

NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM VI NANG NANO CHITOSAN ĐƯỢC TẢI NẠP VỚI TRANS-CINNAMALDEHYDE ỨNG DỤNG TRONG ỨC CHẾ LIÊN LẠC Ở VI KHUẨN *E. coli* TOP10

Nguyễn Thanh Hảo, Nguyễn Thị Bích Lưu, Đồng Huy Giới*

Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: dhgioi@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 27.02.2023

Ngày chấp nhận đăng: 05.01.2024

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm điều chế chế phẩm vi nang nano chitosan được tải nạp với trans-cinnamaldehyde ứng dụng trong ức chế liên lạc ở vi khuẩn. Chúng tôi đã sử dụng phương pháp nhũ hóa để điều chế phức hệ nanocapsule (vi nang nano) và nanoemulsion (nhũ tương nano). Phức hệ vi nang và nhũ tương nano được tải nạp với trans-cinnamaldehyde sử dụng một nhân dầu và chitosan làm vỏ bọc. Phức hệ nano có cấu trúc hạt đồng nhất, độ phân tán thấp, kích thước dao động từ 120 đến 150nm. Cả vi nang nano và nhũ tương nano đều bền vững trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn sau 24h ủ. Hiệu quả tải nạp trans-cinnamaldehyde lần lượt cho hai phức hệ vi nang và nhũ tương nano là 86 và 73%. Cả hai phức hệ đã nhả thuốc qua hai giai đoạn, chậm rãi trong 6h đầu và theo sau là sự nhả thuốc liên tục sau 12h, đạt lần lượt 35 và 45% cho phức hệ vi nang và nhũ tương nano. Khảo nghiệm sinh học với cảm biến sinh học *E. coli* Top 10 cho thấy vi nang nano ưu việt hơn nhũ tương nano trong việc ức chế quá trình liên lạc của vi khuẩn, còn được biết đến với tên gọi là quorum sensing. Ở công thức tốt nhất, vi nang nano ức chế quá trình giao tiếp ở vi khuẩn này lên đến 65%.

Từ khóa: Chitosan, vi nang nano, nhũ tương nano, vi khuẩn, *E. coli*.

Study on Preparation of Chitosan Nanocapsules Transduced with Trans- cinnamaldehyde for Communication Inhibition in *E. coli* Top10

ABSTRACT

This study was conducted with the aim of preparing chitosan nanocapsules transduced with trans-cinnamaldehyde for communication inhibition in bacteria. We used emulsification method to synthesize nanocapsule and nanoemulsion complexes. The nanocapsule and nanoemulsion complexes were transduced with trans-cinnamaldehyde using an oil nucleus and chitosan as cover. The nanocomplex had a uniform particle structure, low dispersion, and the size ranges from 120 to 150nm. Both nanocapsule and nanoemulsion were stable in bacterial culture after 24h of incubation. The trans-cinnamaldehyde transduction efficiency for the nanocapsule and nanoemulsion complexes was 86 and 73%, respectively. Both complexes released the drug through two stages, slowly in the first 6 hours and followed by continuous drug release after 12 hours, reaching 35 and 45%, respectively, for the nanocapsule and nanoemulsion. Bioassays with the *E. coli* Top 10 biosensor showed that nanocapsule was superior to nanoemulsions in inhibiting bacterial communication, also known as quorum sensing. In the best formulation, nanocapsule inhibited the communication process in this bacterium up to 65%.

Keywords: Chitosan, nanocapsules, nanoemulsion, bacteria, *E. coli*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Quorum sensing (còn được biết đến là sự giao tiếp ở vi khuẩn) là phương thức liên lạc giữa các tế bào cho phép vi khuẩn có thể giao

tiếp, điều tiết biểu hiện của gen và đồng bộ hóa hành vi ứng xử dựa theo mật độ tế bào, được phát hiện lần đầu năm 1970 ở vi khuẩn biển *Vibrio fischeri* (Eberhard, 1972). Các phản hồi đồng bộ về mặt kiểu hình diễn ra ở mức độ quần

thể bao gồm: sự hình thành màng sinh học, khả năng phát quang, khả năng tiết độc tố, khả năng di động (Antunes & cs., 2010). Các loại độc tính này nhanh chóng trở thành mục tiêu nhắm đến của các liệu pháp ức chế độc tính, bởi vì chúng không thiết yếu cho sự sinh trưởng của vi khuẩn và được kiểm soát chặt chẽ bởi sự giao tiếp của vi khuẩn (Tang & Zhang, 2014). Do đó, ức chế sự giao tiếp này sẽ dẫn đến suy giảm độc tính hơn là giết chết tế bào vi khuẩn. Kết quả là không gây áp lực chọn lọc cao lên tế bào vi khuẩn và hạn chế sự xuất hiện của tính kháng.

Chitosan là một polymer sinh học được ứng dụng rộng rãi trong y dược và thực phẩm chức năng do các đặc tính như: khả năng phân hủy sinh học, khả năng tương thích sinh học và đặc tính không độc của nó. Chitosan được nghiên cứu rất kỹ về khả năng kháng khuẩn dựa vào sự tương tác tĩnh điện giữa nhóm amine tích điện dương của chitosan và các nhóm chức tích điện âm trên bề mặt tế bào vi khuẩn (Devlieghere & cs., 2004; Helander & cs., 2001). Các nghiên cứu gần đây cũng chỉ ra các hoạt tính sinh học chống lại vi sinh vật gây bệnh như vi khuẩn và nấm mốc của các vật liệu nano dựa trên nền tảng chitosan (Perinelli & cs., 2018). Các hoạt tính kháng khuẩn hoặc chống lại sự giao tiếp của vi khuẩn của cả các hạt nano (nanoparticle) và vi nang nano (nanocapsule) đều được cải thiện rõ rệt do sự tăng về diện tích bề mặt so với tỷ lệ thể tích, vì kích thước của các hạt nano thường rất nhỏ (O'Callaghan & Kerry, 2016).

Trans-cinnamaldehyde (Trans-CA) là một aldehyde vòng thơm và là thành phần chính trong vỏ cây quế cũng như tinh dầu quế. Trans-CA có rất nhiều công dụng, nổi bật là tính chống vi khuẩn, chống nấm, diệt côn trùng và thuốc chống muỗi,... Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra khả năng ức chế sự giao tiếp của trans-CA và các dẫn xuất của nó đối với vi khuẩn *Vibrio* spp (Brackman & cs., 2008) và *P. aeruginosa* (Chang & cs., 2014). Tuy là những chất ức chế sự giao tiếp ở vi khuẩn tiềm năng nhưng trans-CA cũng có những nhược điểm như: tính thấm thấp, độ hòa tan thấp và do đó hạn chế đáng kể các hoạt tính sinh học của nó. Việc sử dụng nhân dầu trong các phức hệ nano là hoàn

toàn phù hợp với các thuốc có độ tan thấp như trans-CA (thể hiện ở giá trị $\log P = 1,9$). Nhân dầu sẽ thuận lợi cho các tương tác kỵ nước với trans-CA và qua đó làm tăng khả năng tải nạp thuốc vào phức hệ nano. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung nghiên cứu khả năng bao gói trans-CA trong các hệ nanocapsule (vi nang nano) và nanoemulsion (nhũ tương nano) khác nhau sử dụng một nhân dầu và chitosan làm vỏ bọc. Sau đó chúng tôi tiến hành nghiên cứu khả năng tải nạp trans-CA của các phức hệ kể trên đồng thời nghiên cứu khả năng điều tiết các phản hồi của sự giao tiếp ở vi khuẩn ở cảm biến sinh học *E. coli* Top10 sử dụng trong nghiên cứu này.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chitosan được cung cấp bởi công ty Mahtani Chitosan Pvt. Ltd., Ấn Độ (tên nhãn hiệu: Chitosan 132). Khối lượng phân tử của Chitosan là 115kDa, mức độ acetyl hóa là 42%. Lecithin được cung cấp bởi công ty Cargill (Epikuron 145 V, Cargill GmbH, Hamburg, CHLB Đức), Miglyol 812N được cung cấp bởi công ty Sasol GmbH (Witten, CHLB Đức). Các hóa chất còn lại đều đạt mức độ phân tích được mua từ công ty Sigma-Aldrich (Hamburg, CHLB Đức).

Chuẩn bị dịch vi khuẩn: Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng chủng vi khuẩn *E. coli* Top10 tái tổ hợp. Theo đó, một cấu trúc di truyền là Bba-T9002 từ vi khuẩn cho là *Vibrio fischeri* đã được tải nạp vào vi khuẩn nhận là *E. coli* Top10, sử dụng plasmid BBa pSB1A3. Cấu trúc di truyền này bản chất là một luxR promoter điều khiển sự phát quang từ vi khuẩn *Vibrio fischeri*. Do đó chủng vi khuẩn tái tổ hợp có khả năng biểu hiện luxR protein, là một chất nhận của phân tử tín hiệu AHL. Do vi khuẩn *E. coli* Top10 không thể tự tổng hợp AHL, do đó AHL cần được bổ sung từ môi trường bên ngoài. Một khi AHL được bổ sung đạt tới ngưỡng nhất định, nó sẽ bám vào phân tử luxR protein, qua đó kích hoạt lux promoter của *V. fischeri* và kích hoạt sự biểu hiện của sự phát quang (green fluorescence protein). Do đó, về mặt bản chất thì vi khuẩn *E. coli* Top10 tái tổ hợp sản sinh

fluorescence theo một cơ chế được điều khiển bởi quorum sensing (hay còn được hiểu là sự liên lạc của vi khuẩn).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp điều chế vi nang nano và xác định các đặc tính lý hóa

- Phương pháp điều chế vi nang nano

Vi nang nano được điều chế theo phương pháp được phát triển bởi Calvo & Remunan-Lopez (1997) và Kaiser & cs. (2015) với một vài thay đổi nhỏ. Theo đó, 500µl, dung dịch lecithin (nồng độ 40 mg/ml) được trộn với 132µl dung dịch trans-CA (nồng độ 20 mg/ml). Hỗn hợp được bổ sung với 62,5µl Miglyol 812 N (Sasol GmbH, Witten, Germany) và 4,305ml ethanol để tạo thành pha hữu cơ. Pha hữu cơ được đổ trực tiếp vào pha nước chứa 10mk chitosan (0,5 mg/ml hòa tan trong axit HCl 5M) dưới khuấy từ ở 200 vòng/phút tạo nên dung dịch có màu trắng sữa. Dung dịch này được cô đặc trong thiết bị cô quay- rotavapor (Büchi R-100, Büchi Labortechnik GmbH, Essen, CHLB Đức) ở 40°C tới khi thể tích cuối cùng tương ứng với một phần ba thể tích phản ứng ban đầu được thu nhận (~ 5ml). Nồng độ trans-CA cuối cùng thu được là 4mm.

- Phương pháp xác định các đặc tính lý hóa của vi nang nano

Đường kính của hạt nano và sự phân bố của kích thước hạt được xác định bởi phương pháp tán xạ ánh sáng với tán xạ ngược không xâm lấn ở 25°C phát hiện ở góc đo 173° được trang bị với một đèn laser ánh sáng đỏ ($\lambda = 632,8\text{nm}$) sử dụng máy Malvern Zetasizer nano ZS instrument (ZEN3600, Malvern Instruments, Vương quốc Anh). Điện tích bề mặt của hạt nano được đo trên cùng thiết bị sử dụng kỹ thuật phân tích pha tán xạ ánh sáng. Tất cả các mẫu được pha loãng trong dung dịch 1mM KCl trước khi đo.

- Phương pháp xác định hiệu quả kết hợp của thuốc trong hệ thống nano

Chế phẩm nano được phân tách nhờ ly tâm ở 16.000rpm trong 1 giờ 30 phút. Lượng

trans-CA thu được dưới đáy ống Eppendorf được hòa tan trong 1ml cồn tuyệt đối và được xác định nhờ phép đo quang phổ. Hiệu quả kết hợp của thuốc trong hệ thống nano được tính toán dựa trên sự khác biệt giữa tổng lượng trans-CA được kết hợp trong công thức (theo lý thuyết) và lượng thu được sau ly tâm. Một đường chuẩn trans-CA hòa tan trong Ethanol 96% được xây dựng để xác định nồng độ trans-CA trong chế phẩm nano thu được.

$$\text{Hiệu quả kết hợp} = \frac{\text{Lượng thuốc được tải nạp}}{\text{Tổng lượng thuốc ban đầu}} \times 100\%$$

$$\text{Khả năng tải nạp} = \frac{\text{Khối lượng thuốc trong nano}}{\text{Tổng khối lượng nano}} \times 100\%$$

- Phương pháp kiểm tra độ bền của chế phẩm nano trong môi trường M9

Độ bền của các công thức chế phẩm nano chọn lọc được đánh giá dựa vào sự thay đổi kích thước và chỉ số độ phân tán kích thước khi được ủ trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn M9, xác định bằng phương pháp tán xạ ánh sáng nêu trên và bằng việc quan sát bằng mắt thường nếu thấy hiện tượng kết tủa. Theo đó 50µl của các công thức nano khác nhau được bổ sung vào cuvette chứa 950µl môi trường M9, đã được ủ ấm trước ở 37°C. Kích thước và độ phân tán của hạt nano được đo tại các thời điểm khác nhau lần lượt là: sau 0, 30, 60, 120, 240, 720 và 1.440 phút sau khi ủ.

2.2.2. Phương pháp xác định các đặc tính sinh học của vi nang nano

- Phương pháp xác định độ nhả của thuốc:

800µl nano chứa đựng thuốc nhất định được chuyển vào ống thẩm tích với kích thước màng là 6kDa và được đặt trong một bình thủy tinh được khử trùng chứa 79,2ml môi trường M9. Tại các thời điểm thích hợp, 300µl dung dịch được lấy ra và thay vào bằng 300µl môi trường M9. Lượng trans-cinnamaldehyde nhả ra được xác định bằng phương pháp đo quang phổ ở bước

Nghiên cứu điều chế chế phẩm vi nang nano chitosan được tải nạp với trans-cinnamaldehyde ứng dụng trong ức chế liên lạc ở vi khuẩn *E. coli* Top10

sóng 262nm, dựa vào đường chuẩn đã được dựng sẵn trước đó.

- Khảo nghiệm sinh học để xác định khả năng kháng liên lạc vi khuẩn của chế phẩm nano:

+ Chúng vi khuẩn *E.coli* Top10 được nuôi cấy trong môi trường Luria-Bertani (LB) bổ sung 200 µg/ml ampicillin trong 18 giờ ở 37°C, lắc ở 100 vòng/phút và sau đó được bảo quản ở -80°C trong 30% glycerol vô trùng để phục vụ các nghiên cứu sau này. Trước khi tiến hành khảo nghiệm, dung dịch làm việc của vi khuẩn được chuẩn bị bằng cách lấy 40µl vi khuẩn được bảo quản ở -80°C cho vào 20ml môi trường M9 đã bổ sung 20µl ampicillin (200 µg/ml), sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, lắc 100 vòng/phút cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0,06 (sau khoảng 4 giờ nuôi cấy).

+ Chuẩn bị chất cảm ứng: 3OC6HSL được hòa tan trong acetonitril ở nồng độ 100mm và được bảo quản ở -20°C. Lấy 5µl dung dịch 3OC6HSL 100mm pha loãng nhiều lần với nước cất vô trùng đến nồng độ làm việc là 10nm.

+ Tiến hành khảo nghiệm sinh học: hoạt động ức chế liên lạc ở vi khuẩn được thử nghiệm trong đĩa 96 giếng, bổ sung vào đó 10µl dung dịch 3OC6HSL nồng độ 10nm, 10µl của các công thức nano khác nhau và 180µl của mẫu vi khuẩn ở mức OD₆₀₀ = 0,06. Hai loại đối chứng đã được thiết lập. Đối chứng 1 (đối chứng OD) chứa 180µl môi trường M9 và 20µl nước cất vô trùng. Đối chứng 2 (Đối chứng huỳnh quang) chứa 180µl dịch nuôi cấy vi khuẩn và 20µl nước cất vô trùng để đo sự phát huỳnh quang tự động của chính vi khuẩn. Một đối chứng dương chứa 180µl dịch nuôi cấy vi khuẩn, 10µl nước cất vô trùng và 10µl AHL cũng được thiết lập để so sánh tác dụng chống liên lạc vi khuẩn của các công thức khác nhau. Các đĩa được ủ trong Máy đọc Microplate Spectra Max-M2 (Thiết bị Phân tử, US/Canada) ở 37°C. Các phép đo huỳnh quang được ghi lại tự động bằng cách sử dụng quy trình lặp lại (λ kích thích = 480nm và λ phát xạ = 510nm, 40µs, 10 lần nhấp nháy, độ lợi 100, độ phát huỳnh quang trên cùng), phép đo tăng trưởng (OD₆₀₀) (bộ lọc hấp thụ λ = 600nm, 10 lần nhấp nháy) và lắc (5s ở tốc độ cao). Khoảng cách giữa các lần đo là 60 phút. Đối với mỗi thí nghiệm, các giá trị cường độ huỳnh

quang (FL) và OD₆₀₀ thu được bằng cách lần lượt trừ các giá trị nhận được với đối chứng huỳnh quang và đối chứng OD ở trên. Tất cả các phép đo được thực hiện trong ba lần.

2.3. Xử lý số liệu

Kết quả nghiên cứu được tổng hợp bằng phần mềm Excel; phân tích phương sai một nhân tố (one-way ANOVA) và so sánh cặp đôi các giá trị trung bình theo chuẩn Tukey (với các mức ý nghĩa: P <0,05; P < 0,01; P <0,001; P <0,0001) bằng phần mềm GraphPad Prism 6.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

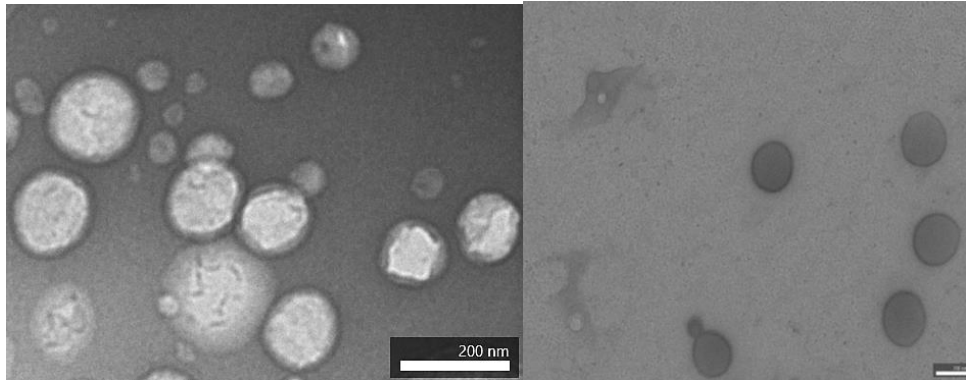
3.1. Đặc tính lý hóa của chế phẩm nano

Đặc tính lý hóa, hiệu quả kết hợp thuốc và khả năng tải nạp thuốc của hệ thống nano được thể hiện trong bảng 1. Có thể nhận thấy, đường kính trung bình của vi nang nano rộng là 147nm, lớn hơn một chút so với nhũ tương nano rộng (d ~130nm). Khi hệ thống nano được tải nạp với trans-CA ở nồng độ 4mm, đã không dẫn đến sự thay đổi đáng kể liên quan đến các đặc tính lý hóa của hệ thống nano. Các kích thước tương tự đã được ghi nhận với vi nang nano chứa thuốc và nhũ tương nano chứa thuốc lần lượt là 153 và 135nm (Hình 1). Nhìn chung, hệ số phân tán của phức hệ nano thu được rất thấp, dao động trong khoảng 0,1 đến 0,2, chứng tỏ rằng các phức hệ thu được gồm các hạt có kích thước đồng đều. Đúng như kỳ vọng, cả vi nang nano rộng và vi nang nano chứa thuốc đều có điện tích bề mặt dương, xấp xỉ +42mV. Ngược lại, nhũ tương nano cả rộng và chứa thuốc do thiếu lớp vỏ chitosan bao bên ngoài nên sở hữu điện tích bề mặt âm, xấp xỉ -52mV.

Hiệu quả kết hợp và khả năng tải nạp thuốc của vi nang nano (~ 86%) đều cao hơn đáng kể so với nhũ tương nano (~ 73%). Điều này chứng tỏ vai trò của lớp vỏ chitosan trong việc thúc đẩy việc bao gói các thuốc ưa lipid trong các vật liệu nano chất mang. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây về vi nang nano chitosan (Kaiser & cs., 2015; Omwenga & cs., 2018; Thanh Nguyen & Goycoolea, 2017).

Bảng 1. Đặc tính lý hóa, hiệu quả kết hợp và khả năng tải nạp trans-CA của hệ thống nano

Công thức nano	Đường kính (nm)	Độ phân tán	Điện tích bề mặt (mV)	Hiệu quả kết hợp (%)	Khả năng tải nạp (%)
Vi nang nano rỗng	147 ± 11	0,105	+ 41,3 ± 1,86		
Vi nang nano tải nạp trans-CA	153 ± 7	0,138	+ 42,4 ± 2,57	86,05 ± 5,74	5,88 ± 0,16
Nhũ tương nano rỗng	130 ± 7	0,166	- 55,5 ± 3,35		
Nhũ tương nano tải nạp trans-CA	135 ± 8	0,142	- 52,5 ± 4,12	72,98 ± 3,61	4,38 ± 0,36



Hình 1. Hình ảnh vi nang nano (trái) và nhũ tương nano (phải) tải nạp với 4 mM trans-CA đo bằng kính hiển vi truyền qua (TEM)

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tổng hợp các phức hệ nano sử dụng kỹ thuật nhũ hóa, trong đó trans-CA được tải nạp trong nhân dầu và được ổn định bề mặt bởi nhiều lớp bao gồm lecithin (nhũ tương nano), lecithin và chitosan (vi nang nano) để can thiệp vào quá trình liên lạc của vi khuẩn. Kết quả của chúng tôi phù hợp với các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng vi nang nano được tạo bởi chitosan khối lượng phân tử thấp sẽ có kích thước nhỏ (Goycoolea & cs., 2012). Phức hệ này hoàn toàn phù hợp cho việc tải nạp các hệ thuốc ưa lipid như trans-CA. Thực tế cho thấy, chitosan đóng vai trò quan trọng trong việc giữ lại trans-CA trong nhân dầu trong quá trình nhũ hóa. Do đó, lớp vỏ chitosan không những ảnh hưởng đến các đặc tính lý hóa của hệ chất mang nano, mà còn ảnh hưởng tới khả năng bao gói các thuốc ưa lipid trong các phức hệ này.

3.2. Tính ổn định của hệ thống nano trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn M9

Hình 2 thể hiện sự thay đổi theo thời về kích thước và độ phân tán của cả phức hệ nano

rỗng và phức hệ nano được tải nạp với trans-CA 4mM, được ủ trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn M9 tại 37°C.

Kích thước và độ phân tán của cả hai hệ thống gần như được duy trì ổn định trong suốt thời gian ủ 24h. Kích thước của cả vi nang nano và nhũ tương nano dao động nhẹ trong khoảng 100 đến 200nm. Trong khi đó, độ phân tán kích thước hạt luôn ở mức rất thấp (dao động trong khoảng từ 0,05 đến 0,15). Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây. Việc ổn định cấu trúc bề mặt của nano cũng như độ phân tán ổn định trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn là nhân tố quan trọng để ứng dụng trong thực tế. Nếu một phức hệ nano không ổn định, hiện tượng kết tủa diễn ra sẽ làm giảm đáng kể hoạt tính sinh học vốn có của phức hệ này. Do đó, kích thước và độ phân tán ổn định thu được sau thời gian 24h ủ trong nghiên cứu này là hoàn toàn phù hợp. Sự ổn định về mặt kích thước và độ phân tán cho phép ứng dụng phức hệ nano trong việc phòng trừ các độc tính của vi khuẩn gây bệnh. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, tính ưa nước tăng tỷ lệ thuận với mức độ acetyl hóa của chitosan, nhưng lại giảm tỷ lệ với

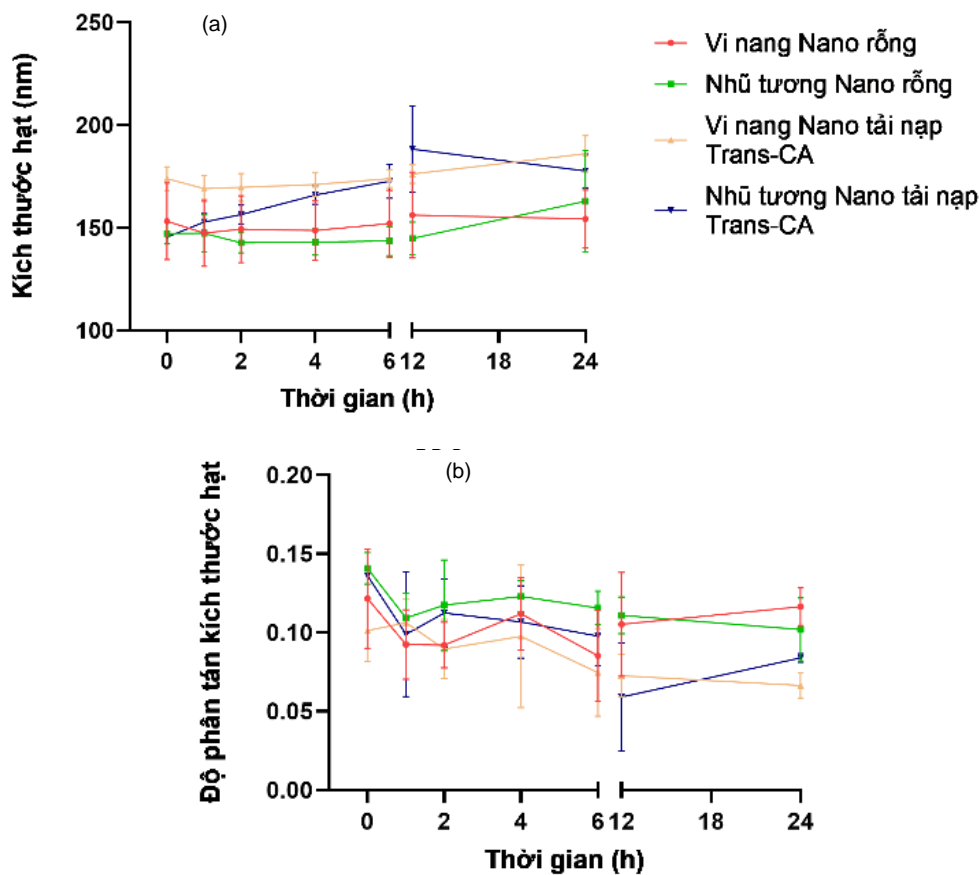
Nghiên cứu điều chế chế phẩm vi nang nano chitosan được tải nạp với trans-cinnamaldehyde ứng dụng trong ức chế liên lạc ở vi khuẩn *E. coli* Top10

mức tăng khối lượng phân tử chitosan (Santander-Ortega & cs., 2011). Do đó, trong nghiên cứu này việc sử dụng chitosan với mức độ acetyl hóa là 42% và khối lượng phân tử thấp là 115kDa được kỳ vọng sẽ duy trì tính ổn định của phức hệ nano trong môi trường M9. Để giải thích cho hiện tượng này, sự tăng mức độ acetyl hóa sẽ làm tăng các phân kỵ nước trong chuỗi xương sống chitosan, do đó sẽ thu hút các tương tác kỵ nước giữa các phân mảnh này và các vùng kỵ nước của nhân dầu và lecithin, trong khi đó các phân kỵ nước này lại được giấu đi. Thêm vào đó, khối lượng phân tử thấp của chuỗi chitosan sẽ cung cấp các vùng ưa nước và tái tổ hợp tốt hơn ở bề mặt, do đó tránh việc tiếp xúc của chúng với nước tốt hơn các phân với khối lượng phân tử lớn. Có thể nhận thấy rằng, phức hệ nano của chúng tôi có tính ổn định cao trong

môi trường nuôi cấy vi khuẩn lên đến 24h là hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đây.

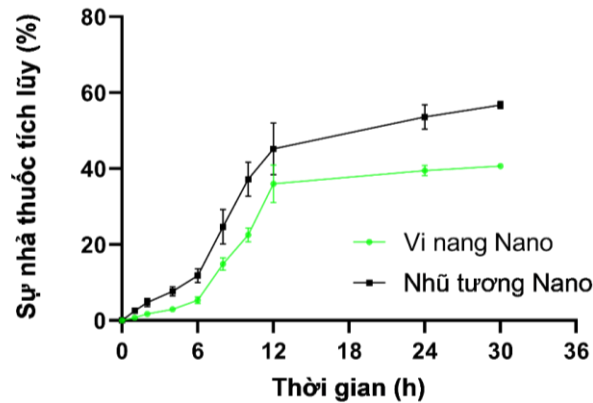
3.3. Sự nhả trans-CA trong môi trường M9

Kết quả nhả thuốc trans-CA trong môi trường M9 được trình bày ở hình 3. Tốc độ nhả thuốc khá chậm và ổn định trong vòng 6 tiếng đầu, theo sau bởi một sự nhả thuốc nhanh chóng theo cấp số nhân sau 12 tiếng. Tổng lượng trans-CA được nhả ra đạt xấp xỉ 45% cho nhũ tương nano và 35% cho vi nang nano. Có thể thấy phức hệ vi nang nano có đặc tính nhả thuốc chậm hơn so với phức hệ nhũ tương nano. Lượng thuốc nhả ra dường như đạt bão hòa sau 24 giờ cho cả hai hệ thống. Sau 24h, một lượng lớn trans-CA được nhả ra từ phức hệ nhũ tương nano (50% ~ 1,46mm), so với lượng được nhả ra từ phức hệ vi nang nano (40% ~ 1,38mm).



Ghi chú: Số liệu hiển thị giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 3$)

Hình 2. Đường kính hạt trung bình theo thời gian (a) và biến thiên của độ phân tán kích thước hạt (b) của phức hệ nano khi ủ ở môi trường M9 tại 37°C trong 24h



Hình 3. Sự nhả thuốc của trans-CA trong môi trường M9 (37°C, lắc 100rpm) của phức hệ vi nang nano (đường màu xanh) và phức hệ nhũ tương nano (đường màu đen)

Nhận thấy, sự nhả theo hai pha có kiểm soát của trans-CA được quan sát từ cả phức hệ nhũ tương nano và phức hệ vi nang nano trong môi trường M9. Sự nhả thuốc được kéo dài hơn ở phức hệ vi nang nano với khoảng 5% được nhả ra trong 6h đầu, so sánh với khoảng trên 10% từ phức hệ nhũ tương nano. Sự nhả từ từ thuốc này được cho là sự khuếch tán của một lượng nhỏ trans-CA liên kết chặt với khoảng giữa của lecithin và chitosan. Trong khi đó, sự nhả một lượng lớn của trans-CA ở giai đoạn tăng trưởng là do lượng lớn trans-CA được nhả ra từ trong nhân dầu của phức hệ. Giường như sự liên kết chặt của chitosan với lớp lecithin đã hạn chế tính thấm của trans-CA được tải nạp từ nhân dầu trong suốt giai đoạn khởi động của việc nhả thuốc. Sự nhả ô ạt của thuốc ở giai đoạn sau được cho là bắt nguồn từ việc sự tan rã của lớp màng chitosan phospholipid trong môi trường M9, do đó cũng cho thấy vai trò của thiết yếu của chitosan trong việc điều khiển quá trình nhả thuốc của trans-CA. Việc nhả thuốc từ từ sẽ hạn chế được các tác dụng phụ, cũng như giảm liều lượng và nâng cao tính sinh khả dụng của thuốc và kéo dài hiệu quả của thuốc tại đích đến (Santander-Ortega & cs., 2011).

3.4. Khả năng kháng liên lạc ở vi khuẩn *E. coli* của hệ thống nano

Chúng tôi đã đánh giá ảnh hưởng của trans-CA và chitosan ở các nồng độ khác nhau, cũng như ảnh hưởng của phức hệ vi nang nano

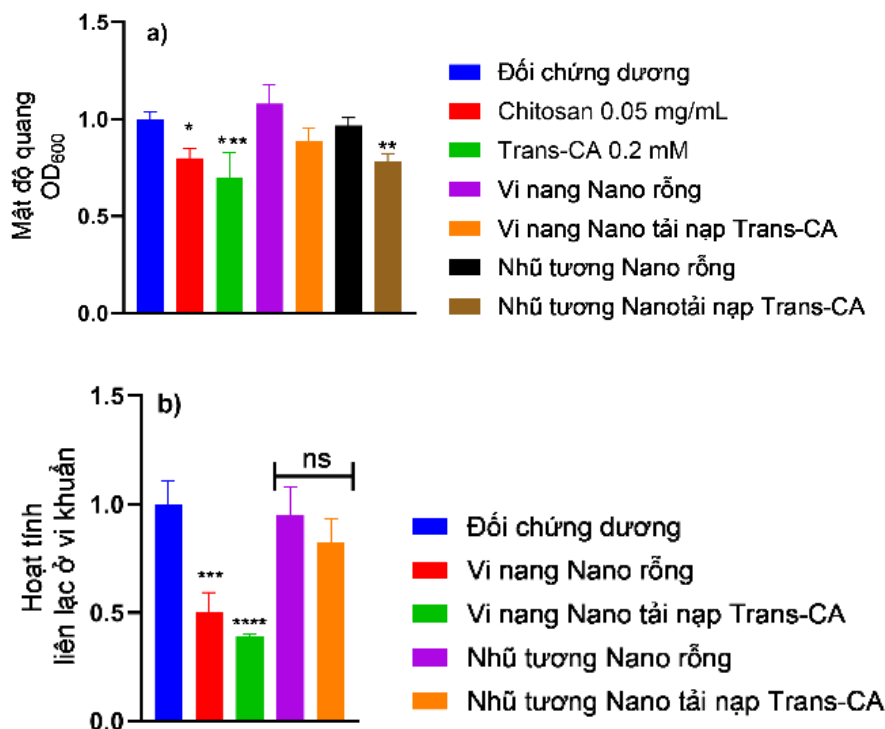
và nhũ tương nano tới biểu hiện của chủng vi khuẩn cảm biến sinh học *E. coli* Top10. Những biểu hiện này bao gồm sự biến thiên về mức độ phát quang (FL), sự hấp thụ OD ở bước sóng 600nm (tỷ lệ thuận với sự sinh trưởng của vi khuẩn) và tỷ lệ giữa mức độ phát quang và mật độ vi khuẩn (FL/OD), tỷ lệ này đặc trưng cho mức độ liên lạc giữa các vi khuẩn gây bệnh. Có thể nhận thấy chitosan ở nồng độ 0,05 mg/ml và trans-CA ở 0,2mm (nồng độ tương đương khi thực hiện khảo nghiệm này đối với phức hệ vi nang nano) gây một sự giảm nhẹ lên sự sinh trưởng của vi khuẩn *E. coli* lần lượt là 15 và 28%. Điều này chứng minh tính kháng khuẩn của chitosan và trans-CA khi tồn tại độc lập ở trạng thái tự do.

Ảnh hưởng của các công thức nano khác nhau cũng được đánh giá theo khảo nghiệm tương tự. Có thể thấy rằng cả vi nang nano rỗng và khi được tải nạp với trans-CA đều không ức chế sinh trưởng của vi khuẩn *E. coli*, do đó nó cũng phù hợp với quan điểm rằng các công thức vi nang nano này không độc với vi khuẩn gây bệnh. Chitosan và trans-CA ở trạng thái tồn tại tự do thể hiện tính kháng khuẩn vốn có của hai chất này theo một số công bố trước đây. Tuy nhiên, khi hai chất này kết hợp trong một phức hệ nano thì tính kháng khuẩn này không được ghi nhận. Điều này có thể được giải thích là do trong phức hệ nano, trans-CA được nhả một cách có kiểm soát chứ không nhả ô ạt, do đó vi khuẩn có thời gian thích nghi hoặc phân giải

chúng. Bên cạnh đó, chitosan tập trung ở bề mặt của vi khuẩn (do tương tác tĩnh điện trái dấu giữa chitosan và lớp màng vi khuẩn) là nguyên nhân để giảm mức độ liên lạc của vi khuẩn. Điều này là do việc tập trung vi nang nano ở bề mặt khiến cho phân tử đặc hiệu AHL không được di chuyển vào bên trong tế bào vi khuẩn để kích hoạt chuỗi promoter hoạt hóa GFP (green fluorescence protein). Ngược lại, nhũ tương nano khi tải nạp với thuốc trans-CA thì ức chế sinh trưởng vi khuẩn khá mạnh ở mức gần 35%. Trong khi nhũ tương nano rỗng không độc, nhũ tương nano tải nạp thuốc lại độc với vi khuẩn điều này đã gợi ý rằng độc tính có thể bắt nguồn từ thuốc đã được tải nạp. Tuy nhiên, vi nang nano chứa cùng một lượng thuốc như vậy lại không độc với tế bào vi khuẩn chứng tỏ vai trò quan trọng của chitosan trong phức hệ vi nang nano trong việc giảm độc tính của phức hệ này đối với tế bào vi khuẩn.

Mặc dù các công thức nhũ tương nano chứa đựng thuốc làm ức chế đáng kể sự sinh trưởng

của vi khuẩn, tuy nhiên khả năng dập tắt sự phát quang của phức hệ này lại rất khiêm tốn. Đúng như kỳ vọng của chúng tôi, cả phức hệ vi nang nano rỗng và khi được tải nạp với trans-CA đều thể hiện khả năng dập tắt phát quang tốt hơn phức hệ nhũ tương nano. Điều này cũng phù hợp với nghiên cứu trước đây (Qin & cs., 2017). Điện tích bề mặt dương của phức hệ vi nang nano có thể là nguyên nhân của hiện tượng này, khi mà tương tác tĩnh điện giữa điện tích trái dấu của vi nang nano và màng vi khuẩn được tăng cường. Hơn thế nữa, vi nang nano tải nạp với trans-CA đã thể hiện khả năng ức chế liên lạc ở vi khuẩn tốt hơn vi nang nano rỗng (50% so với 65%, Hình 4), đã chứng tỏ rằng trans-CA đã có thể phối hợp hoạt động với chitosan để tăng cường hoạt tính ức chế liên lạc của chủng vi khuẩn cảm biến sinh học *E. coli* Top10 đã sử dụng. Do đó có thể kết luận, việc kết hợp giữa điện tích dương của nhóm amin của chitosan, với việc nhả từ từ của trans-CA từ phức hệ nano đã làm tăng đáng kể khả năng ức chế liên lạc của vi khuẩn gây bệnh.



Ghi chú: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$; ns: not significant (không có ý nghĩa).

Hình 4. Ảnh hưởng của các công thức khác nhau đến sự sinh trưởng của vi khuẩn (a), và tới hoạt tính tương đối hoạt động liên lạc ở vi khuẩn (b)

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tổng hợp thành công vật liệu vi nang nano có khả năng bao gói một hợp chất ưa lipid bên trong lớp vỏ bọc chitosan. Vi nang nano này đã chứng minh được khả năng ngăn cản quá trình liên lạc của vi khuẩn *E. coli* Top10 rất hiệu quả trong điều kiện *in vitro*. Viên nang nano với lớp vỏ chitosan này là một ứng cử viên tiềm năng cho việc dẫn thuốc trans-CA đã được tải nạp tới gần lớp thành tế bào vi khuẩn và nhả thuốc một cách chậm rãi và có kiểm soát do đó giúp kéo dài hiệu quả chống lại sự liên lạc của vi khuẩn tốt hơn. Ở công thức tốt nhất đã ghi nhận khả năng chống lại sự liên lạc của vi khuẩn lên đến 65%. Tuy nhiên, hiệu lực của chế phẩm cần được kiểm chứng trong điều kiện thực tế. Các nghiên cứu tiếp theo có thể khai thác việc đồng tải nạp các loại flavonoids trong cùng một phức hệ vi nang nano để thu được hiệu quả cao hơn. Kết quả nghiên cứu cũng góp phần để tạo ra chế phẩm có khả năng thay thế dần việc sử dụng thuốc kháng sinh trong điều trị nhiễm khuẩn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Antunes L.C.M., Ferreira R.B.R., Buckner M.M.C. & Finlay B.B. (2010). Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology*. 156(8): 2271-2282. doi.org/10.1099/MIC.0.038794-0/cite/refworks.
- Brackman G., Defoirdt T., Miyamoto C., Bossier P., Calenbergh S. Van, Nelis H. & Coenye T. (2008). Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives reduce virulence in *Vibrio* spp. by decreasing the DNA-binding activity of the quorum sensing response regulator LuxR. *BMC Microbiology*. 8(8): 1-14. doi.org/10.1186/1471-2180-8-149.
- Calvo P. & Remunan-Lopez C. (1997). Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. *Colloid and Polymer Science*. 275(1): 46-53. doi.org/10.1007/s003960050050.
- Chang C., Krishnan T., Wang H., Chen Y., Yin W., Chong Y., Tan L.Y., Chong T.M. & Chan K.G. (2014). Non-antibiotic quorum sensing inhibitors acting against N-acyl homoserine lactone synthase as druggable target. *Scientific Reports*. 4: 7245. doi.org/10.1038/srep07245.
- Devlieghere F., Vermeulen A. & Debevere J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*. 21(6): 703-714. doi.org/10.1016/J.FM.2004.02.008
- Eberhard', A. (1972). Inhibition and Activation of Bacterial Luciferase Synthesis. *Journal of Bacteriology*. 109(3): 1101-1105.
- Goycoolea F.M., Valle-Gallego A., Stefani R., Menchicchi B., David L., Rochas C., Santander-Ortega M.J. & Alonso M.J. (2012). Chitosan-based nanocapsules: Physical characterization, stability in biological media and capsaicin encapsulation. *Colloid and Polymer Science*. 290(14): 1423-1434. doi.org/10.1007/s00396-012-2669-z.
- Helander I.M., Nurmiaho-Lassila E.L., Ahvenainen R., Rhoades J. & Roller S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 71(2-3): 235-244. doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00609-2.
- Kaiser M., Pereira S., Pohl L., Ketelhut S., Kemper B., Gorzelanny C., Galla H.-., Moerschbacher, B.M. & Goycoolea F.M. (2015). Chitosan encapsulation modulates the effect of capsaicin on the tight junctions of MDCK cells. *Scientific Reports*. 5: 10048. doi.org/10.1038/srep10048.
- Lam S.J., O'Brien-Simpson N.M., Pantarat N., Sulistio A., Wong E.H.H., Chen Y.Y., Lenzo J.C., Holden J.A., Blencowe A., Reynolds E.C. & Qiao G.G. (2016). Combating multidrug-resistant Gram-negative bacteria with structurally nanoengineered antimicrobial peptide polymers. *Nature Microbiology*. doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.162.
- Mancuso G., Midiri A., Gerace E. & Biondo C. (2021). Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens*. 10(10). doi.org/10.3390/pathogens10101310/S1.
- O'Callaghan K.A.M. & Kerry J.P. (2016). Preparation of low- and medium-molecular weight chitosan nanoparticles and their antimicrobial evaluation against a panel of microorganisms, including cheese-derived cultures. *Food Control*. 69: 256-261. doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2016.05.005.
- Omwenga E.O., Hensel A., Shitandi A. & Goycoolea F.M. (2018). Chitosan nanoencapsulation of flavonoids enhances their quorum sensing and biofilm formation inhibitory activities against an *E.coli* Top 10 biosensor. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 164: 125-133. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.01.019.

Nghiên cứu điều chế chế phẩm vi nang nano chitosan được tải nạp với trans-cinnamaldehyde ứng dụng trong ức chế liên lạc ở vi khuẩn *E. coli* Top10

- Perinelli D.R., Fagioli L., Campana R., Lam J.K.W., Baffone W., Palmieri G.F., Casettari L. & Bonacucina G. (2018). Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 117: 8-20. doi.org/10.1016/J.EJPS.2018.01.046.
- Qin X., Engwer C., Desai S., Vila-Sanjurjo C. & Goycoolea F.M. (2017). An investigation of the interactions between an *E. coli* bacterial quorum sensing biosensor and chitosan-based nanocapsules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 149: 358-368. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.10.031.
- Santander-Ortega M.J., Peula-García J.M., Goycoolea F.M. & Ortega-Vinuesa J.L. (2011). Chitosan nanocapsules: Effect of chitosan molecular weight and acetylation degree on electrokinetic behaviour and colloidal stability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 82: 571-580. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.019.
- Sneider W. (2001). History of Sulfonamides. *ELS*. doi.org/10.1038/NPG.ELS.0003625.
- Tang K. & Zhang X.H. (2014). Quorum quenching agents: Resources for antivirulence therapy. *Marine Drugs*. 12(6): 3245-3282. doi.org/10.3390/md12063245.
- Thanh Nguyen H. & Goycoolea F.M. (2017). Chitosan/Cyclodextrin/TPP nanoparticles Loaded with Quercetin as Novel Bacterial Quorum Sensing Inhibitors. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 22(11): 1975. doi.org/10.3390/molecules22111975.