

NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN HỆ NANO PLGA TƯƠNG THÍCH SINH HỌC CHỨA QUERCETIN VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG CHỐNG STRESS OXY HÓA

DEVELOPMENT QUERCETIN-LOADED PLGA BIOCOMPATIBLE NANOPARTICLES AND EVALUATION OF ANTI-OXIDATIVE STRESS

Nguyễn Quốc Châu Thanh^{1,*}, Võ Thành Khang²,
Đỗ Lê Nhân², Tạ Thanh Hồng¹, Trần Thị Thanh Khương³

DOI: <http://doi.org/10.57001/huih5804.2025.173>

TÓM TẮT

Nghiên cứu đã bào chế thành công hệ nano PLGA/QE chứa Quercetin (QE), góp phần cải thiện độ tan và độ sinh khả dụng của hoạt chất. Hệ nano có kích thước trung bình khoảng 246nm, kiểm soát khả năng phóng thích QE theo thời gian ở các môi trường khác nhau, đạt 66,72% tại pH 7,4 và 97,43% tại pH 5,8 sau 72 giờ. Ngoài ra, PLGA/QE vẫn bảo toàn hoạt tính kháng oxy hóa của hoạt chất theo thời gian thông qua khả năng bắt gốc tự do DPPH. Đáng chú ý, PLGA/QE cải thiện hoạt động chống stress oxy hóa bởi H₂O₂ trên mô hình đại thực bào RAW264.7. Các thử nghiệm tán huyết và kích ứng trên màng trứng gà (HET-CAM) đã chứng minh độ an toàn và khả năng tương thích sinh học cao. Do đó, hệ nano PLGA/QE là một sản phẩm ứng dụng tiềm năng trong việc phân phối QE có kiểm soát, góp phần hỗ trợ điều trị các bệnh lý liên quan đến tim mạch, đặc biệt là tăng huyết áp.

Từ khóa: Kháng oxy hóa; stress oxy hóa; Quercetin; hạt nano; PLGA.

ABSTRACT

PLGA/QE encapsulated Quercetin (QE) with an average size of 246nm was successfully prepared to enhance the solubility and bioavailability. PLGA/QE exhibited controlled QE release, reaching 66.72% at pH 7.4 and 97.43% at pH 5.8 after 72 hours. Additionally, PLGA-QE maintained the antioxidant activity of its active ingredients over time by effectively scavenging DPPH free radicals. Notably, PLGA/QE enhanced its activity against H₂O₂-induced oxidative stress in RAW264.7 macrophages. Furthermore, hemolysis and HET-CAM analysis confirmed its high safety and biocompatibility. Thus, PLGA/QE nanoparticles promise to be a potential product for controlled quercetin delivery, contributing to the treatment of cardiovascular diseases, especially hypertension.

Keywords: Antioxidant; antioxidative stress; Quercetin; nanoparticles; PLGA.

¹Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

²PTN. Hóa dược và Hóa dược tiên tiến, Tòa nhà Công nghệ cao, Trường Đại học Cần Thơ

³PTN. Tế bào gốc, Viện Công nghệ sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

*Email: nqcthanh@ctu.edu.vn

Ngày nhận bài: 25/02/2025

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 21/5/2025

Ngày chấp nhận đăng: 28/5/2025

1. GIỚI THIỆU

Sự gia tăng tỷ lệ mắc các bệnh lý liên quan đến stress oxy hóa, như bệnh tim mạch, đái tháo đường và rối loạn thoái hóa thần kinh, cho thấy tính cấp thiết trong nghiên

cứu và phát triển các phương pháp điều trị mới liên quan đến kháng oxy hóa. Những bệnh này thường đi kèm với sự tích lũy các gốc tự do, gây tổn thương tế bào và mô, dẫn đến nhiều biến chứng nghiêm trọng cho sức khỏe [1].

Quercetin (QE), một flavonol tự nhiên có nhiều trong thực vật, với khả năng trung hòa các gốc tự do mạnh mẽ và bảo vệ tế bào khỏi tổn thương. QE còn thể hiện tiềm năng ứng dụng trong phòng ngừa một số loại ung thư và bảo vệ sức khỏe tim mạch [2]. Tuy nhiên, việc ứng dụng QE trong lĩnh vực dược lâm sàng còn gặp phải những thách thức đáng kể liên quan đến độ hòa tan trong nước thấp (0,01mg/mL ở 25°C), gây hạn chế khả năng hấp thu và sinh khả dụng đường uống [3]. Các yếu tố tác động bên ngoài như nồng độ oxy hòa tan, độ pH của môi trường, nhiệt độ và sự hiện diện của các ion kim loại cũng ảnh hưởng tiêu cực đến độ ổn định của phân tử QE, gây ra biến đổi cấu trúc không mong muốn [4]. Do đó, việc cải thiện độ hòa tan trong nước, độ bền và sinh khả dụng là một trong những hướng nghiên cứu nhằm khai thác tối đa tiềm năng trị liệu của hợp chất này.

Trong những năm gần đây, các hạt nano poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) đã thu hút sự chú ý trong lĩnh vực phân phối thuốc nhờ các đặc tính ưu việt. PLGA có khả năng tương thích sinh học và phân hủy cao, đã được FDA chấp nhận và có khả năng kiểm soát linh hoạt quá trình giải phóng thuốc, duy trì nồng độ thuốc tối ưu và giảm tác dụng phụ [5]. Hệ nano PLGA bảo vệ thuốc khỏi sự phân hủy bởi enzyme và yếu tố sinh học, kéo dài thời gian hoạt động và nâng cao hiệu quả điều trị. Sau khi hoàn thành nhiệm vụ, PLGA phân hủy thành lactic acid và glycolic acid, được cơ thể chuyển hóa và đào thải tự nhiên, đảm bảo tính an toàn [6]. Những đặc tính ưu việt của hạt nano PLGA đã mở ra triển vọng cải thiện hiệu quả điều trị cũng như khắc phục các nhược điểm của nhiều dược chất có nguồn gốc tự nhiên.

Nghiên cứu này tập trung phát triển hệ thống dẫn truyền dược chất PLGA mang QE để khắc phục các hạn chế của hợp chất này. Việc bao bọc QE trong hạt nano PLGA không chỉ nâng cao khả năng hòa tan mà còn cho phép giải phóng hoạt chất này theo cơ chế kiểm soát, duy trì nồng độ thuốc ổn định và giảm tần suất sử dụng. Để đánh giá hiệu quả chế phẩm, các đặc tính như khả năng kháng stress oxy hóa, khả năng giải phóng dược chất và tính tương thích sinh học đã được khảo sát qua các thử nghiệm *in vitro*, bao gồm khả năng trung hòa gốc tự do DPPH, giảm stress oxy hóa trên đại thực bào RAW264.7 do H₂O₂ gây ra, khả năng tán huyết và khả năng gây kích ứng trên màng Chorioallantoic trứng gà (HET-CAM). Kết quả khẳng định tiềm năng của hệ thống dẫn truyền dược chất nano PLGA trong việc nâng cao hiệu quả điều trị và giảm thiểu nhược điểm của QE, mở ra hướng nghiên cứu mới cho các liệu pháp điều trị các bệnh liên quan đến stress oxy hóa.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phát triển hệ nano PLGA chứa QE

Hệ nano PLGA chứa hoạt chất QE (Sigma-Aldrich, Mỹ) được bào chế theo phương pháp nhũ hóa bay hơi dung môi với một số sửa đổi [7]. Đầu tiên, dung dịch Polyvinyl alcohol (PVA, MW 31.000 - 50.000g/mol) (Sigma-Aldrich, Mỹ) (0,3% và 3%), PLGA 50:50 (MW 7.000 - 17.000g/mol) (Sigma-Aldrich, Mỹ) và QE với các tỉ lệ QE:PLGA lần lượt là 1:1, 1:2 và 1:4 được chuẩn bị sẵn. Phương pháp nhũ hóa và bốc hơi dung môi được áp dụng để tạo ra hệ nano rỗng (PNPs-Blank) không chứa QE dưới dạng dầu/nước. Quá trình này bao gồm các bước đồng hóa tại 15.000 vòng/phút (Herculan TT - 30K, Anh), hỗ trợ bởi hệ bơm nhu động (NC-NE17, Nanocast. JSC, Việt Nam với tốc độ 500mL/phút và siêu âm với tần số 37kHz, 100W (Elmasonic S100H, Elma, Đức) trong điều kiện từ 0 - 4°C. Đối với việc bào chế hệ nano PLGA chứa QE (PLGA/QE), quy trình tương tự được thực hiện, bổ sung QE trong Dimethylformamide và phối trộn với dung dịch PLGA trong Dichloromethane trước khi tiến hành nhũ hóa. Cuối cùng, ly tâm với tốc độ 14.000 vòng/phút (Mikro 220, Hettich, Đức) trong 10 phút (điều kiện 4 - 5°C) thu được hệ nano. Rửa hạt nano nhiều lần bằng nước cất, dịch nổi sau ly tâm được thu hồi để đánh giá hiệu suất tải/ nạp hoạt chất vào hệ nano.

2.2. Đánh giá các đặc tính lý hóa của hệ nano

Để đánh giá các đặc tính của PNPs-Blank và PLGA/QE, các phương pháp phân tích hiện đại được áp dụng. Kích thước hạt trung bình của các mẫu được xác định bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động (DLS) với sự hỗ trợ của máy Microtrac S3500. Đồng thời, phân tích phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT - IR) được thực hiện để nghiên cứu các nhóm chức và tương tác trong các mẫu PNPs-Blank và PLGA/QE, sử dụng máy FT/IR - 4600 JASCO với kỹ thuật nén viên KBr. Điểm đẳng điện (pH_{pzc}) của PLGA và QE được xác định bằng dung dịch KCl 0,1M, điều chỉnh pH từ 2 đến 12 bằng NaOH 0,1M và HCl 0,1M. Sau khi lắc trong 48 giờ, ở 25°C, pH cuối cùng được đo để tính toán sự thay đổi pH (Δ pH), pH_{pzc} được xác định. Hiệu suất tải (Encapsulation Efficiency - EE) và hiệu suất nạp (Drug Loading - DL) được đánh giá thông qua việc xác định lượng QE tự do có trong dịch nổi. Đo mật độ quang của dịch nổi ở bước sóng hấp thu cực đại của QE là 369 nm, tính toán dựa vào phương trình đường chuẩn: $y = 0,0528x + 0,0234$ ($R^2 = 0,9983$). Hiệu suất tải/nạp được tính theo công thức [8]:

$$EE\% = \frac{\text{Hoạt chất ban đầu} - \text{Hoạt chất tự do}}{\text{Hoạt chất ban đầu}} \times 100\% \quad (1)$$

$$DL\% = \frac{\text{Hoạt chất ban đầu} - \text{Hoạt chất tự do}}{\text{Lượng polymer} + \text{Hoạt chất bắt giữ}} \times 100\% \quad (2)$$

2.3. Khả năng giải phóng hoạt chất

Khả năng giải phóng chất của hệ PLGA/QE được khảo sát trong dung dịch PBS pH 7,4 và pH 5,8, chứa Tween-80 0,5% (v/v), tại 37°C trong vòng 72 giờ. QE giải phóng được xác định bằng cách đo độ hấp thụ quang tại 369 nm tại các mốc thời gian khác nhau, phần trăm giải phóng tích lũy được tính toán. Ngoài ra, hoạt động trung hòa gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, Mỹ) của PLGA/QE cũng được thực hiện trong môi trường pH 7,4 trong 72 giờ, với nồng độ QE tương đương IC₅₀ của mẫu QE tự do [9].

2.4. Khả năng kháng stress oxy hóa trên mô hình đại thực bào RAW264.7

Đại thực bào RAW264.7 (TIB71, ATCC, Mỹ) được nuôi cấy trong môi trường Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Mỹ), bổ sung 10% huyết thanh bò phôi (FBS) (Hyclone, Mỹ), 1% Penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich, Mỹ) và 1% Glutamine (Sigma-Aldrich, Mỹ). Các tế bào được nuôi trong độ ẩm 95%, nhiệt độ 37°C và 5% CO₂. Sau 24 giờ nuôi cấy với mật độ 2×10⁵ tế bào/giếng, trong môi trường có cao chiết, 100μL dung dịch H₂O₂ được bổ sung vào các tế bào trong 4 giờ. Sau thời gian này, tế bào được xử lý với 100μL dung dịch Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies Inc., Mỹ) trong 2 giờ. Khả năng sống sót của tế bào được đánh giá bằng cách đo độ hấp thụ tại bước sóng 450nm bằng máy đọc quang phổ Epoch (Biotek Instruments Inc., Mỹ) [10].

2.5. Thử nghiệm khả năng tán huyết

Hoạt động tán huyết của PLGA/QE được khảo sát trên tế bào hồng cầu dê lấy tại PTN Tế bào gốc (Tòa nhà Công nghệ cao, Trường Đại học Cần Thơ). Hồng cầu được thu thập bằng ly tâm máu dê ở 4000 vòng/phút trong 10 phút, rửa bằng PBS và pha loãng đến nồng độ 1% hematocrit. Mẫu PLGA/QE được chuẩn bị ở các nồng độ khác nhau, cùng với Triton X-100 1% (BioBasic, Canada) (đối chứng dương) và PBS (đối chứng âm). Các mẫu được lắc nhẹ với 500μL dung dịch tế bào hồng cầu ở 37°C trong 4 giờ, sau đó ly tâm ở 12000 vòng/phút trong 15 phút. Phần dịch nổi được đo độ hấp thụ bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 550nm [11].

2.6. Thử nghiệm kích ứng trên mô hình HET-CAM

Hòa tan mẫu thử trong dung dịch Alginate (Dmreagent, Trung Quốc) 2,5%, lấy 10μL dung dịch mẫu nhỏ lên tấm nhôm và sấy khô. Khối lượng mẫu là 50μg, đối chứng âm là NaCl (Xilong, Trung Quốc) 0,9%, đối

chứng dương là SDS (Xilong, Trung Quốc) 1% [12]. Quy trình thử nghiệm kích ứng trên mô hình HET-CAM thực hiện như sau: Trứng gà thụ tinh sau 6 ngày ủ ấm ở 36,5°C, độ ẩm 80%, được mở lỗ trên vỏ trứng, hút 10 - 15mL albumin, rạch đường ngang ở 2/3 chiều cao trứng, loại bỏ phần vỏ phía trên và nuôi tiếp 72 giờ. Mẫu thử (1 mẫu/trứng) được đặt lên màng mao mạch gà (CAM) phát triển. Mỗi nhóm thử nghiệm sử dụng năm trứng, lặp lại ba lần. Phản ứng xuất huyết, tan mạch và đông máu được quan sát trong 5 phút, đánh giá bằng thang điểm kích ứng (Irritation Severity) từ 0 (không phản ứng) đến 3 (phản ứng nghiêm trọng). Điểm kích ứng (Irritation Score-IS) được tính dựa trên thời gian (giây) từ khi đặt mẫu đến khi xuất hiện hiện tượng kích ứng theo công thức [13]:

$$IS = \frac{301 - \text{thời gian xuất hiện xuất huyết}}{300} \cdot 5 + \frac{301 - \text{thời gian xuất hiện tan mạch}}{300} \cdot 7 + \frac{301 - \text{thời gian xuất hiện đông máu}}{300} \cdot 9 \quad (3)$$

2.7. Phân tích thống kê dữ liệu

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại ba lần. Phân tích phương sai một chiều (ANOVA) trong phần mềm Prism 8.0.1 (GraphPad Software Inc., Mỹ) được sử dụng để xử lý thống kê.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Bào chế hệ nano PLGA chứa QE

Hiệu suất tải là tỷ lệ của lượng hoạt chất thực tế được nạp vào hạt so với tổng lượng hoạt chất ban đầu, trong khi hiệu suất nạp đo lường tỷ lệ giữa lượng hoạt chất nạp vào hạt và tổng lượng hoạt chất có thể nạp vào hệ thống [8]. Hiệu suất tải và nạp của PLGA/QE ở các nghiệm thức khảo sát dao động từ 47,09% đến 66,10% và từ 14,18% đến 32,02% (bảng 1). Kết quả này tốt hơn so với nghiên cứu bào chế hạt nano PLGA chứa ciprofloxacin, với hiệu suất tải và nạp chỉ đạt 63,26% và 7,75% [14]. Khi khối lượng hoạt chất trong pha hữu cơ tăng, hiệu suất tải tăng, trong khi hiệu suất nạp lại giảm. Sự thay đổi này có thể giải thích do khối lượng QE tăng, lượng phân tử QE tương tác với chuỗi polymer PLGA tăng, từ đó nâng cao hiệu suất tải [15]. Tuy nhiên, các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng khi lượng hoạt chất vượt quá một ngưỡng nhất định, tính ổn định của hệ sẽ bị suy giảm, PLGA sẽ đạt đến mức độ bão hòa trong ma trận polymer, dẫn đến giảm hiệu suất nạp [16].

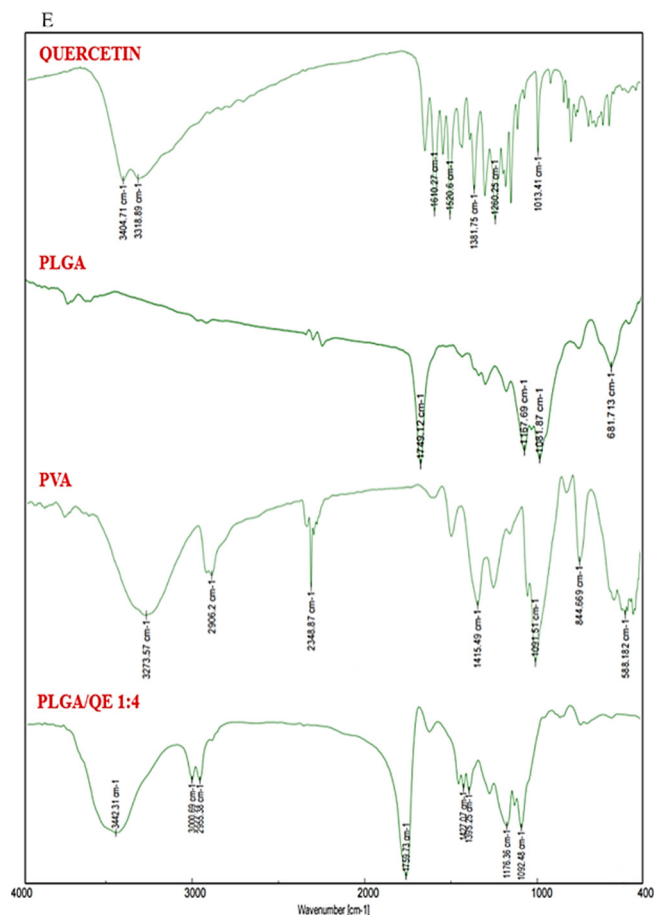
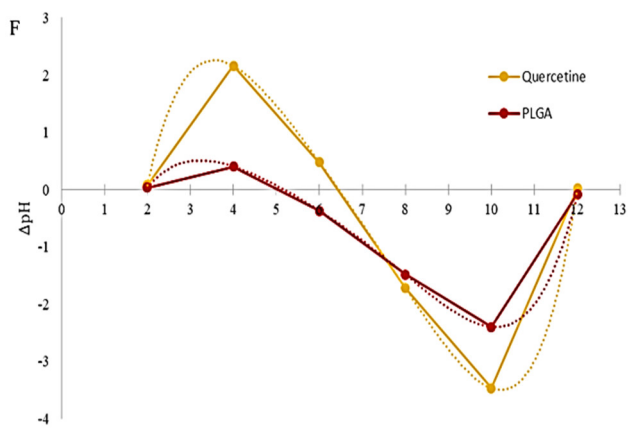
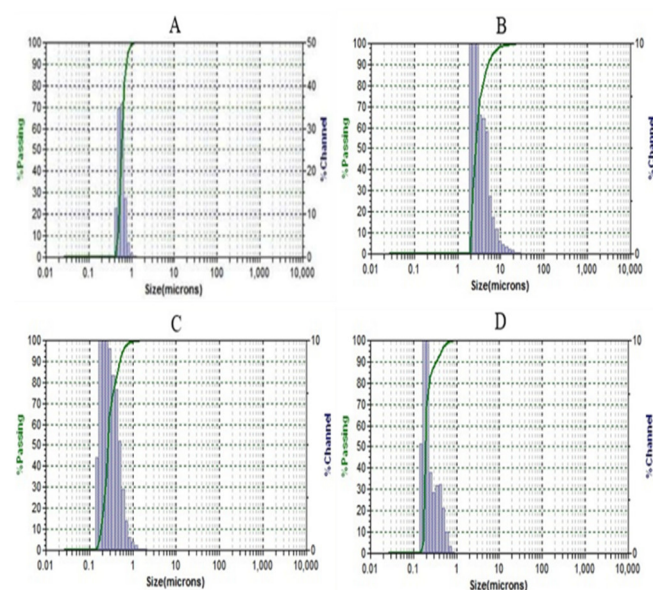
Kích thước hạt là yếu tố then chốt ảnh hưởng đến khả năng ứng dụng của hệ nano, tác động trực tiếp đến diện tích bề mặt, khả năng tương tác với tế bào và hiệu quả vận chuyển, giải phóng hoạt chất [17]. Kết quả xác định

kích thước hạt trung bình của hệ nano trong các tỉ lệ khảo sát dao động từ 246 đến 3568 nm. Kích thước của PLGA/QE tỉ lệ 1:4 phù hợp để phát triển các dạng thuốc với khả năng hấp thu đa dạng, đặc biệt là có tiềm năng cao trong việc dẫn truyền hoạt chất điều trị qua đường uống hoặc tiêm truyền. So với một nghiên cứu khác về hệ nano PLGA chứa 17-DMAG kích thước hạt đều lớn hơn 300nm [18].

Bảng 1. Hiệu suất nạp (EE), hiệu suất tải (DL) và kích thước trung bình PLGA/QE

Tỉ lệ PLGA/QE	Khối lượng QE (mg)	EE (%)	DL (%)	Kích thước hạt (nm)
1:1	20	47,09 ± 0,38 ^a	32,02 ± 0,18 ^a	3568 ^a
1:2	10	52,06 ± 0,26 ^b	20,65 ± 0,08 ^b	330 ^b
1:4	5	66,10 ± 0,17 ^c	14,18 ± 0,03 ^c	246 ^c
PNPs—Blank	0	-	-	656 ^d

Ghi chú: chữ cái khác nhau trong cùng cột thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



Hình 1. Biểu đồ phân bố kích thước PNPs—Blank (A) và PLGA/QE tỉ lệ 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D). Phổ FT-IR của QE, PLGA, PVA và PLGA/QE tỉ lệ 1:4 (E). Đồ thị điểm đẳng điện của PLGA và QE (F)

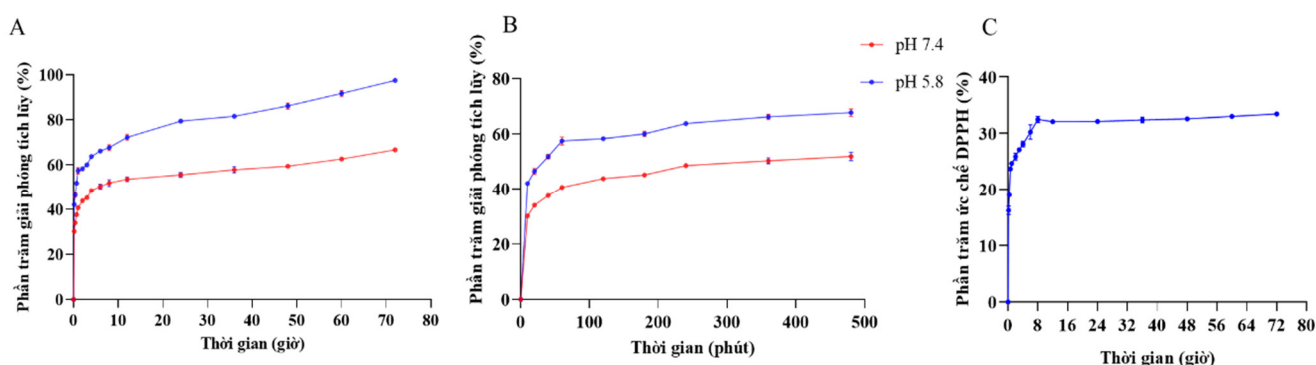
Phổ FT-IR của hệ nano PLGA/QE tỉ lệ 1:4 thể hiện đầy đủ các peak đặc trưng của QE, PLGA và PVA (hình 1-E). Các peak ở 1759cm^{-1} , 1176cm^{-1} và 1093cm^{-1} của PLGA vẫn xuất hiện. Peak dao động nhóm —OH của QE (3404cm^{-1} về 3442cm^{-1}) bị dịch nhẹ và có sự tăng cường bề mặt hấp thụ năng lượng, cho thấy sự tương tác giữa QE và PLGA thông qua liên kết hydro [19]. Kết quả này cho thấy QE đã được nạp thành công vào hệ nano mà vẫn giữ nguyên cấu trúc đặc trưng của các thành phần.

Điểm đẳng điện (pH_{pzc}) của vật liệu hấp phụ được xác định để hiểu rõ ảnh hưởng của pH đối với hiệu quả hấp phụ. Khi pH dung dịch thấp hơn pH_{pzc} , các nhóm chức trên bề mặt vật liệu bị proton hóa, làm bề mặt mang điện tích dương, thuận lợi cho PLGA hấp phụ các ion âm và ngược lại [20]. Kết quả xác định pH_{pzc} của PLGA và QE lần lượt là 5,04 và 6,58 (hình 1-F). PLGA hấp phụ anion khi $\text{pH} < 5,04$ và cation khi $\text{pH} > 5,04$, trong khi QE hấp phụ anion khi $\text{pH} < 6,58$ và cation khi $\text{pH} > 6,58$. Khoảng pH từ 5,04 đến 6,58 là tối ưu cho khả năng hấp phụ của hệ nano. Trong môi trường pH 6,8 - 7,0, do điện thế bề mặt âm của

PLGA và QE, khả năng hình thành liên kết hóa lý bền giảm, làm giảm hiệu quả nạp/tải hoạt chất. Vì vậy, hệ nano PLGA/QE mang điện tích âm, đảm bảo an toàn khi tiếp xúc với máu.

3.2. Ảnh hưởng của pH đến khả năng giải phóng QE của PLGA/QE

Đánh giá khả năng giải phóng hoạt chất là yếu tố quan trọng trong nghiên cứu hệ nano, đặc biệt với các hệ có tiềm năng ứng dụng lâm sàng. Khả năng giải phóng thuốc bền vững và có kiểm soát phản ánh sự thành công trong quá trình bào chế hệ nano [21].



Hình 2. Đồ thị giải phóng QE của PLGA/QE ở môi trường pH 5.8 và pH 7.4 trong cả quá trình khảo sát (A), trong 8 giờ đầu tiên (B) và khả năng trung hòa gốc tự do DPPH (C)

Nghiên cứu khả năng giải phóng của hệ nano trong môi trường pH 7,4 (mô phỏng môi trường máu) và pH 5,8 (mô phỏng môi trường của tế bào hoặc mô bệnh lý) cung cấp thông tin quan trọng để đánh giá tiềm năng ứng dụng và hiệu quả của hệ thống [22]. Quá trình giải phóng QE từ hệ PLGA/QE ở pH 7,4 diễn ra theo các giai đoạn rõ rệt. Ở 10 phút đầu, lượng QE phóng thích mạnh (30,18%) do một phần QE không được bao bọc hoàn toàn trong lõi và bám trên bề mặt PLGA/QE. Từ 10 đến 480 phút (8 giờ), tỷ lệ phóng thích tăng chậm, đạt 51,91% sau 8 giờ (hình 2-B). Từ 8 giờ đến 72 giờ, giải phóng tiếp tục ở tốc độ chậm do sự phân hủy từ từ của lõi nano, đặc trưng cho polymer sinh học (hình 2-A), đạt 66,72% sau 72 giờ khảo sát [23]. Tại pH 5,8, tương tự như tại pH 7,4, nhưng tỷ lệ giải phóng cao hơn đáng kể. Cụ thể, trong 10 phút đầu, lượng phóng thích đạt 42,11%, tại mốc 8 giờ là 67,73%, và đạt 97,43% sau 72 giờ. Sự gia tăng tốc độ giải phóng ở pH thấp là do các liên kết ester trong cấu trúc PLGA dễ bị thủy phân trong môi trường acid, làm phá vỡ cấu trúc nano, từ đó tăng tốc độ giải phóng hoạt chất [24]. Việc giải phóng QE ở hai pH khác nhau cung cấp cái nhìn toàn diện về sự ổn định của hệ nano trong các điều kiện môi trường khác

nhau, cho thấy khả năng ứng dụng cao của hệ nano PLGA/QE.

Gốc tự do DPPH chứa electron chưa ghép đôi, tạo màu đặc trưng. Khi chất kháng oxy hóa có mặt, nó cho electron hoặc nguyên tử hydro để trung hòa gốc tự do, dẫn đến mất màu dung dịch, thể hiện khả năng kháng oxy hóa của mẫu thử [25]. Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH của hệ nano PLGA/QE chia thành ba giai đoạn. Trong 10 phút đầu, hệ nano thể hiện khả năng trung hòa mạnh mẽ ($16,25 \pm 0,74\%$) nhờ QE tự do trên bề mặt và một lượng nhỏ QE trong lõi. Từ 10 đến 480 phút (8 giờ), tốc độ giải

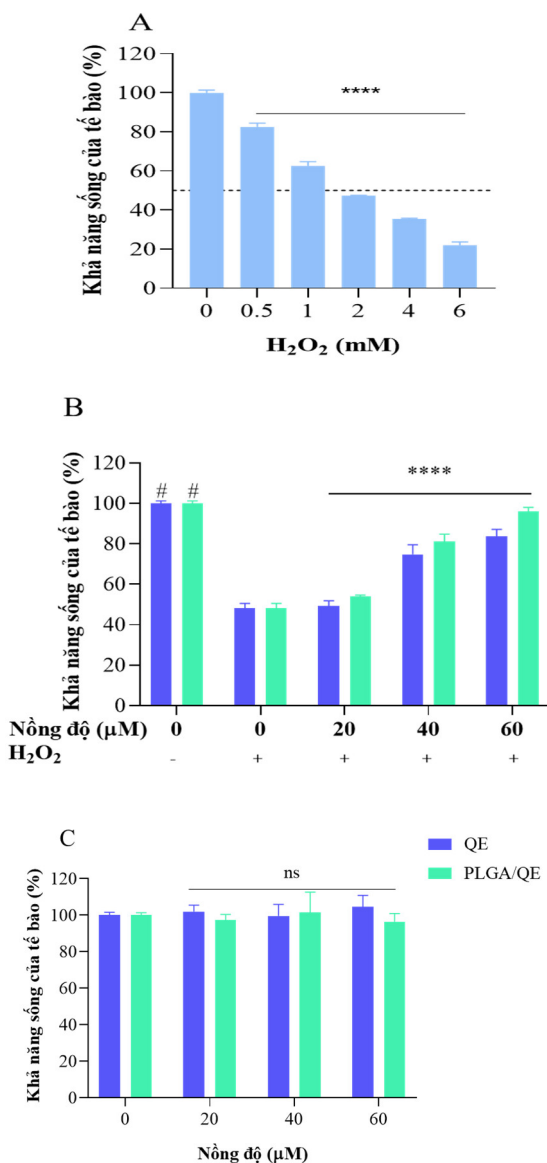
phóng QE tăng, dẫn đến hiệu suất ức chế gốc tự do cao dần. Sau 8 giờ, khả năng trung hòa ổn định ở $33,45 \pm 0,04\%$. Kết quả cho thấy mối tương quan giữa tốc độ giải phóng, khả năng kháng oxy hóa và duy trì hoạt tính sinh học của hệ nano PLGA/QE.

3.3. Khả năng kháng stress oxy hóa trên mô hình đại thực bào RAW264.7

Các tế bào RAW264.7, vốn nhạy cảm với tổn thương do H_2O_2 là mô hình lý tưởng để nghiên cứu các chiến lược điều trị các rối loạn liên quan đến stress oxy hóa [10]. Thử nghiệm khảo sát khả năng gây độc của hydrogen peroxide (H_2O_2) đối với tế bào đại thực bào RAW264.7 cho thấy sự giảm rõ rệt khả năng sống sót của tế bào khi nồng độ H_2O_2 tăng (hình 3-A). Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trước, sau 4 giờ tiếp xúc, giá trị IC_{50} ước tính khoảng 2mM, tương ứng với nồng độ làm giảm 50% khả năng sống sót của tế bào [10].

QE và hệ nano PLGA/QE đã được đánh giá về độc tính trên tế bào đại thực bào RAW264.7 thông qua phương pháp CCK-8 trong vòng 24 giờ. Kết quả cho thấy không có độc tính tế bào đáng kể ở các nồng độ thử nghiệm (hình 3-C). Hiệu quả bảo vệ tế bào của QE và PLGA/QE đối với stress oxy hóa do H_2O_2 gây ra cũng được đánh giá bằng CCK-8 trên tế bào đại thực bào RAW264.7. Kết quả thể hiện trong hình 3-B, tiền xử lý với QE và PLGA/QE ở

các nồng độ 20, 40 và 60 μ M (trong chế phẩm PLGA/QE hàm lượng QE được tính toán tương đương thông qua hiệu suất nạp) đã làm tăng đáng kể khả năng sống sót của tế bào so với nhóm đối chứng điều trị với H₂O₂ gây độc tế bào ở nồng độ 2mM. Đặc biệt, tiền xử lý với PLGA/QE ở nồng độ 60 μ M thể hiện khả năng bảo vệ tế bào vượt trội, giúp tế bào duy trì tỷ lệ sống sót trên 95%, trong khi tỷ lệ sống sót của nhóm sử dụng QE đạt khoảng 85% ở nồng độ tương tự. Điều này chỉ ra rằng khả năng giải phóng kéo dài của PLGA/QE theo thời gian giúp tăng sinh khả dụng của QE đáng kể trong quá trình điều trị.

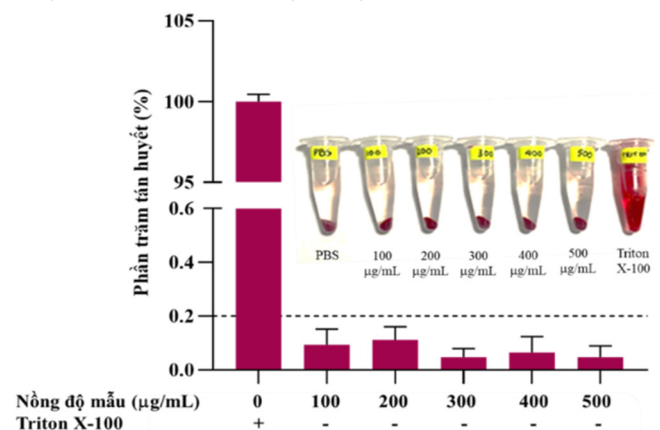


Hình 3. Khả năng sống của tế bào khi xử lý bằng H₂O₂ (A), QE và PLGA/QE có sự hiện diện của H₂O₂ (B), QE và PLGA/QE (C)

3.4. Khả năng tán huyết của chế phẩm

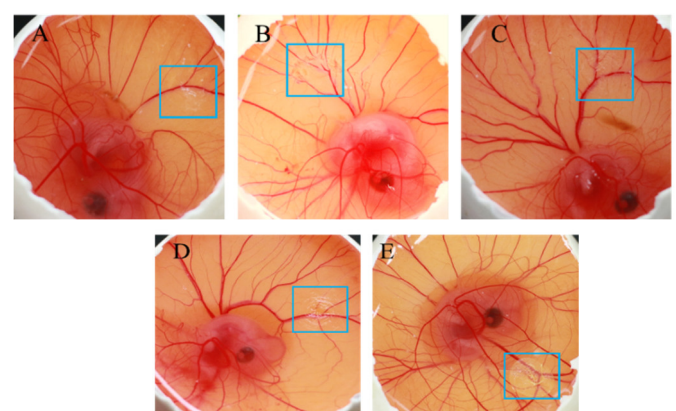
Ly giải hồng cầu (tán huyết) có thể gây ra các biến chứng như thiếu máu, vàng da và các rối loạn bệnh lý

khác. Các hệ thống vận chuyển thuốc dựa trên công nghệ nano cần được thử nghiệm nghiêm ngặt để xác định khả năng tương thích sinh học với các thành phần máu, điều này đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn phát triển thuốc tiền lâm sàng [26]. Kết quả khảo sát với nồng độ dao động từ 100 – 500 μ g/mL của hệ nano PLGA/QE (Hình 4) cho thấy phần trăm tán huyết của hệ nano PLGA/QE ở các nồng độ khảo sát nhỏ hơn 0,2%, gần như không quan sát thấy hiện tượng vỡ hồng cầu ở các mẫu. Kết quả này tương đồng với một nghiên cứu trên hệ nano PLGA chứa QE khác, khi cả chế phẩm có hoặc không có hoạt chất đều không có gây vỡ hồng cầu trong thí nghiệm này [27]. Một số nghiên cứu khác cho rằng khi hồng cầu được xử lý với các nano PLGA mang điện tích âm sẽ không có hiện tượng tan máu, khi hồng cầu tiếp xúc với các hạt nano mang điện tích dương, hiện tượng tán huyết xảy ra rõ rệt [28]. Do đó, hệ nano PLGA/QE mang điện tích âm thể hiện tính tương thích sinh học cao với máu và có thể được sử dụng an toàn cho các ứng dụng tiêm tĩnh mạch.



Hình 4. Đồ thị và hình ảnh mẫu thử nghiệm khả năng tán huyết của PLGA/QE

3.5. Thử nghiệm kích ứng trên mô hình HET-CAM



Hình 5. Hình ảnh thử nghiệm kích ứng trên mô hình HET-CAM của đối chứng âm NaCl 0,9% (A), đối chứng dương SDS (B), mẫu PNPs-Blank (C), mẫu PLGA/QE (D) và QE (E)

Thử nghiệm kích ứng trên HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane) được chuẩn hóa và áp dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp mỹ phẩm và dược phẩm để đánh giá độ an toàn của sản phẩm mà không cần sử dụng động vật thí nghiệm [29]. Kết quả thí nghiệm HET-CAM được thực hiện nhằm đánh giá khả năng gây kích ứng của PLGA/QE. Kết quả trong hình 5 cho thấy, nhóm đối chứng âm (NaCl 0,9%) có điểm kích ứng trung bình là 0,07, không gây phản ứng kích ứng (mức độ kích ứng 0). Nhóm đối chứng dương SDS 1% có điểm kích ứng trung bình là 13,67, được phân loại là nhóm gây phản ứng kích ứng nghiêm trọng (mức độ kích ứng 3), với xuất huyết vi mô, tan mạch và đông máu, mẫu chết sau 30 phút. Đối với nhóm QE, PNPs-Blank và PLGA/QE, điểm kích ứng trung bình đều là 0,07, không có tác động tiêu cực nào trên màng CAM, không có xuất huyết, ly giải hay đông máu, và mẫu vẫn sống sau 24 giờ (mức độ kích ứng 0). Kết quả này tương tự nghiên cứu khác về khả năng kích ứng trên màng HET-CAM, trong khi các mẫu thí nghiệm không gây kích ứng, đối chứng dương SDS 1% có $IS = 12,8$ [13]. Thí nghiệm HET-CAM khẳng định PLGA/QE có tính tương thích sinh học cao, không gây kích ứng trên mô hình thử nghiệm.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu bào chế hệ nano PLGA chứa QE (PLGA/QE) đã thành công trong việc phát triển một hệ thống phân phối thuốc ổn định, hiệu quả và có khả năng giải phóng QE kiểm soát được trong các điều kiện pH khác nhau. Hệ nano đạt hiệu suất tải và nạp lần lượt là 66,10% và 14,18%, với kích thước hạt trung bình 246nm, đáp ứng yêu cầu ứng dụng lâm sàng. Hệ nano PLGA/QE thể hiện khả năng kháng oxy hóa mạnh mẽ, bảo vệ tế bào khỏi stress oxy hóa, giảm tình trạng chết tế bào do H_2O_2 trên mô hình đại thực bào RAW264.7 và trung hòa gốc tự do DPPH hiệu quả theo thời gian giải phóng. Các thử nghiệm tan huyết và kích ứng trên mô hình HET-CAM khẳng định tính an toàn của hệ nano với mức độ kích ứng thấp. Kết quả nghiên cứu chứng minh tính khả thi của hệ nano PLGA/QE trong phân phối thuốc và mở ra tiềm năng ứng dụng trong điều trị các bệnh lý liên quan đến stress oxy hóa, góp phần phát triển thành công nghệ phân phối thuốc tiên tiến.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Uttara B., et al., "Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options," *Current Neuropharmacol*, 7(1), 65-71, 2009.

[2]. Asgharian P., et al., "Potential mechanisms of Quercetin in cancer prevention: focus on cellular and molecular targets," *Cancer Cell International*, 22(257), 1-20, 2022.

[3]. Smith A.J., et al., "Cocrystals of Quercetin with improved solubility and oral bioavailability," *Molecular Pharmaceutics*, 8 (5), 1867-1876, 2011

[4]. Wang W., et al., "The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of Quercetin: A review," *Trends in Food Science & Technology*, 56, 21-38, 2016.

[5]. Alsaab H.O., et al., "PLGA-Based Nanomedicine: History of Advancement and Development in Clinical Applications of Multiple Diseases," *Pharmaceutics*, 14(12), 2728, 2022.

[6]. Todaro B., et al., "Pioglitazone-Loaded PLGA Nanoparticles: Towards the Most Reliable Synthesis Method," *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2522, 2022.

[7]. Pereira M.C., et al., "Effect of nanoencapsulation using PLGA on antioxidant and antimicrobial activities of Guabiroba fruit phenolic extract," *Food Chemistry*, 240, 396-404, 2018.

[8]. Zhang Z., et al., "The drug encapsulation efficiency, in vitro drug release, cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel-loaded poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate nanoparticles," *Biomaterials*, 27(21), 4025-4033, 2006.

[9]. Albisa A., et al., "Preparation of Drug-Loaded PLGA-PEG Nanoparticles by Membrane-Assisted Nanoprecipitation," *Pharmaceutical Research*, 34(6), 1296-1308, 2017.

[10]. Nabila A., et al., "Protection of Fargesin against Hydrogen Peroxide-induced Cell Death in RAW264.7 Cells," *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 14(1), 55-61, 2023.

[11]. Sæbø I.P., et al., "Optimization of the Hemolysis Assay for the Assessment of Cytotoxicity," *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2914, 2023.

[12]. Öztürk A.A., Kıyan, H.T., "Treatment of oxidative stress-induced pain and inflammation with dextropropofol loaded different molecular weight chitosan nanoparticles: Formulation, characterization and anti-inflammatory activity by using in vivo HET-CAM assay," *Microvascular Research*, 128, 1-13, 2020.

[13]. Todaro B., et al., "Pioglitazone-Loaded PLGA Nanoparticles: Towards the Most Reliable Synthesis Method," *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 2522, 2022.

[14]. Watcharadulyarat N., "PEG-PLGA nanoparticles for encapsulating ciprofloxacin," *Scientific Reports*, 13(226), 1-11, 2023.

[15]. Al-Shalabi E., et al., "Rhoifolin loaded in PLGA nanoparticles alleviates oxidative stress and inflammation in vitro and in vivo," *Biomaterials Science*, 10(19), 5504-5519, 2022.

[16]. Liu Y., et al., "PLGA nanoparticles for the oral delivery of nuciferine: preparation, physicochemical characterization and in vitro/in vivo studies," *Drug Delivery*, 24(1), 443-451, 2017.

[17]. Öztürk K., et al., "Effects of nanoparticle size, shape, and zeta potential on drug delivery," *International Journal of Pharmaceutics*, 666, 124799, 2024.

[18]. Cruz K.P., et al., "Development and Characterization of PLGA Nanoparticles Containing 17-DMAG, an Hsp90 Inhibitor," *Frontiers in Chemistry*, 9, 644827, 2021.

[19]. Pool H., et al., "Antioxidant Effects of Quercetin and Catechin Encapsulated into PLGA Nanoparticles," *Journal of Nanomaterials*, 145380, 1-12, 2012.

[20]. Scheverin V.N., et al., "Novel hydroxyapatite-biomass nanocomposites for fluoride adsorption," *Results in Engineering*, 16, 100648, 2022.

[21]. Wang L., et al., "The Effect of Different Factors on Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanoparticle Properties and Drug Release Behaviors When Co-Loaded with Hydrophilic and Hydrophobic Drugs," *Polymers*, 16(7), 856, 2024.

[22]. Zhang H., et al., "Co-delivery of doxorubicin and hydroxychloroquine via chitosan/alginate nanoparticles for blocking autophagy and enhancing chemotherapy in breast cancer therapy," *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1176232, 2023.

[23]. Mu L., Feng S.S., "A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol®): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS," *Journal of Controlled Release*, 86(1), 33-48, 2003.

[24]. Musuc A.M., et al., "Development and Applications of PLGA Hydrogels for Sustained Delivery of Therapeutic Agents," *Gels*, 10, 497, 2024.

[25]. Gulcin İ., Alwasel S.H., "DPPH Radical Scavenging Assay," *Process*, 11, 2248, 2023.

[26]. Dobrovolskaia M.A., et al., "Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro," *Nano Letters*, 8(8), 2180-2187, 2008.

[27]. Derman S., et al., "Antioxidant Activity and Hemocompatibility Study of Quercetin Loaded PLGA Nanoparticles," *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 19(1), 424-435, 2020.

[28]. Luo R., et al., "Surface Functionalization of Nanoparticles to Control Cell Interactions and Drug Release," *Small*, 8, 2585-2594, 2012.

[29]. Steiling W., et al., "The HET-CAM, a Useful In Vitro Assay for Assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients," *Toxicology in Vitro*, 13(2), 375-384, 1999.

AUTHORS INFORMATION

**Nguyen Quoc Chau Thanh¹, Vo Thanh Khang², Do Le Nhan²,
Ta Thanh Hong¹, Tran Thi Thanh Khuong³**

¹College of Natural Sciences, Can Tho University, Vietnam

²Laboratories of Medicinal Chemistry and Advanced Medicinal Chemistry, High-Tech Building, Can Tho University, Vietnam

³Stem Cell Laboratory, Institute of Biotechnology and Food Technology, Can Tho University, Vietnam