
<b>CT26</b>	Murine colon carcinoma cell line, tế bào ung thư biểu mô đại tràng
<b>DCM</b>	Dichlometan
<b>DLS</b>	Dynamic light scattering, tán xạ ánh sáng động
<b>DTA</b>	Differential thermal gravity analysis, phân tích nhiệt vi sai
<b>DTG</b>	Differential thermogravimetry, nhiệt trọng lượng vi phân
<b>Dox</b>	Doxorubicin
<b>EDC</b>	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride
<b>EE</b>	Encapsulating efficiency, hiệu suất nano hóa thuốc
<b>EPR</b>	Enhanced permeability and retention effect, hiệu ứng tăng tính thấm lưu trữ
<b>FESEM</b>	Field emission Scanning electron mictoscopy, hiển vi điện tử quét phát xạ trường
<b>FT-IR</b>	Phổ hấp thụ hồng ngoại biến đổi Fourier
<b>H</b>	Cường độ từ trường
<b>H<sub>c</sub></b>	Lực kháng từ
<b>HeLa</b>	Cervical cancer cells, tế bào ung thư cổ tử cung
<b>Hep-G2</b>	Hepatocellular carcinoma, tế bào ung thư gan
<b>HGC-27</b>	Human gastric carcinoma cells, tế bào ung thư biểu mô dạ dày
<b>HLB</b>	Hydrophile - lipophile balance, chỉ số cân bằng dầu - nước
<b>IC<sub>50</sub></b>	Inhibition concentration, nồng độ ức chế 50% số tế bào
<b>ICG</b>	Indocyanine green
<b>ILP</b>	Intrinsic loss power, công suất tổn hao nội tại
<b>LC</b>	Loading capacity, khả năng mang thuốc
<b>M<sub>s</sub></b>	Saturation magnetization, từ độ bão hòa
<b>MCF7</b>	Human breast adenocarcinoma cells, tế bào ung thư biểu mô tuyến vú
<b>MIH</b>	Magnetic inductive heating, đốt nóng cảm ứng từ
<b>MNDDS</b>	Multi-functional nano drug delivery system, hệ dẫn thuốc nano đa chức năng
<b>MRI</b>	Magnetic resonance image, ảnh cộng hưởng từ

<b>NHS</b>	N-Hydroxysuccinimide
<b>NIR</b>	Near-infrared, hồng ngoại gần
<b>NMR</b>	Nuclear magnetic resonance, cộng hưởng từ hạt nhân
<b>NPs</b>	Nanoparticles, hạt nano
<b>PC3</b>	Human Prostate Adenocarcinoma, tế bào ung thư biểu mô tuyến tiền liệt
<b>PEG</b>	Polyethylene glycol
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline, dung dịch đệm photphat
<b>PLA</b>	Poly(lactic acid)
<b>PLGA</b>	Poly(lactic-co-glycolic acid)
<b>PVA</b>	Poly(vinyl alcohol)
<b>r<sub>1</sub>, r<sub>2</sub></b>	Độ hồi phục dọc và ngang, tương ứng 1 và 2
<b>R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub></b>	Tốc độ hồi phục dọc và ngang, tương ứng 1 và 2
<b>RES</b>	Reticuloendothelial system, các đại thực bào của hệ lưới nội mô
<b>RF</b>	Tần số vô tuyến
<b>R<sub>01,2</sub></b>	Tốc độ hồi phục dọc và ngang khi không có chất tương phản
<b>SAR</b>	Specific absorption rate, tốc độ hấp thụ riêng
<b>SD</b>	Standard Deviation, độ lệch chuẩn
<b>SNR</b>	Signal to noise ratio, tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu
<b>T1, T2</b>	Thời gian hồi phục dọc và ngang, tương ứng 1 và 2
<b>T2*</b>	Thời gian hồi phục ngang hiệu quả
<b>TE</b>	Echo time, thời gian tạo tiếng vọng
<b>TEM</b>	Transmission electron microscopy, hiển vi điện tử truyền qua
<b>TGA</b>	Thermal gravity analysis, phân tích nhiệt
<b>TPGS</b>	D-alpha tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate
<b>TR</b>	Repetition time, thời gian lặp lại
<b>UV-Vis</b>	Ultraviolet-Visible, phổ tử ngoại-khả kiến
<b>VSM</b>	Vibration sample magnetometry, từ kế mẫu rung
<b>XRD</b>	X-ray Diffraction, nhiễu xạ tia X

## DANH MỤC CÁC BẢNG

<b>Bảng 2.1</b>	Bố trí thí nghiệm nhiệt từ trị trên chuột mang khối u phổi Lewis	57
<b>Bảng 3.1</b>	Các nhóm chức đặc trưng của lactide, TPGS và copolyme PLA-TPGS	61
<b>Bảng 3.2</b>	Các nhóm chức đặc trưng của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng (MNDDS) và các chất thành phần	62
<b>Bảng 3.3</b>	Khảo sát tỷ lệ Dox : Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs (w/w) (n=3, mean ± SD)	64
<b>Bảng 3.4</b>	Giá trị từ độ bão hòa (M <sub>s</sub> ) và lực kháng từ (H <sub>c</sub> ) của Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs và các hệ nano PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Doxorubicin (MNDDS)	69
<b>Bảng 3.5</b>	Thông số đốt nóng cảm ứng từ của các hệ nano PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Doxorubicin	70
<b>Bảng 3.6</b>	Các thông số mô hình động học giải phóng thuốc của hệ nano	73
<b>Bảng 5.1</b>	Giá trị độ hồi phục r <sub>1</sub> , r <sub>2</sub> và tỷ số r <sub>2</sub> /r <sub>1</sub> của các hệ nano đa chức năng	104

## DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

<b>Hình 1.1</b>	Cấu trúc phân tử của các polyme PLA, PLGA, PGA và PCL	8
<b>Hình 1.2</b>	Phản ứng tổng hợp copolyme PLA-PEG	10
<b>Hình 1.3</b>	(a) Cấu trúc phân tử của TPGS và các hạt nano mang thuốc có hoặc không có TPGS; (b) cơ chế tế bào của TPGS ức chế P-gp	12
<b>Hình 1.4</b>	Cơ chế tổng hợp copolyme PLA-TPGS	14
<b>Hình 1.5</b>	(a) Trạng thái cân bằng từ hóa sau khi hồi phục spin; (b) quá trình từ hóa dọc (T1) và (c) ngang (T2)	18
<b>Hình 1.6</b>	Khả năng tăng tương phản hình ảnh chụp cộng hưởng từ của hệ nano $Fe_3O_4@PMAO$ ở chế độ trọng T2 (AXIAL) trên khối u chuột sau khi tiêm tiêm trực tiếp khối u, TE= 91 ms, TR =3970 ms trên chuột. (a) Không tiêm; (b) ngay sau tiêm; (c) sau 15 phút; (d) sau 30 phút	20
<b>Hình 1.7</b>	(a) Hình ảnh MRI ở chế độ trọng T2 của vật liệu $Fe_3O_4@Alginate$ trong môi trường nước với nồng độ Fe khác nhau (0 - 0,45 mM); (b) độ hồi phục ngang và hồi phục dọc của vật liệu $Fe_3O_4@Alginate$	21
<b>Hình 1.8</b>	(a) Độ tương phản ảnh MRI theo chế độ trọng T2 của hệ nano $Fe_3O_4@PLA-PEG$ ; (b) hình ảnh MRI theo chế độ trọng T2 khi tiêm trực tiếp $Fe_3O_4@PLA-PEG$ vào khối u rắn dưới da chuột	22
<b>Hình 1.9</b>	Cơ chế tiêu diệt tế bào khối u bằng tác dụng nhiệt từ trị	24
<b>Hình 1.10</b>	Cơ chế sinh nhiệt của các hạt nano $Fe_3O_4$ trong AMF do sự đóng góp của cả hai quá trình hồi phục Brown và hồi phục Neel	25
<b>Hình 1.11</b>	Kích thước khối u ở các nhóm sau mỗi lần nhiệt từ trị	26
<b>Hình 1.12</b>	Độ hấp thụ của nước, melanin, hemoglobin và oxy-hemoglobin	30
<b>Hình 1.13</b>	(a) Cấu trúc phân tử chung của chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần Cyanine (Cy); (b) đồng phân hình học và độ dài liên kết của các phân tử số cacbon methine lẻ và chẵn; (c) cấu trúc phân tử của Cy3, Cy5 và Cy7; (d) phổ hấp thụ (absorption) và phát xạ (emission) tương ứng của Cy3, Cy5 và Cy7 trong DCM	30

<b>Hình 1.14</b>	Cấu trúc hóa học của một số chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần thuộc nhóm Cyanine thường được sử dụng	32
<b>Hình 1.15</b>	(a) Hình ảnh hiển vi của bong bóng nano Cyanine 5.5 trong lưới vuông 50 $\mu\text{m}$ dưới vật kính 100 $\times$ với A, B và C; (b) hình ảnh hiển vi của bong bóng nano Cyanine 5.5 dưới ánh sáng pha (trái) và với bộ lọc phát xạ Cyanine 5.5 (phải); (c) phân bố kích thước của bong bóng nano Cyanine 5.5	33
<b>Hình 1.16</b>	(a) Phân bố kích thước động DLS; (b) ảnh TEM của vật liệu Cy5.5-CNP và ICG-CNP; (c) sự phân bố sinh học <i>in vivo</i> của Cy5.5-CNP ở chuột mang khối u VX2 (n = 3)	35
<b>Hình 1.17</b>	Hình ảnh huỳnh quang NIR trên chuột được gây khối u A549 (trái), cường độ huỳnh quang trung bình từ các khối u (phải) của nhóm A (EGF-NIR in PBS) , nhóm B (NZ-EGF-NIR-low, 2 nM EGF) và nhóm C (NZ-EGF-NIR-high, 2 nM EGF) sau 24, 48, 72 và 96 giờ tiêm, (mean $\pm$ SD, n = 3)	36
<b>Hình 2.1</b>	Sơ đồ hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Doxorubicin	39
<b>Hình 2.2</b>	Sơ đồ hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Dox-Cyanine 5.5	40
<b>Hình 2.3</b>	(a) Phổ UV-Vis; (b) đường chuẩn Doxorubicin	44
<b>Hình 2.4</b>	Hệ thống ghi ánh sáng hiển vi sàng lọc/Phân tích nội hàm cao (Olympus scan <sup>R</sup> , Heidelberg, Đức)	50
<b>Hình 2.5</b>	(a) Bố trí chuột thí nghiệm; (b) thiết bị cộng hưởng từ 7T (300WB, Bruker, Avance II, Wissembourg, Cộng hòa Pháp)	51
<b>Hình 2.6</b>	Thiết bị Photon IMAGER Optima, Biospace Lab, Cộng hòa Pháp	53
<b>Hình 2.7</b>	(a) Chuột thí nghiệm, (b) bố trí chuột trong thiết bị Photon IMAGER Optima và được gây mê trong suốt thời gian chụp ảnh huỳnh quang	54
<b>Hình 2.8</b>	Sơ đồ thử nghiệm phát quang sinh học trên mô hình chuột gây khối u	56
<b>Hình 2.9</b>	Bố trí thí nghiệm nhiệt từ trị <i>in vivo</i> trên thiết bị RDO, model HFI	59
<b>Hình 3.1</b>	(a) Phổ <sup>1</sup> H-NMR của lactide, TPGS và copolyme PLA-TPGS; (b) cấu trúc phân tử của copolyme PLA-TPGS	60
<b>Hình 3.2</b>	Phổ hồng ngoại FTIR của Lactide, TPGS và copolyme PLA-	61

	TPGS	
<b>Hình 3.3</b>	Phổ hồng ngoại FTIR của Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs, Doxorubicin, copolyme PLA-TPGS, và hệ nano MNDDS	63
<b>Hình 3.4</b>	Ảnh (a) FESEM; (b) TEM của hệ nano PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Doxorubicin	65
<b>Hình 3.5</b>	Phân bố kích thước của hệ nano PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Doxorubicin	65
<b>Hình 3.6</b>	Giản đồ phân tích nhiệt của copolyme PLA-TPGS, Doxorubicin, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs và hệ nano PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Doxorubicin	66
<b>Hình 3.7</b>	Giản đồ nhiễu xạ tia X của hạt nano oxit sắt từ và hệ nano PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Doxorubicin	67
<b>Hình 3.8</b>	Đường cong từ hóa của Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs và các hệ nano MNDDS	68
<b>Hình 3.9</b>	Đường cong đốt nóng cảm ứng từ (a) ở các tỷ lệ w/w Dox : Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs; (b) ở các nồng độ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> khác nhau của hệ nano PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Doxorubicin	71
<b>Hình 3.10</b>	Động học giải phóng thuốc Doxorubicin từ hệ nano PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Doxorubicin (n = 3) trong các điều kiện pH khác nhau so với Doxorubicin tự do	72
<b>Hình 3.11</b>	Đánh giá độc tính tế bào <i>in vitro</i> của các hệ nano PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Doxorubicin và Doxorubicin tự do (**p<0,001; và *p<0,05, n=3)	74
<b>Hình 3.12</b>	Ảnh hiển vi huỳnh quang của hệ nano PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Doxorubicin trên dòng tế bào HeLa (độ phóng đại 20x, máy ảnh sCMOS).	75
<b>Hình 3.13</b>	(a) Phân bố chu kỳ tế bào; (b) sơ đồ chu kỳ tế bào và cơ chế ức chế chu kỳ tế bào; (c) sự phân bố chu kỳ tế bào trên dòng tế bào HeLa gây ra bởi các mẫu MNDDS so với Dox tự do và đối chứng âm	77
<b>Hình 4.1</b>	Sơ đồ cơ chế phản ứng APTES với bề mặt Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs	80
<b>Hình 4.2</b>	Phổ huỳnh quang của các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Dox-Cyanine 5.5 ở các tỉ lệ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs : APTES (w/w) khác nhau	81
<b>Hình 4.3</b>	Phổ huỳnh quang của các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Dox-Cyanine 5.5 ở các tỉ lệ Cyanine 5.5 : Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs (w/w) khác nhau	82

<b>Hình 4.4</b>	Phổ huỳnh quang của các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Dox-Cyanine 5.5 ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau	83
<b>Hình 4.5</b>	Sơ đồ phản ứng gắn Cyanine 5.5 lên bề mặt Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>	84
<b>Hình 4.6</b>	Phổ huỳnh quang của các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Dox-Cyanine 5.5 ở các điều kiện pH khác nhau	85
<b>Hình 4.7</b>	Phổ huỳnh quang của các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Dox-Cyanine 5.5 ở các điều kiện thời gian khác nhau	86
<b>Hình 4.8</b>	Phổ hồng ngoại FTIR của hệ nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Dox-Cyanine 5.5 và các chất thành phần	87
<b>Hình 4.9</b>	(a) Giảm đồ phân tích nhiệt khối lượng TGA; (b) giảm đồ nhiệt trọng lượng vi phân DTG của các hệ nano PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Cyanine 5.5 và PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Dox-Cyanine 5.5	89
<b>Hình 4.10</b>	(a) Phổ huỳnh quang; (b) phổ UV-Vis của hệ nano PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Dox-Cyanine 5.5 và các chất thành phần	90
<b>Hình 4.11</b>	Ảnh TEM và biểu đồ phân bố kích thước của hệ nano (a) PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Cyanine 5.5; (b) PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Dox-Cyanine 5.5	91
<b>Hình 4.12</b>	Sự thay đổi về (a) kích thước thủy động; (b) chỉ số đa phân tán PDI; (c) thế zeta trong thời gian 12 tháng của hệ nano PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Cyanine 5.5 và PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Dox-Cyanine 5.5	92
<b>Hình 4.13</b>	(a) Giảm đồ XRD; (b) đường cong từ hóa của Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs, các hệ nano PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Cyanine 5.5 và PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Dox-Cyanine 5.5 ở 300 K	94
<b>Hình 4.14</b>	Động học giải phóng thuốc <i>in vitro</i> của Doxorubicin từ PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Dox-Cyanine 5.5 trong các dung dịch pH 7,4, 6,5 và 5,0 ở 37°C	95
<b>Hình 4.15</b>	Đánh giá độc tính tế bào <i>in vitro</i> của các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng (*p<0,05, **p<0,001; và ***p<0,0001 (n=3)	97
<b>Hình 4.16</b>	(a) Phân bố chu kỳ tế bào; (b) sơ đồ minh họa cơ chế gây độc tế bào của từng thành phần Doxorubicin, Cyanine 5.5 và Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ; (c) chụp ảnh đồng tiêu bốn hệ nano trên dòng tế bào	98

	CCF-SSTG1 (độ phóng đại 20 lần, camera sCMOS)	
<b>Hình 5.1.</b>	Hình ảnh chụp cộng hưởng từ MRI của các hệ nano theo chế độ trọng T1 và trọng T2 ở các nồng độ khác nhau của Fe (mM)	103
<b>Hình 5.2</b>	Tốc độ hồi phục dọc $R_1$ (a); ngang $R_2$ (b) phụ thuộc nồng độ Fe của các hệ nano đa chức năng	104
<b>Hình 5.3</b>	Cơ chế ảnh hưởng của Doxorubicin và Cyanine 5.5 đến khả năng tương phản ảnh MRI của hệ nano đa chức năng	105
<b>Hình 5.4</b>	(a) Hình ảnh MRI <i>in vivo</i> trên chuột thường Balb/C với chế độ chụp trọng T2* ở thời điểm trước và sau 24 giờ tiêm vật liệu nano PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Dox-Cyanine 5.5; (b) những thay đổi về cường độ tín hiệu trên hình ảnh MRI ở các cơ quan gan, lá lách và thận (**p<0,001; n = 3)	107
<b>Hình 5.5</b>	Hình ảnh MRI của chuột Balb/C được gây khối u CT26 (a) nhóm đối chứng; (b) sau 4h tiêm PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Dox - Cyanine 5.5	108
<b>Hình 5.6</b>	Phương pháp %I <sub>0,25</sub> xử lý dữ liệu từ hình ảnh MRI với chế độ chụp trọng T2* để đánh giá sự tích lũy <i>in vivo</i> của hệ nano PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Dox-Cyanine 5.5 trong các khối u. (a) Hình ảnh MRI ở chuột sau 4 giờ tiêm; (b) phân bố cường độ MRI liên quan đến khối u sau 4 giờ tiêm; (c) hình ảnh MRI ở chuột đối chứng; (d) Phân bố cường độ MRI liên quan đến khối u ở chuột đối chứng; (e) Tóm tắt tỷ lệ phần trăm pixel dưới I <sub>0,25</sub> trên hình ảnh khối u MRI. Kiểm định Mann-Whitney phân phối phi gaussian: *p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001	109
<b>Hình 5.7</b>	Hình ảnh quang học <i>in vitro</i> ở các bước sóng kích thích và phát xạ tối ưu tương ứng với từng hệ nano (ở các nồng độ khác nhau của Cyanine 5.5)	111
<b>Hình 5.8</b>	So sánh và phân tích định lượng ROI hình ảnh quang học của các hệ nano ở bước sóng kích thích/phát xạ tối ưu. Tín hiệu huỳnh quang ghi lại độ bức xạ trung bình (average radicance, ph/s/cm <sup>2</sup> /sr), (n = 3)	112
<b>Hình 5.9</b>	Sơ đồ minh họa ảnh hưởng của Doxorubicin và Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> đến bước sóng kích thích/phát xạ tối ưu của các hệ nano	113
<b>Hình 5.10</b>	(a) Sơ đồ bố trí thí nghiệm <i>in vivo</i> trên mô hình chuột mang	114



khối u CT26; (b) sự phân bố *in vivo* trên hình ảnh quang học theo thời gian của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5

<b>Hình 5.11</b>	(a) Định lượng tín hiệu huỳnh quang tại khối u và các cơ quan của chuột; (b) tỷ lệ tín hiệu khối u/gan và gan/thận	115
<b>Hình 5.12</b>	(a) Thu thập khối u và các cơ quan của chuột sau 36 giờ tiêm; (b) hình ảnh huỳnh quang NIR <i>ex vivo</i> ở bước sóng kích thích/phát xạ = 662/722 nm; (c) định lượng tín hiệu huỳnh quang; (d) tỷ lệ tín hiệu khối u/gan và gan/thận <i>ex vivo</i>	116
<b>Hình 5.13</b>	(a) Sơ đồ thí nghiệm trên chuột; (b) hàm lượng Fe tại khối u và các cơ quan của chuột (* <i>p</i> < 0,05; ** <i>p</i> < 0,001)	118
<b>Hình 5.14</b>	Đánh giá tác dụng hóa trị của vật liệu nano PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Dox-Cyanine 5.5 bằng hình ảnh phát quang sinh học. (a) Sơ đồ thí nghiệm; (b) khối lượng chuột; (c) kích thước khối u; (d) hoạt động luciferase trung bình trong khối u với độ lệch chuẩn. Tín hiệu luciferase được chuẩn hóa với tín hiệu trước khi điều trị	119
<b>Hình 5.15</b>	Hình ảnh phát quang sinh học của từng nhóm chuột thử nghiệm cho thấy hoạt động của enzym luciferase trong khối u CT26	120
<b>Hình 5.16</b>	(a) Sơ đồ thí nghiệm đánh giá tác dụng nhiệt từ trị <i>in vivo</i> ; (b) theo dõi khối lượng chuột; (c) đo kích thước khối u trên chuột; (d) thể tích khối u ở các nhóm sau điều trị (* <i>p</i> < 0,05; ** <i>p</i> < 0,001)	124

## MỞ ĐẦU

Hiện nay, ung thư là một trong những nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trên toàn thế giới và luôn được coi như một gánh nặng lớn về y tế. Vì vậy việc sớm tìm ra giải pháp nhằm chẩn đoán sớm và điều trị ung thư hiệu quả là việc làm hết sức cần thiết. Trong số các phương pháp điều trị ung thư, hóa trị vẫn là phương pháp được sử dụng nhiều nhất. Tuy nhiên, các thuốc điều trị ung thư thường có khối lượng phân tử nhỏ nên thường bị đào thải nhanh chóng ra khỏi hệ tuần hoàn. Thêm vào đó, do tính định hướng chọn lọc thấp cho nên phần lớn lượng thuốc hóa trị khi được đưa vào cơ thể không tới được các tổ chức ung thư mà thường có khuynh hướng phân bố rộng trong cơ thể. Do vậy gây ra nhiều tác dụng phụ cho bệnh nhân như rụng tóc, suy nhược, giảm miễn dịch cơ thể, tiêu chảy, buồn nôn...[1] Vì vậy, việc gắn các thuốc điều trị ung thư lên các hệ mang thích hợp có thể đưa thuốc đến đúng vị trí khối u với liều lượng cần thiết luôn là thử thách lớn và cần được các nhà khoa học tập trung giải quyết.

Ngoài các tác nhân hóa trị, các hạt nano oxit sắt từ ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) được sử dụng rộng rãi trong điều trị ung thư do tính chất từ tính tự nhiên của chúng với khả năng hướng đích, khả năng mang nhiều chất có hoạt tính sinh học, tác dụng nhiệt từ trị [2]. Ngoài ra, hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  còn được sử dụng làm chất tương phản ảnh chụp cộng hưởng từ MRI [3]. Trong công nghệ dược phẩm, các hạt nano oxit sắt từ và thuốc chống ung thư được bọc bởi các lớp vỏ là các polyme phân huỷ sinh học như dextran, dextran biến tính, chitosan, chitosan biến tính, alginate, PLA-PEG,... tăng hiệu quả tác động đối với các tế bào ung thư nhất định [4]. Trên thế giới, một số nghiên cứu về hệ nano đa chức năng dùng trong y sinh học, đặc biệt là trong điều trị ung thư đã được công bố. Tuy nhiên, đây vẫn là hướng nghiên cứu mới với nhiều triển vọng.

Đồng thời, điều trị ung thư thường là quá trình tốn nhiều thời gian. Khi bệnh nhân tiếp nhận hóa trị sẽ thường phải trải qua thêm nhiều xét nghiệm để đánh giá hiệu quả tác động của thuốc. Một phương pháp theo dõi quá trình điều trị ung thư thường được sử dụng là kỹ thuật hình ảnh quang học (optical imaging) dựa vào các chất đánh dấu huỳnh quang. Trong các quan sát tín hiệu huỳnh quang hoặc phát quang sinh học trong cơ thể sống, do các đặc điểm quang học như hấp thụ và tán xạ

nên việc quan sát mô sâu rất khó khăn. Các chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần có nhiều lợi thế cho quá trình sinh học so với huỳnh quang trong phổ khả kiến, do khả năng tự phát huỳnh quang và hấp thụ của các mô sinh học ở vùng sóng này thấp hơn [5]. Do đó tạo điều kiện thuận lợi trong quá trình theo dõi sự phân bố *in vivo* của thuốc trong quá trình điều trị nhờ hình ảnh quang học, từ đó giúp bác sĩ và dược sĩ lâm sàng theo dõi tiến triển điều trị và nâng cao hiệu quả của phương pháp điều trị ung thư.

Từ nhận định trên cho thấy việc kết hợp thuốc hoá trị ung thư với hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  và chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần có thể vừa giúp đưa thuốc kháng ung thư đến mô cần điều trị một cách hiệu quả, vừa theo dõi được đáp ứng điều trị của mô ung thư. Việc kết hợp các thành phần như vậy thường được thực hiện nhờ các polyme. Mặc dù, một số nghiên cứu trước đây đã chế tạo ra một số hệ dẫn thuốc đa chức năng khác nhau [6, 7], tuy nhiên theo chúng tôi được biết nghiên cứu kết hợp các thành phần này còn chưa được thực hiện. Nghiên cứu trong luận án này thiết kế một hệ dẫn thuốc nano quang từ đa chức năng có gắn tác nhân phát huỳnh quang hồng ngoại gần Cyanine 5.5 với nhiều chức năng: mang thuốc chống ung thư Doxorubicin trên nền copolyme PLA-TPGS, phát huỳnh quang hồng ngoại gần để theo dõi sự phân bố *in vivo* của hệ dẫn thuốc, tăng độ tương phản trong chụp cộng hưởng từ MRI, và tiêu diệt tế bào ung thư bằng tác dụng hóa trị của thuốc hoặc tác dụng nhiệt trị của lõi từ. Vai trò của Doxorubicin là thuốc hóa trị nhờ khả năng tham gia nhiều phản ứng của các con đường ức chế sự phát triển của tế bào ung thư. Copolyme có khả năng mang thuốc nhờ đầu kỵ nước, vừa có khả năng tăng hấp thu thuốc nhờ đầu ưa nước, làm tăng hiệu quả điều trị và làm giảm lượng thuốc cần dùng.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ở kích thước nano có vai trò làm tăng khả năng mang thuốc của hệ (nhờ khả năng hấp phụ các phân tử thuốc Doxorubicin). Bên cạnh đó, lõi oxit sắt từ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  với tính chất siêu thuận từ (ở kích thước nhất định) có khả năng tự nóng lên dưới tác động của từ trường ngoài. Điều này giúp cho hệ có thể áp dụng trong diệt tế bào ung thư bằng phương pháp nhiệt từ trị.

Trên cơ sở các phân tích trên, chúng tôi thực hiện luận án “**Nghiên cứu chế tạo, đánh giá tác dụng hoá trị - nhiệt trị ung thư và sự phân bố *in vivo* của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần**”.

Trong luận án này, chúng tôi chế tạo hệ dẫn thuốc nano đa chức năng trên cơ sở hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  được bọc bởi copolyme PLA-TPGS, mang thuốc Doxorubicin và gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần Cyanine 5.5, với 4 điểm mới sau đây:

(1) Theo dõi sự phân bố *in vivo* của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng nhờ khả năng phát huỳnh quang trong vùng hồng ngoại gần của Cyanine 5.5. Qua đó, đánh giá được khả năng hướng đích thụ động tới vị trí khối u và đặc điểm phân bố tại các cơ quan bằng kỹ thuật hình ảnh quang học (optical bioimaging) trên mô hình chuột gây khối u đại tràng CT26.

(2) Đánh giá tác dụng hóa trị của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng bằng kỹ thuật phát quang sinh học (Bioluminescence).

(3) Việc kết hợp tác dụng hóa trị và nhiệt từ trị mang lại hiệu quả điều trị khối u vượt trội. Đồng thời xác định cơ chế gây độc tế bào ung thư của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng bằng kỹ thuật sàng lọc nội hàm cao (High Content Screening).

(4) Trong các nghiên cứu trước, bên cạnh việc xác định độ hồi phục  $r_1$ ,  $r_2$ , khả năng tăng độ tương phản trong chụp cộng hưởng từ MRI được xác định bằng cách định tính trên hình ảnh *in vivo*. Ở luận án này, chúng tôi định lượng tín hiệu MRI bằng phương pháp  $\%I_{0,25}$  để khẳng định sự khác biệt về khả năng tăng độ tương phản, đồng thời chứng minh được khả năng hướng đích thụ động tới vị trí khối u của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng trên mô hình chuột gây khối u đại tràng CT26.

Thành công của luận án này có thể đóng góp một hệ trị liệu hiệu quả không chỉ đạt được hiệu quả điều trị kép khi kết hợp hoá trị với nhiệt từ trị trong cùng một hệ dẫn thuốc, mà còn góp phần làm tăng độ tương phản ảnh MRI và khả năng theo dõi bằng đánh dấu huỳnh quang của mô ung thư. Qua đó, nhằm hỗ trợ kế hoạch điều trị cũng như đánh giá đáp ứng của mô đối với quá trình điều trị.

### **Mục tiêu luận án:**

1. Chế tạo được các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng có gắn tác nhân phát huỳnh quang hồng ngoại gần

2. Đánh giá được tác dụng hóa trị, khả năng theo dõi, phát hiện sự phân bố *in vivo* của thuốc tại các mô ung thư bằng chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần, khả

năng tăng độ tương phản trong chụp cộng hưởng từ hạt nhân và khả năng nhiệt từ trị của các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng.

### **Bố cục của luận án:**

Luận án có 130 trang (chưa bao gồm tài liệu tham khảo), bao gồm phần mở đầu, 5 chương nội dung và kết luận. Cụ thể như sau:

Mở đầu

Chương 1. Tổng quan về hệ dẫn thuốc nano đa chức năng trong chẩn đoán và điều trị ung thư.

Chương 2. Phương pháp nghiên cứu

Chương 3. Hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin

Chương 4. Hệ dẫn thuốc nano đa chức năng gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gắn PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin-Cyanine 5.5

Chương 5. Đánh giá khả năng tăng độ tương phản trong chụp cộng hưởng từ hạt nhân, sự phân bố *in vivo*, tác dụng hóa trị và nhiệt từ trị của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gắn

Kết luận và kiến nghị

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VỀ HỆ DẪN THUỐC NANO ĐA CHỨC NĂNG TRONG CHẨN ĐOÁN VÀ ĐIỀU TRỊ UNG THƯ

### 1.1. Khái quát về hệ dẫn thuốc nano đa chức năng trong chẩn đoán, điều trị ung thư

Hiện nay, ung thư đã trở thành một trong những nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trên toàn cầu. Theo số liệu thống kê về ung thư toàn cầu theo khu vực trên thế giới trong năm 2020 (GLOBOCAN), tỷ lệ mắc và tử vong do ung thư đang gia tăng trên toàn thế giới [8]. Tại Việt Nam, số ca mắc mới và số ca tử vong do ung thư được ước tính là 182.563 và 122.690. Năm 2018, Việt Nam đứng ở vị trí thứ 99/185 về tỷ suất mắc mới và thứ 56/185 về tỷ suất tử vong trên 100.000 người. Thứ hạng này đã tăng lên 91/185 về tỷ suất mắc mới và thứ 50/185 về tỷ suất tử vong vào năm 2020 [9]. Điều này cho thấy tình hình mắc mới và tử vong do ung thư ở Việt Nam đang gia tăng nhanh. Tình hình này cũng tương tự với nhiều quốc gia trên thế giới, bao gồm cả các quốc gia phát triển như Pháp, Nhật Bản, Anh, Hoa Kỳ, và Hàn Quốc [10].

Phương pháp điều trị ung thư hiện nay chủ yếu bao gồm phẫu thuật, sau đó là xạ trị và/hoặc hóa trị và các phương thức mới khác như liệu pháp miễn dịch, liệu pháp gen, liệu pháp nhiệt, và liệu pháp quang học. Tuy nhiên, mặc dù thành công ở một mức độ nhất định, cho đến nay những phương thức đơn lẻ đó khó có thể cung cấp phương pháp điều trị hoàn chỉnh do giới hạn liều lượng và khả năng kháng thuốc của tế bào ung thư đối với phương thức này. Do đó, nếu kết hợp được hai hoặc nhiều phương thức đó trên cùng một hệ đa chức năng sẽ giúp phát huy những ưu điểm và tránh những nhược điểm của chúng, và rất có thể đạt được tác dụng hiệp đồng  $1 + 1 > 2$ . Trong số các phương thức điều trị ung thư kể trên, hóa trị là một trong những liệu pháp quan trọng nhất. Hóa trị liệu có hiệu quả đối với nhiều loại ung thư trong thực tế. Tuy nhiên, hóa trị gây ra nhiều tác dụng phụ, nguyên nhân là do không có tính hướng đích, sự kháng thuốc của tế bào ung thư và các vấn đề về độ hòa tan, tính thấm và tính ổn định của thuốc hóa trị [11]. Do đó, các hệ mang thuốc được phát triển để hạn chế những tác dụng phụ này. Thêm vào đó, các hệ mang thuốc đa chức năng, kết hợp việc mang thuốc chống ung thư với các chức năng khác cũng được phát triển.

Sự phát triển gần đây của công nghệ nano trong dược phẩm đã mang lại hy vọng hiện thực hóa việc phân phối thuốc chống ung thư một cách bền vững, có kiểm soát và có khả năng hướng đích bằng các chất mang nano khác nhau bao gồm các tiền thuốc (pro-drug), mixen, liposome, hạt nano lipid rắn, hạt nano được bọc bởi polyme và copolyme phân hủy sinh học [12, 13]. Giới hạn của liệu pháp hóa trị trong vấn đề dung nạp thuốc có thể được khắc phục khi kết hợp với các phương thức khác như liệu pháp nhiệt trị và liệu pháp miễn dịch. Liệu pháp nhiệt trị sẽ làm tăng phản ứng của tế bào ung thư với thuốc chống ung thư và liệu pháp miễn dịch có thể làm tăng khả năng phòng vệ của cơ thể. Cả hai liệu pháp này đều dẫn đến liều lượng ít hơn cho cùng tác dụng điều trị hoặc cùng một liều lượng với tác dụng điều trị cao hơn và ít tác dụng phụ hơn [14].

Sự tiến triển của ung thư là kết quả tổng hợp của nhiều yếu tố, thường không đặc hiệu cho khối u nhưng liên quan đến các quá trình sinh lý bệnh khác nhau. Hơn nữa, các tế bào khối u rất không đồng nhất và có tỷ lệ đột biến cao, dẫn đến sự khác biệt về bệnh lý giữa các loại ung thư, cá thể và vùng trong khối u khác nhau [15]. Để giải quyết tính không đồng nhất này, các liệu pháp kết hợp đa chức năng trong chẩn đoán và điều trị ung thư dựa trên vật liệu nano đang được tập trung nghiên cứu. Tuy nhiên, việc hai hoặc nhiều chức năng liên quan có thể phối hợp nhịp nhàng, khai thác tối đa hiệu quả trên cùng một vật liệu nano cũng là một thách thức. Với việc hiện thực hóa những điều kiện này, các vật liệu nano đa chức năng được kỳ vọng sẽ là một liệu pháp chẩn đoán và điều trị ung thư hiệu quả [16, 17].

## **1.2. Polyme và các hệ nano polyme**

### **1.2.1. Polyme**

Polyme là những hợp chất có mạch phân tử dài, có khối lượng phân tử rất lớn (thường hàng ngàn, hàng triệu đ.v.C) do nhiều mắt xích (monome) liên kết với nhau bằng liên kết cộng hóa trị. Các polyme có nhiều ứng dụng trong phát triển các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng, đã mang lại sự thay đổi mang tính đột phá trong lĩnh vực y sinh [18]. Hệ dẫn thuốc nano sử dụng chất mang là polyme hoặc copolyme có thể cung cấp phương pháp phân phối thuốc bền vững, có kiểm soát và hướng đích để cải thiện hiệu quả điều trị và giảm tác dụng phụ của thuốc hóa trị truyền thống. Polyme có nhiều ưu điểm ứng dụng trong hệ dẫn thuốc nano bao gồm: (1) cung cấp

khả năng kiểm soát giải phóng thuốc đến vị trí đích, (2) mang lại sự ổn định cho các phân tử kém bền (ví dụ: protein, DNA, thuốc kỵ nước,...) và (3) cung cấp khả năng biến đổi các bề mặt bằng chất gắn trung gian hoặc thụ thể cho mục đích phân phối thuốc hướng đích chủ động [19].

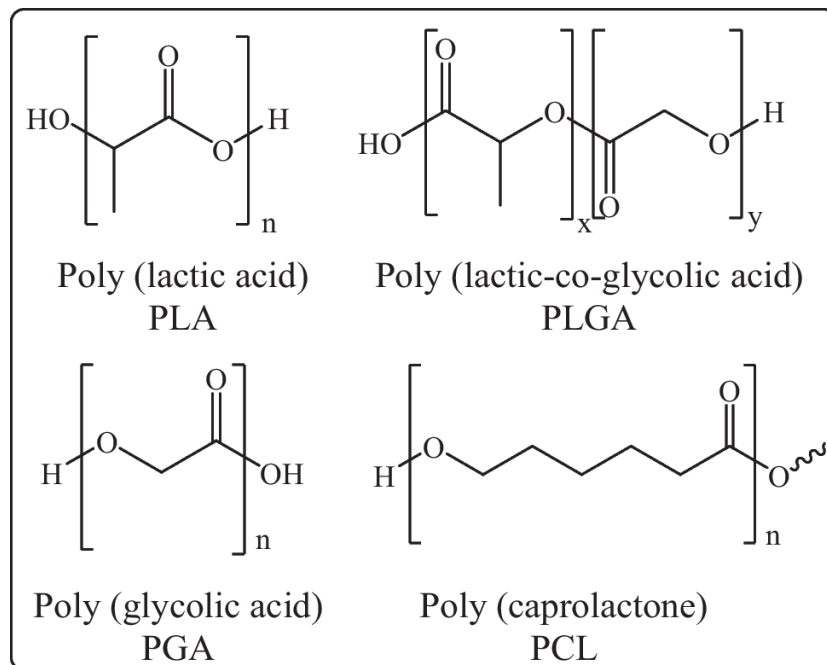
Hệ dẫn thuốc nano sử dụng polyme làm chất mang có thể kiểm soát độ ổn định của các loại thuốc ưa nước và kỵ nước trong thời gian dài. Các đặc tính dược động học và dược lực học được điều chỉnh bằng cách kết hợp thuốc điều trị với polyme thông qua một số cơ chế bao gồm tăng thời gian bán thải của thuốc trong huyết tương, khả năng kháng các enzyme phân giải protein, giảm khả năng sinh miễn dịch, tăng khả năng hòa tan của thuốc có trọng lượng phân tử thấp và khả năng phân phối chọn lọc [20]. Do vậy, sử dụng polyme là một chiến lược tiềm năng để điều trị ung thư thành công và thuận tiện hơn cho bệnh nhân.

Hai loại polyme chính được sử dụng trong phân phối thuốc là polyme phân hủy sinh học và không phân hủy sinh học. Các polyme không phân hủy sinh học gây ra các vấn đề về độc tính, chủ yếu là do tích tụ trong cơ thể. Cơ chế cơ bản của việc giải phóng thuốc từ polyme không phân hủy là khuếch tán, dựa trên tính thấm của polyme và đặc tính của thuốc. Để giải quyết những vấn đề này, các nhà nghiên cứu đã bắt đầu phát triển các polyme phân hủy sinh học vào đầu những năm 1970 [21].

Các polyme phân hủy sinh học có thể là polyme tổng hợp hoặc polyme thiên nhiên. Cấu tạo của một số polyme tổng hợp được trình bày trên hình 1.1. Các polyme có thể bị phân hủy *in vivo* bởi quá trình xúc tác enzym hoặc không enzym. Các sản phẩm phụ tạo ra có thể tham gia các con đường trao đổi chất khác nhau, hoặc bị vi sinh vật đồng hóa làm nguồn carbon để giải phóng CO<sub>2</sub>. Một số polyme phân hủy sinh học có nguồn gốc tự nhiên và tổng hợp đã được nghiên cứu để nhằm hướng đích thuốc và giải phóng thuốc kéo dài, nhưng chỉ một số ít trong số chúng có khả năng tương thích sinh học tốt đang được sử dụng. Chúng có độc tính thấp hoặc không độc hại, phù hợp với nhiều loại ứng dụng khác nhau. Polyme phân hủy sinh học có thể nâng cao hiệu quả phân phối thuốc bằng cách kiểm soát quá trình giải phóng thuốc với lượng ổn định trong thời gian dài [22].



Poly (lactic acid) (PLA), poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) và poly (caprolactone) (PCL) là các polyme phân hủy sinh học được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) phê chuẩn, được sử dụng thường xuyên nhất trong phân phối thuốc. Các polyme này ban đầu được tổng hợp để sử dụng làm chỉ khâu phẫu thuật, nên tồn tại những nhược điểm khi sử dụng trong các hệ mang thuốc như tính kỵ nước quá cao và phân hủy quá chậm. Do đó, cần phát triển các polyme/copolyme mới có khả năng phân hủy sinh học với sự cân bằng kỵ nước/ưa nước mong muốn và tốc độ phân hủy mong muốn [23].



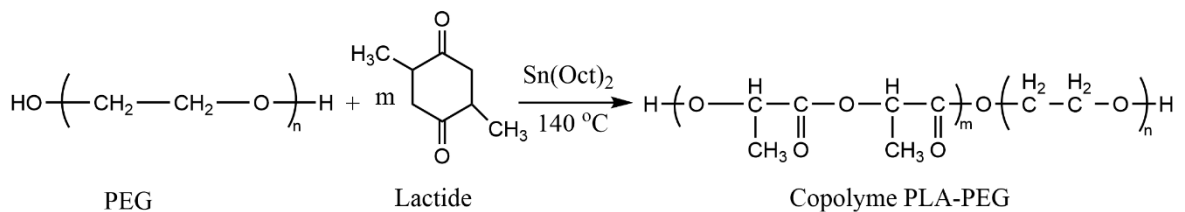
**Hình 1.1.** Cấu trúc phân tử của các polyme PLA, PLGA, PGA và PCL [24]

Poly lactic acid (PLA) là một loại dẫn xuất axit lactic được sản xuất từ các nguồn tài nguyên tái tạo như lúa mì, rom rạ, ngô, lúa, và miến. PLA có khả năng phân hủy sinh học hoàn toàn. PLA có thể bị phân hủy thành axit lactic trong cơ thể con người và được chuyển hóa, đã được FDA chấp thuận cho sử dụng y sinh. Ba phương pháp tổng hợp polyme PLA ( $M_w > 10.000$ ) đã được báo cáo: (a) trùng hợp ngưng tụ trực tiếp; (b) ngưng tụ khử nước đẳng phí (azeotropic dehydration condensation); và (c) trùng hợp mở vòng lactide [25]. PLA có 3 loại đồng phân lập thể là poly (L-lactide) (PLLA), poly (D-lactide) (PDLA), và poly (D,L-lactide) (PDLLA). Việc bổ sung chất hoạt động bề mặt hoặc thay đổi trọng lượng phân tử, kích thước, nhiệt độ và độ ẩm của PLA có thể dễ dàng thay đổi các đặc tính vật lý và hóa học của nó, đặc biệt là khả năng tương thích sinh học và khả năng phân hủy

sinh học. Điều này tạo điều kiện thuận lợi cho việc tạo ra hệ thống phân phối thuốc mong muốn với nhiều công thức khác nhau. Bắt đầu vào những năm 1970, Yolles và cộng sự đã sử dụng PLA cho nghiên cứu phân phối thuốc và điều chế phức hợp PLA có chứa naltrexone. Tỷ lệ giải phóng thuốc *in vitro* là 67% sau 35 ngày. Các thí nghiệm *in vivo* đã chứng minh rằng phức hợp này có tác dụng ngăn chặn morphin [25]. Tính kỵ nước của PLA cho phép mang các thuốc chống ung thư kỵ nước. Tuy nhiên, tính kỵ nước của nó cũng hạn chế sự phân bố của thuốc vào máu. Vậy nên, nhiều polyme ưa nước như PEG và d-alpha tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) được gắn với PLA để tạo thành các copolyme lưỡng cực (amphiphilic: vừa ưa nước, vừa kỵ nước). Các copolyme tạo thành hệ dẫn thuốc nano polymeric micell có cấu trúc lõi - vỏ trong môi trường nước. Lõi bao gồm PLA đóng vai trò là môi trường vi mô cho việc kết hợp các thuốc kỵ nước, vỏ bao gồm các polyme ưa nước giúp ổn định các mixen và bảo vệ các thuốc khỏi môi trường sinh lý của cơ thể [26]. Các polymeric micell có nhiều ưu điểm như kích thước nhỏ, khả năng nạp thuốc cao, độ ổn định cấu trúc cao và khả dụng sinh học tốt. Sahini và cộng sự đã sử dụng polyme PLA để điều chế các vi cầu PLA-PEG-PLA có chứa paclitaxel [24]. Các vi cầu đã được chuẩn bị có kích thước đồng đều và có cấu trúc xốp bên trong giúp thúc đẩy quá trình giải phóng thuốc. Tỷ lệ giải phóng *in vitro* đạt 49% trong một tháng, kéo dài thời gian tác dụng của thuốc trong cơ thể và nâng cao hiệu quả của thuốc. Hệ phân phối thuốc giải phóng kéo dài này tránh được nồng độ thuốc tại chỗ không ổn định do giải phóng thuốc, từ đó nâng cao hiệu quả điều trị.

Polyethylene glycol (PEG) là polyme phân hủy sinh học, tương thích sinh học, khả năng nạp thuốc cao, làm tăng thời gian bán thải của thuốc. PEG là polyme ưa nước phổ biến nhất, dễ biến đổi bề mặt và đã được sử dụng để biến đổi tính kỵ nước của PLA thành dạng copolyme lưỡng cực PLA-PEG. Các nhóm hydroxyl cuối mạch có thể đóng vai trò là chất khơi mào cho quá trình trùng hợp lactide, để tổng hợp copolyme (Hình 1.2). Nhiệt độ lý tưởng để tổng hợp copolyme PLA-PEG là từ 180 đến 190°C, nếu không sản phẩm sẽ chuyển sang màu nâu sẫm hoặc phản ứng không xảy ra. Hơn nữa, tính chất cơ học của copolyme PLA-PEG phụ thuộc vào thành phần của polyme. Nhờ các đặc tính hóa lý và sinh học khác, như không độc hại và làm giảm sự hấp thu của hệ thống lưới nội mô sau khi tiêm tĩnh mạch, nên

copolymer PLA-PEG đã được sử dụng rộng rãi làm chất mang thuốc trong điều trị ung thư [27]. Nhóm nghiên cứu của Stefani và cộng sự đã tổng hợp copolymer PLA-PEG bằng cách sử dụng phản ứng trùng hợp mở vòng anion thay thế với butyl lithium, natri alkoxide và kali alkoxide [28]. Quá trình này được thực hiện thông qua phản ứng trùng hợp mở vòng anion thông qua axit lactic và ethylene oxit, sử dụng chất khơi mào là propanol 3,3-diethoxy-kali. Luận án của TS. Phan Quốc Thông và Đề tài của GS.TSKH. Nguyễn Xuân Phúc (Viện Khoa học vật liệu) đã tổng hợp copolymer PLA-PEG bằng phản ứng mở vòng trùng ngưng axit lactic với polyethylene glycol với sự có mặt của xúc tác thiếc (II) 2-ethylhexanoat [29]. Copolymer PLA-PEG tạo thành với các tỷ lệ thành phần PLA:PEG (w/w) khác nhau được sử dụng để bọc hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> và mang thuốc Curcumin, ứng dụng trong chẩn đoán và điều trị ung thư. Tỷ lệ PLA:PEG có thể điều chỉnh kích thước hạt của hạt nano khi mang thuốc. Kích thước khác nhau của copolymer PLA-PEG mang thuốc sẽ làm cho hệ nano bị phân hủy hoặc khuếch tán ở các tốc độ khác nhau, dẫn đến sự giải phóng thuốc khác nhau. Khi tỷ lệ PLA:PEG tăng lên, hiệu suất mang thuốc và độ hòa tan của curcumin được cải thiện đáng kể. Khi tỷ lệ PLA:PEG giảm thì hiệu suất mang thuốc curcumin vẫn còn 50%. Hiệu suất mang thuốc đạt khoảng 90% khi tỷ lệ PLA:PEG tăng từ 1:3 lên 3:1. Tuy nhiên, tốc độ giải phóng curcumin lại giảm [30].



**Hình 1.2.** Phản ứng tổng hợp copolymer PLA-PEG [30]

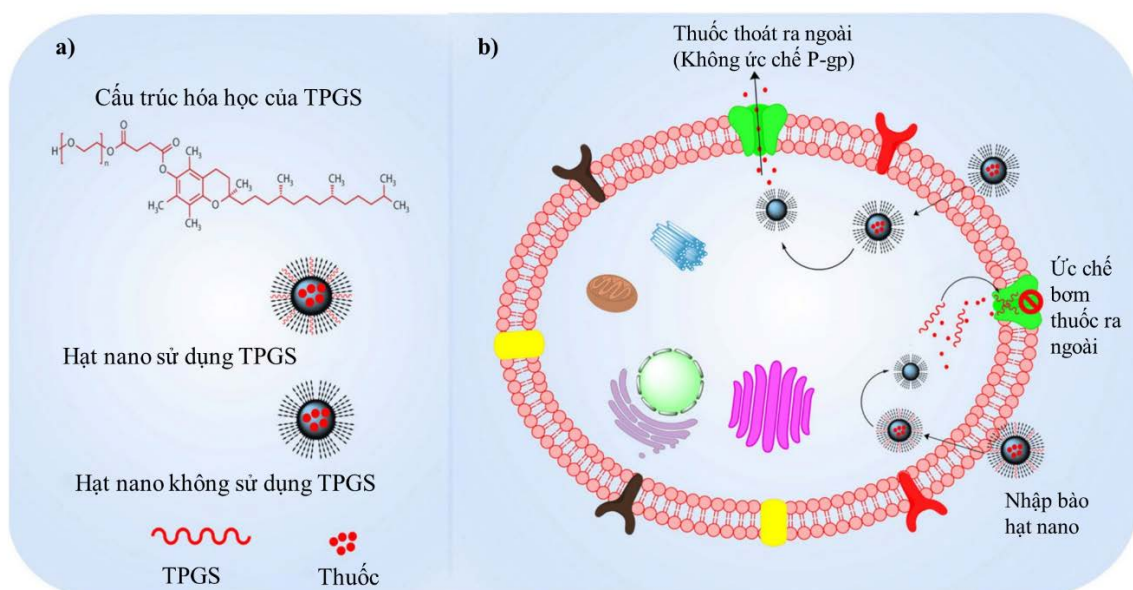
Ngoài ra, các PLA biến tính như PLGA (Polylactoglycolic acid) thường được sử dụng trong các hệ thống phân phối thuốc. Sự kết hợp giữa axit lactic (LA) với axit glycolic (GA) tạo ra copolymer PLGA, một trong những chất mang được sử dụng nhiều nhất trong lĩnh vực dược phẩm. Copolymer PLGA có khả năng phân hủy sinh học, tính tương thích sinh học, hình thái, kích thước hạt và đặc tính giải phóng thuốc được duy trì trong các hệ dẫn thuốc nano. Các đặc tính polyme của PLGA, chẳng hạn như nhiệt độ thủy tinh hóa (Tg) và tốc độ phân hủy, cũng có thể được

điều chỉnh bằng cách thay đổi tỷ lệ hàm lượng LA:GA [31]. Hiện tại, khoảng 20 sản phẩm dựa trên PLGA có sẵn trên thị trường đã được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) và Cơ quan Dược phẩm Châu Âu (EMA) phê duyệt, và được sử dụng làm chất mang thuốc, protein và nhiều đại phân tử trong các ứng dụng điều trị [24]. Nhóm nghiên cứu của Jia và cộng sự đã sử dụng copolyme PLGA để bọc oxit sắt  $Fe_3O_4$ , sau đó mang thuốc Doxorubicin (DOX) bên trong để tạo thành chất mang nanocomposit [32]. PLGA giúp duy trì độ nhạy cao của  $Fe_3O_4$  với từ trường bên ngoài, do đó hệ nano này đạt được mục tiêu từ tính. Thuốc này cũng có hoạt tính chống ung thư tốt. Hơn nữa, các hệ dẫn thuốc nano sử dụng polyme PLGA thường được điều chế bằng cách sử dụng các chất nhũ hóa hóa học như poly (vinyl alcohol) (PVA). Tuy nhiên, chất này có nhược điểm là hiệu quả nhũ hóa thấp, có tác dụng phụ và khó rửa trôi trong quá trình chế tạo. Thay vào đó, d- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (vitamin E TPGS hay gọi đơn giản là TPGS) có hiệu suất nhũ hóa cao (cao gấp 67 lần so với PVA). Nó cũng cải thiện đáng kể hiệu suất nano hóa thuốc (đạt được tới 100% EE), tăng cường sự hấp thu tế bào của các hạt nano, và do đó làm tăng tỷ lệ tiêu diệt tế bào ung thư [22].

TPGS là một loại PEGylated-vitamin E được hình thành bằng cách ester hóa vitamin E succinate với PEG. TPGS là một dẫn xuất hòa tan trong nước của vitamin E tự nhiên, có chỉ số cân bằng dầu - nước (hydrophile-lipophile balance, HLB) là  $\sim 13$  [33]. Do đó, TPGS có đặc tính tăng cường khả năng hòa tan của hợp chất lipophilic trong môi trường nước thông qua quá trình nhũ hóa. Sự thay đổi độ dài chuỗi PEG trong TPGS sẽ làm thay đổi số HLB của nó. Ví dụ: TPGS bao gồm PEG 200, PEG 1000 và PEG 2000 có chỉ số cân bằng dầu-nước HLB lần lượt là 9, 13 và 16. Cấu trúc hóa học của TPGS tương tự như các polyme lưỡng cực khác bao gồm đuôi alkyl kỵ nước và phần đầu ưa nước (Hình 1.3a). Cấu trúc cồng kềnh và đặc điểm diện tích bề mặt lớn làm cho nó trở thành chất nhũ hóa tuyệt vời [34].

TPGS thường có trọng lượng phân tử là 1513 g/mol, nồng độ mixen tới hạn (critical micelle concentration) là 0,02% trọng lượng và giá trị HLB là 13,2. Các nhóm hóa học cũng có thể được thêm vào TPGS để thay đổi tính chất của chúng sao cho có thể sử dụng các nhóm chức năng cần thiết để liên kết các phối tử trên bề mặt [35]. Một số nghiên cứu đã sử dụng TPGS-COOH để chế tạo các hệ dẫn thuốc nano

có nhóm chức  $-COOH$  có thể kết hợp với các kháng thể đơn dòng đặc hiệu thông qua các thụ thể nhất định, chẳng hạn như cetuximab để hướng đích EGFR và bevacizumab cho VEGF [36]. Trong một nghiên cứu khác, Viswanadh và cộng sự đã chế tạo TPGS-SH bằng cách cho TPGS-COOH phản ứng với 4-aminothiophenol với sự có mặt của các chất liên kết ngang carbodiimide (EDC/NHS) [37]. TPGS-SH đã điều chế được sử dụng để tổng hợp các hệ nano nhạy cảm với các quá trình oxy hóa khử. Li và cộng sự đã điều chế TPGS-NH<sub>2</sub> bằng cách phản ứng với triethylamine trong sự có mặt của p-toluenesulfonyl clorua [38]. TPGS-NH<sub>2</sub> thu được sau đó được liên hợp với axit folic với sự có mặt của EDC/NHS để tạo ra TPGS-Folic.



**Hình 1.3.** (a) Cấu trúc phân tử của TPGS và các hạt nano mang thuốc có hoặc không có TPGS; (b) cơ chế tế bào của TPGS ức chế P-gp [36]

Hơn nữa, các nghiên cứu cho thấy việc sử dụng đồng thời vitamin E TPGS có thể tăng cường độc tính tế bào, ức chế tình trạng kháng đa thuốc qua trung gian P-glycoprotein (Hình 1.3b) và tăng sinh khả dụng đường uống của thuốc chống ung thư [36]. TPGS sở hữu những ưu điểm của cả PEG và vitamin E, bao gồm khả năng thoát khỏi sự nhận biết và loại bỏ của các đại thực bào của hệ lưới nội mô (Reticuloendothelial system, RES), dẫn đến thời gian bán thải dài do sự hiện diện của PEG. Đồng thời, sự có mặt của vitamin E tạo điều kiện thuận lợi cho sự hấp thu tế bào của các chất mang nano liên quan đến TPGS [36]. Do vậy, TPGS còn được sử dụng để tổng hợp copolyme PLA-TPGS làm chất mang thuốc trong các hệ dẫn

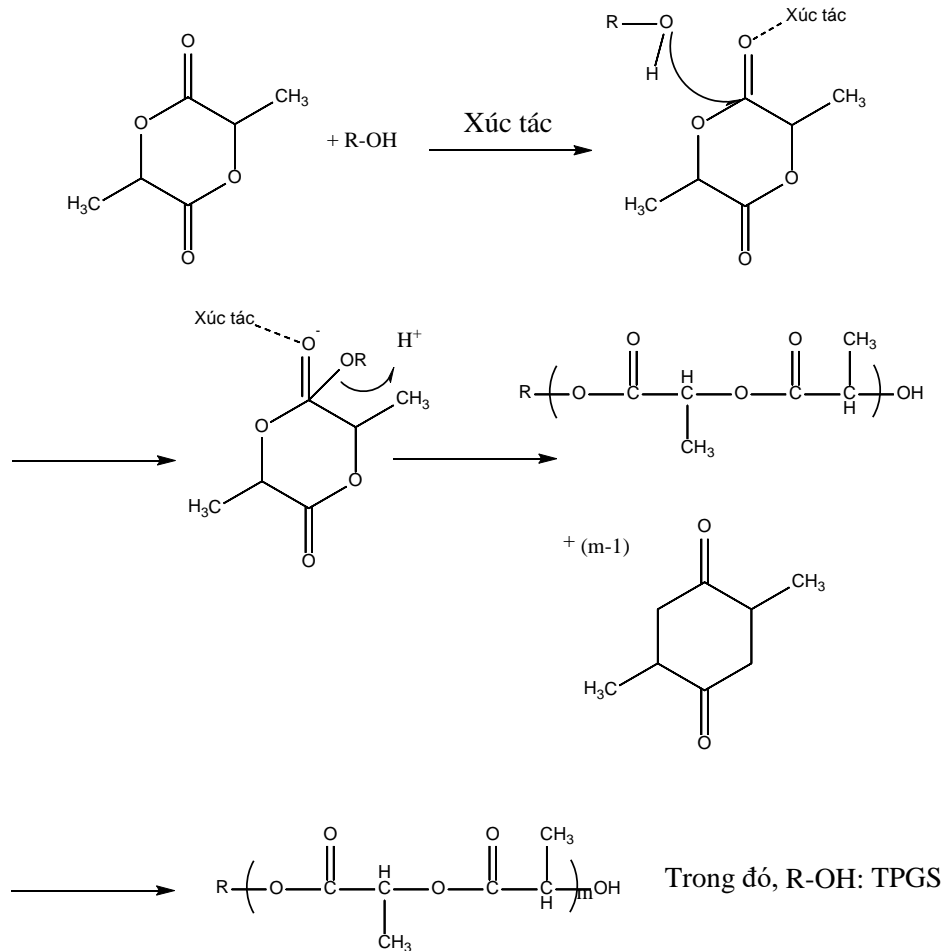
thuốc nano, có thể có tác dụng tự nhũ hóa (không cần chất nhũ hóa cho công thức hạt nano) và đạt được hiệu suất mang thuốc cao và đặc tính giải phóng thuốc mong muốn, như được trình bày trong mục 1.2.2 dưới đây.

### **1.2.2. Copolyme PLA-TPGS**

Copolyme là loại polyme cấu tạo từ hai hoặc nhiều loại monome khác nhau, được hình thành bằng cách trùng hợp hỗn hợp các monome có cấu trúc hóa học khác nhau. Copolyme có thể có nhiều đặc tính khác nhau như độ bền, tính linh hoạt và khả năng chống nước, tùy thuộc vào thành phần của chúng [39]. Hệ dẫn thuốc nano dựa trên copolyme có ứng dụng quan trọng đối với phương pháp điều trị ung thư. Copolyme làm tăng khả năng hòa tan của thuốc kỵ nước, giúp tiêm tĩnh mạch dễ dàng hơn. Copolyme được tổng hợp từ quá trình đồng trùng hợp, có khả năng làm tăng độ tan trong nước của thuốc bằng cách bao bọc trong lõi là thành phần kỵ nước, và vỏ là phần ưa nước. Tính ưa nước của vỏ mang lại những lợi ích khác, ổn định hơn trong hệ tuần hoàn. Hơn nữa, nó làm tăng khả năng tích lũy thuốc tại vị trí khối u. Copolyme lưỡng cực có khả năng cải thiện khả năng hòa tan trong nước của thuốc kỵ nước lên 5000 lần [40].

Trong số các copolyme, PLA-TPGS, đã thu hút được nhiều sự chú ý trong ứng dụng phân phối thuốc điều trị ung thư. Copolyme PLA-TPGS là một loại copolyme lưỡng cực được sử dụng làm chất mang trong các hệ dẫn thuốc nano nhằm làm tăng khả năng sự hấp thu tế bào nhờ đặc tính cân bằng kỵ nước - ưa nước và tránh được sự đào thải của hệ thống lưới nội mô [34]. Copolyme PLA-TPGS có thể được tổng hợp bằng phản ứng trùng hợp mở vòng hoặc liên hợp đơn giản PLA với TPGS. Copolyme thu được có thể mang lại các tính chất đặc biệt của TPGS để khắc phục những hạn chế của PLA, và đã được áp dụng rộng rãi để phân phối thuốc chống ung thư. Nghiên cứu của Si-Shen Feng và cộng sự đã tổng hợp copolyme PLA-TPGS bằng phản ứng trùng hợp mở vòng với thiếc octoate làm chất xúc tác [41]. Đầu hydroxyl của TPGS đóng vai trò là chất khởi đầu để phân cắt có chọn lọc chuỗi acyl-oxy của lactide (Hình 1.4). Copolyme PLA-TPGS sau đó được sử dụng để nano hóa Paclitaxel bằng phương pháp bay hơi dung môi mà không cần chất nhũ hóa. PLA-TPGS có thể làm tăng đáng kể hiệu suất nano hóa thuốc (89% đối với các hạt nano có hàm lượng thuốc là 5%) và đạt được giải phóng thuốc nhanh hơn nhiều

so với các hạt nano PLGA để đáp ứng nhu cầu điều trị. Hệ nano thu được có kích thước khoảng 300 nm và phân bố kích thước hẹp. Sự giải phóng thuốc từ các hạt nano PLA-TPGS là hai pha với pha ban đầu là 17% trong ngày đầu tiên, sau đó là pha duy trì với mức giải phóng 51% sau 31 ngày.



**Hình 1.4.** Cơ chế tổng hợp copolymer PLA-TPGS [41]

Nhóm nghiên cứu của PGS.TS. Hà Phương Thư tại Viện Khoa học vật liệu đã tổng hợp copolymer PLA-TPGS bằng phản ứng trùng hợp mở vòng monome lactide và TPGS, trên cơ sở tối ưu hóa tỷ lệ w/w giữa PLA và TPGS [42]. Trong đó, hệ nano sử dụng copolymer có tỷ lệ PLA:TPGS = 3:1 w/w đạt hiệu suất nano hóa cao nhất với Curcumin là 80,1% và Paclitaxel đạt 82,6%. Tuy nhiên, tỷ lệ này không dẫn đến độc tính trên tế bào ung thư cao hơn của hệ nano. Hệ nano trên cơ sở copolymer có tỷ lệ PLA:TPGS = 1:1 w/w lại là hệ nano đạt hiệu quả nhất trên tất cả các dòng tế bào ung thư, đặc biệt là trên dòng tế bào HepG2 và HeLa. Kết quả thí nghiệm này có thể được giải thích bởi ba lý do. Một là kích thước nhỏ hơn giúp hệ nano từ copolymer PLA-TPGS có tỷ lệ PLA:TPGS = 1:1 w/w dễ dàng hấp thu vào tế bào

hơn. Hai là tốc độ giải phóng Curcumin và Paclitaxel nhanh hơn do tỷ lệ TPGS ưa nước cao có thể cho thấy tác dụng nhanh hơn trên các tế bào ở điều kiện thí nghiệm (xử lý trong 48 giờ). Nguyên nhân cuối cùng và quan trọng nhất có thể là do khả năng tương thích sinh học giữa hệ nano và tế bào nhờ thành phần TPGS ưa nước cao hơn ở tỷ lệ PLA:TPGS = 1:1 w/w [42].

Các nghiên cứu đã cho thấy copolyme PLA-TPGS có thể đạt được kích thước và phân bố kích thước hạt nano mong muốn, hiệu suất nano hóa thuốc cao, kiểm soát động học giải phóng thuốc, hấp thu tế bào *in vitro* cao và hiệu quả gây độc tế bào được cải thiện rõ rệt sau khi giải phóng thuốc. Các hệ nano PLA-TPGS-Paclitaxel có đường kính 200–300 nm, có khả năng mang thuốc cao (~10%) và hiệu suất nano hóa thuốc cao (~80%). Hiệu quả điều trị *in vivo* cao cũng được chứng minh bằng thời gian bán hủy gấp 27,4 lần và diện tích dưới đường cong (AUC) gấp 1,34 lần cũng như hiệu quả tốt hơn nhiều trong mô hình khối u xenograft và khả năng phân phối sinh học mong muốn hơn so với Taxol® [43]. Một lần sử dụng có thể cung cấp liệu pháp duy trì trong 340 giờ so với chỉ 22 giờ đối với Taxol. Nhóm nghiên cứu của Gan và cộng sự đã chế tạo hệ nano docetaxel trên copolyme PLA-TPGS có đường kính 240 nm và hiệu suất nano hóa đạt 85,0%. Giá trị IC<sub>50</sub> sau 24 giờ ủ trên tế bào ung thư chỉ là 5,85 µg/mL so với 10,38 µg/mL của Taxotere®. Thời gian bán thải dài hơn 20,1 lần và giá trị AUC lớn hơn 3,44 lần so với Taxotere. Một liều có thể duy trì hiệu quả trong 360 giờ, so với Taxotere chỉ 25 giờ [44].

Hệ dẫn thuốc nano polydopamine liên hợp galactosamine được bọc bởi copolyme PLA-TPGS cho thấy hoạt tính chống ung thư hiệu quả hơn so với nhóm đối chứng [45]. Nhóm nghiên cứu của Zhang và cộng sự đã tổng hợp copolyme PLA-SS-TPGS nhạy cảm oxi hóa khử với liên kết disulfide giữa PLA và TPGS để thực hiện quá trình phân tách polyme có tính khử để phân tách TPGS dưới nồng độ GSH nội bào cao [46]. TPGS sau khi phân ly có hoạt tính ức chế P-gp, giúp tăng cường tích lũy thuốc nội bào, tăng quá trình apoptosis của tế bào và gây ra tác dụng hiệp đồng ức chế và tiêu diệt khối u.

Ngoài ra, copolyme PLA-TPGS có thể được sử dụng làm chất mang trong các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng. Nhóm nghiên cứu của Feng và cộng sự đã chế tạo hệ nano đa chức năng trên nền chất mang PLA-TPGS pha trộn với TPGS, bao gồm



thuốc hóa trị liệu DTX, liệu pháp sinh học và tác nhân nhắm đích của Herceptin và liệu pháp tăng thân nhiệt bằng oxit sắt [47]. Các hạt nano đa chức năng cho thấy tác dụng chống ung thư hiệp đồng so với phương pháp điều trị riêng lẻ hoặc phương thức kép tương ứng. Wang và cộng sự đã sử dụng copolyme PLA-b-TPGS bọc porphyrin cho liệu pháp quang-hóa trị kết hợp, đạt được tác dụng hiệp đồng chống lại tế bào ung thư cổ tử cung HeLa [48]. Hóa trị thường bao gồm hai hoặc nhiều loại thuốc được tiêm vào vật chủ trong cùng một thời điểm. Quá trình chuyển hóa của một loại thuốc có thể bị thay đổi bởi một hoặc nhiều loại thuốc khác, dẫn đến sự kháng thuốc [49]. Copolyme PLA-TPGS mang thuốc có khả năng làm giảm sự kháng thuốc giữa Docetaxel và Tamoxifen. Các hệ dẫn thuốc nano có thể xảy ra sự giải phóng thuốc được kiểm soát nội bào để có hoạt tính chống ung thư hiệu quả [50].

Như vậy, copolyme PLA-TPGS đã được chứng minh là loại chất mang hiệu quả cho nhiều loại thuốc hoá trị ung thư. Tuy nhiên, việc mang đồng thời hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , thuốc Doxorubicin và tác nhân huỳnh quang hồng ngoại gần Cyanine 5.5 lên copolyme này còn chưa được thực hiện.

### **1.3. Hệ dẫn thuốc nano polyme mang $\text{Fe}_3\text{O}_4$**

Các hạt nano oxit sắt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs có tính chất từ độc đáo, tương thích sinh học, đã và đang được nghiên cứu nhiều trong chẩn đoán và điều trị ung thư. Hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  có thể được tổng hợp bằng nhiều phương pháp khác nhau, sau đó có thể được biến đổi bề mặt bằng các vật liệu tương thích sinh học hoặc được bao bọc bởi polyme hoặc copolyme trong các ứng dụng y sinh với nhiều chức năng khác nhau.

#### ***1.3.1. Chức năng tăng độ tương phản trong chụp ảnh cộng hưởng từ hạt nhân MRI***

Trong các ứng dụng tiềm năng thì ứng dụng các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  làm tác nhân tăng tương phản chụp ảnh cộng hưởng từ hạt nhân (Magnetic resonance imaging, MRI) đã sớm được phát triển thành thương phẩm. MRI là một kỹ thuật hình ảnh không xâm lấn, sử dụng sự hồi phục của các proton nước trong cơ thể để tạo ra hình ảnh chụp cắt lớp ba chiều (3D). Phương pháp này tạo điều kiện thuận lợi trong chẩn đoán, theo dõi điều trị bệnh, cho quá trình phân biệt giữa mô khỏe mạnh và mô bệnh [51].

Chụp cộng hưởng từ MRI dựa trên nguyên tắc cộng hưởng từ hạt nhân (nuclear magnetic resonance, NMR), một kỹ thuật được sử dụng để thu được thông tin vật lý và hóa học vi mô về các phân tử. MRI dựa trên sự hấp thụ và phát xạ năng lượng trong dải tần số vô tuyến (Radio frequency, RF) của phổ điện từ. Nó tạo ra hình ảnh dựa trên sự thay đổi không gian về pha và tần số của năng lượng RF được vật thể chụp ảnh hấp thụ và phát ra [52]. Một số nguyên tố như  $^1\text{H}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{23}\text{Na}$  và  $^{31}\text{P}$  là những nguyên tố tiềm năng để tạo ra hình ảnh cộng hưởng từ MRI. Cơ thể con người chủ yếu là chất béo và nước, cả hai đều có nhiều nguyên tử hydro, nên cơ thể con người có khoảng 63% nguyên tử hydro. Do đó, hình ảnh MRI chủ yếu được ghi lại từ tín hiệu NMR của hạt nhân hydro có rất nhiều trong cơ thể con người. Hạt nhân hydro (proton) hoạt động giống như những thanh nam châm nhỏ, có cực bắc và cực nam nằm trong từ trường. Momen từ của một proton là cực kỳ nhỏ và không thể phát hiện được. Khi không có từ trường bên ngoài, một nhóm proton sẽ có sự định hướng ngẫu nhiên của momen từ. Khi được đặt trong từ trường ngoài, các proton sắp xếp lại, dẫn đến một momen từ có thể đo được theo hướng của từ trường ngoài. Bằng cách áp dụng các xung RF, hình ảnh có thể được tạo ra dựa trên sự khác biệt về tín hiệu từ các nguyên tử hydro trong các loại mô khác nhau [53].

Trong từ trường tĩnh ( $B_0$ ), momen từ của các proton nước sắp xếp song song và phản song song với từ trường  $B_0$  với tổng quần thể spin song song là 0,001%. Proton ròng này dọc theo  $B_0$  bắt đầu tiến động xung quanh  $B_0$  với momen từ thuần là  $M_z$  và ở tần số góc là  $\omega_0 = \gamma B_0$  ( $\gamma = 2,67 \times 10^8 \text{ rad/s}\cdot\text{T}$  trong  $^1\text{H}$ ). Hơn nữa, sự chiếu xạ của xung tần số vô tuyến RF vuông góc với  $B_0$ , gây nên kích thích cộng hưởng dẫn đến sự gia tăng từ hóa ngang [54]. Từ hóa ngang ( $M_{xy}$ ) tăng lên và bắt đầu tuế sai trong mặt phẳng ngang. Khi ngắt từ trường (xung RF),  $M_{xy}$  dần dần trở lại trạng thái cân bằng ban đầu. Quá trình hồi phục spin như vậy liên quan đến hai con đường khác nhau: (a) sự phục hồi  $M_z$ , xảy ra khi năng lượng bị mất từ trạng thái kích thích ra môi trường xung quanh và được gọi là sự hồi phục mạng spin, và (b) phân rã  $M_{xy}$ , xảy ra khi quá trình quay proton trên mặt phẳng xy làm mất sự kết hợp pha do tương tác spin-spin (Hình 1.5a). Các quá trình này có thể được mô tả như các phương trình sau [55].

$$M_z = M_0 (1 - e^{-t/T_1}) \quad (1.1)$$

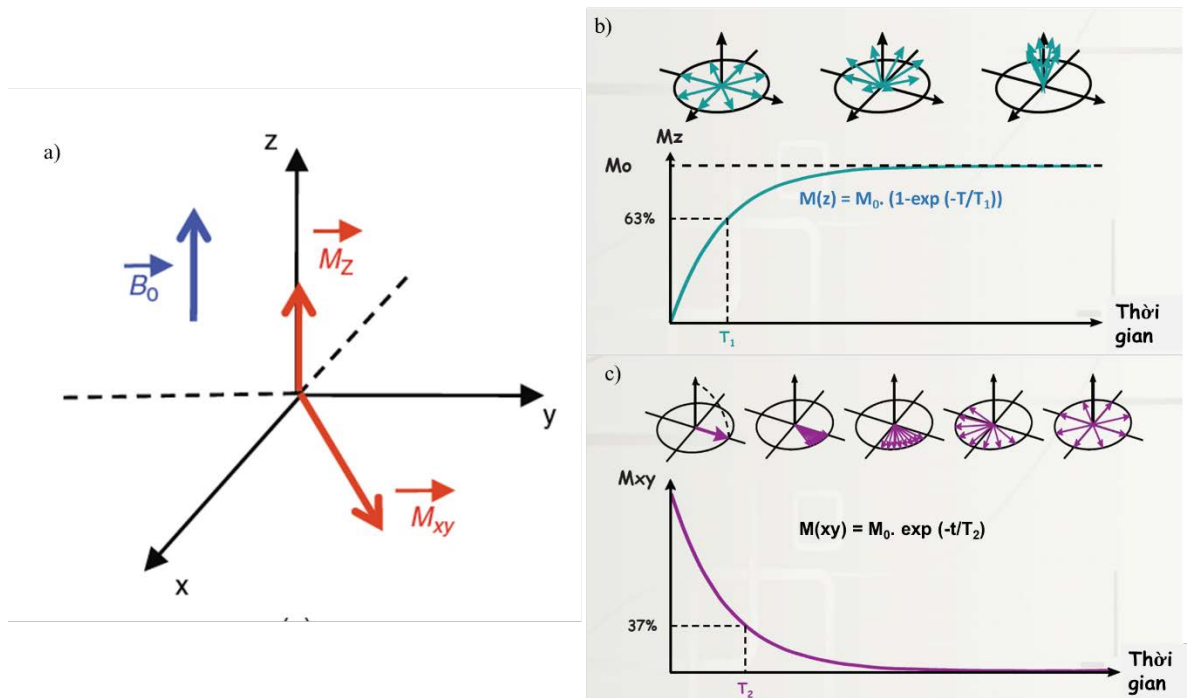
$$M_{xy} = M_0 (e^{-t/T_2}) \quad (1.2)$$

trong đó  $T_1$  là thời gian để  $M_z$  phục hồi đến 63% giá trị cân bằng sau khi áp dụng xung RF. Do đó, hình ảnh MRI có thể được cải thiện bằng cách giảm thời gian hồi phục dọc  $T_1$ , mang lại độ tương phản sáng trong hình ảnh thu được (Hình 1.5b). Trong khi  $T_2$  là thời gian cần thiết để  $M_{xy}$  giảm xuống 37% giá trị từ hóa ban đầu trong các quá trình hồi phục này (Hình 1.5c).

Tốc độ hồi phục  $R_1, R_2$  là đại lượng nghịch đảo của thời gian hồi phục  $T_1$  và  $T_2$  tương ứng. Tốc độ hồi phục là thước đo của tương tác momen từ hạt nhân hydro trong mô tế bào với môi trường từ xung quanh. Khi dùng các chất tăng tương phản, tốc độ hồi phục  $R_1, R_2$  sẽ thay đổi. Đại lượng đặc trưng cho độ ảnh hưởng này đối với mỗi chất tăng tương phản gọi là độ hồi phục (relaxivity), tương ứng là  $r_1$  và  $r_2$ . Trong phần lớn các trường hợp, tốc độ hồi phục  $R_1, R_2$  phụ thuộc một cách tuyến tính vào độ hồi phục của chất tăng tương phản theo công thức:

$$R_{1,2} = \frac{1}{T_{1,2}} = R_{0,1,2} + r_{1,2} \cdot C \quad (1.3)$$

trong đó:  $R_{0,1,2}$  ( $s^{-1}$ ) – tốc độ hồi phục khi không có chất tương phản,  $r_{1,2}$  ( $mM^{-1}s^{-1}$ ) – hằng số độ hồi phục,  $C$  ( $mM$ ) – nồng độ chất tương phản.



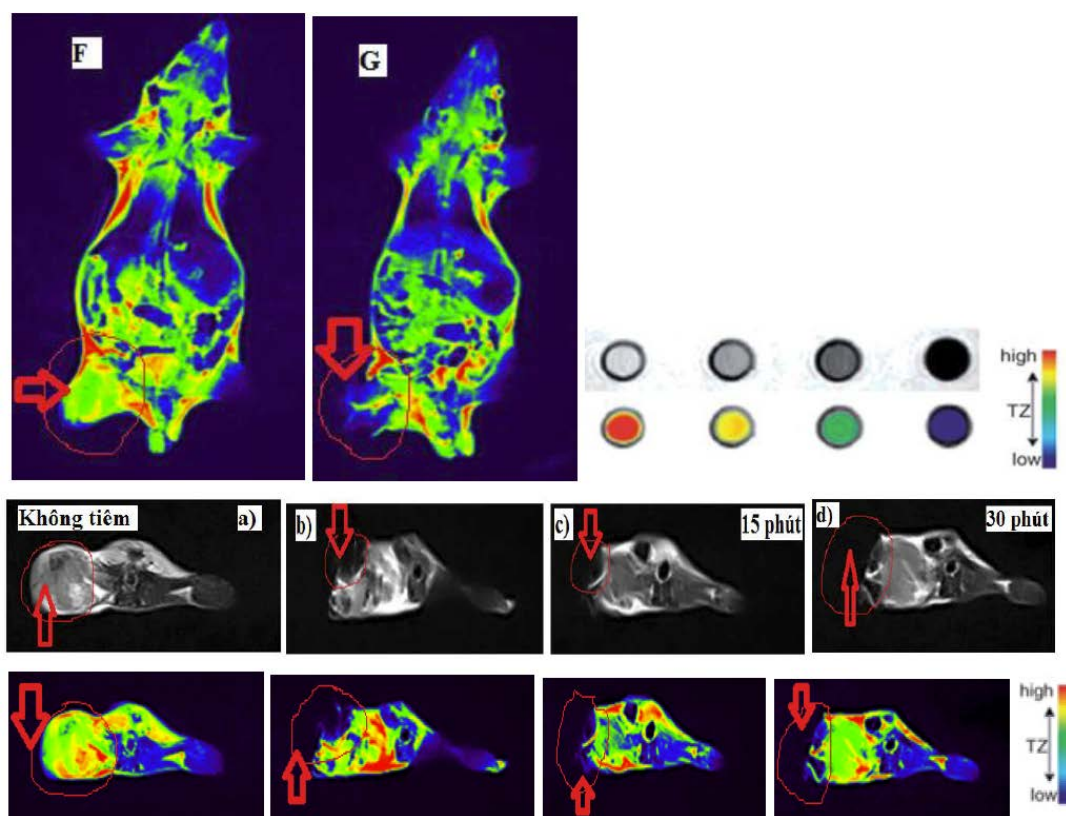
**Hình 1.5.** (a) Trạng thái cân bằng từ hóa sau khi hồi phục spin; (b) quá trình từ hóa dọc ( $T_1$ ) và (c) ngang ( $T_2$ ) [56]

Hiện nay, các chất tương phản MRI đã trở thành một phần không thể thiếu trong quy trình MRI để chẩn đoán một số bệnh. Vì việc bổ sung chúng trong nhiều trường hợp giúp cải thiện độ nhạy và độ đặc hiệu, do đó giúp phân biệt tốt hơn các mô bệnh lý. Các chất tương phản được sử dụng để cải thiện hình ảnh MRI của các mô và cơ quan bằng cách thay đổi thời gian hồi phục của các proton nước. Do đó, thay đổi cường độ tín hiệu ở các vùng cơ thể nơi tác nhân được kết hợp [57]. Chất tương phản MRI thường rút ngắn tốc độ của tất cả các quá trình hồi phục. Tuy nhiên, mỗi chất chủ yếu ảnh hưởng đến một trong số các quá trình hồi phục này. Các chất tương phản chủ yếu rút ngắn thời gian hồi phục của thành phần dọc của từ hóa được gọi là T1 (chất tương phản dương), trong khi chất tương phản T2 (chất tương phản âm) chủ yếu làm giảm thời gian hồi phục của thành phần ngang [2]. Thông thường, hai thông số chính được sử dụng để đánh giá hiệu quả của chất tương phản: độ hồi phục dọc ( $r_1$ ), độ hồi phục ngang ( $r_2$ ), và tỷ lệ  $r_2/r_1$ . Ở đây, giá trị của  $r_1$  hoặc  $r_2$  liên quan đến khả năng tăng cường tín hiệu của chất tương phản, trong khi tỷ lệ  $r_2/r_1$  được sử dụng để xác định loại mà chất tương phản phù hợp, tức là dương (T1) hoặc âm (T2). Nói chung, chất tương phản có tỷ lệ  $r_2/r_1$  thấp ( $<5$ ) được phân loại là chất tương phản T1, trong khi chất tương phản có tỷ lệ  $r_2/r_1$  lớn hơn ( $>10$ ) được phân loại là chất tương phản T2 [58].

Các chất tương phản thuận từ (ví dụ: các hợp chất chứa gadolinium) tăng cường độ tương phản MRI bằng cách rút ngắn T1 và làm sáng mô bệnh trên hình ảnh có trọng T1 (T1-weighted, T1W). Ngược lại, các chất siêu thuận từ và sắt từ được gọi là chất tương phản âm. Các mô bị bệnh tích tụ chất tương phản trông tối hơn trên hình ảnh trọng T2 (T2-weighted, T2W). Hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  đang được nghiên cứu như một tác nhân tương phản T2 do sự kết hợp của các đặc tính siêu thuận từ, đáp ứng nhanh với từ trường ngoài, khả năng phân hủy sinh học và khả năng tương thích sinh học [59].

Tuy nhiên, hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  dễ dàng bị kết tụ. Do đó, để làm tăng độ ổn định và khả năng ứng dụng của hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  được bọc bằng các polyme tương thích sinh học như dextran, latex, polyethylene glycol, polyvinylpyrrolidone-iodine, poly(axit aspartic), ... Trên thị trường, Ferumoxide và Ferucarbotan từng là hai công thức thương mại hóa phổ biến của hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  được sử dụng làm chất

tương phản âm. Ferumoxide còn được gọi là Feridex® ở Mỹ (từ Berlex, Mỹ) và Endorem® ở Châu Âu (từ Guerbet, Pháp) [59]. Ferumoxide là chế phẩm  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  với lớp phủ dextran (Mw thấp), có kích thước hạt tổng thể dao động từ 120 đến 180 nm. Độ hồi phục ngang ( $r_2$ ) và độ hồi phục dọc ( $r_1$ ) lần lượt là  $\sim 98$  và  $\sim 24 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  [60]. Ferucarbotan còn được gọi là Resovist® được phát triển bởi Schering AG, Đức. Hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  của Resovist được phủ bởi carboxydextrane và kích thước hạt tổng thể dao động từ 45 đến 60 nm, nhỏ hơn nhiều so với hạt Ferumoxide. Giá trị  $r_2$  và  $r_1$  lần lượt là  $\sim 150$  và  $25 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  [54].

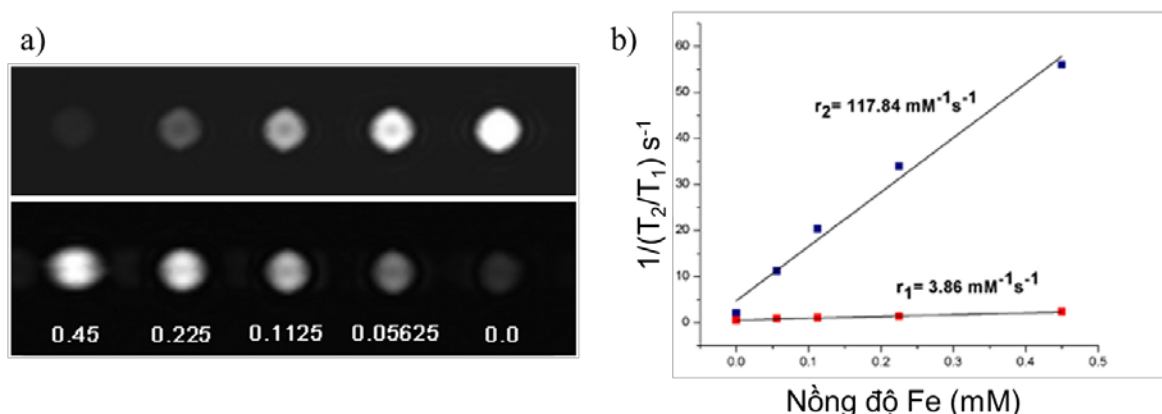


**Hình 1.6.** Khả năng tăng tương phản hình ảnh chụp cộng hưởng từ của hệ nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4@PMAO$  ở chế độ trọng T2 (AXIAL) trên khối u chuột sau khi tiêm trực tiếp khối u, TE= 91 ms, TR =3970 ms trên chuột. (a) Không tiêm; (b) ngay sau tiêm; (c) sau 15 phút; (d) sau 30 phút [61]

Luận án của TS. Lê Thế Tâm và Đề tài của GS.TS. Trần Đại Lâm (Viện Kỹ thuật nhiệt đới) đã khảo sát khả năng tăng độ tương phản MRI của hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bọc chitosan ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS$ ) và poly (maleic anhydride-alt-1-octadecene) ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@PMAO$ ) [61]. Độ hồi phục của hai hệ nano này có giá trị  $r_2$  tương ứng 127,15 và 151,99  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  ở từ trường 1,5 T, cao hơn so với mẫu thương phẩm

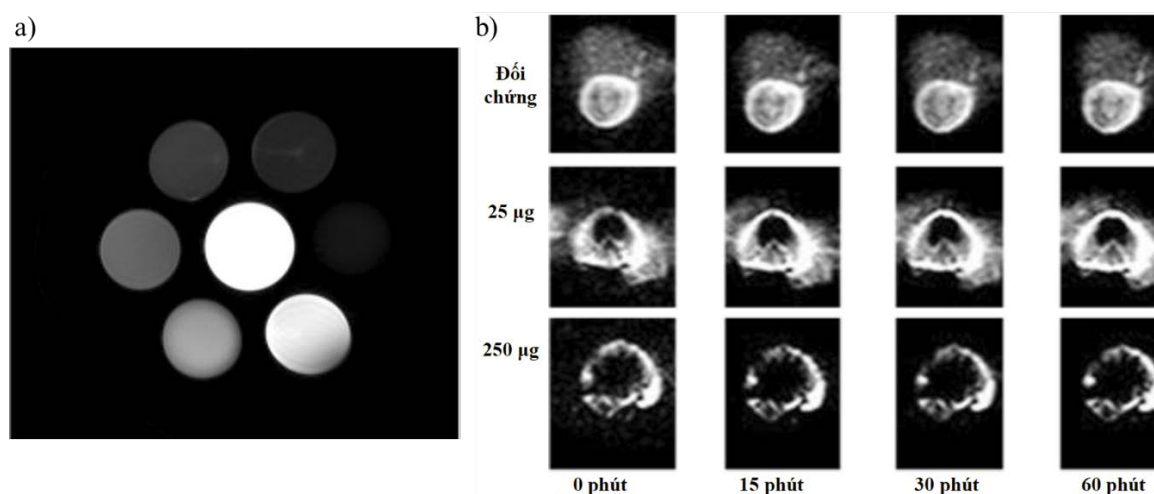
Resovist. Hình ảnh MRI trên môi trường có nồng độ muối khác nhau cho thấy  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bọc polyme cho độ tương phản tốt hơn ở T2 và cường độ tín hiệu tốt ngay tại môi trường có nồng độ muối cao (200 mM). Khi tiêm vật liệu nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @PMAO vào tĩnh mạch chuột, sau 24 giờ tiêm, hình ảnh chụp MRI của khối u cũng được tăng độ tương phản. Tuy nhiên, khi tiêm trực tiếp vật liệu nano này vào khối u (Hình 1.6), độ tương phản trong ảnh chụp MRI của khối u cao hơn so với trường hợp tiêm tĩnh mạch trong thời gian ngắn.

Trong các thử nghiệm *in vivo*, sau khi tiêm vào tĩnh mạch, hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sẽ bị liên hợp với protein huyết tương hoặc opsonin hóa, trong bước đầu tiên để các đại thực bào của hệ lưới nội mô (RES) đào thải khỏi cơ thể. Do vậy, để ứng dụng trong chụp ảnh MRI, việc tránh hấp thu RES làm tăng thời gian bán thải của hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  trong máu rất quan trọng. Vì thời gian lưu thông máu tăng sẽ tối đa hóa khả năng  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  phân bố được tới khối u hoặc mô đích của chúng [62]. Sử dụng polyme để bọc hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  là một kỹ thuật phổ biến để tránh hiện tượng opsonin hóa và sự nhận diện của hệ thống lưới nội mô. Các polyme thường được sử dụng cho mục đích này là các polyme ưa nước như polyme poly(ethylene glycol) (PEG), alginate, carboxymethyl cellulose,... Các polyme này có thể được bọc trên bề mặt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bằng liên kết hydro, lực tĩnh điện hoặc thông qua liên kết giả cộng hóa trị (pseudo-covalent bonding) [63].



**Hình 1.7.** (a) Hình ảnh MRI ở chế độ trọng T2 của vật liệu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Alginate trong môi trường nước với nồng độ Fe khác nhau (0 - 0,45 mM); (b) độ hồi phục ngang và hồi phục dọc của vật liệu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Alginate [64]

Nghiên cứu của Nazeer và cộng sự đã chế tạo hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bằng phương pháp đồng kết tủa và bọc bằng polyme alginate [64]. Vật liệu nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sau khi bọc thể hiện tính chất siêu thuận từ với kích thước trung bình 40 nm và giá trị từ độ bão hòa  $M_s = 53 \text{ emu/g}$ , giá trị độ hồi phục ngang  $r_2$  là  $117,84 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  và tỷ lệ  $r_2/r_1 = 30,53$  ở từ trường 1,5 T (Hình 1.7), cho thấy khả năng tăng độ tương phản ảnh MRI. Nhóm nghiên cứu của PGS.TS. Hà Phương Thư và TS. Lê Thị Thu Hương cùng các cộng sự tại Viện Khoa học vật liệu đã chế tạo vật liệu nano đa chức năng bằng cách bọc đồng thời các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  và các chấm lượng tử CdTe (QDs) bằng polyme alginate [65]. Polyme alginate mang lại khả năng tương thích sinh học và độ ổn định cao (thế Zeta  $-49,1 \text{ mV}$ ) và có thể nano hóa thuốc trị ung thư Doxorubicin (Dox) trong vật liệu nano. Ở từ trường 7 T, vật liệu nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CdTe-Doxorubicin-alginate}$  (FAQD) có giá trị  $r_2 = 218,48 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  và tỷ lệ  $r_2/r_1 = 243$ , và hình ảnh T2 MRI *in vivo* có độ tương phản cao. Trong 24 giờ đầu tiên sau khi tiêm, các hạt nano khuếch tán khắp khối u, đồng thời chúng tập trung xung quanh khối u sau 72 giờ.



**Hình 1.8.** (a) Độ tương phản ảnh MRI theo chế độ trọng T2 của hệ nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4@PLA-PEG$ ; (b) hình ảnh MRI theo chế độ trọng T2 khi tiêm trực tiếp  $\text{Fe}_3\text{O}_4@PLA-PEG$  vào khối u rắn dưới da chuột [29]

Nghiên cứu khác của Sitthichai và cộng sự đã sử dụng polyme carboxymethyl cellulose (CMC) bọc hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [66]. Vật liệu nano CMC- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  thu được với phân bố kích thước 9,6–10,1 nm, có độ hồi phục ngang  $r_2 = 543,3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , cho hình ảnh MRI có độ tương phản cao trong môi trường chứa tế bào HepG2. Luận án của

TS. Phan Quốc Thông và Đề tài của GS.TSKH. Nguyễn Xuân Phúc (Viện Khoa học vật liệu) đã sử dụng copolyme PLA-PEG bọc hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PLA-PEG) và mang thuốc Curcumin ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PLA-PEG/Cur) có giá trị độ hồi phục ngang  $r_2 = 364,75 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  và  $228,74 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  tương ứng ở từ trường 3 T [29]. Khi tiêm  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PLA-PEG trực tiếp vào khối u rắn với liều  $50 \mu\text{g}/0,5 \text{ cm}^3$  khối u, cho phép quan sát khối u trên hình ảnh MRI. Ở liều tiêm cao hơn ( $250 \mu\text{g}/0,5 \text{ cm}^3$  khối u), tín hiệu hình ảnh MRI có độ tương phản rõ rệt, cho thấy hệ nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PLA-PEG phân tán trong toàn bộ khối u sau 15 phút tiêm (Hình 1.8).

Như vậy, hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bọc polyme/ copolyme đã cho thấy khả năng làm tăng độ tương phản trong chụp ảnh cộng hưởng từ MRI. Các nghiên cứu trên đã xác định độ hồi phục  $r_1$ ,  $r_2$  và khảo sát khả năng tăng độ tương phản MRI theo chế độ trọng T2 bằng cách định tính trên hình ảnh *in vivo*.

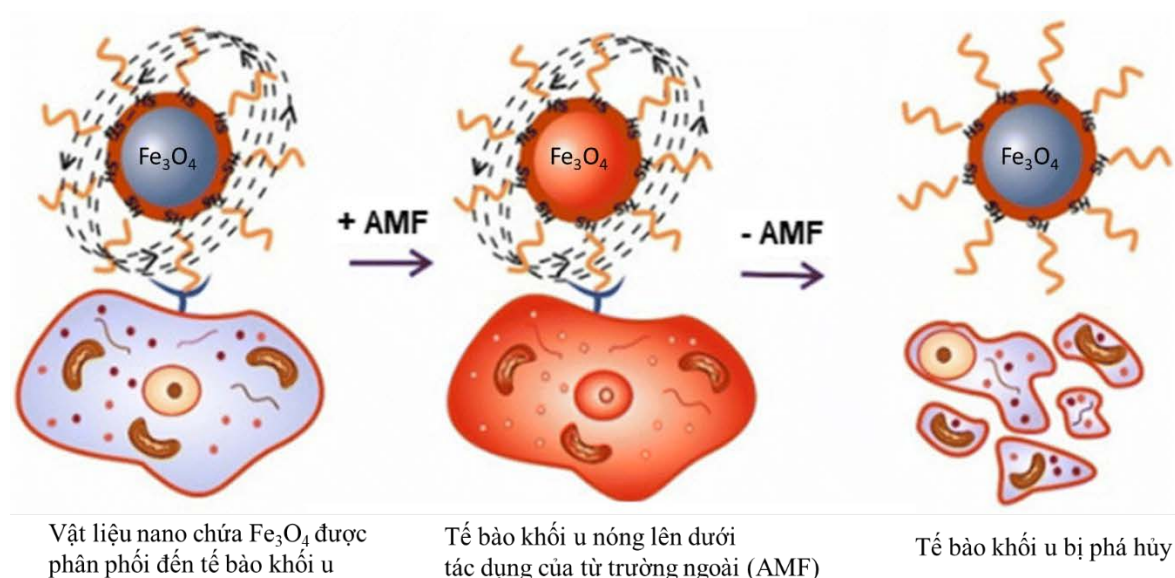
Trong luận án này, sau khi xác định độ hồi phục  $r_1$ ,  $r_2$ , chúng tôi định lượng tín hiệu hình ảnh MRI *in vivo* trên mô hình chuột được gây khối u đại tràng CT26 bằng phương pháp % $I_{0,25}$ , nhằm đánh giá khả năng tăng độ tương phản và hướng đích thụ động tới vị trí khối u của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng mang hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

### **1.3.2. Chức năng nhiệt từ trị**

Hạt nano oxit sắt từ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  còn có chức năng như một tác nhân điều trị tăng thân nhiệt dưới tác dụng của từ trường ngoài. Nhiệt từ trị (hyperthermia) là một loại liệu pháp nhiệt làm cho mô cơ thể tiếp xúc với nhiệt độ cao. Người ta đã chứng minh rằng nhiệt độ cao, thường trên  $42^\circ\text{C}$ , có thể làm tổn thương và tiêu diệt các tế bào ung thư (Hình 1.9), đồng thời gây tổn thương tối thiểu cho các mô bình thường [67]. Hơn nữa, các thử nghiệm độc tính ở chó, cừu và lợn cho thấy sự hoại tử tiến triển của các mô bình thường và mô ung thư xảy ra ở nhiệt độ trên  $45^\circ\text{C}$ . Tuy nhiên, sự tản nhiệt bên trong xảy ra khi các mô bình thường đạt đến nhiệt độ này. Hiện tượng này dẫn đến các mô khỏe mạnh duy trì nhiệt độ dưới  $45^\circ\text{C}$  mà thực tế không gây tổn hại cho các cơ quan, mô hoặc da bình thường. Tuy nhiên, hầu hết các khối u rắn không có khả năng thích ứng này và bị nóng lên tới  $50^\circ\text{C}$ , sau đó bị tổn thương hoặc bị tiêu diệt [68]. Do vậy, nhiệt từ trị là một liệu pháp điều trị ung thư đang được tập trung nghiên cứu.



Khi cho hạt nano oxit sắt từ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  tiếp xúc với từ trường ngoài ở tần số xác định (400 - 1100 kHz), nó có thể tạo ra đủ nhiệt để điều trị ung thư. Quá trình sinh nhiệt do hai cơ chế chính bao gồm hồi phục Brown - chuyển động quay toàn bộ hạt trong môi trường chất lỏng, và hồi phục Néel - chuyển động quay momen từ đơn hạt siêu thuận từ trong từ trường xoay chiều (Alternating magnetic field, AMF). Trên thực tế, cả hai cơ chế có thể xảy ra đồng thời và sự sinh nhiệt sẽ phụ thuộc vào sự đóng góp tương đối của chúng (Hình 1.10) [69].



**Hình 1.9.** Cơ chế tiêu diệt tế bào khối u bằng tác dụng nhiệt từ trị [70]

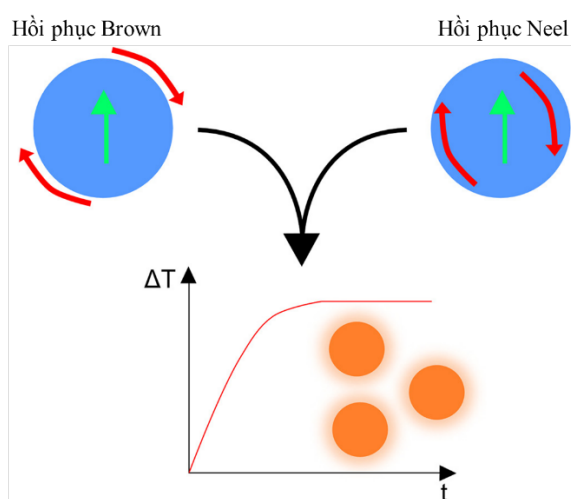
Quá trình chuyển đổi từ năng lượng từ sang năng lượng nhiệt được đánh giá bằng tốc độ hấp thụ riêng (Specific Absorption Rate, SAR):

$$SAR = C \frac{dT}{dt} \frac{m_s}{m_m} \quad (1.2)$$

Trong đó,  $C$  là nhiệt dung riêng của dung môi,  $dT/dt$  là độ dốc ban đầu của đường cong gia nhiệt phụ thuộc vào thời gian,  $m_s$  là khối lượng của chất lỏng từ tính và  $m_m$  là khối lượng của hạt nano từ tính.

SAR là yếu tố quan trọng đối với ứng dụng nhiệt từ trị của  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  vì giá trị SAR cao hơn chỉ yêu cầu một lượng nhỏ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  cần tiêm, và thời gian tiếp xúc với từ trường ngoài thấp hơn. Hergt và cộng sự đã chế tạo hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  có giá trị SAR  $\sim 100$  W/g, có khả năng nhiệt từ trị khối u khi tiêm trực tiếp với nồng độ  $10$  mg/cm<sup>3</sup> [71]. Rajan và cộng sự đã báo cáo việc chế tạo các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  được phủ bằng nhiều chất hoạt động bề mặt tương thích sinh học khác nhau như axit

glutamic, polyetylen glycol, axit xitric và polyvinylpyrrolidone [72]. Kết quả đánh giá khả năng sinh nhiệt cho thấy giá trị SAR tối đa thu được ở các hạt nano magnetite được phủ bởi axit glutamic, đạt 130 W/g ở tần số 316,5 kHz và từ trường áp dụng là 35,8 kA/m. Trong nghiên cứu của Ramirez và cộng sự, giá trị SAR của hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  được chức năng hóa bề mặt bằng EDC/NHS, thu được ở tần số 87 kHz là 179,8 W/g, với khả năng sinh nhiệt 61,2 - 66,4 °C [73]. Thử nghiệm khả năng nhiệt từ trị *in vitro* của vật liệu nano này trên tế bào ung thư đại tràng HCT-116 cho thấy các tế bào ung thư đã bị tiêu diệt do quá trình apoptosis khi đặt trong từ trường 0,1 T ở tần số 87 kHz.

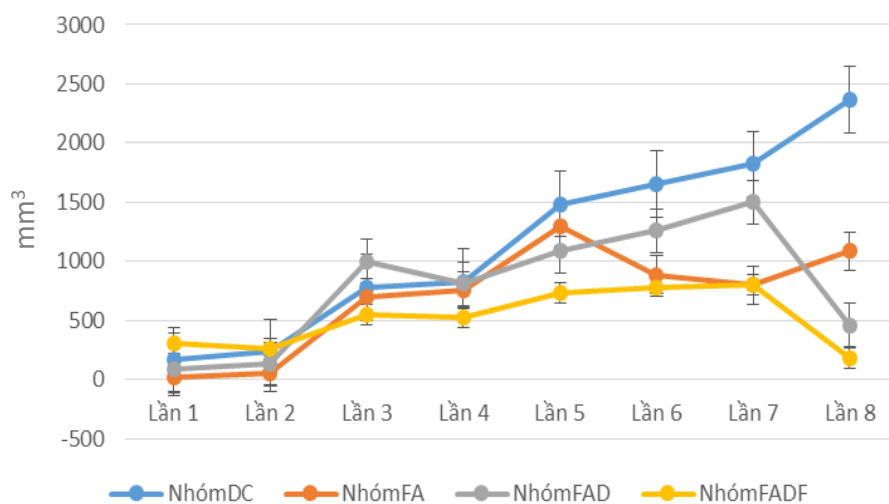


**Hình 1.10.** Cơ chế sinh nhiệt của các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  trong AMF do sự đóng góp của cả hai quá trình hồi phục Brown và hồi phục Néel [74]

Ngoài ra, việc bọc các hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bằng polyme/copolyme trong hệ phân phối thuốc nano sẽ giúp chúng tích tụ bên trong tế bào ung thư với cơ chế hướng đích thụ động và chủ động [75]. Do đó, nhiệt từ trị cục bộ có thể được thực hiện để giảm tổn thương nhiệt cho các tế bào khỏe mạnh. Nhóm nghiên cứu của Soleymani đã bọc hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bằng dextran và đánh giá tác dụng nhiệt từ trị *in vivo* trong từ trường xoay chiều ( $f = 150$  kHz,  $H = 12,5$  mT) trên chuột được gây ung thư vú MC4-L2 [76]. Kết quả cho thấy những con chuột trong nhóm đối chứng có khối lượng khối u tăng gần 3,5 lần trong 15 ngày, trong khi những con chuột trong nhóm nhiệt từ trị có khối lượng khối u tăng nhẹ (1,8 lần) trong cùng thời gian ( $p < 0,05$ ).

Luận án của TS. Lê Thị Thu Hương và đề tài của PGS.TS. Hà Phương Thư (Viện Khoa học vật liệu) đã đánh giá khả năng nhiệt từ trị của các vật liệu nano

$\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Alginate (FA),  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Alginate-Doxorubicin (FAD), và  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Alginate-Doxorubicin-Folate (FADF) trên mô hình *in vivo* chuột mang khối u ung thư phổi Lewis [77]. Sau 8 lần chiếu từ trường (tần số 178 kHz, cường độ 80 Oe), hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  trong các vật liệu nano đã thể hiện rõ vai trò sinh nhiệt tiêu diệt khối u hiệu quả.  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Alginate có khả năng sinh nhiệt tốt hơn so với  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Alginate - Doxorubicin (Hình 1.11). Tuy nhiên, sau lần nhiệt từ trị thứ 7 và 8 đã cho thấy ưu thế của phương pháp nhiệt trị kết hợp với hoá trị của vật liệu  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Alginate-Doxorubicin, và tác nhân hướng đích chủ động (folate) của vật liệu  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Alginate-Doxorubicin-Folate. Vật liệu nano được gắn folate có khả năng hướng đích hiệu quả tới vị trí khối u (biểu hiện mạnh thụ thể folate), làm tăng hiệu quả nhiệt từ trị *in vivo*. Một thử nghiệm nhiệt từ trị khác trên mô hình chuột nhắt trắng Swiss mang khối u rắn 5 ngày tuổi của vật liệu  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PLA-PEG trong luận án của TS. Phan Quốc Thông đã cho thấy thể tích khối u ở lô được điều trị giảm mạnh sau 12 ngày điều trị [29].



**Hình 1.11.** Kích thước khối u ở các nhóm sau mỗi lần nhiệt từ trị [77]

Như vậy, hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  có tiềm năng ứng dụng nhiệt từ trị, làm tăng nhiệt độ của vùng khối u dưới tác động của từ trường xoay chiều. Trong những năm gần đây, nhiệt từ trị đã được sử dụng để hỗ trợ xạ trị, hóa trị và liệu pháp miễn dịch, nhằm làm tăng hiệu quả của liệu pháp điều trị kết hợp.

### 1.3.3. Chức năng hóa trị

Để nâng cao hơn nữa hiệu quả của hệ nano đa chức năng, nhiệt từ trị thường được kết hợp cùng với hóa trị liệu. Người ta đã chứng minh rằng tác dụng nhiệt từ

trị nhẹ từ 39°C đến 43°C làm tăng cường độc tính tế bào của các tác nhân hóa trị liệu bao gồm docetaxel và paclitaxel [78, 79]. Lưu lượng máu tăng cao và tính thấm của mạch máu ở vùng khối u liên quan đến hiệu ứng nhiệt từ trị cũng làm tăng nồng độ thuốc trong khối u và quanh khối u cao hơn để cải thiện hiệu quả của hóa trị liệu [80]. Trong mô khỏe mạnh, các mạch máu được kết nối theo thứ bậc thành mạng lưới động mạch, mao mạch và tĩnh mạch hiệu quả. Mặt khác, các mạch máu tại mô ung thư lại hỗn loạn, rò rỉ và tính dẫn lưu kém. Nhiệt từ trị làm tăng lưu lượng máu đến mô tân sinh của khối u, tăng lượng thuốc được phân phối đến mô tân sinh, và do đó làm tăng cường tác dụng hóa trị [68]. Ngoài ra, nhiệt từ trị còn có khả năng khắc phục vấn đề kháng thuốc bằng cách điều chỉnh các con đường tín hiệu nội bào khác nhau [81].

Hơn nữa, nhiệt từ trị ảnh hưởng đến tính lưu động và ổn định của màng tế bào. Nó ngăn chặn chức năng của protein xuyên màng và thụ thể bề mặt tế bào, do đó tạo điều kiện cho các hạt nano xâm nhập vào tế bào và làm tăng chức năng của chúng. Do vậy, kết hợp tác dụng hóa trị của thuốc chống ung thư cùng với tác dụng nhiệt từ trị của  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , làm tăng độc tính của thuốc do sự hấp thu thuốc của tế bào được cải thiện và tăng độ nhạy cảm của tế bào với thuốc [82].

Nhóm nghiên cứu của Si-Shen Feng đã phát triển một hệ nano trên chất mang là hỗn hợp copolyme PLS-TPGS/TPGS-COOH, kết hợp chức năng nhiệt từ trị của  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  và chức năng hóa trị của docetaxel (DCL) [47]. Kết quả đã chứng minh rằng giá trị  $\text{IC}_{50}$  của hệ nano ( $\text{DCL}+\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) là 0,30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , giảm đáng kể so với  $\text{IC}_{50}$  của mỗi hệ nano đơn lẻ chỉ chứa DCL (>100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) và  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (24,17  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), tức là giảm hơn 99,7% đối với hóa trị và 98,8% đối với liệu pháp nhiệt từ trị, cho thấy đạt được tác dụng hiệp đồng. Luận án của TS. Lê Thị Thu Hương và đề tài của GS.TSKH. Nguyễn Xuân Phúc và PGS.TS. Hà Phương Thư (Viện Khoa học vật liệu) đã kết hợp tác dụng nhiệt từ trị của  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  và tác dụng hóa trị của Doxorubicin trên hệ nano đa chức năng được bọc bởi polyme Alginate và gắn tác nhân hướng đích Folate [83]. Kết quả thử nghiệm *in vivo* cho thấy kích thước khối u trên chuột (được gây khối u ung thư phổi Lewis) giảm đáng kể sau 8 lần điều trị. Sự kết hợp  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  và Doxorubicin làm tăng mức độ giải phóng và tích lũy thuốc trong khối u.

Đồng thời, việc gắn folate trên hạt từ cho phép hướng đích hiệu quả, giảm độc tính và tăng hiệu quả điều trị trên mô hình *in vivo*.

Gần đây, nhóm nghiên cứu của Beola đã chứng minh hiệu quả trong việc làm chậm tốc độ phát triển của khối u khi kết hợp hóa trị và nhiệt từ trị của hệ nano lipid mang  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  và temozolomide (TMZ) trên mô hình chuột mang khối u U-87 MG-Luc2 [84]. Hệ nano đa chức năng kết hợp (TMZ- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  + AMF) cho hiệu quả điều trị cao nhất, tốc độ phát triển của khối u thấp hơn  $\approx 15\%$  so với ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  + AMF), thấp hơn  $\approx 15\%$  so với TMZ, thấp hơn  $\approx 45\%$  so với  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , thấp hơn  $\approx 65\%$  so với đối chứng. Liệu pháp kết hợp nhiệt trị và hóa trị (TMZ- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  + AMF) đã kéo dài đáng kể thời gian sống sót trung bình ( $T_{MS}$ ) của chuột (68 ngày trong tổng số 70 ngày quan sát thử nghiệm), so với nhóm đối chứng được tiêm bằng nước muối ( $T_{MS} = 42$  ngày, không có con vật nào sống sót quá 46 ngày). Kết quả chứng minh hiệu quả chống ung thư cao hơn của phương pháp kết hợp đối với hóa trị liệu riêng lẻ bằng TMZ ( $T_{MS} = 48$  ngày, không có động vật nào sống sót sau 53 ngày) và nhiệt từ trị đơn lẻ ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  + AMF) ( $T_{MS} = 55$  ngày, với chỉ có 14% sống sót khi kết thúc thử nghiệm). Babinová và cộng sự cho thấy trong mô hình dưới da của u thần kinh đệm chuột dựa trên tế bào C6, việc sử dụng một tác nhân hóa trị liệu tự do liều thấp (doxorubicin) trong khối u sẽ làm khối u phát triển chậm hơn, nhưng kết quả được cải thiện (sự thoái triển khối u kéo dài sau 28 ngày sau khi bắt đầu điều trị) chỉ được quan sát thấy ở nhóm được điều trị với các liposome mang doxorubicin và  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  khi kết hợp hóa trị liệu và nhiệt từ trị [85].

Một nghiên cứu khác của Pazouki và cộng sự đã kết hợp hóa trị với nhiệt từ trị bằng cách bọc hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bởi carboxymethyl chitosan và mang thuốc curcumin [86]. Kết quả cho thấy tỷ lệ tế bào ung thư MCF-7 bị tiêu diệt (đang trải qua quá trình apoptosis) của liệu pháp kết hợp cao hơn khoảng 63,5% so với liệu pháp nhiệt từ trị hoặc hóa trị đơn lẻ. Các nhà nghiên cứu cũng đã đánh giá tác động của các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (MNP) và thuốc Temozolomide (TMZ) được chức năng hóa với phối tử axit folic (FA) TMZ-MNP-FA trên dòng tế bào ung thư u nguyên bào thần kinh đệm C6. Kết quả cho thấy rằng phương pháp điều trị kết hợp nhiệt từ trị và hóa trị (AMF + TMZ-MNP-FA) có hiệu quả hơn đáng kể đối với tế bào ung thư so với phương pháp nhiệt từ trị hoặc hóa trị đơn lẻ ( $p < 0,0001$ ) [87].

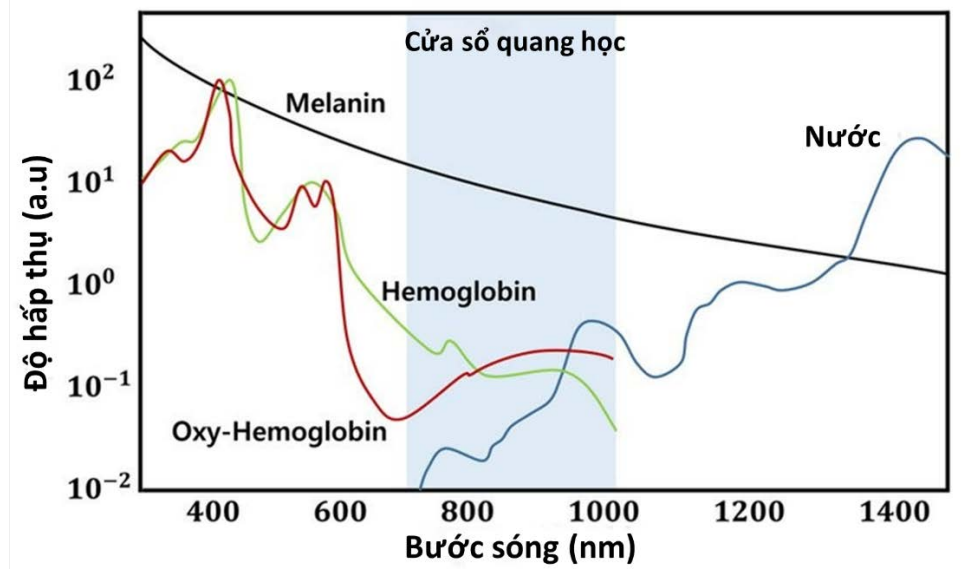
Tuy nhiên, một trong những thách thức lớn của vật liệu nano đa chức năng kết hợp hóa - nhiệt trị ung thư là đạt được sự tích lũy đồng nhất của vật liệu trong khối u sau khi tiêm. Hiệu quả điều trị có thể bị giảm do tính không đồng nhất của liều nhiệt đạt được trong khối u khi một lượng nhỏ vật liệu nano tới được vị trí khối u hoặc do sự phân bố không đồng đều của vật liệu nano trong khối u [84]. Do vậy, khi thiết kế các vật liệu nano đa chức năng, cần nghiên cứu sâu hơn về khả năng thâm nhập và lưu giữ của vật liệu nano vào trong khối u sau khi tiêm. Để đạt được mục đích này, chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần (near-infrared, NIR) được sử dụng trong nghiên cứu của luận án như một chất đánh dấu huỳnh quang để theo dõi sự phân bố *in vivo* và đánh giá hiệu quả hướng đích tới vị trí khối u của vật liệu nano đa chức năng.

#### **1.4. Hệ dẫn thuốc nano polyme gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần**

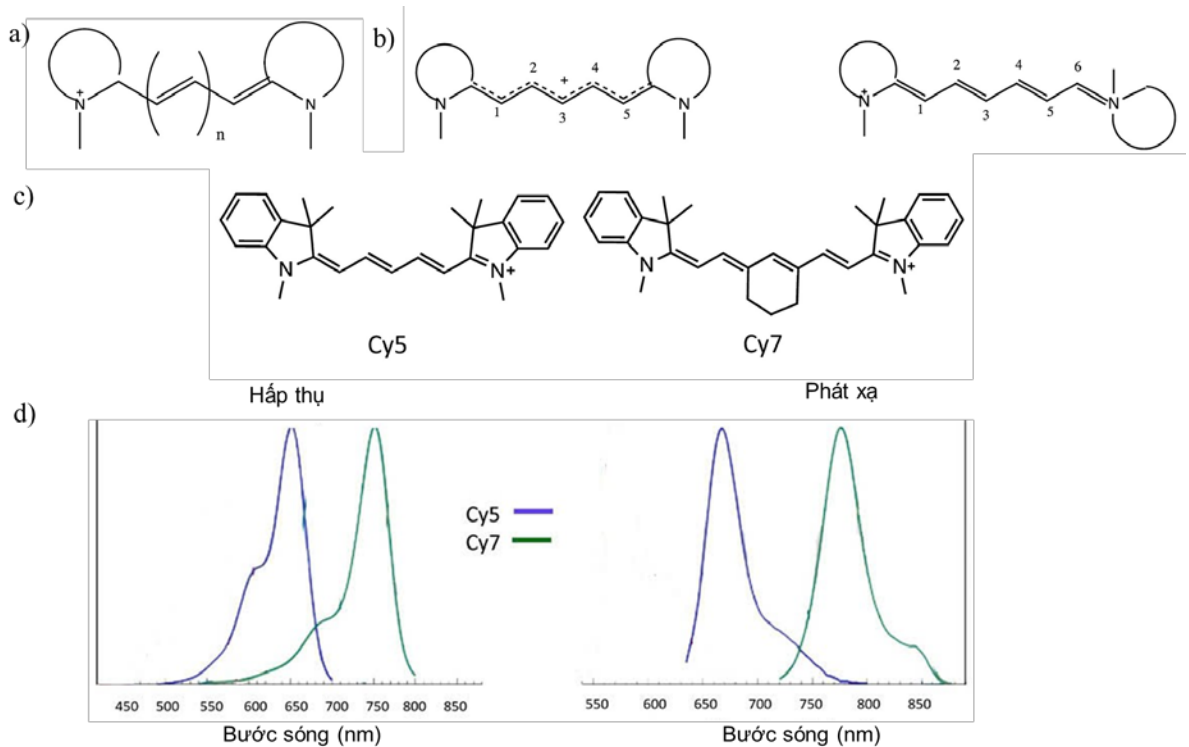
##### **1.4.1. Khái quát về chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần**

Ngày nay, công nghệ hình ảnh quang học (optical imaging) kết hợp với các chất đánh dấu huỳnh quang mới được phát triển được sử dụng rộng rãi trong việc theo dõi sự tiến triển của bệnh, đánh giá tính an toàn và độc tính cũng như đánh giá hiệu quả điều trị *in vivo*. Mặc dù là một trong những kỹ thuật hấp dẫn nhất để cung cấp hình ảnh *in vivo* không xâm lấn và không ion hóa, hình ảnh quang học bị cản trở bởi xu hướng hấp thụ và tán xạ photon của các mô sinh học và tạo ra khả năng tự phát huỳnh quang mạnh, gây cản trở việc thu thập và xử lý tín hiệu [88].

Trong cơ thể, các phân tử sinh học hấp thụ mạnh ánh sáng trong vùng khả kiến. Chẳng hạn như hemoglobin và oxy-hemoglobin có dải hấp thụ mạnh trong khoảng 530 nm, melanin có dải hấp thụ rộng kéo dài đến 700 nm. Trong khi đó, nước trong cơ thể có sự hấp thụ rất thấp ở vùng khả kiến và vùng hồng ngoại gần (Hình 1.12) [89]. Do vậy, để hạn chế tín hiệu nền từ các phân tử sinh học này, các nghiên cứu gần đây đã tập trung phát triển các đầu dò huỳnh quang có độ nhạy cao và hiệu quả hoạt động trong cửa sổ sinh học, vùng hấp thụ ít nhất của các phân tử sinh học, ở vùng hồng ngoại gần (700–1000 nm). Như vậy, để thu được hình ảnh có tỷ lệ tín hiệu trên nền (Signal background ratio, SBR) cao khi xuyên qua mô sâu, hình ảnh ở bước sóng dài trong vùng hồng ngoại gần có nhiều lợi thế hơn vì nền tán xạ và tự phát huỳnh quang thấp hơn.



**Hình 1.12.** Độ hấp thụ của nước, melanin, hemoglobin và oxy- hemoglobin [89]



**Hình 1.13.** (a) Cấu trúc phân tử chung của chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần Cyanine (Cy); (b) đồng phân hình học và độ dài liên kết của các phân tử số cacbon methine lẻ và chẵn; (c) cấu trúc phân tử của Cy5 và Cy7; (d) phổ hấp thụ (absorption) và phát xạ (emission) tương ứng của Cy5 và Cy7 trong DCM [90]

Một số chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần đang được nghiên cứu hiện nay là 1,1-dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindotricarbocyanine iodide (DiR), indocyanine green (ICG), Cyanine 5, Cyanine 5.5, Cyanine 7,... Trong đó, Cyanine

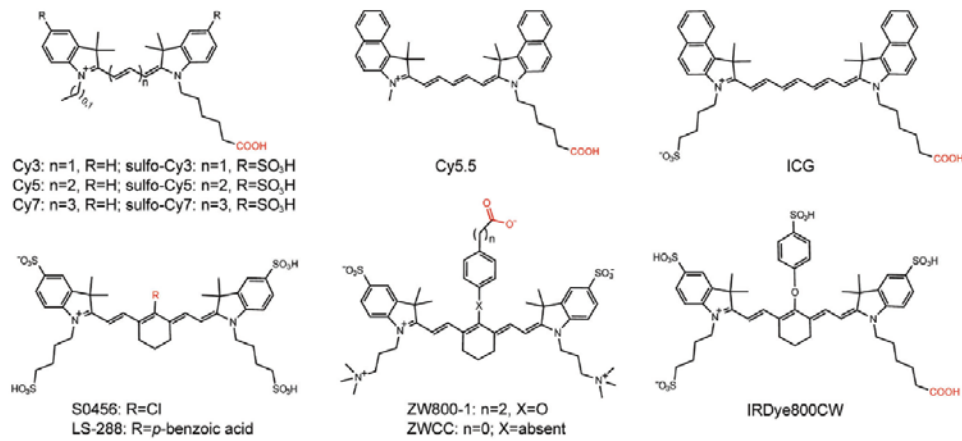
là một trong những lớp chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần được phát triển tốt nhất, có đặc điểm là hệ số hấp thụ mol cao, hiệu suất lượng tử huỳnh quang hợp lý và dải hấp thụ tương đối hẹp [91].

Cấu trúc phân tử chung của Cyanine đặc trưng bởi hai nguyên tử nitơ gắn độc lập vào các dị vòng (ví dụ pyrrole, benzothiazole) và chuỗi polymethine liên hợp  $\pi$ -liên kết hai nguyên tử nitơ, với số lượng cacbon methine lẻ (Hình 1.13a). Những biến thể trong chuỗi polymethine và các nhóm thế nitơ trên các dị vòng tạo ra sự đa dạng về cấu trúc trong các dẫn xuất của Cyanine [92]. Chuỗi polymethine bắc cầu là chuỗi liên hợp được hình thành bởi các nguyên tử carbon lai hóa  $sp^2$  kết thúc bằng điện tích dương trên nitơ thông qua sự dịch chuyển của các electron  $\pi$ . Số lượng cacbon methine ảnh hưởng đến các đặc tính điện tử của phân tử Cyanine [90]. Chỉ phân tử có số cacbon methine lẻ mới có các đặc tính quang học riêng biệt. Vì khi đó không tồn tại đồng phân hình học, tất cả các liên kết carbon-carbon của cầu polymethine gần như giống hệt nhau. Do đó, không có sự xen kẽ độ dài liên kết. Mức hấp thụ và phát xạ tối đa của Cyanine sẽ bị dịch chuyển đỏ khoảng 100 nm khi kéo dài chuỗi polymethine cứ sau hai nguyên tử cacbon (Hình 1.13c và d). Các đặc tính quang học của nhóm Cyanine không xảy ra ở các phân tử có số lượng nguyên tử cacbon methine chẵn, trong đó cấu trúc phân tử xen kẽ liên kết đôi và liên kết đơn (Hình 1.13b). Bên cạnh các đặc tính quang học tuyệt vời, độc tính thấp và khả năng tương thích sinh học cao còn khiến chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần Cyanine trở thành một trong những nền tảng hấp dẫn nhất cho các ứng dụng sinh học và y học [91].

#### ***1.4.2. Các nghiên cứu sử dụng chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần NIR***

Bước sóng huỳnh quang vùng hồng ngoại gần NIR rất hữu ích cho các ứng dụng tạo hình ảnh và định lượng tín hiệu trên mô hình *in vivo*. Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã phát triển các phương pháp hiệu quả để tổng hợp các hệ vật liệu mang chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần, và cải thiện tính chất quang của chúng cho các ứng dụng sinh học.



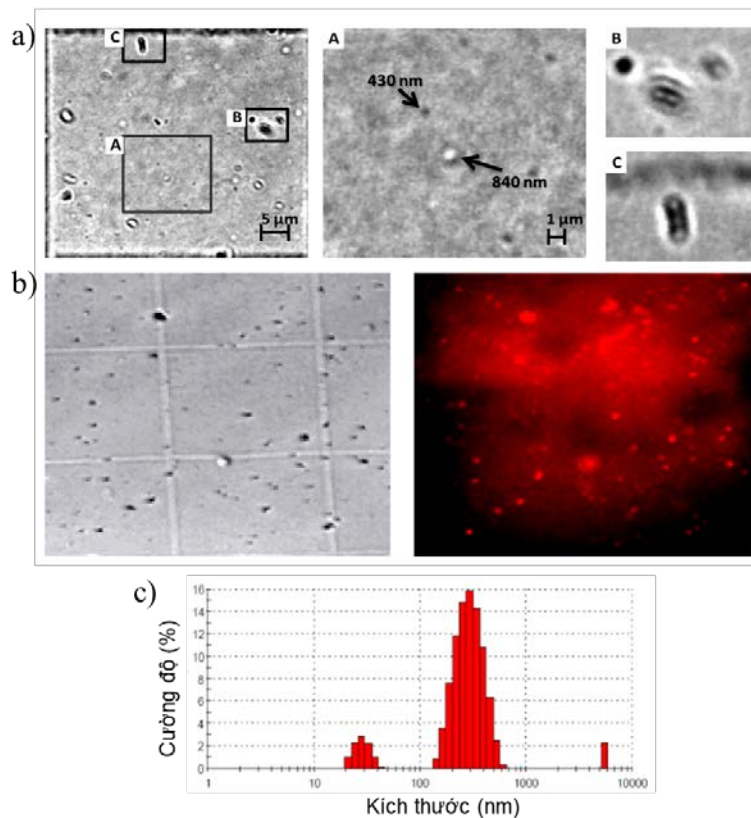


**Hình 1.14.** Cấu trúc hóa học của một số chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần thuộc nhóm Cyanine thường được sử dụng [91]

Giống như các chất phát huỳnh quang nhóm Cyanine, Indocyanine green (ICG) được cấu tạo từ hai dị vòng chứa nitơ: benzindole và chất liên kết heptamethine (Hình 1.14). Hai nhóm sulfonate trong cấu trúc làm tăng đáng kể khả năng hòa tan trong nước và khả năng tương thích sinh học của ICG. Tận dụng lợi thế của chất liên kết heptamethine và các đơn vị benzindole giàu electron, ICG thể hiện khả năng hấp thụ mạnh ở vùng hồng ngoại gần với cực đại khoảng 785 nm trong metanol (hệ số dập tắt mol  $204.000 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) và phát xạ huỳnh quang mạnh với dịch chuyển stock (stock shift) khoảng 40 nm [93]. Ngoài các đặc tính quang học tuyệt vời, ICG còn thể hiện tác dụng liên kết mạnh mẽ với protein huyết tương (80% với globulin và 20% với alpha-lipoprotein và albumin) với hằng số liên kết khoảng  $5,5 \times 10^5 \text{ L/mol}$ , do có tính ưa nước phù hợp và vòng thơm của ICG [94]. Có thể quan sát thấy thời gian lưu thông máu dài lên tới 20 - 30 phút. Cho đến nay, một lượng lớn công cụ tạo ảnh huỳnh quang NIR dựa trên ICG đã được phát triển cho ứng dụng lâm sàng, chẳng hạn như chụp động mạch trong nhãn khoa, chẩn đoán các mô và cơ quan, điều hướng phẫu thuật được hỗ trợ bởi ICG để sinh thiết hạch bạch huyết có khối u [90].

Indocyanine green cũng đã được sử dụng để đánh giá các cấu trúc quan trọng như vị trí ống mật trong khi phẫu thuật và để quan sát mô khối u bằng cách hướng đích thụ động thông qua tăng cường tính thấm và khả năng lưu giữ (Enhanced Permeability and Retention, EPR). Do được phê duyệt lâm sàng, ICG cũng đã được sử dụng trong các phương pháp hướng đích chủ động, việc kết hợp chất phát huỳnh quang này với các phối tử hướng đích chủ động vẫn còn là thách

thức lớn. Hơn nữa, huỳnh quang của ICG sẽ bị dập tắt sau khi liên hợp với protein, điều này có thể có tác động bất lợi đến việc sử dụng cho mục đích chụp ảnh huỳnh quang [95]. Chất phát huỳnh quang ICG đã được nhóm nghiên cứu của Mannucci và cộng sự nano hóa trong hệ lipid rắn bằng phương pháp nóng chảy và siêu âm, cho thấy sự phân bố sinh học *in vivo* trên mô hình chuột thiếu hụt miễn dịch. Sau khoảng 90 phút, tín hiệu huỳnh quang có thể được phát hiện ở những vùng bụng rõ ràng hơn. Sau 120 đến 180 phút, thu nhận được tín hiệu ở vùng gan của chuột [96].



**Hình 1.15.** (a) Hình ảnh hiển vi của bong bóng nano Cyanine 5.5 trong lưới vuông 50  $\mu\text{m}$  dưới vật kính 100 $\times$  với A, B và C; (b) hình ảnh hiển vi của bong bóng nano Cyanine 5.5 dưới ánh sáng pha (trái) và với bộ lọc phát xạ Cyanine 5.5 (phải); (c) phân bố kích thước của bong bóng nano Cyanine 5.5 [97]

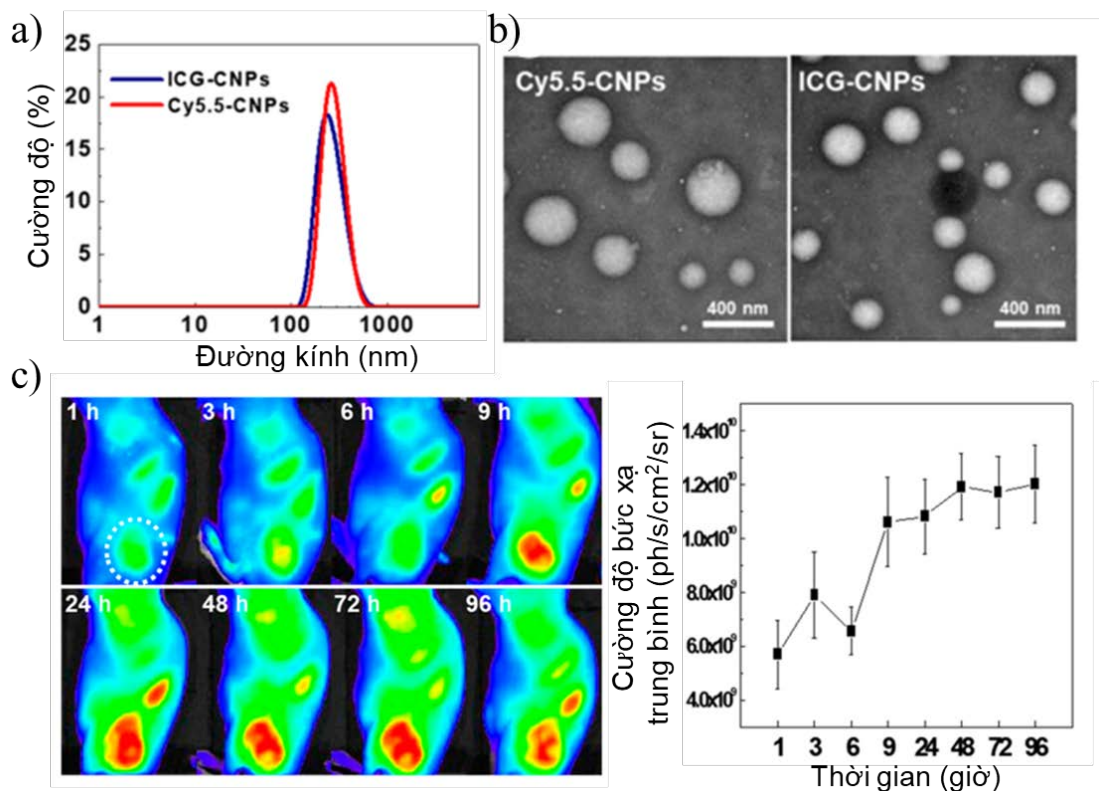
Tương tự như ICG, Cyanine 5.5 là chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần có hai nguyên tử nitơ được nối với nhau bởi 5 nguyên tử cacbon methine (Hình 1.14). Cyanine 5.5 có bước sóng hấp thụ/phát xạ cực đại tại 675/690 nm, bước đầu được nghiên cứu trong hình ảnh quang học *in vivo* do độ nhiễu nền thấp. Nghiên cứu của Liyi Mai và cộng sự đã chế tạo bong bóng nano liên hợp Cyanine 5.5 (Cy5.5-nanobubble) bằng phương pháp siêu âm [97]. Vật liệu Cy5.5-nanobubble có kích

thước nằm trong khoảng 400 - 800 nm (Hình 1.15). Kích thước thủy động trung bình là 359,3 nm trong dung dịch PBS ở 37°C trong khoảng từ 200 - 800 nm với sự phân bố đa phân tán của kích thước hạt (PDI) là 0,46. Nghiên cứu *in vitro* cho thấy Cy5.5-nanobubble có thể tích tụ trong tế bào ung thư do cấu trúc bong bóng nano liên hợp độc đáo. Thử nghiệm *in vivo* trên mô hình chuột được gây ung thư gan H22 cho thấy các bong bóng nano Cyanine 5.5 chủ yếu nằm ở vị trí khối u và trong bàng quang của chuột [97].

Ứng dụng trong chẩn đoán sớm ung thư, nhóm nghiên cứu của Choi và cộng sự đã sử dụng Cyanine 5.5 làm chất đánh dấu huỳnh quang trên mô hình chuột gây khối u đại tràng HT29. Cyanine 5.5 được liên hợp với nano axit hyaluronic và poly(ethylene glycol) (PEG) (P-HA-NP), cho thấy tín hiệu huỳnh quang tập trung tại khối u sau 1 giờ tiêm, và tiếp tục tăng đến 6 giờ sau khi tiêm, sau đó giảm dần theo thời gian. Theo thời gian, các mô khối u được phân biệt rõ ràng với các mô bình thường, có khả năng ứng dụng trong chẩn đoán sớm ung thư [98]. Bên cạnh đó, nhóm nghiên cứu của Shuai và cộng sự đã liên hợp Cyanine 5.5 với thuốc Paclitaxel (PTX) và chất mang mPEG-PLA để theo dõi sự phân bố của Paclitaxel trên mô hình chuột mang khối u Bel-7402 [99]. Kết quả cho thấy Cyanine 5.5 được liên hợp cộng hóa trị với thuốc PTX cho hình ảnh huỳnh quang mô phỏng sự phân bố *in vivo* của hệ dẫn thuốc nano trong cơ thể tốt hơn hệ nano mang đồng thời Cyanine 5.5 và PTX bằng tương tác vật lý.

Ngoài ra, các hạt nano chitosan glycol (CNP) đã được liên hợp với các chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần Cyanine 5.5 (Cy5.5) và ICG trong nghiên cứu của Kyeong Cheol On và cộng sự [100]. Cy5.5 và ICG được liên kết cộng hóa trị với CNP với hàm lượng lần lượt là  $5,8 \pm 0,2$  wt % và  $7,8 \pm 0,4$  wt %. Các tiểu phân Cy5.5-CNP và ICG-CNP có dạng hình cầu, đường kính thủy động trung bình lần lượt là  $264 \pm 3$  nm và  $261,8 \pm 2,69$  nm, với sự phân bố kích thước không đồng đều (Hình 1.16 a và b). Vật liệu nano Cy5.5-CNP và ICG-CNP đã được thử nghiệm trên mô hình thỏ và chuột mang khối u phổi VX2. Cy5.5-CNP (22,5 mg/kg) được tiêm qua tĩnh mạch đuôi của chuột mang khối u VX2. Sự tích lũy Cy5.5-CNP trong mô khối u được theo dõi bằng cách sử dụng hệ thống hình ảnh huỳnh quang trong 96 giờ. Tín hiệu huỳnh quang trong mô khối u tăng dần trong 24 giờ và bão hòa ở 48

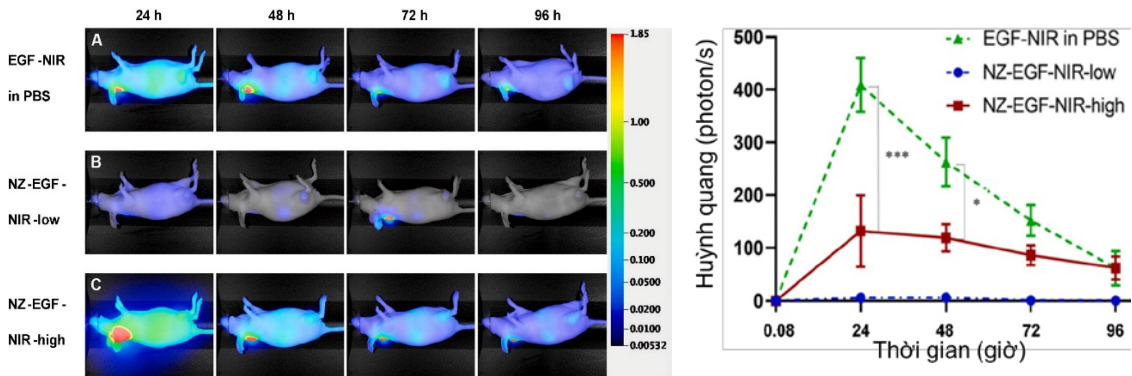
giờ (Hình 1.16c). Trong khoảng thời gian từ 48 giờ đến 96 giờ, cường độ tín hiệu tối đa được đo trong khối u, cho thấy Cy5.5-CNP có thể lưu thông trong cơ thể trong thời gian dài và tích lũy hiệu quả trong khối u (Hình 1.16c). Hơn nữa, tín hiệu huỳnh quang mạnh của Cy5.5-CNP trong thận chứng tỏ rằng Cy5.5-CNP có thể được bài tiết qua thận, là cơ quan chính giúp loại bỏ các hạt nano khỏi cơ thể. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng chitosan glycol có nguồn gốc từ chitosan có thể liên kết với thụ thể megalin, được biểu hiện trên tế bào ống thận, dẫn đến sự hấp thu và lưu giữ Cy5.5-CNP ở thận [101]. Ngoài ra, các khối u có thể được phát hiện tới 96 giờ sau khi tiêm và bờ khối u có thể nhìn thấy rõ ràng trong quá trình phẫu thuật dưới hướng dẫn bằng hình ảnh ở thỏ [100].



**Hình 1.16.** (a) Phân bố kích thước động DLS; (b) ảnh TEM của vật liệu Cy5.5-CNP và ICG-CNP; (c) sự phân bố sinh học *in vivo* của Cy5.5-CNP ở chuột mang khối u VX2 (n = 3) [100]

IRDye 800CW là chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần thể hệ tiếp theo được nghiên cứu. IRDye 800CW có thể được chức năng hóa với nhóm phản ứng NHS hoặc maleimide, cho phép nó được gắn vào một số phân tử sinh học (Hình 1.17). IRDye 800CW có cực đại hấp thụ tại bước sóng 774 nm, và cực đại phát xạ tại 789

nm, với hệ số hấp thụ mol là 240.000 [102]. Tanaka và cộng sự đã sử dụng thành công albumin huyết thanh người được gắn IRDye 800CW để lập bản đồ hạch bạch huyết trọng điểm và phẫu thuật cắt bỏ các khối u ác tính di căn tự phát ở lợn [102]. Trong một nghiên cứu khác, Trastuzumab được gắn nhãn đồng thời với  $^{111}\text{In}$  và IRDye 800CW để phát hiện xenograft biểu hiện Her2 ở chuột thiếu hụt miễn dịch [103]. Các tác giả kết luận rằng vật liệu tổ hợp ( $^{111}\text{In}$  + IRDye 800CW) có tiềm năng trong việc theo dõi hiệu quả sự biểu hiện quá mức Her2 ở bệnh nhân ung thư vú.



**Hình 1.17.** Hình ảnh huỳnh quang NIR trên chuột được gây khối u A549 (trái), cường độ huỳnh quang trung bình từ các khối u (phải) của nhóm A (EGF-NIR in PBS), nhóm B (NZ-EGF-NIR-low, 2 nM EGF) và nhóm C (NZ-EGF-NIR-high, 2 nM EGF) sau 24, 48, 72 và 96 giờ tiêm, (mean  $\pm$  SD, n = 3) [104]

Nhóm nghiên cứu của Gruden và cộng sự đã đánh giá khả năng phân phối sinh học và hướng đích khối u thông qua khả năng phát huỳnh quang hồng ngoại gần IRDye 800CW (cực đại kích thích/phát xạ ở 774 nm/789 nm) gắn trên hệ NanoZolid-EGF trên mô hình chuột mang khối u A549 [104]. Tín hiệu huỳnh quang trên thiết bị chụp ảnh Pearl Trilogy được phân tích bằng phần mềm Image Studio™ (LI-COR), trong điều kiện bước sóng kích thích/phát xạ = 785/800 nm. Việc định lượng tín hiệu huỳnh quang NIR *in vivo* từ khối u hoặc các cơ quan/mô khác được xác định trên các vùng quan tâm (ROI) và chuẩn hóa so với tín hiệu nền. Tín hiệu được biểu thị bằng photon/s. Vật liệu NanoZolid-EGF-IRDye 800CW (EGF-NIR) được giải phóng từ vị trí tiêm ở cổ đã được hấp thụ và cho thấy sự tích tụ vào các khối u ở chân sau [104].

Như vậy, Cyanine 5.5 và các chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần thể hiện nhiều ưu điểm trong kỹ thuật huỳnh quang. Tuy nhiên việc kết hợp Cyanine 5.5 lên các hệ dẫn thuốc đa chức năng còn chưa được thực hiện.

### **Tóm tắt chương 1**

Trong chương này, chúng tôi đã trình bày tổng quan các nghiên cứu về vật liệu nano đa chức năng ứng dụng trong chẩn đoán và điều trị ung thư. Các polyme, copolyme có nhiều ứng dụng trong phát triển các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng, có khả năng khắc phục nhiều nhược điểm của các thuốc điều trị hóa dược hiện nay. Hệ dẫn thuốc nano có các tính chất vượt trội so với các thuốc truyền thống như: tăng khả năng hấp thu chọn lọc, hướng đích thụ động nhờ hiệu ứng tăng tính thấm lưu trữ. Từ đó làm giảm độc tính và tác dụng phụ của thuốc, tăng hiệu quả chữa trị. Hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  có khả năng ứng dụng làm tăng độ tương phản ảnh chụp cộng hưởng từ MRI và khai thác tác dụng nhiệt từ trị ung thư khi đặt trong từ trường ngoài. Các chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần tạo điều kiện thuận lợi trong quá trình theo dõi sự phân bố *in vivo* của thuốc trong quá trình điều trị nhờ hình ảnh quang học. Điểm đặc biệt của chất phát huỳnh quang mạnh trong vùng hồng ngoại gần là cho hình ảnh huỳnh quang có ít tán xạ nền cũng như khả năng thâm nhập vào mô sâu, có thể tạo điều kiện thích hợp cho việc phát hiện, theo dõi quá trình sinh học của hệ dẫn thuốc, hứa hẹn đem lại hiệu quả cao trong việc theo dõi và chữa trị ung thư.

Từ những luận cứ trên, mục tiêu của luận án tập trung vào việc chế tạo được hệ dẫn thuốc nano đa chức năng gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5. Qua đó, nhằm khai thác được (1) khả năng theo dõi, phát hiện sự phân bố *in vivo* của thuốc tại các mô ung thư bằng chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần Cyanine 5.5, (2) khả năng tăng độ tương phản trong chụp cộng hưởng từ hạt nhân và (3) khả năng nhiệt từ trị của  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , và (4) tác dụng hóa trị của Doxorubicin.

## CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Chế tạo vật liệu

#### 2.1.1. Nguyên vật liệu

Cyanine 5.5 NHS este ( $C_{44}H_{46}N_3BF_4O_4$ ) được cung cấp từ Lumiprobe GmbH. Lactide (3,6-dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione,  $C_6H_8O_4$ ) và vitamin E TPGS (d- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate,  $C_{33}O_5H_{54}(CH_2CH_2O)_{23}$ ), thiếc octoate ( $Sn(OOCC_7H_{15})_2$ ), ferric chloride hexahydrate ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ), ferrous chloride tetrahydrate ( $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ), HCl,  $NH_4OH$  (26% amoniac), N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), N-Hydroxysuccinimide (NHS) và Doxorubicin hydrochloride được mua từ hãng Sigma Aldrich. 3-Aminopropyl triethoxysilane (APTES), tetrahydrofuran (THF), dichloromethane (DCM), triethylamine, etanol, toluen và metanol được mua từ hãng Merck. Lactide đã sử dụng được kết tinh lại hai lần từ etyl axetat trước phản ứng. Vitamin E TPGS được đông khô trong hai ngày trước khi sử dụng. Nước cất hai lần được sử dụng cho tất cả các thí nghiệm.

#### 2.1.2. Tổng hợp copolyme PLA-TPGS

Copolyme PLA-TPGS được tổng hợp bằng phản ứng trùng hợp khối mở vòng của monome lactide với TPGS với sự có mặt của thiếc octoate làm chất xúc tác [105]. Cụ thể, 200 mg lactide và 200 mg TPGS được hòa tan trong 30 mL toluene trong một bình cầu 120 mL. Hỗn hợp này được khuấy từ và đun nóng trong bể silicon dưới dòng nitơ. Khi nhiệt độ phản ứng đạt tới 110 °C, 0,25 mL thiếc octoate hòa tan trong 10 mL toluene được thêm nhanh vào hỗn hợp phản ứng và đun hồi lưu. Phản ứng được tiếp tục gia nhiệt lên tới 145 °C và giữ ở nhiệt độ này trong suốt quá trình phản ứng. Sau 16 giờ phản ứng, toluene được cho bay hơi ở 110 °C và hỗn hợp được khuấy qua đêm để thu được hỗn hợp đặc. Sản phẩm được hòa tan trong DCM và kết tủa trong metanol lạnh để loại bỏ các monome lactide và TPGS dư không phản ứng. Sản phẩm cuối cùng thu được bằng cách lọc và sấy khô trong chân không ở 45 °C trong 48 giờ. Cấu trúc của copolyme tổng hợp được xác định bằng phổ  $^1H$ -NMR trong  $CDCl_3$  ở tần số 500 Hz (Bruker AMX500) và phổ hồng ngoại FTIR. Kết quả  $^1H$ -NMR được xử lý và phân tích bằng phần mềm NMRnotebook 2.5.

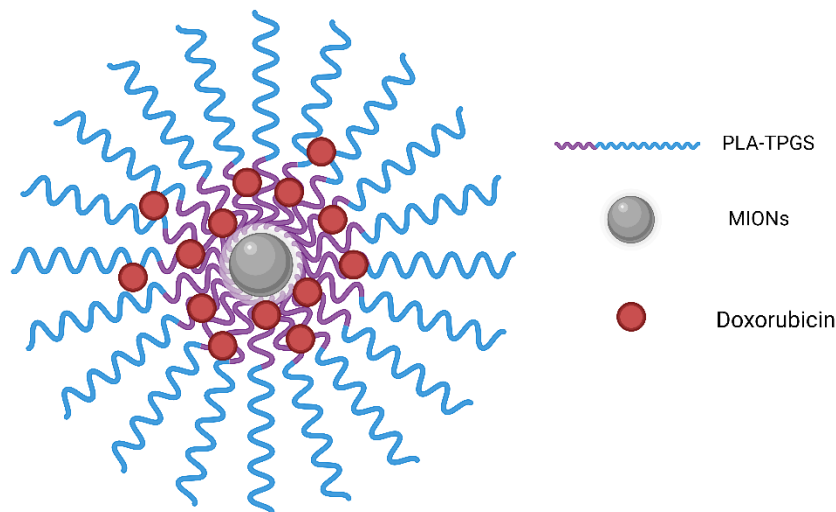
### 2.1.3. Tổng hợp hạt nano oxit sắt từ ( $Fe_3O_4$ NPs)

Hạt nano oxit sắt từ ( $Fe_3O_4$  NPs) được tổng hợp theo phương pháp đồng kết tủa sử dụng hệ phản ứng vi sóng Sineo – Uwave 1000, theo quy trình đã được công bố [41]. Quá trình phản ứng đồng kết tủa theo phương trình phản ứng:



Các tiền chất sử dụng để chế tạo hạt nano oxit sắt từ là ion  $Fe^{2+}$  và  $Fe^{3+}$  (với tỉ lệ mol 1: 2) được chuẩn bị trong dung dịch HCl 2 M. Cụ thể, 4 mmol Fe(III) (dạng  $FeCl_3$ ) và 2 mmol Fe(II) (dạng  $FeCl_2$ ) được hòa tan vào 40 mL axit HCl 2M, sau đó chuyển vào bình cầu và gia nhiệt đến 70 °C. Hỗn hợp phản ứng được khuấy từ và duy trì nhiệt độ 70 °C đồng thời với sục khí  $N_2$  để duy trì môi trường trơ trong suốt quá trình phản ứng. Dung dịch  $NH_3$  2 M (80mL) được nhỏ từ từ vào bình cầu với tốc độ 2 giọt/giây. Hỗn hợp phản ứng chuyển dần từ màu vàng sang nâu và đen và phản ứng được tiếp tục thêm 30 phút sau khi nhỏ hết dung dịch  $NH_3$ . Sản phẩm thu được bằng cách lắng từ, rửa với nước cất đến pH trung hoà và rửa bằng etanol 96%. Sản phẩm có thể được sấy khô ở nhiệt độ 60 °C trong tủ sấy chân không để xác định các tính chất hoặc được phân tán trong nước cất để thực hiện các bước tổng hợp tiếp theo.

### 2.1.4. Chế tạo hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Doxorubicin



**Hình 2.1.** Sơ đồ hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Doxorubicin

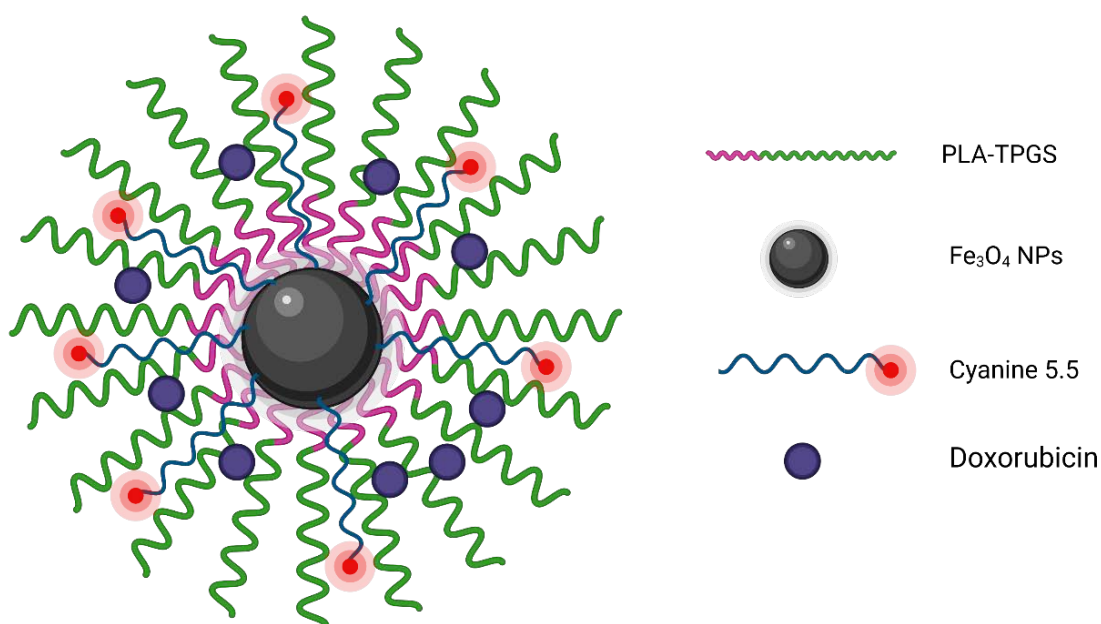
Thuốc điều trị ung thư Doxorubicin và  $Fe_3O_4$  NPs được nano hoá bằng phương pháp nhũ hóa bay hơi dung môi trên cơ sở copolyme PLA-TPGS (Hình 2.1). Cụ thể, copolyme PLA-TPGS được hòa tan trong THF với nồng độ 1,0



mg/mL và khuấy trong 30 phút. Sau đó, Doxorubicin và  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs với các tỷ lệ w/w khác nhau được thêm từ từ vào dung dịch copolyme PLA-TPGS. Hỗn hợp này được khuấy trong 24 giờ trong bình kín và sau đó THF được cho bay hơi trong điều kiện chân không. Dung dịch này sau đó được thẩm tách bằng nước cất để loại bỏ Doxorubicin không được nano hoá. Hỗn hợp được đông khô và bảo quản ở 4 °C. Trước khi sử dụng cho các phép đo khác, các hạt nano đông khô được phân tán lại trong PBS.

### 2.1.5. Chế tạo hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Doxorubicin-Cyanine 5.5

Để chức năng hóa bề mặt của hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs, 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) đã được thêm vào 25 mL dung dịch phân tán  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs 4 mg/mL (ở các tỉ lệ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  : APTES (w/w) khác nhau, gồm 30 : 3, 20 : 3, 10 : 3, và 5 : 3). Hỗn hợp phản ứng được đun hồi lưu trong 3 giờ ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau: 25, 50, 60, 70 và 80 °C, thu được sản phẩm  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ .  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Cyanine 5.5 được tổng hợp bằng cách cho Cyanine 5.5 NHS este phản ứng với  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  (nồng độ 4 mg/mL) ở nhiệt độ phòng trong các khoảng thời gian khác nhau (1 giờ, 2 giờ, 5 giờ, 12 giờ) với sự có mặt của EDC và NHS làm chất xúc tác. Tỷ lệ Cyanine 5.5 :  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs (w/w) được khảo sát ở các tỉ lệ khác nhau, cụ thể là 0,025 : 1, 0,03 : 1, 0,05 : 1, 0,1 : 1 và 0,2 : 1. Ngoài ra, điều kiện pH cũng được khảo sát ở các giá trị khác nhau (pH 5,5; pH 7,4; pH 8,5; pH 10).



**Hình 2.2.** Sơ đồ hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5

Sau đó, 50 mg PLA-TPGS và 30 mL THF được thêm vào hỗn hợp  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Cyanine 5.5. Thuốc điều trị ung thư Doxorubicin được nano hoá bằng phương pháp bay hơi dung môi nhũ tương (Hình 2.2). Cụ thể, thêm 17,5 mg Doxorubicin vào hỗn hợp PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Cyanine 5.5, cùng với triethylamine, trong đó tỷ lệ mol Cyanine 5.5 : Dox = 1:6. Hỗn hợp được khuấy trong 24 giờ trong bình kín và sau đó THF được làm bay hơi trong chân không. Sản phẩm cuối cùng được tinh chế bằng cách thẩm tách với nước cất trong 12 giờ (ngưỡng trọng lượng phân tử 8 kDa) và sau đó đông khô. Các hạt nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 thu được được bảo quản ở 4 °C (tránh ánh sáng) cho đến khi sử dụng. Các hạt nano đông khô được phân tán lại trong PBS trước khi sử dụng.

## **2.2. Các phương pháp đặc trưng vật liệu**

### **2.2.1. Phương pháp phổ hồng ngoại biến đổi Fourier FTIR**

Phương pháp phân tích theo phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) là một trong những kỹ thuật đầu tay để nghiên cứu tính chất vật liệu. Một trong những ưu điểm quan trọng nhất của phương pháp phổ hồng ngoại là phương pháp này cung cấp thông tin về cấu trúc phân tử nhanh, không đòi hỏi các phương pháp tính toán phức tạp. Kỹ thuật này dựa trên hiệu ứng đơn giản là: các hợp chất hoá học có khả năng hấp thụ chọn lọc bức xạ hồng ngoại. Sau khi hấp thụ các bức xạ hồng ngoại, các phân tử của các hợp chất hoá học dao động với nhiều vận tốc dao động và xuất hiện dải phổ hấp thụ gọi là phổ hấp thụ bức xạ hồng ngoại. Các đám phổ khác nhau có mặt trong phổ hồng ngoại tương ứng với các nhóm chức đặc trưng và các liên kết có trong phân tử hợp chất hoá học. Bởi vậy phổ hồng ngoại của một hợp chất hoá học coi như “dấu vân tay”, có thể căn cứ vào đó để nhận dạng chúng. Thiết bị FTIR ngày nay sử dụng bộ giao thoa Michelson thay cho bộ tạo đơn sắc của các hệ thống phổ hồng ngoại phân tán trước đây [106].

Phổ hồng ngoại FTIR của vật liệu nano đa chức năng được thực hiện bằng thiết bị FTIR Nexus 670 (Viện Kỹ thuật nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH-CN VN). Mẫu vật liệu được quét trong vùng số sóng 400 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ , sử dụng nền KBr.

### **2.2.2. Phương pháp hiển vi điện tử quét phát xạ trường FESEM**

Phương pháp chụp ảnh hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscope, SEM) là phương pháp cho phép quan sát hình thái bề mặt của vật liệu. SEM có thể tạo ra ảnh với độ phân giải cao của bề mặt mẫu bằng cách sử dụng một chùm điện tử hẹp (chùm các electron) quét trên bề mặt mẫu. Điện tử được phát ra từ súng phóng điện tử, sau đó được tăng tốc, và hội tụ thành chùm điện tử hẹp nhờ hệ thống thấu kính từ, sau đó quét trên bề mặt vật liệu nhờ các cuộn quét tĩnh điện. Việc tạo ảnh của mẫu vật được thực hiện thông qua việc ghi nhận và phân tích các bức xạ phát ra từ tương tác của chùm điện tử với bề mặt mẫu [106].

Trong luận án này, việc khảo sát hình thái học của vật liệu nano được thực hiện trên kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường (Field emission scanning electron microscopy, FESEM) Hitachi S-4800 sử dụng súng điện tử kiểu phát xạ cathode trường lạnh tại Viện Khoa học vật liệu. Kính có độ phóng đại  $20 \div 800.000$  lần, độ phân giải ảnh SE là 2,0 nm ở thế 1 kV và 1,0 nm ở thế 15 kV. Các mẫu được đặt trên tấm wafer Si, sấy khô và đưa vào thiết bị mà không cần phủ thêm. Phép đo được thực hiện ở mức năng lượng từ 5 đến 10 keV.

### **2.2.3. Phương pháp hiển vi điện tử truyền qua TEM**

Kính hiển vi điện tử truyền qua (Transmission electron microscopy, TEM) là công cụ kỹ thuật cho nghiên cứu vi cấu trúc vật liệu. Dựa trên nguyên tắc hoạt động cơ bản của kính hiển vi quang học, kính hiển vi điện tử truyền qua có ưu điểm nổi bật nhờ bước sóng của chùm electron ngắn hơn rất nhiều so với ánh sáng nhìn thấy nên có thể quan sát với độ phân giải 0,2 nm [106].

Hình thái và kích thước của vật liệu nano đa chức năng trong luận án được chụp trên kính hiển vi điện tử truyền qua JEOL JEM-1010 ở điện áp 120 kV (Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương), và thiết bị hiển vi điện tử truyền qua JEOL 100CX ở điện áp 100 kV (Khoa Dược, Trường Đại học Paris Descartes, CNRS UMS3612, Inserm US25).

### **2.2.4. Phương pháp phân tích nhiệt khối lượng TGA**

Phân tích nhiệt (Thermogravimetric) là một nhóm các kỹ thuật phân tích trong đó các đặc trưng vật lý của mẫu hoặc sản phẩm phản ứng được đo như những hàm của nhiệt độ. Nhiệt độ của mẫu sẽ được điều khiển theo các chương trình định sẵn.

Phân tích nhiệt khối lượng (TGA) là phương pháp phân tích trong đó sự thay đổi khối lượng của mẫu dưới sự thay đổi của nhiệt độ theo một chương trình được ghi lại như là một hàm số của nhiệt độ hoặc thời gian. Kỹ thuật phân tích nhiệt trọng dựa trên cơ sở ghi lại liên tục sự thay đổi khối lượng của mẫu trong quá trình gia nhiệt hoặc làm lạnh, và hữu ích khi phân tích định lượng các thay đổi vật lý hoặc hóa học với sự thay đổi khối lượng. Như sự mất nước, phân hủy, oxy hóa, sự khử... hay sự thay đổi vật lý như thăng hoa, bay hơi, hấp thụ và khử hấp thụ. Khối lượng tổn hao của các thành phần hữu cơ như polyme, copolyme, vật liệu nano tổ hợp có thể xác định được từ giản đồ nhiệt khối lượng TG [18].

Trong luận án này, kỹ thuật phân tích nhiệt TGA được sử dụng để đánh giá quá trình phân hủy nhiệt của copolyme và vật liệu nano đa chức năng trên thiết bị Discovery TGA (TA Instruments, New Castle, DE, USA) tại Viện Kỹ thuật nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH-CN VN. Để phân tích TGA, vật liệu nano được đặt trong chén đựng mẫu và nhiệt độ được thay đổi từ 25 đến 800°C với tốc độ tăng nhiệt là 10°C/phút.

#### ***2.2.5. Phương pháp xác định phân bố kích thước hạt và thế zeta***

Kích thước và phân bố kích thước hạt là thông số quan trọng để đánh giá độ bền vật lý của tiểu phân nano. Phương pháp tán xạ ánh sáng động (Dynamic light scattering, DLS) được sử dụng rộng rãi để đo kích thước tiểu phân nhỏ phân tán trong môi trường lỏng. Kích thước và phân bố kích thước (qua chỉ số PDI) là các đại lượng chính được xác định qua phương pháp này. Giá trị PDI từ 0,1 đến 0,25 cho thấy phân bố kích thước tiểu phân hẹp, trong khi đó PDI lớn hơn 0,5 biểu thị cho hệ phân bố kích thước rộng [106].

Giá trị thế Zeta chứng minh độ bền của hệ nghiên cứu. Thế Zeta là tổng điện tích mà hạt tiểu phân đạt được trong môi trường phân tán. Nó đặc trưng cho lực đẩy giữa các hạt tiểu phân. Các hạt có giá trị tuyệt đối thế Zeta lớn hơn 30 mV được coi là một hệ bền. Nếu giá trị Zeta nằm trong khoảng 20 - 30 mV, thì hệ hỗn dịch coi là tương đối bền. Trong trường hợp thế zeta nhỏ hơn 10mV, hệ hỗn dịch được coi là không ổn định, kém bền, dễ bị kết tập tiểu phân [106].

Sự phân bố kích thước và thế Zeta của vật liệu nano đa chức năng được xác định bằng thiết bị Zetasizer-Nano ZS (Zetasizer Nano, Malvern Instruments, UK) tại Viện Khoa học vật liệu, Viện Hàn lâm KH-CN VN. Mỗi mẫu được đo 3 lần.

### 2.2.6. Phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại và khả kiến UV-Vis

Phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại và khả kiến là phương pháp phân tích dựa trên sự hấp thụ bức xạ điện từ. Nguyên lý của phương pháp là khi chiếu một chùm ánh sáng đơn sắc qua mẫu có cường độ  $I_0$  thì mẫu sẽ hấp thụ một phần. Sau khi truyền qua mẫu, cường độ của bức xạ điện từ là  $I$  ( $I < I_0$ ) [18].

Độ hấp thụ  $A$  của một dung dịch là logarit thập phân của nghịch đảo độ truyền quang  $T$  khi cho ánh sáng đơn sắc đi qua, được biểu thị bằng phương trình:

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (2.1)$$

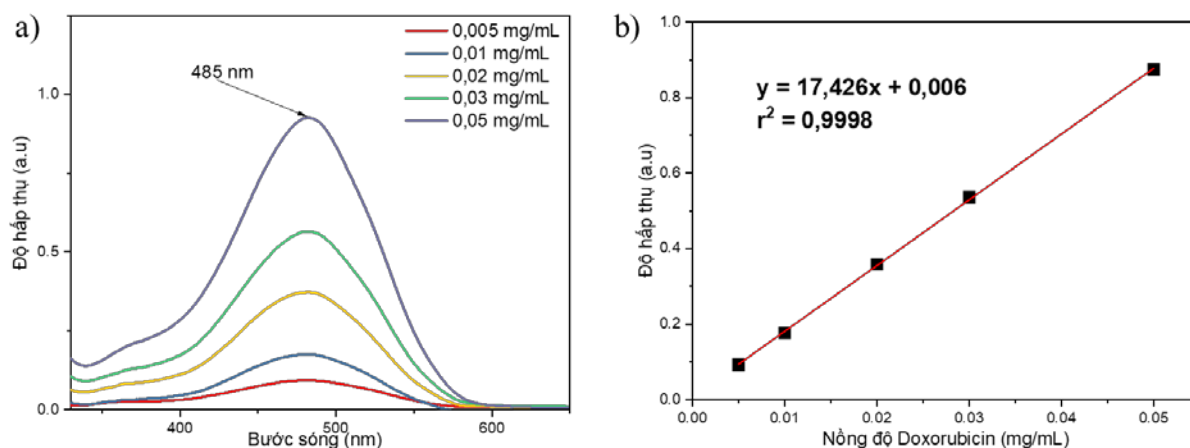
Trong đó:

$I$  là cường độ ánh sáng đơn sắc sau khi đã truyền qua dung dịch;

$I_0$  là cường độ ánh sáng đơn sắc tới;

$T$  là độ truyền quang.

Phổ hấp thụ UV-Vis của vật liệu trong luận án được ghi trên máy quang phổ Ocean Optics Usb4000 tại Viện Khoa học vật liệu, Viện Hàn lâm KH-CN VN.



**Hình 2.3.** (a) Phổ UV-Vis; (b) đường chuẩn Doxorubicin

Xây dựng đường chuẩn độ hấp thụ - nồng độ Doxorubicin: Chuẩn bị dãy dung dịch Doxorubicin chuẩn với nồng độ từ 0,005 đến 0,05 mg/mL. Sau đó tiến hành đo độ hấp thụ của các dung dịch trong dải bước sóng từ 200 đến 800 nm. Xây dựng đường chuẩn độ hấp thụ - nồng độ Doxorubicin:  $y = 17,426x + 0,006$  ( $r^2 = 0,9998$ ), với  $y$  là độ hấp thụ của dung dịch Doxorubicin chuẩn có nồng độ  $x$  tại bước sóng hấp thụ cực đại (485 nm) của Dox (Hình 2.3).

### 2.2.7. Phổ huỳnh quang

Phổ huỳnh quang là phương pháp dùng để nghiên cứu tính chất quang của vật

liệu. Trong phương pháp này, vật liệu được kích thích bằng một nguồn năng lượng từ bên ngoài, sau đó nghiên cứu sự tương tác giữa vật liệu và nguồn năng lượng này. Hệ điện tử hóa trị của vật liệu chuyển trạng thái từ trạng thái cơ bản lên các trạng thái kích thích khác nhau sau khi nhận được năng lượng kích thích. Thời gian tồn tại ở trạng thái kích thích tùy thuộc vào tính chất của vật liệu. Khi hồi phục về trạng thái cân bằng, điện tử giải phóng năng lượng có thể ở các dạng khác nhau như nhiệt hoặc photon. Ánh sáng phát ra trong quá trình hồi phục được gọi chung là huỳnh quang [106].

Trong luận án này, phổ huỳnh quang của các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần Cyanine 5.5 được đo trên máy quang phổ iHR550 (Horiba) với cảm biến Si-CCD (charge Coupled Device) được làm lạnh bằng pin Peltier, dưới bước sóng kích thích của diode laser 355 nm (Teem Photonics).

### **2.2.8. Phương pháp nhiễu xạ tia X**

Phương pháp nhiễu xạ tia X (XRD) dựa trên hiện tượng nhiễu xạ tia X của các vật liệu kết tinh. Khi chiếu chùm tia X có bước sóng  $\lambda$  và mạng tinh thể của vật liệu, các họ mặt phẳng mạng tinh thể của vật liệu, các họ mặt phẳng (hkl) có giá trị  $d_{hkl}$  thỏa mãn điều kiện phản xạ Bragg:  $2d_{hkl} \sin 2\theta = n \cdot \lambda$  sẽ cho các cực đại nhiễu xạ tại vị trí góc nhiễu xạ  $\theta = \arcsin(n\lambda/2d_{hkl})$  tương ứng trên giản đồ nhiễu xạ n nhận các giá trị 1,2,3.... gọi là bậc nhiễu xạ. Thông thường ta chỉ quan sát được các nhiễu xạ bậc 1 (n=1).

Những đặc trưng quan trọng nhất của các giản đồ nhiễu xạ tia X là vị trí của các vạch nhiễu xạ, cường độ vạch nhiễu xạ và đường cong phân bố của vạch nhiễu xạ đó. Phương pháp này cho phép xác định pha cấu trúc, phân tích định tính, định lượng các pha tinh thể, hằng số mạng, mức độ biến dạng mạng, so sánh xác định tương đối hàm lượng pha tạp, từ đó cho phép điều chỉnh quy trình công nghệ chế tạo vật liệu và góp phần lý giải các hiện tượng vật lý [106].

Trong luận án này, cấu trúc tinh thể của vật liệu nano đa chức năng được thực hiện trên hệ nhiễu xạ kế SIEMENS D5000 (CHLB Đức) tại Viện Khoa học vật liệu, Viện Hàn lâm KH-CN VN, sử dụng bức xạ Cu- $\alpha$ , bước sóng  $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ . Dữ liệu được thu thập trong phạm vi  $2\theta$  từ  $30^\circ$  đến  $70^\circ$ , bước nhảy  $0,02^\circ$  và thời gian

mỗi bước là 4 giây ở nhiệt độ phòng.

### 2.2.9. Từ kế mẫu rung VSM

Từ kế mẫu rung (Vibrating sample magnetometer, viết tắt là VSM) là phương pháp đo momen từ của vật liệu trong từ trường ngoài, dựa trên nguyên lý cảm ứng điện từ. VSM còn được gọi là phép đo từ hóa (magnetization), momen từ của mẫu  $M_s$  được đo theo từ trường ngoài. Đường cong từ trễ của vật liệu thu được bằng cách thay đổi cường độ từ trường bên ngoài trong khoảng từ -1,1 kOe đến 1,1 kOe. Trên cơ sở đường cong từ trễ thu được, có thể xác định được các giá trị đặc trưng cho tính chất từ của vật liệu, như từ độ bão hòa ( $M_s$ ), và lực kháng từ ( $H_c$ ) [106].

Trong luận án này, phép đo tính chất từ của vật liệu nano đa chức năng được thực hiện trên thiết bị từ kế mẫu rung tại Phòng Vật lý vật liệu từ và siêu dẫn, Viện Khoa học vật liệu.

### 2.2.10. Đốt nóng cảm ứng từ MIH

Các phép đo đốt nóng cảm ứng từ (Magnetic Inductive Heating, MIH) của vật liệu nano đa chức năng được thực hiện trên thiết bị phát từ trường xoay chiều công suất cao (Model UHF-20A). Thử nghiệm trong điều kiện từ trường xoay chiều có cường độ 100 Oe và tần số 340 kHz, trên cuộn dây cảm ứng (7 vòng, đường kính 3 cm, dài 11,5 cm). Nhiệt độ được đo bằng nhiệt kế quang (GaAs sensor, Opsens) với độ chính xác 0,3 °C trong dải 0 - 250 °C.

Độ hấp thụ năng lượng từ của vật liệu nano đa chức năng được thể hiện qua đại lượng tốc độ hồi phục riêng SAR:

$$SAR = C \left( \frac{dT}{dt} \right) \frac{m_{\text{nano}}}{m_{Fe_3O_4}} \quad (2.2)$$

trong đó: C là nhiệt dung riêng của nước ( $C=4,18 \text{ J/gK}$ ),  $\frac{m_{\text{nano}}}{m_{Fe_3O_4}}$  là nồng độ  $Fe_3O_4$  trong hệ vật liệu nano đa chức năng,  $\left( \frac{dT}{dt} \right)$  là tốc độ tăng nhiệt ban đầu ( $^{\circ}\text{C/s}$ ),  $\left( \frac{dT}{dt} \right)$  được xác định từ tiếp tuyến của đường cong tăng nhiệt tại vùng ban đầu.

Hơn nữa, để có thể so sánh số liệu đo trên các thiết bị khác nhau mà thường là dùng các tần số (f) và từ trường (H) khác nhau, đại lượng tốc độ hấp thụ riêng hiệu

chuẩn, gọi là công suất tổn hao nội tại (intrinsic loss power, ILP) được xác định như sau [18]:

$$ILP = \frac{SAR}{H^2 f} \quad (2.3)$$

### 2.3. Đánh giá động học và cơ chế giải phóng thuốc *in vitro*

#### 2.3.1. Đánh giá động học giải phóng thuốc *in vitro*

Quá trình giải phóng thuốc Doxorubicin từ hệ dẫn thuốc nano đa chức năng được nghiên cứu tại các điều kiện khác nhau, gồm môi trường sinh lý (pH 7,4), và môi trường ngoại bào khối u (pH 5,0 và pH 6,5). Tiến hành như sau: Cho 10 mg hệ dẫn thuốc nano đa chức năng vào túi thẩm tách (MWCO 3,5 kDa) vào 300 mL dung dịch đệm, ở các điều kiện pH 5,0; 6,5 và 7,4, lấy mẫu sau các khoảng thời gian 1; 2; 4; 6; 8; 12; 24; 32; 48; 60; 72 giờ, đo hấp thụ UV-VIS.

#### 2.3.2. Xác định cơ chế giải phóng thuốc *in vitro*

Để phân tích cơ chế giải phóng thuốc Doxorubicin từ hệ dẫn thuốc nano đa chức năng, sáu mô hình động học khác nhau, gồm các mô hình động học bậc 0 (Zero-Order), Higuchi, bậc 1 (First-Order), Weibull, Hixson-Crowell và Korsmeyer-Peppas đã được sử dụng [107]. Dữ liệu thu được từ các nghiên cứu giải phóng thuốc được áp dụng cho 6 mô hình để tìm ra mô hình động học phù hợp nhất. Các phương trình mô hình động học được biểu diễn dưới đây, tương ứng với 6 mô hình nêu trên:

$$Q = K_0 t \quad (2.4)$$

Trong đó,  $K_0$  là hằng số tốc độ bậc 0 và  $t$  là thời gian.

$$Q = Q_0 (1 - e^{-K_1 t}) \quad (2.5)$$

Trong đó,  $Q_0$  là nồng độ ban đầu của thuốc và  $K_1$  là hằng số tốc độ bậc 1.

$$Q = K_H t^{1/2} \quad (2.6)$$

Trong đó,  $K_H$  là hằng số Higuchi biểu thị các biến thiết kế của hệ thống và  $t$  là thời gian.

$$Q = Q_0 (1 - e^{-K_w t^n}) \quad (2.7)$$

Trong đó,  $Q_0$  là nồng độ ban đầu của thuốc, và  $K_w$  là hằng số Weibull.

$$Q = Q_0 \left(1 - (1 - K_{HC} t)^3\right) \quad (2.8)$$



Trong đó,  $Q_0$  là nồng độ ban đầu của thuốc, và  $K_{HC}$  là hằng số Hixson – Crowell.

$$Q = K_{KP} t^n \quad (2.9)$$

Trong đó,  $K_{KP}$  là hằng số Korsmeyer-Peppas và  $n$  là số mũ khuếch tán thể hiện cơ chế giải phóng dược chất.

Tiêu chí thông tin Akaike (Akaike information criterion, AIC) được sử dụng để đánh giá sự phù hợp của các mô hình. Thông số AIC được tính theo công thức sau [108]:

$$AIC = n \times \ln(WSSR^2) + 2 \times p \quad (2.10)$$

Trong đó,  $n$  là số điểm dữ liệu giải phóng,  $p$  là số lượng tham số mô hình và WSSR (the weighted sum of square of residues) là tổng bình phương phần dư có trọng số. Đối với mỗi điều kiện pH, mô hình có giá trị AIC thấp nhất được coi là tối ưu nhất. Phân tích động học được thực hiện trên phần mềm Splus 8.0.

## **2.4. Đánh giá hiệu quả và cơ chế gây độc tế bào ung thư của hệ dẫn nano trên các dòng tế bào thử nghiệm**

### **2.4.1. Nuôi cấy tế bào**

Các dòng tế bào HeLa (Tế bào ung thư cổ tử cung), A549 (Tế bào ung thư biểu mô phổi), HGC-27 (Tế bào ung thư biểu mô dạ dày ở người), CCF-STTG1 (Tế bào ung thư biểu mô não), MCF-7 (Tế bào ung thư biểu mô tuyến vú) và PC-3 (Tế bào ung thư biểu mô tuyến tiền liệt) được cung cấp bởi trung tâm lưu trữ giống nuôi cấy Hoa Kỳ ATCC (Manassas, VA, USA) và được lưu giữ, thử độc tính tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các dòng tế bào được nuôi cấy ở 37°C trong 5% CO<sub>2</sub> trong môi trường thích hợp (RPMI 1640, MEM, DMEM; Merck KGaA, Darmstadt, Đức) chứa 10% huyết thanh bào thai bò bất hoạt do nhiệt (FBS), penicillin (100 UI mL<sup>-1</sup>), streptomycin (100 mg/mL) và L-glutamine (2 mM).

### **2.4.2. Thử nghiệm độc tính tế bào *in vitro* bằng phương pháp MTT**

Hoạt tính gây độc hay ức chế sự tăng sinh tế bào của các hệ nano được đánh giá qua khả năng ức chế enzyme oxidoreductase phụ thuộc NAD(P)H của tế bào. Enzyme này xúc tác phản ứng khử thuốc nhuộm tetrazolium MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; nồng độ cuối 5 mg/mL]

thành sản phẩm formazan không hoà tan (có màu xanh-tím) [109, 110]. Cụ thể, các tế bào được gieo vào đĩa 96 giếng ( $5 \times 10^4$  tế bào trên mỗi giếng hỗn hợp 200  $\mu\text{L}$ ) và gắn vào trong 24 giờ. Sau đó, các tế bào được xử lý bằng Doxorubicin tự do và các hệ nano ở nồng độ Doxorubicin nằm trong khoảng từ 50 đến 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  và được ủ ở  $37^\circ\text{C}$  và 5%  $\text{CO}_2$  trong 48 giờ. Khi kết thúc quá trình ủ, 20  $\mu\text{L}$  MTT (Merck KGaA) được thêm vào các giếng và ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 4 giờ. Sản phẩm chuyển hóa dạng tinh thể formazan được hòa tan trong DMSO 100 % và đo mật độ quang ở bước sóng 540/720 nm bằng cách sử dụng đầu đọc đa chế độ Spark (Tecan, Männedorf, Thụy Sĩ). Sự ức chế tăng sinh tế bào được đánh giá bằng công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ ức chế (\%)} = \left(1 - \frac{OD_{\text{sample}}}{OD_{\text{con}}}\right) \times 100\% \quad (2.11)$$

trong đó  $OD_{\text{sample}}$  và  $OD_{\text{con}}$  lần lượt là mật độ quang học của nhóm mẫu thử nghiệm và đối chứng. Thí nghiệm nói trên được thực hiện ba lần để lấy giá trị  $\text{IC}_{50}$  trung bình được tính toán bởi phần mềm TableCurve AISN (Jandel Scientific, San Rafael, CA). Độc tính gây độc tế bào được biểu thị bằng giá trị  $\text{IC}_{50}$  (nồng độ của các tác nhân thử nghiệm gây ức chế 50% hoặc làm chết tế bào), thu được bằng phương pháp hồi quy phi tuyến tính bằng cách sử dụng chương trình TableCurve 2D (Phần mềm thống kê SPSS, Chicago, IL).

#### **2.4.3. Đánh giá hoạt tính kháng phân bào bằng kỹ thuật hình ảnh huỳnh quang tự động và phân tích, sàng lọc nội hàm cao**

Một kỹ thuật đo tế bào định lượng, còn được gọi là phân tích sàng lọc nội hàm cao (High Content Screening, HCS), được sử dụng để xác định việc bắt giữ chu kỳ tế bào đối với tác động của hệ nano lên tế bào ung thư. Hình ảnh tế bào thu được bằng hệ thống kính hiển vi tự động Olympus scan<sup>R</sup> (Heidelberg, Đức) tại Phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên (Hình 2.4), sử dụng tính năng lấy nét tự động trên nhân tế bào.

Các tế bào được gieo vào các đĩa 96 giếng, một hoặc hai ngày trước khi kích hoạt để đạt được độ hợp lưu khoảng 70%. Sau 24 giờ ủ với các mẫu ở nồng độ  $\text{IC}_{50}$ , các tế bào được đánh dấu Hoechst 33342 (0,5  $\mu\text{M}$ ) ngay trước khi cố định bằng 3,7% paraformaldehyde trong PBS ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Mười sáu vị trí trên mỗi giếng được chụp (độ phóng đại 20 lần và camera sCMOS) với bộ lọc tiêu chuẩn cho các kênh DAPI và Cy3 [111, 112]. Tập hợp các tế bào trong mỗi giai

đoạn của chu kỳ tế bào (subG1, G1, S, G2/M) được xác định bằng cách phân vùng đối tượng phân tích dựa trên cường độ huỳnh quang, sau đó được phân tích bằng phần mềm Phân tích Scan<sup>R</sup> (Olympus).



**Hình 2.4.** Hệ thống ghi ảnh sáng hiển vi sàng lọc/Phân tích nội hàm cao (Olympus scan<sup>R</sup>, Heidelberg, Đức)

## 2.5. Đánh giá khả năng tăng độ tương phản ảnh cộng hưởng từ MRI

### 2.5.1. Xác định độ hồi phục $r_1$ , $r_2$

Như đã giới thiệu trong chương 1, các đại lượng thời gian đặc trưng cho 2 quá trình hồi phục T1 và T2 phụ thuộc vào môi trường xung quanh proton, do vậy phản ánh cấu trúc vi mô của mô sinh học. Các thời gian T1 và T2 chính là đại lượng thể hiện cường độ điểm ảnh MRI. Các phép đo và chụp ảnh MRI trên các mẫu PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5; PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox; PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5; PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> và Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ở các nồng độ Fe khác nhau (0; 0,02; 0,05; 0,1 và 0,2 mM) trong agarose 1%/PBS được thực hiện trên thiết bị cộng hưởng từ 7T (300WB, Bruker, Avance II, Wissembourg, Pháp).

Độ hồi phục ở 7 T của các hệ nano ở nồng độ sắt khác nhau (0,05; 0,1; 0,2 và 0,5 mM) được thực hiện bằng cách chụp chế độ T2 và T1 bằng thiết bị cộng hưởng từ 7 T (300WB, Bruker, Avance II, Wissembourg, Pháp), và được trang bị gradient được bảo vệ chủ động 200 mT/m.  $r_1$  được đo theo trình tự spin-echo biến thiên TR, còn  $r_2$  đo theo trình tự spin-echo đa tiếng vọng (multi-echo) giữ TR cố định. Sử dụng phần mềm ParaVison 5.1 để vẽ vùng quan tâm (region of interest – ROIs) và để tính các giá trị tốc độ hồi phục. Đường cong suy giảm tín hiệu được fit bởi

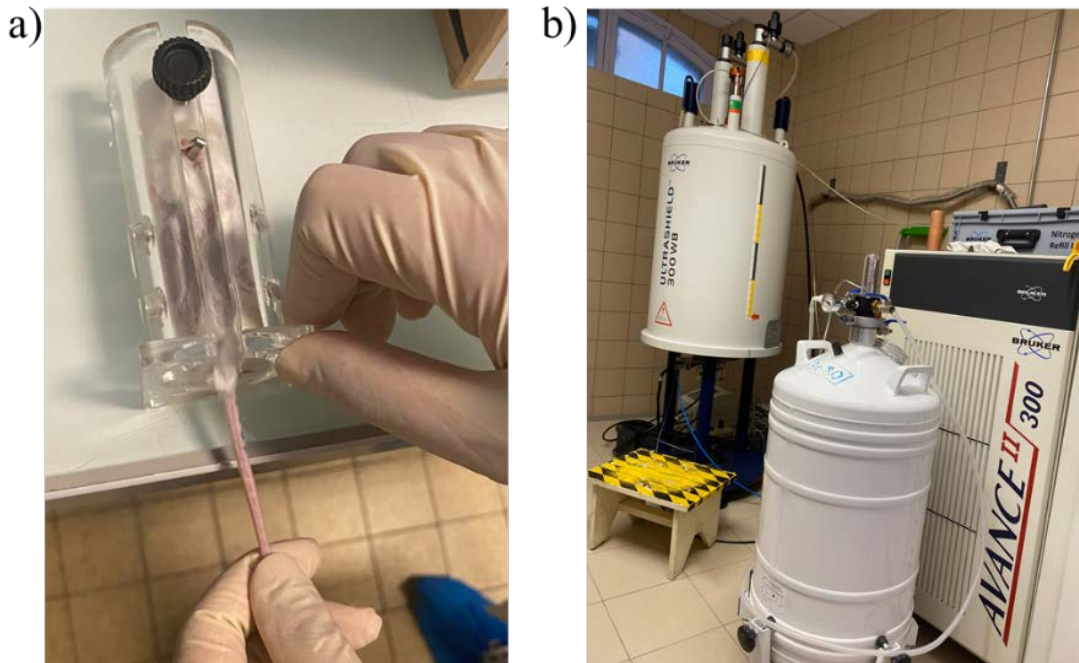
phương trình suy giảm đơn exponential để tính T2,  $y = A + Ce^{-TE/T2}$ , và phương trình đơn exponential tăng trở lại giá trị cực đại để tính T1,  $y = A + C(1 - e^{-TR/T1})$ . Hình ảnh MRI trọng T1 được thu được bằng cách sử dụng chuỗi xung phản xạ quay thông thường theo các thông số sau: TR = 800 ms, TE = 13 ms,  $\alpha = 180^\circ$ , độ dày lát cắt = 1,5 mm. Hình ảnh MRI trọng T2 thu được bằng cách sử dụng chuỗi xung phản hồi nhanh theo các thông số sau: TR = 15000 ms, TE = 99 ms,  $\alpha = 180^\circ$ , độ dày lát cắt = 1,5 mm.

Độ hồi phục  $r_1$  và  $r_2$  thu được bằng công thức sau:

$$\frac{1}{T_i} = r_y[Fe] + \frac{1}{T_{i,0}} \text{ với } i = 1 \text{ hoặc } 2 \quad (2.12)$$

### 2.5.2. Đánh giá khả năng tăng độ tương phản MRI *in vivo*

Các nghiên cứu được thực hiện trên chuột cái Balb/C (Janvier, St Genest de Lisle, Pháp) mang khối u CT26 ở mỗi bên sườn. Tất cả các thử nghiệm *in vivo* trên chuột được thực hiện theo các hướng dẫn của Đại học Paris, đã được phê duyệt bởi ủy ban đạo đức (CEEA34.JS.142.1).



**Hình 2.5.** (a) Bố trí chuột thí nghiệm; (b) thiết bị cộng hưởng từ 7T (300WB, Bruker, Avance II, Wissembourg, Cộng hòa Pháp)

Mười con chuột được gây mê bằng khí isoflurane 1,5% trong hỗn hợp không khí/O<sub>2</sub> (tương ứng 0,5 L/phút và 0,2 L/phút) và được đưa vào bên trong thiết bị cộng hưởng từ 7T (Bruker 7 T vertical MRI spectrometer) 300WB, Bruker, Avance

II, Wissembourg, Cộng hòa Pháp (Hình 2.5). Sau khi thu nhận hình ảnh MRI với chế độ chụp T2\* trước khi tiêm, chuột được đặt trong buồng giữ nhiệt và 150  $\mu$ L hệ dẫn thuốc nano đa chức năng nồng độ Fe 25,8 mM được tiêm cho năm con chuột qua tĩnh mạch mắt. Năm con chuột còn lại được sử dụng làm đối chứng. Sau 4 giờ tiêm, thu hình ảnh MRI trọng T2\*. Hình ảnh MRI chụp theo chế độ này được ghi theo chuỗi FLASH để định lượng T2 hiệu quả, với các tham số sau: TE/TR = 350/5 ms, góc lật (flip angle) 40°. Trường nhìn có kích thước 3 cm x 3 cm, kích thước ma trận 256 x 256 tương ứng với 117  $\mu$ m x 117  $\mu$ m ở độ phân giải mặt phẳng, thời gian quét khoảng 8 phút. Tất cả dữ liệu MRI được xử lý và phân tích trên máy tính được trang bị phần mềm dành riêng cho MRI (ParaVision phiên bản 5.1).

Để xử lý dữ liệu, hình ảnh MRI trọng T2\* của từng lát cắt đã được mở trong phần mềm ImageJ (Viện Y tế Quốc gia, Bethesda) bằng cách sử dụng plugin BrukerOpener. Các vùng quan tâm ROI tương ứng với khối u được xác định và thu được phân bố cường độ pixel. Sau đó, phân bố cường độ pixel cho từng lát của khối u được xử lý bằng phần mềm MATLAB (R2023a, Natick, Massachusetts, Mỹ) để có được phân bố cường độ pixel cho toàn bộ khối u. Từ đó, tỷ lệ phần trăm pixel dưới giá trị  $I_{0,25}$  đã được tính toán ( $I_{0,25} = 0,25 \times (\text{Cường độ}_{\max} - \text{Cường độ}_{\min})$ ) trên cùng phần mềm. Để so sánh khối u đối chứng, tỷ lệ phần trăm pixel dưới  $I_{0,25}$  cho từng chuột được lấy trung bình và phân tích thống kê Mann-Whitney được thực hiện bằng phần mềm Sigmaplot 15.

## **2.6. Đánh giá sự phân bố *in vivo* của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng**

### **2.6.1. Khảo sát bước sóng kích thích/phát xạ**

Hình ảnh huỳnh quang (optical imaging *in vitro*) thu được bằng thiết bị Photon IMAGER Optima (Biospace Lab, Cộng hòa Pháp) tại Khoa Dược – Trường Đại học Paris Descartes (4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris), Cộng hòa Pháp (Hình 2.6). Đây là hệ thống gồm nhiều hợp phần cho phép phát hiện không xâm lấn, định vị và định lượng tín hiệu quang từ động vật sống. Thiết bị này sử dụng công nghệ đếm photon độc đáo, cho phép ghi lại động học của các quá trình động mà không cần thiết lập thời gian thu hoặc tạo pixel trước khi chụp ảnh. Thiết bị liên tục hiển thị phân bố ánh sáng trong suốt quá trình thử nghiệm và quá trình thu thập hình ảnh có thể dừng bất cứ lúc nào để tạo ảnh. Đây là một lợi thế quan trọng nhất trong chụp

ảnh huỳnh quang. Đặc biệt, hệ rất phù hợp với các ứng dụng hình ảnh quang học *in vivo* tiên tiến và có hiệu suất cao.

Một bộ lọc kích thích/phát xạ NIR, sử dụng các bước sóng kích thích ( $\lambda_{ex}$ ) và bước sóng phát xạ ( $\lambda_{em}$ ) tương ứng với Doxorubicin ( $\lambda_{ex} = 487, 512, 537$  nm;  $\lambda_{em} = 547, 572, 597, 622$  nm), và tương ứng với Cyanine 5.5 ( $\lambda_{ex} = 637, 662, 687$  nm;  $\lambda_{em} = 697, 722, 747, 772$  nm). Hình ảnh huỳnh quang optical imaging *in vitro* được hiển thị ở chế độ “photon”; do đó, cường độ tín hiệu được xác định bằng độ bức xạ trung bình (average radiance) được tính bằng đơn vị photon trên giây trên  $cm^2$  trên steradian ( $ph/s/cm^2/sr$ ), dùng để chỉ số lượng photon trên giây phát ra trên  $1 cm^2$  của mẫu và bức xạ vào một góc đặc của một steradian (sr). Tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu (Signal to noise ratio, SNR) được xác định là tỷ lệ giữa tín hiệu trung bình từ vùng quan tâm và độ lệch chuẩn của nhiễu:

$$SNR = \frac{\mu}{\sigma} \quad (2.13)$$

trong đó  $\mu$  là giá trị trung bình của tín hiệu và  $\sigma$  là độ lệch chuẩn của nhiễu. Các bước sóng kích thích và phát xạ tối ưu (có tỷ lệ SNR và tỷ lệ tín hiệu optical imaging *in vitro* cao nhất) sẽ được sử dụng trong đánh giá hình ảnh phân bố sinh học *in vivo*.



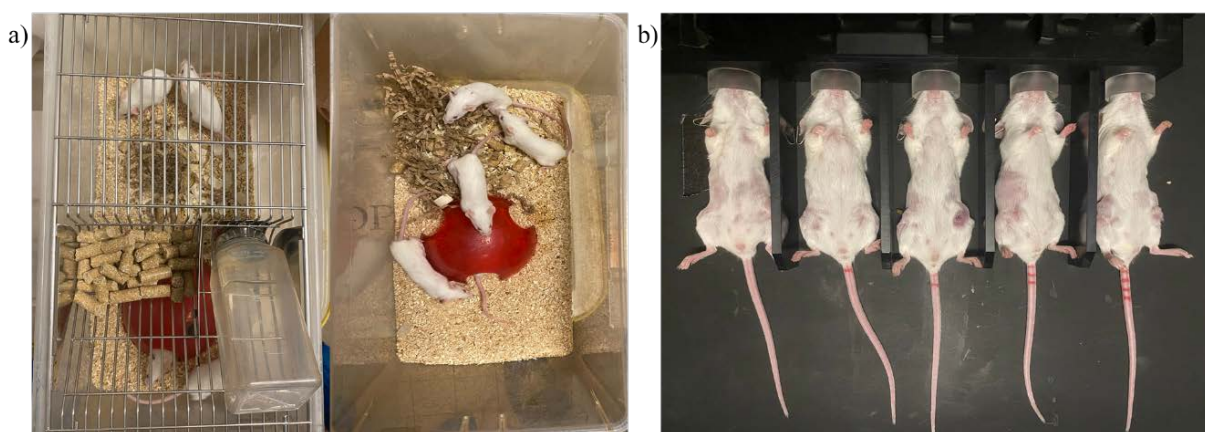
**Hình 2.6.** Thiết bị Photon IMAGER Optima, Biospace Lab, Cộng hòa Pháp

### 2.6.2. Đánh giá sự phân bố *in vivo* trên mô hình chuột gây khối u CT26

Mười con chuột sẽ được gây mê bằng hỗn hợp ketamine/xylazine (80 mg/kg /10 mg/kg), và sau đó 150  $\mu$ L của hệ nano PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox-Cyanine 5.5 với

25,8 mM Fe (tương đương 0,065 mM Cyanine 5.5) được tiêm vào cơ thể chuột thông qua tĩnh mạch mắt bằng kim 26G của năm con chuột ở nhóm điều trị. Năm con chuột nhóm đối chứng được tiêm dung dịch đệm PBS. Một điểm nén tại chỗ tiêm sẽ được thực hiện trong 10 giây để tránh chảy máu.

Tại các thời điểm cụ thể sau khi tiêm mẫu, vào 5, 15, 30 phút, 1 giờ, 3 giờ, 6 giờ và 24 giờ, chuột sẽ được gây mê bằng isoflurane (ban đầu: 2% isoflurane trong hỗn hợp không khí/oxy ở mức 1 L/phút; duy trì 0,5 - 1,5% isoflurane trong hỗn hợp không khí/oxy ở mức 1 L/phút), sau đó đặt dưới đèn (không làm nóng) trong 30 giây để đặt các ống hệ thống thiết bị. Sau đó, chuột sẽ được đặt dưới máy ảnh (trên khay sưởi, hình 2.7) và được chụp ảnh bằng máy đếm photon (Hệ thống Photon IMAGER Optima, Biospace Lab, Pháp) trong 2 phút. Cuối cùng, mỗi nhóm năm con chuột sẽ được chụp ảnh và hy sinh. Tất cả các hình ảnh được hiển thị ở cùng một tỷ lệ. Sau khi thu thập, ROI được đo để hiển thị các cường độ huỳnh quang khác nhau ở các vị trí nhận tín hiệu.



**Hình 2.7.** (a) Chuột thí nghiệm, (b) bố trí chuột trong thiết bị Photon IMAGER Optima và được gây mê trong suốt thời gian chụp ảnh huỳnh quang

## 2.7. Xác định hàm lượng Fe trong khối u và các cơ quan của chuột

Thử nghiệm đánh giá sự phân bố *in vivo* của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 được thực hiện đến 24h sau tiêm. Để đánh giá sự phân bố của hệ nano trong thời gian dài hơn, chúng tôi tiến hành đánh giá sự phân bố hàm lượng nguyên tố Fe ở vị trí khối u và các cơ quan của chuột. 12 con chuột mang khối u như trên được chia làm 2 nhóm. Nhóm điều trị (9 con chuột) được tiêm 150  $\mu$ L của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 qua đường tĩnh mạch đuôi. Sau các thời điểm 24h, 48h và 72h, chuột được mổ và tiến hành thu thập

khối u và các cơ quan: gan, lách, thận, tim, và phổi. 3 con chuột ở nhóm đối chứng cũng được mổ theo quy trình tương tự. Các mẫu nội tạng được giữ ở nhiệt độ  $-80^{\circ}\text{C}$  trong tủ đông. Thử nghiệm này được thực hiện tại Khoa Dược - Trường Đại học Paris Descartes (4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris), Cộng hòa Pháp và Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Khi tiến hành thí nghiệm, khối u và các cơ quan của chuột được rửa đông và cân trực tiếp từ ống trước khi thực hiện quá trình khoáng hóa và xác định hàm lượng nguyên tố Fe. Các mẫu được cho vào 6 mL axit nitric đậm đặc đã chưng cất (65 - 70%) trong 4 giờ ở  $80^{\circ}\text{C}$  bằng thiết bị Digiprep. Sau đó, để nguội dung dịch và pha loãng axit bằng cách thêm 44 mL nước. Sau đó, 50  $\mu\text{L}$  dung dịch được lấy và cho vào 4,95 mL nước để phân tích hàm lượng Fe bằng phương pháp phổ hấp thụ nguyên tử (Atomic Absorption Spectroscopy, AAS). Thiết bị quang phổ hấp thụ nguyên tử Agilent 240 AAS được điều chỉnh để tạo ra độ nhạy và độ ổn định tối đa trước khi phân tích.

## **2.8. Đánh giá tác dụng hóa trị bằng kỹ thuật phát quang sinh học**

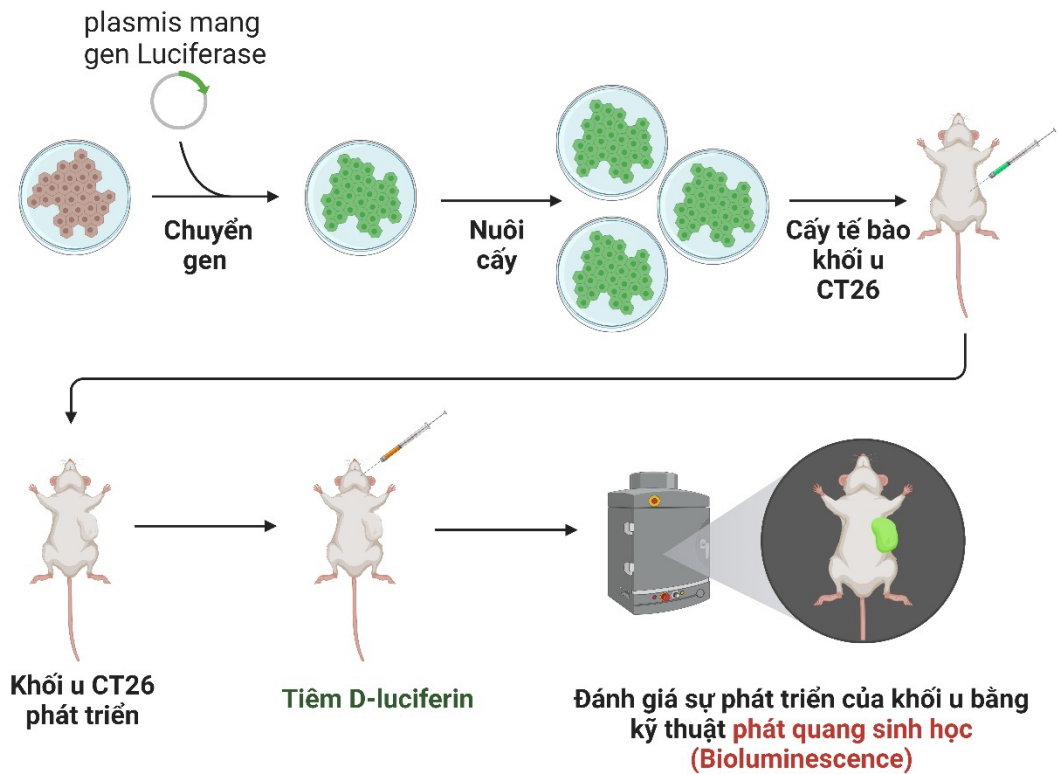
Hình ảnh phát quang sinh học (bioluminescence) trở thành phương thức hình ảnh định lượng, không xâm lấn và phản ánh hoạt tính sinh học được báo cáo bởi biểu hiện gen luciferase trong tế bào khối u. Trong luận án này, tác dụng hóa trị của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng được đánh giá qua mức độ biểu hiện gen luciferase của khối u, dựa trên nguyên lý của kỹ thuật bioluminescence.

Một con chuột mang khối u CT26-Luc dưới da để theo dõi bằng hình ảnh phát quang sinh học về sự phát triển của khối u, đã bị hy sinh 14 ngày sau khi cấy ghép. Khối u được cắt bỏ và ngâm trong môi trường nuôi cấy DMEM và cắt thành các mảnh 3  $\text{mm}^3$ . Dòng tế bào CT26 (ATCC; tiêu chuẩn LGC, Molsheim, Pháp) có nguồn gốc từ ung thư biểu mô đại tràng không phân biệt do hóa chất gây ra.

Chuột Balb-C/JRJ cái 8 tuần tuổi có trọng lượng trung bình 20 g (Janvier, Saint Genest de l'Isle, Pháp) được cấy mảnh khối u CT26 dưới da ở cả hai bên sườn. Sau khi cấy ghép, sự phát triển của khối u và trọng lượng của chuột được theo dõi hàng ngày bằng thước cặp và cân. Luciferin (D-luciferin, muối Fluoprobes  $\text{K}^+$ , Interchim) ở dạng muối kali, pha loãng trong PBS 20  $\text{mg/mL}$  được tiêm qua tĩnh mạch mắt với liều lượng 2 mg (100  $\mu\text{L}$  từ dung dịch PBS 20  $\text{mg/mL}$ ) cho mỗi con



chuột (Hình 2.8). Hình ảnh quang học được thực hiện với máy ảnh thiết bị ghép điện tích tăng cường (Charge Coupled Device, CCD) được làm mát của hệ thống Photon IMAGER Optima (Biospace Lab, Cộng hòa Pháp). Quá trình phát quang được bắt đầu 20 phút sau khi tiêm chất nền với thời gian 10 phút. Mức độ phát quang biểu thị bằng average radiance ( $\text{ph/s/cm}^2/\text{sr}$ ) được đánh giá theo vùng quan tâm (ROI) áp dụng cho vùng khối u (M3 Vision, phần mềm Biospace, Paris, Pháp) và tín hiệu tỷ lệ động học/D0. Ba nhóm chuột trải qua cùng một quy trình trước khi điều trị (tiền xử lý) và sau điều trị 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ.



**Hình 2.8.** Sơ đồ thử nghiệm phát quang sinh học trên mô hình chuột gây khối u

### 2.9. Đánh giá tác dụng nhiệt từ trị

Thử nghiệm đánh giá tác dụng nhiệt từ trị *in vivo* của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng được thực hiện trên mô hình chuột nhắt trắng Swiss mang khối u phổi Lewis. Sau khi cấy tế bào khối u 7 ngày, kích thước khối u đạt trung bình khoảng 7-10 mm đường kính. 35 con chuột mang khối u này được phân thành 7 nhóm, mỗi nhóm 5 con, được bố trí thí nghiệm như bảng 2.1.

Chuột được tiêm trực tiếp vật liệu nano vào khối u với liều 150  $\mu\text{L}$ /con. Sau đó, 40 phút tiến hành thử nghiệm nhiệt từ trị để đảm bảo độ phân tán hạt trong khối u. Chiếu từ trường (4 lần, mỗi lần cách nhau 72 giờ) trên hệ RDO, model HFI (Viện Khoa học vật liệu) với cường độ 150 Oe, tần số 450 kHz trong thời gian 30 phút

(Hình 2.9). Cân nặng, kích thước, hình ảnh khối u được ghi lại ngay trước khi điều trị, nhằm đánh giá ảnh hưởng của nhiệt từ trị lên sự phát triển của khối u cũng như thể trạng chuột.

**Bảng 2.1.** Bố trí thí nghiệm nhiệt từ trị trên chuột mang khối u phổi Lewis

STT	Nhóm thử nghiệm	Loại vật liệu nano được tiêm	Điều kiện chiếu từ trường
1.	Đối chứng (-)	Dung dịch đệm PBS	Không
2.	Đối chứng (+)	Doxorubicin tự do	Không
3.	Thử nghiệm	PLA-TPGS- Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Có
4.	Thử nghiệm	PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Cyanine 5.5	Không
5.	Thử nghiệm	PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Cyanine 5.5	Có
6.	Thử nghiệm	PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Dox-Cyanine 5.5	Không
7.	Thử nghiệm	PLA-TPGS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Dox-Cyanine 5.5	Có



**Hình 2.9.** Bố trí thí nghiệm nhiệt từ trị *in vivo* trên thiết bị RDO, model HFI

Thể tích khối u được tính theo công thức chuẩn sau:

$$\text{Thể tích khối } u = \frac{\text{chiều dài} \times \text{chiều rộng}^2}{2} \quad (2.14)$$

## 2.10. Phương pháp xử lí số liệu

Số liệu được xử lí bằng các phần mềm Excel 2023, OriginPro 9, Sigma Plot 15. Các sai khác được đánh giá thông qua so sánh độ lệch chuẩn của giá trị trung bình. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi giá trị  $p < 0,05$ .

## Tóm tắt chương 2

Trong chương này, chúng tôi đã trình bày các phương pháp thực nghiệm trong việc tổng hợp copolyme PLA-TPGS, chế tạo hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bằng phương pháp đồng kết tủa trong điều kiện vi sóng, và hệ dẫn thuốc nano đa chức năng gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần Cyanine 5.5. Các phương pháp đặc trưng tính chất hóa lý, sinh học, thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* cũng đã được trình bày. Các thiết bị sử dụng trong luận án là các thiết bị hiện đại có độ chính xác và độ tin cậy cao. Đa số các phép đo đạc và phân tích được tiến hành trên các thiết bị tại Viện khoa học vật liệu, và các Viện nghiên cứu trực thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, như: Viện Kỹ thuật nhiệt đới, Viện Hóa học, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên,... Ngoài ra, các thử nghiệm *in vivo* đánh giá khả năng tăng độ tương phản ảnh cộng hưởng từ MRI, khả năng phân bố sinh học và tác dụng hóa trị dựa trên kỹ thuật huỳnh quang hồng ngoại gần được thực hiện tại Trường Đại học Chimie ParisTech (Université PSL - CNRS UMR 8060) và Khoa Dược – Trường Đại học Paris Descartes (4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris), Cộng hòa Pháp. Các kết quả thực nghiệm sẽ được phân tích và bàn luận trong các chương 3, chương 4 và chương 5.

### CHƯƠNG 3. HỆ DẪN THUỐC NANO ĐA CHỨC NĂNG PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOXORUBICIN

Trong chương này, chúng tôi chế tạo hệ nano đa chức năng mang đồng thời hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> và thuốc Doxorubicin trên cơ sở copolyme PLA-TPGS có tỷ lệ PLA:TPGS = 1 : 1 (w/w) (kế thừa từ các kết quả nghiên cứu trước đây [42]). Trong đó, hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> được chế tạo bằng phương pháp đồng kết tủa trong điều kiện vi sóng. Các tỷ lệ w/w giữa Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> và Doxorubicin được khảo sát về mặt vật liệu, hiệu suất nano hóa thuốc và khả năng gây độc tế bào ung thư. Quá trình giải phóng thuốc Doxorubicin được xác định ở các điều kiện pH khác nhau, và xác định cơ chế giải phóng thuốc từ hệ nano mixen bằng các mô hình động học. Hơn nữa, cơ chế gây độc tế bào ung thư của hệ nano này được xác định bằng kỹ thuật sàng lọc nội hàm cao (High-content screening, HCS).

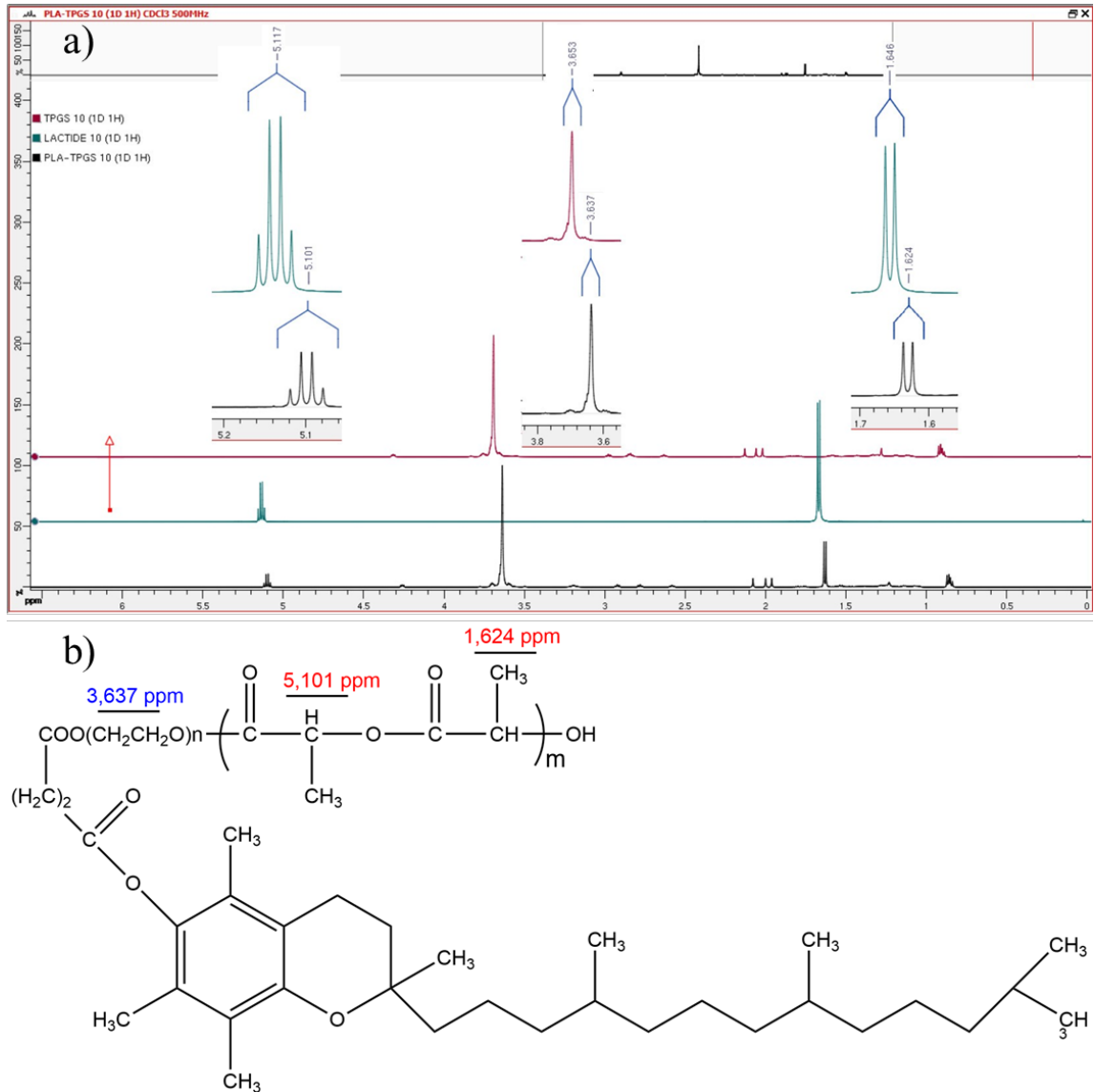
#### 3.1. Tổng hợp copolyme PLA-TPGS

Trong nghiên cứu này, copolyme PLA-TPGS được tổng hợp bằng phương pháp đồng trùng hợp cộng mở vòng trong toluen, sử dụng thiếc octoate làm chất xúc tác. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (<sup>1</sup>H-NMR) và phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) được sử dụng để phân tích cấu trúc của copolyme PLA-TPGS tổng hợp.

Hình 3.1a là phổ cộng hưởng từ hạt nhân <sup>1</sup>H-NMR trong CDCl<sub>3</sub> của copolyme PLA-TPGS. Các tín hiệu ở 5,117 và 1,646 ppm lần lượt tương ứng với các proton -CH và proton methyl -CH<sub>3</sub> của monome lactide. Tín hiệu ở 3,653 ppm trong phổ TPGS của proton -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. Ba vân phổ này tương ứng dịch chuyển sang 5,101; 1,624 và 3,637 ppm trong phổ của copolyme PLA-TPGS. Kết quả này cho thấy copolyme PLA-TPGS đã được tổng hợp và tinh chế thành công. Cấu trúc phân tử của copolyme PLA-TPGS được trình bày trong hình 3.1b. Khối lượng phân tử của PLA-TPGS được ước tính bằng cách sử dụng tỷ số diện tích giữa pic 5,101 ppm và 3,637 ppm. Khối lượng phân tử trung bình của copolyme PLA-TPGS có tỷ lệ khối lượng TPGS 12,3 % được xác định là 13.000. Kết quả này cũng phù hợp với các báo cáo trước đây về phổ <sup>1</sup>H-NMR của copolyme PLA-TPGS [41, 105].

Trong quá trình tổng hợp copolyme PLA-TPGS, đầu hydroxyl của TPGS đóng vai trò là chất khởi đầu để phân cắt có chọn lọc chuỗi acyl-oxy của lactide nhờ chất xúc tác Sn(Oct)<sub>2</sub>. Sự phối hợp này làm tăng electrophile của nhóm cacbonyl của

lactide, làm cho liên kết acyloxy (R-COO-) của lactide dễ bị phá vỡ hơn và cấu trúc tuần hoàn của lactide dễ bị mở hơn. Do sự hình thành của nhóm hydroxyl mới, Sn(Oct)<sub>2</sub> có thể tiếp tục phản ứng với một monome lactide mới khác, làm tăng độ dài chuỗi PLA của copolymer PLA-TPGS [41, 105][113].

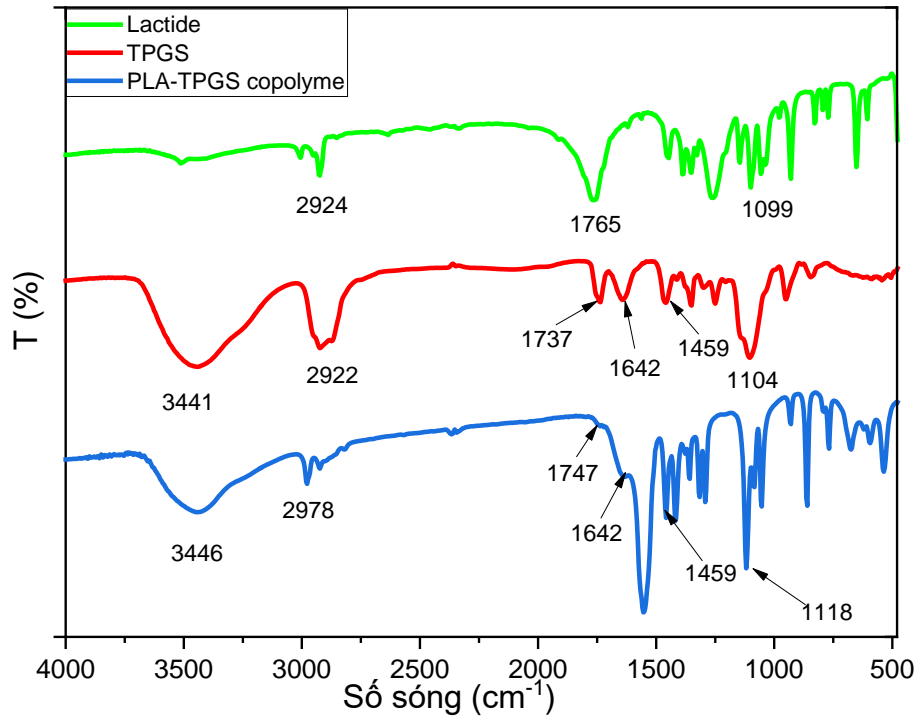


**Hình 3.1.** (a) Phổ <sup>1</sup>H-NMR của lactide, TPGS và copolymer PLA-TPGS; (b) cấu trúc phân tử của copolymer PLA-TPGS

Các dao động điển hình của các nhóm chức trong các thành phần lactide và TPGS cũng xuất hiện trong phổ FTIR của copolymer PLA-TPGS với một số dịch chuyển, được trình bày ở hình 3.2 và bảng 3.1. Trong phổ FTIR của copolymer PLA-TPGS, tất cả các dao động đặc trưng của các nhóm chức trong lactide và TPGS đều xuất hiện với một số dịch chuyển.

**Bảng 3.1.** Các nhóm chức đặc trưng của lactide, TPGS và copolyme PLA-TPGS

Nhóm chức	Số sóng ( $\text{cm}^{-1}$ )		
	Lactide	TPGS	Copolyme PLA-TPGS
-C=O este	1765	1737	1747
C=C trong vòng benzen	1642		1642
C-C trong vòng benzen	1459		1459
C-H ( $\text{sp}^3$ )	2924	2922	2978
-OH		3441	3446
C-O-C	1099	1104	1118

**Hình 3.2.** Phổ hồng ngoại FTIR của lactide, TPGS và copolyme PLA-TPGS

Cụ thể, pic dao động đặc trưng của nhóm carbonyl (dao động hóa trị -C=O este) của lactide và TPGS xuất hiện lần lượt ở  $1765$  và  $1737 \text{ cm}^{-1}$  trong khi pic này dịch chuyển đến  $1747 \text{ cm}^{-1}$  trong phổ FTIR của copolyme PLA-TPGS. Ngoài ra, các pic đặc trưng của TPGS ở  $1642 \text{ cm}^{-1}$  (dao động hóa trị C=C trong vòng benzen) và  $1459 \text{ cm}^{-1}$  (dao động hóa trị C-C trong vòng benzen) cũng xuất hiện trong phổ của copolyme tổng hợp được. Pic trung bình ở  $2978 \text{ cm}^{-1}$  thuộc về dao động hóa trị của C-H ( $\text{sp}^3$ ) của copolyme PLA-TPGS, so với các dải hóa trị của lactide và của TPGS lần lượt được quan sát thấy ở  $2924$  và  $2922 \text{ cm}^{-1}$ . Đối với copolyme tổng hợp

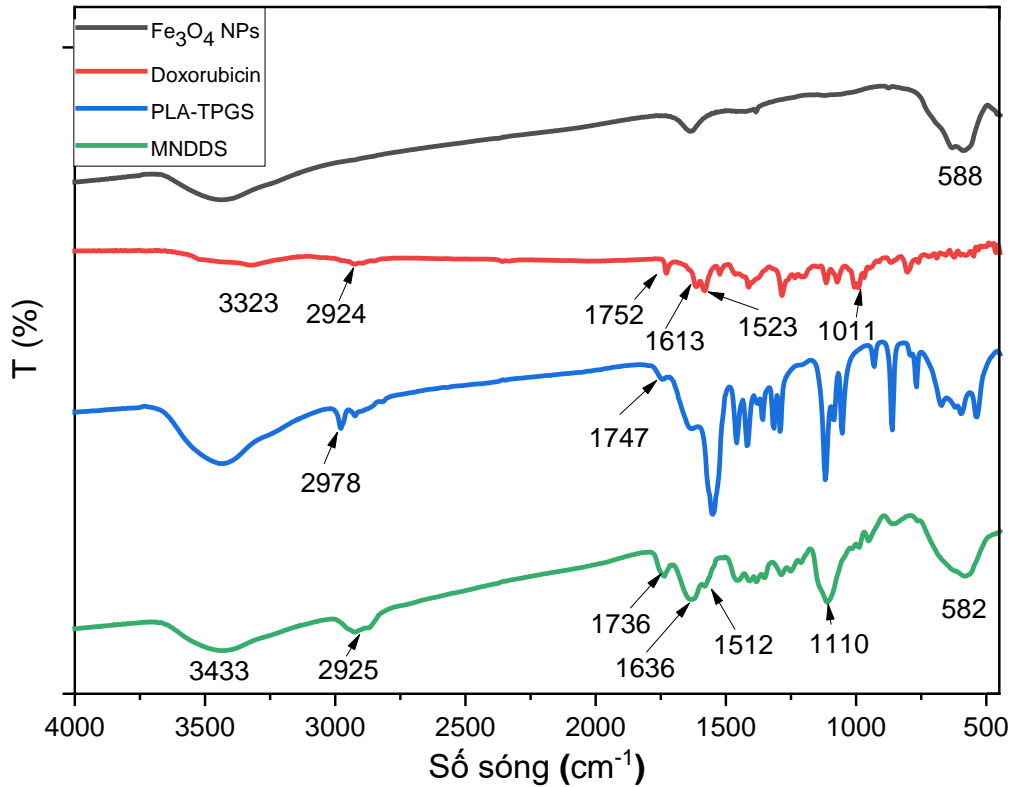
được, pic mạnh ở  $3446\text{ cm}^{-1}$  được cho là do sự hiện diện của dao động hóa trị -OH, trong khi dải hấp thụ này cũng xuất hiện ở  $3441\text{ cm}^{-1}$  trong phổ TPGS. Ngoài ra, các pic đặc trưng do dao động hoá trị C-O-C không đối xứng của lactide ở  $1099\text{ cm}^{-1}$  và của TPGS ở  $1104\text{ cm}^{-1}$  đã dịch chuyển sang  $1118\text{ cm}^{-1}$ . Những sự dịch chuyển này đã xác nhận sự hình thành copolyme PLA-TPGS.

### 3.2. Chế tạo hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin

Sau khi tổng hợp, copolyme PLA-TPGS được sử dụng để mang đồng thời hạt nano oxit sắt từ (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs) và Doxorubicin (Dox) để chế tạo hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin (MNDDS). Bảng 3.2 và hình 3.3 cho thấy một số thay đổi nhỏ của các pic điển hình trong phổ hồng ngoại FTIR của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng MNDDS so với các chất thành phần. Cụ thể, dao động của liên kết Fe-O ở  $588\text{ cm}^{-1}$  trong Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs chuyển sang  $582\text{ cm}^{-1}$  trong MNDDS. Dao động hóa trị của nhóm -CH đã dịch chuyển từ  $2978\text{ cm}^{-1}$  trong PLA-TPGS sang  $2925\text{ cm}^{-1}$  trong MNDDS. Trong khi đó, dao động hóa trị -C=O ester ở  $1736\text{ cm}^{-1}$  trong MNDDS có nguồn gốc từ liên kết tương ứng ở  $1747\text{ cm}^{-1}$  trong PLA-TPGS và  $1752\text{ cm}^{-1}$  trong Dox. Những dịch chuyển này cho thấy sự hình thành các hạt nano MNDDS, đồng thời chứng minh rằng Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs và Doxorubicin đã được nano hoá trong hệ đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin.

**Bảng 3.2.** Các nhóm chức đặc trưng của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng (MNDDS) và các chất thành phần

Nhóm chức	Số sóng ( $\text{cm}^{-1}$ )			
	Doxorubicin	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs	PLA-TPGS	MNDDS
-OH	3323			3433
-CH	2924		2978	2925
-C=O	1728		1747	1736
C=C	1613			1636
-NH	1523			1512
C-O-C	1011			1110
Fe-O		588		582



**Hình 3.3.** Phổ hồng ngoại FTIR của Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs, Doxorubicin, copolyme PLA-TPGS, và hệ nano MNDDS

Trong chương này, hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin được chế tạo mang cả thuốc điều trị ung thư Doxorubicin và hạt nano oxit sắt từ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Đầu tiên, tỉ lệ w/w của Dox : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs được khảo sát khi mang trên hệ dẫn thuốc nano đa chức năng bằng copolyme PLA-TPGS. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của tỷ lệ Dox: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs (thay đổi từ 1:5 đến 2:1) đến kích thước hạt, thế Zeta, chỉ số đa phân tán PDI, khả năng mang thuốc Dox và hiệu suất nano hoá thuốc Dox của các hệ nano được đánh giá (Bảng 3.3). Các hệ nano đã chế tạo tương đối ổn định với thế Zeta có điện thế âm, nằm trong khoảng -22,6 mV đến -41,1 mV. Giá trị tuyệt đối của thế Zeta tăng lên một chút với lượng Dox thấp hơn. Khi các hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> được phủ bằng copolyme lưỡng tính của PLA-TPGS, đầu kỵ nước PLA tương tác với lõi và đầu ưa nước TPGS hướng ra ngoài, dẫn đến khả năng hòa tan tốt trong nước và làm cho chất lỏng nano ổn định [114]. Dung dịch đệm PBS, một môi trường chứa huyết thanh điển hình, làm cho điện thế zeta trở nên ít âm hơn (khoảng -28,4 mV đối với hệ MNDDS4 và -17,5 mV đối với hệ MNDDS1). Khi các hạt nano được phân tán trong dung dịch đệm PBS, sự thay đổi giá trị thế Zeta của hệ là do nồng độ và cường độ ion của chất điện li trong môi



trường PBS chứa dung dịch đệm photphat 0,01M, kali clorua 0,0027M và natri clorua 0,137M [115]. Hơn nữa, giá trị PDI của các mẫu này nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,5 cho thấy độ đồng đều về kích thước hạt.

**Bảng 3.3.** Khảo sát tỷ lệ Dox : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs (w/w) (n=3, mean ± SD)

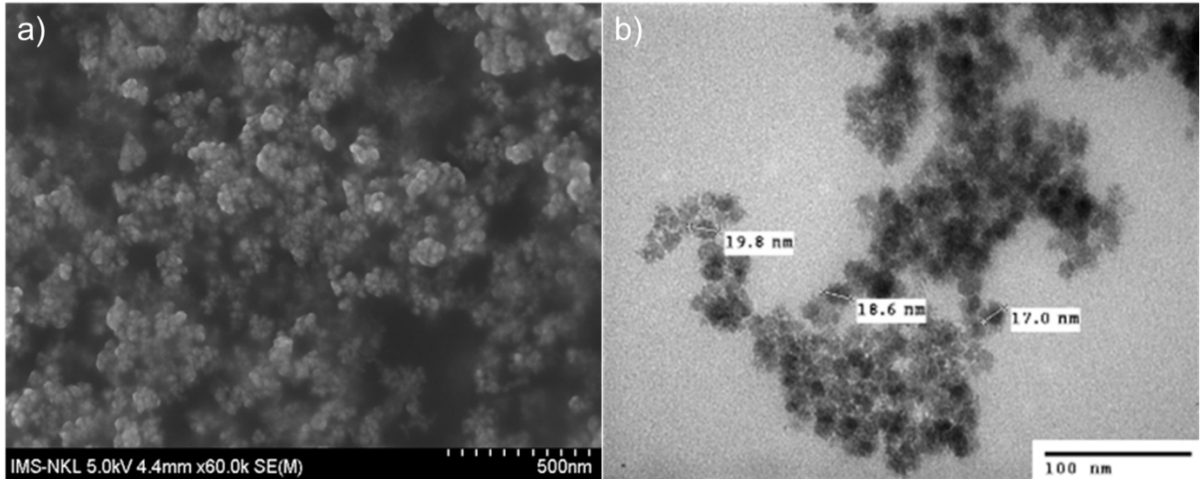
Ký hiệu mẫu	Tỷ lệ Dox : Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs (w/w)	Kích thước thủy động (nm)	Polydispersity index (PDI)	Thế Zeta trong nước cất (mV)	Thế Zeta trong đệm PBS (mV)	Khả năng mang thuốc Dox (%)	Hiệu suất nano hoá (%)
MNDDS1	1 : 5	217,5 ± 4,8	0,19 ± 0,01	-28,7 ± 0,9	-17,5 ± 1,1	7,97 ± 0,33	86,49 ± 0,36
MNDDS2	2 : 5	172,3 ± 2,0	0,41 ± 0,04	-22,6 ± 1,0	-19,3 ± 0,8	13,44 ± 0,38	77,67 ± 0,90
MNDDS3	1 : 2	167,6 ± 2,6	0,39 ± 0,01	-29,6 ± 1,3	-21,1 ± 1,5	18,13 ± 0,78	88,64 ± 0,45
MNDDS4	1 : 1	147,5 ± 1,2	0,15 ± 0,01	-41,1 ± 0,9	-28,4 ± 1,3	31,28 ± 1,64	91,05 ± 0,85
MNDDS5	2 : 1	288,7 ± 1,2	0,37 ± 0,005	-30,8 ± 1,3	-23,9 ± 1,4	44,29 ± 1,03	79,52 ± 1,36

Đáng chú ý, kích thước hạt được điều chỉnh dễ dàng bằng cách thay đổi tỷ lệ w/w của Dox: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs. Tất cả các hệ nano MNDDS trong nghiên cứu này đều có kích thước thủy động nhỏ nằm trong phạm vi kích thước lý tưởng cho hệ thống phân phối thuốc nano (150 nm đến 300 nm) [116]. Do đó, các hạt nano MNDDS cho thấy triển vọng làm tăng tác dụng dược lý của Doxorubicin thông qua cơ chế hướng đích thụ động. Nguyên nhân là do mạch máu của khối u thường có các khe nang tương đối lớn với đường kính khoảng 0,1-2 μm, dẫn đến tính thấm thành mạch cao hơn đáng kể đối với các hạt nano có kích thước hạt trong phạm vi này thông qua hiệu ứng tăng tính thấm và lưu trữ (EPR) [117]. Những kết quả này cũng phù hợp với một nghiên cứu khác về copolyme PLGA-PEG chứa hạt nano Dox và Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [118]. Ngoài ra, hiệu suất nano hoá thuốc Doxorubicin cao nhất trên 91% đạt được ở tỷ lệ Dox : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs w/w = 1:1. Đồng thời, hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin với tỉ lệ Dox : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs w/w = 1:1 (hệ MNDDS4) có thế Zeta cao hơn, kích thước nhỏ hơn và chỉ số PDI thấp nhất. Do đó, tỉ lệ Dox : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs = 1:1 w/w được sử dụng trong một số nghiên cứu tiếp theo.

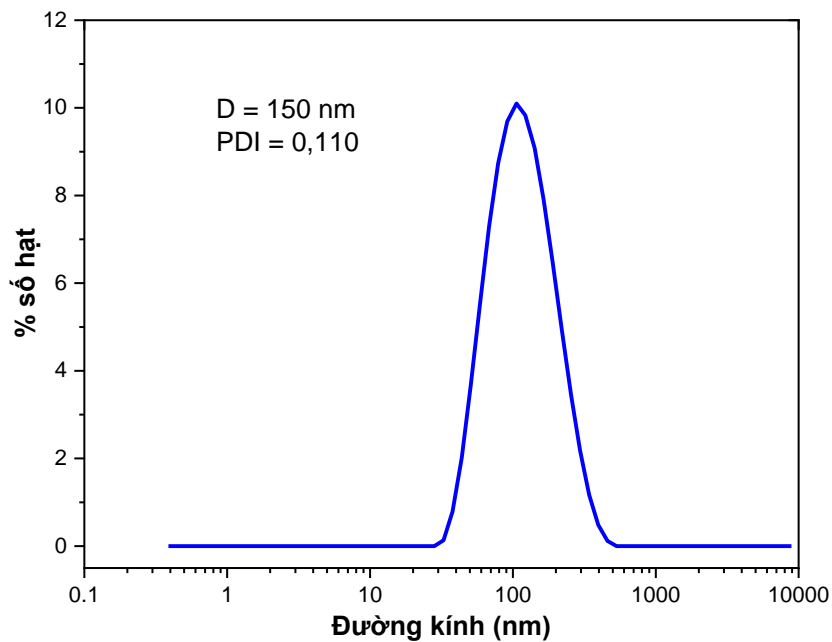
### 3.3. Đặc trưng tính chất lý, hóa

Hình thái và kích thước hạt của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin MNDDS4 được thể hiện trên ảnh hiển vi điện tử quét phát xạ trường (FESEM), các tiểu phân nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin có dạng hình cầu với đường kính

đều khoảng 20 nm (Hình 3.4a). Trên hình ảnh hiển vi điện tử truyền qua (TEM), hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Doxorubicin có dạng hình cầu ở phạm vi kích thước từ 17,0 đến 19,8 nm (Hình 3.4b).



**Hình 3.4.** Ảnh (a) FESEM; (b) TEM của hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Doxorubicin

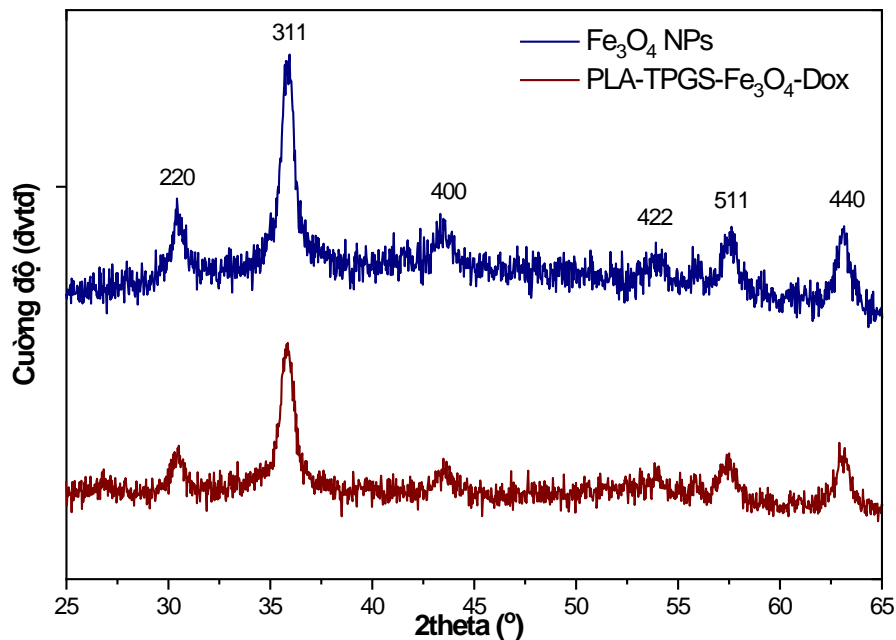


**Hình 3.5.** Phân bố kích thước của hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Doxorubicin

Trong khi đó, kết quả phân bố kích thước động trong môi trường nước (DLS) chỉ ra rằng kích thước hạt trung bình của hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Doxorubicin là 150 nm (Hình 3.5). Sự khác biệt về kích thước hạt đo bằng phương pháp DLS và TEM là do chuỗi PEG ưa nước của copolyme PLA-TPGS trên bề mặt hạt nano. Chuỗi PEG có thể duỗi ra và kéo dài trong môi trường nước. Do đó, cấu trúc lưỡng tính đặc biệt của PLA-TPGS làm tăng đường kính thủy động lực học (kích thước

DLS) do tính linh hoạt của đầu PEG [119]. Tương tự, kết quả TEM kết hợp với dữ liệu FTIR cho thấy các hạt nano oxit sắt từ ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs) được bao bọc trong lõi kỵ nước của các mixen PLA-TPGS bằng cách sắp xếp lại copolyme trong nước do tính chất kỵ nước của chúng [120, 121].

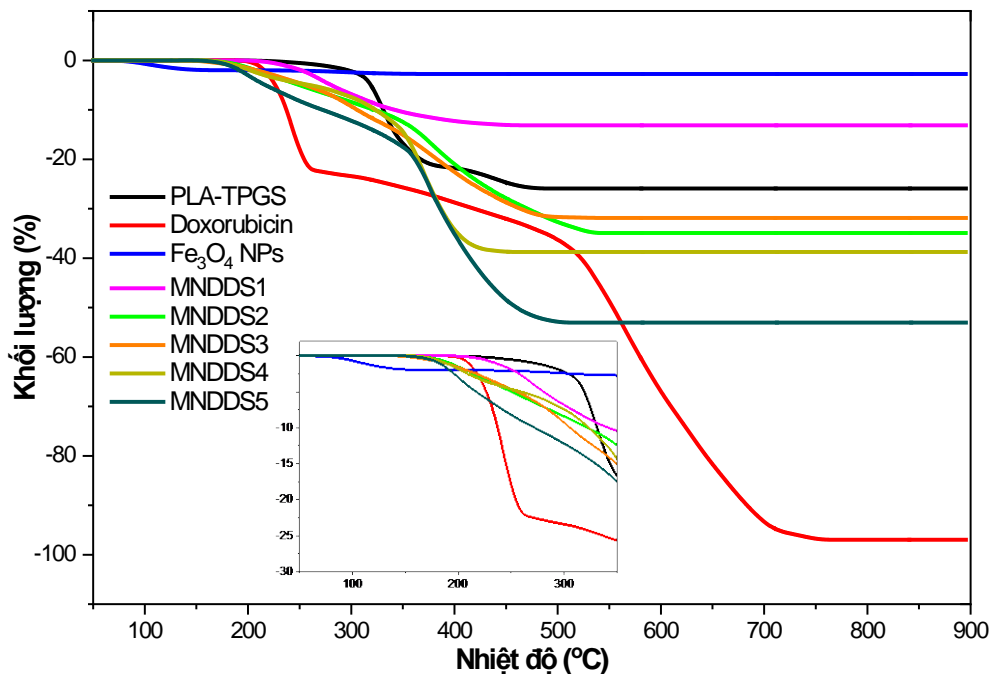
Các đỉnh nhiễu xạ tia X (XRD) (Hình 3.6) đối với  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs xuất hiện ở  $2\theta = 30,74^\circ$ ,  $35,86^\circ$ ,  $43,38^\circ$ ,  $54,04^\circ$ ,  $57,3^\circ$  và  $63,02^\circ$ , phù hợp với các mặt phẳng (220), (311), (400), (422), (511) và (440) đặc trưng cho cấu trúc Spinel đơn pha của hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [122]. Sự có mặt của copolyme PLA-TPGS và Doxorubicin trong hệ nano MNDDS chỉ làm giảm cường độ của các đỉnh nhiễu xạ chứ không làm thay đổi vị trí của các đỉnh nhiễu xạ so với các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Do đó,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs trong hệ nano MNDDS vẫn giữ nguyên cấu trúc tinh thể của chúng trong quá trình nano hoá.



**Hình 3.6.** Giảm độ nhiễu xạ tia X của hạt nano oxit sắt từ và hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Doxorubicin

Kích thước tinh thể trung bình của  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs và hệ nano MNDDS được tính toán thông qua công thức Scherrer [123] lần lượt là khoảng 11,55 nm và 10,72 nm. Các nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  được phủ hoặc chức năng hóa bề mặt bằng polyme/ copolyme như chitosan có kích thước tinh thể nhỏ hơn so với loại không bọc polyme [124].

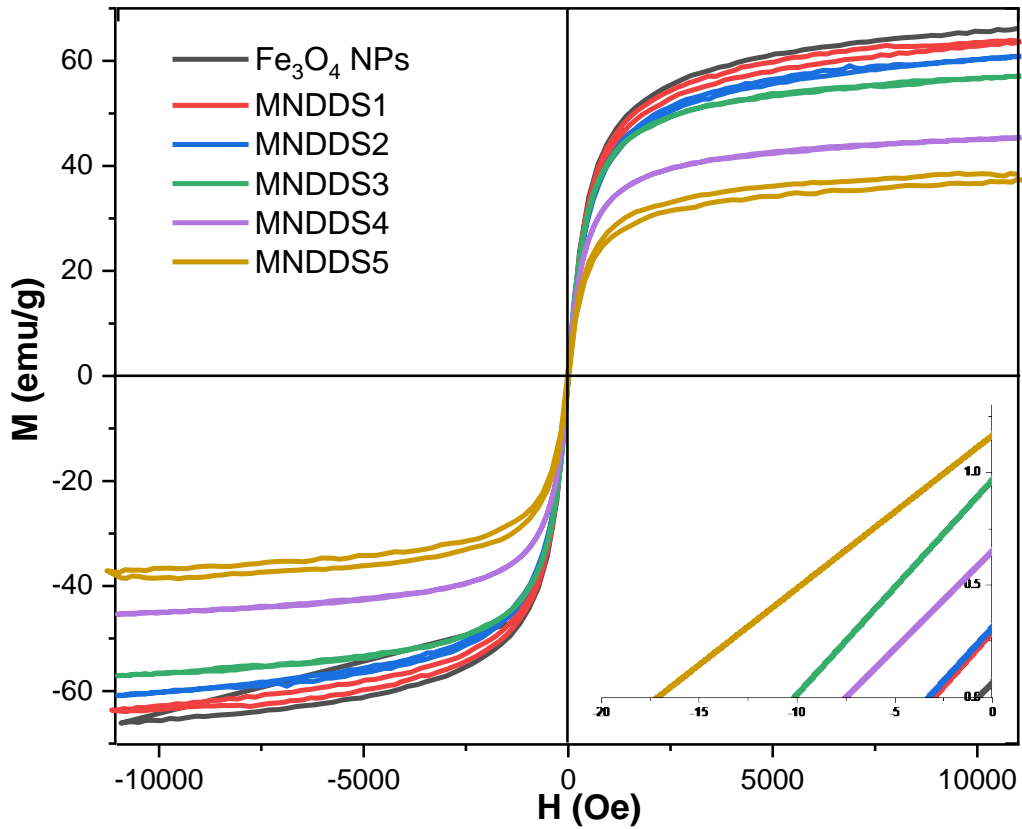
Phân tích nhiệt - khối lượng (TGA) của copolyme PLA-TPGS, Doxorubicin,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs và hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Doxorubicin (MNDDS) ở các tỉ lệ w/w Dox :  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs khác nhau đã được thực hiện để nghiên cứu sự thay đổi khối lượng của các mẫu khi được gia nhiệt trong môi trường trơ (Hình 3.7). Trên giản đồ TGA của mẫu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs, chỉ quan sát thấy một giai đoạn giảm khối lượng ở khoảng 105 °C, điều này có thể được giải thích là do sự hiện diện của nước trong mẫu (khoảng 2,00 %). Điều này chứng tỏ hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  tổng hợp được có độ tinh khiết cao. Ngược lại, Doxorubicin bị phân hủy hoàn toàn sau khi gia nhiệt đến 750 °C với hai giai đoạn giảm khối lượng ở 241 °C và 565,89 °C. Ngoài ra, copolyme PLA-TPGS có sự giảm khối lượng lớn ở 331,83 °C (khoảng 21,68 %). Tuy nhiên, khoảng 75 % PLA-TPGS không bị phân hủy khi nhiệt độ lên tới 450 °C. Kết quả này cho thấy hầu hết copolyme PLA-TPGS không chuyển sang trạng thái hơi và bị than hóa trong quá trình gia nhiệt [32].



**Hình 3.7.** Giản đồ phân tích nhiệt của copolyme PLA-TPGS, Doxorubicin,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs và hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Doxorubicin

Tất cả các hệ nano MNDDS đều bị phân hủy ở nhiệt độ cao hơn so với Doxorubicin tự do. Sự giảm khối lượng quan sát được trong các hệ nano MNDDS có thể là do sự phân hủy nhiệt của cả copolyme PLA-TPGS và thuốc Doxorubicin. So sánh giữa các tỉ lệ w/w Dox :  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs khác nhau, mức giảm khối lượng của các pha hữu cơ trong các hệ nano MNDDS phù hợp với lượng Doxorubicin được

nano hoá tăng dần trong các hệ nano từ MNDDS1 đến MNDDS5. Giai đoạn giảm khối lượng ở khoảng 600 °C của Dox không xuất hiện trong giản đồ TGA của hệ nano MNDDS. Điều này có thể được giải thích bởi thực tế là Doxorubicin được phân bố ở nhiều vị trí khác nhau trong hệ nano MNDDS nên khi gia nhiệt, không thể tạo thành các tinh thể lớn hơn và bị phân hủy ở nhiệt độ cao hơn như trong Doxorubicin tự do [125]. Do đó, sự xuất hiện của Doxorubicin, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs và copolyme PLA-TPGS trong sản phẩm cuối cùng đã được xác nhận thêm từ các nghiên cứu phân tích nhiệt TGA.



**Hình 3.8.** Đường cong từ hóa của Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs và các hệ nano MNDDS

Từ độ bão hòa ( $M_s$ ) của Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs và hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin (MNDDS) được xác định từ -11 kOe đến 11 kOe (Hình 3.8). Từ độ bão hòa ở 11 kOe của Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs là 66,1 emu/g. Từ độ của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin khi tăng tỷ lệ w/w Dox : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs đã giảm dần so với Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs do ảnh hưởng của copolyme PLA-TPGS bao bọc Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs và phân tử thuốc Doxorubicin khi được nano hoá đồng thời trên hệ nano. Nguyên nhân của hiện tượng này là do trên một đơn vị khối lượng, thành phần phi từ càng lớn (khi tăng tỷ

lệ w/w Dox : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs), dẫn đến giá trị  $M_s$  giảm. Kết quả này tương tự như một số công bố trước đây [126, 127]. Mặc dù vậy, các giá trị lực kháng từ ( $H_c$ ) của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin có giá trị nhỏ, nằm trong khoảng từ 2,7 đến 17 Oe, cho thấy hệ nano gần như có đặc tính siêu thuận từ tương tự như Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs ở nhiệt độ phòng (Bảng 3.4). Những kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây [128] và phân tích nhiệt - khối lượng TGA ở trên. Một nghiên cứu khác của Liu và cộng sự cũng thu được kết quả tương tự khi bọc các hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> bằng polyme methoxy poly (ethylene glycol) (mPEG) [129]. So với hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, giá trị từ độ bão hòa  $M_s$  của hệ nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-mPEG giảm từ 57 emu/g xuống 46 emu/g. Điều này được giải thích là do polyme là chất không từ tính, như vậy tổng momen từ trên một đơn vị khối lượng giảm dần đến giảm từ độ.

**Bảng 3.4.** Giá trị từ độ bão hòa ( $M_s$ ) và lực kháng từ ( $H_c$ ) của Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs và các hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin (MNDDS)

	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs	MNDDS1	MNDDS2	MNDDS3	MNDDS4	MNDDS5
$M_s$ (emu/g)	66,1	63,8	60,8	57,1	45,3	38,4
$H_c$ (Oe)	0	2,7	3	10	7,5	17

Hơn nữa, có thể thấy khi tỷ lệ w/w Dox : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs tăng thì tốc độ hấp thụ riêng SAR của các hệ nano MNDDS cũng tăng dần (Bảng 3.5). Về lý thuyết, giá trị SAR phụ thuộc vào nhiều yếu tố: cường độ (H) và tần số (f) từ trường, từ độ bão hòa ( $M_s$ ), nồng độ hạt từ và kích thước hạt [130]. Đối với các hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, kích thước tối ưu theo lý thuyết để giá trị SAR đạt cực đại nằm trong khoảng 17 đến 19 nm [131]. Do vậy, nguyên nhân của hiện tượng giá trị SAR tăng dần khi tăng tỷ lệ w/w Dox : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs, có thể do kích thước của các hệ này đạt tới vùng kích thước tối ưu. Đồng thời, các hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin có giá trị công suất tổn hao nội tại ILP nằm trong khoảng từ 2,69 nHm<sup>2</sup>/kg đến 3,37 nHm<sup>2</sup>/kg, lớn hơn so với các chất lỏng nano từ dạng thanh được phủ polyme khác, các giá trị ILP nằm trong khoảng từ 0,24 đến 1,12 nHm<sup>2</sup>/kg [132].

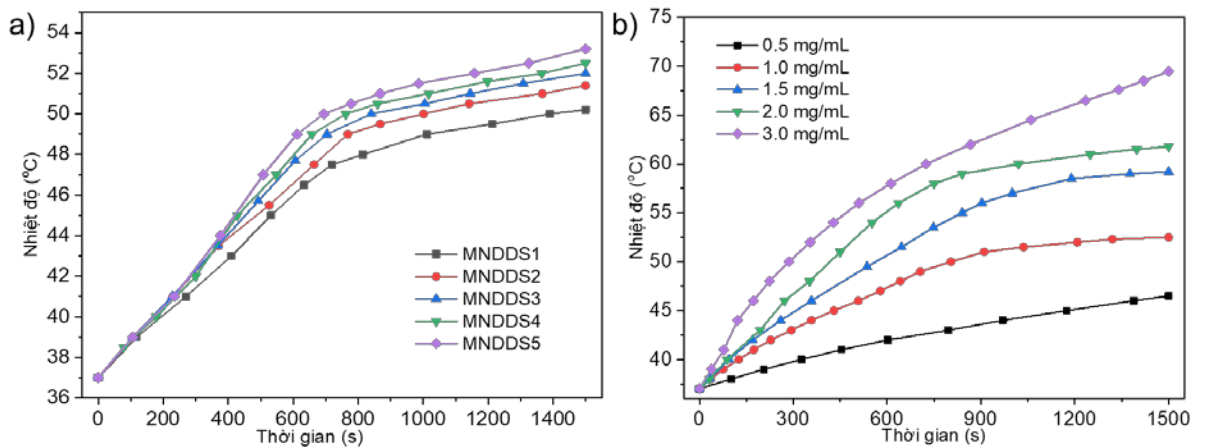
Ngoài ra, giá trị  $T_{max}$  ở 1500s của 5 hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin ở các tỉ lệ w/w Dox : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs khác nhau đều đạt > 50 °C dưới tác dụng của từ trường ngoài ở cường độ 100 Oe, tần số 340 kHz (Hình 3.9a). Kết quả này cho thấy

khả năng sinh nhiệt tốt trong điều trị ung thư. Tế bào khối u thường có độ nhạy nhiệt cao hơn tế bào bình thường, khi tăng nhiệt lên khoảng 43°C đã dẫn đến tổn thương tế bào khối u [133]. Điều này một lần nữa cho thấy tiềm năng của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin ứng dụng trong nhiệt trị.

**Bảng 3.5.** Thông số đốt nóng cảm ứng từ của các hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin

	MNDDS1	MNDDS2	MNDDS3	MNDDS4	MNDDS5	MNDDS4				
Nồng độ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (mg/mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0
T <sub>1500s</sub> (°C)	50,2	51,4	52,0	52,5	53,2	46,5	52,5	59,2	61,8	69,5
dT/dt (°C/s)	0,0139	0,0145	0,0150	0,0170	0,0175	0,0087	0,0170	0,0254	0,0282	0,0375
SAR (W/g)	57,9	60,53	62,53	71,06	72,98	72,73	71,06	70,78	59,04	52,25
ILP (nHm <sup>2</sup> /kg)	2,69	2,81	2,90	3,30	3,39	3,37	3,30	3,28	2,74	2,42

Xét về sự phụ thuộc nồng độ, giá trị tốc độ hấp thụ riêng SAR của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin giảm khi nồng độ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> tăng từ 0,5 lên 3,0 mg/mL (Hình 3.9b). Trong nghiên cứu trước đây, hệ nano dựa trên các hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> mang thuốc Doxorubicin và được bọc polyme alginate cho thấy sự thay đổi tương tự trong kết quả SAR [134]. Hiện tượng giá trị SAR giảm khi tăng nồng độ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> có thể giải thích do khoảng cách giữa các hạt từ giảm, tạo ra tương tác lưỡng cực từ mạnh hơn giữa chúng thông qua cơ chế tổn hao hồi phục Néel và Brown. Công suất tổn hao nội tại ILP của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin ở các nồng độ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> khác nhau nằm trong khoảng từ 2,42 nHm<sup>2</sup>/kg đến 3,37 nHm<sup>2</sup>/kg. Các giá trị này tương tự như các giá trị được báo cáo trong nghiên cứu của Soleymani và cộng sự trên hệ nano Folate-Dextran-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [76], và cao hơn giá trị của các hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> thương mại (Feridex) (0,15 nHm<sup>2</sup>/kg) [135]. Như vậy, với những kết quả như đã trình bày, hiệu ứng đốt nóng cảm ứng từ của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin có khả năng ứng dụng trong liệu pháp nhiệt trị liệu khối u.



**Hình 3.9.** Đường cong đốt nóng cảm ứng từ (a) ở các tỷ lệ w/w Dox : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs; (b) ở các nồng độ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> khác nhau của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin

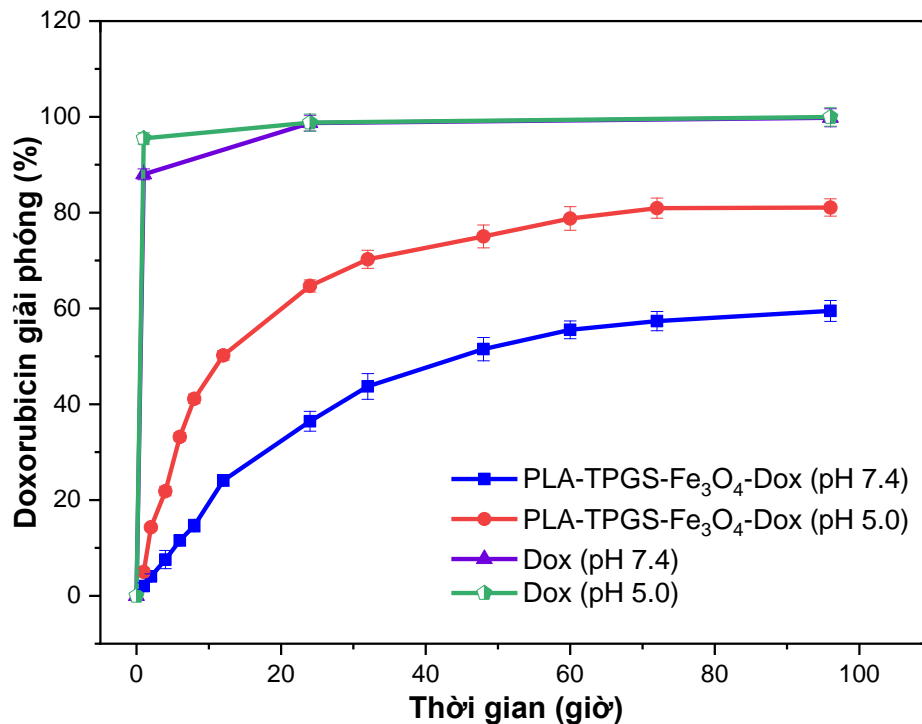
### 3.4. Đánh giá động học và cơ chế giải phóng thuốc *in vitro*

Động học giải phóng thuốc Doxorubicin từ hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin MNDDS4 được thực hiện ở 37 °C và ở pH 7,4 (điều kiện sinh lý của cơ thể) và 5,0 (điều kiện axit gần với môi trường vi mô khối u). Kết quả cho thấy quá trình giải phóng *in vitro* của Doxorubicin từ hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin phụ thuộc vào độ pH của môi trường, so với Doxorubicin tự do (Hình 3.10). Hơn 95% Doxorubicin tự do được giải phóng ở 1 giờ đầu tiên ở cả hai môi trường pH. Ngược lại, sự giải phóng Doxorubicin từ hệ nano cho thấy động học giải phóng hai pha. Pha thứ nhất liên quan đến việc giải phóng nhanh các phân tử thuốc diễn ra trong 12 giờ đầu tiên, trong khi giai đoạn thứ hai là giai đoạn giải phóng bền vững trong những giờ tiếp theo. Sự giải phóng Doxorubicin ở môi trường axit nhanh hơn ở pH sinh lý. Kết quả này có thể được giải thích là do nhóm amino chính trong cấu trúc của Doxorubicin có pK<sub>b</sub> là 9,93 có thể dễ dàng nhận các ion H<sup>+</sup> từ môi trường xung quanh trong điều kiện pH thấp như vậy và trở thành cation [136]. Khi đó, Doxorubicin thể hiện đặc tính ưa nước hơn và dễ dàng khuếch tán vào môi trường ngoài hơn [137].

Ngoài ra, Doxorubicin được giải phóng chậm hơn khỏi hệ nano trong môi trường sinh lý vì quá trình ion hóa của phân tử Doxorubicin trong môi trường này bị hạn chế [132]. Do đó, trong điều kiện pH axit của khối u, hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin có thể giải phóng từ từ Doxorubicin và tích lũy chọn lọc trong khối u dễ dàng hơn. Điều này cũng hữu ích trong việc giảm thiểu độc tính đối với



mô bình thường, nơi môi trường sinh lý có pH 7,4. Nhóm nghiên cứu của Nelemans báo cáo rằng khi đi vào tế bào, việc giải phóng Doxorubicin có thể bị ảnh hưởng một phần bởi hệ thống nội màng của tế bào, có độ pH được duy trì trong khoảng từ 4,5 đến 6,5 [138]. Nhóm nghiên cứu của Li và cộng sự cũng thu được kết quả tương tự, lượng Doxorubicin được giải phóng từ hệ nano kim cương mang thuốc Dox-PEG hoá ở pH axit (pH 5,5) nhanh hơn ở điều kiện pH trung tính (pH 6,5 hoặc pH 7,4) [139].



**Hình 3.10.** Động học giải phóng thuốc Doxorubicin từ hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin (n = 3) trong các điều kiện pH khác nhau so với Doxorubicin tự do

Để đánh giá động học và cơ chế giải phóng thuốc của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin, sáu mô hình động học khác nhau đã được sử dụng để mô hình hoá với dữ liệu giải phóng thu được cho từng điều kiện pH được áp dụng (Bảng 3.6). Khi sử dụng mô hình động học tuyến tính, mô hình động học bậc 0 không phù hợp với số liệu thực nghiệm do giá trị R<sup>2</sup> thấp. Mặc dù có giá trị R<sup>2</sup> cao hơn mô hình bậc 0 nhưng mô hình Higuchi không phù hợp hoàn toàn với dữ liệu thực nghiệm. Trong khi đó, mô hình Weibull mô tả tốt nhất sự giải phóng thuốc từ hệ dẫn thuốc nano đa chức năng (giá trị AIC thấp nhất), tiếp theo là mô hình động học Korsmeyer-Peppas ở cả hai điều kiện pH 5,0 và 7,4. Như vậy, lượng thuốc

Doxorubicin giải phóng (Q) từ hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin theo thời gian (t) được mô tả bằng phương trình động học:

$$Q = 100 x (1 - e^{-0,133xt^{0,621}}) \quad (3.1)$$

**Bảng 3.6.** Các thông số mô hình động học giải phóng thuốc của hệ nano

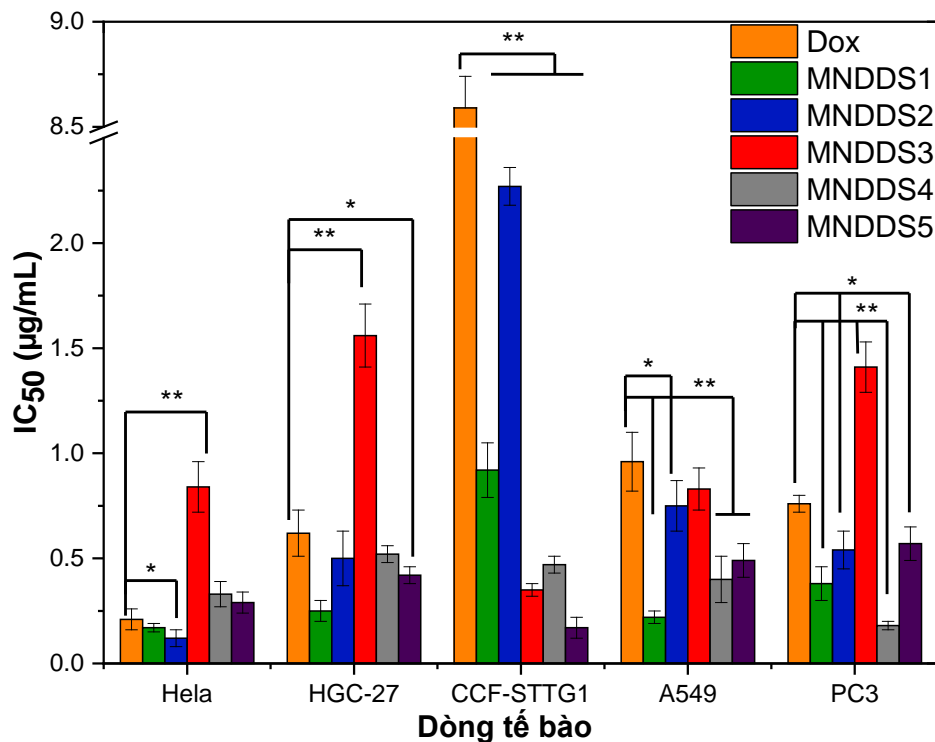
	Zero-order				Higuchi				First-order		
	K <sub>o</sub>	Multiple R <sup>2</sup>	WSSR	AIC	K <sub>H</sub>	Multiple R <sup>2</sup>	WSSR	AIC	K <sub>i</sub>	WSSR	AIC
<b>pH 5,0</b>	1,237	0,816	25,94	41,070	10,44	0,969	10,97	30,742	0,043	10,67	30,409
<b>pH 7,4</b>	0,844	0,906	11,98	31,798	6,794	0,983	5,064	21,466	0,014	6,682	24,794
	Weibull				Korsmeyer–Peppas				Hillxon		
	K <sub>w</sub>	n	WSSR	AIC	K <sub>KP</sub>	n	WSSR	AIC	K <sub>HC</sub>	WSSR	AIC
<b>pH 5,0</b>	0,133	0,621	4,713	<b>23,603</b>	17,535	0,365	8,065	29,050	0,012	13,510	33,241
<b>pH 7,4</b>	0,044	0,705	3,797	<b>20,012</b>	6,008	0,531	5,206	23,80	0,004	8,250	27,322

Tuy nhiên, mô hình Weibull không có bất kỳ tham số nào liên quan đến bản chất tốc độ hòa tan nội tại của thuốc [140]. Do đó, mô hình Korsmeyer-Peppas được sử dụng để phân tích cơ chế giải phóng thuốc của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin và độ lớn của số mũ n được sử dụng để xác định cơ chế giải phóng [141]. Ở pH 5,0, giá trị của số mũ giải phóng n là 0,365 (thấp hơn 0,43) cho thấy sự giải phóng thuốc được kiểm soát bởi cơ chế khuếch tán Fickian cổ điển [142]. Tuy nhiên, ở pH 7,4, số mũ khuếch tán đạt 0,531, gần với giới hạn của sự khuếch tán dị thường, cho thấy sự tác động chung giữa các quá trình trương nở và phân hủy của copolyme PLA-TPGS trong môi trường giải phóng. Do đó, quá trình giải phóng Doxorubicin từ hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin là kết quả của sự kết hợp của hai cơ chế (1) khuếch tán thuốc vào môi trường và (2) quá trình trương nở và phân hủy của copolyme [143]. Trong một nghiên cứu khác, Hervalut và cộng sự cho thấy rằng số mũ giải phóng n thấp hơn 0,5 ở nhiệt độ 37 °C đối với cả độ pH 5,0 và 7,4 khi đánh giá sự giải phóng Doxorubicin khỏi vật liệu nanocomposit từ tính bằng mô hình Korsmeyer–Peppas [144].

### 3.5. Đánh giá tác dụng và cơ chế gây độc tế bào ung thư

Các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng hệ nano tối ưu về mặt vật liệu (khả năng mang thuốc và hiệu suất nano hoá cao, kích thước nhỏ, độ bền và độ ổn định cao

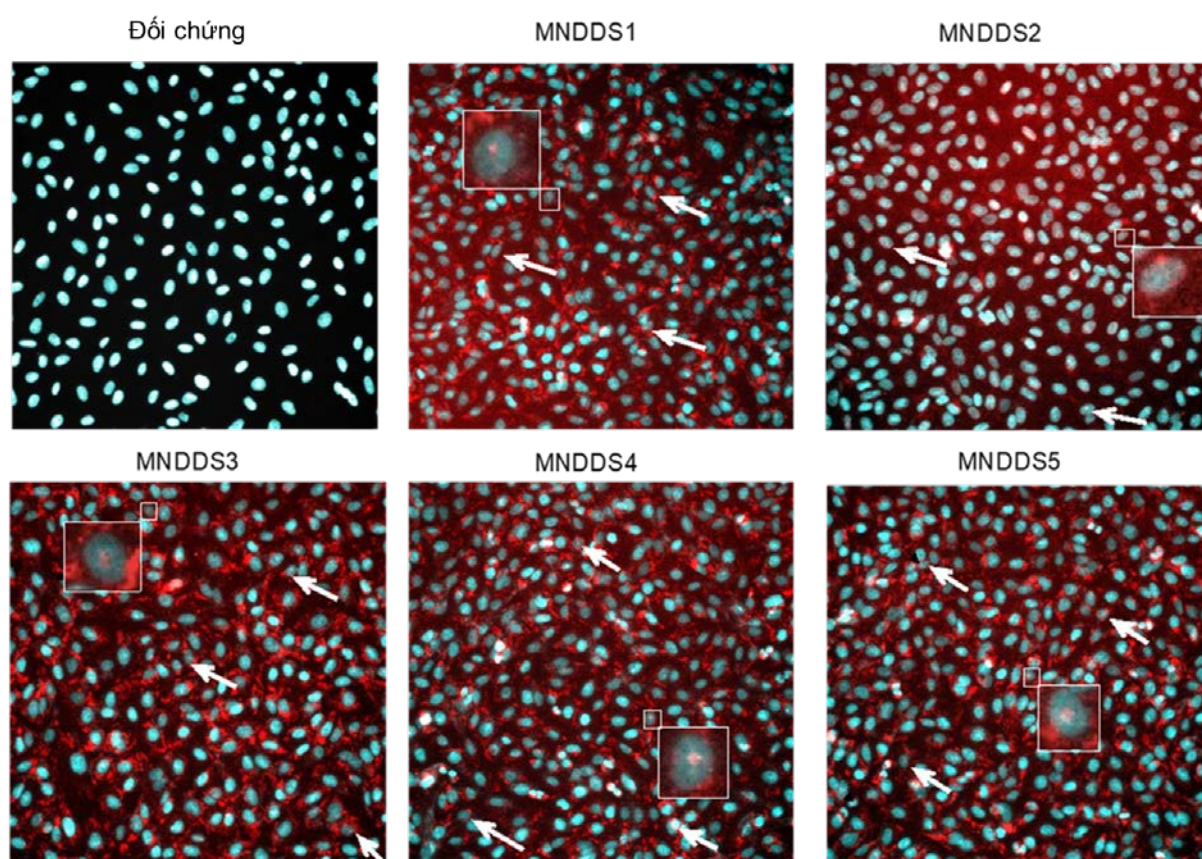
nhất) không biểu hiện độc tính tế bào cao nhất trên tế bào ung thư [30]. Do đó, khả năng gây độc tế bào ung thư của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin (MNDDS) ở các tỉ lệ w/w Dox : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs khác nhau và Doxorubicin tự do đã được đánh giá trên các dòng tế bào: HeLa (Tế bào ung thư cổ tử cung), HGC-27 (Tế bào ung thư biểu mô dạ dày), CCF-STTG1 (Tế bào ung thư biểu mô não), A549 (Tế bào ung thư biểu mô phổi) và tế bào ung thư PC3 (Tế bào ung thư biểu mô tuyến tiền liệt).



**Hình 3.11.** Đánh giá độc tính tế bào *in vitro* của các hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin và Doxorubicin tự do (\*\*p<0,001; và \*p<0,05, n=3)

Tất cả năm hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin đều có hoạt tính gây độc tế bào cao với giá trị IC<sub>50</sub> thấp, dưới 2 µg/mL (Hình 3.11). Hầu hết các hệ nano MNDDS đều có giá trị IC<sub>50</sub> thấp hơn Doxorubicin tự do, ngoại trừ hệ MNDDS3 trên các dòng tế bào HeLa, HGC-27 và PC3. Ngoài ra, sự khác biệt rõ rệt về giá trị IC<sub>50</sub> giữa các hệ nano MNDDS và Doxorubicin tự do được thể hiện trên dòng tế bào CCF-STTG1 (p<0,001). Những kết quả này cho thấy hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin có tiềm năng trong việc điều trị khối u não ở người. Trên thực tế, độc tính *in vitro* ở các dòng tế bào khác nhau đối với các hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin (MNDDS) ở các tỉ lệ w/w Dox : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs khác nhau là khác nhau

mặc dù hệ nano MNDDS4 (tỉ lệ w/w Dox : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs = 1 : 1) là tối ưu nhất về mặt vật liệu. Những kết quả thú vị này có thể là do 3 lý do chính sau đây. *Thứ nhất*, phản ứng đặc hiệu của tế bào đối với mỗi hệ nano là khác nhau, bởi vì mỗi dòng tế bào là một hệ thống hoàn toàn độc lập, với các đặc điểm sinh học riêng [145]. *Thứ hai*, các đặc điểm riêng về tỉ lệ w/w giữa Dox và Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs của từng hệ MNDDS. *Thứ ba*, luôn có sự xuất hiện liên tục và có chọn lọc của các quần thể tế bào ung thư mới, vì vậy mỗi dòng tế bào ung thư là hoàn toàn duy nhất [146]. Điều cần thiết là phải nghiên cứu kỹ cả tính chất vật liệu và tương tác sinh học của hệ nano trước khi áp dụng chúng ở các thử nghiệm *in vivo*. Vì lý do này, quá trình bắt giữ chu kỳ tế bào của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin được tiếp tục đánh giá.



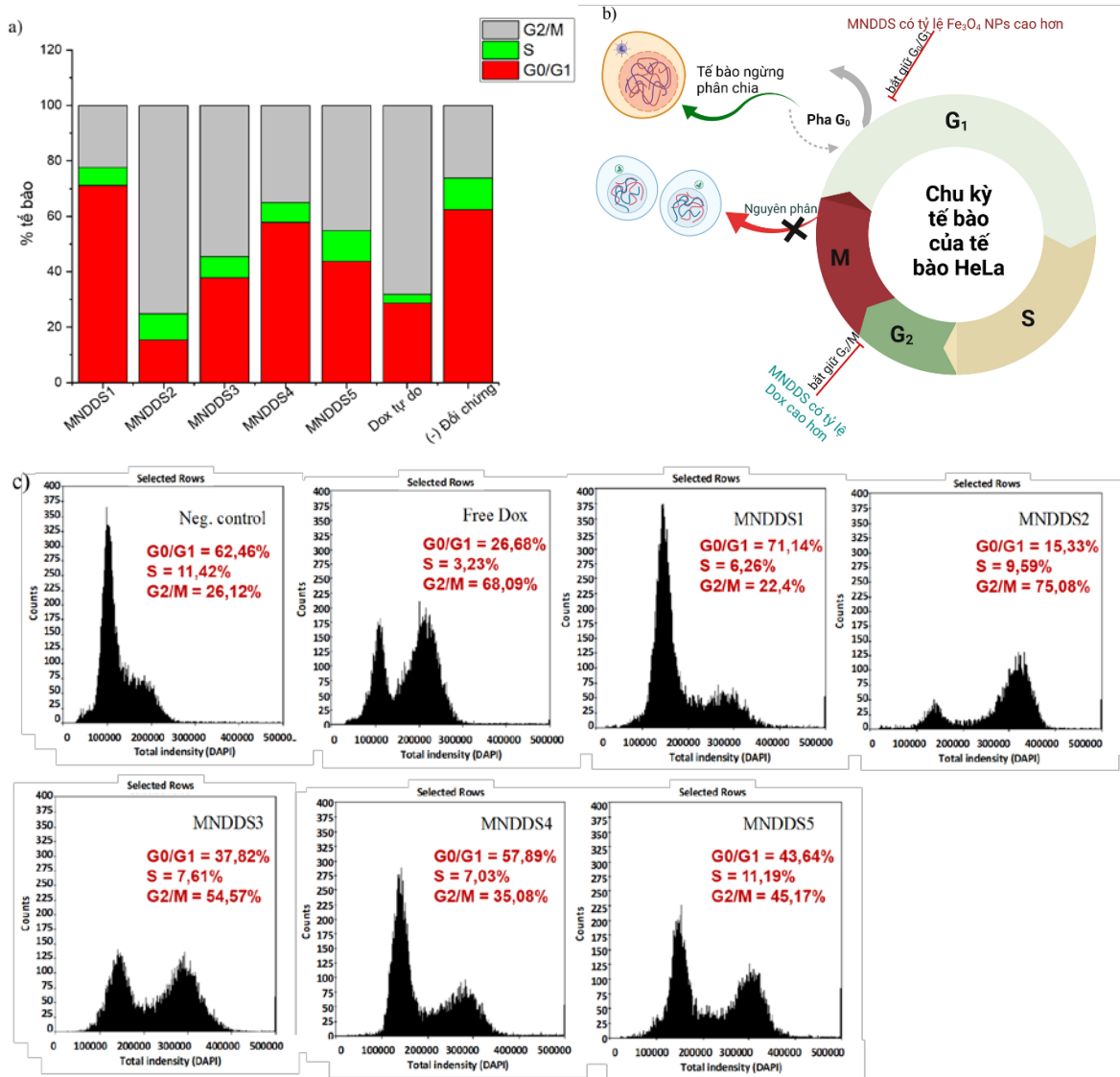
**Hình 3.12.** Ảnh hiển vi huỳnh quang của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin trên dòng tế bào HeLa (độ phóng đại 20x, máy ảnh sCMOS). Mũi tên đánh dấu các tế bào có Doxorubicin xâm nhập vào nhân tế bào.

Khả năng xâm nhập tế bào của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin đã được xác nhận bằng kỹ thuật huỳnh quang *in vitro* của Doxorubicin sau 24 giờ ủ với các hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin (MNDDS) ở các tỉ lệ w/w Dox : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

NPs khác nhau (Hình 3.12). Có thể thấy tín hiệu huỳnh quang màu đỏ của Doxorubicin quan sát được ở khu vực quanh nhân và tế bào chất trong cả năm hệ MNDDS. Các phân tử Doxorubicin được khuếch tán vào nhân tế bào (các tế bào được đánh dấu bằng mũi tên trắng), cho thấy sự hấp thu tế bào tốt của các hệ nano MNDDS. Đặc tính huỳnh quang này của Doxorubicin rất có lợi cho các nghiên cứu về hình thái tế bào, khả năng xâm nhập và sự phân bố của các hệ nano trong tế bào [147]. Những kết quả này phù hợp với kết quả độc tính tế bào và dữ liệu giải phóng Doxorubicin.

Sau khi các hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin xâm nhập vào tế bào thông qua quá trình nhập bào và sau đó được vận chuyển vào hệ thống lưới nội bào/lysosome có tính axit, Doxorubicin được giải phóng khỏi hệ nano [148]. Sau đó, một số phân tử Doxorubicin thâm nhập được vào nhân tế bào ung thư. Điều này tạo điều kiện cho Doxorubicin thể hiện tác dụng dược lý trong việc gây tổn thương DNA bằng cơ chế bám dính topoisomerase II trong các dòng tế bào ung thư dẫn đến độc tính tế bào cao [149]. Ngoài ra, đặc tính lưỡng tính của copolyme PLA-TPGS cho phép hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin ngăn chặn sự liên kết giữa protein huyết tương với bề mặt của chúng nhờ các đặc tính của lớp vỏ TPGS, do đó cải thiện khả năng thâm nhập tế bào của hệ nano [150]. Các tác giả khác cũng báo cáo rằng quá trình nội hóa các tiểu phân nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Dox/PLGA-PEG của tế bào ung thư MCF-7 được quan sát rõ trên các tế bào ung thư sau 24 giờ thông qua quá trình nhập bào [118]. Cuối cùng, hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin có thể gây mất ổn định và phá vỡ màng nội bào (endosome) để giải phóng thuốc sau khi nhập bào, dẫn đến tác dụng gây độc tế bào [151].

Về mặt cơ chế tế bào, ung thư xảy ra do sự thay đổi của một quá trình sinh học bình thường trong cơ thể đó là phân chia tế bào. Các tế bào tiến triển qua chu kỳ tế bào không được kiểm soát cuối cùng có thể hình thành các khối u ác tính, nơi các khối tế bào phát triển và phân chia không kiểm soát, sau đó phát triển khả năng lây lan và di chuyển khắp cơ thể. Để đánh giá cơ chế gây độc tế bào ung thư của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin, khả năng bắt giữ chu kỳ tế bào được đánh giá nhờ vào kỹ thuật sàng lọc nội hàm cao (High-content screening, HCS).



**Hình 3.13.** (a) Phân bố chu kỳ tế bào; (b) sơ đồ chu kỳ tế bào và cơ chế ức chế chu kỳ tế bào; (c) sự phân bố chu kỳ tế bào trên dòng tế bào HeLa gây ra bởi các mẫu MNDDS so với Dox tự do và đối chứng âm

Tỉ lệ tế bào ở tất cả các giai đoạn của chu kỳ tế bào, được xác định đối với hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin so với Doxorubicin tự do và đối chứng âm (Hình 3.13). Sự phân bố chu kỳ tế bào ở pha G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> của tế bào HeLa được xử lý bằng Dox tự do là 28,68 %, trong khi giá trị này ở nhóm đối chứng âm là 62,46 %. Các hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin (MNDDS) ở các tỉ lệ w/w Dox : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs khác nhau dẫn đến những thay đổi khác nhau trong cấu hình chu kỳ tế bào. Có sự gia tăng số lượng tế bào ở pha G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> của mẫu được xử lý MNDDS1 (tỷ lệ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> cao nhất) so với đối chứng. Trong khi đó, đối với 4 hệ MNDDS còn lại, quan sát thấy nhiều tế bào trong pha G<sub>2</sub>/M hơn so với đối chứng âm. Nghiên cứu của Mahmoudi và cộng sự cho thấy các hạt nano oxit sắt từ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> gây ra sự ngừng chu

kỳ tế bào ở pha G1, do sự tổn thương DNA không hồi phục [152]. Các nghiên cứu trước đây cũng báo cáo rằng Doxorubicin tự do có tác dụng ức chế sự tăng sinh tế bào bằng cách bắt giữ chu kỳ tế bào ở pha G2/M theo cách phụ thuộc vào thời gian và liều lượng [153].

Như vậy, các kết quả này chứng minh rằng hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin gây ra tác dụng bắt giữ chu kỳ tế bào mạnh trên dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa, trong đó các tác động khác nhau đến chu kỳ tế bào phụ thuộc vào tỉ lệ w/w Dox : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs với các tác động khác nhau của từng thành phần Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs và Doxorubicin đơn lẻ. Các hệ nano có tỷ lệ Doxorubicin cao hơn, tế bào bị bắt giữ chủ yếu ở pha G2/M. Ngược lại, hệ nano gây độc tế bào theo cơ chế bắt giữ tế bào ở pha G0/G1 ở các mẫu có tỷ lệ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> cao hơn.

### **Tóm tắt chương 3**

Trong chương này, chúng tôi đã chế tạo được hệ dẫn thuốc nano đa chức năng mang đồng thời Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs và thuốc Doxorubicin (PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin) với tỉ lệ Dox : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs w/w = 1:1 là tối ưu về kích thước, độ bền, khả năng mang thuốc và hiệu suất nano hóa thuốc Doxorubicin. Hệ nano này có dạng hình cầu, kích thước tiểu phân trung bình 17 - 19,8 nm, hiệu suất nano hóa đạt  $91,05 \pm 0,8$  %, khả năng mang thuốc Doxorubicin đạt  $31,28 \pm 1,64$  %. Thuốc Doxorubicin được giải phóng từ hệ nano theo mô hình động học Weibull, phụ thuộc vào pH. Trong điều kiện pH axit, Doxorubicin được giải phóng theo cơ chế khuếch tán Fickian cổ điển. Trong môi trường pH sinh lý 7,4, Doxorubicin được giải phóng do tác động đồng thời của cơ chế trương nở và phân hủy của copolyme PLA-TPGS. Hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin có khả năng sinh nhiệt tốt, cho phép diệt tế bào ung thư bằng nhiệt trị. Hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin có tác dụng gây độc tế bào ung thư hiệu quả, với giá trị IC<sub>50</sub> < 2 µg/mL. Trên dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa, hệ nano có tỷ lệ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> cao hơn, gây độc tế bào theo cơ chế bắt giữ tế bào ở pha G0/G1. Trong khi, các hệ nano có tỷ lệ Doxorubicin cao hơn, sẽ gây độc tế bào theo cơ chế bắt giữ tế bào ở pha G2/M. Sự kết hợp giữa Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs và Doxorubicin trong hệ nano đa chức năng duy trì đặc tính huỳnh quang *in vitro* của Doxorubicin và khả năng thâm nhập tế bào tốt, đặc biệt là bên trong nhân và vùng lân cận.

## **CHƯƠNG 4. HỆ DẪN THUỐC NANO ĐA CHỨC NĂNG GẮN CHẤT PHÁT HUỖNH QUANG HỒNG NGOẠI GẦN PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DOXORUBICIN-CYANINE 5.5**

Chương này trình bày các kết quả nghiên cứu chế tạo hệ dẫn thuốc nano đa chức năng gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin-Cyanine 5.5. Trong đó, (1) Doxorubicin là thuốc trị ung thư; (2) hạt nano oxit sắt từ (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs) vừa là tác nhân làm tăng độ tương phản chụp cộng hưởng từ MRI, vừa có tác dụng nhiệt trị khi có từ trường ngoài; (3) Cyanine 5.5 là tác nhân phát huỳnh quang ở vùng hồng ngoại gần nhằm quan sát, đánh dấu, chụp ảnh huỳnh quang; (4) trên chất mang là copolyme PLA-TPGS. Chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần được gắn lên bề mặt hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> bằng liên kết CO-NH, sau đó mang thuốc Doxorubicin lên vật liệu nano đa chức năng trên nền copolyme PLA-TPGS bằng phương pháp nhũ hóa bay hơi dung môi (emulsion solvent evaporation). Các yếu tố như nhiệt độ, pH, thời gian phản ứng, tỷ lệ các thành phần ở bước gắn Cyanine 5.5 được khảo sát để lựa chọn điều kiện tối ưu cho khả năng phát huỳnh quang tốt nhất. Đặc trưng tính chất lý hóa, quá trình giải phóng thuốc ở các điều kiện pH khác nhau, và tác dụng gây độc tế bào ung thư của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 được khảo sát. Đồng thời, trong chương này, luận án sẽ đánh giá vai trò của từng thành phần Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Doxorubicin và Cyanine 5.5 đến chu kỳ tế bào trong cơ chế gây độc tế bào ung thư của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5.

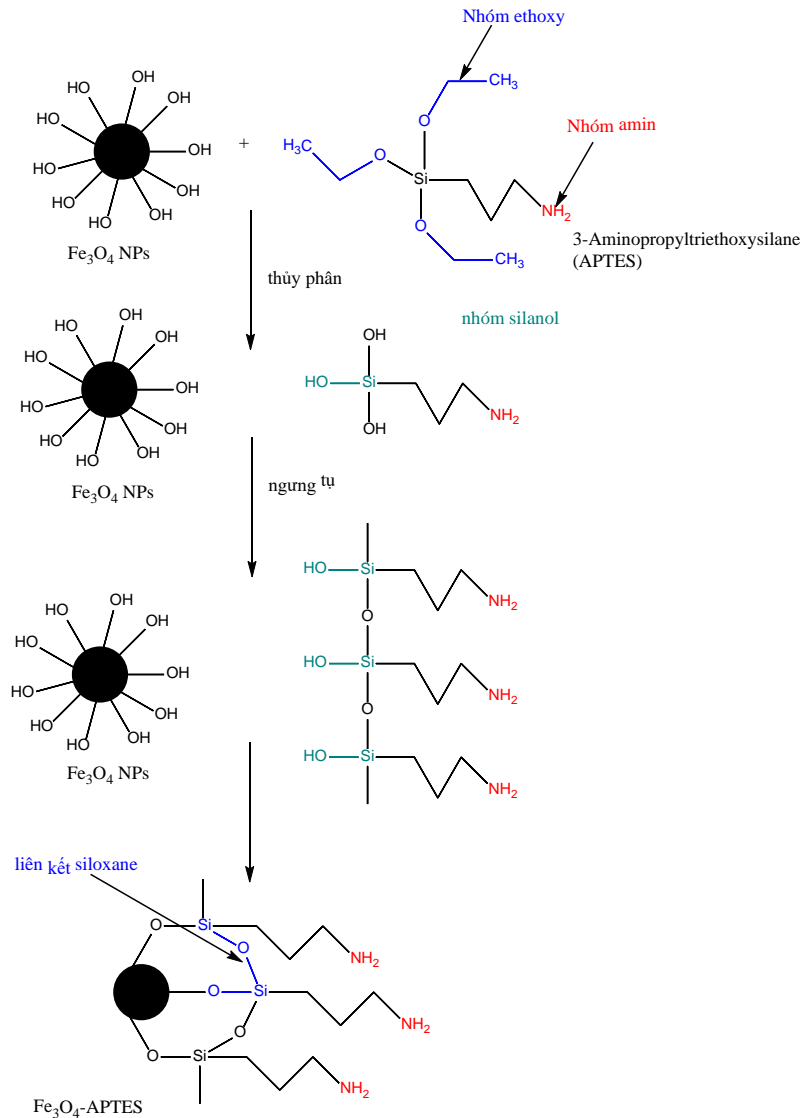
### **4.1. Khảo sát các điều kiện chế tạo hệ dẫn thuốc nano đa chức năng gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin-Cyanine 5.5**

Quá trình dập tắt tín hiệu huỳnh quang gây ra bởi hạt nano oxit sắt từ gây khó khăn cho việc thu được tín hiệu huỳnh quang mạnh [154]. Một số báo cáo đã cho thấy các chất phát huỳnh quang có thể bị dập tắt bởi hạt nano oxit sắt từ khi khoảng cách của chúng nhỏ hơn 10 nm [155]. Ngoài ra, vì các hạt nano từ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> màu đen hấp thụ mạnh ánh sáng khả kiến, nên cường độ huỳnh quang có thể bị giảm đi do sự hấp thụ ánh sáng, ngay cả khi khoảng cách giữa hai thành phần, trong đó lõi từ được phủ các lớp đệm silica hoặc polyme, lớn hơn 10 nm [156]. Do vậy, trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của các điều kiện phản ứng (nhiệt độ, pH, tỷ lệ hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) đến quá trình gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần lên hệ vật liệu tổng hợp hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5, được đánh giá thông qua khả năng phát



huỳnh quang của hệ vật liệu thu được. Việc gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần Cyanine 5.5 lên bề mặt hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , bọc bằng copolyme PLA-TPGS tương thích có thể mang lại một số lợi thế như tính đồng nhất quang học tốt hơn và bảo vệ khỏi sự nhiễu loạn của môi trường bên ngoài.

*Khảo sát tỉ lệ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  : APTES (w/w)*

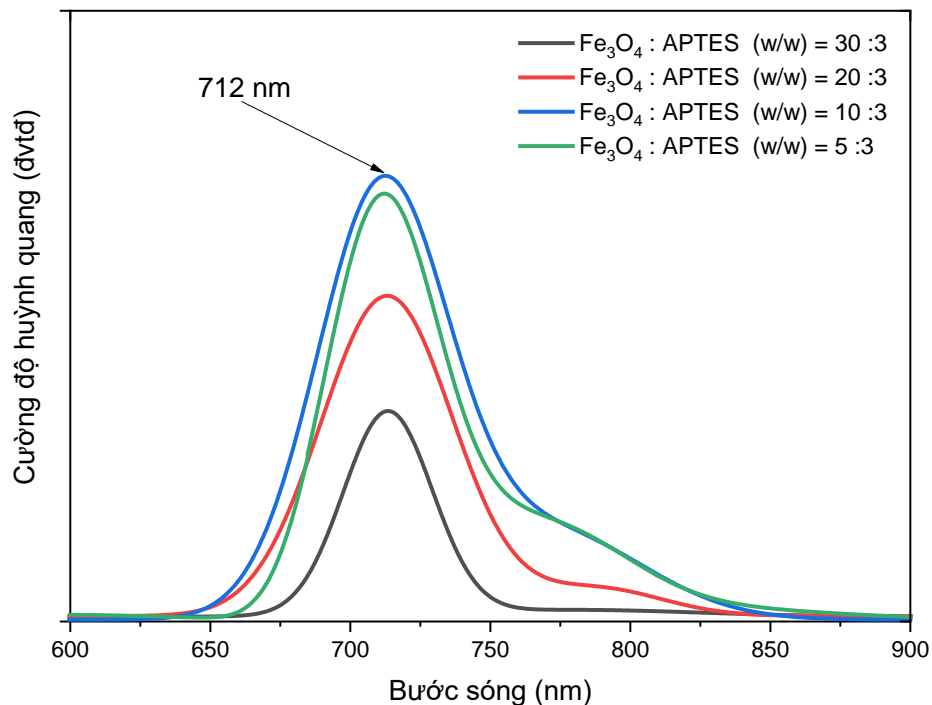


**Hình 4.1.** Sơ đồ cơ chế phản ứng APTES với bề mặt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs

3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) là một phân tử organosilane thường được sử dụng trong các quá trình chức năng hóa dựa trên silane để gắn các phân tử sinh học lên bề mặt. Bề mặt hạt nano oxit sắt từ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs là bề mặt có nhóm hydroxyl (-OH) mang năng lượng bề mặt cao, có thể tương tác nhanh chóng và hình thành liên kết cộng hóa trị với các phân tử silane [157]. Do liên kết cộng hóa trị mạnh này, các phân tử Cyanine 5.5 có thể được gắn về mặt hóa học với lớp silane

thông qua liên kết cộng hoá trị (NH-CO) mà không phá vỡ cấu trúc silane [158]. Trong nghiên cứu này, các phân tử APTES đóng vai trò là lớp trung gian liên kết bề mặt oxit sắt từ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  với các phân tử Cyanine 5.5 như minh họa ở hình 4.1.

Để thực hiện quá trình lắng đọng pha dung dịch trên bề mặt hạt nano oxit sắt từ, chúng tôi hòa tan APTES trong dung dịch etanol 90% (có các phân tử nước). Sự hiện diện của một số phân tử nước bị hấp phụ trên bề mặt hoặc trong dung môi APTES đóng vai trò rất quan trọng để bắt đầu phản ứng thủy phân trong quá trình hình thành liên kết giữa APTES và  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs. Việc sử dụng etanol 90% để hòa tan APTES nhằm cung cấp nước để thúc đẩy phản ứng của nhóm ethoxy silane với nhóm hydroxyl trên bề mặt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs [159]. Điều này rất quan trọng đối với các tính chất của lớp silane thu được vì nếu không có sự định hướng và tương tác của các nhóm ethoxy silane với các nhóm hydroxyl trên bề mặt thì chúng có thể hình thành liên kết hydro với các nhóm amin của silane, tạo thành một lớp với các nhóm amin phản ứng dưới mức tối ưu trên bề mặt [160].

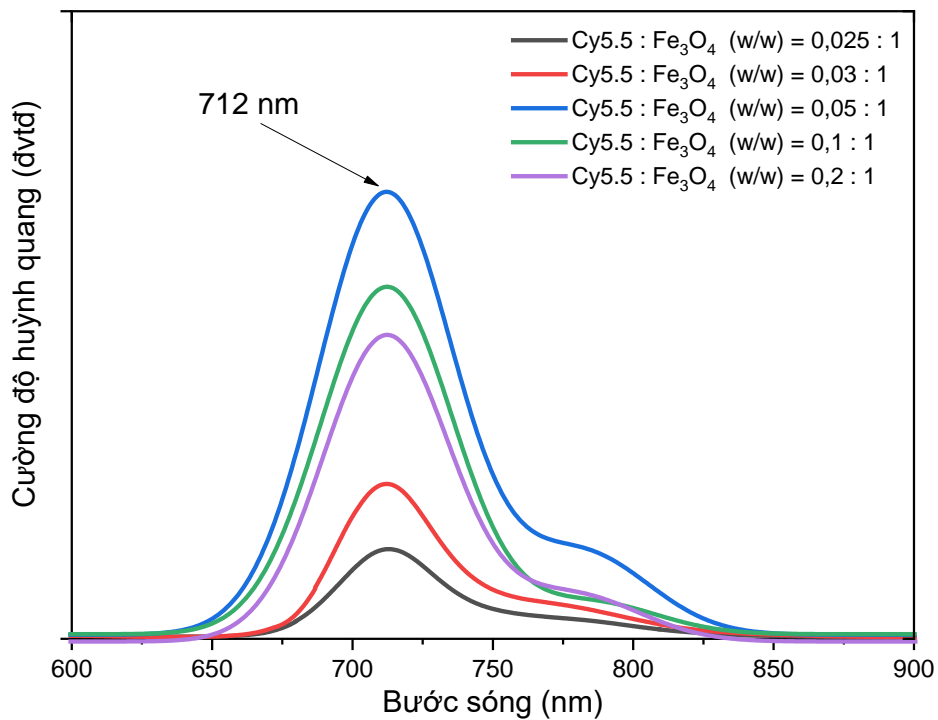


**Hình 4.2.** Phổ huỳnh quang của các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 ở các tỉ lệ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs : APTES (w/w) khác nhau

Hình 4.2 trình bày phổ huỳnh quang của các mẫu nano đa chức năng PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 với tỉ lệ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs : APTES (w/w) khác nhau, lần lượt là 30:3, 20:3, 10:3 và 5:3. Kết quả cho thấy cường độ huỳnh quang tăng theo sự

giảm tỉ lệ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs : APTES (w/w), tương đương với việc tăng nồng độ APTES. Tuy nhiên, khi tăng tỉ lệ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs : APTES (w/w) lên đến 5:3 thì cường độ huỳnh quang giảm, so với tỉ lệ 10:3. Do vậy, tỉ lệ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs : APTES (w/w) = 10:3 được sử dụng cho các bước tiếp theo. Phản ứng ngưng tụ có thể xảy ra giữa hai phân tử APTES và/hoặc giữa bề mặt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs và phân tử APTES [161]. Phản ứng ngưng tụ giữa các nhóm silanol trên phân tử APTES và nhóm -OH trên bề mặt oxit  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs xảy ra sự hình thành liên kết siloxane. Liên kết siloxane có thể gắn cộng hóa trị phân tử silane lên bề mặt theo nhiều cách khác nhau. Ngoài ra, các nhóm silanol của các phân tử silane khác nhau có thể tương tác với nhau, từ đó hình thành các cấu trúc polyme [161].

*Khảo sát tỉ lệ Cyanine 5.5 :  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs (w/w)*

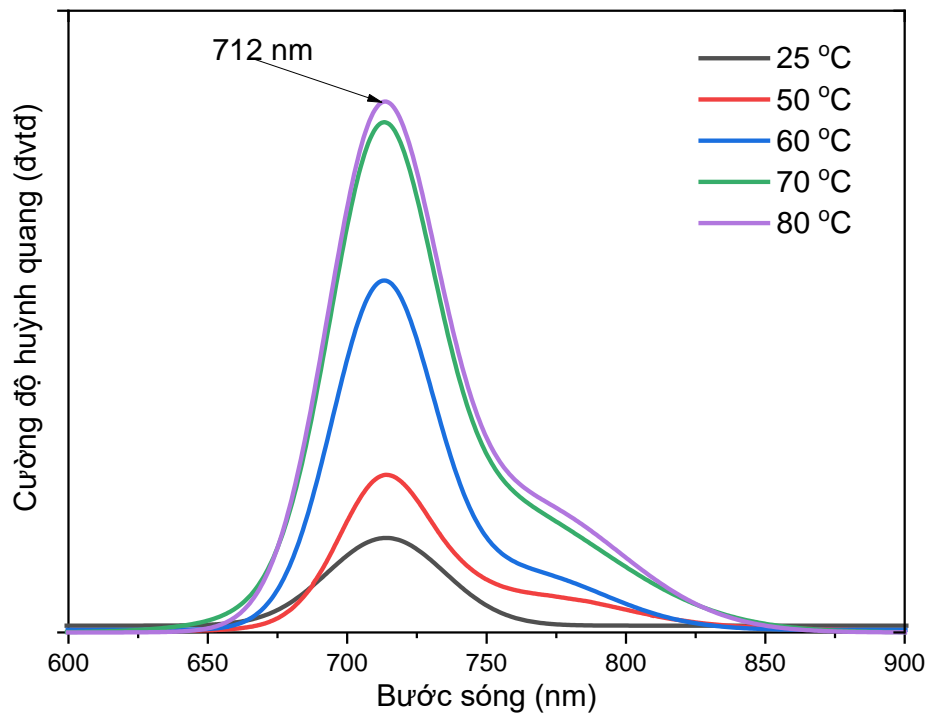


**Hình 4.3.** Phổ huỳnh quang của các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 ở các tỉ lệ Cyanine 5.5 :  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs (w/w) khác nhau

Phổ huỳnh quang của các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 cho thấy cường độ huỳnh quang phụ thuộc trực tiếp vào nồng độ Cyanine 5.5, đạt cường độ cao nhất ở tỉ lệ Cyanine 5.5 :  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs (w/w) = 0,05 : 1 (Hình 4.3). Tuy nhiên, khảo sát cho thấy tỉ lệ Cyanine 5.5 :  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs = 0,1 : 1 cho cường độ huỳnh quang thấp hơn nhiều so với tỉ lệ 0,05 : 1. Kết quả cũng cho thấy

nồng độ Cyanine 5.5 tham gia phản ứng không phải là yếu tố quyết định cường độ huỳnh quang. Điều này có thể liên quan đến số lượng phân tử Cyanine 5.5-NHS este thực sự phản ứng với các nhóm  $\text{NH}_2$  trên bề mặt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs để chuyển từ dạng NHS este thành Cyanine 5.5 tự do. Lượng  $\text{NH}_2$  trên bề mặt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs phụ thuộc vào nồng độ APTES thêm vào phản ứng tại bước chức năng hoá bề mặt hạt nano oxit sắt từ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs. Vì vậy, tỉ lệ Cyanine 5.5 :  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs (w/w) = 0,05 : 1 được duy trì ở các bước tiếp theo.

#### Khảo sát điều kiện nhiệt độ

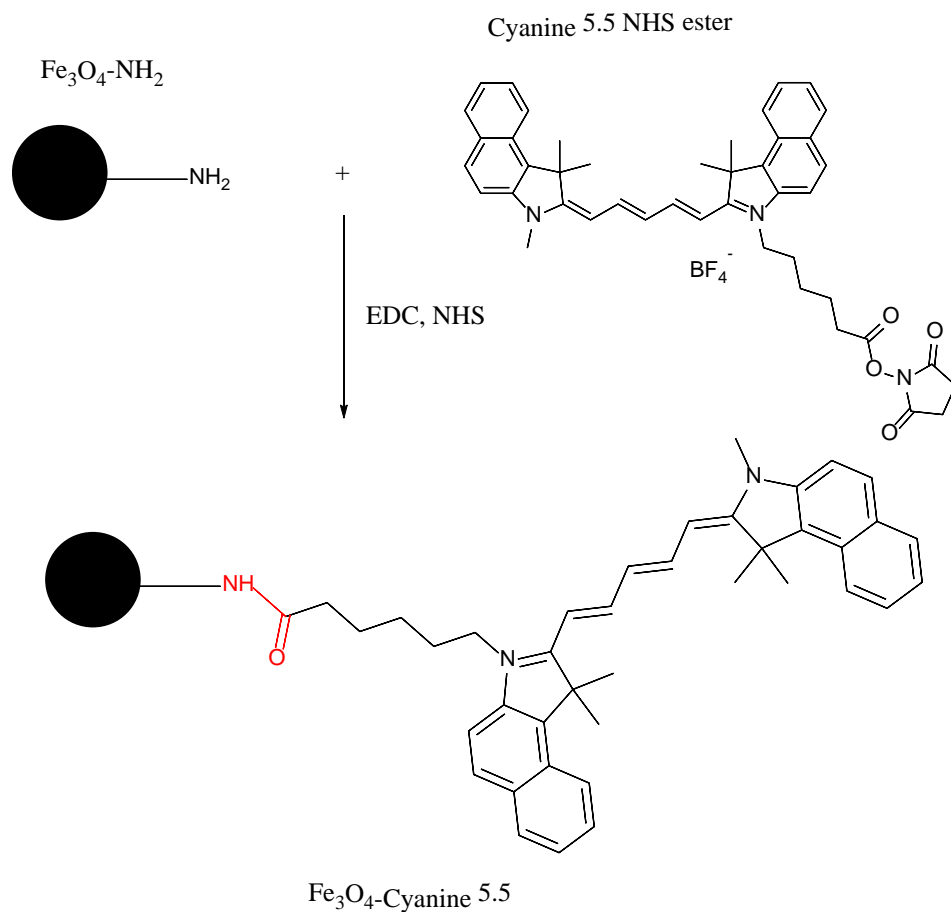


**Hình 4.4.** Phổ huỳnh quang của các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau

APTES có ba nhóm ethoxy phản ứng chức năng và một nhóm amin trên một phân tử silane (Hình 4.1). Quá trình trùng hợp các phân tử APTES trên bề mặt oxit là một phản ứng rất phức tạp bao gồm ba bước chính: (1) thủy phân (nhóm hydroxyl (-OH) thay thế nhóm ethoxy trong môi trường axit, kiềm hoặc trung tính); (2) ngưng tụ (hình thành liên kết siloxane (Si-O-Si)) (Hình 4.3); và (3) tách pha. Do bốn nhóm phản ứng trong phân tử APTES và động học phức tạp trong ba bước phản ứng, điều quan trọng là phải kiểm soát và tối ưu hóa các điều kiện phản ứng. Trong bước tách pha, môi trường phản ứng mất đi tính đồng nhất để hình thành các cấu trúc polyme hữu hình hơn [162]. Thay đổi nhiệt độ trong quá trình ghép APTES có thể làm tăng tốc độ phản ứng và hiệu suất ghép APTES.

Khi tăng nhiệt độ của phản ứng gắn APTES lên bề mặt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs ở các điều kiện 25 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C và 80 °C thì cường độ huỳnh quang tăng dần với cực đại phát xạ tại bước sóng 712 nm (Hình 4.4). Việc ủ ở nhiệt độ cao thúc đẩy sự hình thành các liên kết siloxan cộng hóa trị ổn định đồng thời phá vỡ các liên kết hydro. Sự giải hấp các phân tử APTES từ APTES được xử lý nhiệt được phát hiện là ít hơn và chậm hơn so với quá trình ủ APTES ở nhiệt độ phòng [158]. Ở nhiệt độ cao hơn, tổng lượng silan lắng đọng ít hơn, nhưng cấu trúc của chúng đồng đều hơn và ổn định thủy phân hơn (cả trong nước và chất đệm) [163]. Nghiên cứu của Yang và cộng sự đã cho thấy nhiệt độ phản ứng không chỉ thúc đẩy phản ứng ghép mà còn thúc đẩy sự sắp xếp APTES. Kết quả là sự sắp xếp giả hai lớp xen kẽ của các phân tử APTES đã được sắp xếp lại thành sự sắp xếp đơn lớp [164]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này không có sự khác biệt về cường độ huỳnh quang giữa điều kiện nhiệt độ 70 °C và 80 °C, nên điều kiện nhiệt độ 70 °C được sử dụng cho các bước tiếp theo.

#### Khảo sát điều kiện pH

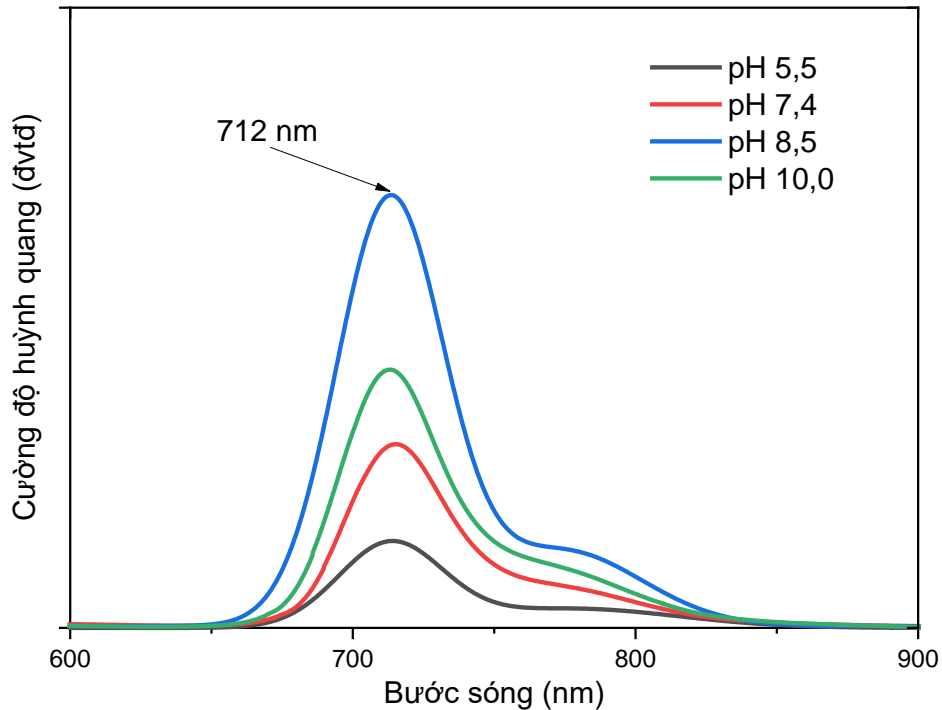


**Hình 4.5.** Sơ đồ phản ứng gắn Cyanine 5.5 lên bề mặt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - $\text{NH}_2$

Trên bề mặt được biến đổi APTES của  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - $\text{NH}_2$ ), các phân tử Cyanine 5.5 có thể được liên kết thông qua việc hoạt hóa các nhóm carboxy của

chúng bằng carbodiimide (ví dụ: EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), chuyển đổi thành các liên kết peptit ổn định hơn thông qua quá trình amin hóa khử bằng cách sử dụng APTES, sau đó kích hoạt với EDC/NHS (Hình 4.5). Để khảo sát ảnh hưởng của pH đến quá trình gắn Cyanine 5.5 NHS este lên hệ dẫn thuốc nano đa chức năng thông qua nhóm  $-NH_2$  của phân tử silane trên bề mặt  $Fe_3O_4$  NPs (Hình 4.6), pH của phản ứng được thay đổi ở các điều kiện pH 5,5; 7,4; 8,5; và 10.

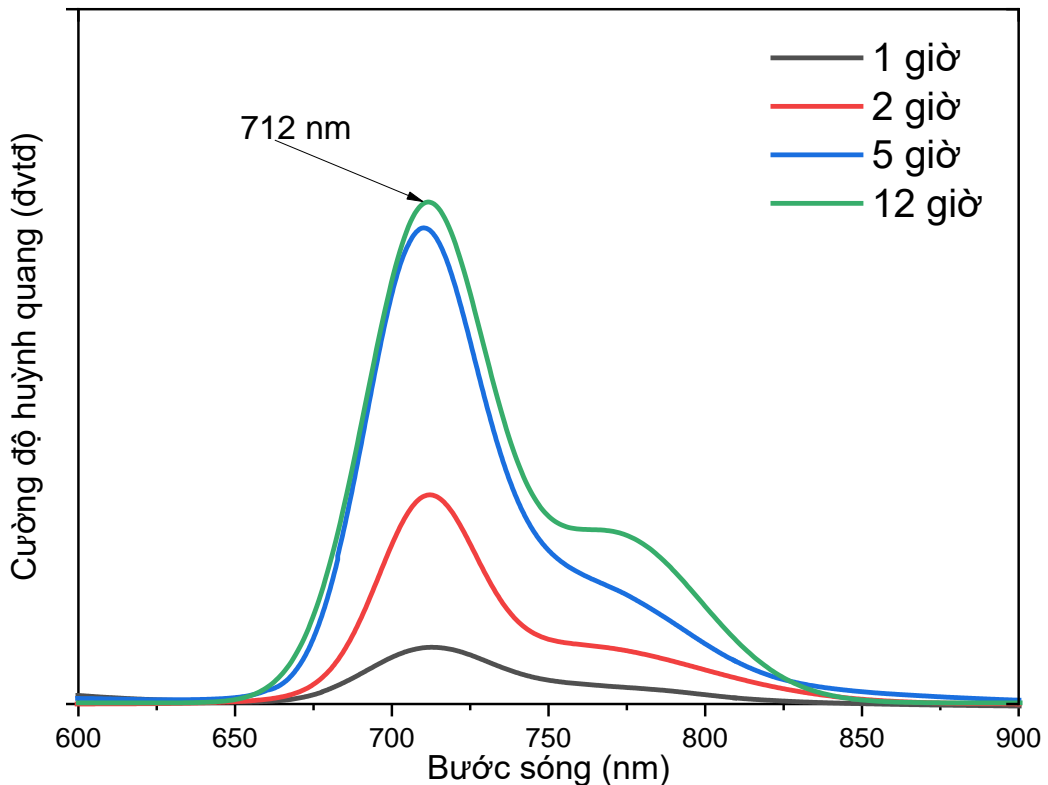
Khi thay đổi điều kiện pH, ở các môi trường đệm acid (pH 5,5), trung tính (pH 7,4) và kiềm (pH 8,5 và pH 10), khả năng gắn Cyanine 5.5 lên hệ nano  $Fe_3O_4$  tăng khi tăng độ pH và đạt cường độ huỳnh quang cao nhất ở pH 8,5. Trong môi trường axit (pH 5,5), khi đó các nhóm  $NH_2$  đều bị proton hóa trở thành  $NH_3^+$ , không còn khả năng phản ứng, làm giảm khả năng gắn Cyanine 5.5 lên bề mặt  $Fe_3O_4$ , do vậy tín hiệu huỳnh quang của hệ nano thu được rất thấp. Ở độ pH cao hơn (kiềm mạnh, pH 10), quá trình thủy phân este NHS diễn ra nhanh chóng và hiệu suất biến tính giảm. Nên cường độ huỳnh quang của hệ nano PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox-Cyanine 5.5 thấp hơn so với điều kiện pH 8,5. Do vậy, phản ứng giữa Cyanine 5.5 NHS este với nhóm amin của  $Fe_3O_4-NH_2$  phụ thuộc nhiều vào độ pH, điều kiện pH tối ưu 8,5 được duy trì ở các thử nghiệm tiếp theo.



**Hình 4.6.** Phổ huỳnh quang của các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox-Cyanine 5.5 ở các điều kiện pH khác nhau

### Khảo sát thời gian phản ứng

Thông số tiếp theo được tối ưu hóa liên quan đến bước gắn Cyanine 5.5 này là thời gian phản ứng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát thời gian phản ứng tạo liên kết cộng hóa trị NH-CO với bề mặt  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  trong điều kiện xúc tác EDC/NHS ở các thời gian khác nhau: 1 giờ, 2 giờ, 5 giờ, 12 giờ. Hình 4.7 cho thấy thời gian phản ứng ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả gắn Cyanine lên bề mặt  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  trong điều kiện xúc tác EDC/NHS. Trong thời gian phản ứng dài hơn, cường độ huỳnh quang tăng đáng kể 3,5 lần khi tăng thời gian từ 1 giờ lên 2 giờ, và sau 5 giờ cường độ huỳnh quang tăng gấp 8 lần so với 1 giờ. Khi tiếp tục tăng thời gian lên 12 giờ thì cường độ đỉnh huỳnh quang tăng không đáng kể. Do vậy, thời gian phản ứng 5 giờ ở bước gắn Cyanine 5.5 được lựa chọn cho các thử nghiệm tiếp theo.

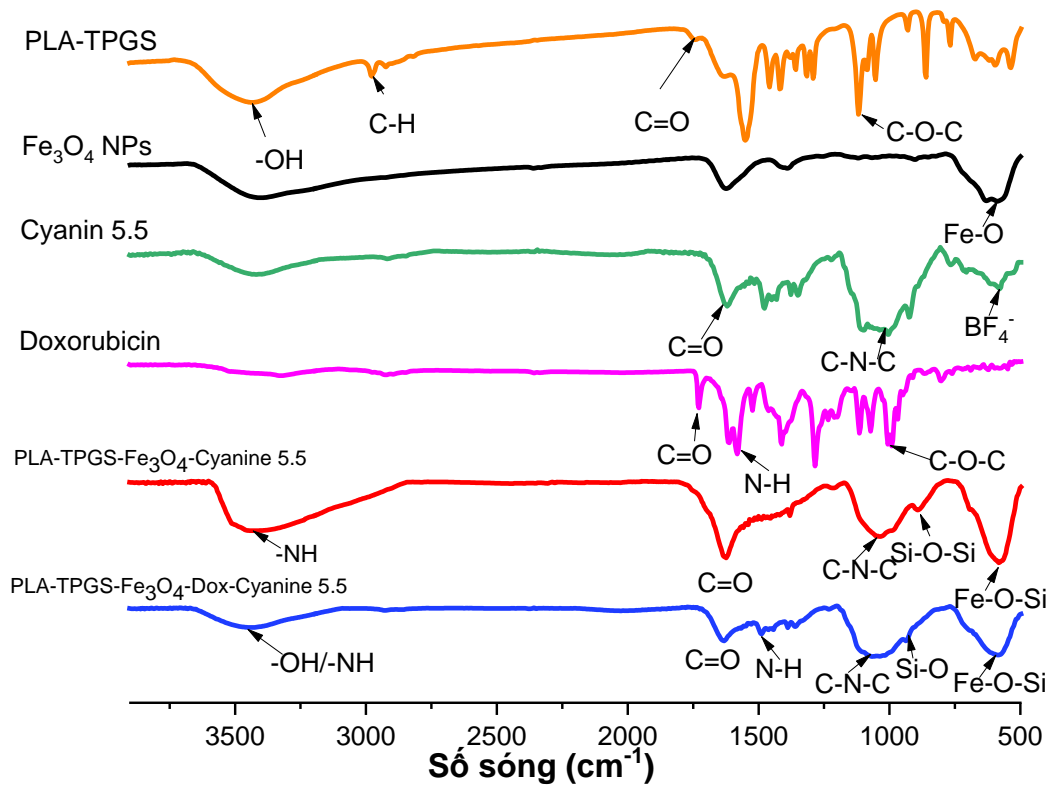


**Hình 4.7.** Phổ huỳnh quang của các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 ở các điều kiện thời gian khác nhau

Từ kết quả khảo sát các điều kiện phản ứng, hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 có khả năng phát huỳnh quang tốt, với các điều kiện tối ưu như sau: tỉ lệ Cyanine 5.5 :  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs (w/w) = 0,05 : 1; tỉ lệ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs : APTES (w/w) = 10:3; nhiệt độ 70 °C; độ pH 8,5; thời gian phản ứng 5 giờ.

## 4.2. Đặc trưng tính chất lý, hóa

Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 được trình bày trong hình 4.8. Trong đó, pic quan sát được ở 587 cm<sup>-1</sup> tương ứng với dao động của liên kết Fe-O trong Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs. Ngoài ra, phổ FTIR của hệ nano xuất hiện dao động hóa trị của Fe-O-Si ở 578 cm<sup>-1</sup> chồng lên các dao động Fe-O từ các Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs. Trong phổ FTIR của Cyanine 5.5, các pic hấp thụ ở 1645 cm<sup>-1</sup> và 1126 cm<sup>-1</sup> tương ứng với các liên kết cacbonyl ester đặc trưng C=O và C-N-C hóa trị tương ứng. Một pic nhỏ ở 925 cm<sup>-1</sup> có thể được gán cho anion [BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] trong phân tử Cyanine 5.5 dạng NHS este [165]. Để gắn được phân tử Cyanine 5.5 (ở dạng NHS ester chứa nhóm COO<sup>-</sup>) lên hệ nano, điều quan trọng là phải chức năng hóa bề mặt của Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs bằng cách gắn các nhóm chức amin -NH<sub>2</sub>. Sự gắn kết hóa học của APTES với các cấu trúc nano thông qua nhóm 3-aminopropyl dẫn đến sự hình thành các nhóm -NH<sub>2</sub> trên bề mặt của Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs. Bằng cách ngưng tụ các nhóm silanol và ethoxy, nhóm chức 3-aminopropyl được liên kết với bề mặt của Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs. Sau đó, Cyanine 5.5 được gắn vào các hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> bằng phản ứng tạo liên kết amid (NH-CO).



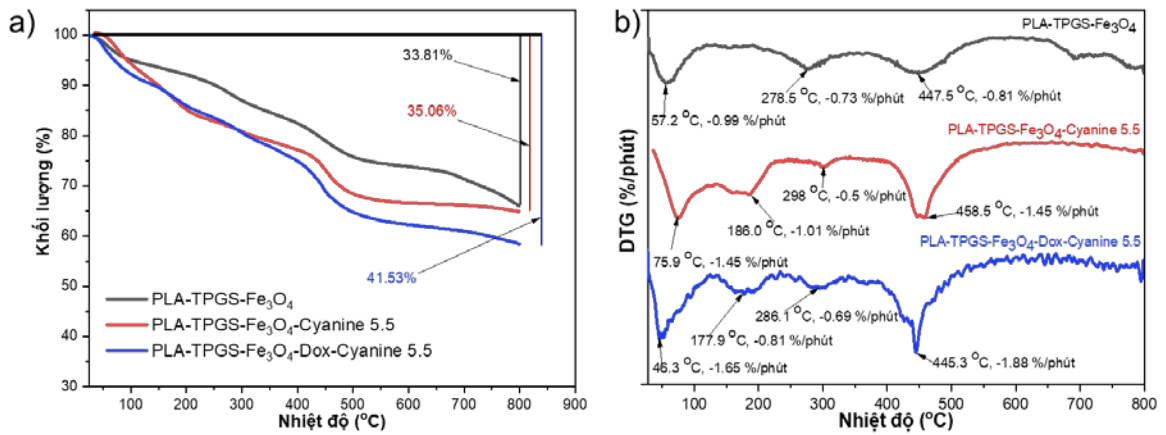
**Hình 4.8.** Phổ hồng ngoại FTIR của hệ nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 và các chất thành phần



Đối với hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5, độ bao phủ của silane với nhóm amin tự do của APTES trên bề mặt oxit sắt được xác nhận bằng pic tương ứng với Si-O-Si ở 1014 cm<sup>-1</sup>, dao động biến dạng và các dao động hóa trị của -NH ở các số sóng tương ứng là 1403 cm<sup>-1</sup> và 3467 cm<sup>-1</sup> [166]. Sự xuất hiện của APTES trên bề mặt của Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs cung cấp các nhóm chức amino cho Cyanine 5.5 có thể gắn vào [167]. Ngoài ra, các pic đặc trưng xuất hiện trên hình 4.8 tại các số sóng 3400 cm<sup>-1</sup>, 2923 cm<sup>-1</sup>, 1631 cm<sup>-1</sup>, 1110 cm<sup>-1</sup> và 925 cm<sup>-1</sup> tương ứng với các dao động biến dạng và dao động hóa trị của nhóm NH hoặc -OH, dao động hóa trị của C-H (CH<sub>3</sub>), dao động hóa trị của C=O (từ amit), và dao động hóa trị của Si-O trong hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 cũng được quan sát thấy. Cuối cùng, sự xuất hiện của các pic đặc trưng của Doxorubicin (C=O, N-H, C-O-C) trong hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 cho thấy quá trình nano hoá thuốc Dox thành công [168].

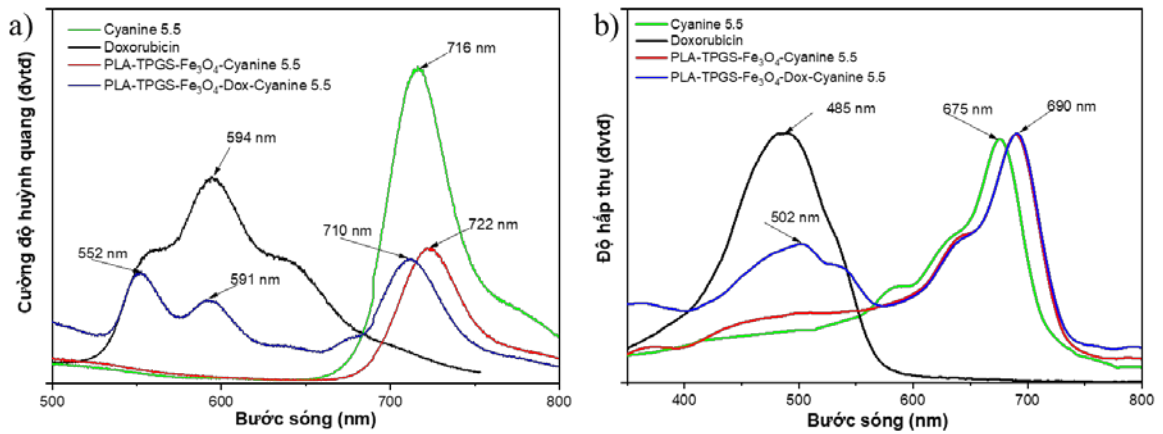
Để xác nhận thêm về quá trình chức năng hóa bề mặt của hạt nano oxit sắt từ (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs) với các nhóm amin APTES, quá trình gắn Cyanine 5.5 và nano hoá Doxorubicin lên hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5, các hệ được phân tích bằng phương pháp đo nhiệt - khối lượng (TGA). Hình 4.9a mô tả đường cong nhiệt - khối lượng TGA, trình bày khối lượng còn lại của mẫu thay đổi như thế nào theo nhiệt độ. Kết quả cho thấy, sự giảm trọng lượng đầu tiên là khoảng 0,99 - 1,65 wt% ở 75 - 120 °C, điều này là do sự bay hơi của phân tử nước ẩm trong cả ba hệ nano. Đối với hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, sự giảm trọng lượng lần thứ hai là khoảng 13,7 wt% ở 200 - 300 °C, có thể là do quá trình đốt cháy phần PLA của copolyme PLA-TPGS với đỉnh tỏa nhiệt ở 278,5 °C trong đường phân tích nhiệt vi sai DTA (Hình 4.9b) [169]. Ở giai đoạn thứ ba, khối lượng hao hụt khoảng 19,19 % trọng lượng ở 450 - 500 °C, tương ứng với quá trình phân hủy nhiệt của dư lượng TPGS của copolyme tương ứng với đỉnh tỏa nhiệt ở 447,5 °C [170]. Cuối cùng, khối lượng giảm đi của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> là 33,81 wt%, cho thấy hàm lượng PLA-TPGS của hệ nano tương ứng với tỉ lệ thành phần ban đầu. Bằng cách so sánh giản đồ TGA của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, tỉ lệ mất khối lượng cao hơn trong các hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5 và PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 cho thấy hàm lượng Cyanine 5.5 và Dox lần lượt là

1,25 % và 6,47 %. Kết quả này cũng phù hợp với ước tính về sự đóng góp khối lượng của các thành phần hữu cơ trong công thức nano ban đầu.



**Hình 4.9.** (a) Giảm đồ phân tích nhiệt khối lượng TGA; (b) giảm đồ nhiệt trọng lượng vi phân DTG của các hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5 và PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5

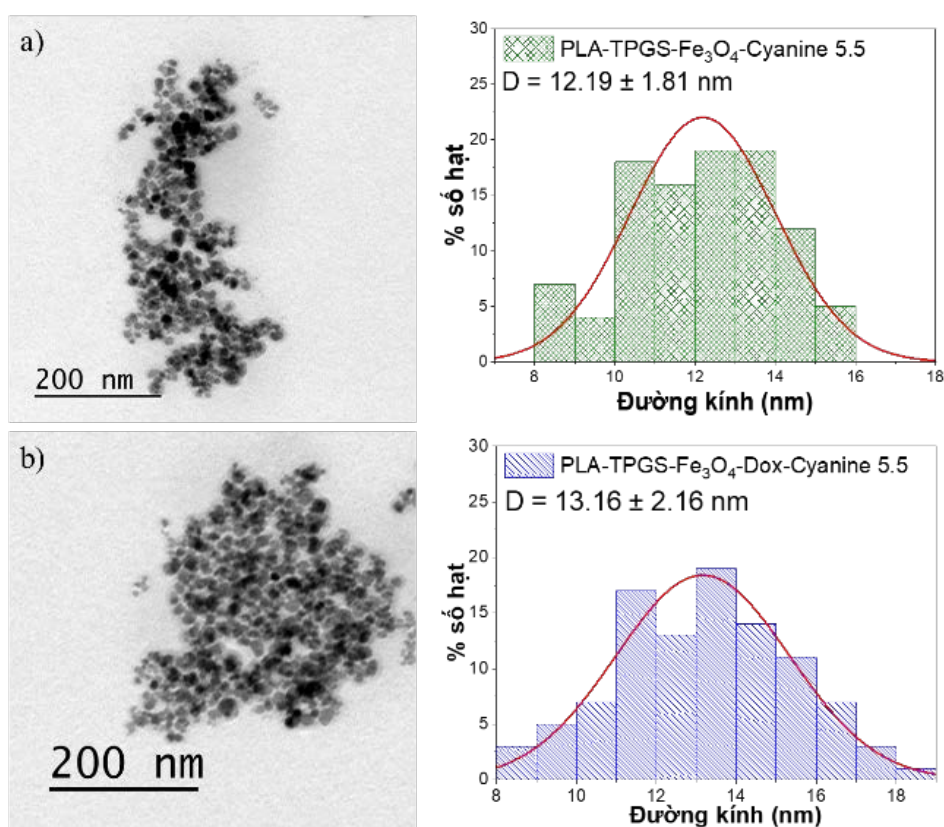
Sự có mặt của Cyanine 5.5 và Doxorubicin trong hệ nano đa chức năng đã được chứng minh bằng phổ huỳnh quang và phổ hấp thụ UV-Vis. Hình 4.10a là phổ huỳnh quang của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 và các chất thành phần cho thấy các cực đại phát xạ chính ở khoảng 716 nm và 594 nm tương ứng với Cyanine 5.5 và Doxorubicin. Sau khi gắn Cyanine 5.5, đỉnh phát xạ đặc trưng của Cyanine 5.5 trong hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5 bị dịch chuyển đỏ (redshift) 6 nm so với Cyanine 5.5 tự do. Sự dịch chuyển đỏ có thể được giải thích bằng sự gia tăng kích thước hạt nano và sự tương tác giữa các hạt nano oxit sắt từ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> và Cyanine 5.5 sau khi gắn, được bao bọc trong copolyme PLA-TPGS [171, 172]. Trong khi đó, sự dịch chuyển xanh (blueshift) trên phổ huỳnh quang của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 có thể là do sự tương tác giữa Dox và các thành phần Cyanine 5.5, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs, và copolyme PLA-TPGS trong hệ nano [173]. Do những tương tác này, cường độ phát huỳnh quang của cả hai hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5 và PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 đều thấp hơn so với mẫu Cyanine 5.5 và Doxorubicin tự do. Hơn nữa, cường độ phát huỳnh quang thấp hơn một phần do ảnh hưởng của lõi Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs gây ra hiệu ứng dập tắt huỳnh quang [172].



**Hình 4.10.** (a) Phổ huỳnh quang; (b) phổ UV-Vis của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 và các chất thành phần

Phổ hấp thụ UV-Vis của các hệ nano trước và sau khi gắn Cyanine 5.5 và mang thuốc Doxorubicin được trình bày trên Hình 4.10b. Cyanine 5.5 tự do có cực đại hấp thụ điển hình ở bước sóng 675 nm. Điều thú vị là cực đại hấp thụ của cả hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5 và PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 đều ở vùng hồng ngoại gần với độ dịch chuyển đỏ 15 nm từ 675 đến 690 nm. Sự dịch chuyển đỏ trong phổ hấp thụ của hệ nano có thể được giải thích bằng sự hình thành liên kết NH-CO giữa phân tử Cyanine 5.5 và nhóm NH<sub>2</sub> trên bề mặt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs sau khi chức năng hoá bằng APTES, đặt phân tử Cyanine 5.5 vào môi trường kỵ nước hơn do tính chất kỵ nước của Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs và chuỗi PLA của copolyme PLA-TPGS [174]. Dobson và cộng sự cũng cho thấy rằng Cyanine 5.5 thể hiện dải hấp thụ chính từ 620 đến 720 nm với vai phổ trong khoảng 620 đến 640 nm. Đây là vùng bước sóng kích thích thích hợp để thu thập toàn bộ tín hiệu phát ra từ 650 đến 710 nm [175]. Hơn nữa, so với Doxorubicin tự do (cực đại hấp thụ ở bước sóng 485 nm), cực đại hấp thụ của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 dịch chuyển sang bước sóng 502 nm, là kết quả của tương tác thuốc - copolyme PLA-TPGS. Hiện tượng dịch chuyển đỏ này phù hợp với các công bố khác khi Doxorubicin được bao bọc trong các hệ nano bằng polyme polyethylen glycol (PEG) hoặc axit polylactide-co-glycolide (PLGA) trong đó các tương tác xếp chồng  $\pi$ - $\pi$  trong phân tử Doxorubicin được nano hoá trong các hệ nano [176, 177]. Tất cả những kết quả này đã chứng minh rõ ràng hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 được chế tạo thành công, và tiềm năng của hệ nano này trong việc đánh giá huỳnh quang *in vivo*.

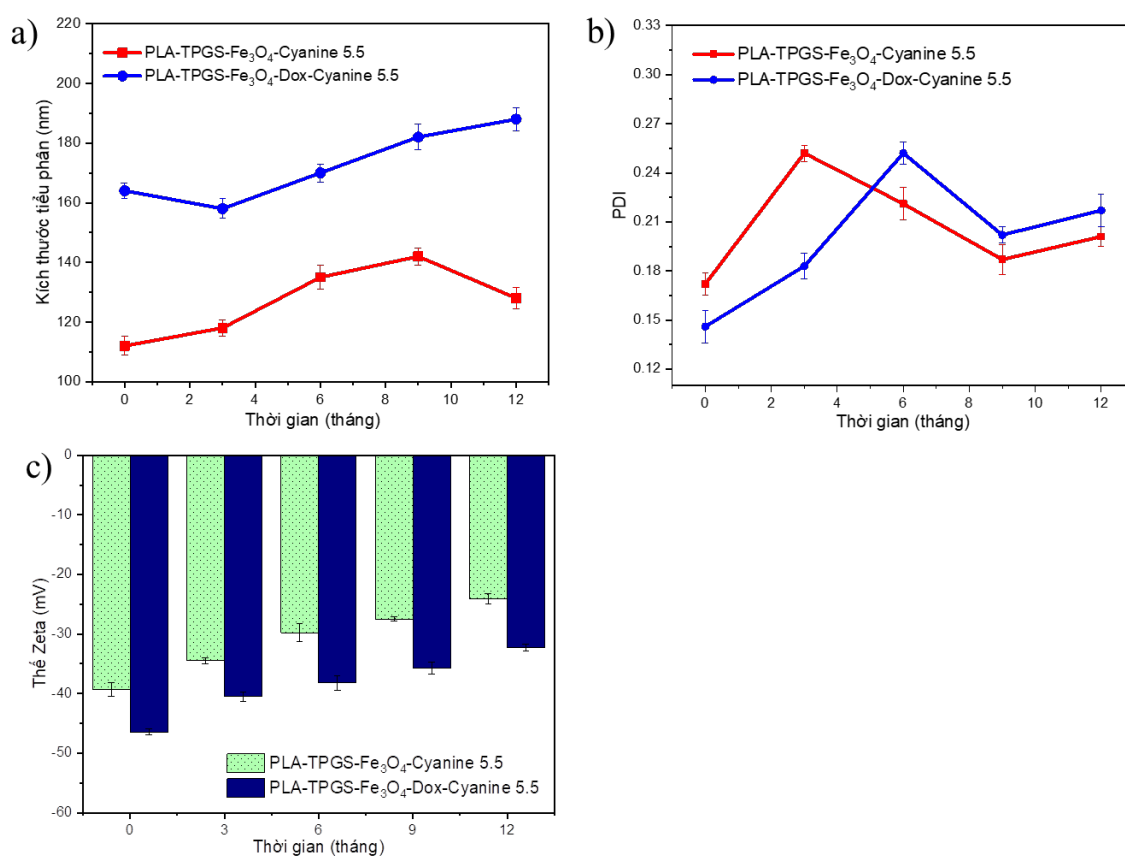
Trong nghiên cứu này, các hạt nano oxit sắt từ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  kỵ nước trở nên phân tán trong nước nhờ sự bao bọc của phối tử APTES. Hình 4.11 thể hiện ảnh TEM của các hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Cyanine 5.5 và PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5. Có thể thấy rằng các hạt nano có dạng hình cầu và đơn phân tán mà không có sự kết tập tiểu phân lớn. Kích thước hạt khoảng 10 - 15 nm với sự phân bố kích thước hẹp. Kích thước trung bình của các hạt nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Cyanine 5.5 và PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 được đo từ ảnh TEM bằng phần mềm ImageJ lần lượt là  $12,19 \pm 1,81$  nm và  $13,16 \pm 2,16$  nm.



**Hình 4.11.** Ảnh TEM và biểu đồ phân bố kích thước của hệ nano (a) PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Cyanine 5.5; (b) PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5

Trong khi đó, phép đo tán xạ ánh sáng động (DLS) cho thấy đường kính thủy động trung bình của các hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Cyanine 5.5 và PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 lần lượt là khoảng  $112,0 \pm 3,2$  nm và  $164,0 \pm 2,6$  nm (Hình 4.12a). Kích thước tiểu phân đo được trong DLS lớn hơn trong ảnh TEM. Đó là do sự mở rộng trong nước của hợp phần ưa nước TPGS trong lớp vỏ ngoài cùng của hạt nano và một số phép tính gần đúng hóa lý trong phép tính cuối cùng của đường kính thủy động sử dụng phép đo DLS như được mô tả trong các tài liệu trước đây

[178]. Kích thước của hệ nano tăng dần theo thời gian lưu trữ, lần lượt đạt  $128,0 \pm 3,5$  nm và  $188,0 \pm 3,8$  nm đối với các hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5 và PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 sau 12 tháng. Điều này có thể là do sự hình thành cụm hạt khi phân tán và dẫn đến sự gia tăng nhẹ về đường kính trung bình [179]. Ngoài ra, chỉ số đa phân tán PDI của cả hai hệ nano đều dao động nhẹ, nhưng đều nhỏ hơn 0,3 (Hình 4.12b), cho thấy sự phân bố hẹp và tính đồng nhất cao của các hạt nano [180]. Các nghiên cứu trước đây đã đề xuất rằng kích thước và hình dạng của hệ nano có thể ảnh hưởng đến sự phân bố sinh học của hệ. Kích thước hạt nhỏ hơn 200 nm phù hợp để truyền tĩnh mạch và hướng đích thụ động khối u bằng hiệu ứng EPR với giá trị PDI thấp hơn 0,3 [181].



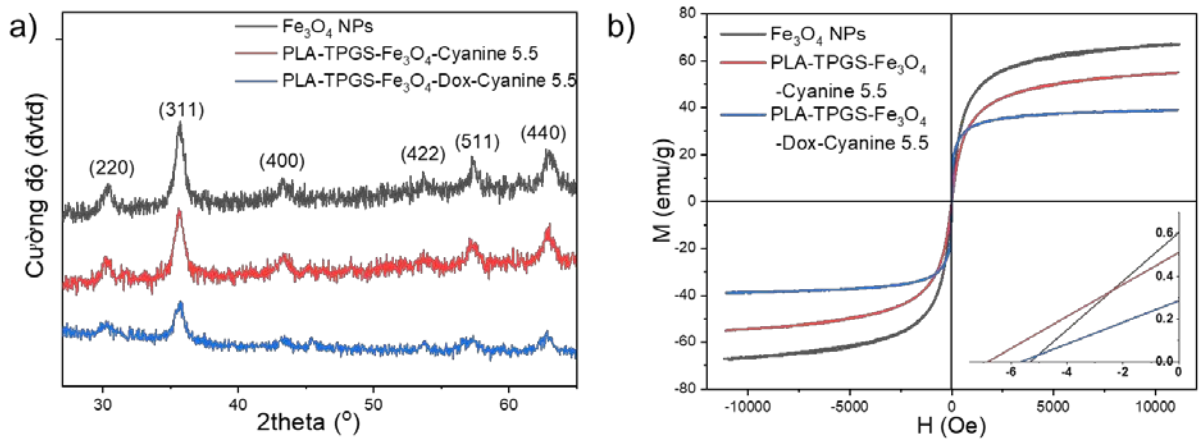
**Hình 4.12.** Sự thay đổi về (a) kích thước thủy động; (b) chỉ số đa phân tán PDI; (c) thế Zeta trong thời gian 12 tháng của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5 và PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5

Giá trị thế Zeta của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5 là  $-39,3$  mV và hệ PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 là  $-46,5$  mV. Giá trị thế Zeta của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 trở nên âm hơn khi mang thuốc Doxorubicin

do sự phân ly ngày càng tăng của các nhóm amin. Ngoài ra, Doxorubicin là một axit yếu ( $pK_a = 9,93$ ), làm thay đổi điện tích bề mặt bằng cách gây ra tương tác giữa các phân tử và trao đổi proton giữa các phân tử thuốc thông qua các nhóm amin  $-NH_2$  [136]. Hình 4.12c thể hiện sự thay đổi thế Zeta của hai hệ nano này trong 12 tháng. Thế zeta của hệ nano PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox-Cyanine 5.5 sau 12 tháng là  $-34,3$  mV, trong khi của hệ PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Cyanine 5.5 là  $-24,1$  mV. Sự thay đổi về thế zeta này có thể là do nhiều yếu tố, đặc biệt là sự thay đổi trong tương tác phân tử giữa thuốc/copolymer/Cyanine 5.5 trong hệ nano [182]. Điều quan trọng là, giá trị tuyệt đối của thế zeta của cả hai hệ nano đều cao cho thấy độ ổn định tốt với xu hướng kết tập thấp. Do tương tác tĩnh điện giữa các hạt nano và nhiều phân tử sinh học trong cơ thể, thế zeta là cũng là một yếu tố quan trọng liên quan đến sự phân bố sinh học trong cơ thể [183]. Các hạt nano tích điện dương có nhiều khả năng bị hấp thụ bởi các tế bào không hướng đích, điều này có thể gây ra tác dụng phụ, làm giảm hiệu quả phân phối đến các tế bào mục tiêu và rút ngắn thời gian lưu thông [184]. Do đó, hệ nano PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox-Cyanine 5.5 có thể tăng thời gian lưu thông bằng cách giảm liên kết với protein huyết thanh do lợi thế về điện tích bề mặt âm của chúng [185].

Cấu trúc tinh thể của các hệ nano được nghiên cứu bằng phương pháp nhiễu xạ tia X (XRD). Biểu đồ XRD của hệ nano PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox-Cyanine 5.5 và PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Cyanine 5.5 (Hình 4.13a) cho thấy các pic đặc trưng quan sát được ở  $30,34^\circ$  (220),  $35,71^\circ$  (311),  $43,22^\circ$  (400),  $53,65^\circ$  (422),  $57,24^\circ$  (511) và  $63,09^\circ$  (440) phù hợp với pha Spinel lập phương nghịch đảo của  $Fe_3O_4$  (magnetit, JCPDS số 85-1436), chứng tỏ rằng sự hình thành hệ PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox-Cyanine 5.5 và PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Cyanine 5.5 không ảnh hưởng đến cấu trúc tinh thể của hạt lõi nano từ  $Fe_3O_4$ . Kết quả này dẫn đến việc bảo toàn các tính chất từ của hệ nano, điều này có thể thấy rõ ở các kết quả nghiên cứu tiếp theo. Những kết quả này tương tự như những kết quả được trình bày trong các nghiên cứu trước [186]. Kích thước tinh thể được xác định bằng sự mở rộng vạch và áp dụng hệ thức Scherrer:  $D = K\lambda / (\beta \cos \theta)$ , trong đó K là hằng số ( $K = 0,9$  đối với Cu- $K\alpha$ ),  $\lambda$  là bước sóng ( $0,15418$  nm đối với Cu- $K\alpha$  và  $\beta$  là độ rộng bán phổ của đỉnh (311) [123]. Đường kính tinh thể trung bình là  $9$  nm, tương đương với kích thước quan sát được qua ảnh TEM ở trên, đồng thời cho thấy tính chất đơn pha tinh thể và độ kết tinh

cao của các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Giảm đồ XRD của các hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Cyanine 5.5 và PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 cho thấy không có sự dịch chuyển về vị trí nhưng các pic đặc trưng mở rộng, cho thấy sự bao bọc thành công của copolyme PLA-TPGS và APTES, gắn Cyanine 5.5 và nano hoá Doxorubicin mà không làm thay đổi tính chất của lõi  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs. Các nghiên cứu khác cũng cho thấy kết quả tương tự, trong đó lõi  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs được phủ bằng polyme PEG [187], dextran [188], mPEG-b-PLGA [189] hoặc gắn với các tác nhân huỳnh quang như chấm lượng tử CdTe [65].



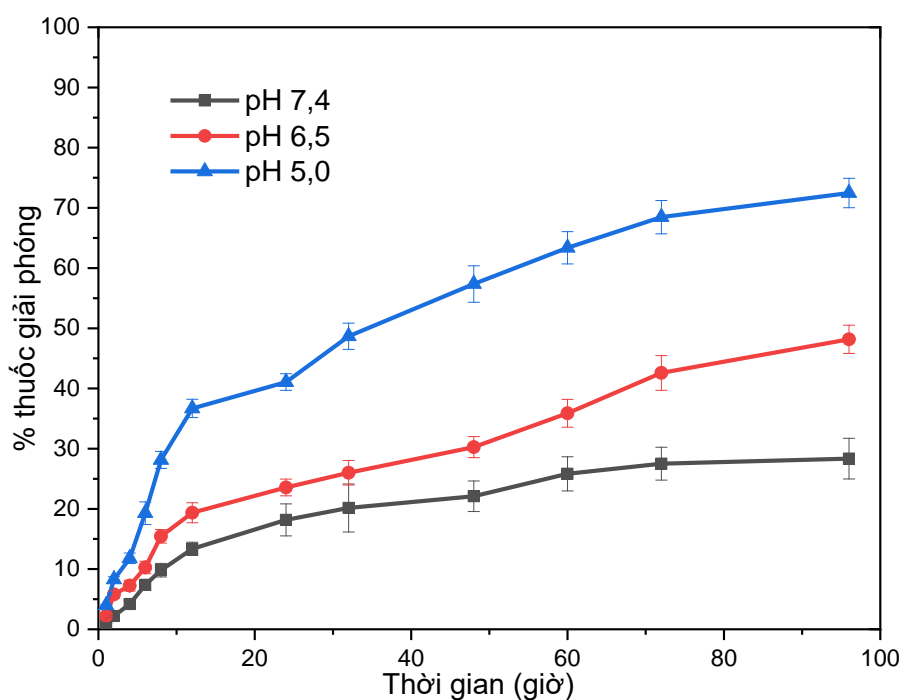
**Hình 4.13.** (a) Giảm đồ XRD; (b) đường cong từ hóa của  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs, các hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Cyanine 5.5 và PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 ở 300 K

Các đường cong từ hóa biểu thị giá trị  $M_s$  của  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs và hai hệ nano (Hình 4.13b). Từ độ bão hòa ( $M_s$ ) đạt 67,4 emu/g đối với hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ở nhiệt độ phòng. Tuy nhiên, từ độ bão hòa của  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs sau khi được phủ bởi copolyme PLA-TPGS trong hệ dẫn thuốc nano đa chức năng đã giảm đáng kể. Hình 4.13b cho thấy các giá trị từ độ bão hòa của các hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Cyanine 5.5 và PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 lần lượt là 54,6 và 38,6 emu/g. Giá trị  $M_s$  thấp hơn của cả hai hệ nano là do các thành phần copolyme hợp PLA-TPGS, Cyanine 5.5, và Doxorubicin là các chất không từ tính, như vậy tổng momen từ trên một đơn vị khối lượng giảm dẫn đến giảm từ độ bão hòa. Xu hướng giá trị  $M_s$  giảm này cũng đã được báo cáo trong các nghiên cứu khác [178, 190]. Ngoài ra, giá trị lực kháng từ ( $H_c$ ) đo được của  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs, PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Cyanine 5.5 và PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 lần lượt là 5,2, 6,8 và 5,6 Oe, chứng tỏ đặc tính siêu thuận từ của các hạt nano được tổng hợp ở nhiệt độ phòng [191]. Dựa trên các đặc tính từ

tính và quang học của hạt nano, có thể suy ra rằng hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 thể hiện khả năng phát huỳnh quang mạnh với đặc tính siêu thuận từ ở nhiệt độ phòng, cho thấy ứng dụng tiềm năng của chúng trong y sinh.

#### 4.3. Đánh giá động học giải phóng thuốc *in vitro*

Để phân phối thuốc hiệu quả đến ma trận ngoại bào và xâm nhập vào bên trong tế bào của khối u cũng như tránh giải phóng sớm, động học và cơ chế giải phóng thuốc của Doxorubicin từ hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin đã được trình bày trong phần 3.1.2. Ở phần này, chúng tôi đã gắn Cyanine 5.5 vào hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 để tạo thành một tác nhân trị liệu mới với hình ảnh đa phương thức và khả năng phân phối thuốc hiệu quả. Trong nghiên cứu này, khi kết hợp Cyanine 5.5, hiệu suất nano hóa Dox của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 là 84,7% ở nồng độ 250 µg/mL và khả năng mang thuốc (hàm lượng tải Doxorubicin) là 6,67% trọng lượng của hệ nano. Động học giải phóng thuốc của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 được đánh giá ở điều kiện sinh lý mô phỏng (pH 7,4) và trong điều kiện axit ma trận ngoại bào khối u (pH 5,0 và 6,5) ở 37 °C.



**Hình 4.14.** Động học giải phóng thuốc *in vitro* của Doxorubicin từ PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 trong các dung dịch pH 7,4, 6,5 và 5,0 ở 37°C

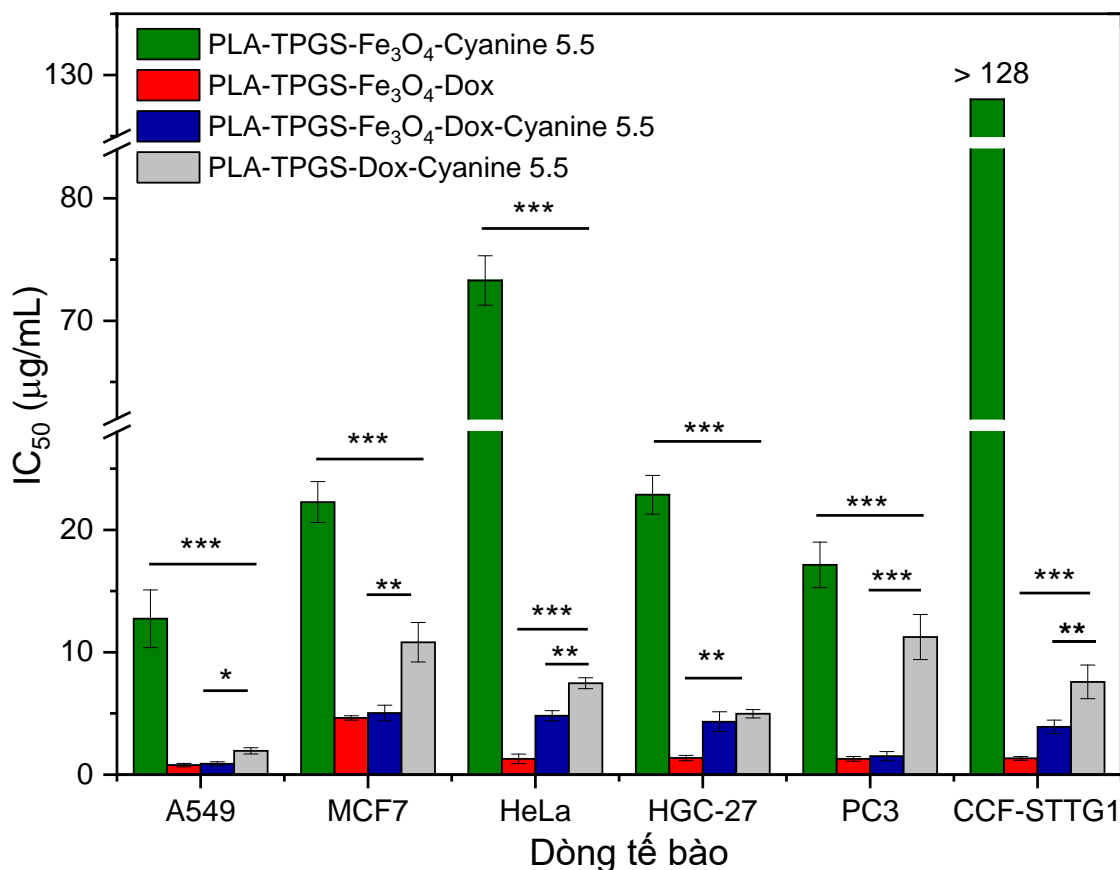


Động học giải phóng thuốc cho thấy rõ ràng sự giải phóng Dox từ hệ nano này phụ thuộc vào độ pH (Hình 4.14). Sự giải phóng Dox ở pH sinh lý rất chậm, với mức giải phóng ban đầu khoảng 9% trong 8 giờ đầu tiên và chỉ giải phóng 28,33% trong 96 giờ. Tốc độ giải phóng được chất tăng khi giá trị pH giảm. Tốc độ giải phóng được chất ở pH 5,0 và 6,5 tăng rõ rệt hơn so với pH 7,4. Tại pH 5,0, 48% Doxorubicin được giải phóng ở pH 6,5 trong vòng 96 giờ và tăng lên 72,47%. Kết quả này cho thấy rằng hầu hết Doxorubicin được nano hóa trong hệ dẫn thuốc nano đa chức năng giải phóng chậm ở pH 7,4; có khả năng giữ ổn định tương đối trong huyết tương sau khi tiêm, có thể giúp làm giảm đáng kể tác dụng phụ toàn thân lên các mô khỏe mạnh. Ngược lại, sự giải phóng Dox nhanh hơn sẽ xảy ra sau khi hệ thống nano xâm nhập vào khối u, do độ pH thấp hơn nhiều (5,0 đến 6,5) so với pH sinh lý [192]. Độ pH axit cải thiện tính ưa nước và tăng khả năng hòa tan của Dox được giải phóng từ hệ nano bằng cách tạo ra các nhóm  $-NH_2$  của phân tử Dox. Do đó, tương tác kỵ nước giữa các phân tử Dox và đoạn PLA của copolyme PLA-TPGS giảm trong môi trường axit, điều này làm tăng tốc độ giải phóng Dox [193]. Trong điều kiện axit, Dox được giải phóng từ hệ PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox theo mô hình động học Weibull bằng cơ chế khuếch tán Fickian cổ điển. Quá trình giải phóng Dox của hệ nano PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox-Cyanine 5.5 chậm hơn so với hệ nano PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox không có Cyanine 5.5 ở cả điều kiện pH 5,0 và 7,4 (được trình bày trong chương 3 của luận án). Điều này có thể là do tính kỵ nước và điện tích âm của Cyanine 5.5 đã cản trở một phần sự giải phóng Dox thông qua tương tác phân tử giữa Doxorubicin và Cyanine 5.5 được bao bọc bởi copolyme PLA-TPGS [194]. Do đó, hệ nano PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox-Cyanine 5.5 có khả năng giải phóng thuốc tốt tại môi trường khối u, làm tăng hiệu quả của liệu pháp điều trị ung thư.

#### **4.4. Đánh giá tác dụng và cơ chế gây độc tế bào ung thư**

Các hệ nano PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Cyanine 5.5, PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox, PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox-Cyanine 5.5 và PLA-TPGS-Dox-Cyanine 5.5 được đánh giá về tác dụng và cơ chế gây độc tế bào của chúng so với một số dòng tế bào ung thư ở người. Các thông số về độc tính tế bào, tính theo  $IC_{50}$  thu được từ thử nghiệm MTT, được trình bày trong hình 4.15.

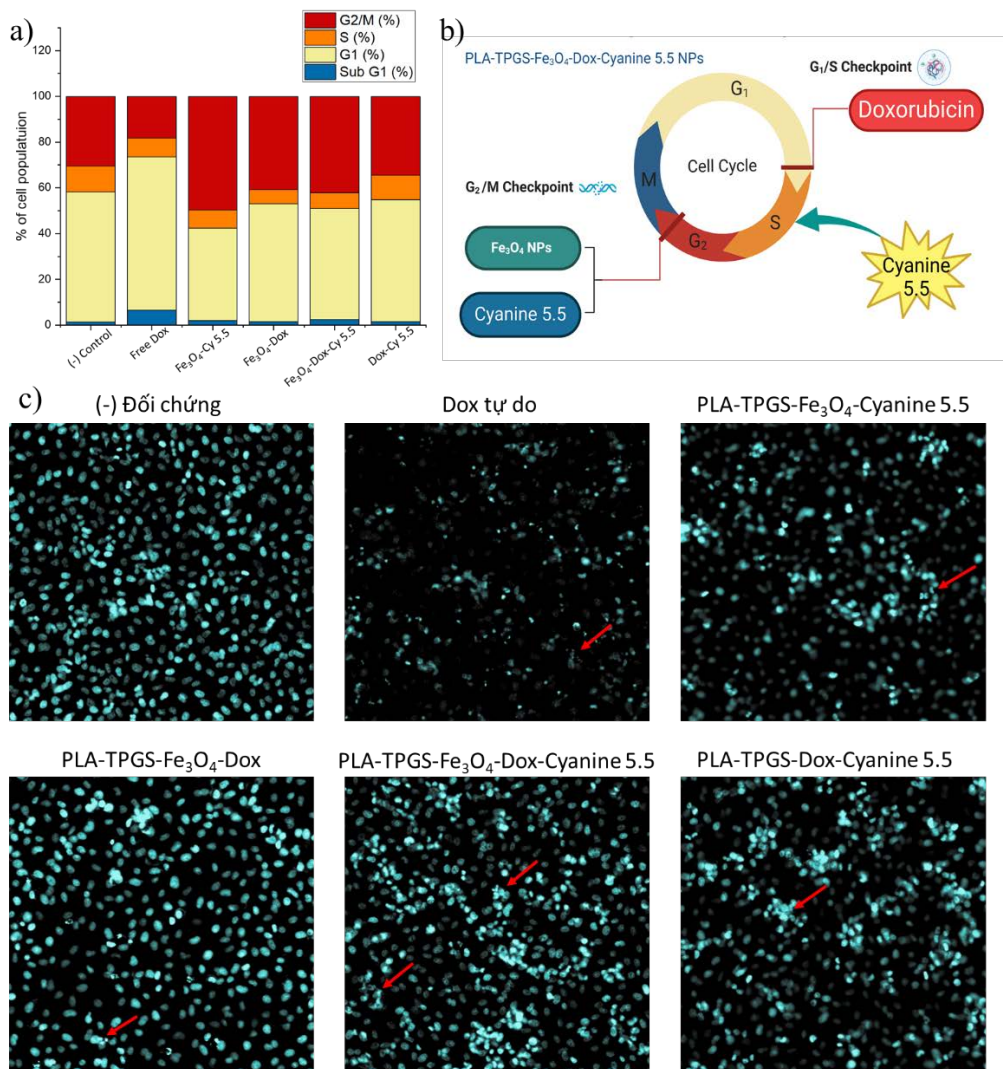
So với các hệ nano mang thuốc Doxorubicin, hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5 cho thấy độc tính thấp hơn trên tất cả các dòng tế bào được thử nghiệm: HeLa (tế bào ung thư cổ tử cung), HGC-27 (tế bào ung thư biểu mô dạ dày), A549 (tế bào ung thư biểu mô phổi), MCF7 (tế bào ung thư biểu mô tuyến vú), PC3 (tế bào ung thư biểu mô tuyến tiền liệt) và CCF-STTG1 (tế bào ung thư biểu mô não).



**Hình 4.15.** Đánh giá độc tính tế bào *in vitro* của các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ ; và \*\*\* $p < 0,0001$  ( $n=3$ ))

Trên dòng tế bào HeLa, hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 có giá trị  $IC_{50} = 4,81 \pm 0,42 \mu\text{g/mL}$ , so với PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox có hoạt tính mạnh hơn với  $IC_{50} = 1,29 \pm 0,39 \mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,0001$ ). Khi không mang Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, hệ nano PLA-TPGS-Dox-Cyanine 5.5 có giá trị  $IC_{50} = 7,47 \pm 0,45 \mu\text{g/mL}$ , so với hệ nano không mang thuốc PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5 có độc tính thấp nhất, với giá trị  $IC_{50} = 73,29 \pm 2,02 \mu\text{g/mL}$ . Namvar và cộng sự đã báo cáo độc tính tế bào của hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> là  $23,83 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$  (HepG2),  $18,75 \pm 2,1 \mu\text{g/mL}$  (MCF-7) và  $12,5 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$  (HeLa) sau 72 giờ điều trị [195]. Đánh giá khả năng cảm ứng apoptosis cho thấy các hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> gây ra sự gia tăng tỷ lệ apoptosis sớm và muộn trong các tế

bào Jurkat. Trong khi đó, hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5 thể hiện độc tính rất thấp (IC<sub>50</sub> > 128 µg/mL) trên dòng tế bào ung thư biểu mô não CCF-SSTG1. Khi mang thuốc Dox, hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox thể hiện hoạt tính mạnh ức chế tế bào ung thư với IC<sub>50</sub> = 1,33 ± 0,16 µg/mL. Trong khi việc gắn Cyanine 5.5, hệ nano có độc tính thấp hơn với giá trị IC<sub>50</sub> = 3,91 ± 0,55 µg/mL và 7,58 ± 1,37 µg/mL, tương ứng với hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 và PLA-TPGS-Dox-Cyanine 5.5 (p < 0,0001). Kết quả tương tự cũng được ghi nhận đối với các dòng tế bào ung thư còn lại. Những kết quả này là cơ sở để tiếp tục đánh giá cơ chế gây độc tế bào của các hệ nano.



**Hình 4.16.** (a) Phân bố chu kỳ tế bào; (b) sơ đồ minh họa cơ chế gây độc tế bào của từng thành phần Doxorubicin, Cyanine 5.5 và Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>; (c) chụp ảnh đồng tiêu bốn hệ nano trên dòng tế bào CCF-SSTG1 (độ phóng đại 20 lần, camera sCMOS).

*Mũi tên màu đỏ cho thấy các tế bào được cảm ứng để trải qua quá trình apoptosis.*

Kết quả phân tích chu kỳ tế bào một lần nữa khẳng định vai trò gây độc tế bào của các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , Doxorubicin và Cyanine 5.5 trong các hệ nano bằng kỹ thuật đo tế bào định lượng, còn gọi là phân tích sàng lọc nội hàm cao (High-content screening, HCS). Một trong những vai trò cơ bản nhất của tế bào là phát triển thông qua chu kỳ tế bào. Tính ổn định của DNA hoặc bộ gen sẽ bị ảnh hưởng nếu chu kỳ tế bào không được kiểm soát hoàn toàn. Điều này liên quan đến những bất thường trong sự xuất hiện và tiến triển của bệnh, đặc biệt là ung thư. Trong nghiên cứu này, tác động của các hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , Dox và Cyanine 5.5 trong các giai đoạn phân bào riêng biệt trên dòng tế bào CCF-STTG1 đã được xác định, từ đó làm sáng tỏ cơ chế gây độc tế bào của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng. Hình 4.16a cho thấy Dox tự do đã bắt giữ chu kỳ tế bào trong giai đoạn G1 của tế bào ung thư biểu mô não (CCF-STTG1) tăng 67,02%. Sự kết hợp của Cyanine 5.5 và Dox trong hệ nano PLA-TPGS-Dox-Cyanine 5.5 đã làm giảm số lượng tế bào trong pha G1 xuống 53,23% và tăng số lượng tế bào trong pha G2/M lên 34,44%. Ngược lại, sự phân bố chu kỳ tế bào ở pha G2/M của tế bào CCF-STTG1 được xử lý bằng PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Cyanine 5,5 là 49,69%, trong khi ở nhóm đối chứng (-) là 30,5% (Hình PL1). So với nhóm đối chứng, hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 làm tăng tỷ lệ tế bào ở pha G2/M cao hơn hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox, với tỷ lệ lần lượt là 42,12% và 40,79%. Như vậy, kết quả cho thấy các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  và Cyanine 5.5 có tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào, gây ra sự ngừng chu kỳ tế bào ở pha G2/M đối với các tế bào ung thư biểu mô não. Một nghiên cứu khác cho thấy rằng bằng cách làm cho các tế bào MCF-7 rơi vào trạng thái bị bắt giữ ở pha S, các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  đã làm giảm quá trình tổng hợp DNA một cách hiệu quả và làm tăng sự chết của tế bào [196].

Điều đáng chú ý là hệ nano không chứa  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , PLA-TPGS-Dox-Cyanine 5.5 lại gây ra mức tăng cao nhất số lượng tế bào bị bắt giữ trong pha S so với các hệ nano khác, thể hiện vai trò của Cyanine 5.5 trong việc bắt giữ chu kỳ tế bào ở pha S (Hình 4.16b). Điểm kiểm tra pha S ngăn chặn việc sao chép DNA bị hư hỏng trong chu kỳ tế bào, dẫn đến việc dừng chu kỳ tế bào, ức chế tổng hợp DNA và thậm chí có thể gây ra apoptosis, tất cả đều làm giảm sự tăng sinh tế bào [197, 198]. Ngoài ra, tế bào chết theo chương trình (apoptosis) có thể được gây ra bởi sự điều khiển của chu kỳ tế bào. Hình 4.16c cho thấy tất cả các hệ nano đều gây ra apoptosis trong

các tế bào CCF-STTG1 (mũi tên màu đỏ), cho thấy sự hiện diện của các tế bào chết. Những kết quả đầy hứa hẹn này xác nhận khả năng thâm nhập tế bào hiệu quả của bốn công thức nano. Chuỗi TPGS của copolyme PLA-TPGS đã được báo cáo là có tác dụng tăng cường sự hấp thu tế bào của hạt nano và có đặc tính gây ra apoptosis độc đáo thông qua việc sản xuất các loại oxy phản ứng [199]. Người ta đã chứng minh rằng Dox tạo ra các chất cộng hóa trị với DNA trong nhân có thể kích hoạt quá trình apoptosis, do đó nâng cao hiệu quả gây độc tế bào tổng thể của hệ nano [200]. Ye và cộng sự đã phát hiện ra rằng các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  có thể ngăn chặn các tế bào ung thư vú MCF-7 phát triển bằng cách gây ra apoptosis do stress oxy hóa và làm đảo lộn chu kỳ tế bào [196]. Do đó, những kết quả này đã chứng minh rằng các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , Doxorubicin và Cyanine 5.5 gây ra sự ngừng chu kỳ tế bào ở các giai đoạn khác nhau, dẫn đến sự kích hoạt cảm ứng apoptosis gây chết tế bào ung thư.

#### **Tóm tắt chương 4**

Trong chương này, chúng tôi đã chế tạo được hệ dẫn thuốc nano đa chức năng gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5; với các điều kiện như sau: tỉ lệ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs : APTES w/w = 10 : 3, tỉ lệ Cyanine 5.5 :  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs w/w = 0,05 : 1, nhiệt độ 70 °C ở bước ghép APTES, pH 8,5 và thời gian 5 giờ ở bước gắn Cyanine 5.5. Hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 thu được có dạng hình cầu, với kích thước trung bình  $13,16 \pm 2,16$  nm, có độ ổn định tốt, thể hiện khả năng phát huỳnh quang mạnh, cho thấy ứng dụng tiềm năng của chúng trong y sinh.

Hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 có khả năng giải phóng thuốc tốt tại môi trường pH axit, đặc trưng cho môi trường vi mô tại vị trí khối u. Hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 có hoạt tính gây độc tế bào cao. Trong đó, trên tế bào ung thư biểu mô não CCF-SSTG1,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  gây độc tế bào theo cơ chế bắt giữ tế bào ở pha G0/G1, Doxorubicin gây độc tế bào theo cơ chế bắt giữ tế bào ở pha G2/M, Cyanine 5.5 gây độc tế bào theo cơ chế bắt giữ tế bào ở pha S. Sự kết hợp của ba cơ chế này gây ra sự chết theo chu trình (apoptosis) của tế bào ung thư.

## CHƯƠNG 5. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG TĂNG ĐỘ TƯƠNG PHẢN TRONG CHỤP CỘNG HƯỞNG TỪ HẠT NHÂN, SỰ PHÂN BỐ *IN VIVO*, TÁC DỤNG HÓA TRỊ VÀ NHIỆT TỬ TRỊ CỦA HỆ DẪN THUỐC NANO ĐA CHỨC NĂNG GẮN CHẤT PHÁT HUỖNH QUANG HỒNG NGOẠI GẦN

Nhờ kích thước nhỏ, hệ dẫn thuốc nano đa chức năng có khả năng hướng đích thụ động thông qua hiệu ứng tăng tính thấm và lưu trữ EPR. Tuy nhiên, khi khối u phát triển, sẽ có những thay đổi đáng kể về mật độ vi môi trường khối u, vùng thiếu oxy/hoại tử và áp suất thủy tĩnh, làm ảnh hưởng đáng kể đến hiệu ứng EPR. Do đó, việc đánh giá sự phân bố của vật liệu nano đa chức năng sau khi tiêm vào cơ thể và hiệu quả hướng đích tới khối u, đóng vai trò quan trọng khi khai thác tác dụng hóa trị, nhiệt tử trị của vật liệu nano đa chức năng.

Chương này sẽ đánh giá sự phân bố *in vivo* của các hệ dẫn thuốc nano đa chức năng đã được tối ưu hoá trong chương 3 và chương 4 bằng kỹ thuật huỳnh quang hồng ngoại gần trên mô hình chuột được gây khối u đại tràng CT26. Ngoài ra, hiệu quả hướng đích tới khối u và khả năng tăng độ tương phản ảnh chụp cộng hưởng từ MRI cũng được xác định thông qua việc định lượng tín hiệu MRI bằng phương pháp % $I_{0,25}$ . Đồng thời, tác dụng hóa trị của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng được đánh giá bằng kỹ thuật phát quang sinh học bioluminescence, và thử nghiệm tác dụng nhiệt tử trị dưới tác động của từ trường xoay chiều trên mô hình *in vivo*.

### 5.1. Đánh giá khả năng tăng độ tương phản trong chụp cộng hưởng từ hạt nhân MRI

#### 5.1.1. Xác định độ hồi phục $r_1$ , $r_2$ và yếu tố ảnh hưởng

Một trong những tiềm năng ứng dụng quan trọng của hạt nano  $Fe_3O_4$  là khả năng tăng độ tương phản ảnh chụp cộng hưởng từ MRI. Vấn đề đặt ra là khi kết hợp  $Fe_3O_4$  trong một hệ nano đa chức năng cùng với tác nhân hóa trị Doxorubicin (Dox), chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần, và được bọc bởi copolyme PLA-TPGS, thì khả năng tăng độ tương phản ảnh MRI có còn hiệu quả và khả năng ứng dụng hay không. Về lý thuyết, để hạt nano  $Fe_3O_4$  hoạt động như một chất tương phản MRI thành công, cần phải có sự trao đổi hiệu quả giữa nước hoặc các thành phần polyme. Do đó, khả năng tăng cường độ tương phản MRI của hạt nano  $Fe_3O_4$  và các hệ nano PLA-TPGS- $Fe_3O_4$  có hoặc không có Dox và Cyanine 5.5 trước hết được đánh giá *in vitro* trên thiết bị cộng hưởng từ MRI 7 T ở nhiệt độ phòng.

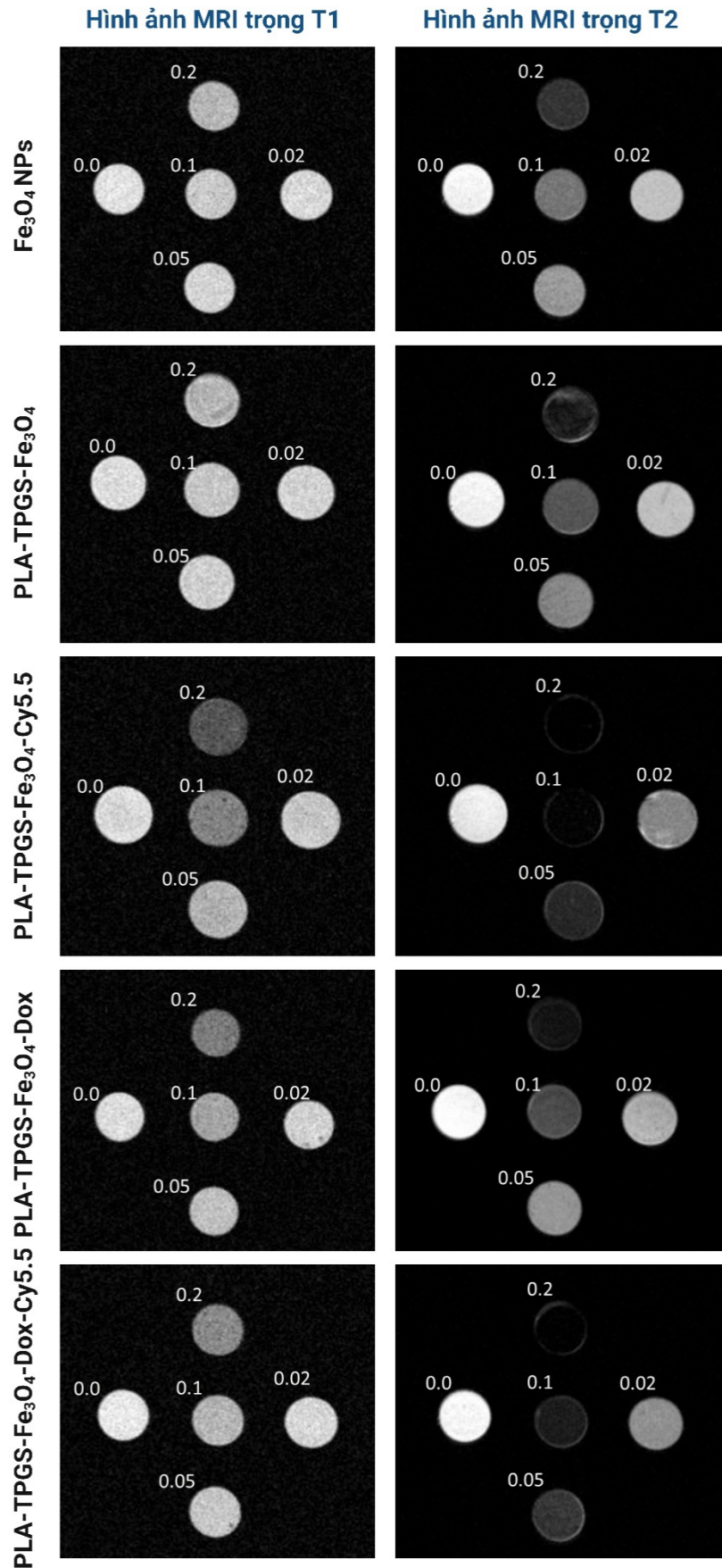
Hình 5.1 là ảnh cộng hưởng từ của các hệ nano  $Fe_3O_4$ , PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ , PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Cyanine 5.5, PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox, và PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox-Cyanine 5.5 ở các nồng độ: 0,02 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, và 0,2 mM (tính cho

nguyên tố Fe) theo chế độ trọng T1 (trái), T2 (phải). Có thể thấy rõ tín hiệu tối tăng dần theo nồng độ Fe trong các hệ nano có trong các giếng so với đối chứng agarose 1% (giếng 0). Hình PL2a cho thấy các đường đo hồi phục ngang, tức diễn trình suy giảm từ độ về giá trị '0' (decay curves). Đường đo cho mẫu agarose 1% (nồng độ nguyên tố Fe bằng 0) trên cùng, các đường cong còn lại từ trên xuống là các đường đo cho mẫu có nồng độ Fe lần lượt là 0,02 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, và 0,2 mM. Các đường suy giảm được fit tốt bằng hàm đơn exponential, với tham số thời gian T2 giảm rõ ràng và nhanh theo chiều tăng của nồng độ Fe.

Hình PL2b trình bày các đường đo hồi phục dọc, tức diễn trình tái lập giá trị từ độ  $M_z$  bão hòa. Từ trên xuống là các đường đo cho mẫu có nồng độ Fe là 0,02 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, và 0,2 mM. Đường có độ cong bé nhất là đường đo cho mẫu agarose 1%, mẫu so sánh. Độ cong của các đường tăng dần theo nồng độ, chứng tỏ  $T_1$  tăng đơn điệu theo nồng độ chất tương phản.

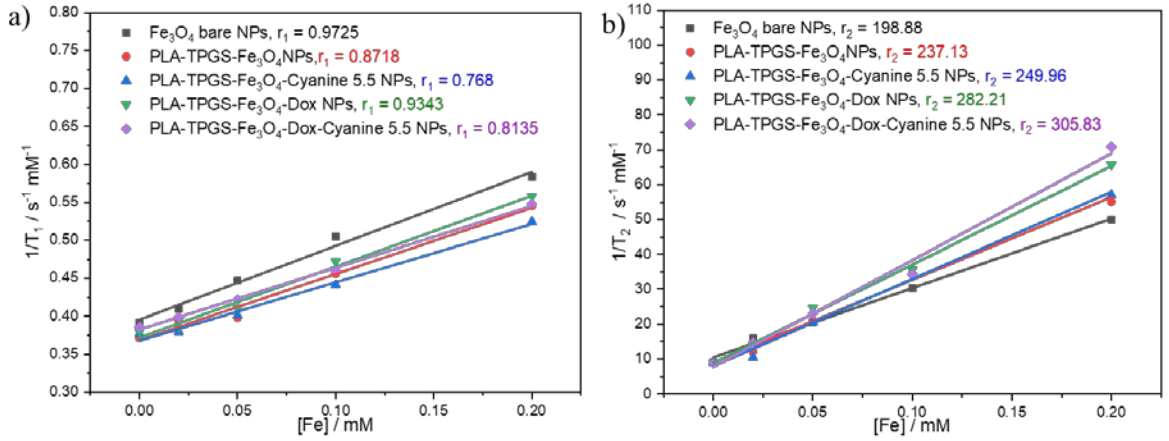
Kết quả cho thấy hệ nano PLA-TPGS- $Fe_3O_4$  thể hiện hiệu ứng T2 mạnh hơn so với hạt nano  $Fe_3O_4$  tự do (Hình 5.1). Ngoài ra, hệ nano PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Cyanine 5.5 lại cho thấy tác dụng T2 mạnh hơn hệ nano PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox. Độ hồi phục dọc ( $r_1$ ) và độ hồi phục ngang ( $r_2$ ) được xác định bằng thực nghiệm (Hình 5.2), từ giá trị trung bình ( $\pm SD$ ) của cường độ tín hiệu hồi phục T1 và T2 theo nồng độ Fe tương ứng với mỗi hệ nano (Hình PL2).

So với các hạt nano  $Fe_3O_4$  đơn lẻ, hạt nano  $Fe_3O_4$  được bọc bởi copolymer PLA-TPGS cho thấy hiệu ứng tương phản tốt hơn do độ hồi phục T2 cao hơn với  $r_2 = 198,88$  và  $237,13 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ , tương ứng (Bảng 5.1). Điều này cho thấy vai trò của việc bao bọc các hạt nano  $Fe_3O_4$  bằng copolymer, dẫn đến hệ nano ổn định hơn và phân tán tốt hơn. Ngoài ra, khi mang thuốc Doxorubicin, giá trị độ hồi phục ngang ( $r_2$ ) của vật liệu tăng. Cụ thể, hệ nano PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox và PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox-Cyanine 5.5 có giá trị  $r_2$  lần lượt là 282,21 và  $305,83 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ . Trong các báo cáo trước đây của Yallapu và cộng sự cho thấy các công thức chứa Curcumin dựa trên hạt nano  $Fe_3O_4$  thể hiện chất lượng tương phản tăng tương tự so với các công thức nano từ tính thông thường [201]. Trong nghiên cứu này, người ta đã chứng minh rằng các hạt nano từ tính chứa Curcumin có giá trị  $r_2$  là  $7,040 \text{ s}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{mL}$  ở 9,4 T ( $400 \text{ MHz}\cdot\text{H}^1$ ), cao hơn gấp đôi so với các hạt nano từ tính không mang thuốc là  $3,40 \text{ s}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{mL}$ . Hơn nữa, Ghorbaanee và cộng sự đã cho thấy một sự khác biệt đáng kể (khoảng 20%) trong giá trị  $r_2$  của hệ chẩn đoán dựa trên các hạt nano  $Fe_3O_4$  được phủ polyethyleneimine (PEI) chứa 30% chất curcumin và các hạt nano  $Fe_3O_4$ -PEI không có chất curcumin [202].



**Hình 5.1.** Hình ảnh chụp cộng hưởng từ MRI của các hệ nano theo chế độ trọng T1 và trọng T2 ở các nồng độ khác nhau của Fe (mM)





**Hình 5.2.** Tốc độ hồi phục dọc  $R_1$  (a); ngang  $R_2$  (b) phụ thuộc nồng độ Fe của các hệ nano đa chức năng

**Bảng 5.1.** Giá trị độ hồi phục  $r_1$ ,  $r_2$  và tỷ số  $r_2/r_1$  của các hệ nano đa chức năng

Mẫu	$r_2$ ( $s^{-1} \text{ mM}^{-1}$ )	$r_1$ ( $s^{-1} \text{ mM}^{-1}$ )	$r_2/r_1$
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ NPs	198,88	0,9725	204,5
PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$	237,13	0,8717	272,0
PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Cyanine 5.5	249,96	0,768	325,4
PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox	282,21	0,9343	302,1
PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5	305,83	0,8135	375,9

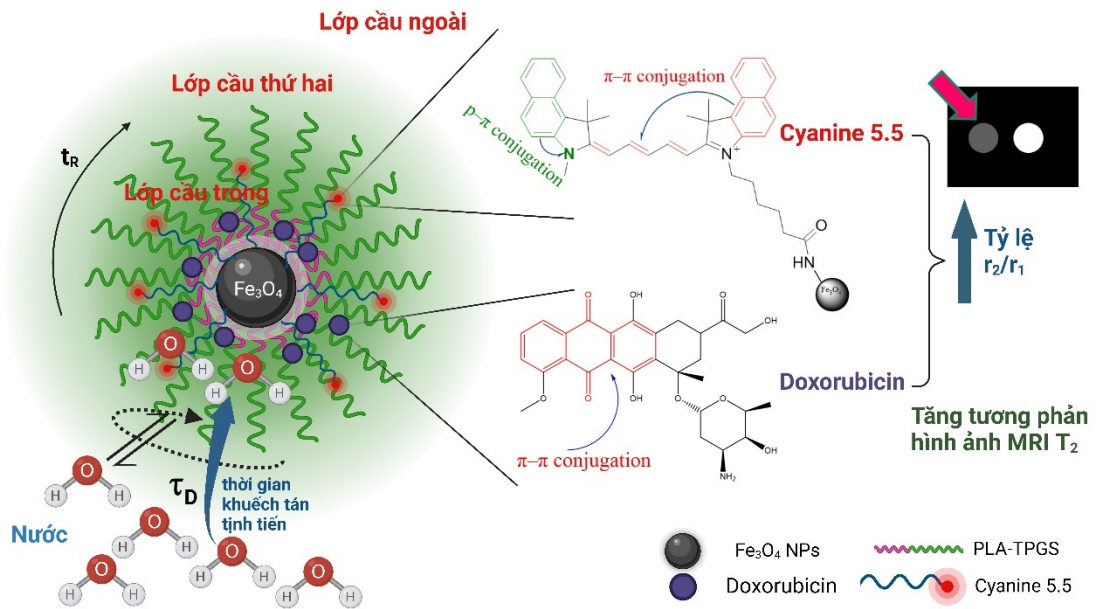
Một thước đo quan trọng thường được sử dụng để xác định xem các hạt nano đa chức năng có phù hợp làm chất tương phản T2 hay không là tỷ lệ  $r_2/r_1$ . Tỷ lệ  $r_2/r_1$  của hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  cao hơn tỷ lệ  $r_2/r_1$  của hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  đơn lẻ. Swee và cộng sự đã chứng minh rằng tỷ lệ  $r_2/r_1$  tăng đơn điệu theo thời gian khuếch tán tịnh tiến bằng cách sử dụng phương trình sau [199]:

$$\frac{r_2}{r_1} = \frac{2}{3J_A\sqrt{2\omega_I\tau_D}} \quad (5.1)$$

trong đó  $\omega_I$  là tần số Larmor của proton,  $J_A$  là hàm mật độ phổ của Ayant và  $\tau_D$  là thời gian khuếch tán tịnh tiến, biểu thị bằng  $r^2/D$  ( $r$  là bán kính hạt và  $D$  là hệ số khuếch tán của phân tử nước).

Trong lý thuyết cơ học lượng tử của Solomon-Bloembergen-Morgan, các cơ chế chịu trách nhiệm cho sự tăng độ hồi phục chủ yếu liên quan đến lớp cầu trong (inner-sphere) và lớp cầu ngoài (outer-sphere) [203]. Sự hồi phục proton ở lớp inner-sphere liên quan đến các phân tử nước hình thành liên kết với các ion thuận từ, trong khi đó sự hồi phục ở lớp cầu ngoài liên quan đến các phân tử nước trong pha khối (bulk water) không hình thành các liên kết này [199, 204]. Độ khuếch tán của các phân tử nước trong lớp copolyme PLA-TPGS thấp hơn độ khuếch tán của

nước trong pha khô. Do đó, từ biểu thức của  $\tau_D$  có thể dễ dàng suy ra rằng tính thấm của lớp phủ copolymer đối với các phân tử nước có thể kéo dài thời gian khuếch tán tịnh tiến (translational diffusion time) [205, 206]. Rõ ràng, lớp phủ copolymer PLA-TPGS phần nào cản trở sự tiếp cận của các phân tử nước với gradient trường lớn hơn (gần lõi  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) khi proton của chúng tịnh tiến gần đến tiểu phân nano (Hình 5.3). Do đó, tỷ lệ  $r_2/r_1$  của hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  đơn lẻ thấp hơn so với hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  được bọc bởi copolymer PLA-TPGS, phù hợp với phát hiện của chúng tôi.



**Hình 5.3.** Cơ chế ảnh hưởng của Doxorubicin và Cyanine 5.5 đến khả năng tương phản ảnh MRI của hệ nano đa chức năng

Điều đáng chú ý là khi mang thuốc Dox, cả hai hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox và PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 đều có tỷ lệ  $r_2/r_1$  cao hơn so với các hệ nano không mang thuốc tương ứng. Giá trị tỷ lệ  $r_2/r_1$  của hai hệ nano này có thể liên quan đến sự có mặt của Dox, khiến các hạt nano tạo ra tính không đồng nhất lớn hơn trong từ trường so với khi không có Dox. Kết quả ở bảng 5.1 cho thấy Cyanine 5.5 có tác động mạnh hơn Dox đến tỷ lệ  $r_2/r_1$ . Về lý thuyết, độ hồi phục ngang của các hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  siêu thuận từ là kết quả của sự lệch pha của các spin proton kết hợp do sự dao động tương tác lưỡng cực giữa spin proton và momen từ tổng thể [204]. Các yếu tố ảnh hưởng đến dao động từ trường (magnetic field fluctuation) có thể ảnh hưởng đến độ hồi phục ngang [207]. Khi một nguyên tử được đặt trong từ trường, các electron chuyển động quay tạo thành một từ trường nhỏ ngược chiều với từ trường ngoài tác dụng. Tính không đồng nhất cục bộ này thường bị bỏ qua, tuy nhiên, sự tuần hoàn của electron  $\pi$  có thể tạo ra từ trường bổ sung mạnh

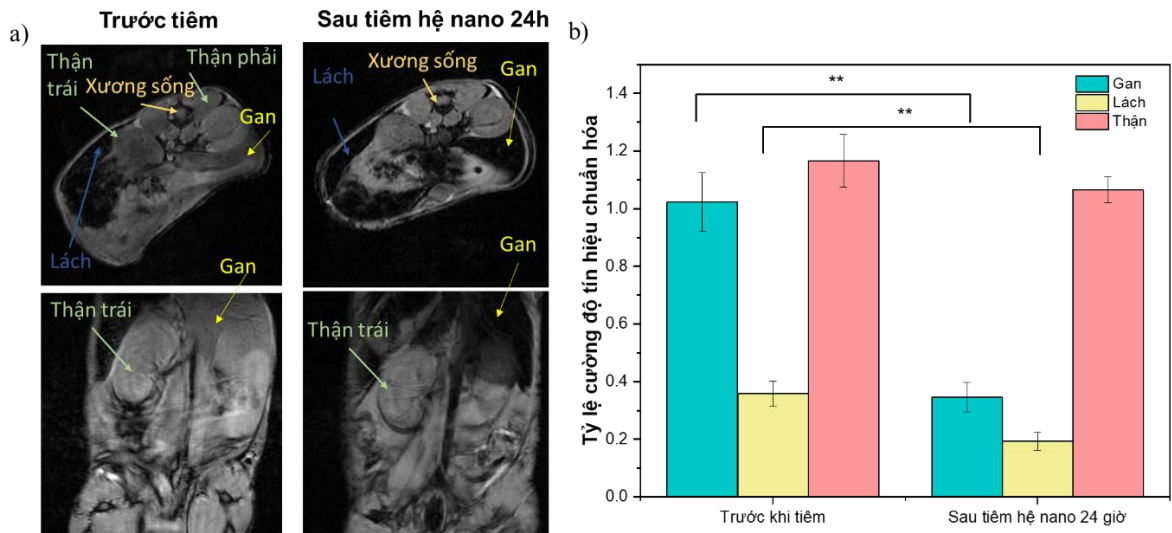
hơn nhiều [199]. Phân tử Cyanine 5.5 bao gồm liên hợp  $\pi$ - $\pi$  và liên hợp  $\rho$ - $\pi$  (Hình 5.3). Những đặc điểm này sẽ làm tăng tính không đồng nhất trong từ trường cục bộ xung quanh các hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  tự do và PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , làm tăng tốc hiệu quả hơn độ hồi phục ngang của các proton nước ở gần đó [199, 206]. Do đó, tỷ lệ  $r_2/r_1$  được xác định bằng thực nghiệm theo thứ tự PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 (375,9) > PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Cyanine 5.5 (325,4) > PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox (302,1). Như vậy, khi mang thuốc Doxorubicin làm giảm đáng kể sự tương tác bề mặt giữa lõi từ tính  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  và phân tử nước, dẫn đến tăng tỷ lệ  $r_2/r_1$  rất tốt [208, 209]. Hơn nữa, giá trị  $r_2$  và tỷ lệ  $r_2/r_1$  của hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 cao hơn đáng kể so với các chất tăng độ tương phản thương mại khác như ferumoxylol, Feraheme; Gd-DTPA, Magnevist; và ZES-SPION, các hạt nano oxit sắt cực nhỏ được phủ zwitterion ở 7 T, đã được báo cáo bởi Wei và cộng sự [210]. Những kết quả thú vị này cho thấy cấu trúc hóa học của Cyanine 5.5 và Doxorubicin góp phần đáng kể vào việc tăng cường khả năng hồi phục T2 của hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

### 5.1.2. Đánh giá khả năng tăng độ tương phản MRI trên mô hình *in vivo*

Các kết quả trên cho thấy hệ nano đa chức năng PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 tác động thay đổi mạnh giá trị T2 nên sự nhiễu loạn từ trường làm tín hiệu cộng hưởng từ tại vùng có hạt nano siêu thuận từ kém hơn so với các vùng xung quanh, cũng có nghĩa là hình ảnh sẽ tối hơn. Do vậy, để đánh giá khả năng tăng tương phản của vật liệu này trên mô hình *in vivo*, chúng tôi sẽ chú trọng đánh giá khả năng gây tối hình ảnh của nó theo chế độ chụp trọng T2\* (T2\*-weighted). Trong khi hình ảnh MRI thường được đánh giá theo cách định tính, ở luận án này, chúng tôi xử lý định lượng tín hiệu MRI để đánh giá khả năng tăng độ tương phản và hiệu quả hướng đích thụ động tới khối u. Việc phát hiện MRI hiệu quả tạo điều kiện thuận lợi cho việc chẩn đoán và điều trị ung thư sau đó.

Đánh giá trên chuột cái bình thường Balb/C cho thấy sự tăng cường độ tương phản đáng kể của tín hiệu MRI ở gan và lách sau 24h tiêm vật liệu nano đa chức năng PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5, có sự xuất hiện vùng tối màu rõ rệt, khác biệt so với hình ảnh trước khi tiêm (Hình 5.4a). Tỷ lệ cường độ tín hiệu tương đối của các vật liệu nano ở gan, lá lách và thận được chuẩn hóa bằng tín hiệu cơ. Sự thay đổi cường độ tín hiệu do sự hấp thu của vật liệu nano vào các cơ quan gan, lá lách và thận được tính toán trong vùng quan tâm (region of interest, ROI) của hình ảnh MRI. Sau 24 giờ tiêm vật liệu nano, cường độ tín hiệu của gan và lá lách giảm lần lượt khoảng 67% và 45% so với trước khi tiêm ( $p < 0,001$ ). Ngoài ra, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về cường độ tín hiệu ở thận trước và sau khi tiêm vật liệu nano. Những kết quả này cũng chứng minh sự hấp thu của gan và lách đối

với vật liệu nano đa chức năng. Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy sau khi tiêm tĩnh mạch, gan và lách hấp thụ một lượng đáng kể các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [211, 212]. Các hạt nano có kích thước  $\leq 10$  nm được thanh thải qua thận, trong khi các hạt nano có kích thước  $\geq 100$  nm bị giữ lại trong gan và lách thông qua quá trình thực bào của đại thực bào [217]. Nhóm nghiên cứu của Feng và cộng sự đã chứng minh rằng lượng sắt vẫn còn đáng kể trong mô gan của động vật được tiêm  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG sau 2 tuần tiêm [213].

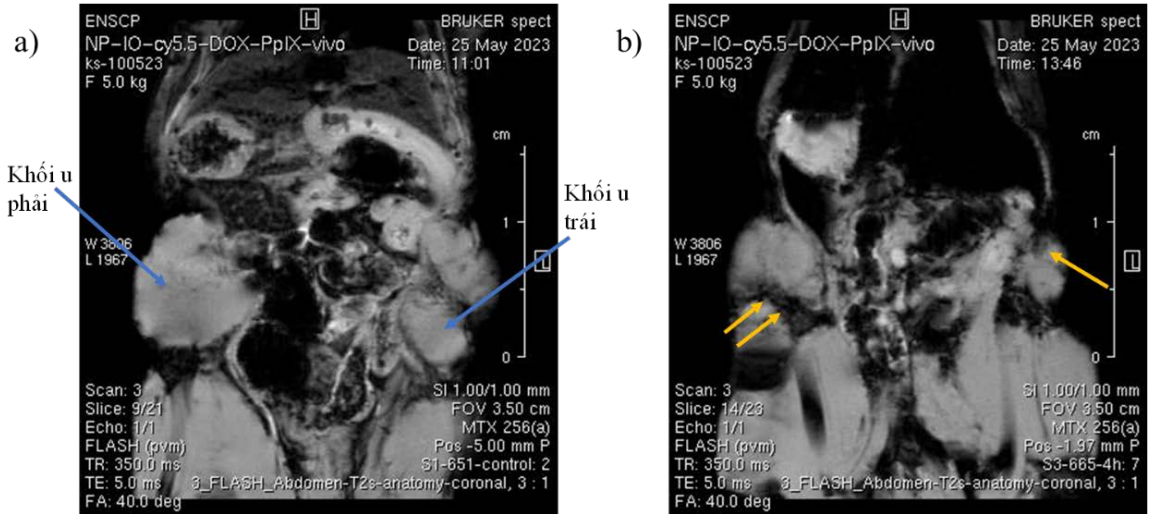


**Hình 5.4.** (a) Hình ảnh MRI *in vivo* trên chuột thường Balb/C với chế độ chụp trọng  $T2^*$  ở thời điểm trước và sau 24 giờ tiêm vật liệu nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5; (b) những thay đổi về cường độ tín hiệu trên hình ảnh MRI ở các cơ quan gan, lá lách và thận (\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 3$ )

Hình ảnh tương phản MRI mạnh sau tiêm 24 giờ cho thấy vật liệu nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 là chất tương phản âm hiệu quả cho hình ảnh MRI *in vivo*. Ngoài ra, ở các kết quả tiếp theo, luận án sẽ đánh giá sự phân bố của vật liệu nano ở các cơ quan của chuột sau khi tiêm tĩnh mạch.

MRI là một kỹ thuật lâm sàng và tiền lâm sàng mạnh mẽ để phân tích giải phẫu và chức năng của khối u rắn. Trong luận án này, bên cạnh việc đánh giá độ tương phản ảnh MRI *in vivo*, chúng tôi phân tích sâu hơn để đánh giá hiệu quả hướng đích thụ động trong khối u đại tràng CT26 bằng cách định lượng tín hiệu trên hình ảnh MRI trọng  $T2^*$ . Các hạt nano có khả năng tích lũy trong các mô khối u bằng cơ chế hướng đích thụ động nhờ hiệu ứng EPR. Tuy nhiên, đặc điểm của vi môi trường khối u là một cấu trúc không đồng nhất và tùy thuộc vào loại, kích thước và vị trí của khối u, nó phản ứng khác nhau với các hệ vật liệu kích thước nano [214]. Đồng thời, hiệu ứng EPR phụ thuộc vào nhiều yếu tố như (1) tình trạng rò rỉ mạch máu, (2) mật độ/thành phần vi môi trường khối u, (3) áp suất dịch kẽ, (4)

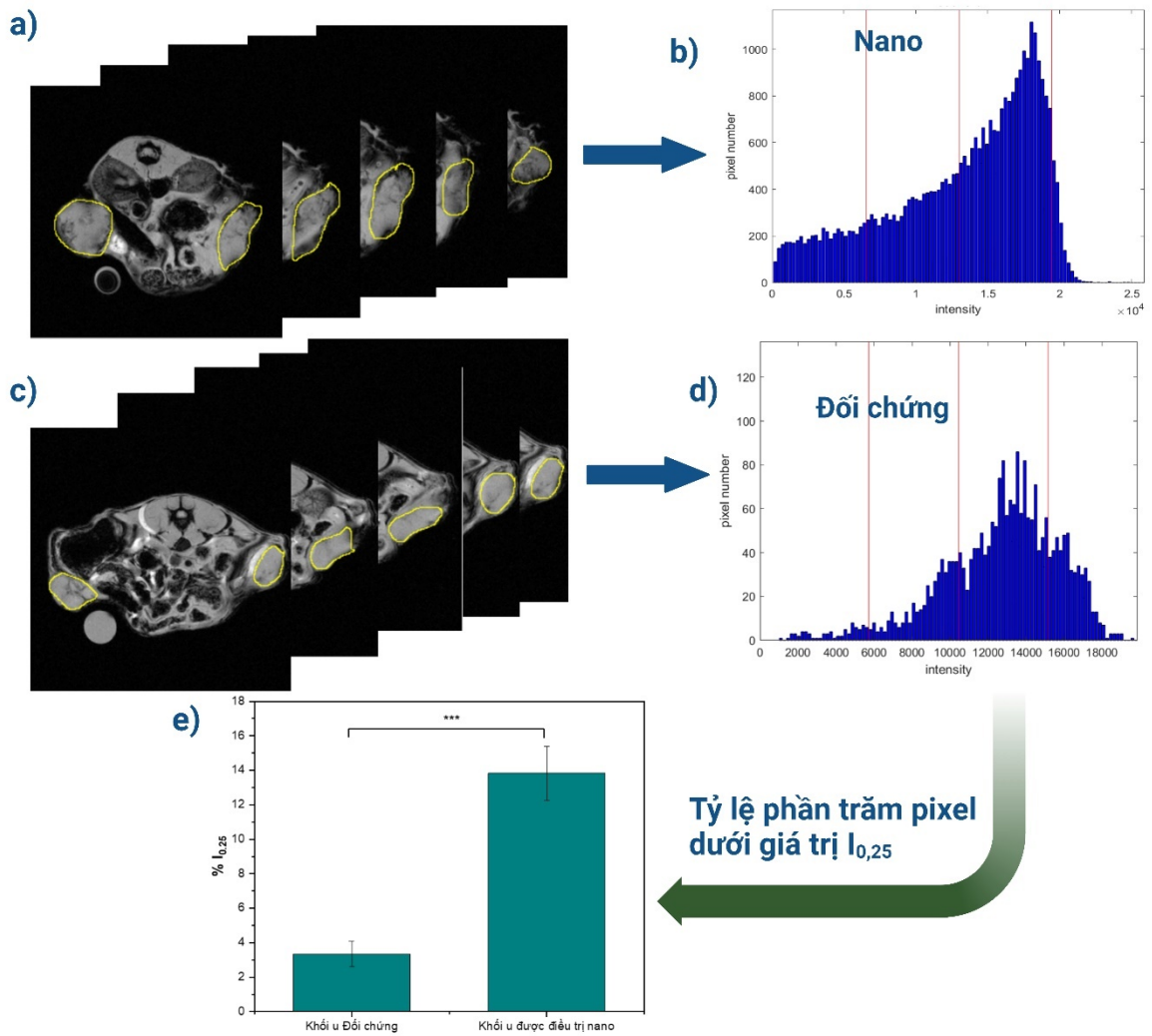
tốc độ phát triển của khối u, (5) thể tích vùng hoại tử, và (6) liều lượng hạt nano sử dụng. Do vậy, khi thiết kế một vật liệu nano đa chức năng trong chẩn đoán và điều trị ung thư, hệ vật liệu có khả năng phân bố được tới vị trí khối u đóng vai trò quan trọng tới hiệu quả điều trị.



**Hình 5.5.** Hình ảnh MRI của chuột Balb/C được gây khối u CT26 (a) nhóm đối chứng; (b) sau 4h tiêm PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5

Hình 5.5 cho thấy ảnh MRI *in vivo* trên mô hình chuột Balb/C được gây khối u đại tràng CT26 của vật liệu nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 sau 4 giờ tiêm và chuột đối chứng. Có thể thấy rõ độ tương phản khối u đồng thời có thể thấy hạt nano được phân tán trong khối u (mũi tên vàng), chứng minh khả năng làm tăng tương phản hình ảnh chụp cộng hưởng từ khối u rắn với chế độ chụp trọng T2\* khi tiêm tĩnh mạch. Hiệu quả này cho phép đánh giá chính xác hơn kích thước, hình dạng, một phần cấu trúc bên trong của khối u, cũng như dễ dàng hơn cho việc đánh giá sự có mặt hay không của một khối u khi xuất hiện bên trong của cơ thể [215].

Để định lượng tín hiệu MRI và đánh giá mức độ tích lũy *in vivo* của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 trong các khối u, chúng tôi sử dụng phương pháp xử lý %I<sub>0,25</sub> đã được phát triển bởi nhóm nghiên cứu của GS. Bích Thủy DOAN (Đại học Chemi PariTech, Cộng hòa Pháp) [216]. Các vùng quan tâm (ROI) được vẽ trên từng lát cắt của khối u trên hình ảnh MRI (Hình 5.6a, c) và thu được phân bố cường độ pixel cho từng lát cắt. Tổng hợp các đồ thị phân bố cường độ pixel này đưa ra phân bố cường độ pixel duy nhất cho mỗi khối u như trong hình 5.6b, d. Hình 5.6e cho thấy tỷ lệ phần trăm pixel dưới I<sub>0,25</sub> có sự khác biệt đáng kể ( $p < 0,001$ ) giữa chuột không được tiêm và chuột 4h sau tiêm vật liệu nano, tương ứng là 3,35 và 13,82%. Điều này phản ánh sự tích lũy thụ động hiệu quả của vật liệu nano trong các khối u này [217].



**Hình 5.6.** Phương pháp % $I_{0,25}$  xử lý dữ liệu từ hình ảnh MRI với chế độ chụp trọng  $T2^*$  để đánh giá sự tích lũy *in vivo* của hệ nano PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox-Cyanine 5.5 trong các khối u. (a) Hình ảnh MRI ở chuột sau 4 giờ tiêm; b) phân bố cường độ MRI liên quan đến khối u sau 4 giờ tiêm; (c) hình ảnh MRI ở chuột đối chứng; (d) Phân bố cường độ MRI liên quan đến khối u ở chuột đối chứng; (e) Tóm tắt tỷ lệ phần trăm pixel dưới  $I_{0,25}$  trên hình ảnh khối u MRI. Kiểm định Mann-Whitney phân phối phi gaussian: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Trong luận án này, phương pháp % $I_{0,25}$  được sử dụng để đánh giá định lượng hiệu quả hướng đích tới các khối u CT26. Phương pháp này có thể được áp dụng cho các chất tương phản T2 khác nhau so với hiệu ứng hướng đích thụ động thông qua hiệu ứng tăng tính thấm và lưu trữ (Enhanced Permeability and Retention, EPR) [216]. Phương pháp này dựa trên việc điều chỉnh phân bố cường độ trong các hình ảnh MRI với chế độ chụp trọng  $T2^*$  tiêu chuẩn. Vật liệu nano PLA-TPGS- $Fe_3O_4$ -Dox-Cyanine 5.5 chứa hạt nano  $Fe_3O_4$  làm giảm tín hiệu, gây ra sự dịch chuyển biểu đồ cường độ về vùng cường độ thấp. Do đó, tỷ lệ phần trăm pixel dưới  $I_{0,25}$  là

tham số liên quan để định lượng mức tăng tích lũy vật liệu nano đa chức năng chứa  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  tại vị trí khối u. Các kết quả trên cho thấy khả năng tăng độ tương phản MRI *in vivo* của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5. Đồng thời, kết quả định lượng bằng phương pháp  $\%I_{0,25}$  cho thấy sự tích lũy thụ động hiệu quả của hệ nano ở vị trí khối u trên mô hình chuột Balb/C được gây ung thư đại tràng CT26. Trên cơ sở này, chúng tôi tiếp tục đánh giá tác dụng hóa trị và nhiệt từ trị ung thư của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 ở phần 5.3 và 5.4.

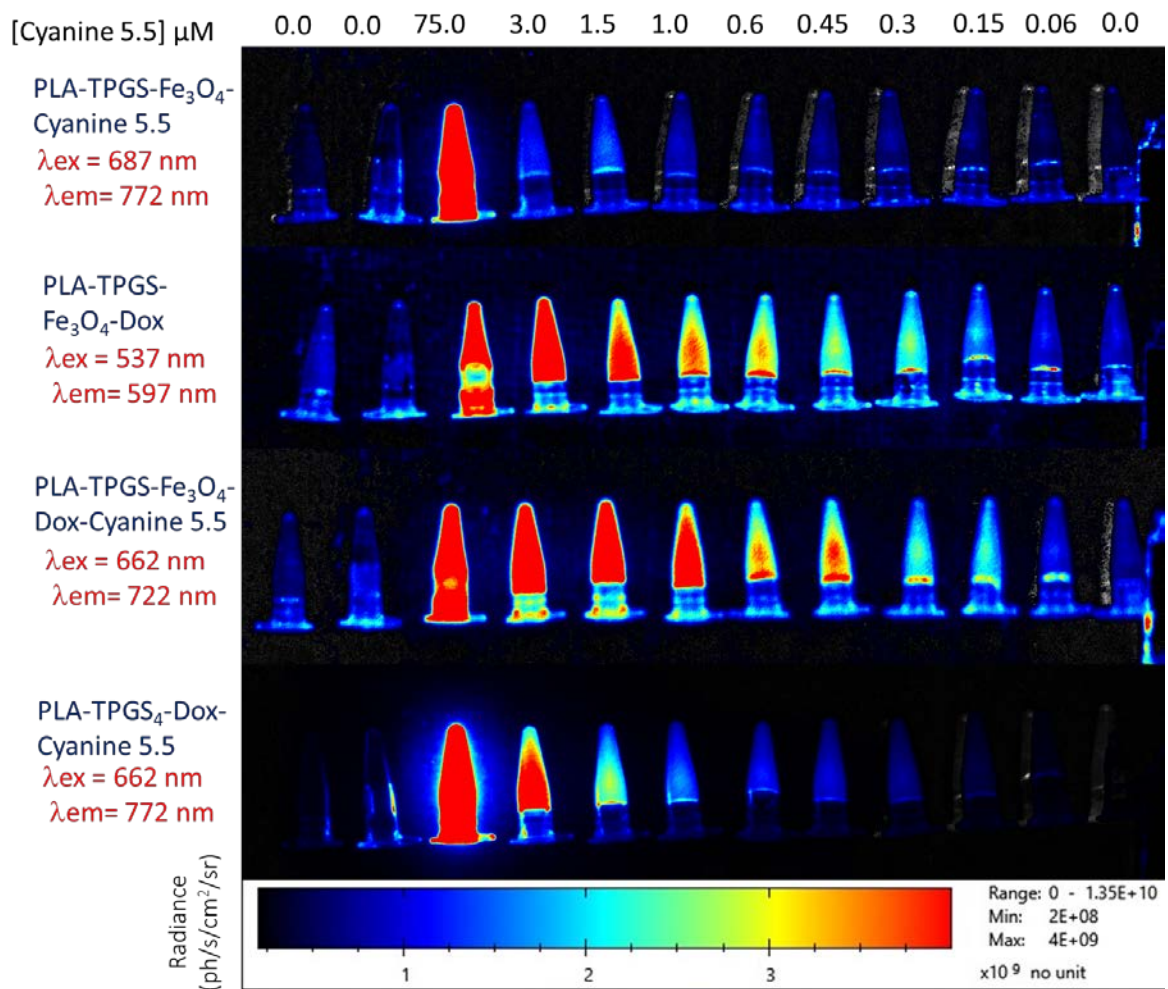
## 5.2. Đánh giá sự phân bố *in vivo* bằng kỹ thuật hình ảnh quang học

### 5.2.1. Khảo sát bước sóng kích thích/phát xạ *in vitro*

Để đánh giá ảnh hưởng của hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , Cyanine 5.5 và Doxorubicin đối với hình ảnh quang học (optical imaging) của từng hệ nano, chúng tôi khảo sát các điều kiện bước sóng phát xạ và kích thích huỳnh quang hữu ích cho tỷ lệ tăng cường bức xạ (radiance enhancement ratio) và tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu (signal-to-noise ratio, SNR) cao nhất. Các hình ảnh quang học thu được bằng hệ thống thiết bị Photon Imager Optima (Biospace Lab, Paris, Cộng hòa Pháp) sau khi lựa chọn ở các điều kiện bước sóng kích thích/phát xạ khác nhau, tương ứng với các bước sóng đặc trưng cho vùng kích thích/phát xạ của Doxorubicin và Cyanine 5.5. Hình ảnh huỳnh quang của các hệ nano ở các nồng độ Cyanine 5.5 khác nhau, từ 0 đến 75  $\mu\text{M}$ , tương ứng với điều kiện bước sóng tối ưu của mỗi hệ nano, được trình bày trên hình 5.7. Khi nồng độ Cyanine 5.5 giảm dần thì cường độ tín hiệu bức xạ (radiance) của hệ nano giảm tương ứng. Sử dụng phần mềm M3Vision (Biospace Lab, France), tín hiệu huỳnh quang được định lượng trên tín hiệu vùng quan tâm (region of interest, ROI) bằng giá trị bức xạ radiance ( $\text{ph/s/cm}^2/\text{sr}$ ). Tín hiệu được chuẩn hóa so với ống tube đối chứng (chứa dung dịch đệm PBS). Kết quả về tỷ lệ tăng cường bức xạ và tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu của các hệ nano ở các điều kiện bước sóng kích thích/phát xạ khác nhau được trình bày trong bảng PL1.

Biểu đồ đường về cường độ huỳnh quang trung bình của các hệ nano so với nồng độ Cyanine 5.5 được trình bày trên hình 5.8. Ở bước sóng kích thích 687 nm và bước sóng phát xạ 772 nm, độ tương phản giữa hệ nano và nền là cao nhất đối với hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Cyanine 5.5 (Hình PL3 và PL4). Kết quả này gần với bước sóng kích thích và phát xạ của Cyanine 5.5. Ngoài ra, tỷ lệ tăng cường độ bức xạ và SNR của hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox đạt cao nhất ở bước sóng kích thích tối ưu (537 nm) và bước sóng phát xạ tối ưu (597 nm) (Hình PL5 và PL6). Các giá trị này tương ứng với vùng bước sóng kích thích/phát xạ của Doxorubicin [218]. Theo các đặc tính hóa lý trước đây, hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine

5.5 có chất lượng tín hiệu tốt nhất và dữ liệu đáng tin cậy nhất sau khi kích thích ở bước sóng 662 nm cho mức phát xạ 722 nm (Hình PL7 và PL8). So với hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5, các bước sóng kích thích và phát xạ tối ưu bị dịch chuyển xanh (blue-shift) khi mang thuốc Doxorubicin lên hệ nano đa chức năng. Điều này có thể là do sự tương tác giữa Doxorubicin và Cyanine 5.5, giúp tăng cường tương tác  $\pi$ - $\pi$  và thúc đẩy sự hình thành tập hợp H (H-aggregate) của phân tử Cyanine 5.5 [219, 220]. Jaiswal và cộng sự cũng báo cáo rằng Doxorubicin đã tương tác với một tác nhân hồng ngoại gần khác, chẳng hạn như indocyanine green-ICG, và tạo ra các tập hợp H và J (H and J-aggregate) trong ICG [173].



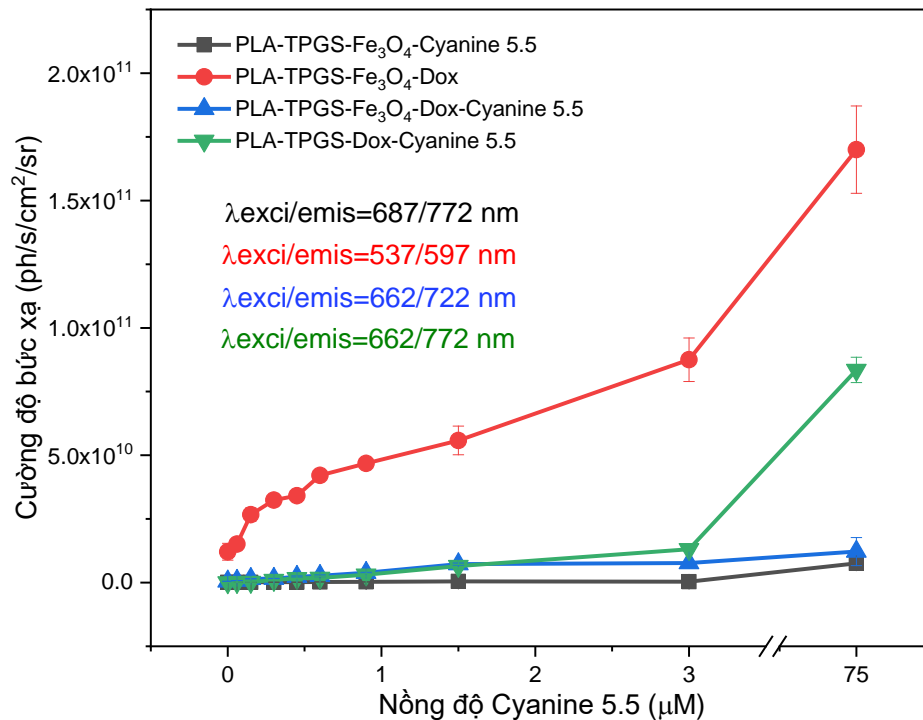
**Hình 5.7.** Hình ảnh quang học *in vitro* ở các bước sóng kích thích và phát xạ tối ưu tương ứng với từng hệ nano (ở các nồng độ khác nhau của Cyanine 5.5)

Nếu không có Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, hình ảnh quang học của hệ nano PLA-TPGS-Dox-Cyanine 5.5 cho thấy bước sóng kích thích và phát xạ tối ưu lần lượt là 662 nm và 772 nm (Hình PL9 và PL10). So với hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5, sự dịch chuyển nhẹ sang vùng xanh của bước sóng phát xạ tối ưu đã xảy ra do ảnh hưởng của các hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Điều này có thể được gây ra bởi sự hiện diện của các



tập hợp  $\pi$ - $\pi$  ( $\pi$ - $\pi$  aggregates) được ghép nối trên bề mặt của các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [221, 222]. Do đó, tính chất huỳnh quang của Cyanine 5.5 thay đổi khi tương tác với Doxorubicin và hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , là cơ sở để tiến hành các thí nghiệm huỳnh quang *in vivo* cho hệ nano đa chức năng.

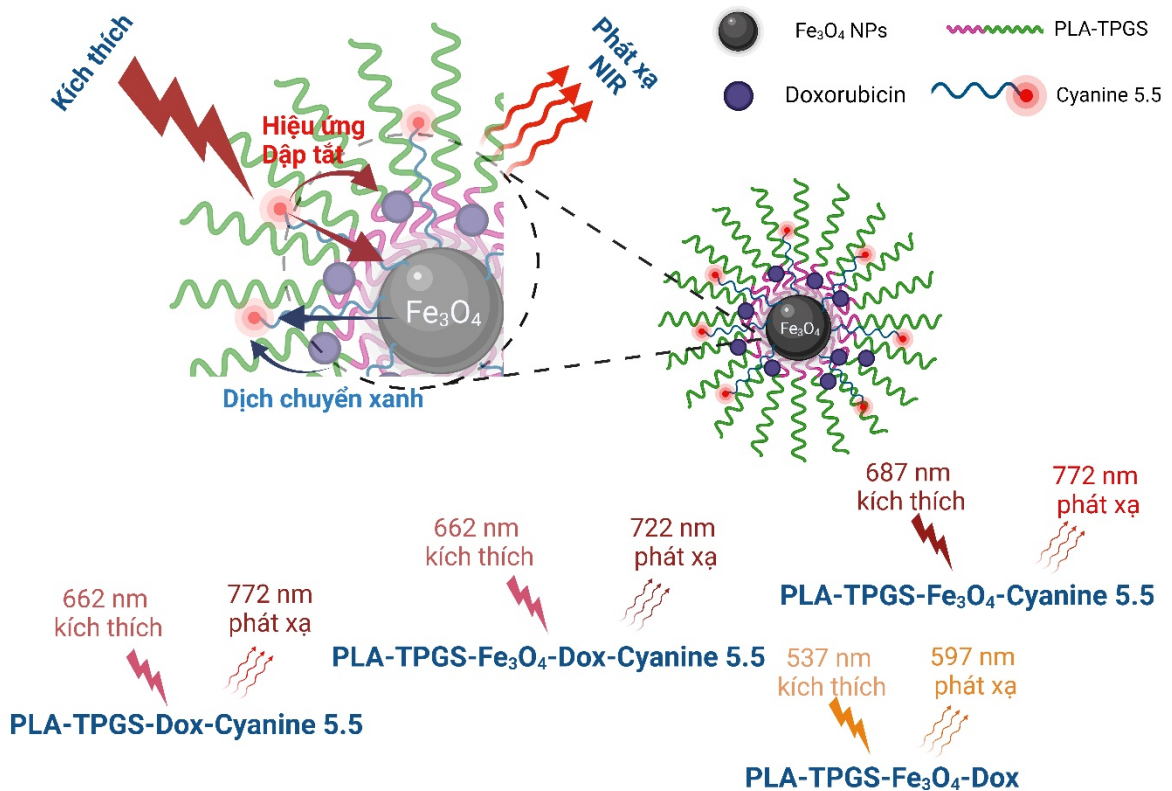
Cuối cùng, so với hệ nano PLA-TPGS-Dox-Cyanine 5.5, tỷ lệ tăng cường độ bức xạ và tỷ lệ tín hiệu/nhiều SNR của hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 đã giảm đáng kể lần lượt là 48,8 và 3,8 lần khi kích thích ở bước sóng 662 nm và phát xạ ở bước sóng 772 nm (Bảng PL1). Cơ chế dập tắt huỳnh quang đã được chứng minh bằng sự có mặt của các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , do các hạt này hấp thụ mạnh cả ánh sáng kích thích và ánh sáng phát xạ [223]. Các photon phát ra từ Cyanine 5.5 có thể bị hấp thụ trở lại bởi lõi  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  màu đen. Sau đó, năng lượng được hấp thụ bởi lõi sẽ bị tiêu tán theo cách không bức xạ hoặc rung động (vibrational way) [224].



**Hình 5.8.** So sánh và phân tích định lượng ROI hình ảnh quang học của các hệ nano ở bước sóng kích thích/phát xạ tối ưu. Tín hiệu huỳnh quang ghi lại độ bức xạ trung bình (average radiance,  $\text{ph/s/cm}^2/\text{sr}$ ), ( $n = 3$ )

Đáng chú ý, so sánh giữa hệ nano PLA-TPGS-Cyanine 5.5 và PLA-TPGS-Dox-Cyanine 5.5 cho thấy Doxorubicin cũng có hiệu ứng dập tắt huỳnh quang trên phát xạ vùng hồng ngoại gần của Cyanine 5.5. Khi Doxorubicin được nạp vào hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5, tỷ lệ tăng cường độ bức xạ và SNR đã giảm 3 lần khi kích thích ở bước sóng 687 nm và phát xạ 772 nm. Jaiswal và cộng sự đã chứng minh rằng sự kết hợp của Doxorubicin trong phân tử ICG tự do nhanh

chóng ảnh hưởng đến đặc tính hấp thụ - phát xạ vùng hồng ngoại gần của ICG, ngay cả ở nồng độ thấp hơn [225]. Có sự giảm bớt cường độ huỳnh quang cực đại điển hình của ICG khi nồng độ Doxorubicin tăng lên. Sự kết tụ của các phân tử gây ra sự thay đổi mặt cắt ngang hấp thụ (absorption cross-section) của ICG, từ đó làm giảm cường độ huỳnh quang. Do đó, xét về đặc tính huỳnh quang, Doxorubicin và hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  có tác động như tác nhân khử huỳnh quang trong hệ nano PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 (Hình 5.9). Tuy nhiên, tỷ lệ tăng cường độ bức xạ và SNR tối đa ở mức kích thích/phát xạ 662/722 nm là cơ sở để chúng tôi tiếp tục thực hiện các thí nghiệm chụp ảnh quang học *in vivo* (optical bioimaging) cho các nghiên cứu phân bố và tích lũy sinh học của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5 bằng phát xạ hồng ngoại gần.

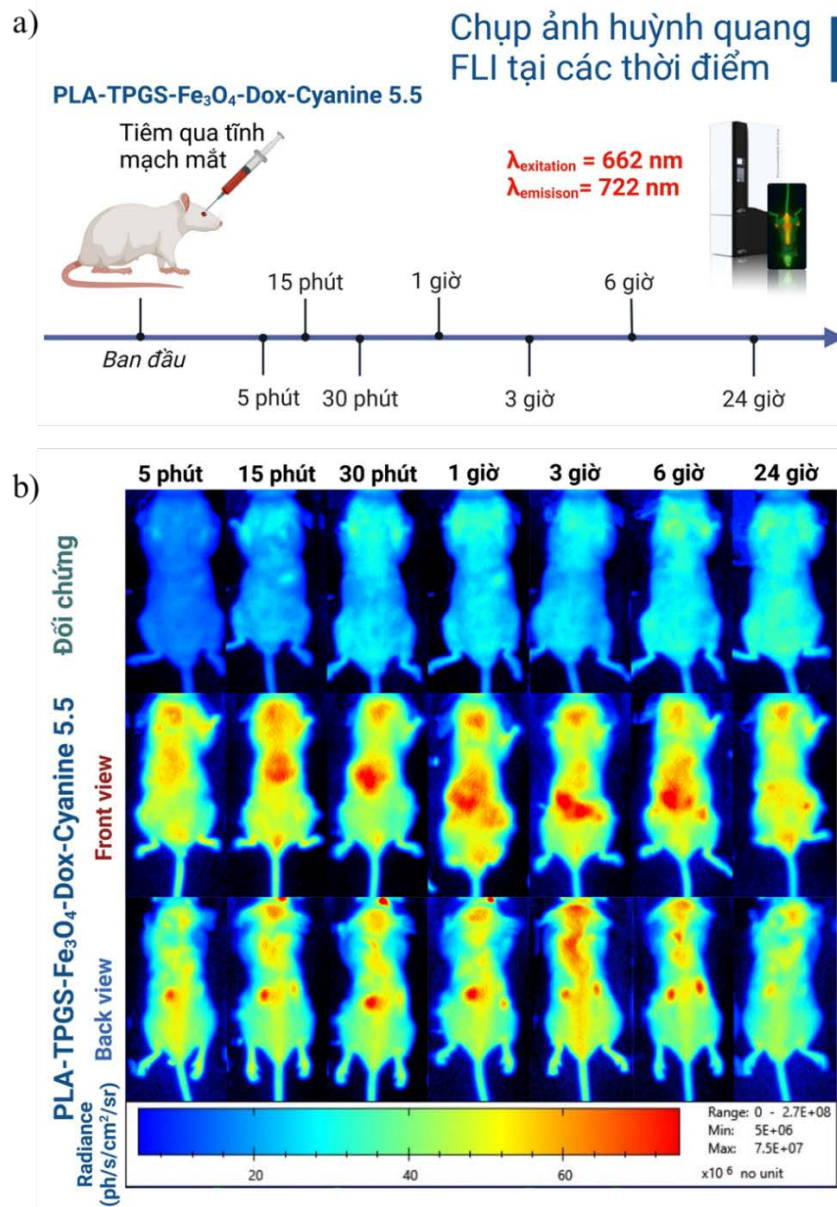


**Hình 5.9.** Sơ đồ minh họa ảnh hưởng của Doxorubicin và  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  đến bước sóng kích thích/phát xạ tối ưu của các hệ nano

### 5.2.2. Đánh giá sự phân bố *in vivo* trên mô hình chuột đực gây khối u CT26

Để nghiên cứu sự phân bố sinh học *in vivo* của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần, chuột mang khối u CT26 được tiêm tĩnh mạch mắt 150  $\mu\text{L}$  PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dox-Cyanine 5.5, liều tương đương 0,065 mM Cyanine 5.5 (Hình 5.10a). Hình ảnh huỳnh quang thu được bằng hệ đếm

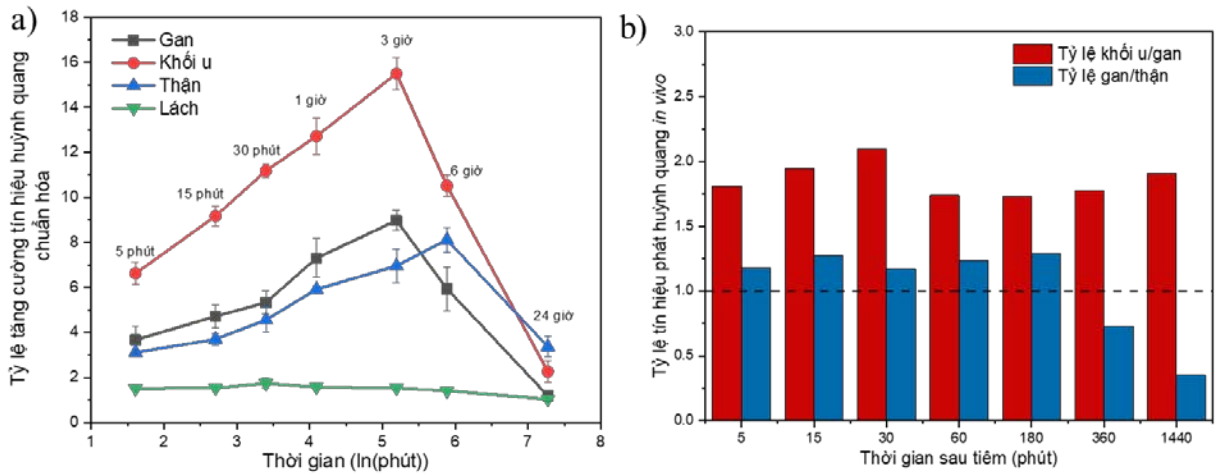
photon dựa trên máy ảnh GaAs ICCD lạnh (Optima, Biospace, Paris, France) ở bước sóng kích thích/phát xạ đã tối ưu là 662/722 nm.



**Hình 5.10.** (a) Sơ đồ bố trí thí nghiệm *in vivo* trên mô hình chuột mang khối u CT26; (b) sự phân bố *in vivo* trên hình ảnh quang học theo thời gian của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5

Hình 5.10b mô tả phân bố *in vivo* trên hình ảnh quang học theo thời gian của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 tại các mốc thời gian: 5 phút, 15 phút, 30 phút, 1 giờ, 3 giờ, 6 giờ, và 24 giờ sau tiêm. Tín hiệu huỳnh quang được phân tích bằng phần mềm M3 vision software (BioSpace Lab, France) và được biểu thị dưới dạng độ bức xạ trung bình (average radiance, ph/s/cm<sup>2</sup>/sr). Các vùng quan tâm (ROI) được vẽ xung quanh các khối u dưới da ở hai bên sườn và các mô lân cận để

xác định độ bức xạ trung bình. Tín hiệu được chuẩn hóa so với chuột đối chứng để đánh giá mức độ tăng cường tín hiệu so với nền (mô sinh học tương ứng).



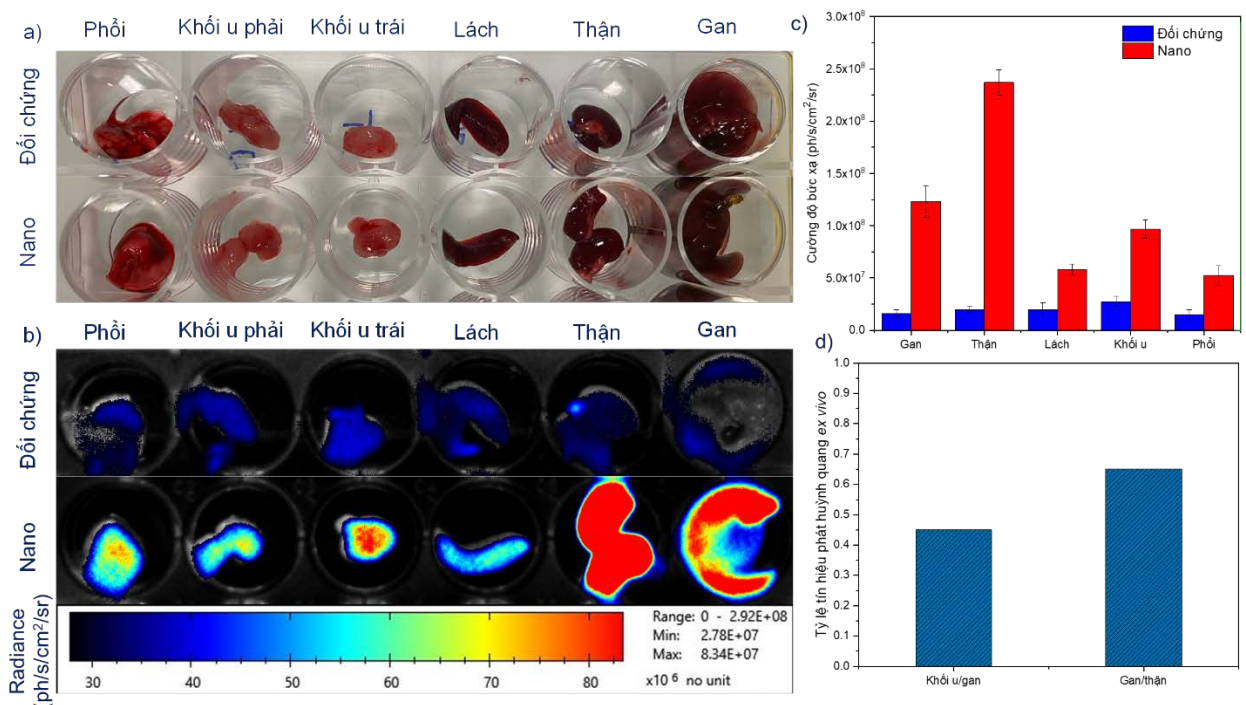
**Hình 5.11.** (a) Định lượng tín hiệu huỳnh quang tại khối u và các cơ quan của chuột; (b) tỷ lệ tín hiệu khối u/gan và gan/thận

Ngay sau 5 phút tiêm, đã bắt đầu quan sát được tín hiệu huỳnh quang, cao nhất ở khối u, sau đó là gan, thận, và lách (Hình 5.11a). Cường độ huỳnh quang tại khối u, gan và thận tăng dần theo thời gian. Sau 3 giờ tiêm, tín hiệu cao nhất ở khối u, sau đó là gan. Kết quả này cũng tương thích với kết quả định lượng MRI ở trên, cho thấy hiệu quả hướng đích thụ động tới vị trí khối u của hệ nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5. Đồng thời, tín hiệu huỳnh quang cao ở gan cho thấy một phần hệ nano đã tích lũy trong gan, là cơ quan chịu trách nhiệm loại bỏ các vật lạ khỏi hệ tuần hoàn. Điều thú vị là tín hiệu huỳnh quang ở thận đạt cao nhất tại thời điểm 6 giờ. Sau 24 giờ, tín hiệu huỳnh quang ở khối u thấp, giảm rõ rệt (5,6 lần so với thời điểm 3 giờ), nhưng cường độ huỳnh quang cao nhất ở thận của chuột, sau đó là gan và lách. Kết quả này cho thấy hệ nano này đã bắt đầu bị đào thải khỏi cơ thể và thời gian tồn tại trong cơ thể của hệ nano này ít nhất là 24 giờ. Cuối cùng, tín hiệu huỳnh quang ở lách rất thấp, không thay đổi đáng kể trong suốt thời gian 24 giờ. Những kết quả này chứng tỏ rằng hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 là một hệ dẫn thuốc nano đa chức năng đầy hứa hẹn ứng dụng chụp ảnh phân bố sinh học *in vivo* NIR trong y sinh.

Ngoài ra, tỷ lệ tín hiệu khối u/gan được xác định là một chỉ số phân bố hạt nano đặc hiệu của khối u so với các cơ quan lưới nội mô RES. Hình 5.11b cho thấy tỷ lệ tín hiệu khối u/gan ngày càng tăng ( $\geq 1$ ) và đạt cao nhất sau tiêm 30 phút ( $=2,1$ ). Điều này cho thấy hệ nano tập trung tại khối u chiếm ưu thế, và hiệu quả hướng đích thụ động tới vị trí khối u của hệ nano. Phân tích sâu hơn về tỷ lệ tín hiệu gan/thận cho phép đánh giá vai trò của từng cơ quan đối với quá trình chuyển hóa

và thải trừ của hệ nano. Trong 3 giờ đầu tiên, tỷ lệ tín hiệu gan/thận luôn  $> 1$ , cho thấy quá trình chuyển hóa tại gan chiếm ưu thế. Sau 6 giờ và 24 giờ tiêm, tỷ lệ tín hiệu gan/thận  $< 1,0$ ; và giá trị này  $< 0,5$  sau 24 giờ tiêm, cho thấy tín hiệu ở thận chiếm ưu thế. Do vậy, sau 6 giờ, hệ nano bắt đầu được thải trừ qua thận. Trong một nghiên cứu khác của Tamarov và cộng sự đã đánh giá sự phân bố *in vivo* trên mô hình chuột mang khối u CT26, cho thấy sau 24 giờ, hệ nano PEG-BPSi-Cyanine 7.5 (kích thước 140 nm) được thải trừ chủ yếu qua gan và lách, và có thể được loại bỏ khỏi cơ thể bằng cách bài tiết qua phân [181]. Nhóm nghiên cứu của Lyli Mai đã chứng minh bong bóng nano liên hợp Cyanine 5.5 có thể tồn tại ở vị trí khối u trong hơn 24 giờ, trên mô hình chuột được gây khối u gan H22. Ngược lại, Cyanine 5.5 tự do nhanh chóng được loại bỏ bằng cách lọc qua thận, sau đó bài tiết qua bàng quang [97].

Sau 36 giờ, khối u, phổi, lá lách, gan và thận được mổ và tiến hành chụp ảnh huỳnh quang *ex vivo*, nhằm định lượng tín hiệu huỳnh quang ở các cơ quan này (Hình 5.12a và b).



**Hình 5.12.** (a) Thu thập khối u và các cơ quan của chuột sau 36 giờ tiêm; (b) hình ảnh huỳnh quang NIR *ex vivo* ở bước sóng kích thích/phát xạ = 662/722 nm; (c) định lượng tín hiệu huỳnh quang; (d) tỷ lệ tín hiệu khối u/gan và gan/thận *ex vivo*

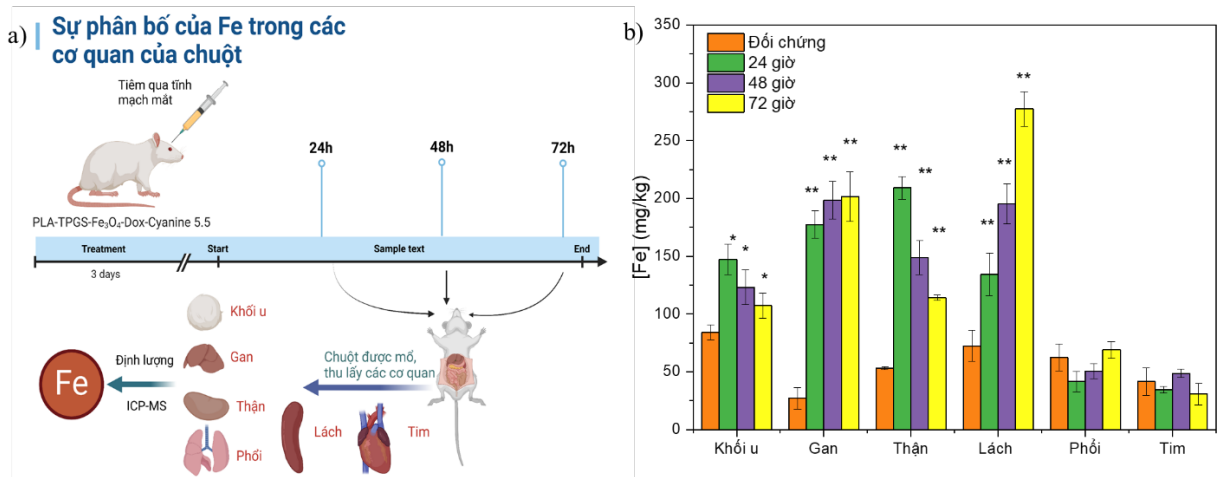
Kết quả trên hình 5.12c cho thấy tín hiệu huỳnh quang cao nhất ở thận, sau đó là gan và khối u. Trong khi, không quan sát thấy tín hiệu huỳnh quang đáng kể ở lách và phổi. Tỷ lệ tín hiệu khối u/gan  $< 0,5$  và gan/thận  $< 1,0$  cho thấy sau 36 giờ

tiêm, hệ nano phân bố chủ yếu ở thận (Hình 5.12d). Điều này cũng cho thấy sau 36 giờ hệ nano đã bắt đầu bị thải trừ, tập trung nhiều ở thận. Tín hiệu huỳnh quang cao ở thận cũng có thể là kết quả của một số phân tử Cyanine 5.5 tự do tách ra khỏi hệ nano. Người ta đã chứng minh rằng vật liệu nano có thể được phân bố trong gan, lá lách, thận và hệ thần kinh trung ương sau khi tiêm tĩnh mạch [226]. Hơn nữa, kích thước của các hạt nano ảnh hưởng đến sự hấp thu và loại bỏ tế bào khỏi cơ thể. Các hạt nano hình cầu có đường kính lớn hơn 150 nm sẽ được hấp thụ bởi lá lách và gan, trong khi các hạt nhỏ hơn 100 nm được lọc chọn lọc và loại bỏ khỏi cơ thể bởi thận [227, 228].

Sau 24 giờ tiêm, tín hiệu huỳnh quang *in vivo* thu được rất thấp, khó quan sát. Do vậy, để tiếp tục đánh giá sự phân bố của hệ nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 ở thời gian dài hơn, chúng tôi tiến hành xác định hàm lượng Fe sau khi tiêm 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ, trong khối u và các cơ quan khác của chuột như gan, thận, lách, phổi và tim (Hình 5.13).

Sau 24 giờ, hàm lượng Fe đạt cao nhất tại thận ( $209,07 \pm 9,98$  mg/kg) khác biệt đáng kể ( $p < 0,001$ ) so với hàm lượng Fe nội sinh ở chuột đối chứng ( $53,04 \pm 1,14$  mg/kg). Sau đó là gan ( $177,33 \pm 11,92$  mg/kg), khối u ( $147,03 \pm 13,21$  mg/kg), và lá lách ( $134,14 \pm 18,28$  mg/kg). Sau 48 giờ, hàm lượng Fe tập trung chủ yếu ở gan ( $198,56 \pm 16,32$  mg/kg) và lách ( $195,34 \pm 16,32$  mg/kg). Sau 72 giờ, hàm lượng Fe cao nhất ở lách ( $277,43 \pm 14,86$  mg/kg), sau đó là gan, thận và khối u. Tuy nhiên, ở cả 3 thời điểm, hàm lượng Fe tại phổi và tim rất thấp ( $< 50$  mg/kg), không có sự khác biệt so với hàm lượng Fe nội sinh ở nhóm đối chứng. Như vậy, kể từ thời điểm 24 giờ sau tiêm, hàm lượng Fe tại khối u giảm dần. Trong khi, hàm lượng Fe ở gan, lách tăng dần, cho thấy ở giai đoạn này, gan và lách đóng vai trò chủ đạo trong việc chuyển hóa và thải trừ hệ nano đa chức năng. Các hạt nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 có thể được tiếp nhận bởi các tế bào gan hoặc tế bào Kupffer, là các đại thực bào chuyên biệt trong gan, sau khi xâm nhập vào gan thông qua tuần hoàn máu [229, 230]. Ngoài ra, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> trong lõi của hệ nano có thể được chuyển hóa trong gan bởi các enzyme lysosomal để giải phóng các ion sắt (giống như ferritin) và tái sử dụng trong tủy xương để tạo ra các tế bào hồng cầu mới [231, 232]. Các nghiên cứu khác cũng cho thấy, mặc dù gan và lá lách là nơi hấp thu hạt nano chính, khi tiêm hạt nano liều cao, lượng dư thừa của chúng sẽ được tích lũy trong các mô và cơ quan khác như phổi, tim hoặc mô mỡ [233]. Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng các hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> có độc tính thấp, chỉ gây ra những thay đổi ngắn hạn, tạm thời, ví dụ như stress oxy hóa, nhưng không góp phần gây tổn thương vĩnh viễn

cho các cơ quan. Chỉ liều rất cao (500 mg Fe/kg) mới gây ra những thay đổi bệnh lý ở gan và lá lách [234].

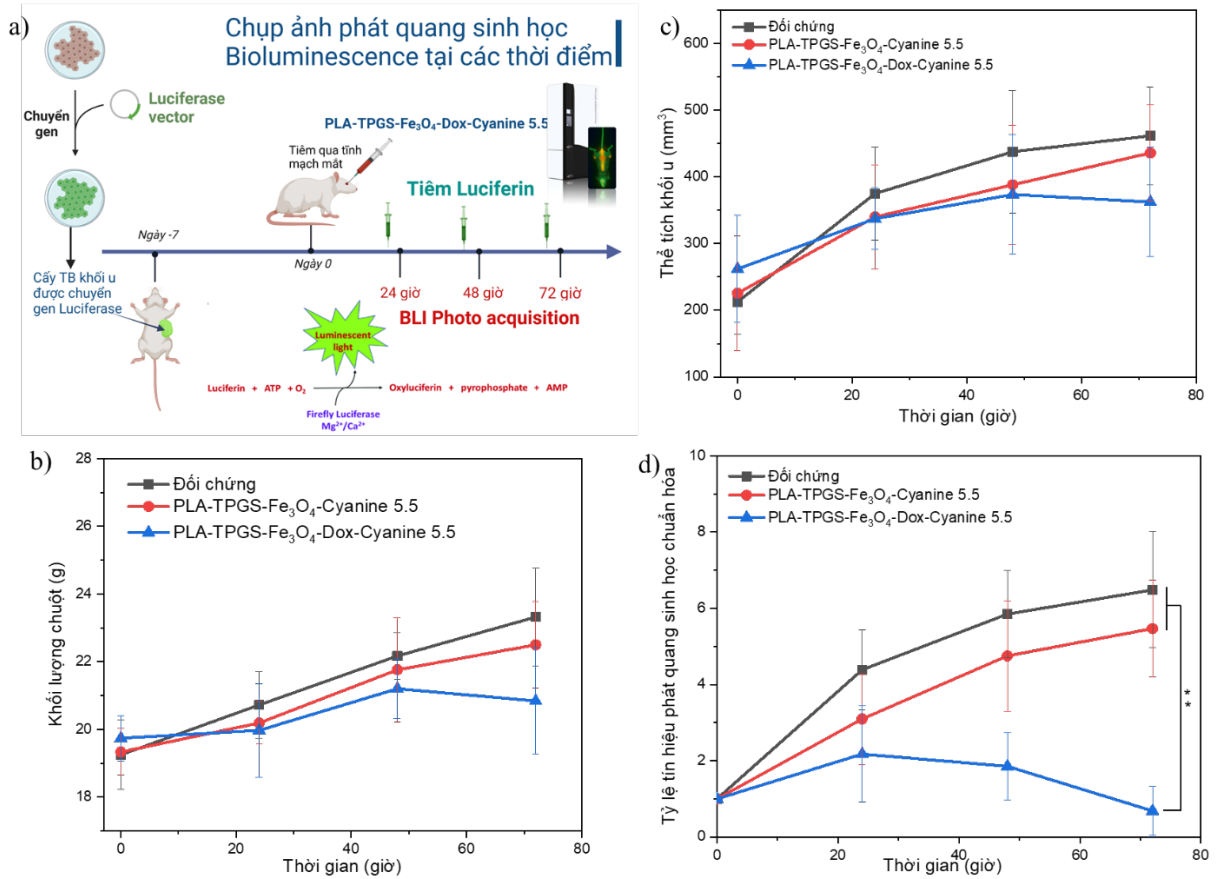


**Hình 5.13.** (a) Sơ đồ thí nghiệm trên chuột; (b) hàm lượng Fe tại khối u và các cơ quan của chuột (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ )

Những kết quả này cùng với kết quả chụp ảnh phân bố huỳnh quang *in vivo* và *ex vivo* ở trên, đã chứng tỏ hiệu quả hướng đích thụ động tới khối u và sự phân bố của hệ nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 tại các cơ quan của chuột mang khối u CT26. Trong đó, gan, lách và thận đóng vai trò trong quá trình chuyển hóa và thải trừ của hệ nano này.

### 5.3. Đánh giá tác dụng hóa trị bằng kỹ thuật phát quang sinh học

Phát quang sinh học (Bioluminescence) là sự sản sinh và phát xạ ánh sáng của một sinh vật sống do kết quả của một phản ứng hóa học trong đó năng lượng hóa học được chuyển đổi thành năng lượng ánh sáng. So với hình ảnh huỳnh quang (optical bioimaging), hình ảnh phát quang sinh học *in vivo* có ưu điểm vượt trội ở chỗ các tín hiệu nền do quá trình tự phát huỳnh quang của mô gần như bằng 0, vì không cần kích thích bên ngoài trong hình ảnh phát quang sinh học. Ngoài ra, hình ảnh phát quang sinh học cho phép quan sát lâu dài các tế bào sống mà không cần chiếu xạ bằng ánh sáng kích thích, dẫn đến không bị tẩy quang (photobleaching) và nhiễm độc tế bào (photocytotoxicity) [235]. Trong đó, luciferase là loại protein phát quang sinh học có nguồn gốc từ đom đóm, đang được quan tâm nghiên cứu ứng dụng cho hình ảnh *in vivo*.

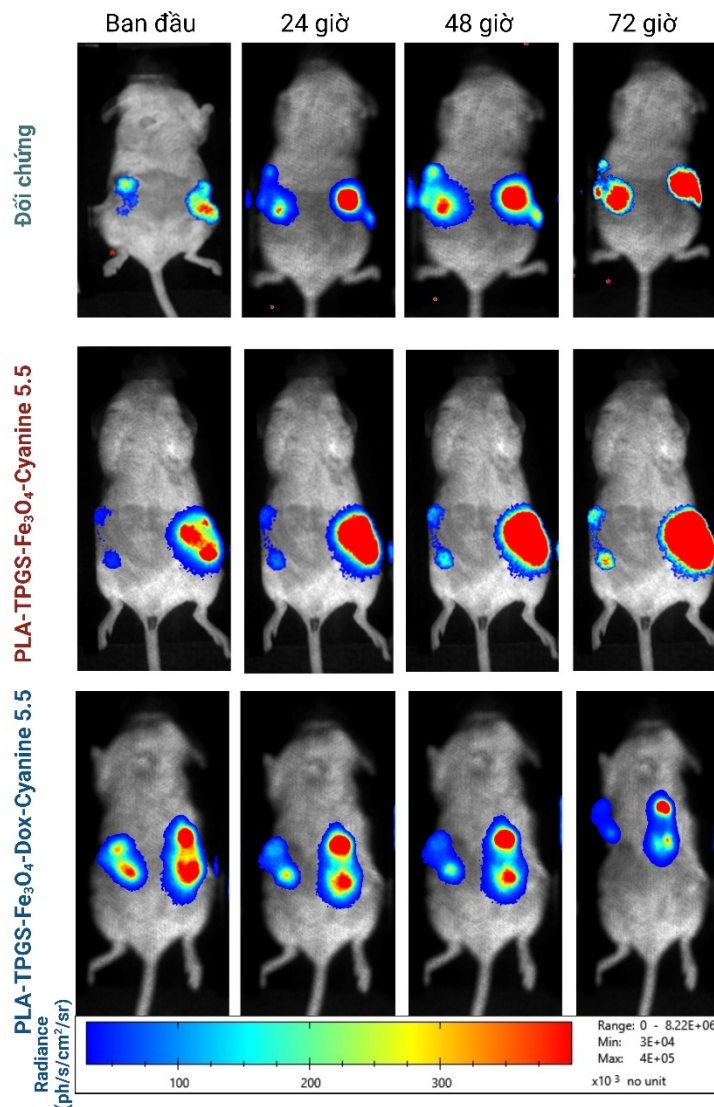


**Hình 5.14.** Đánh giá tác dụng hóa trị của vật liệu nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 bằng hình ảnh phát quang sinh học. (a) Sơ đồ thí nghiệm; (b) khối lượng chuột; (c) kích thước khối u; (d) hoạt động luciferase trung bình trong khối u với độ lệch chuẩn. Tín hiệu luciferase được chuẩn hóa với tín hiệu trước khi điều trị. (\*\*p < 0,001)

Cơ chế của kỹ thuật phát quang sinh học được trình bày trong hình 5.14a. Các tế bào khối u được chèn gen mã hóa luciferase cùng với gen chỉ thị. Do vậy, DNA mã hóa luciferase được nhân lên khi các tế bào khối u phân chia nên luciferase sẽ tích lũy trong tế bào chất của khối u. Sự phát triển của khối u được đánh giá thông qua mức độ biểu hiện của gen mã hóa luciferase. Để kiểm tra số lượng tế bào chứa luciferase, luciferin được sử dụng cho động vật được gây mê trước giai đoạn chụp ảnh. Luciferin là một phân tử nhỏ dễ dàng đi qua hàng rào máu não và màng tế bào, đồng thời có thể dễ dàng sử dụng toàn thân với liều khoảng 150 mg/kg. Luciferase xúc tác phản ứng phát quang sinh học bằng cách oxy hóa luciferin thành oxyluciferin với sự có mặt của oxy, ATP (Adenosin triphosphat) và Mg<sup>2+</sup>. Điều này sau đó gây ra sự phát xạ của một photon có ánh sáng thu được là màu vàng - lục, tạo ra tín hiệu phát quang sinh học đạt cực đại ở bước sóng 562nm [236]. Trong phản



ứng này, ATP bị thủy phân thành AMP (Adenosin monophosphat). Sự phát quang sinh học đạt mức cao nhất trong vòng 10 - 20 phút và thời gian thu được hình ảnh tương đối ngắn (từ vài giây đến vài phút). Tín hiệu phát quang sinh học được định lượng theo các vùng quan tâm (ROI), và được vẽ xung quanh các khối u. Hình ảnh được phân tích bằng phần mềm M3Vision (Biospace Lab, France). Dựa trên việc định lượng tín hiệu phát quang sinh học ở các thời điểm, có thể đánh giá được sự tiến triển của khối u và hiệu quả của liệu pháp điều trị.



**Hình 5.15.** Hình ảnh phát quang sinh học của từng nhóm chuột thử nghiệm cho thấy hoạt động của enzyme luciferase trong khối u CT26

Trong luận án này, chúng tôi sử dụng hình ảnh phát quang sinh học luciferase để đánh giá phản ứng của khối u với tác dụng hóa trị của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5. Vì gen luciferase được chèn vào gen chỉ thị khối u CT26 nên chúng sẽ luôn được biểu hiện cùng nhau. Do đó sau khi tiêm

luciferin, tín hiệu phát quang sinh học chỉ được tạo ra trong các tế bào ung thư tại vị trí khối u do hoạt động của luciferase (Hình 5.15). Cường độ tín hiệu phát quang sinh học cho phép đánh giá khả năng sống sót của tế bào ung thư và sự phát triển của khối u (Hình 5.14d). Ở chuột được tiêm PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5, sau 72 giờ tín hiệu huỳnh quang giảm đi 7,98 lần so với nhóm PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5, và giảm đi đáng kể so với nhóm đối chứng (9,5 lần), sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê,  $p < 0,001$ . Kết quả này cho thấy sự bất hoạt của luciferase, hiệu quả ức chế khối u của hệ nano đa chức năng mang thuốc Doxorubicin (PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5). Ngược lại, cường độ phát quang sinh học ở nhóm chuột được tiêm PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5 giảm không đáng kể (1,19 lần) so với nhóm đối chứng được tiêm dung dịch PBS (sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê,  $p > 0,05$ ). Điều này chứng minh tác dụng hóa trị của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 đã làm ức chế sự phát triển của khối u hiệu quả, thấy rõ tác dụng sau 72 giờ tiêm. Kết quả này cũng phù hợp với hiệu quả gây độc tế bào ung thư của hệ nano này ở chương 4. Hệ nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 thể hiện tác dụng gây độc tế bào *in vitro* thông qua cơ chế bắt giữ chu kỳ tế bào của các thành phần Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Doxorubicin và Cyanine 5.5, kích hoạt cảm ứng chết theo chu trình của tế bào.

Trong khoảng thời gian 72 giờ sau điều trị, giá trị về khối lượng cơ thể (Hình 5.14b) và thể tích khối u (Hình 5.14c) của chuột được điều trị PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 có giảm không đáng kể (sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê,  $p > 0,05$ ). Tuy nhiên, bằng việc định lượng tín hiệu huỳnh quang sinh học thông qua kỹ thuật Bioluminescence, sau 72 giờ tiêm đã cho thấy rõ sự khác biệt giữa nhóm điều trị PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 so với nhóm điều trị PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5 và nhóm đối chứng (sự khác biệt có ý nghĩa thống kê,  $p < 0,001$ ). Kết quả này đã chứng minh tác dụng hóa trị của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5, và ưu điểm của kỹ thuật huỳnh quang sinh học trong việc đánh giá hiệu quả của liệu pháp điều trị. Trong một nghiên cứu khác, Tamarov và cộng sự đã đánh giá hiệu quả chống khối u của vật liệu nano anti-PD-L1 peptit liên hợp glycol chitosan mang thuốc Doxorubicin trên mô hình chuột được gây khối u CT26. Kết quả cho thấy vật liệu nano này ức chế hiệu quả sự phát triển của khối u di căn trong 15 ngày, trong đó cường độ phát quang sinh học giảm

đáng kể xuống còn 0,5 - 0,52% so với nhóm đối chứng vào ngày thứ 5 [237]. Bằng cách ghi lại cường độ phát quang sinh học và phân bố tại chỗ theo trình tự trong quá trình thử nghiệm, quá trình tiến triển của khối u có thể được theo dõi, qua đó xác định được hiệu quả điều trị của hệ nano. Vì phát quang sinh học phụ thuộc vào năng lượng (ATP), nên hình ảnh phát quang sinh học có tính định lượng, có thể liên quan đến các quá trình sinh học quan trọng trong các khối u thực nghiệm, bao gồm sự phát triển, xâm lấn và di căn [235]. Do vậy, kỹ thuật này cung cấp một phương pháp tiếp cận hiệu quả để đánh giá tác dụng hóa trị của vật liệu thử nghiệm và theo dõi sự tiến triển của khối u trong các mô hình *in vivo*.

#### 5.4. Đánh giá tác dụng nhiệt từ trị

Tiến hành đánh giá hiệu quả nhiệt từ trị trên mô hình chuột nhắt trắng Swiss mang khối u rắn 7 ngày tuổi bằng cách tiêm các hệ nano trực tiếp vào khối u với liều 150  $\mu$ L/chuột, tương đương 1,875 mg/kg. Cụ thể như sau:

Nhóm 1: Đối chứng âm - chuột được tiêm dung dịch đệm PBS và không chiếu từ trường.

Nhóm 2: Đối chứng dương - chuột được tiêm dung dịch Doxorubicin tự do và không chiếu từ trường.

Nhóm 3: Chuột được tiêm hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> và chiếu từ trường.

Nhóm 4: Đối chứng nhiệt trị - chuột được tiêm hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 và không chiếu từ trường.

Nhóm 5: Chuột được tiêm hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 và chiếu từ trường.

Nhóm 6: Đối chứng hóa trị - chuột được tiêm hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5 và không chiếu từ trường.

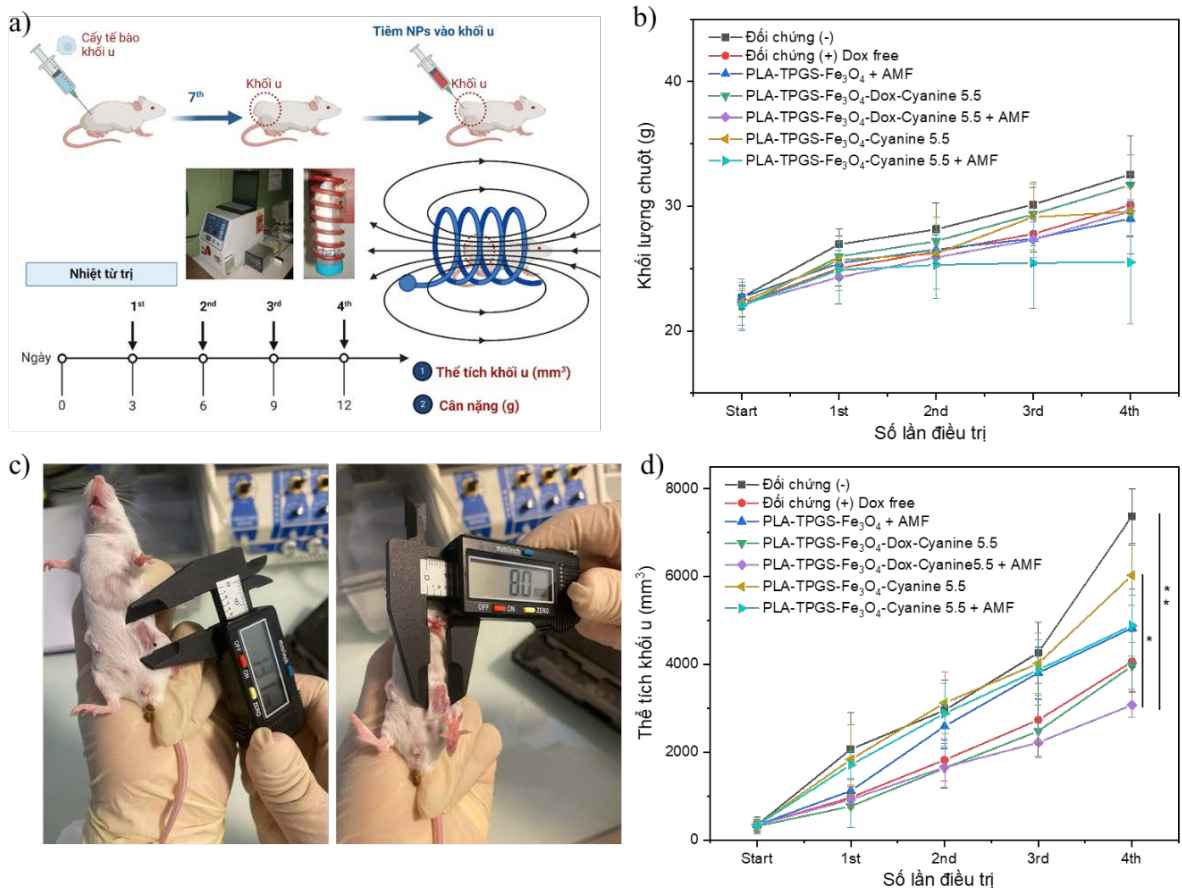
Nhóm 7: Chuột được tiêm hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5 và chiếu từ trường, để đánh giá vai trò hóa trị của Doxorubicin.

Thực hiện bốn lần điều trị trong từ trường có tần số xoay chiều 450 kHz và cường độ 150 Oe với thời gian giữa hai điều trị liên tiếp là 36 giờ (Hình 5.16a). Trong suốt quá trình điều trị (12 ngày), trọng lượng chuột sau mỗi lần điều trị ở các nhóm không có sự khác biệt đáng kể (Hình 5.16b). Hiệu quả điều trị được phản ánh thông qua kích thước khối u trước và sau khi điều trị (Hình 5.16d). Ở nhóm đối chứng âm, khối u rất lớn và phát triển nhanh chóng. Ở thời điểm ban đầu (ngày thứ

7 sau khi gây khối u), thể tích trung bình của khối u là  $345 \pm 146 \text{ mm}^3$ , sau 12 ngày, khối u đã phát triển rất lớn, tăng 21,4 lần, đạt kích thước  $7377 \pm 623 \text{ mm}^3$ . Ở nhóm đối chứng dương (được tiêm Doxorubicin tự do) và nhóm (tiêm PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  + chiếu từ trường) kích thước khối u tăng chậm hơn một nửa so với nhóm đối chứng âm. Thể tích khối u ở hai nhóm này gần tương đương nhau, đạt kích thước  $4060 \pm 690 \text{ mm}^3$  và  $4827 \pm 882 \text{ mm}^3$ , tương ứng, tăng 12 lần so với thời điểm ban đầu. Kích thước khối u ở hai nhóm chuột này nhỏ hơn 50% so với nhóm đối chứng âm, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Điều này khẳng định tác dụng hóa trị của Doxorubicin và tác dụng nhiệt từ trị của hệ nano lõi  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bọc copolyme PLA-TPGS có tác dụng ức chế sự sinh trưởng của khối u.

Ở nhóm điều trị bởi PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Cyanine 5.5 và chiếu từ trường, kích thước khối u tương đương với nhóm (tiêm PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  + chiếu từ trường), thể tích khối u đạt  $4884 \pm 695 \text{ mm}^3$ . Ở nhóm cùng được tiêm PLA-TPGS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Cyanine 5.5 nhưng không chiếu từ, thể tích khối u đạt  $6027 \pm 685 \text{ mm}^3$  sau 12 ngày, tăng 1,23 lần so với khi chiếu từ trường, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Điều này cho thấy rõ vai trò sinh nhiệt của  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  trong hệ nano, và việc gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần Cyanine 5.5 không ảnh hưởng tới hiệu quả nhiệt từ trị của hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Tác dụng nhiệt từ trị ung thư của hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  vừa làm tổn thương tế bào khối u, gây ra chết tế bào; vừa làm tăng biểu hiện kháng nguyên của khối u, kích hoạt tế bào tua (dendritic cell), tế bào tiêu diệt tự nhiên (natural killer cell) cũng như vận chuyển bạch cầu qua nội mô mạch máu. Ngoài ra, nhiệt từ trị cũng làm thay đổi độ ổn định của DNA, cấu trúc protein, và sản sinh các gốc tự do trong tế bào ung thư. Tác động của nhiệt từ trị lên các quá trình này có thể làm cho khối u nhạy cảm hơn với hóa trị, dẫn đến nâng cao hiệu quả điều trị [238]. Ngoài ra, các tế bào ung thư hấp thụ nhiều hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  hơn 8 - 400 lần so với các tế bào bình thường, do đó, các tế bào ung thư dễ bị tiêu diệt bởi tác dụng nhiệt từ trị. Các tác dụng phụ bị hạn chế vì tế bào thường ít nhạy cảm với nhiệt hơn tế bào ung thư, đặc trưng bởi tình trạng thiếu oxy và độ pH thấp hơn. [239]. Đồng thời, hiệu quả nhiệt từ trị khối u bị ảnh hưởng bởi một số yếu tố như: sự phân tán của vật liệu nano ở khắp khối u (điều này ảnh hưởng đến nhiệt lượng sinh ra khi chiếu từ

trường ngoài), quá trình trao đổi chất tại vị trí khối u, tốc độ tưới máu, hệ số truyền nhiệt trong các mô ung thư, khối lượng riêng của máu, ... [240]



**Hình 5.16.** (a) Sơ đồ thí nghiệm đánh giá tác dụng nhiệt từ trị *in vivo*; (b) theo dõi khối lượng chuột; (c) đo kích thước khối u trên chuột; (d) thể tích khối u ở các nhóm sau điều trị (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ )

Sau 4 lần điều trị, kích thước khối u ở nhóm (tiêm PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 + chiếu từ trường) khác biệt rõ rệt so với các lô đối chứng. Thể tích khối u đạt  $3077 \pm 280$  mm<sup>3</sup>, thấp hơn 58,3% so với nhóm đối chứng âm ( $p < 0,001$ ), và khác biệt đáng kể so với các nhóm còn lại ( $p < 0,05$ ). Kết quả này cho thấy tác dụng hiệp đồng khi kết hợp hóa trị (Dox) cùng liệu pháp nhiệt từ trị (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> + chiếu từ trường) trong hệ nano đa chức năng gắn Cyanine 5.5. Lý do đầu tiên có thể có của tác dụng hiệp đồng như vậy do nhiệt từ trị làm tăng nhiệt độ khối u (40 - 43 °C), giúp đẩy nhanh quá trình giải phóng thuốc từ các hạt nano, điều này sẽ dẫn đến nồng độ Doxorubicin cao hơn trong tế bào ung thư. Một lý do khác, khi nhiệt độ khối u tăng lên, làm tăng lưu lượng máu tới khối u, dẫn đến tăng khả năng phân phối thuốc và nồng độ oxy cao. Các thử nghiệm *in vivo* chứng minh rằng khi nhiệt

độ khối u tăng lên từ 39°C đến 43°C, tại vị trí khối u xảy ra quá trình oxy hóa cấp tính và tái oxy hóa lâu dài, làm tăng đáp ứng của khối u với hóa trị liệu [241]. Trong nghiên cứu của Piehler và cộng sự, hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> được phủ bằng axit dimercaptosuccinic và mang thuốc Doxorubicin cho thấy tác dụng hiệp đồng của Doxorubicin và nhiệt từ trong việc giảm thể tích khối u phát hiện được cho đến ngày 17 sau điều trị [242].

Từ các kết quả trên, cho thấy sau 4 lần điều trị, phương pháp nhiệt từ trị sử dụng hệ nano đa chức năng gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gắn PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin-Cyanine 5.5 có tác dụng ức chế sự tiến triển của khối u, trên chuột nhắt trắng Balb/c mang khối ung thư phổi Lewis. Cùng với những kết quả trước, kết quả nghiên cứu này một lần nữa khẳng định phương pháp nhiệt từ trị sử dụng hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> kết hợp với tác dụng hóa trị của Doxorubicin là phương pháp triển vọng trong điều trị ung thư.

### **Tóm tắt chương 5**

Trong chương này, chúng tôi đã đánh giá được sự phân bố *in vivo* của hệ dẫn thuốc đa chức năng trong cơ thể chuột thông qua khả năng phát huỳnh quang hồng ngoại gắn của Cyanine 5.5. Hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 tập trung tại vị trí khối u cao nhất sau 3 giờ tiêm. Các cơ quan như gan, lách và thận đóng vai trò trong quá trình chuyển hóa và thải trừ của hệ nano này. Đồng thời, hệ nano làm tăng độ tương phản trong chụp ảnh cộng hưởng từ MRI, tín hiệu hình ảnh MRI trọng T2\* được định lượng bằng phương pháp %I<sub>0,25</sub> cho thấy sự tích lũy thụ động hiệu quả của hệ nano ở vị trí khối u sau 4 giờ tiêm. Tỷ lệ phần trăm pixel dưới I<sub>0,25</sub> có sự khác biệt đáng kể ( $p < 0,001$ ) giữa nhóm đối chứng (3,35 %) và nhóm điều trị (13,82 %). Các kết quả MRI và hình ảnh quang học đã cho thấy sự phân bố *in vivo* và chứng minh hiệu quả hướng đích thụ động tới vị trí khối u của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5. Hệ nano có tác dụng hóa trị tốt, quan sát được sự khác biệt có ý nghĩa thống kê sau 72 giờ điều trị bằng kỹ thuật phát quang sinh học bioluminescence. Ngoài ra, hệ dẫn thuốc nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 thể hiện tác dụng hiệp đồng khi kết hợp hóa trị và nhiệt từ trị, sau 4 lần chiếu từ trường cường độ 150 Oe, tần số 450 kHz và thời gian chiếu từ trường nhiệt trị là 30 phút.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

L luận án đã tập trung nghiên cứu chế tạo hệ dẫn thuốc nano đa chức năng gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần Cyanine 5.5 trên cơ sở copolyme PLA-TPGS. Trong đó, hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin-Cyanine 5.5 gồm các chức năng: (1) mang thuốc Doxorubicin, (2) tăng cường độ tương phản ảnh MRI, (3) tác dụng hóa trị của Doxorubicin, (4) tác dụng nhiệt từ trị, (5) theo dõi sự phân bố *in vivo* và hiệu quả điều trị bằng kỹ thuật hình ảnh quang học. Từ các kết quả nghiên cứu chi tiết và các thảo luận thích hợp, một số kết luận chính được rút ra như sau:

1. Đã chế tạo và đặc trưng được hệ nano đa chức năng mang đồng thời Doxorubicin và Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, trong đó tỷ lệ Dox : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs là 1 : 1 w/w. Hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox thu được có dạng hình cầu, kích thước tiểu phân trung bình 17 - 19,8 nm, hiệu suất nano hóa đạt  $91,05 \pm 0,8$  %, khả năng mang thuốc Doxorubicin đạt  $31,28 \pm 1,64$  %. Thuốc Doxorubicin được giải phóng từ hệ nano theo mô hình động học Weibull, cơ chế giải phóng thuốc phụ thuộc vào pH. Hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin có tác dụng gây độc tế bào ung thư hiệu quả, có khả năng xâm nhập tế bào và sinh nhiệt tốt, có khả năng ứng dụng trong nhiệt từ trị. Trên dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa, hệ nano có tỷ lệ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> cao, gây độc tế bào theo cơ chế bất giữ tế bào ở pha G0/G1. Trong khi, các hệ nano có tỷ lệ Doxorubicin cao hơn, sẽ gây độc tế bào theo cơ chế bất giữ tế bào ở pha G2/M.

2. Đã chế tạo và đặc trưng được hệ nano đa chức năng gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần Cyanine 5.5, với các thông số kỹ thuật như sau: tỉ lệ Cyanine 5.5 : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs = 0,05 : 1 w/w, tỉ lệ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs : APTES = 10 : 3 w/w, nhiệt độ 70 °C ở bước ghép APTES, pH 8,5 và thời gian 5 giờ ở bước gắn Cyanine 5.5. Hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 thu được có dạng hình cầu, với kích thước trung bình  $13,16 \pm 2,16$  nm, có độ ổn định tốt, thể hiện khả năng phát huỳnh quang mạnh, cho thấy ứng dụng tiềm năng của chúng trong y sinh. Sự kết hợp của 3 thành phần Doxorubicin, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, và Cyanine 5.5 trong hệ dẫn thuốc nano đa chức năng gây ra sự chết tế bào theo chu trình trên các dòng tế bào ung thư thực nghiệm.

3. Đã đánh giá được sự phân bố *in vivo* của hệ nano đa chức năng gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần trên mô hình chuột gây khối u đại tràng CT26 bằng

phương pháp hình ảnh quang học (optical bioimaging). Hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 phân bố tập trung tại khối u hiệu quả, đạt cao nhất sau 3 giờ tiêm, sau đó được thanh thải qua gan, lách và thận.

4. Đã đánh giá được khả năng tăng độ tương phản trong chụp ảnh cộng hưởng từ MRI. Doxorubicin và Cyanine 5.5 khi kết hợp trong hệ nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 làm tăng hiệu ứng tương phản T<sub>2</sub> của hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Định lượng tín hiệu hình ảnh MRI trọng T<sub>2</sub>\* bằng phương pháp %I<sub>0,25</sub> cho thấy sự tích lũy thụ động hiệu quả của hệ nano ở vị trí khối u, với tỷ lệ phần trăm pixel dưới I<sub>0,25</sub> có sự khác biệt đáng kể ( $p < 0,001$ ) giữa nhóm đối chứng (3,35 %) và nhóm điều trị (13,82 %).

5. Đã đánh giá được tác dụng hóa trị và nhiệt từ trị của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng trên mô hình *in vivo*. Tác dụng hóa trị sau 72 giờ điều trị hệ nano đa chức năng PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 được quan sát rõ ràng bằng phương pháp phát quang sinh học (bioluminescence). Hơn nữa, hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 thể hiện hiệu quả của tác dụng hiệp đồng khi kết hợp hóa trị và nhiệt từ trị, sau 4 lần chiếu từ trường cường độ 150 Oe, tần số 450 kHz và thời gian chiếu từ trường nhiệt trị là 30 phút.

Trên cơ sở đó, chúng tôi đề xuất một số kiến nghị sau đây:

1. Nghiên cứu đặc tính dược lực học, dược động học *in vivo* của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần.

2. Tiến hành các thử nghiệm sâu hơn, nhằm phát triển hệ dẫn thuốc nano đa chức năng gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gần ứng dụng trong chẩn đoán và điều trị ung thư.



## NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Đã chế tạo thành công hệ dẫn thuốc nano đa chức năng mang đồng thời hạt nano oxit sắt từ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  và thuốc Doxorubicin, trên chất mang copolyme PLA-TPGS.
2. Đã chế tạo thành công hệ dẫn thuốc nano đa chức năng mang đồng thời hạt nano oxit sắt từ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , thuốc Doxorubicin, và gắn chất phát huỳnh quang hồng ngoại gắn Cyanine 5.5, trên chất mang copolyme PLA-TPGS.
3. Đã đánh giá được sự phân bố *in vivo* của hệ dẫn thuốc đa chức năng thông qua khả năng phát huỳnh quang hồng ngoại gần của Cyanine 5.5 trên mô hình chuột gây khối u đại tràng CT26. Các cơ quan như gan, lách và thận đóng vai trò trong quá trình chuyển hóa và thải trừ của hệ nano này.
4. Đã đánh giá được khả năng tăng độ tương phản trong chụp ảnh cộng hưởng từ MRI, tín hiệu hình ảnh MRI trọng  $T_2^*$  được định lượng bằng phương pháp  $\%I_{0,25}$  cho thấy sự tích lũy thụ động hiệu quả của hệ nano ở vị trí khối u sau 4 giờ tiêm.
5. Đã đánh giá được tác dụng hóa trị của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng bằng kỹ thuật phát quang sinh học (bioluminescence).
6. Đã đánh giá được tác dụng nhiệt từ trị của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng, cho thấy tác dụng hiệp đồng khi kết hợp hóa trị và nhiệt từ trị.

## DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

### ➤ 02 Bài báo quốc tế uy tín SCIE:

1. **Ke Son Phan**, Phuong Thu Ha\*, Huu Nghi Do, Trung Anh Nguyen, Thuc Quang Bui, Hong Nam Pham, Mai Huong Le, Thi Thu Huong Le, “Dual loading of Doxorubicin and magnetic iron oxide into PLA-TPGS nanoparticles: Design, *in vitro* drug release kinetics and biological effects on cancer cells”, *ChemMedChem*, 16, 2021, 3615–25 (Q1, IF = 3.46).

2. **Ke Son Phan**, Bich Thuy DOAN, Thi Thu Huong Le, Thi Thu Trang Mai, Thi Dieu Thuy Ung, Thuc Quang Bui, Sarah Boumati, Phuong Thu Ha\*, “Near-Infrared Cyanine 5.5 and Doxorubicin loaded PLA-TPGS copolymer Based magnetite Nanoparticles for dual- *in vivo* Magnetic Resonance and Biodistribution Imaging”, *ChemistrySelect*, 8(40), e202303580, 2023 (Q2, IF = 2.307).

### ➤ 01 Bài hội nghị quốc gia:

3. **Phan Kế Sơn**, Lê Thị Thu Hương, Mai Thị Thu Trang, Đỗ Hữu Nghị, Bich Thuy DOAN, Phạm Hồng Nam, Nguyễn Hoài Nam, Đồng Thị Nhâm, Tô Xuân Thắng, Vương Thị Kim Oanh, Nguyễn Hải Bình, Hà Phương Thư\*, “Nghiên cứu chế tạo và đánh giá khả năng phân bố *in vivo* bằng hình ảnh huỳnh quang của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Doxorubicin/Curcumin@PLA-TPGS-Cyanine 5.5”, Hội nghị Vật lý chất rắn và Khoa học vật liệu toàn quốc lần thứ XII năm 2022, p.859-864. Giải Nhì Best Poster Award của Hội nghị.

### ➤ 01 Bằng độc quyền sáng chế được cấp:

4. **Phan Kế Sơn**, Hà Phương Thư\*, Lê Thị Thu Hương, Mai Thị Thu Trang, Đỗ Hữu Nghị, Bùi Thúc Quang. Bằng độc quyền Sáng chế số 40854 “Phương pháp sản xuất vật liệu nano đa chức năng trên nền copolyme PLA-TPGS mang đồng thời doxorubicin - nano oxit sắt từ”, được Cục Sở hữu trí tuệ cấp theo QĐ số 8527w/QĐ-SHTT ngày 17 tháng 7 năm 2024.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zhang, Zhe, Li Zhou, Na Xie, Edouard Nice, Tao Zhang, Yongping Cui, and Canhua Huang. 2020. Overcoming cancer therapeutic bottleneck by drug repurposing. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5: 113. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00213-8>.
2. Võ Xuân Minh. 2013. *Kỹ thuật nano và liposome ứng dụng trong dược phẩm, mỹ phẩm*. Trường Đại học Dược Hà Nội.
3. Zhao, Shengzhe, Xujiang Yu, Yuna Qian, Wei Chen, and Jianliang Shen. 2020. Multifunctional magnetic iron oxide nanoparticles: an advanced platform for cancer theranostics. *Theranostics* 10. Ivyspring International Publisher: 6278–6309. 32483453. PubMed. <https://doi.org/10.7150/thno.42564>.
4. Karlsson, Johan, Hannah J Vaughan, and Jordan J Green. 2018. Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Therapeutic Cancer Treatments. *Annual review of chemical and biomolecular engineering* 9: 105–127. 29579402. PubMed. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-060817-084055>.
5. Huang, Jiaguo, and Kanyi Pu. 2021. Near-infrared fluorescent molecular probes for imaging and diagnosis of nephro-urological diseases. *Chemical Science* 12. The Royal Society of Chemistry: 3379–3392. <https://doi.org/10.1039/D0SC02925D>.
6. Xu, Cheng, and Kanyi Pu. 2021. Second near-infrared photothermal materials for combinational nanotheranostics. *Chemical Society Reviews* 50. The Royal Society of Chemistry: 1111–1137. <https://doi.org/10.1039/D0CS00664E>.
7. Jin, Guo-Qing, Haoqiang Lai, Zi-Shu Yang, Yingying Ning, Linqi Duan, Jing Zhang, Tianfeng Chen, Song Gao, and Jun-Long Zhang. 2022. Gadolinium(III) Porphyrinoid Phototheranostics. *Chemistry – An Asian Journal* 17: e202200181. <https://doi.org/10.1002/asia.202200181>.
8. GLOBOCAN. 2020. *International Agency for research on cancer*.
9. Bộ Y tế. 2020. *Tình hình ung thư tại Việt Nam*. Cổng thông tin điện tử Bộ y tế.
10. Bray, Freddie, Mathieu Laversanne, Hyuna Sung, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Isabelle Soerjomataram, and Ahmedin Jemal. 2024. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 74: 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.
11. Alqosaibi, Amany I. 2022. Nanocarriers for anticancer drugs: Challenges and perspectives. *Saudi Journal of Biological Sciences* 29: 103298. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103298>.
12. R. Pandya, Shivani, Harjeet Singh, Martin F. Desimone, Jagpreet Singh, Noble George, and Srushti Jasani. 2024. Circumventing challenges in mitochondrial targeting for cancer treatment: leveraging nanoplatforms for effective solutions. *Materials Advances* 5. Royal Society of Chemistry: 409–431. <https://doi.org/10.1039/D3MA00629H>.
13. Mehta, Meenu, Thuy Anh Bui, Xinpu Yang, Yagiz Aksoy, Ewa M. Goldys, and Wei Deng. 2023. Lipid-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery: An Overview of the Production Techniques and Difficulties Encountered in Their Industrial Development. *ACS Materials Au* 3. American Chemical Society: 600–619. <https://doi.org/10.1021/acsmaterialsau.3c00032>.
14. Dunne, Michael, Maximilian Regenold, and Christine Allen. 2020. Hyperthermia can alter tumor physiology and improve chemo- and radio-therapy efficacy. *Integration of Hyperthermia and Drug Delivery* 163–164: 98–124. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.007>.

15. Wang, Jing, Yiye Li, and Guangjun Nie. 2021. Multifunctional biomolecule nanostructures for cancer therapy. *Nature Reviews Materials* 6. Nature Publishing Group: 766–783. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00315-x>.
16. Kashyap, Brijendra Kumar, Virendra Vikram Singh, Manoj Kumar Solanki, Anil Kumar, Janne Ruokolainen, and Kavindra Kumar Kesari. 2023. Smart Nanomaterials in Cancer Theranostics: Challenges and Opportunities. *ACS Omega* 8. American Chemical Society: 14290–14320. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07840>.
17. Wu, Peng-Yu, Zhi-Chun Shen, Jia-Li Jiang, Bing-Chen Zhang, Wen-Zhong Zhang, Jun-Jie Zou, Juan-Fang Lin, Chao Li, and Jing-Wei Shao. 2022. A multifunctional theranostics nanosystem featuring self-assembly of alcohol-abuse drug and photosensitizers for synergistic cancer therapy. *Biomaterials Science* 10. The Royal Society of Chemistry: 6267–6281. <https://doi.org/10.1039/D2BM00803C>.
18. Thái Hoàng and Nguyễn Thúy Chinh. 2020. *Các phương pháp phân tích nhiệt ứng dụng trong nghiên cứu vật liệu polyme*. Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ.
19. Stevanović, Magdalena. 2019. Chapter 1 - Biomedical Applications of Nanostructured Polymeric Materials. In *Nanostructured Polymer Composites for Biomedical Applications*, ed. Sarat Kumar Swain and Mohammad Jawaid, 1–19. Micro and Nano Technologies. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816771-7.00001-6>.
20. Mundel, Rohit, Tanya Thakur, and Mary Chatterjee. 2022. Emerging uses of PLA–PEG copolymer in cancer drug delivery. *3 Biotech* 12: 41. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-03105-y>.
21. Harun-Or-Rashid, Md, Most Nazmin Aktar, Md Sabbir Hossain, Nadia Sarkar, Md Rezaul Islam, Md Easin Arafat, Shukanta Bhowmik, and Shin-ichi Yusa. 2023. Recent Advances in Micro- and Nano-Drug Delivery Systems Based on Natural and Synthetic Biomaterials. *Polymers* 15. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 4563. <https://doi.org/10.3390/polym15234563>.
22. Ding, Ling, Prachi Agrawal, Sandeep K. Singh, Yashpal S. Chhonker, Jingjing Sun, and Daryl J. Murry. 2024. Polymer-Based Drug Delivery Systems for Cancer Therapeutics. *Polymers* 16. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 843. <https://doi.org/10.3390/polym16060843>.
23. Raj, R. Mohan, and V. Raj. 2023. 6 - Nanostructured polymeric materials for medicine. In *Handbook of Polymers in Medicine*, ed. Masoud Mozafari and Narendra Pal Singh Chauhan, 177–218. Woodhead Publishing Series in Biomaterials. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823797-7.00006-X>.
24. Sahini, Mtabazi G. 2023. Polylactic acid (PLA)-based materials: a review on the synthesis and drug delivery applications. *Emergent Materials* 6: 1461–1479. <https://doi.org/10.1007/s42247-023-00551-7>.
25. Li, Ge, Menghui Zhao, Fei Xu, Bo Yang, Xiangyu Li, Xiangxue Meng, Lesheng Teng, Fengying Sun, and Youxin Li. 2020. Synthesis and Biological Application of Polylactic Acid. *Molecules* 25. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 5023. <https://doi.org/10.3390/molecules25215023>.
26. Vlachopoulos, Antonios, Georgia Karlioti, Evangelia Balla, Vasileios Daniilidis, Theocharis Kalamas, Myrika Stefanidou, Nikolaos D. Bikiaris, et al. 2022. Poly(Lactic Acid)-Based Microparticles for Drug Delivery Applications: An Overview of Recent Advances. *Pharmaceutics* 14. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 359. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020359>.

27. Afsharzadeh, Maryam, Maryam Hashemi, Maryam Babaei, Khalil Abnous, and Mohammad Ramezani. 2020. PEG-PLA nanoparticles decorated with small-molecule PSMA ligand for targeted delivery of galbanic acid and docetaxel to prostate cancer cells. *Journal of Cellular Physiology* 235: 4618–4630. <https://doi.org/10.1002/jcp.29339>.
28. Stefani, Muriel, Jean Coudane, and Michel Vert. 2006. *In vitro* ageing and degradation of PEG–PLA diblock copolymer-based nanoparticles. *Polymer Degradation and Stability* 91: 2554–2559. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2006.05.009>.
29. Phan Quốc Thông. 2019. Nghiên cứu chế tạo, đặc trưng và khảo sát tiềm năng ứng dụng của hệ dẫn thuốc nano đa chức năng nền copolyme PLA-PEG có và không có hạt từ ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). In *Luận án Tiến sĩ, Học viện Khoa học và Công nghệ, VAST*.
30. Phan, Quoc Thong, Mai Huong Le, Thi Thu Huong Le, Thi Hong Ha Tran, Phuc Nguyen Xuan, and Phuong Thu Ha. 2016. Characteristics and cytotoxicity of folate-modified curcumin-loaded PLA-PEG micellar nano systems with various PLA:PEG ratios. *International Journal of Pharmaceutics* 507: 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.05.003>.
31. Gangapurwala, Gauri, Antje Vollrath, Alicia De San Luis, and Ulrich S. Schubert. 2020. PLA/PLGA-Based Drug Delivery Systems Produced with Supercritical  $\text{CO}_2$ —A Green Future for Particle Formulation? *Pharmaceutics* 12. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 1118. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111118>.
32. Jia, Yanhui, Mei Yuan, Huidong Yuan, Xinglu Huang, Xiang Sui, Xuemei Cui, Fangqiong Tang, et al. 2012. Co-encapsulation of magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles and doxorubicin into biodegradable PLGA nanocarriers for intratumoral drug delivery. *International Journal of Nanomedicine* 7. Dove Press: 1697–1708. <https://doi.org/10.2147/IJN.S28629>.
33. de Melo-Diogo, Duarte, Cleide Pais-Silva, Elisabete C Costa, Ricardo O Louro, and Ilídio J Correia. 2017. D- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate functionalized nanographene oxide for cancer therapy. *Nanomedicine* 12. Future Medicine: 443–456. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0384>.
34. Yang, Conglian, Tingting Wu, Yan Qi, and Zhiping Zhang. 2018. Recent Advances in the Application of Vitamin E TPGS for Drug Delivery. *Theranostics* 8: 464–485. <https://doi.org/10.7150/thno.22711>.
35. Vikas, Matte Kasi Viswanadh, Abhishesh Kumar Mehata, Vishal Sharma, Vishnu Priya, Neelima Varshney, Sanjeev Kumar Mahto, and Madaswamy S. Muthu. 2021. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Dual targeting and pharmacokinetic aspects for advanced lung cancer treatment. *Carbohydrate Polymers* 274: 118617. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118617>.
36. Mehata, Abhishesh Kumar, Aseem Setia, Vikas, Ankit Kumar Malik, Rym Hassani, Hamad Ghaleb Dailah, Hassan A. Alhazmi, Ahmed A. Albarraq, Syam Mohan, and Madaswamy S. Muthu. 2023. Vitamin E TPGS-Based Nanomedicine, Nanotheranostics, and Targeted Drug Delivery: Past, Present, and Future. *Pharmaceutics* 15. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 722. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030722>.
37. Viswanadh, Matte Kasi, Nishi Agrawal, Shaik Azad, Abhishek Jha, Suruchi Poddar, Sanjeev Kumar Mahto, and Madaswamy S. Muthu. 2021. Novel redox-sensitive thiolated TPGS based nanoparticles for EGFR targeted lung cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutics* 602: 120652. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120652>.

38. Li, Danni, Shaogang Liu, Jiahao Zhu, Liqun Shen, Qi ying Zhang, and Hua Zhu. 2021. Folic acid modified TPGS as a novel nano-micelle for delivery of nitidine chloride to improve apoptosis induction in Huh7 human hepatocellular carcinoma. *BMC Pharmacology and Toxicology* 22: 1. <https://doi.org/10.1186/s40360-020-00461-y>.
39. Scott, Alison J., and Alexander Penlidis. 2017. Copolymerization. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13901-0>.
40. Wang, Jixue, Shengxian Li, Yuping Han, Jingjing Guan, Shirley Chung, Chunxi Wang, and Di Li. 2018. Poly(Ethylene Glycol)–Polylactide Micelles for Cancer Therapy. *Frontiers in Pharmacology* 9. Frontiers. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00202>.
41. Zhang, Zhiping, and Si-Shen Feng. 2006. Nanoparticles of poly(lactide)/vitamin E TPGS copolymer for cancer chemotherapy: Synthesis, formulation, characterization and in vitro drug release. *Biomaterials* 27: 262–270. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.104>.
42. Do, Hai Doan, Hao Le Thi, Thu Huong Le Thi, Hoai Nam Nguyen, Van Khanh Bui, My Nhung Hoang Thi, and Phuong Thu Ha. 2018. Folate-modified, curcumin and paclitaxel co-loaded PLA-TPGS nanoparticles: preparation, optimization and in vitro cytotoxicity assays. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 9. IOP Publishing: 025004. <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aabb5c>.
43. Wang, Feihu, Michael Porter, Alexandros Konstantopoulos, Pengcheng Zhang, and Honggang Cui. 2017. Preclinical development of drug delivery systems for paclitaxel-based cancer chemotherapy. *Journal of Controlled Release* 267. The 28th KAST International Symposium on Young Scientists in Drug Delivery - Redirecting the Research Field. December 7-8, 2016, Seoul, Korea: 100–118. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.026>.
44. Gan, Chee Wee, Shu Chien, and Si-Shen Feng. 2010. Nanomedicine: enhancement of chemotherapeutic efficacy of docetaxel by using a biodegradable nanoparticle formulation. *Current Pharmaceutical Design* 16: 2308–2320. <https://doi.org/10.2174/138161210791920487>.
45. Zhu, Dunwan, Wei Tao, Hongling Zhang, Gan Liu, Teng Wang, Linhua Zhang, Xiaowei Zeng, and Lin Mei. 2016. Docetaxel (DTX)-loaded polydopamine-modified TPGS-PLA nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer. *Acta Biomaterialia* 30: 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.11.031>.
46. Guo, Yuanyuan, Boning Niu, Qingle Song, Yongdan Zhao, Yuling Bao, Songwei Tan, Luqin Si, and Zhiping Zhang. 2016. RGD-decorated redox-responsive D- $\alpha$ -tocopherol polyethylene glycol succinate–poly(lactide) nanoparticles for targeted drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B* 4. The Royal Society of Chemistry: 2338–2350. <https://doi.org/10.1039/C6TB00055J>.
47. Mi, Yu, Xiaoli Liu, Jing Zhao, Jun Ding, and Si-Shen Feng. 2012. Multimodality treatment of cancer with herceptin conjugated, thermomagnetic iron oxides and docetaxel loaded nanoparticles of biodegradable polymers. *Biomaterials* 33: 7519–7529. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.06.100>.
48. Wang, Teng, Dunwan Zhu, Gan Liu, Wei Tao, Wei Cao, Linhua Zhang, Lijun Wang, et al. 2015. DTX-loaded star-shaped TAPP-PLA-b-TPGS nanoparticles for cancer chemical and photodynamic combination therapy. *RSC Advances* 5. The Royal Society of Chemistry: 50617–50627. <https://doi.org/10.1039/C5RA09042C>.

49. Rn), Open Resources for Nursing (Open, Kimberly Ernstmeier, and Elizabeth Christman. 2023. Chapter 1 Pharmacokinetics & Pharmacodynamics. In *Nursing Pharmacology [Internet]. 2nd edition*. Chippewa Valley Technical College.
50. Tan, Guang-Rong, Si-Shen Feng, and David T. Leong. 2014. The reduction of anti-cancer drug antagonism by the spatial protection of drugs with PLA–TPGS nanoparticles. *Biomaterials* 35: 3044–3051. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.033>.
51. Robert W. Brown, Yu-Chung N. Cheng, and E. Mark Haacke. 2014. Magnetic Resonance Imaging. In *Magnetic Resonance Imaging*, 1–17. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118633953.ch1>.
52. Chan, Rachel W., Justin Y. C. Lau, Wilfred W. Lam, and Angus Z. Lau. 2019. Magnetic Resonance Imaging. In *Encyclopedia of Biomedical Engineering*, ed. Roger Narayan, 574–587. Oxford: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.99945-8>.
53. Switlyk, Marta D., Andreas Hopland, Edmund Reitan, Shivanthe Sivanesan, Bjørn Brennhovd, Ulrika Axcrona, and Knut H. Hole. 2023. Multiparametric Magnetic Resonance Imaging of Penile Cancer: A Pictorial Review. *Cancers* 15. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 5324. <https://doi.org/10.3390/cancers15225324>.
54. Caspani, Sofia, Ricardo Magalhães, João Pedro Araújo, and Célia Tavares Sousa. 2020. Magnetic Nanomaterials as Contrast Agents for MRI. *Materials* 13. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 2586. <https://doi.org/10.3390/ma13112586>.
55. Mohapatra, Jeotikanta, Saumya Nigam, Jabin George, Abril Chavez Arellano, Ping Wang, and J. Ping Liu. 2023. Principles and applications of magnetic nanomaterials in magnetically guided bioimaging. *Materials Today Physics* 32: 101003. <https://doi.org/10.1016/j.mtphys.2023.101003>.
56. Doan, Bich-Thuy, Sandra Meme, and Jean-Claude Beloeil. 2013. General Principles of MRI. In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, 1–23. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118503652.ch1>.
57. Xiao, Yu-Dong, Ramchandra Paudel, Jun Liu, Cong Ma, Zi-Shu Zhang, and Shun-Ke Zhou. 2016. MRI contrast agents: Classification and application. *International journal of molecular medicine* 38. Spandidos Publications: 1319–1326.
58. Tromsdorf, Ulrich I., Nadja C. Bigall, Michael G. Kaul, Oliver T. Bruns, Marija S. Nikolic, Birgit Mollwitz, Ralph A. Sperling, Rudolph Reimer, Heinz Hohenberg, and Wolfgang J. Parak. 2007. Size and surface effects on the MRI relaxivity of manganese ferrite nanoparticle contrast agents. *Nano letters* 7. ACS Publications: 2422–2427.
59. Li, Hongcai, Shuanqiang Yang, David Hui, and Ruoyu Hong. 2020. Progress in magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanomaterials in magnetic resonance imaging. *Nanotechnology Reviews* 9. De Gruyter: 1265–1283. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2020-0095>.
60. Gu, Haojie, Shengxiang Fu, Zhongyuan Cai, and Hua Ai. 2024. Polymer/iron oxide nanocomposites as magnetic resonance imaging contrast agents: Polymer modulation and probe property control. *Journal of Polymer Science* n/a. <https://doi.org/10.1002/pol.20230820>.
61. Lê Thế Tâm. 2019. Nghiên cứu chế tạo chất lỏng từ trên nền oxit sắt siêu thuận từ định hướng ứng dụng chụp ảnh cộng hưởng từ MRI. In *. Luận án Tiến sĩ, Học viện Khoa học và Công nghệ, VAST*.
62. Rinck, Peter, ed. 2001. *Magnetic Resonance in Medicine*. 4th edition. Berlin: Wiley-Blackwell.

63. Gómez-Vallejo, Vanessa, María Puigivila, Sandra Plaza-García, Boguslaw Szczupak, Rafael Piñol, José L. Murillo, Victor Sorribas, et al. 2018. PEG-copolymer-coated iron oxide nanoparticles that avoid the reticuloendothelial system and act as kidney MRI contrast agents. *Nanoscale* 10. The Royal Society of Chemistry: 14153–14164. <https://doi.org/10.1039/C8NR03084G>.
64. Nazeer, Shaiju S., Ariya Saraswathy, Nirmala Nimi, Hema Santhakumar, Parvathy Radhakrishnapillai Suma, Sachin J. Shenoy, and Ramapurath S. Jayasree. 2023. Near infrared-emitting multimodal nanosystem for in vitro magnetic hyperthermia of hepatocellular carcinoma and dual imaging of in vivo liver fibrosis. *Scientific Reports* 13. Nature Publishing Group: 12947. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40143-3>.
65. Ha, Phuong Thu, Thi Thu Huong Le, Thi Dieu Thuy Ung, Hai Doan Do, Bich Thuy Doan, Thi Thu Trang Mai, Hong Nam Pham, Thi My Nhung Hoang, Ke Son Phan, and Thuc Quang Bui. 2020. Properties and bioeffects of magneto–near infrared nanoparticles on cancer diagnosis and treatment. *New Journal of Chemistry* 44. The Royal Society of Chemistry: 17277–17288. <https://doi.org/10.1039/D0NJ02848G>.
66. Sitthichai, Sudarat, Chalermchai Pilapong, Titipun Thongtem, and Somchai Thongtem. 2015. CMC-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as new MRI probes for hepatocellular carcinoma. *Applied Surface Science* 356: 972–977. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.08.140>.
67. Markota, Andrej, Žiga Kalamar, Jure Fluher, and Sergej Pirkmajer. 2023. Therapeutic hyperthermia for the treatment of infection—a narrative review. *Frontiers in Physiology* 14. Frontiers. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1215686>.
68. Włodarczyk, Agnieszka, Szymon Gorgoń, Adrian Radoń, and Karolina Bajdak-Rusinek. 2022. Magnetite Nanoparticles in Magnetic Hyperthermia and Cancer Therapies: Challenges and Perspectives. *Nanomaterials* 12. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 1807. <https://doi.org/10.3390/nano12111807>.
69. Engelmann, Ulrich M., Julian Seifert, Benedikt Mues, Stefan Roitsch, Christine Ménager, Annette M. Schmidt, and Ioana Slabu. 2019. Heating efficiency of magnetic nanoparticles decreases with gradual immobilization in hydrogels. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 471. Elsevier: 486–494.
70. Belyanina, Irina, Olga Kolovskaya, Sergey Zamay, Ana Gargaun, Tatiana Zamay, and Anna Kichkailo. 2017. Targeted Magnetic Nanotheranostics of Cancer. *Molecules* 22. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 975. <https://doi.org/10.3390/molecules22060975>.
71. Hergt, Rudolf, and Silvio Dutz. 2007. Magnetic particle hyperthermia—biophysical limitations of a visionary tumour therapy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311. Proceedings of the Sixth International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers: 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.10.1156>.
72. Kerroum, Mohamed Alae Ait, Cristian Iacovita, Walid Baaziz, Dris Ihiawakrim, Guillaume Rogez, Mohammed Benaissa, Constantin Mihai Lucaciu, and Ovidiu Ersen. 2020. Quantitative Analysis of the Specific Absorption Rate Dependence on the Magnetic Field Strength in Zn<sub>x</sub>Fe<sub>3-x</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* 21. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 7775. <https://doi.org/10.3390/ijms21207775>.
73. Ramirez, D., J. Oliva, T. Cordova-Fraga, Gustavo Basurto-Islas, J. J. Benal-Alvarado, A. I. Mtz-Enriquez, M. Quintana, and C. Gomez-Solis. 2022. High Heating Efficiency of Magnetite Nanoparticles Synthesized with Citric Acid: Application for Hyperthermia Treatment. *Journal of Electronic Materials* 51: 4425–4436. <https://doi.org/10.1007/s11664-022-09678-5>.



74. Ribeiro, Tiago P., J. Agostinho Moreira, Fernando J. Monteiro, and Marta S. Laranjeira. 2022. Nanomaterials in cancer: Reviewing the combination of hyperthermia and triggered chemotherapy. *Journal of Controlled Release* 347: 89–103. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.04.045>.
75. Vilas-Boas, Vânia, Félix Carvalho, and Begoña Espiña. 2020. Magnetic Hyperthermia for Cancer Treatment: Main Parameters Affecting the Outcome of In Vitro and In Vivo Studies. *Molecules* 25. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 2874. <https://doi.org/10.3390/molecules25122874>.
76. Soleymani, Meysam, Solmaz Khalighfard, Saeed Khodayari, Hamid Khodayari, Mohammad Reza Kalhori, Mahmoud Reza Hadjighassem, Zhila Shaterabadi, and Ali Mohammad Alizadeh. 2020. Effects of multiple injections on the efficacy and cytotoxicity of folate-targeted magnetite nanoparticles as theranostic agents for MRI detection and magnetic hyperthermia therapy of tumor cells. *Scientific Reports* 10. Nature Publishing Group: 1695. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58605-3>.
77. Lê Thị Thu Hương. 2019. Nghiên cứu chế tạo và đánh giá hiệu quả tác động của hệ nano đa chức năng (polymer-drug-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-folate) lên tế bào ung thư. In . *Luận án Tiến sĩ, Học viện Khoa học và Công nghệ, VAST*.
78. Richardson, Paul G., Constantine S. Mitsiades, Jacob P. Laubach, Sagar Lonial, Asher A. Chanan-Khan, and Kenneth C. Anderson. 2011. Inhibition of heat shock protein 90 (HSP90) as a therapeutic strategy for the treatment of myeloma and other cancers. *British journal of haematology* 152. Wiley Online Library: 367–379.
79. Yi, Ga Yeong, Min Ju Kim, Hyo In Kim, Jinbong Park, and Seung Ho Baek. 2022. Hyperthermia Treatment as a Promising Anti-Cancer Strategy: Therapeutic Targets, Perspective Mechanisms and Synergistic Combinations in Experimental Approaches. *Antioxidants* 11. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 625. <https://doi.org/10.3390/antiox11040625>.
80. Shi, Fan, Dan Luo, Xuexiao Zhou, Qiaozhen Sun, Pei Shen, and Shengzhi Wang. 2021. Combined effects of hyperthermia and chemotherapy on the regulate autophagy of oral squamous cell carcinoma cells under a hypoxic microenvironment. *Cell Death Discovery* 7. Nature Publishing Group: 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00538-5>.
81. Jose, Jobin, Rajesh Kumar, Seetha Harilal, Githa Elizabeth Mathew, Della Grace Thomas Parambi, Ankitha Prabhu, Md. Sahab Uddin, Lotfi Aleya, Hoon Kim, and Bijo Mathew. 2020. Magnetic nanoparticles for hyperthermia in cancer treatment: an emerging tool. *Environmental Science and Pollution Research* 27: 19214–19225. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07231-2>.
82. Sanhaji, Mourad, Julia Göring, Pierre Couleaud, Antonio Aires, Aitziber L. Cortajarena, José Courty, Adriele Prina-Mello, et al. 2019. The phenotype of target pancreatic cancer cells influences cell death by magnetic hyperthermia with nanoparticles carrying gemcitabine and the pseudo-peptide NucAnt. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 20: 101983. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.12.019>.
83. Ha, Phuong Thu, Thi Thu Huong Le, Thuc Quang Bui, Hong Nam Pham, Anh Son Ho, and Linh Toan Nguyen. 2019. Doxorubicin release by magnetic inductive heating and in vivo hyperthermia-chemotherapy combined cancer treatment of multifunctional magnetic nanoparticles. *New Journal of Chemistry* 43. The Royal Society of Chemistry: 5404–5413. <https://doi.org/10.1039/C9NJ00111E>.
84. Beola, Lilianne, Nerea Iturrioz-Rodríguez, Carlotta Pucci, Rosalia Bertorelli, and Gianni Ciofani. 2023. Drug-Loaded Lipid Magnetic Nanoparticles for Combined Local Hyperthermia and Chemotherapy against Glioblastoma Multiforme. *ACS*

- Nano* 17. American Chemical Society: 18441–18455. <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c06085>.
85. Babincová, Natália, Paul Sourivong, Peter Babinec, Christian Bergemann, Melânia Babincová, and Štefan Durdík. 2018. Applications of magnetoliposomes with encapsulated doxorubicin for integrated chemotherapy and hyperthermia of rat C6 glioma. *Zeitschrift für Naturforschung C* 73. De Gruyter: 265–271. <https://doi.org/10.1515/znc-2017-0110>.
  86. Pazouki, Negin, Shiva Irani, Nafiseh Olov, Seyed Mohammad Atyabi, and Shadab Bagheri-Khoulenjani. 2022. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan containing curcumin in combination with hyperthermia induced apoptosis in breast cancer cells. *Progress in Biomaterials* 11: 43–54. <https://doi.org/10.1007/s40204-021-00178-z>.
  87. Minaei, Soraya Emamgholizadeh, Samideh Khoei, Sepideh Khoei, Fatemeh Vafashoar, and Vahid Pirhajati Mahabadi. 2019. In vitro anti-cancer efficacy of multi-functionalized magnetite nanoparticles combining alternating magnetic hyperthermia in glioblastoma cancer cells. *Materials Science and Engineering: C* 101: 575–587. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.007>.
  88. Yoon, Seokchan, Seo Young Cheon, Sangjun Park, Donghyun Lee, Yeeun Lee, Seokyoung Han, Moonseok Kim, and Heebeom Koo. 2022. Recent advances in optical imaging through deep tissue: imaging probes and techniques. *Biomaterials Research* 26: 57. <https://doi.org/10.1186/s40824-022-00303-4>.
  89. Lee, Jongwon, Incheol Jeong, Kapyol Kim, and Jinsoo Cho. 2022. Design and Implementation of Embedded-Based Vein Image Processing System with Enhanced Denoising Capabilities. *Sensors* 22. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 8559. <https://doi.org/10.3390/s22218559>.
  90. Chang, Zong, Feng Liu, Liang Wang, Mengying Deng, Chunhua Zhou, Qinchao Sun, and Jun Chu. 2019. Near-infrared dyes, nanomaterials and proteins. *Chinese Chemical Letters* 30. SI: Fluorescence Basics and Technology: 1856–1882. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2019.08.034>.
  91. Bilici, Kubra, Sultan Cetin, Eda Celikbas, Havva Yagci Acar, and Safacan Kolemen. 2021. Recent Advances in Cyanine-Based Phototherapy Agents. *Frontiers in Chemistry* 9. Frontiers. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.707876>.
  92. Gunduz, Hande, Kubra Bilici, Sultan Cetin, Abdullah Muti, Alphan Sennaroglu, Havva Yagci Acar, and Safacan Kolemen. 2021. Dual laser activatable brominated hemicyanine as a highly efficient and photostable multimodal phototherapy agent. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 217: 112171. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112171>.
  93. Verbeek, Floris P. R., Quirijn R. J. G. Tummers, Daphne D. D. Rietbergen, Alexander A. W. Peters, Boudewijn E. Schaafsma, Cornelis J. H. van de Velde, John V. Frangioni, Fijis W. B. van Leeuwen, Katja N. Gaarenstroom, and Alexander L. Vahrmeijer. 2015. Sentinel Lymph Node Biopsy in Vulvar Cancer Using Combined Radioactive and Fluorescence Guidance. *International Journal of Gynecologic Cancer* 25. BMJ Specialist Journals. <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000419>.
  94. Carr, Jessica A., Daniel Franke, Justin R. Caram, Collin F. Perkinson, Mari Saif, Vasileios Askoxylakis, Meenal Datta, et al. 2018. Shortwave infrared fluorescence imaging with the clinically approved near-infrared dye indocyanine green. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115. Proceedings of the National Academy of Sciences: 4465–4470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718917115>.
  95. García de Jalón, Elvira, Katrin Kleinmanns, Vibeke Fosse, Ben Davidson, Line Bjørge, Bengt Erik Haug, and Emmet McCormack. 2023. Comparison of Five Near-

- Infrared Fluorescent Folate Conjugates in an Ovarian Cancer Model. *Molecular Imaging and Biology* 25: 144–155. <https://doi.org/10.1007/s11307-021-01685-y>.
96. Mannucci, Silvia, Federico Boschi, Barbara Cisterna, Elisabetta Esposito, Rita Cortesi, Claudio Nastruzzi, Enrica Cappellozza, et al. 2020. A Correlative Imaging Study of in vivo and ex vivo Biodistribution of Solid Lipid Nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* 15: 1745–1758. <https://doi.org/10.2147/IJN.S236968>.
  97. Mai, Liyi, Anna Yao, Jing Li, Qiong Wei, Ming Yuchi, Xiaoling He, Mingyue Ding, and Qibing Zhou. 2013. Cyanine 5.5 Conjugated Nanobubbles as a Tumor Selective Contrast Agent for Dual Ultrasound-Fluorescence Imaging in a Mouse Model. *PLOS ONE* 8. Public Library of Science: e61224. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061224>.
  98. Choi, Ki Young, Eun Jung Jeon, Hong Yeol Yoon, Beom Suk Lee, Jin Hee Na, Kyung Hyun Min, Sang Yoon Kim, et al. 2012. Theranostic nanoparticles based on PEGylated hyaluronic acid for the diagnosis, therapy and monitoring of colon cancer. *Biomaterials* 33: 6186–6193. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.029>.
  99. Shuai, Qi, Guangkuo Zhao, Xiaomin Zhang, Bo Yu, Robert J. Lee, and Wei-Ke Su. 2019. Selection of fluorescent dye for tracking biodistribution of paclitaxel in live imaging. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 181: 872–878. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.035>.
  100. On, Kyeong Cheol, Jiyun Rho, Hong Yeol Yoon, Hyeyoun Chang, Ji Young Yhee, Jun Sik Yoon, Seo Young Jeong, Hyun Koo Kim, and Kwangmeyung Kim. 2020. Tumor-Targeting Glycol Chitosan Nanoparticles for Image-Guided Surgery of Rabbit Orthotopic VX2 Lung Cancer. *Pharmaceutics* 12. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 621. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070621>.
  101. Kim, Chang Seong, Ansuja Pulickal Mathew, Saji Uthaman, Myeong Ju Moon, Eun Hui Bae, Soo Wan Kim, and In-Kyu Park. 2020. Glycol chitosan-based renal docking biopolymeric nanomicelles for site-specific delivery of the immunosuppressant. *Carbohydrate Polymers* 241: 116255. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116255>.
  102. Marshall, Milton V., Daniel Draney, Eva M. Sevick-Muraca, and D. Michael Olive. 2010. Single-Dose Intravenous Toxicity Study of IRDye 800CW in Sprague-Dawley Rats. *Molecular Imaging and Biology* 12: 583–594. <https://doi.org/10.1007/s11307-010-0317-x>.
  103. Xiao, Junhui, Siqi Qiu, Qiufeng Ma, Silan Bai, Xinrong Guo, and Lishi Wang. 2023. Near-infrared dye IRDye800CW-NHS coupled to Trastuzumab for near-infrared II fluorescence imaging in tumor xenograft models of HER-2-positive breast cancer. *Journal of Materials Chemistry B* 11. The Royal Society of Chemistry: 10738–10746. <https://doi.org/10.1039/D3TB01486J>.
  104. Grudén, Stefan, Charlott Brunmark, Bo Holmqvist, Erwin D. Brenndörfer, Martin Johansson, Jian Liu, Ying Zhao, Niklas Axén, and Moustapha Hassan. 2021. Biodistribution of fluorescence-labelled EGF protein from slow release NanoZolid depots in mouse. *International Journal of Pharmaceutics* 601: 120588. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120588>.
  105. Thu Ha, Phuong, Thi Minh Nguyet Tran, Hong Duong Pham, Quang Huan Nguyen, and Xuan Phuc Nguyen. 2010. The synthesis of poly(lactide)-vitamin E TPGS (PLA-TPGS) copolymer and its utilization to formulate a curcumin nanocarrier. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 1. IOP Publishing: 015012. <https://doi.org/10.1088/2043-6254/1/1/015012>.

106. Trần Đại Lâm. 2017. *Các phương pháp phân tích hóa lý vật liệu*. Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ.
107. Dash, Suvakanta, Padala Murthy, Lilakanta Nath, and Prasanta Chowdhury. 2010. Kinetic Modeling on Drug Release from Controlled Drug Delivery Systems. *Acta poloniae pharmaceutica* 67: 217–23.
108. Yang, Xin-She. 2019. 4 - Data fitting and regression. In *Introduction to Algorithms for Data Mining and Machine Learning*, ed. Xin-She Yang, 67–90. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817216-2.00011-9>.
109. Yang, Lingchen, Di Tu, Zhiyong Zhao, and Jun Cui. 2017. Cytotoxicity and apoptosis induced by mixed mycotoxins (T-2 and HT-2 toxin) on primary hepatocytes of broilers in vitro. *Toxicon* 129: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.01.001>.
110. Mosmann, Tim. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
111. Vorobjev, Ivan A., and Natasha S. Barteneva. 2017. Multi-parametric imaging of cell heterogeneity in apoptosis analysis. *Flow Cytometry* 112: 105–123. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.07.003>.
112. Etrych, Tomáš, Henrike Lucas, Olga Janoušková, Petr Chytil, Thomas Mueller, and Karsten Mäder. 2016. Fluorescence optical imaging in anticancer drug delivery. *Journal of Controlled Release* 226: 168–181. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.022>.
113. Yu, Jiaming, Shengchao Xu, Biao Liu, Hailan Wang, Fengmin Qiao, Xiulian Ren, and Qifeng Wei. 2023. PLA bioplastic production: From monomer to the polymer. *European Polymer Journal* 193: 112076. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112076>.
114. Kharisov, Boris I., H. V. Rasika Dias, Oxana V. Kharissova, Alejandro Vázquez, Yolanda Peña, and Idalia Gómez. 2014. Solubilization, dispersion and stabilization of magnetic nanoparticles in water and non-aqueous solvents: recent trends. *RSC Advances* 4. The Royal Society of Chemistry: 45354–45381. <https://doi.org/10.1039/C4RA06902A>.
115. Lorenzetti, Martina, Ekaterina Gongadze, Mukta Kulkarni, Ita Junkar, and Aleš Igljč. 2016. Electrokinetic Properties of TiO<sub>2</sub> Nanotubular Surfaces. *Nanoscale research letters* 11. Springer US: 378–378. 27562014. PubMed. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1594-3>.
116. Gaumet, Marie, Angelica Vargas, Robert Gurny, and Florence Delie. 2008. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 69: 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.08.001>.
117. Kobayashi, Hisataka, Rira Watanabe, and Peter L Choyke. 2013. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? *Theranostics* 4. Ivyspring International Publisher: 81–89. 24396516. PubMed. <https://doi.org/10.7150/thno.7193>.
118. Liang, Chenghua, Nan Li, Zikai Cai, Rongpu Liang, Xiao-Ming Zheng, Li Deng, Longbao Feng, Rui Guo, and Bo Wei. 2019. Co-encapsulation of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and doxorubicin into biocompatible PLGA-PEG nanocarriers for early detection and treatment of tumours. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 47: 4211–4221. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1687500>.
119. Yang, Conglian, Tingting Wu, Yan Qi, and Zhiping Zhang. 2018. Recent Advances in the Application of Vitamin E TPGS for Drug Delivery. *Theranostics* 8. Ivyspring

- International Publisher: 464–485. 29290821. PubMed. <https://doi.org/10.7150/thno.22711>.
120. Pike, John K., Tai Ho, and Kenneth J. Wynne. 1996. Water-Induced Surface Rearrangements of Poly(dimethylsiloxane–urea–urethane) Segmented Block Copolymers. *Chemistry of Materials* 8. American Chemical Society: 856–860. <https://doi.org/10.1021/cm9504596>.
  121. Zhu, Nan, Haining Ji, Peng Yu, Jiaqi Niu, M U Farooq, M Waseem Akram, I O Udego, Handong Li, and Xiaobin Niu. 2018. Surface Modification of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 8. MDPI: 810. 30304823. PubMed. <https://doi.org/10.3390/nano8100810>.
  122. Baqiya, Malik, Ahmad Taufiq, Sunaryono Sunaryono, Khuroti Ayun, Mochamad Zainuri, Suminar Pratapa, Triwikantoro Triwikantoro, and D. Darminto. 2017. Spinel-Structured Nanoparticles for Magnetic and Mechanical Applications. In . <https://doi.org/10.5772/66293>.
  123. Alexander, Leroy, and Harold P. Klug. 1950. Determination of Crystallite Size with the X-Ray Spectrometer. *Journal of Applied Physics* 21: 137–142. <https://doi.org/10.1063/1.1699612>.
  124. Khalkhali, Maryam, Kobra Rostamizadeh, Somayeh Sadighian, Farhad Khoeini, Mehran Naghibi, and Mehrdad Hamidi. 2015. The impact of polymer coatings on magnetite nanoparticles performance as MRI contrast agents: a comparative study. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences* 23. BioMed Central: 45–45. 26381740. PubMed. <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0124-7>.
  125. Songsurang, Kultida, Nalena Praphairaksit, Krisana Siraleartmukul, and Nongnuj Muangsin. 2011. Electrospray fabrication of doxorubicin-chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery of doxorubicin. *Archives of Pharmacal Research* 34: 583. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0408-5>.
  126. Thong, Phan Quoc, Le Thi Thu Huong, Nguyen Dac Tu, Hoang Thi My Nhung, Lam Khanh, Do Hung Manh, Pham Hong Nam, et al. 2022. Multifunctional Nanocarriers of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PLA-PEG/Curcumin for MRI, Magnetic Hyperthermia and Drug Delivery. *Nanomedicine* 17. Taylor & Francis: 1677–1693. <https://doi.org/10.2217/nnm-2022-0070>.
  127. Antarnusa, Ganesha, and Edi Suharyadi. 2020. A synthesis of polyethylene glycol (PEG)-coated magnetite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and their characteristics for enhancement of biosensor. *Materials Research Express* 7. IOP Publishing: 056103. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab8bef>.
  128. Kolhatkar, Arati G, Andrew C Jamison, Dmitri Litvinov, Richard C Willson, and T Randall Lee. 2013. Tuning the magnetic properties of nanoparticles. *International journal of molecular sciences* 14. MDPI: 15977–16009. 23912237. PubMed. <https://doi.org/10.3390/ijms140815977>.
  129. Liu, Xiaoli, Hai Ming Fan, Jiabao Yi, Yang Yang, Eugene Choo, Jun Xue, Dai Fan, and Jun Ding. 2012. Optimization of surface coating on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for high performance magnetic hyperthermia agents. *J. Mater. Chem.* 22: 8235–8244. <https://doi.org/10.1039/C2JM30472D>.
  130. Narayanaswamy, Venkatesha, Imaddin A. Al-Omari, Aleksandr S. Kamzin, Bashar Issa, Huseyin O. Tekin, Hafsa Khoureshid, Hemant Kumar, Ambresh Mallya, Sangaraju Sambasivam, and Ihab M. Obaidat. 2021. Specific Absorption Rate Dependency on the Co<sup>2+</sup> Distribution and Magnetic Properties in CoxMn1-xFe2O4 Nanoparticles. *Nanomaterials* 11. <https://doi.org/10.3390/nano11051231>.
  131. Shaterabadi, Zhila, Gholamreza Nabiyouni, and Meysam Soleymani. 2018. Optimal size for heating efficiency of superparamagnetic dextran-coated magnetite

- nanoparticles for application in magnetic fluid hyperthermia. *Physica C: Superconductivity and its Applications* 549: 84–87. <https://doi.org/10.1016/j.physc.2018.02.060>.
132. Reyes-Ortega, Felisa, Blanca Luna Checa Fernández, Angel V Delgado, and Guillermo R Iglesias. 2019. Hyperthermia-Triggered Doxorubicin Release from Polymer-Coated Magnetic Nanorods. *Pharmaceutics* 11. MDPI: 517. 31597258. PubMed. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11100517>.
  133. Behrouzkhia, Zhaleh, Zahra Joveini, Behnaz Keshavarzi, Nazila Eyvazzadeh, and Reza Zohdi Aghdam. 2016. Hyperthermia: How Can It Be Used? *Oman medical journal* 31. OMJ: 89–97. 27168918. PubMed. <https://doi.org/10.5001/omj.2016.19>.
  134. Phuong Thu, Ha, Huong Le, Thuc Bui, Nam Pham, Ho Son, and Nguyen Toan. 2019. Doxorubicin release by magnetic inductive heating and in vivo hyperthermia-chemotherapy combined cancer treatment of multifunctional magnetic nanoparticles. *New Journal of Chemistry* 43. <https://doi.org/10.1039/C9NJ00111E>.
  135. Jang, Jung-tak, Jooyoung Lee, Jiyun Seon, Eric Ju, Minkyu Kim, Young Il Kim, Min Kim, et al. 2018. Giant Magnetic Heat Induction of Magnesium-Doped  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Superparamagnetic Nanoparticles for Completely Killing Tumors. *Advanced Materials* 30: 1704362. <https://doi.org/10.1002/adma.201704362>.
  136. Alves, Catarina, Aniket Magarkar, Miguel Horta, Jose Lima, Alex Bunker, Cláudia Nunes, and Salette Reis. 2017. Influence of doxorubicin on model cell membrane properties: Insights from in vitro and in silico studies. *Scientific Reports* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06445-z>.
  137. Banerjee, Dishary, and Susmita Bose. 2019. Effects of polymer chemistry, concentration, and pH on doxorubicin release kinetics from hydroxyapatite-PCL-PLGA composite. *Journal of Materials Research*: 1–12. <https://doi.org/10.1557/jmr.2019.120>.
  138. Nelemans, Levi Collin, and Leonid Gurevich. 2020. Drug Delivery with Polymeric Nanocarriers-Cellular Uptake Mechanisms. *Materials (Basel, Switzerland)* 13. MDPI: 366. 31941006. PubMed. <https://doi.org/10.3390/ma13020366>.
  139. Li, Lin, Lu Tian, Yongli Wang, Wenjing Zhao, Fangqin Cheng, Yingqi Li, and Binsheng Yang. 2016. Smart pH-responsive and high doxorubicin loading nanodiamond for in vivo selective targeting, imaging, and enhancement of anticancer therapy. *Journal of Materials Chemistry B* 4. The Royal Society of Chemistry: 5046–5058. <https://doi.org/10.1039/C6TB00266H>.
  140. Bruschi, Marcos Luciano, ed. 2015. 5 - Mathematical models of drug release. In *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, 63–86. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>.
  141. Zuo, Jieyu, Yuan Gao, Nadia Bou-Chakra, and Raimar Löbenberg. 2014. Evaluation of the DDSolver software applications. *BioMed research international* 2014. Hindawi Publishing Corporation: 204925–204925. 24877067. PubMed. <https://doi.org/10.1155/2014/204925>.
  142. Wise, Donald L. 2000. *Handbook of pharmaceutical controlled release technology*. CRC Press.
  143. Fu, Yao, and Weiyuan John Kao. 2010. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. *Expert opinion on drug delivery* 7: 429–444. 20331353. PubMed. <https://doi.org/10.1517/17425241003602259>.
  144. Hervault, Aziliz, Alexander E. Dunn, May Lim, Cyrille Boyer, Derrick Mott, Shinya Maenosono, and Nguyen T. K. Thanh. 2016. Doxorubicin loaded dual pH- and thermo-responsive magnetic nanocarrier for combined magnetic hyperthermia and

- targeted controlled drug delivery applications. *Nanoscale* 8. The Royal Society of Chemistry: 12152–12161. <https://doi.org/10.1039/C5NR07773G>.
145. Niu, Nifang, and Liewei Wang. 2015. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. *Pharmacogenomics* 16: 273–285. 25712190. PubMed. <https://doi.org/10.2217/pgs.14.170>.
  146. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. The Development and Causes of Cancer.
  147. Xiang, Zhichu, Gexuan Jiang, Xiaoliang Yang, Di Fan, Xiaohui Nan, Dan Li, Zhiyuan Hu, and Qiaojun Fang. 2019. Peptosome Coadministration Improves Nanoparticle Delivery to Tumors through NRP1-Mediated Co-Endocytosis. *Biomolecules* 9. MDPI: 172. 31060320. PubMed. <https://doi.org/10.3390/biom9050172>.
  148. Tomankova, Katerina, Katerina Polakova, Klara Pizova, Svatopluk Binder, Marketa Havrdova, Mary Kolarova, Eva Kriegova, et al. 2015. In vitro cytotoxicity analysis of doxorubicin-loaded/superparamagnetic iron oxide colloidal nanoassemblies on MCF7 and NIH3T3 cell lines. *International journal of nanomedicine* 10. Dove Medical Press: 949–961. 25673990. PubMed. <https://doi.org/10.2147/IJN.S72590>.
  149. Yang, Hee-Man, Byung Chang Oh, Jong Hun Kim, Taebin Ahn, Ho-Seong Nam, Chan Woo Park, and Jong-Duk Kim. 2011. Multifunctional poly(aspartic acid) nanoparticles containing iron oxide nanocrystals and doxorubicin for simultaneous cancer diagnosis and therapy. *18th International Symposium on Surfactants in Solution (SIS)* 391: 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.04.032>.
  150. Khin, yin win, and Sizhe Feng. 2005. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 26: 2713–22. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.050>.
  151. Smith, Samuel A., Laura I. Selby, Angus P. R. Johnston, and Georgina K. Such. 2019. The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. *Bioconjugate Chemistry* 30. American Chemical Society: 263–272. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00732>.
  152. Mahmoudi, Morteza, Abdolreza Simchi, and Mohammad Imani. 2009. Cytotoxicity of Uncoated and Polyvinyl Alcohol Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C* 113. American Chemical Society: 9573–9580. <https://doi.org/10.1021/jp9001516>.
  153. Kuznetsov, Andrey V., Raimund Margreiter, Albert Amberger, Valdur Saks, and Michael Grimm. 2011. Changes in mitochondrial redox state, membrane potential and calcium precede mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813: 1144–1152. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.03.002>.
  154. Yu, Jiemiao, Liangrong Yang, Xiangfeng Liang, Tingting Dong, and Huizhou Liu. 2015. Bare magnetic nanoparticles as fluorescence quenchers for detection of thrombin. *Analyst* 140. The Royal Society of Chemistry: 4114–4120. <https://doi.org/10.1039/C5AN00519A>.
  155. Cursi, Lorenzo, Silvia Vercellino, Mura M. McCafferty, Emily Sheridan, Vanya Petseva, Laurent Adumeau, and Kenneth A. Dawson. 2021. Multifunctional superparamagnetic nanoparticles with a fluorescent silica shell for the in vitro study of bio-nano interactions at the subcellular scale. *Nanoscale* 13. Royal Society of Chemistry: 16324–16338. <https://doi.org/10.1039/D1NR04582B>.
  156. Jang, Eue Soon, Seung Yong Lee, Eui-Joon Cha, In-Cheol Sun, Ick Chan Kwon, Dukjoon Kim, Young Il Kim, Kwangmeyung Kim, and Cheol-Hee Ahn. 2014. Fluorescent Dye Labeled Iron Oxide/Silica Core/Shell Nanoparticle as a Multimodal

- Imaging Probe. *Pharmaceutical Research* 31: 3371–3378. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1426-z>.
157. Zhang, Wenyu, and Edward P. C. Lai. 2022. Chemical Functionalities of 3-aminopropyltriethoxy-silane for Surface Modification of Metal Oxide Nanoparticles. *Silicon* 14: 6535–6545. <https://doi.org/10.1007/s12633-021-01477-7>.
  158. Sypabekova, Marzhan, Aidan Hagemann, Donggee Rho, and Seunghyun Kim. 2023. Review: 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES) Deposition Methods on Oxide Surfaces in Solution and Vapor Phases for Biosensing Applications. *Biosensors* 13. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 36. <https://doi.org/10.3390/bios13010036>.
  159. Bañuls, María-José, Rosa Puchades, and Ángel Maquieira. 2013. Chemical surface modifications for the development of silicon-based label-free integrated optical (IO) biosensors: A review. *Analytica Chimica Acta* 777: 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.01.025>.
  160. Vashist, Sandeep Kumar, Edmond Lam, Sabahudin Hrapovic, Keith B. Male, and John H. T. Luong. 2014. Immobilization of Antibodies and Enzymes on 3-Aminopropyltriethoxysilane-Functionalized Bioanalytical Platforms for Biosensors and Diagnostics. *Chemical Reviews* 114. American Chemical Society: 11083–11130. <https://doi.org/10.1021/cr5000943>.
  161. Issa, Ahmed A., Marwa S. Elazazy, and Adriaan S. Luyt. 2018. Polymerization of 3-cyanopropyl (triethoxy) silane: A kinetic study using gas chromatography. *International Journal of Chemical Kinetics* 50: 846–855. <https://doi.org/10.1002/kin.21219>.
  162. Issa, Ahmed A., and Adriaan S. Luyt. 2019. Kinetics of Alkoxysilanes and Organoalkoxysilanes Polymerization: A Review. *Polymers* 11. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 537. <https://doi.org/10.3390/polym11030537>.
  163. Aissaoui, Nesrine, Latifa Bergaoui, Jessem Landoulsi, Jean-François Lambert, and Souhir Boujday. 2012. Silane Layers on Silicon Surfaces: Mechanism of Interaction, Stability, and Influence on Protein Adsorption. *Langmuir* 28. American Chemical Society: 656–665. <https://doi.org/10.1021/la2036778>.
  164. Yang, Shu-qin, Peng Yuan, Hong-ping He, Zong-hua Qin, Qing Zhou, Jian-xi Zhu, and Dong Liu. 2012. Effect of reaction temperature on grafting of  $\gamma$ -aminopropyl triethoxysilane (APTES) onto kaolinite. *Applied Clay Science* 62–63: 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2012.04.006>.
  165. Yamada, Toshiki, and Maya Mizuno. 2021. Infrared Spectroscopy in the Middle Frequency Range for Various Imidazolium Ionic Liquids—Common Spectroscopic Characteristics of Vibrational Modes with In-Plane +C(2)–H and +C(4,5)–H Bending Motions and Peak Splitting Behavior Due to Local Symmetry Breaking of Vibrational Modes of the Tetrafluoroborate Anion. *ACS Omega* 6. American Chemical Society: 1709–1717. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05769>.
  166. Aghayi-Anaraki, Milad, and Vahid Safarifard. 2020. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MOF Magnetic Nanocomposites: Synthesis and Applications. *European Journal of Inorganic Chemistry* 2020: 1916–1937. <https://doi.org/10.1002/ejic.202000012>.
  167. Karade, V. C., A. Sharma, R. P. Dhavale, R. P. Dhavale, S. R. Shingte, P. S. Patil, J. H. Kim, et al. 2021. APTES monolayer coverage on self-assembled magnetic nanospheres for controlled release of anticancer drug Nintedanib. *Scientific Reports* 11. Nature Publishing Group: 5674. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84770-0>.
  168. Ehteshamzadeh, Taraneh, Saeed Kakaei, Mehdi Ghaffari, and Ali Khanchi. 2021. Doxorubicin Embedded Polyvinylpyrrolidone-Coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles for Targeted Drug Delivery System. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism* 34: 1–16. <https://doi.org/10.1007/s10948-021-05952-5>.



169. Cuevas-Carballo, Z. B., S. Duarte-Aranda, and G. Canché-Escamilla. 2019. Properties and Biodegradation of Thermoplastic Starch Obtained from Grafted Starches with Poly(lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment* 27: 2607–2617. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01540-w>.
170. Ma, Yuandong, Yi Zheng, Kexin Liu, Ge Tian, Yan Tian, Lei Xu, Fei Yan, Laiqiang Huang, and Lin Mei. 2010. Nanoparticles of Poly(Lactide-Co-Glycolide)-d- $\alpha$ -Tocopheryl Polyethylene Glycol 1000 Succinate Random Copolymer for Cancer Treatment. *Nanoscale Research Letters* 5: 1161. <https://doi.org/10.1007/s11671-010-9620-3>.
171. Yin, Naiqiang, Ping Wu, Guo Liang, and Wenjing Cheng. 2016. A multifunctional mesoporous Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/CdTe magnetic-fluorescent composite nanoprobe. *Applied Physics A* 122: 243. <https://doi.org/10.1007/s00339-016-9781-8>.
172. Zheng, Hao, Rongxin Su, Zhao Gao, Wei Qi, Renliang Huang, Libing Wang, and Zhimin He. 2014. Magnetic–fluorescent nanocomposites as reusable fluorescence probes for sensitive detection of hydrogen peroxide and glucose. *Analytical Methods* 6. The Royal Society of Chemistry: 6352–6357. <https://doi.org/10.1039/C4AY00886C>.
173. Jaiswal, Saumya, Surjendu Bikash Dutta, Debasis Nayak, and Sharad Gupta. 2021. Effect of Doxorubicin on the Near-Infrared Optical Properties of Indocyanine Green. *ACS Omega* 6. American Chemical Society: 34842–34849. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05500>.
174. Corem-Salkmon, Enav, Benny Perlstein, and Shlomo Margel. 2012. Design of near-infrared fluorescent bioactive conjugated functional iron oxide nanoparticles for optical detection of colon cancer. *International Journal of Nanomedicine* 7: 5517–5527. <https://doi.org/10.2147/IJN.S33710>.
175. Dobson, Damien E., Emily R. Mahoney, Toan P. Mach, Ryan J. LeTourneau, and Hans F. Schmittthener. 2020. Pentamethine Sulfobenzocyanine Dyes with Low Net Charge States and High Photostability. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 19: 56–65. <https://doi.org/10.1039/c9pp00445a>.
176. Kumar, Rajiv, Apurva Kulkarni, Jude Nabulsi, Dattatri Nagesha, Robert Cormack, Mike Makrigiorgos, and Srinivas Sridhar. 2013. Facile Synthesis of PEGylated PLGA Nanoparticles Encapsulating Doxorubicin and its In Vitro Evaluation as Potent Drug Delivery Vehicle. *Drug delivery and translational research* 3: 299–308. <https://doi.org/10.1007/s13346-012-0124-9>.
177. Sun, Changzhen, Yan Liang, Na Hao, Long Xu, Furong Cheng, Ting Su, Jun Cao, Wenxia Gao, Yuji Pu, and Bin He. 2017. A ROS-responsive polymeric micelle with a  $\pi$ -conjugated thioketal moiety for enhanced drug loading and efficient drug delivery. *Organic & Biomolecular Chemistry* 15. The Royal Society of Chemistry: 9176–9185. <https://doi.org/10.1039/C7OB01975K>.
178. Phan, Ke Son, Phuong Thu Ha, Huu Nghi Do, Trung Anh Nguyen, Thuc Quang Bui, Hong Nam Pham, Mai Huong Le, and Thi Thu Huong Le. 2021. Dual Loading of Doxorubicin and Magnetic Iron Oxide into PLA-TPGS Nanoparticles: Design, in vitro Drug Release Kinetics, and Biological Effects on Cancer Cells. *ChemMedChem* 16: 3615–3625. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100535>.
179. Babakhani, Peyman. 2019. The impact of nanoparticle aggregation on their size exclusion during transport in porous media: One- and three-dimensional modelling investigations. *Scientific Reports* 9. Nature Publishing Group: 14071. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50493-6>.
180. Danaei, M., M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, and M. R. Mozafari. 2018. Impact of Particle Size and

- Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* 10: 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.
181. Tamarov, Konstantin, Julie Tzu-Wen Wang, Juuso Kari, Emilia Happonen, Ilkka Vesavaara, Matti Niemelä, Paavo Perämäki, Khuloud T. Al-Jamal, Wujun Xu, and Vesa-Pekka Lehto. 2021. Comparison between Fluorescence Imaging and Elemental Analysis to Determine Biodistribution of Inorganic Nanoparticles with Strong Light Absorption. *ACS Applied Materials & Interfaces* 13. American Chemical Society: 40392–40400. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c11875>.
  182. Cacia, Karen, Fredy Ordóñez, J. Zapata Hernandez, Bernardo Herrera, Elizabeth Pabón, and Robison Buitrago-Sierra. 2019. Surfactant concentration and pH effects on the zeta potential values of alumina nanofluids to inspect stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 583: 123960. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123960>.
  183. Bilardo, Roberta, Federico Traldi, Alena Vdovchenko, and Marina Resmini. 2022. Influence of surface chemistry and morphology of nanoparticles on protein corona formation. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology* 14: e1788. <https://doi.org/10.1002/wnan.1788>.
  184. Hu, Boyang, Ruijie Liu, Qingyue Liu, Zi'an Lin, Yiwei Shi, Jun Li, Lijun Wang, Longjie Li, Xianjin Xiao, and Yuzhou Wu. 2022. Engineering surface patterns on nanoparticles: new insights into nano-bio interactions. *Journal of Materials Chemistry B* 10. Royal Society of Chemistry: 2357–2383. <https://doi.org/10.1039/D1TB02549J>.
  185. Di, Jinwei, Xiang Gao, Yimeng Du, Hui Zhang, Jing Gao, and Aiping Zheng. 2021. Size, shape, charge and “stealthy” surface: Carrier properties affect the drug circulation time in vivo. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 16: 444–458. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.07.005>.
  186. Pournoori, Negin, Mohammad Ali Oghabian, Rasoul Irajirad, Samad Muhammadnejad, and Hamid Delavari H. 2022. Magnetic Resonance Imaging of Tumor-Infiltrating Lymphocytes by Anti-CD3-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles. *ChemMedChem* 17: e202100708. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100708>.
  187. Mohammadi, Mohammad Ali, Saleh Asghari, and Bagher Aslibeiki. 2021. Surface modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: A cross-linked polyethylene glycol coating using plasma treatment. *Surfaces and Interfaces* 25: 101271. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2021.101271>.
  188. Gao, Shipeng, Rebeca M. Torrente-Rodríguez, María Pedrero, José M. Pingarrón, Susana Campuzano, Javier Rocha-Martin, and José M. Guisán. 2022. Dextran-coated nanoparticles as immunosensing platforms: Consideration of polyaldehyde density, nanoparticle size and functionality. *Talanta* 247: 123549. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123549>.
  189. Mansourizadeh, Fariba, Hourii Sepehri, Sepideh Khoei, Mahdi Moridi Farimani, Ladan Delphi, and Marziyeh Shalchi Tousi. 2020. Designing Salvigenin –loaded mPEG-b-PLGA @Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles system for improvement of Salvigenin anti-cancer effects on the breast cancer cells, an in vitro study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 57: 101619. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101619>.
  190. Akl, Magda Ali, Amira Mostafa Kamel, and Mahmoud Ahmed Abd El-Ghaffar. 2023. Biodegradable functionalized magnetite nanoparticles as binary-targeting carrier for breast carcinoma. *BMC Chemistry* 17: 3. <https://doi.org/10.1186/s13065-023-00915-4>.
  191. Nguyen, Minh Dang, Hung-Vu Tran, Shoujun Xu, and T. Randall Lee. 2021. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles: Structures, Synthesis, Magnetic Properties, Surface

- Functionalization, and Emerging Applications. *Applied Sciences* 11. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 11301. <https://doi.org/10.3390/app112311301>.
192. Maleki, Aziz, Mohammad-Ali Shahbazi, Vajiheh Alinezhad, and Hélder A. Santos. 2020. The Progress and Prospect of Zeolitic Imidazolate Frameworks in Cancer Therapy, Antibacterial Activity, and Biomineralization. *Advanced Healthcare Materials* 9: 2000248. <https://doi.org/10.1002/adhm.202000248>.
  193. Karthika, Viswanathan, Mohamad S. AlSalhi, Sandhanasamy Devanesan, Kasi Gopinath, Ayyakannu Arumugam, and Marimuthu Govindarajan. 2020. Chitosan overlaid Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/rGO nanocomposite for targeted drug delivery, imaging, and biomedical applications. *Scientific Reports* 10: 18912. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76015-3>.
  194. Klymchenko, Andrey S., Fei Liu, Mayeul Collot, and Nicolas Anton. 2021. Dye-Loaded Nanoemulsions: Biomimetic Fluorescent Nanocarriers for Bioimaging and Nanomedicine. *Advanced Healthcare Materials* 10: 2001289. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001289>.
  195. Namvar, Farideh, Heshu Sulaiman Rahman, Rosfarizan Mohamad, Javad Baharara, Mahnaz Mahdavi, Elaheh Amini, Max Stanley Chartrand, and Swee Keong Yeap. 2014. Cytotoxic effect of magnetic iron oxide nanoparticles synthesized via seaweed aqueous extract. *International Journal of Nanomedicine* 9. Dove Press: 2479–2488. <https://doi.org/10.2147/IJN.S59661>.
  196. Ye, Ping, Yuanyuan Ye, Xiaojing Chen, Hanbing Zou, Yan Zhou, Xue Zhao, Zhaohua Chang, Baosan Han, and Xianming Kong. 2020. Ultrasmall Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles induce S-phase arrest and inhibit cancer cells proliferation. *Nanotechnology Reviews* 9. De Gruyter: 61–69. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2020-0006>.
  197. Pedroza-Garcia, José Antonio, Yanli Xiang, and Lieven De Veylder. 2022. Cell cycle checkpoint control in response to DNA damage by environmental stresses. *The Plant Journal* 109: 490–507. <https://doi.org/10.1111/tpj.15567>.
  198. Pieretti, Joana Claudio, Marcelly Chue Gonçalves, Gerson Nakazato, Ana Carolina Santos de Souza, Ariane Boudier, and Amedea Barozzi Seabra. 2021. Multifunctional hybrid nanoplatfrom based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ag NPs for nitric oxide delivery: development, characterization, therapeutic efficacy, and hemocompatibility. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 32: 23. <https://doi.org/10.1007/s10856-021-06494-x>.
  199. Sweed, Nabila M., Marwa H. S. Dawoud, Nora M. Aborehab, and Shahira M. Ezzat. 2024. An approach for an enhanced anticancer activity of ferulic acid-loaded polymeric micelles via MicroRNA-221 mediated activation of TP53INP1 in caco-2 cell line. *Scientific Reports* 14. Nature Publishing Group: 2073. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52143-y>.
  200. Kciuk, Mateusz, Adrianna Gielecińska, Somdutt Mujwar, Damian Kołat, Żaneta Kałuzińska-Kołat, Ismail Celik, and Renata Kontek. 2023. Doxorubicin—An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells* 12: 659. <https://doi.org/10.3390/cells12040659>.
  201. Yallapu, Murali, Shadi Othman, Evan Curtis, Nichole Bauer, Neeraj Chauhan, Deepak Kumar, Meena Jaggi, and Subhash Chauhan. 2012. Curcumin-loaded magnetic nanoparticles for breast cancer therapeutics and imaging applications. *International Journal of Nanomedicine* Inter J Nanomed: 1761–1779.
  202. Ghorbaanee, Milad, Amir Ahmad Salarian, and Valiallah Saba. 2018. Curcumin Loaded Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles: An MRI Contrast Agent to Investigate the Impact of Curcumin on Maximizing Negative Contrast and r<sub>2</sub> Relaxation Rate. *Journal of*

- Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* 28: 2169–2178. <https://doi.org/10.1007/s10904-018-0868-x>.
203. Zhou, Zijian, Lijiao Yang, Jinhao Gao, and Xiaoyuan Chen. 2019. Structure-Relaxivity Relationships of Magnetic Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* 31: e1804567. <https://doi.org/10.1002/adma.201804567>.
204. Zhao, Zhenghuan, Muyao Li, Jie Zeng, Linlin Huo, Kun Liu, Ruixue Wei, Kaiyuan Ni, and Jinhao Gao. 2022. Recent advances in engineering iron oxide nanoparticles for effective magnetic resonance imaging. *Bioactive Materials* 12: 214–245. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.10.014>.
205. Ge, Jianxian, Cang Li, Ning Wang, Ruru Zhang, Mohammad J. Afshari, Can Chen, Dandan Kou, et al. 2022. Effects of PEG Chain Length on Relaxometric Properties of Iron Oxide Nanoparticles-Based MRI Contrast Agent. *Nanomaterials* 12. <https://doi.org/10.3390/nano12152673>.
206. Zeng, Jianfeng, Lihong Jing, Yi Hou, Mingxia Jiao, Ruirui Qiao, Qiaojuan Jia, Chunyan Liu, Fang Fang, Hao Lei, and Mingyuan Gao. 2014. Anchoring Group Effects of Surface Ligands on Magnetic Properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles: Towards High Performance MRI Contrast Agents. *Advanced Materials* 26: 2694–2698. <https://doi.org/10.1002/adma.201304744>.
207. Stanicki, Dimitri, Luce Vander Elst, Robert N. Muller, Sophie Laurent, Delphine Felder-Flesch, Damien Mertz, Audrey Parat, et al. 2017. Iron-oxide Nanoparticle-based Contrast Agents. <https://doi.org/10.1039/9781788010146-00318>.
208. Zhao, Zhenghuan, Muyao Li, Jie Zeng, Linlin Huo, Kun Liu, Ruixue Wei, Kaiyuan Ni, and Jinhao Gao. 2022. Recent advances in engineering iron oxide nanoparticles for effective magnetic resonance imaging. *Bioactive Materials* 12: 214–245. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.10.014>.
209. Taboada, Elena, Raul Solanas, Elisenda Rodríguez, Ralph Weissleder, and Anna Roig. 2009. Supercritical-Fluid-Assisted One-Pot Synthesis of Biocompatible Core( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)/Shell(SiO<sub>2</sub>) Nanoparticles as High Relaxivity T<sub>2</sub>-Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Advanced Functional Materials* 19: 2319–2324. <https://doi.org/10.1002/adfm.200801681>.
210. Wei, He, Oliver T. Bruns, Michael G. Kaul, Eric C. Hansen, Mariya Barch, Agata Wiśniowska, Ou Chen, et al. 2017. Exceedingly small iron oxide nanoparticles as positive MRI contrast agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 2325–2330. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620145114>.
211. Bourquin, Joël, Ana Milosevic, Daniel Hauser, Roman Lehner, Fabian Blank, Alke Petri-Fink, and Barbara Rothen-Rutishauser. 2018. Biodistribution, Clearance, and Long-Term Fate of Clinically Relevant Nanomaterials. *Advanced Materials* 30: 1704307. <https://doi.org/10.1002/adma.201704307>.
212. Nowak-Jary, Julia, and Beata Machnicka. 2022. Pharmacokinetics of magnetic iron oxide nanoparticles for medical applications. *Journal of Nanobiotechnology* 20: 305. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01510-w>.
213. Feng, Qiyi, Yanping Liu, Jian Huang, Ke Chen, Jinxing Huang, and Kai Xiao. 2018. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. *Scientific Reports* 8. Nature Publishing Group: 2082. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19628-z>.
214. Golombek, Susanne K., Jan-Niklas May, Benjamin Theek, Lia Appold, Natascha Drude, Fabian Kiessling, and Twan Lammers. 2018. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. *Advanced Drug Delivery Reviews* 130.

- Perspectives and Review Articles on Nanomedicine from NanoDDS 2017: 17–38. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.007>.
215. Nomani, Alireza, Siavash Yousefi, Davit Sargsyan, and Arash Hatefi. 2024. A quantitative MRI-based approach to estimate the permeation and retention of nanomedicines in tumors. *Journal of Controlled Release* 368: 728–739. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.03.019>.
216. Thébault, Caroline J., Grégory Ramniceanu, Aude Michel, Claire Beauvineau, Christian Girard, Johanne Seguin, Nathalie Mignet, Christine Ménager, and Bich-Thuy Doan. 2019. In Vivo Evaluation of Magnetic Targeting in Mice Colon Tumors with Ultra-Magnetic Liposomes Monitored by MRI. *Molecular Imaging and Biology* 21: 269–278. <https://doi.org/10.1007/s11307-018-1238-3>.
217. Seguin, Johanne, Céline Nicolazzi, Nathalie Mignet, Daniel Scherman, and Guy G. Chabot. 2012. Vascular density and endothelial cell expression of integrin alpha v beta 3 and E-selectin in murine tumours. *Tumor Biology* 33: 1709–1717. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0428-x>.
218. Kauffman, Melinda K., Megan E. Kauffman, Hong Zhu, Zhenquan Jia, and Y. Robert Li. 2016. Fluorescence-Based Assays for Measuring Doxorubicin in Biological Systems. *Reactive oxygen species (Apex, N.C.)* 2: 432–439. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.873>.
219. Heo, Jeongyun, Dhiraj P. Murale, Hey Young Yoon, V. Arun, Sangkee Choi, Eunha Kim, Jun-Seok Lee, and Sehoon Kim. 2022. Recent trends in molecular aggregates: An exploration of biomedicine. *Aggregate* 3: e159. <https://doi.org/10.1002/agt2.159>.
220. Ma, Xiaoxie, Yurou Huang, Anning Li, Xiaoyan Zeng, Sheng Hua Liu, Jun Yin, and Guang-Fu Yang. 2023. The Aggregates of Near-Infrared Cyanine Dyes in Phototherapy. *ChemMedChem* 18: e202300204. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202300204>.
221. Son Phan, Ke, Bich Thuy Doan, Thi Thu Huong Le, Thi Thu Trang Mai, Thi Dieu Thuy Ung, Thuc Quang Bui, Sarah Boumati, and Phuong Thu Ha. 2023. Near-Infrared Emission-Cyanine 5.5 and Doxorubicin Loaded Magnetite Nanoparticles for Dual In Vivo Magnetic Resonance and Biodistribution Imaging. *ChemistrySelect* 8: e202303580. <https://doi.org/10.1002/slct.202303580>.
222. Cheng, Jianjun, Guanghui Tan, Wenting Li, Jinghua Li, Zhiqiang Wang, and Yingxue Jin. 2016. Preparation, characterization and in vitro photodynamic therapy of a pyropheophorbide-a-conjugated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> multifunctional magnetofluorescence photosensitizer. *RSC Advances* 6. The Royal Society of Chemistry: 37610–37620. <https://doi.org/10.1039/C6RA03128E>.
223. Liu, Hongling, Junhua Wu, Ji Hyun Min, Ju Hun Lee, and Young Keun Kim. 2019. Synthesis and Characterization of Magnetic–Luminescent Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>–CdSe Core–Shell Nanocrystals. *Electronic Materials Letters* 15: 102–110. <https://doi.org/10.1007/s13391-018-0097-z>.
224. Quenching effect in luminescent and magnetic properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/α-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Eu<sup>3+</sup> nanocomposites. 2023. *Ceramics International* 49. Elsevier: 41133–41141. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.03.076>.
225. Jaiswal, Saumya, Surjendu Bikash Dutta, Debasis Nayak, and Sharad Gupta. 2021. Effect of Doxorubicin on the Near-Infrared Optical Properties of Indocyanine Green. *ACS Omega* 6. American Chemical Society: 34842–34849. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05500>.
226. Bourquin, Joël, Ana Milosevic, Daniel Hauser, Roman Lehner, Fabian Blank, Alke Petri-Fink, and Barbara Rothen-Rutishauser. 2018. Biodistribution, Clearance, and Long-Term Fate of Clinically Relevant Nanomaterials. *Advanced Materials* 30: 1704307. <https://doi.org/10.1002/adma.201704307>.

227. Mitchell, Michael J., Margaret M. Billingsley, Rebecca M. Haley, Marissa E. Wechsler, Nicholas A. Peppas, and Robert Langer. 2021. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* 20. Nature Publishing Group: 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>.
228. Zhang, Mingming, Shan Gao, Dongjuan Yang, Yan Fang, Xiaojie Lin, Xuechao Jin, Yuli Liu, Xiu Liu, Kexin Su, and Kai Shi. 2021. Influencing factors and strategies of enhancing nanoparticles into tumors in vivo. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 11. Hot Topic Reviews in Drug Delivery: 2265–2285. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.03.033>.
229. Li, Jiulong, Chunying Chen, and Tian Xia. 2022. Understanding Nanomaterial–Liver Interactions to Facilitate the Development of Safer Nanoapplications. *Advanced Materials* 34: 2106456. <https://doi.org/10.1002/adma.202106456>.
230. Haroon, H. B., A. C. Hunter, Z. S. Farhangrazi, and S. M. Moghimi. 2022. A brief history of long circulating nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 188: 114396. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114396>.
231. Sukhbaatar, Nyamdolger, and Thomas Weichhart. 2018. Iron Regulation: Macrophages in Control. *Pharmaceuticals* 11: 137. <https://doi.org/10.3390/ph11040137>.
232. Vogt, Anne-Cathrine S., Tasneem Arsiwala, Mona Mohsen, Monique Vogel, Vania Manolova, and Martin F. Bachmann. 2021. On Iron Metabolism and Its Regulation. *International Journal of Molecular Sciences* 22. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 4591. <https://doi.org/10.3390/ijms22094591>.
233. Levy, Michael, Nathalie Luciani, Damien Alloyeau, Dan Elgrabli, Vanessa Deveaux, Christine Pechoux, Sophie Chat, Guillaume Wang, Nidhi Vats, and François Gendron. 2011. Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 32. Elsevier: 3988–3999.
234. Katsnelson, Boris A., Tamara D. Degtyareva, Ilzira I. Minigalieva, Larisa I. Privalova, Sergey V. Kuzmin, Olga S. Yermenko, Ekaterina P. Kireyeva, Marina P. Sutunkova, Irene I. Valamina, and Mark Y. Khodos. 2011. Subchronic systemic toxicity and bioaccumulation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nano- and microparticles following repeated intraperitoneal administration to rats. *International Journal of Toxicology* 30. SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA: 59–68.
235. Mali, Shrikant B. 2024. Bioluminescence in cancer research - Applications and challenges. *Oral Oncology Reports* 9: 100127. <https://doi.org/10.1016/j.oor.2023.100127>.
236. Avci, Pinar, Mahdi Karimi, Magesh Sadasivam, Wanessa C. Antunes-Melo, Elisa Carrasco, and Michael R. Hamblin. 2018. In-vivo monitoring of infectious diseases in living animals using bioluminescence imaging. *Virulence* 9. Taylor & Francis: 28–63. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1371897>.
237. Tamarov, Konstantin, Julie Tzu-Wen Wang, Juuso Kari, Emilia Happonen, Ilkka Vesavaara, Matti Niemelä, Paavo Perämäki, Khuloud T. Al-Jamal, Wujun Xu, and Vesa-Pekka Lehto. 2021. Comparison between Fluorescence Imaging and Elemental Analysis to Determine Biodistribution of Inorganic Nanoparticles with Strong Light Absorption. *ACS Applied Materials & Interfaces* 13. American Chemical Society: 40392–40400. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c11875>.
238. Egea-Benavente, David, Jesús G. Ovejero, María del Puerto Morales, and Domingo F. Barber. 2021. Understanding MNPs Behaviour in Response to AMF in Biological Milieus and the Effects at the Cellular Level: Implications for a Rational Design That Drives Magnetic Hyperthermia Therapy toward Clinical Implementation. *Cancers* 13. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 4583. <https://doi.org/10.3390/cancers13184583>.

239. Ren, Meng-Xin, Yu-Qian Wang, Bu-Yue Lei, Xiao-Xiao Yang, Yun-Lei Hou, Wen-Jie Meng, and Dong-Lin Zhao. 2021. Magnetite nanoparticles anchored on graphene oxide loaded with doxorubicin hydrochloride for magnetic hyperthermia therapy. *Ceramics International* 47: 20686–20692. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.04.080>.
240. Pazouki, Negin, Shiva Irani, Nafiseh Olov, Seyed Mohammad Atyabi, and Shadab Bagheri-Khoulenjani. 2022. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan containing curcumin in combination with hyperthermia induced apoptosis in breast cancer cells. *Progress in Biomaterials* 11: 43–54. <https://doi.org/10.1007/s40204-021-00178-z>.
241. A. Salim, Samar, Taher A. Salaheldin, Mohamed M. Elmazar, A. F. Abdel-Aziz, and Elbadawy A. Kamoun. 2022. Smart biomaterials for enhancing cancer therapy by overcoming tumor hypoxia: a review. *RSC Advances* 12. Royal Society of Chemistry: 33835–33851. <https://doi.org/10.1039/D2RA06036A>.
242. Piehler, Susann, Heidi Dähring, Julia Grandke, Julia Göring, Pierre Couleaud, Antonio Aires, Aitziber L. Cortajarena, et al. 2020. Iron Oxide Nanoparticles as Carriers for DOX and Magnetic Hyperthermia after Intratumoral Application into Breast Cancer in Mice: Impact and Future Perspectives. *Nanomaterials* 10. Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 1016. <https://doi.org/10.3390/nano10061016>.

## PHỤ LỤC

**Bảng PL1.** Tỷ lệ tăng cường bức xạ và tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu của các hệ nano

**Hình PL1.** Sự phân bố chu kỳ tế bào được phân tích bằng phương pháp sàng lọc nội hàm cao HCS trên dòng tế bào CCF-STTG1 của bốn hệ nano so với Dox tự do và đối chứng âm tính

**Hình PL2.** (a) Hồi phục T1; (b) hồi phục T2 đo cho các mẫu có nồng độ nguyên tố Fe khác nhau (Thời gian hồi phục – repetition time, TR (ms); Thời gian tạo tiếng vọng – echo time, TE (ms))

**Hình PL3.** Hình ảnh quang học *in vitro* của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5 ở các bước sóng kích thích và phát xạ khác nhau

**Hình PL4.** So sánh và phân tích định lượng ROI trên hình ảnh quang học của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5. Tín hiệu huỳnh quang được ghi lại là độ bức xạ trung bình (average radiances, ph/s/cm<sup>2</sup>/sr), (n = 3)

**Hình PL5.** Hình ảnh quang học *in vitro* của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox ở các bước sóng kích thích và phát xạ khác nhau

**Hình PL6.** So sánh và phân tích định lượng ROI trên hình ảnh quang học của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox. Tín hiệu huỳnh quang được ghi lại là cường độ bức xạ trung bình (average radiances, ph/s/cm<sup>2</sup>/sr), (n = 3)

**Hình PL7.** Hình ảnh quang học *in vitro* của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 ở các bước sóng kích thích và phát xạ khác nhau

**Hình PL8.** So sánh và phân tích định lượng ROI trên hình ảnh quang học của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5. Tín hiệu huỳnh quang được ghi lại là cường độ bức xạ trung bình (average radiances, ph/s/cm<sup>2</sup>/sr), (n = 3)

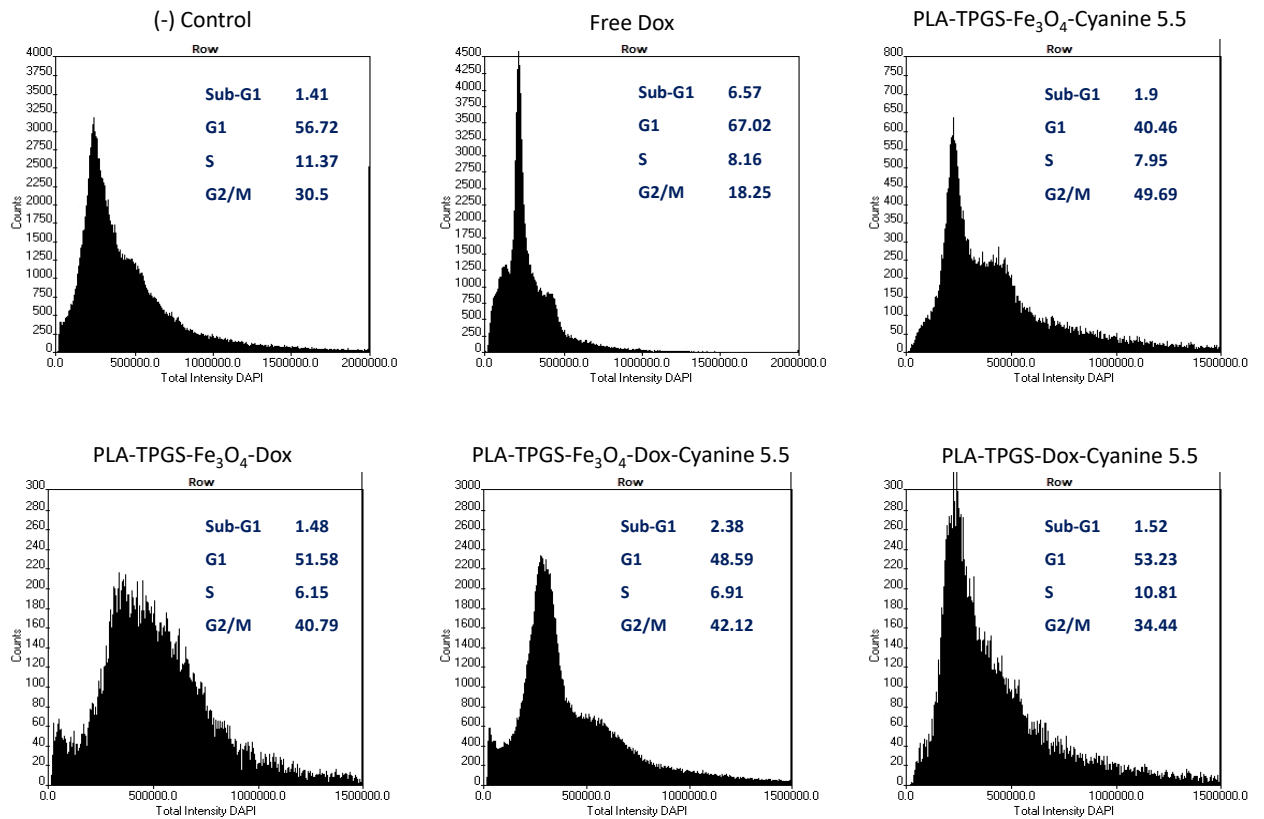
**Hình PL9.** Hình ảnh quang học *in vitro* của hệ nano PLA-TPGS-Dox-Cyanine 5.5 ở các bước sóng kích thích và phát xạ khác nhau

**Hình PL10.** So sánh và phân tích định lượng ROI trên hình ảnh quang học của hệ nano PLA-TPGS-Dox-Cyanine 5.5. Tín hiệu huỳnh quang được ghi lại là cường độ bức xạ trung bình (average radiances, ph/s/cm<sup>2</sup>/sr), (n = 3)

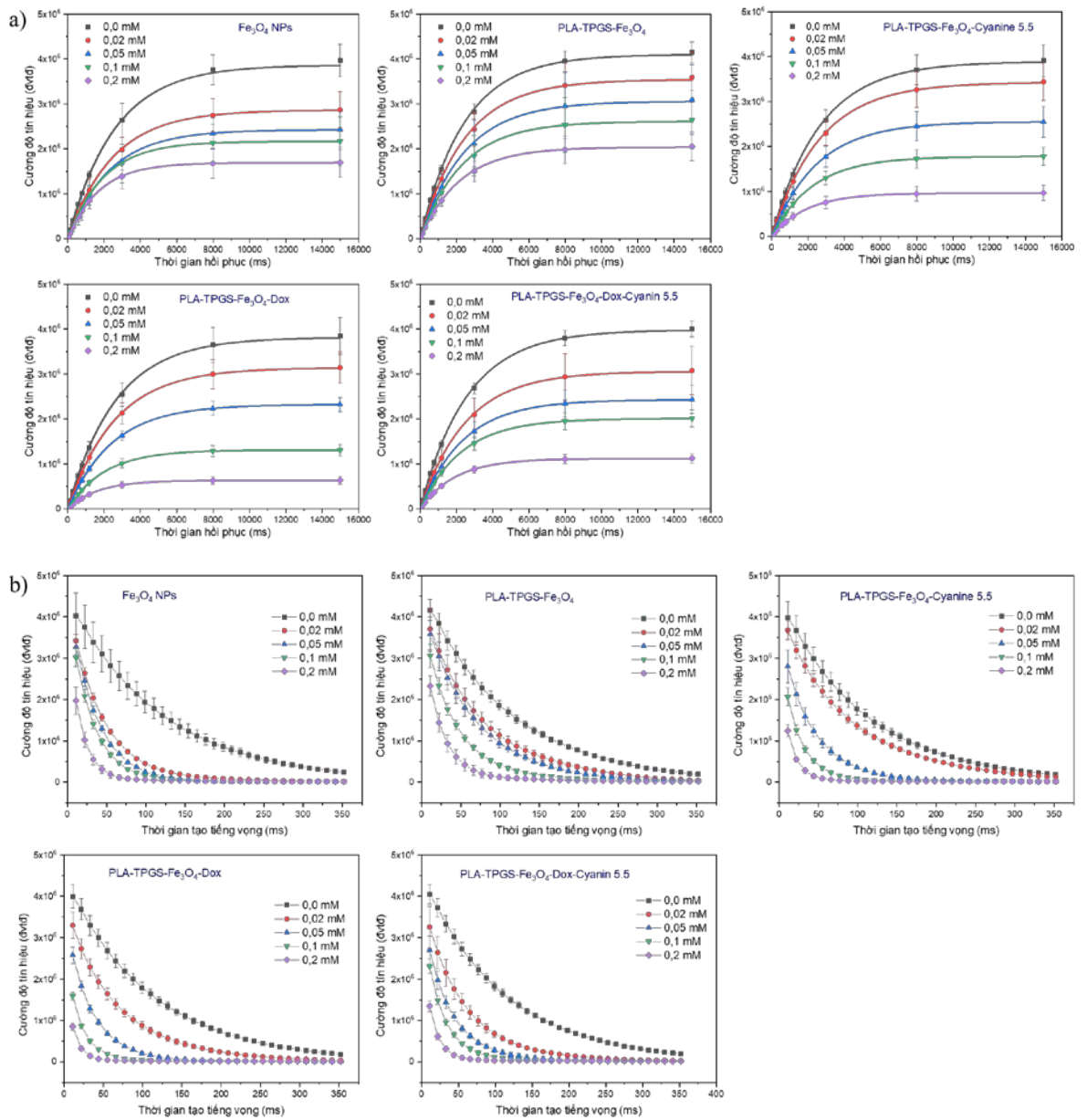


**Bảng PL1. Tỷ lệ tăng cường bức xạ và tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu của các hệ nano**

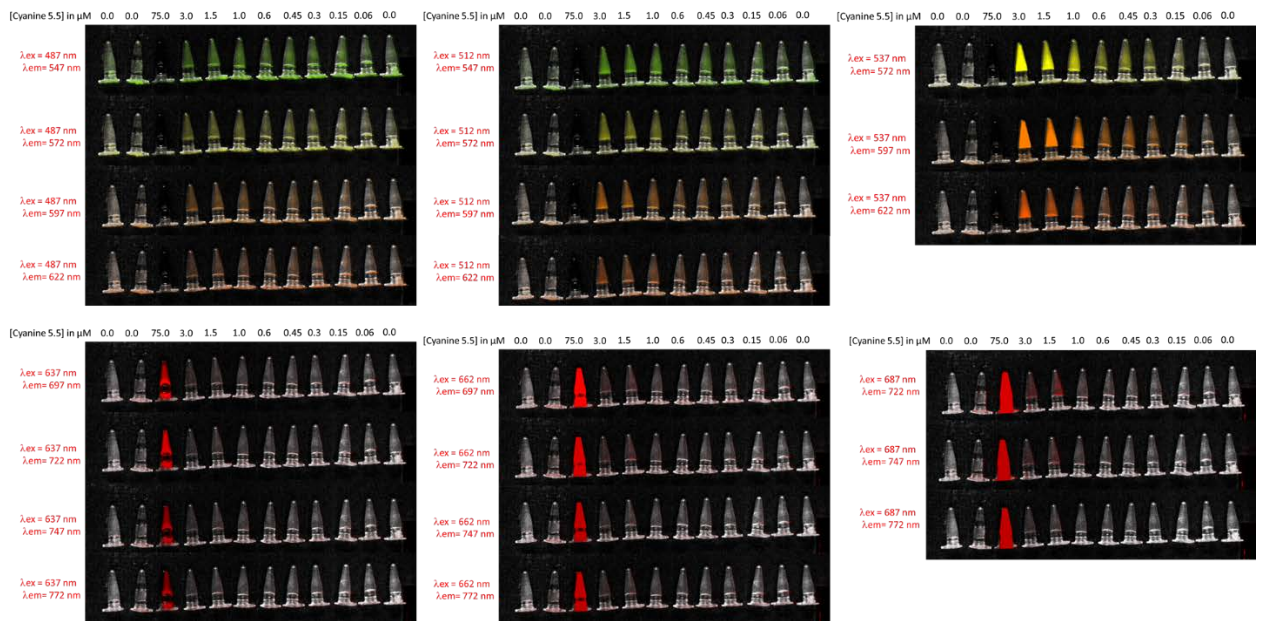
STT	Bước sóng tương ứng với Doxorubicin (nm)		Tỷ lệ tăng cường bức xạ (radiance enhancement ratio)	Tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu (SNR)	Bước sóng tương ứng với Cyanine 5.5 (nm)		Tỷ lệ tăng cường bức xạ (radiance enhancement ratio)	Tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu (SNR)
	$\lambda_{excitation}$	$\lambda_{emission}$			$\lambda_{excitation}$	$\lambda_{emission}$		
<b>I PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5</b>								
1	487	547	0,278	31,694	637	697	6,299	27,497
2		572	0,377	38,351		722	9,677	28,976
3		597	0,319	42,081		747	6,962	22,826
4		622	0,443	32,962		772	7,862	21,329
5	512	547	0,389	57,909	662	697	14,812	36,127
6		572	0,464	84,481		722	23,235	40,843
7		597	0,688	69,653		747	18,464	29,800
8		622	0,522	49,606		772	20,372	27,779
9	537	572	0,646	126,063	687	722	49,689	12,683
10		597	0,947	137,951		747	46,875	31,833
11		622	0,920	91,755		772	<b>63,101</b>	<b>117,095</b>
<b>II PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox</b>								
12	487	547	1,920	46,927	637	697	0,949	21,359
13		572	2,481	53,875		722	0,727	19,427
14		597	3,359	59,826		747	1,313	19,339
15		622	2,811	45,187		772	0,870	19,702
16	512	547	2,778	76,427	662	697	0,832	18,609
17		572	4,639	86,903		722	0,656	17,785
18		597	6,287	96,537		747	0,642	17,219
19		622	5,324	63,463		772	0,613	15,228
20	537	572	9,771	172,698	687	722	0,732	18,380
21		597	<b>14,049</b>	<b>180,847</b>		747	0,721	17,721
22		622	10,582	116,993		772	0,596	18,589
<b>III PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5</b>								
23	487	547	2,68	46,46	637	697	6,41	96,11
24		572	3,55	65,61		722	7,35	108,14
25		597	4,71	81,59		747	7,58	65,21
26		622	3,22	57,54		772	6,06	47,48
27	512	547	4,54	116,19	662	697	19,57	213,65
28		572	6,93	122,0		722	<b>24,70</b>	<b>290,18</b>
29		597	9,16	132,06		747	19,70	123,91
30		622	5,67	91,53		772	19,38	98,34
31	537	572	17,03	248,04	687	722	18,24	242,74
32		597	18,0	285,05		747	20,12	155,58
33		622	14,46	187,40		772	21,60	100,82
<b>IV PLA-TPGS-Dox-Cyanine 5.5</b>								
34	487	547	6,281	27,745	637	697	64,157	225,841
35		572	5,368	27,339		722	81,313	213,622
36		597	6,375	33,135		747	154,711	125,991
37		622	3,0539	27,926		772	346,405	118,499
38	512	547	6,281	31,685	662	697	170,385	252,047
39		572	8,208	33,628		722	304,038	294,031
40		597	8,759	37,250		747	601,626	258,557
41		622	4,493	29,111		772	<b>945,639</b>	<b>362,024</b>
42	537	572	14,462	39,912	687	722	128,813	304,465
43		597	18,000	36,911		747	284,466	200,800
44		622	9,706	37,555		772	494,554	207,493



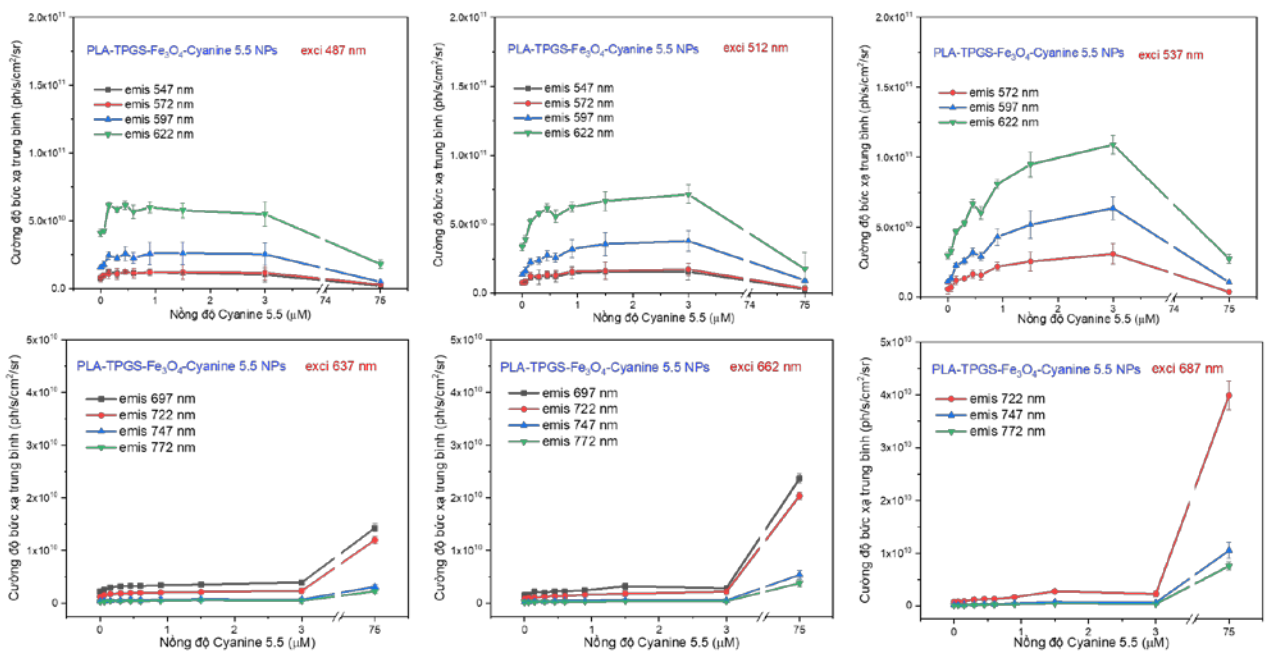
**Hình PL1.** Sự phân bố chu kỳ tế bào được phân tích bằng phương pháp sàng lọc nội hàm cao HCS trên dòng tế bào CCF-STTG1 của bốn hệ nano so với Dox tự do và đối chứng âm tính



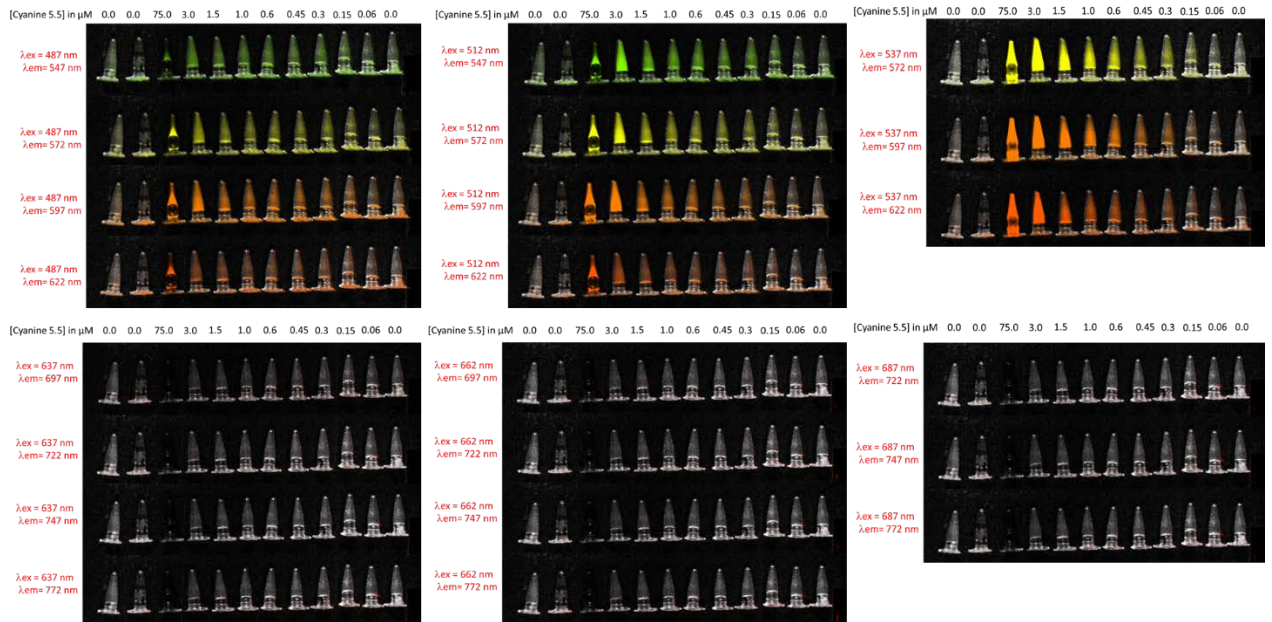
**Hình PL2.** (a) Hồi phục T1; (b) hồi phục T2 đo cho các mẫu có nồng độ nguyên tố Fe khác nhau (Thời gian hồi phục – repetition time, TR (ms); Thời gian tạo tiếng vọng – echo time, TE (ms))



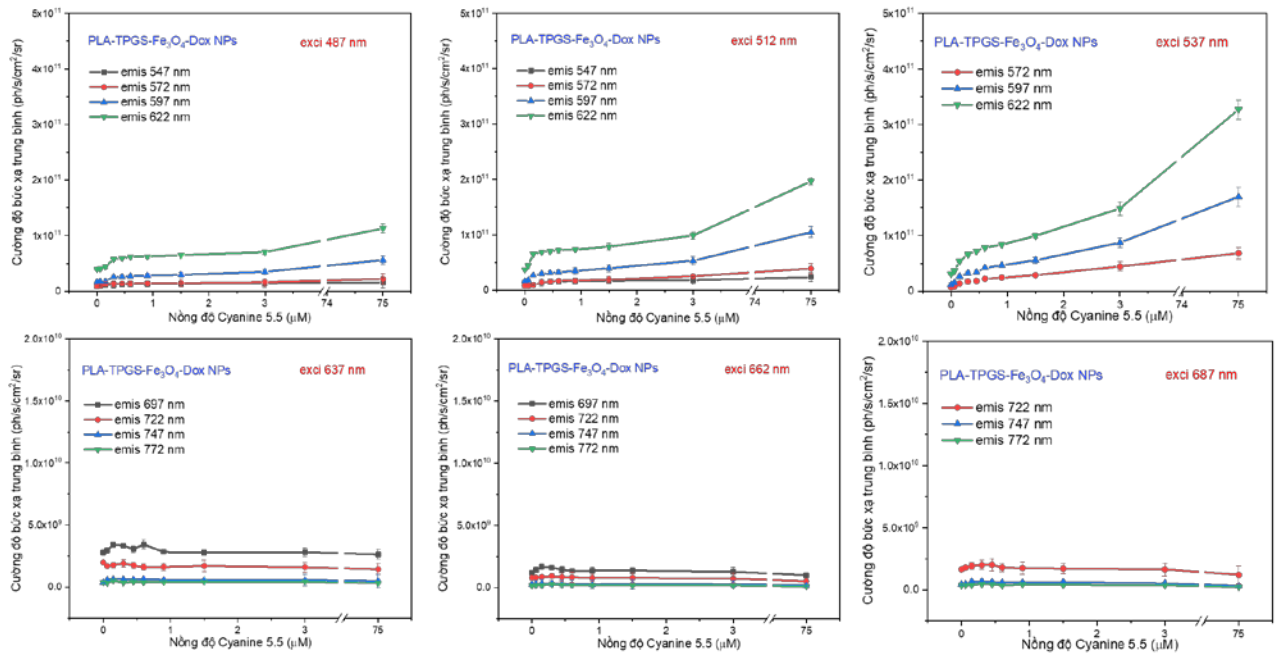
**Hình PL3.** Hình ảnh quang học *in vitro* của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5 ở các bước sóng kích thích và phát xạ khác nhau



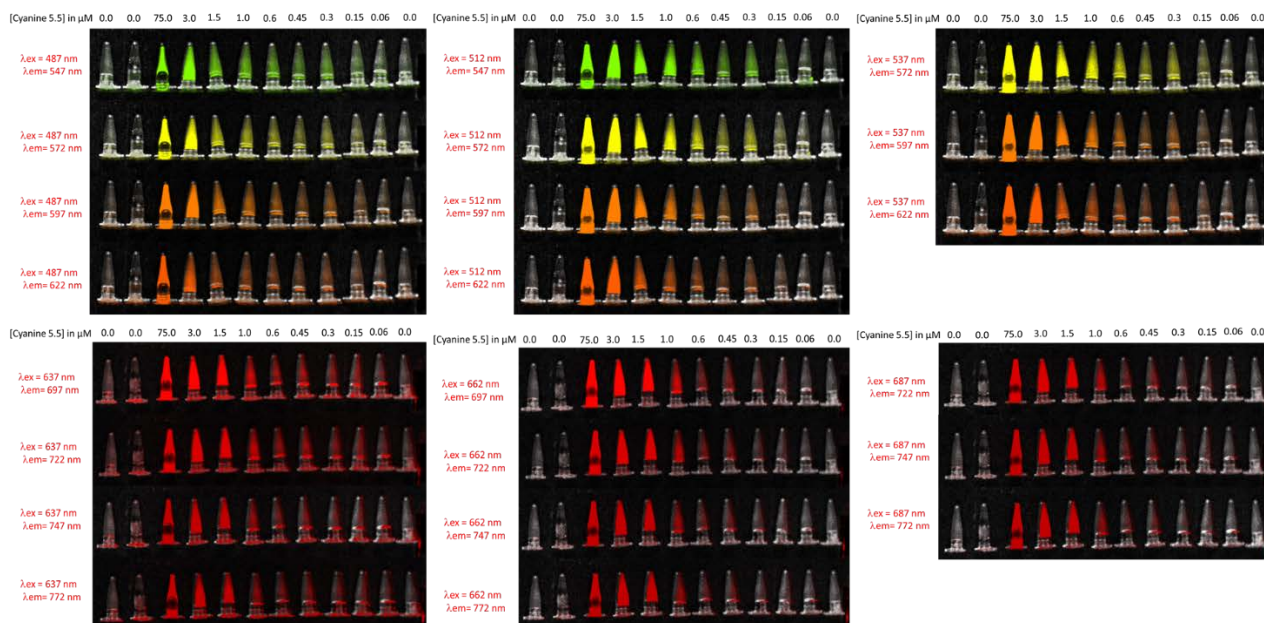
**Hình PL4.** So sánh và phân tích định lượng ROI trên hình ảnh quang học của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Cyanine 5.5. Tín hiệu huỳnh quang được ghi lại là cường độ bức xạ trung bình (average radiance, ph/s/cm<sup>2</sup>/sr), (n = 3)



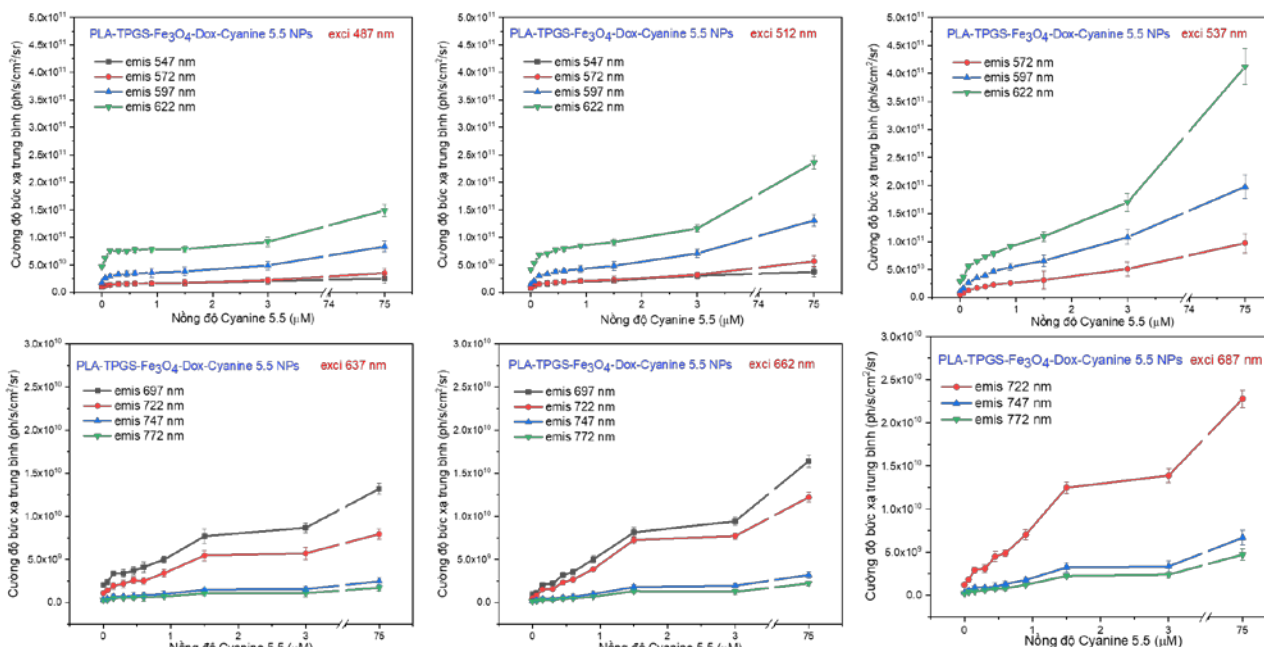
**Hình PL5.** Hình ảnh quang học *in vitro* của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox ở các bước sóng kích thích và phát xạ khác nhau



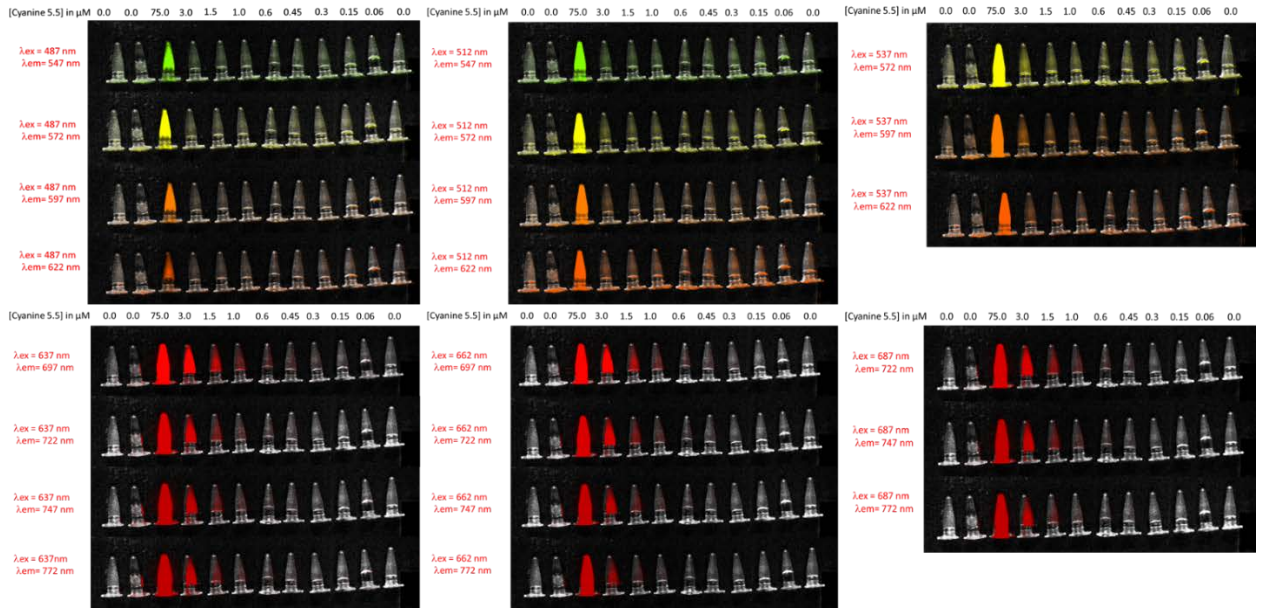
**Hình PL6.** So sánh và phân tích định lượng ROI trên hình ảnh quang học của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox. Tín hiệu huỳnh quang được ghi lại là cường độ bức xạ trung bình (average radiance, ph/s/cm<sup>2</sup>/sr), (n = 3)



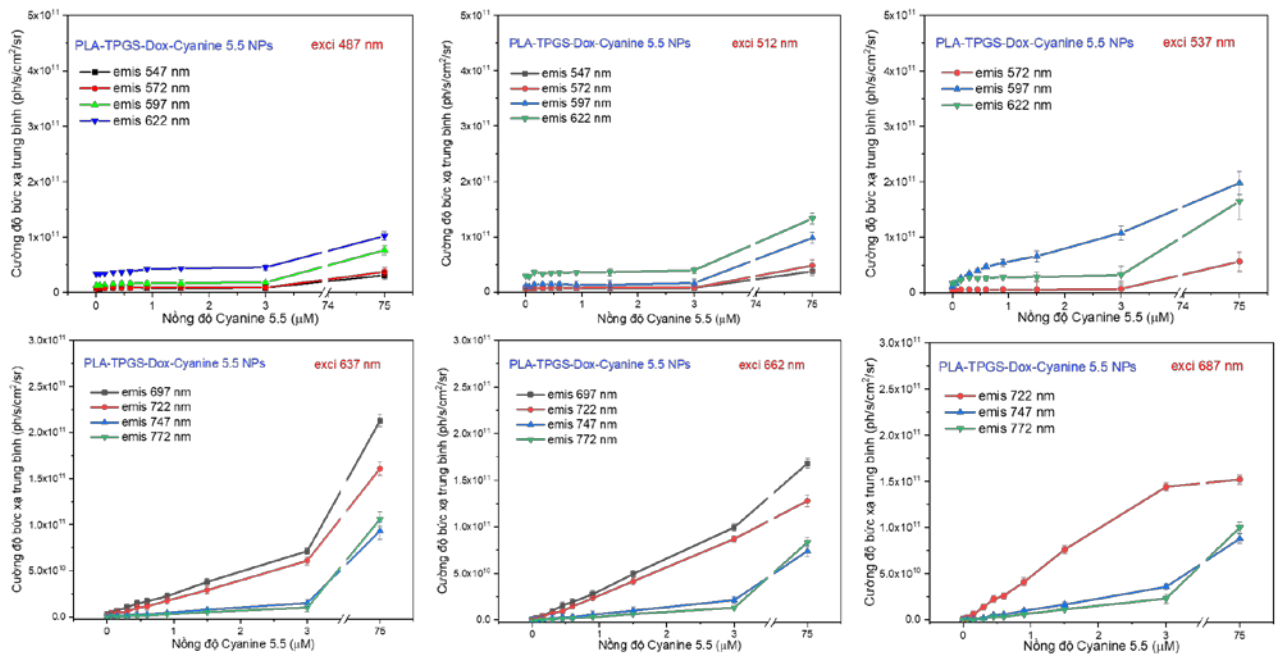
**Hình PL7.** Hình ảnh quang học *in vitro* của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5 ở các bước sóng kích thích và phát xạ khác nhau



**Hình PL8.** So sánh và phân tích định lượng ROI trên hình ảnh quang học của hệ nano PLA-TPGS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dox-Cyanine 5.5. Tín hiệu huỳnh quang được ghi lại là cường độ bức xạ trung bình (average radiance, ph/s/cm<sup>2</sup>/sr), (n = 3)



**Hình PL9.** Hình ảnh quang học *in vitro* của hệ nano PLA-TPGS-Dox-Cyanine 5.5 ở các bước sóng kích thích và phát xạ khác nhau



**Hình PL10.** So sánh và phân tích định lượng ROI trên hình ảnh quang học của hệ nano PLA-TPGS-Dox-Cyanine 5.5. Tín hiệu huỳnh quang được ghi lại là cường độ bức xạ trung bình (average radiance, ph/s/cm<sup>2</sup>/sr), (n = 3)