

Tổng hợp và đánh giá đặc tính hệ nano PLGA mang chlorambucil bằng ba phương pháp bào chế

Phạm Thị Ngọc Hân*, Vũ Quang Hiếu

Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Thành phố Hồ Chí Minh

*ptnhan@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Trong bối cảnh nhu cầu phát triển hệ dẫn thuốc nano cho hóa trị liệu ngày càng tăng, đặc biệt với các thuốc kém tan như chlorambucil (CHL), các nghiên cứu hiện nay chủ yếu tập trung vào một phương pháp bào chế đơn lẻ và thiếu sự so sánh toàn diện giữa các quy trình. Nghiên cứu này hướng đến việc tối ưu hóa và đối chiếu hiệu quả của ba phương pháp bào chế hạt nano PLGA mang CHL: kết tủa dung môi, nhũ hóa một lần và nhũ hóa hai lần, với ba nồng độ chất ổn định PVA (1 %, 2 % và 3 %). Các hệ hạt thu được được đánh giá toàn diện về kích thước, thế zeta, hiệu suất bao gói, động học giải phóng thuốc và độc tính tế bào trên dòng ung thư HepG2 và MCF-7. Kết quả cho thấy nhũ hóa một lần tạo ra hạt nhỏ (155-170) nm và phân bố đồng đều; kết tủa dung môi cho hiệu suất bao gói cao nhất (12-20) %; trong khi nhũ hóa hai lần kiểm soát giải phóng tốt hơn trong môi trường acid. Mặc dù hiệu quả gây độc tế bào còn hạn chế, nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng của hệ PLGA/CHL.

Nhận 24/03/2025

Được duyệt 03/06/2025

Công bố 28/06/2025

Từ khóa

Hạt nano PLGA, Chlorambucil, nhũ hóa, phương pháp kết tủa nano, dẫn thuốc ung thư

© 2025 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Căn bệnh ung thư ngày càng trở thành gánh nặng y tế trên thế giới, khi tỷ lệ mắc và tử vong liên tục gia tăng, kéo theo những hệ lụy nặng nề về mặt y tế và kinh tế cho cộng đồng [1]. Chlorambucil (CHL) là một tác nhân alkyl hóa thuộc nhóm nitrogen mustard, đã được sử dụng trong điều trị nhiều loại ung thư từ lâu, bao gồm bệnh bạch cầu, ung thư hạch Hodgkin và ung thư vú [2]. Tuy nhiên, việc ứng dụng CHL trong điều trị lâm sàng vẫn còn nhiều hạn chế, chủ yếu do đặc tính hóa học ít tan trong nước, độc tính toàn thân cao và sự bất ổn do nhóm chloroethyl dễ bị thủy phân [3]. Do đó, việc tối ưu hóa các hệ mang thuốc nhằm bảo vệ hoạt chất, kiểm soát quá trình giải phóng và giảm thiểu độc tính đang trở thành một hướng nghiên cứu quan trọng [4]. Công nghệ nano đã mở ra nhiều hy vọng trong việc

cải thiện hiệu quả phân phối thuốc, đặc biệt là các hạt nano poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), nhờ đặc tính phân hủy sinh học, tương thích sinh học và khả năng giải phóng được chất có kiểm soát. PLGA là vật liệu được FDA phê duyệt rộng rãi cho ứng dụng dược phẩm [5]. Các hạt nano PLGA có thể được tổng hợp bằng nhiều kỹ thuật như kết tủa dung môi [6], nhũ hóa một lần [7] và nhũ hóa hai lần [8]. Bên cạnh đó, sự hỗ trợ của chất hoạt động bề mặt như poly(vinyl alcohol) (PVA) đóng vai trò quan trọng trong việc ổn định hệ phân tán và kiểm soát kích thước hạt. Tối ưu hóa các thông số tổng hợp, bao gồm nồng độ PVA [9], tỷ lệ dung môi, phương pháp khuấy, siêu âm và điều kiện ly tâm, là yếu tố then chốt ảnh hưởng đến kích thước, chỉ số phân bố kích thước (PDI), thế zeta, hiệu suất bao gói và khả năng giải phóng thuốc [10]. Các hạt nano có kích thước trong khoảng (10-100) nm được xem là tối

ưu cho điều trị ung thư nhờ khả năng lưu thông kéo dài trong máu, xâm nhập hiệu quả vào mô khối u, và hạn chế thải trừ nhanh qua gan hoặc thận, từ đó nâng cao hiệu quả phân phối thuốc đến tế bào ung thư [11]. Bên cạnh đó, thế zeta âm không chỉ góp phần ổn định hệ phân tán mà còn hạn chế sự tương tác với protein huyết tương, từ đó kéo dài thời gian tuần hoàn của hạt trong cơ thể. Một số nghiên cứu trước đã điều chế hạt nano PLGA mang các thuốc chống ung thư như paclitaxel, doxorubicin hoặc methotrexate, cho thấy hiệu quả cao về kiểm soát giải phóng thuốc và giảm độc tính toàn thân [3, 4, 8]. Với CHL, tuy đã có nghiên cứu điều chế hạt nano PLGA-CHL, hầu hết chỉ sử dụng một phương pháp duy nhất và chưa có đánh giá toàn diện các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả mang thuốc [12-15]. Đặc biệt, chưa có nghiên cứu nào so sánh một cách hệ thống ba phương pháp tạo hạt phổ biến – kết tủa dung môi, nhũ hóa một lần, nhũ hóa hai lần – trên cùng một hệ dẫn thuốc chứa CHL, kết hợp với việc khảo sát đồng thời ảnh hưởng của nồng độ PVA và đánh giá từ đặc tính vật lý đến sinh học. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát và tối ưu hóa quá trình bào chế hạt nano PLGA chứa CHL, thông qua so sánh ba phương pháp bào chế kết hợp ba nồng độ PVA khác nhau. Các hệ hạt được đánh giá toàn diện về kích thước, thế zeta, hiệu suất bao gói, động học giải phóng thuốc và độc tính tế bào trên dòng ung thư HepG2 và MCF-7. Kết quả nghiên cứu nhằm xác định quy trình bào chế hiệu quả, tạo tiền đề phát triển các hệ dẫn thuốc nano hướng đích trong điều trị ung thư.

2 Thực nghiệm

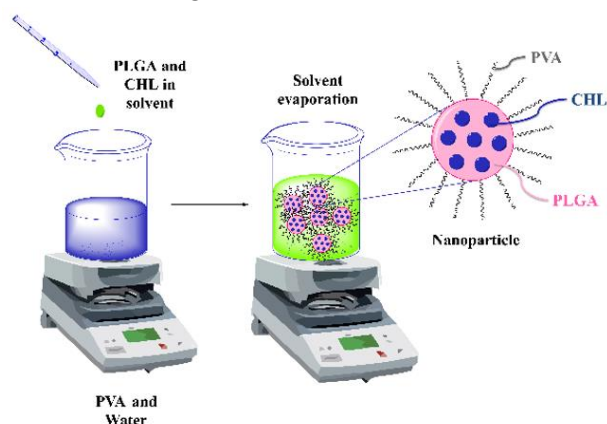
2.1 Hóa chất

Các hóa chất bao gồm poly(vinyl alcohol) (PVA, 30 – 70 kDal, mã 341584), dimethyl sulfoxide (DMSO, mã 472301), acetonitrile (ACN, mã 34851), dung dịch đệm phosphate (PBS, mã P4417), dichloromethane (DCM), PLGA 504H (mã 719927), CHL (mã C0253) và 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (mã M2128) được mua từ Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA). Nước khử ion được sử dụng xuyên suốt trong tất cả các thí nghiệm.

2.2 Chế tạo hạt nano PLGA/CHL

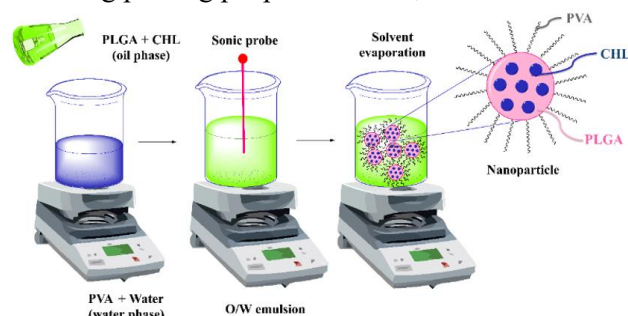
2.2.1 Bằng phương pháp kết tủa

Hệ tiểu phân chứa CHL được bào chế bằng phương pháp kết tủa nano (Hình 1). Cụ thể, 10 mg PLGA được hòa tan vào 2 mL ACN, sau đó thêm 2 mg CHL đã pha trong 20 μ L DMSO để tạo thành pha hữu cơ. Pha nước gồm 20 mL dung dịch PVA với nồng độ (1, 2 hoặc 3) % (w/v). Pha hữu cơ được nhỏ giọt vào pha nước trong khi khuấy đều 200 rpm. Hệ được tiếp tục khuấy từ ở tốc độ 200 rpm trong 16 giờ ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng, hạt nano được thu nhận bằng cách ly tâm lạnh 4 °C với 12 000 rpm trong 30 phút và được rửa lại bằng nước cất tiệt trùng [6].



Hình 1 Sơ đồ tạo hạt nano theo phương pháp kết tủa

2.2.2 Bằng phương pháp nhũ hóa một lần



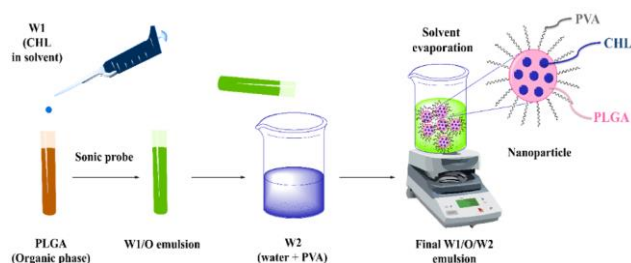
Hình 2 Sơ đồ tạo hạt nano theo phương pháp nhũ hóa 1 lần

Hệ tiểu phân nano chứa CHL cũng được tổng hợp bằng phương pháp nhũ hóa một lần kết hợp bay hơi dung môi (Hình 2). Cụ thể, 10 mg PLGA được hòa tan trong 2 mL DCM, sau đó thêm 2 mg CHL đã pha trong 20 μ L DMSO để tạo thành pha hữu cơ. Pha nước bao gồm 20 mL dung dịch PVA với nồng độ (1, 2 hoặc 3) % (w/v). Pha hữu cơ đổ vào pha nước và vortex đều trong 1 phút,

sau đó hỗn hợp được xử lý bằng siêu âm trong 2 phút với công suất 40 % (chu kỳ 15 giây siêu âm, nghỉ 5 giây). Tiếp theo, thêm 20 mL nước cất để hỗ trợ quá trình bay hơi dung môi. Hệ được khuấy từ tiếp tục ở tốc độ 200 rpm trong 16 giờ ở nhiệt độ phòng nhằm loại bỏ hoàn toàn DCM. Cuối cùng, tiểu phân nano được thu nhận bằng cách ly tâm lạnh 4 °C với 12 000 rpm trong 30 phút và được rửa lại bằng nước cất [7].

2.2.3 Bằng phương pháp nhũ hóa hai lần

Hệ tiểu phân nano chứa CHL cũng được bào chế bằng phương pháp nhũ hóa hai lần (w/o/w), Hình 3. Trước tiên, 2 mg CHL được hòa tan trong 20 µL DMSO để tạo pha nước bên trong. Pha hữu cơ bao gồm 10 mg PLGA được hòa tan trong 2 mL dichloromethane (DCM). Pha nước bên trong được thêm vào pha hữu cơ và hỗn hợp được nhũ hóa bằng siêu âm trong 30 giây với công suất 40 % (chu kỳ 15 giây siêu âm, nghỉ 5 giây) trên nước đá để tạo nhũ tương w/o. Nhũ tương này sau đó được đổ vào 20 mL dung dịch PVA với nồng độ (1, 2 hoặc 3) % (w/v), đồng thời tiếp tục nhũ hóa bằng siêu âm trong 2 phút với điều kiện tương tự. Hệ sau đó được khuấy từ ở tốc độ 200 rpm trong 16 giờ ở nhiệt độ phòng để bay hơi dung môi. Cuối cùng, tiểu phân nano được thu nhận bằng cách ly tâm lạnh 4 °C với 12 000 rpm trong 30 phút và được rửa lại bằng nước cất [8].



Hình 3 Sơ đồ tạo hạt nano phương pháp nhũ hóa 2 lần

2.3 Các phương pháp phân tích

- Đặc trưng kích thước và điện thế zeta của hệ tiểu phân
Kích thước hạt và thế zeta của hệ tiểu phân nano được xác định bằng thiết bị Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, England) ở góc tán xạ 90° tại 25 °C, với ba lần lặp lại nhằm đánh giá phân bố kích thước và độ ổn định của hệ phân tán.

- Hiệu suất mang thuốc

Hiệu suất mang thuốc được xác định sau khi đông khô hệ tiểu phân nano. Mẫu bột được cân chính xác, sau đó hòa tan trong một lượng nhỏ dung môi thích hợp acetonitrile, tiếp theo được pha loãng bằng methanol để kết tủa PLGA. Nồng độ CHL được xác định bằng phương pháp hấp thụ UV-Vis ở bước sóng 258 nm cho CHL sử dụng máy Thermoscientific NanoDrop One C (Waltham, MA, USA). Hiệu suất bao gói thuốc được tính theo công thức:

$$\text{Hiệu suất bao gói thuốc (\%)} = \left(\frac{\text{Khối lượng thuốc được bao gói}}{\text{Khối lượng thuốc ban đầu sử dụng}} \right) \times 100$$

- Khả năng giải phóng thuốc *in vitro*

Để khảo sát khả năng giải phóng thuốc, hệ tiểu phân được phân tán trong dung dịch đệm phosphate loãng (0,1× PBS) với các giá trị pH khác nhau (pH = 7,4 – mô phỏng môi trường sinh lý; pH = 5,4 – mô phỏng môi trường nội bào/endosome). Mẫu được ủ ở 37 °C trong các khoảng thời gian khác nhau (24 giờ, 72 giờ và 168 giờ). Sau mỗi thời điểm, hệ được ly tâm ở 12 000 rpm trong 30 phút để thu lấy phần tiểu phân còn lại, sau đó định lượng lượng thuốc còn giữ lại.

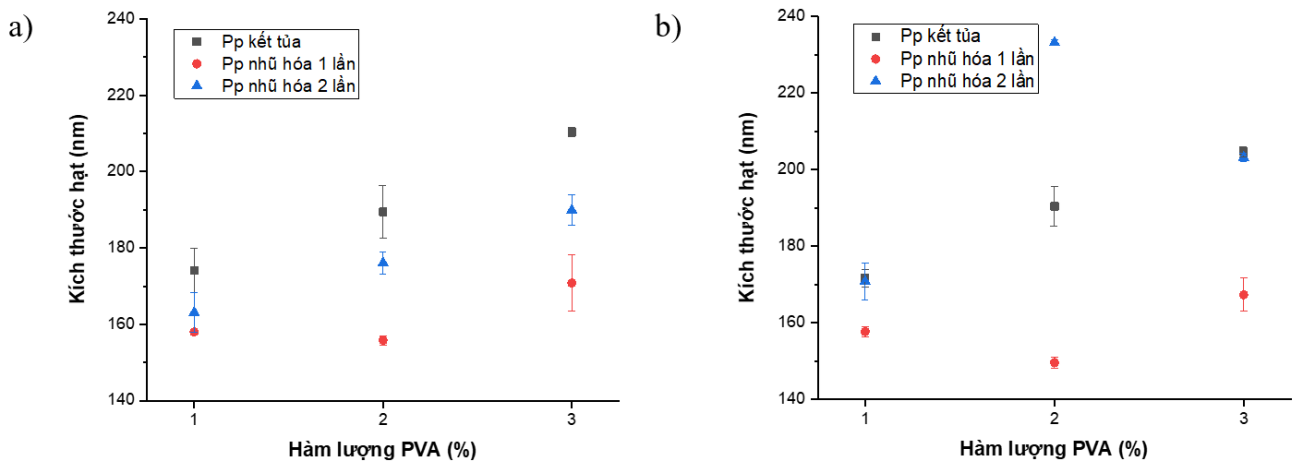
- Đánh giá độc tính tế bào *in vitro*

Độc tính tế bào của hệ tiểu phân nano được đánh giá thông qua phép thử MTT trên hai dòng tế bào ung thư: HepG2 (ung thư gan) và MCF-7 (ung thư vú). Các tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM có bổ sung

10 % huyết thanh bò thai (FBS) và kháng sinh, duy trì ở 37 °C trong điều kiện 5 % CO₂. Hệ nano được thử nghiệm ở ba nồng độ khác nhau gồm 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL và 0,5 mg/mL, được tiếp xúc với tế bào trong 24 giờ và 72 giờ. Sau thời gian ủ, dung dịch MTT được thêm vào và tiếp tục ủ trong 4 giờ để kiểm tra khả năng biến đổi MTT thành formazan của các tế bào còn sống. Kết tủa formazan sau đó được hòa tan bằng DMSO và đo mật độ hấp thụ tại bước sóng 562 nm để định lượng mức độ sống sót của tế bào. Nhóm tế bào không xử lý được sử dụng làm đối chứng âm, trong khi nhóm được xử lý bằng CHL tự do đóng vai trò đối chứng dương.

3 Kết quả và thảo luận

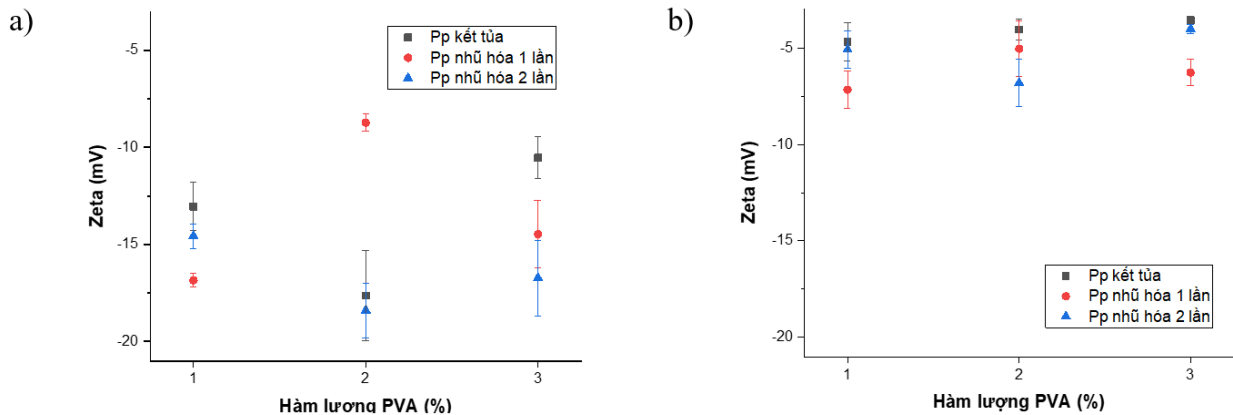
3.1 Tính chất hóa lý hạt nano



Hình 4 Kích thước hạt tạo thành theo 3 phương pháp: kết tủa (đen), nhũ hóa một lần (đỏ) và nhũ hóa 2 lần (xanh dương) trong dung dịch nước (a) và trong môi trường nuôi cấy tế bào PBS 7,4 (b)

Trong môi trường nước (Hình 4a), kích thước tiểu phân dao động từ khoảng 155 nm đến 220 nm tùy thuộc vào phương pháp bào chế và nồng độ PVA. Phương pháp nhũ hóa một lần cho thấy kích thước hạt nhỏ nhất, dao động trong khoảng $(155,83 \pm 1,21)$ nm đến $(170,83 \pm 7,39)$ nm. Phương pháp nhũ hóa hai lần tạo ra các hạt

có kích thước lớn hơn và có độ biến động lớn hơn khi thay đổi hàm lượng PVA. Khi chuyển sang môi trường PBS pH = 7,4 (Hình 4b), kích thước tiểu phân của cả ba phương pháp nhìn chung không thay đổi đáng kể, ngoại trừ phương pháp nhũ hóa một lần có sự gia tăng rõ rệt kích thước hạt.



Hình 5 Thế Zeta hạt tạo thành theo 3 phương pháp: kết tủa (đen), nhũ hóa một lần (đỏ) và nhũ hóa 2 lần (xanh dương) trong dung dịch nước a) và trong môi trường nuôi cấy tế bào PBS 7,4 b)

Giá trị thế zeta của các tiểu phân nano trong môi trường nước và PBS pH = 7,4 (Hình 5) dao động trong khoảng -20 mV đến -5 mV. Trong môi trường PBS, thế zeta có xu hướng cao hơn (ít âm hơn) so với trong nước. Trong nước, sự thay đổi nồng độ PVA ảnh hưởng rõ rệt đến thế zeta, trong khi trong PBS, các giá trị này gần như không thay đổi giữa các điều kiện.

Phân tích kết quả chỉ ra rằng phương pháp bào chế ảnh hưởng rõ rệt đến kích thước và độ ổn định của hạt nano. Phương pháp nhũ hóa một lần tạo ra hệ tiểu phân có kích thước nhỏ, đồng đều và ổn định hơn nhờ quá trình nhũ tương hóa hiệu quả. Ngược lại, với phương pháp nhũ hóa một lần, phương pháp kết tủa tạo ra các hạt PLGA có kích thước lớn hơn do không sử dụng siêu âm. Việc thiếu năng lượng cơ học cao khiến pha hữu

cơ không được phân tán mịn vào pha nước, dẫn đến hình thành các tiểu phân lớn và phân bố kích thước kém đồng đều. Phương pháp nhũ hóa hai lần (W/O/W) tạo ra nhũ tương kép phức tạp, dễ gây biến động kích thước do bước nhũ hóa thứ hai phải kiểm soát nhẹ để tránh phá vỡ cấu trúc giọt bên trong, làm giảm hiệu quả phân tán. Trong môi trường PBS, các hạt từ phương pháp nhũ hóa hai lần có xu hướng tăng kích thước mạnh, phản ánh khả năng ổn định kém. Sự che chắn điện tích từ ion trong PBS làm giảm độ âm của thế zeta, ảnh

hưởng đến độ bền phân tán hạt. Tham khảo nghiên cứu trước đây, hệ nano PLGA-Honokiol có kích thước lớn hơn (200-230) nm so với hệ CHL/PLGA/PVA (155-170) nm, tuy nhiên cả hai đều nằm trong khoảng tối ưu cho phân phối thuốc theo hiệu ứng tăng tính thấm và giữ thuốc [13]. Đáng chú ý, hệ CHL/PLGA/PVA có lợi thế hơn về khả năng thâm nhập vào mô đích nhờ kích thước nhỏ hơn [13].

3.2 Khả năng mang thuốc của hạt nano

Bảng 1 Hiệu suất mang thuốc (%) của các tiểu phân nano PLGA-CHL tại các nồng độ PVA và phương pháp bào chế khác nhau

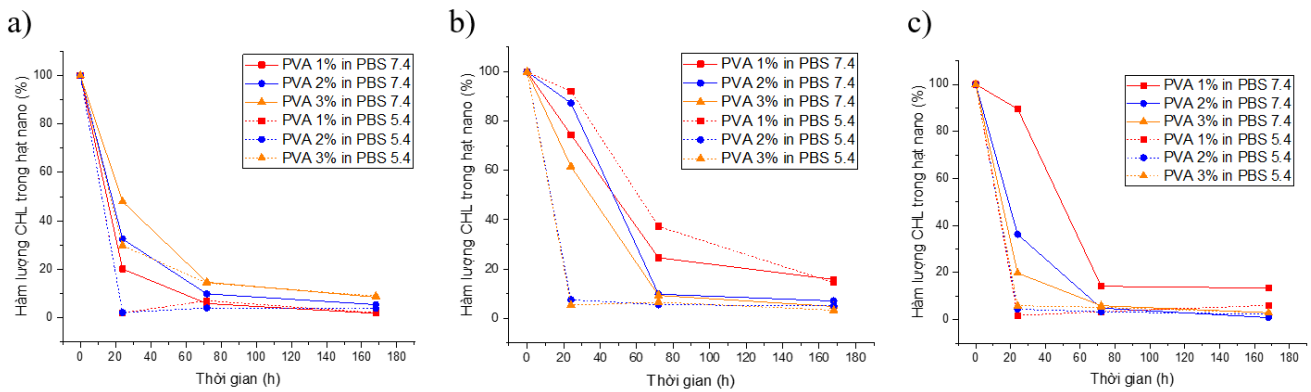
Hàm lượng PVA (%)	Phương pháp kết tủa	Phương pháp nhũ hóa 1 lần	Phương pháp nhũ hóa 2 lần
1	$13,94 \pm 0,98$	$2,06 \pm 0,88$	$14,77 \pm 1,03$
2	$21,23 \pm 0,88$	$5,19 \pm 1,00$	$5,81 \pm 1,04$
3	$12,06 \pm 0,88$	$4,35 \pm 0,82$	$3,94 \pm 0,88$

Bảng 1 thể hiện hiệu suất mang thuốc (%) của các hệ tiểu phân nano PLGA chứa CHL được bào chế theo ba phương pháp: kết tủa, nhũ hóa một lần và nhũ hóa hai lần, với ba nồng độ PVA khác nhau. Ở nồng độ PVA 1 %, phương pháp nhũ hóa hai lần đạt hiệu suất cao nhất ($14,77 \pm 1,03$ %), tiếp theo là phương pháp kết tủa ($13,94 \pm 0,98$ %), trong khi phương pháp nhũ hóa một lần đạt hiệu suất thấp nhất ($2,06 \pm 0,88$ %). Tại nồng độ PVA 2 %, phương pháp kết tủa cho hiệu suất mang thuốc cao nhất ($21,23 \pm 0,88$ %), vượt trội hơn hai phương pháp còn lại. Khi tăng PVA lên 3 %, hiệu suất của phương pháp kết tủa giảm mạnh ($12,06 \pm 0,88$ %), trong khi hiệu suất của hai phương pháp nhũ hóa thay đổi không đáng kể. Nhìn chung, hiệu suất mang thuốc cao khi dùng phương pháp kết tủa, trong khi phương pháp nhũ hóa một lần cho hiệu suất mang thuốc kém hơn.

Kết quả cho thấy hiệu suất mang thuốc bị ảnh hưởng rõ rệt bởi phương pháp bào chế và hàm lượng chất ổn định PVA. Phương pháp kết tủa đạt hiệu suất cao nhất ở

PVA 2 %, có thể do khả năng tương tác tốt giữa CHL và polymer trong điều kiện phân tán phù hợp. Ngược lại, phương pháp nhũ hóa hai lần cho hiệu quả tốt nhất ở PVA 1 %, phù hợp với môi trường nhũ tương ổn định và ít thất thoát dược chất. Phương pháp nhũ hóa một lần cho hiệu suất bao gói thấp nhất ở cả ba nồng độ, có thể do thời gian nhũ hóa ngắn và hiệu quả giữ thuốc thấp trong quá trình tạo hạt. Việc tăng nồng độ PVA lên 3 % dẫn đến giảm hiệu suất ở phương pháp kết tủa, có thể do dư thừa chất ổn định gây cản trở quá trình tạo hạt hiệu quả. So với nghiên cứu trước đây của nhóm, trong đó hệ F127-folate@PLGA/CHL/IR780 đạt hiệu suất bao gói khoảng ($0,5 \pm 0,1$ %), hệ PLGA/CHL trong nghiên cứu này thể hiện khả năng bao gói vượt trội, đặc biệt ở nhũ hóa hai lần ($8,11 \pm 1,03$ %) và nhũ hóa một lần ($7,49 \pm 0,82$ %) [14]. Điều này cho thấy lựa chọn phương pháp phù hợp và tối ưu hóa điều kiện bào chế có thể cải thiện đáng kể hiệu suất mang thuốc của hệ nano PLGA.

3.3 Khả năng giải phóng thuốc



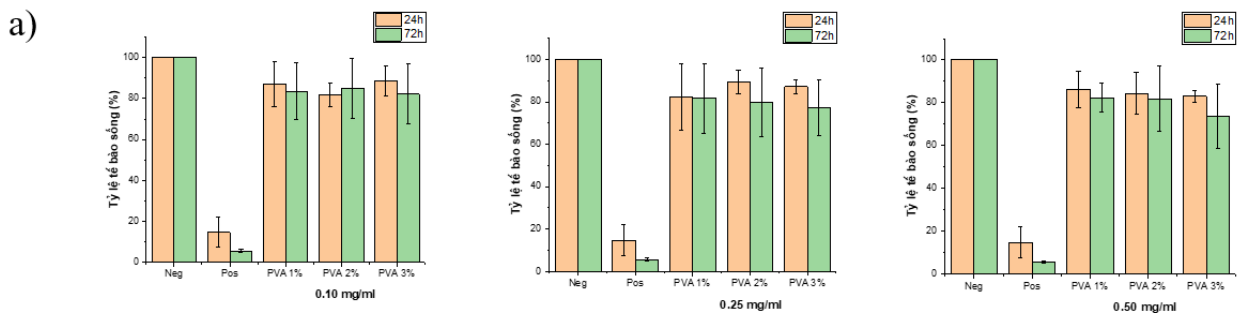
Hình 6 Sự giải phóng thuốc của hạt nano theo 3 phương pháp bào chế lần lượt kết tủa a), nhũ hóa 1 lần b) và nhũ hóa 2 lần c)

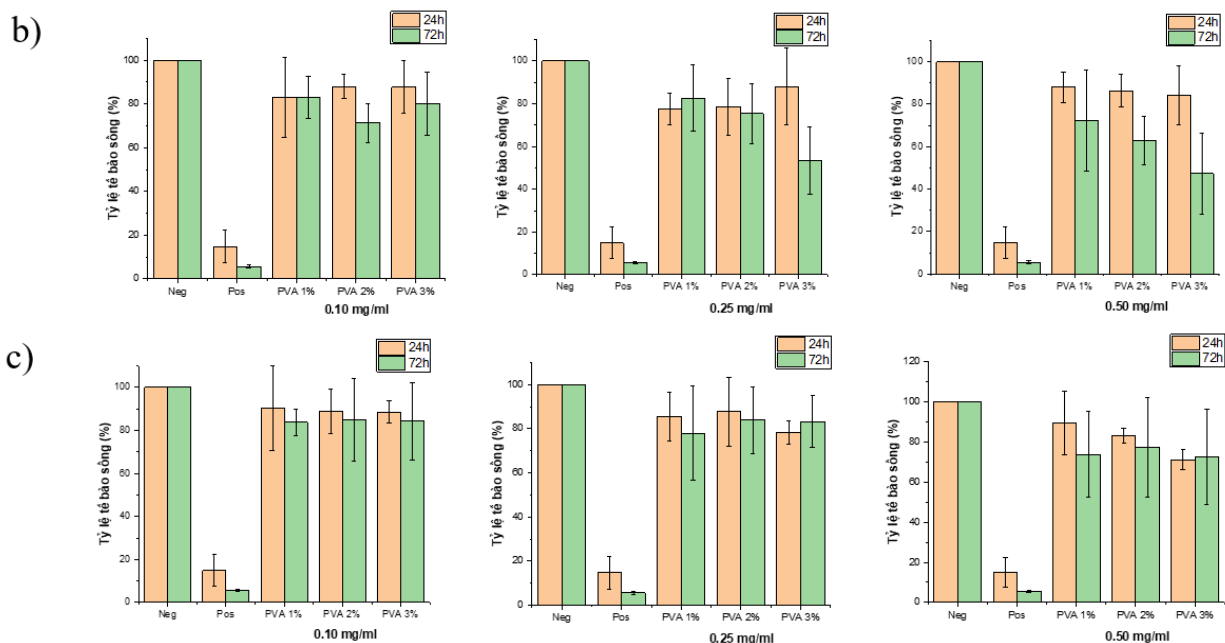
Hình 6 trình bày quá trình giải phóng CHL từ các hệ tiểu phân nano PLGA được bào chế theo 03 phương pháp: kết tủa (Hình 6a), nhũ hóa một lần (Hình 6b), và nhũ hóa hai lần (Hình 6c), trong hai môi trường PBS pH = 7,4 và pH = 5,4, với 03 nồng độ PVA khác nhau. Tất cả các hệ đều thể hiện mô hình giải phóng hai pha đặc trưng: giai đoạn giải phóng nhanh ban đầu trong 8 giờ đầu, tiếp theo là giai đoạn giải phóng kéo dài. Các mẫu có nồng độ PVA thấp (1 %) cho tỷ lệ giải phóng cao hơn. So sánh giữa các phương pháp, hệ kết tủa và nhũ hóa một lần cho tỷ lệ giải phóng thuốc cao hơn, đặc biệt ở giai đoạn đầu, trong khi hệ nhũ hóa hai lần cho tỷ lệ giải phóng chậm và ổn định hơn. Ngoài ra, trong cả 03 phương pháp, môi trường PBS pH = 5,4 luôn cho tỷ lệ giải phóng cao hơn so với môi trường PBS pH = 7,4.

Thử nghiệm cho thấy phương pháp bào chế và nồng độ PVA ảnh hưởng đáng kể đến động học giải phóng thuốc từ hệ tiểu phân PLGA. Tỷ lệ giải phóng cao ở mẫu có

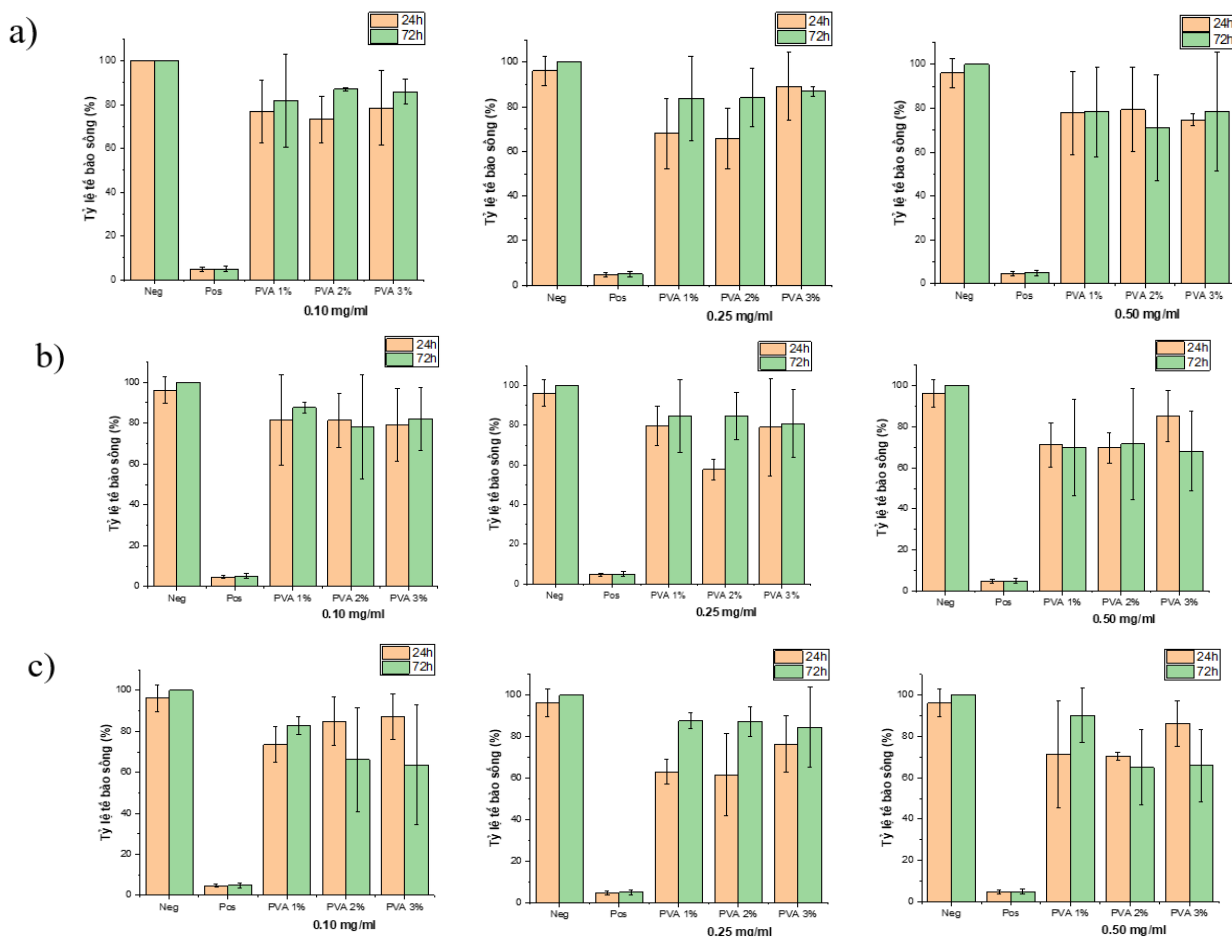
nồng độ PVA thấp (1 %), được lý giải là do lớp vỏ polymer mỏng, giúp thuốc khuếch tán dễ hơn. Ngược lại, nồng độ PVA cao hơn tạo lớp bao dày hơn, làm giảm tốc độ giải phóng. Sự khác biệt giữa các phương pháp bào chế phản ánh cơ chế giữ thuốc đặc trưng của từng hệ. Phương pháp nhũ hóa hai lần cho giải phóng chậm hơn nhờ cấu trúc W/O/W giúp bảo vệ được chất tốt hơn. Trong khi đó, hệ kết tủa và nhũ hóa một lần có cấu trúc đơn giản hơn, dẫn đến giải phóng nhanh, đặc biệt ở giai đoạn đầu. Môi trường pH cũng là yếu tố quan trọng: môi trường acid nhẹ (pH = 5,4) thúc đẩy sự phân hủy của PLGA, làm tăng tốc độ giải phóng. Điều này phù hợp với mục tiêu ứng dụng trong điều trị ung thư, nơi môi trường mô bệnh lý thường có pH thấp hơn mô khỏe mạnh. Tổng thể, việc điều chỉnh phương pháp bào chế và nồng độ PVA cho phép định hướng mục tiêu ứng dụng: giải phóng nhanh cho điều trị cấp tính hoặc giải phóng kéo dài để kiểm soát được động học lâu dài.

3.4 Tính chất sinh học hạt nano





Hình 7 Độc tính tế bào HepG2 được khảo sát trên các mẫu lần lượt ở 3 nồng độ hạt nano là 0,10 mg/mL, 0,25 mg/mL và 0,50 mg/mL ở 3 phương pháp bào chế là kết tủa a), nhũ hóa 1 lần b) và nhũ hóa 2 lần c)



Hình 8 Độc tính tế bào MCF được khảo sát trên các mẫu lần lượt ở 3 nồng độ hạt nano là 0,10 mg/mL, 0,25 mg/mL và 0,50 mg/mL ở 3 phương pháp bào chế là kết tủa (a), nhũ hóa 1 lần (b) và nhũ hóa 2 lần (c)

Độc tính tế bào của các hệ tiểu phân nano PLGA chứa CHL được đánh giá bằng phương pháp MTT trên hai dòng tế bào ung thư HepG2 và MCF-7, tại ba nồng độ tiểu phân: 0,10 mg/mL, 0,25 mg/mL và 0,50 mg/mL. Các mẫu thử được bào chế theo ba phương pháp: kết tủa (a), nhũ hóa một lần (b) và nhũ hóa hai lần (c), với mỗi phương pháp sử dụng ba nồng độ chất ổn định PVA. Kết quả cho thấy tỷ lệ sống sót của tế bào giảm dần theo sự gia tăng nồng độ hạt nano ở cả hai dòng tế bào. Các mẫu chứa PVA 3 % thường cho hiệu quả gây độc tế bào cao hơn so với các mẫu sử dụng PVA (1 và 2) %.

Các kết quả trên chứng minh rằng hiệu quả gây độc tế bào của hệ nano PLGA/CHL phụ thuộc vào liều lượng hạt và nồng độ chất ổn định PVA. Nồng độ PVA cao (3 %) có thể giúp phân tán tiểu phân tốt hơn, từ đó tăng khả năng tiếp xúc và giải phóng thuốc tại môi trường tế bào, góp phần nâng cao độc tính tế bào. Tuy nhiên, nhìn chung, mức độ gây độc của các hệ tiểu phân nano vẫn còn hạn chế, cho thấy cần có chiến lược cải tiến để tăng hiệu quả điều trị. Một trong những hướng tiếp cận tiềm năng là gắn các phối tử hướng đích nhằm giúp hệ nano định vị chính xác vào tế bào ung thư, từ đó tăng hấp thu nội bào và cải thiện hiệu quả sinh học. So sánh với các nghiên cứu khác, hệ mang thuốc CHL có được gắn phối tử đặc hiệu như anti-CD20 hay giá mang siêu thuận từ IONPs tập trung hạt vào khối u hiệu quả, cho thấy tiềm năng rõ rệt của việc tích hợp phối tử vào hệ dẫn thuốc [15]. Điều này mở ra cơ hội phát triển các hệ PLGA/CHL hướng đích trong

tương lai nhằm nâng cao khả năng điều trị ung thư một cách chọn lọc và hiệu quả hơn.

4 Kết luận

Nghiên cứu này đã chứng minh rằng phương pháp bào chế và nồng độ chất ổn định PVA ảnh hưởng đáng kể đến đặc tính vật lý, hiệu suất bao gói và khả năng giải phóng CHL từ hệ tiểu phân nano PLGA. Cụ thể, khi sử dụng PVA 2 %, phương pháp nhũ hóa một lần tạo ra tiểu phân có kích thước nhỏ nhất (155 nm), so với (160-170) nm ở các phương pháp khác, nhưng hiệu suất mang thuốc lại thấp hơn (< 6 %). Ngược lại, phương pháp kết tủa đạt hiệu suất bao gói cao nhất (khoảng 12 %), dù kích thước hạt lớn hơn. Đáng chú ý, phương pháp nhũ hóa hai lần cho thấy khả năng kiểm soát giải phóng thuốc tốt hơn theo thời gian, đặc biệt trong môi trường pH acid. Tuy nhiên, cả ba phương pháp đều cho kết quả độc tính tế bào *in vitro* còn hạn chế trên dòng tế bào ung thư HepG2 và MCF-7, cho thấy hiệu quả ứng dụng hiện tại của hệ PLGA-CHL còn chưa cao. Do đó, hướng phát triển kết hợp PLGA với các polymer tự nhiên hoặc gắn thêm phối tử hướng đích có thể là chiến lược tiềm năng nhằm nâng cao tính sinh học và hiệu quả điều trị của hệ dẫn thuốc nano này trong tương lai.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ – Trường Đại học Nguyễn Tất Thành trong khuôn khổ đề tài mã số 2024.01.137/HĐ-KHCN

Tài liệu tham khảo

1. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778-789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
2. Zefirov, N. A., Korotkova, P. D., Shevtsova, E. F., Shevtsov, P. N., Mamaeva, A. V., Milaeva, E. R., & Zefirova, O. N. (2022). Role of structural components of the 2-methoxyestradiol-chlorambucil conjugate in microtubule stabilization. *Russian Chemical Bulletin*, 71(11), 2519-2524. <https://doi.org/10.1007/s11172-022-3682-0>
3. Ahmed, S., Rehman, S. U., & Tabish, M. (2022). Cancer nanomedicine: A step towards improving the drug delivery and enhanced efficacy of chemotherapeutic drugs. *OpenNano*, 7, 100051. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2022.100051>
4. Bhatia, S. N., Chen, X., Dobrovolskaia, M. A., & Lammers, T. (2022). Cancer nanomedicine. *Nature Reviews Cancer*, 22(10), 550-556. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00496-9>
5. Rocha, C. V., Gonçalves, V., da Silva, M. C., Bañobre-López, M., & Gallo, J. (2022). PLGA-based composites for various biomedical applications. *International journal of molecular sciences*, 23(4), 2034. <https://doi.org/10.3390/ijms23042034>



6. Martínez-Muñoz, O. I., & Ospina-Giraldo, L. F. (2021). Nanoprecipitation: Applications for Entrapping Active Molecules. *Nano-and Microencapsulation: Techniques and Applications*, 101. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93338>
7. Deliormanlı, A. M., & Yenice, A. C. (2021). Preparation of hollow PCL microspheres by o/w single emulsion-solvent evaporation method in the presence of graphene nanopowders. *Express Polymer Letters*, 15(7). <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2021.54>
8. Lee, Y., Lee, D., Park, E., Jang, S. Y., Cheon, S. Y., Han, S., & Koo, H. (2021). Rhamnolipid-coated W/O/W double emulsion nanoparticles for efficient delivery of doxorubicin/erlotinib and combination chemotherapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 19, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01160-4>
9. Darwish, M. S., Al-Harbi, L. M., & Bakry, A. (2022). Synthesis of magnetite nanoparticles coated with polyvinyl alcohol for hyperthermia application. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 147(21), 11921-11930. <https://doi.org/10.1007/s10973-022-11393-6>
10. Dehdari, B., Parsaei, R., Riazzi, M., Rezaei, N., & Zendehboudi, S. (2020). New insight into foam stability enhancement mechanism, using polyvinyl alcohol (PVA) and nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids*, 307, 112755. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112755>
11. Xu, M., Qi, Y., Liu, G., Song, Y., Jiang, X., & Du, B. (2023). Size-dependent in vivo transport of nanoparticles: implications for delivery, targeting, and clearance. *ACS nano*, 17(21), 20825-20849. <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c05853>
12. Németh, Z., Csóka, I., Semnani Jazani, R., Sipos, B., Haspel, H., Kozma, G., ... & Dobó, D. G. (2022). Quality by design-driven zeta potential optimisation study of liposomes with charge imparting membrane additives. *Pharmaceutics*, 14(9), 1798. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091798>
13. Lê Thị Vân Anh & Lê Thị Thùy Dương. (2023). Nghiên cứu tổng hợp và đánh giá một số đặc điểm lý sinh của hệ Nano-polymer PLGA-Honokiol nhằm định hướng trong điều trị ung thư. *Học viện Khoa học và Công nghệ*.
14. Pham, T. N. H., Dang-Luong, P. T., Nguyen, H. P., Le-Tuan, L., Cao, X. T., Nguyen, T. D., ... & Vu Quang, H. (2024). Therapeutic effect of F127-folate@ PLGA/CHL/IR780 nanoparticles on folate receptor-expressing cancer cells. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 15(1), 954-964. <https://doi.org/10.3762/bjnano.15.78>
15. Hussein-Al-Ali, S. H., Hussein, M. Z., Bullo, S., & Arulselvan, P. (2021). Chlorambucil-iron oxide nanoparticles as a drug delivery system for leukemia cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, 6205-6216. <https://doi.org/10.2147/IJN.S312752>

Synthesis and Characterization of PLGA Nanoparticles Loaded with Chlorambucil Using Three Formulation Methods

Pham Thi Ngoc Han*, Vu Quang Hieu – *ptnhan@ntt.edu.vn

NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University, Ho Chi Minh City, Viet Nam

Abstract In the context of the growing demand for the development of nanocarrier systems in chemotherapy, especially for poor water-soluble drugs like chlorambucil (CHL), current research has focused on single preparation methods and lacked a comprehensive comparison among different techniques. This study aims to optimize and compare the effectiveness of three formulation methods for CHL-loaded PLGA nanoparticles: solvent precipitation, single emulsion, and double emulsion, using three concentrations of PVA stabilizer (1%, 2%, and 3%). The resulting nanoparticle systems were thoroughly evaluated in terms of particle size, zeta potential, drug encapsulation efficiency, drug release kinetics, and *in vitro* cytotoxicity against HepG2 and MCF-7 cancer cell lines. The results demonstrated that the single emulsion method produced small and uniform particles of (155-170) nm, while the solvent precipitation method yielded the highest drug encapsulation efficiency of (12-20)%. Meanwhile, the double emulsion method exhibited better control over drug release in acidic environments. Although the cytotoxicity remained limited, the findings highlight the potential applicability of the PLGA/CHL system.

Keyword PLGA nanoparticles, Chlorambucil, Nanoprecipitation method, Emulsification, Drug delivery

