

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

---



Nguyễn Đạt Thịnh

NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ VÀ BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA HỆ NANO  
ALGINATE-PLURONIC MANG THUỐC METHOTREXATE ĐỊNH HƯỚNG ỨNG  
DỤNG ĐIỀU TRỊ VIÊM KHỚP DẠNG THẤP

LUẬN VĂN THẠC SĨ  
Ngành Hóa hữu cơ

Thành phố Hồ Chí Minh – Năm 2023

NGUYỄN ĐẠT THỊNH

HÓA HỮU CƠ

2023

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

---

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Đạt Thịnh

NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ VÀ BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA HỆ NANO  
ALGINATE-PLURONIC MANG THUỐC METHOTREXATE ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG  
ĐIỀU TRỊ VIÊM KHỚP DẠNG THẤP

Chuyên ngành : Hóa hữu cơ  
Mã số: 8440114

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH  
HÓA HỮU CƠ

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

1. TS. CAO VĂN DƯ
2. PGS.TS TRẦN NGỌC QUYỀN

Thành phố Hồ Chí Minh - Năm 2023

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tp. Hồ Chí Minh, ngày ... tháng ... năm ...

Học viên cao học

## LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin chân thành cảm ơn TS. Cao Văn Dư và PGS.TS Trần Ngọc Quyển đã hướng dẫn tôi thực hiện đề tài này. Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn đến ThS. Đặng Thị Lệ Hằng đã nhiệt tình hỗ trợ giúp đỡ, chia sẻ kinh nghiệm nghiên cứu quý báu và động viên tôi trong suốt quá trình làm đề tài.

Tôi xin chân thành cảm ơn đến tất cả thầy cô ở Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã truyền đạt cho tôi những kiến thức sâu rộng trong suốt thời gian qua từ năm 2021 – 2023.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến đề tài ĐLTE00.07/22-23 và Phòng Vật liệu Sinh – Dược, Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi bao gồm hóa chất, dụng cụ và thiết bị để tôi có thể hoàn thành đề tài.

Cuối cùng tôi xin cảm ơn gia đình, bạn bè đã hỗ trợ, động viên tinh thần cho tôi trong thời gian học tập và thực hiện đề tài.

Tp. Hồ Chí Minh, ngày ... tháng ... năm..

Học viên cao học

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN .....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT .....	viii
DANH MỤC HÌNH.....	xi
DANH MỤC BẢNG.....	xiv
TÓM TẮT .....	xvi
ABSTRACT .....	xviii
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	5
1.1.TỔNG QUAN VỀ ALGINATE .....	5
1.1.1.Giới thiệu Alginate: .....	5
1.1.2.Tính chất và ứng dụng của Alginate:.....	7
1.1.2.1.Độ nhớt.....	7
1.1.2.2.Độ hòa tan .....	7
1.1.2.3.Khả năng tạo gel .....	8
1.1.2.4.Tính tương hợp sinh học .....	8
1.2.PLURONIC F127: .....	9
1.2.1.Giới thiệu Pluronic F127: .....	9
1.2.2.Tính chất và đặc điểm của Pluronic F127: .....	10
1.2.3.Ứng dụng của gel Pluronic F127 trong dược phẩm: .....	11
1.3.HỆ DẪN TRUYỀN NANOGEL:.....	11

1.3.1.Tổng quan về hệ dẫn truyền nanogel: .....	11
1.3.2.Cấu tạo của nanogel: .....	12
1.3.2.1.Liên kết vật lý .....	13
1.3.2.2.Liên kết hóa học .....	13
1.3.3.Nanogel với vai trò là chất mang: .....	14
1.3.4.Ứng dụng của nanogel nhạy nhiệt: .....	14
1.4.TỔNG QUAN VỀ METHOTREXATE: .....	15
1.4.1.Giới thiệu về Methotrexate: .....	15
1.4.2.Cơ chế tác dụng của Methotrexate: .....	16
1.4.3.Tác dụng không mong muốn của Methotrexate: .....	17
1.5.TỔNG QUAN VỀ ACID FOLIC: .....	18
1.5.1.Cấu tạo và tính chất của acid folic: .....	18
1.5.2.Tác dụng của acid folic: .....	19
1.6.TỔNG QUAN VỀ TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU: .....	20
1.6.1.Tình hình nghiên cứu ngoài nước .....	20
1.6.2.Tình hình nghiên cứu trong nước .....	28
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	30
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU .....	30
2.1.1.Nguyên liệu hóa chất và tế bào .....	30
2.1.2.Dụng cụ và trang thiết bị .....	32
2.1.3.Các phương pháp phân tích .....	35
2.2.PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	36

2.2.1. Tổng hợp copolymer nhạy nhiệt trên cơ sở alginate-cystamine và Pluronic F127:	36
.....	36
2.2.1.1. Tổng hợp dẫn xuất Alginate-cystamine (Na-Alg-Cys) và khảo sát điều kiện tổng hợp.....	36
2.2.1.2. Tổng hợp copolymer và khảo sát điều kiện ghép Alginate-Cystamine-Pluronic F127 (Alg-Cys-F127).....	40
2.2.1.3. Phân tích hàm lượng nhóm amino bậc 1: .....	42
2.2.1.4. Tổng hợp Alginate-Cys-Pluronic F127-Acid folic (Alg-F127-FA).....	43
2.2.2. Xác định nồng độ tạo nanogel của vật liệu Alg – F127 - FA.....	45
2.2.2.1. Khảo sát nồng độ tạo hạt CMC và sự hình thành nanogel .....	45
2.2.2.2. Phương pháp đo kích thước và tác động của nhiệt lên kích thước hạt nanogel .....	46
2.2.3. Nang hóa Methotrexate vào hệ alginate – pluronic F127 – folic acid và đánh giá hiệu suất nang hóa.....	46
2.2.3.1. Quy trình nang hóa Methotrexate vào hệ alginate – pluronic F127 – folic acid .....	46
2.2.3.2. Thiết kế tối ưu hóa công thức nanogel Alginate – Pluronic F127 – Acid folic mang Methotrexate .....	46
2.2.3.3. Phương pháp xác định hiệu suất nang hóa.....	48
2.2.3.4. Phương pháp đánh giá hàm lượng MTX giải phóng từ hệ Alg-F127-FA....	48
2.2.4. Khảo sát tính an toàn của hệ nano MTX/Alg-F127-FA .....	50
2.2.4.1. Nuôi cấy tế bào .....	50
2.2.4.2. Khảo sát hoạt tính kháng viêm .....	51

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	54
3.1.KẾT QUẢ TỔNG HỢP VẬT LIỆU NHẠY NHIỆT ALG – F127 .....	54
3.1.1.Kết quả tổng hợp Na – Alg – Cys.....	54
3.1.1.1.Kết quả khảo sát điều kiện tổng hợp.....	54
3.1.1.2.Phân tích cấu trúc hóa học Alginate - Cystamine.....	57
3.1.2.Kết quả tổng hợp Alg – F127.....	60
3.1.2.1.Kết quả khảo sát điều kiện tổng hợp Alg - Cys .....	60
3.1.2.2.Phân tích cấu trúc hóa học Alg – F127.....	61
3.1.3.Kết quả tổng hợp Alg-F127-FA.....	64
3.2. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH NỒNG ĐỘ TẠO NANOGEL CỦA HỆ NANO ALGINATE – PLURONIC F127 – FOLIC ACID.....	67
3.2.1.Kết quả khảo sát nồng độ tạo hạt CMC và sự hình thành nanogel.....	67
3.2.1.1.Kết quả khảo sát nồng độ tạo hạt CMC .....	68
3.2.1.2.Kết quả khảo sát sự hình thành hạt nanogel .....	71
3.2.2.Kết quả khảo sát tác động nhiệt độ lên hạt nanogel .....	73
3.3.KẾT QUẢ QUÁ TRÌNH NANG HÓA METHOTREXATE VÀO HỆ ALGINATE – PLURONIC F127 – FOLIC ACID.....	76
3.3.1.Kết quả thiết kế công thức nang hóa Methotrexate vào hệ nano Alginate – Pluronic F127 – Folic acid và hiệu suất nanogel hóa .....	76
3.3.2.Kết quả đánh giá hàm lượng Methotrexate giải phóng từ hệ nano Alg-F127-FA.....	80
3.4. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG KHÁNG VIÊM CỦA HỆ .....	84
3.4.1.Kết quả khảo sát IC <sub>50</sub> .....	84



3.4.1.1.Dòng tế bào RAW264.7.....	84
3.4.1.2.Dòng tế bào MSC.....	85
3.4.2.Kết quả đánh giá khả năng kháng viêm của hệ MTX/Alg-F127-FA .....	85
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....	90
KẾT LUẬN .....	90
KIẾN NGHỊ .....	90
TÀI LIỆU THAM KHẢO .....	92
PHỤ LỤC.....	101

## DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

STT	Từ viết tắt	Từ đầy đủ
1	Alg-F127	Sodium alginate-g- Pluronic F127
2	Alg-F127-FA	Sodium alginate-g- Pluronic F127-Acid folic
3	BZA	Benzoylacetone
4	Cys	Cystamine dihydrochlorid
5	DLS	Dynamic light scattering
6	DMSO	Dimethyl Sulfoxide
7	EDC	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide
8	F127	Pluronic F127
9	FA	Acid folic
10	FDA	Food and Drug Administration
11	FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy
12	G	$\alpha$ -L-gulonate
13	Glu	Acid glutamic
14	<sup>1</sup> H-NMR	Proton nuclear magnetic resonance
15	LCGT	Lower critical gelation temperature
16	M	$\beta$ -D-mannuronate
17	Na-Alg	Sodium alginate
18	Na-Alg-Cys	Sodium alginate-g- cystamine
19	NHS	N-hydroxysuccinimide
20	NPC	p-nitrophenyl chloroformate
21	PABA	acid p-aminobenzoic
22	PBS	Phosphate buffer
23	PEO	Poly (ethylene oxide)

24	AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide
25	DMARDs	Disease-modifying antirheumatic drugs
26	HPLC	High-performance liquid chromatography
27	MTX	Methotrexate
28	RSM	Phương pháp bề mặt đáp ứng (response surface methodology)
29	UV-Vis	Quang phổ tử ngoại khả kiến (ultraviolet – visible spectroscopy)
30	VKDT	Viêm khớp dạng thấp
31	AO/PI	Acridine orange/Propidium iodide
32	BCS	Biopharmaceutics Classification System
33	DMEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
34	DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F12
35	EMA	European Medicines Agency
36	FA-Alg-Plu	Folic acid-Alginate-Pluronic F127
37	FBS	Fetal bovine serum
38	IC <sub>50</sub>	Half-maximal inhibitory concentration
39	IL	Interleukine
40	LPS	Lipopolysaccharide
41	MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide

42	MTX/FA-Alg-Plu	Folic acid-alginate-pluronic mang Methotrexate
----	----------------	---

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1 Cấu trúc monomer và khối phân bố cầu muối Alginate. ....	6
Hình 1.2 Cấu trúc Pluronic F-127.....	10
Hình 1.3 Sơ đồ biểu diễn điều chế nanogel CHP (cholesterol-bearing pullulan) bằng phương pháp vật lý liên kết chéo (tự lắp ráp) <sup>23</sup> . ....	13
Hình 1.4 Cấu trúc hóa học của Methotrexate .....	16
Hình 1.5 Sơ đồ cơ chế tác dụng của MTX.....	17
Hình 1.6 Cấu trúc của acid folic .....	19
Hình 1.7 Kết quả thử nghiệm hệ nano MTX của Roun Heo và cộng sự <sup>[32]</sup> (2013). (a) Minh họa hiệu quả của hệ tiểu phân nano polymer mang MTX trong điều trị VKDT. (b) kích thước hạt nano chứa MTX và đồ thị biểu diễn quá trình giải phóng MTX theo thời gian. (c) mô hình phân khớp gối của các phương án điều trị và mức độ tổn thương sụn, lượng bạch cầu trung tính và viêm hoạt dịch (d). (e) giải phẫu học một số cơ quan của chuột sau khi điều trị. WT: chuột bình thường, nhóm chứng: Vesicle (PBS), DSNP (hệ tiểu phân nano không mang thuốc), MTX, MTX-DSNPs.....	21
Hình 1.8 Kết quả của Jinlong Zhao <sup>[36]</sup> và cộng sự. (A) đánh giá hiệu quả xâm nhập của hệ nano mang tác nhân FA, so sánh với hệ không có FA trong 2 điều kiện nuôi đại thực bào có kích loại LPS và không kích hoạt LPS. DAPI: chất nhuộm nhân tế bào, Rhodamine B: được tải trong hệ nano, để đánh dấu khả năng xâm nhập. (B) kích thước và hình ảnh (C) bàn chân chuột công viêm khớp AIA sau khi điều trị bằng hệ tiểu phân nano có FA và không FA mang MTX, so sánh với các mẫu không điều trị AIA, mẫu chuột công không viêm khớp và MTX tự do.....	25
Hình 1.9 Hệ tiểu phân nano polymer mang MTX của nhóm tác giả MukeshDhanka et al <sup>[41]</sup> .....	27
Hình 2.1 Sơ đồ phản ứng tổng hợp dẫn xuất Na-Alg-Cys.....	36
Hình 2.2 Quy trình tổng hợp Na – Alg – Cys.....	37
Hình 2.3 Sơ đồ tổng hợp Alg-F127 .....	41

Hình 2.4 Quy trình tổng hợp Alg – F127.....	41
Hình 2.5 Sơ đồ tổng hợp Alg-F127-FA.....	44
Hình 2.6 Nguyên tắc của phương pháp Griess .....	52
Hình 3.1 Đường chuẩn dung dịch L-alanine có hàm lượng từ 0-140 ppm phản ứng với dung dịch TNBS 0,1% trong NaHCO <sub>3</sub> 0,1M .....	54
Hình 3.2 Số nhóm NH <sub>2</sub> có trong Na-Alg-cys với các phương án sử dụng EDC/NHS/Cys tỉ lệ mol khác nhau (Phương án 1: 1:1:1; phương án 2: 1:1:0,5 và phương án 3: 1:0:1) ở các điều kiện pH khác nhau. ....	55
Hình 3.3 Phổ FT-IR của Na-Alg, Cys và Na-Alg-Cys tổng hợp sử dụng EDC/NHS/Cys .....	58
Hình 3.4 Phổ <sup>1</sup> H-NMR của Na-alg-cys trong môi trường D <sub>2</sub> O. ....	60
Hình 3.5 Phổ FT-IR của Alg-F127, Na-Alg-Cys và NPC-F127-OH .....	62
Hình 3.6 Phổ <sup>1</sup> H-NMR của Alg-F127.....	63
Hình 3.7 Phổ FT-IR của Alg-F127-FA, FA và Alginate-F127. ....	65
Hình 3.8 Phổ <sup>1</sup> H-NMR của Alg-F127-FA trong dung môi D <sub>2</sub> O, 500HZ .....	66
Hình 3.9 Phổ UV-Vis của (A) Na-alg, (B) NA-alg-cys, (C) Alg-F127, (D) Acid folic và (F) Alg-F127-FA trong dung dịch NaHCO <sub>3</sub> 0,01M .....	67
Hình 3.10 Phản ứng đồng fphaan hóa của BZA <sup>[67]</sup> .....	68
Hình 3.11 Phổ hấp thụ UV-VIS của BZA .....	69
Hình 3.12 Đồ thị biểu diễn tương quan giữa logarit nồng độ và mật độ quang. ....	71
Hình 3.13 Kết quả kích thước hạt nanogel ở 25°C .....	74
Hình 3.14 Kết quả kích thước hạt nanogel ở 37°C .....	75
Hình 3.15 Đồ thị bề mặt đáp ứng biểu diễn sự phụ thuộc của hiệu suất .....	78
Hình 3.16 Đồ thị bề mặt đáp ứng biểu diễn sự phụ thuộc của kích thước .....	79
Hình 3.17 Sơ đồ đường chuẩn MTX .....	81
Hình 3.18 Sơ đồ giải phóng thuốc MTX .....	83

Hình 3.19 Ảnh hưởng của FA-Alg-Plu (A), MTX (B) và MTX/FA-Alg-Plu (C) lên sự sản xuất NO của dòng đại thực bào RAW264.7. Dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (n = 3). \* p < 0,05. .... 87

Hình 3.20 Ảnh hưởng của FA-Alg-Plu, MTX và MTX/ FA-Alg-Plu lên sự sản xuất NO của dòng đại thực bào RAW264.7. (A) Tế bào được ủ với chất thử nghiệm trước, sau đó 1 giờ kích thích LPS. (B) Tế bào được kích thích với LPS trước, sau đó 1 giờ ủ với chất thử nghiệm. Dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (n = 3), ns: no significant difference (không có sự khác biệt đáng kể)..... 89

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1 Nguyên liệu - hóa chất:.....	30
Bảng 2.2 Các dòng tế bào thử nghiệm.....	32
Bảng 2.3 Danh mục trang thiết bị.....	32
Bảng 2.4 Danh mục dụng cụ.....	33
Bảng 2.5 Các biến lựa chọn trong khảo sát tìm điều kiện tổng hợp Na-Alg-Cys. ...	40
Bảng 2.6 Tỷ lệ khối lượng ghép mạch giữa Na – Alg – Cys với NPC – F127 – OH .....	42
Bảng 2.7 L-alanine được pha từ nồng độ 0 -140 ppm.....	43
Bảng 2.8 Quy trình phân tích hàm lượng nhóm amine bậc I.....	43
Bảng 2.9 Giới hạn và các mức độ đã được mã hóa của các yếu tố khảo sát thực nghiệm .....	47
Bảng 3.1 Quy đổi hàm lượng nhóm NH <sub>2</sub> của các mẫu Na-alg-cys theo nồng độ mol .....	57
Bảng 3.2 Hiệu suất phản ứng ghép mạch Alg-F127 với các khối lượng Pluronic F127 khác nhau. ....	61
Bảng 3.3 Độ hấp thu của các dung dịch APF mang BZA .....	70
Bảng 3.4 Bảng kết quả thực nghiệm.....	72
Bảng 3.5 Ma trận kế hoạch thực nghiệm và kết quả thực nghiệm .....	77
Bảng 3.6 Kết quả khảo sát nồng độ dung dịch Alg – F127 – FA mang MTX.....	80
Bảng 3.7 Tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của MTX .....	81
Bảng 3.8 Số liệu MTX được tải vào trong cấu trúc Alg – F127 – FA của công thức lựa chọn.....	82
Bảng 3.9 Số liệu quá trình phóng thích thuốc MTX.....	82
Bảng 3.10 Giá trị IC <sub>50</sub> của MTX tự do và hệ MTX/FA-Alg-Plu sau 48 và 72 giờ trên dòng tế bào RAW264.7.....	85



Bảng 3.11 Giá trị $IC_{50}$ của MTX tự do và hệ MTX/FA-Alg-Plu sau 48 và 72 giờ trên dòng tế bào MSC.....	85
---	----

## TÓM TẮT

Methotrexate là thuốc thuộc nhóm DMRADs, được lựa chọn đầu tiên trong phác đồ điều trị ở bệnh nhân VKDT. MTX phải được điều trị kéo dài, hiệu quả của thuốc thể hiện rõ sau 3 tháng điều trị. Tuy nhiên, các nghiên cứu lâm sàng cho thấy, do nguyên nhân tính tan của MTX, MTX tích lũy trong gan, gây các độc tính cho gan, và từ đó kéo theo nhiều bệnh không mong muốn. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu tạo hệ chất mang cho Methotrexate để khống chế về liều lượng từ đó làm giảm độc tính của MTX. Cụ thể, nghiên cứu điều chế hệ nanogel nhạy nhiệt trên cơ sở dẫn xuất alginate với pluronic F127 có gắn tác nhân hướng đích folic acid, và sử dụng để nang hóa MTX. Thông qua <sup>1</sup>H-NMR và FT-IR kết hợp với UV-vis, cấu trúc của vật liệu tổng hợp từ dẫn xuất alginate-pluronic với FA (FA-Alg-F127) được chứng minh. Vật liệu FA-Alginate-Pluronic tạo được micelles ở nồng độ  $339,766 \pm 1,104$  ppm, và có sự ổn định về kích thước khi nồng độ đạt trên 1000 ppm qua khảo sát bằng phương pháp DLS ở nhiệt độ 25°C. Đồng thời, kích thước hạt tạo từ FA-Alg-F127 cho thấy sự ảnh hưởng mạnh bởi nhiệt độ. Kích thước hạt đạt 45 nm ở nhiệt độ 25°C và giảm xuống 33nm ở nhiệt độ 37°C, cho thấy hạt nanogel tạo thành có tính chất nhạy nhiệt. Sử dụng phương pháp thiết kế thí nghiệm trên cơ sở RSM, công thức bào chế MTX được đưa ra như sau: khối lượng FA-Alg-F127 là 20mg nang hóa với khối lượng thuốc MTX là 4 mg/ml. Với công thức này, hàm lượng MTX giải phóng khỏi hệ cho thấy sự phù hợp với phác đồ điều trị. Hàm lượng MTX giải phóng khỏi hệ sau 1h đạt 10% và tăng lên 30% trong vòng 6h, đạt 60% MTX giải phóng ra khỏi hệ sau 24h. Khảo sát trên dòng RAW 264.7 và dòng tế bào MSC cho thấy nang hóa MTX trong hệ chất mang FA-Alg-F127, độc tính MTX được giảm đáng kể. Sau 72 h với cùng MTX (120ppm), gần 80% tế bào Raw264.7 và tế bào MSC bị ức chế khi thực hiện với MTX tự do, trong khi đó, 40-50% tế bào bị ức chế ghi nhận khi các dòng tế bào này nuôi cấy với MTX/ FA-Alg-Plu. Đánh giá dược tính của MTX và MTX bào chế được thực hiện trên mục tiêu nitric oxide được sản sinh ra khi tế bào

RAW264.7 bị kích thích với yếu tố gây viêm LPS. Khi tế bào bị kích viêm trước 18h, hàm lượng NO được ức chế với MTX / FA-Alg-Plu gần như tương đương với MTX tự do sau 20 giờ ủ. Tuy nhiên, khi tế bào viêm được ủ MTX trong 6h, hàm lượng NO được ức chế bởi MTX / FA-Alg-Plu cao hơn hẳn khi so sánh với MTX tự do. Như vậy có thể thấy, chất mang hỗ trợ cho MTX được thâm nhập vào tế bào viêm ở thời điểm ban đầu. Trên cơ sở các tiền đề trên có thể kết luận, MTX nang hóa trong nanogel hình thành từ vật liệu tổng hợp FA-Alg-F127 tạo hệ bào chế mới cho MTX với khả năng giải phóng thuốc có tính kiểm soát, giảm được tác dụng phụ liên quan đến độc tính, tăng hoạt tính thuốc do tăng cường khả năng nhập bào.

## ABSTRACT

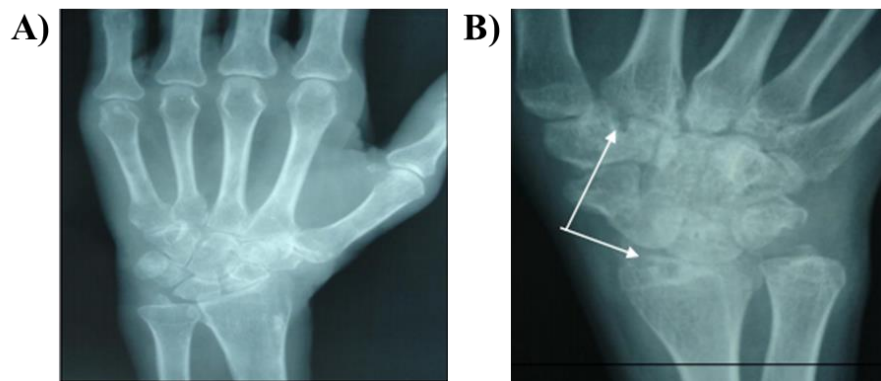
Methotrexate is a drug of the DMRADs class, the first choice in the treatment regimen in patients with RA. MTX must be treated for a long time, the effect of the drug is evident after 3 months of treatment. However, clinical studies show that, due to the solubility of MTX, MTX accumulates in the liver, causing hepatotoxicity, and thereby leading to many unwanted diseases. Therefore, this study was carried out with the goal of creating a carrier system for Methotrexate to control the dose, thereby reducing the toxicity of MTX. Specifically, the study prepared a heat-sensitive nanogel system based on alginate derivatives with pluronic F127 with folic acid-targeting agent attached, and used to encapsulate MTX. Through  $^1\text{H-NMR}$  and FT-IR combined with UV-vis, the structure of composites from alginate-pluronic derivative with FA (FA-Alg-F127) is demonstrated. The FA-Alginate-Pluronic material produced micelles at a concentration of  $339,766 \pm 1,104$  ppm, and had size stability when the concentration reached over 1000 ppm by DLS method at  $25^\circ\text{C}$ . At the same time, the particle size generated from FA-Alg-F127 shows a strong influence by temperature. The particle size reached 45 nm at  $25^\circ\text{C}$  and decreased to 33 nm at  $37^\circ\text{C}$ , showing that the resulting nanogel has thermosensitive properties. Using the experimental design method on the basis of RSM, the formulation of MTX is given as follows: the volume of FA-Alg-F127 is 20mg encapsulated with a control amount of MTX drug of 4 mg/ml. With this formula, the amount of MTX released from the system shows the agreement with the treatment regimen. The content of MTX released from the system after 1 hour reached 10% and increased to 30% within 6 hours, reaching 60% of MTX released from the system after 24 hours. Investigation on RAW264.7 cell line and MSC cell line showed that by encapsulation of MTX in FA-Alg-F127 carrier system, MTX toxicity was significantly reduced. After 72 incubation with the same MTX (120ppm), nearly 80% of RAW264.7 cells and MSC cells were inhibited when treated with free MTX, whereas 40-50% of cells were inhibited when

these cell lines were tested. cultured with MTX/FA-Alg-F127. Pharmacological evaluation of MTX and MTX formulation was performed on the target of nitric oxide produced when RAW264.7 cells were stimulated with the inflammatory factor LPS. When cells were inflamed before 18 h, the NO content inhibited with MTX/FA-Alg-F127 was almost equivalent to that of free MTX after 20 h of incubation. However, when inflammatory cells were incubated with MTX for 6 h, the NO content inhibited by MTX/FA-Alg-F127 was significantly higher when compared with free MTX. Thus, it can be seen that the support carrier for MTX is infiltrated into inflammatory cells at the initial time. On the basis of the above premises, it can be concluded that the encapsulated MTX in the nanogel formed from the FA-Alg-F127 composite material creates a new preparation system for MTX with the ability to control drug release, reduce the effects of the drug. Side effects related to toxicity, increased drug activity due to enhanced cell entry.

## MỞ ĐẦU

Viêm khớp dạng thấp (VKDT) là một bệnh viêm tự miễn hệ thống mạn tính đặc trưng bởi tình trạng sưng khớp, đau khớp và phá hủy màng hoạt dịch khớp, dẫn đến tàn phế nặng nề và tử vong sớm<sup>[1]</sup>. Đây là một bệnh khớp viêm phổ biến nhất, với tỷ lệ hiện mắc trên toàn cầu khoảng 0,5 - 1% dân số <sup>[2]</sup>, do vậy ảnh hưởng nặng nề đến kinh tế và xã hội.

Sưng, nóng, đau có thể có ở nhiều khớp nhỏ, nhờ ngoại vi có tính chất đối xứng hai bên là những triệu chứng lâm sàng điển hình, hay gặp trong VKDT. Sưng đau các khớp kiểu viêm, diễn biến thường kéo dài trên 6 tuần và nhiều đợt tái phát là các biểu hiện thường gặp của bệnh VKDT. Ngoài ra, cứng khớp buổi sáng (CKBS) cũng thường gặp trong các đợt tiến triển của bệnh. Trên X-quang biểu hiện là những tổn thương hủy đầu xương, khe khớp hẹp nham nhở, dính khớp, bán trật khớp, lệch trục khớp (hình 1). Một số trường hợp tổn thương nội tạng như màng tim, màng phổi, não thường là hệ quả do VKDT gây ra.



Hình ảnh bào mòn xương X-quang bàn tay bệnh nhân VKDT (A) <sup>[3]</sup> và Cộng hưởng từ khớp tổn thương (B) <sup>[4]</sup>

Điều trị VKDT cần đạt mục tiêu lui bệnh trên lâm sàng, đồng thời làm chậm hoặc giảm tình trạng phá hủy khớp. Trong điều trị nội khoa VKDT, các thuốc điều trị cơ bản hay còn gọi là nhóm thuốc DMARDs (Disease-modifying antirheumatic

drugs) kinh điển (Methotrexate, sulfasalazine, hydroxychloroquine...) có vai trò quan trọng trong việc ổn định bệnh và cần điều trị kéo dài. Các nghiên cứu lâm sàng cho thấy điều trị cơ bản bằng DMARDs làm chậm hoặc làm ngừng tiến triển của bệnh, cần điều trị lâu dài và theo dõi các triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng trong suốt thời gian điều trị.

Trong các thuốc thấp khớp nhóm DMARDs thì Methotrexate được sử dụng điều trị ngay từ giai đoạn đầu của bệnh. MTX là thuốc được Food and Drug Administration (FDA) chấp thuận trong điều trị VKDT<sup>[5]</sup>, mới đây là thuốc được Hiệp hội Phòng chống Bệnh khớp Châu Âu năm 2015<sup>[6]</sup> (European League against Rheumatism - EULAR) khuyến cáo dùng trong điều trị VKDT mức độ trung bình hoặc nặng<sup>[5]</sup>, hiệu quả điều trị thay đổi tùy theo các nghiên cứu<sup>[7]</sup>, có thể sử dụng đơn trị liệu hoặc phối hợp với các thuốc khác hay phương pháp trị liệu khác.

Do e ngại độc tính của Methotrexate, từ năm 1951 đến năm 1980, chỉ có một vài thông báo trong điều trị VKDT bằng Methotrexate với liều tiêm 15mg/tuần và liều uống 7,5mg đến 15mg/tuần. Các trường hợp ghi nhận trong lâm sàng, sử dụng Methotrexate thường kèm theo nhiều tác dụng phụ không mong muốn như hạ bạch cầu, suy gan, suy thận, tổn thương phổi mạn tính. Bên cạnh đó, theo các báo cáo y khoa, các yếu tố nguy cơ gây độc cho gan, béo phì, đái tháo đường và suy giảm chức năng thận được ghi nhận ở ca lâm sàng sử dụng MTX liều cao. Biến chứng nặng nhất được công bố là nhiễm độc phổi ở bệnh nhân điều trị bằng MTX, thậm chí ở liều thấp 7,5 mg/tuần. Đã có tử vong do Methotrexate gây ra bệnh phổi kẽ mạn tính.

Giải pháp tăng hiệu quả *in vivo* của MTX, điều chỉnh, không chế liều lượng phù hợp sử dụng các hệ phân phối thuốc (drug delivery system) đã và đang được nghiên cứu rộng rãi. Hiện nay, có nhiều hệ tiểu phân nano vận chuyển thuốc như tiểu phân nano polymer (nanogel, micelles), tiểu phân nano lipid (liposome, nano nhũ tương)

được công bố trong lĩnh vực bào chế. Trong các hệ tiểu phân nano trên thì nano polymer có nguồn gốc sinh học, đặc biệt polysaccharide (alginate, chitosan, dextran sulfate, hyaluronic acid) nhận được rất nhiều sự quan tâm trong những năm gần đây. Các polymer sinh học có nhiều nhóm chức năng, do đó dễ dàng biến tính với các tác nhân như folic acid (tác nhân được khuyến cáo sử dụng để làm giảm các tác dụng phụ của Methotrexate) hoặc/và polymer thân nước linh động và nhạy kích thích (nhạy nhiệt độ, pluronic hay nhạy pH cyclodextrin) nhằm làm tăng tương tác của hệ chất mang và tế bào, khống chế khả năng giải phóng thuốc trên đường đến đích tác dụng, giảm nguy cơ kết tụ trong tuần hoàn máu, tăng thời gian lưu thông và cải thiện được tính thấm. Bên cạnh đó, các polymer sinh học thường có độ hòa tan trong nước tương đối cao, tính không độc, khả năng phân hủy sinh học, tính tương hợp sinh học và các đặc điểm tạo gel độc đáo. Do đó, được ứng dụng rộng rãi trong y sinh như truyền tải thuốc và protein, chữa lành vết thương, nuôi cấy tế bào, tái tạo mô (tái tạo mạch máu, tái tạo xương,...)<sup>[1]</sup>. Ví dụ, tiểu phân nano từ alginate hiện đang được nhiều nhà khoa học quan tâm, nghiên cứu trong ứng dụng tạo hệ phân phối thuốc điều trị VKDT. Manjanna (2010) đã tối ưu hóa và phát triển thành công hệ phân phối thuốc aceclofenac bằng cách sử dụng sodium alginate làm chất mang ưa nước và calcium chloride làm chất liên kết ngang. Nghiên cứu giải phóng ổn định qua đường uống, để giảm số lần dùng thuốc, loại bỏ các tác dụng phụ liên quan đến liều lượng. Trong khi tăng nồng độ alginate làm tăng kích thước hạt trung bình, tỷ lệ trương nở và hiệu quả mang thuốc. Kích thước hạt trung bình của microbeads chứa thuốc nằm trong khoảng  $596,45 \pm 1,04$  đến  $880,10 \pm 0,13$   $\mu\text{m}$ . Hiệu suất mang thuốc thu được trong khoảng 63,24-98,90% (w/v). Sự giải phóng thuốc khỏi microbeads ở pH 1,2 là không đáng kể. Trong điều kiện trung tính, các hạt sẽ trương lên và việc giải phóng thuốc phụ thuộc vào độ trương <sup>[2]</sup>.

Hiện nay, các nghiên cứu về dẫn truyền thuốc dựa trên nền copolymer nhạy nhiệt



đang được chú trọng nhằm nâng cao tính sinh khả dụng của thuốc và hạn chế các tác dụng không mong muốn. Chính vì vậy trong nghiên cứu này, đề tài “Nghiên cứu điều chế và bước đầu đánh giá hiệu quả của hệ nano alginate-pluronic mang thuốc Methotrexate định hướng ứng dụng điều trị viêm khớp dạng thấp” được chọn cho đề tài luận văn tốt nghiệp cao học.

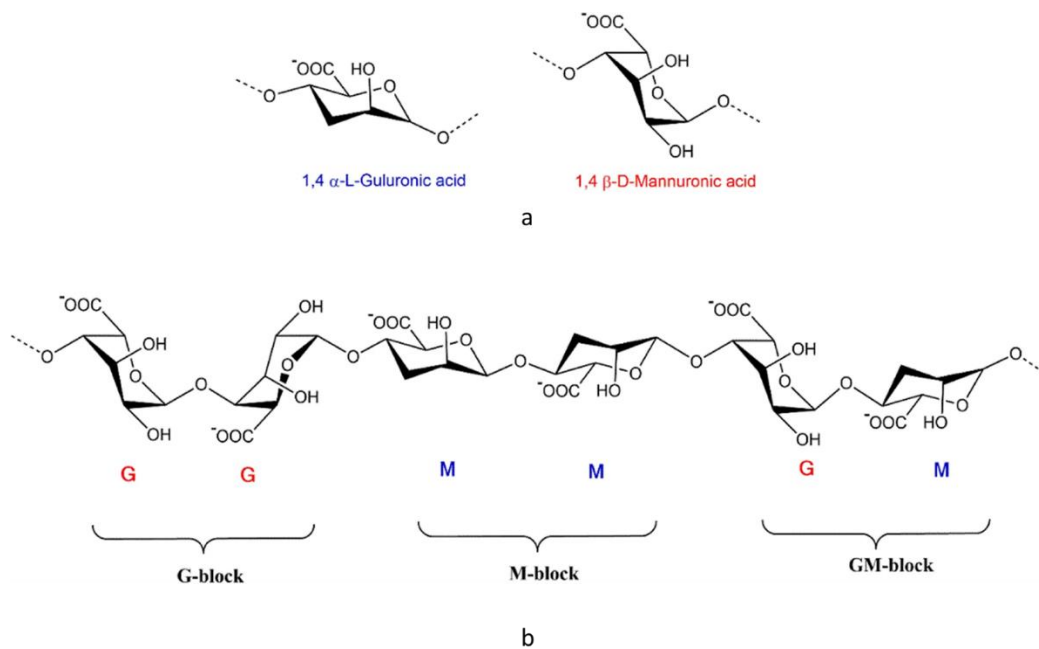
## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

### 1.1. TỔNG QUAN VỀ ALGINATE

#### 1.1.1. Giới thiệu Alginate:

Alginate được Stanford giới thiệu lần đầu vào năm 1881, là một polysaccharide như một thành phần chủ yếu xuất hiện trong cấu trúc tảo nâu biển (Phaeophyta). Tuy nhiên, một loài vi khuẩn đất như *Azotobacter vineladii* và một số loài *Pseudomonas* cũng sản xuất ra một loại polymer có cấu trúc giống như alginate. Đặc biệt, vi khuẩn tiết alginate *Pseudomonas aeruginosa* ở bệnh nhân xơ nang đã được chú ý nhiều trong những năm gần đây. Trong tảo nâu, alginate là polysaccharide phong phú nhất chiếm tới 40% chất khô, chủ yếu xuất hiện ở thành tế bào và khoảng gian bào nơi nó bao gồm hỗn hợp không hòa tan của canxi, magiê, natri và muối kali.<sup>[8]</sup>

Alginate là một họ các copolymer nhị phân tuyến tính gồm (1→4) acid  $\alpha$ -L-guluronic (G) được liên kết glycoside và epimere C-5 của nó, gốc acid  $\beta$ -D-mannuronic (M) (Hình 1.1 a) . Lượng tương đối của hai monome acid uronic cũng như sự sắp xếp tuần tự của chúng dọc theo chuỗi polymer rất khác nhau, tùy thuộc vào nguồn gốc của alginate. Các gốc acid uronic được phân bố dọc theo chuỗi polymer theo mô hình các khối, trong đó các khối đồng nhất của các gốc G (khối G), các khối đồng nhất của các gốc M (khối M) và các khối có trình tự xen kẽ của các đơn vị M và G (khối MG ) cùng tồn tại (Hình 1.1b).<sup>[8]</sup>



Hình 1.1 Cấu trúc monomer và khối phân bố cẩu muối Alginate.

Alginate là một nhóm các polymer tự nhiên tương hợp sinh học và phân hủy sinh học, đã được khai thác và nghiên cứu rộng rãi trong lĩnh vực dược phẩm và y sinh. Alginate được sử dụng rộng rãi làm nguyên liệu thô để điều chế nhiều dạng bào chế phân phối thuốc dựa trên polymer sinh học. Nhiều hạt composite dựa trên alginate đã được nghiên cứu để duy trì sự giải phóng thuốc để sử dụng trong điều trị các bệnh khác nhau. Trong những năm gần đây, các vật liệu vô cơ khác nhau như montmorillonite, hydroxyapatite (HAp) và canxi cacbonate ( $\text{CaCO}_3$ ), v.v., đã được gia cố bên trong chất nền alginate để tạo điều kiện giải phóng dược chất ổn định hơn trong thời gian dài hơn. Chương hiện tại đề cập đến một cuộc thảo luận toàn diện về các nghiên cứu được báo cáo liên quan đến các hạt hỗn hợp vô cơ alginate cho các ứng dụng giải phóng thuốc bền vững.<sup>[9]</sup>

## **1.1.2. Tính chất và ứng dụng của Alginate:**

### **1.1.2.1. Độ nhớt**

Độ nhớt của dung dịch alginate chủ yếu phụ thuộc vào trọng lượng phân tử và nồng độ của mẫu polymer. Tuy nhiên, do tính linh hoạt nội tại của các khối chuỗi khác nhau nên thành phần cũng có thể ảnh hưởng đến độ nhớt cuối cùng của dung dịch. Vì alginate là một polyelectrolyte tích điện âm cao, nên lực đẩy tĩnh điện giữa các nhóm tích điện sẽ tiếp tục góp phần tạo nên độ nhớt bằng cách buộc phân tử vào một cấu trúc cuộn ngẫu nhiên rất dài. Do đó, cường độ ion của dung dịch sẽ có tầm quan trọng trong khía cạnh này vì cường độ ion cao sẽ dẫn đến việc che chắn các điện tích và do đó làm giảm khả năng mở rộng chuỗi<sup>[8]</sup>.

Tuy nhiên, việc sử dụng các vật liệu có trọng lượng phân tử rất cao bị hạn chế bởi độ nhớt cao của chúng, ví dụ: làm cho quá trình lọc vô trùng và xử lý chung của giải pháp trở nên khó khăn. Ngoài ra, đã có báo cáo rằng các dung dịch alginate có độ nhớt rất cao có thể làm giảm khả năng sống của tế bào do lực cắt cao cần thiết để trộn các tế bào với các dung dịch này<sup>[8]</sup>.

### **1.1.2.2. Độ hòa tan**

Natri alginate và hầu hết các alginate khác của kim loại hóa trị một đều hòa tan trong nước và tạo ra dung dịch có độ nhớt cao. Tuy nhiên, độ pH của dung môi là một thông số thiết yếu xác định độ hòa tan của alginate trong nước vì nó sẽ ảnh hưởng đến sự hiện diện của điện tích tĩnh điện trên dư lượng acid uronic. Do đó, acid alginic, dạng alginate bị proton hóa, thường không hòa tan trong nước tạo thành gel hoặc kết tủa. Giá trị pKa của hai monomer đã được xác định là 3,38 đối với M và 3,65 đối với G (trong 0,1M NaCl), và do đó, pKa của polymer tăng khi hàm lượng G tăng. Tuy nhiên, độ hòa tan của mẫu alginate ở pH thấp không nhất thiết là ảnh hưởng trực tiếp của pKa. Trên thực tế, một mẫu có cấu trúc đa xen kẽ tinh khiết đã được chứng minh là hòa tan hoàn toàn trong toàn bộ phạm vi pH ở thời gian cân

bằng ngắn. Lý do cho điều này được cho là do cấu trúc, dựa trên sự bất thường của các liên kết trực/xích đạo trong các chuỗi xen kẽ. Ngoài độ pH quan trọng đối với khả năng hòa tan của alginate trong nước, cường độ ion của chất tan và sự hiện diện của các ion hóa trị hai đóng vai trò quan trọng do tác dụng loại bỏ muối và tạo gel tương ứng.<sup>[8]</sup>

### **1.1.2.3. Khả năng tạo gel**

Các ứng dụng hiện tại và tương lai của alginate chủ yếu liên quan đến đặc điểm nổi bật nhất của phân tử alginate – sự hình thành gel hướng ion với sự có mặt của một số cation đa hóa trị như  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  và  $\text{Sr}^{2+}$ . Sự liên kết của các ion có tính chọn lọc cao và ái lực phụ thuộc rất nhiều vào thành phần alginate. Ái lực của alginate với các kim loại kiềm thổ đã được chứng minh là tăng theo thứ tự  $\text{Mg}^{2+} \ll \text{Ca}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Ba}^{2+}$ . Cụ thể hơn, từ các thí nghiệm liên quan đến quá trình thẩm tách cân bằng của alginate cho thấy rằng độ chọn lọc đối với các kim loại kiềm thổ tăng rõ rệt khi tăng hàm lượng G, nhưng các khối MM và MG hầu như không có tính chọn lọc.<sup>[8]</sup>

Sự tạo gel là quá trình xảy ra theo chiều thuận của phản ứng hóa học và tự tương tác, điều này về mặt vật lý được giải thích bằng liên kết không thuận lợi về mặt entropi của ion hóa trị hai đầu tiên giữa hai khối G và liên kết này trở nên thuận lợi hơn cho các ion sau (cơ chế dây kéo). Yêu cầu tối thiểu để tạo gel với lượng dư ion  $\text{Ca}^{2+}$  là từ 8 đến 20 đơn vị G.<sup>[8]</sup>

### **1.1.2.4. Tính tương hợp sinh học**

Alginate là polymer đa anion tự nhiên, polymer không gây miễn dịch, không độc hại, phân hủy sinh học isanon. Trong thiết kế thuốc hợp lý cho hóa trị liệu, alginate cho thấy một ứng dụng trong điều trị khối u.<sup>[10]</sup>

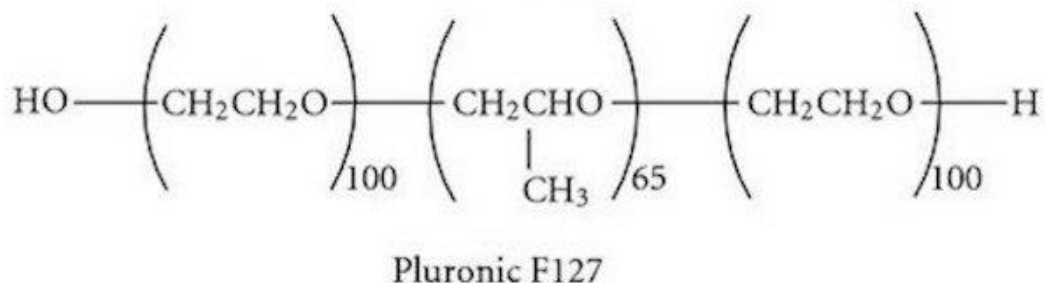
Việc sử dụng alginate qua đường uống đã không được chứng minh là gây ra nhiều phản ứng miễn dịch không giống như các dạng tiêm tĩnh mạch và có báo cáo rằng alginate không độc hại và có thể phân hủy sinh học khi sử dụng qua đường uống. Mặc dù tính tương thích sinh học của alginate đã được nghiên cứu rộng rãi, vẫn có sự bất đồng trong tài liệu. Trong trường hợp tiêm tĩnh mạch, việc gây ra phản ứng dị vật và xơ hóa đã được báo cáo đối với hầu hết các alginate thương mại, trong khi các báo cáo khác cho thấy ít hoặc không có phản ứng miễn dịch xung quanh các mô cấy alginate. Phản ứng tạo miễn dịch đối với việc tiêm tĩnh mạch có thể là do các chất gây ô nhiễm độc hại từ alginate thương mại.<sup>[10]</sup>

## **1.2.PLURONIC F127:**

### **1.2.1. Giới thiệu Pluronic F127:**

Pluronic (polyxamer) là một polymer không ion của polyoxyethylen-polyoxypropylen-polyoxyethylen có công thức chung PEO<sub>n</sub>-PPO<sub>n</sub>-PEO<sub>n</sub> (A-B-A). Nó có nhiều ứng dụng trong dược phẩm.<sup>[11]</sup>

Các Pluronic ở dạng dung dịch với sự có mặt của acid, kiềm và các ion kim loại rất ổn định. Pluronic thương mại với bộ ba A-B-A có sẵn ở nhiều loại khác nhau về trọng lượng phân tử và dạng vật lý. Tùy thuộc vào ký hiệu vật lý, các loại được chia thành các dạng như F cho mảnh, P cho bột nhào hoặc L cho chất lỏng. Các polaxamer thường được sử dụng là: 188 (F-68), 237 (F-87), 338 (F-108) và 407 (F-127).<sup>[12]</sup>



Hình 1.2 Cấu trúc Pluronic F-127

### 1.2.2. Tính chất và đặc điểm của Pluronic F127:

Pluronic F-127 (PF-127) là một chất đồng trùng hợp có trọng lượng 12.000 dalton, tỷ lệ PEO/PPO là 2:1 và không độc hại, có độ nhớt thấp dưới 4 °C và tạo thành gel bán rắn ở nhiệt độ cơ thể (25–29°C). PF-127 hòa tan trong nước lạnh nhiều hơn trong nước nóng do tăng khả năng hòa tan và liên kết hydro ở nhiệt độ thấp.<sup>[11]</sup>

Các dung dịch nước của PF-127 ở nồng độ từ 20–30% (m/m), biến đổi thuận nghịch thành gel ở một nhiệt độ nhất định, tức là chúng trở nên lỏng hơn ở nhiệt độ thấp hơn (4–5 °C) và biến thành gel ở nhiệt độ cơ thể (sự biến đổi này có thể đảo ngược và do đó dung dịch trở lại trạng thái lỏng ở nhiệt độ thấp)<sup>[11]</sup>. Sự tạo gel nhiệt này là kết quả của sự tương tác giữa các phân tử khác nhau của Pluronic. Sự gia tăng nhiệt độ làm thay đổi các quả cầu hydrat hóa xung quanh các đơn vị kỵ nước, do đó gây ra tương tác cao hơn giữa các đơn vị khác nhau này<sup>[13, 14]</sup>.

Nói cách khác, với sự gia tăng nhiệt độ của dung dịch PF-127 thì khối PPO có xu hướng khử nước và tạo thành lõi với lớp vỏ ngoài là chuỗi PEO ngậm nước tập hợp lại thành các mixen hình cầu. Cấu trúc micellar của chất đồng trùng hợp này trong môi trường nước có thể được sử dụng để kết hợp các thuốc ưa nước và kỵ nước, đồng thời kéo dài thời gian giải phóng thuốc<sup>[15, 16]</sup>. Ngoài ra, đặc điểm này, cùng với độc tính thấp, khả năng tương thích sinh học với tế bào và dịch cơ thể, và

đặc tính sinh miễn dịch yếu, có nghĩa là PF-127 là một polymer thường được sử dụng trong các hệ thống phân phối thuốc<sup>[11]</sup>.

### **1.2.3. Ứng dụng của gel Pluronic F127 trong dược phẩm:**

PF-127 (poloxamer 407) có thể được sử dụng làm chất mang cho một số đường dùng, bao gồm đường uống, dưới da, trong mũi, âm đạo, trực tràng, mắt và ngoài đường tiêu hóa<sup>[17, 18]</sup>. Trong vài năm gần đây, PF-127 cũng có một vai trò quan trọng trong các hệ thống phân phối thuốc qua da<sup>[17, 19]</sup>.

Một số nghiên cứu đã được thực hiện để thử nghiệm việc kết hợp PF-127 trong các liệu pháp ngắn hạn, chẳng hạn như kiểm soát khả năng sinh sản, kiểm soát cơn đau và điều trị nhiễm trùng<sup>[20]</sup>. Loại polymer này đã được thử nghiệm để sử dụng bên ngoài (phân phối tại chỗ và lâu dài) thuốc chống ung thư và chống viêm. Nó cũng đã được thử nghiệm trong nhãn khoa bằng cách sử dụng pilocarpine<sup>[11]</sup>. Đã có báo cáo nghiên cứu liên quan đến công thức ngoài đường tiêu hóa (tiêm bắp và tiêm dưới da) với interleukin-2 và kháng sinh<sup>[21]</sup>. Theo cách tương tự, poloxamer này đã được thử nghiệm thành công để mang peptide và protein (insulin, urease và các yếu tố tăng trưởng), thể hiện quá trình phân phối bền vững trong vài giờ<sup>[11]</sup>.

## **1.3.HỆ DẪN TRUYỀN NANOGEL:**

### **1.3.1. Tổng quan về hệ dẫn truyền nanogel:**

Với sự phát triển của công nghệ nano tiên tiến trong những thập kỷ gần đây, các chất mang nano đã xuất hiện và trở nên phổ biến trong y sinh. Các chất mang nano không chỉ đóng vai trò là chất mang các tác nhân hóa trị liệu thông thường do khả năng đóng gói thuốc mà còn là nền tảng cho liệu pháp kết hợp, chẩn đoán đa chức năng và trị liệu<sup>[22]</sup>.

Nanogel, một loại chất mang vận chuyển thuốc toàn thân, là copolymer có cấu trúc xốp có thể điều chỉnh ba chiều (3D) và kích thước hạt nằm trong phạm vi dưới



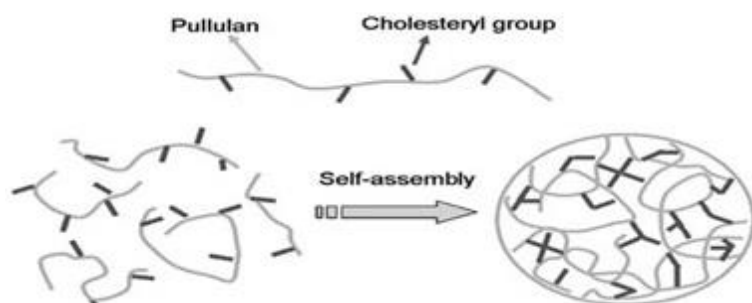
siêu vi kế, từ 20 đến 250 nm; nanogel có thể được phân biệt với microgel, có kích thước hạt nằm trong khoảng từ 1 đến 350  $\mu\text{m}$ , và copolymer hình thành tại chỗ, tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân phối cục bộ. Nanogel bao gồm nhiều loại polymer tự nhiên, polymer tổng hợp hoặc sự kết hợp của chúng, góp phần vào việc bao bọc các phân tử nhỏ, oligonucleotide và thậm chí cả protein. Những đặc tính độc đáo này trang bị cho nanogel khả năng phân phối thuốc, chẩn đoán và chụp ảnh<sup>[22]</sup>.

Là một loại hydrogel, nanogel giữ được bản chất ngậm nước cao và các đặc tính trương nở co lại của hydrogel trong các điều kiện môi trường khác nhau. Cấu trúc 3D của chúng cho phép đóng gói các thuốc kỵ nước hoặc ưa nước trong mạng lưới bên trong của chúng, có khả năng bảo vệ các thuốc này khỏi sự xuống cấp trong quá trình bảo quản hoặc lưu thông (chẳng hạn như sự xuống cấp do thủy phân hoặc enzyme). Không giống như các hạt nano điển hình, gel nano thể hiện kích thước hạt có thể điều chỉnh, hình dạng hạt và độ nhạy với pH, nhiệt độ, cường độ ion, điều kiện oxy hóa khử và các kích thích bên ngoài khác, mang lại cho chúng đặc tính giải phóng thuốc được kiểm soát hiệu quả. Hơn nữa, gel nano có thể được điều chỉnh để trở nên đa chức năng và được nhắm mục tiêu, đồng thời thời gian lưu thông của chúng có thể được kéo dài bằng cách biến đổi bề mặt<sup>[22]</sup>.

### **1.3.2. Cấu tạo của nanogel:**

Dựa trên các cấu trúc và khối xây dựng khác nhau trong nanogel, các phương pháp tổng hợp nanogel có thể được chia thành liên kết ngang hóa học và tự lắp ráp vật lý. Nanogel được hình thành bằng liên kết ngang hóa học thể hiện tính ổn định tốt hơn so với liên kết ngang vật lý thông qua liên kết cộng hóa trị giữa các nhóm chức trên chuỗi polymer. Trong khi đó, các kết nối thuận nghịch của các nanogel liên kết ngang vật lý thường phụ thuộc vào các tương tác không cộng hóa trị, chủ yếu bao gồm liên kết hydro, lực Van der Waals, tương tác kỵ nước, tương tác chủ-khách, tương tác tĩnh điện, v.v. Mặc dù tương tác của liên kết không cộng hóa trị vật

lý tương đối yếu hơn so với liên kết ngang cộng hóa trị hóa học, nhưng quá trình tự lắp ráp vật lý lại linh hoạt và thuận tiện hơn do không cần các phản ứng phức tạp. Phần này thảo luận về các phương pháp tổng hợp và các ví dụ về điều chế nanogel<sup>[22]</sup>.



Hình 1.3 Sơ đồ biểu diễn điều chế nanogel CHP (cholesterol-bearing pullulan) bằng phương pháp vật lý liên kết chéo (tự lắp ráp)<sup>23</sup>.

#### 1.3.2.1. Liên kết vật lý

Các nanogel liên kết ngang về mặt vật lý là các hạt siêu phân tử bao gồm các phân tử polymer được hình thành thông qua các tương tác không cộng hóa trị. Kích thước của nanogel có thể bị ảnh hưởng bởi nồng độ polymer và các điều kiện môi trường khác nhau, chẳng hạn như cường độ ion, nhiệt độ và độ pH, trong quá trình chuẩn bị nanogel<sup>[22]</sup>.

#### 1.3.2.2. Liên kết hóa học

Ngoài liên kết ngang vật lý, liên kết ngang hóa học là chiến lược phát triển nhất và linh hoạt hơn để xây dựng nanogel. Các phương pháp liên kết ngang hóa học bao gồm trùng hợp bằng nhũ tương, chuyển chuỗi phân mảnh bổ sung có thể đảo ngược, liên kết ngang hóa học dựa trên phản ứng click và liên kết chéo cảm ứng. Liên kết ngang amino thường được sử dụng để điều chế gel nano phân hủy sinh học dựa trên acid amin<sup>[22]</sup>.

### **1.3.3. Nanogel với vai trò là chất mang:**

Nanogel trương nở cao có thể kết hợp 30% trọng lượng hoặc nhiều phân tử sinh học và thuốc thông qua tương tác tĩnh điện, van der Waals, kỵ nước hoặc liên kết cộng hóa trị với chuỗi polymer. Khả năng tải này cao bất thường và vượt quá khả năng tải của liposome và mixen polymer. Do quá trình nạp thuốc, các nanogel co lại tạo thành các hạt nano ổn định, trong đó tác nhân sinh học bị cuốn vào. Việc đưa các polymer ưa nước phân tán (ví dụ PEG) vào cấu trúc nanogel có thể ngăn chặn sự kết tụ của chúng. Trong quá trình phân hủy phức hợp thuốc-nanogel, các chuỗi polymer ưa nước lộ ra trên bề mặt và tạo thành một lớp bảo vệ xung quanh nanogel. Khả năng kiểm soát và tính linh hoạt của hóa học polymer cho phép thiết kế một loạt các công thức thuốc và bao gồm nhiều hàng hóa trị liệu trong cùng một chất mang nanogel. Sự giải phóng thuốc đáp ứng với kích thích thông qua sự giảm thể tích do nhiệt độ hoặc pH gây ra cũng có thể rất hấp dẫn đối với các ứng dụng phân phối thuốc. Chức năng hóa của bề mặt nanogel có thể tạo điều kiện thuận lợi hơn nữa cho sự tích lũy có chọn lọc của chúng trong mô hoặc tế bào đích. Việc phát triển các nanogel có thể mang, bảo vệ, nhắm mục tiêu và giải phóng các tác nhân trị liệu theo cách được kiểm soát theo không gian và thời gian đang diễn ra tích cực và thiết kế hợp lý của chúng có thể cung cấp một nền tảng cho nhiều ứng dụng<sup>[24]</sup>.

### **1.3.4. Ứng dụng của nanogel nhạy nhiệt:**

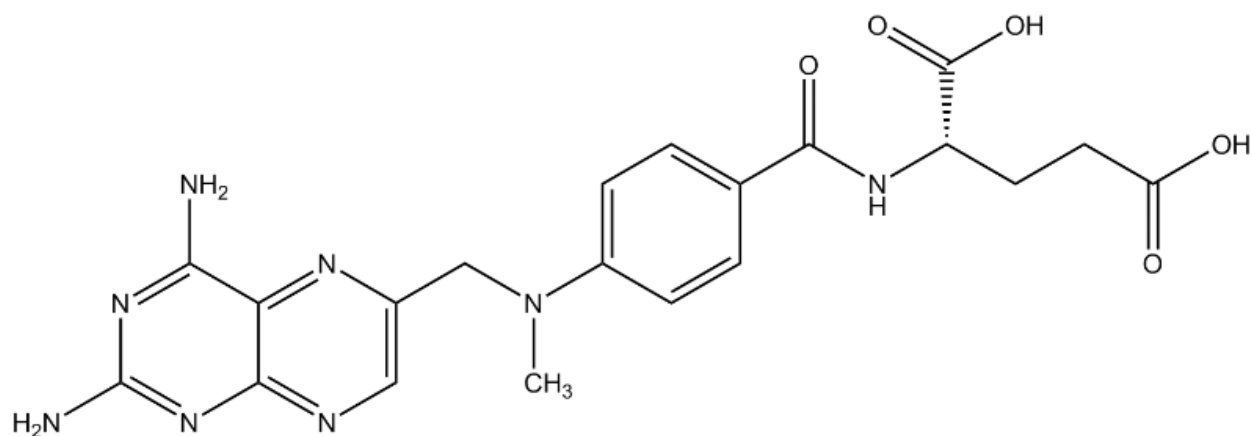
Nanogel phản ứng nhiệt là một trong những hệ phân phối thuốc đa chức năng phản ứng thông minh hấp dẫn nhất. Các nanogel phản ứng nhiệt thể hiện bằng cách trương nở lên với sự thay đổi nhiệt độ môi trường, cho phép tốc độ giải phóng thuốc được nạp vào bên trong được kiểm soát. Hơn nữa, sự tích lũy trong môi trường vi mô liên quan đến bệnh và hiệu quả hấp thu nội bào được cải thiện có thể đạt được bằng cách kích thích giảm kích thước hạt và mang lại lợi ích hơn nữa cho kết quả điều trị<sup>[22]</sup>.

Nanogel nhạy nhiệt này đã được giới thiệu để tải protein bằng cách kết tủa trong nước. Quan trọng hơn, lysozyme protein mẫu thể hiện đặc tính giải phóng dấu ấn đi kèm với sự co lại-phồng lên phụ thuộc vào nhiệt độ của nanogel, cho thấy khả năng phân phối có kiểm soát đầy hứa hẹn<sup>[22]</sup>.

## **1.4.TỔNG QUAN VỀ METHOTREXATE:**

### **1.4.1. Giới thiệu về Methotrexate:**

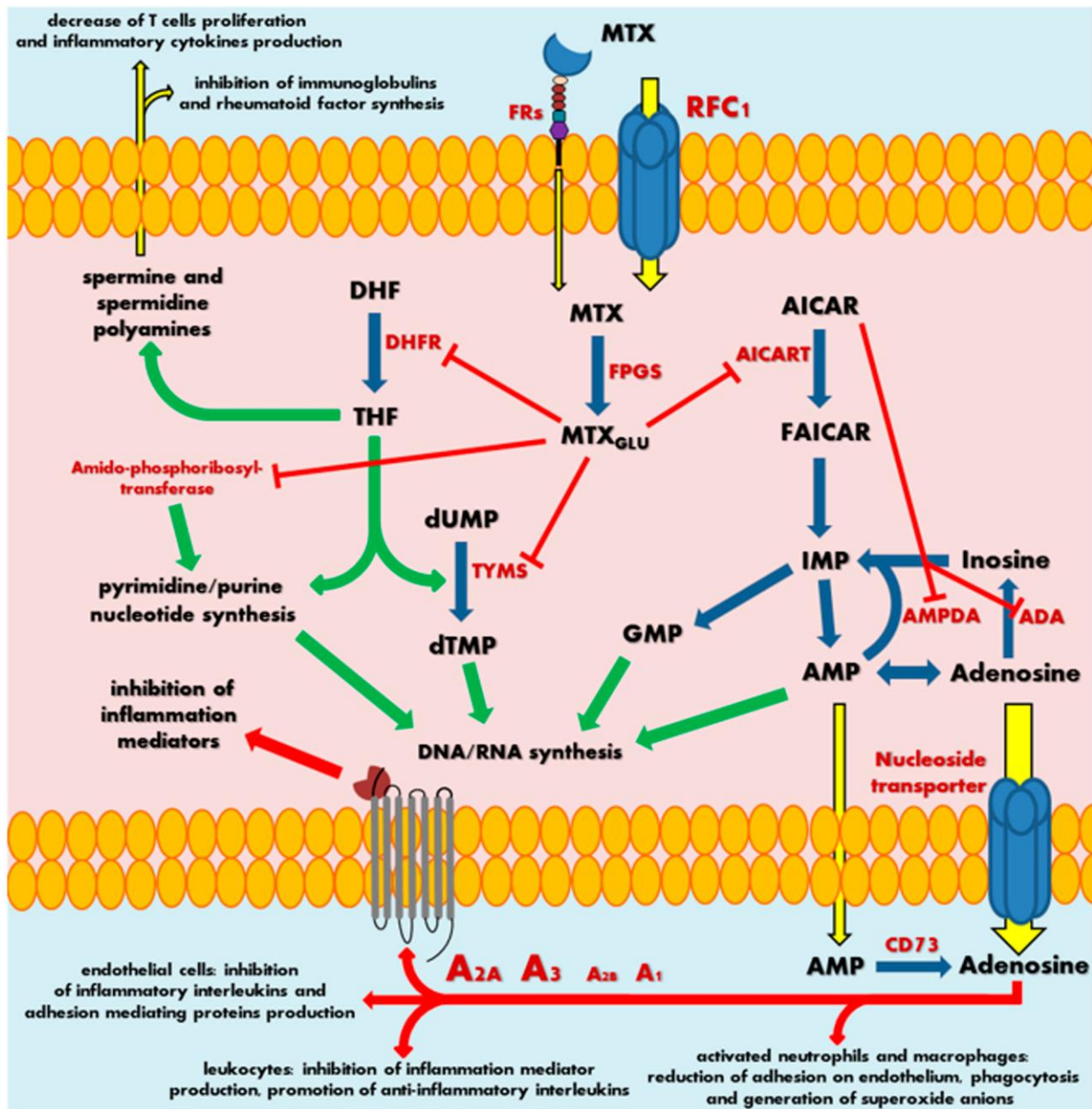
Methotrexate (MTX, amethopterin, Hình 1.3) là một hợp chất hữu cơ tổng hợp, thuộc nhóm điều trị chống folate và thuộc loại III của Hệ thống phân loại dược phẩm sinh học. Nó được tạo ra vào cuối những năm 1940 dưới dạng dẫn xuất ít độc hơn của aminopterin, sau đó là chất đối kháng acid folic (FA) được sử dụng để điều trị cho trẻ em mắc bệnh bạch cầu cấp tính. Vài năm sau, người ta ghi nhận rằng liều thấp aminopterin (1–2 mg/ngày) giúp cải thiện đáng kể ở bệnh nhân viêm khớp dạng thấp (RA) và bệnh nhân vẩy nến. Tuy nhiên, MTX đã được đưa vào ứng dụng lâm sàng trong RA từ giữa những năm 1980. Hiện nay, MTX thường được áp dụng kết hợp với các loại thuốc khác để điều trị nhiều loại ung thư (bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, bệnh bạch cầu màng não và u lympho, sarcoma xương, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư vú, bàng quang và một số bệnh ung thư khác), các dạng bệnh tự miễn nghiêm trọng và kháng thuốc (viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh nhược cơ, bệnh Crohn, bệnh đa xơ cứng, viêm đa khớp tự phát ở trẻ vị thành niên), hoặc thậm chí là mang thai ngoài tử cung<sup>[25]</sup>.



Hình 1.4 Cấu trúc hóa học của Methotrexate

#### 1.4.2. Cơ chế tác dụng của Methotrexate:

MTX là một loại thuốc, có cơ chế hoạt động đa hướng. Hoạt động chống chuyển hóa và chống tăng sinh mạnh có liên quan đến ứng dụng điều trị của MTX như một tác nhân chống ung thư. Hành động dẫn đến tăng nồng độ adenosine cục bộ tại vị trí viêm và tác dụng ức chế miễn dịch cụ thể của MTX đóng vai trò quan trọng trong điều trị viêm nặng và các bệnh tự miễn (viêm khớp, bệnh vẩy nến, bệnh nhược cơ). Ngoài ra, MTX có thể đóng vai trò là vectơ dẫn các tác nhân gắn MTX đến các mục tiêu phân tử cụ thể như RFC hoặc, ít có khả năng là FR, được biểu hiện quá mức trên các tế bào ung thư khác nhau. Trong khi FA đóng vai trò là một con ngựa thành Troia để phân phối có chọn lọc tác nhân gắn FA đến các tế bào ung thư biểu hiện FR, MTX được coi là nền tảng của liệu pháp chống folate trong điều trị một số khối u ác tính<sup>[25]</sup>.



Hình 1.5 Sơ đồ cơ chế tác dụng của MTX

### 1.4.3. Tác dụng không mong muốn của Methotrexate:

Theo hướng dẫn sử dụng thuốc hãng Arthritis của Australia thì những tác dụng phụ thường gặp nhất khi sử dụng MTX là buồn nôn, ói mửa và tiêu chảy; lở miệng;

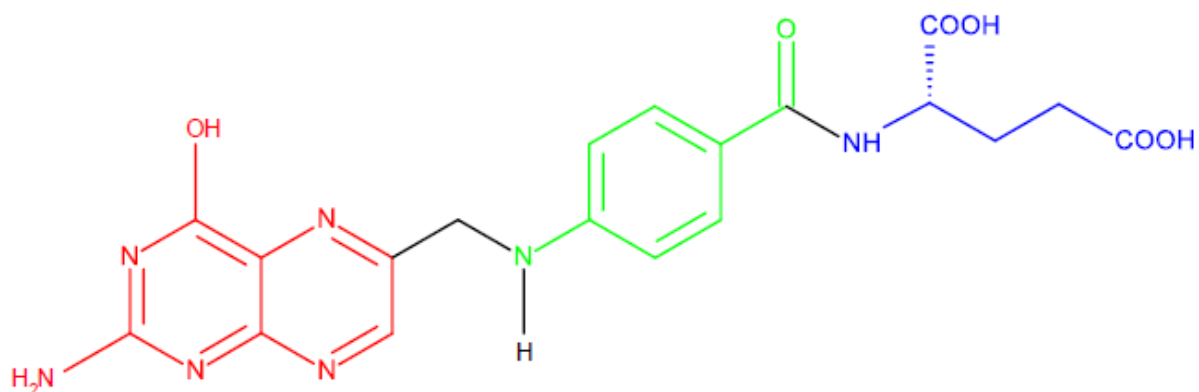
khô da, một số dạng nổi mẩn da; một số báo cáo cho thấy người dùng còn cảm thấy hơi mệt mỏi, nhức đầu và cảm giác nhẹ đầu<sup>[26]</sup>.

Bên cạnh những tác dụng không mong muốn thường gặp sẽ có những tác dụng phụ ít gặp nhưng nguy hiểm như viêm gan, viêm phổi do thuốc MTX, rụng tóc. Ngoài ra những người bị thấp khớp có nguy cơ bị ung thư hạch bạch dịch lymphoma (loại ung thư do u lympho)<sup>[26]</sup>.

## **1.5. TỔNG QUAN VỀ ACID FOLIC:**

### **1.5.1. Cấu tạo và tính chất của acid folic:**

Acid folic (FA) là một chất phân tử nhỏ, còn được gọi là vitamin B9. FA là một hợp chất thiết yếu tham gia vào nhiều quá trình sinh hóa quan trọng ở người, chủ yếu ở dạng ion. FA tham gia vào quá trình nhân lên của tế bào, điều hòa hoạt động của gen, sản xuất tế bào máu và tham gia quá trình tổng hợp các chất hóa học điều chỉnh chức năng của não. FA có sẵn cả tự nhiên và tổng hợp. Folate là dạng anion của acid folic và là dạng ở pH sinh lý. Thông thường thuật ngữ “acid folic” dùng để chỉ hợp chất tổng hợp được oxy hóa hoàn toàn được sử dụng trong các thực phẩm bổ sung dùng cho chế độ ăn uống, trong khi “folate” dùng để chỉ các dẫn xuất của tetrahydrofolate có trong các thực phẩm tự nhiên. Tuy nhiên không có sự khác biệt giữa acid folic “tự nhiên” và “tổng hợp”, dạng tự nhiên hoặc tổng hợp đều cùng một công thức phân tử<sup>[27]</sup>. Cấu trúc phân tử của acid folic được chia thành 3 phần gồm: gốc acid glutamic (Glu), gốc acid p-aminobenzoic (PABA) và gốc pterin. Phần gốc PABA liên kết với pterin bằng cầu methylen và PABA được nối với Glu bằng liên kết peptit để tạo thành Acid folic. FA có độ hòa tan thấp trong nước ở 25 °C (1.6 mg/L). Khả năng hòa tan của FA được cải thiện trong môi trường kiềm hoặc acid và có độ ổn định hơn trong môi trường kiềm<sup>[28]</sup>.



Hình 1.6 Cấu trúc của acid folic

### 1.5.2. Tác dụng của acid folic:

Acid folic rất quan trọng để đảm bảo các chức năng, các quá trình chuyển hóa và sinh hóa khác nhau được diễn ra bình thường trong cơ thể con người. FA đóng một vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp purin và pyrimidin, trong quá trình chuyển hóa homocystein và trong quá trình sao chép và methyl hóa DNA. FA cũng cần thiết cho sự phát triển bình thường của các mô, đặc biệt là những mô liên quan đến quá trình phân chia tế bào nhanh chóng như trong phôi [29].

Khi sử dụng Methotrexate trong điều trị VKDT có thể gây ra các tác dụng không mong muốn do Methotrexate là chất kháng acid folic làm giảm lượng acid folic trong cơ thể. Một số tác dụng không mong muốn của MTX như: đau đầu và mệt mỏi, buồn nôn, nôn, nhiễm độc gan và đau dạ dày. Uống bổ sung acid folic có thể làm giảm nguy cơ mắc các tác dụng không mong muốn này. Và việc uống bổ sung acid folic không làm thay đổi hiệu quả của Methotrexate trong điều trị VKDT [30].

Nghiên cứu của Beverley Shea và cộng sự vào năm 2013 về việc sử dụng acid folic và acid folinic để giảm tác dụng không mong muốn, ở bệnh nhân dùng Methotrexate cho bệnh viêm khớp dạng thấp đã cho thấy, có một sự giảm đáng kể



tỷ lệ tác dụng không mong muốn trên đường tiêu hóa và rối loạn chức năng gan. Cụ thể, acid folic đã làm giảm 26% nguy cơ mắc các tác dụng phụ của Methotrexate, như buồn nôn, nôn và đau dạ dày. Nghiên cứu cho thấy rằng việc bổ sung acid folic có thể làm giảm 76,9% nguy cơ phát triển các vấn đề về men gan của bệnh nhân so với những bệnh nhân không dùng acid folic [31].

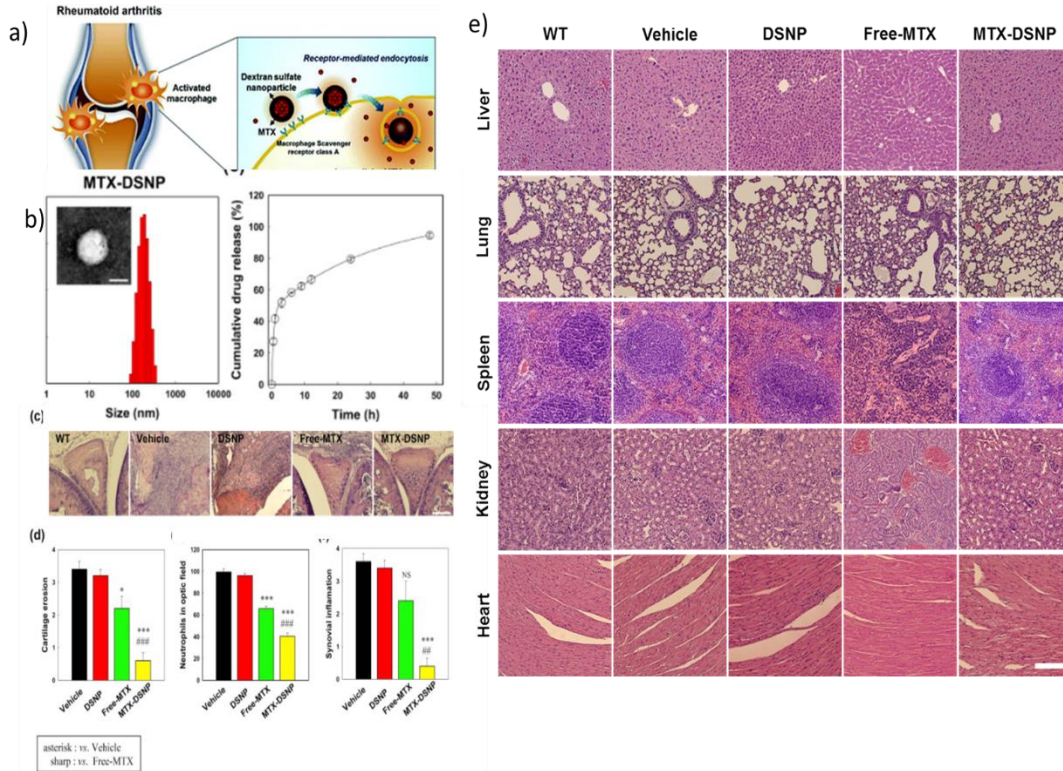
## **1.6. TỔNG QUAN VỀ TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU:**

### **1.6.1. Tình hình nghiên cứu ngoài nước**

Nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới đã đề cập đến phương pháp sử dụng hệ tiểu phân nano polymer để cải thiện nhược điểm của MTX trong điều trị VKDT và cho kết quả khả quan.

Hệ thống phân phối thuốc Methotrexate trên cơ sở poly(amidoamine) dendrimer thế hệ 5 do nhóm Thommey P Thomas và cộng sự công bố công trình nghiên cứu của họ trên tạp chí y khoa Viêm khớp và thấp khớp (Arthritis Rheum) năm 2011. Kết quả cho thấy dendrimer G5 làm tăng khả năng xâm nhập của thuốc vào đại thực bào làm tăng liều dung nạp tối đa trên mô hình chuột Lewis khi so sánh với mô hình chuột Lewis chỉ sử dụng Methotrexate.

Roun Heo và cộng sự<sup>[32]</sup> (2013) công bố hiệu quả sử dụng hệ tiểu phân nano polymer từ polysachride (DSNP) mang MTX thử nghiệm trên mô hình chuột viêm khớp gây bằng CIA. Mặc dù cùng hàm lượng MTX tự do, điều trị bằng hệ tiểu phân nano DSMP mang MTX cho thấy sự giảm đáng kể sự bào mòn khớp, sự thâm nhiễm của tế bào bạch cầu trung tính (neutrophil infiltration), viêm màng hoạt dịch (synovial inflammation). Hơn nữa, phân tích giải phẫu bệnh một số cơ quan của chuột CIA thử nghiệm sau điều trị bằng MTX cho thấy sự thay đổi về cấu trúc gan và thận, trong khi đó chuột điều trị bằng hệ tiểu phân nano MTX- DSNPs không có sự khác biệt với chuột bình thường (hình 1.9).



Hình 1.7 Kết quả thử nghiệm hệ nano MTX của Roun Heo và cộng sự<sup>[32]</sup> (2013).

(a) Minh họa hiệu quả của hệ tiểu phân nano polymer mang MTX trong điều trị VKDT. (b) kích thước hạt nano chứa MTX và đồ thị biểu diễn quá trình giải phóng MTX theo thời gian. (c) mô hình phần khớp gối của các phương án điều trị và mức độ tổn thương sụn, lượng bạch cầu trung tính và viêm hoạt dịch (d). (e) giải phẫu học một số cơ quan của chuột sau khi điều trị. WT: chuột bình thường, nhóm chứng: Vesicle (PBS), DSNP (hệ tiểu phân nano không mang thuốc), MTX, MTX-DSNPs.

Năm 2014, Jung Min Shin cùng cộng sự công bố giải pháp làm tăng hiệu quả điều trị cho Methotrexate bằng cách sử dụng hệ phân phối thuốc nano trên cơ sở hyaluronic acid. Sử dụng hyaluronic acid (HA) không chỉ làm tăng khả năng xâm nhập vào tế bào do bản chất HA tương tác trực tiếp với thụ thể CD44 có mặt trên tế

bào miễn dịch và còn khống chế lượng MTX giải phóng khỏi hệ, tránh được các tác dụng phụ không mong muốn của MTX đối với cơ thể.

Năm 2017, nhóm nghiên cứu của Young Mo Kang<sup>[33]</sup> tại khoa xương khớp, Bệnh viện Đại học Quốc gia Kyungpook nằm ở Daegu, Hàn Quốc phát triển hệ chất mang MTX từ polysaccharide, hyaluronic acid (HA-MTX). HA giúp cho MTX tích tụ trong đại thực bào cao hơn gấp 12 lần so với trường hợp MTX tự do. Thử nghiệm trên mô hình chuột viêm khớp CIA cho thấy ở liều thấp 3mg/kg, không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê giữa HA-MTX và MTX tự do về tiến trình phá hủy sụn khớp. Khi sử dụng liều cao (50 mg/kg), triệu chứng của VKDT gần như được loại bỏ ở mô hình điều trị bằng HA-MTX và tỷ lệ chết 0%. Tuy nhiên, MTX tự do liều 50mg/kg chuột chết gần như 100% sau 2 tuần điều trị mặc dù kết quả đánh giá hiệu quả điều trị là tương đương. Đánh giá về chỉ tiêu huyết học của các nhóm chuột điều trị bằng HA-MTX đều nằm trong khoảng sinh lý bình thường, tuy nhiên chuột điều trị bằng MTX tự do có chỉ số hồng cầu và bạch cầu ngoài ngưỡng tiêu chuẩn và thể hiện rõ khi sử dụng ở liều cao. Trên cơ sở polysaccharide (Hyaluronic acid), hệ phân phối thuốc nano kích thước  $167.6 \pm 57.4\text{nm}$  mang MTX (HA-PLGA(MTX)) được công bố bởi nhóm KeilaIsaac-Olivec<sup>[34]</sup>. Trong nghiên cứu này, nhóm đã biến tính polysaccharide với PLGA- polymer có tính chất tương hợp sinh học cao giúp cho quá trình giải phóng MTX được kiểm soát tốt hơn. Trong 3 giờ đầu, 16% hàm lượng MTX được phóng ra khỏi hệ, theo sau là giai đoạn nhả chậm, khoảng 5% trong khoảng 70h tiếp theo và giải phóng hoàn toàn vào 100h. MTX tự do gây chết 50% đại thực bào (dòng Raw 2647) ở giai đoạn đầu 24h và hồi phục ở giai đoạn sau 120h. Theo nhận định của nhóm tác giả, đối chiếu với các công trình trước, nguyên nhân của sự phục hồi được cho là do sự phân hủy hoặc được tính của MTX bị mất đi. Tỷ lệ sống của dòng Raw 2647 khi được xử lý với HA-PLGA(MTX) khoảng 70% và được duy trì liên tục trong 120h, điều đó chứng tỏ MTX trong hệ tiểu phân nano được bảo toàn và giải phóng có kiểm soát.

Năm 2019, nhóm nghiên cứu Maimoona Qindeel<sup>[35]</sup> tạo ra hệ vận chuyển MTX kích thước nano sử dụng copolymer dạng khối, polycaprolactone-polyethylene glycol-polycaprolactone (PCL-PEG-PCL-MTX). Tương tự với các hệ tiểu phân nano polymer khác, biểu hiện dược tính của MTX có sự cải thiện đáng kể khi được nang hóa trong PCL-PEG-PCL. MTX tự do, ở liều thấp 3.12–12.5 µg/mL gây hiện tượng tan máu ở chuột thử nghiệm, 15% hồng cầu bị vỡ khi sử dụng MTX liều cao (25–50 µg/mL). Sau khi được nang hóa trong hệ nano PCL-PEG-PCL, mức độ tan máu ở dưới 2.5% khi sử dụng nồng độ từ 3.12-50 µg/mL. Bên cạnh đó, nhờ kích thước nano, lượng MTX tích tụ trong đại thực bào raw 264.7 được xử lý LPS cao hơn đáng kể so với MTX tự do. Phần trăm tế bào sống giảm từ 82% xuống 60% khi nồng độ MTX tự do trong môi trường nuôi cấy tăng từ 6.25- 100 µg/mL. Trái lại, tỷ lệ tế bào sống duy trì ở mức 80-88% khi thử nghiệm cùng khoảng nồng độ. MTX tự do có thời gian lưu trong máu thấp, sau 10h cho uống, hàm lượng MTX trong máu rất thấp, thấp hơn 3.68 lần so với chuột cho uống PCL-PEG-PCL-MTX. Nửa đời trong huyết tương (T<sub>1/2</sub>)- thời gian cần thiết để nồng độ MTX trong huyết tương giảm xuống còn một nửa (50%), ở mô hình tiểu phân nano cao hơn 4.34 lần so với mô hình tự do. Kết quả trên mô hình chuột viêm khớp cũng chứng minh tác dụng của hệ nano trong việc làm tăng dược tính của MTX.

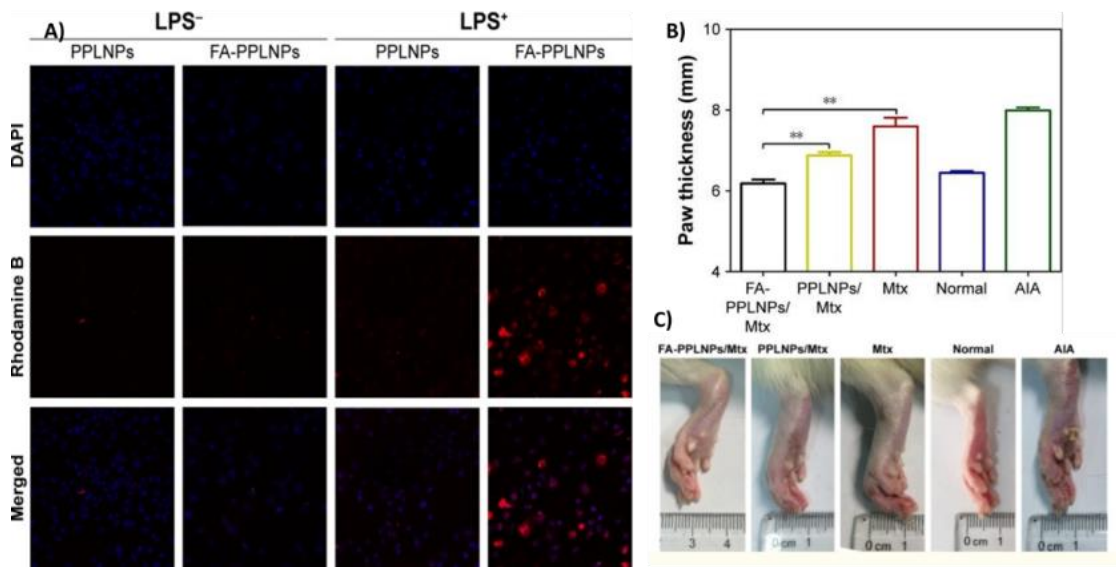
Năm 2020, nhóm tác giả của GS.Yu Zhang về việc sử dụng polyethyleneimine biến tính với cầu nối sulfide để mang MTX ứng dụng trong điều trị VKDT. Hệ giúp khống chế việc nhả MTX phù hợp với phác đồ, ức chế sản sinh cytokines và cải thiện tình trạng sỏi mòn sụn trên mô hình chuột viêm khớp. Như vậy có thể thấy, ứng dụng hệ thống phân phối thuốc kích thước nano giúp cho các liệu pháp điều trị VKDT có hiệu quả hơn nhờ việc kiểm soát liều dùng, giảm được việc dùng thuốc thường xuyên, giảm các nguy cơ ngộ độc do dư lượng thuốc.

VKDT còn được coi là bệnh lý được điều tiết bởi các tế bào đại thực bào, bởi vì các đại thực bào là nguồn gốc chính sản xuất các cytokine tiền viêm trong khớp. Các

cytokine tiền viêm quan trọng do đại thực bào ở màng hoạt dịch sản xuất bao gồm TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, và IL-23. Nguyên bào sợi màng hoạt dịch là một tí tế bào quan trọng khác ở màng hoạt dịch tiết ra các cytokine tiền viêm như IL-1, IL-6 và TNF- $\alpha$ . Trong đó, TNF- $\alpha$  là cytokine tối quan trọng trong sinh bệnh học của viêm màng hoạt dịch. Nguyên bào sợi màng hoạt dịch còn tiết các enzyme tiêu chất nền sụn khớp (matrix metalloproteinases - MMPs) cũng như các protease khác có chức năng phá hủy sụn khớp<sup>[36, 37]</sup>. Nghiên cứu về sự thay đổi bề mặt của đại thực bào trong giai đoạn viêm ở các bệnh nhân VKDT cho thấy sự biểu hiện quá mức của các thụ thể folate, Folate Receptor  $\beta$  (FR $\beta$ )<sup>[37]</sup>. Do đó, Để tăng hiệu quả điều trị, đặc biệt tăng khả năng nhập bào đối với hệ tiểu phân nano polymer vận chuyển MTX, hệ dẫn truyền thuốc nano polymer được gắn thêm tác nhân folic acid trên bề mặt.

Thomney P và cộng sự<sup>[38]</sup> thiết kế hệ nano polymer dẫn truyền MTX có biến tính bề mặt với folic acid (G5-FA). So sánh giữa hệ nano polymer gắn FA và không FA, hiệu quả xâm nhập vào nội bào đại thực bào RAW 264.7 khác biệt tuyệt đối. Hệ nano FA xâm nhập gần như hoàn toàn vào nội bào sau 3-4 nuôi cấy, trong khi tín hiệu của hệ nano không gắn FA gần như không được phát hiện trong cùng khoảng thời gian. Jinlong Zhao<sup>[36]</sup> và cộng sự cung cấp thêm bằng chứng về lợi ích sử dụng hệ nano polymer dẫn truyền MTX. Hệ nano polymer (FA-PLGA) mang MTX từ polyethylene glycol (PEG)-poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) biến tính với tác nhân (folic acid) có thể gắn lên thụ thể FR $\beta$  của các đại thực bào đang trong giai đoạn viêm. Khả năng xâm nhập vào đại thực bào xử lý LPS của hệ FA-PLGA cao hơn hẳn so với các hệ không có FA. Đối với đại thực bào không được kích hoạt bằng LPS, tín hiệu huỳnh quang của các mẫu là như nhau. Điều này chứng tỏ FA làm tăng hiệu quả xâm nhập vào các đại thực bào đang bị kích hoạt viêm hơn là đại thực bào bình thường. Độ dày bàn chân chuột công viêm khớp AIA (6.18mm) gần như tương đương với chuột công bình thường. Chuột công điều trị bằng hệ tiểu phân nano

không tác nhân folic acid, khoảng 6.87mm, cao hơn so với hệ chất mang có FA ( $p < 0.01$ ), nhưng nhỏ hơn so với mô hình sử dụng MTX tự do (8.01mm,  $p < 0.001$ ). Hiện tượng sưng và ban đỏ xuất hiện trong lô chuột cống điều trị bằng MTX tự do và mô hình tiểu phân nano không có FA (hình 1.10).



Hình 1.8 Kết quả của Jinlong Zhao<sup>[36]</sup> và cộng sự. (A) đánh giá hiệu quả xâm nhập của hệ nano mang tác nhân FA, so sánh với hệ không có FA trong 2 điều kiện nuôi đại thực bào có kích loại LPS và không kích hoạt LPS. DAPI: chất nhuộm nhân tế bào, Rhodamine B: được tải trong hệ nano, để đánh dấu khả năng xâm nhập. (B) kích thước và hình ảnh (C) bàn chân chuột cống viêm khớp AIA sau khi điều trị bằng hệ tiểu phân nano có FA và không FA mang MTX, so sánh với các mẫu không điều trị AIA, mẫu chuột cống không viêm khớp và MTX tự do.

Nghiên cứu của Sarat KumarKottarath<sup>[39]</sup> về sự hỗ trợ của folic acid trên bề mặt hệ dẫn truyền MTX trong điều trị VKDT cũng cho kết quả khả quan. Sau 2 ngày điều trị, kích thước bàn chân chuột mô hình viêm khớp giảm mạnh đối với hệ tiểu phân có mang tác nhân FA ( $30.8\% \pm 3.1\%$ ;  $p < 0.001$ ), theo sau là mô hình điều trị bằng hệ tiểu phân không FA ( $28.2\% \pm 3.0\%$ ;  $p < 0.005$ ) và cuối cùng là mô hình điều trị bằng MTX ( $20.2\% \pm 2.9\%$ ). Chỉ số biểu hiện của các cytokine (IL-6 and TNF  $\alpha$ )

giảm mạnh với hệ tiểu phân nano gắn FA khi so với hệ tiểu phân nano không gắn FA và MTX tự do. Nhược điểm của hệ này chủ yếu về thời gian giải phóng thích quá nhanh, gần  $85 \pm 5.4\%$  thuốc giải phóng khỏi hệ sau 24h.

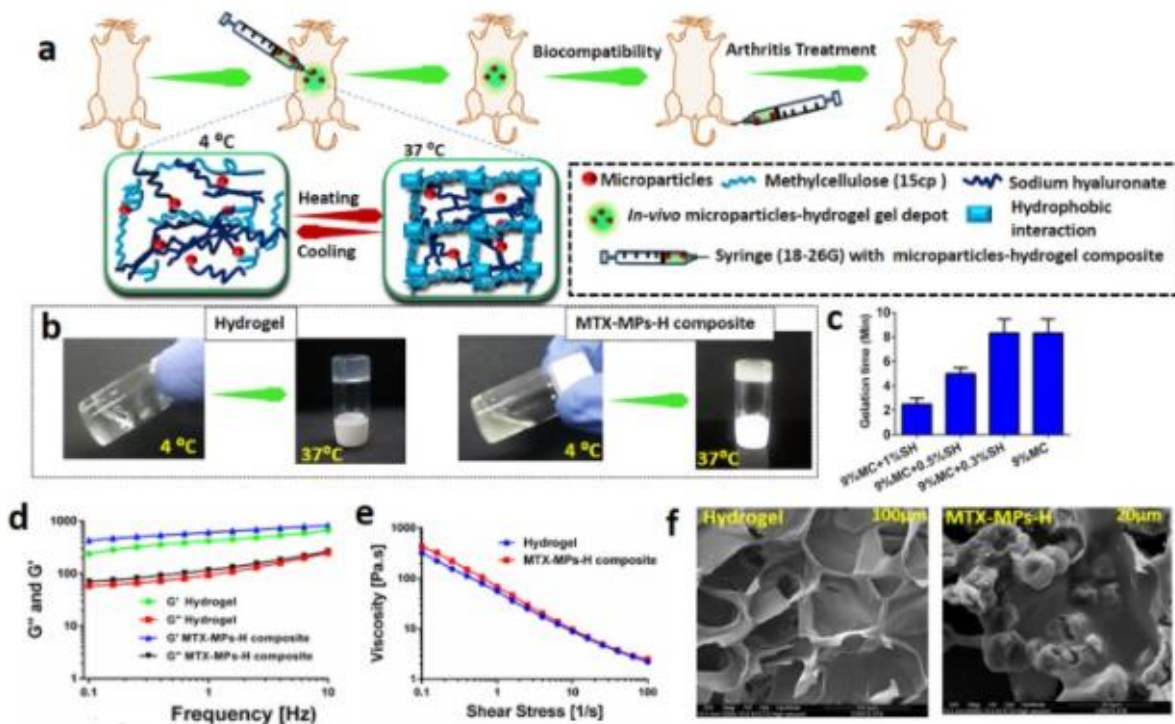
Cùng với xu hướng tạo hệ tiểu phân nano mang thuốc MTX, nghiên cứu tạo các vật liệu nano nhạy cảm với các tác nhân từ môi trường như nhiệt độ, pH hoặc ánh sáng.. tạo kết quả thú vị về điều khiển quá trình phóng thích MTX<sup>[33, 40]</sup>.

Nghiên cứu mới nhất gần đây của MukeshDhanka<sup>[40]</sup> và cộng sự (năm 2021) cũng cho thấy bằng chứng của sử dụng hệ dẫn truyền thuốc nhạy cảm. MukeshDhanka điều chế hệ phân phối thuốc MTX trên cơ sở polysaccharide (chitosan) kết hợp với hydrogel nhạy nhiệt (poloxame). Hệ dẫn truyền được tạo ra có tính đáp ứng sự thay đổi của nhiệt độ. Cụ thể, hệ có sự chuyển dịch từ dạng lỏng sang dạng gel ở nhiệt độ được nâng lên  $37^{\circ}\text{C}$  và quay về dạng dung dịch ở nhiệt độ  $4^{\circ}\text{C}$ . Nhờ đặc điểm này, hệ ứng dụng làm thuốc tiêm tại chỗ. Đặc biệt, sự kết hợp giữa polysaccharide và poloxame cho thấy sự khống chế tốt về hàm lượng MTX giải phóng khỏi hệ. Tương tự như kết quả của Sarat KumarKottarath<sup>[39]</sup>, hệ nano polymer trên cơ sở chitosan không sử dụng poloxame, gần 80% thuốc giải phóng khỏi hệ sau 12h. Kết hợp với poloxame, hàm lượng MTX phóng khỏi hệ trong 4h đầu khoảng 40% và duy trì 5% cho kéo dài 72h. Hàm lượng MTX nang hóa trong hệ nano chitosan sử dụng poloxame cao hơn so với hệ nano chitosan thường. Kết quả trên mô hình động vật gây VKDT cho thấy tiềm năng của hệ kết hợp chitosan-poloxame vì quá trình sửa chữa mô sụn tổn thương được ghi nhận với một liều điều trị duy nhất ( $175.7 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), trong khi điều trị MTX tự do trong 10 ngày liên tiếp (tổng liều  $750 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) mới có kết quả tương tự.

Thay vì sử dụng chitosan và poloxame, MukeshDhanka<sup>[41]</sup> và cộng sự phát triển hệ dẫn truyền MTX nhạy nhiệt trên cơ sở alginate và Methylcellulose. Sự kết hợp này tạo cho hệ có tính tiêm được, cụ thể hệ được tiêm khi ở dạng dung dịch và chuyển thành dạng gel 3D sau khi được tiếp xúc với nhiệt độ cơ thể, như vậy MTX



sẽ được gói trong hệ thống gel và giải phóng một cách có kiểm soát. Nhờ sử dụng alginate trong mạng lưới, hệ dẫn truyền có khả năng hấp thụ nước và trương. Quá trình trương của vật liệu được duy trì trong 3 ngày và sau đó tiến hành phân hủy hoàn toàn trong môi trường sinh học, tạo tính kiểm soát trong giải phóng MTX. 45.5 % MTX được giải phóng khỏi hệ alginate và Methylcellulose trong 24h trong khi gần 75% MTX bị loại khỏi hệ khi không có sự kết hợp 2 thành phần. Hệ dẫn truyền MTX này hoàn toàn bị loại bỏ sau 10 ngày tiêm vào cơ thể chuột và không gây các hiệu ứng miễn dịch. Một trong các lo ngại về sử dụng MTX là gây độc gan. Các chỉ tiêu đánh giá chức năng gan bao gồm nồng độ bilirubin trực tiếp (TBS), Alanine Aminotransferase (ALT), enzyme phosphatase (ALP) đều nằm trong ngưỡng bình thường và không có sự khác biệt so với chuột không tiêm hệ tiểu phân mang MTX (hình 1.11).



Hình 1.9 Hệ tiểu phân nano polymer mang MTX của nhóm tác giả MukeshDhanka et al <sup>[41]</sup>.



Trong các nghiên cứu trên, sử dụng hệ dẫn truyền thuốc nano polymer có nguồn gốc sinh học như polysaccharide giúp cho khả năng đáp ứng MTX cao hơn hẳn khi so với MTX tự do và mức độ đáp ứng tiếp tục cải thiện trong quá trình điều trị. Các chỉ số về số khớp sưng, hoạt động viêm và tình trạng thái hóa sụn cũng giảm rõ rệt hơn ở nhóm điều trị sử dụng hệ dẫn truyền thuốc nano. Thêm vào đó, các tác dụng phụ không mong muốn gây ra bởi MTX tự do cũng được giảm đáng kể mặc dù liều sử dụng là như nhau. Việc biến đổi hệ chất mang với tác nhân folic acid cũng cho thấy hiệu quả trong quá trình tích lũy MTX trong nội bào tế bào viêm. Hoặc sự kết hợp với các polymer nhạy cảm với kích thích từ môi trường cho thấy những kết quả thú vị trong ứng dụng làm chất mang MTX cho điều trị VKDT.

### **1.6.2. Tình hình nghiên cứu trong nước**

Thấy rõ tiềm năng của hệ dẫn truyền thuốc kích thước nano, ở Việt Nam, các trung tâm/phòng thí nghiệm công nghệ nano tại các thành phố lớn như Hà Nội, Tp Hồ Chí Minh được thành lập. Trong lĩnh vực dược bào chế, có nhiều công trình đã được công bố về phát triển dạng thuốc cải tiến dựa trên hệ dẫn truyền thuốc nano.

Nhóm nghiên cứu của Hà Phương Thư-Viện Khoa học Vật liệu đã phát triển nhiều hệ chất dẫn truyền nano sử dụng copolymer poly (lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate biến tính folic để nang hóa curcumin, paclitacel hoặc doxorubicine tăng cường hấp thu hạt nano nang hóa thuốc vào tế bào ung thư.

Nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã thành công phát triển hệ dẫn truyền trên cơ sở chitosan-pluronic các hoạt chất tự nhiên<sup>[42,14,15]</sup> – hoạt chất có dược tính cao nhưng bị hạn chế về sinh khả dụng. Nhờ sự giúp đỡ của hệ chất mang, các hoạt chất được nhả ra phù hợp kích thích sự phát triển của nguyên bào sợi làm vết thương lành nhanh hơn.

Bên cạnh các hệ nanocomposite hydrogel hoạt tính có hiệu quả cao trong chữa lành vết thương, nhóm nghiên cứu chúng tôi cũng phát triển 1 số hệ tiểu phân nano (nanogel) dẫn truyền kết hợp thuốc chống ung thư và các hoạt chất tự nhiên như

curcumin và quercetin. Các hệ dẫn truyền trên đã tạo được sự cộng hợp giữa vai trò của hệ chất mang, thuốc chống ung thư và hoạt chất tự nhiên góp phần làm giảm đáng kể tác dụng phụ của thuốc<sup>[4, 43]</sup>.

Các nhóm nghiên cứu vật liệu dẫn truyền thuốc trong nước hiện nay dành nhiều quan tâm để phát triển thuốc chống ung thư. Tuy nhiên hướng nghiên cứu về dẫn truyền các thuốc điều trị viêm thấp khớp nhằm giảm tác dụng phụ của thuốc thì chưa được quan tâm nghiên cứu. Mặc dù đây là hướng nghiên cứu rất sôi động hiện nay trên thế giới. Hầu hết các nghiên cứu hiện nay đều thuộc lĩnh vực y học cổ truyền, tập trung phát triển chế phẩm từ dịch cao chiết như Hoàng Kinh của tác giả Nguyễn Thị Thanh Tú, chiết xuất nọc ong của Nguyễn Thị Thanh Mai. Các kết quả đều cho thấy khả năng điều trị VKDT. Tuy nhiên, các chế phẩm này chỉ có tác dụng hỗ trợ và không có khả năng thay thế hoàn toàn phác đồ điều trị MTX trong thời gian dài. Vì vậy rất cần có nghiên cứu điều chế hệ tiểu phân nano polymer mang MTX để điều trị viêm khớp dạng thấp trong thời gian dài hơn tại Việt Nam.

## CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

#### 2.1.1. Nguyên liệu hóa chất và tế bào

Bảng 2.1 Nguyên liệu - hóa chất:

STT	Tên nguyên liệu – hóa chất	Xuất xứ	Mục đích sử dụng
1	Sodium alginate (Alg, Mn ~ 120,000-190,000 g/mol)	Fisher Scientific	Nguyên liệu tổng hợp
2	Pluronic F127 (F127, Mn~ 12600 g/mol)	Sigma-Aldrich (USA)	Nguyên liệu tổng hợp
3	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide (EDC, ≥97%)	Acros Organics	Nguyên liệu tổng hợp
4	N-Hydroxysuccinimide (NHS, ≥98%)	Acros Organics	Nguyên liệu tổng hợp
5	Khí nitơ tinh khiết phân tích	Việt Nam	Nguyên liệu tổng hợp
6	Benzoylacetone		
7	Nước cất	Việt Nam	Dung môi
8	p-nitrophenylchloroformate (p-NPC, ≥97%)	Acros Organics	Nguyên liệu tổng hợp

---

9	Cystamine dihydrochloride (Cys, $\geq 97\%$ )	Acros Organics	Nguyên liệu tổng hợp
10	Methotrexate	Toronto Research Chemical	Dược chất thử nghiệm
11	TNBS	Sigma- Aldrich	Nguyên liệu tổng hợp
12	Dimethyl sulfoxide	Fisher Scientific	Dung môi
13	Natri bicarbonate	Hoa Kỳ	Dung môi
14	Acid hydrochloric		Điều chỉnh pH
15	Natri hydroxide		Điều chỉnh pH
16	0,25% Trypsin-EDTA 1X	Gibco	
17	Trypan blue	Sigma- Aldrich	
18	Bộ kit Sulforhodamine B (SRB) (ab235935)	Abcam	

---

19	Thuốc nhuộm Acridine orange/ Propidium iodide (AO/PI)	Life Technologies Korea LLC	Nhuộm tế bào
20	Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich	
21	Griess reagent (modified) (G4410)	Sigma-Aldrich	

Bảng 2.2 Các dòng tế bào thử nghiệm

STT	Tế bào	Nhà cung cấp
1	Tế bào RAW264.7	Được tặng từ Trung tâm Công nghệ sinh học TP.HCM, P4
2	Tế bào MSC	Lonza, P3

### 2.1.2. Dụng cụ và trang thiết bị

Bảng 2.3 Danh mục trang thiết bị

STT	Tên thiết bị	Model	Xuất xứ
1	Máy cô quay	Buchi Rotavapor R-114,	Thụy Sĩ
2	Bể siêu âm	Elmasonic S 80H	Đức
3	Máy đông khô	EYELA FDU-1200	Nhật Bản

4	Máy li tâm lạnh	Hermle Z32HK	Đức
5	Cân phân tích 4 số lẻ	OHAUS pioneer PA114	Mỹ
6	Máy khuấy từ gia nhiệt	VELP Scientifica	Italy
7	Máy quang phổ tử ngoại khả kiến	Agilent 8453 UV-Vis Spectrophotometer.	Nhật Bản
8	Máy quang phổ hồng ngoại FTIR		
9	Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao	Aligent	Nhật Bản
10	Máy đo kích thước hạt	Horiba SZ-100	Nhật Bản
11	Máy ly tâm lạnh tốc độ cao	HERMLE Z 32 HK	Đức
12	Tủ ấm CO <sub>2</sub>	MEMMERT INCO 246 MED	Mỹ
13	Máy đọc bảng giếng tự động	HumanReaderHS	Đức
14	Nồi hấp tiệt trùng	CL-32L/ALP	Nhật Bản
15	Kính hiển vi đảo ngược 2 thị kính LABOMED	TCM 400	Mỹ
16	Kính hiển vi 3 mắt có camera NIKON	Ci-L/DS-Fi2-U3	Nhật Bản
17	Kính hiển vi đồng tiêu Laser ANDOR	Dragonfly 200	Anh

Bảng 2.4 Danh mục dụng cụ

STT	Tên dụng cụ	Hãng sản xuất
1	Bình cầu 1 cổ Duran 100 mL	Việt Nam
2	ống falcon ly tâm 50mL	Việt Nam

---

3	Micro pipet	Việt Nam
4	Hủ bi	Việt Nam
5	Màng cellulose Spectra/Por® 12–14 kDa	Mỹ
6	Cá tù, kim tiêm	Việt Nam
7	Giấy đo pH	Việt Nam
8	Bình định mức, ống đong	Việt Nam
9	Chai nuôi cấy, 25 cm <sup>2</sup>	Biologix (Hoa Kỳ)
10	Đĩa petri nuôi cấy, 35 x 10 mm	Biologix (Hoa Kỳ)
11	Đĩa petri nuôi cấy, 90 x 20 mm	Biologix (Hoa Kỳ)
12	Đĩa nuôi cấy 96 giếng, đáy phẳng, có nắp	SPL Life Sciences (Hàn Quốc)
13	Đĩa nuôi cấy 24 giếng, đáy phẳng, có nắp	SPL Life Sciences (Hàn Quốc)
14	Buồng đếm tế bào Neubauer	Marienfeld (Đức)
15	Ống ly tâm 50 ml	Finetech (Đài Loan)
16	Đầu típ 1000 $\mu$ l	Biologix (Hoa Kỳ)
17	Đầu típ 200 $\mu$ l	Thermo Fisher Scientific (Hoa Kỳ)
18	Đầu típ 10 $\mu$ l	Biologix (Hoa Kỳ)
19	Eppendorf 2,0 ml	ISOLAB (Đức)
20	Đầu lọc $\varnothing$ 0,22 $\mu$ m	Finetech (Đài Loan)

---

### 2.1.3. Các phương pháp phân tích

#### ❖ Phổ hồng ngoại (FT-IR)

Thiết bị FT-IR/NIR Spectroscopy Frontier đặt tại viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam sử dụng phương pháp nén viên bằng KBr, xác định phổ hấp thụ hồng ngoại từ khoảng 4000 – 500  $\text{cm}^{-1}$ .

Mẫu thử được chuẩn bị bằng cách nghiền 2mg mẫu thử chung với 100 mg KBr dạng bột mịn (dùng đo IR) đã được sấy khô, vừa đủ tạo thành một viên nén với đường kính 13 mm và cho phổ có cường độ phù hợp. Hỗn hợp được nghiền mịn đồng nhất và dàn đều trên 1 khuôn thích hợp. Khuôn có hỗn hợp chất thử được nén trong điều kiện chân không tới áp suất khoảng 800 Mpa. Tiến hành đo phổ IR.

#### ❖ Đánh giá cấu trúc của hệ copolymer bằng $^1\text{H-NMR}$

Việc tổng hợp thành công vật liệu copolymer được minh chứng bằng cách hòa tan vật liệu trong dung môi deuterated chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) hoặc nước  $\text{D}_2\text{O}$  sau đó khảo sát cấu trúc bằng máy phổ cộng hưởng từ hạt nhân (Bruker Advance 500MHz, USA, Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) chất chuẩn có độ dịch chuyển hóa học  $\delta$  (ppm) bằng không là tetramethyl silane (TMS). Dựa vào sự xuất hiện độ chuyển dịch hóa học của các proton trên phổ đồ sẽ biết được sự có mặt của các proton trên các nhóm thế khác nhau.

#### ❖ Phổ tử ngoại – khả kiến (UV-Vis)

Phương pháp hấp thụ quang là phương pháp phân tích dựa vào hiệu ứng hấp thụ xảy ra khi phân tử vật chất tương tác với bức xạ điện từ. Vùng bức xạ được sử dụng trong phương pháp này là vùng tử ngoại hay khả kiến ứng với bước sóng khoảng từ 200-800nm. Hiện tượng hấp thụ bức xạ điện từ tuân theo định luật Bouger-Lambert-Beer.



Phổ UV-Vis được đo trên thiết bị UV-1800 Shimadzu đặt tại viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

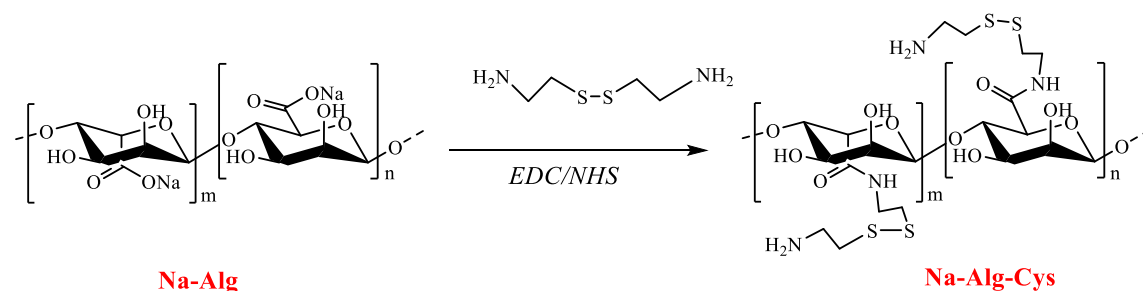
## 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.2.1. Tổng hợp copolymer nhạy nhiệt trên cơ sở alginate-cystamine và Pluronic F127:

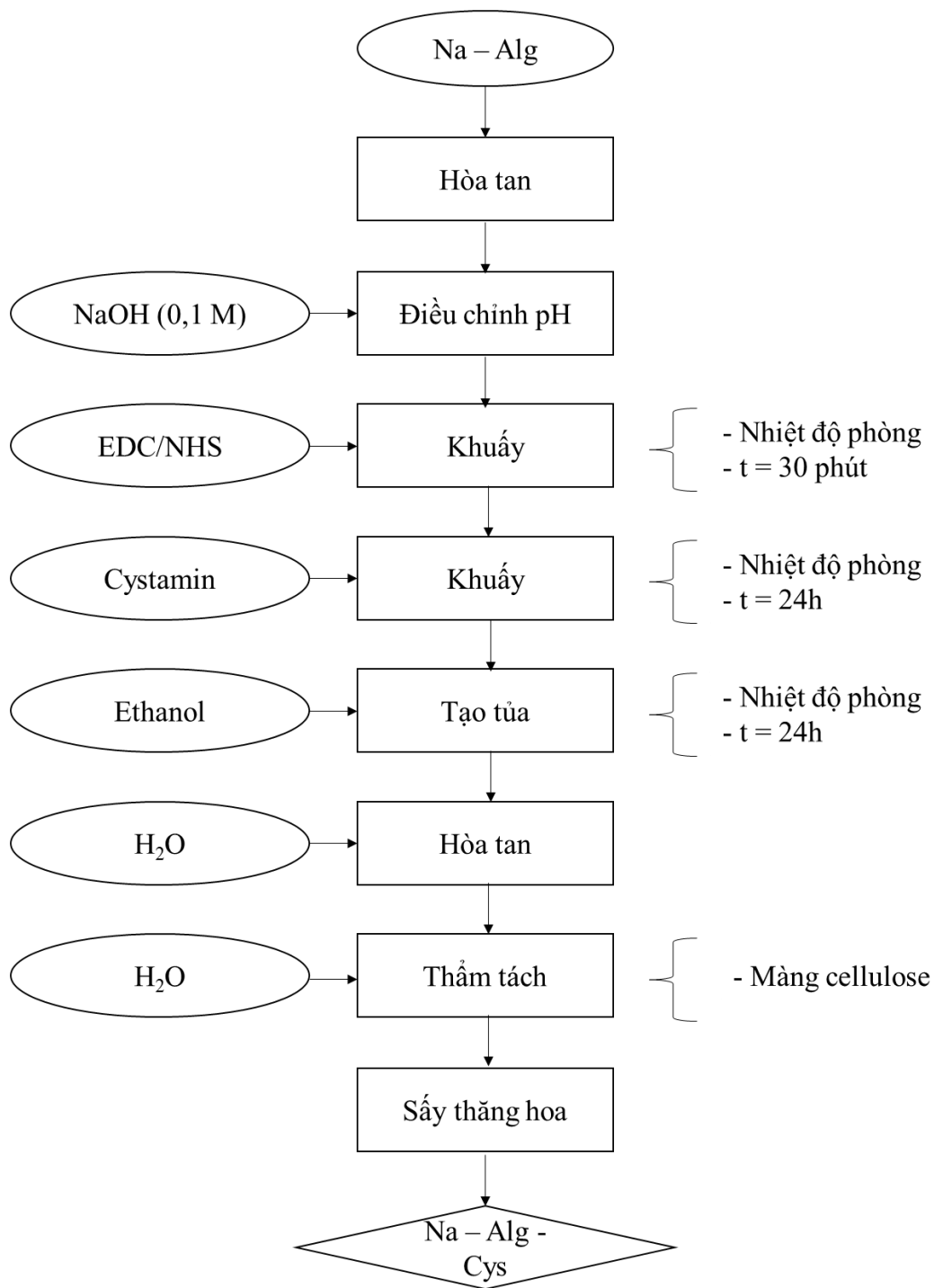
Hệ copolymer nhạy nhiệt được tạo ra trên cơ sở alginate-cystamine và Pluronic F127 thông qua liên kết của nhóm amin trên alginate-cystamine và nhóm ( $-C=O$ ) của hợp chất Pluronic sau khi hoạt hóa bằng p-nitrophenyl chloroformat (NPC), Copolymer Alg-F127 được tạo thành bằng phương pháp tổng hợp hóa học quy trình tổng hợp được thực hiện dựa trên quy trình của Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam<sup>[44]</sup>, sản phẩm sau đó được liên kết với acid folic (FA) thông qua nhóm  $NH_2$  tự do còn tồn tại. Sản phẩm cuối cùng được xác định cấu trúc thông qua phổ  $^1H$ -NMR, FT-IR.

#### 2.2.1.1. Tổng hợp dẫn xuất Alginate-cystamine (Na-Alg-Cys) và khảo sát điều kiện tổng hợp

Các nhóm amin trên mạch Natri alginate (Na-Alg) được tạo ra để phản ứng với NPC-F127-OH, cystamine (Cys) được sử dụng để tạo ra các nhóm amin. Cystamine có cấu trúc 2 nhóm  $NH_2$ , một nhóm tạo liên kết với nhóm carboxylate có trên alginate, một nhóm  $NH_2$  tự do còn lại tạo liên kết với NPC-F127-OH.



Hình 2.1 Sơ đồ phản ứng tổng hợp dẫn xuất Na-Alg-Cys



Hình 2.2 Quy trình tổng hợp Na – Alg – Cys

Thuyết minh quy trình: Cân chính xác khối lượng Sodium alginate (Alg) hòa tan vào DMSO: H<sub>2</sub>O (1:1 theo thể tích). Sau khi hỗn hợp đạt được sự đồng nhất,

điều chỉnh pH của dung dịch Alg về khoảng 5,5 bằng NaOH 0,1M hoặc HCl 0,1M. Cho NHS và EDC vào cùng môi trường dùng hòa tan Alg, hoạt hóa trong vòng 30 phút. Cho tiếp cystamine (Cys) được hòa tan trong H<sub>2</sub>O và được nhỏ giọt vào hỗn hợp dung dịch Alg/EDC/NHS đang được khuấy ở tốc độ 1000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp tiếp tục được khuấy ở nhiệt độ phòng trong vòng 24 giờ, dung dịch sau phản ứng được thêm từng giọt vào cồn tuyệt đối để thu tủa. Kết tủa sau đó được hòa tan lại trong nước và mang đi thẩm tách bằng màng cellulose (MCWO~12-14KDa) trong môi trường nước cất để loại bỏ Cys không phản ứng, chất hoạt hóa và các dung môi đã sử dụng. Phần dung dịch trong túi thẩm tách sau đó được đem sấy thăng hoa thu sản phẩm dạng bột là Na-Alg-Cys. Sản phẩm sau đó được dùng để đánh giá cấu trúc bằng FT-IR và <sup>1</sup>H-NMR.

#### ❖ Khảo sát điều kiện tổng hợp

Ảnh hưởng của pH và sự hiện diện của EDC/NHS được khảo sát thông qua phương pháp Okuyama và Satake phân tích hàm lượng nhóm NH<sub>2</sub> trên sản phẩm Alg-Cys, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) là hợp chất carbodiimide phổ biến nhất được sử dụng để tạo cầu nối giữa nhóm amin và nhóm carboxyl. EDC tan trong nước và hoạt động tốt trong khoảng pH 4,5 - 7,5, EDC cũng thường được sử dụng kết hợp với N-hydroxysuccinimide (NHS) để tăng hiệu quả gắn kết hoặc tạo ra một sản phẩm amin phản ứng ổn định. Na-Alg sẽ phản ứng với EDC/NHS tạo ra một chất trung gian không bền, hợp chất này ngay lập tức sẽ gắn kết với cystamine thông qua liên kết giữa nhóm amin với carboxyl tạo thành sản phẩm bền vững và phản ứng dịch chuyển theo chiều thuận.

Nghiên cứu của Hermanson cho thấy phản ứng của EDC hình thành liên kết amin trong nước và việc hoạt hóa nhóm carboxyl xảy ra hiệu quả nhất khi dùng EDC tại pH 3,5 – 4,5 trong khi liên kết amin được hình thành hiệu quả nhất trong phạm vi pH 4,0 – 6,0, Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra rằng sự thủy phân EDC

xảy ra tối đa ở giá trị pH có tính acid với sự ổn định ngày càng tăng của carbodiimide trong dung dịch có pH bằng hoặc trên 6,5, Ngoài khoảng pH này thì sự hình thành liên kết vẫn xảy ra nhưng với tốc độ rất chậm và hiệu quả không cao <sup>[45]</sup>. Do đó việc khảo sát vùng pH khác nhau để tiến hành phản ứng gắn cystamine lên Na-Alg thông qua cầu nối trung gian EDC/NHS được tiến hành. Bên cạnh đó Na-Alg là hợp chất khó tan, hầu như chỉ trương nở trong môi trường nước hoặc DMSO. Trên cơ sở nghiên cứu của tác giả Đặng Thị Lệ Hằng và cộng sự <sup>[44]</sup> tỷ lệ H<sub>2</sub>O:DMSO là 1:1 được chọn thực hiện nghiên cứu này. Hỗn hợp H<sub>2</sub>O: DMSO được cân chỉnh pH bằng HCl (1M) và NaOH (1M) để đạt được các pH như sau: 4,5, 5,5, 6,5 và 7,0. Cùng với việc lựa chọn môi trường tổng hợp, tỷ lệ alginate và EDC/NHS cũng được tiến hành nhằm xác định được tỷ lệ thích hợp nhất cho hiệu quả gắn cao nhất. Thành phần và các tỷ lệ các chất tham gia được trình bày trong bảng 2.5.

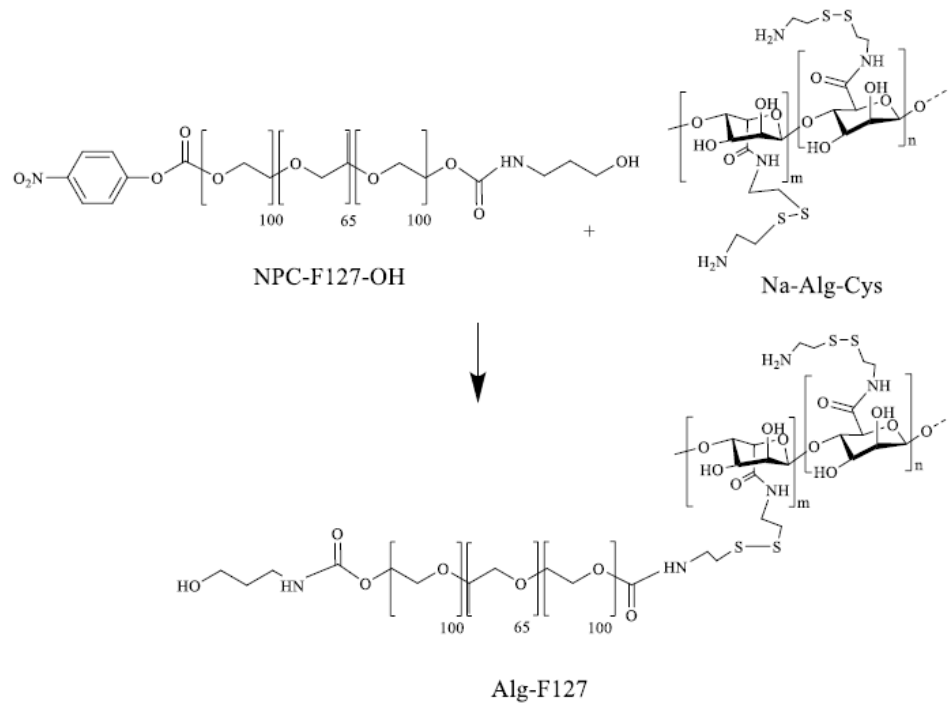
Bảng 2.5 Các biến lựa chọn trong khảo sát tìm điều kiện tổng hợp Na-Alg-Cys.

pH	STT	DMSO/H <sub>2</sub> O (mL)	Na-Alg (g)	EDC/NHS (mol)	Cys (mol)
pH = 4,5	1	50	1	0,0046/0,0046	0,0046
	2	50	1	0,0046/0,0046	0,0023
	3	50	1	0,0046/0	0,0046
pH = 5,5	1	50	1	0,0046/0,0046	0,0046
	2	50	1	0,0046/0,0046	0,0023
	3	50	1	0,0046/0	0,0046
pH = 6,5	1	50	1	0,0046/0,0046	0,0046
	2	50	1	0,0046/0,0046	0,0023
	3	50	1	0,0046/0	0,0046
pH = 7,0	1	50	1	0,0046/0,0046	0,0046
	2	50	1	0,0046/0,0046	0,0023
	3	50	1	0,0046/0	0,0046

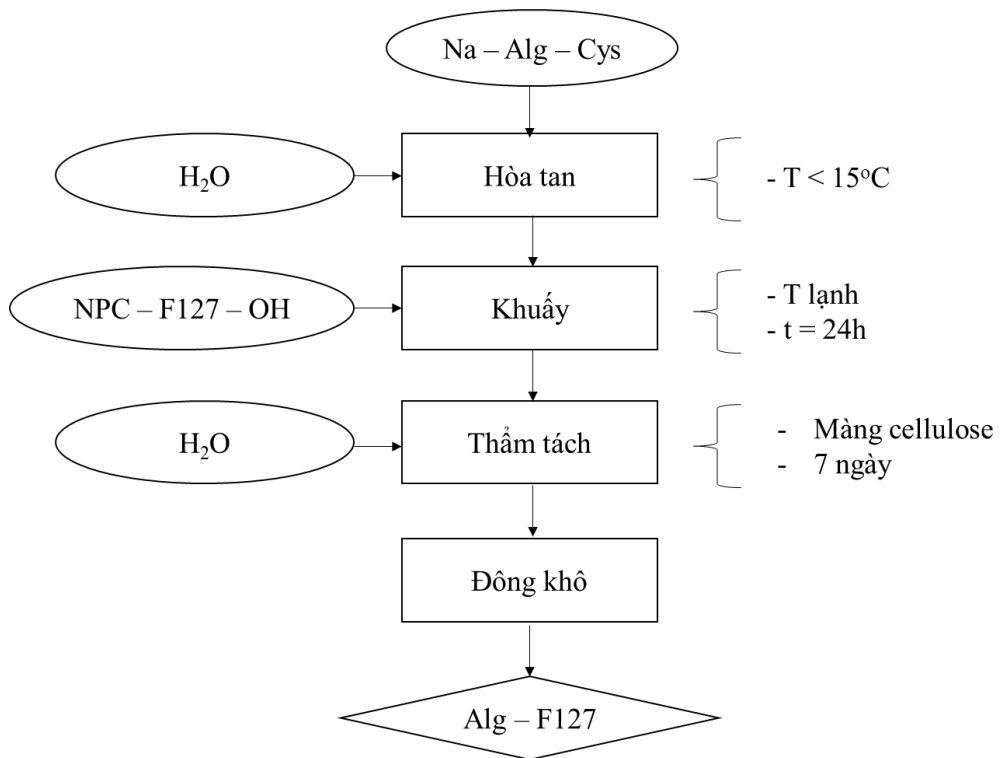
**2.2.1.2. Tổng hợp copolymer và khảo sát điều kiện ghép Alginate-Cystamine-Pluronic F127 (Alg-Cys-F127)**

❖ Tổng hợp NPC-F127-OH:

Pluronic F127 được hoạt hóa bằng 2 bước để thu được sản phẩm NPC – F127 – OH các báo cáo của Trần Ngọc Quyên và cộng sự [46,47,43]. Bước 1 p-nitrophenyl chloroformate được cho vào F127 đã được làm nóng chảy ở 65°C với tỷ lệ NPC:F127 là 2,5:1 theo tỷ lệ mol. Sau 6 giờ nhiệt độ của phản ứng được hạ về nhiệt độ phòng và hỗn hợp này được pha loãng với THF. Sản phẩm thu được sau khi kết tủa lạnh với diethyl ether. Cô quay bay hơi dung môi trong chân không. Bước 2, NPC-F127-NPC tiếp tục cho phản ứng với 3-amino-1-propanol trong THF cho sản phẩm NPC-F127-OH. Quá trình tinh chế làm sạch NPC-F127-OH giống như bước 1.



Hình 2.3 Sơ đồ tổng hợp Alg-F127



Hình 2.4 Quy trình tổng hợp Alg - F127

Thuyết minh quy trình: Đầu tiên, Na-Alg-Cys hòa tan vào nước cất đến khi đồng nhất sau đó mẫu tiếp tục khuấy trong môi trường lạnh, nhiệt độ dưới 15°C. NPC– F127- OH được hoà tan trong nước cất ở nhiệt độ 4°C, khuấy từ cho đến khi tan hoàn toàn. Dung dịch NPC-F127-OH được cho vào dung dịch Na-Alg-Cys khuấy và giữ lạnh ít nhất 24 giờ trước khi đem thẩm tách với mang cellulose (12,000-14,000 Da). Thẩm tách trong nước cất diễn ra trong khoảng 7 ngày trước khi đem mẫu đi đông khô. Sản phẩm thu được đem đi đo phổ <sup>1</sup>H-NMR để xác định cấu trúc.

❖ **Khảo sát điều kiện tổng hợp**

Dựa trên quy trình phản ứng tổng hợp copolymer Alg – Cys – F127. Tỷ lệ khảo sát được thể hiện ở Bảng 2.8 bên dưới. Sản phẩm được đem đi phân tích hàm lượng amoni bậc 1.

Bảng 2.6 Tỷ lệ khối lượng ghép mạch giữa Na – Alg – Cys với NPC – F127 – OH

<b>Tỷ lệ ghép</b>	<b>Na – Alg – Cys (g)</b>	<b>NPC – F127 – OH (g)</b>
1:5	0,5	2,5
1:10	0,5	5,0
1:15	0,5	7,5
1:20	0,5	10

**2.2.1.3. Phân tích hàm lượng nhóm amino bậc 1:**

Phương pháp Okuyama và Satake được sử dụng với dung dịch 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) để phân tích hàm lượng nhóm NH<sub>2</sub> [48] trên sản phẩm Na-alginate. Trong phương pháp này, L-alanine được sử dụng để dựng đường chuẩn. Dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 4000 ppm, sau đó được pha loãng thành các nồng độ ở bảng 2.5 và tiến hành theo quy trình như bảng 2.6.

Bảng 2.7 L-alanine được pha từ nồng độ 0 -140 ppm

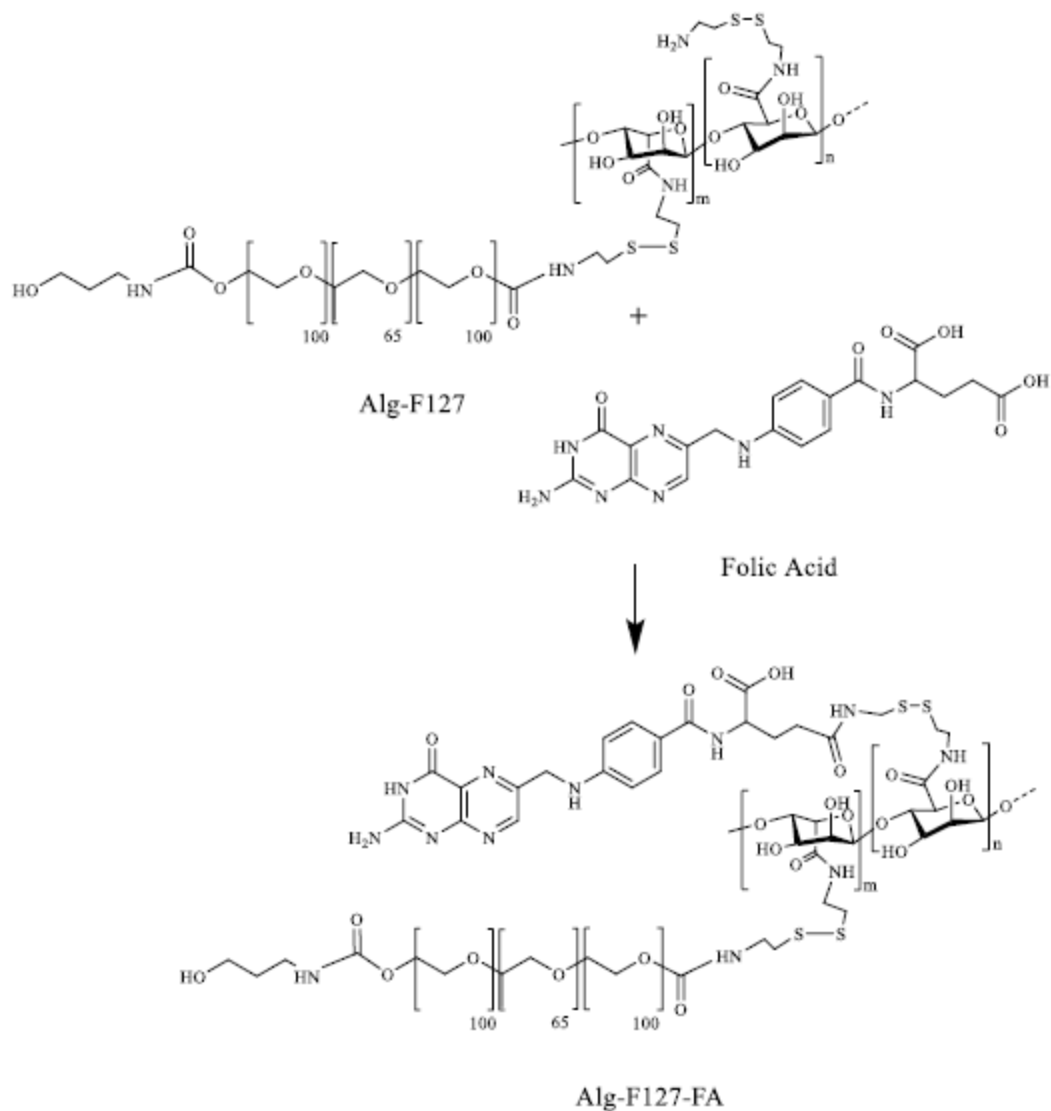
<b>Nồng độ (ppm)</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>100</b>	<b>120</b>	<b>140</b>
Thể tích L-alanine 4000 ppm ( $\mu\text{l}$ )	0	5	10	15	20	25	30	35
Thể tích nước ( $\mu\text{l}$ )	1000	995	990	985	980	975	970	965
Tổng thể tích ( $\mu\text{l}$ )	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Bảng 2.8 Quy trình phân tích hàm lượng nhóm amine bậc I

Mẫu	100 $\mu\text{L}$
$\text{NaHCO}_3$ 0,1M (pH 8,5)	1,5 mL
TNBS	20 $\mu\text{L}$
Ủ 37°C trong 2 giờ	
SDS (10%)	1 mL
HCl 1N	0,5 mL
Mang đi đo ở bước sóng 420 nm	

#### **2.2.1.4. Tổng hợp Alginate-cys-pluronic F127-Acid folic (Alg-F127-FA)**





Hình 2.5 Sơ đồ tổng hợp Alg-F127-FA

Quy trình phản ứng: 0,1g Acid folic được hòa tan hoàn toàn trong 10 ml DMSO, sau đó điều chỉnh pH của dung dịch về khoảng 5,5. Hỗn hợp 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) và N-hydroxysuccinimide (NHS) (tỷ lệ số mol 1: 1 = 0,2 mmol) được pha vào dung dịch FA trên, hoạt hóa trong vòng 30 phút thu được hỗn hợp dung dịch A. Hòa tan 1g Alg-F127 trong 20 ml nước cất được dung dịch B. Nhỏ từ từ dung dịch A vào dung dịch B và cho khuấy ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Dung dịch sau khi thu được mang đi thẩm tách tách

bằng màng cellulose (12 – 14 KDa) trong môi trường đệm PBS (pH 7,4) trong vòng 3 ngày để loại bỏ FA dư, sau đó thẩm tách tiếp tục trong môi trường nước để loại bỏ muối đệm dư. Phần dung dịch trong túi thẩm tách sau đó được đem sấy thăng hoa thu sản phẩm dạng bột là Alg-F127-FA. Đánh giá cấu trúc sản phẩm bằng FT-IR và <sup>1</sup>H-NMR.

## **2.2.2. Xác định nồng độ tạo nanogel của vật liệu Alg – F127 - FA**

### **2.2.2.1. Khảo sát nồng độ tạo hạt CMC và sự hình thành nanogel**

Benzoylacetone (BZA) được dùng để khảo sát những thay đổi về tính hóa lý của hệ Alg-F127-FA (APF) khi micell được hình thành bằng phương pháp UV- Vis [49]. BZA tồn tại trong nước dưới dạng hỗn hợp hai đồng phân enol và keton. Phương pháp xác định nồng độ tạo micell dựa trên hiện tượng chuyển đổi lẫn nhau giữa 2 đồng phân dạng keton và dạng enol của BZA. Khi thêm chất hoạt động bề mặt vào dung dịch BZA tại và trên nồng độ CMC, độ hấp thụ của đồng phân enol tăng đột ngột, trong khi đồng phân keton sẽ giảm đột ngột, điểm cân bằng độ hấp thụ của enol và ketone (A<sub>enol</sub> / A<sub>ketone</sub>) sẽ tăng đột ngột. Khi micell được hình thành, đồng phân enol sẽ bị giữ lại bên trong micell, cân bằng keton – enol trong nước sẽ dịch chuyển về phía hình thành enol [49, 50].

Quy trình: 10 mg BZA được hòa tan trong 10 ml dung môi dimethyl sulfoxide (DMSO) để làm dung dịch gốc BZA (1000 ppm). Dung dịch gốc Alg-F127-FA được chuẩn bị bằng cách hòa tan 250 mg vật liệu trong 250 ml dung môi nước cất lạnh (1000 ppm). Mẫu đo được chuẩn bị bằng cách cho 120 µl dung dịch gốc BZA vào bình định mức 10 ml, sau đó cho dung dịch gốc APF để đạt được nồng độ 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 ppm.

Phổ hấp thụ của dung dịch được ghi lại trong phạm vi 380 – 235 nm bằng máy quang phổ tia UV-vis, tất cả các phép đo được thực hiện ở 25°C. Số liệu của phổ hấp thụ được vẽ thành biểu đồ đường dựa trên các bước sóng thu được.

#### ***2.2.2.2. Phương pháp đo kích thước và tác động của nhiệt lên kích thước hạt nanogel***

Mẫu đo kích thước hạt bị tác động bởi nhiệt độ được chuẩn bị như sau, 10 mg mẫu Alg-F127-FA được hòa tan trong 10 ml nước cất với nhiệt độ lạnh. Sau đó, dung dịch nanogel sẽ được siêu âm trong 20 phút ở 35°C bằng bể siêu âm Elmasonic S 80H. Mẫu tiếp tục được để ổn định 8-12 giờ ở nhiệt độ phòng. Tiến hành đo kích thước tiểu phân ở 25°C và 37°C bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động (Dynamic Light Scattering– DLS) trên thiết bị phân tích kích thước Horiba SZ100.

#### **2.2.3. Nang hóa Methotrexate vào hệ alginate – pluronic F127 – folic acid và đánh giá hiệu suất nanogel hóa**

##### ***2.2.3.1. Quy trình nang hóa Methotrexate vào hệ alginate – pluronic F127 – folic acid***

Cân và hòa tan chính xác khối lượng MTX (X1) trong 8 mL dung dịch Alg – F127 – FA (X2). Khuấy đều ở tốc độ là 200 vòng/phút trong 60 phút ở nhiệt độ phòng. Cho dung dịch thu được vào ống ly tâm 15 mL, sử dụng phương pháp ly tâm để loại bỏ MTX không tải vào hệ với tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dung dịch trước và sau ly tâm sẽ được pha loãng sử dụng cho đánh giá hiệu suất nanogel hóa (Y1). Phần dung dịch sau ly tâm sẽ được sử dụng cho đánh giá đo kích thước hạt của hệ nanogel (Y2).

##### ***2.2.3.2. Thiết kế tối ưu hóa công thức nanogel Alginate – Pluronic F127 – Acid folic mang Methotrexate***

Thiết kế và tối ưu hóa công thức nanogel Alg-F127-FA mang MTX Sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) – mô hình phức hợp nhiều tâm (CCD), được thiết kế bằng phần mềm Design-Expert phiên bản 13.0.5.0. Trong đề tài này, hai yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tính chất sản phẩm được thiết lập bao gồm: hàm lượng MTX ( $X_1$ ) và nồng độ dung dịch Alg-F127-FA ( $X_2$ ). Thông số đáp ứng bao gồm: kích thước hạt nanogel ( $Y_1$ ) và hiệu suất nanogel hóa ( $Y_2$ ). Mỗi yếu tố được chia làm năm mức thay đổi, cụ thể theo Bảng 2.7. Trong nghiên cứu này, miền khảo sát như sau: hàm lượng MTX từ 1 – 5 mg và nồng độ dung dịch Alg-F127-FA được thực hiện từ 10000 – 30000 ppm. Mô hình thống kê biểu diễn sự phụ thuộc của hiệu suất nanogel hóa và kích thước hạt vào các nhân tố được mã hóa là một phương trình đa thức bậc hai có dạng:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_1X_1^2 + b_2X_2^2 \quad (1)$$

Trong đó:

Y là hiệu suất nanogel hóa (%)

$b_0$  là hệ số hồi quy bậc 0

$X_1, X_2$  lần lượt là nồng độ dung dịch Alg-F127-FA và hàm lượng MTX

$b_1, b_2$  là hệ số hồi quy bậc 1 mô tả ảnh hưởng của nhân tố  $X_1, X_2$  với Y

$b_{12}$  là hệ số tương tác của cặp yếu tố  $X_1$  và  $X_2$

Số liệu được phân tích bằng phần mềm Design-Expert để xây dựng mô hình toán học và xác định các giá trị tối ưu.

Bảng 2.9 Giới hạn và các mức độ đã được mã hóa của các yếu tố khảo sát thực nghiệm

Biến thực	Biến mã hóa	Đơn vị	Mức nghiên cứu				
			-2(- $\alpha$ )	-1	0	+1	+2(+ $\alpha$ )
MTX	X <sub>1</sub>	mg	1	2	3	4	5
Alg - F127 - FA	X <sub>2</sub>	ppm	10000	15000	20000	25000	30000

### 2.2.3.3. Phương pháp xác định hiệu suất nanogel hóa

Định lượng MTX toàn phần (MTX dạng tự do và MTX trong phức hợp nanogel): hút chính xác 0,2 mL hỗn dịch nanogel trước khi ly tâm, đưa vào bình định mức 10 mL, định mức tới vạch bằng dung dịch DMSO. Tiến hành phép đo quang phổ UV ở bước sóng 300 nm.

Định lượng MTX nanogel: để xác định hiệu suất nanogel hóa, cần loại phần MTX tự do. Trong nước MTX tự do không tan và kích thước tiểu phân tương đối lớn khi ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 10 phút sẽ lắng, bám vào thành ống. Lấy 0,2 mL phần dịch thu được sau khi ly tâm, đưa vào bình định mức 10 mL, bổ sung dung dịch DMSO đến vạch. Tiến hành phép đo quang phổ UV ở bước sóng 300 nm.

Hiệu suất nanogel hóa được tính bằng công thức<sup>[51]</sup>:

$$H = \frac{A_1 - A_{\text{Blank}}}{A_2 - A_{\text{Blank}}} \times \frac{f_1}{f_2}$$

Trong đó:

A<sub>1</sub> là độ hấp thụ quang của MTX nanogel sau khi ly tâm (Abs)

A<sub>2</sub> là độ hấp thụ quang của MTX nanogel toàn phần (Abs).

f<sub>1</sub>, f<sub>2</sub> lần lượt là hệ số pha loãng của MTX nanogel sau ly tâm và toàn phần.

### 2.2.3.4. Phương pháp đánh giá hàm lượng MTX giải phóng từ hệ Alg-F127-FA

Các nghiên cứu giải phóng in-vitro của các hạt nano cao phân tử được nghiên cứu rộng rãi nhất bằng phương pháp khuếch tán màng [51, 52]. 0,5 mL chế phẩm cho vào túi màng thẩm tách, được buộc chặt và cho vào 15 mL dung dịch muối đệm phosphate (PBS) có pH 7,4. Nhiệt độ của dung dịch được duy trì ở 37 °C và khuấy từ liên tục với tốc độ 50 vòng/phút. Sau mỗi khoảng thời gian xác định trước 1 giờ, 3 giờ, 6 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 0,5 mL dung dịch môi trường được lấy ra lọc qua màng lọc 0,22 µm, đồng thời thêm vào 0,5 mL dung dịch PBS để đảm bảo thể tích dung dịch đệm không đổi. Các mẫu sau khi thẩm tách được bơm vào vial để tiêm mẫu tự động. Lượng mẫu tiêm là 20 µL, dung môi chạy cột C18 – 18000 5.5 µm. Tốc độ bơm là 1 mL/phút đo tại bước sóng 303 nm. Pha động bao gồm Acetonitrile (kênh A) và nước có bổ sung 1% acid fomic (kênh B). Chương trình chạy gradient, 0 – 12 phút kênh A tăng từ 0 – 60%, từ 12 – 15 phút kênh A tăng từ 60 – 100%. Sự giải phóng MTX từ các hạt nano được xác định bằng cách sử dụng đường chuẩn.

Xác định đường chuẩn bằng cách: lấy chính xác 4 mg MTX tinh khiết hòa tan trong 10 mL PBS có pH 7,4 (400 ppm). Sau đó, pha loãng thành các nồng độ từ 0 – 28 ppm bằng dung dịch đệm PBS có pH 7,4. Kết quả đo HPLC của dung dịch MTX sau khi được lọc qua màng 0,22 µL để xác định đường chuẩn. Từ phương trình đường chuẩn ta có thể xác định được hàm lượng thuốc MTX được tải vô hệ và nồng độ thuốc MTX giải phóng ra từ hệ nano Alg-F127-FA.

Phần trăm thuốc MTX phóng thích được tính theo công thức [53]:

$$\%MTX = \frac{V_1 \times C_i + V_2 \sum C_{i-1}}{m} \times 100\%$$

Trong đó:

$V_1$  là tổng thể tích của dung dịch PBS (15 mL)

$C_i$  là nồng độ của thuốc trong dung dịch PBS (mg/mL)

$V_2$  là thể tích của mẫu (0,5 mL)

$m$  là lượng thuốc MTX trong 0,5 mL chế phẩm (mg)

## **2.2.4. Khảo sát tính an toàn của hệ nano MTX/Alg-F127-FA**

### **2.2.4.1. Nuôi cấy tế bào**

#### ❖ Chuẩn bị môi trường

Môi trường DMEM/F12: 11,8 g DMEM/F12 và 1,2 g  $\text{NaHCO}_3$  trong 1000 ml nước cất (đã lọc và hấp tiệt trùng), pH 7,4.

Môi trường DMEM: 13,3 g DMEM và 3,7 g  $\text{NaHCO}_3$  trong 1000 ml nước cất (đã lọc và hấp tiệt trùng), pH 7,4.

Môi trường được lọc ( $\varnothing$  0,22  $\mu\text{m}$ ) trước khi sử dụng. Môi trường được bảo quản ở nhiệt độ  $2\text{ }^\circ\text{C} - 8\text{ }^\circ\text{C}$ .

Môi trường hoàn chỉnh được bổ sung 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) penicillin-streptomycin.

#### ❖ Điều kiện nuôi cấy tế bào

MSC được nuôi trong môi trường DMEM/F12. RAW264.7 được nuôi trong môi trường DMEM.

Đĩa được ủ trong tủ  $\text{CO}_2$  ở điều kiện  $\text{CO}_2$  5%, độ ẩm 90% ở  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Môi trường nuôi cấy được thay mỗi 48 giờ. Khi tế bào đạt đến độ hợp lưu 70 – 80%, cấy chuyển được thực hiện.

#### ❖ Quy trình cấy chuyển tế bào bám dính (MSC, RAW264.7)

Môi trường cũ được loại bỏ, rửa đĩa nhẹ bằng PBS 1X (3 lần), sau đó thêm vào 2 ml 0,25% Trypsin-EDTA 1X, tráng đều bề mặt đĩa nuôi và ủ ở nhiệt độ  $37\text{ }^\circ\text{C}$  trong 3 – 5 phút. Quan sát dưới kính hiển vi soi ngược để đảm bảo các tế bào đã co tròn và

tách ra khỏi bề mặt đĩa. Thêm vào 4 ml môi trường để bất hoạt trypsin và trộn đều. Chuyển huyền phù tế bào vào ống ly tâm 50 ml. Ly tâm ở 1200 rpm trong 5 phút, thu cặn tế bào. Thêm 2 ml môi trường vào và trộn đều. Sau đó, cho huyền phù tế bào vào các đĩa mới, thêm môi trường cho đủ 5 ml (đối với chai nuôi cấy 25 cm<sup>2</sup>) hoặc 10 ml (đối với đĩa petri 90 x 20 mm).

Khảo sát giá trị IC<sub>50</sub> với dòng tế bào RAW264.7 và dòng tế bào MSC sau 48 giờ và 72 giờ ủ giữa MTX tự do là 120 ppm và hệ MTX/Alg – F127 – FA.

#### **2.2.4.2. Khảo sát hoạt tính kháng viêm**

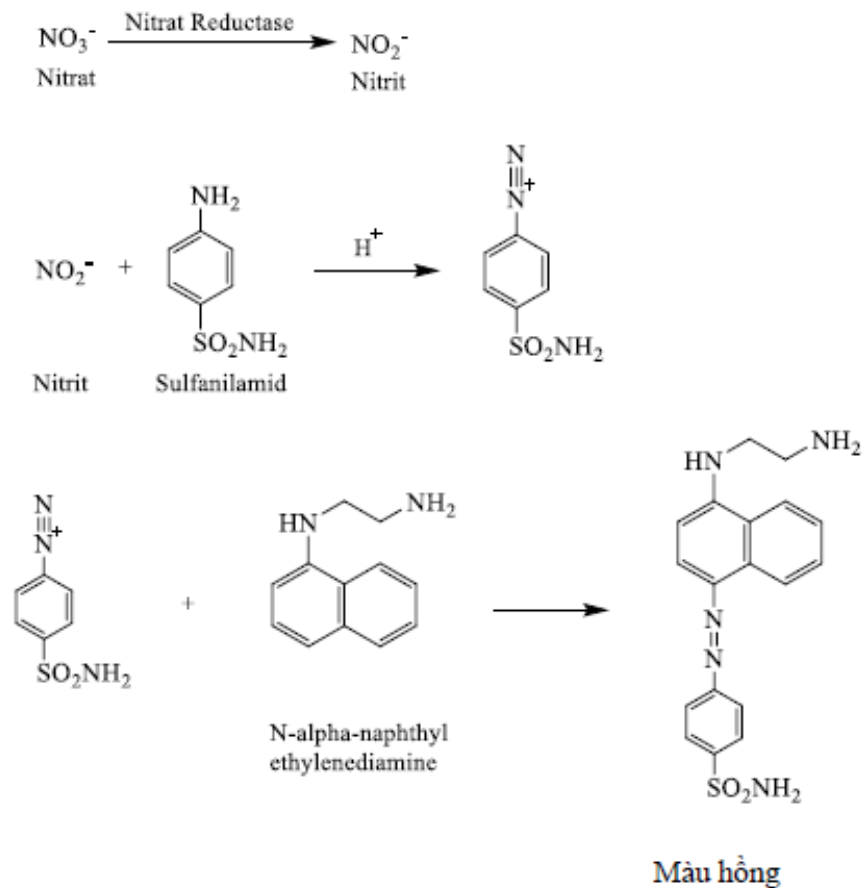
Đánh giá hoạt tính kháng viêm của các mẫu thử nghiệm thông qua khả năng ức chế sản xuất nitric oxid (NO) của tế bào RAW264.7 do kích thích LPS. Xác định hàm lượng NO ở các mẫu thử nghiệm bằng thuốc thử Griess.

##### **❖ Nguyên tắc**

Đại thực bào RAW264.7 được kích hoạt phản ứng viêm bằng cách kích thích với LPS. Khi đó, NO được tiết ra với lượng lớn bởi các tế bào này. Định lượng NO bằng phương pháp Griess để đánh giá khả năng ức chế sản sinh NO; từ đó đánh giá được hoạt tính kháng viêm của các mẫu thử.

Phương pháp Griess là một phương pháp định lượng gián tiếp NO thông qua phản ứng màu giữa nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) và thuốc thử Griess. Phản ứng này đòi hỏi nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) đầu tiên được khử thành nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), do tác động của nitrate reductase. Sau đó, nitrit được phản ứng với sulfanilamid trong môi trường tạo thành muối diazonium, tiếp đó muối diazonium được phản ứng với N-alpha-naphthyl ethylenediamin để tạo thành hợp chất azo màu hồng đỏ ổn định. Độ hấp thụ của hợp chất azo này ở bước sóng 540 nm. Kết quả độ hấp thụ tỉ lệ thuận với lượng NO có trong các giếng <sup>[54]</sup>.





Hình 2.6 Nguyên tắc của phương pháp Griess

❖ Quy trình

Tế bào RAW264.7 được cho vào đĩa 96 giếng với mật độ  $2 \times 10^4$  tế bào/giếng (100  $\mu\text{l}$ /giếng). Đĩa được ủ trong tủ ấm  $\text{CO}_2$  ở điều kiện  $\text{CO}_2$  5%, độ ẩm 90% ở  $37^\circ\text{C}$  trong 24 giờ.

Sau đó:

- Tế bào được ủ trước với mẫu thử, lắc nhẹ và ủ đĩa ở  $37^\circ\text{C}$  và  $\text{CO}_2$  5%. Sau 1 giờ, LPS (pha trong PBS ở pH 7,4) được thêm vào các giếng ở nồng độ cuối là  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  (trường hợp 1)

- Tế bào được kích thích trước bằng LPS (nồng độ cuối là  $1 \mu\text{g/ml}$ ), lắc nhẹ và ủ đĩa ở  $37^\circ\text{C}$  và  $\text{CO}_2$  5%. Sau 1 giờ, mẫu thử được thêm vào các giếng (trường hợp 2)

Sau 24 giờ, dịch nuôi cấy được thu thập để đo mức độ tiết NO bằng thuốc nhuộm Griess.

Phương pháp Griess được thực hiện theo bộ kit của Sigma G4410 <sup>[55]</sup>.

Mẫu đối chứng âm là tế bào được xử lý với LPS và PBS 7,4 + 0,1%  $\text{NaHCO}_3$ . Mẫu đối chứng dương là tế bào được xử lý với LPS và dexam.

Nồng độ nitrit của mỗi mẫu được xác định dựa vào đường chuẩn natri nitrit; pha loãng ở các nồng độ trong khoảng [ 0;100  $\mu\text{M}$  ]

- 100  $\mu\text{l}$  dịch nuôi cấy hoặc dung dịch  $\text{NaNO}_2$  được trộn với thể tích tương ứng của thuốc thử Griess
- Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng

Đo độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm bằng máy ELISA.

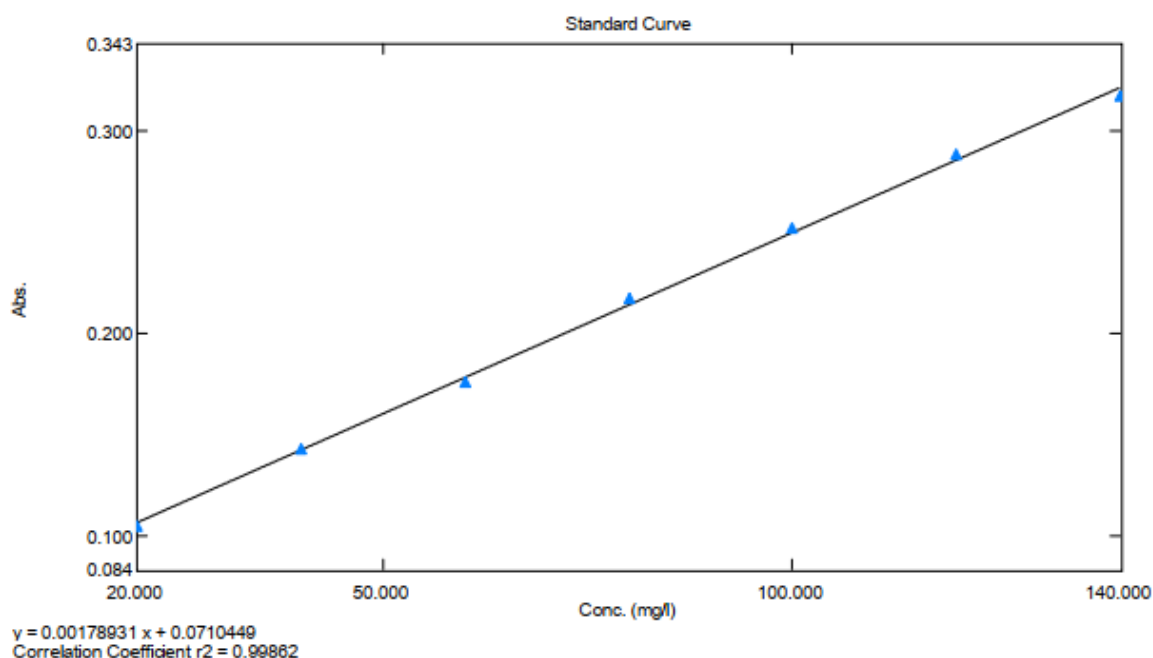
## CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. KẾT QUẢ TỔNG HỢP VẬT LIỆU NHẠY NHIỆT ALG – F127

#### 3.1.1. Kết quả tổng hợp Na – Alg – Cys

##### 3.1.1.1. Kết quả khảo sát điều kiện tổng hợp

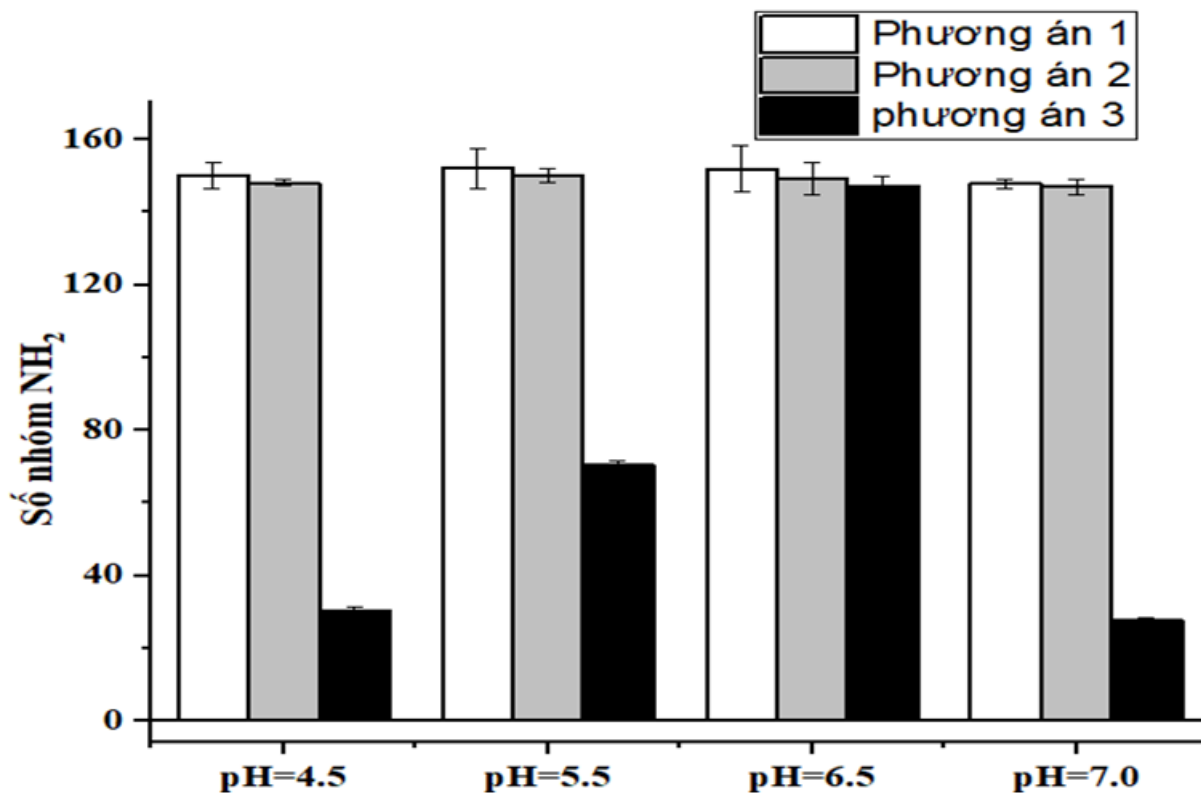
Phương trình hồi quy tuyến tính thể hiện mối quan hệ giữa hàm lượng L-alanine và giá trị OD là  $y = 0,00178931x + 0,0710449$  trong đó y là giá trị OD đo được ở bước sóng 335 nm và x là số mol L-alanine (đơn vị là mmol), hệ số tương quan R của phương trình tuyến tính là 0,998.



Hình 3.1 Đường chuẩn dung dịch L-alanine có hàm lượng từ 0-140 ppm phản ứng với dung dịch TNBS 0,1% trong NaHCO<sub>3</sub> 0,1M

Đối với các mẫu Na-alg-cys sau khi được đông khô, cân chính xác khối lượng 0,01 g pha vào 50 ml nước cất sau khi tan hết, định mức chính xác 100 ml. 10 ml dung dịch Na-alg-cys (có nồng độ pha loãng đến 2 ppm) cho vào ống nghiệm sau đó 5 ml NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M được cho vào trước khi 1 ml TNBS 0,1% được thêm vào. Ống

nghiệm này được ủ trong bể ổn nhiệt 37°C trong 2 giờ, rồi đo độ hấp thụ ở bước sóng 420 nm. Số nhóm NH<sub>2</sub> được tính dựa trên sự so sánh số hàm lượng L-alanine tương ứng với giá trị OD đo được ở mẫu Na-Alg-cys.



Hình 3.2 Số nhóm NH<sub>2</sub> có trong Na-Alg-cys với các phương án sử dụng EDC/NHS/Cys tỉ lệ mol khác nhau (Phương án 1: 1:1:1; phương án 2: 1:1:0,5 và phương án 3: 1:0:1) ở các điều kiện pH khác nhau.

Hình 3.2 không có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ cys sử dụng ( $p = 0,34$ ), trong khi có sự khác biệt đáng kể trong việc sử dụng kết hợp EDC/NHS ( $p < 0,05$ ) khi so sánh với các giá trị pH khác nhau. Theo cơ chế đã được chứng minh bởi Nakajima về cơ chế hoạt hóa nhóm carboxyl bằng EDC, EDC cần được proton hóa tạo ra carbocation. Các carbocation này sẽ tấn công vào gốc carboxylate –COOH tạo thành thành nhóm O-acylisourea<sup>[50]</sup>. Do đó môi trường có pH > 7,0 là cần thiết trong quá trình sử dụng EDC là tác nhân hoạt hóa. Điều này hoàn toàn phù hợp với kết quả

thực nghiệm khi số nhóm  $\text{NH}_2$  ( $27 \pm 1$ ,  $3,08 \pm 0,08$  mM) ít nhất là ở pH 7,0 khi sử dụng EDC riêng lẻ. Tuy nhiên, số nhóm  $\text{NH}_2$  gắn lên Na-alg chỉ khoảng  $30 \pm 1$  ( $3,39 \pm 0,09$  mM) nhóm ở pH 4,5 thấp hơn 3 lần với điều kiện pH 5,5 và 4,87 lần so với điều kiện pH 6,5. Theo nghiên cứu của Bulpitt và cộng sự<sup>[56]</sup>, ở pH 4,75, O-acylisourea bị thủy phân nhanh, dẫn đến phản ứng cộng hợp với nhóm  $\text{NH}_2$  bị khó khăn. Số nhóm  $\text{NH}_2$  gắn cao nhất trong trường hợp sử dụng EDC riêng lẻ là  $147 \pm 3$  ( $16,51 \pm 0,26$  mM) được gắn lên Na-Alg khi tổng hợp trong điều kiện pH 6,5. Như vậy có thể kết luận pH 6,5 là điều kiện tối ưu cho phản ứng carbodiimide sử dụng EDC là tác nhân hoạt hóa.

So sánh với phương án sử dụng EDC riêng lẻ, sự kết hợp với NHS cho thấy không có sự khác biệt khi so sánh trong khoảng giá trị pH khi so sánh ở mức độ 95%. Đặc biệt, duy nhất ở pH 6,5, việc sử dụng NHS không có tác dụng tăng tỷ lệ gắn kết cystamine lên mạch Na-Alg (giá trị p của phương án 1: 1: 1 và 1: 1: 0,5 với 1: 0: 1 lần lượt 0,80629 và 0,99954 ở pH 6,5). Số nhóm  $\text{NH}_2$  gắn lên mạch 1 phân tử Na-Alg ở pH 6,5 lần lượt là  $152 \pm 6$ ,  $149 \pm 5$  và  $147 \pm 3$  ở 3 phương án sử dụng EDC/NHS/cys. Ngoài ra trong trường hợp sử dụng EDC: NHS tỷ lệ 1:1 theo số mol, không có sự khác biệt nhiều về mặt thống kê khi so sánh số nhóm  $\text{NH}_2$  được gắn trên mạch Na-Alg giữa 2 phương án 1 (EDC/NHS/cys= 1:1:1 theo số mol) và phương án 2 (EDC/NHS/cys = 1:1:0,5 theo số mol). Điều này chứng tỏ việc sử dụng NHS chỉ giúp cho ngăn cản sự hình thành của nhóm N-acylurea do sự thủy phân của O-acylisourea trong điều kiện pH không thuận lợi. Trên cơ sở các kết quả trên, quy trình tổng hợp Na-Alg-cys nên được thực hiện theo phương án số 1, 2 để đạt được hiệu quả tốt.

Bảng 3.1 Quy đổi hàm lượng nhóm NH<sub>2</sub> của các mẫu Na-alg-cys theo nồng độ mol

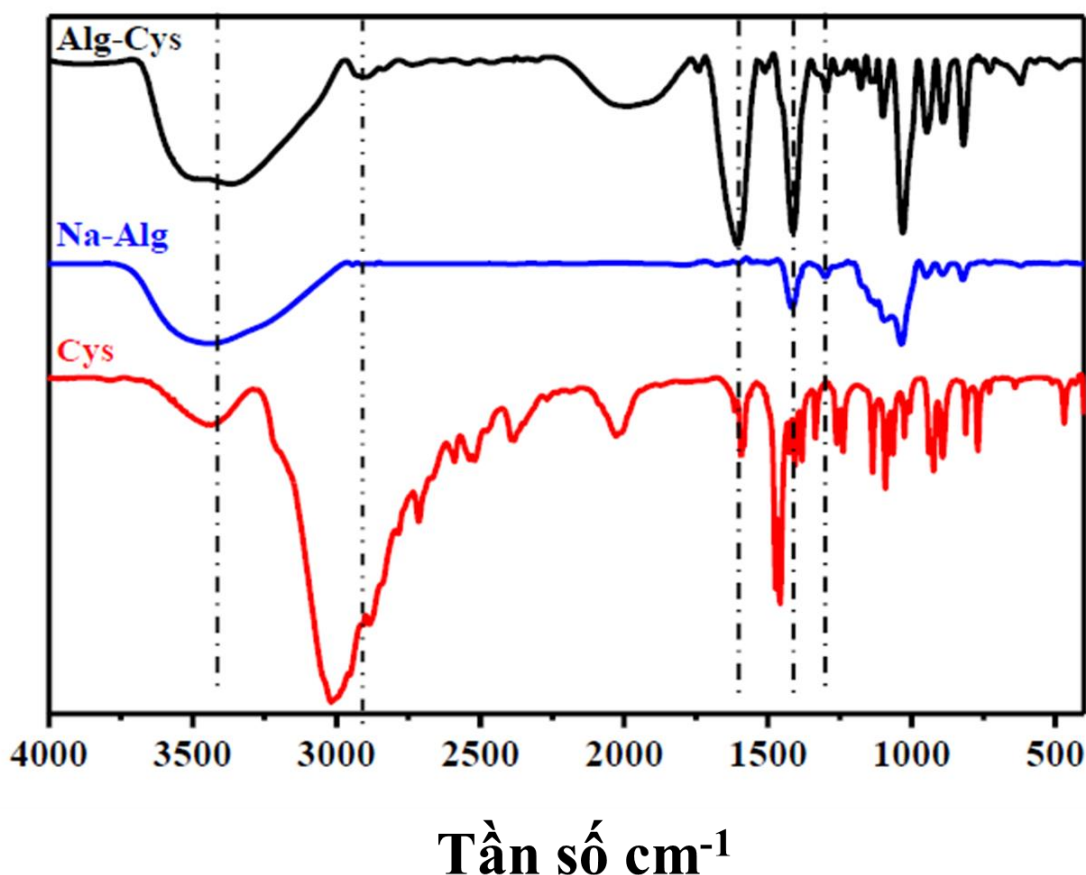
Điều kiện pH	Tỷ lệ EDC/NHS/Cys	Nồng độ (mM)	Sai số
pH = 4,5	1: 1: 1	16,85	0,34
	1: 1: 0,5	16,61	0,009
	1: 0: 1	3,39	0,09
pH = 5,5	1: 1: 1	17,07	0,50
	1: 1: 0,5	16,84	0,16
	1: 0: 1	7,89	0,11
pH = 6,5	1: 1: 1	17,05	0,59
	1: 1: 0,5	16,75	0,41
	1: 0: 1	16,51	0,26
pH = 7,0	1: 1: 1	16,58	0,12
	1: 1: 0,5	16,49	0,20
	1: 0: 1	3,08	0,08

### 3.1.1.2. Phân tích cấu trúc hóa học Alginate - Cystamine

Phổ FT –IR của Na – Alg (Hình 3.3) cho thấy có sự hiện diện của nhóm –OH qua dãy hấp thụ ở cường độ mạnh ở số sóng 3437 cm<sup>-1</sup>, dao động từ số sóng 2944 cm<sup>-1</sup> và 2911 cm<sup>-1</sup> với cường độ yếu thể hiện sự dao động của chuỗi –CH<sub>2</sub>. Ở mũi dao động 1294 cm<sup>-1</sup> và 1037 cm<sup>-1</sup> đặc trưng của nhóm guluronic acid, mũi dao động tại 890 cm<sup>-1</sup> và 815 cm<sup>-1</sup> chứng tỏ cho sự hiện diện của mannuronic acid<sup>[57]</sup>.

Sau khi gắn cystamine lên mạch, phổ xuất hiện mũi với dao động hấp thụ mạnh ở 2909 cm<sup>-1</sup> được ấn định đối với dao động dẫn nối của nhóm amino bậc I, tín hiệu này tương tự như phổ FT-IR của cys tự do. Đặc biệt trên phổ gắn cystamine có sự xuất hiện 1 dao động dẫn nối ở số sóng 1606 cm<sup>-1</sup> tương ứng với tín hiệu của N-

C=O của nhóm amide bậc I. Cường độ lớn của các dải tại  $1294\text{ cm}^{-1}$  và  $1037\text{ cm}^{-1}$  cho biết hàm lượng G cao. Trong khi đó, hàm lượng M nhiều hơn, tương ứng với cường độ mạnh của các dải tại  $815, 890\text{ cm}^{-1}$ . So sánh tỉ lệ các dải phổ trên cho thấy, sau khi gắn cystamine cường độ tín hiệu tại  $1037$  bị chuyển dịch xuống vùng dưới  $1112\text{ cm}^{-1}$ , trong khi cường độ các tín hiệu tại  $815\text{ cm}^{-1}$  và  $890\text{ cm}^{-1}$  trở nên rõ nét, chứng tỏ hàm lượng M cao trong phổ ghép cao hơn, như vậy hầu hết cystamine được gắn chủ yếu trên nhóm carboxylate của guluronic acid.



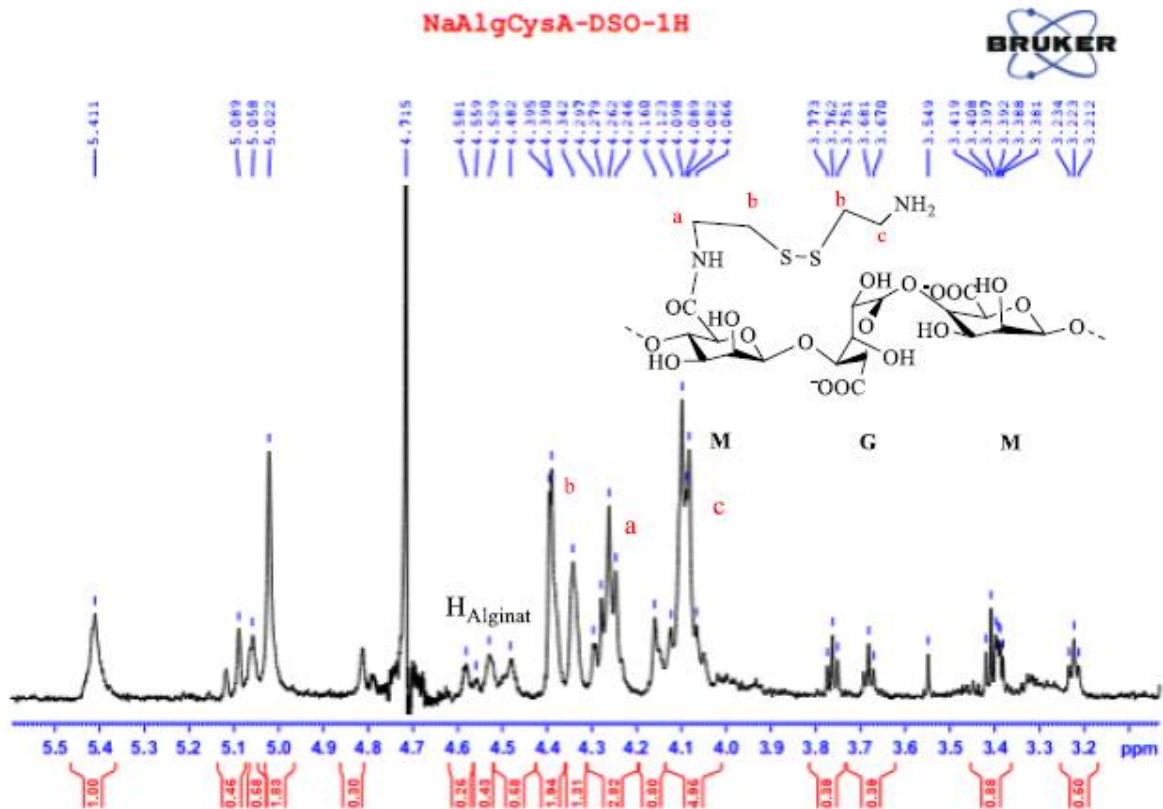
Hình 3.3 Phổ FT-IR của Na-Alg, Cys và Na-Alg-Cys tổng hợp sử dụng EDC/NHS/Cys

Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của Na-Alg-cys (Hình 3.4) cho thấy tín hiệu cộng hưởng ở trường thấp  $5,08\text{ ppm}$  và  $4,48\text{ ppm}$  là của proton ở C-1 của đơn vị guluronate (H-1-

G) và mannuronate (H-1-M) <sup>[58]</sup>. Bên cạnh đó, phổ Na-alg-cys còn xuất hiện các tín hiệu cộng hưởng ở 5,02 ppm và 4,20 ppm tương ứng lần lượt với proton ở C-5 của đơn vị guluronate (H-5-G) và mannuronate (H5-M) <sup>[59]</sup>. Trong khi H-5 của các đơn vị guluronate trong khối GG (H-5-GG) cho tín hiệu cộng hưởng ở 4,39 ppm và các tín hiệu cộng hưởng ở 4,48 ppm và 4,7 ppm là của H-1 của đơn vị mannuronate và H5 của đơn vị guluronate trong các đơn vị thuộc khối GM (H-1-M+ H-5-GM). Bên cạnh các tín hiệu đặc trưng của Na-alg, phổ <sup>1</sup>H-NMR xuất hiện tín hiệu mới ở 3,4 ppm và 3,2 ppm, 2 tín hiệu đặc trưng của proton có trên phổ <sup>1</sup>H-NMR của cystamine. Đối chiếu với phổ <sup>1</sup>H-NMR của cystamine tự do, với các công bố khác về phổ Na-alg <sup>[59, 60]</sup>. Dựa trên các tài liệu tham khảo về sự ghép nối giữa Na-alg và cystamine, tín hiệu này có thể được sinh nhờ sự hình thành do sự amit hóa của nhóm carboxylate <sup>[61]</sup>.

Như vậy, thông qua đánh giá cấu trúc bằng <sup>1</sup>H-NMR và FT-IR, quy trình biến đổi Na-alg để có nhóm NH<sub>2</sub> bằng cách gắn phân tử cystamine với tác nhân hỗ trợ EDC/NHS đã tạo ra được sản phẩm Na-Alg-cys.





Hình 3.4 Phổ <sup>1</sup>H-NMR của Na-alg-cys trong môi trường D2O.

### 3.1.2. Kết quả tổng hợp Alg – F127

#### 3.1.2.1. Kết quả khảo sát điều kiện tổng hợp Alg - Cys

Dựa trên phương pháp nhận biết và xác định số nhóm NH<sub>2</sub> đã trình bày ở trên, mẫu Alg – F127 cho phản ứng với TNBS và sau đó đo mật độ quang tại 335nm để tính toán số nhóm NH<sub>2</sub> còn lại trên mẫu ghép. Kết quả được trình trong bảng 3.2, Như kết quả trình bày trong bảng 3.2, số nhóm NH<sub>2</sub> giảm rõ rệt sau phản ứng ghép mạch, cụ thể trong trường hợp được phân tích phổ (tỷ lệ Na-alg-cys: Pluronic F127=1:10), số nhóm α-amino được ghép với Pluronic là 111 nhóm. Điều này giải thích cho việc cường độ hấp thụ của dao động giãn NH<sub>2</sub> giảm mạnh trong phổ ghép. Ngoài ra, khi tăng hàm lượng Pluronic F127, số lượng nhóm NH<sub>2</sub> tự do giảm, nhưng khi phản ứng ghép mạch đạt quá trình bão hòa thì hiệu suất phản ứng không thay đổi

đáng kể mặc dù hàm lượng Pluronic F127 tăng. Trên cơ sở các phân tích trên, quá trình tổng hợp đã thành công trong việc tạo ra vật liệu copolymer ghép trên cơ sở Pluronic F127 và Natri alginate thông qua cầu nối cystamine và chọn ra được tỉ lệ ghép thích hợp để tiếp tục các nghiên cứu sau.

Bảng 3.2 Hiệu suất phản ứng ghép mạch Alg-F127 với các khối lượng Pluronic F127 khác nhau.

Na-alg-cys (g)	Pluronic F127 (g)	Số nhóm NH <sub>2</sub> ban đầu trên 1 phân tử dẫn xuất <sup>a</sup>	Số nhóm NH <sub>2</sub> sau phản ứng với pluronic <sup>b</sup>	Hiệu suất (%)
1	5	152	63 ± 6	58,55 ± 4,31
1	10	152	41 ± 4	73,03 ± 2,85
1	15	152	39 ± 1	74,34 ± 0,90
1	20	152	31 ± 1	79,61 ± 0,16

a: kết quả tính bằng phương pháp TBNA, số nhóm NH<sub>2</sub> = (số mol Alg-cys)/(số mol NH<sub>2</sub>); số mol alg-cys = mass Alg-cys/ (GPC wieight of Alg-cys)

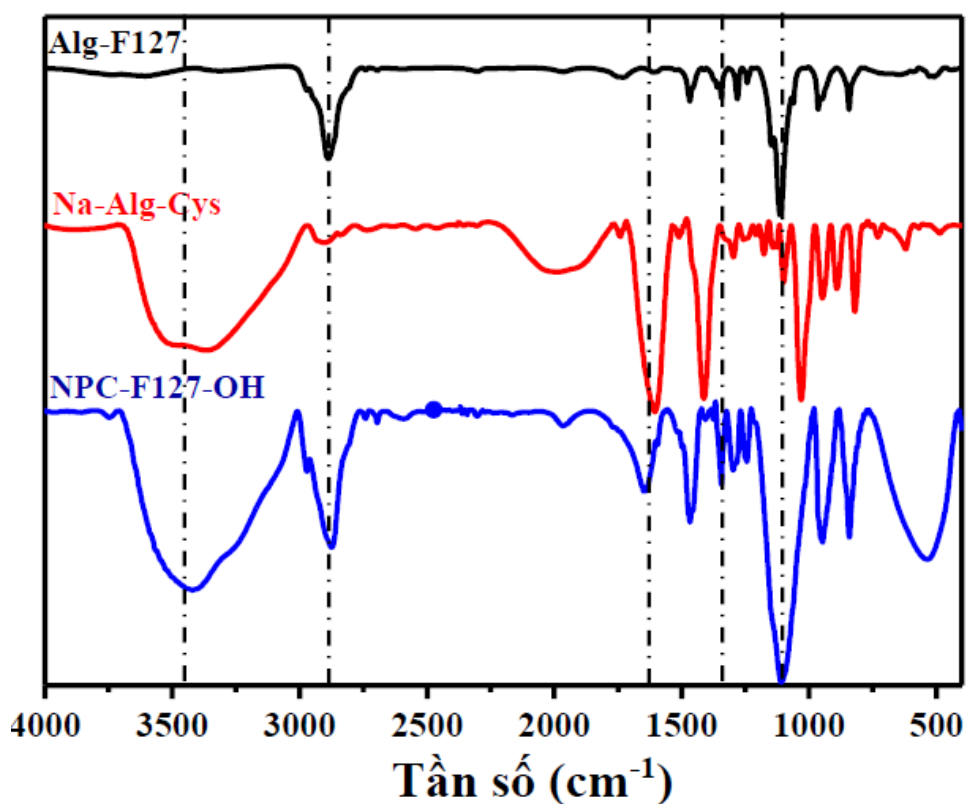
b: Kết quả tính dựa trên TBNA, số nhóm NH<sub>2</sub> có trong mẫu Al-F127 = (n alg-F127)/ (nNH<sub>2</sub>); số mol Agl-F127 = mass Alg-F127/ GPC weight of Alg-F127

### 3.1.2.2. Phân tích cấu trúc hóa học Alg – F127

Phản ứng tổng hợp copolymer ghép giữa Na-Alg-Cys với Pluronic F127 đã hoạt hóa cho ra sản phẩm Alg-F127. Cấu trúc hóa học của hợp chất được xác định thông qua phổ FT-IR và <sup>1</sup>H-NMR trong môi trường nước.

Trên phổ FT-IR của Alg-F127 (Hình 3.5) các mũi dao động đặc trưng của Na-Alg, cys và F127 đều xuất hiện. Đặc biệt dao động co giãn của nhóm OH tại vị trí 3554 cm<sup>-1</sup> được cải thiện về cường độ hấp thụ, do sự bổ sung nhóm chức OH của pluronic F127 sau khi được ghép thành công. Mặc dù tín hiệu tại vị trí 2887 cm<sup>-1</sup> đặc

trung cho dao động dẫn của nhóm  $\text{NH}_2$  vẫn xuất hiện trên phổ chứng tỏ vẫn còn dư nhóm  $\text{NH}_2$  tự do để tiếp tục nghiên cứu tiếp theo. Bên cạnh đó, tần số hấp thụ của dao động  $\text{NH}$  và  $\text{C}=\text{O}$  trong liên kết amin được thể hiện rõ ràng hơn trong phổ ghép. Đặc biệt có sự xuất hiện tín hiệu hấp thụ mạnh của amin bậc I và bậc II ở vùng sóng  $1600\text{ cm}^{-1} - 1700\text{ cm}^{-1}$  và tín hiệu dẫn của liên kết bất đối xứng  $\text{C}=\text{O}$  có trong mạch Na-alg tương tự như ở phổ IR của Na-alg-cys. Độ hấp thụ của tín hiệu đặc trưng cho mannuronic acid đường như không có sự thay đổi đáng kể, tuy nhiên các tín hiệu của guluronic acid tại  $1294\text{ cm}^{-1}$  có sự chuyển dịch sang vùng trên  $1281\text{ cm}^{-1}$ . Mũi 1241  $\text{cm}^{-1}$  cũng xuất hiện trên phổ ghép những với độ sắc nét và rõ ràng hơn khi so sánh với phổ Na-alg-cys, điều đó chứng tỏ nhiều liên kết amin được hình thành hơn.

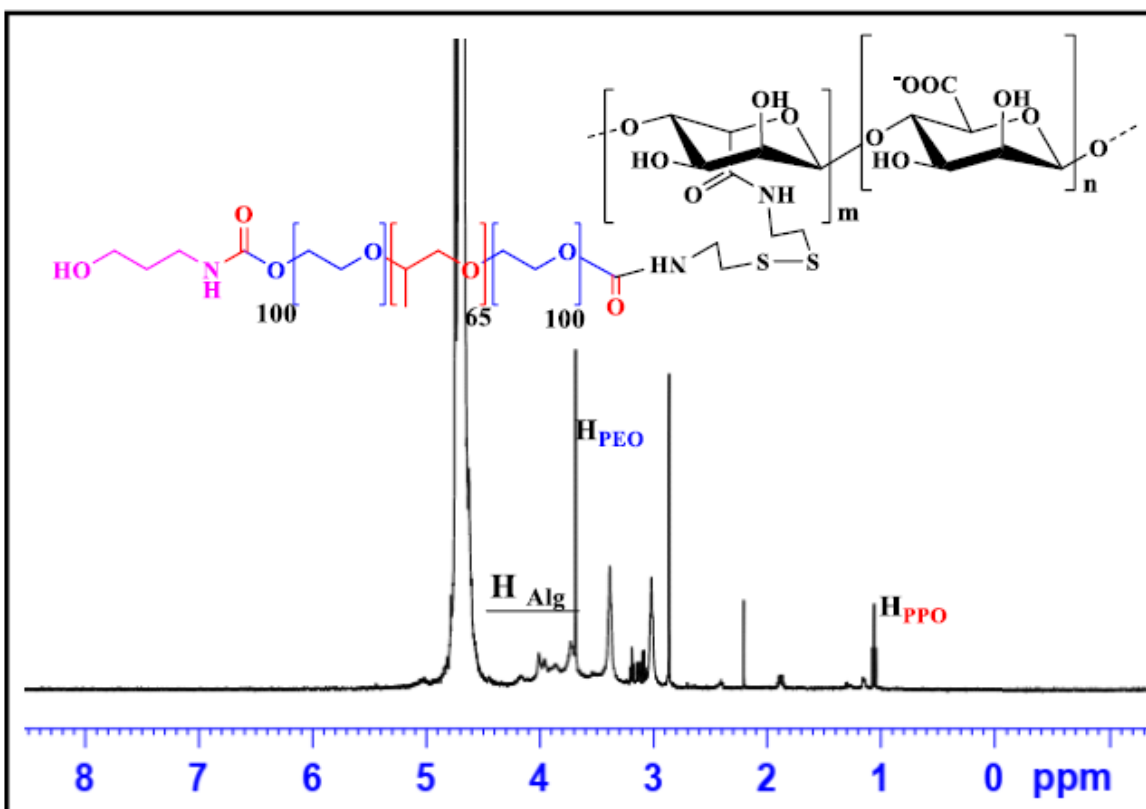


Hình 3.5 Phổ FT-IR của Alg-F127, Na-Alg-Cys và NPC-F127-OH

Theo kết quả phổ  $^1\text{H-NMR}$  (hình 3.6), sau khi ghép F127 lên, tín hiệu cộng hưởng của proton trên guluronate (H-1-G) và mannuronate (H-1-M) xuất hiện với

cường độ rất thấp, do sự giảm chắn mạnh nhất của hai nguyên tử oxi kề với chúng và sự giảm chắn bởi nguyên tử oxi từ liên kết trục (axial) là mạnh hơn từ liên kết xích đạo (equatorial) sau khi được ghép với Pluronic F127. Chỉ còn tín hiệu của proton trên mannuronic acid, MH5, MH4 và MH3 xuất hiện trên phổ cộng hưởng từ tại các vị trí 3,73 ppm, 3,71 ppm và 3,9 ppm<sup>[59]</sup>. Đồng thời tín hiệu ở 3,4 ppm và 3,1 ppm cũng xuất hiện nhưng với cường độ rất thấp, chúng tỏ phần lớn nhóm NH<sub>2</sub> của cystamine gắn trên Na-alg đã tham gia phản ứng với Pluronic F127.

Ngoài các tín hiệu đặc trưng của Na-Alg-cys, phổ còn cho thấy tín hiệu của pluronic tại vị trí 3,5-3,8 ppm tương ứng với sự hiện diện của methylen proton trên Pluronic. Tín hiệu xuất hiện ở trường mạnh  $\delta = 3,64$  ppm tương ứng với proton của –CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>– thuộc chuỗi PEO của pluronic.

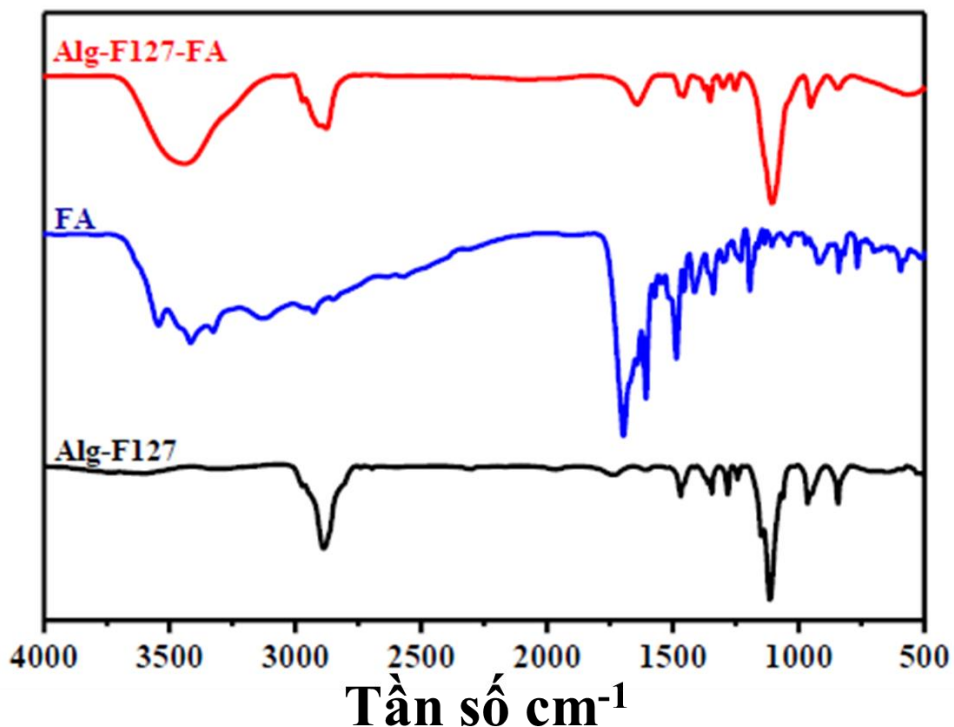


Hình 3.6 Phổ <sup>1</sup>H-NMR của Alg-F127

Dựa vào dữ liệu phổ FT-IR,  $^1\text{H-NMR}$  và so sánh với các tài liệu tham khảo, chúng tôi chứng tỏ rằng đã tổng hợp thành công hệ copolymer ghép Alg - F127.

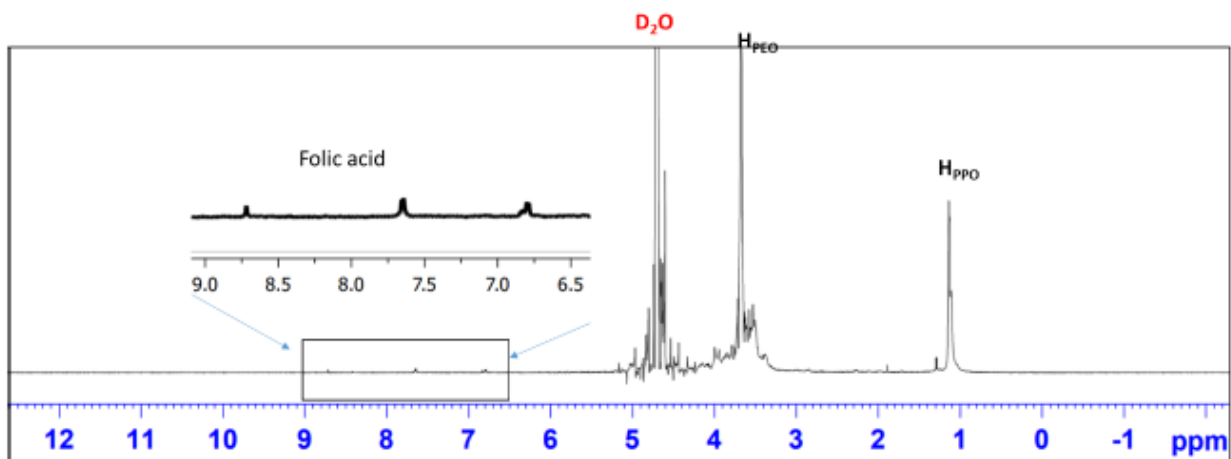
### ***3.1.3. Kết quả tổng hợp Alg-F127-FA***

Phổ FT-IR (hình 3.7) của acid folic cho thấy sự xuất hiện của dãy hấp thụ với cường độ mạnh ở số sóng  $3327\text{ cm}^{-1}$  đặc trưng cho nhóm amin bậc I <sup>[62]</sup>, ở số sóng  $2960 - 2924\text{ cm}^{-1}$  ứng với dao động của chuỗi  $\text{CH}_2$ , Bên cạnh đó, trên phổ xuất hiện số sóng  $3590\text{ cm}^{-1}$ , là đặc trưng của nhóm OH <sup>[63]</sup>. Trên phổ xuất hiện cường độ mạnh ở mũi  $1697\text{ cm}^{-1}$  đặc trưng cho nhóm carbonyl  $\text{C=O}$  thuộc nhóm  $\text{COOH}$  ở pterin . Sau khi FA được gắn lên Alginate-F127, bên cạnh các tín hiệu đặc trưng của Alg-cys hay Alg-F127 như  $3451\text{ cm}^{-1}$  đặc trưng của giãn O-H, ở vị trí  $2891\text{ cm}^{-1}$  là của  $\text{CH}_2$ , các tín hiệu của FA gần như khó xác định trên phổ. Tuy nhiên, so sánh phổ Alg-F127 và Alg-F127-FA, có thể thấy dao động dẫn nối của  $\text{C=O}$  ở  $1700\text{ cm}^{-1}$  hay tín hiệu  $1697\text{ cm}^{-1}$  của nhóm carbonyl của FA đều bị không phân biệt được. Thay vào đó, tín hiệu ở  $1642\text{ cm}^{-1}$  xuất hiện, đặc trưng của nhóm  $\text{N-C=O}$  của amin I <sup>[63]</sup>, với cường độ mạnh hơn khi so sánh với phổ Alg-F127.



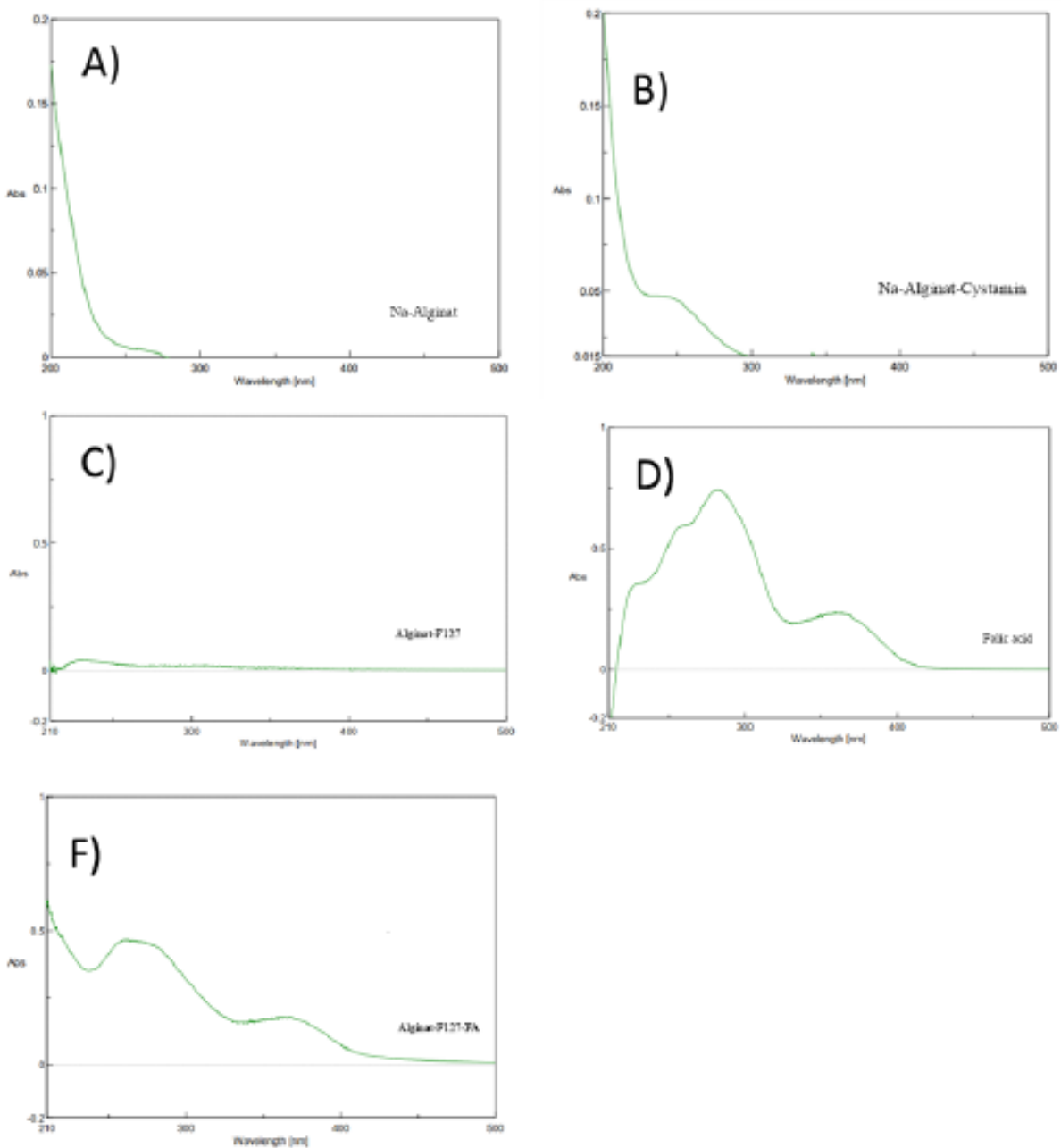
Hình 3.7 Phổ FT-IR của Alg-F127-FA, FA và Alginate-F127.

Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của Alg-F127-FA (Hình 3.8) được thực hiện trong môi trường nước. Kết quả được thể hiện trong hình. Bên cạnh các tín hiệu của pluronic (HPPO tại 1,05 ppm, 3,5 - 3,8 ppm của HPEO) và các tín hiệu của alginate tại vùng 3,73 ppm, 3,71 ppm và 3,9 ppm, phổ cộng hưởng từ xuất hiện chuyển dịch hóa học tại  $\delta = 8,65$  ppm, proton trên vòng pteridin <sup>[64]</sup>, tại  $\delta=6,61$  và ppm  $\delta=7,59$  ppm proton trên vòng benzen của glutamic acid. Kết quả này góp phần chứng minh sự thành công trong việc tổng hợp Alg-F127-FA.



Hình 3.8 Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của Alg-F127-FA trong dung môi  $\text{D}_2\text{O}$ , 500HZ

Bên cạnh đó, UV-vis được tiến hành để khẳng định sự thành công của quá trình tổng hợp. Acid folic được biết đến là chất có khả năng hấp thụ ánh sáng khả kiến tại vùng 285 nm và 350 nm do sự dịch chuyển của  $\pi \rightarrow \pi^*$  trong vòng pterin [65]. Tuy nhiên, do mẫu pha trong  $\text{NaHCO}_3$ , nhóm carboxylic acid trên Folic trở thành carboxylate, do vậy tín hiệu hấp thụ ở 285 nm xuất hiện thêm các tín hiệu nhỏ bên cạnh [66]. Sau khi được gắn vào Alg-F127, sản phẩm Alg-F127-FA chỉ xuất hiện 2 đỉnh 285nm và 350nm (hình 3,9 F). Bên cạnh đó, các nguyên liệu cho phần tổng hợp bao gồm Na-alg, Na-alg-cys hay Alg-F127 đều không có xuất hiện các đỉnh hấp thụ như mẫu Alg-F127-FA. Kết hợp với  $^1\text{H-NMR}$ , có thể kết luận, mẫu Alg-F127-FA được tổng hợp thành công.



Hình 3.9 Phổ UV-Vis của (A) Na-alg, (B) NA-alg-cys, (C) Alg-F127, (D) Acid folic và (E) Alg-F127-FA trong dung dịch  $\text{NaHCO}_3$  0,01M

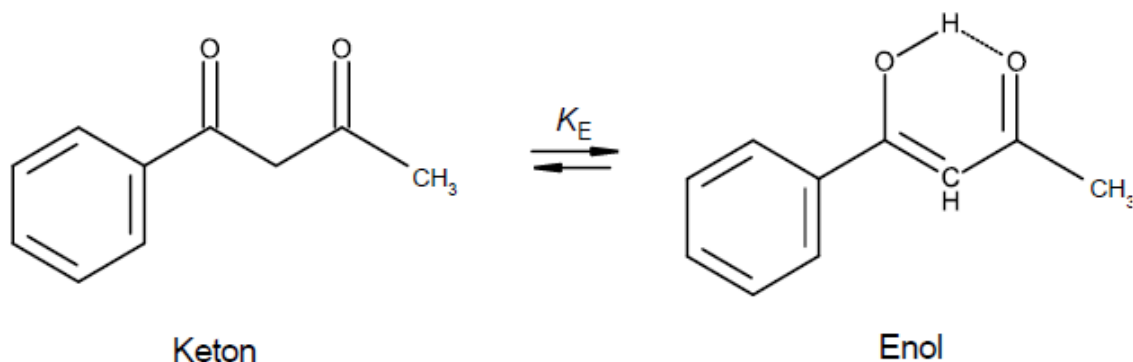
### 3.2.KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH NỒNG ĐỘ TẠO NANOGEL CỦA HỆ NANO ALGINATE – PLURONIC F127 – FOLIC ACID

#### 3.2.1. Kết quả khảo sát nồng độ tạo hạt CMC và sự hình thành nanogel



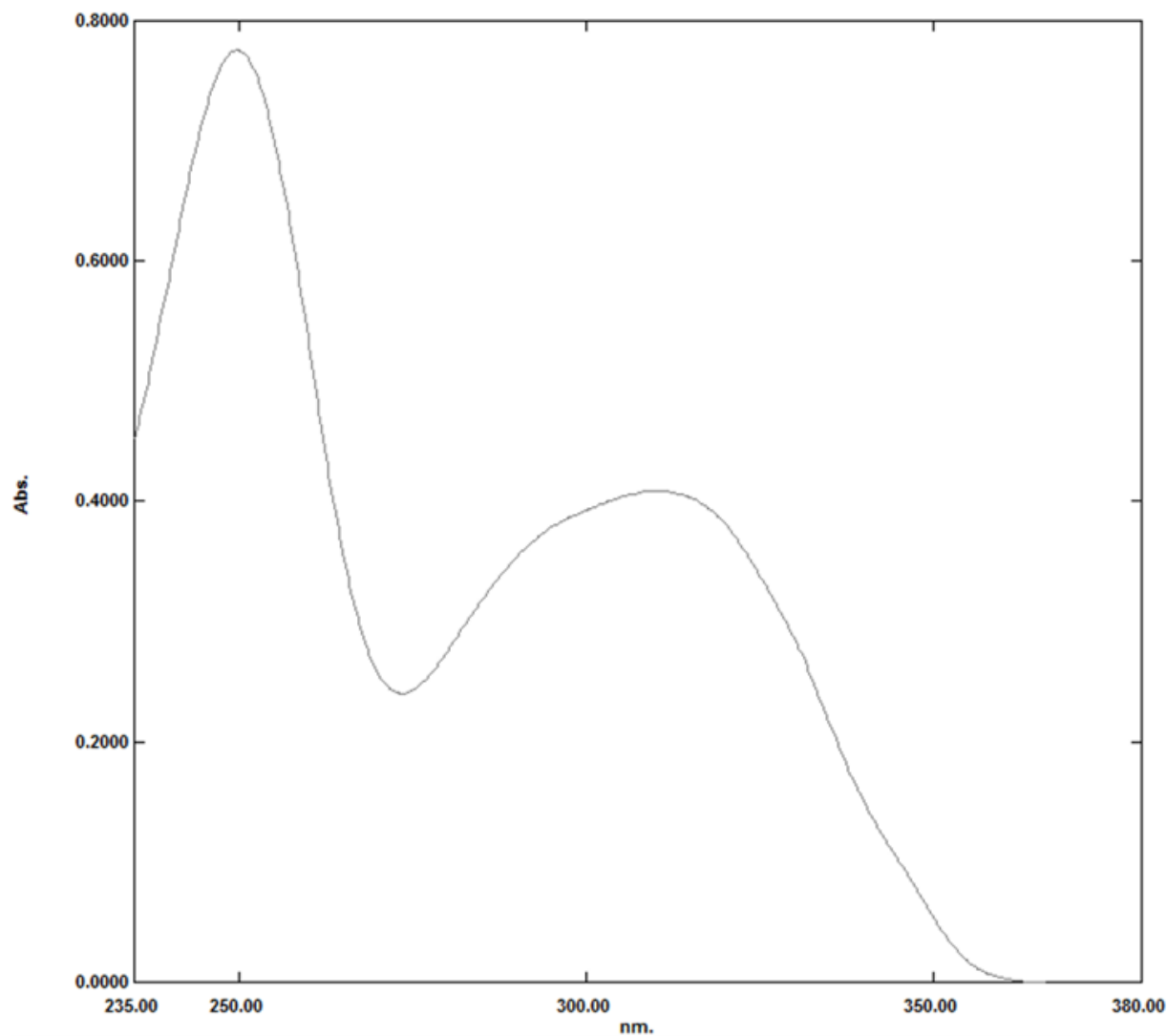
### 3.2.1.1. Kết quả khảo sát nồng độ tạo hạt CMC

Phương pháp xác định nồng độ tạo nanogel dựa trên hiện tượng chuyển đổi lẫn nhau giữa 2 đồng phân dạng keton và dạng enol của BZA. BZA tồn tại trong nước dưới dạng hỗn hợp của cả hai đồng phân (trong đó đồng phân enol chiếm 37,5%)<sup>[67]</sup>. Khi thêm chất hoạt động bề mặt vào dung dịch BZA tại và trên nồng độ tạo nanogel, độ hấp thụ của đồng phân enol tăng đột ngột, trong khi đồng phân keton sẽ giảm đột ngột. Lúc này, tỷ lệ độ hấp thụ của enol và keton (A<sub>enol</sub>/A<sub>keton</sub>) sẽ tăng đột ngột. Khi có mặt của nanogel, đồng phân enol sẽ bị giữ lại bên trong nanogel, cân bằng keton – enol trong nước sẽ dịch chuyển về phía hình thành enol. Khả năng hòa tan đồng phân enol trong nanogel càng cao là do hiệu ứng kỵ nước. Sự hình thành các liên kết hydro nội phân tử trong một cấu trúc, làm cho dạng enol của BZA ít phân cực hơn dạng keton<sup>[68]</sup>.



Hình 3.10 Phản ứng đồng phân hóa của BZA<sup>[67]</sup>

Để xác định bước sóng hấp thụ cực đại của BZA, tiến hành khảo sát quét phổ hấp thụ của BZA trong dung môi được chuẩn bị như sau: cho 5 mg vật liệu Alg – F127 – FA vào bình định mức 10 mL và định mức tới vạch bằng nước cất), ở nồng độ 12 ppm ở dải sóng 380 – 235 nm trên máy quang phổ UV-VIS Shimadzu.

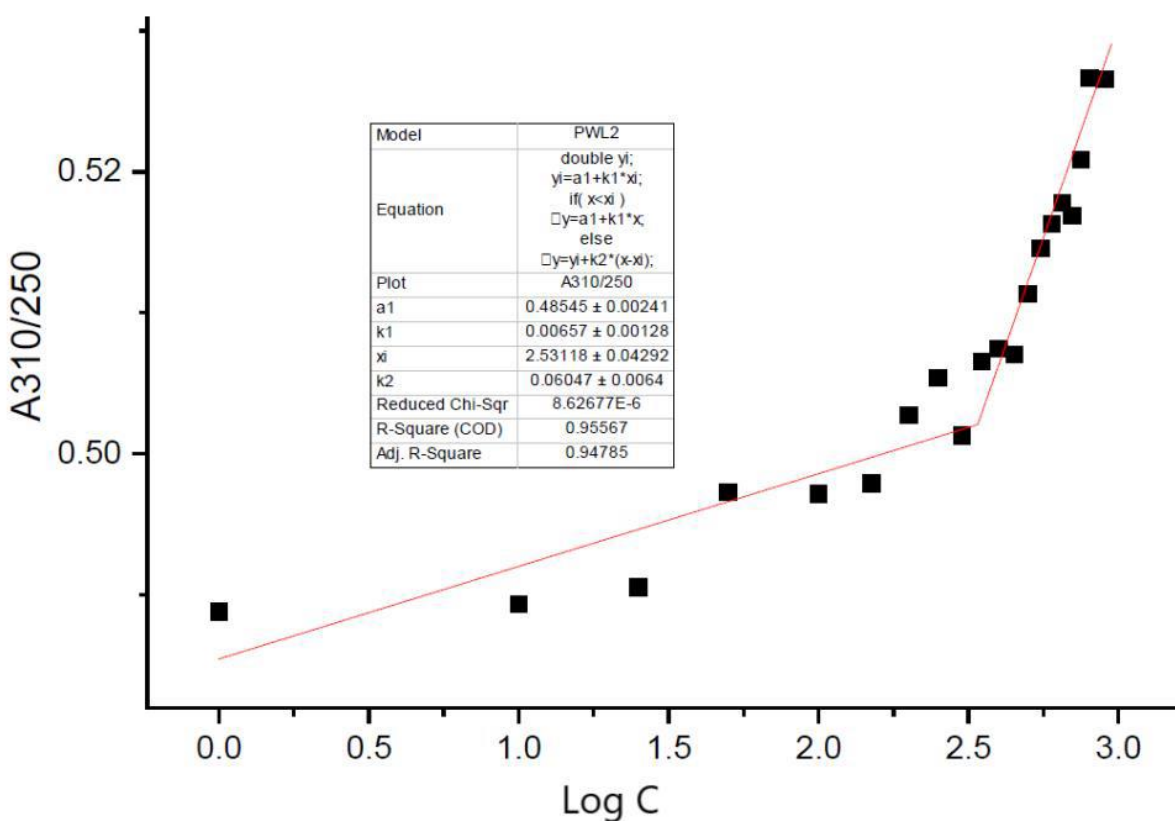


Hình 3.11 Phổ hấp thụ UV-VIS của BZA

BZA cho hai bước sóng hấp thụ cực đại 310 nm đồng phân enol của BZA (0,41 Abs) và 250 nm đồng phân keton của BZA (0,78 Abs). Kết hợp với các tham khảo các nghiên cứu trước đây <sup>[69]</sup>, độ hấp thụ của mẫu dung dịch Alg- F127- FA mang BZA được đo ở hai bước sóng 310 nm và 250 nm.

Bảng 3.3 Độ hấp thu của các dung dịch APF mang BZA

<b>Nồng độ chất mang C (ppm)</b>	<b>Log C</b>	<b>A310</b>	<b>A250</b>	<b>A310/A250</b>
1	0.00	0.35	0.716	0.488826816
10	1.00	0.344	0.703	0.489331437
25	1.40	0.363	0.74	0.490540541
50	1.70	0.371	0.746	0.497319035
100	2.00	0.354	0.712	0.497191011
150	2.18	0.36	0.723	0.497925311
200	2.30	0.366	0.728	0.502747253
250	2.40	0.376	0.744	0.505376344
300	2.48	0.379	0.756	0.501322751
350	2.54	0.385	0.76	0.506578947
400	2.60	0.372	0.733	0.507503411
450	2.65	0.36	0.71	0.507042254
500	2.70	0.382	0.747	0.511378849
550	2.74	0.388	0.754	0.514588859
600	2.78	0.38	0.736	0.516304348
650	2.81	0.378	0.73	0.517808219
700	2.85	0.382	0.739	0.51691475
750	2.88	0.374	0.718	0.520891365
800	2.90	0.395	0.75	0.526666667
900	2.95	0.406	0.771	0.526588846
950	2.98	0.392	0.733	0.53478854



Hình 3.12 Đồ thị biểu diễn tương quan giữa logarit nồng độ và mật độ quang.

Kết quả là khi nồng độ APF < 251 ppm ( $\log C = 2,4$ ), độ hấp thu thay đổi không đáng kể khi tăng nồng độ chất điện hoạt. Khi tăng nồng độ từ 251 – 316 ppm ( $\log C: 2,4 - 2,5$ ) mật độ quang tăng mạnh. Chứng tỏ một lượng lớn BZA đã được nạp vào micell (vùng kỵ nước) hay nói cách khác micell của dung dịch APF đã được hình thành. Nồng độ để tạo được hạt nanogel của dung dịch APF được tính dựa trên đồ thị là  $339,766 \pm 1,104$  ppm.

### 3.2.1.2. Kết quả khảo sát sự hình thành hạt nanogel

Nồng độ dung dịch Alg – F127 – FA sử dụng trong công thức bào chế nanogel mang MTX phải có nồng độ > 339 ppm. Bởi vì, nồng độ  $339,766 \pm 1,104$  là nồng độ tối thiểu để có sự xuất hiện của hạt micelle. Nên cần khảo sát DLS về nồng độ để

xác định được nồng độ tạo hạt nanogel của hệ Alg – F127 – FA. Kết quả khảo sát DLS về nồng độ xác định được hạt nanogel được trình bày ở Bảng 3.4, có thể thấy để các hạt nanogel hoàn toàn hình thành, nồng độ 10000 ppm nên được sử dụng. Nồng độ dung dịch càng cao thì khả năng tạo hạt của vật liệu càng cao, hạt càng nhỏ, độ ổn định của hạt càng lớn. Do vậy nồng độ dung dịch Alg – F127 – FA được sử dụng để thiết kế công thức nanogel mang thuốc MTX là 10000 – 30000.

Bảng 3.4 Bảng kết quả thực nghiệm

STT	Alg - F127 - FA (ppm)	Kích thước (nm)
1	400	Không xác định
2	500	Không xác định
3	500	Không xác định
4	750	Không xác định
5	750	Không xác định
6	750	Không xác định
7	1000	Không xác định
8	1500	Không xác định
9	1500	Không xác định
10	5750	1291,7
11	5750	1319,0
12	8000	1047,7
13	10000	59,4

### **3.2.2. Kết quả khảo sát tác động nhiệt độ lên hạt nanogel**

Dựa trên kết quả thiết kế công thức nanogel Alg – F127 – FA mang thuốc MTX tiến hành khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ lên kích thước hạt khi điều chế nanogel từ dung dịch Alg – F127 – FA tại mức nồng độ 20000 ppm.

Kết quả của khảo sát kích thước hạt nanogel của Alg-F127-FA được tính bằng cách lấy kết quả trung bình giữa 2 lần đo cho mỗi nhiệt độ là 25°C và 37°C, kết quả lần lượt là 42,25 nm và 33,8 nm.

**Measurement Results**

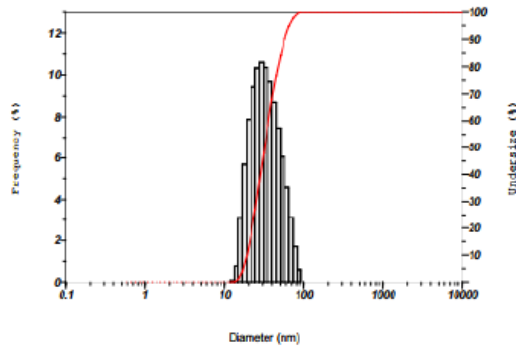
Date : Friday, June 17, 2022 13:12:17 PM  
 Measurement Type : Particle Size  
 Sample Name : acp fa 37C  
 Scattering Angle : 90  
 Temperature of the Holder : 24.8 °C  
 Dispersion Medium Viscosity : 0.898 mPa·s  
 Transmission Intensity before Meas. : 31953  
 Distribution Form : Standard  
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse  
 Representation of Result : Scattering Light Intensity  
 Count Rate : 2022 kCPS

**Calculation Results**

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	35.1 nm	15.0 nm	23.2 nm
2	---	---	---	---
3	---	---	---	---
Total	1.00	35.1 nm	15.0 nm	23.2 nm

**Cumulant Operations**

Z-Average : 39.6 nm  
 PI : 0.505



**Measurement Results**

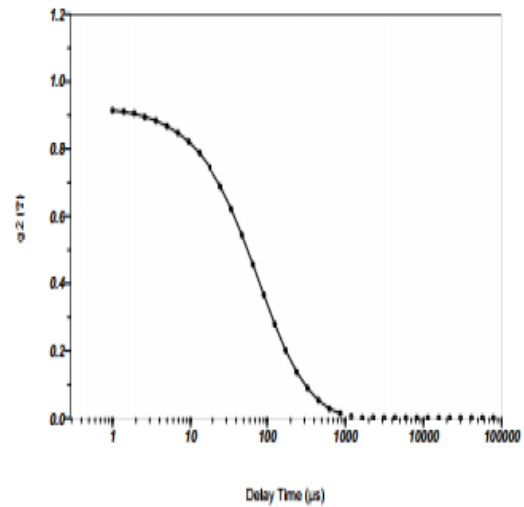
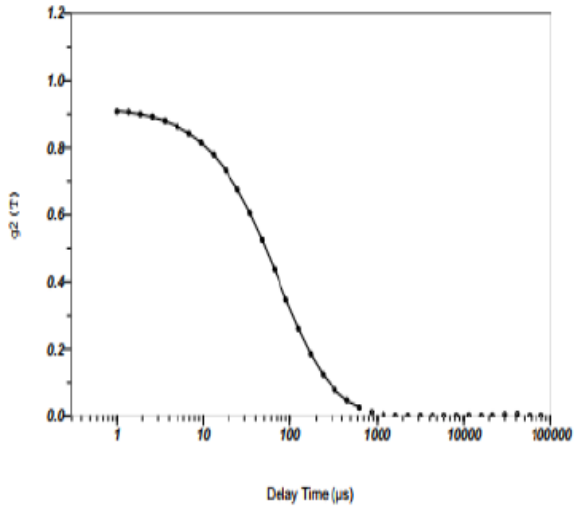
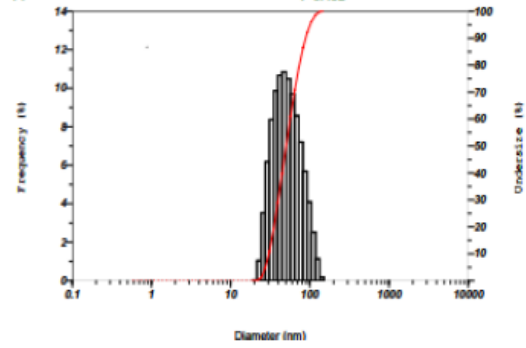
Date : Friday, June 17, 2022 13:15:06 PM  
 Measurement Type : Particle Size  
 Sample Name : acp fa 37C  
 Scattering Angle : 90  
 Temperature of the Holder : 24.9 °C  
 Dispersion Medium Viscosity : 0.897 mPa·s  
 Transmission Intensity before Meas. : 31963  
 Distribution Form : Standard  
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse  
 Representation of Result : Scattering Light Intensity  
 Count Rate : 1969 kCPS

**Calculation Results**

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	55.5 nm	22.9 nm	47.5 nm
2	---	---	---	---
3	---	---	---	---
Total	1.00	55.5 nm	22.9 nm	47.5 nm

**Cumulant Operations**

Z-Average : 44.9 nm  
 PI : 0.452



Hình 3.13 Kết quả kích thước hạt nanogel ở 25°C

**Measurement Results**

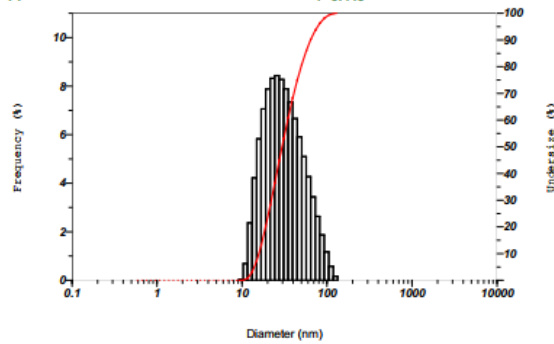
Date : Friday, June 17, 2022 13:29:02 PM  
 Measurement Type : Particle Size  
 Sample Name : acp fa 37C  
 Scattering Angle : 90  
 Temperature of the Holder : 37.0 °C  
 Dispersion Medium Viscosity : 0.694 mPa·s  
 Transmission Intensity before Meas. : 31389  
 Distribution Form : Standard  
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse  
 Representation of Result : Scattering Light Intensity  
 Count Rate : 2302 kCPS

**Calculation Results**

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	35.5 nm	20.2 nm	25.8 nm
2	---	---	---	---
3	---	---	---	---
Total	1.00	35.5 nm	20.2 nm	25.8 nm

**Cumulant Operations**

Z-Average : 33.4 nm  
 PI : 0.449



**Measurement Results**

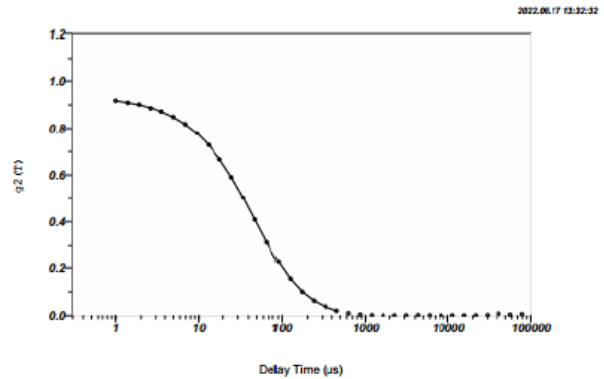
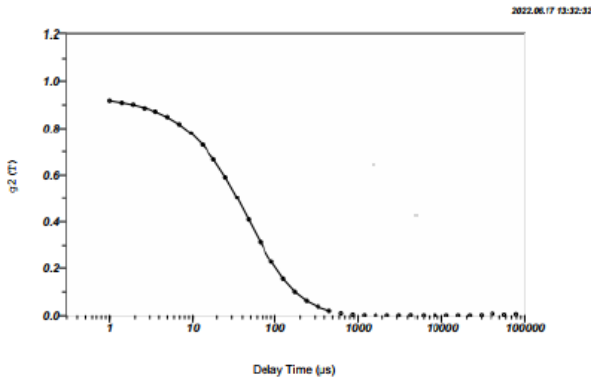
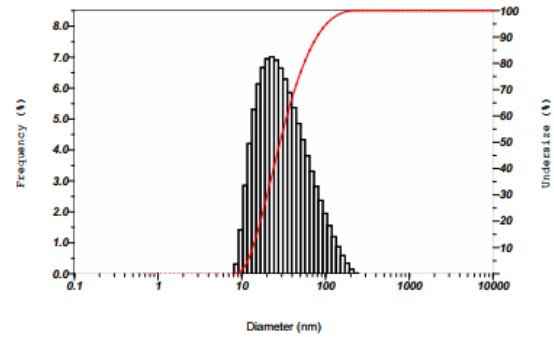
Date : Friday, June 17, 2022 13:31:33 PM  
 Measurement Type : Particle Size  
 Sample Name : acp fa 37C  
 Scattering Angle : 90  
 Temperature of the Holder : 37.0 °C  
 Dispersion Medium Viscosity : 0.692 mPa·s  
 Transmission Intensity before Meas. : 31389  
 Distribution Form : Standard  
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse  
 Representation of Result : Scattering Light Intensity  
 Count Rate : 2392 kCPS

**Calculation Results**

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	38.9 nm	30.4 nm	22.8 nm
2	---	---	---	---
3	---	---	---	---
Total	1.00	38.9 nm	30.4 nm	22.8 nm

**Cumulant Operations**

Z-Average : 34.2 nm  
 PI : 0.464



Hình 3.14 Kết quả kích thước hạt nanogel ở 37°C

Như vậy, thông qua kết quả khảo sát kích thước hạt của Alg-F127-FA ở 25°C và 37°C bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động (Dynamic Light Scattering– DLS) trên thiết bị phân tích kích thước Horiba SZ100 cho thấy nhiệt độ có ảnh hưởng đến sự thay đổi kích thước hạt nanogel của Alg-F127-FA. Khi ở nhiệt độ 37°C kích thước hạt nhỏ hơn ở nhiệt độ 25°C do ở nhiệt độ 37°C. Nguyên nhân do nhóm PEO ưa



nước còn PPO thì kỵ nước nên khi nâng nhiệt độ lên nó tạo thành dạng micelle với nhân là PPO và lớp vỏ ngoài là PEO. Việc tăng nhiệt độ sẽ dẫn đến sự cắt đứt các liên kết trên mạch PPO và xảy ra quá trình loại nước tại vùng chứa các nhóm kỵ nước, kết quả là các nhóm PPO có xu hướng mất nước tạo thành lõi với vỏ bên ngoài là chuỗi PEO ngậm nước hợp thành hình cầu micelle bền nhiệt động polymer và gel được hình thành

### **3.3.KẾT QUẢ QUÁ TRÌNH NANG HÓA METHOTREXATE VÀO HỆ ALGINATE – PLURONIC F127 – FOLIC ACID**

#### **3.3.1. Kết quả thiết kế công thức nang hóa Methotrexate vào hệ nano Alginate – Pluronic F127 – Folic acid và hiệu suất nanogel hóa**

Phương pháp RSM – CCD được thiết kế bằng phần mềm Design – Expert phiên bản 13.0.5.0 gồm 13 công thức. Sự tương tác của hai biến độc lập bao gồm: hàm lượng MTX và nồng độ dung dịch Alg – F127 – FA ảnh hưởng tới kích thước nanogel và hiệu suất nanogel hóa được trình bày trong Bảng 3.5.

Bảng 3.5 Ma trận kế hoạch thực nghiệm và kết quả thực nghiệm

STT	MTX (mg)	Alg - F127 - FA (ppm)	Kích thước (nm)	Hiệu suất nanogel hóa (%)
1	3	20000	39,70	91,73
2	4	25000	38,10	97,92
3	1	20000	40,00	98,43
4	4	15000	39,60	87,38
5	3	20000	43,40	97,12
6	3	10000	40,60	73,86
7	5	20000	41,10	97,73
8	3	30000	41,10	92,71
9	3	20000	42,80	96,16
10	2	25000	40,60	95,29
11	3	20000	41,60	96,02
12	3	20000	42,80	96,40
13	2	15000	40,80	96,24

Mô hình toán học mô tả mối quan hệ giữa kích thước nanogel (1) và hiệu suất nanogel hóa (2) với các biến mã hóa như sau:

$$Y_1 = 40,97 \quad (1)$$

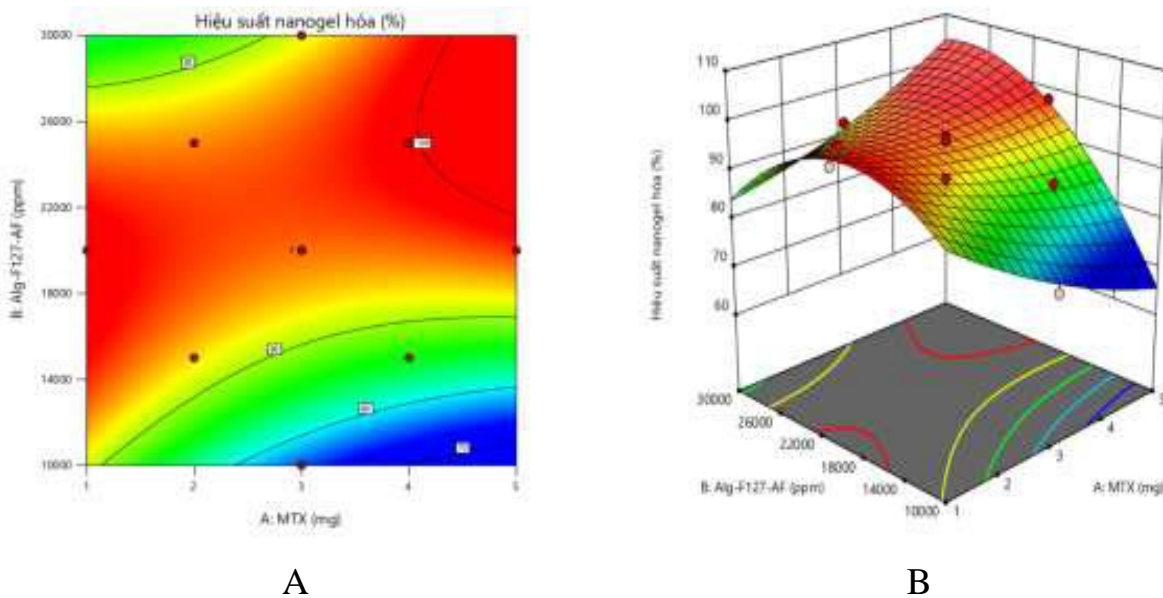
$$Y_2 = 95,80 - 0,6358X_1 + 3,94X_2 + 2,87X_1X_2 + 0,6679X_1^2 - 3,03X_2^2 \quad (2)$$

Phương trình hồi quy (1) cho thấy, kích thước hạt không chịu sự ảnh hưởng của bậc 1 và 2 của yếu tố  $X_1$  và  $X_2$  cũng như là sự tương tác giữa chúng.

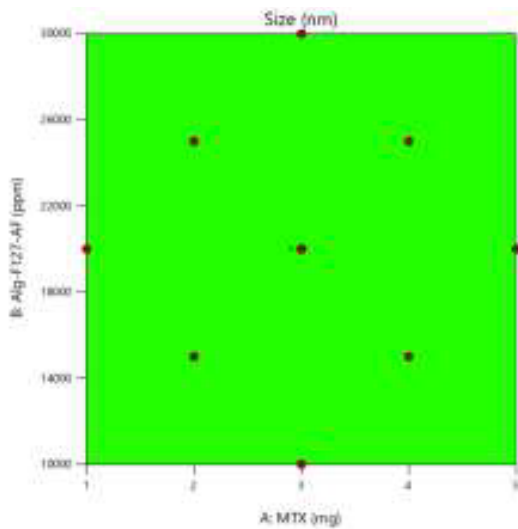
Đối với hiệu suất nanogel hóa theo phương trình hồi quy (2) cho thấy, hiệu suất nanogel hóa chịu sự ảnh hưởng bậc 1 và bậc 2 của yếu tố nồng độ Alg – F127 – FA ( $X_2$ ) với hệ số lần lượt 3,94 và - 3,03. Đồng thời hiệu suất nanogel hóa cũng chịu sự ảnh hưởng bậc 1 và 2 của yếu tố hàm lượng MTX ( $X_1$ ) với hệ số lần lượt là

- 0,6358 và 0,6679. Hai yếu tố  $X_1X_2$  tương tác với nhau và ảnh hưởng đến hàm mục tiêu với hệ số 2,87.

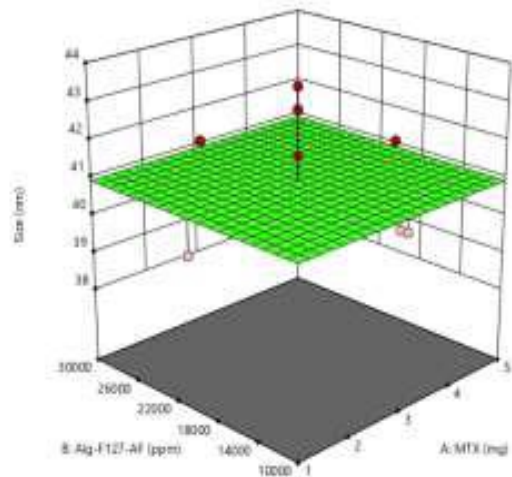
Kết quả đáp ứng bề mặt được thể hiện ở Hình 3.14, khi tăng nồng độ dung dịch Alg – F127 – FA và hàm lượng MTX thì hiệu suất nanogel hóa thể hiện xu hướng tăng trong vùng khảo sát. Hiệu suất nanogel hóa cao khi dung dịch Alg – F127 – FA có nồng độ từ 20000 – 30000 ppm và hàm lượng MTX từ 3,5 – 5 mg. Từ kết quả Hình 3.15 cho thấy, kích thước nanogel không thay đổi khi các yếu tố thay đổi trong vùng khảo sát.



Hình 3.15 Đồ thị bề mặt đáp ứng biểu diễn sự phụ thuộc của hiệu suất nanogel hóa vào nồng độ Alg – F127 – FA và hàm lượng MTX – (A) đường đồng mức và (B) ba chiều



A



B

Hình 3.16 Đồ thị bề mặt đáp ứng biểu diễn sự phụ thuộc của kích thước nanogel vào nồng độ Alg – F127 – FA và hàm lượng MTX – (A) đường đồng mức và (B) ba chiều

Từ các kết quả phân tích cho thấy giá trị tối ưu để bào chế nanogel sử dụng ít vật liệu mang thuốc và tải lượng thuốc lớn nhất bằng phương pháp đáp ứng bề mặt. Các điều kiện bào chế được chọn là: nồng độ dung dịch Alg – F127 – FA là 20000 ppm nang hóa với khối lượng thuốc MTX là 4 mg.

*Đánh giá hiệu quả điều kiện được chọn*

Để kiểm tra kết quả của mô hình tiến hành thực hiện lại quy trình nang hóa Methotrexate vào hệ nano Alginate – Pluronic F127 – Acid folic với điều kiện được chọn đã được lựa chọn. Thí nghiệm được thực hiện 3 lần và kết quả được trình bày ở Bảng 3.6.

Bảng 3.6 Kết quả khảo sát nồng độ dung dịch Alg – F127 – FA mang MTX

STT	MTX (mg)	Alg – F127 – FA (ppm)	Kích thước (nm)	Hiệu suất nanogel hóa (%)
1	4	20000	40,00	96,52
2	4	20000	40,30	96,52
3	4	20000	41,10	95,70
Trung bình			40,47 ± 0,33	96,25 ± 0,27

Sai số kích thước nanogel giữa kết quả sử dụng phần mềm và thực nghiệm

$$\% \Delta = \frac{|K_{q_{tn}} - K_{q_{tt}}|}{K_{q_{tt}}} = \frac{|40,47 - 40,94|}{40,94} \times 100\% = 1,15\%$$

Sai số hiệu suất nanogel hóa giữa kết quả sử dụng phần mềm và thực nghiệm

$$\% \Delta = \frac{|K_{q_{tn}} - K_{q_{tt}}|}{K_{q_{tt}}} = \frac{|96,25 - 95,83|}{95,83} \times 100\% = 0,44\%$$

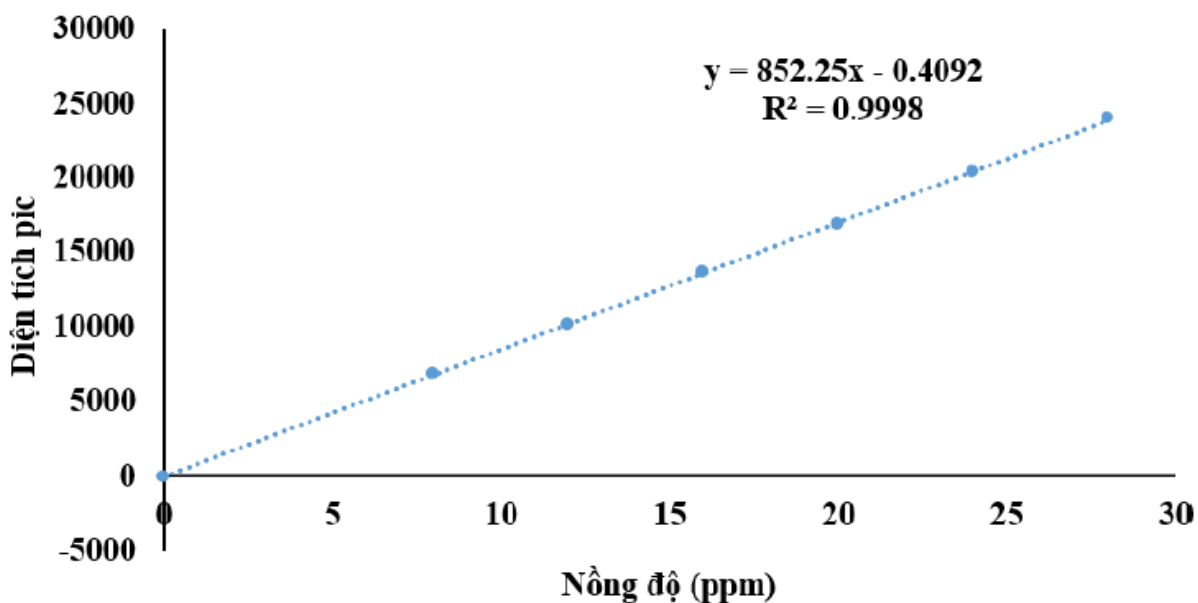
Kích thước của MTX/Alg – F127 – FA dao động từ 40 – 41,10 nm sử dụng bằng phương pháp đo kích thước động DLS. Độ sai số khoảng 1,15% so sánh với giá trị ước đoán từ phần mềm thực nghiệm. Bên cạnh đó, hiệu suất MTX được tải trong hệ dao động từ 95,70 – 96,52%, đạt trên 99% độ tương quan với giá trị tối ưu xác định từ phương trình hồi quy. Kết quả cho thấy mô hình tối ưu có độ lặp lại tốt.

### 3.3.2. Kết quả đánh giá hàm lượng Methotrexate giải phóng từ hệ nano Alg-F127-FA

Thuốc MTX được pha với 7 nồng độ khác nhau từ 0 – 28 (ppm), sau đó đo HPLC ghi lại tín hiệu pic và tiến hành lập đường hồi quy tuyến tính. Kết quả khảo sát sự tương quan giữa diện tích pic và nồng độ MTX được trình bày trong Bảng 3.7 và Hình 3.17.

Bảng 3.7 Tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của MTX

STT	Nồng độ (ppm)	Spic (mAU.s)
1	0	0
2	8	6896,221
3	12	10177,917
4	16	13712,562
5	20	16867,783
6	24	20375,803
7	28	24010,297



Hình 3.17 Sơ đồ đường chuẩn MTX

Dựa vào phương trình đường chuẩn để tính lượng MTX được tải vào trong cấu trúc Alg – F127 – FA và lượng thuốc MTX đã được phóng thích ra ngoài màng.

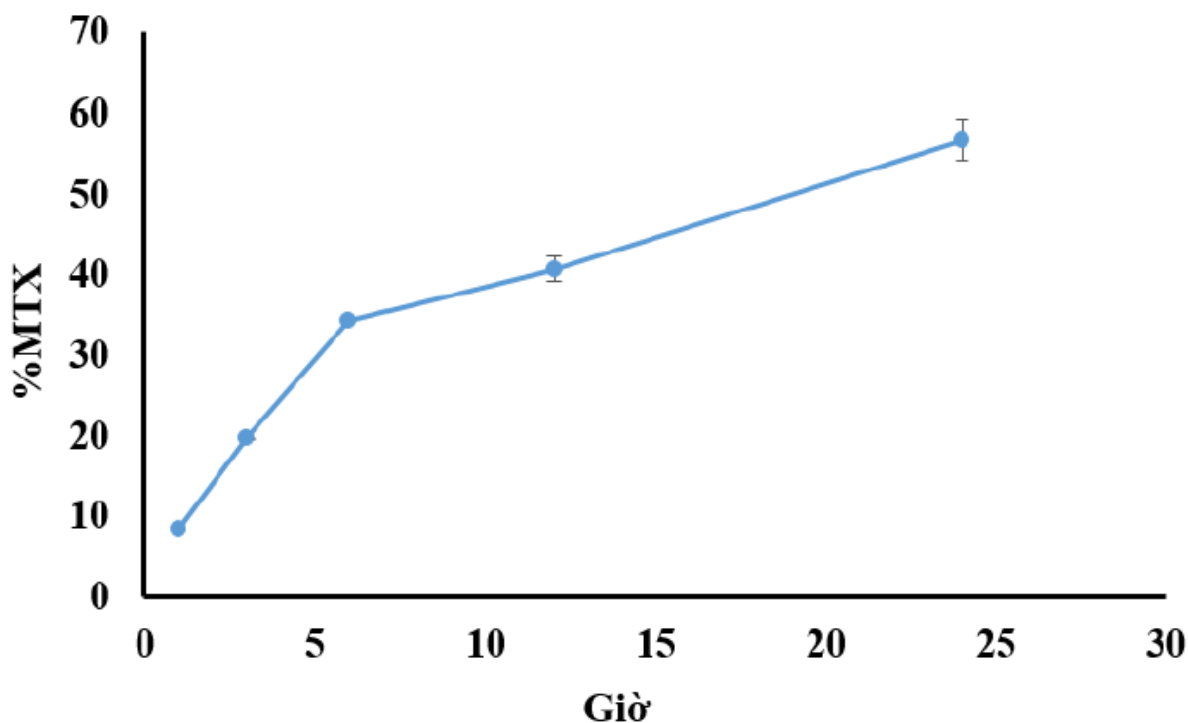
Kết quả định lượng MTX có trong hệ được thể hiện ở Bảng 3.8 và kết quả nhả thuốc trong 24 giờ được thể hiện ở Bảng 3.9 và Hình 3.18 như sau:

Bảng 3.8 Số liệu MTX được tải vào trong cấu trúc Alg – F127 – FA của công thức lựa chọn

<b>Tổng thuốc mang được</b>	<b>Tỷ lệ thuốc / chất mang</b>	<b>Hiệu suất nanogel hóa (%)</b>
3,38 mg	0,021	84,52

Bảng 3.9 Số liệu quá trình phóng thích thuốc MTX

<b>Giờ</b>	<b>MTX (mg)</b>	<b>% MTX</b>
1	0,0177	8,420 ± 0,040
3	0,0413	19,645 ± 0,015
6	0,0722	34,375 ± 0,095
12	0,0857	40,800 ± 1,580
24	0,1194	56,830 ± 2,560



Hình 3.18 Sơ đồ giải phóng thuốc MTX

Bảng 3.9 và Hình 3.18 cho thấy tốc độ giải phóng MTX từ hệ nano Alg – F127 – FA tăng dần theo thời gian. Ở thời điểm 1 giờ, 8,420% MTX được giải phóng ra môi trường và tăng theo tuyến tính trong thời gian 6 giờ tiếp theo. Từ 6 – 12 giờ, hàm lượng MTX giải phóng khoảng 34,375 – 40,800%, cho thấy sự ổn định. Tại thời điểm 24 giờ khảo sát, 56,830% hoạt chất đã được giải phóng hoàn toàn. So sánh với một số hệ chất mang có tính chất gần tương tự Alg – F127 – FA, cho thấy tính tương đồng trong việc giải phóng thuốc. Ví dụ, Jinlong Zhao và cộng sự (2017) <sup>[36]</sup> công bố MTX giải phóng từ hệ polyethylene glycol (PEG)–poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) khoảng 14% ở giờ đầu và 35% trong 6 giờ tiếp theo, đạt 64% trong vòng 24 giờ. Mukesh Dhaka và cộng sự (2021) <sup>[41]</sup> lượng thuốc MTX được giải phóng mạnh tuyến tính với thời gian và đạt 40%, sau đó chậm dần với 45,5% MTX được giải phóng khỏi hệ alginate – methylcellulose trong 24 giờ. Hệ poly (hydroxyethyl methacrylate) mang MTX nghiên cứu của nhóm Javad Farzanfar



(2021) [70] 30% MTX được giải phóng tuyến tính khỏi hệ sau 10 giờ, và đạt 40% sau 24 giờ. Như vậy có thể thấy, quá trình giải phóng ban đầu của MTX từ các hệ nanogel đều, có thể do nguyên nhân MTX ở bề mặt ngoài sẽ giải phóng đầu tiên. Các thời điểm sau là do sự hấp thụ dịch từ môi trường khiến cho hạt nanogel bị trương lên, khiến cho các liên kết trong mạng lưới của hạt bắt đầu bị gãy và thuốc được giải phóng ra bên ngoài. Sự duy trì ổn định được hàm lượng thuốc giải phóng hoàn toàn phụ thuộc vào cấu trúc của vật liệu tạo chất mang. Dược động học của MTX là 2 – 10 giờ. Như vậy có thể thấy, việc phóng thích MTX theo thời gian sẽ góp phần tăng thời gian MTX được lưu trữ trong hệ thống tuần hoàn, tăng cường hiệu quả của thuốc trong điều trị bệnh.

### **3.4.KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG KHÁNG VIÊM CỦA HỆ**

#### **3.4.1. Kết quả khảo sát IC<sub>50</sub>**

##### **3.4.1.1. Dòng tế bào RAW264.7**

Giá trị IC<sub>50</sub> (Half-maximal inhibitory concentration) là giá trị nồng độ hoạt chất ức chế 50% sự phát triển của tế bào, được trình bày ở Bảng 3.10, IC<sub>50</sub> xác định đối với MTX tự do khi ủ 48 giờ là 104,00 µg/ml, trong khi đó, giá trị IC<sub>50</sub> của hệ MTX/FA-Alg-Plu không xác định được. Tại thời điểm 72 giờ, 43,03 µg/ml là nồng độ cần thiết để MTX tự do ức chế 50% tế bào RAW264.7, trong khi MTX/FA-Alg-Plu cần tới 128,10 µg/ml. Kết quả này cho thấy dạng bào chế nano MTX/FA-Alg-Plu giúp giảm độc tính của MTX đối với dòng tế bào RAW264.7.

Bảng 3.10 Giá trị IC<sub>50</sub> của MTX tự do và hệ MTX/FA-Alg-Plu sau 48 và 72 giờ trên dòng tế bào RAW264.7

Thời gian ủ (giờ)	IC <sub>50</sub> của MTX tự do (µg/ml)	IC <sub>50</sub> của MTX/FA-Alg-Plu (µg/ml)
48	104,00	Không xác định
72	43,03	128,10

#### 3.4.1.2. Dòng tế bào MSC

Giá trị IC<sub>50</sub> của dòng tế bào MSC đối với MTX đơn và MTX/ MTX/FA-Alg-Plu được thể hiện ở Bảng 3.11. tại thời điểm 48 giờ, giá trị IC<sub>50</sub> của MTX là 101,30 µg/ml , giá trị IC<sub>50</sub> của hệ MTX/ MTX/FA-Alg-Plu cho kết quả 352,70. Đặc biệt, kéo dài thời gian ủ lên đến 72 giờ, giá trị IC<sub>50</sub> của MTX là 23,56 µg/ml, tuy nhiên IC<sub>50</sub> của MTX/FA-Alg-Plu cao hơn (56,54 µg/ml).

Bảng 3.11 Giá trị IC<sub>50</sub> của MTX tự do và hệ MTX/FA-Alg-Plu sau 48 và 72 giờ trên dòng tế bào MSC

Thời gian ủ (giờ)	IC <sub>50</sub> của MTX tự do (µg/ml)	IC <sub>50</sub> của MTX/FA-Alg-Plu (µg/ml)
48	101,30	352,70
72	23,56	56,54

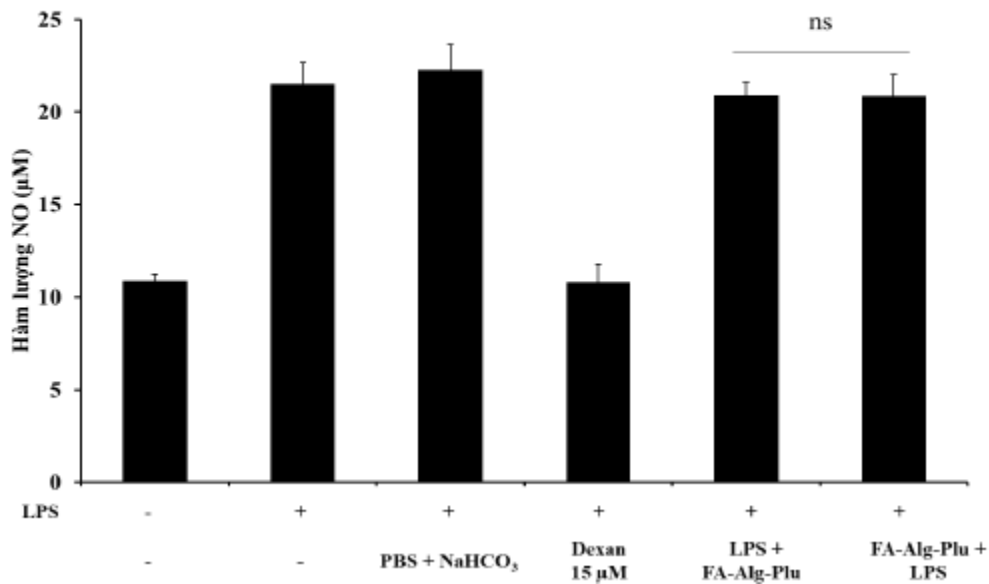
#### 3.4.2. Kết quả đánh giá khả năng kháng viêm của hệ MTX/Alg-F127-FA

Tác dụng kháng viêm của các nhóm thử nghiệm được đánh giá qua khả năng ức chế sản xuất NO của RAW264.7 do kích thích LPS.

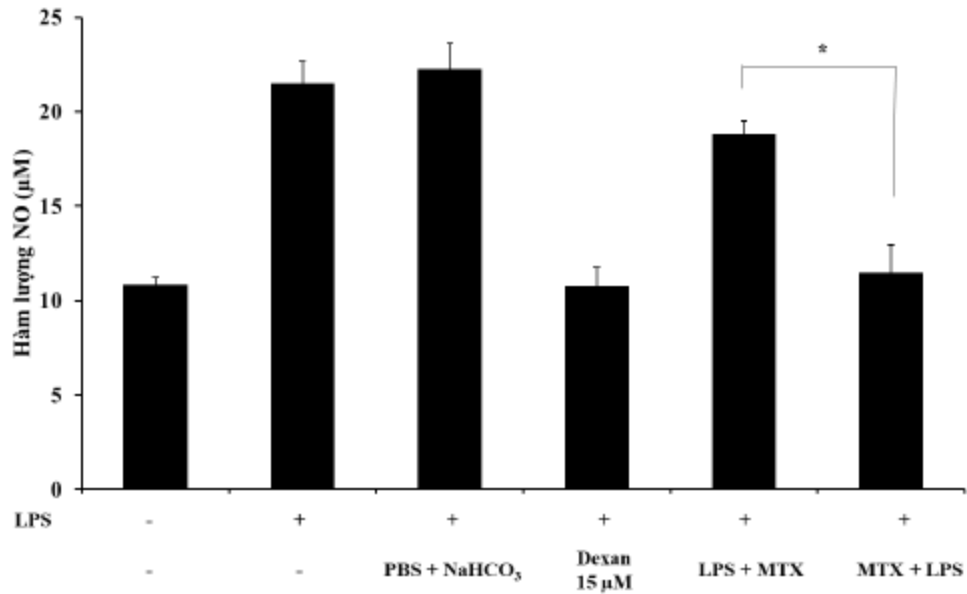
Sau khi đánh giá độc tính của các nhóm thử nghiệm trên dòng tế bào RAW264.7, nồng độ của các chất thử nghiệm mà tại đó khả năng sống của tế bào

không bị ảnh hưởng là MTX 15  $\mu\text{g/ml}$ , MTX/FA-Alg-Plu 15  $\mu\text{g/ml}$ , FA-Alg-Plu 100000  $\mu\text{g/ml}$  được chọn để tiếp tục khảo sát khả năng kháng viêm. Để khảo sát ảnh hưởng của các chất thử nghiệm đối với việc giải phóng NO trong quá trình viêm do kích thích với LPS, các tế bào được ủ với chất thử nghiệm, sau đó 1 giờ kích thích với LPS (trường hợp 1); hoặc kích thích LPS trước, sau đó 1 giờ ủ với chất thử nghiệm (trường hợp 2). Hình 3.19 thể hiện kết quả khảo sát, hàm lượng NO ở nhóm chỉ kích thích với LPS cao hơn so với nhóm đối chứng không kích thích với LPS. Đối với nhóm chứng âm PBS + NaHCO<sub>3</sub> (dung môi pha mẫu) không có sự khác biệt đáng kể so với nhóm chỉ kích thích với LPS. Đối với nhóm chứng dương dexam (thuốc kháng viêm), cho thấy tác động giảm sản xuất NO của đại thực bào RAW264.7 có sự khác biệt có ý nghĩa so với nhóm chỉ kích thích với LPS. Tại nồng độ 100000  $\mu\text{g/ml}$  FA-Alg-Plu trong cả hai trường hợp, kết quả cho thấy hàm lượng NO không có sự khác biệt đáng kể so với nhóm chỉ kích thích với LPS (Hình 3.19A). Điều này, chứng tỏ chất mang FA-Alg-Plu không có khả năng kháng viêm.

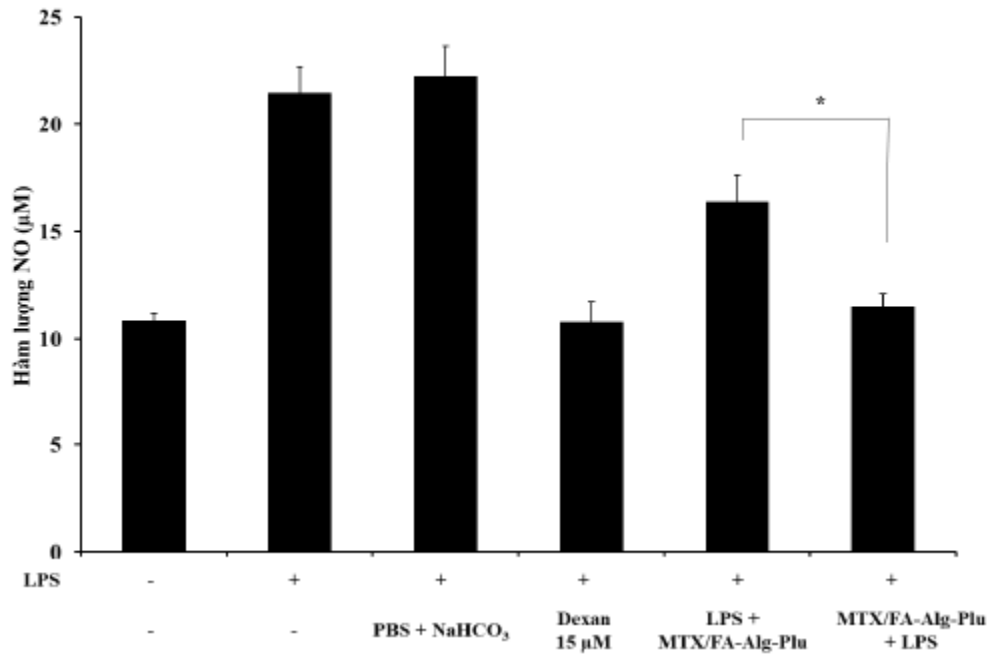
A.



B.



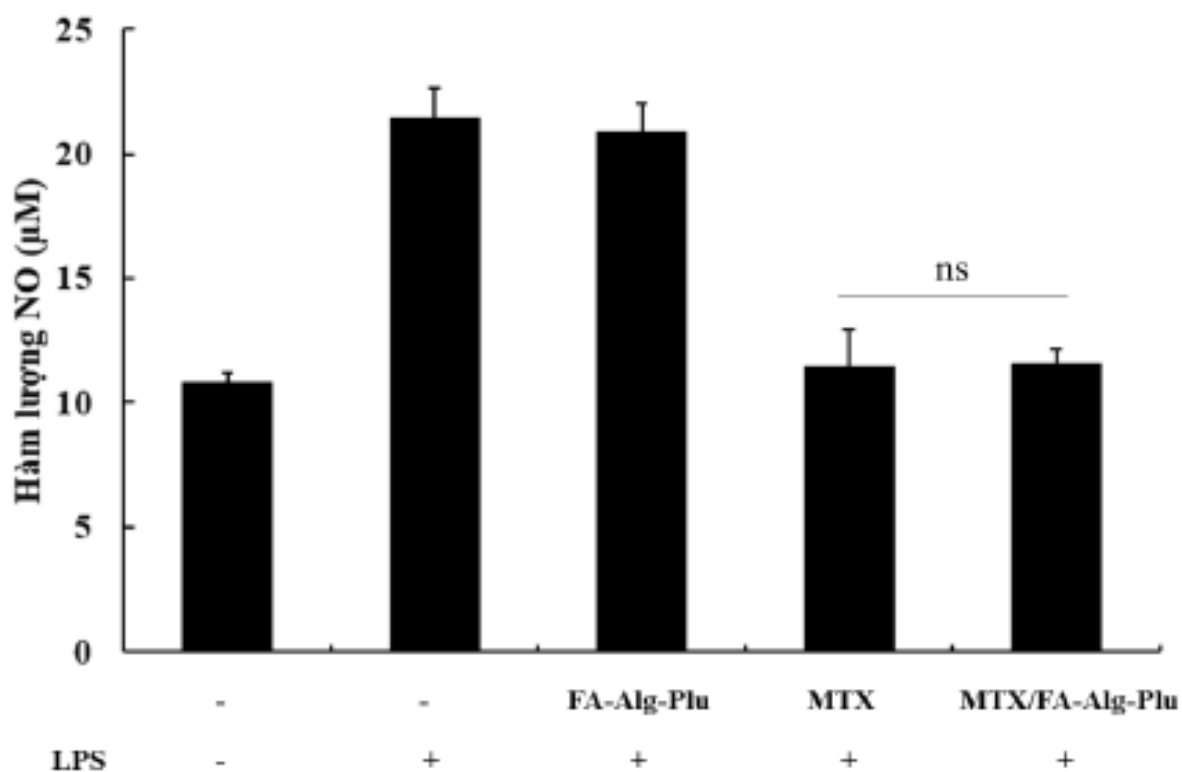
C.



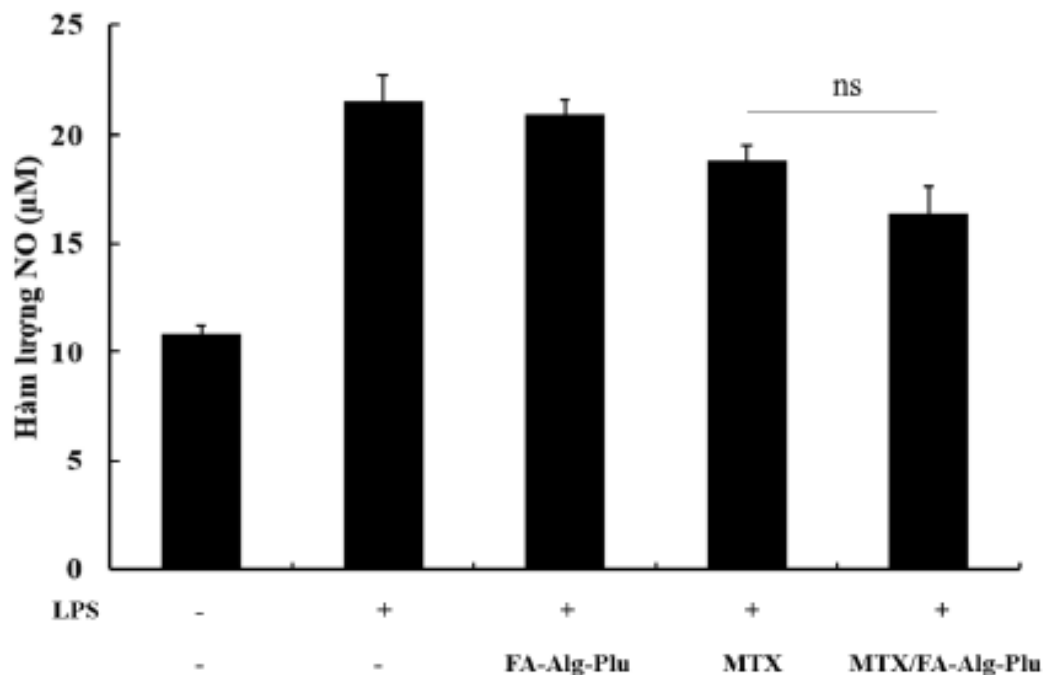
Hình 3.19 Ảnh hưởng của FA-Alg-Plu (A), MTX (B) và MTX/FA-Alg-Plu (C) lên sự sản xuất NO của dòng đại thực bào RAW264.7. Dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (n = 3). \* p < 0,05.

Mặt khác, trong cả hai trường hợp, hàm lượng NO trong môi trường nuôi cấy ử với MTX/FA-Alg-Plu thấp hơn so với MTX nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (Hình 3.20). Đối với trường hợp kích thích RAW264.7 với LPS trước khi ử MTX hay MTX/FA-Alg-Plu, nồng độ NO giảm ở cả hai nhóm khi so sánh với tế bào chỉ được kích thích với LPS, nhưng cao hơn so với mẫu chứng không xử lý (Hình 3.20B). Đối với trường hợp ử MTX hay MTX/FA-Alg-Plu trước 1 giờ, sau đó xử lý với LPS, kết quả cho thấy hàm lượng NO giảm một cách đáng kể.

A.



**B.**



Hình 3.20 Ảnh hưởng của FA-Alg-Plu, MTX và MTX/ FA-Alg-Plu lên sự sản xuất NO của dòng đại thực bào RAW264.7. (A) Tế bào được ủ với chất thử nghiệm trước, sau đó 1 giờ kích thích LPS. (B) Tế bào được kích thích với LPS trước, sau đó 1 giờ ủ với chất thử nghiệm. Dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn ( $n = 3$ ), ns: no significant difference (không có sự khác biệt đáng kể).

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đạt được trong luận văn cho thấy chúng tôi đã thành công trong việc điều chế hệ tiểu phân nano trên cơ sở nanogel nhạy cảm nhiệt từ Alginate và Pluronic F127 có gắn tác nhân hướng đích acid folic, Các kết quả nghiên cứu khảo sát chọn được tỉ lệ EDC/NHS/cys = 1: 1: 0,5 theo số mol, tỉ lệ Alginate : Pluronic F127 (1:10) giúp đạt được hiệu quả tốt nhất và kinh tế nhất. Các cấu trúc được chứng minh bằng phổ  $^1\text{H-NMR}$ , phổ hồng ngoại FT-IR và quang phổ tử ngoại khả kiến UV-Vis. Hệ nanogel nhạy nhiệt trên nền vật liệu Alg – F127 – FA mang hiệu quả thuốc MTX.

Kết quả xác định nồng độ tạo hạt micelle (CMC) của hệ vật liệu là  $339,766 \pm 1,104$  ppm. Khi khảo sát tác động nhiệt lên hệ vật liệu thì ở  $37^\circ\text{C}$  kích thước hạt của vật liệu là 33,8 nm nhỏ hơn so với khi ở  $25^\circ\text{C}$  là 42,25 nm. Hệ nanogel Alg – F127 – FA (20000 ppm) mang thuốc Methotrexate (4 mg) có kích thước tiểu phân nhỏ 40,47 nm, hiệu suất nanogel hóa cao 96,25% và giải phóng 56,83% MTX sau 24 giờ trong môi trường pH = 7,4.

Chất mang FA-Alg-Plu không ảnh hưởng đến khả năng sống của hai dòng tế bào RAW264.7 và MSC. Hệ MTX/FA-Alg-Plu có khả năng gây độc tế bào thấp hơn so với MTX ở cùng nồng độ, có thể do khả năng giải phóng có kiểm soát của hệ MTX/FA-Alg-Plu. Kết quả cũng cho thấy MTX và MTX/FA-Alg-Plu có khả năng kháng viêm trên dòng đại thực bào RAW264.7 và cho hiệu quả trong ức chế sản xuất NO.

### KIẾN NGHỊ

- ❖ Về mặt vật liệu:

Cần thực hiện thêm các bước như đo GPC để xác định khối lượng phân tử, từ đó xác định được hiệu suất tổng hợp. Hình thái học của hạt nanogel cần được xác định thêm bằng phương pháp TEM. Độ ổn định nanogel theo thời gian cần được xác định.

Phương pháp đánh giá hàm lượng MTX giải phóng từ hệ alginate – pluronic F127 – acid folic cần có thêm các mốc thời gian khảo sát phóng thích thuốc sau 24 giờ như 36 giờ, 48 giờ và 72 giờ để xác định được thời điểm thuốc được phóng thích hoàn ra khỏi hệ nano.

❖ Về thử nghiệm lâm sàng:

Do thời gian thực hiện đề tài có hạn nên chưa thực hiện được nhiều thử nghiệm lâm sàng hơn. Cần khảo sát thêm khả năng chống ung thư của hệ nanogel mang Methotrexate. Thử nghiệm khả năng kháng viêm thông qua khả năng ức chế cytokine TNF- $\alpha$ , IL-6. Tiếp tục thực hiện thử nghiệm độc tính, hiệu quả kháng viêm của hệ MTX/FA-Alg-Plu trên động vật.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Qin, Y., Gel swelling properties of alginate fibers. *Journal of applied polymer science* **2004**, *91* (3), 1641-1645.
2. Manjanna, K.; Kumar, T. P.; Shivakumar, B., Calcium alginate cross-linked polymeric microbeads for oral sustained drug delivery in arthritis. *Drug discoveries & therapeutics* **2010**, *4* (2), 109-122.
3. Dang, L. H.; Vu, M. T.; Chen, J.; Nguyen, C. K.; Bach, L. G.; Tran, N. Q.; Le, V. T. J. A. O., Effect of ultrasonication on self-assembled nanostructures formed by amphiphilic positive-charged copolymers and negative-charged drug. **2019**, *4* (3), 4540-4552.
4. Nguyen, N. T.; Nguyen, N. N. T.; Tran, N. T. N.; Le, P. N.; Nguyen, T. B. T.; Nguyen, N. H.; Bach, L. G.; Doan, V. N.; Tran, H. L. B.; Le, V. T.; Tran, N. Q., Synergic Activity Against MCF-7 Breast Cancer Cell Growth of Nanocurcumin-Encapsulated and Cisplatin-Complexed Nanogels. *Molecules* **2018**, *23* (12).
5. Pham, L.; Dang, L. H.; Truong, M. D.; Nguyen, T. H.; Le, L.; Le, V. T.; Nam, N. D.; Bach, L. G.; Nguyen, V. T.; Tran, N. Q., A dual synergistic of curcumin and gelatin on thermal-responsive hydrogel based on Chitosan-P123 in wound healing application. *Biomed Pharmacother* **2019**, *117*, 109183.
6. Jain, S.; Tran, T.-H.; Amiji, M. J. B., Macrophage repolarization with targeted alginate nanoparticles containing IL-10 plasmid DNA for the treatment of experimental arthritis. **2015**, *61*, 162-177.
7. Le, P. N.; Huynh, C. K.; Tran, N. Q., Advances in thermosensitive polymer-grafted platforms for biomedical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2018**, *92*, 1016-1030.
8. Mørch, Y. A. J. D. o. B., Novel alginate microcapsules for cell therapy. **2008**.

9. Hasnain, M. S.; Nayak, A. K., Alginate-inorganic composite particles as sustained drug delivery matrices. In *Applications of Nanocomposite materials in drug delivery*, Elsevier: 2018; pp 39-74.
10. Martau, G. A.; Mihai, M.; Vodnar, D. C., The Use of Chitosan, Alginate, and Pectin in the Biomedical and Food Sector-Biocompatibility, Bioadhesiveness, and Biodegradability. *Polymers (Basel)* **2019**, *11* (11).
11. Almeida, H.; Amaral, M. H.; Lobão, P.; Lobo, J. M. S. J. J. o. P.; Sciences, P., Pluronic® F-127 and Pluronic Lecithin Organogel (PLO): Main features and their applications in topical and transdermal administration of drugs. **2012**, *15* (4), 592-605.
12. HB, N.; Bakliwal, S.; Pawar, S. J. I. J. o. P. R., In-situ gel: new trends in controlled and sustained drug delivery system. **2010**, *2* (2), 1398-408.
13. El-Kamel, A. J. I. j. o. p., In vitro and in vivo evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate. **2002**, *241* (1), 47-55.
14. Jeong, B.; Gutowska, A. J. T. i. b., Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications. **2002**, *20* (7), 305-311.
15. Hosseinzadeh, H.; Atyabi, F.; Dinarvand, R.; Ostad, S. N. J. I. j. o. n., Chitosan–Pluronic nanoparticles as oral delivery of anticancer gemcitabine: preparation and in vitro study. **2012**, 1851-1863.
16. Leszczyńska, K.; Namiot, A.; Cruz, K.; Byfield, F.; Won, E.; Mendez, G.; Sokołowski, W.; Savage, P.; Bucki, R.; Janmey, P. J. J. o. a. m., Potential of ceragenin CSA-13 and its mixture with pluronic F-127 as treatment of topical bacterial infections. **2011**, *110* (1), 229-238.
17. Dumortier, G.; Grossiord, J. L.; Agnely, F.; Chaumeil, J. C. J. P. r., A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **2006**, *23*, 2709-2728.

18. Barichello, J. M.; Morishita, M.; Takayama, K.; Nagai, T. *J. I. j. o. p.*, Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. **1999**, *184* (2), 189-198.
19. Müller-Goymann, C. C. J. A. P., Preparation, characterization, and in vitro permeation study of terbinafine HCl in poloxamer 407-based thermogelling formulation for topical application. **2011**, *12*, 496-506.
20. Ruel-Gariepy, E.; Leroux, J.-C. *J. E. J. o. P.*; Biopharmaceutics, In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems. **2004**, *58* (2), 409-426.
21. Ricci, E.; Lunardi, L. O.; Nanclares, D.; Marchetti, J. M. *J. I. j. o. p.*, Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. **2005**, *288* (2), 235-244.
22. Yin, Y.; Hu, B.; Yuan, X.; Cai, L.; Gao, H.; Yang, Q., Nanogel: A Versatile Nano-Delivery System for Biomedical Applications. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (3).
23. Sultana, F.; Manirujjaman, M.; Haque, M. I.-U.; Arafat, M.; Sharmin, S., An Overview of Nanogel Drug Delivery System. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **2013**.
24. Soni, K. S.; Desale, S. S.; Bronich, T. K., Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation. *J Control Release* **2016**, *240*, 109-126.
25. Kozminski, P.; Halik, P. K.; Chesori, R.; Gniazdowska, E., Overview of Dual-Acting Drug Methotrexate in Different Neurological Diseases, Autoimmune Pathologies and Cancers. *Int J Mol Sci* **2020**, *21* (10).
26. <Vietnamese-Methotrexate.pdf>.
27. Marchetti, C.; Palaia, I.; Giorgini, M.; De Medici, C.; Iadarola, R.; Vertechy, L.; Domenici, L.; Di Donato, V.; Tomao, F.; Muzii, L.; Benedetti Panici, P., Targeted drug delivery via folate receptors in recurrent ovarian cancer: a review. *Onco Targets Ther* **2014**, *7*, 1223-36.

28. Gazzali, A. M.; Lobry, M.; Colombeau, L.; Acherar, S.; Azais, H.; Mordon, S.; Arnoux, P.; Baros, F.; Vanderesse, R.; Frochot, C., Stability of folic acid under several parameters. *Eur J Pharm Sci* **2016**, *93*, 419-30.
29. Borradaile, D.; Isenring, E.; Hacker, E.; Kimlin, M. G., Exposure to solar ultraviolet radiation is associated with a decreased folate status in women of childbearing age. *J Photochem Photobiol B* **2014**, *131*, 90-5.
30. Liu, L.; Liu, S.; Wang, C.; Guan, W.; Zhang, Y.; Hu, W.; Zhang, L.; He, Y.; Lu, J.; Li, T.; Liu, X.; Xuan, Y.; Wang, P., Folate Supplementation for Methotrexate Therapy in Patients With Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. *J Clin Rheumatol* **2019**, *25* (5), 197-202.
31. Shea, B.; Swinden, M. V.; Tanjong Ghogomu, E.; Ortiz, Z.; Katchamart, W.; Rader, T.; Bombardier, C.; Wells, G. A.; Tugwell, P., Folic acid and folinic acid for reducing side effects in patients receiving methotrexate for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev* **2013**, *2013* (5), CD000951.
32. Heo, R.; You, D. G.; Um, W.; Choi, K. Y.; Jeon, S.; Park, J.-S.; Choi, Y.; Kwon, S.; Kim, K.; Kwon, I. C., Dextran sulfate nanoparticles as a theranostic nanomedicine for rheumatoid arthritis. *Biomaterials* **2017**, *131*, 15-26 % @ 0142-9612.
33. Alam, M. M.; Han, H. S.; Sung, S.; Kang, J. H.; Sa, K. H.; Al Faruque, H.; Hong, J.; Nam, E. J.; San Kim, I.; Park, J. H., Endogenous inspired biomineral-installed hyaluronan nanoparticles as pH-responsive carrier of methotrexate for rheumatoid arthritis. *Journal of Controlled Release* **2017**, *252*, 62-72 % @ 0168-3659.
34. Trujillo-Nolasco, R. M.; Morales-Avila, E.; Ocampo-Garcia, B. E.; Ferro-Flores, G.; Gibbens-Bandala, B. V.; Escudero-Castellanos, A.; Isaac-Olive, K., Preparation and in vitro evaluation of radiolabeled HA-PLGA nanoparticles as novel

MTX delivery system for local treatment of rheumatoid arthritis. *Materials Science and Engineering: C* **2019**, *103*, 109766 %@ 0928-4931.

35. Qindeel, M.; Khan, D.; Ahmed, N.; Khan, S.; Asim, ur, R., Surfactant-free, self-assembled nanomicelles-based transdermal hydrogel for safe and targeted delivery of methotrexate against rheumatoid arthritis. *ACS nano* **2020**, *14* (4), 4662-4681 %@ 1936-0851.

36. Zhao, J.; Zhao, M.; Yu, C.; Zhang, X.; Liu, J.; Cheng, X.; Lee, R. J.; Sun, F.; Teng, L.; Li, Y., Multifunctional folate receptor-targeting and pH-responsive nanocarriers loaded with methotrexate for treatment of rheumatoid arthritis. *International journal of nanomedicine* **2017**, *12*, 6735.

37. Brennan, F. M.; McInnes, I. B., Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation* **2008**, *118* (11), 3537-3545 %@ 0021-9738.

38. Thomas, T. P.; Goonewardena, S. N.; Majoros, I. J.; Kotlyar, A.; Cao, Z.; Leroueil, P. R.; Baker Jr, J. R., Folate-targeted nanoparticles show efficacy in the treatment of inflammatory arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **2011**, *63* (9), 2671-2680 %@ 0004-3591.

39. Kottarath, S. K.; Bhat, M.; Verma, C.; Bhattacharya, S.; Kaul, A.; Kumar, U.; Dinda, A. K., Folate receptor- $\beta$  targeted cholesterol-chitosan nanocarrier for treatment of rheumatoid arthritis: An animal study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2020**, *60*, 101946 %@ 1773-2247.

40. Agostini, S. B. N.; Malta, I. H. S.; Rodrigues, R. F.; Freitas, J. T. J.; de Sousa Lino, M. E.; Dos Santos, R. S.; Elisei, L. S.; Moraes, T. R.; dos Reis Giusto, L. A.; de Oliveira, M. K., Preclinical evaluation of methotrexate-loaded polyelectrolyte complexes and thermosensitive hydrogels as treatment for rheumatoid arthritis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2021**, 105856 %@ 0928-0987.

41. Dhanka, M.; Pawar, V.; Chauhan, D. S.; Jain, N. K.; Prabhuraj, R. S.; Shetty, C.; Kumawat, M. K.; Prasad, R.; Srivastava, R., Synthesis and characterization of an injectable microparticles integrated hydrogel composite biomaterial: In-vivo biocompatibility and inflammatory arthritis treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2021**, *201*, 111597 %@ 0927-7765.
42. Pham, L.; Truong, M. D.; Nguyen, T. H.; Le, L.; Nam, N. D.; Bach, L. G.; Nguyen, V. T.; Tran, N. Q., A dual synergistic of curcumin and gelatin on thermal-responsive hydrogel based on Chitosan-P123 in wound healing application. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2019**, *117*, 109183 %@ 0753-3322.
43. Dang, L. H.; Nguyen, T. H.; Tran, H. L. B.; Doan, V. N.; Tran, N. Q., Injectable Nanocurcumin-Formulated Chitosan-g-Pluronic Hydrogel Exhibiting a Great Potential for Burn Treatment. *J Healthc Eng* **2018**, *2018*, 5754890.
44. Dang, L. H.; Doan, P.; Nhi, T. T. Y.; Nguyen, D. T.; Nguyen, B. T.; Nguyen, T. P.; Tran, N. Q., Multifunctional injectable pluronic-cystamine-alginate-based hydrogel as a novel cellular delivery system towards tissue regeneration. *Int J Biol Macromol* **2021**, *185*, 592-603.
45. Hermanson, G. T., *Bioconjugate techniques*. Academic press: 2013.
46. Nguyen, T. B. T.; Dang, L. H.; Nguyen, T. T. T.; Tran, D. L.; Nguyen, D. H.; Nguyen, V. T.; Nguyen, C. K.; Nguyen, T. H.; Le, V. T.; Tran, N. Q., Green processing of thermosensitive nanocurcumin-encapsulated chitosan hydrogel towards biomedical application. *Green Processing and Synthesis* **2016**, *5* (6).
47. Tong, N. A.; Nguyen, T. P.; Cuu Khoa, N.; Tran, N. Q., Aqueated cisplatin and heparin-pluronic nanocomplexes exhibiting sustainable release of active platinum compound and NCI-H460 lung cancer cell antiproliferation. *J Biomater Sci Polym Ed* **2016**, *27* (8), 709-20.

48. Satake, K.; OKUYAMA, T.; OHASHI, M.; SHINODA, T. J. T. J. o. B., The spectrophotometric determination of amine, amino acid and peptide with 2, 4, 6-trinitrobenzene 1-sulfonic acid. **1960**, *47* (5), 654-660.
49. Mabrouk, M. M.; Hamed, N. A.; Mansour, F. R. J. A. S. R., Spectroscopic methods for determination of critical micelle concentrations of surfactants; a comprehensive review. **2023**, *58* (3), 206-234.
50. Nakajima, N.; Ikada, Y., Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjug Chem* **1995**, *6* (1), 123-30.
51. Nguyễn, K., Preparation of Rutin Phytosome Complex. *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences* **2018**, *34* (2).
52. Muthu, M. S.; Singh, S., Poly (D, L-lactide) nanosuspensions of risperidone for parenteral delivery: formulation and in-vitro evaluation. *Curr Drug Deliv* **2009**, *6* (1), 62-8.
53. Qi, X.; Xiong, L.; Peng, J.; Tang, D. J. R. A., Near infrared laser-controlled drug release of thermoresponsive microgel encapsulated with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. **2017**, *7* (32), 19604-19610.
54. Sun, J.; Zhang, X.; Broderick, M.; Fein, H., Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. **2003**, *3* (8), 276-284.
55. sigma Griess reagent (modified).  
<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/355/046/g4410bul.pdf> (accessed March 30).
56. Bulpitt, P.; Aeschlimann, D., New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *J Biomed Mater Res* **1999**, *47* (2), 152-69.

57. Salomonsen, T.; Jensen, H. M.; Stenbæk, D.; Engelsen, S. B. J. C. P., Chemometric prediction of alginate monomer composition: A comparative spectroscopic study using IR, Raman, NIR and NMR. **2008**, *72* (4), 730-739.
58. Zhao, Y.; Gao, S.; Zhao, S.; Li, Y.; Cheng, L.; Li, J.; Yin, Y. J. M. S.; C, E., Synthesis and characterization of disulfide-crosslinked alginate hydrogel scaffolds. **2012**, *32* (8), 2153-2162.
59. Tian, M.; Chen, X.; Li, H.; Ma, L.; Gu, Z.; Qi, X.; Li, X.; Tan, H.; You, C. J. R. a., Long-term and oxidative-responsive alginate–deferoxamine conjugates with a low toxicity for iron overload. **2016**, *6* (39), 32471-32479.
60. Wan, W.; Li, Q.; Gao, H.; Ge, L.; Liu, Y.; Zhong, W.; Ouyang, J.; Xing, M., BMSCs laden injectable amino-diethoxypropane modified alginate-chitosan hydrogel for hyaline cartilage reconstruction. *J Mater Chem B* **2015**, *3* (9), 1990-2005.
61. Mahou, R.; Borcard, F.; Crivelli, V.; Montanari, E.; Passemard, S.; Noverraz, F.; Gerber-Lemaire, S.; Bühler, L. o.; Wandrey, C. J. C. o. M., Tuning the properties of hydrogel microspheres by adding chemical cross-linking functionality to sodium alginate. **2015**, *27* (12), 4380-4389.
62. He, M.; Ro, L.; Liu, J.; Chu, C. C., Folate-decorated arginine-based poly(ester urea urethane) nanoparticles as carriers for gambogic acid and effect on cancer cells. *J Biomed Mater Res A* **2017**, *105* (2), 475-490.
63. Parin, F. N.; Ullah, S.; Yildirim, K.; Hashmi, M.; Kim, I. S., Fabrication and Characterization of Electrospun Folic Acid/Hybrid Fibers: In Vitro Controlled Release Study and Cytocompatibility Assays. *Polymers (Basel)* **2021**, *13* (20).
64. Tsai, S. W.; Liaw, J. W.; Hsu, F. Y.; Chen, Y. Y.; Lyu, M. J.; Yeh, M. H., Surface-Modified Gold Nanoparticles with Folic Acid as Optical Probes for Cellular Imaging. *Sensors (Basel)* **2008**, *8* (10), 6660-6673.



65. Novikova, A. S.; Ponomaryova capital Te, C.; Goryacheva, I. Y., Fluorescent AgInS/ZnS quantum dots microplate and lateral flow immunoassays for folic acid determination in juice samples. *Mikrochim Acta* **2020**, *187* (8), 427.
66. Ribeiro, M. V. d. M.; Melo, I. d. S.; Lopes, F. d. C. d. C.; Moita, G. C. J. B. J. o. P. S., Development and validation of a method for the determination of folic acid in different pharmaceutical formulations using derivative spectrophotometry. **2016**, *52*, 741-750.
67. Domínguez, A.; Fernández, A.; González, N.; Iglesias, E.; Montenegro, L. J. J. o. c. e., Determination of critical micelle concentration of some surfactants by three techniques. **1997**, *74* (10), 1227.
68. Iglesias, E. J. T. J. o. P. C., Enolization of Benzoylacetone in aqueous surfactant Solutions: a novel method for determining enolization constants. **1996**, *100* (30), 12592-12599.
69. Jafari-Chashmi, P.; Bagheri, A. J. J. o. M. L., The strong synergistic interaction between surface active ionic liquid and anionic surfactant in the mixed micelle using the spectrophotometric method. **2018**, *269*, 816-823.
70. Farzanfar, J.; Farjadian, F.; Roointan, A.; Mohammadi-Samani, S.; Tayebi, L. J. M. R., Assessment of pH responsive delivery of methotrexate based on PHEMA-st-PEG-DA nanohydrogels. **2021**, *29*, 54-61.

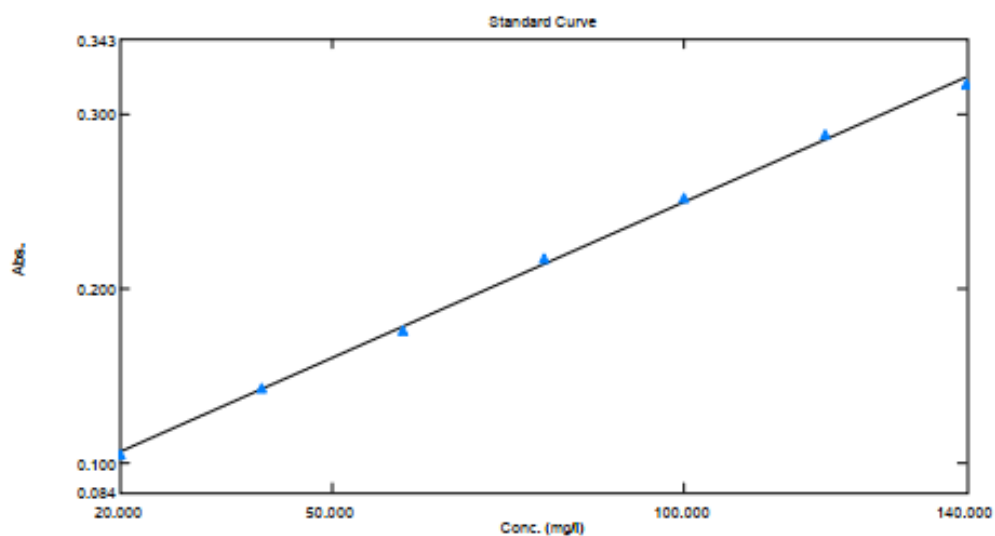
## PHỤ LỤC

Phụ lục 1 Đường chuẩn của dung dịch L-Alanine có hàm lượng từ 0-140 ppm phản ứng với dung dịch TNBS 0,1% trong NaHCO<sub>3</sub> 0,1M.

### Standard Table Report

05/24/2022 04:25:27 PM

File Name: C:\Users\ADMIN\Desktop\Bao- Hoa duoc\khoa\duong chuan alanine\duong chuan ala.pho



Standard Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL420.0	Wgt.Factor	Comments
1	mau3	Standard		40.000	0.143	1.000	
2	mau6	Standard		100.000	0.252	1.000	
3	mau8	Standard		140.000	0.317	1.000	
4	mau 2	Standard		20.000	0.105	1.000	
5	mau 4	Standard		60.000	0.176	1.000	
6	mau5	Standard		80.000	0.217	1.000	
7	mau 7	Standard		120.000	0.288	1.000	
8							

Phụ lục 2: Độ hấp thu của benzoylacetone tại bước sóng 310 nm và 250 nm

Standard Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL310.0	WL250.0	Result	Wgt.Factor	Commen
1	01	Standard		1.000	0.350	0.716	-0.366	1.000	
2	02	Standard		10.000	0.344	0.703	-0.360	1.000	
3	03	Standard		25.000	0.363	0.740	-0.377	1.000	
4	04	Standard		50.000	0.371	0.746	-0.375	1.000	
5	05	Standard		100.000	0.354	0.712	-0.358	1.000	
6	06	Standard		150.000	0.360	0.723	-0.364	1.000	
7	07	Standard		200.000	0.366	0.728	-0.362	1.000	
8	08	Standard		250.000	0.376	0.744	-0.368	1.000	
9	09	Standard		300.000	0.379	0.756	-0.376	1.000	
10	10	Standard		350.000	0.385	0.760	-0.375	1.000	
11	11	Standard		400.000	0.372	0.733	-0.362	1.000	
12	12	Standard		450.000	0.360	0.710	-0.350	1.000	
13	13	Standard		500.000	0.382	0.747	-0.365	1.000	
14	14	Standard		550.000	0.388	0.754	-0.366	1.000	
15	15	Standard		600.000	0.380	0.736	-0.356	1.000	
16	16	Standard		650.000	0.378	0.730	-0.352	1.000	
17	17	Standard		700.000	0.382	0.739	-0.358	1.000	
18	18	Standard		750.000	0.374	0.718	-0.344	1.000	

Standard Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL310.0	WL250.0	Result	Wgt.Factor	Commen
19	19	Standard		800.000	0.395	0.750	-0.355	1.000	
20	20	Standard		850.000	0.390	0.738	-0.349	1.000	
21	21	Standard		900.000	0.406	0.771	-0.364	1.000	
22	22	Standard		950.000	0.392	0.733	-0.341	1.000	
23	23	Standard		1000.000	0.408	0.772	-0.364	1.000	
24									

### Phụ lục 3: Kết quả đo nồng độ tạo nanogel trên thiết bị phân tích kích thước Horiba SZ100.

**Parameters**

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t	Dependency
A310/250	a1	0.48545	0.00241	201.3702	3.71334E-30	0.92932
	k1	0.00657	0.00128	5.11919	8.54574E-5	0.95179
	xi	2.53118	0.04292	58.97792	4.17231E-21	0.86565
	k2	0.06047	0.0064	9.44459	3.55382E-8	0.78211
	a2	0.34903	0.01783			

Reduced Chi-sqr = 8.6267697343E-6  
 COD(R^2) = 0.95567279658374  
 Iterations Performed = 8  
 Total Iterations in Session = 8  
 Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.  
 Standard Error was scaled with square root of reduced Chi-Sqr.  
 a2 are derived parameter(s).

**Statistics**

	A310/250
Number of Points	21
Degrees of Freedom	17
Reduced Chi-Sqr	8.62677E-6
Residual Sum of Squares	1.46655E-4
R-Square (COD)	0.95567
Adj. R-Square	0.94785
Fit Status	Succeeded(100)

Fit Status Code :  
 100 : Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

**Summary**

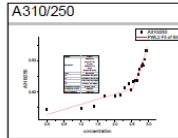
	a1		k1		xi		k2		a2		Statistics	
	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square
A310/250	0.48545	0.00241	0.00657	0.00128	2.53118	0.04292	0.06047	0.0064	0.34903	0.01783	8.62677E-6	0.94785

**ANOVA**

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
A310/250	Regression	3	0.00316	0.00105	122.17056	1.05564E-11
	Residual	17	1.46655E-4	8.62677E-6		
	Uncorrected Total	21	5.43245			
	Corrected Total	20	0.00331			

A310/250: At the 0.05 level, the fitting function is significantly better than the function y=constant.

**Fitted Curves Plot**



## Phụ lục 4: Kết quả khảo sát điều kiện điều chế Alginate - Cystamine

### Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
pH value	3	127.63484	42.54495	319.47388	0
ty le	2	656.5966	328.2983	2465.22193	0
Interaction	6	225.68333	37.61389	282.44613	0
Model	11	1009.91478	91.81043	689.41293	0
Error	24	3.19613	0.13317	--	--
Corrected Total	35	1013.1109	--	--	--

At the 0.05 level, the population means of pH value are significantly different.

At the 0.05 level, the population means of ty le are significantly different.

At the 0.05 level, the interaction between pH value and ty le is significant.

### Means Comparisons

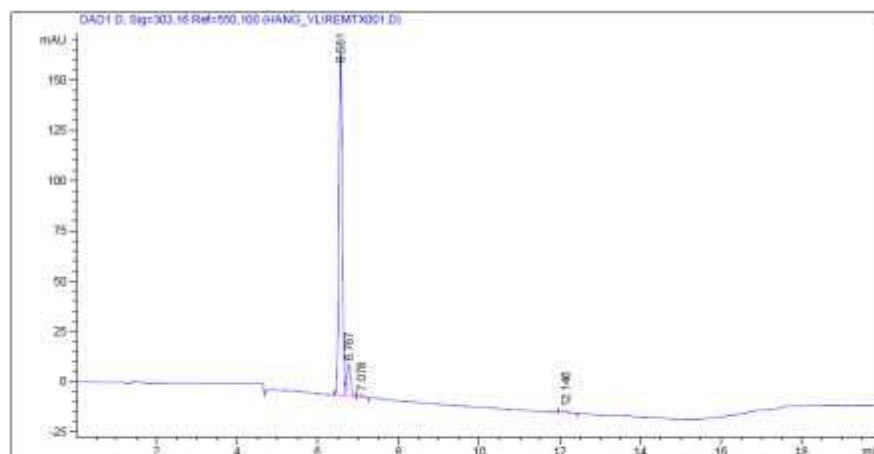
#### Tukey Test

##### Interactions

pH value	ty le	pH value	ty le	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
pH= 4.5	1:1:0.5	pH= 4.5	1:1:1	-0.23621	0.29796	1.12114	0.99951	0.05	0	-1.31056	0.83813
pH= 4.5	1:0:1	pH= 4.5	1:1:1	-13.45525	0.29796	63.8625	0	0.05	1	-14.52959	-12.3809
pH= 4.5	1:0:1	pH= 4.5	1:1:0.5	-13.21903	0.29796	62.74136	0	0.05	1	-14.29337	-12.14469
pH= 5.5	1:1:1	pH= 4.5	1:1:1	0.21769	0.29796	1.03324	0.99977	0.05	0	-0.85665	1.29203
pH= 5.5	1:1:1	pH= 4.5	1:1:0.5	0.45391	0.29796	2.15438	0.91934	0.05	0	-0.62043	1.52825
pH= 5.5	1:1:1	pH= 4.5	1:0:1	13.67294	0.29796	64.89574	1.2815E-6	0.05	1	12.5986	14.74728
pH= 5.5	1:1:0.5	pH= 4.5	1:1:1	-0.01072	0.29796	0.05087	1	0.05	0	-1.08506	1.06362
pH= 5.5	1:1:0.5	pH= 4.5	1:1:0.5	0.2255	0.29796	1.07028	0.99968	0.05	0	-0.84884	1.29984
pH= 5.5	1:1:0.5	pH= 4.5	1:0:1	13.44453	0.29796	63.81163	0	0.05	1	12.37019	14.51887
pH= 5.5	1:1:0.5	pH= 5.5	1:1:1	-0.22841	0.29796	1.08411	0.99964	0.05	0	-1.30275	0.84593
pH= 5.5	1:0:1	pH= 4.5	1:1:1	-8.95627	0.29796	42.50904	0	0.05	1	-10.03061	-7.88192
pH= 5.5	1:0:1	pH= 4.5	1:1:0.5	-8.72005	0.29796	41.38789	0	0.05	1	-9.79439	-7.64571
pH= 5.5	1:0:1	pH= 4.5	1:0:1	4.49898	0.29796	21.35347	6.91184E-8	0.05	1	3.42464	5.57332
pH= 5.5	1:0:1	pH= 5.5	1:1:1	-9.17396	0.29796	43.54228	0	0.05	1	-10.2483	-8.09962
pH= 5.5	1:0:1	pH= 5.5	1:1:0.5	-8.94555	0.29796	42.45817	0	0.05	1	-10.01989	-7.87121
pH= 6.5	1:1:1	pH= 4.5	1:1:1	0.19862	0.29796	0.94273	0.99991	0.05	0	-0.87572	1.27297
pH= 6.5	1:1:1	pH= 4.5	1:1:0.5	0.43484	0.29796	2.06388	0.93793	0.05	0	-0.6395	1.50918
pH= 6.5	1:1:1	pH= 4.5	1:0:1	13.65387	0.29796	64.80523	1.27797E-6	0.05	1	12.57953	14.72821
pH= 6.5	1:1:1	pH= 5.5	1:1:1	-0.01907	0.29796	0.09051	1	0.05	0	-1.09341	1.05527
pH= 6.5	1:1:1	pH= 5.5	1:1:0.5	0.20934	0.29796	0.9936	0.99984	0.05	0	-0.865	1.28368
pH= 6.5	1:1:1	pH= 5.5	1:0:1	9.15489	0.29796	43.45177	0	0.05	1	8.08055	10.22923
pH= 6.5	1:1:0.5	pH= 4.5	1:1:1	-0.10142	0.29796	0.48137	1	0.05	0	-1.17576	0.97292
pH= 6.5	1:1:0.5	pH= 4.5	1:1:0.5	0.13479	0.29796	0.63977	1	0.05	0	-0.93955	1.20913

pH =6.5	1:1:0.5	pH= 5.5	1:1:1	-0.31911	0.29796	1.51461	0.99332	0.05	0	-1.39346	0.75523
pH =6.5	1:1:0.5	pH= 5.5	1:1:0.5	-0.0907	0.29796	0.4305	1	0.05	0	-1.16504	0.98364
pH =6.5	1:1:0.5	pH= 5.5	1:0:1	8.85484	0.29796	42.02766	0	0.05	1	7.7805	9.92918
pH =6.5	1:1:0.5	pH =6.5	1:1:1	-0.30005	0.29796	1.4241	0.99597	0.05	0	-1.37439	0.77429
pH =6.5	1:0:1	pH= 4.5	1:1:1	-0.3358	0.29796	1.5938	0.98999	0.05	0	-1.41014	0.73854
pH =6.5	1:0:1	pH= 4.5	1:1:0.5	-0.09959	0.29796	0.47266	1	0.05	0	-1.17393	0.97476
pH =6.5	1:0:1	pH= 4.5	1:0:1	13.11944	0.29796	62.2687	0	0.05	1	12.0451	14.19379
pH =6.5	1:0:1	pH= 5.5	1:1:1	-0.55349	0.29796	2.62704	0.77221	0.05	0	-1.62783	0.52085
pH =6.5	1:0:1	pH= 5.5	1:1:0.5	-0.32508	0.29796	1.54294	0.99225	0.05	0	-1.39942	0.74926
pH =6.5	1:0:1	pH= 5.5	1:0:1	8.62046	0.29796	40.91523	0	0.05	1	7.54612	9.69481
pH =6.5	1:0:1	pH =6.5	1:1:1	-0.53443	0.29796	2.53654	0.80629	0.05	0	-1.60877	0.53992
pH =6.5	1:0:1	pH =6.5	1:1:0.5	-0.23438	0.29796	1.11243	0.99954	0.05	0	-1.30872	0.83996
pH=7.0	1:1:1	pH= 4.5	1:1:1	-0.26898	0.29796	1.27667	0.99842	0.05	0	-1.34332	0.80536
pH=7.0	1:1:1	pH= 4.5	1:1:0.5	-0.03277	0.29796	0.15553	1	0.05	0	-1.10711	1.04157
pH=7.0	1:1:1	pH= 4.5	1:0:1	13.18626	0.29796	62.58583	0	0.05	1	12.11192	14.2606
pH=7.0	1:1:1	pH= 5.5	1:1:1	-0.48668	0.29796	2.30991	0.87991	0.05	0	-1.56102	0.58766
pH=7.0	1:1:1	pH= 5.5	1:1:0.5	-0.25827	0.29796	1.22581	0.9989	0.05	0	-1.33261	0.81607
pH=7.0	1:1:1	pH= 5.5	1:0:1	8.68728	0.29796	41.23236	0	0.05	1	7.61294	9.76162
pH=7.0	1:1:1	pH =6.5	1:1:1	-0.46761	0.29796	2.21941	0.90401	0.05	0	-1.54195	0.60673
pH=7.0	1:1:1	pH =6.5	1:1:0.5	-0.16756	0.29796	0.7953	0.99998	0.05	0	-1.2419	0.90678
pH=7.0	1:1:1	pH =6.5	1:0:1	0.06682	0.29796	0.31713	1	0.05	0	-1.00752	1.14116
pH=7.0	1:1:0.5	pH= 4.5	1:1:1	-0.36046	0.29796	1.71085	0.98283	0.05	0	-1.4348	0.71388
pH=7.0	1:1:0.5	pH= 4.5	1:1:0.5	-0.12425	0.29796	0.58971	1	0.05	0	-1.19859	0.95009
pH=7.0	1:1:0.5	pH= 4.5	1:0:1	13.09478	0.29796	62.15165	0	0.05	1	12.02044	14.16913
pH=7.0	1:1:0.5	pH= 5.5	1:1:1	-0.57815	0.29796	2.74409	0.72502	0.05	0	-1.6525	0.49619
pH=7.0	1:1:0.5	pH= 5.5	1:1:0.5	-0.34974	0.29796	1.65998	0.98631	0.05	0	-1.42408	0.7246
pH=7.0	1:1:0.5	pH= 5.5	1:0:1	8.5958	0.29796	40.79819	0	0.05	1	7.52146	9.67015
pH=7.0	1:1:0.5	pH =6.5	1:1:1	-0.55909	0.29796	2.65358	0.76179	0.05	0	-1.63343	0.51526
pH=7.0	1:1:0.5	pH =6.5	1:1:0.5	-0.25904	0.29796	1.22948	0.99887	0.05	0	-1.33338	0.8153
pH=7.0	1:1:0.5	pH =6.5	1:0:1	-0.02466	0.29796	0.11704	1	0.05	0	-1.099	1.04968
pH=7.0	1:1:0.5	pH=7.0	1:1:1	-0.09148	0.29796	0.43418	1	0.05	0	-1.16582	0.98286
pH=7.0	1:0:1	pH= 4.5	1:1:1	-13.76385	0.29796	65.32723	1.29821E-6	0.05	1	-14.83819	-12.68951
pH=7.0	1:0:1	pH= 4.5	1:1:0.5	-13.52764	0.29796	64.20609	1.25447E-6	0.05	1	-14.60198	-12.4533
pH=7.0	1:0:1	pH= 4.5	1:0:1	-0.30861	0.29796	1.46473	0.99491	0.05	0	-1.38295	0.76574
pH=7.0	1:0:1	pH= 5.5	1:1:1	-13.98154	0.29796	66.36047	0	0.05	1	-15.05589	-12.9072
pH=7.0	1:0:1	pH= 5.5	1:1:0.5	-13.75313	0.29796	65.27637	1.29625E-6	0.05	1	-14.82747	-12.67879
pH=7.0	1:0:1	pH= 5.5	1:0:1	-4.80759	0.29796	22.8182	6.83504E-8	0.05	1	-5.88193	-3.73324
pH=7.0	1:0:1	pH =6.5	1:1:1	-13.96248	0.29796	66.26996	0	0.05	1	-15.03682	-12.88813
pH=7.0	1:0:1	pH =6.5	1:1:0.5	-13.66243	0.29796	64.84586	1.27956E-6	0.05	1	-14.73677	-12.58809
pH=7.0	1:0:1	pH =6.5	1:0:1	-13.42805	0.29796	63.73343	0	0.05	1	-14.50239	-12.35371
pH=7.0	1:0:1	pH=7.0	1:1:1	-13.49487	0.29796	64.05056	0	0.05	1	-14.56921	-12.42053
pH=7.0	1:0:1	pH=7.0	1:1:0.5	-13.40339	0.29796	63.81638	0	0.05	1	-14.47773	-12.32905

Phụ lục 5: Sắc ký đồ định lượng methotrexat tại các thời điểm phóng thích 1, 3, 6, 12, 24 giờ

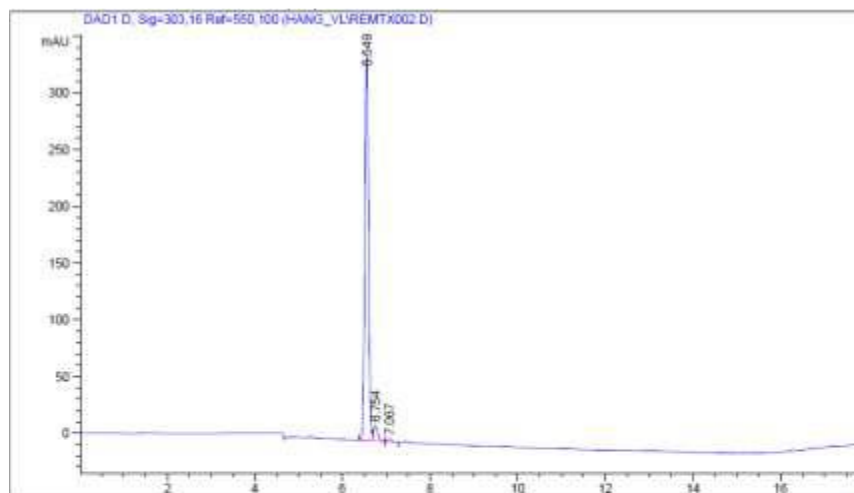


Area Percent Report

Sorted By : Signal  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 D, Sig=303,16 Ref=550,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.561	EV	0.0915	895.82920	172.86258	88.4521

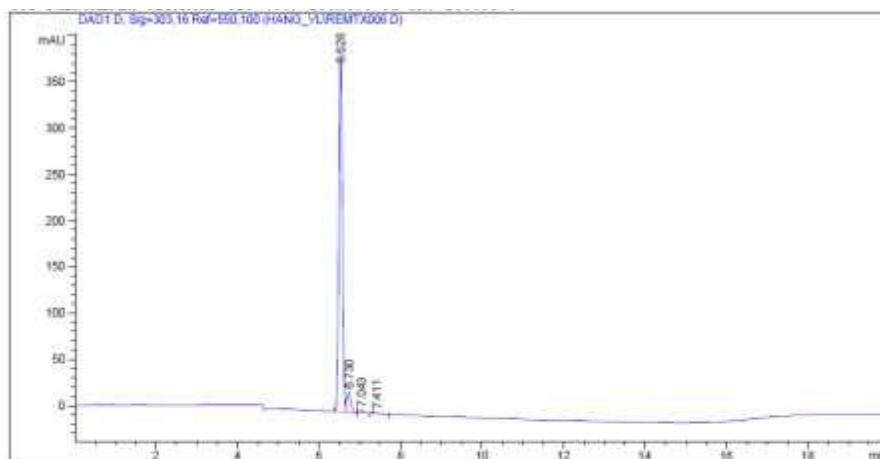


Area Percent Report

Sorted By : Signal  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 D, Sig=303,16 Ref=550,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.549	EV	0.092	1008.59021	343.41220	94.7264

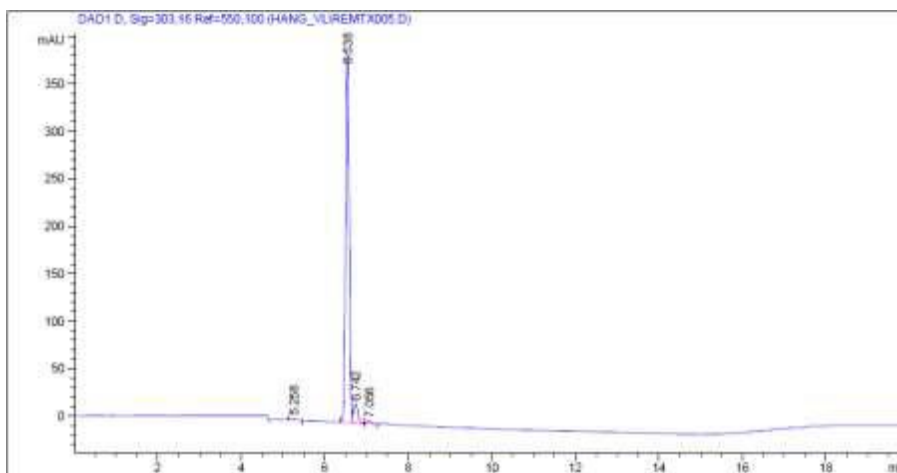


=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1.D, Sig=303.16 Ref=550.100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.526	BV	0.0932	2311.76318	389.89346	92.5022



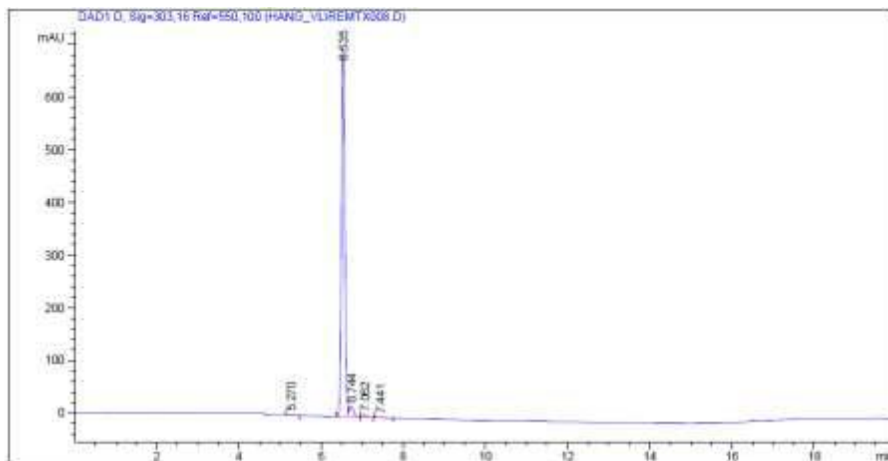
=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1.D, Sig=303.16 Ref=550.100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.259	BB	0.1184	7.89785	1.03270	0.3231
2	6.538	BV	0.0929	2309.38110	389.27338	93.2536



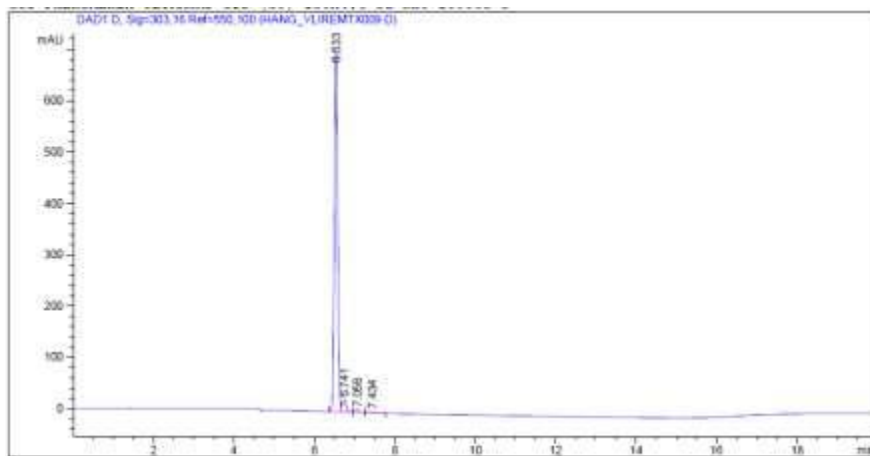


=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 D, Sig=303,16 Ref=550,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.270	BB	0.1257	9.29896	1.11098	0.2206
2	6.535	BV	0.0508	4012.36672	699.36293	85.2059

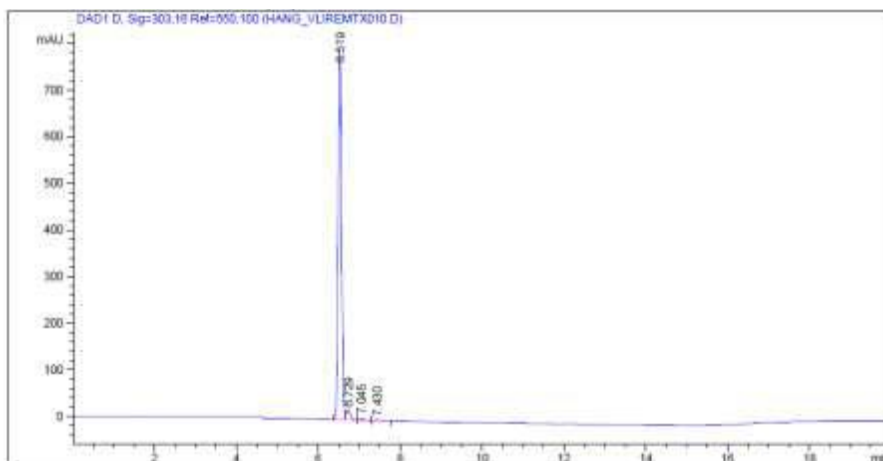


=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 D, Sig=303,16 Ref=550,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.533	BV	0.0910	4035.37915	702.72150	95.1704

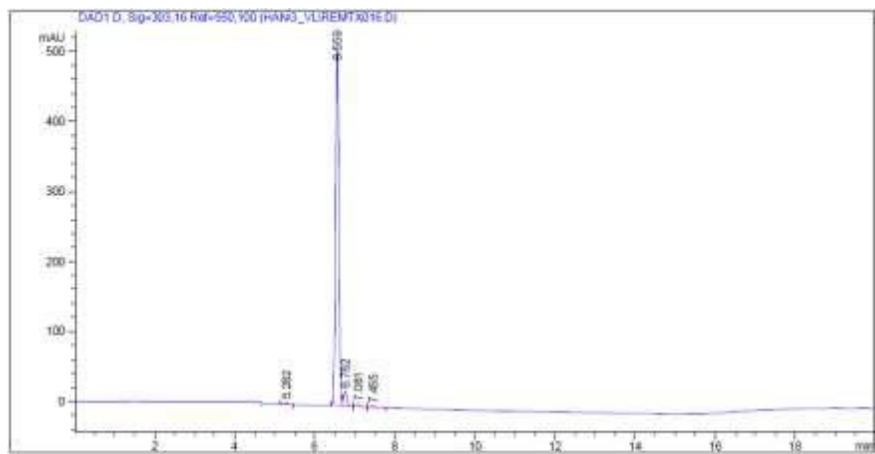


=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 D, Sig=303.16 Ref=550.100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	4.519	SP	0.0512	4545.88896	785.51848	95.6717

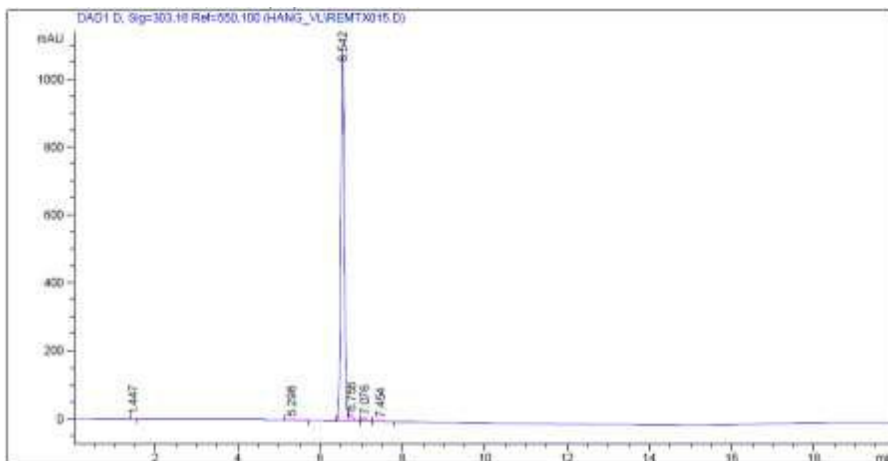


=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 D, Sig=303.16 Ref=550.100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.282	BB	0.1075	16.93469	3.39210	0.5389
2	6.599	SP	0.0901	4321.09204	515.62419	99.5151

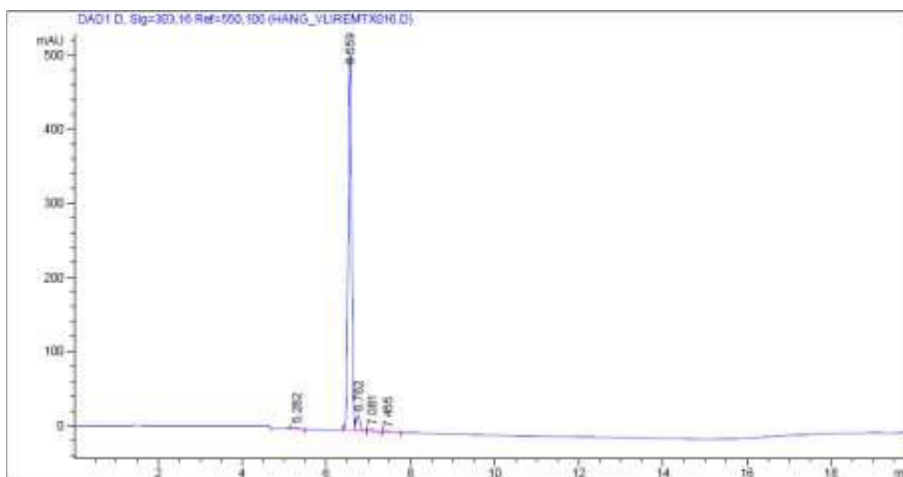


=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By: Signal  
 Multiplier: 1.0000  
 Dilution: 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 D, Sig=303.16 Ref=550.100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.447	BB	0.0787	5.79504	1.07874	0.0893
2	5.298	BB	0.1320	13.60410	1.58662	0.2072
3	6.542	BB	0.0276	6323.54248	1090.59423	96.2270



=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By: Signal  
 Multiplier: 1.0000  
 Dilution: 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 D, Sig=303.16 Ref=550.100

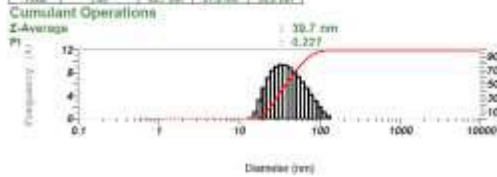
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.292	BB	0.1075	16.83465	2.35210	0.5389
2	6.542	BB	0.0290	6921.09204	515.42419	93.5151

# Phụ lục 6 Kích thước nanogel của 13 công thức và công thức tối ưu

**Measurement Results**  
 Date : Wednesday, June 1, 2022 9:38:45 AM  
 Measurement Type : Particle Size  
 Sample Name : CT1  
 Scattering Angle : 90  
 Temperature of the Holder : 25.0 °C  
 Dispersion Medium Viscosity : 0.552 mPa·s  
 Transmission Intensity before Meas. : 26230  
 Distribution Form : Standard  
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse  
 Representation of Result : Scattering Light Intensity  
 Count Rate : 2442 KCPS

**Calculation Results**

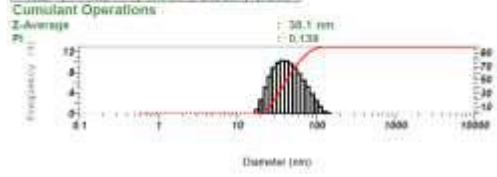
Peak No.	S.F. Area Ratio	Mean	S.D.	Width
1	1.00	33.7 nm	0.227	33.8 nm
2	---	---	---	---
3	---	---	---	---
Total	1.00	33.7 nm	0.227 nm	33.8 nm



**Measurement Results**  
 Date : Wednesday, June 1, 2022 9:41:04 AM  
 Measurement Type : Particle Size  
 Sample Name : CT2  
 Scattering Angle : 90  
 Temperature of the Holder : 24.9 °C  
 Dispersion Medium Viscosity : 0.553 mPa·s  
 Transmission Intensity before Meas. : 34177  
 Distribution Form : Standard  
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse  
 Representation of Result : Scattering Light Intensity  
 Count Rate : 2980 KCPS

**Calculation Results**

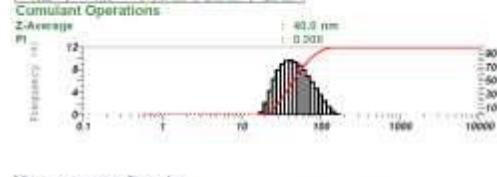
Peak No.	S.F. Area Ratio	Mean	S.D.	Width
1	1.00	37.8 nm	0.185	37.9 nm
2	---	---	---	---
3	---	---	---	---
Total	1.00	37.8 nm	0.185 nm	37.9 nm



**Measurement Results**  
 Date : Wednesday, June 1, 2022 9:45:26 AM  
 Measurement Type : Particle Size  
 Sample Name : CT3  
 Scattering Angle : 90  
 Temperature of the Holder : 25.0 °C  
 Dispersion Medium Viscosity : 0.552 mPa·s  
 Transmission Intensity before Meas. : 34002  
 Distribution Form : Standard  
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse  
 Representation of Result : Scattering Light Intensity  
 Count Rate : 2893 KCPS

**Calculation Results**

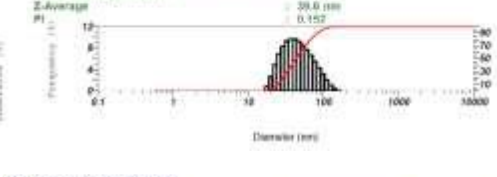
Peak No.	S.F. Area Ratio	Mean	S.D.	Width
1	1.00	40.2 nm	0.203	40.3 nm
2	---	---	---	---
3	---	---	---	---
Total	1.00	40.2 nm	0.203 nm	40.3 nm



**Measurement Results**  
 Date : Wednesday, June 1, 2022 9:48:50 AM  
 Measurement Type : Particle Size  
 Sample Name : CT4  
 Scattering Angle : 90  
 Temperature of the Holder : 24.9 °C  
 Dispersion Medium Viscosity : 0.550 mPa·s  
 Transmission Intensity before Meas. : 33448  
 Distribution Form : Standard  
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse  
 Representation of Result : Scattering Light Intensity  
 Count Rate : 1078 KCPS

**Calculation Results**

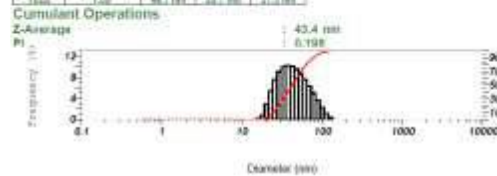
Peak No.	S.F. Area Ratio	Mean	S.D.	Width
1	1.00	49.2 nm	0.152	49.3 nm
2	---	---	---	---
3	---	---	---	---
Total	1.00	49.2 nm	0.152 nm	49.3 nm



**Measurement Results**  
 Date : Wednesday, June 1, 2022 9:54:05 AM  
 Measurement Type : Particle Size  
 Sample Name : CT5  
 Scattering Angle : 90  
 Temperature of the Holder : 24.9 °C  
 Dispersion Medium Viscosity : 0.553 mPa·s  
 Transmission Intensity before Meas. : 33337  
 Distribution Form : Standard  
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse  
 Representation of Result : Scattering Light Intensity  
 Count Rate : 1084 KCPS

**Calculation Results**

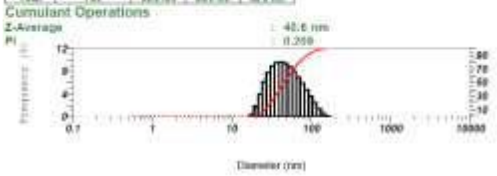
Peak No.	S.F. Area Ratio	Mean	S.D.	Width
1	1.00	49.7 nm	0.178	49.8 nm
2	---	---	---	---
3	---	---	---	---
Total	1.00	49.7 nm	0.178 nm	49.8 nm



**Measurement Results**  
 Date : Wednesday, June 1, 2022 9:57:57 AM  
 Measurement Type : Particle Size  
 Sample Name : CT6  
 Scattering Angle : 90  
 Temperature of the Holder : 25.0 °C  
 Dispersion Medium Viscosity : 0.552 mPa·s  
 Transmission Intensity before Meas. : 33598  
 Distribution Form : Standard  
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse  
 Representation of Result : Scattering Light Intensity  
 Count Rate : 4105 KCPS

**Calculation Results**

Peak No.	S.F. Area Ratio	Mean	S.D.	Width
1	1.00	51.1 nm	0.143	51.2 nm
2	---	---	---	---
3	---	---	---	---
Total	1.00	51.1 nm	0.143 nm	51.2 nm



### Measurement Results

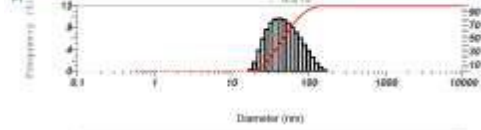
Date: Wednesday, June 1, 2022 10:02:50 AM  
 Measurement Type: Particle Size  
 Sample Name: CT7  
 Scattering Angle: 90  
 Temperature of the Holder: 25.0 °C  
 Dispersion Medium Viscosity: 0.552 mPa·s  
 Transmission Intensity before Meas.: 33723  
 Distribution Form: Standard  
 Distribution Form(Dispersity): Monodisperse  
 Representation of Result: Scattering Light Intensity  
 Count Rate: 4162 kCPS

#### Calculation Results

Peak No.	S.P. Area Ratio	Mean	S.D.	Width
1	1.00	35.0 nm	26.4 nm	41.1 nm
2	---	---	---	---
3	---	---	---	---
Total	1.00	35.0 nm	26.4 nm	41.1 nm

#### Cumulant Operations

Z-Average



### Measurement Results

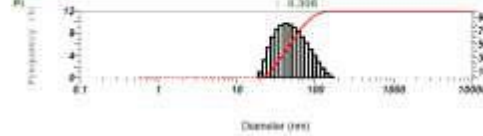
Date: Wednesday, June 1, 2022 10:06:07 AM  
 Measurement Type: Particle Size  
 Sample Name: CT9  
 Scattering Angle: 90  
 Temperature of the Holder: 25.0 °C  
 Dispersion Medium Viscosity: 0.552 mPa·s  
 Transmission Intensity before Meas.: 33546  
 Distribution Form: Standard  
 Distribution Form(Dispersity): Monodisperse  
 Representation of Result: Scattering Light Intensity  
 Count Rate: 3902 kCPS

#### Calculation Results

Peak No.	S.P. Area Ratio	Mean	S.D.	Width
1	1.00	35.0 nm	26.1 nm	41.1 nm
2	---	---	---	---
3	---	---	---	---
Total	1.00	35.0 nm	26.1 nm	41.1 nm

#### Cumulant Operations

Z-Average



### Measurement Results

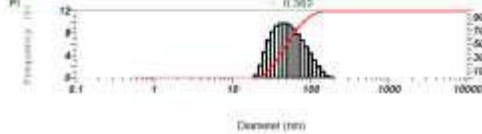
Date: Wednesday, June 1, 2022 10:10:17 AM  
 Measurement Type: Particle Size  
 Sample Name: CT9  
 Scattering Angle: 90  
 Temperature of the Holder: 24.9 °C  
 Dispersion Medium Viscosity: 0.552 mPa·s  
 Transmission Intensity before Meas.: 32204  
 Distribution Form: Standard  
 Distribution Form(Dispersity): Monodisperse  
 Representation of Result: Scattering Light Intensity  
 Count Rate: 1105 kCPS

#### Calculation Results

Peak No.	S.P. Area Ratio	Mean	S.D.	Width
1	1.00	42.0 nm	26.4 nm	47.4 nm
2	---	---	---	---
3	---	---	---	---
Total	1.00	42.0 nm	26.4 nm	47.4 nm

#### Cumulant Operations

Z-Average



### Measurement Results

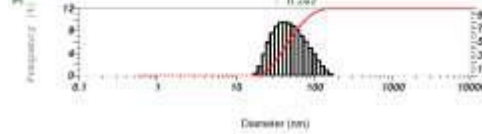
Date: Wednesday, June 1, 2022 10:14:23 AM  
 Measurement Type: Particle Size  
 Sample Name: CT10  
 Scattering Angle: 90  
 Temperature of the Holder: 25.0 °C  
 Dispersion Medium Viscosity: 0.552 mPa·s  
 Transmission Intensity before Meas.: 28275  
 Distribution Form: Standard  
 Distribution Form(Dispersity): Monodisperse  
 Representation of Result: Scattering Light Intensity  
 Count Rate: 2972 kCPS

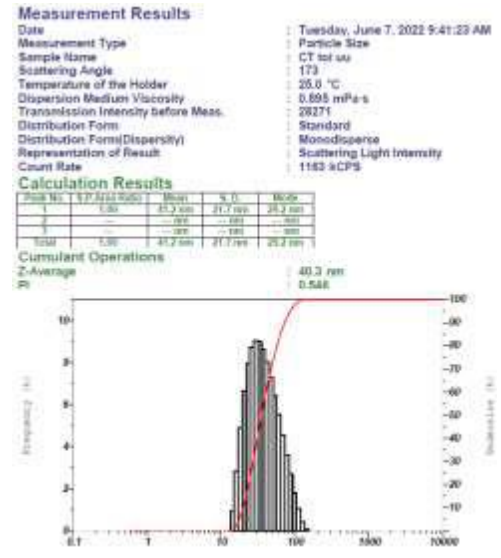
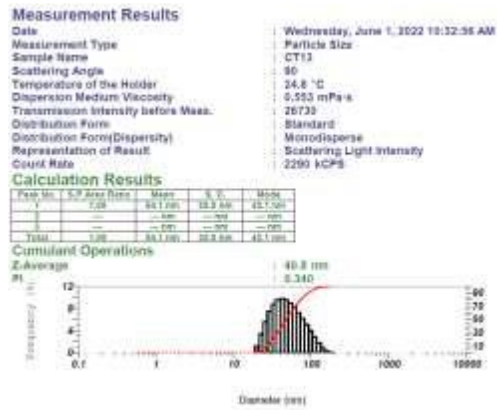
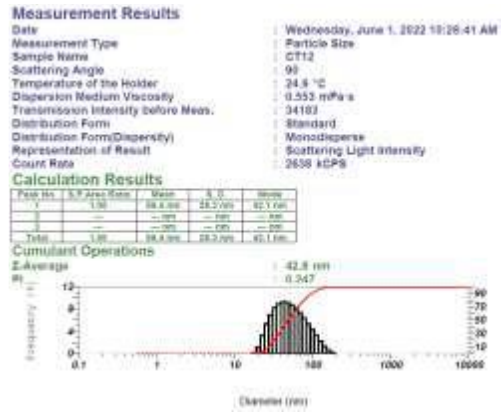
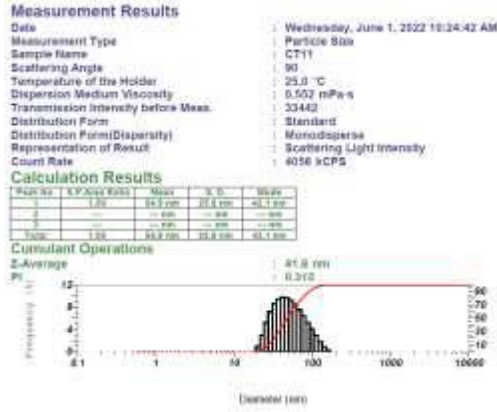
#### Calculation Results

Peak No.	S.P. Area Ratio	Mean	S.D.	Width
1	1.00	42.0 nm	26.8 nm	45.7 nm
2	---	---	---	---
3	---	---	---	---
Total	1.00	42.0 nm	26.8 nm	45.7 nm

#### Cumulant Operations

Z-Average





Phụ lục 7 Độ hấp thụ dung dịch trước và sau ly tâm của 13 công thức và

công thức tối ưu

Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL300.0	Comments
1	CT4T L1	Unknown		*****	0.670	
2	CT4T L2	Unknown		*****	0.665	
3	CT4T L3	Unknown		*****	0.662	
4	CT4 L1	Unknown		*****	0.583	
5	CT4 L2	Unknown		*****	0.579	
6	CT4 L3	Unknown		*****	0.583	
7	CT13 L1	Unknown		*****	0.282	
8	CT13 L2	Unknown		*****	0.281	
9	CT13 L3	Unknown		*****	0.281	
10	CT13T L1	Unknown		*****	0.293	
11	CT13T L2	Unknown		*****	0.293	
12	CT13T L3	Unknown		*****	0.291	
13	CT1T L1	Unknown		*****	0.375	
14	CT1T L2	Unknown		*****	0.375	
15	CT1T L3	Unknown		*****	0.374	
16	CT1 L1	Unknown		*****	0.346	
17	CT1 L2	Unknown		*****	0.342	
18	CT1 L3	Unknown		*****	0.343	

Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL300.0	Comments
19	CT5T L1	Unknown		*****	0.431	
20	CT5T L2	Unknown		*****	0.425	
21	CT5T L3	Unknown		*****	0.428	
22	CT5 L1	Unknown		*****	0.419	
23	CT5 L2	Unknown		*****	0.416	
24	CT5 L3	Unknown		*****	0.412	
25	CT7T L1	Unknown		*****	0.723	
26	CT7T L2	Unknown		*****	0.721	
27	CT7T L3	Unknown		*****	0.718	
28	CT9T L1	Unknown		*****	0.391	
29	CT9T L2	Unknown		*****	0.390	
30	CT9T L3	Unknown		*****	0.390	
31	CT11 L1	Unknown		*****	0.422	
32	CT11 L2	Unknown		*****	0.417	
33	CT11 L3	Unknown		*****	0.415	
34	CT11T L1	Unknown		*****	0.435	
35	CT11T L2	Unknown		*****	0.435	
36	CT11T L3	Unknown		*****	0.436	



Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL300.0	Comments
37	CT12 L1	Unknown		*****	0.375	
38	CT12 L2	Unknown		*****	0.376	
39	CT12 L3	Unknown		*****	0.374	
40	CT12T L1	Unknown		*****	0.388	
41	CT12T L2	Unknown		*****	0.388	
42	CT12T L3	Unknown		*****	0.391	
43	CT2T L1	Unknown		*****	0.561	
44	CT2T L2	Unknown		*****	0.562	
45	CT2T L3	Unknown		*****	0.559	
46	CT2 L1	Unknown		*****	0.550	
47	CT2 L2	Unknown		*****	0.548	
48	CT2 L3	Unknown		*****	0.549	
49	CT10T L1	Unknown		*****	0.284	
50	CT10T L2	Unknown		*****	0.283	
51	CT10T L3	Unknown		*****	0.283	
52	CT10 L1	Unknown		*****	0.270	
53	CT10 L2	Unknown		*****	0.270	
54	CT10 L3	Unknown		*****	0.270	

Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL300.0	Comments
55	CT8 L1	Unknown		*****	0.373	
56	CT8 L2	Unknown		*****	0.375	
57	CT8 L3	Unknown		*****	0.371	
58	CT8T L1	Unknown		*****	0.402	
59	CT8T L2	Unknown		*****	0.402	
60	CT8T L3	Unknown		*****	0.403	
61	CT6 L1	Unknown		*****	0.293	
62	CT6 L2	Unknown		*****	0.296	
63	CT6 L3	Unknown		*****	0.301	
64	CT6T L1	Unknown		*****	0.402	
65	CT6T L2	Unknown		*****	0.401	
66	CT6T L3	Unknown		*****	0.402	
67	CT3 L1	Unknown		*****	0.127	
68	CT3 L2	Unknown		*****	0.124	
69	CT3 L3	Unknown		*****	0.124	
70	CT3T L1	Unknown		*****	0.128	
71	CT3T L2	Unknown		*****	0.128	
72	CT3T L3	Unknown		*****	0.125	



Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL300.0	Comments
73	CT9 L1	Unknown		*****	0.376	
74	CT9 L2	Unknown		*****	0.375	
75	CT9 L3	Unknown		*****	0.375	
76	CT7 L1	Unknown		*****	0.705	
77	CT7 L2	Unknown		*****	0.704	
78	CT7 L3	Unknown		*****	0.704	
79						

Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL300.0	Comments
1	CTTUTT L1	Unknown		*****	0.489	
2	CTTUTT L2	Unknown		*****	0.488	
3	CTTUTT L3	Unknown		*****	0.489	
4	CTTU 1	Unknown		*****	0.472	
5	CTTU 2	Unknown		*****	0.471	
6	CTTU 3	Unknown		*****	0.468	
7						

### Phụ lục 8: Đường chuẩn NO trong phương pháp Griess

