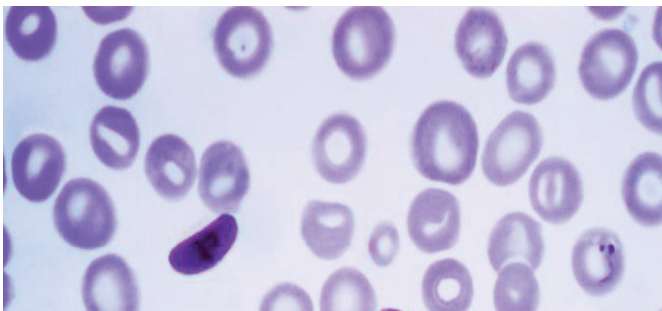


TỔNG HỢP HỆ VẬT LIỆU NANO KẾT HỢP ALBUMIN ỨNG DỤNG TRONG ĐIỀU TRỊ SỐT RÉT

Sốt rét, căn bệnh gây tử vong hàng đầu ở người, ngày càng trở nên nguy hiểm hơn khi các chủng ký sinh trùng Plasmodium gây bệnh đang dần có khả năng kháng thuốc. Trong nỗ lực nghiên cứu của mình, nhóm nghiên cứu của GS Francoise Nepveu đến từ Đại học Toulouse (Pháp) đã tìm ra một loại thuốc mới dựa trên các hợp chất indolone-N-oxides có thể chống lại hiệu quả các ký sinh trùng kháng thuốc này. Tuy nhiên, độ tan quá kém trong nước đã khiến cho indolone-N-oxides khó được ứng dụng vào thực tế. Vì vậy, GS Francoise Nepveu và các cộng sự đã phát triển một cách thức mới: tổng hợp thuốc indolone-N-oxides dưới dạng các hạt nano kết hợp với albumin nhằm vừa có thể vận chuyển thuốc dễ dàng trong tĩnh mạch, vừa đảm bảo hoạt tính chống sốt rét hiệu quả.

Nghiên cứu thuốc điều trị sốt rét

Cho đến nay, sốt rét vẫn tiếp tục là một vấn nạn của thế giới, bất chấp những nỗ lực không mệt mỏi của khoa học trong việc tìm ra một phương pháp phòng ngừa và chữa trị hiệu quả [1]. Đây là căn bệnh đến từ việc nhiễm phải các ký sinh trùng đơn bào thuộc hệ gen Plasmodium, trong đó ký sinh trùng Plasmodium falciparum (hình 1) được xem là nguy hiểm nhất. Mỗi năm có hàng triệu ca bệnh sốt rét được phát hiện, hàng trăm ngàn người chết, trong đó đa số là phụ nữ mang thai và trẻ em dưới 5 tuổi [1]. Mặc dù tốc độ tử vong do sốt rét gây ra đã giảm, trẻ em chết do căn bệnh này ở châu Phi vẫn không ngừng gia tăng. Thống kê cho thấy, trong năm 2010, hơn 655.000 người đã chết do sốt rét [2]. Sự nguy hiểm của sốt rét nằm ở chỗ các biến chứng từ căn bệnh này có thể phát triển đột ngột và gây tổn thương nghiêm trọng một hoặc nhiều cơ quan trong cơ thể người, bao gồm hôn mê, co giật, suy gan, suy thận, thiếu máu, phù phổi, suy hô hấp...



Hình 1: ký sinh trùng Plasmodium falciparum, nguồn gốc của căn bệnh sốt rét chết người

Đáng tiếc, hiện nay có rất ít thuốc có khả năng ngăn chặn ký sinh trùng Plasmodium. Tình hình còn trở nên nghiêm trọng hơn khi các ký sinh trùng này ngày càng có

khả năng kháng thuốc. Cụ thể, khả năng kháng thuốc của Plasmodium đối với artemisinins (thế hệ thuốc đầu tiên trị sốt rét) đã được ghi nhận ở nhiều vùng tại châu Á, đặc biệt là khu vực lân cận sông Mekong [3]. Điều này đã thúc đẩy những nghiên cứu về các cấu trúc thuốc nguyên mẫu mới có khả năng chống sốt rét [4, 5]. Tuy nhiên, nghịch lý là gần như không có một loại thuốc chống sốt rét mới nào được giới thiệu thử nghiệm lâm sàng kể từ năm 1996 [6]. Gần đây, nhóm nghiên cứu của GS Francoise Nepveu và các cộng sự đến từ Đại học Toulouse hợp tác với Đại học Aix - Marseille và Đại học Pierre và Marie Curie - Paris 6 (Pháp) đã phát triển một dãy các hợp chất indolone-N-oxides (INODs) với khả năng kháng sốt rét nhanh và hiệu quả [7]. INODs có thể được hấp thu nhanh chóng và dễ dàng chuyển hóa sinh học thành các hợp chất hoạt tính trong hồng cầu của con người, nơi mà chủng Plasmodium falciparum kháng chloroquine thường hiện diện [7, 8]. Tại đây, thông qua cơ chế hoạt động được kích hoạt bởi các phản ứng oxi hóa khử đặc thù, INODs sẽ làm suy yếu màng tế bào và hình thành những túi bọc bao quanh các hồng cầu bị nhiễm P. falciparum. Những ảnh hưởng này không chỉ tạo ra một môi trường không thuận lợi cho sự phát triển của ký sinh trùng, mà còn làm giảm độ bền cơ học và khả năng chứa chấp ký sinh trùng trong hồng cầu [9].

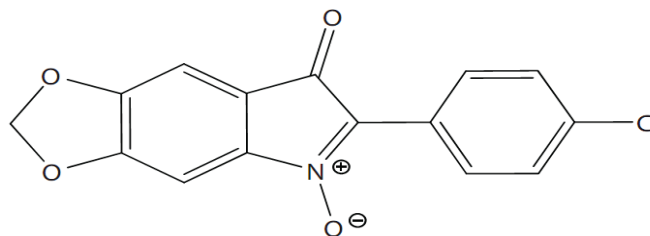
Tuy nhiên, khi nhóm của GS Nepveu tiếp tục đi sâu nghiên cứu về INODs, những thí nghiệm in-vivo (đặc biệt là các nghiên cứu về độc tính khi sử dụng INODs ở nồng độ cao) bị cản trở bởi khả năng hòa tan của INODs trong nước rất kém (< 10 mg/l). Vì vậy, bất chấp hoạt tính sinh học đa dạng của INODs, bao gồm khả năng chống nhiễm trùng [10, 11], bảo vệ thần kinh [12], ức chế quá trình tổng hợp ty thể ATP [13] và khả năng tiêu thụ các tiểu phân oxy hóa mạnh [14, 15], rất ít báo cáo được tìm thấy về hoạt tính in-vivo của chúng. Khả năng hòa tan kém của thuốc luôn là một thách thức lớn trong nghiên cứu dược phẩm và thường là nguyên

nhân chính khiến quá trình nghiên cứu thuốc bị gián đoạn (hơn 60% dược phẩm mới điều chế đều phải đối mặt với vấn đề hòa tan [16]). Vì vậy, để có thể tiến hành thử nghiệm in-vivo, INODs cần phải được thiết kế dưới một hình thái mới để có thể xâm nhập vào hệ thống tĩnh mạch một cách thuận lợi nhằm đảm bảo quá trình vận chuyển trực tiếp thuốc trị sốt rét đến các vị trí bị nhiễm bệnh.

Vật liệu vận chuyển thuốc

Giữa nhiều phương pháp khác nhau để vận chuyển thuốc ít tan, micro hóa vật liệu (làm giảm kích thước đến cỡ micro) là phương pháp cổ điển cho phép gia tăng tốc độ hòa tan nhờ vào sự tăng diện tích bề mặt riêng. Tuy nhiên, nếu vật liệu có khả năng hòa tan rất kém trong nước, ví dụ dưới 1 mg/ml, chỉ giảm kích thước bằng phương pháp micro hóa là chưa đủ [17]. Hơn nữa, những hạt micro với kích thước lớn hơn 5 µm không phù hợp để di chuyển trong hệ thống tĩnh mạch bởi chúng có thể gây tắc nghẽn mạch khi nồng độ vượt quá ngưỡng cho phép của tĩnh mạch [18]. Gần đây, nano hóa đã được biết đến như một cách thức mới để đạt được kích thước hạt dao động trong khoảng từ 10 đến 1000 nm [17]. Nano hóa vật liệu không chỉ làm tăng tốc độ hòa tan mà đồng thời còn tăng độ tan của vật liệu trong nước [17]. Những dung dịch huyền phù nano có thể được tiêm thẳng vào trong tĩnh mạch, từ đó đảm bảo 100% sinh khả dụng.

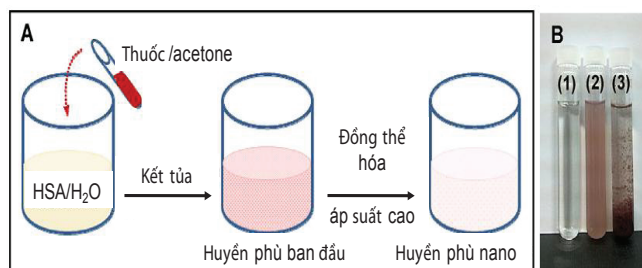
Rất nhiều hợp chất cao phân tử đã được sử dụng để tổng hợp các hạt nano phân hủy sinh học. Giữa các hợp chất này, albumin trong huyết thanh người (HSA) được chứng minh là chất vận chuyển thuốc hiệu quả nhờ vào tính nội sinh, không độc hại và không miễn dịch [19]. Albumin vốn được biết đến như là một chất vận chuyển thuốc có nguồn gốc tự nhiên, có khả năng vận chuyển các phân tử kỵ nước đi khắp cơ thể và thải chúng tại bề mặt các tế bào [20]. Gần đây, Ibrahim [21] đã nhận thấy giữa albumin và INODs có ái lực cao, từ đó gợi ý khả năng sử dụng kết hợp albumin và INODs trong khảo sát thực nghiệm. Về mặt lý thuyết, những hạt nano INODs khi được gắn kết với albumin tỏ ra rất phù hợp với mục tiêu trị bệnh sốt rét vì HSA sẽ được hấp thu và phân hủy một cách chọn lọc bởi những hồng cầu nhiễm *P. falciparum*, nơi mà HSA đóng vai trò như một nguồn cung cấp amino acid phụ thêm, bên cạnh hemoglobin [22]. Hơn nữa, albumin vẫn được sử dụng như một giải pháp điều trị gần như duy nhất để giảm tỷ lệ tử vong ở các ca bệnh sốt rét não nặng [23]. Ngoài ra, việc sử dụng các hạt nano phân hủy sinh học này không cần đi kèm theo một chất hoạt động bề mặt hoặc vật liệu nền polymer, vì vậy tỏ ra đơn giản hơn. Xuất phát từ ý tưởng trên, GS F. Nepveu cùng các cộng sự [24] đã tiến hành tổng hợp 6-(4-chlorophenyl)-7H-[1,3]dioxolo[4,5-f]indol-7-one-5-oxide (một chất trong nhóm INODs, hình 2) dưới dạng hạt nano gắn kết albumin để có thể dễ dàng vận chuyển thuốc trong tĩnh mạch, đồng thời ngăn chặn sự mất hoạt tính nhanh của INODs trong quá trình vận chuyển.



Hình 2: công thức phân tử của 6-(4-chlorophenyl)-7H-[1,3]dioxolo[4,5-f]indol-7-one-5-oxide

Tổng hợp hệ vật liệu nano thuốc kết hợp albumin

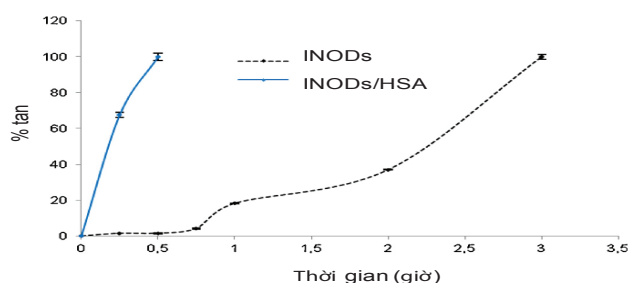
Quá trình tổng hợp các hạt nano INODs gắn kết albumin được thực hiện thông qua 2 giai đoạn: kết tủa tiền chất và đồng thể hóa ở áp suất cao (hình 3). Cụ thể, ở giai đoạn ban đầu, 10 mg 6-(4-chlorophenyl)-7H-[1,3]dioxolo[4,5-f]indol-7-one-5-oxide (thuốc) được hòa tan vào acetone với nồng độ 3,3 mg/ml. Trong khi đó, 10 mg HSA được hòa tan riêng trong dung dịch đệm phosphate nồng độ 0,01 M. Sau đó dung dịch chứa thành phần thuốc được nhỏ từng giọt (tốc độ 1 ml/phút) vào dung dịch HSA trong điều kiện khuấy từ liên tục. Dung dịch huyền phù được hình thành này được làm cho bay hơi dưới áp suất thấp ở 36°C trong 15 phút để loại bỏ acetone, sau đó sẽ được chuyển qua giai đoạn 2: giai đoạn đồng thể hóa. Toàn bộ dung dịch huyền phù được đồng thể hóa trong 15 vòng ở 25000 psi bằng máy đồng thể hóa áp suất cao Emulsiflex-C3 (SODEXIM S.A.S., Pháp). Quá trình này có thể khiến nhiệt độ hệ thống tăng lên, vì vậy để tránh sự phân hủy nhiệt của thuốc, một hệ thống làm mát đối lưu sẽ được sử dụng kết hợp, đồng thời dung dịch tuần hoàn luôn phải được đảm bảo đủ lạnh. Huyền phù nano sau đó sẽ được chuyển vào máy làm lạnh khô Labconco ở -80°C trong 24 giờ, rồi làm lạnh khô ở -55°C, 6 µHg trong 48 giờ (với albumin trong thành phần của hệ đóng vai trò là chất làm lạnh khô, sử dụng kèm theo mannitol hoặc trahalose, chất có khả năng ngăn chặn hiện tượng kết tụ hạt) nhằm gia tăng độ bền hóa lý của hệ. Cuối cùng những hạt nano sản phẩm được lưu trữ ở 4°C.



Hình 3: (A) Quy trình tổng hợp hạt nano INODs/HSA; (B) Hình chụp ống nghiệm đựng: (1) HSA, (2) HSA và thuốc INODs, (3) thuốc INODs

Khả năng của hệ vật liệu nano thuốc kết hợp albumin

Sau khi tổng hợp, sản phẩm thuốc dưới dạng các hạt nano gắn kết albumin được thử nghiệm khả năng hòa tan trong dung dịch đệm phosphate. Hình 4 so sánh khả năng hòa tan của thuốc ở dạng tinh khiết và thuốc ở dạng hạt nano kết hợp albumin (thuốc/HSA). Thuốc tinh khiết cho thấy khả năng hòa tan rất kém, sau 3 giờ mới hòa tan hoàn toàn. Đặc biệt, trong 45 phút đầu, thuốc gần như không hòa tan do khả năng thẩm ướt hạn chế của INODs. Ngược lại, các hạt nano INODs/HSA thể hiện khả năng hòa tan nhanh vượt trội (100% trong 30 phút). Sự gia tăng tốc độ hòa tan này có thể được giải thích nhờ vào sự kết hợp đồng thời 3 quá trình: vô định hình hóa, gia tăng độ thẩm ướt và quá trình nano hóa các hạt INODs/HSA, từ đó khiến cho diện tích bề mặt riêng tăng lên cùng với sự rút ngắn quãng đường phân tán của hạt trong dung dịch.



Hình 4: so sánh tốc độ tan của các hạt nano INODs/HSA với INODs dạng tinh khiết

Nano INODs/HSA tiếp tục được nhóm nghiên cứu đem thử nghiệm in-vivo trên cơ thể sống. Tuy nhiên, do vấn đề đạo đức và chi phí cao khi thử nghiệm trên các động vật linh trưởng nên nhóm nghiên cứu đã tiến hành trên chuột. Loài động vật gặm nhấm này đã được chứng minh hoàn toàn thích hợp cho các thử nghiệm thuốc kháng sốt rét [25]. Trong thí nghiệm này, chuột từ 9 đến 11 tuần tuổi được nuôi trong các chuồng tiết trùng và dùng thức ăn đã được xử lý qua tia tử ngoại. Ban đầu chuột được tiêm vào màng bụng 0,5 ml hồng cầu máu người đã nhiễm sẵn chủng *P. falciparum* với nồng độ ký sinh trùng 0,3%, cùng với 10 mg/kg kháng thể đơn dòng NIMP-R14 và 300 g liposome clodronate. Sau khi nhiễm *P. falciparum*, hồng cầu máu người sẽ được bổ sung vào cho chuột mỗi 2-3 ngày. Những con chuột thử nghiệm này chỉ được điều trị khi dung tích hồng cầu giảm xuống 50%. Cụ thể, sau ngày thứ 7 bị nhiễm *P. falciparum*, chuột sẽ được tiêm 25 mg/kg thuốc INODs/HSA mỗi ngày và kéo dài trong 4 ngày. Kết quả cho thấy, INODs/HSA có hoạt tính hiệu quả cao trong điều trị sốt rét, 97% ký sinh trùng bị tiêu diệt trong 4 ngày. Đặc biệt, có hơn 67% số chuột nhiễm bệnh sống sót sau 4 ngày điều trị.

Những kết quả nghiên cứu khả quan nêu trên chứng minh tiềm năng của hạt nano INODs kết hợp albumin trong điều trị lâm sàng sốt rét. Mặc dù còn cần nhiều thí nghiệm lâm sàng trên động vật linh trưởng và người, nghiên cứu của GS F.

Nepveu và các cộng sự đã đem lại hy vọng trong cuộc chiến chống lại căn bệnh sốt rét của nhân loại, nhất là đối với các chủng sốt rét kháng thuốc.

LTK (tổng hợp)

Tài liệu tham khảo

- [1] World Health Organization, World Malaria Report 2013.
- [2] World Health Organization, World Malaria Report 2010.
- [3] Cui L., Yan G., Sattabongkot J., et al., 2012. Acta Trop. 121, 227-239.
- [4] White N.J., 2010. Lancet 376, 2051-2052.
- [5] Murray C.J.L., Rosenfeld L.C., Lim S.S., et al., 2012. Lancet 379, 413-431.
- [6] Gamo F.J., Sanz L.M., Vidal J., et al., 2010. Nature 465, 305-310.
- [7] Nepveu F., Kim S., Boyer J., et al., 2010. J. Med. Chem. 53, 699-714.
- [8] Tahar R., Vivas L., Basco L., et al., 2011. J. Antimicrob. Chemother. 66, 2566-2572.
- [9] Ibrahim H., Pantaleo A., Turrini F., et al., 2011. Med. Chem. Commun. 2, 860-869.
- [10] Hooper M., Patterson D.A., Wibberley D.G., 1965. 17, 734-741.
- [11] Sahasrabudhe A.B., Kamath H.V., Bapat B.V., et al., 1980. Indian J. Chem. 19B, 230-232.
- [12] Menton K., Spedding M., Gressens P., et al., 2002. Eur. J. Pharmacol. 444, 53-60.
- [13] Foster H., Hooper M., Imam S.H., et al., 1983. Br. J. Pharmacol. 79, 273-278.
- [14] Boyer J., Bernardes-Genisson V., Farines V., et al., 2004. Free Radic. Res. 38, 459-471.
- [15] Ramana C.V., Patel P., Vanka K., et al., 2010. Eur. J. Org. Chem. 2010, 5955-5966.
- [16] Kumar S., Burgess D.J., 2012. Springer, New York, 239-261.
- [17] Muller R.H., Keck C.M., 2004. J. Biotechnol. 113, 151-170.
- [18] Schroeder H.G., Bivins B.A., Sherman G.P., et al., 1978. J. Pharm. Sci. 67, 508-513.
- [19] Desai N.P., Tao C., Yang A., et al., 29 June 1999. US Patent 5, 916, 596.
- [20] Izoghby A.O., Samy W.M., Elgindy N.A., 2012. J. Control. Release 157, 168-182.
- [21] Ibrahim N., Ibrahim H., Kim S., et al., 2010. Biomacromolecules 11, 3341-3351.
- [22] Duranton C., Tanneur V., Lang C., et al., 2008. Cell. Physiol. Biochem. 22, 395-404.
- [23] John C.C., Kutamba E., Mugarura K., et al., 2010. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 8, 997-1008.
- [24] Ibrahim N., Ibrahim H., Dormoi J., Briolant Pradines, B., Moreno A., Mazier D., Legrand P., Nepveu F., 2014. Inter. J. Pharma. 464, 214-224.
- [25] Cosledan F., Fraisse L., Pellet A., et al., 2008. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 17579-17584.