

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

NGUYỄN THỊ NGỌC TRÂM

**NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP VÀ BIẾN TÍNH BỀ MẶT NANO
SILICA CẤU TRÚC RỔNG ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG
MANG THUỐC CHỐNG UNG THƯ**

Chuyên ngành: **Vật Liệu Cao Phân Tử Và Tổ Hợp**
Mã số: **9440125**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT LIỆU

Hà Nội - 2021

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học 1: PGS.TS. Nguyễn Đại Hải

Người hướng dẫn khoa học 2: GS.TSKH. Nguyễn Công Hòa

Phản biện 1: PGS.TS. Hoàng Thị Đông Quỳnh

Phản biện 2: PGS.TS. Nguyễn Quang Long

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án tiến sĩ, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi ... giờ ..', ngày ... tháng ... năm 202....

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
- Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Từ năm 2000, nano silica cấu trúc mao quản (mesoporous silica nanoparticles – MSN) là vật liệu được nghiên cứu rộng rãi cho các ứng dụng y sinh [1]. So với các hạt nano polymer, micelle và liposome, thì MSN được biết đến như là chất mang nano đầy hứa hẹn do có diện tích bề mặt cao, thể tích lỗ xốp lớn, có thể điều chỉnh kích thước lỗ xốp, tính tương hợp sinh cao và dễ biến tính bề mặt [2],[3]. Gần đây, vật liệu nano silica cấu trúc rỗng (hollow mesoporous silica nano particles – HMSN) đang thu hút sự chú ý của rất nhiều nhà khoa học. HMSN có lớp vỏ cấu trúc mao quản tương tự như MSN và lỗ rỗng bên trong nên có khả năng chứa được nhiều phân tử thuốc hơn, giảm thiểu khả năng tích lũy vật liệu lạ trong cơ thể do đó hứa hẹn tiềm năng thay thế vật liệu MSN trong tương lai.

HMSN có thể được tổng hợp bằng nhiều phương pháp khác nhau, trong đó hard – template là phương pháp phổ biến hiện nay vì có thể kiểm soát quá trình tạo hạt và kích thước hạt [4]. Các nghiên cứu hiện nay chỉ tập trung vào quá trình tổng hợp, biến tính bề mặt vật liệu tạo thành và ứng dụng vào các lĩnh vực khác nhau. Trong khi đó quá trình xử lý lõi rắn và kiểm soát hình thái, giai đoạn phủ lớp vỏ, kích thước hạt HMSN chưa được nghiên cứu một cách hoàn chỉnh và giải thích rõ ràng. Mặt khác, trong cấu trúc lớp vỏ của hạt HMSN có các ống mao quản nối trực tiếp với lỗ rỗng bên trong nên thuốc dễ bị rò rỉ trong quá trình vận chuyển. Do đó, vấn đề đặt ra là cần phải che chắn các lỗ mao quản này bằng cách biến tính bề mặt các hạt HMSN với các phân tử hữu cơ hay các polymer giữ vai trò

như là “ nấp” đây các lỗ mao quản để tăng hiệu quả mang thuốc và kiểm soát phóng thích thuốc [2].

Trong nghiên cứu này, với mục tiêu tạo ra hệ chất mang ứng dụng trong dẫn truyền thuốc, đề tài tập trung tổng hợp hạt HMSN hình cầu với kích thước mong muốn nhỏ hơn 200 nm. Hình thái, kích thước của hạt HMSN sẽ được kiểm soát thông qua việc kiểm soát hình thái, kích thước của các hạt nano silica được tạo thành trong từng giai đoạn tổng hợp: hình thái và kích thước lõi nano silica rắn ban đầu, quá trình phủ lớp vỏ có cấu trúc mao quản và xử lý lõi rắn được nghiên cứu. Ngoài ra, PEG (poly (ethylene glycol)) và Pluronic (F127) sẽ được sử dụng để biến tính trên bề mặt các hạt HMSN nhằm giữ lượng thuốc đã được nang hóa nên khả năng mang thuốc của vật liệu sau khi biến tính sẽ cao hơn các hạt HMSN ban đầu. Từ những phân tích trên cho thấy, đề tài “*Nghiên cứu tổng hợp và biến tính bề mặt nano silica cấu trúc rỗng định hướng ứng dụng mang thuốc chống ung thư*” sẽ góp phần hoàn thiện hệ chất mang thuốc trên nền tảng vật liệu nano silica cấu trúc rỗng.

2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

Nghiên cứu tổng hợp chất mang thuốc nano silica cấu trúc rỗng và kiểm soát kích thước hạt tạo thành. Đồng thời, khảo sát khả năng mang và phóng thích của hệ chất mang trên cơ sở biến tính bề mặt nano silica cấu trúc rỗng với nhóm chức hữu cơ và các polymer.

3. Các nội dung nghiên cứu chính của luận án

1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến kích thước hạt nano silica rắn (SSN)

2. Tổng hợp hạt nano silica rắn (SSN) bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM)

3. Nghiên cứu tổng hợp hạt nano silica cấu trúc lõi – vỏ (SSN@CTAB-SSN)

4. Nghiên cứu tổng hợp hạt nano silica cấu trúc rỗng (HMSN)

5. Nghiên cứu biến tính bề mặt nano silica cấu trúc rỗng bằng nhóm amine với các tỉ lệ mol HMSN/nhóm $-NH_2$ khác nhau (HMSN- NH_2).

6. Nghiên cứu biến tính bề mặt nano silica cấu trúc rỗng bằng Polyethylene glycol 5000 (PEG5k) (HMSN-mPEG).

7. Nghiên cứu biến tính bề mặt nano silica cấu trúc rỗng bằng Pluronic F127 (HMSN-F127).

8. Nghiên cứu hiệu quả nang hóa thuốc chống ung thư Doxorubicin (Dox) của các chất mang nano HMSN, HMSN- NH_2 , HMSN-mPEG, HMSN-F127.

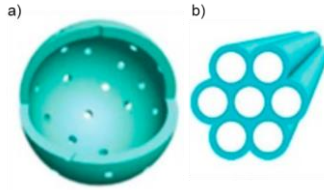
9. Khảo sát tốc độ phóng thích thuốc Doxorubicin của hệ HMSN/Dox, HMSN- NH_2 /Dox, HMSN-mPEG/Dox, HMSN-F127/Dox.

10. Nghiên cứu độc tính tế bào ung thư đối với các hệ chất mang nano HMSN, HMSN- NH_2 , HMSN-PEG, HMSN-F127, HMSN/Dox, HMSN- NH_2 /Dox, HMSN-mPEG/Dox, HMSN-F127/Dox.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Cấu tạo của nano silica cấu trúc rỗng

Nano silica cấu trúc rỗng là một loại đặc biệt của vật liệu nano silica cơ bản với cấu tạo đặc biệt gồm hai phần: lõi rỗng bên trong [29] và lớp vỏ cấu trúc mao quản [30,31] (Hình 1.1).



*Hình 1.1. Mô hình cấu trúc nano silica rỗng (a)
và cấu trúc lớp vỏ (b)*

1.2. Phương pháp tổng hợp nano silica cấu trúc rỗng

Theo loại khuôn (template) để tạo ra lỗ rỗng bên trong có thể chia thành phương pháp soft-template (khuôn mềm), hard-template (khuôn cứng) và phương pháp self-template (tự tạo khuôn). Đối với phương pháp hard-template, một số hạt rắn cứng được chuẩn bị làm lõi và sẽ được xử lý sau khi tạo lớp vỏ cấu trúc mao quản trên lõi, trong đó lớp vỏ được tạo ra bởi sự tự lắp ráp giữa các tiền chất và micell chất hoạt động bề mặt [38, 39].

1.3. Một số polymer được sử dụng biến tính bề mặt nano silica cấu trúc rỗng

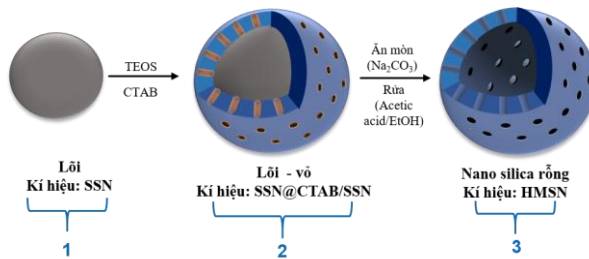
Trong lĩnh vực dẫn truyền thuốc, hệ PEG – thuốc để tăng cường khả năng hòa tan, kéo dài thời gian lưu thông trong cơ thể, giảm sự đào thải qua thận, giảm độ độc và thay đổi sự phân bố sinh học [69].

Pluronic (F127) còn được gọi là Poloxamer 407, đã được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi trong dẫn truyền thuốc do tính tương hợp sinh học cao và đặc biệt là nhạy nhiệt [74, 75]. Giá trị LCST (lower critical solution temperatures) của F127 có thể thay đổi từ 25 - 37°C bằng cách điều chỉnh nồng độ, điều này có nghĩa là F127 là có dạng chuỗi ở nhiệt độ phòng và co cụm tại nhiệt độ cơ thể [76, 77].

CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM

2.1. Tổng hợp hạt nano silica cấu trúc rỗng theo phương pháp hard – template

Hạt nano silica cấu trúc rỗng được tổng hợp bằng phương pháp hard – template. Quá trình tổng hợp gồm 3 giai đoạn: (i) Tổng hợp lõi nano silica rắn, (ii) phủ lớp vỏ mao quản tạo thành cấu trúc lõi – vỏ SSN@CTAB/SSN và (iii) ăn mòn lõi tạo thành nano silica rỗng thể hiện trong Sơ đồ 2.1.



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ tổng hợp hạt nano silica cấu trúc rỗng

2.1.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến kích thước hạt nano silica rắn (SSN)

Hạt nano silica rắn được tổng hợp theo phương pháp Stober gồm các chất phản ứng alkyl silicate, alcohol, nước và ammonia.

2.1.2. Tổng hợp hạt nano silica rắn (SSN) bằng phương pháp đáp ứng bề mặt

Tổng hợp được nano có kích thước mong muốn bằng phương pháp đáp ứng bề mặt với thiết kế thí nghiệm phức hợp trung tâm Box–Behnken designs hay còn gọi là mô hình BBD dựa trên khảo sát đơn yếu tố đã trình bày ở mục 2.1.1.

2.1.3. Tổng hợp hạt nano silica cấu trúc lõi – vỏ (SSN@CTAB-SSN)

Quá trình phủ lớp vỏ lên SSN được thực hiện theo phương pháp sol-gel từ TEOS là tiền chất của silica và CTAB là chất tạo ra các lỗ xốp [119]. Hầu hết các nghiên cứu đều sử dụng phương pháp sol – gel và chất hoạt động bề mặt CTAB để phủ lớp vỏ lên hạt nano silica rắn, các chất phản ứng gồm TEOS, CTAB, ethanol, nước, NH_3 và CTAB. Mỗi nghiên cứu này sử dụng lõi nano silica rắn với kích thước khác nhau, do đó các thông số thực hiện phản ứng phủ vỏ cũng khác nhau [1, 31, 91, 123].

2.1.4. Tổng hợp hạt nano silica cấu trúc rỗng (HMSN)

Giai đoạn cuối cùng trong tổng hợp nano silica cấu trúc rỗng HSMS là quá trình xử lý lõi SSN trong cấu trúc lõi – vỏ SSN@CTAB/SSN. Lõi SSN được xử lý trong môi trường base yếu bằng cách sử dụng dung dịch Na_2CO_3 nhằm mục đích kiểm soát phản ứng ăn mòn được diễn ra từ từ [30, 31].

2.2. Biến tính bề mặt nano silica cấu trúc rỗng với nhóm amine

Biến tính bề mặt nano silica cấu trúc rỗng với nhóm amine bằng phương pháp đồng ngưng - tụ “co-condensation” thông qua tiền chất silic chứa nhóm amine có thể là 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) với các thể tích khác nhau.

2.3. Biến tính bề mặt nano silica cấu trúc rỗng với các polymer Poly (ethylene glycol) (PEG) và Pluronic (F127)

Trước khi biến tính, PEG và F127 cần được “hoạt hóa” tức là những nhóm OH ở vị trí cuối cần được chuyển thành những nhóm hoạt động [97, 131]. Trong nghiên cứu, PEG và F127 được hoạt hóa bởi 4-Nitrophenyl chloroformate (NPC) sản phẩm tạo thành mPEG-

NPC, NPC-F127-OH. Do NPC dễ dàng phản ứng với nhóm amine trong nước nên để biến tính bề mặt nano silica với mPEG, F127 sẽ sử dụng mẫu silica trên bề mặt có chứa nhóm amine cao nhất trong các tỉ lệ khảo sát thể tích của APTES thực hiện ở mục 2.2. Sản phẩm tạo thành kí hiệu HMSN-mPEG, HMSN-F127.

2.4. Nghiên cứu hiệu quả nang hóa thuốc chống ung thư Doxorubicin (Dox) của các chất mang nano HMSN, HMSN-NH₂, HMSN-mPEG, HMSN-F127

Để đánh giá khả năng nang hóa thuốc của nano silica rỗng và mẫu chức hóa bề mặt, phương pháp khuếch tán qua màng được sử dụng. Hiệu suất tải thuốc – DLE (Drug loading efficiency) và khả năng mang thuốc – DLC [97, 139].

2.5. Khảo sát tốc độ phóng thích thuốc Doxorubicin của hệ HMSN/Dox, HMSN-NH₂/Dox, HMSN-mPEG/Dox, HMSN-F127/Dox

Đệm PBS là một dung dịch đẳng trương có pH 7,4 giống với pH trong cơ thể người, pH 5,5 là pH của tế bào ung thư, đây là dung dịch điển hình để thẩm tách các chất tương hợp sinh học. Phương pháp màng thẩm tách được sử dụng để khảo sát sự nhả chậm thuốc Dox từ hệ chất mang.

2.6. Nghiên cứu độc tính tế bào đối với các hệ chất mang nano HMSN, HMSN-NH₂, HMSN-PEG, HMSN-F127, HMSN/Dox, HMSN-NH₂/Dox, HMSN-mPEG/Dox, HMSN-F127/Dox

Sử dụng các phương pháp MTT để đánh giá độ độc tế bào của hệ mang thuốc và hiệu quả diệt tế bào ung thư của hệ chất mang khi mang thuốc chống ung thư. Tế bào ung thư sử dụng là tế bào ung thư gan HCC J5.

2.7. Phương pháp xác định tính chất đặc trưng của vật liệu

Hình thái và bề mặt vật liệu được kiểm tra bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM). Kích thước hạt và sự phân bố kích thước hạt, thể zeta được đánh giá thông qua phương pháp tán xạ ánh sáng động học.

Phân tích cấu trúc, đặc trưng nhóm không gian của vật liệu bằng phổ nhiễu xạ tia X (X-ray Diffraction, XRD). Phân tích nhóm chức, định danh các hợp chất hữu cơ và nghiên cứu cấu trúc bằng phương pháp phổ hồng ngoại (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR).

Phân tích thành phần cơ bản, trạng thái hóa học, trạng thái điện tử của các nguyên tố trên bề mặt vật liệu bằng phương pháp phổ quang điện tử tia X (XPS).

Đánh giá diện tích bề mặt và thể tích lỗ xốp bằng phương pháp hấp phụ - khử hấp phụ khí N_2 .

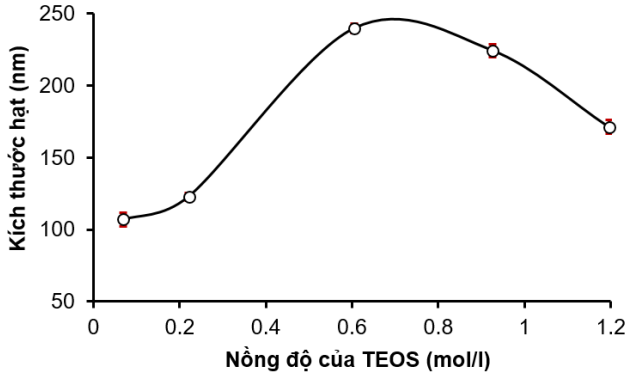
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến kích thước hạt nano silica rắn

3.1.1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ TEOS

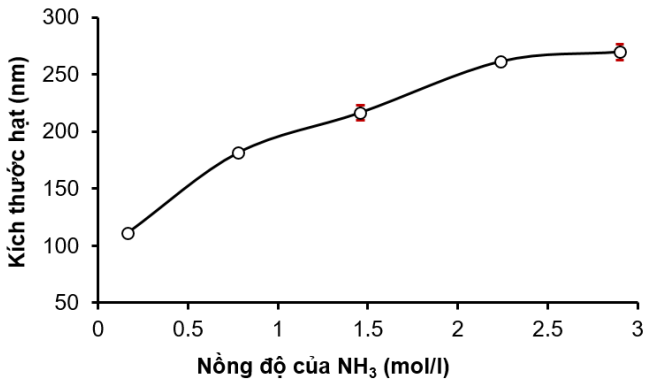
Quan sát Đồ thị 3.1 nhận thấy tại nồng độ của dung dịch NH_3 0,41 mol/l và nồng độ H_2O 7,23 mol/l, kích thước hạt tăng khi tăng nồng độ của TEOS cho đến khi nồng độ TEOS 0,61 mol/l thì kích thước hạt ổn định khoảng $239,63 \pm 3,50$ nm. Cơ chế tạo thành các hạt gồm hai giai đoạn. Giai đoạn thứ nhất (giai đoạn tạo mầm) tại dung dịch quá bão hòa ban đầu, sự tạo thành các hạt mầm diễn ra để hình thành các hạt sơ cấp. Giai đoạn thứ hai (giai đoạn phát triển

mâm) là sự kết tụ các hạt sơ cấp tạo thành các hạt thứ cấp bền hơn [13, 141].



Đồ thị 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ TEOS đến kích thước hạt tại nồng độ ban đầu cố định của NH_3 (0,41 mol/l) và H_2O (7,23 mol/l)

3.1.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ ammonia

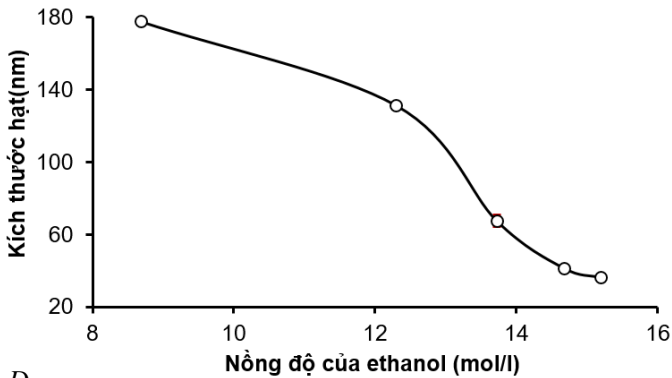


Đồ thị 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ ammonia đến kích thước hạt tại nồng độ ban đầu cố định của TEOS (0,36 mol/l) và H_2O (6,90 mol/l)

Ammonia được dùng làm chất xúc tác cho phản ứng thủy phân và ngưng tụ của TEOS trong ethanol. Khi tăng nồng độ ammonia thì kích thước hạt sẽ tăng và hạt hình cầu lớn nhất được tạo thành khi hỗn hợp phản ứng bão hòa với ammonia [10].

3.1.3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của ethanol

Vì khả năng hòa tan giữa orthosilicate và nước thấp nên một dung môi được dùng để trộn lẫn hai chất phản ứng này trong quá trình phản ứng như ethanol đã được sử dụng [11, 115]. Ngoài ra, ethanol còn ảnh hưởng đến độ phân tán và kích thước hạt nano silica [113]. Quan sát Đồ thị 3.3 nhận thấy ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến kích thước hạt, khi nồng độ ethanol tăng thì kích thước hạt giảm.

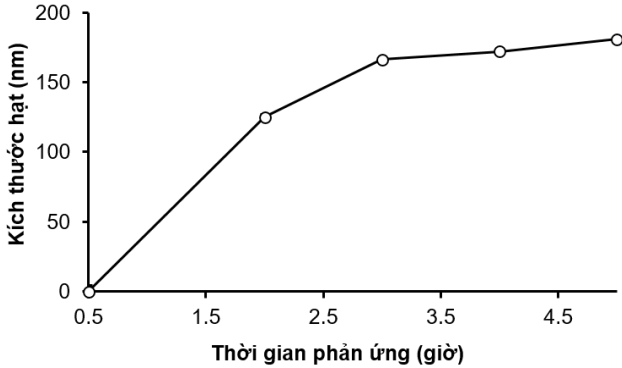


Đ

Đồ thị 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến kích thước hạt tại nồng độ ban đầu cố định của TEOS (1,49 mol/l) và H₂O (28,90 mol/l)

3.1.4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian phản ứng

Ảnh hưởng của thời gian phản ứng từ 0,5 giờ đến 5 giờ được thực hiện tại nồng độ các chất tham gia phản ứng TEOS 0,22 mol/l, NH₃ 0,39 mol/l và ethanol 13,48 mol/l thể hiện qua Đồ thị 3.4.



Đồ thị 3.4. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến kích thước hạt tại nồng độ ban đầu cố định của TEOS (0,22 mol/l) và H₂O (6,87 mol/l)

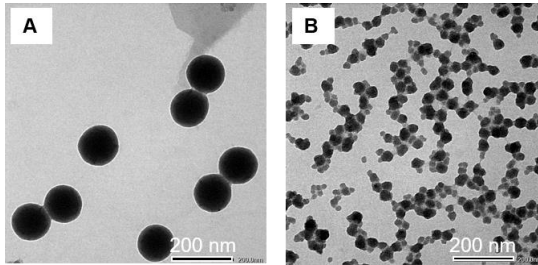
3.1.5. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ

Dựa vào Bảng 3.1 nhận thấy kích thước hạt giảm khi nhiệt độ tăng tại nồng độ các chất tham gia phản ứng TEOS 0,22 mol/lít, NH₃ 0,39 mol/l và ethanol 13,48 mol/l, kích thước hạt thể hiện rõ trong hình TEM (Hình 3.5), kết quả này tương ứng với nghiên cứu của Rahman và cộng sự [112]. Tại nhiệt độ 50°C và 65°C thì kích thước hạt thay đổi không đáng kể.

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến kích thước hạt

STT	Nhiệt độ (°C)	Kích thước hạt (nm)
1	35	227,7 ± 3,7
2	50	172,2 ± 1,0
3	65	176,3 ± 3,5
Dữ liệu được tính toán dựa trên giá trị trung bình ± Độ lệch chuẩn (n=3)		

3.1.6. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tốc độ thêm dung dịch ammonia



Hình 3.1. Ảnh TEM của nano silica tương ứng với tốc độ nhỏ của NH_3 : (A) nhanh và (B) $100\mu\text{l/phút}$ tại điều kiện cố định.

Dựa vào Hình 3.1 nhận thấy khi cho nhanh dung dịch NH_3 đặc vào hỗn hợp ethanol, nước, TEOS thì tốc độ phản ứng thủy phân, kết quả tạo nồng độ các hạt sơ cấp tăng nhanh. Đồng thời, tốc độ phản ứng cũng tăng nhanh tương tự nên các hạt sơ cấp sẽ ngưng tụ nhanh chóng, do đó kích thước hạt tăng nhanh [112].

Các yếu tố ảnh hưởng đến kích thước hạt gồm nồng độ TEOS, NH_3 , ethanol và nhiệt độ đều có những quy luật riêng nên không thể cố định các yếu tố này để tạo thành một bộ số liệu cho tổng hợp hạt nano theo kích thước đã dự định. Các yếu tố này sẽ được tối ưu theo mô hình BBD.

3.2. Kết quả tổng hợp hạt nano silica rắn bằng phương pháp đáp ứng bề mặt

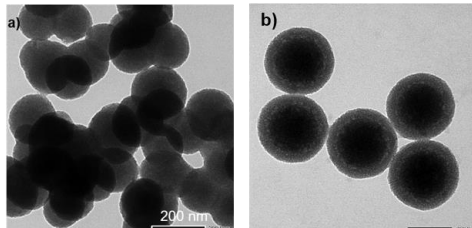
Sơ đồ đường viền của mô hình bậc hai cho thấy ảnh hưởng của từng cặp yếu tố ảnh hưởng đến kích thước hạt. Bằng cách áp dụng RSM, kích thước hạt mong muốn khoảng 130 nm được thiết lập theo các điều kiện được tóm tắt trong Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Bảng kết quả kích thước hạt sử dụng điều kiện mong muốn bằng minitab 16

Điều kiện	Đơn yếu tố				Giá trị		% Khác nhau
	V_{TEOS} mol/l	V_{NH_3} mol/l	V_{EtOH} mol/l	Nhiệt độ °C	Thực nghiệm	Dự đoán	
Y (kích thước)	5	1,8	10	45	$132,2 \pm 1,7$	130	1,7

3.3. Kết quả tổng hợp hạt nano silica cấu trúc lõi – vỏ

Sau khi phủ lớp vỏ thì các hạt nano silica tạo thành SSN@CTAB-SSN có dạng hình cầu như lõi nano silica rắn SSN ban đầu (Hình 3.1.b). Như vậy, có thể khẳng định hình dạng của hạt nano silica cấu trúc lõi – vỏ sẽ phụ thuộc vào hình dạng của lõi được sử dụng. Ngược lại hạt SSN-SSN khi không sử dụng CTAB thì không có dạng cấu trúc lõi – vỏ thể hiện trong Hình 3.2.a

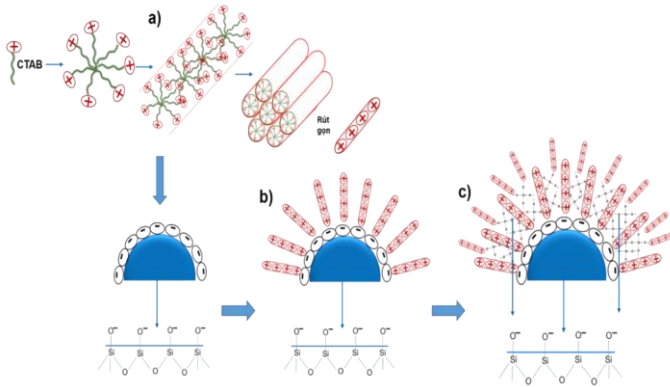


Hình 3.2. Ảnh TEM của SSN-SSN a) và SSN@CTAB-SSN b)

Mô tả quá trình phủ lớp vỏ silica lên lõi SSN

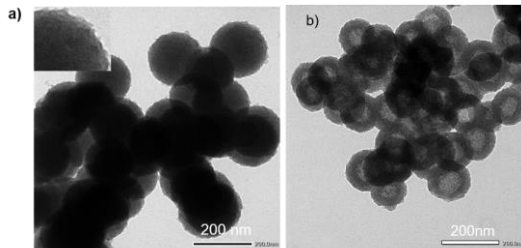
Quá trình phủ lớp vỏ được mô tả tương tự cơ chế tổng hợp các hạt nano silica cấu trúc mao quản họ MCM-41. Các nghiên cứu về tổng hợp hạt nano silica cấu trúc mao quản kết luận rằng có hai cơ chế khác nhau: (i) Thứ nhất, chất hoạt động bề mặt tại nồng độ cao sẽ tự lắp ghép thành pha tinh thể lyotropic “lyotropic crystalline phase” (hay gọi là micell) và các micell này kết tụ lại với nhau tạo

thành các khuôn mẫu micell. Sau đó là sự ngưng tụ của silica xung quanh các khuôn micell. (ii) Cơ chế thứ hai cũng có thể tạo thành các micell nhưng tại nồng độ chất hoạt động bề mặt thấp hơn; sự tự kết tụ của chất hoạt động bề mặt và silica được định hình bởi dung dịch tiền chất chứa silica (có thể là TEOS) để tạo thành pha tinh thể lỏng có dạng hình lục giác, hình khối hay dạng bản [153] thể hiện qua Sơ đồ 3.1.



Sơ đồ 3.1. Sơ đồ tổng hợp hạt nano silica cấu trúc lõi – vỏ

3.4. Kết quả tổng hợp hạt nano silica cấu trúc rỗng



Hình 3.3. Ảnh TEM của HMSN-K a) và HMSN b)

Quá trình ăn mòn hạt SSN-SSN thì hạt không tạo thành cấu trúc rỗng, kí hiệu HMSN-K (Hình 3.3.a). Hạt nano silica cấu trúc lõi – vỏ SSN@CTAB-SSN/2 được chọn để xử lý lõi bằng dung dịch Na_2CO_3 0,2 M tạo thành hạt nano silica cấu trúc rỗng HMSN (Hình 3.3.b).

Cơ chế quá trình xử lý lõi

Cơ chế tạo thành hạt nano silica rỗng từ quá trình ăn mòn lõi silica rắn SSN gồm hai giai đoạn quan trọng: (i) sự hòa tan chậm lõi nano silica rắn SSN trong môi trường base để tạo thành dạng silicate hòa tan (ion silicate) và (ii) sự đồng lắp ghép “co-assembly” của CTAB và silicate hòa tan để tạo thành lớp vỏ cấu trúc mao quản, trong đó chất hoạt động bề mặt giữ vai trò quyết định trong cơ chế ăn mòn – ngưng tụ lại. Trong môi trường base yếu tạo bởi dung dịch Na_2CO_3 và CTAB trong cấu trúc lớp vỏ thì sự ăn mòn chọn lọc silica từ lõi rắn được bắt đầu. Do ion silicate được tạo ra từ quá trình ăn mòn lõi rắn mang điện tích âm nên sẽ kết hợp với phần điện tích dương CTA^+ bằng lực hút tĩnh điện, kết quả là nồng độ các ion silicate tăng trên bề mặt micell. Ngoài ra, giữa các ion silicate còn có tương tác đẩy nên để giảm tương tác này thì các ion silicate tự ngưng tụ lại với nhau tạo thành đơn lớp silica trên các micell. Tại giai đoạn này, các micell được phủ bởi silica có thể bắt đầu tụ lại với nhau bằng phản ứng ngưng tụ giữa các lớp silica của từng micell riêng lẻ tạo nên khung cấu trúc MCM-41. Kết quả của các quá trình này là vỏ silica xung quanh các lỗ mao quản có dạng vô định hình và độ dày chỉ có 2 đến 3 đơn lớp silica. Mặt khác, quá trình ngưng tụ lại silicate như vậy sẽ làm giảm lượng silicate được tạo ra và do đó về mặt động học sẽ thúc đẩy phản ứng hòa tan hạt nano silica rắn SSN xảy ra

nhanh hơn. Cuối cùng, các micell (khuôn) sẽ được loại bỏ để tạo thành lớp vỏ có cấu trúc mao quản [171-177].

Như vậy bằng phương pháp hard – template hạt nano silica cấu trúc rỗng HMSN đã được tổng hợp thành công. Quy trình tổng hợp theo phương pháp này gồm ba giai đoạn bao gồm tổng hạt nano silica rắn SSN, hạt nano silica cấu trúc lõi – vỏ SSN@CTAB-SSN và quá trình ăn mòn để tạo thành cấu trúc rỗng HMSN. Hình dạng và kích thước của hạt HMSN có thể được kiểm soát chặt chẽ thông qua kiểm soát hình dạng và kích thước lõi nano silica rắn. Ngoài ra, kiểm soát độ dày lớp vỏ cũng góp phần kiểm soát được kích thước hạt HMSN tạo thành. Quá trình chuyển từ hạt SSN tạo thành hạt HMSN với sự thay đổi về kích thước hạt, thế zeta, diện tích bề mặt và bản chất của các hạt được thể hiện qua Bảng 3.3.

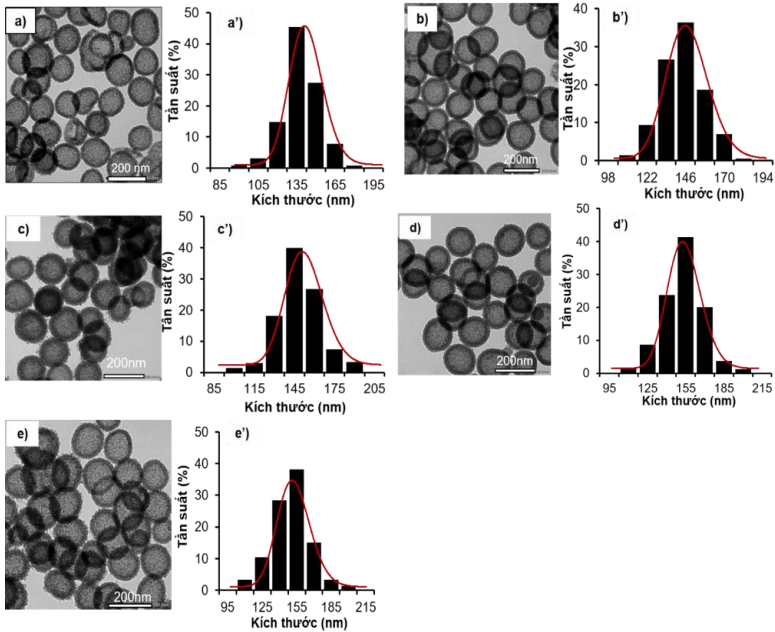
Bảng 3.3. Kích thước hạt và thế zeta của SSN, SSN@CTAB-SSN và HMSN

STT	Mẫu	Kích thước hạt, nm	Thế zeta, mV	Diện tích bề mặt, m ² /g	Bản chất
1	SSN	104,0 ± 0,7	-43,3 ± 0,87	97,2	Vô định hình
2	SSN@CTAB-SSN	167,0 ± 0,7	32,5 ± 0,66	46,6	Vô định hình
3	HMSN	134,0 ± 0,3	-25,53 ± 0,15	983, 7	Vô định hình

3.5. Kết quả biến tính bề mặt hạt nano silica cấu trúc rỗng bằng nhóm amine

Quan sát ảnh TEM được thể hiện qua Hình 3.4, kết quả cho thấy sau khi biến tính bề mặt với nhóm amine các hạt nano tạo thành có dạng hình cầu, độ đồng nhất cao và phân bố kích thước hạt hẹp. Đặc biệt, so với các hạt HMSN (Hình 3.3.b) thì các hạt HMSN-NH₂ không có hiện tượng kết tụ giữa các hạt. Điều này có thể do các

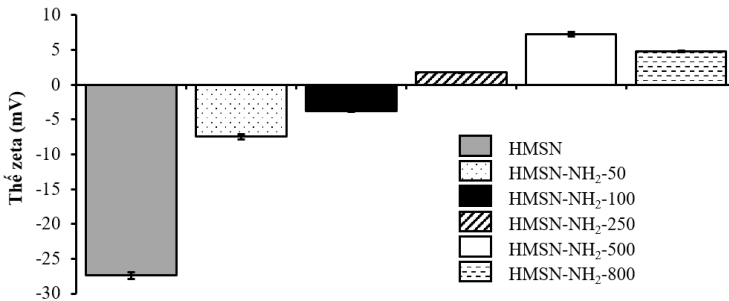
nhóm $-NH_2$ trên bề mặt bị proton hóa thành NH_3^+ , giữa các nhóm mang điện tích dương tương tác với nhau bằng lực đẩy nhau bằng lực đẩy tĩnh điện và lực đẩy này lớn hơn lực hút giữa các hạt nên hạn chế xảy ra sự kết tụ của các hạt (vì theo thuyết DLVO, các hạt có khuynh hướng kết tụ lại với nhau để giảm năng lượng bề mặt tạo thành các hệ phân tán bền) [198].



Hình 3.4. Ảnh TEM và sự phân bố kích thước hạt của HMSN- NH_2 từ thống kê ảnh TEM tại các tỉ lệ khác nhau của APTES (μl) 50 (a/a'), 100 (b/b'), 250 (c/c'), 500 (d/d'), và 800 (e/e')

Điện tích bề mặt của tất cả các hạt nano silica cấu trúc rỗng và biến tính được thể hiện bằng thế zeta trong Đồ thị 3.5. Khi thế zeta lớn thì lực đẩy tĩnh điện giữa các hạt càng tăng, kết quả là giảm sự kết tụ giữa các hạt và cải thiện độ bền, độ phân tán của hạt. Thế

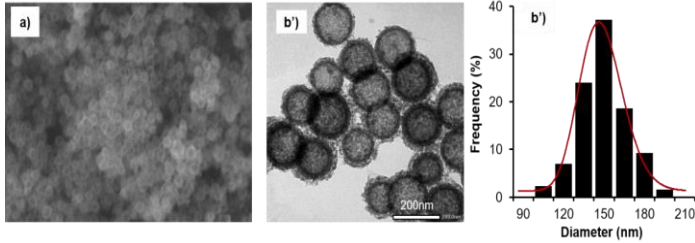
zeta của HMSN âm do điện tích âm của nhóm hydroxyl trên bề mặt. Đối với các mẫu HMSN-NH₂ do các nhóm amine bị proton hóa thành NH₃⁺ mang điện tích dương nên sẽ làm bớt điện tích âm trên bề mặt silica và tăng đến dương điện theo chiều tăng thể tích của APTES, tương ứng với sự tăng lượng nhóm amine được biến tính trên bề mặt. Điện tích dương cao nhất được tìm thấy tại thể tích APTES là 500 μ l tương ứng với thế zeta là +7,27 mV, điều này phù hợp với kết quả xác định lượng nhóm NH₂ trên bề mặt và có thể khẳng định nhóm amine được biến tính thành công [199].



Đồ thị 3.5. Thế zeta của HMSN và HMSN-NH₂ tại các tỉ lệ khác nhau của APTES

3.6. Kết quả biến tính bề mặt nano silica cấu trúc rỗng với monomethoxyl polyethylene glycol (mPEG)

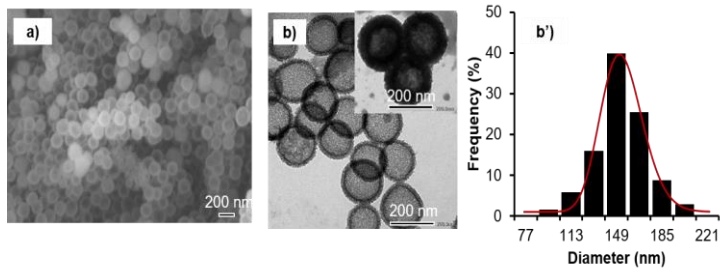
Quan sát ảnh SEM và TEM Hình 3.5 cho thấy kích thước hình thái của các hạt thu được. Cả HMSN và HMSN-mPEG đều có hình dạng hình cầu và không có sự thay đổi lớn về kích thước. Đặc biệt, khác với hạt HMSN khi được phủ lớp polymer mPEG thì kết quả FE-SEM cho thấy cấu trúc rỗng của hạt. Kích thước hạt của HMSN là $134,0 \pm 0,3$ nm, trong khi của HMSN-mPEG là $149,3 \pm 0,9$ nm.



Hình 3.5. Ảnh SEM (a) và TEM (b) và phân bố kích thước hạt (b') của HMSN-mPEG

3.7. Kết quả biến tính bề mặt nano silica cấu trúc rỗng với Pluronic

Hình 3.6 cho thấy hình thái và kích thước hạt HMSN-F127. Các hạt HMSN-F127 vẫn có dạng hình cầu, kết quả FE-SEM cũng cho thấy cấu trúc với một lỗ rỗng lớn bên trong như khi phủ mPEG. Kích thước trung bình của HMSN là $134,8 \pm 0,3$ nm, trong khi đó HMSN được phủ F127 là $152,9 \pm 0,9$ nm, kích thước này tương tự như khi phủ mPEG.



Hình 3.6. Ảnh SEM (a) và TEM (b) và phân bố kích thước hạt (b') của HMSN-F127

3.8. Hiệu quả nang hóa thuốc chống ung thư Doxorubicin (Dox) của các chất mang nano HMSN, HMSN-NH₂, HMSN-mPEG, HMSN-F127

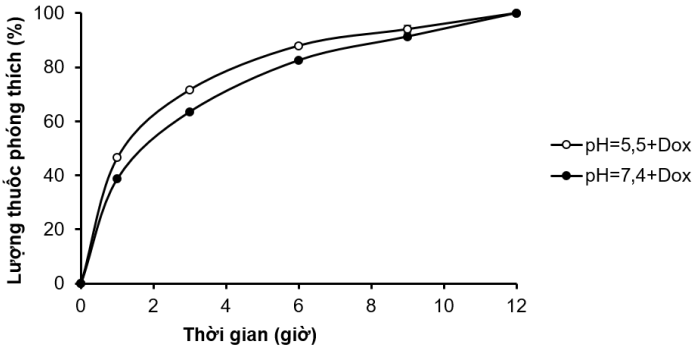
Bảng 3.4. Hiệu suất và khả năng mang thuốc Dox (DLE và DLC) của các hệ chất mang

STT	Loại chất mang	Hiệu suất mang thuốc Dox, DLE (%)	Khả năng mang thuốc Dox, DLC (%)
1	HMSN	22,70 ± 0,77	5,40 ± 0,17
2	HMSN-NH ₂ -500	96,86 ± 1,98	19,59 ± 0,32
3	HMSN-mPEG	65,43 ± 0,74	10,40 ± 0,11
4	HMSN-F127	72,08 ± 0,09	11,09 ± 0,01

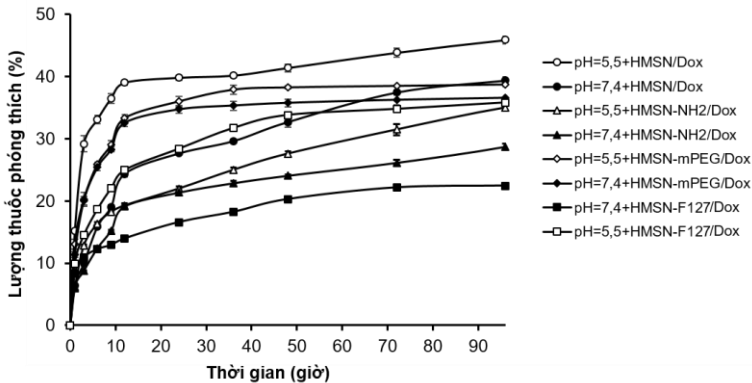
Dựa vào Bảng 3.4 nhận thấy HMSN khi mang tải thuốc Doxorubixin (Dox) có giá trị DLE và DLC tương ứng $22,70 \pm 0,77$ (%) và $5,40 \pm 0,17$ (%). Kết quả cho thấy, hiệu suất và khả năng mang thuốc Dox của HMSN thấp hơn so với khi mang tải dược chất Rhodamine B (Rh), tuy nhiên vẫn cao hơn khả năng mang thuốc của hạt nano silica xốp (PNS), điều này được thể hiện trong nghiên cứu đã được công bố [118]. Kết quả nang hóa thuốc của HMSN được biến tính bề mặt với nhóm amine, mPEG và F127 cho thấy hiệu suất và khả năng mang thuốc cao hơn hạt nano silica cấu trúc rỗng ban đầu HMSN.

3.9. Kết quả khảo sát tốc độ phóng thích thuốc Doxorubicin của hệ chất mang HMSN/Dox, HMSN-NH₂/Dox, HMSN-mPEG/Dox, HMSN-F127/Dox

Kết quả cho thấy thuốc Dox được kiểm soát tốt bởi các hệ chất mang. Điều này được thể hiện rõ tại thời gian 1 giờ đầu tiên thì có gần 40% thuốc Dox tự do được phóng thích ra môi trường tại cả hai giá trị pH, cao hơn tất cả lượng thuốc Dox được phóng thích ra môi trường bởi các hệ chất mang. Cụ thể đến 12 giờ thì có khoảng 40% lượng thuốc Dox được phóng thích bởi hệ chất mang/thuốc HMSN/Dox trong môi trường pH 5,5.



Đồ thị 3.6. Biểu đồ phóng thích thuốc của Doxorubicine theo thời gian



Đồ thị 3.7. Biểu đồ phóng thích thuốc của các hệ chất mang/Dox gồm HMSN/Dox, HMSN-NH₂/Dox, HMSN-mPEG/Dox và HMSN-F127/Dox theo thời gian

3.10. Kết quả độc tính tế bào của chất mang nano dẫn truyền thuốc Dox

Kết quả sau 48 giờ tại các nồng độ từ 0 - 250 $\mu\text{g/L}$ các hệ chất mang nano không độc đối với tế bào HCC J5. Các thử nghiệm khả năng sống của tế bào khẳng định hiệu quả điều trị bệnh ung thư

của thuốc Dox với 100 % tế bào HCC J5 chết ở nồng độ 10 $\mu\text{g/L}$. Đặc biệt, khi thuốc Dox được nang hóa trong các chất mang nano HMSN/Dox, HMSN-NH₂/Dox, HMSN-mPEG/Dox và HMSN-F127/Dox thì có độ độc giảm so với thuốc Dox đối chứng.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

Từ các kết quả phân tích trên đã cho thấy đề tài đã hoàn thành đầy đủ các mục tiêu đề ra: Thành công tổng hợp hạt nano silica cấu trúc rỗng HMSN với kích thước được kiểm soát. HMSN có hiệu suất và khả năng mang thuốc cao hơn so với nano silica cấu trúc mao quản. Nhằm hạn chế thuốc bị rò rỉ, tăng khả năng mang thuốc, HMSN được biến tính bề mặt với nhóm amine. Để tăng tính tương hợp sinh học và khả năng mang thuốc HMSN được biến tính bề mặt với các polymer mPEG và F127.

Kiến nghị

Do hạn chế về thời gian và một số yếu tố khác, do đó đề nghị một số nội dung sẽ thực hiện trong giai đoạn tiếp theo: Tổng hợp các hạt nano silica cấu trúc rỗng với các kích thước khác nhau, kích thước nhỏ hơn 134 nm, tiến hành đánh giá hiệu suất và khả năng mang thuốc; Biến tính bề mặt với các loại polymer có khối lượng phân tử khác nhau, tiến hành đánh giá hiệu suất và khả năng mang thuốc; Đánh giá trên cấp độ *in vivo* để thấy được hiệu quả trong điều trị ung thư của các hệ mang thuốc.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Quá trình tổng hợp hạt HMSN gồm ba giai đoạn, tại mỗi giai đoạn thực hiện đánh giá hình thái, kích thước, cấu trúc và diện tích bề mặt các sản phẩm tạo thành.

Kích thước hạt nano silica rắn được kiểm soát bằng cách khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến kích thước hạt. Đặc biệt, lõi rắn với kích thước mong muốn được tổng hợp bằng phương pháp đáp ứng bề mặt.

Thử nghiệm chứng minh vai trò của CTAB trong việc làm bền và định hướng cấu trúc lớp vỏ. Giải thích cơ chế tạo thành lớp vỏ và cơ chế ăn mòn lõi rắn để tạo thành hạt nano cấu trúc rỗng.

Các hạt HMSN được biến tính bề mặt với nhóm amin với sự khảo sát các lượng APTES khác nhau, kết quả ảnh TEM cho thấy giảm sự kết tụ các hạt. Trong nghiên cứu này đã xác định được lượng amin được biến tính trên bề mặt, tương ứng với mẫu HMSN-NH₂-500 có hiệu suất và khả năng mang thuốc cao nhất.

PEG và F127 đã được biến tính thành công trên bề mặt của hệ nano silica cấu trúc rỗng. Sau khi biến tính hệ chất có khả năng kiểm soát phóng thích thuốc. Theo hiểu biết của nhóm thì cho đến nay chưa có nghiên cứu về tổng hợp hệ chất mang HMSN-F127.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

- 1. Thi Ngoc Tram Nguyen**, Diem Huong Nguyen Tran, Long Giang Bach, Tran Hoang Du Truong, Ngoc Thuy Trang Le, Dai Hai Nguyen, “*Surface PEGylation of hollow mesoporous silica nanoparticles via aminated intermediate*”, Progress in Natural Science: Materials International Vol 29 (6), 2019, pp 612-616, Tạp chí quốc tế (ISI).
- 2. Ngoc Tram Nguyen Thi**, Linh Phuong Pham Tran, Ngoc Thuy Trang Le, Minh Tri Cao, The Nam Tran, Ngoc Tung Nguyen, Cong Hao Nguyen, Dai Hai Nguyen, Van Thai Than, Quang Tri Le and Nguyen Quang Trung, “*The Engineering of Porous Silica and Hollow Silica Nanoparticles to Enhance Drug-loading Capacity*”, Processes, Vol 7(11), 2019, Tạp chí quốc tế (ISI).
- 3. Thi Ngoc Tram Nguyen**, Ngoc Thuy Trang Le, Ngoc Hoi Nguyen, Bui Thi Kim Ly, Trinh Duy Nguyen, Dai-Hai Nguyen, “*Aminated hollow mesoporous silica nanoparticles as an enhanced loading and sustained releasing carrier for doxorubicin delivery*”, Microporous and Mesoporous Materials, Vol 309 (2020), Tạp chí quốc tế.
- 4. Ngoc Tram Nguyen Thi**, Dai Hai Nguyen, “*Hollow mesoporous silica nanoparticles fabrication for anticancer drug delivery*”, Vietnam Journal of Science and Technology Vol 58 (2020), pp 152-158, Tạp chí trong nước.
- 5. Ngoc Tram Nguyen Thi**, Ngoc Hoang Le, Uyen Vy Vo, Cuu Khoa Nguyen and Dai Hai Nguyen, “*Engineering of hollow mesoporous silica nanoparticles enhancing drug-loading capacity*”, The 7th International Conference in Viet Nam on the Development of Biomedical Engineering (BME7), pp 197-201, Hội nghị quốc tế.