



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0049360

(51)^{2022.01} A61L 27/52

(13) B

(21) 1-2023-07669

(22) 01/11/2023

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/01/2024 430A

(73) Viện Công nghệ tiên tiến - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
1B, đường Thanh Lộc 29, khu phố 1, phường Thanh Lộc, quận 12, thành phố Hồ Chí Minh

(72) Trần Ngọc Quyền (VN); Đặng Thị Lệ Hằng (VN).

(54) PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ HYDROGEL DẠNG TIÊM THỂ LAI TRÊN NỀN
ALGINAT/PLURONIC F127 KẾT HỢP HẠT THỦY TINH SINH HỌC VỚI TÍNH
CHẤT XÚC TÁC TƯƠNG TỰ PEROXIDAZA

(21) 1-2023-07669

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp điều chế hydrogel dạng tiêm trên nền alginate/pluronic kết hợp hạt thủy tinh sinh học với tính chất xúc tác tương tự peroxidaza. Theo sáng chế, hạt thủy tinh sinh học với tính chất xúc tác tương tự peroxidaza theo sáng chế được tạo ra bằng cách kết hợp hạt nano hemin vào cấu trúc hạt thủy tinh sinh học thành phần silic oxit (SiO_2), canxi oxit (CaO) và photpho pentoxit (P_2O_5) có tỷ lệ số mol như sau: $64 \text{ SiO}_2 - 31 \text{ CaO} - 5 \text{ P}_2\text{O}_5$ bằng phương pháp thủy nhiệt. Hydrogel theo sáng chế được tạo ra từ chất nền là alginat và pluronic F127 sau khi được sửa đổi bởi nhóm dopamin, tạo thành alginate- dopamin và pluronic F127-dopamin. Hydrogel dạng tiêm thể lai được hình thành bằng cách tạo liên kết ngang giữa các nhóm sửa đổi dopamin trên nền tiền vật liệu biến tính với tác nhân liên kết dopamine thông qua phản ứng oxi hóa với tác nhân hydro peroxit dưới tác dụng xúc tác của hạt thủy tinh sinh học với tính chất xúc tác tương tự peroxidaza. Pháp tạo vật liệu hydrogel thể lai theo sáng chế tạo ra có đặc tính chuyển pha từ lỏng sang gel theo sự thay đổi của nhiệt độ, thể hiện tính chất tiêm phù hợp với liệu pháp điều trị không xâm lấn và thể hiện khả năng khoáng hóa, cảm ứng tạo xương đồng thời an toàn khi cấy ghép và đây là quy trình có thể thực hiện được một cách dễ dàng trong điều kiện thực tế tại Việt Nam.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ dược phẩm. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế hydrogel dạng tiêm trên nền alginat/pluronic F127 kết hợp hạt thủy tinh sinh học với tính chất xúc tác tương tự peroxidaza.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hydrogel dạng tiêm đã và đang thu hút được sự chú ý lớn trong kỹ thuật tái tạo mô xương tạo liệu pháp điều trị không xâm lấn. Hydrogel dạng tiêm là các vật liệu ở dạng lỏng trước và trong khi tiêm hoặc có đặc tính làm loãng cho phép chúng đi qua kim hoặc ống thông cỡ nhỏ. Sau khi được tiêm, vật liệu dạng lỏng sẽ đông đặc lại thành chất rắn xốp thấm nhờ thiết lập mạng lưới liên kết ngang để có cấu trúc không gian ba chiều. Dạng vật liệu này giúp lấp đầy các khuyết tật xương có hình dạng khác nhau. Hydrogel nhạy nhiệt là một trong các lựa chọn hàng đầu để phát triển hydrogel dạng tiêm. Trên cơ sở chuyển pha dung dịch-gel được kích hoạt bởi nhiệt độ, vật liệu hydrogel nhạy nhiệt thể hiện khả năng tiêm và khả năng thích ứng hình thái tuyệt vời, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình tái tạo mô mong muốn.

Hydrogel nhạy nhiệt phát triển từ poly(etylene oxit)–poly(propylene oxit)–poly(etylene oxit) (PEO-PPO-PEO hoặc Pluronic) đang được chú ý nhiều nhất hiện nay. Polyme này được sắp xếp theo cấu trúc ba lớp đối xứng, với các nhóm poly(etylene glycol) (PEG) ưa nước và các nhóm poly(etylene oxit) (PPO) kỵ nước. Nhờ cấu trúc trên, khi nhóm ưa nước và kỵ nước trong polyme đạt sự cân bằng sẽ dẫn đến hiện tượng co mạch và sau cùng là tách pha. Quá trình chuyển đổi là kết quả của sự hình thành các mixen có kích thước nano tự liên kết thông qua các tương tác kỵ nước giữa các phân tử Pluronic tại nhiệt độ hoà tan tới hạn dưới. Mặc dù hydrogel phát triển từ Pluronic thường được sử dụng trong các ứng dụng tạo gel dạng tiêm, độ bám dính mô của hydrogel hạn chế, độ bền cơ học và các vấn đề về giảm cấp nhanh trong cơ thể đã đặt ra những thách

thức trong quá trình cấy ghép mô bên trong cơ thể. Với sự tiến bộ của khoa học vật liệu, một chiến lược đơn giản để vượt qua trở ngại này là đưa một thành phần polyme khác vào mạng Pluronic tạo ra hydrogel nhạy nhiệt thể lai. Trong cách tiếp cận này, hydrogel dựa trên natri alginate đã thu hút được sự chú ý đáng kể trong tạo vật liệu hydrogel ứng dụng tái tạo mô xương. Alginat là nguyên liệu ưa chuộng trong tổng hợp vật liệu ứng dụng trong lĩnh vực tái tạo xương. Ái lực của alginat với các ion dương, đặc biệt là Ca^{2+} , tạo điều kiện cho quá trình lắng đọng calcium trên bề mặt của vật liệu. Khả năng này thúc đẩy quá trình tạo mầm và phát triển tinh thể, do đó mang lại khả năng khoáng hóa sinh học đối với vật liệu alginat. Hơn nữa, alginat được sự chấp thuận của Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) cho các ứng dụng trên người, kể cả trong vật liệu cấy ghép.

Alginat có cấu trúc tinh thể do mạng lưới liên kết hydro nội phân tử mạnh mẽ của chúng. Do đó, alginat thường có độ hòa tan thấp, độ nhớt khác biệt dẫn đến khó hòa trộn vào pluronic và gây sự triệt tiêu đặc tính nhạy nhiệt của hệ vật liệu. Hiện nay, có sự quan tâm đáng kể đến việc thiết kế và phát triển vật liệu hydrogel thể lai bằng cách sử dụng các hợp chất phân tử nhỏ làm cầu nối. Phương án này cho nhiều ưu điểm vượt trội trong việc kết hợp alginat với pluronic. Trong số các tác nhân liên kết ngang khác nhau, nhóm catechol đã thu hút được sự chú ý như một lựa chọn an toàn để tạo ra hydrogel thể lai. Catechol dễ dàng bị oxy hóa để tạo thành o-quinone, trải qua các phản ứng thứ cấp để thiết lập liên kết cộng hóa trị giữa hai phân tử catechol. Ngoài ra, catechol còn được biến đến là chất kết dính mô. Bổ sung hay biến đổi cấu trúc vật liệu hydrogel với catechol làm tăng cường độ bám dính với mô, tránh hiện tượng bị rửa trôi. Axit amin 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA), chứa nhóm chức ortho-dihydroxyphenyl (catechol), là một “keo sinh học” nên có tính chất kết dính mạnh và tạo được liên kết cộng hóa trị và không cộng hóa trị mạnh mẽ với nhiều bề mặt hữu cơ và vô cơ.

Hầu hết các nghiên cứu về phương pháp sử dụng DOPA là cầu nối tạo ra hydrogel thể lai tập trung vào liên kết ion phối trí giữa các nhóm catechol và các ion kim loại chuyển tiếp, đặc biệt là Fe^{3+} , cũng như liên kết cộng hóa trị thông qua việc sử dụng các tác nhân oxy hóa, đặc biệt là NaIO_4 . Tuy nhiên, các ứng dụng rộng rãi hơn của các kỹ thuật này đã bị cản trở bởi những thách thức liên quan đến khả năng tương thích sinh học

kém và độ ổn định hạn chế trong môi trường sinh học. Những thách thức này được giải quyết một cách hiệu quả thông qua sự hiện diện của enzym peroxidaza.

Bất chấp những hiệu quả của peroxidaza enzym, hai thách thức đáng kể vẫn tồn tại trong bối cảnh hình thành hydrogel được xúc tác peroxidaza dựa trên quá trình oxy hóa catechol. Phản ứng oxy hóa catechol diễn ra trong điều kiện $\text{pH} > 8$, điều này gây ảnh hưởng đến hoạt độ của enzym peroxidaza, có khả năng dẫn đến mất chức năng peroxidaza. Hơn nữa, peroxidaza đã được xác định là có khả năng kích hoạt phản ứng miễn dịch ở người và các động vật có vú khác do trình tự protein của nó. Để khắc phục những hạn chế này, những nỗ lực đáng kể đã được dành cho việc phát triển các vật liệu mô phỏng chức năng peroxidaza hay còn gọi là peroxidaza nhân tạo. Cách tiếp cận này nhằm mục đích vượt qua những thách thức liên quan đến peroxidaza tự nhiên bằng cách tạo ra vật liệu có khả năng bắt chước hoạt động xúc tác của peroxidaza. Bằng cách đó, các nhà nghiên cứu mong muốn đạt được sự kiểm soát được cải thiện đối với quá trình tổng hợp hydrogel thể lai từ phản ứng oxy hóa catechol, giải quyết các vấn đề về điều kiện hoạt động và phản ứng miễn dịch, đồng thời cho phép sử dụng rộng rãi hơn các hệ thống hydrogel có tính kết dính mô cho các ứng dụng trong y học tái tạo.

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

Ngoài các đặc tính có thể tiêu, bám dính và tự phục hồi, vật liệu hydrogel lý tưởng để tái tạo xương cũng phải thể hiện hoạt tính cảm ứng tạo xương. Thủy tinh hoạt tính sinh học (BG) đã trở nên nổi bật trong lĩnh vực này nhờ khả năng thúc đẩy sự hình thành

xương mới bằng cách kích thích sự hình thành hydroxyapatit, cung cấp khả năng bảo vệ khỏi nhiễm trùng thông qua các ion kim loại được giải phóng. Việc đưa BG vào trong hydrogel tạo ra kích thích đáng kể cho hoạt động tạo mầm xương. Đáng chú ý, BG có thể thể hiện sự đa dạng chức năng dựa trên thành phần của chúng. Bằng cách lấy cảm hứng từ chức năng giống peroxidaza của xeri oxit, đồng tổng hợp của xeri và BG tạo ra hạt thủy tinh sinh học có tính bắt chước chức năng của peroxidase enzym. Trong một nghiên cứu khác của Ziqi Xu, việc kết hợp các cụm nano vàng vào mạng BG đã thể hiện một chức năng mới cho BG: hoạt động xúc tác giống peroxidaza. Do đó, BG có đặc tính bắt chước peroxidaza có thể là chiến lược hiệu quả hơn để thiết kế hydrogel thể lai với tác nhân liên kết là catechol.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp điều chế hydrogel dạng tiêm trên nền alginate/pluronic kết hợp hạt thủy tinh sinh học với tính chất xúc tác tương tự peroxidaza giải quyết các hạn chế nêu ra ở trên.

Mục đích sáng chế nhằm tạo ra phương pháp mới nhằm tạo ra hydrogel dạng tiêm trên nền alginate/pluronic kết hợp hạt thủy tinh sinh học với tính chất xúc tác tương tự peroxidaza thích hợp làm vật liệu tái tạo xương.

Cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế hydrogel dạng tiêm trên nền alginate/pluronic kết hợp hạt thủy tinh sinh học với tính chất xúc tác tương tự peroxidaza bao gồm:

- tạo nano hemin;
- tạo hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza;
- tạo tiền vật liệu biến tính với tác nhân liên kết dopamin, bước này bao gồm tạo dẫn xuất alginat-dopamin và pluronic –dopamin;
- tạo hydrogel nhạy nhiệt thể lai từ dẫn xuất alginate-dopamin/pluronic-dopamin dưới tác dụng xúc tác của hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza bằng cách phối trộn alginat-dopamin và pluronic –dopamin với hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza kết hợp với tác nhân hydro peroxit.

Hydrogel theo sáng chế này tạo được gel ở nhiệt độ trên 30°C và chuyển về trạng thái dung dịch khi nhiệt độ hạ xuống dưới 20°C, thể hiện tính chất tiêm được.

Theo sáng chế, kết hợp hạt thủy tinh sinh học với hemin tạo hệ thủy tinh sinh học có chức năng bắt chước hoạt tính peroxidaza và sử dụng nó vừa làm chất xúc tác trong quá trình tạo hydrogel nhạy nhiệt thể lại từ alginat và pluronic với tác nhân liên kết dopamin vừa làm chất cảm ứng tạo xương tạo ra vật liệu hydrogel dạng tiêm phù hợp với ứng dụng tái tạo xương.

Theo sáng chế, đặc tính của hydrogel này có thể điều chỉnh thông qua điều chỉnh hàm lượng của tiền vật liệu biến tính với các tác nhân liên kết dopamine để đạt được hiệu quả ứng dụng phù hợp với mô, vì vậy có thể đa dạng hóa các sản phẩm y sinh.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: A) Hình thái học và B) kích thước hạt, C) sản phẩm nano hemin, D) Phổ phát xạ dung dịch nano hemin với kích thích 200 nm đến 800 nm, E) Phổ phát xạ dung dịch nano hemin với các kích thích tại 397 nm, 479 nm và 593 nm.

Hình 2: A) Hình thái học và B-C) bản đồ nguyên tố của hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza, D) Phổ phát xạ hạt thủy tinh điều chế và hạt thủy tinh thông thường ở bức xạ 479 nm, E) Hình ảnh hạt nano hạt thủy tinh điều chế dưới kính hiển vi huỳnh quang kích thích 480nm và kính hiển vi thường, F) Phổ nhiễu xạ tia X của hạt thủy tinh sinh học điều chế và hạt thủy tinh thường.

Hình 3: Tính chất nhạy nhiệt của hydrogel thể lại trên nền alginat- dopamin/ pluronic F127-dopamin sử dụng hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza làm xúc tác

Hình 4: Minh họa cấu trúc hydrogel thể lại trên nền alginat- dopamin/ pluronic F127-dopamin sử dụng hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza làm xúc tác

Mô tả chi tiết sáng chế

Tác giả đề xuất phương pháp mới điều chế hydrogel thể lại từ alginat và pluronic sử dụng phản ứng oxi hóa tạo liên kết cộng hóa trị giữa các phân tử dopamine với sự giúp đỡ của hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza được tạo thành từ

hạt thủy tinh sinh học kết hợp với nano hemin, có đặc tính nhạy nhiệt và có khả năng tiêm được, đồng thời mang nhân tố cảm ứng tạo khoáng xương.

Để đạt được hiệu quả kỹ thuật cao đối với hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza, các hạt thủy tinh sinh học được kết hợp với hạt nano hemin tạo ra nhờ quá trình cacbon hóa. Do vòng lặp tetrapyrrolic lớn, các ứng dụng thực tế của hemin thường bị cản trở bởi một số nhược điểm nội tại, bao gồm độ hòa tan trong nước thấp và dễ kết tụ. Thông qua phản ứng thủy nhiệt, quá trình kết tinh của các phân tử hemin và liên kết liên phân tử giữa các phân tử hemin bị gián đoạn tạo ra các hạt nano hemin có khả năng hòa tan tuyệt vời. Việc kết hợp hạt nano hemin vào mạng hạt thủy tinh sinh học mang lại cho hạt thủy tinh sinh học một chức năng mới, hoạt tính xúc tác của enzym peroxidaza. Sau đó, hạt thủy tinh sinh học này hỗ trợ phản ứng oxi hóa tạo liên kết giữa hai polyme dẫn xuất, alginate–dopamin và pluronic–dopamin, dẫn đến hình thành hydrogel thể lai với tính chất tiêm. Ngoài ra, việc kết hợp hạt thủy tinh sinh học này có thể điều khiển hiệu quả khả năng của quá trình khoáng hóa giúp thúc đẩy đáng kể quá trình hình thành xương mới, đẩy nhanh quá trình tái tạo xương tại chỗ và có đặc tính kháng khuẩn.

Cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế điều chế hydrogel dạng tiêm trên nền alginat/pluronic kết hợp hạt thủy tinh sinh học với tính chất xúc tác tương tự peroxidaza bao gồm:

- tạo nano hemin;
- tạo hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza;
- tạo tiền vật liệu biến tính với tác nhân liên kết dopamin, bước này bao gồm tạo dẫn xuất alginat-dopamin và pluronic –dopamin;
- tạo hydrogel nhạy nhiệt thể lai từ dẫn xuất alginate-dopamin/pluronic-dopamin dưới tác dụng xúc tác của hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza bằng cách phối trộn alginat-dopamin và pluronic –dopamin với hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza kết hợp với tác nhân hydro peroxit.

Đặc điểm thứ nhất của phương pháp điều chế điều chế hydrogel dạng tiêm trên nền alginat/pluronic kết hợp hạt thủy tinh sinh học với tính chất xúc tác tương tự peroxidaza

là phương pháp tạo nano hemin bằng phản ứng thủy nhiệt hemin với dung môi hữu cơ trong môi trường chân không nhiệt độ 120-150°C, trong 5-6 giờ, thu được nano hemin. Quy trình điều chế nano hemin được tiến hành cụ thể như sau: hemin phân tán vào dung môi hữu cơ như metanol, axeton, etanol, có sự hỗ trợ siêu âm 30 phút và sau đó chuyển vào cốc phản ứng thủy nhiệt. Trong đó, nếu dung môi hữu cơ là etanol nồng độ hemin là 0,2 mg/ml, dung môi hữu cơ là axeton nồng độ hemin là 0,5 mg/mL, dung môi hữu cơ là metanol nồng độ hemin là 0,5 mg/mL. Cốc thủy nhiệt được đặt trong lò chân không ở nhiệt độ 120-150°C trong 5-6 giờ. Cốc thủy nhiệt được làm nguội trong tủ cho đến khi đạt nhiệt độ phòng. Ly tâm tốc độ 10000 vòng/phút, trong 10 đến 20 phút để loại bỏ các hemin không bị carbon hóa trước khi sử dụng phương pháp đuổi dung môi hữu cơ bằng máy cô quay chân không. Nước cất được cho vào chất kết tinh thu sau khi cô quay. Sản phẩm sau đó được lọc qua màng 0,22 μm . Nano hemin thu được sau 3 lần ly tâm với tốc độ 20.000 vòng/phút trong 20 phút. Phương pháp đông khô được sử dụng để thu được bột nano hemin.

Đặc điểm thứ hai của phương pháp điều chế điều chế hydrogel dạng tiêm trên nền alginat/pluronic kết hợp hạt thủy tinh sinh học với tính chất xúc tác tương tự peroxidaza này là tạo hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza bằng cách trộn đều hạt thủy tinh sinh học thành phần silic oxit (SiO_2), canxi oxit (CaO) và photpho pentoxit (P_2O_5) có tỷ lệ số mol như sau: 64 SiO_2 – 31 CaO – 5 P_2O_5 với dung dịch nano hemin dưới tác động bề siêu âm tạo dạng huyền phù đồng nhất, sau đó thực hiện phản ứng thủy nhiệt trong điều kiện chân không, nhiệt độ 120°C-150 °C, trong vòng 2-3 giờ thu được hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza. Các hạt thủy tinh sinh học có thành phần 64 SiO_2 –31 CaO –5 P_2O_5 (tính bằng mol%) được điều chế bằng quy trình sol–gel. Cetrimonium bromua (CTAB) được hòa tan vào hỗn hợp etanol và nước theo tỷ lệ thể tích 70:30 sau khi thêm 5 ml amoni hydroxit (nồng độ gốc 37% theo khối lượng). Nồng độ CTAB là 0,05 M. Hỗn hợp này được khuấy liên tục với tốc độ 450 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 24 giờ để đảm bảo độ ổn định của các mixen. Tiếp theo, 0,064 mol tetraetyl orthosilicat (TEOS) được thêm vào hỗn hợp này. Sau 30 phút cho 0,005 mol trietyl photphat (TEP) vào phản ứng. Hòa tan 0,031 mol canxi nitrat (CaNT) vào nước rồi cho vào hệ phản ứng. Tiếp theo, phản ứng được thực

hiện ở 60°C trong điều kiện khuấy mạnh, 1000 vòng/phút, trong 48 giờ. Quá trình bay hơi được sử dụng để tạo thành gel. Lớp gel thu được được đưa vào tủ sấy chân không VOS-210C ở 120°C trong 12 giờ để loại bỏ nước. Sau đó, gel được nung ở 700 °C trong 10 giờ với tốc độ gia nhiệt 5°C/phút và làm nguội đến nhiệt độ phòng với tốc độ 5°C/phút. Sản phẩm thu được sau đó được rửa bằng etanol để loại bỏ các vùng giàu canxi và sấy khô trong không khí trước khi thực hiện bước tiếp theo. Hạt thủy tinh sinh học được phân tán đồng đều trong dung dịch nano hemin, 1g hạt thủy tinh sinh học trong 50 ml dung dịch nano hemin nồng độ từ 0,01 mg/ml đến 0,05 mg/ml, và chuyển vào cốc thủy nhiệt. Phản ứng thực hiện ở 120°C -150°C trong 2 giờ trong tủ sấy chân không. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ phòng, dung dịch được khuấy trên bếp khuấy từ tốc độ 800-1200 vòng/phút trong 48 giờ. Hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza thu lại bằng cách ly tâm ở tốc độ 10000 vòng/phút và rửa bằng nước khử ion. Lặp lại bước ly tâm ở tốc độ 10000 vòng/phút để thu tủa và sản phẩm cuối cùng được đông khô trong 24 giờ.

Đặc điểm thứ ba của phương pháp điều chế điều chế hydrogel dạng tiêm trên nền alginat/pluronic kết hợp hạt thủy tinh sinh học với tính chất xúc tác tương tự peroxidaza này là tạo tiền vật liệu biến tính với tác nhân liên kết dopamin bằng cách tạo dẫn xuất alginat-dopamin và pluronic-dopamin. Trong đó, phân tử dopamin lên cấu trúc alginate thông qua chất bắt cặp carbodiimid được chọn từ nhóm bao gồm: etyl (dimetyl aminopropyl)carbodiimid, 1-cyclohexyl-3-(2- morpholinoethyl)carbodiimide-metho-*p*-toluene sulfonat, 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho-4-toluenesulfonat. Cụ thể, alginate phân tán trong môi trường nước, tốt nhất sử dụng đệm axit 2-(N-morpholino) ethanesulfonic, pH 6,0. Carbodiimid dạng bột được cho vào dung dịch alginate theo tỷ lệ 1g alginate sử dụng 5,22 mol carbodiimid. Phản ứng trong 30 phút điều kiện kỵ sáng, sau đó cho dopamin (DA) dạng bột vào, lượng DA sử dụng tương đương với số mol carbodiimid, phản ứng trong 3-4 giờ, tối thiểu cần 3 giờ và không lâu hơn 5 giờ. Dung dịch phản ứng được nhỏ giọt bằng bình chiết vào hỗn hợp dung môi etanol và cồn propan-2-ol được pha ở tỷ lệ 50:50 theo thể tích để thu sản phẩm dạng tủa. Muối natri clorua được cho vào hỗn hợp dung môi etanol và cồn propan-2-ol để làm giảm thời gian phân tách giữa alginate-dopamin và dung dịch. Phương pháp lọc chân

không được tiến hành để thu sản phẩm alginat-dopamin. Sản phẩm alginat-dopamin được tinh sạch bằng cách phân tán lại trong nước khử ion và lặp lại bước rửa trong hỗn hợp dung môi etanol và cồn propan-2-ol 3 lần. Sản phẩm alginat-dopamin thu được bằng phương pháp lọc chân không được tiến hành đuổi dung môi bằng máy cô quay chân không. Pluronic-dopamin được tổng hợp bằng cách cacbonat este hóa nhóm hydroxyl của pluronic F127 để tạo liên kết cộng hóa trị cacbamate, với nhóm amine của phân tử dopamin. Pluronic F127 được phân tán trong dung môi diclometan (DCM), tỷ lệ 20g pluronic F127 sử dụng 50 mL dung môi, phản ứng trong điều kiện nhiệt độ phòng, khuấy trên máy từ. Cacbonat este hóa nhóm hydroxyl của pluronic F127 được thực hiện với chất hữu cơ chloroformat este, alkoxycacbonyl clorua, trong đó lượng chloroformat este sử dụng bằng 2,5 lần số mol của pluronic F127 cần hoạt hóa. Chloroformat este phân tán trong DCM và sau đó cho vào dung dịch pluronic F127 trong DCM đã chuẩn bị. Phản ứng tiến hành trong 24 giờ, ở nhiệt độ phòng. DA dạng bột, tối thiểu 2 lần số mol của pluronic F127 và tốt nhất là gấp 2,4 lần số mol pluronic F127 được cho vào phản ứng. Phản ứng được tiếp tục trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Dung môi hữu cơ trong phản ứng được loại bỏ bằng phương pháp cô quay chân không. Dung môi cloroform được sử dụng để phân tán lại, trong đó dopamin không tan trong dung môi này bị loại bỏ bằng phương pháp lọc chân không, thu dung dịch là pluronic-dopamin. Dung dịch pluronic-dopamin nhỏ giọt vào dung môi ete dietyl lạnh, thấp hơn 0°C , để thu được sản phẩm rửa là pluronic-dopamin thông qua lọc chân không. Phản ứng kết tủa trong dung môi dietyl lạnh được lặp lại 4 đến 5 lần. Sản phẩm được thu lại bằng phương pháp lọc hút chân không và được cô quay để loại bỏ hết dung môi và thu sản phẩm cuối cùng của bước này là sản phẩm pluronic –dopamin.

Đặc điểm thứ tư của phương pháp điều chế điều chế hydrogel dạng tiêm trên nền alginat/pluronic kết hợp hạt thủy tinh sinh học với tính chất xúc tác tương tự peroxidaza theo phương án này là tạo hydrogel nhạy nhiệt thể lại từ dẫn xuất alginat-dopamin và pluronic-dopamin dưới tác dụng xúc tác của hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza bằng phương pháp phối trộn alginat-dopamin và pluronic -dopamin theo tỷ lệ khối lượng, trong đó pluronic-dopamin tối thiểu là 15% và tỷ lệ alginat-dopamin tối đa là 0,5%, hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza

với tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng 5-10% so với khối lượng hydrogel và hydro peroxit có nồng độ trong khoảng 0,5-6 mM. Cụ thể, hai dung dịch pluronic-dopamin và alginate-dopamin được chuẩn bị riêng biệt trong nước cất. Pluronic-dopamin chuẩn bị trong môi trường lạnh, alginate-dopamin chuẩn bị ở môi trường thường. Hai dung dịch được trộn lại với nhau và khuấy ở tốc độ 200 vòng/phút để loại bỏ bọt khí. Môi trường phản ứng cần thực hiện ở dưới 15°C. Sau khi đạt độ đồng nhất về dung dịch, bột hạt thủy tính sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza. Sau đó, hydro peroxit được bổ sung để bắt đầu quá trình oxi hóa nhóm dopamin trên alginate-dopamin và pluronic-dopamin hình thành liên kết ngang trong vật liệu lai dưới sự hỗ trợ của hạt thủy tính sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza. Nồng độ hydro peroxit nằm trong khoảng 0,5 -20 mM, tốt nhất trong khoảng 5-6mM. Nhiệt độ phản ứng khi cho hydro peroxit là ở nhiệt độ phòng, khuấy tốc độ dưới 250 vòng/ phút đến khi có hiện tượng đông đặc. Sau đó, phản ứng được chuyển qua môi trường lạnh nhiệt độ dưới 15°C, để phản ứng oxi hóa được hoàn thiện trên bếp khuấy từ, tốc độ dưới 250 vòng/ phút. Sản phẩm sau đó được ủ ở nhiệt độ trên 30 °C thu được hydrogel nhạy nhiệt thể lai từ dẫn xuất alginate-dopamin và pluronic-dopamin dưới tác dụng xúc tác của hạt thủy tính sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza. Trường hợp để chuyển về dạng lỏng, hydrogel được đặt lại vào môi trường lạnh nhiệt độ dưới 15°C.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Điều chế nano hemin

Cho 25mg hemin (Acros Organic, Mã code: 345960010) vào 50 ml metanol (loại sử dụng cho sắc ký lỏng hiệu năng cao, Hãng Fisher, tỷ trọng riêng 0.7913 mg/ml), tiến hành siêu âm 30 phút và sau đó chuyển vào cốc phản ứng thủy nhiệt. Cốc thủy nhiệt sau đó được đặt trong lò chân không VOS-210C ở nhiệt độ 150°C trong 6 giờ. Cốc thủy nhiệt được làm nguội trong tủ cho đến khi đạt nhiệt độ phòng. Ly tâm tốc độ 10000 vòng/phút được sử dụng để loại bỏ các hemin không bị carbon hóa trước khi sử dụng phương pháp đuổi dung môi hữu cơ bằng máy cô quay chân không. Nước cất được cho vào chất kết tinh thu sau khi cô quay. Sản phẩm sau đó được lọc qua màng 0.22 µm

(Finetech). Nano hemin thu được sau 3 lần ly tâm với tốc độ 20.000 vòng/phút trong 20 phút. Phương pháp đông khô được sử dụng để thu được bột nano hemin. Hạt nano hemin được hình thành có dạng cầu quan sát bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (Hình 1A), kích thước 33.4 nm, phân tán đồng đều thu nhận bằng phương pháp đo tán xạ ánh sáng động (Hình 1B), dung dịch nano hemin phân tán tốt trong môi trường nước (Hình 1C) và có hiện tượng phát xạ khi có kích thích vùng đèn tử ngoại. Kiểm tra bằng phổ phát xạ huỳnh quang (Hình 1D) cho thấy dung dịch nano hemin phát xạ tại các bức xạ ở 397 nm, 479 nm và 593 nm, trong đó đỉnh phát xạ thể hiện ở 479 nm (Hình 1E).

Ví dụ 2: Điều chế hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza

Điều chế hạt thủy tinh sinh học thành phần silic oxit (SiO_2), canxi oxit (CaO) và photphor pentoxit (P_2O_5) có tỷ lệ số mol như sau: $64 \text{ SiO}_2 - 31 \text{ CaO} - 5 \text{ P}_2\text{O}_5$ bằng phương pháp sol-gel. Cetrimonium bromua (CTAB, Acros Organics) được hòa tan vào hỗn hợp etanol và nước theo tỷ lệ thể tích 70:30 sau khi thêm 5ml amoni hydroxit (nồng độ gốc 37%). Nồng độ CTAB là 0.05 M. Hỗn hợp này được khuấy ở tốc độ liên tục với tốc độ 450 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 24 giờ để đảm bảo độ ổn định của các mixen. Tiếp theo, 0,064 mol TEOS được thêm vào hỗn hợp này. Sau 30 phút cho 0,005 mol TEP vào phản ứng. Hòa tan 0,031 mol CaNT vào nước rồi thả vào. Tiếp theo, phản ứng được thực hiện ở 60°C trong điều kiện khuấy mạnh (~ 1000 vòng/phút) trong 48 giờ. Quá trình bay hơi được sử dụng để tạo thành gel. Lốp gel thu được được đưa vào tủ sấy chân không VOS-210C ở 120°C trong 12h để loại bỏ nước. Sau đó, gel được nung ở 700°C trong 10 giờ với tốc độ gia nhiệt $5^\circ\text{C}/\text{phút}$ và làm nguội đến nhiệt độ phòng với tốc độ $5^\circ\text{C}/\text{phút}$. Sản phẩm thu được sau đó được rửa bằng etanol để loại bỏ các vùng giàu canxi và sấy khô trong không khí trước khi thực hiện bước tiếp theo.

Điều chế hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza. 1g thủy tinh sinh học $64 \text{ SiO}_2 - 31 \text{ CaO} - 5 \text{ P}_2\text{O}_5$ (theo số mol) được phân tán trong 50 ml dung dịch nano hemin có nồng độ 0,05 mg/ml. Hỗn dịch được tiến hành siêu âm trong 30 phút tạo dạng huyền phù đồng nhất trước khi đưa vào cốc thủy nhiệt. Cốc thủy nhiệt được đặt trong tủ sấy chân không, nhiệt độ 150°C trong 2 giờ. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ phòng, dung dịch được khuấy mạnh, ở tốc độ 1200 vòng/phút, trong 48 giờ. Dung dịch

sau đó được ly tâm ở tốc độ 10 000 vòng/phút. Phần dung dịch được loại bỏ và nước khử ion được cho vào phân tán phần kết tụ. Tiếp theo, lặp lại bước ly tâm ở tốc độ 10 000 vòng/phút, thu sản phẩm kết tụ. Sản phẩm cuối cùng được đông khô trong 24 giờ. Hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza thu được có dạng hình cầu, kích thước đồng nhất (Hình 2A) và có các nguyên tố silic, photpho, caxi và sắt (Hình 2B-C). Sau khi kết hợp nano hemin vào cấu trúc, hạt thủy tinh sinh học có thêm đặc tính phát xạ huỳnh quang (Hình 2D-2E), điều này chứng tỏ sự hình thành của hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza bằng cách kết hợp hạt thủy tinh sinh học và hạt nano hemin bằng phương pháp thủy nhiệt. Phổ nhiễu xạ tia X chứng minh dạng vô định hình của hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza (Hình 3F).

Ví dụ 3: Kiểm tra hoạt tính bắt chước peroxidaza enzyme của hạt thủy tinh sinh học

Pyrogallol được pha trong nước siêu tinh khiết và đựng trong lọ màu hổ phách ở nồng độ 30 mM cho dung dịch gốc. Nồng độ hydro peroxit (H_2O_2) được cố định là 20mM. Nồng độ gốc của enzyme peroxidaza là 1mg/ml được pha trong nước siêu tinh khiết và được pha loãng thành 40 μ g/ml trước khi sử dụng. Nano hemin và hạt thủy tinh sinh học được pha bằng nước siêu tinh khiết. Quy trình thử nghiệm như sau: 0,15 ml H_2O_2 trong 3 ml nước siêu tinh khiết được trộn với 0,3 ml pyrogallol trong cuvet thạch anh 4,0 ml và được cân bằng ở 25°C trong điều kiện tối. Sau đó, 0,05 ml enzyme peroxidaza hoặc vật liệu mô phỏng peroxidaza được thêm vào cuvet. Phản ứng được ghi lại bằng máy quang phổ quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-1900, Shimadzu, Nhật Bản). Đối với phân tích động học phản ứng, nồng độ pyrogallol được chuẩn bị trong khoảng 0-3mM. Chế độ động học trong UV-1900 được chọn để đo sự thay đổi độ hấp thụ ở mức 420 trong 5 phút. Vận tốc ban đầu được tính toán bằng phần mềm UVProbe. Đánh giá phản ứng oxi hóa Pyrogallol oxy bằng cách đo lượng purpurogallin được tạo ra, sử dụng hệ số hấp thụ phân tử purpurogallin là $\epsilon=2460\text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Đặc tính điển hình của phản ứng enzyme là phương trình Michaelis-Menten, như $V_0=V_{\max} \cdot [S]/([S]+K_m)$. Số chu kỳ, $k_{\text{cat}}=V_{\max}/[E]$, được tính bằng biểu đồ Lineweaver-Burk ($1/V_0$ là trục y và $1/[S]$ là trục x), độc lập với nồng

độ cơ chất và enzym. Thông qua khảo sát, khả năng bắt chước hoạt tính xúc tác của enzym peroxidaza của hạt thủy tinh sinh học đã được chứng minh trong bảng 1.

Bảng 1: Hoạt tính xúc tác của hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza, hạt nano hemin và enzym peroxidaza đối với pyrogallol

Giá trị	Loại xúc tác		
	Enzym peroxidaza	Hạt nano hemin	Hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza
K _m (mM)	8.673	3.932	4.003
K _{cat} (min ⁻¹)	1177	926.8	9.667
K _{cat} /K _m (mM ⁻¹ .min ⁻¹)	135.7	235.7	2.415

Ví dụ 4: Kiểm tra khả năng xúc tác phản ứng oxy hóa của dopamin của hạt thủy tinh sinh học

Dopamin (0,4 mM, DA) được pha bằng nước siêu tinh khiết. H₂O₂ (37% theo khối lượng) được pha loãng thành 30mM. Các bước phản ứng: 0,5 ml DA được trộn với 0,1 ml H₂O₂ và sau đó chuyển sang cuvet chứa 3,0 ml dung dịch nước chứa hạt thủy tinh sinh học hoặc peroxidaza enzyme. Phổ của phản ứng này được đo từ 250-700nm trong khoảng 2700s. Phản ứng oxy hóa này được phân tích bằng UHPLC Ultimate 3000 – MSQ Plus. Kết quả trên phổ tử ngoại khả kiến (Hình 5) cho thấy hạt thủy tinh sinh học có khả năng xúc tác cho phản ứng oxy hóa dopamine tương tự như enzym peroxidaza. Phân tích trên UHPLC Ultimate 3000 – MSQ Plus cho thấy, sản phẩm tạo ra ở dạng cấu trúc của các polydopamin sau khi thực hiện phản ứng với xúc tác bằng hạt thủy tinh sinh học, điều này chứng tỏ hạt thủy tinh sinh học có thể sử dụng thay thế chức năng của peroxidaza trong hydrogel thông qua phản ứng oxy hóa dopamine.

Ví dụ 5: Tổng hợp dẫn xuất alginat với dopamin

DA được gắn vào mạch chính alginat bằng cách sử dụng cơ chế ghép nối ethyl(dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC). Natri alginate (1g) được hòa tan vào dung dịch đệm MES (pH 6,0, 50ml) trước khi thêm EDC (5,22 mmol). Sau 30 phút, DA tương đương với EDC được thêm vào phản ứng và duy trì khuấy trong 3-4 giờ. Sau đó, phản ứng được nhỏ giọt vào hỗn hợp dung môi, etanol/ propan-2 ol (50:50), để thu kết tủa. Muối NaCl được bổ sung vào hỗn hợp dung môi etanol/ propan-2 ol, 3g muối cho 1 lít dung môi, để thúc đẩy quá trình rửa của sản phẩm. Kết tủa sau đó được hòa tan lại vào nước khử ion và lặp lại bước kết tủa ít nhất 3 lần để loại bỏ EDC dư thừa cũng như DA. Đối với lần rửa cuối cùng không bổ sung thêm NaCl. Cuối cùng, dung môi hữu cơ còn lại trong sản phẩm kết tủa được loại bỏ bằng cách bay hơi trong chân không. Sản phẩm thu được là alginate-dopamin dạng bột, có màu xám và được bảo quản ở 4°C. Sự hình thành của các dopamin trên cấu trúc alginate được chứng minh bằng phổ tử ngoại khả kiến thông qua sự xuất hiện của tín hiệu tại bước sóng 280nm.

Ví dụ 6: Tổng hợp dẫn xuất pluronic với dopamin

Dẫn xuất Pluronic-dopamin được tổng hợp thông qua sử dụng alkoxycarbonyl clorua là p-nitrophenyl chloroformate (NPC) tạo nhóm cacbonate este trên pluronic F127, sau đó nhóm này tạo liên kết cacbamate với nhóm amine trên phân tử dopamine. 20 g Pluronic F-127 được hòa tan trong diclometan (DCM, 50 ml) nhỏ từng giọt vào phản ứng. Sau 24 giờ kích hoạt, 3,84 mmol DA được thêm vào và phản ứng trong 12 giờ ở nhiệt độ phòng. DCM được loại bỏ bằng cách bay hơi quay trong chân không. Cloroform được thêm vào để kết tủa DA tự do. Dung dịch thu được sau đó được rửa trong ete dietyl lạnh (-20 °C). Rửa được thu lại bằng phương pháp lọc chân không. Bước rửa được lặp lại 4-5 lần để loại bỏ p-NPC dư thừa trong phản ứng này. Cuối cùng, quá trình bay hơi quay trong chân không được áp dụng để thu được sản phẩm chính là ADA.

Ví dụ 7: Điều chế hydrogel nhạy nhiệt thể lai từ alginate-dopamin và pluronic- dopamin

Hai dung dịch alginate-dopamin và pluronic- dopamin được chuẩn bị riêng rẽ. 300 mg pluronic- dopamin được hòa tan vào 1ml nước cất, khuấy trong điều kiện lạnh. 10 mg alginate-dopa được hòa tan trong 1ml nước cất, khuấy đều ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp

alginate-dopamin và pluronic- dopamin được trộn lại khuấy ở tốc độ vừa phải (~200 vòng/phút) để bỏ qua bọt khí, nhiệt độ lạnh. Sau đó, hạt thủy tinh sinh học (10% theo khối lượng hỗn hợp) đã được thêm vào cùng với H_2O_2 (nồng độ 5mM). Phản ứng thực hiện ở nhiệt độ phòng cho đến khi có hiện tượng gel hóa. Hỗn hợp sau đó được đặt trong môi trường lạnh (nhiệt độ dưới $15^{\circ}C$) để phản ứng oxi hóa được hoàn thiện. Hydrogel thu được khi đặt dung dịch vào môi trường có nhiệt độ lớn hơn $30^{\circ}C$. Đặc tính nhạy nhiệt của vật liệu được thể hiện thông qua quá trình chuyển đổi sol-gel khi có sự thay đổi nhiệt độ, và được ghi nhận bằng phương pháp lưu biến học (Hình 7).

Ví dụ 8: Đánh giá khả năng tiêm của hydrogel thể lai

Đánh giá được thực hiện với Máy đo lưu biến DHR3 (TA Instruments, New Castle, DE) với đầu đo dạng hình nón và tấm (tấm hình nón 40 mm, $2,0^{\circ}$, tấm Peltier Thép không gỉ). Thể tích mẫu tối thiểu là 0,585 mL. Nhiệt độ dao động được thiết lập với nhiệt độ trong khoảng từ $5^{\circ}C$ đến $50^{\circ}C$. Tốc độ tăng nhiệt là $2,5^{\circ}C/phút$. Biến dạng và tần số góc được cố định ở mức 1% và 10 rad/s. Đối với quét tần số, biến dạng được đặt ở mức 1% và nhiệt độ được đặt ở $37^{\circ}C$ hoặc $20^{\circ}C$. Đối với biên độ dao động, hàm biến dạng được đo từ 0,1 đến 200% ở tốc độ 10 rad/s với thời gian điều hòa là 180 giây và 5 điểm mỗi điểm khảo sát. Đối với quá trình quét dòng chảy liên tục, tốc độ cắt là từ 0,1 đến 200 (1/s) với 5 điểm điểm khảo sát. Đối với quét thời gian theo chu kỳ, quét thời gian dao động (200 giây) ở mức biến dạng 0,1%, 10 Hz và sau đó quét thời gian dao động (200 giây) với biến dạng cao ở mức biến dạng 200%, 10 Hz. Chu kỳ được lặp lại 6 lần.

Ví dụ 9: Đánh giá khả năng khoáng hóa trong môi trường mô phỏng dịch thể người SBF (Simulated Body Fluid)

Quá trình khoáng hóa sinh học được đánh giá trong môi trường mô phỏng SBF. Hydrogel được tạo trong các ống nghiệm, được đặt ở nhiệt độ $37^{\circ}C$, sau đó dung dịch SBF ấm được cho vào (tỷ lệ theo khối lượng hydrogel: SBF là 1: 10). Tại các mốc thời gian 7 ngày và 14 ngày, hydrogel còn lại được thu thập và đông khô. Các mẫu khô được nghiên cứu bằng kính hiển vi điện tử truyền qua SEM và thành phần hóa học của các sản phẩm khoáng hóa được đặc trưng bằng phân tích tia X phân tán năng lượng trong quá

trình quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét. Ngoài ra, nhiễu xạ tia X được thực hiện trong phạm vi 2θ từ $10-80^\circ$ với bức xạ Cu/K cho thấy cấu hình tinh thể lắng đọng trên bề mặt của các hydrogel này sau khi ngâm trong SBF, chứng tỏ sự hình thành của lớp khoáng hydroxiapatit.

Ví dụ 10: Đánh giá khả năng cảm ứng tạo xương

Tế bào hMSC được mạ ở mật độ 1×10^4 tế bào/trong đĩa 24 giếng. Sau 24 giờ để bám dính, các tế bào nhận được môi trường tối thiểu thiết yếu Eagle's minimal essential medium (MEM) hoàn chỉnh có bổ sung hydrogel (10mg/ml). Sự lắng đọng của nền khoáng hóa được đánh giá bằng nhuộm màu đỏ alizarin. Các tế bào được rửa bằng dung dịch đệm phosphate (PBS) 0,15 M (pH 7,2) và cố định bằng glutaraldehyde (3vol.%) trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi cố định, tế bào được rửa bằng PBS 0,15 M (pH 7,4) và nước siêu tinh khiết. Sau đó, 1 mL thuốc nhuộm đỏ alizarin (2%) được thêm vào và ủ tế bào trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Thuốc nhuộm dư thừa được loại bỏ và tế bào được rửa bằng nước siêu tinh khiết. Sau đó, rửa bằng PBS 0,15 M (pH 7,2) được thực hiện trong 15 phút, sau đó rửa nhanh bằng nước siêu tinh khiết và sấy khô ở nhiệt độ phòng. Các tế bào được quan sát dưới kính hiển vi soi nổi cho thấy các nốt sần đỏ xuất hiện, chứng tỏ sự lắng đọng caxi nội bào, hay nói cách khác, đã có sự biệt hóa từ tế bào gốc trung mô thành nguyên bào xương.

Ví dụ 11: Đánh giá khả năng kháng khuẩn

Hiệu quả kháng khuẩn được xác định dựa trên sự tiếp xúc liên tục của các loài vi khuẩn mẫu với công thức hydrogel. Nuôi cấy vi khuẩn được nuôi cấy qua đêm. Sau khi pha loãng và điều chỉnh theo thang MacFarland 0,5 bằng môi trường lỏng Luria broth (LB), huyền phù vi khuẩn được phân bổ đều trong các ống 5 mL chứa 1ml hydrogel. Sau 24 giờ và 96 giờ, mỗi phần mẫu được pha loãng theo thứ tự trong PBS và mỗi độ pha loãng mẫu là thạch LB đổ đĩa được ủ phía sau ở 37°C trong 24 giờ. Khả năng ức chế tăng trưởng của hydrogel được đánh giá bằng cách định lượng số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) trên mililit (CFU mL⁻¹). Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại với 3 lần lặp lại cho mỗi mẫu. Hydrogel được điều chế bởi enzyme peroxidaza đã được sử dụng

làm đối chứng trong thí nghiệm này. Đối với mẫu chứng, mật độ khuẩn không thay đổi, trong khi đối với mẫu hydrogel thể lai sử dụng hạt thủy tinh sinh học làm xúc tác mật độ vi khuẩn giảm dần và đạt gần như 0% sau 96 giờ ủ.

Ví dụ 12: Đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch của hydrogel

Tất cả động vật được điều trị theo đúng hướng dẫn, chính sách đã được Khoa Y - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh phê duyệt (số 03/QĐ-IRB-VN01.017, ký ngày 25 tháng 3 năm 2022). Tất cả chuột (CD-1 ICR, Màu lông trắng – Albino, 7 tuần tuổi, 20 - 24 g) được cung cấp từ Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (Việt Nam) và được nuôi trong 12 giờ sáng và 12 giờ tối trong môi trường có mầm bệnh- điều kiện tự do với đầy đủ thức ăn và nước uống. Hydrogel ở liều lượng khác nhau (0,2 ml và 0,4ml) được tiêm dưới da vào sườn sau của chuột. Da tại chỗ tiêm và tình trạng suy yếu thể chất của chuột được theo dõi hàng ngày cho đến khi kết thúc nghiên cứu. Vào thời điểm xác định, xét nghiệm máu đã được tiến hành. Tế bào bạch cầu (WBC) bao gồm bạch cầu hạt, bạch cầu đơn nhân và tế bào lympho được ước tính bằng Mindray BA-88A (Mindray, Trung Quốc) bằng bộ xét nghiệm tương ứng (ELITech, Pháp). Đối với protein phản ứng C (CRP), cần sử dụng Bộ kit ELISA CRP (Chuột). Quy trình được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau 7 ngày, phân tích mô bệnh học được thực hiện bằng các quy trình xét nghiệm tiêu chuẩn. Tất cả da chuột được thu thập và cố định bằng dung dịch formalin 10% (v/v). Các lát cắt được nhuộm bằng hematoxylin–eosin (HE) và được nhà nghiên cứu bệnh học kiểm tra bằng kính hiển vi quang học. Kết quả cho thấy không có sự thay đổi về nồng độ bạch cầu cũng như giá trị CRP, chứng tỏ hydrogel sau khi cấy ghép dưới da không gây các phản ứng kích thích.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp điều chế hydrogel dạng tiêm trên nền alginate/pluronic kết hợp hạt thủy tinh sinh học với tính chất xúc tác tương tự peroxidaza bao gồm:

- điều chế nano hemin bằng phản ứng thủy nhiệt hemin với dung môi hữu cơ trong môi trường chân không nhiệt độ 120-150°C, trong 5 đến 6 giờ, thu được nano hemin,

trong đó bao gồm các bước:

i) hemin được phân tán trong dung môi hữu cơ có sự hỗ trợ siêu âm trong 30 phút, trước khi chuyển vào cốc phản ứng thủy nhiệt,

trong đó dung môi hữu cơ là rượu metylic thì hemin được phân tán trong rượu metylic với lượng 0,5mg/ml,

trong đó dung môi hữu cơ là etanol thì hemin được phân tán trong etanol với lượng 0,2mg/ml,

trong đó dung môi hữu cơ là axeton thì hemin được phân tán trong axeton với lượng 0,5 mg/ml,

ii) cốc thủy nhiệt đặt vào tủ sấy chân không nhiệt độ từ 120°C đến 150°C, trong 5 đến 6 giờ,

iii) cốc thủy nhiệt ở bước ii) làm nguội ở nhiệt độ phòng trước khi thu dung dịch,

iv) dung dịch ở bước iii) được áp dụng ly tâm ở tốc độ 10000 vòng/ phút, trong 10 đến 20 phút thu phần dung dịch,

v) dung môi ở dung dịch ở bước iv) được loại bỏ bằng cô quay chân không,

vi) nước cất được cho vào phân tán lại sản phẩm thu được ở bước v),

vii) màng 0,22 μm được sử dụng để thu dung dịch,

viii) dung dịch ở bước vii) thực hiện ly tâm tốc độ 20000 vòng/phút, trong 20 phút, 3 lần thu phần dịch nổi,

ix) dung dịch ở bước viii) được đem đi đông khô, thu dạng bột nano hemin màu đen,

- tạo hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza bằng cách trộn đều hạt thủy tinh sinh học thành phần silic oxit (SiO_2), canxi oxit (CaO) và photphor pentoxit (P_2O_5) có tỷ lệ số mol như sau: $64 \text{ SiO}_2 - 31 \text{ CaO} - 5 \text{ P}_2\text{O}_5$ với dung dịch nano hemin dưới tác động bề siêu âm tạo dạng huyền phù đồng nhất, sau đó thực hiện phản ứng thủy nhiệt trong điều kiện chân không, nhiệt độ từ 120°C đến 150°C , trong vòng từ 2 đến 3 giờ thu được hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza,

trong đó các bước thực hiện bao gồm:

i) hạt thủy tinh sinh học với thành phần $64 \text{ SiO}_2 - 31 \text{ CaO} - 5 \text{ P}_2\text{O}_5$ (tính bằng mol%) phân tán trong dung dịch nano hemin, 1g hạt thủy tinh sinh học trong 50 ml dung dịch nano hemin nồng độ từ 0,01 mg/ml đến 0,05 mg/ml,

ii) hỗn dịch ở bước i) được xử lý trong bể siêu âm, từ 30 đến 60 phút tạo dạng huyền phù đồng nhất,

iii) hỗn dịch bước ii) chuyển vào cốc thủy nhiệt và đặt vào tủ sấy chân không nhiệt độ từ 120°C đến 150°C , tốt nhất 150°C , trong 2 giờ,

iv) cốc thủy nhiệt ở bước ii) làm nguội ở nhiệt độ phòng, thu dung dịch trong cốc,

v) dung dịch bước iv) khuấy trên bếp khuấy từ, tốc độ từ 800 đến 1200 vòng/phút, trong 48 giờ,

vi) dung dịch ở bước v) được ly tâm ở tốc độ 10 000 vòng/phút, thu phần tủa,

vii) tủa ở bước vi) được hòa tan lại vào nước khử ion và lặp lại bước vi) để thu tủa,

viii) phần tủa ở bước vii) được thực hiện tiếp bằng phương pháp sấy thăng hoa thu sản phẩm hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza;

- tạo tiền vật liệu biến tính với tác nhân liên kết dopamin, bước này bao gồm tạo dẫn xuất alginat-dopamin và pluronic –dopamin,

trong đó alginat-dopamin được tổng hợp bằng các bước sau:

i) alginate phân tán trong môi trường nước, tốt nhất sử dụng đệm axit 2-(N-morpholino) ethanesulfonic, pH 6,0,

ii) carbodiimid dạng bột được cho vào dung dịch ở bước i), tỷ lệ 1g alginat sử dụng 5,22 mmol carbodiimid, phản ứng trên bếp khuấy từ, trong 30 phút, điều kiện kỵ sáng,

trong đó carbodiimid được chọn từ nhóm bao gồm: etyl (dimethyl aminopropyl)carbodiimid, 1-cyclohexyl-3-(2- morpholinoethyl)carbodiimid-metho-*p*-toluene sulfonat, 1-cyclohexyl-3-92-morpholinoethyl)carbodiimid metho-4-toluenesulfonat,

iii) dopamin (DA) dạng bột được cho vào phản ứng ở bước ii), lượng DA sử dụng tương đương với số mol carbodiimid được thêm vào ở bước ii), phản ứng trên bếp khuấy từ, trong 3-4 giờ, tối thiểu cần 3 giờ và không lâu hơn 5 giờ, điều kiện kỵ sáng,

iv) dung dịch phản ứng ở bước iii) được nhỏ giọt bằng bình chiết vào hỗn hợp dung môi etanol và cồn propan-2-ol tỷ lệ 50: 50 theo thể tích, để thu tủa bằng phương pháp lọc chân không,

trong đó muối natri clorua được bổ sung vào hỗn hợp etanol và cồn propan-2-ol ở tỷ lệ 3g muối cho 1 lít dung môi,

v) sản phẩm tủa ở bước iv được phân tán trong nước khử ion và thực hiện lại bước iv),

vi) lặp lại bước v) và bước iv) 3 lần

vii) sản phẩm ở bước vi) đuổi dung môi bằng máy cô quay chân không, alginat-dopamin thu được ở dạng bột, màu xám, và

trong đó pluronic-dopamin được tổng hợp bằng cách cacbonat este hóa nhóm hydroxyl của pluronic F127 để tạo liên kết cộng hóa trị, cacbamate với nhóm amine của phân tử dopamin, cụ thể gồm các bước sau:

i) pluronic F127 được phân tán trong dung môi diclometan, tỷ lệ 20g pluronic F127 sử dụng 50 mL dung môi, phản ứng trong điều kiện nhiệt độ phòng, khuấy trên máy từ,

ii) chất hữu cơ chloroformat este, alkoxycacbonyl clorua, sử dụng 2.5 lần số mol của pluronic F127 ở bước i), phân tán trong DCM và sau đó cho vào phản ứng ở bước i), phản ứng trong 24 giờ, điều kiện nhiệt độ phòng,

iii) bột dopamin, tối thiểu 2 lần số mol của pluronic F127, tốt nhất gấp 2,4 lần số mol pluronic F127, cho vào phản ứng ở bước ii), phản ứng 24 giờ ở nhiệt độ phòng,

iv) đuổi dung môi trong hệ phản ứng bước iii) bằng máy cô quay chân không, sau đó sử dụng dung môi cloroform để phân tán lại, lọc chân không được tiến hành thu dung dịch là sản phẩm pluronic-dopamin,

v) dung dịch thu được ở bước iv) được rửa trong ete dietyl lạnh, thấp hơn 0°C , sau đó rửa được thu lại bằng phương pháp lọc chân không,

vi) bột thu được ở bước v) có màu trắng và tới sau đó được phân tán lại trong ete dietyl lạnh, thấp hơn 0°C , sau đó rửa được thu lại bằng phương pháp lọc chân không,

vii) lặp lại bước vi) 4 đến 5 lần sau đó phương pháp cô quay chân không được áp dụng để thu được sản phẩm chính pluronic-dopamin,

- tạo hydrogel nhạy nhiệt thể lai từ dẫn xuất alginat-dopamin và pluronic-dopamin dưới tác dụng xúc tác của hạt thủy tính sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza bằng phương pháp phối trộn alginat-dopamin và pluronic-dopamin, hạt thủy tính sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza kết hợp với tác nhân hydro peroxit,

trong đó pluronic-dopamin tối thiểu là 15% khối lượng so với tổng khối lượng hydrogel và tỷ lệ alginat-dopamin tối đa là 0,5% khối lượng so với tổng khối lượng hydrogel,

trong đó hạt thủy tính sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza sử dụng với lượng từ 5% đến 10% khối lượng so với tổng khối lượng hydrogel,

trong đó, nồng độ hydro peroxit trong nằm trong khoảng từ 0,5 đến 20 mM, tốt nhất nằm trong khoảng từ 5 đến 6mM, và

trong đó, phương pháp tạo hydrogel nhạy nhiệt thể lai từ dẫn xuất alginat-dopamin và pluronic-dopamin dưới tác dụng xúc tác của hạt thủy tính sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza theo các điều kiện nồng độ, tỷ lệ các thành phần bất kỳ bao gồm:

i) phân tán pluronic-dopamin trong nước cất ở điều kiện nhiệt độ lạnh, dưới 15°C

ii) phân tán alginat-dopamin trong nước cất

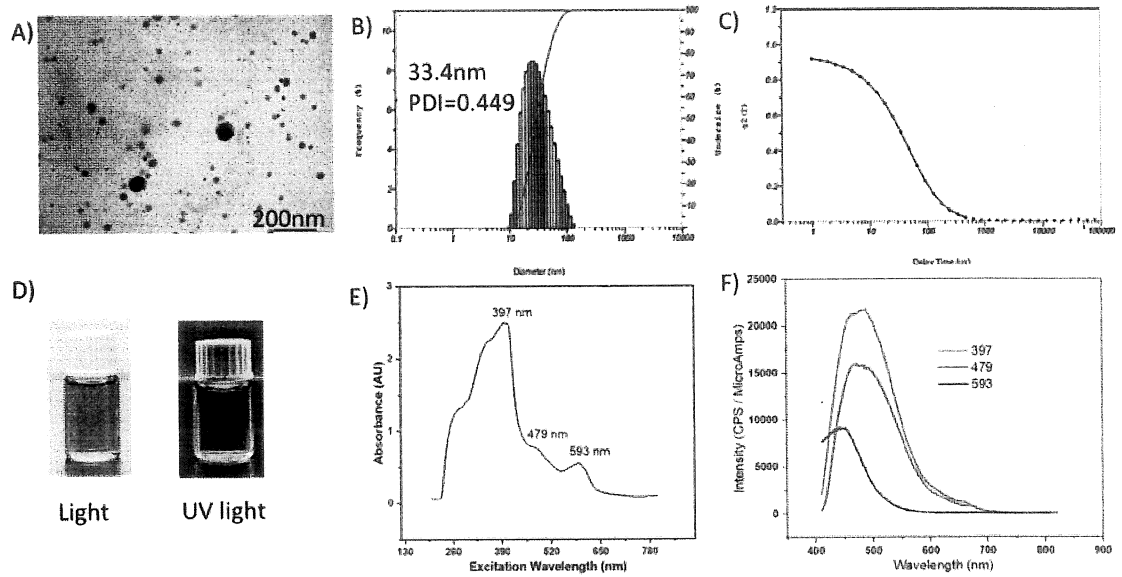
iii) trộn dung dịch ở bước i) và bước ii), khuấy trên bếp khuấy từ, tốc độ dưới 200 vòng/ phút, nhiệt độ lạnh dưới 15°C đến khi đạt độ đồng nhất,

iv) trộn bột hạt thủy tính sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza vào hỗn dịch ở bước iii)

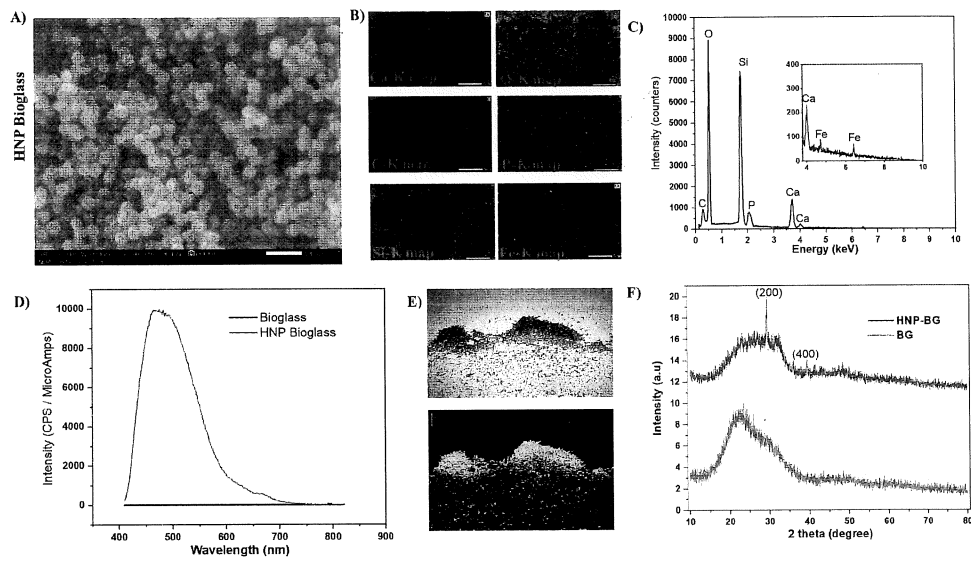
v) thêm dung dịch hydro peroxit vào bước iv), khuấy trên bếp khuấy từ, tốc độ dưới 250 vòng/ phút, nhiệt độ phòng đến khi có hiện tượng đông đặc,

vi) phản ứng ở bước v) đặt trong môi trường lạnh, nhiệt độ dưới 15°C), để phản ứng oxy hóa được hoàn thiện trên bếp khuấy từ, tốc độ dưới 250 vòng/ phút.

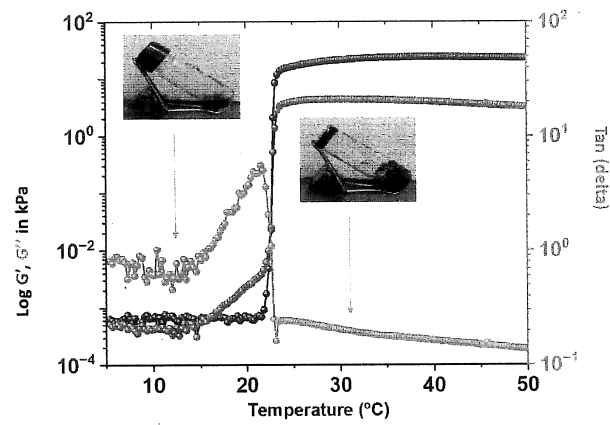
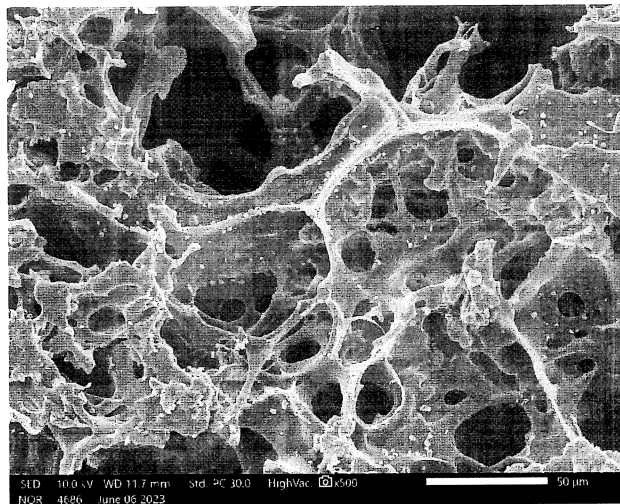
vii) ủ sản phẩm ở bước vi) ở nhiệt độ trên 30°C thu được hydrogel nhạy nhiệt thể lại từ dẫn xuất alginat-dopamin và pluronic-dopamin dưới tác dụng xúc tác của hạt thủy tinh sinh học có tính chất xúc tác tương tự peroxidaza.



Hình 1.



Hình 2.

**Hình 3.****Hình 4.**