

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đặng Thị Lệ Hằng

**HYDROGEL DẠNG TIÊM TRÊN CƠ SỞ ALGINATE VÀ PLURONIC
VỚI CÁC HỢP CHẤT HOẠT TÍNH SINH HỌC THEO YÊU CẦU ĐỂ
TÁI TẠO MÔ CHUYÊN BIỆT**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỮU CƠ

(Bộ môn Hóa sinh Hữu cơ)

Mã số: 9 44 01 14

Thành phố Hồ Chí Minh- 2023

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

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn.....: Trần Ngọc Quyển (PGS.TS) Viện Khoa học Vật liệu ứng Dụng
2. Người hướng dẫn.....:

Phản biện 1:.....

Phản biện 2:.....

Phản biện 3:.....

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi giờ, ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

CHƯƠNG 1: MỞ ĐẦU

1.1 *Động lực nghiên cứu: tầm quan trọng của hydrogel nhạy nhiệt trong kỹ thuật mô và thách thức*

Mục tiêu chính trong lĩnh vực kỹ thuật mô xoay quanh việc phục hồi các mô bị tổn thương. Nỗ lực này đòi hỏi phải có sự kết nối đa ngành bao gồm sinh học tế bào, hóa sinh và vật liệu [1-2]. Thông qua hiểu biết về khả năng tự phục hồi của mô sau tổn thương, định hướng tiếp cận tạo mô thay thế mô tổn thương đã trở thành kim chỉ nam trong kỹ thuật mô [1]. Với liệu pháp này, vật liệu sinh học được phát triển để hỗ trợ cho quá trình tái tạo mô, còn được gọi là liệu pháp tái tạo mô in situ [3]. Cụ thể, vật liệu sinh học được thiết kế, mang các tín hiệu sinh học, đóng vai trò là đèn hiệu dẫn đường, hướng dẫn tế bào gốc nội sinh hoặc tế bào gốc đến vị trí mô bị tổn thương và thúc đẩy quá trình sửa chữa các mô bị tổn thương [1-3]. Trong suốt quá trình này, vật liệu sinh học cung cấp một cấu trúc giàn giáo tạo điều kiện thuận lợi cho sự bám dính và di chuyển của tế bào gốc và tế bào tiền thân của vật chủ, cuối cùng điều khiển sự biến đổi của chúng thành các loại tế bào chuyên biệt dành riêng cho mô cần sửa chữa [3-5].

Hydrogel nhạy nhiệt là một trong vật liệu nhạy cảm với kích thích từ môi trường có tính hấp dẫn trong tái tạo mô [2-3,6]. Hydrogel nhạy cảm với kích ứng nhiệt mang lại nhiều lợi thế khi so sánh với hydrogel truyền thống: (1) trạng thái lỏng của vật liệu khi ở nhiệt độ phòng cho phép có thể tiêm vào vị trí đích tác dụng, thông qua đường tiêm tĩnh mạch hay tiêm dưới da hoặc thậm chí nội soi [7-9]; (2) cho phép giải phóng thuốc có kiểm soát, theo kích thích của nhiệt độ [11-12]; (3) lượng nước trong hydrogel có thể kiểm soát bằng nhiệt độ, dẫn đến dễ dàng kiểm soát về tốc độ trương nở, kiểm soát về tốc độ khuếch tán cũng như tốc độ thải trừ [15]; (4) các hydrogel nhạy nhiệt chủ yếu hình thành liên kết ngang bằng tương tác vật lý kiểm soát bằng nhiệt độ, giúp loại bỏ các tác nhân hóa học hay các yêu cầu về dung môi hữu cơ đặc biệt [16-18]. Điều này giúp cho việc nang hóa protein, peptide hay gen trở nên dễ dàng, không có nhiều tác động mạnh đến mô liên kết xung quanh hay gây độc tính cấp do tồn dư của tác nhân hóa học [19].

Nguyên liệu polymer tạo hydrogel nhạy nhiệt có thể có nguồn gốc từ tự nhiên hoặc tổng hợp [20-21]. Trong số này, poloxamer 407, còn được gọi là pluronic F127, nổi bật là polyme nhạy nhiệt được nghiên cứu rộng rãi nhất [20, 22-24] và được FDA phê chuẩn sử dụng ở nhiều hình thức trong dược phẩm, bao gồm qua sử dụng trong thuốc đường miệng, mắt, xoang mũi, thuốc đặt trực tràng và âm đạo [22, 23]. Tuy nhiên, việc sử dụng Pluronic F127 đơn lẻ để tạo ra hydrogel có nhiều thách thức cần được giải quyết [24-26]. Những thách thức này bao gồm nồng độ gel hóa cao [25-26], có thể ảnh hưởng đến chi phí sản xuất và sự thuận tiện của ứng dụng, độ bền gel kém dẫn đến gel có cơ tính thấp không phù hợp với một số ứng dụng nhất định [23], nhiệt độ gel hóa thấp [11] không tương thích với nhiệt độ cơ thể sinh lý cần thiết cho quá trình tạo gel tại chỗ, dẫn đến khả năng gây độc tế bào [25].

Để giải quyết những hạn chế này, Pluronic thường được kết hợp chung với các polysaccharide tự nhiên [13]. Polysaccharide, là các polyme cao phân tử được cấu tạo từ đường đơn hoặc dẫn xuất từ đường được gọi là monosaccharide, là một trong những polyme tự nhiên phong phú nhất hiện có [27-28]. Trong lĩnh vực ứng dụng y sinh, polysaccharides mang lại nhiều lợi thế hơn so với polyme tổng hợp [29-30]. Chúng có khả năng tương thích sinh học và phân hủy sinh học tốt hơn hẳn, sản phẩm phân hủy thân thiện với cơ thể [30]. Điều này làm cho chúng được sử dụng rộng rãi trong thiết kế chất mang cho các tác nhân trị liệu và làm khung vật liệu cho kỹ thuật mô [29]. Hơn nữa, polysaccharide mang lại những thuận lợi đáng kể do chúng giống với các đại phân tử sinh học, về thành phần và cấu trúc giống với ma trận ngoại bào tự nhiên (ECM) [28,31]. Nhờ những đặc điểm này, vật liệu từ polysaccharide dễ dàng các thụ thể bề mặt tế bào nhận ra và tăng cường sự bám dính, kích thích các tín hiệu nội bào dẫn đến thúc đẩy tăng sinh [31]. Điều này đặc biệt có giá trị trong lĩnh vực kỹ thuật mô và liệu pháp tế bào. Trong số các polysaccharide, alginate – một polysaccharide được chiết xuất từ rong, tảo biển, ... nhận được nhiều sự chú ý trong kết hợp với các polymer nhạy nhiệt. Alginate là muối của acid Alginic. Cấu tạo hóa học của Alginate gồm 2 phân tử β -D-Mannuroic acid (M) và α -L-Guluronic acid (G) liên kết với nhau bằng liên kết 1-4 glucozid. Có 3 loại liên kết có thể gặp trong 1 phân tử Alginate: (M-M-M), (G-G-G), (M-M-G). Alginate có các đặc điểm về độ nhớt có tính đàn hồi cao, khả năng tương thích sinh học cao và không gây kích ứng miễn dịch [51] được ưa chuộng trong phát triển vật liệu cho y học tái tạo. Thêm vào đó, việc kết nối hai polymers, alginate và pluronic F127 tạo đặc tính lưu biến phù hợp với ứng dụng [3, 27,32-37]. Đặc biệt, alginate không có đặc tính phản ứng nhiệt [13], do đó, sự ảnh hưởng đến tổng thể về đặc tính nhạy nhiệt của hydrogel hoàn toàn phụ thuộc vào polymer nhạy nhiệt. Nói cách khác, quá trình không chế để khoảng chuyển đổi pha sol-gel sẽ dễ dàng hơn. Do đó, việc kết hợp các đặc tính phản ứng nhiệt của Pluronic F127 với alginate không chỉ giúp tăng cường độ bền cơ học, cải thiện khả năng trương nở mà còn giải quyết các vấn đề liên quan đến hòa tan, cuối cùng là cải thiện khả năng kiểm soát việc nạp và giải phóng thuốc từ Pluronic hydrogel.

Tuy nhiên, mối quan tâm trong việc kết hợp này là quá trình tách pha (chuyển đổi sol-gel) của polymer nhạy nhiệt không thể bị gián đoạn khi đưa alginate [39]. Điều quan trọng là phải duy trì phạm vi chuyển tiếp ở khoảng nhiệt độ hẹp và trong giới hạn ở nhiệt độ sinh lý cơ thể người [25, 39]. Khi hòa tan các

Alginate vào nước chúng sẽ ngậm nước và tạo dung dịch nhớt. Độ nhớt phụ thuộc vào chiều dài của phân tử Alginate. Trong một số trường hợp độ nhớt có thể gia tăng ở nồng độ thấp với sự hiện diện của một số cơ chất như: CaSO_4 , CaCO_3 . Sự khác biệt sự ảnh hưởng của các tác động của môi trường xung quanh lên độ nhớt của alginate và pluronic gây khó khăn trong vấn đề phối trộn vật liệu, để tạo thành hydrogel nhạy nhiệt thích hợp với ứng dụng cụ thể. Do đó, việc tạo hydrogel nhạy nhiệt từ 2 loại polymer với nhiệt độ chuyển pha hoàn toàn có thể dự đoán và kiểm soát được vẫn là một nhiệm vụ đầy thách thức. Một thách thức nảy sinh khác là sự cần thiết kiểm soát là về tính chất cơ học của vật liệu, đặc biệt là về tính tương thích với ma trận ngoại bào (ECM) [2-4, 10, 18]. Mặc dù rất nhiều hydrogel dạng này được tạo ra, nhưng các vật liệu này cũng chưa đạt sự tương thích với hệ thống in vivo [18], đặc biệt là mặt điều chỉnh mô học chưa đạt sự tương đồng với mô tự nhiên [40]. Với sự tiến bộ của ngành hóa sinh, sự hạn chế của hệ hydrogel là do không kiểm soát được các tín hiệu sinh học [41-42]. Bằng cách bổ sung thêm các hợp chất sinh học như amino acid [43-45], các chất hoạt tính sinh học chiết tách từ thảo dược [46-48] và/hoặc nhân tố vô cơ như thủy tinh sinh học [43, 49] vào mạng lưới hydrogel, các hydrogel tạo được các tín hiệu kích thích tế bào trả lời. Điều thú vị là, việc tăng cường hoạt tính hydrogel thông qua việc sử dụng các yếu tố sinh học tạo được hiệu ứng tốt hơn hoặc thay thế tác dụng của các tín hiệu sinh hóa [50], đặc biệt trong các ứng dụng mà các yếu tố đó khuyến khích một cách hiệu quả các tế bào được nuôi cấy và/hoặc được tuyển dụng để góp phần hình thành các mô chức năng [45, 47-48]. Do đó, cần phải khám phá các phương pháp tạo vật liệu hydrogel nhạy nhiệt với khả năng bắt chước với mô tự nhiên, từ đó tạo tiềm năng ứng dụng cho kỹ thuật mô.

1.2 Mục tiêu và định hướng

Mục tiêu của luận án là phát triển các hydrogel dạng tiêm trên tính năng nhạy cảm nhiệt từ việc kết hợp polysaccharide, alginate và polymer nhạy nhiệt, pluronic F127 tạo môi trường vi mô phù hợp để hướng dẫn tế bào, nhằm điều phối sự hoàn thiện quá trình sửa chữa mô tổn thương. Bên cạnh đó, để tăng cường hiệu quả hướng dẫn, các tín hiệu sinh học (hợp chất tự nhiên - resveratrol, axit amin - arginine hoặc hạt nano vô cơ - thủy tinh sinh học) được bổ sung làm chất điều chỉnh tín hiệu trong các hệ hydrogel nhằm phát huy hiệu quả của các vật liệu này trong tái tạo mô (chữa lành vết thương và chữa lành xương).

Hai chiến lược phổ biến để tổng hợp hydrogel phản ứng nhiệt từ Pluronic F127 và alginate là ghép mạch và tạo liên kết ngang, được thực hiện trong nghiên cứu này. Vì vậy, luận án này sẽ liên quan đến hai đối tượng chi tiết chính:

Mục tiêu 1: Phát triển hydrogel phản ứng nhiệt từ alginate và Pluronic F127 bằng kỹ thuật ghép. Giả thuyết là sau khi ghép Pluronic trên alginate, giàn giáo tương thích sinh học sẽ hình thành với quá trình chuyển đổi sol-gel thuận nghịch theo chức năng của nhiệt độ. Hydrogel này sẽ mang các tín hiệu sinh học theo yêu cầu cho mô cụ thể theo cách giải phóng phù hợp để hỗ trợ quá trình tái tạo của mô này.

Mục tiêu 2: Phát triển hydrogel phản ứng nhiệt từ alginate và Pluronic F127 bằng cách sử dụng các kỹ thuật liên kết ngang. Trên cơ sở sự hình thành liên kết ngang do phản ứng oxy hóa của nhóm catechol, 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (DOPA) sẽ được đưa vào alginate và pluronic F127, tạo thành alginate-DOPA (ADA) và Pluronic F127-DOPA (PDA) tương ứng. Thay vì sử dụng enzyme peroxidase làm tác nhân xúc tác cho phản ứng oxy hóa, thủy tinh sinh học sẽ được sửa đổi trong nghiên cứu này để bắt chước hoạt động xúc tác của peroxidase. Giả thuyết cho rằng enzyme bắt chước peroxidase dựa trên thủy tinh sinh học sẽ hoạt động như một chất xúc tác tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình oxy hóa catechol, dẫn đến sự hình thành liên kết ngang trong alginate và Pluronic với sự chuyển tiếp sol-gel thích hợp và cung cấp giàn giáo mô phòng sinh học để tái tạo xương.

CHƯƠNG 2: CƠ SỞ LÝ THUYẾT

Xem trong toàn văn

CHƯƠNG 3: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THỰC NGHIỆM

Xem trong toàn văn

CHƯƠNG 4: PHÁT TRIỂN HYDROGEL NHIỆT TỪ ALGinate VÀ PLURONIC QUA PHƯƠNG PHÁP GHÉP MẠCH

4.1 Cấu trúc vật liệu alginate-pluronic

Vật liệu alginate-pluronic được tạo thành thông qua cầu nối cystamine. Trên cấu trúc alginate có nhiều nhóm chức carboxylic acid trong khi đó pluronic có hydroxyl ở 2 đầu mạch. Mặc dù liên kết ester có thể sử dụng để ghép nối 2 cấu trúc lại nhau, liên kết ester không phải lựa chọn tối ưu trong vật liệu y sinh, khi so sánh với liên kết amid. Do vậy, cystamine, phân tử có 2 nhóm NH_2 ở đầu mạch được sử dụng làm cầu nối liên kết. Đầu tiên, alginate được biến tính để có dẫn xuất Alginate-cystamine (AC) thông qua sự hỗ trợ của tác nhân phản ứng 1-ethyl-3-dimethylamino propyl carbodiimide hydrochloride (EDC). Các nhóm carboxyl trên alginate được hoạt hóa bằng EDC thành dạng O-acylurea. Dạng chất trung gian này lập tức phản ứng với nhóm amin trên cystamine thành liên kết amide. Đối với pluronic, p-nitrophenyl chloroformate (NPC) được sử dụng để hoạt hóa nhóm hydroxyl trên mạch pluronic tạo thành dẫn xuất aromatic carbonate esters

nhạy cảm với nhóm amine. Khi kết hợp pluronic hoạt hóa và AC, cấu trúc mạch ghép Alginate-pluronic được hình thành.

4.1.1 Đánh giá cấu trúc, alginate-cystamine

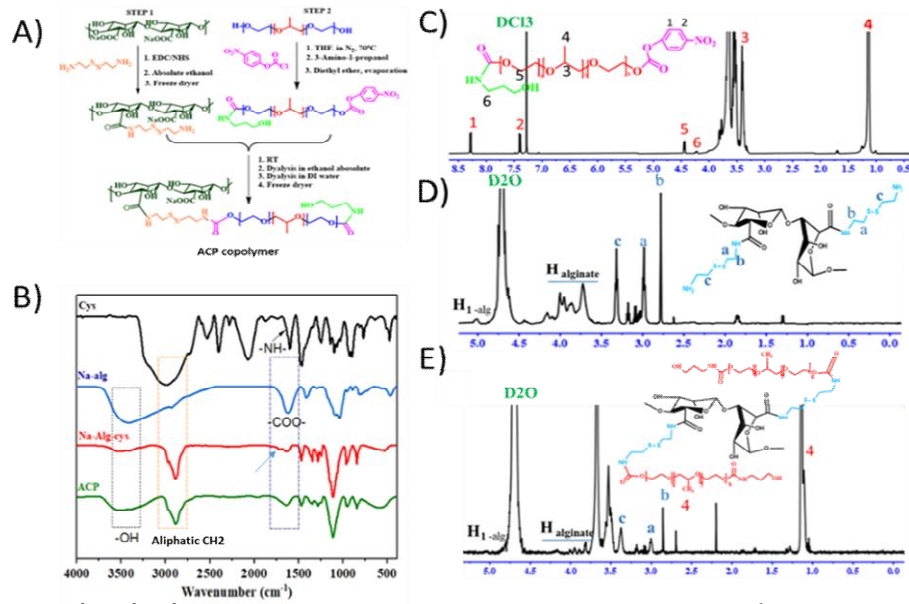
Alginate-cystamine (AC), các nhóm carboxyl trên mạch alginate được chuyển hóa thành O-acylurea có khả năng phản ứng nhanh với các amin bậc một [56]. FT-IR được sử dụng để xác nhận sự chuyển đổi nhóm carboxylic trên quy trình Na-alg (hình 3.1). Phổ FT-IR của Na-Alg: 3411 cm^{-1} đối với nhóm hydroxyl (-OH), 2923 cm^{-1} đối với aliphatic (CH_2), 1619 cm^{-1} và 1412 cm^{-1} đối với độ giãn đối xứng và bất đối xứng (-COO-), tương ứng [57]. Vùng 1294–815 cm^{-1} có một số dao động đối đặc trưng của các nhóm chức ete (C-O-C) trong liên kết glycoside [58]. Đỉnh dao động trong vùng 890-815 cm^{-1} thuộc về liên kết C-C và C-O trong axit mannuronic [59] trong khi sự xuất hiện của vòng pyranoid trong axit guluronic được đặc trưng ở 1294 cm^{-1} -1037 cm^{-1} [57]. Sau khi biến tính với Cystamine, phần lớn đặc tính của Na-alg (O-H, C=O) vẫn được thể hiện trên phổ FT-IR của Na-alg-cys (AC). Tuy nhiên, sự dịch của các nhóm cacboxyl đối xứng và bất đối xứng xuống vùng sóng thấp hơn so với Na-Alg tinh khiết, cho thấy sự tương tác của các nhóm amin trên các nhóm cacboxylic [60]. Phổ của AC cho thấy tín hiệu nhỏ của liên kết SH ở 2298-1960 cm^{-1} , trong khi không tồn tại đối với phổ Na-alg tinh khiết. Đáng chú ý, dấu hiệu nhận biết ở bước sóng 1700 cm^{-1} và 1243 cm^{-1} cho thấy các dải hấp thụ đặc trưng của dao động N-C=O (amine I) và N-H, cho thấy sự amid hóa của nhóm cacboxylic của các phân tử alginate [61]. Sự thành công quy trình tổng hợp AC tiếp tục được khẳng định qua phổ $^1\text{H-NMR}$ trên hình 3.1. Cả hai đỉnh proton đặc trưng của Na-alg và Cystamine đều được thể hiện trên phổ $^1\text{H-NMR}$. Phổ hiển thị proton của đơn vị guluronic (H1-G) và đơn vị mannuronic (H1-M) ở $\delta = 5,05\text{ppm}$ và $\delta = 4,45\text{ppm}$ [62,63]. Bên cạnh đó, sự dịch chuyển hóa học của proton C-5 trên đơn vị guluronic (H5-G, ở $\delta = 4,37\text{ppm}$) và đơn vị mannuronic (H5-M, $\delta = 4,20\text{ppm}$) [64], đặc trưng của alginate cũng được phát hiện trên phổ AC. Ngoài ra, phổ còn thể hiện các tín hiệu ở $\delta = 3,1\text{ ppm}$ (Ha) và $\delta = 3,4\text{ ppm}$ (Hb), đặc trưng tín hiệu của cystamine, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-$ và $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{S}-$, giúp khẳng định sự thành công trong quá trình tổng hợp dẫn xuất alginate-cystamine AC [65]. Thông qua TNBS, hàm lượng amin được biến tính trên bề mặt alginate là $54,70 \pm 0,36\text{ mg/g Na-alg-cys}$, hiệu suất quy trình đạt $78,04 \pm 2,31\%$.

4.1.2 Đánh giá cấu trúc dẫn xuất pluronic F127 với p-NPC

Nhóm hydroxyl của F127 được kích hoạt bằng p-NPC và cấu trúc hóa học được trình bày trong hình 3.3A. Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy sự dịch chuyển hóa học của các proton trong vòng thơm của p-NPC ở $\delta = 7,41\text{ppm}$ (H2) và $\delta = 8,29\text{ppm}$ (H1). Tín hiệu proton của khối PPO của Pluronic F127 ở $\delta = 1,15\text{ ppm}$ (H4, nhóm methyl ($-\text{CH}_3$)) và $\delta = 3,41\text{ppm}$ (H3, nhóm methylene ($>\text{CH}_2$)), trong khi proton của $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ của Khối PEO ở mức $\delta = 3,67\text{ppm}$. Ngoài ra, độ dịch chuyển hóa học ở $\delta = 4,44\text{ppm}$ (H5) được gán cho proton trên nhóm methylene trong liên kết este với p-NPC, $\text{CH}_2-\text{O-NPC}$. Chuyển dịch hóa học tại $\delta = 4,22\text{ppm}$ tương ứng với proton methylene của $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O-Ami}$, khẳng định sự thành công trong tổng hợp cây trúc dẫn xuất pluronic F127 với p-NPC.

4.1.3 Đánh giá cấu trúc alginate-pluronic ACP

Việc tổng hợp thành công ACP được khẳng định bằng phổ FT-IR và phổ $^1\text{H-NMR}$ (hình 4.1). ACP thể hiện tất cả các đỉnh đặc trưng điển hình có trong phổ FT-IR của AC. Sự xuất hiện của pluronic trên mạch AC gây ra sự thay đổi cường độ kéo dài của các nhóm este (C=O) và nhóm hydroxyl (OH). Chứng minh sự hình thành liên kết hóa học giữa pluronic và Na-alg-cys thể hiện qua dao động biến dạng của liên kết NH và dao động kéo giãn của CN trong phổ FT-IR của chất đồng trùng hợp ACP. $^1\text{H-NMR}$ đã được sử dụng để xác nhận thêm kết quả này). $^1\text{H NMR}$ (Hình 1A) xác nhận quá trình tổng hợp thành công copolyme ghép ACP (600 MHz, $\text{d-H}_2\text{O}$): pluronic F127 ($\delta = 1,04\text{ ppm}$ đối với CH_3 (1) trên khối PPO, $\delta = 3,702\text{ ppm}$ đối với CH_2 (2) trên khối PEO) [10,66]; alginate ($\delta = 5,02\text{ ppm}$ (H1), 4,46 ppm, 4,39 ppm đối với proton axit guluronic, $\delta = 4,43, 3,91\text{ ppm}$ đối với proton axit manuronic)10; Cystamine ($\delta = 2,99\text{ ppm}$ (a), 3,37 ppm (c) đối với methylene ($-\text{CH}_2$)) [67]. Về hàm lượng nhóm amin còn lại tính toán thông qua phản ứng thử TNBS, hiệu suất phản ứng ghép của pluronic hoạt hóa với alginate-cystamine là $44,47 \pm 0,74\%$.

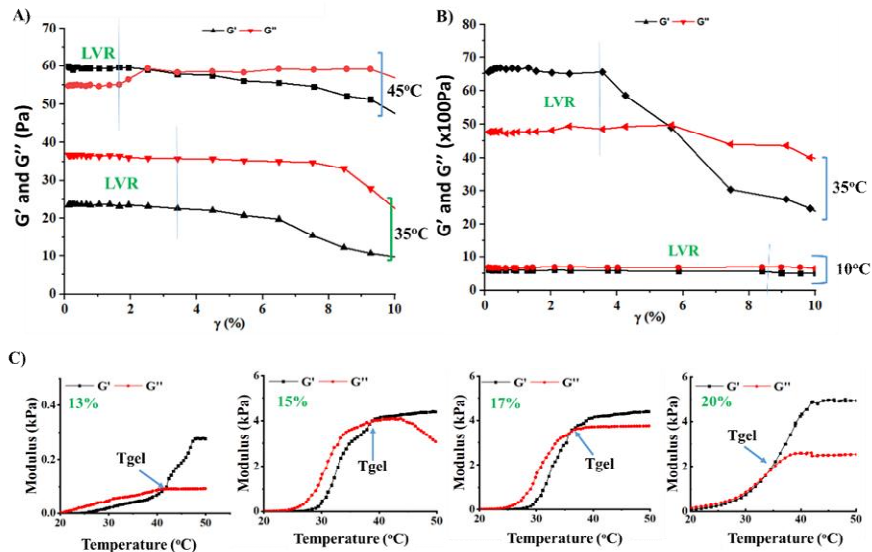


Hình 4.1: A) Sơ đồ thiết kế copolymer ghép từ Alginate và pluronic F127. B) Phổ FT-IR của polyme tiền chất (cystamine, Na-alg) và polyme thu được (Na-alg-cys và ACP). Phổ 1H-NMR của C) pluronic hoạt hóa, D) alginate-cystamine và E) copolymer ghép ACP.

4.2 Điều chế hydrogel nhạy nhiệt từ alginate-pluronic

4.2.1 Ảnh hưởng của alginate đến tính chất nhạy nhiệt của hydrogel thu được

Mật độ năng lượng kết dính (cohesive energy density) là thuật ngữ trong lưu biến để xác định mật độ liên kết nội phân tử trong vật liệu [68-69]. Mật độ năng lượng kết dính càng thấp, khả năng hình thành vật liệu khối càng khó [68]. Kết quả hình 4.1 A-B cho thấy mật độ năng lượng kết dính của pluronic F127 được cải thiện khi ghép lên mạch alginate. Mật độ năng lượng kết dính của dung dịch pluronic F127 (20wt%) ở 35°C là 28,8 Pa. Sau khi ghép lên mạch alginate (ACP với pluronic chiếm 87,5%), năng lượng kết dính được cải thiện gấp 1655 lần. Tuy nhiên, khi tỷ lệ alginate tăng lên (ACP với pluronic chiếm 83,33% khối lượng), mật độ năng lượng kết dính giảm. Mật độ năng lượng kết dính còn 158,84 Pa, giảm khoảng 300 lần so với APC từ pluronic 87,5%. Phân tử copolymer ghép ACP sẽ có hiện tượng cuộn tạo thành các hạt micelles do quá trình phân pha của phân tử pluronic. Alginate là phân tử ngậm nước, hình thành dạng “egg-box”. Khi pluronic được ghép lên mạch alginate, quá trình phân pha của phân tử pluronic dễ dàng hơn nhờ khoảng không gian do alginate tạo ra. Điều này chứng tỏ việc ghép pluronic lên mạch alginate tăng tính tương tác giữa các phân tử khi so sánh với pluronic F127 đơn lẻ. Tuy nhiên, khi tăng hàm lượng alginate, các hốc giam phân tử nước trong cấu trúc của alginate tăng lên đáng kể, khiến cho quá trình phân pha của pluronic trong cấu trúc trở nên khó khăn [65], do đó mật độ năng lượng kết dính bị giảm.



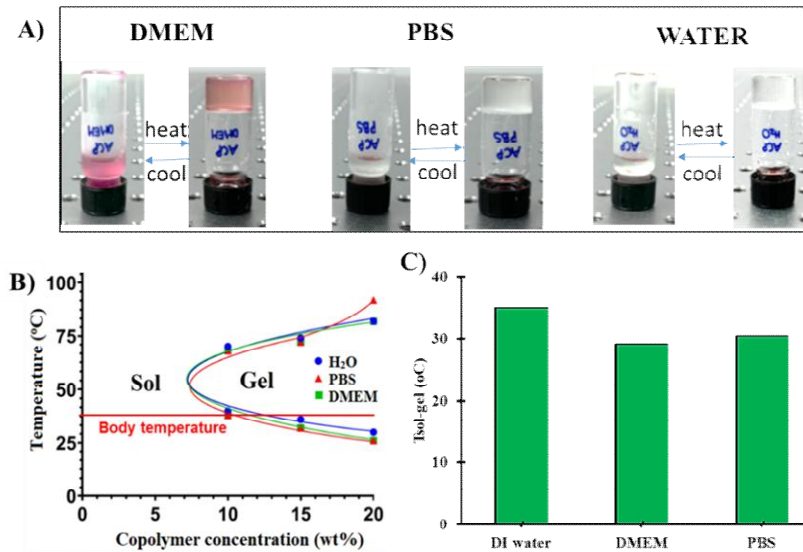
Hình 4.1: Các thông số đàn hồi nhớt của hai ACP (20 % wt/wt) với tỷ lệ pluronic là A) 83,33% hoặc B) 87,5%, thực hiện ở tần số góc cố định 1,0rad/s, ở 2 điều kiện nhiệt độ. Sự biến thiên của giá trị G' và G'' của ACP (hàm lượng pluronic là 87.5%) với các nồng độ khác nhau (wt/wt). C) 13%, D) 15%, E) 17% và F) 20%.

Bên cạnh mật độ năng lượng kết dính, thông số về độ nhớt của vật liệu ACP theo sự thay đổi về ứng suất cắt hoàn toàn phụ thuộc vào hàm lượng pluronic F127 trong mẫu copolymer ghép (Hình 4.2 A-B). Khi hàm lượng pluronic ghép ở mức 83.33%, vùng LVE tồn tại trong vùng biến dạng cắt cực thấp, dưới 2% khi ở nhiệt độ 45oC, và dưới 4% khi ở nhiệt độ 35oC. Bên cạnh đó, dựa trên giá trị G' và G'' , trạng thái vật liệu được kết luận là trạng thái chất lỏng. Nhiệt độ chỉ làm độ nhớt của vật liệu tăng lên. Nói cách khác, mật độ năng lượng kết dính các nanogel này chưa đủ để hình thành được mạng lưới cấu trúc 3D. Sự thay đổi biên độ của LVE đã được quan sát thấy khi pluronic F127 được tăng lên 87,5%. LVE được xác định ở 3,8% tại 35°C và 8,4% ở 10°C. Bên cạnh đó, biểu hiện giá trị G' và G'' của ACP với 87.5% pluronic cho thấy sự khác biệt khi so sánh với ACP với 83.33% ở cùng nhiệt độ, 35°C. Trong trường hợp với hàm lượng pluronic lớn hơn, giá trị modun tích lũy cao hơn so với giá trị modun tổn thất, chứng tỏ sự hình thành của cấu trúc hydrogel trong trường hợp này. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với mật độ năng lượng liên kết. Thêm vào đó, khi ở nhiệt độ 10°C, vật liệu này thể hiện trạng thái lỏng, chứng tỏ sự ảnh hưởng của nhiệt độ trong việc cung cấp động năng để tăng mật độ năng lượng kết dính của vật liệu. Để hiểu rõ tác động của alginate lên tính nhạy nhiệt của pluronic F127, nhiệt độ chuyển đổi sol-gel được xác nhận thông qua lưu biến học. Nhiệt độ chuyển đổi sol-gel của pluronic F127 ở nồng độ 20% wt/wt là 20.01°C. Sau khi kết hợp với alginate, nhiệt độ chuyển đổi sol-gel tăng lên. ACP với 83.33% pluronic cho thấy sự chuyển tiếp sol-gel ở nhiệt độ 44.89°C. Càng tăng sự hiện diện của pluronic F127 trong copolymer ghép, nhiệt độ chuyển tiếp càng dịch chuyển về phía pluronic F127. Cụ thể, ACP với 87.5%, nhiệt độ chuyển tiếp tại 35.1°C. Trên thực tế, khi tăng nồng độ alginate, hệ ACP trở lên ưa nước hơn do bản chất của alginate [39, 71]. Hàm lượng alginate cao, mật độ liên kết hydro với phân tử nước với sườn cấu trúc alginate tăng lên, dẫn đến năng lượng enthalpy cần để cho quá trình hydrate hóa cũng tăng lên [13, 72-73]. Nói cách khác, đặc tính của alginate gây cản trở quá trình tập hợp năng lượng kết dính do tương tác của các mixen của cấu trúc pluronic, do đó nhiệt độ cao là cần thiết để thúc đẩy quá trình hydrate hóa của pluronic, từ đó thúc đẩy quá trình hình thành cấu trúc hydrogel [72-73]. Bởi vì chỉ có ACP với 87,7% pluronic biểu hiện gel trong khoảng 30-37°C; do đó, copolymer ghép này đã được sử dụng để nghiên cứu thêm.

4.2.2 Ảnh hưởng của nồng độ copolymer đến quá trình chuyển sol-gel

Sự ảnh hưởng của nồng độ copolymer ghép đến nhiệt độ chuyển pha sol-gel được khảo sát thông qua phương pháp lưu biến học với phương trình động học độ nhớt đàn hồi theo nhiệt độ, và kết quả được trình bày trong hình 4.1.C. Nhiệt độ gây chuyển đổi sol-gel của dung dịch ACP phụ thuộc vào nồng độ ACP. Khi nồng độ copolymer tăng từ 13% (wt/wt) lên 20% (wt/wt), Tgel cảm ứng nhiệt độ sẽ giảm. Cụ thể, ở mức 13% (wt/wt), Tgel là 41,2 °C, và giảm xuống 35,1°C khi nồng độ ACP đạt 20% (wt/wt). Hơn nữa, giá trị tối đa của G' tuân theo sự tuyến tính của nồng độ, điều này được cho là do độ linh hoạt của copolymer ACP giảm ở nồng độ cao hơn [72,73]. Tăng nồng độ ACP dẫn đến mật độ tương tác kỵ nước cao hơn; do đó, dẫn đến mật độ năng lượng kết dính sẽ cao hơn, độ nhớt của vật liệu cũng được tăng lên. Hơn nữa, hoạt động của pluronic khi phản ứng với sự thay đổi nhiệt độ gây ra sự gấp nếp của khung alginate, tạo ra vùng kỵ nước hơn [74,75]. Tương tự như quá trình tạo gel do gây nhiễu trong các hệ thống Pluronic thuần túy, quá trình tạo gel nhiệt trong hệ thống ACP có thể là do sự di chuyển của các mixen trong túi gấp alginate [75]. Sau đó, nó có khả năng lưu trữ năng lượng biến dạng cũng như khử gel đẳng hướng [76]. Do đó, nồng độ ACP cao hơn đòi hỏi năng lượng nhiệt thấp hơn để tạo ra sự tổng hợp ACP; do đó, đạt được Tgel thấp hơn.

4.2.3 Ảnh hưởng của môi trường sinh lý đến quá trình chuyển sol-gel

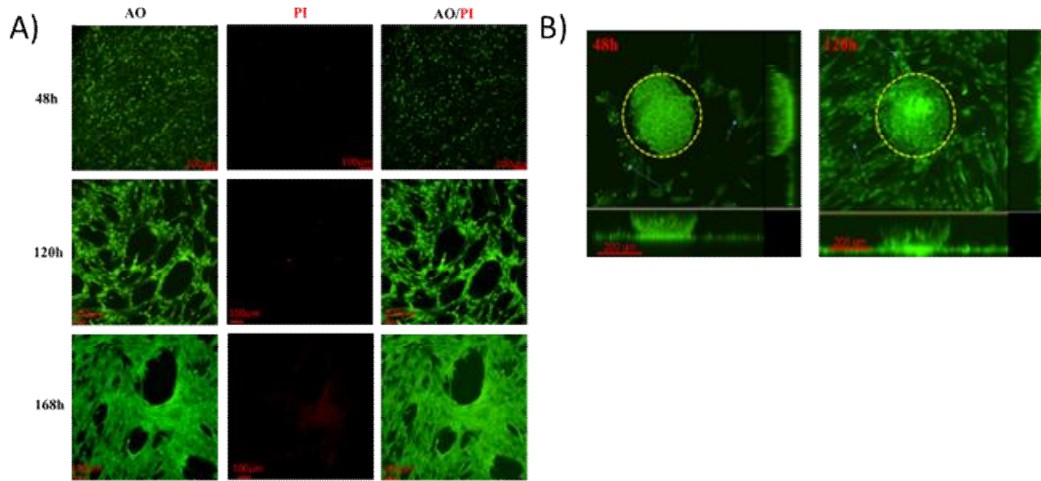


Hình 4.3: A) Hình ảnh của dung dịch ACP (20% wt/wt) pha trong các môi trường khác nhau (nước DI, DMEM và PBS) khi đặt ở 2 điều kiện nhiệt độ khác nhau, dưới 20°C và trên 30°C. B) Nhiệt độ chuyển tiếp sol-gel của hydrogel ACP được điều chế trong các môi trường khác nhau (nước DI, DMEM và PBS) bằng phương pháp ống đảo ngược. C) Điểm chuyển pha, Tgel, xác định bằng phương pháp lưu biến.

Bên cạnh sự ảnh hưởng của nồng độ, ảnh hưởng của môi trường sinh lý lên quá trình hình thành hydrogel của hệ ACP được khảo sát, và kết quả được trình bày trong hình 4.3. Ở nồng độ 20% (wt/wt), ACP phân tán tốt trong các môi trường sinh lý (DMEM và PBS) lẫn trong môi trường nước DI và để thể hiện hiện tượng chuyển đổi sol-gel khi có sự thay đổi của nhiệt độ. Đồng thời, không có sự khác biệt về hiện tượng chuyển tiếp sol-gel được ghi nhận ở các nồng độ ACP khác nhau (hình 4.3B). Về mặt lưu biến, sự thay đổi về dung môi phân tán ACP gây ra biến đổi nhỏ về giá trị Tgel của ACP (hình 4.3 C). ACP (20% wt/wt) phân tán trong nước DI có giá trị Tgel tại 35,1°C. Tuy nhiên, trong môi trường sinh lý (PBS, 7.4 hoặc DMEM, điểm Tgel diễn ra ở nhiệt độ thấp hơn khi so với môi trường nước DI. Điều này có thể là do sự tương tác của mạch alginate với ion trong môi trường sinh lý [60,65, 77-78]. Khi ACP được phân tán trong các môi trường này, ion sẽ khuếch tán vào mạng lưới ACP và tạo thành các cầu nối ion, giảm enthalpy của quá trình hydrate hóa, quá trình phân pha của pluronic F127 trở nên dễ dàng hơn [77-78]. Nói cách khác, do các tác nhân cation trong môi trường đậm, mật độ nước xung quanh Pluronic bị giảm đi [79], các phân đoạn PPO trở nên kỵ nước hơn và ít phân cực hơn [80], tạo nền tảng cho việc thúc đẩy quá trình tạo gel. Do đó, Tgel thấp hơn. Trong phạm vi nồng độ và tất cả dung môi được thử nghiệm, ACP hydrogel (20% wt/wt) có thể là chất liệu phù hợp với ứng dụng phát triển vật liệu tái tạo mô.

4.3 Đánh giá khả năng mang tế bào của hệ hydrogel ACP

Để chứng minh khả năng ứng dụng của hệ hydrogel ACP trong tái tạo mô, các nguyên bào sợi được đưa vào hệ hydrogel để đánh giá về khả năng sống và khả năng duy trì đặc tính của nguyên bào sợi. Kết quả được trình bày trong hình 4.4. Sau 48h nuôi cấy, khả năng sống sót của nguyên bào sợi được đánh giá thông qua phương pháp nhuộm AO/PI. Kết quả cho thấy, tỷ lệ sống của nguyên bào sợi đạt $96,7 \pm 3,5\%$. Theo tiêu chuẩn đánh giá về tính an toàn vật liệu (ISO 10993-1:2018), vật liệu thiết kế được coi là không gây độc. Để chứng minh ACP cung cấp môi trường thuận lợi cho tế bào phát triển, sự phát triển của nguyên bào sợi trong khối hydrogel được quan sát trong 168h. Nguyên bào sợi phân bố đều trong mạng lưới cấu trúc của ACP hydrogel sau 48h. Sau 120h, các nguyên bào sợi phát triển, bám lên thành cấu trúc của hydrogel. Toàn cấu trúc hydrogel được che phủ bởi nguyên bào sợi sau 168h (hình 4.4 A). Hơn nữa, hình thái của nguyên bào sợi nuôi cấy bên trong hydrogel ACP là cấu trúc đặc trưng khi nuôi cấy 2D, và hiếm khi thấy trong trường hợp nuôi cấy trong môi trường 3D [81]. Sự biểu hiện hình thái học đặc trưng của nguyên bào sợi trong trường hợp nuôi cấy 3D chỉ được báo cáo với các hệ alginate hydrogel có biến đổi cấu trúc bề mặt với RGD peptide [82] hoặc các hệ hydrogel hình thành bằng vật liệu ECM như gelatin [83] hoặc collagen [84]. Trong nghiên cứu này, cấu trúc nguyên bào sợi được thể hiện ở thời điểm 120h và 168h, xác nhận hệ hydrogel ACP có môi trường phù hợp để tế bào có thể bám lên và phát triển.



Hình 4.4: A) Nguyên bào sợi từ da người được cấy trong ACP hydrogel ở 48 giờ, 120 giờ và 168 giờ. Các tế bào được xử lý bằng phương pháp nhuộm kép AO/PI. Kích thước hình: 100 μ m, Độ phóng đại 200x. B) Hình ảnh huỳnh quang theo trục Z của tế bào di chuyển ra khỏi giọt hydrogel (20 μ l). Vòng tròn thể hiện sự hình thành của cụm ACP, các mũi tên màu xanh được sử dụng để xác định tế bào di chuyển khỏi hệ hydrogel.

Bên cạnh việc cung cấp môi trường phù hợp cho tế bào phát triển, tính toàn năng của nguyên bào sợi sau khi được tải vào hệ hydrogel được kiểm chứng thông qua đánh giá sự di chuyển của nguyên bào sợi từ hệ hydrogel và khả năng hình đơn lớp. Kết quả hình 4.4B cho thấy, sau khi giọt hydrogel chứa nguyên bào sợi được tải vào giếng nuôi cấy, sự phân rã cấu trúc giọt hydrogel được ghi nhận tại thời điểm 48h. Các tế bào thoát ra cũng bám lên bề mặt đĩa và bắt đầu hình thành hình thái học đặc trưng của nguyên bào sợi. Ở thời điểm 120h, mảng tế bào đơn lớp được hình thành xung quanh giọt hydrogel. Dựa trên quan sát này, điều này có thể xác nhận rằng cấu trúc hydrogel ACP cung cấp môi trường vi mô thuận lợi cho sự kết dính, lan rộng và tăng sinh của tế bào. Do đó, hydrogel ACP có thể được áp dụng để tái tạo mô cùng liệu pháp tế bào [85].

4.4 Khả năng kết hợp đa hợp chất hoạt tính trong hydrogel trong ứng dụng hỗ trợ quá trình chữa lành vết thương mô hình đái tháo đường

4.4.1 Cơ sở lý thuyết để phát triển hệ hydrogel hoạt tính

Độ cứng của ACP hydrogel (20% wt/wt) là 4-6kPa (qua lưu biến học). Độ cứng của hydrogel rất quan trọng trong việc lựa chọn ứng dụng của vật liệu trong tái tạo mô. Độ cứng của hydrogel ảnh hưởng đến quá trình biểu hiện của tế bào, đặc biệt là ảnh hưởng đến quá trình biệt hóa của tế bào gốc trung mô thành tế bào đích tác dụng. Ví dụ, neurons và tế bào biểu mô có thể duy trì được cấu trúc cũng như chức năng của chúng nếu độ cứng của hydrogel nằm trong khoảng 0.1 kPa to 1.1 kPa [45]. Tế bào gốc trung mô biệt hóa thành nguyên bào sợi nếu độ cứng của ma trận nằm trong khoảng 4-6kPa [46], tuy nhiên chúng sẽ chuyển thành tế bào sụn hoặc nguyên bào xương nếu độ cứng của hydrogel trên 40kPa [47]. Với độ cứng của ACP hydrogel, ứng dụng phù hợp là làm vật liệu tái tạo mô mềm. Do đó, mục tiêu tiếp theo, phát triển hệ hydrogel chức năng thúc đẩy, hỗ trợ quá trình chữa lành vết thương của bệnh lý đái tháo đường.

Quá trình "khép miệng" hay làm lành một vết thương được gọi là quy trình ba pha chồng lấp nối tiếp gồm: viêm, tăng sinh và tái cấu trúc. Cơ chế chữa lành vết thương liên quan đến một số yếu tố sinh học và phân tử, chẳng hạn như đông máu, viêm, hay thay thế mô bị thương bằng mô mới do cơ thể sản sinh. Để định hướng đúng về quá trình hỗ trợ chữa lành vết thương, các yếu tố sinh học thường được bổ sung. Với sự hiểu biết về vết thương bệnh nhân đái tháo đường, sự thiếu hụt nitric oxide là một trong các nguyên nhân khiến quá trình lành vết thương bị kéo dài. Khi bị thương, Nitric oxide được tạo thành từ eNOS để ngăn tiểu cầu tập kết tại thành mạch. Nitric oxide có tác dụng trong điều hòa các yếu tố cytokine kích thích quá trình viêm bao gồm interleukins, monocytes, và neutrophils với cơ chế điều xuôi dòng (downstream) trong kích thích sự di chuyển của các tế bào sừng. Nitric oxide có tác động điều hòa tăng cường (upstream) nồng độ Matrix Metalloproteinases (MMP), điều chỉnh quá trình di chuyển và bám của tế bào bạch cầu trung tính trên biểu mô bị tổn thương, tạo tín hiệu kích thích di chuyển của các tế bào leukocyte, thúc đẩy quá trình viêm và làm sạch khu vực vết thương. Các nguyên bào sợi tiến vào, và pha tăng sinh bắt đầu. Pha này được đặc trưng bởi việc tích lũy mô liên kết, các nguyên bào sợi tiến vào và chế tiết các protein nền, chủ yếu là collagen. Các phân tử collagen được lắp ráp thành một cấu trúc, sản sinh mạch xây ra, và các cạnh vết thương được khép lại với nhau. Khi vết thương đã đóng miệng thì việc tái cấu trúc lại hệ thống mô, tế bào da vẫn được tiếp tục trong một thời gian sau đó. Với vết thương ở bệnh nhân đái tháo đường, quá trình làm

lành vết thương không diễn tiến trong một khoảng thời gian nhất định như bình thường, do đó cần phải được can thiệp hỗ trợ.

Arginine là một amino acid tiền chất tham gia tạo thành nitric oxide (NO). Khi có sự hiện diện của NADPH, enzyme NOS sử dụng L-arginine tạo ra nitric oxide. Do đó, bổ sung arginine vào hydrogel cung cấp và bổ sung đầy đủ hàm lượng nitric oxide gia tăng lưu lượng máu đến vết thương giúp thúc đẩy quá trình lành vết thương. Tuy nhiên, nitric oxide là chất kém bền, và dễ dàng kết hợp các gốc tự do tại vị trí mô tổn thương và tạo thành hợp chất có tính oxy hóa mạnh peroxit, ONOO-. Hợp chất dẫn đến stress oxy hóa, đồng thời gây tổn thương với mô mới hình thành, khiến quá trình viêm kéo dài, vết thương trở nên lâu lành đặc biệt ở bệnh nhân có bệnh nền như đái tháo đường.

Để khắc phục được nhược điểm trên, cách thức kết hợp với chất có khả năng ức chế gốc tự do tạo điều kiện duy trì sự tồn tại của nitric oxide tại vị trí mô tổn thương, tận dụng các lợi ích vốn có của L-arginine trong quá trình hỗ trợ lành vết thương. Các chất có khả năng ức chế gốc tự do có nguồn gốc từ hoạt chất thứ cấp tách chiết từ thảo dược nhận được nhiều chú ý. Trong đó, resveratrol- hoạt chất chiết từ hạt nho nhận được nhiều sự chú ý trong những năm gần đây. Resveratrol là hợp chất polyphenol, có khả năng vô hiệu hóa các gốc tự do sản sinh từ tế bào, từ đó giúp giảm và ngăn chặn quá trình hình thành stress oxy hóa, tạo tổn thương với mô. Bên cạnh đó, resveratrol còn được biết đến là nhân tố tăng thúc đẩy enzyme eNOS trong tế bào biểu mô sản sinh nitric oxide. Như vậy, có thể thấy kết hợp L-arginine và resveratrol sẽ tạo được hiệu ứng cộng hợp trong việc duy trì cân bằng nội môi của tế bào và kéo dài quá trình tồn tại của nitric oxide để thu được lợi ích tối đa trong cân bằng yếu tố oxy hóa ở mô tổn thương.

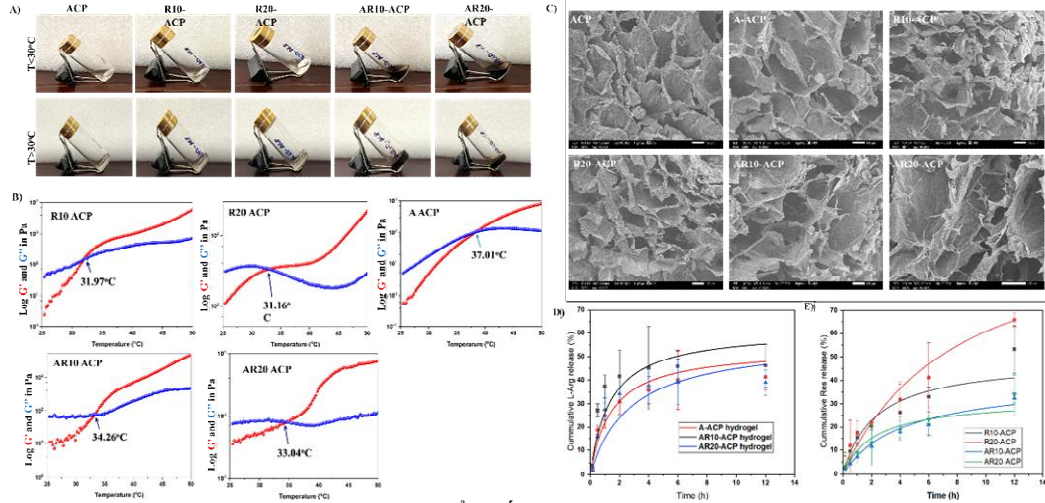
4.4.2 Xác định nồng độ hoạt chất

Để xác định được nồng độ hoạt chất (L-arginine và resveratrol) nên đưa vào hệ hydrogel, các hệ đơn được điều chế trước. Với resveratrol, đây là chất kém tan trong nước, do vậy, nồng độ tối đa resveratrol tải được trong hệ được xác định đầu tiên. Kết quả phân tích cho thấy, hệ ACP mang được tối đa được 22.12 ± 1.26 % resveratrol (tức $221.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ ACP copolymer). Độc tính của hệ R-ACP (resveratrol- ACP hydrogel) ở hàm lượng resveratrol tối đa không gây độc tính đối với nguyên bào sợi. Thêm vào đó, tải resveratrol vào hệ ACP không làm thay đổi khả năng chuyển pha sol-gel theo nhiệt độ của hệ. Do đó, hệ ACP được thiết kế với resveratrol ở nồng độ 50 và $100 \mu\text{g}/\text{mg}$ ACP polymer, ký hiệu là R10-ACP và R20 ACP. Đối với L-arginine, hàm lượng arginine khảo sát nằm trong khoảng từ 50-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tuy nhiên, khi ACP hydrogel được tải với L-arginine (A-ACP) có hiện tượng gây độc với nguyên bào sợi khi sử dụng ở nồng độ cao. Mật độ cũng như hình thái học của nguyên bào sợi nuôi cấy trên nền ACP gel có bổ sung L-arginine ở nồng độ 50 hay 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tương tự như mẫu chứng. Tuy nhiên khi nồng độ L-arginine tăng lên 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, nguyên bào sợi cho thấy sự thay đổi về hình thái học, trạng thái được ghi nhận khi tế bào bị stress [196]. Tín hiệu apoptotic (tín hiệu tế bào chết theo chương trình) biểu hiện nhiều ở các mẫu nguyên bào sợi nuôi cấy với hydrogel chứa L-arginin ở nồng độ cao. Hydrogel chứa arginine (A-ACP hydrogel) cho thấy sự thay đổi khoảng pH của môi trường nuôi cấy. Ở nồng độ L-arginine ở 50 hay 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, giá trị pH nằm trong khoảng 7.2-7.4, trong khi giá trị pH >8 được ghi nhận khi nồng độ L-arginine vượt ngưỡng 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Các tài liệu đã chứng minh sự ảnh hưởng của pH của màng băng vết thương lên quá trình lành của vết thương [197-198]. Môi trường tại vết thương quá kiềm giảm sự kết tập của tế bào, do đó kéo dài quá trình lành vết thương, đặc biệt là vết thương khó lành như vết thương trên bệnh nền đái tháo đường [197]. Trên cơ sở này, nồng độ của L-arginine sử dụng trong toàn bộ nghiên cứu là $100 \mu\text{g}/\text{ml}$. Đối với hệ tải kép, ký hiệu là AR 10-ACP (resveratrol: 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ACP copolymer, L-arginine: $100 \mu\text{g}/\text{ml}$) và AR20- ACP (resveratrol: 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ACP copolymer, L-arginine: $100 \mu\text{g}/\text{ml}$) được thiết lập.

4.4.3 Ảnh hưởng của hoạt chất lên đặc tính nhạy nhiệt của hệ ACP hydrogel.

Theo phương pháp đảo ngược ống nghiệm, cả AR10-ACP và AR20- ACP đều cho thấy khả năng chuyển đổi pha sol-gel theo nhiệt độ, cụ thể mẫu chuyển thành hydrogel khi nhiệt độ trên 30°C và chuyển thành dạng lỏng khi được đặt trong môi trường lạnh (hình 4.5A). Kết quả này được khẳng định lại trong phép đo lưu biến (hình 4.5 B). Tuy nhiên, khi đưa hoạt chất vào trong gel, tính chất lưu biến của vật liệu ACP hydrogel bị ảnh hưởng. Việc tải resveratrol vào trong hệ, nhiệt độ chuyển pha (Tgel) diễn ra ở nhiệt độ thấp hơn. Nhiệt độ chuyển pha của ACP hydrogel từ 35.01°C chuyển xuống 31.97°C khi có mặt 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ resveratrol (R10-ACP) trong cấu trúc (hình 4.5B). Khi resveratrol ở hàm lượng cao hơn, 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (R20-ACP), nhiệt độ chuyển pha ở 31.16°C . Thêm vào đó, giá trị modun tích lũy cũng tăng lên đáng kể khi resveratrol được tải vào hệ, điều này tương tự với các nghiên cứu trước về việc tải các hoạt chất có tính kỵ nước vào hydrogel [12, 50, 202]. Resveratrol là hợp chất kém tan trong nước, do vậy, khi đưa vào hệ, mật độ kỵ nước sẽ được tăng lên dẫn đến khoảng cách giữa các PPO tập kết giảm, nhiệt độ cần thiết để thúc đẩy quá trình hydrate hóa giảm, nhiệt độ chuyển pha giảm trong khi giá trị modun tích lũy được tăng lên [12, 202]. Ngược lại, tải L-arginine, nhiệt độ cần để quá trình chuyển pha diễn ra tăng lên (Hình 4.5B). L-arginine là amino acid ưa nước, và có điện tích dương [134]. L-arginine tạo tương tác tĩnh điện với nhóm carboxylate trên alginate trong cấu trúc ACP. Sự giảm của giá trị modun tích lũy của ACP hydrogel sau khi tải L-arginine chứng tỏ tương tác tĩnh điện đủ mạnh để can thiệp vào quá trình hydrate hóa của nhóm PPO

[202], do đó nhiệt độ cao cần thiết để thúc đẩy quá trình để tạo hiện tượng chuyển pha sol-gel. Đối với hệ kép, nhiệt độ chuyển pha của hệ thể hiện sự điều hòa giữa arginine và resveratrol. Nhiệt độ chuyển pha của R10-ACP tăng từ 31.97 °C đến 34.04 °C khi L-arginine được tải vào cùng (AR10-AC). Điều này cũng tương tự với mẫu AR20- ACP. Chứng tỏ, resveratrol có thể làm giảm sự ảnh hưởng của tương tác tĩnh điện giữa L-argininien và alginate, làm nhiệt độ chuyển pha của R-ACP hydrogel phù hợp với các ứng dụng y sinh.



Hình 4.5: A) Hình ảnh khảo sát quá trình chuyển tiếp sol-gel thuận nghịch của ACP hydrogel với các chất tải khác nhau trong ACP hydrogel và B) nghiên cứu tính lưu biến trong điều kiện nhiệt độ dao động (biến dạng =1% và tần số = 10rad/s): A-ACP hydrogel ; Hydrogel R10-ACP; R20 - hydrogel ACP; AR10 – hydrogel ACP; AR20 – hydrogel ACP. C) Hình thái của các hydrogel này thu được bằng kỹ thuật SEM với độ phóng đại = 100, SED = 10KeV. Nghiên cứu quá trình phóng thích D) arginine và E) resveratrol từ ACP hydrogel được theo dõi trong 12 giờ đầu tiên.

Cấu trúc xốp của hydrogel ACP được duy trì ổn định mặc dù có bổ sung L-arginine, resveratrol hay cả hai. Do sự khác biệt về tính chất của arginine và resveratrol, người ta đã quan sát thấy hình thái nhỏ gọn liên kết với các lỗ chân lông khác nhau. Với việc bổ sung L-arginine, một số bó fibril lộ ra trong kênh xuyên thấu, bộc lộ liên kết phối hợp ion giữa xương sống alginate và L-arginine. Trong trường hợp resveratrol, sự sắp xếp nội bộ của mạng ACP vẫn được giữ nguyên; tuy nhiên, có cấu trúc xốp nhỏ gọn hơn cấu trúc nguyên chất. Đây có thể là kết quả của việc bổ sung kiểu liên phân tử kỵ nước của resveratrol và vùng kỵ nước của mạng lưới hydrogel ACP, do đó tạo ra liên kết ngang chặt chẽ hơn giữa các mixen này.

4.4.4 Đánh giá quá trình giải phóng hoạt chất

Cấu hình giải phóng của cả arginine và resveratrol đã được nghiên cứu rộng rãi (Hình 4.5D-E). Các mô hình động học giải phóng thuốc từ nền polyme [90,91] như bậc 0, bậc 1, Higuchi, Hixson-Crowell, Korsmeyer-Peppas và dạng biến tính theo thời gian được trình bày trong bảng 4.1. Cả arginine và resveratrol đều được giải phóng tương đối nhanh trong 2 giờ đầu tiên và sau đó cho thấy sự giải phóng kéo dài. Như được trình bày trong bảng A1, Korsmeyer-Peppas đã được sửa đổi có tiềm năng lớn hơn để được sử dụng làm mô hình dự đoán cho Arginine từ ACP hydrogel. Đáng chú ý, L-arginine là phân tử ưa nước. Các phân tử L-arginine được ưu tiên định vị tại hoặc gần bề mặt hydrogel. Do đó, khoảng 30-40% arginine đã bị rò rỉ ra khỏi hệ thống ACP trong 2 giờ ngâm. Tương tự, arginine từ hệ thống tải kép, Korsmeyer-Peppas đã được sửa đổi, hoạt động tốt hơn tất cả các mẫu đã được thử nghiệm. Việc sử dụng resveratrol cùng với L-arginine không có ảnh hưởng đến thời gian giải phóng ban đầu (t_{lag} cho A-ACP, AR10-ACP và AR20-ACP lần lượt là 0,23 giờ, 0,26 giờ và 0,24 giờ). Số mũ khuếch tán n đều dưới 0,45 trong mọi trường hợp, xác nhận điều tương tự trong cơ chế giải phóng L-arginine. Điều thú vị là, giá trị hệ số động k của arginine từ hệ thống kép thấp hơn nhiều so với hệ thống đơn, xác nhận ảnh hưởng của resveratrol trong việc giảm tốc độ giải phóng L-arginine. Đối với hệ thống resveratrol, bằng cách so sánh giá trị Tiêu chí thông tin Akaike (AIC), mô hình Zero-order và Korsmeyer-Peppas là mô hình được ưa thích. Bởi vì tất cả số mũ khuếch tán n của R10-ACP và R20-ACP đều nằm trong khoảng 0,43-0,85, cho thấy rằng sự giải phóng resveratrol bị ảnh hưởng bởi cả ma trận khuếch tán và tương n[90]. Các mô hình giải phóng thuốc đặc mô tả hành vi giải phóng resveratrol từ hệ thống nạp kép, AR10-ACP và AR20-ACP, tương tự như hydrogel R10-ACP và R20-ACP. Ngoài ra, số mũ khuếch tán được đề xuất rằng việc giải phóng resveratrol từ nhiều hệ thống kép phụ thuộc vào khuếch tán phi Fickian (0,43<n<0,85) 91. Tuy nhiên, hằng số vận chuyển (K) đối với hệ thống nạp resveratrol đơn lẻ cao hơn nhiều so với resveratrol từ hệ thống kép. Hiện tượng này tương tự như việc giải phóng L-arginine từ hệ thống kép. Đối với hệ thống R-ACP, mật độ vùng

ky nước trong hydrogel ACP tăng lên sau khi đóng gói resveratrol [10]. Sau khi ngâm trong dung dịch đệm giải phóng, nước khuếch tán vào mạng, gây ra quá trình hydrat hóa các vùng này; do đó, resveratrol có thể dễ dàng thoát khỏi [71]. Sự hỗ trợ của L-arginine trong cấu trúc vi mô có thể cung cấp thêm một hàng rào chắn cho resveratrol. Do đó, cấu hình giải phóng resveratrol trong hệ thống kép đã được điều chỉnh một cách phù hợp.

Bảng 4.1: Động học quá trình giải phóng

Mô hình giải phóng	Biological cues		Zero Order	First Order	KP*		Higuchi	Hixson-Crowell	Modified KP*			
	Sample	R ²			R ²	R ²			K	n	R ²	n
Resveratrol	AR20-ACP	0,95	0,73	0,99	8,907	0,54	0,99	0,82	0,79	0,53	0,003	8,94
	AR10-ACP	0,99	0,72	0,99	7,200	0,62	0,93	0,82	0,79	0,61	0,002	7,22
	R20-ACP	0,96	0,59	0,94	13,03	0,68	0,88	0,7617	0,94	0,48	0,14	18,09
	R10-ACP	0,95	0,62	0,96	11,66	0,67	0,90	0,76	0,92	0,47	0,13	15,19
Arginine	AR20-ACP	0,45	0,28	0,74	n/a	0,66	0,49	0,33	0,98	0,24	0,15	24,307
	AR10-ACP	0,57	0,31	0,76	n/a	0,58	0,62	0,39	0,99	0,26	0,15	24,67
	A-ACP	0,37	0,23	0,67	n/a	0,49	n/a	0,27	0,98	0,23	0,15	32,57
	Sample	R ²	R ²	R ²	K	n	R ²	R ²	R ²	n	t _{lag}	K

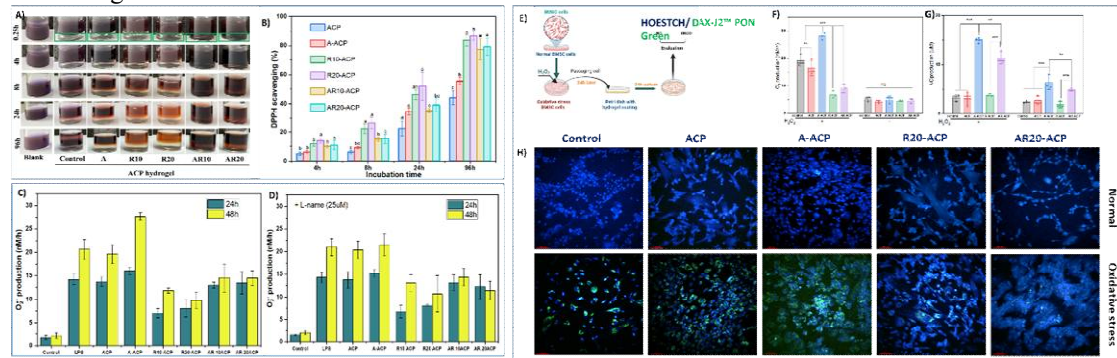
*KP: Korsmeyer-Peppas; n/a: non observation.

4.4.2 Tác dụng hiệp lực của L-arginine và resveratrol trong hoạt tính chống oxy hóa

4.4.2.1 L-arginine kiểm soát tốc độ triệt tiêu gốc tự do của resveratrol

Thử nghiệm gốc 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH) được thực hiện để kiểm tra khả năng triệt tiêu gốc tự do của hydrogel chức năng bằng cách kiểm tra nồng độ gốc tự do của DPPH tại bước sóng 517 nm, và kết quả được trình bày trong hình 4.6 A-B. Do có sự tham gia của các phân tử sulphhydryl trong cấu trúc copolyme ACP, là chất loại bỏ gốc tự do hiệu quả [92,93], hydrogel ACP thu được thể hiện khả năng chống oxy hóa đầy hứa hẹn. Kết quả cho thấy rằng việc bổ sung resveratrol hoặc L-arginine cho thấy khả năng triệt tiêu gốc tự do vượt trội hơn so với ACP hydrogel (Hình 4.6A-B). Sự kết hợp giữa L-arginine và resveratrol mang lại chiến lược cân bằng quá trình tiêu diệt gốc tự do. Với resveratrol đơn lẻ, hoạt động triệt tiêu diễn ra mạnh tại thời điểm 8 giờ. Bổ sung L-arginine, tốc độ loại bỏ gốc tự do của hệ resveratrol hydrogel thấp hơn gần hai lần so với hệ thống đơn lẻ ($p=0,00248$, R10-ACP so với AR10-ACP; $p=0,00493$, R20-ACP so với AR20-ACP). Hoạt tính triệt tiêu gốc tự do của AR-ACP hydrogel và R-ACP hydrogel có hiệu quả tương đương nhau sau 96 giờ ($p=0,11688$, R10-ACP so với AR10-ACP; $p=0,62544$, R20-ACP so với AR20-ACP). Arginine không ức chế công dụng của resveratrol trong tiêu diệt gốc tự do, mà không chế tốc độ tiêu diệt của resveratrol. Nhiều nghiên cứu chứng minh tầm quan trọng của các tác nhân gốc tự do trong việc chữa lành vết thương [128-129]. Một mặt, một lượng thấp các tác nhân gốc tự do hỗ trợ bảo vệ vết thương chống lại nhiễm trùng vi khuẩn và thúc đẩy quá trình tạo mạch bằng cách kích hoạt nhiều con đường truyền tín hiệu tế bào [127]. Mặt khác, việc sản xuất nhiều ROS ở bệnh nhân đái tháo đường sẽ cản trở quá trình chữa lành vết thương bằng cách ngăn chặn quá trình trao đổi chất sinh lý bình thường [94-97]. Nếu hàm

lượng ROS quá cao, vết thương thường trở nên không lành và mãn tính, khiến việc điều trị trở nên khó khăn [10-21]. Do đó, không chế tốc độ loại bỏ gốc tự do, sẽ tạo điều kiện tối ưu trong quá trình làm lành vết thương.



Hình 4.6: A) Màu của dung dịch DPPH (0,5 mM) thêm vào khi ủ với các hydrogel ACP khác nhau ở các thời điểm khác nhau (khung màu xanh lá cây là lớp hydrogel). B) Phần trăm DPPH tự do được loại bỏ bằng hydrogel ACP so với mẫu không được xử lý. Hàm lượng superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) tạo ra trong tế bào RAW 264,7 ủ với hydrogel ACP ở hai thời điểm: 24h và 48h không có C) L- name (chất ức chế NOS) và D) có L-Name. Tác dụng của hydrogel AR-ACP đối với mô hình tế bào stress oxy hóa của quá trình oxy hóa do H_2O_2 gây ra. E) Hình minh họa mô hình tế bào. Nồng độ F) superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) và G) NO giải phóng từ tế bào bình thường và tế bào bị stress oxy hóa khi ủ với các ACP hydrogel sau 24 giờ (n = 3 thí nghiệm riêng lẻ). H) Các tế bào được nhuộm bằng chất chỉ thị DAX-J2 PON (Xanh) đặc trưng cho peroxynitrite ($ONOO^-$) và Hoesch (Xanh lam) cho nhân tế bào. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng trung bình \pm SEM. Sự khác biệt đáng kể được phát hiện bằng ANOVA một chiều với thử nghiệm so sánh nhiều lần của Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Khoảng trống ACP (chúng), A (A-ACP), R10 (R10-ACP), R20 (R20-ACP), AR10 (AR10-ACP), AR20 (AR20-ACP).

4.4.2.2 Resveratrol ngăn chặn việc tạo ra superoxide anion trong các tế bào miễn dịch bị kích viêm

$O_2^{\cdot-}$ là ROS đầu tiên được tạo ra bởi các đại thực bào khi tiếp xúc với nhiều loại kích thích kích hoạt (ví dụ: LPS, cytokine, các yếu tố tăng trưởng và các mảnh màng vi khuẩn) [94,96,98]. Do đó, để xác minh liệu hydrogel được thiết kế có thể có khả năng loại bỏ hoạt động ROS nội bào hay không, việc tiêu thụ sản phẩm $O_2^{\cdot-}$ trong các tế bào Raw 264,7 được kích thích viêm được thực hiện. Sự hình thành $O_2^{\cdot-}$ rất cao trong các tế bào đại thực bào bị kích thích (Hình 4.6C). Sau 24 giờ kích thích bằng LPS, đại thực bào sản sinh ra lượng $O_2^{\cdot-}$ tương đối cao ($14,2 \pm 1,1$ nM/h), cao hơn khoảng 8 lần so với tế bào không được kích thích ($p < 0,05$), sau đó tăng lên tới $20,6 \pm 2,2$ nM/h lúc 48h ($p < 0,01$). Tác dụng của hydrogel ACP đối với việc sản xuất $O_2^{\cdot-}$ có thể bị bỏ qua do các giá trị không thể phân biệt được so với LPS đối chứng, trong khi các mẫu ACP khác gây ra tác động mạnh lên quá trình tổng hợp chất tự do này. Có sự gia tăng đáng kể về sản xuất $O_2^{\cdot-}$ trong các tế bào được kích thích khi được ủ bằng hydrogel A-ACP, từ $16,1 \pm 0,8$ nM/h ở 24 giờ lên $27,7 \pm 0,9$ nM/h ở 48 giờ, tương đương 134,3% ở các tế bào được kích thích bằng LPS ($p < 0,05$). Ngược lại, hydrogel ACP với resveratrol dẫn đến giảm sản xuất $O_2^{\cdot-}$ một cách rõ rệt. Nồng độ $O_2^{\cdot-}$ trong cả hydrogel R10-ACP và hydrogel R20-ACP đều giảm một nửa so với hydrogel A-ACP ($p < 0,05$) hoặc tế bào được kích thích ($p < 0,05$) sau 24 giờ. Điều thú vị là thời gian nuôi cấy dài hơn dường như không ảnh hưởng đến nồng độ $O_2^{\cdot-}$ trong trường hợp ACP hydrogel được bổ sung resveratrol ($p > 0,05$). Có lẽ là nhờ tác dụng của resveratrol, hydrogel AR-ACP kếp đã ức chế lượng $O_2^{\cdot-}$ so với hydrogel ACP mang L-arginine đơn lẻ. Từ 24h đến 48h, lượng $O_2^{\cdot-}$ trong môi trường tế bào cấy trên nền AR10-ACP hydrogel hoặc AR20-ACP hydrogel duy trì ở mức khoảng 14–15 nM/h. Để xác định rõ hơn tầm quan trọng của resveratrol trong việc làm giảm quá trình sản xuất anion superoxide trong các đại thực bào được kích thích nội độc tố vi khuẩn được nuôi cấy bằng A-hydrogel, chất cạnh tranh của L-arginine (L-NAME) - được gọi là chất ức chế NOS [99] đã được thêm vào môi trường nuôi cấy (Hình 4.6D). Kết quả cho thấy rằng đối với tế bào RAW 264.7 được nuôi với R-ACP hoặc ACP, nồng độ $O_2^{\cdot-}$ gần như không có sự khác biệt khi bổ sung thêm L-NAME. Tuy nhiên, trong trường hợp ACP với L-arginine, nồng độ $O_2^{\cdot-}$ tăng lên đáng kể. Kết quả này đã xác nhận tác dụng phụ về việc sử dụng L-arginine trong việc chữa lành vết thương [100]. Điều quan trọng là chất ức chế NOS không ảnh hưởng đến nồng độ $O_2^{\cdot-}$ từ các nhóm hydrogel AR-ACP. Mức sản xuất $O_2^{\cdot-}$ nằm trong khoảng 14–15 nM/h, tương tự như mức được thể hiện khi bổ sung chất không ức chế trong môi trường. Các kết quả thu được cho thấy rằng việc bổ sung resveratrol có thể giúp kiểm soát ROS ngoại bào gây ra bởi sự sẵn có của L-arginine ngoại bào trong điều trị.

4.4.2.3 Resveratrol giúp kéo dài sự ổn định của oxit nitric được tạo ra từ L-arginine trong tình trạng stress oxy hóa

Mô hình tế bào gây stress oxy hóa đã được thiết lập để hỗ trợ bằng chứng về sức mạnh hiệp đồng của L-arginine và resveratrol trong quá trình chống oxy hóa. Các tế bào BMSC được xử lý bằng chất oxy hóa mạnh (H_2O_2) trong 24 giờ để xử lý stress oxy hóa trong các tế bào BMSC (Hình 4.6E). Sau khi cấy truyền các tế bào đã được thiết lập, $O_2^{\bullet-}$ được sản xuất quá mức trong các tế bào stress ($p > 0,05$) (Hình 4.6F). Phù hợp với kết quả DPPH, sự hình thành $O_2^{\bullet-}$ yếu đi dần so với các tế bào stress không được xử lý ($p = 0,0023$). Tương tự như các tế bào đại thực bào kích hoạt LPS được xử lý bằng hydrogel A-ACP, nồng độ $O_2^{\bullet-}$ nội bào tăng đáng kể trong các tế bào bị stress oxy hóa ($28,1 \pm 2,2$ nM/h). Việc sử dụng resveratrol cùng với L-arginine trong hydrogel trị liệu kết hợp có tác dụng nổi bật, tương tự như tác dụng của hydrogel nạp đơn resveratrol. Nồng độ NO nội sinh được giải phóng từ tế bào BMSC được theo dõi và kết quả ghi nhận trong hình 4.6G. Mặc dù có bằng chứng về sự kích thích của resveratrol để đáp ứng với NO synthase (eNOS) [101] nội mô, sự giải phóng NO nội sinh khỏi stress oxy hóa sBMSC được điều trị bằng R-ACP hydrogel có thể so sánh với các tế bào không được điều trị hoặc với hydrogel ACP trần. Mức độ oxit nitric (NO) chỉ chiếm ưu thế trong nuôi cấy tế bào trên hydrogel với L-arginine. Trong điều kiện tế bào bình thường, NO cũng được tạo ra mạnh mẽ từ các tế bào được gieo trên bề mặt hydrogel A-ACP hoặc AR-ACP (tất cả $p < 0,05$) so với các loại khác, cho thấy chức năng của arginine là hợp chất cho oxit nitric. NO hiện diện gần đó, việc sản xuất $O_2^{\bullet-}$ có thể kết hợp với NO để tạo thành peroxynitrite ($ONOO^-$) - một chất oxy hóa mạnh, đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ vật chủ [97,102]. Tuy nhiên, lượng lớn $ONOO^-$ sẽ làm chậm thời gian lành vết thương do viêm kéo dài [28]. Đầu dò huỳnh quang peroxynitrite (DAX-J2 PON (Xanh)) đã được sử dụng để xác nhận sự hiện diện của $ONOO^-$ trong tế bào chất của tế bào BMSC. Đối với các tế bào BMSC bình thường, tín hiệu của đầu dò peroxynitrite không có trong tất cả các mẫu được xử lý (Hình 4.6 H). Tuy nhiên, trong các tế bào bị stress oxy hóa, tín hiệu màu xanh được phát hiện bên trong tế bào chất của hầu hết các tế bào. Mô hình tế bào nuôi cấy trên dạng ACP tự nhiên không cho thấy sự giảm mật độ tế bào có huỳnh quang màu xanh so với không được xử lý. Với sự hỗ trợ của L-arginine, các tín hiệu của $ONOO^-$ được thể hiện mạnh mẽ, khẳng định mối quan tâm của liệu pháp L-arginine. Điều thú vị là huỳnh quang màu xanh bị biến đổi đáng kể khi xử lý bằng hydrogel có chứa resveratrol. Đối với hydrogel R-ACP, chỉ phát hiện thấy sự tạo ra $ONOO^-$ nhẹ, điều này có thể là do các phản ứng với NO nội sinh hoặc $O_2^{\bullet-}$. Lấy ví dụ về resveratrol, mặc dù lượng NO giải phóng cao khỏi các tế bào được xử lý bằng AR-ACP hydrogel, việc tạo ra $ONOO^-$ nội bào là rất nhỏ. Nói cách khác, khả năng chống oxy hóa của resveratrol trong việc ức chế quá trình tạo $ONOO^-$ nội bào có thể giúp duy trì nồng độ NO có lợi cho sự hình thành mạch và sửa chữa mô trong quá trình chữa lành vết thương.

4.4.3 Đánh giá diễn biến quá trình khép miệng vết thương của hệ hydrogel hoạt tính

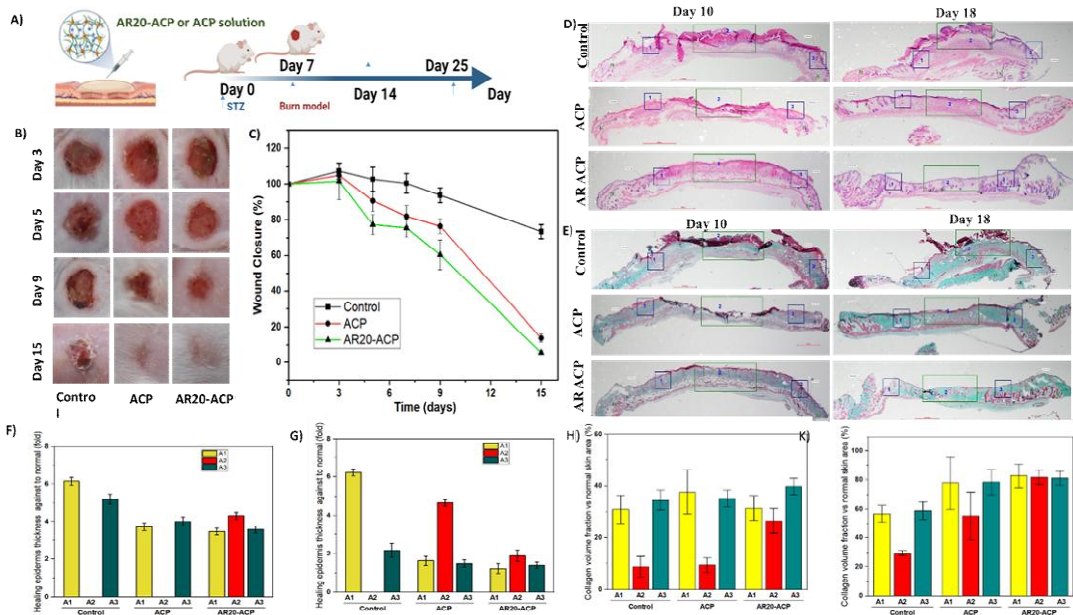
Thí nghiệm được thiết kế được minh họa trên hình 4.7A. Hình ảnh vết thương trong mỗi nhóm tại các thời điểm thời gian khác nhau được trình bày ở hình Hình 4.7B và diễn biến quá trình khép miệng vết thương được xác định bằng cách đo diện tích vết thương trong 14 ngày (Hình 4.7C). Các nhóm được điều trị bằng hydrogel cho thấy vết thương diễn biến tích cực hơn khi so sánh với vết thương không điều trị. Ở nhóm không điều trị, vết thương có tình trạng bị chảy máu và sưng tấy kéo dài đến ngày thứ 9 điều trị, thậm chí đến ngày 15, vết thương mới bắt đầu đóng vảy, nhưng vẫn rỉ máu và có dấu hiệu của nhiễm trùng. Sử dụng hydrogel ACP, bề mặt vết thương sáng, hồng hào hơn hẳn. Vết thương co lại bắt đầu từ ngày thứ 3 và khép lại gần như hoàn toàn ở ngày thứ 15. Đối với vết thương điều trị bằng AR20-ACP, diễn biến quá trình khép miệng vết thương và màu sắc của mô da tổn thương đều tốt hơn khi so sánh với mẫu hydrogel không hoạt chất.

4.4.4 Đánh giá khả năng tái tạo của vùng da tổn thương

Vào ngày thứ 10, vi phẫu với kỹ thuật nhuộm H&E (Hình 4.7D) cho thấy sự tái cấu trúc biểu mô biểu hiện rõ ở lề vết thương (được dán nhãn A1 và A3) ở các nhóm đối chứng. Hình 4.7F cho thấy biểu mô ở khu vực này dày gấp 5-6 lần so với biểu mô ở vùng da bình thường (ký hiệu N). Tuy nhiên, vị trí trung tâm vết thương (được dán nhãn A2) ở nhóm đối chứng cho thấy sự hoại tử nặng cùng với sự thâm nhiễm bạch cầu trung tính, đại diện cho các phản ứng viêm nghiêm trọng. Bên cạnh đó, hiện tượng xuất huyết chân bì cũng quan sát thấy ở vùng vết thương này. Tương tự như đối chứng, sử dụng ACP hydrogel tập trung tái tạo biểu mô ở mép ở mép vết thương thay vì ở giữa vết thương, nhưng với độ hoàn thiện tốt hơn. Lớp biểu mô tái tạo khu vực rìa mỏng hơn so với nhóm đối chứng ($p = 0,013$), nhưng đủ phân lớp. Ngoài ra, các cơ quan liên kết của da, chẳng hạn như nang lông và tuyến bã nhờn bắt đầu xuất hiện ở khu vực này, trong khi không có ở mẫu chứng. Phân tích mô học chỉ ra rằng nhóm động vật được điều trị bằng AR20-ACP hydrogel phục hồi hoàn toàn lớp biểu bì ở tất cả các khu vực được kiểm tra ở ngày thứ 10, điều không được ghi nhận ở 2 nhóm còn lại. Độ dày biểu mô không có sự khác biệt khi so sánh ở mép vết thương hoặc tâm vết thương (tất cả đều $p > 0,2$). Hơn nữa, lớp biểu bì của toàn bộ vùng vết thương đã được phân tầng đầy đủ, bao gồm cả lớp sừng biệt hóa ở giai đoạn cuối, bao phủ phần lớn bề mặt vết thương. Cùng với việc tái tạo biểu mô, quá trình hình thành tân mạch là một ưu điểm chính của hydrogel AR20-ACP. Mật độ mạch máu mới hình thành là $37,12 \pm 11,4\%$ ở vết thương khi bôi hydrogel AR20-ACP, cao hơn gần 9 lần so với nhóm hydrogel ACP không hoạt chất. Quá trình tạo mạch được thể hiện trên tổng thể diện tích vết thương điều trị bằng AR20-

ACP nhưng chỉ xảy ra ở rìa vết thương khi điều trị bằng ACP hydrogel và gần như hiếm gặp ở nhóm đối chứng.

Đến ngày thứ 18, sự phục hồi cấu trúc da tổn thương tạo khác biệt đáng kể ở ba nhóm (Hình 4.7G). Các trung tâm của vết thương nhóm đối chứng không xuất hiện biểu mô bao phủ khu vực trung tâm sau 18 ngày. Quá trình tái tạo mô hình ở các rìa vết thương cũng không đồng đều. Xuất huyết và thâm nhiễm tế bào bạch cầu đơn nhân xuất hiện ở vùng A2 dưới lớp biểu bì non. Ngược lại, quá trình tái tạo biểu mô có thể xem như hoàn thiện ở cả hydrogel ACP hoặc hydrogel AR20-ACP sau ngày 18. Tuy nhiên, quá trình tái mô được đánh giá là hiệu quả hơn đối với nhóm hydrogel AR20-ACP. Độ dày biểu mô của vết thương tương đương với độ dày của da không bị tổn thương. Đáng chú ý, trong phương pháp điều trị bằng hydrogel AR20-ACP, những con chuột được đóng vết thương hoàn toàn cũng có biểu hiện lông mọc lại ở rìa vết thương. Trong khi đó, các nang lông và tuyến bã nhờn được thấy rõ ở lớp hạ bì của trung tâm vết thương, điều này không có ở các nhóm khác. Những kết quả này đã chứng minh hiệu quả hỗ trợ lành vết thương của nhóm AR20-ACP.



Hình 4.7: A) Mô hình vết thương bỏng trên mô hình chuột đái đường. B) Hình ảnh và C) diễn biến quá trình khép vết thương (n=3) trong 14 ngày. Kiểm tra cấu trúc da bằng giải phẫu vi mô thông qua D) nhuộm H&E và E) Masson trichrome (MT) của các mô vết thương vào ngày thứ 10 và 18 với các phương pháp điều trị khác nhau. Phân tích tái cấu trúc ở 3 khu vực rìa cạnh vết thương (A1 và A3) và tâm vết thương (A2). Tốc độ tái cấu trúc biểu mô khi so sánh với vùng da bình thường (ký hiệu N) (n= 3) vào F) ngày thứ 10 và G) ngày 18. Định lượng thể tích collagen tái biểu hiện ở H) ngày thứ 10 và cho K) ngày 18.

Để làm rõ hơn khả năng hỗ trợ của hydrogel chức năng, AR20-ACP trên vết thương bệnh lý nền đái tháo đường, giải phẫu vi mô với masson trichrom (MT) được thực hiện và kết quả được trình bày trong hình 4.7D, trong khi kết quả phân tích định lượng thể tích collagen tái biểu hiện ở trung bì trình bày trong hình 4.7 H-K. Không có sự khác biệt về quá trình tái lập biểu bì ở vùng rìa vết thương khi so sánh giữa ba nhóm điều trị ở ngày thứ 10. Tuy nhiên, sự tái lập biểu bì ở vùng trung tâm chỉ xuất hiện ở nhóm điều trị bằng AR20-ACP. Mức độ lắng đọng collagen ở mẫu mô điều trị bằng AR20-ACP vào ngày thứ 10 đạt 30–40% so với da không bị tổn thương (Hình 4.7H). Mật độ dày đặc hơn, đồng thời xuất hiện dưới dạng các bó, được thấy vào ngày 18 ở tất cả các nhóm thử nghiệm. Đặc biệt các bó collagen có trật tự hơn ở lớp biểu bì da điều trị bằng hydrogel AR20-ACP (Hình 4.7K). Các vết thương nhóm chứng cho thấy xuất hiện của tế bào hạt và mạch máu cao hơn sau khi các nguyên bào sợi cơ tăng nhanh ở ngày 18 khi so với ngày thứ 10. Sự biểu hiện này cho thấy sự hình thành sẹo lồi. Tuy nhiên, lớp biểu bì của những vết thương này không khép kín hoàn toàn, điều này làm tăng nguy cơ rối loạn chức năng da. Với hydrogel ACP, lớp biểu bì của vết thương được tái tạo; tuy nhiên, mật độ tế bào ở lớp trung bì cao xen lẫn với mô sợi, đặc trưng của tổ chức mô sẹo. Đối với da điều trị bằng AR20-ACP, mật độ tế bào trong mô liên kết ở trung bì rất thấp, mô liên kết sợi trội hơn hẳn, hình thái đặc trưng của mô liên kết đặc tương tự với mô da thường, xác nhận quá trình tái lập mô liên kết hoàn hảo ở nhóm điều trị này. Do đó, hydrogel AR20-ACP đã được xác nhận là có hiệu quả trong việc đẩy nhanh quá trình lành vết thương và tái tạo da trên mô hình chuột bệnh lý đái tháo đường.

Kết luận: Thành công tạo hệ hydrogel nhạy nhiệt trên cơ sở alginate và pluronic F127 bằng phương pháp ghép mạch. Kiểm tra và xác định được sự ảnh hưởng của thành phần polysaccharide (alginate) lên đặc tính nhạy nhiệt của pluronic được thực hiện thông qua phép đo lưu biến. Thành phần alginate cho thấy sự ảnh hưởng đến đặc tính nhạy nhiệt gây hiện tượng tách pha của pluronic F127. Sự ghép mạch giữa pluronic và alginate làm thay đổi khoảng nhiệt độ chuyển pha sol-gel của pluronic. Ở trường hợp pluronic thuần, nhiệt độ chuyển pha được thực hiện ở 20.01°C. Khi pluronic được ghép lên mạch alginate, nhiệt độ chuyển pha dịch chuyển lên khoảng trên. Mật độ năng lượng kết dính lần khả năng chống chịu lực tác động cho thấy sự ảnh hưởng của alginate trong quá trình hydrate của chuỗi kỵ nước PPO trên pluronic. Do đó, khi tỷ lệ giữa alginate: pluronic tăng lên (tương đương với hàm lượng pluronic tham gia ghép mạch giảm từ 87.5% xuống 83.3%), nhiệt độ chuyển pha chuyển dịch từ 35.01°C đến trên 40°C. Thêm vào đó, nhiệt độ chuyển pha còn phụ thuộc vào nồng độ của copolymer ghép và dung môi sử dụng để pha mẫu. Nồng độ càng cao, mật độ các tụ điểm kỵ nước tăng, sự hình thành quá trình phân pha sol-gel sẽ diễn ra ở nhiệt độ thấp hơn. Đối với môi trường phân tán, môi trường sinh lý có chứa các ion điện giải cũng làm cho nhiệt độ phân pha giảm do sự tương tác của các ion với mạch alginate. Cơ tính của hệ ACP ở nồng độ 20% (wt/wt) nằm trong khoảng 4-6kPa, chứng tỏ hệ thích hợp với các ứng dụng của mô mềm. Hệ ACP hydrogel được tạo ra môi trường thích hợp cho tế bào phát triển. Cụ thể, nguyên bào sợi phát triển tốt trong mạng lưới của hydrogel và thể hiện kiểu hình đặc trưng sau 96 ngày nuôi cấy. Các nguyên bào sợi sau khi di chuyển khỏi hydrogel vẫn tạo được tế bào đơn lớp bám và phát triển trên đĩa nuôi cấy. Hệ ACP hydrogel chứng tỏ khả năng ứng dụng làm khung để mang hoạt chất kép, vừa ưa nước (L-arginine) và vừa kỵ nước (resveratrol). Hoạt chất giải phóng khỏi hệ tạo điều kiện thích hợp để cân bằng oxy hóa. L-arginine không chế quá trình triệt tiêu gốc tự do của resveratrol ở tốc độ phù hợp, giúp đảm bảo đủ gốc tự do để khống chế sự phát triển của vi sinh. Trong khi đó, resveratrol giúp duy trì độ bền của nitric oxide sản sinh từ L-arginine trong môi trường bị stress oxy hóa. Sự ngăn chặn quá trình chuyển hóa nitric oxide thành ONOO⁻, chất có tính oxy hóa cực mạnh và gây quá trình viêm kéo dài, được chứng minh khi sử dụng kết hợp L-arginine và resveratrol. Nhờ các hiệu quả về tính chất trên, hệ hydrogel hoạt tính cho thấy khả năng hỗ trợ quá trình lành vết thương trên chuột mô hình đái tháo đường.

CHƯƠNG 5 PHÁT TRIỂN HYDROGEL PHẢN ỨNG NHIỆT TỪ ALGINATE VÀ PLURONIC QUA KỸ THUẬT LIÊN KẾT NGANG

5.1 Cơ sở nghiên cứu

Trên cơ sở về khả năng trùng hợp của dopamine (DA) trong phản ứng oxy hóa thành polydopamine, DA được sử dụng tạo liên kết ngang trong quá trình tổng hợp hydrogel [26]. Catechol trên DA dễ dàng bị oxy hóa để tạo thành o-quinone, trải qua các phản ứng thứ cấp để thiết lập liên kết cộng hóa trị giữa hai phân tử catechol [12]. Ngoài ra, catechol còn được biến đổi là chất kết dính mô. Bổ sung hay biến đổi cấu trúc vật liệu hydrogel với catechol làm tăng cường độ bám dính với mô, tránh hiện tượng bị rửa trôi. Hydrogen peroxidase kết hợp với enzyme HRP thường được sử dụng để tạo liên kết giữa các polymer có nhóm dopamine trên cấu trúc hình thành hydrogel. Mặc dù rất nhiều công bố về quy trình này, tuy nhiên đến hiện tại chưa có công trình thực hiện hệ gel nhạy nhiệt với chế độ tách pha sol-gel thực hiện thành công. Bên cạnh đó, hai thách thức đáng kể vẫn tồn tại trong bối cảnh hình thành hydrogel được xúc tác peroxidase dựa trên quá trình oxy hóa catechol. Phản ứng oxy hóa catechol diễn ra trong điều kiện pH > 8, điều này gây ảnh hưởng đến hoạt độ của enzyme peroxidase, có khả năng dẫn đến mất chức năng peroxidase. Hơn nữa, peroxidase đã được xác định là có khả năng kích hoạt phản ứng miễn dịch ở người và các động vật có vú khác do trình tự protein của nó. Để khắc phục những hạn chế này, những nỗ lực đáng kể đã được dành cho việc phát triển các vật liệu mô phỏng chức năng peroxidase hay còn gọi là peroxidase nhân tạo. Cách tiếp cận này nhằm mục đích vượt qua những thách thức liên quan đến peroxidase tự nhiên bằng cách tạo ra vật liệu có khả năng bắt chước hoạt động xúc tác của peroxidase. Bằng cách đó, các nhà nghiên cứu mong muốn đạt được sự kiểm soát được cải thiện đối với quá trình tổng hợp hydrogel thể lai từ phản ứng oxy hóa catechol, giải quyết các vấn đề về điều kiện hoạt động và phản ứng miễn dịch, đồng thời cho phép sử dụng rộng rãi hơn các hệ thống hydrogel có tính kết dính mô cho các ứng dụng trong y học tái tạo.

Hemin, một hợp chất porphyrin sắt có hoạt tính sinh học, sở hữu một trung tâm xúc tác tương tự như peroxidase cải ngựa (HRP). Hiệu suất xúc tác gần như tương tự peroxidase enzyme đã thu hút được sự chú ý đáng kể trong lĩnh vực enzyme nhân tạo. Tuy nhiên, hemin không thể phân tán tốt trong nước, và chỉ tan tốt trong môi trường kiềm (pH > 8.0), điều này gây khó khăn trong quá trình điều chế hydrogel ứng dụng cho người. Hầu hết, để giải quyết vấn đề về độ hòa tan hemin, phương pháp chủ yếu là kết hợp với đại phân tử sinh học như DNA, protein và polypeptide hay polysaccharide làm khung để mô phỏng môi trường tăng cường khả năng hòa tan của hemin nhưng quá trình điều chế phức tạp vẫn là một trở ngại đáng kể cho sản xuất quy mô lớn. Do đó, việc theo đuổi một cách tiếp cận đơn giản hóa để đạt được mức sử dụng hemin cao vẫn là một thách thức nổi bật trong lĩnh vực này.

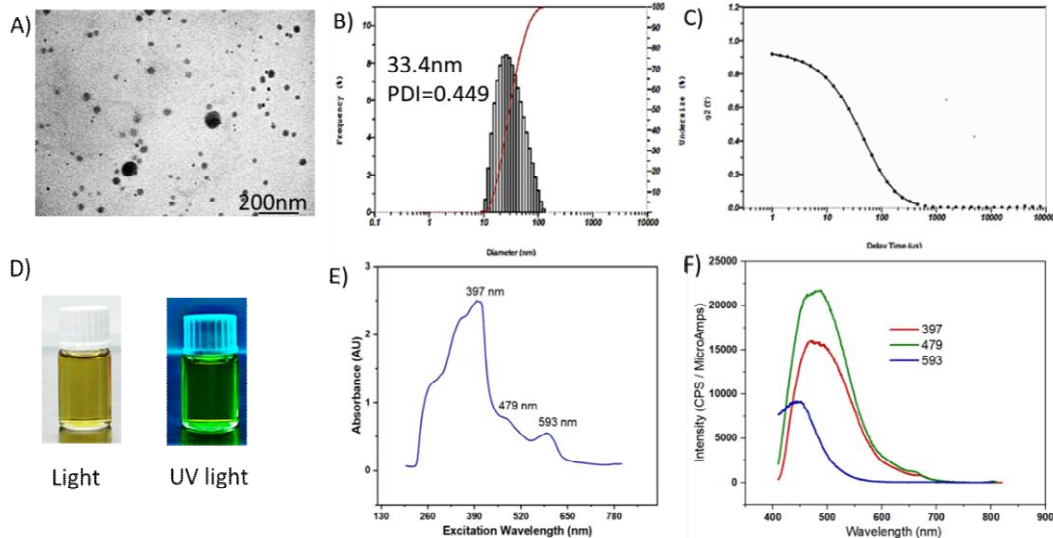
Thủy tinh hoạt tính sinh học (BG) đã trở nên nổi bật trong lĩnh vực tái tạo y sinh, đặc biệt trong việc tái tạo mô cứng như xương hay thậm chí mô mềm. Đối với mô cứng, BG có khả năng thúc đẩy quá trình hình thành xương mới bằng cách thúc đẩy sự hình thành hydroxyapatite [111]. Đối với mô mềm, BG cho thấy khả năng ức chế sự phát triển của vi sinh vật, bảo vệ mô tổn thương khỏi nhiễm trùng thông qua các ion kim loại được giải phóng [112]. Việc đưa BG vào trong hydrogel có thể tăng cường đáng kể hoạt động tạo xương của chúng [43]. Đáng chú ý, BG có thể thể hiện nhiều chức năng khác nhau dựa trên thành phần của chúng [112]. Tận dụng chức năng giống peroxidase của xeri oxit, quá trình đồng tổng hợp xeri và thủy tinh sinh học đã tạo ra được BG với hoạt tính xúc tác tương tự [113,114]. Trong một nghiên cứu khác của Ziqi Xu [106], việc kết hợp các cụm nano vàng vào mạng BG đã cho thấy một chức năng mới của BG: hoạt tính xúc tác tương tự peroxidase.

Do đó, kết hợp BG với hemin tạo hệ BG có chức năng bắt chước hoạt tính peroxidase và sử dụng nó vừa làm chất xúc tác trong quá trình tạo hydrogel nhạy nhiệt thể lại từ alginate và pluronic với tác nhân liên kết DA là mục tiêu trong chương này

5.1.1 Tổng hợp hemin- BG (HNP BG)

5.1.1.1 Chế tạo hạt nano HNP

Hemin chuyển hóa thành HNP thông qua phản ứng cacbon hóa trong dung môi metanol. TEM cho thấy HNP có hình thái dạng cầu với độ phân tán đồng nhất (Hình 5.1A). Kết quả DLS cho thấy kích thước trung bình của HNP vào khoảng 33,4 nm. Tuy nhiên, giá trị PDI (PDI > 0.3) của HNP chỉ ra rằng hệ thống này có sự phân bố có độ phân tán vừa không cao trong môi trường nước. Khảo sát hàm về thời gian trễ của HNP trong nước được giải mã thành một hàm mũ duy nhất (Hình 5.1C), xác nhận sự đồng nhất về kích thước hạt. Dung dịch HNP (Hình 5.1D) trong suốt sau khi phân tán trong nước, khẳng định đặc tính phân tán cao của HNP. Theo nghiên cứu trước, phổ UV-vis của hemin trong NaOH hiển thị hai dải Soret tách ở 360 và 385,5 nm và dải Q ở 500 nm [115]. Trong nghiên cứu này, sau quá trình cacbon hóa, đỉnh hấp thụ của hemin không thay đổi nhưng có sự dịch chuyển lên vùng có bước sóng dài hơn (Hình 5.1E). HNP còn có một đỉnh hấp thụ khác ở bước sóng 266 nm, bắt nguồn từ sự chuyển tiếp $n-\pi^*$ của các nhóm chức trên hemin với một cặp electron đơn độc [218]. Ngoài ra, HNP thể hiện khả năng phát xạ huỳnh quang, trong khi hemin nguyên liệu thô không có, phù hợp với một số báo cáo trước đây [115, 218]. Dưới UV, màu của dung dịch HNP chuyển từ vàng sang xanh lục (Hình 5.1D). Tính chất huỳnh quang của HNP sau đó được kiểm tra lại thông qua phổ phát xạ huỳnh quang. HNP cho thấy các tính năng phát xạ phụ thuộc vào bước sóng kích thích. Như Hình 5.1F, ở bước sóng kích thích 470nm, HNP cho thấy sự phát huỳnh quang mạnh ở 500nm, tương ứng với màu xanh lục, tương tự như các báo cáo trước đây. Dựa trên những kết quả này, có thể kết luận rằng hemin đã được cacbon hóa bằng phản ứng thủy nhiệt và sản xuất thành công hemin ở dạng hạt có kích thước nano với đặc tính vật lý mới (phát xạ huỳnh quang).

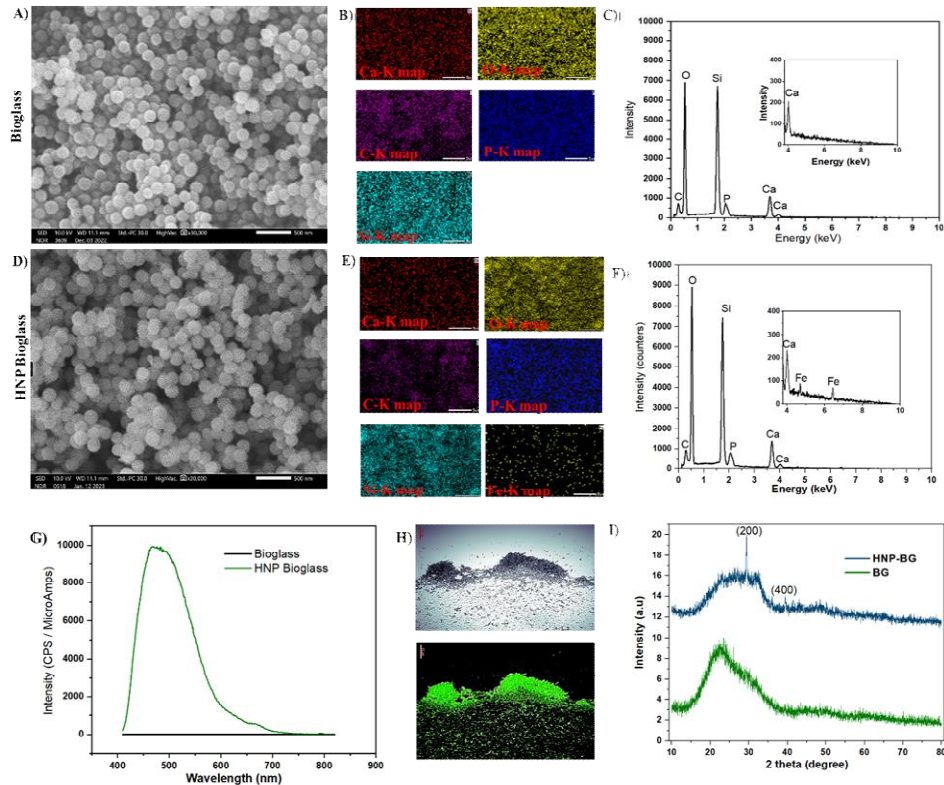


Hình 5.1: Đặc tính của HNP. Ảnh TEM điển hình (A), kích thước thủy động lực trong nước (B) và hàm tự tương quan DLS (C) của HNP tổng hợp. (D) Ảnh chụp các lọ chứa dung dịch HNP dưới ánh sáng trắng và tia UV. Phổ bước sóng hấp thụ (E) và phổ phát xạ (Em) (F) của HNP trong nước ở các bước sóng kích thích khác nhau.

5.1.1.2 Chế tạo hạt HNP BG

Thủy tinh sinh học (BG) được tổng hợp bằng phương pháp sol-gel. Hình 5.1A cho thấy kích thước, hình thái và sự phân bố nguyên tử bằng cách sử dụng ảnh SEM kèm phân tích nguyên tố bằng phổ EDS. BG tổng hợp có kích thước khoảng ~ 150 nm với dạng hình cầu và đồng nhất. Phổ EDS (Hình 5.1B, C) thể hiện

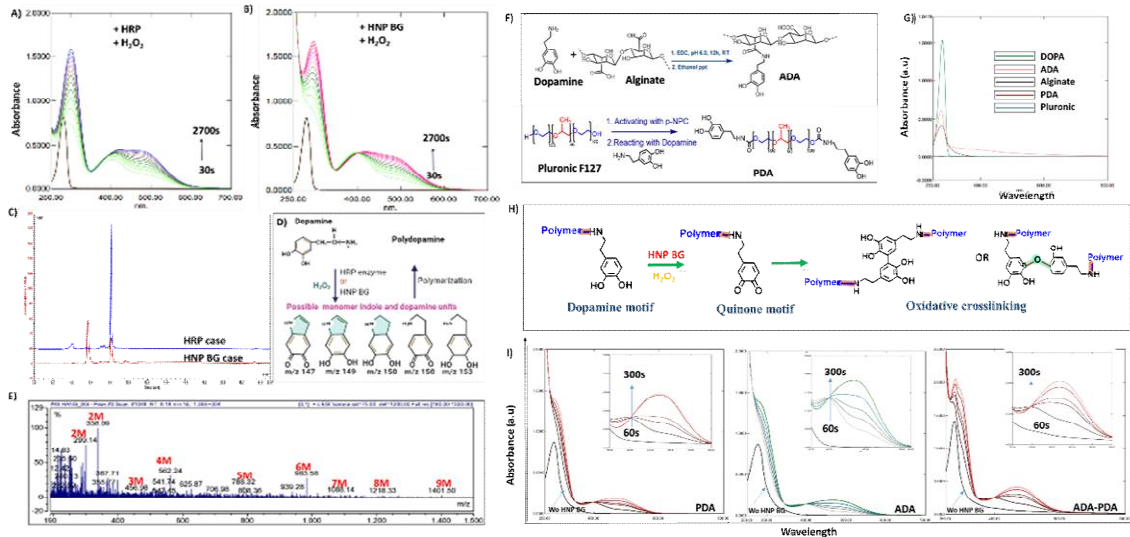
ba nguyên tố chính trong BG là Si, Ca và P. Việc bổ sung HNP không ảnh hưởng đến kích thước hoặc hình thái của BG (Hình 5.1D). So với BG nguyên gốc, phổ EDS của HNP BG (Hình 5.1F) hiển thị tín hiệu nguyên tố mới tương ứng với Fe, chiếm 0,77% khối lượng. Điều thú vị là HNP BG cho thấy sự phát huỳnh quang mạnh ở bước sóng 500 nm khi bị kích thích ở bước sóng 479 nm (Hình 5.1G), tương tự như HNP, trong khi BG không có. Kính hiển vi đồng tiêu được tiến hành để hỗ trợ bằng chứng này (Hình 5.1H). Tín hiệu huỳnh quang màu xanh lá cây được phát ra từ HNP BG dưới sự kích thích $\lambda = 480\text{nm}$. Phổ XRD của BG và HNP BG được so sánh trong Hình 5.2I. Đúng như dự đoán, BG và HNP BG cho thấy cấu trúc vô định hình. Tuy nhiên, một số kết tinh đã xảy ra ở HNP BG. Các pha tinh thể được xác định là canxit (ICDD: 01-072-1937). Ngoài ra, XRD của HNP BG cho thấy sự dịch chuyển từ vùng $20\text{--}25^\circ$ đến $23\text{--}32^\circ$, xác nhận hỗn hợp các vùng tinh thể của hemin hợp nhất với pha tinh thể của BG [106, 114]. Theo kết quả thu được từ phân tích được báo cáo, có thể kết luận rằng HNP BG đã được tổng hợp thành công trong nghiên cứu này.



Hình 5.1: Đặc tính của HNP BG. SEM kết hợp với ánh xạ bề mặt EDS của nó cho các nguyên tố chính đặc trưng (C, O, Ca, P, Si và Fe) phân bố và toàn bộ EDS của thủy tinh sinh học tự nhiên BG (A, B, C) và HNP BG (D, E, F). (G) Phổ phát xạ (Em) của hạt nano HNP BG và BG trong nước ở bước sóng kích thích 479 nm. (H) Hình HNP BG dưới ánh sáng mạnh và đèn huỳnh quang (Ex = 480, Em = 525). Giản đồ XRD của BG và đạo hàm HNP BG (I) của nó.

5.1.2 Tiềm năng của HNP BG làm chất xúc tác cho liên kết ngang catechol

Quá trình trùng hợp DA được nghiên cứu dựa trên thời gian thực thay đổi của phổ UV-vis của phản ứng giữa DA với tác nhân H_2O_2 cùng sự trợ giúp của HRP (hình 5.2A) hoặc HNP BG (Hình 5.2B). Kết quả cho thấy HNP BG có khả năng xúc tác quá trình oxy hóa DA thành aminochrome (AC) với tác nhân H_2O_2 , tương tự như HRP. DA có các đỉnh đặc trưng ở bước sóng 280nm tương ứng với quá trình chuyển đổi điện tử trong các amin catechol phenolic. Việc bổ sung H_2O_2 không gây ra bất kỳ thay đổi nào trong phổ UV-vis của DA trong hơn 1 giờ. Khi thêm HRP hoặc HNP BG, cực đại ở bước sóng 280 nm ngay lập tức tăng cường và chuyển sang dịch sang bước sóng dài hơn, $\sim 300\text{ nm}$ đồng thời xuất hiện một vai rộng trong vùng khả kiến ($\sim 400\text{ nm}$), xác nhận sự hình thành của các quinone (DQ) – sản phẩm oxy hóa trong gian của DA khác nhau, như được mô tả công trình công bố trước [117, 118]. Khi thời gian ủ tăng lên, độ hấp thụ do sự hình thành DQ trung gian dopachromore ở bước sóng 300 nm tăng lên trong khi độ hấp thụ ở bước sóng 400 nm có xu hướng mở rộng trong phạm vi 400–600 nm, cho thấy sự chuyển đổi sâu hơn sang họ indole.



Hình 5.2: Phổ UV-vis của dung dịch DA sau khi bổ sung H_2O_2 và chất xúc tác, ghi enzyme HRP (A) và HNP BG (B) trong vòng 2700 giây. Sau đó, phản ứng được phân tích bằng phân tích LC-MS (ESI+) (C). Monomer được đề xuất hình thành sau phản ứng oxy hóa (D) được sử dụng để xác định khả năng tự trùng hợp của sản phẩm DA dưới chất xúc tác là HNP BG (E). Chức năng của HNP BG trong việc thực hiện liên kết ngang giữa các polyme catecholic: F) Con đường tổng hợp các polyme catecholic (DA), alginate-dopamine (ADA) và Pluronic F127-dopamine (PDA) và (G) quang phổ UV-vis của chúng cùng với các chất phản ứng tiền chất (DA, natri alginate và Pluronic F127); H) Theo thời gian thực của phổ UV-vis đối với các dung dịch PDA, ADA và hỗn hợp ADA-PDA (1:1) sau khi bổ sung bán HNP BG 5 mg/ml. K) Hình minh họa sự hình thành liên kết ngang giữa hoạt tiết dopamine trên mỗi polymer.

Để xác nhận kết quả UV-vis, thời gian lưu giữ trên sắc ký và phổ MS sản phẩm của DA oxy hóa được tiến hành. Trong các điều kiện phân tích HPLC-MS đã chọn, thời gian lưu do phản ứng của DA và H_2O_2 với xúc tác HNP BG giống như enzyme HRP (Hình 5.2C), cho thấy quá trình oxy hóa của HNP BG giống hệt với quá trình oxy hóa của enzym HRP. Để xác minh thêm sự hiện diện của cấu trúc polydopamine, phương pháp sắc ký lỏng nhanh/khối phổ song song (LC-MS/MS) đã được phát triển. Trên thực tế, trong quá trình phản ứng oxy hóa, nhiều monome polydopamine khác nhau được tạo ra. Sự liên kết oxy hóa của các đơn vị DA oxi hóa nối hai hoặc nhiều vòng benzen là cách trùng hợp chính với polydopamine. Dựa trên trọng lượng phân tử của các monomer đề xuất trong Hình 5.2D, 5,6-indol-quinone (m/z 147) đã được chọn làm monome trong nghiên cứu này, được định nghĩa là M. Thật may mắn là có thể phát hiện được các đỉnh khối lượng đối với các oligome có mức độ bão hòa khác nhau từ dimer đến nonamer, như được mô tả trong Hình 4E. Đầu tiên là đỉnh dimer m/z là 299,14 (2M + 6H) hoặc 338,09 (2M + 6H + Ca^{2+}). Sự xuất hiện của đỉnh tại m/z 456,98 được ấn định cho các oligome thể ba (3M + 18). Ngoài ra, tetramer (4M) cũng xuất hiện trong phổ khối, điều này dự đoán nguồn gốc từ liên kết cộng hóa trị giữa các gốc Trimer và axit pyrrolecarboxylic ($\text{C}_4\text{H}_{14}\text{NO}_3^+$) có nguồn gốc từ sự phân hủy oxy hóa của các đơn vị indole. Hơn nữa, phổ ion dương của các polydopamine khác nhau với số lượng monomer cao hơn với các ion canxi từ HNP BG, chẳng hạn như pentamer (5M + 20 + Ca^{2+}), hexamer (6M + 30 + 2 Ca^{2+}), v.v., đã được đề xuất trong nghiên cứu này. Nhìn chung, kết quả đã tiết lộ chiến lược khả thi của HNP BG làm chất xúc tác thay thế cho hydrogel sử dụng DA làm liên kết ngang.

5.2 Tổng hợp dẫn xuất catechol- alginate và catechol-pluronic

Hình 5.2F trình bày quy trình điều chế các dẫn xuất catechol- alginate và catechol-pluronic. Sự liên hợp của catechol hydroxyphenol (DA) trên khung alginate (ADA) được thực hiện thông qua phản ứng tạo liên kết carbodiimide. Trong trường hợp của Pluronic F127, nhóm hydroxyl ở cả hai đầu được kích hoạt bằng p-nitrophenyl chloroformate để tạo ra 4-nitrophenylcarbamate, nhóm chức nhạy cảm với amino trên DA, dẫn đến hình thành dẫn xuất pluronic -DA (ADA). Để đánh giá sự hình thành các cấu trúc tổng hợp, phổ UV-vis được sử dụng. Cả natri alginate và Pluronic đều không hiển thị dải hấp thụ trong phạm vi 250–800 nm (Hình 5.5G). Sau khi liên hợp dopamine, phổ UV-vis của ADA và PDA cho thấy các dải hấp thụ ở $\lambda_{\text{max}} = 280$ nm tương ứng với sự chuyển tiếp La-Lb trong catecholamine phenolic trong DA nguyên sơ. Từ phương pháp quang phổ UV-vis, định luật Beer đã được sử dụng để tính toán lượng neo catecholic trên xương sống polymer. Hiệu suất liên hợp của alginate và Pluronic F127 là $13,91 \pm 2,55\%$ ($30,7 \pm 0,02$ mg catechol/g dẫn xuất alginate) và $94,78 \pm 3,22\%$ ($23,02 \pm 0,78$ mg catechol/g dẫn xuất Pluronic).

5.3 Tổng hợp hydrogel từ catechol- alginate và catechol-pluronic

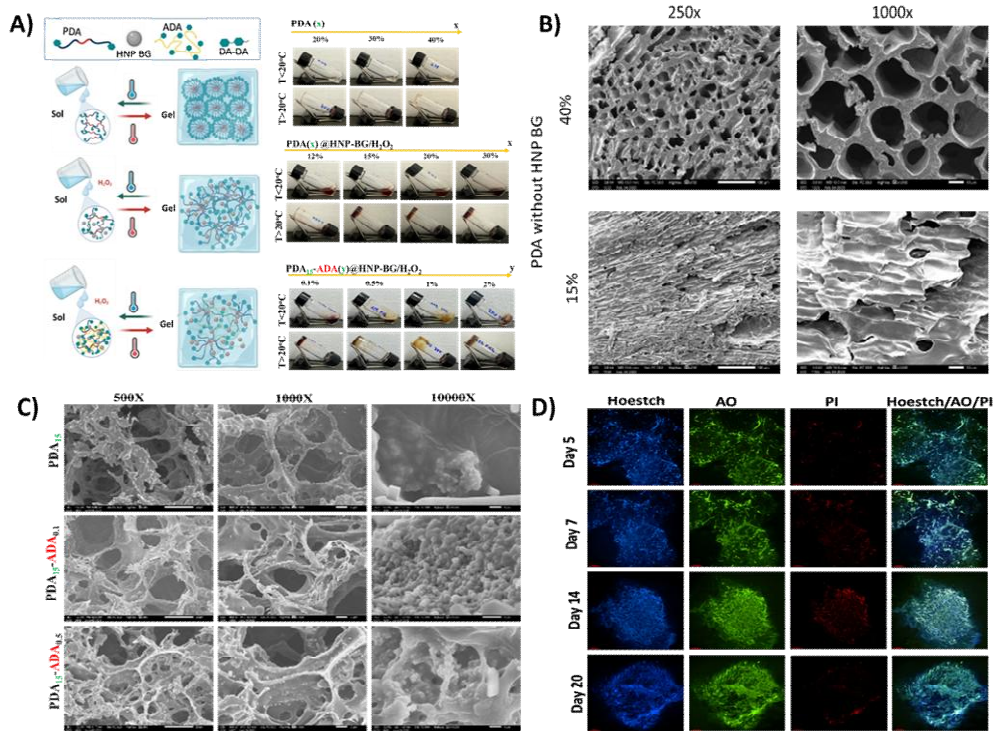
5.3.1 Khảo sát sự hình thành liên kết giữa hai dẫn xuất dopamine, catechol- alginate và catechol-pluronic

UV-vis được sử dụng để theo dõi sự thay đổi của polyme catecholic (DA) trong quá trình phản ứng nhằm nghiên cứu cơ chế tạo gel (hình 5.2 H). Kết quả UV-vis từ các mẫu catechol- alginate và catechol-pluronic trong Hình 5.2I mang lại kết quả thuyết phục về sự hình thành các chất liên kết catechol-catechol giữa DA của các dẫn xuất được kích hoạt bởi H_2O_2 và HNP BG. Đối với các polyme dẫn xuất DA đơn, đỉnh quinone ($\lambda_{max} = 401 \text{ nm}$) xuất hiện ngay sau khi bổ sung HNP BG, cho thấy quá trình oxy hóa nhanh chóng của các polyme DA khi có mặt chất oxy hóa (Hình 5.6C). Sau đó, các đỉnh hấp thụ ở bước sóng 401 nm cho thấy sự dịch chuyển đến vùng 500 nm, có thể là kết quả của sự hình thành dicatechol, cho thấy sự hình thành 5,5'-di(3,4-dihydroxyphenylalanine)- có thể là sự kết hợp thông qua cơ chế hình thành gốc aryloxy trên vòng DA phenyl (hình 5.2H). Phổ UV-vis này khớp chính xác với DA nguyên bản bị oxy hóa được thể hiện trong Hình 5.2B. Quá trình oxy hóa các dẫn xuất DA kép cho kết quả có quang phổ giống như dẫn xuất đơn. Tuy nhiên, đỉnh quinone dịch chuyển sang vùng bước sóng dài nhanh hơn dẫn xuất đơn. Các kết quả được mô tả ở đây chỉ ra rằng các dẫn xuất dopamine, ADA và PDA, có khả năng tạo gel nhanh chóng tại chỗ trong điều kiện có mặt HNP BG.

5.3.2 Khảo sát sự hình thành hydrogel

Tiếp theo, sự hình thành hydrogel dựa trên các polyme dẫn xuất DA ở dạng kết hợp đơn hoặc kép đã được nghiên cứu thông qua quá trình chuyển đổi sol-gel; kết quả được trình bày trên Hình 5.3A.

Phù hợp với các báo cáo trước đây, sự hình thành hydrogel từ Pluronic F127 dẫn xuất DA, cần có nồng độ cao hơn so với Pluronic nguyên bản. Việc gắn DA lên cấu trúc Pluronic F127 cho thấy các đặc tính chuyển tiếp sol-gel khi được pha ở nồng độ 40% wt/wt, trong khi Pluronic F127 là ~16% wt/wt. Được biết, các copolyme Pluronic ở dạng mixen hình cầu do tương tác kỵ nước giữa các khối giữa PPO của copolyme. Trên nồng độ tới hạn, các mixen Pluronic tự kết dính chặt chẽ để tạo ra cấu trúc hydrogel. Sự hiện diện DA ở đầu PEO của Pluronic F127 có thể làm xáo trộn tính toàn vẹn của các mixen cũng như mật độ năng lượng kết dính micelles do sự thay đổi cân bằng ưa nước/kỵ nước của Pluronic F127, do đó làm tăng nồng độ tạo gel [56]. Với việc bổ sung HNP BG cùng với H_2O_2 , quá trình tạo gel của PDA thực hiện ở nồng độ thấp hơn. Nồng độ gel của PDA được phát hiện ở mức 15 wt% ở nhiệt độ cao hơn 30 °C. Gel này có thể đảo ngược trạng thái sang lỏng trong khoảng từ 4 °C đến 30 °C tương tự như hydrogel Pluronic. Khảo sát lưu biến cũng chứng minh điều tương tự. Như trong hình 4.8A, công thức PDA 15% được chứng minh tồn tại ở trạng thái dung dịch. Giá trị G' luôn thấp hơn giá trị G'' ở tất cả các điểm nhiệt khảo sát. Khi HNP BG và H_2O_2 được thêm vào PDA15, giá trị nhớt đàn hồi (G' và G'') của PDA15 đã thay đổi đáng kể. Từ điểm nhiệt độ 5°C, chỉ phát hiện được G'' , xác nhận trạng thái lỏng của mẫu. Từ 25°C, dung dịch xuất hiện giá trị tích trữ năng lượng đàn hồi (G'). Sau thời điểm nhiệt độ này, G' cao hơn G'' , từ đó suy ra sự hình thành cấu trúc gel. Ngoài ra, màu của dung dịch PDA chuyển từ không màu sang màu nâu sẫm, khẳng định quá trình oxy hóa của nhóm catechol [117-119]. HNP BG gây ra quá trình oxy hóa DA và sau đó hình thành liên kết ngang giữa các mixen Pluronic, tạo ra các vòng và đuôi trên lớp vỏ của các mixen Pluronic được đóng gói, tạo ra các mối nối liên kết chặt chẽ về mặt vật lý và hóa học giữa chúng. Do đó, PDA15 với HNP BG/ H_2O_2 cho thấy đặc tính chuyển pha sol-gel trong khi PDA15 chỉ tồn tại dạng dung dịch.



Hình 5.3: A) Tính nhạy nhiệt của hydrogel thu được khảo sát bằng phương pháp đảo ngược ống đê chuyển hóa sol-gel của PDA có/không có HNP BG/H₂O₂ và hỗn hợp PDA-ADA. x và y lần lượt biểu thị nồng độ của PDA và ADA. B) Hình thái học của hydrogel PDA không có HNP BG ở nồng độ 40% wt/wt và 15% wt/wt. C) Hình thái của hydrogel thu được từ PDA và hỗn hợp giữa PDA và ADA với sự hỗ trợ của HNP BG/H₂O₂. D) Độc tính tế bào của hydrogel thu được: Nhuộm hMSC sống/chết chứa đầy hydrogel được thực hiện với Propidium Iodide (PI, đỏ, tế bào chết), Acridine Orange (AO, xanh lá cây, tế bào sống) và Hoechst 33342 (xanh lam, nhân tế bào).

Hỗn hợp 15% PDA và 0,1% ADA tạo thành hydrogel trong vòng 60 giây. Hỗn hợp PDA-ADA duy trì tính chất lỏng dung dịch ở điều kiện nhiệt độ thấp và trở lại trạng thái gel ở nhiệt độ ấm ($T > 30\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nghiên cứu lưu biến cho thấy G' và G'' của PDA15-ADA0.1@HNP BG/H₂O₂ tuân theo hàm số của nhiệt độ. Sự thay đổi mạnh mẽ về mô đun đàn hồi và sự giao thoa giữa G' và G'' ở khoảng 22,61 $^{\circ}\text{C}$ là đặc trưng cho quá trình chuyển pha sol-gel [120]. Ngược lại với PDA15@HNP BG/H₂O₂, giá trị modun đàn hồi xuất hiện trong điều kiện thử nghiệm nhiệt độ ban đầu, gợi ý các liên kết bên trong vật liệu, ví dụ như liên kết hóa học hoặc tương tác lý hóa [121]. Tăng nồng độ ADA lên 0,5% thì quá trình chuyển pha sol-gel không thay đổi (hình 5.3C). Tuy nhiên, giá trị G'' của PDA15-ADA0.1@HNP BG/H₂O₂ cao hơn PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂ sau khi đạt đến trạng thái chuyển pha. Điều này xác nhận rằng lực tương tác trong PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂ nhiều hơn so với PDA15-ADA0.1@HNP BG/H₂O₂. Sự tồn tại của mật độ liên kết ngang cao ngăn cản sự chuyển đổi năng lượng biến dạng thành năng lượng nhiệt, gợi ý hydrogel với độ nhớt đàn hồi lý tưởng [121]. Tuy nhiên, ở nồng độ ADA ở nồng độ 1%, đặc tính chuyển tiếp sol-gel không xuất hiện. Tương tự, kết quả lưu biến không cho thấy sự giao thoa giữa các đường cong G' và G'' ở mẫu PDA15-ADA1@HNP BG/H₂O₂. Đồng thời, G' của hydrogel này luôn cao hơn G'' ở mọi nhiệt độ. Điều thú vị là khi tăng nhiệt độ, cả G' và G'' đều tăng rất rõ ràng, cho thấy độ nhạy cảm của hệ thống này với nhiệt độ. Sau 22-23 $^{\circ}\text{C}$, độ nhớt của hệ composite có xu hướng ổn định trong quá trình tăng nhiệt độ. Được biết, riêng ADA đã trở thành trạng thái gel ở mức 1% sau khi bổ sung HNP BG. Đây không chỉ là kết quả của liên kết ngang oxy hóa của DA mà còn là kết quả của mô hình ‘hộp trứng’ của khung alginate với các cation hóa trị hai giải phóng từ BG [74,75]. Do đó, nồng độ ADA càng cao thì mật độ liên kết ngang do ADA là đủ và sự ức chế quá trình lắp ráp thuận nghịch theo nhiệt độ của các mixen do phân đoạn PPO trong PDA; do đó, sự chuyển tiếp sol-gel do nhiệt độ bị loại bỏ.

5.3.3 Hình thái của hydrogel

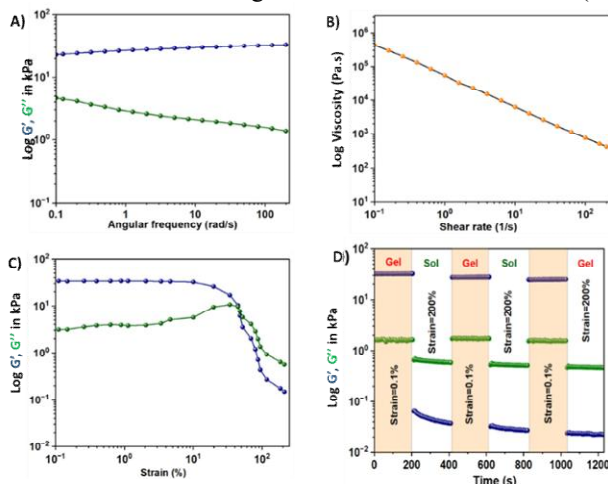
Hình thái của hydrogel thu được quan sát bằng SEM. Mật cắt ngang của PDA hydrogel ở nồng độ 40% wt/wt có cấu trúc giống như tổ ong với cấu trúc xốp tương đối dày đặc (hình 5.3B). Kích thước lỗ trở nên lớn hơn khi giảm nồng độ PDA xuống 15% wt/wt. Hydrogel này thể hiện hình thái mạng lưới hình ống và lưới với các lỗ liên kết với nhau thấp hơn PDA hydrogel ở nồng độ 40%, xác nhận giai đoạn gel.

Ngược lại, sự xuất hiện của liên kết ngang hóa học trong PDA 15% wt/wt dưới hoạt tính xúc tác của HNP BG (PDA15@HNP BG/H₂O₂) dẫn đến sự hình thành tự phát cấu trúc ba chiều (3D) (Hình 5.3C). Nó chỉ ra

rằng cơ chế liên kết ngang kèm theo sự phân tách pha do trật tự mixen dẫn đến hình thái đa dạng của cấu trúc xốp thu được của hydrogel này [4,17,81,122]. Khi sử dụng dung dịch ADA 0,1% cùng với PDA 15% wt/wt (PDA15-ADA0.1@HNP BG/H₂O₂), hydrogel tổng hợp có cấu trúc tương tự như PDA@HNP BG/H₂O₂ đơn lẻ, nhưng có mức độ liên kết cao. Sự gia tăng nồng độ ADA đến 0.5%, cấu trúc mạng giống như bọt biển, đã được quan sát thấy trong PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂, nhưng với kích thước lỗ tương đối nhỏ hơn. Ngoài ra, thành của các vi lỗ dày hơn nhiều, có thể kéo thời gian phân hủy. Cấu trúc liên kết chặt chẽ trong hydrogel PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂ cung cấp khung cần thiết để giữ lại dịch mô và có khả năng thấm oxy và chất dinh dưỡng cao[83,84,104]. Do đó, thiết kế hydrogel có thể phù hợp cho việc gắn tế bào và phát triển tế bào ba chiều.

5.3.4 Đánh giá cơ tính của vật liệu

Cơ tính của vật liệu PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂ được đánh giá thông qua phép đo lưu biến học và kết quả được trình bày trong hình 5.4. Đầu tiên, đặc tính của vật liệu được xác định thông qua sự biến thiên của modun đàn hồi G' và modun suy hao G'' của hydrogel ở 37°C đối với sự gia tăng của tần số (Hình 5.4A). Khi tần số dao động tăng từ 0.1 rad/s đến 200 rad/s, giá trị modun đàn hồi luôn trội hơn so với giá trị modun suy hao, có thể kết luận trạng thái vật liệu luôn ở trạng thái hydrogel. Có thể kết luận trạng thái hydrogel của vật liệu ổn định dù tần số dao động tăng. Tuy nhiên, độ nhớt của vật liệu hydrogel này bị giảm mạnh, khoảng 7000 lần khi tăng tốc độ trượt từ 0.1 đến 200 (1/s), chứng tỏ có sự biến dạng trong cấu trúc vật liệu (hình 5.4B). Để hiểu rõ, sự thay đổi tính chất đàn hồi nhớt của vật liệu được kiểm chứng bằng phương pháp đo sự thay đổi của G' và G'' khi ứng suất trượt từ 0.1% đến 200% (hình 5.4C).



Hình 5.4: Khảo sát cơ tính của vật liệu PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂ bằng phương pháp lưu biến học: A) modun đàn hồi G' và modun suy hao G'' của hydrogel ở 37°C với gia tăng tần số, B) độ nhớt của hydrogel ở 37°C khi tăng tốc độ trượt C) modun đàn hồi G' và modun suy hao G'' của hydrogel ở 37°C khi tăng ứng suất trượt, D) vòng lặp (200s) của modun đàn hồi G' và modun suy hao G'' của hydrogel ở 37°C khi ứng suất trượt thay đổi giữa 0.1% và 200%.

Với ứng suất trong khoảng từ 0.1% đến dưới 30%, vật liệu duy trì trạng thái hydrogel của chúng với ổn định tương đối cao về tính chất đàn hồi nhớt. Khi ứng suất trượt vượt qua ngưỡng 30%, cả hai giá trị của đàn hồi đều giảm, trong đó tính chất dẻo của vật liệu giảm nhanh nhất. Điều này chứng tỏ vật liệu hydrogel đang ở trạng thái chất lỏng chảy, tương tự như khảo sát về độ nhớt vật liệu theo tốc độ trượt. Vòng lặp về tính chất đàn hồi của vật liệu hydrogel ở hai giá trị ứng suất trượt, 0.1% và 200%, được thực hiện để kiểm tra khả năng phục hồi của vật liệu sau biến dạng. Theo kết quả ở hình 5.4D, giá trị G' và G'' của vật liệu chỉ thị trạng thái hydrogel khi ứng suất trượt 0.1% được áp dụng, và lập tức chuyển đổi sang trạng thái chất lỏng khi ứng suất 200% được thay thế. Đặc biệt, khi ứng suất 200% không còn vật liệu tự phục hồi lại trạng thái hydrogel ban đầu của nó. Do vậy, vật liệu PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂ được mô tả như chất rắn đàn hồi. Đồng thời, khả năng thay đổi trạng thái vật liệu theo ứng suất trượt và sự giảm độ nhớt theo tốc độ trượt cùng với tính chất đàn hồi của chúng, vật liệu này có tiềm năng lớn trong phát triển vật liệu dạng tiêm.

Bên cạnh đó, ở nhiệt độ 37°C, giá trị modun tích lũy của vật liệu nằm trong khoảng 40-50kPa, cho thấy sự thích hợp ứng dụng phát triển mô cứng như tái tạo xương.

5.3.4 Độc tính tế bào của hydrogel thu được

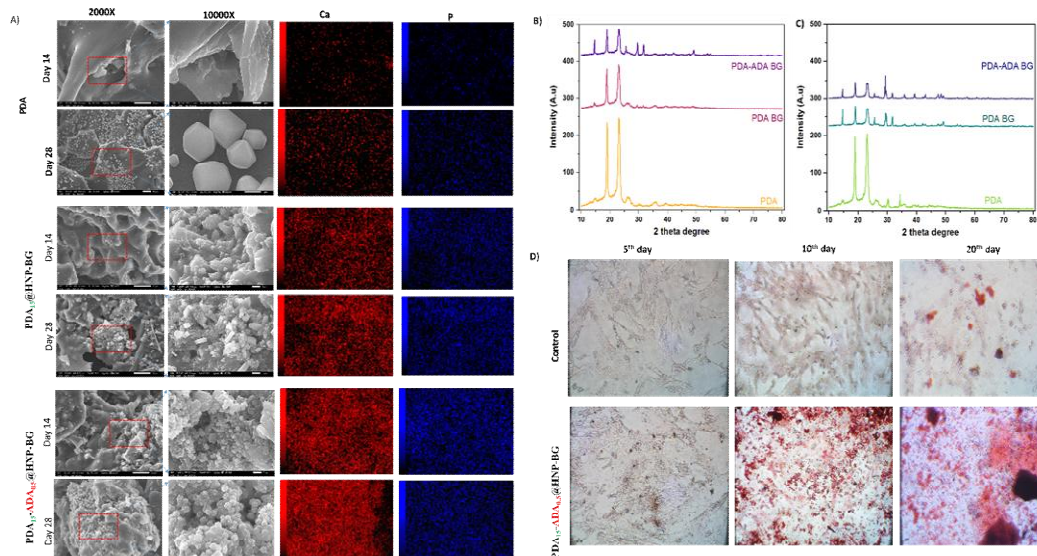
Độc tính tiềm ẩn của hydrogel cần phải được kiểm tra. Trong nuôi cấy 2D, khả năng tồn tại của hMSC được nuôi cấy bằng dung dịch hydrogel chiết xuất là hơn 90% so với các tế bào không được xử lý ở các thời điểm nuôi cấy, cho thấy quá trình phân hủy hydrogel không gây độc cho tế bào. Độc tính tiềm ẩn của

PDA15-ADA0.5@HNP BG cũng đã được thử nghiệm bằng nuôi cấy 3D. Để làm được điều này, các hMSC được đưa vào trong mạng lưới hydrogel và kiểm định sống-chết bằng phương pháp nhuộm kép sống/chết (AO/PI) đã được thực hiện để quan sát và phân tích sự khác biệt một cách trực quan hơn. Hình ảnh nhuộm sống/chết cho thấy hầu hết các tế bào được bao bọc trong hydrogel được thử nghiệm đều có khả năng sống sót (màu xanh lá cây) ngay cả ở ngày thứ 20 (Hình 5.3D). Tuy nhiên, một số tế bào vẫn tròn sau 5 ngày nuôi cấy. Số lượng tế bào lan rộng và khả năng lan rộng của chúng tăng lên theo thời gian nuôi. Cuối cùng, các tế bào trong hydrogel tổng hợp phát triển thành hình dạng trực chính điển hình, trong đó các chân giả có thể nhìn thấy rõ ràng. Nhìn chung, PDA15-ADA0.5@HNP BG thể hiện khả năng tương thích sinh học vượt trội.

5.4 Tiềm năng của HNP BG dựa trên catechol hydrogel trong tái tạo xương

5.4.1 Khoáng hóa sinh học trong ống nghiệm

Khoáng hóa là một trong những đặc tính quan trọng nhất của vật liệu để tái tạo xương, có thể được xác nhận bằng cách theo dõi sự phát triển của các lớp hydroxycarbonate apatit (HCA) sau khi ngâm vật liệu vào SBF trong một khoảng thời gian. Bề mặt lắng đọng apatit với thành phần hóa học được quan sát bằng phân tích SEM-EDS, trình bày trong Hình 5.5. Quan sát bằng kính hiển vi của SEM cho thấy bề mặt của giàn giáo PDA không thay đổi, bề mặt tương đối phẳng với tín hiệu rất thấp của các nguyên tố Ca và P sau 7 ngày ngâm SBF. Sau 14 ngày khoáng hóa trong SBF, các ion siêu bão hòa trong SBF tiếp tục kết tủa trên bề mặt PDA. Phổ EDS cho thấy tỷ lệ Ca/P trên PDA nằm trong khoảng 0,42–0,6. Tuy nhiên, từ phân tích XRD, người ta thấy rằng vật liệu lắng đọng trên bề mặt PDA không phải là apatit. Trong trường hợp hydrogel có HNP BG, sự hiện diện của HNP BG đã được quan sát thấy trên bề mặt của giàn giáo có cấu trúc giống như súp lơ. Bề mặt gần như được bao phủ hoàn toàn bởi một lượng lớn tinh thể nhỏ khi ủ trong thời gian dài trong SBF. Hơn nữa, EDS đã chứng minh rằng thành phần bề mặt hydrogel dẫn xuất HNP được tìm thấy là các nguyên tố Ca và P có tỷ lệ Ca/P cao hơn 2,0, dự đoán sự hiện diện của HA và một dạng thù hình canxi khác, chẳng hạn như canxit. Theo tài liệu tham khảo từ JCPDS no. 09-0432, mẫu XRD của hydrogel hình thành với HNP BG kết luận rằng những tinh thể kết tủa này thuộc về HA. Cấu trúc thù hình cũng chuyển sang pha gần như vô định hình sau 14 ngày ngâm. Thụ tinh đã trở nên vô định hình hơn và các đỉnh HA ở $2\theta = 28,35^\circ$ (1 0 2) và $2\theta = 39,80^\circ$ (1 1 3) trở nên sắc nét hơn, cho thấy sự hình thành tinh thể HCA. Cùng với tín hiệu HCA, phổ XRD của hydrogel với HNP BG (Hình 5.5 B-C) đã xác nhận sự xuất hiện của canxit. Tuy nhiên, cường độ nhiễu xạ của các đỉnh này ở PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂ cao hơn so với hydrogel PDA đơn lẻ. EDS của PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂ cho thấy sự kết tụ Ca và P tăng sau 7 ngày ngâm và các tín hiệu này giống hệt với PDA15@HNP BG. Sự lắng kết Ca và P mới trên bề mặt của PDA15@HNP BG chỉ được xác nhận khi thời gian ngâm được kéo dài đến 14 ngày. Nói cách khác, ADA có thể giúp tăng tốc độ của quá trình kết tinh dẫn đến thúc đẩy quá trình khoáng hóa. Điều này là do cấu trúc alginate chứa các nhóm carboxylate, có thể tương tác với các chất hòa tan khuếch tán như Ca²⁺ từ môi trường SBF hoặc HNP BG, do đó làm tăng độ bão hòa liên quan đến việc thúc đẩy quá trình tạo mầm của cấu trúc apatit hoặc canxit trên bề mặt của PDA-ADA hydrogel tổng hợp trong thời gian đầu so với hydrogel đơn thành phần PDA[123-124]. Do đó, hoạt tính sinh học của PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂ cao hơn nhiều so với các loại khác.



Hình 5.5: Đặc tính thúc đẩy quá trình khoáng hóa của hydrogel thiết kế: PDA, PDA15@HNP BG, PDA15-ADA0.5@HNP BG. A) Bề mặt của các hydrogel ở các độ phóng đại khác nhau (2000 X và 10.000 X) và sự phân bố Ca và P. Giảm độ nhiễu xạ tia X sau B) 7 ngày và C) 14 ngày ngâm trong SBF ở 37 oC. D) Cảm

ứng tạo khoáng xương của PDA15-ADA0.5@HNP BG thử nghiệm trên mô hình tế bào gốc trung mô trong thời gian 20 ngày.

5.4.2 Đánh khả tính cảm ứng tạo khoáng xương

Quá trình khoáng hóa do lắng đọng canxi được coi là dấu hiệu muộn trong quá trình biệt hóa xương. Do đó, tế bào gốc trung mô hMSC được sử dụng để kiểm tra xem liệu PDA15-ADA0.5@HNP BG có gây ra sự khác biệt hóa xương hay không. Sự khoáng hóa canxi được phát hiện thông qua nhuộm Alizarin Red S. Như được hiển thị trong Hình 5.5, các phân tử canxi được tạo ra từ tế bào hMSC nuôi cấy với PDA15-ADA0.5@HNP BG vào ngày thứ 7, trong khi hiện tượng này không xảy ra ở các hMSC đối chứng. Màu Alizarin Red của hMSC được nuôi cấy bằng hỗn hợp hydrogel xuất hiện với mật độ dày hơn vào ngày thứ 14 của quá trình biệt hóa, trong khi sự khoáng hóa bắt đầu được quan sát thấy trong đối chứng (hình 5.5D). Điều này chứng tỏ PDA15-ADA0.5@HNP BG có tác dụng hỗ trợ thúc đẩy cảm ứng tạo xương.

5.4.3 Đánh giá khả năng kháng khuẩn

Để chứng minh PDA15-ADA0.5@HNP BG là vật liệu cấy ghép hiệu quả, đặc tính kháng khuẩn của hydrogel PDA15-ADA0.5@HNP BG cũng được triển khai trong nghiên cứu này. PDA15-ADA0.5 được hình thành bởi enzyme HRP và H₂O₂ được sử dụng cho mục đích so sánh, được xác định là mẫu đối chứng. *S. aureus* và *E. coli* đã được chọn làm mô hình trong thí nghiệm này. Có thể khẳng định rằng hydrogel PDA15-ADA0.5 không có HNP BG không có hoạt tính kháng khuẩn. Sự phát triển của vi khuẩn tăng lên trong 24 giờ đầu tiên (10⁹ CFU/mL, $p < 0,0001$), duy trì ổn định ở nồng độ vi khuẩn cao trong suốt thời gian còn lại của giai đoạn thử nghiệm. Khi vi khuẩn tiếp xúc với hydrogel PDA15-ADA0.5@HNP BG, sự giảm phát triển của vi khuẩn được ghi nhận đáng kể. Hydrogel với HNP BG làm giảm nồng độ vi khuẩn xuống dưới 10² CFU/mL và $\geq 99\%$ *S. aureus* và *E. coli* đã bị tiêu diệt. Nhìn chung, vi khuẩn dường như nhạy cảm với HNP BG. Thủy tinh sinh học vốn có khả năng kháng khuẩn nội tại. Sự trao đổi các ion từ mạng lưới của thủy tinh sinh học với các ion hydro từ môi trường gây ra sự gia tăng độ pH và sự hỗn loạn trong áp suất thẩm thấu tế bào, do đó ức chế sự phát triển của vi khuẩn [125]. Như vậy việc sử dụng HNP BG thay thế chức năng HRP không những hỗ trợ quá trình hình thành liên kết giữa các DA mà còn bổ sung thêm hoạt tính kháng khuẩn cho sản phẩm hydrogel.

Kết luận: Thành công tạo hệ hydrogel nhạy nhiệt trên cơ sở alginate và pluronic F127 bằng phương pháp tạo liên kết ngang thông qua tác nhân liên kết DA. Hạt thủy tinh sinh học biến tính (HNP BG) với nano hemin đã chứng minh khả năng thay thế enzyme HRP trong phản ứng oxi hóa các DA trên dẫn xuất của pluronic và Alginate để tạo hydrogel thể lại. Khảo sát sự ảnh hưởng các thành phần trong khả năng tách pha sol-gel theo nhiệt độ cùng với cấu trúc của vật liệu hydrogel tạo thành, PDA15-ADA0.5@HNP BG được lựa chọn là vật liệu tiềm năng để phát triển. Hệ hydrogel này có tính chất nhạy nhiệt thông qua quá trình chuyển đổi pha sol-gel ở nhiệt độ phù hợp với ứng dụng vật liệu y sinh. Khảo sát tính chất lưu biến của vật liệu cho thấy tiềm năng ứng dụng của vật liệu hydrogel này trong lĩnh vực mô cứng như xương do giá trị stiffness nằm trong 40-50kPa. Thêm vào đó, vật liệu ở trạng thái gel cho thấy tính chất đàn hồi thích hợp sử dụng ở đường tiêm. Sản phẩm phân hủy của hydrogel trong môi trường sinh lý không gây độc đối với tế bào gốc trung mô, tỷ lệ sống của tế bào trên 90%. Việc cấy tế bào gốc trung mô trong cấu trúc của hydrogel cũng cho thấy tính tương hợp sinh học cao và tiềm năng ứng dụng vật liệu này trong dẫn truyền tế bào hay ứng dụng tạo mô/ cơ quant hay thể. Nhờ thành phần HNP BG, vật liệu cho thấy khả năng khoáng hóa. Sau 7 ngày ngâm vật liệu trong môi trường giả sinh học, kết quả SEM kết hợp EDS và XRD đều chứng minh tinh thể calcium và phospho bắt đầu lắng đọng trên bề mặt hydrogel, đặc biệt ở các gel có thành phần alginate, tạo điều kiện thuận lợi cho sự hình thành khoáng xương. Nhờ đặc tính trên, khi vật liệu được nuôi cấy với tế bào gốc trung mô, các đặc điểm ban đầu về cảm ứng biệt hóa thành nguyên bào xương được ghi nhận. Kế thừa đặc tính sinh học trong ức chế sự phát triển của vi khuẩn, hydrogel tạo từ thành phần này cho thấy khả năng ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn, chứng tỏ tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực cấy ghép xương.

CHƯƠNG 6: KẾT LUẬN

6.1 Kết luận

Công trình này đã phát triển các hydrogel nhạy cảm nhiệt từ polyme phản ứng nhiệt, pluronic F127 và alginate bằng 2 phương pháp khác nhau: ghép mạch và tạo liên kết ngang— và đánh giá tiềm năng của hydrogel trong lĩnh vực tái tạo mô.

Mục đích đầu tiên của công việc này liên quan đến việc thiết kế hydrogel phản ứng nhiệt dựa trên kỹ thuật ghép. Trong phần này, pluronic F127 được ghép vào khung chính của alginate. Để làm được điều đó, liên kết hóa học được thực hiện để tạo mạch ghép. Các nhóm carboxylate của alginate được biến đổi với cystamine, tạo dẫn xuất xuất alginate-cystamine (AC). Quy trình này cho phép đưa vào một nhóm chức năng mới, thường dễ phản ứng hơn khi so sánh với nhóm chức cacboxylic của alginate trong quá trình ghép mạch. Ngoài ra, nhóm Cystamine làm giảm độ nhớt, do đó tăng hiệu suất của phản ứng. Liên kết amid được đánh giá là dễ phân hủy trong môi trường sinh học hơn khi so sánh với các liên kết khác. Các nhóm hydroxyl trên F127 được kích hoạt bằng p-nitrophenyl chloroformate. Quy trình này dẫn đến sự hình thành

dẫn xuất este cacbonat vòng thơm, chất này dễ dàng phản ứng với nhóm amine trên mạch AC để thu được hợp chất copolymer ghép alginate-cys-pluronic F127 (ACP). Hợp chất copolymer ghép này kế thừa tính chất phản ứng nhiệt của pluronic. Với phương pháp ghép mạch, copolymer ghép dễ tạo tính đồng nhất trong điều chế hydrogel; do đó, hình thái của hydrogel thu được ở cả trạng thái ướt và trạng thái khô thể hiện một cấu trúc vi mô xốp và liên kết điển hình với các lỗ được sắp xếp đồng đều nhằm mục đích vận chuyển và thẩm thấu oxy và chất dinh dưỡng hiệu quả cũng như trao đổi chất thải dịch mô. ACP hydrogel cho thấy quá trình chuyển đổi sol-to-gel thuận nghịch khi phản ứng với nhiệt độ mà không có hiện tượng phân tách. Hydrogel thể hiện khả năng tương thích tế bào tuyệt vời. Nhiệt độ tạo gel nằm trong khoảng rộng (từ 25oC đến dưới 37oC) với điều kiện ôn hòa, thích hợp cho việc đóng gói tế bào trong mô hình 3D. Các tế bào phát triển từ cụm tạo thành lớp tế bào trên bề mặt đĩa nuôi cấy tương tự như nuôi cấy 2D. Cơ tính của vật liệu chứng minh qua phương pháp lưu biến cho thấy tiềm năng ứng dụng trong tái tạo mô mềm như hỗ trợ lành vết thương. Nghiên cứu này còn đưa ra tiềm năng phát triển hệ hydrogel với các điều kiện thuận lợi cho tái tạo mô mềm bằng cách bổ sung các hoạt chất sinh học trong điều kiện, cân bằng các yếu tố tại mô tổn thương. Nghiên cứu sử dụng L-arginine và resveratrol là mô hình mẫu để chứng minh giả thuyết này. Đáng chú ý, sự kết hợp kép của resveratrol và L-arginine đã mang lại cho hydrogel ACP nhạy cảm với nhiệt khả năng chống oxy hóa vượt trội. Khảo sát về khả năng triệt tiêu gốc tự do cho thấy hydrogel dạng kép cho thấy tốc độ tiêu diệt phù hợp, tạo sự cân bằng hơn khi so sánh với hydrogel đơn hợp chất. Bên cạnh đó, sự kết hợp này còn mang lại lợi ích kéo dài và duy trì sự ổn định của nitric oxide – sản phẩm được tạo ra từ L-arginine, giúp duy trì lợi ích về tín hiệu tế bào do NO tạo ra, kích thích quá trình làm lành vết thương. Các thí nghiệm in vivo chỉ ra rằng hệ hydrogel mang hoạt chất kép này thúc đẩy quá trình lành vết thương ở mô hình chuột bệnh lý đái tháo đường. Các phân tích mô học cho thấy hệ hydrogel này tạo điều kiện thuận lợi cho sự hình thành các sợi collagen và mạch máu, đồng thời kích thích sự di chuyển của tế bào, điều này cho thấy quá trình sửa chữa nhanh chóng đối với mô vết thương.

Mục đích thứ hai của luận án là thiết kế hydrogel phản ứng nhiệt dựa trên kỹ thuật liên kết ngang sử dụng tác nhân liên kết thông qua phản ứng oxi hóa dưới sự giúp đỡ của xúc tác peroxidase. So với các kỹ thuật ghép mạch, chiến lược này dễ thực hiện để tạo ra hệ hydrogel nhạy nhiệt giữa polysaccharide và polymer nhạy nhiệt. Lấy cảm hứng từ khả năng nối mạch của catechol trong môi trường phản ứng oxi hóa, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DA) đã được chọn làm chất liên kết ngang. Việc đưa DA vào khung chính alginate (ADA) được tổng hợp thông qua hỗ trợ của EDC, trong khi nhóm hydroxyl của F127 được thay thế bằng DA tạo thành dẫn xuất pluronic-dopamine (PDA) thông qua phương pháp hoạt hóa bằng chất bắt cặp p-NPC. Dựa trên khả năng hình thành liên hợp polymer-catechol với sự có mặt của peroxidase và H₂O₂, luận án thành công đề xuất một chiến lược mới để tạo ra hạt thủy tinh sinh học với khả năng thay thế chức năng peroxidase bằng cách kết hợp với hemin peroxidase-mimic (HNP BG), nhờ đó đạt được tác dụng hiệp đồng, làm chất xúc tác trong phản ứng liên kết ngang và các tác nhân hoạt tính sinh học để củng cố chức năng của hydrogel thu được. Để tạo ra hiệu quả trong tạo ra BG hoạt tính HNP BG, quá trình cacbon hóa hemin đã được áp dụng. Do vòng lặp tetrapyrrolic lớn, các ứng dụng thực tế của hemin thường bị cản trở bởi một số nhược điểm, bao gồm độ hòa tan trong nước thấp và dễ kết tụ. Thông qua phản ứng thủy nhiệt, hemin chuyển thành các hạt có kích thước nano (HNP) có khả năng phân tán tuyệt vời. Việc kết hợp HNP vào mạng BG mang lại cho HNP BG một chức năng mới, hoạt động xúc tác của enzyme peroxidase. Ngoài ra, HNP BG đã thúc đẩy liên kết chéo giữa hai polyme dẫn xuất catechol là ADA và PDA, dẫn đến sự hình thành hydrogel mô phỏng sinh học. Điều thú vị là hydrogel thu được có khả năng tiêm theo hệ thống tạo gel phản ứng nhiệt với cấu trúc vi xốp với cơ tính thích hợp cho ứng dụng trên xương. Ngoài ra, việc kết hợp HNP BG có thể điều khiển hiệu quả khả năng của quá trình khoáng hóa giúp thúc đẩy đáng kể quá trình hình thành xương mới, đẩy nhanh quá trình tái tạo xương tại chỗ và có đặc tính kháng khuẩn. Do đó, HNP BG cung cấp cái nhìn sâu sắc mới về việc chuẩn bị vật liệu sinh học trong kỹ thuật mô xương.

Các kết luận tổng thể rút ra từ nghiên cứu này là hydrogel dựa trên alginate và pluronic F127 có thể tiêm tại chỗ với các chiến lược khác nhau tạo ra các sản phẩm tiềm năng cho các ứng dụng kỹ thuật mô. Cả hai phương pháp, phương pháp ghép và kỹ thuật liên kết ngang thông qua quá trình oxy hóa catechol, đều có thể thiết kế được hydrogel phản ứng nhiệt dựa trên alginate và pluronic F127. Cả hai hydrogel thu được đều là chất lỏng ở nhiệt độ lạnh để tiêm, nhanh chóng hình thành mạng lưới hydrogel ba chiều khi tiếp xúc với nhiệt độ cơ thể và tạo điều kiện thực hiện với các mô có hình khuyết tật không đều, cho phép phân phối tế bào đơn giản và cục bộ, và cuối cùng, phân hủy để cho phép mô phát triển. Bằng cách thêm chất hoạt tính sinh học như L-arginine, resveratrol hoặc BG, hydrogel alginate-pluronic trở thành nền tảng hấp dẫn cho lĩnh vực tái tạo mô mới. Những hydrogel thông minh này có thể cung cấp giải pháp thay thế tiềm năng, an toàn hơn và thành công hơn cho nhiều ứng dụng trong y sinh trong tương lai.

6.2 Định hướng tương lai

Bất chấp triển vọng thú vị về kết quả trên, rất nhiều định hướng cần được hoàn thiện để có thể đưa sản phẩm này vào thực tế. Trong nghiên cứu này chủ yếu tập trung vào hai đối tượng mô mềm là da và mô

cứng là xương. Để hoàn thiện, những mở rộng nghiên cứu này bao gồm các phương pháp khác nhau để phát triển các hydrogel với các cơ tính khác nhau tạo điều kiện thuận lợi đối với từng mô riêng biệt. Thúc đẩy và kích thích tín hiệu tế bào cực kỳ quan trọng trong lĩnh vực này. Do đó, để mở rộng nghiên cứu các hoạt chất khác nhau hay các yếu tố sinh trưởng hormone nên được mở rộng nghiên cứu, tạo sự đa dạng trong phát triển vật liệu nguồn. Bên cạnh đó, các thử nghiệm tiền sinh học trên động vật lớn hơn với tính tương thích về cấu trúc mô với người nên được thực hiện để cung cấp thêm nhiều bằng chứng về khả năng phát triển của hệ hydrogel trong tương lai. Ngoài ra, xây dựng bộ hồ sơ tiêu chuẩn để đánh giá chất lượng sản phẩm là cần thiết trong trường hợp phát triển sản phẩm thương mại.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN *(nếu có)*

Công bố chính liên quan đến luận án

1. **Le Hang Dang**, Phuong Doan, Tran Thi Yen Nhi, Dinh Trung Nguyen, Bich Tram Nguyen, Thi Phuong Nguyen, and Ngoc Quyen Tran. "Multifunctional injectable Pluronic-cystamine-alginate-based hydrogel as a novel cellular delivery system towards tissue regeneration." *International Journal of Biological Macromolecules* 185 (2021): 592-603.
2. Vo Le, Tuong Van, Ngoc Quyen Tran, **Dang Le Hang**, Thanh Tuyen Nguyen, Quynh Anh Bui, Nguyen Dinh Trung, Nguyen Dat Thinh et al. "Impacting different structures of injectable Pluronic-conjugated alginate (chitosan) hydrogels on their physicochemical characteristics and morphological fibroblast behavior." *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* 27, no. 3 (2022): 205-219.
3. **Le Hang Dang**, Hong Tuoi Do, Kim Tram Pham, Phuong Thu Ha, Thi Phuong Nguyen, Tan Phat Dao, Ngoc Quyen Tran. "Injectable thermogel incorporating reactive oxygen species scavenger and nitric oxide donor to accelerate the healing process of diabetic wounds". *International Journal of Pharmaceutics* 648 (2023): 123576.
4. **Le Hang Dang**, Vu Nhu Quynh, Thuy Tien Nguyen, Thi Hong Tuoi Do, Thi Kim Tram Pham, and Ngoc Quyen Tran. "Thermally-responsive and reduced glutathione-sensitive folate-targeted nanocarrier based on alginate and pluronic F127 for on-demand release of methotrexate." *International Journal of Biological Macromolecules* 263 (2024): 130227.
5. **Đặng Thị Lệ Hằng**, Trần Ngọc Quyển, National Patent (VN 1-2021-01465): QUY TRÌNH TỔNG HỢP HYDROGEL NHẠY NHIỆT TỪ VẬT LIỆU ALGINAT-CYS-PLURONIC, cấp năm 2024.

Các công trình liên quan đến luận án

1. **Le Hang Dang**, Thai Tuan Tran, Minh Tuan Nguyen, Thao- Han Luong, Dat Thinh Nguyen, Minh-Dung Truong, Phuong Le, Hai Khoa Le, Thuy-Tien Dang, Ngoc Quyen Tran. "Syringeable hydrogel based β -cyclodextrin and mixed micelles for Methotrexate delivery". *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 92 (2023), 105299.

