

Đánh giá tốc độ phân hủy sinh học và tính tương thích sinh học của vật liệu kết xương magie phủ hydroxyapatite trên mô hình invitro

Investigation of in vitro biodegradation and biocompatibility of hydroxyapatite coated Mg for biodegradable implant applications

Lê Hanh*, Lê Văn Hải**, Nguyễn Thế Hoàng*,
Lê Minh Hải***, Lê Thị Trang****,
Lê Văn Quân**, Nguyễn Việt Nam*

*Bệnh viện Trung ương Quân đội 108,
**Bệnh viện Quân y 103,
***Trường Đại học Bách khoa Hà Nội,
****Học viện Công nghệ Tokyo, Nhật Bản

Tóm tắt

Mục tiêu: Đánh giá tốc độ tự tiêu và khả năng tương thích sinh học của vật liệu kết xương magie (Mg) phủ hydroxyapatite (HAp) nhằm ứng dụng trong chấn thương chỉnh hình. **Đối tượng và phương pháp:** Vật liệu kết xương Mg phủ HAp được sử dụng cho thí nghiệm nuôi cấy tế bào trong môi trường MEM- α . Tốc độ tự tiêu của vật liệu kết xương được đánh giá bằng lượng khí hydro giải phóng và hình thái bề mặt mẫu. Khả năng tương thích sinh học của vật liệu kết xương được đánh giá qua hình thái tế bào, khả năng tăng sinh của tế bào. **Kết quả:** Thí nghiệm nuôi cấy tế bào MC3T3-E1 trong môi trường MEM- α cho thấy mẫu được phủ HAp không những thể hiện lượng khí hydro thoát ra giảm mà còn có mật độ tế bào tăng sinh lớn hơn nhiều so với mẫu không được phủ HAp. **Kết luận:** Lớp phủ HAp vừa có khả năng làm giảm tốc độ tự tiêu vừa làm tăng tính tương thích sinh học của vật liệu kết xương phù hợp để ứng dụng vào chấn thương chỉnh hình.

Từ khóa: Vật liệu kết xương Mg, hydroxyapatite, phân hủy sinh học, tương thích sinh học.

Summary

Objective: To evaluate of the biodegradation rate and biocompatibility of HAp coated Mg for biodegradable implant applications. **Subject and method:** Biodegradable HAp coated Mg will be used for cell culture tests in MEM- α medium. The biodegradation rate was evaluated via the amount of hydrogen gas released and the morphology of the samples. The in vitro biocompatibility of the material was evaluated via proliferation of the cell and cell morphology. **Result:** The cell culture test using MC3T3-E1 cell line demonstrated that HAp improved both biocorrosion resistance and biocompatibility of the implant materials. **Conclusion:** The HAp coated Mg has moderate biodegradation rate and good biocompatibility and is suitable for implant applications.

Keywords: Biodegradable magnesium implants, hydroxyapatite, biodegradation, biocompatibility.

Ngày nhận bài: 25/10/2020, ngày chấp nhận đăng: 15/1/2021

Người phản hồi: Lê Hanh, Email: lehanh77@gmail.com - Bệnh viện TWQĐ 108

1. Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, sự gia tăng trong nhu cầu về việc sử dụng vật liệu cấy ghép trên toàn thế giới ngày càng tăng. Điển hình, vào năm 2002, có khoảng 605.000 ca phẫu thuật chấn thương chỉnh hình được tiến hành trên toàn nước Mỹ, và 408.000 ca được thực hiện trong khu vực Liên minh châu Âu [1]. Bên cạnh đó, năm 2009, một báo cáo chỉ ra rằng Trung Quốc có khoảng 69,4 triệu người trên 50 tuổi mắc bệnh loãng xương [2]. Để đáp ứng sự gia tăng nhanh chóng trong nhu cầu sử dụng, vật liệu kết xương cũng được quan tâm và chú trọng phát triển hơn với những bước tiến mới, trong đó có sự ra đời của vật liệu tự tiêu [3]. Đối với vật liệu chỉnh hình có khả năng chịu tải trọng, vật liệu kết xương magie (Mg) được coi là một vật liệu tiềm năng và nhận được nhiều sự quan tâm, nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới. Kim loại Mg có khối lượng riêng tương đối thấp $\rho = 1,74\text{g/cm}^3$ và độ bền cao nhưng lại có mô đun đàn hồi thấp $E = 41 - 45\text{GPa}$; tương đương với khối lượng riêng $\rho = 1,8 - 2,1\text{g/cm}^3$ và mô đun đàn hồi $E = 7 - 30\text{GPa}$ của xương người [4]. Sự tương đồng này loại bỏ sự hình thành của hiệu ứng teo xương sau một thời gian cấy ghép [5]. Hiện tượng teo xương lại là một trở ngại lớn đối với các vật liệu cấy ghép khác có mô đun đàn hồi lớn như thép không gỉ, hợp kim titan hay hợp kim coban-crom. Ngoài ra, nguyên tố Mg có khả năng kích thích sự hình thành xương vì Mg dưới dạng ion làm tăng sự gắn kết và tăng sinh tế bào, và xương mới cũng được quan sát thấy được hình thành khi tiếp xúc trực tiếp với Mg [6].

Mặc dù nghiên cứu đầu tiên ứng dụng Mg vào y khoa được công bố từ năm 1878 [6], nhưng vì Mg có tốc độ tự tiêu rất nhanh trong cơ thể người nên sau đó, các vật liệu như thép không gỉ hay vật liệu Ti nguyên chất chủ yếu được tập trung nghiên cứu. Vì vậy có thể nói, hạn chế lớn nhất của vật liệu kết xương Mg chính là khả năng chống ăn mòn sinh học. Dung

dịch cơ thể bao gồm nước, protein và các ion điện phân như clorua và hydroxit. Trong môi trường này, Mg dễ dàng bị ăn mòn và tạo ra các ion tự do di chuyển từ bề mặt kim loại vào môi trường xung quanh [7]. Quá trình ăn mòn xảy ra đồng thời cũng dẫn đến quá trình hình thành và tích tụ bọt khí trong giai đoạn đầu ngay sau khi phẫu thuật cấy ghép được thực hiện. Sự tồn tại của các túi khí gây xưng ở vị trí phẫu thuật [8], ngăn chặn sự liên kết giữa các mô cứng với vật liệu cấy ghép, và làm chậm quá trình chữa lành của xương [9]. Các túi khí này có thể tự tiêu hay bằng việc áp dụng liệu pháp châm kim, nhưng Kim và các cộng sự chỉ ra rằng sự tích tụ bọt khí dẫn đến các biến chứng như gây hoại tử cho da hay gây tổn thương dài hạn cho xương [10]. Ngoài ra, tốc độ tự tiêu của kim loại Mg nguyên chất lớn hơn tốc độ chữa lành của xương nên việc sử dụng vật liệu Mg sẽ không duy trì được sự bảo toàn cơ tính giữa vật liệu cấy ghép và xương [11]. Do đó, việc làm giảm tốc độ tự tiêu của vật liệu nền Mg là điều cần thiết nhằm mục đích đưa vật liệu này vào ứng dụng thực tiễn.

Hydroxyapatite (HAp) được biết đến là lớp phủ có tính tương thích sinh học cao. HAp có cấu trúc hóa học $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, là thành phần chính của xương và răng người và động vật. HAp cũng có khả năng thúc đẩy quá trình hình thành và phát triển của xương mới. Ngoài ra, HAp có tốc độ tự tiêu chậm hơn tốc độ chữa lành của xương. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm mục tiêu: *Tập trung đánh giá tốc độ tự tiêu và khả năng tương thích sinh học của vật liệu kết xương Mg phủ HAp nhằm ứng dụng trong chấn thương chỉnh hình.*

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Hợp kim Mg được phủ HAp.

2.2. Phương pháp

Hợp kim Mg sau khi phủ HAP sẽ tiến hành khảo sát so sánh đánh giá tính ăn mòn, khả năng tương thích sinh học với dòng tế bào MC3T3-E1.

Bước 1: Tạo lớp phủ HAP

Dung dịch phủ là dung dịch hỗn hợp của 50mmol. L⁻¹ muối Ca-EDTA (C₈H₁₂CaN₂Na₂O₈) và 50mmol. L⁻¹ muối kali dihydrophosphat (KH₂PO₄) với cùng thể tích. NaOH được dùng để điều chỉnh độ pH của dung dịch đạt pH = 7,6. Dung dịch phủ sau đó nâng nhiệt đạt 90°C. Thời gian phủ kéo dài trong hai giờ đồng hồ. Khi quá trình phủ hoàn tất, mẫu được lấy ra và rửa sạch bằng nước tinh khiết để loại bỏ các hợp chất còn dư bám trên mẫu, sau đó sấy khô hoàn toàn và bảo quản cẩn thận để chuẩn bị cho quá trình nuôi cấy tế bào.

Bước 2: Đánh giá hòa tan, tính tương thích sinh học

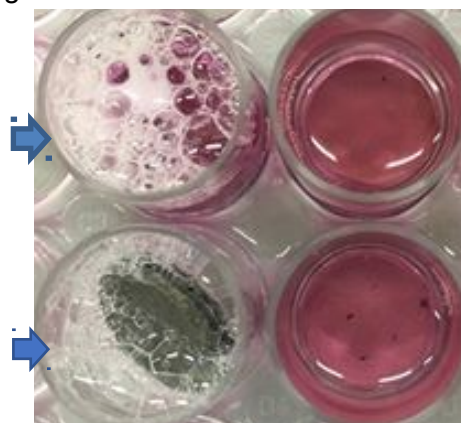
Thí nghiệm này được thực hiện trên mô hình invitro nhằm mục đích khảo sát và so sánh tính chống ăn mòn và tính tương thích sinh học của vật liệu trước và sau phủ HAP. Sự ăn mòn vật liệu thể hiện bằng sự giải phóng khí hidro trong môi trường MEM-α trong 24 giờ do phản ứng hóa học của hợp kim Mg.

Dòng tế bào được sử dụng là dòng tế bào tiền thân của nguyên bào xương, MC3T3-E1. Dòng tế bào này được lấy trực tiếp từ xương sọ và có khả năng tổng hợp và hình thành xương mới ở chuột. Mật độ tế bào ban đầu là 2500 tế bào/cm². Môi trường nuôi cấy tế bào là môi trường giả định MEM-α. Cả mẫu phủ HAP và mẫu không phủ HAP được ngâm trong môi trường giả định chứa tế bào trong 24 giờ tại 37°C. Sau khi được tách ra khỏi môi trường giả định, các mẫu được nhuộm theo phương pháp nhuộm Giemsa tạo màu để tiện cho việc thống kê số tế bào còn bám trên bề mặt vật liệu. Các mẫu sau thí nghiệm nuôi cấy được quan sát qua kính hiển vi quang học (OM). Để khảo sát về sự tương tác của các tế bào MC3T3-E1 với vật liệu Mg nguyên chất phủ HAP, mật độ tế bào sau 24

giờ nuôi cấy trong môi trường giả định MEM-α được thống kê dựa trên phương pháp đếm tế bào.

3. Kết quả và bàn luận

Sự giải phóng khí hidro khi ngâm mẫu Mg nguyên chất được phủ và không được phủ HAP vào môi trường giả định MEM-α được thể hiện qua ảnh chụp trong Hình 1. Hình ảnh cho thấy, tại hai giếng chứa vật liệu không phủ, hiện tượng giải phóng khí xảy ra ngay sau khi ngâm mẫu vào trong dung dịch MEM-α và lượng khí thoát ra nhiều. Ngược lại, với các giếng chứa mẫu Mg phủ HAP, hiện tượng sủi bọt khí hầu như không xảy ra. Kim loại Mg là kim loại có khả năng hoạt động hóa học mạnh, đặc biệt trong các môi trường chứa ion clorua, Cl⁻, ví dụ như môi trường MEM-α. Do đó, khi kim loại nguyên chất Mg không phủ tiếp xúc trực tiếp với môi trường giả định, Mg sẽ bị ăn mòn sinh học nhanh chóng. Khí hidro được tạo thành trong quá trình phân hủy sinh học của Mg dẫn đến hiện tượng sủi bọt khí. Kết quả trên chứng tỏ rằng vật liệu phủ HAP được bảo vệ khỏi sự ăn mòn sinh học trong môi trường MEM-α.

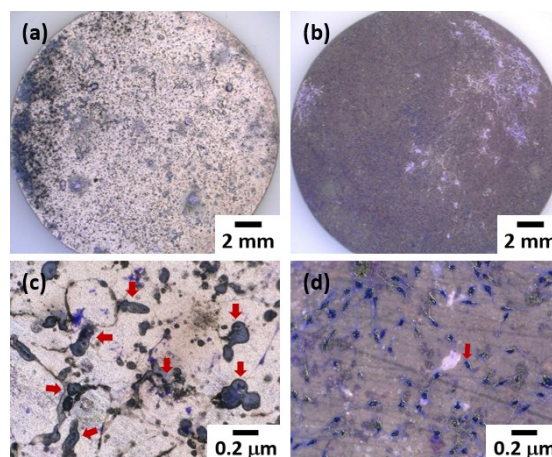


Hình 1. Ảnh chụp thể hiện lượng khí hidro thoát ra trong thí nghiệm nuôi cấy tế bào.

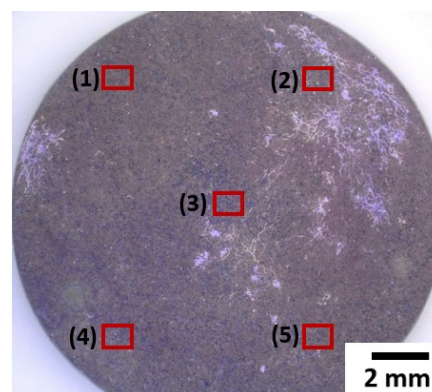
Hình 2 thể hiện sự so sánh bề mặt của các mẫu không phủ HAP và mẫu phủ HAP sau thí nghiệm nuôi cấy tế bào. Sau 24 giờ nuôi cấy trong môi trường giả định MEM-α, mẫu Mg không được phủ bị ăn mòn cục bộ nghiêm trọng

trên toàn bộ bề mặt mẫu, Hình 2 (a) và (c). Các vết màu đen chính là vị trí hiện tượng ăn mòn cục bộ hay ăn mòn lỗ xảy ra dưới sự có mặt của ion Cl^- . Trong khi đó, trong Hình 2 (b) và (d) của mẫu Mg phủ HAp, mặc dù hiện tượng ăn mòn vẫn xảy ra nhưng mức độ mẫu bị ăn mòn giảm đáng kể so với mẫu không phủ HAp. Ở đây, vị trí vật liệu bị ăn mòn là các vị trí có màu tím nhạt. Kết quả này cho thấy lớp phủ HAp đã làm giảm đáng kể tốc độ phân hủy sinh học của kim loại Mg nguyên chất trong môi trường giả định.

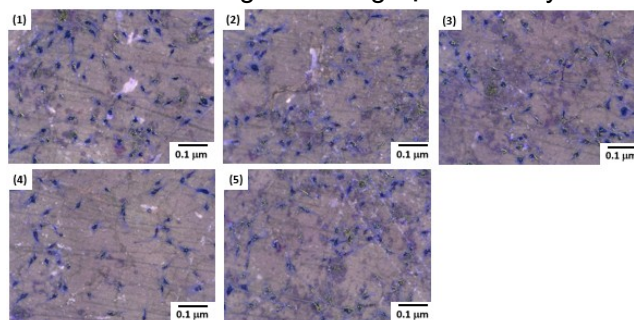
Thêm vào đó, trong hình ảnh của mẫu không phủ, Hình 2 (c), không thấy sự xuất hiện của các tế bào MC3T3-E1 trong khi một lượng lớn tế bào màu tím đậm xuất hiện trên bề mặt mẫu được phủ HAp, Hình 2 (d). Phát hiện này chỉ ra rằng, vật liệu phủ HAp thể hiện tính tương thích sinh học tốt hơn nhiều so với vật liệu không được phủ HAp. Sự tồn tại của tế bào trên bề mặt mẫu có thể được giải thích như sau. Để tồn tại và thực hiện các chức năng sinh học, tế bào cần bám dính lên vật chủ. Tuy nhiên, ở mẫu Mg không phủ, do kim loại bị ăn mòn nghiêm trọng dẫn đến sự hình thành bọt khí liên tục và các sản phẩm ăn mòn được tạo ra bám dính trên bề mặt mẫu, các vết màu đen trong Hình 2 (a) và (c). Bọt khí và sản phẩm ăn mòn là các tác nhân chính cản trở tế bào bám dính vào bề mặt mẫu. Do đó, tế bào không thể tồn tại trên bề mặt mẫu vật liệu không phủ. Ngược lại, với mẫu vật liệu được phủ HAp, vữa vật liệu được bảo vệ khỏi môi trường ăn mòn nhờ vào lớp trong đặc của lớp phủ HAp. Hơn nữa, lớp ngoài xốp với các tinh thể HAp có cấu trúc dạng lá cũng tạo điều kiện cho tế bào bám dính và tồn tại. Nhờ đó mà tế bào quan sát được trên mẫu vật liệu phủ.



Hình 2. Ảnh hiển vi quang học của mẫu không phủ (a và c) và mẫu phủ HAp (b và d) sau 24 giờ nuôi cấy tế bào trong môi trường giả định MEM- α .



Hình 3. Năm vị trí được chọn để khảo sát mật độ tế bào còn sống sau thí nghiệm nuôi cấy.



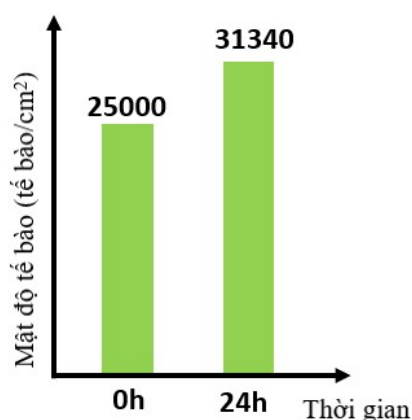
Hình 4. Ảnh hiển vi quang học của năm điểm được chọn trên bề mặt mẫu vật liệu kết xương Mg phủ HAp sau thí nghiệm nuôi cấy tế bào

Khảo sát về sự tương tác của các tế bào MC3T3-E1 với vật liệu Mg nguyên chất phủ HAp, mật độ tế bào sau 24 giờ nuôi cấy trong môi trường MEM- α được thống kê dựa trên đếm tế bào. Năm vùng trên bề mặt mẫu sẽ được khảo

sát. Trong đó, Hình 3 một vùng đặt vị trí trung tâm của mẫu, vị trí số (3); bốn vùng còn lại sẽ được chọn ngẫu nhiên nhưng đối xứng với nhau, vị trí (1), (2), (4), và (5). Hình 4 thể hiện ảnh hiển vi quang học tại năm vị trí được chọn. Tên của các hình ảnh hiển vi trong Hình 3 tương ứng với số thứ tự được gán cho năm vị trí đã chọn trong Hình 4. Số lượng tế bào tại năm vị trí đã chọn được thống kê trong Bảng 1, Biểu đồ 1 thể hiện sự so sánh mật độ tế bào trước và sau thí nghiệm nuôi cấy tế bào trong môi trường giả định. Biểu đồ này chỉ ra rằng sau 24 giờ, mật độ tế bào tăng lên khoảng 1,25 lần so với mật độ tế bào ban đầu. Kết quả này chỉ ra rằng tế bào có khả năng tăng sinh khi tiếp xúc với mẫu vật liệu phủ HAp. Từ đó có thể kết luận rằng lớp phủ HAp đã cải thiện đáng kể tính tương thích sinh học của vật liệu Mg nguyên chất.

Bảng 1. Số lượng tế bào thống kê được tại năm vị trí được chọn trong Hình 4

Vị trí	Số tế bào sống
(1)	78
(2)	81
(3)	74
(4)	54
(5)	73



Biểu đồ 1. Biểu đồ thể hiện sự gia tăng mật độ tế bào trước và sau 24 giờ nuôi cấy tế bào trong môi trường MEM- α

4. Kết luận

Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích đánh giá khả năng chống ăn mòn sinh học và tính tương thích sinh học của vật liệu cấy ghép được làm bằng kim loại Mg nguyên chất phủ HAp. Thí nghiệm nuôi cấy tế bào trong môi trường giả định MEM- α chỉ ra rằng lớp phủ HAp có khả năng cải thiện đáng kể khả năng chống ăn mòn sinh học và tính tương thích sinh học của vật liệu kết xương. Trong nghiên cứu này, phương pháp phủ hydroxyapatite lên bề mặt vật liệu kết xương Mg không những có tác dụng làm chậm tốc độ tự tiêu mà còn tăng tính tương thích sinh học của vật liệu. Vì vậy, vật liệu kết xương Mg phủ HAp có thể trở thành một vật liệu tự tiêu tiềm năng ứng dụng làm trong y khoa.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED), mã số đề tài: 103.02-2018.56.

Tài liệu tham khảo

1. Hing KA (2004) *Bone repair in the twenty-first century: Biology, chemistry or engineering?*. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences 362(1825): 2821-2850.
2. Wu S, Liu X, Yeung KWK, Liu C, and Yang X (2014) *Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering*. Mater. Sci. Eng. R Reports 80(1): 1-36.
3. Larry HL and Julia MP (2002) *Third-generation biomedical materials*. Science 80(295): 1014-1017.
4. Mordike BL and Ebert T (2001) *Magnesium Properties - applications - potential*. Materials Science and Engineering A 302(1):37-45.
5. Sumner DR (2015) *Long-term implant fixation and stress-shielding in total hip replacement*. J. Biomech 48(5): 797-800.

6. Witte F (2010) *The history of biodegradable magnesium implants: A review*. Acta Biomater 6(5): 1680-1692.
7. Atrens A, Liu M, and Zainal Abidin NI (2011) *Corrosion mechanism applicable to biodegradable magnesium implants*. Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol 176(20): 1609-1636.
8. Noviana D, Paramitha D, Ulu MF, and H Hermawan (2016) *The effect of hydrogen gas evolution of magnesium implant on the postimplantation mortality of rats*. J. Orthop. Transl 5: 9-15.
9. Li X, Liu X, Wu S, Yeung KWK, Zheng Y, and Chu PK (2016) *Design of magnesium alloys with controllable degradation for biomedical implants: From bulk to surface*. Acta Biomater 45: 2-30.
10. Kim YK et al (2018) *Gas formation and biological effects of biodegradable magnesium in a preclinical and clinical observation*. Sci. Technol. Adv. Mater 19(1): 324–335.