

Khảo sát khả năng kháng ung thư *in vitro* của doxorubicin bao trong hạt nano oxy hóa khử nhạy pH

Nguyễn Thị Hoàng¹, Trịnh Như Thùy², Vòng Bính Long^{2*}

¹Khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

²Khoa Kỹ thuật Y sinh, Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 8/3/2021; ngày chuyển phân biện 10/3/2021; ngày nhận phân biện 12/4/2021; ngày chấp nhận đăng 19/4/2021

Tóm tắt:

Doxorubicin (DOX) được biết đến là một tác nhân hóa trị liệu nhiều loại ung thư. Tuy nhiên, DOX bị hạn chế trong các ứng dụng lâm sàng do tác dụng phụ nghiêm trọng gây ra bởi việc phân bố không đặc hiệu dẫn đến hiệu quả điều trị thấp. Trong nghiên cứu này, hạt nano oxy hóa khử nhạy pH axit chứa DOX được nghiên cứu nhằm tạo thành hạt nano bao thuốc có kích thước khoảng 40-60 nm làm tăng nồng độ thuốc tích lũy ở vị trí khối u khi đáp ứng với môi trường pH thấp. Các đặc tính tối ưu của hạt nano được khảo sát bằng các phân tích về khả năng kháng oxy hóa, nhạy với pH, khả năng giải phóng thuốc trong môi trường pH thấp và thử nghiệm độc tính trên tế bào ung thư, quan sát khả năng ức chế sự di căn của thuốc bao nano. Kết quả cho thấy, sự kết hợp DOX với hạt nano oxy hóa khử nhạy pH này không những làm tăng khả năng kháng ung thư trên dòng tế bào ung thư đại trực tràng (C-26), ung thư vú (MCF-7) mà còn làm giảm độc tính trên tế bào nội mô (BAEC), ức chế sự di chuyển của tế bào C-26 *in vitro*. Từ những kết quả trong nghiên cứu này cho thấy tiềm năng ứng dụng của hạt nano oxy hóa khử nhạy pH trong việc cải thiện hiệu quả điều trị ung thư.

Từ khóa: doxorubicin, hệ thống phân phối thuốc, oxy hóa, stress, ung thư, y học nano.

Chỉ số phân loại: 3.4

Giới thiệu

Ung thư là một nhóm bệnh do các tế bào phát triển bất bình thường, mất kiểm soát, có khả năng xâm lấn và làm hại các mô khỏe mạnh, chúng có thể di chuyển đến một số cơ quan quan trọng như gan, não, phổi, tim, khiến bệnh nhân suy đa cơ quan và tử vong [1, 2]. Nguyên nhân gây ung thư có thể do sự biến đổi các yếu tố di truyền hoặc bị tác động bởi các tác nhân bên ngoài như bức xạ tia cực tím và ion hóa (tác nhân vật lý), khói thuốc lá, chất gây ô nhiễm thực phẩm, ô nhiễm môi trường (tác nhân hóa học), nhiễm trùng từ một số loại virus, ký sinh trùng (tác nhân sinh học) [3]. Ngoài ra, mức độ ROS (gốc oxy hóa khử mạnh, reactive oxygen species) trong mô cũng được xem là dấu hiệu bệnh lý ung thư. Trong tế bào ung thư, ROS được chứng minh hiện diện với nồng độ cao hơn so với tế bào thường. Chúng đóng vai trò như phân tử tín hiệu, góp phần thúc đẩy các tế bào ung thư tăng sinh mất kiểm soát, tăng sinh mạch, xâm lấn, di căn và trốn thoát chương trình tự chết của tế bào (apoptosis). Do đó, ROS trở thành mục tiêu tiềm năng cho các liệu pháp điều trị ung thư [4].

Hóa trị là một hình thức điều trị ung thư truyền thống

khá phổ biến, sử dụng thuốc để tiêu diệt các tế bào phát triển và tăng sinh nhanh chóng, là đặc tính quan trọng của tế bào ung thư [5, 6]. Doxorubicin (DOX) là thuốc hóa trị liệu của nhiều loại ung thư, được chuyển hóa từ xạ khuẩn *Streptomyces peucetius* [7]. DOX kháng tế bào ung thư bằng cách xâm nhập vào DNA tế bào, ngăn chặn hoạt động enzyme sao chép topoisomerase II hoặc hình thành các gốc tự do ROS để tiêu diệt tế bào ung thư [8]. DOX tan trong nước nên sau khi tiêm tĩnh mạch, các phân tử thuốc khuếch tán và phân phối tự do khắp cơ thể, dẫn đến tác dụng phụ không mong muốn và hạn chế đạt liều lượng thích hợp cần thiết để ức chế tế bào ung thư.

Công nghệ nano là một lĩnh vực khoa học mới đang phát triển nhanh chóng trong thế kỷ XXI và được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như công nghiệp, nông nghiệp, y học, mỹ phẩm... [9, 10]. Các vật liệu có kích thước từ 10-100 nm như hạt nano tương thích sinh học, nano robot cho thấy hiệu quả rất cao trong việc chẩn đoán, phân phối thuốc trúng đích... [11, 12]. Một trong những ứng dụng được nghiên cứu nhiều nhất về công nghệ nano là thiết kế các vật liệu có kích thước nano làm hệ thống phân phối thuốc đến

*Tác giả liên hệ: Email: vblong@hcmiu.edu.vn

Studying the anticancer activity *in vitro* of doxorubicin-encapsulated pH-sensitive redox nanoparticles

Thi Hoang Nguyen¹, Nhu Thuy Trinh², Binh Long Vong^{2*}

¹Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh city (VNU-HCMC)

²School of Biomedical Engineering, International University, VNU-HCMC

Received 8 March 2021; accepted 19 April 2021

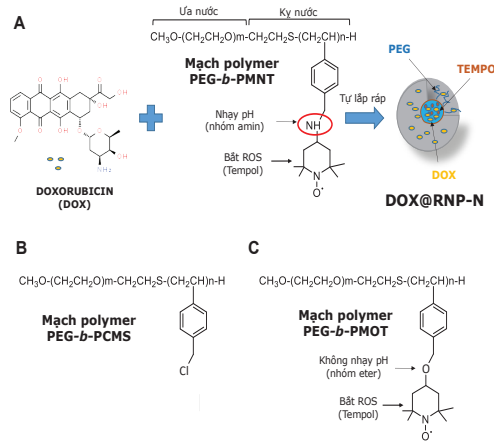
Abstract:

Doxorubicin (DOX) is known as a chemotherapeutic agent for treating a variety of cancers. However, due to non-specific distribution, DOX causes severe side effects, leading to the limitation of its clinical application. In this study, pH-sensitive redox nanoparticles containing DOX were studied to form drug-coated nanoparticles with the size of about 40-60 nm that increases the concentration of drugs accumulated at the tumor site in response to low pH conditions. The optimal properties of the nanoparticles were investigated by analysing the antioxidant activity, sensitivity to pH, drug delivery in a low pH environment, and toxicity on cancer cells, thereby observing the possibility of inhibiting the migration of cancer cells. Results showed that the combination of DOX and the pH-sensitive redox nanoparticles not only increases anticancer in colorectal cancer (C-26), breast cancer (MCF-7) but also reduces bovine aorta endothelial cells (BAEC) and inhibits C-26 cell migration *in vitro*. The paper results reveal the application potential of the pH-sensitive redox nanoparticles in improving the effectiveness of cancer treatment.

Keywords: cancer, doxorubicin, drug delivery system, nanomedicine, oxidizing, stress.

Classification number: 3.4

vị trí mục tiêu, giúp tiêu diệt tế bào ung thư mà không ảnh hưởng đến tế bào thường. Hệ thống thuốc nano cải thiện thời gian hấp thu thuốc, giúp các thuốc tan trong nước giải phóng thuốc chậm hơn, giữ hàm lượng thuốc ổn định trong khoảng thời gian tối đa và tối thiểu mong muốn. Một số dạng hạt nano thường được ứng dụng làm hệ thống phân phối thuốc như nano polymer, liposome, dendrimer, nanoshell... [13], trong đó nano polymer là một trong những hệ thống phân phối thuốc tiềm năng nhất bởi khả năng phân hủy và tương hợp sinh học [14, 15]. Trong nghiên cứu này, hạt nano oxy hóa khử (redox nanoparticle - RNP) là một loại nano polymer được tạo từ khối polymer lưỡng tính poly(ethylene glycol)-b-poly(4-(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) aminomethylstyrene (PEG-b-PMNT) bằng phương pháp thẩm tích loại dung môi. Khối polymer đồng trùng hợp này sau khi hòa tan trong nước sẽ xảy ra hiện tượng tái sắp xếp cấu trúc giữa các phân đoạn ưa nước và kỵ nước thành những khối cầu micell trong nước. Trong khối cầu này, các phân đoạn kỵ nước sẽ tập trung tạo thành lõi được bao bọc bởi vỏ hình thành từ những phân đoạn ưa nước [16] như được mô tả ở hình 1. Hạt nano này gồm mạch ưa nước PEG và mạch kỵ nước PMNT có chứa gốc nitroxide TEMPO có khả năng kháng oxy hóa [17]. Bên cạnh đó, hạt nano thể hiện tính nhạy với pH axit vì gốc nitroxide TEMPO liên kết trong mạch PMNT với liên kết amine, là một liên kết dễ dàng bị proton hóa trong điều kiện axit [17], dẫn đến sự không kém bền của hạt nano RNP-N ở pH thấp như ở môi trường vi khối u. Lớp phủ PEG làm cho hạt nano trở nên ưa nước và trung tính hơn, cho phép chúng dễ dàng vượt qua hệ thống miễn dịch, tăng thời gian bán hủy và lưu thông trong máu [18]. Ngoài ra, nhằm mục tiêu thụ động là quá trình các hạt nano thoát ra khỏi vòng tuần hoàn qua hệ mạch bị rò rỉ đến vùng khối u [19], đây là hiện tượng hiệu ứng tăng tính thấm và tính lưu (Enhanced Permeability and Retention effect) [20]. Khai thác các đặc điểm sinh học đặc trưng của môi trường khối u như có độ pH axit so với pH máu, nồng độ ROS cao, khả năng thấm và lưu giữ các vật liệu kích thước nhỏ hơn 1.000 nm, hạt nano oxy hóa khử nhạy pH mang thuốc DOX đến mục tiêu khối u nhằm tăng hiệu quả dược chất và giảm tác dụng phụ. Mục tiêu của nghiên cứu này là khảo sát hoạt tính kháng oxy hoá của hạt nano nhạy pH (RNP-N) và hoạt tính kháng ung thư sau khi mang thuốc DOX trên mô hình tế bào *in vitro*. Hạt nano oxy hóa khử không nhạy với pH (RNP-O) [21] và hạt nano không có khả năng kháng oxy hóa (nRNP) [17] là những hạt nano được sử dụng thực hiện các khảo sát đối chứng dùng trong nghiên cứu này.



Hình 1. Cấu trúc mạch polymer tổng hợp nano dùng trong nghiên cứu này. (A) Mạch polymer PEG-*b*-PMNT và hạt nano nhạy pH bao thuốc doxorubicin (DOX@RNP-N). (B) Mạch polymer PEG-*b*-PCMS không chứa gốc kháng oxy hoá Tempo. (C) Mạch polymer PEG-*b*-PMOT chứa gốc kháng oxy hoá Tempo tạo liên kết ether không nhạy pH.

Vật liệu và phương pháp

Hóa chất

Các polymer bao gồm poly(ethylene glycol)-*b*-poly[4-(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl)aminomethylstyrene] PEG-*b*-PMNT, mạch polymer PEG-*b*-PCMS, mạch polymer poly(ethylene glycol)-*b*-poly[4-(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl)oxymethylstyrene] PEG-*b*-PMOT được tổng hợp bằng phương pháp polymer hoá tự do theo nghiên cứu trước đây [17, 21]. Trước tiên, mạch PEG-*b*-PCMS được tổng hợp bằng phương pháp polymer hoá tạo gốc tự do dùng PEG và chloromethyl styrene với chất xúc tác azobisisobutyronitrile. Sau đó, gốc nitroxide của amino-tempo hoặc hydroxyl-tempo được gắn vào mạch PEG-*b*-PCMS tạo liên kết amine hoặc eter. Các hoá chất bao gồm doxorubicin (DOX), dimethylformamide (DMF), 4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (amino-tempo) được mua từ Công ty Wako, Nhật Bản. Môi trường nuôi tế bào Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) mua từ Công ty Gibco, Mỹ được pha với 5% huyết thanh nhau thai bò (fetal bovine serum (FBS) và 1% kháng sinh penicillin, streptomycin, neomycin từ Công ty Sigma, Mỹ, được khử trùng bằng màng lọc 0,22 µm. Các hoá chất khác như 2,2-diphenyl-1-(2,4,6 trinitrophenyl) hydrazyl (DPPH), 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) được mua từ Sigma, Mỹ. Các dung dịch đệm phosphate được pha với NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), Na₂HPO₄ (10 mM) và KH₂PO₄ (1,8 mM), sau đó pH được chỉnh bằng NaOH (1 M) hoặc HCl (1 M). Nước cất 2 lần được sử dụng trong suốt quá trình thí nghiệm.

Tế bào

Tế bào nội mô động mạch bò (BAEC), tế bào ung thư đại trực tràng chuột (C-26) và tế bào ung thư vú ở người (MCF-7) được mua từ RIKEN BioResource Research Center, Nhật Bản.

Quy trình tạo hạt nano và hạt nano bao thuốc

Tạo hạt nano: hạt nano RNP-N tạo ra từ mạch polymer PEG-*b*-PMNT bằng phương pháp thẩm tích loại dung môi. Đầu tiên, hòa tan 15 mg PEG-*b*-PMNT trong 1 ml *N,N*-dimethylformamide (DMF), khuấy từ 15 phút để hòa tan hoàn toàn, sau đó chuyển hỗn hợp dung dịch vào màng thẩm tích (MWCO = 3,5 kDa từ Công ty Spectrum Laboratories) tiến hành thẩm tích trong 24 giờ với 2 lít nước cất, thay nước 4 lần. Hạt nano đối chứng là RNP-O (từ mạch PEG-*b*-PMOT) và nRNP (từ mạch PEG-*b*-PCMS) thực hiện tương tự như trên.

Tạo hạt nano bao thuốc: hòa tan hỗn hợp thuốc DOX và mạch polymer với tỷ lệ 1:20 trong dung dịch DMF, khuấy từ 15 phút để hòa tan hoàn toàn. Sau đó, chuyển hỗn hợp dung dịch này vào màng thẩm tích kích thước MWCO = 3,5 kDa, thẩm tích trong 24 giờ và khoảng 4 giờ sẽ thay nước 1 lần.

Phương pháp bắt gốc tự do DPPH

Khảo sát khả năng kháng oxy hóa của hạt nano: dung dịch DPPH 40 µg/ml: hòa tan 4 mg trong 100 ml dung dịch methanol (chú ý tránh sáng). Pha các mẫu thử (RNP-N, RNP-O, nRNP, Tempol) với dung dịch đệm photphat pH 7,4 thành các nồng độ khác nhau (0, 20, 50, 80, 100 µg/ml). Trộn 1 ml mẫu thử với 1,5 ml dung dịch DPPH (tỷ lệ 2:3) và để phản ứng xảy ra 30 phút trong tối. Đo giá trị OD ở bước sóng 517 nm bằng máy quang phổ kế UV-Vis.

Khảo sát sự ảnh hưởng của pH đến khả năng kháng oxy hóa: cách tiến hành tương tự như thí nghiệm khảo sát khả năng kháng oxy hóa của hạt nano nhưng thử nghiệm với 3 mẫu thử (RNP-N, RNP-O, nRNP) trong hai dung dịch đệm phosphate có pH 7,4 và đệm phosphate có pH 5,5.

Phương pháp tán xạ ánh sáng động

Đo kích thước hạt: kích thước hạt nano và độ phân bố hạt (PdI) được xác định bằng thiết bị đo kích thước hạt Zetasizer Nano ZS (Malvern, Anh) ở 25°C, với góc tán xạ là 173°. Mẫu được pha loãng với nước cất hoặc dung dịch đệm phosphate có pH 7,4 trước khi đo.

Khảo sát độ nhạy với pH axit: pha loãng mẫu thử (RNP-N, RNP-O) với dung dịch đệm phosphate (PBS 7,4, PBS 5,5, PBS 2,0) theo tỷ lệ 1:2. Tiến hành xác định tốc độ đếm của hỗn hợp nano với PBS 7,4. Cố định vị trí ánh sáng phát ra và quan sát sự thay đổi tốc độ đếm của các hỗn hợp còn lại sau 10 phút ở các pH khác nhau.

Khảo sát sự giải phóng DOX

Cho 3 ml dung dịch mẫu thử gồm DOX và DOX@RNP-N vào màng thấm tích kích thước MWCO 3,5 kDa. Tiếp đó, cho màng thấm tích vào 400 ml dung dịch đệm phosphate (PBS 7,4, PBS 5,5). Xác định mật độ quang của 100 µl dịch mẫu ở bước sóng 490 nm bằng thiết bị đo mật độ quang 96 giếng PerkinElmer tại các thời điểm 0 phút, 30 phút, 1 giờ, 3 giờ, 6 giờ, 8 giờ, 20 giờ và 24 giờ.

Khảo sát độc tính tế bào bằng phương pháp MTT

Cho 180 µl dịch tế bào (C-26, MCF-7, BAEC) vào đĩa 96 giếng với mật độ khoảng 10^4 tế bào/giếng, ủ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂ trong 24 giờ. Thêm 20 µl mẫu thử DOX, DOX@RNP-N, RNP-N vào mỗi giếng với nồng độ DOX lần lượt là 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1 (µg/ml), ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 48 giờ. Loại bỏ dịch môi trường và thêm 50 µl dung dịch MTT (0,5 mg/ml PBS), ủ tiếp trong 4 giờ. Loại bỏ MTT và thêm 100 µl dung dịch DMSO, ủ tiếp trong 10 phút và huyền phù để hòa tan hoàn toàn formazan. Tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 540 nm bằng máy đọc đĩa 96 giếng (PerkinElmer).

Hiệu quả kháng ung thư của DOX kết hợp với nano được xác định bằng phần trăm sống sót của tế bào theo công thức sau:

$$\% \text{ tế bào sống sót} = \frac{OD_{\text{mẫu}} - OD_{\text{blank}}}{OD_{\text{mẫu đối chứng}} - OD_{\text{blank}}} \times 100\%$$

Trong đó: OD_{mẫu} là chỉ số mật độ quang của tế bào xử lý với hạt nano và DOX; OD_{blank} là chỉ số mật độ quang của mẫu dung dịch môi trường không có tế bào; OD_{mẫu đối chứng} là chỉ số mật độ quang của mẫu tế bào xử lý với PBS.

Phương pháp tạo ức chế tế bào di căn

Cho 500 µl dịch tế bào C-26 vào đĩa 24 giếng với mật độ khoảng 10^5 tế bào/giếng và ủ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂ trong 48 giờ. Hút bỏ môi trường, tạo vết rạch bằng đầu tip 200 µl. Rửa bỏ tế bào trôi bằng 200 µl dung dịch PBS. Bổ sung 450 µl môi trường DMEM có 5% FBS, 1% kháng sinh và 50 µl mẫu thử (DOX, DOX@RNP-N, RNP-N) vào mỗi giếng, lắc nhẹ. Các mẫu thử nghiệm khảo sát với nồng độ DOX là 0,5 µg/ml. Quan sát và đo khoảng cách vết rạch ở thời điểm 24 giờ.

Khả năng ức chế tế bào di chuyển của nano bao thuốc DOX được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ tế bào di chuyển} (\%) = \frac{\text{Khoảng cách di chuyển ở 24 giờ}}{\text{Khoảng cách tế bào ở 0 giờ}} \times 100$$

$$\% \text{ ức chế tế bào di chuyển} (\%) = 100\% - \% \text{ tế bào di chuyển}$$

Xử lý thống kê

Tất cả số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel 2016 dưới dạng trung bình ±SD. Sử dụng Student's *t*-test để đánh giá sự khác biệt thống kê giữa các kết quả, với độ lặp lại 3 lần. Sự khác biệt giữa hai nhóm có ý nghĩa khi **p*<0,05 hoặc ***p*<0,01.

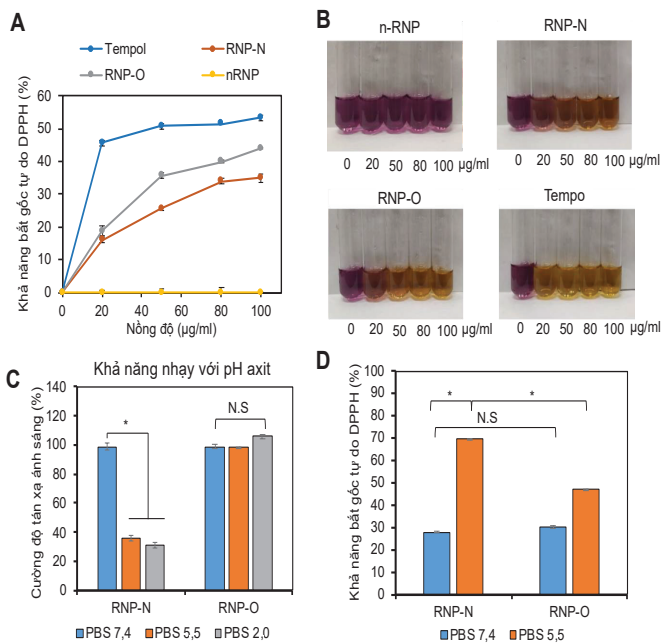
Kết quả và thảo luận

Phân tích các đặc tính hạt nano

Mẫu dung dịch nano thu từ quá trình thẩm tích loại dung môi được tiến hành phân tích các đặc tính gồm khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp bắt gốc tự do DPPH và khả năng nhạy với pH axit bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động DLS. Hình 2A và hình 2B cho thấy hạt nano RNP-N và RNP-O có khả năng kháng oxy hóa so với Tempo - chất được chứng minh là một trong những chất có khả năng kháng oxy hóa mạnh và hạt nRNP không có khả năng kháng oxy hóa. Tại nồng độ 100 µg/ml, hoạt tính kháng oxy hóa của RNP-N đạt được khoảng 30%, RNP-O 40% và Tempo 50%. Mạch polymer PEG-*b*-PMNT có chứa nhóm nitroxide có khả năng bắt gốc tự do nhưng chúng bị gấp cuộn lại để hình thành lõi hạt nano nên khả năng bắt gốc tự do của nhóm nano thấp hơn so với Tempo.

Khả năng nhạy với pH axit của hạt nano được thể hiện ở hình 2C. Khi vị trí ánh sáng laser được cố định ở một vị trí nhất định, cường độ tán xạ của hạt nano tỷ lệ thuận với số lượng hạt hấp thụ. Ở các điều kiện pH giảm dần từ trung tính đến axit (pH 7,4 đến pH 2,0), cường độ tán xạ của hạt nano RNP-N liên tục giảm từ 100 xuống 30%, trong khi đó đại lượng này hầu như không đổi đối với hạt nano RNP-O. Nhánh kỵ nước PMNT của mạch polymer PEG-*b*-PMNT có chứa nhóm amino dễ dàng bị proton hóa ở điều kiện axit, trong khi đó nhánh PMOT chứa gốc eter ổn định ở điều kiện axit. Do đó, chúng tỏ hạt nano RNP-N nhạy trong môi trường axit, dẫn đến cấu trúc lỏng lẻo, sự tách rời của các mạch polymer và không giữ lại cấu trúc nano.

Tiến hành đánh giá khả năng kháng oxy hóa của hạt nano trong 2 điều kiện môi trường trung tính (pH 7,4) và môi trường axit (pH 5,5) bằng phương pháp bắt gốc tự do DPPH cho thấy: trong điều kiện trung tính (pH 7,4), hoạt tính kháng oxy hóa của hạt nano nhạy với pH axit RNP-N và hạt nano không nhạy RNP-O không có nhiều sự khác biệt, cụ thể RNP-N đạt 27,85% và RNP-O đạt 30,04%. Tuy nhiên, trong điều kiện pH 5,5 hoạt tính kháng oxy hóa của RNP-N đạt 60,45%, cao gấp 1,5 lần so với RNP-O chỉ đạt 46,86% (hình 2D). Điều này chứng minh cấu trúc hạt nano RNP-N kém bền trong môi trường axit so với hạt nano RNP-O, biểu lộ các nhóm Tempo trong mạch polymer làm tăng hoạt tính kháng oxy hoá của hạt nano.



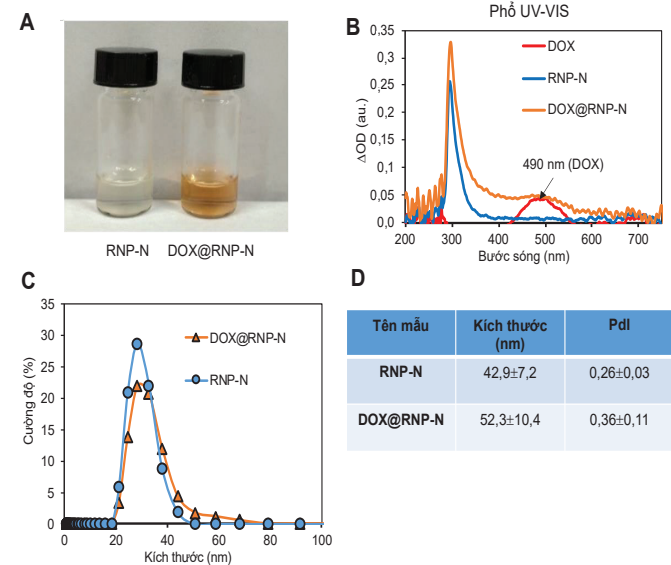
Hình 2. Đặc tính kháng oxy hoá và nhạy pH của hạt nano RNP-N. (A, B) Khả năng kháng oxy hóa của hạt nano: RNP-N (màu cam), RNP-O (màu xám) thể hiện khả năng kháng oxy hóa so với Tempo (màu xanh dương) kháng oxy hóa mạnh và nRNP (màu vàng) không có khả năng kháng oxy hóa. (C) Khả năng nhạy với pH axit của hạt nano: cường độ tán xạ ánh sáng của hạt nano RNP-N giảm dần theo chiều giảm dần của giá trị pH dung dịch đệm PBS 7,4 (màu xanh dương), PBS 5,5 (màu cam) và PBS 2,0 (màu xám), trong khi cường độ tán xạ của RNP-O không thay đổi ở cả 3 giá trị pH. (D) Sự ảnh hưởng của pH đến khả năng kháng oxy hóa của hạt nano: phần trăm bắt gốc tự do DPPH của RNP-N (nhạy với pH axit) và RNP-O (không nhạy với pH axit) không có sự khác biệt ở giá trị PBS 7,4 (xanh dương) nhưng chênh lệch nhiều ở dung dịch PBS 5,5 (màu cam) với * $p < 0,05$, N.S: không có sự khác biệt thống kê.

Phân tích các đặc tính của hạt nano bao thuốc

Quan sát mẫu dung dịch nano bao thuốc sau thẩm tích (DOX@RNP-N) có màu đỏ nhạt so với màu hơi vàng của mẫu dung dịch nano RNP-N (hình 3A), tức DOX đã được bao trong lõi hạt nano. Mặt khác, hạt nano bao thuốc xuất hiện đỉnh hấp thụ tại bước sóng 490 nm, là bước sóng hấp thụ cực đại của thuốc DOX, trong khi đó hạt nano RNP-N không hấp thụ tại bước sóng này (hình 3B). Điều này chứng tỏ các hạt nano không ảnh hưởng đến độ hấp thụ của DOX và DOX có chứa trong lõi hạt nano. Khi quan sát kích thước thì hạt nano bao thuốc (DOX@RNP-N) có kích thước tăng so với kích thước của hạt nano (RNP-N) (hình 3C và D). Cụ thể, kích thước của RNP-N là $42,9 \pm 7,2$ nm thì sau khi bao thuốc kích thước hạt đạt $52,3 \pm 10,4$ nm (DOX@RNP-N). Với khoảng kích thước này, các hạt nano sẽ thuận lợi mang thuốc DOX thụ động đến vị trí khối u nhờ hiệu ứng tăng tính thấm và tính lưu [22].

Để xác định chính xác nồng độ thuốc được bao, tiến hành định lượng bằng phương pháp khảo sát khả năng bao thuốc (Drug Loading Capacity) và hiệu suất bao thuốc

(Efficiency Encapsulation) của hạt nano. Dựa vào giá trị OD của DOX@RNP-N và đồ thị đường chuẩn, xác định hạt nano RNP-N bao thành công 30,18% thuốc DOX với khả năng bao thuốc là 1,51%.

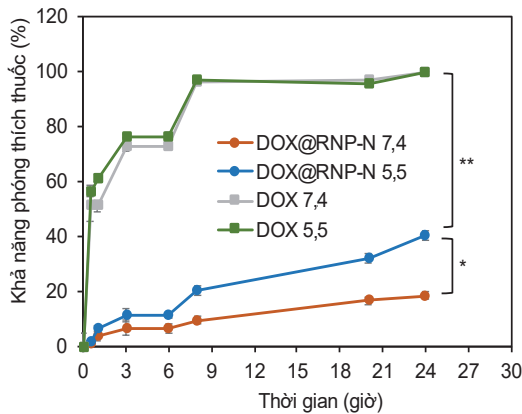


Hình 3. Đặc tính của hạt nano bao thuốc (DOX@RNP-N). (A) Dung dịch nano RNP-N và DOX@RNP-N, màu sắc của hạt nano trước và sau khi bao thuốc có sự khác biệt rõ rệt. (B) Phổ hấp thụ UV-Vis của hạt nano. DOX@RNP-N (màu cam) xuất hiện đỉnh hấp thụ ở bước sóng 490 nm, là bước sóng hấp thụ cực đại của DOX (màu đỏ), trong khi đó RNP-N (màu xanh dương) hầu như không hấp thụ ở bước sóng này. (C và D) Sự thay đổi kích thước trước và sau khi bao thuốc bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động (DLS).

Sự giải phóng DOX của hạt nano

Sự giải phóng DOX của hạt nano bao thuốc (DOX@RNP-N) được khảo sát ở điều kiện 37°C với hai giá trị pH khác nhau, pH 7,4 (tương trưng cho môi trường máu và sinh lý bình thường) và pH 5,5 (tương trưng môi trường vi mô khối u) (hình 4). Ở điều kiện pH 7,4, lượng thuốc giải phóng ra khỏi hạt nano RNP-N khá thấp, cụ thể sau 24 giờ khảo sát chỉ có khoảng 19% lượng thuốc DOX được giải phóng (hình 4). Còn ở giá trị pH 5,5, lượng thuốc DOX giải phóng nhanh hơn do RNP-N phân rã trong điều kiện axit, với khoảng 18 và 40% lượng thuốc lần lượt được giải phóng sau 6 giờ và 24 giờ khảo sát. Với ưu điểm kích thước nhỏ khoảng 40-60 nm, DOX@RNP-N có thể di chuyển đến các vị trí vùng mô khối u thông qua hiệu ứng tăng tính thấm và tính lưu. Mặt khác, khi so sánh sự giải phóng của hai dung dịch DOX và DOX@RNP-N (hình 4) đã cho thấy khả năng thuốc DOX giải phóng ra ngoài được kiểm soát khi bao trong hạt nano oxy hóa khử nhạy pH. Điều này chứng tỏ hạt nano RNP-N đã kéo dài thời gian lưu thông trong máu của thuốc DOX, phù hợp ứng dụng trong điều trị ung thư. Do đó, với những đặc tính tối ưu này của hạt nano RNP-N và DOX@RNP-N, chúng được lựa chọn để thực hiện khảo sát tiếp ở những thí

nghiệm xác định hoạt tính kháng ung thư như độc tính trên tế bào và ức chế sự di căn của tế bào.



Hình 4. Sự giải phóng DOX ở những điều kiện pH khác nhau. So sánh sự giải phóng thuốc của DOX và DOX@RNP-N ở điều kiện pH 7,4 (môi trường sinh lý bình thường) và pH 5,5 (môi trường vi mô khối u). Hạt nano RNP-N có khả năng kiểm soát lượng DOX giải phóng ra ngoài môi trường. Các số liệu được trình bày dưới dạng trung bình \pm SD và * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

RNP-N tăng cường khả năng kháng ung thư của DOX

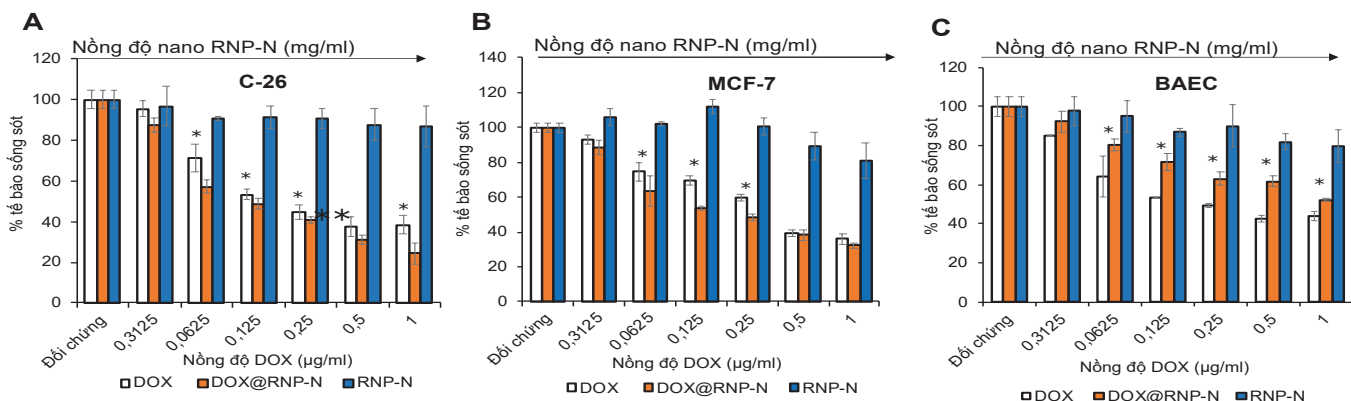
Hiệu quả kháng ung thư *in vitro* của DOX, DOX@RNP-N, RNP-N trên dòng tế bào ung thư đại trực tràng C-26 và ung thư vú MCF-7 được thực hiện bằng phương pháp độc tính trên tế bào MTT. Hạt nano RNP-N không gây độc tính trên tế bào ung thư và điều này cũng đã được chứng minh trong một số nghiên cứu trước đó [23]. RNP-N cải thiện hiệu quả kháng ung thư của DOX trên cả dòng tế bào ung thư đại trực tràng C-26 và ung thư vú MCF-7 với nồng độ thuốc càng cao thì số lượng tế bào ung thư sống sót càng thấp (hình 5A và B). Ở nồng độ khảo sát cao nhất 1 $\mu\text{g/ml}$, sau 48 giờ chỉ còn 20% tế bào C-26 còn sống khi điều trị bởi DOX@RNP-N, trong khi đó 40% tế bào C-26 còn sống khi thử nghiệm bởi DOX. Tình trạng tương tự cũng xảy ra với điều trị ở tế bào MCF-7 (hình 5B). Kết quả cho thấy RNP-N

tăng hiệu quả điều trị của thuốc DOX trong sự ức chế phát triển của các dòng tế bào ung thư.

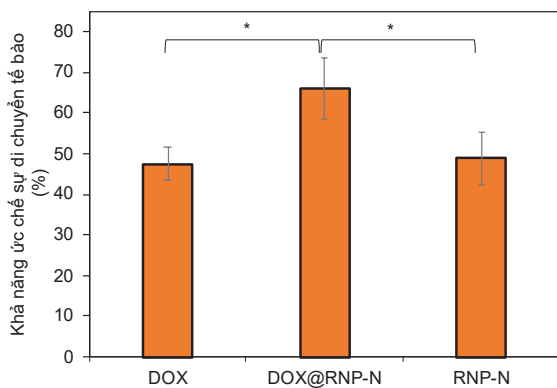
Ngoài ra, tác động của DOX@RNP-N đến sự sống sót của tế bào thường BAEC cũng được đánh giá. Kết quả cho thấy RNP-N làm giảm độc tính của DOX trên dòng tế bào nội mô bình thường BAEC (hình 5C). Sau 48 giờ khảo sát có 40% tế bào sống sót khi điều trị bởi DOX 0,25 $\mu\text{g/ml}$, trong khi có khoảng 62% tế bào sống sót khi điều trị bằng DOX@RNP-N cùng nồng độ DOX. Hạt nano RNP-N có khả năng kháng oxy hóa, chúng bắt ROS được tạo ra bởi thuốc DOX trên tế bào thường, làm cân bằng tỷ lệ chất kháng oxy hóa và gốc oxy hóa mạnh ROS trong cơ thể, giảm độc tính do DNA không bị tổn thương bởi stress oxy hóa [19]. Hạt nano RNP-N có tiềm năng ứng dụng trong việc tăng hiệu quả kháng ung thư và làm giảm tác dụng phụ của thuốc hóa trị lên mô tế bào khỏe mạnh.

Khả năng ức chế sự di chuyển của tế bào ung thư đại trực tràng C-26

Khảo sát khả năng ức chế sự di chuyển tế bào bằng thuốc hóa trị DOX, DOX@RNP-N và hạt nano RNP-N. DOX@RNP-N cho thấy có sự ức chế di chuyển của tế bào ung thư đại trực tràng C-26 cao hơn so với DOX ở cùng nồng độ khảo sát là 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (hình 6). Sau 24 giờ thử nghiệm trên dòng tế bào ung thư đại trực tràng, DOX@RNP-N ức chế sự di chuyển của khoảng 66% tế bào, trong khi DOX ức chế khoảng 49% tế bào. Điều này có thể là do bản chất RNP-N cũng có khả năng ức chế sự di chuyển tế bào và trong cùng một thời gian khảo sát, RNP-N ức chế khoảng 45% tế bào. Do đó, sự kết hợp DOX với hạt nano oxy hóa RNP-N ức chế sự di chuyển tế bào hiệu quả hơn so với DOX tự do. Kết quả này cho thấy tiềm năng của DOX@RNP-N trong ức chế khả năng di căn của các tế bào ung thư trong cơ thể. Các nghiên cứu tiếp theo cần khảo sát các điều kiện về nồng độ và thời gian phù hợp để tìm được công thức tối ưu trong ức chế khả năng di chuyển của tế bào ung thư bằng kết hợp hạt nano và thuốc kháng ung thư.



Hình 5. Độc tính của DOX@RNP-N *in vitro* thử nghiệm trên tế bào ung thư và tế bào thường được xác định bằng phương pháp MTT sau 48 giờ. (A) Dòng tế bào ung thư đại trực tràng C-26; (B) Dòng tế bào ung thư vú MCF-7; (C) Dòng tế bào nội mô thường BAEC. Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình \pm SD (n=3), với mẫu đối chứng là mẫu tế bào và môi trường mà không có thuốc điều trị. * $p < 0,05$ so với DOX.



Hình 6. Khả năng ức chế di chuyển tế bào ung thư đại trực tràng C-26 của DOX@RNP-N so với DOX. % ức chế sự di chuyển tế bào được tính bằng cách so sánh với mẫu tế bào không điều trị thuốc. Số liệu được thể hiện dưới dạng trung bình \pm SE và * $p < 0,05$.

Kết luận

Trong nghiên cứu này, DOX@RNP-N được tổng hợp với kích thước khoảng 40-60 nm có khả năng nhạy pH và khả năng kháng oxy hoá. Hoạt tính kháng oxy hoá và giải phóng thuốc DOX của hạt nano RNP-N tăng lên ở pH thấp mô phỏng môi trường vi khối u. Hoạt tính kháng các tế bào ung thư của DOX@RNP-N cao hơn và ít độc tính trên tế bào thường so với DOX. Tuy nhiên, ở những nồng độ cao DOX@RNP-N vẫn gây độc trên tế bào thường với tỷ lệ sống sót thấp hơn 80% (hình 5C), do vậy cần tối ưu hoá đặc tính của hạt nano nhằm tăng tính bền khi đi vào tế bào thường để giảm thiểu tác dụng phụ của thuốc. Mặt khác, DOX@RNP-N cũng có khả năng ức chế sự di chuyển của các tế bào ung thư *in vitro* tốt hơn so với DOX. Những kết quả trong nghiên cứu này cho thấy tiềm năng của DOX@RNP-N trong điều trị ung thư và là tiền đề để thực hiện những nghiên cứu *in vivo* cũng như thử nghiệm lâm sàng sau này.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh (đề tài mã số C2019-18-24). Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] S. Rivankar (2014), "An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy", *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, **10**(4), pp.853-858.

[2] D. Hanahan and R.A. Weinberg (2011), "Hallmarks of cancer: the next generation", *Cell*, **114**(5), pp.646-674.

[3] B.N. Ames, L.S. Gold and W.C. Willett (1995), "The causes and prevention of cancer", *PNAS*, **92**(15), pp.5258-5265.

[4] J.N. Moloney and T.G. Cotter (2018), "ROS signalling in the biology of cancer", *Semin. Cell Dev. Biol.*, **80**, pp.50-64.

[5] B.A. Chabner and T.G.J. Roberts (2005), "Timeline: chemotherapy and the war on cancer", *Nature Reviews Cancer*, **5**(1), pp.65-72.

[6] A. Ardizzoni, et al. (2007), "Cisplatin - versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis", *J. Natl. Cancer Inst.*, **99**(11), pp.847-857.

[7] Y. Octavia, et al. (2012), "Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies", *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **52**(6), pp.1213-1225.

[8] C. Carvalho, et al. (2009), "Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect", *Curr. Med. Chem.*, **16**, pp.3267-3285.

[9] H.-M. Chiang, et al. (2012), "Nanoscale ZnO induces cytotoxicity and DNA damage in human cell lines and rat primary neuronal cells", *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **12**(3), pp.2126-2135.

[10] P. Fu, Q. Xia, et al. (2014), "Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species", *J. Food Drug Anal.*, **22**(1), pp.64-75.

[11] S.M. Moghimi, et al. (2005), "Nanomedicine: current status and future prospects", *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **19**(3), pp.311-330.

[12] S. Singh and A. Singh (2013), "Current status of nanomedicine and nanosurgery", *Anesth. Essays and Res.*, **7**(2), pp.237-242.

[13] N. Pradhan, et al. (2015), "Facets of nanotechnology as seen in food processing, packaging, and preservation industry", *Biomed. Res. Int.*, **2015**, pp.3656-3672.

[14] R. Shanmuganathan, et al. (2019), "Chitosan nanoparticles: an overview of drug delivery against cancer", *Int. J. Biol. Macromol.*, **130**, pp.727-736.

[15] S. Kruszewski and D.M. Kruszewska (2010), "Fluorescence spectroscopy in camptothecin studies", *Acta Phys. Pol. A*, **118**, pp.99-102.

[16] Y. Lu, E. Zhang, J. Yang, and Z. Cao (2018), "Strategies to improve micelle stability for drug delivery", *Nano Res.*, **11**(10), pp.4985-4998.

[17] L.B. Vong and Y. Nagasaki (2016), "Combination treatment of murine colon cancer with doxorubicin and redox nanoparticles", *Mol. Pharm.*, **13**(2), pp.449-455.

[18] J.S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, and L.M. Ensign (2016), "PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **99**, pp.28-51.

[19] Y. Zhou and J. Kopeček (2013), "Biological rationale for the design of polymeric anti-cancer nanomedicines", *J. Drug Target.*, **21**(1), pp.1-26.

[20] R. Misra, S. Acharya, and S.K. Sahoo (2010), "Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy", *Drug Discov. Today*, **15**(19-20), pp.842-850.

[21] L.B. Vong, T. Tomita, T. Yoshitomi, H. Matsui, and Y. Nagasaki (2012), "An orally administered redox nanoparticle that accumulates in the colonic mucosa and reduces colitis in mice", *Gastroenterology*, **143**(4), pp.1027-1036.

[22] T. Yoshitomi, Y. Ozaki, S. Thangavel, and Y. Nagasaki (2013), "Redox nanoparticle therapeutics to cancer - increase in therapeutic effect of doxorubicin, suppressing its adverse effect", *J. Control. Release*, **172**(1), pp.137-143.

[23] I. Sadowska-Bartosz and G. Bartosz (2018), "Redox nanoparticles: synthesis, properties and perspectives of use for treatment of neurodegenerative diseases", *J. Nanobiotechnology*, **16**(1), pp.87.