



Original Article

Synthesis and Investigation into Apatite-forming Ability of Hydroxyapatite/Chitosan-based Scaffold

Tran Thanh Hoai, Nguyen Kim Nga*

*School of Chemical Engineering, Hanoi University of Science and Technology,
1 Dai Co Viet, Hanoi, Viet Nam*

Received 10 May 2019

Revised 02 June 2019; Accepted 18 June 2019

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.

* Corresponding author.

Email address: nga.nguyenkim@hust.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4896>



Tổng hợp và nghiên cứu khả năng tạo apatit của khuôn định dạng hydroxyapatit trên nền chitosan

Trần Thanh Hoài, Nguyễn Kim Ngà*

Viện Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội, 1 Đại Cồ Việt, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 10 tháng 5 năm 2019

Chỉnh sửa ngày 02 tháng 6 năm 2019; Chấp nhận đăng ngày 18 tháng 6 năm 2019

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 độ xốp 83 %, kích thước lỗ trung bình khoảng 200 μm , 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 (Cs), Apatit, 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 [1]. 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 [2]. 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.

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: nga.nguyenkim@hust.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4896>

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 khuôn ngoại bào nên có khả năng tương thích tốt với tế bào [3, 4]. 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, không 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 [5]. 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 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 [6]. 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 [7, 8]. 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 vật liệu composit HAp/CS theo các phương pháp khác nhau và thử tính tương thích sinh học với tế bào động vật. Thein-Han và các cộng sự đã chế tạo khuôn định dạng trên cơ sở composit HAp/CS bằng phương pháp đông khô. Kết quả tạo ra được mẫu khuôn định dạng có cấu trúc xốp, với kích thước lỗ xốp trong khoảng 50- 120 μm [9], có khả năng bám dính và phát triển tế bào cao hơn nhiều so với vật liệu CS (điều chế trong cùng điều kiện). Trong khi đó, Yanzhong Zhang và các cộng sự đã dùng phương pháp electrospining để chế tạo khuôn định dạng HAp/Cs dạng sợi [10]. 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. Kết quả thử nghiệm sinh học với tế bào cho thấy composit HAp/CS dạng sợi có khả năng hình thành xương tốt hơn nhiều so với vật liệu CS. Trong nước, cũng có một số nghiên cứu chế tạo composit HAp/Cs [11], 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, nhiều phương pháp khác nhau đã được nghiên cứu để chế tạo khuôn định dạng 3D HAp/Cs, 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, do 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 [12]. Trong công trình này, chúng tôi đã 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. Tính tương thích sinh học của vật liệu HAp/CS tổng hợp được đánh giá thông qua các thí nghiệm in-vitro với dung dịch mô phỏng dịch cơ thể người (SBF).

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 ($d_{\text{tb}} = 28 \text{ nm} \pm 5$, $l_{\text{tb}} = 120 \text{ nm} \pm 32$, tỉ lệ Ca/P = 1,66, tỷ lệ bề mặt = 4,29). Bột HAp được tổng hợp theo [13].

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 các nghiên cứu trước [12]. Phương pháp này được thực hiện bằng cách hòa tan 0,48 g 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 $^\circ\text{C}$ 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. Thí nghiệm tổng hợp khuôn định dạng HAp/Cs được thực hiện tại phòng thí nghiệm Hóa Vô cơ, trường Đại học Bách Khoa Hà Nội.

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

Giản đồ XRD được đo trên máy Siemens D5005 sử dụng bức xạ CuK_α ($\lambda = 0,15406$ nm), góc quay từ 10 - 70 $^\circ$, tại Trung tâm Khoa học Vật liệu, trường Đại Học Khoa học Tự nhiên.

Phổ FT-IR được đo trên máy Impact-410, Nicolet-Hoa Kỳ theo phương pháp ép viên KBr. Thí nghiệm phân tích mẫu được thực hiện tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hình thái học của mẫu tổng hợp được xác định trên thiết bị hiển vi điện tử truyền qua SEM (S4800, Hitachi, Nhật Bản), tại viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương. 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 [14] và được thực hiện tại

phòng thí nghiệm Hóa Vô cơ, trường Đại học Bách Khoa Hà Nội. 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 $(W_f - W_i)/\rho_{H_2O}$. Độ xốp của khuôn định dạng được tính theo công thức sau:

$$\text{Độ xốp} = \frac{(W_f - W_i)/\rho_{H_2O}}{V_2 - V_3}$$

Các kết quả được đo nhiều lần và lấy giá trị trung bình. Sử dụng Anova để phân tích thông 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 [15]. Các hóa chất được bổ sung lần lượt theo protocol 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 $^\circ\text{C}$. 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 $^\circ\text{C}$. 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 Ca^{2+} bám trên bề mặt khuôn định dạng được đánh giá thông qua sự thay đổi nồng độ Ca^{2+} trong dung dịch SBF.

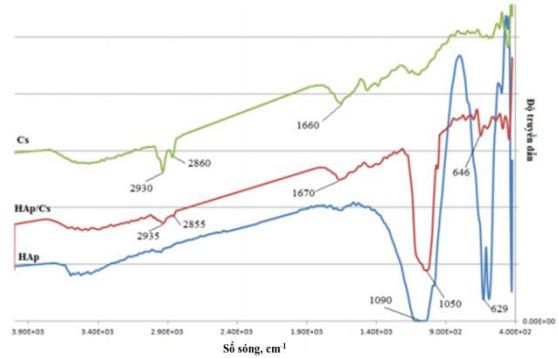
3. Kết quả và thảo luận

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

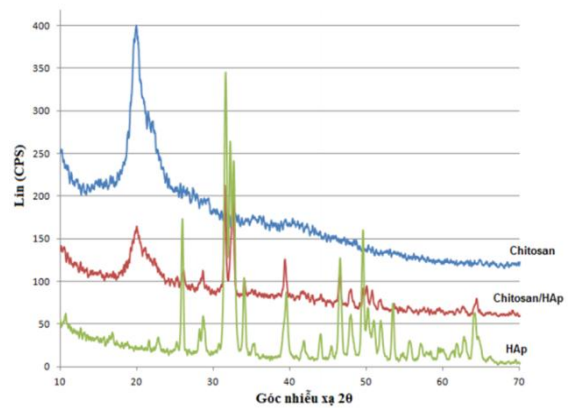
Sự tương tác giữa hai loại vật liệu chitosan và pha tinh thể HAP trong việc tổng hợp khuôn định dạng được đánh giá qua phổ FT-IR (Hình 1) và giản đồ XRD (Hình 2) của các mẫu HAP, Cs và HAP/Cs. Trên phổ hồng ngoại của Cs có dải hấp thụ nằm trong vùng $3200 \div 3500 \text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm -OH liên hợp và nhóm NH_2 . Hai đỉnh hấp thụ ở $2930, 2860 \text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động hóa trị bất đối xứng và đối xứng của nhóm -CH_2 , đỉnh hấp thụ ở 1660 cm^{-1} đặc trưng cho dao động biến dạng của nhóm amin bậc một -NH_2 . Trên phổ hồng ngoại của HAP cũng có dải hấp thụ trong vùng $3400 \div 3600 \text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho nhóm -OH . Đặc biệt là hai đỉnh nổi bật 1090 cm^{-1} và 629 cm^{-1} thể hiện dao động hóa trị và dao động biến dạng của nhóm PO_4^{3-} . 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 $3200 \div 3600 \text{ cm}^{-1}$ của nhóm OH và NH_2 , đỉnh 2935 cm^{-1} và 2855 cm^{-1} của nhóm -CH_2 , đỉnh 1670 cm^{-1} của nhóm NH_2 , đỉnh 1050 cm^{-1} và 646 cm^{-1} của nhóm PO_4^{3-} của HAP.

Trên giản đồ XRD của các mẫu Cs cho thấy chỉ có một pic duy nhất ở góc quay $2\theta = 20^\circ$. Giản đồ mẫu bột HAP thấy xuất hiện nhiều pic đặc trưng do tồn tại ở dạng tinh thể hình que. Trong đó, đặc trưng nhất là pic ở vị trí góc quay $2\theta = 31,5^\circ$ đạt giá trị cực đại. Mặt khác, do HAP tồn tại ở dạng tinh thể hình que nên giản đồ XRD của nó còn rất nhiều các pic ở các góc 2θ khác nhau. Tương tự như phổ FTIR, từ giản đồ XRD của khuôn định dạng HAP/Cs có thể dễ dàng thấy được sự pha trộn giản đồ của chitosan và HAP. Cụ thể, pic đặc trưng của Cs ở góc quay $2\theta = 20^\circ$ vẫn xuất hiện. Các pic đặc trưng của

HAP tại các góc quay $2\theta = 31,5^\circ; 40^\circ; 50^\circ$ vẫn được thể hiện trên giản đồ XRS của HAP/Cs.

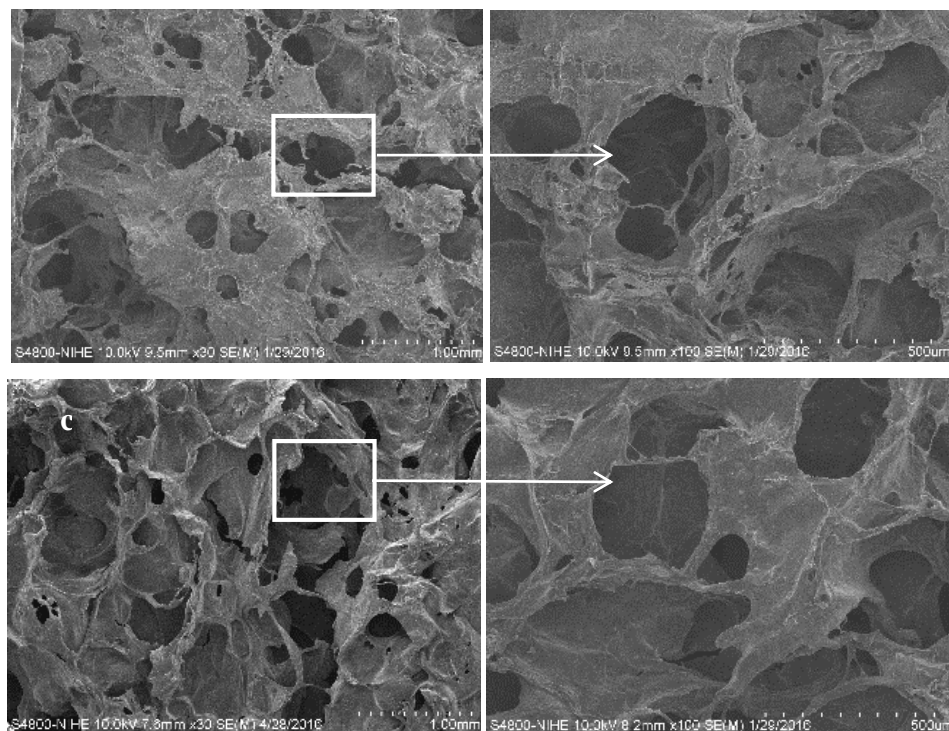


Hình 1. Phổ FT-IR của các mẫu HAP, (Cs), HAP/Cs.



Hình 2. Giản đồ XRD các mẫu Cs, HAP/Cs, Hap.

Điểm khác biệt duy nhất là cường độ các đỉnh đặc trưng của cả Cs và HAP đều bị giảm đi, nguyên nhân là do khi trộn vào nhau, sẽ xuất hiện sự che chắn của Cs đối với HAP và ngược lại, từ đó làm giảm cường độ tán xạ của chúng đối với tia tới. 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 compozit 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 3. Ảnh SEM của mẫu khuôn định dạng được tạo thành: a, b – mẫu Cs, c,d-mẫu HAp/Cs.

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 $3,5 \pm 1,6 \mu\text{m}$ đâm xuyên qua màng. 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 [16].

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

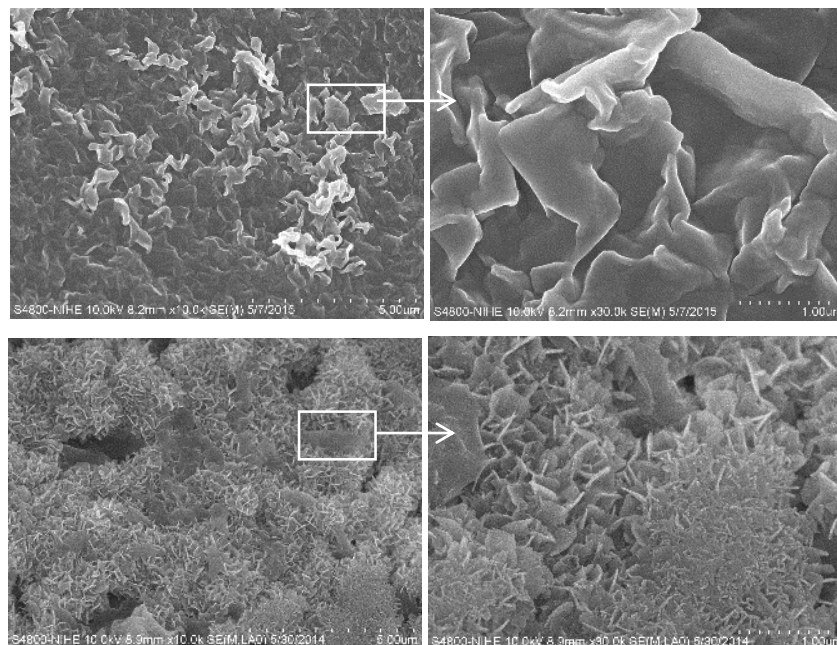
| Mẫu khuôn định dạng | Độ xốp trung bình |
|---------------------|-------------------|
| HAp/Cs | $78,96 \pm 3,18$ |
| Cs | $84,32 \pm 3,93$ |

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 thiên 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

Ảnh SEM chụp ở các thời gian khác nhau 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).



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

Trên 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). Trong dung dịch SBF ngâm với mẫu khuôn định dạng Cs, nồng độ Ca^{2+} có sự giảm nhẹ có thể là do sự hấp phụ CO_2 từ không khí dẫn đến sự kết tủa muối $CaCO_3$.

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 $1,8 \pm 0,4 \mu m$. Kích thước các cánh apatite đạt $190 \pm 31 nm$.

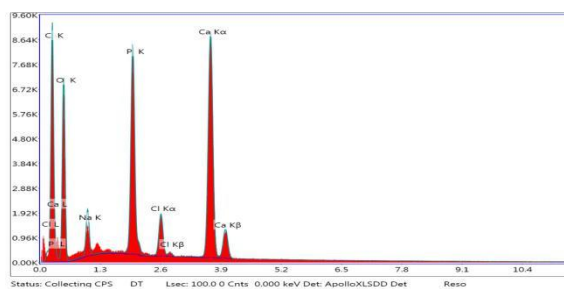
Từ việc phân tích ảnh SEM, có thể thấy được vật liệu đơn pha chitosan không thể hiện hoạt tính trong thí nghiệm này. Ngược lại, vật liệu HAp/Cs thể hiện hoạt tính tốt khi có khả năng dẫn mọc các khoáng apatit. Có thể giải thích điều này thông qua cơ chế kết tủa tạo apatit. Thông thường, để cho một hợp 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 $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ 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.

Bảng 0. Thành phần các nguyên tố trong lớp apatit trên mẫu HAp/Cs sau 10 ngày ngâm trong SBF

| Thành phần các nguyên tố, At% | | | | | | Tỷ lệ Ca/P |
|-------------------------------|-------|------|------|------|------|------------|
| C | O | Na | P | Cl | Ca | |
| 56,46 | 33,62 | 1,85 | 2,96 | 0,62 | 4,49 | 1,52 |

Kết quả phân tích EDX (Bảng 3) 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 Ca/P = 1,52. Tỷ lệ này rất gần với tỷ lệ 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 đồ 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 μ m). Kết quả thử hoạt tính cho thấy mẫu khuôn định dạng HAp/Cs có khả năng tương thích 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] M.P. Bostrom, D.A. Seigerman, The clinical use of allografts, demineralized bone matrices, synthetic bone graft substitutes and osteoinductive growth factors: a survey study, *Hss. Journal* 1 (2005) 9-18. <https://doi.org/10.1007/s11420-005-0111-5>.
- [2] T.T. Hoai, N.K. Nga, L.T. Giang, T.Q. Huy, P.N.M. Tuan, B.T.T. Binh, Hydrothermal Synthesis of Hydroxyapatite Nanorods for Rapid Formation of Bone-Like Mineralization, *J. Electron. Mater.* 46 (2017) 5064-5072. <https://doi.org/10.1007/s11664-017-5509-6>.
- [3] M. Rinaudo, Chitin and chitosan: properties and applications, *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006) 603-632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>.
- [4] N.K. Nga, H.D. Chinh, P.T.T. Hong, T.Q. Huy, Facile chitosan films for high performance removal of reactive blue 19 dye from aqueous solution, *J. Polym. Environ.* 25 (2007) 146-155. <https://doi.org/10.1007/s10924-016-0792-5>.
- [5] M.N.V. Ravi Kumar, R.A.A. Muzzarelli, H. Sashiwa, A.J. Domb, Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives, *Chem. Rev.* 104 (2004) 6017-6084. <https://doi.org/10.1021/cr030441b>.
- [6] J.M. Karp, M.S. Shoichet, J.E. Davies, Bone formation on two-dimensional poly (DL-lactide-co-glycolide)(PLGA) films and three-dimensional PLGA tissue engineering scaffolds

- in vitro, *J. Biomed. Mater. Res. A* 64 (2003) 388-396. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10420>.
- [7] J.F. Mano, R.L. Reis, Osteochondral defects: present situation and tissue engineering approaches, *J. Tissue. Eng. Regen. Med.* 1 (2007) 261-273. <https://doi.org/10.1002/term.37>.
- [8] A.G. Mikos, J.S. Temenoff, Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering, *Electron. J. Biotechn.* 3 (2000) 23-24. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34582000002000003>.
- [9] W.W. Thein-Han, R.D.K Misra, Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Acta Biomater.* 5 (2009) 1182-1197. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.11.025>.
- [10] Y. Zhang, J.R. Venugopal, A.E. Turki, S. Ramakrishna, B. Su, C.T. Lim, Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering, *Biomaterials* 29 (2008) 4314-4322. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.07.038>.
- [11] B.X. Vương, 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 (2018) 9-15. <https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4689>.
- [12] N.K. Nga, T.T. Hoai, 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 Surf. B Biointerf.* 128 (2015) 506-514. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.001>.
- [13] N.K. Nga, L.T. Giang, T.Q. Huy, C. Migliaresi, Surfactant-assisted size control of hydroxyapatite nanorods for bone tissue engineering, *Colloids Surf. B: Biointerf.* 116 (2014) 666-673. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.11.001>.
- [14] C.R. Kothapalli, M.T. Shaw, M. Wei, Biodegradable HA-PLA 3-D porous scaffolds: effect of nano-sized filler content on scaffold properties, *Acta Biomater.* 1 (2005) 653-662. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2005.06.005>.
- [15] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials* 27 (2006) 2907-2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
- [16] T.T. Hoai, N.K. Nga, Effect of pore architecture on osteoblast adhesion and proliferation on hydroxyapatite/poly (D, L) lactic acid-based bone scaffolds, *J. Iran. Chem. Soc.* 15 (2018) 1663-1671. <https://doi.org/10.1007/s13738-018-1365-4>.