

NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ HYDROGEL NHẠY CẢM VỚI NHIỆT ĐỘ CƠ THỂ TỪ GELATIN VÀ PLURONIC F127 ĐỂ MANG NHẢ CHÂM CURCUMIN ỨNG DỤNG TRONG CHỮA LÀNH VẾT THƯƠNG

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF CURCUMIN NANOPARTICLES LOADED THERMOSENSITIVE GELATIN - PLURONIC F127 HYDROGEL FOR WOUND HEALING APPLICATION

Huỳnh Thị Ngọc Trinh¹, Trần Ngọc Quyên², Nguyễn Thị Yên Linh³, Nguyễn Tiến Thịnh⁴

Tóm tắt – Curcumin là một hợp chất tự nhiên thuộc nhóm phenolic được chiết xuất từ củ nghệ có nhiều hoạt tính sinh học. Tuy nhiên, tính kỵ nước cao đã làm hạn chế ứng dụng của nó trong dược dụng. Nghiên cứu đưa ra phương pháp điều chế một loại vật liệu y sinh mang hàm lượng curcumin ở kích thước nano để tăng cường hiệu quả chữa lành vết thương, cải thiện đặc tính kém tan trong nước của curcumin. Phương pháp này sử dụng pluronic F127 nhạy nhiệt ghép với gelatin (GP) đóng vai trò như chất hoạt động bề mặt để phân tán và ngăn chặn sự kết tụ của hạt nanocurcumin. Cấu trúc của copolymer GP được xác định bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR. Đặc tính nhạy nhiệt của hydrogel được xác định bằng phương pháp đảo ngược ống nghiệm inversion tube và nhiệt quét vi sai (DSC). Kích thước hạt nanocurcumin trong hydrogel được xác định bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) và tán xạ ánh sáng động học (DLS) cho thấy hạt nano phân bố từ 7 đến 285 nm tùy hàm lượng curcumin sử dụng. Hạt nanocurcumin được phân tán trong dung dịch copolymer GP sẽ tạo thành hệ hydrogel khi nâng nhiệt độ lên 36.27 °C. Đường cong nhả thuốc đã chứng minh khả năng nhả chậm curcumin của hydrogel. Kết quả

nghiên cứu cho thấy hydrogel nhạy nhiệt gelatin - pluronic F127 có tiềm năng là vật liệu y sinh ứng dụng trong lĩnh vực tái tạo mô.

Từ khóa: gelatin ghép pluronic F127, hydrogel nhạy nhiệt, nanocurcumin, sóng siêu âm, trị lành vết thương.

Abstract – Curcumin, a natural phenolic compound, is extracted from turmeric exhibiting several biomedical activities. Unfortunately, less aqueous solubility causes drawback in medicinal application. This study introduces a method in order to produce a biomaterial containing high content of curcumin nanoparticles, which can overcome curcumin's poor dissolution and wound healing. This method uses a thermo-reversible pluronic F127-grafted gelatin (GP) which play the role as surfactant to disperse and protect nanocurcumin from aggregation. The synthetic GP copolymer was identified via ¹H NMR. Thermal transition behavior was identified under test tube inversion and differential scanning calorimetry (DSC). The synthesized curcumin size was characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM) and Dynamic Light Scattering (DLS), which indicated that the size of nanocurcumin significantly varied ranging from 7 to 285 nm according to the amount of feeded curcumin. The nanocurcumin-dispersed GP copolymer solution forms the nanocomposite hydrogel when warmed up to 36.27 °C. Release profile indicated the sustainable release control of nanocurcumin

^{1,3,4}Khoa Khoa học Cơ bản, Trường Đại học Trà Vinh
Email: htntrinh99@tvu.edu.vn

²Phòng Vật liệu Hóa Dược, Viện Khoa học Vật liệu,
Thành phố Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài: 24/11/2016; Ngày nhận kết quả bình
duyet: 11/01/2017; Ngày chấp nhận đăng: 22/02/2017

in the thermogel system. These results showed potential application of the biomaterial in tissue regeneration.

Keywords: *gelatin-grafting pluronic F127, thermo-induced hydrogel composite, nanocurcumin, ultrasonication, burn wound healing.*

I. GIỚI THIỆU

Hydrogel gelatin-pluronic F127 giống như một loại da nhân tạo có rất nhiều ứng dụng cho những bệnh nhân bị thương, bỏng, tiểu đường... không có khả năng phục hồi da. Vật liệu này được tổng hợp thông qua việc ghép pluronic F127 đã được hoạt hóa và gelatin có collagen tương tự như da người cho nên có khả năng tái tạo da.

Bản thân da của chúng ta khi mất một khoảng da do bị bỏng với kích thước nhỏ có thể tái tạo được nhưng nếu kích thước mất quá lớn thì không thể tái tạo bởi không tạo được nền cho các nguyên bào tạo da bám vào để tăng trưởng. Chính vì vậy, vật liệu này đóng vai trò như một cái nền cho các tế bào tạo da bám lên nhân đôi, tăng sinh, phát triển để tái tạo da mới. Hơn nữa, vật liệu này lại kết hợp thêm với curcumin có kích thước nano có tác dụng rất tốt đối với vết thương.

Trong quá trình bôi vào vết thương có nước do dịch vết thương tiết ra, hydrogel gelatin-pluronic F127 chứa nanocurcumin sẽ bị phân hủy sinh học và hàm lượng nanocurcumin được nhả ra từ từ với nồng độ phù hợp sẽ kích thích quá trình lành vết thương [1], [2].

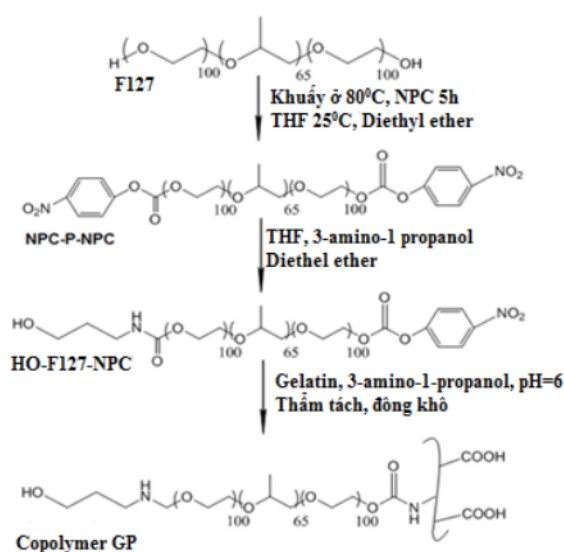
Vấn đề đặt ra là hydrogel gelatin-pluronic F127 phải nhạy nhiệt độ cơ thể vì mục đích sử dụng cuối cùng của sản phẩm thương mại đựng trong những tuyp giống kem đánh răng dạng lỏng có thể nặn ra. Sau khi bôi lên vùng da tổn thương ở nhiệt độ từ 35-37 °C, nó sẽ đóng rắn lại tạo thành lớp màng gel dính chắc vào vết thương [3], [4]. Loại hydrogel này có khả năng hút nước tốt nên có thể loại bỏ dịch do vết thương tiết ra, hoạt động như bức tường ngăn sự xâm nhập của các yếu tố ngoại vi từ bên ngoài như bụi và vi khuẩn. Băng hydrogel nhạy nhiệt trên cơ sở gelatin-pluronic F127 kết hợp nanocurcumin là chất nền mềm ẩm ướt, nên sẽ có tác dụng làm mát vết thương và làm giảm các triệu chứng đau. Hơn nữa, hydrogel này còn ngăn chặn sự kết dính vào vết thương gây khó khăn khi thay băng mới cho bệnh nhân.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

A. Nguyên liệu

Gelatin - Merck, Pluronic F127 - Sigma Aldrich, p-nitrophenyl chlorofomate (p-NPC) - Acros organics, Diethyl ether -Merck, Tetrahydrofuran (THF) – Merck, 3-amino-1-propanol – Acros organic, Curcumin -Merck.

B. Quy trình tổng hợp hydrogel nhạy nhiệt trên cơ sở gelatin và pluronic F127



Hình 1: Sơ đồ tổng hợp hydrogel gelatin-pluronic F127 [5]–[7]

1) *Tổng hợp NPC-F127-OH:* Pluronic F127 được nung chảy ở nhiệt độ 80°C trong môi trường hút chân không. Sau đó, NPC được thêm vào với tỉ lệ mol (F127:NPC=1:2.5) và khuấy liên tục 5 giờ trong môi trường khí N₂. Hạ nhiệt độ hệ phản ứng, tiếp tục thêm 40 ml THF vào và khuấy ở nhiệt độ phòng. Dung dịch phản ứng được rửa với diethyl ether ở nhiệt độ 0 °C thu được chất bột màu trắng mịn NPC-F127-NPC. Sau đó, NPC-F127-NPC được hòa tan trong THF và tiến hành nhỏ giọt dung dịch 3-amino-1-propanol vào, khuấy trong 24 giờ ở 25 °C. Dung dịch sau phản ứng được rửa trong diethyl ether. Lọc rửa kết tủa, loại bỏ dung môi thu được sản phẩm có dạng bột màu trắng mịn. Cấu trúc NPC-F127-NPC, NPC-F127-OH được xác định bằng phổ 1H-NMR (Bruker Advance 500MHz, USA,

Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội).

2) *Tổng hợp hydrogel GP ở các tỉ lệ khác nhau:* Cân 0.25 g gelatin hoà tan trong nước cất ở nhiệt độ 40 °C khuấy đều trong 24 giờ rồi đem lưu trữ ở nhiệt độ 4 °C cho phản ứng tiếp theo. Cân NPC-F127-OH có khối lượng lần lượt (0.5, 1.25, 2.5, 3.75, 5.0, 6.25 g) hoà tan trong nước cất ở nhiệt độ 4 °C, khuấy từ 1 giờ rồi đem giữ ở nhiệt độ 4 °C trong 24 giờ. Dung dịch NPC-F127-OH được cho vào dung dịch gelatin lạnh khuấy và giữ lạnh ít nhất 24 giờ trước khi đem thẩm tách với màng cellulose (12-14 KDa). Thẩm tách trong nước cất diễn ra trong khoảng một tuần trước khi đem mẫu đi đông khô [8]. Sản phẩm thu được xác định cấu trúc bằng phổ 1H-NMR và khảo sát đặc tính nhạy nhiệt.



Hình 2: Mẫu Copolymer GP khi thẩm tách và đông khô

C. Khảo sát đặc tính nhạy nhiệt của hydrogel bằng phương pháp inversion tube và Differential scanning calorimetry (DSC)

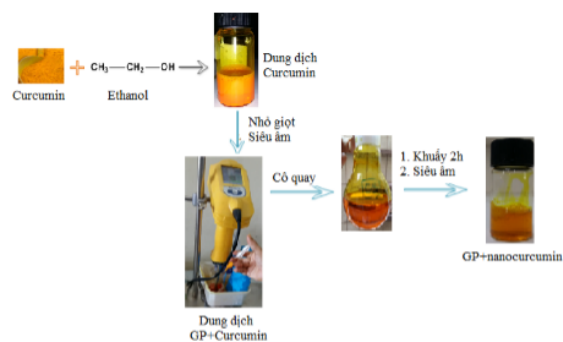
1) *Phương pháp inversion tube:* Copolymer gelatin-pluronic F127 được hoà tan trong nước cất ở các nồng độ (5, 8, 10, 12, 15, 20, 25% w/v), vortex khoảng 10 phút để toàn bộ copolymer ghép thẩm nước, rồi đem giữ lạnh ít nhất 24 giờ để sản phẩm thu được là hỗn hợp đồng nhất trước khi đem khảo sát nhiệt. Khảo sát nhiệt được tiến hành với các nhiệt độ 4, 25, 30, 37, 40 và 50 °C nhằm xác định nhiệt độ tạo gel của các nồng độ pluronic F127 khác nhau khi pha cùng nồng độ gelatin. Mẫu gel trong hủ bi được đặt vào bể điều nhiệt đã cài đặt nhiệt độ, để ổn định 5 phút, lấy hủ bi ra trút ngược lại để xem sự hình thành gel theo quy ước: (-) : không có khả năng tạo gel, gel chảy như nước khi trút ngược ống nghiệm; (+):

tạo gel yếu, gel chảy khi trút ngược ống nghiệm; (++) : tạo gel khá tuy nhiên gel chưa đặc lại hoàn toàn, gel chảy từ từ khi trút ngược ống nghiệm; (+++) : tạo gel tốt, gel đông đặc không chảy khi đặt nghiêng. Từ đó, vẽ đồ thị nhiệt độ chuyển pha sol gel của các tỉ lệ copolymer gelatin-pluronic F127 ở các nồng độ khác nhau theo nhiệt độ. Tuy nhiên, bằng phương pháp inversion tube chỉ xác định được copolymer gelatin-pluronic F127 có sự thay đổi trạng thái từ lỏng sang dạng gel.

2) *Phương pháp DSC:* Để chứng minh chính xác điểm nhiệt độ tạo gel, mẫu được đem khảo sát nhiệt độ chuyển pha sol-gel khi tăng nhiệt độ bằng phương pháp nhiệt quét vi sai (DSC) (Universal V4.5A TA Instrument, Trường Đại học Trà Vinh). Mẫu được cho vào chén nhôm, đẩy nắp chén nhôm lại bằng máy ép. Cho chén chứa mẫu và chén chuẩn vào khoang chứa, thiết lập dòng khí sạch (N₂). Cài đặt chương trình nhiệt với tốc độ gia nhiệt 1°C/phút từ 10 °C đến 50 °C và hạ nhiệt ngược lại từ 50 °C xuống 10 °C với tốc độ 1 °C/phút.

D. Tổng hợp nanocurcumin trong hydrogel GP bằng sóng siêu âm

Nanocurcumin được tổng hợp bằng phương pháp Wet của Bhawana, năm 2011.



Hình 3: Sơ đồ tổng hợp nanocurcumin trong hydrogel GP bằng phương pháp Wet

1) *Chuẩn bị gel GP 20%:* Cân 1.25 g GP (1:15) hòa tan trong 2.5 ml H₂O cất để ổn định ở 4 °C trong 24 giờ. Sau đó, cho 20 ml hỗn hợp dung môi (Et:DCM 7:3) vào khuấy từ ở 4 °C trong 2 giờ cho dung dịch đồng nhất (nếu dung

dịch đục thêm từ từ từng giọt HCl 1% đến khi dung dịch trong trở lại).

2) *Chuẩn bị curcumin*: Cân 100 mg curcumin hòa tan trong 5 ml (Eth:DCM 7:3), tiến hành đánh siêu âm để phân tán tốt curcumin trong 24 giờ.

3) *Tiến hành đánh siêu âm*: Cho mẫu gel vào cốc, nhỏ giọt dung dịch curcumin vào copolymer GP dưới tác dụng của sóng siêu âm với thông số cài đặt trên máy sonicator như sau: biên độ A = 70%, tần số C = 50%, trữ lạnh 15 phút, tiếp tục sonicator 10 phút. Tiến hành li tâm mẫu 3 lần với tốc độ 5500 rpm trong 15 phút và cô quay để loại dung môi. Thêm 2.5 ml nước cất, khuấy trong 2 giờ, tiếp tục đánh sóng siêu âm để tạo hỗn hợp đồng nhất. Hạt nanocurcumin trong hydrogel gelatin-pluronic F127 tạo thành được bảo quản lạnh ở 4 °C. Hình dạng và kích thước hạt nanocurcumin được xác định bằng TEM (TEM (JEM-1400 JEOL, Trường Đại học Bách khoa Thành phố Hồ Chí Minh) và DLS (Zetasizer Nano ZS, Trường Đại học Trà Vinh).

E. Đánh giá hiệu quả nhả chậm

Phương pháp màng thẩm tách được sử dụng để khảo sát sự nhả chậm nanocurcumin từ hệ. Túi thẩm tách có khối lượng phân tử 3.5 kDa chứa 2 ml mẫu được treo lơ lửng trong 10 ml dung dịch phosphate-buffered saline (PBS) có pH = 7.4 được đặt trong bể điều nhiệt ở 37±0.5 °C. Ở mỗi khoảng thời gian khác nhau (0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 24 giờ), 1 ml mẫu được rút ra, đồng thời thêm vào 1 ml dung dịch PBS để đảm bảo thể tích dung dịch đệm không đổi. Hàm lượng nanocurcumin nhả ra được xác định bằng phương pháp quang phổ tử ngoại khả kiến UV-Vis 1800 hãng Thermo-Mỹ với bước sóng hấp thụ lớn nhất ở 1100 nm, Trường Đại học Trà Vinh. Thí nghiệm nhả chậm nanocurcumin được làm lặp lại 3 lần với khoảng tin cậy lớn hơn 95%. Phần trăm nanocurcumin nhả ra được tính bằng công thức (Wendy H. Chern) [1], [4], [9].

$$Q = C_n V_s + V_t \sum_{i=1}^{n-1} C_{n-1} \quad (1)$$

Trong đó:

- Q: Phần trăm curcumin nhả ra từ hydrogel (%)

- C_n : nồng độ curcumin ở thời điểm t (mg/L).
- V_s : thể tích của PBS (mL)
- V_t : thể tích mẫu lấy ra (mL).
- C_{n-1} : nồng độ của curcumin nhả ra theo thời gian (mg/L).



Hình 4: Release curcumin trong hydrogel GP bằng túi thẩm tách

F. Đánh giá khả năng chữa lành vết thương bỏng độ 2 trên chuột

Theo quy trình của Bộ môn Công nghệ Sinh học và Sinh lý động, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hồ Chí Minh.

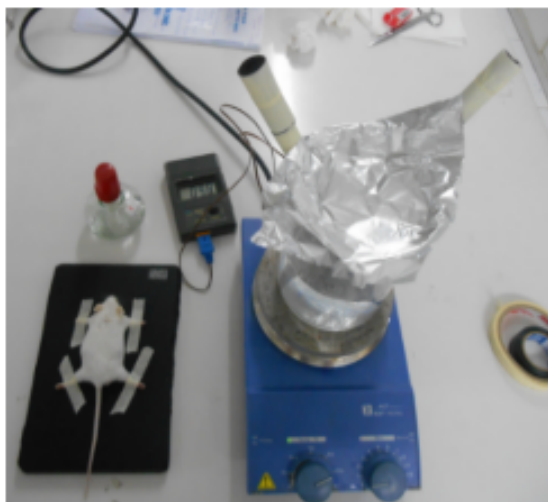
Chuột được nuôi ổn định trong chuồng khoảng 2 – 4 ngày, tiêm hỗn hợp thuốc mê Ketamine và nước (tỷ lệ 1.5:1.5) với liều lượng 0.02 ml/g trọng lượng cơ thể chuột. Cố định chuột bằng băng keo, xử lý sạch phần lông bằng cùn 70% rồi tiến hành cạo lông, trước khi dùng cùn iodine để xử lý vùng da này.

Thanh kim loại đường kính 1 cm được nung nóng đến 100 °C trong nước và để ổn định trong 30 phút trước khi thí nghiệm diễn ra. Sau đó, đặt thanh kim loại nóng lên vùng da đã được xử lý trước đó và giữ trong vòng 5 giây. Sau khi gây bỏng chuột được thả trở về lồng và tiến hành bôi thuốc sau 1 ngày bị thương. Tiến hành so sánh độ khép của vết thương trên chuột điều trị bằng hydrogel gelatin-pluronic F127 có chứa nanocurcumin với vết thương điều trị bằng thuốc thương mại dành cho bệnh nhân bị bỏng độ 2, vết thương điều trị bằng hydrogel gelatin-pluronic F127 và vết thương không điều trị.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

A. Kết quả phổ 1H NMR của NPC-F127-NPC

Kết quả phân tích thành phần, cấu trúc của NPC-F127-NPC được thể hiện qua phổ cộng



Hình 5: Chuẩn bị tạo vết thương trên chuột

hưởng từ hạt nhân Hình 6. Phổ đồ có các tín hiệu mũi cộng hưởng đặc trưng ở $\delta = 1.08$ ppm chứng tỏ sự có mặt của proton H trên dây PPO ở vị trí liên kết với nhóm ($-\text{CH}_3$). Một mũi đơn ở vị trí 3.2 - 3.5 chứng tỏ sự có mặt của proton H trên PPO ở vị trí (CH_2 -, $-\text{CH}$). Một mũi đơn ở vị trí 3.62 ppm chứng tỏ sự có mặt của proton H trên dây PEO ở vị trí liên kết với nhóm ($-\text{CH}_2$ - CH_2). Đặc biệt là tín hiệu ở vị trí $\delta = 4.42$ ppm chứng tỏ sự có mặt của proton H trên dây PEO ở vị trí liên kết với nhóm ($-\text{CH}_2$ - O -NPC). Tín hiệu này chỉ xuất hiện khi pluronic được hoạt hóa với NPC. Ngoài ra, còn có hai mũi đôi ở vị trí $\delta = 7.38$ ppm và $\delta = 8.22$ ppm chứng tỏ sự có mặt của proton H trên NPC ở vị trí liên kết với nhóm ($-\text{CH}$) trên vòng benzen. Từ phổ ^1H NMR cho thấy gắn thành công NPC vào hai đầu F127 với mức độ hoạt hóa đạt khoảng 95.33%. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu [4], [8], [10], [11].

B. Kết quả phổ ^1H NMR NPC-F127-AMI

Để ngăn sự hình thành F127 dimer do nhóm NPC rất dễ dàng bị thay thế, một lượng dư 3-amino-1-propanol được sử dụng để khoá một đầu NPC trên mạch của pluronic đã được hoạt hoá. Phổ ^1H -NMR cho thấy việc khoá nhóm NPC trên pluronic rất thành công. Đối với sản phẩm thể một phần 3-amino-1-propanol của F127 hoạt hóa NPC, ngoài những peak cộng hưởng đặc trưng

cho các proton trên NPC-F127-NPC thì ta còn thấy có tín hiệu peak cộng hưởng ở vị trí 4.42 ppm thể hiện proton H trên dây PEO ở vị trí liên kết với nhóm ($-\text{CH}_2$ - O -NPC) chuyển một phần đáng kể về vùng 4.2 ppm do sự thay thế NPC bằng 3-amino-1-propanol (thể hiện proton H trên dây PEO liên kết trực tiếp với nhóm ($-\text{O}$ - NH -)). Độ thế 3-amino-1-propanol càng cao, tín hiệu ở 4.2 ppm sẽ càng tăng cường độ. Một mũi đơn ở vị trí $\delta = 1.75 - 2.2$ ppm là của proton H trên C bão hòa không liên kết trực tiếp với N nằm trong nhóm 3-amino-1-propanol (CO - NH - CH_2 - CH_2). Chứng tỏ một đầu NPC được thay thế bởi 3-amino-1-propanol. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu [4], [8], [10], [11].

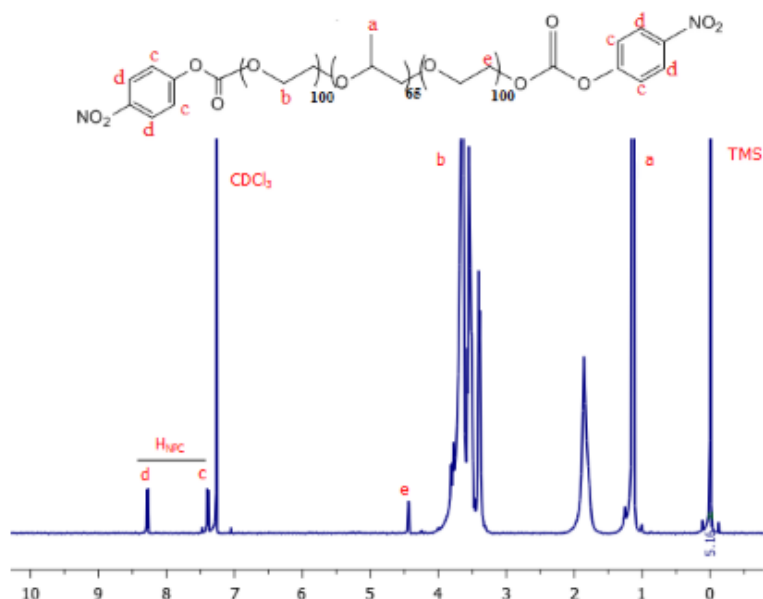
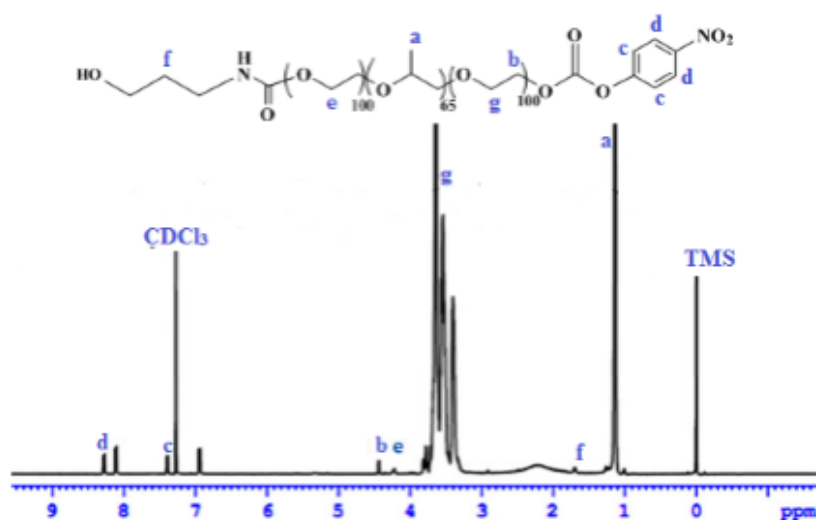
C. Kết quả phổ ^1H NMR của gelatin-pluronic F127

Kết quả phân tích thành phần, cấu trúc của gelatin-F127-OH trong D_2O được thể hiện qua phổ cộng hưởng từ hạt nhân. Phổ đồ có các tín hiệu của các proton có trong gelatin như pic đơn ở vị trí 4.8 ppm (proton vị trí aromatic carbon của gelatin) và các pic ở vị trí 0.8 - 4.6 ppm (proton của các nhóm alkyl của gelatin), 7.20 - 7.29 ($-\text{CH}$ -, phenylalanine).

Kết quả cho thấy quá trình tổng hợp copolymer gelatin-pluronic thông qua liên kết với chất hoạt hóa p-NPC là có hiệu quả. Kết quả thể hiện trong hình xác nhận sự thành công của việc ghép 2 polyme, bên cạnh sự triệt tiêu các tín hiệu peak của p-NPC ($\delta = 7.4$ và 8.3 ppm), phổ còn cho thấy số proton trong pluronic F127 nhiều nên cường độ tín hiệu trong phổ phần lớn là của F127. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu [4], [5].

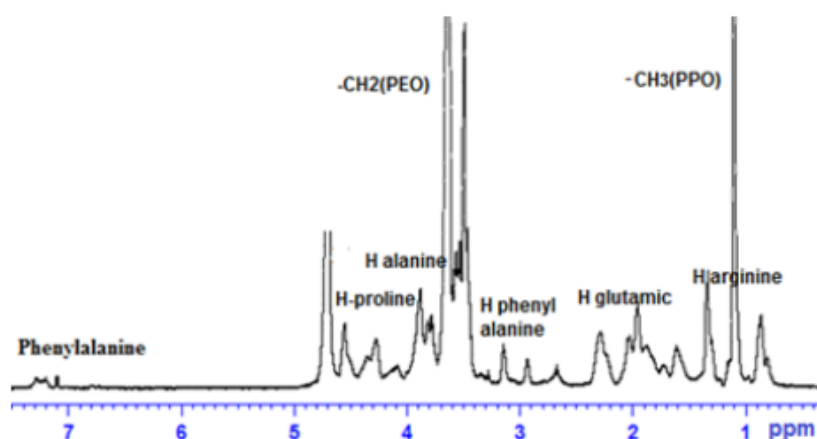
D. Khảo sát đặc tính nhạy nhiệt của hydrogel gelatin - pluronic F127

Sự chuyển pha sol-gel của copolymer GP được thể hiện ở Bảng 1 và Hình 9 cho thấy sự chuyển pha của bốn mẫu copolymer GP với các tỉ lệ khối lượng của gelatin và pluronic F127 khác (GP 1:5, GP 1:10, GP 1:15, GP 1:20). Nhiệt độ tạo gel của copolymer phụ thuộc vào tỉ lệ khối lượng của pluronic F127 ghép với gelatin. Kết quả cho thấy GP 1:15 ở nồng độ 20% có nhiệt độ chuyển pha sol-gel gần với nhiệt độ cơ thể hơn so với các nồng độ (5, 8, 10, 12, 15, 25%). Mẫu GP 1:5 tạo

Hình 6: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của NPC-F127-NPCHình 7: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của NPC-F127-OH

gel ở nhiệt độ thấp nhất và không có khả năng tạo gel khi nhiệt độ lớn hơn $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ mặc dù đã nâng nồng độ của copolymer. Tính chất tạo gel của GP 1:5 giống với tính chất tạo gel của gelatin là gel hóa trong điều kiện lạnh nhưng lại tan ở nhiệt độ phòng. Khi tăng tỉ lệ pluronic F127 (GP 1:15, GP 1:20) thì tính chất của pluronic F127 gần như vượt trội hơn tính chất của gelatin, điều này có nghĩa là gel sẽ hình thành khi nhiệt độ lớn

hơn $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ở nồng độ là 10% (wt/v) của pluronic F127. Đối với mẫu GP 1:10, gel chỉ hình thành khi nồng độ của nó lớn hơn 12.5% (wt/v) và khả năng tạo gel của nó giống với tính chất tạo gel của pluronic F127 hơn so với của gelatin. Tuy nhiên, mẫu F15 và F20 có nhiệt độ tạo gel cao hơn các mẫu còn lại, trong đó mẫu GP 1:15 ở nồng độ 20% wt/v có nhiệt độ chuyển pha sol-gel ở $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ và gel hình thành tốt ở nhiệt độ của



Hình 8: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của Gelatin-F127-OH

cơ thể con người.

Kết quả quá trình chuyển pha sol-gel của hydrogel GP theo nhiệt độ do khi ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ tới hạn (nhiệt độ tạo gel 30°C) thì dung dịch polyme đông lại thành gel. Do pluronic có cấu trúc PEO-PPO-PEO, trong đó PEO là phần ưa nước, PPO là phần kỵ nước nên khi gia tăng nhiệt độ PEO có xu hướng ngậm nước tạo thành một lớp vỏ bọc cho thành PPO bị mất nước dẫn đến sự hình thành hình cầu micelle ngăn chặn PPO tiếp xúc với nước và gel được hình thành [12]–[14] (nhóm kỵ nước PPO có khả năng tự lắp ráp thành cấu trúc lõi và nhóm ưa nước PEO cuộn lại thành vòng xoắn tạo thành lớp vỏ bao quanh bên ngoài).

Sự chuyển pha sol-gel của dung dịch copolymer được xác định bằng phương pháp đo DSC biểu diễn ở Hình 10, có pic tỏa nhiệt cực đại xuất hiện ở nhiệt độ 36.27°C (trong vùng nhiệt độ từ 28 đến 40°C) cho thấy sự đặc lại của dung dịch GP. Biểu đồ chuyển pha cũng chỉ ra vùng nhiệt độ mà dung dịch copolymer tạo thành pha gel đồng nhất. Sự chuyển pha này gần giống với nghiên cứu của Barba A. A. Et al đã khảo sát sự chuyển pha sol-gel của F127 [15].

E. Kết quả kích thước hạt nanocurcumin

Sự phân bố kích thước, hình thái hạt nanocurcumin trong hydrogel gelatin-pluronic được xác định bằng TEM và DLS ở 4°C cho thấy rằng hạt nanocurcumin hình cầu, với nồng độ curcumin

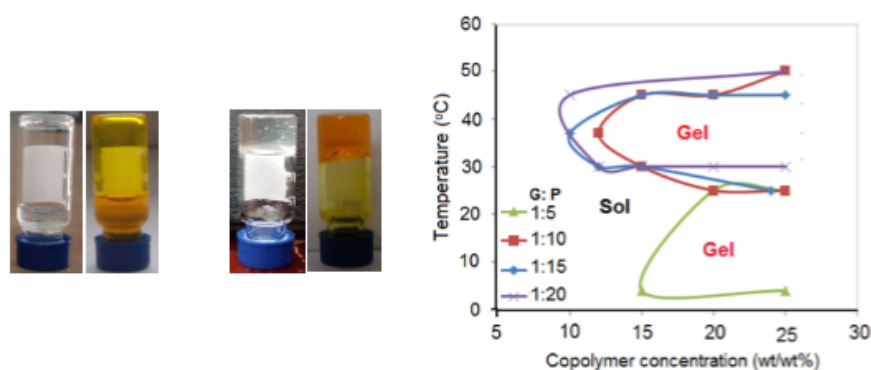
5% trong hydrogel cho kích thước hạt dưới 7 nm. DLS cho thấy hạt nanocurcumin phân bố đồng đều trong hydrogel, tuy nhiên kích thước hạt thay đổi đáng kể từ $7 - 258$ nm khi thay đổi nồng độ curcumin trong copolymer GP. Khi tăng nồng độ curcumin thì đường kính hạt nano tăng dần: hạt nano có kích thước 7 ± 0.5 nm (5 wt/wt%), 16 ± 3.2 nm (10 wt/wt%), 26 ± 10.3 nm (15 wt/wt%), 128 ± 8.8 nm (20 wt/wt%) và 258 ± 9.7 nm (30 wt/wt%). Điều đặc biệt là sự kết hợp của nanocurcumin không làm ảnh hưởng đến đặc tính nhạy nhiệt của hydrogel.

F. Kết quả release nanocurcumin

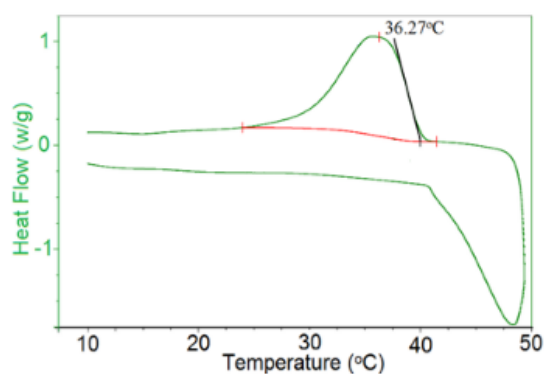
Khả năng mang nhả hàm lượng nanocurcumin của hydrogel được xác định bằng phương pháp khuếch tán với màng thấm tách tại $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, pH = 7.4. Kết quả chỉ ra ở Hình 13 (được tính dựa vào công thức (1)) cho thấy hàm lượng nanocurcumin được nhả chậm trong hai thời điểm đầu tiên (0, 1 giờ) và tăng đáng kể trong bốn thời điểm tiếp theo (2, 3, 4, 5 giờ), rồi chậm lại trong hai thời điểm khảo sát cuối cùng (10, 24 giờ). Trong hai thời điểm đầu tiên (0, 1 giờ), lượng thuốc nhả ra khỏi hydrogel chỉ đạt 5% , nhưng lượng nanocurcumin nhả ra trong bốn thời điểm tiếp theo (2, 3, 4, 5 giờ) đạt trên 50% . Ta thấy lượng thuốc nhả chậm trong hai thời điểm đầu, nguyên nhân có thể là do sự kết hợp của phân tử gelatin với pluronic F127 làm tăng sự đan xen, phân nhánh của chuỗi copolymer nên

Bảng 1. Khảo sát nhiệt độ tạo gel

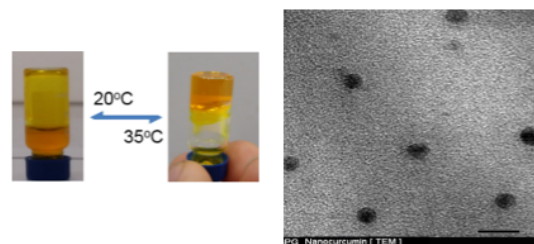
| Tên mẫu | Gelatin (g) | Pluronic (g) | 4 °C | 25 °C | 30 °C | 37 °C | 40 °C | 50 °C |
|---------|-------------|--------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| F5 | 0.25 | 1.25 | +++ | +++ | + | + | - | - |
| F10 | 0.25 | 2.5 | + | + | + | + | + | + |
| F15 | 0.25 | 3.75 | + | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| F20 | 0.25 | 5.0 | + | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ |



Hình 9: Đồ thị thể hiện sự tương quan của nồng độ copolymer và nhiệt độ



Hình 10: Đường cong nhiệt DSC của copolymer GP (1:15) 20%

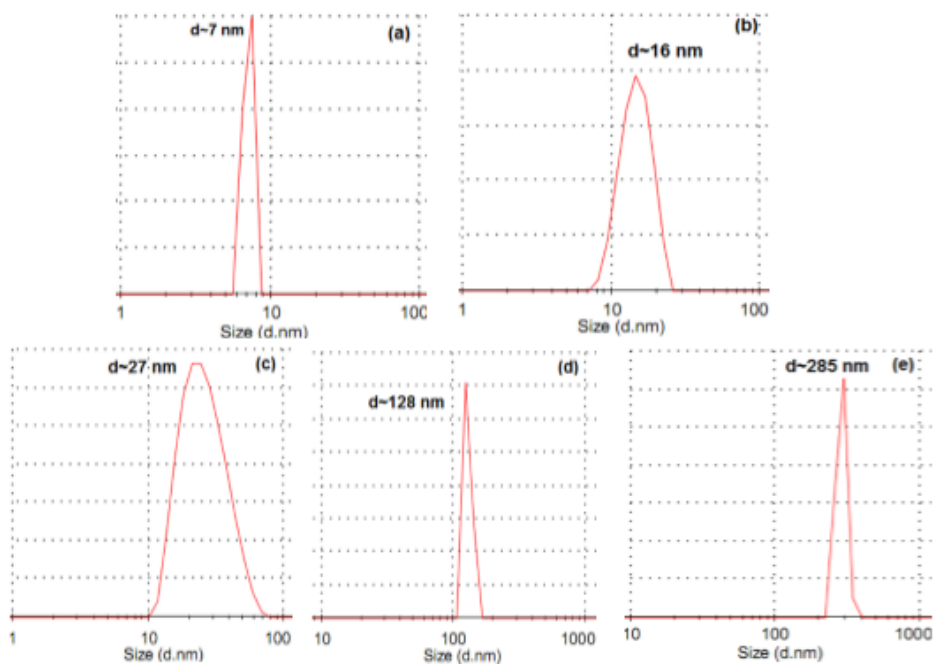


Hình 11: Chuyển pha sol-gel và hình TEM của hydrogel GP chứa nanocurcumin 5%

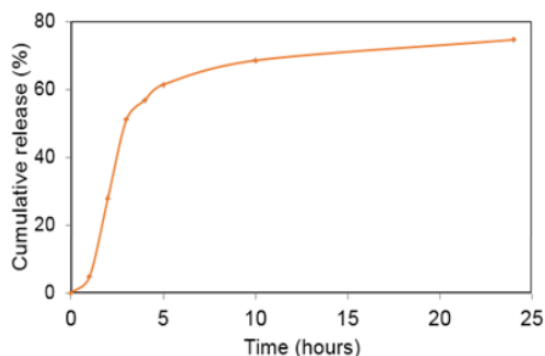
tăng tính ổn định của hydrogel trong quá trình trương nở mạng lưới. Trong bốn thời điểm tiếp theo, nước bắt đầu khuếch tán vào chất nền làm gel trương lên mạng lưới hydrogel được mở rộng và nanocurcumin được giải phóng ra với số lượng nhiều hơn [1].

Trong hai thời điểm khảo sát cuối cùng (10, 24 giờ), lượng nanocurcumin nhả ra với tốc độ gần như không đổi đạt $74.66\% \pm 0.039$. Kết

quả nghiên cứu cho thấy vật liệu hydrogel GP có khả năng mang nhả chậm nanocurcumin, có tiềm năng ứng dụng trong trị lành vết thương. Việc tiến hành khảo sát khả năng nhả thuốc cho thấy lượng thuốc nhả ra không hoàn toàn, điều này là do hydrogel khi co lại các cấu trúc lỗ mao quản dần nhỏ lại làm cho một lượng thuốc sẽ bị giữ lại trong cấu trúc hydrogel. Kết quả nghiên cứu phù hợp với nghiên cứu [4].



Hình 12: Kết quả DLS của nanocurcumin trong hydrogel ở các nồng độ 5, 10, 15, 20, 25%



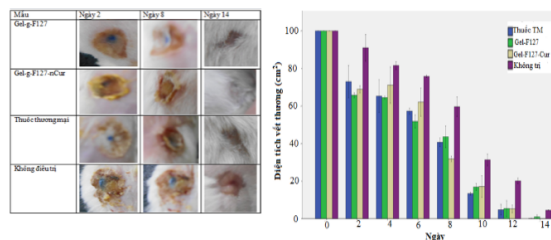
Hình 13: Kết quả nhả chậm nCur của hydrogel gelatin-pluronic F127

G. Đánh giá khả năng chữa lành vết thương bỏng độ 2 trên chuột

Theo đánh giá sơ bộ ban đầu, vết thương được điều trị bằng hệ gel có chứa nanocurcumin cho thấy tính thẩm mỹ cao: nguyên bào sợi tăng sinh che lấp phần diện tích da bị thương và sau 14 ngày vùng bị thương trở lại gần như tương đương với vùng da lành, không có sẹo lồi hình thành, có nang lông phát triển trên bề mặt vết thương, bề mặt nhìn giống với mảng da bình thường.

Đối với các vết thương điều trị bằng loại gel nhưng không có nanocurcumin và điều trị bằng thuốc bôi ngoài da đặc trị cho bệnh nhân bị bỏng độ 2 về mặt cảm quan là như nhau, lớp da hình thành trơn láng nhưng không có nang lông phát triển phía trên.

Riêng đối với mẫu không điều trị, sau 14 ngày bề mặt căng bóng, vết thương vẫn đang trong quá trình lành, có dấu hiệu của quá trình hình thành mô sẹo, là dấu hiệu không tốt trong quá trình chữa lành vết thương.



Hình 14: Đánh giá khả năng lành trên bề mặt vết thương chuột

IV. KẾT LUẬN

Tổng hợp thành công hydrogel gelatin-pluronic F127 có khả năng phân tán hạt nanocurcumin đồng đều trong khoảng 7-285 nm tùy theo nồng độ curcumin sử dụng. Tỷ lệ giữa gelatin:pluronic F127 là 1:15 và ở nồng độ 20% tạo thành màng gel ở nhiệt độ gần nhiệt độ cơ thể con người 36.27 °C. Vật liệu này có khả năng mang nhả chậm nanocurcumin hiệu quả, có tính tương hợp sinh học và có khả năng trị lành vết thương một cách hiệu quả. Đây là loại vật liệu y sinh có tiềm năng ứng dụng trong việc chữa lành vết thương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Cửu Khoa. *Vật liệu polyme thông minh và ứng dụng trong y sinh*. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Hà Nội; 2016.
- [2] El-Refaie WM, Elnaggar YSR, El-Massik MA, Abdallah OY. Novel curcumin-loaded gel-core hyalurosomes with promising burn-wound healing potential: Development, in-vitro appraisal and in-vivo studies. *International journal of pharmaceutics*. 2001;486(1):88–98.
- [3] Trần Hữu Dũng. Ứng dụng của polymer pluronic F127 nhạy cảm bởi nhiệt trong điều trị các tổn thương bỏng. *Tạp chí Dược học*. 2014;(11):54.
- [4] Đặng Thị Lê Hằng. Preparation of Nanocurcumin In Thermosensitive Chitosan Pluronic Copolymer Towards Biomedical Application [Luận văn tốt nghiệp Đại học]; 2015.
- [5] Nguyễn Thị Phương. Nghiên cứu tổng hợp vật liệu mới trong cấy ghép và tái tạo xương trên cơ sở hydrogel composite sinh học gồm Biphasic Calcium Phosphate và Polymer sinh học (gelatin, chitosan) [Luận án tiến sĩ]; 2015.
- [6] Alexandridis P, Hatton TA. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects*. 1995;96(1-2):88–98.
- [7] Kulac M, Aktas C, Tubulas F, Uygur R, Kanter M, Erboga M, et al. The effect of topical treatment with curcumin on burn wound healing in rats. *Journal of Molecular Histology*. 2013;44(1):83–90.
- [8] Nguyen TBT, Dang LH, Nguyen TTT, Tran DL, Nguyen DH, Nguyen VT, et al. Green processing of thermosensitive nanocurcumin-encapsulated chitosan hydrogel towards biomedical application. *Green Processing and synthesis*. 2016;5:511–520.
- [9] Jia WJ, Liu JG, De Zhang Y, Wang JW, Wang J, Sun CY, et al. Preparation, characterization, and optimization of pancreas-targeted 5-Fu loaded magnetic bovine serum albumin microspheres. *Journal of Drug Target*. 2007;15(2):140–5.
- [10] Mazaki T, Shiozaki Y, Yamane K, Yoshida A, Nakamura M, Yoshida Y, et al. A novel, visible light-induced, rapidly cross-linkable gelatin scaffold for osteochondral tissue engineering. *Scientific Report* 4. 2014;p. 4457.
- [11] Tong NNA, Nguyen TP, Nguyen CK, NQ T. Aquated Cisplatin and Heparin-Pluronic Nanocomplexes Exhibiting Sustainable Release of Active Platinum Compound and NCI-H460 Lung Cancer Cell Antiproliferation. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition, ISSN: 0920-5063*. 2016;p. 1568–5624.
- [12] Jong HC, Yoon KJ, Jin WB, Jang WC, Tran NQ, Ki DP. Self-Assembled Nanogel of Pluronic-Conjugated Heparin as a Versatile Drug Nanocarrier. *Macromolecular Research*. 2011;19(2):180–188.
- [13] HG Schild. Self-Assembled Nanogel of Pluronic-Conjugated Heparin as a Versatile Drug Nanocarrier. *Prog Poly Sci*. 1992;(17):163–249.
- [14] Southall NT, Dill KA, Haymet ADJ. A view of the hydrophobic effect. *Journal of Physical Chemistry B*. 1992;106(3):33–521.
- [15] Kesisoglou F, Panmai S, Wu Y. Nanosizing-oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. *Advanced Drug Delivery Review*. 2007;59(7):631–44.