

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Trần Hữu Minh

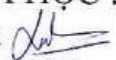

**CHÉ TẠO VẬT LIỆU COMPOSIT TRÊN CƠ SỞ HYDROGEL
CHỨA HYDROXYAPATIT ĐỊNH HƯỚNG
ỨNG DỤNG TÁI TẠO XƯƠNG**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: *Hoá vô cơ*

Mã số: 8440113

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

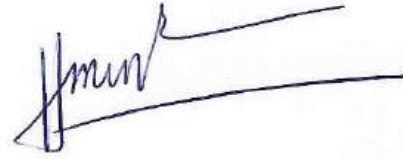
1. TS. Trần Diệu Linh 
2. GS.TS. Nguyễn Đại Hải 

Thành phố Hồ Chí Minh – Năm 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả luận văn ký và ghi rõ họ tên



Nguyễn Trần Hữu Minh

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, em xin gửi lời cảm ơn sâu sắc nhất đến ban Lãnh đạo của Học viện, Phòng đào tạo và các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện và giúp đỡ em trong suốt quá trình học và thực hiện luận văn. Đồng thời, em xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ và giúp đỡ của ban Lãnh đạo cùng các anh chị đồng nghiệp trong Viện Công nghệ Tiên tiến - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Em xin chân thành cảm ơn TS. Trần Diệu Linh và GS.TS. Nguyễn Đại Hải đã giúp đỡ tận tình trong suốt quá trình hoàn thành luận văn. Cô và thầy đã tận tâm chỉ dạy và truyền đạt những kiến thức quý báu để em có thể hoàn thành luận văn thạc sĩ.

Em xin chân thành cảm ơn thầy, cô, tập thể các anh, chị, em trong Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ - Viện Công nghệ tiên tiến - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã nhiệt tình quan tâm và giúp đỡ trong suốt quá trình thực hiện luận văn. Cuối cùng, em xin cảm ơn những người thân trong gia đình đã cho em những điều kiện tốt nhất để em hoàn thành luận văn.

Tp. Hồ Chí Minh, ngày 22 tháng 05 năm 2026

Tác giả



Nguyễn Trần Hữu Minh

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT	v
DANH MỤC CÁC BẢNG	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ VÀ ĐỒ THỊ	vii
MỞ ĐẦU	1
1. Lý do chọn đề tài	1
2. Mục đích nghiên cứu	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
4. Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài	3
5. Những đóng góp của luận văn	3
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	4
1.1. Tổng quan về xương và quá trình chữa lành xương	4
1.1.1. Thành phần và cấu trúc của xương	4
1.1.2. Quá trình chữa lành xương	5
1.2. Tổng quan về cấy ghép xương	8
1.3. Nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà	10
1.4. Hydrogel nền gelatin biến tính axit tannic	12
1.5. Tình hình nghiên cứu	15
1.5.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới	15
1.5.2. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam	17
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	20
2.1. Đối tượng nghiên cứu	20
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	20
2.1.2. Phạm vi nghiên cứu	20
2.2. Phương pháp nghiên cứu	20
2.2.1. Hoá chất, thiết bị và dụng cụ thí nghiệm	20
2.2.2. Phương pháp nghiên cứu	22

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	29
3.1. Tổng hợp nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà.....	29
3.1.1. Đánh giá hiệu quả thu nhận canxi oxit từ vỏ trứng gà.....	29
3.1.2. Đánh giá tính chất hoá lý cơ bản của nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà..	31
3.1.3. Đánh giá khả năng phân huỷ sinh học của nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà.....	35
3.1.4. Thử nghiệm tế bào <i>in vitro</i> đối với nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà.....	36
3.2. Tổng hợp hydrogel nền gelatin biến tính axit tannic.....	37
3.2.1. Tổng hợp polyme gelatin biến tính axit tannic	37
3.2.2. Đánh giá tính chất cơ học, hoá lý cơ bản của hydrogel nền GTA	38
3.2.3. Thử nghiệm tế bào <i>in vitro</i> đối với hydrogel GTA-Co và GTA-Bi.....	41
3.3. Chế tạo vật liệu nanocomposit hydrogel nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà kết hợp với hydrogel gelatin biến tính axit tannic liên kết ngang bằng Bi^{3+}	44
3.3.1. Đánh giá tính chất cơ học, hoá lý cơ bản của nanocomposit HGB.....	44
3.3.2. Đánh giá hoạt tính sinh học của nanocomposit HGB	50
3.3.3. Thử nghiệm tế bào <i>in vitro</i> đối với nanocomposit HGB.....	54
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	60
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	62

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Diễn giải đầy đủ	
	Tiếng Anh	Tiếng Việt
BAP	Bioapatite	Apatit sinh học
BMSC	Bone marrow mesenchymal stromal cells	Tế bào gốc trung mô tủy xương
CES	Calcined eggshell	Vỏ trứng nung
Col I	Collagen type I	Collagen loại I
DI	Deion water	Nước khử ion
DLS	Dynamic light scattering	Tán xạ ánh sáng động
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline	Dung dịch đệm phosphate
EDX	Energy Dispersive X-ray spectroscopy	Phổ tán sắc năng lượng tia X
ESP	Eggshell powder	Bột vỏ trứng
FBS	Fetal bovine serum	Huyết thanh bào thai bò
FTIR	Fourier transform infrared	Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier
Gel	Gelatin	
GTA	Gelatin-tannic acid	Gelatin-axit tannic
HGB	Nano hydroxyapatite/Gelatin-tannic acid/Bismuth	Nano hydroxyapatit/Gelatin-axit tannic/Bismuth
NDI		Nồng độ ion
nHA	Nano hydroxyapatite	Nano hydroxyapatit
nHAE	Nano hydroxyapatite from hen eggshell	Nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà
IK		Ion kim loại
PVA	Polyvinyl alcohol	
SBF	Stimulated body fluid	Giả dịch thể người
SEM	Scanning Electron Microscopy	Kính hiển vi điện tử quét
TA	Tannic acid	Axit tannic
TCP	Tricalcium phosphate	Tricanxi photphat
TGA	Thermogravimetric analysis	Phân tích nhiệt trọng lượng
TGTG		Thời gian tạo gel
TTG		Trạng thái gel
XRD	X-ray diffraction	Nhiều xạ tia X

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1 Bảng danh mục hoá chất sử dụng trong nghiên cứu	20
Bảng 2 Bảng danh mục trang thiết bị sử dụng trong nghiên cứu	22

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ VÀ ĐỒ THỊ

Hình 1.1 Hình ảnh minh họa cấu trúc cơ bản của mô xương: A) Cấu trúc phân cấp của xương; B) Đặc điểm giải phẫu của xương; và C) Thành phần nguyên tố của xương	5
Hình 1.2 Sơ đồ tóm tắt các giai đoạn trong quá trình lành xương.....	6
Hình 1.3 Hình minh họa các vật liệu cấy ghép xương truyền thống	9
Hình 1.4 Cơ chế của con đường truyền tín hiệu của nano hydroxyapatit đến quá trình biệt hoá tạo xương	10
Hình 1.5 Hình ảnh cấu trúc nguyên tử của hydroxyapatit pha tạp ion. A) Hình ảnh theo trục c, và B) Hình ảnh vuông góc với trục c.....	11
Hình 1.6 Sự liên kết giữa trình tự Arg-Gly-Asp trên gelatin với tế bào hỗ trợ cho quá trình bám dính, tăng sinh và biệt hoá.....	13
Hình 1.7 Cơ chế phản ứng tổng hợp gelatin biến tính axit tannic	14
Hình 1.8 Sơ đồ nghiên cứu của các hệ composit mô phỏng pha vô cơ và hữu cơ của xương người. A) Composit hydrogel dựa trên gelatin, alginate và nHA; B) ; Composit dựa trên gelatin, polyvinyl alcohol, alginate và nHA; C) Composit hydrogel dựa trên methacrylate – silk fibroin kết hợp với nHA; D) Composit dựa trên gelatin, chitosan, polyvinyl alcohol và nHA; và E) Gelatin methacrylate, hyaluronic acid methacrylate, nHA và exosome có nguồn gốc từ tế bào gốc nước tiểu người	17
Hình 1.9 Sơ đồ nghiên cứu của các hệ vật liệu ứng dụng tái tạo mô. A) Canxi photphat kép; B) Composit trên cơ sở beta-tricalcanxi photphat, alpha-canxi sunphat hemihydrat và hydroxyapatit; C) Hydrogel gelatin – axit tannic liên kết ngang bởi ion vàng; D) Hydrogel gelatin – axit tannic liên kết ngang bằng ion đồng; và E) Composit trên cơ sở cacboxymethyl chitosan, oxidized xathan gum và canxi photphat kép.....	19
Hình 3.1 Kết quả đánh giá hoá lý của các mẫu vỏ trứng nung. A) Phổ FTIR, B) Phổ TGA và C) Ảnh SEM – phổ EDX mapping	30
Hình 3.2 Kết quả đánh giá tính chất hoá lý của nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà. A) Phổ FTIR, B) Đường cong DLS, và C) Giản đồ XRD	33
Hình 3.3 Hình ảnh SEM của nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà trước và sau khi được xử lý sóng siêu âm. Phổ EDX và hình ảnh mapping của nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà.....	34
Hình 3.4 Kết quả đánh giá khả năng phân huỷ sinh học của nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà trong môi trường giả dịch thể người.....	35
Hình 3.5 Kết quả đánh giá tính tương thích tế bào và khả năng hỗ trợ tăng sinh tế bào của nano hydroxyapatit thông qua A) Độ hấp thụ của formazan ở 570 nm và B) Hình ảnh tế bào L929 dưới kính hiển vi soi ngược	36
Hình 3.6 Kết quả đánh giá hiệu quả tổng hợp polyme gelatin biến tính axit tannic. A) Phổ UV-vis và B) Phổ FTIR.....	37

Hình 3.7 Kết quả khảo sát thời gian tạo gel và trạng thái gel của polyme gelatin biến tính axit tannic với một số ion kim loại. A) Đồ thị thể hiện sự ảnh hưởng của nồng độ của một số ion kim loại đến thời gian tạo gel và B) Hình ảnh ống nghiệm đảo ngược	39
Hình 3.8 Phổ FTIR của các mẫu hydrogel gelatin biến tính axit tannic	40
Hình 3.9 Đồ thị thể hiện khả năng phân huỷ sinh học. A) GTA-Co và B) GTA-Bi	41
Hình 3.10 Kết quả đánh giá độc tính tế bào của GTA-Co thông qua A) Tỷ lệ tế bào sống sót và B) Hình ảnh tế bào dưới kính hiển vi soi ngược	42
Hình 3.11 Kết quả đánh giá độc tính tế bào của GTA-Bi thông qua A) Tỷ lệ tế bào sống sót và B) Hình ảnh tế bào dưới kính hiển vi soi ngược	43
Hình 3.12 Đồ thị thể hiện thời gian tạo gel của hệ nanocomposit hydrogel HGB	44
Hình 3.13 A, B) Kết quả đánh giá FTIR của các mẫu nanocomposit hydrogel HGB	45
Hình 3.14 Hình ảnh SEM, phổ EDX và hình ảnh mapping của GTA-Bi50, HGB10, HGB50, và HGB100	47
Hình 3.15 Đồ thị thể hiện mô đun đàn hồi của hydrogel GTA-Bi và nanocomposit hydrogel HGB	48
Hình 3.16 Hình ảnh trực quan đánh giá khả năng bám dính của nanocomposit hydrogel HGB trên các bề mặt mô sinh học khác nhau	50
Hình 3.17 Đồ thị thể hiện khả năng phân hủy sinh học của vật liệu nanocomposit hydrogel HGB trong môi trường DPBS chứa enzym collagenase	51
Hình 3.18 Kết quả đánh giá khả năng kháng oxi hóa của nanocomposit hydrogel HGB thông qua thử nghiệm DPPH. A) Đồ thị thể hiện tỷ lệ bắt gốc tự do và B) Hình ảnh trực quan sự mất màu của dung dịch DPPH	52
Hình 3.19 Đồ thị thể hiện sự tăng trưởng của vi khuẩn trong môi trường đồng nuôi cấy với mẫu vật liệu composit hydrogel HGB. A) <i>Staphylococcus aureus</i> và B) <i>Escherichia coli</i>	54
Hình 3.20 Kết quả đánh giá tính tương thích tế bào và khả năng hỗ trợ tăng sinh của nanocomposit hydrogel HGB thông qua B) Độ hấp thụ quang học tại 570 nm và C) Hình ảnh tế bào L929 dưới kính hiển vi soi ngược	55
Hình 3.21 Kết quả thử nghiệm khả năng di chuyển tế bào của nanocomposit hydrogel HGB	57
Hình 3.22 Hình ảnh mật độ tế bào và hình thái tế bào gốc xương dưới kính hiển vi soi ngược sau khi được đồng nuôi cấy với dịch chiết của của nanocomposit hydrogel HGB và nhuộm với Alizarin Red S	59

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Khiếm khuyết xương vẫn luôn là một tình trạng bệnh lý phổ biến trong lĩnh vực y học. Đặc biệt là các trường hợp khiếm khuyết xương nghiêm trọng do các bệnh lý như u xương, loãng xương, hoặc tai nạn giao thông khiến cho xương mất đi khả năng tự chữa lành. Các phương pháp điều trị truyền thống như cấy ghép xương tự thân, đồng loài và dị loài tuy có thể mang lại hiệu quả nhất định tuy nhiên vẫn tồn tại nhiều hạn chế như thiếu nguồn cung, nguy cơ tiềm ẩn về truyền nhiễm bệnh và bị đào thải bởi hệ miễn dịch. Do đó, việc phát triển các vật liệu sinh học thay thế có khả năng hỗ trợ quá trình tái tạo xương hiệu quả đã và đang là một hướng nghiên cứu được quan tâm rộng rãi trên toàn thế giới. Xương tự nhiên là một cấu trúc composit vô cơ – hữu cơ phức tạp, trong đó pha vô cơ chủ yếu là hydroxyapatit (HA) đóng vai trò cung cấp độ cứng và khả năng chịu lực, trong khi pha hữu cơ chủ yếu là collagen tạo nên tính đàn hồi và môi trường thuận lợi cho hoạt động tế bào. Sự phối hợp hài hòa giữa hai pha này đóng vai trò quyết định đối với cấu trúc, cơ tính và chức năng sinh học của mô xương. Vì vậy, việc thiết kế các hệ vật liệu có khả năng mô phỏng cấu trúc composit tự nhiên của xương được xem là một chiến lược đầy tiềm năng trong lĩnh vực tái tạo mô xương.

Trong số các loại vật liệu sinh học, gốm sinh học và đặc biệt là HA được xem là một trong những vật liệu nền tảng trong tái tạo xương nhờ thành phần hoá học và cấu trúc tương tự với pha khoáng của xương tự nhiên. Từ lâu, HA đã được chứng minh là có tính tương thích sinh học cao, khả năng dẫn tạo xương hiệu quả và hỗ trợ tốt cho quá trình khoáng hoá. Đặc biệt, HA ở kích thước nano sẽ mô phỏng được kích thước thực tế của pha khoáng trong xương tự nhiên, đồng thời cho thấy khả năng tương tác tốt hơn với tế bào và cải thiện tính chất sinh học của vật liệu. Tuy nhiên, HA nhìn chung vẫn có một số nhược điểm như tính giòn, và khó tạo hình trong các ứng dụng lâm sàng phức tạp.

Để khắc phục những hạn chế này, một hướng tiếp cận được xem là tiềm năng là kết hợp HA với các polyme sinh học nhằm tạo thành hệ vật liệu composit vô cơ - hữu cơ. Trong đó, vật liệu hydrogel dựa trên nền các polyme tự nhiên như collagen, gelatin hay chitosan,... rất được quan tâm nhờ tính tương thích sinh học cao, khả năng phân huỷ sinh học tốt và có cấu trúc tương tự với chất nền ngoại bào, từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho tế bào bám dính và phát triển. Tuy nhiên, các vật liệu hydrogel thường có độ bền cơ học thấp và thiếu đi khả năng hỗ trợ tái tạo xương hiệu quả. Do đó, việc gia cường vật liệu hydrogel bằng pha vô cơ và đặc biệt là HA để nâng cao hiệu quả ứng dụng được xem là điều cần thiết. Bên cạnh đó, việc biến tính các polyme sinh học bằng các hợp chất giàu nhóm chức như axit gallic hoặc axit tannic được chú ý như một chiến lược hiệu quả nhằm cải thiện tính chất của hệ vật liệu. Các hợp chất giàu polyphenol này

không chỉ có khả năng tạo liên kết hydro mà còn có khả năng hình thành liên kết phối trí với ion kim loại, từ đó tăng cường mật độ liên kết ngang và độ ổn định của mạng lưới hydrogel. Đồng thời, việc lựa chọn ion kim loại phù hợp còn có thể mang lại các tính chất chức năng bổ sung như khả năng kháng khuẩn hay khả năng hỗ trợ quá trình tái tạo xương.

Trong bối cảnh đó, đề tài này tập trung vào việc phát triển một hệ vật liệu nanocomposit hydrogel dựa trên sự kết hợp giữa hydroxyapatit kết hợp với hydrogel nền gelatin liên kết ngang bằng ion kim loại. Cách tiếp cận này không chỉ tận dụng được tính chất sinh học của HA trong vai trò vô cơ mà còn khai thác khả năng tạo mạng linh hoạt và đa chức năng của hydrogel, từ đó hướng tới việc xây dựng một hệ vật liệu mô phỏng cấu trúc vô cơ - hữu cơ của xương tự nhiên và có tiềm năng ứng dụng trong tái tạo xương.

2. Mục đích nghiên cứu

Phát triển hệ vật liệu nanocomposit hydrogel trên cơ sở nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà và hydrogel nền gelatin biến tính axit tannic, có bổ sung ion Bi^{3+} nhằm mô phỏng hệ đa thành phần của mô xương tự nhiên, định hướng trong ứng dụng tái tạo mô xương.

Mục tiêu nghiên cứu cụ thể :

- Thu nhận nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà (nHAE) có thành phần, cấu trúc tinh thể và đặc tính bề mặt tương đồng với khoáng xương tự nhiên.
- Chế tạo thành công vật liệu composit nHAE/Gel-TA liên kết ngang bằng ion Bi^{3+} với độ bền cơ học, độ ổn định cấu trúc và động học phân huỷ phù hợp cho môi trường tái tạo xương.
- Xác lập tính tương thích sinh học và khả năng hỗ trợ các đáp ứng tế bào *in vitro*, hướng tới tiềm năng ứng dụng trong tái tạo mô xương.

3. Nội dung nghiên cứu

Luận văn bao gồm 3 nội dung chính:

Nội dung 1: Tổng hợp nano hydroxyapatit vỏ trứng (nHAE)

- Công việc 1.1: Xây dựng quy trình và tổng hợp nHAE
- Công việc 1.2: Đánh giá tính chất hoá lý cơ bản của nHAE
- Công việc 1.3: Thử nghiệm tế bào *in vitro* đối với nHAE

Nội dung 2: Tổng hợp hydrogel nền gelatin (Gel)

- Công việc 2.1: Tổng hợp hydrogel nền gelatin
- Công việc 2.2: Đánh giá tính chất cơ học, hoá lý cơ bản của Gel
- Công việc 2.3: Thử nghiệm tế bào *in vitro* đối với Gel

Nội dung 3: Chế tạo vật liệu composit nHAE kết hợp hydrogel nền gelatin bổ sung ion kim loại (nHAE/Gel-MI)

- Công việc 3.1: Xây dựng quy trình và tổng hợp vật liệu composit nHAE/Gel-MI
- Công việc 3.2: Đánh giá tính chất cơ học, hoá lý cơ bản của vật liệu composite nHAE/Gel-MI
- Công việc 3.3: Đánh giá hoạt tính sinh học của nHAE/Gel-MI
- Công việc 3.4: Thử nghiệm tế bào *in vitro* đối với nHAE/Gel-MI

4. Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài

Đề tài dựa trên nguyên lý là kết hợp giữa các thành phần vô cơ và hữu cơ để mô phỏng lại các pha thành phần trong xương tự nhiên. Hydroxyapatit là vật liệu có thành phần và cấu trúc tương tự như pha khoáng của xương tự nhiên, có khả năng tương thích sinh học và dẫn tạo xương tốt. Trong khi đó, gelatin là một dạng polyme thuỷ phân của collagen, nó có cấu trúc và tính chất tương đối giống với pha hữu cơ trong xương tự nhiên. Đồng thời, trên bề mặt của gelatin có các nhóm chức dễ phản ứng với các nhóm chức năng làm cơ sở cho việc chế tạo hydrogel đa chức năng tùy theo hệ vật liệu muốn hướng tới những tính chất cụ thể cho từng vị trí xương thương tổn. Vậy nên, việc kết hợp nano hydroxyapatit và hydrogel nền gelatin có thể cải thiện về tính chất cơ học và hoạt tính sinh học của hệ vật liệu.

Tính thực tiễn của đề tài nằm ở chỗ vật liệu composit hydrogel có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực tái tạo xương nhờ khả năng phân huỷ sinh học, tương thích tế bào và hỗ trợ quá trình tái tạo xương. Bên cạnh đó, việc sử dụng các nguồn nguyên liệu tự nhiên như gelatin và nano hydroxyapatit từ nguồn tự nhiên có thể giúp giảm chi phí và tăng tính thân thiện môi trường, phù hợp với định hướng phát triển vật liệu y sinh xanh, an toàn và hiệu quả.

5. Những đóng góp của luận văn

Luận văn sẽ đóng góp quy trình chế tạo vật liệu composit trên nền hydrogel gelatin kết hợp với nano hydroxyapatit. Đồng thời cung cấp các cơ sở về việc đánh giá các tính chất hoá lý và sinh học của vật liệu. Kết quả nghiên cứu sẽ góp phần cung cấp thêm cơ sở khoa học cho việc phát triển các hệ vật liệu composit nano hydroxyapatit với hydrogel trong lĩnh vực y sinh tại Việt Nam.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

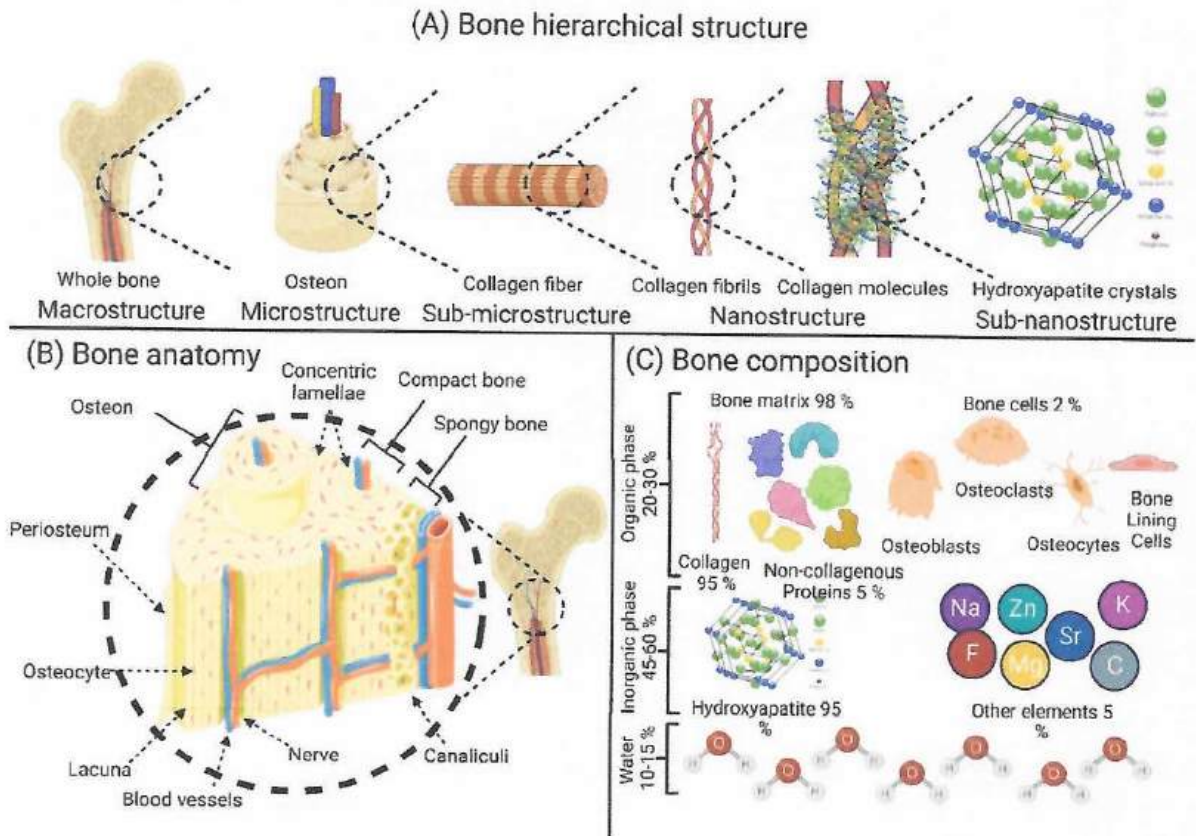
1.1. Tổng quan về xương và quá trình chữa lành xương

1.1.1. Thành phần và cấu trúc của xương

Mô xương được xem như một dạng mô liên kết chuyên biệt có mức độ khoáng hoá cao. Loại mô này đảm nhận nhiều chức năng quan trọng đối với cơ thể như nâng đỡ cấu trúc, bảo vệ các cơ quan nội tạng và hỗ trợ hệ vận động. Bên cạnh đó, xương còn là nguồn dự trữ chính của các khoáng chất như canxi và photphat. Đồng thời, tuỷ xương cũng được lưu trữ ở xương, và là cơ quan tham gia vào quá trình tạo máu [1]. Về thành phần hoá học, xương là loại vật liệu đa pha tự nhiên, bao gồm 45 – 60% khối lượng là thành phần vô cơ, 20 – 30% là thành phần hữu cơ và còn lại là nước, như được mô tả trong Hình 1.1 C. Trong đó, pha hữu cơ chủ yếu được cấu thành từ collagen loại I với cấu trúc xoắn ba đặc trưng, tạo nên bộ khung nền cho mô xương [2]. Ngoài collagen, thành phần hữu cơ còn bao gồm một lượng nhỏ các protein không collagen như các glycoprotein và proteoglycan đặc hiệu của mô xương. Các protein này đóng vai trò quan trọng trong việc điều hoà quá trình khoáng hoá cũng như tương tác giữa các tế bào và chất nền ngoại bào. Ngoài ra, một số yếu tố tăng trưởng cũng được tìm thấy trong thành phần này, mặc dù chiếm tỉ lệ rất nhỏ nhưng có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt động của tế bào xương [3]. Thành phần vô cơ của xương chủ yếu là HA với công thức hoá học là $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Các tinh thể HA trong xương không hoàn toàn đồng nhất mà có thể thay đổi về thành phần và kích thước theo thời gian, từ đó ảnh hưởng đến các tính chất sinh học và cơ học của mô xương [4].

Mô xương là một hệ thống động, được đặc trưng bởi hoạt động tái cấu trúc liên tục suốt đời thông qua sự phối hợp của các tế bào chuyên biệt như nguyên bào xương – tế bào tạo xương (osteoblast), tế bào huỷ xương (osteoclast), tế bào xương trưởng thành (osteocyte) và tế bào lót xương (bone lining cell). Hoạt động này diễn ra nhằm cân bằng giữa quá trình hình thành và tiêu huỷ mô xương [5]. Nguyên bào xương chiếm 4 – 6% tế bào xương (bone cell), chịu trách nhiệm chính trong việc tổng hợp nhiều loại protein như collagen loại I, osteonectin, osteopontin (OPN), protein γ -carboxy, osteocalcin (OCN), proteoglycan và phosphatase kiềm (ALP). Đồng thời, tiết ra nhiều yếu tố tăng trưởng như yếu tố tăng trưởng chuyển đổi β (TGF- β), yếu tố tăng trưởng giống insulin I và II (IGF-I và IGF-II) và protein hình thái xương (BMP) [6]. Tế bào xương trưởng thành chiếm phần lớn trong tổng số tế bào xương, khoảng 90 – 95%, tồn tại chủ yếu trên bề mặt xương, nơi mô xương tương đối ổn định. Các tế bào này thực hiện một số chức năng trong quá trình cầm máu ở xương như điều hoà hoạt động của nguyên bào xương và tế bào huỷ xương, điều hoà cân bằng photphat, cảm biến ứng suất cơ học cục bộ và điều hoà tín hiệu tế bào. Đóng vai trò quan trọng trong việc cảm nhận cơ học, điều hoà hoạt động của các tế bào và duy trì cân bằng nội môi khoáng chất [6]. Trong khi đó, tế

bào lót xương tham gia điều chỉnh quá trình trao đổi khoáng chất giữa xương và môi trường xung quanh [6]. Các tế bào hủy xương giữ vai trò then chốt trong giai đoạn đầu của quá trình tái tạo xương bởi khả năng thực bào chất nền xương cũ hoặc bị hư hỏng để tạo không gian cho quá trình hình thành xương mới diễn ra [6]. Sự phối hợp của các tế bào xương giúp xương có khả năng tự tái tạo liên tục.



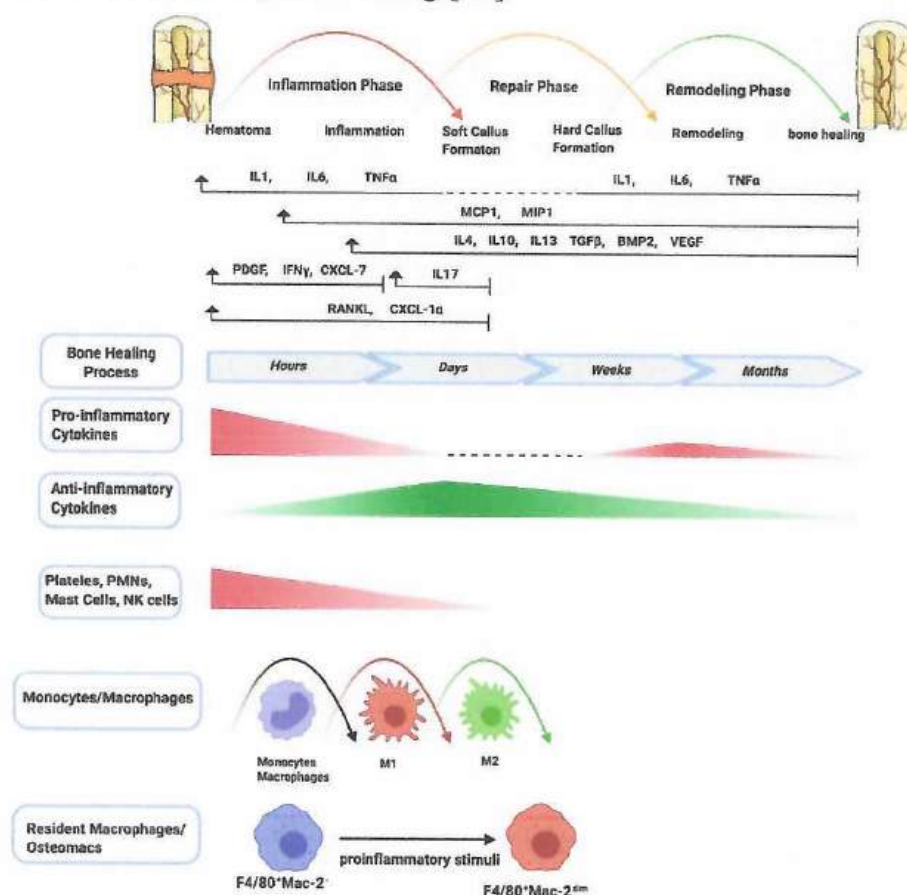
Hình 1.1 Hình ảnh minh họa cấu trúc cơ bản của mô xương: A) Cấu trúc phân cấp của xương; B) Đặc điểm giải phẫu của xương; và C) Thành phần nguyên tố của xương [7]

Xương có cấu trúc phân cấp phức tạp từ cấp độ vĩ mô (micro) đến vi mô (nano). Ở cấp độ vĩ mô, xương được chia thành hai loại chính là xương đặc (xương vỏ) và xương xốp (xương bè). Đối với các xương dài (xương đùi, xương chày...), cấu trúc xương thường bao gồm xương bè bên trong được bao bọc bởi xương vỏ bên ngoài, trong khi cấu trúc của xương dẹt (xương sọ,...) có cấu trúc dạng lớp với lớp xương bè nằm giữa hai lớp xương vỏ [8]. Ở cấp độ vi mô, các sợi collagen được gia cường bởi các hạt HA và đều dao động ở kích thước vài chục nanomet, gọi là collagen khoáng hoá. Các sợi này được sắp xếp trong các cấu trúc mặt phẳng gọi là phiến mỏng (lamellae), sau đó được sắp xếp đồng tâm xung quanh kênh Haversian và song song với trục dọc của xương được gọi là osteon [9]. Cấu trúc phân cấp và thành phần của xương như được thể hiện trong Hình 1.1 A và B.

1.1.2. Quá trình chữa lành xương

Quá trình lành xương là một cơ chế tái tạo sinh học phức tạp, có thể được chia thành hai dạng chính gồm lành xương nguyên phát (trực tiếp) và lành xương thứ phát

(gián tiếp). Trong đó, lành xương nguyên phát chỉ xảy ra trong điều kiện vị trí gãy xương cũng như các mảnh xương được cố định tuyệt đối và hầu như không được dịch chuyển. Khi đó, sự tái tạo sẽ được diễn ra thông qua sự hình thành trực tiếp các kênh Haversian, tương tự như quá trình tái cấu trúc xương sinh lý. Loại lành xương này thường diễn ra chậm và kéo dài từ vài tháng đến vài năm, đồng thời phản ứng viêm hầu như không xuất hiện trong quá trình này [10]. Ngược lại, quá trình lành xương thứ phát là hình thức phổ biến hơn trong các trường hợp gãy xương trên thực tế. Quá trình này bao gồm ba giai đoạn chính và giữa các giai đoạn này thường có sự chồng chéo nhất định, như được thể hiện trong Hình 1.2. Ba giai đoạn này bao gồm giai đoạn viêm, giai đoạn sửa chữa và giai đoạn tái tạo. Trong đó, phản ứng viêm ban đầu đóng vai trò quyết định đến hiệu quả lành xương trong giai đoạn cuối cùng. Hơn nữa, các tế bào miễn dịch cùng với tế bào gốc trung mô có nguồn gốc tuỷ xương tham gia tích cực vào quá trình tương tác tế bào, từ đó điều hoà tiến trình tái tạo mô xương [11].



Hình 1.2 Sơ đồ tóm tắt các giai đoạn trong quá trình lành xương [12]

Giai đoạn viêm bắt đầu ngay sau khi khiếm khuyết xương xuất hiện. Sự phá vỡ mạch máu tại vị trí gãy xương dẫn đến hình thành các khối máu tụ, tạo ra một môi trường vi mô đặc trưng bởi tình trạng thiếu oxy, pH thấp, nhiệt độ giảm nhẹ, đồng thời chứa nồng độ cao các ion canxi và sản phẩm chuyển hoá như axit lactic. Các khối máu tụ này đóng vai trò như một giá đỡ sinh học cho các tế bào viêm tập trung và các loại cytokine như IL-1, IL-6, TNF- α và CCL2, từ đó khởi phát phản ứng viêm [13]. Ban đầu, các

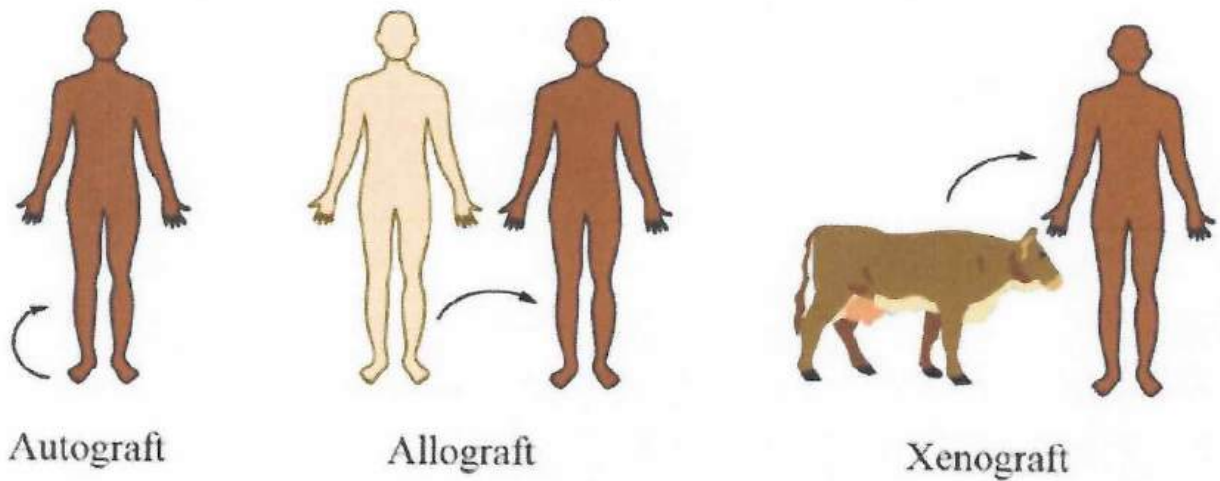
bạch cầu trung tính được huy động đến vị trí tổn thương, tiếp theo là sự xâm nhập của đại thực bào và các tế bào đơn nhân [14]. Các đại thực bào trong thời gian đầu chủ yếu tồn tại ở kiểu hình M1, tham gia vào quá trình loại bỏ mô chết và các mảnh vụn. Sau đó, phản ứng miễn dịch chuyển dần sang giai đoạn thích ứng với sự tham gia của tế bào lympho vào vị trí gãy xương. Bạch cầu trung tính và đại thực bào sau khi thực hiện nhiệm vụ dọn sạch các tế bào chết và mảnh vụn thì quá trình sẽ chuyển sang giai đoạn quyết viêm. Trong giai đoạn này, các tác nhân khởi phát phản ứng viêm và quá trình tổng hợp các chất trung gian gây viêm bị giảm đi và các tế bào miễn dịch dần được loại bỏ khỏi mô. Các đại thực bào chuyển sang kiểu hình M2 dưới tác động của các cytokine chống viêm như IL-4, IL-10 và IL-13 [15]. Các tế bào gốc tuỷ xương được thu hút cục bộ bởi các cytokine như TNF α và yếu tố dẫn xuất từ tế bào mô đệm 1 (SDF1). Đồng thời, nhiều yếu tố tăng trưởng như TGF- β , BMP, yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF), yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (PDGF) và yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi-2 (FGF-2) được tiết ra, đóng vai trò quan trọng trong việc khởi phát quá trình tái tạo xương và tái tạo mạch máu [16]. Các đại thực bào cư trú trong mô xương (osteomac) cũng tham gia vào việc điều hoà phản ứng viêm và hỗ trợ các sự kiện tế bào cần thiết cho quá trình tái tạo. Ngoài ra, trong giai đoạn này cũng có thể hình thành u hạt, tạo cơ sở cho sự hình thành mô sẹo sau đó. Nhìn chung, giai đoạn viêm cấp tính thường đạt đỉnh điểm trong vòng 24 – 48 giờ và giảm dần sau khoảng một tuần.

Giai đoạn sửa chữa được đặc trưng bởi sự hình thành mô sẹo (callus) thông qua sự phát triển của mạch máu mới và sự lắng đọng collagen. Quá trình này diễn ra theo hai cơ chế chính là cốt hoá nội màng và cốt hoá nội sụn [17]. Trong cốt hoá nội màng, các tế bào gốc trung mô tại màng xương biệt hoá trực tiếp thành nguyên bào xương và hình thành xương dạng lưới. Trong khi đó, cốt hoá nội sụn xảy ra ở vùng tuỷ xương và màng xương trong, nơi các tế bào gốc trung mô (MSC) sẽ biệt hoá thành tế bào sụn, tạo nên mô sẹo mềm trước khi hình thành mô sẹo cứng. MSC sau khi biệt hoá và tiết ra chất nền sụn, tế bào sụn sẽ trải qua quá trình phì đại, khoáng hoá và chết theo chương trình. Điều này tạo điều kiện cho sự xâm nhập của các mạch máu và sự thay thế bởi các mô xương. Từ đó chất nền sụn sẽ dần dần được chuyển đổi thành chất nền xương [17]. Trong giai đoạn này, các cytokine gây viêm như IL1, và IL6 đều giảm xuống trong khi TNF α có xu hướng giảm xuống trong thời gian sớm và tăng lên lại vào khoảng sau của giai đoạn sửa chữa. Trong quá trình cốt hoá nội sụn, TNF α hỗ trợ cho quá trình chết theo chương trình của tế bào sụn, sự tiêu huỷ sụn khoáng hoá, và thúc đẩy quá trình hình thành mạch [18]. Song song đó, các osteomac tập trung tại các vùng hình thành xương mới, hỗ trợ hoạt động của nguyên bào xương và thúc đẩy sự trưởng thành của mô xương [19]. Tế bào huỷ xương cũng tham gia vào quá trình này bằng cách phân giải các mô xương hoặc sụn đã khoáng hoá, tạo điều kiện cho sự tái cấu trúc.

Ở cuối quá trình tái tạo xương là giai đoạn tái tạo. Trong giai đoạn này, cấu trúc và chức năng của xương dần được phục hồi về trạng thái ban đầu. Quá trình này liên quan đến sự cân bằng giữa hoạt động tạo xương của nguyên bào xương và tiêu xương của tế bào hủy xương, dẫn đến hình thành xương dạng phiến có cấu trúc tốt hơn. Đồng thời, một số cytokine gây viêm như IL-1, IL-6 và TNF- α vẫn được biểu hiện ở mức nhất định, góp phần điều hòa quá trình tái cấu trúc xương [2].

1.2. Tổng quan về cấy ghép xương

Xương có khả năng tự tái tạo tự nhiên, tuy nhiên, quá trình chữa lành tự nhiên sẽ không thể diễn ra trong các trường hợp tổn thương xương nghiêm trọng như chấn thương lớn, gãy xương, và các bệnh lý liên quan đến loãng xương hoặc u xương. Vấn đề này đòi hỏi cần phải có biện pháp can thiệp, hỗ trợ quá trình tái tạo xương. Cấy ghép xương được xem là phương pháp phổ biến nhất vì có khả năng hỗ trợ quá trình tái tạo xương hiệu quả [20, 21]. Việc này có thể được thực hiện bằng việc cấy ghép trực tiếp mô xương hoặc các vật liệu cấy ghép xương tổng hợp [22, 23]. Việc cấy ghép mô xương trực tiếp còn được gọi là phương pháp cấy ghép xương truyền thống, các phương pháp này bao gồm cấy ghép tự thân, cấy ghép đồng loài và cấy ghép dị loài (Hình 1.3). Cấy ghép tự thân là một phương pháp được thực hiện dựa trên việc cấy ghép trực tiếp từ xương của bệnh nhân vào vị trí khiếm khuyết. Xương tự thân có thể được lấy từ xương hàm, xương quay, xương chày,... vì đây được xem là nguồn cung cấp xương đặc và xương xốp hiệu quả. Đặc biệt phương pháp này còn được xem là tiêu chuẩn vàng trong phẫu thuật cấy ghép vì xương được lấy từ chính bản thân bệnh nhân. Các mảnh xương này chứa tế bào sống, có khả năng tạo xương, dẫn tạo xương và kích tạo xương, đồng thời, chúng có khả năng tương thích sinh học cao và không bị cơ thể đào thải bởi hệ miễn dịch. Tuy nhiên, nguồn cung hạn chế và việc lấy xương cần phải phẫu thuật lần hai, dẫn đến việc gây đau đớn, mất máu và để lại sẹo [24–26]. Các mảnh ghép xương đồng loài được lấy từ những người hiến tặng vậy nên có thể khắc phục hạn chế về nguồn cung. Các mảnh ghép xương đồng loài vẫn có khả năng dẫn tạo xương và thậm chí là khả năng kích tạo xương vì chúng có collagen loại 1 và BMP. Dù vậy, các mảnh ghép xương thường phải trải qua quá trình xử lý, dẫn đến việc tế bào sống bị loại bỏ và không còn khả năng tạo xương. Ngoài ra, loại xương cấy ghép này còn có nguy cơ bị đào thải, và tiềm ẩn các bệnh truyền nhiễm [27–29]. Vật liệu cấy ghép dị loài có nguồn gốc từ các nguồn không phải con người, thường là bò và lợn. Loại vật liệu này thường có ưu điểm về tính sẵn có nên rất dễ tiếp cận. Tuy nhiên, loại vật liệu này vẫn tiềm ẩn nguy cơ lây bệnh truyền nhiễm và tốc độ phân hủy sinh học kém hơn so với mảnh ghép xương đồng loài và dị loài, dẫn đến quá trình điều trị bị kéo dài [27–29].



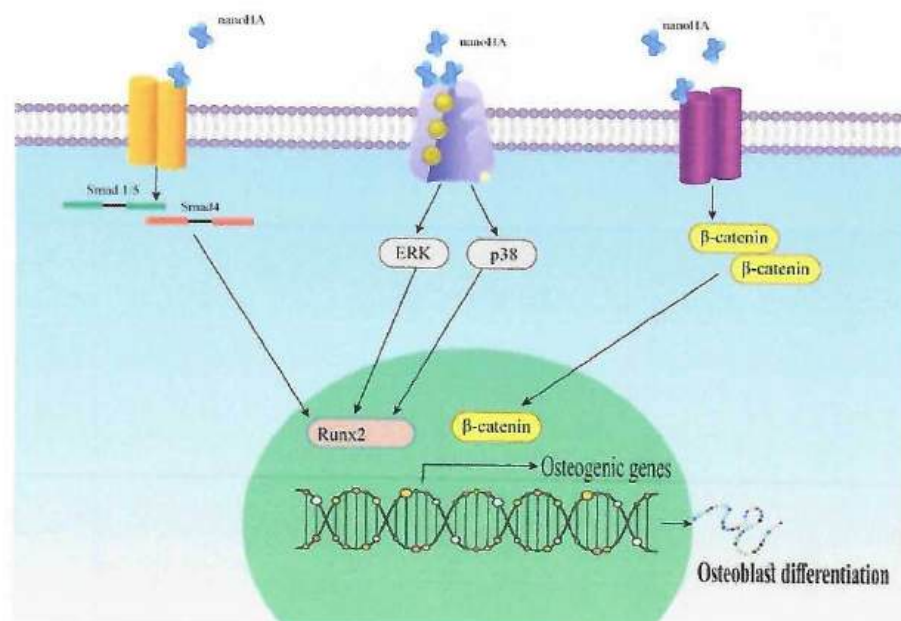
Hình 1.3 Hình minh họa các vật liệu cấy ghép xương truyền thống [30]

Nhìn chung, mặc dù các phương pháp truyền thống được sử dụng rộng rãi và có nhiều lợi ích, chúng vẫn còn một số nhược điểm ảnh hưởng đến hiệu quả ứng dụng trong cấy ghép lâm sàng. Vậy nên, cần có những vật liệu tổng hợp (vật liệu tái tạo xương) và kỹ thuật cải tiến hơn trong lĩnh vực cấy ghép xương. Một trong những yếu tố quan trọng nhất đối với vật liệu tái tạo xương là khả năng kích thích quá trình tái tạo xương trong cơ thể, điều này đồng nghĩa với việc vật liệu tái tạo xương phải có khả năng kích tạo xương. Đồng thời, những vật liệu này cũng cần phải bắt chước các đặc tính của xương tự nhiên, hỗ trợ sự phát triển xương mới, tích hợp với mô xương xung quanh và hạn chế nguy cơ bị đào thải bởi hệ miễn dịch [31, 32]. Trong lâm sàng hiện nay, nhiều loại vật liệu tổng hợp đã được sử dụng để gia cố và thay thế các khiếm khuyết xương nghiêm trọng như kim loại, thủy tinh hoạt tính sinh học, gốm sinh học, cũng như các loại polyme hữu cơ khác nhau [33]. Tính tương thích sinh học, khả năng hỗ trợ tái tạo xương, không giới hạn nguồn cung, chất lượng đồng nhất, và đa dạng hình thức ứng dụng trong lâm sàng là các ưu điểm mạnh nhất đối với vật liệu cấy ghép tổng hợp [34]. Tuy nhiên, các vật liệu này vẫn đang đối mặt với nhiều thách thức như tính giòn đặc trưng của vật liệu gốm sinh học, sự chênh lệch về độ bền cơ học của vật liệu kim loại, và độ bền cơ học hạn chế của một số các loại polyme sinh học... [8] [35]. Mặc dù các loại vật liệu tổng hợp đều đã được ứng dụng rộng rãi, song vẫn tồn tại các ưu và nhược điểm riêng của từng loại, chưa đáp ứng hoàn toàn các yêu cầu lý tưởng trong tái tạo xương. Để thấy rõ hướng nghiên cứu phù hợp hơn, cần nhìn vào chính cấu trúc của xương tự nhiên. Xương là một loại mô phức tạp bao gồm hai pha chính, gồm pha vô cơ (hydroxyapatit chủ yếu) và pha hữu cơ (collagen chủ yếu), chứa các yếu tố tăng trưởng [36]. Sự phối hợp hài hòa của các thành phần này tạo nên tính chất cơ học và sinh học đặc trưng của xương tự nhiên. Do đó, việc nghiên cứu vật liệu composit, loại vật liệu kết hợp hai hoặc nhiều pha thành phần khác nhau, để mô phỏng lại sự kết hợp hài hòa giữa pha vô cơ và hữu cơ chứa các yếu tố tăng trưởng của xương được xem là hướng đi tất yếu, nhằm khắc phục

hạn chế của vật liệu đơn lẻ và tiến gần hơn đến yêu cầu của một mảnh ghép xương lý tưởng.

1.3. Nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà

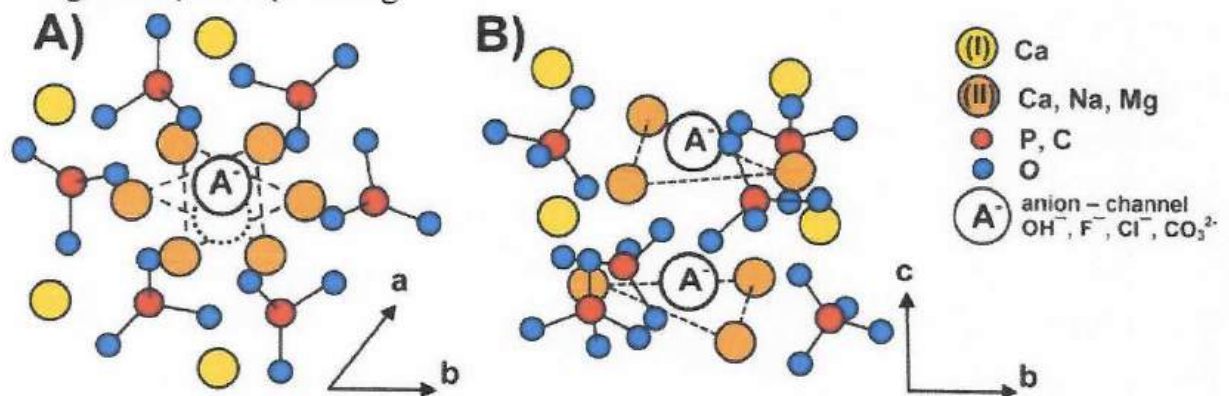
Trong các dạng HA, HA có kích thước nano (nano hydroxyapatit – nHA) đã thu hút sự quan tâm đáng kể trong các nghiên cứu cơ bản cũng như nhiều ứng dụng trong lĩnh vực y sinh. Theo định nghĩa, các hạt HA có kích thước nhỏ hơn 100 nm ở ít nhất một chiều được xem là nHA [37]. Ở kích thước này, vật liệu sở hữu diện tích bề mặt riêng lớn cùng với năng lượng bề mặt cao, vậy nên, khả năng tương tác với môi trường sinh học được gia tăng đáng kể. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, nHA thể hiện hoạt tính sinh học vượt trội và khả năng phân huỷ sinh học tốt hơn so với HA có kích thước micromet [38, 39]. Đặc biệt, sự giải phóng ion Ca^{2+} từ nHA diễn ra nhanh hơn nhờ kích thước hạt nhỏ và diện tích bề mặt lớn góp phần thúc đẩy quá trình khoáng hoá và tái tạo mô xương. Ở cấp độ tế bào, các đặc tính ở cấp độ nano của nHA đóng vai trò quan trọng trong điều hoà một số quá trình như tăng sinh, di chuyển và truyền tín hiệu tế bào và biểu hiện gen của nguyên bào xương cũng như tế bào gốc trung mô (Hình 1.4) [40]. Nhờ những ưu điểm này, các vật liệu gốm sinh học và composit dựa trên nHA ngày càng được quan tâm và ứng dụng rộng rãi, đặc biệt là trong kỹ thuật tái tạo xương. Tuy nhiên, HA tinh khiết với tỉ lệ Ca/P lý thuyết (1,67) thường tồn tại ở trạng thái gần stoichiometric nên hoạt tính sinh học thường chưa được thực sự tối ưu so với pha vô cơ trong xương người.



Hình 1.4 Cơ chế của con đường truyền tín hiệu của nano hydroxyapatit đến quá trình biệt hoá tạo xương [41]

Như đã được đề cập, pha khoáng trong xương tự nhiên không phải là HA tinh khiết theo công thức lý tưởng $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, mà tồn tại chủ yếu dưới dạng apatit sinh học (BAP) có cấu trúc nano và chứa nhiều ion thay thế. Trên thực tế, BAP trong xương là

một hệ tinh thể không hoàn hảo, tại vị trí của Ca^{2+} , PO_4^{3-} và OH^- có thể bị thay thế bởi nhiều ion khác nhau như Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Sr^{2+} , CO_3^{2-} , Cl^- và F^- , thậm chí là ở hàm lượng rất nhỏ (ppm) (Hình 1.5) [42]. Sự thay thế ion này làm thay đổi đáng kể về cấu trúc tinh thể, độ kết tinh và tính chất hoá lý của vật liệu [43]. Các tinh thể BAP hình thành và phát triển bên trong mạng lưới collagen dưới dạng các tinh thể nano dạng tấm, có độ dày khoảng 2 – 3 nm và rộng vài chục nanomet. Điều đáng chú ý là các tinh thể này thường có độ kết tinh thấp và tồn tại cùng với các vùng bề mặt ngậm nước, nơi chứa các ion linh động chẳng hạn như Ca^{2+} và HPO_4^{2-} . Điều này làm cho BAP có khả năng trao đổi ion hiệu quả, tăng tính phản ứng bề mặt và thúc đẩy tương tác với các protein, tế bào cũng như chất nền ngoại bào [44, 45]. Chính sự hiện diện của các ion thay thế trong cấu trúc, BAP đóng vai trò quan trọng trong việc điều hoà quá trình khoáng hoá, giúp quá trình phân huỷ sinh học có kiểm soát cũng như cải thiện khả năng tương thích sinh học và khả năng hỗ trợ quá trình tái tạo xương diễn ra hiệu quả [46]. Do đó, việc phát triển các vật liệu nHA bắt chước lại cấu trúc của BAP thông qua việc pha tạp các ion phù hợp được xem là một chiến lược hiệu quả nhằm nâng cao tính ứng dụng của vật liệu trong lĩnh vực tái tạo xương.



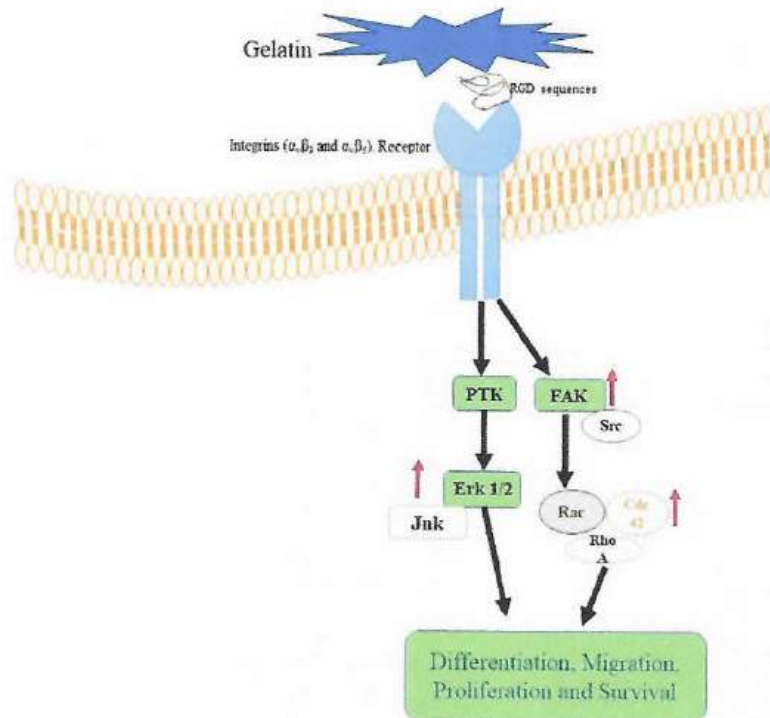
Hình 1.5 Hình ảnh cấu trúc nguyên tử của hydroxyapatit pha tạp ion. A) Hình ảnh theo trục c, và B) Hình ảnh vuông góc với trục c [47]

Có nhiều phương pháp khác nhau để có thể tổng hợp nHA pha tạp ion như phương pháp thủy nhiệt, sol-gel và các kỹ thuật tiên tiến khác. Tuy nhiên, phần lớn các phương pháp thường yêu cầu điều kiện phản ứng khắc khe, quy trình phức tạp hoặc khó kiểm soát đồng thời kích thước và độ đồng nhất của hạt, từ đó hạn chế khả năng ứng dụng rộng rãi trong thực tiễn [48]. Trong số đó, phương pháp kết tủa hoá học được xem là một hướng tiếp cận hiệu quả nhờ quy trình đơn giản và dễ kiểm soát [49]. Đặc biệt, việc kết hợp với sóng siêu âm đã được chứng minh là có thể cải thiện đáng kể quá trình tạo mầm và phát triển tinh thể, giúp giảm kích thước hạt và tăng độ đồng đều. Các hiệu ứng của siêu âm bao gồm xâm thực, dòng chảy vi mô và sự hình thành các vi tia chất lỏng góp phần tăng cường quá trình khuếch tán và sự tương tác giữa các tiền chất, từ đó thúc đẩy quá trình kết tinh theo hướng có kiểm soát [50]. Tuy nhiên, một hạn chế chung của các phương pháp truyền thống là việc sử dụng các tiền chất hoá học thương mại,

thường có chi phí cao và tiềm ẩn những tác động tiêu cực đến môi trường trong quá trình sản xuất. Trước xu hướng phát triển vật liệu xanh và bền vững, nhiều nghiên cứu gần đây đã tập trung vào việc tận dụng các nguồn nguyên liệu tự nhiên giàu canxi như xương động vật, vỏ sinh vật biển và vỏ trứng [51–53]. Trong số các nguồn này, vỏ trứng gà là một nguồn nguyên liệu tiềm năng do tính sẵn có, trữ lượng dồi dào, chi phí thấp và dễ tiếp cận. Thành phần chính của vỏ trứng gà là CaCO_3 (chiếm khoảng 94 – 96%), đồng thời chứa một lượng nhỏ các ion kim loại như Mg^{2+} , Sr^{2+} , ... Đây là những ion sinh học có ý nghĩa quan trọng trong việc bắt chước lại thành phần hoá học của BAP [54]. Việc sử dụng nguồn vỏ trứng gà không chỉ tận dụng được nguồn canxi tự nhiên mà còn cho phép hình thành HA có sự pha tạp ion một cách tự nhiên thay vì phải bổ sung thêm ion trong quá trình tổng hợp. Do đó, việc tổng hợp nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà (nHAE) bằng cách kết hợp phương pháp kết tủa hoá học với xử lý sóng siêu âm có thể được xem là một hướng tiếp cận hiệu quả và bền vững. Phương pháp này không chỉ đơn giản, dễ triển khai mà còn có thể tận dụng được nguồn phụ phẩm sinh học sẵn có, từ đó góp phần giảm thiểu chi phí và tác động đến môi trường, đồng thời tạo ra vật liệu có đặc tính gần với apatit sinh học tự nhiên.

1.4. Hydrogel nền gelatin biến tính axit tannic

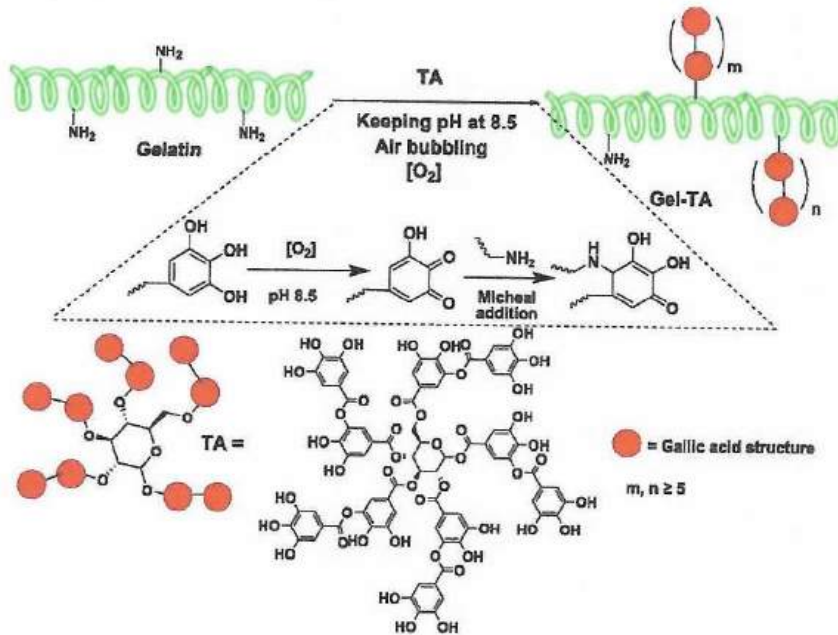
Collagen loại I (Col I) là thành phần chính trong pha hữu cơ của xương tự nhiên và đóng vai trò như khung cấu trúc nền, giúp định hình mô xương và chịu lực kéo [55]. Ngoài ra, Col I còn tham gia vào việc liên kết các protein chức năng và yếu tố tăng trưởng, từ đó điều hoà các quá trình sinh học liên quan đến tái tạo xương. Tương tự với thành phần chính của pha hữu cơ, collagen tinh khiết được ứng dụng rộng rãi trong kỹ thuật mô như một chất nền sinh học, hỗ trợ quá trình tái tạo xương nhờ các ưu điểm như khả năng phân huỷ sinh học tốt, tính tương thích sinh học cao và khả năng hỗ trợ cho sự bám dính của tế bào [56]. Tuy nhiên, việc ứng dụng collagen trong kỹ thuật mô vẫn gặp một số hạn chế nhất định, đặc biệt là chi phí sản xuất cao, và quy trình tách chiết phức tạp, do đó việc ứng dụng collagen thường không mang lại hiệu quả kinh tế và khó ứng dụng trong chế tạo vật liệu tái tạo xương ở quy mô lớn hơn [57]. Thay vào đó, gelatin (Gel) là một dạng dẫn xuất của collagen đang được xem là một lựa chọn thay thế tiềm năng. Mặc dù trong Gel, cấu trúc xoắn ba đặc trưng của Col đã bị biến tính nhưng Gel vẫn giữ được nhiều đặc điểm sinh học quan trọng, đặc biệt là trình tự amino axit đặc hiệu như Arg-Gly-Asp (RGD), cho phép duy trì khả năng tương tác và bám dính tế bào (Hình 1.6) [58]. Bên cạnh đó, gelatin có ưu điểm vượt trội về tính kinh tế, dễ hoà tan, không độc hại và có thể bị phân huỷ sinh học bởi các enzym nội sinh như collagenase và metalloprotease [59].



Hình 1.6 Sự liên kết giữa trình tự Arg-Gly-Asp trên gelatin với tế bào hỗ trợ cho quá trình bám dính, tăng sinh và biệt hoá [60]

Trong lĩnh vực tái tạo xương, gelatin có thể được ứng dụng theo hai cách chính. Thứ nhất, gelatin có thể được sử dụng như một polyme thuần và được phối trộn với các pha vô cơ như gốm sinh học để tạo thành vật liệu composit, tận dụng ưu điểm đồng thời của pha hữu cơ và pha vô cơ [61, 62]. Mặt khác, nhờ sự hiện diện của nhiều nhóm chức hoạt động như NH_2 , COOH và OH , bản thân Gel có thể được ứng dụng dưới dạng hydrogel thông qua các phản ứng tạo liên kết ngang, hình thành mạng lưới ba chiều tương tự như chất nền ngoại bào [63]. Cấu trúc này không chỉ cải thiện tính chất cơ học mà còn tạo môi trường thuận lợi cho sự xâm nhập, bám dính và phát triển tế bào. Điều đáng chú ý là chính các nhóm chức hoạt động cũng có thể dễ dàng được biến tính với các nhóm chức năng nhằm bổ sung một số tính chất cần thiết cho quá trình tái tạo xương. Trong số đó, axit tannic (TA) đã thu hút được sự quan tâm đáng kể nhờ có nguồn gốc tự nhiên, và tính tương thích sinh học cao [64]. TA là một polyphenol giàu nhóm galloy giúp mang lại khả năng kháng oxi hoá hiệu quả, đồng thời TA cũng có khả năng kháng khuẩn đặc trưng của hợp chất tự nhiên, các tính chất này giúp cho quá trình tái tạo xương diễn ra thuận lợi hơn [65, 66]. Bên cạnh đó, các nhóm phenolic trong cấu trúc của TA có thể chuyển đổi thành dạng quinone hoạt động, hình thành nhiều loại tương tác như liên kết hydro, tương tác π - π , và tương tác tĩnh điện giúp cải thiện đáng kể khả năng bám dính của hydrogel trong môi trường ẩm [67, 68]. Đặc biệt là TA có khả năng tạo liên kết phối trí mạnh với các ion kim loại thông qua các nhóm phenolic, hình thành các mạng lưới liên kết ngang giúp tăng độ bền cấu trúc hydrogel [69, 70]. Đồng thời, sự hiện diện của các ion kim loại trong mạng lưới này còn mở ra khả năng tích hợp các tác

dụng sinh học đặc trưng của các ion kim loại như khả năng kháng khuẩn, kích thích hành vi tế bào, hỗ trợ khả năng biệt hoá,... Vậy nên, việc biến tính TA lên gelatin thông qua phản ứng cộng Micheal (Hình 1.7) không chỉ giúp cải thiện tính chất cơ học và sinh học của hydrogel mà còn tạo điều kiện thuận lợi cho việc tích hợp các ion kim loại, hướng tới việc phát triển hệ vật liệu đa chức năng mô phỏng hiệu quả pha hữu cơ của xương tự nhiên [71].



Hình 1.7 Cơ chế phản ứng tổng hợp gelatin biến tính axit tannic [72]

Từ khả năng tạo liên kết phối trí với các ion kim loại của axit tannic, việc lựa chọn ion kim loại phù hợp đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh cấu trúc và chức năng của hệ hydrogel. Trong lĩnh vực tái tạo xương, nhiều ion kim loại sinh học như Ag^+ , Sr^{2+} , Zn^{2+} ,... đã được nghiên cứu rộng rãi và được chứng minh là có khả năng hỗ trợ thuận lợi cho quá trình tái tạo xương [73]. Tuy nhiên, các ion này chủ yếu có hoá trị thấp, dẫn đến khả năng tạo liên kết ngang hạn chế và đôi khi chưa đáp ứng được yêu cầu về độ bền cấu trúc của hydrogel. Bên cạnh các ion sinh học phổ biến, một số nguyên tố kim loại ít được khai thác hơn như bismuth (Bi) gần đây đã thu hút được nhiều sự chú ý trong lĩnh vực vật liệu y sinh. Mặc dù không phải nguyên tố thiết yếu trong cơ thể, Bi đã được chứng minh là có độc tính thấp và đã được ứng dụng trong y học thời gian dài [74, 75]. Về mặt lý thuyết, hoá trị ba của Bi có tiềm năng tạo liên kết phối trí mạnh và đa điểm với các nhóm chức như phenolic, từ đó có thể đóng vai trò như một tác nhân liên kết ngang tiềm năng. Dù vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về tác dụng của bismuth trong hiệu quả hỗ trợ quá trình tái tạo xương, một vài nghiên cứu gần đây đã chỉ ra tiềm năng của Bi. Kết quả bước đầu cho thấy Bi góp phần cải thiện hoạt tính sinh học bao gồm tăng cường khả năng kháng khuẩn, thúc đẩy tăng sinh tế bào, hỗ trợ biệt hoá tạo xương và sự hình thành mạch mới, đồng thời đã có nghiên cứu ghi nhận sự tích hợp và tạo xương tốt trên mô hình thử nghiệm *in vivo* [76–78]. Do đó, việc khảo sát một cách

có hệ thống các ion kim loại, bao gồm cả các ion sinh học truyền thống và các nguyên tố ít được khai thác như Bi là điều cần thiết để làm rõ vai trò của chúng đến quá trình hình thành cấu trúc hydrogel và ảnh hưởng đến các đặc tính sinh học liên quan đến tái tạo xương.

1.5. Tình hình nghiên cứu

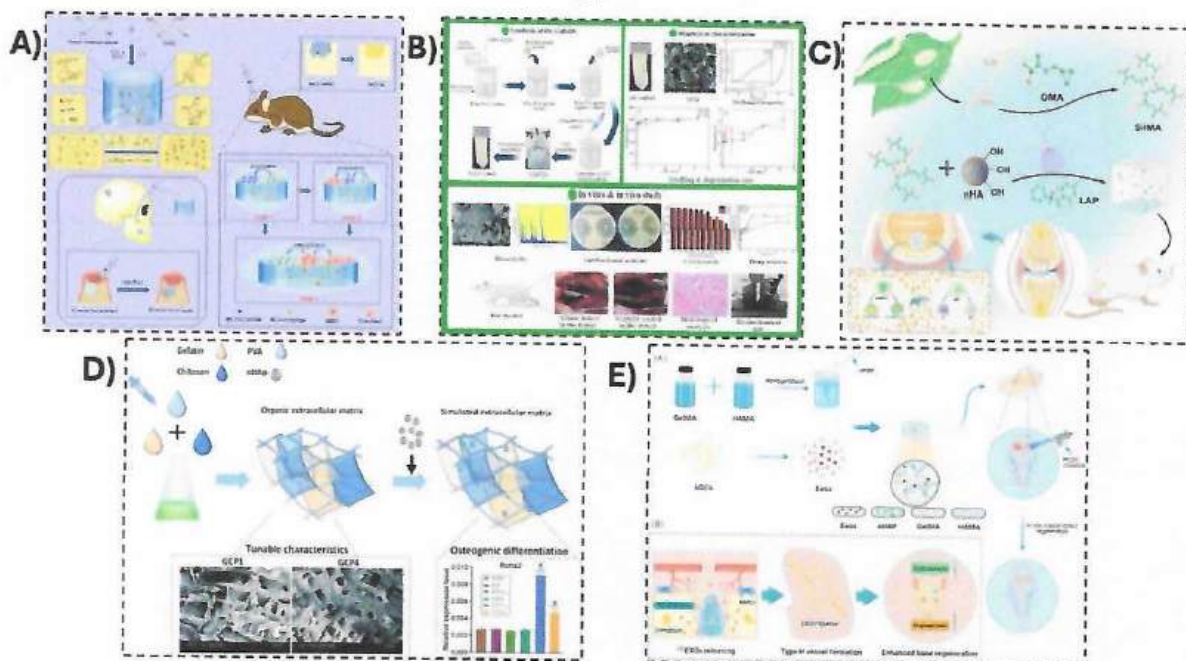
1.5.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Trong những năm gần đây, hướng nghiên cứu vật liệu composit mô phỏng cấu trúc phân cấp của xương tự nhiên đã thu hút sự quan tâm mạnh mẽ trong lĩnh vực kỹ thuật mô xương. Trong số các vật liệu được nghiên cứu, sự kết hợp giữa nHA và polyme sinh học như gelatin được chứng minh là có khả năng mô phỏng tương đối và bắt chước thành phần của xương tự nhiên. Trong đó, nHA đóng vai trò như pha khoáng có chức năng dẫn tạo xương và gelatin đóng vai trò như chất nền hữu cơ để hỗ trợ sự bám dính và phát triển của tế bào. Bên cạnh đó, các nghiên cứu gần đây còn tập trung vào việc chức năng hoá các hệ composit này thông qua việc biến tính polyme, pha tạp ion kim loại hoặc tích hợp các yếu tố sinh học nhằm cải thiện tính chất cơ học, khả năng kháng khuẩn và hoạt tính sinh học của vật liệu. Những hướng tiếp cận này không chỉ giúp vật liệu tiệm cận hơn với cấu trúc và chức năng của xương tự nhiên mà còn mở ra tiềm năng rộng rãi trong điều trị khiếm khuyết xương phức tạp.

Năm 2021, nghiên cứu về khung composit đa thành phần nhằm mô phỏng cấu trúc và thành phần của xương tự nhiên được quan tâm đáng kể. Một hệ composit kết hợp Gel, chitosan (CS), polyvinyl alcohol (PVA) và nHA đã được phát triển nhằm tái tạo đồng thời pha vô cơ và pha hữu cơ của xương như Hình 1.8D [79]. Trong đó, hệ polyme Gel/CS/PVA đóng vai trò như chất nền ngoại bào với cấu trúc lỗ xốp, khả năng trương nở, khả năng phân huỷ sinh học và tính chất cơ học có thể được điều chỉnh. Đồng thời, việc bổ sung nHA giúp cải thiện đáng kể độ bền nén, tăng hoạt tính sinh học bề mặt và thúc đẩy khả năng bám dính, tăng sinh cũng như biệt hoá của tế bào gốc tủy xương. Đặc biệt, khung composit chứa khoảng 12,5% nHA cho thấy hiệu quả tạo xương tối ưu, từ đó cho thấy tiềm năng của hệ composit đa pha trong kỹ thuật mô xương. Đến năm 2022, xu hướng phát triển các hệ composit hydrogel có khả năng tiêm và thích ứng hình dạng cho các khuyết tật xương phức tạp tiếp tục được đẩy mạnh. Một hệ hydrogel kép liên kết ngang dựa trên gelatin và alginate biến tính được kết hợp với nHA nhằm tạo cấu trúc xốp sinh học có kiểm soát đã được chế tạo như Hình 1.8A [80]. Hệ vật liệu này không chỉ thể hiện khả năng tiêm, tự phục hồi và thích ứng hình dạng tốt mà còn tạo ra bề mặt xốp vi mô đồng đều, đóng vai trò như nền tảng tương tác giữa đại thực bào và tế bào gốc trung mô. Sự tương tác này góp phần thúc đẩy quá trình tạo xương hiệu quả, được xác nhận thông qua mô hình khuyết tật xương sọ trên động vật. Nghiên cứu cho thấy việc tích hợp nHA vào hydrogel không chỉ cải thiện cơ tính mà còn tăng cường

hoạt tính sinh học thông qua cơ chế điều hòa miễn dịch. Năm 2023, các hệ composit hydrogel không chỉ dừng lại ở vai trò khung mà còn được phát triển như hệ mang các yếu tố sinh học. Một hệ hydrogel gelatin methacrylate (GelMA), hyaluronic acid methacrylate (HAMA) kết hợp nHA đã được thiết kế như một hệ dẫn truyền exosome có kiểm soát như Hình 1.8E [81]. Việc tích hợp exosome từ tế bào gốc giúp thúc đẩy đồng thời quá trình tạo xương và hình thành mạch máu. Kết quả thử nghiệm *in vitro* cho thấy sự tăng cường biệt hoá tạo xương của tế bào gốc trung mô và hình thành mạch của tế bào nội mô. Đặc biệt, trong khi thí nghiệm *in vivo* trên mô hình khuyết tật xương sọ xác nhận khả năng tái tạo xương vượt trội. Đáng chú ý, hệ vật liệu này còn thúc đẩy hình thành mạch loại H, yếu tố quan trọng trong tái tạo xương hiệu quả. Đến năm 2024, các nghiên cứu bắt đầu tích hợp công nghệ in ba chiều sinh học với vật liệu composit. Một hệ hydrogel dựa trên silk fibroin methacrylate (SilMA) kết hợp nHA đã được phát triển như một mực in sinh học cho công nghệ in ba chiều như Hình 1.8C [82]. Hệ vật liệu này có khả năng đóng rắn nhanh dưới tia cực tím, đồng thời vẫn có khả năng duy trì tính chất cơ học và sinh học sau khi bổ sung nHA. Kết quả cho thấy nHA không chỉ cải thiện khả năng tạo xương mà còn thúc đẩy quá trình điều hoà miễn dịch thông qua cảm ứng phân cực đại thực bào sang kiểu hình M2. Thử nghiệm trên mô hình khuyết tật xương đùi ở chuột cho thấy khả năng tái tạo xương và sụn hiệu quả, mở ra hướng tiếp cận mới kết hợp giữa vật liệu sinh học và công nghệ in ba chiều. Gần đây, vào năm 2025, xu hướng phát triển vật liệu đa chức năng tiếp tục được mở rộng. Một hệ khung composit dựa trên Gel/PVA/alginate kết hợp với nHA tổng hợp tại chỗ đã được phát triển, đồng thời tích hợp khả năng mang và giải phóng thuốc như được thể hiện Hình 1.8B [83]. Hệ composit này thể hiện cấu trúc xốp liên thông, độ bền cơ học phù hợp với xương xốp và khả năng phân huỷ kéo dài. Đặc biệt, vật liệu cho phép giải phóng có kiểm soát các tác nhân điều trị như kháng sinh và thuốc chống ung thư, đồng thời thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và khả năng ức chế tế bào ung thư xương. Thử nghiệm *in vivo* cho thấy khả năng thúc đẩy tái tạo xương hiệu quả, cho thấy tiềm năng của composit đa chức năng trong kết hợp điều trị và tái tạo mô xương.

Từ các nghiên cứu đã công bố có thể thấy rằng các hệ vật liệu composit trên cơ sở nHA và gelatin đã đạt được nhiều tiến bộ đáng kể trong việc mô phỏng cấu trúc và chức năng của mô xương tự nhiên. Các hướng tiếp cận gần đây không chỉ dừng lại ở việc cải thiện tính chất cơ học mà còn mở rộng sang tích hợp các chức năng sinh học như điều hòa miễn dịch, dẫn truyền yếu tố tăng trưởng và mang thuốc. Do đó, việc phát triển một hệ vật liệu composit dựa trên kết hợp giữa pha vô cơ nano hydroxyapatit pha tạp ion từ nguồn tự nhiên và hydrogel polyme biến tính có khả năng liên kết ngang bằng ion kim loại, được xem là một hướng đi tiềm năng và khả thi.



Hình 1.8 Sơ đồ nghiên cứu của các hệ composit mô phỏng pha vô cơ và hữu cơ của xương người. A) Composit hydrogel dựa trên gelatin, alginate và nHA; B) Composit dựa trên gelatin, polyvinyl alcohol, alginate và nHA; C) Composit hydrogel dựa trên methacrylate – silk fibroin kết hợp với nHA; D) Composit dựa trên gelatin, chitosan, polyvinyl alcohol và nHA; và E) Gelatin methacrylate, hyaluronic acid methacrylate, nHA và exosome có nguồn gốc từ tế bào gốc nước tiểu người [79–83]

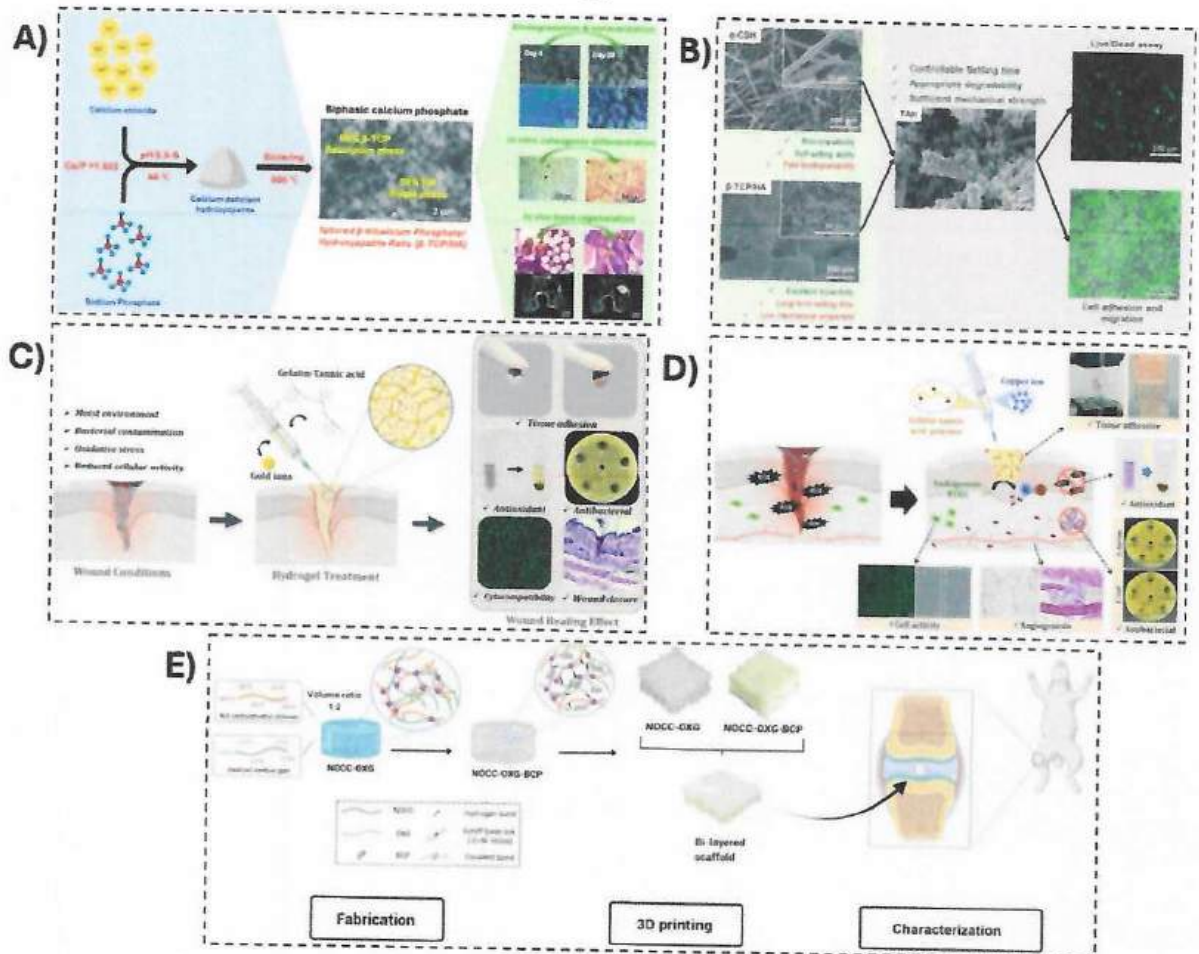
1.5.2. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam

Hiện tại, tình hình nghiên cứu tại Việt Nam đã có những bước tiến đáng kể, đặc biệt là các vật liệu gốm canxi photphat và các hệ composit dựa trên các loại gốm này. Nhiều hướng tiếp cận đã được triển khai nhằm điều chỉnh thành phần cũng như tính chất của pha vô cơ. Bên cạnh đó, các hướng nghiên cứu về vật liệu mô phỏng pha hữu cơ cũng được quan tâm, đặc biệt là các hệ hydrogel dựa trên nền gelatin hướng tới ứng dụng trong tái tạo mô mềm và chữa lành vết thương. Ngoài ra, một số nghiên cứu đã bước đầu kết hợp pha vô cơ và pha hữu cơ trong các hệ composit phức tạp đã có được những kết quả khả quan.

Một hướng nghiên cứu tập trung vào việc tối ưu hoá tỷ lệ beta-tricalcanxi photphat (TCP) và HA trong vật liệu canxi photphat kép (BCP) nhằm cân bằng độ ổn định và khả năng phân huỷ sinh học đã được phát triển như Hình 1.9A [84]. Kết quả cho thấy BCP chứa 80% TCP và 20% HA đạt được sự cân bằng tối ưu và giúp cải thiện khả năng tạo apatit trong môi trường giả dịch thể người cũng như thúc đẩy biệt hóa tạo xương. Thử nghiệm trên mô hình động vật *in vivo* cho thấy vật liệu có khả năng tái tạo xương đáng kể với tỷ lệ hình thành xương vượt 50% sau 4 tuần, khẳng định tiềm năng ứng dụng của BCP trong kỹ thuật mô xương. Một hướng nghiên cứu khác đã phát triển hệ composit dựa trên sự kết hợp giữa TCP, HA và α -canxi sunphat hemihydrat (CSH) (Hình 1.9B) nhằm cải thiện đồng thời tính chất cơ học và khả năng phân huỷ sinh học [85]. Việc bổ

sung CSH giúp rút ngắn thời gian đông kết, tăng độ bền nén và tạo cấu trúc xốp thuận lợi cho sự bám dính và di chuyển của tế bào. Kết quả thử nghiệm *in vitro* cũng cho thấy vật liệu không gây độc tế bào và có khả năng thúc đẩy quá trình tăng sinh, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong tái tạo xương. Trong lĩnh vực hydrogel, một nghiên cứu đã phát triển hệ gelatin biến tính bởi axit tannic liên kết ngang bằng ion Au^{3+} với mục tiêu ứng dụng trong chữa lành mô mềm như được thể hiện trong Hình 1.9C [86]. Hệ hydrogel này cho thấy khả năng tạo gel nhanh, độ bám dính mô cao, hoạt tính chống oxy hoá mạnh và khả năng kháng khuẩn hiệu quả. Đồng thời vật liệu cũng cho thấy tính tương thích sinh học tốt và khả năng hỗ trợ tế bào tăng sinh trong điều kiện *in vitro* và *in vivo*. Mặc dù hệ hydrogel này được ứng dụng tái tạo mô mềm, nhưng những tính chất này vẫn cho thấy tiềm năng mở rộng sang ứng dụng tái tạo xương. Tương tự, trong một nghiên cứu khác cũng dựa trên hệ hydrogel nền gelatin – axit tannic nhưng sử dụng ion Cu^{2+} để tạo điều kiện cho hệ có khả năng nhả khí oxit nitric (NO) nhằm thúc đẩy chữa lành vết thương (Hình 1.9D) [87]. Hệ vật liệu không chỉ thể hiện tính kháng khuẩn và kháng oxy hoá mạnh mà còn có khả năng kích thích tế bào nội mô tăng sinh và hình thành mạch máu thông qua cơ chế giải phóng khí NO có kiểm soát. Các tính chất của hệ này cũng cho thấy ý nghĩa quan trọng trong tiềm năng ứng dụng cho mục đích tái tạo xương. Ngoài ra, composit hai lớp mô phỏng mô xương và sụn được chế tạo bằng cách kết hợp N,O-carboxymethyl chitosan, oxidized xanthan gum và BCP đã được nghiên cứu phát triển như Hình 1.9E [88]. Kết quả cho thấy composit có khả năng hỗ trợ tốt tương tác tế bào, thúc đẩy tăng sinh và tái tạo đồng thời cả mô sụn và xương trong mô hình *in vivo*, thể hiện hiệu quả cao trong tái tạo mô phức hợp.

Từ các nghiên cứu trong nước có thể thấy rằng, các hướng tiếp cận hiện nay chủ yếu tập trung riêng lẻ vào việc tối ưu pha vô cơ hoặc phát triển các hệ hydrogel polyme chức năng ứng dụng cho tái tạo mô mềm. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu cũng đã bước đầu mô phỏng lại pha hữu cơ và vô cơ. Tuy nhiên, vẫn còn nhiều hạn chế trong việc tích hợp đồng thời nhiều yếu tố như sử dụng nguồn nguyên liệu tự nhiên, khả năng cung cấp ion sinh học và đặc biệt là bắt chước lại thành phần của mô xương. Việc tận dụng các nguồn sinh học tự nhiên để tổng hợp nano hydroxyapatit có sẵn các ion pha tạp, kết hợp với các hệ hydrogel polyme biến tính có khả năng liên kết ngang bằng ion kim loại, vẫn chưa được nghiên cứu một cách hệ thống. Do đó, việc phát triển một hệ vật liệu composit kết hợp nano hydroxyapatit có nguồn gốc tự nhiên với hydrogel gelatin biến tính axit tannic liên kết ngang bằng ion kim loại không chỉ mang ý nghĩa khoa học mà còn có tiềm năng ứng dụng cao trong lĩnh vực tái tạo xương, hướng tới mô phỏng toàn diện cấu trúc và chức năng của mô xương tự nhiên.



Hình 1.9 Sơ đồ nghiên cứu của các hệ vật liệu ứng dụng tái tạo mô. A) Canxi photphat kép; B) Composit trên cơ sở beta-tricanxi photphat, anpha-canxi sunphat hemihydrat và hydroxyapatit; C) Hydrogel gelatin – axit tannic liên kết ngang bởi ion vàng; D) Hydrogel gelatin – axit tannic liên kết ngang bằng ion đồng; và E) Composit trên cơ sở cacboxymethyl chitosan, oxidized xathan gum và canxi photphat kép [84–88]

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu tập trung vào việc chế tạo nanocomposit hydrogel trên cơ sở nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà và hydrogel nền gelatin biến tính axit tannic, có bổ sung ion Bi^{3+} nhằm mô phỏng hệ đa thành phần của mô xương tự nhiên, định hướng trong ứng dụng tái tạo mô xương.

2.1.2. Phạm vi nghiên cứu

Luận văn xoay quanh việc chế tạo vật liệu nanocomposit hydrogel nHAE/GTA/Bi có các tính chất hoá lý, cơ học, hoạt tính sinh học và tính chất sinh học phù hợp cho ứng dụng tái tạo xương. Cụ thể, nHAE được tổng hợp từ vỏ trứng gà bằng phương pháp kết tủa hoá học kết hợp với sóng siêu âm để thu được các hạt hydroxyapatit có kích thước nano và các tính chất, hoá lý, tính chất sinh học phù hợp cho ứng dụng tái tạo xương. Polyme gelatin biến tính axit tannic (GTA) được tổng hợp bằng phương pháp cộng Micheal để gắn axit tannic (TA) lên mạch gelatin (Gel). Sau đó, khả năng tạo gel giữa GTA với một số ion kim loại được khảo sát và dựa trên khả năng tạo gel, đặc tính hoá lý, và tính chất sinh học phù hợp để chọn ra một ion thích hợp. Cuối cùng, vật liệu nanocomposit hydrogel được chế tạo bằng cách phân tán nHAE vào dung dịch polyme GTA và được liên kết ngang bằng ion kim loại phù hợp. Vật liệu nanocomposit hydrogel sau đó sẽ được đánh giá một loạt các tính chất như hoá lý, cơ lý, hoạt tính sinh học và tính chất sinh học để phân tích tính phù hợp của vật liệu này cho ứng dụng tái tạo xương.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Hoá chất, thiết bị và dụng cụ thí nghiệm

2.2.1.1. Danh mục hoá chất

Bảng 1 Bảng danh mục hoá chất sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên hoá chất	Hãng sản xuất	Xuất xứ
1.	2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$)	Sigma-Aldrich	Mỹ
2.	Bismuth (III) nitrate pentahydrate ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\geq 98.0\%$)	Sigma-Aldrich	Mỹ
3.	Calcium chloride (CaCl_2 , $\geq 93.0\%$)	Sigma-Aldrich	Mỹ
4.	Cobalt (II) nitrate hexahydrate ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\geq 99.9\%$)	Sigma-Aldrich	Mỹ
5.	Collagenase IV from Clostridium histolyticum	Sigma-Aldrich	Mỹ
6.	Di-potassium hydrogen phosphate trihydrate ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 99%)	Sigma-Aldrich	Mỹ
7.	Dimethyl sulfoxide (DMSO; $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$, $\geq 99.5\%$)	Sigma-Aldrich	Mỹ

8.	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL	Mỹ
9.	Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	Gibco BRL	Mỹ
10.	Ethanol absolute	Chemsol	VN
11.	Fetal bovine serum (FBS)	Gibco BRL	Mỹ
12.	Gelatin from porcine skin (70 – 90%)	Sigma-Aldrich	Mỹ
13.	Hydrochloric Acid (HCl, 32-35%)	Fisher Scientific	Mỹ
14.	L-Ascorbic acid ($C_6H_8O_6$, $\geq 98\%$), Alizarin Red S ($C_{14}H_7NaO_7S$, 25.0 - 49.1% C)	Sigma-Aldrich	Mỹ
15.	Lysogenia Broth medium (LB)	Himedia	Án Độ
16.	Magnesium chloride hexahydrate ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 98%)	Sigma-Aldrich	Mỹ
17.	Magnesium nitrate hexahydrate ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, 99.999%)	Sigma-Aldrich	Mỹ
18.	Manganese sulfate monohydrate ($MnSO_4 \cdot H_2O$, 98%)	Oxford	Án Độ
19.	Minimum Essential Medium α (α -MEM)	Gibco BRL	Mỹ
20.	MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (MTT)	Invitrogen	Mỹ
21.	Ortho-phosphoric acid (H_3PO_4 , 85%)	Merck	Đức
22.	Pen Strep Glutamine (PSG)	Gibco BRL	Mỹ
23.	Potassium chloride (KCl, 99.5%)	Sigma-Aldrich	Mỹ
24.	Sodium chloride (NaCl, 99.5%)	Sigma-Aldrich	Mỹ
25.	Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$, 99.5%)	Sigma-Aldrich	Mỹ
26.	Sodium Hydroxide (NaOH, $\geq 97\%$)	Fisher Scientific	Mỹ
27.	Sodium sulfate (Na_2SO_4 , 99%)	Sigma-Aldrich	Mỹ
28.	Strontium chloride hexahydrate ($SrCl_2 \cdot 6H_2O$, 99%)	Oxford	Án Độ
29.	Tannic acid ($C_{76}H_{52}O_{46}$)	Sigma-Aldrich	Mỹ
30.	Tris-hydroxymethyl aminomethane (TRIS, 99%)	Sigma-Aldrich	Mỹ
31.	Trypsin-EDTA	Gibco BRL	Mỹ
32.	β -Glycerophosphate disodium salt hydrate ($C_3H_7Na_2O_6P \cdot xH_2O$, $\geq 99\%$)	Sigma-Aldrich	Mỹ

2.2.1.2. Danh mục hoá chất

Bảng 2 Bảng danh mục trang thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên hoá chất	Hãng sản xuất	Xuất xứ
1.	Bể điều nhiệt	Nuve	Thổ Nhĩ Kỳ
2.	Bể siêu âm	TQ	TQ
3.	Beaker	Duran	Đức
4.	Bếp khuấy từ gia nhiệt	Sigma-Aldrich	Mỹ
5.	Buret	Duran	Đức
6.	Cân phân tích 4 số lẻ	Satorius	Đức
7.	Đầu côn	Gibco BRL	Mỹ
8.	Đĩa 24 giếng	Biologix	Mỹ
9.	Falcon	Biologix	Mỹ
10.	Kính hiển vi điện tử quét	Hitachi	Nhật
11.	Kính hiển vi soi ngược	OPTIKA	Ý
12.	Máy đo lưu biến	Thermofisher	Mỹ
13.	Máy đo pH để bàn	Horiba	Nhật
14.	Máy ly tâm	Hermle	Đức
15.	Máy phân tích kích thước hạt (DLS)	Horiba	Nhật
16.	Máy phân tích nhiệt trọng trường – quét vi sai (TGA)	Mettler Toledo	Mỹ
17.	Máy quang phổ hồng ngoại biến đổi (FTIR)	PerkinElmer	Mỹ
18.	Máy nhiễu xạ tia X (XRD)	Bruker	Đức
19.	Micropipette	Biologix	Mỹ
20.	Tủ ấm CO ₂	Nuve	Thổ Nhĩ Kỳ

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Tổng hợp nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà

Quy trình tổng hợp nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà như được thể hiện trong Phụ lục 1. Đầu tiên, vỏ trứng gà Ba Huân (thu thập ở địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh) được làm sạch với nước cất và đun sôi ở 100 °C trong 30 phút để loại bỏ các protein còn sót lại. Màng trắng của vỏ trứng được loại bỏ và rửa sạch lại với nước cất. Sau đó, vỏ trứng được sấy khô ở 80 °C trong 24 giờ trước khi được nghiền thành bột vỏ trứng (ESP) bằng chày và cối. Quy trình tối ưu để thu nhận CaO được khảo sát bằng cách chuẩn bị 5 g ESP và nung ở 1100 °C trong các mốc thời gian 1 giờ (CES1), 2 giờ (CES2) và 3 giờ (CES3). Bột trắng thu được sẽ được đánh giá để chọn ra điều kiện phù hợp thu nhận CaO từ vỏ trứng gà [89].

Vật liệu nano hydroxyapatit được tổng hợp từ vỏ trứng gà thông qua phương pháp kết tủa hoá học kết hợp với sóng siêu âm. Cụ thể, mẫu vỏ trứng nung tối ưu được phân tán vào nước khử ion (DI) để chuẩn bị huyền phù $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0,5M. Nhỏ từ từ cho đến hết dung dịch H_3PO_4 0,6M vào huyền phù $\text{Ca}(\text{OH})_2$ trong khi khuấy từ liên tục ở 60°C , hàm lượng tiền chất được tính toán sao cho tỉ lệ Ca/P đạt khoảng 1,67. Phản ứng kết tủa ước được thực hiện dưới điều kiện khuấy liên tục (500 rpm) trong 1 giờ ở 60°C và pH của hỗn hợp phản ứng được duy trì ở khoảng 10 bằng dung dịch NaOH 1M hoặc HCl 1M. Toàn bộ hỗn hợp dịch sữa sau giai đoạn phản ứng kết tủa ước được xử lý với sóng siêu âm trong bể siêu âm với tần số 42 kHz, năng lượng 300 W trong 1 giờ. Sản phẩm thu được sẽ được lọc rửa với DI 3 lần để thu được nHAE [90].

2.2.2.2. Tổng hợp hydrogel nền gelatin biến tính axit tannic

Quy trình tổng hợp hydrogel nền gelatin biến tính axit tannic được thể hiện trong Phụ lục 2. Trước tiên, polyme gelatin biến tính axit tannic (GTA) được tổng hợp dựa trên cơ chế phản ứng cộng Michael giữa các nhóm amin của gelatin và các nhóm galloyl của axit tannic trong môi trường kiềm. Cụ thể, gelatin được hoà tan hoàn toàn với DI ở 40°C trong vòng 2 giờ dưới điều kiện khuấy liên tục. Sau đó, pH của dung dịch gelatin được điều chỉnh lên khoảng 8.5 bằng dung dịch NaOH 1M để tạo điều kiện thuận lợi cho phản ứng. Tiếp theo, dung dịch TA 1 wt% được bổ sung từ từ vào hệ phản ứng dưới điều kiện khuấy liên tục trong suốt quá trình phản ứng. Đồng thời, pH của hỗn hợp phản ứng luôn được duy trì ổn định ở mức 8.5 bằng dung dịch NaOH 1M. Phản ứng được diễn ra trong vòng 3 giờ và sau đó pH của hỗn hợp được điều chỉnh về 7.4. Sau khi kết thúc phản ứng, hỗn hợp sau phản ứng được làm sạch bằng màng thẩm tách có giới hạn khối lượng phân tử 3.5 kDa trong DI qua đêm. Hỗn hợp sau thẩm tách được đông khô để thu được polyme GTA dạng rắn [91].

Để chuẩn bị hydrogel nền GTA, polyme GTA được hoà tan trong DI với nồng độ 250 mg/mL ở 40°C trong điều kiện khuấy liên tục. Sau đó, các hydrogel nền GTA được chế tạo bằng cách thêm các ion (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} và Bi^{3+}) ở các nồng độ khác nhau (10, 25, 50, 75, và 100 mg/mL) vào dung dịch GTA 250 mg/mL với tỷ lệ 9:1 (v/v). Thời gian tạo gel được xác định bằng phương pháp đảo ngược ống nghiệm. Trạng thái gel được hình thành khi hỗn hợp không bị chảy khi úp ngược ống nghiệm [92].

2.2.2.3. Chế tạo vật liệu composit nHAE kết hợp hydrogel gelatin biến tính axit tannic bổ sung ion kim loại (nHAE/GTA-MI)

Quy trình chế tạo vật liệu composit nHAE kết hợp hydrogel gelatin biến tính axit tannic bổ sung ion kim loại được thể hiện trong Phụ lục 3. Composit hydrogel nHAE/GTA-MI được chế tạo thông qua phương pháp phối trộn trực tiếp kết hợp với liên kết ngang bằng ion kim loại. Đầu tiên, bột nHAE được phân tán trong DI với nồng

độ 250 mg/mL dưới điều kiện khuấy liên tục ở 40°C. Sau đó, polyme GTA được hoà tan vào hệ với nồng độ 250 mg/mL và khuấy cho đến khi thu được hỗn hợp đồng nhất. Tiếp theo, dung dịch ion kim loại phù hợp đã được lựa chọn từ bước khảo sát ion kim loại phù hợp cho hệ hydrogel GTA được thêm vào hỗn hợp nHAE/GTA theo tỉ lệ thể tích 9:1 (v/v). Các nồng độ ion được khảo sát bao gồm 10, 25, 50, 75 và 100 mg/mL nhằm đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng ion đến quá trình tạo gel và tính chất của composit. Thời gian tạo gel được xác định bằng phương pháp đảo ngược ống nghiệm. Trạng thái gel được hình thành khi hỗn hợp không bị chảy khi úp ngược ống nghiệm [79].

2.2.2.4. Đánh giá đặc tính hoá lý và cơ lý

❖ Phương pháp phân tích quang phổ hồng ngoại biến đổi (FTIR)

Phổ FTIR được sử dụng để xác định các nhóm chức hoá học đặc trưng và xác định thành phần hoá học trong vật liệu. Mẫu được đo trong khoảng số sóng từ 400 đến 4000 cm^{-1} để phân tích sự thay đổi về thành phần hoá học sau khi tổng hợp hoặc biến tính vật liệu.

❖ Phương pháp quang phổ nhiễu xạ tia X (XRD)

Giản đồ XRD được sử dụng để xác định cấu trúc tinh thể và thành phần pha của vật liệu. Các mẫu được đo trong khoảng góc 2θ từ 10 đến 60° để xác định các pha tinh thể đặc trưng và đánh giá mức độ kết tinh của vật liệu sau tổng hợp.

❖ Phương pháp phân tích nhiệt trọng lượng (TGA)

Đường cong TGA được sử dụng để đánh giá độ bền nhiệt và sự thay đổi khối lượng của vật liệu theo nhiệt độ. Thông qua đường cong TGA có thể xác định các giai đoạn phân huỷ, hàm lượng thành phần hữu cơ, vô cơ của vật liệu và độ tinh khiết của vật liệu.

❖ Phương pháp phân tích kích thước hạt (DLS)

Phương pháp DLS được sử dụng để xác định kích thước hạt và phân bố kích thước hạt trong môi trường phân tán. Dựa trên sự dao động cường độ ánh sáng tán xạ do chuyển động Brown của các hạt trên dung dịch để xác định kích thước thủy động học của vật liệu.

❖ Phương pháp kính hiển vi điện tử quét – phổ tán xạ năng lượng tia X mapping (SEM/EDX mapping)

SEM (khoảng cách làm việc 10 mm) được sử dụng để quan sát hình thái bề mặt và cấu trúc vi mô của vật liệu. Kết hợp với EDX mapping cho phép xác định thành phần nguyên tố và sự phân bố của các nguyên tố trên bề mặt mẫu.

❖ Phương pháp đo lưu biến học (Rheometer)

Phép đo lưu biến được sử dụng để đánh giá tính chất cơ học và hành vi biến dạng của hydrogel. Các thông số như mô đun đàn hồi (G'), và mô đun thất thoát (G'') được xác định thông qua các phép đo quét tần số.

2.2.2.5. Đánh giá khả năng bám dính

Khả năng bám dính của vật liệu composit được đánh giá định tính thông qua phương pháp quan sát trực quan trên các bề mặt mô sinh học khác nhau. Cụ thể, một lượng vật liệu được đặt lên bề mặt của các mô sinh học như xương, sụn, ... Sau khi tiếp xúc, mẫu được giữ trong một khoảng thời gian ngắn để đảm bảo sự hình thành liên kết bám dính. Khả năng bám dính được đánh giá thông qua quan sát khả năng cố định của vật liệu trên bề mặt khi lật ngược các bề mặt. Đồng thời, độ ổn định bám dính trong môi trường ẩm cũng được khảo sát bằng cách cho mẫu tiếp xúc với dòng chảy của nước nhằm mô phỏng điều kiện sinh lý. Hình ảnh thu được phản ánh khả năng bám dính của vật liệu với các bề mặt của mô sinh học [93].

2.2.2.6. Đánh giá hoạt tính sinh học

❖ Khả năng phân huỷ sinh học

Khả năng phân huỷ sinh học của nHAE được thử nghiệm dựa trên tiêu chuẩn ISO – 23317 – 2014. Cụ thể, môi trường giả dịch thể người (SBF) pH 7,4 được chuẩn bị theo như tiêu chuẩn đã công bố. Môi trường này bao gồm Na^+ 142 mM, K^+ 5 mM, Mg^{2+} 1,5 mM, Ca^{2+} 2,5 mM, Cl^- 147,8 mM, HCO_3^- 4,2 mM, HPO_4^{2-} 1 mM và SO_4^{2-} 0,5 mM. Các mẫu thử nghiệm được chuẩn bị ở dạng khối hình trụ có đường kính 10 mm và chiều cao 2 mm bằng cách trộn bột nHAE với DI theo tỉ lệ 1:1 về khối lượng và sau đó sấy khô ở 60°C trong tủ sấy đối lưu. Quá trình thử nghiệm khi mẫu được ngâm trong falcon 15mL chứa 6,5 mL SBF trong điều kiện 37°C. Thử nghiệm phân huỷ sinh học được tiến hành ở các mốc 1, 7, 14, 21 và 28 ngày. Sau khi kết thúc thử nghiệm, mẫu được rửa sạch bằng DI 2 lần trước khi được sấy khô ở 60°C trong tủ sấy đối lưu. Khả năng phân huỷ sinh học của vật liệu được đánh giá thông qua sự thay đổi khối lượng mẫu trước khi thử nghiệm (W_0) và khối lượng mẫu sau khi thử nghiệm tại các mốc thời gian (W_i) trong SBF. Tỷ lệ phần trăm khối lượng mất đi được tính theo công thức: Khối lượng còn lại (%) = $[(W_0 - W_i)/W_0] \times 100\%$ [94].

Khả năng phân huỷ sinh học của hydrogel nền GTA và composit được đánh giá trong môi trường DPBS chứa enzym collagenase 0.001wt % nhằm mô phỏng điều kiện sinh lý. Cụ thể, khoảng 300 μL vật liệu được chuẩn bị trong các ống eppendorf 2 mL. Các mẫu được xác định khối lượng ban đầu (W_0) và các mẫu được ngâm trong 1 mL dung dịch DPBS chứa emzym collagenase 0.001 wt% và ủ ở 37°C. Môi trường được thay mới và khối lượng mẫu được ghi nhận sau mỗi 24 giờ (W_i). Tỷ lệ phần trăm khối

lượng mất đi được tính theo công thức: Khối lượng còn lại (%) = $[(W_0 - W_t)/W_0] \times 100\%$ [93].

❖ Khả năng kháng oxy hoá

Khả năng kháng oxy hoá của composit được đánh giá thông qua thử nghiệm bắt gốc tự do DPPH. Cụ thể, dung dịch DPPH 0,03 mM được chuẩn bị trong ethanol. Sau đó, khoảng 300 µL vật liệu được ủ trong dung dịch DPPH ở điều kiện tránh sáng. Tại các thời điểm 10 phút và 30 phút, dung dịch phản ứng được đo độ hấp thụ ở 517 nm. Sự giảm cường độ hấp thụ phản ánh khả năng bắt gốc tự do của mẫu. Hiệu suất bắt gốc tự do được tính theo công thức: Tỷ lệ bắt gốc tự do (%) = $[(A_0 - A_t)/A_0] \times 100\%$. Trong đó, A_0 là độ hấp thụ của dung dịch DPPH 0,03 mM ở 517 nm và A_t là độ hấp thụ của dung dịch phản ứng ở các mốc thời gian [91].

❖ Khả năng kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn của composit được đánh giá thông qua sự ghi nhận đường cong tăng trưởng của *Escherichia coli* (*E. coli*) và *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) dựa trên tiêu chuẩn ASTM E2315-16. Cụ thể, *E. coli* và *S. aureus* được tăng sinh trong môi trường môi trường Lysogenia Broth trong 24 giờ ở 37°C. Vi khuẩn sau tăng sinh được điều chỉnh đến mật độ khoảng $1,2 - 1,5 \times 10^8$ CFU/mL và mẫu thử nghiệm được khử trùng dưới tia UV 30 phút để chuẩn bị cho thử nghiệm. Mẫu thử nghiệm và môi trường chứa vi khuẩn được đồng nuôi cấy với nồng độ 25 mg/mL ở 37°C. Đồng thời, môi trường chứa vi khuẩn cũng được chuẩn bị riêng để làm đối chứng. Quá trình đồng nuôi cấy được kéo dài qua các mốc 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ. Sau mỗi mốc thời gian thử nghiệm, khả năng tăng trưởng của vi khuẩn được xác định bằng cách ghi nhận giá trị độ hấp thụ quang học của môi trường thử nghiệm ở bước sóng 600 nm [95].

2.2.2.7. Đánh giá tính chất sinh học

❖ Chuẩn bị dịch chiết vật liệu

Các mẫu thử nghiệm dạng dịch chiết được chuẩn bị dựa trên tiêu chuẩn ISO 10993-12. Cụ thể, mẫu vật liệu dạng bột, hydrogel và composit được xử lý với tia UV trong 30 phút để khử trùng. Các mẫu bột đã khử trùng được ngâm trong môi trường tăng sinh phù hợp cho từng thử nghiệm với nồng độ 200 mg/mL ở 37 °C và 5% CO₂ trong 72 giờ. Trong khi đó, các mẫu hydrogel và composit đã khử trùng được ngâm trong môi trường tăng sinh phù hợp cho từng thử nghiệm với nồng độ 100 µL/mL ở 37°C và 5% CO₂ trong 72 giờ. Các mẫu chất lỏng sau đó được xử lý vô trùng bằng màng lọc vô trùng để chuẩn bị cho các thử nghiệm đối với dịch chiết vật liệu [93].

❖ Nuôi cấy tế bào

Để chuẩn bị cho thử nghiệm trên tế bào, dòng tế bào nguyên bào sợi đuôi chuột (L929) và dòng tế bào gốc tuỷ xương (BMSC) được nuôi cấy trong môi trường tăng sinh phù hợp. Cụ thể, L929 được nuôi cấy trong môi trường Dulbecco's Modified Eagle

Medium chứa 10% FBS, và 1% Pen Strep Glutamine. Trong khi đó, BMSC được nuôi cấy trong môi trường Minimum Essential Medium α chứa 10% FBS và 1% Pen Strep Glutamine. Khi các dòng tế bào đạt độ hợp lưu khoảng 80% sẽ được xử lý với Trypsin-EDTA để chuẩn bị cho các thử nghiệm [93].

❖ Thử nghiệm độc tính và tăng sinh tế bào

Thử nghiệm độc tính và khả năng hỗ trợ tăng sinh tế bào của vật liệu được tiến hành để cung cấp cơ sở cho các thử nghiệm chuyên sâu hơn. Cụ thể, 300 μ L huyền phù tế bào L929 với mật độ 2×10^4 tế bào/giếng được gieo vào đĩa 24 giếng. Tế bào được để ổn định trong 24 giờ ở 37°C và 5% CO₂ trước khi tế bào môi trường cũ bị loại bỏ và 300 μ L môi trường thử nghiệm tương ứng được thêm vào. Thử nghiệm được kéo dài theo thời gian với các mốc thử nghiệm bao gồm 1 ngày và 5 ngày. Sau khi kết thúc thời gian thử nghiệm, môi trường mới chứa dung dịch MTT 5 mg/mL theo tỉ lệ 10:1 được thay thế môi trường cũ và ủ trong 4 giờ ở 37°C và 5% CO₂. Các tinh thể formazan xuất hiện được hoà tan với DMSO và được đo độ hấp thụ tại bước sóng 570 nm. Hình thái tế bào được quan sát dưới kính hiển vi soi ngược và sự chênh lệch về tế bào sống sót tại các khoảng thời gian khác nhau sẽ được phân tích để đánh giá khả năng hỗ trợ tế bào tăng sinh của vật liệu. Tỉ lệ tế bào sống sót được tính toán theo sự chênh lệch độ hấp thụ tại 570 nm của mẫu thử nghiệm (OD_s) và độ hấp thụ tại 570 nm của mẫu chỉ nuôi cấy với môi trường tăng sinh (OD_n). Tỉ lệ tế bào sống sót được tính theo công thức: Tỷ lệ tế bào sống sót (%) = OD_s/OD_n*100% [93].

❖ Thử nghiệm di chuyển tế bào

Để chuẩn bị cho thử nghiệm đánh giá khả năng hỗ trợ di chuyển tế bào, 300 μ L huyền phù tế bào L929 với mật độ 1×10^5 tế bào/giếng được gieo vào đĩa 24 giếng ở 37°C và 5% CO₂. Tế bào sau khi hợp lưu, phủ kín toàn bộ đáy giếng sẽ được rạch 1 đường bằng đầu côn. Môi trường cũ và tế bào bong được loại bỏ và làm sạch bằng DPBS 2 lần. Sau đó, 300 μ L môi trường tăng sinh (đối chứng) và dịch chiết vật liệu tương ứng được thêm vào giếng và ủ ở 37 °C và 5% CO₂. Sau các mốc thời gian 0 giờ, 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ, vị trí vết rạch được quan sát dưới kính hiển vi soi ngược để đánh giá sự khép lại của vết rạch, từ đó đánh giá khả năng hỗ trợ tế bào di chuyển của vật liệu [96].

❖ Thử nghiệm biệt hoá xương

Để chuẩn bị cho thử nghiệm đánh giá khả năng hỗ trợ quá trình biệt hoá xương của vật liệu, 300 μ L huyền phù tế bào BMSC với mật độ 1×10^5 tế bào/giếng được gieo vào đĩa 24 giếng. Sau đó, môi trường được thay thế bằng dịch chiết vật liệu và được thay mới sau mỗi hai ngày trong suốt thời gian thử nghiệm (7 ngày). Đồng thời, môi trường biệt hoá xương (α -MEM chứa 10% FBS, 1% PS, 250 μ L β -glycerol 2-phosphate, 100 μ L axit ascorbic và 500 μ L dexamethasone), và môi trường tăng sinh được đồng nuôi cấy với BMSC lần lượt được xem là đối chứng dương và đối chứng âm. Kết thúc

quá trình xử lý tế bào với mẫu thử nghiệm, tế bào được làm sạch với DPBS và được cố định bằng 4% paraformaldehyde trong 30 phút. Sau cùng, tế bào được nhuộm với 2% Alizarin Red S và rửa lại với DPBS trước khi được quan sát mật độ và hình thái dưới kính hiển vi soi ngược [97].

2.2.2.8. Phân tích thống kê

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần và kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (SD). Phân tích thống kê được thực hiện theo phương pháp one-way ANOVA. Sự khác biệt được coi là có ý nghĩa ở mức $p < 0.05$

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

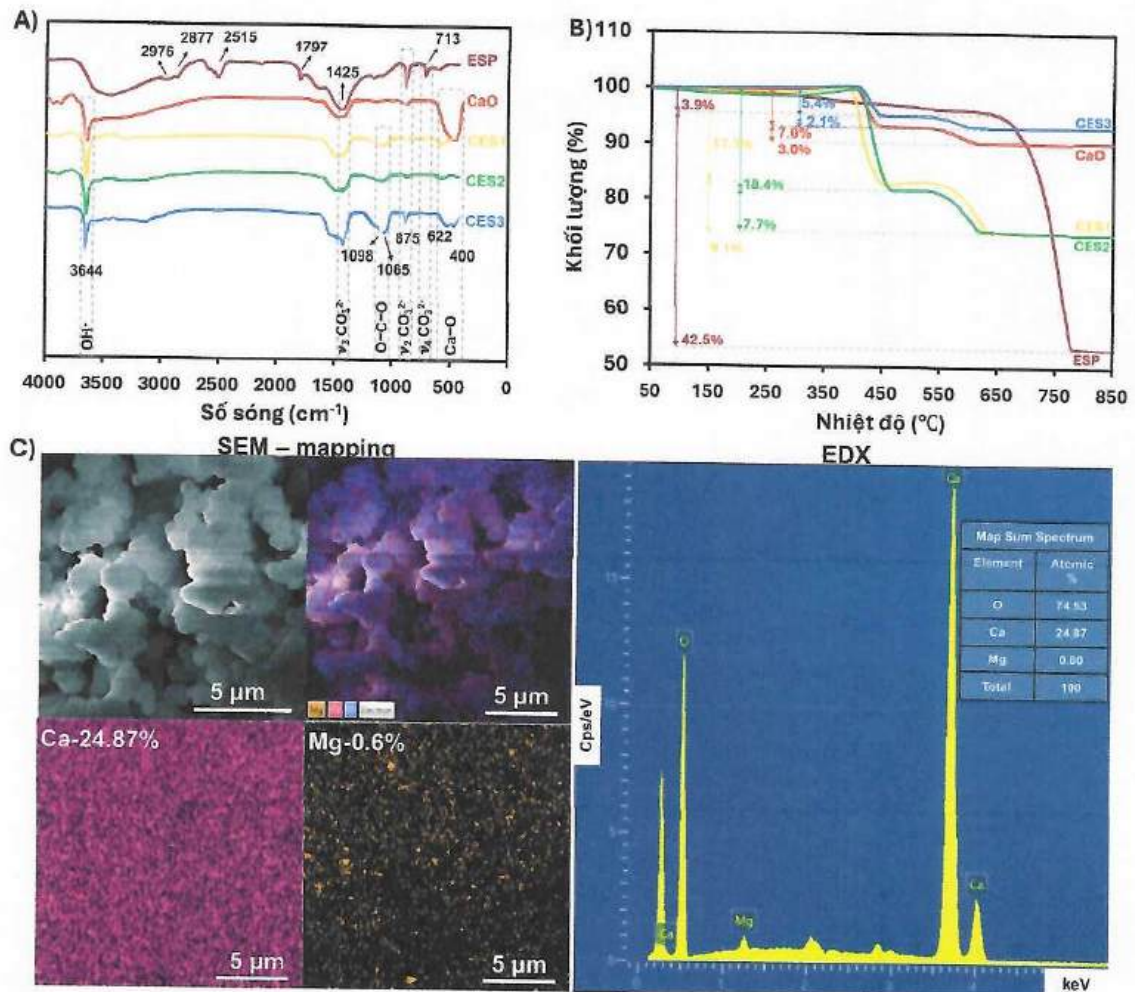
3.1. Tổng hợp nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà

3.1.1. Đánh giá hiệu quả thu nhận canxi oxit từ vỏ trứng gà

Để xác định điều kiện phù hợp để thu nhận CaO từ vỏ trứng gà thông qua quá trình nung bột vỏ trứng gà ở 1100°C, FTIR và TGA đã được sử dụng. Như được thể hiện trong Hình 3.1A, phổ FTIR xác nhận bột vỏ trứng có thành phần chủ yếu là hợp chất của nhóm CO_3^{2-} ($1425\text{ cm}^{-1} - \nu_3$, $875\text{ cm}^{-1} - \nu_2$, and $713\text{ cm}^{-1} - \nu_4$) và hợp chất hữu cơ ($2976\text{ cm}^{-1} - \text{CH}$, $2877\text{ cm}^{-1} - \text{CH}$, $2515\text{ cm}^{-1} - \text{COOH}$, and $1797\text{ cm}^{-1} \text{ C=O}$) [98–100]. Sau quá trình xử lý nhiệt, các đỉnh hấp thụ đặc trưng của các nhóm chức hữu cơ đã biến mất hoàn toàn trên phổ FTIR của các mẫu vỏ trứng nung. Các đỉnh hấp thụ đặc trưng cho nhóm CO_3^{2-} cũng thay đổi rõ rệt, sự biến mất của đỉnh hấp thụ tại vị trí 713 cm^{-1} và sự suy giảm cường độ đối với đỉnh hấp thụ ở 1425 cm^{-1} cũng như đỉnh hấp thụ ở 875 cm^{-1} đã được quan sát thấy. Điều này cho thấy quá trình phân hủy đã diễn ra đối với các hợp chất hữu cơ và hợp chất chứa CO_3^{2-} . Mặt khác, khi so sánh giữa các phổ FTIR của vỏ trứng nung và CaO, có thể dễ dàng nhận thấy sự tương đồng tương đối về hình dạng và vị trí các đỉnh phổ. Bên cạnh đó, dao động đặc trưng cho các liên kết oxit kim loại ($622 - 400\text{ cm}^{-1}$), trong trường hợp này là CaO, cho thấy cường độ mạnh nhất ở CES3 (1100°C – 3h) khi so giữa các mẫu vỏ trứng nung [101]. Dựa trên cường độ hấp thụ có thể thấy rằng thời gian nung ảnh hưởng trực tiếp đến sự hình thành và hàm lượng CaO sau quá trình xử lý nhiệt. Dù vậy, sự xuất hiện các đỉnh hấp thụ đặc trưng cho CO_3^{2-} và OH^- cũng được ghi nhận ở phổ CaO thương mại và các phổ vỏ trứng nung. Nguyên nhân của hiện tượng này có thể là do sự hấp phụ CO_2 và hơi nước trong không khí dẫn đến sự hình thành Ca(OH)_2 và CaCO_3 trên bề mặt. Kết quả đánh giá FTIR bước đầu cho thấy mức nhiệt độ phù hợp cho quá trình phân hủy diễn ra để thu nhận CaO từ vỏ trứng gà. Dù vậy, để xác định điều kiện phù hợp cho sản phẩm vỏ trứng nung đạt độ tinh khiết tương đương với CaO thương mại, phép đánh giá TGA là cần thiết.

Sự ổn định nhiệt của bột vỏ trứng gà, CaO thương mại và các mẫu vỏ trứng nung được thể hiện trên Hình 3.1B. Trước hết, đường cong TGA của bột vỏ trứng gà cho thấy khối lượng mất đạt xấp xỉ 47%, con số này phù hợp với một số công bố trước đây và nguyên nhân chủ yếu là do sự phân hủy của CaCO_3 cùng với các chất hữu cơ [102]. Trong khi đó, đường cong TGA của CaO thương mại chỉ thể hiện hai vùng mất khối lượng ở $400 - 450^\circ\text{C}$ và $550 - 600^\circ\text{C}$ lần lượt là 7% và 3%. Hiện tượng này liên quan đến quá trình khử nước của Ca(OH)_2 và phân hủy CaCO_3 hình thành do quá trình hút ẩm và tái cacbonat hóa bề mặt, phản ánh độ ổn định nhiệt cao của CaO thương mại [103]. Dạng đường cong tương tự cũng được quan sát thấy ở phổ TGA của các mẫu vỏ trứng nung và đều có 2 vùng mất khối lượng ở $400 - 450^\circ\text{C}$ và $550 - 600^\circ\text{C}$. Mặc dù vậy, tỷ lệ khối lượng mất đi của các mẫu vỏ trứng nung khác nhau. Trong khi CES1 và

CES2 cho thấy lượng mất khối lượng nhiều hơn, lần lượt mất khoảng 17.5% và 8.5% khối lượng ở hai khoảng nhiệt. CES3 chỉ cho thấy tỉ lệ mất khối lượng lần lượt là 5.4% và 2.1%. Kết quả này phản ánh các mẫu nung trong thời gian ngắn (1h và 2h) thể hiện lượng mất khối lượng cao hơn, cho thấy CaO thu được có xu hướng hút ẩm và cacbonat hoá mạnh hơn. Ngược lại, mẫu nung 3h cho đường cong TGA gần như tương đồng với CaO thương mại, cho thấy quá trình nung kéo dài đã giúp làm giảm đáng kể xu hướng hút ẩm và tái cacbonat hoá. Kết quả cho thấy thời gian nung đóng vai trò quyết định đến độ ổn định nhiệt và trạng thái hoá học của CaO thu được từ vỏ trứng gà. Thời gian nung chưa đủ có thể tạo ra CaO dễ hút ẩm và tái cacbonat hoá, trong khi nung đủ lâu sẽ giúp hình thành CaO có hành vi nhiệt gần giống CaO thương mại. Dựa trên kết quả TGA thu được, thời gian nung 3h được xem là phù hợp. Cuối cùng, khi kết hợp với kết quả FTIR, điều kiện thích hợp để thu nhận CaO từ vỏ trứng gà được xác định là nung ở 1100°C trong 3h.



Hình 3.1 Kết quả đánh giá hoá lý của các mẫu vỏ trứng nung. A) Phổ FTIR, B) Phổ TGA và C) Ảnh SEM – phổ EDX mapping

Hình thái và thành phần nguyên tố bề mặt của CES3 được phân tích bằng SEM kết hợp với EDX mapping như được thể hiện trong Hình 3.1C. Ảnh SEM cho thấy CES3 có cấu trúc gồm các hạt kích thước nano đến cận micromet, và phân bố không đồng đều.

Các hạt riêng lẻ quan sát được có hình dạng không đồng nhất và có xu hướng kết tụ thành cụm. Dù vậy, các hạt lớn với hình dạng tròn đều không xuất hiện cho thấy hiện tượng thiêu kết quá mức không xảy ra [104]. Bên cạnh đó, các khoảng trống giữa các cụm hạt cùng với bề mặt hạt có cấu trúc không nhẵn là các đặc điểm thuận lợi cho quá trình hydrat hoá ở giai đoạn tổng hợp phía sau [105]. Đặc biệt, kết quả phân tích EDX mapping cho thấy nguyên tố Mg xuất hiện với hàm lượng rất nhỏ (~ 0.6 at.%) và phân bố đồng đều trên bề mặt CES3. Điều này giúp mang lại lợi thế sinh học cho vật liệu sinh học được tổng hợp từ vỏ trứng gà [106]. Những kết quả này cung cấp thêm bằng chứng để chứng minh tính phù hợp của điều kiện nung được lựa chọn để thu nhận CaO chất lượng cao từ chất thải vỏ trứng gà.

3.1.2. Đánh giá tính chất hoá lý cơ bản của nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà

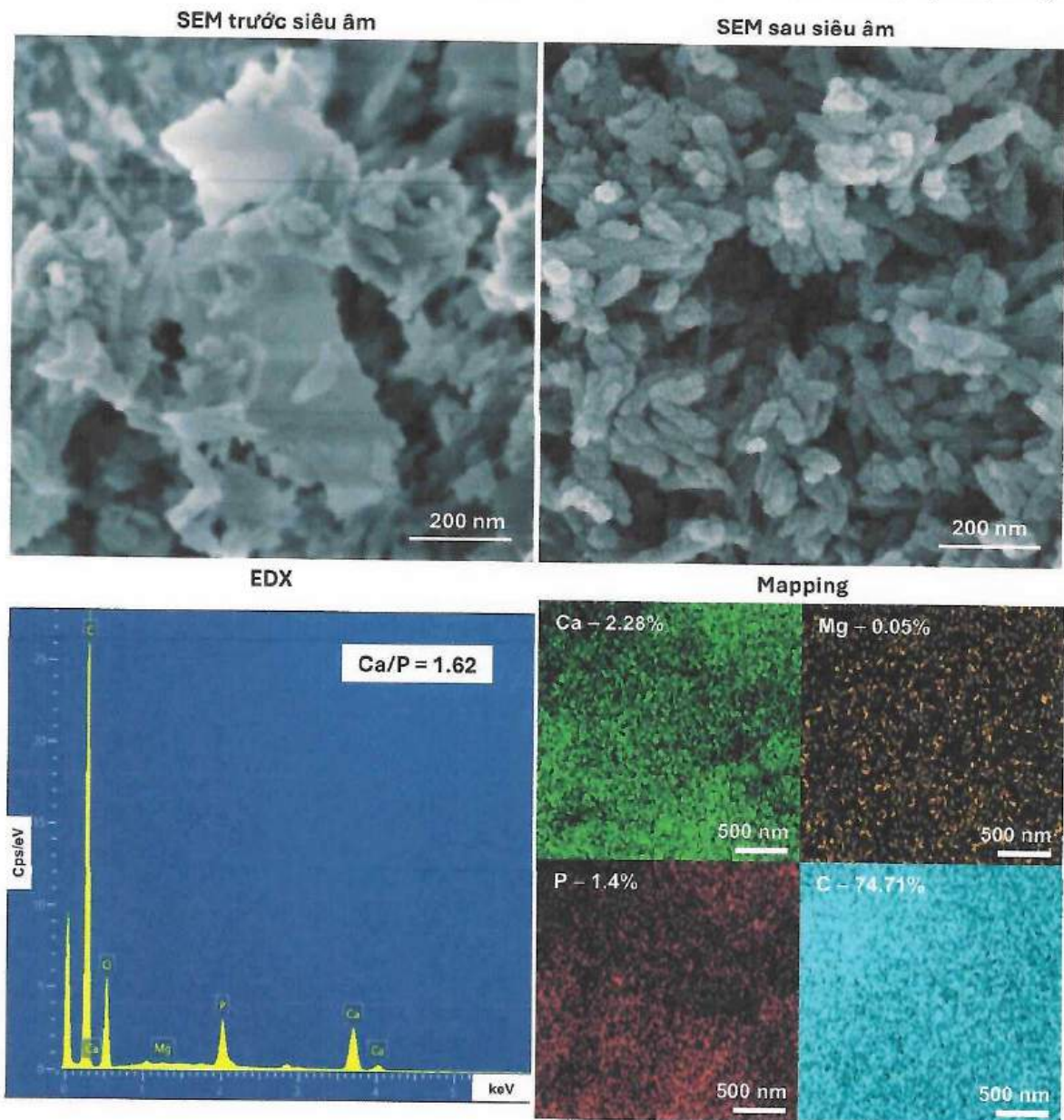
Vật liệu nano hydroxyapatit sau khi được tổng hợp từ bột vỏ trứng nung phù hợp thông qua phương pháp kết tủa hoá học kết hợp với sóng siêu âm được đánh giá thông qua các phép phân tích hoá lý để xác nhận sự tổng hợp thành công. Đầu tiên, nhóm chức PO_4^{3-} có 4 miền dao động chính, các miền này có thể được xác định thông qua phổ FTIR. Cụ thể, dải số sóng $400 - 450 \text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động biến dạng kiểu kéo ($\nu_2 \text{ PO}_4^{3-}$) của đoạn O-P-O, dải số sóng $570 - 610 \text{ cm}^{-1}$ biểu thị chế độ biến dạng suy biến bậc ba ($\nu_4 \text{ PO}_4^{3-}$) trong liên kết O-P-O, và dải số sóng $1010 - 1190 \text{ cm}^{-1}$ cho thấy sự hiện diện của chế độ kéo giãn suy biến bậc ba bất đối xứng ($\nu_3 \text{ PO}_4^{3-}$) trong liên kết P-O. Các đỉnh hấp thụ trong dải số sóng $937 - 970 \text{ cm}^{-1}$ tương ứng với chế độ kéo giãn đối xứng không suy biến ($\nu_1 \text{ PO}_4^{3-}$) trong liên kết P-O [107]. Phổ FTIR của nHAE được thể hiện trong Hình 3.2A thể hiện rõ các chế độ dao động ν_1 , ν_2 , ν_3 và ν_4 khác nhau của nhóm chức PO_4^{3-} đặc trưng cho HA. Cụ thể, phổ FTIR của nHAE cho thấy các đỉnh hấp thụ của nhóm chức PO_4^{3-} đặc trưng của vật liệu hydroxyapatit đã được hình thành rõ ràng. Đỉnh hấp thụ tại khoảng số sóng 1042 cm^{-1} được quy cho dao động kéo giãn bất đối xứng ($\nu_3 \text{ PO}_4^{3-}$) của nhóm photphat. Bên cạnh đó, các đỉnh hấp thụ tại khoảng số sóng 963 cm^{-1} đặc trưng cho dao động kéo giãn đối xứng ($\nu_1 \text{ PO}_4^{3-}$), trong khi các dải tại khoảng số sóng 602 cm^{-1} và $504 - 473 \text{ cm}^{-1}$ lần lượt tương ứng với dao động biến dạng (ν_4 và $\nu_2 \text{ PO}_4^{3-}$) của liên kết O-P-O. Sự xuất hiện đồng thời và rõ nét của các dao động đặc trưng này cho thấy cấu trúc của nhóm chức photphat của HA đã được hình thành hoàn chỉnh. Bên cạnh đó, đỉnh hấp thụ tại khoảng số sóng 3570 cm^{-1} được gán cho dao động kéo giãn của nhóm hydroxyl ($\nu_s \text{ OH}^-$), là đặc trưng quan trọng của cấu trúc tinh thể hydroxyapatit. Ngoài ra, dải phổ rộng trong khoảng số sóng $3700 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ xuất hiện có thể là do sự hấp thụ nước trong không khí. Đặc biệt, sự xuất hiện đỉnh hấp thụ tại các số sóng 1459 cm^{-1} , 1423 cm^{-1} và 876 cm^{-1} là đặc trưng của dao động ν_2 và dao động ν_3 của nhóm CO_3^{2-} . Nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, các đỉnh hấp thụ xuất hiện trong dải số sóng $890 - 850 \text{ cm}^{-1}$ và $1650 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ lần lượt là tín hiệu đặc

trung cho dao động ν_2 (thay thế loại A) và dao động ν_3 (thay thế loại B) của nhóm cacbonat trong cấu trúc của HA [108]. Sự xuất hiện đỉnh hấp thụ đặc trưng của CO_3^{2-} cho thấy vật liệu HA được tổng hợp là dạng HA thay thế cacbonat loại AB, trong đó các ion CO_3^{2-} có thể thay thế đồng thời vị trí của PO_4^{3-} và OH^- trong mạng tinh thể. Kết quả phân tích FTIR cho thấy sự hiện diện đầy đủ của các nhóm chức đặc trưng như PO_4^{3-} , và OH^- , đồng thời có sự xuất hiện của nhóm chức pha tạp CO_3^{2-} đã xác nhận sự tổng hợp thành công vật liệu HA có thành phần gần giống như HA sinh học tự nhiên.

Phương pháp nhiễu xạ tia X được sử dụng để xác định pha tinh thể và mức độ kết tinh của nHAE như được thể hiện trên Hình 3.2C. Kết quả từ giản đồ XRD cho thấy sự xuất hiện các đỉnh nhiễu xạ tại các vị trí 2θ đặc trưng gồm $25,79^\circ$; $28,029^\circ$; $31,728^\circ$; $32,079^\circ$; $32,916^\circ$; $33,948^\circ$ lần lượt đặc trưng cho các mặt phẳng (002), (102), (211), (112), (300), và (202). Các mặt phẳng này là các mặt phẳng đặc trưng cho vật liệu HA, điều này cho thấy nHAE được tổng hợp thành công với cấu trúc tinh thể chính thuộc về HA. Đồng thời, so với dữ liệu chuẩn của HA theo JCPDS No. 09-0432, các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng này hoàn toàn phù hợp. Để củng cố thêm kết quả này, phân tích pha tinh thể bằng phần mềm Profex cũng đã được thực hiện (Phụ lục 4). Kết quả cho thấy toàn bộ các đỉnh nhiễu xạ đều khớp hoàn toàn với pha HA mà không ghi nhận bất kỳ của các pha tạp nào. Điều này xác nhận rằng vật liệu nHAE thu được có thành phần hoàn toàn là HA. Kết quả này cho thấy quá trình tổng hợp từ nguồn nguyên liệu vô trùng gà không ảnh hưởng đến độ tinh khiết của sản phẩm khi mà các pha phụ như β -TCP hay CaO không xuất hiện trong giản đồ XRD của nHAE. Ngoài ra, độ kết tinh của nHAE cũng được xác định thông qua phần mềm Origin cho thấy giá trị đạt khoảng 62%. Giá trị này cho thấy nHAE có mức độ kết tinh trung bình, phù hợp với đặc trưng của HA sinh học. Nhiều nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, HA có độ kết tinh trung bình thường thể hiện sự cân bằng giữa độ ổn định và khả năng phân hủy sinh học, từ đó có thể cải thiện hoạt tính sinh học và khả năng tương tác với mô xương [109, 110]. Nhìn chung, phân tích XRD cho thấy nHAE được tổng hợp thành công với thành phần chính là HA và có độ kết tinh có tiềm năng thuận lợi cho ứng dụng tái tạo xương.

Phân tích tán xạ ánh sáng động được sử dụng để xác định kích thước thủy động học và sự phân bố kích thước hạt của nHAE như được thể hiện trên Hình 3.2B. Kết quả phân tích cho thấy kích thước trung bình của nHAE khoảng 179,5 nm, nằm trong vùng kích thước nano đặc trưng của vật liệu nano. Đường cong phân bố kích thước hạt được thể hiện ở dạng đơn đỉnh tương đối hẹp cho thấy hệ có xu hướng phân bố kích thước hạt tương đối đồng đều. Mặc dù vẫn có sự kéo dài nhẹ về phía có kích thước lớn hơn, gợi ý sự tồn tại của một số lượng nhỏ các cụm hạt thứ cấp. Bên cạnh đó, chỉ số phân tán của nHAE đạt khoảng 0,278, giá trị này cho thấy mức độ phân bố kích thước trung bình và nằm trong khoảng chấp nhận được đối với các hệ vật liệu nano. Giá trị này thể hiện hệ

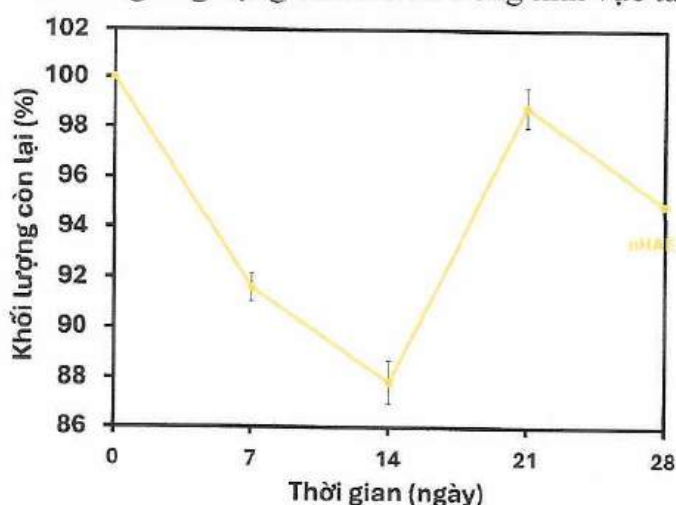
sự xuất hiện của nguyên tố Mg với hàm lượng nhỏ cho thấy khả năng pha tạp tự nhiên từ nguồn nguyên liệu vỏ trứng gà, điều này có thể đóng vai trò quan trọng việc điều chỉnh cấu trúc tinh thể và tăng hoạt tính sinh học của vật liệu. Bên cạnh đó, tín hiệu của nguyên tố C phân bố trên bề mặt cũng gợi ý sự hiện diện của các nhóm CO_3^{2-} . Sự có mặt của cả Mg^{2+} và CO_3^{2-} đã được chứng minh là có thể tăng cường khả năng phân huỷ sinh học và khả năng trao đổi ion của vật liệu, từ đó góp phần cải thiện hiệu quả trong các ứng dụng tái tạo xương [111, 112]. Nhìn chung, kết quả SEM/EDX không chỉ chứng minh hiệu quả của quá trình siêu âm trong việc kiểm soát hình thái và kích thước hạt, mà còn xác nhận thành phần hóa học và sự phân bố đồng đều của các nguyên tố trong vật liệu nHAE, tạo cơ sở cho việc đánh giá các tính chất sinh học của hệ vật liệu này.



Hình 3.3 Hình ảnh SEM của nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà trước và sau khi được xử lý sóng siêu âm. Phổ EDX và hình ảnh mapping của nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà

3.1.3. Đánh giá khả năng phân huỷ sinh học của nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà

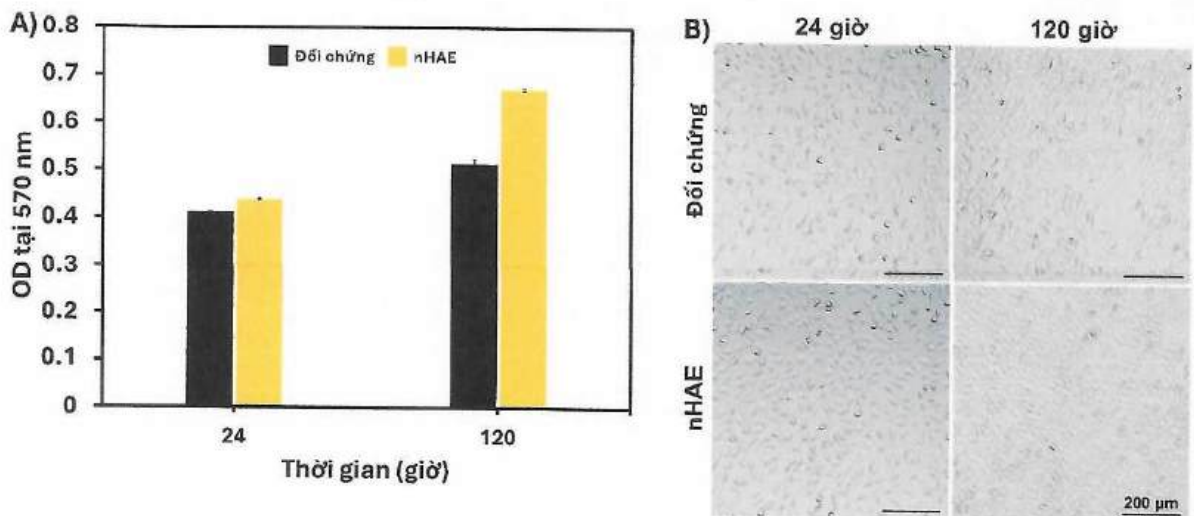
Kết quả đánh giá khả năng phân huỷ sinh học của nHAE trong môi trường SBF được thể hiện trong Hình 3.4. Trong thời gian đầu (0 – 14 ngày), khối lượng của nHAE đã giảm từ 100% xuống còn $87,82 \pm 0,86\%$. Điều này cho thấy khả năng phân huỷ sinh học của nHAE có thể liên quan đến sự tồn tại của của các khuyết tật cấu trúc từ sự phá vỡ của các ion như Mg^{2+} và CO_3^{2-} . Trong giai đoạn tiếp theo (21 ngày), khối lượng mẫu thử nghiệm tăng lên khoảng $98,82 \pm 0,79\%$. Sự gia tăng này có thể là hệ quả của quá trình hình thành lớp apatit trên bề mặt của nHAE. Điều này bắt nguồn từ sự bão hoà quá mức ion trong dịch SBF do sự phân huỷ của nHAE. Các ion Ca^{2+} , PO_4^{3-} ,... được giải phóng từ nHAE kết hợp với các ion sẵn có trong môi trường SBF tạo thành kết tủa apatit trên bề mặt của vật liệu nHAE, làm tăng khối lượng mẫu [113]. Đây là một dấu hiệu quan trọng trong gợi ý về tiềm năng khoáng hoá của vật liệu nHAE. Ở giai đoạn sau của quá trình thử nghiệm (28 ngày), khối lượng mẫu lại có hiện tượng giảm nhẹ xuống $94,91 \pm 0,22\%$. Điều này gợi ý cho việc dường như hệ đã đạt trạng thái cân bằng động giữa quá trình hoà tan và kết tủa. Các xu hướng này cho thấy nHAE không chỉ có khả năng phân huỷ sinh học mà còn duy trì được độ ổn định tương đối trong môi trường SBF. So với các polyme sinh học thường được ứng dụng trong chế tạo vật liệu tái tạo xương như collagen, gelatin, chitosan,... vốn có xu hướng phân huỷ sinh học nhanh và mất cấu trúc trong thời gian ngắn, nHAE thể hiện tính ổn định cao hơn, phù hợp cho các yêu cầu duy trì cấu trúc trong quá trình tái tạo xương. Nhìn chung, vật liệu nHAE thể hiện hành vi phân huỷ sinh học và khoáng hoá đặc trưng, bao gồm giai đoạn hoà tan ban đầu, tiếp theo là hình thành apatit và cuối cùng là trạng thái cân bằng động. Sự gia tăng khối lượng sau giai đoạn đầu là bằng chứng rõ ràng cho khả năng cảm ứng hình thành apatit, qua đó khẳng định tiềm năng ứng dụng của nHAE trong lĩnh vực tái tạo xương.



Hình 3.4 Kết quả đánh giá khả năng phân huỷ sinh học của nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà trong môi trường giả dịch thể người.

3.1.4. Thử nghiệm tế bào *in vitro* đối với nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà

Kết quả đánh giá khả năng tương thích tế bào và khả năng hỗ trợ tăng sinh trên dòng tế bào L929 được thể hiện như Hình 3.5A và B. Dựa trên tiêu chuẩn ISO 10993-5, vật liệu được xem là không gây độc tế bào khi tỷ lệ sống sót của tế bào lớn hơn 70%. Như được thể hiện trên Hình 3.5A, giá trị OD tại 570 nm của mẫu nHAE tại các mốc 1 ngày và 5 ngày lần lượt đạt $0,438 \pm 0,002$ và $0,669 \pm 0,004$, cao hơn so với mẫu đối chứng ($0,412 \pm 0,002$ và $0,515 \pm 0,01$). Điều này cho thấy nHAE không chỉ có tính tương thích tế bào mà còn có xu hướng thúc đẩy tế bào tăng sinh. Theo thời gian thử nghiệm, mật độ quang học của cả hai nhóm đều tăng, phản ánh sự tăng sinh tự nhiên của tế bào. Tuy nhiên, mức độ gia tăng mật độ quang học ở nhóm nHAE rõ rệt hơn so với mẫu đối chứng, đặc biệt là ở mốc thử nghiệm 5 ngày. Điều này cho thấy môi trường dịch chiết của vật liệu nHAE có khả năng tạo điều kiện thuận lợi hơn cho sự phát triển và tăng sinh của tế bào. Bên cạnh đó, kết quả định lượng được củng cố bởi hình ảnh tế bào được quan sát dưới kính hiển vi soi ngược (Hình 3.5B). Ở cả hai mốc thời gian thử nghiệm, tế bào trong nhóm nHAE vẫn duy trì hình thái kéo dài, bám dính tốt và không xuất hiện dấu hiệu co rút hay tròn hoá tế bào, cho thấy vật liệu nHAE không gây ra sự căng thẳng hoặc kích hoạt quá trình chết theo chương trình của tế bào. Đặc biệt, tại mốc thử nghiệm 5 ngày, mật độ tế bào trong nhóm nHAE cao hơn rõ rệt so với mẫu đối chứng, cho thấy hiệu quả thúc đẩy tế bào tăng sinh của nHAE. Hiệu quả này có thể được giải thích do hành vi phân huỷ sinh học của nHAE cung cấp các ion Ca^{2+} và một lượng nhỏ Mg^{2+} có thể tạo ra môi trường thuận lợi và kích thích sự tăng sinh của tế bào [114, 115]. Nhìn chung, nHAE có khả năng tương thích tế bào tốt và khả năng hỗ trợ tăng sinh tế bào L929 hiệu quả. Các kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng của vật liệu trong lĩnh vực tái tạo mô xương.

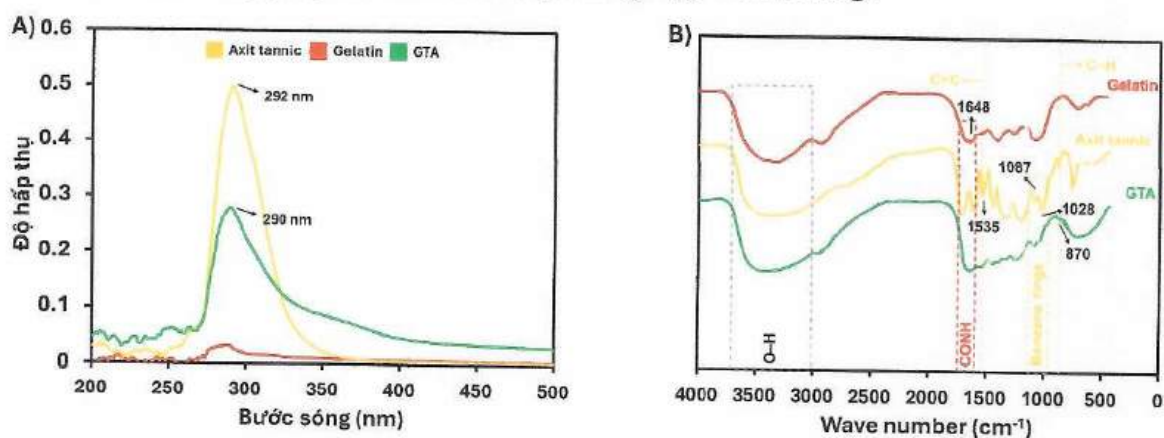


Hình 3.5 Kết quả đánh giá tính tương thích tế bào và khả năng hỗ trợ tăng sinh tế bào của nano hydroxyapatit thông qua A) Độ hấp thụ của formazan ở 570 nm và B) Hình ảnh tế bào L929 dưới kính hiển vi soi ngược

3.2. Tổng hợp hydrogel nền gelatin biến tính axit tannic

3.2.1. Tổng hợp polyme gelatin biến tính axit tannic

Polyme GTA được tổng hợp bằng phản ứng cộng Michael giữa gelatin và axit tannic được phân tích FTIR như Hình 3.6B. Đối với Gel, các đỉnh hấp thụ đặc trưng xuất hiện trong khoảng 3400 cm^{-1} (N–H và O–H), $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$ (C=O), và vùng $\sim 1000 - 1100\text{ cm}^{-1}$ (C–O). Trong khi đó, phổ FTIR của TA cho thấy dải hấp thụ rộng ở khoảng $3200 - 3500\text{ cm}^{-1}$ (hydroxyl phenolic) và các đỉnh hấp thụ trong vùng $1400 - 1700\text{ cm}^{-1}$ (vòng thơm và C–O). Đặc biệt đối với GTA, phổ FTIR thể hiện sự kết hợp đặc trưng của cả hai thành phần bao gồm cả Gel và TA. Cụ thể các dải hấp thụ của gelatin vẫn được duy trì nhưng có xu hướng giảm cường độ và mở rộng, chủ yếu tại vùng $3200 - 3500$ và $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$. Đồng thời, sự xuất hiện rõ rệt của các đỉnh hấp thụ đặc trưng cho cấu trúc vòng thơm và nhóm phenolic trong phổ FTIR của GTA là bằng chứng cho thấy TA đã được tích hợp thành công vào polyme Gel. Sự thay đổi về cường độ và hình dạng của các đỉnh hấp thụ cho thấy sự hình thành các tương tác giữa Gel và TA, có thể bao gồm liên kết hydro và/hoặc tương tác cộng hoá trị thông qua cơ chế phản ứng cộng Michael [116, 117]. Bên cạnh đó, phép đánh giá UV-vis cũng được thực hiện đồng thời để củng cố sự đánh giá về việc tổng hợp GTA. Như được thể hiện trong Hình 3.6A, Gel hầu như không thể hiện đỉnh hấp thụ đặc trưng trong khoảng bước sóng $200 - 500\text{ nm}$. Ngược lại, TA xuất hiện một đỉnh hấp thụ rõ ràng, sắc nét tại bước sóng khoảng 292 nm , đặc trưng cho hệ liên hợp $\pi - \pi^*$ của vòng thơm. Sau khi biến tính Gel với TA, phổ UV-vis của GTA cho thấy một đỉnh hấp thụ tại 290 nm . Sự xuất hiện của đỉnh này cùng với sự dịch chuyển nhẹ so với đỉnh đặc trưng của TA ban đầu cho thấy môi trường điện tử của các nhóm chức trong TA đã thay đổi sau khi tương tác với Gel. Điều này được cho là do sự hình thành các liên kết hoặc tương tác giữa TA và mạch polyme Gel, làm thay đổi mức năng lượng của các điện tử ($n - \pi^*$ và $\pi - \pi^*$) [118]. Từ các kết quả đánh giá, có thể kết luận rằng polyme GTA đã được tổng hợp thành công.

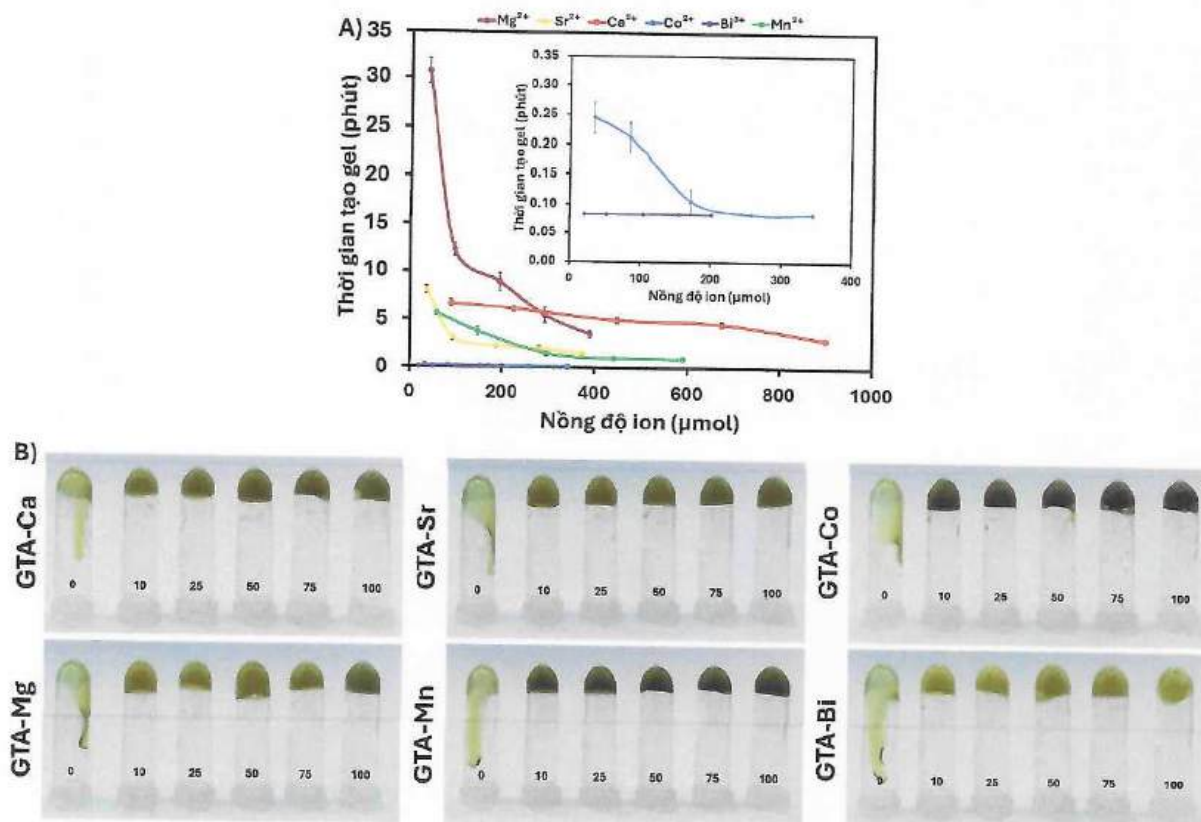


Hình 3.6 Kết quả đánh giá hiệu quả tổng hợp polyme gelatin biến tính axit tannic. A) Phổ UV-vis và B) Phổ FTIR

3.2.2. Đánh giá tính chất cơ học, hoá lý cơ bản của hydrogel nền GTA

3.2.2.1. Khảo sát khả năng tạo gel của một số ion kim loại

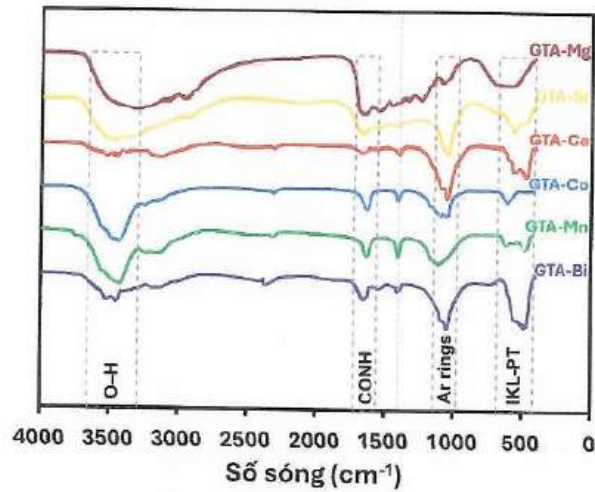
Sau khi thành công tổng hợp polyme GTA, khả năng tạo gel của hệ được khảo sát với các ion kim loại bao gồm Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} và Bi^{3+} thông qua thử nghiệm khảo sát thời gian tạo gel bằng phương pháp đảo ngược ống nghiệm. Kết quả được thể hiện trong Phụ lục 5 và Hình 3.7B cho thấy tất cả các ion đều có khả năng tạo gel với GTA nhưng hiệu quả tạo gel có sự khác biệt đáng kể. Đối với các ion Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} và Mn^{2+} , thời gian tạo gel tương đối dài (hầu hết hơn 1 phút) và giảm dần khi tăng nồng độ ion. Cụ thể, tại nồng độ 10 mg/mL, thời gian tạo gel của Mg^{2+} lên đến 1827 ± 10 s, trong khi Ca^{2+} và Sr^{2+} lần lượt là 391 ± 6 s và 429 ± 8 s. Ngay cả khi tăng nồng độ tăng lên đến 100 mg/mL (nồng độ ion cao nhất – Hình 3.7A), thời gian tạo gel của các hệ này vẫn lớn hơn 60 giây. Bên cạnh đó, trạng thái gel trên thực tế được ghi nhận đối với các hệ gel này đều ở trạng thái gel lỏng và có thể kéo sợi. Ngược lại, các hệ gel sử dụng Co^{2+} và Bi^{3+} thể hiện khả năng tạo gel nhanh hơn đáng kể. Thời gian tạo gel của Co^{2+} đạt khoảng 14 ± 2 s ở nồng độ 10 mg/mL và giảm xuống dưới 5 giây khi tăng nồng độ lên 75 – 100 mg/mL, trong khi hệ Bi^{3+} cho thấy thời gian tạo gel dưới 5 giây ở toàn bộ dải nồng độ khảo sát. Trạng thái gel trên thực tế cho thấy gel hình thành nhanh, đồng nhất và có khả năng giữ hình dạng tốt ngay sau khi phối trộn. Sự hình thành hydrogel trong hệ GTA với ion kim loại chủ yếu được chi phối bởi liên kết phối trí giữa các nhóm chức của polyme và ion kim loại. Trong môi trường phản ứng, các nhóm phenolic hydroxyl của axit tannic trong GTA có thể bị oxy hoá một phần thành dạng catechol và/hoặc quinone, đóng vai trò là ligand cho các ion kim loại thông qua việc cho cặp electron tự do. Quá trình này dẫn đến sự hình thành các liên kết phối trí, đóng vai trò như các điểm liên kết ngang trong mạng polyme ba chiều. Ngoài ra, các tương tác hỗ trợ như liên kết hydro và tương tác π - π cũng góp phần ổn định cấu trúc hydrogel. Hiệu quả tạo gel do đó phụ thuộc mạnh vào hóa trị và khả năng phối trí của ion kim loại, trong đó các ion hóa trị cao hoặc có khả năng tạo phức mạnh sẽ hình thành mạng gel nhanh và ổn định hơn [119, 120].



Hình 3.7 Kết quả khảo sát thời gian tạo gel và trạng thái gel của polyme gelatin biến tính axit tannic với một số ion kim loại. A) Đồ thị thể hiện sự ảnh hưởng của nồng độ của một số ion kim loại đến thời gian tạo gel và B) Hình ảnh ống nghiệm đảo ngược

3.2.2.2. Đánh giá tính chất hoá lý của hydrogel nền gelatin biến tính axit tannic

Kết quả đánh giá FTIR của các hệ GTA – ion kim loại được thể hiện trên Hình 3.8 cung cấp thêm bằng chứng cho cơ chế này. Cụ thể, dải hấp thụ rộng tại khoảng $3600 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ (liên quan đến dao động kéo giãn của nhóm O-H) có xu hướng giảm cường độ và dịch chuyển nhẹ, cho thấy sự tham gia của các nhóm phenolic hydroxyl trong quá trình tạo phức với ion kim loại. Đồng thời, các dải hấp thụ trong vùng $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ (liên quan đến dao động C=O và khung vòng thơm) cũng có sự thay đổi về vị trí và cường độ, phản ánh sự hình thành cấu trúc catechol/quinone và tương tác với ion kim loại. Đặc biệt, trong vùng dấu vân tay, sự xuất hiện hoặc biến đổi các dải hấp thụ đặc trưng được gán cho sự hình thành liên kết phối trí giữa ion kim loại và các nhóm chức của GTA [86]. Từ kết quả khảo sát khả năng tạo gel và phân tích FTIR có thể thấy rằng mặc dù tất cả các ion kim loại đều có khả năng tạo gel với polyme GTA, tuy nhiên các ion Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} và Mn^{2+} không phù hợp cho các ứng dụng hydrogel *in situ* do thời gian tạo gel kéo dài và yêu cầu nồng độ ion cao để hình thành gel ổn định. Ngược lại, Co^{2+} và Bi^{3+} thể hiện khả năng tạo gel nhanh, cấu trúc gel đồng nhất và có bằng chứng rõ ràng về sự hình thành liên kết phối trí trong phổ FTIR. Do đó, hai ion này được lựa chọn để tiếp tục khảo sát trong các thử nghiệm tiếp theo.

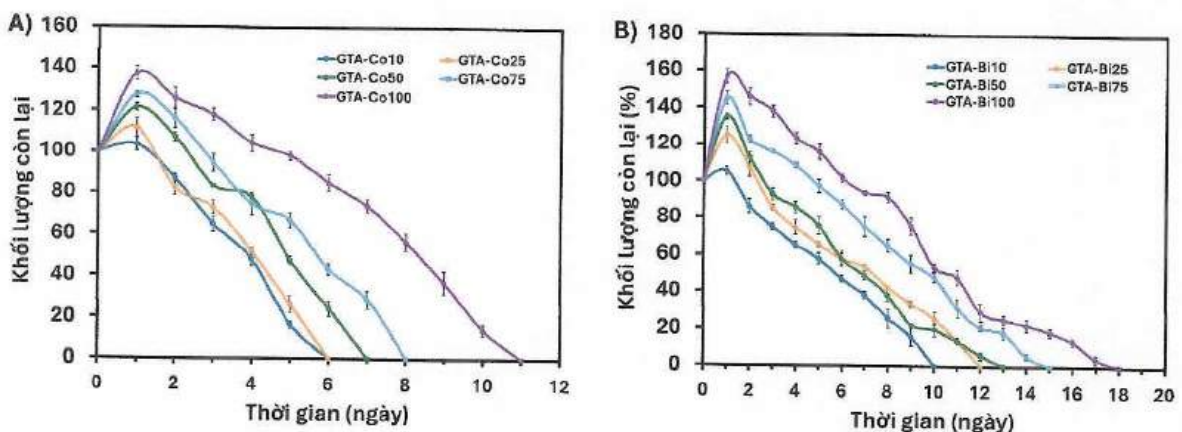


Hình 3.8 Phổ FTIR của các mẫu hydrogel gelatin biến tính axit tannic

3.2.2.3. Đánh giá khả năng phân hủy sinh học của hydrogel GTA-Co và GTA-Bi

Khả năng phân hủy sinh học là một yếu tố quan trọng đối với các vật liệu hydrogel ứng dụng trong tái tạo mô, đặc biệt là tái tạo xương. Tính chất này ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng thay thế dần dần vật liệu bằng mô mới cũng như quá trình giải phóng các yếu tố sinh học. Vậy nên, khả năng phân hủy của các hệ hydrogel GTA liên kết ngang bởi ion Co^{2+} và Bi^{3+} được đánh giá trong môi trường DPBS chứa enzyme collagenase nhằm mô phỏng điều kiện sinh lý. Do gelatin là một polyme tự nhiên có chứa các trình tự đặc hiệu với enzyme collagenase nên tất cả các mẫu hydrogel đều thể hiện đặc trưng phân hủy sinh học thông qua cơ chế enzym. Kết quả được thể hiện trong Hình 3.9 cho thấy cả hai hệ GTA-Co và GTA-Bi đều trải qua giai đoạn trương nở ban đầu trước khi bước vào quá trình phân hủy. Đối với hệ GTA-Bi, tất cả các mẫu đều ghi nhận sự gia tăng khối lượng trong giai đoạn đầu, với mức độ trương nở tăng theo nồng độ ion. Cụ thể, mẫu GTA-Bi100 đạt giá trị trương nở cao nhất ($156,66 \pm 3,68\%$) tại ngày đầu tiên, trong khi các mẫu có nồng độ thấp hơn như GTA-Bi10 và GTA-Bi25 chỉ đạt khoảng 105 – 125%. Sau giai đoạn trương nở, các mẫu bắt đầu phân hủy dần theo thời gian. Đáng chú ý, thời gian phân hủy kéo dài đáng kể khi tăng nồng độ Bi^{3+} . Các mẫu GTA-Bi10 và GTA-Bi25 bị phân hủy hoàn toàn trong khoảng 6 – 10 ngày, trong khi GTA-Bi50 và GTA-Bi75 kéo dài đến khoảng 12 – 15 ngày. Đặc biệt, mẫu GTA-Bi100 thể hiện độ bền cao nhất, duy trì cấu trúc đến khoảng 17–18 ngày trước khi phân hủy hoàn toàn. Xu hướng này cho thấy nồng độ Bi^{3+} càng cao thì tốc độ phân hủy càng chậm. Đối với hệ GTA-Co, xu hướng tương tự cũng được quan sát, tuy nhiên mức độ khác biệt rõ rệt hơn ở tốc độ phân hủy. Các mẫu GTA-Co có giai đoạn trương nở ban đầu với mức tăng khối lượng từ khoảng 103 – 137%, trong đó GTA-Co100 đạt giá trị cao nhất ($137,25 \pm 3,29\%$) tại ngày đầu tiên. Sau đó, quá trình phân hủy diễn ra nhanh hơn so với hệ GTA-Bi. Cụ thể, các mẫu GTA-Co10 và GTA-Co25 phân hủy hoàn toàn trong khoảng 5 – 6 ngày, trong khi GTA-Co50 và GTA-Co75 kéo dài đến khoảng 7 – 8 ngày. Mẫu

GTA-Co100 có độ bền cao nhất trong nhóm này nhưng cũng chỉ duy trì đến khoảng 10 – 11 ngày trước khi phân hủy hoàn toàn, ngắn hơn đáng kể so với hệ Bi^{3+} . Sự khác biệt về hành vi phân hủy giữa hai hệ có thể được giải thích dựa trên mật độ liên kết ngang trong mạng hydrogel. Khi nồng độ ion kim loại tăng, mật độ liên kết phối trí giữa ion kim loại và các nhóm phenolic/catechol trong GTA tăng lên, tạo thành mạng lưới chặt chẽ hơn. Đối với ion Bi^{3+} , với hóa trị cao hơn (+3), khả năng tạo liên kết phối trí mạnh và đa điểm với các nhóm chức trong GTA lớn hơn so với Co^{2+} , dẫn đến cấu trúc hydrogel đặc hơn và ổn định hơn. Cấu trúc này hạn chế sự xâm nhập của nước cũng như sự tiếp cận của enzym collagenase vào các vị trí phân cắt, từ đó làm chậm quá trình phân hủy. Ngược lại, hệ GTA-Co với hóa trị thấp hơn (+2) tạo mạng liên kết kém chặt chẽ hơn, cho phép enzym dễ dàng tiếp cận và phân cắt polyme nhanh hơn. Từ góc độ ứng dụng, một vật liệu hydrogel lý tưởng cho tái tạo xương cần có tốc độ phân hủy phù hợp, không quá nhanh để đảm bảo duy trì cấu trúc hỗ trợ ban đầu, nhưng cũng không quá chậm để cản trở quá trình tái tạo mô. Kết quả thu được cho thấy hệ GTA-Bi có xu hướng phân hủy chậm hơn và duy trì độ ổn định cấu trúc tốt hơn so với hệ GTA-Co. Trong khi đó, hệ GTA-Co thể hiện tốc độ phân hủy nhanh hơn, cho thấy mạng liên kết kém bền hơn trong môi trường enzym. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng khả năng phân hủy sinh học chỉ là một trong những tiêu chí đánh giá vật liệu. Để lựa chọn ion kim loại phù hợp cho ứng dụng y sinh, đặc biệt trong tái tạo xương, cần xem xét đồng thời các yếu tố khác như tính tương thích sinh học và độc tính tế bào. Do đó, mặc dù kết quả phân hủy cho thấy hệ GTA-Bi có tiềm năng về độ ổn định cấu trúc, việc lựa chọn ion kim loại tối ưu sẽ được đưa ra sau khi kết hợp và phân tích thêm các kết quả đánh giá độc tính tế bào trong các phần tiếp theo.

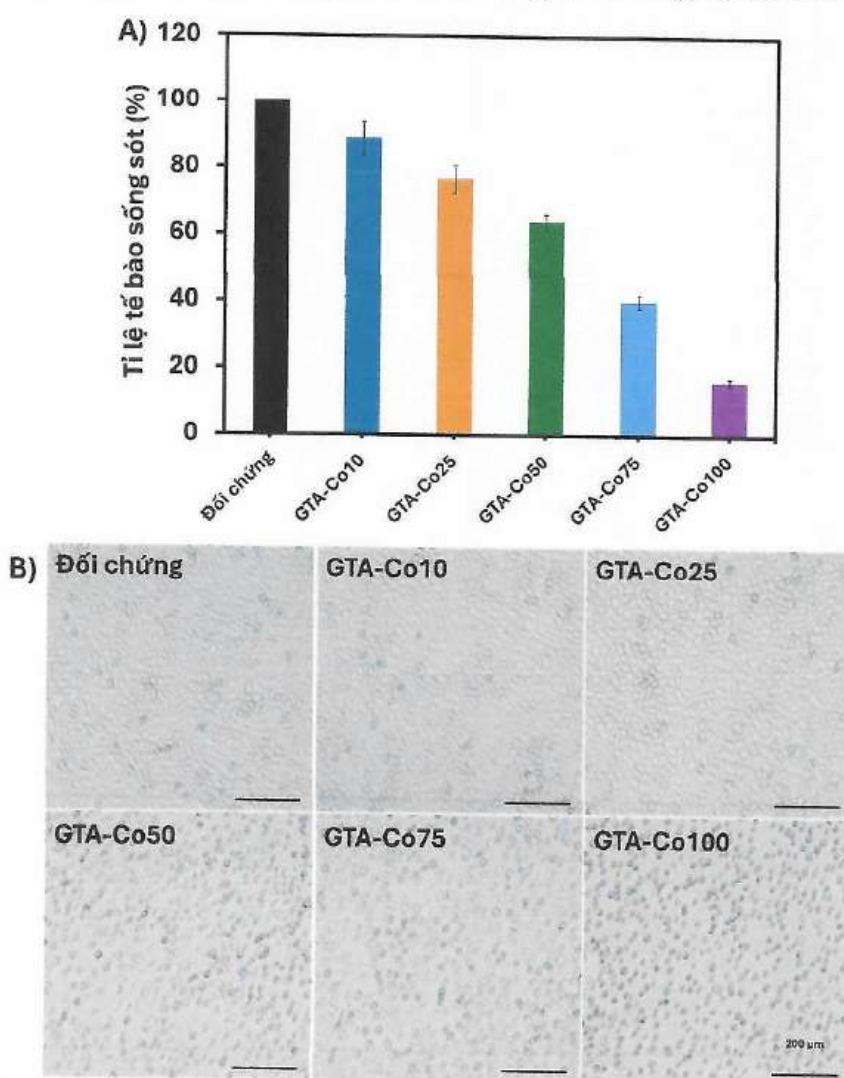


Hình 3.9 Đồ thị thể hiện khả năng phân hủy sinh học. A) GTA-Co và B) GTA-Bi

3.2.3. Thử nghiệm tế bào *in vitro* đối với hydrogel GTA-Co và GTA-Bi

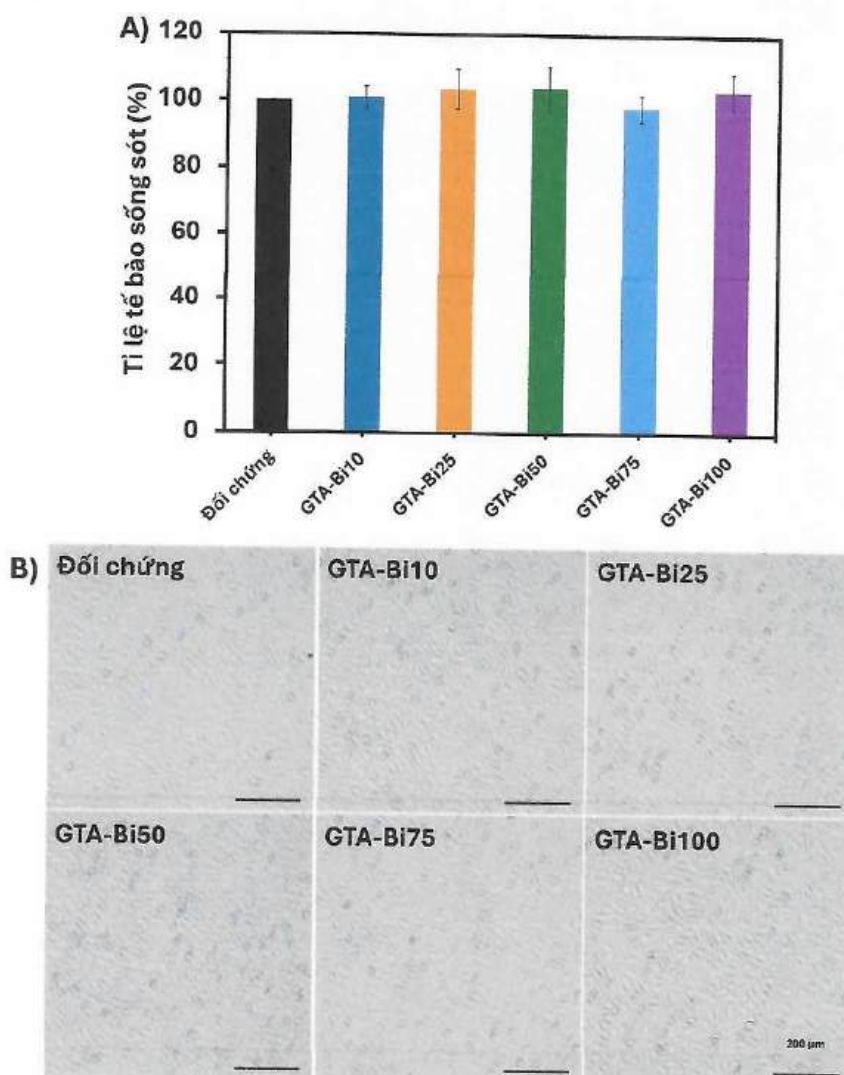
Thử nghiệm khả năng tương thích tế bào của các hệ hydrogel GTA liên kết ngang bởi Co^{2+} và Bi^{3+} được đánh giá thông qua thử nghiệm MTT trên dòng tế bào L929. Kết quả được đánh giá thông qua tỷ lệ tế bào sống sót và hình thái tế bào (Hình 3.10 và Hình

3.11). Theo tiêu chuẩn ISO 10993 – 5, vật liệu được xem là không gây độc tế bào khi tỉ lệ tế bào sống sót lớn hơn 70%. Hệ hydrogel GTA-Co thể hiện xu hướng giảm mạnh tỉ lệ tế bào sống sót khi tăng nồng độ ion. Cụ thể, tại nồng độ 10 mg/mL, tỉ lệ sống sót vẫn duy trì ở mức $88,71 \pm 4,92\%$, tuy nhiên khi tăng lên 25 mg/mL và 50 mg/mL, giá trị này giảm xuống còn lần lượt khoảng 76,62% và 63,96%. Trong đó, tỉ lệ tế bào sống sót của mẫu GTA-Co50 đã thấp hơn ngưỡng 70% theo tiêu chuẩn ISO 10993 – 5, cho thấy bắt đầu xuất hiện độc tính tế bào. Xu hướng này trở nên nghiêm trọng hơn ở các nồng độ cao, với GTA-Co75 và GTA-Co100 chỉ đạt khoảng 40,23% và 16,41%. Quan sát hình ảnh tế bào (Hình 3.10B) cho thấy sự thay đổi rõ rệt về hình thái, các tế bào có xu hướng co tròn, giảm khả năng bám dính và mật độ tế bào giảm mạnh theo sự tăng dần của nồng độ Co^{2+} . Ở các mẫu GTA-Co75 và GTA-Co100, phần lớn tế bào mất hình thái kéo dài đặc trưng, xuất hiện nhiều tế bào co tròn và rời rạc, cho thấy dấu hiệu stress tế bào và tổn thương màng tế bào. Những quan sát này hoàn toàn phù hợp với kết quả định lượng MTT, khẳng định độc tính tế bào của GTA-Co tăng theo nồng độ ion Co^{2+} .



Hình 3.10 Kết quả đánh giá độc tính tế bào của GTA-Co thông qua A) Tỷ lệ tế bào sống sót và B) Hình ảnh tế bào dưới kính hiển vi soi ngược

Ngược lại, đối với hệ hydrogel GTA-Bi, tất cả các mẫu khảo sát trong dãy nồng độ từ 10 đến 100 mg/mL đều cho thấy tỉ lệ tế bào sống sót cao, dao động trong khoảng 98,26 – 104,06% và gần như tương đương với mẫu đối chứng. Điều này cho thấy hệ hydrogel GTA-Bi không gây độc và có khả năng tương thích tế bào tốt. Kết quả định lượng này được củng cố bởi hình ảnh tế bào quan sát được dưới kính hiển vi soi ngược (Hình 3.11B), trong đó các tế bào L929 ở tất cả các mẫu GTA-Bi đều có dạng hình thoi đặc trưng, bám dính tốt trên bề mặt và phân bố đồng đều tương tự như mẫu đối chứng. Bên cạnh đó, hiện tượng co tròn cũng như sự bong tách hay giảm mật độ tế bào đáng kể không xuất hiện.



Hình 3.11 Kết quả đánh giá độc tính tế bào của GTA-Bi thông qua A) Tỷ lệ tế bào sống sót và B) Hình ảnh tế bào dưới kính hiển vi soi ngược

Khi kết hợp với kết quả phân hủy sinh học, có thể thấy rõ sự khác biệt giữa hai hệ vật liệu. Hệ GTA-Co không chỉ thể hiện độc tính tế bào tăng theo nồng độ mà còn có tốc độ phân hủy nhanh hơn, cho thấy mạng hydrogel kém ổn định và khó duy trì vai trò giá đỡ trong quá trình tái tạo mô. Ngược lại, hệ GTA-Bi vừa đảm bảo tính tương thích tế bào cao, vừa thể hiện khả năng kiểm soát phân hủy tốt hơn với thời gian tồn tại kéo

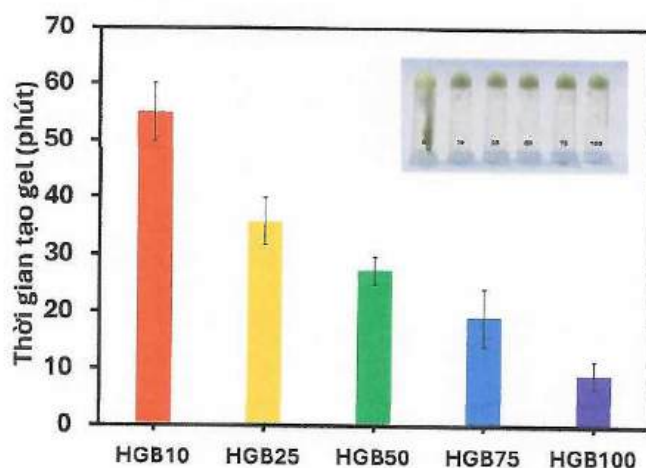
dài hơn trong môi trường enzyme. Điều này cho thấy hệ GTA-Bi có khả năng duy trì cấu trúc đủ lâu để hỗ trợ tế bào bám dính và phát triển mà không gây ảnh hưởng bất lợi đến môi trường vi mô xung quanh. Từ các kết quả trên, có thể thấy rằng mặc dù cả Co^{2+} và Bi^{3+} đều có khả năng tạo gel hiệu quả, tuy nhiên hệ GTA-Co không đáp ứng yêu cầu về tính tương thích sinh học, đặc biệt ở nồng độ cao. Vậy nên, trong trường hợp này, GTA-Co chưa phù hợp cho ứng dụng tái tạo xương. Ngược lại, hệ GTA-Bi thể hiện sự cân bằng giữa khả năng tạo gel, độ ổn định cấu trúc và tính tương thích tế bào. Vì vậy, ion Bi^{3+} được lựa chọn là tác nhân liên kết ngang để tiếp tục chế tạo hệ nanocomposit hydrogel nHAE/GTA/Bi (HGB) trong các thử nghiệm tiếp theo.

3.3. Chế tạo vật liệu nanocomposit hydrogel nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà kết hợp với hydrogel gelatin biến tính axit tannic liên kết ngang bằng Bi^{3+}

3.3.1. Đánh giá tính chất cơ học, hoá lý cơ bản của nanocomposit HGB

3.3.1.1. Khảo sát khả năng tạo gel của các nồng độ ion kim loại Bi^{3+}

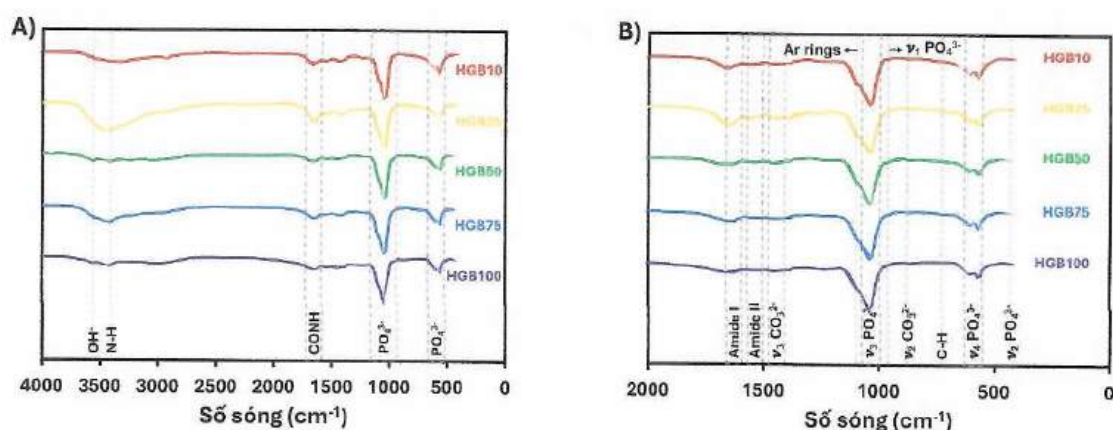
Vật liệu nHAE/GTA/Bi được chế tạo thông qua việc phối trộn giữa nHAE và polyme GTA được liên kết ngang bằng biến thiên các nồng độ muối Bi^{3+} từ 10 đến 100 mg/mL. Kết quả đánh giá thời gian tạo gel của hệ HGB được thể hiện trên Hình 3.12 cho thấy thời gian tạo gel giảm đáng kể khi tăng nồng độ ion Bi^{3+} . Cụ thể, thời gian tạo gel giảm từ $55,04 \pm 5,01$ phút (HGB10) xuống còn $9,05 \pm 2,44$ phút (HGB100). Xu hướng này tương tự với hệ GTA-Bi, trong đó sự gia tăng nồng độ ion kim loại làm tăng mật độ liên kết phối trí giữa Bi^{3+} và các nhóm chức giàu electron, từ đó thúc đẩy quá trình hình thành mạng lưới hydrogel diễn ra nhanh hơn. Tuy nhiên, khi so sánh trực tiếp với hydrogel GTA-Bi, có thể nhận thấy hệ composit HGB có xu hướng tạo gel chậm hơn tại cùng nồng độ ion. Điều này có thể được giải thích là do sự hiện diện của các hạt nHAE trong hệ làm cản trở quá trình khuếch tán và tiếp xúc giữa ion Bi^{3+} với các vị trí liên kết trên chuỗi polyme, từ đó làm giảm tốc độ hình thành liên kết ngang trong giai đoạn đầu của quá trình gel hóa.



Hình 3.12 Đồ thị thể hiện thời gian tạo gel của hệ nanocomposit hydrogel HGB

3.3.1.2. Đánh giá tính chất hoá lý của nanocomposit HGB

Phân tích FTIR được sử dụng để xác định sự hiện diện của các thành phần cấu tạo trong hệ nanocomposit hydrogel HGB. Kết quả được thể hiện trên Hình 3.13. Nhìn chung, phổ FTIR của các mẫu nanocomposit thể hiện đồng thời các đỉnh đặc trưng của cả pha vô cơ (nHAE) và pha hữu cơ (GTA), chứng minh sự kết hợp thành công của hai thành phần này trong hệ vật liệu nanocomposit HGB. Cụ thể, các đỉnh hấp thụ đặc trưng của GTA vẫn được duy trì trong phổ FTIR của các mẫu nanocomposit. Các đỉnh hấp thụ đó bao gồm dải rộng trong khoảng $3500 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ tương ứng với dao động kéo giãn của nhóm O-H và N-H, cùng với đỉnh khoảng $1650 - 1630 \text{ cm}^{-1}$ (C=O). Sự duy trì của các đỉnh này cho thấy cấu trúc khung polyme GTA không bị phá vỡ hoặc biến tính sau khi kết hợp với pha vô cơ và ion kim loại. Bên cạnh đó, sự hiện diện của nHAE được xác định thông qua các đỉnh đặc trưng của nhóm photphat (PO_4^{3-}) trong vùng $1100 - 1000 \text{ cm}^{-1}$, và $600 - 560 \text{ cm}^{-1}$. Điều này chứng minh rằng pha vô cơ được tích hợp thành công mà không làm biến đổi cấu trúc đặc trưng của nHAE. Ngoài ra, sự xuất hiện của đỉnh tại khoảng 870 cm^{-1} có thể liên quan đến nhóm cacbonat (CO_3^{2-}), đặc trưng cho hydroxyapatit có nguồn gốc sinh học, cho thấy vật liệu nHAE mang đặc tính gần với apatit tự nhiên như đã được chứng minh trước đó. Các đỉnh này vẫn được bảo toàn trong phổ của nanocomposit nHAE/GTA/Bi, chứng minh rằng pha vô cơ và pha hữu cơ đã được tích hợp thành công mà không làm biến đổi cấu trúc đặc trưng của từng thành phần. Các kết quả FTIR cho thấy hệ nanocomposit HGB đã được chế tạo thành công với sự hiện diện đồng thời của cả pha vô cơ và pha hữu cơ. Điều này tạo tiền đề quan trọng cho việc cải thiện các tính chất cơ học và sinh học của vật liệu trong các ứng dụng tái tạo xương.



Hình 3.13 A, B) Kết quả đánh giá FTIR của các mẫu nanocomposit hydrogel HGB

3.3.1.3. Phân tích bề mặt của nanocomposit HGB

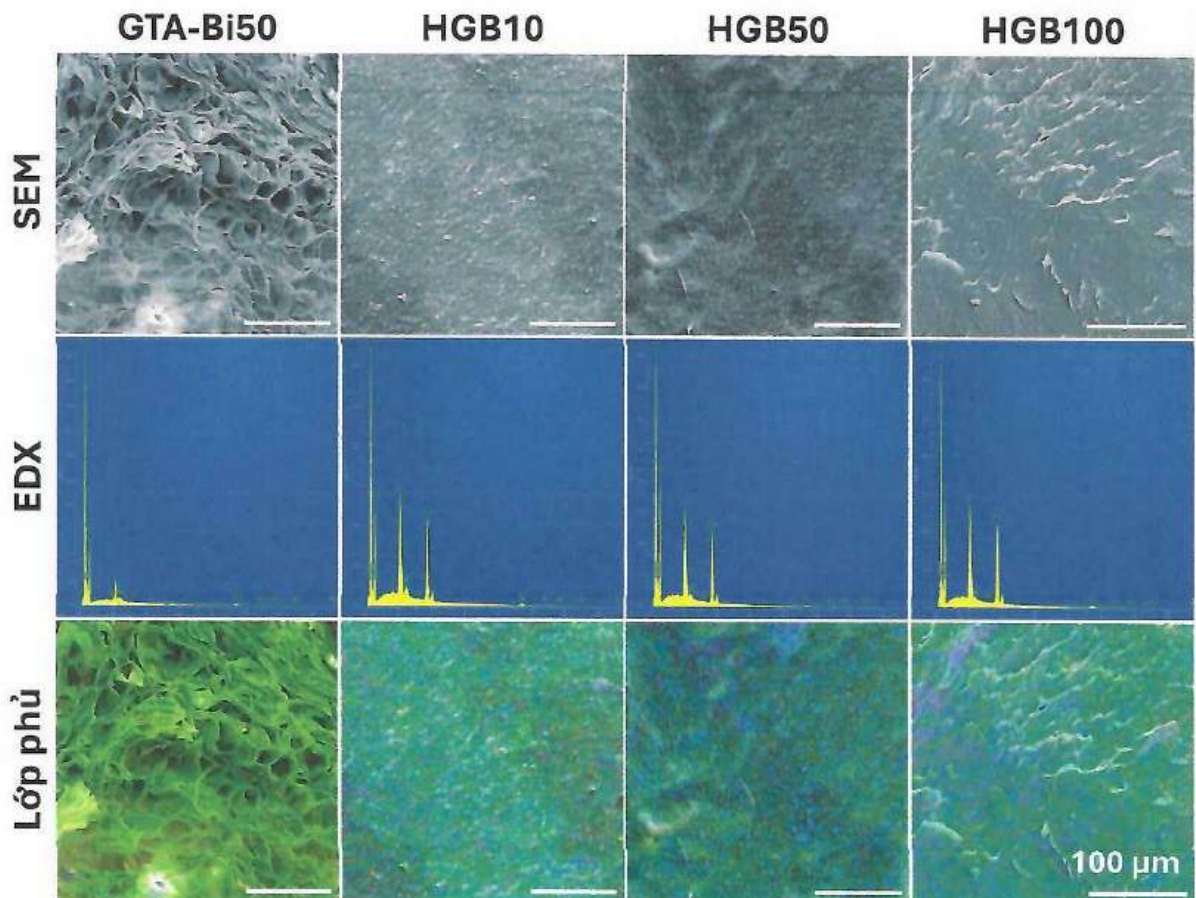
Như được thể hiện trong ảnh SEM (Hình 3.14), hydrogel GTA-Bi50 sở hữu cấu trúc xốp ba chiều với các lỗ xốp liên thông và phân bố tương đối không đồng đều. Cấu trúc này là cấu trúc đặc trưng của loại vật liệu hydrogel. Sau quá trình đông khô, nước

được giữ lại trong mạng polyme kết tinh thành tinh thể đá và sau đó thăng hoa để lại các khoảng trống [121]. Mạng lưới liên kết ngang được hình thành thông qua liên kết phối trí giữa ion Bi^{3+} và các nhóm hydroxyl phenolic của axit tannic là nguyên nhân chính dẫn đến sự hình thành cấu trúc xốp của GTA-Bi50. Ngược lại, các mẫu nanocomposit HGB lại cho thấy cấu trúc lỗ xốp hầu như không còn được quan sát rõ, thay vào đó là mạng lưới đặc hơn và bề mặt thô ráp hơn. Điều này có thể được quy cho sự có mặt của nHAE đóng vai trò vừa là pha gia cường vô cơ vừa là tác nhân tạo liên kết bổ sung. Cụ thể, các ion Ca^{2+} , PO_4^{3-} và các nhóm OH^- trên bề mặt nHAE có thể tương tác với các nhóm chức như NH_3^+ và COO^- của gelatin cũng như các nhóm OH^- của axit tannic, từ đó hình thành các liên kết ion và liên kết hydro bổ sung trong mạng hydrogel. Những tương tác này làm tăng mật độ liên kết ngang, hạn chế độ linh động của chuỗi polyme và dẫn đến sự hình thành mạng lưới chặt chẽ hơn. Đồng thời, các hạt nHAE còn có xu hướng lấp đầy các khoảng rỗng trong cấu trúc, góp phần làm giảm hoặc triệt tiêu các lỗ xốp quan sát được trong ảnh SEM. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây, trong đó việc bổ sung pha vô cơ như hydroxyapatit được chứng minh có khả năng làm tăng mật độ mạng và giảm kích thước lỗ xốp của hydrogel [122].

Bên cạnh đó, sự gia tăng hàm lượng ion Bi^{3+} cũng có ảnh hưởng đáng kể đến hình thái vi mô của vật liệu. Khi nồng độ ion Bi^{3+} tăng, mật độ liên kết phối trí giữa Bi^{3+} và các nhóm phenolic của axit tannic tăng lên, dẫn đến sự gia tăng mật độ liên kết ngang trong mạng hydrogel. Về mặt lý thuyết, sự gia tăng mật độ liên kết ngang dẫn đến hình thành cấu trúc đặc hơn, giảm thể tích lỗ xốp và tăng mức độ nén chặt của mạng polyme. Điều này thường được dự đoán sẽ góp phần cải thiện các tính chất cơ học chẳng hạn như mô đun đàn hồi của vật liệu. Tuy nhiên, mối quan hệ giữa mật độ liên kết ngang và tính chất cơ lý của hydrogel không phải lúc nào cũng tuyến tính, đặc biệt đối với các hệ liên kết phối trí động như mạng kim loại – phenolic. Ở nồng độ ion kim loại cao, sự hình thành các cụm liên kết cục bộ hoặc hiện tượng quá bão hòa liên kết ngang có thể dẫn đến sự không đồng nhất trong cấu trúc mạng, từ đó ảnh hưởng đến tính đàn hồi và khả năng phân tán ứng suất của vật liệu. Do đó, mặc dù kết quả SEM cho thấy xu hướng cấu trúc trở nên đặc hơn khi tăng hàm lượng Bi^{3+} , việc suy luận về sự cải thiện tính chất cơ học chỉ có thể mang tính chủ quan. Để đánh giá chính xác ảnh hưởng của mật độ liên kết ngang đến tính chất cơ lý, cần thực hiện các phép đo lưu biến (rheology), đặc biệt là xác định mô đun lưu trữ (G'). Các thông số này sẽ cung cấp bằng chứng định lượng về độ cứng mạng, khả năng đàn hồi và tính ổn định cơ học của hydrogel, từ đó làm rõ mối tương quan giữa nồng độ Bi^{3+} , cấu trúc vi mô và tính chất cơ học của hệ vật liệu nanocomposit hydrogel HGB.

Phân tích phổ EDX và hình ảnh mapping (Phụ lục 6) cho thấy sự hiện diện của các nguyên tố đặc trưng bao gồm C, N, O, Bi, Ca, và P đại diện cho sự xuất hiện của

pha vô cơ nHAE, pha hữu cơ GTA và tác nhân liên kết ngang Bi. Sự xuất hiện rõ ràng của các nguyên tố Ca và P trong các mẫu HGB xác nhận sự tích hợp thành công của nHAE vào hệ nanocomposit. Hình ảnh mapping cho thấy các nguyên tố C, N, O, Bi, Ca và P phân bố tương đối đồng đều trong toàn bộ cấu trúc mẫu, chứng tỏ sự hình thành mạng nanocomposit đồng nhất và không xảy ra hiện tượng kết tụ pha vô cơ ở quy mô lớn. Sự phân bố đồng đều này đóng vai trò quan trọng trong việc đảm bảo tính ổn định cấu trúc cũng như góp phần nâng cao hoạt tính sinh học của vật liệu. Nhìn chung, các kết quả SEM, EDX và mapping nguyên tố đã chứng minh rằng việc kết hợp nHAE và điều chỉnh nồng độ Bi^{3+} có ảnh hưởng rõ rệt đến cấu trúc vi mô của hydrogel, thông qua việc điều khiển mật độ liên kết ngang và mức độ đặc của mạng polyme. Những thay đổi này không chỉ ảnh hưởng đến hình thái mà còn có ý nghĩa quan trọng trong việc định hướng các tính chất cơ lý và sinh học của vật liệu trong ứng dụng tái tạo xương.

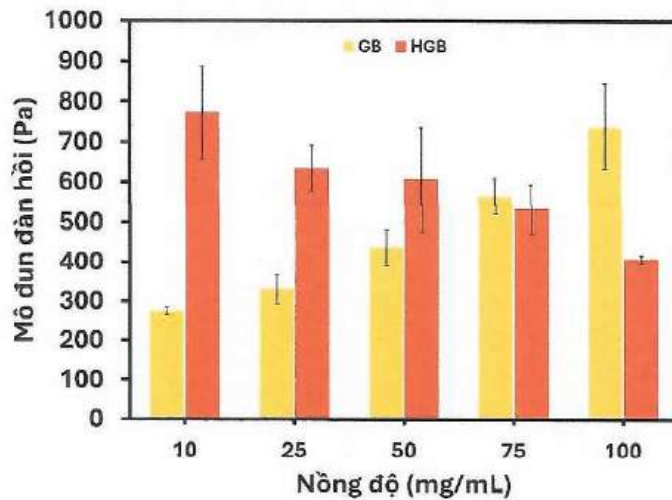


Hình 3.14 Hình ảnh SEM, phổ EDX và hình ảnh mapping của GTA-Bi50, HGB10, HGB50, và HGB100

3.3.1.4. Đánh giá tính chất cơ lý của nanocomposit HGB

Về tính chất cơ học, cả hai hệ hydrogel GTA-Bi và nanocomposit hydrogel HGB đều thể hiện tính đàn hồi vượt trội như được thể hiện trong Phụ lục 7. Đặc biệt, kết quả đo mô đun đàn hồi (G') cho thấy hai hệ vật liệu thể hiện xu hướng khác biệt rõ rệt. Đối với hệ GTA-Bi, giá trị mô đun đàn hồi G' được thể hiện trên Hình 3.15 tăng dần theo

nồng độ ion Bi^{3+} , cho thấy sự gia tăng mật độ liên kết ngang trong mạng hydrogel. Cụ thể, mô đun đàn hồi tăng dần từ khoảng 270 Pa (GTA-Bi10) đến 730 Pa (GTA-Bi100). Khi nồng độ Bi^{3+} tăng, số lượng liên kết phối trí hình thành nhiều hơn, tạo nên mạng lưới chặt chẽ và ổn định hơn, từ đó làm tăng độ cứng của vật liệu. Điều này phù hợp với cơ chế liên kết chéo ion kim loại trong các hệ hydrogel giàu polyphenol. Trong khi đó, đối với hệ composit HGB, giá trị G' ban đầu cao hơn so với hệ GTA-Bi tại cùng nồng độ thấp, cho thấy vai trò gia cường của pha vô cơ nHAE (Hình 3.15). Các hạt nano hydroxyapatit có thể đóng vai trò như các điểm neo vật lý trong mạng polyme, giúp phân tán ứng suất và tăng khả năng chịu lực của vật liệu. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ ion Bi^{3+} , giá trị G' của hệ HGB không tăng tuyến tính mà có xu hướng giảm dần ở các nồng độ cao. Hiện tượng này có thể liên quan đến mật độ liên kết ngang quá cao, dẫn đến sự hình thành các vùng tập trung ứng suất hoặc làm gián đoạn tính liên tục của mạng lưới polyme. Đồng thời, việc cạnh tranh tương tác giữa ion Bi^{3+} với cả GTA và bề mặt nHAE cũng có thể làm giảm hiệu quả liên kết ngang tối ưu trong hệ nanocomposit.



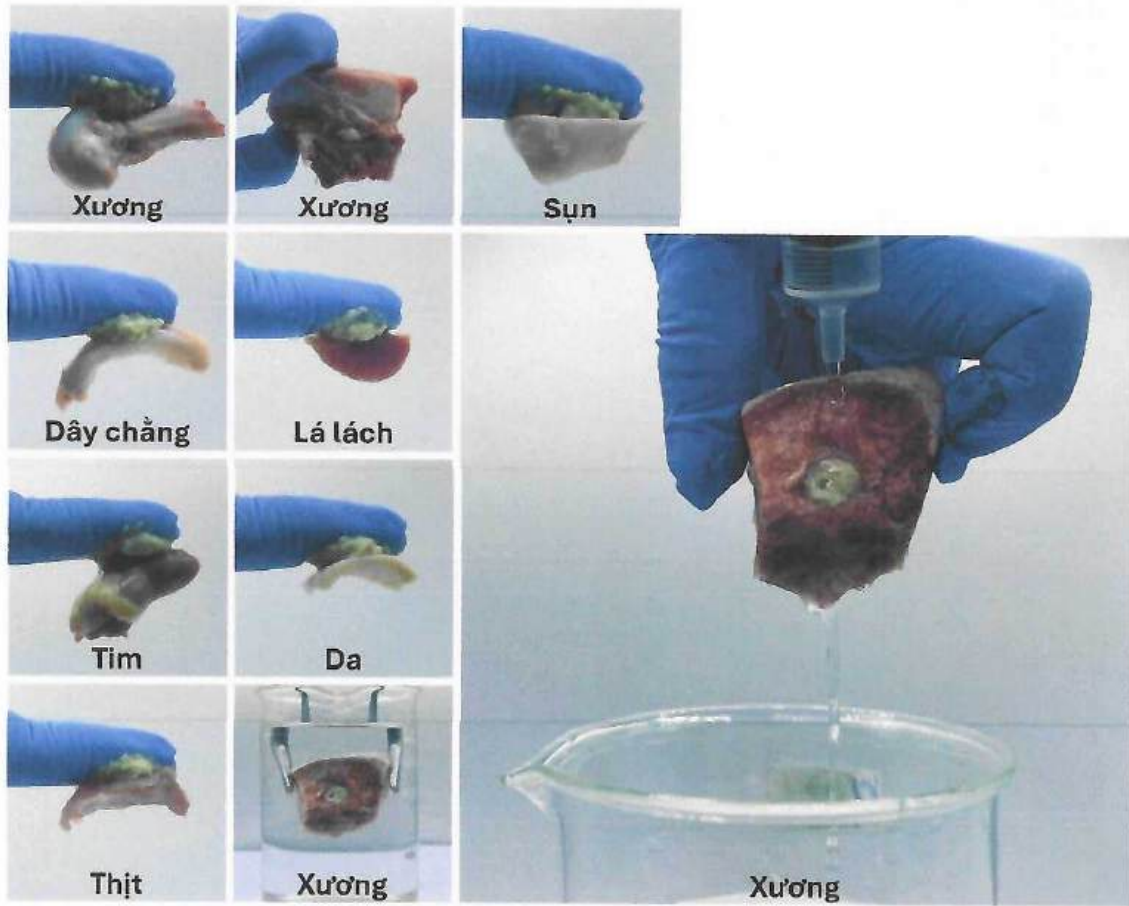
Hình 3.15 Đồ thị thể hiện mô đun đàn hồi của hydrogel GTA-Bi và nanocomposit hydrogel HGB

So sánh tổng thể giữa hai hệ cho thấy, việc bổ sung nHAE mang lại hiệu quả gia cường cơ học rõ rệt ở nồng độ ion thấp đến trung bình, nhưng đồng thời cũng ảnh hưởng đến tính chất cơ lý của hệ nanocomposit khi tăng nồng độ tác nhân liên kết ngang. Cụ thể, trong khi hệ GTA-Bi phụ thuộc chủ yếu vào liên kết phối trí polyme – ion để hình thành mạng hydrogel, thì hệ HGB tồn tại đồng thời hai cơ chế bao gồm liên kết phối trí giữa Bi^{3+} và GTA; và tương tác vật lý giữa GTA và nHAE. Sự kết hợp này giúp cải thiện tính chất cơ học ở điều kiện tối ưu, nhưng khi vượt quá ngưỡng nồng độ ion thích hợp, sự mất cân bằng giữa các tương tác có thể dẫn đến suy giảm tính chất cơ học. Từ các kết quả trên, có thể thấy rằng việc lựa chọn nồng độ ion Bi^{3+} phù hợp là yếu tố quan

trọng để đạt được sự cân bằng giữa tốc độ tạo gel và tính chất cơ học của hệ composit nHAE/GTA/Bi, tạo tiền đề cho các ứng dụng trong tái tạo xương.

3.3.1.5. Đánh giá tính chất bám dính của nanocomposit HGB

Tính chất dính của hệ nanocomposit hydrogel HGB được đánh giá thông qua thử nghiệm bám dính trực quan trên nhiều loại mô sinh học khác nhau như được thể hiện trên Hình 3.16. Có thể quan sát thấy rằng vật liệu nanocomposit HGB thể hiện khả năng bám dính tốt trên nhiều loại mô như xương, sụn, dây chằng, tim, da, lá lách và mô cơ. Đặc biệt, trên bề mặt xương vốn có cấu trúc cứng, không đồng nhất và thường khó bám dính nhưng vật liệu nanocomposit hydrogel HGB vẫn thể hiện được khả năng bám dính ổn định, điều này cho thấy tiềm năng ứng dụng trong tái tạo xương. Bên cạnh đó, thí nghiệm mô phỏng trong môi trường dòng chảy cho thấy vật liệu HGB không bị rửa trôi dưới dòng chảy cũng như trong môi trường nước, chứng minh khả năng duy trì liên kết trong điều kiện ẩm ướt. Đây là một trong các yếu tố quan trọng đối với các vật liệu ứng dụng trong y sinh, đặc biệt là trong môi trường sinh lý, nơi dịch cơ thể và dòng chảy liên tục có thể ảnh hưởng đến độ ổn định của vật liệu. Tính chất dính của hệ vật liệu nanocomposit hydrogel HGB có thể được giải thích dựa trên thành phần hoá học của hệ. Cụ thể, sự hiện của các nhóm galloyl từ axit tannic trong GTA đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành nhiều tương tác với bề mặt mô, bao gồm liên kết hydro, tương tác kỵ nước,... Các nhóm chức này có thể tương tác với các nhóm amin, cacboxyl và hydroxyl có sẵn trong các cấu trúc protein như collagen, từ đó tạo nên sự bám dính trên bề mặt mô sinh học [123]. Đồng thời, sự có mặt của ion Bi^{3+} góp phần hình thành các liên kết phối trí bổ sung, giúp tăng cường độ bền liên kết và ổn định cấu trúc hydrogel. Điều đáng chú ý là nHAE trong hệ composit không chỉ đóng vai trò gia cường cơ học mà còn góp phần tăng cường khả năng bám dính với mô xương. Do thành phần hoá học của nHAE tương đồng với pha vô cơ của xương tự nhiên, các hạt nHAE có thể tạo ra các tương tác thuận lợi tại vị trí tiếp xúc giữa vật liệu và mô xương, từ đó cải thiện khả năng tích hợp và neo giữ vật liệu tại vị trí khiếm khuyết. Tóm lại, từ những hình ảnh được quan sát có thể thấy hệ vật liệu nanocomposit hydrogel nHAE/GTA/Bi không chỉ có khả năng bám dính đa dạng trên nhiều loại mô mà còn duy trì độ bám dính trong điều kiện ẩm ướt, đặc biệt là thể hiện tiềm năng bám dính tốt trên mô xương. Điều này cho thấy vật liệu là một ứng viên tiềm năng cho các ứng dụng trong tái tạo xương.



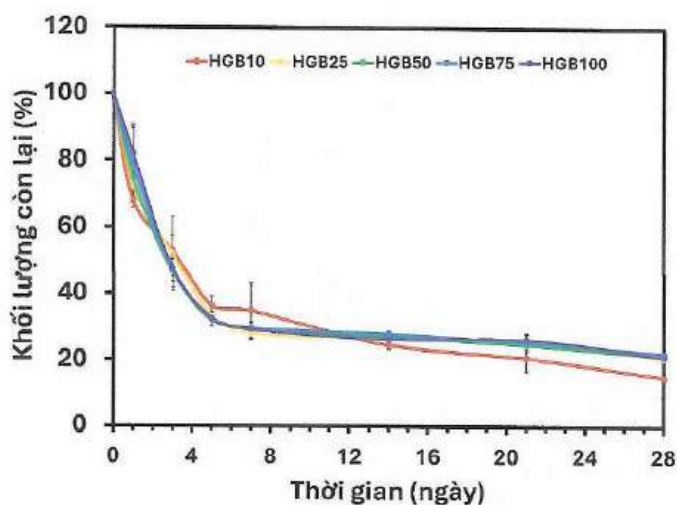
Hình 3.16 Hình ảnh trực quan đánh giá khả năng bám dính của nanocomposit hydrogel HGB trên các bề mặt mô sinh học khác nhau

3.3.2. Đánh giá hoạt tính sinh học của nanocomposit HGB

3.3.2.1. Khảo sát khả năng phân huỷ sinh học của nanocomposit HGB

Khả năng phân huỷ sinh học của hệ nanocomposit hydrogel HGB được đánh giá trong môi trường DPBS chứa collagenase tại các mốc thời gian 1, 3, 5, 7, 14, 21, và 28 ngày như được thể hiện trên Hình 3.17. Khi so với hệ hydrogel không chứa nHAE, các mẫu HGB không thể hiện tính trương nở trong giai đoạn ban đầu mà xảy ra quá trình phân huỷ sinh học từ ngày đầu tiên. Điều này được thể hiện thông qua sự suy giảm khối lượng rõ rệt sau 24 giờ, trong khoảng từ 67 – 82%. Hiện tượng này cho thấy cấu trúc polyme trong hệ nanocomposit HGB dễ dàng và nhanh chóng bị phân cắt trong giai đoạn đầu bởi enzym. Bên cạnh đó, sự hiện diện của nHAE góp phần vào việc ức chế quá trình trương nở diễn ra, làm giảm khả năng giữ nước của mạng hydrogel, đồng thời tạo ra các vị trí giúp enzym dễ dàng tiếp cận trên chuỗi gelatin. Sau giai đoạn phân huỷ ban đầu, tốc độ phân huỷ của các mẫu thử nghiệm có xu hướng chậm lại và đạt trạng thái tương đối ổn định khoảng từ ngày thứ 7 trở về sau với khối lượng còn lại đa số được duy trì trong khoảng từ 20 – 26% đến ngày thứ 28. Điều này cho thấy, trong giai đoạn đầu, pha hữu cơ bị phân huỷ là chủ yếu và còn lại pha vô cơ dần trở nên ổn định ở giai đoạn sau. Trong hệ nanocomposit HGB, nHAE đóng vai trò như một khung vô cơ ít bị

phân hủy sinh học, giúp duy trì hình thái và hạn chế sự sụp đổ hoàn toàn của vật liệu. Sự kết hợp giữa pha hữu cơ có khả năng phân hủy sinh học và pha vô cơ bền vững giúp vật liệu đạt được sự cân bằng giữa độ ổn định và khả năng phân hủy có kiểm soát, phù hợp cho các ứng dụng trong tái tạo xương.

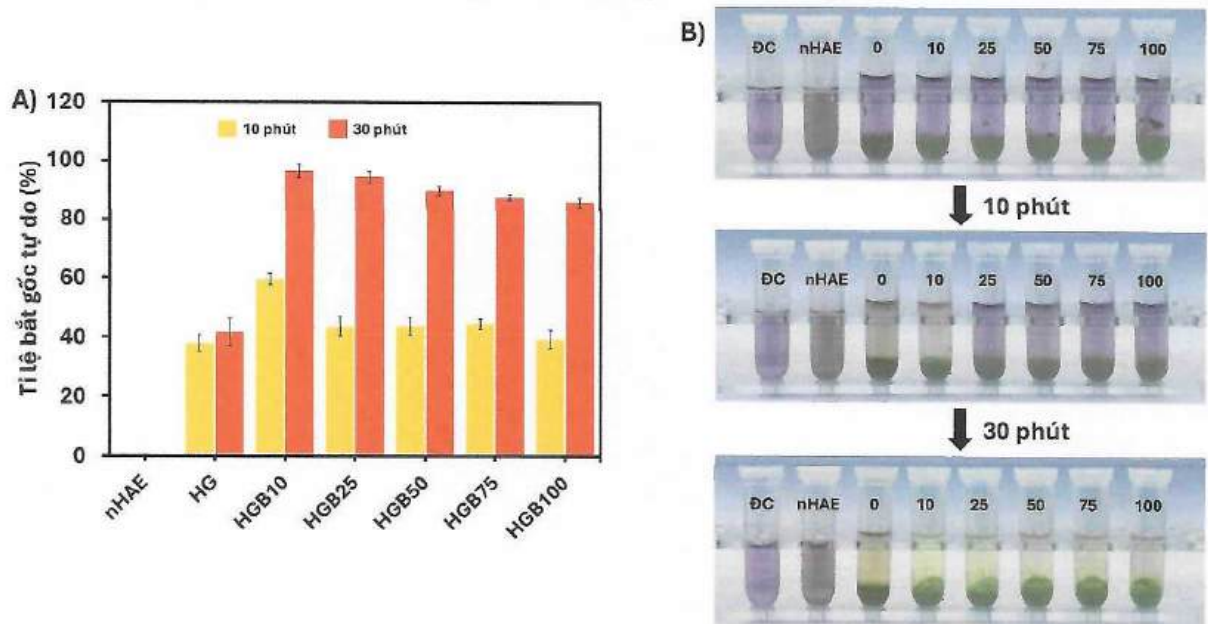


Hình 3.17 Đồ thị thể hiện khả năng phân hủy sinh học của vật liệu nanocomposit hydrogel HGB trong môi trường DPBS chứa enzym collagenase

3.3.2.2. Khảo sát khả năng kháng oxy hoá của nanocomposit HGB

Khả năng kháng oxy hoá của hệ nanocomposit hydrogel HGB được đánh giá thông qua khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH. Kết quả được thể hiện trên Hình 3.18 cho thấy tỷ lệ bắt gốc tự do dao động trong khoảng 39 – 60%, trong đó HGB10 và HGB25 thể hiện tốc độ bắt gốc tự do nhanh với tỷ lệ lần lượt đạt $59,71 \pm 1,86\%$ và $43,61 \pm 3,41\%$. Ngược lại, các mẫu có nồng độ ion Bi^{3+} cao hơn như HGB75 và HGB100 cho thấy tốc độ mất màu chậm hơn. Đáng chú ý là mẫu nHAE gần như không thể hiện khả năng kháng oxy hoá. Điều này cho thấy GTA trong hệ nanocomposit là yếu tố quyết định hoạt tính kháng oxy hoá, đồng thời sự có mặt của ion Bi^{3+} ở nồng độ thấp cho thấy tốc độ phản ứng mất màu ban đầu nhanh hơn. Sau 30 phút phản ứng, hầu như tỷ lệ bắt gốc tự do của tất cả các mẫu HGB đều tăng mạnh và đạt mức lớn hơn 85%. Trong đó, HGB10 và HGB25 thể hiện khả năng bắt gốc tự do lần lượt đạt $96,63 \pm 2,21\%$ và $94,65 \pm 1,87\%$. Tuy nhiên, sự khác biệt về giữa các mẫu đã giảm đáng kể so với giai đoạn đầu. Điều này cho thấy dù tốc độ phản ứng khác nhau, nhưng theo thời gian các nhóm phenolic trong GTA vẫn có thể tham gia gần như hoàn toàn vào quá trình trung hòa gốc tự do. Sự khác biệt về tốc độ phản ứng ban đầu có thể là do mức độ tự do của các nhóm phenolic hydroxyl trong cấu trúc GTA [124, 125]. Ở nồng độ ion thấp, mật độ liên kết ngang thấp hơn nên nhiều nhóm phenolic vẫn ở trạng thái tự do và có thể nhanh chóng tham gia vào quá trình cho electron hoặc nguyên tử hydro để trung hòa gốc tự do DPPH. Ngược lại, khi nồng độ ion Bi^{3+} tăng, đồng nghĩa với việc mạng lưới hydrogel sẽ trở nên chặt chẽ hơn dẫn đến sự khuếch tán của DPPH vào bên trong cấu trúc bị giảm, từ đó làm chậm

tốc độ phản ứng. Nhìn chung, hệ nanocomposit hydrogel HGB được chứng minh là có khả năng kháng oxy hoá. Kết quả này cho thấy việc tối ưu nồng độ ion không chỉ ảnh hưởng đến tính chất cơ học và phân hủy sinh học mà còn đóng vai trò quan trọng trong việc điều khiển động học phản ứng chống oxy hóa, một yếu tố có ý nghĩa trong việc kiểm soát căng thẳng oxy hóa trong môi trường tái tạo xương.



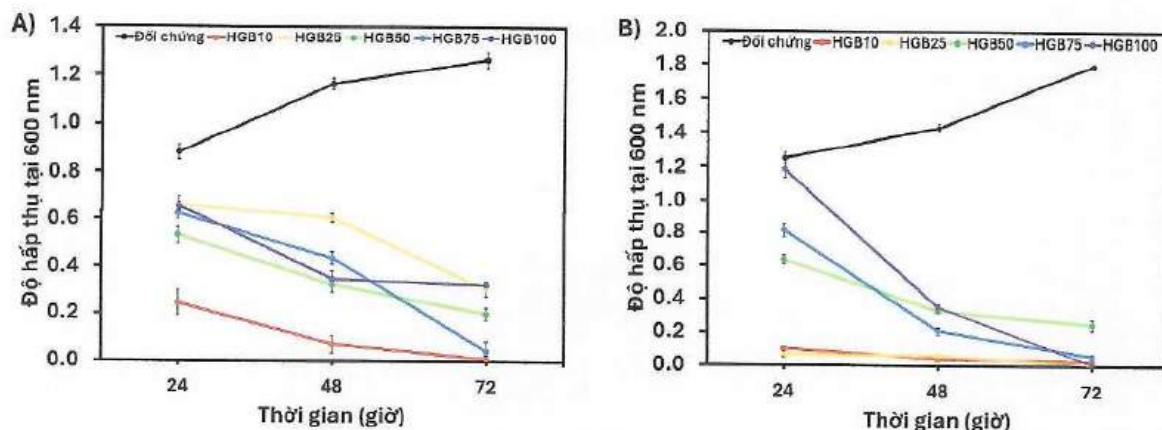
Hình 3.18 Kết quả đánh giá khả năng kháng oxy hóa của nanocomposit hydrogel HGB thông qua thử nghiệm DPPH. A) Đồ thị thể hiện tỷ lệ bắt gốc tự do và B) Hình ảnh trực quan sự mất màu của dung dịch DPPH

3.3.2.3. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của nanocomposit HGB

Tính chất kháng khuẩn của hệ nanocomposit hydrogel HGB được chứng minh bằng phương pháp đồng nuôi cấy với hai chủng vi khuẩn đại diện là *E. coli* (Gram âm) và *S. aureus* (Gram dương). Sự tăng trưởng của tế bào vi khuẩn tại các mốc 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ được xác định thông qua mật độ quang học tại 600 nm như được thể hiện trên Hình 3.19. Đối với vi khuẩn gram âm, mẫu đối chứng cho thấy sự tăng trưởng theo thời gian với giá trị OD tăng từ $1,25 \pm 0,03$ (24 giờ) lên $1,80 \pm 0,01$ (72 giờ), cho thấy sự phát triển bình thường của vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy. Trái lại, tất cả các mẫu nanocomposit đều thể hiện khả năng ức chế sự nhân lên của vi khuẩn. Đặc biệt HGB10 cho thấy khả năng ức chế vi khuẩn tốt so với các mẫu còn lại khi mà giá trị OD rất thấp đã được ghi nhận. Giá trị OD hầu như thấp hơn 0,1 và gần như không tăng lên theo thời gian, cho thấy khả năng ức chế gần như hoàn toàn sự phát triển của vi khuẩn. Bên cạnh đó, các mẫu nanocomposit còn lại cũng thể hiện khả năng kháng khuẩn đáng kể, tuy nhiên hiệu quả thấp hơn trong giai đoạn đầu so với HGB10 trước khi giảm mạnh sau 72 giờ. Điều này cho thấy quá trình ức chế vi khuẩn của các mẫu này diễn ra chậm hơn nhưng vẫn đạt hiệu quả cao theo thời gian. Xu hướng tương tự cũng được ghi nhận đối với *S. aureus*. Mẫu đối chứng tăng trưởng tốt theo thời gian trong môi trường nuôi

cấy và các mẫu nanocomposit hydrogel HGB đều thể hiện khả năng ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn. Cụ thể, HGB10 thể hiện hiệu quả khả năng kháng khuẩn vượt trội với OD giảm xuống $0,01 \pm 0,02$ sau 72 giờ. Các mẫu nanocomposit HGB còn lại cũng cho thấy khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn rõ rệt sau 72 giờ. Đáng chú ý là hiệu quả kháng khuẩn đối với *S. aureus* có xu hướng thấp hơn so với *E. coli* trong giai đoạn đầu, điều này có thể liên quan đến sự khác biệt về bản chất giữa hai loại vi khuẩn Gram dương và Gram âm.

Tính kháng khuẩn của hệ vật liệu nanocomposit hydrogel HGB có thể được giải thích bởi sự kết hợp giữa hai cơ chế chính. Đầu tiên, các nhóm polyphenol có trong TA có khả năng làm mất ổn định màng tế bào vi khuẩn, tăng tính thấm màng và ức chế hoạt động của enzyme, từ đó cản trở quá trình trao đổi chất của vi khuẩn [126, 127]. Thứ hai, sự giải phóng ion Bi^{3+} từ hệ nanocomposit đóng vai trò quan trọng trong việc tăng cường hiệu quả kháng khuẩn thông qua nhiều cơ chế khác nhau như phá vỡ cấu trúc tế bào, tương tác với các protein chứa nhóm thiol, gây rối loạn quá trình trao đổi chất nội bào và thúc đẩy căng thẳng oxy hoá. Ngoài ra, ion Bi^{3+} còn có khả năng làm suy giảm cấu trúc màng sinh học nên làm tăng độ nhạy của vi khuẩn với các tác nhân kháng khuẩn [128]. Một điều đáng chú ý là các mẫu có nồng độ Bi^{3+} thấp thể hiện hiệu quả kháng khuẩn nhanh và mạnh hơn so với các mẫu có nồng độ cao. Điều này có thể do mật độ liên kết ngang trong hydrogel, mạng lưới hydrogel lỏng lẻo hơn ở nồng độ ion thấp dẫn đến sự khuếch tán nhanh hơn của các tác nhân kháng khuẩn như TA và Bi^{3+} vào môi trường nuôi cấy. Ngược lại, ở nồng độ Bi^{3+} cao hơn, mạng lưới trở nên chặt chẽ hơn, làm hạn chế sự giải phóng ion và giảm tốc độ tiếp xúc với vi khuẩn trong giai đoạn đầu. Tóm lại, hệ nanocomposit hydrogel HGB thể hiện khả năng kháng khuẩn hiệu quả đối với cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Trong đó, các mẫu nanocomposit có nồng độ ion Bi^{3+} thấp thể hiện hiệu quả nhanh và mạnh hơn. Kết quả này cho thấy sự kết hợp giữa polyphenol và ion kim loại không chỉ mang lại hiệu quả kháng khuẩn cao mà còn cho phép điều chỉnh khả năng ức chế vi khuẩn thông qua việc kiểm soát mật độ liên kết ngang trong hydrogel, góp phần nâng cao tiềm năng ứng dụng trong tái tạo xương với sự hạn chế tối thiểu nhiễm trùng sau cấy ghép.



Hình 3.19 Đồ thị thể hiện sự tăng trưởng của vi khuẩn trong môi trường đồng nuôi cấy với mẫu vật liệu composite hydrogel HGB. A) *Staphylococcus aureus* và B) *Escherichia coli*

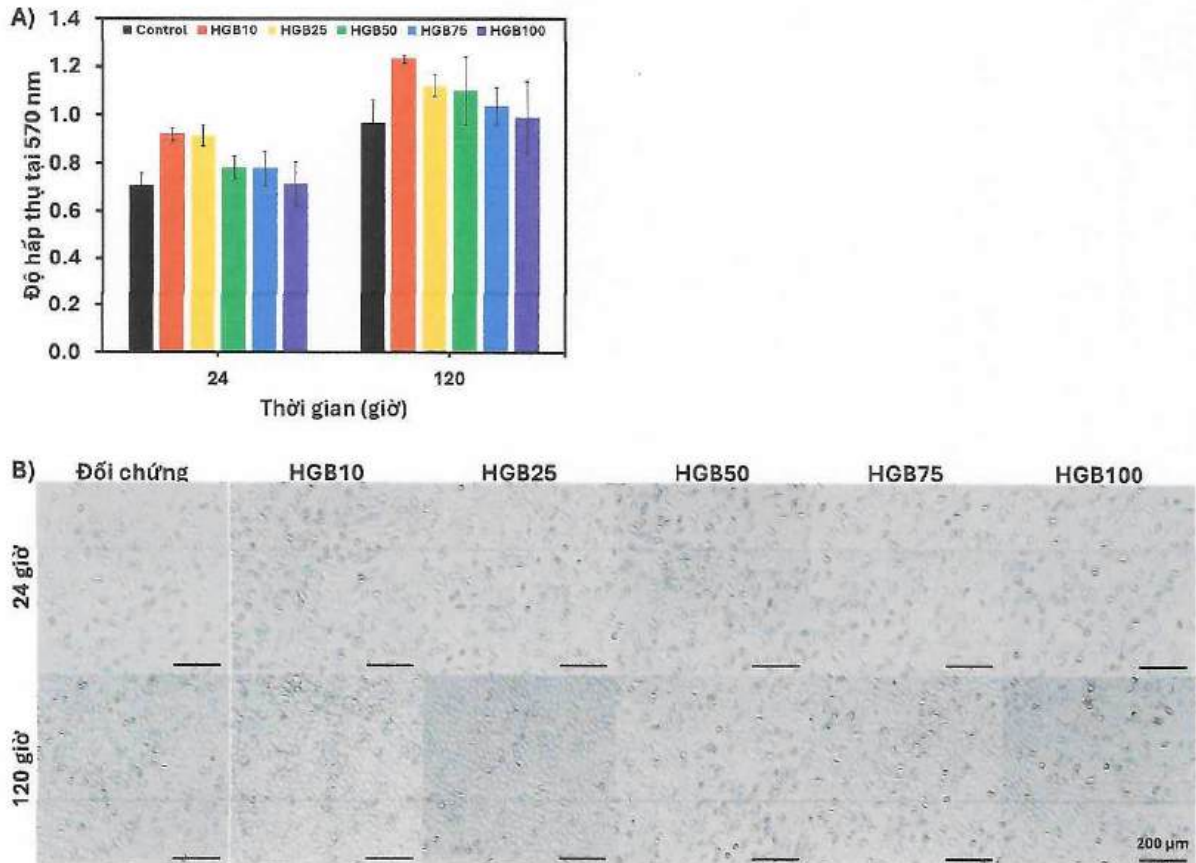
3.3.3. Thử nghiệm tế bào *in vitro* đối với nanocomposit HGB

3.3.3.1. Thử nghiệm khả năng hỗ trợ tăng sinh tế bào của nanocomposit HGB

Khả năng tương thích và hỗ trợ tế bào tăng sinh của hệ vật liệu nanocomposit hydrogel HGB được thử nghiệm bằng phương pháp MTT thông qua dịch chiết vật liệu. Kết quả ghi nhận được bao gồm mật độ quang học tại 570 nm và hình ảnh tế bào dưới kính hiển vi soi ngược như được thể hiện trên Hình 3.20. Theo tiêu chuẩn ISO 10993 – 5, các mẫu nanocomposit đều được xem là tương thích tế bào vì giá trị OD tại 570 nm được ghi nhận đều tương đương hoặc cao hơn so với mẫu đối chứng tại mốc thử nghiệm 24 giờ. Đặc biệt, HGB10 và HGB25 đạt giá trị cao hơn khi so với mẫu đối chứng, lần lượt là $0,92 \pm 0,03$ và $0,92 \pm 0,04$. Điều này cho thấy, ngay từ giai đoạn đầu, các mẫu nanocomposit đã không gây ức chế mà còn có xu hướng hỗ trợ hoạt động sống của tế bào. Trong khi đó, các mẫu có nồng độ ion Bi^{3+} cao hơn mặc dù giá trị OD vẫn cao hơn đối chứng nhưng vẫn không thể đạt tới giá trị của HGB10 và HGB25 cho thấy. Dù vậy, các mẫu nanocomposit đều thể hiện tiềm năng trong việc hỗ trợ tế bào tăng sinh ban đầu.

Đối với mốc thử nghiệm 120 giờ, tất cả các mẫu thử nghiệm (bao gồm cả đối chứng và nanocomposit) đều cho thấy mật độ tế bào tăng lên, điều này cho thấy tế bào nuôi cấy tế bào giữ tốt vai trò đối chứng. Các mẫu nanocomposit đều thể hiện vai trò hỗ trợ tế bào phát triển khi giá trị OD được ghi nhận đều cao hơn đối chứng. Điều đáng quan tâm là xu hướng tăng sinh cũng được thể hiện rõ ràng tại mốc thử nghiệm này. Đặc biệt, trong số các mẫu nanocomposit, HGB10 thể hiện giá trị OD là $1,23 \pm 0,02$, cao hơn đáng kể so với mẫu đối chứng và các mẫu nanocomposit còn lại. Kết quả này cho thấy tế bào L929 không chỉ duy trì khả năng sống mà còn tăng sinh mạnh theo thời gian trong môi trường dịch chiết vật liệu nanocomposit hydrogel HGB. Bên cạnh đó, hình ảnh tế bào được quan sát dưới kính hiển vi soi ngược (Hình 3.20B) càng củng

cổ thêm kết quả định lượng. Tế bào L929 được nuôi cấy trong môi trường dịch chiết vật liệu HGB đều giữ được hình dạng đặc trưng của nguyên bào sợi, bám dính tốt và phân bố đồng đều. Hiện tượng co rút hay biến dạng tế bào không xuất hiện, điều này chứng tỏ vật liệu không gây căng thẳng tế bào hay độc tính tiềm ẩn. Đặc biệt, đối với các tế bào được đồng nuôi cấy với dịch chiết vật liệu nanocomposit, có thể quan sát được mật độ tế bào tăng rõ rệt sau 120 giờ thử nghiệm với sự lan rộng và kết nối giữa các tế bào, cho thấy môi trường dịch chiết của vật liệu nanocomposit HGB thuận lợi cho quá trình tế bào tăng sinh.



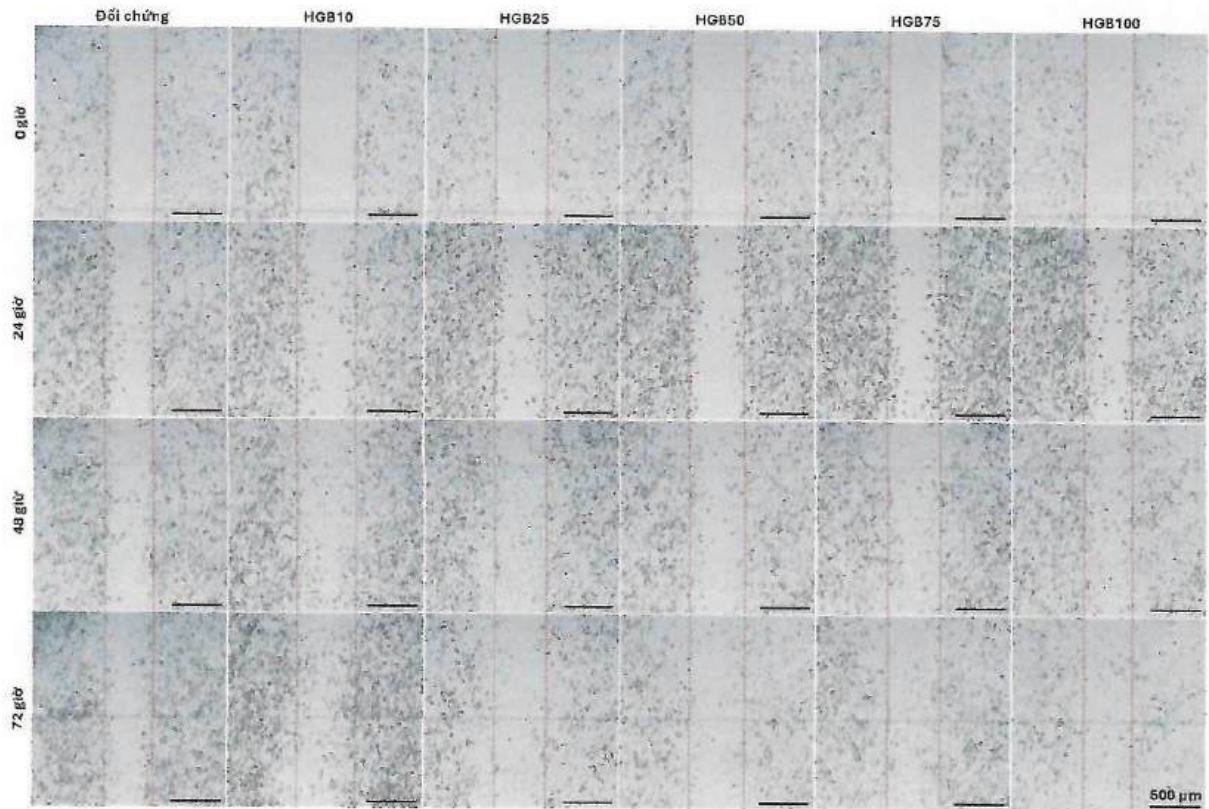
Hình 3.20 Kết quả đánh giá tính tương thích tế bào và khả năng hỗ trợ tăng sinh của nanocomposit hydrogel HGB thông qua B) Độ hấp thụ quang học tại 570 nm và C) Hình ảnh tế bào L929 dưới kính hiển vi soi ngược

Hiệu quả hỗ trợ tế bào tăng sinh của các mẫu HGB có thể được giải thích bởi hệ quả của sự kết hợp giữa các thành phần vật liệu. Trước hết, nHAE đóng vai trò quan trọng trong việc giải phóng ion Ca^{2+} và ion vi lượng Mg^{2+} . Các ion này được bổ sung vào môi trường nuôi cấy và tạo ra điều kiện thuận lợi cho sự tăng sinh của nguyên bào sợi. Bên cạnh đó, nền polyme GTA với các nhóm polyphenol từ axit tannic còn có khả năng điều hoà căng thẳng oxy hoá, góp phần bảo vệ tế bào và hỗ trợ tăng sinh [129]. Hơn nữa, sự hiện diện của ion Bi^{3+} ở nồng độ thích hợp cũng góp phần cải thiện khả năng tăng sinh tế bào. Một số nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng ion Bi^{3+} có thể thúc đẩy hoạt động tế bào mà không gây độc tính khi được ứng dụng ở nồng độ thấp [130].

Nhìn chung, hệ nanocomposit hydrogel nHAE/GTA/Bi thể hiện khả năng tương thích sinh học tốt và hỗ trợ sự tăng sinh của tế bào L929. Sự kết hợp giữa hoạt tính sinh học của nHAE, khả năng điều hòa của GTA và vai trò của ion Bi^{3+} đã tạo nên một môi trường thuận lợi cho sự phát triển tế bào, cho thấy tiềm năng ứng dụng của vật liệu trong tái tạo mô xương.

3.3.3.2. Thử nghiệm khả năng hỗ trợ di chuyển tế bào của composit HGB

Khả năng hỗ trợ tế bào di chuyển của hệ nanocomposit hydrogel HGB được thử nghiệm bằng phương pháp tạo vết xước trên dòng tế bào L929. Kết quả được ghi nhận dưới kính hiển vi soi ngược được thể hiện trên Hình 3.21. Sự thay đổi về độ rộng của vết rạch theo thời gian sẽ phản ánh khả năng di chuyển của tế bào trong môi trường dịch chiết của vật liệu. Khi bắt đầu thử nghiệm, các vết rạch được tạo ra đều có độ rộng tương tự nhau. Sau 72 giờ thử nghiệm, sự khác biệt giữa các mẫu thử nghiệm so với mẫu đối chứng trở nên rõ rệt. Cụ thể, trong môi trường dịch chiết của vật liệu nanocomposit HGB, các tế bào L929 có sự di chuyển mạnh mẽ và gần như vết rạch được thu hẹp hoàn toàn với vùng trống giữa hai mép rạch gần như bị lấp đầy. Trong khi đó, mẫu đối chứng chỉ cho thấy sự thu hẹp một phần của vết rạch và vẫn còn khoảng trống, cho thấy tốc độ di chuyển của tế bào chậm hơn. Tương tự như cơ chế thúc đẩy tế bào tăng sinh, sự di chuyển của tế bào L929 cũng được hỗ trợ bởi nhiều yếu tố. Trước hết, nHAE đóng vai trò quan trọng thông qua việc giải phóng các ion sinh học như Ca^{2+} và Mg^{2+} . Trong đó, ion Ca^{2+} đã được chứng minh là có vai trò trong việc điều hòa tín hiệu nội bào và kích thích sự tái tổ chức khung xương tế bào. Trong khi đó, ion Mg^{2+} có liên quan trực tiếp đến quá trình bám dính và di chuyển tế bào thông qua việc điều chỉnh hoạt động của integrin và các protein liên kết với actin. Sự hiện diện đồng thời của các ion này có thể tạo ra môi trường thuận lợi cho việc di chuyển và lan rộng của nguyên bào sợi. Bên cạnh đó, mặc dù vai trò trực tiếp của ion Bi^{3+} trong việc hỗ trợ tế bào di chuyển vẫn chưa được báo cáo rõ ràng, các kết quả thu được cho thấy ở nồng độ thấp, ion Bi^{3+} có thể gián tiếp ảnh hưởng đến hành vi tế bào từ đó hỗ trợ hiệp đồng cho quá trình di chuyển của tế bào. Tóm lại, hệ nanocomposit hydrogel HGB thể hiện khả năng hỗ trợ di chuyển tế bào rõ rệt. Tác động hiệp đồng giữa các ion sinh học (Ca^{2+} , Mg^{2+}), và ion Bi^{3+} đã tạo nên một môi trường thuận lợi cho quá trình di chuyển tế bào, góp phần nâng cao tiềm năng ứng dụng của vật liệu trong tái tạo mô và lành thương.



Hình 3.21 Kết quả thử nghiệm khả năng di chuyển tế bào của nanocomposit hydrogel HGB

Dựa trên kết quả thử nghiệm tăng sinh và thử nghiệm di chuyển tế bào, các mẫu nanocomposit hydrogel HGB đều cho thấy khả năng hỗ trợ tốt cho hoạt động sống của tế bào L929. Khả năng duy trì tăng sinh và thúc đẩy di chuyển tế bào được vật liệu nanocomposit hydrogel HGB thể hiện tốt. Điều này cho thấy hệ vật liệu nanocomposit hydrogel HGB có tính tương thích sinh học phù hợp và tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực tái tạo xương. Trên cơ sở đó, hai mẫu vật liệu nanocomposit hydrogel HGB10 và HGB25 được lựa chọn cho thử nghiệm biệt hoá tạo xương tiếp theo. Việc lựa chọn này được thực hiện theo nguyên tắc ưu tiên sử dụng nồng độ ion Bi^{3+} thấp nhưng vẫn đảm bảo duy trì các đặc tính sinh học mong muốn của vật liệu. Cách tiếp cận này còn dựa trên sự hạn chế các ảnh hưởng bất lợi tiềm tàng có thể phát sinh khi sử dụng hàm lượng kim loại cao trong các ứng dụng y sinh lâu dài, đồng thời phù hợp với xu hướng phát triển các vật liệu sinh học có tính an toàn và tương thích sinh học cao. Vì vậy, hai mẫu vật liệu nanocomposit hydrogel HGB10 và HGB25 được lựa chọn để tiếp tục đánh giá khả năng hỗ trợ biệt hoá tạo xương nhằm khảo sát sâu hơn tiềm năng ứng dụng của hệ vật liệu nanocomposit hydrogel HGB trong tái tạo mô xương.

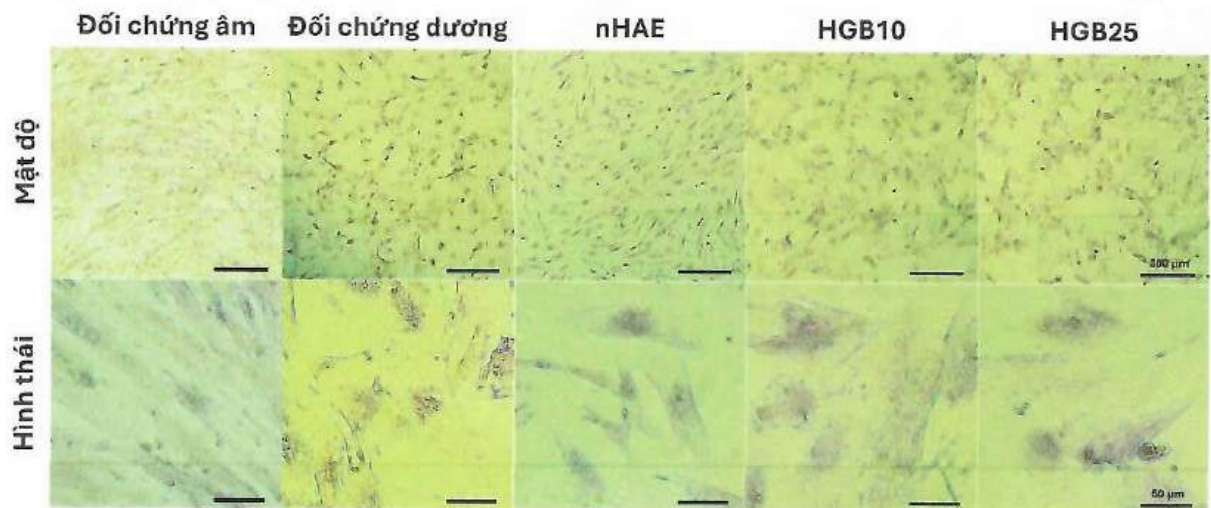
3.3.3.3. Thử nghiệm khả năng hỗ trợ tế bào biệt hoá xương của composit HGB

Kết quả thử nghiệm khả năng hỗ trợ quá trình biệt hoá xương của các mẫu vật liệu được thực hiện thông qua phương pháp nhuộm Alizarin Red S. Sau 7 ngày đồng nuôi cấy các tế bào BMSC, hình ảnh mật độ và hình thái tế bào được thể hiện như trong

Hình 3.22. Khả năng biệt hoá của BMSC trong thử nghiệm ARS được đánh giá thông qua khả năng bắt màu thuốc nhuộm của các ion Ca^{2+} trong chất nền ngoại bào, từ đó phản ánh mức độ biệt hoá của tế bào theo hướng nguyên bào xương. Đầu tiên, các tế bào BMSC được nuôi cấy trong môi trường tăng sinh bình thường (đối chứng âm) chủ yếu duy trì hình dạng sợi dài đặc trưng và hầu như không quan sát thấy sự bắt màu thuốc nhuộm. Điều này cho thấy không có sự biệt hoá nào diễn ra đối với các tế bào này. Ngược lại, trong môi trường có chứa các yếu tố thúc đẩy quá trình biệt hoá xương (đối chứng dương), các tế bào BMSC thể hiện rõ ràng quá trình biệt hoá với mật độ tế bào cao, hình thái lan rộng, đa giác và sự xuất hiện của các vùng nhuộm đỏ cam đặc trưng, phản ánh sự hình thành của các nốt khoáng hoá.

Đối với mẫu nHAE, kết quả thử nghiệm sau 7 ngày cho thấy hiệu quả nhất định về khả năng hỗ trợ tế bào BMSC biệt hoá so với đối chứng âm. Các tế bào đã bắt đầu có xu hướng lan rộng và sự bắt màu thuốc nhuộm nhẹ nhưng hình thái tế bào vẫn chưa chuyển đổi hoàn toàn sang hình dạng đặc trưng của nguyên bào xương. Kết quả này cho thấy nHAE vẫn có khả năng hỗ trợ quá trình biệt hoá ở giai đoạn sớm nhưng chưa thật sự mạnh mẽ. Nguyên nhân có thể đến từ khả năng giải phóng ion Ca^{2+} và Mg^{2+} , tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình biệt hoá xương diễn ra. Đặc biệt, các mẫu HGB10 và HGB25 cho thấy khả năng thúc đẩy quá trình biệt hoá xương diễn ra mạnh mẽ. Các tế bào BMSC được nuôi cấy trong môi trường dịch chiết của các mẫu nanocomposit HGB10 và HGB25 thể hiện những đặc trưng của quá trình biệt hoá một cách rõ ràng. Ở độ phóng đại 4X, mật độ tế bào bắt màu thuốc nhuộm xuất hiện rõ rệt và phân bố rộng khắp trong toàn bộ bề mặt quan sát. Ở độ phóng đại 40X, hình thái của các tế bào không chỉ thay đổi mà còn thể hiện những đặc trưng của tế bào xương với hình dạng đa giác, lan rộng và liên kết chặt chẽ. Hiệu quả được ghi nhận là có sự tương đương đối với đối chứng dương. Điều này chứng tỏ rằng, môi trường dịch chiết từ HGB10 và HGB25 đã hỗ trợ tốt cho quá trình biệt hoá xương và khoáng hoá của tế bào. Hiệu ứng tăng cường này có thể được giải thích bởi sự kết hợp hiệp đồng của các thành phần trong hệ nanocomposit. Các ion như Ca^{2+} và Mg^{2+} được cung cấp từ nHAE là các yếu tố đã được chứng minh là có khả năng kích hoạt các con đường tín hiệu liên quan đến biệt hoá xương. Bên cạnh đó, sự hiện diện của ion Bi^{3+} trong hệ nanocomposit có thể đóng vai trò quan trọng đối với việc điều hoà các phản ứng sinh học của tế bào. Mặc dù các cơ chế tác động cụ thể của ion Bi^{3+} lên quá trình biệt hoá xương vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ nhưng một số công bố gần đây đã cho thấy hiệu quả của ion Bi^{3+} trong việc cải thiện khả năng tăng sinh và biệt hoá xương của tế bào mà không gây độc tính. So với nHAE đơn lẻ, hệ nanocomposit hydrogel HGB cho thấy hiệu quả vượt trội rõ rệt hơn trong việc hỗ trợ quá trình biệt hoá xương. Tác dụng cộng hưởng giữa các ion sinh học Ca^{2+} , Mg^{2+} cùng với ion Bi^{3+} đã mang lại hiệu quả cảm ứng biệt hoá xương hiệu quả trong thời gian ngắn

[130–133]. Tổng hợp các kết quả thu được, có thể kết luận rằng các mẫu HGB10 và HGB25 không chỉ thể hiện khả năng tương thích sinh học, hỗ trợ tăng sinh và di chuyển tế bào mà còn có khả năng kích thích mạnh mẽ quá trình biệt hoá xương. Đây là cơ sở quan trọng cho thấy tiềm năng ứng dụng của hệ nanocomposit hydrogel nHAE/GTA/Bi trong lĩnh vực tái tạo xương.



Hình 3.22 Hình ảnh mật độ tế bào và hình thái tế bào gốc xương dưới kính hiển vi soi ngược sau khi được đồng nuôi cấy với dịch chiết của của nanocomposit hydrogel HGB và nhuộm với Alizarin Red S

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

❖ Kết luận

Luận văn với mục tiêu chế tạo thành công hệ vật liệu nanocomposit hydrogel trên cơ sở nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà và hydrogel nền gelatin biến tính axit tannic, có bổ sung ion Bi^{3+} nhằm mô phỏng hệ đa thành phần của mô xương tự nhiên, định hướng trong ứng dụng tái tạo mô xương. Nhìn chung, đã đạt được một số kết quả như sau:

- Tổng hợp thành công vật liệu nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà với hình thái đồng đều và kích thước hạt nhỏ hơn 100 nm. Các kết quả phân tích hóa lý bao gồm FTIR, và XRD cho thấy vật liệu nHAE được tổng hợp thành công với thành phần chính là hydroxyapatit. Các phép phân tích bao gồm phổ EDX và hình ảnh mapping xác nhận nHAE có sự pha tạp ion bởi ion Mg và nhóm cacbonat. Thử nghiệm hoạt tính sinh học cho thấy cho dù nHAE thể hiện khả năng phân hủy sinh học nhưng nhìn chung vẫn ổn định trong môi trường mô phỏng sinh lý. Thử nghiệm trên tế bào L929 cho thấy nHAE có khả năng tương thích tế bào tốt và khả năng hỗ trợ tế bào tăng sinh hiệu quả. Các kết quả cho thấy tiềm năng của nHAE ứng dụng làm pha vô cơ của vật liệu composit tái tạo xương.
- Tổng hợp thành công hệ hydrogel gelatin biến tính axit tannic sử dụng bismuth làm tác nhân liên kết ngang. Khảo sát thời gian tạo gel và phân tích FTIR cho thấy khả năng tạo gel tốt của ion Bi đối với polyme GTA. Thử nghiệm khả năng phân hủy cho thấy hệ hydrogel GTA-Bi có khả năng phân hủy sinh học tốt trong môi trường mô phỏng sinh lý. Đồng thời, thử nghiệm trên tế bào L929 cho thấy hệ hydrogel GTA-Bi có tính tương thích tế bào tốt do tỷ lệ tế bào sống sót hơn 70% dù cho nồng độ muối sử dụng đạt 100 mg/mL. Các kết quả thử nghiệm cho thấy hệ hydrogel GTA-Bi phù hợp cho ứng dụng làm pha hữu cơ của vật liệu composit tái tạo xương.
- Chế tạo thành công vật liệu nanocomposit hydrogel trên cơ sở nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà và hydrogel nền gelatin biến tính axit tannic, có bổ sung ion Bi^{3+} . Hệ vật liệu có khả năng tạo gel tốt thông qua khảo sát thời gian tạo gel. Phân tích FTIR cho thấy sự kết hợp thành công khi các nhóm chức đặc trưng cho các pha vật liệu xuất hiện trên phổ FTIR. Khả năng bám dính của vật liệu cũng được xác nhận thông qua các hình ảnh trực quan trên các mô sinh học khác nhau. Các thử nghiệm liên quan đến hoạt tính sinh học bao gồm khả năng phân hủy sinh học, khả năng kháng oxi hóa và khả năng kháng khuẩn xác nhận HGB có khả năng hỗ trợ tốt cho quá trình tái tạo xương. Đặc biệt thử nghiệm trên dòng tế bào L929 cho thấy vật liệu nanocomposit hydrogel HGB có khả năng hỗ trợ tế bào tăng sinh và di chuyển. Hơn thế nữa, khả năng thúc đẩy tế bào gốc tủy xương cũng

được xác nhận thông qua phương pháp nhuộm Alizarin Red S. Các kết quả thử nghiệm cho thấy vật liệu nanocomposit hydrogel nHAE/GTA/Bi có tiềm năng rất lớn cho ứng dụng tái tạo xương

❖ **Kiến nghị**

Dựa trên các kết quả thử nghiệm hiện tại, một số kiến nghị sau đây có thể sẽ giúp cho hệ vật liệu được phát triển một cách trọn vẹn hơn:

- Tiếp tục đánh giá chuyên sâu hơn về khả năng hình thành gel cũng như các tính chất cơ lý phù hợp cho ứng dụng tái tạo xương.
- Thử nghiệm chuyên sâu hơn đối với khả năng bám dính của hệ vật liệu nanocomposit với mô hình phù hợp.
- Đánh giá tính chất sinh học rộng hơn đối với các tiềm năng như khả năng hỗ trợ tế bào bám dính, khả năng tương thích máu, khả năng kháng viêm và khả năng thúc đẩy hình thành mạch máu.
- Thử nghiệm hiệu quả tái tạo xương trên mô hình động vật để có cái nhìn tổng quát về khả năng hỗ trợ quá trình hình thành xương mới trên cơ thể sống thông qua các phương pháp chụp cắt lớp vi tính và nhuộm mô học.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lin, X., Patil, S., Gao, Y.-G., Qian, A.: The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Front. Pharmacol.* 11, (2020). <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00757>
2. Florencio-Silva, R., Sasso, G.R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J., Cerri, P.S.: Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–17 (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
3. Emam, A.N.: Collagen and collagen-derived materials: synthesis, structure, classification, fundamental properties and biomedical applications. *Discover Applied Sciences.* 7, 1114 (2025). <https://doi.org/10.1007/s42452-025-07780-x>
4. Berrahou, S., Latifi, S., Saoiabi, S., Abidi, N., Saoiabi, S., Azzaoui, K., Hanbali, G., Jodeh, S., Hammouti, B., Sabbahi, R.: Hydroxyapatite–cellulose composites: properties, fabrication methods, and applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 37, 27 (2026). <https://doi.org/10.1007/s10856-025-06993-1>
5. Bolamperti, S., Villa, I., Rubinacci, A.: Bone remodeling: an operational process ensuring survival and bone mechanical competence. *Bone Res.* 10, 48 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41413-022-00219-8>
6. Florencio-Silva, R., Sasso, G.R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J., Cerri, P.S.: Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–17 (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
7. Abdelaziz, A.G., Nageh, H., Abdo, S.M., Abdalla, M.S., Amer, A.A., Abdal-hay, A., Barhoum, A.: A Review of 3D Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Principles, Fabrication Techniques, Immunomodulatory Roles, and Challenges. *Bioengineering.* 10, 204 (2023). <https://doi.org/10.3390/bioengineering10020204>
8. Tang, T., Casagrande, T., Mohammadpour, P., Landis, W., Lievers, B., Grandfield, K.: Characterization of human trabecular bone across multiple length scales using a correlative approach combining X-ray tomography with LaserFIB and plasma FIB-SEM. *Sci. Rep.* 14, 21604 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-72739-8>
9. Buccino, F., Giuseppoli, F., Kochetkova, T., Schwiedrzik, J., Vergani, L.M.: Advances in nanoscopic mechanobiological structure-property relationship in human bones for tailored fragility prevention. *Mater. Today Commun.* 40, 110108 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2024.110108>
10. ElHawary, H., Baradaran, A., Abi-Rafeh, J., Vorstenbosch, J., Xu, L., Efanov, J.I.: Bone Healing and Inflammation: Principles of Fracture and Repair. *Semin. Plast. Surg.* 35, 198–203 (2021). <https://doi.org/10.1055/s-0041-1732334>
11. Maruyama, M., Rhee, C., Utsunomiya, T., Zhang, N., Ueno, M., Yao, Z., Goodman, S.B.: Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 11, (2020). <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00386>
12. Maruyama, M., Rhee, C., Utsunomiya, T., Zhang, N., Ueno, M., Yao, Z., Goodman, S.B.: Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 11, (2020). <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00386>
13. Walters, G., Pountos, I., Giannoudis, P. V.: The cytokines and micro-environment of fracture haematoma: Current evidence. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 12, (2018). <https://doi.org/10.1002/term.2593>

14. Oliveira-Costa, K.M., Menezes, G.B., Paula Neto, H.A.: Neutrophil accumulation within tissues: A damage x healing dichotomy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 145, 112422 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112422>
15. Yuqiang, W., Ziyang, Z., Xuedi, S., Chengdong, P.: Recent progress in immunomodulation-based strategies for bone repair. *Regen. Ther.* 31, 101054 (2026). <https://doi.org/10.1016/j.reth.2025.101054>
16. Liang, W., Zhou, C., Liu, X., Xie, Q., Xia, L., Liu, L., Bao, W., Lin, H., Xiong, X., Zhang, H., Zheng, Z., Zhao, J.: Current status of nano-embedded growth factors and stem cells delivery to bone for targeted repair and regeneration. *J. Orthop. Translat.* 50, 257–273 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.jot.2024.12.006>
17. Kenkre, J., Bassett, J.: The bone remodelling cycle. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*. 55, 308–327 (2018). <https://doi.org/10.1177/0004563218759371>
18. Kushioka, J., Chow, S.K.-H., Toya, M., Tsubosaka, M., Shen, H., Gao, Q., Li, X., Zhang, N., Goodman, S.B.: Bone regeneration in inflammation with aging and cell-based immunomodulatory therapy. *Inflamm. Regen.* 43, 29 (2023). <https://doi.org/10.1186/s41232-023-00279-1>
19. Batoon, L., Millard, S.M., Raggatt, L.J., Pettit, A.R.: Osteomacs and Bone Regeneration. *Curr. Osteoporos. Rep.* 15, 385–395 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11914-017-0384-x>
20. Migliorini, F., La Padula, G., Torsiello, E., Spiezia, F., Oliva, F., Maffulli, N.: Strategies for large bone defect reconstruction after trauma, infections or tumour excision: a comprehensive review of the literature. *Eur. J. Med. Res.* 26, 118 (2021). <https://doi.org/10.1186/s40001-021-00593-9>
21. Trumble, T.E., Friedlaender, G.E.: Allogeneic Bone in the Treatment of Tumors, Trauma, and Congenital Anomalies of the Hand. *Orthopedic Clinics of North America*. 18, 301–310 (1987). [https://doi.org/10.1016/S0030-5898\(20\)30393-X](https://doi.org/10.1016/S0030-5898(20)30393-X)
22. Fesseha, H., Fesseha, Y.: Bone Grafting, Its Principle and Application: A Review. *Osteology and Rheumatology – Open Journal*. 3, 7–14 (2020). <https://doi.org/10.17140/ORHOJ-3-113>
23. Kumar, P., Vinitha, B., Fathima, G.: Bone grafts in dentistry. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 5, 125 (2013). <https://doi.org/10.4103/0975-7406.113312>
24. Ferraz, M.P.: Bone Grafts in Dental Medicine: An Overview of Autografts, Allografts and Synthetic Materials. *Materials*. 16, 4117 (2023). <https://doi.org/10.3390/ma16114117>
25. Titsinides, S., Agrogiannis, G., Karatzas, T.: Bone grafting materials in dentoalveolar reconstruction: A comprehensive review. *Japanese Dental Science Review*. 55, 26–32 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2018.09.003>
26. Sakkas, A., Wilde, F., Heufelder, M., Winter, K., Schramm, A.: Autogenous bone grafts in oral implantology—is it still a “gold standard”? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int. J. Implant Dent.* 3, 23 (2017). <https://doi.org/10.1186/s40729-017-0084-4>
27. Ferraz, M.P.: Bone Grafts in Dental Medicine: An Overview of Autografts, Allografts and Synthetic Materials. *Materials*. 16, 4117 (2023). <https://doi.org/10.3390/ma16114117>
28. Titsinides, S., Agrogiannis, G., Karatzas, T.: Bone grafting materials in dentoalveolar reconstruction: A comprehensive review. *Japanese Dental Science Review*. 55, 26–32 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2018.09.003>

29. Georgeanu, V.Al., Gingu, O., Antoniac, I. V., Manolea, H.O.: Current Options and Future Perspectives on Bone Graft and Biomaterials Substitutes for Bone Repair, from Clinical Needs to Advanced Biomaterials Research. *Applied Sciences*. 13, 8471 (2023). <https://doi.org/10.3390/app13148471>
30. Farag, M.M., Al-Rashidy, Z.M.: Recent Clinical Applications of Biomaterials in Tissue Engineering. Presented at the (2024)
31. Titsinides, S., Agrogiannis, G., Karatzas, T.: Bone grafting materials in dentoalveolar reconstruction: A comprehensive review. *Japanese Dental Science Review*. 55, 26–32 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2018.09.003>
32. García-Gareta, E., Coathup, M.J., Blunn, G.W.: Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*. 81, 112–121 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.07.007>
33. De Pace, R., Molinari, S., Mazzoni, E., Perale, G.: Bone Regeneration: A Review of Current Treatment Strategies. *J. Clin. Med.* 14, 1838 (2025). <https://doi.org/10.3390/jcm14061838>
34. Gillman, C.E., Jayasuriya, A.C.: FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration. *Materials Science and Engineering: C*. 130, 112466 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112466>
35. Song, P., Zhou, D., Wang, F., Li, G., Bai, L., Su, J.: Programmable biomaterials for bone regeneration. *Mater. Today Bio*. 29, 101296 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2024.101296>
36. Šromová, V., Sobola, D., Kaspar, P.: A Brief Review of Bone Cell Function and Importance. *Cells*. 12, 2576 (2023). <https://doi.org/10.3390/cells12212576>
37. Sadat-Shojai, M., Khorasani, M.-T., Jamshidi, A.: A new strategy for fabrication of bone scaffolds using electrospun nano-HAp/PHB fibers and protein hydrogels. *Chemical Engineering Journal*. 289, 38–47 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.12.079>
38. Dorozhkin, S. V.: Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. *Acta Biomater*. 6, 715–734 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.031>
39. Wang, Y., Liu, L., Guo, S.: Characterization of biodegradable and cytocompatible nano-hydroxyapatite/polycaprolactone porous scaffolds in degradation in vitro. *Polym. Degrad. Stab.* 95, 207–213 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.11.023>
40. Gong, T., Xie, J., Liao, J., Zhang, T., Lin, S., Lin, Y.: Nanomaterials and bone regeneration. *Bone Res.* 3, 15029 (2015). <https://doi.org/10.1038/boneres.2015.29>
41. Hoveidaei, A.H., Sadat-Shojai, M., Mosalamiaghili, S., Salarikia, S.R., Roghani-shahraki, H., Ghaderpanah, R., Ersi, M.H., Conway, J.D.: Nano-hydroxyapatite structures for bone regenerative medicine: Cell-material interaction. *Bone*. 179, 116956 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.bone.2023.116956>
42. Skinner, H.C.W.: Biominerals. *Mineral. Mag.* 69, 621–641 (2005). <https://doi.org/10.1180/0026461056950275>
43. Wang, L., Nancollas, G.H.: Calcium Orthophosphates: Crystallization and Dissolution. *Chem. Rev.* 108, 4628–4669 (2008). <https://doi.org/10.1021/cr0782574>
44. Dorozhkin, S. V.: Nanodimensional and Nanocrystalline Apatites and Other Calcium Orthophosphates in Biomedical Engineering, Biology and Medicine. *Materials*. 2, 1975–2045 (2009). <https://doi.org/10.3390/ma2041975>

45. Rey, C., Combes, C., Drouet, C., Sfihi, H., Barroug, A.: Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials. *Materials Science and Engineering: C*. 27, 198–205 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.015>
46. Kurzyk, A., Szwed-Georgiou, A., Pagacz, J., Antosik, A., Tymowicz-Grzyb, P., Gerle, A., Szterner, P., Włodarczyk, M., Płociński, P., Urbaniak, M.M., Rudnicka, K., Biernat, M.: Calcination and ion substitution improve physicochemical and biological properties of nanohydroxyapatite for bone tissue engineering applications. *Sci. Rep.* 13, 15384 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42271-2>
47. Šupová, M.: Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. *Ceram. Int.* 41, 9203–9231 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.03.316>
48. Anandan, D., Jaiswal, A.K.: Synthesis methods of hydroxyapatite and biomedical applications: an updated review. *Journal of the Australian Ceramic Society*. 60, 663–679 (2024). <https://doi.org/10.1007/s41779-023-00943-2>
49. Wu, S.-C., Hsu, H.-C., Liu, M.-Y., Ho, W.-F.: Characterization of nanosized hydroxyapatite prepared by an aqueous precipitation method using eggshells and mulberry leaf extract. *Journal of the Korean Ceramic Society*. 58, 116–122 (2021). <https://doi.org/10.1007/s43207-020-00087-0>
50. Nikolaev, A.L., Gopin, A.V., Severin, A.V., Rudin, V.N., Mironov, M.A., Dezhkunov, N.V.: Ultrasonic synthesis of hydroxyapatite in non-cavitation and cavitation modes. *Ultrason. Sonochem.* 44, 390–397 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.047>
51. Alahnoori, A., Badrossamay, M., Foroozmehr, E.: Characterization of hydroxyapatite powders and selective laser sintering of its composite with polyamide. *Mater. Chem. Phys.* 296, 127316 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2023.127316>
52. Pan, P., Geng, Y., Hu, L., Liu, Q., Liu, M., Cheng, M., Chen, L., Chen, J.: Biologically enhanced 3D printed micro-nano hybrid scaffolds doped with abalone shell for bone regeneration. *Adv. Compos. Hybrid Mater.* 6, 10 (2023). <https://doi.org/10.1007/s42114-022-00593-1>
53. Ho, W.-F., Lee, M.-H., Thomas, J.L., Li, J.-A., Wu, S.-C., Hsu, H.-C., Lin, H.-Y.: Porous Biphasic Calcium Phosphate Granules from Oyster Shell Promote the Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 9444 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22179444>
54. Arnold, M., Rajagukguk, Y.V., Sidor, A., Kulczyński, B., Brzozowska, A., Suliburska, J., Wawrzyniak, N., Gramza-Michałowska, A.: Innovative Application of Chicken Eggshell Calcium to Improve the Functional Value of Gingerbread. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 19, 4195 (2022). <https://doi.org/10.3390/ijerph19074195>
55. Tozzi, G., De Mori, A., Oliveira, A., Roldo, M.: Composite Hydrogels for Bone Regeneration. *Materials*. 9, 267 (2016). <https://doi.org/10.3390/ma9040267>
56. Zhang, D., Wu, X., Chen, J., Lin, K.: The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration. *Bioact. Mater.* 3, 129–138 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.08.004>
57. Amirrah, I.N., Lokanathan, Y., Zulkiflee, I., Wee, M.F.M.R., Motta, A., Fauzi, M.B.: A Comprehensive Review on Collagen Type I Development of

- Biomaterials for Tissue Engineering: From Biosynthesis to Bioscaffold. *Biomedicines*. 10, 2307 (2022). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092307>
58. Sarker, B., Singh, R., Silva, R., Roether, J.A., Kaschta, J., Detsch, R., Schubert, D.W., Cicha, I., Boccaccini, A.R.: Evaluation of Fibroblasts Adhesion and Proliferation on Alginate-Gelatin Crosslinked Hydrogel. *PLoS One*. 9, e107952 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107952>
 59. Sellers, A., Reynolds, J.J., Meikle, M.C.: Neutral metallo-proteinases of rabbit bone. Separation in latent forms of distinct enzymes that when activated degrade collagen, gelatin and proteoglycans. *Biochemical Journal*. 171, 493–496 (1978). <https://doi.org/10.1042/bj1710493>
 60. Tripathi, A.S., Zaki, M.E.A., Al-Hussain, S.A., Dubey, B.K., Singh, P., Rind, L., Yadav, R.K.: Material matters: exploring the interplay between natural biomaterials and host immune system. *Front. Immunol.* 14, (2023). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1269960>
 61. Wu, Y., Chen, X., Kang, J., Yang, Y., Zhao, X., Liu, Y., Qiao, J.: Calcium silicate/gelatin composite scaffolds with controllable degradation behavior: Fabrication and evaluation. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 152, 106422 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2024.106422>
 62. Liu, Y., Zhao, Q., Chen, C., Wu, C., Ma, Y.: β -tricalcium phosphate/gelatin composite scaffolds incorporated with gentamycin-loaded chitosan microspheres for infected bone defect treatment. *PLoS One*. 17, e0277522 (2022). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0277522>
 63. Andrezza, R., Morales, A., Pieniz, S., Labidi, J.: Gelatin-Based Hydrogels: Potential Biomaterials for Remediation. *Polymers (Basel)*. 15, 1026 (2023). <https://doi.org/10.3390/polym15041026>
 64. Baldwin, A., Booth, B.W.: Biomedical applications of tannic acid. *J. Biomater. Appl.* 36, 1503–1523 (2022). <https://doi.org/10.1177/08853282211058099>
 65. Baldwin, A., Booth, B.W.: Biomedical applications of tannic acid. *J. Biomater. Appl.* 36, 1503–1523 (2022). <https://doi.org/10.1177/08853282211058099>
 66. Guo, Z., Xie, W., Lu, J., Guo, X., Xu, J., Xu, W., Chi, Y., Takuya, N., Wu, H., Zhao, L.: Tannic acid-based metal phenolic networks for bio-applications: a review. *J. Mater. Chem. B*. 9, 4098–4110 (2021). <https://doi.org/10.1039/D1TB00383F>
 67. Myint, K.B., Sing, L.C., Wei, Z.: Tannic Acid as Phytochemical Potentiator for Antibiotic Resistance Adaptation. *APCBEE Procedia*. 7, 175–181 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2013.08.030>
 68. Fan, H., Wang, L., Feng, X., Bu, Y., Wu, D., Jin, Z.: Supramolecular Hydrogel Formation Based on Tannic Acid. *Macromolecules*. 50, 666–676 (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.6b02106>
 69. Zhang, X., Do, M.D., Casey, P., Sulistio, A., Qiao, G.G., Lundin, L., Lillford, P., Kosaraju, S.: Chemical Modification of Gelatin by a Natural Phenolic Cross-linker, Tannic Acid. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6809–6815 (2010). <https://doi.org/10.1021/jf1004226>
 70. Strauss, G., Gibson, S.M.: Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocoll.* 18, 81–89 (2004). [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00045-6](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00045-6)
 71. Guo, J., Sun, W., Kim, J.P., Lu, X., Li, Q., Lin, M., Mrowczynski, O., Rizk, E.B., Cheng, J., Qian, G., Yang, J.: Development of tannin-inspired antimicrobial

- bioadhesives. *Acta Biomater.* 72, 35–44 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.008>
72. Guo, J., Sun, W., Kim, J.P., Lu, X., Li, Q., Lin, M., Mrowczynski, O., Rizk, E.B., Cheng, J., Qian, G., Yang, J.: Development of tannin-inspired antimicrobial bioadhesives. *Acta Biomater.* 72, 35–44 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.008>
73. Ressler, A., Žužić, A., Ivanišević, I., Kamboj, N., Ivanković, H.: Ionic substituted hydroxyapatite for bone regeneration applications: A review. *Open Ceramics.* 6, 100122 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.oceram.2021.100122>
74. Pantulap, U., Arango-Ospina, M., Boccaccini, A.R.: Bioactive glasses incorporating less-common ions to improve biological and physical properties. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 33, 3 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10856-021-06626-3>
75. Wang, R., Li, H., Sun, H.: Bismuth: Environmental Pollution and Health Effects. In: *Encyclopedia of Environmental Health*. pp. 415–423. Elsevier (2019)
76. Clavijo-Mejía, G.A., Michálek, M., Arango-Ospina, M., Unalan, I., Nawaz, Q., Galusek, D., Boccaccini, A.R.: Biocompatibility and antibacterial activity of radiopaque bismuth-containing bioactive glasses. *Ceram. Int.* 51, 42725–42733 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2025.07.016>
77. No, Y.J., Nguyen, T., Lu, Z., Mirkhalaf, M., Fei, F., Foley, M., Zreiqat, H.: Development of a bioactive and radiopaque bismuth doped baghdadite ceramic for bone tissue engineering. *Bone.* 153, 116147 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.116147>
78. Shen, Y., Li, G., Wang, J., Qi, J., Cui, W., Deng, L.: Facile synthesis of in situ bismuth-doped calcium phosphate nanocomposite integrated injectable biopolymer hydrogel slurry for bone regeneration. *J. Colloid Interface Sci.* 679, 760–771 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2024.09.243>
79. Ma, P., Wu, W., Wei, Y., Ren, L., Lin, S., Wu, J.: Biomimetic gelatin/chitosan/polyvinyl alcohol/nano-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Mater. Des.* 207, 109865 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2021.109865>
80. Zhou, X., Sun, J., Wo, K., Wei, H., Lei, H., Zhang, J., Lu, X., Mei, F., Tang, Q., Wang, Y., Luo, Z., Fan, L., Chu, Y., Chen, L.: nHA-loaded gelatin/alginate hydrogel with combined physical and bioactive features for maxillofacial bone repair. *Carbohydr. Polym.* 298, 120127 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120127>
81. Lu, W., Zeng, M., Liu, W., Ma, T., Fan, X., Li, H., Wang, Y., Wang, H., Hu, Y., Xie, J.: Human urine-derived stem cell exosomes delivered via injectable GelMA templated hydrogel accelerate bone regeneration. *Mater. Today Bio.* 19, 100569 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100569>
82. Zhou, L., Chen, D., Wu, R., Li, L., Shi, T., Shangguang, Z., Lin, H., Chen, G., Wang, Z., Liu, W.: An injectable and photocurable methacrylate-silk fibroin/nano-hydroxyapatite hydrogel for bone regeneration through osteoimmunomodulation. *Int. J. Biol. Macromol.* 263, 129925 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129925>
83. El-Bahrawy, N.R., Hafez, A.A.A.E.L., Elmekawy, A., Salem, M., Sarhan, N., Morsy, R.: Development and characterization of nano-hydroxyapatite/gelatin/PVA/alginate-based multifunctional active scaffolds for

- bone regeneration: An in vitro and in vivo study. *Int. J. Biol. Macromol.* 307, 141160 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.141160>
84. Tran, D.L., Ta, Q.T.H., Tran, M.H., Nguyen, T.M.H., Le, N.T.T., Nguyen Hong, A.P., Park, H.-J., Park, K.D., Nguyen, D.H.: Optimized synthesis of biphasic calcium phosphate: enhancing bone regeneration with a tailored β -tricalcium phosphate/hydroxyapatite ratio. *Biomater. Sci.* 13, 969–979 (2025). <https://doi.org/10.1039/D4BM01179A>
85. Nguyen Hong, A.P., Trang Le, N.T., Truong, M.-D., Tran, D.L., Nguyen, N.H., Nguyen, D.H.: Alpha-calcium sulfate hemihydrate incorporated with tri-calcium phosphate and hydroxyapatite bioceramics as potential scaffold for bone regeneration. *Ceram. Int.* 50, 54125–54133 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2024.10.269>
86. Phung Thi, N.A., Ba, N.H.P., Hong, A.P.N., Nguyen, D.Y.P., Vo Do, M.H., Nguyen, D.H., Tran, D.L.: Harnessing gold-ion crosslinked polyphenol-mediated hydrogels with enhanced tissue adhesiveness, antioxidation, and antibacterial for advanced wound care. *Mater. Today Commun.* 41, 110724 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2024.110724>
87. Tran, D.L., Tran, Q.T.T., Nguyen, H.T.A., Thi, N.A.P., Phan, H.N., Nguyen, L.M., Dinh, T.N., Le, N.T.T., Nguyen, N.H., Nguyen, D.H.: A Breakthrough Straightforward Multifunctional Hydrogel Platform Releasing Therapeutic Gas for Advanced Wound Healing. *Journal of Polymer Science.* 63, 1184–1196 (2025). <https://doi.org/10.1002/pol.20240972>
88. Nguyen, M.N.-H., Vu, B.T., Truong, D.M., Le, T.D., Vo, T.-T.T., Vo, T. V., Nguyen, T.-H.: Fabrication of 3-Dimensional-Printed Bilayered Scaffold Carboxymethyl Chitosan/Oxidized Xanthan Gum, Biphasic Calcium Phosphate for Osteochondral Regeneration. *Biomater. Res.* 29, (2025). <https://doi.org/10.34133/bmr.0186>
89. Abdulhussein, H.J., Mohsin, M.H., Jabir, M.S., Sulaiman, G.M., Mohammed, Hamdoon.A., Ismail, R.A., Ramizy, A., Eisa, M.H., Ibrahim, N.A., Badher, N.S.: Eco-friendly synthesis of eggshell-derived nano-hydroxyapatite: physicochemical characterization, hemocompatibility, and bone regeneration potential. *Sci. Rep.* 15, 32832 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-17486-0>
90. Swamiappan, S., Xie, X., Lu, C., Peng, X.: Ultrasonic-assisted green synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite from *Cirrhinus molitorella* fish scales bio-waste for biomedical applications. *Ceram. Int.* 51, 20452–20464 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2025.02.215>
91. Tran, D.L., Tran, Q.T.T., Nguyen, H.T.A., Thi, N.A.P., Phan, H.N., Nguyen, L.M., Dinh, T.N., Le, N.T.T., Nguyen, N.H., Nguyen, D.H.: A Breakthrough Straightforward Multifunctional Hydrogel Platform Releasing Therapeutic Gas for Advanced Wound Healing. *Journal of Polymer Science.* 63, 1184–1196 (2025). <https://doi.org/10.1002/pol.20240972>
92. Liang, Z., Sun, Q., Gao, H., Song, D., Cao, H., Liu, Z., Hu, W., Chen, J., Li, Y., Yang, B., Xie, C., Tang, B., Lin, L.: Mussel-inspired adhesive hydrogel reprograms osteoimmune niche for robust bone regeneration in complex defects. *Mater. Today Bio.* 37, 102996 (2026). <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2026.102996>
93. Tran, D.L., Phan, H.N., Nguyen, H.T.A., Nguyen, H.-M.T., Nguyen, L.M., Phung, V.T., Nguyen, D.H.: An injectable conductive hydrogel enabling sustained

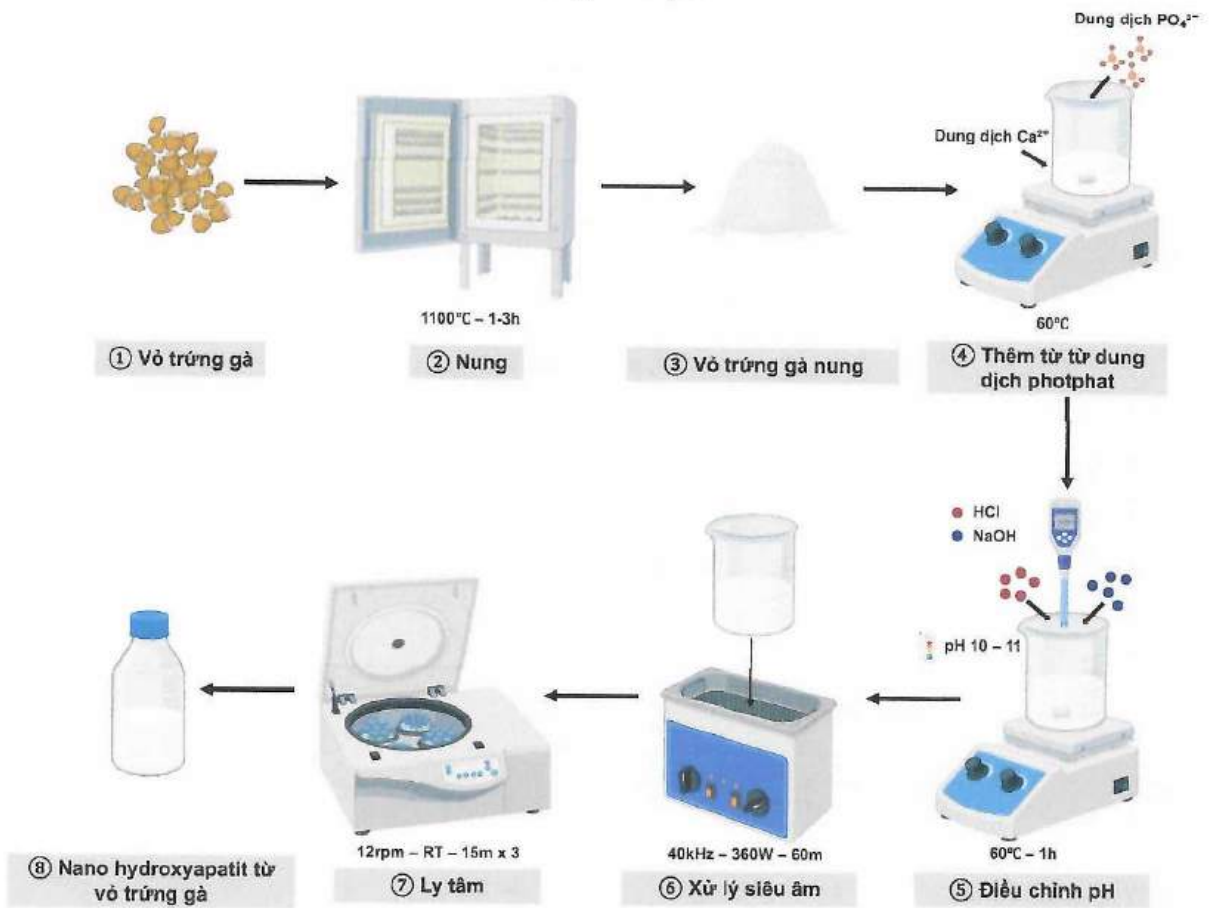
- nitric oxide generation for cardiac tissue regeneration. *J. Mater. Chem. B*, 14, 4330–4345 (2026). <https://doi.org/10.1039/D5TB01839K>
94. Nguyen Hong, A.P., Trang Le, N.T., Truong, M.-D., Tran, D.L., Nguyen, N.H., Nguyen, D.H.: Alpha-calcium sulfate hemihydrate incorporated with tri-calcium phosphate and hydroxyapatite bioceramics as potential scaffold for bone regeneration. *Ceram. Int.* (2024). <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2024.10.269>
 95. Li, L., Xu, J., Zhu, J., Zhou, P., Zou, A., Pang, Y., Wang, J.: Injectable black phosphorus/hyaluronic acid hydrogel for antibacterial and osteogenic applications in periodontitis. *Colloid Interface Sci. Commun.* 73, 100899 (2026). <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2026.100899>
 96. Tran, D.L., Le Thi, P., Hoang Thi, T.T., Park, K.D.: Novel enzymatically crosslinked chitosan hydrogels with free-radical-scavenging property and promoted cellular behaviors under hyperglycemia. *Progress in Natural Science: Materials International*. 30, 661–668 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2020.08.004>
 97. Tran, D.L., Ta, Q.T.H., Tran, M.H., Nguyen, T.M.H., Le, N.T.T., Nguyen Hong, A.P., Park, H.-J., Park, K.D., Nguyen, D.H.: Optimized synthesis of biphasic calcium phosphate: enhancing bone regeneration with a tailored β -tricalcium phosphate/hydroxyapatite ratio. *Biomater. Sci.* 13, 969–979 (2025). <https://doi.org/10.1039/D4BM01179A>
 98. Matei, C., Berger, D., Dumbrava, A., Radu, M.D., Gheorghe, E.: Calcium carbonate as silver carrier in composite materials obtained in green seaweed extract with topical applications. *J. Solgel Sci. Technol.* 93, 315–323 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10971-019-05145-6>
 99. Tizo, M.S., Blanco, L.A. V., Cagas, A.C.Q., Dela Cruz, B.R.B., Encoy, J.C., Gunting, J. V., Arazo, R.O., Mabayo, V.I.F.: Efficiency of calcium carbonate from eggshells as an adsorbent for cadmium removal in aqueous solution. *Sustainable Environment Research*. 28, 326–332 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.serj.2018.09.002>
 100. Sid, A.N.E.H., Tahraoui, H., Kebir, M., Bezzekhami, M.A., Kouini, B., Hassen-Bey, A.H., Selma, T., Amrane, A., Imessaoudene, A., Mouni, L.: Comparative Investigation of the Effect of Eggshell Powder and Calcium Carbonate as Additives in Eco-Friendly Polymer Drilling Fluids. *Sustainability*. 15, 3375 (2023). <https://doi.org/10.3390/su15043375>
 101. Hemmami, H., Zeghoud, S., Ben Amor, I., Alnazza Alhamad, A., Tliba, A., Alsalmeh, A., Cornu, D., Bechelany, M., Barhoum, A.: Green synthesis of CaO nanoparticles from chicken eggshells: antibacterial, antifungal, and heavy metal (Pb^{2+} , Cr^{2+} , Cd^{2+} and Hg^{2+}) adsorption properties. *Front. Environ. Sci.* 12, (2024). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2024.1450485>
 102. Ben Aribia, W., Trigui, A., Alshammari, N.K., Abdelmoleh, M.: Development of phase change eco-composite materials from eggshell waste. *Green Chem. Lett. Rev.* 17, (2024). <https://doi.org/10.1080/17518253.2024.2380060>
 103. Habte, L., Shiferaw, N., Mulatu, D., Thenepalli, T., Chilakala, R., Ahn, J.: Synthesis of Nano-Calcium Oxide from Waste Eggshell by Sol-Gel Method. *Sustainability*. 11, 3196 (2019). <https://doi.org/10.3390/su11113196>
 104. Shukla, R., Sokkalingam, R., Prashanth, K.G.: Densification of the eggshell powder by spark plasma sintering. *J. Alloys Compd.* 962, 171079 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2023.171079>

105. Fan, Y., Guo, W., Hu, Y., Zhang, Y., Wang, J., Wen, Z.: Study on the Regulation of Diethylene Glycol on the Hydration Process of High-Activity Calcium Oxide. *Materials*. 19, 1132 (2026). <https://doi.org/10.3390/ma19061132>
106. Ho, W.-F., Hsu, H.-C., Hsu, S.-K., Hung, C.-W., Wu, S.-C.: Calcium phosphate bioceramics synthesized from eggshell powders through a solid state reaction. *Ceram. Int.* 39, 6467–6473 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.01.076>
107. Jastrzębski, W., Sitarz, M., Rokita, M., Bułat, K.: Infrared spectroscopy of different phosphates structures. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 79, 722–727 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.08.044>
108. Lafon, J.P., Champion, E., Bernache-Assollant, D.: Processing of AB-type carbonated hydroxyapatite $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6-x(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x-2y}(\text{CO}_3)_y$ ceramics with controlled composition. *J. Eur. Ceram. Soc.* 28, 139–147 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2007.06.009>
109. Dorozhkin, S. V.: Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*. 31, 1465–1485 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.050>
110. Dorozhkin, S. V.: Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. *Materials*. 2, 399–498 (2009). <https://doi.org/10.3390/ma2020399>
111. Xing, Y., Zhong, X., Chen, S., Wu, S., Chen, K., Li, X., Su, M., Liu, X., Zhong, J., Chen, Z., Pan, H., Chen, Z., Liu, Q.: Optimized osteogenesis of porcine bone-derived xenograft through surface coating of magnesium-doped nanohydroxyapatite. *Biomedical Materials*. 18, 055025 (2023). <https://doi.org/10.1088/1748-605X/acf25e>
112. Alvarez, K., Nakajima, H.: Metallic Scaffolds for Bone Regeneration. *Materials*. 2, 790–832 (2009). <https://doi.org/10.3390/ma2030790>
113. Cao, J., Lian, R., Jiang, X., Liu, X.: Formation of Porous Apatite Layer after Immersion in SBF of Fluorine-Hydroxyapatite Coatings by Pulsed Laser Deposition Improved *in Vitro* Cell Proliferation. *ACS Appl. Bio Mater.* 3, 3698–3706 (2020). <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00328>
114. Wang, L., Pang, Y., Tang, Y., Wang, X., Zhang, D., Zhang, X., Yu, Y., Yang, X., Cai, Q.: A biomimetic piezoelectric scaffold with sustained Mg^{2+} release promotes neurogenic and angiogenic differentiation for enhanced bone regeneration. *Bioact. Mater.* 25, 399–414 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.11.004>
115. Dai, Y., Wu, J., Wang, J., Wang, H., Guo, B., Jiang, T., Cai, Z., Han, J., Zhang, H., Xu, B., Zhou, X., Wang, C.: Magnesium Ions Promote the Induction of Immunosuppressive Bone Microenvironment and Bone Repair through HIF-1 α -TGF- β Axis in Dendritic Cells. *Small*. 20, (2024). <https://doi.org/10.1002/sml.202311344>
116. Kim, N.E., Park, S., Kim, S., Choi, J.H., Kim, S.E., Choe, S.H., Kang, T. woong, Song, J.E., Khang, G.: Development of Gelatin-Based Shape-Memory Polymer Scaffolds with Fast Responsive Performance and Enhanced Mechanical Properties for Tissue Engineering Applications. *ACS Omega*. 8, 6455–6462 (2023). <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06730>
117. Nath, J., Saikia, P.P., Handique, J., Gupta, K., Dolui, S.K.: Multifunctional mussel-inspired Gelatin and Tannic acid-based hydrogel with pH-controllable release of vitamin B₁₂. *J. Appl. Polym. Sci.* 137, (2020). <https://doi.org/10.1002/app.49193>

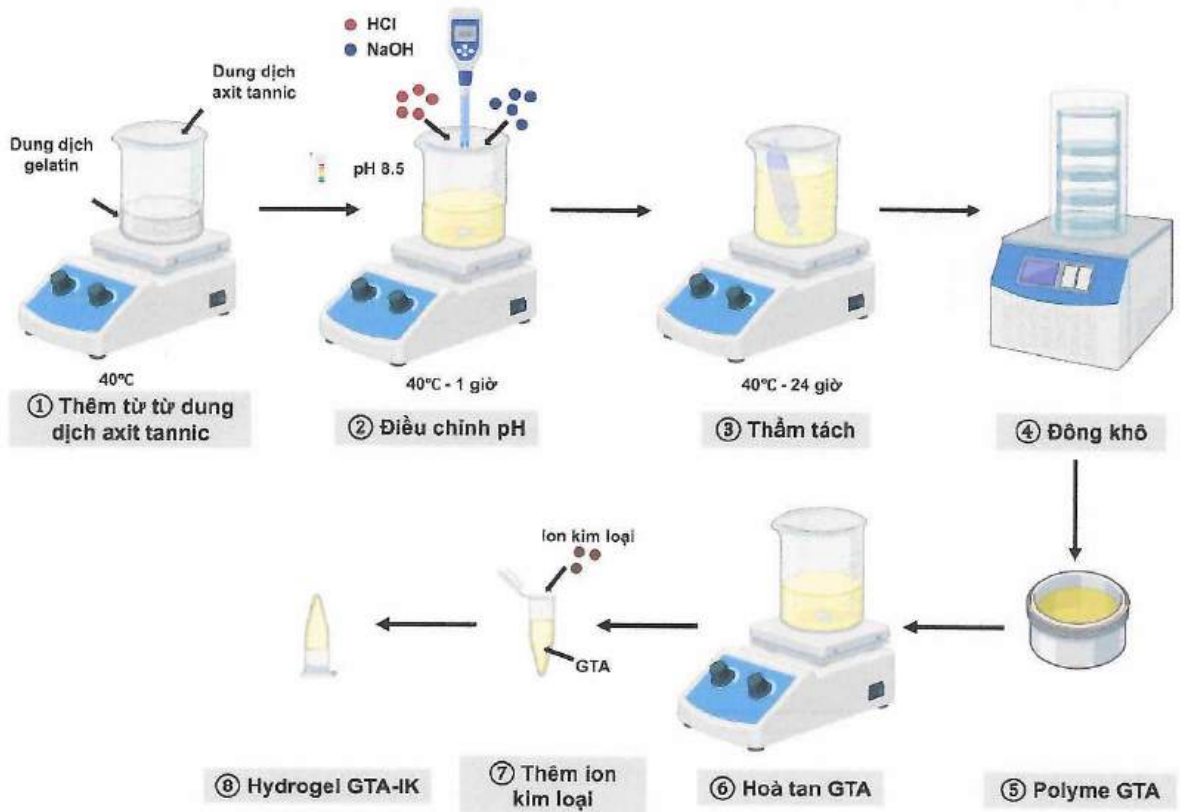
118. Sagadevan, S., Murugasen, P.: Studies on Optical, Mechanical and Electrical Properties of Organic Nonlinear Optical p-Toluidine p-Toluenesulfonate Single Crystal. *Journal of Crystallization Process and Technology*. 04, 99–110 (2014). <https://doi.org/10.4236/jcpt.2014.42013>
119. Geng, H., Zhong, Q.-Z., Li, J., Lin, Z., Cui, J., Caruso, F., Hao, J.: Metal Ion-Directed Functional Metal-Phenolic Materials. *Chem. Rev.* 122, 11432–11473 (2022). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c01042>
120. Wang, H., Wang, D., Yu, J., Zhang, Y., Zhou, Y.: Applications of metal-phenolic networks in nanomedicine: a review. *Biomater. Sci.* 10, 5786–5808 (2022). <https://doi.org/10.1039/D2BM00969B>
121. Govindan, R., Gu, F.L., Karthi, S., Girija, E.K.: Effect of phosphate glass reinforcement on the mechanical and biological properties of freeze-dried gelatin composite scaffolds for bone tissue engineering applications. *Mater. Today Commun.* 22, 100765 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2019.100765>
122. Hassani, A., Khoshfetrat, A.B., Rahbarghazi, R., Sakai, S.: Collagen and nano-hydroxyapatite interactions in alginate-based microcapsule provide an appropriate osteogenic microenvironment for modular bone tissue formation. *Carbohydr. Polym.* 277, 118807 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118807>
123. Gwak, M.A., Hong, B.M., Seok, J.M., Park, S.A., Park, W.H.: Effect of tannic acid on the mechanical and adhesive properties of catechol-modified hyaluronic acid hydrogels. *Int. J. Biol. Macromol.* 191, 699–705 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.123>
124. Janarthanan, G., Noh, I.: Recent trends in metal ion based hydrogel biomaterials for tissue engineering and other biomedical applications. *J. Mater. Sci. Technol.* 63, 35–53 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2020.02.052>
125. Guo, Z., Xie, W., Lu, J., Guo, X., Xu, J., Xu, W., Chi, Y., Takuya, N., Wu, H., Zhao, L.: Tannic acid-based metal phenolic networks for bio-applications: a review. *J. Mater. Chem. B* 9, 4098–4110 (2021). <https://doi.org/10.1039/D1TB00383F>
126. Baldwin, A., Booth, B.W.: Biomedical applications of tannic acid. *J. Biomater. Appl.* 36, 1503–1523 (2022). <https://doi.org/10.1177/08853282211058099>
127. Guo, Z., Xie, W., Lu, J., Guo, X., Xu, J., Xu, W., Chi, Y., Takuya, N., Wu, H., Zhao, L.: Tannic acid-based metal phenolic networks for bio-applications: a review. *J. Mater. Chem. B* 9, 4098–4110 (2021). <https://doi.org/10.1039/D1TB00383F>
128. Ma, Y., Ghosh, S., Kong, X., Kalimuthu, S., Pudipeddi, A., Okuro, K., Ye, Z., Dubey, N., Neelakantan, P.: Nanoscale bismuth infused bioadhesive gelatin methacryloyl electrospun mats demonstrate excellent antibiofilm activity and biocompatibility. *Int. J. Biol. Macromol.* 312, 144103 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.144103>
129. Huang, K., Liu, H., Zhang, H., Zhang, X., Jiang, H., Liu, X., Wang, X.: Tannic acid: A link between metallic elements and biomedical applications. *Coord. Chem. Rev.* 548, 217193 (2026). <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2025.217193>
130. Pazarçeviren, A.E., Tahmasebifar, A., Tezcaner, A., Keskin, D., Evis, Z.: Investigation of bismuth doped bioglass/graphene oxide nanocomposites for bone tissue engineering. *Ceram. Int.* 44, 3791–3799 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.11.164>

131. Zhang, W., He, H., Tian, Y., Gan, Q., Zhang, J., Yuan, Y., Liu, C.: Calcium ion-induced formation of β -sheet/-turn structure leading to alteration of osteogenic activity of bone morphogenetic protein-2. *Sci. Rep.* 5, 12694 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep12694>
132. Wang, L., Pang, Y., Tang, Y., Wang, X., Zhang, D., Zhang, X., Yu, Y., Yang, X., Cai, Q.: A biomimetic piezoelectric scaffold with sustained Mg^{2+} release promotes neurogenic and angiogenic differentiation for enhanced bone regeneration. *Bioact. Mater.* 25, 399–414 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.11.004>
133. Dai, Y., Wu, J., Wang, J., Wang, H., Guo, B., Jiang, T., Cai, Z., Han, J., Zhang, H., Xu, B., Zhou, X., Wang, C.: Magnesium Ions Promote the Induction of Immunosuppressive Bone Microenvironment and Bone Repair through HIF-1 α -TGF- β Axis in Dendritic Cells. *Small.* 20, (2024). <https://doi.org/10.1002/sml.202311344>

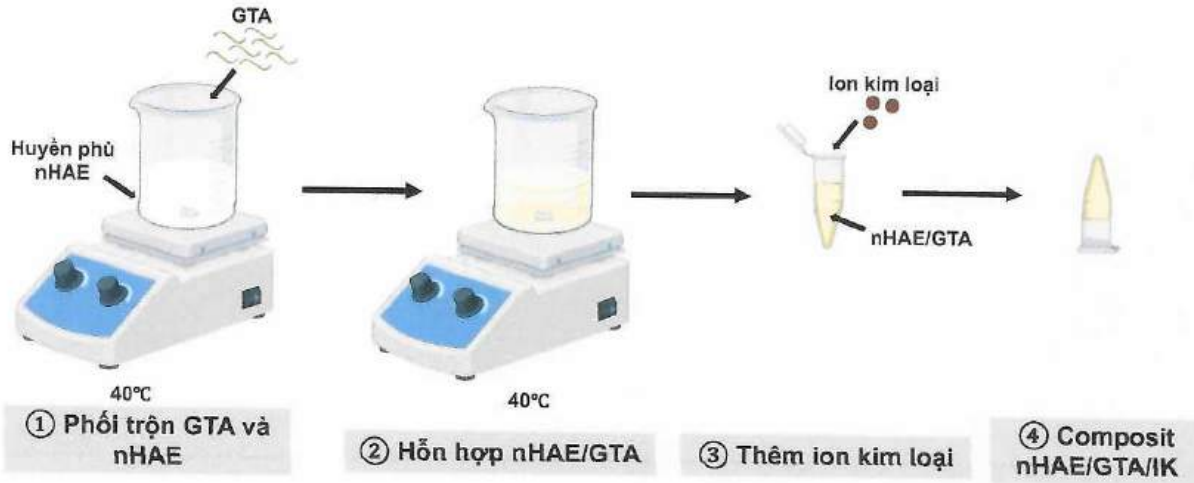
PHỤ LỤC



Phụ lục 1 Sơ đồ quy trình tổng hợp nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà

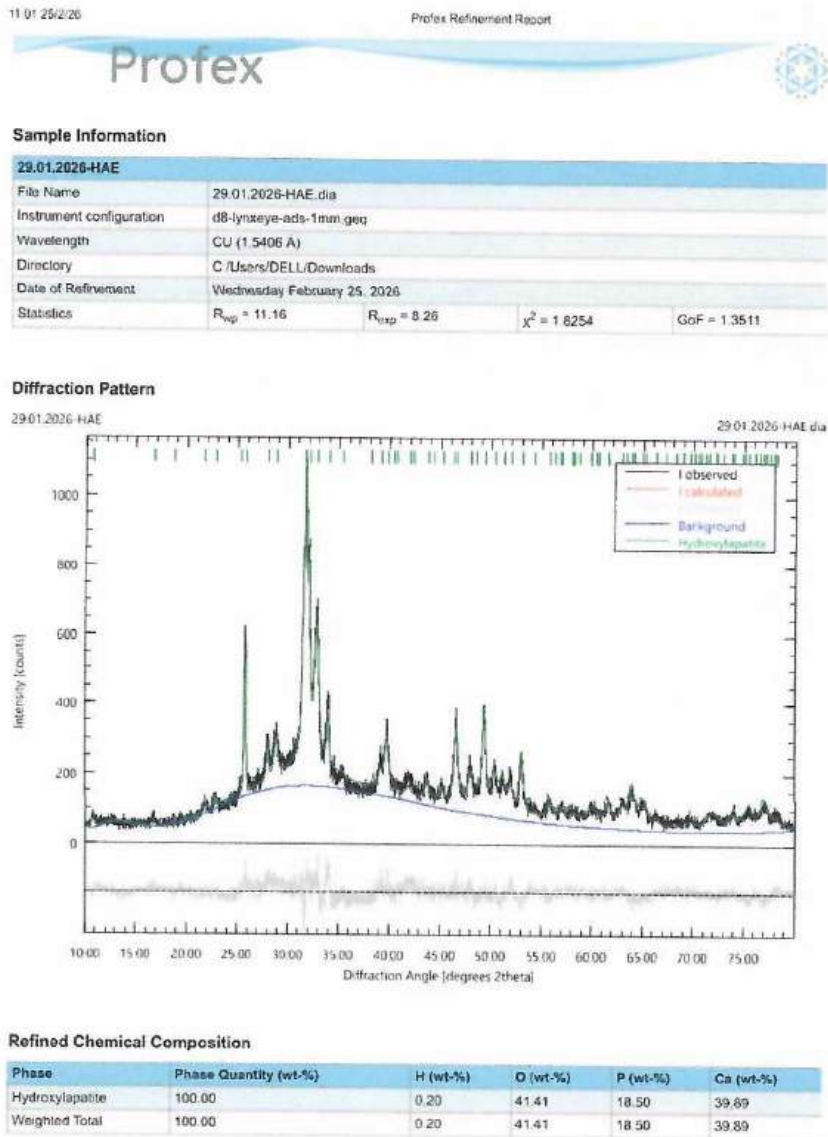


Phụ lục 2 Sơ đồ quy trình tổng hợp hydrogel gelatin biến tính axit tannic



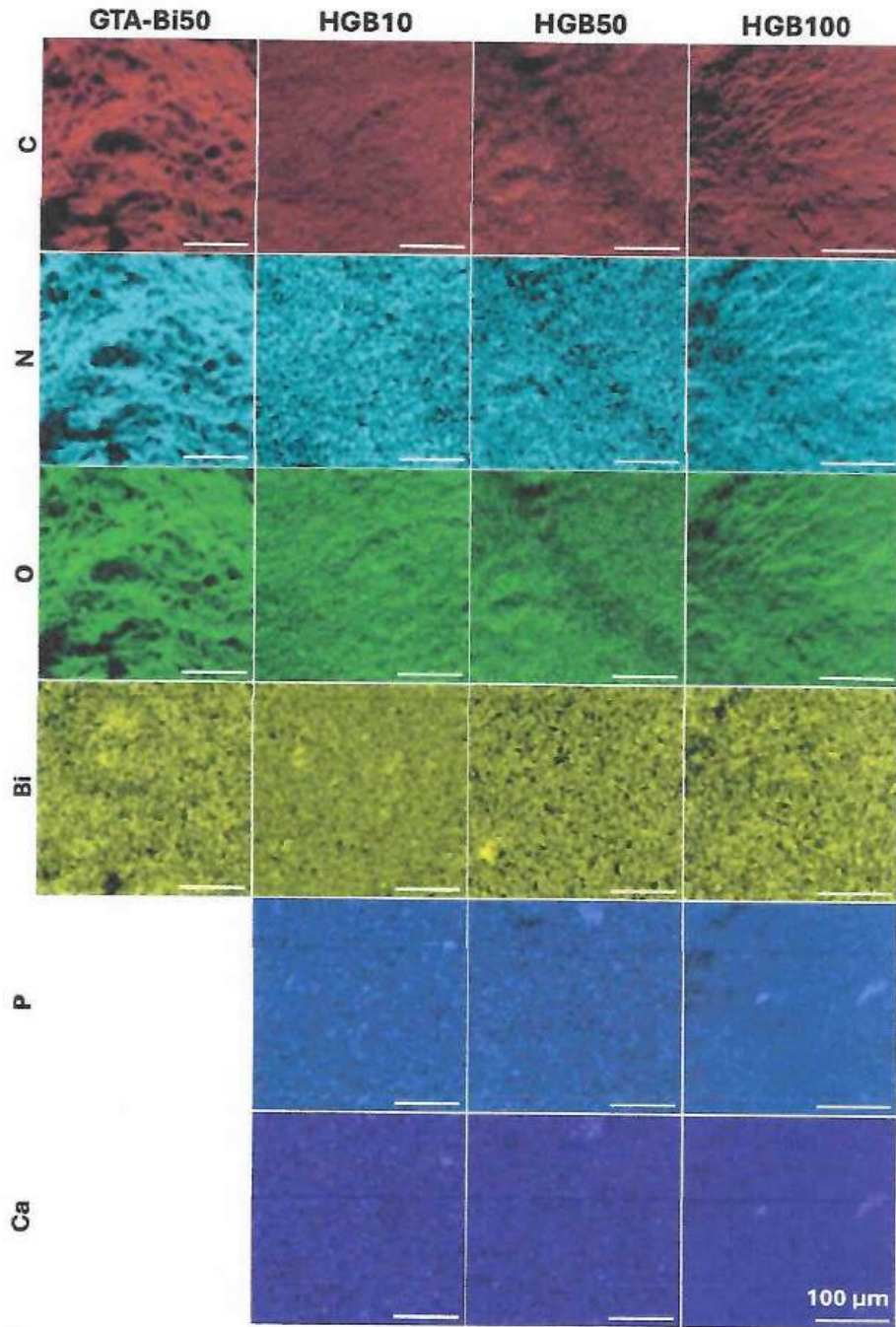
Phụ lục 3 Sơ đồ chế tạo vật liệu composit nHAE kết hợp hydrogel gelatin biến tính axit tannic bổ sung ion kim loại

Phụ lục 4 Kết quả phân tích Profex của nano hydroxyapatit từ vỏ trứng gà

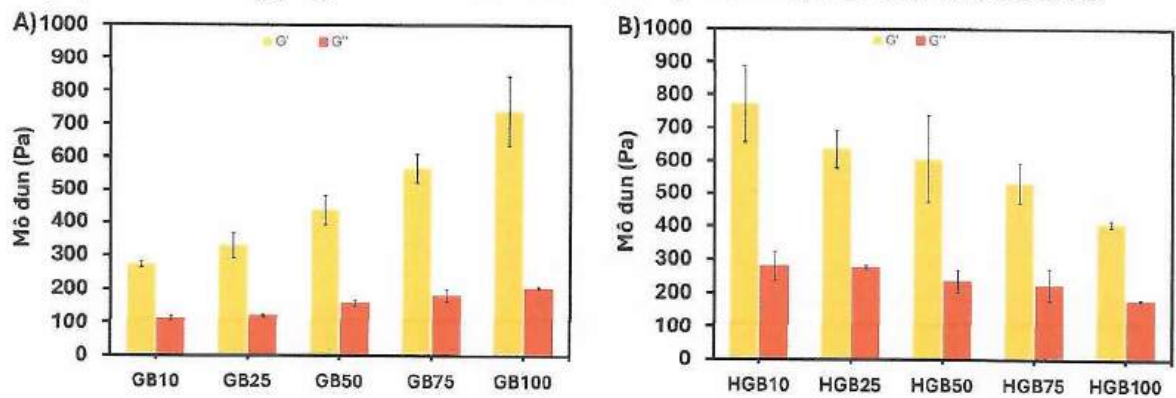


Phụ lục 5 Bảng khảo sát thời gian tạo gel và trạng thái gel của polyme gelatin biến tính axit tannic với một số ion kim loại

NĐM	10	25	50	75	100	Thông số
Ca²⁺	90 μmol	225 μmol	450 μmol	675 μmol	900 μmol	NĐI
	6,69 \pm 0,4	6,13 \pm 0,3	4,99 \pm 0,3	4,62 \pm 0,3	2,97 \pm 0,2	TGTG
	Gel lỏng, kéo sợi					TTG
Mg²⁺	39 μmol	97 μmol	195 μmol	292 μmol	390 μmol	NĐI
	30,73 \pm 1,3	12,26 \pm 0,7	8,94 \pm 0,9	5,46 \pm 0,8	3,53 \pm 0,4	TGTG
	Gel lỏng, kéo sợi					TTG
Sr²⁺	37 μmol	93 μmol	187 μmol	281 μmol	375 μmol	NĐI
	8,09 \pm 0,4	3,09 \pm 0,3	2,26 \pm 0,2	1,97 \pm 0,3	1,52 \pm 40,2	TGTG
	Gel lỏng, kéo sợi					TTG
Mn²⁺	59 μmol	147 μmol	295 μmol	443 μmol	591 μmol	NĐI
	5,65 \pm 0,2	3,77 \pm 0,4	1,48 \pm 0,23	1,03 \pm 0,1	1,01 \pm 0,2	TGTG
	Gel lỏng, kéo sợi					TTG
Co²⁺	34 μmol	85 μmol	171 μmol	257 μmol	343 μmol	NĐI
	0,24 \pm 0,03	0,21 \pm 0,03	0,11 \pm 0,02	< 0,08	< 0,08	TGTG
	Gel lỏng, kéo sợi			Gel bắt đầu tạo khối	Gel khối	TTG
Bi³⁺	20 μmol	51 μmol	103 μmol	154 μmol	200 μmol	NĐI
	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	TGTG
	Sợi dai, gel bắt đầu tạo khối	Gel khối, kéo sợi				TTG



Phụ lục 6 Ảnh mapping của các mẫu GTA-Bi50, HGB10, HGB50 và HGB100



Phụ lục 7 Đồ thị thể hiện mô đun lưu trữ (G') và mô đun thất thoát (G'') của: A) hydrogel GTA-Bi và B) nanocomposit hydrogel HGB