

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

NGUYỄN TIẾN THỊNH

**NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ IN SITU HYDROGEL
COMPOSITE TRÊN NỀN GELATINE VÀ
CHITOSAN/ALGINATE/CHONDROITIN SULFATE ĐỊNH
HƯỚNG TRONG TÁI TẠO XƯƠNG**

Chuyên ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 62440114

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ HÓA HỌC

TP. HỒ CHÍ MINH – 2023

Công trình được hoàn thành tại: Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng - Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Người hướng dẫn khoa học 1: PGS.TS. Trần Ngọc Quyển

Người hướng dẫn khoa học 2: PGS.TS. Nguyễn Đại Hải

Phản biện 1: ...

Phản biện 2: ...

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện, họp tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng - Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi ... giờ ..', ngày ... tháng ... năm 20....

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ.
- Thư viện Quốc gia Việt Nam.

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của luận án:

Thương tật do chấn thương đang ở mức cao chưa từng thấy trên toàn cầu, là nguyên nhân đứng hàng thứ 4 gây tử vong ở mọi độ tuổi (6%). Tuy nhiên, vài thập kỷ qua cũng chứng kiến những tiến bộ vượt bậc trong lĩnh vực chăm sóc sức khỏe xương khớp [1]. Hiện nay, vật liệu y sinh đang được chú trọng phát triển để dần thay thế cho những vật liệu truyền thống dùng trong cấy ghép như kim loại, hợp kim,... do những vật liệu này có tính chất cơ lý khác biệt nhiều so với xương. Kỹ thuật mô xương (bone tissue engineering – BTE) thiết kế các khung nền có cấu trúc tương tự như khung cấu trúc của xương như khung nền hydrogel. Hydrogel được cấu tạo từ các chuỗi polymer ưa nước có cấu trúc ba chiều, có thể cung cấp môi trường dinh dưỡng phù hợp cho sự phát triển của tế bào nội sinh do có thể bắt chước chất nền ngoại bào (ECM) tự nhiên của xương. Tuy nhiên, bản chất mềm dẻo của hydrogel khiến nó không thích hợp cho các trường hợp cần độ bền cơ học cao. Do đó, việc thiết kế vật liệu hydrogel tổng hợp có các ưu điểm của hydrogel và các vật liệu phụ, có thể nâng cao tính năng cơ học của hydrogel mà không ảnh hưởng đến các đặc tính có lợi của chúng. Các nhà khoa học đã hướng tới nghiên cứu vật liệu cấy ghép tái tạo trên cơ sở các vật liệu hydrogel composite chứa biphasic calcium phosphate (BCP), vì BCP có tính tương hợp sinh học, hoạt tính sinh học cao và khả năng chữa lành xương do thành phần tương tự thành phần khoáng trong xương. Ngoài ra, BCP có khả năng hòa tan từ từ trong cơ thể để giải phóng ion Ca^{2+} và PO_4^{3-} có lợi trong việc hình thành và phát triển tế bào xương. Tuy nhiên, BCP ở dạng bột với kích thước hạt lớn, khó có thể cung cấp khoáng cho xương [2].

Dựa vào những ưu điểm của khung nền hydrogel, kết hợp với khả năng cung cấp ion Ca^{2+} và PO_4^{3-} để hình thành khoáng xương từ các hạt nano BCP, đề tài “Nghiên cứu điều chế in situ hydrogel composite trên nền gelatine và chitosan/alginate/chondroitin sulfate định hướng trong tái tạo xương” được lựa chọn để nghiên cứu.

Mục tiêu nghiên cứu của luận án:

Nghiên cứu tổng hợp vật liệu mới trên nền gelatine với polysaccharide (chitosan, alginate, chondroitin sulfate) kết hợp với

các hạt nano biphasic calcium phosphate để tạo ra vật liệu có khả năng tương hợp sinh học, kích thích sự phát triển xương, có thời gian suy giảm phù hợp với thời gian xương phát triển để có thể ứng dụng trong lĩnh vực tái tạo xương

Bố cục của luận án: luận án gồm phần Mở đầu, kết luận, kiến nghị và 3 chương (Chương 1: Tổng quan, Chương 2: Nghiên cứu, Chương 3: Kết quả và biện luận). Luận án có 6 bảng số liệu, 53 hình vẽ và đã có 3 công trình có liên quan được công bố. Phần phụ lục bao gồm 13 hình vẽ và bảng số liệu.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Xương và điều trị các vấn đề liên quan đến xương

Xương là những bộ phận rắn bên trong tạo thành một bộ khung vững chắc có nhiệm vụ nâng đỡ, bảo vệ, vận động, tạo huyết và là kho dự trữ chất khoáng (calci và phospho) mà khi cần cơ thể có thể huy động lấy ra [3].

Hiện nay, các phương pháp phổ biến điều trị các vấn đề liên quan đến xương là dùng vật liệu và thiết bị cố định xương gãy (titan, hợp kim titan, thép không gỉ, vật liệu composite gốc polymer, bioceramic,...); ghép xương (ghép xương tự thân, ghép xương đồng loại, ghép xương dị loại,...). Một số vật liệu như ceramic, kim loại, polymer, hydrogel,... cũng có thể được dùng để làm vật liệu thay thế trong cấy ghép xương [9,10].

1.2. Hydrogel

Hydrogel là polymer có cấu trúc mạng lưới không gian có nhiều tính chất quan trọng như khả năng hấp thụ nước cao, khả năng giảm cấp sinh học và khả năng tương thích sinh học. Cấu trúc và thành phần của hydrogel có thể được biến đổi tùy theo vật liệu ban đầu hay quy trình tổng hợp. Do đó, hydrogel là nguyên liệu tiềm năng trong lĩnh vực vật liệu y sinh.

Hydrogel có thể được điều chế từ các polymer tự nhiên (gelatin, chitosan, chondroitin sulfate,...), tổng hợp hoặc bán tổng hợp [20]. Các polymer tự nhiên thường có khả năng tương thích sinh học và khả năng phân hủy sinh học tốt, và hầu hết đều hòa tan trong nước. Hầu hết chúng là thành phần tự nhiên của chất nền ngoại bào (ECM), bề mặt thân nước cho phép các tế bào dễ dàng bám dính, tăng sinh và phân hóa. Hydrogel có thể tổng hợp bằng liên kết ngang vật lý (gel hóa vật lý) hoặc bằng liên kết ngang hóa học (gel hóa hóa học).

Trong đó, phương pháp Horseradish peroxidase (HRP) được sử dụng gần đây trong tổng hợp in situ nhiều loại hydrogel.

1.3. Hydrogel composite

Vật liệu composite là vật liệu tổng hợp từ hai hay nhiều vật liệu khác nhau tạo lên vật liệu mới kết hợp được các tính năng của những vật liệu ban đầu. Việc tổng hợp các hydrogel composite kết hợp được các đặc tính tốt của mạng polymer và các vật liệu phụ có thể nâng cao tính cơ học của hydrogel mà không làm ảnh hưởng đến các tính chất có lợi của chúng.

Vật liệu hydrogel composite dẫn tạo xương là các vật liệu mà đặc tính hóa lý của nó có thể kích thích sự phát triển của tế bào và hướng dẫn quá trình lành xương. Trong các chất độn thường được sử dụng để tạo hydrogel composites, BCP được quan tâm nghiên cứu do BCP ảnh hưởng tốt đến quá trình tái tạo xương hơn HAp hoặc β -TCP đơn lẻ. BCP có tốc độ tan phù hợp với thời gian tái tạo của xương và có khả năng kích thích tạo xương.

1.4. Những nghiên cứu trước đây

Trong nước: Năm 2011, Nhóm nghiên cứu của Trần Ngọc Quyền đã điều chế được gel hình thành tại chỗ của dẫn xuất chitosan là rutin-tyramine-chitosan-PEG dưới sự hiện diện của enzyme horseradish peroxidase (HRP) và hydrogen peroxide (H_2O_2) và áp dụng cho điều trị vết thương ở da [2]. Năm 2014, Nguyen và các cộng sự đã tổng hợp hydrogel composite Hyaluronic acid (HyA)-Gelatin (Gel)/biphasic calcium phosphate (BCP) ứng dụng trong tái tạo xương. Năm 2015, Nguyễn Thị Phương, Viện Khoa học Vật liệu và Ứng dụng đã tiến hành 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) ứng dụng trong tái tạo xương [3].

Ngoài nước: Một số công trình nghiên cứu ngoài nước:

- Barbani và cộng sự (2012) vật liệu composite trên cơ sở Hydroxyapatite/gelatin/gellan dùng trong lĩnh vực tái tạo xương Hunter và cộng sự (2013) đánh giá sự phát triển và biệt hóa tế bào gốc xương người trong điều kiện nuôi cấy (in vitro) của hydroxyapatite, chitosan, gelatin trong tái tạo xương
- Pasqui và cộng sự (2014) nghiên cứu carboxymethyl cellulose/Hap composite ứng dụng làm vật liệu cho xương

- Derakhshan với các cộng sự (2015) đã điều chế hydrogel dựa trên chondroitin sulfate kết hợp với hydroapatite
- Bhasham cùng các cộng sự (2019) đã phát triển hệ hydrogel chitosan và chondroitin sulfate kết hợp với thủy tinh sinh học với kích thước nano nhằm khắc phục những khuyết điểm về tính cơ lý và thiếu sự ổn định trong cấu trúc của chitosan

CHƯƠNG 2: NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Tổng hợp vật liệu: điều chế và khảo sát các đặc tính của các hạt khoáng nano BCP.
- Tổng hợp và đánh giá cấu trúc, hình thái của các hydrogel và hydrogel nanocomposite gelatin-tyramin (GTA).
- Tổng hợp và đánh giá cấu trúc, hình thái của các hydrogel và hydrogel nanocomposite chitosan 4-hydroxyphenylacetic acid (CHPA).
- Tổng hợp và đánh giá cấu trúc, hình thái của các hydrogel và hydrogel nanocomposite alginate-tyramin (ATA).
- Tổng hợp và đánh giá cấu trúc, hình thái của các hydrogel và hydrogel composite chondroitin sulfate-tyramin (CDTA).
- Nghiên cứu tổng hợp và xác định các tính chất của hydrogel và hydrogel nanocomposite trên nền GTA với từng loại vật liệu CHPA, ATA, CDTA với các tỉ lệ khác nhau.
- Đánh giá khả năng tạo khoáng của hydrogel và hydrogel nanocomposite trên nền GTA với từng loại vật liệu CHPA, ATA, CDTA với các tỉ lệ khác nhau.
- So sánh giảm cấp, tương hợp sinh học và khoáng hóa của 3 nền hydrogel.nanocomposite.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

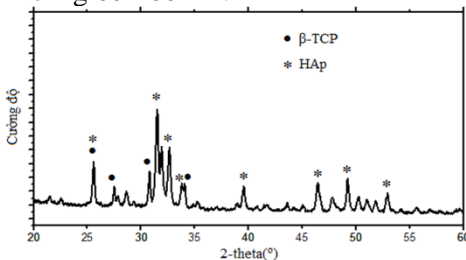
- Tổng hợp BCP bằng phương pháp siêu âm với tỉ lệ Ca/P: 1.57 và pH = 7. Sử dụng phương pháp phân tích XRD để xác định thành phần, cấu trúc. Phương pháp SEM để xác định hình thái, kích thước các hạt khoáng BCP.
- Tổng hợp các hydrogel GTA, CHPA, ATA, CDTA bằng phương pháp pha trộn dùng enzyme HRP và H₂O₂
- Xác định hàm lượng của TA trong hydrogel GTA, ATA, CDTA bằng phương pháp UV-Vis.

- Tổng hợp các hydrogel nanocomposite GTA/BCP, CHPA-GTA/BCP, GTA-ATA/BCP, GTA-CDTA/BCP bằng phương pháp pha trộn dùng enzyme HRP và H₂O₂.
- Cấu trúc sản phẩm được xác định bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR và quang phổ hồng ngoại biến đổi FT-IR.
- Khảo sát hình thái của hydrogel và hydrogel nanocomposite bằng máy FESEM
- Khảo sát thời gian gel hóa của hydrogel và hydrogel nanocomposite đến khi tạo thành một khối gel đông đặc và khi đảo ngược vật liệu không chảy xuống trong 1 phút
- Khảo sát khối lượng suy giảm của hydrogel và hydrogel nanocomposite trong môi trường giả sinh học (dung dịch PBS chứa enzyme collagenase)
- Đánh giá khả năng khoáng hóa của hydrogel và hydrogel nanocomposite bằng phương pháp đo EDS
- Đánh giá độc tính tế bào trên vật liệu hydrogel nanocomposite

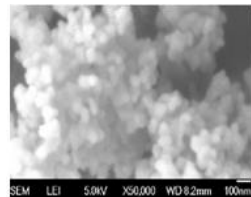
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1. Kết quả tổng hợp BCP

Phân tích cấu trúc pha của BCP bằng phương pháp nhiễu xạ XRD cho thấy với tỉ lệ mol Ca/P = 1,57 tại pH = 7 thì BCP (β -TCP và HAp) đã được tổng hợp thành công. Kết quả hình thái của BCP sau khi tổng hợp được quan sát bằng SEM cho thấy sản phẩm có kích thước nano, kích thước các hạt tương đối đồng đều và nằm trong khoảng 60-100 nm.



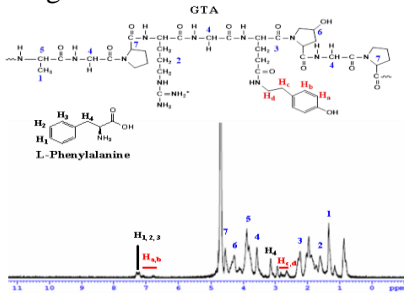
Hình 0.1. Giảm đồ XRD của BCP với tỉ lệ mol Ca/P = 1,57 tại pH = 7



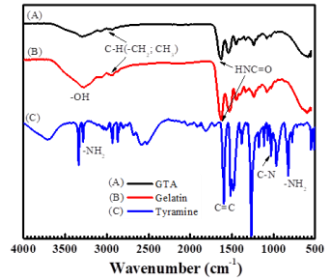
Hình 0.2. Hình SEM của BCP

3.2. Kết quả tổng hợp GTA

- Phổ $^1\text{H-NMR}$ của GTA trong D_2O và kết quả phổ FTIR của Gelatin, Tyramine và GTA chứng tỏ GTA đã được tổng hợp thành công.



Hình 0.3. Phổ $^1\text{H-NMR}$ GTA trong D_2O



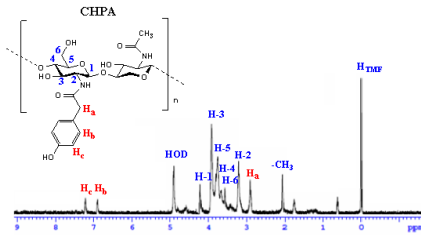
Hình 0.4. Phổ FTIR của GTA

- Kết quả đo độ hấp thụ A của TA và GTA thu được bằng UV-Vis ($\lambda = 275 \text{ nm}$) cho thấy lượng H_2O_2 tối thiểu cần phản ứng với TA trong 10 mg GTA để tạo gel là 0,014% trong dung dịch GTA 10% (không cao hơn 0,25% vì sẽ gây độc đối với tế bào)

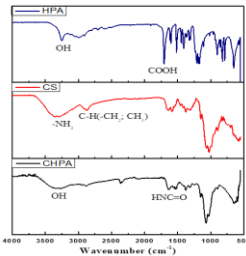
3.3. Kết quả tổng hợp CHPA

3.3.1. Xác định cấu trúc các sản phẩm

- Phổ $^1\text{H-NMR}$ của CHPA trong D_2O và kết quả phổ FTIR của CHPA chứng tỏ CHPA đã được tổng hợp thành công.



Hình 0.6. Phổ $^1\text{H-NMR}$ CHPA trong D_2O



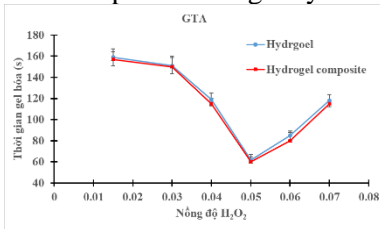
Hình 0.7. Phổ FTIR CHPA

- Kết quả đo độ hấp thụ A của HPA và CHPA thu được bằng UV-Vis ($\lambda = 275 \text{ nm}$) cho thấy lượng H_2O_2 tối thiểu cần phản ứng với HPA trong 10 mg CHPA để tạo gel là 0,046% trong dung dịch CHPA 5% (không cao hơn 0,25% vì sẽ gây độc đối với tế bào)

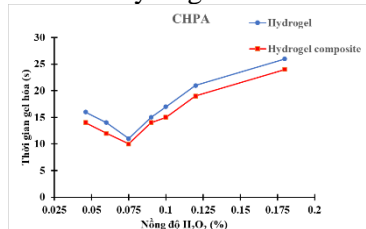
3.3.2. Kết quả khảo sát các tính chất của hydrogel và hydrogel nanocomposite CHPA-GTA/BCP

Thời gian gel hóa

- Kết quả cho thấy, thời gian gel hóa của hydrogel GTA biến thiên khá lớn. Khi tăng nồng độ H_2O_2 từ đến 0,05%, quá trình hình thành gel tăng tương ứng với thời gian tạo gel giảm. Với nồng độ H_2O_2 từ 0,05 đến 0,07% quá trình hình thành gel chậm dần tương ứng với thời gian gel hóa tăng. Thời gian tạo gel của hydrogel nanocomposite không thay đổi nhiều so với hydrogel.

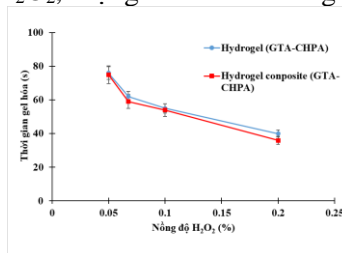


Hình 3.9. Thời gian tạo gel của hydrogel và hydrogel nanocomposite GTA với nồng độ HRP 0,05 mg/mL



Hình 0.5. Thời gian tạo gel của hydrogel và hydrogel nanocomposite CHPA với nồng độ HRP 0,07 mg/mL

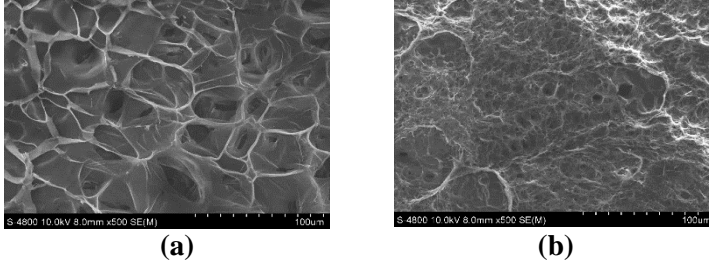
- Kết quả khảo sát thời gian gel hóa của hydrogel và hydrogel composite CHPA trên nền GTA với tỉ lệ 1:1 với nồng độ HRP 0,07 mg/ml cho thấy thời gian gel hóa của hydrogel khá nhanh trong vài phút, và lượng H_2O_2 , lượng HRP ảnh hưởng đến thời gian tạo gel.



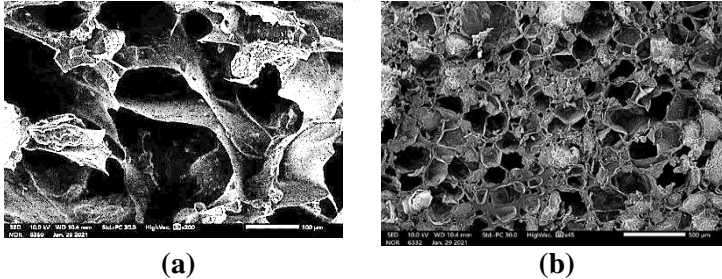
Hình 3.11. Thời gian tạo gel của hydrogel và hydrogel composite CHPA trên nền GTA với tỉ lệ 1:1 với nồng độ HRP 0,07 mg/mL

Hình thái của hydrogel CHPA-GTA và hydrogel composite CHPA-GTA/BCP với tỷ lệ 1:1 và 1:2

- Kết quả hình SEM với độ phóng đại 100 μm cho thấy cấu trúc của vật liệu bao gồm nhiều lỗ xốp với cấu trúc không gian ba chiều, kích thước của lỗ xốp khoảng 30-50 μm . Đối với hydrogel composite, những hạt BCP bao phủ trên bề mặt của vật liệu.



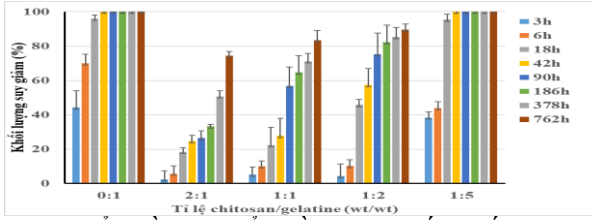
Hình 0.6. Hình SEM hydrogel CHPA-GTA tỉ lệ 1:1 (a) và 1:2 (b)



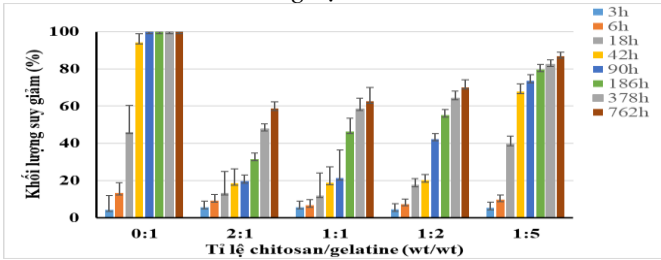
Hình 3.13. Hình SEM (a) của hydrogel composite CHPA-GTA/BCP tỉ lệ 1:1 (a) và 1:2 (b)

Khối lượng suy giảm của hydrogel CHPA-GTA và hydrogel composite CHPA-GTA/BCP

- Kết quả thể hiện ở biểu đồ 4.1 cho thấy hydrogel GTA có thời gian giảm cấp rất nhanh trong 42 giờ. Còn đối với hydrogel CHPA trên nền GTA, khi tăng tỉ lệ CHPA lên thì sự suy giảm khối lượng càng chậm (với tỉ lệ 2:1 suy giảm 89,5% trong 762h). Khi cho thêm các hạt BCP vào (biểu đồ 4.2) sự suy giảm khối lượng diễn ra chậm hơn so với hydrogel.



Biểu đồ 0.1. Biểu đồ% giảm cấp khối lượng của hydrogel CHPA trên nền GTA theo các tỉ lệ (C/G) trong dung dịch PBS

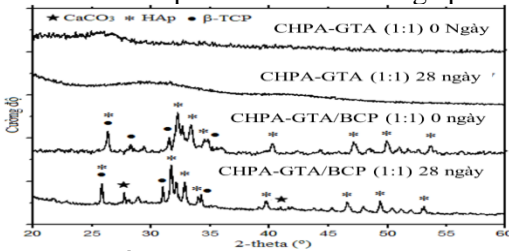


Biểu đồ 0.2. Biểu đồ% giảm cấp khối lượng của hydrogel composite CHPA trên nền GTA theo các tỉ lệ (C/G) trong dung dịch PBS

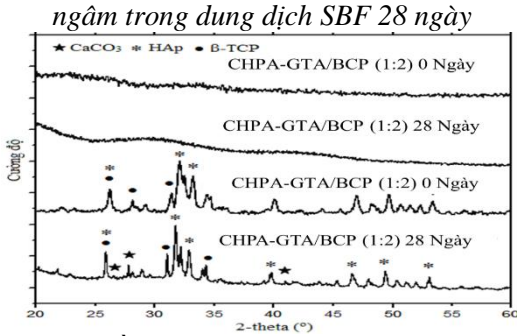
Đánh giá khả năng tạo khoáng của hydrogel CHPA-GTA và hydrogel composite CHPA-GTA/BCP

• Giảm độ nhiễu xạ XRD

- Phân tích cấu trúc của hydrogel CHPA-GTA (1:1), GTA-CHPA (1:2) và hydrogel composite CHPA-GTA/BCP (1:1), CHPA-BCP/BCP (1:2) trước và sau khi ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày cho thấy hydrogel composite GTA-CHPA/BCP có hiệu quả trong quá trình hình thành và phát triển của khoáng aptite carbonate.



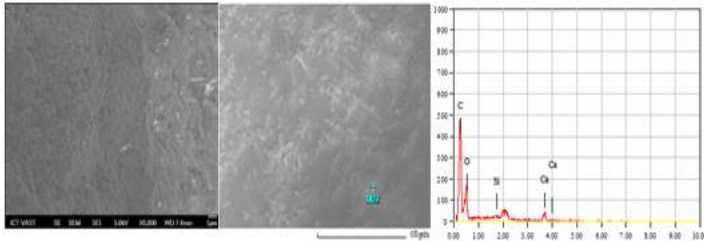
Hình 3.14. Giảm độ nhiễu xạ XRD của hydrogel CHPA- GTA (1:1) và hydrogel composite CHPA- GTA/BCP (1:1) trước và sau khi



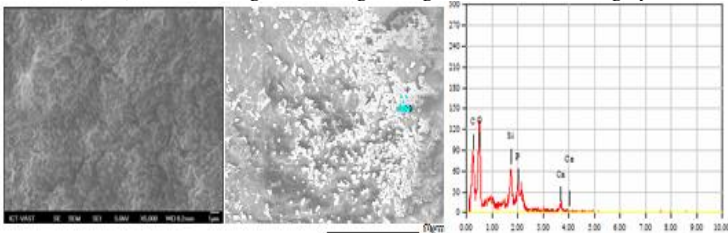
Hình 0.7. Giảm độ XRD của hydrogel CHPA- GTA (1:2) và hydrogel composite CHPA- GTA/BCP (1:2) trước và sau khi ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày

- **Khảo sát sự hình thành khoáng appatite carbonate**

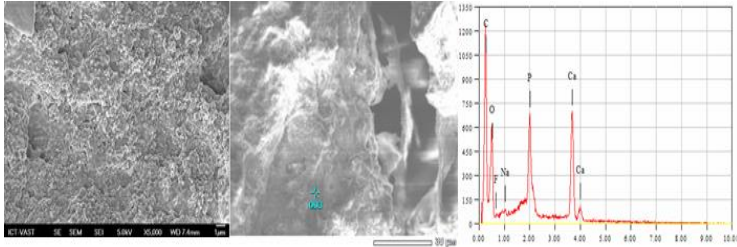
- Từ các kết quả phân tích EDS (hình 3.16, 3.17, 3.18, 3.19) cho thấy hydrogel composite CHPA-GTA/ BCP (1:1) và CHPA-GTA/ BCP (1:2) cho kết tạo khoáng cao hơn nhiều so với hydrogel CHPA-GTA (1:1) và CHPA-GTA (1:2).



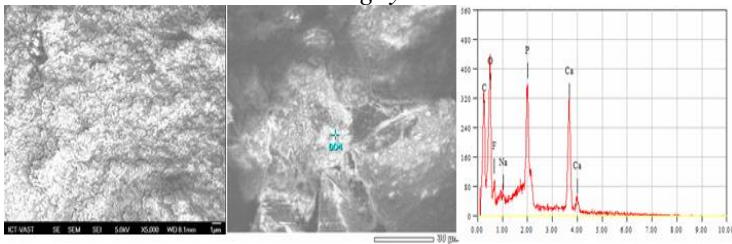
Hình 0.8. Kết quả SEM và EDS của hydrogel CHPA-GTA (1:1) sau khi ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày



Hình 0.9. Kết quả SEM và EDS của hydrogel CHPA-GTA (1:2) sau khi ngâm trong dung dịch SBF trong 28 ngày

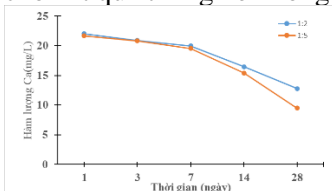


Hình 0.10. SEM và EDS của hydrogel composite GTA-CHPA/BCP-1G:1C sau khi ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày

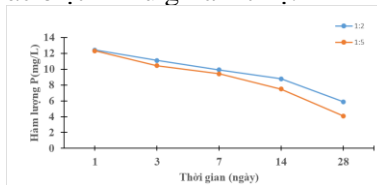


Hình 0.11. SEM và EDS của hydrogel composite GTA-CHPA/BCP-2G:1C sau khi ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày

- Khảo sát hàm lượng Ca, P trong dung dịch SBF
 - Khảo sát hàm lượng Ca, P trong dung dịch SBF sau khi ngâm hydrogel composite cho thấy sau 1 ngày lượng ion Ca, P tăng lên, sau đó lượng Ca, P giảm đều xuống. Các mẫu hydrogel composite cho kết quả thống kê không khác biệt nhiều giữa 2 tỉ lệ.



Hình 3.20. Hàm lượng Ca trong dung dịch SBF ngâm hydrogel composite trong 28 ngày với tỉ lệ 1:1 và 1:2



Hình 3.21. Hàm lượng P trong dung dịch SBF ngâm hydrogel composite trong 28 ngày với tỉ lệ 1:1 và 1:2

Kết luận: Từ kết quả phân tích EDS, XRD và ICP cho thấy vật liệu hydrogel composite CHPA-GTA/BCP có khả năng tạo khoáng và

hình thành apatite có ảnh hưởng với xương tốt hơn so với hydrogel CHPA-GTA.

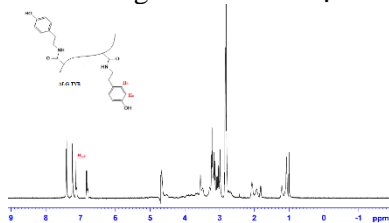
- Đánh giá độc tính tế bào:

- Dựa trên kết quả MTT và ảnh chụp huỳnh quang cho thấy, vật liệu hydrogel composite an toàn, không gây độc tính tế bào sau khi phân hủy.

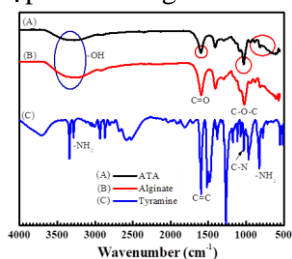
3.4. Kết quả tổng hợp ATA

3.4.1. Xác định cấu trúc các sản phẩm

- Phổ $^1\text{H-NMR}$ của CHPA trong D_2O và kết quả phổ FTIR của ATA chứng tỏ ATA đã được tổng hợp thành công



Hình 0.12. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của ATA trong D_2O



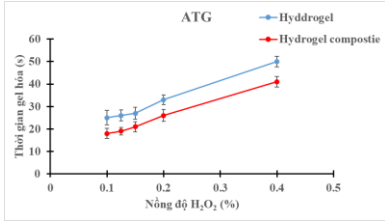
Hình 0.13. Kết quả phổ FTIR của ATA

- Kết quả đo độ hấp thụ (A) của TA trong ATA bằng UV-Vis ($\lambda = 275 \text{ nm}$) cho thấy lượng H_2O_2 tối thiểu cần phản ứng với TA trong 10 mg ATA để tạo gel là 0,012% trong dung dịch ATA 10% (không cao hơn 0,25% vì sẽ gây độc đối với tế bào)

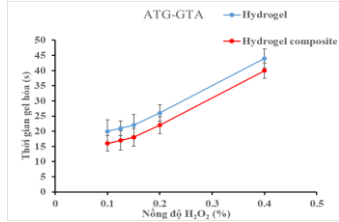
3.4.2. Kết quả khảo sát các tính chất của hydrogel và hydrogel nanocomposite ATA-GTA/BCP

Thời gian gel hóa

- Kết quả cho thấy thời gian gel hóa của hydrogel khá nhanh trong vài phút và thay đổi theo nồng độ H_2O_2 , hydrogel nanocomposite có thời gian tạo gel diễn ra nhanh hơn so với hydrogel.



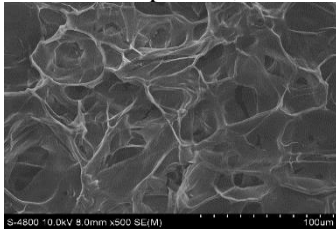
Hình 3.27. Thời gian tạo gel của hydrogel và hydrogel nanocomposite ATA với nồng độ HRP 0,0125mg/ml mg/mL



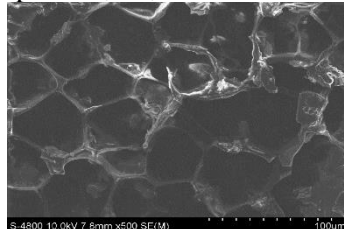
Hình 3.28. Thời gian tạo gel của hydrogel và hydrogel nanocomposite ATA trên nền GTA với nồng độ HRP 0,0125mg/ml

Hình thái của hydrogel ATA-GTA và hydrogel nanocomposite ATA-GTA/BCP

- Kết quả hình SEM với độ phóng đại 100 μ m cho thấy cấu trúc của vật liệu bao gồm nhiều lỗ xốp với cấu trúc không gian ba chiều, kích thước của lỗ xốp khoảng 20-40 μ m. Trong trường hợp hydrogel nanocomposite, hình SEM cho thấy xuất hiện các hạt nano BCP phủ đều trên khắp bề mặt cấu trúc xốp của vật liệu.

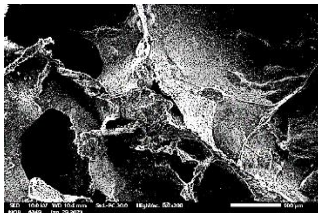


(a)

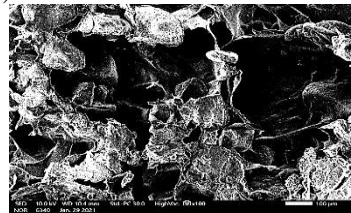


(b)

Hình 0.29. Hình SEM hydrogel ATA-GTA tỉ lệ 1:1 (a) và 1:2 (b)



(a)

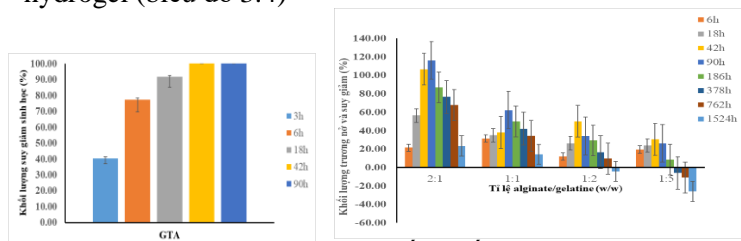


(b)

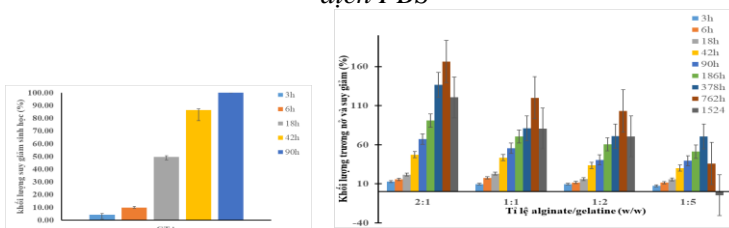
Hình 3.30. Hình SEM (a) của hydrogel nanocomposite ATA-GTA/BCP tỉ lệ 1:1 (a) và 1:2 (b)

Khối lượng suy giảm của hydrogel CHPA-GTA và hydrogel nanocomposite CHPA-GTA/BCP

- Kết quả khảo sát khối lượng suy giảm so sánh GTA so với hydrogel của ATA trên nền GTA cho thấy hydrogel GTA suy giảm sinh học rất nhanh. Với hydrogel nanocomposite khi cho thêm các hạt BCP vào sự suy giảm khối lượng diễn ra chậm hơn so với hydrogel (biểu đồ 3.4)



Biểu đồ 3.3. Biểu đồ% giảm cấp khối lượng của hydrogel GTA và ATA trên nền GTA theo các tỉ lệ (A/G) trong dung dịch PBS

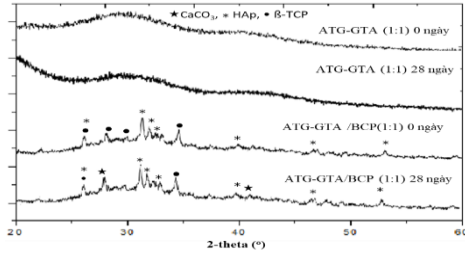


Biểu đồ 3.4. Biểu đồ % khối lượng phân hủy sinh học hydrogel nanocomposite GTA và ATA trên nền GTA theo các tỉ lệ (A/G) trong dung dịch PBS

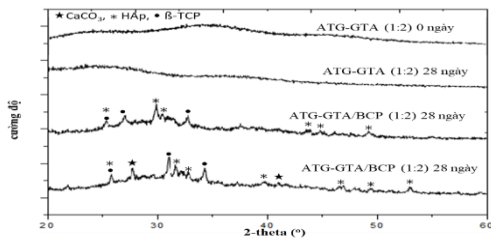
Đánh giá khả năng tạo khoáng của hydrogel ATA-GTA và hydrogel nanocomposite ATA-GTA/BCP

• Giảm độ nhiễu xạ XRD

- Phân tích cấu trúc của hydrogel CHPA-GTA (1:1), GTA-CHPA (1:2) và hydrogel nanocomposite CHPA-GTA/BCP (1:1), CHPA-BCP/BCP (1:2) trước và sau khi ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày cho thấy cho thấy hydrogel nanocomposite ATA-GTA/BCP có hiệu quả trong quá trình hình thành và phát triển của khoáng apatite carbonate.



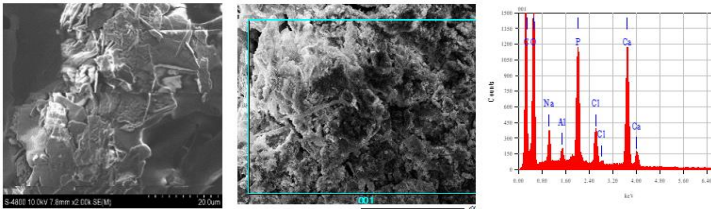
Hình 3.31. Giảm đồ XRD của hydrogel ATA- GTA (1:1) và hydrogel nanocomposite ATA- GTA/BCP (1:1) trước và sau khi ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày

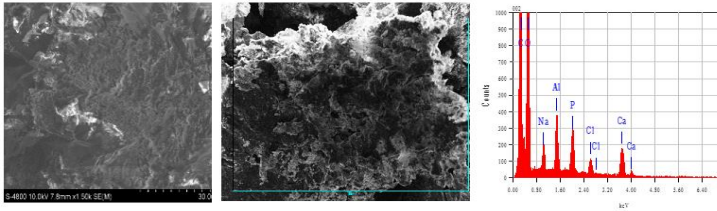


Hình 3.32. Giảm đồ XRD của hydrogel ATA- GTA (1:2) và hydrogel nanocomposite ATA- GTA/BCP (1:2) trước và sau khi ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày

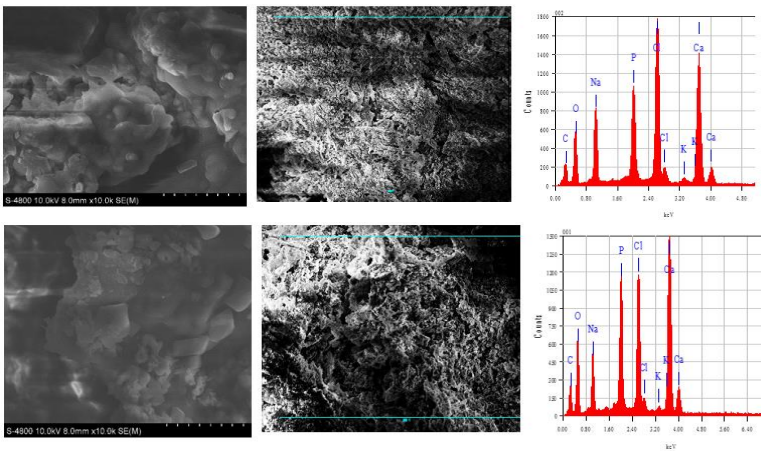
- **Khảo sát sự hình thành khoáng apatite carbonate**

- Từ các kết quả phân tích EDS cho thấy hydrogel nanocomposite ATA-GTA/ BCP (1:1) và ATA-GTA/ BCP (1:2) cho kết tạo khoáng cao hơn nhiều so với hydrogel ATA-GTA (1:1) và ATA-GTA (1:2).





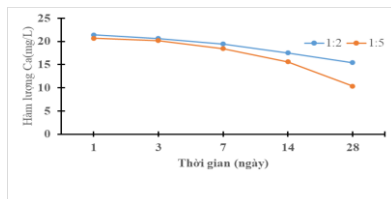
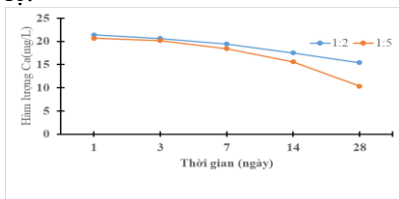
Hình 3.33. Kết quả SEM và EDS của hydrogel ATA-GTA (1:1) và ATA-GTA (1:2) sau khi ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày



Hình 3.34. Kết quả SEM và EDS của hydrogel ATA-GTA (1:1) và ATA-GTA (1:2) sau khi ngâm trong dung dịch SBF trong 28 ngày

- Khảo sát hàm lượng Ca, P trong dung dịch SBF

- Khảo sát hàm lượng Ca, P trong dung dịch SBF sau khi ngâm hydrogel nanocomposite cho thấy sau 1 ngày lượng ion Ca, P tăng lên, sau đó lượng Ca, P giảm đều xuống. Các mẫu hydrogel nanocomposite cho kết quả thống kê không khác biệt nhiều giữa 2 tỉ lệ.



Hình 3.35. Hàm lượng Ca trong dung dịch SBF ngâm hydrogel nanocomposite trong 28 ngày với tỉ lệ 1:1 và 1:2

Hình 0.14. Hàm lượng P trong dung dịch SBF ngâm hydrogel nanocomposite trong 28 ngày với tỉ lệ 1:1 và 1:2

Kết luận: Từ kết quả phân tích EDS, XRD và ICP cho thấy vật liệu hydrogel nanocomposite ATA-GTA/BCP có khả năng tạo khoáng và hình thành apatite có ảnh hưởng với xương tốt hơn so với hydrogel ATA-GTA.

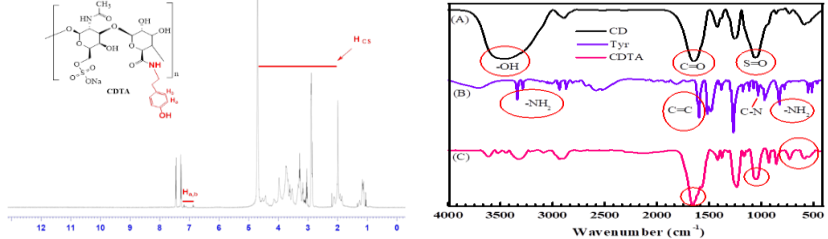
- Đánh giá độc tính tế bào:

- Dựa trên kết quả MTT và ảnh chụp huỳnh quang cho thấy, vật liệu hydrogel nanocomposite an toàn, không gây độc tính tế bào sau khi phân hủy.

3.5. Kết quả tổng hợp CDTA

3.5.1. Xác định cấu trúc các sản phẩm

- Phổ $^1\text{H-NMR}$ của CDTA trong D_2O và kết quả phổ FTIR của CDTA chứng tỏ CDTA đã được tổng hợp thành công.



Hình 3.39. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của GTA trong D_2O

Phổ FT-IR của CD_Tyr. (A) CD; (B) Tyr; (C) CDTA

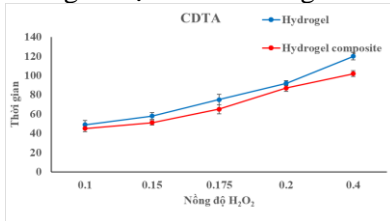
- Kết quả đo độ hấp thụ A của TA và CDTA thu được bằng UV-Vis ($\lambda = 275 \text{ nm}$) lượng H_2O_2 tối thiểu cần phản ứng với TA trong 10 mg CDTA để tạo gel là 0,014% trong dung dịch CDTA 10% (không cao hơn 0,25% vì sẽ gây độc đối với tế bào)

3.5.2. Kết quả khảo sát các tính chất của hydrogel và hydrogel nanocomposite CDTA-GTA/BCP

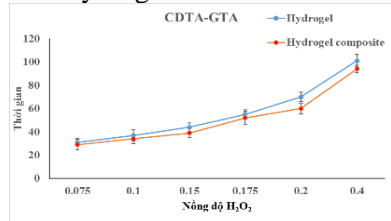
Thời gian gel hóa

- Đồ thị cho thấy thời gian gel hóa của hydrogel khá nhanh trong vài phút, và lượng H_2O_2 , lượng HRP ảnh hưởng đến thời gian tạo gel. Đối với hydrogel nanocomposite CDTA-GTA /BCP (1:1) thời

gian hình thành gel nhanh hơn từ 29 đến 94 giây, nhưng nhìn chung không có sự biến đổi đáng kể khi so với hydrogel.



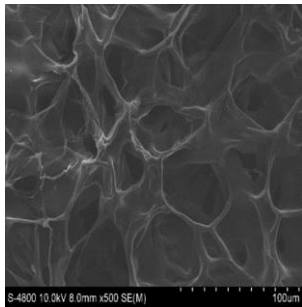
Hình 3.42. Thời gian tạo gel của hydrogel và hydrogel nanocomposite CDTA với nồng độ HRP 0,125 mg/mL



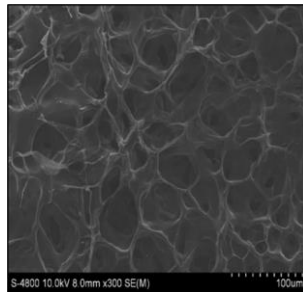
Hình 3.43. Thời gian tạo gel của hydrogel và hydrogel nanocomposite CDTA trên nền GTA với nồng độ HRP 0,0125mg/ml

Hình thái của hydrogel CDTA-GTA và hydrogel nanocomposite CDTA-GTA/BCP

- Qua kết quả hình SEM với độ phóng đại 100 μm cho thấy cấu trúc của vật liệu bao gồm nhiều lỗ xốp với cấu trúc không gian ba chiều, kích thước của lỗ xốp khoảng 20-40 μm . Trong trường hợp hydrogel nanocomposite. Hình SEM cho thấy xuất hiện các hạt nano BCP phủ đều trên khắp bề mặt cấu trúc xốp của vật liệu.

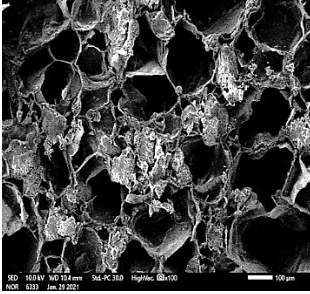


(a)

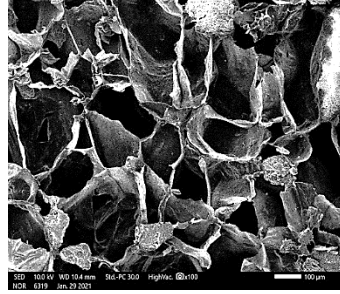


(b)

Hình 3.44. Hình SEM (a) hydrogel CDTA-GTA (1:2) ngày và (b) CDTA-GTA (2:1)



(a)



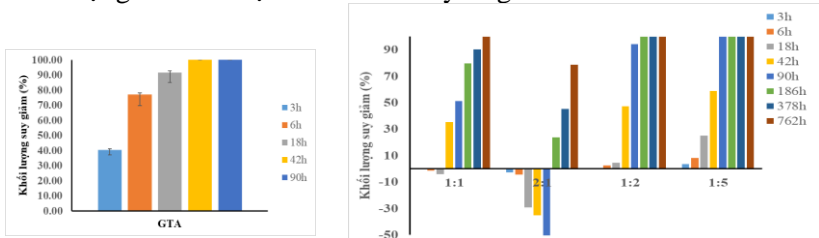
(b)

Hình 3.45. Hình SEM (a) hydrogel nanocomposite CDTA-

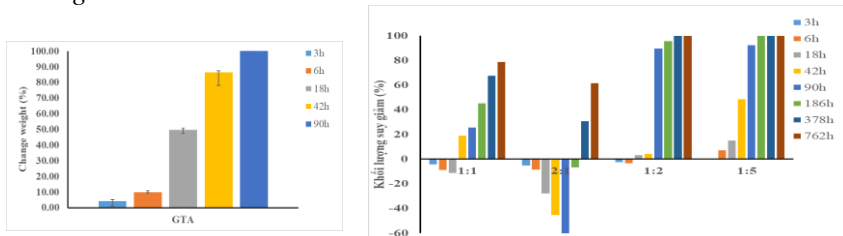
GTA (1:2) ngày và (b) CDTA-GTA (2:1)

Khối lượng suy giảm của của hydrogel CDTA-GTA và hydrogel nanocomposite CDTA-GTA/BCP

- Kết quả so sánh giữa 2 biểu đồ hydrogel và hydrogel nanocomposite cho thấy, khi cho thêm các hạt BCP vào sự suy giảm khối lượng diễn ra chậm hơn so với hydrogel



Biểu đồ 4.5. Biểu đồ% giảm cấp khối lượng của hydrogel CDTA trên nền GTA theo các tỉ lệ (CD/G) trong dung dịch PBS có enzyme collagenase

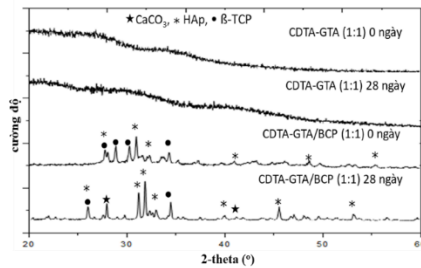


Biểu đồ 4.6. Biểu đồ% giảm cấp khối lượng của hydrogel nanocomposite GTA và CDTA trên nền GTA theo các tỉ lệ (A/G) trong dung dịch PBS

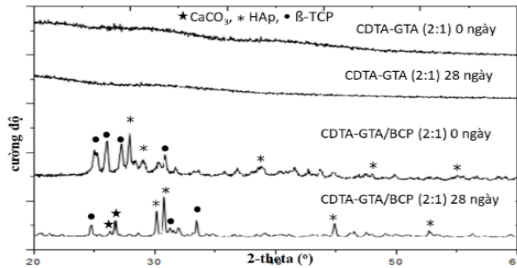
Đánh giá khả năng tạo khoáng của hydrogel CDTA-GTA và hydrogel nanocomposite CDTA-GTA/BCP

• **Giải đồ nhiễu xạ XRD**

- Phân tích cấu trúc của hydrogel CHPA-GTA (1:1), GTA-CHPA (1:2) và hydrogel nanocomposite CHPA-GTA/BCP (1:1), CHPA-BCP/BCP (1:2) trước và sau khi ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày cho thấy cho thấy hydrogel nanocomposite CDTA-GTA/BCP có hiệu quả trong quá trình hình thành và phát triển của khoáng aptite carbonate.



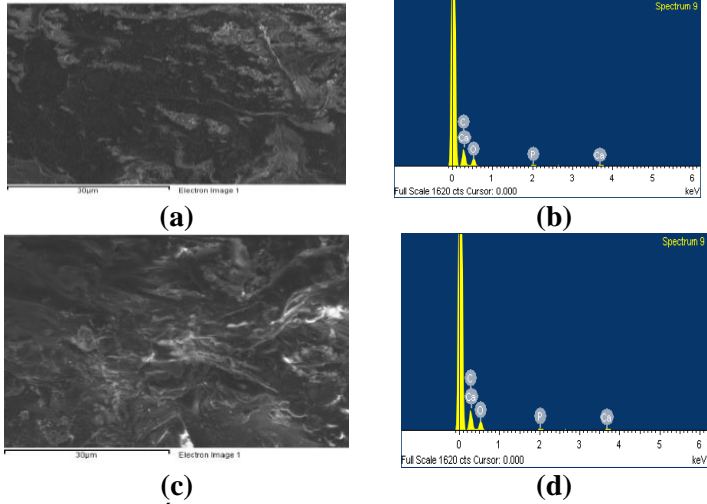
Hình 3.46. Giải đồ XRD của hydrogel CDTA- GTA (1:1) và hydrogel nanocomposite CDTA- GTA/BCP (1:2) trước và sau khi ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày



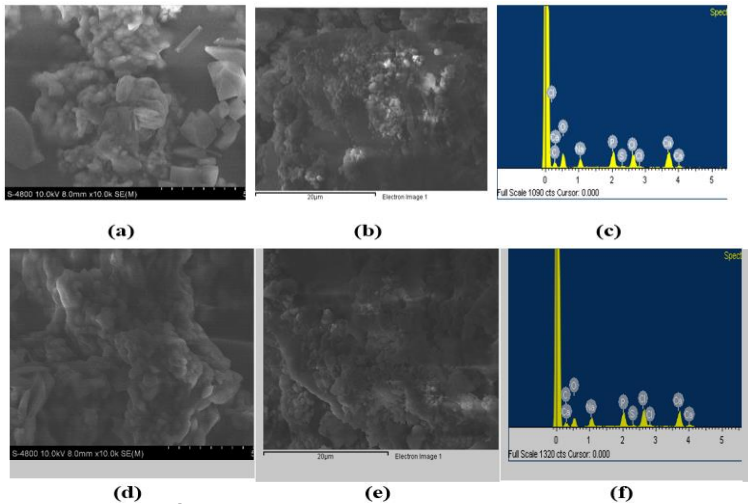
Hình 3.47. Giải đồ XRD của hydrogel CDTA- GTA (2:1) và hydrogel nanocomposite CDTA- GTA/BCP (2:1) trước và sau khi ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày

• **Khảo sát sự hình thành khoáng appatite carbonate**

- Kết quả phân tích EDS cho thấy hydrogel nanocomposite CDTA-GTA/BCP (1:1), CDTA-BCP/BCP (2:1) cho kết tạo khoáng cao hơn nhiều so với hydrogel CDTA-GTA (1:1), CDTA-GTA (2:1)



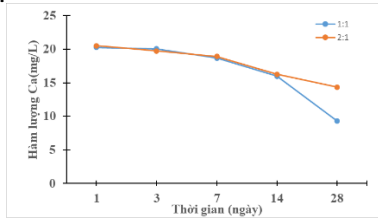
Hình 3.48. Kết quả SEM và EDS của hydrogel CDTA-GTA (1:1) và CDTA-GTA (2:1) sau khi ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày



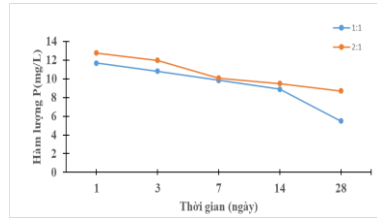
Hình 3.49. Kết quả SEM và EDS của hydrogel nanocomposite CDTA-GTA (1:1) và CDTA-GTA (2:1) sau khi ngâm trong dung dịch SBF trong 28 ngày

- Khảo sát hàm lượng Ca, P trong dung dịch SBF

- Khảo sát hàm lượng Ca, P trong dung dịch SBF sau khi ngâm hydrogel nanocomposite cho thấy sau 1 ngày lượng ion Ca, P tăng lên, sau đó lượng Ca, P giảm đều xuống. Các mẫu hydrogel nanocomposite cho kết quả thống kê không khác biệt nhiều giữa 2 tỉ lệ.



Hình 3.50. Hàm lượng Ca trong dung dịch SBF ngâm hydrogel nanocomposite trong 28 ngày với tỉ lệ 1:1 và 2:1



Hình 0.15. Hàm lượng P trong dung dịch SBF ngâm hydrogel nanocomposite trong 28 ngày với tỉ lệ 1:1 và 2:1

Kết luận: Từ kết quả phân tích EDS, XRD và ICP cho thấy vật liệu hydrogel nanocomposite CDTA-GTA/BCP có khả năng tạo khoáng và hình thành apatite có ảnh hưởng với xương tốt hơn so với hydrogel CDTA-GTA.

- Đánh giá độc tính tế bào:

- Dựa trên kết quả MTT và ảnh chụp huỳnh quang cho thấy, vật liệu hydrogel nanocomposite an toàn, không gây độc tính tế bào sau khi phân hủy.

KẾT LUẬN

- Tổng hợp vật liệu: điều chế và khảo sát các đặc tính của các hạt khoáng nano BCP.
- Tổng hợp và đánh giá cấu trúc, hình thái của các hydrogel và hydrogel nanocomposite gelatin-tyramin (GTA).
- Tổng hợp và đánh giá cấu trúc, hình thái của các hydrogel và hydrogel nanocomposite chitosan 4-hydroxyphenylacetic acid (CHPA).
- Tổng hợp và đánh giá cấu trúc, hình thái của các hydrogel và hydrogel nanocomposite alginate-tyramin (ATA).
- Tổng hợp và đánh giá cấu trúc, hình thái của các hydrogel và hydrogel nanocomposite chondroitin sulfate-tyramin (CDTA).

- Nghiên cứu tổng hợp và xác định các tính chất của hydrogel và hydrogel nanocomposite trên nền GTA với từng loại vật liệu CHPA, ATA, CDTA với các tỉ lệ khác nhau.
- Đánh giá khả năng tạo khoáng của hydrogel và hydrogel nanocomposite của hydrogel và hydrogel nanocomposite trên nền GTA với từng loại vật liệu CHPA, ATA, CDTA với các tỉ lệ khác nhau.
- So sánh giảm cấp, tương hợp sinh học và khoáng hóa của ba nền nanocomposite hydrogel

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

- Đã tổng hợp thành công các vật liệu hydrogel composite trên nền gelatine với các polysaccharide như chitosan, alginate, chondroitine sulfate... kết hợp với các hạt nano Biphasic calcium phosphate. Các sản phẩm hydrogel tổng hợp được đánh giá cấu trúc bằng các phương pháp H1NMR, FT-IR, SEM.
- Khảo sát thời gian hình thành gel của các vật liệu như sau:
 - Vật liệu CHPA – GTA: Đối với hydrogel, hydrogel nanocomposite có thời gian tạo gel nhanh nhất là 11s; 40s (khảo sát trong nồng độ H₂O₂ từ 0,05-0,2%)
 - Vật liệu ATA – GTA: Đối với hydrogel, hydrogel nanocomposite có thời gian tạo gel nhanh nhất là 25s; 16s (khảo sát trong nồng độ H₂O₂ từ 0,05-0,2%)
 - Vật liệu CDTA – GTA: Đối với hydrogel, hydrogel nanocomposite có thời gian tạo gel nhanh nhất là 43s; 46s (khảo sát trong nồng độ H₂O₂ từ 0,1-0,4%).

Kết quả chứng minh rằng khi tăng nồng độ H₂O₂, thời gian hình thành gel sẽ kéo dài do enzyme HRP bị ức chế khả năng tạo liên kết ngang trong mạch polymer.

- Trong môi trường giả sinh học, thời gian phân hủy sinh học trên 3 hệ vật liệu hydrogel và hydrogel nanocomposite được khảo sát tỷ lệ thuận với hàm lượng GTA được sử dụng, do gelatine là polymer dễ bị thủy phân ngay cả trong môi trường sinh lý và giả sinh học, nên quá trình phân hủy sinh học của vật liệu diễn ra trong thời gian tương đối ngắn. Do đó, việc kết hợp GTA với các polysaccharide (CHPA, ATA, CDTA) sẽ giúp kéo dài thời gian phân hủy sinh học của vật liệu. Vì thế, tùy theo nhu cầu và mục đích của vật liệu, có thể điều

chính tỉ lệ GTA để có thời gian phân hủy sinh học như mong muốn trong môi trường giả sinh học.

- Khi so sánh giữa 2 vật liệu có cùng tỉ lệ BCP là CHPA-GTA và CDTA-GTA cho thấy CHPA có khả năng khoáng hóa tốt hơn. ATA cho thấy khả năng khoáng hóa thấp nhất trong ba vật liệu. Điều này được giải thích do cấu trúc alginate có độ nhớt rất cao, làm cho các hạt nano BCP khó phân tán đều trong vật liệu, dẫn đến việc khả năng tạo khoáng kém. Đối với cấu trúc chitosan tương tác tĩnh điện trong chitosan và gelatin giúp cho vật liệu có khả năng tạo khoáng tốt hơn.

- Dựa trên kết quả MTT và ảnh chụp huỳnh quang cho thấy, vật liệu hydrogel nanocomposite trên các hệ vật liệu CHPA-GTA/BCP, ATA-GTA/BCP, CDTA-GTA/BCP (với các tỉ lệ khác nhau) an toàn, không gây độc tính tế bào sau khi phân hủy.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. Nguyen Vu Viet Linh, Nguyen Tien Thinh, Pham Trung Kien, Tran Ngoc Quyen, Huynh Dai Phu, Injectable Nanocomposite Hydrogels and Electrosprayed Nano(Micro) Particles for Biomedical Applications, *Novel Biomaterials for Regenerative Medicine*, 2018, 225-249, IF: 3.65, Q2
2. Nguyen Tien Thinh, Dang Le Hang, Tran Thi Yen Nhi, Sija Feng, Jun Chen, Nguyen Phuong, Tran Ngoc Quyen, Biphasic calcium phosphate embedded biomimetic hydrogel based chondroitin sulfate and gelatin as an injectable scaffold for bone regeneration, *European Polymer Journal*, 2023, 189: 111975, IF: 5.5, Q1
3. Tien Thinh Nguyen, Chan Khon Huynh, Ngoc Quyen Tran, Van Thu Le, Minh Dung Truong, Bach Long Giang, Minh Thanh Vu, In situ fabrication of biological chitosan and gelatin-based hydrogels loading biphasic calcium phosphate nanoparticles for bone tissue regeneration, 2019, 31(5), 1062-1070, IF: 0.6, Q4