

ỨNG DỤNG HYDROGEL COMPOSITE BIPHASIC CALCIUM PHOSPHATE/GELATIN/OXIDIZED ALGINATE TRONG LĨNH VỰC TÁI TẠO XƯƠNG

Nguyễn Thị Phương*

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: nphuongvc0201@gmail.com

Ngày nhận bài: 26/6/2017; Ngày chấp nhận đăng: 07/3/2018

TÓM TẮT

Nghiên cứu thử nghiệm cấy ghép vật liệu hydrogel composite sinh học trên cơ sở biphasic calcium phosphate (BCP)-oxidized alginate, gelatin được tiến hành trên thỏ. Đánh giá sự phát triển của xương sau khi cấy ghép vật liệu composite vào xương đùi thỏ dựa trên kết quả phân tích phương pháp vi mô chụp cắt lớp về tỷ lệ thể tích xương/thể tích mô, diện tích xương bề mặt/thể tích xương và kết quả phân tích mô học. Nhuộm mô học bằng kỹ thuật nhuộm thường quy H&E để khảo sát cấu trúc mô xương đánh giá sự phát triển của tế bào trên khối xương ghép vật liệu cho thấy sau 4 tháng và 6 tháng trên tất cả các mẫu xương mới hình thành, tế bào xương và tế bào mạch máu phát triển.

Từ khóa: Biphasic calcium phosphate, phương pháp vi mô chụp cắt lớp, H&E, oxidized alginate, gelatin.

1. GIỚI THIỆU

Vật liệu y sinh đã và đang được quan tâm nghiên cứu để đáp ứng nhu cầu thay thế các bộ phận cơ thể, cấy ghép mô, xương của con người, hứa hẹn cho việc chữa trị và tái tạo các mô và cơ quan bị mất hoặc bị tổn thương do chấn thương, bệnh tật hoặc lão hóa.

Trong lĩnh vực vật liệu dùng cho xương, nhiều loại vật liệu dùng trong cấy ghép và thay thế xương đã phát triển đáng kể trong những thập kỷ qua như kim loại và hợp kim (titan, hợp kim của titan, thép không gỉ...). Những vật liệu này tuy tương hợp sinh học nhưng tính chất cơ lý của kim loại, hợp kim khác biệt nhiều so với xương dẫn đến nguy cơ gãy xương do kém tương thích giữa phần xương tiếp xúc với kim loại ghép.

Vì vậy, các nhà khoa học trên thế giới hiện nay quan tâm đến vật liệu trên cơ sở calcium phosphate như hydroxyapatite (HAp) và biphasic calcium phosphate (BCP). HAp và BCP có tính tương hợp sinh học, hoạt tính sinh học cao, và khả năng chữa lành xương do thành phần tương tự thành phần khoáng trong xương. Mặt khác, HAp và BCP có thể từ từ hòa tan trong cơ thể giải phóng ion calcium và phosphate có lợi trong việc hình thành và phát triển xương. Tuy nhiên HAp và BCP ở dạng bột nên khó tạo hình có thành phần, cấu trúc xốp tương tự như xương [1-3].

Các công trình nghiên cứu vật liệu hydrogel composite có khả năng tái tạo xương trên cơ sở calcium phosphate và polymer tự nhiên như gelatin, chitosan, hyaluronic acid, collagen tuy nhiên thời gian phân hủy của các vật liệu này ngắn, chưa phù hợp với thời gian phát triển của xương. Trên cơ sở kết quả kinh nghiệm tại Bệnh viện Đại học Soonchunhyang - Hàn Quốc, vật liệu hydrogel composite sinh học trên cơ sở calcium phosphate, alginate và gelatin

có khả năng kích thích phát triển tế bào xương rất tốt đồng thời thời gian phân hủy của vật liệu phù hợp với thời gian xương phát triển [4]. Vật liệu hydrogel composite sinh học trên cơ sở BCP và oxidized alginate, gelatin, vật liệu tiềm năng đầy hứa hẹn trong lĩnh vực tái tạo xương. Cấu trúc xốp 3D của hydrogel tạo điều kiện cho tế bào phát triển bên trong vật liệu giúp xương phát triển bên trong vật liệu. Vật liệu trên tương tự các thành phần của xương. Gelatin có nguồn gốc từ collagen, gelatin rất tương hợp sinh học nên ứng dụng nhiều trong y học. Alginate là một polysaccharide phân hủy sinh học, tương thích với extracellular matrix của tế bào. BCP tương hợp sinh học, BCP dần dần hòa tan và giải phóng các ion Ca^{2+} và PO_4^{3-} , có lợi để hình thành xương. Hydrogel composite này tạo môi trường phỏng theo môi trường sinh học của xương với sự tương hợp sinh học cao, khi hydrogel composite phân hủy sinh học sẽ thúc đẩy quá trình tái tạo mô xương, xương mới hình thành thay thế dần hydrogel composite được cấy ghép.

Vật liệu hydrogel composite sinh học trên cơ sở calcium phosphate, oxidized alginate, gelatin tương hợp sinh học, tế bào xương MG-63 phát triển tốt trên vật liệu và điều thú vị của vật liệu này là thời gian phân hủy sinh học dài thích hợp làm vật liệu cho xương. Trên cơ sở những kết quả đã đạt được, kinh nghiệm về tổng hợp nano calcium phosphate, hydrogel composite [4, 5] và những đánh giá ưu khuyết điểm của những vật liệu composite y sinh của các nhóm nghiên cứu như đề cập trên nên việc hoàn thiện quy trình tổng hợp hydrogel composite sinh học trên cơ sở biphasic calcium phosphate-oxidized alginate, gelatin ứng dụng làm vật liệu thay thế tạm thời và hỗ trợ quá trình tái tạo xương rất cần thiết.

Trên cơ sở đó, việc nghiên cứu thử nghiệm cấy ghép vật liệu hydrogel composite sinh học trên cơ sở biphasic calcium phosphate (BCP)-oxidized alginate, gelatin trên thỏ được tiến hành. Đánh giá sự phát triển của xương sau khi cấy ghép vật liệu composite vào xương đùi thỏ dựa trên kết quả phân tích phương pháp vi mô chụp cắt lớp về tỷ lệ thể tích xương/thể tích mô, diện tích xương bề mặt/thể tích xương và kết quả phân tích mô học. Nhuộm mô học bằng kỹ thuật nhuộm thường quy H&E để khảo sát cấu trúc mô xương, hình thái, các thành phần khác trong mô xương, đánh giá sự phát triển của tế bào trên khối xương ghép vật liệu cho thấy sau 4 tháng và 6 tháng trên tất cả các mẫu xương mới hình, tế bào xương và tế bào mạch máu phát triển.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Phẫu thuật

Quy trình phẫu thuật

Chích thuốc mê.

Cố định thỏ, chọn vùng phẫu thuật, cạo lông vùng phẫu thuật.

Cô lập vùng phẫu thuật, sát trùng vùng phẫu thuật.

Rạch da, lật vạt.

Khoan lỗ 5/5 mm.

Bơm rửa nước muối sinh lý, kiểm soát chảy máu.

Vị trí ghép: Lắp đầy vật liệu ghép vào lỗ khoan, nhồi nén cho đầy đến miệng lỗ khoan. Đặt màng- khâu kín.

Vị trí đối chứng: Bơm rửa sạch bằng nước muối sinh lý, kiểm soát chảy máu. Đặt màng - khâu kín.

Đánh dấu vị trí phẫu thuật bằng 2 vít kim loại cắm vào vùng xương lành 2 bên miệng lỗ khoan, cách thành lỗ khoan 1 mm. Sau khi lành vết thương, bộc lộ vị trí nghiên cứu dựa vào

dấu sẹo lưu trên da, sẽ nối 2 điểm này lại để xác định tâm lỗ khoan, làm cơ sở cho việc lấy mẫu mô đúng vị trí nghiên cứu.

Sau phẫu thuật thỏ được theo dõi vết thương như các dấu hiệu nhiễm trùng (vết thương sưng, mép vật vết thương chảy dịch có mùi hôi) và chích kháng sinh trong 14 ngày.

Chăm sóc, theo dõi lành thương trong 4, 6 tháng.

2.2. Quy trình đánh giá sự phát triển của xương và tế bào

Phân tích xương hình thành bằng phương pháp vi mô chụp cắt lớp (Micro computed tomography – Micro-CT)

Mẫu được quét bằng cách sử dụng hệ thống chụp cắt lớp (Skyscan 1072, SKYSCAN, Kontich, Bỉ. Sau khi quét, các dữ liệu hình ảnh 2D được xây dựng lại 3D. Từ những hình ảnh lát sử dụng phần mềm (TomoNT, SKYSCAN, Kontich, Bỉ) tính toán các thông số cấu trúc: thể tích xương/thể tích mô, diện tích xương/thể tích xương.

Cố định mẫu

Mẫu xương thỏ được ngâm trong dung dịch 4% formalin (48 giờ ở nhiệt độ phòng), sau đó ngâm mẫu xương trong dung dịch ethanol 70%.

Khử khoáng xương

Ngâm mẫu trong 11% acid formic qua đêm.

Rửa mẫu dưới nước trong 30- 60 phút.

Cố định mẫu trong parafin

70% ethanol trong 1 giờ.

95% ethanol (95% ethanol/5% methanol) trong 1 giờ.

Ngâm mẫu trong ethanol trong 1 giờ.

Ngâm mẫu trong ethanol trong 1,5 giờ (2 lần).

Ngâm mẫu trong ethanol trong 2 giờ.

Ngâm mẫu trong xylene trong 1 giờ (2 lần).

Ngâm mẫu trong nến ở 58 °C trong 1 giờ (2 lần).

Mục đích nhuộm thường quy H&E:

Nhuộm H&E: Khảo sát cấu trúc mô xương, hình thái, các thành phần khác trong mô xương. Hematoxylin có màu xanh-tím, Eosin có màu hồng.

2.3. Xử lý thống kê số liệu thí nghiệm

Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm thống kê SPSS ver 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) và excel. Phân tích phương sai 2 yếu tố (Anova) dùng để so sánh hàm lượng Ca, P sản sinh trong quá trình khoáng hóa trong dung dịch SBF và đánh giá xương mới được hình thành ở mỗi nhóm trong phân tích kết quả phương pháp vi mô chụp cắt lớp. Mức ý nghĩa thống kê được sử dụng là 5%. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thử nghiệm cấy ghép vật liệu hydrogel composite sinh học trên cơ sở biphasic calcium phosphate (BCP)-oxidized alginate, gelatin trên thỏ

Thỏ được gây mê, sau đó cố định trên bàn phẫu thuật. Tiến hành cạo lông và khử trùng vùng phẫu thuật. Tiến hành phẫu thuật khoan xương đùi thỏ, ghép vật liệu vào chỗ xương đã

khoan, đặt màng ghép phẫu thuật lên trên vị trí xoang xương để tránh phần mềm xâm lấn mô xương. Khâu phần mềm và phần da để che kín vết thương.



Hình 1. Ảnh phẫu thuật xương đui thỏ

3.2. Đánh giá sự phát triển của xương bằng phương pháp vi mô chụp cắt lớp (Micro-CT)

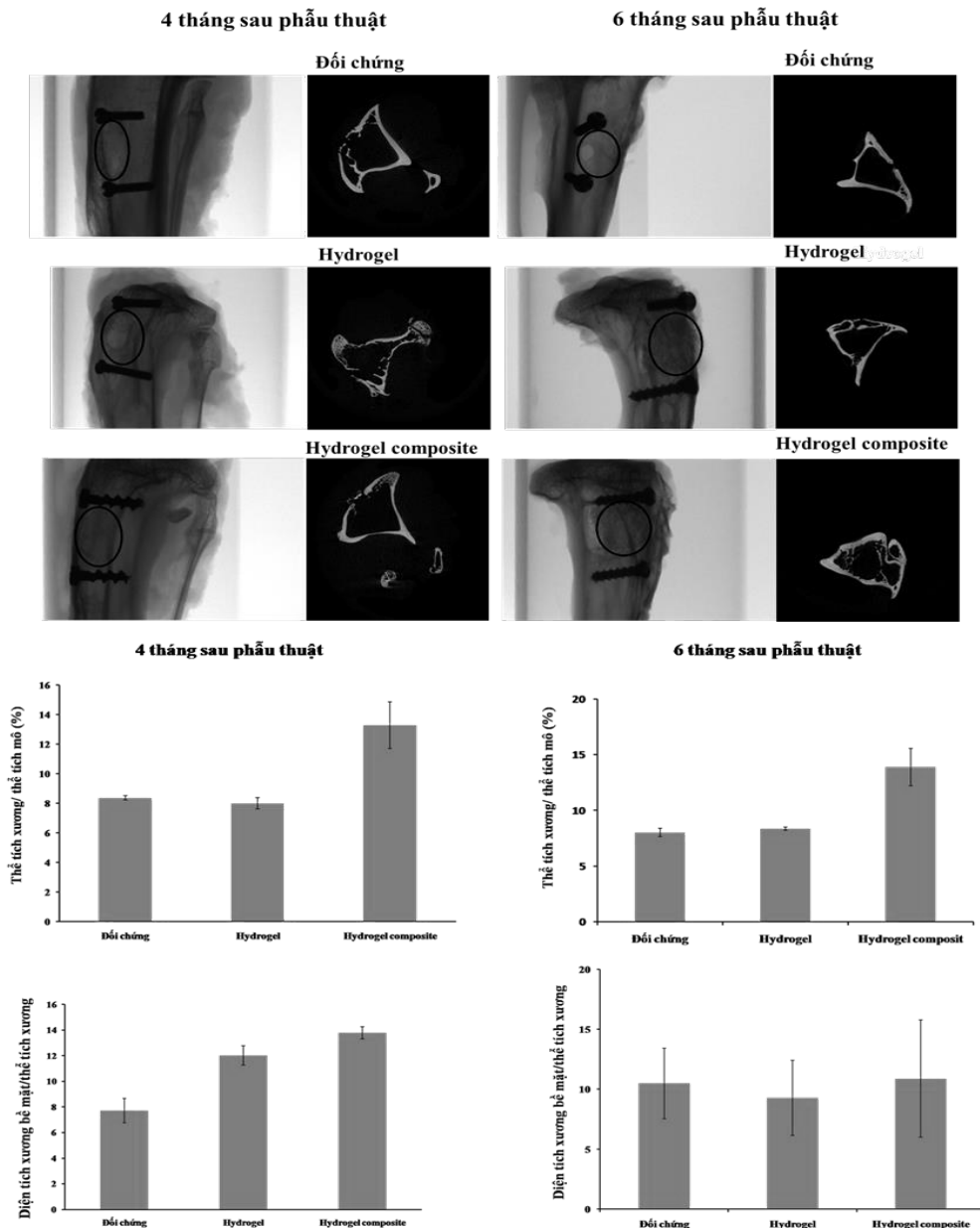
Sau khi phẫu thuật 4 tháng, quan sát hình ảnh phương pháp vi mô chụp cắt lớp của các mẫu xương cho thấy xương mới được hình thành trong vùng phẫu thuật, mẫu hydrogel composite xương mới hình thành lấp kín lỗ khoan xương, mẫu hydrogel và mẫu đối chứng xương mới có hình thành nhưng chưa lấp kín lỗ khoan xương.

Tỷ lệ thể tích xương/thể tích mô xương 4 tháng của mẫu hydrogel composite ($13,28 \pm 1,58$), hydrogel ($8,00 \pm 0,37$) và mẫu đối chứng ($8,37 \pm 0,14$) cho thấy có sự khác biệt giữa các loại mẫu phân tích ($p < 0,05$). Nhưng kết quả thống kê số liệu tỷ lệ thể tích xương/thể tích mô xương 4 tháng giữa các mẫu hydrogel và các mẫu đối chứng không có sự khác biệt ($p > 0,05$). Do đó có thể kết luận mẫu hydrogel và đối chứng ảnh hưởng không khác nhau đến tỷ lệ thể tích xương/thể tích mô. Kết quả số liệu thống kê của mẫu hydrogel composite và mẫu hydrogel cho thấy sự khác biệt trong thống kê ($p < 0,05$). Do đó có thể kết luận BCP làm tăng tỷ lệ thể tích xương/thể tích mô.

Tỷ lệ thể tích xương/thể tích mô xương 6 tháng của mẫu hydrogel composite ($13,89 \pm 1,67$), hydrogel ($8,37 \pm 0,14$) và mẫu đối chứng ($8,00 \pm 0,37$) cho thấy có sự khác biệt giữa các loại mẫu phân tích ($p < 0,05$). Tuy nhiên, kết quả thống kê số liệu tỷ lệ thể tích xương/thể tích mô xương 6 tháng giữa các mẫu hydrogel và các mẫu đối chứng cho thấy không có sự khác biệt ($p > 0,05$). Do đó, có thể kết luận mẫu hydrogel và đối chứng ảnh hưởng không khác nhau đến tỷ lệ thể tích xương/thể tích mô. Kết quả số liệu thống kê của mẫu hydrogel composite và mẫu hydrogel cho thấy sự khác biệt trong thống kê ($p < 0,05$). Vì vậy, có thể kết luận BCP làm tăng tỷ lệ thể tích xương/thể tích mô.

Kết quả phân tích tỷ lệ thể tích xương/thể tích mô của mẫu xương 4, 6 tháng của hydrogel composite cao hơn hydrogel và mẫu đối chứng, nhưng so sánh kết quả của mẫu hydrogel và mẫu đối chứng không khác biệt trong thống kê ($p < 0,05$). Do đó, có thể kết luận mẫu hydrogel và mẫu đối chứng cho kết quả như nhau trong phân tích phương pháp vi mô chụp cắt lớp.

Kết quả phân tích diện tích bề mặt xương/thể tích xương của các mẫu xương 4 tháng cho thấy diện tích bề mặt xương/thể tích xương của hydrogel composite ($13,78 \pm 0,48$) cao hơn hydrogel ($12,02 \pm 0,76$) và mẫu đối chứng ($7,73 \pm 0,95$). Theo phân tích thống kê ($p < 0,05$), có sự khác biệt giữa các loại mẫu phân tích. So sánh mẫu hydrogel và mẫu đối chứng cũng có sự khác biệt ($p < 0,05$). So sánh mẫu hydrogel và hydrogel composite có sự khác biệt ($p < 0,05$).



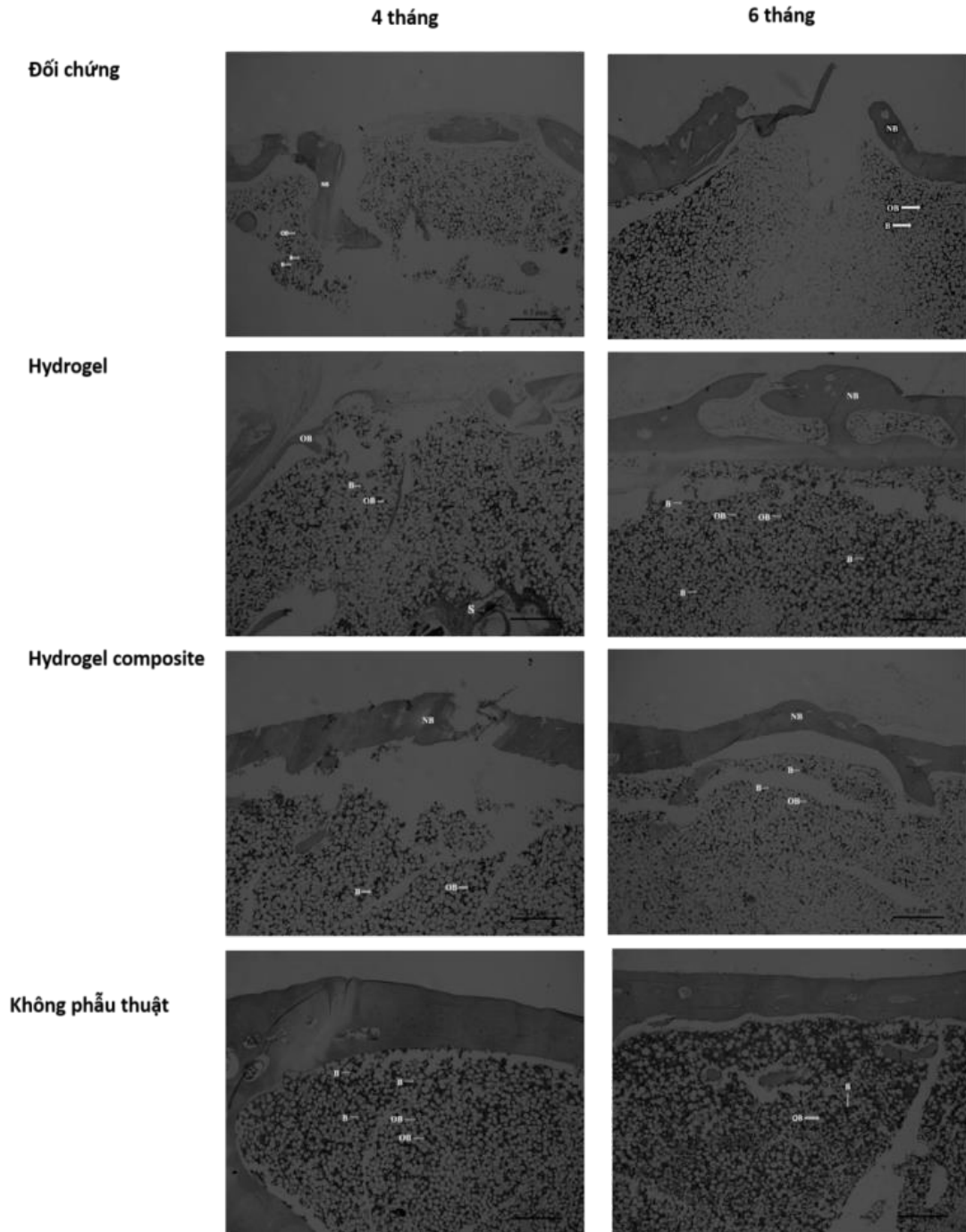
Hình 2. Kết quả phân tích phương pháp vi mô chụp cắt lớp của mẫu xương sau 4 và 6 tháng phẫu thuật; $p < 0,05$

Kết quả phân tích diện tích bề mặt xương/thể tích xương của các mẫu xương 6 tháng cho thấy diện tích bề mặt xương/thể tích xương của hydrogel composite ($10,87 \pm 4,89$), hydrogel ($9,27 \pm 3,13$) và mẫu đối chứng ($10,48 \pm 2,94$). Theo phân tích thống kê ($p > 0,05$) cho thấy không có sự khác biệt giữa các loại mẫu phân tích. Do đó, có thể kết luận sau 6 tháng không có sự khác biệt về diện tích xương bề mặt/thể tích xương giữa các mẫu.

Các kết quả phân tích phương pháp vi mô chụp cắt lớp trên có thể giải thích như sau: tế bào xương bám lên bề mặt vật liệu (hydrogel và hydrogel composite) để phát triển nên diện tích xương bề mặt/thể tích mô của mẫu hydrogel và hydrogel composite cao hơn đối chứng [6-8]. Hydrogel composite có khả năng khoáng hóa nên tỷ lệ thể tích xương/thể tích mô cao hơn so với hydrogel. Tuy nhiên, kết quả phân tích diện tích bề mặt xương/thể tích xương của

các mẫu xương 6 tháng cho thấy không có sự khác biệt giữa các loại mẫu phân tích do có sự tiêu xương trên bề mặt các mẫu [9, 10]. Mặc dù có hiện tượng tiêu xương nhưng tỷ lệ thể tích xương/thể tích mô của mẫu 6 tháng không thấp hơn mẫu 4 tháng cho thấy tiêu xương xảy ra đồng thời với hình thành xương mới.

3.3. Đánh giá sự phát triển của tế bào xương *in vivo* bằng kỹ thuật nhuộm thường quy H&E (Hematoxylin Eosin)



Hình 3. Ảnh nhuộm tiêu bản H&E của xương đùi thỏ: NB (xương hình thành), B (tế bào máu), OB (tế bào tạo thành xương), S (mẫu còn lại)

Kết quả khảo sát cấu trúc mô xương, hình thái, các thành phần khác trong mô xương của các mẫu hydrogel composite, hydrogel và mẫu đối chứng cho thấy sau khi cấy ghép vật liệu 4, 6 tháng mô xương mới hình thành (NB), các tế bào tạo thành xương (OB), tế mạch máu (B) phát triển tại vị trí phẫu thuật.

Mẫu hydrogel sau 4 tháng vẫn còn hydrogel chưa phân hủy hết.

Lớp xương cứng hình thành ở mẫu 6 tháng phát triển hơn mẫu 4 tháng. Cấu trúc mô xương của mẫu hydrogel composite 6 tháng giống như mẫu xương không phẫu thuật, lớp xương cứng hình thành che phủ toàn bộ vị trí phẫu thuật.

Mẫu hydrogel 6 tháng lớp xương cứng hình thành vẫn xen lẫn vùng tế bào xương cho thấy sự phát triển chưa hoàn thiện của lớp xương cứng. Mẫu đối chứng 6 tháng cũng tương tự mẫu hydrogel, lớp xương cứng hình thành như chưa che phủ hết vị trí phẫu thuật xương.

Kết quả nhuộm tiêu bản H&E của mẫu hydrogel composite cho thấy sau 6 tháng vùng phẫu thuật xương giống xương chưa phẫu thuật.

4. KẾT LUẬN

Sau khi phẫu thuật 4 và 6 tháng, kết quả phân tích phương pháp vi mô chụp cắt lớp của các mẫu xương cho thấy xương mới được hình thành trong vùng phẫu thuật, hydrogel composite xương mới hình thành với tỷ lệ thể tích xương/thể tích mô cao hơn hydrogel và mẫu đối chứng. So sánh kết quả phân tích phương pháp vi mô chụp cắt lớp của mẫu 4 tháng và 6 tháng cho thấy không có sự khác biệt về tỷ lệ thể tích xương/thể tích mô cũng như tỷ lệ diện tích bề mặt xương/thể tích xương, điều này cho thấy có sự tiêu xương và sự hình thành xương đồng thời xảy ra trong giai đoạn hồi phục xương. Kết quả phân tích mô học cho thấy mẫu hydrogel composite sau 6 tháng cấy ghép đã phát triển thành mô xương giống mô xương không phẫu thuật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kühne J. H., Bartl R., Frisch B., Hammer C., Jansson V. and Zimmer M. - Bone formation in coralline hydroxyapatite: effects of pore size studied in rabbits, *Acta Orthopaedica Scandinavica* **65** (1994) 2246–2252.
2. Grenga T. E., Zins J. E., Bauer T. W. - The rate of vascularization of coralline hydroxyapatite, *Plastic and Reconstructive Surgery* **84** (1989) 245–249.
3. Dillow A. K., Lowman A. M., Hudgins K. A. - Biomimetic materials and design: biointerfacial strategies, tissue engineering, and targeted drug delivery, Marcel-Dekker, Inc., New York (2002) 85-98.
4. Nguyen T. P., Lee B.T. - Fabrication of oxidized alginate-gelatin-BCP hydrogels and evaluation of the microstructure, material properties and biocompatibility for bone tissue regeneration, *Biomaterial Application* **27** (3) (2011) 311–321.
5. Nguyen Thi Phuong, Dai Hai Nguyen, Nguyen Cuu Khoa, Ngoc Quyen Tran and Ki Dong Park. - Enzyme-mediated fabrication of the oxidized chitosan hydrogel for tissue sealant, *Journal of Bioactive and Compatible Polymer* **4** (2015) 4106-4110.
6. Zhang L., Hanagata N., Maeda M., Minowa T., Ikoma T., Fan H., Zhang X. - Porous hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics promote ectopic osteoblast differentiation from mesenchymal stem cells, *Science and Technology of Advanced Materials* **10** (2) 2009.

7. Gamblin A. L., Brennan M. A., Renaud A., Yagita H., Lézot F., Heymann D., Trichet V., Layrolle P. - Bone tissue formation with human mesenchymal stem cells and biphasic calcium phosphate ceramics: The local implication of osteoclasts and macrophages, *Biomaterials* **35** (36) (2014).
8. Özkucur N., Monsees T. K., Perike S., Do H. Q., and Funk R. H. W. - Local calcium elevation and cell elongation initiate guided motility in electrically stimulated osteoblast-like cells, *PLoS One* **4** (7) (2009).
9. Maeno S., Niki Y., Msumoto H., Morioka H., Yatabe T., Funayama A., Toyama Y., Taguchi T. and Tanaka J. - The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture, *Biomaterials* **26** (23) (2005).
10. Golding A., Guay J. A., Rincon C. H., Levin M., Kaplan D. L. - A tunable silk hydrogel device for studying limb regeneration in adult *Xenopus laevis*, *PLoS One* **11** (6) (2016).

ABSTRACT

HYDROGEL COMPOSITE BASED BIPHASIC CALCIUM PHOSPHATE AND GELATIN, OXIDIZED ALGINATE FOR BONE REGENERATION

Nguyen Thi Phuong*

Ho Chi Minh City University of Food Industry

*Email: ntphuongvc0201@gmail.com

Hydrogel composites based on oxidized alginate-gelatin and biphasic calcium phosphate (BCP) were implanted into rabbit femur. Evaluation of bone development after implantation into rabbit bones based on the results of micro-CT and histological analysis. Micro-CT data showed that hydrogel composites have bone surface/volume ratio and bone surface density higher than hydrogel. Hematoxylin-Eosin (H&E) staining technique for examination of bone structure, evaluation of cell growth in bone grafts showed that after 4 months and 6 months new bone formation, bone cells and blood vessels develop.

Keywords: Biphasic calcium phosphate, micro-CT, H&E, oxidized alginate, gelatin.