

**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

Chuyên ngành Hóa Hữu Cơ

Mã số: : 9 44 01 14

Thành phố Hồ Chí Minh- Năm 2024

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:

Người hướng dẫn: PGS.TS. Trần Ngọc Quyển (Viện Khoa học Vật Liệu Ứng dụng)

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: ĐẶT VẤN ĐỀ

1.1 Lý do chọn đề tài: tầm quan trọng của hydrogel nhạy cảm nhiệt trong kỹ thuật mô và thách thức hiện tại

Hàng triệu ca tử vong xảy ra trên toàn cầu mỗi năm do thương tích và bệnh tật mà nguyên nhân từ tổn thương mô, gây tác động mạnh đến chất lượng cuộc sống và gánh nặng chăm sóc sức khỏe [1-4]. Mặc dù đã áp dụng phương pháp cấy ghép nội tạng nhưng việc tái tạo có thể không thích hợp trong nhiều trường hợp [5, 6]. Các mô ghép đồng loại phải đối mặt với những hạn chế như nguồn mô người thích hợp, sự cần thiết phải ức chế miễn dịch và những thách thức kỹ thuật [7, 8]. Các biện pháp ức chế miễn dịch đối với người nhận mô ghép tiềm ẩn những rủi ro đáng kể, bao gồm khả năng dễ bị nhiễm trùng, tăng nguy cơ ung thư và giảm tuổi thọ [6, 8]. Để đối phó với những thách thức này, đã có sự phát triển nhanh chóng trong các nghiên cứu trong lĩnh vực tái tạo mô [1, 3, 5]. Mục tiêu chính của những nghiên cứu này là tạo ra các mô tương đương chức năng của con người để sửa chữa và thay thế nội tạng [9, 10].

Khái niệm cơ bản về tái tạo mô liên quan đến việc sử dụng vật liệu sinh học mô phỏng cấu trúc của ma trận ngoại bào (ECM) để hỗ trợ sự phát triển của tế bào mới và thúc đẩy quá trình sửa chữa [1, 5, 10]. Trong khi các ma trận ngoại bào từ kỹ thuật khử tế bào từ mô gốc đã cung cấp vật liệu sinh học lý tưởng (dECM) cho ngành tạo mô [4, 11-14], tuy nhiên, những lo ngại về mức độ phù hợp, phê duyệt về mặt đạo đức, mở rộng quy mô và chi phí đã thúc đẩy sự chuyển hướng tiếp cận sang sử dụng các giải pháp thay thế tạo các khung xương ngoại bào an toàn và hiệu quả trong tái tạo mô [2, 3, 10]. Trong số này, hydrogel nổi lên như một vật liệu nổi bật và linh hoạt trong kỹ nghệ mô [1, 3, 5]. Hydrogel được đặc trưng bởi mạng lưới ba chiều (3D) ngậm nước của các polyme ưa nước [1, 3]. Cấu trúc trương nở và ngậm nước của chúng gần giống với ECM trong các mô tự nhiên, tạo ra môi trường vi mô thuận lợi cho các tế bào tái sinh [15, 16]. Cấu trúc xốp của hydrogel hỗ trợ quá trình đóng gói và trao đổi chất. Nó có thể hoạt động như bộ phận vận chuyển các tín hiệu sinh học, khiến vật liệu này trở thành sự lựa chọn tuyệt vời để vận chuyển và giải phóng thuốc/tác nhân trị liệu [2, 3, 16]. Đặc tính mềm của hydrogel có thể giúp giảm phản ứng viêm của mô xung quanh, từ đó tăng cường khả năng tương thích sinh học của nó [1, 15]. Hydrogel có thể dễ dàng điều chỉnh hình dạng theo yêu cầu riêng biệt, khiến vật liệu này được ưu tiên sử dụng cho các vật liệu và thiết bị cấy ghép [2, 10].

Trong những năm gần đây, hydrogel dạng tiêm thu hút được nhiều sự chú ý hơn so với gel thông thường vì những ưu điểm của chúng trong các thủ tục phẫu thuật xâm lấn tối thiểu và khả năng đáp ứng tại chỗ về điều chỉnh hình dạng [17, 18]. Gel dạng tiêm về cơ bản là một loại hydrogel hình thành tại chỗ giúp đơn giản hóa việc kết hợp hoạt chất, khiến chúng trở thành phương tiện vận chuyển thích hợp hơn [19]. Dạng hydrogel này đặc biệt thích hợp cho các ứng dụng trong đó dạng hoặc hình dạng cuối cùng không quan trọng hoặc được xác định bởi khoảng trống hoặc không gian mà vật liệu được tiêm vào [17, 18]. Ngoài đặc tính tạo gel tại chỗ, thuật ngữ "có thể tiêm" còn ngụ ý rằng hydrogel được tạo ra thông qua một quá trình chủ yếu liên quan đến việc đưa dung dịch hoặc tiền chất dạng lỏng đến vị trí mục tiêu để tạo gel thông qua thiết bị tiêm [15, 17]. Nhu cầu về hydrogel dạng tiêm đã thúc đẩy việc sử dụng hydrogel thông minh có cấu trúc phản ứng với sự thay đổi nhiệt độ [17, 19-21]. Các hydrogel như vậy, ở nồng độ gel hóa tới hạn (CGT), hydrogel thể hiện trạng thái của chất lỏng, chuyển từ trạng thái lỏng sang trạng thái gel khi tiếp xúc với điểm nhiệt độ trên [17, 22]. Các polyme có nhiệt độ dung dịch tới hạn thấp hoặc chuyển pha giữa nhiệt độ phòng và nhiệt độ cơ thể đã được sử dụng để tạo ra hydrogel tiêm tại chỗ [17]. Sau khi tiêm vào cơ thể, dung dịch polymer trải qua quá trình tự lắp ráp cấu trúc để tạo thành hydrogel ở nhiệt độ cơ thể [20]. Một trọng tâm quan trọng là phát triển hydrogel nhạy nhiệt bằng cách kết hợp các polyme nhạy cảm nhiệt với các thành phần polyme tự nhiên, chẳng hạn như polysaccharit [20, 23]. Sự kết hợp này cho phép thiết kế vật liệu tạo môi trường nhân tạo hợp lý có lợi cho sự phát triển và biệt hóa tế bào [24]. Polysaccharit, được liên hợp với polyme nhạy nhiệt hoặc tạo liên kết chéo với polyme nhạy nhiệt, đã được sử dụng để điều chế hydrogel nhạy cảm nhiệt có nhiệt độ dung dịch tới hạn tối ưu phù hợp để tiêm vào cơ thể [20, 22, 23]. Sự kết hợp này cũng mang lại những khả năng mới để phát triển độ bền cơ học phù hợp cho từng ứng dụng mô [15, 16].

Việc kết hợp tất cả các tính năng thiết yếu vào cấu trúc hydrogel là thách thức cho việc đáp ứng các yêu cầu cơ bản cho ứng dụng lâm sàng tái tạo mô mong muốn. Việc thừa nhận những hạn chế của hydrogel dạng trần đã dẫn đến sự phát triển của các hệ hydrogel thể lai với các dấu hiệu sinh học khác nhau [25, 26]. Bằng cách kết hợp các hợp chất hoạt tính sinh học như axit amin [27-29], các chất hoạt tính sinh học có nguồn gốc từ thực vật [30-32] và/hoặc thủy tinh sinh học [27, 33] vào hydrogel, các hệ hydrogel này thu được các đặc tính sinh học mà dạng trần của khung xương hydrogel không thể đạt được theo cách riêng của cấu trúc. Điều thú vị là, việc tăng cường hoạt tính

cho hydrogel thông qua các yếu tố sinh lý học có thể tốt hơn hoặc thay thế hoặc tác động tích cực đến các tín hiệu sinh hóa [34], đặc biệt là các yếu tố đó kích thích hiệu quả các nuôi dưỡng tế bào và/hoặc kích thích di chuyển tế bào để hình thành các mô chức năng [29, 31, 32]. Do đó, cần phải khám phá các thiết kế tổng hợp sáng tạo để giải quyết những thách thức này và tạo ra các vật liệu có khả năng lập trình cao hơn cho kỹ thuật mô.

1.2 Mục tiêu và đối tượng

Luận án này nhằm mục đích khám phá và phát triển các khung xương ngoại bào nhân tạo dạng tiêm tiên tiến có đặc tính nhạy nhiệt và đáp ứng các yêu cầu chuyên biệt về tái tạo mô. Điều này đạt được bằng cách sử dụng vật liệu polyme lai, đặc biệt là polysaccharide, alginate và polyme nhạy cảm nhiệt Pluronic F127. Mục tiêu luận án là tạo ra các khung xương ngoại bào nhân tạo cung cấp một môi trường vi mô phù hợp để hướng dẫn các tế bào đáp ứng, từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình tái tạo mô. Ngoài ra, sự kết hợp với các tín hiệu sinh học (hợp chất resveratrol từ thực vật, axit amin (arginine) hoặc các hạt nano vô cơ (thủy tinh sinh học) sẽ được coi là chất phát tín hiệu sinh học trong các hệ hydrogel được thiết kế để tăng cường và phát huy hiệu quả của các vật liệu này trong việc tái tạo mô.

Hai phương pháp thường được sử dụng để thiết kế hydrogel nhạy cảm nhiệt từ Pluronic F127 và alginate: ghép mạch và khâu mạch. Vì vậy, luận văn này có hai mục tiêu chính:

Mục tiêu 1: Phát triển hydrogel nhạy cảm nhiệt từ alginate và Pluronic F127 bằng kỹ thuật ghép mạch. Giả thuyết cho rằng sau khi ghép Pluronic trên alginate, tính năng chuyển tiếp sol-gel của pluronic sẽ được giữ nguyên, đồng thời cấu trúc lỗ xốp sẽ hỗ trợ sự phát triển của tế bào. Cấu trúc được thiết kế sẽ là khung đỡ cho các tác nhân trị liệu kép nhằm hỗ trợ điều trị vết thương do bệnh tiểu đường.

Mục tiêu 2: Phát triển hydrogel nhạy nhiệt bằng cách sử dụng kỹ thuật khâu mạch giữa alginate và Pluronic F127 thông qua phản ứng oxy hóa của nhóm catechol. Bioglass được tích hợp để phát triển hydrogel chức năng mô phỏng môi trường sinh học của xương. Để loại bỏ việc sử dụng enzyme peroxidase cho phản ứng oxy hóa catechol, bioglass được thiết kế bằng cách tích hợp với các hạt nano hemin để mang lại chức năng mới cho hệ Bioglass. Giả thuyết cho hệ Bioglass này với tính chất bất chước khả năng của peroxidase sẽ đóng vai trò là chất xúc tác tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình oxy hóa catechol, dẫn đến hình thành liên kết ngang trong alginate và Pluronic với sự chuyển tiếp sol-gel thích hợp. Việc bổ sung Bioglass cũng có thể cung cấp một giàn giáo tiềm năng để tái tạo xương.

1.3 Cấu trúc luận án

Luận án có sáu chương. Chương 1 là phần giới thiệu (3 trang), chương 2 là tổng quan tài liệu (37 trang), chương 3 là phương pháp luận (17 trang). Phần kết quả và thảo luận được chia thành 2 chương: Chương 4 (mục tiêu 1, 37 trang) và Chương 5 (mục tiêu 2, 27 trang). Cuối cùng là phần kết luận, hạn chế và khuyến nghị được trình bày ở Chương 6 (4 trang). Một số kết quả được trình bày trong phần phụ lục. Luận án có 9 bảng, 41 hình và 2 sơ đồ. Luận án sử dụng 311 tài liệu tham khảo, với 187 tài liệu tham khảo mới nhất trong 5 năm qua, chiếm 60,13%.

CHƯƠNG 2: TỔNG QUAN VỀ KỸ THUẬT TIÊN TIẾN VÀ LÝ THUYẾT

2.1 Ý tưởng về hydrogel nhạy nhiệt dạng tiêm trong tái tạo mô

2.2 Mã hóa hydrogel cho các mô chuyên biệt

2.2.1 Sự đàn hồi (mềm dẻo) của hydrogel

2.2.2 Các tín hiệu sinh học

2.2.2.1 Vết thương đái tháo đường

2.2.2.2 Tái tạo xương

2.3 Vật liệu hydrogel nhạy nhiệt từ pluronic

2.4 Alginate- vật liệu linh hoạt cho các ứng dụng y học tái tạo

CHƯƠNG 3: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

Tất cả thông tin vật liệu, nguyên liệu, thiết bị phân tích được trình bày trong bản luận án đầy đủ.

3.1 Tổng hợp polymer

3.1.1 Tổng hợp tiền polymer Pluronic

1.1.1.1 Tổng hợp Pluronic -NPC

Quy trình này được dựa trên các báo cáo trước đó [71-72]. Nhóm OH ở mạch Pluronic F127 được kích hoạt bằng p-nitrophenyl chloroformate (pNPC) tạo dẫn xuất carbonates (tác nhân electrophile mạnh) dễ dàng hình thành liên kết với nhóm chức ái nucleophile như amino NH_2 .

1.1.1.2 Pluronic-DOPA (PDA)

Dẫn xuất pluronic-dopamine (PDA) được tổng hợp với sự trợ giúp của p-NPC. Sau khi pluronic F127 được hoạt hóa với pNPC, liên kết carbamate được hình thành giữa nhóm carbonates của pluronic-NPC và nhóm amino trên phân tử DOPA.

3.1.2 Tổng hợp tiền chất alginate

1.1.1.3 Tổng hợp alginate-cystamine

Dẫn xuất alginate-cystamine (AC) được tổng hợp với sự trợ giúp của EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide), NHS (N-hydroxysuccinimide). Nhóm carboxylate trên alginate được kích hoạt với EDC tạo nhóm chức electrophile mạnh O-acylisourea, dễ dàng hình thành liên kết với nhóm ái nucleophilic NH₂ trên phân tử cystamine. NHS được sử dụng cùng với EDC để làm tăng độ bền của dẫn xuất O-acylisourea- alginate.

1.1.1.4 Tổng hợp alginate-DOPA

Dẫn xuất alginate-DOPA (ADA) được tổng hợp với sự trợ giúp của EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide). Nhóm carboxylate trên alginate được kích hoạt với EDC tạo nhóm chức electrophile mạnh O-acylisourea, dễ dàng hình thành liên kết hóa học với nhóm ái nucleophilic NH₂ trên phân tử DOPA.

3.1.3 Tổng hợp alginate-cystamine –Pluronic

Copolymer alginate-cystamine-pluronic được hình thành thông qua liên kết carbamate của pluronic-NPC và nhóm NH₂ trên dẫn xuất alginate-cystamine.

3.1.4 Kỹ thuật để đánh giá cấu trúc tổng hợp

Cấu trúc hóa học của sản phẩm được xác minh bằng phương pháp quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier, cộng hưởng hạt nhân proton và UV-vis (UV-1900, Shimadzu, Nhật Bản). Mật độ nhóm amino trên alginate được xác định bằng axit 2,4,6-trinitrobenzen sulfonic (TNBS, Thermo Fisher Scientific) sử dụng l-alanine làm chất chuẩn nội. Mức độ thay thế của DA trên alginate hoặc Pluronic được tính toán bằng cách sử dụng độ hấp thụ theo dõi ở bước sóng 280 nm

3.2 Chế tạo kính sinh học mô phỏng peroxidase

3.2.1 Tổng hợp HNP

Hạt nano HNP được tổng hợp từ hemin bằng phương pháp thủy nhiệt trong môi trường methanol.

3.2.2 Tổng hợp HNP BG

Bioglass được tổng hợp bằng phương pháp sol-gel, với công thức 64% SiO₂–31% CaO–5% P₂O₅ (tính bằng mol%). Hạt HNP được tích hợp vào mạng lưới bioglass bằng phương pháp thủy nhiệt tương tự như tổng hợp ở bước 3.2.1.

3.2.3 Đặc điểm cấu trúc

Hình thái được xác định bằng thiết bị kính hiển vi điện tử quét (SEM, JSM IT-200 Jeol) có đầu dò phổ tán sắc năng lượng (EDS) để phân tích sự phân bố nguyên tố. Nhiều xạ tia X được thực hiện với D8 Advance ECO (Bruker AXS, Đức) để xác định tinh thể của sản phẩm. Phổ hấp thụ UV-vis được ghi lại bằng máy quang phổ UV-vis (UV-1900, Shimadzu, Nhật Bản). Phổ huỳnh quang được ghi lại bởi Fluoromax Plus C (Horiba, Nhật Bản).

3.3 Kiểm tra hoạt tính tương tự peroxidase

3.3.1 Phép phân tích Pyrogallol

Phép phân tích pyrogallol được sử dụng để đánh giá khả năng bắt chước tính chất xúc tác của peroxidase. HRP enzyme được sử dụng làm chất đối chiếu. Dựa trên động học của phản ứng oxi hóa pyrogallol, các thông số về K_m và V_{max} của HNP BG được tính toán và so sánh với giá trị tạo ra bởi HRP enzyme trong cùng một điều kiện. Phép phân tích được thực hiện với UV-vis (UV-1900, Shimadzu, Nhật Bản)

3.3.2 Phản ứng oxi hóa dopamine

Phản ứng oxi hóa dopamine được sử dụng để đánh giá khả năng bắt chước tính chất của peroxidase trong việc tạo ra polydopamine. HRP enzyme được sử dụng làm chất đối chiếu. Phép phân tích được thực hiện với UV-vis (UV-1900, Shimadzu, Nhật Bản). Phân tích sản phẩm polydopamine được thực hiện với UHPLC ultimate 3000 – MSQ Plus.

3.4 Tổng hợp hydrogel

3.4.1 Tổng hợp hydrogel từ alginate-cystamine-Pluronic ACP

Phân tán bột ACP vào nước cất ở nồng độ khác nhau (0-20 wt%), khuấy ở nhiệt độ 10–15 °C. Dung dịch được ổn định ở 4 °C trong 24h trước khi tạo thành gel ở nhiệt độ phòng.

3.4.2 Tổng hợp hydrogel thông qua liên kết dopamine

Dung dịch A: Dẫn xuất pluronic-DOPA (PDA) được phân tán trong nước cất, và khuấy ở nhiệt độ 10–15 °C. Dung dịch ổn định ở 4 °C trong 24h. Nồng độ PDA tạo hydrogel được khảo sát từ 20 wt%.

Dung dịch B: Dẫn xuất alginate-DOPA (ADA) được phân tán trong nước cất, and khuấy ở nhiệt độ phòng.

Đối với PDA hydrogel, dung dịch A được trộn với H₂O₂ trước khi bổ sung thêm HNP BG. Nồng độ PDA kết hợp với HNP BG để tạo ra hydrogel được khảo sát dựa trên kết quả tạo gel của dung dịch A trong điều kiện không bổ sung tác nhân oxy hóa và xúc tác.

Đối với PDA-ADA hydrogel, dung dịch A và B được trộn lại nhau, trong đó nồng độ A được lựa chọn dựa trên kết quả khảo sát của PDA hydrogel với HNP BG và H₂O₂, nồng độ ADA thay đổi từ 0.1 - 2 wt%.

3.5 Đánh giá về hình thái học của các hệ hydrogel

Hình thái học ở trạng thái khô được đánh giá bằng SEM. Hydrogel ở trạng thái ướt được đánh giá bằng kính hiển vi đồng tiêu với sự hỗ trợ của chất nhuộm AO.

3.6 Kiểm tra đặc tính nhạy nhiệt

3.6.1 Phương pháp đảo ngược ống nghiệm

Giá trị CGC và GT của vật liệu tổng hợp được đánh giá bằng phương pháp đảo ngược ống nghiệm thông qua sự chảy của dung dịch polymer trong ống nghiệm ở các điểm nhiệt độ và nồng độ.

3.6.2 Phân tích tính chất lưu biến

Lưu biến học được nghiên cứu với Thermo HAAKE 6000 hoặc TA Discovery HR 30.

3.7 Kiểm tra khả năng hấp thu nước và sự phân hủy

Kiểm tra khả năng hấp thu nước và sự phân hủy của hydrogel được thực hiện với DMEM, PBS 1×, và nước cất. Khả năng hấp thu nước được đánh giá thông qua sự thay đổi khối lượng hydrogel theo thời gian được ngâm trong môi trường khảo sát. Sự phân hủy của hydrogel được tính toán dựa trên sự thay đổi của trọng lượng copolymer sử dụng tạo hydrogel trước và sau khi ngâm.

3.8 Nghiên cứu về mang hoạt chất và giải phóng hoạt chất in vitro

3.8.1 Sự mang hoạt chất

Quá trình mang hoạt chất được thực hiện bằng phương pháp nghiền bi [266].

3.8.2 Phân tích giải phóng hoạt chất

Giải phóng hoạt chất được thực hiện bằng phương pháp thẩm tách sử dụng màng cellulose 3.5 kDa. Hàm lượng hoạt chất giải phóng được phân tích bằng phương pháp HPLC kết hợp ELSD. Nghiên cứu động học quá trình giải phóng hoạt chất được thực hiện với KinetDS 3.0.

3.9 Kiểm tra độc tính

3.9.1 Kiểm tra độc tính bằng phương pháp nuôi cấy 2D

Dịch chiết của hydrogel được sử dụng trong nghiên cứu này. Phân tích SRB được sử dụng để đánh giá về khả năng sống sót của tế bào sau khi tiếp xúc với dịch chiết.

3.9.2 Kiểm tra độc tính bằng phương pháp nuôi cấy 3D

Tế bào được trộn chung với copolymer tạo thành khối hydrogel. Độc tính của hệ được phân tích thông qua kỹ thuật nhuộm sống chết, AO/PI.

3.9.3 Kiểm tra chức năng tế bào trong hydrogel

Khả năng di chuyển của tế bào và khả năng bám dính sau khi được nuôi cấy trong hydrogel được sử dụng để kiểm tra chức năng tế bào trong hydrogel và được kiểm tra thông qua kỹ thuật nhuộm huỳnh quang.

3.10 Kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa và phương pháp vi pha loãng.

3.11 Kiểm tra hoạt tính kháng oxi hóa

3.11.1 Phép phân tích DPPH

Phép phân tích DPPH được đánh giá thông qua giá trị hấp thu của OD 517 nm.

3.11.2 Phép phân tích superoxide anion

Phép phân tích superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) được đánh giá thông qua hàm lượng $O_2^{\cdot-}$ sản sinh từ tế bào đại thực bào Raw 264.7 sau khi kích thích bằng LPS bằng kit cytochrome c reductase.

3.11.3 Phép phân tích tình trạng stress oxi hóa với tế bào BMSC

Phép phân tích được thực hiện với dòng tế bào bị gây stress oxi hóa. Cụ thể, tế bào BMSC được gây stress oxi hóa bằng H_2O_2 . Sau đó, tế bào này được xử lý với các mẫu test để đánh giá hiệu quả phục hồi sau khi stress. Các giá trị được đánh giá thông qua nồng độ nitric oxide (sử dụng kit phân tích Griess) và sự có mặt của peroxynitrite (sử dụng chất đánh dấu huỳnh quang J2™ PON Green 99)

3.12 Phép phân tích tán huyết

Phép phân tích tán huyết được sử dụng để test về độ tương hợp sinh học của hydrogel với máu. Nếu vật liệu gây hiện tượng tán huyết >10%, được đánh giá là độc tính.

3.13 Phép phân tích về khoáng hóa sinh học

3.13.1 Khoáng hóa sinh học trong môi trường sinh lý SBF

Hydrogel được ngâm trong môi trường SBF theo một thời gian nhất định. Sau đó, hydrogel được thu lại và đông khô. Phương pháp SEM kết hợp với EDS được sử dụng để đánh giá về sự hình thành của sản phẩm khoáng hóa trên bề mặt hydrogel. XRD được sử dụng để phân tích thành phần tinh thể hình thành trên bề mặt của hydrogel sau thời gian ngâm.

3.13.2 Phép phân tích khả năng cảm ứng tạo xương

Thí nghiệm được tiến hành với tế bào hMSCs. Sau khi nuôi cấy tế bào với mẫu thử nghiệm, sự tích tụ calci thông qua phương pháp nhuộm Alizarin Red được sử dụng để đánh giá khả năng biệt hóa xương của tế bào gốc hMSCs.

3.14 Nghiên cứu trên động vật

Nghiên cứu trên động vật được thực hiện ở đại học Khoa học Tự Nhiên, Đại Học Quốc Gia TP.HCM và Đại học Y Dược Thành Phố Hồ Chí Minh.

Chuột albino (CD-1 ICR, Coat Color White – Albino) và thỏ trắng NewZealand được sử dụng trong nghiên cứu, cung cấp từ Viện Kiểm nghiệm thuốc TP.HCM.

3.14.1 Phép phân tích kích ứng da

Quy trình thực nghiệm được tiến hành theo hướng dẫn của ISO 10993-10:2010 (E).

3.14.2 Phép phân tích độc tính

Độc tính hydrogel được thực nghiệm thông qua phương pháp tiêm dưới da, thực hiện ở Đại học Y Dược Thành Phố HCM (Số y đức: 958/GCN-HĐĐDNCTĐV ngày 16/6/2023). Sau khi cấy dưới da, các thông số về thành phần bạch cầu và định lượng protein phản ứng C (CRP) được đánh giá để đánh giá tình trạng viêm. Mẫu da chỗ cấy được đánh giá bằng phương pháp nhuộm mô hematoxylin–eosin (HE).

3.14.3 Thiết lập mô hình chuột đái tháo đường

Mô hình chuột đái tháo đường được thiết lập với Streptozotocin (STZ) thực hiện tại đại học Khoa học Tự nhiên (Số y đức: 79B/KHTN-ACUCUS ngày 30/06/2020). STZ được tiêm theo đường tĩnh mạch đơn liều. Liều STZ được xác định thông qua phân tích hàm sống sót Kaplan-Meier (KM) và nồng độ glucose máu (đo bằng Accu Chek Performa). Liều STZ tạo chuột với mức đường huyết > 250 mg/dL trong 14 ngày với tỷ lệ sót sót > 90% được lựa chọn cho nghiên cứu thử nghiệm vết thương.

3.14.4 Thiết lập mô hình vết thương bỏng trên chuột đái tháo đường

Chuột bệnh lý đái tháo đường mang vết thương bỏng được tạo bằng thanh sắt nóng đường kính 0.5cm. Vết thương được điều trị sau 2 ngày gây bỏng. Mẫu được tiêm bằng kim tiêm 25G với liều lượng 0.4 mL/vết thương. Vết thương được điều trị 2 ngày/lần.

3.14.5 *Đánh giá quá trình lành vết thương*

Quá trình lành vết thương được ghi nhận vào mỗi 2 ngày. Thước kẹp và hình ảnh vết thương được chụp lại. Diện tích vết thương được ước tính thông qua các quy trình đã công bố trong tài liệu [71, 72]. Nghiên cứu về giải phẫu mô học được thực hiện với H&E, và Masson's trichrome (MT). Thí nghiệm này được thực hiện ở Khoa Giải phẫu bệnh- Bệnh viện Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh. Sự tái tạo lớp biểu mô được đánh giá thông qua độ dày lớp biểu bì da với phần mềm AxioVision 3.0. Hàm lượng collagen trong lớp trung bì đánh giá bằng phần mềm ImageJ.

3.15 *Phân tích số liệu*

OriginPro2022B và Graph-Pad Primes 2021 được sử dụng để phân tích số liệu. Các dữ liệu được thu thập từ ít nhất 3 lần lặp lại. Sự khác biệt được xác nhận nếu giá trị p trả về nhỏ hơn 0.05.

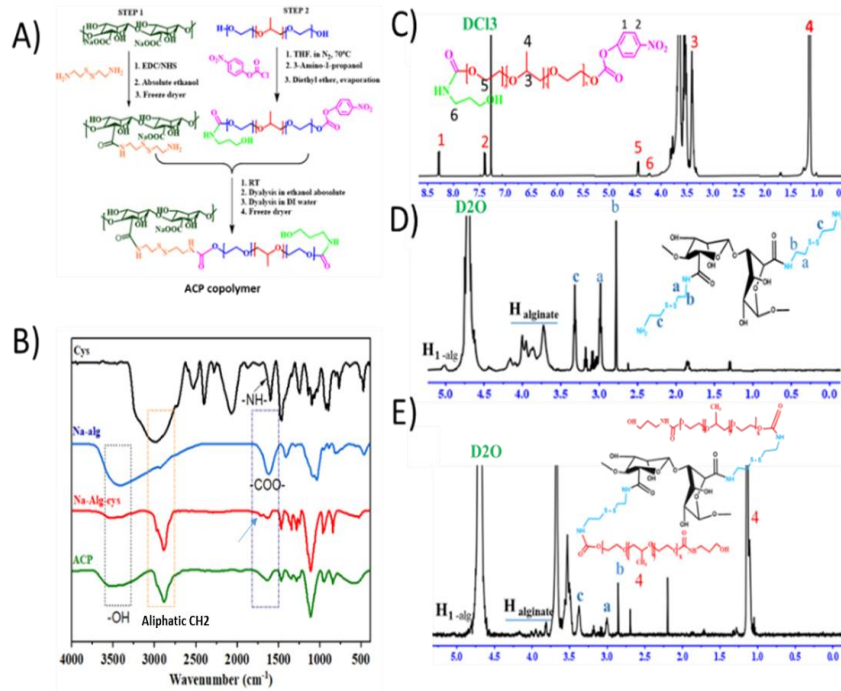
CHƯƠNG 4: TỔNG HỢP HYDROGEL NHẠY CẢM NHIỆT TỪ ALGINATE VÀ PLURONIC BẰNG KỸ THUẬT GHEP MẠCH ỨNG DỤNG LÀM LÀNH VẾT THƯƠNG BỆNH LÝ ĐÁI THÁO ĐƯỜNG

4.1 *Phân tích cấu trúc co-polymer ghép alginate-pluronic*

Pluronic F127 được ghép lên mạch alginate thông qua cầu nối cystamine, như **hình 4.1A**. Cystamine được gắn lên mạch alginate sử dụng EDC/NHS, tạo thành dẫn xuất alginate mang nhóm chức amine, ký hiệu alginate-cystamine (AC). Để gắn pluronic lên cấu trúc AC tại vị trí nhóm amino, nhóm hydroxyl ở đầu mạch của pluronic được oạt hóa với p-nitrophenyl chloroformate (NPC) để hình thành nhóm chức p-nitrophenyl carbonate, ký hiệu NPC-F127. Nhóm p-nitrophenyl carbonate trên NPC-F127 là nhóm nhạy cảm mạnh với nhóm amino trên AC hình thành liên kết urethane bền. Phản ứng giữa NPC-F127 và AC được diễn ra trong môi trường nước ở nhiệt độ phòng. Cấu trúc hóa học của vật liệu được phân tích bằng FT-IR, ¹H-NMR and UV-vis.

4.1.1 *Phân tích cấu trúc tiền chất alginate, alginate-cystamine*

Alginate-cystamine (AC), các nhóm carboxyl trên mạch Na-alg 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 4.1 B**). Phổ FT-IR của Na-Alg: 3411 cm⁻¹ đối với nhóm hydroxyl (-OH), 2923 cm⁻¹ đối với aliphatic (CH₂), 1619 cm⁻¹ và 1412 cm⁻¹ đối với độ giãn đối xứng và bất đối xứng (-COO⁻), tương ứng [57]. Vùng 1294–815cm⁻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 1294cm⁻¹-1037cm⁻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 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 cho thấy tín hiệu dao động của liên kết amine bậc 1, cùng với dao động nhỏ của liên kết SH ở 2298-1960 cm⁻¹. 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 ¹H-NMR trên hình 4.1D. Cả hai đỉnh proton đặc trưng của Na-alg và Cystamine đều được thể hiện trên phổ ¹H-NMR. Phổ hiển thị proton của đơn vị guluronic (H1-G) và đơn vị mannuronic (H1-M) ở δ = 5,05ppm và δ = 4,45ppm [62,63]. Bên cạnh đó, sự dịch chuyển hóa học của proton C-5 trên đơn vị guluronic (H5-G, ở δ= 4,37ppm) và đơn vị mannuronic (H5-M, δ=4,20ppm) [64], đặc trưng của alginate cũng được phát hiện trên phổ AC. Ngoài ra, phổ còn thể hiện các tín hiệu ở δ= 3,1 ppm (Ha) và δ= 3,4 ppm (Hb), đặc trưng tín hiệu của cystamine, -CH₂CH₂S- và -NHCH₂CH₂S-, 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±0,36 mg/g AC, hiệu suất quy trình đạt 78,04±2,31%.



Hình 4.1: A) Sơ đồ thiết kế quy trình tổng hợp 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 $^1\text{H-NMR}$ của C) pluronic hoạt hóa, D) alginate-cystamine và E) copolymer ghép ACP.

4.1.2 Phân tích cấu trúc tiền chất pluronic, pluronic-NPC

Nhóm hydroxyl của F127 được kích hoạt bằng pNPC và cấu trúc hóa học được trình bày trong **hình 4.1C**. 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, $\text{CH}_2-\text{O}-\text{NPC}$. Chuyển dịch hóa học tại $\delta=4,22\text{ppm}$ tương ứng với proton methylene của $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Ami}$, khẳng định sự thành công trong bước tổng hợp thứ 2.

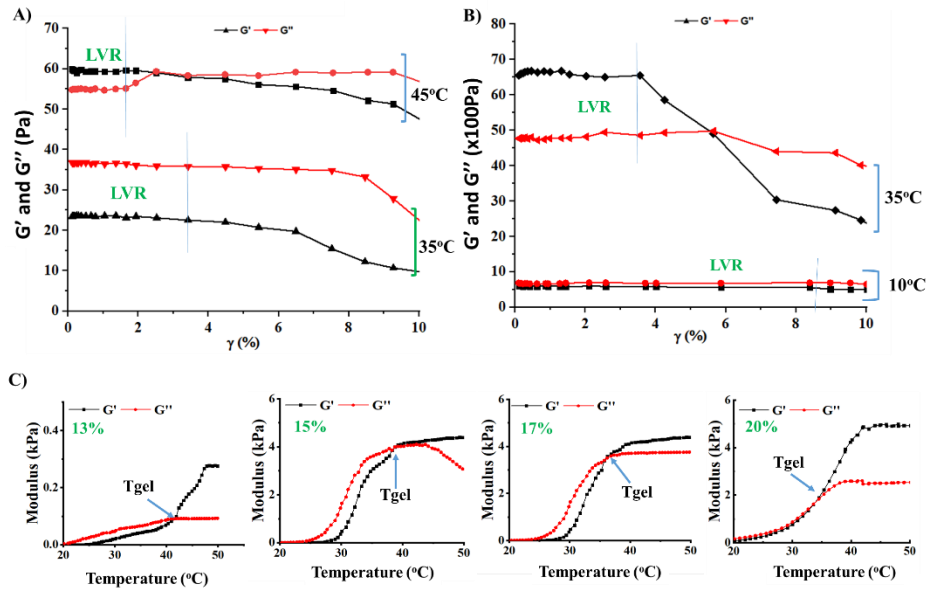
4.1.3 Phân tích cấu trúc co-polymer ghép alginate-pluronic

Việc tổng hợp thành công ACP được khẳng định bằng phổ FT-IR và phổ $^1\text{H-NMR}$ (**hình 4.1**). Copolymer 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 ($\text{C}=\text{O}$) 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 4.1E**) xác nhận quá trình tổng hợp thành công copolymer 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 là $44,47\pm 0,74\%$.

4.2 Điều chế hydrogel nhạy nhiệt từ copolymer ghép 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 của pluronic F127 được cải thiện sau 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%.

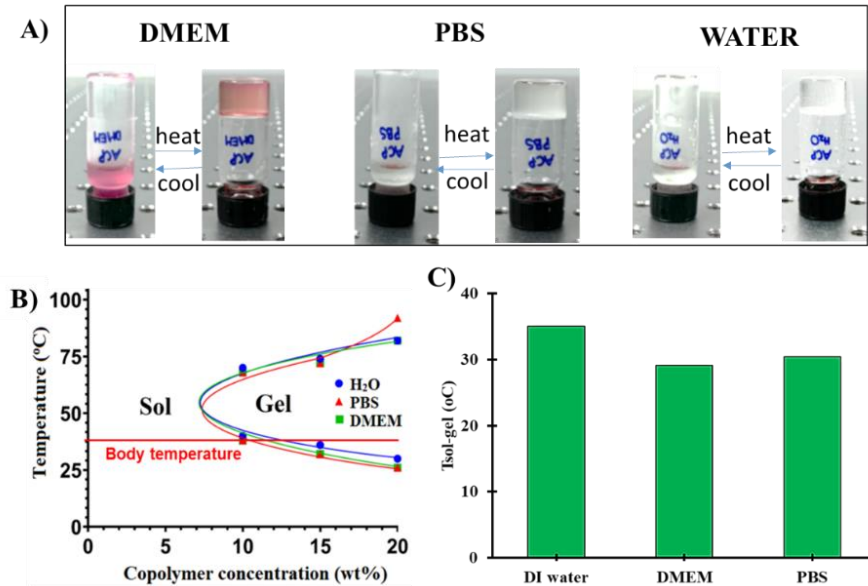


Hình 4.2: Các thông số đàn hồi nhớt của hai ACP (20 % wt/wt) với tỷ lệ pluronic là A) 83,33% hoặc B) 87,5%, thực hiện ở tần số góc cố định 1,0rad/s, ở 2 điều kiện nhiệt độ. Sự biến thiên của giá trị G' và G'' của ACP (hàm lượng pluronic là 87.5%) với các nồng độ khác nhau (wt/wt). C) 13%, D) 15%, C) 17% và D) 20%.

Bên cạnh mật độ năng lượng kết dính, thông số về độ nhớt của vật liệu ACP 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 duy trì ở khu vực có lực biến dạng cắt cực thấp, dưới 2% khi ở nhiệt độ 45°C, và dưới 4% khi ở nhiệt độ 35°C. Dung dịch copolymer ACP ở tỷ lệ này tồn tại ở trạng thái chất lỏng nhớt đàn hồi ở 35°C, cho thấy rằng dung dịch này không thể hình thành giai đoạn gel ở nhiệt độ dưới 37°C mặc dù nồng độ copolymer của nó lên tới 20 wt% như trong Hình 4.2A. Một sự thay đổi biên độ trong vùng LVE đã được quan sát thấy khi phần khối lượng của pluronic F127 tăng lên 87,5%. Vùng LVE là 3,8% ở 35°C và 8,4% ở 10°C. Ngoài ra, với 87,5% pluronic F127 trong phản ứng ghép (hình 4.2B), giá trị mô đun tổn hao G'' lớn hơn giá trị mô đun dự trữ G' ở 35°C, khẳng định rằng tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm, cấu trúc thượng tầng hình thành một mạng lưới ba chiều nhất quán. Những kết quả này phù hợp với mật độ năng lượng gắn kết. Để hiểu rõ hơn về tác động của alginate, nồng độ gel tối hạn của pluronic F127 nguyên chất đã được xác định. Sự chuyển tiếp sol-gel của pluronic F127 ở 20 wt% là 20,01°C. Nhiệt độ tối hạn của gel (GCT) này được chuyển lên điểm cao hơn khi kết hợp alginate. Ví dụ, với ACP với pluronic 83,33%, GCT ở 44,89 °C, trong khi ACP với pluronic 87,5% thiết lập GCT của ở 35,1 °C. Các giá trị GCT phụ thuộc vào hàm lượng F127. Sự tăng nồng độ alginate làm cho hệ thống ưa nước hơn do bản chất của alginate [39,71]. Lượng alginate cao hơn làm tăng mật độ liên kết hydro với các phân tử nước và sau đó làm tăng enthalpy của quá trình khử nước [13,72,73]. Sự hiện diện của alginate cản trở cả sự sắp xếp lại cấu trúc ban đầu của các mixen và sự đóng gói tiếp theo để tạo thành cấu trúc gel được đóng gói, có trật tự [72,73]; do đó, nó làm tăng sự tạo gel của nhiệt độ. Do chỉ có ACP với 87,7% pluronic biểu hiện gel trong khoảng 30-37°C nên copolymer ghép này được sử dụng cho nghiên cứu tiếp theo.

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

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 4.2C. 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 lên 20 %wt, nhiệt độ cảm ứng T_{gel} giảm. Cụ thể, ở mức 13 %wt, T_{gel} là 41,2 °C, và giảm xuống 35,1°C khi nồng độ ACP đạt 20 %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 cấu trúc 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 T_{gel} thấp hơn.



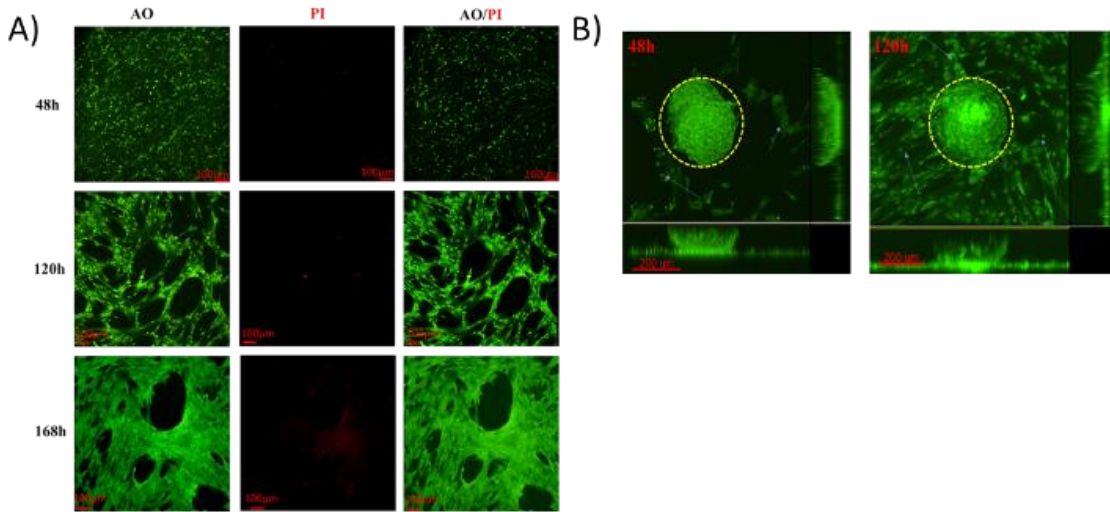
Hình 4.3: A) Hình ảnh của dung dịch ACP (20 %wt) pha trong các môi trường khác nhau (nước DI, DMEM và PBS) khi đặt ở 2 điều kiện nhiệt độ khác nhau, dưới 20°C và trên 30°C. B) Nhiệt độ chuyển tiếp sol-gel của hydrogel ACP được điều chế trong các môi trường khác nhau (nước DI, DMEM và PBS) bằng phương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

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

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. Theo **hình 4.3 A**, ở nồng độ 20 %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 T_{gel} của ACP (hình 4.3 C). ACP (20 %wt) phân tán trong nước DI có giá trị T_{gel} tại 35,1°C. Tuy nhiên, trong môi trường sinh lý (PBS, 7.4 hoặc DMEM, điểm T_{gel} 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, T_{gel} 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

Nguyên bào sợi được cấy vào trong ma trận hydrogel ACP để chứng minh mẫu khung xương ngoại bào thiết kế tốt cho các mô chuyên biệt. Sau 48 giờ nuôi cấy, tỷ lệ sống sót của nguyên bào sợi là khoảng $96,7 \pm 3,5\%$, được ước tính bằng số lượng tế bào bắt màu xanh trên tế bào bắt màu đỏ. Đối với nuôi cấy lâu dài, trên 90% nguyên bào sợi chủ yếu được nhuộm màu xanh lá cây, chứng tỏ rằng hầu hết các tế bào đều có sống sót. Nói cách khác, điều này cho thấy các tế bào được nuôi cấy trong điều kiện tốt. Sau 24 giờ ủ, các tế bào BJ bám vào thành hydrogel ACP, sinh sôi và mở rộng trong cấu trúc khung xương ACP sau 120 giờ. Sự phát triển của tế bào nguyên bào sợi tăng nhanh và tạo thành mạng lưới phân lớp bão hòa trên cơ sở nền hydrogel sau 168 giờ (**Hình 4.4 A**). Hơn nữa, hình thái của nguyên bào sợi nuôi cấy bên trong hydrogel ACP kéo dài, điều này hiếm thấy trong điều kiện nuôi cấy 3D [81]. Sự kéo dài của quá trình nuôi cấy nguyên bào sợi bên trong hydrogel đã được báo cáo với hệ thống hydrogel hình thành với các tín hiệu sinh học như alginate hydrogel được biến tính bằng RGD peptide [82] hoặc hệ thống hydrogel hình thành bằng các vật liệu dẫn xuất ECM như gelatin [83] hoặc collagen [84]. Trong nghiên cứu này, mật độ nguyên bào sợi kéo dài ở 120 giờ và 168 giờ cao hơn so với hydrogel 3D đã được thiết lập trong các nghiên cứu khác, xác nhận rằng ACP hydrogel bắt chước cấu trúc ECM.



Hình 4.4: A) Nguyên bào sợi từ da người (BJ) 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.

Tiếp theo, các tế bào từ các cụm ACP giải phóng ra và phát triển lại hình thái học nguyên bản của nguyên bào sợi (**Hình 4.4B**). Hơn nữa, các tế bào này đã thiết lập lớp tế bào hợp lưu trên bề mặt đĩa nuôi cấy vào ngày nuôi cấy thứ 5. Quan sát này có thể xác nhận rằng khung xương ngoại bào ACP cung cấp một 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 [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 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. Hệ ACP mang được tối đa được 22.12 ± 1.26 % resveratrol (tức 221.2 μ g cho 1 mg ACP). Hệ R-ACP (resveratrol- ACP hydrogel) ở hàm lượng resveratrol tối đa không gây độc tính cho nguyên bào sợi. Thêm vào đó, nang hóa 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 μ g/mg ACP polymer, ký hiệu là R10-ACP và R20 ACP.

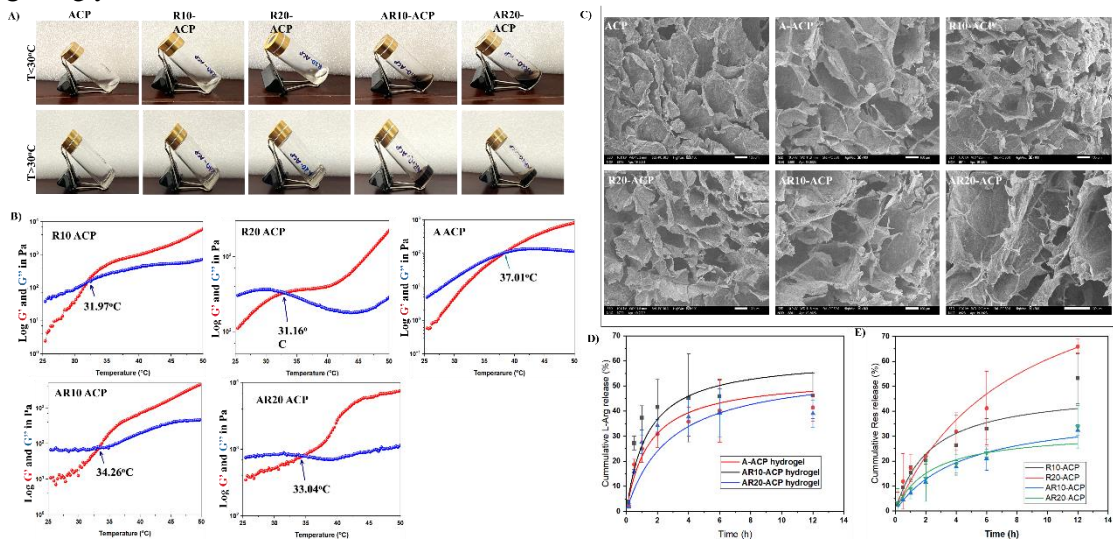
Đối với L-arginine, hàm lượng arginine khảo sát nằm trong khoảng từ 50-200 μ g/mL. Tuy nhiên, ACP hydrogel được bổ sung L-arginine (A-ACP) có hiện tượng gây độc với nguyên bào sợi khi sử dụng ở nồng độ cao. Mật độ cũng như hình thái học của nguyên bào sợi nuôi cấy trên nền ACP gel có bổ sung L-arginine ở nồng độ 50 hay 100 μ g/mL tương tự như mẫu chứng. Tuy nhiên khi nồng độ L-arginine tăng lên 150 μ g/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-arginine 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 μ g/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 μ g/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 μ g/ml.

Dựa trên các kết quả trên, hệ tải kép được thiết lập với AR 10-ACP (resveratrol: 50 μ g/mg ACP copolymer, L-arginine: 100 μ g/ml) và AR20- ACP (resveratrol: 100 μ g/mg ACP copolymer, L-arginine: 100 μ g/ml).

4.4.2 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 $^{\circ}$ 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 µg/mg resveratrol (R10-ACP) trong cấu trúc. Khi resveratrol ở hàm lượng cao hơn, 100 µg/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-ACP). 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-arginine 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.

4.4.3 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.

Bảng 4.1: Động học quá trình giải phóng

Resveratrol				Arginine			Biologic	Mô hình
AR20-	AR10-	R20-	R10-	AR20-	AR10-	A-	Sample	
0.95	0.99	0.96	0.95	0.45	0.57	0.37	R ²	Zero
0.73	0.72	0.59	0.62	0.28	0.31	0.23	R ²	First
0.99	0.99	0.94	0.96	0.74	0.76	0.67	R ²	KP*
8.907	7.200	13.03	11.66	n/a	n/a	n/a	K	
0.54	0.62	0.68	0.67	0.66	0.58	0.49	n	
0.99	0.93	0.88	0.90	0.49	0.62	n/a	R ²	Higuc
0.82	0.82	0.7617	0.76	0.33	0.39	0.27	R ²	Hixson
0.79	0.79	0.94	0.92	0.98	0.99	0.98	R ²	Modif
0.53	0.61	0.48	0.47	0.24	0.26	0.23	n	ed KP*
0.003	0.002	0.14	0.13	0.15	0.15	0.15	t _{lag}	
8.94	7.22	18.09	15.19	24.307	24.67	32.57	K	

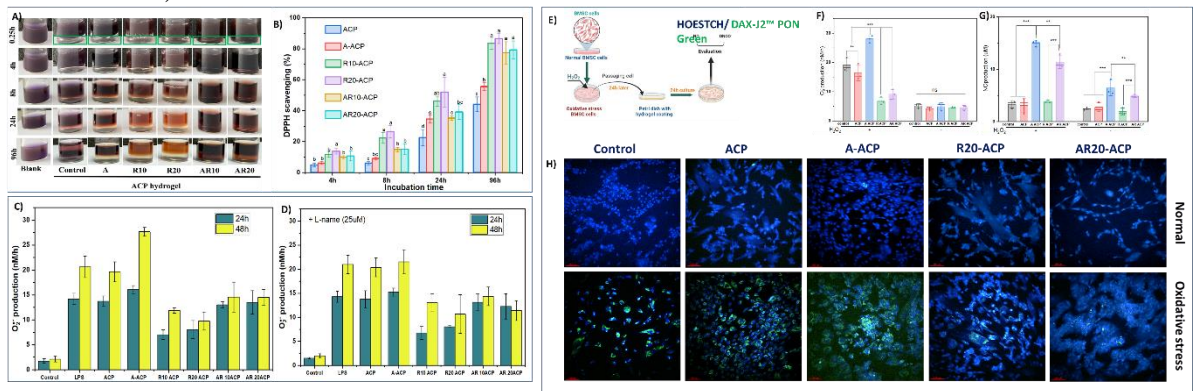
*KP: Korsmeyer-Peppas; n/a: non observation.

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 trương nở [90]. Các mô hình giải phóng thuốc để 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 kỵ 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.

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

4.4.4.1 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 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 gốc tự do của AR-ACP hydrogel và R-ACP hydrogel có hiệu quả tương đương nhau sau 96 giờ ủ ($p=0,11688$, R10-ACP so với AR10-ACP; $p=0,62544$, R20-ACP so với AR20-ACP).



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 (chứng), A (A-ACP), R10 (R10-ACP), R20 (R20-ACP), AR10 (AR10-ACP), AR20 (AR20-ACP).

4.4.4.2 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 kép 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

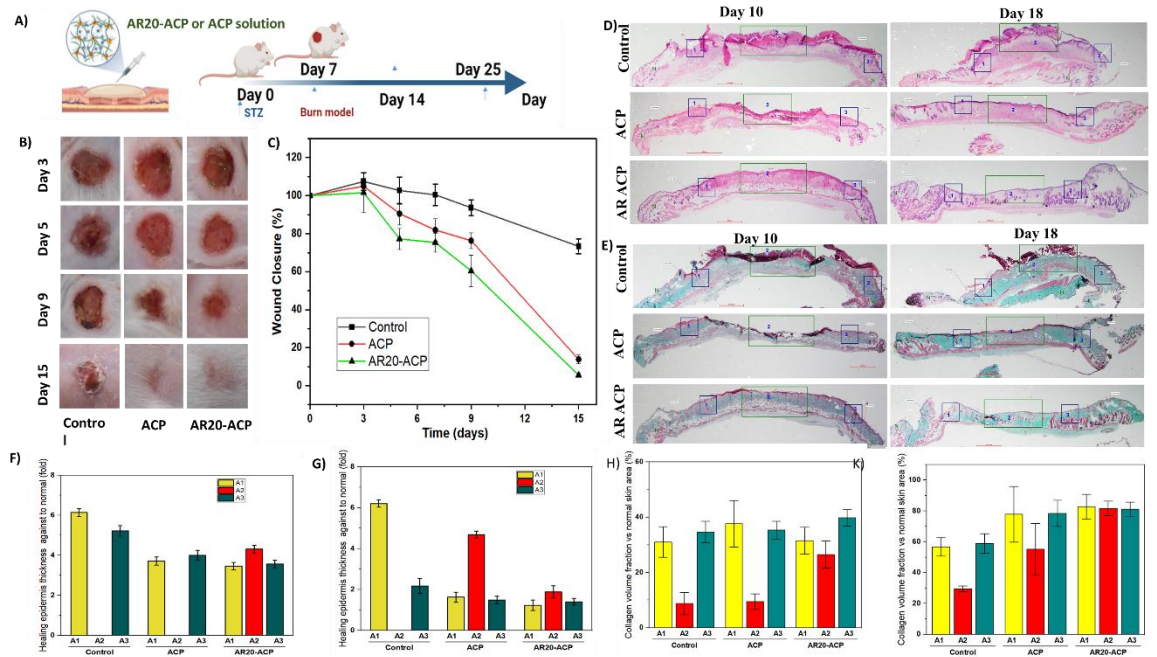
14–15nM/h. Để xác định rõ hơn tầm quan trọng của resveratrol trong việc làm giảm quá trình sản xuất anion superoxide trong các đại thực bào được kích thích nội độc tố vi khuẩn được nuôi cấy bằng A-hydrogel, chất cạnh tranh của L-arginine (L-NAME) - được gọi là chất ức chế NOS [99] đã được thêm vào môi 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 $O_2^{\bullet-}$ gần như không có sự khác biệt khi bổ sung thêm L-NAME. Tuy nhiên, trong trường hợp ACP với L-arginine, nồng độ $O_2^{\bullet-}$ 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 $O_2^{\bullet-}$ từ các nhóm hydrogel AR-ACP. Mức sản xuất $O_2^{\bullet-}$ nằm trong khoảng 14–15nM/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.

4.4.4.3 *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.

4.4.5 *Đánh giá sự khép miệng vết thương điều trị bằng hydrogel*

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 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.



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.

4.4.6 Đánh giá khả năng tái tạo của vùng da tổn thương điều trị bằng hydrogel

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 rìa 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 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 tạo 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

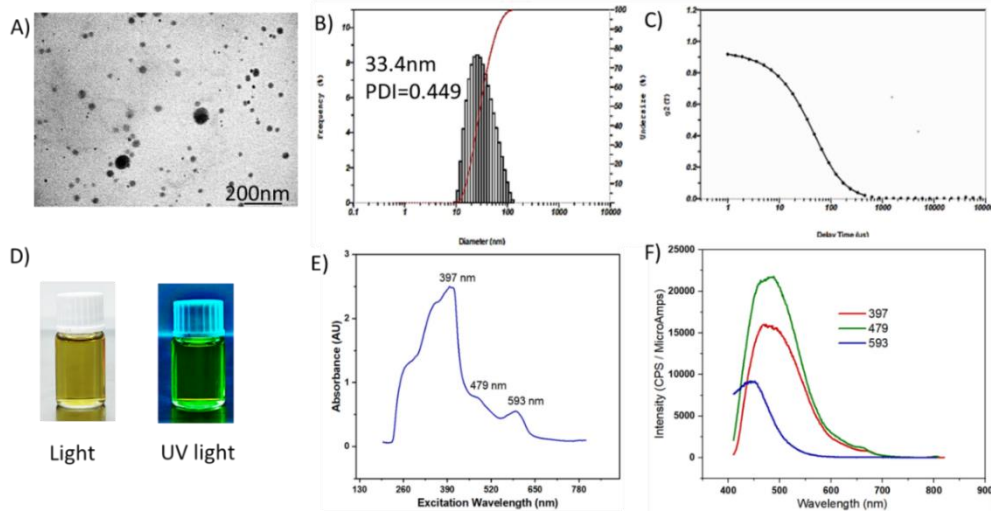
rõ ở lớp hạ bì của trung tâm vết thương, điều này không có ở các nhóm khác. Những kết quả này đã chứng minh hiệu quả hỗ trợ làm lành vết thương của nhóm AR20-ACP.

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 trưng 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.

CHƯƠNG 5: PHÁT TRIỂN HYDROGEL PHẢN ỨNG NHIỆT TỪ ALGINATE VÀ PLURONIC QUA KỸ THUẬT KHẤU MẠCH

5.1 Tổng hợp hemin- BG (HNP BG)

5.1.1 Chế tạo hạt nano HNP

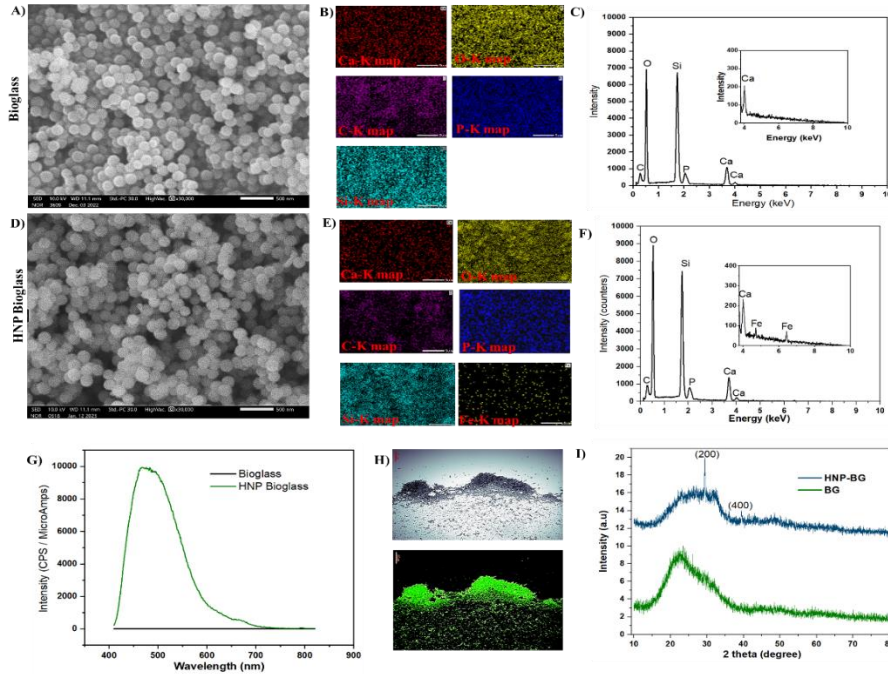


Hình 5.1: Đặc tính của HNP. Ảnh TEM điển hình (A), kích thước thủy động lực trong nước (B) và hàm tương quan DLS (C) của HNP tổng hợp. (D) Ảnh chụp các lọ chứa dung dịch HNP dưới ánh sáng trắng và tia UV. Phổ bước sóng hấp thụ (E) và phổ phát xạ (Em) (F) của HNP trong nước ở các bước sóng kích thích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

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).

5.1.2 Chế tạo hạt HNP BG



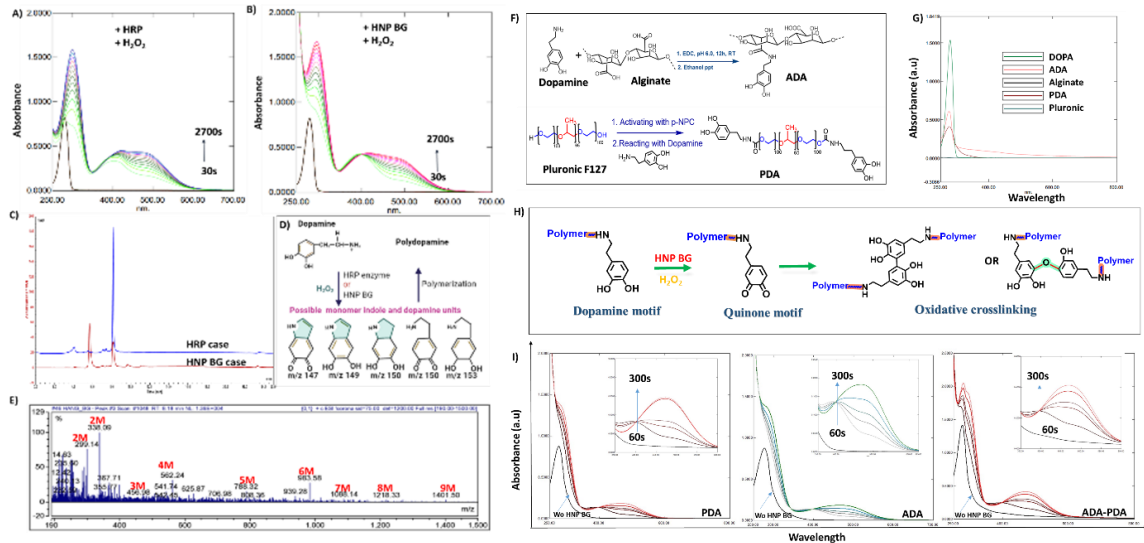
Hình 5.2: Đặc tính của HNP BG. SEM kết hợp với ảnh xạ bề mặt EDS của nó cho các nguyên tố chính đặc trưng (C, O, Ca, P, Si và Fe) phân bố và toàn bộ EDS của thủy tinh sinh học tự nhiên BG (A, B, C) và HNP BG (D, E, F). (G) Phổ phát xạ (Em) của hạt nano HNP BG và BG trong nước ở bước sóng kích thích 479 nm. (H) Hình HNP BG dưới ánh sáng mạnh và đèn huỳnh quang ($E_x = 480$, $E_m = 525$). Giản đồ XRD của BG và đạo hàm HNP BG (I) của nó.

Thủy tinh sinh học (BG) được tổng hợp bằng phương pháp sol-gel. **Hình 5.2A** cho thấy kích thước, hình thái và sự phân bố nguyên tố 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 5.2B, 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 5.2D**). 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 5.2G**), 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 $\lambda = 480$ 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 20–25° đến 23–32°, 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.

5.2 Tiềm năng của HNP BG làm chất xúc tác cho khâu mạch bằng phản ứng oxy hóa 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 5.3A**) hoặc HNP BG (**Hình 5.3B**). 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, ~ 300 nm đồng thời xuất hiện một vai rộng trong vùng khả kiến (~ 400 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 5.3: 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 bản HNP BG 5 mg/ml. K) Hình minh họa sự hình thành liên kết ngang giữa họa 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 5.3C**), 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 5.3D**, 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 5.3E**. 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 pyrrolicarboxylic ($C_4H_{14}NO_3^+$) 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 ($6M + 30 + 2Ca^{2+}$), 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 để khâu mạch.

5.3 Tổng hợp tiền chất polymer catechol, catechol- alginate và catechol-pluronic

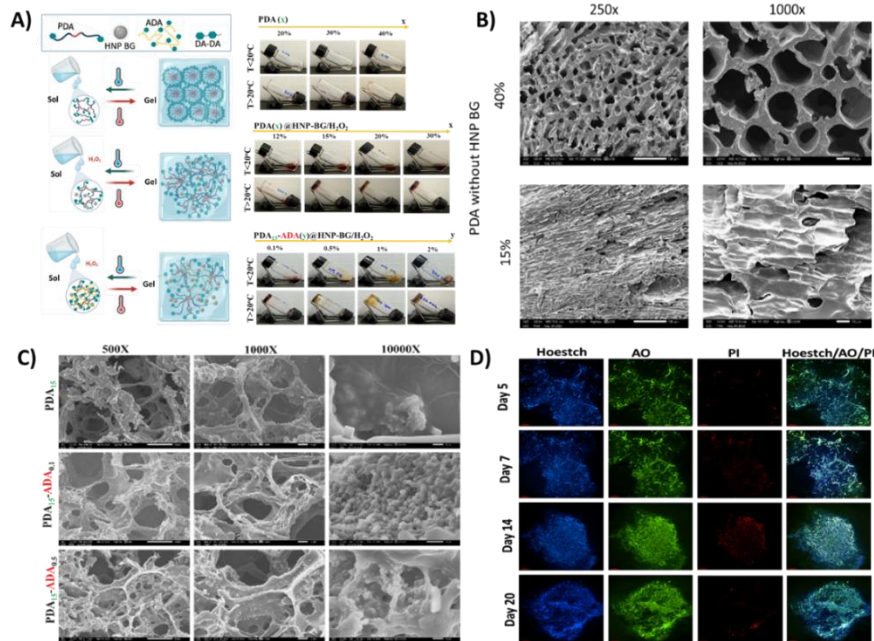
Hình 5.3F trình bày quy trình điều chế các dẫn xuất catechol- alginate và catechol-pluronic. Sự liên hợp của catechol hydroxyphenol (DA) trên khung alginate (ADA) được thực hiện thông qua phản ứng tạo liên kết carbodiimide. Trong trường hợp của Pluronic F127, nhóm hydroxyl ở cả hai đầu được kích hoạt 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) (**Hình 5.3G**). 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 5.3G**). Sau khi liên hợp dopamine, phổ UV-vis của ADA và PDA cho thấy các dải hấp thụ ở $\lambda_{max} = 280$ 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).

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

5.4.1 Khảo sát sự hình thành liên kết giữa hai dẫn xuất dopamine

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 5.3H**). Kết quả UV-vis từ các mẫu catechol- alginate và catechol-pluronic trong **Hình 5.3I** 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 ($\lambda_{max} = 401$ 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. 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. Phổ UV-vis này khớp chính xác với DA nguyên bản bị oxy hóa được thể hiện trong **Hình 5.3B**. 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.



Hình 5.4: A) Tính nhạy nhiệt của hydrogel thu được khảo sát bằng phương pháp đảo ngược ống để chuyển hóa sol-gel của PDA có/không có HNP BG/ H_2O_2 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% và 15 wt%. C) Hình thái của hydrogel thu được từ PDA và hỗn hợp giữa PDA và ADA với sự hỗ trợ của HNP BG/ H_2O_2 . 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).

5.4.2 Tổng hợp 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 5.4A**. 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%, trong khi Pluronic F127 là ~ 16 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 tối 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 PDA15 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.

Hỗn hợp 15 wt% PDA và 0,1 wt% ADA tạo thành hydrogel trong vòng 60 giây. Hỗn hợp PDA-ADA duy trì tính chất giống dung dịch ở điều kiện nhiệt độ thấp và trở lại trạng thái gel ở nhiệt độ ấm ($T > 30$ °C). Nghiên cứu lưu biến cho thấy G' và G'' của PDA15-ADA0.1@HNP BG/ H_2O_2 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 °C là đặc trưng cho quá trình chuyển pha sol-gel [120]. Ngược lại với PDA15@HNP BG/ H_2O_2 , 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 wt% thì quá trình chuyển pha sol-gel không thay đổi (hình 5.3C). Tuy nhiên, giá trị G'' của PDA15-ADA0.1@HNP BG/ H_2O_2 cao hơn PDA15-ADA0.5@HNP BG/ H_2O_2 sau khi đạt đến trạng thái chuyển pha. Điều này xác nhận rằng lực tương tác trong PDA15-ADA0.5@HNP BG/ H_2O_2 nhiều hơn so với PDA15-ADA0.1@HNP BG/ H_2O_2 . 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 wt%, 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/ H_2O_2 . 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°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 1wt% 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.

5.4.3 Hình thái của hydrogel

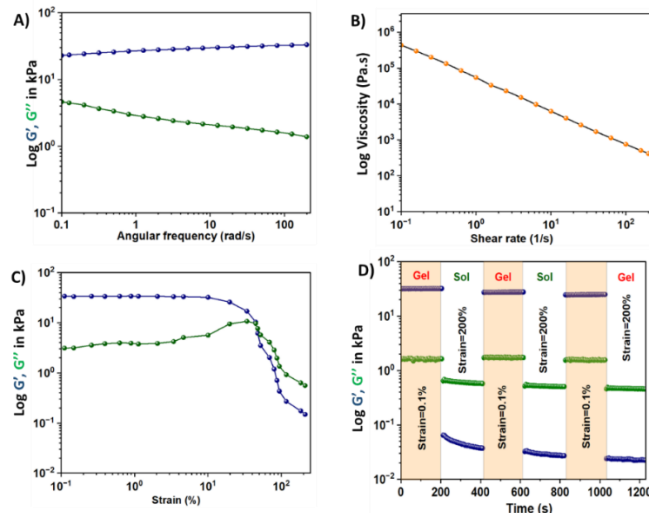
Hình thái của hydrogel thu được quan sát bằng SEM. Mặt cắt ngang của PDA hydrogel ở nồng độ 40 wt% có cấu trúc giống như tổ ong với cấu trúc xốp tương đối dày đặc (Hình 5.4B). Kích thước lỗ trở nên lớn hơn khi giảm nồng độ PDA xuống 15 wt%. Hydrogel này thể hiện hình thái mạng lưới hình ống và lưới với các lỗ liên kết với nhau thấp hơn PDA hydrogel ở nồng độ 40%, xác nhận giai đoạn giả gel.

Ngược lại, sự xuất hiện của liên kết ngang hóa học trong PDA 15wt% dưới hoạt tính xúc tác của HNP BG (PDA15@HNP BG/ H_2O_2) 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 wt% cùng với PDA 15 wt% (PDA15-ADA0.1@HNP BG/ H_2O_2), hydrogel tổng hợp có cấu trúc tương tự như PDA@HNP BG/ H_2O_2 đơn lẻ, nhưng có mức độ liên kết cao. Sự gia tăng nồng độ ADA đến 0.5 wt%, cấu trúc mạng giống như bọt biển, đã được quan sát thấy trong PDA15-ADA0.5@HNP BG/ H_2O_2 , 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/ H_2O_2 cung cấp khung cần thiết để giữ lại dịch mô và có khả năng thẩm 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.

5.4.4 Đánh giá đặc tính tiêm của hydrogel

Tiếp theo, một đánh giá để xác định xem hydrogel điều chế có thể hiện các đặc tính cơ học thiết yếu để tạo ra nền tảng phân phối thuốc có thể áp dụng trong lâm sàng hay không được thực hiện thông qua lưu biến học. Do đặc tính chuyển tiếp sol-gel, PDA15-ADA0.5@HNP BG/ H_2O_2 có thể tiêm được theo sự thay đổi nhiệt độ. Phép đo tần

số quét cung cấp thông tin tương đối về tính chất đàn hồi và nhớt ở trạng thái suất đàn hồi không đổi. Việc tăng tần số làm giảm thời gian hồi phục và ưu tiên các đặc tính đàn hồi (G' , mô đun lưu trữ) hơn các đặc tính nhớt (G'' , mô đun tổn thất), vì có thời gian tối thiểu để tiêu tán năng lượng hoặc để hydrogel chảy trong quá trình thử nghiệm [302]. Những kết quả này chỉ ra rằng PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂ có đặc tính giống chất rắn (ví dụ: G' lớn hơn G'') trên một dải tần số rộng khi thực hiện ở nhiệt độ 37°C (**Hình 5.5A**). Ngược lại, khi PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂ ở nhiệt độ 20°C, không có hydrogel nào được hình thành và đặc tính lưu biến cho thấy hỗn hợp biểu hiện các đặc tính giống chất lỏng. Hydrogel PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂ dễ tiêm hơn ở điều kiện nhiệt độ mát ($T < 20^\circ\text{C}$). Vì vậy, hệ thích hợp sử dụng ở nhiệt độ thấp. Khả năng tiêm của mẫu PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂ ở điều kiện gel cũng được nghiên cứu. Phân tích quá trình quét biến dạng ở 37°C, rõ ràng là hydrogel trải qua sự giảm đáng kể cả về mô đun lưu trữ và tổn thất ngoài một biến dạng hiệu suất cụ thể, biểu thị hiệu suất vật liệu (**Hình 5.5B**) [303]. Khi đánh giá khả năng tiêm bằng cách sử dụng dữ liệu lưu biến, đặc tính (shear thinning là tiêu chí được lựa chọn đầu tiên[304]. Như được hiển thị trong **Hình 5.5C**, độ nhớt của PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂ hydrogel giảm khoảng 7000 lần khi tốc độ trượt tăng từ 0,1 đến 200 (1/s), chứng tỏ vật liệu này có tính tiêm [302, 305]. Độ nhớt giảm mạnh chứng tỏ rằng cấu trúc mạng của hệ PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂ đã bị gián đoạn trong điều kiện chuyển động trượt cao. Để phục hồi lại cấu trúc rắn sau khi tiêm, cấu trúc mạng cần phải tính tự tái tạo [306]. Để xác định khả năng tự phục hồi của PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂, phép đo quá trình quét thời gian theo chu kỳ trong đó vật liệu trải qua nhiều chu kỳ ở điều kiện biến dạng cao và thấp. Khi áp dụng biến dạng ở mức 200%, G' thấp hơn G'' , chứng tỏ sự biến đổi gel-sol của vật liệu. Mô đun của PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂ được khôi phục nhanh chóng và liên tục về mức ban đầu sau khi áp dụng điều kiện biến dạng ở mức thấp (0,1%), xác nhận đặc tính tự phục hồi nhanh chóng của hydrogel này (**Hình 5.5D**). Điều này cũng cho thấy khả năng tiêm của PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂ ở nhiệt độ gel tới hạn[302].



Hình 5.5: 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%.

5.4.5 Độc tính tế bào của hydrogel thu được

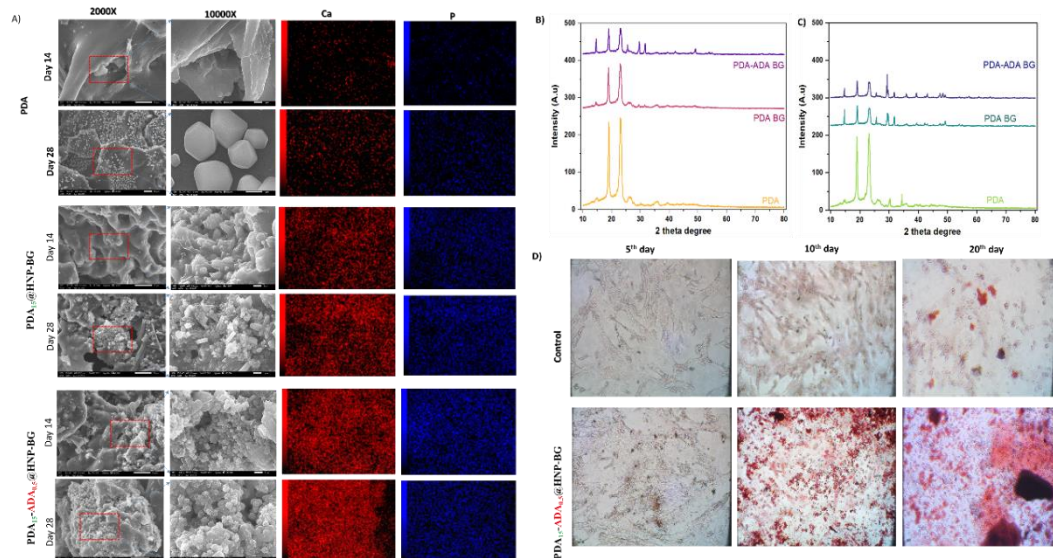
Độc tính tiềm ẩn của hydrogel cần phải được kiểm tra. Trong nuôi cấy 2D, khả năng tồn tại của hMSC được nuôi cấy bằng dung dịch hydrogel chiết xuất là hơn 90% so với các tế bào không được xử lý ở các thời điểm nuôi cấy, cho thấy quá trình phân hủy hydrogel không gây độc cho tế bào. Độc tính tiềm ẩn của PDA15-ADA0.5@HNP BG/H₂O₂ 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 kẹp 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 5.4D**). 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.

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

5.5.1 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 5.6**. 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 thủy tinh cũng chuyển sang pha gần như vô định hình sau 14 ngày ngâm. Thủy tinh đã trở nên vô định hình hơn và các đỉnh HA ở $2\theta = 28,35^\circ$ (1 0 2) và $2\theta = 39,8^\circ$ (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 5.6 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/H₂O₂. Sự lắng kết Ca và P mới trên bề mặt của PDA15@HNP BG/H₂O₂ 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 5.6: Đặc tính thúc đẩy quá trình khoáng hóa của hydrogel thiết kế: PDA, PDA15@HNP BG/ H₂O₂, PDA15-ADA0.5@HNP BG/ H₂O₂. 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. Giản đồ nhiễu xạ tia X sau B) 7 ngày và C) 14 ngày ngâm trong SBF ở 37 °C. D) Cảm ứng tạo khoáng xương của PDA15-ADA0.5@HNP BG/ H₂O₂ thử nghiệm trên mô hình tế bào gốc trung mô trong thời gian 20 ngày.

5.5.2 *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/ H₂O₂ 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 5.6D**, các phân tử canxi được tạo ra từ tế bào hMSC nuôi cấy với PDA15-ADA0.5@HNP BG/ H₂O₂ 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 5.6D**). Điều này chứng tỏ PDA15-ADA0.5@HNP BG/ H₂O₂ có tác dụng hỗ trợ thúc đẩy cảm ứng tạo xương.

5.5.3 *Đánh giá khả năng kháng khuẩn*

Để chứng minh PDA15-ADA0.5@HNP BG/ H₂O₂ là vật liệu cấy ghép hiệu quả, đặc tính kháng khuẩn của hydrogel PDA15-ADA0.5@HNP BG/ H₂O₂ 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 (10^9 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/ H₂O₂, sự giảm phát triển của vi khuẩn được ghi nhận đáng kể. Hydrogel với HNP BG làm giảm nồng độ vi khuẩn xuống dưới 10^2 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.

CHƯƠNG 6: KẾT LUẬN

6.1 **Kết luận**

Luận án đã phát triển các hydrogel tiêm từ polyme nhạy cảm nhiệt, Pluronic F127 và alginate bằng các phương pháp khác nhau với độ cứng biến dạng và các tín hiệu sinh học cụ thể để tái tạo mô chuyên biệt.

- Đã tổng hợp thành công hydrogel nhạy cảm nhiệt từ dẫn xuất alginate đến pluronic bằng kỹ thuật ghép mạch, cụ thể:

+ Đã điều chế thành công hydrogel ACP có khả năng phản ứng nhiệt ở nhiệt độ cơ thể.

+ Đã điều chế thành công hydrogel mang kép hợp chất có hoạt tính sinh học (Resveratrol và L-arginine),

AR-ACP.

+ Đã thành công cung cấp thông tin hiệu quả của hydrogel trên mô hình chữa lành vết thương của động vật mang bệnh lý đái tháo đường.

- Đã tổng hợp thành công hydrogel nhạy cảm nhiệt từ alginate và pluronic bằng kỹ thuật khâu mạch, cụ thể:

+ Đã chế tạo thành công Bioglass có tính chất bất chước chức năng của enzyme peroxidase, HNP BG

+ Đã chế tạo thành công hydrogel lai nhạy cảm nhiệt, alginate, pluronic bằng cách sử dụng xúc tác bioglass tổng hợp, ADA-PDA@HNP BG/ H₂O₂ hydrogel.

+ Đã thành công cung cấp thông tin về khả năng tái tạo xương của hydrogel này.

6.2 **Định hướng tương lai**

Bất chấp triển vọng thú vị về kết quả trên, nhiều nghiên cứu cần được hoàn thiện để có thể đưa sản phẩm này vào thực tế. Đầu tiên, nghiên cứu trong tương lai nên tập trung vào khả năng mở rộng quy mô của quá trình tổng hợp để ước tính các kỹ thuật tiềm năng được chuyển giao cho công nghiệp. Nói cách khác, cần làm rõ quy trình tối ưu hóa để tăng khả thi của nghiên cứu. Thứ hai, cần tiếp cận độ ổn định của sản phẩm để hiểu được tình trạng bảo quản và thông tin lão hóa của sản phẩm. Mặc dù thí nghiệm trên động vật được tiến hành trong nghiên cứu này nhưng da chuột hoặc hệ thống miễn dịch của chuột khá khác với con người; những động vật lớn như chó, lợn,... nên được sử dụng trong tương lai. Hydrogel tổng hợp cho thấy khả năng thích ứng tốt với tế bào. Điều này cung cấp luận cứ cho việc ứng dụng hydrogel mang tế bào sẽ được nghiên cứu sâu hơn để cung cấp thông tin về ứng dụng của chúng trong lĩnh vực kỹ thuật mô đa chức năng. Ví dụ, cần xem xét nghiên cứu sâu hơn về tái tạo mô theo y học cá nhân hóa bằng liệu pháp tế bào kết hợp với khung xương ngoại bào hydrogel được thiết kế. Hơn nữa, cần tiến hành các tiêu chí tiêu chuẩn hóa để đánh giá các hydrogel này để đưa sản phẩm vào thử nghiệm lâm sàng.

DANH SÁCH CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ 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 Quyên, National Patent (VN 1-2021-01465): QUY TRÌNH TỔNG HỢP HYDROGEL NHẠY NHIỆT TỪ VẬT LIỆU ALGINAT-CYS-PLURONIC, cấp năm 2024.

Other related publications

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.