

ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP. HỒ CHÍ MINH
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

NGUYỄN THỊ THANH HIỀN

**NGHIÊN CỨU HỆ VẬN CHUYỂN THUỐC TRÊN CƠ SỞ HẠT
MICRO-NANO CHITOSAN VÀ VẬT LIỆU HYDROGEL Y SINH
NHẠY NHIỆT ĐỘ, NHẠY PH**

Ngành: Kỹ thuật Hóa học
Mã số ngành: 9520301

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

TP. HỒ CHÍ MINH - NĂM 2023

Công trình được hoàn thành tại **Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM**

Người hướng dẫn 1: PGS.TS. Huỳnh Đại Phú

Người hướng dẫn 2: TS. Hà Cẩm Anh

Phản biện độc lập 1:

Phản biện độc lập 2:

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án họp tại

.....
.....

vào lúc giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

- Thư viện Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM
- Thư viện Đại học Quốc gia Tp.HCM
- Thư viện Khoa học Tổng hợp Tp.HCM

CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN

1.1 Tính cấp thiết của đề tài

Trong những năm gần đây, sự gia tăng một cách nhanh chóng các căn bệnh như ung thư, bệnh đái tháo đường đang trở thành mối lo ngại lớn cho sức khỏe cộng đồng [1]. Song song đó, khoa học y khoa cũng đang tăng trưởng mạnh mẽ. Các loại thuốc mới, các phương pháp điều trị liên tục được nghiên cứu và phát triển [2], [3]. Do đó, việc tìm kiếm một phương thức điều trị căn bệnh có ảnh hưởng đến sức khỏe toàn cầu như bệnh tiểu đường nằm trong xu thế phát triển của xã hội. Trong đó, nghiên cứu chất dẫn truyền thuốc bằng polymer y sinh thông minh là chủ đề được quan tâm và phát triển mạnh trong thập kỷ gần đây.

Polymer y sinh thông minh là polymer được áp dụng trong điều trị y học trực tiếp, tương tác được với hệ thống sinh học của cơ thể, đồng thời polymer này có thể đáp ứng với sự thay đổi của các yếu tố môi trường (nhiệt độ, pH, ánh sáng, từ trường) bởi sự thay đổi các tính chất hóa lí của polymer (hình dáng, đặc tính bề mặt, chuyển pha sol-gel, độ hòa tan, cấu trúc) [4]-[6]. Trên thực tế, tùy theo đặc điểm, cấu tạo, tính chất của loại polymer mà polymer y sinh thông minh được phân loại rất nhiều dạng khác nhau với các tên gọi riêng rẽ như: micelle, liposome, hạt nano hay hydrogel. Ưu điểm nổi bật của polymer y sinh thông minh dẫn truyền thuốc là: khả năng tương thích cao, giảm thiểu các độc tính, kiểm soát được tốc độ và vị trí nhả thuốc, duy trì sự ổn định của thuốc và ngưỡng thuốc thích hợp để điều trị, kéo dài thời gian nhả thuốc nên giảm tần suất sử dụng thuốc [6], [7]. Qua đó cho thấy, phương pháp dẫn truyền thuốc này có thể đảm bảo đúng lúc, đúng vị trí và đúng liều lượng, giúp hiệu quả điều trị tốt hơn [6]-[8].

Vật liệu polymer y sinh thông minh đang được nghiên cứu dẫn truyền đa dạng các loại thuốc (cả thuốc kị nước và ưa nước) [6]-[9]. Quan trọng là, hiệu quả của phương thức dẫn truyền phụ thuộc rất lớn vào đặc tính của vật liệu. Do đó, các hệ polymer y sinh cần được phân tích rõ các đặc tính, để từ đó đánh giá được loại thuốc thích hợp dẫn truyền, hay dự đoán được khả năng dẫn truyền thuốc. Việc nghiên cứu thành công một hệ dẫn truyền thuốc sẽ đem lại thành quả rất lớn, nhất

là khi ứng dụng vào điều trị các căn bệnh điển hình như bệnh tiểu đường, là căn bệnh mà gần như phải cung cấp thuốc hàng ngày để kiểm soát lượng đường trong cơ thể.

Với các lý do đã phân tích trên, đề tài “Nghiên cứu hệ vận chuyển thuốc trên cơ sở hạt micro-nano chitosan và vật liệu hydrogel y sinh nhạy nhiệt độ và pH” được lựa chọn cho nghiên cứu trong luận án này.

1.2 Mục đích nghiên cứu

Đánh giá đặc tính hệ vật liệu hạt micro-nano và hydrogel nhạy nhiệt, hydrogel nhạy nhiệt và nhạy pH để áp dụng làm hệ dẫn truyền thuốc dạng tiêm, định hướng tăng khả năng tải thuốc và kéo dài thời gian nhả thuốc, đặc biệt là thuốc exendin-4 - thuốc trị tiểu đường tuýp 2.

1.3 Nội dung của luận án

- Tổng hợp hệ vật liệu bao gồm: hydrogel nhạy nhiệt độ PLA-PEG-PLA, hydrogel nhạy nhiệt độ và pH OS-PLA-PEG-PLA-OS, OSA-PLA-PEG-PLA-OSA bằng phản ứng trùng ngưng, và hạt micro-nano chitosan bằng phương pháp electrospraying.

- Đánh giá đặc tính của hệ vật liệu: khả năng chuyển pha sol-gel của hydrogel, hình thái, kích thước hạt micro-nano chitosan, khả năng tương thích sinh học, phân hủy in vitro, in vivo.

- Áp dụng và đánh giá khả năng bao gói, nhả thuốc ưu nước và kị nước của các hệ vật liệu. Kết hợp hệ hydrogel và hạt micro-nano để dẫn truyền thuốc ưu nước, đặc biệt là exendin-4, thuốc trị bệnh tiểu đường tuýp 2.

1.4 Ý nghĩa của đề tài

Đề tài mang ý nghĩa xã hội sâu sắc bởi tính thiết thực, góp phần tăng hiệu quả điều trị. Bên cạnh đó, đề tài cũng thể hiện ý nghĩa tiếp cận và kế thừa các thành tựu khoa học, kỹ thuật hiện đại qua việc lựa chọn nguyên liệu chitosan (dễ sản xuất), PLA, PEG (được FDA công nhận làm vật liệu y sinh) và phương pháp tạo hạt micro-nano đơn giản bằng máy electrospraying, hay tổng hợp hydrogel bằng

phản ứng trùng ngưng hiệu quả cao [10]-[13]. Việc nghiên cứu thành công sẽ tạo ra hệ truyền dẫn thuốc/protein mới với những đặc tính vượt trội, hạn chế những nhược điểm của phương pháp truyền thống như tiêm nhiều lần, khó kiểm soát được ngưỡng thuốc nên có thể gây độc [9],[16]. Trong tình hình Việt Nam hiện nay, với điều kiện chưa phát triển mạnh về khoa học công nghệ của ngành dược liệu và y tế, nên nhiệm vụ khoa học tạo ra tín hiệu tích cực cho sự phát triển khoa học nước nhà, góp phần cho việc phát triển công nghệ mới và áp dụng trong việc chữa bệnh, phục vụ đời sống.

1.5 Tính mới của đề tài

- Tổng hợp vật liệu y sinh hydrogel nhạy nhiệt độ (T-2.6) và hydrogel y sinh nhạy nhiệt độ và pH (P-2.6 và P-2.6A) là hệ vật liệu mới, có những tính chất tuyệt vời của một chất dẫn truyền thuốc, đặc biệt hệ nghiên cứu này theo tìm hiểu là mới ở Việt Nam.
- Khai thác đặc tính hóa lý của hạt micro-nano chitosan và hydrogel để tạo hệ vật liệu kết hợp nhằm tăng khả năng bao gói thuốc và kéo dài thời gian nhả thuốc ưa nước, đặc biệt là thuốc exendin-4, thuốc trị bệnh tiểu đường.

1.6 Cơ sở khoa học của đề tài

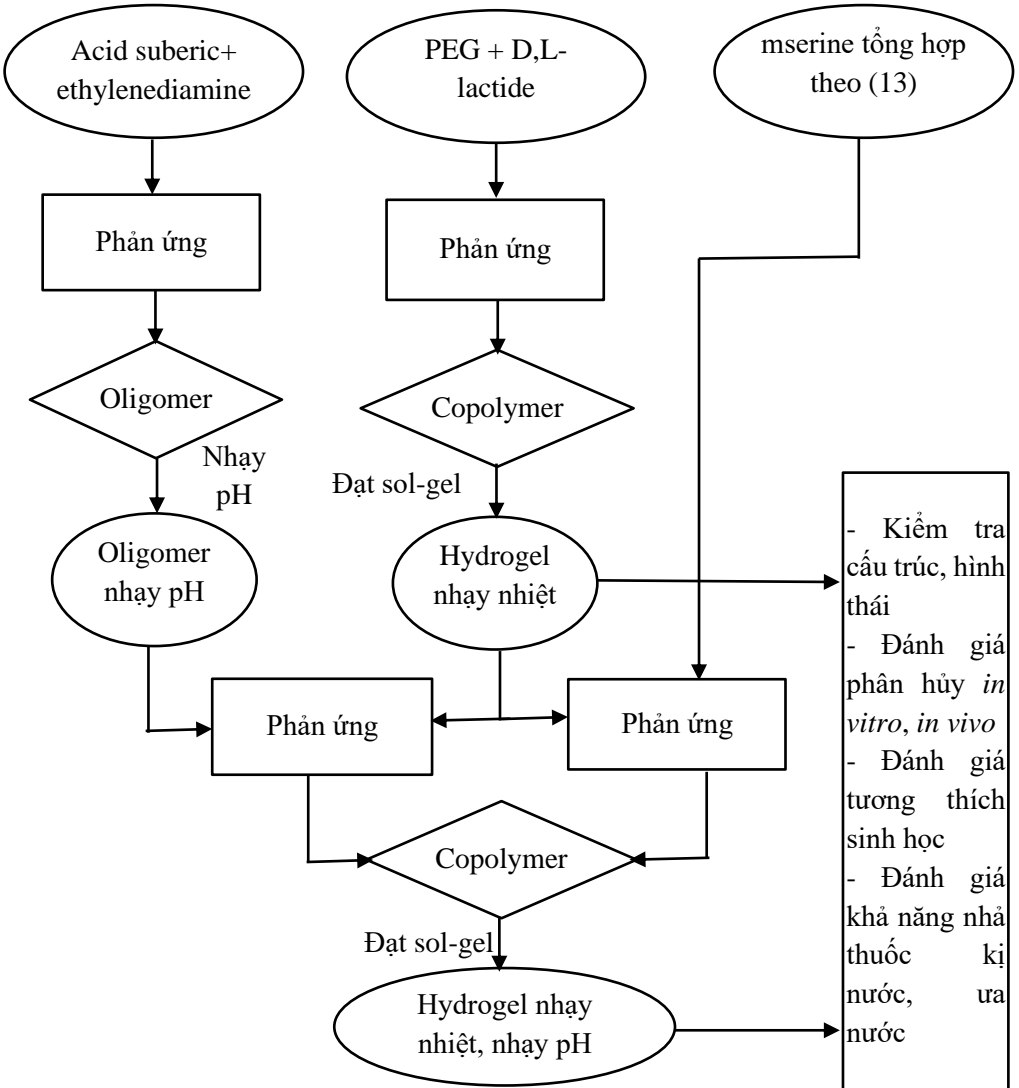
Luận án này tập trung tổng hợp và đánh giá đặc tính của hệ vật liệu, tìm mối quan hệ giữa các thông số tính chất của hệ để đưa ra các giải pháp hiệu quả khi định hướng làm hệ dẫn truyền thuốc dạng tiêm, kéo dài thời gian nhả thuốc. Do đó, luận án cần làm sáng tỏ các vấn đề sau: Đầu tiên, hydrogel nhạy nhiệt có nguồn gốc tổng hợp từ copolymer PLA-PEG-PLA đạt những ưu điểm tuyệt vời như mềm giống mô, tải thuốc cao, có tính lưỡng tính nên có thể bao gói cả ưa nước và kỵ nước [33]-[35], [42]. Tuy nhiên, hydrogel nhạy nhiệt có nhược điểm: độ bền cơ, độ ổn định thấp, đặc biệt khi áp dụng dẫn truyền dạng tiêm gây nghẽn kim tiêm bởi sự gel hóa khi nhiệt độ thay đổi đột ngột [41]. Giải pháp kết hợp thêm nhóm chức amide nhạy pH như sulfonamide và carboxamide lên cấu trúc copolymer PLA-PEG-PLA nhằm biến tính thành hydrogel nhạy nhiệt, nhạy pH

là cần thiết để khắc phục nhược điểm này. Các nhóm chức amide nhạy pH này dạng polyacid nên ion hóa trong môi trường pH cao và đề ion hóa trong môi trường pH thấp [5], [49] giúp hydrogel ở trạng thái sol trong điều kiện môi trường nên tiêm dễ dàng, tăng độ ổn định và đồng thời có tính tương hợp tốt với cơ thể [49]-[52]. Do đó, luận án này sẽ tổng hợp pentablock copolymer nhạy nhiệt, nhạy pH để nghiên cứu làm một hệ dẫn truyền thuốc. Thứ hai, hạt micro-nano chitosan được tạo thành bằng phương pháp electrospraying định hướng làm hệ dẫn truyền thuốc phải đảm bảo về hình thái học (hình cầu, kích thước micro-nano, đồng đều) [21], [22]. Trên thực tế, mỗi loại chitosan sẽ có đặc điểm khác biệt về khối lượng phân tử, độ hòa tan, mức độ deacetyl hóa nên sẽ thích hợp với dung môi hòa tan và chế độ làm việc của máy electrospraying khác nhau [52]-[54]. Trong luận án này, mối quan hệ giữa đặc tính của chitosan với các chế độ vận hành của máy electrospraying tạo hạt micro-nano được giải thích khoa học. Hơn nữa, việc phân tích các đặc tính của chitosan và dung dịch chitosan cũng góp phần đánh giá khả năng tải thuốc, bao thuốc và nhả thuốc của hạt micro-nano chitosan hình thành [54]. Cơ sở khoa học thứ ba để luận án đề cập đến là tính tương thích sinh học và phân hủy sinh học của hệ vật liệu y sinh. Các hydrogel và hạt chitosan chú trọng thử nghiệm *in vivo* (kết hợp với phân hủy *in vitro*) để xây dựng cơ chế phân hủy, đồng thời chứng minh không có tính độc. Bên cạnh đó, sự phân hủy liên quan đến quá trình nhả thuốc. Do đó, luận án này sẽ làm rõ cơ chế phân hủy của từng hệ ảnh hưởng đến kiểm soát quá trình nhả thuốc. Cuối cùng, luận án này đề cập việc kết hợp các hệ vật liệu để áp dụng dẫn truyền thuốc ưa nước exendin-4, chữa bệnh tiểu đường tuýp 2. Hệ kết hợp sẽ tận dụng hai rào cản quá trình phân tán thuốc vào môi trường. Rào cản thứ nhất là sự khuếch tán thuốc ra khỏi hạt chitosan để phân tán vào cấu trúc hydrogel. Rào cản thứ hai là thuốc khuếch tán ra khỏi hydrogel. Điều này sẽ làm cho hệ ổn định, tránh nhả thuốc nhanh ban đầu, dễ kiểm soát tốc độ và kéo dài thời gian nhả thuốc.

CHƯƠNG 2 THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

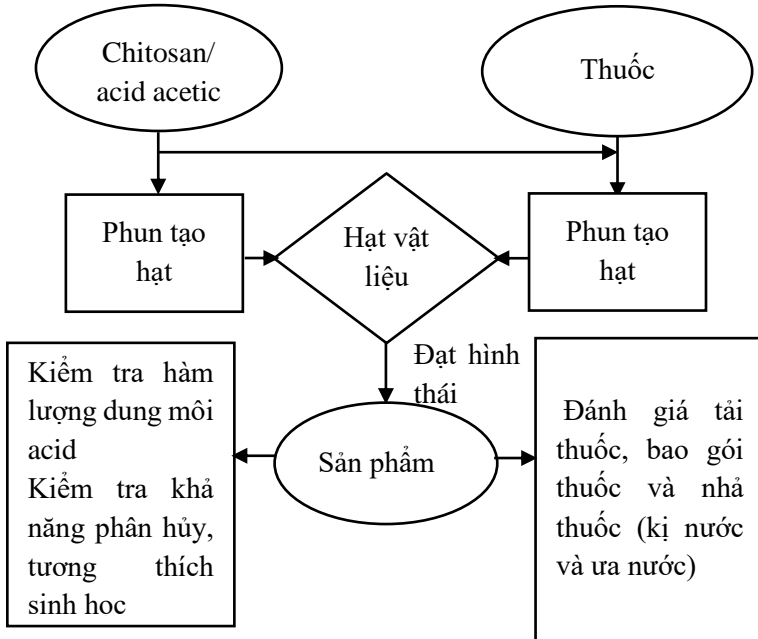
2.1 Quy trình tổng hợp và đánh giá vật liệu

Thứ nhất: Tổng hợp và đánh giá đặc tính oligomer nhạy pH, hydrogel nhạy nhiệt và hydrogel vừa nhạy nhiệt và nhạy pH theo sơ đồ 2.11



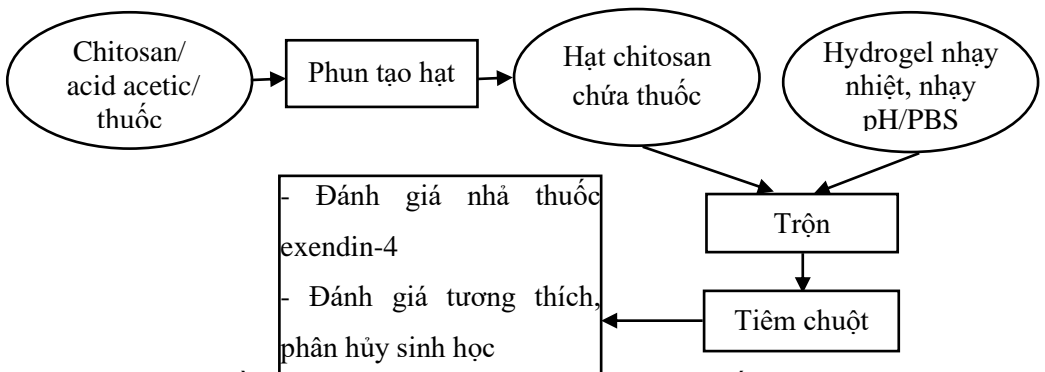
Hình 2.11 Sơ đồ tổng hợp và đánh giá hệ vật liệu hydrogel

Thứ hai: Tổng hợp và đánh giá đặc tính hạt micro-nano chitosan, hạt micro-nano chitosan bao thuốc theo sơ đồ hình 2.12



Hình 2.12 Sơ đồ tạo hạt micro-nano CS và micro-nano CS chứa thuốc

Thứ ba: Kết hợp hạt micro-nano chitosan và hydrogel để bao gói thuốc ưa nước (exendin-4) theo sơ đồ hình 2.14



Hình 2.14 Sơ đồ kết hợp hạt micro-nano chitosan bao thuốc exendin-4 phân tán trong hydrogel

2.2 Phương pháp phân tích

Kiểm tra đặc tính, cấu trúc, hình thái: NMR, SEM, TEM, GPC, FTIR, XRD, chuẩn độ acid-bazo.

Đánh giá khả năng phân hủy, tương thích: đo pH, chụp hình vật liệu theo thời gian thử in vitro và in vivo, soi mô (nhuộm HE) xung quanh chỗ tiêm.

Đánh giá chuột bị tiểu đường tuýp 2: đo cân nặng, đo đường huyết, đo HbA1c, soi mô (HE) thận, tim, gan chuột.

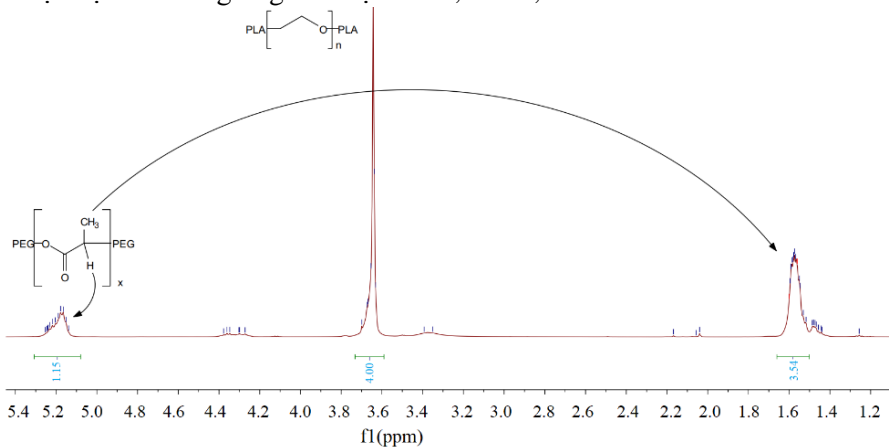
Định lượng hàm lượng thuốc (paracetamol, ibuprofen, ceftiofur hydrochloride) bằng HPLC, định tính khả năng nhả thuốc exendin-4 bằng máy đo đường huyết.

CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1 Tổng hợp và đánh giá đặc tính hydrogel

3.1.1 Tổng hợp hydrogel nhạy nhiệt PLA-PEG-PLA

Trong nghiên cứu này, 4 loại triblock copolymer PLA-PEG-PLA được tổng hợp theo tỉ lệ khối lượng giữa D,L-Lactide và PEG khác nhau là 2,3; 2,6; 2,7 và 2,8 và được đặt tên tương ứng lần lượt T-2.3, T-2.6, T-2.7 và T-2.8.



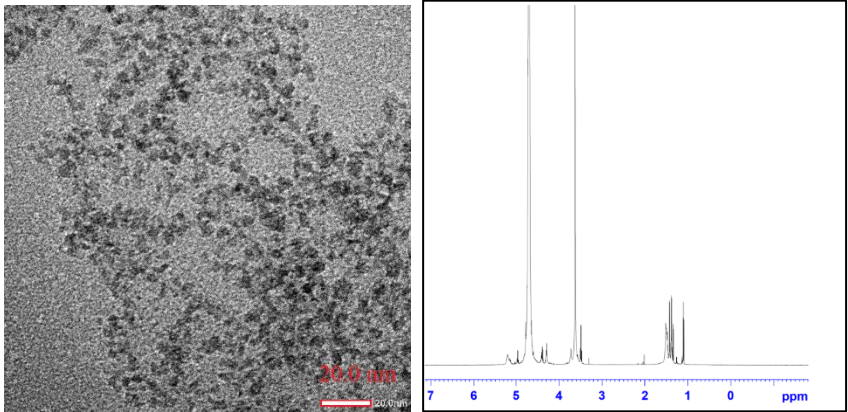
Hình 3.2 Kết quả phổ ^1H NMR triblock copolymer T-2.3

Sản phẩm triblock copolymer tạo thành được phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H NMR cho kết quả ở hình 3.2. Các đỉnh đặc trưng của nguyên tử H trong cấu trúc của mạch phân tử tương ứng với các độ dịch chuyển hóa học $\delta= 3,6$ ppm của EO (4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$), đỉnh $\delta= 5,2$ ppm và đỉnh ở $\delta=1,6$ ppm của nhóm LA trình tự (1H, $-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_3-\text{O}-$) và (3H, $-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_3-\text{O}-$). Bên cạnh đó, bảng 3.1 cho kết quả tính toán khối lượng phân tử và độ đa phân tán các copolymer tương ứng theo tỉ lệ giữa LA/EO. Mẫu có tỉ lệ LA/EO càng thấp thì giá trị PDI càng thấp, khối lượng càng nhỏ, thể hiện độ sạch càng cao và ngược lại. Nguyên nhân là tỉ lệ LA càng cao thì xác suất lượng LA phản ứng không hoàn toàn với PEG tăng, cộng với việc gạn lọc, làm sạch có thể chưa hoàn thiện.

Bảng 3.1 Khối lượng copolymer PLA-PEG-PLA và độ đa phân tán

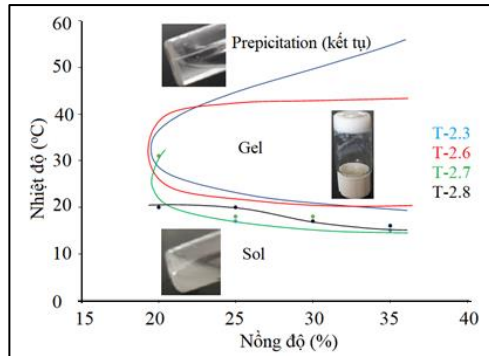
Mẫu	Mn (NMR)	LA/EO	PDI
T-2.3	PLA ₁₆₅₀ -PEG ₁₇₅₀ -PLA ₁₆₅₀	1,15	1,21
T-2.6	PLA ₁₇₅₀ -PEG ₁₇₅₀ -PLA ₁₇₅₀	1,21	1,27
T-2.7	PLA ₁₉₆₀ -PEG ₁₇₅₀ -PLA ₁₉₆₀	1,36	1,32
T-2.8	PLA ₂₀₇₀ -PEG ₁₇₅₀ -PLA ₂₀₇₀	1,44	1,36

Mặt khác, copolymer PLA-PEG-PLA còn được xem là một micelle với lõi kỵ nước PLA và vỏ ưa nước PEG. Ảnh TEM (hình 3.4) thể hiện kích thước micelle PLA₁₇₅₀-PEG₁₇₅₀-PLA₁₇₅₀ dạng cầu với đường kính dưới 20 nm. Kết quả đo ^1H NMR của T-2.6 trong dung môi D₂O (hình 3.5) cho thấy đỉnh đặc trưng cho proton của EO ($\delta=3.6$ ppm) gần như không thay đổi, trong khi đỉnh proton đặc trưng cho LA ($\delta=5,2$ ppm; $\delta=1,6$ ppm) giảm cường độ rất nhiều. Điều đó cho thấy, LA (kỵ nước) nằm trong lõi của micelle rất khó tan trong dung môi D₂O, phần ưa nước bên ngoài của micelle là PEG.



Hình 3.4 Ảnh TEM của T-2.6 - Hình 3.5 ^1H NMR T-2.6 trong dung môi D_2O

Hình 3.6 thể hiện trạng thái chuyển pha sol (chảy) – gel (không chảy) của triblock copolymer trong môi trường PBS (pH 7,4) được xác định bằng phương pháp thử nghiệm đảo ngược ống nghiệm.



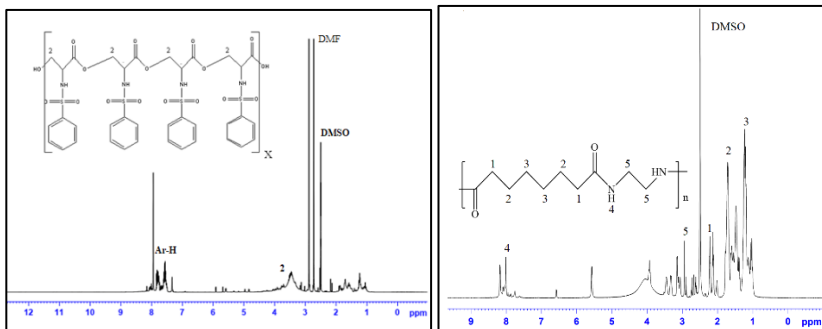
Hình 3.6 Đồ thị chuyển pha sol-gel triblock copolymer PLA-PEG-PLA

Đồ thị có dạng hình chữ U, được biểu thị làm 3 trạng thái. Đó là trạng thái sol nằm dưới một nhánh U- đường nhiệt độ bắt đầu gel (LCGT), trạng thái gel nằm giữa 2 nhánh hình chữ U và trạng thái kết tụ nằm trên một nhánh chữ U- đường nhiệt độ kết thúc gel (UCGT). Kết quả T-2.3, T-2.6 và T-2.7 có khả năng phân tán trong môi trường để chuyển pha sol-gel, ngoại trừ T-2.8 do tỉ lệ phần kị nước PLA cao nên chuyển từ sol sang kết tụ. Sự chuyển pha sol-gel của copolymer có

sự phụ thuộc vào khối lượng phân tử (tỉ lệ kị nước PLA cao) và nồng độ. Quy luật chung là phân tử càng lớn, nồng độ càng cao thì LCGT càng thấp. Trong đó, T-2.3 và T-2.6 nồng độ 25%-35% đạt yêu cầu gel ở điều kiện nhiệt độ cơ thể 37°C, thể hiện là một hydrogel nhạy nhiệt tốt.

3.1.2 Tổng hợp oligomer nhạy pH

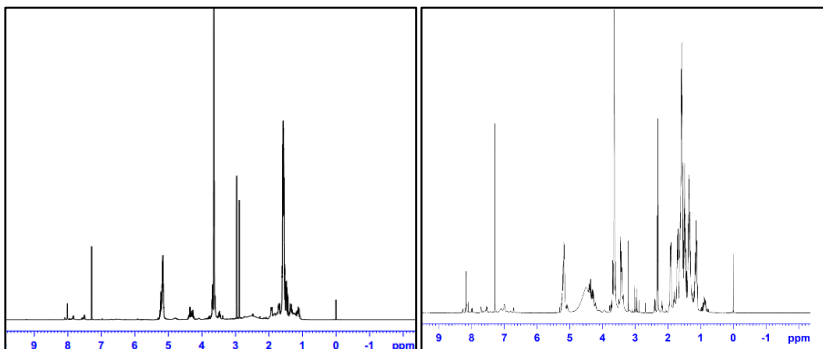
Oligomer OS và OSA nhạy pH được tổng hợp thành công theo theo tài liệu tham khảo [13], [58]. Phổ ^1H NMR của OS và OSA ở hình 3.9, 3.11 thể hiện đầy đủ các đỉnh proton đặc trưng cho từng nhóm chức trong cấu trúc OS và OSA. Kết quả khảo sát độ nhạy pH của các mẫu cho thấy oligomer OS và OSA đều theo cơ chế nhạy anion bởi các nhóm sulfonamide và carboxamide, với giá trị pKa tương ứng khoảng 6,75 và 6,70 tương ứng. Các oligomer OS và OSA này có khả năng ion hóa ở môi trường pH cao và bị đề ion hóa ở môi trường pH thấp.



Hình 3.9 Phổ ^1H NMR của OS - Hình 3.11 Phổ ^1H NMR của OSA

3.1.3 Tổng hợp hydrogel nhạy nhiệt, nhạy pH

Triblock copolymer T-2.6, T-2.3 và cả T-2.7 (tạo gel tốt nồng độ 20%) được lựa chọn phản ứng với OS để tạo pentablock copolymer nhạy nhiệt, nhạy pH, với tên được gán tương ứng P-2.3, P-2.6 và P-2.7. Trong khi đó, OSA phản ứng với T-2.6 và T-2.8 để tạo copolymer P-2.6A và P-2.8A. Phân tích cấu trúc pentablock copolymer bằng phổ ^1H NMR trên hình 3.17, 3.20 đều xuất hiện các mũi đặc trưng của triblock copolymer nhạy nhiệt ($\delta=3,6$ ppm, $\delta=5,2$ ppm và $\delta=1,6$ ppm).



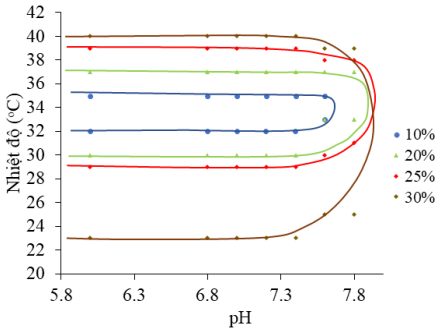
Hình 3.17 Phổ ^1H NMR của OS-PLA-PEG-PLA-OS

Hình 3.20 Phổ ^1H NMR của OSA-PLA-PEG-PLA-OSA

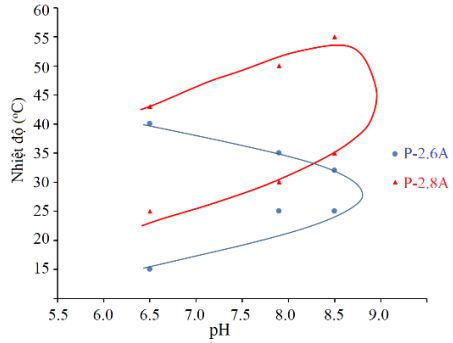
Bên cạnh đó, các mũi đặc trưng cho OS và OSA cũng thể hiện đầy đủ trên phổ. Cụ thể, phổ của OS (hình 3.17) xuất hiện đỉnh đặc trưng tách biệt tại $\delta=7-8$ ppm thể hiện vòng thơm trên mạch phân tử OS. Ngoài ra, mũi đặc trưng cho H của nhóm methylene ($-\text{CH}_2-$) trên mạch OS được dịch chuyển sang vị trí $\delta=3,00$ ppm. Trong khi đó, phổ của OSA (hình 3.20) cho thấy các mũi đặc trưng ở $\delta=2,16$ ppm ($-\text{CH}_2\text{CONH}-$), $\delta=1,49$ ppm ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}-$), $\delta=1,23$ ppm ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}-$), $\delta=8,00$ ppm ($-\text{NH}-\text{CO}-$) và $\delta=2,90$ ppm ($-\text{CH}_2\text{NHCO}-$). Qua đó, có thể kết luận triblock copolymer nhạy nhiệt gắn được oligomer OS, OSA nhạy cảm pH để tạo pentablock copolymer nhạy nhiệt, nhạy pH.

Đồ thị chuyển pha sol-gel của các pentablock cũng có hình dáng chữ U, với vùng gel nằm bên trong hai nhánh như đồ thị của triblock. Tuy nhiên, điều kiện chuyển pha sol-gel phụ thuộc vào nồng độ, khối lượng phân tử và cả pH (hình 3.19, 3.21). Nhìn chung, pH dưới 7,4, quá trình deion hóa của nhóm sulfonamide và carboxamide làm cho các pentablock dễ gel và vùng gel khá ổn định. Ngược lại, ở pH cao hơn 7,4 quá trình ion hóa của nhóm nhạy pH, làm cho LCGT tăng và UCGT giảm nên vùng gel sẽ hẹp lại. Trong khi đó, P-2.8A chỉ đơn thuần là nhạy nhiệt do có thành phần kị nước PLA lớn nên sự có mặt của OSA trong mạch không ảnh hưởng đến nhạy pH. Qua các kết quả trên cho thấy mẫu OS-PLA-PEG-PLA-OS P-2.6 25%, OSA-PLA-PEG-PLA-OSA P-2.6A 35% đạt yêu cầu là hydrogel nhạy nhiệt, nhạy pH tốt nên được lựa chọn để nghiên cứu tiếp. Tuy

nhiên, về cảm quan P-2.6A không đạt độ bền cơ tốt nên đề tài tập trung chủ yếu vào P-2.6.



Hình 3.19 Đồ thị sol-gel của P-2.6 ở các nồng độ khác nhau



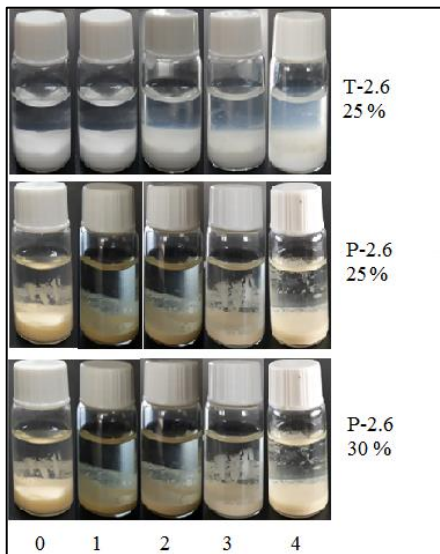
Hình 3.21 Đồ thị chuyển pha sol-gel pentablock P-2.6A và P-2.8A (35%)

3.2 Đánh giá khả năng phân hủy và tương thích của hydrogel

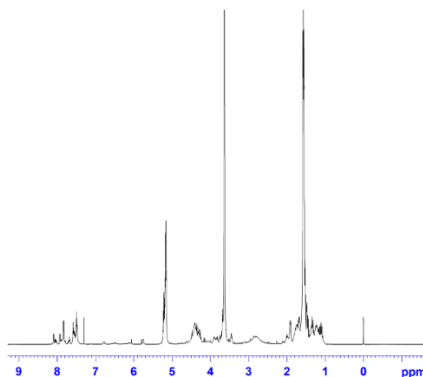
Để hydrogel làm một chất dẫn truyền thuốc tốt, ngoài khả năng tạo gel ở điều kiện cơ thể thì gel phải đạt độ bền cơ tốt để bao bọc thuốc, phân hủy từ từ để nhả thuốc chậm, đồng thời gel không gây nguy hiểm cho cơ thể.

3.2.1 Phân hủy *in vitro* hydrogel

Đánh giá khả năng phân hủy *in vitro* của hydrogel bằng cách cho gel ngâm trong dung dịch PBS (37°C, pH 7,4) trong vòng 4 tuần và theo dõi sự thay đổi của gel theo thời gian. Kết quả hình 3.27 cho thấy gel T-2.6 25% trong dung dịch PBS có hiện tượng trương nước của PEG làm cho gel có màu trắng trong. Gel T-2.6 sau 2 tuần gần như không thay đổi, nhưng sang tuần thứ 3 thì có hiện tượng vẩn đục dung dịch, đến tuần thứ 4 thì gel gần như bị xói mòn bề mặt, hình dạng gel bị thay đổi. Phổ ¹H NMR của T-2.6 chứng minh PEG phân hủy với tỉ lệ LA/EO tăng lên 1,27 và 1,41 so với ban đầu là 1,21. Sự phân hủy PLA được thể hiện bằng độ giảm pH như đồ thị hình 3.30. Mảnh PLA bị phân hủy ban đầu bị bẫy trong khối gel nên không thấy sự khác biệt của gel trong 2 tuần đầu. Sau 4 tuần, lượng PLA phân hủy nhỏ dần nhiều lên và khuếch tán nhanh qua dung dịch nên quan sát bằng mắt thường thấy rõ sự vẩn đục dung dịch, đồng thời gel bị phá hủy trên bề mặt cho thấy sự phân hủy mạnh trong cấu trúc hydrogel này.



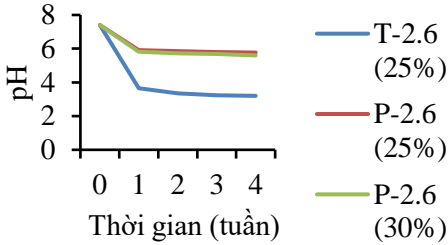
Hình 3.27 Phân hủy *in vitro* của T-2.6 (25%), P-2.6 (25% và 30%) theo thời gian (bắt đầu tuần 0 đến tuần số 4)



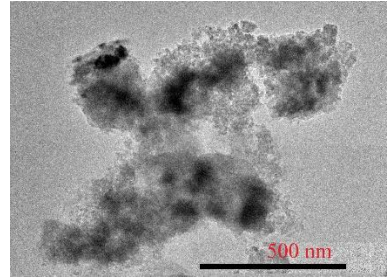
Hình 3.28 Phổ NMR P-2.6 sau khi phân hủy *in vitro* 1 tháng

Trong khi đó, quá trình phân hủy gel P-2.6 cũng có hiện tượng tương tự của PEG với màu sắc vàng đặc trưng của P-2.6 bị nhạt lại. Điều này dự đoán oligomer mserine xảy ra trước được minh chứng qua phổ ^1H NMR hình 3.28. Sau bốn tuần phân hủy, tỉ lệ cường độ các đỉnh proton của vòng thơm trong cấu trúc OS so với đỉnh proton đặc trưng cho PEG và PLA giảm đi rất nhiều so với ban đầu. Đặc biệt tại mũi có $\delta = 3,0$ ppm đặc trưng cho H của nhóm methine (-CH-) trên OS có cường độ cực thấp. Hơn nữa, pH triblock copolymer T-2.6 (25%) trong dung dịch giảm nhanh từ 7,4 xuống 3,6 sau 1 tuần do có sự phân hủy ở nhóm este không bền (-OH-C=O) của block PLA tạo acid lactic. Trong khi đó, P-2.6 có độ giảm pH chậm hơn từ 7,4 xuống 5,9 do PLA phân hủy chậm hơn. Lí do bởi sự có mặt của OS nhạy pH trong thành phần kĩ nước PLA và đặc biệt trong điều kiện pH nhỏ hơn pKa thì polymer này deion hóa nên bao gói tốt hơn. Thêm vào đó, tỉ lệ cường độ giữa LA/EO của P-2.6 ban đầu và P-2.6 sau 1 tháng phân hủy thay đổi nhiều từ 1,21 tăng lên 1,33 và 1,46 sau 2 và 4 tuần phân hủy *in vitro*. Điều này cho thấy, P-2.6 vẫn là một micelle với khối PEG ở phần vỏ dễ phân hủy hơn phần

kị nước PLA –OS ở lõi. Kết quả ảnh TEM pentablock copolymer trên hình 3.31 chứng minh micelle dạng cầu rõ rệt kích thước nhỏ dưới 50 nm.



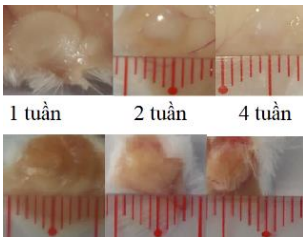
Hình 3.30 Độ giảm pH của copolymer theo thời gian



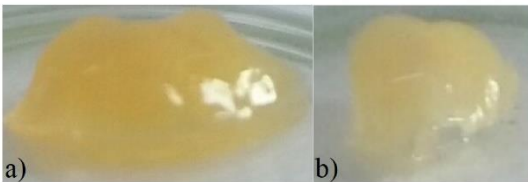
Hình 3.31 Kết quả TEM P-2.6

3.2.2 Phân hủy *in vivo* và tương thích sinh học hydrogel

Để đánh giá phân hủy *in vivo* của hydrogel, chuột bạch đực được lựa chọn để tiêm hydrogel dưới da và định kì theo thời gian, chuột hi sinh để mổ, quan sát sự phân hủy của gel. Kết quả sự phân hủy gel T-2.6 (25%), P-2.6 (25%) được thể hiện ở hình 3.32. Cả hai gel có sự đóng gói chặt chẽ thể hiện độ bền cơ tốt. Kích thước gel giảm dần từ tuần 1 đến tuần 2, và giảm nhiều sau 4 tuần. Điểm khác biệt là gel của P-2.6 so với gel T-2.6 là lượng gel còn nhiều, rất chắc chắn, và đóng gói tốt sau 4 tuần. Kết quả này cũng phù hợp với thử nghiệm *in vitro* được phân tích ở trên.



Hình 3.32 Phân hủy *in vivo* T-2.6 25% (trên) và P-2.6 25% (dưới)

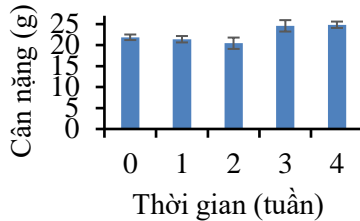
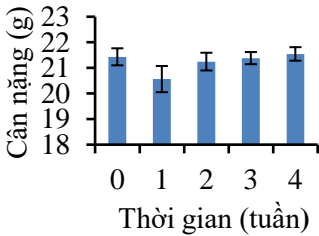


Hình 3.33 Phân hủy *in vivo* P-2.6 (25%): a) gel sau 1 ngày, b) gel sau 1 tuần

Bên cạnh đó, sự thay đổi về màu sắc của gel P-2.6 (25%) khi bị phân hủy *in vivo* tương tự *in vitro*, màu vàng nhạt dần theo thời gian như chắc chắn các OS bị phân hủy trước (hình 3.33). Kết hợp các kết quả phân hủy *in vitro* và *in vivo* là cơ sở

dự đoán khả năng dẫn thuốc của T-2.6 có tốc độ nhả chậm trong thời gian đầu, sau 3 tuần sẽ tăng, đến 4 tuần tăng nhanh, trong khi đó P-2.6 sẽ nhả chậm hơn, bền cơ, ổn định tốt.

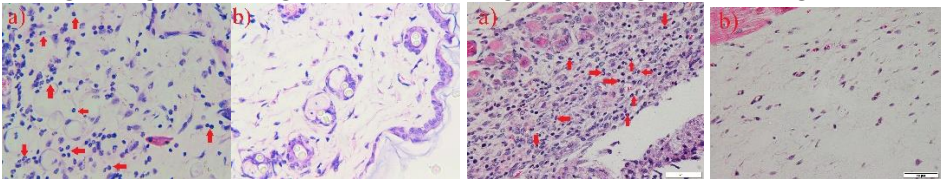
Sự tương thích sinh học của hydrogel được đánh giá qua sự thay đổi trọng lượng của chuột khi tiêm hydrogel dưới da và phân tích mô da xung quanh vùng tiêm. Hình 3.25, 3.34 thể hiện cân nặng trung bình của chuột sau khi tiêm T-2.6 (25%), P-2.6 (25%) theo thời gian. Kết quả cho thấy, sau khi tiêm 1 tuần, tất cả các chuột đều giảm cân nhẹ. Sau đó, chuột hồi phục và tăng khối lượng từ tuần 3. Như vậy, các hydrogel này đều ảnh hưởng nhẹ đến sinh lí của chuột, như chất lạ xâm nhập vào cơ thể làm hệ miễn dịch phản ứng nên giảm cân trong tuần đầu tiên.



Hình 3.25 Sự thay đổi cân nặng chuột theo thời gian sau khi tiêm T-2.6

Hình 3.34 Sự thay đổi khối lượng chuột khi tiêm P-2.6 (25%) theo thời gian

Phân tích mô (nhuộm HE) tại chỗ tiêm T-2.6 và P-2.6 được thể hiện trên hình 3.26 và 3.35. Sau 1 tuần tiêm, mô da có xuất hiện nhiều tế bào viêm (bạch cầu), nhưng không tổn thương. Sau 4 tuần, lượng bạch cầu gần như không còn.



Hình 3.26 Mô xung quanh vùng tiêm T-2.6 (HE) sau: a) 1 tuần, b) 4 tuần

Hình 3.35 Mô xung quanh chỗ tiêm P-2.6 (HE) sau: a) 1 tuần, b) 4 tuần

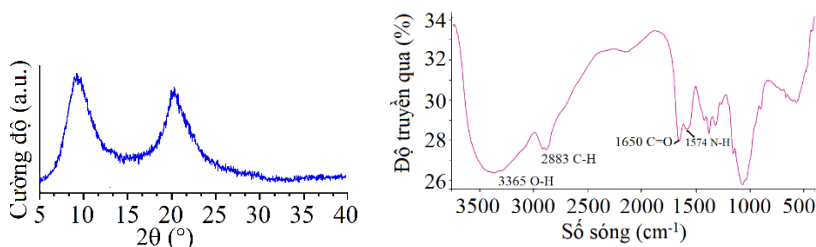
Như vậy, các hệ dẫn truyền này hoàn toàn tương thích với cơ thể. So với T-2.6, hydrogel nhạy nhiệt, nhạy pH P-2.6 có ưu thế hơn là dễ tiêm, đảm bảo độ bền cơ.

3.3 Tổng hợp hạt micro-nano chitosan

Để tổng hợp hạt micro-nano chitosan bằng phương pháp electrospraying thì có hai yếu tố chính tác động đến hình dáng, kích thước và độ đồng nhất của hạt. Thứ nhất, đó là các đặc tính của chitosan như: mức độ deacetyl hóa, độ tan, độ kết tinh, độ nhớt dung dịch, nồng độ dung dịch chitosan, sức căng bề mặt. Thứ hai là các thông số vận hành của máy electrospraying bao gồm hiệu điện thế, khoảng cách hai điện cực, tốc độ phun. Do đó, cả hai yếu tố này phải được khảo sát, phân tích nhằm thu được hạt micro-nano chitosan tròn, đều có kích thước mong muốn trong khoảng 200- 500 nm để làm chất dẫn truyền thuốc dạng tiêm.

3.3.1 Đánh giá đặc tính của nguyên liệu chitosan

Chitosan sử dụng có khối lượng phân tử lớn ($M_n > 10^5$ Da) với mục đích nhằm tăng khả năng bao gói thuốc, kéo dài thời gian nhả thuốc. Mức độ deacetyl hóa (DD) của chitosan đạt giá trị 76,13%, chứng tỏ số lượng nhóm acetyl trong cấu trúc là không nhiều, mà chủ yếu là nhóm chức $-NH_2$ nên dự đoán chitosan này có thể hòa tan được trong dung dịch acid acetic (pH < 6) do quá trình proton hóa nhóm $-NH_2$. Độ kết tinh (CrI) của chitosan có giá trị khoảng 60% thể hiện hai đỉnh nhiễu xạ đặc trưng tại $2\theta = 10,5^\circ$ (020) đặc trưng cho nhóm amine I ($-N-CO-CH_3$) và 20° (110) đặc trưng cho nhóm amine II ($-NH_2$) ở hình 3.39. Kết hợp với phổ FTIR chitosan (hình 3.40) cho thấy sự liên kết hydro nội phân tử trong cấu trúc bởi đỉnh hấp thụ chồng lấp của hai nhóm $-O-H$ và $-N-H$ bị rộng, không sắc nét ở 3400 cm^{-1} - 3600 cm^{-1} .



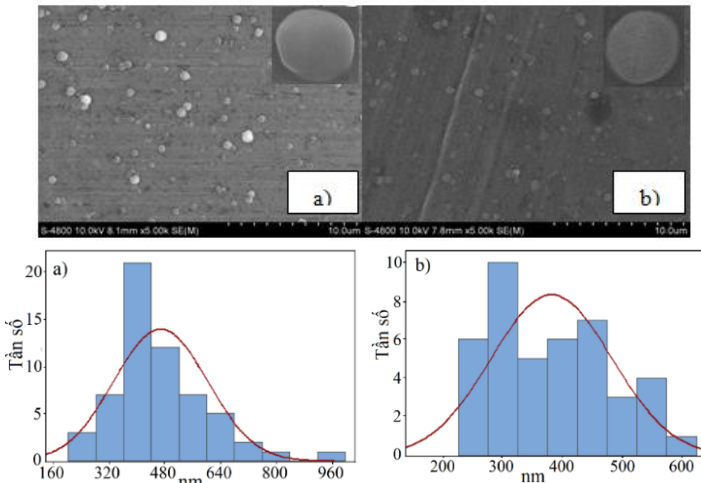
Hình 3.39 Kết quả XRD của chitosan- Hình 3.40 Phổ FTIR của chitosan

Từ các kết quả trên cho thấy chitosan được lựa chọn phù hợp với khả năng tan trong dung dịch acid acetic (một loại dung môi có sức căng bề mặt nhỏ, bay hơi

nhánh) và đồng thời có độ kết tinh vừa phải đảm bảo khả năng hòa tan, nhả thuốc, phân hủy. Việc phân tích trên cũng có thể dự đoán sự hòa tan trong acid và độ kết tinh thông qua giá trị DD.

3.3.2 Phân tích các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo hạt micro-nano chitosan bằng phương pháp electrospraying

Các thí nghiệm được tiến hành tối ưu hóa các thông số ảnh hưởng như nồng độ chitosan, nồng độ acid, khoảng cách từ đầu phun đến bản thu và hiệu điện thế. Dựa theo các tài liệu [15], [61], [62], nếu giọt dung dịch polymer ở trạng thái phun hình côn (single cone) và tốc độ ổn định thì kết quả thu được các hạt có dạng hình cầu, riêng rẽ nên đây cũng bước cảm quan đầu tiên để lựa chọn điều kiện thu mẫu. Kết quả cho thấy, để thu giọt dung dịch đầu côn thì độ nhớt dung dịch thấp dưới $20 \text{ mm}^2/\text{s}$, nồng độ chitosan thấp từ 0,2% đến 0,5% (do khối lượng phân tử lớn) sẽ dễ điều chỉnh. Dung môi acid acetic nồng độ cao 80%, 90% được lựa chọn do đảm bảo độ dẫn và sức căng bề mặt thấp để kiểm soát thiết bị vận hành. Hiệu điện thế và khoảng cách hai điện cực có mối quan phụ thuộc, khoảng cách xa thì hiệu điện thế phải lớn mới tạo đủ lực hút bút dung dịch ra khỏi đầu phun.

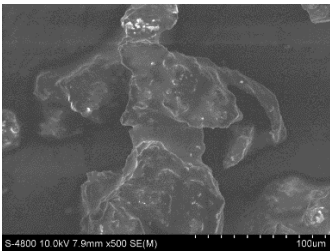


Hình 3.47 Ảnh SEM và phân phối cỡ hạt nồng độ chitosan 0,2%: a) trong acid acetic 90% ở $L=10 \text{ cm}$, $U=9 \text{ kV}$, b) trong acid acetic 80% ở $L=12 \text{ cm}$, $U=12 \text{ kV}$

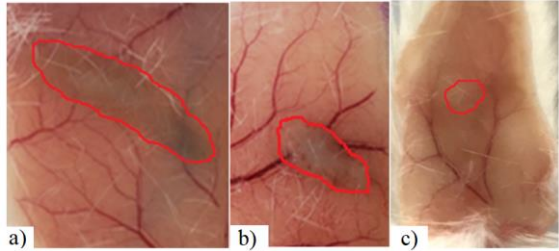
Kết quả ở hình 3.47 thể hiện hai chế độ có hình dạng đẹp nhất, hạt hình cầu, riêng rẽ, khá đồng đều. Trong đó, chế độ nồng độ chitosan 0,2% trong 80% acid acetic ở hiệu điện thế $U=12$ kV, khoảng cách điện cực $L=12$ cm có kích thước là 367 nm, đáp ứng đúng yêu cầu. Do đó, đây là chế độ được lựa chọn để nghiên cứu tải thuốc, nhà thuốc.

3.4 Đánh giá khả năng tương thích sinh học và phân hủy *in vitro*, *in vivo* của hạt micro-nano chitosan

Tương tự hệ hydrogel, tính tương thích của chitosan được đánh giá bằng cách tiêm dung dịch sol chitosan/PBS 7,4 dưới da chuột. Quan sát chuột sau khi tiêm khỏe mạnh, linh động và cân nặng tăng. Bên cạnh đó, định lượng hàm lượng acid acetic trong hạt chitosan bằng HPLC cho thấy lượng acid trong mẫu nhỏ dưới 3000 ppm, đảm bảo theo khuyến cáo. Phân tích mô da sau khi tiêm chitosan cho thấy không có viêm nhiễm nên có thể nói chitosan là vật liệu an toàn. Thử nghiệm tính phân hủy *in vitro* của chitosan được thực hiện bằng cách chụp hình SEM mẫu hạt micro-nano chitosan sau 1 tháng ngâm trong PBS (pH 7,4). Kết quả thể hiện hình 3.48, các hạt chitosan bị phân hủy, hình dáng bị biến dạng, bị dính, kết khối. Trong khi đó, thử nghiệm *in vivo* cho thấy chitosan giảm kích thước rõ rệt sau 4 tuần hình 3.50. Các phân tích trên cho thấy chitosan tương thích với cơ thể, không gây độc hại, phân hủy tốt, có thể gây tập hợp.



Hình 3.48 Phân hủy *in vitro* hạt micro-nano chitosan sau 1 tháng



Hình 3.50 Phân hủy *in vivo* hạt chitosan: a) 1 tuần, b) 2 tuần và c) 4 tuần

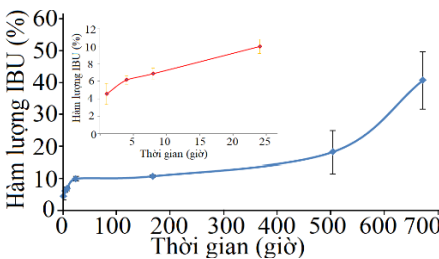
3.5 Đánh giá khả năng bao thuốc, nhả thuốc *in vitro* của hydrogel, hạt micro-nano chitosan

Để đánh giá khả năng dẫn truyền thuốc thích hợp, các hệ vật liệu được khảo sát bao gói các dạng thuốc mẫu bao gồm thuốc kị nước (ibuprofen, ceftiofur HCl) và thuốc ưa nước (paracetamol, exendin-4). Việc phân chia các dạng thuốc này được dựa vào độ hòa tan trong nước kém hay tốt.

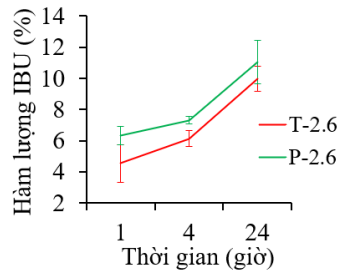
3.5.1 Đánh giá khả năng bao gói, nhả thuốc kị nước của hydrogel, hạt micro-nano chitosan

- Khả năng nhả thuốc ibuprofen của hydrogel

Ibuprofen (IBU) là dạng thuốc kị nước mẫu được lựa chọn để đánh giá khả năng nhả thuốc của T-2.6, và P-2.6. Với kết cấu micelle, thuốc kị nước sẽ tương tác với PLA ở lõi micelle. T-2.6 được xem là mạch chính của hydrogel nên được khảo sát nhả thuốc cẩn thận với kết quả trên đồ thị hình 3.52. Quá trình nhả thuốc của T-2.6 có thể chia thành 3 giai đoạn: ban đầu nhả nhanh, kế tiếp chậm và cuối cùng là tăng rất nhanh, phù hợp với quy luật phân hủy *in vitro* của T-2.6. Cụ thể, tốc độ nhả chậm trong 3 tuần đầu (504 giờ) với tổng lượng thuốc nhả ra chỉ 18%. Từ tuần 3 đến tuần 4 (672 giờ), tốc độ diễn ra nhanh với tổng lượng thuốc là 41%. Riêng trong 24 giờ đầu, lượng IBU nhả nhanh khoảng 10%, do lượng thuốc nằm trên bề mặt. Điều này được chứng minh qua *in vitro* gel T-2.6 bao thuốc IBU. Với cơ chế phân hủy tương tự T-2.6, P-2.6 bao gói thuốc IBU dự đoán sẽ kéo dài thời gian nhả thuốc hơn so với T-2.6. Như vậy, kiểm tra thời gian ban đầu nhả thuốc là cần thiết để đánh giá quy luật nhả thuốc của P-2.6.



Hình 3.52 Sự nhả thuốc ibuprofen của T-2.6 theo thời gian



Hình 3.54 Sự nhả thuốc IBU của hydrogel

Kết quả nhả thuốc các hydrogel trong 24 giờ đầu được thể hiện ở hình 3.54 cho thấy sự nhả thuốc của T-2.6 không khác biệt nhiều so với P-2.6. Nhìn tổng thể thì trong 24 giờ đầu, các hệ này nhả thuốc ổn, không có sự nhả ồ ạt, hoàn toàn thích hợp để áp dụng dẫn truyền thuốc hệ kỵ nước.

- Đánh giá khả năng bao gói thuốc và nhả thuốc ceftiofur HCl của chitosan

Thuốc ceftiofur HCl là loại thuốc kỵ nước được thử nghiệm khả năng bao gói của hạt micro-nano chitosan bằng phương pháp electrospraying. Kết quả hình thái hạt thu được tròn, lớn hơn hạt chitosan tron (467 nm) với khả năng tải thuốc LC 3% và khả năng bao gói EE đạt 19,37% đều thấp. Sự khó khăn khi sử dụng hạt micro-nano chitosan tải thuốc là thuốc và chitosan không có tương tác vật lí hay hóa học ảnh hưởng đáng kể đến LC và EE.

3.5.2 Đánh giá khả năng tải thuốc, bao thuốc và nhả thuốc ưa nước của hydrogel, hạt micro-nano chitosan

Paracetamol được lựa chọn làm thuốc mẫu để thử nghiệm khả năng bao gói và nhả thuốc của các hệ vật liệu. Nhìn chung, kết quả đều không thành công cho cả hai hệ dẫn truyền là hydrogel và hạt micro-nano chitosan. Đối với hydrogel T-2.6 (25%) nhả thuốc 100% trong 8 giờ đầu, P-2.6 có thể kéo dài nhả hoàn toàn đến 48 giờ. Điều này có thể do các hydrogel này là các micelle với vỏ PEG ưa nước nên thuốc chỉ giữ ở vỏ chứ không được bao gói ở lõi nên nhanh chóng khuếch tán ra môi trường. Do đó, đây cũng là cơ sở để ước đoán sẽ không khả thi nếu dùng hệ này bao gói thuốc ưa nước. Đối với hạt micro-nano chitosan, khả năng tải thuốc LC, bao gói thuốc EF đều rất thấp tương ứng $2,15 \pm 0,03$; $23,66 \pm 0,32$. Thêm vào đó là hệ nhả thuốc paracetamol nhanh trên 80% sau 1 giờ và gần như hoàn toàn 100% trong 8 giờ. Nguyên nhân có thể thuốc chỉ phủ bên ngoài hạt, không có sự gắn kết hóa học giữa thuốc với chitosan nên hiệu quả kém.

3.6 Giải pháp làm tăng hiệu quả dẫn truyền thuốc ưa nước của hệ vật liệu

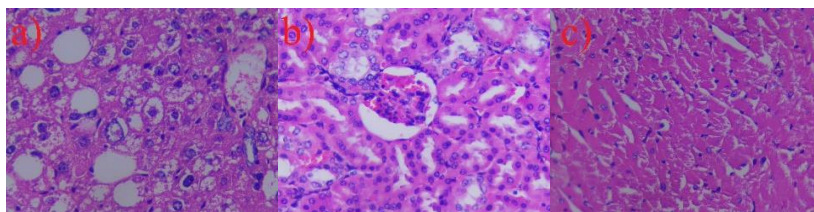
Ý tưởng giải pháp kết hợp hạt micro-nano chitosan bao thuốc sau đó phân tán trong hydrogel tận dụng đặc tính của hydrogel là bẫy thuốc chứa trong hạt nano chitosan trong mạng cấu trúc, đồng thời làm tăng độ ổn định cho hạt nano

chitosan, tránh tập hợp. Đây cũng là giải pháp áp dụng bao thuốc exendin-4 ưa nước với mong muốn kéo dài thời gian nhả thuốc.

Bảng 3.12 Đặc điểm chuột sau khi tiêm STZ

Liều STZ (mg/kg)	2 tháng		4 tháng		Đánh giá
	Cân nặng	Đường huyết (mg/dL)	Đường huyết (mg/dL)	HbA1c (%)	
Liều thấp (40-60 mg/kg)	Tăng đều	112,8±13,8	129,5±5,3	<6,5	Chưa đủ kết luận chuột bị tiểu đường tuýp 2
Liều cao 1 (60-100 mg/kg)	Tăng đều	164,3±21,5	156±27,7	6,7	Chuột bị tiểu đường tuýp 2
Liều cao 2 (100-60 mg/kg)	Tăng đều	270,0±40	262,5±2,5	8,6	Chuột bị tiểu đường tuýp 2

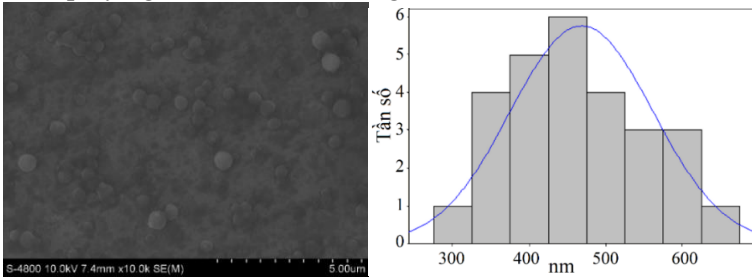
Để thực hiện được khảo sát này thì chuột tiểu đường tuýp 2 phải được tạo ra bằng cách tiêm STZ lên ổ bụng của chuột trong dung dịch đệm sodium citrate (pH 4- pH 5) với ba liều lượng khác nhau cho kết quả trên bảng 3.12. Điểm chung là tất cả các lần thí nghiệm, chuột đều hoạt động bình thường, tăng cân đều. Chuột có khối lượng tăng nhanh thì dễ bị tăng đường huyết hơn.



Hình 3.70 Mô (nhuộm HE) chuột tiểu đường: a) gan, b) thận và c) tim

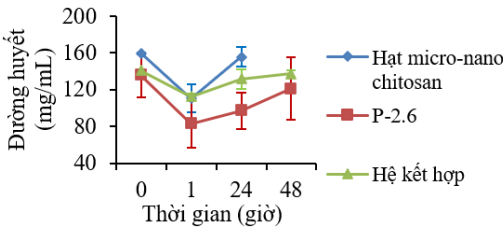
Kết quả chuột tiêm liều cao đều có ngưỡng đường huyết và HbA1c bị tiểu đường tuýp 2. Phân tích mô gan, thận và tim của chuột tiêm liều cao hình 3.70 cũng cho thấy thận bị hư tổn ít, thể hiện có sự xâm nhập bạch cầu (lympho), mô gan bị thoái hóa mỡ, tim bình thường. Đó là dấu hiệu của bệnh tiểu đường tuýp 2.

Mặt khác, hạt chitosan bao thuốc exendin-4 (5%) được tổng hợp bằng phương pháp electrospraying đạt kích thước trung bình 468 nm, hình cầu, hình 3.71.

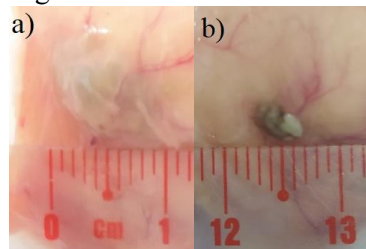


Hình 3.71 Ảnh SEM của hạt micro-nano chitosan /thuốc exendin-4

Thí nghiệm phân tán hạt chitosan chứa thuốc trong P-2.6 25% để tạo hệ kết hợp. Đồ thị hình 3.72 thể hiện lượng đường huyết của chuột theo thời gian khi thử nghiệm nhà thuốc 3 hệ vật liệu: hạt nano chitosan, P-2.6 và hệ kết hợp. Kết quả, cả ba hệ đều có lượng đường huyết giảm xuống nhanh sau 1 giờ cho thấy nhà thuốc nhanh. Tuy nhiên, thứ tự tăng tốc độ nhà thuốc như sau: hệ kết hợp < P-2.6 < hạt micro-nano chitosan được thể hiện bởi độ dốc của đồ thị. Sau 48 giờ, lượng đường huyết của chuột tiêm hệ P-2.6 và hệ kết hợp trở lại lượng đường huyết ban đầu so với hệ hạt micro-nano là 24 giờ.



Hình 3.72 Sự thay đổi lượng đường huyết của chuột trong thử nghiệm nhà thuốc *in vivo*



Hình 3.73 Sự phân hủy *in vivo* của hệ kết hợp hạt micro-nano chitosan và hydrogel P-2.6 trường hợp: a) 1 tuần, b) 6 tuần

Như vậy, hệ kết hợp nhả thuốc chậm hơn và kéo dài được thời gian nhả thuốc. Một ưu điểm của hệ kết hợp là gắn kết dưới da tốt sau 1 tuần và phân hủy nhiều sau 6 tuần (hình 3.73), kích thước hệ còn lại rất nhỏ bao gồm gel màu trắng và hạt chitosan màu sẫm. Điều này minh chứng hệ tương thích tốt cơ thể, độ bền cơ học tốt. Các kết quả nghiên cứu này có giá trị quan trọng rất lớn để tạo tiền đề nghiên cứu kỹ hơn hệ dẫn truyền ứng dụng dẫn truyền exendin-4 vào thực tế.

CHƯƠNG 4 KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu, luận án đã đạt những mục tiêu chính đặt ra với các kết luận như sau:

Các copolymer nhạy nhiệt PLA-PEG-PLA (T-2.3, T-2.6, T-2.7, T-2.8) được tổng hợp thành công. Trong đó, PLA₁₇₅₀-PEG₁₇₅₀-PLA₁₇₅₀ (T-2.6 25%) là hydrogel có khoảng nhiệt độ tạo gel tốt từ 20°C đến 42°C. Hơn nữa, các oligomer nhạy pH bao gồm OS và OSA có khoảng nhạy pH tương ứng từ 5,8-7,5 và 6,3-7,2 được tổng hợp và được ghép với hydrogel nhạy nhiệt tạo ra hydrogel nhạy nhiệt, nhạy pH. Đặc biệt, hydrogel nhạy nhiệt và nhạy pH OS-PLA₁₇₅₀-PEG₁₇₅₀-PLA₁₇₅₀-OS (P-2.6 25%) và OSA- PLA₁₇₅₀-PEG₁₇₅₀-PLA₁₇₅₀-OSA (P-2.6A 35%) thể hiện khoảng nhiệt độ gel hóa tốt (37°C, pH 7,4).

Hạt micro-nano chitosan có hình cầu, đường kính trung bình 367 nm được tạo thành bằng phương pháp electrospraying ở chế độ làm việc L= 12 cm, U= 12kV, Q= 0,1 mL.h⁻¹ tương ứng nồng độ chitosan 0,2% trong acid acetic 80%. Kết quả này tương thích với đánh giá các đặc tính ban đầu chitosan và dung dịch chitosan bằng các phương pháp phân tích. Chitosan có DD cao (76,13%), độ kết tinh trung bình (60%), khối lượng phân tử lớn nên phù hợp nồng độ chitosan thấp, độ nhớt thấp và dung môi acid nồng độ cao, có sức căng dung dịch thấp sẽ dễ dàng điều chỉnh đầu côn Taylor tạo hạt chitosan tròn, đều.

Các hydrogel và hạt micro-nano chitosan tạo thành đều thể hiện tính tương thích sinh học tốt. Qua thử nghiệm *in vivo*, hệ vật liệu không ảnh hưởng đến chuột được biểu hiện qua sự tăng cân, hoạt động sinh hoạt bình thường, mô da (chỗ

tiêm vật liệu) không tổn thương sau 4 tuần. Kết quả phân tích phân hủy *in vitro* và *in vivo* cho thấy hydrogel nhạy nhiệt T-2.6 phân hủy nhanh hơn so với hydrogel nhạy nhiệt, nhạy pH P-2.6, P-2.6A. Đối với các hydrogel sự phân hủy diễn ra bởi thành phần ưa nước PEG trương trong môi trường, thành phần nhạy pH phân tán trong dung dịch gây thay đổi màu gel và dung dịch, phần kỵ nước PLA phân hủy bị bẫy lại trong mạng cấu trúc hydrogel cho đến khi sự xói mòn dạng khối xảy. Trong khi đó, hạt micro-nano chitosan phân hủy *in vitro* từ từ ở bề mặt gây biến dạng hạt.

Hydrogel T-2.6 cho kết quả thử nghiệm *in vitro* nhả thuốc kỵ nước (ibuprofen) có kiểm soát tương tự quy luật phân hủy *in vitro*. Thời gian nhả 41% thuốc IBU có thể kéo dài đến 4 tuần (672 giờ). Nhìn chung, hydrogel thích hợp tải thuốc kỵ nước vì sự tương tác của thuốc và lõi micelle PLA. Ngược lại, các hệ vật liệu hydrogel bao thuốc, nhả thuốc ưa nước (paracetamol) kém do thuốc được giữ bởi PEG nằm vỏ của micelle dễ dàng khuếch tán vào dung dịch. Trong khi đó, khả năng bao thuốc, nhả thuốc kỵ nước (ceftiofur hydrochloride) và thuốc ưa nước (paracetamol) của hạt micro-nano chitosan đều có kết quả LC và EE không cao do không có sự tương tác giữa thuốc và chitosan.

Cuối cùng, các giải pháp tăng khả năng bao gói thuốc ưa nước bằng kết hợp hai hệ vật liệu hydrogel và chitosan để tăng thêm tính năng của hệ vật liệu. Kết quả, hạt micro-nano chitosan/hydrogel bao thuốc paracetamol có giá trị LC và EE tăng đáng kể. Điều này là do tạo được sự tương tác vật lý giữa nhóm chức chitosan và PLA được chứng minh qua phổ FTIR, XRD. Quan trọng nhất mà đề tài hướng đến là kéo dài thời gian nhả thuốc ưa nước exendin-4, loại thuốc trị bệnh tiểu đường tuýp 2 được thực hiện bằng hệ kết hợp hạt micro-nano chitosan chứa thuốc phân tán trong hydrogel nhạy nhiệt, nhạy pH P-2.6. Chuột tiểu đường tuýp 2 đã được nghiên cứu thành công với các triệu chứng bệnh như tổn thương nhẹ thận, mô gan thoái hóa mỡ, HbA1c ngưỡng 6,7%-8,6% được áp dụng thử nghiệm hệ dẫn truyền thuốc này. Kết quả, hệ kết hợp hạt micro-nano chitosan và hydrogel P-2.6 kéo dài được thời gian nhả thuốc đến 2 ngày và tốc độ nhả thuốc nhỏ hơn so với hệ đơn P-2.6 và hạt micro-nano chitosan.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

Tạp chí quốc tế

1. **Nguyễn Thị Thanh Hiền**, Nguyễn Thị Trúc Lam, Hà Cẩm Anh and Huỳnh Đại Phú, “Evaluation of Ibuprofen Prolonged Release of Biomedical PLA-PEG-PLA Hydrogel via Degradation Mechanism,” *International Journal of Biomaterials*, vol 2023, 2023. Q3. <https://doi.org/10.1155/2023/5005316>.

2. Trịnh Thúy An, Lê Thái Minh Duy, **Nguyễn Thị Thanh Hiền**, Nguyễn Thanh Lộc, Jaeyun Kim, Huỳnh Đại Phú, and Doo Sung Lee, “pH-temperature Responsive Hydrogel-Mediated Delivery of Exendin-4 Encapsulated Chitosan Nanospheres for Sustained Therapeutic Efficacy in Type 2 Diabetes Mellitus”, *Macromol. Biosci.*, 2023. Q1. <https://doi.org/10.1002/mabi.202300221>.

3. **Nguyễn Thị Thanh Hiền**, Trần Ngọc Tính, Hà Cẩm Anh and Huỳnh Đại Phú, “Impact of deacetylation degree on properties of chitosan for formation of electrosprayed nanoparticles,” *Journal of Nanotechnology*, vol 2022, 2022. Q3. <https://doi.org/10.1155/2022/2288892>.

4. **Nguyễn Thị Thanh Hiền**, Bùi Xuân Tiến, Hà Cẩm Anh and Huỳnh Đại Phú, “Synthesis and Evaluation of Thermoresponsive PLA-PEG-PLA and pH/Temperature-Sensitive OS-PLA-PEG-PLA-OS Hydrogels as Injectable Drug Delivery Application,” *IFMBE-Proceedings- 8th International Conference on the Development of Biomedical Engineering in Vietnam*, vol 85, pp. 339-349, 2022. SCOPUS. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-75506-5_27.

Tạp chí trong nước

1. **Nguyễn Thị Thanh Hiền**, Tống Ngọc Trinh, Huỳnh Bảo Long, Hà Cẩm Anh and Huỳnh Đại Phú, “Characterization of electrosprayed chitosan/PLA-PEG-PLA (copolymer) nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drug,” *Vietnam Journal of Science and Technology*, vol 60, no 3, pp. 436-446, 2022. <https://doi:10.15625/2525-2518/16239>.

2. **Nguyễn Thị Thanh Hiền**, Bùi Phan Minh Châu, A. Hà Cẩm Anh and Huỳnh Đại Phú, “Synthesis and characterization of ph-sensitive polymer via carboxamide group,” *Journal of Science Technology and Food*, vol 21, no 2, pp. 22-30, 2021. https://jstf.hufi.edu.vn/synthesis-and-characterization-of-ph-sensitive-polymer-via-carboxamide-group-20210709163743700file_

Kỷ yếu hội nghị quốc tế

1. **Nguyễn Thị Thanh Hiền**, Nguyễn Thị Quế Hương, Võ Phạm Phương Trang, Bùi Xuân Tiến, Hà Cẩm Anh and Huỳnh Đại Phú, “Ceftiofur hydrochloride-containing chitosan micro/nano particles via electrospraying method as an efficient drug delivery system,” *Proceedings of 12th AUN/SEED-net RCME & ISMSE 2019*, pp. 163-170, 2019.