

Ộ 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**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ HÓA HỌC

TP. HỒ CHÍ MINH – 2023

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: 62 44 01 14

LUẬN ÁN TIẾN SỸ HÓA HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. PGS.TS TRẦN NGỌC QUYÊN
2. PGS. TS. NGUYỄN ĐẠI HẢI

TP. HỒ CHÍ MINH – 2023

LỜI CAM ĐOAN

Công trình nghiên cứu mà tôi đã thực hiện tại phòng Hóa dược - Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng - Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam tại Thành phố Hồ Chí Minh, với sự hướng dẫn chuyên môn từ PGS.TS Trần Ngọc Quyền và PGS.TS. Nguyễn Đại Hải.

Trong công trình nghiên cứu này, tôi cam kết trình bày những nghiên cứu và kết quả với sự trung thực tuyệt đối, dựa trên cơ sở tri thức và kết quả nghiên cứu của bản thân. Đồng thời, tôi xác nhận rằng các thông tin và kết quả trong khóa luận này chưa từng được sử dụng trong bất kỳ công trình nghiên cứu cùng cấp nào khác.

Nghiên cứu sinh

Nguyễn Tiến Thịnh

LỜI CẢM ƠN

Trong công trình nghiên cứu này, tôi muốn bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đối với sự hướng dẫn và đóng góp quý báu của PGS.TS Trần Ngọc Quyên và PGS.TS. Nguyễn Đại Hải, đã đồng hành và hỗ trợ tận tâm trong suốt quá trình thực hiện nghiên cứu, và tôi muốn gửi tới họ lời biết ơn chân thành nhất.

Tôi cũng muốn cảm ơn sự hỗ trợ quý báu từ các đồng nghiệp tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng - Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Họ đã đóng góp một phần quan trọng vào sự thành công của nghiên cứu này.

Tôi không thể không đề cập đến sự giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi từ Học viện Khoa học Công nghệ và Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trong suốt thời gian tôi tiến hành luận án. Sự ủng hộ của các tổ chức này đã đóng vai trò quan trọng trong quá trình nghiên cứu của tôi.

Cuối cùng, tôi muốn gửi lời biết ơn đặc biệt đến gia đình, bạn bè và những người đồng hành đã động viên và giúp đỡ tôi trong hành trình hoàn thành công trình nghiên cứu.

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC HÌNH	v
DANH MỤC BẢNG VÀ BIỂU ĐỒ.....	xii
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT	xiv
MỞ ĐẦU	1
1. TỔNG QUAN.....	4
1.1. Thành phần, cấu tạo của xương và giới thiệu về Biphasic calcium phosphate.....	4
1.1.1. Giới thiệu về xương.....	4
1.1.2. Biphasic calcium phosphate (BCP).....	5
1.2. Các bệnh liên quan đến xương và phương pháp điều trị phổ biến	7
1.2.1. Các bệnh liên quan đến xương	7
1.2.2. Các phương pháp sử dụng trong điều trị liên quan đến gãy xương	9
1.3. Vật liệu Hydrogel.....	13
1.3.1. Khái niệm và phân loại vật liệu hydrogel.....	13
1.3.2. Nguyên liệu tạo thành hydrogel	16
1.3.3. Các phương pháp tổng hợp hydrogel	24
1.3.4. Hydrogel tiêm tại chỗ và các phương pháp tạo thành hydrogel tiêm	32
1.4. Vật liệu Hydrogel composite	41
1.4.1. Khái niệm	41
1.4.2. Vật liệu composite trong tái tạo xương.....	42
1.4.3. Các phương pháp tổng hợp và tính chất nanocomposite hydrogel [84]	46
1.5. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước.....	49
1.5.1. Trong nước	49
1.5.2. Ngoài nước	49
2. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	53
2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu.....	53
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	53
2.1.2. Phạm vi nghiên cứu	53
2.2. Dung môi, hóa chất, thiết bị dùng trong nghiên cứu	53
2.2.1. Dung môi, hóa chất dùng trong nghiên cứu	53
2.2.2. Thiết bị và dụng cụ	54
2.3. Tổng hợp và phân tích cấu trúc BCP.....	55

2.4. Tổng hợp và phân tích cấu trúc các polymer mang nhóm chức phenol .	55
2.4.1. Tổng hợp Gelatin-Tyramine (GTA)	55
2.4.2. Tổng hợp Chitosan-4-hydroxyphenylacetic acid (CHPA).....	56
2.4.3. Tổng hợp Alginate-tyramine (ATA)	57
2.4.4. Tổng hợp Chondroitine sulfate-tyramine (CDTA)	58
2.4.5. Xác định cấu trúc, hình thái các sản phẩm	59
2.4.6. Xác định hàm lượng TA, HPA trong các polymer phenol tổng hợp .	59
2.5. Tổng hợp và xác định các tính chất của các hệ hydrogel và hydrogel composite trên nền GTA	60
2.5.1. Tổng hợp insitu hydrogel và hydrogel composite CHPA, ATA, CDTA trên nền GTA bằng phương pháp pha trộn dùng enzyme HRP và H ₂ O ₂	60
2.5.2. Khảo sát các hình thái, thời gian hình thành gel, thời gian giảm cấp sinh học, khả năng tạo khoáng và độc tính của hydrogel và hydrogel composite	61
2.5.3. Đánh giá độc tính tế bào trên vật liệu hydrogel composite.....	63
3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN.....	66
3.1. KẾT QUẢ TỔNG HỢP BCP	66
3.1.1. Kết quả phân tích XRD của BCP	66
3.1.2. Kết quả hình thái của BCP	66
3.2. TỔNG HỢP CÁC POLYMER MANG NHÓM CHỨC PHENOL	67
3.2.1. Kết quả tổng hợp GTA	67
3.2.2. Kết quả tổng hợp CHPA.....	71
3.2.3. Kết quả tổng hợp vật liệu hydrogel và hydrogel composite ATA	74
3.2.4. Kết quả tổng hợp vật liệu CDTA	77
3.3. TỔNG HỢP VÀ XÁC ĐỊNH CÁC TÍNH CHẤT CỦA CÁC HỆ HYDROGEL, HYDROGEL COMPOSITE	81
3.3.1. Hệ hydrogel và hydrogel composite GTA-CHPA/BCP.....	81
3.3.2. Hệ hydrogel và hydrogel composite ATA-GTA/BCP	98
3.3.3. Hệ hydrogel và hydrogel composite CDTA-GTA/BCP	113
3.4. So sánh các hệ hydrogel composite	126
KẾT LUẬN	129
KIẾN NGHỊ	131
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ	132
European Polymer Journal	133
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	134
PHỤ LỤC.....	I

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu tạo của xương [5].....	5
Hình 1.2. BCP có thể được sản xuất dưới dạng bột, viên, khối đặc hoặc xốp [7]	6
Hình 1.3. Bốn giai đoạn của quá trình liền xương [10]	9
Hình 1.4. Hình thành hydrogel bằng phương pháp tạo liên kết ngang của các polyme tan trong nước [18]	13
Hình 1.5. Sự trương nở của hydrogel [22].....	14
Hình 1.6. Cấu trúc gelatin	17
Hình 1.7. Phản ứng deacetyl hóa chitin tạo chitosan.....	19
Hình 1.8. Cấu trúc chitosan.....	20
Hình 1.9. Cấu trúc hóa học của khối G, khối M và khối xen kẽ trong alginate	22
Hình 1.10. Tương tác kỵ nước	25
Hình 1.11. Tương tác ion	26
Hình 1.12. Tương tác liên kết hydro giữa các biopolyme tương thích hình học (methylcellulose và acid hyaluronic); các liên kết hydro bị phá vỡ dưới ảnh hưởng của nhiệt độ [45].	27
Hình 1.13. Tương tác lập thể D-lactide và L-lactide	27
Hình 1.14. Tạo liên kết ngang bằng glutaraldehyde [48]	28
Hình 1.15. Phản ứng cộng Michael [54].....	29
Hình 1.16. Liên kết Schiff-base [57]	30
Hình 1.17. Phản ứng liên kết ngang hình thành hydrogel dưới sự xúc tác của enzyme Transglutaminase [58].....	31

Hình 1.18. Phản ứng liên kết ngang hình thành hydrogel dưới sự xúc tác của enzyme tyrosinase [58].....	31
Hình 1.19. Cơ chế xúc tác vòng của enzyme HRP [60].....	32
Hình 1.20. Sơ đồ minh họa hydrogel dạng tiêm được điều chế bằng phương pháp liên kết ngang enzym với peroxidase cải ngựa (HRP) và H ₂ O ₂ [71]	39
Hình 1.21. Sơ đồ minh họa hydrogel tiêm được điều chế bằng phương pháp liên kết ngang ánh sáng [71]	40
Hình 2.1. Phản ứng tổng hợp GTA.....	56
Hình 2.2. Phản ứng tổng hợp CHPA	57
Hình 2.3. Phản ứng tổng hợp alginate-tyramine (ATA).....	58
Hình 2.4. Phản ứng tổng hợp CDTA	59
Hình 3.1. Biểu đồ XRD của BCP với tỉ lệ mol Ca/P =1,57 tại pH = 7 ..	66
Hình 3.2. Kết quả SEM với độ phóng đại 100nm của BCP được tổng hợp bằng phương pháp sóng siêu âm với tỉ lệ Ca/P = 1,57 tại pH = 7	67
Hình 3.3. Phổ ¹ H-NMR của GTA trong D ₂ O	68
Hình 3.4. Kết quả phổ FTIR của GTA.....	69
Hình 3.5. Phương trình đường chuẩn của TA.....	70
Hình 3.6. Kết quả phổ ¹ H-NMR với các peak đặc trưng của vật liệu CHPA trong D ₂ O.....	71
Hình 3.7. Kết quả phổ FTIR của CHPA.....	72
Hình 3.8. Phương trình đường chuẩn của HPA	74
Hình 3.9. Kết quả phổ ¹ H-NMR với các peak đặc trưng của vật liệu ATA trong D ₂ O.....	75

Hình 3.10. Kết quả phổ FTIR của ATA	75
Hình 3.11. Phương trình đường chuẩn của TA.....	77
Hình 3.12. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của GTA trong D_2O	78
Hình 3.13. Kết quả đo phổ FT-IR của CD_Tyr. (A) CD; (B) Tyr; (C) CDTA	78
Hình 3.14. Phương trình đường chuẩn của TA.....	81
Hình 3.15. Khảo sát thời gian hình thành gel của hydrogel và hydrogel composite GTA (với nồng độ HRP 0,05 mg/mL)	82
Hình 3.16. Thời gian hình thành gel hoá của hydrogel và hydrogel composite CHPA (nồng độ HRP 0,07 mg/mL)	83
Hình 3.17. Thời gian hình thành gel hoá của hydrogel và hydrogel composite CHPA trên nền GTA với tỉ lệ 1:1 (nồng độ HRP 0,07 mg/mL) ...	84
Hình 3.18. Hình SEM (a) hydrogel CHPA-GTA (1:1) và (b) CHPA-GTA (1:2)	85
Hình 3.19. Hình SEM (a) hydrogel composite CHPA-GTA/BCP (1:1) ngày và (b) CHPA-GTA/BCP (1:2).....	85
Hình 3.20. Kết quả phân tích XRD của hydrogel và hydrogel composite (CHPA- GTA , CHPA- GTA/BCP với tỉ lệ 1:1) ban đầu và sau thời gian ngâm trong dung dịch giả sinh học SBF trong 28 ngày.....	90
Hình 3.21. Kết quả phân tích XRD của hydrogel và hydrogel composite (CHPA- GTA , CHPA- GTA/BCP với tỉ lệ 1:2) ban đầu và sau thời gian ngâm trong dung dịch giả sinh học SBF trong 28 ngày.....	91
Hình 3.22. Kết quả hình ảnh phân tích bằng phương pháp SEM và phân tích nguyên tố EDS của hydrogel CHPA-GTA (1:1) sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày	92

Hình 3.23. Kết quả hình phân tích bằng phương pháp SEM và phân tích nguyên tố EDS của hydrogel CHPA-GTA (1:2) sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF trong 28 ngày.....	92
Hình 3.24. Kết quả hình ảnh phân tích bằng phương pháp SEM và phân tích nguyên tố EDS hydrogel composite GTA-CHPA/BCP-(1:1) sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày.....	93
Hình 3.25. Kết quả hình ảnh phân tích bằng phương pháp SEM và phân tích nguyên tố EDS hydrogel composite GTA-CHPA/BCP-(2:1) sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày.....	93
Hình 3.26. Hàm lượng Ca trong dung dịch SBF ngâm hydrogel composite trong 28 ngày với tỉ lệ 1:1 và 1:2	95
Hình 3.27. Hàm lượng P trong dung dịch SBF ngâm hydrogel composite trong 28 ngày với tỉ lệ 1:1 và 1:2	95
Hình 3.28. Tỷ lệ tế bào MSC sống sau khi ủ với chứng âm (DMEM/F12) và dịch chiết hydrogel composite CHPA-GTA (1-1) và CHPA-GTA (1-2) sau 24h (A) và sau 48h (B).....	97
Hình 3.29. Hình ảnh tế bào MSC được ủ với chứng âm (DMEM/F12) và dịch chiết hydrogel composite CHPA-GTA (1-1) và CHPA-GTA (1-2) sau 48h. Màu xanh: Chất nhuộm Hoestch; màu xanh: chất nhuộm AO và màu đỏ: chất nhuộm PI.	98
Hình 3.30. Thời gian tạo gel của hydrogel và hydrogel composite ATA với nồng độ HRP 0,0125mg/ml mg/mL	99
Hình 3.31. Thời gian tạo gel của hydrogel và hydrogel composite ATA trên nền GTA với nồng độ HRP 0,0125mg/ml.....	100
Hình 3.32. Hình SEM (a) hydrogel ATA-GTA (1:1) và (b) ATA-GTA (1:2).....	101

Hình 3.33. Hình SEM (a) hydrogel composite ATA-GTA (1:1) và (b) ATA-GTA (1:2)	101
Hình 3.34. Kết quả phân tích XRD của hydrogel và hydrogel composite (ATA- GTA , ATA- GTA/BCP với tỉ lệ 1:1) ban đầu và sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày	106
Hình 3.35. Kết quả phân tích XRD của hydrogel và hydrogel composite (ATA- GTA , ATA- GTA/BCP với tỉ lệ 1:2) trước và sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày	106
Hình 3.36. Kết quả hình ảnh phân tích bằng phương pháp SEM và phân tích nguyên tố EDS của hydrogel ATA-GTA (1:1) (a) và ATA-GTA (1:2) (b) sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày	107
Hình 3.37. Kết quả hình ảnh phân tích bằng phương pháp SEM và phân tích nguyên tố EDS của hydrogel composite ATA-GTA (1:1) (a) và ATA-GTA (1:2) sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF trong 28 ngày.....	108
Hình 3.38. Hàm lượng Ca trong dung dịch SBF ngâm hydrogel composite trong 28 ngày với tỉ lệ 1:1 và 1:2	110
Hình 3.39. Hàm lượng P trong dung dịch SBF ngâm hydrogel composite trong 28 ngày với tỉ lệ 1:1 và 1:2	110
Hình 3.40. Tỷ lệ tế bào MSC sống sau khi ủ với chứng âm (DMEM/F12) và dịch chiết hydrogel composite ATG-GTA (1-1) và ATG-GTA (1-2) sau 24h (A) và sau 48h (B).....	111
Hình 3.41. Hình ảnh tế bào MSC được ủ với chứng âm (DMEM/F12) và dịch chiết hydrogel composite ATG-GTA (1-1) và ATG-GTA (1-2) sau 48h. Màu xanh: Chất nhuộm Hoestch; màu xanh: chất nhuộm AO và màu đỏ: chất nhuộm PI.	112

Hình 3.42. Thời gian hình thành gel hoá của hydrogel và hydrogel composite CDTA với nồng độ HRP 0,125 mg/mL	113
Hình 3.43. Thời gian hình thành gel hoá của hydrogel và hydrogel composite CDTA trên nền GTA với nồng độ HRP 0,0125mg/ml	114
Hình 3.44. Kết quả hình ảnh phân tích bằng phương pháp SEM (a) hydrogel CDTA-GTA (1:2) ngày và (b) CDTA-GTA (2:1).....	115
Hình 3.45. Kết quả hình ảnh phân tích bằng phương pháp SEM (a) hydrogel composite CDTA-GTA (1:2) ngày và (b) CDTA-GTA (2:1)	115
Hình 3.46. Kết quả phân tích XRD của hydrogel và hydrogel composite (CDTA- GTA , CDTA- GTA/BCP với tỉ lệ 1:1) ban đầu và sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày	119
Hình 3.47. Kết quả phân tích XRD của hydrogel và hydrogel composite (CDTA- GTA , CDTA- GTA/BCP với tỉ lệ 2:1) trước và sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày	120
Hình 3.48. Kết quả hình ảnh phân tích bằng phương pháp SEM và phân tích nguyên tố EDS của hydrogel CDTA-GTA (1:1) và CDTA-GTA (2:1) sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày	121
Hình 3.49. Kết quả hình ảnh phân tích bằng phương pháp SEM và phân tích nguyên tố EDS của hydrogel composite CDTA-GTA (1:1) và CDTA-GTA (2:1) sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF trong 28 ngày.....	122
Hình 3.50. Hàm lượng Ca trong dung dịch SBF ngâm hydrogel composite trong 28 ngày với tỉ lệ 1:1 và 2:1	123
Hình 3.51. Hàm lượng P trong dung dịch SBF ngâm hydrogel composite trong 28 ngày với tỉ lệ 1:1 và 2:1	124

Hình 3.52. Tỷ lệ tế bào MSC sống sau khi ủ với chứng âm (DMEM/F12) và dịch chiết hydrogel composite CDTA-GTA (1-1) và CDTA-GTA (1-2) sau 24h (A) và sau 48h (B)..... 125

Hình 3.53. Hình ảnh tế bào MSC được ủ với chứng âm (DMEM/F12) và dịch chiết hydrogel composite CDTA-GTA (1-1) và CDTA-GTA (1-2) sau 48h. Màu xanh: Chất nhuộm Hoestch; màu xanh: chất nhuộm AO và màu đỏ: chất nhuộm PI. 126

DANH MỤC BẢNG VÀ BIỂU ĐỒ

Bảng 1.1. Ưu điểm và nhược điểm của một số vật liệu sử dụng trong tổng hợp khung nền cho kỹ thuật mô xương.....	12
Bảng 1.4. Tính chất cơ học của hydrogel composite có chứa các thành phần vô cơ	44
Bảng 2.1. Dung môi, hóa chất dùng trong nghiên cứu	53
Bảng 2.2. Tổng hợp hydrogel composite theo tỷ lệ X: GTA (wt/wt).....	60
Bảng 3.1. Kết quả phổ FT-IR của Tyramine, Gelatin, GTA	70
Bảng 3.2. Kết quả phổ FT-IR của HPA, CS, CHPA	73
Bảng 3.3. Kết quả phổ FT-IR của Tyramin, Alginate, ATA	76
Bảng 3.4. Kết quả phổ FT-IR của Tyramin, CD, CDTA.....	80
Bảng 3.5. Thành phần trăm các nguyên tố trong phân tích EDS của hydrogel composite sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày	94
Bảng 3.6. Thành phần trăm các nguyên tố trong phân tích EDS của hydrogel sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày.....	108
Bảng 3.7. Thành phần trăm các nguyên tố trong phân tích EDS của hydrogel composite sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày	109
Bảng 3.8. Thành phần trăm các nguyên tố trong phân tích EDS của hydrogel sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày.....	121
Bảng 3.9. Thành phần trăm các nguyên tố trong phân tích EDS của hydrogel composite sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày	123
Bảng 3.10. Kết quả tính toán lượng TA trong GTA	IV
Bảng 3.11. Kết quả tính toán lượng HPA trong CHPA.....	IV
Bảng 3.12. Kết quả tính toán lượng TA trong ATA.....	IV
Bảng 3.13. Kết quả tính toán lượng TA trong CDTA	IV
Biểu đồ 3.1. Biểu đồ% giảm cấp khối lượng của hydrogel CHPA trên nền GTA theo các tỉ lệ (C/G) trong dung dịch PBS	87
Biểu đồ 3.2. Biểu đồ% giảm cấp khối lượng của hydrogel composite CHPA trên nền GTA theo các tỉ lệ (C/G) trong dung dịch PBS	87
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.....	102
Biểu đồ 3.4. Biểu đồ % khối lượng phân hủy sinh học của hydrogel composite GTA và ATA trên nền GTA theo các tỉ lệ (A/G) trong dung dịch PBS.....	104
Biểu đồ 3.5. 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 ...	116
Biểu đồ 3.6. Biểu đồ% giảm cấp khối lượng của hydrogel composite GTA và CDTA trên nền GTA theo các tỉ lệ (A/G) trong dung dịch PBS	118

Biểu đồ 3.1. Biểu đồ thời gian % suy giảm sinh học của hydrogel CHPA trên nền GTA theo các tỉ lệ (C/G) trong dung dịch PBS	87
Biểu đồ 3.2. Biểu đồ thời gian % suy giảm sinh học của hydrogel composite CHPA trên nền GTA theo các tỉ lệ (C/G) trong dung dịch PBS ..	87
Biểu đồ 3.3. Biểu đồ % suy giảm khối lượng của hydrogel GTA và ATA trên nền GTA theo các tỉ lệ (A/G) trong dung dịch PBS	102
Biểu đồ 3.4. Biểu đồ % suy giảm khối lượng sinh học của hydrogel composite GTA và ATA trên nền GTA theo các tỉ lệ (A/G) trong dung dịch PBS	104
Biểu đồ 3.5. Biểu đồ % suy giảm khối lượng sinh học của hydrogel CDTA trên nền GTA theo các tỉ lệ (CD/G) trong dung dịch PBS có enzyme collagenase	116
Biểu đồ 3.6. Biểu đồ % giảm cấp khối lượng của hydrogel composite GTA và CDTA trên nền GTA theo các tỉ lệ (A/G) trong dung dịch PBS	118

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tên tiếng Anh	Tên tiếng Việt
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
NHS	N-hydroxysuccinimide	N-hydroxysuccinimide
SBF	Stimulates body fluid	Dung dịch mô phỏng dịch cơ thể người
BCP	Biphasic calcium phosphate	Biphasic calcium phosphat
CHPA	Chitosan-4-hydroxyphenylacetic acid	Axit chitosan-4-hydroxyphenylacetic
GTA	Gelatin-tyramine	Gelatin-tyramine
ATA	Alginate-tyramine	Alginate-tyramine
CDTA	Chondroitin sulfate-tyramine	Chondroitin sulfate-tyramine
HRP	Horseradish peroxidase	Horseradish peroxidase
¹ H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
FT-IR	Fourier Transform Infrared spectroscopy	Phương pháp phân tích quang phổ hồng ngoại
SEM	Scanning electron microscopy	Kính hiển vi điện tử quét
ICP-OES	Inductively coupled plasma - optical emission spectrometry	Quang phổ plasma phát xạ nguyên tử
Da	Dalton	Dalton
EDS	Energy-dispersive X-ray spectroscopy	Phổ tán sắc năng lượng tia X
XRD	X-ray diffraction	Nhiễu xạ tia X
PBS	Phosphate buffer saline	Nước muối đệm photphat
BTE	Bone tissue engineering	Kỹ thuật mô xương
ECM	The extracellular matrix	Chất nền ngoại bào

MỞ ĐẦU

Theo các báo cáo, chấn thương là nguyên nhân đứng hàng thứ tư gây tử vong ở mọi độ tuổi (6%). Bên cạnh đó, thương tật gây ra do chấn thương đang ở mức cao trên toàn cầu, đặc biệt là ở các quốc gia đang phát triển. Trong đó, tai nạn giao thông, tai nạn công nông nghiệp, thiên tai (lũ lụt và động đất) là những nguyên nhân chính dẫn đến thương tích. Trong vài thập kỷ qua, con người cũng chứng kiến những tiến bộ vượt bậc trong lĩnh vực chăm sóc sức khỏe xương khớp [1]. Hiện nay, vật liệu hydrogel đang được chú trọng phát triển để dần thay thế cho những vật liệu truyền thống dùng trong cấy ghép trước đây như kim loại, hợp kim (titan, hợp kim titan của titan, thép không gỉ...). Chúng có tính tương hợp sinh học, tính cơ lý và độ đàn hồi tốt. Bên cạnh đó, vật liệu có thể bao bọc các yếu tố khác để gia tăng khả năng kích thích tế bào xương phát triển. Vì biphasic calcium phosphate (BCP) có thành phần tương tự thành phần khoáng trong xương, tính tương hợp sinh học, hoạt tính sinh học cao và khả năng chữa lành xương, các nhà khoa học đã nghiên cứu vật liệu cấy ghép tái tạo trên cơ sở các vật liệu composite chứa BCP. Ngoài ra, BCP có khả năng phân hủy 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].

Vì vậy, 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 thực hiện với các mục tiêu như sau:

- Mục tiêu tổng quát

Nghiên cứu tổng hợp vật liệu hydrogel mới trên nền gelatin với các 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.

Mục tiêu cụ thể

- Điều chế thành công một số hệ hydrogel composite trên nền gelatin kết hợp với polysaccharide như chitosan, alginate, chondroitin sulfate để mang các hạt nano Biphasic calcium phosphate.
- Khảo sát khả năng tạo khoáng, quá trình phân hủy sinh học của vật liệu với các nền khác nhau Từ đó tìm ra được hệ hydrogel composite phù hợp với giai đoạn phát triển của xương.

Nội dung nghiên cứu

Để làm sáng tỏ các mục tiêu nghiên cứu nêu trên, luận án gồm 8 nội dung chính được trình bày sau đây.

- **Nội dung 1:** Điều chế và khảo sát các đặc tính của các hạt khoáng nano BCP.
- **Nội dung 2:** Tổng hợp và đánh giá cấu trúc, hình thái của các hydrogel và hydrogel composite gelatin-tyramin (GTA).
- **Nội dung 3:** Tổng hợp và đánh giá cấu trúc, hình thái của các hydrogel và hydrogel composite chitosan 4-hydroxyphenylacetic acid (CHPA).
- **Nội dung 4:** Tổng hợp và đánh giá cấu trúc, hình thái của các hydrogel và hydrogel composite alginate-tyramin (ATA).
- **Nội dung 5:** Tổng hợp và đánh giá cấu trúc, hình thái của các hydrogel và hydrogel composite chondroitin sulfate-tyramin (CDTA).
- **Nội dung 6:** Tổng hợp và xác định các tính chất của hydrogel và hydrogel composite trên nền GTA với từng loại vật liệu CHPA, ATA, CDTA với các tỉ lệ khác nhau.
- **Nội dung 7:** Đánh giá khả năng tạo khoáng của hydrogel và hydrogel composite trên nền GTA với từng loại vật liệu CHPA, ATA, CDTA với các tỉ lệ khác nhau.

- **Nội dung 8:** Đánh giá độc tính tế bào bằng phương pháp MTT và chụp ảnh tế bào của hydrogel và hydrogel composite trên nền GTA với từng loại vật liệu CHPA, ATA, CDTA với tỉ lệ khác nhau.

1. TỔNG QUAN

1.1. Thành phần, cấu tạo của xương và giới thiệu về Biphasic calcium phosphate

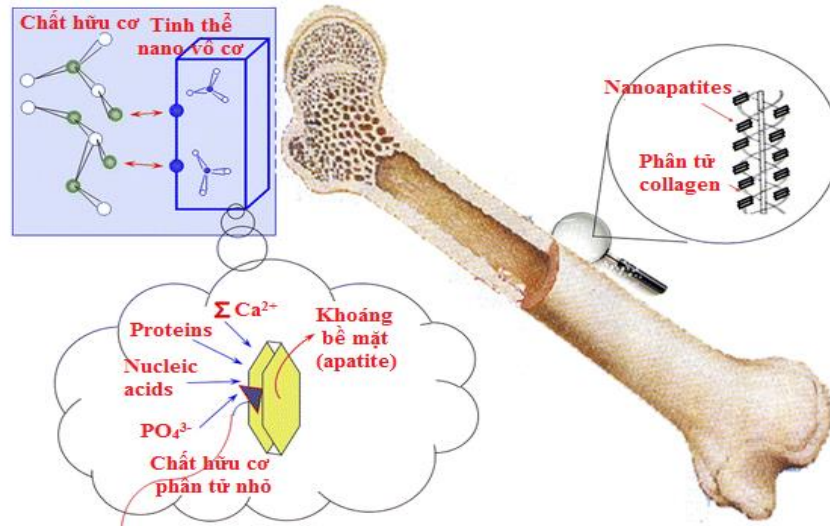
1.1.1. Giới thiệu về xương

Định nghĩa:

Xương là bộ khung vững chắc nâng đỡ toàn cơ thể, có tác dụng che chở và bảo vệ những cơ quan bên trong như: hộp sọ, lồng ngực, khung chậu,... và là chỗ bám của các cơ. Khung xương có ba nhiệm vụ chủ yếu: nâng đỡ, bảo vệ và vận động. Tủy xương là nơi tạo máu, sản sinh ra hồng cầu. Xương cũng là kho dự trữ khoáng chất (calci và phospho...) mà khi cần cơ thể có thể huy động lấy ra [3].

Cấu tạo và thành phần của xương

- Cấu tạo đại thể: Bất kỳ một xương nào cũng được cấu tạo bằng các thành phần sau đây (kể từ ngoài vào trong): ngoài cùng là màng ngoài xương (ngoại cốt mạc), kế tiếp là xương đặc (cortical bones), dưới lớp xương đặc là xương xốp (trabecular hay cancellous bones), trong cùng là tủy xương (tủy đỏ và tủy vàng) [3]. 20% tổng khối lượng xương là xương xốp, 80% còn lại là xương đặc. Xương xốp có độ chuyển hóa cao, có diện tích rộng hơn, và dễ bị gãy hơn xương đặc [4].



Hình 1.1. Cấu tạo của xương [5]

- Cấu tạo vi thể: mô xương là thành phần quan trọng nhất cấu tạo nên bộ xương. Mô xương là hình thái thích nghi đặc biệt của mô liên kết, tuy nhiên, các thành phần ngoài tế bào bị calci hóa làm cho chất căn bản trở nên cứng rắn. Mô xương được tạo thành từ các tế bào, các sợi và chất căn bản. Xương được cấu thành từ 4 loại tế bào chính: tế bào tạo xương (osteoblast), tế bào hủy xương (osteoclast), cốt bào (osteocyte), và tế bào liên kết (lining cells). Những tế bào này tương tác với một số chất khoáng, protein, hormon, và các phân tử khác để nuôi dưỡng xương, liên tục bỏ xương cũ và thay bằng xương mới qua một quá trình mô hình và tái mô hình (modelling và remodelling) [6].

1.1.2. Biphasic calcium phosphate (BCP)

Trong số nhiều vật liệu sinh học, calcium phosphate tồn tại trong xương tự nhiên đã được quan tâm nghiên cứu. Nó có thể góp phần trực tiếp vào quá trình tái tạo xương hoặc hỗ trợ việc các vật liệu sinh học khác trong quá trình tái tạo xương. Calcium phosphate có tiềm năng rất lớn cho ghép xương vì chúng có tính tương hợp sinh học, tính dẫn tạo xương, tính kích tạo xương và có khả năng tạo liên kết trực tiếp với xương. Sự giải phóng các ion Ca^{2+} và PO_4^{3-} điều chỉnh việc kích hoạt các tế bào tạo xương và tế bào hủy xương để tạo điều kiện cho quá trình tái tạo xương. Quá trình suy giảm của calcium phosphate tạo kết tủa carbonate apatite có thành phần và cấu trúc tương tự với các khoáng chất

sinh học của xương. Các đặc tính ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học khác nhau tùy thuộc vào loại calcium phosphate như HAP, TCP và có thể được sử dụng trong nhiều ứng dụng khác nhau do sự khác biệt về khả năng giải phóng ion, độ hòa tan, độ ổn định và độ bền cơ học.

Khả năng kích tạo xương của các vật liệu kích thích tế bào gốc biệt hóa thành tế bào xương có sự ảnh hưởng khác nhau dựa trên loại calcium phosphate. Thứ tự ưu tiên của sự kích tạo xương có thể được xác định như sau: β -TCP > BCP > HAp > ACP (β -TCP: Beta tricalcium phosphate; Hap: Hydroxylapatite; ACP: Amorphous Calcium Phosphate).

BCP, hay còn gọi là hỗn hợp của HAp và β -TCP, đang thu hút sự quan tâm trong nghiên cứu vì có ảnh hưởng tích cực đối với quá trình tái tạo xương hơn so với HAp hoặc β -TCP đơn lẻ. BCP có tốc độ tan phù hợp với thời gian tái tạo xương và khả năng kích thích quá trình hình thành xương.



Hình 1.2. BCP có thể được sản xuất dưới dạng bột, viên, khối đặc hoặc xốp [7]

Do những ưu điểm như trên, vật liệu composite chứa calcium phosphate cho thấy tiềm năng đáp ứng các yêu cầu của vật liệu y sinh dùng cho xương. Vật liệu composite này có thành phần, cấu trúc tương tự xương, tương hợp sinh học, suy giảm sinh học. Calcium phosphate thúc đẩy sự khoáng hoá, cải thiện tính chất cơ học so với vật liệu cấy ghép trước đây. Calcium phosphate phân tán trong polymer tự nhiên sẽ cung cấp mầm cho sự hình thành lớp tạo khoáng cũng như di chuyển tế bào xương đến vùng xương bị tổn thương từ đó thúc đẩy

quá trình tái tạo xương và được kỳ vọng nhiều trong lĩnh vực cấy ghép và tái tạo xương.

Tỷ lệ mol Ca/P trong xương được phân tích và cho thấy giá trị nằm trong khoảng từ 1,3 đến 1,9. Tỷ lệ này phụ thuộc vào sự đóng góp của các phosphate hữu cơ trong chất nền xương và bản chất của các khoáng chất trong xương [8].

Các nghiên cứu khoa học đã cho thấy rằng, cơ chế tạo khoáng xương được diễn ra thông qua các quá trình tạo khoáng sinh học trong môi trường tế bào. Ban đầu, quá trình tạo khoáng tập trung vào nhiều vùng khác nhau dọc theo các sợi collagen. Tại những điểm này, các tinh thể khoáng đầu tiên bắt đầu hình thành ở vị trí cụ thể, sau đó tiếp tục phát triển thông qua một quá trình kéo dài qua là quá trình kết tụ. Điều quan trọng là trong quá trình tạo khoáng, kích thước và hình dạng của các mầm tinh thể apatite được điều chỉnh bởi môi trường collagen và các protein xung quanh. Điều này dẫn đến việc các mầm tinh thể này luôn có kích thước nano.

1.2. Các bệnh liên quan đến xương và phương pháp điều trị phổ biến

1.2.1. Các bệnh liên quan đến xương

Các bệnh lý bộ máy vận động rất phong phú, đa dạng thường được chia làm hai nhóm: nhóm có chấn thương (chấn thương do thể thao, tai nạn giao thông, tai nạn lao động, tai nạn sinh hoạt)... và nhóm không chấn thương (bao gồm nhiều loại bệnh lý như lupus ban đỏ hệ thống, gút, viêm khớp nhiễm khuẩn, loãng xương, thoái hóa khớp, thoái hóa cột sống, u xương nguyên phát, ung thư di căn xương,...)

Quá trình liền xương và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình liền xương

Khi xương bị gãy, quá trình liền xương diễn ra. Đây là một quá trình phức tạp. Về mặt mô học, có bốn giai đoạn của quá trình liền xương: viêm, tạo can xương, sửa chữa can xương và hồi phục hình thái xương [9].

- Giai đoạn viêm: bắt đầu ngay sau khi xương bị gãy và kéo dài khoảng 3 tuần. Áp lực gây gãy xương làm tổn thương các tế bào tại vùng gãy, gây chết các tế

bào. Các tế bào này cần các yếu tố kích thích sự hình thành mạch máu, dẫn đến mở rộng mạch máu và tăng khả năng thẩm thấu của chúng, do đó làm tăng lưu lượng máu tới vùng gãy. Trên nền của các mầm máu đông tạo thành từ các tế bào viêm, các tế bào sợi bắt đầu xuất hiện để dần thay thế máu đông bằng việc hình thành các nguyên bào sợi, bao gồm sự hình thành collagen..

- Giai đoạn tạo can xương:

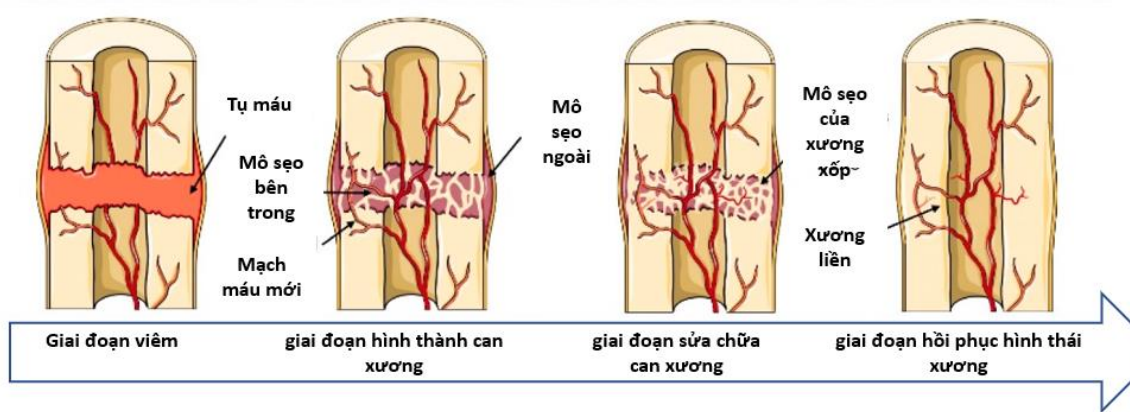
+ Hình thành can xương mềm: Trong khoảng 1 đến 3 tuần đầu, nhiều mạch máu sẽ được tái tạo bởi các tế bào gốc tủy xương. . Các tế bào trung mô xâm nhập vào vùng tổn thương và trải qua biệt hóa. Không những lực căng tại vị trí tổn thương kích thích hoạt động của tế bào gốc, mà chúng tiếp tục sản sinh ra các tế bào sợi. Can xương mềm được hình thành thông qua sự chuyển đổi từ tổ chức hạt thành tổ chức tạm thời chứa canxi, bao gồm các tạo cốt bào và tế bào sụn cùng với hệ thống các sợi collagen, các dạng bào chất gian và sụn.

+ Hình thành can xương cứng: là một quá trình quan trọng của quá phát triển của xương, bắt đầu với can xương mềm. Các tế bào sụn và sợi collagen trong can xương mềm bắt đầu thu thập canxi, tạo ra môi trường thích hợp cho sự phát triển của các tế bào gốc chuyển hóa thành tế bào xương. Các tế bào này biến đổi từ sụn đã khoáng hóa thành các bè xương cứng, sắp xếp dọc theo các vi quản. Quá trình này gọi là sự cốt hoá, và nó đóng vai trò quan trọng trong việc tạo ra các bè xương cứng. Sự cốt hoá đảm bảo rằng xương được tạo ra sẽ nối liền một cách vững chắc với độ bền cần thiết để duy trì cấu trúc xương. Cấu trúc xương này rất quan trọng để đảm bảo xương không bị gãy và có khả năng chịu lực một cách hiệu quả.

- Giai đoạn sửa chữa can xương: Quá trình hình thành can xương cứng diễn ra khi can xương mềm tiếp tục phát triển. Các tế bào sụn và hệ thống sợi collagen bắt đầu kết tủa canxi, tạo môi trường thuận lợi cho các tế bào gốc tham gia và trải qua biến đổi thành các tế bào xương. Các tế bào này chuyển đổi từ tế bào sụn đã khoáng hóa thành các cốt xương cứng, được sắp xếp theo hình dạng của

các vi khuẩn. Quá trình cốt hoá này tạo ra các bề xương cứng, đảm bảo rằng ổ gãy được nối liền vững chắc.

- Giai đoạn hồi phục hình thái xương: Giai đoạn phục hồi kéo dài khá lâu, từ một đến nhiều năm. Ở người đến độ tuổi trưởng thành, quá trình phục hồi cấu trúc diễn ra không thể về trạng thái ban đầu.



Hình 1.3. Bốn giai đoạn của quá trình liền xương [10]

- Một số biện pháp đã được nghiên cứu để tăng cường khả năng liền xương:
 - + Thực phẩm bổ sung - calci, protein, vitamin C và D
 - + Kích thích tạo xương bằng điện, điện từ và siêu âm. Tuy nhiên, hiệu quả của các phương pháp này vẫn còn cần được nghiên cứu thêm.
 - + Ghép xương – tạo giá đỡ cho xương mới hình thành [11].

1.2.2. Các phương pháp sử dụng trong điều trị liên quan đến gãy xương

Các phương pháp sửa chữa xương gãy

- Vật liệu và thiết bị cố định gãy xương: Vật liệu sinh học dùng trong để cố định xương gãy là những vật liệu có khả năng chịu tải, cho phép các hoạt động tạo xương xảy ra bình thường. Kim loại (titan và hợp kim của titan, thép không gỉ), vật liệu composite gốc polymer, bioceramic, vật liệu tự tiêu hủy sinh học (biodegradable material) là những vật liệu thường được sử dụng nhất trong chấn thương chỉnh hình [12].
- Ghép xương: Xương ghép được sử dụng như một chất độn và làm khung nền, tạo điều kiện hình thành xương và thúc đẩy quá trình liền xương. Thông thường là ghép xương tự thân (autogenous bone graft), ghép xương đồng loại

(allograft), ghép xương dị loại (xenograft) hoặc sử dụng vật liệu sinh học tổng hợp (synthetic biomaterial). 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. Các phác đồ điều trị gãy xương hiện tại chủ yếu sử dụng phương pháp cấy ghép xương (tự thân/hiến tặng) hoặc cấy ghép các vật liệu (kim loại/ceramic). Trong đó, cấy ghép xương tự thân (autograft) là tiêu chuẩn vàng để điều trị các khuyết tật về xương. Kỹ thuật này có ưu điểm là mô xương được cấy ghép có các đặc tính như tính tạo xương (osteoconduction), tính kích tạo xương (osteoinduction), và tính sinh xương (osteogenesis); nhược điểm là chi phí cao và hạn chế vị trí lấy xương ghép. Kỹ thuật phổ biến thứ hai là ghép xương đồng loại, nhược điểm chính của kỹ thuật này là dễ nhiễm trùng và nguồn xương hiến tặng rất hiếm. Các vật liệu kim loại cũng được sử dụng rộng rãi, nhưng mặc dù có các đặc tính cơ học tốt, chúng không có hoạt tính sinh học hoặc không thể hấp thụ sinh học, thậm chí gây tiêu xương. Ceramic là vật liệu sẵn có và có thể ứng dụng trong nhiều trường hợp. Ví dụ, xi măng calcium phosphate (CaP) có các đặc tính hóa học và chức năng tương đương với mô xương, vừa có tính tương hợp sinh học vừa có hoạt tính sinh học. Tuy nhiên, vật liệu này có quá trình tái thông mạch và khoáng hóa kém, thời gian sống ngắn và không có khả năng thích ứng với những thay đổi của xương. Do vậy, các phương pháp kỹ thuật mô xương cần được ứng dụng vào lĩnh vực này [13].

Phát triển khung nền (scaffold) trong kỹ thuật mô xương [13]

Kỹ thuật mô xương (BTE) có mục đích phát triển một khung nền 3 chiều nhiều thành phần (3D multicomponent scaffold) tạo ra sự tái tạo sinh lý của mô chức năng (ví dụ mô xương), khắc phục những nhược điểm của các vật liệu sinh học hiện có. Các khung này trước hết nhằm mục đích hoạt động như chất độn, chiếm không gian có sẵn trong cơ quan hoặc mô bị tổn thương và từ từ, sự ăn mòn sinh học và tái hấp thu được lập trình sẵn của chúng cho phép chúng cung cấp một khung cho sự phát triển của mô mới. Cuối cùng, các mô này sẽ

thay thế một phần hoặc hoàn toàn khung nền. Khung nền lý tưởng cho kỹ thuật mô xương phải có ba đặc tính chính sau đây:

- Tính tạo xương (osteoconduction): là khả năng các tế bào tạo xương trong vùng ghép di chuyển qua khung nền và từ từ thay thế nó bằng xương mới theo thời gian. Điều này phụ thuộc rất nhiều vào dạng vật lý và thành phần hóa học của vật liệu. Các yếu tố như tính ưa nước, độ xốp, tính tương hợp sinh học và khả năng phân hủy sinh học của vật liệu sẽ ảnh hưởng đến tính chất tạo xương của nó.
- Tính sinh xương (Osteogenicity): là đặc tính của những khung nền chứa các tiền cốt bào và tạo thuận lợi cho sự kết dính và tăng sinh của chúng
- Tính kích tạo xương (Osteoinduction): là khả năng thu hút các tế bào chưa trưởng thành đến vị trí tổn thương và kích thích các tế bào này phát triển thành các tạo cốt bào.

Một khung nền đóng vai trò của như một chất nền ngoại bào, được sử dụng như một giá đỡ cơ học chống lại các tác nhân từ môi trường, vật liệu thường có cường độ nén trong khoảng 2–12 MPa và mô đun khoảng 5 Gpa (đây là độ bền của xương xốp). Ngoài ra, vật liệu có khả năng phân hủy sinh học được kiểm soát để khi mô tái tạo từ từ, khung nền sẽ bị thoái hóa và không cần phải phẫu thuật cắt bỏ, tránh các biến chứng tiềm ẩn sau phẫu thuật như nhiễm trùng và sốc. Lý tưởng nhất là vật liệu không gây ra bất kỳ phản ứng miễn dịch nào cho cơ thể, do đó, nó phải tương thích sinh học. Tính chất hóa học bề mặt của khung nền phải tạo ra sự kết dính, tăng sinh và biệt hóa tế bào thành mô tự nhiên, tạo môi trường 3D cho các tế bào khác nhau và các yếu tố tăng trưởng được nhúng vào khung nền, kích thích sự phát triển của mô xương dẫn đến tích hợp xương. Điều quan trọng vật liệu phải có cấu trúc mạng lưới xốp liên kết với nhau vì cấu trúc này cần thiết cho sự phát triển của mạch máu, cung cấp oxy và các chất dinh dưỡng khác đến các tế bào và loại bỏ chất thải [14]. Kích thước lỗ cho khung nền BTE nằm trong khoảng từ 50 đến > 900 μm [15]. Mỗi

vật liệu chế tạo khung nền đều có những ưu điểm và hạn chế riêng và chúng được tóm tắt trong bảng dưới đây [14].

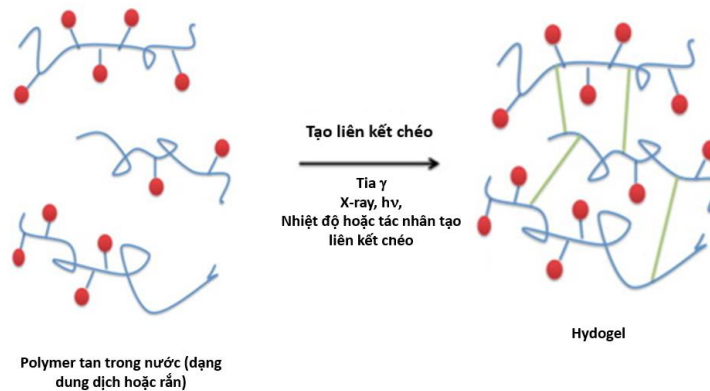
Bảng 1.1. Ưu điểm và nhược điểm của một số vật liệu sử dụng trong tổng hợp khung nền cho kỹ thuật mô xương [10]

Vật liệu	Ví dụ	Ưu điểm	Nhược điểm
Kim loại	Nickel-Titanium alloy, titanium alloy, magnesium alloy, tantalum	Mô đun Young cao, cường độ nén cao, ái lực xương cao, khả năng giảm chấn cao	Rò rỉ ion, không phân hủy sinh học, ăn mòn, cần phẫu thuật để loại bỏ vật cấy ghép
Ceramics (gốm sứ)	HAP, β -TCP, Bio-glass	Tương thích sinh học, Phân hủy sinh học, hỗ trợ hoạt động của tế bào, dẫn truyền xương tốt, kiểm soát được tỷ lệ thoái hóa	Giòn, dễ gãy và độ bền môi thấp, suy thoái và tỷ lệ hình thành xương không phù hợp
Polymer tổng hợp	PLGA, PCL, PEG, PPF	Có thể tái sản xuất do thành phần hóa học được xác định rõ, tỷ lệ thoái hóa được kiểm soát, Có thể được sửa đổi	Khả năng tương thích sinh học kém, phản ứng miễn dịch tiêu cực, tương tác tế bào-ma trận có vấn đề, độ bám dính tế bào thấp, độ dẻo thấp, tốc độ thoái hóa rất lâu dẫn đến phải mổ lần thứ hai để loại bỏ, không kỵ nước
Polymer tự nhiên	Collagen, chitosan, axit hyaluronic, sợi tơ	Nguồn gốc tự nhiên, khả năng tương thích sinh học, khả năng hấp thụ sinh học, hoạt tính sinh học, Khả năng phân hủy sinh học, Sự hiện diện của các vị trí bám dính và nhận dạng tế bào, Không độc hại, kháng vi khuẩn	Phụ thuộc vào quy trình khai thác và chế biến, độ bền cơ học không đủ, dễ bị nhiễm chéo, khó xử lý

1.3. Vật liệu Hydrogel

1.3.1. Khái niệm và phân loại vật liệu hydrogel

Hydrogel là polymer có cấu trúc mạng lưới không gian (3D) (cross-linked polymer networks) [16], có nhiều tính chất quan trọng như khả năng hấp thụ nước cao, khả năng phân hủy sinh học 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 [17].



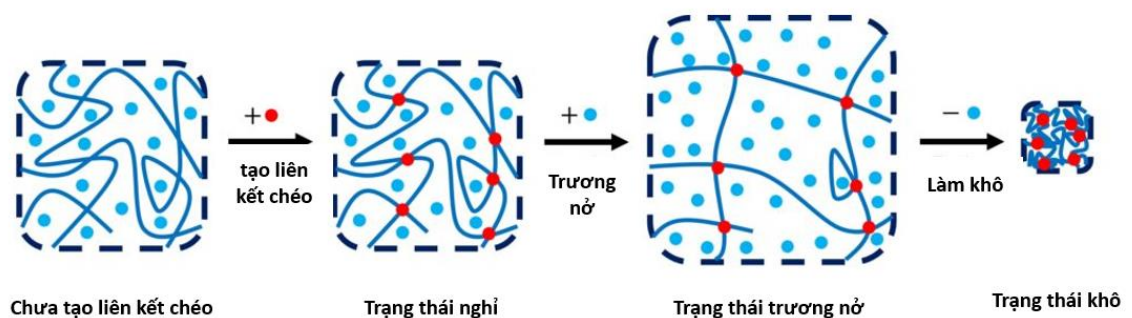
Hình 1.4. Hình thành hydrogel bằng phương pháp tạo liên kết ngang của các polyme tan trong nước [18]

Tính chất hydrogel

Hydrogel có các tính chất đặc trưng như độ trương nở, độ bền cơ học, tính tương thích và phân hủy sinh học nên được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như kỹ thuật, công nghệ, dược phẩm và y sinh học.

- Tính trương nở: thành phần và cấu trúc của hydrogel được đặc trưng bởi một chuỗi các liên kết vật lý hay hóa học, chính vì thế không có khái niệm rõ ràng về khối lượng phân tử của hydrogel. Để biết khả năng trương nở của một hydrogel người ta phải xác định khoảng không gian bên trong mạng hydrogel có sẵn để chứa nước. Trong hydrogel có ba lực tương tác chính là: polymer-nước, tĩnh điện, và thẩm thấu. Ba tương tác đó có tác động làm mở rộng mạng lưới hydrogel. Tuy nhiên, lực tương tác giữa polymer và nước là yếu tố quyết

định đến sự trương nở của hydrogel. Tính ưa nước của hydrogel sẽ giúp cho lực tương tác giữa polymer với nước trở nên mạnh hơn và giúp vật liệu sẽ trương nở trong nước. Vì thế, đối với những hydrogel mang những nhóm chức ưa nước thì sẽ làm cho lực tương tác polymer-nước trở nên càng mạnh. Ngoài ra, sau khi hình thành gel, độ trương nở còn chịu ảnh hưởng bởi mật độ liên kết ngang và điện tích cũng như nồng độ liên kết ngang [2, 19-21].



Hình 1.5. Tính chất trương nở của hydrogel [22]

Cấu trúc và tính chất của hydrogel có thể được chia thành hai loại chính: hydrogel không chứa ion và hydrogel chứa ion. Hydrogel không chứa ion, như poly (N-vinyl-pyrrolidone) và poly (ethylene oxide), thường có xu hướng trương lên trong môi trường nước do tương tác polymer-nước. Điều này làm cho chúng hấp thụ nước và trở nên phồng lên khi tiếp xúc với nước. Hydrogel này thường được sử dụng trong các ứng dụng y tế và công nghiệp, nơi tính chất hấp thụ nước quan trọng. Hydrogel chứa các nhóm ion, bao gồm các loại như anion, cation và ion lưỡng tính, có khả năng thẩm thấu nước. Sự thẩm thấu xảy ra do sự khác biệt về nồng độ ion giữa gel và dung dịch xung quanh, dẫn đến sự bù trừ điện tích của các ion. Điều này ảnh hưởng đến sự trương nở của hydrogel, nó phụ thuộc vào pH của môi trường nước, tức là nó thay đổi theo mức độ phân ly của các chuỗi ion. Thay đổi pH có thể làm thay đổi các đặc tính của hydrogel chứa ion, và điều này có ảnh hưởng lớn đến việc điều chỉnh sự phát triển và sử dụng của chúng trong các ứng dụng như thuốc trúng đích. [2, 19-21].

Ngoài những yếu tố trên, sự hấp thụ nước của hydrogel còn liên quan tới một số yếu tố khác như mật độ liên kết ngang, mật độ điện tích, bản chất dung dịch, cấu trúc các lỗ xốp trong không gian. Yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến độ trương nở của hydrogel chính là mật độ liên kết ngang vì mật độ liên kết ngang càng cao thì khoảng cách giữa các chuỗi với nhau càng ngắn, từ đó dẫn đến làm giảm khả năng trương nở của hydrogel [2, 19-21].

- Tính cơ học: Tính cơ học của hydrogel là yếu tố rất quan trọng vì độ bền cơ học của gel là chỉ tiêu quan trọng khi thiết kế hydrogel. Mức độ liên kết ngang quá cao sẽ dẫn đến tính giòn hoặc ít đàn hồi của gel. Tính đàn hồi của gel rất quan trọng để tạo ra độ mềm dẻo của các mạch tạo lưới, thuận lợi cho quá trình di chuyển của các tác nhân có hoạt tính sinh học. Do đó, việc cân bằng giữa độ vững chắc và độ mềm dẻo của hệ gel là cần thiết để sử dụng các vật liệu này một cách phù hợp [2, 19, 23, 24].

- Tính phân hủy sinh học: Một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến ngành kỹ thuật mô xương là khả năng phân hủy sinh học của vật liệu. Theo một số nghiên cứu, mật độ liên kết ngang có ảnh hưởng đến khối lượng suy giảm và tính cơ học của hydrogel. Mật độ liên kết ngang càng cao thì khả năng suy giảm khối lượng càng lâu. Ngoài ra, trong quá trình tái tạo mô, sự phân hủy của hydrogel rất cần thiết. Khối lượng phân hủy của vật liệu cấy ghép phải phù hợp với tốc độ hình thành mô mới và các phân tử giải phóng ra trong quá trình phân hủy không độc đối với tế bào. Do đó, cần hiểu và kiểm soát được cơ chế, khối lượng suy giảm để tạo ra vật liệu phù hợp với ứng dụng [2, 19, 23-26].

- Có ba cơ chế suy giảm cơ bản của hydrogel là thủy phân, suy giảm bởi enzyme và suy giảm do quá trình hòa tan. Phần lớn các hydrogel tổng hợp suy giảm thông qua quá trình thủy phân của các liên kết ester. Trong khi đó, khối lượng suy giảm của những hydrogel suy giảm bởi enzyme khác nhau tùy thuộc vào loại enzyme trong cơ thể động vật và nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* [25, 26].

- Tính tương hợp sinh học: Một trong những đặc điểm quan trọng của vật liệu hydrogel là khả năng biến tính nhằm tạo ra các tính chất như tương hợp sinh học và không độc để trở thành một polymer y sinh tiềm năng. Tất cả các polymer được sử dụng trong y sinh đều phải trải qua các thử nghiệm về độc tế bào và độc tính. Đánh giá khả năng gây độc của tất cả các loại vật liệu sử dụng để tạo gel là một phần không thể thiếu để xác định tính phù hợp của gel cho những ứng dụng sinh học. Hydrogel tạo ra môi trường để tế bào có thể di chuyển, sinh trưởng và biệt hóa. Những vật liệu được dùng để tạo hydrogel có thường những tính chất như tăng khả năng biệt hóa của tế bào, tăng độ bám dính, tăng trưởng và từ đó phát triển và hình thành mô. Polymer được lựa chọn cần phải thỏa mãn những tính chất như không gây độc tế bào, không kích hoạt phản ứng miễn dịch ngoài ra còn phải tăng sự phát triển và thúc đẩy sự bám dính của tế bào [2, 19, 23, 26].

1.3.2. Nguyên liệu tạo thành hydrogel

Hydrogel có thể được điều chế từ các polymer tự nhiên (gelatin, chitosan, collagen, axit hyaluronic,...), tổng hợp (ví dụ: polyethylene glycol -PEG) hoặc bán tổng hợp (PEG kết hợp với polysaccharide chứa cholesterol) [27].

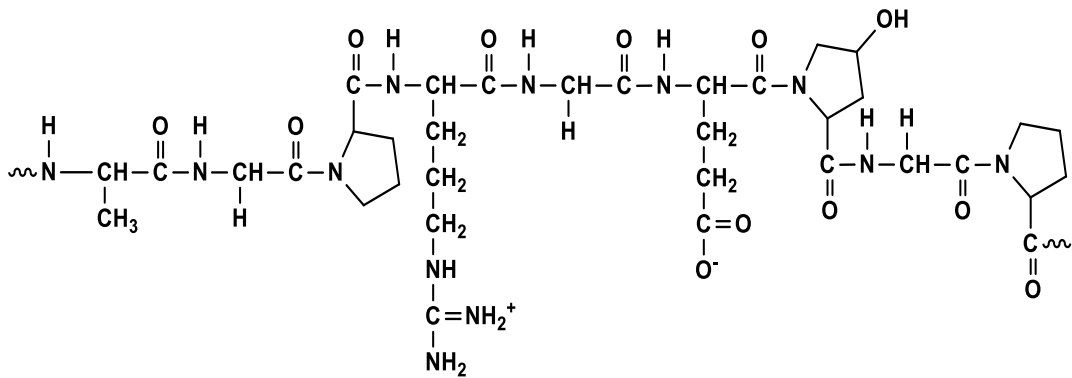
Các polymer tự nhiên thường có khả năng tương thích sinh học và khả năng phân hủy sinh học tốt, hầu hết đều hòa tan trong nước. Đa phần chúng là thành phần tự nhiên của chất nền ngoại bào (ECM), bề mặt thân nước cho phép các tế bào dễ dàng bám dính, tăng sinh và phân hóa. Các polymer tổng hợp có ưu điểm là có thể kiểm soát và tái tạo được. Tuy nhiên, khả năng tương thích sinh học, độ an toàn, hoạt tính sinh học kém hơn với polymer tự nhiên [28].

1.3.2.1. Gelatin

- Gelatin là sản phẩm của quá trình thủy phân một phần collagen - protein cấu trúc chính của các mô liên kết. Trọng lượng phân tử và đặc tính của gelatin phụ thuộc vào nguồn collagen và phương pháp sản xuất. Dựa vào quy trình sản xuất người ta phân ra loại A và B. Loại A được tạo ra thông qua xử lý acid,

trong khi loại B được xử lý bằng dung dịch kiềm. Tính chất của mỗi loại được trình bày ở Bảng 1.2 [29].

- Thành phần cấu tạo chủ yếu của gelatin là protein (85-92%), muối khoáng và nước. Xương gia súc, da sừng, da lợn, da cá, côn trùng,... là những nguồn collagen chính để sản xuất gelatin [30].



Hình 1.6. Cấu trúc gelatin

Bảng 1.3. Tính chất của gelatin loại A và B

Loại gelatin	A		B	
Nguồn gốc	Da heo	Xương heo	Da bò	Xương bò
Điểm đẳng điện (pI)	7,5-9	6,5-8	4,8-5,2	4,8-5,2
Độ nhớt (mPa.s)	1,8-5,5	1,8-4	2-7	2 - 7

- Một số tính chất của gelatin [31]:

+ Gelatin là chất rắn dạng miếng, bột hoặc hạt, không mùi, không vị, trong suốt, có màu từ trắng đến vàng nhạt, độ ẩm từ 9-12% và có tỉ trọng riêng từ 1,3-1,4.

+ Trong nước nóng, gelatin sẽ hút nước, trương nở tạo dung dịch nhớt. Trong dung dịch acid và kiềm, gelatin hòa tan nhanh. Gelatin có khả năng tan trong glycerin, propylen glycol, sorbitol, manitol nhưng không tan trong cồn, aceton, CCl_4 , benzen, ether và các dung môi hữu cơ khác

+ Độ bền của gelatin tỉ lệ nghịch với nhiệt độ (độ bền giảm nếu nhiệt độ trên 100°C), ngoài ra còn phụ thuộc nhiều yếu tố như nồng độ, thời gian và pH.

+ Độ nhớt: độ nhớt của gelatin loại B thường cao hơn 30-50% độ nhớt của gelatin loại A. Độ nhớt của gelatin thương mại thường từ 2-7 cP, tối đa 3 cP. Các yếu tố ảnh hưởng đến độ nhớt là nguồn nguyên liệu, nồng độ, dung môi, pH, nhiệt độ.

+ Điểm đẳng nhiệt: Điểm đẳng điện mà tại đó Gelatin kết tủa là 7,0-9,0 với loại A và 4,7-5,4 với loại B.

+ Khả năng tạo gel: Khả năng tạo gel là một thuộc tính quan trọng của gelatin và được sử dụng để đánh giá chất lượng của nó cũng như xác định các ứng dụng có thể sử dụng gelatin. Sự bền của gelatin khi hình thành gel được đo bằng độ Bloom. Gelatin thường có độ Bloom trong khoảng từ 150 đến 300 Bloom. Gelatin có chất lượng thấp có độ Bloom dưới 150, gelatin chất lượng trung bình có độ Bloom từ 150 đến 220, và gelatin chất lượng cao có độ Bloom từ 220 đến 300. Cơ chế tạo gel gồm 2 giai đoạn:

- Giai đoạn 1: Vật liệu bắt đầu hấp thụ và trương nở trong nước để tạo dung dịch, giai đoạn xảy ra khi gelatin được cho vào nước và gia nhiệt ở 45-60°C.
- Giai đoạn 2: Tạo liên kết ngang nối các phân tử gelatin lại từ đó hình thành mạng cấu trúc không gian chiều khi gelatin được làm nguội ở 8-10°C.

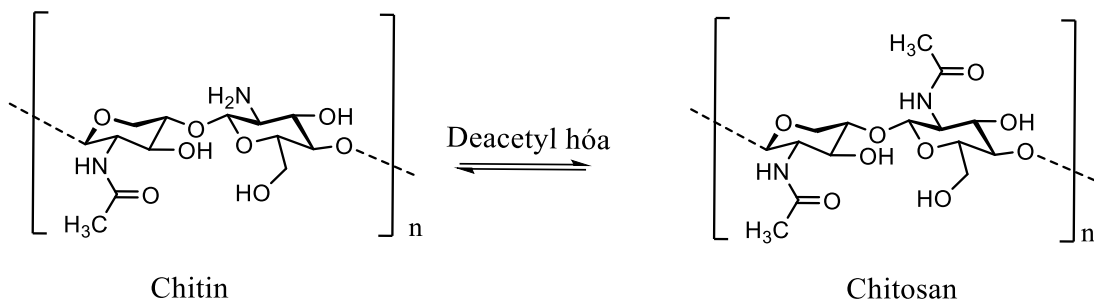
Gelatin có nhiều ưu điểm và được sử dụng trong các lĩnh vực như công nghiệp thực phẩm, trong phân phối thuốc, trong kỹ thuật mô xương, trong ngành y dược (làm băng vết thương, chất làm nở huyết tương, chất kết dính và miếng thấm dùng trong phẫu thuật). Gelatin trương nở trong nước, có sẵn trên thị trường, rẻ hơn nhiều so với collagen, đồng thời, nó vẫn chứa các phân tử liên kết quan trọng cho sự gắn kết của tế bào. Sự quan tâm rộng rãi đến gelatin còn do tính không độc, không gây ung thư, tính tương hợp sinh học và khả năng

phân hủy sinh học của nó. Tuy nhiên, các vật liệu dựa trên gelatin thường có các đặc tính cơ học kém, không ổn định nhiệt và thời gian phân hủy tương đối ngắn [29].

Chitosan

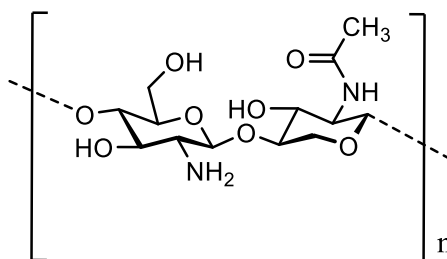
- Chitosan là một loại polymer tự nhiên, không độc hại, có khả năng phân hủy sinh học. Chitosan cấu tạo từ D-glucosamine liên kết với các nhóm glucosamine N-acetyl qua liên kết $\beta \rightarrow (1,4)$. Chitosan có cấu trúc tương tự như cellulose, tuy nhiên, ở vị trí C-2 trong chitosan là nhóm amin, còn ở cellulose là các nhóm hydroxyl (-OH). Sự thay đổi của nhóm chức này giúp chitosan có những tính chất để được ứng dụng rộng rãi trong thực phẩm cũng như trong y sinh [32].

- Chitosan được sản xuất từ quá trình deacetyl hóa chitin. Chitin trong tự nhiên thường tồn tại trong ở cả thực vật và động vật, nhiều nhất là ở các loài giáp xác. Do vậy, người ta thường dùng vỏ các loài giáp xác để điều chế chitosan bằng phương pháp deacetyl hóa trong môi trường kiềm (**Hình 1.7**). [33]. Một số tính chất như khả năng hút nước, khả năng hấp phụ chất màu, kim loại, kết dính với chất béo, kháng khuẩn, kháng nấm, mang DNA,... của chitosan phụ thuộc rất lớn vào độ deacetyl hóa. Tuy nhiên, khả năng hút nước của chitosan giảm đi khi tăng độ deacetyl.



Hình 1.7. Phản ứng deacetyl hóa chitin tạo chitosan

- Chitosan có Công thức phân tử : $(C_6H_{11}O_4N)_n$. Tên gọi IUPAC: **Poly β -(1-4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose** hay **Poly β -(1-4)-glucosamine**
- Công thức cấu tạo:



Hình 1.8. Cấu trúc chitosan

Một trong số những tính chất của chitosan là khả năng kháng khuẩn, ức chế những chủng vi sinh vật như: Gram âm, Gram dương và vi nấm. Khả năng ức chế vi sinh vật của chitosan phụ thuộc vào độ deacetyl hóa (chitosan có độ deacetyl trên 90% có khả năng kháng khuẩn tốt) và phân tử lượng. Một số nghiên cứu cho rằng sự tương tác tĩnh điện giữa cấu trúc polymer dương của chitosan, protein bề mặt tế bào anion với nội độc tố của vi sinh vật làm thay đổi tính thấm của màng tế bào của vi sinh vật, dẫn đến sự phá hủy các thành phần nội bào, dẫn đến chết tế bào. Vì thế sự hiện diện của các nhóm amin trong chuỗi phân tử chitosan rất quan trọng đối với đặc tính kháng khuẩn. Do vậy, khi chitosan được acetyl hóa hoàn toàn sẽ mất hoạt tính kháng khuẩn do thiếu các nhóm amine.

Ngoài ra, Khả năng tạo màng của chitosan rất tốt và có nhiều tính chất cơ lý quan trọng. Tuy nhiên, những tính chất này thường phụ thuộc vào hai yếu tố chính: phân tử lượng và độ deacetyl hóa của chitosan. Màng chitosan với độ deacetyl hóa cao thường có đặc điểm ứng suất kéo cao và khả năng giãn dài tốt, tạo ra màng chất lượng với độ bền vượt trội. Tuy nhiên, chất này thường có độ trương nở thấp hơn, giới hạn sự linh hoạt. Tính chất độ rắn của màng chitosan cũng có thể biến đổi tùy thuộc vào dung môi sử dụng trong quá trình sản xuất màng. Dung môi có thể ảnh hưởng lớn đến độ rắn và cấu trúc của màng chitosan. [33].

- Tính chất sinh học: chitosan có tính hút nước, giữ ẩm, kháng khuẩn và đặc biệt có tính tương hợp sinh học cao, không gây độc và an toàn với cơ thể người. Ngoài ra, chitosan được xem như là một chất nền tạo điều kiện cho sự phát triển

tế bào để tối ưu quá trình kích thích, tái tạo mô mà không gây ra các phản ứng phụ gây hại cho cơ thể:

+ Tính tương hợp sinh học: Một số nghiên cứu được thực hiện để đánh giá khả năng tương hợp của chitosan trên nhiều loại tế bào như nguyên bào sợi, nguyên xương, tế bào sụn, tế bào mô, tế bào thần kinh và tế bào gan. Kết quả cho thấy chitosan không gây độc tế bào và hỗ trợ cho quá trình tăng sinh phát triển [34-37]. Bumgardner và các cộng sự đánh giá tính tương hợp sinh học của chitosan bằng cách cấy ghép titan bọc chitosan ở xương chày của thỏ. Đánh giá mô học cho thấy phản ứng viêm xảy ra là rất nhỏ và quá trình tái tạo xương bắt đầu hình thành, tiếp sau đó là phát triển cấu trúc vi mô [36, 38].

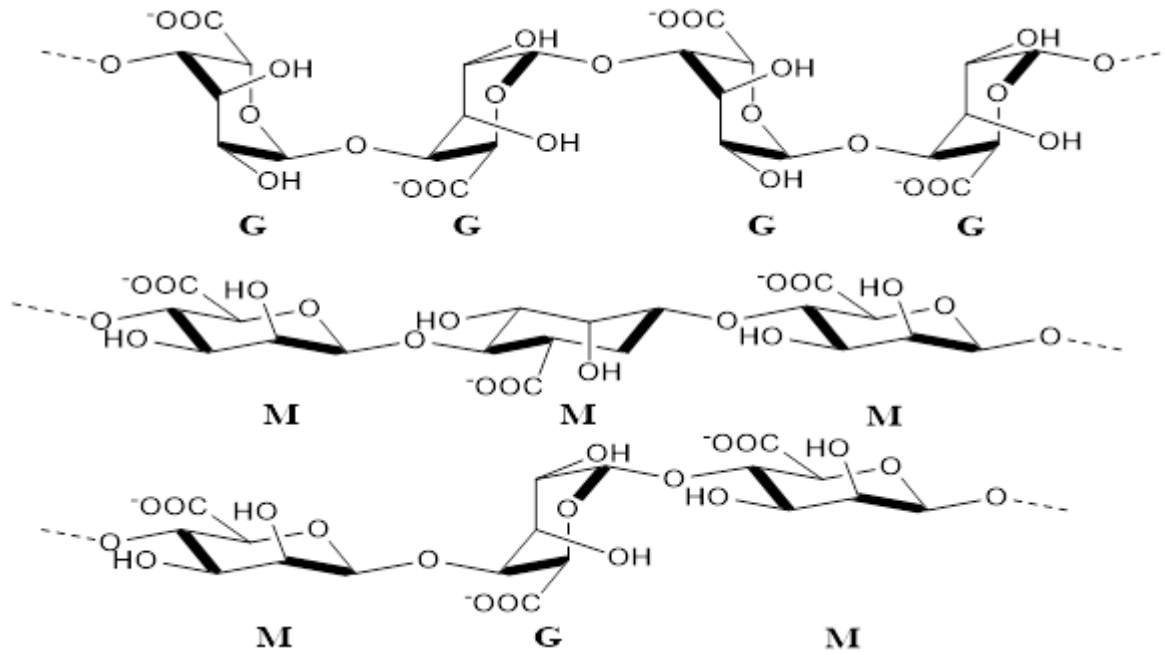
+ Tính kháng khuẩn: nhiều nghiên cứu đã cho thấy chitosan chống lại vi khuẩn Gram dương và Gram âm, nấm và nấm men [36, 39, 40].

- Ứng dụng của chitosan trong y sinh: Chitosan được ứng dụng trong việc điều trị vết bỏng, chitosan là chất được thêm vào băng gạc và đã cho phép sử dụng trên con người, chitosan với trọng lượng phân tử thấp có thể được sử dụng làm chất mang vì khả năng dễ hấp thụ sinh học,... [33, 34]

1.3.2.2. Alginate

- Alginate là một loại polysaccharide âm điện có nhiều trong thành tế bào của rong nâu với hàm lượng cao (40% khối lượng chất khô) và trong các nang polysaccharide của vi khuẩn. Alginate là loại polymer sinh học có nguồn gốc tự nhiên nhiều thứ 2 trên thế giới chỉ sau cellulose. Alginate được hình thành bằng cách trùng hợp acid d-mannuronic và acid l-guluronic [41].

- Alginate được cấu tạo từ các polysaccharide mạch thẳng liên kết với nhau bằng liên kết (1 → 4) glucozid với 2 phân tử β-D-mannuronic (M) và acid α-L-guluronic (G). Sự liên kết này được phân ra thành 3 nhóm chính như sau: chuỗi homopolymannuronic (gồm các gốc acid mannuronic MMM), chuỗi homopolyguluronic (gồm các gốc acid gluronic GGG) và chuỗi luân phiên (2 gốc luân phiên nhau MGM) [42].



Hình 1.9. Cấu trúc hóa học của khối G, khối M và khối xen kẽ trong alginate

- Khi alginate tiếp xúc với dung dịch chứa các ion có hóa trị hai, sẽ tạo liên kết giữa các chuỗi phân tử alginate. Điều này diễn ra thông qua các cầu nối ion, với các khối GGG trong alginate tham gia vào quá trình tạo gel. Tuy nhiên, vùng chứa khối MMMM và GMGM không tương tác trực tiếp với các ion, tạo thành các vùng ngắt trong mạng lưới gel. Kết quả là, mạng lưới gel alginate có tính chất cùng lúc đó là độ bền chắc và độ mềm dẻo. Các ion Ca^{2+} có kích thước nano giúp cho việc tạo ra liên kết ion trong alginate. Ion này chen vào các lỗ trống tạo bởi bốn gốc G từ hai chuỗi phân tử alginate khác nhau. Mô hình này thường được gọi là "mô hình vỉ trứng" (Egg-box) do sự tương tự về cấu trúc với việc các ion Ca^{2+} nằm trong nhiều lỗ trống trong liên kết.
- Ứng dụng trong y sinh: alginate được sử dụng rộng rãi trong y sinh, dược phẩm, công nghiệp thực phẩm, kỹ thuật mô và mỹ phẩm. Ngoài ra, alginate còn được sử dụng rộng rãi trong phân phối thuốc do nó là vật liệu trơ, có khả năng hòa tan tốt, có đặc tính phân hủy sinh học trong môi trường cơ thể người và có độ xốp gel cao để phân tán các phân tử.

1.3.2.3. *Chondroitin sulfate*

- Chondroitin sulfate là một glucosaminoglycan sulfate, một trong những thành phần chính của môi trường ngoại bào của nhiều mô liên kết. Chúng được tìm thấy nhiều trong sụn, vây cá và các chất nền hữu cơ trong xương động vật. Trong cơ thể con người, chondroitin sulfate chứa nhiều trong sụn khớp, xương, da, giác mạc mắt và thành các động mạch.

Chondroitin sulfate thường được sử dụng để điều trị các bệnh liên quan về xương khớp. Chondroitin sulfate là thành phần chính của sụn khớp, chúng có chức năng bảo vệ bằng cách ức chế enzyme phá hủy sụn như collagenase, phospholipase A2 và N-acetylglucosaminidase, ngoài ra chúng còn có vai trò kích thích các enzyme xúc tác phản ứng tổng hợp acid hyaluronic. Nó thường được sử dụng kết hợp với các thành phần khác, bao gồm mangan ascorbate, glucosamine sulfate, glucosamine hydrochloride hoặc N-acetyl glucosamine để tăng hiệu quả chữa bệnh.

- Chondroitin sulfate được phân loại dựa trên vị trí N-Acetylglucosamine trên cấu trúc :

+ ***Chondroitin sulfate A***: vị trí carbon thứ 4 N-acetylgalactosamine (GalNAc) (chondroitin-4-sulfate)

+ ***Chondroitin sulfate C***: vị trí carbon 6 của GalNAc (chondroitin-6-sulfate)

+ ***Chondroitin sulfate D***: vị trí carbon 2 của acid glucuronic và 6 của GalNAc (chondroitin-2,6-sulfate)

+ ***Chondroitin sulfate E***: vị trí carbon 4 và 6 của GalNAc (chondroitin-4,6-sulfat)

Trong đó, *Chondroitin-4- sulfate* và *Chondroitin-6-sulfate* là chiếm đa số và là thành phần chính trong các mô xương và mô mềm liên kết.

- Tính chất của chondroitin sulfate: Chúng có khối lượng phân tử trung bình trong khoảng 50000 tùy vào nguồn gốc. Chondroitin sulfate được gắn với các protein để tạo thành một proteoglycan (PG) bằng liên kết O-glycosid. Phân tử

proteoglycan ở mô sụn (có khoảng 100 chondroitin sulfate) kết hợp với protein để tạo thành một cấu trúc vững chắc. Ngoài ra, chondroitin sulphate còn là thành phần kích thích tổng hợp proteoglycan, ức chế sự hình thành các enzyme phân giải protein và oxit nitric. Chúng còn có khả năng tương tác với môi trường ngoại bào và cho thấy hiệu quả chống viêm, điều hòa miễn dịch, và điều trị bệnh xương khớp

- Ứng dụng chondroitin sulfate trong y sinh:

+ Điều trị viêm xương khớp: Trong một nghiên cứu của Michel và các cộng sự, chondroitin sulfate 800 mg được sử dụng trên 300 đối tượng bệnh nhân viêm xương khớp trong hai năm. Kết quả sau hai năm cho thấy chondroitin sulfate có thể ngăn chặn tiến triển của viêm xương khớp khi quan sát X-quang [43].

+ Ứng dụng khác: Chống đông máu, điều trị ung thư, dùng trong nhãn khoa được sử dụng làm thuốc nhỏ mắt để phòng ngừa và điều trị tình trạng mắt, khô mắt, thoái hóa võng mạc.

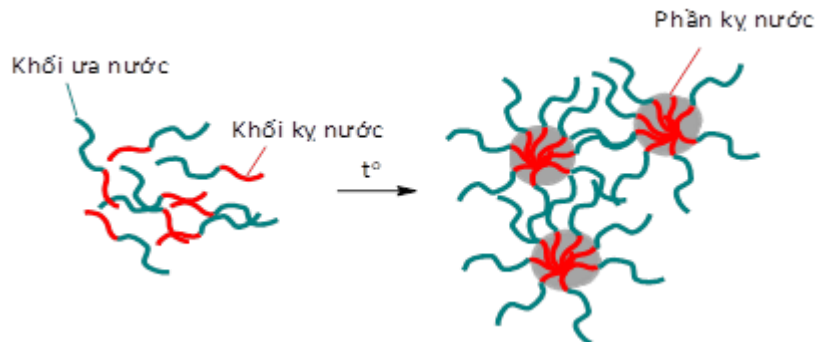
1.3.3. Các phương pháp tổng hợp hydrogel

Sự hình thành hydrogel liên quan đến quá trình “khâu mạng” của các chuỗi polymer. Quá trình này còn được gọi là quá trình “gel hóa”. Dựa trên các cơ chế gel hóa khác nhau, quá trình gel hóa có thể diễn ra bằng liên kết ngang vật lý (gel hóa vật lý) hoặc bằng liên kết ngang hóa học (gel hóa hóa học) [16]. Phân loại hydrogel dựa vào phương pháp tạo thành liên kết ngang là phép phân loại phổ biến nhất và có thể làm ra vật liệu hydrogel mong muốn (tối ưu thời gian gel hóa, tăng tính cơ lý và khả năng tương hợp sinh học).

1.3.3.1. Liên kết ngang hình thành bằng phương pháp vật lý:

Tương tác kỵ nước: Các polymer kỵ nước tạo liên kết ngang trong môi trường nước từ đó dung dịch tạo gel khi tăng nhiệt độ, quá trình này còn được gọi là sol gel. Sự tạo gel theo tương tác kỵ nước xảy ra thông qua cơ chế như trong **(Hình 1.10)**. Bằng phản ứng trùng hợp hay tổng hợp trực tiếp khối

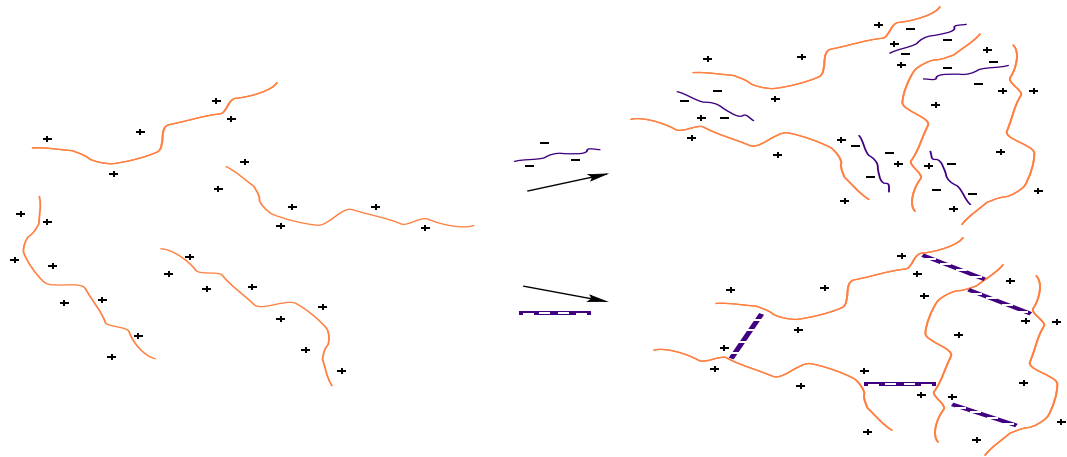
copolymer để tạo ra các phân tử polymer mang hai đầu ưa nước và kỵ nước. Ở nhiệt độ thấp, vật liệu sẽ hòa tan trong nước. Khi nhiệt độ tăng lên sẽ kéo theo các đầu kỵ nước gom tụ lại để giảm thiểu diện tích bề mặt tiếp xúc với nước. Nhiệt độ xảy ra sự gel hóa phụ thuộc vào các yếu tố chính như nồng độ, đầu kỵ nước và cấu trúc polymer.



Hình 1.10. Tương tác kỵ nước

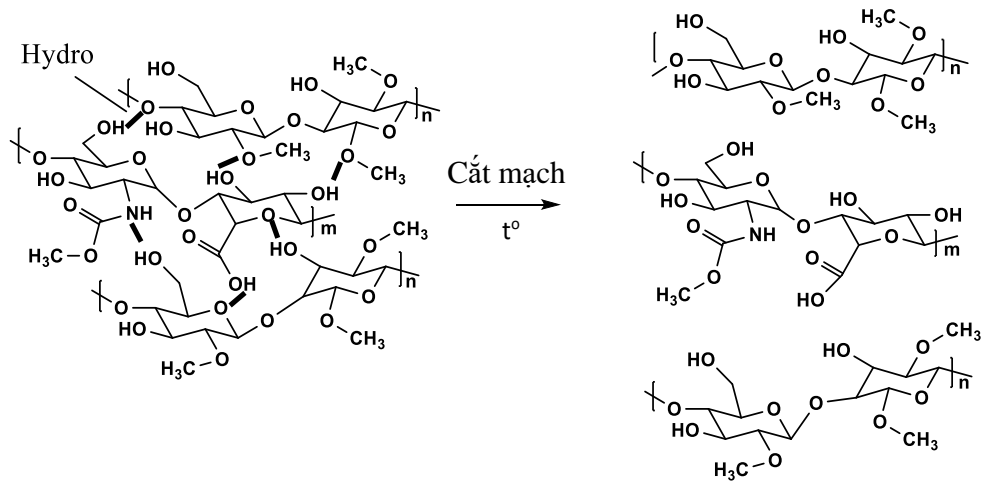
Tương tác ion: Các tương tác ion đã được nghiên cứu sẽ hình thành các liên kết ngang *trong* mạng lưới polymer, từ đó dẫn đến hiện tượng tạo gel. Ưu điểm của phương pháp này là khả năng phân hủy sinh học xảy ra khi ion trong dịch ngoại bào liên kết cạnh tranh với các thành phần gel, làm phá vỡ mạng lưới liên kết ngang. Liên kết ngang cũng được hình thành bởi sự thay đổi pH, khi đó sẽ làm ion hóa hoặc proton các nhóm chức dẫn đến sự gel hóa.

Tương tác điện tích có thể xảy ra giữa một polymer và một phân tử nhỏ hoặc giữa hai polymer có điện tích trái dấu để tạo thành hydrogel, như được minh họa trong **(Hình 1.11)**.



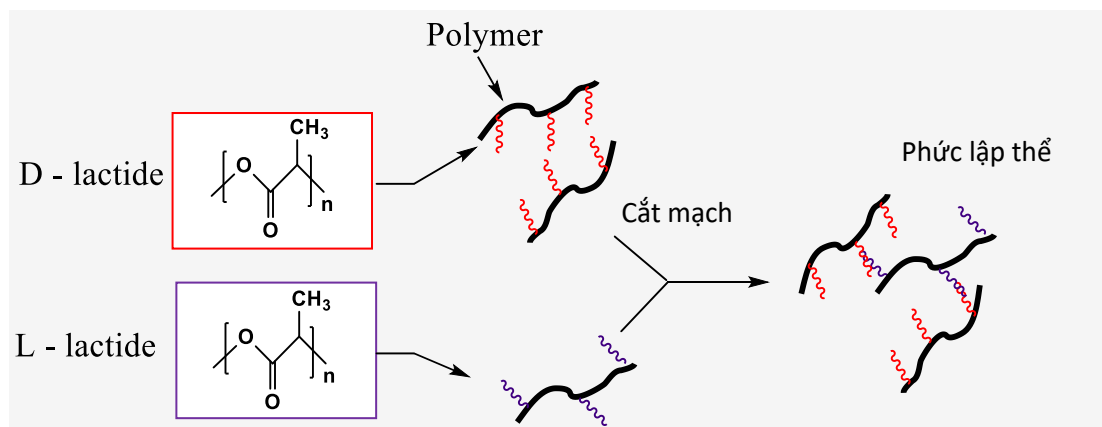
Hình 1.11. Tương tác ion

Tương tác liên kết hydro: Các tương tác liên kết hydro có thể tạo thành hydrogel thông qua phương pháp tăng hoặc giảm nhiệt độ đông đặc. Ví dụ điển hình cho phương pháp này là hydrogel dựa trên poly(vinyl alcohol) [44]. Ngoài ra, phương pháp này còn có thể ứng dụng vào hydrogel dạng tiêm. Hỗn hợp của hai hay nhiều polymer tự nhiên có thể đồng bộ về tính chất như tính lưu biến, kéo theo các thuộc tính đàn hồi, độ nhớt của hỗn hợp polymer giống gel nhiều hơn so với các polymer riêng lẻ. Các chuỗi polymer tương tác với nhau thông qua các liên kết hydro để tạo ra sự tương thích trong cấu trúc hình học của các polymer tham gia



Hình 1.12. Tương tác liên kết hydro giữa các biopolymer tương thích hình học (methylcellulose và acid hyaluronic); các liên kết hydro bị phá vỡ dưới ảnh hưởng của nhiệt độ [45].

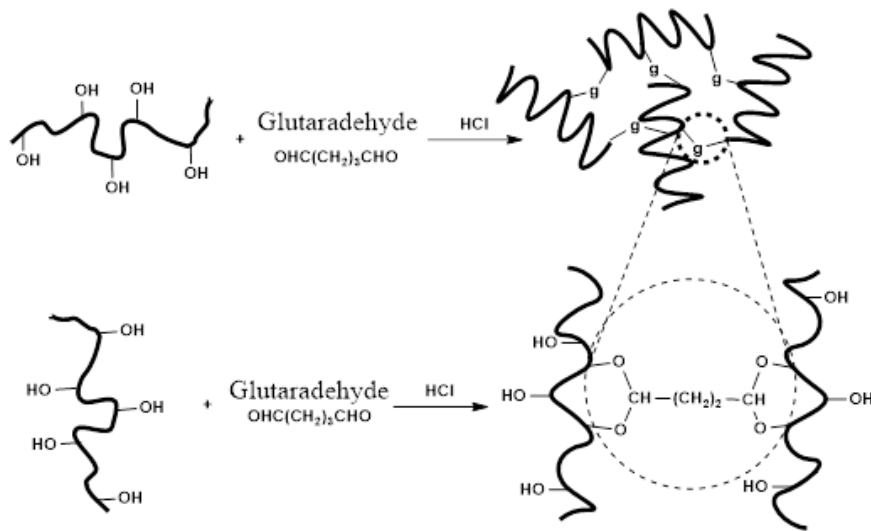
Tương tác phức lập thể: tương tác xảy ra giữa các chuỗi polymer hay các phân tử nhỏ có cùng thành phần hóa học nhưng hóa học lập thể khác nhau. Đặc biệt, hydrogel được tạo ra có các mô đun có khả năng lưu trữ cao (14 kPa), chúng được tạo ra bằng sự tương tác mạnh giữa các khối polylactide với L- và D-stereochemistry [46]. Ghép các oligome L-lactide và D-lactide vào tiền chất dextran gây ra hiện tượng gel hóa trong môi trường nước, làm nên các tính chất như tương thích sinh học và phân hủy sinh học mà không cần sử dụng các điều kiện phản ứng trong môi trường độc hại như hữu cơ dung môi [47].



Hình 1.13. Tương tác lập thể D-lactide và L-lactide

1.3.3.2. Liên kết ngang hình thành bằng phương pháp hóa học

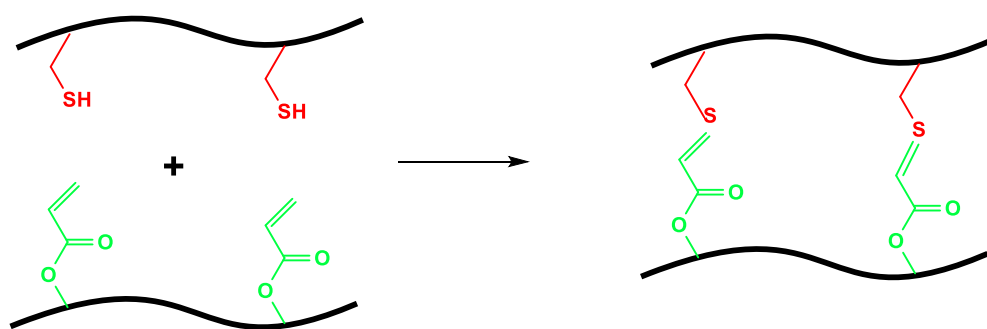
Tạo liên kết ngang bằng chất tạo liên kết ngang: Các chất tạo liên kết ngang như glutaraldehyd, epichlorohydrin, v.v ... đã được sử dụng phổ biến để tạo ra mạng lưới hydrogel liên kết ngang giữa các polymer tổng hợp hay polymer tự nhiên khác nhau. Phương pháp này liên quan liên kết giữa phân tử với các chuỗi polymer để tạo ra chuỗi liên ngang. Ví dụ điển hình cho phương pháp này là hydrogel được điều chế bằng tinh bột ngô và rượu polyvinyl sử dụng glutaraldehyd làm chất liên kết ngang [48].



Hình 1.14. Tạo liên kết ngang bằng glutaraldehyde [48]

Tạo liên kết ngang bằng cách polymer hóa gốc tự do: Bằng cách sử dụng các chất để tạo gốc tự do như chất khơi mào nhạy sáng và chất khơi mào oxi hóa khử (N, N, N', N'-tetramethyl ethylenediamine) để tổng hợp các hydrogel có ứng dụng trong sinh học [49]... Phương pháp này tạo liên kết ngang rất nhanh dựa vào cường độ tia UV ở cường độ cao, tuy nhiên nó cũng gây ảnh hưởng xấu đến hoạt động trao đổi chất của tế bào và nhiệt sinh ra trong quá trình tạo liên kết ngang cũng có thể gây hoại tử tế bào. Vì vậy, cường độ giới hạn tia UV cho phép nằm trong khoảng từ $5\text{-}10 \text{ mW}^3/\text{cm}^2$ để không ảnh hưởng xấu đến tế bào. Ngoài ra, khi tăng nồng độ chất khơi mào sẽ làm giảm thời gian gel hóa và tăng cường tính cơ học của vật liệu. Nồng độ chất khơi mào cao (10 mM) sẽ gây độc tế bào trong 3 ngày nuôi cấy [19].

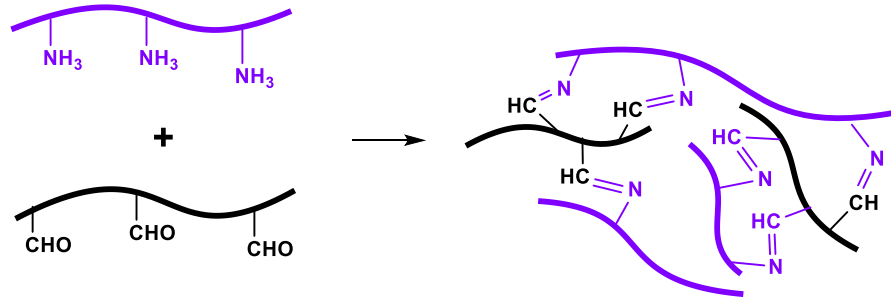
Tạo liên kết ngang bằng phản ứng cộng Michael: Phản ứng Michael (hay phản ứng cộng Michael) là phản ứng cộng của một nucleophil với một hợp chất cacbonyl không bão hoà ở vị trí α , β . Polymer chứa các nhóm thân hạch (nhóm amine hoặc nhóm thiol) liên kết ngang với polymer chứa các nhóm thân điện tử (vinyl/acrylate/ Maleimide) để tạo thành hydrogel [50]. Phản ứng xảy ra với hiệu quả cao, trong điều kiện nước mà không có bất kỳ sản phẩm phụ nào khác, làm cho nó trở thành một phương pháp phù hợp để tạo liên kết ngang trong tổng hợp hydrogel ứng dụng trong y sinh. Tuy nhiên, việc dùng dư các nhóm chức thiol có thể gây chết tế bào. Phản ứng cộng Michael tạo ra hydrogel có thời gian gel hóa trung bình từ 0,5-60 phút. Ngoài ra, thời gian gel hóa có thể thay đổi qua mật độ liên kết ngang [51-53].



Hình 1.15. Phản ứng cộng Michael [54]

Tạo liên kết ngang bằng phản ứng Schiff-base: Cơ sở của phản ứng Schiff-base là phản ứng của các nhóm amin, hydrazide và hydroxylamine với các nhóm aldehyde hoặc ketone để tạo thành một liên kết imine, hydrazone hoặc oxime. Phản ứng xảy ra trong điều kiện nước mà không cần sử dụng thêm hóa chất hoặc chất xúc tác khác và tốc độ phản ứng phụ thuộc vào pH. Do những ưu điểm trên, phương pháp này phù hợp để chế tạo hydrogel. Nhược điểm của phản ứng Schiff-base là các hợp chất chứa aldehyde có thể ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học hoặc gây ảnh hưởng đến môi trường ma trận ngoại bào thông qua phản ứng giữa các nhóm amin [55]. Trong một nghiên cứu về alginate được điều chế bằng phản ứng của oxy hóa alginate với borax, kết quả cho thấy liên kết ngang được hình thành từ các nhóm amin trong gelatin. Thời

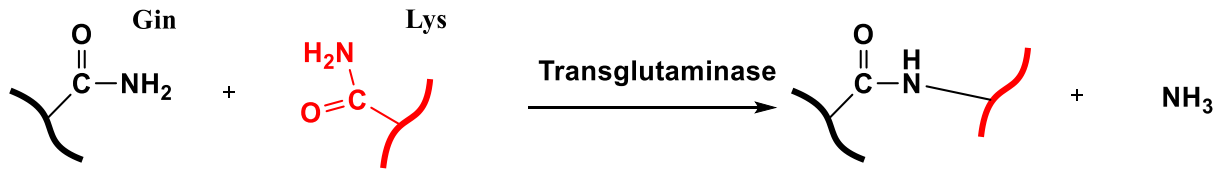
gian hình thành hydrogel dao động từ vài giây đến dưới một phút bằng cách thay đổi nồng độ của các chất [56]. Tương tự, polyethyleneglycol cũng có chức năng tạo liên kết ngang giữa aldehyde và oxyamine trên cơ sở phương pháp Schiff-base [57].



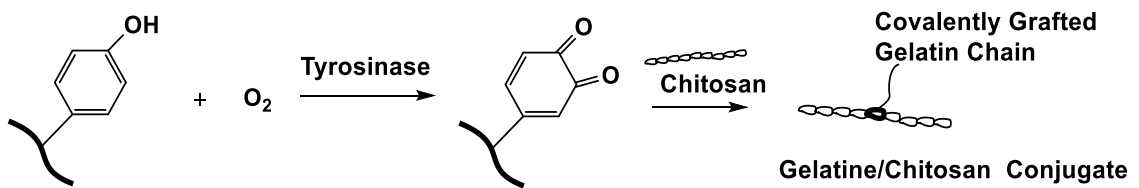
Hình 1.16. Liên kết Schiff-base [57]

Tạo liên kết ngang bằng xúc tác enzyme: Phản ứng tạo liên kết ngang có những ưu điểm như: tính đặc hiệu cao, phản ứng êm dịu, không có phản ứng phụ trong quá trình hình thành liên kết ngang. Do đó có thể kiểm soát của sự gel hóa, từ đó làm tăng tỷ lệ liên kết ngang bằng cách điều chỉnh nồng độ enzyme. Các enzyme phổ biến để tổng hợp hydrogel như: transglutaminase, tyrosinase, horseradish peroxidase.

Trong một nghiên cứu về tác động của enzyme transglutaminase và tyrosinase cho kết quả rằng enzyme xúc tác trực tiếp cho sự hình thành gel mà không cần các xúc tác khác, quá trình xảy ra đơn giản và êm dịu. Transglutaminase tham gia quá trình xúc tác phản ứng amide dẫn đến hình thành liên kết ngang N-C(g-glutamyl)lysine giữa 2 protein. Còn tyrosinase oxi hóa các phenol có khối lượng phân tử thấp hoặc các phần tyrosine trong protein thành những quinone, sau đó các quinone phản ứng trực tiếp với nhóm amine hoặc các hợp chất mang amine để hình thành các hydrogel sinh học [19, 58].



Hình 1.17. Phản ứng liên kết ngang hình thành hydrogel dưới sự xúc tác của enzyme Transglutaminase [58]



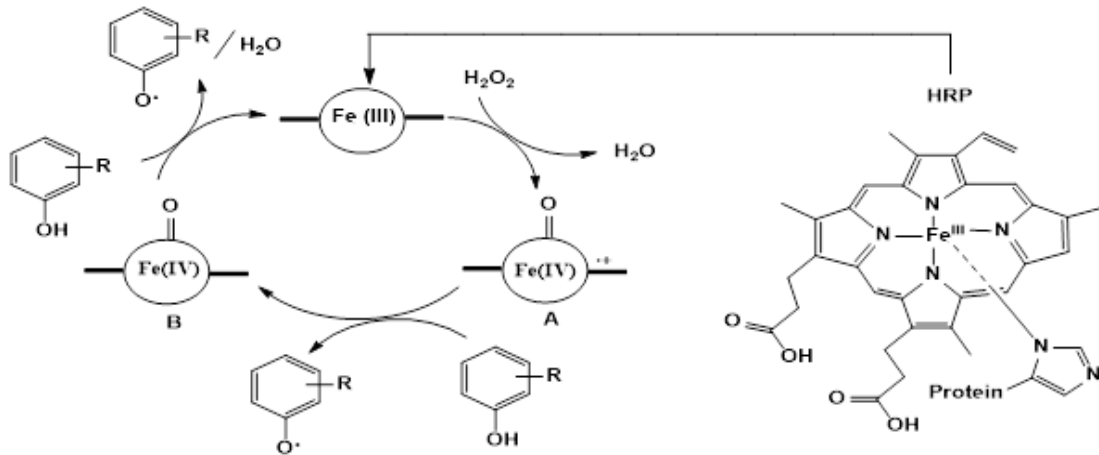
Hình 1.18. Phản ứng liên kết ngang hình thành hydrogel dưới sự xúc tác của enzyme tyrosinase [58]

Horseradish peroxidase (HRP):

Nhiều loại enzyme khác nhau được sử dụng để hình thành hydrogel in situ do chúng có tính chọn lọc và hiệu suất cao, điều kiện phản ứng ôn hòa, không tạo ra các sản phẩm phụ độc hại. Tuy nhiên, hydrogel hình thành có tốc độ gel hóa chậm và tính chất cơ học kém. Ngược lại, hệ thống liên kết ngang được tạo thành do xúc tác peroxidase (HRP) cải thiện cung cấp khả năng kiểm soát tốt, tạo ra các đặc tính mong muốn, do đó ngày càng nhận được sự chú ý trong kỹ thuật tái tạo mô [59].

Horseradish peroxidase (HRP) là một loại β -hemoprotein đơn loại được sử dụng gần đây trong tổng hợp in situ của nhiều loại hydrogel. Chúng có nhiệm vụ xúc tác cho phản ứng gắn cặp của các nhóm phenol hoặc dẫn xuất của anilin trong polymer với sự hiện diện của H₂O₂ để tạo ra liên kết ngang và hình thành hydrogel. Cơ chế xúc tác vòng của enzyme HRP được giải thích qua **Hình 1.19**. Trong quá trình xúc tác, enzyme chứa Fe(III) ở trạng thái nghỉ tương tác với H₂O₂, giải phóng một phân tử nước và oxy hóa Fe(III) thành hợp chất A. Hợp chất A bao gồm Fe(IV) oxoferryl và gốc cation porphyrin (Por.+FeIV=O) trong trạng thái oxy hóa cao. Để phản ứng, cần giảm đi hai electron để hợp chất A

trở về trạng thái nghỉ. Quá trình giảm electron đầu tiên của gốc cation porphyrin cần sự có mặt của chất nền phenol hoặc dẫn xuất anilin, tạo thành hợp chất B (Fe(IV)=O). Sau đó, giảm electron thứ hai giúp hợp chất B trở lại trạng thái nghỉ. [60].



Hình 1.19. Cơ chế xúc tác vòng của enzyme HRP [60]

1.3.4. Hydrogel tiêm tại chỗ và các phương pháp tạo thành hydrogel tiêm tại chỗ [61]

Hydrogel tiêm tại chỗ cho thấy tiềm năng ứng dụng lớn, vì chúng có thể thay thế phương pháp phẫu thuật cấy ghép, xâm lấn tối thiểu và có thể tạo thành bất kỳ hình dạng mong muốn nào, phù hợp với các khuyết tật bất thường. Nhiều loại vật liệu sinh học, cả tự nhiên và tổng hợp, đã được ứng dụng để điều chế hydrogel tiêm: chitosan, collagen hoặc gelatin, alginate, axit hyaluronic, heparin, chondroitin sulfate, poly(ethylene glycol)(PEG) và poly(vinyl alcohol).

- Hydrogel tiêm trên cơ sở chitosan: Chitosan có tiềm năng tạo hydrogel tiêm để sửa chữa sụn, do cấu trúc tương tự như glycosaminoglycan trong sụn. Hydrogel tiêm tại chỗ thể hiện các đặc tính cơ học được cải thiện, có thể phân hủy sinh học và tương thích sinh học. Naderi-Meshkinet và cộng sự đã phát triển một hydrogel tiêm khung chitosan thông qua sự kết hợp của chitosan, glycerol phosphate và tác nhân liên kết ngang hydroxyethyl cellulose [62]. Các nghiên cứu về khả năng tồn tại, tăng sinh và khả năng biệt hóa của các tế bào

gốc trung mô được kết hợp trong hydrogel chỉ ra rằng hydrogel tiêm này có tiềm năng cao trong kỹ thuật mô sụn. Bằng cách kết hợp chitosan-glycerophosphate với các nồng độ khác nhau của tinh bột, Sá-Lima và cộng sự đã điều chế thành công một hydrogel chitosan-tinh bột phản ứng nhiệt dạng tiêm để phân phối tế bào [63].

- Hydrogel tiêm dựa trên collagen-gelatin: Yuan và cộng sự đã kết hợp collagens loại I và loại II để tạo ra một hydrogel tiêm có mô đùn nén có thể được điều chỉnh bằng cách thay đổi hàm lượng collagen loại I trong hydrogel. [64]. Các tế bào chondrocyte được nhúng trong hydrogel duy trì hình thái tự nhiên của chúng và tiết ra ECM đặc hiệu cho sụn. Hơn nữa, hydrogel tiêm dựa trên collagen có thể được điều chế bằng cách tích hợp collagen với các vật liệu sinh học khác. Kontturiet và cộng sự đã phát triển một loại hydrogel in situ tiêm gồm collagen loại II/hyaluronic acid [65]. Sau khi bao gói tế bào chondrocyte và chondrogenic growth factor transforming growth factor- β 1, khả năng tồn tại và tăng sinh của tế bào, hình thái, khả năng sản xuất glycosaminoglycan và biểu hiện gen đã được nghiên cứu. Hydrogel này có thể duy trì khả năng tồn tại và các đặc tính của tế bào chondrocyte, và nó có thể là một giá thể tiềm năng cho kỹ thuật mô sụn. Geng và cộng sự đã điều chế một hydrogel tiêm dựa trên gelatin từ dextran bị oxy hóa, gelatin amin và PEG-acrylate 4 nhánh thông qua quy trình hai bước [66]. Sự gắn kết và lan rộng của tiền nguyên bào xương, cũng như sự lan rộng và tăng sinh của tế bào bọc bên trong hydrogel cho thấy hydrogel tiêm có các đặc tính cơ học thuận lợi, khả năng phân hủy sinh học và tính tương hợp sinh học.

- Hydrogel tiêm dựa trên alginate: Balakrishnan và cộng sự đã tạo ra một hydrogel dạng tiêm gel hóa nhanh bằng cách tự liên kết chéo periodate-oxidized alginate và gelatin khi có sự hiện diện của hàn the. [67]. Hydrogel tích hợp tốt với mô sụn, phản ứng stress oxy hóa và viêm không đáng kể. Hơn nữa, các tế bào chondrocyte được bao bọc trong hydrogel có khả năng tồn tại thuận lợi và thể hiện kiểu hình bình thường về sự tăng sinh và di chuyển trong chất nền, cho

thấy hydrogel là một khung kết dính thu hút tế bào, có thể tiêm được. Tuy nhiên, hạn chế khi sử dụng hydrogel alginate dạng tiêm là nó không đủ mạnh để duy trì hình dạng cấu trúc của mô tái sinh. Do đó, alginate thường được biến đổi hoặc sử dụng kết hợp với các vật liệu sinh học khác để cải thiện tính chất cơ học của nó. Zhao và cộng sự đã phát minh ra một hệ thống hydrogel xi măng canxi photphat-alginate mạnh về mặt cơ học [68]. Các tính chất cơ học của hydrogel tốt hơn nhiều so với các chất mang polymer và hydrogel dạng tiêm trước đây, và các tế bào được bao bọc có thể tồn tại, biểu hiện sự biệt hóa xương và tiết ra các khoáng chất của xương. Hơn nữa, do không có khả năng kết dính tế bào, alginate thường được pha trộn với các polymer khác. Một hydrogel alginate/ axit hyaluronic bị oxy hóa có thể tiêm, phân hủy sinh học, đã được điều chế bởi Park và Lee [69]. Vào sáu tuần sau khi tiêm hydrogel vào chuột, kết quả cho thấy có sự tăng tái tạo sụn. Trong một nghiên cứu khác, một loại hỗn hợp hydrogel dựa trên alginate được tổng hợp bằng cách sử dụng alginate và O-carboxymethyl chitosan và bổ sung các hạt nano fibrin. Đánh giá tỷ lệ trương nở, biên dạng phân hủy, cường độ nén và mô-đun đàn hồi chỉ ra rằng vật liệu phù hợp cho các ứng dụng kỹ thuật mô xương.

- Hydrogel tiêm dựa trên chondroitin sulfat: Wiltsey và cộng sự đã phát triển khung hydrogel tiêm dựa trên poly (N-isopropylacrylamide)-graft-chondroitin sulfat, hoạt động như một khung kết dính với mô xung quanh [70]. Hydrogel đã được chứng minh là có các đặc tính cơ học được cải thiện ở 37°C, tăng cường độ bền kéo của chất kết dính (từ 0,4 đến 1 kPa), và không có độc tính tế bào đối với tế bào thận bào thai người (human embryonic kidney 293 cell).

Hydrogel tiêm có thể được tạo ra bằng phương pháp vật lý và hóa học như hydrogel. Trên cơ sở các phương pháp chế tạo, hydrogel tiêm có thể được phân loại thành hydrogel liên kết ngang bằng enzym, hydrogel liên kết ngang nhờ ánh sáng, hydrogel liên kết ngang nhờ phản ứng Schiff-base, hydrogel hình thành liên kết ngang bằng phương pháp cộng Michael, hydrogel liên kết ngang qua trung gian hóa học, hydrogel nhạy cảm với ion, hydrogel nhạy cảm

với pH, và hydrogel nhạy cảm với nhiệt độ. Mặc dù có nhiều phương pháp hình thành hydrogel tiêm đã được nghiên cứu, nhưng hiếm có loại hydrogel tiêm nào được sử dụng trong y học tái tạo lâm sàng. Do đó, việc phát triển một loại hydrogel tiêm phù hợp cho các ứng dụng kỹ thuật mô sụn và xương là rất cần thiết [71].

Hydrogel tiêm tạo thành bằng phương pháp vật lý:

- Các hydrogel tiêm nhạy cảm với nhiệt độ: vật liệu có khả năng gel hóa ở nhiệt độ sinh lý. Các hydrogel tiêm này ở dạng nước ở nhiệt độ phòng, nhưng chúng nhanh chóng tạo gel ở nhiệt độ sinh lý trước khi đông đặc trong mô mong muốn. Đặc điểm hữu ích nhất của hydrogel này là chúng có thể trải qua quá trình chuyển pha mà không cần bất kỳ tác nhân kích thích hóa học nào. Cách giải thích phổ biến nhất về cơ chế chuyển pha của hydrogel tiêm nhạy cảm với nhiệt độ là khi nhiệt độ thay đổi, có sự thay đổi trong trạng thái hydrat hóa của các liên kết hydro liên và nội phân tử, từ đó thay đổi độ hòa tan của hydrogel. Do đó, để tạo ra hydrogel tiêm nhạy cảm với nhiệt độ, các polyme nhạy cảm với nhiệt độ như poly poly(lactic-co-glycolic acid)-PEG, poly(N,N-diethylacrylamide), PNIPAAm, và poly(ethylene glycol-b-[DL-lactic acid-co-glycolic acid]-b-ethylene glycol) thường được sử dụng [71].

- Hydrogel tiêm nhạy cảm với pH: để thu được hydrogel tiêm nhạy cảm với pH, cần kết hợp hydrogel có gốc nhạy cảm với pH như polyelectrolyte N-palmitoylchitosan, polyacrylic acid, oligomeric sulfamethazine, và các đồng phân sulfamethazine (SMO). Ví dụ, Shim và cộng sự đã tổng hợp hydrogel có thể tiêm, nhạy cảm với pH bằng cách thêm các SMO nhạy cảm với pH vào cả hai đầu của polymer đồng trùng hợp khối (poly (ϵ -caprolactone-co-lactide)-PEG-poly (ϵ -caprolactone-co-lactide)) (PCLA-PEG-PCLA) [72]. Hydrogel tiêm SMO- PCLA-PEG-PCLA-SMO này tồn tại dạng dung dịch ở pH cao (pH 8,0), nhưng nhanh chóng biến đổi thành dạng gel ổn định trong các điều kiện sinh lý (pH 7,4). Kim và cộng sự đã gói tế bào gốc trung mô của người và protein-2 tái tổ hợp hình thái xương người (human bone morphogenetic

protein-2) vào hydrogel và tiêm hỗn hợp này vào lưng chuột [73]. Các nghiên cứu mô học quan sát sự biệt hóa tế bào gốc trung mô của người trong 7 tuần đã cho thấy sự hình thành mô khoáng hóa và mức độ hoạt động cao của phosphatase kiềm trong mô khoáng hóa [71].

Ngoài ra, các hydrogel tiêm vật lý khác, chẳng hạn như hydrogel nhạy cảm với ion (ion-sensitive) và nhạy cảm với stress (stress-sensitive),... đã được tổng hợp. Ngoài trừ phát triển các phương pháp mới tạo hydrogel, việc cải thiện tính tương thích sinh học, khả năng phân hủy sinh học, tính chất cơ học và duy trì tính toàn vẹn cấu trúc của vật liệu sinh học trong cơ thể là những chủ đề nghiên cứu sâu hơn để thiết kế hydrogel tiêm vật lý [71].

Hydrogel tiêm tạo thành bằng phương pháp hóa học:

- Hydrogel tiêm tạo thành bằng xúc tác enzyme: phương pháp tạo liên kết chéo bằng xúc tác enzyme có ưu điểm là quá trình gel hóa nhanh, tính đặc hiệu của vị trí cao, khả năng hoạt động ở điều kiện sinh lý bình thường và độc tính tế bào thấp. Một số enzyme đã được áp dụng để tổng hợp hydrogel tiêm cho các ứng dụng kỹ thuật mô xương như: transglutaminase, tyrosinase, phosphopantetheinyl transferase, lysyl oxidase, plasma amine oxidase, phosphatase, thermolysin, β -lactamase và peroxidase. Trong số đó, HRP là loại enzyme được sử dụng phổ biến nhất trong việc tổng hợp hydrogel dạng tiêm. Hệ thống liên kết ngang qua trung gian HRP liên kết cộng hóa trị các polymer có nhóm chức phenol với các protein ECM của mô tự nhiên xung quanh và do đó có lợi trong việc duy trì tính toàn vẹn cấu trúc của mô vết thương. Các hydrogel hình thành bằng phương pháp này có thể được tùy chỉnh một cách hiệu quả bằng cách kiểm soát tốc độ và mức độ hình thành liên kết ngang, cả hai yếu tố đều ảnh hưởng đến các đặc tính hydrogel, chẳng hạn như thời gian tạo gel, độ cứng và tốc độ phân hủy [71].

+ Điều chỉnh thời gian tạo gel: nồng độ HRP và H_2O_2 là các thông số cần thiết để điều chỉnh tốc độ liên kết ngang của các polyme giàu phenol. Mỗi quan

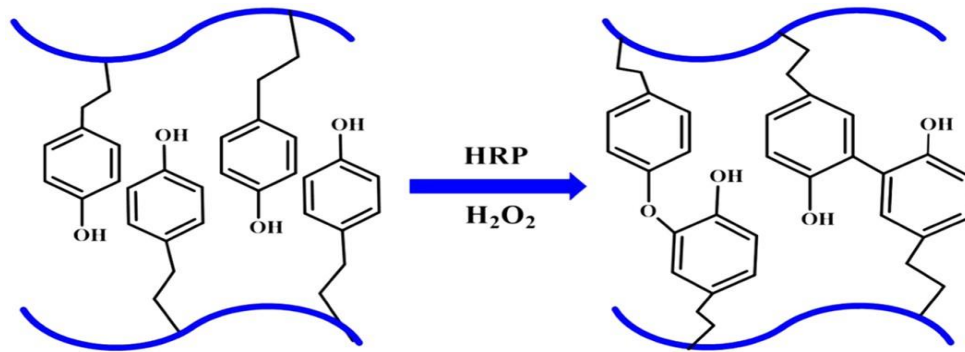
hệ giữa các tham số này và thời gian tạo gel đã được thiết lập. Một vài nghiên cứu cho thấy thời gian tạo gel giảm khi tăng nồng độ HRP và ngược lại ([74, 75]). Mặc dù có những khác biệt nhỏ về thời gian tạo gel cần thiết cho các loại vật liệu khác nhau, nhưng thời gian tạo gel có thể được kiểm soát với độ chính xác từ vài giây đến vài phút. Các thông số khác, chẳng hạn như trọng lượng phân tử, hàm lượng phenol, nồng độ polyme và độ hòa tan trong nước, cũng có thể ảnh hưởng đến thời gian tạo gel [74].

+ Độ cứng cơ học hoặc độ đàn hồi của hydrogel ảnh hưởng đến độ bám dính, tăng sinh, lan rộng, di cư và biệt hóa của tế bào. Độ cứng bị ảnh hưởng đáng kể bởi nồng độ của HRP và H_2O_2 , cũng như số lượng nhóm phenol có sẵn. Một số nghiên cứu đã chứng minh xu hướng phụ thuộc của độ cứng hydrogel vào HRP và H_2O_2 . Mối tương quan giữa độ cứng của hydrogel với nồng độ H_2O_2 cũng đã được nghiên cứu bằng cách sử dụng một loạt nồng độ H_2O_2 với nồng độ HRP cố định. Dữ liệu chứng minh rằng sự gia tăng nồng độ H_2O_2 dẫn đến mô đun lưu trữ của hydrogel tăng lên. Tuy nhiên, việc sử dụng quá nhiều H_2O_2 dẫn đến chết tế bào [71].

+ Phân hủy sinh học: tốc độ phân hủy hydrogel phù hợp sẽ cung cấp không gian cho sự tăng sinh và di chuyển của các tế bào được bọc trong hydrogel. Hai phương pháp đã được áp dụng cho các hệ thống tạo gel *in situ* được xúc tác bởi HRP: thủy phân và phân hủy bằng enzyme. Hầu hết các hệ vật liệu sử dụng polyme tự nhiên (Hyaluronic acid, gelatin, chitosan và dextran) có quá trình thủy phân bằng enzym. Các polyme này có thể bị phân hủy *in vivo* bởi một số enzyme như hyaluronidase, lysozyme và collagenase. Phương pháp thứ hai để tạo ra gel phân hủy sinh học là sử dụng gel có liên kết phân tử có thể thủy phân, như liên kết este và urethane. Bằng cách đưa vào các mối liên kết về mặt hóa học giữa phenol liên hợp và khung polymer, các hydrogel được hình thành có thể trải qua quá trình phân hủy theo thời gian. Động học của quá trình phân hủy của hydrogel được hình thành bởi liên kết ngang được xúc tác bằng HRP có thể

được kiểm soát bằng cách điều chỉnh nồng độ HRP và H_2O_2 , điều này có liên quan đến những thay đổi về mật độ liên kết ngang. Mật độ liên kết ngang thấp dẫn đến tốc độ phân hủy hydrogel cao, trong khi liên kết ngang dày đặc dẫn đến tốc độ phân hủy thấp [71].

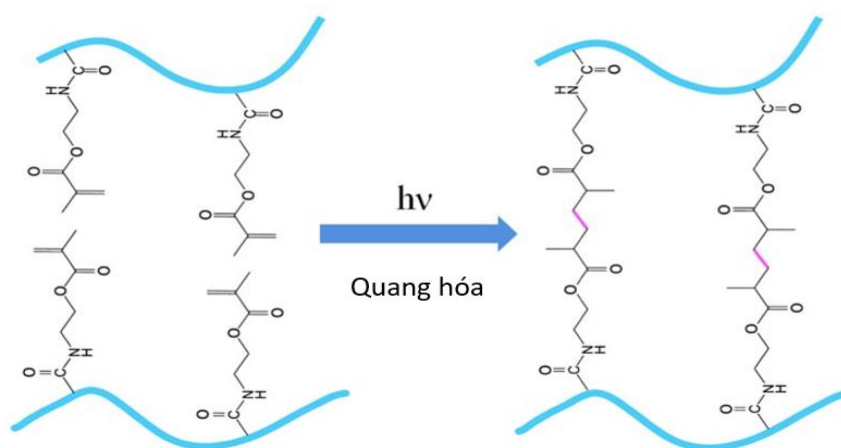
+ Dễ dàng liên hợp tại chỗ: Một ưu điểm của hệ thống tạo gel in situ được xúc tác bằng HRP là phản ứng có thể kết hợp bất kỳ hợp chất nào có các nhóm phenol vào hydrogel. Do đó, một hợp chất quan tâm có các nhóm phenol có thể tham gia vào phản ứng tạo gel và liên kết cộng hóa trị với các phân tử giàu phenol khác. Trong một nghiên cứu của Park và cộng sự, sự liên hợp dễ dàng của peptid chứa tyrosine, SVVYGLRGGY, với hydrogel gelatin-poly(ethylene glycol)-tyramine (GPT). Peptid được trộn đơn giản với dung dịch nước của GPT, sau đó liên kết ngang được hình thành tại chỗ với sự có mặt của HRP và H_2O_2 . Kết quả cho thấy rằng lượng peptid liên hợp có thể được kiểm soát bằng cách thay đổi nồng độ peptid và các peptid liên hợp được phân phối đều trong nền hydrogel. Hơn nữa, sự gia tăng nồng độ peptid làm giảm đáng kể độ cứng của hydrogel, bởi vì GPT và peptid cạnh tranh với nhau để liên kết phenol-phenol. Hệ thống tạo gel in situ được xúc tác bằng HRP cũng có thể được sử dụng để chế tạo hỗn hợp hydrogel bao gồm các polyme giàu phenol khác nhau [76, 77]. Bằng cách thay đổi tỷ lệ pha trộn của các polyme giàu phenol, các hydrogel lai tạo liên kết ngang bằng enzym có thể có hoạt tính sinh học hoặc tính chất cơ học mong muốn.



Hình 1.20. Sơ đồ minh họa hydrogel dạng tiêm được điều chế bằng phương pháp liên kết ngang enzym với peroxidase cải ngựa (HRP) và H_2O_2 [71]

- Hydrogel tiêm tạo thành bằng phản ứng Schiff-base: có ưu điểm là điều kiện phản ứng nhẹ và tốc độ phản ứng cao, cũng như khả năng hình thành liên kết imine giữa các nhóm amin và aldehyd mà không cần xúc tác bên ngoài. Chitosan là một vật liệu sinh học phù hợp để điều chế hydrogel tiêm bằng phản ứng Schiff-base, do có nhiều nhóm amin trên khung. Ví dụ, Cheng và cộng sự đã tổng hợp một polysaccharide hydrogel dựa trên chitosan dạng tiêm để phân phối tế bào và protein, được liên kết chéo thông qua liên kết imine tạo ra từ phản ứng Schiff-base giữa nhóm amin của chitosan và các nhóm aldehyde của dextran aldehyde trong dung dịch nước [71, 78].
- Hydrogel tiêm tạo thành bởi phản ứng cộng Michael: axit hyaluronic, chitosan và PEG thường được sử dụng để điều chế hydrogel qua phản ứng cộng Michael. Ví dụ, Calogero và cộng sự đã điều chế hai loại hydrogel tiêm dựa trên axit hyaluronic bằng phản ứng cộng Michael, sử dụng dẫn xuất amin của axit hyaluronic (HA-EDA), HA-EDA được ghép α -elastin và α , β -poly (N-2-hydroxyethyl)-DL-aspartam đã được chuyên hóa bằng divinylsulfone. Sự trương nở và thoái hóa cũng như khả năng kết hợp các tế bào sụn khớp cho thấy hydrogel tiêm này sở hữu các đặc tính mong muốn để điều trị tổn thương sụn khớp trong các điều kiện sinh lý [71, 79]
- Hydrogel tiêm tạo thành bởi ánh sáng: đây là một quá trình phức tạp, bao gồm các bước khởi đầu, lan truyền và kết thúc, được kích hoạt bởi bức xạ điện

từ trong vùng nhìn thấy và vùng cực tím. Các phương pháp tạo hydrogel đã được áp dụng rộng rãi để điều chế hydrogel tiêm cho kỹ thuật mô sụn vì khả năng kiểm soát thời gian và vị trí của liên kết ngang trong các điều kiện sinh lý. Ví dụ, Papadopoulos và cộng sự đã tổng hợp một poly (ethylene glycol) hydrogel tiêm dựa trên đồng trùng hợp dimethacrylate bằng cách liên kết chéo quang [71], [79]



Hình 1.21. Sơ đồ minh họa hydrogel tiêm được điều chế bằng phương pháp liên kết ngang ánh sáng [71]

Ngoài ra, để cải thiện các tính chất cơ học và khoáng hóa của giá thể trong kỹ thuật mô xương, vật liệu vô cơ thường được đưa vào tạo hydrogel composite. Fu và cộng sự cho rằng hydroxyapatite (HA) là một trong những thành phần vô cơ chính trong mô xương, đã điều chế một hỗn hợp hydrogel cảm ứng nhiệt có thể tiêm gồm ba thành phần: đồng trùng hợp PEG – PCL – PEG, collagen và nanohydroxyapatite. Hydrogel composite này có cấu trúc xốp và nhạy nhiệt. Hơn nữa, các nghiên cứu *in vivo* đã chứng minh rằng hydrogel PECE/collagen/nanohydroxyapatite có khả năng tương thích sinh học tốt và thể hiện hiệu suất tốt hơn trong quá trình tái tạo xương so với quá trình tự phục hồi, do đó cho thấy hứa hẹn tuyệt vời của nó đối với kỹ thuật mô xương [80]. Huang và cộng sự đã chế tạo một hydrogel tổng hợp nanohydroxyapatite/glycol chitosan/axit hyaluronic có thể tiêm được. Các tế bào MC-3T3-E1 được kết hợp trong hydrogel sẽ gắn và lây lan tốt sau 7 ngày đồng ủ, do đó cho thấy ứng dụng tiềm

năng của hydrogel trong kỹ thuật mô xương [81]. Gần đây nhất, một khung alginate/ HA hydrogel có thể tiêm, kết hợp với các vi cầu gelatin (GM), đã được Yan và cộng sự phát triển. Trong hydrogel này, HA và GMs đã cải thiện thành công các tính chất cơ học của khung nền, từ đó cho thấy HA và hydrogel dựa trên alginate tích hợp kép GMs có tính năng vật lý và hoạt tính sinh học phù hợp. Do đó, hydrogel cho thấy tiềm năng lớn để điều trị cục bộ các bệnh lý liên quan đến khuyết tật xương [71, 82].

Các vật liệu vô cơ khác như nanosilica và bioglass đã được nghiên cứu để điều chế hệ thống hydrogel composite. Ví dụ, Vishnu Priya và cộng sự đã phát triển một hệ thống hydrogel có thể tiêm bằng cách sử dụng chitin và poly (butylene succinate) được kết hợp với các hạt nano fibrin và magiê pha tạp kính sinh học. Hệ thống hydrogel này tăng cường sự biểu hiện của phosphatase kiềm và osteocalcin, do đó cho thấy hứa hẹn của nó trong việc tái tạo các khiếm khuyết xương không đều [71, 83].

1.4. Vật liệu Hydrogel composite

1.4.1. Khái niệm

Vật liệu composite là một loại vật liệu được tạo ra bằng cách kết hợp hai hoặc nhiều vật liệu khác nhau để tạo thành một vật liệu mới, kết hợp các tính năng của những vật liệu ban đầu.

Hydrogel có thể mô phỏng các mô tự nhiên, cung cấp một vi môi trường thích hợp cho tế bào, có khả năng tương thích sinh học tốt, do vậy đây là vật liệu được ứng dụng rộng rãi trong kỹ thuật mô xương. Tuy nhiên, các vật liệu hydrogel truyền thống có hạn chế đáng kể về độ bền cơ học và cấu trúc bên trong của chúng. Do vậy, việc tổng hợp các hydrogel composite kết hợp được các đặc tính tốt của mạng polymer và các chất độn có thể nâng cao tính cơ học của hydrogel mà không làm ảnh hưởng đến các tính chất có lợi của chúng [84].

1.4.2. Vật liệu composite trong tái tạo xương

1.4.2.1. Vật liệu Hydrogel composite dẫn tạo xương (Osteoconductive Composite Hydrogels)

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. Các chất độn thường được sử dụng để tạo hydrogel composite là bioceramic (hydroxyapatite, tricalcium phosphate), thủy tinh hoạt tính sinh học (bioglass particles) và ống nano carbon (carbon nanotubes) [13].

- Bioactive Glass: năm 1969, Larry L. Hench phát triển vật liệu 45S5 Bioglass® đầu tiên với những đặc tính nổi bật như tính tương hợp sinh học và hoạt tính sinh học, tạo được liên kết với mô xương đã được khoáng hóa trong môi trường sinh lý cơ thể. Hầu hết các vật liệu Bioactive Glass ngày nay đều có công thức: 45% silica (SiO_2); 24,5% calcium oxide (CaO); 24,5% sodium oxide (Na_2O) và 6% phosphorous pentoxide (P_2O_5) (theo phần trăm khối lượng). Vật liệu Bioactive Glass phân hủy với tốc độ có thể kiểm soát được, giải phóng các ion trong quá trình phân hủy và tạo một lớp carbonated phosphate cho phép chúng liên kết hóa học với xương gốc. Trong môi trường dịch sinh học của cơ thể, Bioactive Glass tạo tủa hydroxyapatite (dạng calcium phosphate tự nhiên có tính tương thích sinh học cao với tế bào và mô) làm tăng sự khoáng hóa của mô xương. Chúng cũng có khả năng gây ra sự biệt hóa của các tế bào trung mô thành các tạo cốt bào (osteoblasts), kích thích giãn mạch. Tuy nhiên, vật liệu này có tính giòn, không thích hợp cho các trường hợp cần chịu tải. Khi sử dụng một mình, chúng kém linh hoạt và có độ bền mỏi kém, vì vậy vật liệu này thường được kết hợp tạo hydrogel composite [13].

Gantar và cộng sự đã kết hợp hydrogel gellan-gum với nanoparticulate glass để cải thiện cấu trúc vi mô và các tính chất cơ học của vật liệu [85]. Khung hydrogel composite chứa 50% bioactive-glass thể hiện Mô đun Young (mô đun ứng suất) là ~ 1,2 MPa. Mặc dù giá trị này không đủ để đáp ứng tải cơ sinh học, tuy nhiên, khi so sánh với hydrogel gellan-gum, việc kết hợp bioglass đã làm

tăng đáng kể Mô đun Young từ 0,4 lên ~ 1,2 MPa và ứng suất phá hoại (failure stress) từ 0,02 lên ~ 0,11 MPa. Năm 2013, Killion và các cộng sự đã tổng hợp hydrogel composite bằng cách kết hợp hydrogel poly(ethylene glycol) dimethacrylate được quang polymer hóa với bioactive glass, việc kết hợp bioactive glass làm tăng độ bền cơ học của vật liệu composite [86].

- Ống nano carbon (CNT) và các vật liệu carbon khác: CNT là là một dạng thù hình của carbon, gồm các nguyên tử cacbon được liên kết với nhau thông qua liên kết sp^2 . Ống nano carbon thường được chia thành hai loại: ống nano carbon đơn vách (single-wall nanotube) và ống nano carbon đa vách (multi-wall nanotube). Vật liệu này có độ bền cực cao, độ dẫn điện cao và diện tích bề mặt lớn, có thể hỗ trợ việc xây dựng các cấu trúc mềm và xốp tương tự như chất nền ngoại bào (ECM), tạo môi trường cho các tế bào di chuyển và tăng sinh một cách sinh lý để hình thành các mô và cơ quan.

Năm 2014, Seo và cộng sự đã phát triển một màng phân hủy được cấu tạo bởi chitosan /silica kết hợp với functionalised-carbon nanotubes (f-CNT) để tái tạo xương. Trong nghiên cứu này, việc kết hợp 2% f-CNT đã tăng cường đáng kể các tính chất cơ học (độ bền kéo và mô đun đàn hồi) của màng CNT/chitosan/silica so với màng chitosan/silica hoặc chitosan đơn thuần, trong khi không ảnh hưởng đến độ giãn dài [87].

Nanocomposite của polymer poly(propylene fumarate) (PPF) được tăng cường bằng ba cấu trúc carbon nanostructure (SWNTs, SWNT siêu ngắn (US-tube) và fullerenes (C60)) được chế tạo bởi Sitharaman và cộng sự. Các US-tube nanocomposite cho thấy hiệu quả tăng cường cơ học tốt nhất. Các tính chất cơ học của vật liệu US-tube nanocomposite đạt đỉnh ở nồng độ 0,5% và các đặc tính cơ học nén và uốn được nâng cao đáng kể (lên đến 200%), khi so sánh với PPF nguyên chất. Nghiên cứu kết luận rằng ống US và SWNTs đóng góp vào việc gia cố cơ học tốt hơn C60 [88].

- Hydroxyapatite: vật liệu nano-hydroxyapatite (nHap) ngày càng được quan tâm do các đặc tính sinh học và cơ sinh học vượt trội của chúng, chúng thể hiện ái lực mạnh mẽ với các mô cứng của vật chủ do sự tương đồng về mặt hóa học với mô xương người đã được khoáng hóa. Một số nghiên cứu đã kết hợp các polymer và nHap để tạo ra các hydrogel composite, kết hợp các đặc tính mong muốn của pha hữu cơ và vô cơ để đạt được hiệu quả hiệp đồng bao gồm cả việc tăng cường các tính chất cơ học [13].

Bảng 1.4. Tính chất cơ học của hydrogel composite có chứa các thành phần vô cơ [89]

Thành phần hydrogel composite		Tỷ lệ	Cường độ nén (MPa)	Mô đun nén (KPa)	Mô đun đàn hồi (MPa)
Hữu cơ	Vô cơ				
Poly(acrylamide)	nHA	85:15	35.8	-	-
Silk fibroin	nHA	85:15	-	109.8	1104.4
Agarose	nHA	65:35	390	-	-
Oxidized alginate-gelatin-BCP	Spherical HA	65:35	-	2.45 khô 0.05 ướt	-
hitin	nHA	75:25	0.3	-	0.3
Gellam gum	Bioglass	50:50	-	-	1.2
PEG	Bioglass	80:20	2.5	-	8

1.4.2.2. Vật liệu Hydrogel composite kích tạo xương (Osteoinductive Composite Hydrogels) [13]

Ở những bệnh nhân loãng xương và có các bệnh về xương làm cản trở quá trình liền xương, cần sử dụng thuốc và các yếu tố tăng trưởng để kích thích hoạt động tái tạo xương. Trong nhiều trường hợp, việc phóng thích có kiểm soát và duy trì nồng độ thuốc tại chỗ là cần thiết, hydrogel là một vật liệu mang lý tưởng trong trường hợp này

- Bisphosphonate: là một trong những nhóm thuốc quan trọng nhất để điều trị các bệnh như ung thư xương di căn và loãng xương. Loại thuốc này khi dùng đường uống có độ hấp thu thấp và độc tính cao. Việc sử dụng vật liệu hydrogel cho phép phân bố thuốc tới đích có kiểm soát với mức độ xâm lấn tối thiểu và thời gian tồn tại lâu dài tại khu vực mô bị tổn thương.
- Statin: thường được sử dụng để giảm cholesterol máu. Tuy nhiên, gần đây, một số nghiên cứu cho thấy statin có vai trò trong việc tăng hình thành xương mới trên mô hình nuôi cấy tế bào và trên các mô hình động vật. Trong một nghiên cứu, Sukul và cộng sự đã điều chế một hệ phức hệ hydrogel ba thành phần để giải phóng có kiểm soát Simvastatin bao gồm: β -tricalcium phosphate (β -TCP); nanofibrillar cellulose (một loại polymer phân huỷ chậm cải thiện khả năng kiểm soát tốc độ giải phóng của gel) và gelatin. Sự hiện diện của các sợi nano và β -TCP đã tạo ra một khung nền có đặc tính tạo xương và phóng thích thuốc có kiểm soát trong hơn 30 ngày.
- Yếu tố tăng trưởng (Growth Factors): Các yếu tố tăng trưởng như Protein tạo hình xương (Bone Morphogenic Protein - BMP) liên quan đến khả năng tạo ra xương và sụn. Tuy nhiên, hiện nay việc sử dụng chúng rất hạn chế vì chúng có thời gian bán hủy ngắn và sự khuếch tán của các yếu tố này đến các mô khác đòi hỏi phải sử dụng liều lượng rất cao (10 μ g) làm cho việc điều trị tốn kém và không an toàn. Để cải thiện điều này, có thể tận dụng ái lực đã biết của BMP-2 đối với heparin bằng cách thêm heparin vào hydrogel. Một nghiên cứu được thực hiện bởi Bhakta và cộng sự đã chứng minh rằng sự giải phóng kéo dài của BMP-2, thu được khi bổ sung heparin vào gel axit hyaluronic cần thiết cho sự hình thành xương. Tương tự, Chung và cộng sự đã điều chế gel fibrin chứa các hạt nano có chứa heparin, trong đó sự hiện diện của heparin là công cụ làm giảm tốc độ giải phóng BMP-2 và tăng cường số lượng và sự khoáng hóa của xương mới hình thành trong cơ thể.

1.4.2.3. Vật liệu Hydrogel composite chứa mô tạo xương (Osteogenic Composite Hydrogels)

Để tái tạo xương, ngành kỹ thuật mô xương nghiên cứu kết hợp các tế bào với một khung nền thích hợp và các tín hiệu tạo xương để kích thích quá trình sửa chữa xương. Hydrogel tạo ra một khung có các đặc tính của chất nền ngoại bào cung cấp cấu trúc vật lý, tính toàn vẹn cơ học và khả năng tương thích sinh học với mô chủ cho phép các tiền tạo cốt bào tăng sinh và biệt hóa thành tạo cốt bào. Hydrogel có thể được kết hợp với các tế bào đã biệt hóa hoàn toàn, tế bào gốc trưởng thành (adult stem cell) hoặc tế bào gốc phôi (embryonic stem cell). Một vài loại tế bào được ứng dụng là: tế bào gốc trung mô (Mesenchymal Stem Cells), tế bào gốc trung mô từ mô mỡ (Adipose Derived Stem Cells), tế bào gốc răng sữa,... [90]

1.4.3. Các phương pháp tổng hợp và tính chất nanocomposite hydrogel [84]

Hydrogel nanocomposite thường được tổng hợp từ vật liệu nano vô cơ và polyme tổng hợp/tự nhiên. Các tính chất của hydrogel nanocomposite thu được phụ thuộc vào thành phần của vật liệu nano và polyme, nồng độ tỷ lệ của vật liệu nano và polyme, kích thước và mức độ phân tán của vật liệu nano trong hydrogel. Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng một số lượng nhỏ vật liệu nano (2-10%) được thêm vào có thể cải thiện đáng kể các tính chất của hydrogel. Do đó, việc kiểm soát mức độ phân tán của vật liệu nano trong hydrogel và sự kết hợp của nó với các chuỗi phân tử của hydrogel là yếu tố quan trọng để điều chế hydrogel nanocomposite.

Phương pháp pha trộn

Đây là phương pháp đơn giản nhất để điều chế hydrogel nanocomposite, trộn trực tiếp các monomer polymer, chất liên kết chéo và vật liệu nano, đồng thời bắt đầu quá trình trùng hợp để tạo thành hydrogel nanocomposite. Quá trình chuẩn bị đơn giản và có thể thu được hydrogel nanocomposite với kích thước hạt đồng nhất bằng cách kiểm soát tốc độ khuấy, nồng độ nguyên liệu và thời gian chuẩn bị trong quá trình trộn. Filippi và cộng sự đã điều chế hydrogel nanocomposite đáp ứng từ tính từ các hạt nano oxit sắt (kích thước hạt trung

binh 15 nm) và polyme hydrogel polyetylen glycol (PEG) bằng cách đồng pha trộn, có khả năng tương thích sinh học tốt và mô đun đàn hồi cao, đồng thời hoạt động như một chất thúc đẩy quá trình tạo xương và sự hình thành mạch để đáp ứng với kích thích từ trường bên ngoài.

Tuy nhiên, khi điều chế bằng phương pháp này, các hạt nano dễ bị kết tụ, điều này làm cho tác dụng nâng cao cấu trúc của vật liệu không rõ ràng. Ví dụ, Tong và cộng sự đã điều chế hydrogel nanocomposite bằng cách trộn các ống nano carbon và hydrogel từ polyme polyvinyl alcohol. Đặc tính trương nở của hydrogel hỗn hợp được tăng cường đáng kể, nhưng tính chất cơ học không được cải thiện đáng kể. Hiện tượng kết tụ sinh ra trong quá trình pha trộn làm suy yếu sự tương tác trực tiếp giữa các hạt nano và polyme hydrogel, dẫn đến việc các tính chất cơ học của hydrogel nanocomposite không cải thiện rõ.

Phương pháp Grafting-Onto (Ghép)

Phương pháp này có thể cải thiện hiện tượng kết tụ của vật liệu nano vô cơ trong hydrogel bằng cách biến đổi bề mặt của vật liệu nano để tạo thành liên kết cộng hóa trị giữa vật liệu nano vô cơ và mạng hydrogel. Đồng thời, do tăng cường liên kết giữa các hạt nano và polymer hydrogel, hydrogel nanocomposite thể hiện tính chất cơ học mạnh hơn. Sự biến đổi bề mặt của vật liệu nano bằng phương pháp ghép chủ yếu dùng cho hydrogel polyacrylamide (PAM). Messing và cộng sự đã sử dụng các nhóm axit metacrylic để biến đổi bề mặt của các hạt nano từ tính, sau đó bổ sung các hạt nano từ tính đã biến đổi vào mạng lưới hydrogel polyacrylamide để điều chế hydrogel nanocomposite, cho thấy độ bền kéo và độ bền đứt gãy cao. Một nghiên cứu tương tự khác đã tổng hợp hydrogel nanocomposite bằng phương pháp ghép và các hạt oxit sắt nano hợp nhất với 3-(trimethoxysilyl) propyl methacrylate, polydimethylsiloxane (PDMS) được sử dụng để biến đổi bề mặt của hydrogel. Các tính chất cơ học của hydrogel nanocomposite này được cải thiện rất nhiều, đồng thời, nó có thể duy trì sự ổn định dưới tải trọng môi, rất phù hợp cho ứng dụng kỹ thuật mô

xương. Ưu điểm của phương pháp ghép là sau khi bề mặt của vật liệu nano được biến đổi, các hạt nano và polyme hydrogel được kết hợp với nhau theo liên kết cộng hóa trị, giúp cải thiện đáng kể độ bền cơ học và độ ổn định của hydrogel nanocomposite.

Sự tạo tủa in situ

Sự tạo tủa in situ là quá trình phân tán đồng đều các hạt nano vô cơ trong các monome polymer hydrogel, và sau đó polymer hóa các monomer đó trong các điều kiện nhiệt độ nhất định để tạo thành các hệ hydrogel nanocomposite. Phương pháp này có thể điều chế hydrogel nanocomposite với hiệu quả phân tán tốt, duy trì các đặc tính tốt của hạt nanocomposite, đồng thời làm cho liên kết giữa hạt nano và hydrogel bền vững hơn. Sự tạo tủa *in situ* giúp các hạt nano phân bố đều trong hydrogel và duy trì các đặc tính của hạt nano, do đó có thể tăng độ bền cơ học của hydrogel nanocomposite. Ví dụ, Wang và cộng sự đã tổng hợp hydrogel nanocomposite đáp ứng từ tính bằng kết tủa tại chỗ. Quá trình chuẩn bị chính là trộn các hạt nano từ tính và hydrogel chitosan, sau đó hỗn hợp này được trùng hợp trong dung dịch NaOH, trong đó các chitosan và ion sắt có thể chelate hóa, sự tương tác này làm cho các hạt nano từ tính phân tán đều trong hydrogel và cuối cùng thu được một hỗn hợp hydrogel nanocomposite với phản ứng từ tính và tính chất cơ học tốt. Các tính chất cơ học của hydrogel nanocomposite có thể được tăng cường bằng cách tăng nồng độ của các hạt nano từ tính (0 đến 15 wt%). Nhược điểm là dung dịch kiềm được sử dụng có thể ảnh hưởng đến khả năng tải tế bào của hydrogel và các hạt nano vô cơ phải được biến đổi trước phản ứng trùng hợp.

Phương pháp đóng băng – tan băng (Freeze-thaw method)

Phương pháp này điều chế nanocomposite hydrogels bằng liên kết ngang vật lý. Phương pháp chủ yếu là làm rã đông nhiều lần dung dịch hỗn hợp hydrogel ở nhiệt độ thấp và nhiệt độ phòng. Kỹ thuật này tạo ra các hydrogel ổn định được liên kết chéo vật lý bởi sự hiện diện của các vùng tinh thể. Thêm

vào đó, chúng không độc hại và những loại gel đông lạnh /rã đông này đã được chứng minh có các đặc tính cơ học cao, đặc biệt cho các ứng dụng y sinh [91].

1.5. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước

1.5.1. Trong nước

Ở Việt Nam, nghiên cứu tổng hợp các vật liệu y sinh tái tạo xương đang được phát triển trong những năm gần đây:

Năm 2011, Trần Ngọc Quyển và cộng sự đã nghiên cứu một hệ thống tạo gel tại chỗ bao gồm các dẫn xuất chitosan liên hợp rutin và tyramine, với sự có mặt của peroxidase cải ngựa (HRP) và hydrogen peroxide (H_2O_2) để điều trị vết thương ở da [92].

Năm 2014, Nguyen và cộng sự đã tổng hợp vật liệu hydrogel composite Hyaluronic acid (HyA)-Gelatin (Gel)/biphasic calcium phosphate (BCP) để ứng dụng trong tái tạo xương. Vật liệu này có các lỗ xốp và có tính cơ học tốt, đạt lực nén trung bình là $2,8 \pm 0,15$ MPa. Ngoài ra, vật liệu HyA-Gel/BCP có tính tương hợp sinh học tốt. Kết quả nghiên cứu *in vivo* cho thấy sau khi cấy ghép 3 tháng, xương mới được hình thành và tạo khoáng với tốc độ nhanh [93].

Năm 2015, Nguyễn Thị Phương, tác giả 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 [19].

1.5.2. Ngoài nước

Năm 2012 Barbani và cộng sự nghiên cứu vật liệu composite trên cơ sở Hydroxyapatite/gelatin/gellan dùng trong lĩnh vực tái tạo xương. Nghiên cứu đã mô tả đặc tính hình thái, hóa lý, cơ học và sinh học của một hệ thống tổng hợp mới, dựa trên gelatin, gellan và hydroxyapatite, và mô phỏng thành phần của xương tự nhiên. Khung nền được chuẩn bị bằng kỹ thuật đông khô, trong ba điều kiện khác nhau. Phân tích hình thái cho thấy độ xốp đồng nhất, với các

lỗ xếp được kết nối tốt. Mô đun đàn hồi của mẫu gần giống với xương tự nhiên. Sự hiện diện của sự tương tác giữa các thành phần đã được chứng minh thông qua nghiên cứu hóa lý. Ngoài ra, phân tích hình ảnh hóa học hồng ngoại đã chỉ ra sự giống nhau giữa khung composite và xương tự nhiên về thành phần hóa học, tính đồng nhất, tương tác phân tử và cấu trúc cấu trúc. Đặc tính sinh học sơ bộ cho thấy tế bào gốc trung mô của con người có khả năng bám dính và tăng sinh tốt [94].

Năm 2013, Hunter và cộng sự đã nghiên cứu sự phát triển và biệt hóa tế bào gốc xương người trong điều kiện nuôi cấy (in vitro) của hydroxyapatite, chitosan, gelatin trong lĩnh vực tái tạo xương. Trong nghiên cứu này, tác giả đã sử dụng vật liệu sinh học dựa trên cơ sở chitosan và Hap, gelatin có thành phần, cấu trúc tương tự xương để nghiên cứu sự tương tác của tế bào gốc xương người (hMSC) với màng composite trên cơ sở chitosan, gelatin và Hap (HCG).

Sự kết hợp của HCG hình thành một màng phân hủy sinh học sinh học với 60% khối lượng nước và độ cứng ban đầu là 20 kPa. Các biểu hiện của các protein xương và các gen cho thấy màng HCG thúc đẩy sự phát triển của hMSC và sự biệt hóa tạo xương. Màng HCG tương tác với protein huyết thanh và tế bào gốc xương người đặc trưng. Kết quả nghiên cứu này chứng minh rằng màng HCG có thể tạo thành một môi trường thúc đẩy hMSC phát triển, giúp tăng cường sự biệt hóa tế bào xương. Màng composite có thành phần, cấu trúc và đặc tính mong muốn cần thiết cho các ứng dụng như màng trong tái tạo mô xương [95].

Năm 2014, Pasqui và đồng nghiệp đã nghiên cứu ứng dụng carboxymethyl cellulose/Hap composite làm vật liệu cho xương. Trong nghiên cứu này, tác giả đã sử dụng tế bào xương MG63 để đánh giá hiệu quả của vật liệu. Kết quả cho thấy tế bào xương phát triển tốt trên carboxymethyl cellulose/Hap composite nhờ cấu trúc xếp của vật liệu giúp tế bào xâm nhập và

phát triển bên trong vật liệu. Tuy nhiên, sự phân hủy sinh học của vật liệu chưa được tác giả đề cập [96].

Năm 2015, Trong nghiên cứu của Derakhshan với các cộng sự đã điều chế hydrogel dựa trên chondroitin sulfate kết hợp với hydroapatite. Qua kiểm tra, kết quả độ nén của vật liệu được ghi nhận là 0,269 và 0,288 thay đổi theo phần trăm khối lượng hydroapatite thêm vào (20% và 40%). Qua kính hiển vi quỳnh quang cho thấy vật liệu không gây độc với tế bào và có khả năng giúp tế bào phát triển [97].

Năm 2018, Tao li và các cộng sự đã nghiên cứu vật liệu hydrogel chondroitin sulfate kết hợp với pullulan. Trong nghiên cứu này sử dụng liên kết ngang dựa trên phản ứng Schiff-base, do đó phản ứng không sinh ra bất kỳ sản phẩm phụ có hại. Qua kết quả đánh giá cho thấy vật liệu có nhiều cấu trúc lỗ xốp từ đó giúp cho tế bào đi qua và làm môi trường cho tế bào phát triển. Ngoài ra phương pháp đánh giá tế bào cho thấy tế bào phát triển thành các tế bào sụn sau 14 ngày [98].

Năm 2019, Bhisham cùng các cộng sự 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. Kết quả nghiên cứu cho thấy khi kết hợp với thủy tinh sinh học giúp cho vật liệu tăng cường độ bền, giảm hiện tượng trương nở và tăng cường ổn định cấu trúc của vật liệu. Đánh giá *in vivo* khi cấy ghép vật liệu vào xương chậu của thỏ, sau 24 tuần cho thấy chỗ khiếm khuyết được lấp đầy bằng mô xương rắn [99].

Năm 2019, Trong nghiên cứu của Purohit và các cộng sự đã đánh giá sự phát triển của tế bào MG-63 trong điều kiện nuôi cấy trên vật liệu nano composite được điều chế từ gelatin và alignate kết hợp với các graphene oxide. Khi có sự kết hợp với graphene oxide giúp cho vật liệu tăng độ trương nở lên gấp 7 lần, thời gian phân hủy sinh học sinh học giảm chậm (30%) trong 28 ngày.

Kết quả khi cấy tế bào MG-63 cho thấy vật liệu tăng cường khả năng sinh trưởng và bám dính tế bào [100].

2. ĐỐI TƯỢNG, PHẠM VI VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Vật liệu hydrogel và hydrogel composite trên nền gelatin kết hợp với các polysaccharide (chitosan, alginate, chondroitin sulfate) mang các hạt nano biphasic calcium, ứng dụng làm vật liệu tái tạo xương. Vật liệu mang các hạt nano này được đánh giá khả năng tạo khoáng, phân hủy sinh học và *in vitro* từ đó xem xét các vật liệu phù hợp cho quá trình tái tạo xương.

2.1.2. Phạm vi nghiên cứu

- Nghiên cứu tổng hợp GTA, CHPA, ATA, CDTA và BCP.
- Nghiên cứu tổng hợp Hydrogel và hydrogel composite CHPA, ATA, CDTA trên nền GTA.
- Đánh giá thành phần, cấu trúc GTA, CHPA, ATA, CDTA.
- Khảo sát: thời gian gel hóa, hình thái, khối lượng suy giảm trong dung dịch PBS, khả năng tạo khoáng trong dung dịch SBF của hydrogel và hydrogel composite CHPA, ATA, CDTA trên nền GTA.
- Đánh giá độc tính tế bào của các vật liệu.

2.2. Dung môi, hóa chất, thiết bị dùng trong nghiên cứu

2.2.1. Dung môi, hóa chất dùng trong nghiên cứu

Bảng 2.1. Dung môi, hóa chất dùng trong nghiên cứu

Tên hóa chất	Hãng sản xuất	Nước sản xuất
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide	Acros	Mỹ
Tyramine	Acros	Mỹ
Sodium chloride	Fisher	Mỹ
Calcium chloride	Fisher	Mỹ
Trisodium phosphate	Fisher	Mỹ
Sodium bicarbonate	Fisher	Mỹ
Potassium chloride	Fisher	Mỹ
Magiesium chloride	Fisher	Mỹ

Hydrochloric acid	Fisher	Mỹ
Sodium sulphate	Fisher	Mỹ
Diethyl ether	Fisher	Mỹ
Collagenase from Clostridium histolyticum	Sigma	Mỹ
Alginate	Acros	Mỹ
Gelatin	Sigma	Mỹ
Chondroitin sulfate	Acros	Mỹ
Disodiumhydrophosphate	Merck	Đức
Tris (CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	Sigma	Mỹ
MG-63 tế bào xương (nguồn gốc từ human osteosarcomas)	Ngân hàng tế bào	Hàn quốc
H ₂ O ₂	Sigma	Mỹ
4-Hydrophenyl acetic acid (HAP)	Acros	Mỹ
Horsera dish peroxidase (HRP) (261u/mg)	Sigma	Mỹ

2.2.2. Thiết bị và dụng cụ

Thiết bị

- Tủ sấy, máy khuấy từ có hiệu chỉnh nhiệt độ.
- Máy đo pH, Fisher Scientific, Đức.
- Bể siêu âm hiệu Branson, USA, tần số 42 kHz, công suất 100 W.
- Lò nung hiệu, Đức, nhiệt độ lớn nhất 1000 °C.
- Máy đông khô chân không FDU-2100 Eyela.
- Máy cô quay chân không HANVAPOR, Ấn độ.

Dụng cụ

- Bình cầu cổ nhám một cổ
- Ống nhỏ giọt
- Ống đong
- Máy khuấy từ
- Máy sấy
- Túi thấm tách Spectra Por Regenerated Cellulose Membrane, MWCO 6000-8000 Da.
- Pipette
- Phễu lọc hút chân không
- Cá từ
- Eppendorf
- Micropipet 20-200 µL

Các phương pháp khảo sát vật liệu

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ được thực hiện trên máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker AC 500, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam tại Hà Nội.
- Phân tích nhiễu xạ tia X (XRD), thực hiện trên máy Bruker D5005 (Đức) thuộc trung tâm Manar Đại học Quốc gia.
- Quan sát hình thái mẫu, phân tích nguyên tố bằng máy FESEM (JSM-635F, JEOL), tại Viện Công nghệ hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. Tổng hợp và phân tích cấu trúc BCP

Theo nghiên cứu trong luận án Nguyễn Thị Phương [19]. Trong nghiên cứu này, tổng hợp BCP với tỉ lệ Ca/P: 1,57 và pH=7 (pH ở 7 không gây độc tế bào và hàm lượng %m HAp cao)

Hòa tan 6,93 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ trong 100 mL H_2O , sau đó cho hỗn hợp vào bể siêu âm, điều chỉnh dung dịch đạt pH = 7 bằng dung dịch NaOH nồng độ 1 M. Tiếp tục cho 5,34 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ vào 100 mL H_2O , hỗn hợp hoà tan được đánh bằng sóng siêu âm và điều chỉnh pH=7 bằng dung dịch ba NaOH 1 M hoặc HCl 5%. Sau đó, dùng pipet nhỏ từ từ dung dịch $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ vào dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rồi điều chỉnh pH=7, ổn định trong suốt quá trình phản ứng bằng dung dịch NaOH 1 M.

Sau 12 giờ, sử dụng máy lọc hút chân không dung dịch để lọc dung dịch huyền phù, sau đó lượng tủa thu được sấy ở nhiệt độ 80°C , khối lượng kết tủa được sấy khô và dùng cối để nghiền mịn rồi nung ở nhiệt độ 750°C trong 2 giờ.

Sử dụng máy phân tích XRD để phân tích cấu trúc, thành phần. Máy SEM để phân tích hình thái, kích thước các hạt khoáng BCP.

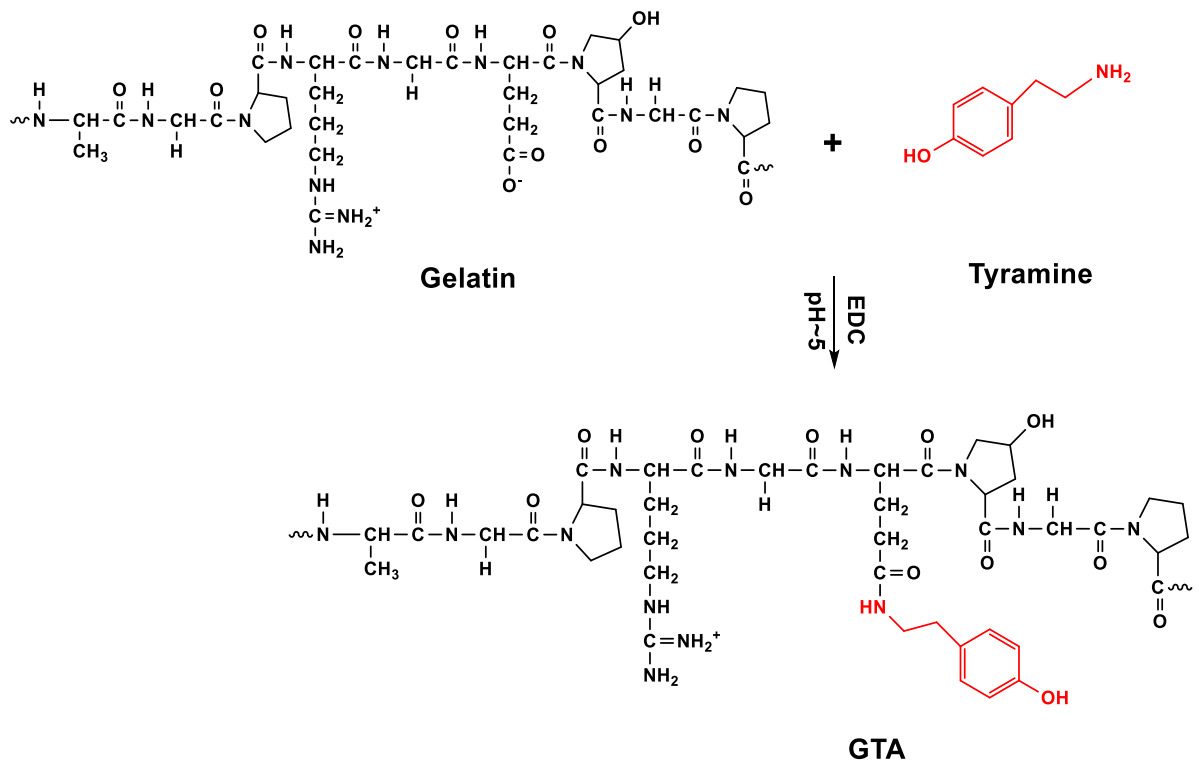
2.4. Tổng hợp và phân tích cấu trúc các polymer mang nhóm chức phenol

2.4.1. Tổng hợp Gelatin-Tyramine (GTA)

Cho 2 g gelatin vào 30 mL H_2O và đun cách thủy ở nhiệt độ 40°C . Thêm 1 g tyramine khi hỗn hợp tan hoàn toàn, khuấy trong 15 phút. Sau đó, để dung

dịch nguội ở 40°C và điều chỉnh pH = 6 bằng dung dịch HCl 5% đến khi dung dịch tan hoàn toàn. Cho thêm 250 mg EDC/NHS vào hỗn hợp phản ứng và điều chỉnh lại dung dịch đạt pH=6. Khuấy đều hỗn hợp ở nhiệt phòng trong 24 giờ rồi sử dụng phương pháp tinh sạch các polymer thông qua các loại màng thẩm tách sinh học cho từng polymer có MWCO 6-8 kDa, MWCO 12-14 kDa. Kỹ thuật thẩm tách được tiến hành trong nước cất ở nhiệt độ phòng dưới điều kiện khuấy trong khoảng từ 4-7 ngày. Dung dịch sau khi thẩm tách được đông sâu ở -80°C và đông khô hai ngày thu được sản phẩm có chất rắn màu trắng.

Cấu trúc polymer ghép được đánh giá bằng phổ ($^1\text{H-NMR}$, Bruker AC 500 MHz spectrometer).



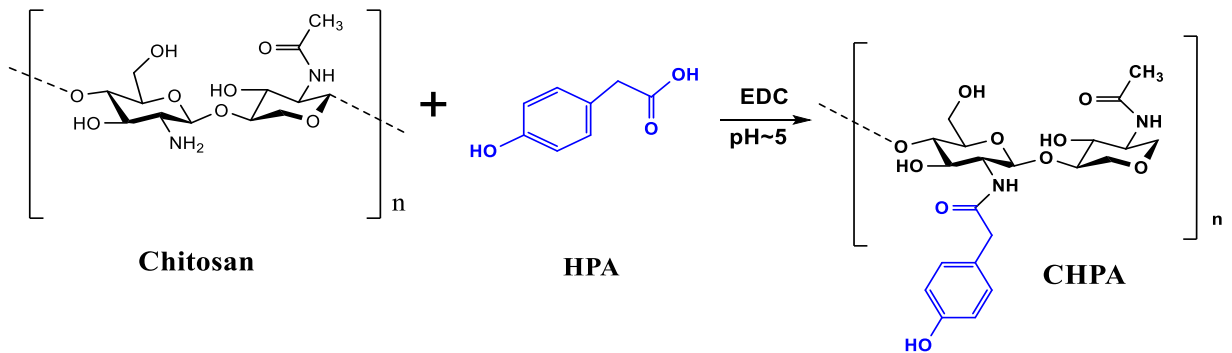
Hình 2.1. Phản ứng tổng hợp GTA

2.4.2. Tổng hợp Chitosan-4-hydroxyphenylacetic acid (CHPA)

Hòa tan 1 g chitosan trong 40 mL H_2O , sử dụng dung dịch HCl 5% để điều chỉnh đạt pH=3 và khuấy đều cho đến khi vật liệu tan hoàn toàn. Cho thêm vào 0,24 g HPA (4-hydroxyphenylacetic acid) rồi tiếp tục khuấy trong 15 phút. Sau đó, cân 450 mg EDC và cho vào dung dịch phản ứng, sử dụng dung

dịch NaOH 1 M điều chỉnh đạt pH=5, khuấy sau 24 giờ, thẩm tách sản phẩm trong 3 ngày bằng màng Spectra Pork Cellulose Ester Membrane, MW 6000-8000 Da. Sản phẩm sau khi thẩm tách được đông sâu ở -80°C và đông khô 2 ngày thu được chất rắn màu trắng.

Cấu trúc polymer ghép được đánh giá bằng phổ ($^1\text{H-NMR}$, Bruker AC 500 MHz spectrometer).

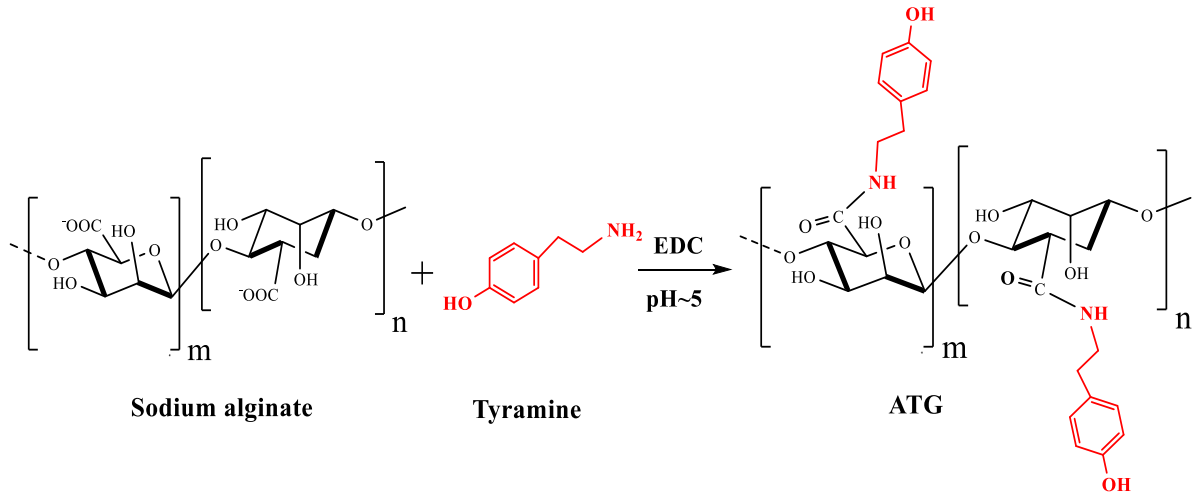


Hình 2.2. Phản ứng tổng hợp CHPA

2.4.3. Tổng hợp Alginate-tyramine (ATA)

Hòa tan 2 g alginate vào 125 mL nước cất, khuấy dung dịch đến khi tan hoàn toàn. Cho thêm vào 3 g tyramine, điều chỉnh pH=5 bằng dung dịch HCl 5%. Hòa tan 1,394g EDC vào 10 mL nước cất rồi nhỏ từng giọt vào hỗn hợp alginate với tyramine. Dung dịch được điều chỉnh ổn định ở pH=5. Khuấy đều hỗn hợp ở nhiệt phòng trong 24 giờ rồi sử dụng phương pháp tinh sạch các polymer thông qua màng thẩm tách sinh học có MWCO 6-8 kDa. Kỹ thuật thẩm tách tiến hành trong nước cất ở nhiệt độ phòng dưới điều kiện khuấy trong khoảng từ 4-7 ngày. Dung dịch sau khi thẩm tách được đông sâu ở -80°C và đông khô 2 ngày thu được sản phẩm có chất rắn màu trắng.

Cấu trúc polymer ghép được đánh giá bằng phổ ($^1\text{H-NMR}$, Bruker AC 500 MHz spectrometer).



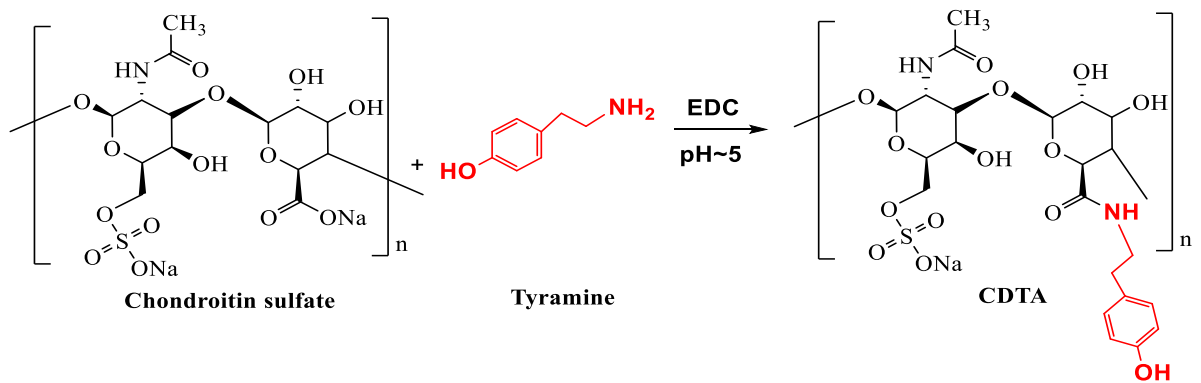
Hình 2.3. Phản ứng tổng hợp alginate-tyramine (ATA)

2.4.4. Tổng hợp Chondroitine sulfate-tyramine (CDTA)

Chuẩn bị dung dịch Chondroitine sulfate: Hòa tan 2 g chondroitin sulfate vào 80 mL nước cất, khuấy dung dịch đến khi tan hoàn toàn.

Tổng hợp CDTA: Hòa tan 1 g tyramine vào trong 10 mL dung môi Dimethylformamide. Dung dịch được điều chỉnh pH=5 bằng HCl 5%. Tiếp tục hòa tan 0,8 g EDC và 0,5 mg NHS trong 5 mL nước cất, lắc đều. Nhỏ từng giọt hỗn hợp EDC và NHS vào trong dung dịch Chondroitine sulfate và hoạt hóa trong 15 phút. Sau đó, nhỏ từng giọt dung dịch tyramine vào dung dịch chondroitin sulfate đã hoạt hóa, khuấy đều hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ rồi sử dụng phương pháp tinh sạch các polymer thông qua màng thẩm tách sinh học có MWCO 6-8 kDa. Kỹ thuật thẩm tách được tiến hành trong nước cất ở pH=7,4 trong 3 ngày, sau đó thẩm tách trong nước cất ở nhiệt độ phòng dưới điều kiện khuấy trong khoảng từ 2 ngày. Dung dịch sau khi thẩm tách được đông sâu ở -80°C và đông khô 2 ngày thu được sản phẩm có chất rắn màu trắng.

Cấu trúc polymer ghép được đánh giá bằng phổ (¹H-NMR, Bruker AC 500 MHz spectrometer).



Hình 2.4. Phản ứng tổng hợp CDTA

2.4.5. Xác định cấu trúc, hình thái các sản phẩm

Cấu trúc sản phẩm được xác định bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ và quang phổ hồng ngoại biến đổi FT-IR. Kết quả đo phổ $^1\text{H-NMR}$ được thực hiện trên máy cộng hưởng từ hạt nhân NMR, Bruker 500 MHz, tại Viện Công nghệ Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và phổ FT-IR được thực hiện trên máy quang phổ hồng ngoại biến đổi FT-IR, PerkinElmer Frontier, tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.4.6. Xác định hàm lượng TA, HPA trong các polymer phenol tổng hợp

Xác định hàm lượng của TA trong GTA, ATA và CDTA

Xác định hàm lượng của TA trong các polymer phenol tổng hợp bằng phương pháp UV-Vis. Đo độ hấp thụ A của dung dịch GTA, ATA, CDTA ở nồng độ 0,1 mg/mL và dùng đường chuẩn của nồng độ TA tại 0,15; 0,075; 0,0375; 0,01875; 0,009375 mg/mL và độ hấp thụ A tại bước sóng 275 nm để xác định lượng TA trong GTA, ATA, CDTA.

Xác định hàm lượng HPA trong CHPA

Xác định hàm lượng của HPA trong CHPA bằng phương pháp UV-Vis. Đo độ hấp thụ A của dung dịch CHPA ở nồng độ 0,1 mg/mL và dùng đường chuẩn của nồng độ HPA tại 0,15; 0,075; 0,0375; 0,01875; 0,009375 mg/mL và độ hấp thụ A tại bước sóng 275 nm để xác định lượng HPA trong CHPA.

2.5. Tổng hợp và xác định các tính chất của các hệ hydrogel và hydrogel composite trên nền GTA

2.5.1. Tổng hợp *insitu* hydrogel và hydrogel composite CHPA, ATA, CDTA trên nền GTA bằng phương pháp pha trộn dùng enzyme HRP và H_2O_2

Hydrogel được điều chế với sự hiện diện của enzyme HRP và H_2O_2 ở nhiệt độ phòng. Hòa tan vào 2 eppendorf, eppendorf thứ nhất, cứ 10 mg X (với X là CHPA hoặc ATA hoặc CDTA) trong 90 μ L nước cất và được thêm vào 15 μ L H_2O_2 (0,2%). Eppendorf thứ hai, cứ 10 mg GTA trong 90 μ L nước cất và được thêm vào 15 μ L HRP. Trộn lẫn hai dung dịch lại với nhau theo tỷ lệ ở Bảng 2.2. Gel sẽ được hình thành ở nhiệt độ phòng.

Hydrogel composite được điều chế tương tự như phương pháp điều chế hydrogel, tuy nhiên sau khi hòa tan mẫu trong nước cất, BCP được phân tán đều vào trong hai eppendorf bằng phương pháp pha trộn. Gel cũng được hình thành ở nhiệt độ phòng.

Cách điều chế hydrogel và hydrogel composite theo tỷ lệ X: GTA (wt/wt) được trình bày trong **Bảng 2.2**.

Bảng 2.2. Tổng hợp hydrogel composite theo tỷ lệ X: GTA (wt/wt)

Tỷ lệ X: GTA (wt/wt)	Eppendorf 1 (Dung dịch polymer chứa H_2O_2 0,05%)		Eppendorf 2 (Dung dịch polymer chứa HRP 0,07 mg/mL)	
	1:5	4,7 mg X	28 mg BCP	4,7 mg X
23,3 mg GTA		23,3 mg GTA		
1:2	9,3 mg X	28 mg BCP	9,3 mg X	28 mg BCP
	18,7 mg GTA		18,7 mg GTA	

1:1	14 mg X	28 mg	14 mg X	28 mg
	14 mg GTA	BCP	14 mg GTA	BCP
0:1	0 mg X	28 mg	0 mg X	28 mg
	28 mg GTA	BCP	28 mg GTA	BCP
2:1	18,7 mg X	28 mg	18,7 mg X	28 mg
	9,3 mg GTA	BCP	9,3 mg GTA	BCP

2.5.2. Khảo sát các hình thái, thời gian hình thành gel, thời gian giảm cấp sinh học, khả năng tạo khoáng và độc tính của hydrogel và hydrogel composite

Khảo sát hình thái của vật liệu hydrogel và hydrogel composite

Vật liệu hydrogel và hydrogel composite sau khi được điều chế và đông khô. Sau đó, Sử dụng phương pháp SEM để quan sát hình thái của vật liệu

Khảo sát thời gian hình thành gel hóa của vật liệu hydrogel và hydrogel composite

Tiến hành khảo sát thời gian hình thành gel hóa của hydrogel và hydrogel composite (sử dụng nồng độ và thể tích của HRP, H₂O₂ để tổng hợp các hydrogel và các hydrogel composite như mục 2.5.1). Thời gian tạo gel được tính lúc các chất tương tác và phản ứng hình thành thành liên kết ngang. Vì thế thời gian hình thành gel được tính khi các chất phản ứng với nhau đến khi tạo thành một khối gel đông đặc và khi dốc ngược vật liệu không chảy xuống trong 1 phút [101].

Khảo sát khối lượng suy giảm của hydrogel và hydrogel composite

❖ Chuẩn bị dung dịch PBS chứa enzyme collagenase

Cân 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄, 16 mg enzyme collagenase hòa tan hoàn toàn trong 1 L nước cất, pH=7,4.

❖ **Tiến hành khảo sát khối lượng suy giảm của hydrogel và hydrogel composite như sau:**

Ngâm các mẫu hydrogel và hydrogel composite đã chuẩn bị vào dung dịch PBS có chứa collagenase (16 mg/L). Khối lượng giảm cấp sinh học của các mẫu được tính toán và xác định bằng phương pháp trọng lượng theo thời gian. Vật liệu sau khi tổng hợp được cân để xác định khối lượng (W_0). Sau đó, chúng được ngâm trong các eppendorf chứa 1mL dung dịch giả sinh học PBS, ở nhiệt độ phòng và pH=7,4. Vật liệu được ngâm trong khoảng thời gian 3 giờ, 6 giờ, 18 giờ, 42 giờ, 90 giờ, 186 giờ, 378 giờ, 762 giờ. Sau mỗi khoảng thời gian trên, dung dịch giả sinh học PBS được bỏ đi và tránh gây ảnh hưởng lên đến phần mẫu gel chưa suy giảm, tiếp đến cân khối lượng vật liệu. Mẫu gel trên tiếp tục cho thêm vào 1ml dung dịch PBS mới để khảo sát với khoảng thời gian tiếp theo [102]. Tiếp tục quy trình đến mốc thời gian cuối. Phần trăm khối lượng mẫu gel suy giảm được tính theo công thức sau :

$$\% \text{ khối lượng suy giảm} = \frac{w_0 - w_t}{w_0} \cdot 100\%$$

Trong đó:

w_0 : Khối lượng ban đầu.

w_t : Khối lượng còn lại sau khoảng thời gian (t) đã bị giảm cấp sinh học.

Đánh giá khả năng tạo khoáng của hydrogel và hydrogel composite

Chuẩn bị dung dịch SBF: Cân 8,035 g NaCl; 0,355 g NaHCO₃; 0,225 g KCl; 0,231 g K₂HPO₄.3H₂O; 0,311 g MgCl₂.6H₂O, 0,292 g CaCl₂; 0,072 g Na₂SO₄, vào khoảng 900 mL nước cất. Khi các chất đã hoàn toàn tan trong nước, tiếp theo thêm 39 mL dung dịch HCl 1 M vào dung dịch trên. Sau đó, thêm 6,118 g (CH₂OH)₃CNH₂ vào dung dịch và khuấy đều. Thêm nước cất đủ lượng để đạt tổng thể tích 1 L, hỗn hợp dung dịch có pH = 7,4.

Quy trình đánh giá khả năng khoáng hóa của hydrogel và hydrogel composite: Chuẩn bị các mẫu hydrogel và hydrogel composite với các tỉ lệ

thích hợp nhất qua các khảo sát được chọn. Hydrogel và hydrogel composite được đem đông khô và tạo thành gel với hình khối vuông 1 cm^3 . Sau đó cố định bằng kim và được ngâm trong ống ly tâm nhựa chứa 10 mL dung dịch SBF. Sau 28 ngày, mẫu được lấy ra và rửa bằng nước cất để trôi sạch các muối tan trên bề mặt. Mẫu được đông khô và phân tích bằng phương pháp XRD, SEM và EDS để xác định quá trình tạo khoáng hoá trên bề mặt vật liệu.

Ngoài ra, sau khoảng thời gian 1, 5, 7, 14 và 28 ngày, dung dịch SBF được chiết ra để phân tích hàm lượng Ca, P trong dung dịch SBF bằng phương pháp ICP [103].

2.5.3. *Đánh giá độc tính tế bào trên vật liệu hydrogel composite*

Quy trình: 1g gel ngâm trong 10ml môi trường DMEM/F12, để phân hủy trong điều kiện nhiệt độ phòng, sau 7 ngày ngâm, gel được nghiền nát. dịch chiết từ các mẫu được pha loãng với môi trường nuôi cấy tế bào AdvanceSTEM (Cytiva HyClone) để đạt nồng độ cuối là 0,5 mg/ml. Sau đó mẫu được trữ lạnh trước khi sử dụng.

Nuôi cấy tế bào

Tế bào xương MSC được sử dụng trong đánh giá độ tương hợp sinh học của các mẫu nghiên cứu. Tế bào MSC được nuôi cấy trong đĩa Petri với mật độ 2×10^4 tế bào/cm² trong môi trường Dulbecco's Eagle (DMEM; Gibco BRL, USA) bổ sung 10% (v/v) huyết thanh bò (FBS; Gibco BRL, USA), 100 U/ml penicillin (Gibco BRL, USA) và 100 µg/ml streptomycin (Gibco BRL, USA). Đĩa cấy được đặt trong điều kiện môi trường không khí ẩm với 5% CO₂ ở 37°C. Sau ba ngày, tế bào được thu hoạch bằng cách xử lý với Trypsin-EDTA (Gibco BRL, USA). Sau đó dung dịch chứa tế bào được ly tâm, thay thế bằng dung dịch PBS và được dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Đánh giá độc tính tế bào [104]

Phương pháp MTT đánh giá độc tính tế bào ở cấp độ “*in vitro*”. Phương pháp này dựa trên phản ứng của enzyme của tế bào sống với MTT, màu vàng

nhạt của MTT chuyển sang màu xanh đặc trưng của phức MTT và enzyme. Độ tính của mẫu được xác định dựa trên tiêu chuẩn (tiêu chuẩn ISO 10993-5, 1999).

Dung dịch chiết của mẫu trong DMEM được sử dụng để đánh giá độ tính tế bào của mẫu. Để lấy dịch chiết, các mẫu trước tiên được xử lý bằng dung dịch ethanol 70% để khử trùng và sau đó rửa sạch với PBS để loại bỏ ethanol. Bước tiếp theo, mẫu được ngâm trong môi trường nuôi cấy tế bào DMEM và được đặt bên trong tủ ấm (incubator) điều kiện 37°C, tốc độ lắc 120 vòng/phút trong thời gian ba ngày. Sau khi ủ, dịch chiết của mẫu được lọc qua màng lọc khuẩn (kích thước lỗ 22 μm) và pha loãng với các nồng độ khác nhau 100%, 75%, 50%, 25%.

Các dịch chiết đã pha loãng trên được cho vào đĩa cây 96 giếng chứa tế bào MSC (2×10^4 tế bào/giếng) đã được ủ 24 giờ, và đĩa cây 96 giếng này được giữ trong tủ ấm 3 ngày. Sau đó 20 μl dung dịch MTT (5 mg/ml) được cho vào các giếng nuôi và đĩa cây 96 giếng được giữ trong tủ ấm 4 h. Cuối cùng, loại bỏ dung dịch trong đĩa cây, cho vào mỗi giếng 200 μl DMSO. Độ hấp thụ của dung dịch được đo tại bước sóng 595 nm bằng bộ đọc ELISA (EL, 312, Biokinetics reader, Bio-Tek instruments). Các mẫu được thí nghiệm lặp lại 4 lần.

Nhuộm tế bào

Tế bào MSC (2×10^4) được cấy vào giếng 24, 1 mL môi trường đã bổ sung dịch chiết được thêm vào. Sau 48 giờ, Hoechst (1 $\mu\text{g/mL}$) được cho vào các giếng, ủ 15 phút ở điều kiện nuôi cấy. Môi trường sau đó bị loại bỏ, PBS 1X được sử dụng để loại bỏ chất nhuộm dư, 1 mL môi trường AdvanceSTEM (Cytiva HyClone) được thêm vào. 10 μl hỗn hợp chất nhuộm AO/PI được cho vào. Tế bào tiếp tục ủ trong điều kiện nuôi cấy trong 15 phút. Tiếp theo, môi trường cũ bị loại bỏ, và PBS được sử dụng để rửa nhuộm dư. 1 mL môi trường được thêm vào trước khi quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang (IN Cell

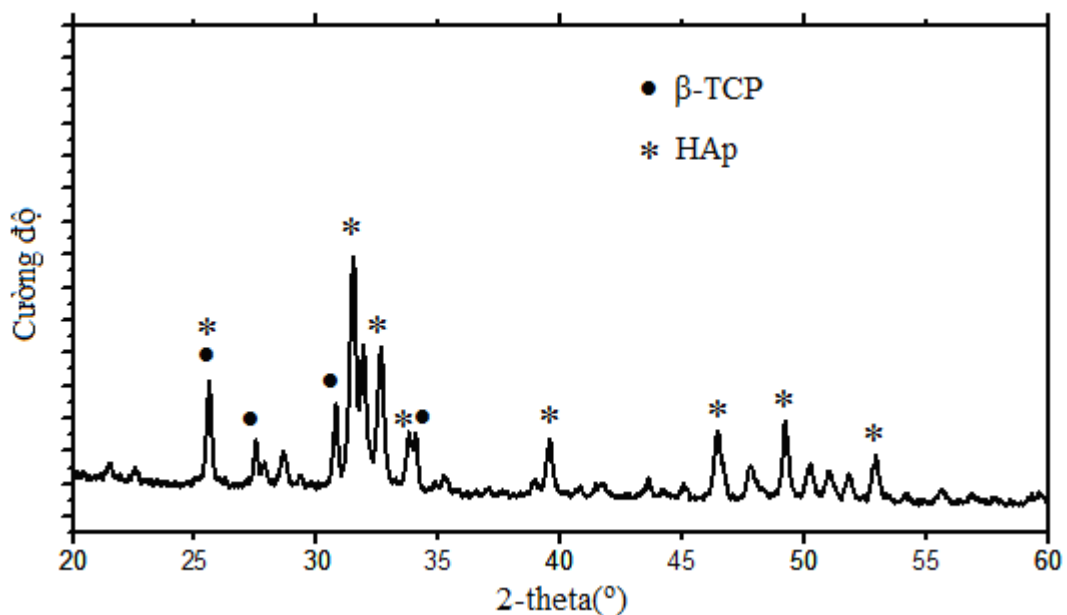
Analyzer 6000). Chế độ chụp đa nhuộm được sử dụng. Hoestch (390 nm), AO (490 nm) và PI (620 nm).

3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1. KẾT QUẢ TỔNG HỢP BCP

3.1.1. Kết quả phân tích XRD của BCP

Phương pháp nhiễu xạ tia X (XRD) được sử dụng để phân tích cấu trúc tinh thể của vật liệu, bao gồm cả biphasic calcium phosphate (BCP). Kết quả phân tích cấu trúc pha của BCP bằng phương pháp nhiễu xạ XRD được trình bày ở **Hình 3.1**.



Hình 3.1. Giải đồ XRD của BCP với tỉ lệ mol Ca/P =1,57 tại pH = 7

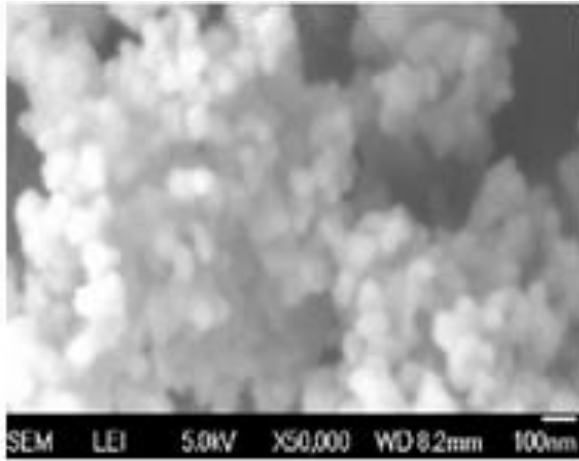
Kết quả phân tích XRD ở 2-theta (°) cho các tín hiệu đặc trưng của β -TCP: 25,80°, 27,77°, 31,03°, 34,37° và của HAp: 25,90°, 31,86°, 32,90°, 34,22°, 39,70°, 46,69°, 49,51°, 53,27°. Điều này khẳng định rằng với tỉ lệ mol Ca/P = 1,57 tại pH=7 thì BCP (β -TCP và HAp) đã được tổng hợp thành công [20, 53, 105]

3.1.2. Kết quả hình thái của BCP

Phương pháp kết tủa kết hợp sóng siêu âm được sử dụng để tổng hợp vật liệu biphasic calcium phosphate (BCP) với kích thước hạt nano đồng đều từ 60-100 nm. Kết quả phân tích hình thái của BCP sau khi tổng hợp được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) đã được trình bày trong **Hình 3.2**. Theo

nghiên cứu của Wang, phương pháp tạo hạt BCP không dùng sóng siêu âm cho kích thước các hạt tương đối lớn từ vài trăm micro và hạt đa phân tán. Chính vì thế, phương pháp dùng sóng siêu âm phù hợp cho ứng dụng tái tạo y sinh [106].

Trong quá trình siêu âm, năng lượng được truyền đi và va chạm với các hạt BCP làm hiệu ứng vật lý và tăng hiệu ứng hóa học. Quá trình tạo-vỡ bọt liên tục xảy ra trên bề mặt của pha lỏng và dẫn làm giảm sự tích tụ của các hạt. Ngoài ra, sóng siêu âm còn giúp tạo thành các mầm tinh thể giúp cho sản phẩm hình thành với kích thước nhỏ hơn. Vì vậy, luận án này sử dụng phương pháp dùng sóng siêu âm để tổng hợp BCP [107, 108].



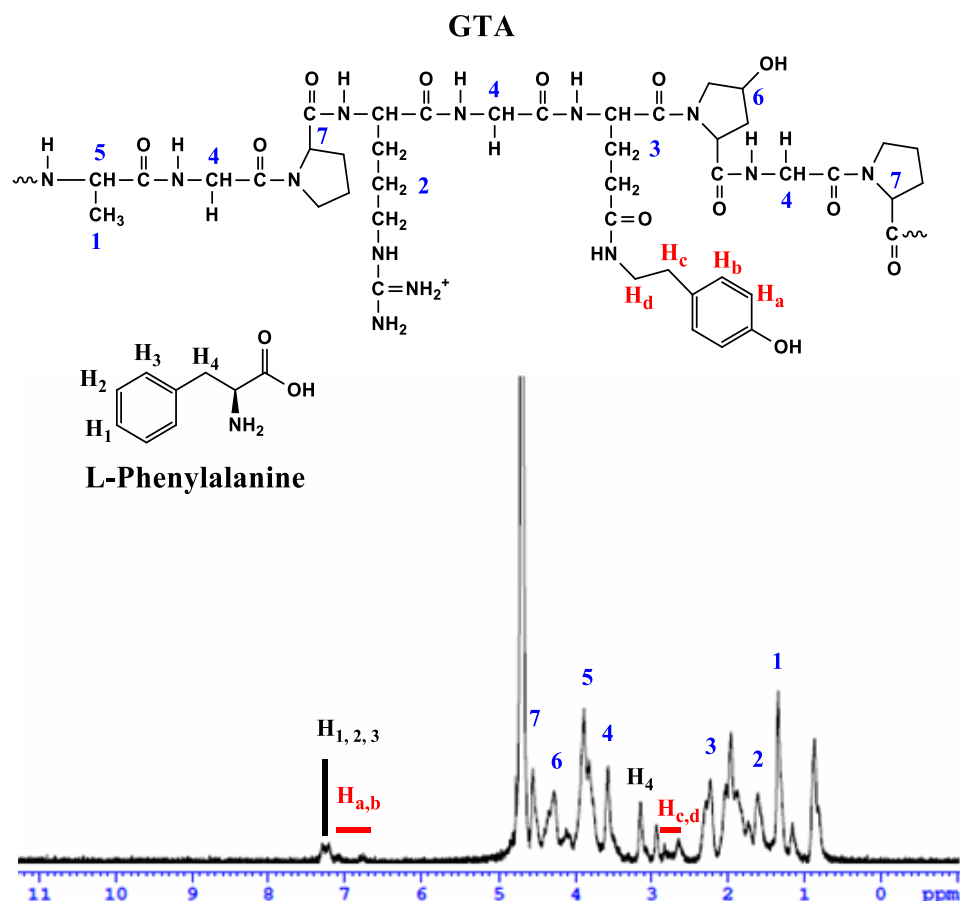
Hình 3.2. Kết quả SEM với độ phóng đại 100nm của BCP được tổng hợp bằng phương pháp sóng siêu âm với tỉ lệ Ca/P = 1,57 tại pH = 7

3.2. TỔNG HỢP CÁC POLYMER MANG NHÓM CHỨC PHENOL

3.2.1. Kết quả tổng hợp GTA

3.2.1.1. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của GTA

Kết quả phân tích thành phần và cấu trúc của GTA (phổ $^1\text{H-NMR}$) được trình bày ở **Hình 3.3**.

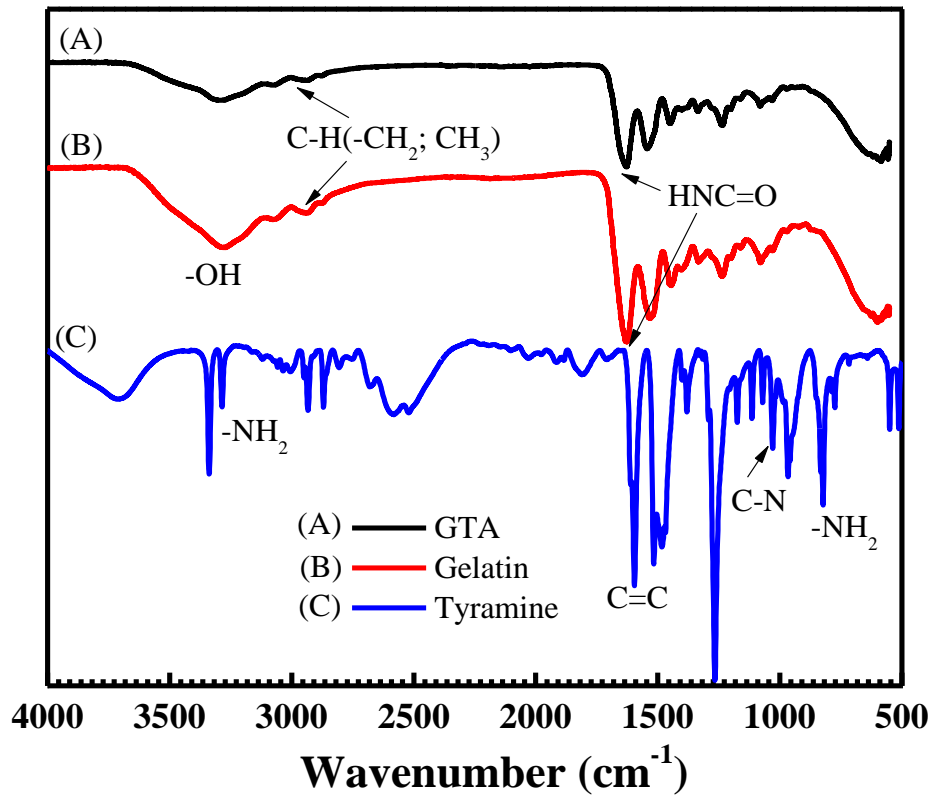


Hình 3.3. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của GTA trong D_2O

Phổ cho các tín hiệu đặc trưng của tyramine với độ dịch chuyển δ (ppm): δ 6,75 và δ 7,11 (d, $-\text{CHCH}-$, TA), δ 2,65 và δ 2,88 (m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, TA). Những tín hiệu đặc trưng của amino acid trong phổ $^1\text{H-NMR}$ δ (ppm): δ 4,30 ($-\text{CH}-$, hydroxyproline); δ 4,61 ($-\text{CH}-$, proline); δ 1,39 ($-\text{CH}_3$, alanine); δ 3,84 ($-\text{CH}-$, alanine); δ 3,53 ($-\text{CH}_2-$, glycine); δ 2,25 ($-\text{CH}_2-$, glutamic acid); δ 1,61 ($-\text{CH}_2-$, arginine); δ 3,15 ($-\text{CH}_2-$, phenylalanine); δ 7,22; 7,25 và 7,31 ($-\text{CH}-$, phenylalanine). Điều này chứng tỏ GTA đã được tổng hợp thành công. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của Park [77, 109].

3.2.1.2. Kết quả phổ FTIR của GTA

Phương pháp phổ hồng ngoại FTIR được sử dụng để phân tích thành phần của GTA (A), Gelatin (B), Tyramine ©. Kết quả phân tích được trình bày ở **Hình 3.4**.



Hình 3.4. Kết quả phổ FTIR của GTA

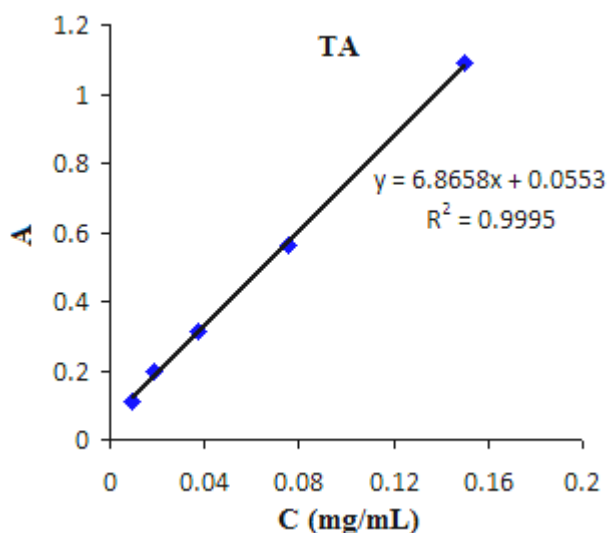
Hình 3.4 thể hiện kết quả phổ FTIR của Gelatin, Tyramine và GTA. Phổ FTIR của gelatin cho thấy một đỉnh rộng ở khoảng 3283 cm^{-1} là do sự kéo dài của các nhóm OH, HNC=O ở 1628 cm^{-1} , dao động giãn của liên kết C-O và dao động uốn C-H vòng thơm ở 1233 cm^{-1} và 1030 cm^{-1} , dao động uốn ngoài mặt phẳng C-H vòng thơm ở 876 cm^{-1} và 712 cm^{-1} [110]. Phổ FTIR của Tyramine cho thấy đỉnh 3400 cm^{-1} là dao động đặc trưng cho nhóm amine bậc 1 ($-\text{NH}_2$). Dao động uốn ngoài mặt phẳng của nhóm amine bậc 1 (NH_2) đã được chứng minh tại số sóng 828 cm^{-1} đến 622 cm^{-1} [111]. Đỉnh đặc trưng của **Tyramine** được quan sát tại 1635 cm^{-1} do dao động giãn của liên kết C=C trong vòng phenol. Dải hấp thụ từ 1387 cm^{-1} đến 1323 cm^{-1} chứng tỏ dao động giãn của liên kết C-N. Ngoài ra, dải hấp thụ từ 1149 cm^{-1} đến 1037 cm^{-1} được hình thành do dao động uốn của liên kết C-N [111, 112].

Bảng 3.1. Kết quả phổ FT-IR của Tyramine, Gelatin, GTA

Nhóm chức	Số sóng (cm ⁻¹)		
	Tyramine	Gelatin	GTA
-OH, -NH ₂	3400	3273,1	3283,48
-CH(-CH ₂ và -CH ₃)		2936,93	2937,77
-C-O-C	1030	1030	1030
-CH (vòng thơm)	876; 712	876; 712	972,1
-COO		1531,52	1543,97
-NH ₂	828; 622	626,37	
-NHCOO-			1628.3

3.2.1.3. Hàm lượng của TA trong GTA

Kết quả đo độ hấp thu A của TA và GTA thu được bằng UV-Vis ($\lambda = 275$ nm) được trình bày trong **Phụ lục 4**. Dựa vào kết quả đo được, thiết lập phương trình đường chuẩn của TA (Hình 3.5)



Hình 3.5. Phương trình đường chuẩn của TA

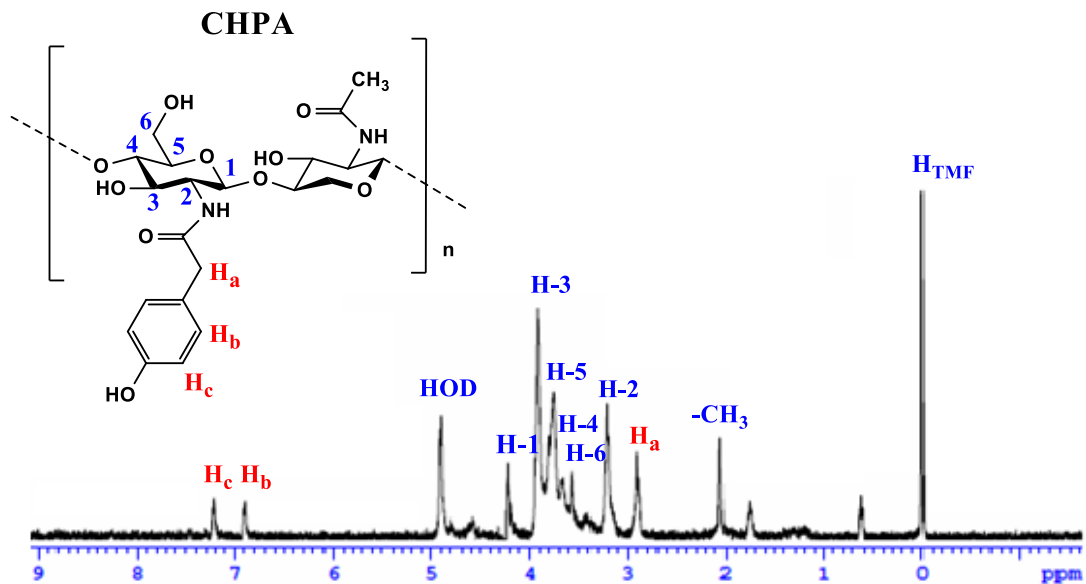
Phương trình đường chuẩn của TA với độ tuyến tính $R^2 = 0,9995$ thích hợp cho việc định lượng hàm lượng TA có trong polymer GTA. Kết quả tính toán hàm lượng TA trong mẫu nghiên cứu GTA trình bày ở Phụ lục 5.

Theo nghiên cứu của Kurisawa [74] số mol H_2O_2 tối thiểu cần phản ứng với TA trong GTA là 60% số mol TA. Trên cơ sở đó, 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%. Ngoài ra, nồng độ H_2O_2 không sử dụng cao hơn 0,25% vì sẽ gây độc đối với tế bào [113].

3.2.2. Kết quả tổng hợp CHPA

3.2.2.1. Kết quả Phổ $^1\text{H-NMR}$ của vật liệu CHPA

Kết quả phân tích thành phần và cấu trúc của CHPA (phổ $^1\text{H-NMR}$) được trình bày ở **Hình 3.6**.

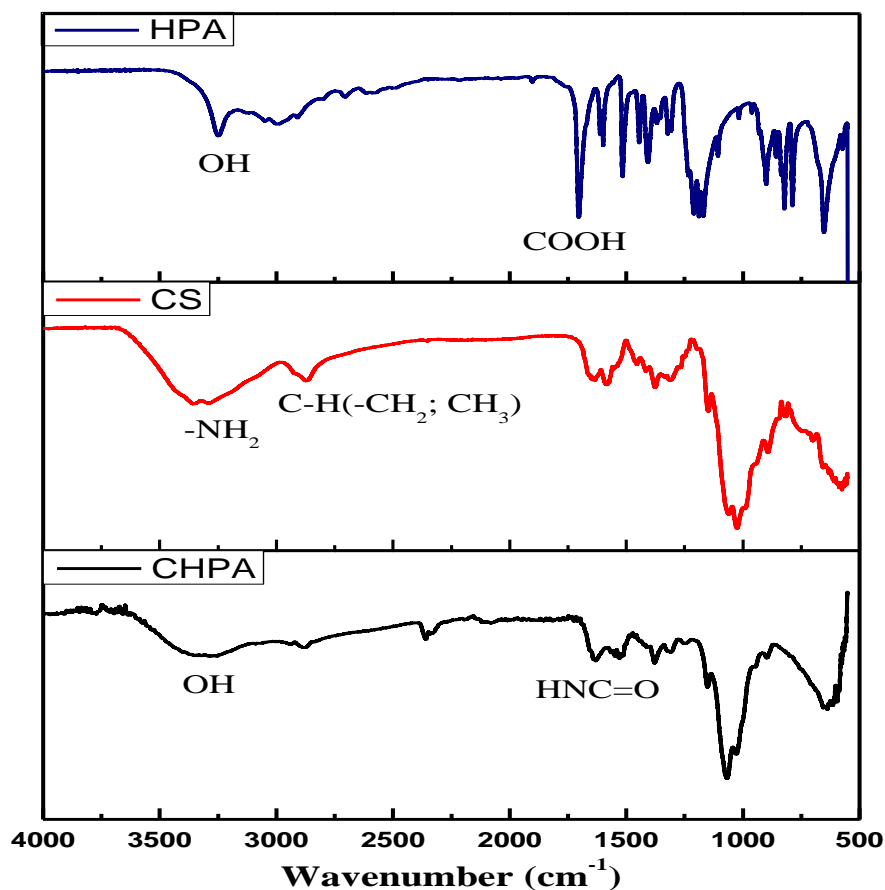


Hình 3.6. Kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$ với các peak đặc trưng của vật liệu CHPA trong D_2O

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của CHPA trong D_2O (**Hình 3.6**) cho các tín hiệu đặc trưng của chitosan và HPA với độ dịch chuyển từ 2-4 δ (ppm): δ 2,05 (s, $-\text{COCH}_3$, chitosan); δ 4,21 (d, $\text{C}_1(\text{H})$, chitosan), δ 3,22 (m, $-\text{C}_2(\text{H})$, chitosan); δ 3,43-3,92 (m, $\text{C}_{3+4+5+6}(\text{H})$, chitosan); δ 2,89 (d, $-\text{CH}_2-$, HPA). Các tín hiệu của các proton có trong chitosan như các peak đơn ở vị trí từ 2-4 ppm là các tín hiệu D-glucosamine có trong chitosan. Peak đơn ở vị trí 2,056 chứng tỏ sự có mặt của proton H nhóm $-\text{NHCOCH}_3$ trên mạch chitosan. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của các tác giả trước đây [114-117].

Sự xuất hiện của 2 peak liên tiếp nhau ở vị trí δ 6,89 và δ 7,22 (d, -CHCH-, HPA) chứng tỏ sự có mặt H_b, H_c (nhóm -CH=CH- trong nhân thơm). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của Tran và Lee, điều này chứng tỏ CHPA đã được tổng hợp thành công [116, 118].

3.2.2.2. Kết quả phổ FTIR của CHPA



Hình 3.7. Kết quả phổ FTIR của CHPA

Kết quả FTIR (Hình 3.7) cho thấy đặc điểm dải phổ của chitosan chuẩn ở số sóng 3353 cm⁻¹ là do dao động giãn của liên kết NH₂, 1559 cm⁻¹ là dao động liên kết N-H, tín hiệu này cũng xuất hiện trong dải phổ CHPA ở số sóng 3279 cm⁻¹ dao động liên kết O-H, 1468 cm⁻¹ dao động liên kết N-H [119]. Dao động của các liên kết trong dải phổ HPA cho thấy ở số 3249 cm⁻¹ là dao động giãn của liên kết OH. Dao động giãn ở số sóng 1111 cm⁻¹ do dao động liên kết C-O. HPA được quan sát tại 1635 cm⁻¹ do dao động giãn của liên kết C=C trong vòng phenol. Tín hiệu khoảng 1571 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động biến dạng

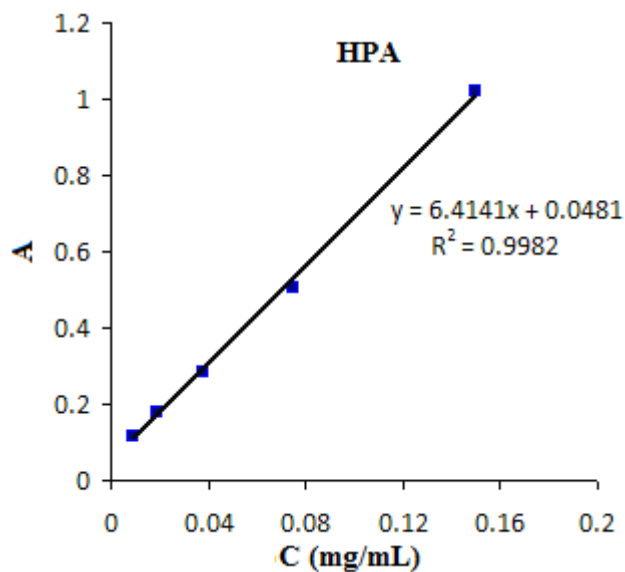
-NH của nhóm amine trong CS, tuy nhiên trong phổ đồ của CHPA không có tín hiệu ở vị trí này có thể do nhóm amine của CS đã được liên kết với HPA tạo thành nhóm amide I có vân hấp thụ khoảng 1650 cm^{-1} [111], tóm lại, dữ liệu phổ FT-IR cho thấy các vân phổ phù hợp với các nhóm chức trong công thức cấu tạo dự kiến của copolymer ghép. Điều đó chứng tỏ đã gắn HPA lên CS thành công

Bảng 3.2. Kết quả phổ FT-IR của HPA, CS, CHPA

Nhóm chức	Số sóng (cm^{-1})		
	HPA	CS	CHPA
-OH, -NH ₂	3249,26	3353,91	3279,73
-CH(-CH ₂ và -CH ₃)	2706,44; 2909,39	2871,34	2882,92
-C-O-C		1026,27	1068,61
-CH (vòng thơm)	821,87; 652,48	876; 712	897,36
-COO	1703,78		
-NH		1531,52	1547,78
-NH ₂		815,7; 630,08	
-NHCOO-			1630,1

3.2.2.3. Hàm lượng của HPA trong CHPA

Kết quả đo độ hấp thụ A của HPA và CHPA thu được bằng UV-Vis ($\lambda = 275\text{ nm}$) trình bày trong **Phụ lục 12**. Dựa vào kết quả đo được, thiết lập phương trình đường chuẩn của HPA (**Hình 3.8**)



Hình 3.8. Phương trình đường chuẩn của HPA

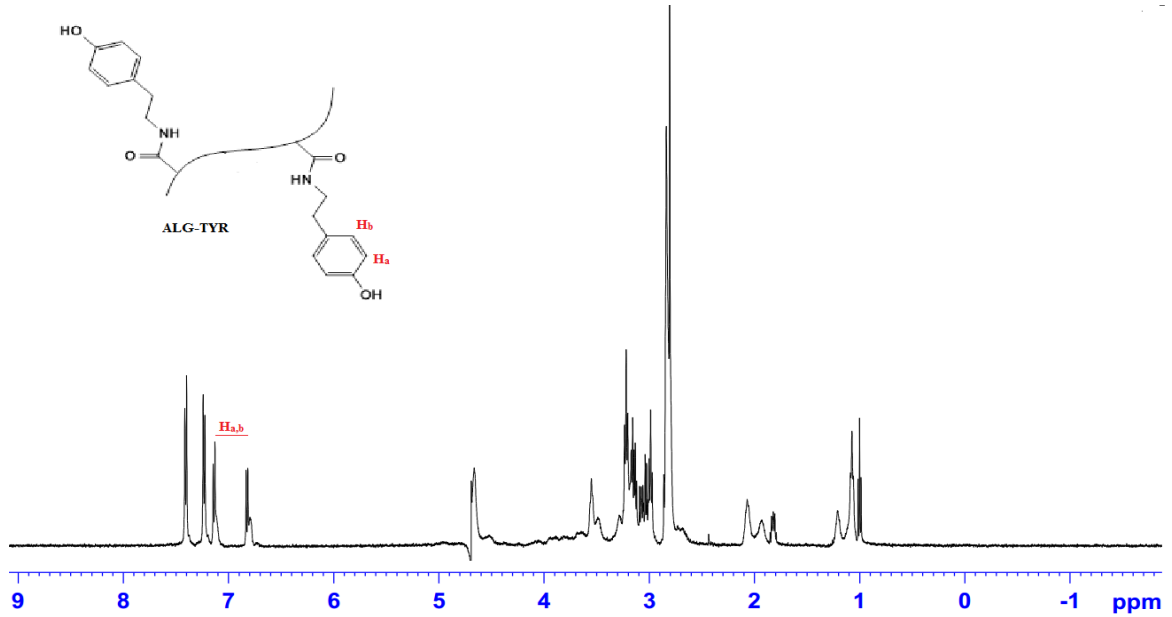
Phương trình đường chuẩn của HPA với độ tuyến tính $R^2 = 0,9982$ thích hợp cho việc định lượng hàm lượng của HPA trong polymer CHPA. Kết quả tính toán hàm lượng HPA trong mẫu nghiên cứu CHPA trình bày ở Phụ lục 6.

Dựa trên Phụ lục 6 (số mol HPA có trong 10 mg CHPA: n_{HPA} (mmol) là 0,004492) và nghiên cứu của Kurisawa [74], 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%. Ngoài ra nồng độ H_2O_2 không sử dụng cao hơn 0,25% vì sẽ gây độc đối với tế bào [113].

3.2.3. Kết quả tổng hợp vật liệu hydrogel và hydrogel composite ATA

3.2.3.1. Kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$ của vật liệu ATA

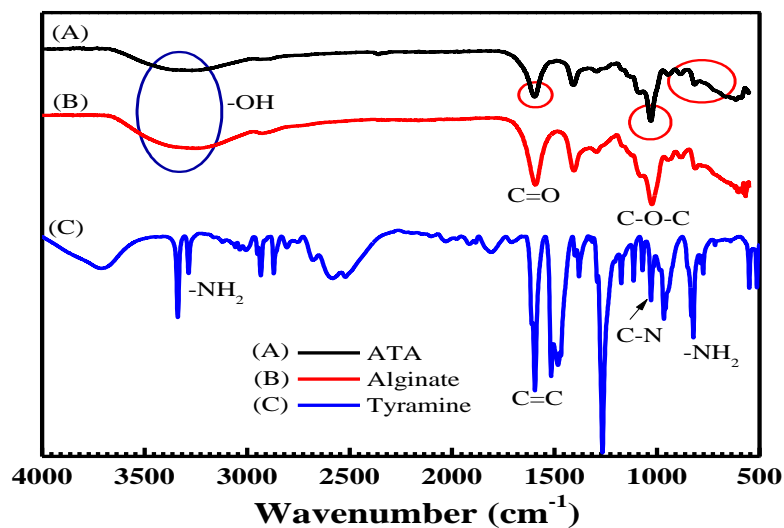
Kết quả phân tích thành phần và cấu trúc của ATA (phổ $^1\text{H-NMR}$) được trình bày ở **Hình 3.9**



Hình 3.9. Kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$ với các peak đặc trưng của vật liệu ATA trong D_2O

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của ATA trong D_2O (Hình 3.9) cho các tín hiệu đặc trưng proton polysaccharide của alginate xuất hiện ở các peak từ 3,2 ppm-5,1 ppm. Sự xuất hiện của hai peak ở vị trí 6,8 ppm và 7,2 ppm là tín hiệu proton liên hợp vòng thơm của nhóm tyramin ($-\text{CH}=\text{CH}_2-$). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của Park và Nguyen [93, 120].

3.2.3.2. Kết quả phổ FTIR của ATA



Hình 3.10. Kết quả phổ FTIR của ATA

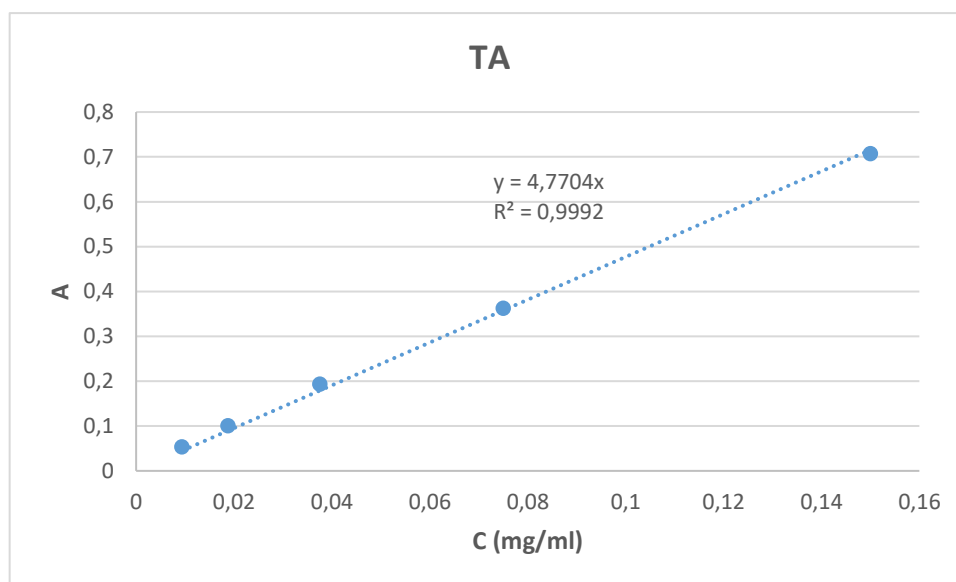
Hình 3.10 thể hiện kết quả FT-IR của Alg, Tyr và ATA. Hình dạng phổ FT-IR của Alg và ATA có các đỉnh đặc trưng giống nhau cụ thể ở: số sóng 1627 cm^{-1} đặc trưng cho dao động giãn của nhóm carbonyl (C=O) [121], số sóng 1034 cm^{-1} đặc trưng cho dao động của nhóm chức ether C-O-C trong liên kết glucoside, số sóng $800 - 1095\text{ cm}^{-1}$ tương ứng với dao động giãn đối xứng của C-C, C-H [122, 123]. Tín hiệu ở số sóng 3631 cm^{-1} của Alg là dao động giãn đặc trưng của -OH [124]. Đối với phổ FT-IR của Tyr, vùng phổ rộng ở số sóng từ $2900-3400\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động giãn của nhóm amine bậc 1 (NH_2) [111]. Đỉnh đặc trưng của Tyr được quan sát tại 1635 cm^{-1} do dao động giãn của liên kết C=C trong vòng phenol. Dải hấp thụ từ 1387 cm^{-1} đến 1323 cm^{-1} chứng tỏ dao động giãn của liên kết C-N. Sau khi gắn Tyr, phổ FT-IR của ATA xuất hiện đỉnh đặc trưng của His ở 1627 cm^{-1} (giãn C=N) [111]. Trong phổ ATA, ta thấy các đỉnh hấp thụ ứng với các dao động điển hình trong Alg, Tyr đều xuất hiện. Ngoài ra, tại số sóng từ 828 cm^{-1} đến 622 cm^{-1} quan sát thấy không còn đỉnh hấp thụ. Chứng tỏ rằng, ATA đã được tổng hợp thành công.

Bảng 3.3. Kết quả phổ FT-IR của Tyramin, Alginate, ATA

Nhóm chức	Số sóng (cm^{-1})		
	Tyramin	Alginate	ATA
-OH, -NH ₂	3400	3243,45	3270,01
-CH(-CH ₂ và -CH ₃)		2928,45	2937,77
-C-O-C	1030	1025,91	1030,19
-CH (vòng thơm)	876; 712	883,45	885,48
-COO		1593,11	1597,75
-NH ₂	828; 622		

3.2.3.3. Hàm lượng của TA trong ATA

Kết quả đo độ hấp thụ A của TA và ATA thu được bằng UV-Vis ($\lambda = 275$ nm) được trình bày trong **Phụ lục 15**. Dựa vào kết quả đo được, thiết lập phương trình đường chuẩn của TA (**Hình 3.11**).



Hình 3.11. Phương trình đường chuẩn của TA

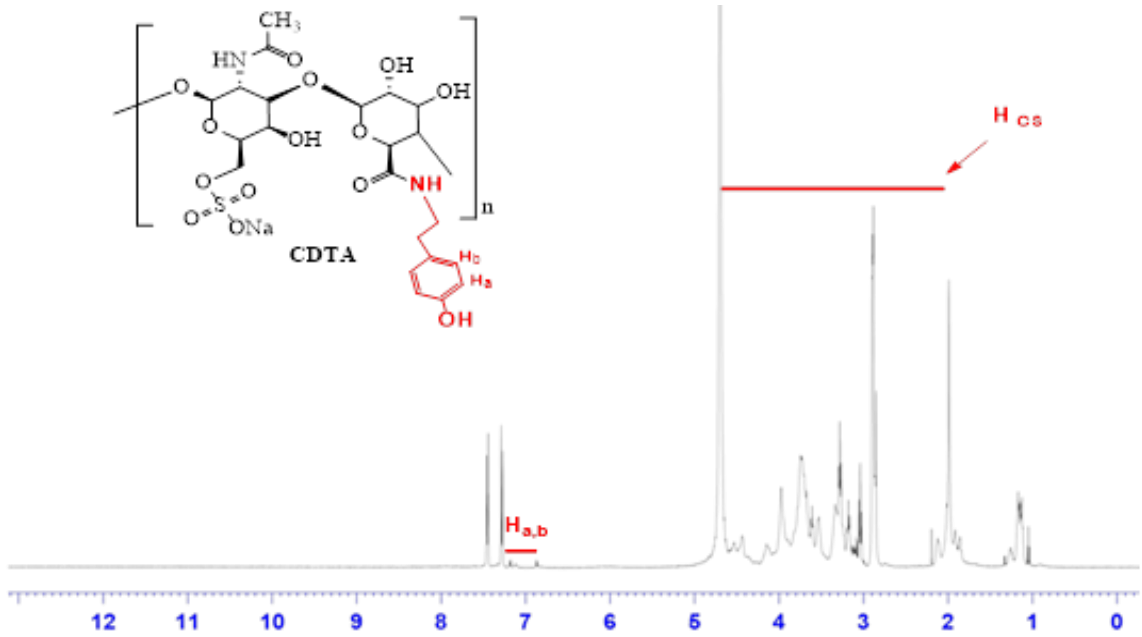
Phương trình đường chuẩn của TA với độ tuyến tính $R^2 = 0,9992$ thích hợp cho việc định lượng hàm lượng TA có trong polymer ATA. Kết quả tính toán hàm lượng TA trong mẫu nghiên cứu ATA trình bày ở Phụ lục 7.

Dựa trên Phụ lục 7 nghiên cứu của Kurisawa [74], lượng H_2O_2 tối thiểu cần phản ứng với TA trong 10 mg ATA để tạo gel là 0,024% trong dung dịch ATA 10%. Ngoài ra nồng độ H_2O_2 không sử dụng cao hơn 0,25% vì sẽ gây độc đối với tế bào

3.2.4. Kết quả tổng hợp vật liệu CDTA

3.2.4.1. Kết quả phổ 1H -NMR của vật liệu CDTA

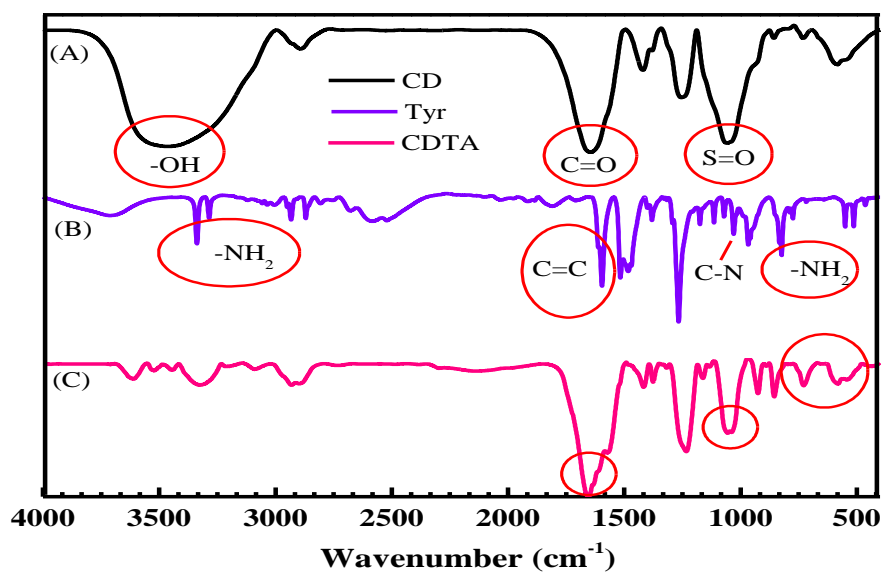
Kết quả phân tích thành phần và cấu trúc của CDTA (phổ 1H -NMR) được trình bày ở **Hình 3.12**



Hình 3.12. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của GTA trong D_2O

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của CDTA trong D_2O (Hình 3.12) cho các tín hiệu đặc trưng của chondroitin sulfate xuất hiện ở các peak từ 2 ppm-4,8 ppm. Sự xuất hiện của hai peak ở vị trí 6,8 ppm và 7,2 ppm là tín hiệu proton liên hợp vòng thơm của nhóm tyramin ($-\text{CH}=\text{CH}_2-$). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của Park và Nguyen [93, 120].

3.2.4.2. Kết quả đo phổ FT-IR của CDTA



Hình 3.13. Kết quả đo phổ FT-IR của CD_Tyr. (A) CD; (B) Tyr; (C) CDTA

Kết quả phổ FT-IR của CD cho thấy sự hiện diện của các dao động đặc trưng:

Dao động giãn của liên kết C-O trong nhóm acetamido, dao động của nhóm C=O, dao động giãn của liên kết S=O và dao động của liên kết C-O-S [122], [123].

Phổ FT-IR của CD có độ hấp thụ mạnh ở số sóng $1645,94\text{ cm}^{-1}$ chứng minh sự có mặt của nhóm cacboxyl [111].

Các đỉnh đặc trưng của C-O-S đã được ghi nhận tại số sóng $857,15\text{ cm}^{-1}$. Liên kết C-O-S là liên kết đặc trưng của mắt xích D-galactosamine trong CD.

Các đỉnh đặc trưng của dao động hóa trị bất đối xứng S=O trong nhóm sunfat được quan sát thấy ở $1056,93\text{ cm}^{-1}$ [122, 123].

Độ hấp thụ tại bước sóng $1419,63\text{ cm}^{-1}$ là kết quả của dao động uốn của liên kết N-H.

Đỉnh hấp thụ được ghi nhận tại bước sóng 3463 cm^{-1} đã chứng minh sự tồn tại của nhóm -OH trong GalNAc và GlcA của CD.

Đỉnh đặc trưng của CH₂-CH đã được ghi nhận tại số sóng $2891,49\text{ cm}^{-1}$.

Trong kết quả phổ FT-IR ứng với dao động điển hình trong cấu trúc của Tyramin:

Dải hấp thụ trải dài từ 3400 cm^{-1} là dao động đặc trưng cho nhóm amine bậc 1 (-NH₂).

Dao động uốn ngoài mặt phẳng của nhóm amine bậc 1 (NH₂) đã được chứng minh tại số sóng 828 cm^{-1} đến 622 cm^{-1} [111].

Đỉnh đặc trưng của **Tyramine** được quan sát tại 1635 cm^{-1} do dao động giãn của liên kết C=C trong vòng phenol.

Dải hấp thụ từ 1387 cm^{-1} đến 1323 cm^{-1} chứng tỏ dao động giãn của liên kết C-N. Ngoài ra, dải hấp thụ từ 1149 cm^{-1} đến 1037 cm^{-1} được hình thành do dao động uốn của liên kết C-N

Kết quả phổ FT-IR ứng với dao động điển hình trong cấu trúc của CDTA:

Trong phổ CDTA, ta thấy các đỉnh hấp thụ ứng với các dao động điển hình trong CD, Tyr đều xuất hiện. Ngoài ra, tại số sóng từ 828 cm^{-1} đến 622 cm^{-1} quan sát thấy không còn đỉnh hấp thụ. Điều đó chứng tỏ đã khi gắn Tyr lên CD đã có sự chuyển dịch nhóm amine của Tyr lên hợp chất CS-Tyr.

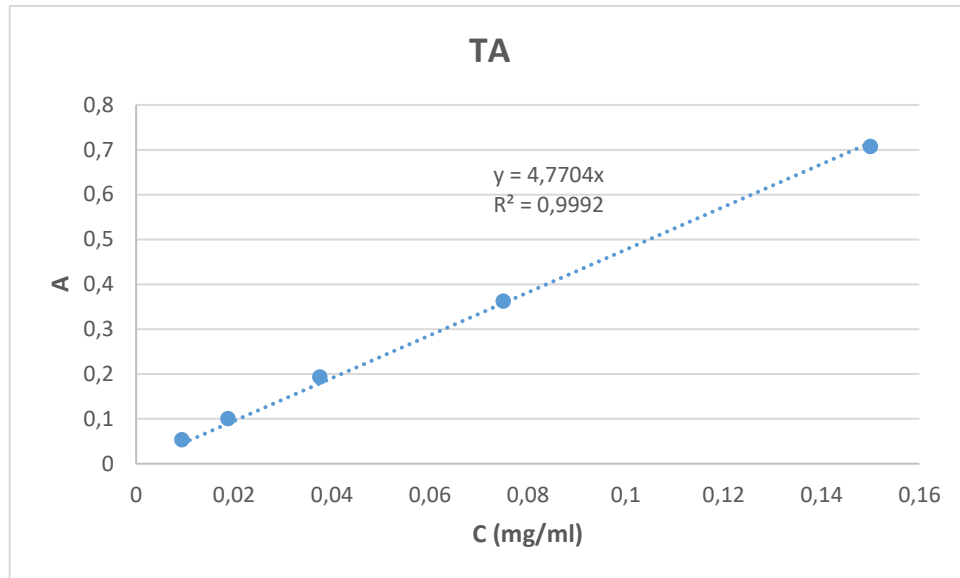
Từ các dữ kiện trên ta chứng minh được đã gắn thành công Tyr lên CD

Bảng 3.4. Kết quả phổ FT-IR của Tyramin, CD, CDTA

Nhóm chức	Số sóng (cm^{-1})		
	Tyramin	CD	CDTA
-OH, -NH ₂	3400	3400	3290,39
-CH(-CH ₂ và -CH ₃)		2936,93	2937,77
-C-O-C	1030	1030	1033,45
-COO		1645,94	1543,46
-NH ₂	828; 622		
S=O		1056,93	1033,45
-C-O-S		857,15	852,23
-NHCOO-			1654,2

3.2.4.3. Hàm lượng của TA trong CDTA

Kết quả đo độ hấp thụ A của TA và CDTA thu được bằng UV-Vis ($\lambda = 275\text{ nm}$) được trình bày **Phụ lục 17**. Dựa vào kết quả đo được, thiết lập phương trình đường chuẩn của TA (**Hình 3.14**)



Hình 3.14. Phương trình đường chuẩn của TA

Phương trình đường chuẩn của TA với độ tuyến tính $R^2 = 0,9992$ thích hợp cho việc định lượng hàm lượng TA có trong polymer CDTA. Kết quả tính toán hàm lượng TA trong mẫu nghiên cứu CDTA trình bày ở Phụ lục 8.

Dựa trên **Phụ lục 8** và nghiên cứu của Kurisawa [74], 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%. Ngoài ra nồng độ H_2O_2 không sử dụng cao hơn 0,25% vì sẽ gây độc đối với tế bào

3.3. TỔNG HỢP VÀ XÁC ĐỊNH CÁC TÍNH CHẤT CỦA CÁC HỆ HYDROGEL, HYDROGEL COMPOSITE

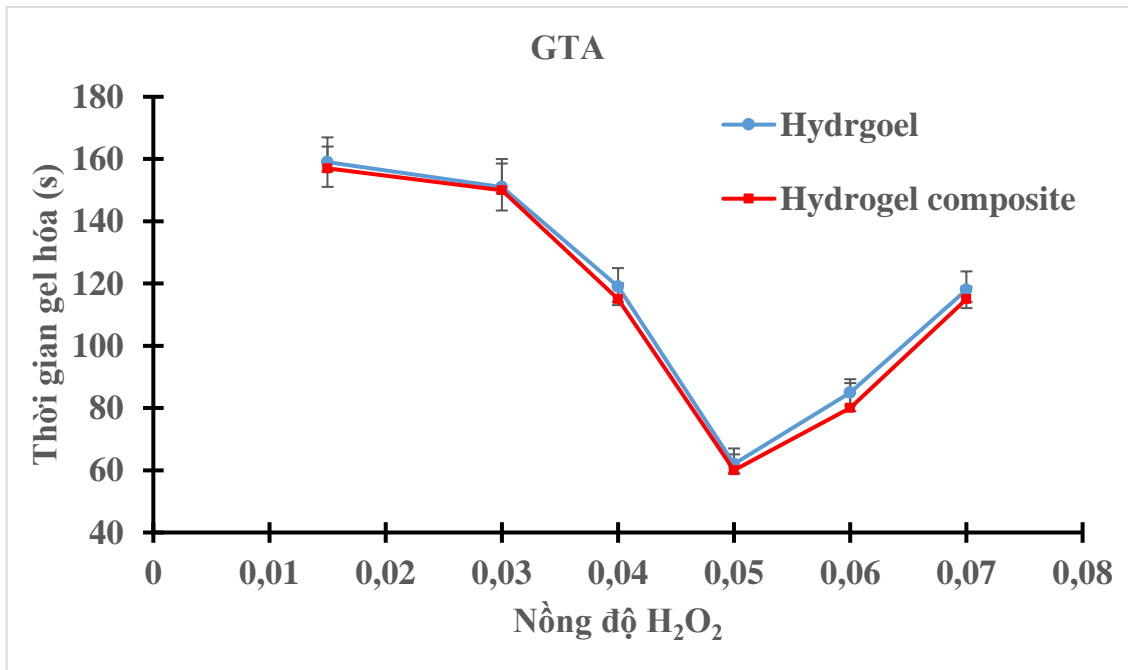
3.3.1. Hệ hydrogel và hydrogel composite GTA-CHPA/BCP

3.3.1.1. Thời gian gel hóa của hydrogel và hydrogel composite CHPA-GTA/BCP

Thời gian gel hóa của hydrogel và hydrogel composite là thông số rất quan trọng trong việc định hình để ứng dụng vật liệu trong việc tiêm trực tiếp vào vết thương hay tính toán quá trình hình thành gel từ đó mới cấy ghép vật liệu vào vết thương.

- Kết quả khảo sát thời gian gel hóa của hydrogel và hydrogel composite GTA ở các nồng độ 0,015%, 0,03%, 0,045%, 0,06% và 0,075% H_2O_2 với

enzyme HRP cố định là 0,05 mg/mL với độ lặp lại 3 lần được trình bày trong **Hình 3.15**.



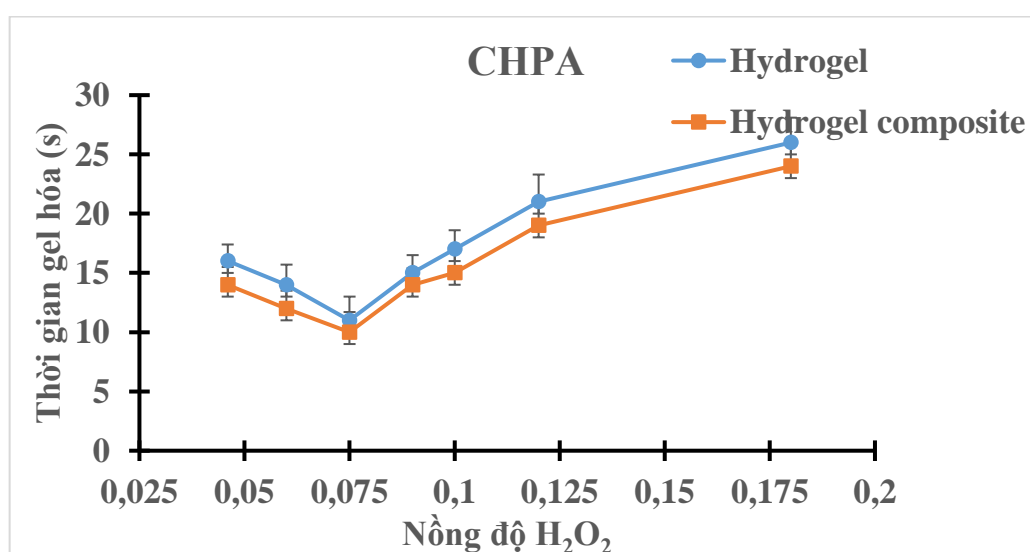
Hình 3.15. Khảo sát thời gian hình thành gel của hydrogel và hydrogel composite GTA (với nồng độ HRP 0,05 mg/mL)

Kết quả cho thấy, thời gian gel hóa của hydrogel GTA biến thiên khá lớn. Khi tăng nồng độ H₂O₂ từ 0,015% đến 0,05%, quá trình hình thành gel tăng nhanh dần tương ứng với thời gian tạo gel giảm dần từ 159 đến 62 giây. Khi tăng nồng độ H₂O₂ từ 0,05 đến 0,07% quá trình hình thành gel chậm dần tương ứng với thời gian gel hóa tăng từ 62 đến 118 giây. Điều này có thể giải thích là do ảnh hưởng nồng độ càng cao của H₂O₂/HRP làm cho sự phân hủy H₂O₂ càng nhiều dẫn đến việc các gốc phenol được sinh ra bởi enzyme HRP tăng lên, từ đó thời gian tạo gel giảm. Nhưng nếu nồng độ H₂O₂/HRP quá cao thì sẽ làm enzyme HRP bị ức chế làm cho thời gian tạo gel tăng lên. Kết quả này phù hợp với kết quả của các nghiên cứu trước của Jin, Kurisawa, Veitch. Điều này đã được giải thích như sau: khi lượng H₂O₂ cao, H₂O₂ ức chế enzyme HRP làm cho thời gian tạo gel tăng lên [74, 101, 113].

Trong trường hợp của hydrogel composite GTA, thời gian tạo gel không thay đổi nhiều so với hydrogel. Ví dụ, thời gian hình thành gel giảm từ 157 đến

60 giây tương ứng với nồng độ H_2O_2 0,015%-0,05%. Sau đó tăng từ 60 đến 115 giây tương ứng với nồng độ H_2O_2 0,05%-0,07%. Nghĩa là khi thêm BCP vào khoảng biến thiên giảm không đáng kể so với hydrogel ban đầu. Điều này được giải thích là do trong quá trình hình thành gel có sự tương tác giữa các hạt BCP với vật liệu hydrogel. Đầu tiên là ảnh hưởng của các nhóm chức OH, NH_2 , COOH của gelatin liên kết hydrogen với nhóm OH của HAp trong BCP. Tiếp đến là nhóm NH_2 liên kết tạo phức ion Ca^{2+} của BCP [20, 21, 58, 60]. Vì lực tương tác giữa các hạt nano BCP với vật liệu, từ đó giúp tăng mật độ liên kết trong khối gel hydrogel composite, kết quả làm giảm thời gian tạo gel. Ngoài ra, khi cho thêm BCP vào sẽ làm tăng mật độ trong dung dịch dẫn đến độ nhớt dung dịch tăng làm ảnh hưởng đến quá trình xúc tác và khuếch tán, vì vậy thời gian hình thành liên kết ngang tăng dần. Do đó, thời gian hình thành gel hoá của hydrogel composite của GTA nói riêng và hydrogel composite nói chung sẽ ít thay đổi so với hydrogel.

- Kết quả khảo sát thời gian gel hóa của hydrogel và hydrogel composite CHPA ở các nồng độ 0,046%, 0,06%, 0,075%, 0,09%, 0,1%, 0,12% và 0,18% H_2O_2 với enzyme HRP cố định là 0,07 mg/mL với độ lặp lại 3 lần được trình bày trong **Hình 3.16**.

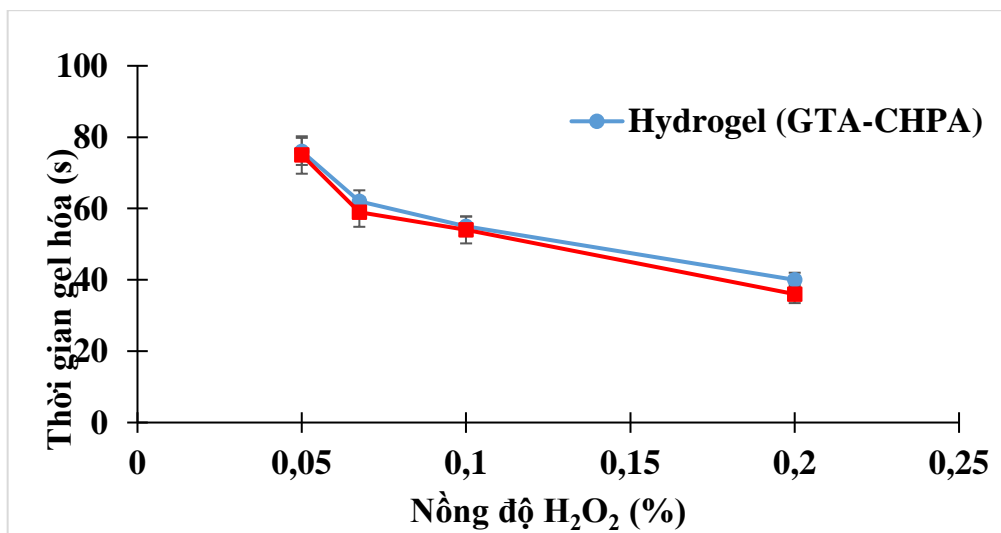


Hình 3.16. Thời gian hình thành gel hoá của hydrogel và hydrogel composite CHPA (nồng độ HRP 0,07 mg/mL)

Đồ thị trên cho thấy thời gian gel hóa của hydrogel khá nhanh diễn ra trong vài chục giây, và lượng H_2O_2 ảnh hưởng đến thời gian tạo gel. Thời gian gel hóa của hydrogel CHPA biến thiên khá lớn. Khi tăng nồng độ H_2O_2 từ 0,046-0,075% , quá trình hình thành gel tăng nhanh dần tương ứng với thời gian tạo gel giảm dần từ 16 đến 14 giây. Khi tăng nồng độ H_2O_2 từ 0,05-0,07% quá trình hình thành gel chậm dần tương ứng với thời gian gel hóa tăng từ 11 đến 26 giây.

Trong trường hợp của hydrogel composite CHPA, thời gian tạo gel không thay đổi nhiều so với hydrogel. Ví dụ thời gian hình thành gel giảm từ 14 đến 10 giây tương ứng với nồng độ H_2O_2 0,046%-0,075%. Sau đó tăng từ 14 đến 24 giây tương ứng với nồng độ H_2O_2 0,09%-0,18%. Nghĩa là khi thêm BCP vào khoảng biến thiên giảm không đáng kể so với hydrogel ban đầu.

- Kết quả khảo sát thời gian gel hóa của hydrogel và hydrogel composite CHPA trên nền GTA với tỉ lệ 1:1 như bảng 2.2 ở các nồng độ 0,05%; 0,075%; 0,1%; 0,15% và 0,2% với nồng độ HRP cố định là 0,07 mg/mL được trình bày trong Hình 3.17.



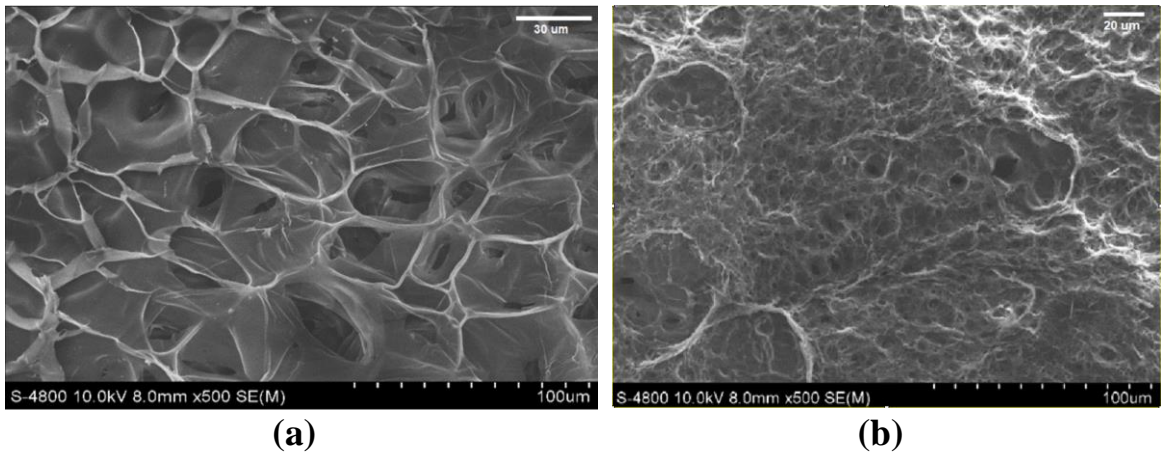
Hình 3.17. Thời gian hình thành gel hoá của hydrogel và hydrogel composite CHPA trên nền GTA với tỉ lệ 1:1 (nồng độ HRP 0,07 mg/mL)

Đồ thị trên cho thấy thời gian gel hóa của hydrogel khá nhanh trong vài giây, và lượng H_2O_2 , lượng HRP ảnh hưởng đến thời gian tạo gel. Khi tăng

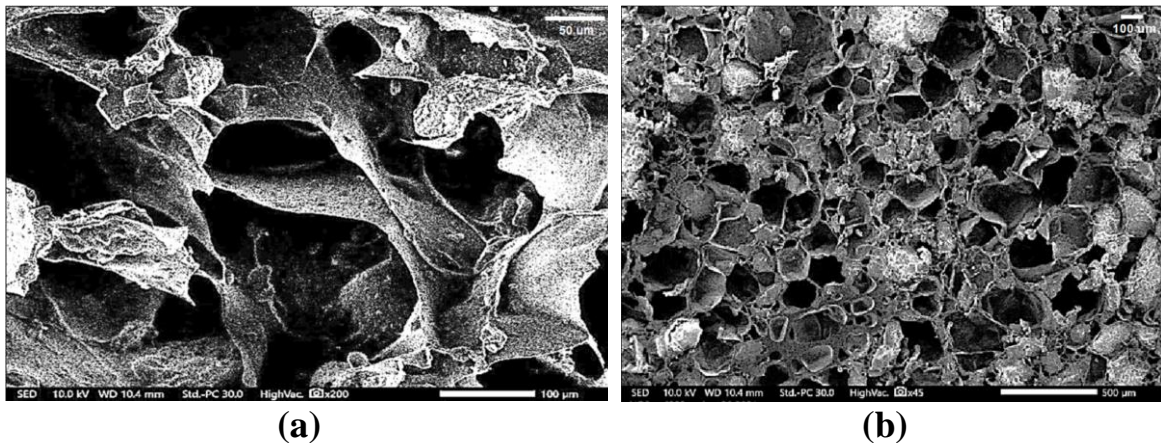
nồng độ H_2O_2 từ 0,05%-0,2% thời gian gel hóa của hydrogel GTA-CHPA (1:1) giảm từ 76 đến 40 giây. Đối với hydrogel composite GTA-CHPA/BCP (1:1) thời gian hình thành gel nhanh hơn nhưng nhìn chung có sự thay đổi không lớn khi so với hydrogel. Điều này có thể giải thích do ảnh hưởng của BCP đến quá trình tạo gel như trên.

3.3.1.2. Kết quả hình thái đối với vật liệu hydrogel CHPA-GTA và hydrogel composite CHPA-GTA/BCP

Sau khi tổng hợp và đông khô, dùng phương pháp SEM để quan sát hình thái học của hydrogel CHPA-GTA (1:1), CHPA-GTA (1:2) và hydrogel composite CHPA-GTA/BCP (1:1), CHPA-GTA/BCP (1:2). Kết quả được thể hiện qua **Hình 3.18** và **Hình 3.19**.



Hình 3.18. Hình SEM (a) hydrogel CHPA-GTA (1:1) và (b) CHPA-GTA (1:2)



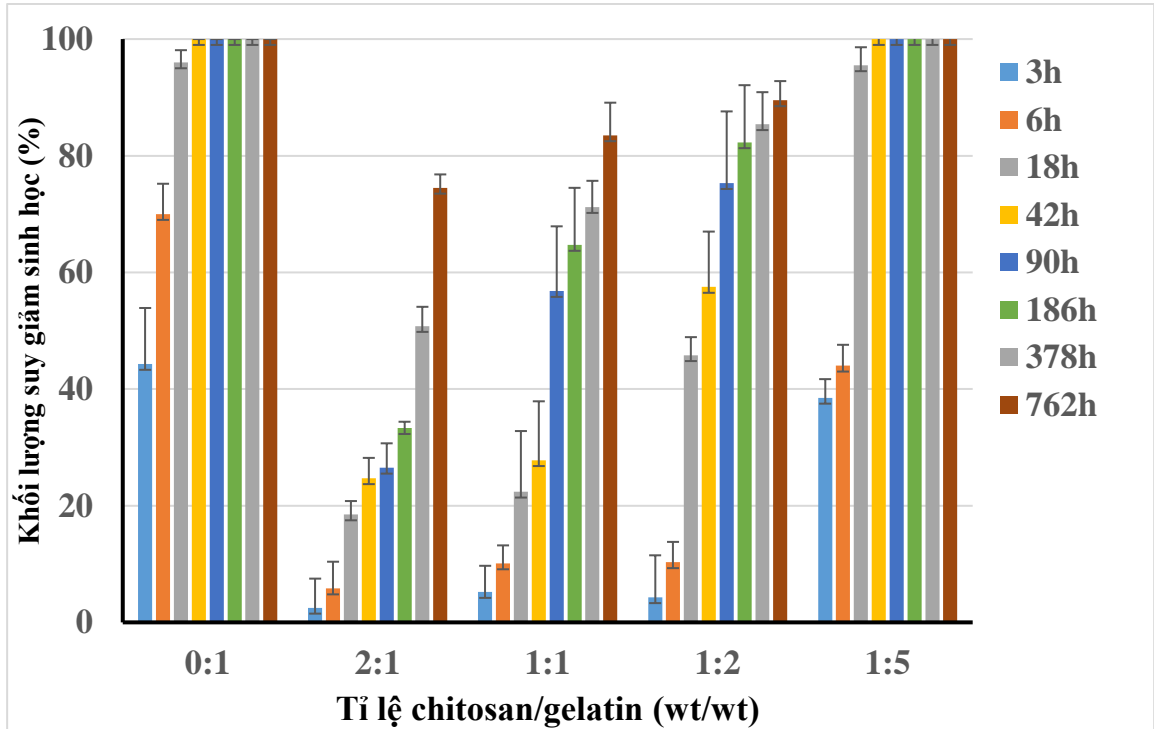
Hình 3.19. Hình SEM (a) hydrogel composite CHPA-GTA/BCP (1:1) ngày và (b) CHPA-GTA/BCP (1:2)

Kết quả hình SEM với kích thước thang đo 100 μm (**Hình 3.18** và **Hình 3.19**) của hydrogel và hydrogel composite CHPA-GTA (1:1) và CHPA-GTA/BCP (1:2): cấu trúc của vật liệu bao gồm nhiều lỗ xốp với cấu trúc không gian ba chiều, kích thước của lỗ xốp khoảng 20-150 μm . Đối với hydrogel composite, kết quả cho thấy những hạt BCP bao phủ trên bề mặt của vật liệu, chứng minh rằng vật liệu này có ưu điểm hơn so với vật liệu tổng hợp bằng phương pháp khác vì vật liệu không có cấu trúc xốp giống như hydrogel và hydrogel composite khi sử dụng phương pháp đông khô.

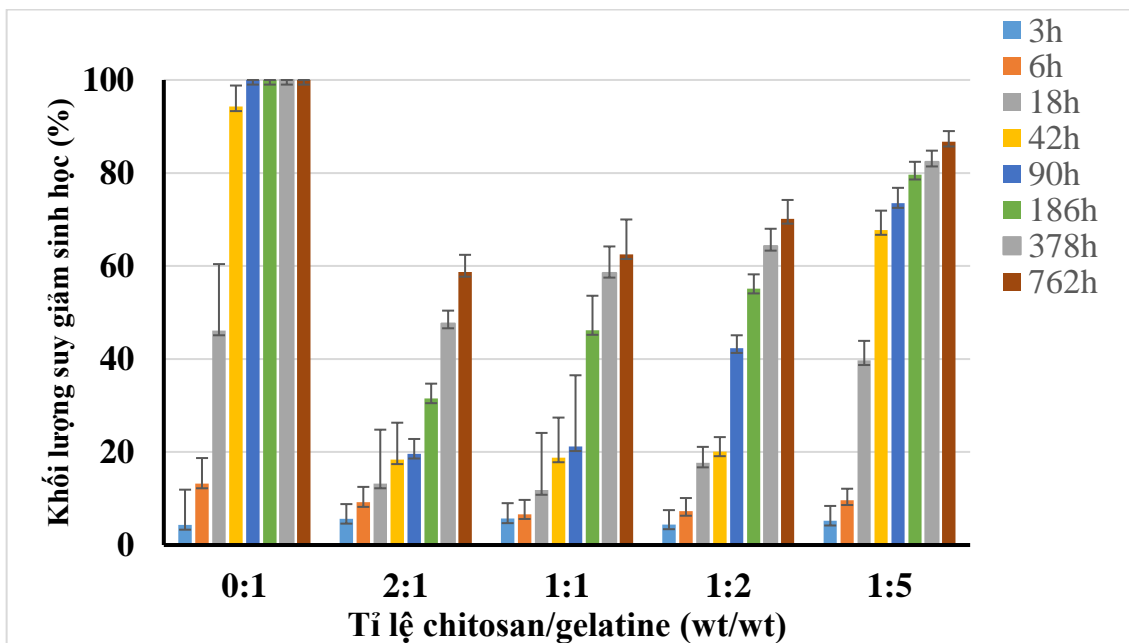
Khi cấu trúc có nhiều lỗ xốp như hydrogel CHPA-GTA và hydrogel composite CHPA-GTA/BCP sẽ giúp cho vật liệu tạo nhiều khoảng trống ba chiều, từ đó góp phần cho các tế bào dịch chuyển và lưu thông, làm tăng khả năng tái tạo chuyển hóa xương. Ngoài ra, cấu trúc xốp còn là nơi để tế bào và mạch máu bám dính và phát triển bên trong, giúp tế bào xương hình thành và phát triển phía bên trong vật liệu. Tóm lại, cấu trúc hình thái của hydrogel và hydrogel composite chứa nhiều lỗ xốp phù hợp cho ứng dụng trong lĩnh vực cấy ghép và tái tạo xương. Kết quả cho thấy vật liệu phù hợp với ứng dụng tái tạo y sinh [117, 125].

3.3.1.3. Thời gian suy giảm sinh học của hydrogel CHPA-GTA và hydrogel composite CHPA-GTA/BCP

Kết quả khảo sát thời gian suy giảm sinh học trong dung dịch PBS có chứa enzyme collagenase của hydrogel và hydrogel composite của CHPA trên nền GTA theo tỉ lệ Bảng 2.2 được trình bày qua hai biểu đồ **Biểu đồ 3.1** và **Biểu đồ 3.2**



Biểu đồ 3.1. Biểu đồ thời gian % suy giảm sinh học của hydrogel CHPA trên nền GTA theo các tỉ lệ (C/G) trong dung dịch PBS



Biểu đồ 3.2. Biểu đồ thời gian % suy giảm sinh học của hydrogel composite CHPA trên nền GTA theo các tỉ lệ (C/G) trong dung dịch PBS

Dung dịch PBS chứa enzyme collagenase được sử dụng trong nghiên cứu này để khảo sát suy giảm khối lượng của vật liệu hydrogel và hydrogel composite thông qua việc phá hủy các liên kết peptide. Enzyme collagenase là một enzyme đặc biệt có trong cơ thể động vật, xuất hiện trong quá trình thủy phân và có nhiệm vụ phân cắt protein tự nhiên, phá vỡ các liên kết peptide trong collagen. Kết quả của hai biểu đồ cho thấy suy giảm khối lượng của hydrogel giảm rất nhanh so với hydrogel composite.

Theo kết quả **Biểu đồ 3.1** ta 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 762 giờ). Điều này cho thấy khi kết hợp với chitosan đã làm tăng độ bền của hệ hydrogel khi so sánh với việc chỉ sử dụng một mình gelatine. Điều này được giải thích do tính chất của gelatin là một polymer rất dễ bị phân hủy trong môi trường enzym collagenase. Khi kết hợp với chitosan sẽ làm tăng sự đan xen giữa các chuỗi copolymer phân nhánh dẫn đến việc làm tăng tính ổn định của hydrogel trong quá trình giảm cấp. Ngoài ra, chitosan là loại polymer khá bền, khó thủy phân trong môi trường sinh lý. Kết quả là việc kết hợp với chitosan sẽ làm tăng thời gian suy giảm khối lượng.

Kết quả so sánh giữa 2 biểu đồ hydrogel và hydrogel composite cho thấy, khi cho thêm các hạt BCP vào sự suy giảm khối lượng diễn ra chậm hơn so với hydrogel. Ví dụ với tỉ lệ 0:1 thời gian giảm cấp hoàn toàn trong 92 giờ (suy giảm hoàn toàn đối với hydrogel), tỉ lệ 2:1 giảm cấp 58,7% trong 762 giờ (suy giảm 82% đối với hydrogel). Tương tác giữa các hạt nano BCP với gelatin và chitosan thông qua các liên kết hydrogen giữa các nhóm chức OH, NH₂, COOH trong gelatin và nhóm chức NH₂ của chitosan với nhóm OH của HAP trong BCP. Ngoài ra, nhóm NH₂ của gelatin và chitosan liên kết tạo phức với ion Ca²⁺ của BCP. Mật độ liên kết của mạng lưới sẽ tăng lên nhờ các liên kết tạo phức giữa các hạt nano BCP với gelatin và chitosan, từ đó làm cho hydrogel

composite CHPA-GTA/BCP bền vững hơn so với hydrogel CHPA-GTA. Vì vậy, khối lượng suy giảm của hydrogel composite CHPA-GTA/BCP trong dung dịch PBS chậm hơn so với hydrogel CHPA-GTA [23-26].

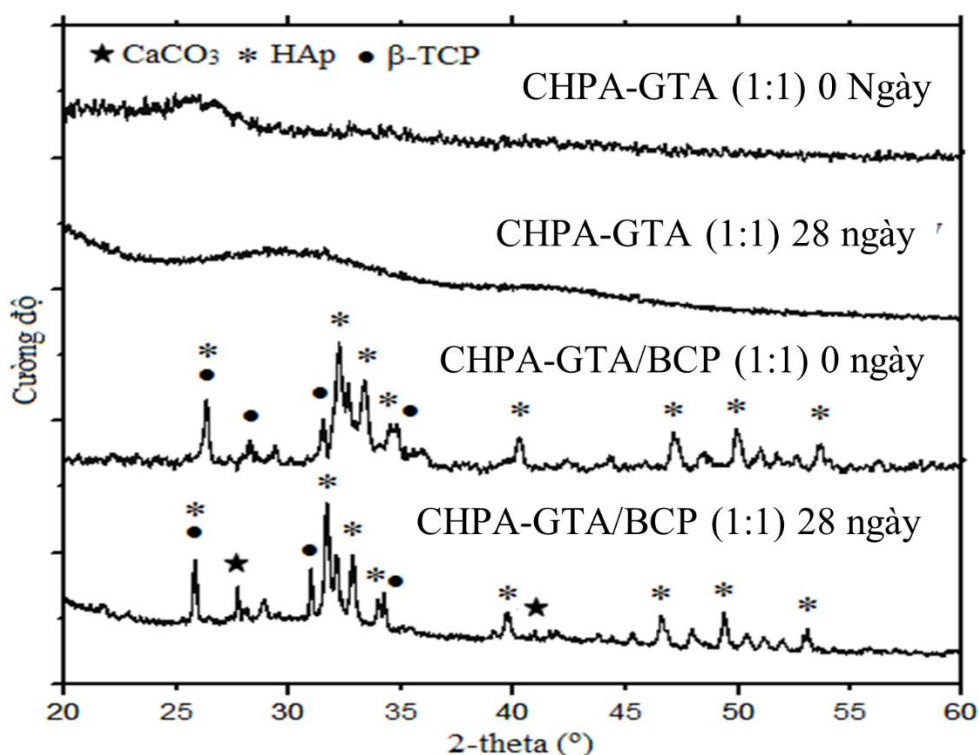
Thời gian suy giảm sinh học hoàn toàn (100% khối lượng suy giảm) là sau 42 giờ, đối với hydrogel GTA và đối với hydrogel composite GTA/BCP diễn ra sau 90 giờ. Kết quả cho thấy vật liệu hydrogel GTA và hydrogel composite GTA/BCP không đáp ứng được yêu cầu về khả năng sử dụng trong lĩnh vực cấy ghép và tái tạo xương. Thời gian giảm cấp sinh học của hydrogel composite CHPA-GTA với tỉ lệ 1:1 và 1:2 sau 762 giờ lần lượt là 62%; 74,6% thích hợp cho ứng dụng tái tạo, chữa lành khiếm khuyết của xương. Do đó, trong nghiên cứu này tập trung tiến hành đánh giá khả năng tạo khoáng của hydrogel CHPA-GTA và hydrogel composite CHPA-GTA/BCP với cùng tỉ lệ 1:1, 1:2 trong dung dịch giả sinh học SBF để đánh giá về tác dụng của hydrogel và hydrogel composite trong việc tái tạo và chữa lành khiếm khuyết của xương.

3.3.1.4. Kết quả đánh giá khả năng tạo khoáng của hydrogel CHPA-GTA và hydrogel composite CHPA-GTA/BCP

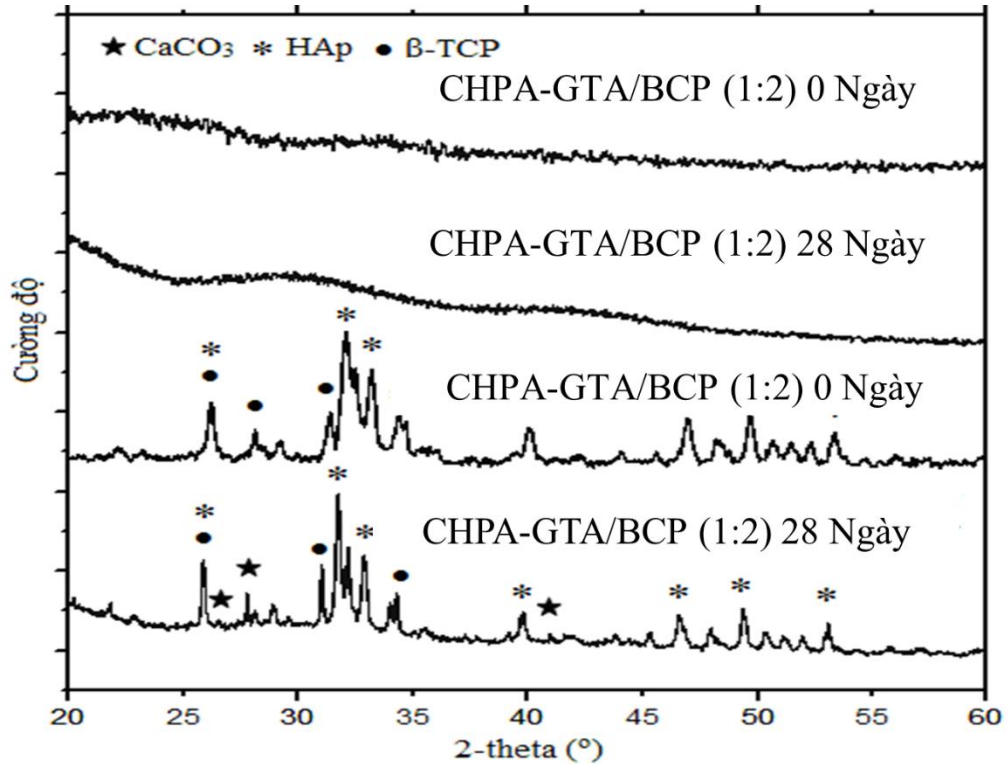
Giản đồ nhiễu xạ XRD

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) ban đầu và sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày, vật liệu được xác định bằng phương pháp nhiễu xạ XRD (**Hình 3.20** và **Hình 3.21**). Sau 28 ngày ngâm trong dung dịch SBF, quá trình hình thành khoáng apatit trong hydrogel composite CHPA-GTA/BCP (1:1) và CHPA-GTA/BCP (1:2) đã được xác định. Trước khi ngâm SBF, các mẫu hydrogel composite composite CHPA-GTA/BCP (1:1) và CHPA-GTA/BCP (1:2) xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của tinh thể β -TCP: 25,82°, 27,79°, 32,05°, 34,41° và HAp: 25,92°, 31,81°, 32,80°, 34,23°, 39,78°, 46,69°, 49,54°, 53,27°. Sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày của hydrogel composite composite CHPA-GTA/BCP (1:2) và

CHPA-GTA/BCP (1:5), kết quả cho thấy có thêm các tín hiệu đặc trưng của CaCO_3 tại vị trí 2-theta ($^\circ$) 26,41 $^\circ$, 27,62 $^\circ$, 41,37 $^\circ$. Kết quả cho thấy hydrogel composite CHPA-GTA (1:1), CHPA-GTA(1:2) đã tạo thành khoáng apatit sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF. Bên cạnh đó, hydrogel CHPA-GTA(1:1), CHPA-GTA(1:2) không có các ion tạo khoáng như Ca^{2+} và PO_4^{3-} từ BCP nên quá trình tạo khoáng diễn ra chậm, từ đó các tín hiệu đặc trưng của CaCO_3 không quan sát được rõ. Qua phân tích khả năng tạo khoáng bằng phương pháp phân tích XRD, cho thấy hydrogel composite GTA-CHPA/BCP có tiềm năng trong quá trình hình thành và thúc đẩy quá trình phát triển tạo khoáng apatite carbonate [20, 53, 105, 126].



Hình 3.20. Kết quả phân tích XRD của hydrogel và hydrogel composite (CHPA- GTA , CHPA- GTA/BCP với tỉ lệ 1:1) ban đầu và sau thời gian ngâm trong dung dịch giả sinh học SBF trong 28 ngày

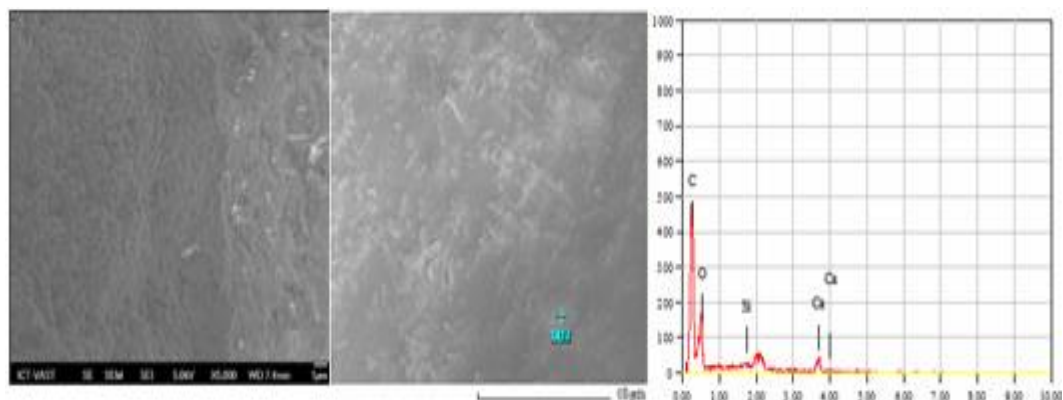


Hình 3.21. Kết quả phân tích XRD của hydrogel và hydrogel composite (CHPA- GTA , CHPA- GTA/BCP với tỉ lệ 1:2) ban đầu và sau thời gian ngâm trong dung dịch giả sinh học SBF trong 28 ngày

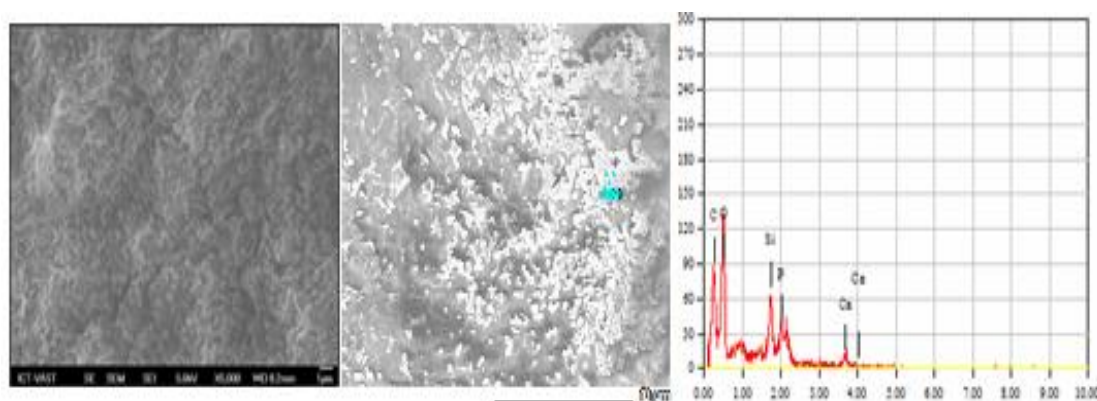
Sự hình thành khoáng appatite carbonate

Hoạt tính sinh học của hydrogel và hydrogel composite được dự đoán trên khả năng tạo khoáng của vật liệu trong các nghiên cứu in vitro và in vivo như khả năng tạo mầm và thúc đẩy gia tăng tinh thể thể appatite carbonate trên bề mặt của vật liệu

Nhóm nghiên cứu khảo sát sự hình thành khoáng appatite carbonate bằng cách tiến hành ngâm hydrogel hydrogel CHPA- GTA (1:1), CHPA- GTA (1:2) và hydrogel composite CHPA- GTA/BCP (1:1), CHPA- GTA/BCP (1:2) trong dung dịch SBF sau 28 ngày và thu được kết quả thể hiện (**Hình 3.22, Hình 3.23, Hình 3.24, Hình 3.25**).



Hình 3.22. Kết quả hình ảnh phân tích bằng phương pháp SEM và phân tích nguyên tố EDS của hydrogel CHPA-GTA (1:1) sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày



Hình 3.23. Kết quả hình ảnh phân tích bằng phương pháp SEM và phân tích nguyên tố EDS của hydrogel CHPA-GTA (1:2) sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF trong 28 ngày

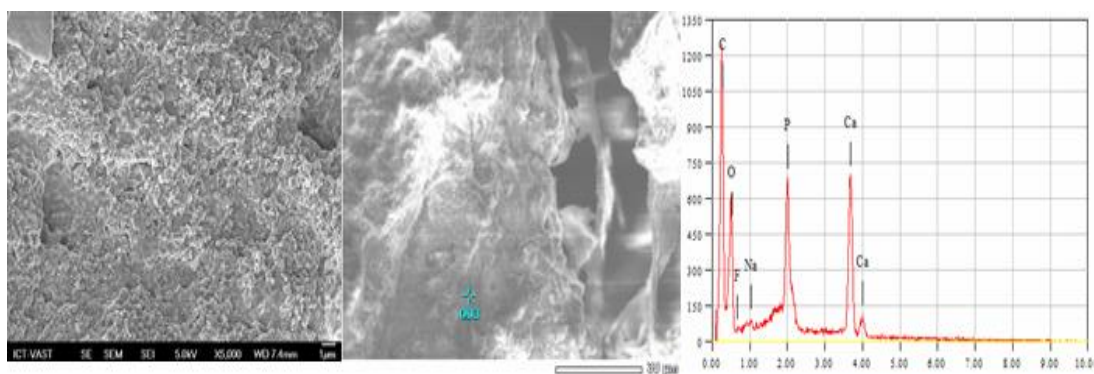
Kết quả hình SEM **Hình 3.22** và **Hình 3.23** thang phóng đại 1 μm hydrogel CHPA-GTA (1:1), CHPA-GTA (1:2) vẫn giữ được cấu trúc xốp. Đối với thang 10 μm cho thấy trên bề mặt của vật liệu hydrogel CHPA-GTA (1:1), CHPA-GTA (1:2) xuất hiện rất ít các tinh thể tạo khoáng.

Qua kết quả phân tích nguyên tố EDS cho thấy các khoáng hình thành trải đều trên bề mặt, bao gồm các nguyên tố Ca, C, O, P và nguyên tố Si xuất hiện do trong phương pháp này sử dụng lớp silic bao phủ lên bề mặt mẫu nhằm phân tích EDS sau thời gian ngâm trong dung dịch giả sinh học SBF 28 ngày. Phần trăm các nguyên tố tham gia tạo khoáng được biểu thị ở bảng 3.5.

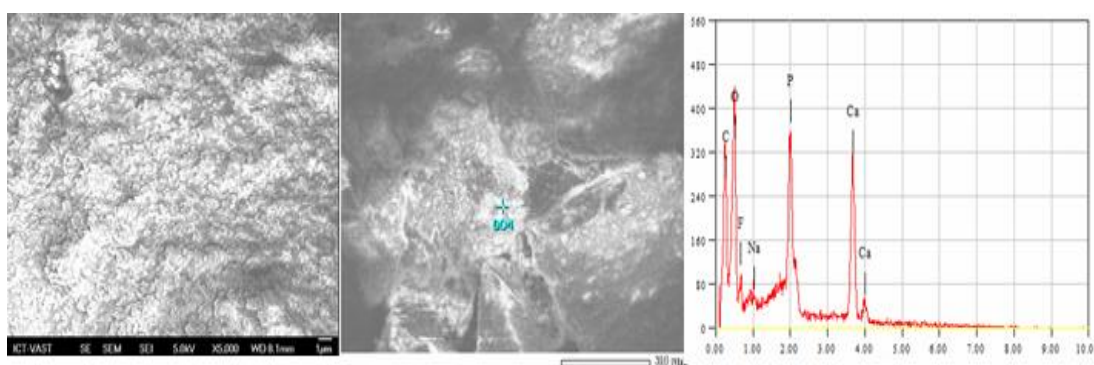
Bảng 3.5. Thành phần trăm (%) các nguyên tố khi sử dụng phương pháp phân tích EDS của hydrogel sau thời gian ngâm trong dung dịch giả sinh học SBF 28 ngày

Mẫu hydrogel	Phần trăm khối lượng (%)			
	P	Ca	C	O
CHPA-GTA (1:1) 28 ngày		7,71	81,76	9,88
CHPA-GTA (1:2) 28 ngày	9,99	5,94	26,37	39,50

Hydrogel composite GTA-CHPA/BCP



Hình 3.24. Kết quả hình ảnh phân tích bằng phương pháp SEM và phân tích nguyên tố EDS hydrogel composite GTA-CHPA/BCP-(1:1) sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày



Hình 3.25. Kết quả hình ảnh phân tích bằng phương pháp SEM và phân tích nguyên tố EDS hydrogel composite GTA-CHPA/BCP-(2:1) sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày

Khi sử dụng kỹ thuật SEM với thang phóng đại 1 μ m, hydrogel composite CHPA-GTA (1:1), CHPA-GTA (1:2), cấu trúc xốp của vật liệu không thay đổi

so với ban đầu. Trong khi đó, khi sử dụng thang phóng đại 30 μ m, hình SEM cho thấy trên bề mặt của vật liệu hydrogel composite CHPA-GTA (1:1), CHPA-GTA (1:2) xuất hiện các mầm tinh thể tạo khoáng (**Hình 3.24** và **Hình 3.25**)

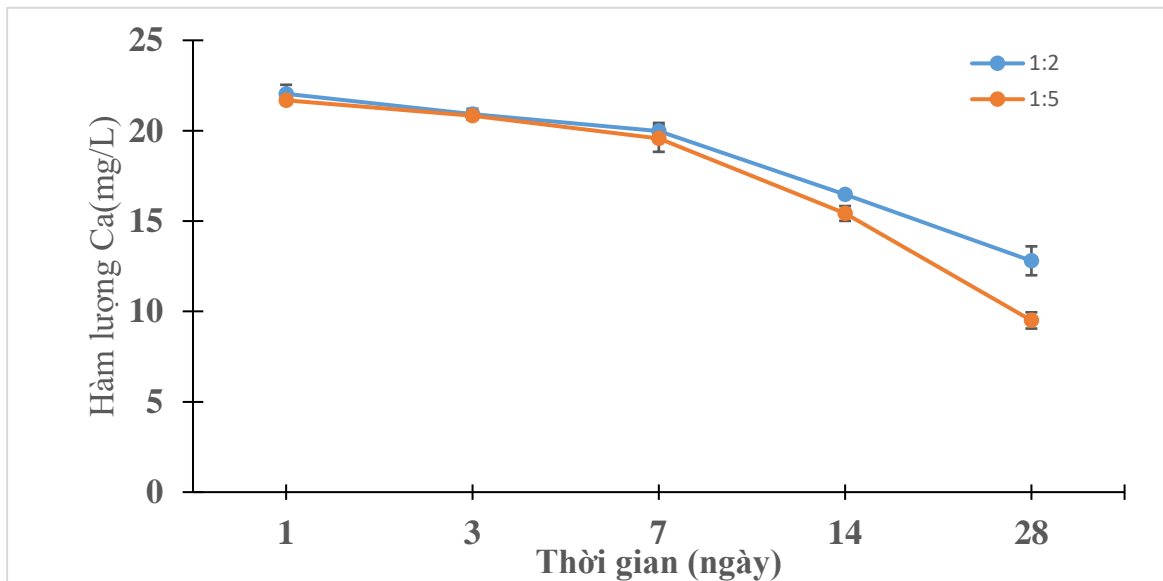
Qua quá trình quả phân tích EDS cho thấy thành phần khoáng hoá tạo thành gồm các nguyên tố Ca, C, O, P và Si và nguyên tố Si xuất hiện do trong phương pháp này sử dụng lớp silic bao phủ lên bề mặt mẫu nhằm phân tích EDS sau thời gian ngâm trong dung dịch giả sinh học SBF 28 ngày. Phần trăm các nguyên tố tham gia tạo khoáng được biểu thị ở **Bảng 3.5**.

Bảng 3.5. Phần trăm khối lượng (%) các nguyên tố sau thời gian ngâm trong SBF (28 ngày)

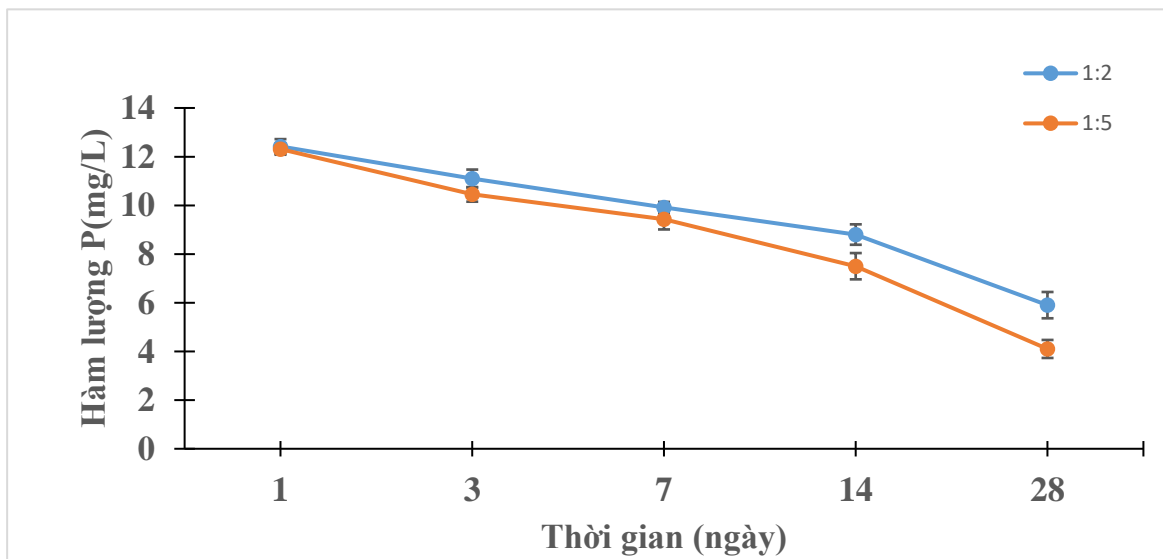
Mẫu hydrogel composite	Phần trăm khối lượng (%)				
	Na	P	Ca	C	O
CHPA-GTA/ BCP (1:1) 28 ngày	0,65	13,48	31,36	46,18	7,65
CHPA-GTA/ BCP (1:2) 28 ngày	0,84	19,01	35,97	13,33	27,42

Từ các kết quả phân tích EDS cho thấy hydrogel composite CHPA-GTA/BCP (1:1) và CHPA-GTA/BCP (1:2) cho kết quả tạo khoáng cao hơn nhiều so với hydrogel CHPA-GTA (1:1) và CHPA-GTA (1:2). Ví dụ đối với % Ca có trong hydrogel composite với 2 tỉ lệ lần lượt là 31,36% và 35,97%, trong khi đó đối với hydrogel % Ca thấp hơn với tỉ lệ lần lượt 7,71% và 5,94%. Giải thích vấn đề này, các hạt nano BCP giúp thúc đẩy quá trình tạo khoáng, đóng vai trò tương tự như các mầm apatite carbonate, từ đó cung cấp các ion Ca^{2+} và PO_4^{3-} cho quá trình phát triển mầm tinh thể và tinh thể apatite carbonate. Ngoài ra, Tỉ lệ giữa gelatin và chitosan cũng đóng góp quan trọng trong việc hình thành và thúc đẩy quá trình tạo khoáng của vật liệu [127]. Ngoài khả năng giúp tế bào xương bám dính lên bề mặt vật liệu, gelatin còn có giúp kích thích tế bào xương phát triển.

Khảo sát hàm lượng Ca, P trong dung dịch SBF



Hình 3.26. Hàm lượng Ca trong dung dịch SBF ngâm hydrogel composite trong 28 ngày với tỉ lệ 1:1 và 1:2



Hình 3.27. Hàm lượng P trong dung dịch SBF ngâm hydrogel composite trong 28 ngày với tỉ lệ 1:1 và 1:2

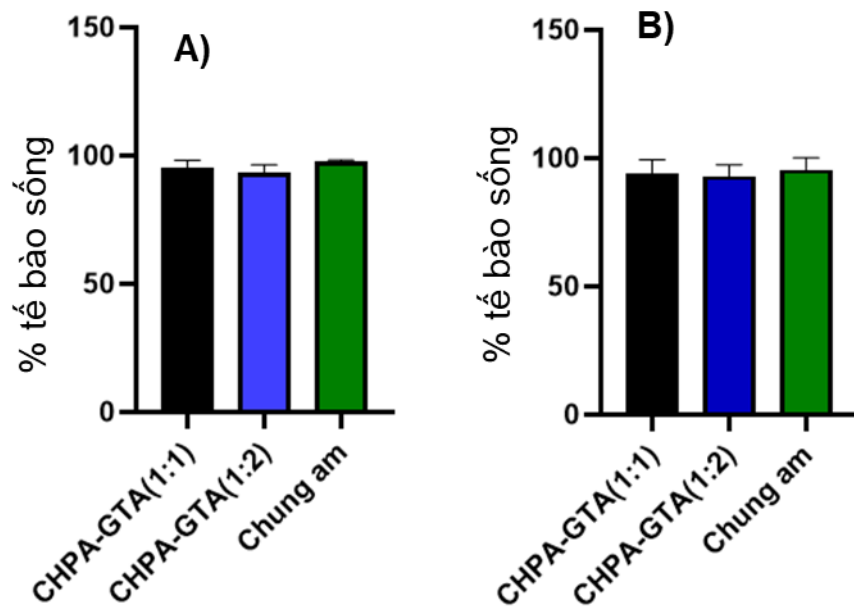
Khảo sát hàm lượng Ca, P trong dung dịch SBF sau thời gian ngâm hydrogel composite cho thấy sau 1 ngày lượng ion Ca, P tăng lên, sau đó lượng Ca, P giảm đều xuống. Các mẫu hydrogel composite cho kết quả thống kê không khác biệt nhiều giữa hai tỉ lệ, như vậy vật liệu có ảnh hưởng đến lượng

Ca, P khi ngâm mẫu hydrogel composite trong dung dịch SBF. Sự tăng lên về hàm lượng Ca, P sau 1 ngày ngâm mẫu được giải thích là một phần BCP phân hủy giải phóng ion Ca^{2+} và ion phosphate. Sau 3 đến 28 ngày ngâm hydrogel composite trong dung dịch SBF, bắt đầu có sự kết tủa từ khoáng apatite làm giảm dần lượng Ca và phosphate tăng dần.

Kết luận: Kết quả phân tích EDS, XRD và ICP cho thấy hydrogel composite CHPA-GTA/BCP có khả năng tạo khoáng và hình thành apatite, ảnh hưởng đến xương tốt hơn so với hydrogel CHPA-GTA.

3.3.2.5. Kết quả đánh giá độc tính tế bào

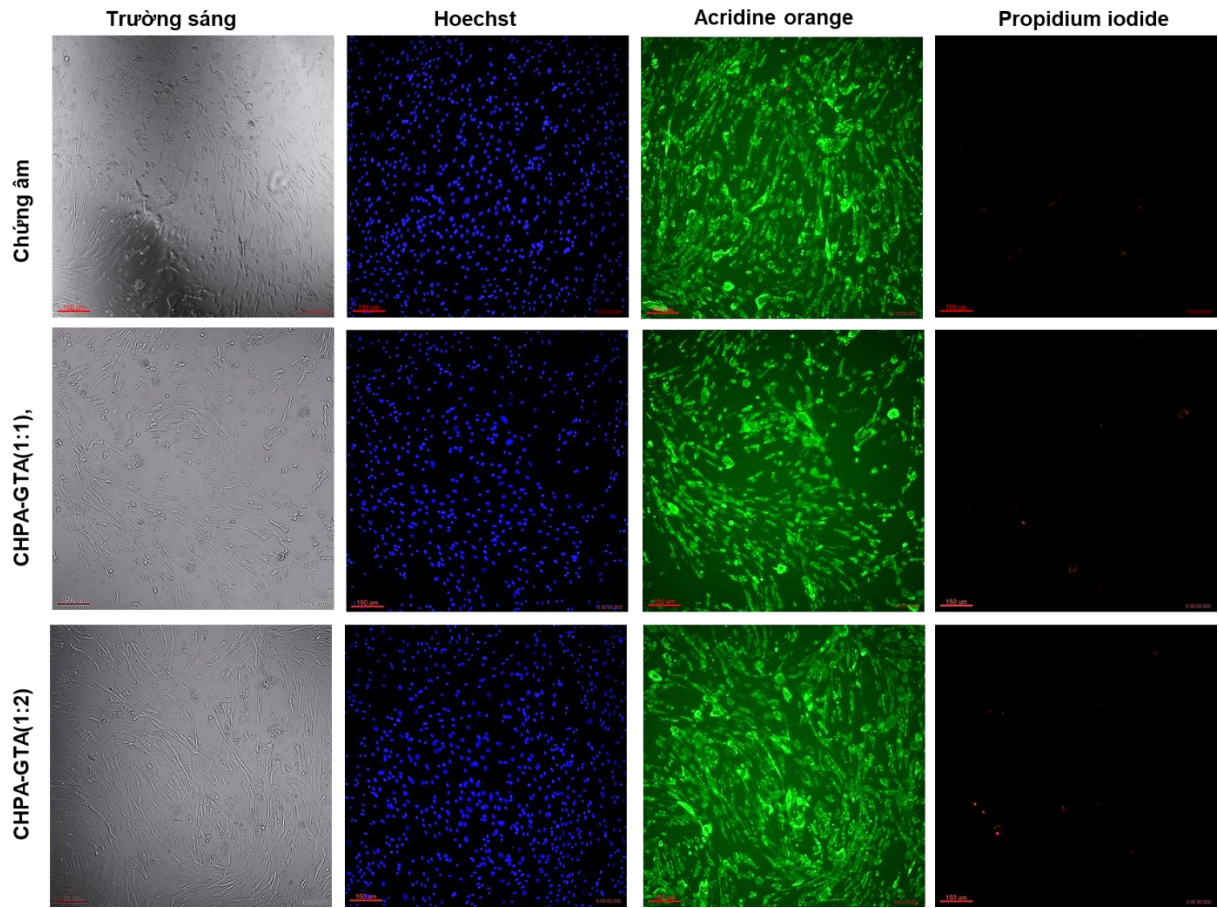
Mục đích ứng dụng của vật liệu là cấy ghép trong cơ thể, vấn đề liên quan đến độc tính của vật liệu, đặc biệt là mối quan ngại về sản phẩm phân hủy của vật liệu có gây độc cho cơ thể. Do vậy, dịch chiết của hydrogel composite được sử dụng để đánh giá tính an toàn của vật liệu cấy ghép. Kết quả khảo sát bằng MTT được trình bày trong Hình 3.28. Đối với mẫu chứng âm (DMEM/F127), $97.8 \pm 5.47\%$ tế bào sống sau 24 giờ và $99.4 \pm 8.4\%$ tế bào sống sau 48 giờ. Như vậy có thể thấy, chứng âm không ảnh hưởng đến tỷ lệ sống/chết của MSC trong thử nghiệm. Dịch chiết 2 mẫu hydrogel composite được sử dụng ở nồng độ 0,5 mg/mL. Kết quả cho thấy, không có sự khác biệt khi so sánh với chứng âm ở các thời điểm thử nghiệm (ANOVA 2 way, $p=0,654$ (so mẫu), $p=0,5157$ (so thời gian)). Thêm vào đó, phần trăm tế bào MSC sống sót sau 24 giờ ủ và sau 48 giờ ủ đều trên 80%. Theo ISO 10993-5:2009, tỷ lệ tế bào sống trên 80% được coi là an toàn.



Hình 3.28. Tỷ lệ tế bào MSC sống sau khi ủ với chứng âm (DMEM/F12) và dịch chiết hydrogel composite CHPA-GTA (1-1) và CHPA-GTA (1-2) sau 24h (A) và sau 48h (B).

Để khẳng định kết quả MTT, phương pháp chụp ảnh tế bào sử dụng chất nhuộm huỳnh quang được sử dụng. Trong nghiên cứu này, tế bào MSC sau 48h xử lý được ủ với 3 chất nhuộm: Hoestch (nhuộm nhân, phát quang màu xanh biển); AO (nhuộm tế bào chất tế bào sống, chỉ ra được tính nguyên vẹn của màng tế bào, phát quang màu xanh); PI (chỉ chỉ xâm nhập vào các tế bào có màng bị tổn thương, phát quang màu đỏ). Kết quả được trình bày trong **Hình 3.29**. Theo kết quả, nhân tế bào bình thường ở các mẫu xử lý với mẫu và chứng âm, mật độ tế bào tương đương nhau. Thành phần nhuộm phẩm màu AO cho thấy tế bào MSC nguyên vẹn và không có huỳnh quang trong tế bào chết. Thêm vào đó, dựa trên kết quả nhuộm AO có thể thấy mật độ tế bào ở các mẫu hydrogel composite phát triển tương đương với mẫu chứng âm.

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.

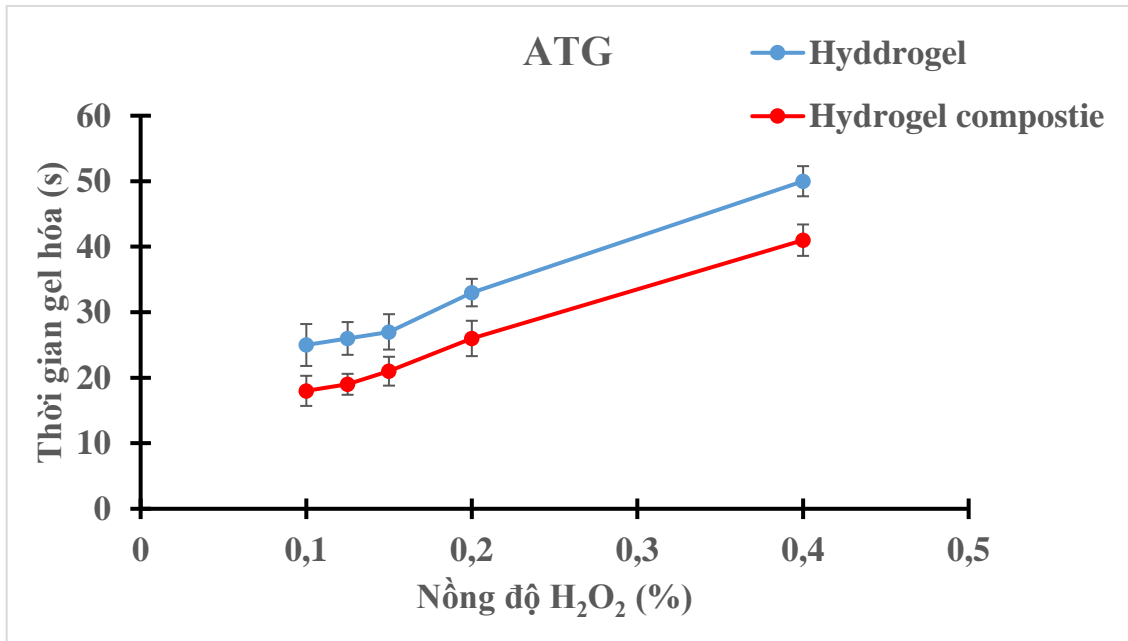


Hình 3.29. Hình ảnh tế bào MSC được ủ với chứng âm (DMEM/F12) và dịch chiết hydrogel composite CHPA-GTA (1-1) và CHPA-GTA (1-2) sau 48h. Màu xanh: Chất nhuộm Hoestch; màu xanh: chất nhuộm AO và màu đỏ: chất nhuộm PI.

3.3.2. Hệ hydrogel và hydrogel composite ATA-GTA/BCP

3.3.2.1. Thời gian gel hóa

Kết quả khảo sát thời gian gel hóa của hydrogel và hydrogel composite ATA ở các nồng độ 0,4%, 0,2%, 0,175%, 0,15%, 0,1%, 0,075%, 0,05% H_2O_2 với enzyme HRP cố định là 0,0125 mg/mL với độ lặp lại 3 lần.

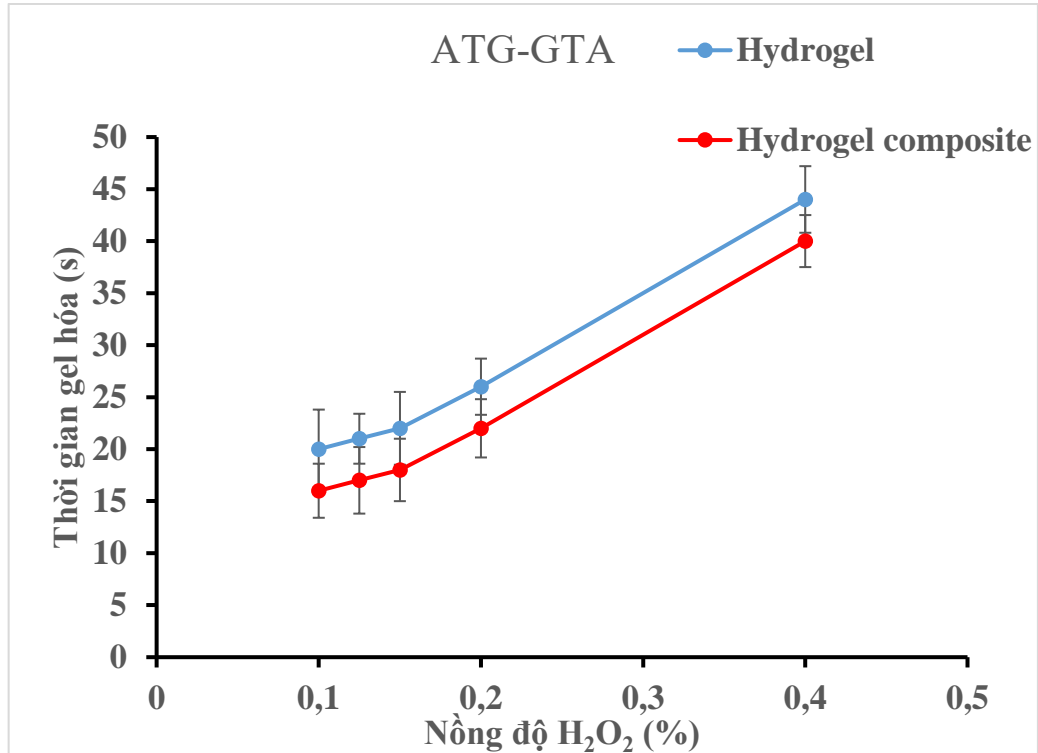


Hình 3.30. Thời gian tạo gel của hydrogel và hydrogel composite ATA với nồng độ HRP 0,0125mg/ml mg/mL

Qua kết quả đồ thị trên cho thấy thời gian gel hóa của hydrogel khá nhanh trong vài phút và thay đổi theo nồng độ H₂O₂.

Đối với nồng độ H₂O₂ 0,075% và 0,05%, hydrogel và hydrogel composite không diễn ra quá trình hình thành gel của vật liệu. Điều này có thể giải thích là do nồng độ H₂O₂ còn quá thấp không đủ lượng xúc tác, làm cho quá trình hình thành gel không xảy ra. Khi tăng nồng độ H₂O₂ từ 0,1%-0,4%, quá trình tạo gel hình thành và thời gian tăng theo nồng độ H₂O₂ từ 25 đến 50 giây. Trong trường hợp của hydrogel composite ATA, thời gian tạo gel diễn ra nhanh hơn so với hydrogel. Ví dụ khi tăng nồng độ H₂O₂ từ 0,1%-0,4% thì thời gian hình thành gel đối với hydrogel composite từ 18 đến 41 giây. Điều này có thể giải thích tương tự như kết quả thời gian tạo gel của hydrogel và hydrogel composite CHPA ở mục 3.3.4.

Kết quả khảo sát thời gian gel hóa của hydrogel và hydrogel composite ATA trên nền GTA với tỉ lệ 1:1 ở các nồng độ 0,4%, 0,2%, 0,175% ,0,15%, 0,1% H₂O₂ với enzyme HRP cố định là 0,0125 mg/mL với độ lặp lại 3 lần.



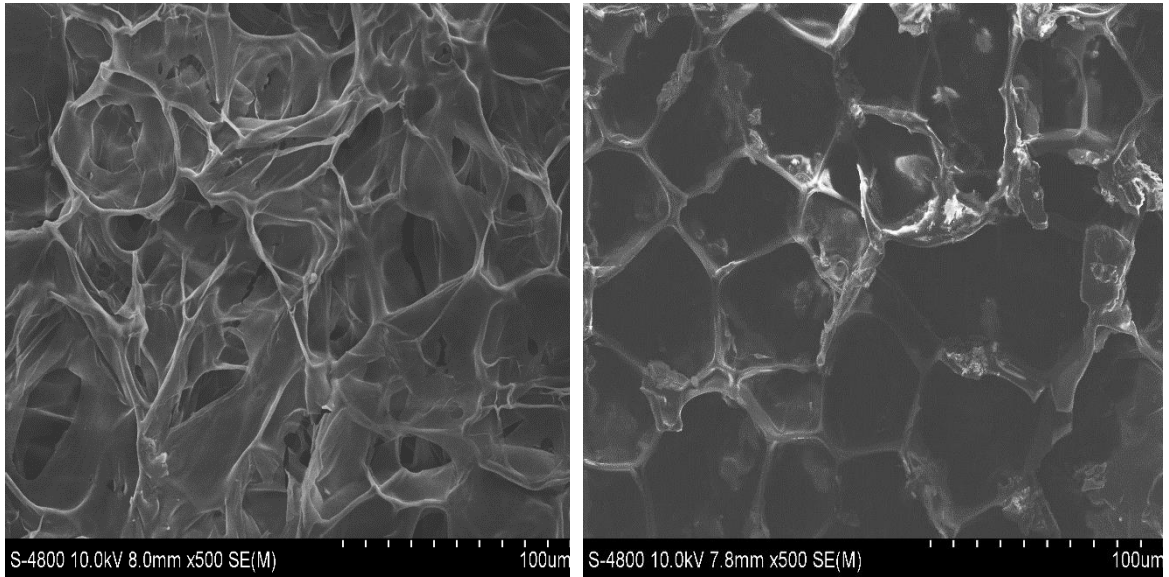
Hình 3.31. Thời gian tạo gel của hydrogel và hydrogel composite ATA trên nền GTA với nồng độ HRP 0,0125mg/ml

Đồ thị trên cho thấy thời gian gel hóa của hydrogel khá nhanh trong vài phút, và lượng H₂O₂, lượng HRP ảnh hưởng đến thời gian tạo gel.

Qua kết quả đồ thị cho thấy **Hình 3.31**, khi tăng nồng độ H₂O₂ từ 0,1-0,4% thời gian gel hóa của hydrogel ATA-GTA (1:1) tăng từ 20 đến 44 giây. Đối với hydrogel composite ATA-GTA /BCP (1:1) thời gian hình thành gel nhanh hơn từ 16 đến 40 giây, nhưng nhìn chung không có sự biến đổi đáng kể khi so với hydrogel.

3.3.2.2. Kết quả hình thái đối với vật liệu hydrogel ATA-GTA và hydrogel composite ATA-GTA/BCP

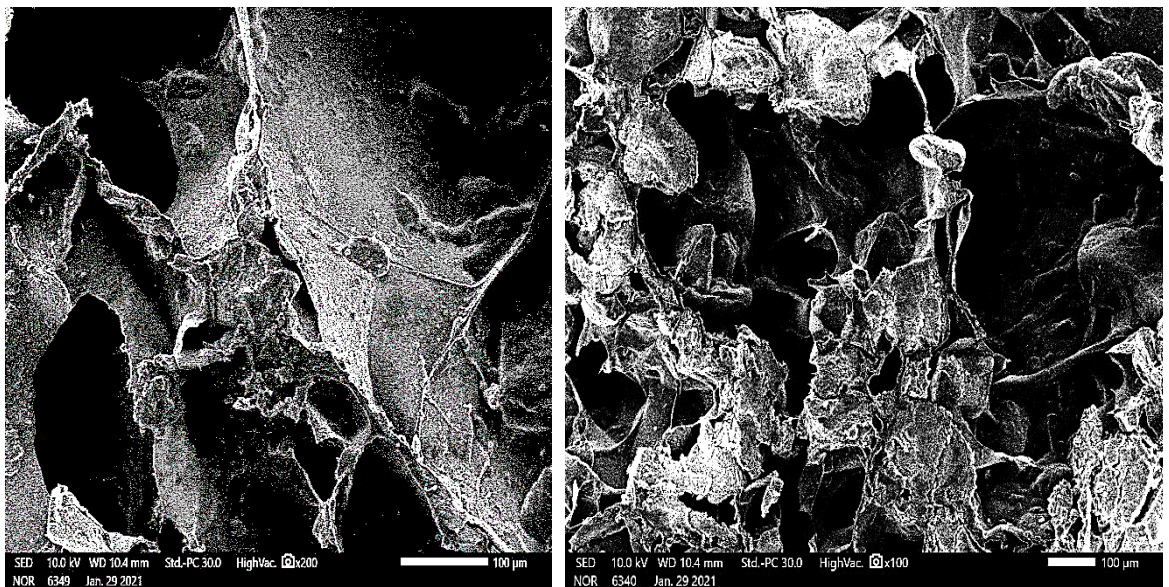
Sau khi tổng hợp và đông khô, dùng phương pháp SEM để quan sát hình thái học của hydrogel ATA-GTA (1:1), ATA-GTA (1:2) và hydrogel composite ATA-GTA/BCP (1:1), ATA-GTA/BCP (1:2) được thể hiện qua **Hình 3.32** và **Hình 3.33**



(a)

(b)

Hình 3.32. Hình SEM (a) hydrogel ATA-GTA (1:1) và (b) ATA-GTA (1:2)



(a)

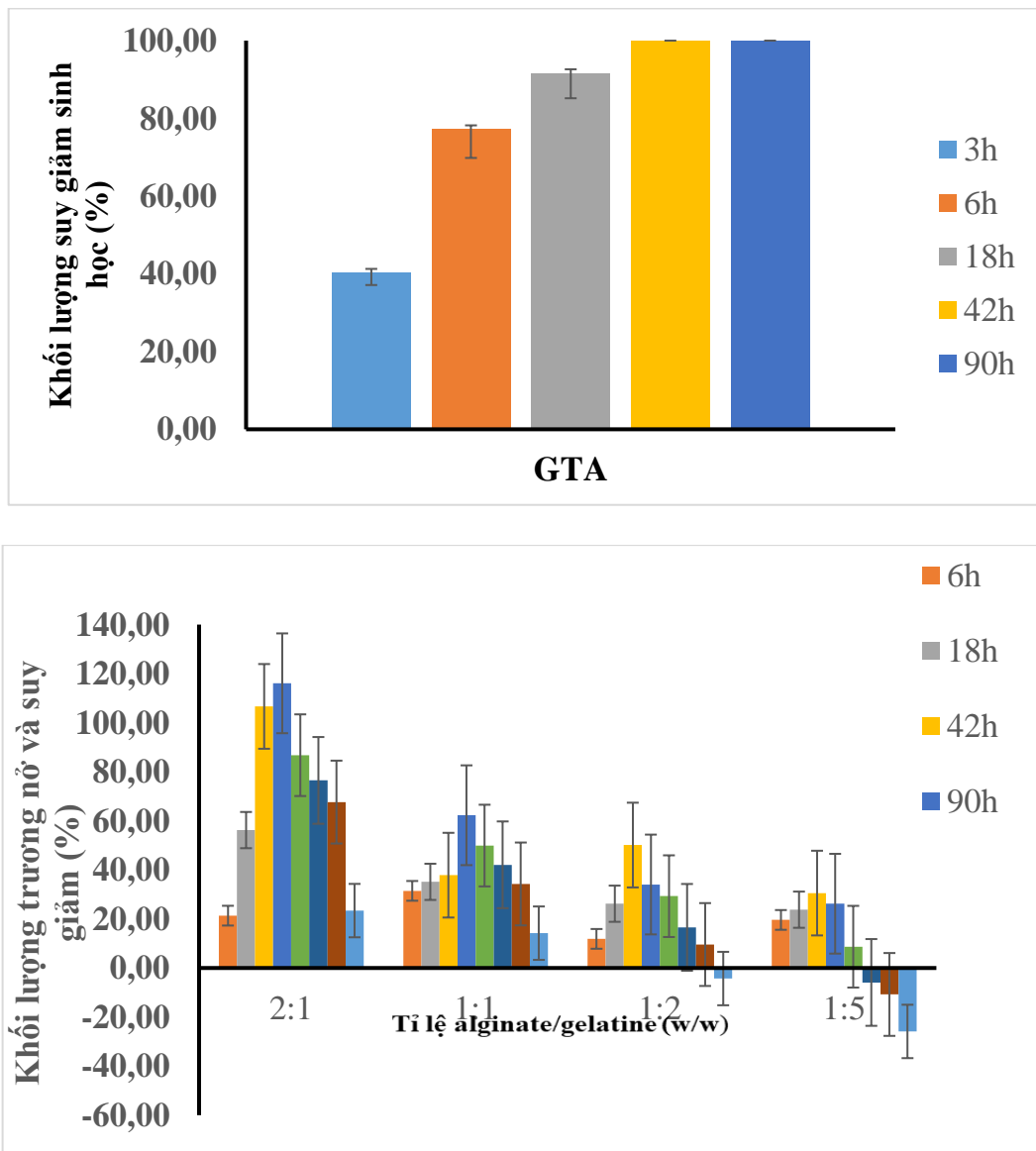
(b)

Hình 3.33. Hình SEM (a) hydrogel composite ATA-GTA (1:1) và (b) ATA-GTA (1:2)

Qua kết quả hình SEM với kích thước thang đo 100 μm (**Hình 3.32** và **Hình 3.33**) của hydrogel và hydrogel composite ATA-GTA (1:1) và ATA-GTA/BCP (1:2). 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 composite, hình SEM cho thấy xuất hiện các hạt nano BCP phủ đều trên khắp bề mặt cấu trúc xốp của vật liệu.

3.3.2.3. Khối lượng suy giảm của hydrogel ATA-GTA và hydrogel composite ATA-GTA/BCP

Biểu đồ 3.3 cho thấy kết quả khảo sát thời gian suy giảm sinh học của hydrogel composite CHPA-GTA/ATA so với hydrogel CHPA-GTA trong dung dịch PBS chứa enzyme collagenase trên nền GTA theo tỉ lệ được trình bày trong bảng 2.2.

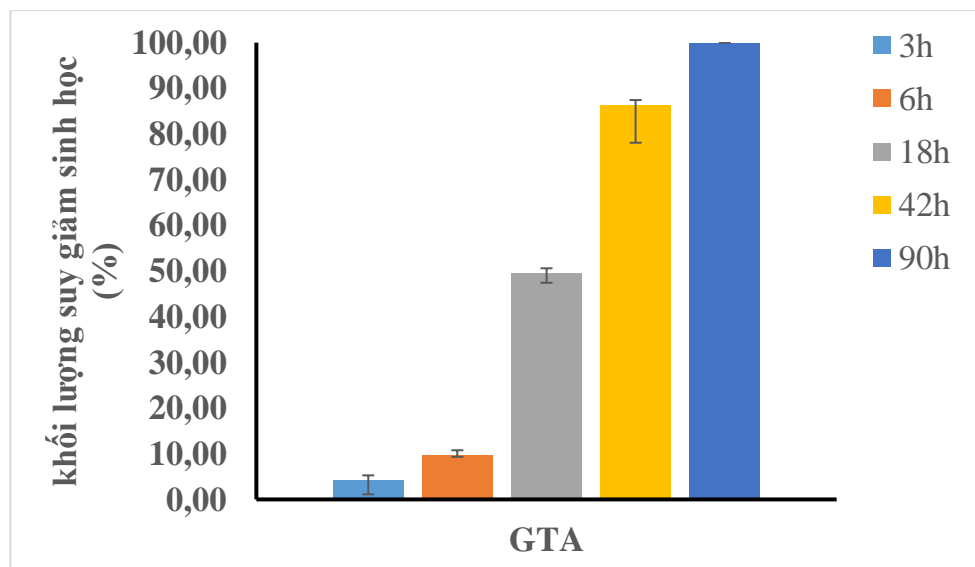


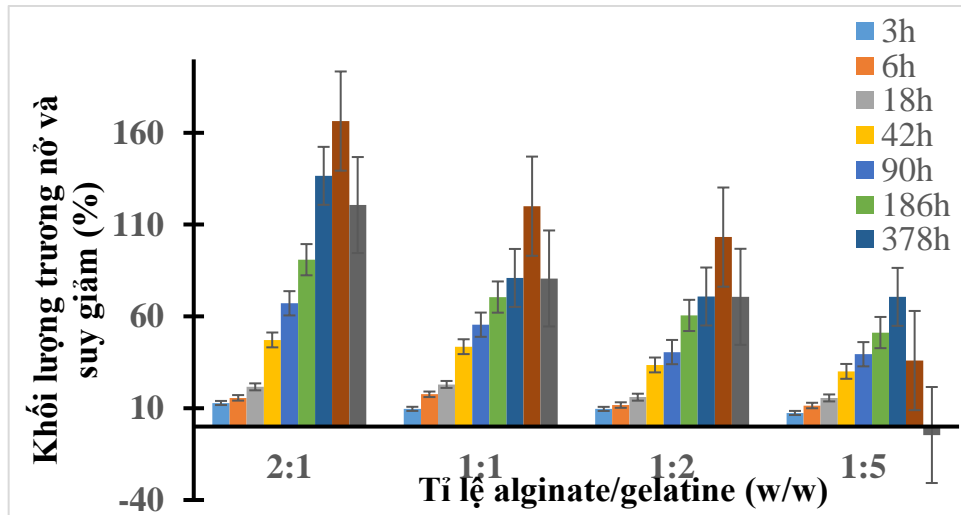
Biểu đồ 3.3. Biểu đồ% suy giảm khối lượng của hydrogel GTA và ATA trên nền GTA theo các tỉ lệ (A/G) trong dung dịch PBS

Kết quả 2 biểu đồ trên cho thấy hydrogel GTA suy giảm sinh học rất nhanh. Khi kết hợp với alginate, cho thấy kết quả vật liệu hydrogel và hydrogel

composite ATA-GTA với các tỉ lệ có sự tăng đáng kể về mặt khối lượng. Qua số liệu từ đồ thị, tỉ lệ 2:1 % khối lượng trương nở nhiều nhất là 116% trong 90 giờ. Tiếp đến là tỉ lệ 1:1 với trương nở đạt đỉnh về mặt tăng khối lượng là 62,7% trong 90 giờ, tỉ lệ 1:2 (50,1%) trong 42 giờ, tỉ lệ 1:5 (30,5%) trong 42 giờ. Sau đó vật liệu bắt đầu giảm cấp dần với thời gian khá lâu. Qua 1524 giờ cho thấy tỉ lệ 1:2 và 1:5 suy giảm khối lượng lần lượt là 4,3% và 25,9%. Còn đối với tỉ lệ 1:1 và 2:1 vẫn chưa có dấu hiệu suy giảm về mặt khối lượng. Khi kết hợp với alginate, hydrogel sẽ có khả năng trương nở rất cao khoảng 90-95% khối lượng. Ngoài ra, trong cấu trúc của alginate có nhiều nhóm -COOH giúp cho vật liệu có nhiều khoang trữ nước, làm cho vật liệu trương nở và giữ nước đến một giới hạn nhất định. Điều này giải thích lý do vật liệu lại tăng khối lượng đáng kể so với thể tích ban đầu. Kết quả là việc kết hợp với ATA sẽ làm vật liệu tăng lên về mặt khối lượng do trương nở và làm cho quá trình suy giảm diễn ra chậm hơn rất nhiều.

Kết quả khảo sát khối lượng suy giảm so sánh GTA so với hydrogel composite của ATA trên nền GTA theo tỉ lệ **Bảng 2.2** trong dung dịch PBS có chứa enzyme collagenase được trình bày qua các biểu đồ dưới đây





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

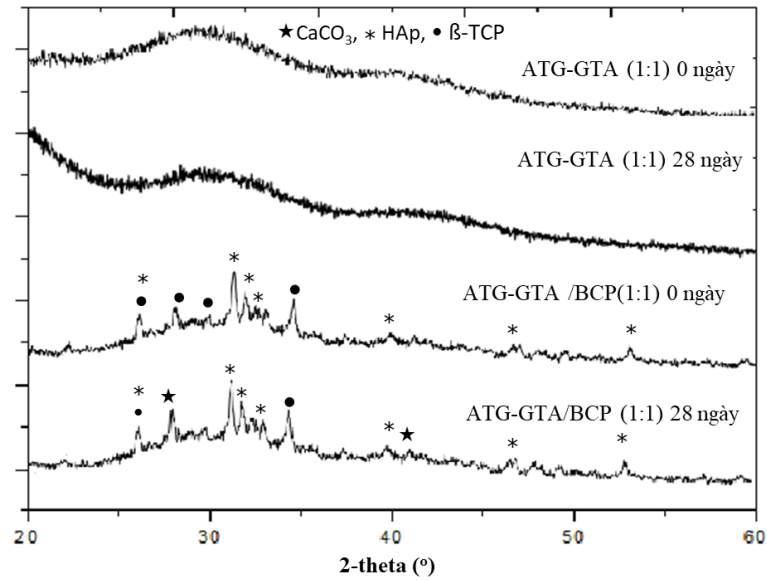
Kết quả so sánh giữa 2 biểu đồ hydrogel và hydrogel composite cho thấy, khi cho thêm các hạt BCP vào sự suy giảm khối lượng diễn ra chậm hơn so với hydrogel. Đối với GTA cho kết quả tương tự là giảm cấp hoàn toàn sau 92 giờ. Còn đối với hydrogel composite trên nền GTA, sự trương nở đạt đỉnh ở 762 giờ và vật liệu bắt sự suy giảm diễn ra chậm rất nhiều so với hydrogel. Trong 1524 giờ tiếp theo hầu như hydrogel composite ATA trên nền GTA không suy giảm về mặt khối lượng so với ban đầu. Chỉ có ATA-GTA với tỉ lệ 1:5 suy giảm 4,6% khối lượng trong 1524 giờ. Đối với các hydrogel composite, trong cấu trúc gelatin có các nhóm chức OH, NH₂, COOH và nhóm chức COOH của alginate. Những nhóm chức này sẽ liên kết hydrogen với nhóm -OH của HAP trong BCP. Ngoài ra, còn có liên kết tạo phức của nhóm NH₂ của gelatin và chitosan với ion Ca²⁺ của BCP. Nhờ các liên kết giữa các hạt nano BCP với gelatin và chitosan, mật độ liên kết của mạng lưới sẽ tăng lên, làm cho hydrogel composite ATA-GTA/BCP bền vững hơn so với hydrogel ATA-GTA. Do đó, khối lượng suy giảm của hydrogel composite ATA-GTA/BCP trong dung dịch PBS sẽ chậm hơn so với hydrogel ATA-GTA [23-26].

3.3.2.4. Kết quả đánh giá khả năng tạo khoáng của hydrogel ATA-GTA và

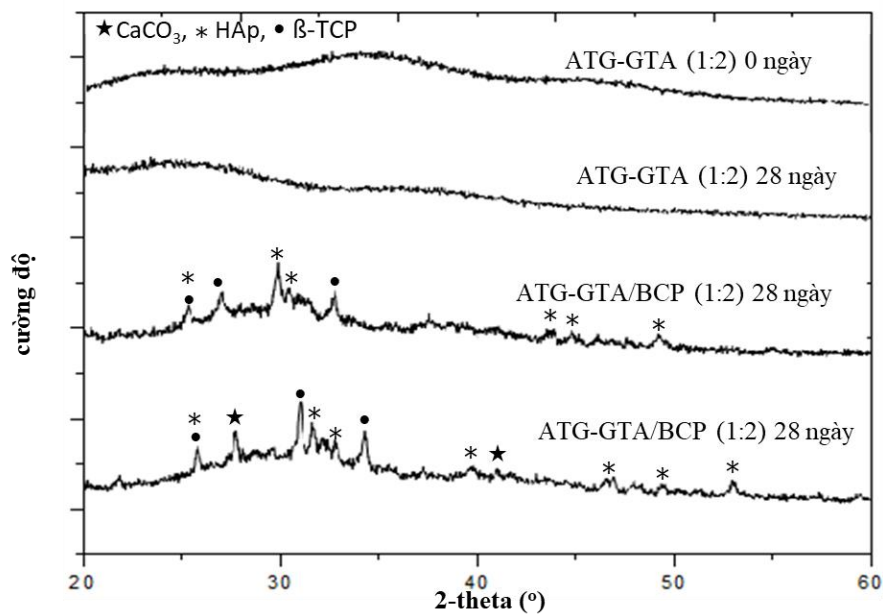
hydrogel composite ATA-GTA/BCP

Giản đồ nhiễu xạ XRD

Khi sử dụng phương pháp nhiễu xạ XRD, cấu trúc của hydrogel ATA-GTA (1:1), ATA-GTA (1:2) và hydrogel composite ATA-GTA/BCP (1:1), ATA-BCP/BCP (1:2) trước và sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày đã được xác định (**Hình 3.34** và **Hình 3.35**). Sự hình thành khoáng apatit của hydrogel composite ATA-GTA/BCP (1:1) và ATA-GTA/BCP (1:2) sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày đã được xác định. Kết quả cho thấy vật liệu ATA-GTA/BCP (1:1) và ATA-GTA/BCP (1:2) trước khi ngâm dung dịch giả sinh học SBF có các tín hiệu đặc trưng của tinh thể β -TCP: $26,40^\circ$, $28,37^\circ$, $29,80^\circ$, $34,25^\circ$ và HAp: $25,50^\circ$, $31,78^\circ$, $32,66^\circ$, $33,84^\circ$, $39,72^\circ$, $46,47^\circ$, $49,54^\circ$, $53,48^\circ$. Sau 28 ngày khi ngâm vật liệu hydrogel composite composite ATA-GTA/BCP (1:1) và ATA-GTA/BCP (1:2) trong dung dịch giả sinh học SBF cho thấy xuất hiện thêm các peak đặc trưng của CaCO_3 tại vị trí 2-theta ($^\circ$) $26,74^\circ$, $27,72^\circ$. Điều này được khẳng định sự hình thành khoáng apatit của hydrogel composite ATA-GTA/BCP (1:1), ATA-GTA/BCP (1:2) sau 28 ngày khi ngâm trong dung dịch giả sinh học SBF. Có thể thấy, hydrogel ATA-GTA (1:1), GTA-GTA (1:2) không được cung cấp các ion Ca^{2+} và PO_4^{3-} từ BCP, từ đó làm chậm quá trình hình thành và các peak đặc trưng của CaCO_3 không xuất hiện trên giản đồ XRD. Mặc khác, qua phân tích khả năng tạo khoáng bằng phương pháp phân tích XRD, cho thấy hydrogel composite ATA-GTA/BCP có tiềm năng trong quá trình hình thành và thúc đẩy quá trình phát triển tạo khoáng aptite carbonate. [20, 53, 105, 126].



Hình 3.34. Kết quả phân tích XRD của hydrogel và hydrogel composite (ATA- GTA , ATA- GTA/BCP với tỉ lệ 1:1) ban đầu và sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày

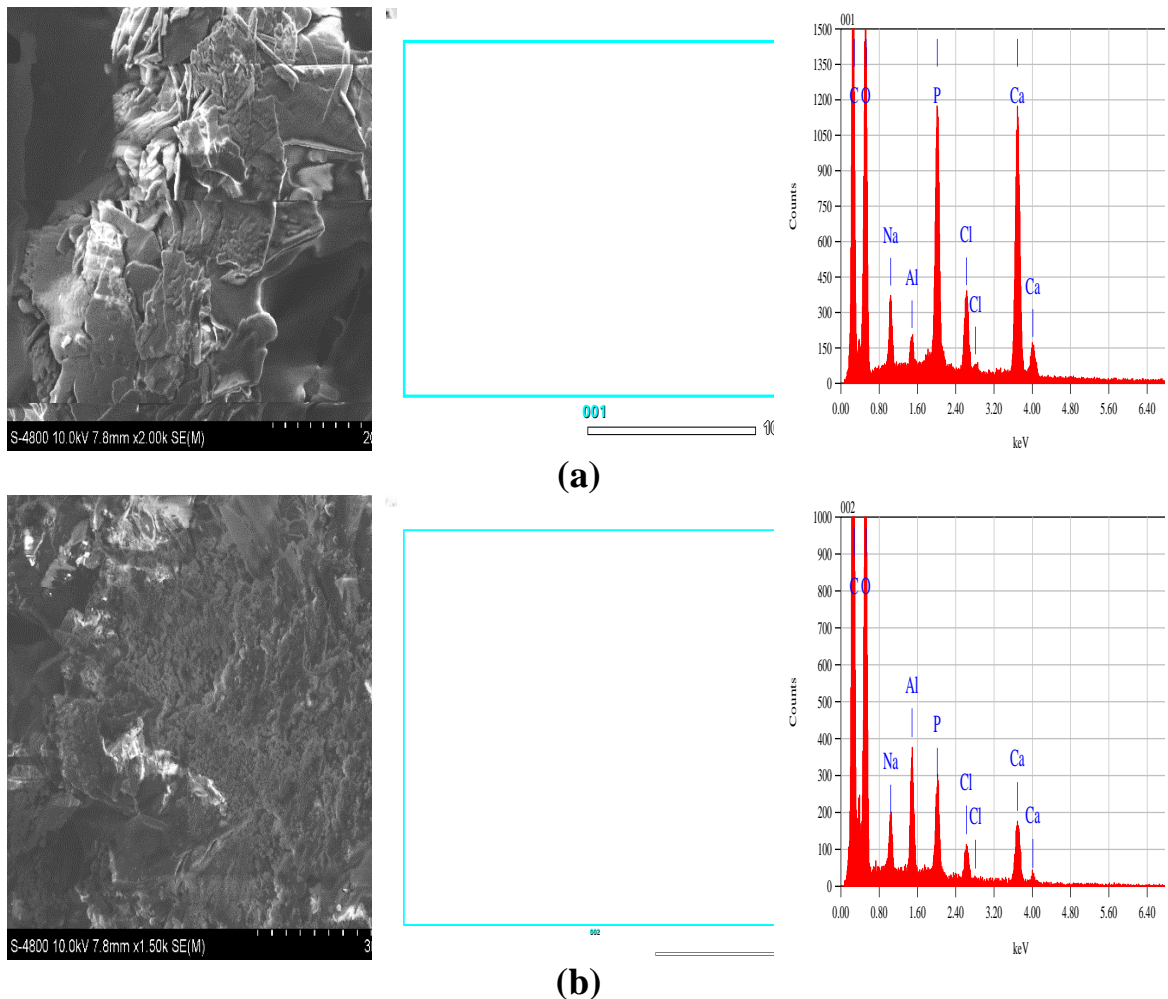


Hình 3.35. Kết quả phân tích XRD của hydrogel và hydrogel composite (ATA- GTA , ATA- GTA/BCP với tỉ lệ 1:2) trước và sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày

Sự hình thành khoáng appatite carbonate

Khảo sát sự hình thành khoáng appatite carbonate bằng cách tiến hành ngâm hydrogel hydrogel ATA-GTA (1:1), ATA-GTA (1:2) và hydrogel

composite ATA-GTA/BCP (1:1), ATA-GTA/BCP (1:2) trong dung dịch SBF sau 28 ngày và thu được kết quả thể hiện **Hình 3.36**



Hình 3.36. Kết quả hình ảnh phân tích bằng phương pháp SEM và phân tích nguyên tố EDS của hydrogel ATA-GTA (1:1) (a) và ATA-GTA (1:2) (b) sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày

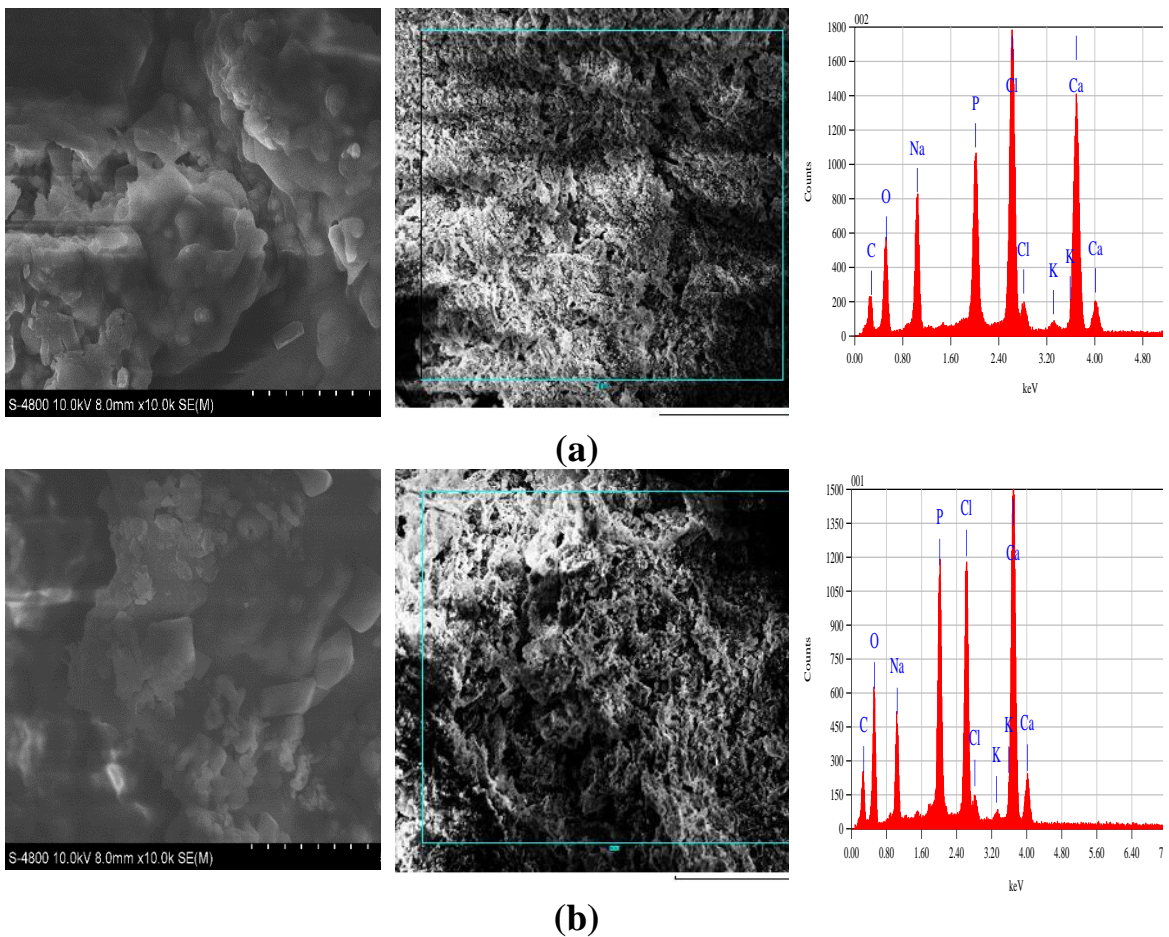
Kết quả hình SEM (**Hình 3.36**) với thang phóng đại 20 μm hydrogel ATA-GTA (1:1), ATA-GTA (1:2) cho thấy xuất hiện một ít các tinh thể tạo khoáng. Đối với thang phóng đại 200 μm cho thấy trên bề mặt của vật liệu hydrogel ATA -GTA (1:1), ATA -GTA (1:2) vật liệu vẫn giữ được cấu trúc xốp.

Qua kết quả phân tích nguyên tố EDS cho thấy các khoáng hình thành trải đều trên bề mặt, bao gồm các nguyên tố Ca, C, O, P và nguyên tố Si xuất hiện do trong phương pháp này sử dụng lớp silic bao phủ lên bề mặt mẫu nhằm phân tích EDS sau thời gian ngâm trong dung dịch giả sinh học SBF 28 ngày. Phần trăm các nguyên tố tham gia tạo khoáng được biểu thị ở **Bảng 3.6**

Bảng 3.6. Phần trăm khối lượng (%) các nguyên tố sau thời gian ngâm trong SBF (28 ngày)

Mẫu hydrogel	Phần trăm khối lượng (%)			
	P	Ca	C	O
ATA -GTA (1:1) 28 ngày	6,54	9,30	32,31	46,23
ATA -GTA (1:2) 28 ngày	2,53	2,10	40,48	49,05

Hydrogel composite ATA-GTA



Hình 3.37. Kết quả hình ảnh phân tích bằng phương pháp SEM và phân tích nguyên tố EDS của hydrogel composite ATA-GTA (1:1) (a) và ATA-GTA (1:2) sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF trong 28 ngày

Kết quả hình SEM (Hình 3.37) với thang phóng đại 5 μm hydrogel composite ATA-GTA (1:1), ATA-GTA (1:2) xuất hiện nhiều các hạt tinh thể tạo khoáng. Đối với thang phóng đại 30 μm cho thấy trên bề mặt của vật liệu

hydrogel composite ATA-GTA (1:1), ATA-GTA (1:2), cấu trúc xốp của vật liệu không thay đổi so với ban đầu.

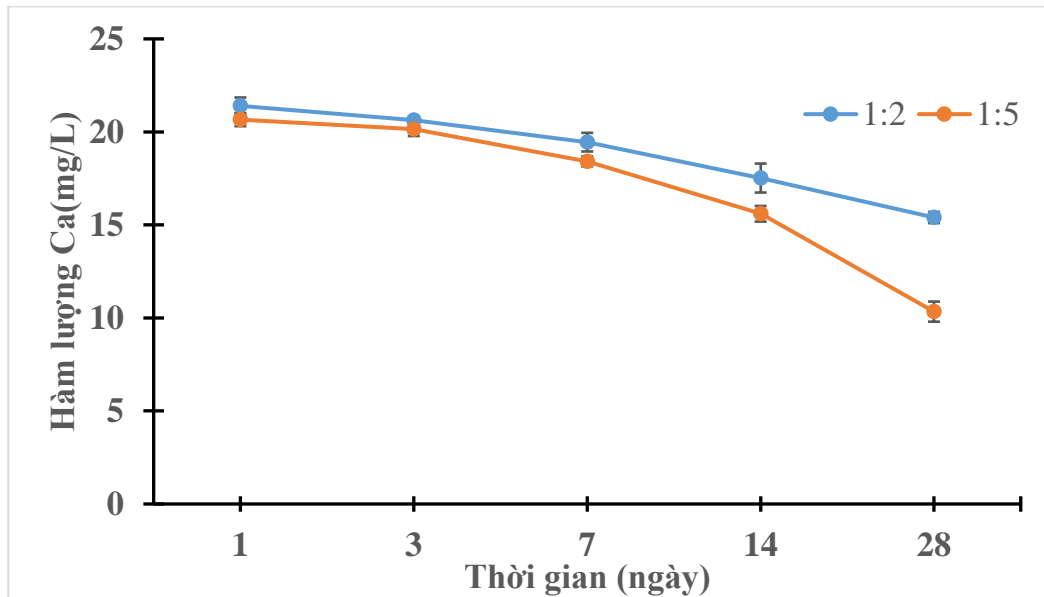
Phân trăm các nguyên tố tham gia tạo khoáng sau thời gian ngâm trong SBF (28 ngày) bao gồm các nguyên tố Ca, C, O, P, được thể hiện ở **Bảng 3.7**.

Bảng 3.7. Phần trăm khối lượng (%) các nguyên tố sau thời gian ngâm trong SBF (28 ngày)

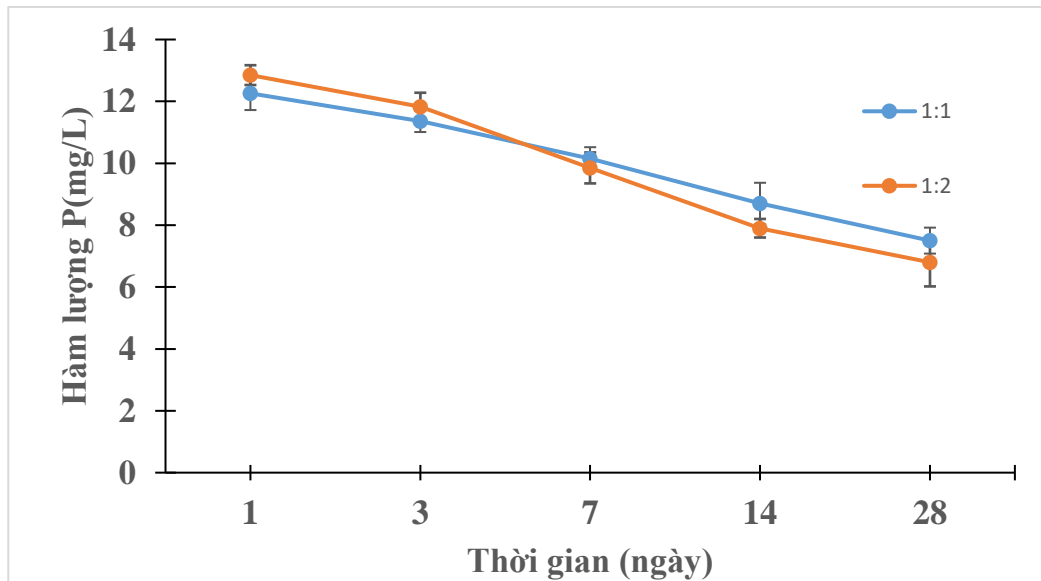
Mẫu hydrogel composite	Phần trăm khối lượng (%)				
	Na	P	Ca	C	O
ATA -GTA/ BCP (1:1) 28 ngày	10.15	8.97	17,81	15.99	30.51
ATA -GTA/ BCP (1:2) 28 ngày	6,32	10,29	21,07	15.99	34,74

Từ các kết quả phân tích EDS cho thấy hydrogel composite ATA-GTA/ BCP (1:1) và ATA-GTA/ BCP (1:2) cho kết quả tạo khoáng cao hơn nhiều so với hydrogel ATA-GTA (1:1) và ATA-GTA (1:2). Ví dụ đối với %Ca có trong hydrogel composite với 2 tỉ lệ lần lượt là 17,81% và 21,07%, trong khi đó đối với hydrogel %Ca thấp hơn với tỉ lệ lần lượt 9,30% và 2,10%.

Khảo sát hàm lượng Ca, P trong dung dịch SBF



Hình 3.38. Hàm lượng Ca trong dung dịch SBF ngâm hydrogel composite trong 28 ngày với tỉ lệ 1:1 và 1:2



Hình 3.39. Hàm lượng P trong dung dịch SBF ngâm hydrogel composite trong 28 ngày với tỉ lệ 1:1 và 1:2

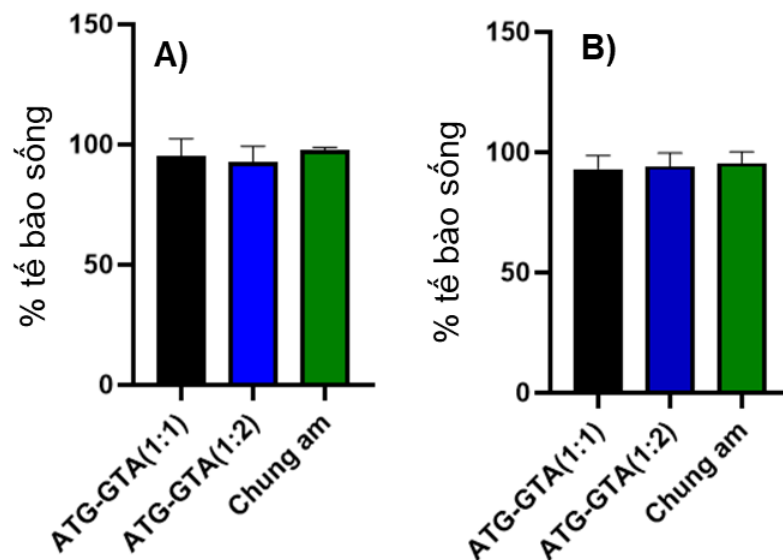
Khảo sát hàm lượng Ca, P trong dung dịch SBF sau thời gian ngâm hydrogel composite cho thấy sau 1 ngày lượng ion Ca, P tăng lên, sau đó lượng Ca, P giảm đều xuống. Các mẫu hydrogel composite cho kết quả thống kê không khác biệt nhiều giữa 2 tỉ lệ, như vậy vật liệu có ảnh hưởng đến lượng Ca, P khi ngâm mẫu hydrogel composite trong dung dịch SBF. Sự tăng lên về hàm

lượng Ca, P sau 1 ngày ngâm mẫu được giải thích là một phần BCP phân hủy giải phóng ion Ca^{2+} và ion phosphate. Sau 3 đến 28 ngày ngâm hydrogel composite trong dung dịch SBF bắt đầu giảm lượng Ca và phosphate.

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

3.3.2.5. Kết quả đánh giá độc tính tế bào

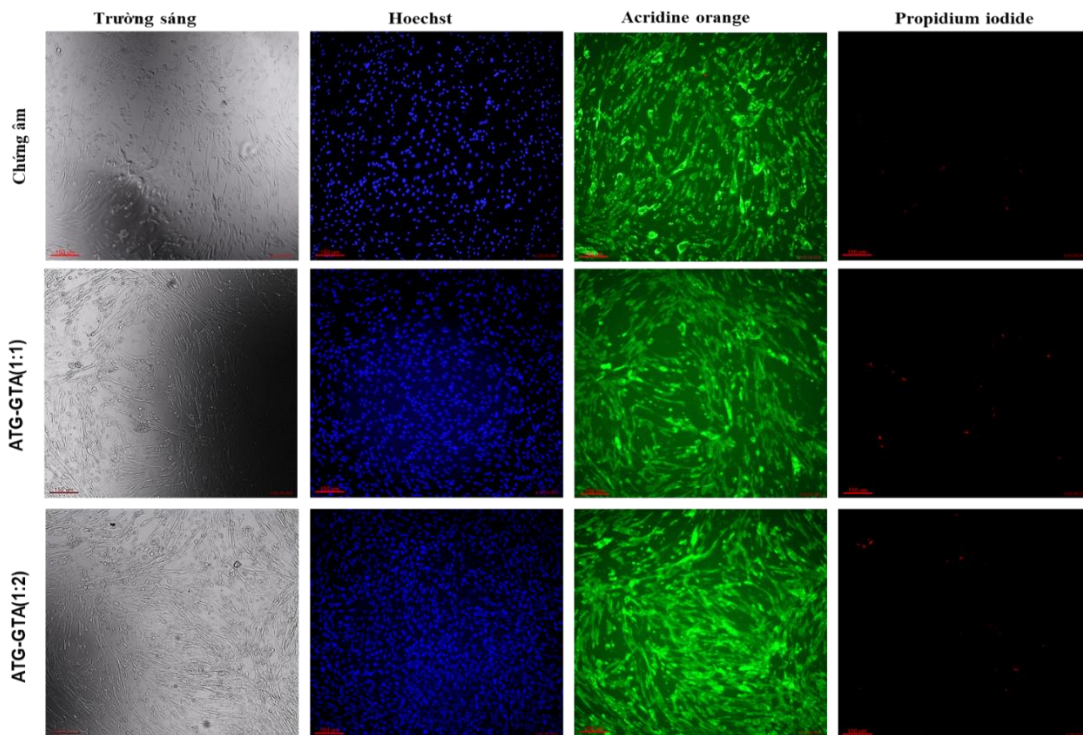
Kết quả khảo sát bằng MTT được trình bày trong **Hình 3.40**. Đối với mẫu chứng âm (DMEM/F127), $97.8 \pm 5.47\%$ tế bào sống sau 24 giờ và $99.4 \pm 8.4\%$ tế bào sống sau 48 giờ. Như vậy có thể thấy, chứng âm không ảnh hưởng đến tỷ lệ sống/chết của MSC trong thử nghiệm. Dịch chiết 2 mẫu hydrogel composite được sử dụng ở nồng độ 0,5 mg/mL. Kết quả cho thấy, không có sự khác biệt khi so sánh với chứng âm ở các thời điểm thử nghiệm (ANOVA 2 way, $p=0,456$ (so mẫu), $p=0,741$ (so thời gian)). Thêm vào đó, phần trăm tế bào MSC sống sót sau 24 giờ ủ và sau 48 giờ ủ đều trên 80%. Theo ISO 10993-5:2009, tỷ lệ tế bào sống trên 80% được coi là an toàn.



Hình 3.40. Tỷ lệ tế bào MSC sống sau khi ủ với chứng âm (DMEM/F12) và dịch chiết hydrogel composite ATG-GTA (1-1) và ATG-GTA (1-2) sau 24h (A) và sau 48h (B)

Để khẳng định kết quả MTT, phương pháp chụp ảnh tế bào sử dụng chất nhuộm huỳnh quang được sử dụng. Trong nghiên cứu này, tế bào MSC sau 48 giờ xử lý được ủ với 3 chất nhuộm: Hoestch (nhuộm nhân, phát quang màu xanh biển); AO (nhuộm tế bào chất tế bào sống, chỉ ra được tính nguyên vẹn của màng tế bào, phát quang màu xanh); PI (chỉ chỉ xâm nhập vào các tế bào có màng bị tổn thương, phát quang màu đỏ). Kết quả được trình bày trong **Hình 3.41**. Theo kết quả, nhân tế bào bình thường ở các mẫu xử lý với mẫu và chứng âm, mật độ tế bào tương đương nhau. Thành phần nhuộm phẩm màu AO cho thấy tế bào MSC nguyên vẹn và không có huỳnh quang trong tế bào chết. Thêm vào đó, dựa trên kết quả nhuộm AO có thể thấy mật độ tế bào ở các mẫu hydrogel composite phát triển tương đương với mẫu chứng âm.

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.

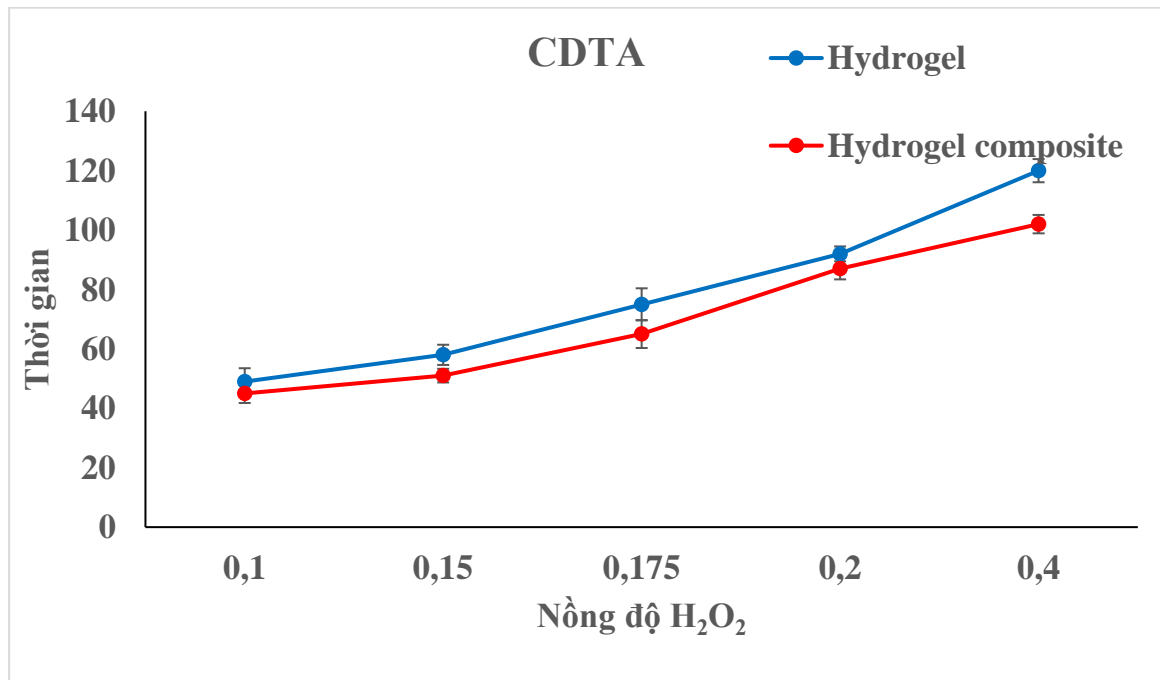


Hình 3.41. Hình ảnh tế bào MSC được ủ với chứng âm (DMEM/F12) và dịch chiết hydrogel composite ATG-GTA (1-1) và ATG-GTA (1-2) sau 48h. Màu xanh: Chất nhuộm Hoestch; màu xanh: chất nhuộm AO và màu đỏ: chất nhuộm PI.

3.3.3. Hệ hydrogel và hydrogel composite CDTA-GTA/BCP

3.3.3.1. Thời gian gel hóa

Kết quả khảo sát thời gian gel hóa của hydrogel và hydrogel composite CDTA ở các nồng độ 0,4%, 0,2%, 0,175% ,0,15%, 0,1%, 0,075% H_2O_2 với enzyme HRP cố định là 0,125 mg/mL với độ lặp lại 3 lần.

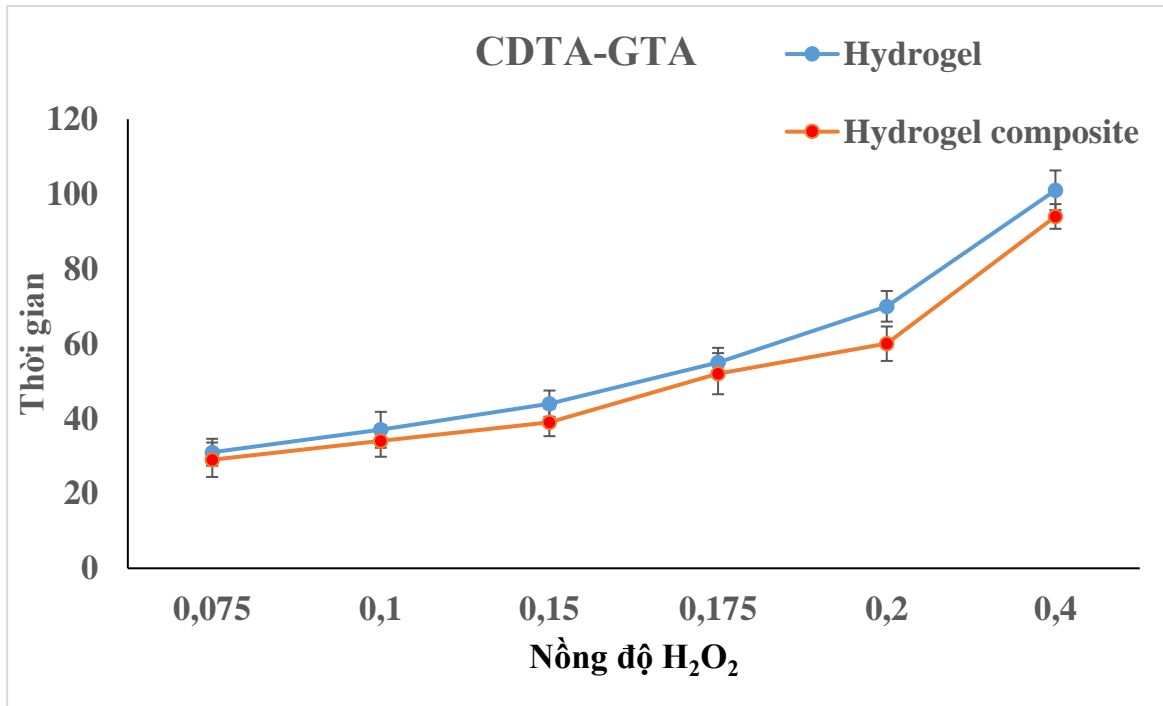


Hình 3.42. Thời gian hình thành gel hoá của hydrogel và hydrogel composite CDTA với nồng độ HRP 0,125 mg/mL

Qua kết quả đồ thị **Hình 3.42** cho thấy thời gian gel hóa của hydrogel khá nhanh trong vài phút và thay đổi theo nồng độ H_2O_2 .

Khi tăng nồng độ H_2O_2 từ 0,1%-0,4%, quá trình tạo gel hình thành và thời gian tăng theo nồng độ H_2O_2 từ 46 đến 120 giây. Trong trường hợp của hydrogel composite CDTA, thời gian tạo gel diễn ra nhanh hơn so với hydrogel. Ví dụ khi tăng nồng độ H_2O_2 từ 0,1%-0,4% thì thời gian hình thành gel đối với hydrogel composite từ 43 đến 102 giây.

Kết quả khảo sát thời gian gel hóa của hydrogel và hydrogel composite CDTA trên nền GTA với tỉ lệ 1:1 ở các nồng độ 0,4%, 0,2%, 0,175% ,0,15%, 0,1% H_2O_2 với enzyme HRP cố định là 0,125mg/ml với độ lặp lại 3 lần.



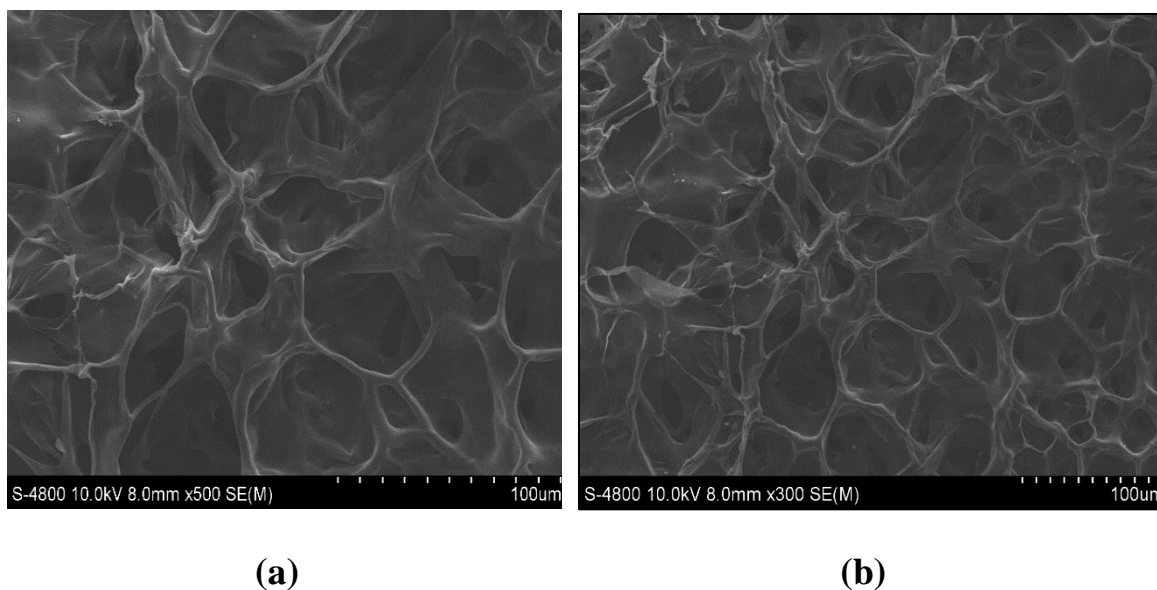
Hình 3.43. Thời gian hình thành gel hoá của hydrogel và hydrogel composite CDTA trên nền GTA với nồng độ HRP 0,0125mg/ml

Đồ thị trên cho thấy thời gian gel hóa của hydrogel khá nhanh trong vài phút, và lượng H₂O₂, lượng HRP ảnh hưởng đến thời gian tạo gel.

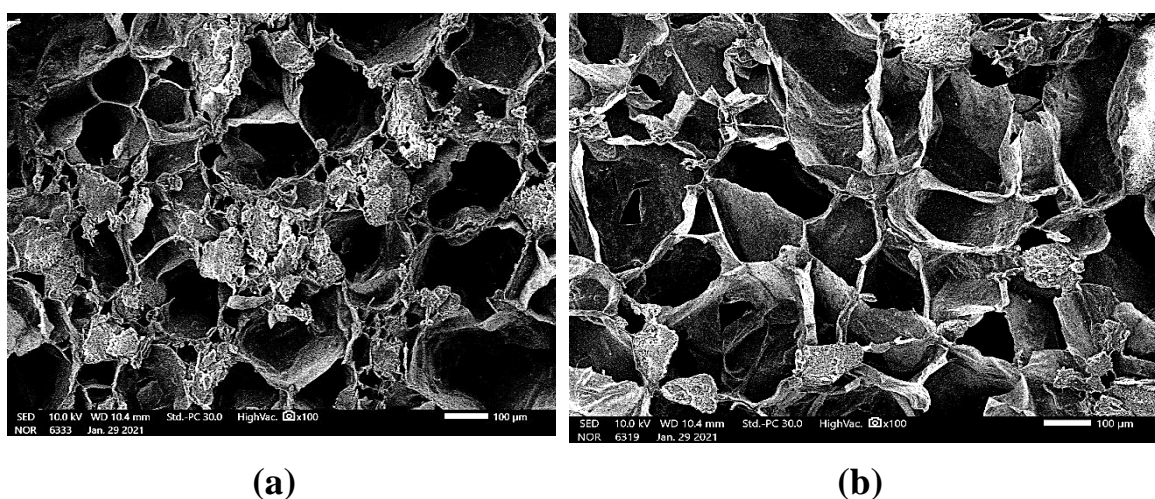
Qua kết quả đồ thị cho thấy **Hình 3.43**, khi tăng nồng độ H₂O₂ từ 0,1-0,4% thời gian gel hóa của hydrogel CDTA-GTA (1:1) tăng từ 31 đến 101 giây. Đối với hydrogel composite CDTA-GTA /BCP (1:1) thời gian hình thành gel nhanh hơn từ 29 đến 94 giây, nhưng nhìn chung không có sự biến đổi đáng kể khi so với hydrogel.

3.3.3.2. Kết quả hình thái đối với vật liệu hydrogel CDTA-GTA và hydrogel composite CDTA-GTA/BCP

Sau khi tổng hợp và đông khô, dùng phương pháp SEM để quan sát hình thái học của hydrogel CDTA-GTA (1:1), CDTA-GTA (2:1) VÀ hydrogel composite CDTA-GTA/BCP (1:1), CDTA-GTA/BCP (2:1) được thể hiện qua



Hình 3.44. Kết quả hình ảnh phân tích bằng phương pháp SEM (a) hydrogel CDTA-GTA (1:2) ngày và (b) CDTA-GTA (2:1)

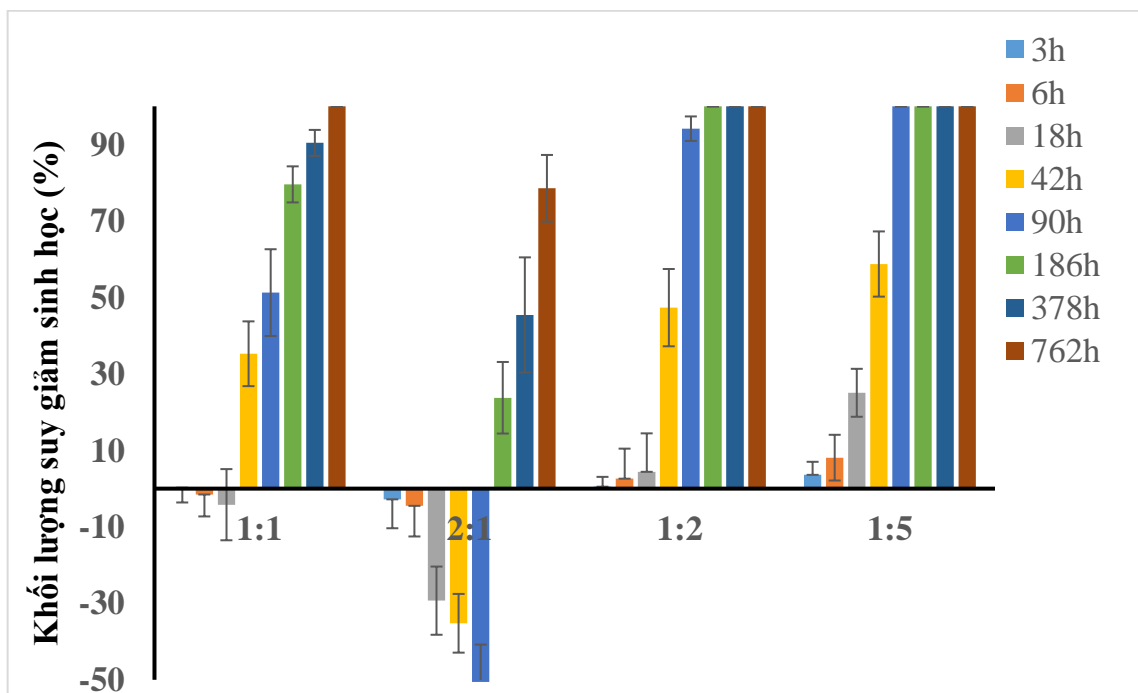
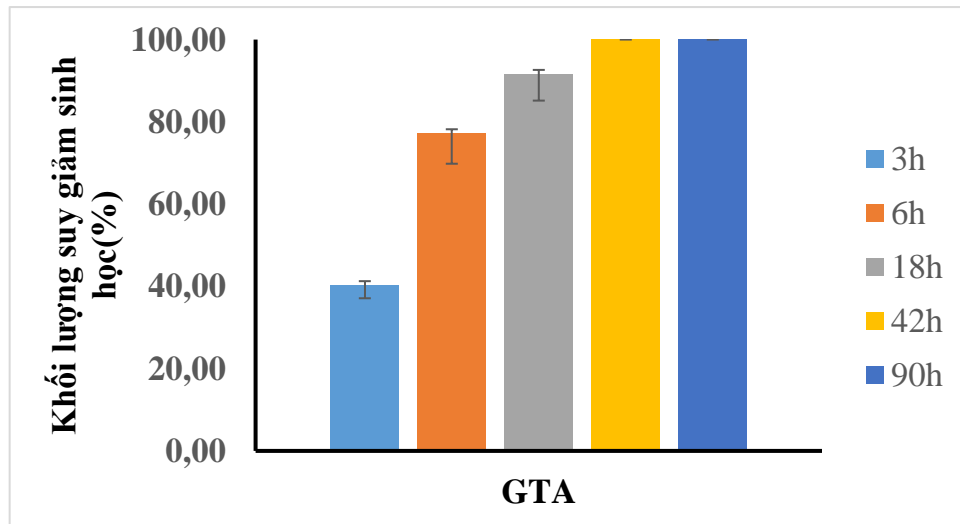


Hình 3.45. Kết quả hình ảnh phân tích bằng phương pháp SEM (a) hydrogel composite CDTA-GTA (1:2) ngày và (b) CDTA-GTA (2:1)

Qua kết quả hình SEM với kích thước thang đo 100 µm (**Hình 3.44** và **Hình 3.45**) của hydrogel và hydrogel composite CDTA-GTA (1:1) và CDTA-GTA/BCP (2:1). 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 composite, Hình SEM cho thấy xuất hiện các hạt nano BCP phủ đều trên khắp bề mặt cấu trúc xốp của vật liệu.

3.3.3.3. Thời gian suy giảm sinh học của hydrogel CDTA-GTA và hydrogel composite CDTA-GTA/BCP

Kết quả khảo sát khối lượng suy giảm so sánh GTA so với hydrogel của CDTA trên nền GTA theo tỉ lệ (**bảng 2.2**) trong dung dịch PBS có chứa enzyme collagenase được trình bày qua 2 biểu đồ dưới đây .

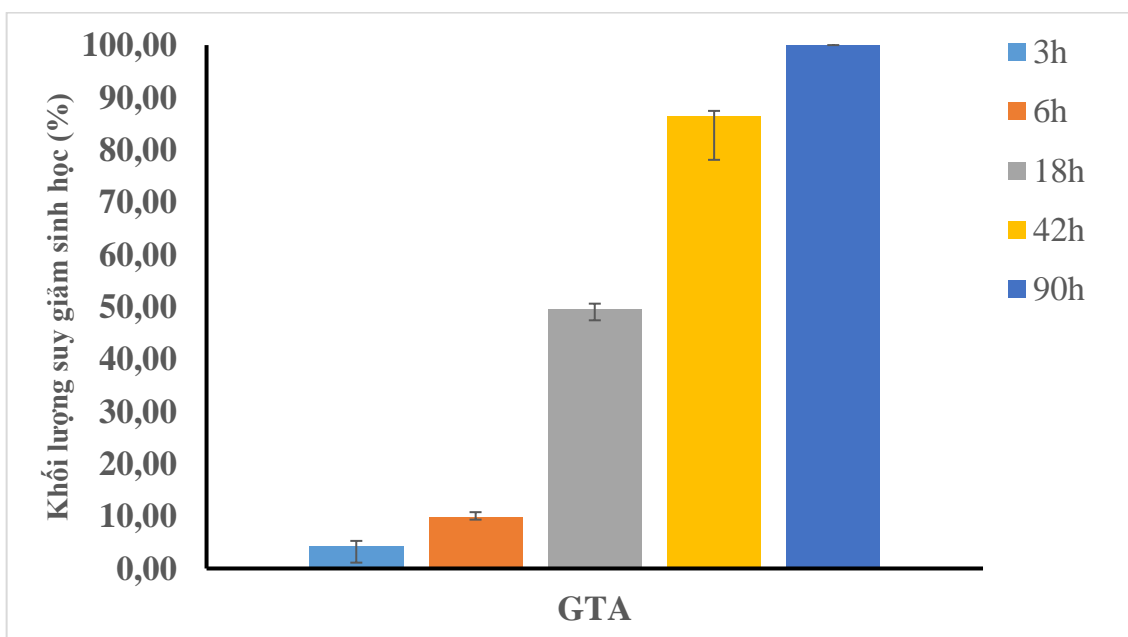


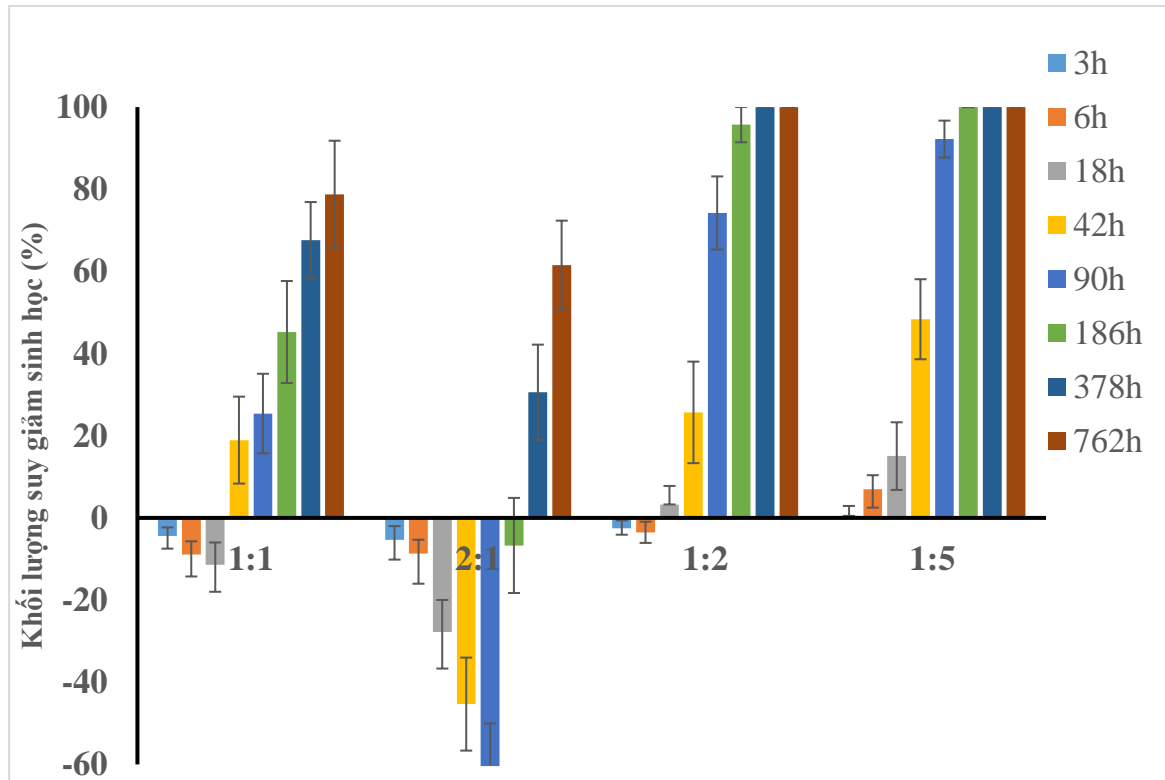
Biểu đồ 3.5. Biểu đồ % suy giảm khối lượng sinh học của hydrogel CDTA trên nền GTA theo các tỉ lệ (CD/G) trong dung dịch PBS có enzyme collagenase

Khi kết hợp với chondroitin, cho thấy kết quả vật liệu hydrogel và hydrogel composite CDTA-GTA ở tỉ lệ 2:1 có sự tăng đáng kể về mật độ

lượng. Qua số liệu từ đồ thị, tỉ lệ 2:1 tăng khối lượng nhiều nhất là 50,56% trong 90h. Sau đó vật liệu bắt đầu giảm cấp dần với thời gian khá lâu. Qua 762h, hầu như toàn bộ tỉ lệ đều phân hủy sinh học hoàn toàn ngoài tỉ lệ 2:1. Điều này được giải thích khi tăng hàm lượng chondroitin sulfate sẽ làm tăng thêm các nhóm COOH giúp cho vật liệu có nhiều khoang trữ nước hơn khi tăng hàm lượng chondroitine. Kết quả là việc kết hợp với CDTA sẽ làm vật liệu tăng lên về mặt khối lượng do trương nở và sau một khoảng thời gian vật liệu bắt đầu phân hủy sinh học mạnh.

Kết quả khảo sát khối lượng suy giảm so sánh GTA so với hydrogel composite của CDTA trên nền GTA theo tỉ lệ **Bảng 2.2** trong dung dịch PBS có chứa enzyme collagenase được trình bày qua các biểu đồ dưới đây





Biểu đồ 3.6. Biểu đồ% giảm cấp khối lượng của hydrogel composite GTA và CDTA trên nền GTA theo các tỉ lệ (A/G) trong dung dịch PBS

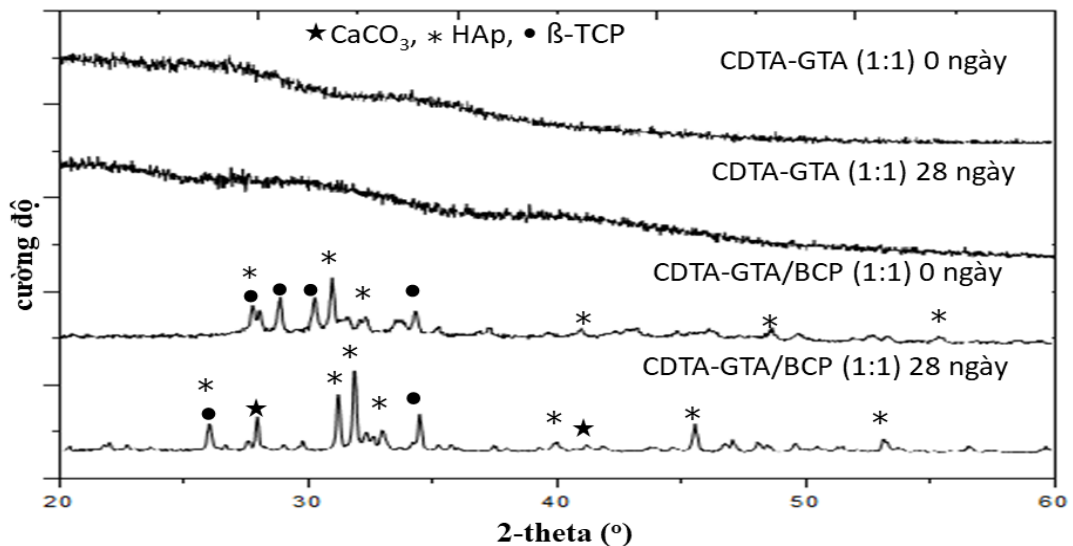
Kết quả so sánh giữa 2 biểu đồ hydrogel và hydrogel composite cho thấy, khi cho thêm các hạt BCP vào sự suy giảm khối lượng diễn ra chậm hơn so với hydrogel. Đối với GTA cho kết quả tương tự là giảm cấp hoàn toàn sau 92 giờ. Còn đối với hydrogel composite trên nền GTA sự suy giảm diễn ra chậm rất nhiều so với hydrogel. Đối với tỉ lệ 2:1 độ trương nở đạt đỉnh ở 90h và vật liệu bắt đầu giảm cấp dần. Trong 762 giờ tiếp theo hydrogel composite với tỉ lệ 1:1 và 2:1 phân hủy sinh học tương ứng 78,77% và 61,56% so với ban đầu.

3.3.3.4. Kết quả đánh giá khả năng tạo khoáng của hydrogel CDTA-GTA và hydrogel composite CDTA-GTA/BCP

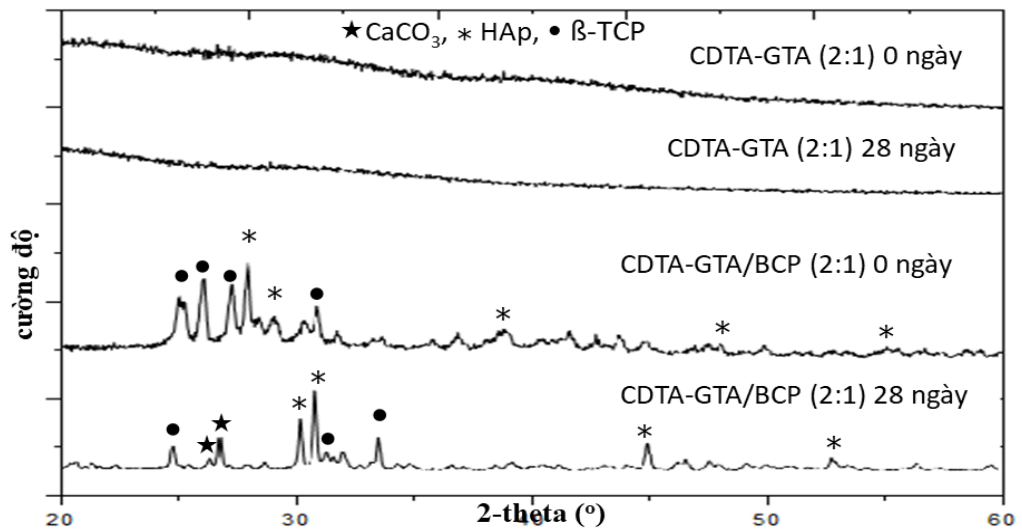
Giản đồ nhiễu xạ XRD

Phân tích cấu trúc của hydrogel CDTA-GTA (1:1), CDTA-GTA (2:1) và hydrogel composite CDTA-GTA/BCP (1:1), CDTA-BCP/BCP (2:1) ban đầu và sau thời gian ngâm trong dung dịch giả sinh học SBF 28 ngày được xác định bằng phương pháp nhiễu xạ XRD (Hình 3.46 và Hình 3.47). Qua kết quả cho

thấy, các mầm tinh thể đã được xác định có trong vật liệu hydrogel composite CDTA-GTA/BCP (1:1) và CDTA-BCP/BCP (2:1) sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày. Vật liệu hydrogel composite composite CDTA-GTA/BCP (1:1) và CDTA-BCP/BCP (2:1) trước khi ngâm dung dịch giả sinh học SBF có các tín hiệu đặc trưng của tinh thể β -TCP: $27,14^\circ$, $28,74^\circ$, $29,45^\circ$, $30,23^\circ$, $34,76^\circ$ và HAp: $28,35^\circ$, $29,26^\circ$, $31,78^\circ$, $41,72^\circ$, $47,62^\circ$, $57,15^\circ$. Sau 28 ngày khi ngâm hydrogel composite composite CDTA-GTA/BCP (1:1) và CDTA-BCP/BCP (2:1) trong dung dịch giả sinh học SBF, kết quả cho thấy có thêm các tín hiệu đặc trưng của CaCO_3 tại vị trí 2-theta ($^\circ$) $26,95^\circ$, $28,52^\circ$. Điều này khẳng định sự tạo thành khoáng apatit của hydrogel composite CDTA-GTA/BCP (1:1), CDTA-BCP/BCP (2:1) sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF. Qua phân tích khả năng tạo khoáng bằng phương pháp phân tích XRD, cho thấy hydrogel composite GTA-CHPA/BCP có tiềm năng trong quá trình hình thành và thúc đẩy quá trình phát triển tạo khoáng aptite carbonate [20, 53, 105, 126].



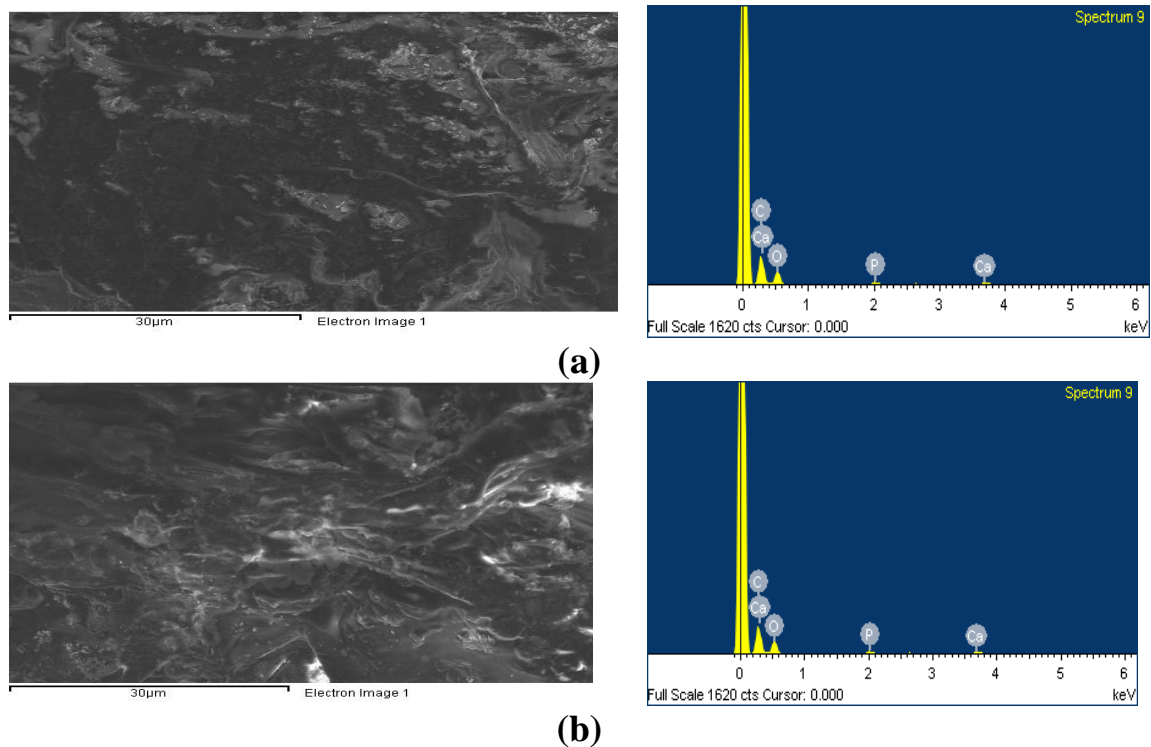
Hình 3.46. Kết quả phân tích XRD của hydrogel và hydrogel composite (CDTA- GTA , CDTA- GTA/BCP với tỉ lệ 1:1) ban đầu và sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày



Hình 3.47. Kết quả phân tích XRD của hydrogel và hydrogel composite (CDTA- GTA , CDTA- GTA/BCP với tỉ lệ 2:1) trước và sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày

Sự hình thành khoáng appatite carbonate

Nhóm nghiên cứu khảo sát sự hình thành khoáng appatide carbonate bằng cách tiến hành ngâm hydrogel hydrogel CDTA-GTA (1:1), CDTA-GTA (2:1) và hydrogel composite CDTA-GTA/BCP (1:1), CDTA-BCP/BCP (2:1) trong dung dịch SBF sau 28 ngày và thu được kết quả thể hiện **Hình 3.48**



Hình 3.48. Kết quả hình ảnh phân tích bằng phương pháp SEM và phân tích nguyên tố EDS của hydrogel CDTA-GTA (1:1) và CDTA-GTA (2:1) sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF 28 ngày

Kết quả hình SEM với thang phóng đại 30 µm hydrogel composite CDTA-GTA (1:1), CDTA-GTA (2:1) cho thấy xuất hiện một ít các tinh thể tạo khoáng. Đối với thang phóng đại 200 µm cho thấy trên bề mặt của vật liệu hydrogel composite CDTA-GTA (1:1), CDTA-GTA (2:1), cấu trúc xốp của vật liệu không thay đổi so với ban đầu.

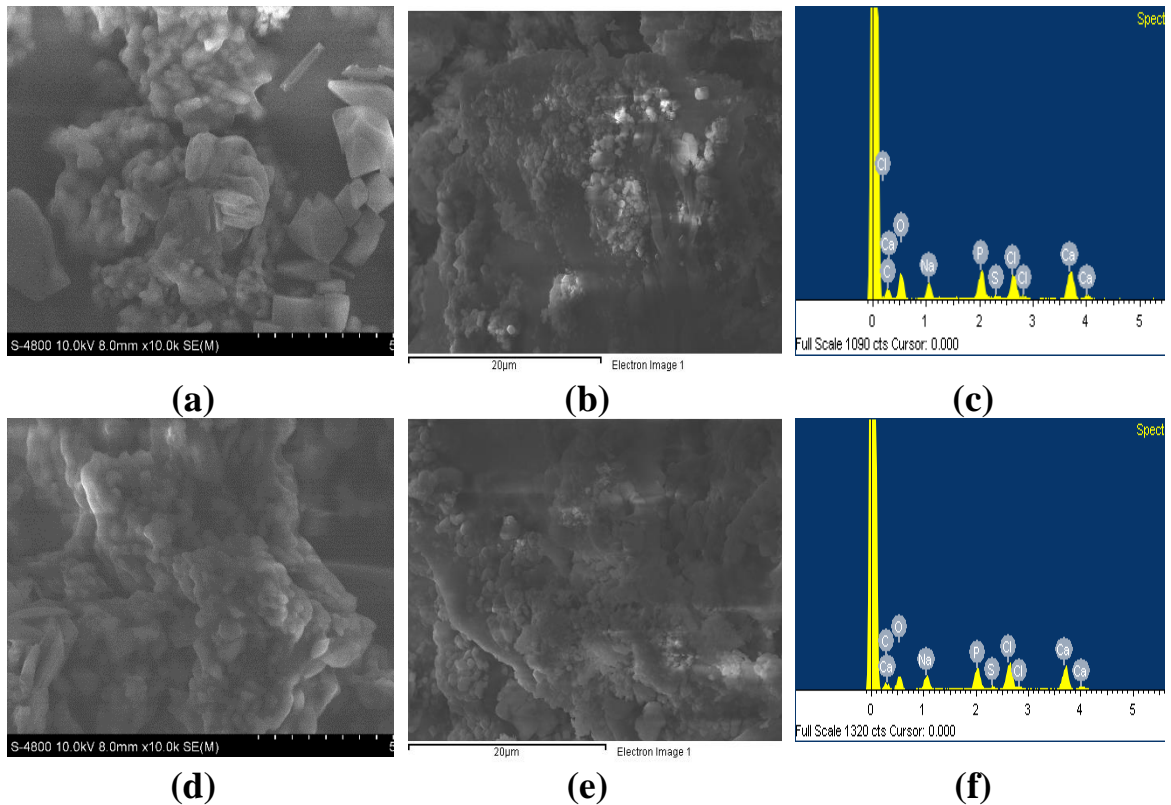
Qua quá trình phân tích EDS cho thấy thành phần khoáng hoá tạo thành gồm các nguyên tố Ca, C, O, P và Si và nguyên tố Si xuất hiện do trong phương pháp này sử dụng lớp silic bao phủ lên bề mặt mẫu nhằm phân tích EDS sau khi ngâm trong dung dịch giả sinh học SBF 28 ngày. Phần trăm các nguyên tố tham gia tạo khoáng được biểu thị ở **Bảng 3.8**.

Bảng 3.8. Phần trăm khối lượng (%) các nguyên tố sau thời gian ngâm trong SBF (28 ngày)

Mẫu hydrogel	Phần trăm khối lượng (%)			
	P	Ca	C	O

CDTA -GTA (1:1) 28 ngày	2,20	2,94	51,94	42,91
CDTA -GTA (2:1) 28 ngày	1,25	5,67	56,80	26,28

Hydrogel composite CDTA-GTA



Hình 3.49. Kết quả hình ảnh phân tích bằng phương pháp SEM và phân tích nguyên tố EDS của hydrogel composite CDTA-GTA (1:1) và CDTA-GTA (2:1) sau thời gian ngâm trong dung dịch SBF trong 28 ngày

Kết quả hình SEM (**Hình 3.49**) với thang phóng đại 5µm hydrogel composite CDTA-GTA hydrogel composite CDTA-GTA/BCP (1:1) (**a**), CDTA-BCP/BCP (2:1) (**b**) xuất hiện nhiều mầm tinh thể tạo khoáng. Đối với thang phóng đại 20µm cho thấy trên bề mặt của vật liệu hydrogel composite CDTA-GTA/BCP (1:1) (**b**), CDTA-BCP/BCP (2:1) (**e**), cấu trúc xốp ban đầu của vật liệu vẫn được giữ nguyên.

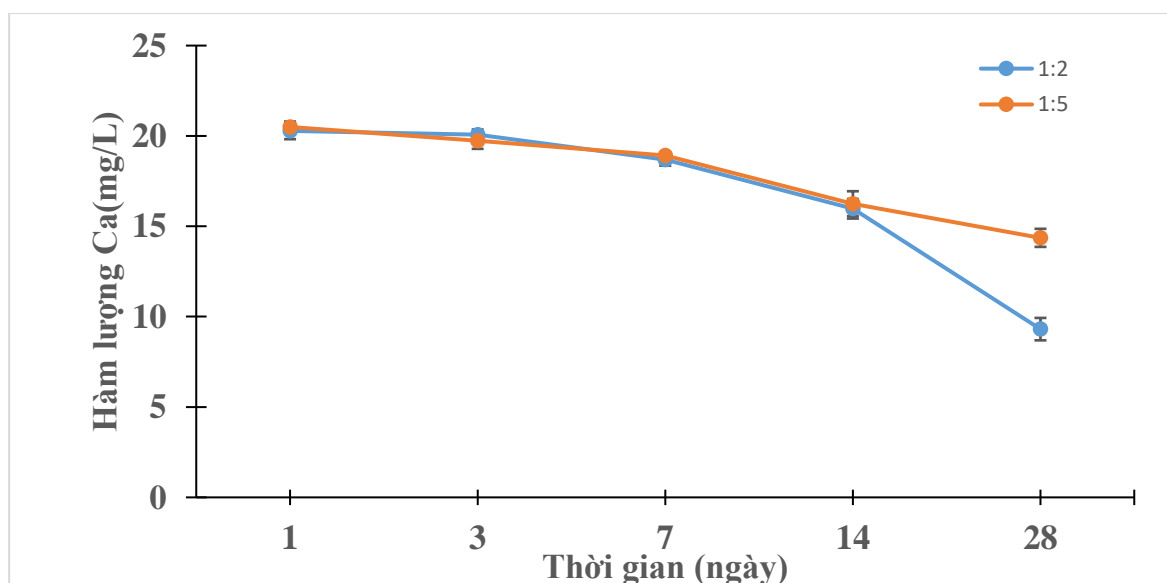
Phần trăm các nguyên tố tham gia tạo khoáng sau thời gian ngâm trong SBF (28 ngày) bao gồm các nguyên tố Ca, C, O, P, được thể hiện ở **Bảng 3.9**.

Bảng 3.9. Phần trăm khối lượng (%) các nguyên tố sau thời gian ngâm trong SBF (28 ngày)

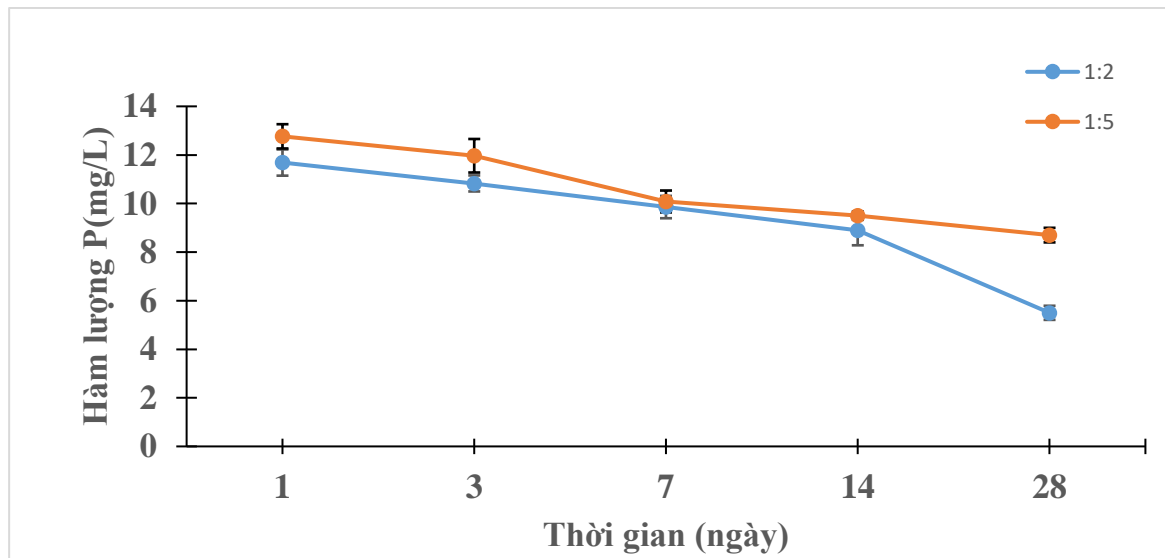
Mẫu hydrogel composite	Phần trăm khối lượng (%)				
	Na	P	Ca	C	O
CDTA-GTA/BCP (1:1) 28 ngày	6,48	9,48	17,71	15,30	39,54
CDTA-GTA/BCP (2:1) 28 ngày	8,26	10,19	19,70	9,45	34,49

Từ các kết quả phân tích EDS cho thấy hydrogel composite CDTA-GTA/BCP (1:1), CDTA-BCP/BCP (2:1) cho kết quả tạo khoáng cao hơn nhiều so với hydrogel CDTA-GTA (1:1), CDTA-GTA (2:1). Ví dụ đối với %Ca có trong hydrogel composite với 2 tỉ lệ lần lượt là 17,81% và 21,07%, trong khi đó đối với hydrogel %Ca thấp hơn với tỉ lệ lần lượt 9,30% và 2,10%.

Khảo sát hàm lượng Ca, P trong dung dịch SBF



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



Hình 3.51. Hàm lượng P trong dung dịch SBF ngâm hydrogel composite trong 28 ngày với tỉ lệ 1:1 và 2:1

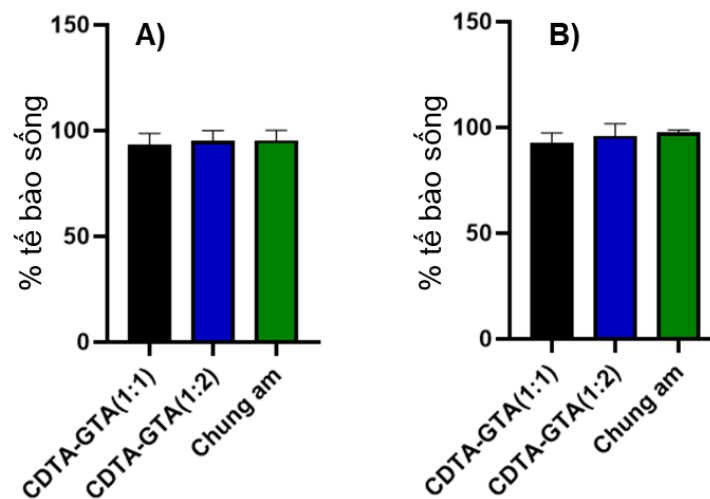
Khảo sát hàm lượng Ca, P trong dung dịch SBF sau thời gian ngâm hydrogel composite cho thấy sau 1 ngày lượng ion Ca, P tăng lên, sau đó lượng Ca, P giảm đều xuống. Các mẫu hydrogel composite cho kết quả thống kê không khác biệt nhiều giữa 2 tỉ lệ, như vậy vật liệu có ảnh hưởng đến lượng Ca, P khi ngâm mẫu hydrogel composite trong dung dịch SBF. Sự tăng lên về hàm lượng Ca, P sau 1 ngày ngâm mẫu được giải thích là một phần BCP phân hủy giải phóng ion Ca^{2+} và ion phosphate. Sau 3 đến 28 ngày ngâm hydrogel composite trong dung dịch SBF bắt đầu có sự kết tủa từ khoáng apatite làm giảm lượng Ca và phosphate.

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

3.3.3.5. Kết quả đánh giá độc tính tế bào

Kết quả khảo sát bằng MTT được trình bày trong **Hình 3.52**. Đối với mẫu chứng âm (DMEM/F127), $97.8 \pm 5.47\%$ tế bào sống sau 24 giờ và $99.4 \pm 8.4\%$ tế bào sống sau 48 giờ. Như vậy có thể thấy, chứng âm không ảnh hưởng đến tỷ lệ sống/chết của MSC trong thử nghiệm. Dịch chiết hai mẫu hydrogel composite được sử dụng ở nồng độ 0,5 mg/mL. Kết quả cho thấy, không có sự

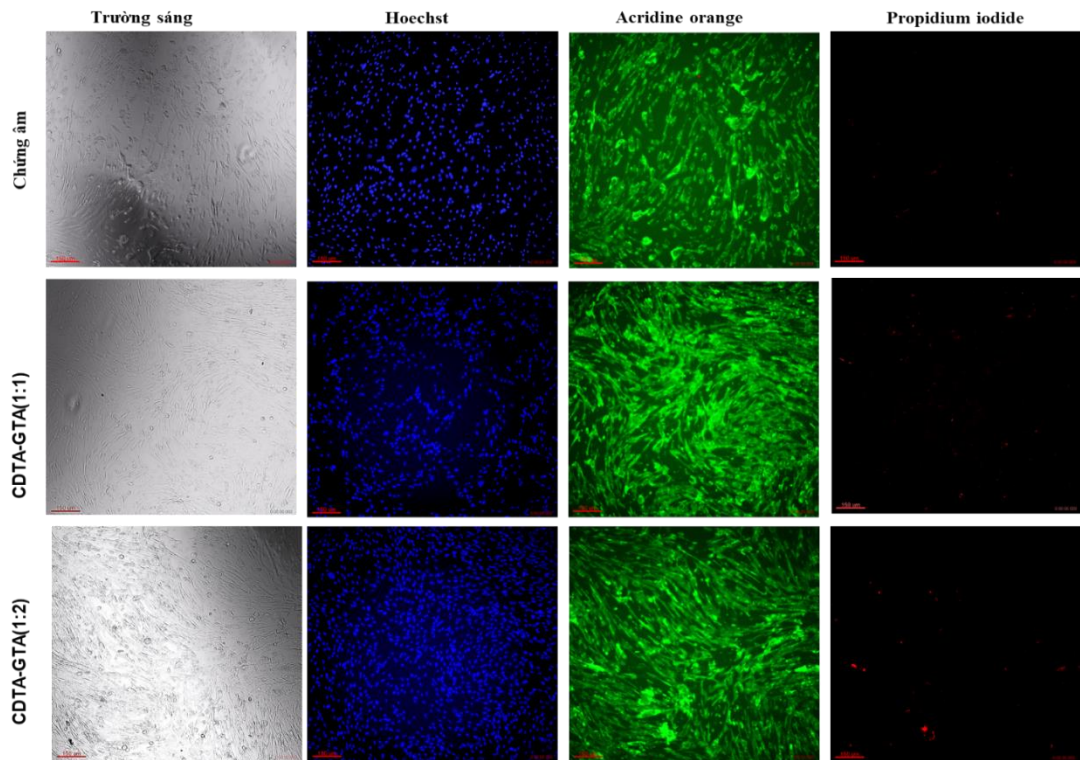
khác biệt khi so sánh với chứng âm ở các thời điểm thử nghiệm (ANOVA 2 way, $p=0.780$ (so mẫu), $p=0.557$ (so thời gian)). Thêm vào đó, phần trăm tế bào MSC sống sót sau 24 giờ ủ và sau 48 giờ ủ đều trên 80%. Theo ISO 10993-5:2009, tỷ lệ tế bào sống trên 80% được coi là an toàn.



Hình 3.52. Tỷ lệ tế bào MSC sống sau khi ủ với chứng âm (DMEM/F12) và dịch chiết hydrogel composite CDTA-GTA (1-1) và CDTA-GTA (1-2) sau 24h (A) và sau 48h (B)

Để khẳng định kết quả MTT, phương pháp chụp ảnh tế bào sử dụng chất nhuộm huỳnh quang được sử dụng. Trong nghiên cứu này, tế bào MSC sau 48h xử lý được ủ với 3 chất nhuộm: Hoestch (nhuộm nhân, phát quang màu xanh biển); AO (nhuộm tế bào chất tế bào sống, chỉ ra được tính nguyên vẹn của màng tế bào, phát quang màu xanh); PI (chỉ xâm nhập vào các tế bào có màng bị tổn thương, phát quang màu đỏ). Kết quả được trình bày trong Hình 3.53. Theo kết quả, nhân tế bào bình thường ở các mẫu xử lý với mẫu và chứng âm, mật độ tế bào tương đương nhau. Thành phần nhuộm phẩm màu AO cho thấy tế bào MSC nguyên vẹn và không có huỳnh quang trong tế bào chết. Thêm vào đó, dựa trên kết quả nhuộm AO có thể thấy mật độ tế bào ở các mẫu hydrogel composite phát triển tương đương với mẫu chứng âm.

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.



Hình 3.53. Hình ảnh tế bào MSC được ủ với chứng âm (DMEM/F12) và dịch chiết hydrogel composite CDTA-GTA (1-1) và CDTA-GTA (1-2) sau 48h. Màu xanh: Chất nhuộm Hoestch; màu xanh: chất nhuộm AO và màu đỏ: chất nhuộm PI.

3.4. So sánh các hệ hydrogel composite

Thời gian tạo gel của tất cả các hệ hydrogel composite trên cơ sở polymer sinh học (gelatin, chitosan) và BCP ngắn nên có thể ứng dụng các hệ gel trên phù hợp trong ứng dụng tái tạo xương.

Bảng 3.14. So sánh các hệ hydrogel và hydrogel composit trên nền gelatine

STT	Hệ hydrogel, hydrogel composit	Hình thái	Khối lượng suy giảm (%)	Tương hợp sinh học	Khả năng tạo khoáng
1	CHPA-GTA (1:1)	Cấu trúc xốp	89,5% sau 762 giờ		Không có khả năng tạo khoáng
2	CHPA-GTA (1:2)	Cấu trúc xốp	100% sau 42 giờ		Không có khả năng tạo khoáng
3	CHPA-GTA/BCP (1:1)	Cấu trúc xốp	82,9% sau 762 giờ	Tương hợp sinh học	Có khả năng tạo khoáng
4	CHPA-GTA/BCP (1:2)	Cấu trúc xốp	69,55 % sau 762 giờ	Tương hợp sinh học	Có khả năng tạo khoáng
5	ATA-GTA (1:1)	Cấu trúc xốp	4,3% sau 1524 giờ		Không có khả năng tạo khoáng
6	ATA-GTA (1:2)	Cấu trúc xốp	25,9% sau 1524 giờ		Không có khả năng tạo khoáng
7	ATA-GTA/BCP (1:1)	Cấu trúc xốp	Trương nở 170,6% sau 1524 giờ	Tương hợp sinh học	Có khả năng tạo khoáng
8	ATA-GTA/BCP (1:2)	Cấu trúc xốp	4,6% sau 1524 giờ	Tương hợp sinh học	Có khả năng tạo khoáng
9	CDTA-GTA (1:1)	Cấu trúc xốp	90,43% sau 378 giờ		Không có khả năng tạo khoáng
10	CDTA-GTA (2:1)	Cấu trúc xốp	78,55% sau 762 giờ		Không có khả năng tạo khoáng

11	CDTA-GTA/BCP (1:1)	Cấu trúc xốp	78,77% sau 762 giờ	Tương hợp sinh học	Có khả năng tạo khoáng
12	CDTA-GTA/BCP (2:1)	Cấu trúc xốp	61,56 % sau 762 giờ	Tương hợp sinh học	Có khả năng tạo khoáng

Phân tích cấu trúc cho thấy vật liệu có cấu trúc không gian 3 chiều, xốp. Vật liệu này có khả năng tạo nhiều khoảng cư trú cho dịch chuyển tế bào, giúp chuyển hóa và lưu thông các yếu tố chuyển hóa xương. Đồng thời, vật liệu này đáp ứng không gian cho tế bào bám dính, phát triển và sự xâm nhập của mạch máu.

Hydrogel CHPA-GTA, ATA-GTA, CDTA-GTA không có khả năng tạo khoáng trên bề mặt vật liệu, không phù hợp với ứng dụng tái tạo xương.

Thời gian giảm cấp sinh học phụ thuộc vào tính chất của polysaccharide của vật liệu. CDTA-GTA/BCP và CHPA-GTA/BCP phù hợp với thời gian tái tạo xương từ 6-8 tuần. Tuy nhiên, ở những dân số đặc biệt, ví dụ ở người lớn tuổi, quá trình tái tạo xương sẽ kéo dài hơn nên vật liệu ATA-GTA/BCP có thời gian giảm cấp sinh học phù hợp hơn [128].

KẾT LUẬN

Nhìn lại mục tiêu ban đầu của luận án: “Nghiên cứu điều chế in situ hydrogel composite trên nền gelatine và chitosan/alginate/chondroitin sulfate định hướng trong tái tạo xương”. Một số kết quả mới của luận án đạt được có thể tóm tắt như sau:

1. Đã tổng hợp thành công các vật liệu hydrogel composite mới, trên nền gelatin 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 $^1\text{H-NMR}$, FT-IR, SEM.

2. Khảo sát thời gian hình thành gel của các vật liệu như sau:

- Vật liệu CHPA – GTA: Đối với hydrogel, hydrogel composite có thời gian tạo gel nhanh nhất là 11s; 40s (khảo sát trong nồng độ H_2O_2 từ 0,05-0,2%)

- Vật liệu ATA – GTA: Đối với hydrogel, hydrogel composite có thời gian tạo gel nhanh nhất là 25s; 16s (khảo sát trong nồng độ H_2O_2 từ 0,05-0,2%)

- Vật liệu CDTA – GTA: Đối với hydrogel, hydrogel composite có thời gian tạo gel nhanh nhất là 43s; 46s (khảo sát trong nồng độ H_2O_2 từ 0,1-0,4%).

Kết quả chứng minh rằng khi tăng nồng độ H_2O_2 , thời gian hình thành gel sẽ kéo dài do enzyme HRP bị ức chế khả năng tạo liên kết ngang trong mạch polymer.

3. Trong môi trường giả sinh học, thời gian phân hủy sinh học trên 3 hệ vật liệu hydrogel và hydrogel composite được khảo sát tỷ lệ thuận với hàm lượng GTA được sử dụng, do gelatin 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 chỉnh tỉ lệ GTA để có thời gian phân hủy sinh học như mong muốn trong môi trường giả sinh học.

4. Khi so sánh giữa 3 vật liệu có cùng tỉ lệ BCP, CHPA-GTA, ATA-GTA, CDTA-GTA cho thấy CHPA có khả năng khoáng hóa tốt nhất. ATA cho thấy khả năng khoáng hóa thấp nhất trong ba vật liệu. Điều này được giải thích do cấu trúc alginate mang điện tích âm, khi kết hợp với các hạt nano mang điện tích dương Ca^{2+} , từ đó tạo nên tương tác tĩnh điện giữ chặt trong cấu trúc polymer, đây là nguyên nhân chủ yếu làm cho ATA có khả năng tạo khoáng kém. Mặt khác, cấu trúc chitosan mang điện tích dương, tương tác tĩnh điện giữa chitosan và BCP làm cho các hạt Ca^{2+} được giữ trên bề mặt cấu trúc vật liệu, từ đó dẫn đến vật liệu có khả năng tạo khoáng tốt hơn.

5. Dựa trên kết quả MTT và ảnh chụp huỳnh quang cho thấy, vật liệu hydrogel composite 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.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục đề tài này kết hợp với các polysaccharide khác, để đạt hiệu quả về phân hủy sinh học, tạo khoáng tốt hơn.
- Thực hiện đánh giá tính cơ lý của vật liệu
- Khảo sát hàm lượng BCP để tối ưu hóa khoáng hóa
- Đánh giá độc tính cấp, bán trường diễn, từ đó lựa chọn vật liệu thích hợp thử nghiệm trên động vật

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

STT	Tên bài báo	Thành phần tác giả	Tên tạp chí	Link bài báo
1	Enzyme-mediated preparation of the gelatin/alginate-based nanocomposite hydrogel	Nguyen Tien Thinh, Bui Ngọc Kim Thanh, Pham Trung Kien, Nguyen Dai Hai, Tran Ngoc Quyen.	VietNam Journal of CHEMISTRY	
2	Injectable Nanocomposite Hydrogels and Electrospayed Nano(Micro) Particles for Biomedical Applications	Nguyen Vu Viet Linh, Nguyen Tien Thinh, Pham Trung Kien, Tran Ngoc Quyen, Huynh Dai Phu	IF 3.65	https://doi.org/10.1007/978-981-13-0947-2_13
3	<i>In situ</i> fabrication of biological chitosan and gelatin-based hydrogels loading biphasic calcium phosphate	Tien Thinh Nguyen, Chan Khon Huynh, Ngoc Quyen Tran, Van Thu Le,	Asian Journal of Chemistry (Scopus)	DOI: 10.14233/ajchem.2019.21627

	nanoparticles for bone tissue regeneration	Minh Dung Truong, Bach Long Giang, Minh Thanh Vu		
4	Biphasic calcium phosphate embedded biomimetic hydrogel based chondroitin sulfate and gelatin as an injectable scaffold for bone regeneration	Nguyen Tien Thinh, Dang Le Hang, Tran Thi Yen Nhi, Sija Feng, Jun Chen, Nguyen Phuon, Tran Ngoc Quyen	European Polymer Journal (IF=5,5; minor revision)	

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. General, O.o.t.S., *A Public Health Approach to Promote Bone Health*, in *Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General*. 2004, Office of the Surgeon General (US).
2. Zhu, J. and R.E. Marchant, *Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds*. Expert review of medical devices, 2011. **8**(5): p. 607-626.
3. Minh, G.T.B.T.V., *Giải phẫu người*. Vol. I. 2015: NXB Giáo dục Việt Nam.
4. Lan, H.P.T. and N.V. Tuấn, *Sinh lý học loãng xương*. Thời sự y học, 2011. **62**: p. 27.
5. María, V. and D.J.N.C.M.A.R.S.C. Navarrete, *CHAPTER 1 Biological Apatites in Bone and Teeth*. 2016: p. 1-29.
6. Bình, G.T.T., *Mô phôi*. Vol. I. 2015: NXB Y học.
7. Daculsi, G., O. Malard, and E. Goyenvalle, *Efficacy and performance of bone substitute for bone reconstruction in place of allograft and autograft*. ITBM-RBM, 2005. **26**: p. 218-22.
8. Gokhale, J.A., A.L. Boskey, and P.G. Robey, *The biochemistry of bone*, in *Osteoporosis*. 2001, Elsevier. p. 107-188.
9. Thủy, B.T., *Đánh giá hiệu quả của phương pháp ghép tự thân mảnh xương sọ bảo quản lạnh sâu trên thực nghiệm và người*. 2015, Đại học Y Hà Nội. p. 6.
10. Pfeiffenberger, M., et al., *Fracture Healing Research—Shift towards In Vitro Modeling?* 2021. **9**(7): p. 748.
11. Sheen, J.R. and V.V. Garla, *Fracture healing overview*, in *StatPearls [Internet]*. 2021, StatPearls Publishing.
12. Kim, T., et al., *Orthopedic implants and devices for bone fractures and defects: Past, present and perspective*. Engineered Regeneration, 2020. **1**: p. 6-18.
13. Tozzi, G., et al., *Composite hydrogels for bone regeneration*. Materials, 2016. **9**(4): p. 267.
14. Kanwar, S. and S.J.B. Vijayavenkataraman, *Design of 3D printed scaffolds for bone tissue engineering: A review*. 2021. **24**: p. e00167.
15. Collins, M.N., et al., *Scaffold fabrication technologies and structure/function properties in bone tissue engineering*. 2021. **31**(21): p. 2010609.
16. Wang, W., R. Narain, and H. Zeng, *Hydrogels*, in *Polymer science and nanotechnology*. 2020, Elsevier. p. 203-244.
17. Caló, E. and V.V. Khutoryanskiy, *Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products*. European Polymer Journal, 2015. **65**: p. 252-267.
18. Caló, E. and V.V.J.E.P.J. Khutoryanskiy, *Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products*. 2015. **65**: p. 252-267.
19. Phương, N.T., *Nghiên cứu tổng hợp vật liệu mới trong cấy ghép và tái tạo xương trên cơ sở hydrogel composit sinh học gồm biphasic calcium phosphate và polymer sinh học (gelatin, chitosan)*. Luận án tiến sĩ 2015.
20. Siepmann, J., R.A. Siegel, and M.J. Rathbone, *Fundamentals and applications of controlled release drug delivery*. Vol. 3. 2012: Springer.

21. Gerlach, G. and K.-F. Arndt, *Hydrogel sensors and actuators: engineering and technology*. Vol. 6. 2009: Springer Science & Business Media.
22. <https://hydrogeldesign.com/swelling/>. 2022 [cited 2022 2/11/2022]; Available from: <https://hydrogeldesign.com/swelling/>.
23. Barbucci, R., *Hydrogels: Biological properties and applications*. 2010: Springer Science & Business Media.
24. Pal, K., A. Banthia, and D. Majumdar, *Polymeric hydrogels: characterization and biomedical applications*. Designed monomers polymers, 2009. **12**(3): p. 197-220.
25. Li, X., et al., *Precise control and prediction of hydrogel degradation behavior*. *Macromolecules*, 2011. **44**(9): p. 3567-3571.
26. Lee, K. and D. Kaplan, *Tissue engineering I: scaffold systems for tissue engineering*. Vol. 102. 2006: Springer.
27. Gibbs, D.M., et al., *A review of hydrogel use in fracture healing and bone regeneration*. *Journal of tissue engineering regenerative medicine*, 2016. **10**(3): p. 187-198.
28. Yue, S., et al., *Hydrogel as a biomaterial for bone tissue engineering: a review*. *Nanomaterials*, 2020. **10**(8): p. 1511.
29. Skopinska-Wisniewska, J., M. Tuszynska, and E. Olewnik-Kruszkowska, *Comparative study of gelatin hydrogels modified by various cross-linking agents*. *Materials*, 2021. **14**(2): p. 396.
30. Mariod, A.A. and H. Fadul, *Gelatin, source, extraction and industrial applications*. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 2013. **12**(2): p. 135-147.
31. Schrieber, R. and H. Gareis, *Gelatine handbook: theory and industrial practice*. 2007: John Wiley & Sons.
32. Islam, S., M.R. Bhuiyan, and M. Islam, *Chitin and chitosan: structure, properties and applications in biomedical engineering*. *Journal of Polymers the Environment*, 2017. **25**(3): p. 854-866.
33. Kumar, M.N.R., *A review of chitin and chitosan applications*. *Reactive functional polymers*, 2000. **46**(1): p. 1-27.
34. Lahiji, A., et al., *Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2000. **51**(4): p. 586-595.
35. Howling, G.I., et al., *The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro*. *Biomaterials*, 2001. **22**(22): p. 2959-2966.
36. Jiang, T., et al., *Chitosan as a biomaterial: structure, properties, and applications in tissue engineering and drug delivery*, in *Natural and synthetic biomedical polymers*. 2014, Elsevier. p. 91-113.
37. Amara, A., et al., *Synthesis and characterization of porous biphasic calcium phosphate scaffold from different porogens for possible bone tissue engineering applications*. *Science of Sintering*, 2011. **43**(2): p. 183-192.
38. Bumgardner, J.D., et al., *The integration of chitosan-coated titanium in bone: an in vivo study in rabbits*. *Implant dentistry*, 2007. **16**(1): p. 66-79.

39. Chen, C.-S., W.-Y. Liao, and G.-J. Tsai, *Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation*. Journal of Food Protection, 1998. **61**(9): p. 1124-1128.
40. Jung, B.O., et al., *Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities*. Journal of Applied Polymer Science, 1999. **72**(13): p. 1713-1719.
41. Aramwit, P., *Introduction to biomaterials for wound healing*, in *Wound healing biomaterials*. 2016, Elsevier. p. 3-38.
42. Thiện, T.V., *Điều chế khảo sát cấu trúc và tính chất của alginate và oligosaccharide tách từ prong biển khu vực Bắc Hải Vân và ứng dụng của chúng*. Luận án tiến sĩ hóa học, 2009.
43. Michel, B.A., et al., *Chondroitins 4 and 6 sulfate in osteoarthritis of the knee: a randomized, controlled trial*. 2005. **52**(3): p. 779-786.
44. Ricciardi, R., et al., *Investigation of the relationships between the chain organization and rheological properties of atactic poly (vinyl alcohol) hydrogels*. Polymer, 2003. **44**(11): p. 3375-3380.
45. Hoare, T.R. and D.S. Kohane, *Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges*. Polymer, 2008. **49**(8): p. 1993-2007.
46. Tsuji, H., *Poly (lactide) stereocomplexes: formation, structure, properties, degradation, and applications*. Macromolecular bioscience, 2005. **5**(7): p. 569-597.
47. De Jong, S., et al., *Physically crosslinked dextran hydrogels by stereocomplex formation of lactic acid oligomers: degradation and protein release behavior*. Journal of controlled release, 2001. **71**(3): p. 261-275.
48. Gulrez, S.K., S. Al-Assaf, and G.O. Phillips, *Hydrogels: methods of preparation, characterisation and applications*. Progress in molecular environmental bioengineering-from analysis modeling to technology applications, 2011: p. 117-150.
49. O'brien, F.J., *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*. Materials today, 2011. **14**(3): p. 88-95.
50. Shinde, U.P., B. Yeon, and B. Jeong, *Recent progress of in situ formed gels for biomedical applications*. Progress in polymer science, 2013. **38**(3-4): p. 672-701.
51. Carpi, A., *Progress in molecular and environmental bioengineering: from analysis and modeling to technology applications*. 2011: BoD–Books on Demand.
52. Pek, Y.S., et al., *The development of a nanocrystalline apatite reinforced crosslinked hyaluronic acid–tyramine composite as an injectable bone cement*. Biomaterials, 2009. **30**(5): p. 822-828.
53. Chen, J.P., Tsai, M. J., & Liao, H. T., *Incorporation of biphasic calcium phosphate microparticles in injectable thermoresponsive hydrogel modulates bone cell proliferation and differentiation*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013. **110**: p. 120-129.
54. Liu, M., et al., *Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering*. Bone research, 2017. **5**(1): p. 1-20.
55. Li, Q.L., et al., *Chitosan-phosphorylated chitosan polyelectrolyte complex hydrogel as an osteoblast carrier*. Journal of Biomedical Materials Research

- Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 2007. **82**(2): p. 481-486.
56. Zaino, C., et al., *A novel polyelectrolyte complex (PEC) hydrogel for controlled drug delivery to the distal intestine*. The Open Drug Delivery Journal, 2007. **1**(1).
 57. You, J., et al., *Quaternized chitosan/poly (acrylic acid) polyelectrolyte complex hydrogels with tough, self-recovery, and tunable mechanical properties*. Macromolecules, 2016. **49**(3): p. 1049-1059.
 58. Chen, T., et al., *Enzyme-catalyzed gel formation of gelatin and chitosan: potential for in situ applications*. Biomaterials, 2003. **24**(17): p. 2831-2841.
 59. Bae, J.W., et al., *Horseradish peroxidase-catalysed in situ-forming hydrogels for tissue-engineering applications*. 2015. **9**(11): p. 1225-1232.
 60. Guzik, U., K. Hupert-Kocurek, and D. Wojcieszynska, *Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-application to oxidoreductases*. Molecules, 2014. **19**(7): p. 8995-9018.
 61. Liu, M., et al., *Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering*. Bone Research, 2017. **5**(1): p. 17014.
 62. Naderi-Meshkin, H., et al., *Chitosan-based injectable hydrogel as a promising in situ forming scaffold for cartilage tissue engineering*. Cell biology international, 2014. **38**(1): p. 72-84.
 63. Sá-Lima, H., et al., *Stimuli-responsive chitosan-starch injectable hydrogels combined with encapsulated adipose-derived stromal cells for articular cartilage regeneration*. Soft Matter Materials Science, 2010. **6**(20): p. 5184-5195.
 64. Yuan, L., et al., *Effects of composition and mechanical property of injectable collagen I/II composite hydrogels on chondrocyte behaviors*. Tissue Engineering Part A, 2016. **22**(11-12): p. 899-906.
 65. Kontturi, L.-S., et al., *An injectable, in situ forming type II collagen/hyaluronic acid hydrogel vehicle for chondrocyte delivery in cartilage tissue engineering*. Drug delivery translational research, 2014. **4**: p. 149-158.
 66. Geng, X., et al., *Hierarchically designed injectable hydrogel from oxidized dextran, amino gelatin and 4-arm poly (ethylene glycol)-acrylate for tissue engineering application*. Journal of Materials Chemistry, 2012. **22**(48): p. 25130-25139.
 67. Balakrishnan, B., et al., *Self-crosslinked oxidized alginate/gelatin hydrogel as injectable, adhesive biomimetic scaffolds for cartilage regeneration*. Acta Biomaterialia, 2014. **10**(8): p. 3650-3663.
 68. Zhao, L., M.D. Weir, and H.H. Xu, *An injectable calcium phosphate-alginate hydrogel-umbilical cord mesenchymal stem cell paste for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2010. **31**(25): p. 6502-6510.
 69. Park, H. and K.Y. Lee, *Cartilage regeneration using biodegradable oxidized alginate/hyaluronate hydrogels*. Journal of biomedical materials research Part A, 2014. **102**(12): p. 4519-4525.
 70. Wiltsey, C., et al., *Characterization of injectable hydrogels based on poly (N-isopropylacrylamide)-g-chondroitin sulfate with adhesive properties for*

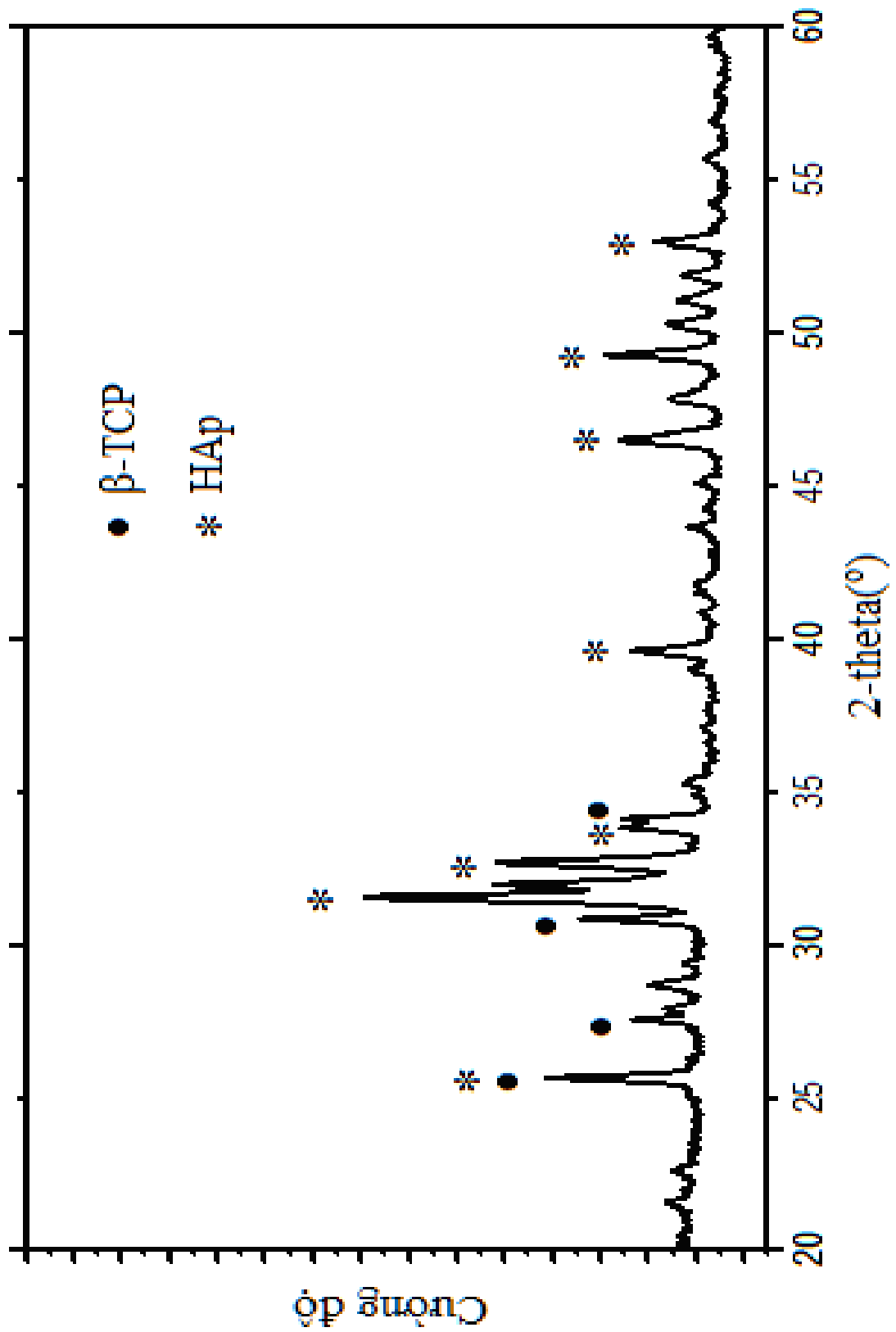
- nucleus pulposus tissue engineering*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2013. **24**: p. 837-847.
71. Liu, M., et al., *Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering*. 2017. **5**(1): p. 1-20.
 72. Shim, W.S., et al., *Biodegradability and biocompatibility of a pH-and thermo-sensitive hydrogel formed from a sulfonamide-modified poly (ϵ -caprolactone-co-lactide)–poly (ethylene glycol)–poly (ϵ -caprolactone-co-lactide) block copolymer*. Biomaterials, 2006. **27**(30): p. 5178-5185.
 73. Kim, H.K., et al., *Injectable in situ-forming pH/thermo-sensitive hydrogel for bone tissue engineering*. Tissue Engineering Part A, 2009. **15**(4): p. 923-933.
 74. Kurisawa, M., et al., *Injectable biodegradable hydrogels composed of hyaluronic acid–tyramine conjugates for drug delivery and tissue engineering*. Chemical communications, 2005(34): p. 4312-4314.
 75. Park, K.M., et al., *In situ forming hydrogels based on tyramine conjugated 4-Arm-PPO-PEO via enzymatic oxidative reaction*. 2010. **11**(3): p. 706-712.
 76. Jin, R., et al., *Chondrogenesis in injectable enzymatically crosslinked heparin/dextran hydrogels*. 2011. **152**(1): p. 186-195.
 77. Park, K.M., et al., *Synthesis and characterizations of in situ cross-linkable gelatin and 4-arm-PPO-PEO hybrid hydrogels via enzymatic reaction for tissue regenerative medicine*. Biomacromolecules, 2012. **13**(3): p. 604-611.
 78. Cheng, Y., et al., *In situ gelling polysaccharide-based hydrogel for cell and drug delivery in tissue engineering*. Journal of Applied Polymer Science, 2014. **131**(4).
 79. Fiorica, C., et al., *Injectable in situ forming hydrogels based on natural and synthetic polymers for potential application in cartilage repair*. RSC Advances, 2015. **5**(25): p. 19715-19723.
 80. Fu, S., et al., *Injectable and thermo-sensitive PEG-PCL-PEG copolymer/collagen/n-HA hydrogel composite for guided bone regeneration*. Biomaterials, 2012. **33**(19): p. 4801-4809.
 81. Huang, Y., et al., *An injectable nano-hydroxyapatite (n-HA)/glycol chitosan (G-CS)/hyaluronic acid (HyA) composite hydrogel for bone tissue engineering*. Rsc Advances, 2016. **6**(40): p. 33529-33536.
 82. Yan, J., et al., *Injectable alginate/hydroxyapatite gel scaffold combined with gelatin microspheres for drug delivery and bone tissue engineering*. Materials Science Engineering: C, 2016. **63**: p. 274-284.
 83. Priya, M.V., et al., *Injectable osteogenic and angiogenic nanocomposite hydrogels for irregular bone defects*. Biomedical Materials, 2016. **11**(3): p. 035017.
 84. Du, C. and W. Huang, *Progress and prospects of nanocomposite hydrogels in bone tissue engineering*. Nanocomposites, 2022(just-accepted): p. 1-33.
 85. Gantar, A., et al., *Nanoparticulate bioactive-glass-reinforced gellan-gum hydrogels for bone-tissue engineering*. Materials Science Engineering: C, 2014. **43**: p. 27-36.
 86. Killion, J.A., et al., *Hydrogel/bioactive glass composites for bone regeneration applications: Synthesis and characterisation*. Materials Science Engineering: C, 2013. **33**(7): p. 4203-4212.

87. Seo, S.-J., et al., *Enhanced mechanical properties and bone bioactivity of chitosan/silica membrane by functionalized-carbon nanotube incorporation*. Composites science technology Composites science, 2014. **96**: p. 31-37.
88. Sitharaman, B., et al., *Injectable in situ cross-linkable nanocomposites of biodegradable polymers and carbon nanostructures for bone tissue engineering*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2007. **18**(6): p. 655-671.
89. Tozzi, G., et al., *Composite hydrogels for bone regeneration*. 2016. **9**(4): p. 267.
90. Kim, J., et al., *Bone regeneration using hyaluronic acid-based hydrogel with bone morphogenic protein-2 and human mesenchymal stem cells*. Biomaterials, 2007. **28**(10): p. 1830-1837.
91. Hassan, C.M. and N.A. Peppas, *Structure and morphology of freeze/thawed PVA hydrogels*. Macromolecules, 2000. **33**(7): p. 2472-2479.
92. Tran, N.Q., et al., *In situ forming and rutin-releasing chitosan hydrogels as injectable dressings for dermal wound healing*. Biomacromolecules, 2011. **12**(8): p. 2872-2880.
93. Nguyen, T.B.L. and B.-T. Lee, *A combination of biphasic calcium phosphate scaffold with hyaluronic acid-gelatin hydrogel as a new tool for bone regeneration*. Tissue Engineering Part A, 2014. **20**(13-14): p. 1993-2004.
94. Barbani, N., et al., *Hydroxyapatite/gelatin/gellan sponges as nanocomposite scaffolds for bone reconstruction*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2012. **23**(1): p. 51-61.
95. Hunter, K.T. and T. Ma, *In vitro evaluation of hydroxyapatite–chitosan–gelatin composite membrane in guided tissue regeneration*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2013. **101**(4): p. 1016-1025.
96. Pasqui, D., et al., *Carboxymethyl cellulose–hydroxyapatite hybrid hydrogel as a composite material for bone tissue engineering applications*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2014. **102**(5): p. 1568-1579.
97. Derakhshan, Z.H., et al., *In situ forming hydrogel based on chondroitin sulfate–hydroxyapatite for bone tissue engineering*. International Journal of Polymeric Materials
Polymeric Biomaterials, 2015. **64**(17): p. 919-926.
98. Li, T., et al., *Self-crosslinking and injectable chondroitin sulfate/pullulan hydrogel for cartilage tissue engineering*. Applied Materials Today, 2018. **10**: p. 173-183.
99. Singh, B.N., et al., *Design and evaluation of chitosan/chondroitin sulfate/nano-bioglass based composite scaffold for bone tissue engineering*. International journal of biological macromolecules, 2019. **133**: p. 817-830.
100. Purohit, S.D., et al., *Development of a nanocomposite scaffold of gelatin–alginate–graphene oxide for bone tissue engineering*. International journal of biological macromolecules, 2019. **133**: p. 592-602.
101. Jin, R., et al., *Enzyme-mediated fast in situ formation of hydrogels from dextran–tyramine conjugates*. Biomaterials, 2007. **28**(18): p. 2791-2800.

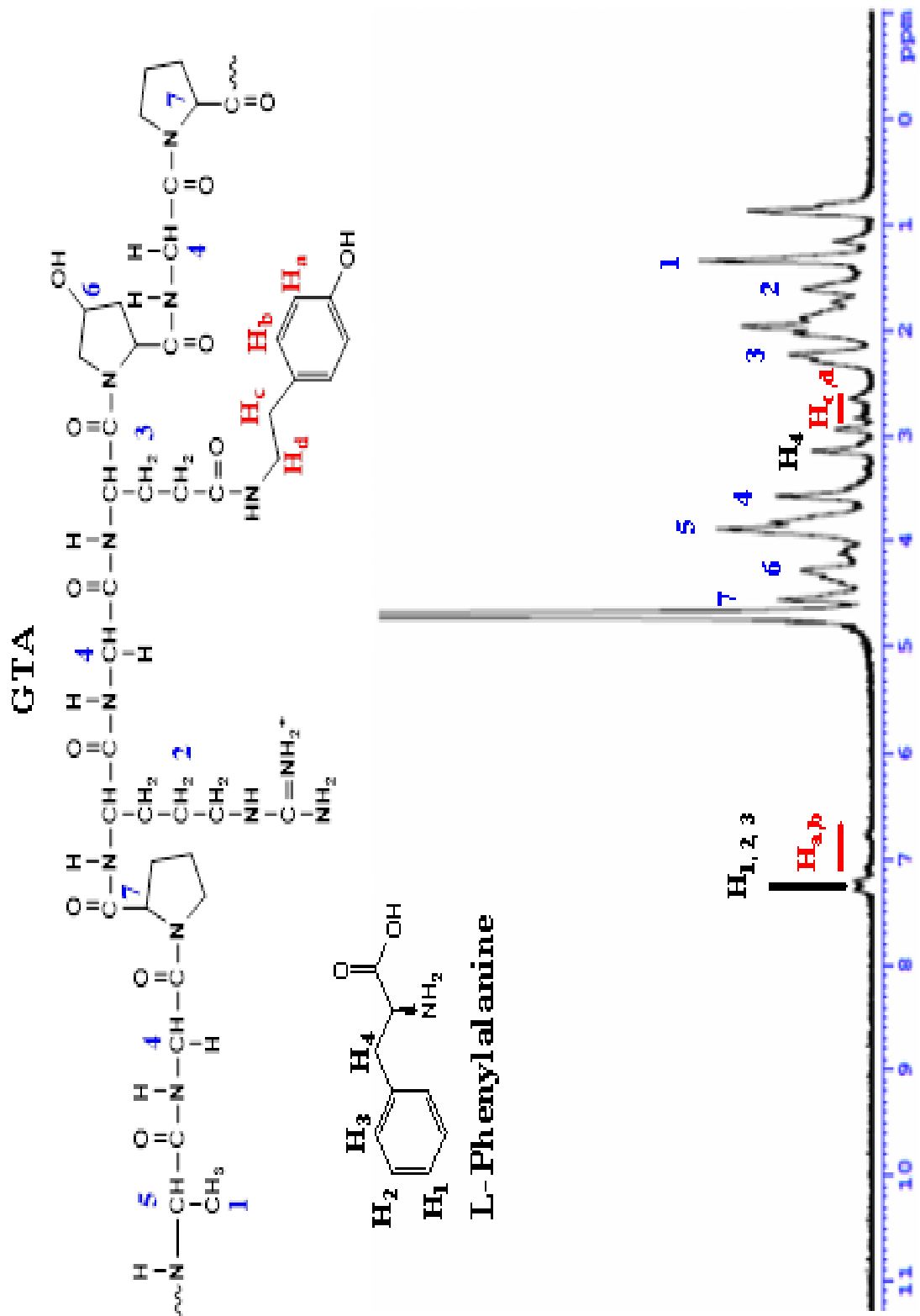
102. Deshmukh, M., et al., *Biodegradable poly (ethylene glycol) hydrogels based on a self-elimination degradation mechanism*. *Biomaterials*, 2010. **31**(26): p. 6675-6684.
103. Peter, M., et al., *Preparation and characterization of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications*. *Carbohydrate polymers Biomedical Materials*, 2010. **80**(3): p. 687-694.
104. Ton, T.P., et al., *Hematin-conjugated gelatin as an effective catalyst for preparing biological hydrogels*. *New Journal of Chemistry Green Processing*, 2021. **45**(39): p. 18327-18336.
105. Mazhuga, P., *Mechanisms of cartilage precursor replacement by bone in the mammalian skeleton*. *Acta Biologica Hungarica*, 1984. **35**(2-4): p. 219-225.
106. Wang, P., et al., *Effects of synthesis conditions on the morphology of hydroxyapatite nanoparticles produced by wet chemical process*. *Powder Technology*, 2010. **203**(2): p. 315-321.
107. Rouhani, P., N. Taghavinia, and S. Rouhani, *Rapid growth of hydroxyapatite nanoparticles using ultrasonic irradiation*. *Ultrasonics sonochemistry*, 2010. **17**(5): p. 853-856.
108. Kuznetsov, A., et al., *Hydroxyapatite of platelet morphology synthesized by ultrasonic precipitation from solution*. *Russian Journal of Inorganic Chemistry*, 2008. **53**(1): p. 1-5.
109. Park, K.M., et al., *In situ cross-linkable gelatin–poly (ethylene glycol)–tyramine hydrogel via enzyme-mediated reaction for tissue regenerative medicine*. *Journal of Materials Chemistry*, 2011. **21**(35): p. 13180-13187.
110. Van Thoai, D., et al., *Lipophilic effect of various pluronic-grafted gelatin copolymers on the quercetin delivery efficiency in these self-assembly nanogels*. *Journal of Polymer Research*, 2020. **27**: p. 1-12.
111. Silverstein, R.M. and G.C. Bassler, *Spectrometric identification of organic compounds*. *Journal of Chemical Education*, 1962. **39**(11): p. 546.
112. Larkin, P., *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. 2017: Elsevier.
113. Veitch, N.C., *Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme*. *Phytochemistry*, 2004. **65**(3): p. 249-259.
114. Nguyen, D.H., N.Q. Tran, and C.K. Nguyen, *Tetronic-grafted chitosan hydrogel as an injectable and biocompatible scaffold for biomedical applications*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2013. **24**(14): p. 1636-1648.
115. Ho, V.A., et al., *Silver core-shell nanoclusters exhibiting strong growth inhibition of plant-pathogenic fungi*. *Journal of Nanomaterials Green Processing*, 2015. **2015**.
116. Tran, N.Q., et al., *Supramolecular hydrogels exhibiting fast in situ gel forming and adjustable degradation properties*. *Biomacromolecules*, 2010. **11**(3): p. 617-625.
117. Phuong, N.T., et al., *Enzyme-mediated fabrication of an oxidized chitosan hydrogel as a tissue sealant*. *Journal of Bioactive Compatible Polymers*, 2015. **30**(4): p. 412-423.

118. Lee, Y., et al., *In situ forming gelatin-based tissue adhesives and their phenolic content-driven properties*. Journal of Materials Chemistry B, 2013. **1**(18): p. 2407-2414.
119. Nguyen, T.B.T., et al., *Green processing of thermosensitive nanocurcumin-encapsulated chitosan hydrogel towards biomedical application*. Green Processing synthesis, 2016. **5**(6): p. 511-520.
120. Park, K.R. and Y.C. Nho, *Preparation and characterization by radiation of poly (vinyl alcohol) and poly (N-vinylpyrrolidone) hydrogels containing aloe vera*. Journal of applied polymer science, 2003. **90**(6): p. 1477-1485.
121. Wan, W., et al., *BMSCs laden injectable amino-diethoxypropane modified alginate-chitosan hydrogel for hyaline cartilage reconstruction*. Journal of Materials Chemistry B, 2015. **3**(9): p. 1990-2005.
122. Salomonsen, T., et al., *Chemometric prediction of alginate monomer composition: A comparative spectroscopic study using IR, Raman, NIR and NMR*. Carbohydrate Polymers, 2008. **72**(4): p. 730-739.
123. Gómez-Ordóñez, E. and P. Rupérez, *FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds*. Food hydrocolloids, 2011. **25**(6): p. 1514-1520.
124. Kuzmanović, M., et al., *Sodium-alginate biopolymer as a template for the synthesis of nontoxic red emitting Mn 2+-doped CdS nanoparticles*. RSC advances, 2017. **7**(84): p. 53422-53432.
125. Casettari, L., et al., *PEGylated chitosan derivatives: Synthesis, characterizations and pharmaceutical applications*. Progress in Polymer Science, 2012. **37**(5): p. 659-685.
126. Bakarich, S.E., et al., *Three-dimensional printing fiber reinforced hydrogel composites*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2014. **6**(18): p. 15998-16006.
127. Hoffman, A.S., *Hydrogels for biomedical applications*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2001. **944**(1): p. 62-73.
128. Gruber, R., et al., *Fracture healing in the elderly patient*. 2006. **41**(11): p. 1080-1093.

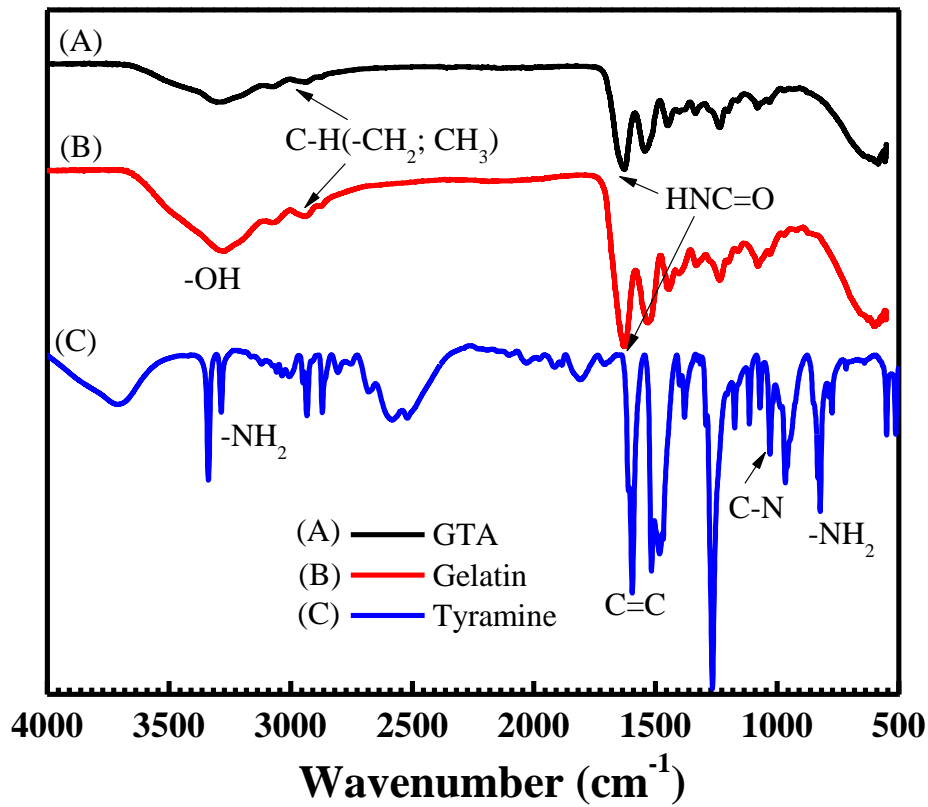
PHỤ LỤC



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



Phụ lục 2. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của GTA trong D_2O



Phụ lục 3. Kết quả phổ FTIR của GTA

Nồng độ (mg/mL)		Độ hấp thu A	
Dung dịch chuẩn TA	Dung dịch polymer GTA	TA	GTA
0,15	0,1	1,08772	0,12105
0,075		0,56313	
0,0375		0,31239	
0,01875		0,19764	
0,009375		0,1112	

Phụ lục 4. Bảng 3.1. Độ hấp thu A ($\lambda = 275$ nm) của dung dịch TA và GTA

Bảng 3.10. Kết quả tính toán lượng TA trong GTA

STT	Đại lượng	Kết quả
1	Độ hấp thu A của GTA	0,12105
2	Nồng độ TA: C_{TA} (mg/mL)	0,00958
3	Khối lượng TA trong 1 mg GTA: m_{TA} (mg)	0,00958
4	Khối lượng TA trong 10 mg GTA: m_{TA} (mg)	0,0958
5	Số mol TA có trong 10 mg GTA: n_{TA} (mmol)	0,000699

Phụ lục 5. Kết quả tính toán lượng TA trong GTA**Bảng 3.11. Kết quả tính toán lượng HPA trong CHPA**

STT	Đại lượng	Kết quả
1	Độ hấp thu A của CHPA	0,48606
2	Nồng độ HPA: C_{HPA} (mg/mL)	0,06828
3	Khối lượng HPA trong 1 mg CHPA: m_{HPA} (mg)	0,06828
4	Khối lượng HPA trong 10 mg CHPA: m_{HPA} (mg)	0,6828
5	Số mol HPA có trong 10 mg CHPA: n_{HPA} (mmol)	0,004492

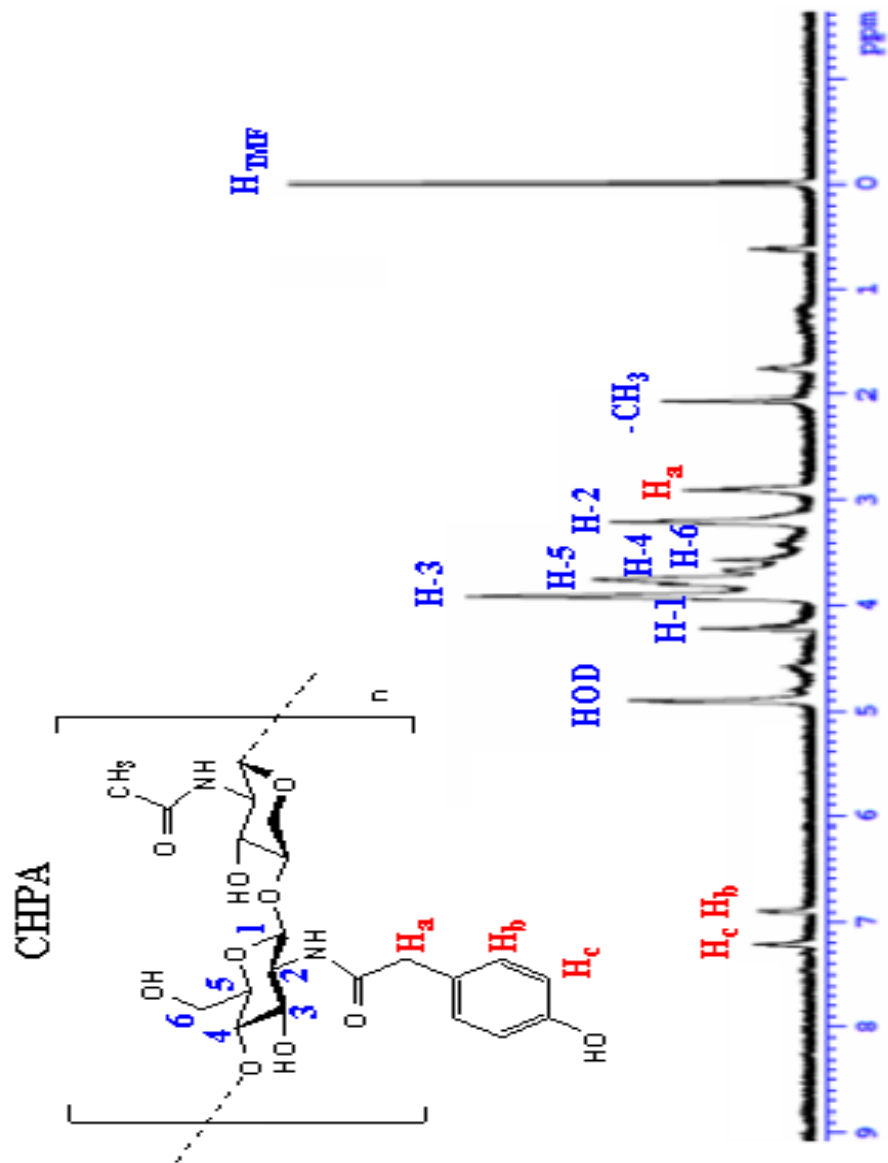
Phụ lục 6. Kết quả tính toán lượng HPA trong CHPA**Bảng 3.12. Kết quả tính toán lượng TA trong ATA**

STT	Đại lượng	Kết quả
1	Độ hấp thu A của ATA	0,0770
2	Nồng độ TA: C_{TA} (mg/mL)	0,0161
3	Khối lượng TA trong 1 mg ATA: m_{TA} (mg)	0,0161
4	Khối lượng TA trong 10 mg ATA: m_{TA} (mg)	0,1614
5	Số mol TA có trong 10 mg ATA: n_{TA} (mmol)	0,0012

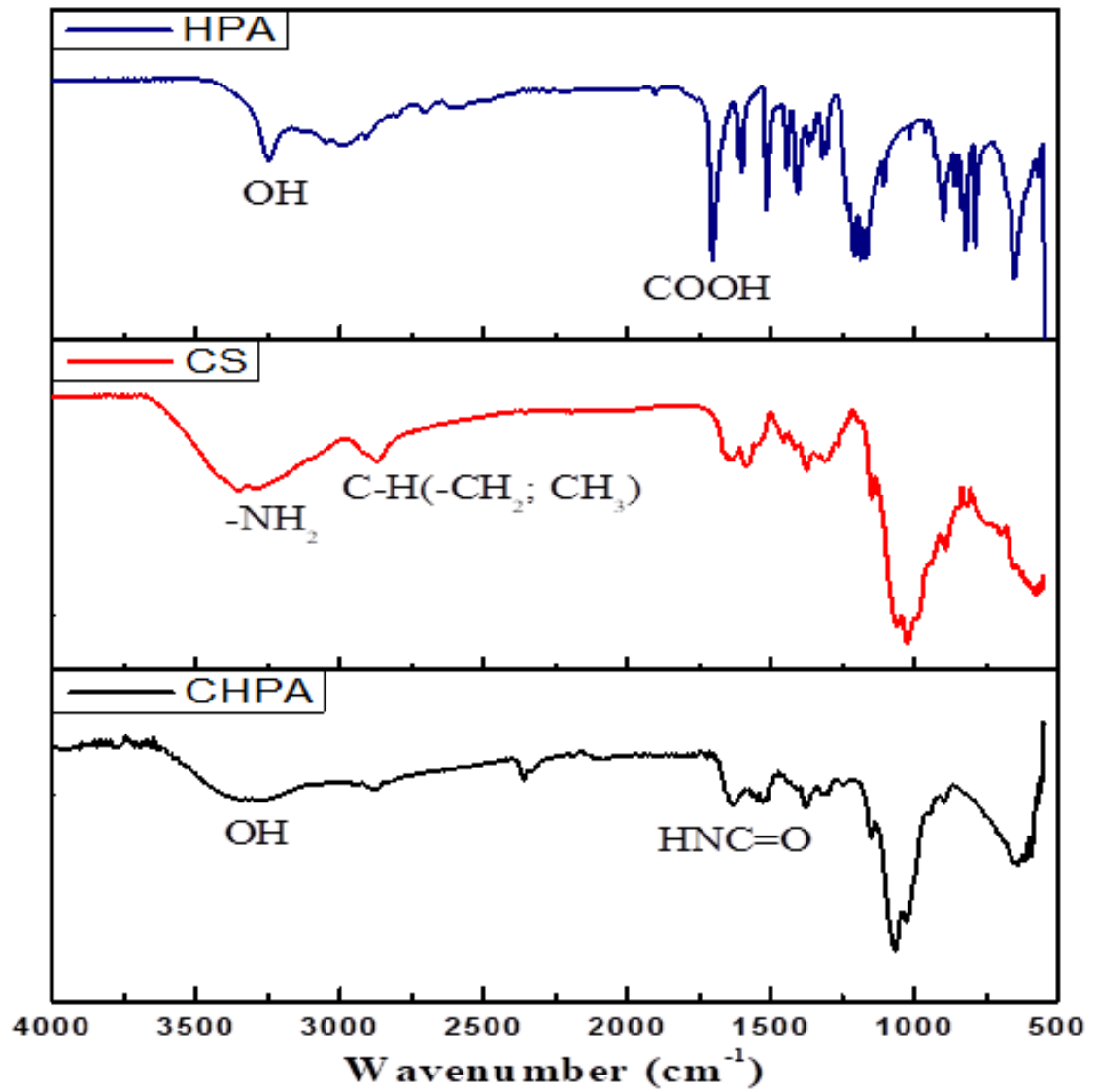
Phụ lục 7. Kết quả tính toán lượng TA trong ATA**Bảng 3.13. Kết quả tính toán lượng TA trong CDTA**

STT	Đại lượng	Kết quả
1	Độ hấp thu A của ATA	0,3168
2	Nồng độ TA: C_{TA} (mg/mL)	0,0662
3	Khối lượng TA trong 1 mg CDTA: m_{TA} (mg)	0,0662
4	Khối lượng TA trong 10 mg CDTA: m_{TA} (mg)	0,6624
5	Số mol TA có trong 10 mg CDTA: n_{TA} (mmol)	0,0048

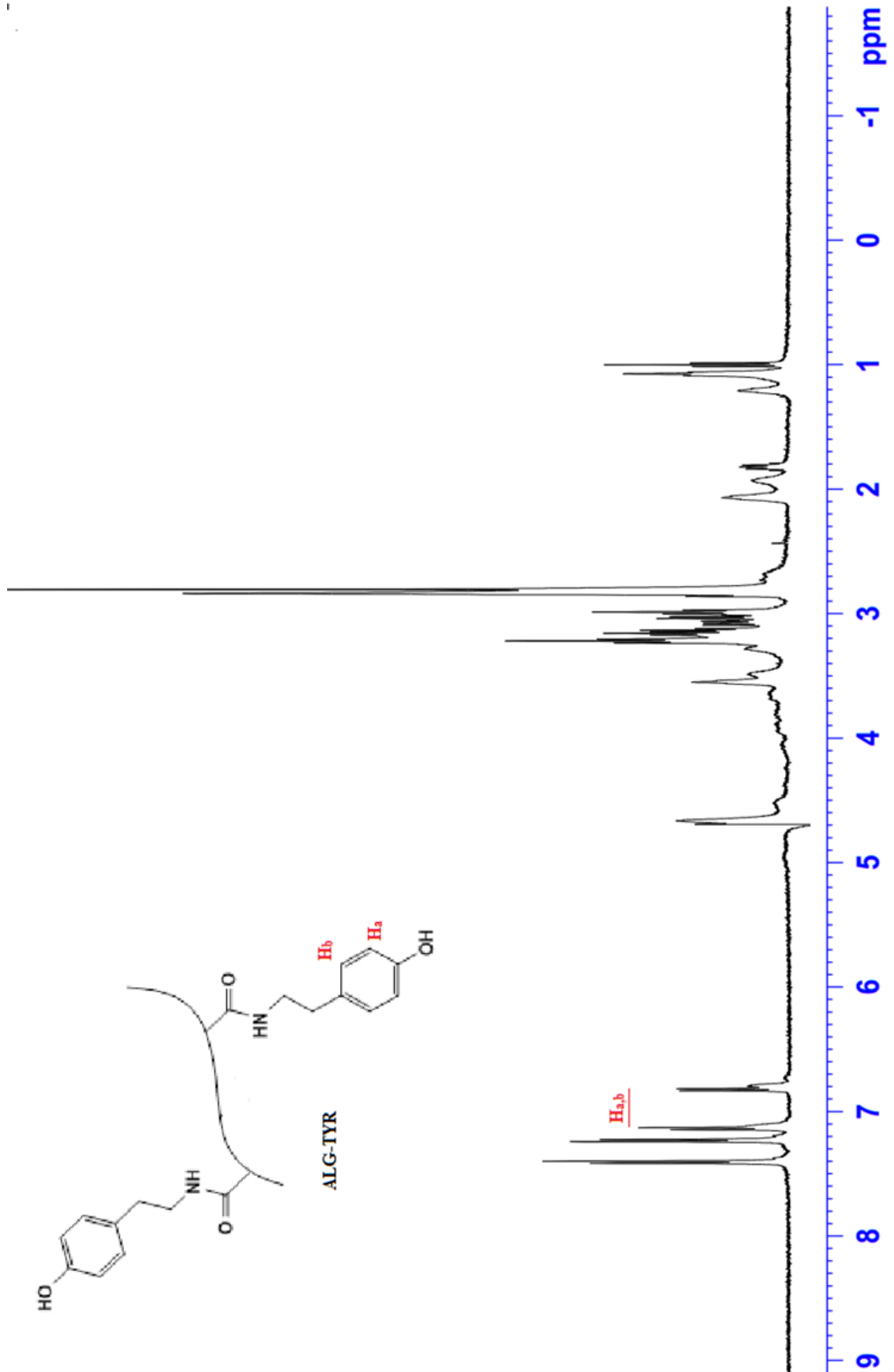
Phụ lục 8. Kết quả tính toán lượng TA trong CDTA



Phụ lục 9. Phổ ¹H-NMR của CHPA trong D₂O



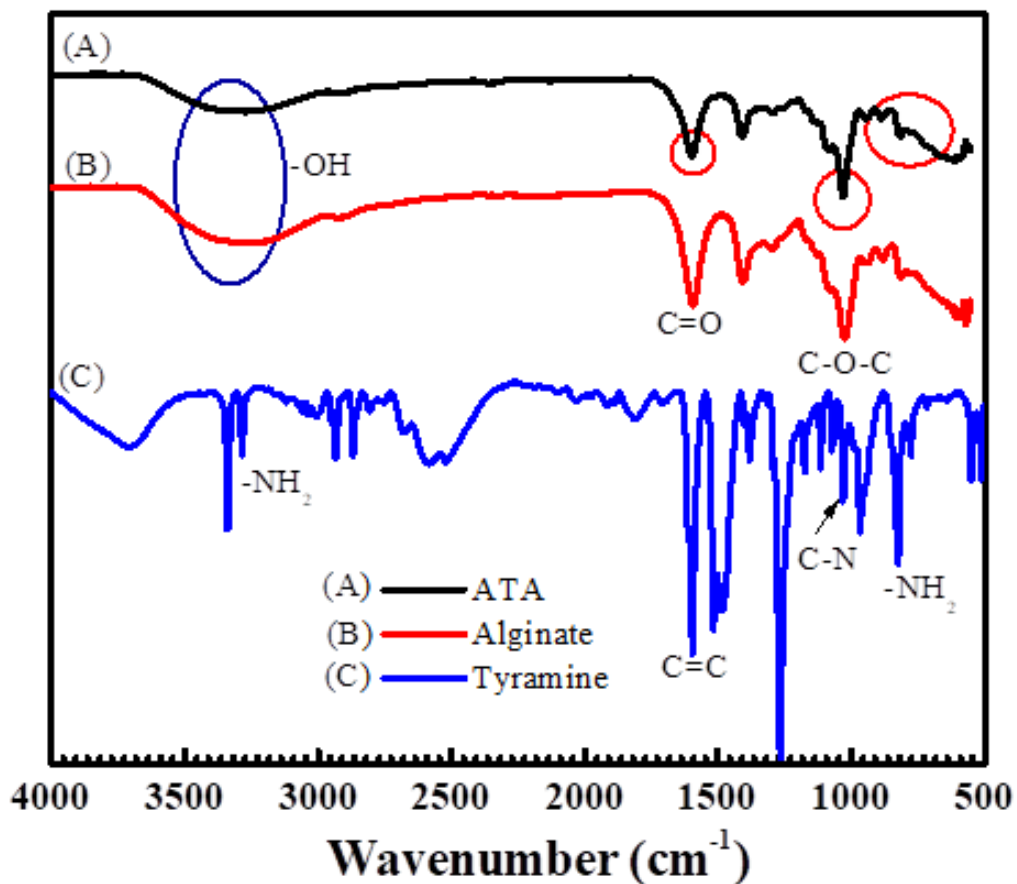
Phụ lục 10. Kết quả phổ FTIR của CHPA



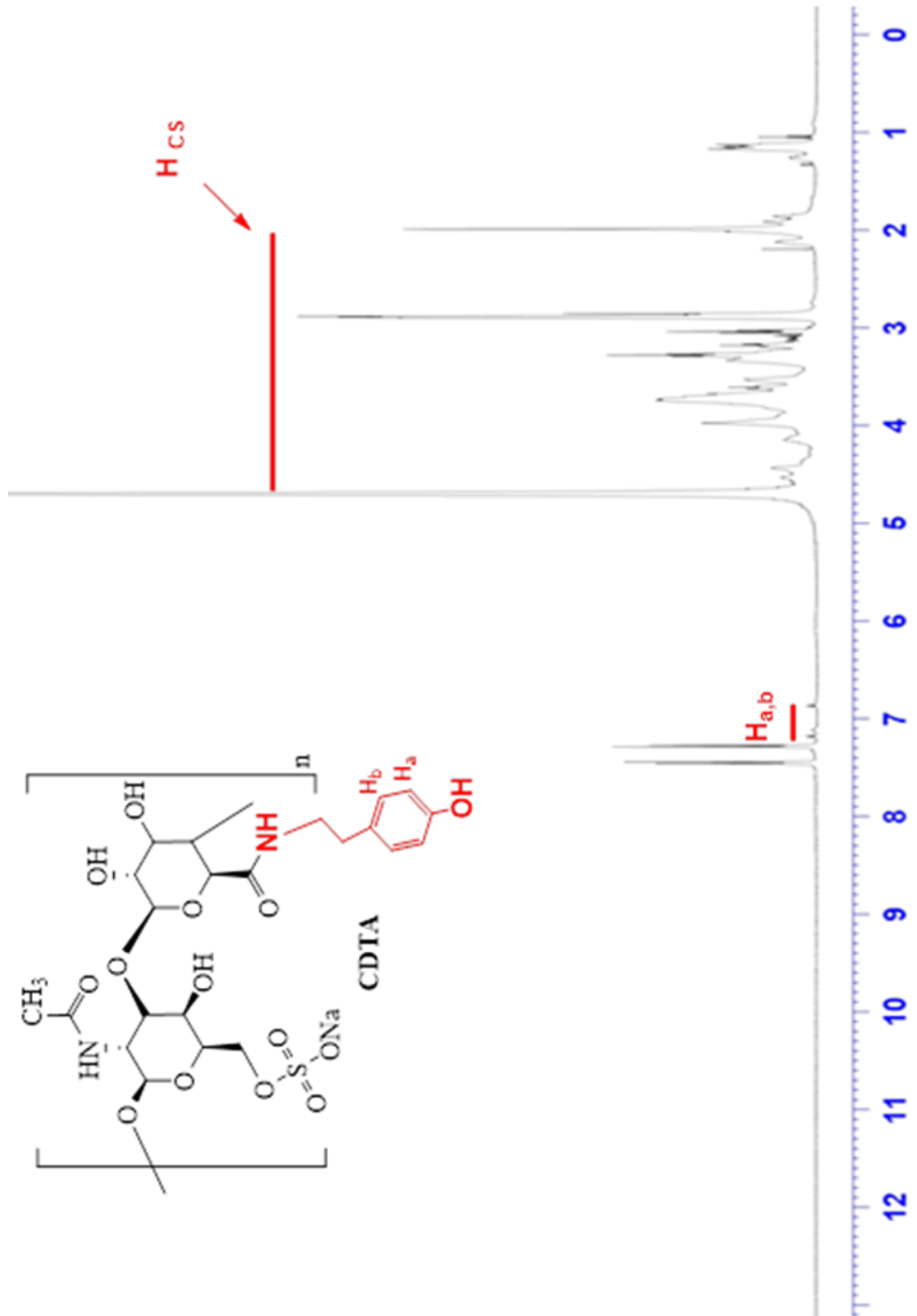
Phụ lục 11. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của ATA trong D_2O

Nồng độ (mg/mL)		Độ hấp thu A	
Dung dịch chuẩn HPA	Dung dịch polymer CHPA	HPA	CHPA
0,15	0,1	1,02196	0,48606
0,075		0,50357	
0,0375		0,28572	
0,01875		0,17911	
0,009375		0,11405	

Phụ lục 12. Độ hấp thu A ($\lambda = 275 \text{ nm}$) của dung dịch HPA và CHPA



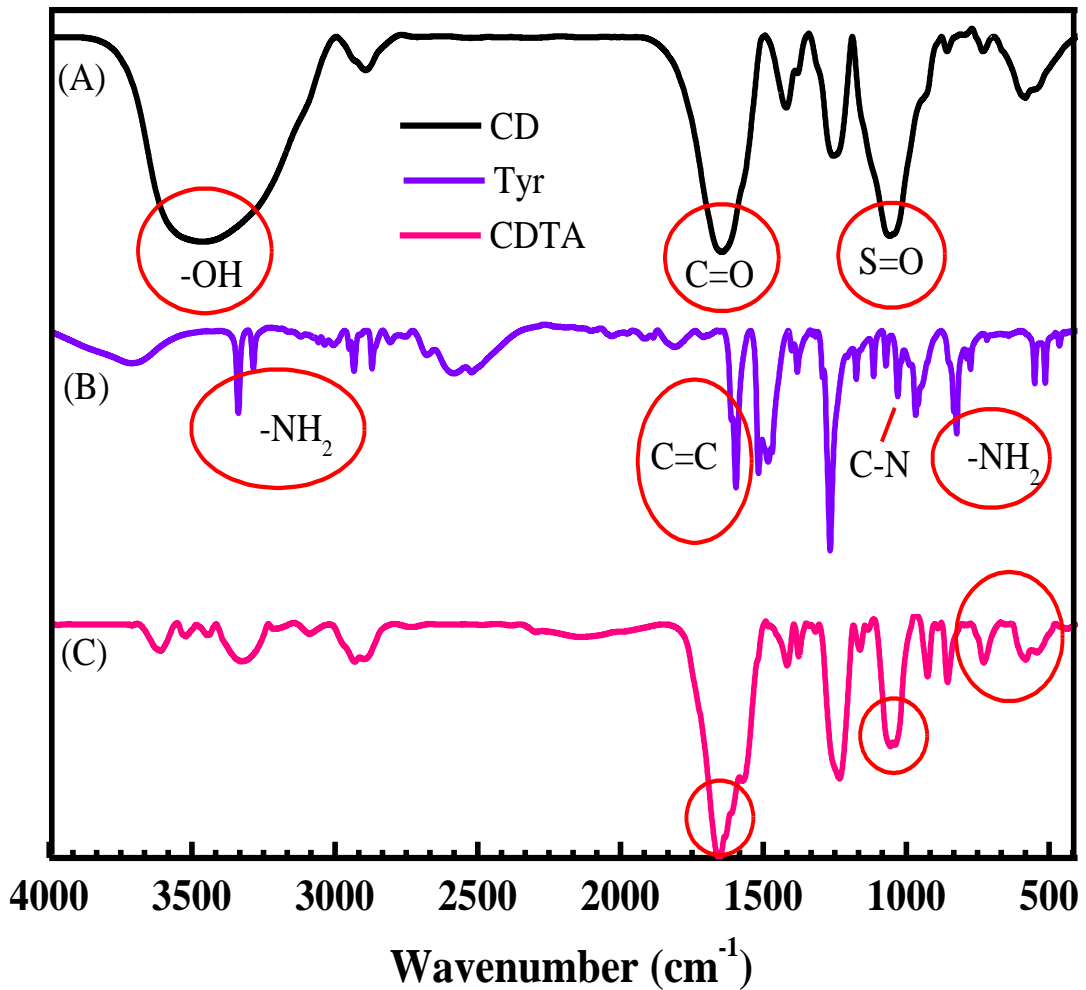
Phụ lục 13. Kết quả phổ FTIR của ATA



Phụ lục 14. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của CDTA trong D_2O

Nồng độ (mg/mL)		Độ hấp thu A	
Dung dịch chuẩn TA	Dung dịch polymer GTA	TA	GTA
0,15	0,1	0,7075	0,077
0,075		0,3626	
0,0375		0,1934	
0,01875		0,1011	
0,009375		0,0538	

Phụ lục 15. Độ hấp thu A ($\lambda = 275 \text{ nm}$) của dung dịch TA và GTA



Phụ lục 16. Kết quả đo phổ FT-IR của CD_Tyr. (A) CD; (B) Tyr; (C) CDTA

Nồng độ (mg/mL)		Độ hấp thu A	
Dung dịch chuẩn TA	Dung dịch polymer CDTA	TA	CDTA
0,15	0,1	0,7075	0,3168
0,075		0,3626	
0,0375		0,1934	
0,01875		0,1011	
0,009375		0,0538	

Phụ lục 17. Độ hấp thu A ($\lambda = 275$ nm) của dung dịch TA và CDTA