

CHẾ TẠO KHUNG NUÔI CÂY TẾ BÀO TỪ VẬT LIỆU HYDROGEL GELATIN/CARBOXYMETHYL CHITOSAN KHÂU MẠCH BỨC XẠ

ĐẶNG VĂN PHÚ^{1,2}, NGUYỄN NGỌC DUY¹, LÊ ANH QUỐC¹, TRẦN THANH PHƯỚC³
TRẦN LÊ BẢO HÀ³, NGUYỄN QUỐC HIỂN¹

¹ Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ, Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam
202A, Đường 11, P. Linh Xuân, Q. Thủ Đức, Tp. Hồ Chí Minh

² Học Viện Khoa học và Công Nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
18 Hoàng Quốc Việt, Q. Cầu Giấy, Hà Nội

³ Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh
227, Nguyễn Văn Cừ, P. 4, Q. 5, Tp. Hồ Chí Minh
Email: phu659797@yahoo.com (Đ.V. Phú)

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Khung hydrogel nuôi cấy tế bào từ các polyme tự nhiên tương hợp sinh học đang được phát triển nghiên cứu ứng dụng trong lĩnh vực công nghệ mô. Để tạo được khung hydrogel nuôi cấy tế bào thì việc chọn lựa thành phần các hợp chất polymer và phương pháp chế tạo hydrogel luôn thu hút nhiều nghiên cứu.

Mục tiêu: Chế tạo được khung hydrogel từ gelatin và carboxymethyl-chitosan (CM-chitosan) có đặc trưng tính chất phù hợp để nuôi cấy tế bào gốc trung mô (mô mỡ).

Phương pháp: Sử dụng bức xạ tia gamma Co⁶⁰ để khô mạch các hỗn hợp gelatin/CM-chitosan với tỷ lệ hàm lượng 10/0; 9/1; 8/2 và 7/3 tạo hydrogel. Sau phản ứng khô mạch, các hydrogel được xác định hàm lượng gel, độ trương nước bão hòa bằng phương pháp cân trọng lượng và kích thước lỗ xốp bằng chụp ảnh kính hiển vi điện tử quét (SEM).

Kết quả: Xác định được liều xạ 30 – 35 kGy là cần thiết để tạo hydrogel đạt hàm lượng gel 72 – 84%; độ trương nước bão hòa 4,9 – 12 g/g trong thời gian ngâm nước 10 giờ; kích thước lỗ xốp của hydrogel đạt 100 – 350 μm . Hydrogel tạo được từ hợp phần gelatin/CM-chitosan với tỉ lệ khối lượng 9/1 có hàm lượng gel cao (~84%), độ trương nước ~5,8 g/g và kích thước lỗ xốp 120 – 250 μm phù hợp để ứng dụng làm khung nuôi cấy tế bào gốc trung mô.

Kết luận: Đã chế tạo được hydrogel gelatin/CM-chitosan có hàm lượng gel, độ trương nước bão hòa và cấu trúc – kích thước lỗ xốp phù hợp làm khung nuôi cấy tế bào trung mô. Các đặc trưng liên quan khác đang tiếp tục khảo sát.

Từ khóa: Gelatin, carboxymethyl-chitosan, hydrogel, bức xạ gamma.

1. MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, công nghệ tạo mô từ tế bào gốc trung mô mỡ đã và đang thu hút nhiều nghiên cứu nhằm mục tiêu ứng dụng điều trị khuyết mô và tái tạo mô. Để tạo được mô nhân tạo đòi hỏi phải có khung nuôi cấy tế bào (scaffold) có vai trò và chức năng tương tự chất nền ngoại bào (ECM) để đảm bảo tế bào gốc bám dính, tăng sinh và biệt hóa thành mô [1], đặc biệt kích thước lỗ xốp của khung là thông số quan trọng, ví dụ nuôi cấy tế bào trung mô thì kích thước lỗ xốp trong khoảng 100 – 300 μm . Vật liệu hydrogel từ các polyme tự nhiên luôn là đối tượng được ưu tiên nghiên cứu do có đặc trưng tính chất cơ-lý-hóa và sinh học gần giống với EMC [2]. Gelatin, một sản phẩm thủy phân của collagen có nhiều trong da động vật, thường được sử dụng để khô mạch tạo hydrogel làm khung nuôi cấy tế bào do gelatin là một polyme sinh học và trong cấu trúc có mang các trình tự axit amin làm phối tử liên kết với tế bào (RGD: Arg-Gly-Asp) [3]. Tuy nhiên, hydrogel gelatin có tính cơ lý hạn chế như có độ cứng cao, tính đàn hồi, độ ổn định cấu trúc 3D và mức độ ổn định nhiệt độ kém [4]. Do vậy, các dẫn xuất polysaccharit tự nhiên điển hình là carboxymethyl chitosan (CM-chitosan) có khả năng hòa tan tốt trong nước và có hoạt tính sinh học được bổ sung vào dung dịch

gelatin nhằm khai thác hoạt tính sinh học của CM-chitosan và cải thiện tính chất cơ lý của hydrogel gelatin [5]. Khâu mạch hỗn hợp gelatin/polysacarit thường bằng phương pháp hóa học [1, 4] và phương pháp chiếu xạ ion hóa năng lượng cao [3, 5, 6]. Khâu mạch hóa học cho hiệu quả cao nhưng cũng có những tồn tại nhất định như là phải làm sạch chất khơi mào khâu mạch tồn dư, chẳng hạn là glutaraldehyt có nguy cơ gây độc tế bào [3, 6]. Ngược lại, phương pháp khâu mạch bức xạ có nhiều thuận lợi do không sử dụng chất hóa học để khơi mào phản ứng nên sản phẩm có độ tinh sạch cao [3, 5, 6], đồng thời hiện nay đã có nhiều máy chiếu xạ quy mô công nghiệp nên khả thi áp dụng sản xuất hydrogel quy mô lớn. Tuy nhiên, trong khâu mạch bức xạ hỗn hợp gelatin/CM-chitosan tạo hydrogel làm khung nuôi cấy tế bào thì việc nghiên cứu chọn lựa tỷ lệ hợp phần các polyme tối ưu vẫn còn là nội dung cần tiếp tục nghiên cứu. Xuất phát từ các lý do trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu chế tạo hydrogel khâu mạch bức xạ từ hỗn hợp gelatin/CM-chitosan với tỷ lệ hợp phần khác nhau, định hướng ứng dụng làm khung nuôi cấy tế bào gốc trung mô mỡ. Hàm lượng gel, độ trương nước và cấu trúc xốp của khung hydrogel đã được khảo sát.

2. NỘI DUNG

2.1. Đối tượng và Phương pháp

- Gelatin từ da lợn, loại A (thủy phân bằng axit) và CM-chitosan ($M_w \sim 60$ kDa, độ thế 1,7) của hãng Sigma-Aldrich và nước tinh khiết của Merck được sử dụng cho thực nghiệm.

- Dung dịch có tổng nồng độ của hai loại polyme là 15% (w/v) với tỷ lệ khối lượng gelatin/chitosan là 10/0; 9/1; 8/2; 7/3 được chuẩn bị bằng cách hòa tan hoàn toàn gelatin và CM-chitosan trong nước cất theo tỷ lệ xác định. Quá trình hòa tan được thực hiện trong 30 phút, ở nhiệt độ 50°C trên máy khuấy đũa IKA, 400 vòng/phút. Sau đó rót dung dịch vào các ống Erlen loại 30 ml, rung siêu âm 15 phút cho tan bọt khí, đưa mẫu vào ngăn mát tủ lạnh giữ qua đêm (~ 16 giờ) để định hình khối gel rắn. Chuyển mẫu gel đi chiếu xạ tia γ để khâu mạch tạo hydrogel trên nguồn gamma Co^{60} (SVST Co^{60}/B , Hungary) có suất liều $\sim 1,2$ kGy/giờ tại Trung tâm VINAGAMMA. Hàm lượng gel và độ trương nước bão hòa của hydrogel được xác định theo phương pháp cân trọng lượng như mô tả bởi Yang và cs (2010) [3].

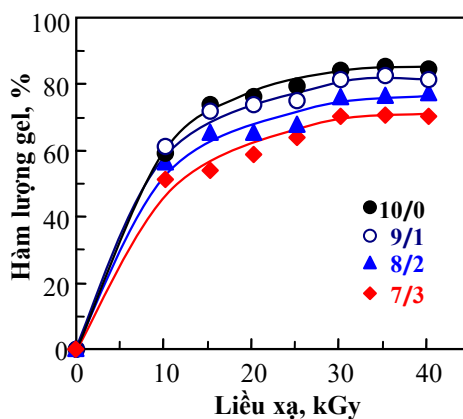
$$\text{Hàm lượng gel [GF (\%)]} = W_d \times 100 / W_i \times a \quad (1)$$

$$\text{Độ trương nước bão hòa [ESW (g/g)]} = (W_s - W_d) / W_d \quad (2)$$

Trong đó a là tổng nồng độ của các polyme (0,15). W_d , W_i và W_s tương ứng với khối lượng của mẫu hydrogel sau làm khô, mẫu hydrogel ướt ban đầu và mẫu hydrogel trương nước.

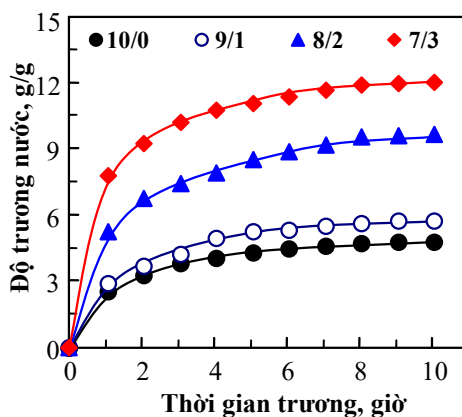
- Kích thước lỗ xốp của khung hydrogel sau sấy đông khô được xác định bằng phương pháp đo kích thước lỗ xốp trung bình từ ảnh chụp kính hiển vi điện tử quét [1, 3, 4].

2.2. Kết quả



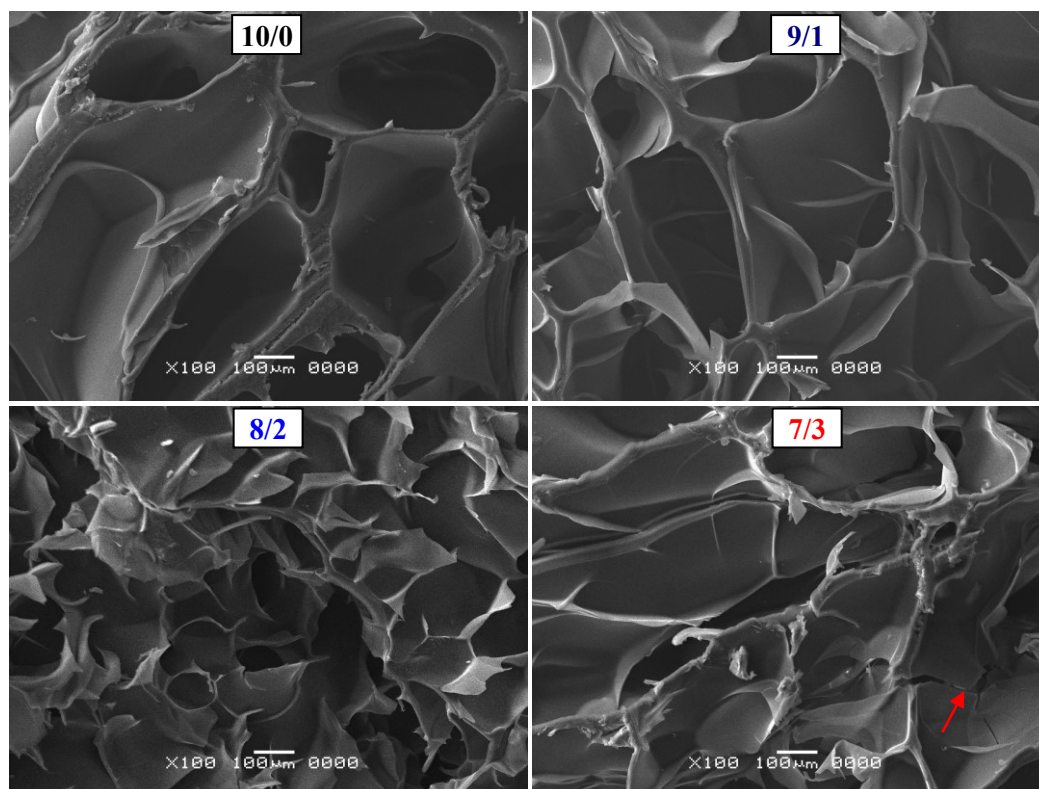
Hình 1. Hàm lượng gel theo liều xạ của các mẫu hydrogel có tỷ lệ gelatin/CM-chitosan khác nhau

Hydrogel sau chiếu xạ khô mạch được cắt thành khối lập phương $5 \times 5 \times 5$ mm, ngâm nước cất trong 5 ngày ở nhiệt độ phòng $\sim 32^\circ\text{C}$ để loại bỏ các thành phần hòa tan, sau đó sấy khô phần không tan ở 60°C đến trọng lượng không đổi để xác định hàm lượng gel. Từ kết quả hàm lượng gel (GF) của các mẫu hydrogel như trình bày trên hình 1 cho thấy rằng: GF của các mẫu gia tăng khi tăng liều xạ và đạt giá trị cao nhất trong khoảng liều xạ 30 – 35 kGy; trong khi đó giá trị GF giảm khi tăng hàm lượng CM-chitosan trong hợp phần, cụ thể là GF đạt cực đại lần lượt là 85,1%; 83,8%; 77,1% và 70,9% tương ứng đối với mẫu hydrogel có tỷ lệ khối lượng gelatin/CM-chitosan là 10/0; 9/1; 8/2 và 7/3.



Hình 2. Độ trương nước của các mẫu hydrogel có tỷ lệ gelatin/CM-chitosan khác nhau theo thời gian

Các mẫu hydrogel gelatin/CM-chitosan có tỷ lệ gelatin/CM-chitosan khác nhau sau khi chiếu xạ khô mạch tại liều xạ 30 kGy được ngâm và lắc trong nước cất ở nhiệt độ 37°C . Sau mỗi khoảng thời gian 1 giờ, cân mẫu và tính độ trương nước. Kết quả trên hình 2 cho thấy độ trương nước của các mẫu hydrogel tăng theo thời gian ngâm nước và đạt giá trị ổn định sau khoảng 8 – 9 giờ, đây được gọi là độ trương nước bão hòa (ESW). Kết quả trên cũng cho thấy giá trị ESW tăng từ $\sim 4,8$ g/g lên đến ~ 12 g/g khi tăng tỷ lệ hàm lượng CM-chitosan trong hợp phần từ 10/0 đến 7/3. Hay nói một cách khác, ESW của hydrogel giảm khi GF tăng.

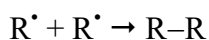
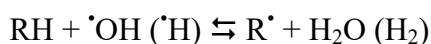
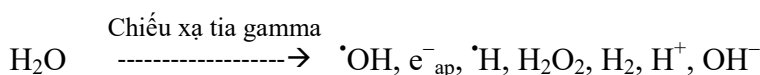


Hình 3. Ảnh SEM của các khung hydrogel có tỷ lệ khối lượng gelatin/CM-chitosan khác nhau

Hình 3 mô tả cấu trúc vi xấp của các khung hydrogel có tỷ lệ hợp phần khác nhau được khâu mạch bằng bức xạ và sấy đông khô. Quan sát từ ảnh chụp SEM cho thấy, khung hydrogel gelatin (mẫu 10/0) có kích thước lỗ xấp 300 – 500 μm , thành dày và không có nhiều lỗ xấp liên thông; trong khi đó khung hydrogel gelatin/CM-chitosan tỷ lệ 9/1 và 8/2 có kích thước lỗ xấp trong khoảng 120 – 250 μm , thành mỏng và có nhiều lỗ xấp liên thông rất phù hợp để nuôi cấy tế bào gốc mô mỡ; tuy nhiên khi tăng hàm lượng CM-chitosan lên tỷ lệ 7/3 thì khung hydrogel có cấu trúc kênh xấp không rõ ràng và nhiều vết nứt gãy. Qua kết quả ghi nhận được như trên cho thấy tỷ lệ hợp phần polyme có ảnh hưởng rõ ràng đến đặc trưng tính chất của khung hydrogel gelatin/CM-chitosan khâu mạch bức xạ.

2.3. Bàn luận

Không giống như phương pháp khâu mạch hóa học, sử dụng bức xạ tia gamma để khâu mạch hydrogel từ gelatin/CM-chitosan được đánh giá là phương pháp sạch và hiệu quả. Phản ứng khâu mạch bức xạ trong dung dịch gelatin/CM-chitosan diễn ra chủ yếu theo hiệu ứng gián tiếp từ sản phẩm xạ ly nước, được trình bày tóm tắt như sau [5]:



Trong đó, R là các phân tử gelatin hay CM-chitosan.

Theo kết quả nghiên cứu của Tarao và cs [6], hiệu quả khâu mạch bức xạ gelatin phụ thuộc vào nguồn gốc, cụ thể là gelatin từ da lợn và da bò thì khâu mạch bức xạ trong khi gelatin từ da cá tuyết thì không. Điều này là do sự khác nhau về mức độ xoắn trong cấu trúc chuỗi phân tử gelatin. Đối với CM-chitosan, hiệu quả khâu mạch phụ thuộc chủ yếu vào nồng độ và trạng thái. Ở nồng độ thấp hơn 10% hoặc trạng thái rắn thì CM-chitosan bị cắt mạch bức xạ, trong khi dung dịch nồng độ cao (dạng keo đặc) thì khâu mạch bức xạ [7]. Thông thường, bổ sung CM-chitosan vào các polyme khác để khâu mạch bức xạ nhằm mục đích cải thiện hiệu ứng sinh học và tính chất hóa lý cho hydrogel. Ở dạng hỗn hợp thì tỷ lệ hợp phần có ảnh hưởng rõ ràng đến đặc trưng tính chất của hydrogel khâu mạch bức xạ. Kết quả ở hình 1 và hình 2 cho thấy khi tăng hàm lượng CM-chitosan trong hợp phần thì GF giảm nhẹ và tăng ESW đáng kể so với hydrogel gelatin. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận bởi nhiều công trình nghiên cứu khác [3, 5, 7]. Hơn nữa, một trong những kết quả mong đợi từ việc kết hợp CM-chitosan với gelatin đó là cải thiện được tính cơ lý và cấu trúc xấp của khung hydrogel. Trong khi đó khả năng điều chỉnh cấu trúc và kích thước lỗ xấp thông qua thay đổi tỷ lệ gelatin/CM-chitosan bằng phương pháp khâu mạch hóa học dùng glytaraldehyde là ít hiệu quả [4]. Kết quả ở hình 3 cho thấy khi tăng mẫu hydrogel có tỷ lệ 9/1 và 8/2 có độ xấp cao, thành mỏng và nhiều khoang xấp liên thông hơn so với hydrogel gelatin. Kích thước trung bình lỗ xấp đạt được trong khoảng 120 – 250 μm là phù hợp với yêu cầu của khung nuôi cấy tế bào gốc (75 – 250 μm) [8]. Các tác giả khác như Yang và cs [3], Huang và cs [5] cũng ghi nhận rằng việc bổ sung CM-chitosan đã làm giảm độ cứng và cải thiện độ xấp cũng như các đặc tính mong muốn khác đối với khung hydrogel gelatin/CM-chitosan khâu mạch bức xạ ứng dụng làm khung nuôi cấy tế bào tạo mô nhân tạo.

Trong hầu hết hydrogel từ các polyme tự nhiên làm khung nuôi cấy tế bào gốc trung mô thì các yếu tố như hàm lượng gel, độ trương nước và kích thước lỗ xấp có ý nghĩa quyết định đến chất lượng của khung. Hàm lượng gel thường cao hơn 75% để đảm bảo độ ổn định cấu trúc 3D, độ trương nước 5 – 8 g/g là thích hợp để tế bào hấp thu dưỡng chất và đào thải chất bài tiết, kích thước lỗ xấp 100 – 350 μm với nhiều kênh xấp liên thông để thuận lợi cho sự di trú, bám dính tế bào và hình thành mạch [1, 9]. Dựa vào các tiêu chí trên và kết quả thu được

trong nghiên cứu này thì khung hydrogel tạo được từ tỷ lệ hợp phần 8/2 đến 9/1 bằng phương pháp khâu mạch bức xạ tia gamma với liều 30 – 35 kGy là lựa chọn thích hợp.

3. KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu chế tạo được khung hydrogel từ hỗn hợp polyme sinh học gelatin/CM-chitosan bằng phương pháp khâu mạch bức xạ kết hợp xử lý đông khô. Tỷ lệ hợp phần gelatin/CM-chitosan có ảnh hưởng đáng kể đến đặc trưng tính chất của khung hydrogel. Hydrogel với tỷ lệ gelatin/CM-chitosan là 9/1 và 8/2 có hàm lượng gel cao, độ trương nước thích hợp, cấu trúc và kích thước lỗ xốp phù hợp làm khung nuôi cấy tế bào gốc trung mô. Mặc dù vậy, các đặc trưng khác như tương hợp – phân hủy sinh học, khả năng bám dính và tăng trưởng tế bào của khung hydrogel gelatin/CM-chitosan cần phải nghiên cứu bổ sung.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyen H.T.T., To Q.M., Huynh T.D., Tran C.T., Tran L.B.H. “Gelatin-alginate sponge: A potential scaffold for adipose tissue engineering”, *European Journal of Biological and Pharmaceutical Sciences*, 2(7), 48-53, 2015.
2. El-Sherbiny I.M., Yacoub M.H. “Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges”, *Global Cardiology Science and Practice*, 2013(3), 316-342, 2013.
3. Yang C., Xu L., Zhou Y. et al. “A green fabrication approach of gelatin/CM-chitosan hybrid hydrogel for wound healing”, *Carbohydrate Polymers*, 82(4), 1297-1305, 2010.
4. Agarwal T., Narayan R., Maji S. et al. “Gelatin/carboxymethyl chitosan based scaffolds for dermal tissue engineering applications”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 93(Pt B), 1499-1506, 2016.
5. Huang X., Zhang Y., Zhang X., Xu L., Chen X., Wei S. “Influence of radiation crosslinked carboxymethyl-chitosan/gelatin hydrogel on cutaneous wound healing”, *Materials Science and Engineering C*, 33(8), 4816-4821, 2013.
6. Terao K., Nagasawa N., Nishida H. Et al. “Reagent-free crosslinking of aqueous gelatin: manufacture and characteristics of gelatin gels irradiated with gamma-ray and electron beam”, *Journal of Biomaterials Science - Polymer Edition*, 14(11), 1197-1208, 2003.
7. Zhao L., Xu L., Mitomo H., Yoshii F. “Synthesis of pH-sensitive PVP/CM-chitosan hydrogels with improved surface property by irradiation”, *Carbohydrate Polymers*, 64(3), 473-480, 2006.
8. Sagar N., Soni V.P., Bellare J.R. “Influence of carboxymethyl chitin on stability and biocompatibility of 3D nanohydroxyapatite/gelatin/carboxymethyl chitin composite for bone tissue engineering”, *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*, 100B(3), 624-636, 2012.
9. Annabi N., Nichol J.W., Zhong X. et al. “Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering”, *Tissue Engineering: Part B*, 16(4), 371-383, 2010.

SYNTHESIS OF RADIATION CROSSLINKED GELATIN/CARBOXYMETHYL CHITOSAN HYDROGEL SCAFFOLD FOR TISSUE CULTURE

Email address: phu659797@yahoo.com (D.V. Phu)

Abstract

Background: The hydrogel scaffolds from biocompatible natural polymers have been investigated and developed for application in tissue engineering. In order to create a suitable hydrogel scaffold, the selection of polymer compounds and hydrogel production methods has always attracted many studies.

Objectives: To prepare a hydrogel scaffold with suitable characteristic properties from gelatin/CM-chitosan for culturing mesenchymal stem cells (adipose tissue).

Methods: Hydrogels from gelatin/CM-chitosan mixtures with the different weight ratios of 10/0, 9/1, 8/2, and 7/3 were prepared by γ -ray irradiation-crosslinking. After irradiating, the hydrogels were determined the gel fraction and equilibrium water swelling

by the weighing; and scanning electron microscope (SEM) images of scaffolds were taken after freeze-drying to determine the porous structures.

Results: It was determined that the dose of 30 – 35 kGy is necessary to prepare the hydrogels with gel fraction of 72 - 84%; equilibrium water swelling of 4.9 – 12 g/g after 10 hours immersing; the porous size of 100 – 350 μm . The hydrogel derived from the gelatin/CM-chitosan mixture of 9/1 ratio has a high gel fraction ($\sim 84\%$), equilibrium swelling of ~ 5.8 g/g, and porous size of 120 – 250 μm , met the requirements for use as a mesenchymal stem cell culture scaffold.

Conclusion: The hydrogel scaffolds were prepared from the different ratios of gelatin/CM-chitosan by crosslinked-irradiation and their properties were characterized after freeze-drying. Amongst all the studied samples, the hydrogel gelatin/CM-chitosan with the ratio of 9/1 (13.5 g/1.5 g/100 ml water) attained the highest gel content ($\sim 84\%$), the water absorption degree (5.8 g/g), and the porous size was suitable for use as a scaffold for tissue culture. However, the other important properties of the hydrogel scaffold should be further investigated.

Keyword: *Gelatin, carboxymethyl-chitosan, hydrogel, gamma irradiation.*