

Tổng hợp và thử hoạt tính sinh học của khuôn định dạng hydroxyapatit trên nền chitosan

Synthesis and Evaluation of the Biological Activity of Hydroxyapatite/Chitosan-based Scaffold

Trần Thanh Hoài, Nguyễn Kim Ngà*

Trường Đại Học Bách khoa Hà Nội – Số 1, Đại Cồ Việt, Hai Bà Trưng, Hà Nội

Đến tòa soạn: 17-3-2019; chấp nhận đăng: 20-01-2020

Tóm tắt

Trong nghiên cứu này, khuôn định dạng ứng dụng trong kỹ thuật mô xương được chế tạo từ vật liệu vô cơ hydroxyapatit trên nền chitosan. Sự kết hợp giữa hydroxyapatit và chitosan sẽ làm tăng khả năng tương thích sinh học của khuôn định dạng. Khuôn định dạng tổng hợp bằng phương pháp đổ dung môi rửa hạt. Hoạt tính sinh học được đánh giá thông qua các thí nghiệm in vitro trong dung dịch giả plasma (SBF). Kết quả nghiên cứu cho thấy khuôn định dạng HAp/chitosan có cấu trúc lỗ xốp và liên thông, với kích thước lỗ trung bình khoảng 200 μm và độ xốp khoảng 79 %, tạo ra lớp khoáng apatit sau 10 ngày ngâm trong dung dịch SBF. Tuy nhiên, khuôn định dạng chitosan sau 10 ngày ngâm không tạo ra lớp khoáng apatit. Kết quả cho thấy, khuôn định dạng HAp/chitosan có khả năng tương thích sinh học tốt hơn khuôn định dạng chitosan.

Từ khóa: khuôn định dạng, chitosan, apatit, SBF.

Abstract

In this study, porous scaffolds were fabricated using inorganic material-hydroxyapatite and chitosan for bone-tissue engineering. The combination of hydroxyapatite and chitosan may result in increasing biocompatibility of the scaffolds. The scaffolds were prepared by solvent casting and particulate leaching method. Bioactivity of the scaffolds was evaluated through in vitro experiments by soaking scaffold samples in simulated body fluid (SBF). The scaffolds obtained were highly porous and interconnected with a mean pore size of around 200 μm and porosity about 79 %. The apatite-mineral layer was produced on the HAp/chitosan after 10 days of soaking in SBF, however, it was not observed on the chitosan scaffold after 10 days soaking. The results revealed that the HAp/chitosan scaffold showed better bioactivity than the chitosan scaffold.

Keywords: scaffold, chitosan, apatite, SBF.

1. Mở đầu

Khuôn định dạng (scaffold) là khuôn tạm thời để tế bào bám dính, sinh trưởng, phát triển và hình thành khung ngoại bào trong quá trình hình thành cấu trúc mô mới ứng dụng trong cấy ghép điều trị các tổn thương về xương. Khuôn định dạng có thể được chế tạo từ các vật liệu polyme phân hủy sinh học, vật liệu vô cơ có hoạt tính sinh học hoặc composite. Vật liệu composite với sự liên kết của hydroxyapatit (HAp) và polyme, được xem là phương pháp hiệu quả để tăng cường hoạt tính sinh học và tính chất cơ học của khuôn định dạng. HAp có thành phần tương tự thành phần khoáng trong xương nên có tính tương thích sinh học cao. Hơn nữa, khi bị phân hủy, HAp giải phóng ra ion canxi và photpho có lợi cho việc hình thành và phát triển xương. Các nghiên cứu trước đây của chúng tôi đã công bố kết quả khuôn định dạng composite với sự có mặt của nano HAp làm tăng khả năng tương thích sinh học của khuôn định dạng với tế

bào [1]. Bên cạnh đó, việc lựa chọn polyme kết hợp với HAp cũng đóng vai trò quan trọng đến tính tương thích sinh học của khuôn định dạng.

Chitosan (Cs) là một polysaccharit mạch thẳng cấu tạo từ các D-glucosamine và N-acetyl-D-glucosamin có cấu trúc gần giống với cấu trúc của các protein bao xung quanh các mô và cơ quan nên có khả năng tương thích tốt với tế bào [2]. Hơn nữa, Chitosan đã được nghiên cứu ứng dụng nhiều trong lĩnh vực y sinh như: chất dẫn thuốc, là thành phần trong da nhân tạo... Các nghiên cứu cho thấy chitosan là một chất không độc hại, ít gây các phản ứng miễn dịch, có tính kháng khuẩn, có khả năng thúc đẩy quá trình chữa lành các mô mềm, mô cứng và có khả năng phân hủy sinh học [3]. Với những ưu điểm nêu trên, nghiên cứu này đã lựa chọn chitosan làm chất nền trong tổng hợp khuôn định dạng.

Khuôn định dạng dùng trong kỹ thuật mô nói chung cần có ba yêu cầu chính sau: phải có không gian xác định để các mô có thể tái sinh; phải có các tính chất phù hợp để đảm nhiệm chức năng của phần tổn thương trong quá trình mô mới tái tạo và cho

* Địa chỉ liên hệ: Tel.: (+84) 913.097.079

Email: nga.nguyenkim@hust.edu.vn

phép các mô phát triển dễ dàng trên khuôn cũng như các tế bào được cấy lên, các protein hay các tín hiệu kích thích tạo xương [4]. Cấu trúc 3D của khuôn định dạng phải có độ xốp cao, các lỗ xốp có độ liên thông cao. Các nghiên cứu cho thấy với kích thước lỗ tối thiểu là 100 μm là thích hợp cho tế bào di chuyển và quá trình trao đổi chất giữa tế bào với môi trường [5] [6]. Cấu trúc vi mô của khuôn định dạng là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của khuôn định dạng. Các đặc điểm cấu trúc của khuôn định dạng phụ thuộc vào phương pháp chế tạo.

Hiện nay, trên thế giới đã có một số nghiên cứu chế tạo khuôn định dạng HAp/CS với nhiều phương pháp khác nhau. Jayachandran Venkatesan và các cộng sự đã chế tạo khuôn định dạng HAp/CS bằng phương pháp đông lạnh. Kết quả tạo ra được mẫu khuôn định dạng có kích thước lỗ xốp khoảng 200 nm [7], độ xốp là 70%. Trong khi đó, Chia-Cherng Yu và các cộng sự đã dùng phương pháp electrospinning để chế tạo khuôn định dạng HAp/CS [8]. Phương pháp này có ưu điểm là tạo ra khuôn định dạng có độ xốp cao nhưng khó điều chỉnh kích thước lỗ cũng như hình dạng của khuôn định dạng. Trong nước, cũng có một số nghiên cứu chế tạo composite HAp/CS [9], nhưng các nghiên cứu này chỉ chế tạo vật liệu dạng 2D ứng dụng trong kỹ thuật y sinh còn dạng 3D thì chưa có nghiên cứu nào được công bố. Từ các tài liệu tổng hợp được có thể thấy các nghiên cứu chế tạo khuôn định dạng 3D HAp/CS đã sử dụng rất nhiều phương pháp khác nhau, mỗi phương pháp có những ưu nhược điểm riêng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng phương pháp đổ dung môi rửa hạt. Phương pháp đổ dung môi rửa hạt có ưu điểm đơn giản nhưng hiệu quả cao, dễ dàng tạo hình cho khuôn định dạng và dễ kiểm soát độ xốp, kích thước lỗ của khuôn định dạng bằng kích thước và số lượng hạt tạo lỗ. Phương pháp này đã được thực hiện thành công trong nghiên cứu chế tạo khuôn định dạng HAp/PDLLA đã công bố của chúng tôi [10]. Vì vậy, chúng tôi tiếp tục sử dụng phương pháp đổ dung môi rửa hạt với hạt tạo lỗ là NaCl để chế tạo khuôn định dạng 3D composite HAp/Chitosan.

2. Thực nghiệm

2.1. Hóa chất

Các hóa chất sử dụng là hóa chất Merck: CH_3COOH , NaCl , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaOH , NaHCO_3 , KCl , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 , $\text{CH}_2(\text{OH})_3\text{CNH}_2$, Chitosan. Bột nano HAp ($d_{ib} = 28 \text{ nm} \pm 5$, $l_{ib} = 120 \text{ nm} \pm 32$, tỉ lệ Ca/P = 1,66, tỷ lệ bề mặt = 4,29). Bột HAp được tổng hợp theo [11].

2.2. Chế tạo khuôn định dạng composite HAp/Chitosan

Khuôn định dạng được tổng hợp theo phương pháp đổ dung môi rửa hạt và đã được thực hiện trong nghiên cứu trước [10]. Phương pháp này được thực hiện bằng cách hòa tan 0,48g Cs trong lọ thủy tinh chứa 24 ml dung dịch CH_3COOH 3% trên máy khuấy từ, điều chỉnh tốc độ khuấy 450 vòng/phút, ở nhiệt độ phòng, trong 3 giờ. Cân 0,096 g HAp trong ống falcon dung tích 15 ml, thêm vào 1,5 ml nước deion và siêu âm trong 1 giờ. Sau khi dung dịch Cs khuấy trộn được 2-3 giờ, nhỏ từ từ huyền phù HAp vào dung dịch Cs, tiếp tục khuấy trộn hỗn hợp. Sau 2 giờ, hỗn hợp trên được trộn với 16 g NaCl (kích thước hạt muối 405- 450 μm), tiếp theo hỗn hợp Cs/HAp và muối được đổ ra đĩa thủy tinh kích thước 5,5 cm. Dùng que khuấy đảo trộn đều sao cho các hạt muối đều được bao phủ bởi lớp gel Cs. Hỗn hợp thu được, được để trong tủ hút trong một giờ, sau đó được sấy ở 60°C trong 36 giờ. Sau khi sấy, đĩa vật liệu được ngâm trong dung dịch NaOH 10% trong 30 phút, sau đó rửa lại nhiều lần bằng nước cất 2 lần. Sau đó, sản phẩm được đem sấy khô, cuối cùng thu được miếng vật liệu xốp HAp/Cs.

2.3. Phương pháp nghiên cứu hình thái học và đặc trưng của khuôn định dạng

Giải đồ XRD được đo trên máy Siemens D5005 sử dụng bức xạ $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0,15406 \text{ nm}$), góc quay từ $10-70^\circ$.

Phổ FT-IR được đo trên máy Impact-410, Nicolet-Hoa Kỳ theo phương pháp ép viên KBr.

Hình thái học của mẫu tổng hợp được xác định trên thiết bị hiển vi điện tử truyền qua SEM (S4800, Hitachi, Nhật Bản). Kích thước lỗ trên khuôn định dạng được đo bằng phần mềm ImageJ trên ảnh SEM.

Độ xốp của mẫu được đo theo phương pháp bão hòa chất lỏng [12]. Chất lỏng được sử dụng là nước cất. Mẫu được sấy khô đến khối lượng không đổi và cân được khối lượng W_i . Mẫu được ngâm vào trong ống nước có thể tích là V_1 . Nước sẽ được hút vào các lỗ xốp đến khi tất cả các lỗ bão hòa nước. Tổng thể tích của nước và nước bão hòa trong khuôn định dạng là V_2 . Khi đó thể tích đặc của khuôn định dạng HAp/CS là $(V_2 - V_1)$. Sau đó, khuôn định dạng bão hòa nước được nhấc ra khỏi ống nước và thể tích nước còn lại trong ống là V_3 . Thể tích tổng cộng của khuôn định dạng là $V = (V_2 - V_1) + (V_1 - V_3) = (V_2 - V_3)$. Khối lượng của khuôn định dạng trước và sau khi ngâm trong nước là W_i và W_f . Thể tích lỗ của khuôn định dạng là $(W_f - W_i) / \rho_{\text{H}_2\text{O}}$. Độ xốp của khuôn định dạng được tính theo công thức sau:

$$\text{Độ xốp} = \frac{(W_f - W_i) / \rho_{\text{H}_2\text{O}}}{V_2 - V_3}$$

Các kết quả được đo 5 lần và lấy giá trị trung bình. Sử dụng Anova để phân tích thống kê với giá trị $P < 0,05$ là giá trị có sự khác biệt giữa các mẫu.

2.4. Thử nghiệm khả năng tạo apatit của khuôn định dạng HAp/Chitosan

Dung dịch giả plasma người SBF được chuẩn bị theo tài liệu [13]. Các hóa chất được bổ sung lần lượt theo quy trình để đảm bảo dung dịch cuối cùng thu được không bị kết tủa và pH đạt 7,4. Các mẫu khuôn định dạng HAp/Cs được cắt nhỏ với đường kính 10 mm và ngâm trong 15 ml dung dịch SBF ở nhiệt độ 37°C. Sau 3, 6, và 10 ngày, mẫu được lấy ra tráng rửa nhiều lần bằng nước khử ion rồi được sấy khô ở nhiệt độ 40-45°C. Mẫu sau khi sấy khô được quan sát qua hiển vi điện tử quét (SEM) để xác định hình thái của lớp apatit tạo thành. Tỷ lệ Ca/P của lớp apatit hình thành trên bề mặt khuôn định dạng HAp/Cs được phân tích bằng thiết bị đo phổ tán xạ năng lượng tia X (EDX). Lượng Ca²⁺ bám trên bề mặt khuôn định dạng được đánh giá thông qua sự thay đổi nồng độ Ca²⁺ trong dung dịch SBF.

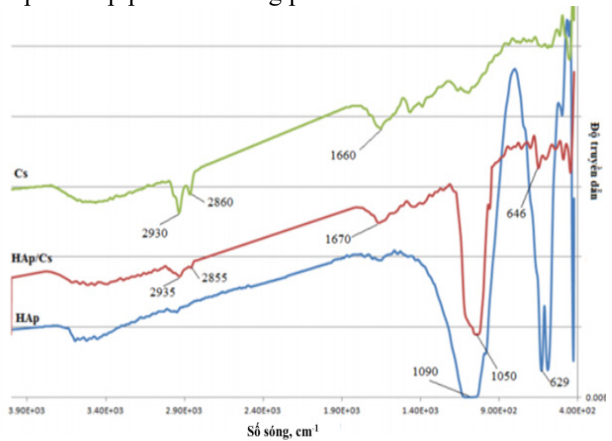
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả phân tích hình thái học và đặc trưng của khuôn định dạng

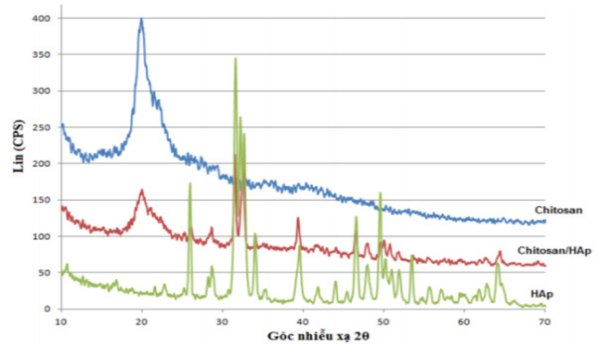
Sự tương tác giữa hai loại vật liệu chitosan và pha tinh thể HAp trong việc tổng hợp khuôn định dạng được đánh giá bằng phổ FT-IR (Hình 1) và giản đồ XRD (Hình 2) của các mẫu HAp, Cs và HAp/Cs. Trên phổ hồng ngoại của Cs có dải hấp thụ nằm trong vùng 3200÷3500cm⁻¹ đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm -OH liên hợp và nhóm NH₂. Hai đỉnh hấp thụ ở 2930cm⁻¹, 2860cm⁻¹ đặc trưng cho dao động hóa trị bất đối xứng và đối xứng của nhóm -CH₂, đỉnh hấp thụ ở 1660cm⁻¹ đặc trưng cho dao động biến dạng của nhóm amin bậc một -NH₂. Trên phổ hồng ngoại của HAp cũng có dải hấp thụ trong vùng 3400÷3600 cm⁻¹ đặc trưng cho nhóm -OH. Đặc biệt là hai đỉnh nổi bật 1090cm⁻¹ và 629cm⁻¹ thể hiện dao động hóa trị và dao động biến dạng của nhóm PO₄³⁻. Phổ hồng ngoại của Cs/HAp thể hiện đầy đủ các dải phổ, các đỉnh của các nhóm chức quan trọng trong cả hai chất nguyên liệu ban đầu (dải 3200÷3600cm⁻¹ của nhóm OH và NH₂, đỉnh 2935cm⁻¹ và 2855cm⁻¹ của nhóm -CH₂, đỉnh 1670cm⁻¹ của nhóm NH₂ (của pha CS), đỉnh 1050cm⁻¹ và 646cm⁻¹ của nhóm PO₄³⁻ của HAp [14].

Trên giản đồ XRD của mẫu Cs cho thấy chỉ xuất hiện một đỉnh duy nhất ở góc quay 2θ = 20°, đặc trưng cho pha vô định hình Cs. Trên giản đồ mẫu bột HAp thấy xuất hiện các đỉnh ở góc 2θ = 25.9°, 31.55°, 32.15°, 32.62°, và 39.4° đặc trưng cho tinh thể HAp [11]. Trên giản đồ XRD của khuôn định dạng HAp/Cs, ngoài đỉnh rộng xuất hiện ở góc 2θ = 20°, tương ứng với CS còn thấy các đỉnh ở góc 2θ = 25.99°, 31.62°, 32.62°, 32.68° và 39.43°, tương ứng với pha tinh thể HAp (các đỉnh này dịch về phía giá trị cao hơn so với mẫu bột HAp). Từ các kết quả

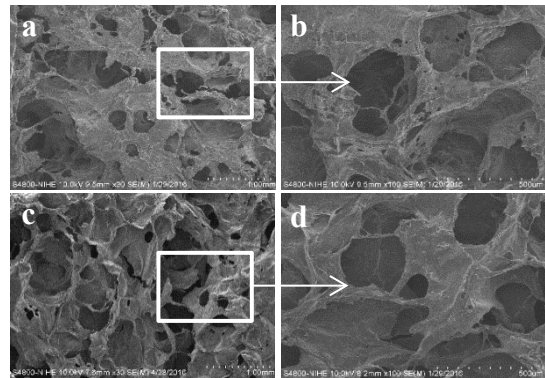
FTIR và XRD cho phép khẳng định giữa các pha Cs và HAp tồn tại các mối tương tác phân tử, giúp cho pha HAp phân tán trong pha Cs.



Hình 1. Phổ FT-IR của các mẫu HAp, (Cs), HAp/Cs



Hình 2. Giản đồ XRD các mẫu Cs, HAp/Cs, HAp



Hình 3. Ảnh SEM của mẫu khuôn định dạng được tạo thành: a, b – mẫu Cs, c,d-mẫu HAp/Cs

Kết quả phân tích giản đồ XRD cho phép khẳng định kết quả IR rằng sự tồn tại của pha tinh thể HAP trong khuôn định dạng composit HAp/Cs. Hơn nữa, hai loại vật liệu Cs và HAp khi hòa trộn không xảy ra phản ứng hóa học mà chỉ phân tán vào nhau và giữ nguyên các đặc tính lý hóa của mình.

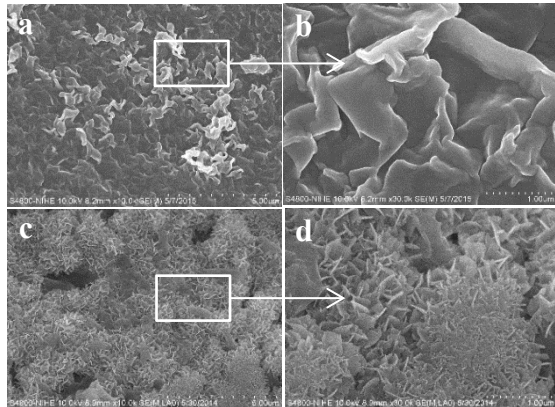
Hình thái học, cấu trúc lỗ xốp của các khuôn định dạng Cs và HAp/Cs tổng hợp được thể hiện trên hình 3. Các ảnh SEM cho thấy, cả khuôn

định dạng Cs và HAp/Cs tổng hợp ra có cấu trúc xốp, kích thước lỗ xốp lớn và khả năng liên thông của các lỗ xốp cao. Các kết quả đo đạc và tính toán bằng phần mềm ImageJ cho thấy, kích thước lỗ xốp của khuôn định dạng Cs đạt $209 \pm 60 \mu\text{m}$ (Hình 3: a và b), khuôn định dạng HAp/Cs đạt $196 \pm 30 \mu\text{m}$ (Hình 3: c và d). Đây là một điều kiện thuận lợi cho việc thực hiện trao đổi chất cũng như việc di chuyển của các tế bào vào vật liệu trong quá trình cấy ghép, bởi kích thước của tế bào nhân thực chỉ vào khoảng $10\div 100 \mu\text{m}$. Tuy nhiên, ở cả hai mẫu vật liệu, kích thước và hình dạng các lỗ xốp còn biến động nhiều. Chưa đạt được sự đồng đều như mong muốn.

Mặt khác, ở độ phóng đại lớn hơn cho thấy trên thành vách của các lỗ xốp lớn hình thành nên các lỗ xốp thứ cấp có kích thước nhỏ hơn, đạt mức $3,5 \pm 1,6 \mu\text{m}$. Có thể giải thích sự hình thành của các lỗ xốp thứ cấp này là nhờ vào sự bay hơi của dung môi trong quá trình sấy. Sự xuất hiện của các lỗ xốp thứ cấp này làm tăng diện tích bề mặt của khuôn định dạng, từ đó làm tăng khả năng trao đổi chất cũng như khả năng bám dính của tế bào và khoáng khi nuôi cấy, giúp cải thiện tính tương thích sinh học của vật liệu [15].

Bảng 1. Độ xốp của khuôn định dạng Cs và HAp/Cs

Mẫu khuôn định dạng	Độ xốp trung bình (%)
HAp/Cs	$78,96 \pm 3,18$
Cs	$84,32 \pm 3,93$



Hình 4. Ảnh SEM mẫu Cs (a, b) và HAp/Cs (c, d) sau 10 ngày ngâm trong dung dịch SBF

Kết quả đo thể hiện độ xốp của cả hai mẫu vật liệu đều tương đối cao. Cụ thể, khuôn định dạng Cs có độ xốp đạt $84,32 \pm 3,93$ (%), và khuôn định dạng HAp/Cs có độ xốp đạt $78,96 \pm 3,18$ (%). Nguyên nhân của việc độ xốp mẫu Cs cao hơn so với HAp/Cs là do vật liệu đơn pha chitosan có độ bền cơ học kém hơn, trong quá trình sấy dễ bị co kéo tại ra các lỗ xốp rộng hơn, đặc biệt là khả năng hình thành các lỗ xốp thứ cấp cao hơn. Khuôn định dạng

HAp/Cs được bổ sung pha phân tán HAp làm tăng độ bền cơ học, giảm độ biến dạng cơ học do tác nhân bên ngoài tác động đến vật liệu.

3.2. Kết quả thử nghiệm sự hình thành apatit của khuôn định dạng HAp/chitosan

Tính chất quan trọng của vật liệu sinh học là khả năng liên kết với tế bào sống thông qua lớp apatit giống với xương trên bề mặt vật liệu. Vì vậy, hoạt tính sinh học của vật liệu được đánh giá thông qua thí nghiệm ngâm vật liệu trong dung dịch SBF.

Quan sát ảnh SEM của các mẫu sau các khoảng thời gian ngâm trong dung dịch SBF cho thấy, đối với khuôn định dạng Cs không thấy xuất hiện apatit ở tất cả các mốc thời gian 3 ngày, 6 ngày và 10 ngày (Hình 4: a, b). Với khuôn định dạng Cs/HAp, ở mốc 3 ngày rất khó để tìm được các vùng phát triển của khoáng apatit, các điểm khoáng mọc nằm rất rải rác. Ở mốc 6 ngày, khoáng apatit đã phát triển lớn hơn, hình thành nên các đám lớn và bắt đầu liên kết lại với nhau. Ở mốc thời gian 10 ngày (Hình 4: c,d), dễ dàng tìm thấy khoáng apatit và kích thước của chúng cũng đạt lớn nhất. Điều này phản ánh đúng theo sự suy giảm nồng độ Ca^{2+} của dung dịch SBF trong quá trình nuôi cấy (Bảng 2)

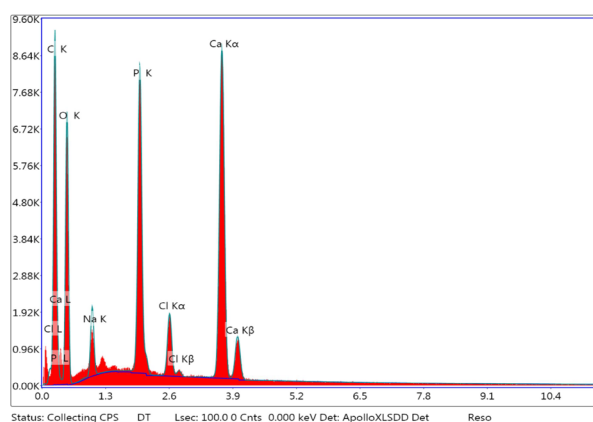
Bảng 2. Nồng độ Ca^{2+} trong dung dịch SBF sau khi ngâm

Mẫu	Nồng độ Ca^{2+} (mM)		
	3 ngày	6 ngày	10 ngày
Cs	$1,42 \pm 0,04$	$1,40 \pm 0,02$	$1,30 \pm 0,02$
HAp/Cs	$1,28 \pm 0,01$	$0,94 \pm 0,01$	$0,92 \pm 0,09$

Ở các độ phóng đại cao hơn, hình dạng của apatit cũng được thể hiện rõ ràng với các cánh xếp lại với nhau thành từng bông, đồng thời các bông này có cấu trúc xốp giống các đám san hô, đây cũng chính là cấu trúc thành phần khoáng trong xương tự nhiên. Kết quả đo và tính toán bằng phần mềm ImageJ cho thấy kích thước của các bông apatit là $1,8 \pm 0,4 \mu\text{m}$. Kích thước các cánh apatite đạt $190 \pm 31 \text{nm}$. Từ việc phân tích ảnh SEM, có thể thấy được vật liệu đơn pha chitosan không có khả năng hình thành các khoáng apatit. Ngược lại, vật liệu HAp/Cs thể hiện khả năng dẫn mọc các khoáng apatit. Có thể giải thích điều này thông qua cơ chế kết tủa tạo apatit. Thông thường, để cho một hợp chất kết tủa, thì tích nồng độ các ion chất đó trong dung dịch phải lớn hơn tích số tan của hợp chất đó. Trong trường hợp này, tích số tan của HAp là $2,12 \cdot 10^{-118}$, tích số tan này nhỏ hơn tích số ion của Ca^{2+} và PO_4^{3-} có trong dung dịch. Tuy nhiên, trong trạng thái bình thường, do HAp có cấu trúc rất phức tạp nên các ion không thể tự tổ chức sắp xếp lại để tạo thành tinh thể HAp mới được. Nhưng dưới khả năng dẫn tạo khoáng rất tốt của HAp trong composit HAp/Cs, các khoáng

mới có thể hình thành. Trong dung dịch SBF tồn tại các ion có khả năng kết tủa tạo ra không chỉ HAP $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ mà còn có thể tạo ra các loại khoáng khác. Để xác định được thành phần nguyên tố có trong các khoáng apatit phát triển trên nền vật liệu trong quá trình nuôi cấy và xác định xem khoáng này có đúng là hydroxyapatit hay không, mẫu vật liệu HAp/Cs sau khi nuôi cấy 10 ngày được phân tích EDX.

Kết quả phân tích EDX cho thấy, trong mẫu vật liệu chứa đầy đủ các thành phần nguyên tố chủ yếu là Ca, O, P. Sự xuất hiện của thành phần nguyên tố Na, Cl là do quá trình rửa vật liệu còn tồn đọng. Thành phần C là do có trong Cs. Mặt khác, tỷ lệ $\text{Ca/P} = 1,52$. Tỷ lệ này rất gần với tỷ lệ $\text{Ca/P} = 1,6$ chứng tỏ các khoáng mọc trên nền vật liệu ở đây là hydroxyapatit.



Hình 5. Giản đồ thành phần nguyên tố EDX mẫu HAp/Cs sau 10 ngày ngâm trong dung dịch SBF

4. Kết luận

Khuôn định dạng HAp/Cs đã được tổng hợp thành công bằng phương pháp đổ dung môi rửa hạt. Khuôn định dạng tổng hợp bằng phương pháp này có độ xốp 83%, sự liên thông giữa các lỗ cao và kích thước lỗ phù hợp cho sự phát triển của tế bào (khoảng 200 μm). Kết quả thử hoạt tính cho thấy mẫu khuôn định dạng HAp/Cs có hoạt tính sinh học tốt hơn khuôn định dạng Cs. Do mẫu HAp/Cs có hình thành lớp khoáng apatit khi ngâm trong dung dịch giả plasma người. Trong khi đó mẫu khuôn định dạng Cs không có sự hình thành lớp khoáng này.

Lời cảm ơn

Các tác giả cảm ơn Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu trên đây thông qua Đề tài 104.03-2015.25.

Tài liệu tham khảo

[1] T.T. Hoai, N.K. Nga, L.T. Giang, T.Q. Huy, P.N.M. Tuan, B.T.T. Bình Hydrothermal Synthesis of Hydroxyapatite Nanorods for Rapid Formation of

Bone-Like Mineralization. *Journal of Electronic Materials*. 46(8) (2017) 5064-5072.

[2] Rinaudo, M., Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*. 31(2006) 603-632.

[3] Kumar, M.R., et al., Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical reviews*. 104 (2004) 6017-6084.

[4] Karp, J.M., M.S. Shoichet, and J.E. Davies, Bone formation on two-dimensional poly (DL-lactide-co-glycolide)(PLGA) films and three-dimensional PLGA tissue engineering scaffolds in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 64 (2003) 388-396.

[5] Mano, J. and R. Reis, Osteochondral defects: present situation and tissue engineering approaches. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 1 (2007) 261-273.

[6] Mikos, A.G. and J.S. Temenoff, Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3(2)2000 23-24.

[7] Venkatesan, J., et al., Preparation and characterization of carbon nanotube-grafted-chitosan-natural hydroxyapatite composite for bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*. 83(2) (2011) 569-577.

[8] Yu, C.-C., et al., Electrospun scaffolds composing of alginate, chitosan, collagen and hydroxyapatite for applying in bone tissue engineering. *Materials Letters*. 93 (2013) 133-136.

[9] Vương, B.X., Tổng hợp và đặc trưng vật liệu composite hydroxyapatite/chitosan ứng dụng trong kỹ thuật y sinh. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*. Tập 34(Số 1) (2018) 9-15.

[10] Nga, N.K., T.T. Hoai, and P.H. Viet, Biomimetic scaffolds based on hydroxyapatite nanorod/poly (D, L) lactic acid with their corresponding apatite-forming capability and biocompatibility for bone-tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 128 (2015) 506-514.

[11] Nga, N.K., et al., Surfactant-assisted size control of hydroxyapatite nanorods for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 116 (2014) 666-673.

[12] Kothapalli, C.R., M.T. Shaw, and M. Wei, Biodegradable HA-PLA 3-D porous scaffolds: effect of nano-sized filler content on scaffold properties. *Acta biomaterialia*. 1(6) (2005) 653-662.

[13] Kokubo, T. and H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, (2006) 2907-2915.

[14] Koutsopoulos, S., Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals. *Journal of Biomedical Materials Research*. 62(4)(2002) 600-612.

[15] Hoai, T.T. and N.K. Nga, Effect of pore architecture on osteoblast adhesion and proliferation on hydroxyapatite/poly (D, L) lactic acid-based bone scaffolds. *Journal of the Iranian Chemical Society* 15 (2018) 1663-1671.